



(10) 申请公布号 CN 118510888 A

(43) 申请公布日 2024.08.16

(21) 申请号 202280088123.8

(22) 申请日 2022.11.14

(30) 优先权数据

63/278,447 2021.11.11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.07.08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/079843 2022.11.14

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2023/087009 EN 2023.05.19

(71) 申请人 加拿大干细胞技术公司

地址 加拿大

(72) 发明人 M·F·马洛尼 E·I·奥扎伊

S·M·洛赫德 R·J·希尔弗

A·布拉特 M·希尔瓦

J·B·吉尔伯特 D·布里根

C·J·查尔霍弗

(74) 专利代理机构 北京市铸成律师事务所

11313

专利代理师 陈艳娟 王艳波

(51) Int.Cl.

C12N 5/0783 (2006.01)

C12M 1/42 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

A61K 35/17 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C12N 5/0781 (2006.01)

A61K 35/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

权利要求书2页 说明书55页
序列表(电子公布) 附图81页

(54) 发明名称

通过微流体递送来产生增强的肿瘤浸润性
淋巴细胞的方法

(57) 摘要

本申请提供了TIL,其包含增强所述TIL的活性和/或增殖能力的剂;制造此类TIL的方法;以及使用此类经修饰的TIL来增强免疫应答的方法。

1. 一种增加肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)上的颗粒酶B表达的方法,其包括:(a)修饰所述TIL以增加以下的表达:(i)共刺激分子、(ii)细胞因子,或(ii)共刺激分子和细胞因子两者;以及(b)在不存在外源细胞因子的情况下培养所述TIL,其中在所述修饰和所述培养之后,与尚未经修饰的相应TIL(参考TIL)相比,所述TIL在活化后表现出颗粒酶B表达增加。

2. 一种增加肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)上的颗粒酶B表达的方法,其包括在不存在外源细胞因子的情况下培养所述TIL,其中所述TIL已被修饰以增加以下的表达:(i)共刺激分子、(ii)细胞因子,或(iii)共刺激分子和细胞因子两者,并且其中在所述培养之后,与尚未经修饰的相应TIL(参考TIL)相比,所述TIL在活化后表现出增殖增加。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其中与所述参考TIL相比,所述颗粒酶B表达增加至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约4.5倍、至少约5倍、至少约5.5倍、至少约6倍、至少约6.5倍、至少约7倍、至少约7.5倍、至少约8倍、至少约8.5倍、至少约9倍、至少约9.5倍或至少约10倍。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述培养持续至少约一天、至少约两天或至少约三天。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述共刺激分子是CD86。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述细胞因子包括膜结合性IL-2、膜结合性IL-12或两者。

7. 如1和3至6所述的方法,其中所述修饰包括使包含所述TIL的细胞悬液通过细胞变形缩窄结构,从而引起所述TIL的扰动,以使得编码所述共刺激分子的核酸和/或编码所述细胞因子的核酸在与所述TIL接触时通过所述扰动进入所述TIL。

8. 如权利要求7所述的方法,其中所述修饰还包括使所述TIL与编码所述共刺激分子的所述核酸和/或编码所述细胞因子的所述核酸接触。

9. 如权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述TIL通过以下方式来修饰:使包含输入TIL的细胞悬液通过细胞变形缩窄结构,从而引起所述输入TIL的扰动,以使得编码所述共刺激分子的核酸和/或编码所述细胞因子的核酸在与所述TIL接触时进入所述输入TIL,其中在编码所述共刺激分子的核酸和/或编码所述细胞因子的核酸之后,所述输入TIL表现出所述共刺激分子和/或所述细胞因子的表达增加,从而成为已经经修饰的所述TIL。

10. 如权利要求9所述的方法,其还包括使所述细胞悬液与编码所述共刺激分子的所述核酸和/或编码所述细胞因子的所述核酸接触。

11. 如权利要求10所述的方法,其中在使所述细胞悬液通过所述细胞变形缩窄结构之前,使所述细胞悬液与编码所述共刺激分子的所述核酸和/或编码所述细胞因子的所述核酸接触。

12. 如权利要求10或11所述的方法,其中在使所述细胞悬液通过所述细胞变形缩窄结构期间,使所述细胞悬液与编码所述共刺激分子的所述核酸和/或编码所述细胞因子的所述核酸接触。

13. 如权利要求10至12中任一项所述的方法,其中在使所述细胞悬液通过所述细胞变形缩窄结构期间,使所述细胞悬液与编码所述共刺激分子的所述核酸和/或编码所述细胞因子的所述核酸接触。

14. 如权利要求1至13中任一项所述的方法,其中编码所述共刺激分子的所述核酸和/

或编码所述细胞因子的所述核酸是mRNA。

15. 如权利要求7至14中任一项所述的方法,其中所述细胞变形缩窄结构具有的宽度为所述TIL的平均直径的约10%至约99%。

16. 如权利要求15所述的方法,其中所述细胞变形缩窄结构具有的宽度为输入TIL的平均直径的约10%至约99%。

17. 如权利要求16所述的方法,其中所述缩窄结构的宽度为约3.5 μm 至约4.2 μm 、或约3.5 μm 至约4.8 μm 、或约3.5 μm 至约6 μm 、或约5 μm 至约12 μm 、或约12 μm 至约15 μm 、或约6 μm 至约12 μm 、或约8 μm 至约11 μm 或约9 μm 至约11 μm 。

18. 如权利要求16或17所述的方法,其中所述缩窄结构的宽度为约3 μm 至约5 μm 。

19. 如权利要求18所述的方法,其中所述缩窄结构的宽度为约4 μm 。

通过微流体递送来产生增强的肿瘤浸润性淋巴细胞的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本PCT申请要求2021年11月11日提交的美国临时申请63/278,447的优先权权益,该临时申请以引用的方式整体并入本文。通过EFS WEB以电子方式提交的序列表的引用

[0003] 本申请中以电子方式提交的序列表(4821_079PC04_Seqlisting_S T26.xml;大小:20,165字节;创建日期:2022年11月9日)的内容以引用的方式整体并入本文。

技术领域

[0004] 本公开整体涉及TIL,其包含增强所述TIL的活性和/或增殖能力的剂;制造此类TIL的方法;以及使用此类经修饰的TIL来增强免疫应答的方法。

背景技术

[0005] 肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)疗法的开发面临着各种挑战。虽然TIL疗法已经在患者中显示出显著的实体瘤活性,但是目前的TIL组合物需要进行患者淋巴细胞清除并且在细胞输注后维持高剂量IL-2以支持临床活性。使用mRNA对TIL产品进行离体工程化可以增强效力、扩大潜在患者群体并且可能允许用于重复给药以及与其他疗法一起进行的伴随治疗。

[0006] 本文引用的所有参考文献,包括专利申请和公布,均以引用的方式整体并入。专利公布W0 2016070136、US20180142198、W02017008063、US20180201889、W0 2019178005和W0 2019178006和W0 2020176789据此明确地以引用的方式整体并入。

发明内容

[0007] 本文提供了一种增加肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)上的颗粒酶B表达的方法,其包括:(a)修饰TIL以增加以下的表达:(i)共刺激分子、(ii)细胞因子,或(ii)共刺激分子和细胞因子两者;以及(b)在不存在外源细胞因子的情况下培养TIL,其中在修饰和培养之后,与尚未经修饰的相应TIL(参考TIL)相比,TIL在活化后表现出颗粒酶B表达增加。

[0008] 本公开还提供了一种增加肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)上的颗粒酶B表达的方法,其包括在不存在外源细胞因子的情况下培养TIL,其中TIL已被修饰以增加以下的表达:(i)共刺激分子、(ii)细胞因子,或(iii)共刺激分子和细胞因子两者,并且其中在培养之后,与尚未经修饰的相应TIL(参考TIL)相比,TIL在活化后表现出增殖增加。

[0009] 在一些方面,与参考TIL相比,颗粒酶B表达增加至少约1.5倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约4.5倍、至少约5倍、至少约5.5倍、至少约6倍、至少约6.5倍、至少约7倍、至少约7.5倍、至少约8倍、至少约8.5倍、至少约9倍、至少约9.5倍或至少约10倍。

[0010] 在一些方面,培养持续至少约一天、至少约两天或至少约三天。在一些方面,共刺激分子是CD86。在一些方面,细胞因子包括膜结合性IL-2、膜结合性IL-12或两者。

[0011] 在一些方面,修饰包括使包含TIL的细胞悬液通过细胞变形缩窄结构,从而引起

TIL的扰动,以使得编码共刺激分子的核酸和/或编码细胞因子的核酸在与TIL接触时通过扰动进入TIL。在一些方面,修饰还包括使TIL与编码共刺激分子的核酸和/或编码细胞因子的核酸接触。

[0012] 在一些方面,TIL通过以下方式来修饰:使包含输入TIL的细胞悬液通过细胞变形缩窄结构,从而引起输入TIL的扰动,以使得编码共刺激分子的核酸和/或编码细胞因子的核酸在与TIL接触时进入输入TIL,其中在编码共刺激分子的核酸和/或编码细胞因子的核酸之后,输入TIL表现出共刺激分子和/或细胞因子的表达增加,从而成为已经经修饰的TIL。

[0013] 在一些方面,上述方法还包括使细胞悬液与编码共刺激分子的核酸和/或编码细胞因子的核酸接触。在一些方面,在使细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前,使细胞悬液与编码共刺激分子的核酸和/或编码细胞因子的核酸接触。在一些方面,在使细胞悬液通过细胞变形缩窄结构期间,使细胞悬液与编码共刺激分子的核酸和/或编码细胞因子的核酸接触。在一些方面,在使细胞悬液通过细胞变形缩窄结构期间,使细胞悬液与编码共刺激分子的核酸和/或编码细胞因子的核酸接触。

[0014] 在一些方面,编码共刺激分子的核酸和/或编码细胞因子的核酸是mRNA。

[0015] 在一些方面,细胞变形缩窄结构具有的宽度为TIL的平均直径的约10%至约99%。在一些方面,细胞变形缩窄结构具有的宽度为输入TIL的平均直径的约10%至约99%。在一些方面,缩窄结构的宽度为约3.5 μm 至约4.2 μm 、或约3.5 μm 至约4.8 μm 、或约3.5 μm 至约6 μm 、或约5 μm 至约12 μm 、或约12 μm 至约15 μm 、或约6 μm 至约12 μm 、或约8 μm 至约11 μm 或约9 μm 至约11 μm 。在一些方面,缩窄结构的宽度为约3 μm 至约5 μm 。在一些方面,缩窄结构的宽度为约4 μm 。

[0016] 在一些方面,本发明提供了一种调节肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的活性和/或增殖能力的方法,其中TIL被修饰以增加一种或多种共刺激分子和/或一种或多种细胞因子的表达。在一些方面,本发明提供了一种调节肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的活性和/或增殖能力的方法,其中TIL被修饰以增加共刺激分子中的一种或多种的表达。在一些实施方案中,共刺激分子是B7-H2(ICOSL)、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、CD70、LIGHT、HVEM、CD40、4-1BBL、OX40L、TL1A、GITRL、CD30L、TIM4、SLAM、CD48、CD58、CD155或CD112。在一些实施方案中,共刺激分子是CD86。在一些方面,本发明提供了一种调节TIL的表型和/或增殖能力的方法,其中TIL被修饰以增加一种或多种细胞因子的表达。

[0017] 在本文所述方法的一些实施方案中,TIL被修饰以包含嵌合型膜结合性细胞因子。在一些实施方案中,嵌合型膜结合性细胞因子是包含细胞因子和跨膜结构域的融合蛋白。在一些实施方案中,细胞因子通过肽接头连接至跨膜结构域。在一些实施方案中,肽接头是(G4S)₃(SEQ ID NO:3)或(EAAAK)₃(SEQ ID NO:4)。在一些实施方案中,细胞因子是I型细胞因子。在一些实施方案中,细胞因子是IL-15、IL-12、IL-2、IFN α 、IFN β 或IL-21或者它们的功能变体。在一些实施方案中,细胞因子是IL-2或其功能变体以及/或者IL-12或其功能变体。在一些实施方案中,嵌合型膜结合性细胞因子包含SEQ ID NO:7-10的氨基酸序列。

[0018] 在本发明的一些实施方案中,经修饰的TIL具有一种或多种细胞因子和/或共刺激分子中的一种或多种的表达增加,其中TIL通过以下方法来制备,所述方法包括:a)使包含输入TIL的细胞悬液通过细胞变形缩窄结构,其中缩窄结构的直径随悬液中的输入TIL的直径而变化,从而使得输入TIL的扰动的大小足以使编码一种或多种细胞因子的一种或多种

核酸和/或编码一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸得以通过,从而形成扰动的输入TIL;和b)将扰动的输入TIL与编码一种或多种细胞因子的一种或多种核酸和/或编码一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸一起孵育,以允许编码一种或多种细胞因子的一种或多种核酸和/或编码一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸进入扰动的输入TIL;其中核酸得以表达,从而产生包含一种或多种细胞因子和/或一种或多种共刺激分子的经修饰的TIL。在本发明的一些实施方案中,经修饰的TIL具有一种或多种细胞因子和/或共刺激分子中的一种或多种的表达增加,其中TIL通过以下方法来制备,所述方法包括:a)使包含输入TIL的细胞悬液通过细胞变形缩窄结构,其中缩窄结构的直径随悬液中的输入TIL的直径而变化,从而使得输入TIL的扰动的大小足以使编码一种或多种细胞因子和/或一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸得以通过,从而形成扰动的输入TIL;并且b)将扰动的输入TIL与编码一种或多种细胞因子和/或一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸一起孵育,以使一种或多种核酸进入扰动的输入TIL;其中核酸得以表达,从而产生包含一种或多种细胞因子和/或一种或多种共刺激分子的经修饰的TIL。在一些实施方案中,方法包括:(a)在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前、期间和/或之后,将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸一起孵育;(b)在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前、期间和/或之后,将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子和共刺激分子的核酸一起孵育;(c)在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前、期间和/或之后,将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸和编码共刺激分子的核酸一起孵育;或者(d)在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前、期间和/或之后,将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸和编码一种或多种共刺激分子的核酸一起孵育。在一些实施方案中,方法包括:(a)在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前,将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸一起孵育;(b)在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前,将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子和共刺激分子的核酸一起孵育;(c)在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前,将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸和编码共刺激分子的核酸一起孵育;或者(d)在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前,将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸和编码一种或多种共刺激分子的核酸一起孵育。在一些实施方案中,核酸中的一种或多种是mRNA。

[0019] 在本发明的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL具有T-bet、EOMES、TCF1和CD62L中的一者或多者的表达增加。在一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,在不存在外源细胞因子的情况下培养时,经修饰的TIL具有T-bet、EOMES、TCF1和CD62L中的一者或多者的表达增加。在一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL中的T-bet、EOMES、TCF1和CD62L中的一者或多者的表达增加超过约1.2倍、1.5倍、1.8倍、2倍、3倍、4倍、5倍、8倍或超过10倍。

[0020] 在本发明的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL具有颗粒酶B的表达增加。在一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,在不存在外源细胞因子的情况下培养时,经修饰的TIL具有颗粒酶B的表达增加。在一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,在不存在外源细胞因子的情况下与肿瘤细胞共培养时,经修饰的TIL具有颗粒酶B的表达增加。在一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL中的颗粒酶B的表达增加约1.2倍、1.5倍、1.8倍、2倍、3倍、4倍、5倍、8倍、或10倍或更多。

[0021] 在一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL表现出增殖增加。在

一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,在不包含外源细胞因子的培养基中培养时,经修饰的TIL表现出增殖增加。在一些实施方案中,外源细胞因子是IL-2和/或IL-12;任选地其中外源细胞因子是IL-2。在一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,在不包含外源细胞因子的培养基中与肿瘤细胞共培养时,经修饰的TIL表现出增殖增加。在一些实施方案中,肿瘤是自体肿瘤。

[0022] 在一些方面,本发明提供了一种组合物,其包含经修饰的TIL,经修饰的TIL被修饰以增加共刺激分子中的一种或多种和/或一种或多种细胞因子的表达。在一些方面,本发明提供了一种组合物,其包含经修饰的TIL,其中TIL被修饰以增加共刺激分子中的一种或多种的表达。在一些实施方案中,共刺激分子是B7-H2 (ICOSL)、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、CD70、LIGHT、HVEM、CD40、4-1BBL、OX40L、TL1A、GITRL、CD30L、TIM4、SLAM、CD48、CD58、CD155或CD112。在一些实施方案中,共刺激分子是CD86。在一些实施方案中,TIL被修饰以增加一种或多种细胞因子的表达。在一些方面,本发明提供了一种组合物,其包含经修饰的TIL,所述TIL被修饰以包含嵌合型膜结合性细胞因子。

[0023] 在本文所述的组合物的一些实施方案中,嵌合型膜结合性细胞因子是包含细胞因子和跨膜结构域的融合蛋白。在一些实施方案中,细胞因子通过肽接头连接至跨膜结构域。在一些实施方案中,肽接头是(G4S)₃(SEQ ID NO:3)或(EAAAK)₃(SEQ ID NO:4)。在一些实施方案中,细胞因子是I型细胞因子。在一些实施方案中,细胞因子是IL-15、IL-12、IL-2、IFN α 、IFN β 或IL-21或者它们的功能变体。在一些实施方案中,细胞因子是IL-2或其功能变体以及/或者IL-12或其功能变体。在一些实施方案中,嵌合型膜结合性细胞因子包含SEQ ID NO:7-10的氨基酸序列。

[0024] 在本文的组合物的一些实施方案中,经修饰的TIL具有一种或多种细胞因子和/或共刺激分子中的一种或多种的表达增加,其中经修饰的TIL通过以下方法来制备,所述方法包括:a)使包含输入TIL的细胞悬液通过细胞变形缩窄结构,其中缩窄结构的直径随悬液中的输入TIL的直径而变化,从而使得输入TIL的扰动的大小足以使编码一种或多种细胞因子的一种或多种核酸和/或编码一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸得以通过,从而形成扰动的输入TIL;并且b)将扰动的输入TIL与编码一种或多种细胞因子的一种或多种核酸和/或编码一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸一起孵育,以允许编码一种或多种细胞因子的一种或多种核酸和/或编码一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸进入扰动的输入TIL;其中核酸得以表达,从而产生包含一种或多种细胞因子和/或一种或多种共刺激分子的经修饰的TIL。在一些实施方案中,TIL具有一种或多种细胞因子和/或共刺激分子中的一种或多种的表达增加,其中TIL通过以下方法来制备,所述方法包括:a)使包含输入TIL的细胞悬液通过细胞变形缩窄结构,其中缩窄结构的直径随悬液中的输入TIL的直径而变化,从而使得输入TIL的扰动的大小足以使编码一种或多种细胞因子和/或一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸得以通过,从而形成扰动的输入TIL;并且b)将扰动的输入TIL与编码一种或多种细胞因子和/或一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸一起孵育,以使一种或多种核酸进入扰动的输入TIL;其中核酸得以表达,从而产生包含一种或多种细胞因子和/或一种或多种共刺激分子的经修饰的TIL。在一些实施方案中,制备经修饰的TIL的方法包括:(a)在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前、期间和/或之后,将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸一起孵育;(b)在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前、期间和/

或之后,将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子和共刺激分子的核酸一起孵育;(c)在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前、期间和/或之后,将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸和编码共刺激分子的核酸一起孵育;或者(d)在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前、期间和/或之后,将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸和编码一种或多种共刺激分子的核酸一起孵育。在一些实施方案中,制备经修饰的TIL的方法包括:(a)在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前,将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸一起孵育;(b)在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前,将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子和共刺激分子的核酸一起孵育;(c)在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前,将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸和编码共刺激分子的核酸一起孵育;或者(d)在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前,将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸和编码一种或多种共刺激分子的核酸一起孵育。在一些实施方案中,核酸中的一种或多种是mRNA。

[0025] 在本文所述的组合物的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL具有T-bet、EOMES、TCF1和CD62L中的一者或多者的表达增加。在一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,在不存在外源细胞因子的情况下培养时,经修饰的TIL具有T-bet、EOMES、TCF1和CD62L中的一者或多者的表达增加。在一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL中的T-bet、EOMES、TCF1和CD62L中的一者或多者的表达增加超过约1.2倍、1.5倍、1.8倍、2倍、3倍、4倍、5倍、8倍或超过10倍。

[0026] 在本发明的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL具有颗粒酶B的表达增加。在一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,在不存在外源细胞因子的情况下培养时,经修饰的TIL具有颗粒酶B的表达增加。在一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,在不存在外源细胞因子的情况下与肿瘤细胞共培养时,经修饰的TIL具有颗粒酶B的表达增加。在一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL中的颗粒酶B的表达增加约1.2倍、1.5倍、1.8倍、2倍、3倍、4倍、5倍、8倍、或10倍或更多。

[0027] 在一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,组合物的经修饰的TIL表现出增殖增加。在一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,在不包含外源细胞因子的培养基中培养时,经修饰的TIL表现出增殖增加。在一些实施方案中,外源细胞因子是IL-2和/或IL-12;任选地其中外源细胞因子是IL-2。在一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,在不包含外源细胞因子的培养基中与肿瘤细胞共培养时,经修饰的TIL表现出增殖增加。在一些实施方案中,肿瘤是自体肿瘤。

[0028] 在一些方面,本发明提供了一种调节个体的免疫应答的方法,其包括将经修饰的TIL施用于个体,其中经修饰的TIL根据本文所述的方法来制备。在一些方面,本发明提供了一种调节个体的免疫应答的方法,其包括施用本文所述的组合物。

[0029] 在一些方面,本发明提供了一种用于治疗个体的癌症、感染性疾病或病毒相关疾病的方法,其包括将经修饰的TIL施用于个体,其中经修饰的TIL根据本文所述的方法来制备。在一些实施方案中,本发明提供了一种用于治疗个体的癌症、感染性疾病或病毒相关疾病的方法,其包括施用本文所述的组合物。在一些实施方案中,方法包括多次施用经修饰的TIL,或多次施用组合物。在一些实施方案中,经修饰的TIL通过静脉内或肿瘤内施用。在一些实施方案中,个体是人。在一些实施方案中,经修饰的TIL在施用另一种疗法之前施用、在施用另一种疗法的同时施用或在施用另一种疗法之后施用。

[0030] 在一些方面,本发明提供了一种用于刺激个体的免疫应答的药物组合物,其中组合物包含有效量的本文所述的组合物。在一些实施方案中,本发明提供了一种用作药品的药物组合物,其中药物组合物包含有效量的本文所述的组合物。在一些实施方案中,本发明提供了一种用于治疗个体的癌症、感染性疾病或病毒相关疾病的药物组合物,其中药物组合物包含有效量的本文所述的组合物。在一些实施方案中,组合物包含经修饰的TIL,经修饰的TIL在施用另一种疗法之前施用、在施用另一种疗法的同时施用或在施用另一种疗法之后施用。

[0031] 在本文所述的缩窄结构介导的递送的一些实施方案中,缩窄结构的宽度为输入TIL的平均直径的约10%至约99%。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约3.5 μm 至约4.2 μm 、或约3.5 μm 至约4.8 μm 、或约3.5 μm 至约6 μm 、或约5 μm 至约12 μm 、或约12 μm 至约15 μm 、或约6 μm 至约12 μm 、或约8 μm 至约11 μm 或约9 μm 至约11 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约3 μm 至约5 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约4 μm 。在一些实施方案中,使包含多个输入TIL的细胞悬液通过多个缩窄结构,其中多个缩窄结构串联和/或并联布置。

[0032] 在一些方面,本发明提供了一种用于本文所述方法中的任一种的药盒。在一些方面,本发明提供了一种包括本文所述的组合物的药盒。在一些实施方案中,药盒还包括缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头、注射器或附有将组合物施用于个体的说明的包装插页中的一者或多者。

[0033] 在一些方面,本发明提供了一种产生包含嵌合型膜结合性细胞因子的TIL的方法,所述方法包括将编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸引入TIL中。在一些实施方案中,包含嵌合型膜结合性细胞因子的TIL通过以下步骤来制备:a)使包含输入TIL的细胞悬液通过细胞变形缩窄结构,其中缩窄结构的直径随悬液中的输入TIL的直径而变化,从而使得输入TIL的扰动的大小足以使编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸得以通过,从而形成扰动的输入TIL;和b)将扰动的输入TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸一起孵育,以允许核酸进入扰动的输入TIL,其中编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸在扰动的输入TIL中得以表达;从而产生包含嵌合型膜结合性细胞因子的TIL。在一些实施方案中,方法包括在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前、期间和/或之后,将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸一起孵育。在一些实施方案中,方法包括在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前,将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸一起孵育。在一些实施方案中,编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸是编码嵌合型膜结合性细胞因子的mRNA。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为输入TIL的平均直径的约10%至约99%。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约5 μm 至约12 μm 、或约6 μm 至约12 μm 、或约8 μm 至约11 μm 、或约9 μm 至约11 μm 或约12 μm 至约15 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约10 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约8 μm 。在一些实施方案中,使包含多个输入TIL的细胞悬液通过多个缩窄结构,其中多个缩窄结构串联和/或并联布置。

[0034] 在一些方面,本发明提供了药物组合物用于制造用于刺激个体的免疫应答的药物的用途,其中药物组合物包含有效量的本文所述的组合物。在一些方面,本发明提供了药物组合物用于制造用于治疗个体的癌症、感染性疾病或病毒相关疾病的药物的用途,其中药物组合物包含有效量的本文所述的组合物。在一些实施方案中,药物组合物被配制用于多次施用。在一些实施方案中,药物组合物通过静脉内或肿瘤内施用。在一些实施方案中,个

体是人。在一些实施方案中,药物组合物被配制用于在施用另一种疗法之前施用、在施用另一种疗法的同时施用或在施用另一种疗法之后施用。

附图说明

[0035] 图1A显示了在递送后的不同时间点,通过缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达膜结合性IL-2(“mbIL-2”)、膜结合性IL-12(“mbIL-12”)或者mbIL-2和mbIL-12两者的肿瘤浸润性淋巴细胞的活力。在这些实验中使用以下作为对照:不接触(“NC”,例如,细胞不通过缩窄结构介导的递送进行处理)、空挤压(例如,使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送)以及缩窄结构介导的mRNA递送提供的GFP。

[0036] 图1B显示了在递送后的不同时间点,通过缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达膜结合性IL-2(“mbIL-2”)、膜结合性IL-12(“mbIL-12”)或者mbIL-2和mbIL-12两者的肿瘤浸润性淋巴细胞的GFP表达。在这些实验中使用以下作为对照:不接触(“NC”)、空挤压(例如,使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送)以及缩窄结构介导的mRNA递送提供的GFP。

[0037] 图1C显示了在递送后的不同时间点,通过缩窄结构介导的mRNA递送提供的在表达mbIL-2、膜结合性IL-12(“mbIL-12”)或者mbIL-2和mbIL-12两者的肿瘤浸润性淋巴细胞中进行的膜结合性IL-2(“mbIL-2”)表达。在这些实验中使用以下作为对照:不接触(“NC”)、空挤压(例如,使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送)以及缩窄结构介导的mRNA递送提供的GFP。

[0038] 图1D显示了在递送后的不同时间点,通过缩窄结构介导的mRNA递送提供的在表达膜结合性IL-2(“mbIL-2”)、mbIL-12或者mbIL-2和mbIL-12两者的肿瘤浸润性淋巴细胞中进行的膜结合性IL-12(“mbIL-12”)表达。在这些实验中使用以下作为对照:不接触(“NC”)、空挤压(例如,使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送)以及缩窄结构介导的mRNA递送提供的GFP。

[0039] 图2A显示了在递送后的不同时间点,通过缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达膜结合性IL-2(“mbIL-2”)、膜结合性IL-12(“mbIL-12”)或者mbIL-2和mbIL-12两者的肿瘤浸润性淋巴细胞的GFP表达的平均荧光强度(“MFI”)。在这些实验中使用以下作为对照:不接触(“NC”)、空挤压(例如,使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送)以及缩窄结构介导的mRNA递送提供的GFP。

[0040] 图2B显示了在递送后的不同时间点,通过缩窄结构介导的mRNA递送提供的在表达mbIL-2、膜结合性IL-12(“mbIL-12”)或者mbIL-2和mbIL-12两者的肿瘤浸润性淋巴细胞中进行的膜结合性IL-2(“mbIL-2”)表达的平均荧光强度(“MFI”)。在这些实验中使用以下作为对照:不接触(“NC”)、空挤压(例如,使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送)以及缩窄结构介导的mRNA递送提供的GFP。

[0041] 图2C显示了在递送后的不同时间点,通过缩窄结构介导的mRNA递送提供的在表达膜结合性IL-2(“mbIL-2”)、mbIL-12或者mbIL-2和mbIL-12两者的肿瘤浸润性淋巴细胞中进行的膜结合性IL-12(“mbIL-12”)表达的平均荧光强度(“MFI”)。在这些实验中使用以下作为对照:不接触(“NC”)、空挤压(例如,使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送)以及缩窄结构介导的mRNA递送提供的GFP。

[0042] 图3A至图3D显示了通过缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达膜结合性IL-2

(“mbIL-2”)、膜结合性IL-12 (“mbIL-12”) 或者mbIL-2和mbIL-12两者,然后在包含不同的IL-2浓度(3000IU/mL、300IU/mL、30IU/mL或0IU/mL)的培养基中培养的肿瘤浸润性淋巴细胞的活力。在这些实验中使用以下作为对照:不接触 (“NC”)、空挤压(例如,使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送)。

[0043] 图4A至图4D显示了通过缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达膜结合性IL-2 (“mbIL-2”)、膜结合性IL-12 (“mbIL-12”) 或者mbIL-2和mbIL-12两者,然后在包含不同的IL-2浓度(3000IU/mL、300IU/mL、30IU/mL或0IU/mL)的培养基中培养的肿瘤浸润性淋巴细胞的增殖。在这些实验中使用以下作为对照:不接触 (“NC”)、空挤压(例如,使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送)。

[0044] 图5A至图5D显示了通过缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达膜结合性IL-2 (“mbIL-2”)、膜结合性IL-12 (“mbIL-12”) 或者mbIL-2和mbIL-12两者,然后在包含不同的IL-2浓度(3000IU/mL、300IU/mL、30IU/mL或0IU/mL)的培养基中培养的肿瘤浸润性淋巴细胞的CD39+表达。在这些实验中使用以下作为对照:不接触 (“NC”)、空挤压(例如,使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送)。

[0045] 图6A至图6D显示了通过缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达膜结合性IL-2 (“mbIL-2”)、膜结合性IL-12 (“mbIL-12”) 或者mbIL-2和mbIL-12两者,然后在包含不同的IL-2浓度(3000IU/mL、300IU/mL、30IU/mL或0IU/mL)的培养基中培养的肿瘤浸润性淋巴细胞的CD39+CD69+表达。在这些实验中使用以下作为对照:不接触 (“NC”)、空挤压(例如,使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送)。

[0046] 图7A至图7D显示了通过缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达膜结合性IL-2 (“mbIL-2”)、膜结合性IL-12 (“mbIL-12”) 或者mbIL-2和mbIL-12两者,然后在包含不同的IL-2浓度(3000IU/mL、300IU/mL、30IU/mL或0IU/mL)的培养基中培养的肿瘤浸润性淋巴细胞的CD62L+表达。在这些实验中使用以下作为对照:不接触 (“NC”)、空挤压(例如,使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送)。

[0047] 图8A至图8H显示了通过缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达膜结合性IL-2 (“mbIL-2”)、膜结合性IL-12 (“mbIL-12”) 或者mbIL-2和mbIL-12两者,然后在包含不同的IL-2浓度(3000IU/mL、300IU/mL、30IU/mL或0IU/mL)的培养基中培养的肿瘤浸润性淋巴细胞的CD69+表达。在这些实验中使用以下作为对照:不接触 (“NC”)、空挤压(例如,使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送)。

[0048] 图9A至图9D显示了通过缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达mbIL-2、膜结合性IL-12 (“mbIL-12”) 或者mbIL-2和mbIL-12两者,然后在包含不同的IL-2浓度(3000IU/mL、300IU/mL、30IU/mL或0IU/mL)的培养基中培养的肿瘤浸润性淋巴细胞中的膜结合性IL-2 (“mbIL-2”) 表达。在这些实验中使用以下作为对照:不接触 (“NC”)、空挤压(例如,使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送)。

[0049] 图10A至图10D显示了通过缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达膜结合性IL-2 (“mbIL-2”)、mbIL-12或者mbIL-2和mbIL-12两者,然后在包含不同的IL-2浓度(3000IU/mL、300IU/mL、30IU/mL或0IU/mL)的培养基中培养的肿瘤浸润性淋巴细胞中的膜结合性IL-12 (“mbIL-12”) 表达。在这些实验中使用以下作为对照:不接触 (“NC”)、空挤压(例如,使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送)。

[0050] 图11A至图11D显示了通过缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达膜结合性IL-2 (“mbIL-2”)、mbIL-12或者mbIL-2和mbIL-12两者,然后在包含不同的IL-2浓度(3000IU/mL、300IU/mL、30IU/mL或0IU/mL)的培养基中培养的肿瘤浸润性淋巴细胞中的膜结合性IL-2和膜结合性IL-12两者 (“mbIL-2mbIL-12”)的表达。在这些实验中使用以下作为对照:不接触 (“NC”)、空挤压(例如,使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送)。

[0051] 图12A至图12D显示了通过缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达膜结合性IL-2 (“mbIL-2”)、膜结合性IL-12 (“mbIL-12”)或者mbIL-2和mbIL-12两者,然后在包含不同的IL-2浓度(3000IU/mL、300IU/mL、30IU/mL或0IU/mL)的培养基中培养的肿瘤浸润性淋巴细胞的T-bet+表达。在这些实验中使用以下作为对照:不接触 (“NC”)、空挤压(例如,使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送)。

[0052] 图13A至图13D显示了通过缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达膜结合性IL-2 (“mbIL-2”)、膜结合性IL-12 (“mbIL-12”)或者mbIL-2和mbIL-12两者,然后在包含不同的IL-2浓度(3000IU/mL、300IU/mL、30IU/mL或0IU/mL)的培养基中培养的肿瘤浸润性淋巴细胞的Eomes+和TCF-1+表达。在这些实验中使用以下作为对照:不接触 (“NC”)、空挤压(例如,使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送)。

[0053] 图14A至图14B显示了通过以0.1mg/mL、0.25mg/mL或0.5mg/mL进行的缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达膜结合性IL-2 (“mbIL-2”)和膜结合性IL-12 (“mbIL-12”)两者的肿瘤浸润性淋巴细胞的活力,以及通过以0.25mg/mL进行的缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达CD86和mbIL-2、CD86和mb-IL12以及CD86及mbIL-2和mbIL-12两者的肿瘤浸润性淋巴细胞的活力。在mRNA递送后,肿瘤浸润性淋巴细胞在包含3000IU/mL(图14A)或0IU/mL(图14B)IL-2的培养基中进行培养。在这些实验中使用以下作为对照:不接触 (“NC”)、空挤压(例如,使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送)。

[0054] 图15A至图15B显示了通过以0.1mg/mL、0.25mg/mL或0.5mg/mL进行的缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达膜结合性IL-2 (“mbIL-2”)和膜结合性IL-12 (“mbIL-12”)两者的肿瘤浸润性淋巴细胞的增殖,以及通过以0.25mg/mL进行的缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达CD86和mbIL-2、CD86和mb-IL12以及CD86及mbIL-2和mbIL-12两者的肿瘤浸润性淋巴细胞的增殖。在mRNA递送后,肿瘤浸润性淋巴细胞在包含3000IU/mL(图15A)或0IU/mL(图15B)IL-2的培养基中进行培养。在这些实验中使用以下作为对照:不接触 (“NC”)、空挤压(例如,使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送)。

[0055] 图16A至图16B显示了通过以0.1mg/mL、0.25mg/mL或0.5mg/mL进行的缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达膜结合性IL-2 (“mbIL-2”)和膜结合性IL-12 (“mbIL-12”)两者的肿瘤浸润性淋巴细胞的CD39+表达,以及通过以0.25mg/mL进行的缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达CD86和mbIL-2、CD86和mb-IL12以及CD86及mbIL-2和mbIL-12两者的肿瘤浸润性淋巴细胞的CD39+表达。在mRNA递送后,肿瘤浸润性淋巴细胞在包含3000IU/mL(图16A)或0IU/mL(图16B)IL-2的培养基中进行培养。在这些实验中使用以下作为对照:不接触 (“NC”)、空挤压(例如,使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送)。

[0056] 图17A至图17B显示了通过以0.1mg/mL、0.25mg/mL或0.5mg/mL进行的缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达膜结合性IL-2 (“mbIL-2”)和膜结合性IL-12 (“mbIL-12”)两者的肿瘤浸润性淋巴细胞的CD62L+表达,以及通过以0.25mg/mL进行的缩窄结构介导的mRNA递

送提供的表达CD86和mbIL-2、CD86和mb-IL12以及CD86及mbIL-2和mbIL-12两者的肿瘤浸润性淋巴细胞的CD62L+表达。在mRNA递送后,肿瘤浸润性淋巴细胞在包含3000IU/mL(图17A)或0IU/mL(图17B)IL-2的培养基中进行培养。在这些实验中使用以下作为对照:不接触(“NC”)、空挤压(例如,使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送)。

[0057] 图18A至图18B显示了通过以0.1mg/mL、0.25mg/mL或0.5mg/mL进行的缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达膜结合性IL-2(“mbIL-2”)和膜结合性IL-12(“mbIL-12”)两者的肿瘤浸润性淋巴细胞的CD86+表达,以及通过以0.25mg/mL进行的缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达CD86和mbIL-2、CD86和mb-IL12以及CD86及mbIL-2和mbIL-12两者的肿瘤浸润性淋巴细胞的CD86+表达。在mRNA递送后,肿瘤浸润性淋巴细胞在包含3000IU/mL(图18A)或0IU/mL(图18B)IL-2的培养基中进行培养。在这些实验中使用以下作为对照:不接触(“NC”)、空挤压(例如,使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送)。

[0058] 图19A至图19B显示了通过以0.1mg/mL、0.25mg/mL或0.5mg/mL进行的缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达mbIL-2和膜结合性IL-12(“mbIL-12”)两者的肿瘤浸润性淋巴细胞的膜结合性IL-2(“mbIL-2”)表达,以及通过以0.25mg/mL进行的缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达CD86和mbIL-2、CD86和mb-IL12以及CD86及mbIL-2和mbIL-12两者的肿瘤浸润性淋巴细胞的mbIL-2表达。在mRNA递送后,肿瘤浸润性淋巴细胞在包含3000IU/mL(图19A)或0IU/mL(图19B)IL-2的培养基中进行培养。在这些实验中使用以下作为对照:不接触(“NC”)、空挤压(例如,使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送)。

[0059] 图19C至图19D显示了通过以0.1mg/mL、0.25mg/mL或0.5mg/mL进行的缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达mbIL-2和膜结合性IL-12(“mbIL-12”)两者的肿瘤浸润性淋巴细胞的膜结合性IL-2(“mbIL-2”)表达的平均荧光强度(“MFI”),以及通过以0.25mg/mL进行的缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达CD86和mbIL-2、CD86和mb-IL12以及CD86及mbIL-2和mbIL-12两者的肿瘤浸润性淋巴细胞的mbIL-2表达的平均荧光强度(“MFI”)。在mRNA递送后,肿瘤浸润性淋巴细胞在包含3000IU/mL(图19C)或0IU/mL(图19D)IL-2的培养基中进行培养。在这些实验中使用以下作为对照:不接触(“NC”)、空挤压(例如,使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送)。

[0060] 图20A至图20B显示了通过以0.1mg/mL、0.25mg/mL或0.5mg/mL进行的缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达mbIL-12和膜结合性IL-2(“mbIL-2”)两者的肿瘤浸润性淋巴细胞的膜结合性IL-12(“mbIL-12”)表达,以及通过以0.25mg/mL进行的缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达CD86和mbIL-2、CD86和mb-IL12以及CD86及mbIL-2和mbIL-12两者的肿瘤浸润性淋巴细胞的mbIL-12表达。在mRNA递送后,肿瘤浸润性淋巴细胞在包含3000IU/mL(图20A)或0IU/mL(图20B)IL-2的培养基中进行培养。在这些实验中使用以下作为对照:不接触(“NC”)、空挤压(例如,使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送)。

[0061] 图20C至图20D显示了通过以0.1mg/mL、0.25mg/mL或0.5mg/mL进行的缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达mbIL-12和膜结合性IL-2(“mbIL-2”)两者的肿瘤浸润性淋巴细胞的膜结合性IL-12(“mbIL-12”)表达的平均荧光强度(“MFI”),以及通过以0.25mg/mL进行的缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达CD86和mbIL-2、CD86和mb-IL12以及CD86及mbIL-2和mbIL-12两者的肿瘤浸润性淋巴细胞的mbIL-12表达的平均荧光强度(“MFI”)。在mRNA递送后,肿瘤浸润性淋巴细胞在包含3000IU/mL(图20C)或0IU/mL(图20D)IL-2的培养基中进行

培养。在这些实验中使用以下作为对照：不接触（“NC”）、空挤压（例如，使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送）。

[0062] 图21A至图21B显示了通过以0.1mg/mL、0.25mg/mL或0.5mg/mL进行的缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达膜结合性IL-2（“mbIL-2”）和膜结合性IL-12（“mbIL-12”）两者的肿瘤浸润性淋巴细胞的T-bet+表达，以及通过以0.25mg/mL进行的缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达CD86和mbIL-2、CD86和mb-IL12以及CD86及mbIL-2和mbIL-12两者的肿瘤浸润性淋巴细胞的T-bet+表达。在mRNA递送后，肿瘤浸润性淋巴细胞在包含3000IU/mL（图21A）或0IU/mL（图21B）IL-2的培养基中进行培养。在这些实验中使用以下作为对照：不接触（“NC”）、空挤压（例如，使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送）。

[0063] 图22A至图22B显示了通过以0.1mg/mL、0.25mg/mL或0.5mg/mL进行的缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达膜结合性IL-2（“mbIL-2”）和膜结合性IL-12（“mbIL-12”）两者的肿瘤浸润性淋巴细胞的Eomes+表达，以及通过以0.25mg/mL进行的缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达CD86和mbIL-2、CD86和mb-IL12以及CD86及mbIL-2和mbIL-12两者的肿瘤浸润性淋巴细胞的Eomes+表达。在mRNA递送后，肿瘤浸润性淋巴细胞在包含3000IU/mL（图22A）或0IU/mL（图22B）IL-2的培养基中进行培养。在这些实验中使用以下作为对照：不接触（“NC”）、空挤压（例如，使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送）。

[0064] 图23A至图23B显示了通过以0.1mg/mL、0.25mg/mL或0.5mg/mL进行的缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达膜结合性IL-2（“mbIL-2”）和膜结合性IL-12（“mbIL-12”）两者的肿瘤浸润性淋巴细胞的Eomes+和TCF-1+表达，以及通过以0.25mg/mL进行的缩窄结构介导的mRNA递送提供的表达CD86和mbIL-2、CD86和mb-IL12以及CD86及mbIL-2和mbIL-12两者的肿瘤浸润性淋巴细胞的Eomes+和TCF-1+表达。在mRNA递送后，肿瘤浸润性淋巴细胞在包含3000IU/mL（图23A）或0IU/mL（图23B）IL-2的培养基中进行培养。在这些实验中使用以下作为对照：不接触（“NC”）、空挤压（例如，使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送）。

[0065] 图24A显示了用指定总量的mbIL-2mRNA和mbIL-12mRNA挤压加载的人肿瘤浸润性淋巴细胞（TIL）或者用空有效负载挤压处理的TIL（对照TIL）中的活细胞随时间推移的百分比。图24B至图24C分别显示了用指定总量的mbIL-2mRNA和mbIL-12mRNA挤压加载的TIL或者用空有效负载挤压处理的TIL（对照TIL）中的表达mbIL-2和mbIL-12的细胞随时间推移的百分比。图24D至图24E分别显示了用指定总量的mbIL-2mRNA和mbIL-12mRNA挤压加载的TIL或者用空有效负载挤压处理的TIL（对照TIL）中的挤压后1天的mbIL-2和mbIL-12的代表性表达。

[0066] 图25A和图25B分别显示了，如通过流式细胞术所测量，用空有效负载（对照TIL）、mbIL-2mRNA、或mbIL-2mRNA和mbIL-12mRNA挤压处理，并且在不存在外源细胞因子的情况下用自体肿瘤细胞共培养3天的从三名人黑素瘤患者体内回收的TIL；或者用空有效负载挤压处理，然后在存在外源性IL-2和IL-12的情况下用自体肿瘤细胞共培养3天的TIL（对照TIL+rhIL-2+12）中的活CD8+T细胞的数量和Ki67阳性细胞的百分比。

[0067] 图26显示了，如通过流式细胞术所测量，用空有效负载（对照TIL）、mbIL-2mRNA、或mbIL-2mRNA和mbIL-12mRNA挤压处理，并且在不存在外源细胞因子的情况下用自体肿瘤细胞共培养3天的从三名人黑素瘤患者体内回收的TIL；或者用空有效负载挤压处理，然后在存在外源性IL-2和IL-12的情况下用自体肿瘤细胞共培养3天的TIL（对照TIL+rhIL-2+12）

中的颗粒酶B(GZMB)阳性细胞的百分比。

[0068] 图27A至图27B(荧光图像)和图27C至图27D(散点图)显示了,用空有效负载(对照TIL)、mbIL-2mRNA、或mbIL-2mRNA和mbIL-12mRNA挤压处理,并且在不存在外源细胞因子的情况下用自体肿瘤细胞共培养24小时的从两名人黑素瘤患者体内回收的TIL;或者用空有效负载挤压处理,然后在存在外源性IL-2和IL-12的情况下用自体肿瘤细胞共培养24小时的TIL(对照TIL+rhIL-2+12)的肿瘤杀伤量。

具体实施方式

[0069] 在一些方面,提供了调节肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的活性和/或增殖能力的方法,其中TIL被修饰以增加一种或多种共刺激分子和/或一种或多种细胞因子的表达。在一些实施方案中,提供了调节肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的活性和/或增殖能力的方法,其中TIL通过包括以下步骤的方法来制备:a)使包含输入TIL的细胞悬液通过细胞变形缩窄结构,其中缩窄结构的直径随悬液中的输入TIL的直径而变化,从而使得输入TIL的扰动的大小足以使编码一种或多种细胞因子的一种或多种核酸和/或编码一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸得以通过,从而形成扰动的输入TIL;并且b)将扰动的输入TIL与编码一种或多种细胞因子的一种或多种核酸和/或编码一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸一起孵育,以允许编码一种或多种细胞因子的一种或多种核酸和/或编码一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸进入扰动的输入TIL;其中核酸得以表达,从而产生包含一种或多种细胞因子和/或一种或多种共刺激分子的TIL。在一些方面,本文提供了一种调节TIL的活性和/或增殖能力的方法,所述方法包括将编码一种或多种细胞因子的一种或多种核酸细胞内递送至TIL。在一些方面,本文提供了一种调节TIL的活性和/或增殖能力的方法,所述方法包括将编码一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸细胞内递送至TIL。在一些方面,本文提供了一种调节TIL的活性和/或增殖能力的方法,所述方法包括将(i)编码一种或多种细胞因子的一种或多种核酸以及(ii)编码一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸细胞内递送至TIL。

[0070] 因此,在一些方面,本文提供了一种调节TIL的活性和/或增殖能力的方法,所述方法包括使包含TIL的细胞悬液通过细胞变形缩窄结构,从而使得TIL发生扰动,以使得(i)编码一种或多种细胞因子的一种或多种核酸、(ii)编码一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸或者(iii) (i)和(ii)两者在与TIL接触时通过扰动进入TIL。在一些方面,这种方法还可以包括使TIL与(i)编码一种或多种细胞因子的一种或多种核酸、(ii)编码一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸或者(iii) (i)和(ii)两者接触。如本文所进一步描述,在一些方面,一种或多种细胞因子和/或一种或多种共刺激分子可以调节TIL的活性和/或增殖能力。

[0071] 在一些方面,提供了包含经修饰的TIL的组合物,其中TIL被修饰以增加共刺激分子中的一种或多种和/或一种或多种细胞因子的表达。因此,在一些方面,本文提供了一种组合物,其包含经修饰的TIL,与参考TIL(例如,如本文所述的尚未经修饰的相应TIL)相比,经修饰的TIL表现出一种或多种共刺激分子的表达增加。在一些方面,本文提供了一种组合物,其包含经修饰的TIL,与参考TIL(例如,如本文所述的尚未经修饰的相应TIL)相比,经修饰的TIL表现出一种或多种细胞因子的表达增加。在一些方面,本文提供了一种组合物,其

包含经修饰的TIL,与参考TIL(例如,如本文所述的尚未经修饰的相应TIL)相比,经修饰的TIL表现出一种或多种细胞因子以及一种或多种共刺激分子两者的表达增加。

[0072] 在一些实施方案中,提供了组合物,所述组合物包含经修饰的TIL,其中经修饰的TIL通过包括以下步骤的方法来制备:a)使包含输入TIL的细胞悬液通过细胞变形缩窄结构,其中缩窄结构的直径随悬液中的输入TIL的直径而变化,从而使得输入TIL的扰动的大小足以使编码一种或多种细胞因子的一种或多种核酸和/或编码一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸得以通过,从而形成扰动的输入TIL;并且b)将扰动的输入TIL与编码一种或多种细胞因子的一种或多种核酸和/或编码一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸一起孵育,以允许编码一种或多种细胞因子的一种或多种核酸和/或编码一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸进入扰动的输入TIL;其中核酸得以表达,从而产生包含一种或多种细胞因子和/或一种或多种共刺激分子的经修饰的TIL。因此,在一些方面,本文所述的经修饰的TIL已经通过细胞变形缩窄结构,其中细胞变形缩窄结构使TIL发生变形,从而引起TIL的扰动,以使得编码一种或多种细胞因子的一种或多种核酸在与TIL接触时通过扰动进入TIL。在一些方面,本文所述的经修饰的TIL已经通过细胞变形缩窄结构,其中细胞变形缩窄结构使TIL发生变形,从而引起TIL的扰动,以使得编码一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸在与TIL接触时通过扰动进入TIL。在一些方面,本文所述的经修饰的TIL已经通过细胞变形缩窄结构,其中细胞变形缩窄结构使TIL发生变形,从而引起TIL的扰动,以使得(i)编码一种或多种细胞因子的一种或多种核酸以及(ii)编码一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸在与TIL接触时通过扰动进入TIL。

[0073] 在一些方面,提供了产生包含嵌合型膜结合性细胞因子的经修饰的TIL的方法,所述方法包括将编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸引入TIL中。在一些实施方案中,提供了产生包含嵌合型膜结合性细胞因子的经修饰的TIL的方法,所述方法包括:a)使包含输入TIL的细胞悬液通过细胞变形缩窄结构,其中缩窄结构的直径随悬液中的输入TIL的直径而变化,从而使得输入TIL的扰动的大小足以使编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸得以通过,从而形成扰动的输入TIL;并且b)将扰动的输入TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸一起孵育,以允许核酸进入扰动的输入TIL,其中编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸在扰动的输入TIL中得以表达;从而产生包含嵌合型膜结合性细胞因子的经修饰的TIL。

[0074] 本文所述或引用的技术和程序通常是本领域的技术人员熟知的,并且通常是通过常规方法来使用的,所述常规方法例如以下文献所述的广泛采用的方法:Molecular Cloning:A Laboratory Manual(Sambrook等人,第4版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,2012);Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等人编,2003);the series Methods in Enzymology(Academic Press, Inc.);PCR 2:A Practical Approach(M.J.MacPherson,B.D.Hames和G.R.Taylor编,1995);Antibodies,A Laboratory Manual(Harlow和Lane编,1988);Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique and Specialized Applications(R.I.Freshney,第6版,J.Wiley and Sons,2010);Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait编,1984);Methods in Molecular Biology,Humana Press;Cell Biology:A Laboratory Notebook(J.E.Cellis编,Academic Press,1998);Introduction to Cell and Tissue Culture(J.P.Mather和P.E.Roberts,Plenum Press,1998);Cell and Tissue Culture:

Laboratory Procedures (A.Doyle,J.B.Griffiths和D.G.Newell编,J.Wiley and Sons, 1993-8);Handbook of Experimental Immunology (D.M.Weir和C.C.Blackwell编,1996); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M.Miller和M.P.Calos编,1987);PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis等人编,1994);Current Protocols in Immunology (J.E.Coligan等人编,1991);Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel等人编,J.Wiley and Sons,2002);Immunobiology (C.A.Janeway等人,2004); Antibodies (P.Finch,1997);Antibodies:A Practical Approach (D.Catty.编,IRL Press,1988-1989);Monoclonal Antibodies:A Practical Approach (P.Shepherd和C.Dean编,Oxford University Press,2000);Using Antibodies:A Laboratory Manual (E.Harlow和D.Lane,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999);The Antibodies (M.Zanetti和J.D.Capra编,Harwood Academic Publishers,1995);以及Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T.DeVita等人编,J.B.Lippincott Company, 2011)。

[0075] 定义

[0076] 出于解释本说明书的目的,以下定义将适用,并且在适当的情况下,以单数形式使用的术语也将包括复数,反之亦然。如果下文阐述的任何定义与以引用的方式并入本文的任何文件冲突,则以所阐述的定义为准。

[0077] 如本文所用,除非另外指明,否则单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指代物。

[0078] 应当理解,本文所述的本发明的方面和实施方案包括“包括”方面和实施方案、“由方面和实施方案组成”以及“基本上由方面和实施方案组成”。

[0079] 如本文所用,术语“约”是指本技术领域的技术人员容易知晓的相应值的通常误差范围。本文中对“约”某个值或参数的引用包括(以及描述了)针对该值或参数本身的实施方案。

[0080] 如本文所用,“治疗”是用于获得有益的或期望的临床结果的方法。如本文所用,“治疗”涵盖针对哺乳动物(包括人)疾病的任何治疗剂施用或应用。出于本发明的目的,有益的或期望的临床结果包括但不限于以下中的任一者或多者:减轻一种或多种症状、减少疾病的程度、防止或延迟疾病的扩散(例如,转移,例如转移至肺或淋巴结)、防止或延迟疾病的复发、延迟或减缓疾病进展、改善疾病状态、抑制疾病或疾病的进展、抑制或减缓疾病或其进展、阻止疾病的发展以及缓解(部分或全部)。“治疗”还涵盖减少增殖性疾病的病理结果。本发明的方法设想了这些治疗方面中的任一个或多个。

[0081] 如本文所用,术语“预防性治疗”是指对已知或怀疑患有病症或处于患有病症的风险中但未表现出病症的症状或表现出极少病症的症状的个体的治疗。接受预防性治疗的个体可以在症状出现之前接受治疗。在一些实施方案中,如果个体患有癌前病变,则它们可以接受治疗。

[0082] 如本文所用,所谓“组合疗法”意指第一种剂与另一种剂联合施用。“联合”是指除了施用一种治疗方式之外,还施用另一种治疗方式,诸如除了施用如本文所述的TIL的组合物之外还向同一个体施用如本文所述的免疫缀合物。因此,“联合”是指一种治疗方式向个体的施用在另一种治疗方式的递送之前、期间或之后。

[0083] 如本文所用,术语“同时施用”意指组合疗法中的第一疗法和第二疗法的施用时间间隔不超过约15分钟,诸如不超过约10、5或1分钟中的任一者。当同时施用第一疗法和第二疗法时,第一疗法和第二疗法可以包含在同一组合物中(例如,包含第一疗法和第二疗法两者的组合物)或单独的组合物中(例如,第一疗法包含在一种组合物中,第二疗法包含在另一种组合物中)。

[0084] 如本文所用,术语“依次施用”意指组合疗法中的第一疗法和第二疗法的施用时间间隔大于约15分钟,诸如大于约20、30、40、50、60分钟中的任一者或更长时间。可以首先施用第一疗法或第二疗法中的任一者。第一疗法和第二疗法包含在单独的组合物中,单独的组合物可以包含在相同的或不同的包装或药盒中。

[0085] 如本文所用,术语“同时施用”意指组合疗法中的第一疗法和第二疗法的施用彼此重叠。

[0086] 在癌症的背景下,术语“治疗”包括杀伤癌细胞、抑制癌细胞的生长、抑制癌细胞的复制、减轻总体肿瘤负荷以及改善与疾病相关的一种或多种症状中的任一者或全部。

[0087] 如本文所用,术语“孔”是指开口,包括但不限于材料内的洞、裂口、空腔、开孔、断裂、缝隙或穿孔。在一些示例中,(如有指明)该术语是指本公开的表面内的孔。在其他实例中,(如有指明)孔可以指细胞膜中的孔。

[0088] 如本文所用,术语“膜”是指含有孔的选择性屏障或薄片。该术语包括作为边界或衬里的柔韧薄片状结构。在一些实例中,该术语是指含有孔的表面或过滤器。该术语与术语“细胞膜”不同。

[0089] 如本文所用,术语“过滤器”是指允许选择性通过孔的多孔制品。在一些实例中,该术语是指含有孔的表面或膜。

[0090] 当术语“外源性”用于指与细胞相关的剂,诸如抗原或佐剂时,是指细胞外部的剂或从细胞外部递送至细胞中的剂。细胞可以具有或不具有已经存在的剂,并且在外源剂递送之后细胞可以产生或不产生剂。

[0091] 如本文所用,术语“异质性”是指在结构或组合物中混合或不均匀的物质。在一些实例中,该术语是指在给定表面内具有不同尺寸、形状或分布的孔。

[0092] 如本文所用,术语“同质性”是指在整体结构或组合物中的一致或均匀的物质。在一些实例中,该术语是指在给定表面内具有一致尺寸、形状或分布的孔。

[0093] 如本文所用,术语“同源性”是指来源于同一生物体的分子。在一些实例中,该术语是指在给定生物体内正常存在或表达的核酸或蛋白质。

[0094] 术语“异源性”涉及核酸序列,诸如编码序列和调控序列,表示通常不连接在一起和/或通常与特定细胞不相关的序列。因此,核酸构建体或载体的“异源性”区域是在另一个核酸分子内或连接至另一个核酸分子的核酸的区段,该核酸的区段在自然界中与另一个分子不相关。例如,核酸构建体的异源性区域可以包含在自然界中与编码序列不相关的序列侧接的编码序列。异源性编码序列的另一个实例是编码序列本身在自然界中不存在的构建体(例如,具有与天然基因不同的密码子的合成序列)。类似地,出于本发明的目的,用细胞中通常不存在的构建体转化的细胞将被认为是异源性的。等位基因变异或天然存在的突变事件不产生异源性DNA,如本文所用。

[0095] 术语“异源性”涉及氨基酸序列,诸如肽序列和多肽序列,表示通常不连接在一起

和/或通常与特定细胞不相关的序列。因此,肽序列的“异源性”区域是在另一个氨基酸分子内或连接至另一个氨基酸分子的氨基酸的区段,该氨基酸的区段在自然界中与另一个分子不相关。例如,肽构建体的异源性区域可以包含在自然界中与肽的氨基酸序列不相关的序列侧接的肽的氨基酸序列。异源性肽序列的另一个实例是肽序列本身在自然界中不存在的构建体(例如,具有与天然基因所编码不同的氨基酸的合成序列)。类似地,出于本发明的目的,用细胞中通常不存在的表达氨基酸构建体的载体转化的细胞将被认为是异源性的。等位基因变异或天然存在的突变事件不产生异源性肽,如本文所用。

[0096] 如本文所用,术语“抑制”可以指阻断、减少、消除或者拮抗特定靶标的存在或活性的行为。抑制可以指部分抑制或完全抑制。例如,抑制免疫应答可以指引引起免疫应答的阻断、减少、消除或任何其他拮抗作用的任何行为。在其他实例中,核酸的表达的抑制可以包括但不限于核酸的转录的减少、mRNA丰度的减少(例如,mRNA转录的沉默)、mRNA的降解、mRNA翻译的抑制等等。在另一个实例中,抑制可以指减缓或阻止生长的行为;例如,延缓或防止肿瘤细胞的生长。

[0097] 如本文所用,术语“阻抑”可以指降低、减少、阻止、限制、减轻或者减弱特定靶标的存在或活性的行为。阻抑可以指部分阻抑或完全阻抑。例如,阻抑免疫应答可以指引引起免疫应答的降低、减少、阻止、限制、减轻或者减弱的任何行为。在其他实例中,核酸的表达的阻抑可以包括但不限于核酸的转录的减少、mRNA丰度的减少(例如,mRNA转录的沉默)、mRNA的降解、mRNA翻译的抑制等等。

[0098] 如本文所用,术语“增强”可以指改善、加强、提高或者增加特定靶标的存在或活性的行为。例如,免疫应答的增强可以指引引起免疫应答的改善、加强、提高或者增加的任何行为。在一个示例性实例中,免疫应答的增强可以指采用抗原和/或佐剂来改善、加强、提高或者增加免疫应答。在其他实例中,核酸的表达的增强可以包括但不限于核酸的转录的增加、mRNA丰度的增加(例如,mRNA转录的增加)、mRNA降解的减少、mRNA翻译的增加等等。如本文用于描述本公开的经修饰的TIL,在一些方面,该术语可以指经修饰的TIL与相应的未经修饰的TIL相比有所改善或增加的一种或多种性质。整个本公开提供了此类性质的非限制性实例。

[0099] 如本文所用,术语“调节”可以指改变、变更、变化或者修改特定靶标的存在或活性的行为。例如,免疫应答的调节可以指引引起免疫应答的改变、变更、变化或者修改的任何行为。在一些实例中,“调节”是指增强特定靶标的存在或活性。在一些实例中,“调节”是指阻抑特定靶标的存在或活性。在其他实例中,核酸的表达的调节可以包括但不限于核酸的转录的变化、mRNA丰度的变化(例如,mRNA转录的增加)、mRNA降解的相应变化、mRNA翻译的变化等等。

[0100] 如本文所用,术语“诱导”可以指引发、促使、刺激、建立或者产生结果的行为。例如,免疫应答的诱导可以指引引起所期望的免疫应答的引发、促使、刺激、建立或者产生的任何行为。在其他实例中,核酸的表达的诱导可以包括但不限于引发核酸的转录、引发mRNA翻译等等。

[0101] 如本文所用,术语“多核苷酸”或“核酸”是指任何长度的核苷酸(核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸)的聚合物形式。因此,该术语包括但不限于单链、双链或多链DNA或RNA、基因组DNA、cDNA、DNA-RNA杂交体,或者包含嘌呤碱基和嘧啶碱基、或其他天然的、化学或生物化

学修饰的、非天然的或衍生化的核苷酸碱基的聚合物。多核苷酸的主链可以包含糖和磷酸基团(通常可以存在于RNA或DNA中),或者经修饰的或取代的糖或磷酸基团。或者,多核苷酸的主链可以包含合成亚基的聚合物,所述合成亚基诸如氨基磷酸酯和硫代磷酸酯,因此多核苷酸的主链可以是寡脱氧核苷氨基磷酸酯(P-NH₂)、混合硫代磷酸酯-磷酸二酯寡聚体、或混合氨基磷酸酯-磷酸二酯寡聚体。此外,双链多核苷酸可以从化学合成的单链多核苷酸产物获得,所述化学合成通过合成互补链并在适当条件下使链进行退火,或者通过使用DNA聚合酶以及适当引物从头合成互补链来进行。

[0102] 术语“多肽”和“蛋白质”可互换使用,是指氨基酸残基的聚合物,并且不限于最小长度。此类氨基酸残基的聚合物可以含有天然的或非天然的氨基酸残基,并且包括但不限于氨基酸残基的肽、寡肽、二聚体、三聚体和多聚体。该定义涵盖全长蛋白质和它们的片段两者。该术语还包括多肽的表达后修饰,例如,糖基化、唾液酸化、乙酰化、磷酸化等等。此外,出于本发明的目的,“多肽”是指包含对天然序列的修饰的蛋白质,所述修饰诸如缺失、添加和置换(通常在性质上是保守的),只要蛋白质维持所期望的活性即可。这些修饰可以是有意的,如通过定点诱变,或者可以是意外的,诸如通过产生蛋白质的宿主的突变或由于PCR扩增而产生的误差。

[0103] 如本文所用,所谓“药学上可接受的”或“药理学上相容的”意指非生物学或者不期望的材料,例如,该材料可以掺入施用于患者的药物组合物中,而不会引起任何显著的不期望的生物学效应,也不会与包含该材料的组合物的任何其他组分发生有害的相互作用。药学上可接受的载剂或赋形剂优选地满足毒理学和制造测试的所需的标准和/或包含在美国食品药品监督管理局制定的非活性成分指南中。

[0104] 如本文所用,“微流体系统”是指对小体积(例如,mL、nL、pL、fL)的流体进行处理以实现小体积液体的离散处理的系统。本文所述的某些实施包括多重、自动化和高通量筛选。流体(例如,缓冲液、溶液、含有有效负载的溶液或细胞悬液)可以被移动、混合、分离或者处理。在本文所述的某些实施方案中,微流体系统用于对悬浮于缓冲液中的细胞施加机械压缩,从而引起细胞中的扰动(例如,孔),该扰动允许有效负载或化合物进入细胞的胞质溶胶。

[0105] 对于本文所述的任何结构和功能特征,确定这些特征的方法在本领域中是已知的。

[0106] 增强肿瘤浸润性淋巴细胞的活性和/或增殖的方法

[0107] T细胞活化引发细胞内信号级联,该细胞内信号级联最终引起增殖、效应功能或死亡,具体取决于TCR信号和相关信号的强度。为了防止过早或过度活化,T细胞需要两种独立的信号才能完全活化。信号1是TCR与MHC复合的抗原肽结合所提供的抗原特异性信号。信号2由细胞因子或抗原呈递细胞(APC)上的共刺激分子(诸如B7.1(CD80)和B7.2(CD86))的参与介导。信号3由炎性细胞因子(诸如IL-2、IL-12和IFN- α)介导。

[0108] 如本文所用,肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)可以包括已经侵入肿瘤组织的任何或所有淋巴细胞群。TIL已经在包括乳腺癌在内的多种实体瘤中有所描述,并且正在成为预测治疗的功效和结局的重要生物标志物。在乳腺癌中,TIL可以主要包括细胞毒性(CD8+)和辅助(CD4+)T细胞以及少量B细胞和NK细胞(Pruneri等人,Breast.2018年2月;37:207-214;Whitford等人,Eur J Cancer,1992;28(2-3):350-6)。大量TIL可以与肿瘤中三级淋巴结构

的存在有关,这些结构还容纳负责淋巴细胞生成的滤泡辅助T细胞(Tfh)(Gu-Trantien等人,J Clin Invest,2013年7月;123(7):2873-92)。

[0109] TIL对肿瘤抗原具有增加的特异性,因此在治疗上很有用。出于治疗目的,TIL可以通过一种或多种方法从肿瘤组织中分离,所述方法包括但不限于酶促消化。在从肿瘤中分离后,可以任选地分离TIL的亚群,以增加亚群体的纯度。随后,TIL可以以一个或多个阶段进行扩增(Dudley等人,J Immunother.2003;26(4):332-342;Jin等人,J Immunother.2012年4月;35(3):283-292)。在一些实例中,TIL可以从数千个细胞扩增到数十亿个细胞。扩增的TIL可以输注到个体内以治疗一种或多种肿瘤。在一些实施方案中,TIL对于个体而言是自体的。在一些实施方案中,TIL对于个体而言是同种异体的。

[0110] 在一些实施方案中,TIL可以通过机械分离、酶促解聚和/或密度梯度离心从癌症中分离(Baldan等人,Br J Cancer 2015年4月28日;112(9):1510-8;Tan和Lei,Methods Mol Biol.2019;1960:93-99)。

[0111] 增强肿瘤浸润性淋巴细胞的活性和/或增殖的方法

[0112] 在一些方面,提供了用于调节肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的活性和/或增殖的方法,其中TIL被修饰以增加信号2和/或信号3介质中的一种或多种的表达。

[0113] 在一些方面,提供了用于调节肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的活性和/或增殖能力的方法,其中TIL被修饰以增加一种或多种共刺激分子和/或一种或多种细胞因子的表达。在一些方面,提供了用于调节TIL的活性和/或增殖能力的方法,其中TIL被修饰以增加共刺激分子中的一种或多种的表达。在一些实施方案中,共刺激分子是B7-H2(ICOSL)、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、CD70、LIGHT、HVEM、CD40、4-1BBL、OX40L、TL1A、GITRL、CD30L、TIM4、SLAM、CD48、CD58、CD155或CD112。在一些实施方案中,共刺激分子是CD86。在一些实施方案中,TIL被修饰以增加以下中的一者或多者的表达:B7-H2(ICOSL)、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、CD70、LIGHT、HVEM、CD40、4-1BBL、OX40L、TL1A、GITRL、CD30L、TIM4、SLAM、CD48、CD58、CD155或CD112。在一些实施方案中,TIL被修饰以增加CD86的表达。

[0114] 在一些实施方案中,提供了用于调节TIL的活性和/或增殖能力的方法,其中所述方法包括在TIL中表达编码共刺激分子的核酸。在一些实施方案中,方法包括表达编码以下中的一者或多者的一种或多种核酸:B7-H2(ICOSL)、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、CD70、LIGHT、HVEM、CD40、4-1BBL、OX40L、TL1A、GITRL、CD30L、TIM4、SLAM、CD48、CD58、CD155或CD112。在一些实施方案中,方法包括表达编码CD86的一种或多种核酸。在一些实施方案中,编码共刺激分子的核酸是mRNA。在一些实施方案中,编码CD86的核酸是mRNA。因此,在一些方面,修饰TIL以增加一种或多种共刺激分子的表达包括将编码细胞因子中的一种或多种的一种或多种核酸(例如,mRNA)细胞内递送至TIL。

[0115] 在一些方面,提供了用于调节肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的活性和/或增殖能力的方法,其中TIL被修饰以增加一种或多种共刺激分子和/或一种或多种细胞因子的表达。在一些方面,方法包括修饰TIL以增加与参考TIL(例如,如本文所述的尚未经修饰的相应TIL)相比一种或多种共刺激分子的表达。在一些方面,方法包括修饰TIL以增加与参考TIL(例如,如本文所述的尚未经修饰的相应TIL)相比一种或多种细胞因子的表达。在一些方面,方法包括修饰TIL以增加与参考TIL(例如,如本文所述的尚未经修饰的相应TIL)相比一种或多种细胞因子以及一种或多种共刺激分子两者的表达。

[0116] 在一些方面,提供了用于调节TIL的活性和/或增殖能力的方法,其中TIL被修饰以增加细胞因子中的一种或多种的表达。在一些实施方案中,细胞因子是I型细胞因子。在一些实施方案中,细胞因子是2型细胞因子。在一些实施方案中,细胞因子包括以下中的一者或多者:IL-2、IL-15、IL-10、IL-12、IFN- α 或IL-21或者它们的功能变体。在一些实施方案中,细胞因子是IL-2或其功能变体以及/或者IL-12或其功能变体。如本文所用,术语“功能变体”是指与多肽或蛋白质具有实质上或显著的序列同一性,并且保持多肽或蛋白质的生物学活性中的至少一种的多肽或蛋白质(例如,细胞因子)的变体。可以根据本公开通过本领域已知的手段来制备多肽或蛋白质的功能变体。功能变体可以包括对多肽或蛋白质的氨基酸序列的一种或多种修饰。在一些方面,修饰改变多肽或蛋白质的一种或多种物理化学性质,例如通过改善多肽或蛋白质的热稳定性、改变底物特异性、改变最佳pH、降低免疫原性等等。在一些方面,修饰改变多肽或蛋白质的生物学活性中的一种或多种,只要它们不破坏或消除多肽或蛋白质的所有生物学活性即可。

[0117] 在一些方面,提供了用于调节TIL的活性和/或增殖能力的方法,其中所述方法包括在TIL中表达编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸。在一些实施方案中,方法包括在TIL中表达编码嵌合型膜结合性细胞因子中的一种或多种的一种或多种核酸,其中细胞因子是IL-2、IL-15、IL-10、IL-12、IFN- α 或IL-21。在一些实施方案中,方法包括在TIL中表达编码嵌合型膜结合性细胞因子的一种或多种核酸,其中细胞因子是IL-2和/或IL-12。在一些实施方案中,编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸是编码嵌合型膜结合性细胞因子的mRNA。在一些实施方案中,编码嵌合型膜结合性细胞因子的一种或多种mRNA是编码IL-2和/或IL-12的mRNA。

[0118] 在一些实施方案中,TIL被修饰以增加一种或多种细胞因子的表达。在一些实施方案中,细胞因子是IL-10、IL-15、IL-12、IL-2、IFN- α 、IFN- γ 、IL-21或者它们的功能变体。在一些实施方案中,细胞因子是IFN- α 2或其功能变体。在一些实施方案中,细胞因子是变体细胞因子(诸如经修饰的细胞因子),诸如嵌合型膜结合性细胞因子。在一些实施方案中,TIL被修饰以增加一种或多种嵌合型膜结合性细胞因子(诸如膜结合性IL-10、IL-15、IL-12、IL-2、IFN- α 、IFN- γ 、IL-21)的表达。

[0119] 在一些实施方案中,细胞因子是经修饰的,并且经修饰的细胞因子是包含细胞因子和跨膜结构域的融合蛋白。在一些实施方案中,细胞因子通过肽接头连接至跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域是运铁蛋白受体蛋白1(TFRC)或肿瘤坏死因子(例如,FasL)跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域包含SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在一些实施方案中,肽接头是G₄S接头或EAAAK接头。在实施方案中,G₄S接头包含G₄S序列的2、3、4、5、6、7、8、9或10个重复序列中的任一个。在一些实施方案中,EAAAK接头包含EAAAK序列的2、3、4、5、6、7、8、9或10个重复序列中的任一个。在一些实施方案中,肽接头是(G₄S)₃(SEQ ID NO:3)或(EAAAK)₃(SEQ ID NO:4)。在一些实施方案中,嵌合型膜结合性细胞因子包含SEQ ID NO:7-10的氨基酸序列。在一些实施方案中,TIL被修饰以包含使一种或多种细胞因子的表达和/或分泌增加的核酸。在一些实施方案中,编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸包含SEQ ID NO:1或2的核苷酸序列。在一些实施方案中,细胞因子是刺激T细胞活化的信号3效应子。在一些实施方案中,与非膜结合性细胞因子相比,嵌合型膜结合性细胞因子延长细胞因子在个体中的半衰期。在一些实施方案中,与非膜结合性细胞因子相比,嵌

合型膜结合性细胞因子的半衰期延长约以下中的任一者：10%、25%、50%、75%、100%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、200倍、或500倍或更多。在一些实施方案中，与包含非膜结合性细胞因子的TIL相比，经修饰的TIL中的膜结合性细胞因子使细胞因子与抗原呈递细胞呈递的抗原的空间缔合延长约以下中的任一者：1、2、3、4、6、8、12、16、20、24、28、32、36、48、72、96小时或更长时间。在一些实施方案中，与包含非膜结合性细胞因子的相应TIL相比，包含膜结合性细胞因子的TIL表现出局部细胞因子浓度高约以下中的任一者：10%、25%、50%、75%、100%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、200倍或500倍或更多。在一些实施方案中，膜结合性细胞因子是膜结合性趋化因子。

[0120] 在一些方面，提供了一种用于增强TIL的活性的组合物，所述组合物包含在TIL中的嵌合型膜结合性细胞因子。在一些实施方案中，细胞因子是经修饰的，并且经修饰的细胞因子是包含细胞因子和跨膜结构域的融合蛋白。在一些实施方案中，细胞因子通过肽接头连接至跨膜结构域。在一些实施方案中，跨膜结构域是运铁蛋白受体蛋白1(TFRC)或肿瘤坏死因子(例如，FasL)跨膜结构域。在一些实施方案中，跨膜结构域包含SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在一些实施方案中，肽接头是G₄S接头或EAAAK接头。在实施方案中，G₄S接头包含G₄S序列的2、3、4、5、6、7、8、9或10个重复序列中的任一个。在一些实施方案中，EAAAK接头包含EAAAK序列的2、3、4、5、6、7、8、9或10个重复序列中的任一个。在一些实施方案中，肽接头是(G₄S)₃(SEQ ID NO:3)或(EAAAK)₃(SEQ ID NO:4)。在一些实施方案中，嵌合型膜结合性细胞因子包含SEQ ID NO:7-10中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中，TIL包含使一种或多种细胞因子的表达和/或分泌增加的核酸。在一些实施方案中，编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸包含SEQ ID NO:1或2的核苷酸序列。在一些实施方案中，TIL包含使一种或多种细胞因子的表达和/或分泌增加的mRNA。在一些实施方案中，细胞因子是刺激T细胞活化的信号3效应子。在一些实施方案中，与非膜结合性细胞因子相比，所述嵌合型膜结合性细胞因子延长细胞因子在个体中的半衰期。在一些实施方案中，与非膜结合性细胞因子相比，嵌合型膜结合性细胞因子的半衰期延长约以下中的任一者：10%、25%、50%、75%、100%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、200倍、或500倍或更多。在一些实施方案中，与包含非膜结合性细胞因子的相应TIL相比，膜结合性细胞因子使细胞因子与通过嵌合型膜结合性细胞因子引入的TIL呈递的抗原的空间缔合延长约以下中的任一者：1、2、3、4、6、8、12、16、20、24、28、32、36、48、72、96小时或更长时间。在一些实施方案中，与包含非膜结合性细胞因子的相应TIL相比，包含膜结合性细胞因子的TIL表现出局部细胞因子浓度高约以下中的任一者：10%、25%、50%、75%、100%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、200倍或500倍或更多。在一些实施方案中，膜结合性细胞因子是膜结合性趋化因子。

[0121] 在一些实施方案中，提供了用于调节肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的活性和/或增殖能力的方法，其中TIL通过包括以下步骤的方法来修饰：a)使包含输入TIL的细胞悬液通过细胞变形缩窄结构，其中缩窄结构的直径随悬液中的输入TIL的直径而变化，从而使得输入TIL的扰动的大小足以使编码一种或多种细胞因子的一种或多种核酸和/或编码一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸得以通过，从而形成扰动的输入TIL；并且b)将扰动的输入TIL与编码一种或多种细胞因子的一种或多种核酸和/或编码一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸一起孵育，以允许编码一种或多种细胞因子的一种或多种核酸和/或编码一

种或多种共刺激分子的一种或多种核酸进入扰动的输入TIL；其中核酸得以表达，从而产生包含一种或多种细胞因子和/或一种或多种共刺激分子的经修饰的TIL。在一些实施方案中，编码细胞因子的核酸和/或编码共刺激分子的一种或所述核酸是mRNA。在一些实施方案中，其中细胞因子是膜结合性细胞因子，编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸是编码嵌合型膜结合性细胞因子的mRNA。

[0122] 在一些实施方案中，提供了用于调节肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的活性和/或增殖能力的方法，其中TIL通过包括以下步骤的方法来修饰：a)使包含输入TIL的细胞悬液通过细胞变形缩窄结构，其中缩窄结构的直径随悬液中的输入TIL的直径而变化，从而使得输入TIL的扰动的大小足以使编码一种或多种细胞因子和/或一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸得以通过，从而形成扰动的输入TIL；并且b)将扰动的输入TIL与编码一种或多种细胞因子和/或一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸一起孵育，以使一种或多种核酸进入扰动的输入TIL；其中核酸得以表达，从而产生包含一种或多种细胞因子和/或一种或多种共刺激分子的经修饰的TIL。在一些实施方案中，编码一种或多种细胞因子的核酸是mRNA。在一些实施方案中，其中细胞因子是膜结合性细胞因子，编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸是编码嵌合型膜结合性细胞因子的mRNA。

[0123] 在一些实施方案中，提供了用于调节肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的活性和/或增殖能力的方法，其中所述方法包括在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前、期间和/或之后，将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸一起孵育。在一些实施方案中，方法包括在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前、期间和/或之后，将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子和共刺激分子的核酸一起孵育。在一些实施方案中，方法包括在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前、期间和/或之后，将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸和编码共刺激分子的核酸一起孵育。在一些实施方案中，方法包括在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前、期间和/或之后，将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸和编码一种或多种共刺激分子的核酸一起孵育。在一些实施方案中，编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸是编码嵌合型膜结合性细胞因子的mRNA。如本文所用，术语“孵育”包括将至少第一组分(例如，编码细胞因子的核酸)和第二组分(例如，TIL)结合在一起，以使得第一组分和第二组分在物理上接近，因此可以发生相互作用(即，接触)。

[0124] 在一些实施方案中，提供了用于调节肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的活性和/或增殖能力的方法，其中方法包括在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前，将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸一起孵育。在一些实施方案中，方法包括在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前，将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子和共刺激分子的核酸一起孵育。在一些实施方案中，方法包括在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前，将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸和编码共刺激分子的核酸一起孵育。在一些实施方案中，方法包括在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前，将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸和编码一种或多种共刺激分子的核酸一起孵育。在一些实施方案中，编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸是编码嵌合型膜结合性细胞因子的mRNA。

[0125] 在根据本文所述的方法中的任一种的一些实施方案中，TIL是哺乳动物TIL。在一些实施方案中，TIL是猴、小鼠、狗、猫、马、大鼠、绵羊、山羊、猪或兔TIL。在一些实施方案中，TIL是灵长类动物TIL。在一些实施方案中，TIL是人TIL。

[0126] 具有增强的活性和/或增殖的经修饰的TIL的组合物

[0127] 在一些方面,提供了包含具有增强的活性和/或增殖能力的经修饰的TIL的组合物。

[0128] 在一些方面,提供了包含经修饰的TIL的组合物,其中TIL被修饰以增加信号2和/或信号3介质中的一种或多种的表达。

[0129] 在一些方面,提供了包含经修饰的TIL的组合物,其中TIL被修饰以增加一种或多种共刺激分子和/或一种或多种细胞因子的表达。在一些方面,提供了包含经修饰的TIL的组合物,其中TIL被修饰以增加共刺激分子中的一种或多种的表达。在一些实施方案中,共刺激分子是B7-H2 (ICOSL)、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、CD70、LIGHT、HVEM、CD40、4-1BBL、OX40L、TL1A、GITRL、CD30L、TIM4、SLAM、CD48、CD58、CD155或CD112。在一些实施方案中,共刺激分子是CD86。在一些实施方案中,TIL被修饰以增加以下中之一者或多者的表达: B7-H2 (ICOSL)、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、CD70、LIGHT、HVEM、CD40、4-1BBL、OX40L、TL1A、GITRL、CD30L、TIM4、SLAM、CD48、CD58、CD155或CD112。在一些实施方案中,TIL被修饰以增加CD86的表达。

[0130] 在一些实施方案中,提供了包含经修饰的TIL的组合物,其中TIL被修饰以在TIL中表达编码共刺激分子的核酸。在一些实施方案中,TIL被修饰以表达编码以下中之一者或多者的一种或多种核酸: B7-H2 (ICOSL)、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、CD70、LIGHT、HVEM、CD40、4-1BBL、OX40L、TL1A、GITRL、CD30L、TIM4、SLAM、CD48、CD58、CD155或CD112。在一些实施方案中,TIL被修饰以表达编码CD86的一种或多种核酸。在一些实施方案中,核酸中的一种或多种是mRNA。

[0131] 在一些方面,提供了包含经修饰的TIL的组合物,其中TIL被修饰以增加一种或多种共刺激分子和/或一种或多种细胞因子的表达。在一些方面,提供了包含经修饰的TIL的组合物,其中TIL被修饰以增加细胞因子中的一种或多种的表达。在一些实施方案中,细胞因子是I型细胞因子。在一些实施方案中,细胞因子是2型细胞因子。在一些实施方案中,细胞因子包括以下中之一者或多者: IL-2、IL-15、IL-10、IL-12、IFN- α 或IL-21或者它们的功能变体。在一些实施方案中,细胞因子是IL-2或其功能变体以及/或者IL-12或其功能变体。

[0132] 在一些方面,提供了包含经修饰的TIL的组合物,其中TIL被修饰以在TIL中表达编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸。在一些实施方案中,TIL被修饰以在TIL中表达编码嵌合型膜结合性细胞因子中的一种或多种的一种或多种核酸,其中细胞因子是IL-2、IL-15、IL-10、IL-12、IFN- α 或IL-21。在一些实施方案中,TIL被修饰以在TIL中表达编码嵌合型膜结合性细胞因子的一种或多种核酸,其中细胞因子是IL-2和/或IL-12。在一些实施方案中,核酸中的一种或多种是mRNA。

[0133] 在一些实施方案中,TIL被修饰以增加一种或多种细胞因子的表达。在一些实施方案中,细胞因子是IL-10、IL-15、IL-12、IL-2、IFN- α 、IFN- γ 、IL-21或者它们的功能变体。在一些实施方案中,细胞因子是IFN- α 2或其功能变体。在一些实施方案中,细胞因子是变体细胞因子(诸如经修饰的细胞因子),诸如嵌合型膜结合性细胞因子。在一些实施方案中,TIL被修饰以增加一种或多种嵌合型膜结合性细胞因子(诸如膜结合性IL-10、IL-15、IL-12、IL-2、IFN- α 、IFN- γ 、IL-21)的表达。

[0134] 在一些实施方案中,细胞因子是经修饰的,并且经修饰的细胞因子是包含细胞因

子和跨膜结构域的融合蛋白。在一些实施方案中,细胞因子通过肽接头连接至跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域是运铁蛋白受体蛋白1 (TFRC) 或肿瘤坏死因子(例如,FasL)跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域包含SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在一些实施方案中,肽接头是G₄S接头或EAAAK接头。在实施方案中,G₄S接头包含G₄S序列的2、3、4、5、6、7、8、9或10个重复序列中的任一个。在一些实施方案中,EAAAK接头包含EAAAK序列的2、3、4、5、6、7、8、9或10个重复序列中的任一个。在一些实施方案中,肽接头是(G₄S)₃(SEQ ID NO:3)或(EAAAK)₃(SEQ ID NO:4)。在一些实施方案中,嵌合型膜结合性细胞因子包含SEQ ID NO:7-10的氨基酸序列。在一些实施方案中,TIL被修饰以包含使一种或多种细胞因子的表达和/或分泌增加的核酸。在一些实施方案中,编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸包含SEQ ID NO:1或2的核苷酸序列。在一些实施方案中,TIL被修饰以包含使一种或多种细胞因子的表达和/或分泌增加的mRNA。在一些实施方案中,细胞因子是刺激T细胞活化的信号3效应子。在一些实施方案中,与非膜结合性细胞因子相比,嵌合型膜结合性细胞因子延长细胞因子在个体中的半衰期。在一些实施方案中,与非膜结合性细胞因子相比,嵌合型膜结合性细胞因子的半衰期延长约以下中的任一者:10%、25%、50%、75%、100%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、200倍、或500倍或更多。在一些实施方案中,与包含非膜结合性细胞因子的TIL相比,经修饰的TIL中的膜结合性细胞因子使细胞因子与抗原呈递细胞呈递的抗原的空间缔合延长约以下中的任一者:1、2、3、4、6、8、12、16、20、24、28、32、36、48、72、96小时或更长时间。在一些实施方案中,与包含非膜结合性细胞因子的相应TIL相比,包含膜结合性细胞因子的TIL表现出局部细胞因子浓度高约以下中的任一者:10%、25%、50%、75%、100%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、200倍或500倍或更多。在一些实施方案中,膜结合性细胞因子是膜结合性趋化因子。

[0135] 在一些方面,提供了一种用于增强TIL的活性的组合物,所述组合物包含在TIL中的嵌合型膜结合性细胞因子。在一些实施方案中,细胞因子是经修饰的,并且经修饰的细胞因子是包含细胞因子和跨膜结构域的融合蛋白。在一些实施方案中,细胞因子通过肽接头连接至跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域是运铁蛋白受体蛋白1 (TFRC) 或肿瘤坏死因子(例如,FasL)跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域包含SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在一些实施方案中,肽接头是G₄S接头或EAAAK接头。在实施方案中,G₄S接头包含G₄S序列的2、3、4、5、6、7、8、9或10个重复序列中的任一个。在一些实施方案中,EAAAK接头包含EAAAK序列的2、3、4、5、6、7、8、9或10个重复序列中的任一个。在一些实施方案中,肽接头是(G₄S)₃(SEQ ID NO:3)或(EAAAK)₃(SEQ ID NO:4)。在一些实施方案中,嵌合型膜结合性细胞因子包含SEQ ID NO:7-10中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,TIL包含使一种或多种细胞因子的表达和/或分泌增加的核酸。在一些实施方案中,编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸包含SEQ ID NO:1或2的核苷酸序列。在一些实施方案中,细胞因子是刺激T细胞活化的信号3效应子。在一些实施方案中,与非膜结合性细胞因子相比,嵌合型膜结合性细胞因子延长细胞因子在个体中的半衰期。在一些实施方案中,与非膜结合性细胞因子相比,嵌合型膜结合性细胞因子的半衰期延长约以下中的任一者:10%、25%、50%、75%、100%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、200倍、或500倍或更多。在一些实施方案中,与包含非膜结合性细胞因子的相应TIL相比,膜结合性细胞因子使细胞因子与通过嵌合型膜结合性细胞因子引入的TIL呈递的抗原的空间缔合延长约以下中

的任一者:1、2、3、4、6、8、12、16、20、24、28、32、36、48、72、96小时或更长时间。在一些实施方案中,与包含非膜结合性细胞因子的相应TIL相比,包含膜结合性细胞因子的TIL表现出局部细胞因子浓度高约以下中的任一者:10%、25%、50%、75%、100%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、200倍或500倍或更多。在一些实施方案中,膜结合性细胞因子是膜结合性趋化因子。

[0136] 在一些实施方案中,提供了组合物,所述组合物包含经修饰的TIL,其中TIL通过包括以下步骤的方法来修饰:a)使包含输入TIL的细胞悬液通过细胞变形缩窄结构,其中缩窄结构的直径随悬液中的输入TIL的直径而变化,从而使得输入TIL的扰动的大小足以使编码一种或多种细胞因子的一种或多种核酸和/或编码一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸得以通过,从而形成扰动的输入TIL;并且b)将扰动的输入TIL与编码一种或多种细胞因子的一种或多种核酸和/或编码一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸一起孵育,以允许编码一种或多种细胞因子的一种或多种核酸和/或编码一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸进入扰动的输入TIL;其中核酸得以表达,从而产生包含一种或多种细胞因子和/或一种或多种共刺激分子的经修饰的TIL。在一些实施方案中,编码细胞因子的核酸和/或编码共刺激分子的一种或多种核酸是mRNA。在一些实施方案中,其中细胞因子是膜结合性细胞因子,编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸是编码嵌合型膜结合性细胞因子的mRNA。

[0137] 在一些实施方案中,提供了组合物,所述组合物包含经修饰的TIL,其中TIL通过包括以下步骤的方法来修饰:a)使包含输入TIL的细胞悬液通过细胞变形缩窄结构,其中缩窄结构的直径随悬液中的输入TIL的直径而变化,从而使得输入TIL的扰动的大小足以使编码一种或多种细胞因子和/或一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸得以通过,从而形成扰动的输入TIL;并且b)将扰动的输入TIL与编码一种或多种细胞因子和/或一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸一起孵育,以使一种或多种核酸进入扰动的输入TIL;其中核酸得以表达,从而产生包含一种或多种细胞因子和/或一种或多种共刺激分子的经修饰的TIL。在一些实施方案中,编码一种或多种细胞因子的核酸是mRNA。在一些实施方案中,其中细胞因子是膜结合性细胞因子,编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸是编码嵌合型膜结合性细胞因子的mRNA。

[0138] 在一些实施方案中,提供了包含经修饰的TIL的组合物,其中TIL在以下方法中被修饰,所述方法包括在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前、期间和/或之后,将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸一起孵育。在一些实施方案中,TIL在以下方法中被修饰,所述方法包括在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前、期间和/或之后,将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子和共刺激分子的核酸一起孵育。在一些实施方案中,TIL在以下方法中被修饰,所述方法包括在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前、期间和/或之后,将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸和编码共刺激分子的核酸一起孵育。在一些实施方案中,TIL在以下方法中被修饰,所述方法包括在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前、期间和/或之后,将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸和编码一种或多种共刺激分子的核酸一起孵育。在一些实施方案中,编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸是编码嵌合型膜结合性细胞因子的mRNA。

[0139] 在一些实施方案中,提供了包含经修饰的TIL的组合物,其中TIL在以下方法中被修饰,所述方法包括在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前,将TIL与编码嵌合型膜结合性

细胞因子的核酸一起孵育。在一些实施方案中,TIL在以下方法中被修饰,所述方法包括在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前,将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子和共刺激分子的核酸一起孵育。在一些实施方案中,TIL在以下方法中被修饰,所述方法包括在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前,将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸和编码共刺激分子的核酸一起孵育。在一些实施方案中,TIL在以下方法中被修饰,所述方法包括在细胞悬液通过细胞变形缩窄结构之前,将TIL与编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸和编码一种或多种共刺激分子的核酸一起孵育。在一些实施方案中,编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸是编码嵌合型膜结合性细胞因子的mRNA。

[0140] 在根据本文所述的组合物中的任一种的一些实施方案中,TIL是哺乳动物TIL。在一些实施方案中,TIL是猴、小鼠、狗、猫、马、大鼠、绵羊、山羊、猪或兔TIL。在一些实施方案中,TIL是灵长类动物TIL。在一些实施方案中,TIL是人TIL。

[0141] 用作药品的治疗方法、组合物以及药物组合物用于制造药物的用途

[0142] 在一些方面,提供了一种调节个体的免疫应答的方法,所述方法包括施用经修饰的TIL,所述经修饰的TIL表现出一种或多种细胞因子和/或一种或多种共刺激分子的表达增加。例如,在一些方面,本公开提供了一种调节有需要的个体的免疫应答的方法,所述方法包括将经修饰的TIL施用于受试者,所述经修饰的TIL表现出一种或多种细胞因子的表达增加。在一些方面,本公开提供了一种调节有需要的个体的免疫应答的方法,所述方法包括将经修饰的TIL施用于受试者,所述经修饰的TIL表现出一种或多种共刺激分子的表达增加。在一些方面,本文提供了一种调节有需要的个体的免疫应答的方法,所述方法包括将经修饰的TIL施用于受试者,所述经修饰的TIL表现出(i)一种或多种细胞因子和(ii)一种或多种共刺激分子两者的表达增加。在一些方面,经修饰的TIL根据本文所述的方法中的任一种来制备。在一些方面,提供了一种调节个体的免疫应答的方法,所述方法包括施用包含本文所述的经修饰的TIL的组合物中的任一种。

[0143] 在一些方面,提供了一种治疗个体的癌症、感染性疾病或病毒相关疾病的方法,所述方法包括施用根据本文所述的方法中的任一种制备的经修饰的TIL。在一些方面,提供了一种治疗个体的癌症、感染性疾病或病毒相关疾病的方法,所述方法包括施用包含本文所述的经修饰的TIL的组合物中的任一种。因此,本公开的一些方面涉及一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括将本文所述的经修饰的TIL中的任一种施用于受试者。在一些方面,本文提供了一种治疗有需要的受试者的感染性疾病的方法,所述方法包括将本文所述的经修饰的TIL中的任一种施用于受试者。在一些方面,本文提供了一种治疗有需要的受试者的病毒相关疾病的方法,所述方法包括将本文所述的经修饰的TIL中的任一种施用于受试者。本文别处提供了可以用本公开治疗的癌症、感染性疾病和病毒相关疾病的非限制性实例。

[0144] 在一些实施方案中,方法包括经修饰的TIL或包含经修饰的TIL的组合物的多次施用的多次施用。从本公开可以明显看出,经修饰的TIL(或包含经修饰的TIL的组合物)可以使用任何合适的施用途径施用于受试者。此类施用途径的非限制性实例包括:肿瘤内、口服、肺部、鼻内、肠胃外(静脉内、动脉内、肌肉内、腹膜内或皮下)、直肠、淋巴管内、鞘内、眼周或局部。在一些实施方案中,经修饰的TIL或包含经修饰的TIL的组合物通过静脉内或肿瘤内施用。在一些实施方案中,个体是哺乳动物。在一些实施方案中,个体是猴、小鼠、狗、

猫、马、大鼠、绵羊、山羊、猪或兔。在一些实施方案中,个体是灵长类动物。在一些实施方案中,个体是人。在一些实施方案中,经修饰的TIL或包含经修饰的TIL的组合物在施用另一种疗法之前施用、在施用另一种疗法的同时施用或在施用另一种疗法之后施用。在一些实施方案中,另一种疗法是检查点疗法。

[0145] 在一些方面,提供了一种用于刺激个体的免疫应答的药物组合物,其中所述组合物包含有效量的包含本文所述的经修饰的TIL的组合物中的任一种。在一些方面,提供了用作药品的药物组合物,其中所述药物组合物包含有效量的包含本文所述的经修饰的TIL的组合物中的任一种。

[0146] 在一些方面,提供了一种用于治疗个体的癌症、感染性疾病或病毒相关疾病的药物组合物,其中所述药物组合物包含有效量的包含本文所述的经修饰的TIL的组合物中的任一种。

[0147] 在一些方面,提供了药物组合物用于制造用于刺激个体的免疫应答的药物中的用途,其中所述药物组合物包含有效量的包含本文所述的经修饰的TIL的组合物中的任一种。

[0148] 在一些方面,提供了药物组合物用于制造用于治疗个体的癌症、感染性疾病或病毒相关疾病的药物的用途,其中所述药物组合物包含有效量的包含本文所述的经修饰的TIL的组合物中的任一种的组合物。

[0149] 在一些方面,提供了一种用作药品的组合物,其中所述组合物包含有效量的经修饰的TIL,所述经修饰的TIL包含嵌合型膜结合性细胞因子。在一些方面,提供了用于使用组合物来治疗个体的癌症、感染性疾病或病毒相关疾病的组合物,其中所述组合物包含有效量的TIL,所述TIL包含嵌合型膜结合性细胞因子。在一些方面,提供了治疗个体的癌症、感染性疾病或病毒相关疾病的方法,所述方法包括将包含有效量的TIL的组合物施用于个体,所述TIL包含嵌合型膜结合性细胞因子。

[0150] 在一些实施方案中,提供了包含有效量的包括嵌合型膜结合性细胞因子的TIL的组合物用于制造用于刺激个体的免疫应答和/或治疗个体的癌症、感染性疾病或病毒相关疾病的药物的用途。

[0151] 在根据本文所述的药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,组合物被配制用于多次施用的多次施用。在一些实施方案中,组合物通过静脉内或肿瘤内施用。在一些实施方案中,个体是哺乳动物。在一些实施方案中,个体是猴、小鼠、狗、猫、马、大鼠、绵羊、山羊、猪或兔。在一些实施方案中,个体是灵长类动物。在一些实施方案中,个体是人。在一些实施方案中,组合物被配制用于在施用另一种疗法之前施用、在施用另一种疗法的同时施用或在施用另一种疗法之后施用。在一些实施方案中,另一种疗法是检查点疗法。

[0152] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,TIL通过包括以下步骤的方法来修饰:a)使包含输入TIL的细胞悬液通过细胞变形缩窄结构,其中缩窄结构的直径随悬液中的输入TIL的直径而变化,从而使得输入TIL的扰动的大小足以使编码一种或多种细胞因子的一种或多种核酸和/或编码一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸得以通过,从而形成扰动的输入TIL;并且b)将扰动的输入TIL与编码一种或多种细胞因子的一种或多种核酸和/或编码一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸一起孵育,以允许编码一种或多种细胞因子的一种或多种核酸和/或编码一种或

多种共刺激分子的一种或多种核酸进入扰动的输入TIL;其中核酸得以表达,从而产生包含一种或多种细胞因子和/或一种或多种共刺激分子的经修饰的TIL。在一些实施方案中,编码细胞因子的核酸和/或编码共刺激分子的一种或所述核酸是mRNA。在一些实施方案中,其中细胞因子是膜结合性细胞因子,编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸是编码嵌合型膜结合性细胞因子的mRNA。

[0153] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,TIL通过包括以下步骤的方法来修饰:a)使包含输入TIL的细胞悬液通过细胞变形缩窄结构,其中缩窄结构的直径随悬液中的输入TIL的直径而变化,从而使得输入TIL的扰动的大小足以使编码一种或多种细胞因子和/或一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸得以通过,从而形成扰动的输入TIL;并且b)将扰动的输入TIL与编码一种或多种细胞因子和/或一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸一起孵育,以使一种或多种核酸进入扰动的输入TIL;其中核酸得以表达,从而产生包含一种或多种细胞因子和/或一种或多种共刺激分子的经修饰的TIL。在一些实施方案中,编码一种或多种细胞因子的核酸是mRNA。在一些实施方案中,其中细胞因子是膜结合性细胞因子,编码嵌合型膜结合性细胞因子的核酸是编码嵌合型膜结合性细胞因子的mRNA。

[0154] TIL的活性和增殖能力的调节

[0155] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL表现出体内持久性增加。在一些实施方案中,与不表达膜结合性IL-2和/或IL-12的相应TIL相比,表达膜结合性IL-2和/或IL-12的经修饰的TIL表现出体内持久性增加。

[0156] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL表现出体内循环时间增加。在一些实施方案中,与不表达膜结合性IL-2和/或IL-12的相应TIL相比,表达膜结合性IL-2和/或IL-12的经修饰的TIL表现出体内循环时间增加。

[0157] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,在不存在外源细胞因子的情况下,经修饰的TIL表现出体内持久性增加。在一些实施方案中,与不表达膜结合性IL-2和/或IL-12的相应TIL相比,在不存在外源细胞因子的情况下,表达膜结合性IL-2和/或IL-12的经修饰的TIL表现出体内持久性增加。

[0158] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,在不存在外源细胞因子的情况下,经修饰的TIL表现出体内循环时间增加。在一些实施方案中,与不表达膜结合性IL-2和/或IL-12的相应TIL相比,在不存在外源细胞因子的情况下,表达膜结合性IL-2和/或IL-12的经修饰的TIL表现出体内循环时间增加。

[0159] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL表现出体内持久性增加,其中TIL在不存在外源细胞因子的情况下培养1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天中的任一者。在一些实施方案中,与不表达膜结合性IL-2和/或IL-12的相应TIL相比,表达膜结合性IL-2和/或IL-12的经修饰的TIL表现出体内持久性增加,其中TIL在不存在外源细胞因子的情况下培养1、2、3、

4、5、6、7、8、9或10天中的任一者。

[0160] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,在不存在外源细胞因子的情况下,经修饰的TIL表现出体内循环时间增加,其中TIL在不存在外源细胞因子的情况下培养1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天中的任一者。在一些实施方案中,与不表达膜结合性IL-2和/或IL-12的相应TIL相比,表达膜结合性IL-2和/或IL-12的经修饰的TIL表现出体内循环时间增加,其中TIL在不存在外源细胞因子的情况下培养1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天中的任一者。

[0161] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL具有中央记忆T细胞(诸如但不限于CD62L)的一种或多种标志物的表达增加。如本文所用,术语“中央记忆T细胞”或“T_{CM}细胞”是指表达至少CD45RO、CCR7、CD62L和/或CD127的记忆T细胞。因此,在一些方面,所述的修饰TIL的方法可用于增加TIL上的一种或多种中央记忆T细胞标志物的表达。在一些实施方案中,与不表达膜结合性IL-2和/或IL-12的相应TIL相比,表达膜结合性IL-2和/或IL-12的经修饰的TIL具有中央记忆T细胞的一种或多种标志物的表达增加。

[0162] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL在不存在外源细胞因子的情况下培养时具有中央记忆T细胞的一种或多种标志物的表达增加。在一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL在不存在外源细胞因子的情况下培养1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天中的任一者时具有中央记忆T细胞的一种或多种标志物的表达增加。在一些实施方案中,与不表达膜结合性IL-2和/或IL-12的相应TIL相比,表达膜结合性IL-2和/或IL-12的经修饰的TIL在不存在外源细胞因子的情况下培养时具有中央记忆T细胞的一种或多种标志物的表达增加。在一些实施方案中,外源细胞因子包括外源性IL-2。

[0163] 在根据上文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL中的中央记忆T细胞的一种或多种标志物的表达增加约以下中的任一者:10%、25%、50%、75%、100%、1.2倍、1.5倍、1.8倍、2倍、3倍、4倍、5倍、8倍或超过10倍。

[0164] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL具有T细胞自我更新的一种或多种标志物(诸如但不限于TCF1)的表达增加。在一些实施方案中,与不表达膜结合性IL-2和/或IL-12的相应TIL相比,表达膜结合性IL-2和/或IL-12的经修饰的TIL具有T细胞自我更新的一种或多种标志物的表达增加。

[0165] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL在不存在外源细胞因子的情况下培养时具有T细胞自我更新的一种或多种标志物的表达增加。在一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL在不存在外源细胞因子的情况下培养1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天中的任一者时具有T细胞自我更新的一种或多种标志物的表达增加。在一些实施方案中,与不表达膜结合性IL-2和/或IL-12的相应TIL相比,表达膜结合性IL-2和/或IL-12的经修饰的TIL在不存在外源细胞因子的情况下培养时具有T细胞自我更新的一种或多种标志物的表达增加。在一些实施方案中,外源细胞因子包括外源性IL-2。

[0166] 在根据上文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL中的T细胞自我更新的一种或多种标志物的表达增加约以下中的任一者:10%、25%、50%、75%、100%、1.2倍、1.5倍、1.8倍、2倍、3倍、4倍、5倍、8倍或超过10倍。

[0167] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL具有T细胞耗竭的一种或多种标志物(诸如但不限于CD39或CD69)的表达减少。在一些实施方案中,与不表达膜结合性IL-2和/或IL-12的相应TIL相比,表达膜结合性IL-2和/或IL-12的经修饰的TIL具有T细胞自我耗竭的一种或多种标志物的表达减少。衰竭标志物的非限制性实例包括:PD-1、CD39、TIM-3、TIGIT和/或LAG-3。

[0168] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL在不存在外源细胞因子的情况下培养时具有T细胞耗竭的一种或多种标志物的表达减少。在一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL在不存在外源细胞因子的情况下培养1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天中的任一者时具有T细胞耗竭的一种或多种标志物的表达减少。在一些实施方案中,与不表达膜结合性IL-2和/或IL-12的相应TIL相比,表达膜结合性IL-2和/或IL-12的经修饰的TIL在不存在外源细胞因子的情况下培养时具有T细胞耗竭的一种或多种标志物的表达减少。在一些实施方案中,外源细胞因子包括外源性IL-2。

[0169] 在根据上文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL中的T细胞耗竭的一种或多种标志物的表达减少约以下中的任一者:10%、25%、50%、75%、100%、1.2倍、1.5倍、1.8倍、2倍、3倍、4倍、5倍、8倍或超过10倍。

[0170] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL具有T-bet、EOMES、TCF1、CD62L中的一者或多者的表达增加。在一些实施方案中,与不表达膜结合性IL-2和/或IL-12的相应TIL相比,表达膜结合性IL-2和/或IL-12的经修饰的TIL具有T-bet、EOMES、TCF1、CD62L中的一者或多者的表达增加。

[0171] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL在不存在外源细胞因子的情况下培养时具有T-bet、EOMES、TCF1、CD62L中的一者或多者的表达增加。在一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL在不存在外源细胞因子的情况下培养1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天中的任一者时具有T-bet、EOMES、TCF1、CD62L中的一者或多者的表达增加。在一些实施方案中,与不表达膜结合性IL-2和/或IL-12的相应TIL相比,表达膜结合性IL-2和/或IL-12的经修饰的TIL在不存在外源细胞因子的情况下培养时具有T-bet、EOMES、TCF1、CD62L中的一者或多者的表达增加。在一些实施方案中,外源细胞因子包括外源性IL-2。

[0172] 在根据上文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL中的T-bet、EOMES、TCF1、CD62L中的一者或多者的表达增加约以下中的任一者:10%、25%、50%、75%、100%、1.2倍、1.5倍、1.8倍、2倍、3倍、4倍、5倍、8倍或超过10倍。

[0173] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL具有T-bet、EOMES、CD39和CD69中的一者或多者的表达减少。在一些实施方案中,与不表达膜结合性IL-2和/或IL-12的相应TIL相比,表达膜结合性IL-2和/或IL-12的经修饰的TIL具有T-bet、EOMES、CD39和CD69中的一者或多者的表达减少。

[0174] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL在不存在外源细胞因子的情况下培养时具有T-bet、EOMES、CD39和CD69中的一者或多者的表达减少。在一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL在不存在外源细胞因子的情况下培养1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天中的任一者时具有T-bet、EOMES、CD39和CD69中的一者或多者的表达减少。在一些实施方案中,与不表达膜结合性IL-2和/或IL-12的相应TIL相比,表达膜结合性IL-2和/或IL-12的经修饰的TIL在不存在外源细胞因子的情况下培养时具有T-bet、EOMES、CD39和CD69中的一者或多者的表达减少。在一些实施方案中,外源细胞因子包括外源性IL-2。

[0175] 在根据上文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL中的T-bet、EOMES、CD39和CD69中的一者或多者的表达减少约以下中的任一者:10%、25%、50%、75%、100%、1.2倍、1.5倍、1.8倍、2倍、3倍、4倍、5倍、8倍或超过10倍。

[0176] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL表现出增殖增加。在一些实施方案中,与不表达膜结合性IL-2和/或IL-12的相应TIL相比,表达膜结合性IL-2和/或IL-12的经修饰的TIL表现出增殖增加。

[0177] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL在不包含外源细胞因子(诸如但不限于外源性IL-2)的培养基中培养时表现出增殖增加。在一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL在不包含外源细胞因子(诸如但不限于外源性IL-2)的培养基中培养1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天中的任一者时表现出增殖增加。在一些实施方案中,与不表达膜结合性IL-2和/或IL-12的相应TIL相比,表达膜结合性IL-2和/或IL-12的经修饰的TIL在不包含外源细胞因子(诸如但不限于外源性IL-2)的培养基中培养时表现出增殖增加。在一些实施方案中,外源细胞因子包括外源性IL-2。

[0178] 在根据上文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL的增殖速率增加约以下中的任一者:10%、25%、50%、75%、100%、1.2倍、1.5倍、1.8倍、2倍、3倍、4倍、5倍、8倍或超过10倍。

[0179] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,在与肿瘤细胞共培养后,经修饰的TIL表现出增殖增加。在一些实施方案中,与不表达膜结合性IL-2和/或IL-12的相应TIL相比,在与肿瘤细胞共培养后,表达膜结合性IL-2和/或IL-12的经修饰的TIL表现出增殖增加。

[0180] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL在不存在外源细胞因子(诸如但不限于外源性IL-2和/或IL-12)的情况下与肿瘤细胞共培养时表现出增殖增加。在一些实施方

案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL在不存在外源细胞因子(诸如,但不限于外源性IL-2和/或IL-12)的情况下与肿瘤细胞共培养1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天中的任一者时表现出增殖增加。在一些实施方案中,与不表达膜结合性IL-2和/或IL-12的相应TIL相比,表达膜结合性IL-2和/或IL-12的经修饰的TIL在不存在外源细胞因子(诸如但不限于外源性IL-2和/或IL-12)的情况下与肿瘤细胞共培养时表现出增殖增加。在一些实施方案中,外源细胞因子包括外源性IL-2。

[0181] 在根据上文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,当在不存在外源细胞因子的情况下与肿瘤细胞共培养时,经修饰的TIL的增殖速率增加约以下中的任一者:10%、25%、50%、75%、100%、1.2倍、1.5倍、1.8倍、2倍、3倍、4倍、5倍、8倍、10倍、20倍、50倍或100倍或更多。

[0182] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL表现出颗粒酶B的表达增加。在一些实施方案中,与不表达膜结合性IL-2和/或IL-12的相应TIL相比,表达膜结合性IL-2和/或IL-12的经修饰的TIL表现出颗粒酶B的表达增加。

[0183] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,在不存在外源细胞因子的情况下培养时,经修饰的TIL表现出颗粒酶B的表达增加。在一些实施方案中,与不表达膜结合性IL-2和/或IL-12的相应TIL相比,在不存在外源细胞因子的情况下培养时,表达膜结合性IL-2和/或IL-12的经修饰的TIL表现出颗粒酶B的表达增加。

[0184] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,在不存在外源细胞因子的情况下与肿瘤细胞共培养时,经修饰的TIL表现出颗粒酶B的表达增加。在一些实施方案中,与不表达膜结合性IL-2和/或IL-12的相应TIL相比,在不存在外源细胞因子的情况下与肿瘤细胞共培养时,表达膜结合性IL-2和/或IL-12的经修饰的TIL表现出颗粒酶B的表达增加。在一些实施方案中,肿瘤细胞是自体肿瘤细胞。

[0185] 在根据上文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL中的颗粒酶B的表达增加约以下中的任一者:10%、25%、50%、75%、100%、1.2倍、1.5倍、1.8倍、2倍、3倍、4倍、5倍、8倍、10倍、20倍、50倍或100倍或更多。

[0186] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,经修饰的TIL中的表达颗粒酶B的细胞的百分比大于未经修饰的相应TIL中的该百分比。在一些实施方案中,表达膜结合性IL-2和/或IL-12的经修饰的TIL中的表达颗粒酶B的细胞百分比大于不表达膜结合性IL-2和/或IL-12的相应TIL中的该百分比。

[0187] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,在不存在外源细胞因子的情况下培养时,经修饰的TIL中的表达颗粒酶B的细胞的百分比大于未经修饰的相应TIL中的该百分比。在一些实施方案中,在不存在外源细胞因子的情况下培养时,表达膜结合性IL-2和/或IL-12的经修饰的TIL中的表达颗粒酶B的细胞百分比大于不表达膜结合性IL-2和/或IL-12的相应TIL中的该百分比。

[0188] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些

实施方案中,在不存在外源细胞因子的情况下与肿瘤细胞共培养时,经修饰的TIL中的表达颗粒酶B的细胞的百分比大于未经修饰的相应TIL中的该百分比。在一些实施方案中,在不存在外源细胞因子的情况下与肿瘤细胞共培养时,表达膜结合性IL-2和/或IL-12的经修饰的TIL中的表达颗粒酶B的细胞百分比大于不表达膜结合性IL-2和/或IL-12的相应TIL中的该百分比。在一些实施方案中,肿瘤细胞是自体肿瘤细胞。

[0189] 在根据上文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,经修饰的TIL中的表达颗粒酶B的细胞的百分比比未经修饰的相应TIL中的该百分比大约以下中的任一者:10%、25%、50%、75%、100%、1.2倍、1.5倍、1.8倍、2倍、3倍、4倍、5倍、8倍、10倍、20倍、50倍或超过100倍。

[0190] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,在共培养后,经修饰的TIL表现出肿瘤细胞的杀伤增加。在一些实施方案中,与不表达膜结合性IL-2和/或IL-12的相应TIL相比,在共培养后,表达膜结合性IL-2和/或IL-12的经修饰的TIL表现出肿瘤细胞的杀伤增加。

[0191] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,在不存在外源细胞因子的情况下共培养后,经修饰的TIL表现出肿瘤细胞的杀伤增加。在一些实施方案中,与不表达膜结合性IL-2和/或IL-12的相应TIL相比,在不存在外源细胞因子的情况下共培养后,表达膜结合性IL-2和/或IL-12的经修饰的TIL表现出肿瘤细胞的杀伤增加。

[0192] 在根据上文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与未经修饰的相应TIL相比,在共培养后,经修饰的TIL促进的肿瘤细胞杀伤增加约以下中的任一者:10%、25%、50%、75%、100%、1.2倍、1.5倍、1.8倍、2倍、3倍、4倍、5倍、8倍、10倍、20倍、50倍或100倍或更多。在一些实施方案中,肿瘤细胞是自体肿瘤细胞。

[0193] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与在存在一种或多种外源细胞因子的情况下共培养后未经修饰的相应TIL相比,在不存在外源细胞因子的情况下共培养后,经修饰的TIL表现出相当的肿瘤细胞的杀伤。在一些实施方案中,外源细胞因子包括外源性IL-2。在一些实施方案中,外源细胞因子包括外源性IL-12。在一些实施方案中,外源细胞因子包括外源性IL-2和/或IL-12。

[0194] 在根据上文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途中的任一者的一些实施方案中,与在存在一种或多种外源细胞因子的情况下未经修饰的相应TIL促进的肿瘤细胞杀伤相比,在共培养后,经修饰的TIL促进的肿瘤细胞杀伤相差不超过以下中的任一者:1%、2%、5%、8%、10%、25%、50%、75%、100%、1.2倍、1.5倍、1.8倍或2倍。在一些实施方案中,外源细胞因子包括外源性IL-2和/或IL-12。在一些实施方案中,肿瘤细胞是自体肿瘤细胞。

[0195] 在根据本文所述的方法、药物组合物、供使用的组合物或用途的一些实施方案中,包含嵌合型膜结合性IL-2和/或IL-12的TIL通过以下步骤来制备:a)使包含输入TIL的细胞悬液通过细胞变形缩窄结构,其中缩窄结构的直径随悬液中的输入TIL的直径而变化,从而使得输入TIL的扰动的大小足以使编码嵌合型膜结合性IL-2和/或IL-12的核酸得以通过,从而形成扰动的输入TIL;并且b)将扰动的输入TIL与编码嵌合型膜结合性IL-2和/或IL-12的核酸一起孵育,以允许核酸进入扰动的输入TIL,其中编码嵌合型膜结合性IL-2和/或IL-

12的核酸在扰动的输入TIL中得以表达;从而产生包含嵌合型膜结合性IL-2和/或IL-12的TIL。

[0196] 缩窄结构介导的递送

[0197] 如本文所述和展示,本文提供的修饰TIL的方法包括使TIL(例如,包含TIL的细胞悬液)通过细胞变形缩窄结构,所述细胞变形缩窄结构在TIL中引起扰动,以使得编码细胞因子的一种或多种核酸和/或编码共刺激分子的一种或多种核酸在与TIL接触时通过扰动进入TIL。如本文所用,“扰动”是指细胞膜中的任何开口(例如,TIL的开口),该开口在正常稳定状态条件下是不存在的(例如,不存在施加于细胞的变形力)。扰动可以包括洞、裂口、空腔、开孔、孔、断裂、缝隙、穿孔或它们的组合。如本文所述,当细胞通过缩窄结构(诸如本公开的那些缩窄结构)时,它会因限制性物理环境而受到各种力,包括但不限于导致在细胞膜中产生扰动的机械变形力和/或剪切力。

[0198] 在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为输入TIL的平均直径的约10%至约99%。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为输入TIL的平均直径的约10%至约90%、约10%至约80%、约10%至约70%、约20%至约60%、约40%至约60%、约30%至约45%、约50%至约99%、约50%至约90%、约50%至约80%、约50%至约70%、约60%至约90%、约60%至约80%或约60%至约70%中的任一者。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约5 μ m至约12 μ m、约6 μ m至约12 μ m、约8 μ m至约11 μ m、约9 μ m至约11 μ m、约9.5 μ m至约10.5 μ m、约8 μ m至约15 μ m、约10 μ m至约15 μ m或约12 μ m至约15 μ m。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约10 μ m。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约3 μ m至约6 μ m。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约4.2 μ m至约6 μ m。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约4.2 μ m至约4.8 μ m。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约3 μ m至约5 μ m。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约3 μ m至约3.5 μ m。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约3.5 μ m至约4 μ m。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约4 μ m至约4.5 μ m。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约3.2 μ m至约3.8 μ m。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约3.8 μ m至约4.3 μ m。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约或小于以下中的任一者:2 μ m、2.5 μ m、3 μ m、3.5 μ m、4 μ m、4.5 μ m、5 μ m、5.5 μ m、6 μ m、6.5 μ m、7 μ m、7.5 μ m、8 μ m、8.5 μ m、9 μ m、9.5 μ m、10 μ m、10.5 μ m、11 μ m、11.5 μ m、12 μ m、12.5 μ m、13 μ m、13.5 μ m、14 μ m、14.5 μ m或15 μ m。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约或小于以下中的任一者:3.0 μ m、3.1 μ m、3.2 μ m、3.3 μ m、3.4 μ m、3.5 μ m、3.6 μ m、3.7 μ m、3.8 μ m、3.9 μ m、4.0 μ m、4.1 μ m、4.2 μ m、4.3 μ m、4.4 μ m、4.5 μ m、4.6 μ m、4.7 μ m、4.8 μ m、4.9 μ m或5.0 μ m。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约3.5 μ m。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约4 μ m。在一些实施方案中,使包含输入TIL的细胞悬液通过多个缩窄结构,其中多个缩窄结构串联和/或并联布置。

[0199] 用于产生包含共刺激分子和/或细胞因子的TIL的组合物的缩窄结构

[0200] 在一些实施方案中,本发明提供了包含共刺激分子或细胞因子的TIL的组合物。在一些实施方案中,编码共刺激分子和/或细胞因子的核酸细胞内递送至TIL。

[0201] 在一些实施方案中,将核酸引入TIL中通过以下方式进行:使细胞通过缩窄结构,以将瞬时孔引入细胞膜,从而允许核酸进入细胞。基于缩窄结构的化合物至细胞的递送的实例提供于WO 2013/059343、WO 2015/023982、WO 2016/070136、WO2017041050、WO2017008063、WO 2017/192785、WO 2017/192786、WO 2019/178005、WO 2019/178006、WO 2020/072833、WO2020154696和WO2020176789中。

[0202] 在一些实施方案中,将核酸递送至TIL中以产生本发明的TIL通过以下方式进行:使包含TIL的细胞悬液通过缩窄结构,其中缩窄结构使细胞发生变形,从而引起细胞的扰动,以使得核酸进入细胞,其中核酸得以表达。在一些实施方案中,缩窄结构包含在微流体通道内。在一些实施方案中,多个缩窄结构可以并联和/或串联放置于微流体通道内。

[0203] 在一些实施方案中,微流体通道内的缩窄结构包括入口部分、中心点和出口部分。在一些实施方案中,微流体通道内的缩窄结构的长度、深度和宽度可能有所不同。在一些实施方案中,微流体通道内的缩窄结构的宽度随TIL的直径而变化。确定TIL的直径的方法是本领域已知的;例如,高内涵成像、细胞计数器或流式细胞术。

[0204] 在基于缩窄结构的编码共刺激分子或细胞因子的核酸至TIL的递送的一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约2 μm 至约15 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约3 μm 至约10 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约3 μm 至约6 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约4.2 μm 至约6 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约4.2 μm 至约4.8 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约3 μm 至约5 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约3 μm 至约3.5 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约3.5 μm 至约4 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约4 μm 至约4.5 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约3.2 μm 至约3.8 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约3.8 μm 至约4.3 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约或小于以下中的任一者:2 μm 、2.5 μm 、3 μm 、3.5 μm 、4 μm 、4.5 μm 、5 μm 、5.5 μm 、6 μm 、6.5 μm 、7 μm 、7.5 μm 、8 μm 、8.5 μm 、9 μm 、9.5 μm 、10 μm 、10.5 μm 、11 μm 、11.5 μm 、12 μm 、12.5 μm 、13 μm 、13.5 μm 、14 μm 、14.5 μm 或15 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约或小于以下中的任一者:3.0 μm 、3.1 μm 、3.2 μm 、3.3 μm 、3.4 μm 、3.5 μm 、3.6 μm 、3.7 μm 、3.8 μm 、3.9 μm 、4.0 μm 、4.1 μm 、4.2 μm 、4.3 μm 、4.4 μm 、4.5 μm 、4.6 μm 、4.7 μm 、4.8 μm 、4.9 μm 或5.0 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约3.5 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约4 μm 。

[0205] 在基于缩窄结构的编码共刺激分子或细胞因子的核酸至TIL的递送的一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约3 μm 至约20 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约5 μm 至约15 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约8 μm 至约12 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约9 μm 至约11 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约9.5 μm 至约10.5 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约7 μm 至约9 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约8 μm 至约10 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约9 μm 至约11 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约10 μm 至约12 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约11 μm 至约13 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约5 μm 至约12 μm 、约6 μm 至约12 μm 、约8 μm 至约11 μm 、约9 μm 至约11 μm 、约9.5 μm 至约10.5 μm 、约8 μm 至约15 μm 、约10 μm 至约15 μm 或约12 μm 至约15 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约9.7 μm 至约10.3 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约或小于以下中的任一者:3 μm 、3.5 μm 、4 μm 、4.5 μm 、5 μm 、5.5 μm 、6 μm 、6.5 μm 、7 μm 、7.5 μm 、8 μm 、8.5 μm 、9 μm 、9.5 μm 、10 μm 、10.5 μm 、11 μm 、11.5 μm 、12 μm 、12.5 μm 、13 μm 、13.5 μm 、14 μm 、14.5 μm 、15 μm 、15.5 μm 、16 μm 、16.5 μm 、17 μm 、17.5 μm 或18 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约或小于以下中的任一者:9.0 μm 、9.1 μm 、9.2 μm 、9.3 μm 、9.4 μm 、9.5 μm 、9.6 μm 、9.7 μm 、9.8 μm 、9.9 μm 、10.0 μm 、10.1 μm 、10.2 μm 、10.3 μm 、10.4 μm 、10.5 μm 、10.6 μm 、10.7 μm 、10.8 μm 、10.9 μm 或11.0 μm 。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为约10.0 μm 。

[0206] 在本发明的一些实施方案中,组合物包含多种TIL。在一些实施方案中,缩窄结构

的宽度为在TIL群体中具有最小直径的TIL亚群的平均直径的约10%至约99%。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为在TIL群体中具有最小直径的TIL亚群的平均直径的约10%至约90%、约10%至约80%、约10%至约70%、约20%至约60%、约40%至约60%、约30%至约45%、约50%至约99%、约50%至约90%、约50%至约80%、约50%至约70%、约60%至约90%、约60%至约80%或约60%至约70%中的任一者。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为在TIL群体中具有最小直径的TIL亚群的平均直径的约10%至约20%、约20%至约30%、约30%至约40%、约40%至约50%、约50%至约60%、约60%至约70%、约70%至约80%、约80%至约90%或约90%至约99%中的任一者。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为在TIL群体中具有最小直径的TIL亚群的平均直径的约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%中的任一者。

[0207] 在本发明的一些实施方案中,组合物包含多种TIL。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为在TIL群体中具有最大直径的TIL亚群的平均直径的约10%至约99%。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为在TIL群体中具有最大直径的TIL亚群的平均直径的约10%至约90%、约10%至约80%、约10%至约70%、约20%至约60%、约40%至约60%、约30%至约45%、约15%至约30%、约15%至约20%、约20%至约25%、约25%至约30%、约20%至约30%、约30%至约70%或约30%至约60%中的任一者。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为在TIL群体中具有最大直径的TIL亚群的平均直径的约5%至约10%、约10%至约20%、约20%至约30%、约30%至约40%、约40%至约50%、约50%至约60%、约60%至约70%、约70%至约80%、约80%至约90%或约90%至约99%中的任一者。在一些实施方案中,缩窄结构的宽度为在TIL群体中具有最大直径的TIL亚群的平均直径的约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%中的任一者。

[0208] 许多参数可以影响化合物至TIL的递送,以用于通过本文所述的方法刺激免疫应答。在一些实施方案中,细胞悬液在通过缩窄结构之前、同时或之后与化合物接触。TIL可以通过悬浮于包含待递送的化合物的溶液中的缩窄结构,但是可以在TIL通过缩窄结构后将化合物添加至细胞悬液中。在一些实施方案中,将待递送的化合物涂覆于缩窄结构上。

[0209] 可以影响化合物至TIL递送的参数的实例包括但不限于缩窄结构的尺寸、缩窄结构的入口角度、缩窄结构的表面性质(例如,粗糙度、化学改性、亲水性、疏水性等)、工作流速(例如,细胞通过缩窄结构的运输时间)、细胞浓度、细胞悬液中的化合物的浓度、细胞悬液中的缓冲液以及TIL通过缩窄结构后恢复或孵育的时间长短,这些参数都可能影响所递送的化合物至TIL的传递。影响化合物至TIL的递送的其他参数包括TIL在缩窄结构中的速度、缩窄结构的剪切速率、细胞悬液的粘度、垂直于流速的速度分量以及在缩窄结构中的时间。此外,包括串联和/或并联通道的多个芯片可以影响向TIL的递送。并联的多个芯片可以用于提高吞吐量。可以设计这些参数来控制化合物的递送。在一些实施方案中,细胞浓度范围为约 10^8 至至少约 10^{12} 个细胞/mL或者它们之间的任何浓度或浓度范围。在一些实施方案中,递送化合物浓度范围可以为约10ng/mL至约1g/mL或者它们之间的任何浓度或浓度范围。在一些实施方案中,递送化合物浓度范围可以为约1pM至至少约2M或者它们之间的任何浓度或浓度范围。

[0210] 在一些实施方案中,与TIL一起孵育的共刺激分子的浓度在约0.01 μ M和约10mM之

间。例如,在一些实施方案中,与TIL一起孵育的共刺激分子的浓度小于约0.01 μ M、约0.1 μ M、约1 μ M、约10 μ M、约100 μ M、约1mM或约10mM中的任一者。在一些实施方案中,与TIL一起孵育的共刺激分子的浓度大于约10mM。在一些实施方案中,与TIL一起孵育的共刺激分子的浓度为在约0.01 μ M和约0.1 μ M之间、在约0.1 μ M和约1 μ M之间、在约1 μ M和约10 μ M之间、在约10 μ M和约100 μ M之间、在约100 μ M和约1mM之间或者在1mM和约10mM之间中的任一者。在一些实施方案中,与TIL一起孵育的共刺激分子的浓度在约0.1 μ M和约1mM之间。在一些实施方案中,与TIL一起孵育的共刺激分子的浓度在约0.1 μ M和约10 μ M之间。在一些实施方案中,与TIL一起孵育的共刺激分子的浓度为1 μ M。

[0211] 在一些实施方案中,编码与TIL一起孵育的细胞因子和/或共刺激分子的核酸的浓度在约1nM和约1mM之间。在一些实施方案中,编码与TIL一起孵育的细胞因子和/或共刺激分子的核酸的浓度小于约0.1nM、约1nM、约0.01 μ M、约0.1 μ M、约1 μ M、约10 μ M、约100 μ M、约1mM或约10mM。在一些实施方案中,编码与TIL一起孵育的细胞因子和/或共刺激分子的核酸的浓度大于约10mM。在一些实施方案中,编码与TIL一起孵育的细胞因子和/或共刺激分子的核酸的浓度为在约0.1nM至约1nM之间、在约1nM至约10nM之间、在约10nM至约100nM之间、在约0.1 μ M和约1 μ M之间、在约1 μ M和约10 μ M之间、在约10 μ M和约100 μ M之间、在约100 μ M和约1mM之间或者在1mM和约10mM之间中的任一者。在一些实施方案中,编码与TIL一起孵育的细胞因子和/或共刺激分子的核酸的浓度在约10nM和约100nM之间。在一些实施方案中,编码与TIL一起孵育的细胞因子和/或共刺激分子的核酸的浓度在约1nM和约10nM之间。在一些实施方案中,编码与TIL一起孵育的细胞因子和/或共刺激分子的核酸的浓度为约50nM。在一些实施方案中,核酸是mRNA。

[0212] 在一些实施方案中,TIL包含编码细胞因子和/或共刺激分子的核酸,所述核酸的浓度在约1nM和约1mM之间。在一些实施方案中,TIL包含编码细胞因子和/或共刺激分子的核酸,所述核酸的浓度为小于约0.1nM、约1nM、约0.01 μ M、约0.1 μ M、约1 μ M、约10 μ M、约100 μ M、约1mM或约10mM中的任一者。在一些实施方案中,TIL包含编码细胞因子和/或共刺激分子的核酸,所述核酸的浓度大于约10mM。在一些实施方案中,TIL包含编码细胞因子和/或共刺激分子的核酸,所述核酸的浓度为在约0.1nM至约1nM之间、在约1nM至约10nM之间、在约10nM至约100nM之间、在约0.1 μ M和约1 μ M之间、在约1 μ M和约10 μ M之间、在约10 μ M和约100 μ M之间、在约100 μ M和约1mM之间或者在1mM和约10mM之间中的任一者。在一些实施方案中,TIL包含编码细胞因子和/或共刺激分子的核酸,所述核酸的浓度在约10nM和约100nM之间。在一些实施方案中,TIL包含编码细胞因子和/或共刺激分子的核酸,所述核酸的浓度在约1nM和约10nM之间。在一些实施方案中,TIL包含编码细胞因子和/或共刺激分子的核酸,所述核酸的浓度为约50nM。在一些实施方案中,核酸是mRNA。

[0213] 系统和药盒

[0214] 在一些方面,本发明提供了一种系统,其包括用于本文公开的方法的缩窄结构、TIL悬液、编码细胞因子和/或共刺激分子的核酸。系统可以包括上文公开的方法所述的任何实施方案,包括微流体通道或具有孔的表面,所述微流体通道或具有孔的表面提供细胞变形缩窄结构、细胞悬液、细胞扰动、递送参数、化合物和/或应用等。在某个实施方案中,细胞变形缩窄结构的尺寸适合于向TIL递送。在一些实施方案中,递送参数,诸如工作流速、细胞和化合物浓度、细胞在缩窄结构中的速度以及细胞悬液的组合物(例如,渗透压体积摩尔

浓度、盐浓度、血清含量、细胞浓度、pH值等)均被优化为增强TIL的活性和/或增殖能力。

[0215] 还提供了用于治疗患有癌症或感染的个体的药盒或制品。在一些实施方案中,药盒包括TIL,所述TIL包含细胞内编码细胞因子和/或共刺激分子的核酸。在一些实施方案中,药盒包括缩窄结构、TIL悬液、编码细胞因子和/或共刺激分子的核酸,用于产生经修饰的TIL,所述经修饰的TIL用于治疗患有癌症或感染的个体。在一些实施方案中,药盒包括在合适的包装中的本文所述的组合物(例如,含有孔、细胞悬液和/或化合物的微流体通道或表面)。合适的包装材料是本领域已知的,并且包括例如小瓶(诸如密封小瓶)、器皿、安瓿瓶、瓶、广口瓶、柔性包装(例如,密封聚酯薄膜或塑料袋)等等。这些制品可以被进一步灭菌和/或密封。

[0216] 本发明还提供了药盒,其包括本文所述的方法的组件,并且还可以包括用于进行治疗有需要的个体的所述方法的说明和/或用于将细胞因子和/或共刺激分子引入TIL中的说明。本文所述的药盒还可以包括其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针头、注射器和包装插页,所述包装插页附有用于进行本文所述的任何方法的说明;例如,用于治疗有需要的个体的说明或用于将TIL修饰以包含细胞内细胞因子和/或共刺激分子的说明。

[0217] 示例性实施方案

[0218] 实施方案1.一种调节肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的活性和/或增殖能力的方法,其中所述TIL被修饰以增加一种或多种共刺激分子和/或一种或多种细胞因子的表达。

[0219] 实施方案2.一种调节肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的活性和/或增殖能力的方法,其中所述TIL被修饰以增加共刺激分子中的一种或多种的表达。

[0220] 实施方案3.如实施方案1或2所述的方法,其中所述共刺激分子是B7-H2(ICOSL)、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、CD70、LIGHT、HVEM、CD40、4-1BBL、OX40L、TL1A、GITRL、CD30L、TIM4、SLAM、CD48、CD58、CD155或CD112。

[0221] 实施方案4.如实施方案1或2所述的方法,其中所述共刺激分子是CD86。

[0222] 实施方案5.一种调节TIL的表型和/或增殖能力的方法,其中所述TIL被修饰以增加一种或多种细胞因子的表达。

[0223] 实施方案6.如实施方案1和3-5中任一项所述的方法,其中所述TIL被修饰以包含嵌合型膜结合性细胞因子。

[0224] 实施方案7.如实施方案6所述的方法,其中所述嵌合型膜结合性细胞因子是包含所述细胞因子和跨膜结构域的融合蛋白。

[0225] 实施方案8.如实施方案7所述的方法,其中所述细胞因子通过肽接头连接至所述跨膜结构域。

[0226] 实施方案9.如实施方案8所述的方法,其中所述肽接头是(G4S)₃(SEQ ID NO:3)或(EAAAK)₃(SEQ ID NO:4)。

[0227] 实施方案10.如实施方案1和3-9中任一项所述的方法,其中所述细胞因子是I型细胞因子。

[0228] 实施方案11.如实施方案1和3-10中任一项所述的方法,其中所述细胞因子是IL-15、IL-12、IL-2、IFN α 、IFN β 或IL-21或者它们的功能变体。

[0229] 实施方案12.如实施方案11所述的方法,其中所述细胞因子是IL-2或其功能变体以及/或者IL-12或其功能变体。

[0230] 实施方案13.如实施方案7-12中任一项所述的方法,其中所述嵌合型膜结合性细胞因子包含SEQ ID NO:7-10的氨基酸序列。

[0231] 实施方案14.如实施方案1-13中任一项所述的实施方案的方法,其中所述经修饰的TIL包括一种或多种细胞因子和/或共刺激分子中的一种或多种的表达增加,其中所述TIL通过包括以下步骤的方法来制备:

[0232] a) 使包含输入TIL的细胞悬液通过细胞变形缩窄结构,其中缩窄结构的直径随所述悬液中的所述输入TIL的直径而变化,从而使得所述输入TIL的扰动的大小足以使编码一种或多种细胞因子的一种或多种核酸和/或编码一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸得以通过,从而形成扰动的输入TIL;和

[0233] b) 将所述扰动的输入TIL与编码一种或多种细胞因子的所述一种或多种核酸和/或编码一种或多种共刺激分子的所述一种或多种核酸一起孵育,以允许编码一种或多种细胞因子的所述一种或多种核酸和/或编码一种或多种共刺激分子的所述一种或多种核酸进入所述扰动的输入TIL;其中所述核酸得以表达,从而产生包含所述一种或多种细胞因子和/或所述一种或多种共刺激分子的所述经修饰的TIL。

[0234] 实施方案15.如实施方案1-13中任一项所述的实施方案的方法,其中所述经修饰的TIL包括一种或多种细胞因子和/或共刺激分子中的一种或多种的表达增加,其中所述TIL通过包括以下步骤的方法来制备:

[0235] a) 使包含输入TIL的细胞悬液通过细胞变形缩窄结构,其中缩窄结构的直径随所述悬液中的所述输入TIL的直径而变化,从而使得所述输入TIL的扰动的大小足以使编码一种或多种细胞因子和/或所述一种或多种共刺激分子的所述一种或多种核酸得以通过,从而形成扰动的输入TIL;并且

[0236] b) 将所述扰动的输入TIL与编码一种或多种细胞因子和/或所述一种或多种共刺激分子的所述一种或多种核酸一起孵育,以使所述一种或多种核酸进入所述扰动的输入TIL;其中所述核酸得以表达,从而产生包含所述一种或多种细胞因子和/或所述一种或多种共刺激分子的所述经修饰的TIL。

[0237] 实施方案16.如实施方案14或15所述的方法,其中所述方法包括:

[0238] (a) 在所述细胞悬液通过所述细胞变形缩窄结构之前、期间和/或之后,将所述TIL与编码所述嵌合型膜结合性细胞因子的所述核酸一起孵育;

[0239] (b) 在所述细胞悬液通过所述细胞变形缩窄结构之前、期间和/或之后,将所述TIL与编码所述嵌合型膜结合性细胞因子和所述共刺激分子的所述核酸一起孵育;

[0240] (c) 在所述细胞悬液通过所述细胞变形缩窄结构之前、期间和/或之后,将所述TIL与编码所述嵌合型膜结合性细胞因子的所述核酸和编码所述共刺激分子的所述核酸一起孵育;或者

[0241] (d) 在所述细胞悬液通过所述细胞变形缩窄结构之前、期间和/或之后,将所述TIL与编码所述嵌合型膜结合性细胞因子的所述核酸和编码所述一种或多种共刺激分子的所述核酸一起孵育。

[0242] 实施方案17.如实施方案14或15所述的方法,其中所述方法包括:

[0243] (a) 在所述细胞悬液通过所述细胞变形缩窄结构之前,将所述TIL与编码所述嵌合型膜结合性细胞因子的所述核酸一起孵育

[0244] (b) 在所述细胞悬液通过所述细胞变形缩窄结构之前,将所述TIL与编码所述嵌合型膜结合性细胞因子和所述共刺激分子的所述核酸一起孵育;

[0245] (c) 在所述细胞悬液通过所述细胞变形缩窄结构之前,将所述TIL与编码所述嵌合型膜结合性细胞因子的所述核酸和编码所述共刺激分子的所述核酸一起孵育;或者

[0246] (d) 在所述细胞悬液通过所述细胞变形缩窄结构之前,将所述TIL与编码所述嵌合型膜结合性细胞因子的所述核酸和编码所述一种或多种共刺激分子的所述核酸一起孵育。

[0247] 实施方案18.如实施方案14-17中任一项所述的方法,其中所述核酸中的一种或多种是mRNA。

[0248] 实施方案19.如实施方案1-18中任一项所述的方法,其中与未经修饰的相应TIL相比,所述经修饰的TIL具有T-bet、EOMES、TCF1和CD62L中的一者或多者的表达增加。

[0249] 实施方案20.如实施方案1-18中任一项所述的方法,其中与未经修饰的相应TIL相比,在不存在外源细胞因子的情况下培养时,所述经修饰的TIL具有T-bet、EOMES、TCF1和CD62L中的一者或多者的表达增加。

[0250] 实施方案21.如实施方案19或20所述的方法,其中与未经修饰的相应TIL相比,所述经修饰的TIL中的T-bet、EOMES、TCF1和CD62L中的一者或多者的表达增加超过约1.2倍、1.5倍、1.8倍、2倍、3倍、4倍、5倍、8倍或超过10倍。

[0251] 实施方案21A.如实施方案1-21中任一项所述的方法,其中与未经修饰的相应TIL相比,所述经修饰的TIL具有颗粒酶B的表达增加。

[0252] 实施方案21B.如实施方案1-21中任一项所述的方法,其中与未经修饰的相应TIL相比,在不存在外源细胞因子的情况下培养时,所述经修饰的TIL具有颗粒酶B的表达增加。

[0253] 实施方案21C.如实施方案1-21中任一项所述的方法,其中与未经修饰的相应TIL相比,在不存在外源细胞因子的情况下与肿瘤细胞共培养时,所述经修饰的TIL具有颗粒酶B的表达增加。

[0254] 实施方案21D.如实施方案21A、21B或21C所述的方法,其中与未经修饰的相应TIL相比,所述经修饰的TIL中的所述颗粒酶B的表达增加约1.2倍、1.5倍、1.8倍、2倍、3倍、4倍、5倍、8倍、或10倍或更多。

[0255] 实施方案22.如实施方案1-21中任一项所述的方法,其中与未经修饰的相应TIL相比,所述经修饰的TIL表现出增殖增加。

[0256] 实施方案23.如实施方案1-21中任一项所述的方法,其中与未经修饰的相应TIL相比,在不包含外源细胞因子的培养基中培养时,所述经修饰的TIL表现出增殖增加。

[0257] 实施方案23A.如实施方案1-21中任一项所述的方法,其中与未经修饰的相应TIL相比,在不存在外源细胞因子的情况下与肿瘤细胞共培养时,所述经修饰的TIL表现出增殖增加。

[0258] 实施方案24.如实施方案20-23A中任一项所述的方法,其中所述外源细胞因子是IL-2和/或IL-12;任选地其中所述外源细胞因子是IL-2。

[0259] 实施方案25.一种包含经修饰的TIL的组合物,其中所述TIL被修饰以增加共刺激分子中的一种或多种和/或一种或多种细胞因子的表达。

[0260] 实施方案26.一种包含经修饰的TIL的组合物,其中所述TIL被修饰以增加共刺激分子中的一种或多种的表达。

[0261] 实施方案27.如实施方案25或26所述的组合物,其中所述共刺激分子是B7-H2(ICOSL)、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、CD70、LIGHT、HVEM、CD40、4-1BBL、OX40L、TL1A、GITRL、CD30L、TIM4、SLAM、CD48、CD58、CD155或CD112。

[0262] 实施方案28.如实施方案27所述的组合物,其中所述共刺激分子是CD86。

[0263] 实施方案29.一种包含经修饰的TIL的组合物,其中所述TIL被修饰以增加一种或多种细胞因子的表达。

[0264] 实施方案30.如实施方案25和27-29中任一项所述的组合物,其中所述TIL被修饰以包含嵌合型膜结合性细胞因子。

[0265] 实施方案31.如实施方案30所述的组合物,其中所述嵌合型膜结合性细胞因子是包含所述细胞因子和跨膜结构域的融合蛋白。

[0266] 实施方案32.如实施方案31所述的组合物,其中所述细胞因子通过肽接头连接至所述跨膜结构域。

[0267] 实施方案33.如实施方案32所述的组合物,其中所述肽接头是(G4S)₃(SEQ ID NO:3)或(EAAAK)₃(SEQ ID NO:4)。

[0268] 实施方案34.如实施方案25和27-33中任一项所述的组合物,其中所述细胞因子是I型细胞因子。

[0269] 实施方案35.如实施方案25和27-34中任一项所述的组合物,其中所述细胞因子是IL-15、IL-12、IL-2、IFN α 、IFN β 或IL-21或者它们的功能变体。

[0270] 实施方案36.如实施方案35所述的方法,其中所述细胞因子是IL-2或其功能变体以及/或者IL-12或其功能变体。

[0271] 实施方案37.如实施方案30-36中任一项所述的组合物,其中所述嵌合型膜结合性细胞因子包含SEQ ID NO:7-10的氨基酸序列。

[0272] 实施方案38.如实施方案25-37中任一项所述的组合物,其中所述经修饰的TIL包括一种或多种细胞因子和/或共刺激分子中的一种或多种的表达增加,其中所述经修饰的TIL通过包括以下步骤的方法来制备:

[0273] a) 使包含输入TIL的细胞悬液通过细胞变形缩窄结构,其中缩窄结构的直径随所述悬液中的所述输入TIL的直径而变化,从而使得所述输入TIL的扰动的大小足以使编码一种或多种细胞因子的一种或多种核酸和/或编码一种或多种共刺激分子的一种或多种核酸得以通过,从而形成扰动的输入TIL;和

[0274] b) 将所述扰动的输入TIL与编码一种或多种细胞因子的所述一种或多种核酸和/或编码一种或多种共刺激分子的所述一种或多种核酸一起孵育,以允许编码一种或多种细胞因子的所述一种或多种核酸和/或编码一种或多种共刺激分子的所述一种或多种核酸进入所述扰动的输入TIL;其中所述核酸得以表达,从而产生包含所述一种或多种细胞因子和/或所述一种或多种共刺激分子的所述经修饰的TIL。

[0275] 实施方案39.如实施方案25-37中任一项所述的组合物,其中所述TIL包括一种或多种细胞因子和/或共刺激分子中的一种或多种的表达增加,其中所述TIL通过包括以下步骤的方法来制备:

[0276] a) 使包含输入TIL的细胞悬液通过细胞变形缩窄结构,其中缩窄结构的直径随所述悬液中的所述输入TIL的直径而变化,从而使得所述输入TIL的扰动的大小足以使编码一

种或多种细胞因子和/或所述一种或多种共刺激分子的所述一种或多种核酸得以通过,从而形成扰动的输入TIL;并且

[0277] b) 将所述扰动的输入TIL与编码一种或多种细胞因子和/或所述一种或多种共刺激分子的所述一种或多种核酸一起孵育,以使所述一种或多种核酸进入所述扰动的输入TIL;其中所述核酸得以表达,从而产生包含所述一种或多种细胞因子和/或所述一种或多种共刺激分子的所述经修饰的TIL。

[0278] 实施方案40.如实施方案38或39所述的组合物,其中制备所述经修饰的TIL的所述方法包括:

[0279] (a) 在所述细胞悬液通过所述细胞变形缩窄结构之前、期间和/或之后,将所述TIL与编码所述嵌合型膜结合性细胞因子的所述核酸一起孵育;

[0280] (b) 在所述细胞悬液通过所述细胞变形缩窄结构之前、期间和/或之后,将所述TIL与编码所述嵌合型膜结合性细胞因子和所述共刺激分子的所述核酸一起孵育;

[0281] (c) 在所述细胞悬液通过所述细胞变形缩窄结构之前、期间和/或之后,将所述TIL与编码所述嵌合型膜结合性细胞因子的所述核酸和编码所述共刺激分子的所述核酸一起孵育;或者

[0282] (d) 在所述细胞悬液通过所述细胞变形缩窄结构之前、期间和/或之后,将所述TIL与编码所述嵌合型膜结合性细胞因子的所述核酸和编码所述一种或多种共刺激分子的所述核酸一起孵育。

[0283] 实施方案41.如实施方案38-39中任一项所述的组合物,其中制备所述经修饰的TIL的所述方法包括:

[0284] (a) 在所述细胞悬液通过所述细胞变形缩窄结构之前,将所述TIL与编码所述嵌合型膜结合性细胞因子的所述核酸一起孵育

[0285] (b) 在所述细胞悬液通过所述细胞变形缩窄结构之前,将所述TIL与编码所述嵌合型膜结合性细胞因子和所述共刺激分子的所述核酸一起孵育;

[0286] (c) 在所述细胞悬液通过所述细胞变形缩窄结构之前,将所述TIL与编码所述嵌合型膜结合性细胞因子的所述核酸和编码所述共刺激分子的所述核酸一起孵育;或者

[0287] (d) 在所述细胞悬液通过所述细胞变形缩窄结构之前,将所述TIL与编码所述嵌合型膜结合性细胞因子的所述核酸和编码所述一种或多种共刺激分子的所述核酸一起孵育。

[0288] 实施方案42.如实施方案38-41中任一项所述的组合物,其中所述核酸中的一种或多种是mRNA。

[0289] 实施方案43.如实施方案25-42中任一项所述的组合物,其中与未经修饰的相应TIL相比,所述经修饰的TIL具有T-bet、EOMES、TCF1和CD62L中的一者或多者的表达增加。

[0290] 实施方案44.如实施方案25-43中任一项所述的组合物,其中与未经修饰的相应TIL相比,在不存在外源细胞因子的情况下培养时,所述经修饰的TIL具有T-bet、EOMES、TCF1和CD62L中的一者或多者的表达增加。

[0291] 实施方案45.如实施方案43或44所述的组合物,其中与所述未经修饰的相应TIL相比,经修饰的TIL中的T-bet、EOMES、TCF1和CD62L中的一者或多者的表达增加超过约1.2倍、1.5倍、1.8倍、2倍、3倍、4倍、5倍、8倍或超过10倍。

[0292] 实施方案45A.如实施方案25-45中任一项所述的组合物,其中与未经修饰的相应

TIL相比,所述经修饰的TIL具有颗粒酶B的表达增加。

[0293] 实施方案45B.如实施方案25-45中任一项所述的组合物,其中与未经修饰的相应TIL相比,在不存在外源细胞因子的情况下培养时,所述经修饰的TIL具有颗粒酶B的表达增加。

[0294] 实施方案45C.如实施方案25-45中任一项所述的组合物,其中与未经修饰的相应TIL相比,在不存在外源细胞因子的情况下与肿瘤细胞共培养时,所述经修饰的TIL具有颗粒酶B的表达增加。

[0295] 实施方案45D.如实施方案45A或45B或45C所述的组合物,其中与未经修饰的相应TIL相比,所述经修饰的TIL中的所述颗粒酶B的表达增加约1.2倍、1.5倍、1.8倍、2倍、3倍、4倍、5倍、8倍、或10倍或更多。

[0296] 实施方案46.如实施方案25-45中任一项所述的组合物,其中与未经修饰的相应TIL相比,所述经修饰的TIL表现出增殖增加。

[0297] 实施方案47.如实施方案25-45中任一项所述的组合物,其中与未经修饰的相应TIL相比,在不包含外源细胞因子的培养基中培养时,所述经修饰的TIL表现出增殖增加。

[0298] 实施方案47A.如实施方案25-45中任一项所述的组合物,其中与未经修饰的相应TIL相比,在不存在外源细胞因子的情况下与肿瘤细胞共培养时,所述经修饰的TIL表现出增殖增加。

[0299] 实施方案48.如实施方案44-47A中任一项所述的组合物,其中所述外源细胞因子是IL-2和/或IL-12;任选地其中所述外源细胞因子是IL-2。

[0300] 实施方案49.一种调节个体的免疫应答的方法,其包括将经修饰的TIL施用于个体,其中所述经修饰的TIL根据实施方案1-24中任一项所述的方法来制备。

[0301] 实施方案50.一种调节个体的免疫应答的方法,其包括施用如实施方案25-48中任一项所述的组合物。

[0302] 实施方案51.一种治疗个体的癌症、感染性疾病或病毒相关疾病的方法,其包括将经修饰的TIL施用于个体,其中所述经修饰的TIL根据实施方案1-24中任一项所述的方法来制备。

[0303] 实施方案52.一种治疗个体的癌症、感染性疾病或病毒相关疾病的方法,其包括施用如实施方案25-48中任一项所述的组合物。

[0304] 实施方案53.如实施方案49-52中任一项所述的方法,其中所述方法包括多次施用所述经修饰的TIL,或多次施用所述组合物。

[0305] 实施方案54.如实施方案49-53中任一项所述的方法,其中所述经修饰的TIL通过静脉内或肿瘤内施用。

[0306] 实施方案55.如实施方案49-54中任一项所述的方法,其中所述个体是人。

[0307] 实施方案56.如实施方案49-55中任一项所述的方法,其中所述经修饰的TIL在施用另一种疗法之前施用、在施用另一种疗法的同时施用或在施用另一种疗法之后施用。

[0308] 实施方案57.一种用于刺激个体的免疫应答的药物组合物,其中所述组合物包含有效量的如实施方案25-48中任一项所述的组合物。

[0309] 实施方案58.一种用作药品的药物组合物,其中所述药物组合物包含有效量的如实施方案25-48中任一项所述的组合物。

[0310] 实施方案59.一种用于治疗个体的癌症、感染性疾病或病毒相关疾病的药物组合物,其中所述药物组合物包含有效量的如实施方案25-48中任一项所述的组合物。

[0311] 实施方案60.如实施方案58或59所述的药物组合物,其中包含经修饰的TIL的所述组合物在施用另一种疗法之前施用、在施用另一种疗法的同时施用或在施用另一种疗法之后施用。

[0312] 实施方案61.如实施方案1-24和49-56中任一项所述的方法或如实施方案25-48和57-60中任一项所述的组合物,其中缩窄结构的宽度为所述输入TIL的平均直径的约10%至约99%。

[0313] 实施方案62.如实施方案1-24和49-56中任一项所述的方法或如实施方案25-48中任一项所述的组合物,其中缩窄结构的宽度为约3.5 μm 至约4.2 μm 、或约3.5 μm 至约4.8 μm 、或约3.5 μm 至约6 μm 、或约5 μm 至约12 μm 、或约12 μm 至约15 μm 、或约6 μm 至约12 μm 、或约8 μm 至约11 μm 或约9 μm 至约11 μm 。

[0314] 实施方案63.如实施方案1-24和49-56中任一项所述的方法或如实施方案25-48和57-60中任一项所述的组合物,其中缩窄结构的宽度为约3 μm 至约5 μm 。

[0315] 实施方案64.如实施方案1-24和49-56中任一项所述的方法或如实施方案25-48和57-60中任一项所述的组合物,其中缩窄结构的宽度为约4 μm 。

[0316] 实施方案65.如实施方案1-24和49-56中任一项的所述方法或如实施方案25-48和57-60中任一项所述的组合物,其中使包含多个输入TIL的所述细胞悬液通过多个缩窄结构,其中所述多个缩窄结构串联和/或并联布置。

[0317] 实施方案66.一种药盒,用于如实施方案1-24、49-56和61-65中任一项所述的方法。

[0318] 实施方案67.一种药盒,其包括如实施方案25-48和57-65中任一项所述的组合物。

[0319] 实施方案68.如实施方案66或67所述的药盒,其中所述药盒还包括缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头、注射器或附有将所述组合物施用于个体的说明的包装插页中的一者或多者。

[0320] 实施方案69.一种产生包含嵌合型膜结合性细胞因子的TIL的方法,所述方法包括将编码所述嵌合型膜结合性细胞因子的核酸引入所述TIL中。

[0321] 实施方案70.如实施方案69所述的方法,其中包含所述嵌合型膜结合性细胞因子的所述TIL通过以下方式制备:

[0322] a) 使包含输入TIL的细胞悬液通过细胞变形缩窄结构,其中缩窄结构的直径随所述悬液中的所述输入TIL的直径而变化,从而使得所述输入TIL的扰动的大小足以使编码所述嵌合型膜结合性细胞因子的核酸得以通过,从而形成扰动的输入TIL;并且

[0323] b) 将所述扰动的输入TIL与编码所述嵌合型膜结合性细胞因子的所述核酸一起孵育,以允许所述核酸进入所述扰动的输入TIL,其中编码所述嵌合型膜结合性细胞因子的所述核酸在所述扰动的输入TIL中得以表达;从而产生包含嵌合型膜结合性细胞因子的TIL。

[0324] 实施方案71.如实施方案70所述的方法,其中所述方法包括在所述细胞悬液通过所述细胞变形缩窄结构之前、期间和/或之后,将所述TIL与编码所述嵌合型膜结合性细胞因子的所述核酸一起孵育。

[0325] 实施方案72.如实施方案70所述的方法,其中所述方法包括在所述细胞悬液通过

所述细胞变形缩窄结构之前,将所述TIL与编码所述嵌合型膜结合性细胞因子的所述核酸一起孵育。

[0326] 实施方案73.如实施方案69-72中任一项所述的方法,其中编码所述嵌合型膜结合性细胞因子的所述核酸是编码所述嵌合型膜结合性细胞因子的mRNA。

[0327] 实施方案74.如实施方案70-73中任一项所述的方法,其中所述缩窄结构的宽度为所述输入TIL的平均直径的约10%至约99%。

[0328] 实施方案75.如实施方案70-74中任一项所述的方法,其中所述缩窄结构的宽度为约5 μ m至约12 μ m、或约6 μ m至约12 μ m、或约8 μ m至约11 μ m、或约9 μ m至约11 μ m或约12 μ m至约15 μ m。

[0329] 实施方案76.如实施方案70-75中任一项所述的方法,其中所述缩窄结构的宽度为约10 μ m。

[0330] 实施方案77.如实施方案70-76中任一项所述的方法,其中所述缩窄结构的宽度为约8 μ m。

[0331] 实施方案78.如实施方案70-77中任一项所述的方法,其中使包含多个输入TIL的所述细胞悬液通过多个缩窄结构,其中所述多个缩窄结构串联和/或并联布置。

[0332] 实施方案79.药物组合物用于制造用于刺激个体的免疫应答的药物的用途,其中所述药物组合物包含有效量的如实施方案25-48中任一项所述的组合物。

[0333] 实施方案80.药物组合物用于制造用于治疗个体的癌症、感染性疾病或病毒相关疾病的药物的用途,其中所述药物组合物包含有效量的如实施方案25-48中任一项所述的组合物。

[0334] 实施方案81.如实施方案79或80所述的用途,其中所述药物组合物被配制用于多次施用。

[0335] 实施方案82.如实施方案79-81中任一项所述的用途,其中所述药物组合物通过静脉内或肿瘤内施用。

[0336] 实施方案83.如实施方案79-82中任一项所述的用途,其中所述个体是人。

[0337] 实施方案84.如实施方案79-83中任一项所述的用途,其中所述药物组合物被配制用于在施用另一种疗法之前施用、在施用另一种疗法的同时施用或在施用另一种疗法之后施用。

[0338] 实施例

[0339] 本领域的技术人员将认识到,在本发明的范围和精神内,多个实施方案都是可能的。现在将参考以下非限制性实施例更详细地描述本发明。以下实施例进一步展示了本发明,但是当然不应理解为以任何方式限制其范围。

[0340] 实施例1:肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)在缩窄结构介导的编码膜结合性细胞因子的mRNA递送之后48小时内表达膜结合性细胞因子

[0341] 本实施例显示了在缩窄结构介导的mbIL-2和/或mbIL-12mRNA递送之后48小时内肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)中的膜结合性IL-2(例如,mbIL-2)和/或膜结合性IL-12(例如,mbIL-12)的表达。

[0342] 方法

[0343] 将TIL解冻并在含有高浓度IL-2(3000IU/mL)的培养基中培养24小时。在培养后,

将编码mbIL-2的mRNA (0.25mg/mL)、编码mbIL-12的mRNA (0.25mg/mL) 或编码mbIL-2和mbIL-12的mRNA (各0.25mg/mL; 总计0.5mg/mL) 通过缩窄结构介导的递送 (“挤压”) 递送至TIL。具体而言, 如本文所述, 在存在mRNA的情况下, 使用ST-10-040-70芯片 (长度10 μ m、宽度4 μ m、深度70 μ m) 以30psi对TIL进行挤压处理。同样使用空有效负载和GFP mRNA来进行缩窄结构介导的递送, 以作为下游分析的对照。将包含挤压递送的mRNA的TIL重悬于包含高浓度IL-2 (3000IU/mL) 的培养基中。使用荧光活化细胞分选 (FACS) 来确定在重悬后4小时、24小时和48小时的膜结合性细胞因子的表达。具体而言, 对细胞活力、表达GFP mbIL-2和/或mbIL-12的细胞的百分比以及GFP表达、mbIL-2表达和mbIL-12表达的平均荧光强度 (例如, MFI) 进行评估 (图1A至图1D和图2A至图2C)。表1提供了用于评估TIL的FACS方案的概述。

[0344] 表1. 实施例1的测定对应的流程图。

	发射 (nm)	通道	荧光染料	靶标	抗体 克隆	最终稀 释度	
	紫光(405 nm)	440/50	VL-1	太平洋蓝	CD3	SK7	1:200
[0345]	蓝光 (488 nm)	530/30	BL-1	GFP	mRna 表达	不适用	以 0.25 mg/mL 递送
	黄光 (561 nm)	585/16	YL-1	PE	mbIL12	20C2	1:200
	红光 (638 nm)	670/14	RL-1	APC	mbIL2	MQ1-1 7H12	1:200
[0346]		780/60	RL-3	Live/Dead 近 红外	活力		1:1000

[0347] 结果

[0348] 如图1A所示, 在挤压后所有测量时间点 (4小时、第1天和第2天) 的活力持续保持在80% -90%之间。TIL的活力在高IL-2培养基中随时间推移而增加, 如4小时与第2天的TIL活力比较所示。

[0349] GFP mRNA阳性对照表明, 使用缩窄结构介导递送方法, mRNA可以有效递送并在TIL中表达 (图1B和图2A)。当通过缩窄结构介导的递送方法递送mRNA时, TIL成功表达mbIL-2和mbIL-12, 并且同时表达mbIL-2和mbIL-12两者, 这可通过表达细胞因子的细胞的百分比和MFI表达来表示 (参见, 例如, 图1C-1D和图2B-2C)。

[0350] 实施例2: 在与不同浓度的IL-2一起培养时, 在缩窄结构介导的编码膜结合性细胞因子的mRNA递送后, TIL在7天内表达膜结合性细胞因子

[0351] 本实施例显示了在缩窄结构介导的编码mbIL-2和mbIL-12mRNA的mRNA递送之后, 在不同的IL-2浓度下培养时, 膜结合性IL-2 (例如, mbIL-2) 或膜结合性IL-12 (例如, mbIL-12) 在7天内的表达。

[0352] 方法

[0353] 将TIL解冻并在含有高浓度IL-2 (3000IU/mL) 的培养基中培养24小时。在培养后, 编码mbIL-2 (0.25mg/mL)、mbIL-12 (0.25mg/mL) 或者mbIL-2和mbIL-12两者 (0.25mg/mL) 的mRNA通过缩窄结构介导的递送来递送至TIL。如本文所述, 在存在mRNA的情况下, 使用ST-

10-040-70芯片(长度10 μ m、宽度4 μ m、深度70 μ m)以30psi对TIL进行挤压处理。将包含挤压递送的mRNA的TIL重悬于包含以下浓度IL-2的培养基中,总共7天:3000IU/mL、300IU/mL、30IU/mL和0IU/mL。使用荧光活化细胞分选(FACS)来确定在重悬后1天、3天和7天的细胞因子的表达。具体而言,对细胞活力、增殖、表达细胞因子的细胞的百分比以及mbIL-2和mbIL-12的表达的平均荧光强度(例如,MFI)进行评估。图3A至图3D显示了在mRNA的挤压递送以及在存在IL-2的情况下孵育之后TIL的活力。图4A至图4D显示了在mRNA的挤压递送以及在存在IL-2的情况下孵育之后TIL的增殖、TIL的活力。图5A至图5D显示了在mRNA的挤压递送以及在存在IL-2的情况下孵育之后TIL上的CD39的表达。图6A至图6D显示了在mRNA的挤压递送以及在存在IL-2的情况下孵育之后TIL中的CD39和CD69的共表达。图7A至图7D显示了在mRNA的挤压递送以及在存在IL-2的情况下孵育之后TIL上的CD62L的表达。图8A至图8H显示了在mRNA的挤压递送以及在存在IL-2的情况下孵育之后TIL上的CD69的表达。图9A至图9D、图10A至图10D和图11A至图11D分别显示了表达mbIL-2、或mbIL-12、或者表达mbIL-2和mbIL-12两者的TIL的百分比。图12A至图12D显示了在mRNA的挤压递送以及在存在IL-2的情况下孵育之后表达T-bet的TIL的百分比。图13A至图13D显示了在mRNA的挤压递送以及在存在IL-2的情况下孵育之后表达Eomes和TCF-1的TIL的百分比。对培养基中的IL-2的每个浓度进行每项测定。

[0354] 表2和3提供了用于评估TIL的表面和核组分的FACS方案的概述。

[0355] 表2. 实施例2的细胞表面染色测定对应的流程图。

	发射 (nm)	通道	荧光染料	靶标	最终稀 释度	
[0356]	紫光 (405 nm)	440/50	VL-1	太平洋蓝	IL-12	1:200
		603/28	VL-3	BV605	CD62L	1:200
	蓝光 (488 nm)	530/30	BL-1	FITC	CD39	1:200
	黄光	585/16	YL-1	PE	CD3	1:200
[0357]	(561 nm)	780/60	YL-4	PE-Cy7	CD69	1:200
	红光	670/14	RL-1	APC	IL-2	1:200
	(638 nm)	780/60	RL-3	NIR	Live/Dead	1:1000

[0358] 表3. 实施例2的核染色测定对应的流程图。

	发射 (nm)	通道	荧光染料	靶标	最终稀 释度	
[0359]	紫光 (405 nm)	VL-1	BV421	T-bet	1:200	
	蓝光 (488 nm)	530/30	BL-1	FITC	Eomes	1:200
		695/40	BL-3	PerCP/Cy5.5	CD3	1:200
	黄光 (561 nm)	585/16	YL-1	PE	TCF-1	1:200
红光 (638 nm)	780/60	RL-3	NIR	Live/Dead	1:1000	

[0360] 结果

[0361] 如图3A至图3C所示,在所有时间点,在3000IU/mL、300IU/mL和30IU/mL IL-2培养基中测试的所有细胞的活力均持续大于约85%。在不含IL-2的培养基中TIL的活力持续大于约85%直到第3天(图3D)。在含有3000IU/mL、300IU/mL和30IU/mL IL-2的培养基中,所有TIL的增殖均增加(图4A至图4C),并且在不含IL-2的培养基中培养的TIL的增殖与在3000IU/mL IL-2培养基中培养直到第3天的相应TIL的增殖相似。

[0362] 在挤压介导的mRNA递送后,TIL成功表达mbIL-2、mbIL-12或者同时表达mbIL-2和mbIL-12两者,如表达相应的细胞因子的细胞的百分比所示(参见,例如,图9A至图9D、图10A至图10D和图11A至图11D)。如图9A至图9D所示,在每个IL-2培养基浓度下,在挤压递送后2天内mbIL-2的表达均降低。mbIL-2表达在mRNA递送之后第1天最高,到第3天可忽略不计(图9A至图9D)。在mRNA的挤压递送之后的孵育期间,在每个IL-2培养基浓度下,在挤压递送之后2天内mbIL-12的表达同样降低(图10A至图10D)。如图10A至图10D所示,mbIL-12表达在mRNA的挤压递送之后第1天达到最高,并随时间推移逐渐降低。类似地,在相应的mRNA的挤压递送之后的孵育期间,在每个IL-2培养基浓度下,在挤压递送之后2天内,mb-IL2和mbIL-12的共表达降低(图11A至图11D)。

[0363] 还对mRNA的挤压递送以及随后与IL-2一起孵育之后TIL的表型进行评估。图5A至图5D显示,CD39的表达在所有TIL中均相似,无论IL-2培养条件如何。CD62L(中央记忆T细胞)的表达在mbIL-2和mbIL-12mRNA递送的组合递送,然后在培养基中与IL-2一起孵育后第1天达到最高(图7A至图7D)。在IL-2培养基中培养的所有TIL中,CD69的表达在第1天和第7天相似,但是在第3天降低(图8A至图8H)。如图12A至图12D所示,在表达mbIL-2、mbIL-12或者mbIL-2和mbIL-12两者的TIL中,T-bet表达随着培养基中IL-2浓度的增加而增强。在挤压介导的mRNA递送后第3天,TIL显示出更高的Eomes和TCF-1表达(图13A至图13D)。

[0364] 实施例3:在与不同浓度的IL-2一起培养时,在缩窄结构介导的编码mbIL-2、mbIL-12和CD86的mRNA递送后,TIL在3天内表达膜结合性细胞因子

[0365] 本实施例显示了挤压介导的编码mbIL-2和mbIL-12或CD86的mRNA递送后TIL的mbIL-2和mbIL-12表达及其对TIL表型的影响。

[0366] 方法

[0367] 将TIL解冻并在含有高浓度IL-2(3000IU/mL)的培养基中培养24小时。在培养后,使用ST-10-040-70芯片(长度10 μ m、宽度4 μ m、深度70 μ m)以30psi通过挤压介导的处理将编

码mbIL-2和mbIL-12(0.1mg/mL)、mbIL-2和mbIL-12(0.25mg/mL)、mbIL-2和mbIL-12(0.5mg/mL)、CD86和mbIL-2(0.25mg/mL)、CD86和mbIL-12(0.25mg/mL)或者CD86和mbIL-2和mbIL-12(各0.25mg/mL)的mRNA递送至TIL。将包含缩窄结构介导递送的mRNA的TIL重悬于包含3000IU/mL IL-2或不含IL-2的培养基中3天。使用荧光活化细胞分选(FACS)来确定在重悬后1天和3天的细胞因子的表达。图14A和图14B显示了在mRNA的挤压递送以及在存在IL-2的情况下孵育之后TIL的活力。图15A和图15B显示了在mRNA的挤压递送以及在存在IL-2的情况下孵育之后TIL的增殖、TIL的活力。图16A和图16B显示了在mRNA的挤压递送以及在存在IL-2的情况下孵育之后TIL上的CD39的表达。图17A和图17B显示了在mRNA的挤压递送以及在存在IL-2的情况下孵育之后TIL上的CD62L的表达。图18A和图18B显示了CD86的平均荧光强度。图19A至图19D显示了在mRNA的挤压递送以及在存在IL-2的情况下孵育之后表达mbIL-2的TIL的百分比。图20A至图20D显示了在mRNA的挤压递送以及在存在IL-2的情况下孵育之后表达mbIL-12的TIL的百分比。图21A和图21B显示了在mRNA的挤压递送以及在存在IL-2的情况下孵育之后表达T-bet的TIL的百分比。图22A和图22B显示了在mRNA的挤压递送以及在存在IL-2的情况下孵育之后表达Eomes的TIL的百分比。图23A和图23B显示了在mRNA的挤压递送以及在存在IL-2的情况下孵育之后表达Eomes+TCF-1的TIL的百分比。

[0368] 表4和5提供了用于评估TIL的表面和核组分的FACS方案的概述。

[0369] 表4. 实施例3的细胞表面染色测定对应的流程图。

	发射(nm)	通道	荧光染料	靶标	最终稀释度
紫光 (405 nm)	440/50	VL-1	太平洋蓝	IL-12	1:200
	603/28	VL-3	BV605	CD62L	1:200
蓝光 (488 nm)	530/30	BL-1	FITC	CD39	1:200
黄光 (561 nm)	585/16	YL-1	PE	CD3	1:200
	780/60	YL-4	PE-Cy7	CD86	1:200
红光 (638 nm)	720/30	RL-1	APC	IL-2	1:200
	780/60	RL-3	NIR	Live/Dead	1:1000

[0371] 表5. 实施例3的核染色测定对应的流程图。

	发射(nm)	通道	荧光染料	靶标	最终稀释度
紫光 (405 nm)	440/50	VL-1	BV421	T-bet	1:200
蓝光 (488 nm)	695/40	BL-3	PerCP/Cy5.5	CD3	1:200
黄光 (561 nm)	585/16	YL-1	PE	TCF-1	1:200
	670/14	RL-1	APC	Eomes	1:200
红光 (638 nm)	780/60	RL-3	NIR	Live/Dead	1:1000

[0373] 结果

[0374] 如图14A至图14B所示,对于在3000IU/mL中测试的所有细胞,在所有重复中(例如,来自第1天和第3天)活力均持续大于约85%。在不含IL-2的培养基中TIL的活力持续大于约85%直到第3天(图14B)。编码mbIL-2和mbIL-12的mRNA或CD86 mRNA的TIL在0IU/mL IL-2培养基中显示出活力增加。对于使用挤压介导的递送来递送编码mbIL-2和mbIL-12的mRNA和/或CD86 mRNA的TIL,增殖增加(图15A至图15B)。

[0375] 当通过挤压介导的处理来递送mRNA时,TIL成功表达mbIL-2和mbIL-12以及CD86,这可通过表达细胞因子的细胞的百分比和MFI表达来表示(参见,例如,图19A至图19D和图20A至图20D)。如图19A至图19D和图20A至图20D所示,通过挤压介导的处理的更高浓度的编码mbIL-2的mRNA和/或mbIL-12mRNA(0.5mg/mL)显示出表达相应的细胞因子的细胞百分比相当,并且分别显示出与0.25mg/mL编码mbIL-2和/或mbIL-12的mRNA的挤压介导的处理相比,在3天内相应的mbIL-2和/或mbIL-12表达总体增加。

[0376] 还评估了通过挤压介导的处理的接收mRNA的TIL的表型。图16A至图16B显示,CD39在所有TIL中均相似,无论IL-2培养条件如何。在存在mbIL-12mRNA的情况下,CD62L(中央记忆T细胞)表达得到改善(图17A至图17B)。在TIL中存在mbIL-12mRNA的情况下,CD86 MFI也同样得到改善(图18A至图18B)。在培养基中接受具有更高浓度的IL-2的mRNA的TIL中,Eomes+和TCF-1+表达得到增强(图23A至图23B)。

[0377] 实施例4:肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)在不存在另外的外源性rhIL2的情况下在缩窄结构介导的编码膜结合性细胞因子的mRNA递送之后最多72小时内表达膜结合性细胞因子

[0378] 本实施例显示了在缩窄结构介导的mbIL-2和mbIL-12mRNA递送之后72小时内TIL中的膜结合性IL-2(例如,mbIL-2)和膜结合性IL-12(例如,mbIL-12)的表达。

[0379] 方法

[0380] 将TIL解冻并在含有一定浓度IL-2(3000IU/mL)的培养基中培养24小时。在培养后,分别通过缩窄结构介导的递送(“挤压”)将以下两组递送至TIL:(1)编码mbIL-2和mbIL-12的mRNA(总计0.25mg/mL)以及(2)编码mbIL-2和mbIL-12的mRNA(总计0.50mg/mL)。如本文所述,在存在mRNA的情况下,使用ST-10-04-70芯片(长度10 μ m、宽度4 μ m、深度70 μ m)以30psi对TIL进行挤压处理。同样使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送,以作为下游分析的对照(对照TIL)。将包含挤压递送的mRNA的TIL重悬于不含外源性rhIL-2的培养基中,培养3天。通过流式细胞术对mbIL-2和mbIL-12的活力和表达进行定量。(图24A至图24E)。

[0381] 结果

[0382] 如图24A所示,包含挤压递送的mbIL-2和mbIL-12mRNA的经修饰的TIL的活力在挤压后所有测量时间点(第0、1、2和3天)持续较高(约80%)。

[0383] 如图24B至图24所示,使用缩窄结构介导的递送方法,编码mbIL-2和mbIL-12的mRNA可同时有效递送至TIL中并随后进行表达。

[0384] 实施例5:用编码膜结合性细胞因子的mRNA挤压加载的TIL在肿瘤共培养物中增殖

[0385] 本实施例显示了在3天时包含挤压加载的mbIL-2和mbIL-12RNA的TIL的增殖分析,该分析包括每个样品中活CD8+T细胞的数量、流式细胞术分析的Ki67表达以及在与肿瘤细胞共培养后通过流式细胞术分析的颗粒酶B表达。

[0386] 方法

[0387] 从3名黑素瘤患者的肿瘤组织中分离出TIL。将TIL解冻并在不含rhIL-2的培养基中培养过夜。在培养后,分别通过缩窄结构介导的递送(“挤压”)将以下两组递送至TIL:(1) 编码mbIL-2的mRNA以及(2) 编码mbIL-2和mbIL-12的mRNA。如本文所述,在存在mRNA的情况下,使用ST-10-04-70芯片(长度10 μ m、宽度4 μ m、深度70 μ m)以30psi对TIL进行挤压处理。同样使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送,以作为下游分析的对照(对照TIL)。然后将挤压处理的TIL在存在自体肿瘤细胞但不含外源细胞因子的情况下培养3天。作为另外的对照,将用空有效负载挤压的TIL(对照TIL)与自体肿瘤细胞一起在含有3000IU/mL rhIL-2和10ng/mL rhIL-12的培养基中培养。

[0388] 结果

[0389] 如图25A所示,对于全部三个供体样品,与用空有效负载挤压的TIL(对照TIL)相比,在存在自体肿瘤细胞但不含外源性IL-2或IL-12的情况下培养时,仅用mbIL2 mRNA挤压的TIL或者用mbIL-2和mbIL-12mRNA挤压的TIL均显示出细胞增殖增加,如通过每个供体样品中CD8⁺T细胞的数量所测量。如图25B所示,对于全部三个供体样品,与用空有效负载挤压的TIL(对照TIL)相比,在存在自体肿瘤细胞但不含外源性IL-2或IL-12的情况下培养时,仅用mbIL2mRNA挤压的TIL或者用mbIL-2和mbIL-12mRNA挤压的TIL均显示出每个样品中的Ki67上调和Ki67阳性细胞的百分比增加。如图26所示,在与自体肿瘤细胞共培养20小时后,通过流式细胞术来分析TIL的颗粒酶B表达,并且类似地显示,与对照TIL相比,在不存在外源性IL-2或IL-12的情况下,在与自体肿瘤细胞共培养后,用(1) 仅mbIL2 mRNA或者(2) mbIL-2和mbIL-12mRNA挤压的TIL中,颗粒酶B上调。

[0390] 实施例6:在与自体肿瘤细胞共培养时,用编码膜结合性细胞因子的mRNA挤压加载的TIL的肿瘤杀伤

[0391] 本实施例显示了,与在存在外源性rhIL-2和rhIL-12的情况下用肿瘤细胞共培养的对照TIL相比,在不存在外源细胞因子的情况下用(1) mbIL-2mRNA或者(2) mbIL-2和mbIL-12mRNA挤压的TIL的肿瘤杀伤。

[0392] 方法

[0393] 将TIL解冻并在不含细胞因子培养基中培养1-2天,其中用Cytolight红染色的自体肿瘤细胞系的比率为2:1,并使用IncuCyte荧光显微镜成像24小时。在培养后,分别通过缩窄结构介导的递送(“挤压”)将以下两组递送至TIL:(1) 编码mbIL-2的mRNA以及(2) 编码mbIL-2和mbIL-12的mRNA。如本文所述,在存在mRNA的情况下,使用ST-10-04-70芯片(长度10 μ m、宽度4 μ m、深度70 μ m)以30psi对TIL进行挤压处理。同样使用空有效负载来进行缩窄结构介导的递送,以作为下游分析的对照(对照TIL)。然后在不存在外源细胞因子的情况下将挤压处理的TIL与自体肿瘤细胞一起共培养。作为另外的对照,将用空有效负载挤压的TIL(对照TIL)与自体肿瘤细胞一起在含有3000IU/mL rhIL-2和10ng/mL rhIL-12的培养基中培养。将红色蒙版施加于IncuCyte图像并用于计算肿瘤汇合的百分比。

[0394] 结果

[0395] 如图27A至图27D所示,与用肿瘤细胞共培养同时通过外源性rhIL-2和rhIL-12支持的对照TIL相比,用(1) mbIL-2mRNA或者(2) mbIL-2和mbIL-12mRNA挤压的TIL,在不存在外源细胞因子的情况下共培养后,显示出相当的肿瘤杀伤能力。与在不存在外源细胞因子的

情况下共培养的对照TIL相比,用(1)mbIL-2mRNA或者(2)mbIL-2和mbIL-12mRNA挤压的TIL,在不存在外源细胞因子的情况下共培养后,也显示出肿瘤杀伤能力显著增强。

[0396] 序列表

[0397]

1	ATGATGGTGGACGGCGACAACAGCCAC GTGGAAATGAAGCTGGCCGTGGACGAG GAAGAGAACGCCGACAACAACACCAA GGCCAACGTGACCAAGCCTAAGAGATG CAGCGGCAGCATCTGCTACGGCACAAT CGCCGTGATCGTGTTCTTCCTGATCGGC TTTATGATCGGCTACCTGGGCTACTGCA AGAGCAGTGATGGACCTGGCGAAACAG GCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGCGGAG GAAGCGGTGGCGGGCGGATCTTGTGATC TGCCTCAGACACACAGCCTGGGCAGCA GACGAACACTGATGCTGCTGGCCCAGA TGCGGAAGATCAGCCTGTTCACTGCC TGAAGGACCGGCACGATTCGGCTTCC CTCAAGAGGAATTCGGCAACCAGTTCC AGAAGGCCGAGACAATCCCTGTGCTGC ACGAGATGATCCAGCAGATCTTCAACC TGTTCTCCACCAAGGACAGCAGCGCCG CCTGGGATGAGACACTGCTGGACAAGT TCTACACCGAGCTGTACCAGCAGCTGA ATGACCTGGAAGCCTGCGTGATCCAAG GCGTGGGAGTGACAGAGACACCCCTGA TGAAGGAAGATAGCATCCTGGCCGTGC GCAAGTACTTCCAGCGGATCACCCCTGT	TFRC_G4S_IF N-a2a mRNA
---	---	---------------------------

	<p>ACCTGAAAGAGAAGAAGTACAGCCCCT GCGCCTGGGAAGTCGTGCGGGCCGAAA TCATGAGAAGCTTCAGCCTGAGCACCA ACCTGCAAGAGAGCCTGCGGAGCAAAG AGTGA</p>	
<p>2</p>	<p>ATGATGGTGGACGGCGACAACAGCCAC GTGGAAATGAAGCTGGCCGTGGACGAG GAAGAGAACGCCGACAACAACACCAA GGCCAACGTGACCAAGCCTAAGAGATG CAGCGGCAGCATCTGCTACGGCACAAT CGCCGTGATCGTGTTCTTCCTGATCGGC TTTATGATCGGCTACCTGGGCTACTGCA AGAGCAGTGATGGACCTGGCGAAACAG GCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGCGGAG GAAGTGGCGGCGGAGGTTCTATTTGGG AGCTGAAGAAAGACGTGTACGTGGTGG AACTGGACTGGTATCCCGATGCTCCTG GCGAGATGGTGGTGTGACCTGCGATA CCCCTGAAGAGGACGGCATCACCTGGA CACTGGATCAGTCTAGCGAGGTGCTCG GCAGCGGCAAGACCCTGACCATCCAAG TGAAAGAGTTTGGCGACGCCGGCCAGT ACACCTGTCACAAAGGCGGAGAAGTGC TGAGCCACAGCCTGCTGCTGCTCCACA AGAAAGAGGATGGCATTGAGCACCG ACATCCTGAAGGACCAGAAAGAGCCCA AGAACAAGACCTTCCTGAGATGCGAGG CCAAGA ACTACAGCGGCCGGTTCACAT GTTGGTGGCTGACCACCATCAGCACCG ACCTGACCTTCAGCGTGAAGTCCAGCA GAGGCAGCAGTGATCCTCAGGGCGTTA CATGTGGCGCCGCTACACTGTCTGCCG AAAGAGTGCGGGGCGATAACAAAGAA TACGAGTACAGCGTGGAATGCCAAGAG GACAGCGCCTGTCCAGCCGCCGAAGAG TCTCTGCCTATCGAAGTGATGGTCGACG CCGTGCACAAGCTGAAGTACGAGA ACT ACACCAGCAGCTTTTTTCATCCGGGACAT CATCAAGCCCGATCCTCCAAAGAACCT GCAGCTGAAGCCTCTGAAGAACAGCAG ACAGGTGGAAGTGTCTGGGAGTACCC CGACACCTGGTCTACACCCACAGCTA CTTCAGCCTGACCTTTTGCGTGCAAGTG</p>	<p>TFRC_G4S_IL- 12 mRNA</p>

[0398]

[0399]

	<p>CAGGGCAAGTCCAAGCGCGAGAAAA GGACCGGGTGTTCACCGACAAGACCAG CGCCACCGTGATCTGCAGAAAGAACGC CAGCATCAGCGTCAGAGCCCAGGACCG GTACTACAGCAGCTCTTGGAGCGAATG GGCCAGCGTGCCATGTAGCGGAGGTGG TGGTAGCGGAGGCGGCGGAAGCGGCG GTGGTGGATCAGGTGGTGGTGGCTCTA GAAACCTGCCAGTGGCTACCCCTGATC CTGGCATGTTCCCTTGTCTGCACCACAG CCAGAACCTGCTGAGAGCCGTGTCCAA CATGCTGCAGAAGGCCAGACAGACCCT GGAATTCTACCCCTGCACCAGCGAGGA AATCGACCACGAGGACATCACCAAGGA TAAGACCAGCACCGTGGAAGCCTGCCT GCCTCTGGAAGTACCAAGAACGAGAG CTGCCTGAACAGCCGGGAAACCTCCTT CATACCAACGGCTCTTGCCTGGCCAG CAGAAAGACAAGCTTCATGATGGCCCT GTGCCTGAGCAGCATCTACGAGGACCT GAAGATGTACCAGGTGGAATTCAAGAC CATGAACGCCAAGCTGCTGATGGACCC CAAGCGGCAGATCTTCCTGGACCAGAA CATGCTGGCTGTGATCGACGAGCTGAT GCAGGCCCTGAACTTCAACAGCGAGAC AGTGCCCCAGAAGTCTAGCCTGGAAGA ACCCGACTTCTACAAGACCAAGATCAA GCTGTGCATCCTGCTGCACGCCTTCCGG ATCAGAGCCGTGACCATCGACAGAGTG ATGAGCTACCTGAACGCCTCCTGA</p>	
3	(G ₄ S) ₃	G ₄ S 接头
4	(EAAAK) ₃	EAAAK 接头
5	(G ₄ S) _n	G ₄ S 接头
6	(EAAAK) _n	EAAAK 接头
7	<p>MMVDGDNSHVEMKLAVDEEENADNNT KANVTKPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIGFM IGYLGYCKSSDGPGETG GGGGSGGGGSGGGGS APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN</p>	TFRC_G4S_IL-2

[0400]

	<p>NYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQ CLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFCQSIISTL</p>	
8	<p>MLKKRGNHSTGLCLLVMFFMVLVALVG LGLGMFQLFHLQKETG GGGGSGGGGSGGGGS APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKHLQ CLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS NINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFCQSIISTLT</p>	FasL_G4S_IL-2
9	<p>MMVDGDNSHVEMKLA VDEEENADNNT KANVTKPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIGFM IGYLGYCKSSDGPGETG GGGGSGGGGSGGGGS IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLT CDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQ VKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHK KEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAK NYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSS DPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSV ECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLK YENYTSSFFIRDIKPDPPKNLQLKPLKNS RQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQV QGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASI SVRAQDRYYSWSEWASVPCSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPMFP CLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPC TSEEDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNE SCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALC LSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKR QIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQ KSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTID RVMSYLNAS</p>	TFRC_G4S_IL-12
10	<p>MMVDGDNSHVEMKLA VDEEENADNNT KANVTKPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIGFM IGYLGYCKSSDGPGETG GGGGSGGGGSGGGGS CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSC LKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHE MIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTE LYQQLNLEACVIQGVGTETPLMKEDSI</p>	TFRC_G4S_IF N-a2a

	LAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVR AEIMRSFSLSTNLQESLRSKE	
[0401]	11 MMVDGDNSHVEMKLAVDEEENADNNT KANVTKPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIGFM IGYLG YCKSSDGPGETG	TFRC 结构域
	12 MLKKRGNHSTGLCLLVMFFMVLVALVG LGLGMFQLFHLQKETG	FasL 结构域

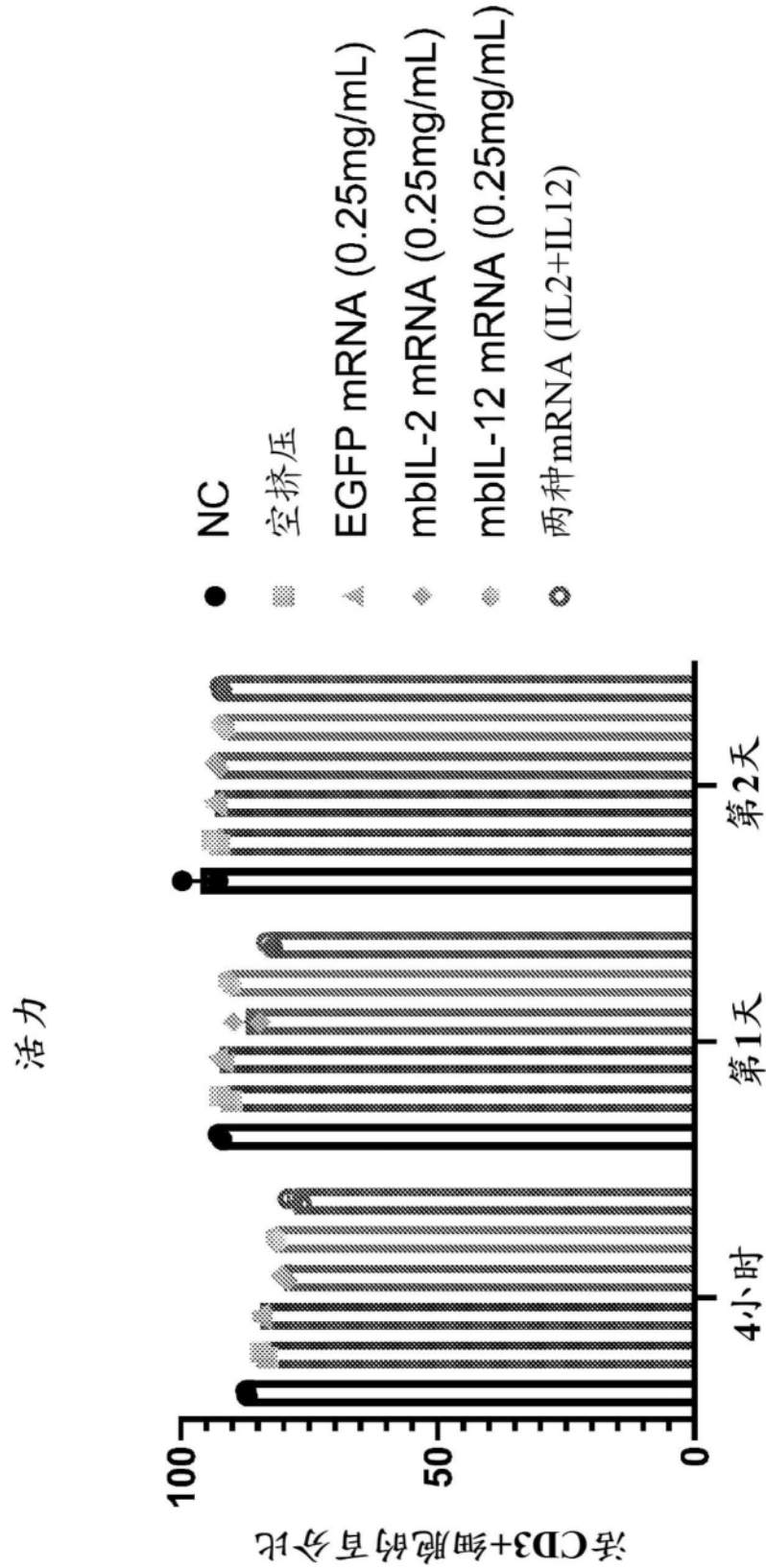


图1A

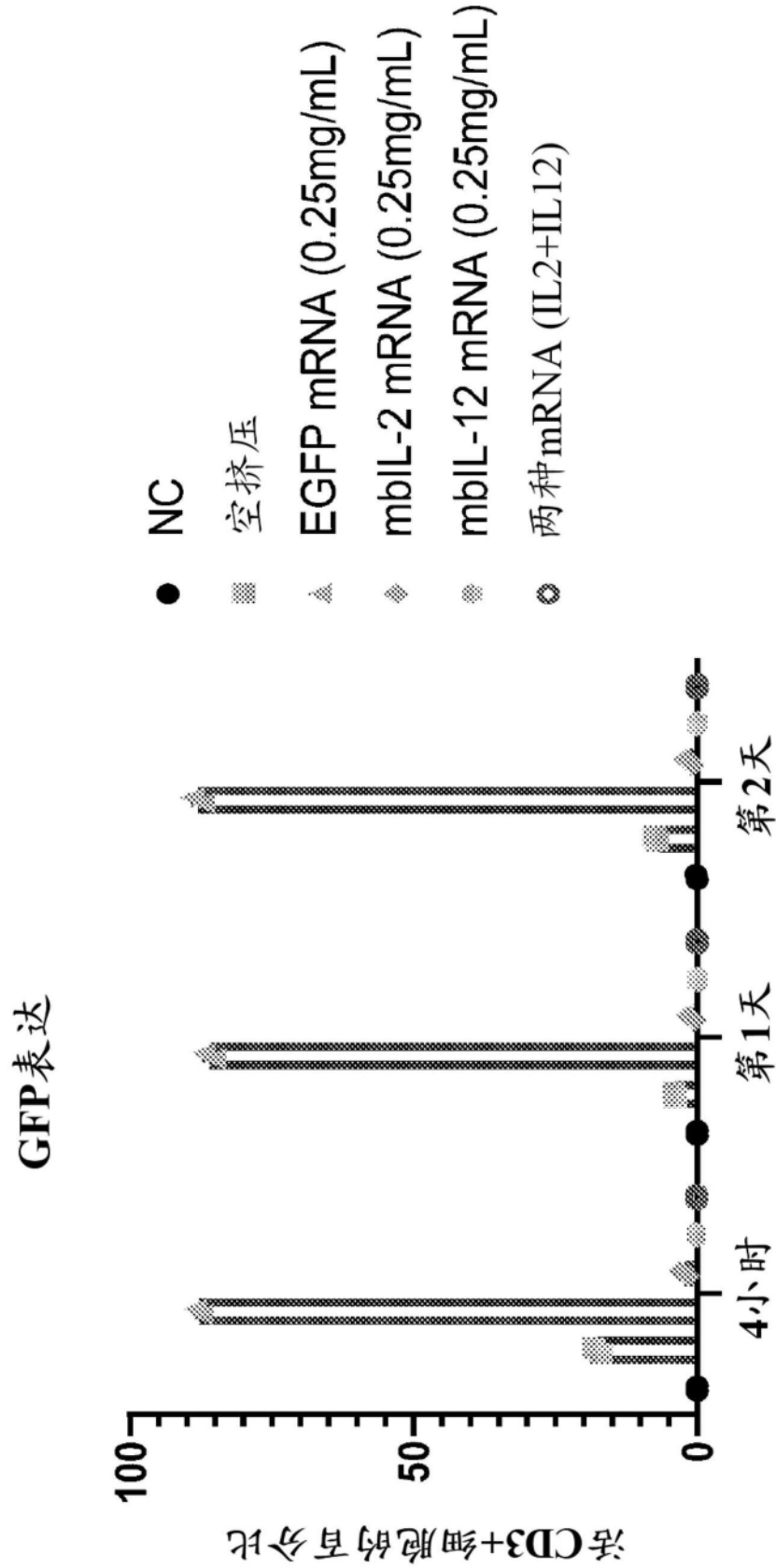


图1B

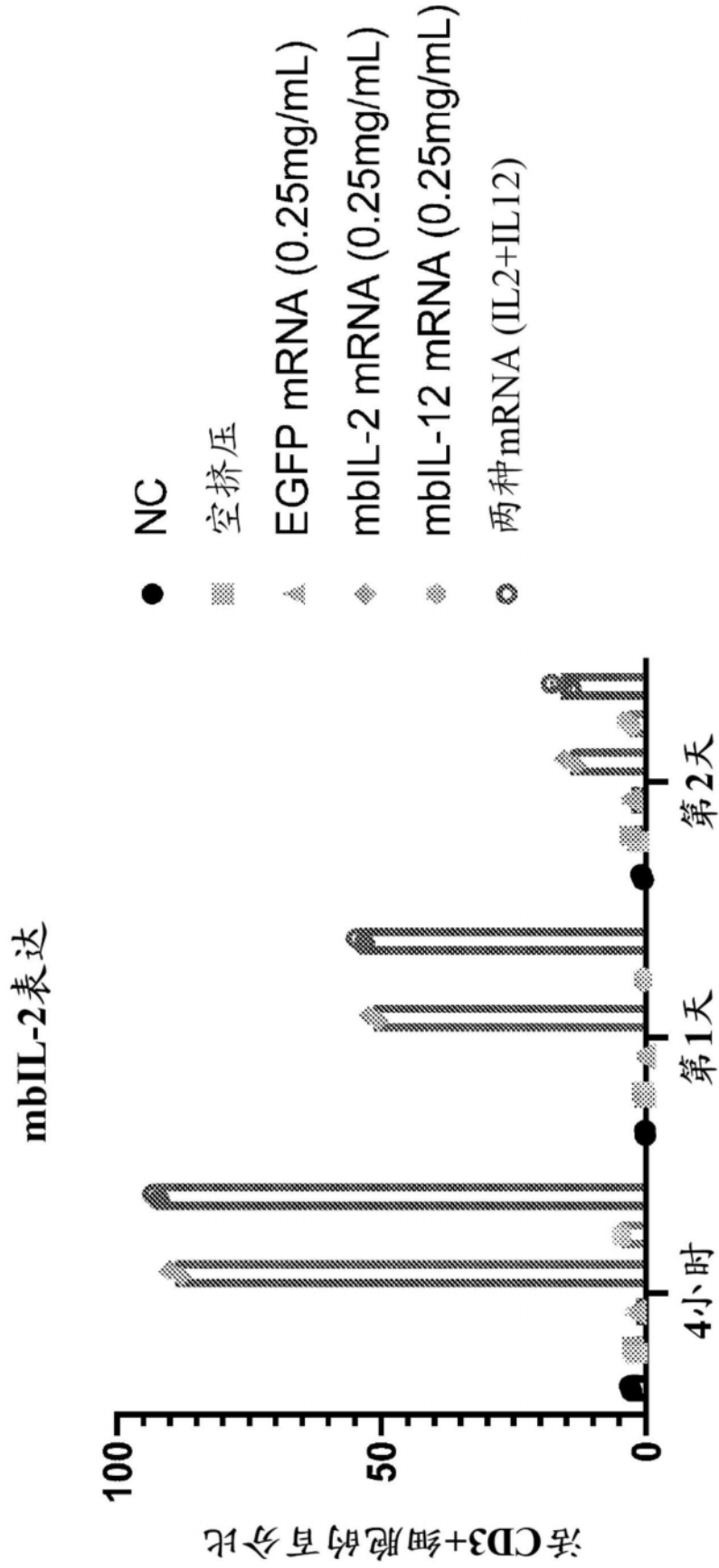


图1C

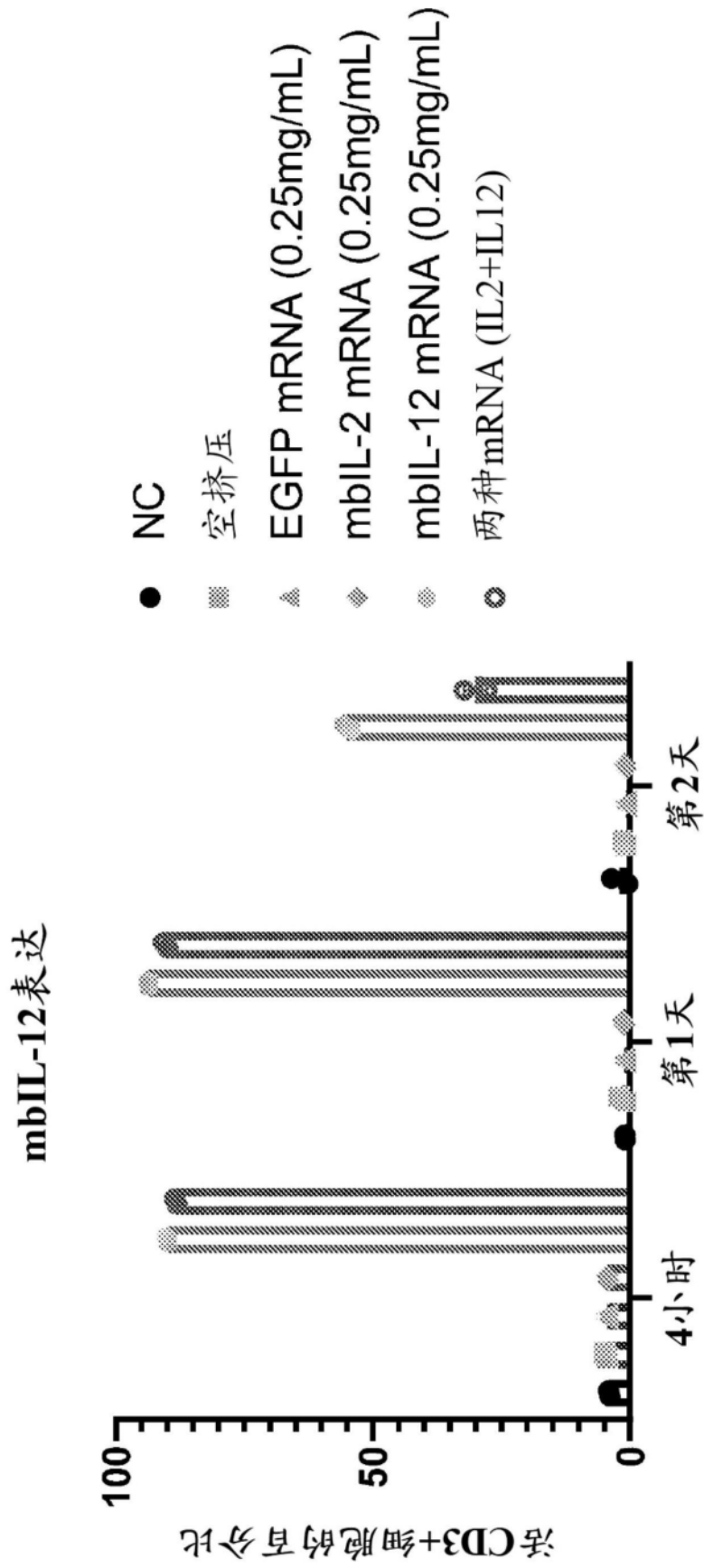


图1D

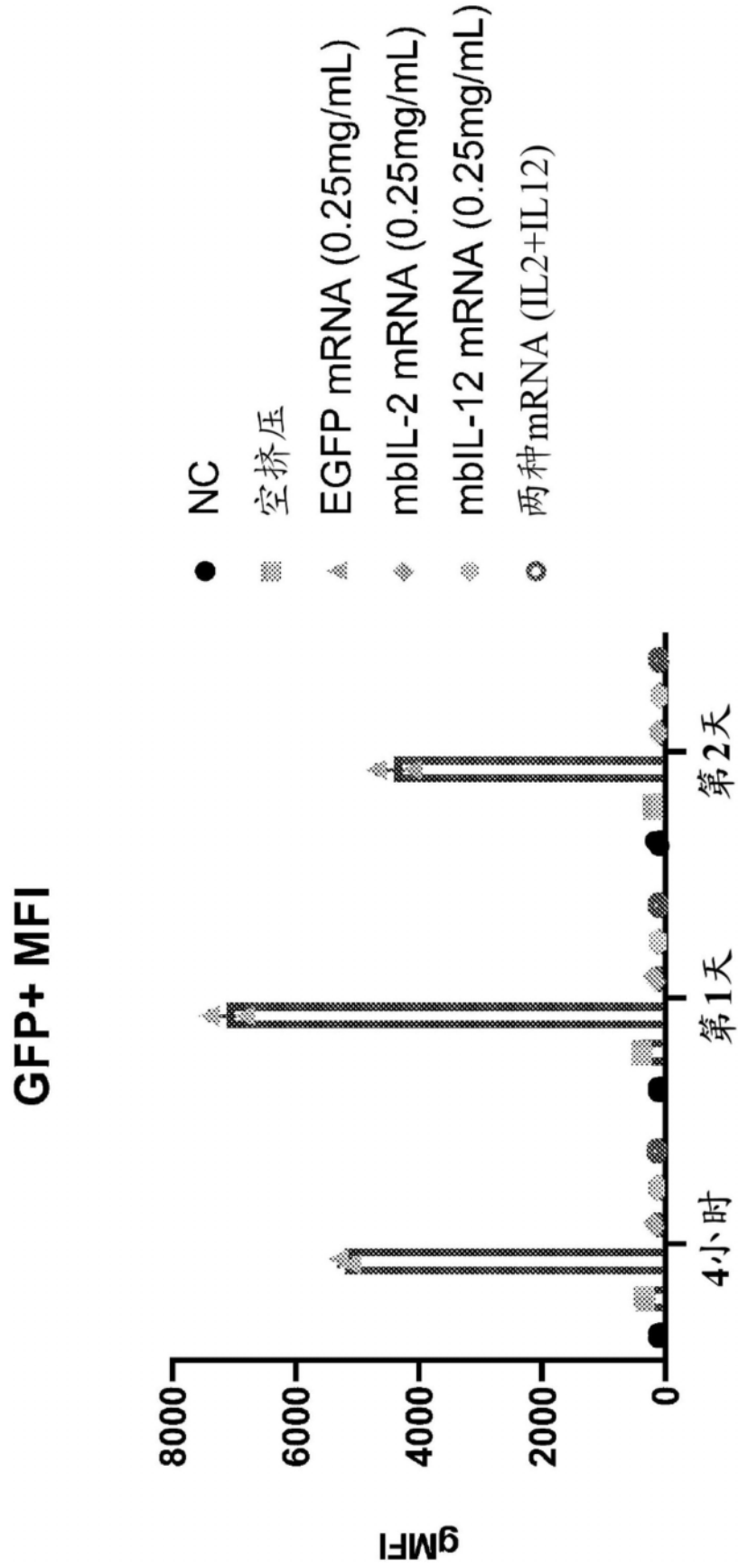


图2A

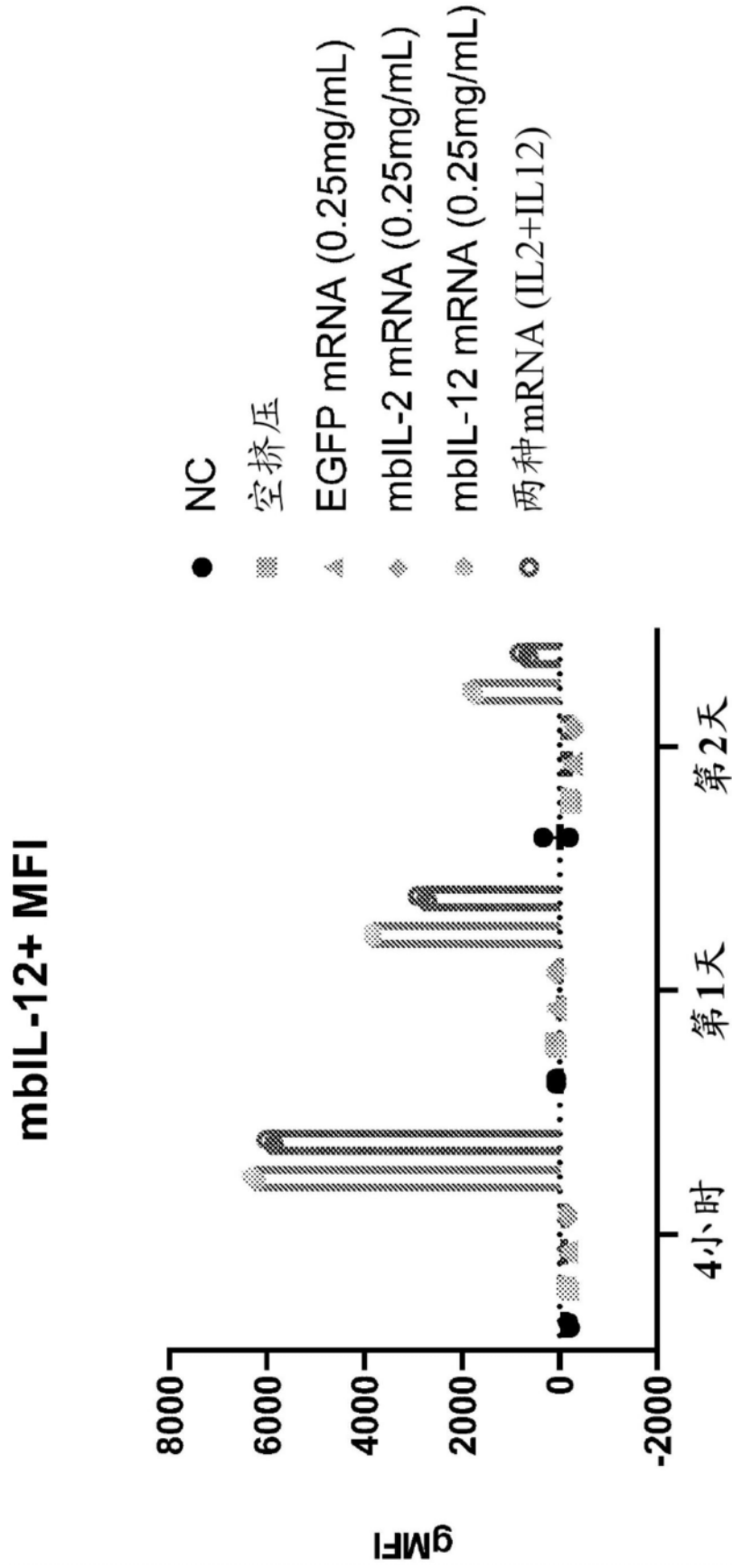


图2B

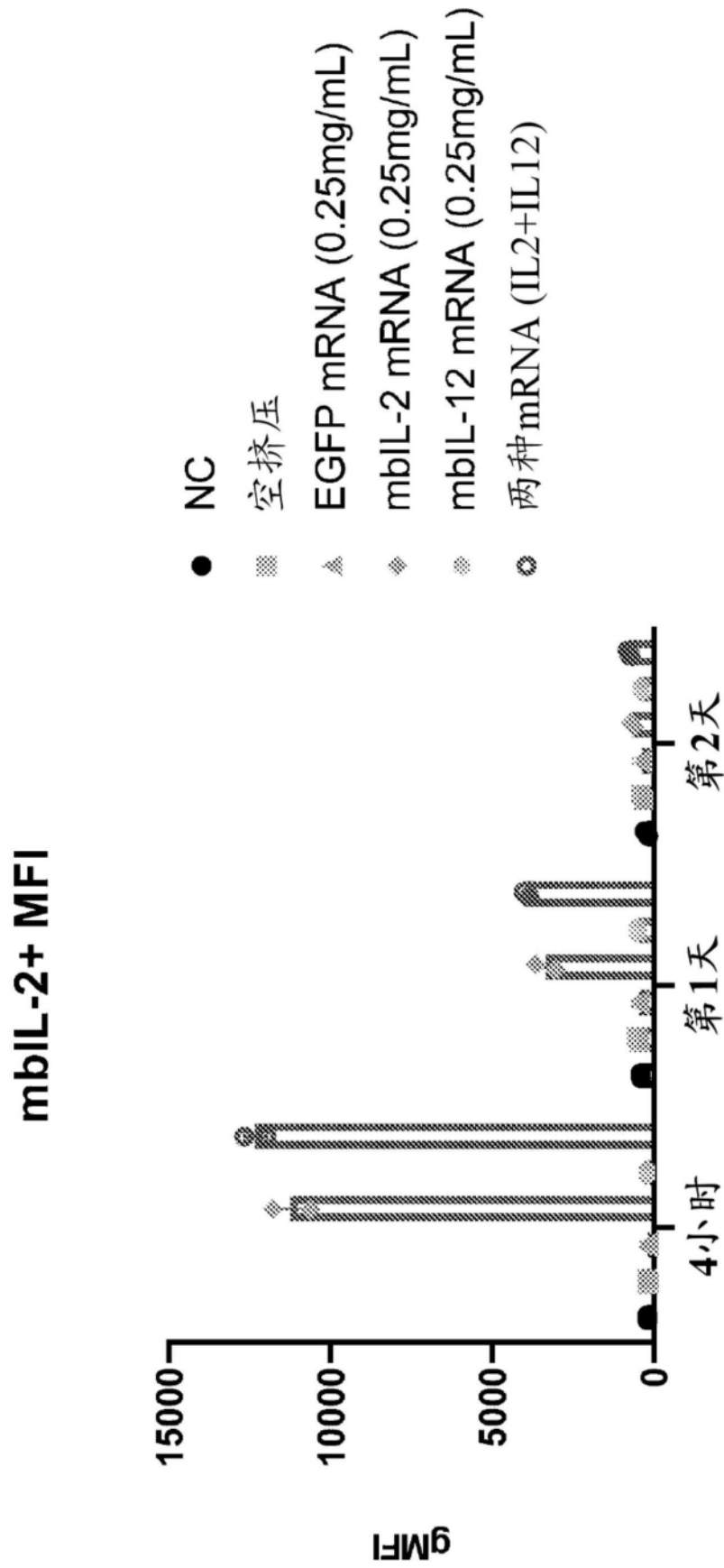


图2C

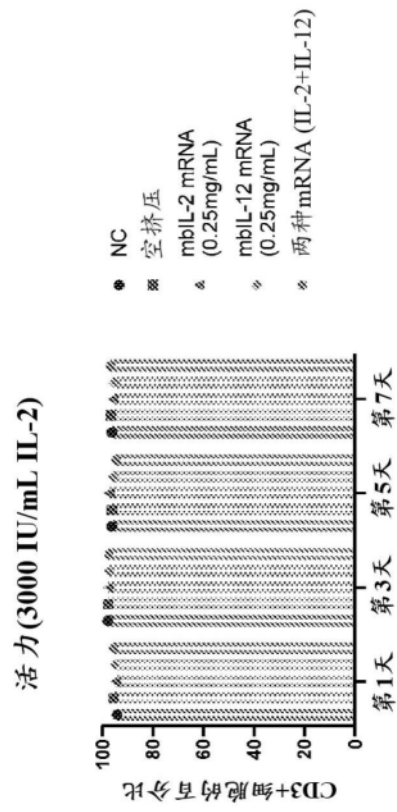


图3A

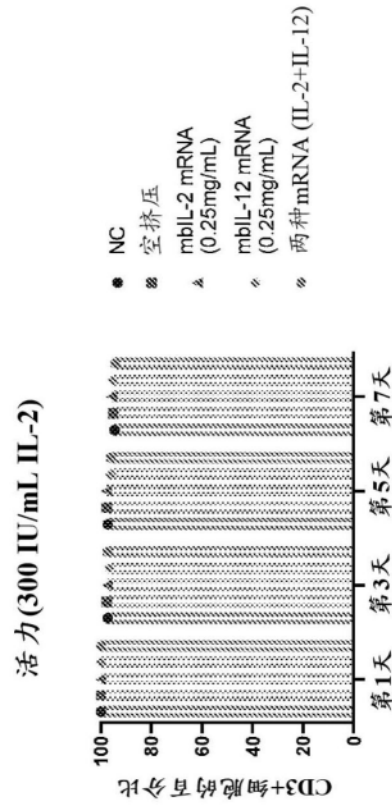


图3B

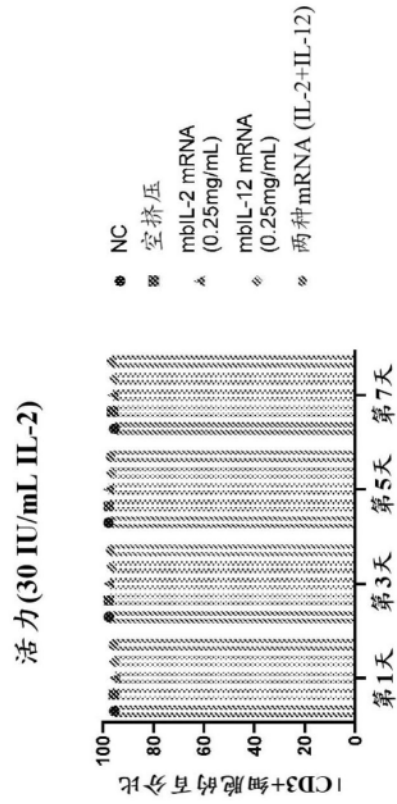


图3C

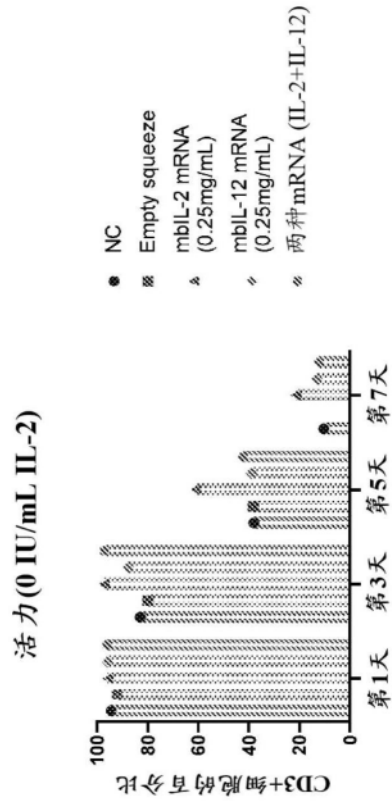


图3D

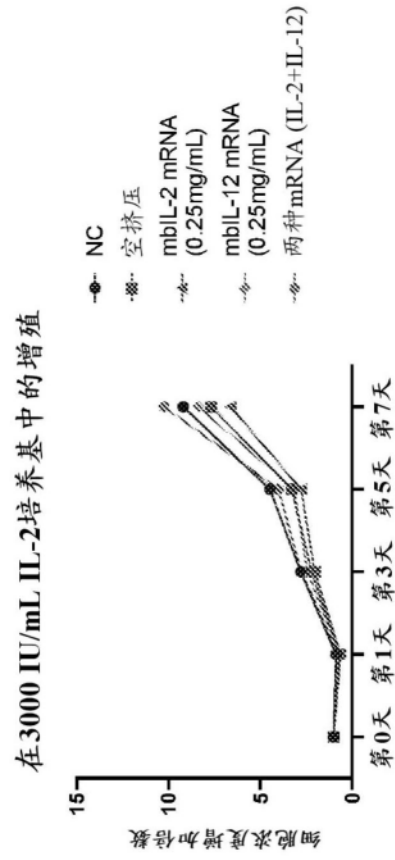


图4A

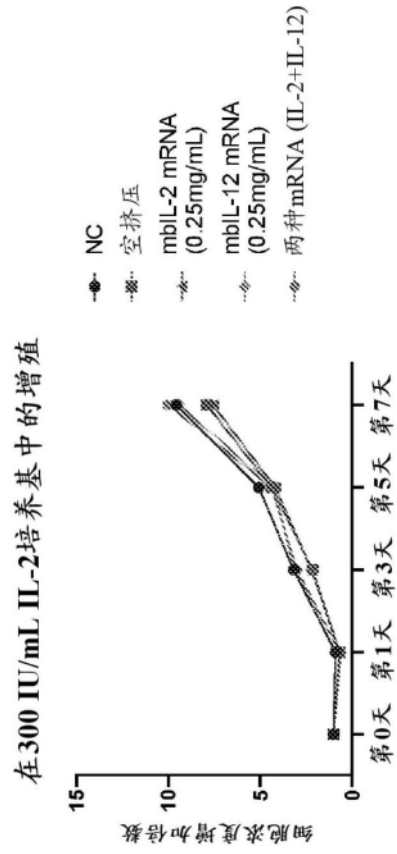


图4B

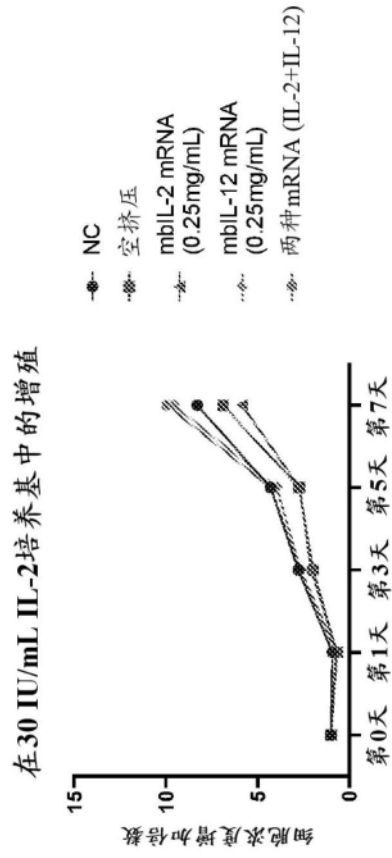


图4C

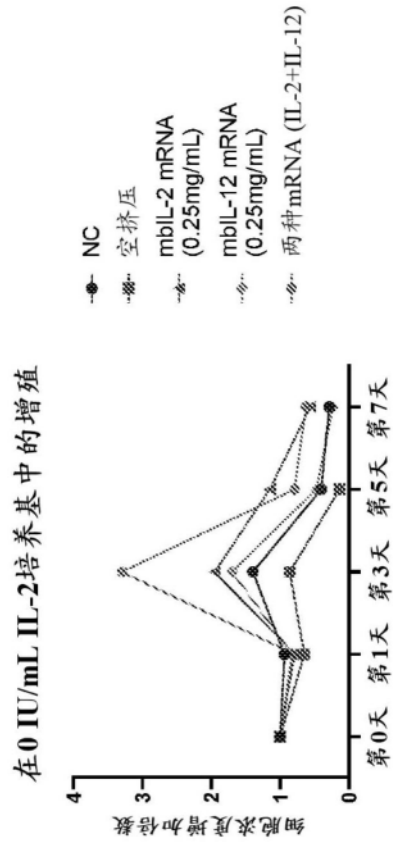


图4D

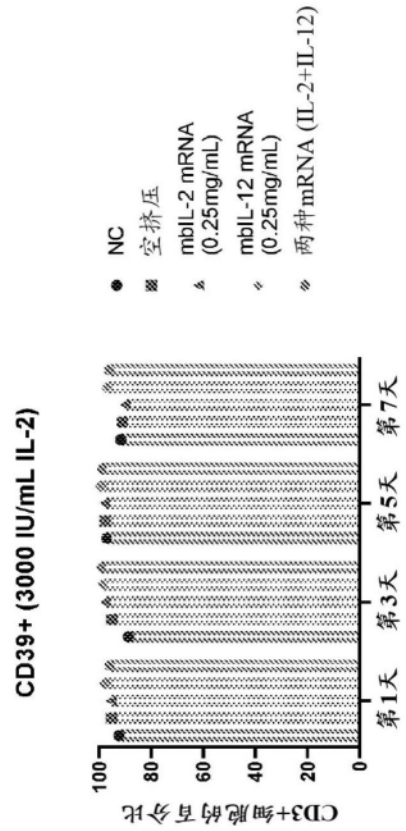


图5A

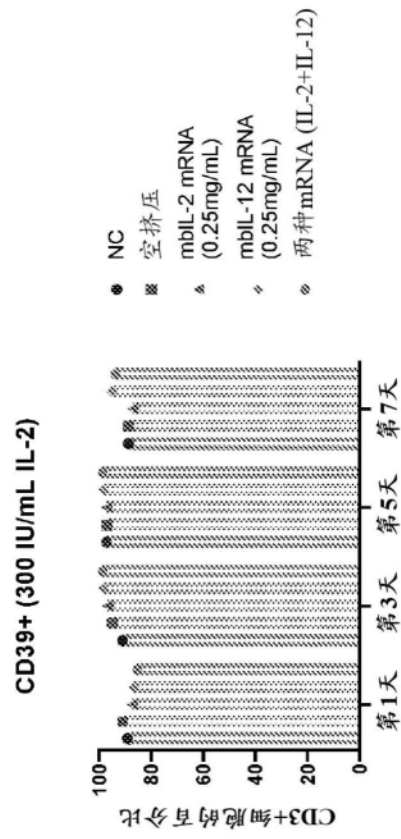


图5B

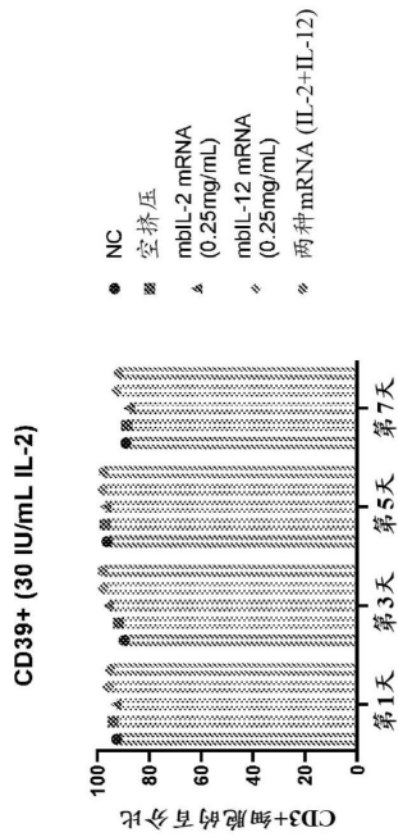


图5C

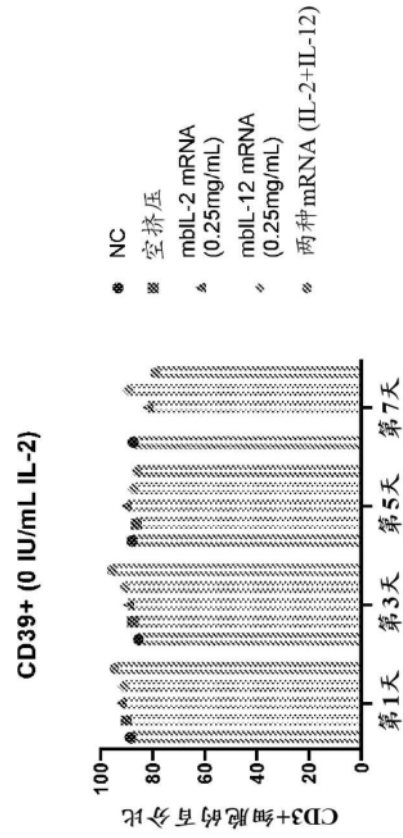


图5D

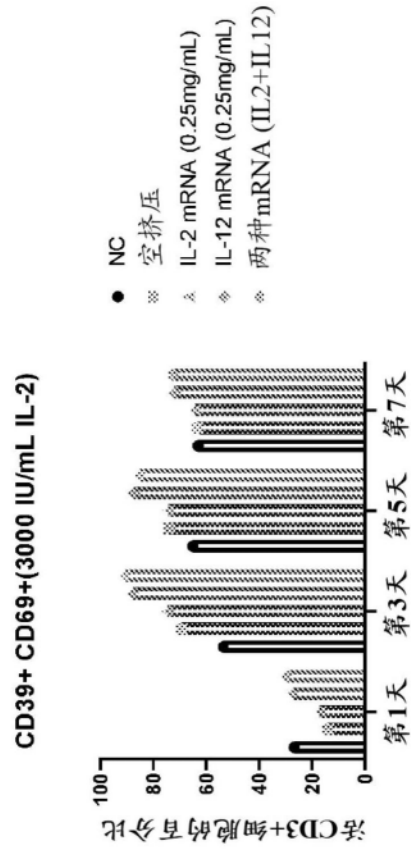


图6A

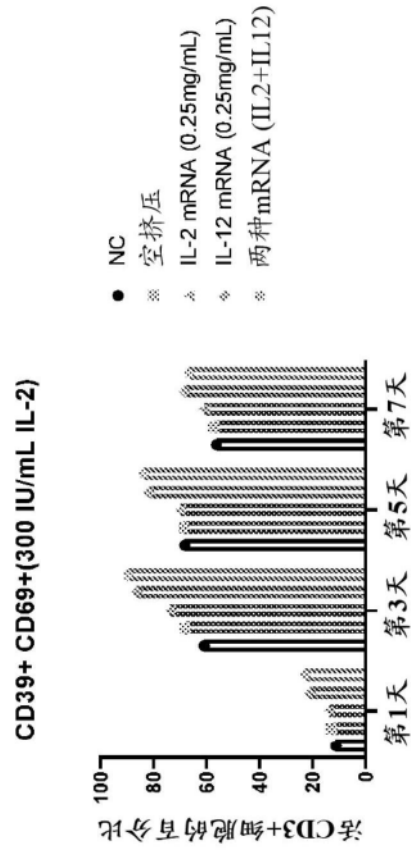


图6B

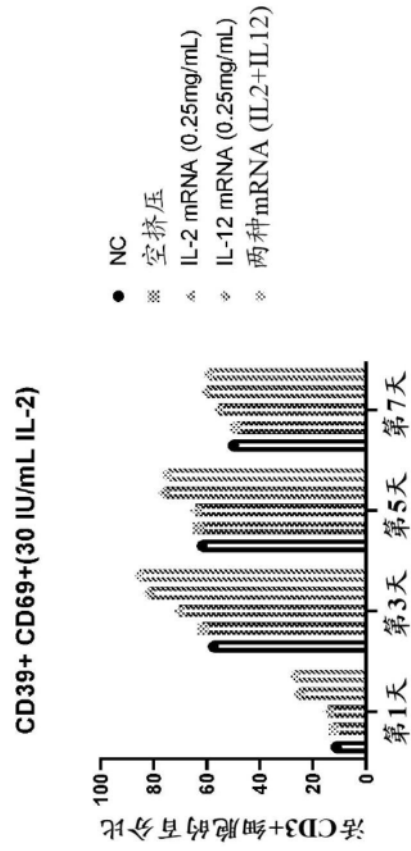


图6C

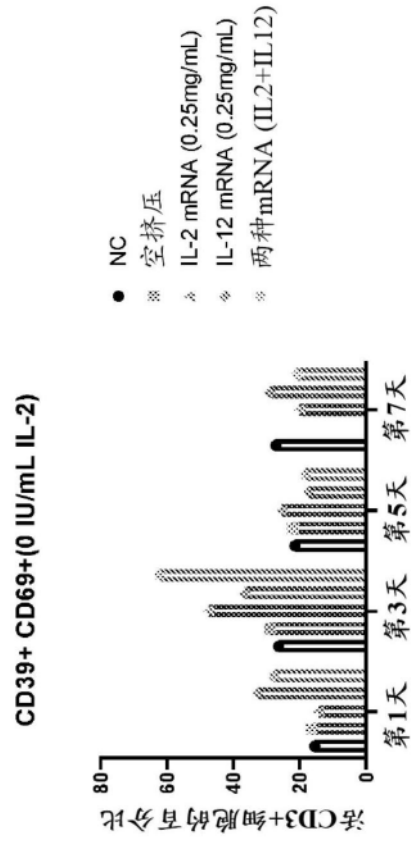


图6D

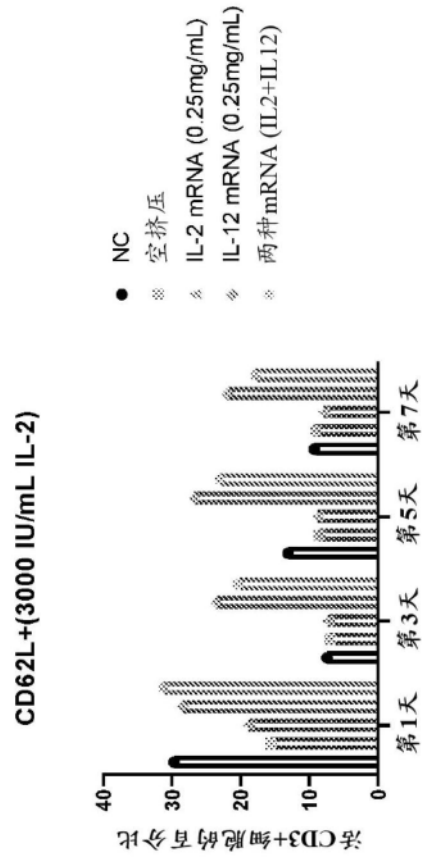


图7A

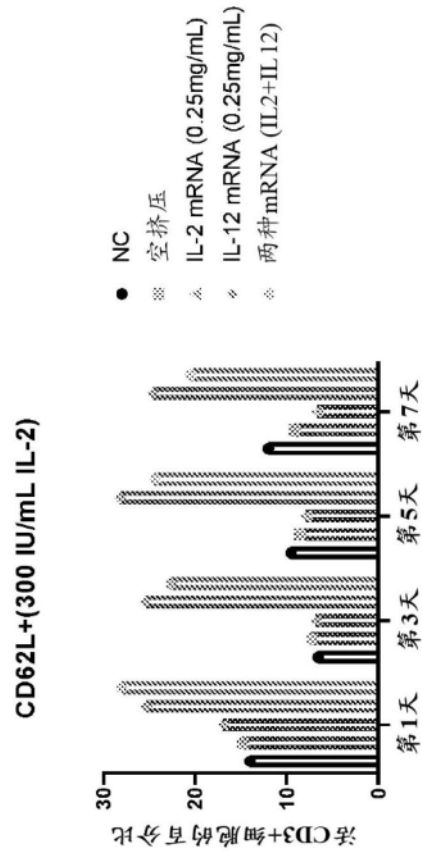


图7B

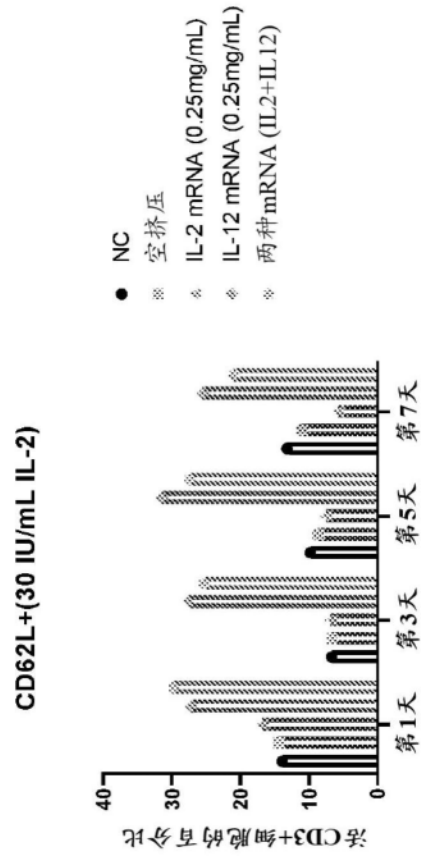


图7C

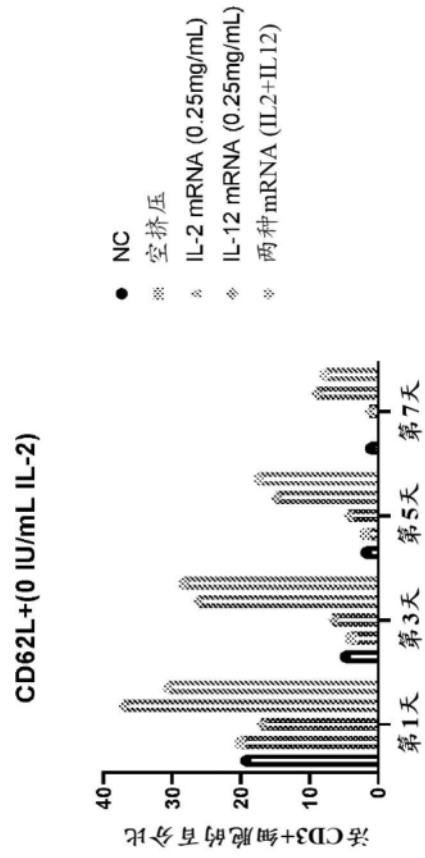


图7D

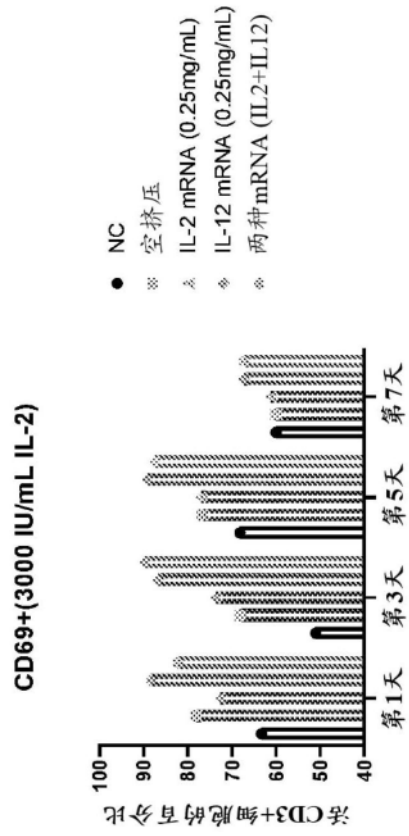


图8A

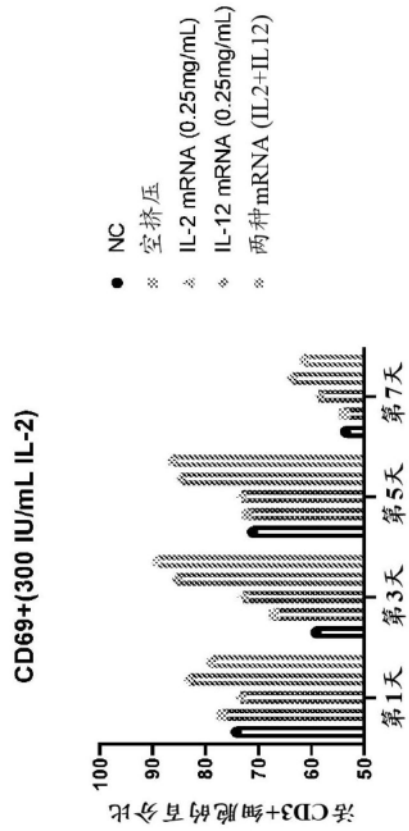


图8B

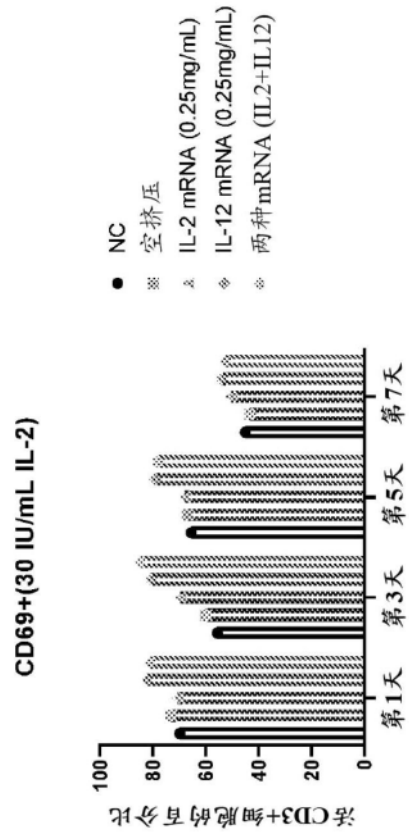


图8C

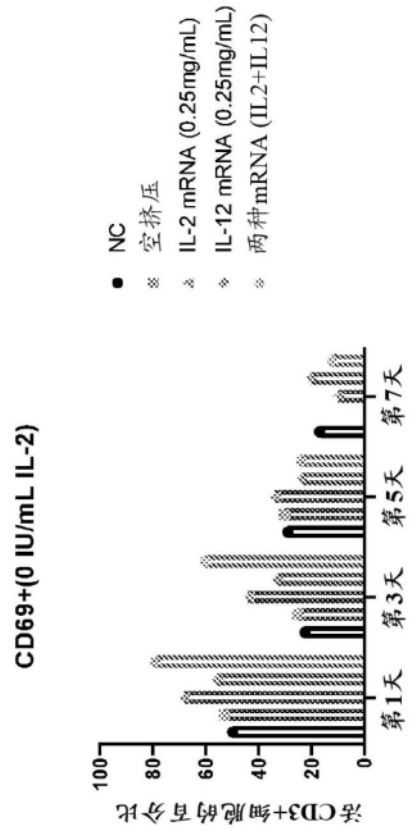


图8D

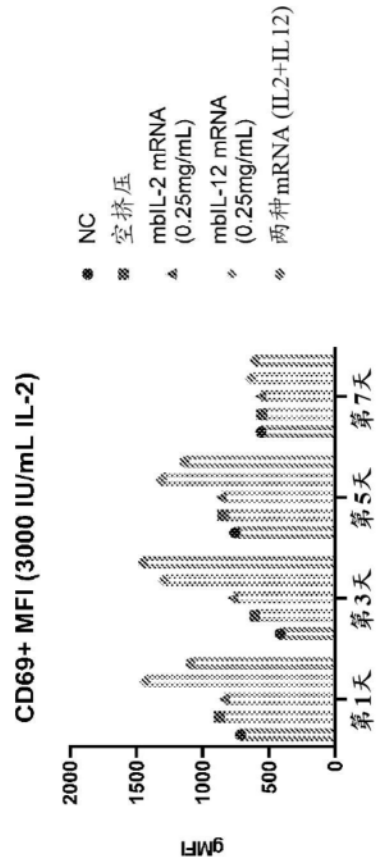


图8E

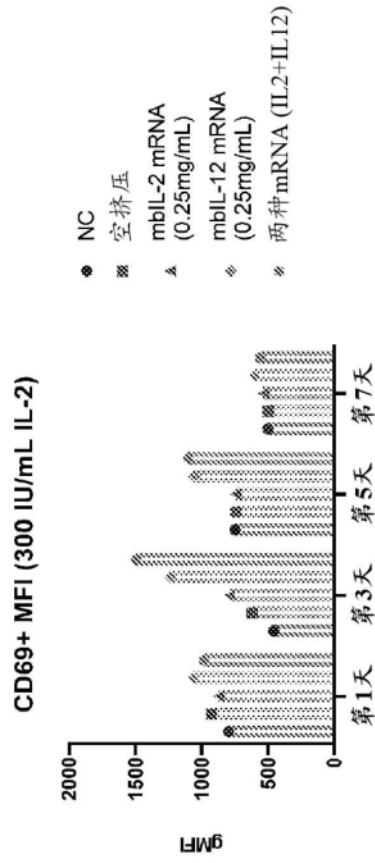


图8F

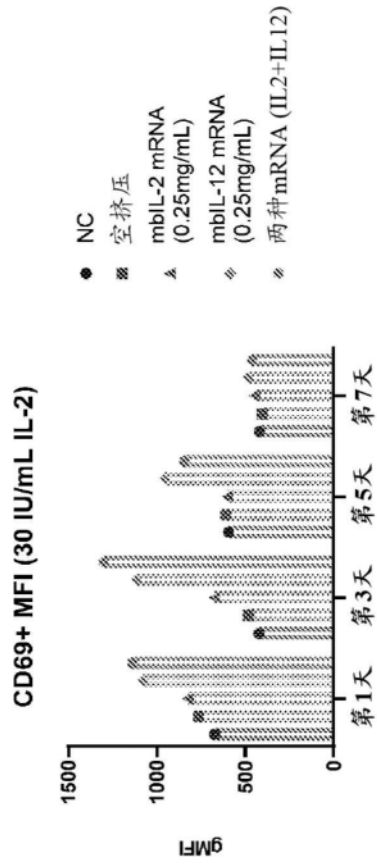


图8G

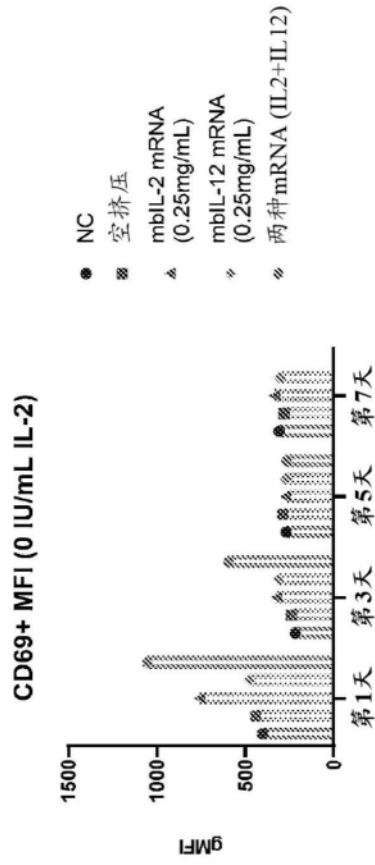


图8H

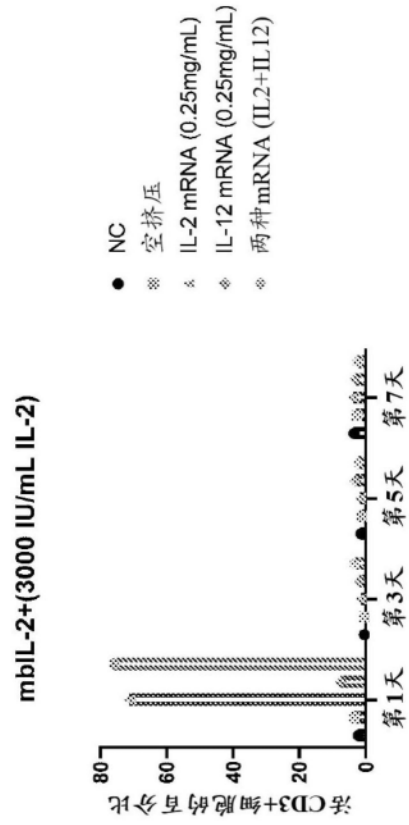


图9A

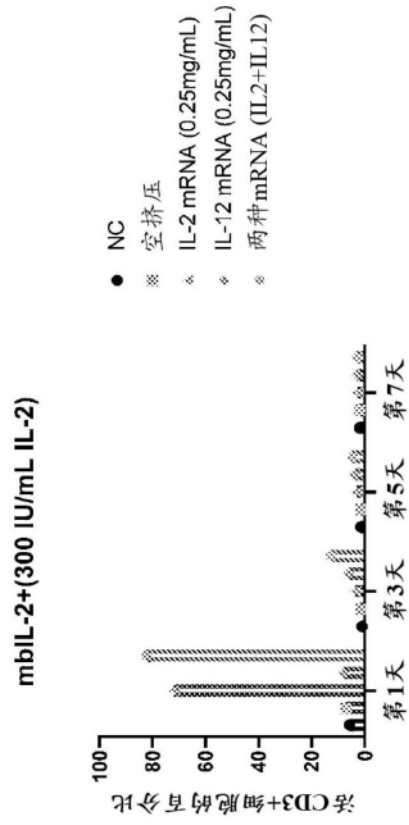


图9B

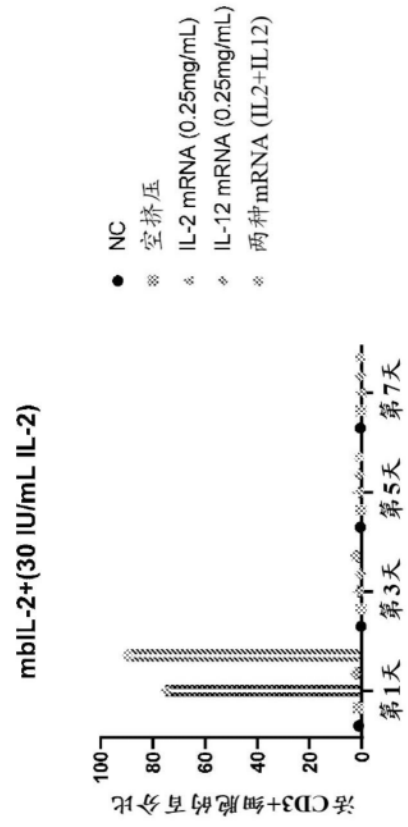


图9C

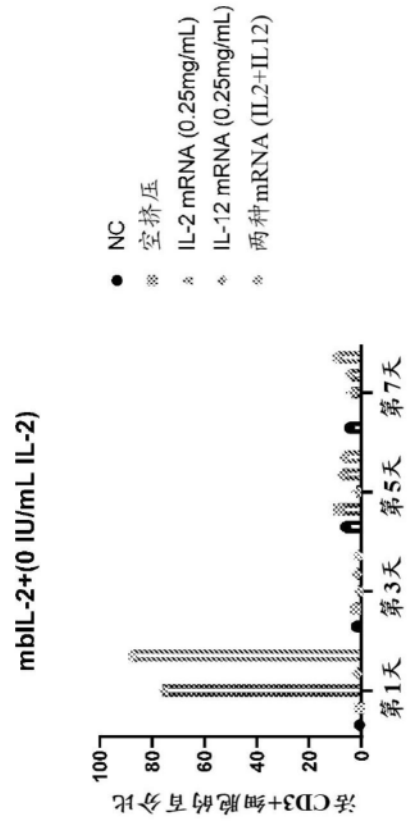


图9D

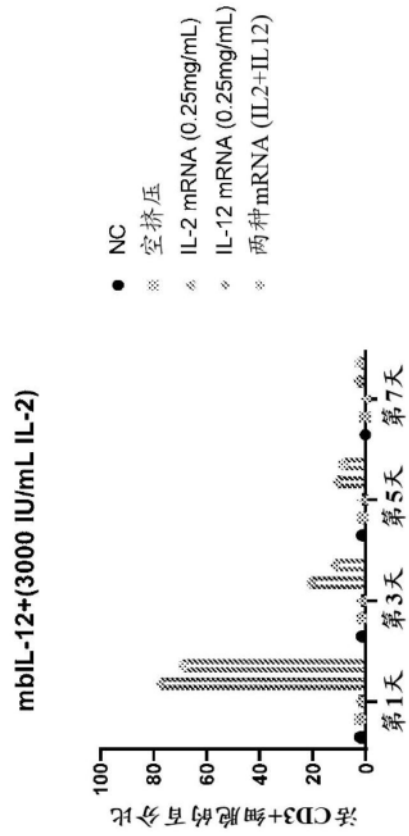


图10A

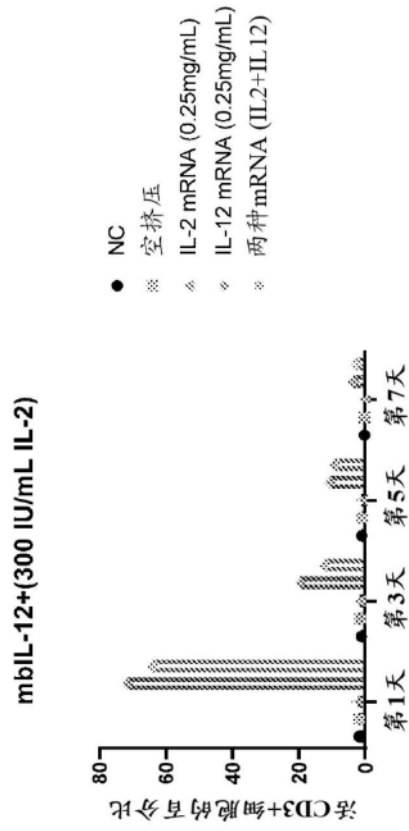


图10B

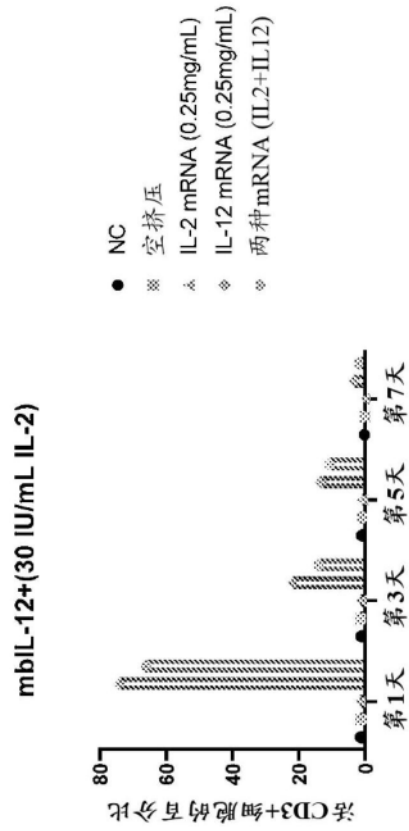


图10C

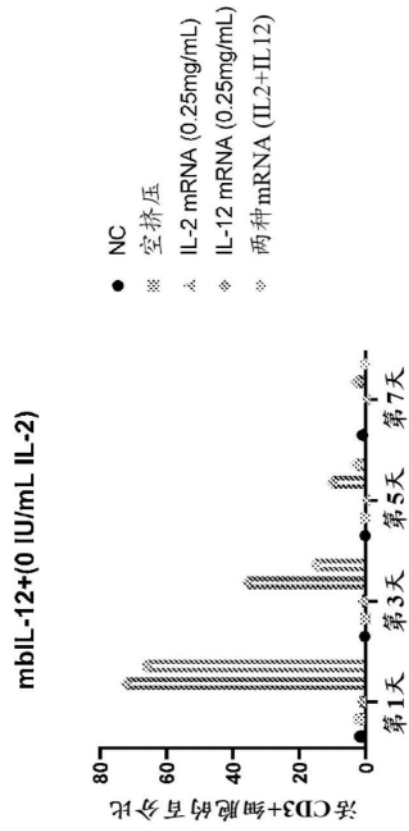


图10D

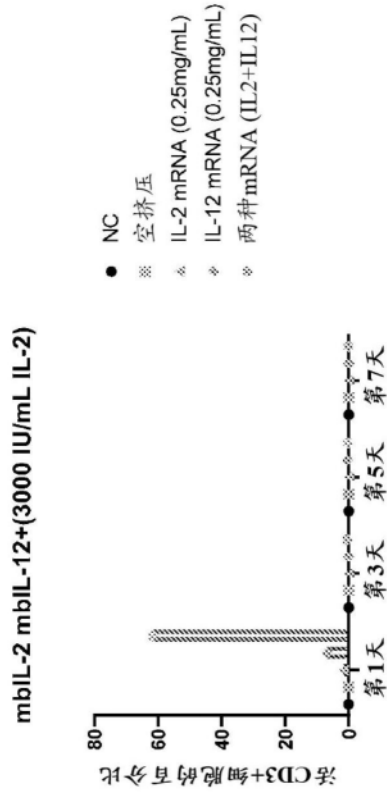


图11A

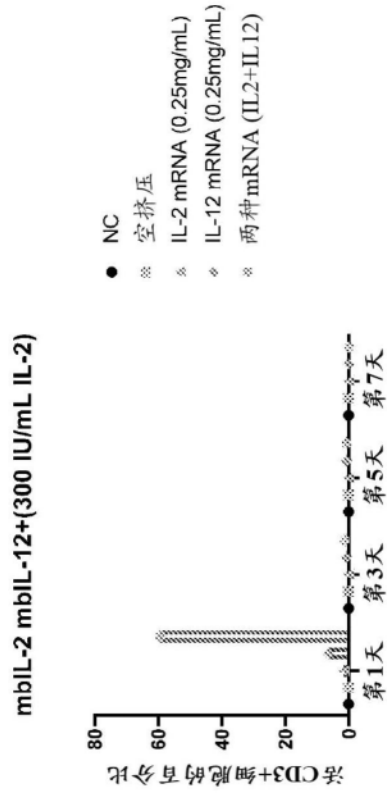


图11B

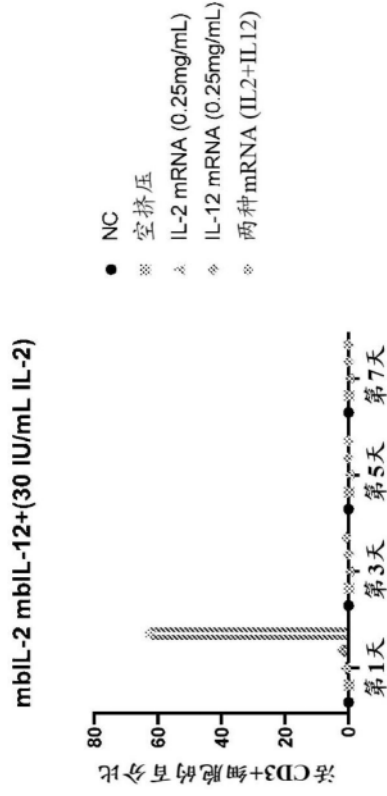


图11C

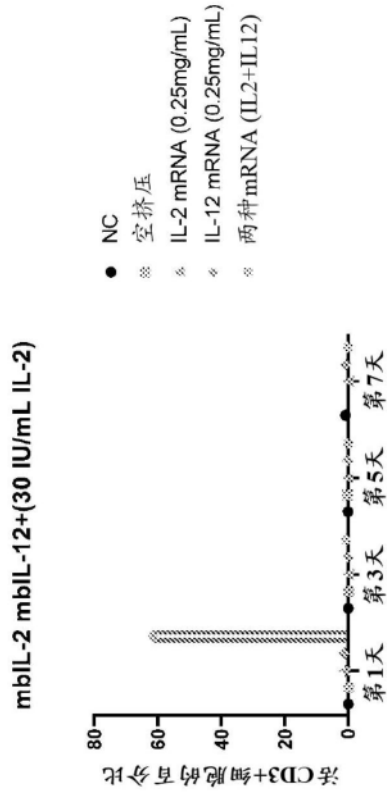


图11D

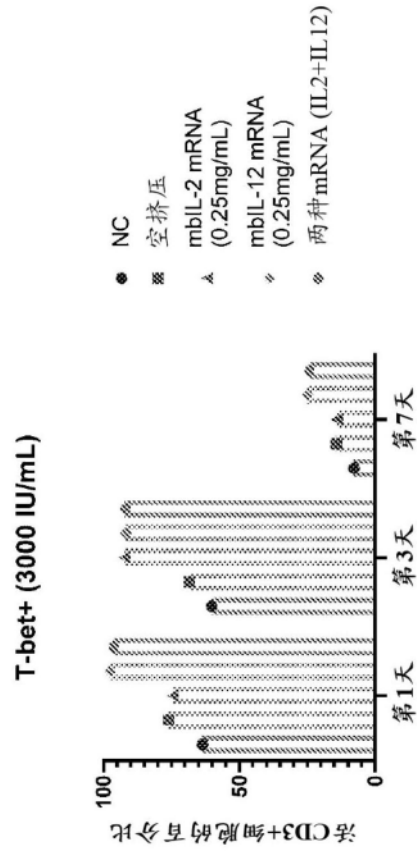


图12A

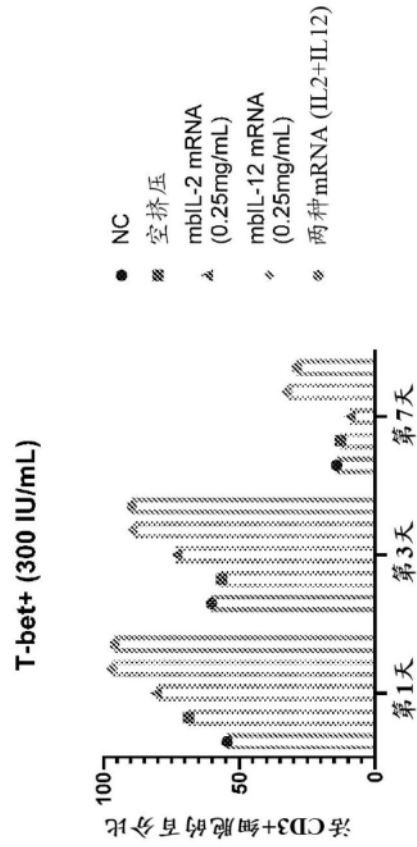


图12B

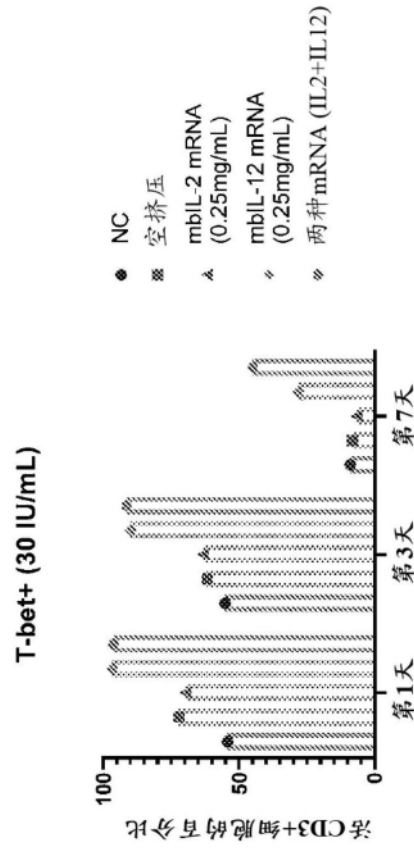


图12C

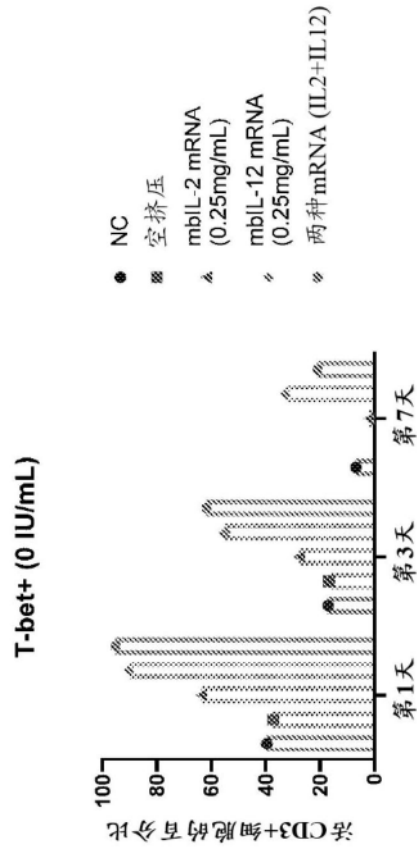


图12D

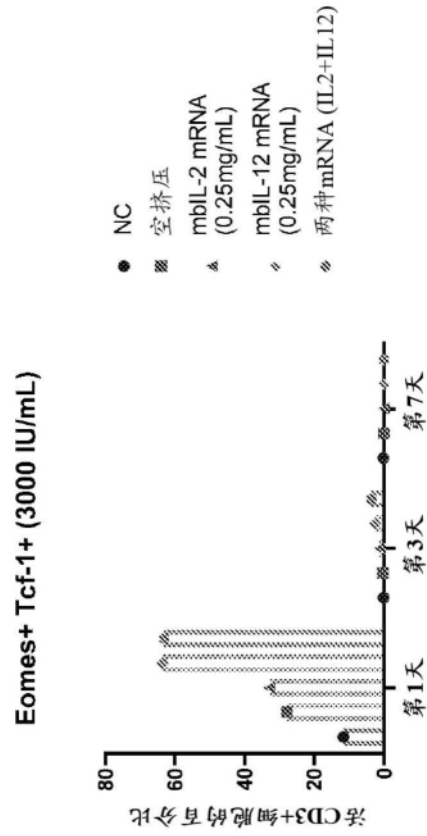


图13A

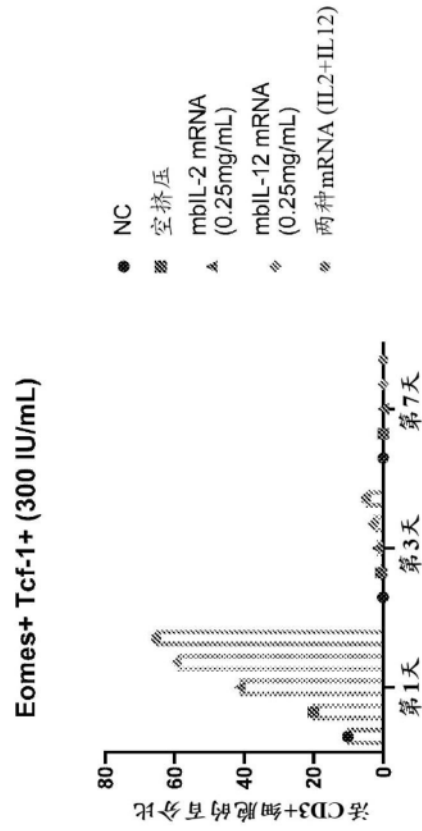


图13B

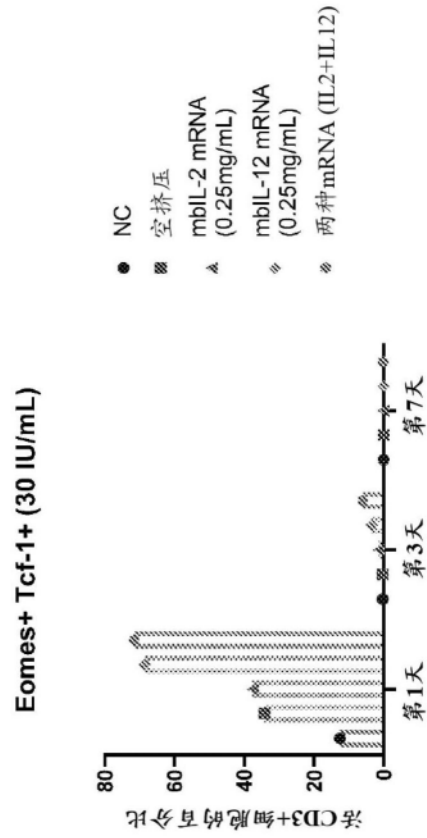


图13C

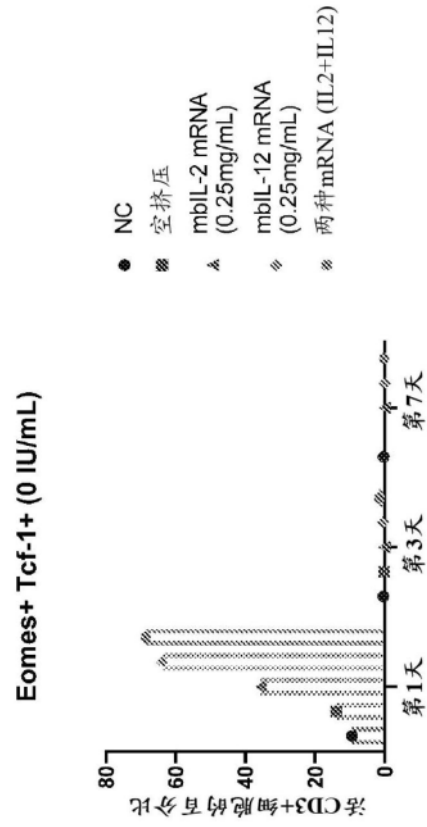


图13D

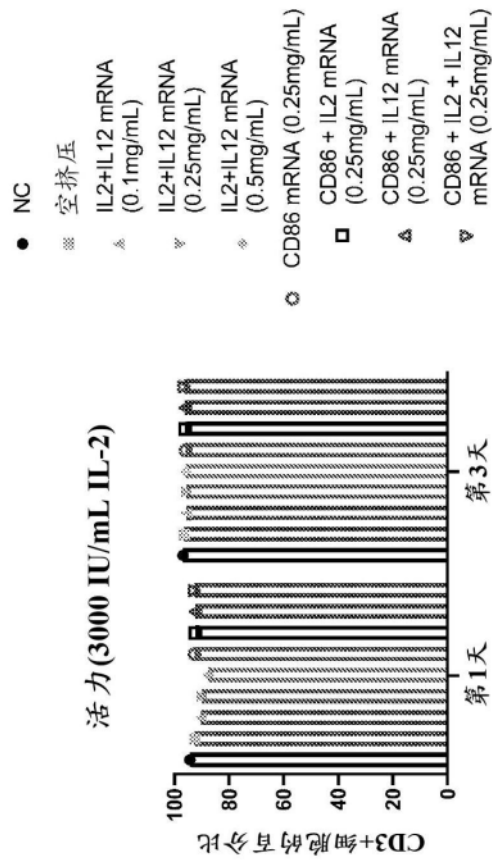


图14A

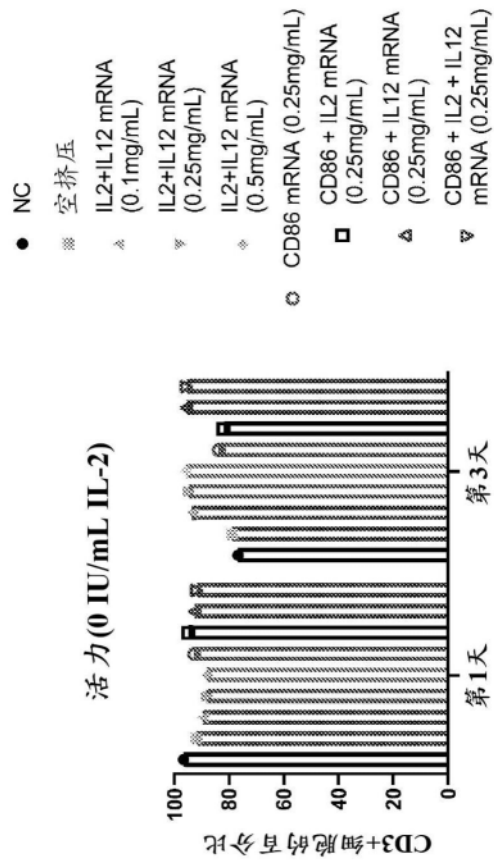


图14B

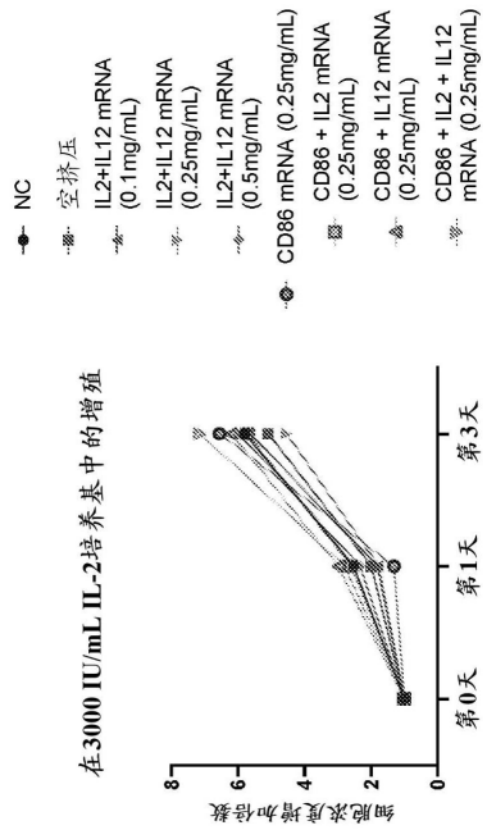


图15A

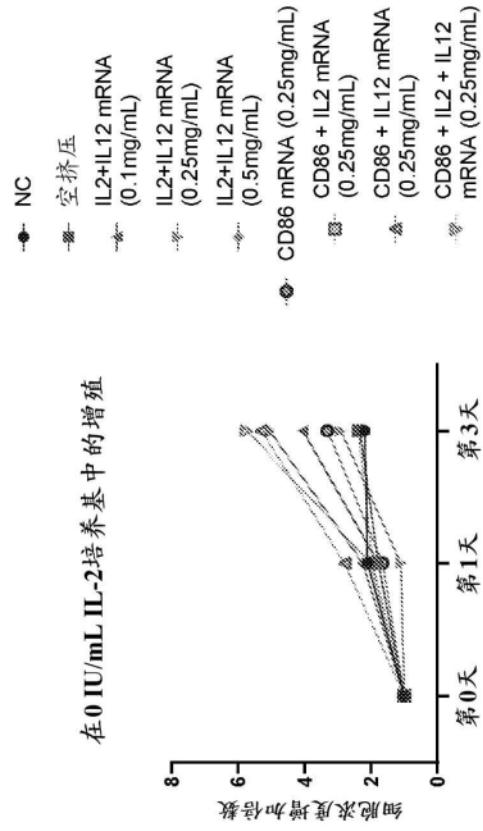


图15B

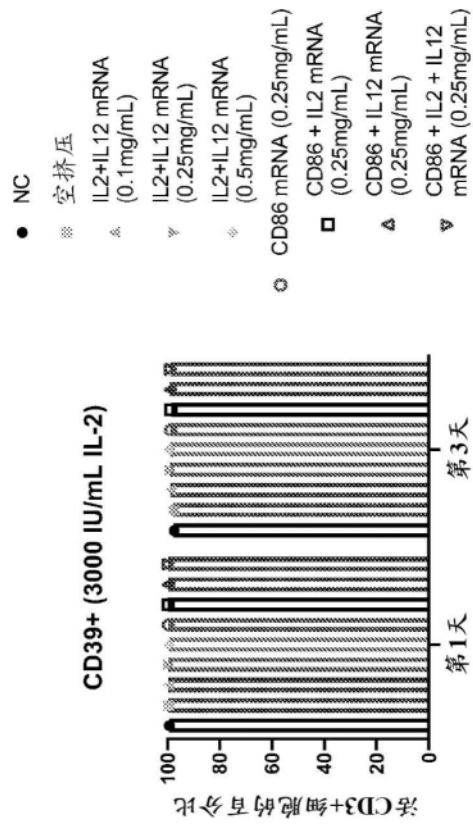


图16A

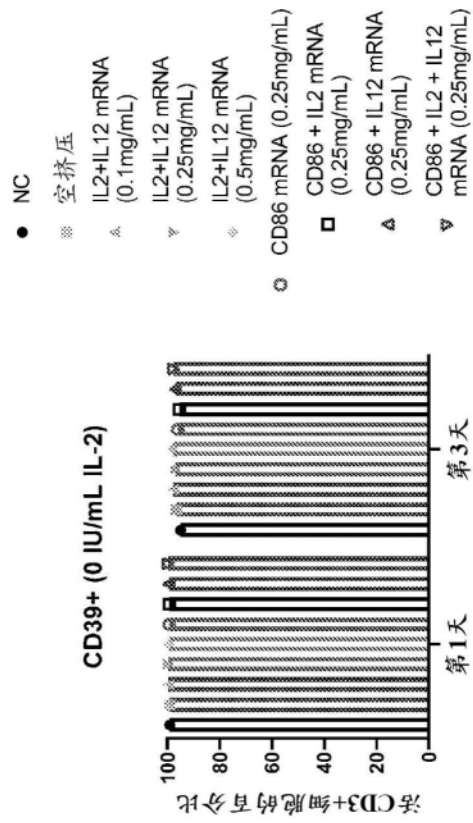


图16B

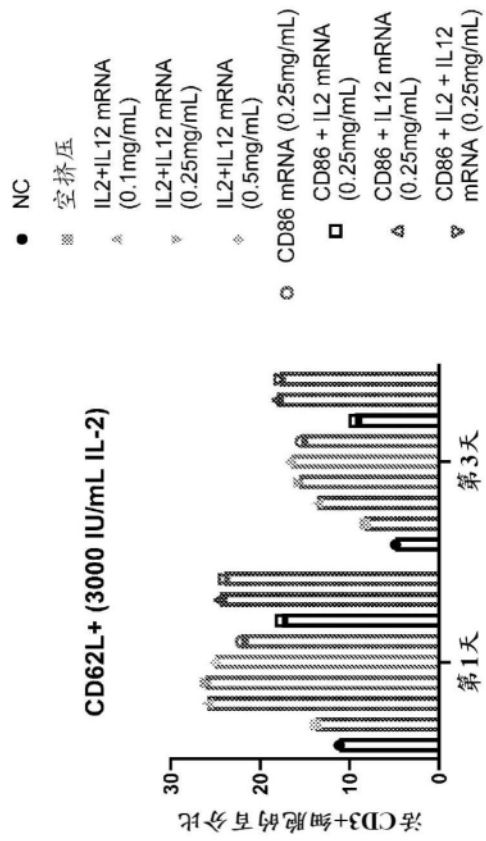


图17A

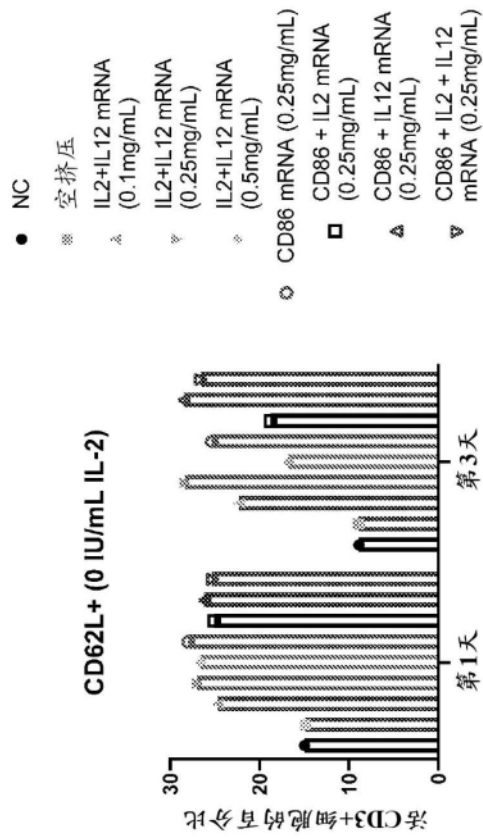


图17B

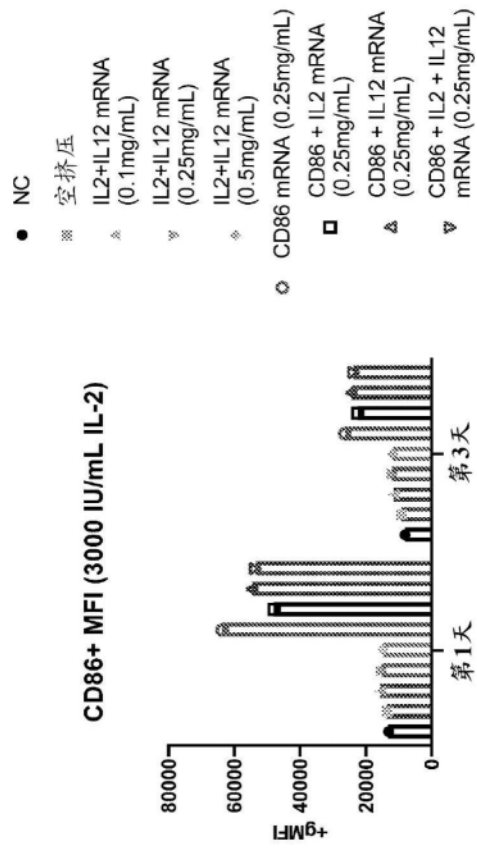


图18A

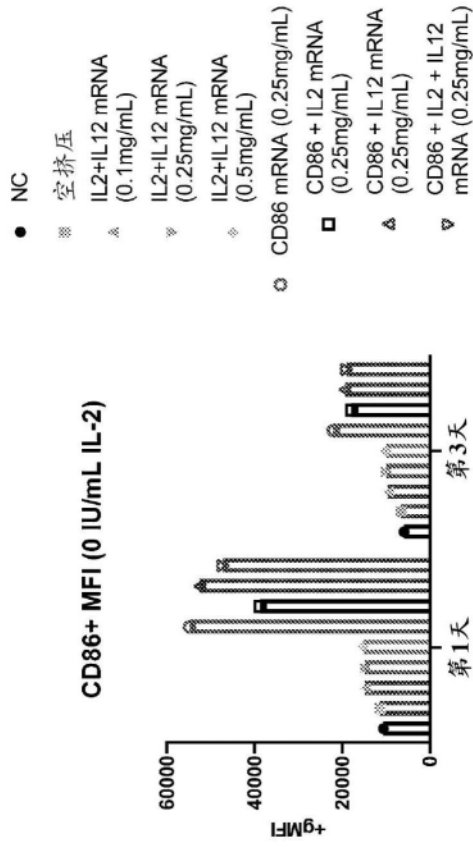


图18B

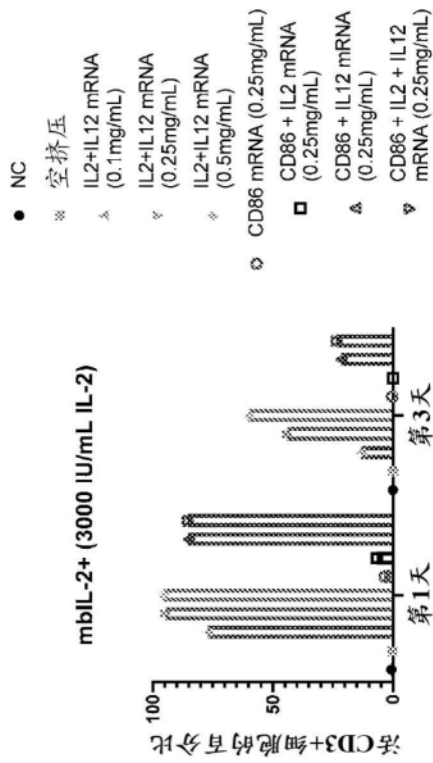


图19A

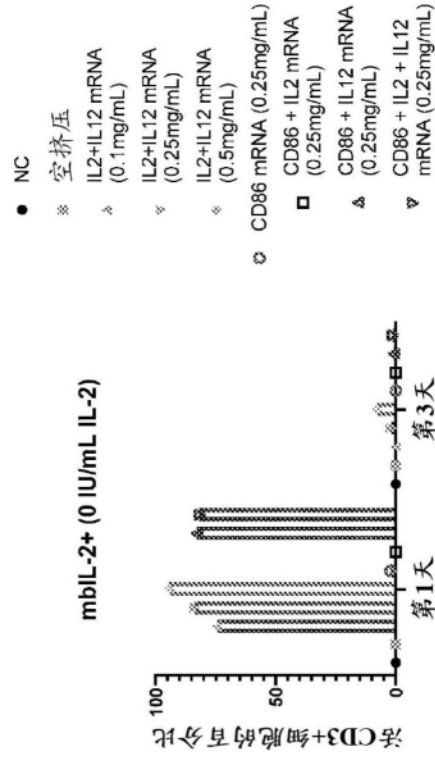


图19B

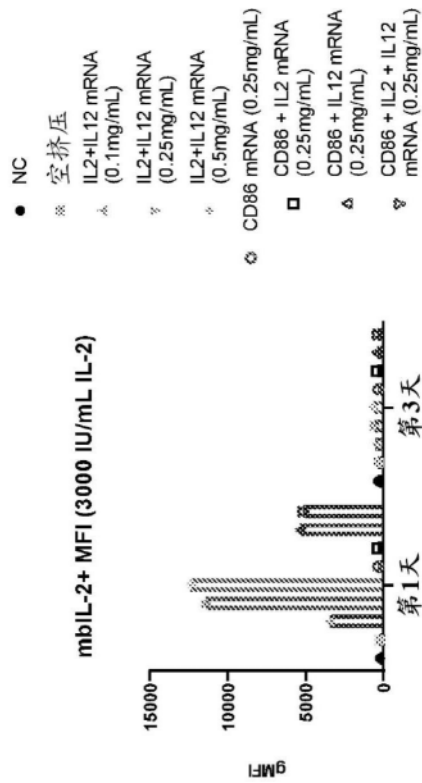


图19C

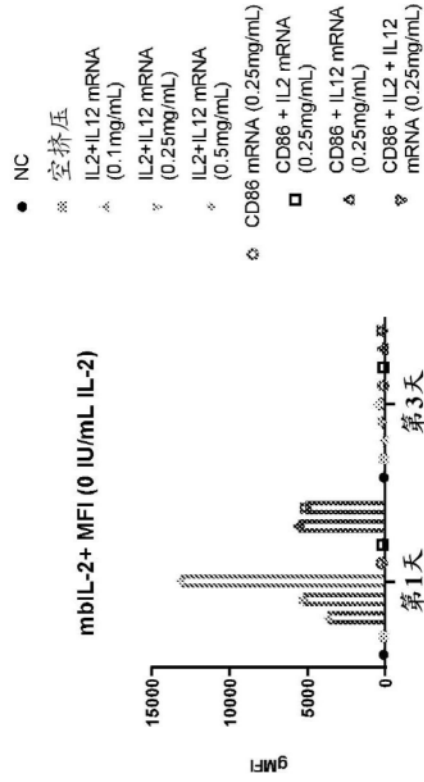


图19D

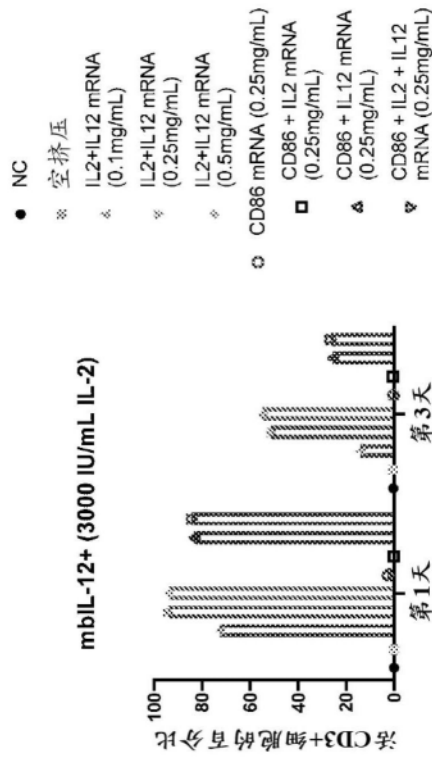


图20A

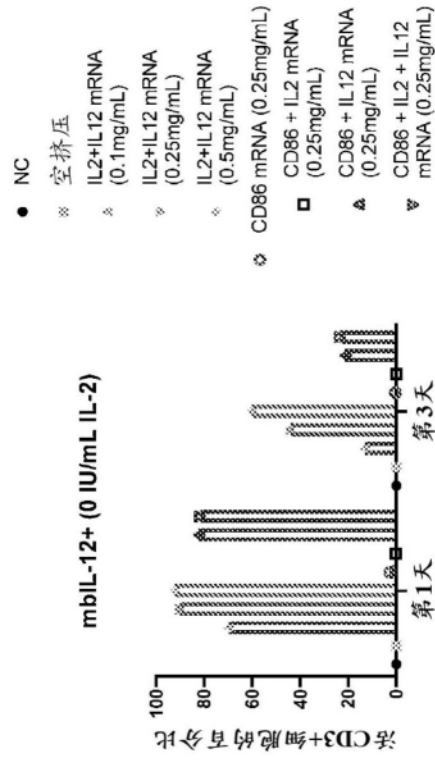


图20B

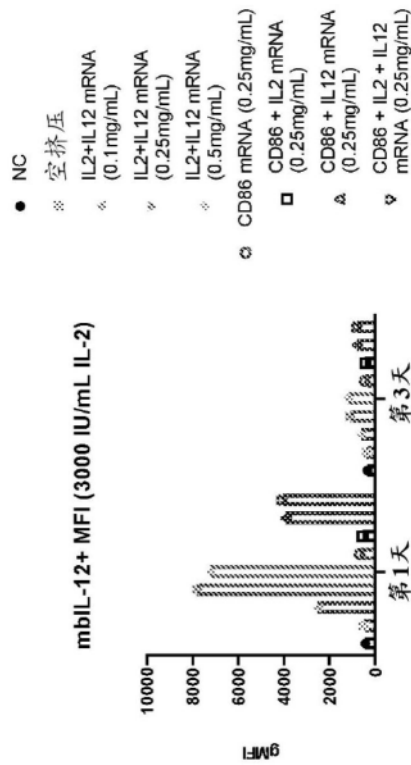


图20C

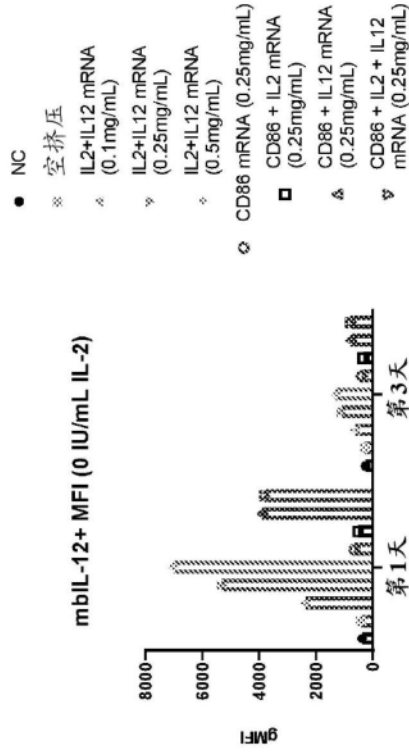


图20D

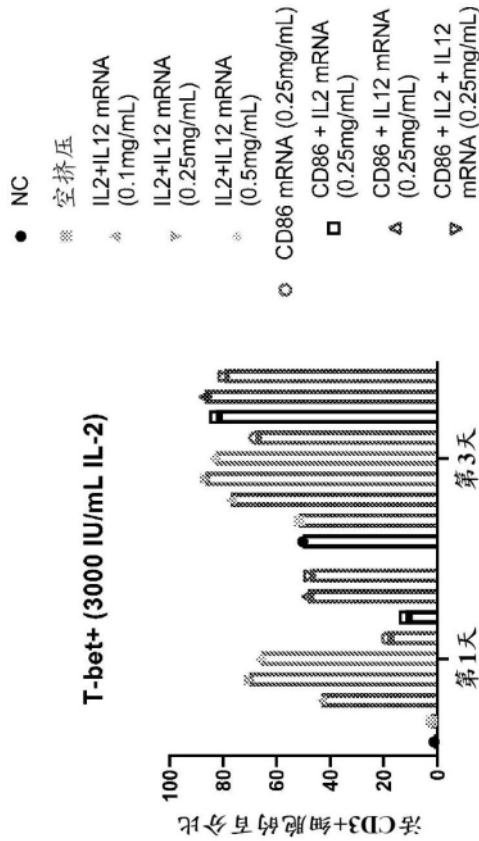


图21A

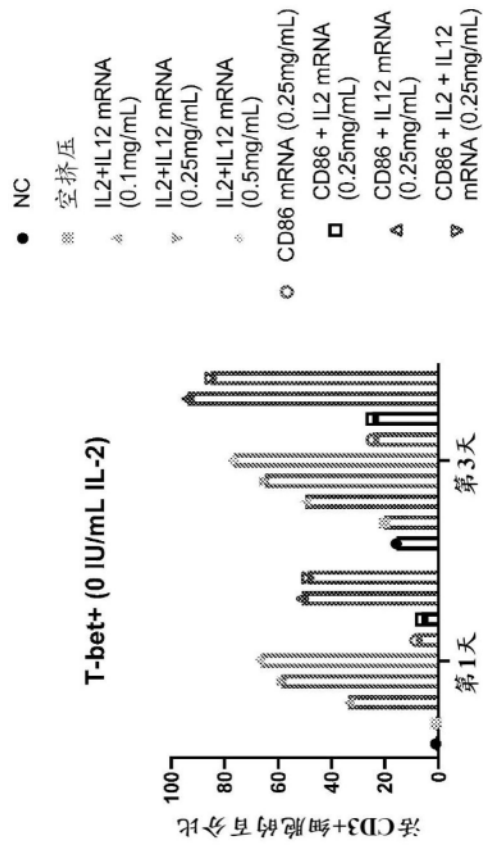


图21B

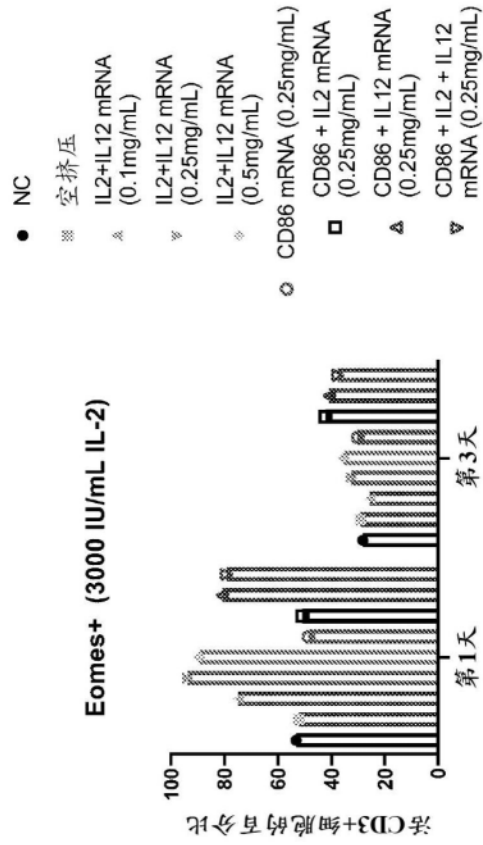


图22A

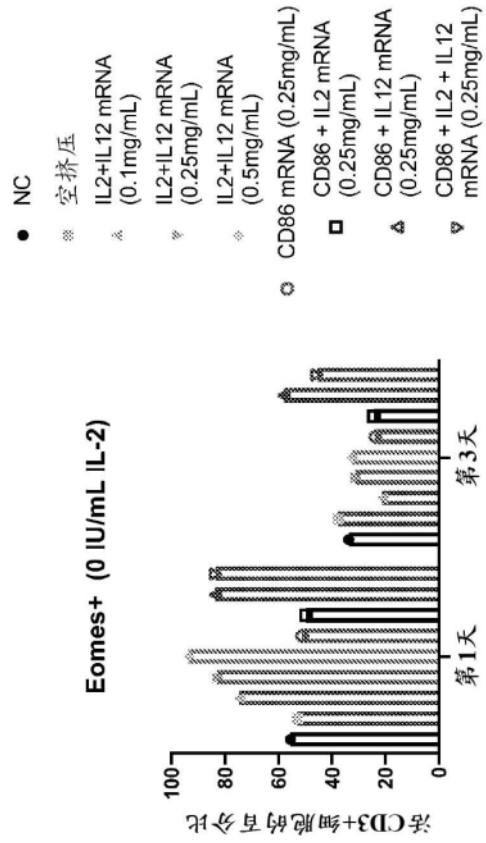


图22B

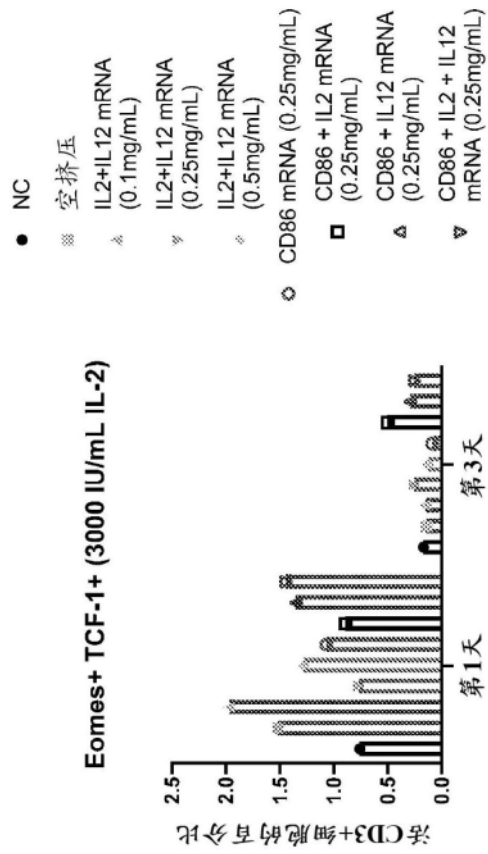


图23A

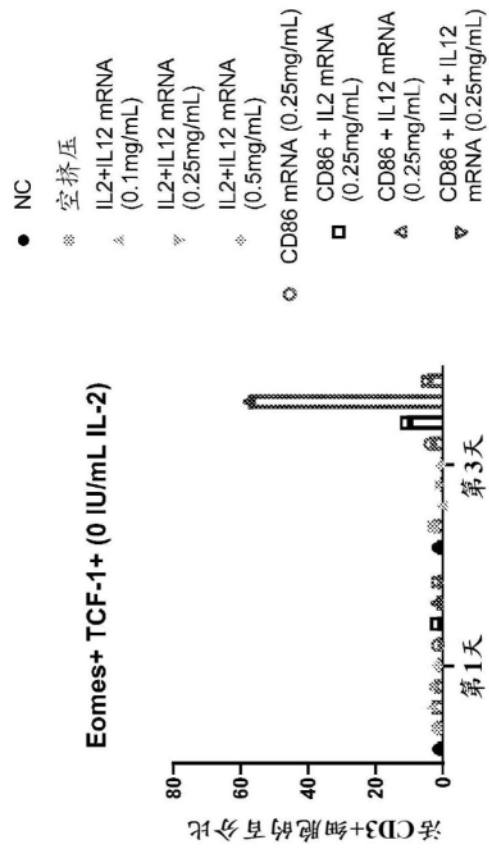


图23B

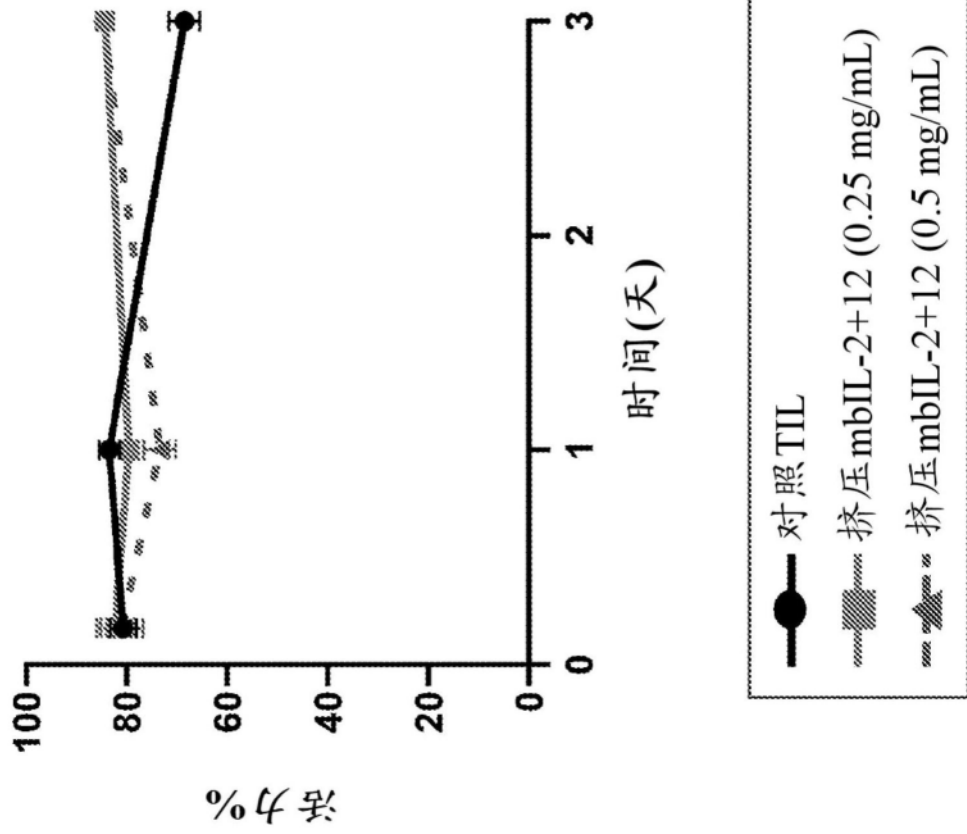


图24A

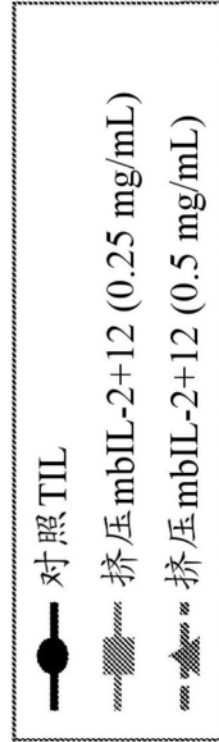
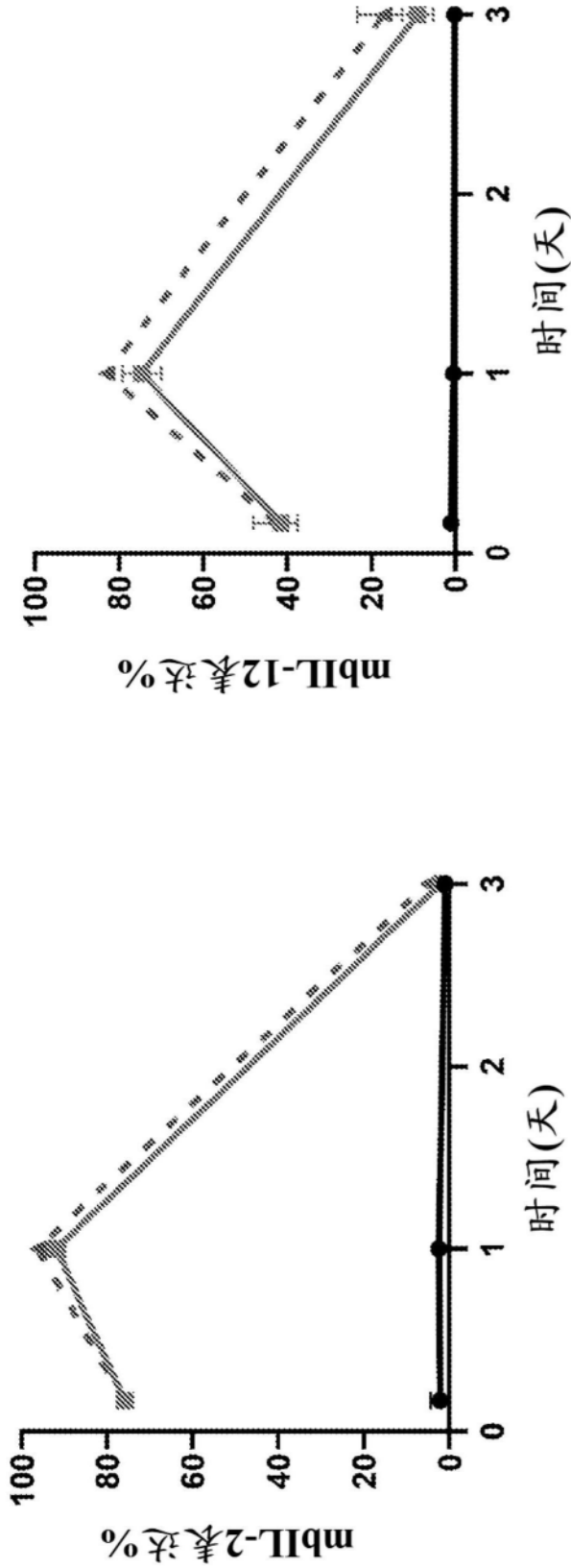


图 24C

图 24B

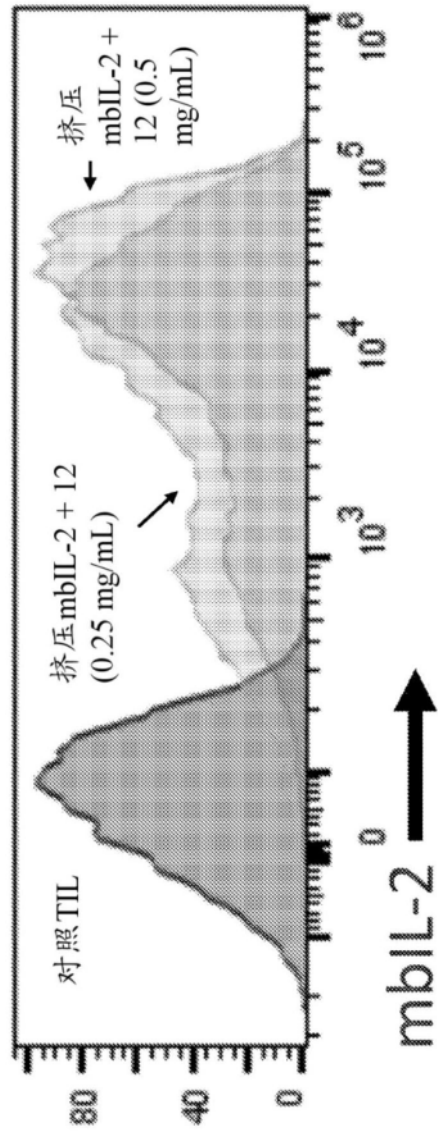


图24D

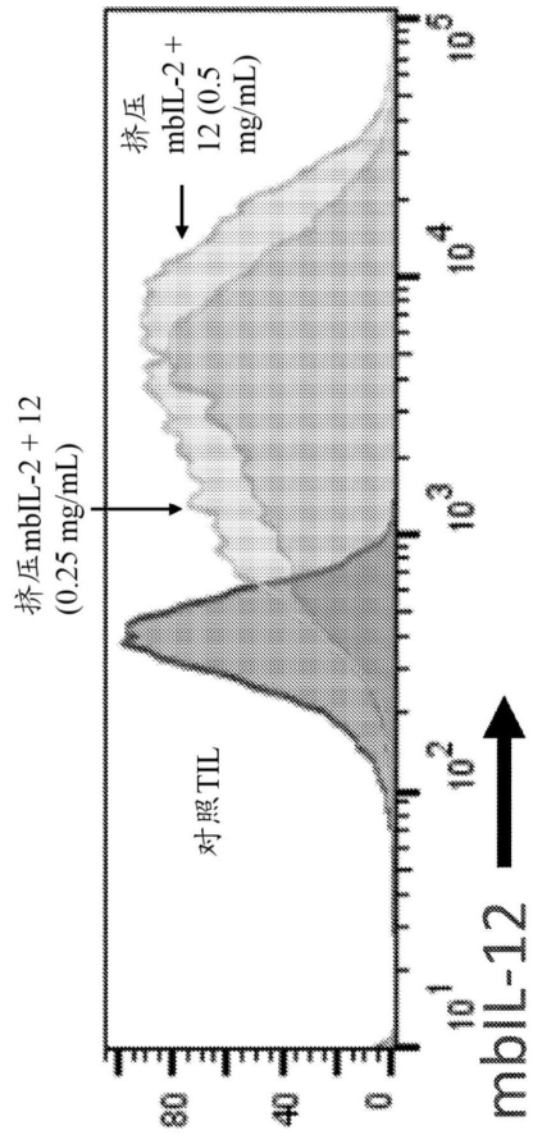


图24E

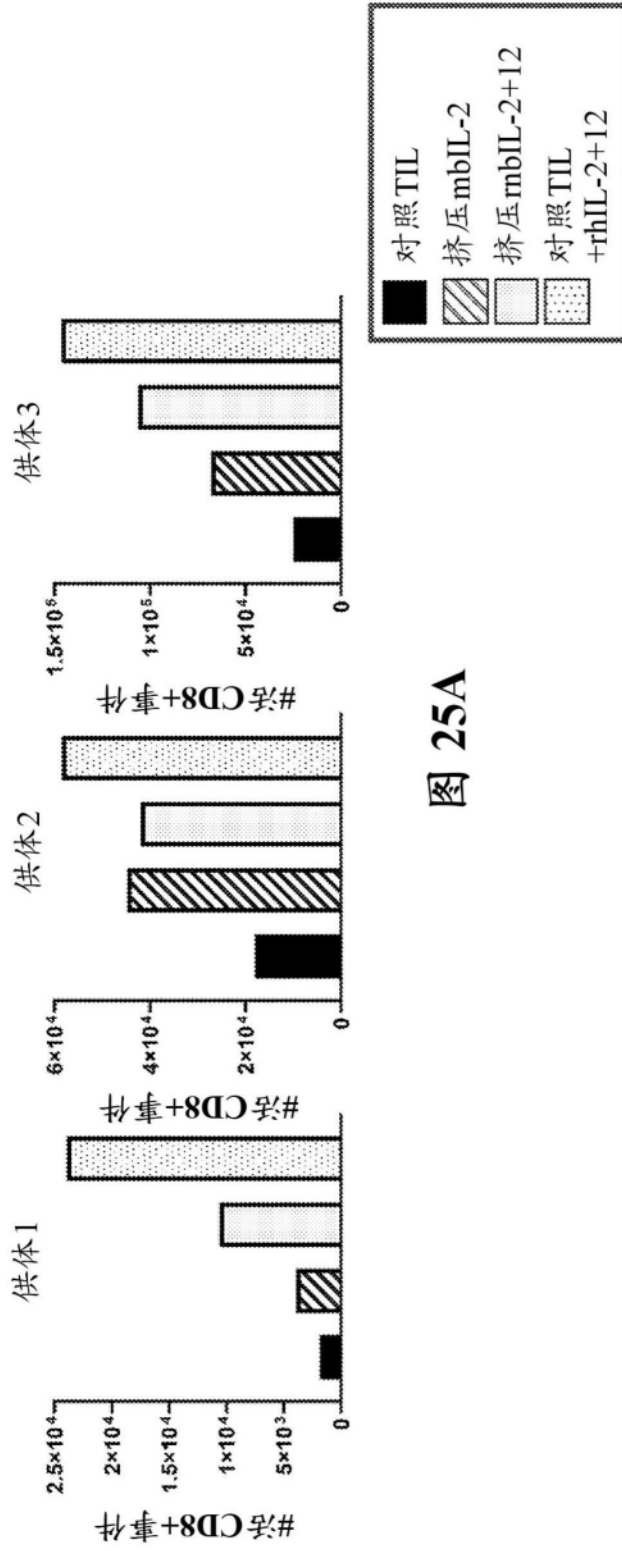


图 25A

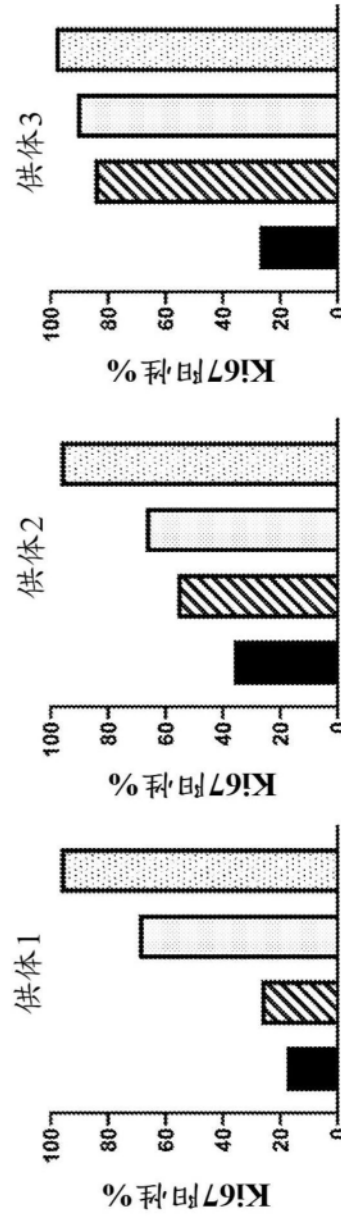


图 25B

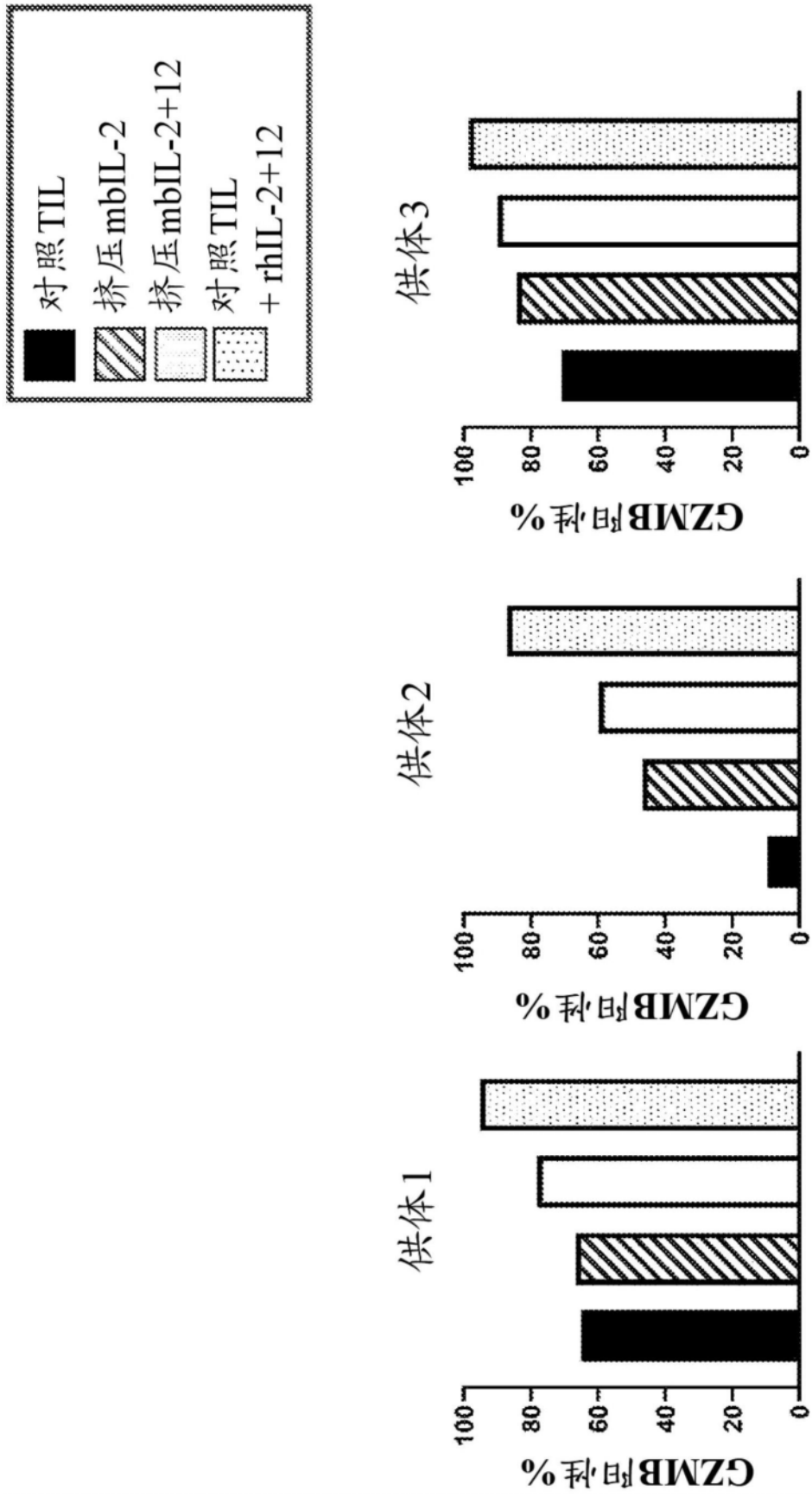


图26

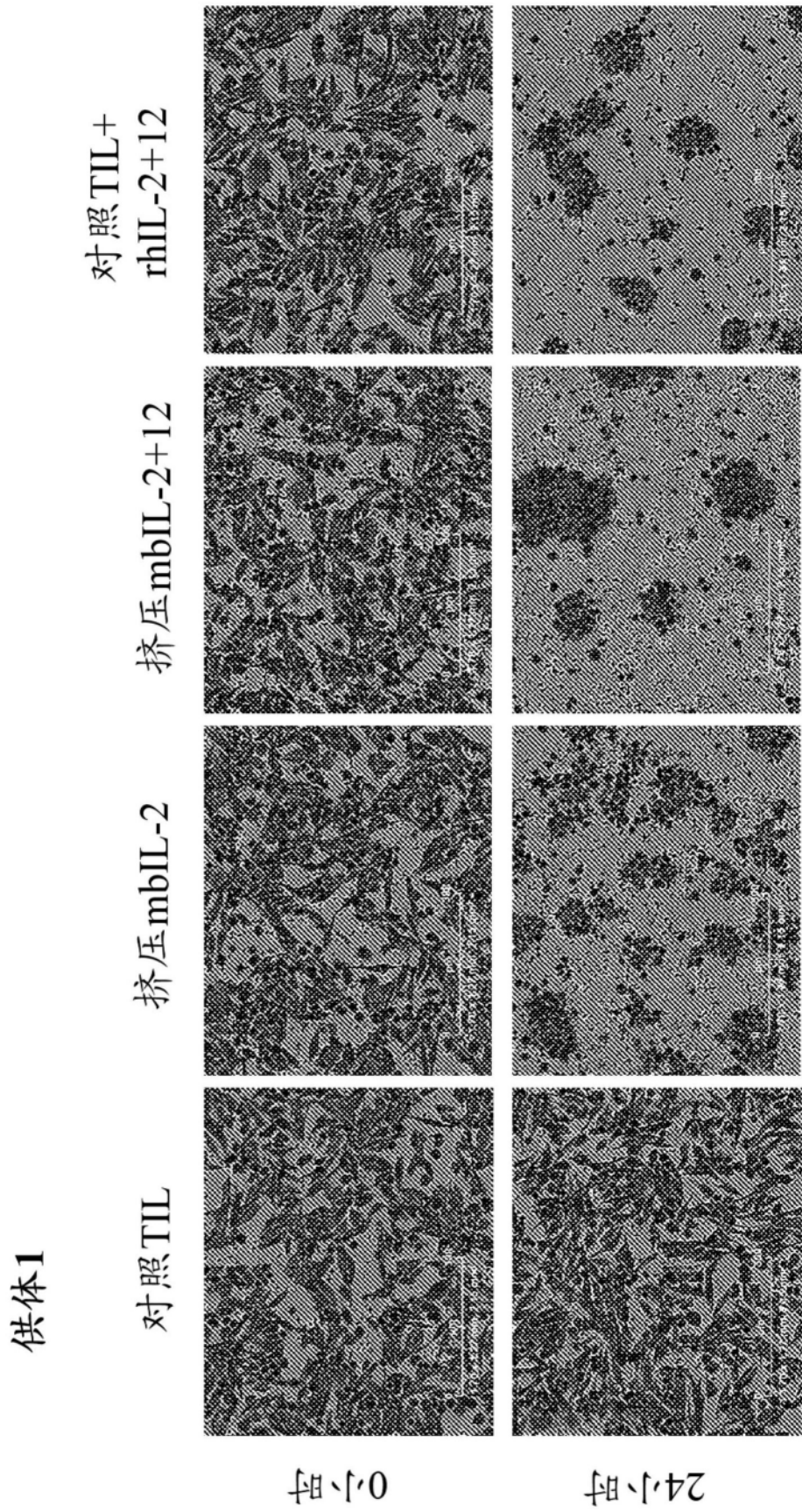


图27A

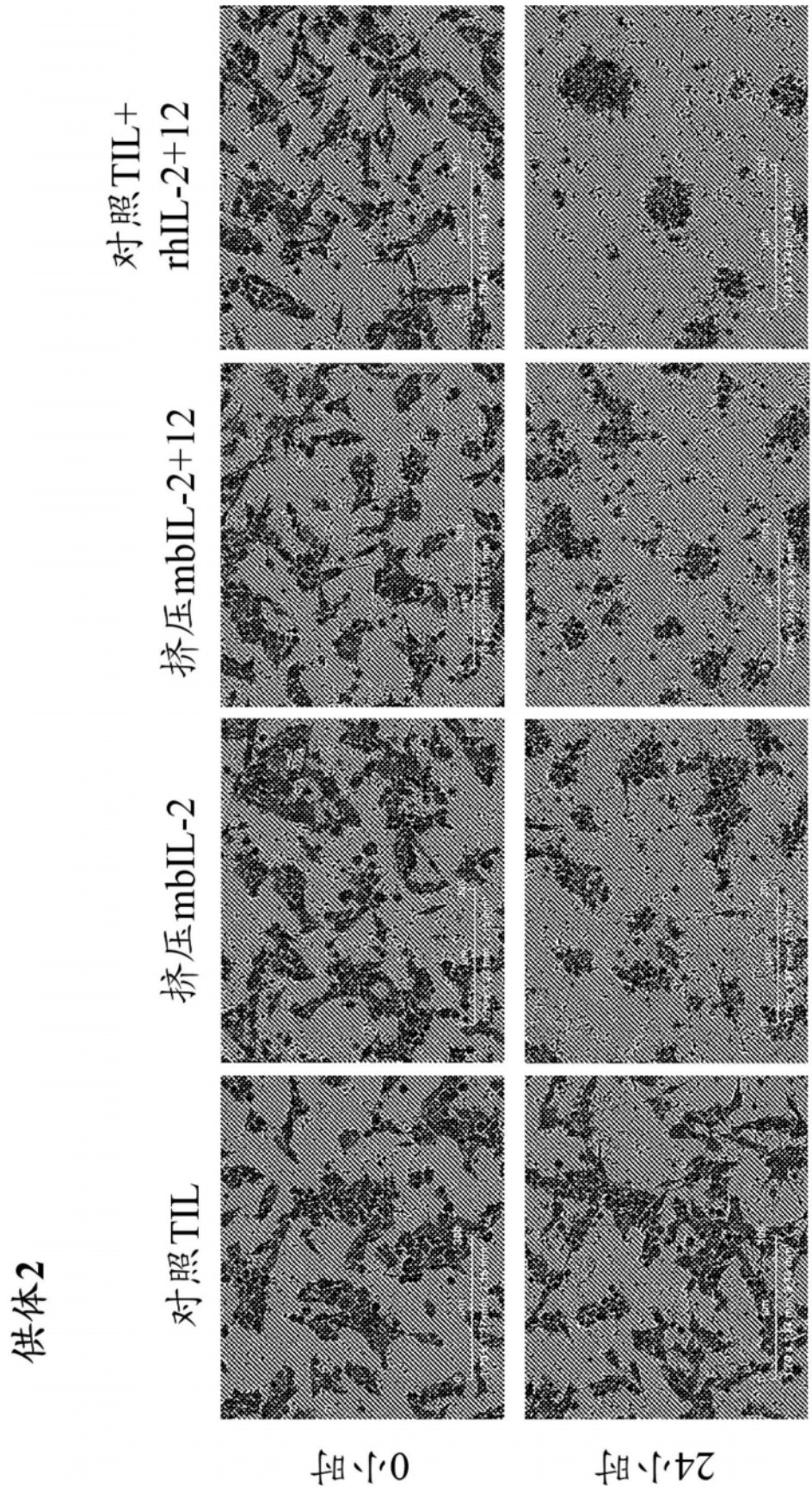


图27B

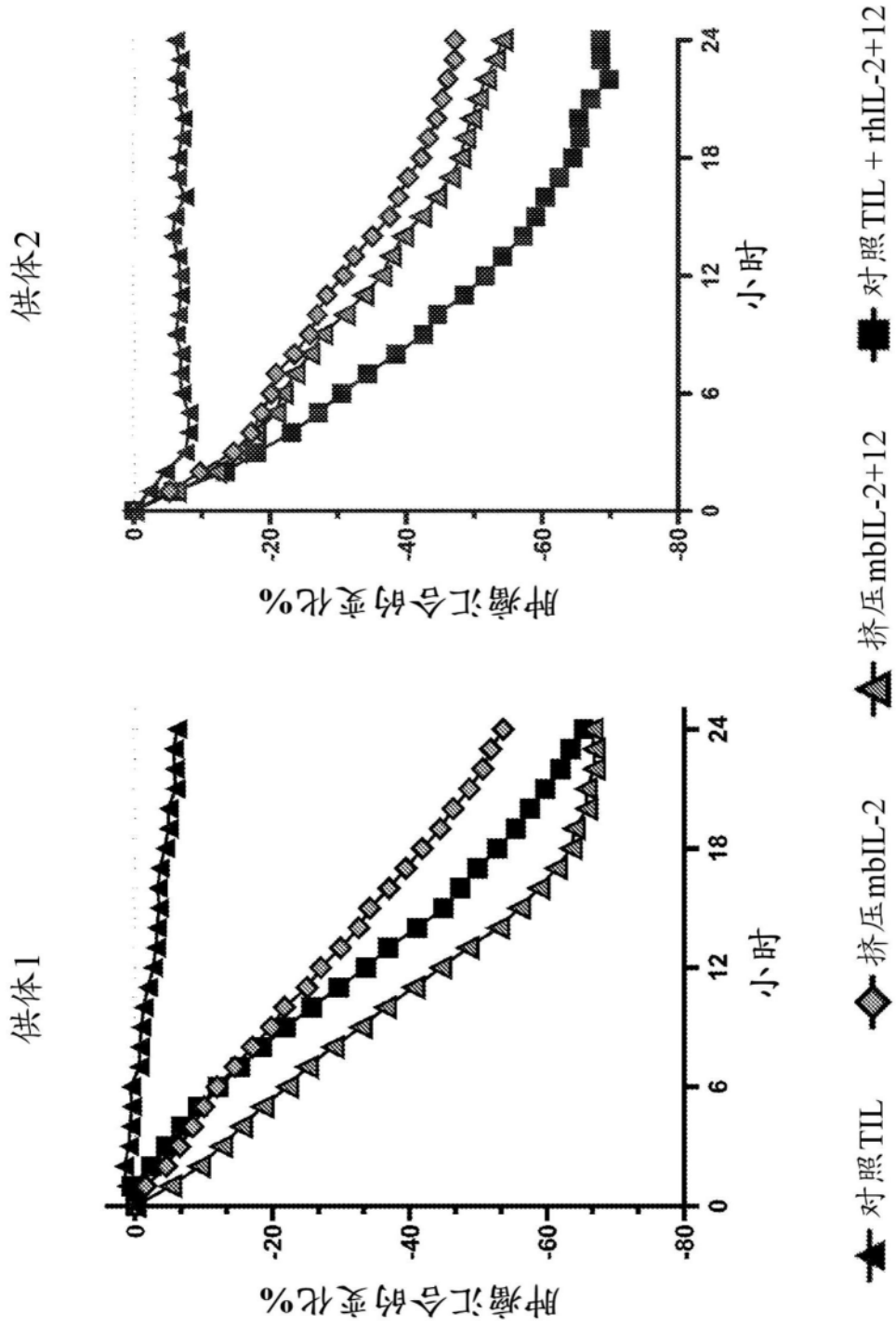


图 27D

图 27C