(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116887845 A
(43)申请公布日 2023.10.13

(21)申请号 202180088217.0
(22)申请日 2021.10.29
(30)优先权数据
63/107027 2020.10.29 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.06.28
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2021/040069 2021.10.29
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/092277 JA 2022.05.05
(71)申请人 国立研究开发法人理化学研究所
地址 日本埼玉县和光市
(72)发明人 石川文彦 齐藤赖子 伊藤亚里 L·D·舒尔茨
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 李志强 张华
(51)Int.Cl.
A61K 35/17(2006.01)

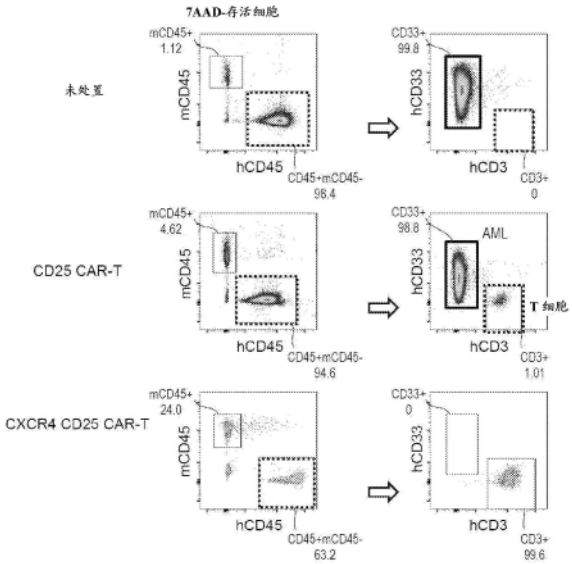
权利要求书2页 说明书18页 附图19页

(54)发明名称

表达CXCL12受体的嵌合抗原受体(CAR)-T细胞

(57)摘要

本发明提供细胞、含有该细胞且具抗肿瘤活性的药剂和药物组合物作为用于根治预后不良的血液肿瘤性疾病的治疗方法，所述细胞在细胞膜上共表达嵌合抗原受体(CAR)蛋白和CXCL12受体蛋白。



CN 116887845 A

1.细胞,该细胞在细胞膜上共表达嵌合抗原受体(CAR)蛋白和CXCL12受体蛋白。

2.根据权利要求1所述的细胞,其中,上述CXCL12受体为CXCR4。

3.根据权利要求1或2所述的细胞,其中,嵌合抗原受体(CAR)蛋白以选自CD25(IL-2受体α链)、CD19和CD7的细胞表面抗原为靶。

4.根据权利要求1～3中任一项所述的细胞,其为T细胞。

5.药剂,其显示抗肿瘤活性,含有权利要求1～4中任一项所述的细胞。

6.根据权利要求5所述的药剂,其与其他的抗肿瘤药和/或抗肿瘤治疗组合使用。

7.药物组合物,其含有权利要求5所述的药剂和药学上可接受的载体。

8.根据权利要求5或6所述的药剂或权利要求7所述的药物组合物,其用于肿瘤性疾病的治疗和/或其复发的预防,该肿瘤性疾病选自急性骨髓性白血病(AML)、成人T细胞白血病、B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)、混合表型急性白血病(MPAL)、慢性骨髓性白血病(CML)、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤。

9.根据权利要求1～4中任一项所述的细胞的制作方法,其包括:将编码嵌合抗原受体(CAR)蛋白的第1多核苷酸和编码CXCL12受体蛋白的第2多核苷酸引入到细胞内。

10.根据权利要求9所述的方法,其中,嵌合抗原受体(CAR)蛋白以选自CD25(IL-2受体α链)、CD19和CD7的细胞表面抗原为靶。

11.根据权利要求9或10所述的方法,其中,上述第1多核苷酸和上述第2多核苷酸通过相同或不同的载体引入到细胞内。

12.用于对象的肿瘤性疾病的治疗和/或其复发的预防的方法,其包括以下步骤:向对象给予细胞,该细胞在细胞膜上共表达以CD25(IL-2受体α链)为靶的嵌合抗原受体(CAR)蛋白和CXCL12受体蛋白。

13.根据权利要求12所述的方法,其中,嵌合抗原受体(CAR)蛋白以选自CD25(IL-2受体α链)、CD19和CD7的细胞表面抗原为靶。

14.根据权利要求12或13所述的方法,其中,肿瘤性疾病选自急性骨髓性白血病(AML)、成人T细胞白血病、B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)、混合表型急性白血病(MPAL)、慢性骨髓性白血病(CML)、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤。

15.根据权利要求12～14中任一项所述的方法,该方法是向对象单次给予上述细胞。

16.根据权利要求12～15中任一项所述的方法,其中,对象的每1kg体重给予10^4～10^9个范围的上述细胞。

17.根据权利要求12～16中任一项所述的方法,该方法进一步包括以下步骤:在给予细胞之前测定上述对象的肿瘤细胞中的靶细胞表面抗原的表达水平。

18.根据权利要求12～17中任一项所述的方法,该方法进一步包括以下步骤:在给予细胞之后评价治疗效果。

19.根据权利要求18所述的方法,其中,根据对象中的指标来评价治疗效果,该指标为选自下述(i)～(iv)的1种以上:(i)血液中的肿瘤细胞的减少、(ii)骨髓中的肿瘤细胞的减少、(iii)脾脏中的肿瘤细胞的减少、以及(iv)抑制肿瘤细胞对肝脏的浸润。

20.细胞,其用于在癌症的治疗和/或其复发的预防中使用,该细胞在细胞膜上共表达嵌合抗原受体(CAR)蛋白和CXCL12受体蛋白。

21.根据权利要求20所述的细胞，其中，嵌合抗原受体(CAR)蛋白以选自CD25(IL-2受体α链)、CD19和CD7的细胞表面抗原为靶。

22.根据权利要求20或21所述的细胞，其中，上述癌症为选自急性骨髓性白血病(AML)、成人T细胞白血病、B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)、混合表型急性白血病(MPAL)、慢性骨髓性白血病(CML)、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤的肿瘤性疾病。

23.根据权利要求20～22中任一项所述的细胞，该细胞为T细胞。

表达CXCL12受体的嵌合抗原受体(CAR)-T细胞

技术领域

[0001] 本发明涉及改进的嵌合抗原受体(CAR)-T细胞疗法。更具体而言,本发明涉及共表达嵌合抗原受体和CXCL12受体蛋白的修饰细胞、含有该细胞的具有抗肿瘤活性的药剂和药物组合物。本发明还涉及利用共表达嵌合抗原受体和CXCL12受体蛋白的修饰细胞进行的肿瘤性疾病的治疗方法。

背景技术

[0002] 嵌合抗原受体(CAR)-T细胞疗法是使用表达CAR的T细胞(CAR-T细胞)的过继免疫疗法,该CAR以在肿瘤细胞等细胞的表面表达的特定抗原为靶。CAR-T细胞设计成识别靶抗原、并由此攻击表达靶抗原的细胞。

[0003] 近年来,以CD19为靶的CAR-T细胞作为对复发性/难治性B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)和弥漫性大细胞型B细胞性淋巴瘤(DLBCL)有希望的治疗方法的选择而出现(非专利文献1～3),已知仅通过单次给药即可带来高的治疗效果。

[0004] 之后,为了评价CAR-T细胞疗法是否也可应用于其他的血液恶性肿瘤或实体肿瘤而做了很多努力。例如,在血液恶性肿瘤中,急性骨髓性白血病(AML)是临床上非常难治愈的疾病,为了延长AML患者的存活,开发了以CD33(非专利文献4)、CD123(非专利文献5)和肿瘤相关抗原Lewis-Y(TAA-LeY)(非专利文献6)等分子为靶的CAR-T细胞,正在进行临床评价。

[0005] 现有技术文献

[0006] 非专利文献

[0007] 非专利文献1:Grupp,S.A.,Kalos,M.,Barrett,D.,Aplenc,R.,Porter,D.L.,Rheingold,S.R.,Teachey,D.T.,Chew,A.,Hauck,B.,Wright,J.F.等人.(2013).Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia.N Engl J Med 368,1509-1518.10.1056/NEJMoa1215134;

[0008] 非专利文献2:Lee,D.W.,Kochenderfer,J.N.,Stetler-Stevenson,M.,Cui,Y.K.,Delbrook,C.,Feldman,S.A.,Fry,T.J.,Orentas,R.,Sabatino,M.,Shah,N.N.等人.(2015).T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults:a phase 1dose-escalation trial.Lancet 385,517-528.10.1016/S0140-6736(14)61403-3;

[0009] 非专利文献3:Park,J.H.,Riviere,I.,Gonen,M.,Wang,X.,Senechal,B.,Curran,K.J.,Sauter,C.,Wang,Y.,Santomasso,B.,Mead,E.等人.(2018).Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia.N Engl J Med 378,449-459.10.1056/NEJMoa1709919;

[0010] 非专利文献4:Kenderian,S.S.,Rosado,F.G.,Sykes,D.B.,Hoyer,J.D.和Lacy,M.Q.(2015).Long-term complete clinical and hematological responses of the TEMPI syndrome after autologous stem cell transplantation.Leukemia 29,2414-

2416.10.1038/leu.2015.298;

[0011] 非专利文献5:Mardiros,A.,Forman,S.J.和Budde,L.E.(2015).Tcells expressing CD123 chimeric antigen receptors for treatment of acute myeloid leukemia.Curr Opin Hematol 22,484-488.10.1097/MOH.0000000000000190;

[0012] 非专利文献6:Ritchie,D.S.,Neeson,P.J.,Khot,A.,Peinert,S.,Tai,T.,Tainton,K.,Chen,K.,Shin,M.,Wall,D.M.,Honemann,D.等人.(2013).Persistence and efficacy of second generation CAR T cell against the LeY antigen in acute myeloid leukemia.Mol Ther 21,2122-2129.10.1038/mt.2013.154。

发明内容

[0013] 发明所要解决的课题

[0014] 在针对AML的CAR-T细胞的开发中存在几个大的障碍。首先,在AML细胞和正常血液干细胞/前体细胞中基因表达类似,因此难以发现作为用于CAR-T细胞的合适靶的细胞表面分子。

[0015] 第二,CD19+B淋巴细胞的去除可通过向静脉内补充免疫球蛋白来管理,例如上述的CD33是在造血干细胞/前体细胞(HSPC)和嗜中性粒细胞中表达的分子,由于对嗜中性粒细胞等正常骨髓细胞可起到的有害作用,根据情况可引起致命的发热性中性粒细胞减少症和由真菌、细菌导致的机会感染。

[0016] 最后,虽然CD19在B-ALL患者的全部B-ALL细胞中表达,但AML中的细胞表面分子的表达在患者间和患者内都非常不均匀。

[0017] 用于解决课题的手段

[0018] 本发明人使用临床上侵袭性高的AML患者的白血病起始细胞(leukemia-initiating cells、LIC)、正常CD34+CD38-CD45RA-造血干细胞(HSC)和嗜中性粒细胞实施全局转录组分析,另外,还对来自患者的AML起始细胞的基因表达进行分析,该细胞在NOD/SCID/Il2rgKO(NSG)异种移植测定中被证实了在体内产生AML的能力。

[0019] 其结果,鉴定了CD25(IL-2受体α链、IL2RA)为AML中的有可能治疗的细胞表面分子(Saito等人,STM 2010)。CD25/IL2RA被报道为AML的预后不良标志物(Gonen等人,blood 2012),此外还在慢性骨髓性白血病(CML)、成人T细胞白血病/淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤等其他血液恶性肿瘤中表达。然而,在调节性T细胞和活化T细胞的亚群中也看到了CD25表达,因此评价CD25/IL2RA是否适合作为CAR-T细胞疗法中的靶分子并不容易。

[0020] 本发明人为了开发针对预后不良AML的CAR-T细胞疗法,制作了包含TCR-信号序列和人CD25/IL2RA抗原的Fab抗原识别位点的慢病毒载体。向来自脐带血的人T细胞中引入CD25-CAR慢病毒颗粒,在体外实现了2×10^7个以上的CD25 CAR-T细胞增加。

[0021] 评价了CD25 CAR-T细胞在体外对预后不良AML的原代培养细胞的靶向效率,结果仅在使用表达CD25的AML细胞作为靶的情况下观察到了细胞毒性,在CD25缺损白血病中没有观察到细胞毒性。

[0022] 由于确认到了CD25 CAR-T细胞的抗原依赖性细胞毒性,接下来使用来自NOD/SCID/IL2rgKO(NSG)患者的异种移植(PDX)动物,构建关于AML的体内治疗实验。对移植了AML患者(U390#2)的AML细胞(CD33阳性血细胞)的3只小鼠单次注入5×10^6个靶向CD25的

CAR-T细胞时，在3只中的1只PDX小鼠的外周血(PB)中来自患者的白血病细胞减少。注入4周后牺牲3只小鼠进行观察时，发现治疗效果不足以从受体小鼠的骨髓中排除侵袭性AML细胞。通过HE染色证实了：骨髓细胞中的大部分是来自患者的AML细胞。

[0023] 为了克服人AML细胞的根除不是最佳的这个课题，本发明人以更有效地将CAR-T细胞导向至骨髓为目的，通过进一步修饰人T细胞以具有作为归巢受体而已知的CXCR4的表达，探讨了将CD25 CAR-T细胞诱导至骨髓。

[0024] 其结果，在利用流式细胞术分析由给予了CAR-T细胞的小鼠回收的外周血的细胞时显示：与未表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞相比，表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞在体内(生物体内)更有效地增殖。表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞可与其高频率和数量一致地根除外周血、脾脏、骨髓和肝脏中的人AML细胞。在长期观察实验中，表达人CXCR4的CD25 CAR-T细胞停留在处置了4个月以上的小鼠的骨髓中，防止受体小鼠中的AML的复发。在以具有正常人的先天性和后天性免疫的方式移植的NSG小鼠中，没有观察到表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞对正常人免疫细胞的严重有害作用、例如CAR-T细胞的预料之外的增殖、移植物抗宿主病、或严重的炎性应答。

[0025] 根据上述见解进一步进行探讨时，本发明人确认到：在针对其他靶分子的CAR-T细胞的情况下，也可通过CXCR4的共表达而带来CAR-T细胞治疗效果的提高，从而完成了本发明。

[0026] 即，本发明的方案如下。

[0027] 1.细胞，该细胞在细胞膜上共表达嵌合抗原受体(CAR)蛋白和CXCL12受体蛋白。

[0028] 2.根据上述1所述的细胞，其中，上述CXCL12受体为CXCR4。

[0029] 3.根据上述1或2所述的细胞，其中，嵌合抗原受体(CAR)蛋白以选自CD25(IL-2受体α链)、CD19和CD7的细胞表面抗原为靶。

[0030] 4.根据上述1～3中任一项所述的细胞，其为T细胞。

[0031] 5.药剂，其显示抗肿瘤活性，含有上述1～4中任一项所述的细胞。

[0032] 6.根据上述5所述的药剂，其与其他的抗肿瘤药和/或抗肿瘤治疗组合使用。

[0033] 7.药物组合物，其含有上述5所述的药剂和药学上可接受的载体。

[0034] 8.根据上述5或6所述的药剂或上述7所述的药物组合物，其用于肿瘤性疾病的治疗和/或其复发的预防，该肿瘤性疾病选自急性骨髓性白血病(AML)、成人T细胞白血病、B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)、混合表型急性白血病(MPAL)、慢性骨髓性白血病(CML)、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤。

[0035] 9.根据上述1～4中任一项所述的细胞的制作方法，其包括：将编码嵌合抗原受体(CAR)蛋白的第1多核苷酸和编码CXCL12受体蛋白的第2多核苷酸引入到细胞内。

[0036] 10.根据上述9所述的方法，其中，嵌合抗原受体(CAR)蛋白以选自CD25(IL-2受体α链)、CD19和CD7的细胞表面抗原为靶。

[0037] 11.根据上述9或10所述的方法，其中，上述第1多核苷酸和上述第2多核苷酸通过相同或不同的载体引入到细胞内。

[0038] 12.用于对象的肿瘤性疾病的治疗和/或其复发的预防的方法，其包括以下步骤：向对象给予细胞，该细胞在细胞膜上共表达以CD25(IL-2受体α链)为靶的嵌合抗原受体(CAR)蛋白和CXCL12受体蛋白。

[0039] 13.根据上述12所述的方法,其中,嵌合抗原受体(CAR)蛋白以选自CD25(IL-2受体α链)、CD19和CD7的细胞表面抗原为靶。

[0040] 14.根据上述12或13所述的方法,其中,肿瘤性疾病选自急性骨髓性白血病(AML)、成人T细胞白血病、B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)、混合表型急性白血病(MPAL)、慢性骨髓性白血病(CML)、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤。

[0041] 15.根据上述12～14中任一项所述的方法,该方法是向对象单次给予上述细胞。

[0042] 16.根据上述12～15中任一项所述的方法,其中,对象的每1kg体重给予10^4～10^9个范围的上述细胞。

[0043] 17.根据上述12～16中任一项所述的方法,该方法进一步包括以下步骤:在给予细胞之前测定上述对象的肿瘤细胞中的靶细胞表面抗原的表达水平。

[0044] 18.根据上述12～17中任一项所述的方法,该方法进一步包括以下步骤:在给予细胞之后评价治疗效果。

[0045] 19.根据上述18所述的方法,其中,根据对象中的选自下述(i)～(iv)的1种以上的指标来评价治疗效果:(i)血液中的肿瘤细胞的减少、(ii)骨髓中的肿瘤细胞的减少、(iii)脾脏中的肿瘤细胞的减少、以及(iv)抑制肿瘤细胞对肝脏的浸润。

[0046] 20.细胞,其用于在癌症的治疗和/或其复发的预防中使用,该细胞在细胞膜上共表达嵌合抗原受体(CAR)蛋白和CXCL12受体蛋白。

[0047] 21.根据上述20所述的细胞,其中,嵌合抗原受体(CAR)蛋白以选自CD25(IL-2受体α链)、CD19和CD7的细胞表面抗原为靶。

[0048] 22.根据上述20或21所述的细胞,其中,上述癌症为选自急性骨髓性白血病(AML)、成人T细胞白血病、B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)、混合表型急性白血病(MPAL)、慢性骨髓性白血病(CML)、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤的肿瘤性疾病。

[0049] 23.根据上述20～22中任一项所述的细胞,该细胞为T细胞。

[0050] 本说明书包含作为本申请的优先权基础的于2020年10月29日申请的美国临时专利申请号第63/107027号的公开内容。

[0051] 发明效果

[0052] 通过本发明,可提供对预后不良且难以完全治愈的肿瘤性疾病非常有效的治疗和/或预防复发的方法。表达CXCR4的CAR-T细胞是针对预后不良的肿瘤性疾病的有希望的治疗战略。

附图说明

[0053] [图1]A:显示PDX(Patient-Derived Xenograft:患者来源的异种移植)小鼠的骨髓的AML细胞中的CD25表达细胞的比例,该PDX小鼠是将来自CD25表达不同的3名患者的AML细胞移植到免疫缺陷小鼠中而得。从左起为CD25阴性、中度表达、高度表达。参考图分别显示2012年报道的CD25阴性和CD25阳性AML患者的存活曲线。报道了CD25表达与AML的预后不良相关(Gonen等人,Blood 2012)。B:显示通过流式细胞术测定的84名AML患者中的CD25的阳性率。高度表达和中度表达总计约30%的AML患者为CD25阳性。C:显示在人源化小鼠的骨

髓细胞中评价CD25的表达的结果，该人源化小鼠是向免疫缺陷小鼠中移植来自脐带血的人造血干细胞而得。CD25是调节性T细胞的标志物，在一部分活化T细胞中发现了CD25的表达。相对于此，CD25在正常单核细胞(CD14+)、粒细胞(CD15+)以及$CD34^{+}CD38^{-}$干细胞中没有表达。

[0054] [图2]A:显示以CD25为靶的CAR-T构建体的一例。其是第2代CAR，以抗CD25单克隆抗体的scFV为靶结合结构域，具有来自CD8a的前导序列、铰链、跨膜结构域、来自4-1BB和CD3ζ的胞内结构域。B:显示CD25 CAR-T细胞对CD25阳性AML细胞(U390、U346)和CD25阴性ALL细胞(U328)的体外细胞毒活性。CAR-T细胞以表达CD25的AML细胞(U390和U346)为靶，而不以CD25阴性白血病细胞(U328)为靶，显示出CD25依赖性的细胞毒活性。

[0055] [图3]对移植了人AML细胞的PDX小鼠(#1、#2、#3)给予5×10^{6}个CD25 CAR-T，每周采集外周血，采集4周，以CD33和CD3的表达为指标，显示使用流式细胞仪对人CD45阳性细胞进行分析的结果。在所有小鼠中均发现T细胞(CD3+)增加、AML细胞(CD33+)减少，4周后发现在外周血中仍有AML细胞残留。另外，在小鼠#2中发现了良好的治疗应答，判明了在以CD25为靶的CAR-T细胞治疗中效果产生偏差。

[0056] [图4]对移植了AML细胞的PDX小鼠给予5×10^{6}个CD25 CAR-T细胞，4周后解剖，显示进行骨髓切片的HE染色的结果。在免疫缺陷小鼠(正常NSG)的骨髓中观察到粒细胞或骨髓细胞等各种细胞，在AML PDX小鼠的骨髓中确认到骨髓内充满了白血病性母细胞，发现CD25CAR-T细胞所产生的治疗效果不充分。左侧:低倍放大、右侧:高倍放大。

[0057] [图5-1]对移植了人AML细胞(U390)的PDX小鼠给予表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞后，经过2周后将外周血中的CD45阳性细胞的流式细胞术的结果与未给予CAR-T细胞(未处置)和给予了CD25 CAR-T细胞的情况进行比较而显示。注入的表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞在体内增殖。

[0058] [图5-2]对移植了人AML细胞(U390)的PDX小鼠给予表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞后，经过4周后将外周血中的CD45阳性细胞的流式细胞术的结果与未给予CAR-T细胞(未处置)和给予CD25 CAR-T细胞的情况进行比较而显示。在给予CD25 CAR-T细胞的情况下，人细胞中几乎全部是残留的白血病细胞，相对于此，在给予表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞的情况下，CD33阳性白血病(AML)细胞完全消失。

[0059] [图5-3]显示对移植了人AML细胞(U390)的PDX小鼠给予表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞后，经过4个月后的外周血中的CD45阳性细胞的流式细胞术的结果。在外周血中没有检测到AML细胞，给予后4周使靶AML细胞消失的效果维持了4个月以上。靶细胞消失后，CXCR4 CD25CAR-T细胞的频率和绝对数量逐渐减少，在外周血中小鼠CD45阳性细胞占多数。

[0060] [图6]显示移植了人AML细胞的PDX小鼠的外周血细胞中的AML细胞、小鼠白细胞和CAR-T细胞的频率(比例)。在未给予CAR-T细胞的情况下(2只)，从刚刚移植AML细胞后到4周后外周血中的细胞几乎都是人AML细胞，在注入了CD25 CAR-T细胞的情况下(2只)，在一只小鼠中发现AML细胞减少，对应地发现CAR-T细胞增加，在另一只小鼠中没有观察到AML细胞的减少。相对于此，在给予了表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞的小鼠(3只)中AML细胞显著减少，在给予CAR-T细胞后3周可使来自AML细胞的细胞从血循环中完全消失。在AML细胞残留期间CAR-T细胞的比例增加，之后逐渐减少。另一方面，正常的小鼠白细胞增加，在给予CAR-T细胞后14周，外周血中的90％以上为小鼠白细胞。

[0061] [图7]是对移植了人AML细胞的PDX小鼠给予表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞的情况下和未给予的情况下(未处置)小鼠脾脏和骨髓的照片。在未处置的小鼠中观察到脾肿大和骨髓白色化,而在给予了表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞的小鼠中观察到脾脏尺寸减少、显示红细胞的存在的骨髓红色化,确认了对AML的显著的治疗效果。

[0062] [图8]显示给予表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞后4周的小鼠(U390移植PDX小鼠)骨髓组织的HE染色的结果。在用CAR-T细胞根除AML细胞后,确认到小鼠的正常的白细胞、红细胞、产生血小板的巨核细胞全部恢复。左为弱放大、右为强放大。

[0063] [图9-1]显示对移植了人AML细胞(U390)的PDX小鼠给予CD25CAR-T细胞或表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞的情况下和未给予的情况下(未处置)的骨髓细胞的流式细胞术分析结果。显示未处置和给予CD25 CAR-T细胞的样品从给予起4周后的结果、给予表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞的样品从给予起4个月后的结果。

[0064] [图9-2]显示对移植了人AML细胞(U390)的PDX小鼠给予CD25CAR-T细胞或表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞的情况下和未给予的情况下(未处置)的骨髓细胞的流式细胞术分析结果。显示未处置和给予CD25 CAR-T细胞的样品从给予起4周后的结果、给予表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞的样品从给予起4个月后的结果。仅在给予表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞的情况下看到AML细胞的完全消失和小鼠的正常白细胞(mCD45)的恢复。AML细胞的完全消失、以及CAR-T细胞的存在从CAR-T细胞注入起维持了140天以上。

[0065] [图9-3]显示对移植了人AML细胞(U390)的PDX小鼠给予CD25CAR-T细胞或表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞的情况下和未给予的情况下(未处置)的骨髓细胞的流式细胞术分析结果。显示未处置和给予CD25 CAR-T细胞的样品从给予起4周后的结果、给予表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞的样品从给予起4个月后的结果。仅在给予表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞的情况下看到了小鼠红细胞(Ter119)的恢复。

[0066] [图10]显示使单次给予表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞的AML移植小鼠(右侧)和未给予的小鼠(左侧)从给予起150天后牺牲,对骨髓组织进行HE染色或利用抗CD34单克隆抗体进行染色的结果。从注入CAR-T细胞起经过5个月后仍在维持AML细胞的根除效果。

[0067] [图11-1]显示对分别移植了来自4个病例的AML的细胞而制作的PDX小鼠给予CD25 CAR-T或表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞的数周后牺牲小鼠,对脾脏细胞、骨髓细胞和肝脏细胞研究白血病细胞的比例(%嵌合状态)的结果。1个点表示1只受体小鼠。在脾脏中,在给予表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞的情况下,可在相当数量的受体小鼠中杀死白血病细胞。在骨髓和肝脏中,通过给予CD25 CAR-T(CAR-T),在多个小鼠中白血病细胞高频率地残留,但通过给予表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞(CXCR4 CAR-T),能够以相当大的概率杀死白血病细胞。NT:未给予。

[0068] [图11-2]显示对移植来自AML的细胞而制作的PDX小鼠给予CD25 CAR-T或表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞的数周后牺牲小鼠,对骨髓细胞进行流式细胞术分析的结果。在给予表达CXCR4的CD25CAR-T细胞的情况下白血病细胞消失,之后CAR-T细胞没有过度活化而是数量减少,正常的白细胞占多数。

[0069] [图12]显示对移植了人AML细胞(U300)的PDX小鼠给予CD25CAR-T细胞或表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞的情况下从给予起4周后对肝脏细胞进行流式细胞术分析的结果。在肝脏中,在给予表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞的情况下发现T细胞增加和AML细胞完全消

失(在5只中的4只小鼠中确认),确认到与给予CD25 CAR-T细胞的情况相比显示出显著强的治疗效果。

[0070] [图13-1]显示对移植了CD19阳性B细胞性混合表型急性白血病(MPAL、B/骨髓、U211)细胞的PDX小鼠用小分子治疗药进行治疗后,在给予表达CXCR4的CD19 CAR-T细胞的情况下的外周血中的白血病细胞的比例(左侧)。通过给予小分子治疗药,看起来好像是白血病细胞基本从外周血中消失,但实际上残留在骨髓中。

[0071] [图13-2]在给予小分子治疗药后,若给予表达CXCR4的CD19CAR-T细胞,则给予后第10天残留的MPAL细胞在第23天减少至0.4%,在第32天和第39天完全消失。

[0072] [图14]显示在使用了伯基特淋巴瘤的细胞株TL1的异种移植模型小鼠中表达CXCR4的CD19 CAR-T(CXCR4 CD19 CAR-T)治疗的效果。左侧显示未给予CAR-T细胞的小鼠的骨髓和肝脏中的流式细胞术的结果。人CD45阳性细胞中的大部分为B细胞标志物的CD19阳性,在骨髓、肝脏中都是淋巴瘤细胞占多数。另一方面,在给予了CXCR4 CD19CAR-T的小鼠(右侧)中,在骨髓和肝脏中均显示人CD45阳性细胞中的大部分是CAR-T细胞(CD3阳性),可知淋巴瘤细胞几乎被消灭。

具体实施方式

[0073] 本发明在一个方案中提供细胞,该细胞在细胞膜上共表达嵌合抗原受体(CAR)蛋白和CXCL12受体蛋白。

[0074] ＜嵌合抗原受体(CAR)蛋白＞

[0075] 在本说明书中,“嵌合抗原受体(CAR)”是指可将靶特异性移植到细胞中的修饰受体。以下,在本说明书中,有时将嵌合抗原受体或嵌合抗原受体蛋白记作“CAR”。

[0076] 这里,对通过CAR移植靶特异性的细胞没有限定,例如可适合使用T细胞。作为T细胞,例如可使用:初始T细胞、中枢记忆T细胞、效应记忆T细胞、或它们的组合等T细胞。另外,T细胞可以是炎性T淋巴细胞、细胞毒性T淋巴细胞或辅助性T淋巴细胞。特别是可使用细胞毒性T淋巴细胞。在一个方案中,T细胞选自CD4+T淋巴细胞和CD8+T淋巴细胞。在特定方案中,按照本发明修饰的T细胞为人T细胞。

[0077] T细胞可在本发明的细胞的增殖和基因重组前通过各种非限定性的方法由对象、例如人患者获得。T细胞可由外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸水、脾脏组织、以及包括肿瘤在内的多个非限定的供给源获得。在一个方案中,可使用可获取且为本领域技术人员所已知的任意数量的T细胞株。在另一方案中,上述细胞可由健康供体获得,也可由诊断为癌症的患者获得。在又一方案中,上述细胞是显示不同的表型特征的细胞的混合群的一部分。在本说明书中,为了方便而将以表达嵌合抗原受体的方式修饰的细胞记作“CAR-T细胞”。

[0078] 嵌合抗原受体(CAR)蛋白的结构在本领域为人所熟知,本发明中使用的CAR也可利用通常使用的CAR的结构。具体而言,本发明中使用的CAR具有:特异性地与靶分子结合的靶结合结构域、跨膜结构域和细胞内信号传递结构域。这里,“结构域”是指多肽内的区域,表示与其他区域独立地折叠成特定结构的区域。

[0079] 在本发明中,CAR所靶向的分子可从下述中适当选择:在肿瘤细胞表面表达的抗原、例如分化簇分子、例如CD16、CD64、CD78、CD96、CLL1、CD116、CD117、CD71、CD45、CD71、

CD123、CD138;肿瘤相关表面抗原、例如ErbB2(HER2/neu)、癌胚抗原(CEA)、Lewis-Y(TAA-LeY)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、上皮生长因子受体(EGFR)、EGFR变体III(EGFRvIII)、CD19、CD20、CD30、CD40、二唾液酸神经节苷脂GD2、管上皮粘蛋白、gp36、TAG-72、鞘糖脂、神经胶质瘤相关抗原、β-人绒毛膜促性腺激素、甲胎蛋白(AFP)、凝集素反应性AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CA IX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2(AS)、肠羧酸酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶(prostase)、前列腺酶特异性抗原(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGA-1a、p53、前列腺素(prostain)、PSMA、存活蛋白(survivin)和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1(PCTA-1)、MAGE、ELF2M、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、Eflin B2、CD22、胰岛素生长因子(IGF1)-I、IGF-II、IGFI受体、间皮素(mesothelin)、主要组织相容性复合物(MHC)分子、5T4、ROR1、Nkp30、NKG2D、肿瘤间质抗原、纤连蛋白的额外结构域A(EDA)和额外结构域B(EDB)、以及生腱蛋白-C的A1结构域(TnC A1)和成纤维细胞相关蛋白(fap);细胞系特异性抗原或组织特异性抗原、例如CD3、CD4、CD7、CD8、CD24、CD25(IL-2受体α链)、CD32、CD33、CD34、CD123、CD133、CD138、CTLA-4、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、CD180、GM-CSF、细胞因子受体、内皮糖蛋白、主要组织相容性复合物(MHC)分子、淋巴母细胞性白血病抗原、例如TNFRSF17(UNIPROT Q02223)、SLAMF7、GPRC5D、FKBP11、KAMP3、ITGA8、PRAME和FCRL5等。

[0080] 优选地,本发明中CAR所靶向的分子是在肿瘤细胞中与其他细胞相比发现明显或显著表达的抗原,没有限定,例如可列举:CD7、CD19、CD20、GD2、CD22、CD25(IL-2受体α链)、CD30、CD33、CD44、CD96、CD123、CD180、CEA、Her2/neu、MUC1、MUC4、MUC6、EGFR、PRAME、VEGFR2、GM-CSFR、IL-11Rα、IL-13α2、Lewis-Y(TAA-LeY)等。

[0081] 更优选地,本发明中CAR所靶向的分子是在特定的血液肿瘤细胞中与其他细胞相比发现明显或显著的表达的抗原,没有限定,例如可列举:CD7、CD19、CD25(IL-2受体α链)、CD33、CD123、肿瘤相关抗原Lewis-Y(TAA-LeY)等。

[0082] 例如,为了对急性骨髓性白血病(AML)进行治疗和/或预防其复发,可将CD7、CD25、CD96、CD123、PRAME和CD180作为靶。例如,为了对B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)和混合表型急性白血病(MPAL)进行治疗和/或预防其复发,可将CD19、CD20、CD32和CD180作为靶。例如,为了对T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)、MPAL和慢性骨髓性白血病(CML)进行治疗和/或预防其复发,可将CD7作为靶。

[0083] 本发明中,作为CAR所靶向的分子,可选择1种,但为了以多种分子为靶,也可使用以各自的分子为靶的多种CAR-T细胞。另外,为了以多种分子为靶,还可将针对各分子的CAR引入到相同的细胞中。

[0084] 特别优选地,在本发明中,CAR是以选自在血液肿瘤细胞中发现表达的CD25(IL-2受体α链)、CD19和CD7的细胞表面抗原为靶。

[0085] 一直以来,CD25(IL-2受体α链)被报道为AML中的预后不良的标志物。据报道,与正常的D34+CD38-造血干细胞/前体细胞(HSPC)相比,CD25在AML起始细胞中过度表达(Saito等人,Science Translational Medicine 2010)。

[0086] CD25的基因序列等信息例如在美国国立生物技术信息中心(NCBI)等数据库中被收录为基因ID:3559,可根据需要来获取。

[0087] 已知CD19在弥漫性大细胞型B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤、B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)中表达,而在非造血细胞、骨髓系细胞、红细胞和T细胞中不表达。本发

明人在B细胞性混合表型急性白血病(MPAL)中也确认到了CD19的表达。

[0088] CD19的基因序列等信息例如在NCBI等数据库中收录为基因ID:930,可根据需要来获取。

[0089] CD7是在胸腺细胞和成熟T细胞上表达的40kDa的I型跨膜糖蛋白,可用作T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)的标志物。本发明人在T细胞性混合表型急性白血病(MPAL)和慢性骨髓性白血病(CML)中也确认到了CD7的表达。

[0090] CD7的基因序列等信息例如在NCBI等数据库中收录为基因ID:924,可根据需要来获取。

[0091] CAR蛋白的靶结合结构域例如可包含单链抗体(scFv)片段,该片段包含如上所述的特异性地与靶分子结合的单克隆抗体的重链(H链)可变区和轻链(L链)可变区。本领域技术人员可容易地制作抗特定抗原的单克隆抗体和可用于CAR的scFv片段,也可利用市售品。例如,作为本发明中可适合利用的靶结合结构域,可列举:特异性地与CD25、CD19或CD7结合的scFv片段。

[0092] 作为靶结合结构域,还可使用:特异性地与靶分子结合的配体、例如亲和体(affibody),来自天然型受体的配体结合结构域、例如肿瘤细胞上的受体的溶解性蛋白/肽配体,肽等。

[0093] CAR蛋白根据情况可在存在于细胞外的靶结合结构域与膜结合结构域之间包含“细胞外间隔结构域”。细胞外间隔结构域希望是促进CAR与靶分子的结合、使向细胞内的信号传递增强的序列。例如,可使用抗体的Fc片段或其片段或衍生物、抗体的铰链区或其片段或衍生物、抗体的CH2区、抗体的CH3区、人工间隔序列、或它们的组合。

[0094] CAR蛋白包括:胞外结构域,其包含靶结合结构域和任选的细胞外间隔结构域;跨膜结构域;以及胞内结构域,其包含细胞内信号传递结构域和任选的共刺激结构域。

[0095] 相对于胞外结构域和胞内结构域均为亲水性结构域,“跨膜结构域”是对构成细胞膜的脂质双层具有亲和性的结构域。对跨膜结构域没有特别限定,CAR蛋白可存在于细胞膜上,只要不损及靶结合结构域与细胞内信号传递结构域的功能即可,有时来自与后述的共刺激结构域相同的蛋白的多肽也可实现作为跨膜结构域的功能。跨膜结构域例如可使用CD28、CD3ε、CD8α、CD3、CD4或4-1BB等跨膜结构域。

[0096] CAR蛋白根据情况可包含“共刺激结构域”。共刺激结构域特异性地与共刺激配体结合,由此介导CAR-T细胞的增殖、细胞因子的产生、功能分化、靶细胞的细胞死亡等通过细胞进行的共刺激应答,但并不限于这些。作为共刺激结构域,例如可使用CD27、CD28、4-1BB(CD137)、CD134(OX40)、Dap10、CD27、CD2、CD5、CD30、CD40、PD-1、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、TNFR-1、TNFR-II、Fas、Lck。例如,共刺激结构域可使用人4-1BB(GenBank:U03397.1)等。

[0097] CAR蛋白包含“细胞内信号传递结构域”。细胞内信号传递结构域传递发挥免疫细胞的效应子功能所需的信号。作为细胞内信号传递结构域,例如可使用:人CD3ζ链、FcγRIII、FcεRI、Fc受体的细胞质末端、具有免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)的细胞质受体或它们的组合。例如,细胞内信号传递结构域可使用人CD3ζ链(例如NCBI登录号NM_000734.3的核苷酸299-637)。

[0098] 在称为第1代的CAR中,信号传递结构域来自CD3ζ或Fc受体γ链的细胞质区域。第1

代CAR显示出可对T细胞的细胞毒性赋予方向，但在体内的长期增殖和抗肿瘤活性方面并不充分。为了提高CAR-T细胞的存活率、增加增殖，将CD28、OX-40(CD134)和4-1BB(CD137)等来自共刺激分子的信号传递结构域单独(第2代)或组合(第3代)使用。

[0099] 图2A显示在本发明中可适合使用的CAR构建体的一例。在该例中，靶结合结构域是以CD25为靶的scFV片段。在本发明中，CAR的靶结合结构域可以是以CD19为靶的scFV片段。另外，在本发明中，CAR的靶结合结构域可以是以CD7为靶的scFV片段。

[0100] 针对靶的单克隆抗体的获取方法在本领域已知，本领域技术人员可获得以所选择的靶为抗原的单克隆抗体，单克隆抗体也可获取市售品。单克隆抗体或其scFV片段可根据本领域的技术常识来合成，关于编码它们的基因，也可获得其核苷酸序列来进行合成。

[0101] ＜CXCL12受体蛋白＞

[0102] 本发明的细胞的特征在于：在细胞表面表达CAR，同时表达CXCL12受体蛋白。

[0103] CXC趋化因子配体12(CXCL12)是也称为SDF(Stromal Cell-Derived Factor:基质细胞衍生因子)-1的89个氨基酸的小分子蛋白，属于趋化因子CXC家族。CXCL12是淋巴细胞的强效化学诱导因子，暗示了通过从骨髓中动员内皮前体细胞等而在血管新生中起到重要作用。作为CXCL12的受体而已知的CXC基序趋化因子受体4型(CXCR4、Fusin、CD184)是7次跨膜型G蛋白偶联受体，已知在嗜中性粒细胞、单核细胞、树突状细胞、NK细胞、B细胞、T细胞、血小板中表达。

[0104] CXCL12/SDF1是促进人和小鼠造血细胞或免疫细胞归巢和移动到骨髓和包括肝脏在内的多个器官中的趋化因子配体之一。与不表达CXCR4的CAR-T细胞相比，认为CAR-T细胞通过共表达CXCL12受体、例如CXCR4可更有效地归巢到骨髓，但并不受理论的约束。本发明中可适合使用的CXCL12受体是CXCR4。

[0105] 人CXCR4是由CXCR4基因编码的包含360个氨基酸的蛋白，其基因的核苷酸序列和蛋白的氨基酸序列例如在美国国立生物技术信息中心(NCBI)等数据库中收录为基因ID:7852、登录号:CAA12166，可根据这些信息获取基因和蛋白。

[0106] 本发明人发现了：与不表达CXCL12受体蛋白的CAR-T细胞相比，表达CXCL12受体蛋白的CAR-T细胞对靶细胞显示出显著优异的细胞毒活性。细胞上的CXCL12受体蛋白、例如CXCR4的表达可以是完整CXCL12受体蛋白，只要特异性地与CXCL12结合、并可提高CAR-T细胞的细胞毒活性即可，也可以是作为这样的功能性片段的蛋白部分的表达。

[0107] 例如，表达CXCR4、且以CD25为靶的CAR-T细胞(以下，在本说明书中有时记作CXCR4 CD25 CAR-T)对急性骨髓性白血病(AML)显示优异的抗肿瘤活性。因此，本发明的细胞的一个方案为：共表达CXCR4和以CD25为靶的CAR的细胞。

[0108] 另外，表达CXCR4、且以CD19为靶的CAR-T细胞(以下，在本说明书中有时记作CXCR4 CD19 CAR-T)对CD19阳性急性淋巴细胞白血病(ALL)、B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、B细胞性混合表型急性白血病(MPAL)或伯基特淋巴瘤显示优异的抗肿瘤活性。因此，本发明的细胞的一个方案为：共表达CXCR4和以CD19为靶的CAR的细胞。

[0109] 目前，ALL是用BIRC抑制剂(例如AZD5582)、BCL-2抑制剂(例如维奈托克(venetoclax))、甾体药物等小分子治疗药单独或组合进行治疗，但仅使用这样的小分子治疗药有时无法根治。本发明人在仅使用小分子治疗药对移植了人ALL细胞的小鼠进行治疗的情况下，发现白血病细胞好像是从外周血中消失，但实际上白血病细胞残留在骨髓中，确

认了有可能引起复发。相对于此，若给予表达CXCR4的CD19CAR-T细胞，则在小分子治疗后可使显示增加(复发)的ALL细胞完全消失。

[0110] 表达CXCR4、且以CD7为靶的CAR-T细胞(以下，在本说明书中有时记作CXCR4 CD7 CAR-T)对CD7阳性T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)、T细胞性混合表型急性白血病(MPAL)、慢性骨髓性白血病(CML)显示显著的治疗效果。因此，本发明的细胞的一个方案为：共表达CXCR4和以CD7为靶的CAR的细胞。

[0111] 如上所述，表达CXCL12受体蛋白的CAR-T细胞对肿瘤细胞具有优异的治疗和/或预防复发的效果。因此，本发明还提供药剂，其含有上述本发明的细胞，对肿瘤细胞显示抗肿瘤活性。

[0112] 成为本发明的药剂所治疗/预防复发的对象的疾病是肿瘤性疾病，特别是血液肿瘤性疾病。对血液肿瘤性疾病没有限定，可列举：白血病和恶性淋巴瘤。

[0113] 白血病有骨髓性白血病和淋巴细胞白血病，骨髓性白血病有急性骨髓性白血病(AML)、急性早幼粒细胞白血病、慢性骨髓性白血病(CML)、骨髓增生异常综合征，淋巴细胞白血病有急性淋巴细胞白血病(ALL)(例如B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)、混合表型急性白血病(MPAL))、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、成人T细胞白血病淋巴瘤等。

[0114] 恶性淋巴瘤有霍奇金淋巴瘤(HL)和非霍奇金淋巴瘤(NHL)，非霍奇金淋巴瘤分为B细胞性、T细胞性、NK细胞性等。作为B细胞性恶性淋巴瘤，可列举：弥漫性大B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞性淋巴瘤、淋巴浆细胞性淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、粘膜相关淋巴组织结外边缘区淋巴瘤(MALT淋巴瘤)、淋巴结边缘区淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤等。作为T细胞性恶性淋巴瘤，可列举：非特异性外周T细胞淋巴瘤、肠病相关T细胞淋巴瘤、未分化大细胞淋巴瘤、肝脾T细胞淋巴瘤、成人T细胞白血病/淋巴瘤、鼻型结外NK/T细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤、T细胞大颗粒淋巴细胞白血病、成人T细胞白血病/淋巴瘤、蕈样肉芽肿/Sezary综合征、原发性皮肤未分化大细胞淋巴瘤、快速进展的NK细胞白血病等。

[0115] 成为本发明药剂的治疗/预防对象的疾病例如是肿瘤性疾病，该肿瘤性疾病选自急性骨髓性白血病(AML)、成人T细胞白血病、B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)、混合表型急性白血病(MPAL)、慢性骨髓性白血病(CML)、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤。

[0116] 本发明的药剂是针对上述肿瘤性疾病的抗癌药。本发明的药剂、即CAR-T细胞可单独使用，也可根据治疗对象的癌症的种类和症状的进展等各种状态，通过医生的判断，与不同机制的其他抗肿瘤药和/或抗肿瘤治疗组合使用。

[0117] 对其他抗肿瘤药没有特别限定，例如可列举：代谢拮抗剂、铂系药剂、微管抑制剂、拓扑异构酶抑制剂、分子靶向药、甾体药物等。

[0118] 作为代谢拮抗剂，可列举：5-氟尿嘧啶(5-FU)、曲氟尿苷、氟达拉滨(或作为活性代谢物的氟达拉滨核苷)、阿糖胞苷、吉西他滨、地西他滨、呱西他滨(guadecitabine)或阿扎胞苷。作为铂系药剂，可列举：顺铂、奥沙利铂或卡铂。作为微管抑制剂，可列举：紫杉醇、多西他赛、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨、艾日布林等。作为拓扑异构酶抑制剂，可列举：伊立替康、依托泊苷等。

[0119] 作为分子靶向药，可列举：CSF1R抑制剂、TIE2抑制剂、TRKB抑制剂、ATR抑制剂、Chk1抑制剂、HSP90抑制剂、PARP抑制剂、EGFR抑制剂、Her2抑制剂、VEGFR抑制剂、PDGFR抑制剂、MET抑制剂、AXL抑制剂、RET抑制剂、FLT3抑制剂、KIT抑制剂、HCK抑制剂、BIRC抑制剂(例如AZD5582)、或BCL-2抑制剂(例如维奈托克)。HCK抑制剂和BCL-2抑制剂例如可使用日本特开2019-529423号中公开的药物。

[0120] 作为甾体药物，例如可列举：地塞米松。

[0121] 另一方面，作为其他抗肿瘤治疗，可列举：外科手术或放射线治疗等。

[0122] 确认到：本发明的药剂通过与BIRC抑制剂和/或BCL-2抑制剂组合，可更稳健地发挥对白血病的治疗效果，但没有限定。因此，本发明的一个方案包括组合疗法，其包含：含有表达CXCL12受体蛋白的CAR-T细胞的药剂和BIRC抑制剂和/或BCL-2抑制剂。例如，本发明的在细胞膜上共表达嵌合抗原受体(CAR)蛋白和CXCL12受体蛋白的细胞可与BIRC抑制剂(例如AZD5582)组合，给予至患有血液肿瘤性疾病的患者。另外，本发明的在细胞膜上共表达嵌合抗原受体(CAR)蛋白和CXCL12受体蛋白的细胞可与BCL-2抑制剂(例如维奈托克)组合，给予至患有血液肿瘤性疾病的患者。

[0123] 本发明的含有表达CXCL12受体蛋白的CAR-T细胞的药剂可与上述的其他抗肿瘤药和/或抗肿瘤治疗同时连续地或分开给药。在一个方案中，可与本发明药剂的给药同时进行其他抗肿瘤药的给药和/或抗肿瘤治疗。在一个方案中，可在本发明药剂的给药后进行其他抗肿瘤药的给药和/或抗肿瘤治疗。在一个方案中，可在本发明药剂的给药前进行其他抗肿瘤药的给药和/或抗肿瘤治疗。在一个方案中，可与本发明药剂的给药同时进行其他抗肿瘤药的给药和/或抗肿瘤治疗。在另一个方案中，在通过抗肿瘤药的给药和/或抗肿瘤治疗进行治疗后复发的情况下，可给予本发明的药剂。

[0124] 本发明还提供药物组合物，其含有上述本发明的药剂和药学上可接受的载体。药物组合物可单独含有本发明的药剂作为有效成分，或者与其他有效成分组合含有。本发明的药物组合物以上述肿瘤性疾病的治疗和/或其复发的预防为目的。例如，本发明的药物组合物可用于肿瘤性疾病的治疗和/或其复发的预防，该肿瘤性疾病选自急性骨髓性白血病(AML)、成人T细胞白血病、B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)、混合表型急性白血病(MPAL)、慢性骨髓性白血病(CML)、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤。

[0125] 本说明书中使用的术语“药学上可接受的载体”是指，不会损及有效成分的活性，为了药物组合物的制剂化和给药而需要或适合添加的无毒性载体。例如为水、生理盐水等水性介质，可适当包含赋形剂、等渗剂、缓冲剂、稳定剂、凝胶化剂等。

[0126] 本发明的药剂或药物组合物可进行局部给药或全身给药，对给药方式没有限定，例如在治疗白血病的情况下，优选静脉内给药。本发明的药剂的给药量根据患者的体重、年龄、疾病的严重程度等而变化，没有特别限定，例如对象的每1kg体重可给予10^4～10^{10}个或10^4～10^9个范围的上述细胞。本发明的药剂或药物组合物可进行单次给药。或者，本发明的药剂或药物组合物可1天1次～数次、每2天、每3天、每周、每2周、每个月、每2个月、每3个月进行多次给药。

[0127] ＜细胞的制作方法＞

[0128] 本发明还提供上述本发明的细胞的制作方法，其包括：将编码嵌合抗原受体(CAR)

蛋白的第1多核苷酸和编码CXCL12受体蛋白的第2多核苷酸引入到细胞内。

[0129] 目标多核苷酸可按照常规方法容易制作。编码嵌合抗原受体(CAR)蛋白的多核苷酸可由显示各结构域(靶结合结构域、细胞外间隔结构域、跨膜结构域、共刺激结构域和细胞内信号传递结构域)的氨基酸序列的NCBI RefSeq ID或GenBank的登录号获得编码各自的氨基酸序列的核苷酸序列,利用标准的分子生物学和/或化学步骤连接编码各结构域的多核苷酸以制作本发明的第1多核苷酸。例如,可根据这些核苷酸序列合成核酸,另外,可将利用聚合酶链反应(PCR)由cDNA文库得到的DNA片段组合以制作本发明的多核苷酸。

[0130] 关于编码CXCL12受体蛋白的第2多核苷酸,也可由显示其氨基酸序列的NCBI RefSeq ID或GenBank的登录号获得编码氨基酸序列的核苷酸序列,可采用标准分子生物学和/或化学步骤制作本发明的第2多核苷酸。

[0131] 上述第1和第2多核苷酸可按照本领域已知的任选的适当方法引入到细胞、例如T细胞中。对将核酸分子引入到细胞内的适当方法没有限定,包括将多核苷酸插入到细胞基因组的稳定转化法、多核苷酸未插入到细胞基因组中的瞬时转化法、以及由病毒介导的方法。例如,可通过重组病毒载体(例如,逆转录病毒、慢病毒、腺病毒)、脂质体等引入到细胞内。一过性转化法例如包括显微注射、电穿孔或粒子轰击。

[0132] 引入到细胞内的多核苷酸可以是DNA也可以是RNA。在一个方案中,引入的核酸分子为DNA。在一个方案中,引入到细胞内的核酸分子为RNA、特别是编码CAR蛋白或CXCL12受体蛋白的mRNA。

[0133] 例如,嵌合抗原受体(CAR)蛋白可以是以选自CD25(IL-2受体α链)、CD19和CD7的细胞表面抗原为靶的蛋白。

[0134] 上述第1多核苷酸和上述第2多核苷酸可通过单一的相同载体引入到细胞内,或者,上述第1多核苷酸和上述第2多核苷酸可通过不同的载体分别引入到细胞内。

[0135] ＜治疗方法＞

[0136] 本发明还提供肿瘤的治疗方法,其包括:对患者给予治疗有效量的上述本发明的药剂或药物组合物。治疗的有效量和给药方案可考虑对象疾病的种类和进展程度、患者的年龄等适当确定。通过本发明的方法治疗的对象(患者)为哺乳动物,例如可列举:小鼠、大鼠、狗、猫、兔、牛、马、绵羊、山羊、猴、人等。优选地,通过本发明的方法治疗的对象为人患者。另外,对象可以是移植了人肿瘤细胞的非人哺乳动物、或患有肿瘤性疾病的非人动物。

[0137] 本发明的方法是用于对象的肿瘤性疾病的治疗和/或其复发的预防的方法,包括以下步骤:向对象给予细胞,该细胞在细胞膜上共表达以CD25(IL-2受体α链)为靶的嵌合抗原受体(CAR)蛋白和CXCL12受体蛋白。

[0138] 对嵌合抗原受体(CAR)蛋白没有限定,例如可以是以选自CD25(IL-2受体α链)、CD19和CD7的细胞表面抗原为靶的蛋白。

[0139] 本发明的方法中的成为治疗和/或预防复发的对象的肿瘤性疾病可以是上述肿瘤性疾病中的任一种,例如可以是选自急性骨髓性白血病(AML)、成人T细胞白血病、B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)、混合表型急性白血病(MPAL)、慢性骨髓性白血病(CML)、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤的疾病。

[0140] 在本发明的方法中,可向对象单次给予上述细胞。或者,在本发明的方法中,可向对象多次给予上述细胞。另外,如上所述,本发明的方法可将本发明的药剂或药物组合物与

其他治疗药、例如其他抗肿瘤药和/或抗肿瘤治疗组合实施。

[0141] 在本发明的方法中，对于对象的每1kg体重，可单次给予或多次给予10^4～10^9个范围的上述细胞。

[0142] 另外，本发明的方法可进一步包括以下步骤：在给予细胞前，测定上述对象的肿瘤细胞中的靶细胞表面抗原的表达水平。例如，在一个方案中，本发明的方法可包括以下步骤：在给予表达CXCR4的CD25CAR-T细胞前，测定成为对象的肿瘤细胞中的CD25的表达水平。在另一个方案中，本发明的方法可包括以下步骤：在给予表达CXCR4的CD19 CAR-T细胞前，测定成为对象的肿瘤细胞中的CD19的表达水平。在又一个方案中，本发明的方法可包括以下步骤：在给予表达CXCR4的CD7 CAR-T细胞前，测定成为对象的肿瘤细胞中的CD7的表达水平。

[0143] 本发明的方法还可进一步包括以下步骤：在给予表达CXCR4的CAR-T细胞后评价治疗效果。这里，治疗效果可根据对象中的选自下述(i)～(iv)的1个以上的指标进行评价：(i)血液中的肿瘤细胞的减少、(ii)骨髓中的肿瘤细胞的减少、(iii)脾脏中的肿瘤细胞的减少、以及(iv)抑制肿瘤细胞对肝脏的浸润。

[0144] ＜在癌症的治疗和/或其复发的预防中的应用＞

[0145] 本发明还提供细胞，其用于在癌症的治疗和/或其复发的预防中使用，该细胞在细胞膜上共表达嵌合抗原受体(CAR)蛋白和CXCL12受体蛋白。

[0146] 关于细胞，例如在其表面上表达的嵌合抗原受体(CAR)蛋白以选自CD25(IL-2受体α链)、CD19和CD7的细胞表面抗原为靶。

[0147] 上述癌症可以是选自上述肿瘤性疾病的疾病中的任一种，例如是选自急性骨髓性白血病(AML)、成人T细胞白血病、B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)、混合表型急性白血病(MPAL)、慢性骨髓性白血病(CML)、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤的肿瘤性疾病。细胞可以是上述细胞中的任一种，优选为T细胞。

[0148] 实施例

[0149] 以下，列举实施例，以更具体地说明本发明，但本发明并不仅限定于以下的实施例。

[0150] 慢病毒载体的构建如下进行。

[0151] 使用pHR_SFFV(Addgene质粒#79121、由Wendell Lim博士赠与)作为慢病毒载体，使用CD25-CAR(pHR_SFFV CD25CAR)和小鼠CXCR4(pHR_SFFV mCXCR4)以及包装质粒(pCMVR、pL2、pMD2.G-VSV-G、pAdV(Promega))(Cho等人，2018Cell)，用JetPEI转染试剂(Polyplus)转染293T细胞，从而将引入基因包装在慢病毒载体中。

[0152] 转染4天后，回收病毒上清，用Vivaspin200(merck)进行离心。将浓缩后的病毒上清离心一夜后废弃上清，使沉淀物在T细胞用培养基中溶解。

[0153] 原代人T细胞的培养和慢病毒感染按照以下步骤实施。

[0154] 从AML患者中获得知情同意后，采集人样品。脐带血是从中部脐带血库(爱知县)获取健康供体的脐带血。

[0155] AML患者的骨髓单核细胞和脐带血中的单核细胞通过密度梯度离心进行分离。$CD34^+$细胞和$CD34^-$细胞通过autoMACS(Miltenyi)用抗人CD34免疫磁珠进行分离。T细胞通过带有Pan T细胞分离试剂盒的autoMACS(Miltenyi)从$CD34^-$群中浓缩。分离T细胞后，在X-

Vivo15(Lonza)、5％胎牛血清、10mM的N-乙酰-L-半胱氨酸(Sigma-Aldrich#A9165)、55mM的2-巯基乙醇中培养(Jang hwan Cho2018Cell)。

[0156] 用25μl的人T-激活剂CD3/CD28 DynaBeades(Thermo Scientific#11132D)刺激T细胞，使1ml培养基中有1×10^6个细胞。第二天，在96孔板的每孔中以1×10^5个/100μl接种T细胞以感染慢病毒。使用vectofusin-1(10μg/ml、Miltenyi)向100μl的T细胞悬液中添加16-100μl的CAR慢病毒，培养1天。去除半量的包含感染的T细胞的培养基，添加等量的新的培养基。感染2天后，对于感染的T细胞，用CD25-FC融合蛋白分析25CAR的表达，用抗mCXCR4抗体分析mCXCR4的表达。在确认了表面蛋白的表达后，将CD25 CAR-T细胞从眶后窦注入到AML模型小鼠中。

[0157] 流式细胞术是用单克隆抗体(CD45、CD3、CD4、CD8、CD25、CD33、小鼠CD45)标记细胞，使用FACSAriaIII或FACSCanto II(BD Biosciences)进行分析。

[0158] [参考例1正常和恶性人造血细胞表面上的CD25/IL2RA的表达]

[0159] CD25(IL-2Rα链)被鉴定为在AML发病细胞和正常$CD34^+CD38^-$造血干细胞/前体细胞中表达不同的基因之一(Saito等人.2010Sci Trans Med)。而且，AML中的CD25的表达还被报道为预后不良因子(Gonen等人.2012Blood,Nguyen等人.Cancer Research 2020)。在具有各种遗传异常的AML中，CD25表达的程度可根据病例而变化。

[0160] 为了对AML患者的细胞中的CD25表达的不均匀性进行研究，利用流式细胞术对来自84个病例的AML的$CD33^+$白血病母细胞中的CD25的细胞表面表达进行分析。

[0161] 其结果，57个病例为CD25阴性、14个病例为CD25的中度表达、13个病例为CD25的高度表达，在来自84个病例中的27个病例(32.2％)的患者的AML细胞中CD25以各种程度表达(图1A和1B)。

[0162] 而且，在分析未成熟和成熟人造血细胞中的CD25的表达时，与我们以前的报道(Saito等人2010Sci Trans Med)一致，在造血干细胞/前体细胞($CD34^+C38^-$)和骨髓-红细胞系前体细胞($CD34^+CD38^+$)中CD25表达细胞的频率低(图1C)。另外，发现单核细胞($CD14^+$)、粒细胞($CD15^+$)和NK细胞($CD56^+$)中的CD25蛋白表达均小于5％，在人T细胞($CD3^+$)中有8.8％表达CD25(图1C)。

[0163] [参考例2以CD25为靶的CAR-T细胞的细胞毒活性]

[0164] 为了制作以CD25抗原为靶的CAR-T细胞，设计了具有抗IL2RA/CD25蛋白单链可变片段(scFv)和细胞内CD3z和CD137(4-1BB)信号传递结构域的慢病毒载体(图2A)(Michael C.Milone等人.2009Mol Therapy 17(8):1453-64)。

[0165] 然后，评价了CAR-T细胞对具有各种程度的CD25表达的患者白血病细胞的体外杀伤效果。为了该目的，使用具有或不具有CD25表达的患者AML样品，构建了体外T细胞介导的细胞毒性试验。

[0166] 在与CD25CAR-T细胞一同培养了3天的情况下，CD25阳性原代AML细胞(U390、U346)的存活显著受损，AML细胞的绝对数量减少，但在非特异性活化T细胞(U328)中没有看到这样的变化(图2B)。使用作为靶的CD25阴性AML细胞或未引入作为效应子的CAR的活化T细胞则不会发生AML细胞死亡，由此显示：AML细胞死亡是通过CAR-T细胞对CD25的识别而发生的。

[0167] [参考例3CD25 CAR-T在生物体内无法驱逐CD25阳性AML]

[0168] 由于在体外观察了CAR-T细胞对表达CD25的患者AML的抗原特异性细胞毒性，所以对CAR-T细胞的体内治疗效果进行了评价。

[0169] 如下操作，制作了移植有来自患者的AML细胞的NSG小鼠。NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg$^{tm1Wjl/Sz}$(NOD-SCID-IL2rg^{null})小鼠从Jackson Laboratory获取，该小鼠通过回交向NOD.Cg-Prkdc^{scid}(NOD-SCID)株(Shultz等人.2005J immunol)的Il2rg基因座中导入了完全的无效突变。

[0170] 对NOD-SCID-IL2rg^{null}的小鼠新生儿的全身照射150cGy的放射线后，向静脉注入人AML细胞。为了制作AML移植受体，向各受体注入10^3～10^5个AML移植细胞(Ishikawa等人.2007nature biotechnol)。为了制作正常人HSC移植受体，向各受体注入10^4个7AAD-系统(hCD3/hCD4/hCD8)-hCD34+hCD38-的CB细胞(Ishikawa等人.2005Blood)。人外周血细胞的移植通过眶后取血进行评价。

[0171] 确认了在移植有AML细胞的NSG小鼠的外周血中存在AML细胞后，单次给予5×10^6个CD25 CAR-T细胞，每周采集外周血，采集4周，使用流式细胞仪进行分析。其结果，如图3所示，发现在所有的小鼠中人CD45中的CAR-T细胞(CD3+)的比例增加、AML(hCD45+CD33+CD25+)的比例减少，4周后仍残留hCD45$^+$hCD33$^+$AML母细胞。另外，有时如小鼠#2那样效果强，有时如小鼠#1和#3那样效果弱，在效果上可见偏差。

[0172] 另外，在给予CD25 CAR-T细胞4周后解剖小鼠，对骨髓进行HE染色时，如图4所示，在免疫缺陷小鼠的骨髓(正常NSG)中可见粒细胞或骨髓细胞等各种细胞，但在AML PDX小鼠的骨髓中，即使在给予CD25 CAR-T细胞后，大部分的骨髓细胞也是AML细胞，红细胞系细胞、巨核细胞和正常白细胞非常少。

[0173] [实施例1表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞的效果1]

[0174] 由于骨髓中的CD25 CAR-T细胞的治疗效果不是最佳，所以设计了可使CAR-T细胞更好地归巢到骨髓的CAR构建体。为了制作表达CXCR4的CD25 CAR-T，将pHR_SFFV_mCXCR4载体和pHR_SFFV_CD25CAR载体都转染到293T细胞中。

[0175] 对移植有AML细胞的PDX小鼠给予CD25 CAR-T细胞或表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞后，每周采集外周血，通过流式细胞术分离细胞，研究AML细胞、小鼠白细胞、CAR-T细胞的比例。其结果，发现在4周的观察期间人AML细胞随时间稳定地减少，并且注入4周后人AML完全被排除(图5-1～图5-3、图6)。

[0176] 若使用表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞进行治疗，则4周内CD33阳性白血病细胞完全消失，该效果维持4个月以上。在白血病细胞减少后，CAR-T细胞也减少，小鼠CD45细胞在外周血中占多数。即，显示了：对于在体内利用CD25 CAR-T细胞根除人AML细胞，共表达CXCR4的细胞会带来更高的效果。

[0177] [实施例2表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞的效果2]

[0178] 摘出在实施例1中给予了表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞的PDX小鼠的脾脏和骨髓，与未给予的情况相比进行目视观察。其结果，如图7所示，在给予了表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞的小鼠中，观察到脾脏尺寸缩小到正常水平、表示红细胞系细胞的恢复的骨髓的红色化。

[0179] 图8显示对给予表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞后4周的小鼠(U390移植PDX小鼠)骨髓组织进行HE染色的结果。确认到：在利用CAR-T细胞根除AML细胞后，小鼠的正常的白细

胞、红细胞、产生血小板的巨核细胞均恢复。

[0180] 另外，对骨髓细胞进行流式细胞术分析的结果与上述结果一致，仅在给予了表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞的情况下发现白血病细胞完全消失、小鼠红细胞(Ter119)或白细胞(mCD45)等正常细胞恢复(图9-1～图9-3)。

[0181] 表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞对骨髓中的AML细胞的根除效果从注入CAR-T细胞起经过5个月后仍在维持(图10)。

[0182] 在肝脏中，也仅在给予了表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞的情况下发现T细胞增加和白血病细胞完全消失，与给予CD25 CAR-T细胞的情况相比，确认显示显著强的治疗效果(图11-1～图11-2、图12)。

[0183] 根据组织学研究进一步确认到：在给予了表达CXCR4的CD25CAR-T细胞的小鼠的肝脏、肠和皮肤中没有GVHD或其他病理学炎症(没有显示数据)。在另2个病例中，利用表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞，确认到了人AML细胞的显著优异的死亡。在所研究的3个病例中的2个中确认到AML细胞对受体的肝脏组织的浸润，但肝脏是显示CXCL-12/SDF1的强表达的脏器，认为CD25 CAR-T细胞中的CXCR4的共表达对浸润到受体动物的肝脏组织中的人AML细胞显示出强效的治疗效果。

[0184] 如上所述，5×10^6个表达CXCR4的CD25 CAR-T细胞的单次注入可足以实现对表达CD25的侵袭性AML的长期的治疗应答。

[0185] [实施例3表达CXCR4的CD19 CAR-T细胞的效果1]

[0186] 对于移植了CD19阳性B细胞性混合表型急性白血病(MPAL、B/骨髓、U211)细胞的PDX小鼠，用BIRC抑制剂AZD5582(腹腔内给药、0.5mg/kg/天)、BCL-2抑制剂(维奈托克)(口服给药、30mg/kg/天)和地塞米松(DEX)(腹腔内给药、30mg/kg/天)进行治疗。如图13-1所示，给药10次后，与治疗前相比，外周血中的白血病细胞(MPAL)减少(37.8%→0.9%)，但依然残留白血病细胞。不仅在外周血中，在骨髓中也得到确认(没有显示数据)。

[0187] 残留白细胞的存在可引起复发，因此在用分子靶向药进行治疗后给予5×10^6个表达CXCR4的CD19 CAR-T细胞。

[0188] 其结果，如图13-2所示，可知从给予CAR-T细胞起第10天存在显示复发的MPAL细胞，但在第23天为0.4%，在第32天、第39天MPAL细胞完全消失。

[0189] [实施例4表达CXCR4的CD19 CAR-T细胞的效果2]

[0190] 作为B细胞性的高恶性度淋巴瘤的伯基特淋巴瘤是通过多药化学疗法进行治疗的，但在显示治疗抗性的病例或出现复发的病例中，即使进行自体造血干细胞移植联合大剂量化学疗法或同种造血干细胞移植，据报道5年存活率也在50%以下，预后不良(J Oncol Pract.2018Nov;14(11):665-671)。

[0191] 在本实施例中，使用伯基特淋巴瘤的细胞株TL1(从東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センター获取)，与实施例1同样地操作，制作异种移植伯基特淋巴瘤模型小鼠，探讨了给予5×10^6个表达CXCR4、且对CD19具有结合特异性的CAR-T(表达CXCR4的CD19 CAR-T)细胞的效果。

[0192] 图14的左侧显示未给予CAR-T细胞的小鼠的骨髓(BM)和肝脏中的流式细胞术的结果。可知：人CD45阳性细胞中的大部分为B细胞标志物的CD19阳性，在骨髓、肝脏中都是淋巴瘤细胞占多数。

[0193] 相对于此,在给予了表达CXCR4的CD19 CAR-T细胞的小鼠(右侧)中,在骨髓和肝脏中人CD45阳性细胞中的大部分都是CAR-T细胞(CD3阳性),可知淋巴瘤细胞几乎消失。

[0194] 产业实用性

[0195] 根据本发明,可提供对预后不良且难以完全治愈的肿瘤性疾病非常有效的治疗和/或预防复发的方法。

[0196] 本说明书中引用的所有出版物、专利和专利申请均作为参考而直接纳入本说明书中。

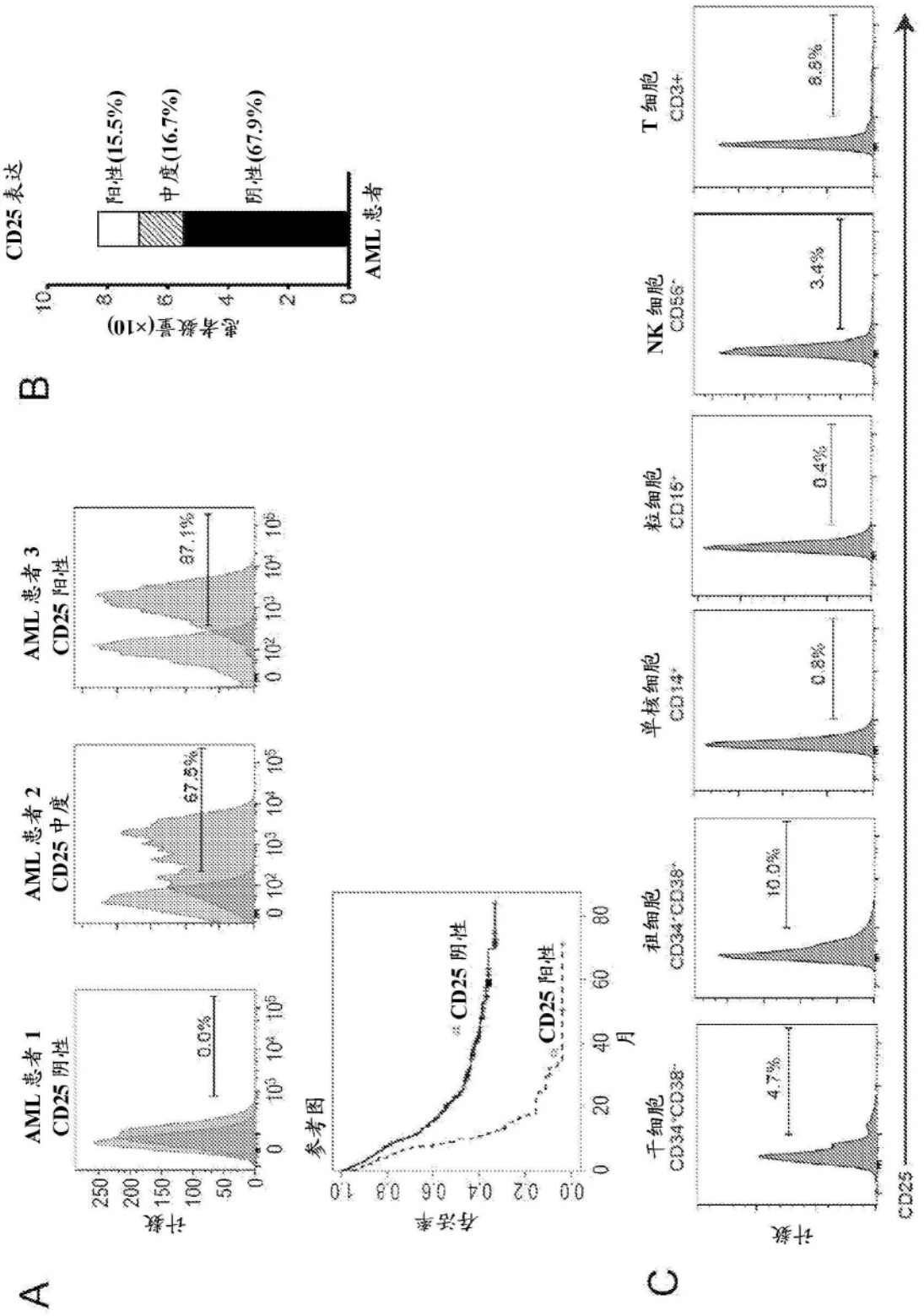

A
AML 患者 1
CD25 阴性
0.0%
AML 患者 2
CD25 中度
67.8%
AML 患者 3
CD25 阳性
87.1%
计数
CD25
参考图
存活率
月
CD25 阴性
CD25 阳性
B
CD25 表达
阳性(15.5%)
中度(16.7%)
阴性(67.9%)
AML 患者
细胞数量(×10)
C
干细胞
CD34+CD38-
4.7%
祖细胞
CD34+CD38+
10.0%
单核细胞
CD14+
0.8%
粒细胞
CD15+
0.4%
NK 细胞
CD56+
3.4%
T 细胞
CD3+
8.8%

图1

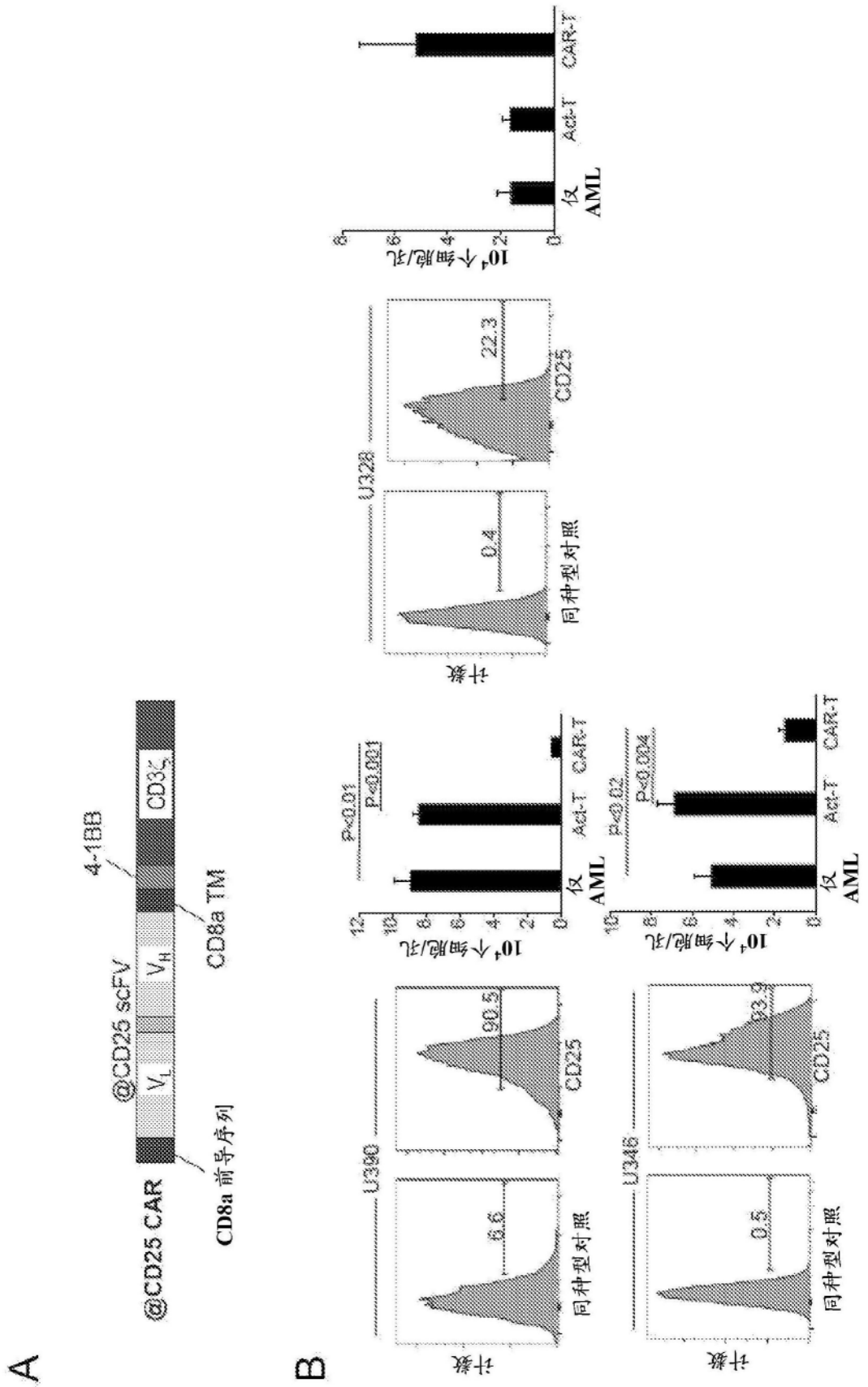

A
@CD25 CAR
CD8a 前导序列
@CD25 scFV
V_L
V_H
CD8a TM
4-1BB
CD3ζ
B
计数
同种型对照
U390
6.6
90.5
CD25
U346
0.5
93.9
P<0.01
P<0.001
P<0.02
P<0.004
10^4 个细胞/孔
仅 AML
Act-T
CAR-T
U328
0.4
22.3

图2

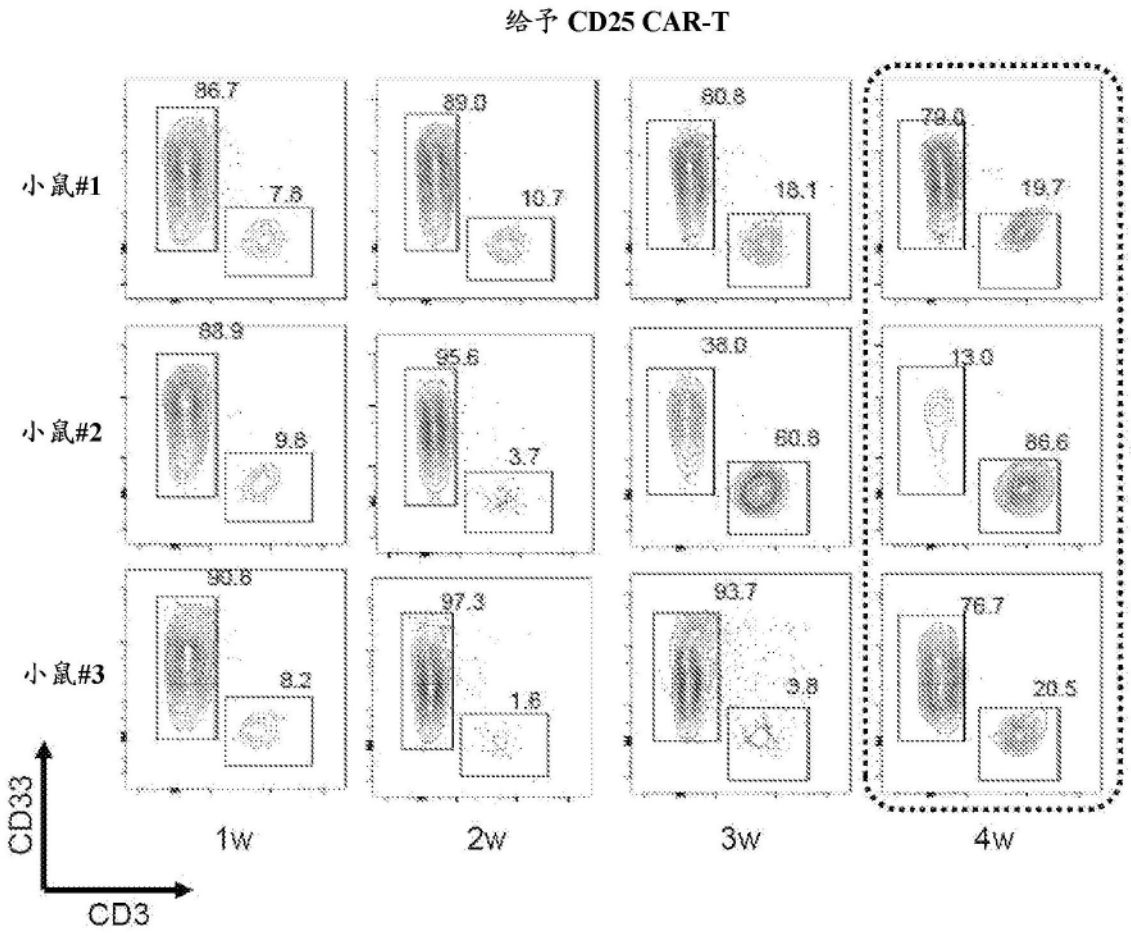

给予 CD25 CAR-T
小鼠#1
小鼠#2
小鼠#3
86.7
7.6
89.0
10.7
80.8
18.1
78.0
19.7
88.9
9.8
95.6
3.7
38.0
60.8
13.0
86.6
90.8
8.2
97.3
1.6
93.7
3.8
76.7
20.5
1w
2w
3w
4w
CD33
CD3

图3

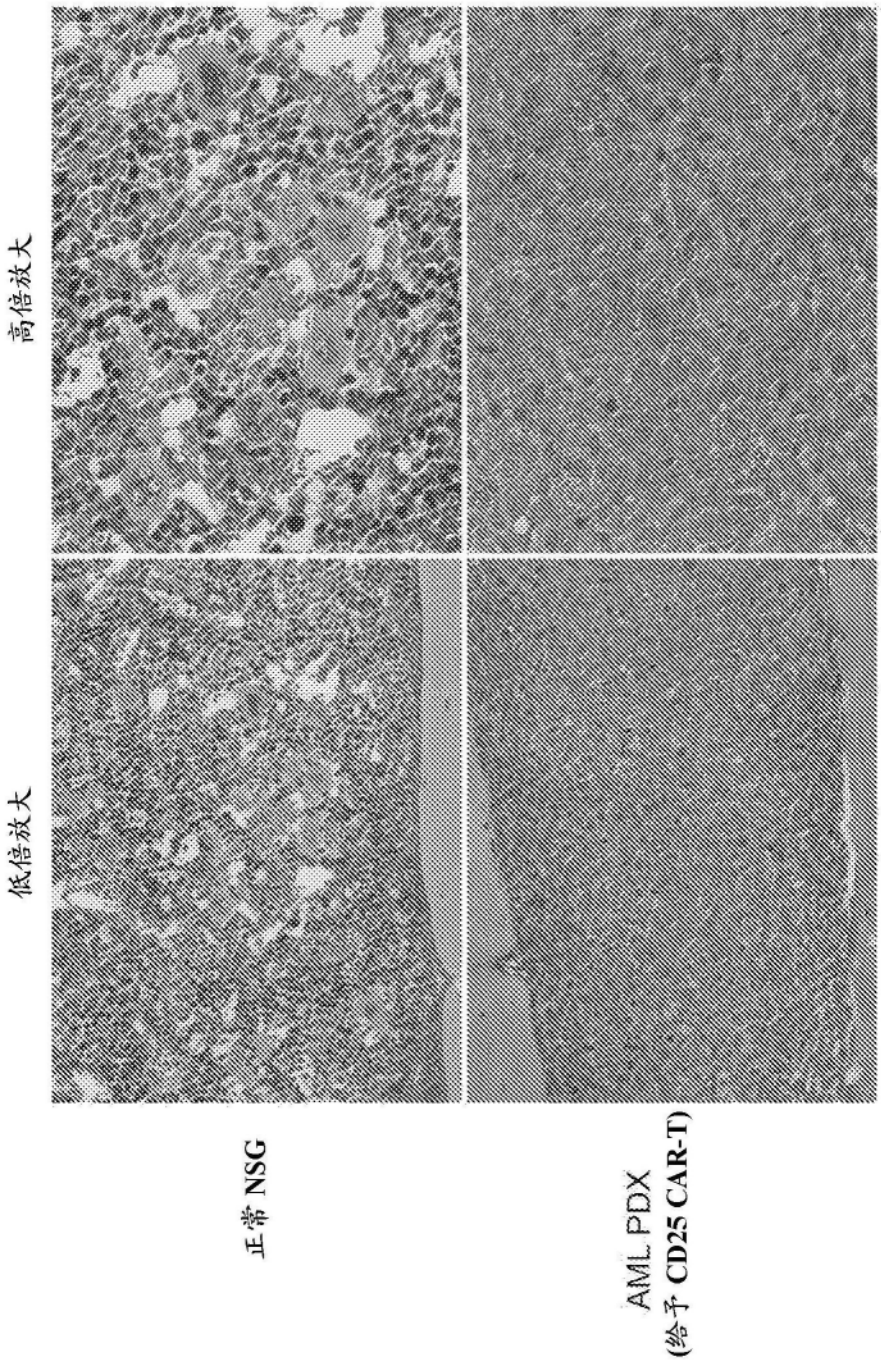


图4

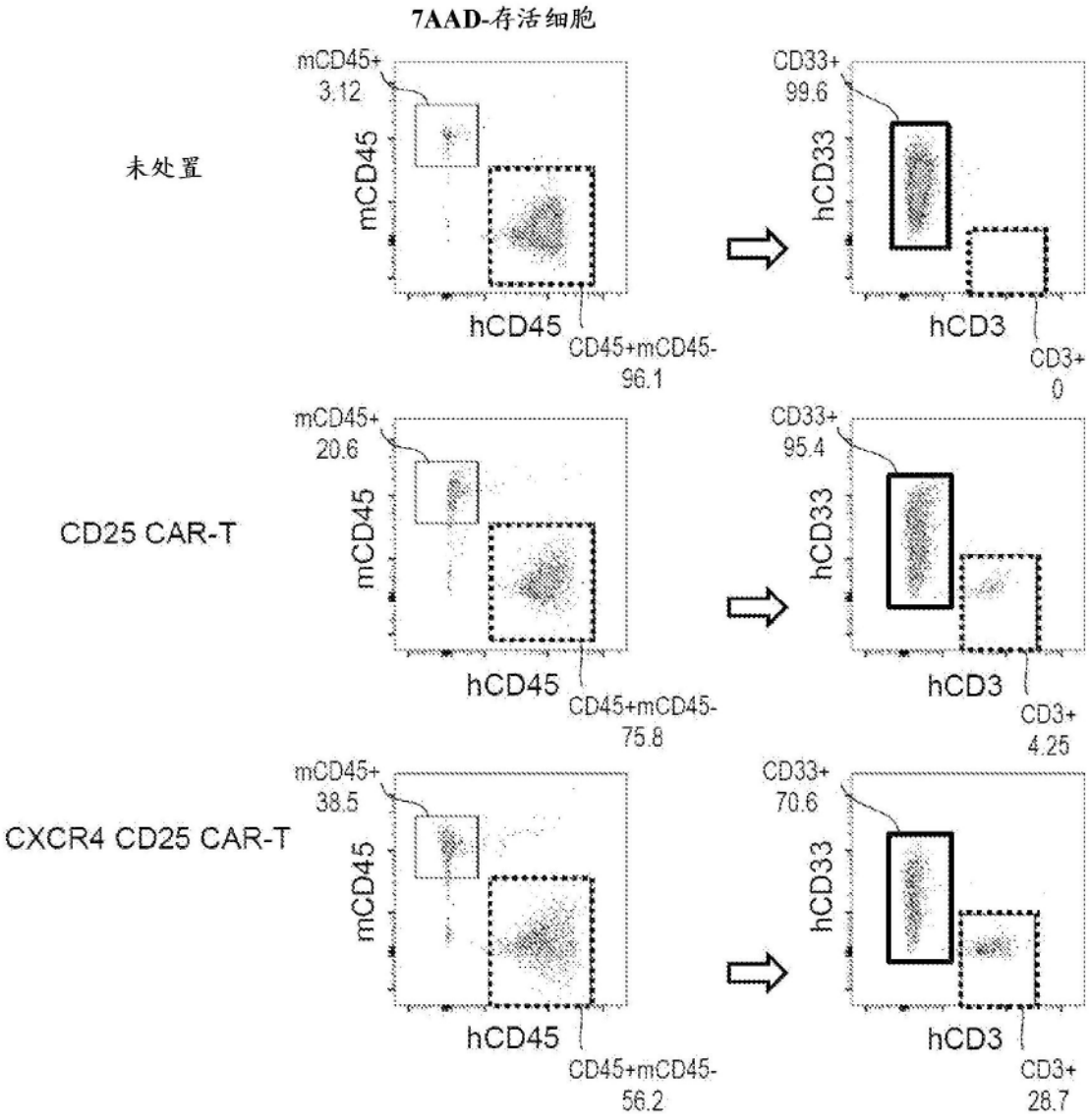

7AAD-存活细胞
未处置
mCD45+
3.12
mCD45
hCD45
CD45+mCD45-
96.1
CD33+
99.6
hCD33
hCD3
CD3+
0
CD25 CAR-T
mCD45+
20.6
mCD45
hCD45
CD45+mCD45-
75.8
CD33+
95.4
hCD33
hCD3
CD3+
4.25
CXCR4 CD25 CAR-T
mCD45+
38.5
mCD45
hCD45
CD45+mCD45-
56.2
CD33+
70.6
hCD33
hCD3
CD3+
28.7

图5-1

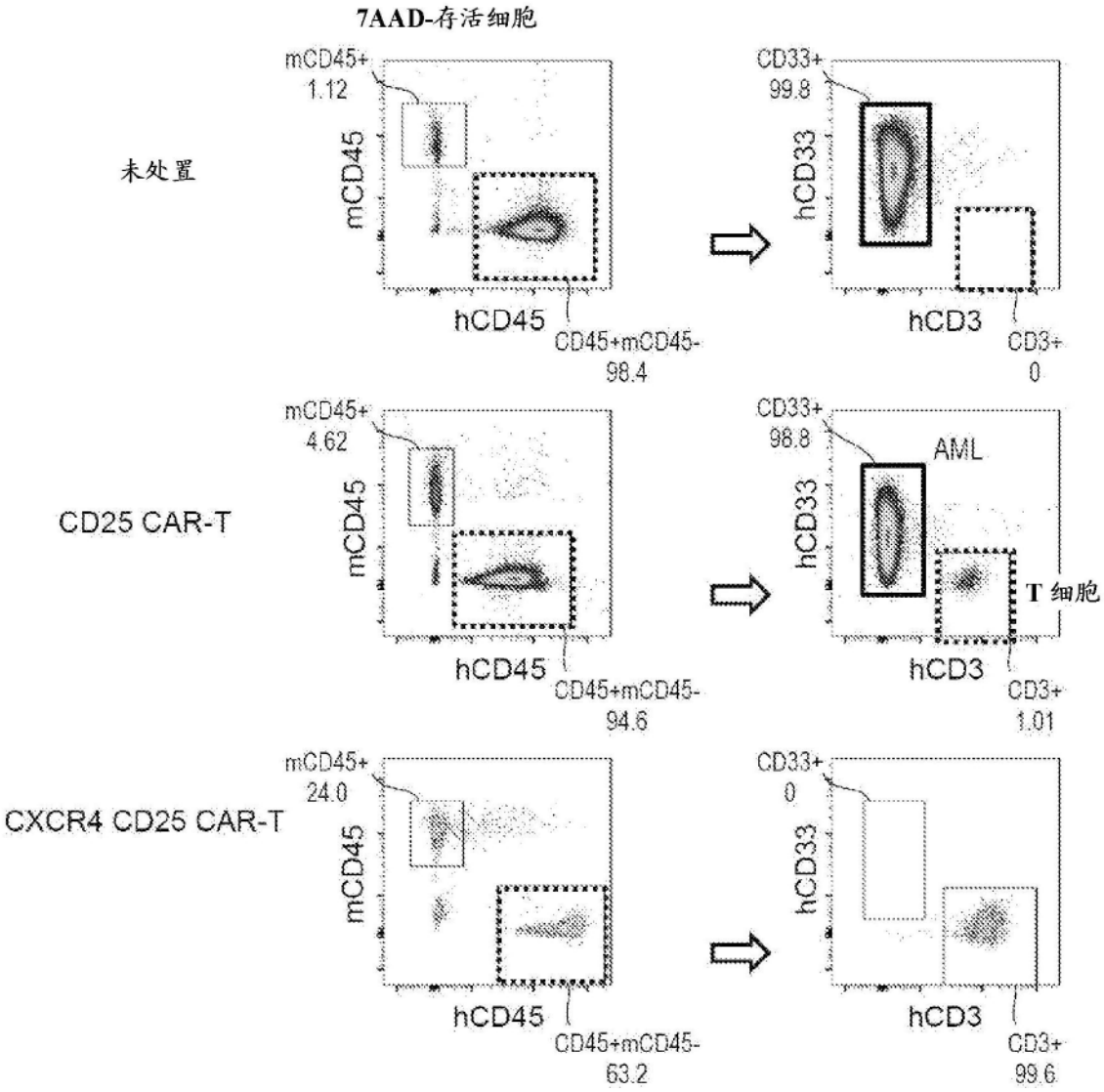

7AAD-存活细胞
未处置
mCD45+
1.12
mCD45
hCD45
CD45+mCD45-
98.4
CD33+
99.8
hCD33
hCD3
CD3+
0
CD25 CAR-T
mCD45+
4.62
mCD45
hCD45
CD45+mCD45-
94.6
CD33+
98.8
AML
hCD33
T 细胞
hCD3
CD3+
1.01
CXCR4 CD25 CAR-T
mCD45+
24.0
mCD45
hCD45
CD45+mCD45-
63.2
CD33+
0
hCD33
hCD3
CD3+
99.6

图5-2

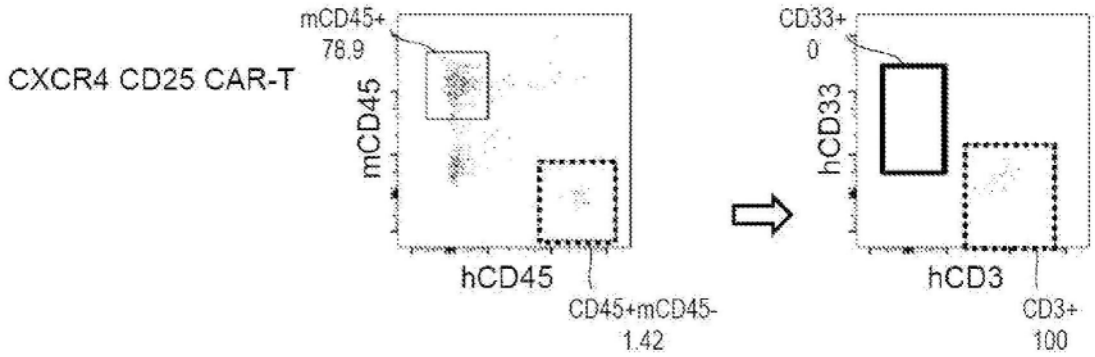

CXCR4 CD25 CAR-T
mCD45+
78.9
mCD45
hCD45
CD45+mCD45-
1.42
CD33+
0
hCD33
hCD3
CD3+
100

图5-3

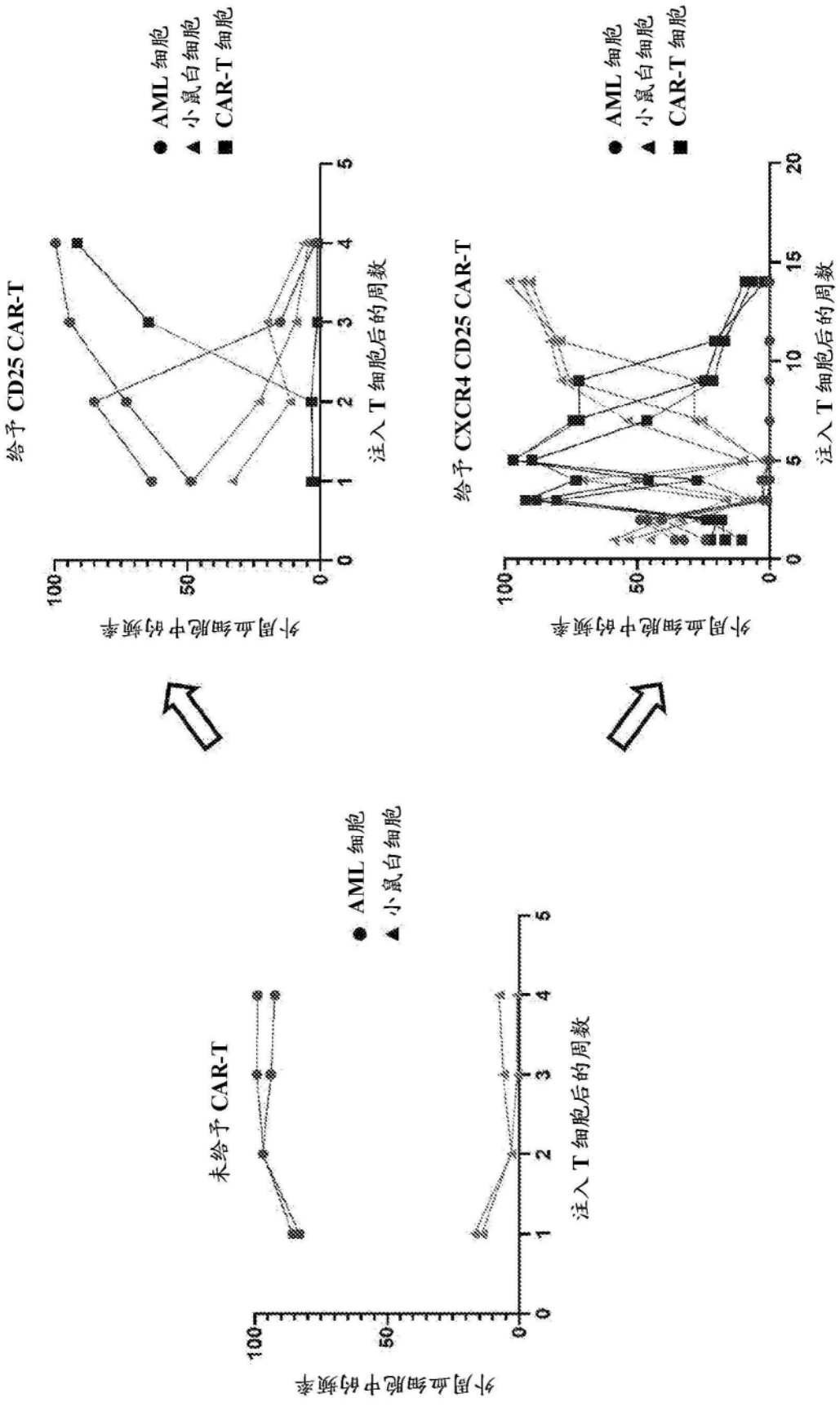

未给予 CAR-T
给予 CD25 CAR-T
给予 CXCR4 CD25 CAR-T
● AML 细胞
▲ 小鼠白细胞
■ CAR-T 细胞
外周血细胞中的频率
注入 T 细胞后的周数
0
50
100
0
1
2
3
4
5
0
5
10
15
20

图6

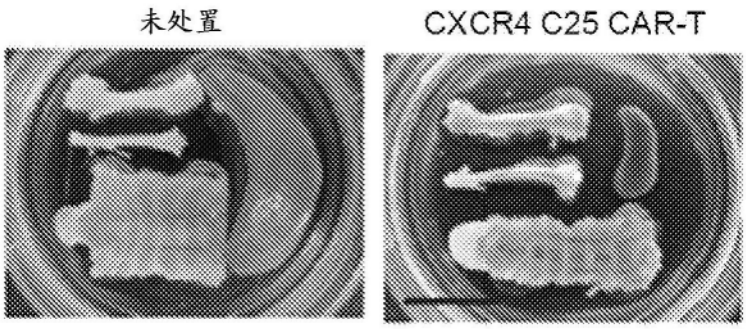


图7

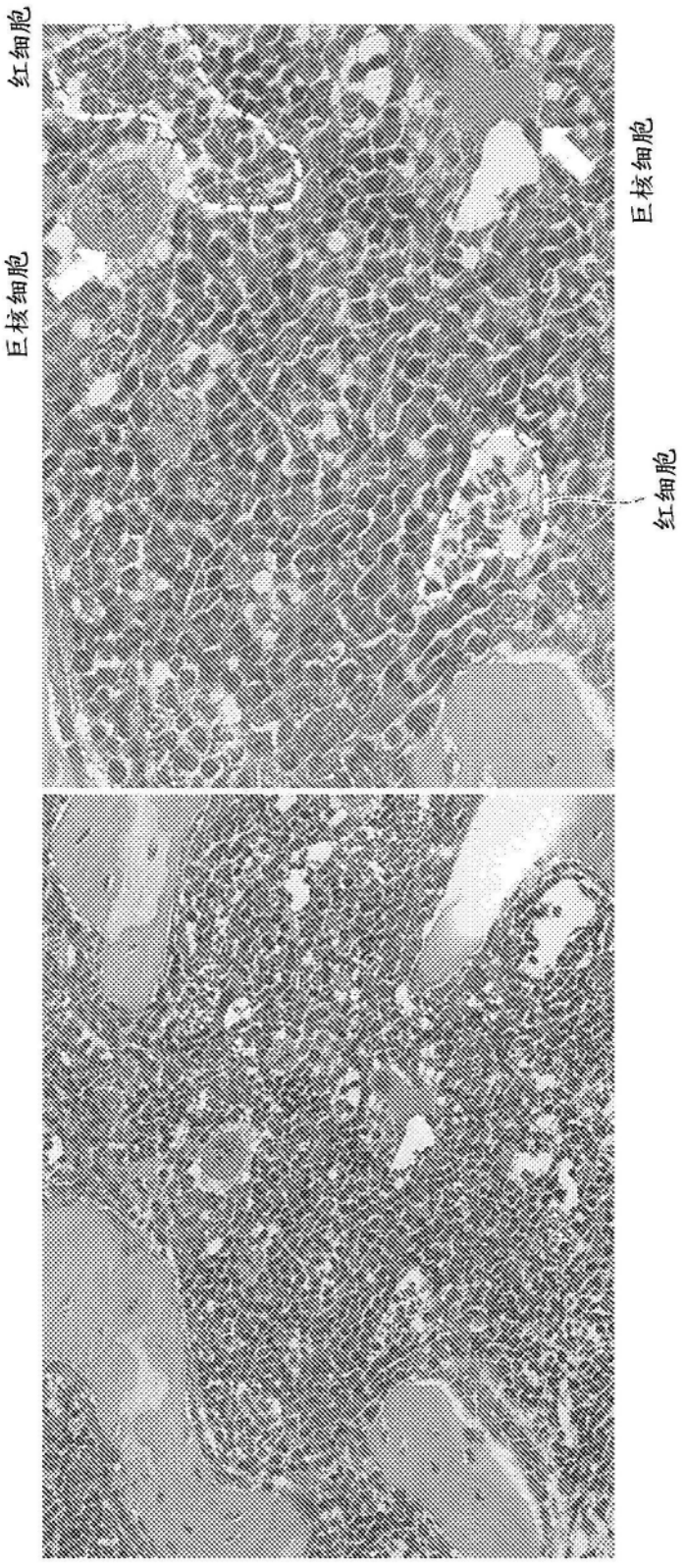


图8

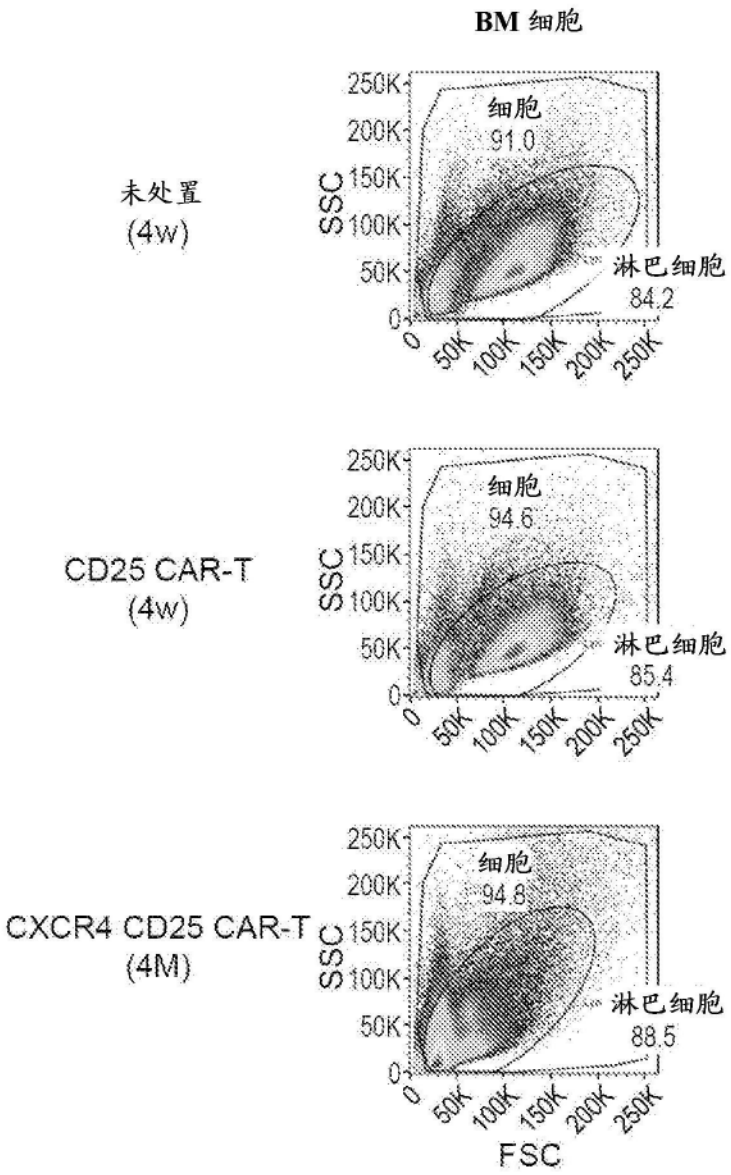

BM 细胞
未处置
(4w)
CD25 CAR-T
(4w)
CXCR4 CD25 CAR-T
(4M)
SSC
FSC
250K
200K
150K
100K
50K
0
细胞
91.0
淋巴细胞
84.2
细胞
94.6
淋巴细胞
85.4
细胞
94.8
淋巴细胞
88.5

图9-1

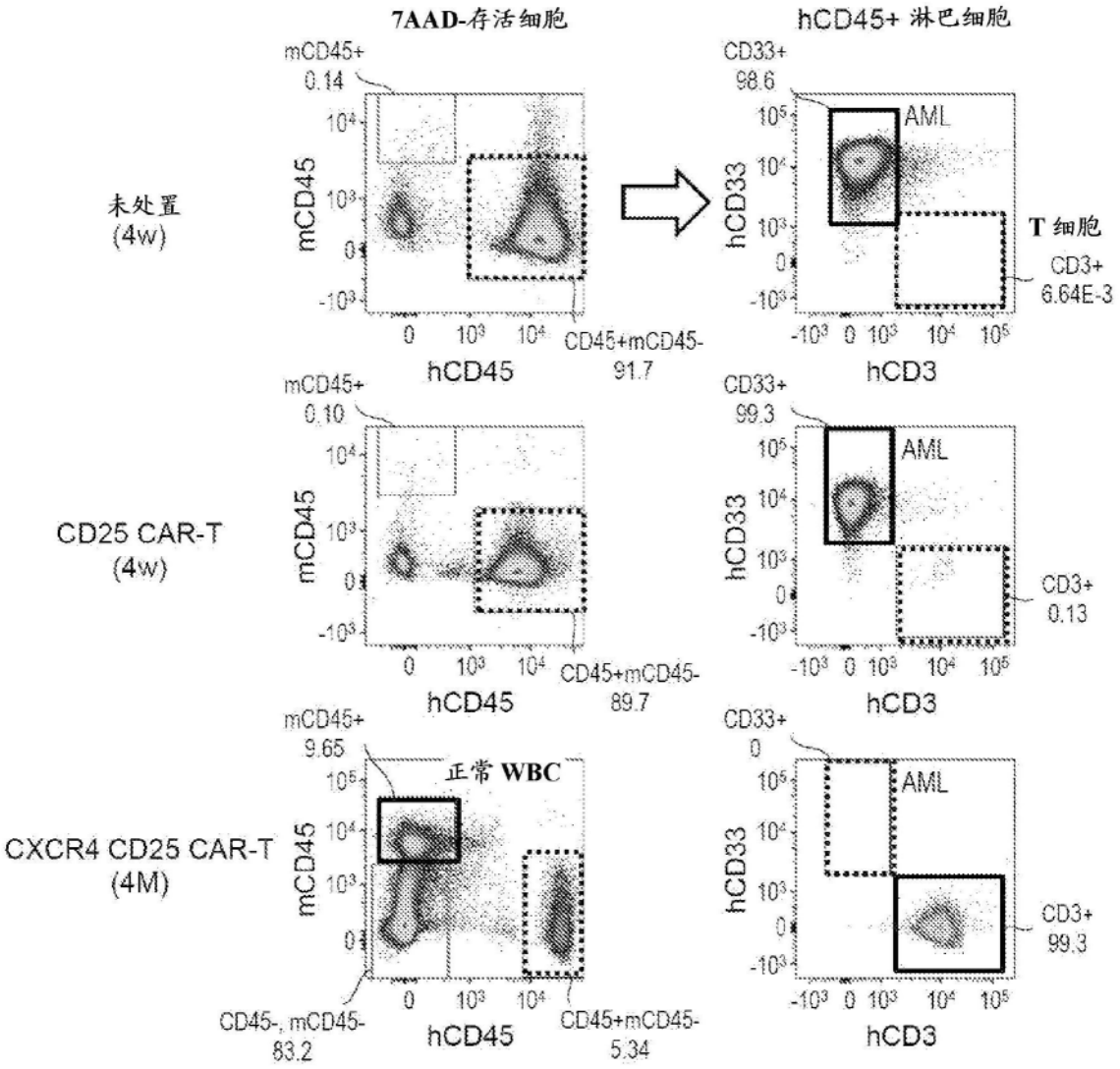

7AAD-存活细胞
hCD45+ 淋巴细胞
未处置
(4w)
CD25 CAR-T
(4w)
CXCR4 CD25 CAR-T
(4M)
mCD45+
0.14
mCD45
hCD45
CD45+mCD45-
91.7
CD33+
98.6
hCD33
AML
T 细胞
CD3+
6.64E-3
hCD3
mCD45+
0.10
CD45+mCD45-
89.7
CD33+
99.3
CD3+
0.13
mCD45+
9.65
正常 WBC
CD45-, mCD45-
83.2
CD45+mCD45-
5.34
CD33+
0
CD3+
99.3

图9-2

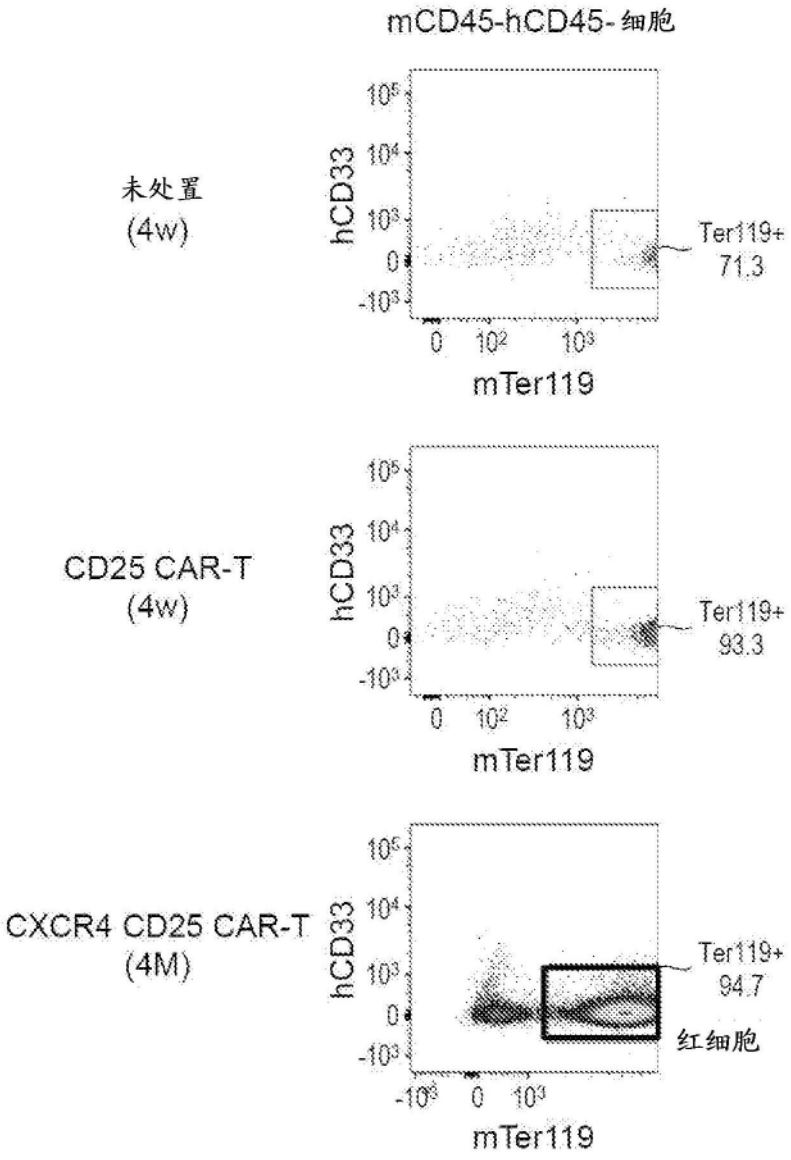

mCD45-hCD45-细胞
未处置
(4w)
hCD33
mTer119
Ter119+
71.3
CD25 CAR-T
(4w)
Ter119+
93.3
CXCR4 CD25 CAR-T
(4M)
Ter119+
94.7
红细胞

图9-3

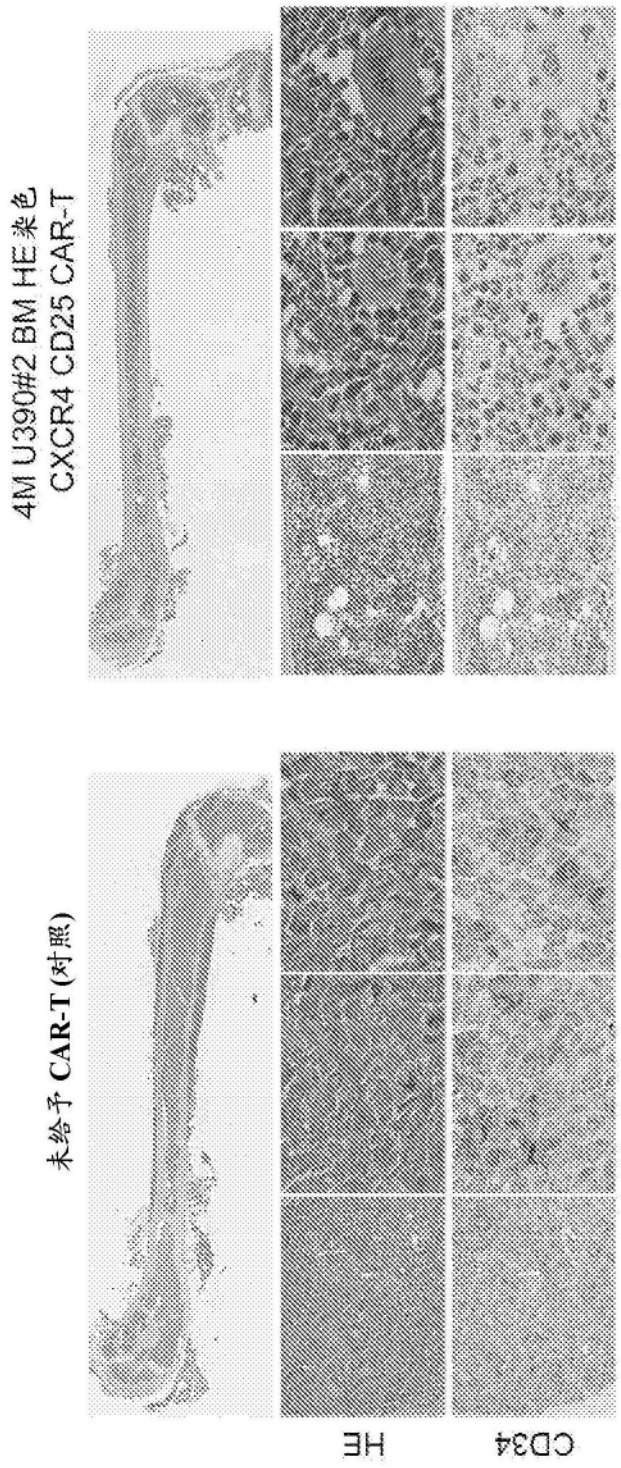


图10

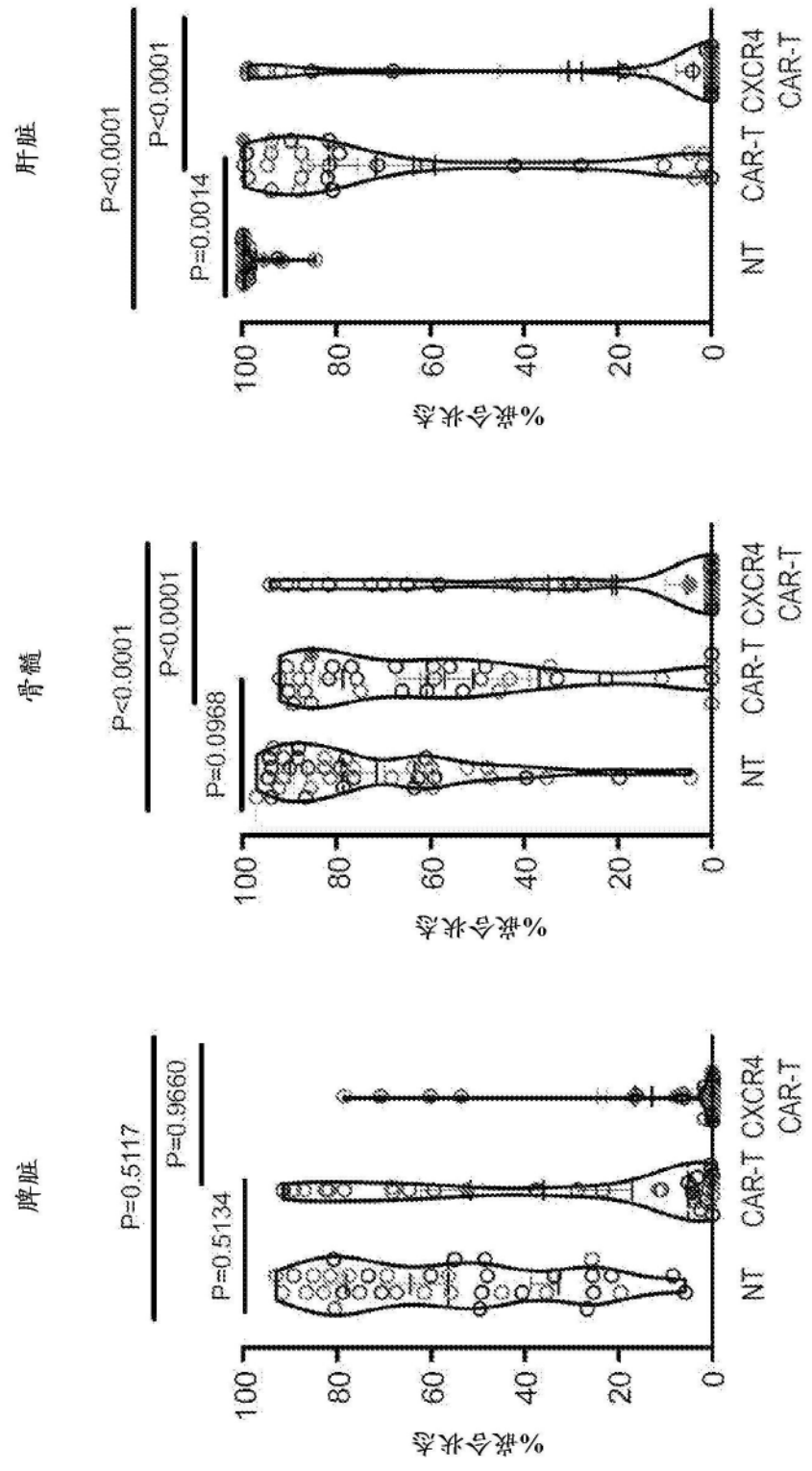

肝脏
P<0.0001
P<0.0001
P=0.0014
%存活状态
100
80
60
40
20
0
NT
CAR-T
CXCR4 CAR-T
骨髓
P<0.0001
P<0.0001
P=0.0968
%存活状态
100
80
60
40
20
0
NT
CAR-T
CXCR4 CAR-T
脾脏
P=0.5117
P=0.9660
P=0.5134
%存活状态
100
80
60
40
20
0
NT
CAR-T
CXCR4 CAR-T

图11-1

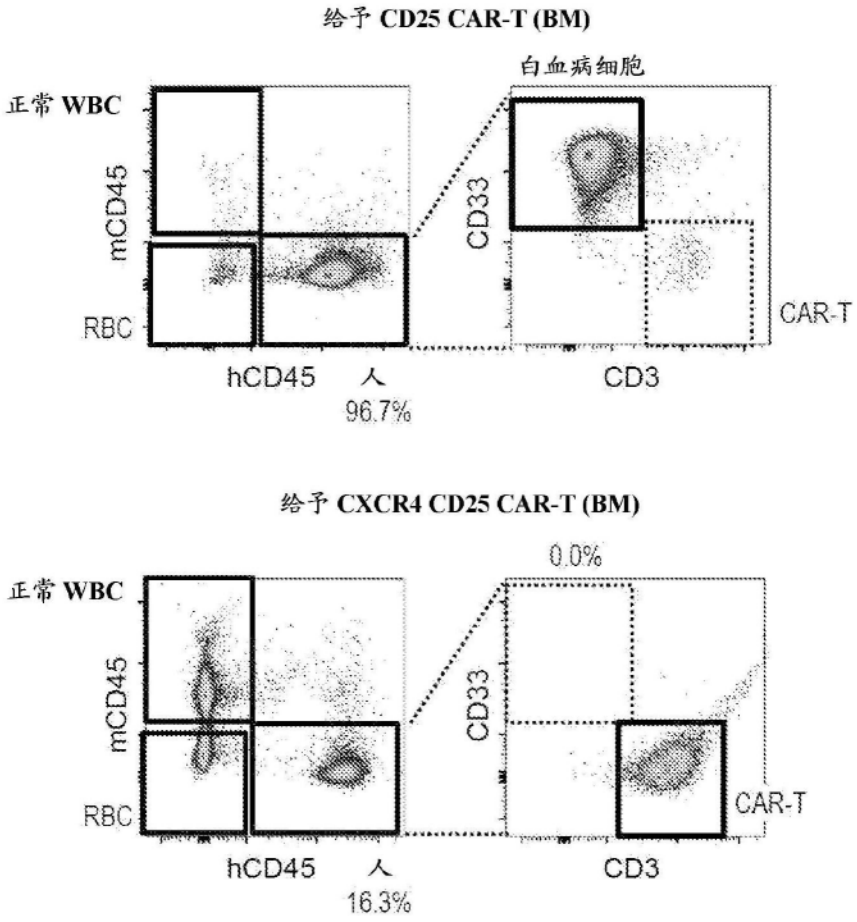

给予 CD25 CAR-T (BM)
白血病细胞
正常 WBC
mCD45
RBC
hCD45
人
96.7%
CD33
CD3
CAR-T
给予 CXCR4 CD25 CAR-T (BM)
0.0%
正常 WBC
mCD45
RBC
hCD45
人
16.3%
CD33
CD3
CAR-T

图11-2

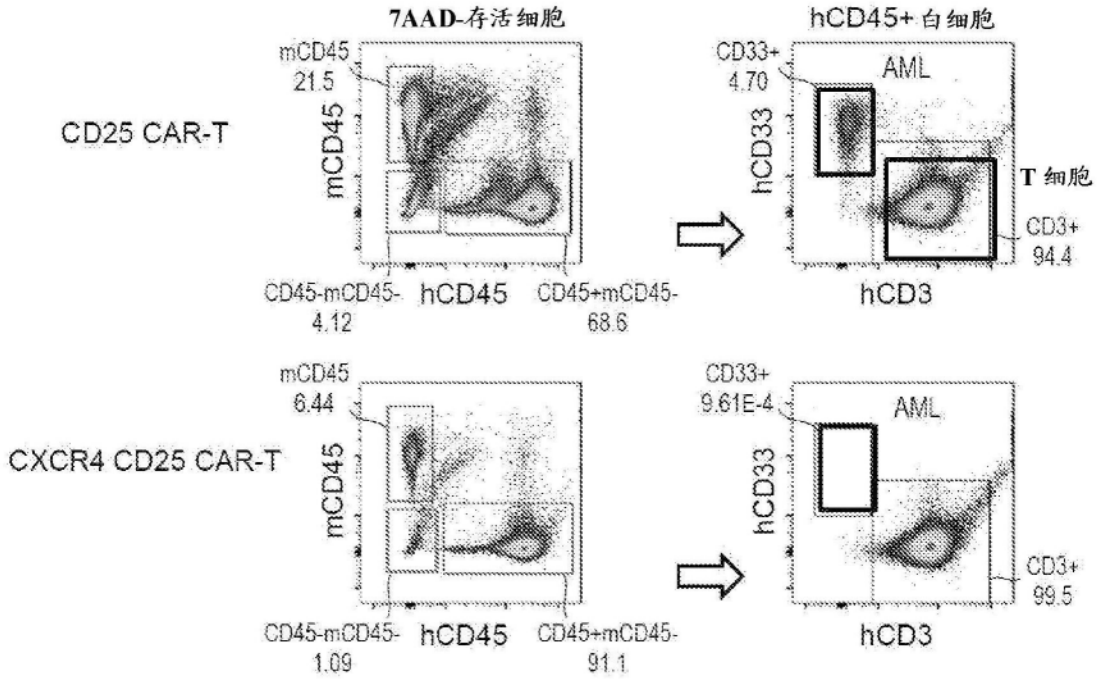

7AAD-存活细胞
hCD45+白细胞
CD25 CAR-T
mCD45
21.5
mCD45
CD45-mCD45-
4.12
hCD45
CD45+mCD45-
68.6
CD33+
4.70
AML
hCD33
T细胞
CD3+
94.4
hCD3
CXCR4 CD25 CAR-T
mCD45
6.44
mCD45
CD45-mCD45-
1.09
hCD45
CD45+mCD45-
91.1
CD33+
9.61E-4
AML
hCD33
CD3+
99.5
hCD3

图12

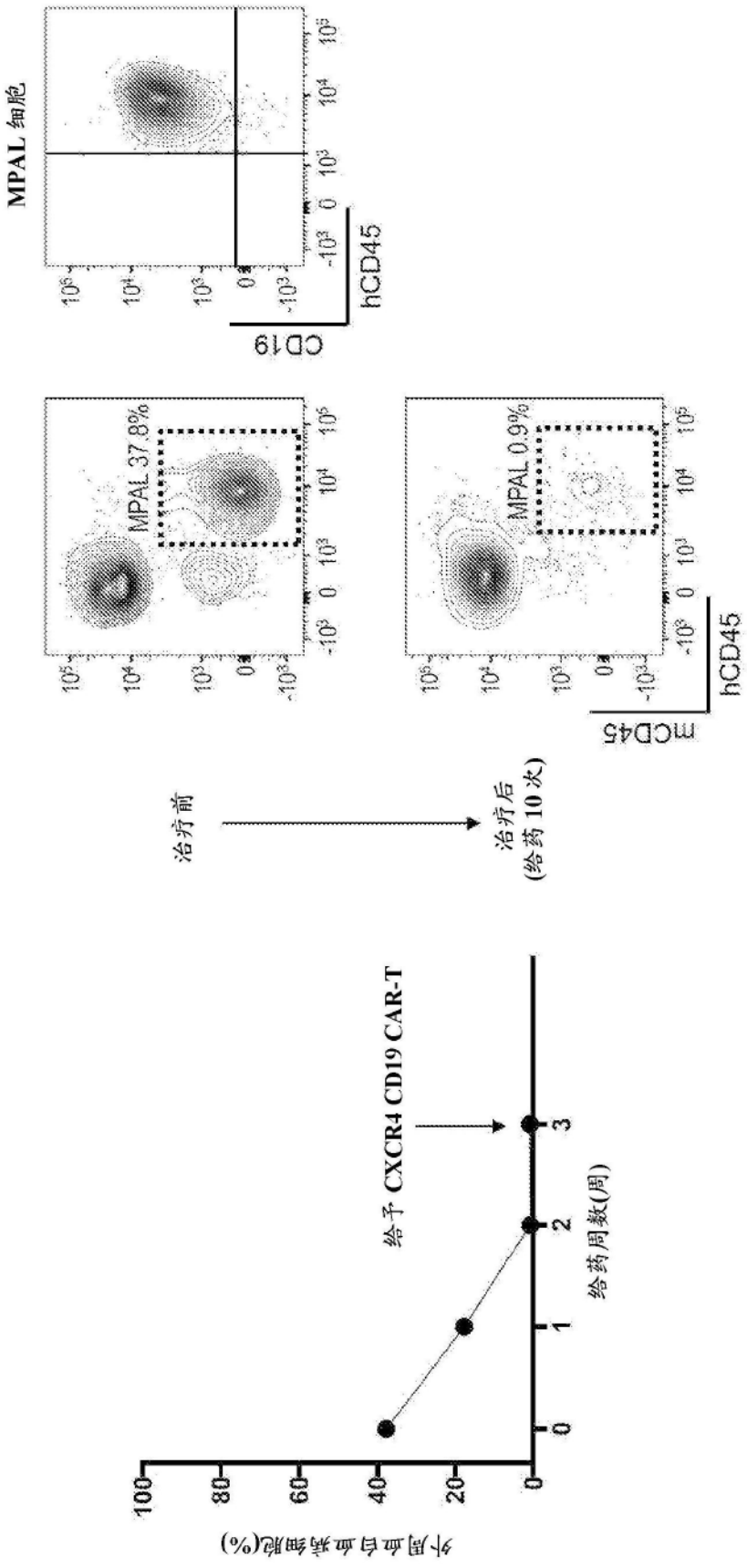

外周血白血病细胞(%)
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
给药周数(周)
给予 CXCR4 CD19 CAR-T
治疗前
治疗后
(给药 10 次)
MPAL 细胞
CD19
hCD45
MPAL 37.8%
MPAL 0.9%
mCD45
hCD45

图13-1

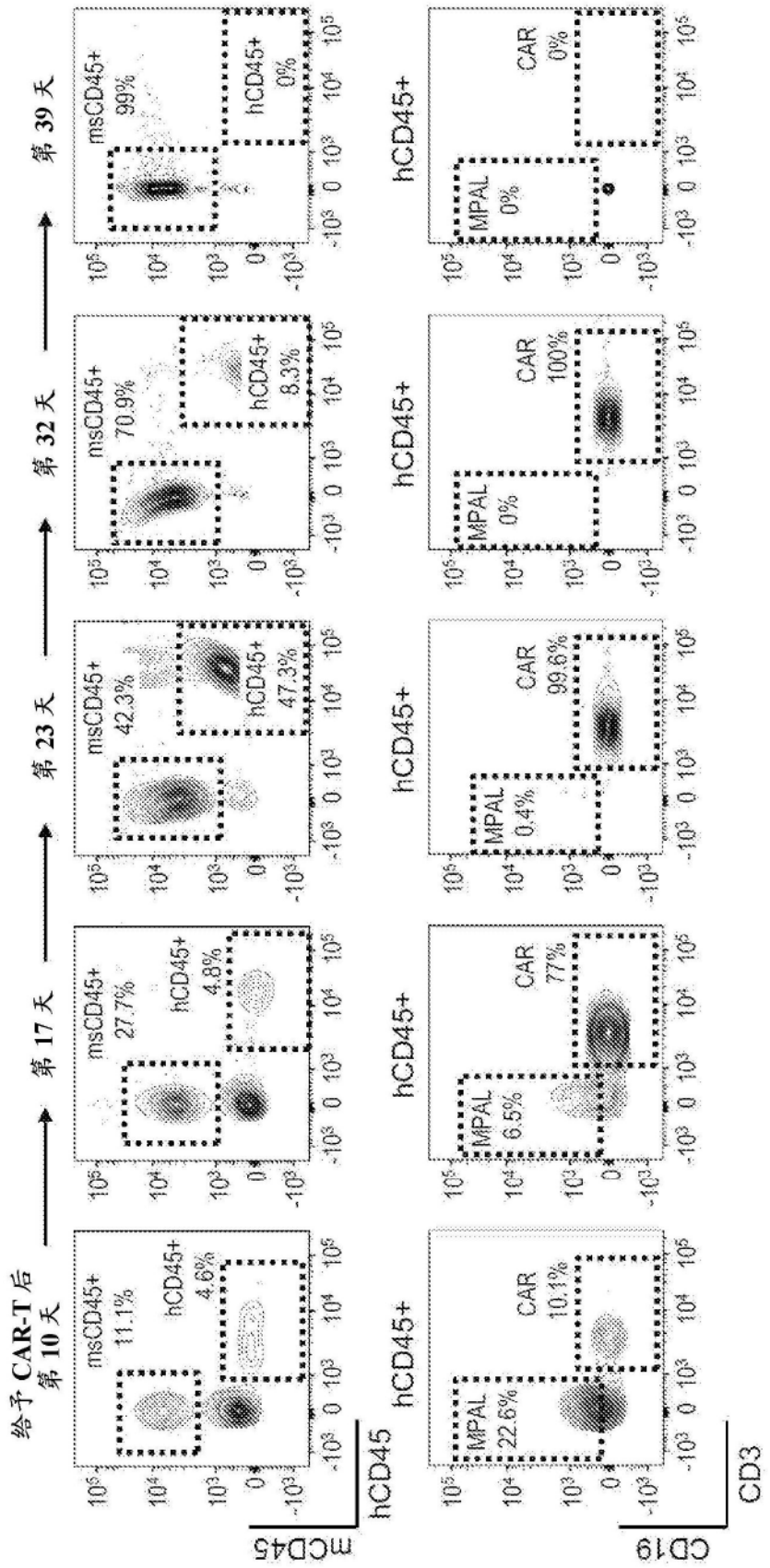

给予 CAR-T 后
第 10 天
第 17 天
第 23 天
第 32 天
第 39 天
msCD45+
11.1%
hCD45+
4.6%
msCD45+
27.7%
hCD45+
4.8%
msCD45+
42.3%
hCD45+
47.3%
msCD45+
70.9%
hCD45+
8.3%
msCD45+
99%
hCD45+
0%
MPAL
22.6%
CAR
10.1%
MPAL
6.5%
CAR
77%
MPAL
0.4%
CAR
99.6%
MPAL
0%
CAR
100%
MPAL
0%
CAR
0%
hCD45+
hCD45+
hCD45+
hCD45+
hCD45+
hCD45+
hCD45+
hCD45+
hCD45+
hCD45+
hCD45
CD3
CD19

图13-2

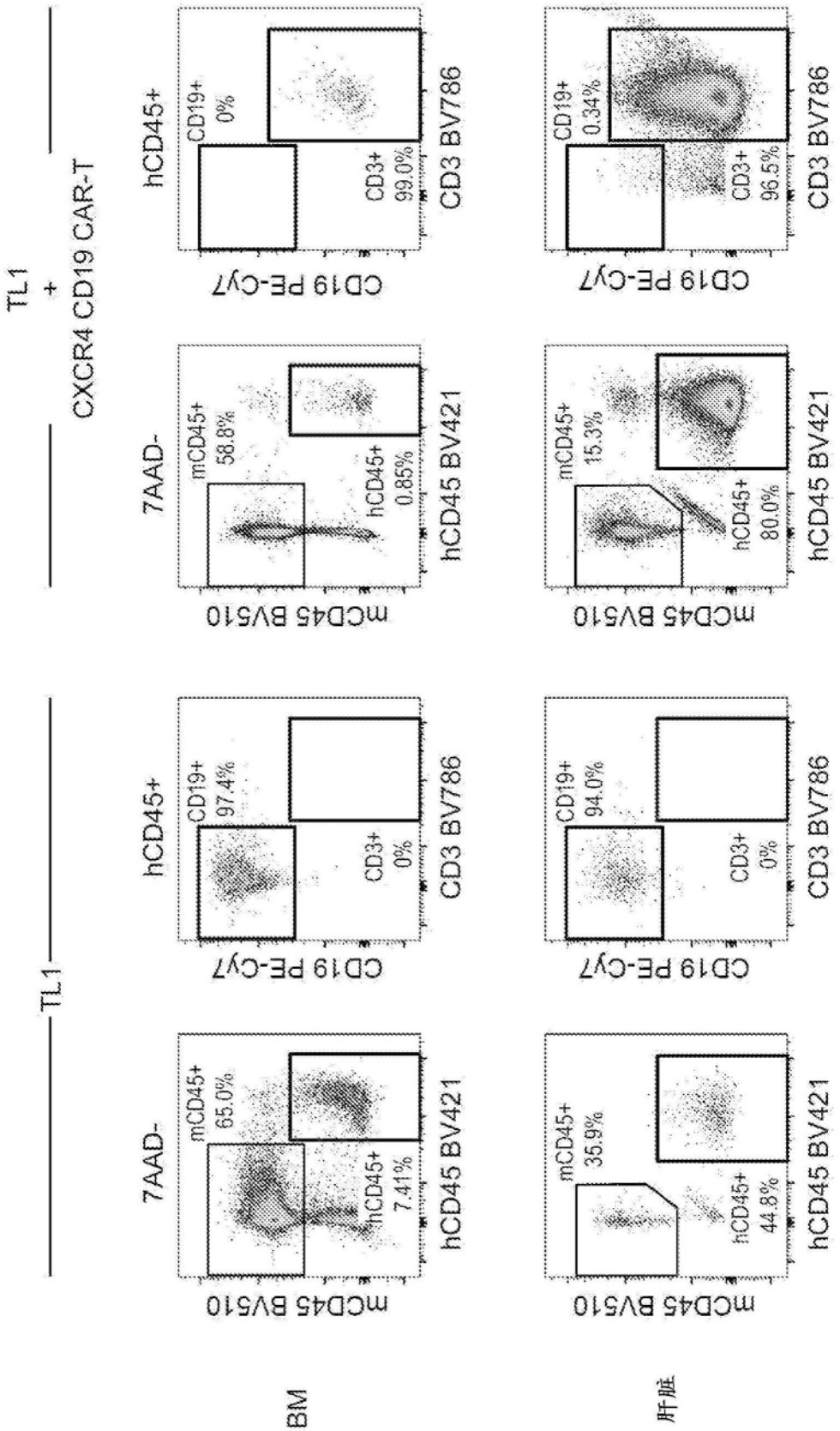

TL1
TL1
+
CXCR4 CD19 CAR-T
BM
肝脏
7AAD-
mCD45+
65.0%
hCD45+
7.41%
mCD45 BV510
hCD45 BV421
hCD45+
CD19+
97.4%
CD3+
0%
CD19 PE-Cy7
CD3 BV786
7AAD-
mCD45+
58.8%
hCD45+
0.85%
mCD45 BV510
hCD45 BV421
hCD45+
CD19+
0%
CD3+
99.0%
CD19 PE-Cy7
CD3 BV786
mCD45+
35.9%
hCD45+
44.8%
mCD45 BV510
hCD45 BV421
CD19+
94.0%
CD3+
0%
CD19 PE-Cy7
CD3 BV786
mCD45+
15.3%
hCD45+
80.0%
mCD45 BV510
hCD45 BV421
CD19+
0.34%
CD3+
96.5%
CD19 PE-Cy7
CD3 BV786

图14