



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107530376 A

(43)申请公布日 2018.01.02

(21)申请号 201680022848.1

(72)发明人 S·诺维克 D·梅沃拉克

(22)申请日 2016.02.18

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

(30)优先权数据

62/117,752 2015.02.18 US

62/127,218 2015.03.02 US

62/148,227 2015.04.16 US

62/159,365 2015.05.11 US

代理人 区斌

(51)Int.Cl.

A61K 35/17(2006.01)

A61P 37/06(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.10.17

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IL2016/050194 2016.02.18

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/132366 EN 2016.08.25

(71)申请人 恩立夫克治疗有限责任公司

地址 以色列耶路撒冷

权利要求书2页 说明书68页 附图6页

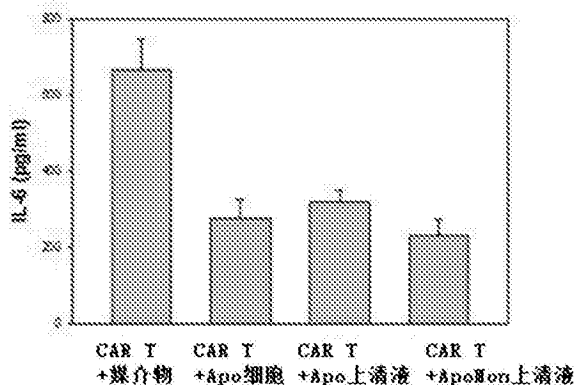
(54)发明名称

用于癌症治疗的联合免疫疗法和细胞因子控制疗法

(57)摘要

本文公开的组合物及其使用方法包括用于在接受CAR T-细胞疗法的对象中抑制或减少细胞因子释放综合征或细胞因子风暴发生率的那些,其中给所述对象施用包括凋亡细胞或凋亡细胞上清液的组合物。在某些情况下,本文公开的组合物及其使用方法不减少CAR T-细胞癌症疗法的效力。本文还公开了用于在经历细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的对象中减少或抑制细胞因子产生的组合物及其使用方法,包括施用包括凋亡细胞或凋亡细胞上清液的组合物。

在T4+CAR-T细胞细胞毒性测定中IL-6分泌



1. 一种组合物,其包含表达嵌合抗原受体的T-细胞 (CAR T-细胞) 以及凋亡细胞或凋亡细胞上清液,以及药学可接受的赋形剂。

2. 权利要求1的组合物,其中所述凋亡细胞包含处于早期凋亡状态的凋亡细胞。

3. 权利要求1的组合物,其中所述凋亡细胞是汇集的第三方供体细胞。

4. 权利要求1的组合物,其中所述凋亡细胞上清液通过包括以下步骤的方法获得:

(a) 提供凋亡细胞,

(b) 培养步骤 (a) 的细胞,以及

(c) 从所述细胞分离上清液。

5. 权利要求4的组合物,其中所述凋亡细胞上清液是凋亡细胞-白血细胞上清液,并且所述获得进一步包括以下步骤:

(d) 提供白血细胞;

(e) 任选地,洗涤所述凋亡细胞和白血细胞,以及

(f) 共培养所述凋亡细胞和白血细胞,

其中步骤 (d) - (f) 代替权利要求4的步骤 (b)。

6. 权利要求5的组合物,其中所述提供的白血细胞选自由吞噬细胞、巨噬细胞、树突细胞、单核细胞、B细胞、T细胞和NK细胞组成的组。

7. 权利要求1的组合物,其中所述CAR T-细胞以及所述凋亡细胞或凋亡细胞上清液包含在不同组合物中。

8. 权利要求1的组合物,其进一步包含额外的药物,所述额外的药物选自包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于砷的化合物或者免疫调节剂的组,或者它们的任何组合。

9. 权利要求8的组合物,其中所述额外的药物或其任何组合与CAR T-细胞,或者凋亡细胞或凋亡细胞上清液一起被包含于组合物中,或者被包含在不同组合物中。

10. 一种在接受表达嵌合抗原受体的T-细胞 (CAR T-细胞) 癌症疗法的对象中抑制细胞因子释放综合征 (CRS) 或减少细胞因子风暴发生率的方法,所述方法包括给所述对象施用包含凋亡细胞或凋亡上清液的组合物的步骤。

11. 权利要求10的方法,其中所述凋亡细胞包含处于早期凋亡状态的凋亡细胞。

12. 权利要求10的方法,其中所述凋亡细胞是所述对象自体的或者是汇集的第三方供体细胞。

13. 权利要求10的方法,其中包含所述凋亡细胞或所述凋亡细胞上清液的所述组合物的施用发生在CAR T-细胞疗法之前、同时或之后。

14. 权利要求10的方法,其中所述凋亡细胞上清液通过包括以下步骤的方法获得:

(a) 提供凋亡细胞,

(b) 培养步骤 (a) 的细胞,以及

(c) 从所述细胞分离上清液。

15. 权利要求14的方法,其中所述凋亡细胞上清液是凋亡细胞-白血细胞上清液,并且所述方法进一步包括以下步骤:

(d) 提供白血细胞;

(e) 任选地,洗涤所述凋亡细胞和白血细胞,以及

(f) 共培养所述凋亡细胞和白血细胞，

其中步骤 (d) - (f) 代替权利要求14的步骤 (b)。

16. 权利要求15的方法，其中所述提供的白血细胞选自由吞噬细胞、巨噬细胞、树突细胞、单核细胞、B细胞、T细胞和NK细胞组成的组。

17. 权利要求10的方法，其中所述方法进一步包括施用额外的药物，其选自包含CTLA-4阻断剂、基于砷的化合物、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物或者免疫调节剂的组，或者它们的任何组合。

18. 权利要求17的方法，其中所述额外的药物的施用发生在CAR T-细胞疗法之前、同时或之后。

19. 权利要求10的方法，其中与接受CAR T-细胞癌症疗法且不施用所述凋亡细胞或所述凋亡细胞上清液的对象相比，所述对象中的至少一种促炎细胞因子的水平降低。

20. 一种在经历细胞因子释放综合征或细胞因子风暴或者易受细胞因子释放综合征或细胞因子风暴影响的对象中减少或抑制细胞因子产生的方法，所述方法包括给所述对象施用包含凋亡细胞或凋亡细胞上清液的组合物的步骤，其中所述施用减少或抑制所述对象中的细胞因子的产生。

21. 权利要求20的方法，其中与经历细胞因子释放综合征或细胞因子风暴或者易受细胞因子释放综合征或细胞因子风暴影响且不施用凋亡细胞或凋亡细胞上清液的对象相比，所述对象中至少一种促炎细胞因子的产生减少或受到抑制。

22. 权利要求20的方法，其中所述对象正接受CAR T-细胞癌症疗法，并且所述方法不降低所述CAR T-细胞癌症疗法的效力。

23. 权利要求20的方法，其中所述细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的原因包括感染性刺激、病症或综合征。

24. 权利要求23的方法，其中所述感染性刺激、病症或综合征包含流感、禽流感、严重急性呼吸道综合征 (SARS)、埃巴病毒相关的嗜血淋巴组织细胞增生症 (HLH)、败血症、革兰氏阴性菌败血症、疟疾、埃博拉病毒、天花病毒、全身革兰氏阴性菌感染或贾-赫氏 (Jarisch-Herxheimer) 综合征。

25. 权利要求20的方法，其中所述细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的原因包括非感染性刺激、病症或综合征。

26. 权利要求25的方法，其中所述非感染性刺激、病症或综合征包括嗜血淋巴组织细胞增生症 (HLH)、散发性HLH、巨噬细胞活化综合征 (MAS)、慢性关节炎、全身型幼年特发性关节炎 (sJIA)、斯蒂尔病、Cryopyrin相关周期性综合征 (CAPS)、家族性寒冷自身炎症综合征 (FCAS)、家族性寒冷性荨麻疹 (FCU)、Muckle-Well综合征 (MWS)、慢性婴幼儿神经皮肤和关节 (CINCA) 综合征、在NLRP3基因中包含遗传或从头获得的功能突变的cryopyrinopathy、遗传学自身炎症性病症、急性胰腺炎、严重烧伤、外伤、急性呼吸窘迫综合征、免疫疗法、单克隆抗体疗法、继发于药物使用、继发于毒素吸入、脂多糖 (LPS)、革兰氏阳性菌毒素、真菌毒素、糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 或者RIG-1基因表达的调节。

用于癌症治疗的联合免疫疗法和细胞因子控制疗法

[0001] 所关注的领域

[0002] 本文公开了在接受CAR T-细胞癌症疗法的对象中用于抑制或减少细胞因子释放综合征 (CRS) 或细胞因子风暴发生率的组合物及其方法。进一步地,本文公开了在经历细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的对象中用于减少或抑制细胞因子产生的组合物及其方法。本文公开的方法包括那些包含施用含有凋亡细胞或凋亡细胞上清液的组合物结合CAR T-细胞疗法。

[0003] 发明背景

[0004] 虽然癌症的标准治疗是手术、化疗和放射疗法,但是目前正在开发和测试改进的方法,如靶向免疫疗法。一种很有前途的技术使用过继细胞转移 (ACT), 其中将免疫细胞修饰以识别并攻击他们的肿瘤。ACT的一个实例是将患者自己的或供体的细胞毒性T-细胞工程化以表达嵌合抗原受体 (CAR T-细胞), 其靶向肿瘤细胞表面上表达的肿瘤特异性抗原。这些CAR T-细胞则仅对表达肿瘤特异性抗原的细胞是细胞毒性的。临床试验已显示CAR T-细胞疗法在控制晚期急性淋巴细胞白血病 (ALL) 和淋巴瘤等中具有很大潜力。

[0005] 但是, 给予CAR T-细胞疗法和其他免疫疗法的一些患者经历称作细胞因子释放综合征 (CRS) 的危险和有时危及生命的副作用, 其中注入的、活化的T-细胞产生全身性炎症反应, 其中细胞因子迅速和大规模释放入血流, 导致危险的低血压、高烧和寒颤。

[0006] 在CRS的严重病例中, 患者经历细胞因子风暴 (也称为细胞因子级联或高细胞因子血症 (hypercytokinemia)), 其中有细胞因子和白细胞之间的正反馈循环, 具有高度升高水平的细胞因子。这可以导致潜在的危及生命的并发症, 包括心功能障碍、成人呼吸窘迫综合征、神经系统毒性、肾和/或肝衰竭、肺水肿以及弥漫性血管内凝血。

[0007] 例如, 施用单克隆抗体TGN1412 (其结合至T-细胞上的CD28受体) 的最近I期实验中的6个患者表现出细胞因子风暴和多器官衰竭的严重病例。尽管TGN1412剂量比发现在动物中安全的剂量低500-倍, 这仍然发生 (St. Clair EW: The calm after the cytokine storm : Lessons from the TGN1412 trial. J Clin Invest 118:1344-1347, 2008)。

[0008] 到目前为止, 评价皮质类固醇、生物疗法如抗IL6疗法和抗炎药物控制施用CAR T-细胞疗法的患者中的细胞因子释放综合征。但是, 类固醇可能影响CAR T-细胞活性和/或增殖, 并且使患者处于败血症和机会性感染的危险中。抗炎药物可能不能有效控制细胞因子释放综合征或细胞因子风暴, 因为细胞因子风暴包括非常大量的细胞因子, 但是向患者注入抗炎药物的能力有限。需要新策略以控制细胞因子释放综合征, 特别是细胞因子风暴, 以便实现CAR T-细胞疗法的潜力。

[0009] 细胞因子风暴还是其他感染和非感染性刺激之后的问题。在细胞因子风暴中, 释放许多促炎细胞因子, 如白介素-1 (IL-1)、IL-6、 γ -干扰素 (γ -IFN) 和肿瘤坏死因子- α (TNF α), 导致低血压、出血, 并最终多器官衰竭。在1918年H1N1流感大流行和更近期的禽流感H5N1感染中, 具有推测是健康免疫系统的年轻人中相对高的死亡率被归因于细胞因子风暴。还已知这种综合征发生在严重急性呼吸道综合征 (SARS)、埃巴病毒 (Epstein-Barr virus) 相关的嗜血淋巴组织细胞增生症、革兰氏阴性菌败血症、疟疾和包括埃博拉感染在

内的许多其他感染疾病的晚期或末期病例中。

[0010] 细胞因子风暴还可以源于非传染性原因,如急性胰腺炎、严重烧伤或外伤、或者急性呼吸窘迫综合征。因此需要新策略以控制细胞因子释放综合征,特别是细胞因子风暴。

[0011] 发明概述

[0012] 在一方面,本文公开了一种组合物,其包含表达嵌合抗原受体T-细胞(CAR T-细胞),以及凋亡细胞或凋亡细胞上清液,以及药学可接受的赋形剂。在一相关方面,凋亡细胞包含处于早期凋亡状态中的凋亡细胞。在另一相关方面,所述凋亡细胞包含汇集的第三方供体细胞。在一相关方面,通过一种方法获得凋亡细胞上清液,所述方法包括以下步骤:(a)提供凋亡细胞,(b)培养步骤(a)的所述细胞,以及(c)从所述细胞分离上清液。在一相关方面,所述凋亡细胞上清液是凋亡细胞-白血细胞上清液,并且所述获得进一步包括以下步骤:(d)提供白血细胞,(e)任选地,洗涤所述凋亡细胞和白血细胞,(f)共培养所述凋亡细胞和白血细胞,其中步骤(d)-(f)代替步骤(b)。在另一相关方面,提供的白血细胞选自吞噬细胞、巨噬细胞、树突细胞、单核细胞、B细胞、T细胞和NK细胞组成的组。

[0013] 在一相关方面,CAR T-细胞以及凋亡细胞或凋亡细胞上清液包含在不同组合物中。

[0014] 在一相关方面,所述组合物进一步包含额外的药物,其选自包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于碲的化合物或免疫调节剂的组,或者它们的任何组合。在另一相关方面,所述额外的药物或其任何组合包含在具有CAR T-细胞的组合物中,或者具有凋亡细胞或凋亡细胞上清液的组合物中,或者在另一相关方面包含在不同组合物中。

[0015] 在一方面,本文公开了一种抑制或减少接受表达嵌合抗原受体T-细胞(CAR T-细胞)癌症疗法的对象中的细胞因子释放综合征(CRS)或细胞因子风暴发生率的方法,所述方法包括向所述对象施用包含凋亡细胞或凋亡细胞上清液的组合物的步骤,其中所述施用抑制或减少所述对象中CRS或细胞因子风暴的发生率。在一相关方面,所述凋亡细胞包含处于早期凋亡状态中的凋亡细胞。在另一相关方面,所述凋亡细胞是所述对象自体的或者是汇集的第三方供体细胞。在另一相关方面,包含所述凋亡细胞或所述凋亡细胞上清液的所述组合物的施用发生在CAR T-细胞疗法之前、同时或之后。在另一相关方面,通过一种方法获得所述凋亡细胞上清液,所述方法包括以下步骤:(a)提供凋亡细胞,(b)培养步骤(a)的所述细胞,以及(c)从所述细胞分离上清液。在另一相关方面,所述凋亡细胞上清液是凋亡细胞-白血细胞上清液,并且所述方法进一步包括以下步骤:(d)提供白血细胞,(e)任选地,洗涤所述凋亡细胞和白血细胞,(f)共培养所述凋亡细胞和白血细胞,其中步骤(d)-(f)代替步骤(b)。在另一相关方面,所述提供的白血细胞选自吞噬细胞、巨噬细胞、树突细胞、单核细胞、B细胞、T细胞和NK细胞组成的组。

[0016] 在另一相关方面,所述方法进一步包括施用额外的药物,其选自包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于碲的化合物或者免疫调节剂的组,或者它们的任何组合。在另一相关方面,所述额外的药物的施用发生在CAR T-细胞疗法之前、同时或之后。在另一相关方面,与接受CAR T-细胞癌症疗法且不施用所述凋亡细胞或所述凋亡细胞上清液的对象相比,促炎细胞因子的水平在所述对象中降低。

[0017] 在一方面,本文公开了一种在经历细胞因子释放综合征或细胞因子风暴或者易受

细胞因子释放综合征或细胞因子风暴影响的对象中减少或抑制细胞因子产生的方法,所述方法包括向所述对象施用包含凋亡细胞或凋亡细胞上清液的组合物的步骤,其中所述施用减少或抑制所述对象对象中的细胞因子产生。在一相关方面,与经历细胞因子释放综合征或细胞因子风暴或者易受细胞因子释放综合征或细胞因子风暴影响且不施用凋亡细胞或凋亡细胞上清液的对象相比,所述对象中至少一种促炎细胞因子的产生减少或受到抑制。在另一相关方面,所述对象接受CAR T-细胞癌症疗法,并且所述方法不减少所述CAR T-细胞癌症疗法的效力。

[0018] 在一相关方面,本文公开了所述细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的原因包括感染性刺激、症状或综合征。在另一相关方面,所述感染性刺激、症状或综合征包含流感、禽流感、严重急性呼吸道综合征(SARS)、埃巴病毒相关的嗜血淋巴组织细胞增生症(HLH)、败血症、革兰氏阴性菌败血症、疟疾、埃博拉病毒、天花病毒、全身性革兰氏阴性菌感染或贾-赫氏综合征(Jarisch-Herxheimer syndrome)。

[0019] 在一相关方面,所述细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的原因包括非感染性刺激、症状或综合征。在另一相关方面,所述非感染性刺激、疾病状况或综合征包括嗜血淋巴组织细胞增生症(HLH)、散发性HLH、巨噬细胞活化综合征(MAS)、慢性关节炎、全身型幼年特发性关节炎(sJIA)、斯蒂尔病、Cryopyrin相关周期性综合征(CAPS)、家族性寒冷自身炎症综合征(FCAS)、家族性寒冷性荨麻疹(FCU)、Muckle-Well综合征(MWS)、慢性婴幼儿神经皮肤和关节(CINCA)综合征、在NLRP3基因中包含遗传或从头获得的功能突变的cryopyrinopathy、遗传性自身炎症性疾病、急性胰腺炎、严重烧伤、外伤、急性呼吸窘迫综合征、免疫疗法、单克隆抗体疗法、继发于药物使用、继发于毒素吸入、脂多糖(LPS)、革兰氏阳性菌毒素、真菌毒素、糖基磷脂酰肌醇(GPI)或者RIG-1基因表达的调节。

附图说明

[0020] 本文公开的主题在说明书的结论部分特别指出和明确要求保护。但是,本文公开的组合物和方法,关于组织和操作方法,连同其目的、特征和优点,在阅读附图时可参考以下详细描述最好地理解。

[0021] 图1A-1B. 示出标准CAR T-细胞疗法(图1A)以及患者中安全和有效的CAR T-细胞癌症疗法的方法的实施方案的示意图,使用患者自己的细胞(自体的)(图1B)以产生凋亡细胞或凋亡细胞上清液。

[0022] 图2. 示出患者中安全和有效的CAR T-细胞癌症疗法的实施方案的示意图,使用供体细胞以产生凋亡细胞或凋亡上清液。

[0023] 图3. T-细胞转导的验证,示出转导的T4⁺CAR-T细胞的抗CD124分析的流式细胞术结果。

[0024] 图4. T4⁺CAR T-细胞减少SKOV3-1uc卵巢腺癌细胞的增殖。条形图中示出细胞毒性测定的结果,其中通过非转导的T细胞或通过T4⁺CAR-T细胞培养单层的SKOV3-1uc细胞。

[0025] 图5. 凋亡细胞不废除T4⁺CAR-T细胞抗肿瘤活性。结果是基于细胞毒性测定,其中在媒介物(Hartmann溶液)、或凋亡细胞(ApoCell)、或凋亡细胞(ApoSup)的上清液、或者凋亡细胞和单核细胞/巨噬细胞共培养的上清液(ApoMon Sup)的存在下用非转导的T细胞或用T4⁺CAR-T细胞培养单层的SKOV3-1uc细胞。

[0026] 图6. 在细胞毒性期间高水平分泌的IL-6被凋亡细胞下调。这里示出的结果证实SKOV3-luc和人单核细胞/巨噬细胞的共培养的影响暴露于凋亡细胞 (ApoCell)、或ApoCell上清液 (ApoSup)、或者凋亡细胞和单核细胞/巨噬细胞共培养 (ApoMon Sup)。

[0027] 图7. CAR-T细胞疗法期间LPS暴露之后凋亡细胞或凋亡细胞上清液或者凋亡细胞和单核细胞的共培养的效果。当将脂多糖 (LPS) 添加至细胞毒性测定时记录到非常高分泌的IL-6。结果显示暴露于凋亡细胞 (ApoCell)、或凋亡细胞的上清液 (ApoSup) 或者凋亡细胞和单核细胞/巨噬细胞的共培养的上清液 (ApoMon Sup) 下调IL-6, 其中IL-6降低至可接受的水平。

[0028] 应当理解为了说明的简单和清晰, 图中示出的元素不必是按比例绘制的。例如, 为了清晰, 一些元素的尺寸可以相对于其他元素扩大。此外, 当适当考虑时, 参考数字可以在图中重复以表示相应或类似元素。

[0029] 发明详述

[0030] 本申请要求2015年2月18日提交的美国专利临时申请号62/117,752; 2015年3月2日提交的62/127,218, 2015年4月16日提交的62/148,227; 和2015年5月11日提交的62/159,365的权益。这些申请通过整体援引加入本文。

[0031] [1]在以下详细描述中示出了许多具体细节以提供本文公开的方法的完全理解。但是, 本领域技术人员会理解没有这些具体细节可以实施这些方法。在其他情况下, 未详细描述的方法、程序和组分以便不模糊本文公开的方法。

[0032] 免疫细胞的遗传修饰是众所周知的抗癌免疫细胞疗法的策略。这些免疫细胞疗法是基于自体或同种异体免疫细胞的操作和施用至需要的对象。基于免疫细胞的疗法包括自然杀伤细胞疗法、树突细胞疗法和T-细胞免疫疗法, T-细胞免疫疗法包括那些利用幼稚T-细胞 (naïve T-cell)、也称作T-辅助细胞的效应T-细胞、细胞毒性T-细胞和调节性T-细胞 (Tregs)。

[0033] 在一实施方案中, 本文公开了包含遗传修饰的免疫细胞的组合物。在另一实施方案中, 所述遗传修饰的免疫细胞是T-细胞。在另一实施方案中, T-细胞是幼稚T-细胞。在另一实施方案中, T-细胞是幼稚CD4⁺T-细胞。在另一实施方案中, T-细胞是幼稚T-细胞。在另一实施方案中, T-细胞是幼稚CD8⁺T-细胞。在另一实施方案中, 所述遗传修饰的免疫细胞是自然杀伤 (NK) 细胞。在另一实施方案中, 所述遗传修饰的免疫细胞是树突细胞。在另一实施方案中, 所述遗传修饰的T-细胞是细胞毒性T淋巴细胞 (CTL细胞)。在另一实施方案中, 所述遗传修饰的T-细胞是调节性T-细胞 (Treg)。在另一实施方案中, 所述遗传修饰的T-细胞是嵌合抗原受体 (CAR) T-细胞。在另一实施方案中, 所述遗传修饰的T-细胞是遗传修饰的T-细胞受体 (TCR) 细胞。

[0034] 在一实施方案中, 本文公开了包含遗传修饰的免疫细胞和凋亡细胞的组合物。在另一实施方案中, 本文公开了包含遗传修饰的免疫细胞和来自凋亡细胞的上清液的组合物。在另一实施方案中, 所述遗传修饰的免疫细胞是T-细胞。在另一实施方案中, 所述遗传修饰的免疫细胞是自然杀伤 (NK) 细胞。在另一实施方案中, 所述遗传修饰的免疫细胞是细胞毒性T淋巴细胞 (CTL细胞)。在另一实施方案中, 所述遗传修饰的免疫细胞是调节性T-淋巴细胞 (Treg细胞)。

[0035] 在一实施方案中, 本文公开了包含遗传修饰的T-细胞和凋亡细胞的组合物。在另

一实施方案中,本文公开了包含遗传修饰的T-细胞和凋亡细胞的上清液的组合物。在另一实施方案中,所述遗传修饰的T-细胞是嵌合抗原受体(CAR) T-细胞。在另一实施方案中,所述遗传修饰的T-细胞是遗传修饰的T-细胞受体(TCR)细胞。

[0036] 在一实施方案中,本文公开了包含CAR T-细胞和凋亡细胞的组合物。在另一实施方案中,本文公开了包含遗传修饰的T-细胞受体细胞(TCR)和凋亡细胞的组合物。在另一实施方案中,本文公开了包含CAR T-细胞和来自凋亡细胞的上清液的组合物。在另一实施方案中,本文公开了包含遗传修饰的T-细胞受体细胞(TCR)和凋亡细胞的上清液的组合物。

[0037] 在某些实施方案中,遗传修饰的免疫细胞以及凋亡细胞或凋亡细胞上清液被包含在单一组合物内。在其他实施方案中,遗传修饰的免疫细胞以及凋亡细胞或凋亡细胞上清液被包含在不同组合物中。

[0038] 在一实施方案中,本文公开了包含遗传修饰的免疫细胞和额外的药物的组合物,所述额外的药物选自包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于碲的化合物或者免疫调节剂的组,或者它们的任何组合。在另一实施方案中,本文公开了包含遗传修饰的免疫细胞、凋亡细胞和额外的药物的组合物,所述额外的药物选自包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于碲的化合物或者免疫调节剂的组,或者它们的任何组合。在另一实施方案中,本文公开了包含遗传修饰的免疫细胞和额外的药物的组合物,所述额外的药物选自包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于碲的化合物或者免疫调节剂的组,或者它们的任何组合。在另一实施方案中,本文公开了包含遗传修饰的免疫细胞、来自凋亡细胞的上清液和额外的药物的组合物,所述额外的药物选自包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于碲的化合物或者免疫调节剂的组,或者它们的任何组合。在另一实施方案中,所述遗传修饰的免疫细胞是T-细胞。在另一实施方案中,所述遗传修饰的免疫细胞是自然杀伤(NK)细胞。在另一实施方案中,所述遗传修饰的免疫细胞是细胞毒性T淋巴细胞(CTL细胞)。

[0039] 在一实施方案中,本文公开了包含遗传修饰的T-细胞和额外的药物的组合物,所述额外的药物选自包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于碲的化合物或者免疫调节剂的组,或者它们的任何组合。在另一实施方案中,本文公开了包含遗传修饰的T-细胞、凋亡细胞和额外的药物的组合物,所述额外的药物选自包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于碲的化合物或者免疫调节剂的组,或者它们的任何组合。在另一实施方案中,本文公开了包含遗传修饰的T-细胞和额外的药物的组合物,所述额外的药物选自包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于碲的化合物或者免疫调节剂的组,或者它们的任何组合。在另一实施方案中,本文公开了包含遗传修饰的T-细胞、凋亡细胞的上清液和额外的药物的组合物,所述额外的药物选自包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于碲的化合物或者免疫调节剂的组,或者它们的任何组合。在另一实施方案中,所述遗传修饰的T-细胞是嵌合抗原受体(CAR) T-细胞。在另一实施方案中,所述遗传修饰的T-细胞是遗传修饰的T-细胞受体(TCR)细胞。

[0040] 在一实施方案中,本文公开了包含CAR T-细胞和额外的药物的组合物,所述额外的药物选自包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于碲的化合物或者免疫调节剂的组,或者它们的任何组合。在另一实施方案中,本文公开了包含CAR T-细胞、凋亡细胞和额外的药物的组合物,所述额外的药物选自包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶

或其片段或其类似物、基于碲的化合物或者免疫调节剂的组,或者它们的任何组合。在另一实施方案中,本文公开了包含遗传修饰的T-细胞受体(TCR)和额外的药物的组合物,所述额外的药物选自包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于碲的化合物或者免疫调节剂的组,或者它们的任何组合。在另一实施方案中,本文公开了包含遗传修饰的T-细胞受体(TCR)、凋亡细胞和额外的药物的组合物,所述额外的药物选自包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于碲的化合物或者免疫调节剂的组,或者它们的任何组合。在另一实施方案中,本文公开了包含遗传修饰的T-细胞受体(TCR)、凋亡细胞上清液和额外的药物的组合物,所述额外的药物选自包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于碲的化合物或者免疫调节剂的组,或者它们的任何组合。

[0041] 在一实施方案中,施用包含凋亡细胞的组合物不影响CAR T-细胞治疗、预防、抑制、减少癌症或肿瘤的发生率或改善或缓解癌症或肿瘤的效力。在另一实施方案中,施用包含凋亡细胞的组合物不减少CAR T-细胞治疗、预防、抑制、减少所述癌症或所述肿瘤的发生率或改善或缓解所述癌症或所述肿瘤的效力超过约5%。在另一实施方案中,施用包含凋亡细胞的组合物不减少CAR T-细胞治疗、预防、抑制、减少所述癌症或所述肿瘤的发生率或改善或缓解所述癌症或所述肿瘤的效力超过约10%。在另一实施方案中,施用包含凋亡细胞的组合物不减少CAR T-细胞治疗、预防、抑制、减少所述癌症或所述肿瘤的发生率或改善或缓解所述癌症或所述肿瘤的效力超过约15%。在另一实施方案中,施用包含凋亡细胞的组合物不减少CAR T-细胞治疗、预防、抑制、减少所述癌症或所述肿瘤的发生率或改善或缓解所述癌症或所述肿瘤的效力超过约20%。

[0042] 在另一实施方案中,施用包含凋亡细胞上清液的组合物不减少CAR T-细胞治疗、预防、抑制、减少所述癌症或所述肿瘤的发生率或改善或缓解所述癌症或所述肿瘤的效力超过约5%。在另一实施方案中,施用包含凋亡细胞上清液的组合物不减少CAR T-细胞治疗、预防、抑制、减少所述癌症或所述肿瘤的发生率或改善或缓解所述癌症或所述肿瘤的效力超过约10%。在另一实施方案中,施用包含凋亡细胞上清液的组合物不减少CAR T-细胞治疗、预防、抑制、减少所述癌症或所述肿瘤的发生率或改善或缓解所述癌症或所述肿瘤的效力超过约15%。在另一实施方案中,施用包含凋亡细胞上清液的组合物不减少CAR T-细胞治疗、预防、抑制、减少所述癌症或所述肿瘤的发生率或改善或缓解所述癌症或所述肿瘤的效力超过约20%。在另一实施方案中,施用包含凋亡细胞上清液的组合物不影响CAR T-细胞治疗、预防、抑制、减少所述癌症或所述肿瘤的发生率或改善或缓解所述癌症或所述肿瘤的效力。在另一实施方案中,施用包含凋亡细胞上清液的组合物不减少CAR T-细胞治疗、预防、抑制、减少所述癌症或所述肿瘤的发生率或改善或缓解所述癌症或所述肿瘤的效力。

[0043] 在另一实施方案中,本文公开了抑制或减少接受CAR T-细胞癌症疗法的对象中的细胞因子释放综合征(CRS)或细胞因子风暴的发生率的方法。在另一实施方案中,本文公开的方法减少或防止接受CAR T-细胞癌症疗法的所述对象中的细胞因子产生,从而抑制或减少对象中的细胞因子释放综合征(CRS)或细胞因子风暴的发生率。在另一实施方案中,本文公开的抑制或减少接受CAR T-细胞癌症疗法的所述对象中的细胞因子释放综合征(CRS)或细胞因子风暴的发生率的方法,其包括向接受癌症疗法的所述对象施用包含凋亡细胞的组合物的步骤。在另一实施方案中,本文公开的减少或抑制接受CAR T-细胞癌症疗法的对象中的细胞因子产生的方法包括向接受癌症疗法的所述对象施用包含凋亡细胞的组合物的

步骤。在另一实施方案中,施用包含凋亡细胞的组合物不影响CAR T-细胞疗法的效力。在另一实施方案中,施用包含凋亡细胞或凋亡上清液的组合物不减少CAR T-细胞疗法的效力。在另一实施方案中,施用包含凋亡细胞或凋亡细胞上清液的组合物不减少CAR T-细胞疗法的效力超过约5%。在另一实施方案中,施用包含凋亡细胞或凋亡细胞上清液的组合物不减少CAR T-细胞疗法的效力超过约10%。在另一实施方案中,施用包含凋亡细胞或凋亡细胞上清液的组合物不减少CAR T-细胞疗法的效力超过约15%。在另一实施方案中,施用包含凋亡细胞或凋亡细胞上清液的组合物不减少CAR T-细胞疗法的效力超过约20%。

[0044] 在另一实施方案中,本文公开了在经历细胞因子释放综合征或细胞因子风暴或者易受细胞因子释放综合征或细胞因子风暴影响的对象中减少或抑制细胞因子产生的方法,其包括施用如本文公开的凋亡细胞上清液的步骤,或者施用包含所述凋亡细胞上清液的组合物。在另一实施方案中,凋亡细胞上清液包含凋亡细胞-吞噬细胞上清液。

[0045] 在另一实施方案中,本文公开的在接受CAR T-细胞癌症疗法的对象中减少或抑制细胞因子产生的方法,包括向接受癌症疗法的所述对象施用包含凋亡细胞上清液的组合物的步骤。在另一实施方案中,施用包含凋亡细胞上清液的组合物不影响CAR T-细胞疗法的效力。在另一实施方案中,施用包含凋亡细胞上清液的组合物不减少CAR T-细胞疗法的效力。

[0046] 在一实施方案中,在接受表达嵌合抗原受体T-细胞(CAR T-细胞)癌症疗法的对象中抑制或减少细胞因子释放综合征(CRS)或细胞因子风暴的发生率的方法,包括向所述对象施用包含凋亡细胞或凋亡上清液的组合物的步骤。在另一实施方案中,在接受表达嵌合抗原受体T-细胞(CAR T-细胞)癌症疗法的对象中抑制或减少细胞因子释放综合征(CRS)或细胞因子风暴的发生率的方法在所述对象中减少或抑制至少一种促炎细胞因子的产生。

[0047] 表达嵌合抗原受体T-细胞(CAR T-细胞)

[0048] 在一实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)是抗原靶向受体的一种类型,其由融合至胞外肿瘤结合部分(最常见的是来自单克隆抗体的单链可变片段(scFv))的胞内T-细胞信号传导结构域组成。CAR直接识别细胞表面抗原,独立于MHC介导的递呈,允许使用所有患者中任何给定抗原特异性的单一受体构建体。最初CAR抗原识别结构域融合至T-细胞受体(TCR)复合物的CD3 ζ 激活链。虽然这些第一代CAR在体外诱导T-细胞效应子功能,但是它们在体内很大程度上受到抗肿瘤效力差的限制。随后的CAR迭代包括与CD3 ζ 串联的第二共刺激信号,包括来自CD28或各种TNF受体家族分子如4-1BB(CD137)和OX40(CD134)的胞内结构域。此外,第三代受体包括除CD3 ζ 以外的两个共刺激信号,最常见的是来自CD28和4-1BB。第二代和第三代CAR显著提高抗肿瘤效力,在某些情况下诱导患有晚期癌症的患者中的完全缓解。

[0049] 在一实施方案中,CAR T-细胞是包括抗原受体的免疫应答细胞,当它的受体结合至其抗原时被激活。

[0050] 在一实施方案中,如本文公开的组合物和方法中使用的CAR T-细胞是第一代CAR T-细胞。在另一实施方案中,如本文公开的组合物和方法中使用的CAR T-细胞是第二代CAR T-细胞。在另一实施方案中,如本文公开的组合物和方法中使用的CAR T-细胞是第三代CAR T-细胞。在另一实施方案中,如本文公开的组合物和方法中使用的CAR T-细胞是第四代CAR T-细胞。在一实施方案中,每代CAR T-细胞比前代CAR T-细胞更有效。

[0051] 在一实施方案中,第一代CAR具有一个信号传导结构域,通常是CD3TCR ζ 链的胞质

信号传导结构域。

[0052] 在另一实施方案中,如本文公开的CAR T-细胞是第二代CAR T-细胞。在另一实施方案中,如本文公开的CAR T-细胞包含三嵌合受体(TPCR)。在一实施方案中,如本文公开的CAR T-细胞包含以共刺激独立模式的激活幼稚T-细胞的一个或多个信号传导部分。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞进一步编码肿瘤坏死因子受体家族的一个或多个成员,其在一实施方案中是CD27、4-1BB (CD137) 或OX40 (CD134),或者它们的组合。

[0053] 第三代CAR T-细胞试图利用2个共刺激结构域的信号传导潜力:在一实施方案中,CD28结构域之后是4-1BB或OX-40信号传导结构域。在另一实施方案中,如本文公开的组合物和方法中使用的CAR T-细胞进一步编码共刺激信号传导结构域,其在一实施方案中是CD28。在另一实施方案中,所述信号传导结构域是CD3 ζ -链、CD97、GDI 1a-CD18、CD2、ICOS、CD27、CD154、CDS、OX40、4-1BB、CD28信号传导结构域,或者它们的组合。

[0054] 在一实施方案中,端粒长度和复制能力与过继转移的T-细胞系的移植效率和抗肿瘤效力相关。在一实施方案中,CD28刺激保持T-细胞中的端粒长度。

[0055] 在一实施方案中,CAR修饰的T-细胞效力可通过引入额外的基因进一步增强,包括那些编码增殖性细胞因子(即,IL-12)或共刺激配体(即4-1BBL)的基因,因此产生“武装的(armed)”第四代CAR修饰的T-细胞。在一实施方案中,“武装的CAR T-细胞”是在抑制肿瘤微环境中受到保护的CAR T-细胞。在另一实施方案中,“武装的”CAR技术纳入可溶性信号传导蛋白的局部分泌以放大肿瘤微环境内的免疫应答,目的是最小化全身副作用。在一实施方案中,所述信号传导蛋白信号是IL-12,其可以刺激T-细胞激活和募集。在一实施方案中,“武装的”CAR技术在实体瘤指示中特别有用,其中微环境和强效的免疫抑制机制有潜力使强健的抗肿瘤反应的建立更具挑战性。

[0056] 在一实施方案中,将CAR T-细胞遗传修饰以编码参与预防凋亡、重塑肿瘤微环境、诱导稳态增殖以及促进定向T-细胞归巢的趋化因子受体的分子。

[0057] 在另一实施方案中,利用细胞因子转基因的表达、与小分子抑制剂的联合疗法或单克隆抗体增强如本文公开的组合物和方法中使用的CAR T-细胞疗法。在另一实施方案中,旨在改善CAR T-细胞疗法的其他策略,包括使用双CAR和趋化因子受体以更特异性地靶向肿瘤细胞,被认为是如本文公开的CAR T-细胞和CAR T-细胞疗法的一部分。

[0058] 在一实施方案中,如本文公开的组合物和方法的CAR T-细胞包括第二结合结构域,其可以导致抑制或放大信号,以增加CAR T-细胞相比于正常细胞对癌细胞的特异性。例如,可将CAR T-细胞工程化,从而其会在一个靶蛋白的存在下被触发,但是如果第二蛋白质存在,其会被抑制。或者,还可将其工程化,从而对于最大激活需要两个靶蛋白。这些方法可增加CAR相对于正常组织对肿瘤的特异性。

[0059] 在一实施方案中,如本文公开的组合物和方法中使用的CAR T-细胞编码基于抗体的外部受体结构和胞质结构域,其编码由基于免疫受体酪氨酸的激活基序组成的信号传导分子。

[0060] 在一实施方案中,CAR T-细胞进一步编码结合具有免疫抑制活性的多肽的单链可变片段(scFv)。在另一实施方案中,所述具有免疫抑制活性的多肽是CD47、PD-1、CTLA-4或它们的组合。

[0061] 在一实施方案中,CAR T-细胞进一步编码结合具有免疫刺激活性的多肽的单链可

变片段(scFv)。在另一实施方案中,所述具有免疫刺激活性的多肽是CD28、OX-40、4-1BB或它们的组合。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞进一步编码CD40配体(CD40L),其在另一实施方案中增强抗原的免疫刺激活性。

[0062] 在一实施方案中,所述免疫细胞是细胞毒性的。在另一实施方案中,遗传修饰的细胞毒性细胞可获得自所述对象或供体的骨髓。在其他情况下,所述细胞获得自干细胞。例如,细胞毒性细胞可源自人多能干细胞如人胚胎干细胞或人诱导的多能T-细胞。在诱导的多能干细胞(IPSC)的情况下,可利用来自向其提供遗传修饰的细胞毒性细胞的对象的体细胞获得这类多能T-细胞。在一实施方案中,可通过静脉穿刺、通过分离(apheresis)方法、通过白血细胞动员然后分离或静脉穿刺、或者通过骨髓穿刺收获细胞获得来自对象或供体的免疫细胞。

[0063] 在一实施方案中,如本文公开的方法,其包括从对象获得免疫细胞,并且遗传修饰所述免疫细胞以表达嵌合抗原受体。在另一实施方案中,如本文公开的方法,其包括从对象获得免疫细胞,遗传修饰所述免疫细胞以表达嵌合抗原受体以及与凋亡细胞群体组合,导致对象中的细胞因子产生减少但相对于不与凋亡细胞群体一起施用的表达CAR的免疫细胞基本上不影响细胞毒性(图1A-1B和2)。在另一实施方案中,如本文公开的方法包括从对象获得免疫细胞,遗传修饰所述免疫细胞以表达嵌合抗原受体以及与凋亡细胞上清液或包含所述上清液的组合物组合,导致对象中的细胞因子产生减少但相对于不与凋亡细胞上清液一起施用的表达CAR的免疫细胞基本上不影响细胞毒性。在另一实施方案中,凋亡细胞群体或来自凋亡细胞的上清液的施用不减少表达嵌合抗原受体的免疫细胞的效力。

[0064] 因此,如本文公开的一实施方案涉及包含嵌合抗原受体(CAR)的细胞毒性免疫细胞(例如NK细胞或T-细胞),从而所述细胞保留它们的细胞毒性功能。在另一实施方案中,所述嵌合抗原受体对于T-细胞是外源的。在另一实施方案中,所述CAR是重组表达的。在另一实施方案中,所述CAR表达自载体。

[0065] 在一实施方案中,用来产生CAR T-细胞的T-细胞是幼稚CD4⁺T-细胞。在另一实施方案中,用来产生CAR T-细胞的T-细胞是幼稚CD8⁺T-细胞。在另一实施方案中,用来产生CAR T-细胞的T-细胞是效应T-细胞。在另一实施方案中,用来产生CAR T-细胞的T-细胞是调节性T-细胞(Treg)。在另一实施方案中,用来产生CAR T-细胞的T-细胞是细胞毒性T-细胞。

[0066] 遗传修饰的免疫细胞如T细胞的来源已在文献中广泛描述,参见例如Themelli et al. (2015) *New Cell Sources for T Cell Engineering and Adoptive Immunotherapy*. *Cell Stem Cell* 16:357-366; Han et al. (2013) *Journal of Hematology&Oncology* 6:47-53; Wilkie et al. (2010) *J Bio Chem* 285(33):25538-25544; 和van der Stegen et al. (2013) *J. Immunol* 191:4589-4598。CAR T-细胞可订购自商业来源如Creative Biolabs (NY USA), 其提供嵌合抗原受体(CAR)的定制构建和生产服务,并且还提供预先做好的CAR构建库存,其可诱导重组腺病毒疫苗编码的保护性免疫。定制的CAR T-细胞还可以获得自Promab Biotechnologies (CA USA), 其可以提供特别设计的CAR T-细胞。

[0067] 靶向抗原

[0068] 在一实施方案中,CAR通过导向至抗原的抗体或抗体片段结合至所述抗原的表位。

在另一实施方案中,所述抗体是单克隆抗体。在另一实施方案中,所述抗体是多克隆抗体。在另一实施方案中,所述抗体片段是单链可变片段(scFv)。

[0069] 在另一实施方案中,如本文公开的组合物CAR T-细胞结合至肿瘤相关抗原(TAA)。在另一实施方案中,所述肿瘤相关抗原是:粘蛋白1、细胞表面相关(MUC1)或多态性上皮粘蛋白(PEM)、富含精氨酸在早期肿瘤中突变的(Armet)、热休克蛋白60(HSP60)、钙联蛋白(CANX)、亚甲基四氢叶酸脱氢酶(NADP+依赖性)2、次甲基四氢叶酸环水解酶(MTHFD2)、成纤维细胞激活蛋白(FAP)、基质金属蛋白酶(MMP6)、B黑素瘤抗原-1(BAGE-1)、N-乙酰基葡萄糖胺基转移酶V的异常转录物(GnTV)、Q5H943、癌胚抗原(CEA)、Pme1、激肽释放酶-4、乳腺球蛋白-1、MART-1、GPR143-OA1、前列腺特异性抗原(PSA)、TRP1、酪氨酸酶、FGP-5、NEU原癌基因、Aft、MMP-2、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、端粒酶相关蛋白-2、前列腺酸性磷酸酶(PAP)、尿溶蛋白II或蛋白酶3。

[0070] 在另一实施方案中,在白血病中想破坏B细胞的情况下,所述CAR结合至CD19或CD20以靶向B细胞。在另一实施方案中,所述CAR结合至ROR1、CD22或GD2。在另一实施方案中,所述CAR结合至NY-ESO-1。在另一实施方案中,所述CAR结合至MAGE家族蛋白。在另一实施方案中,所述CAR结合至间皮素。在另一实施方案中,所述CAR结合至c-erbB2。在另一实施方案中,所述CAR结合至肿瘤特异性的突变抗原,如BRAFV600E突变和BCR-ABL易位。在另一实施方案中,所述CAR结合至肿瘤特异性的病毒抗原,如HD中的EBV、子宫颈癌中的HPV和Merkel癌中的多瘤病毒。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞结合至Her2/neu。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞结合至EGFRvIII。

[0071] 在一实施方案中,所述嵌合抗原受体(CAR) T-细胞结合CD19抗原。在另一实施方案中,所述CAR结合CD22抗原。在另一实施方案中,所述CAR结合 α 叶酸受体。在另一实施方案中,所述CAR结合至CAIX。在另一实施方案中,所述CAR结合至CD20。在另一实施方案中,所述CAR结合至CD23。在另一实施方案中,所述CAR结合至CD24。在另一实施方案中,所述CAR结合至CD30。在另一实施方案中,所述CAR结合至CD33。在另一实施方案中,所述CAR结合至CD38。在另一实施方案中,所述CAR结合至CD44v6。在另一实施方案中,所述CAR结合至CD44v7/8。在另一实施方案中,所述CAR结合至CD123。在另一实施方案中,所述CAR结合至CD171。在另一实施方案中,所述CAR结合至癌胚抗原(CEA)。在另一实施方案中,所述CAR结合至EGFRvIII。在另一实施方案中,所述CAR结合至EGP-2。在另一实施方案中,所述CAR结合至EGP-40。在另一实施方案中,所述CAR结合至EphA2。在另一实施方案中,所述CAR结合至Erb-B2。在另一实施方案中,所述CAR结合至Erb-B 2,3,4。在另一实施方案中,所述CAR结合至Erb-B3/4。在另一实施方案中,所述CAR结合至FBP。在另一实施方案中,所述CAR结合至胎儿乙酰胆碱受体。在另一实施方案中,所述CAR结合至G_{D2}。在另一实施方案中,所述CAR结合至G_{D3}。在另一实施方案中,所述CAR结合至HER2。在另一实施方案中,所述CAR结合至HMW-MAA。在另一实施方案中,所述CAR结合至IL-11R α 。在另一实施方案中,所述CAR结合至IL-13R α 1。在另一实施方案中,所述CAR结合至KDR。在另一实施方案中,所述CAR结合至 κ -轻链。在另一实施方案中,所述CAR结合至Lewis Y。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞结合至L1-细胞粘附分子。在另一实施方案中,所述CAR结合至MAGE-A1。在另一实施方案中,所述CAR结合至间皮素。在另一实施方案中,所述CAR结合至CMV感染的细胞。在另一实施方案中,所述CAR结合至MUC1。在另一实施方案中,所述CAR结合至MUC16。在另一实施方案中,所述CAR结合至

NKG2D配体。在另一实施方案中,所述CAR结合至NY-ESO-1(氨基酸157-165)。在另一实施方案中,所述CAR结合至癌胚胎(oncofetal)抗原(h5T4)。在另一实施方案中,所述CAR结合至PSCA。在另一实施方案中,所述CAR结合至PSMA。在另一实施方案中,所述CAR结合至ROR1。在另一实施方案中,所述CAR结合至TAG-72。在另一实施方案中,所述CAR结合至VEGF-R2或其他VEGF受体。在另一实施方案中,所述CAR结合至B7-H6。在另一实施方案中,所述CAR结合至CA9。在另一实施方案中,所述CAR结合至 $\alpha_v\beta_6$ 整联蛋白。在另一实施方案中,所述CAR结合至8H9。在另一实施方案中,所述CAR结合至NCAM。在另一实施方案中,所述CAR结合至胎儿乙酰胆碱受体。

[0072] 在另一实施方案中,所述嵌合抗原受体(CAR) T-细胞靶向CD19抗原,并且对患有B-细胞恶性肿瘤、ALL、滤泡性淋巴瘤、CLL和淋巴瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向CD22抗原,并且对患有B-细胞恶性肿瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向 α 叶酸受体或叶酸受体 α ,并且对患有卵巢癌或上皮癌的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向CAIX或G250/CAIX,并且对患有肾细胞癌的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向CD20,并且对患有淋巴瘤、B-细胞恶性肿瘤、B-细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤和惰性B-细胞淋巴瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向CD23,并且对患有CLL的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向CD24,并且对患有胰腺癌的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向CD30,并且对患有淋巴瘤或霍奇金淋巴瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向CD33,并且对患有AML的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向CD38,并且对患有非霍奇金淋巴瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向CD44v6,并且对患有几种恶性肿瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向CD44v7/8,并且对患有子宫颈癌的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向CD123,并且对患有髓系恶性血液病的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向CEA,并且对患有结肠直肠癌的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向EGFRvIII,并且对患有胶质母细胞瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向EGP-2,并且对患有多种恶性肿瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向EGP-40,并且对患有结肠直肠癌的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向EphA2,并且对患有胶质母细胞瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向Erb-B2或ErbB3/4,并且对患有乳腺癌和其他、前列腺癌、结肠癌、各种肿瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向Erb-B 2,3,4,并且对患有乳腺癌和其他的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向FBP,并且对患有卵巢癌的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向胎儿乙酰胆碱受体,并且对患有横纹肌肉瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向G_{D2},并且对患有神经母细胞瘤、黑素瘤或尤文肉瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向G_{D3},并且对患有黑素瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向HER2,并且对患有成神经管细胞瘤、胰腺癌、胶质母细胞瘤、骨肉瘤或卵巢癌的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向HMW-MAA,并且对患有黑素瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向IL-11R α ,并且对患有骨肉瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向IL-13R α 1,并且对患有神经胶质瘤、胶质

母细胞瘤或成神经管细胞瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向IL-13受体 $\alpha 2$,并且对患有几种恶性肿瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向KDR,并且通过靶向肿瘤新生血管对患有肿瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向 κ -轻链,并且对患有B-细胞恶性肿瘤(B-NHL, CLL)的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向Lewis Y,并且对患有各种癌症或上皮衍生的肿瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向L1-细胞粘附分子,并且对患有神经母细胞瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向MAGE-A1或HLA-A1MAGE A1,并且对患有黑素瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向间皮素,并且对患有间皮瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向CMV感染的细胞,并且对患有CMV的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向MUC1,并且对患有乳腺癌或卵巢癌的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向MUC16,并且对患有卵巢癌的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向NKG2D配体,并且对患有骨髓瘤、卵巢和其他肿瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向NY-ESO-1 (157-165) 或HLA-A2 NY-ESO-1,并且对患有多种骨髓瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向癌胚抗原(h5T4),并且对患有各种肿瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向PSCA,并且对患有前列腺癌的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向PSMA,并且对患有前列腺癌/肿瘤脉管系统的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向ROR1,并且对患有B-CLL和套细胞淋巴瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向TAG-72,并且对患有腺癌或胃肠癌的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向VEGF-R2或其他VEGF受体,并且通过靶向肿瘤新生血管对患有肿瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向CA9,并且对患有肾细胞癌的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向CD171,并且对患有肾神经母细胞瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向NCAM,并且对患有神经母细胞瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞靶向胎儿乙酰胆碱受体,并且对患有横纹肌肉瘤的对象具有疗效。在另一实施方案中,所述CAR结合至Sadelain等人(Cancer Discov. 2013Apr; 3(4):388-398)的表1中列出的靶抗原之一,其整体援引加入本文。在另一实施方案中,CAR T-细胞结合至碳水化合物或糖脂结构。

[0073] 在一实施方案中,所述CAR结合至血管生成因子,从而靶向肿瘤脉管系统。在一实施方案中,所述血管生成因子是VEGFR2。在另一实施方案中,所述血管生成因子是内皮糖蛋白。在另一实施方案中,本文公开的血管生成因子是血管生成素(angiotensin);血管生成素-1;De1-1;成纤维细胞生长因子:酸性(aFGF)和碱性(bFGF);促滤泡素抑制素;粒细胞集落刺激因子(G-CSF);肝细胞生长因子(HGF)/分散因子(SF);白介素-8(IL-8);瘦蛋白;中期因子;胎盘生长因子;血小板衍化内皮细胞生长因子(PD-ECGF);血小板衍化生长因子-BB(PDGF-BB);多营养因子(PTN);Progranulin;增殖蛋白;转化生长因子- α (TGF- α);转化生长因子- β (TGF- β);肿瘤坏死因子- α (TNF- α);血管内皮生长因子(VEGF)/血管通透性因子(VPF)。在另一实施方案中,血管生成因子是血管生成蛋白。在一实施方案中,生长因子是血管生成蛋白。在一实施方案中,用于本文公开的组合物和方法的血管生成蛋白是成纤维细胞生长因子(FGF);VEGF;VEGFR和神经毡蛋白1(NRP-1);血管生成素1(Ang1)和Tie2;血小板

衍化生长因子 (PDGF; BB-同型二聚体) 和 PDGFR; 转化生长因子- β (TGF- β)、内皮糖蛋白和 TGF- β 受体; 单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1); 整联蛋白 α V β 3、 α V β 5 和 α 5 β 1; VE-钙粘着蛋白和 CD31; 肝配蛋白; 纤溶酶原激活物; 纤溶酶原激活物抑制物-1; 氧化氮合酶 (NOS) 和 COX-2; AC133; 或者 Id1/Id3。在一实施方案中, 用于本文公开的组合物和方法的血管生成蛋白是血管生成素, 其在一实施方案中是血管生成素1、血管生成素3、血管生成素4或血管生成素6。在一实施方案中, 内皮糖蛋白也称作 CD105; EDG; HHT1; ORW; 或 ORW1。在一实施方案中, 内皮糖蛋白是 TGF β 共受体。

[0074] 在另一实施方案中, 所述 CAR T-细胞结合至与感染性物质相关的抗原。在一实施方案中, 所述感染性物质是结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)。在一实施方案中, 所述结核分枝杆菌相关抗原是: 抗原85B、脂蛋白 IpqH、ATP 依赖性解旋酶推定、未表征的蛋白质 Rv0476/MT04941 前体或未表征的蛋白质 Rv1334/MT1376 前体。

[0075] 在另一实施方案中, 所述 CAR 结合至抗体。在一实施方案中, 所述 CAR T-细胞是“抗体偶联的 T-细胞受体” (ACTR)。根据这个实施方案, 所述 CAR T-细胞是通用的 CAR T-细胞。在另一实施方案中, 在施用抗体之前、之后或同时施用具有抗体受体的 CAR T-细胞, 然后结合至所述抗体, 使 T-细胞接近肿瘤或癌症。在另一实施方案中, 所述抗体针对肿瘤细胞抗原。在另一实施方案中, 所述抗体针对 CD20。在另一实施方案中, 所述抗体是利妥昔单抗。

[0076] 在另一实施方案中, 所述抗体是曲妥珠单抗 (赫赛汀; Genentech): 人源化 IgG1, 其针对 ERBB2。在另一实施方案中, 所述抗体是贝伐珠单抗 (阿瓦斯丁; Genentech/Roche): 人源化 IgG1, 其针对 VEGF。在另一实施方案中, 所述抗体是西妥昔单抗 (爱必妥; Bristol-Myers Squibb): 嵌合人-小鼠 IgG1, 其针对 EGFR。在另一实施方案中, 所述抗体是帕尼单抗 (Vectibix; Amgen): 人 IgG2, 其针对 EGFR。在另一实施方案中, 所述抗体是依匹木单抗 (Yervoy; Bristol-Myers Squibb): IgG1, 其针对 CTLA4。

[0077] 在另一实施方案中, 所述抗体是阿伦珠单抗 (Campath; Genzyme): 人源化 IgG1, 其针对 CD52。在另一实施方案中, 所述抗体是奥法木单抗 (Arzerra; Genmab): 人 IgG1, 其针对 CD20。在另一实施方案中, 所述抗体是吉妥珠单抗奥佐米星 (Mylotarg; Wyeth): 人源化 IgG4, 其针对 CD33。在另一实施方案中, 所述抗体是 Brentuximab vedotin (Adcetris; Seattle Genetics): 嵌合 IgG1, 其针对 CD30。在另一实施方案中, 所述抗体是 90Y-标记的替伊莫单抗 (Zevalin; IDEC Pharmaceuticals): 小鼠 IgG1, 其针对 CD20。在另一实施方案中, 所述抗体是 131I-标记的托西莫单抗 (Bexxar; GlaxoSmithKline): 小鼠 IgG2, 其针对 CD20。

[0078] 在另一实施方案中, 所述抗体是 Ramucirumab, 其针对血管内皮生长因子受体-2 (VEGFR-2)。在另一实施方案中, 所述抗体是雷莫芦单抗 (ramucirumab) (Cyramza Injection, Eli Lilly and Company)、博纳吐单抗 (blinatumomab) (BLINCYTO, Amgen Inc.)、派姆单抗 (pembrolizumab) (KEYTRUDA, Merck Sharp&Dohme Corp.)、奥滨尤妥珠单抗 (obinutuzumab) (GAZYVA, Genentech, Inc.; 以前称作 GA101)、培妥珠单抗注射液 (PERJETA, Genentech, Inc.) 或地舒单抗 (Xgeva, Amgen Inc.)。在另一实施方案中, 所述抗体是巴利昔单抗 (舒莱; Novartis)。在另一实施方案中, 所述抗体是达克珠单抗 (赛尼哌; Roche)。

[0079] 在另一实施方案中, 所述 CAR T-细胞偶联的抗体针对本文描述和/或本领域已知的肿瘤或癌症抗原或者其部分。在另一实施方案中, 所述 CAR T-细胞偶联的抗体针对肿瘤

相关抗原。在另一实施方案中,所述CAR T-细胞偶联的抗体针对是血管生成因子的肿瘤相关抗原或其部分。

[0080] 在另一实施方案中,所述CAR T-细胞偶联的抗体针对本文描述和/或本领域已知的肿瘤或癌症抗原或者其部分。

[0081] 细胞因子风暴和细胞因子释放综合征

[0082] 在一实施方案中,如本文公开的方法包括提供包含工程化嵌合抗原受体的免疫细胞(如NK细胞或T-细胞)与至少一种额外的药物以减少对象中可能发生的毒性细胞因子释放或“细胞因子释放综合征”(CRS)或“严重细胞因子释放综合征”(sCRS)或“细胞因子风暴”。在另一实施方案中,所述CRS、sCRS或细胞因子风暴因为施用免疫细胞而发生。在另一实施方案中,所述CRS、sCRS或细胞因子风暴是与免疫细胞分开的刺激、病状或综合征的结果(见下文)。在另一实施方案中,细胞因子风暴、细胞因子级联或高细胞因子血症是更严重形式的细胞因子释放综合征。

[0083] 在一实施方案中,用于减少有害细胞因子释放的额外的药物包含凋亡细胞或包含所述凋亡细胞的组合物。在另一实施方案中,用于减少有害细胞因子释放的额外的药物包含凋亡细胞上清液或包含所述上清液的组合物。在另一实施方案中,用于减少有害细胞因子释放的额外的药物包含CTLA-4阻断剂。在另一实施方案中,用于减少有害细胞因子释放的额外的药物包含凋亡细胞或凋亡细胞上清液或其组合物,以及CTLA-4阻断剂。在另一实施方案中,用于减少有害细胞因子释放的额外的药物包含 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物。在另一实施方案中,用于减少有害细胞因子释放的额外的药物包含凋亡细胞或凋亡细胞上清液或其组合物,以及 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物。在另一实施方案中,用于减少有害细胞因子释放的额外的药物包含基于碲的化合物。在另一实施方案中,用于减少有害细胞因子释放的额外的药物包含凋亡细胞或凋亡细胞上清液或其组合物,以及基于碲的化合物。在另一实施方案中,用于减少有害细胞因子释放的额外的药物包含免疫调节剂。在另一实施方案中,用于减少有害细胞因子释放的额外的药物包含凋亡细胞或凋亡细胞上清液或其组合物,以及免疫调节剂。

[0084] 技术人员会理解减少毒性细胞因子释放或毒性细胞因子水平包括减少或抑制对象中毒性细胞因子水平的产生,或者抑制或减少对象中细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的发生率。在另一实施方案中,在CRS或细胞因子风暴期间降低毒性细胞因子水平。在另一实施方案中,减少或抑制毒性细胞因子水平的产生包括治疗CRS或细胞因子风暴。在另一实施方案中,减少或抑制毒性细胞因子水平的产生包括预防CRS或细胞因子风暴。在另一实施方案中,减少或抑制毒性细胞因子水平的产生包括缓解CRS或细胞因子风暴。在另一实施方案中,减少或抑制毒性细胞因子水平的产生包括改善CRS或细胞因子风暴。在另一实施方案中,所述毒性细胞因子包含促炎细胞因子。在另一实施方案中,促炎细胞因子包含IL-6。在另一实施方案中,促炎细胞因子包含IL-1 β 。在另一实施方案中,促炎细胞因子包含TNF- α 。在另一实施方案中,促炎细胞因子包含IL-6、IL-1 β 或TNF- α ,或者它们的任何组合。

[0085] 在一实施方案中,细胞因子释放综合征的特征在于升高水平的几种炎性细胞因子和对象中的不良生理反应,如低血压、高烧和寒颤。在另一实施方案中,炎性细胞因子包含IL-6、IL-1 β 和TNF- α 。在另一实施方案中,CRS的特征在于升高水平的IL-6、IL-1 β 或TNF- α ,或者它们的任何组合。在另一实施方案中,CRS的特征在于升高水平的IL-8或IL-13,或者它

们的任何组合。在另一实施方案中,细胞因子风暴的特征在于TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、GM-CSF、IL-5、分形趋化因子(fractalkine),或它们或它们的子集的组合的增加。在另一实施方案中,IL-6包含CRS或细胞因子风暴的标志物。在另一实施方案中,IFN- γ 包含CRS或细胞因子风暴的标志物。在另一实施方案中,具有较大肿瘤负荷的患者具有较高的细胞因子释放综合征发生率和严重程度。

[0086] 在另一实施方案中,人和小鼠中CRS或细胞因子风暴中增加的细胞因子可包含下文表1和2中列出的细胞因子的任何组合。

[0087] 表1:人和/或小鼠中CRS或细胞因子风暴中增加的细胞因子的小组

[0088]

细胞因子 (分析物)	人模型 (临床实验 I)	小鼠模型(临床前)			细胞分泌细胞因子	备注/其他
		CAR-T (H) 来源	小鼠来源	未规定的		
Flt-3L	*				DC (?)	
Fractalkine	*				APC, 内皮细胞 (?)	= CX3CL1, 神经趋化蛋白 (小鼠)
M-CSF						= CSF1
GM-CSF	*			* (体外)	T 细胞, MØ	
IFN-	*				T 细胞, MØ, 单核细胞	
IFN-	?			?	T 细胞, MØ, 单核细胞	
IFN-	*	*		* (体外)	细胞毒性T细胞, 辅助T细胞, NK 细胞, MØ, 单核细胞, DC	
IL-1	*				单核细胞, MØ, Epithel	
IL-1	*			*	巨噬细胞,	

[0089]

					DCs, 纤维母细胞, 内皮细胞, 肝细胞	
IL-1R	*					
IL-2	*	*		*(体外)	T 细胞	
IL-2R	*				淋巴细胞	
IL-4	*	*		*(体外)	Th2 细胞	
IL-5	*	*		*	T 细胞	
IL-6	*		*	*	单核细胞/巨噬细胞, 树突细胞, T 细胞, 纤维母细胞, 角质细胞, 内皮细胞, 脂肪细胞, 单核细胞, 系膜细胞, 以及骨细胞	
IL-7	*			*	体外通过骨髓间充质干细胞	
IL-8	*				巨噬细胞, 单核细胞s	
IL-9	*	*			T 细胞, T helper	
IL-10	*	*	*	*(体外)	单核细胞s/巨噬细胞, 肥大细胞, B 细胞, 调控性 T 细胞, 以及辅助 T 细胞	
IL-12	*			*	MØ, 单核细胞, DC, 激活的淋巴细胞, 嗜中性粒细胞	= p70 (p40+p35)
IL-13	*	*			T 细胞	

[0090] 在一实施方案中,认为表1的细胞因子F1t-3L、Fractalkine、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-2 α 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12和IL-13在CRS或细胞因子风暴中意义重大。在另一实施方案中,表1的IFN- α 、IFN- β 、IL-1和IL-1 α 看来在CRS或细胞因子风暴中是重要的。在另一实施方案中,M-CSF具有未知的重要性。在另一实施方案中,表

1中列出的任何细胞因子或它们的组合可用作CRS或细胞因子风暴的标志物。

[0091] 表2:人和/或小鼠中CRS或细胞因子风暴中增加的细胞因子的小组

[0092]

细胞因子 (分析物)	人模型 (临床试 验)	小鼠模型(临床前)			细胞分泌细胞因子	备注/ 其 他
		CAR-T (H) 来源	小鼠来 源	未 规 定 的		
IL- 15	*			*	纤维母细胞, 单核细胞 (?)	22
IL- 17	*			*	T 细胞	
IL- 18					巨噬细胞	
IL- 21	*				T 辅助细胞, NK 细胞	
IL- 22	*				激活的 DC 和 T 细胞	
IL- 23						
IL- 25						保护性?
IL- 27	*				APC	
IP-10	*				单核细胞 (?)	
MCP-1	*				内皮, 纤维母细胞, 上 皮, 单核细胞	= CXCL10
MCP-3	*				PBMCs, MØ (?)	= CCL2
MIP-1	*			*(体外)	T 细胞	= CXCL9
MIP-1	*				T 细胞	= CCL3
PAF	?				血小板, 内皮细胞, 嗜 中性粒细胞, 单核细 胞, 以及巨噬细胞, 系 膜细胞	= CCL4
PGE2	*			*	肠胃黏膜和其他	
RANTES	*				单核细胞	
TGF-	*			*	MØ, 淋巴细胞, 内皮, 血小板 ...	= CCL5
TNF-	*	*	*	*(体外)	巨噬细胞, NK, T 细胞	
TNF- R 1	*					
HGF						
MIG	*				T 细胞趋化, 由 IFN-诱 导	

[0093] 在一实施方案中,认为表2的IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、IL-22、IP-10、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 和TNF- α 在CRS或细胞因子风暴中意义重大。在另一实施方案中,表2的IL-27、MCP-3、PGE2、RANTES、TGF- β 、TNF- α R1和MIG看来在CRS或细胞因子风暴中是重要的。在另一实施方案中,IL-23和IL-25具有未知的重要性。在另一实施方案中,表2中列出的任何细胞因子或它们的组合可用作CRS或细胞因子风暴的标志物。

[0094] 技术人员会理解术语“细胞因子”可涵盖细胞因子(例如,干扰素 γ 、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、肿瘤坏死因子 α)、趋化因子(例如,MIP 1 α 、MIP 1 β 、RANTES)和炎症的其他可溶性介质,如活性氧簇和氧化氮。

[0095] 在一实施方案中,特定细胞因子的释放增加,无论意义重大、重要或具有未知的重要性,不先验地表示所述特定细胞因子是细胞因子风暴的部分。在一实施方案中,至少一种

细胞因子的增加不是细胞因子风暴或CRS的结果。在另一实施方案中，CAR T-细胞可以是升高水平的特定细胞因子或细胞因子组的来源。

[0096] 在另一实施方案中，细胞因子释放综合征的特征在于任何或全部以下症状：伴有或不伴有寒战的发热、不适、疲劳、厌食症、肌痛、关节痛、恶心、呕吐、头痛、皮疹、恶心、呕吐、腹泻、呼吸急促、低氧血症心血管性心动过速、脉压宽、低血压、心输出量增加(早期)、心输出量可能减少(晚期)、升高的D-二聚体、伴有或不伴有出血的低纤维蛋白原血症、氮质血症肝转氨酶升高、高胆红素血症、头痛、精神状态变化、混乱、谵妄、找词困难或失语、幻觉、震颤、辨距不良、步态改变、癫痫发作(seizure)。在另一实施方案中，细胞因子风暴的特征在于IL-2释放和淋巴组织增生(lymphoproliferation)。在另一实施方案中，细胞因子风暴的特征在于CAR T-细胞释放的细胞因子增加。在另一实施方案中，细胞因子风暴的特征在于其他CAR T-细胞以外的细胞释放的细胞因子增加。

[0097] 在另一实施方案中，细胞因子风暴导致潜在的危及生命的并发症，包括心功能障碍、成人呼吸窘迫综合征、神经系统毒性、肾和/或肝衰竭以及弥漫性血管内凝血。

[0098] 技术人员会理解在CRS或细胞因子风暴触发之后几天至几周估计发生细胞因子释放综合征(CRS)或细胞因子风暴的特征。在一实施方案中，CAR T-细胞是CRS或细胞因子风暴的触发器。在另一实施方案中，CRS或细胞因子风暴的触发器不是CAR T-细胞。

[0099] 在一实施方案中，作为细胞因子风暴的指标的细胞因子水平或浓度的测量可表示为-细胞因子水平或浓度的倍数增加、百分比(%)增加、净增加或变化率。在另一实施方案中，某个水平或浓度以上的绝对细胞因子水平或浓度可以是对象经历或即将经历细胞因子风暴的指示。在另一实施方案中，某个水平或浓度的绝对细胞因子水平或浓度，例如通常在未经历CAR-T细胞疗法的对照对象中发现的水平或浓度，可以是在经历CAR T-细胞的对象中抑制或减少细胞因子风暴发生率的方法的指示。

[0100] 技术人员会理解术语“细胞因子水平”可涵盖浓度的度量、倍数变化的度量、百分比(%)变化的度量或变化率的度量。此外，测量血液、唾液、血清、尿和血浆中的细胞因子的方法是本领域公知的。

[0101] 在一实施方案中，尽管认识到细胞因子风暴与几种炎性细胞因子的升高相关，但是IL-6水平可用作细胞因子风暴的通用度量和/或细胞因子风暴治疗有效性的通用度量。技术人员会理解其他细胞因子可用作细胞因子风暴的标志物，例如任何TNF- α 、IB-1 α 、IL-6、IL-8、IL-13或INF- γ 或者以上的任何组合可用作CRS或细胞因子风暴的标志物。此外，测量细胞因子的测定方法是本领域公知的。技术人员会理解影响细胞因子风暴的方法可相似地影响细胞因子释放综合征(CRS)。

[0102] 在一实施方案中，本文公开了在经历细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的对象中减少或抑制细胞因子产生的方法。在另一实施方案中，本文公开了在易受经历细胞因子释放综合征或细胞因子风暴影响的对象中减少或抑制细胞因子产生的方法。在另一实施方案中，本文公开的方法在经历细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的对象中减少或抑制细胞因子产生，其中表1和/或2中列出的任何细胞因子或细胞因子的组的产生减少或受到抑制。在另一实施方案中，细胞因子IL-6的产生减少或受到抑制。在另一实施方案中，细胞因子IL- β 1的产生减少或受到抑制。在另一实施方案中，细胞因子IL-8的产生减少或受到抑制。在另一实施方案中，细胞因子IL-13的产生减少或受到抑制。在另一实施方案中，细胞因

子TNF- α 的产生减少或受到抑制。在另一实施方案中,细胞因子IL-6的产生、IL-1 β 的产生或TNF- α 的产生或者它们的任何组合减少或受到抑制。

[0103] 在一实施方案中,将细胞因子释放综合征分级。在另一实施方案中,1级描述细胞因子释放综合征,其中症状不危及生命且仅需要对症治疗,例如,发热、恶心、疲劳、头痛、肌痛、不适。在另一实施方案中,2级症状需要并响应轻度干预,如氧、流体或低血压的血管加压剂。在另一实施方案中,3级症状需要并响应侵略性干预。在另一实施方案中,4级症状是危及生命的症状且需要呼吸机,并且患者表现出器官毒性。

[0104] 在另一实施方案中,细胞因子风暴的特征在于IL-6和干扰素 γ 释放。在另一实施方案中,细胞因子风暴的特征在于IL-6释放。在另一实施方案中,细胞因子风暴的特征在于干扰素 γ 释放。在另一实施方案中,细胞因子风暴的特征在于表1和2中列出的任何细胞因子或其组合的释放。在另一实施方案中,细胞因子风暴的特征在于本领域已知的任何细胞因子或其组合的释放。

[0105] 在一实施方案中,症状发作在输液开始之后几分钟至几小时开始。在另一实施方案中,症状与峰值细胞因子水平相符。

[0106] 在一实施方案中,在经历CAR T-细胞癌症疗法的对象中抑制或减少细胞因子释放综合征(CRS)或细胞因子风暴发生率的方法包括施用凋亡细胞群体或凋亡细胞上清液或其组合物。在另一实施方案中,所述凋亡细胞群体或凋亡细胞上清液或其组合物可辅助CAR T-细胞疗法。在另一实施方案中,所述凋亡细胞群体或凋亡细胞上清液或其组合物可辅助抑制或减少CRS或细胞因子风暴的发生率。在另一实施方案中,所述凋亡细胞群体或凋亡细胞上清液或其组合物可辅助治疗CRS或细胞因子风暴。在另一实施方案中,所述凋亡细胞群体或凋亡细胞上清液或其组合物可辅助预防CRS或细胞因子风暴。在另一实施方案中,所述凋亡细胞群体或凋亡细胞上清液或其组合物可辅助改善CRS或细胞因子风暴。在另一实施方案中,所述凋亡细胞群体或凋亡细胞上清液或其组合物可辅助缓解CRS或细胞因子风暴。

[0107] 在一实施方案中,在经历CAR T-细胞癌症疗法的对象中抑制或减少细胞因子释放综合征(CRS)或细胞因子风暴发生率的方法包括施用额外的药物。在另一实施方案中,所述额外的药物可辅助CAR T-细胞疗法。在一实施方案中,在经历TCR T-细胞癌症疗法的对象中抑制或减少细胞因子释放综合征(CRS)或细胞因子风暴发生率的方法包括施用额外的药物。在另一实施方案中,所述额外的药物可辅助TCR T-细胞疗法。在一实施方案中,在经历树突细胞疗法的对象中抑制或减少细胞因子释放综合征(CRS)或细胞因子风暴发生率的方法包括施用额外的药物。在另一实施方案中,所述额外的药物可辅助树突细胞疗法。在一实施方案中,在经历NK细胞疗法的对象中抑制或减少细胞因子释放综合征(CRS)或细胞因子风暴发生率的方法包括施用额外的药物。在另一实施方案中,所述额外的药物可以辅助NK细胞疗法。

[0108] 在一实施方案中,在经历CAR T-细胞癌症疗法且施用凋亡细胞群体或凋亡细胞上清液或其组合物的对象中抑制或减少细胞因子释放综合征(CRS)或细胞因子风暴发生率的方法,其包括施用额外的药物。在另一实施方案中,所述额外的药物可辅助CAR T-细胞疗法。在另一实施方案中,所述额外的药物可辅助抑制或减少CRS或细胞因子风暴的发生率。在另一实施方案中,所述额外的药物可辅助治疗CRS或细胞因子风暴。在另一实施方案中,所述额外的药物可辅助预防CRS或细胞因子风暴。在另一实施方案中,所述额外的药物可辅

助改善CRS或细胞因子风暴。在另一实施方案中,所述额外的药物可辅助缓解CRS或细胞因子风暴。

[0109] 在一实施方案中,在经历CAR T-细胞癌症疗法的对象中抑制或减少细胞因子释放综合征(CRS)或细胞因子风暴发生率的方法包括施用额外的药物。在另一实施方案中,所述额外的药物可辅助CAR T-细胞疗法。在另一实施方案中,所述额外的药物可辅助抑制或减少CRS或细胞因子风暴的发生率。在另一实施方案中,所述额外的药物可辅助治疗CRS或细胞因子风暴。在另一实施方案中,所述额外的药物可辅助预防CRS或细胞因子风暴。在另一实施方案中,所述额外的药物可辅助改善CRS或细胞因子风暴。在另一实施方案中,所述额外的药物可辅助缓解CRS或细胞因子风暴。

[0110] 在一实施方案中,用于减少有害细胞因子释放的额外的药物包含凋亡细胞或包含所述凋亡细胞的组合物。在另一实施方案中,用于减少有害细胞因子释放的额外的药物包含凋亡细胞上清液或包含所述上清液的组合物。在另一实施方案中,用于减少有害细胞因子释放的额外的药物包含CTLA-4阻断剂。在另一实施方案中,用于减少有害细胞因子释放的额外的药物包含凋亡细胞或凋亡细胞上清液或其组合物,以及CTLA-4阻断剂。在另一实施方案中,用于减少有害细胞因子释放的额外的药物包含 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物。在另一实施方案中,用于减少有害细胞因子释放的额外的药物包含凋亡细胞或凋亡细胞上清液或其组合物,以及 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物。在另一实施方案中,用于减少有害细胞因子释放的额外的药物包含基于碲的化合物。在另一实施方案中,用于减少有害细胞因子释放的额外的药物包含凋亡细胞或凋亡细胞上清液或其组合物,以及基于碲的化合物。在另一实施方案中,用于减少有害细胞因子释放的额外的药物包含免疫调节剂。在另一实施方案中,用于减少有害细胞因子释放的额外的药物包含凋亡细胞或凋亡细胞上清液或其组合物,以及免疫调节剂。在另一实施方案中,用于减少有害细胞因子释放的额外的药物包含Treg细胞。在另一实施方案中,用于减少有害细胞因子释放的额外的药物包含凋亡细胞或凋亡细胞上清液或其组合物,以及Treg细胞。

[0111] 在另一实施方案中,如本文公开的组合物和方法利用CAR T-细胞与一种或多种CTLA-4-阻断剂(如依匹木单抗)的联合疗法。在另一实施方案中,CTLA-4是有助于保持自身耐受性的T-细胞激活的有效抑制剂。在另一实施方案中,在另一实施方案中是抗体的抗CTLA-4阻断剂的施用产生T-细胞激活的净效应。在另一实施方案中,如本文公开的组合物和方法利用包含凋亡细胞、CAR T-细胞以及一种或多种CTLA-4-阻断剂的联合疗法。

[0112] 在另一实施方案中,可以通过如本文公开的组合物和方法治疗、预防、抑制、改善、减少发生率或缓解由CAR T-细胞或NK细胞施用所致的其他毒性,包括B细胞发育不全或肿瘤溶解综合征(TLS)。

[0113] 在一实施方案中,在经历CAR T-细胞癌症疗法的对象中抑制或减少细胞因子释放综合征(CRS)或细胞因子风暴发生率的方法不影响CAR T-细胞疗法的效力。在另一实施方案中,在CAR T-细胞癌症疗法的对象中抑制或减少经历CRS或细胞因子风暴发生率的方法不减少CAR T-细胞疗法的效力超过约5%。在另一实施方案中,在CAR T-细胞癌症疗法的对象中抑制或减少经历CRS或细胞因子风暴发生率的方法不减少CAR T-细胞疗法的效力超过约10%。在另一实施方案中,在CAR T-细胞癌症疗法的对象中抑制或减少经历CRS或细胞因子风暴发生率的方法不减少CAR T-细胞疗法的效力超过约15%。在另一实施方案中,在经

历CAR T-细胞癌症疗法的对象中抑制或减少CRS或细胞因子风暴发生率的方法不减少CAR T-细胞疗法的效力超过约20%。

[0114] 定量细胞毒性的任何适当方法可被用来确定修饰以表达CAR的免疫细胞中的活性是否保持基本上不变。例如,可以利用基于细胞培养的测定(如实施例中描述的细胞毒性测定)定量细胞毒性。细胞毒性测定可采用优先染色死细胞DNA的染料。在其他情况下,可使用测量细胞群体中活细胞和死细胞的相对数量的荧光和发光测定。对于这类测定,蛋白酶活性用作细胞生存力和细胞毒性的标志物,并且标记的细胞透性肽产生与样品中的活细胞数量成比例的荧光信号。各种细胞毒性测定的药物盒可商购自制造商如Promega和Life Technologies。在另一实施方案中,细胞毒性的度量可以是定性的。在另一实施方案中,细胞毒性的度量可以是定量的。在进一步的实施方案中,细胞毒性的度量可以涉及细胞毒性细胞因子表达的变化。

[0115] 在一实施方案中,如本文公开的方法包括可用于克服同种异体供体细胞排斥的额外步骤。在一实施方案中,所述方法包括在施用CAR T-细胞之前完全或部分淋巴细胞耗竭(lymphodepletion)的步骤,其在一实施方案中,所述CAR T-细胞是同种异体CAR T-细胞。在另一实施方案中,调整淋巴细胞耗竭,从而其延迟宿主抗移植物反应一段时间,足以允许所述同种异体T-细胞攻击它们针对的肿瘤,但达到不足以需要通过骨髓移植拯救宿主免疫系统的程度。在另一实施方案中,延迟同种异体T-细胞从淋巴结退出的药物如2-氨基-2-[2-(4-辛基苯基)乙基]丙烷-1,3-二醇(FTY720)、5-[4-苯基-5-(三氟甲基)噻吩-2-基]-3-[3-(三氟甲基)苯基-1]1,2,4-噁二唑(SEW2871)、3-(2-(-己基苯基氨基)-2-氧代乙基氨基)丙酸(W123)、2-铵基-4-(2-氯-4-(3-苯氧基苯基硫代)苯基)-2-(羟基甲基)丁-基磷酸氢盐(KRP-203磷酸盐)或本领域已知的其他药物可以用作如本文公开的组合物和方法的部分以允许使用具有效力且缺乏引发移植物对抗宿主疾病的同种异体CAR T-细胞。在一实施方案中,将同种异体T-细胞的MHC表达沉默以减少同种异体细胞的排斥。在另一实施方案中,所述凋亡细胞预防同种异体细胞的排斥。

[0116] 与CAR T-细胞疗法相关的细胞因子释放

[0117] 在一实施方案中,细胞因子释放发生在施用免疫疗法如CAR T-细胞疗法之后几天至2周。在一实施方案中,低血压和其他症状在细胞因子释放之后,即几天至几周。因此,在一实施方案中,在免疫疗法同时向对象施用凋亡细胞或凋亡细胞上清液作为预防。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后2-3天向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后7天向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后10天向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后14天向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后2-14天向对象施用凋亡细胞或上清液。

[0118] 在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后2-3小时向对象施用凋亡细胞或凋亡细胞上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后7小时向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后10小时向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后14小时向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后2-14小时向对象施用凋亡细胞或上清液。

[0119] 在一替代实施方案中,在免疫疗法之前向对象施用凋亡细胞或凋亡细胞上清液作

为预防。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之前1天向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之前2-3天向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之前7天向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之前10天向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之前14天向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之前2-14天向对象施用凋亡细胞或上清液。

[0120] 在另一实施方案中,在施用免疫疗法之前2-3小时向对象施用凋亡细胞或凋亡细胞上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之前7小时向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之前10小时向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之前14小时向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之前2-14小时向对象施用凋亡细胞或上清液。

[0121] 在另一实施方案中,一旦细胞因子释放综合征已发生,可以治疗性施用凋亡细胞或凋亡细胞上清液。在一实施方案中,一旦细胞因子释放导致或证明检测到细胞因子释放综合征开始,可以施用凋亡细胞或上清液。在一实施方案中,凋亡细胞或上清液可终止升高的细胞因子水平或细胞因子释放综合征,并且避免其后遗症。

[0122] 在另一实施方案中,可以在多个时间点治疗性施用凋亡细胞或凋亡细胞上清液。在另一实施方案中,凋亡细胞或凋亡细胞上清液的施用在本文描述的至少两个时间点。在另一实施方案中,凋亡细胞或凋亡细胞上清液的施用在本文描述的至少三个时间点。在另一实施方案中,凋亡细胞或凋亡细胞上清液的施用在CRS或细胞因子风暴之前、一旦细胞因子释放综合征已发生以及它们的任何组合。

[0123] 在一实施方案中,将表达嵌合抗原受体T-细胞(CAR T-细胞)疗法以及凋亡细胞疗法或上清液一起施用。在另一实施方案中,在凋亡细胞疗法或上清液之后施用CAR T-细胞疗法。在另一实施方案中,在凋亡细胞疗法或上清液之前施用CAR T-细胞疗法。根据这个方面和在一实施方案中,在CAR T-细胞疗法之后约2-3周施用凋亡细胞疗法或上清液。在另一实施方案中,在CAR T-细胞疗法之后约6-7周施用凋亡细胞疗法或上清液。在另一实施方案中,在CAR T-细胞疗法之后约9周施用凋亡细胞疗法或上清液。在另一实施方案中,在CAR T-细胞疗法之后长达几个月施用凋亡细胞疗法。

[0124] 因此,在一实施方案中,在免疫疗法同时向对象施用凋亡细胞或凋亡细胞上清液作为预防。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后2-3天向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后7天向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后10天向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后14天向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后2-14天向对象施用凋亡细胞或上清液。

[0125] 在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后2-3小时向对象施用凋亡细胞或凋亡细胞上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后7小时向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后10小时向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后14小时向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后2-14小时向对象施用凋亡细胞或上清液。

[0126] 在一替代实施方案中,在免疫疗法之前向对象施用凋亡细胞或凋亡细胞上清液作

为预防。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之前1天向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之前2-3天向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之前7天向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之前10天向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之前14天向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之前2-14天向对象施用凋亡细胞或上清液。

[0127] 在另一实施方案中,在施用免疫疗法之前2-3小时向对象施用凋亡细胞或凋亡细胞上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之前7小时向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之前10小时向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之前14小时向对象施用凋亡细胞或上清液。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之前2-14小时向对象施用凋亡细胞或上清液。

[0128] 在另一实施方案中,一旦细胞因子释放综合征已发生,可以治疗性施用凋亡细胞或凋亡细胞上清液。在一实施方案中,一旦细胞因子释放导致或证明检测到细胞因子释放综合征开始,可以施用凋亡细胞或上清液。在一实施方案中,凋亡细胞或上清液可以终止升高的细胞因子水平或细胞因子释放综合征,并且避免其后遗症。

[0129] 在另一实施方案中,可在多个时间点治疗性施用凋亡细胞或凋亡细胞上清液。在另一实施方案中,凋亡细胞或凋亡细胞上清液的施用在本文描述的至少两个时间点。在另一实施方案中,凋亡细胞或凋亡细胞上清液的施用在本文描述的至少三个时间点。在另一实施方案中,凋亡细胞或凋亡细胞上清液的施用在CRS或细胞因子风暴之前、一旦细胞因子释放综合征已发生以及它们的任何组合。

[0130] 在一实施方案中,将表达嵌合抗原受体T-细胞(CAR T-细胞)疗法以及凋亡细胞疗法或上清液一起施用。在另一实施方案中,在凋亡细胞疗法或上清液之后施用CAR T-细胞疗法。在另一实施方案中,在凋亡细胞疗法或上清液之前施用CAR T-细胞疗法。根据这个方面和在一实施方案中,在CAR T-细胞疗法之后约2-3周施用凋亡细胞疗法或上清液。在另一实施方案中,在CAR T-细胞疗法之后约6-7周施用凋亡细胞疗法或上清液。在另一实施方案中,在CAR T-细胞疗法之后约9周施用凋亡细胞疗法或上清液。在另一实施方案中,在CAR T-细胞疗法之后长达几个月施用凋亡细胞疗法。

[0131] 在其他实施方案中,在免疫疗法同时向对象施用额外的药物作为预防。在一实施方案中,所述额外的药物包含凋亡细胞、凋亡上清液、CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于砷的化合物或免疫调节化合物,或者它们的任何组合。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后2-3天向对象施用所述额外的药物。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后7天向对象施用所述额外的药物。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后10天向对象施用所述额外的药物。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后14天向对象施用所述额外的药物。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后2-14天向对象施用所述额外的药物。

[0132] 在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后2-3小时向对象施用所述额外的药物。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后7小时向对象施用所述额外的药物。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后10小时向对象施用所述额外的药物。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后14小时向对象施用所述额外的药物。在另一实施方案中,在施用免疫疗法之后

CAR T-细胞疗法。

[0140] 在一实施方案中,凋亡细胞对所述对象是异源的。在一实施方案中,凋亡细胞源自一个或多个供体。在一实施方案中,凋亡细胞源自一个或多个骨髓供体。在另一实施方案中,凋亡细胞源自一个或多个血库捐赠。在一实施方案中,所述供体是匹配的供体。在另一实施方案中,凋亡细胞来自不匹配的第三方供体。在一实施方案中,凋亡细胞是通用的同种异体凋亡细胞。在另一实施方案中,凋亡细胞来自同基因供体。在另一实施方案中,凋亡细胞来自汇集的第三方供体细胞。在一实施方案中,所述供体是骨髓供体。在另一实施方案中,所述供体是血库供体。在另一实施方案中,凋亡细胞对所述对象是自体的。在这个实施方案中,使用患者自己的细胞。

[0141] 根据一些实施方案,向所述对象全身性施用本文公开的治疗性富集的单核细胞制品或凋亡细胞上清液。在另一实施方案中,施用是通过静脉内途径。或者,可根据各种其他途径向所述对象施用治疗性富集的单核细胞或上清液,包括但不限于肠胃外、腹腔内、关节内、肌肉内和皮下途径。每种可能性代表如本文公开的单独实施方案。

[0142] 根据一些实施方案,向所述对象全身性施用本文公开的治疗性富集的单核细胞制品或额外的药物。在另一实施方案中,施用是通过静脉内途径。或者,可以根据各种其他途径向所述对象施用治疗性富集的单核细胞或额外的药物,包括但不限于肠胃外、腹腔内、关节内、肌肉内和皮下途径。每种可能性代表如本文公开的单独实施方案。

[0143] 在一实施方案中,以局部而不是全身性方式施用所述制品,例如,通过将所述制品直接注射入患者身体的特定区域。在另一实施方案中,特定区域包含肿瘤或癌症。

[0144] 在另一实施方案中,将治疗性富集的单核细胞或上清液悬浮于合适的生理缓冲液中向所述对象施用,例如但不限于盐水溶液、PBS、HBSS等。此外,悬浮介质可以进一步包含有助于保持细胞生存力的补充物。在另一实施方案中,将所述额外的制剂悬浮于合适的生理缓冲液中向所述对象施用,例如但不限于盐水溶液、PBS、HBSS等。

[0145] 根据一些实施方案,所述药物组合物静脉内施用。根据另一实施方案,所述药物组合物以单一剂量施用。根据可选的实施方案,所述药物组合物以多剂量施用。根据另一实施方案,所述药物组合物以两个剂量施用。根据另一实施方案,所述药物组合物以三个剂量施用。根据另一实施方案,所述药物组合物以四个剂量施用。根据另一实施方案,所述药物组合物以五个或更多个剂量施用。根据一些实施方案,配制所述药物组合物用于静脉内注射。

[0146] 在一实施方案中,向对象提供修饰的CAR表达免疫细胞的任何适当的方法均可被用于本文描述的方法。在一实施方案中,向对象提供细胞的方法包括造血细胞移植(HCT)、将供体衍生的NK细胞输入癌症患者或它们的组合。

[0147] 在另一实施方案中,本文公开了在接受表达嵌合抗原受体T-细胞(CAR T-细胞)疗法的对象中抑制或减少细胞因子释放综合征或细胞因子风暴发生率的方法,所述方法包括向所述对象施用包含凋亡细胞的组合物的步骤。

[0148] 在另一实施方案中,本文公开了一种在接受表达嵌合抗原受体T-细胞(CAR T-细胞)疗法的对象中抑制或减少细胞因子释放综合征或细胞因子风暴发生率的方法,所述方法包括向所述对象施用凋亡细胞上清液(如凋亡细胞-吞噬细胞上清液)的步骤。

[0149] 在另一实施方案中,本文公开了在接受表达嵌合抗原受体T-细胞(CAR T-细胞)疗法的对象中抑制或减少细胞因子释放综合征或细胞因子风暴发生率的方法,所述方法包括

向所述对象施用至少一种额外的药物的步骤。

[0150] 在某些实施方案中, CAR T-细胞疗法包括施用本文公开的包含CAR T-细胞以及凋亡细胞或凋亡细胞上清液的组合物, 或者另一种如本文公开的额外的药物或如本文公开的额外的药物的组合。在替代实施方案中, CAR T-细胞疗法包括施用本文公开的包含CAR T-细胞的组合物以及包含凋亡细胞或凋亡细胞上清液的组合物, 或者如本文公开的额外的药物或其组合。与非CAR T-细胞应用相关的细胞因子释放

[0151] 在一实施方案中, 本文公开了一种在经历细胞因子释放综合征或细胞因子风暴或者易受细胞因子释放综合征或细胞因子风暴影响的对象中减少或抑制细胞因子产生的方法, 所述方法包括向所述对象施用包含凋亡细胞或凋亡上清液的组合物的步骤, 其中所述施用减少或抑制所述对象中的细胞因子产生。在另一实施方案中, 细胞因子产生的减少或抑制是与经历细胞因子释放综合征或细胞因子风暴或者易受细胞因子释放综合征或细胞因子风暴影响且未施用凋亡细胞或凋亡上清液的对象进行比较。在另一实施方案中, 减少或抑制细胞因子产生的方法减少或抑制促炎细胞因子产生。在另一实施方案中, 减少或抑制细胞因子产生的方法减少或抑制至少一种促炎细胞因子的产生。在另一实施方案中, 减少或抑制细胞因子产生的方法减少或抑制至少细胞因子IL-6的产生。在另一实施方案中, 减少或抑制细胞因子产生的方法减少或抑制至少细胞因子IL-1 β 的产生。在另一实施方案中, 减少或抑制细胞因子产生的方法减少或抑制至少细胞因子TNF- α 的产生。在另一实施方案中, 本文公开的减少或抑制细胞因子产生的方法导致所述对象中与经历细胞因子释放综合征或细胞因子风暴或者易受细胞因子释放综合征或细胞因子风暴影响且未施用凋亡细胞或凋亡上清液的对象相比细胞因子IL-6、IL-1 β 或TNF- α 的产生减少或受到抑制。

[0152] 癌症或肿瘤还可影响包括促炎细胞因子在内的细胞因子的绝对水平。对象中肿瘤负荷的水平可影响细胞因子特别是促炎细胞因子的水平。技术人员会理解短语“减少或抑制”或其语法变体可涵盖细胞因子产生的倍数减少或抑制, 或者细胞因子产生的净减少或抑制, 或者百分比(%)减少或抑制, 或者可涵盖细胞因子产生的减少或抑制的变化率。

[0153] 在另一实施方案中, 本文公开了一种在经历细胞因子释放综合征或细胞因子风暴或者易受细胞因子释放综合征或细胞因子风暴影响的对象中减少或抑制细胞因子产生的方法, 所述方法包括向所述对象施用凋亡细胞或包含凋亡细胞的组合物的步骤。

[0154] 在另一实施方案中, 本文公开了一种在经历细胞因子释放综合征或细胞因子风暴或者易受细胞因子释放综合征或细胞因子风暴影响的对象中减少或抑制细胞因子产生的方法, 所述方法包括向所述对象施用凋亡细胞上清液如凋亡细胞-吞噬细胞上清液或包含所述上清液的组合物的步骤。

[0155] 在另一实施方案中, 本文公开了一种在经历细胞因子释放综合征或细胞因子风暴或者易受细胞因子释放综合征或细胞因子风暴影响的对象中减少或抑制细胞因子产生的方法, 所述方法包括向所述对象施用凋亡细胞上清液如选自包含凋亡细胞、凋亡细胞上清液、CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于碲的化合物或免疫调节剂的组或者它们的任何组合的额外的药物, 或者包含所述上清液的组合物的步骤。

[0156] 在一实施方案中, 感染引起对象中的细胞因子释放综合征或细胞因子风暴。在一实施方案中, 所述感染是流感感染。在一实施方案中, 所述流感感染是H1N1。在另一实施方案中, 所述流感感染是H5N1禽流感。在另一实施方案中, 所述感染是严重急性呼吸道综合征

(SARS)。在另一实施方案中,所述对象患有埃巴病毒相关的嗜血淋巴组织细胞增生症(HLH)。在另一实施方案中,所述感染是败血症。在一实施方案中,所述败血症是革兰氏阴性的。在另一实施方案中,所述感染是疟疾。在另一实施方案中,所述感染是埃博拉病毒感染。在另一实施方案中,所述感染是天花病毒。在另一实施方案中,所述感染是全身性革兰氏阴性细菌感染。在另一实施方案中,所述感染是Jarisch-Herxheimer综合征。

[0157] 在一实施方案中,对象中细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的原因是嗜血淋巴组织细胞增生症(HLH)。在另一实施方案中,HLH是散发性HLH。在另一实施方案中,HLH是巨噬细胞活化综合征(MAS)。在另一实施方案中,对象中细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的原因是MAS。

[0158] 在一实施方案中,对象中细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的原因是慢性关节炎。在另一实施方案中,对象中细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的原因是全身型幼年特发性关节炎(sJIA),也称作斯蒂尔病。

[0159] 在一实施方案中,对象中细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的原因是Cryopyrin相关周期性综合征(CAPS)。在另一实施方案中,CAPS包括家族性寒冷自身炎症综合征(FCAS),也称作家族性寒冷性荨麻疹(FCU)。在另一实施方案中,CAPS包括Muckle-Well综合征(MWS)。在另一实施方案中,CAPS包括慢性婴幼儿神经皮肤和关节(CINCA)综合征。在另一实施方案中,CAPS包括FCAS、FCU、MWS或CINCA综合征,或者它们的任何组合。在另一实施方案中,对象中细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的原因是FCAS。在另一实施方案中,对象中细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的原因是FCU。在另一实施方案中,对象中细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的原因是MWS。在另一实施方案中,对象中细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的原因是CINCA综合征。在另一实施方案中,对象中细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的原因是FCAS、FCU、MWS或CINCA综合征,或者它们的任何组合。

[0160] 在另一实施方案中,对象中细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的原因是cryopyrinopathy,包括也称作CIAS1基因的NLRP3基因中的继承或从头获得的功能突变。

[0161] 在一实施方案中,对象中细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的原因是遗传性自身炎症性疾病。

[0162] 在一实施方案中,炎性细胞因子释放的触发器是脂多糖(LPS)、革兰氏阳性毒素、真菌毒性、糖基磷脂酰肌醇(GPI)或RIG-1基因表达的调节。

[0163] 在另一实施方案中,经历细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的对象没有传染性疾病。在一实施方案中,所述对象患有急性胰腺炎。在另一实施方案中,所述对象患有组织损伤,其在一实施方案中是严重烧伤或外伤。在另一实施方案中,所述对象患有急性呼吸窘迫综合征。在另一实施方案中,所述对象患有继发于药物使用的细胞因子释放综合征或细胞因子风暴。在另一实施方案中,所述对象患有继发于毒素吸入的细胞因子释放综合征或细胞因子风暴。

[0164] 在另一实施方案中,所述对象患有继发于接受免疫疗法的细胞因子释放综合征或细胞因子风暴,其在一实施方案中所述免疫疗法是用superagonistic CD28特异性单克隆抗体(CD28SA)的免疫疗法。在另一实施方案中,所述CD28SA是TGN1412。在另一实施方案中,所述免疫疗法是CAR T-细胞疗法。在另一实施方案中,所述免疫疗法是树突细胞疗法。

[0165] 在另一实施方案中,凋亡细胞或上清液或CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段

或其类似物、基于铈的化合物或免疫调节剂,或者它们的任何组合可以用来控制施用药物组合物所致的细胞因子释放综合征或细胞因子风暴。在一实施方案中,所述药物组合物是奥沙利铂、阿糖胞苷、来那度胺或它们的组合。

[0166] 在另一实施方案中,凋亡细胞或上清液或CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于铈的化合物或免疫调节剂,或者它们的任何组合可以用来控制施用抗体所致的细胞因子释放综合征或细胞因子风暴。在一实施方案中,所述抗体是单克隆的。在另一实施方案中,所述抗体是多克隆的。在一实施方案中,所述抗体是利妥昔单抗。在另一实施方案中,所述抗体是Orthoclone OKT3(莫罗单抗-CD3)。在另一实施方案中,所述抗体是阿伦珠单抗、tosituzumab、CP-870,893、L0-CD2a/BTI-322或TGN1412。

[0167] 在另一实施方案中,控制炎性细胞因子产生可以是有益的疾病的实例包括癌症、过敏、任何类型的感染、中毒性休克综合征、败血症、任何类型的自身免疫性疾病、关节炎、克罗恩病、狼疮、银屑病或者标志性特征是在对象中造成有害影响的毒性细胞因子释放的任何其他疾病。

[0168] T-细胞受体 (TCR)

[0169] 在另一实施方案中,如本文公开的组合物和方法利用凋亡细胞或凋亡细胞上清液、或CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于铈的化合物或免疫调节剂、或者它们的任何组合以及除CAR T-细胞之外还有设计师T-细胞受体或代替CAR T-细胞的设计师T-细胞受体的联合疗法。在一实施方案中,TCR疗法包括将所关注的蛋白质的表位特异性的T-细胞受体 (TCR) 引入T-细胞。在另一实施方案中,所关注的蛋白质是肿瘤相关抗原。在另一实施方案中,遗传工程化的TCR识别肿瘤细胞上主要组织相容性复合物 (MHC) 呈递的肿瘤抗原表位加上T-细胞激活结构域。在另一实施方案中,T-细胞受体识别抗原无关它们的胞内或膜定位。在另一实施方案中,TCR识别胞内表达肿瘤相关抗原的肿瘤细胞。在一实施方案中,TCR识别内部抗原。各种遗传修饰的T-细胞受体和它们的制备方法是本领域已知的。

[0170] 在一实施方案中,TCR疗法用来治疗、预防、抑制、改善、减少发生率或缓解晚期转移性疾病,包括具有血液(淋巴瘤和白血病)和实体瘤(难治性黑素瘤、肉瘤)的那些。在另一实施方案中,将T-细胞受体遗传修饰以结合NY-ESO-1表位,并且TCR-工程化的T-细胞是抗NY-ESO-1。在另一实施方案中,将T-细胞受体遗传修饰以结合HPV-16E6表位,并且TCR-工程化的T-细胞是抗HPV-16E6。在另一实施方案中,将T-细胞受体遗传修饰以结合HPV-16E7表位,并且TCR-工程化的T-细胞是抗HPV-16E7。在另一实施方案中,将T-细胞受体遗传修饰以结合MAGE A3/A6表位,并且TCR-工程化的T-细胞是抗MAGE A3/A6。在另一实施方案中,将T-细胞受体遗传修饰以结合MAGE A3表位,并且TCR-工程化的T-细胞是抗MAGE A3。在另一实施方案中,将T-细胞受体遗传修饰以结合SSX2表位,并且TCR-工程化的T-细胞是抗SSX2。

[0171] 在一实施方案中,如本文公开的组合物和方法中使用的TCR疗法治疗Sadelain等人, (ibid) 的表1中列出的恶性肿瘤。

[0172] 树突细胞

[0173] 在另一实施方案中,凋亡细胞或凋亡上清液或CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于铈的化合物或免疫调节剂,或者它们的任何组合可用来增加用树突细胞的免疫疗法的安全性。在一实施方案中,树突细胞 (DC) 是哺乳动物免疫系统的抗原产

生和呈递细胞,其加工抗原材料并在细胞表面上呈递至免疫系统的T-细胞,从而能够使T-细胞对新抗原和回忆抗原(recall antigen)敏感。在另一实施方案中,DC是最有效的抗原产生细胞,充当先天和适应性免疫系统之间的信使。在一实施方案中,DC细胞可用来通过产生攻击和裂解肿瘤的效应细胞来准备好特异性抗肿瘤免疫。

[0174] 树突细胞存在于与外部环境接触的那些组织中,如皮肤(有称作朗格汉斯细胞的特化树突细胞类型)和鼻的内层、肺、胃和肠。还可以发现它们在血液中处于未成熟状态。一旦激活,它们迁移至淋巴结,在那里它们与T-细胞和B细胞接触以启动和形成适应性免疫应答。在某些发育阶段,它们长出分支的突起,赋予细胞名称的树突。可以将树突细胞工程化以表达特定肿瘤抗原。

[0175] T-细胞激活需要的3个信号是:(i)在自身MHC分子中呈递同源抗原;(ii)通过膜结合的受体-配体对共刺激;以及(iii)确保免疫应答的直接极化的可溶性因子。树突细胞(DC)能够提供T-细胞激活需要的所有3个信号,使得它们成为优秀的癌症疫苗平台。

[0176] 因此,在另一实施方案中,本文公开了一种组合物,其包含树突细胞以及凋亡细胞或凋亡上清液或CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于碲的化合物或免疫调节剂,或者它们的任何组合。

[0177] 在另一实施方案中,本文公开了一种在接受树突细胞疗法的对象中抑制或减少细胞因子释放综合征或细胞因子风暴发生率的方法,所述方法包括向所述对象施用组合物的步骤,所述组合物包含凋亡细胞或凋亡细胞上清液或CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于碲的化合物或免疫调节剂,或者它们的任何组合。在另一实施方案中,一种治疗在接受树突细胞疗法的对象中的细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的方法包括向所述对象施用组合物的步骤,所述组合物包含凋亡细胞或凋亡细胞上清液或CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于碲的化合物或免疫调节剂,或者它们的任何组合。在另一实施方案中,一种在接受树突细胞疗法的对象中预防细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的方法包括向所述对象施用组合物的步骤,所述组合物包含凋亡细胞或凋亡细胞上清液或CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于碲的化合物或免疫调节剂,或者它们的任何组合。在另一实施方案中,一种在接受树突细胞疗法的对象中改善细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的方法包括向所述对象施用组合物的步骤,所述组合物包含凋亡细胞或凋亡细胞上清液或CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于碲的化合物或免疫调节剂,或者它们的任何组合。在另一实施方案中,一种在接受树突细胞疗法的对象中缓解细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的方法包括向所述对象施用组合物的步骤,所述组合物包含凋亡细胞或凋亡细胞上清液或CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于碲的化合物或免疫调节剂,或者它们的任何组合。

[0178] 在一实施方案中,本文公开了一种包含树突细胞和额外的药物的组合物,其中所述额外的药物包含凋亡细胞、凋亡上清液、CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于碲的化合物或免疫调节剂,或者它们的任何组合。

[0179] 在另一实施方案中,本文公开了一种在经历细胞因子释放综合征或细胞因子风暴或者易受细胞因子释放综合征或细胞因子风暴影响的对象中抑制或减少细胞因子产生的方法,所述方法包括向所述对象施用组合物的步骤,所述组合物包含凋亡细胞或凋亡细胞上清液或CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于碲的化合物或免疫调节

剂,或者它们的任何组合。

[0180] 在另一实施方案中,本文公开了一种抑制或减少自身免疫毒性发生率的方法,所述方法包括向所述对象施用组合物的步骤,所述组合物包含凋亡细胞或凋亡细胞群体、或者凋亡细胞上清液或其组合物或CTLA-4阻断剂、 α -1-抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于砷的化合物或免疫调节剂,或者它们的任何组合。

[0181] α -1-抗胰蛋白酶(AAT)

[0182] α -1-抗胰蛋白酶(AAT)是主要由肝产生的循环52-kDa糖蛋白。AAT主要被认知为丝氨酸蛋白酶抑制剂,并且由基因SERPINA1编码。AAT抑制嗜中性粒细胞弹性蛋白酶,并且循环AAT中的遗传缺陷导致肺组织恶化和肝疾病。健康对象中的血清AAT浓度在炎症期间增加2倍。

[0183] AAT水平和几种炎症疾病的严重程度之间有负关联。例如,在患有HIV感染、糖尿病、丙型肝炎感染诱导的慢性肝疾病和几种类型的脉管炎的患者中已描述AAT的水平或活性降低。

[0184] 越来越多的证据证实人血清衍生的 α -1-抗胰蛋白酶(AAT)减少促炎细胞因子的产生,诱导抗炎细胞因子,并且干扰树突细胞的成熟。

[0185] 实际上,将AAT添加至人外周血单个核细胞(PBMC)抑制LPS诱导的TNF- α 和IL-1 β 释放,但是增加IL-1受体拮抗剂(IL-1Ra)和IL-10产生。

[0186] AAT减少体外IL-1 β 介导的胰岛毒性,并且AAT单一疗法延长胰岛同种移植存活率,促进小鼠中的抗原特异性免疫耐受,以及延缓非肥胖型糖尿病(NOD)小鼠中糖尿病的发展。据显示AAT抑制实验模型中LPS诱导的急性肺损伤。最近,据显示AAT减少急性心肌缺血-再灌注损伤的小鼠模型中梗死的面积和心力衰竭的严重程度。

[0187] 用临床等级人AAT(hAAT)的单一疗法减少循环促炎细胞因子,降低移植物对抗宿主疾病(GvHD)严重程度,并且延长实验性同种异体骨髓转移之后的动物存活(Tawara等人, Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jan 10; 109(2):564-9),通过援引加入本文。AAT治疗减少同种异体反应性T效应细胞的扩张但增强T调节性T-细胞(Treg)的恢复,因此改变供体T效应子与T调节性细胞的比例,有利于减少病理过程。在体外,AAT抑制LPS诱导的体外促炎细胞因子(如TNF- α 和IL-1 β)的分泌,增强抗炎细胞因子IL-10的产生,并且损害宿主树突细胞中的NF- κ B易位。通过援引加入本文的Marcondes, Blood. 2014 (Oct 30; 124(18):2881-91)显示用AAT治疗不仅改善GvHD,而且还保留可能甚至增强移植物对抗白血病(GVL)效应。

[0188] 在一实施方案中,本文公开了包含表达嵌合抗原受体T-细胞(CAR T-细胞)和 α -1-抗胰蛋白酶(AAT)的组合物。在另一实施方案中,CAR T-细胞和 α -1-抗胰蛋白酶(AAT)在不同组合物中。在另一实施方案中,AAT包含全长AAT或其功能性片段。在另一实施方案中,AA包含全长AAT的类似物或其功能性片段。在另一实施方案中,包含AAT的组合物进一步包含凋亡细胞或凋亡细胞上清液。

[0189] 在另一实施方案中,本文公开了一种在接受表达嵌合抗原受体T-细胞(CAR T-细胞)疗法的对象中抑制或减少细胞因子释放综合征或细胞因子风暴发生率的方法,所述方法包括向所述对象施用包含 α -1-抗胰蛋白酶(AAT)的组合物的步骤。在另一实施方案中,一种在接受表达嵌合抗原受体T-细胞(CAR T-细胞)疗法的对象中治疗细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的方法,包括向所述对象施用包含 α -1-抗胰蛋白酶(AAT)的组合物的步骤。

在另一实施方案中,一种在接受表达嵌合抗原受体T-细胞(CAR T-细胞)疗法的对象中预防细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的方法,包括向所述对象施用包含 α -1-抗胰蛋白酶(AAT)的组合物的步骤。在另一实施方案中,一种在接受表达嵌合抗原受体T-细胞(CAR T-细胞)疗法的对象中改善细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的方法,包括向所述对象施用包含 α -1-抗胰蛋白酶(AAT)的组合物的步骤。在另一实施方案中,一种在接受表达嵌合抗原受体T-细胞(CAR T-细胞)疗法的对象中缓解细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的方法,包括向所述对象施用包含 α -1-抗胰蛋白酶(AAT)的组合物的步骤。

[0190] 在另一实施方案中,本文公开了一种在经历细胞因子释放综合征或细胞因子风暴或者易受细胞因子释放综合征或细胞因子风暴影响的对象中减少或抑制细胞因子产生的方法,所述方法包括向所述对象施用包含 α -1-抗胰蛋白酶(AAT)的组合物的步骤。

[0191] 在一实施方案中,将AAT单独施用以控制细胞因子释放。在另一实施方案中,施用AAT以及凋亡细胞或其组合物,或者凋亡细胞上清液或其组合物以控制细胞因子释放。

[0192] 免疫调节剂

[0193] 技术人员会理解免疫调节剂可涵盖胞外介质、受体、胞内信号传导途径的介质以及翻译和转录的调节物。在一实施方案中,本文公开的额外的药物是本领域已知的免疫调节剂。在另一实施方案中,在本文公开的方法中使用免疫调节剂降低至少一种细胞因子的水平。在另一实施方案中,在本文公开的方法中使用免疫调节剂减少或抑制CRS或细胞因子风暴。

[0194] 在一实施方案中,免疫调节剂包含阻断、抑制或减少细胞因子或趋化因子释放的化合物。在另一实施方案中,免疫调节剂包含阻断、抑制或减少IL-21或IL-23或者它们的组合的释放的化合物。在另一实施方案中,免疫调节剂包含趋化因子受体-5(CCR5)受体拮抗剂类别中的抗逆转录病毒药物,例如马拉韦罗。在另一实施方案中,免疫调节剂包含抗DNAM-1抗体。在另一实施方案中,免疫调节剂包含选自包含硫酸肝素、ATP和尿酸的组或者它们的任何组合的损伤/病原体相关分子(DAMP/PAMP)。在另一实施方案中,免疫调节剂包含唾液酸结合Ig样凝集素(Siglecs)。在另一实施方案中,免疫调节剂包含细胞耐受介质,例如调节性CD4⁺CD25⁺T细胞(Tregs)或不变的自然杀伤T细胞(iNK T-细胞)。在另一实施方案中,免疫调节剂包含选自包含鲁索替尼(ruxolitinib)和托法替尼的组的JAK2或JAK3抑制剂。在另一实施方案中,免疫调节剂包含脾酪氨酸激酶(Syk)的抑制剂,例如fostamatinib。在另一实施方案中,免疫调节剂包含组蛋白脱乙酰酶抑制剂伏林司他乙酰化STAT3。在另一实施方案中,免疫调节剂包含泛素化修饰(neddylation)抑制剂,例如MLN4924。在另一实施方案中,免疫调节剂包含miR-142拮抗剂。在另一实施方案中,免疫调节剂包含胞苷的化学类似物,例如阿扎胞苷。在另一实施方案中,免疫调节剂包含组蛋白脱乙酰酶的抑制剂,例如伏林司他。在另一实施方案中,免疫调节剂包含组蛋白甲基化的抑制剂。

[0195] 基于碲的化合物

[0196] 碲是在人体中发现的痕量元素。各种碲化合物具有免疫调节特性,并且在不同临床前和临床研究中已显示出有益效果。在一实施方案中,本文公开的方法包括施用基于碲的化合物作为额外的药物。

[0197] 在一实施方案中,基于碲的化合物抑制至少一种细胞因子的分泌。在另一实施方案中,

案中,基于碲的化合物减少至少一种细胞因子的分泌。在另一实施方案中,基于碲的化合物抑制或减少细胞因子风暴的细胞因子释放综合征(CRS)。

[0198] 在一实施方案中,本文公开了包含表达嵌合抗原受体T-细胞(CAR T-细胞)和基于碲的化合物的组合物。在另一实施方案中,CAR T-细胞和基于碲的化合物在不同组合物中。在另一实施方案中,AAT包含全长AAT或其功能性片段。在另一实施方案中,AA包含全长AAT的类似物或其功能性片段。

[0199] 在另一实施方案中,本文公开了一种在接受表达嵌合抗原受体T-细胞(CAR T-细胞)疗法的对象中抑制或减少细胞因子释放综合征或细胞因子风暴发生率的方法,所述方法包括向所述对象施用包含基于碲的化合物的组合物的步骤。在另一实施方案中,一种在接受表达嵌合抗原受体T-细胞(CAR T-细胞)疗法的对象中治疗细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的方法,包括向所述对象施用包含基于碲的化合物的组合物的步骤。在另一实施方案中,一种在接受表达嵌合抗原受体T-细胞(CAR T-细胞)疗法的对象中预防细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的方法,包括向所述对象施用包含基于碲的化合物的组合物的步骤。在另一实施方案中,一种在接受表达嵌合抗原受体T-细胞(CAR T-细胞)疗法的对象中改善细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的方法,包括向所述对象施用包含基于碲的化合物的组合物的步骤。在另一实施方案中,一种在接受表达嵌合抗原受体T-细胞(CAR T-细胞)疗法的对象中缓解细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的方法,包括向所述对象施用包含基于碲的化合物的组合物的步骤。

[0200] 在另一实施方案中,本文公开了一种在经历细胞因子释放综合征或细胞因子风暴或者易受细胞因子释放综合征或细胞因子风暴影响的对象中减少或抑制细胞因子产生的方法,所述方法包括向所述对象施用包含基于碲的化合物的组合物的步骤。

[0201] 在一实施方案中,将基于碲的化合物单独施用以控制细胞因子释放。在另一实施方案中,施用基于碲的化合物以及凋亡细胞或其组合物,或者凋亡细胞上清液或其组合物以控制细胞因子释放。

[0202] 遗传修饰

[0203] 在一实施方案中,T-细胞、树突细胞和/或凋亡细胞的遗传修饰可利用RNA、DNA、重组病毒或它们的组合完成。在一实施方案中,如本文公开的组合物和方法中使用衍生自 γ 逆转录病毒或慢病毒的载体。在另一实施方案中,可以将这些载体整合入宿主基因组,转基因可能永久性表达,并且具有低内在免疫原性。在另一实施方案中,整合入宿主基因组和/或具有低内在免疫原性的另一载体可被用于如本文公开的组合物和方法。在另一实施方案中,非病毒载体介导的睡美人转座子系统用来将CAR和其他基因插入T-细胞。在另一实施方案中,将“自杀”基因整合入T-细胞,其中促凋亡基因的表达在对全身递送的药物应答的诱导型启动子的控制下。

[0204] 在一实施方案中,遗传修饰可以是暂时的。在另一实施方案中,遗传修饰可以利用信使RNA(mRNA)。在另一实施方案中,在多个场合下大量细胞可被输入瞬时工程化的T-细胞中,如mRNA转染的T-细胞。在另一实施方案中,在体外转录mRNA使用的基于RNA的淋巴细胞电穿孔介导蛋白质的瞬时表达约一周,并且避免整合病毒载体的风险。在另一实施方案中,mRNA转导的树突细胞或者mRNA电穿孔的T和NK淋巴细胞。

[0205] 已证实遗传修饰的T-细胞可以在过继转移之后坚持十多年而没有不利影响,表明

遗传修饰人T-细胞根本上是安全的。

[0206] 在另一实施方案中,如本文公开的组合物和方法中的遗传修饰可以是本领域已知的任何方法。

[0207] 凋亡细胞

[0208] 在一实施方案中,用于如本文公开的组合物和方法的凋亡细胞(“Apocell”)如WO 2014/087408所述,其通过援引整体加入本文。在另一实施方案中,用于如本文公开的组合物和方法的凋亡细胞以本领域已知的任何方式制备。在另一实施方案中,用于本文公开的组合物和方法的凋亡细胞是接受疗法的对象自体的。在另一实施方案中,用于本文公开的组合物和方法的凋亡细胞与接受疗法的对象是同种异体的。在另一实施方案中,包含凋亡细胞的组合物包含如本文公开或如本领域已知的凋亡细胞。

[0209] 在一实施方案中,凋亡细胞包含细胞制品,所述细胞制品包含富集的单个核细胞,其中所述制品包含至少85%单个核细胞,其中所述制品中至少40%的细胞处于早期凋亡状态中,其中所述制品中至少85%的细胞是活细胞,并且其中所述制品包含不超过15%CD15^高表达细胞。

[0210] 技术人员会理解术语“早期凋亡状态”可涵盖表现出凋亡的早期迹象而没有凋亡的晚期迹象的细胞。细胞中凋亡的早期迹象的实例包括磷脂酰丝氨酸(PS)的暴露和线粒体膜电位的丢失。晚期事件的实例包括碘化丙啶(PI)进入细胞和最终的DNA切割。为了记录细胞处于“早期凋亡”状态中,在一实施方案中,使用通过Annexin-V和PI染色的PS暴露检测,并且认为用Annexin V染色但用PI不染色的细胞是“早期凋亡细胞”。在另一实施方案中,认为通过Annexin-V FITC和PI染色的细胞是“晚期凋亡细胞”。在另一实施方案中,认为Annexin-V或PI不染色的细胞是非凋亡的活细胞。

[0211] 在一实施方案中,凋亡细胞包含处于早期凋亡状态中的细胞。在另一实施方案中,凋亡细胞包含这样的细胞,其中至少90%的所述细胞处于早期凋亡状态中。在另一实施方案中,凋亡细胞包含这样的细胞,其中至少80%的所述细胞处于早期凋亡状态中。在另一实施方案中,凋亡细胞包含这样的细胞,其中至少70%的所述细胞处于早期凋亡状态中。在另一实施方案中,凋亡细胞包含这样的细胞,其中至少60%的所述细胞处于早期凋亡状态中。在另一实施方案中,凋亡细胞包含这样的细胞,其中至少50%的所述细胞处于早期凋亡状态中。

[0212] 在一实施方案中,包含凋亡细胞的组合物进一步包含抗凝剂。

[0213] 在一实施方案中,所述抗凝剂选自由肝素、酸性柠檬酸盐葡萄糖(ACD)配方A和它们的组合组成的组。

[0214] 在一实施方案中,所述组合物进一步包含甲泼尼龙。在一实施方案中,甲泼尼龙的浓度不超过30 μ g/ml。在一实施方案中,施用140X 10⁶-210X10⁶个凋亡细胞。

[0215] 在一实施方案中,以高剂量使用凋亡细胞。在一实施方案中,以高浓度使用凋亡细胞。在一实施方案中,使用人凋亡多形核嗜中性粒细胞(PMN)。在一实施方案中,使用50%是凋亡细胞的一组细胞。在一实施方案中,通过May-Giemsa染色的cytopreps验证凋亡细胞。在一实施方案中,通过台盼蓝拒染法评价细胞的生存力。在一实施方案中,通过膜联蛋白V/碘化丙啶染色用FACS检测证实细胞的凋亡和坏死状态。

[0216] 在一实施方案中,施用10x10⁶个凋亡细胞的剂量。在另一实施方案中,施用10x10⁷

个凋亡细胞的剂量。在另一实施方案中,施用 10×10^8 个凋亡细胞的剂量。在另一实施方案中,施用 10×10^9 个凋亡细胞的剂量。在另一实施方案中,施用 10×10^{10} 个凋亡细胞的剂量。在另一实施方案中,施用 10×10^{11} 个凋亡细胞的剂量。在另一实施方案中,施用 10×10^{12} 个凋亡细胞的剂量。在另一实施方案中,施用 10×10^5 个凋亡细胞的剂量。在另一实施方案中,施用 10×10^4 个凋亡细胞的剂量。在另一实施方案中,施用 10×10^3 个凋亡细胞的剂量。在另一实施方案中,施用 10×10^2 个凋亡细胞的剂量。

[0217] 在一实施方案中,施用高剂量的凋亡细胞。在一实施方案中,施用 35×10^6 个凋亡细胞的剂量。在另一实施方案中,施用 210×10^6 个凋亡细胞的剂量。在另一实施方案中,施用 70×10^6 个凋亡细胞的剂量。在另一实施方案中,施用 140×10^6 个凋亡细胞的剂量。在另一实施方案中,施用 $35-210 \times 10^6$ 个凋亡细胞的剂量。

[0218] 根据一些实施方案,根据本文公开的制备方法获得富集的单核细胞组合物通过白细胞去除术完成。技术人员会理解术语“白细胞去除术”可涵盖其中从供体血液分离白细胞的净化过程。根据一些实施方案,供体的血液接受白细胞去除术,因此根据本文公开的制备方法获得富集的单核细胞组合物。应当注意,如本领域已知的,需要在白细胞去除术中使用至少一种抗凝剂,以防止收集细胞的凝结。

[0219] 根据一些实施方案,配置白细胞去除术过程以允许根据本文公开的制备方法收集富集的单核细胞组合物。根据一些实施方案,通过白细胞去除术获得的细胞集合包含至少65%,在其他实施方案中,至少70%或至少80%单核细胞。每种可能性代表如本文公开的单独实施方案。根据一些实施方案,与根据本文公开的制备方法获得富集的单核细胞组合物平行采集来自细胞供体的血浆。根据一些实施方案,与根据本文公开的制备方法获得富集的单核细胞组合物平行采集约300-600ml来自细胞供体的血浆。根据一些实施方案,与根据本文公开的制备方法获得富集的单核细胞组合物平行采集的血浆用作冷冻和/或温育培养基的部分。每种可能性代表如本文公开的单独实施方案。获得凋亡细胞的富集群体用于如本文公开的组合物和方法的额外的详细方法可以在WO 2014/087408中找到,其通过援引整体加入本文。

[0220] 根据一些实施方案,应当注意到虽然初始富集的单核细胞制品包含至少65%单核细胞、至少70%或至少80%单核细胞,但是本文公开的制备方法之后,本文公开的最终药物组合物包含至少85%单核细胞。在另一实施方案中,至少90%或至少95%单核细胞。每种可能性代表如本文公开的单独实施方案。

[0221] 在一实施方案中,凋亡细胞可以通过本领域已知的任何方法施用,包括但不限于静脉内、皮下、结节内(intranodal)、肿瘤内、鞘内、胸膜内、腹腔内和直接至胸腺。

[0222] 在一实施方案中,所述凋亡细胞是同种异体的。在一实施方案中,所述凋亡细胞来自汇集的第三方供体。在一实施方案中,如本文公开的方法包括在克服同种异体供体细胞排斥中有用的额外步骤,包括美国专利申请20130156794中描述的一个或多个步骤,其通过援引整体加入本文。在一实施方案中,所述方法包括在施用凋亡细胞之前完全或部分淋巴细胞耗竭(lymphodepletion)的步骤,在一实施方案中,所述凋亡细胞是同种异体凋亡细胞。在一实施方案中,调整淋巴细胞耗竭,从而其延迟宿主对抗移植物反应一段时间,足以允许同种异体凋亡细胞控制细胞因子释放。在另一实施方案中,所述方法包括施用延迟同种异体凋亡T-细胞从淋巴结退出的药物的步骤,如2-氨基-2-[2-(4-辛基苯基)乙基]丙烷-

1,3-二醇(FTY720)、5-[4-苯基-5-(三氟甲基)噻吩-2-基]-3-[3-(三氟甲基)苯基-1]1,2,4-噁二唑(SEW2871)、3-(2-(己基苯基氨基)-2-氧代乙基氨基)丙酸(W123)、2-铵基-4-(2-氯-4-(3-苯氧基苯基硫代)苯基)-2-(羟基甲基)丁-基磷酸氢盐(KRP-203磷酸盐)或本领域已知的其他药物,可以用作如本文公开的组合物和方法的部分以允许使用具有效力且缺乏引发移植物对抗宿主疾病的同种异体凋亡细胞。在另一实施方案中,将同种异体凋亡T-细胞的MHC表达沉默以减少同种异体细胞的排斥。

[0223] 在另一实施方案中,所述方法包括在施用至受体之前辐照衍生自WBC的凋亡细胞的步骤,所述WBC来自供体。在一实施方案中,以避免凋亡细胞群体内残余活细胞的增殖和/或激活的方式辐照细胞。在另一实施方案中,辐照的凋亡细胞保留它们所有的早期凋亡、免疫调节、稳定性特性。在另一实施方案中,辐照步骤使用UV辐射。在另一实施方案中,辐射步骤使用 γ 辐射。在另一实施方案中,所述凋亡细胞包含减少的百分比的活的非凋亡细胞,包含具有凋亡细胞制品内存在的任何活的非凋亡细胞的抑制细胞激活的制品,或者包含具有凋亡细胞制品内存在的任何活的非凋亡细胞的增殖减少的制品,或者它们的任何组合。

[0224] 在一实施方案中,汇集的单核凋亡细胞制品包含处于早期凋亡状态的单个核细胞,其中所述汇集的单核凋亡细胞包含减少的百分比的活的非凋亡细胞,具有任何活的非凋亡细胞的抑制细胞激活的制品,或者具有任何活的非凋亡细胞的增殖减少的制品,或者它们的任何组合。在另一实施方案中,汇集的单核凋亡细胞已经过辐照。在另一实施方案中,本文公开了汇集的单核凋亡细胞制品,在一些实施方案中,其源自获得自捐献的血液的白血细胞级分(WBC)。

[0225] 在一实施方案中,所述凋亡细胞制品是辐照的。在另一实施方案中,所述辐照包括 γ 辐照或UV辐照。在另一实施方案中,辐照的制品具有与非辐照的凋亡细胞制品相比减少数量的非凋亡细胞。在另一实施方案中,辐照的制品具有与非辐照的凋亡细胞制品相比减少数量的增殖细胞。在另一实施方案中,辐照的制品具有与非辐照的凋亡细胞群体相比减少数量的潜在免疫活性细胞。

[0226] 在一实施方案中,汇集的血液包含在供体和受体之间不匹配的第三方血液。

[0227] 技术人员会理解术语“汇集”可涵盖采集自多个供体、制备并可能储存供以后使用的血液。这种合并的血液的池然后可被加工以制备汇集的单核凋亡细胞制品。在另一实施方案中,汇集的单核凋亡细胞制品确保现成供应的单核凋亡细胞是可用的。在另一实施方案中,在其中诱导凋亡的温育步骤之前汇集细胞。在另一实施方案中,温育步骤之后在重悬步骤汇集细胞。在另一实施方案中,在辐照步骤之前汇集细胞。在另一实施方案中,在辐照步骤之后汇集细胞。在另一实施方案中,在制备方法中的任何步骤汇集细胞。

[0228] 在一实施方案中,汇集的凋亡细胞制品衍生自约2-25单元的血液中的细胞。在另一实施方案中,所述汇集的凋亡细胞制品包含约2-5、2-10、2-15、2-20、5-10、5-15、5-20、5-25、10-15、10-20、10-25、6-13或6-25单元的血液中的细胞。在另一实施方案中,所述汇集的凋亡细胞制品包含约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25单元的血液中的细胞。需要的血液单元数还取决于从血液WBC回收的效率。例如,低效率WBC回收会导致需要额外的单元,而高效率WBC回收会导致需要较少单元。在一些实施方案中,每个单元是一袋血液。在另一实施方案中,汇集的凋亡细胞制品包含至少25单元的血液、至少50单元的血液或至少100单元的血液中的细胞。每种可能性

代表如本文公开的单独实施方案。

[0229] 在一实施方案中,血液单元包含来自血液捐赠的白血细胞(WBC)级分。在另一实施方案中,捐赠可以来自血液中心或血库。在另一实施方案中,捐赠可以来自在制备汇集的凋亡细胞制品时召集的医院中的供体。在另一实施方案中,包含来自多个供体的WBC的血液单元可保存并维持在为了如本文公开的组合物及其方法的目的建立的独立血库中。在另一实施方案中,为了如本文公开的组合物及其方法的目的开发的血库能够供应包含来自多个供体的WBC的血液蛋白,并且包含白细胞去除术单元。

[0230] 在一实施方案中,汇集的WBC的单元不受HLA匹配限制。因此,所得的汇集的凋亡细胞制品包含不受HLA匹配限制的细胞群体。因此,在某些实施方案中,汇集的单核凋亡细胞制品包含同种异体细胞。

[0231] 衍生自不受HLA匹配限制的汇集的WBC的汇集的单核凋亡细胞制品的优点是WBC的现成来源并减少获得WBC的成本。

[0232] 在一实施方案中,汇集的血液包含来自独立于HLA匹配的多个供体的血液。在另一实施方案中,汇集的血液包含来自多个供体的血液,其中已考虑与受体的HLA匹配。例如,在供体和受体中已匹配1个HLA等位基因、2个HLA等位基因、3个HLA等位基因、4个HLA等位基因、5个HLA等位基因、6个HLA等位基因或7个HLA等位基因。在另一实施方案中,多个供体部分匹配,例如一些供体已HLA匹配,其中在一些供体和受体之间已匹配1个HLA等位基因、2个HLA等位基因、3个HLA等位基因、4个HLA等位基因、5个HLA等位基因、6个HLA等位基因或7个HLA等位基因。每种可能性包含如本文公开的一个实施方案。

[0233] 在某些实施方案中,一些活的非凋亡细胞(抗凋亡的)在下文描述的凋亡诱导步骤之后可以保留。在一实施方案中,在辐照步骤之前观察到这些活的非凋亡细胞的存在。这些活的非凋亡细胞可能能够增殖或被激活。在一实施方案中,衍生自多个供体的汇集的单核凋亡细胞制品可针对宿主被激活、互相激活或两者。

[0234] 在一实施方案中,如本文公开的辐照的细胞制品与非辐照的细胞制品相比具有抑制的细胞激活和减少的增殖。在另一实施方案中,所述辐照包括 γ 辐照或UV辐照。在另一实施方案中,辐照的细胞制品具有与非辐照的细胞制品相比减少数量的非凋亡细胞。在另一实施方案中,所述辐照包含约15格雷单位(Gy)。在另一实施方案中,所述辐照包含约20格雷单位(Gy)。在另一实施方案中,所述辐照包含约25格雷单位(Gy)。在另一实施方案中,所述辐照包含约30格雷单位(Gy)。在另一实施方案中,所述辐照包含约35格雷单位(Gy)。在另一实施方案中,所述辐照包含约40格雷单位(Gy)。在另一实施方案中,所述辐照包含约45格雷单位(Gy)。在另一实施方案中,所述辐照包含约50格雷单位(Gy)。在另一实施方案中,所述辐照包含约55格雷单位(Gy)。在另一实施方案中,所述辐照包含约60格雷单位(Gy)。在另一实施方案中,所述辐照包含约65格雷单位(Gy)。在另一实施方案中,所述辐照包含多达2500Gy。在另一实施方案中,辐照的汇集的凋亡细胞制品保持与非辐照的汇集的凋亡细胞制品相同或相似的凋亡谱、稳定性和效力。

[0235] 在一实施方案中,如本文公开的汇集的单核凋亡细胞制品稳定长达24小时。在另一实施方案中,汇集的单核凋亡细胞制品稳定至少24小时。在另一实施方案中,汇集的单核凋亡细胞制品稳定超过24小时。在另一实施方案中,如本文公开的汇集的单核凋亡细胞制品稳定长达36小时。在另一实施方案中,汇集的单核凋亡细胞制品稳定至少36小时。在进一

步的实施方案中,汇集的单核凋亡细胞制品稳定超过36小时。在另一实施方案中,如本文公开的汇集的单核凋亡细胞制品稳定长达48小时。在另一实施方案中,汇集的单核凋亡细胞制品稳定至少48小时。在另一实施方案中,汇集的单核凋亡细胞制品稳定超过48小时。

[0236] 在一实施方案中,包含辐照步骤的制备汇集的细胞制品的方法保留在其中细胞制备可不包括辐照步骤的衍生自单一匹配供体的凋亡制品中观察到的早期凋亡、免疫调节和稳定性特性。在另一实施方案中,如本文公开的汇集的单核凋亡细胞制品不引发移植物对抗宿主疾病(GVHD)应答。

[0237] 在本领域中认为细胞制品的辐照是安全的。目前常规性地上对捐献的血液进行辐照程序以防止对WBC的反应。

[0238] 在另一实施方案中,如本文公开的汇集的单核凋亡细胞制品中凋亡细胞的百分比接近100%,从而减少所述细胞制品中活的非凋亡细胞的级分。在一实施方案中,凋亡细胞的百分比为至少40%。在另一实施方案中,凋亡细胞的百分比为至少50%。在另一实施方案中,凋亡细胞的百分比为至少60%。在另一实施方案中,凋亡细胞的百分比为至少70%。在另一实施方案中,凋亡细胞的百分比为至少80%。在另一实施方案中,凋亡细胞的百分比为至少90%。在另一实施方案中,凋亡细胞的百分比为至少99%。因此,在一实施方案中,包含减少或不存在级分的活的非凋亡细胞的细胞制品可提供在受体中不引发GVHD的汇集的单核凋亡细胞制品。每种可能性代表如本文公开的一个实施方案。

[0239] 或者,在另一实施方案中,通过特异性去除活细胞群体,例如通过靶向沉淀,减少活的非凋亡WBC的百分比。在另一实施方案中,可以利用结合至磷脂酰丝氨酸的磁珠减少活的非凋亡细胞的百分比。在另一实施方案中,可以利用结合非凋亡细胞而不是凋亡细胞的细胞表面上的标志物的磁珠减少活的非凋亡细胞的百分比。在另一实施方案中,可以利用结合至凋亡细胞而不是非凋亡细胞的细胞表面上的标志物的磁珠选择凋亡细胞进一步制备。在另一实施方案中,通过使用超声减少活的非凋亡WBC的百分比。

[0240] 在一实施方案中,所述凋亡细胞来自汇集的第三方供体。

[0241] 在一实施方案中,汇集的细胞制品包含选自以下组成的组的至少一种细胞类型:淋巴细胞、单核细胞和自然杀伤细胞。在另一实施方案中,汇集的细胞制品包含富集单个核细胞群体。在一实施方案中,汇集的单核是富集单个核细胞制品,包含选自以下组成的组的细胞类型:淋巴细胞、单核细胞和自然杀伤细胞。在另一实施方案中,富集单个核细胞制品包含不超过15%,或者不超过10%,通常不超过5%多形核白细胞,也称作粒细胞(即,嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞)。在另一实施方案中,汇集单个核细胞制品没有粒细胞。每种可能性代表如本文公开的单独实施方案。

[0242] 在另一实施方案中,汇集的富集单个核细胞制品包含不超过15%,或者不超过10%,通常不超过5%CD15^高表达细胞。在一实施方案中,汇集的凋亡细胞制品包含少于15%CD15高表达细胞。每种可能性代表如本文公开的单独实施方案。

[0243] 在一实施方案中,本文公开的汇集的富集单个核细胞制品包含至少80%单个核细胞,至少85%单个核细胞,或者至少90%单个核细胞,或至少95%单个核细胞,其中每种可能性是本文公开的单独实施方案。根据一些实施方案,本文公开的汇集的富集单个核细胞制品包含至少85%单个核细胞。

[0244] 在另一实施方案中,具有至少80%的单个核细胞的最终汇集百分比的任何汇集的

细胞制品认为是如本文公开的汇集的富集的单个核细胞制品。因此,汇集具有增加的多形核细胞(PMN)的细胞制品和具有高单个核细胞的细胞制品至有至少80%单个核细胞的所得“池”包含如本文公开的制品。根据一些实施方案,单个核细胞包含淋巴细胞和单核细胞。

[0245] 技术人员会理解术语“单个核细胞”可涵盖具有一个裂叶核(lobed nucleus)的白细胞。在另一实施方案中,如本文公开的汇集的凋亡细胞制品包含少于5%多形核白细胞。

[0246] 在一实施方案中,所述凋亡细胞是T-细胞。在另一实施方案中,所述凋亡细胞衍生自相同的汇集的第三方供体T-细胞作为CAR T-细胞。在另一实施方案中,所述凋亡细胞衍生自CAR T-细胞群体。

[0247] 令人惊讶的是,所述凋亡细胞减少与细胞因子风暴相关的细胞因子如IL-6的产生。在一实施方案中,所述凋亡细胞影响巨噬细胞和DC中的细胞因子表达水平,但是不影响T-细胞自身中的细胞因子表达水平。因此出乎意料的是,凋亡细胞可用于增强CAR T-细胞疗法或树突细胞疗法。

[0248] 在另一实施方案中,所述凋亡细胞触发T-细胞的死亡,但是不通过细胞因子表达水平的改变。

[0249] 在另一实施方案中,凋亡细胞拮抗巨噬细胞和树突细胞的启动以分泌细胞因子否则放大细胞因子风暴。在另一实施方案中,凋亡细胞增加抑制炎症反应和/或预防细胞因子过量释放的Tregs。

[0250] 在一实施方案中,凋亡细胞的施用抑制一种或多种促炎细胞因子。在一实施方案中,所述促炎细胞因子包含IL-1 β 、IL-6、TNF- α 或IFN- γ ,或者它们的任何组合。在另一实施方案中,凋亡细胞的施用促进一种或多种抗炎细胞因子的分泌。在一实施方案中,所述抗炎细胞因子包含TGF- β 、IL10或PGE2,或者它们的任何组合。

[0251] 在另一实施方案中,凋亡细胞的施用抑制暴露于TLR配体之后的树突细胞成熟。在另一实施方案中,凋亡细胞的施用产生潜在的致耐受性树突细胞,其在一实施方案中能够迁移,并且在另一实施方案中,所述迁移是由于CCR7。在另一实施方案中,凋亡细胞的施用引发各种信号传导事件,在一实施方案中其是TAM受体信号传导(Tyro3、Ax1和Mer),在一实施方案中,其抑制抗原呈递细胞中的炎症。

[0252] 在一实施方案中,Tyro-3、Ax1和Mer构成受体酪氨酸激酶(RTK)的TAM家族,其特征在于激酶结构域内的保守序列和粘附分子样胞外结构域。在另一实施方案中,凋亡细胞的施用通过MerTK激活信号传导。在另一实施方案中,凋亡细胞的施用激活磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/AKT途径,其在一实施方案中负向调节NF- κ B。在另一实施方案中,凋亡细胞的施用负向调节炎症小体,其在一实施方案中导致促炎细胞因子分泌、DC成熟或它们的组合的抑制。在另一实施方案中,凋亡细胞的施用上调抗炎基因如Nr4a、Thbs1或它们的组合的表达。在另一实施方案中,凋亡细胞的施用诱导高水平的AMP,其在一实施方案中以泛连接蛋白1依赖性方式积累。在另一实施方案中,凋亡细胞的施用抑制炎症。

[0253] 凋亡细胞上清液(ApoSup和ApoSup Mon)

[0254] 在一实施方案中,用于如本文公开的方法和治疗的组合物包括如本文公开的凋亡细胞上清液。

[0255] 在一实施方案中,通过一种方法获得凋亡细胞上清液,所述方法包括以下步骤:
(a) 提供凋亡细胞,(b) 培养步骤(a)的凋亡细胞,以及(c)从所述细胞分离上清液。

[0256] 在一实施方案中,用于制备如本文公开的凋亡细胞上清液的凋亡细胞是接受疗法的对象自体的。在另一实施方案中,用于制备如本文公开的凋亡细胞上清液的凋亡细胞与接受疗法的对象是同种异体的。

[0257] 获得凋亡细胞上清液的“凋亡细胞”可以是选自对象的任何细胞类型的细胞,或者任何可商购的细胞系,接受本领域技术人员已知的诱导凋亡的方法。诱导凋亡的方法可以是低氧、臭氧、加热、辐射、化学物质、渗透压、pH改变、X-射线辐照、 γ -射线辐照、UV辐照、血清剥夺、类皮质激素或它们的组合,或者本文描述或本领域已知的任何其他方法。在另一实施方案中,诱导凋亡的方法产生处于早期凋亡状态的凋亡细胞。

[0258] 在一实施方案中,所述凋亡细胞是白细胞。

[0259] 在一实施方案中,所述凋亡白细胞衍生自外周血单个核细胞(PBMC)。在另一实施方案中,凋亡白细胞来自汇集的第三方供体。在另一实施方案中,所述白细胞是同种异体的。

[0260] 根据一实施方案中,通过选择非粘附白细胞并将它们提交至凋亡诱导,然后培养基中的细胞培养步骤,提供凋亡细胞。用来制备凋亡细胞-吞噬细胞上清液的“白细胞”可衍生自免疫系统和/或造血系统的有核细胞的任何谱系或子系,包括但不限于树突细胞、巨噬细胞、*masT*-细胞、嗜碱性粒细胞、造血干细胞、骨髓细胞、自然杀伤细胞等。白细胞可以任何合适的方式衍生或获得自任何合适的解剖区室,根据任何常用方法,取决于应用和目的、期望的白细胞谱系等。在一实施方案中,来源白细胞是原代白细胞(primary leukocyte)。在另一实施方案中,来源白细胞是原代外周血白细胞。

[0261] 原代淋巴细胞和单个核细胞可以方便地衍生自外周血。外周血白细胞包括70-95%淋巴细胞和5-25%单核细胞。

[0262] 从血液获得特定类型的来源白细胞的方法是常规实施的。获得来源淋巴细胞和/或单核细胞可以例如通过在抗凝剂如肝素或柠檬酸盐的存在下收获血液来完成。然后将收获的血液在Ficoll垫上离心以在梯度界面分离淋巴细胞和单核细胞,并且嗜中性粒细胞和红细胞在沉淀中。

[0263] 白细胞可根据它们的特异性表面标志物通过标准免疫磁性选择或免疫荧光流式细胞术技术,或者通过离心淘洗互相分离。例如,单核细胞可被选择为CD14⁺级分,T-淋巴细胞可被选择为CD3⁺级分,B-淋巴细胞可被选择为CD19⁺级分,巨噬细胞为CD206⁺级分。

[0264] 淋巴细胞和单核细胞可以通过使这些细胞接受底物粘附条件,如通过在组织培养处理的培养受体中静态培养来互相分离,这导致单核细胞而不是淋巴细胞选择性粘附至细胞粘附底物。

[0265] 白细胞还可获得自外周血单个核细胞(PBMC),其可如本文所述分离。

[0266] 本领域技术人员会具有适当培养原代白细胞的必要专业知识以便产生期望数量的如本文公开的培养的来源白细胞,并且实施这类培养方法的充分指导在本领域的文献中可获得。

[0267] 本领域技术人员会进一步具有建立、购买或获得由其衍生凋亡白细胞的适当建立的白细胞细胞系的必要专业知识。合适的白细胞细胞系可获得自商业供应商,如美国典型培养物保藏中心(ATCC)。对于本领域技术人员,显而易见来源白细胞不应当通过会显著干扰它们产生凋亡白细胞的能力的技术获得。

[0268] 在一实施方案中,凋亡细胞包含细胞制品,所述细胞制品包含富集的单个核细胞,其中所述制品包含至少85%单个核细胞,其中所述制品中至少40%的细胞处于早期凋亡状态中,其中所述制品中至少85%的细胞是活细胞,并且其中所述制品包含不超过15%CD15^高表达细胞。

[0269] 在另一实施方案中,凋亡细胞可以是凋亡淋巴细胞。淋巴细胞(如原代淋巴细胞)的凋亡可通过用血清剥夺、皮质类固醇或辐照处理所述原代淋巴细胞诱导。在另一实施方案中,通过用皮质类固醇处理诱导原代淋巴细胞的凋亡通过用地塞米松处理原代淋巴细胞来实现。在另一实施方案中,用浓度约1微摩尔的地塞米松。在另一实施方案中,通过辐照诱导原代淋巴细胞的凋亡通过用 γ -辐照处理原代淋巴细胞来实现。在另一实施方案中,用约66rad的剂量。这样的处理导致产生适合与吞噬细胞共培养步骤的凋亡淋巴细胞。

[0270] 在进一步的实施方案中,凋亡细胞可以是凋亡单核细胞,如原代单核细胞。为了产生凋亡单核细胞,使单核细胞在血清剥夺的条件下接受底物/表面-粘附的体外条件。这样的处理导致产生适合与吞噬细胞共培养步骤的非促炎凋亡单核细胞。

[0271] 在其他实施方案中,凋亡细胞可以是本文描述的任何凋亡细胞,包括同种异体凋亡细胞、第三方凋亡细胞和凋亡细胞的池。

[0272] 在其他实施方案中,凋亡细胞上清液可以通过凋亡细胞与其他细胞的共培养获得。

[0273] 因此,在一实施方案中,凋亡细胞上清液是通过一种方法获得的凋亡细胞上清液,所述方法包括以下步骤:a)提供凋亡细胞,b)提供其他细胞,c)任选地洗涤来自步骤a)和b)的细胞,d)共培养步骤a)和b)的细胞,以及任选地e)分离来自所述细胞的上清液。

[0274] 在一实施方案中,与凋亡细胞共培养的其他细胞是白血细胞。

[0275] 因此,在一实施方案中,凋亡细胞上清液是通过一种方法获得的凋亡细胞-白血细胞上清液,所述方法包括以下步骤:a)提供凋亡细胞,b)提供白血细胞,c)任选地洗涤来自步骤a)和b)的细胞,d)共培养步骤a)和b)的细胞,以及任选地e)分离来自所述细胞的上清液。

[0276] 在一实施方案中,白血细胞可以是吞噬细胞,如巨噬细胞、单核细胞或树突细胞。

[0277] 在一实施方案中,白血细胞可以是B细胞、T-细胞或自然杀伤细胞(NK细胞)。

[0278] 因此,在一实施方案中,用于如本文公开的方法和治疗的组合物包括如WO 2014/106666中描述的凋亡细胞-吞噬细胞上清液,其通过援引整体加入本文。在另一实施方案中,用于如本文公开的组合物和方法的凋亡细胞-吞噬细胞上清液以本领域已知的任何方式制备。

[0279] 在一实施方案中,凋亡细胞-吞噬细胞上清液获得自吞噬细胞与凋亡细胞的共培养物。

[0280] 在一实施方案中,通过一种方法获得凋亡细胞-吞噬细胞上清液,所述方法包括以下步骤:a)提供吞噬细胞,b)提供凋亡细胞,c)任选地洗涤来自步骤a)和b)的细胞,d)共培养步骤a)和b)的细胞,以及任选地e)从所述细胞分离上清液。

[0281] 术语“吞噬细胞”表示通过摄取(吞噬)有害的外源颗粒、细菌以及死的或濒死的细胞来保护身体的细胞。吞噬细胞包括例如称作嗜中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞和肥大T-细胞的细胞,优选树突细胞和单核细胞/巨噬细胞。吞噬细胞可以是树突细胞

(CD4+HLA-DR+谱系-BDCA1 /BDCA3+)、巨噬细胞(CD14+CD206+HLA-DR+)或衍生自单核细胞(CD14+)。区分这些不同吞噬细胞的技术是本领域技术人员已知的。

[0282] 在一实施方案中,通过塑料粘附步骤获得单核细胞。所述单核细胞可以从B和T-细胞用标志物CD14+被区分,而不需要的B细胞表达CD19+和T-细胞CD3+。在巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)诱导的成熟之后,在一实施方案中,所得巨噬细胞是标志物CD14+、CD206+、HLA-DR+阳性的。

[0283] 在一实施方案中,所述吞噬细胞衍生自外周血单个核细胞(PBMC)。

[0284] 吞噬细胞可通过本领域已知用于获得吞噬细胞的任何方法提供。在一实施方案中,吞噬细胞如巨噬细胞或树突细胞可从对象直接分离或者通过成熟步骤衍生自前体细胞。

[0285] 在一实施方案中,巨噬细胞可从对象的腹膜腔直接分离并在完全RRPMI培养基中培养。巨噬细胞还可从脾分离。

[0286] 吞噬细胞还可获得自外周血单核细胞。在所述实例中,当向细胞培养基添加但不限于巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)时,单核细胞在培养时分化为单核细胞衍生的巨噬细胞。

[0287] 例如,吞噬细胞可衍生自外周血单个核细胞(PBMC)。例如,PBMC可通过Ficoll梯度离心从来自对象的cytapheresis袋中分离,在细胞粘附步骤中在完全RPMI培养基(10% FBS,1%青霉素/链霉素)中平板接种90min。通过塑料粘附步骤去除非粘附性T-细胞,并且在补充了重组人M-CSF的完全RPMI环境中培养粘附的T-细胞。培养期之后,获得单核细胞衍生的巨噬细胞。

[0288] 可以通过细胞粘附步骤选择吞噬细胞。所述“细胞粘附步骤”表示通过允许培养细胞粘附至表面、细胞粘附表面(例如组织培养皿、基质、具有适当类型的尼龙或塑料的囊或袋)的培养条件选择吞噬细胞或可以成熟为吞噬细胞的细胞。技术人员会理解术语“细胞粘附表面”可涵盖亲水和带负电荷的,并且可以本领域已知的任何各种方式获得,在其他实施方案中通过利用例如电晕放电或等离子气体(gas-plasma)修饰聚苯乙烯表面。这些方法产生高能氧离子,其移植至表面聚苯乙烯链上,从而使表面变成亲水和带负电荷的。设计用于促进细胞粘附的培养受体可获得自各种商业供应商(例如Corning、Perkin-Elmer、Fisher Scientific、Evergreen Scientific、Nunc等)。

[0289] B细胞、T-细胞和NK细胞可以通过本领域已知用于获得这类细胞的任何方法提供。在一实施方案中,B细胞、T-细胞或NK细胞可以从对象直接分离或者通过成熟步骤衍生自前体细胞。在另一实施方案中,B、T或NK细胞可以来自B、T或NK细胞系。本领域技术人员会具有建立、购买或获得合适建立的B细胞、T-细胞和NK细胞系的必要专业知识。合适的细胞系可以获得自商业供应商,如美国典型培养物保藏中心(ATCC)。

[0290] 在一实施方案中,所述凋亡细胞和所述白血细胞如吞噬细胞、B、T或NK细胞在共培养步骤d)之前单独培养。

[0291] 吞噬细胞的细胞成熟发生在细胞培养期间,例如由于向培养基添加成熟因子。在一实施方案中,所述成熟因子是M-CSF,其可以用来例如获得单核细胞衍生的巨噬细胞。

[0292] 用于吞噬细胞的成熟或选择的培养步骤可进行几小时至几天。在另一实施方案中,将所述未成熟的吞噬细胞在适当的培养基中培养2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、

26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58小时。

[0293] 吞噬细胞的培养基是本领域技术人员已知的,并且可以是例如但不限于RPMI、DMEM、X-vivo和Ultraculture milieus。

[0294] 在一实施方案中,凋亡细胞和吞噬细胞的共培养发生在生理溶液中。

[0295] 在这种“共培养”之前,可以将细胞提交至洗涤步骤。在一实施方案中,在共培养步骤之前洗涤白血细胞(例如吞噬细胞)和凋亡细胞。在另一实施方案中,用PBS洗涤细胞。

[0296] 在所述共培养期间,将白血细胞(例如吞噬细胞如巨噬细胞、单核细胞或吞噬细胞,或者B、T或NK细胞)和凋亡细胞以10:1、9:1;8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1或1:1的比例,或者(白血细胞:凋亡细胞)1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9或1:10的比例混合。在一实例中,白血细胞比凋亡细胞的比例为1:5。

[0297] 细胞的共培养可进行几小时至几天。在一些实施方案中,将所述凋亡细胞培养2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52小时。本领域技术人员可通过测量抗炎化合物的存在、白血细胞的存活量和到目前为止尚未消除的凋亡细胞的量评价共培养的最佳时间。

[0298] 由于凋亡细胞的消失,通过吞噬细胞消除凋亡细胞可用光显微镜观察。

[0299] 在一实施方案中,凋亡细胞的培养,如与白血细胞(例如吞噬细胞如巨噬细胞、单核细胞或吞噬细胞,或者B、T或NK细胞)共培养,发生在培养基和/或与施用(如注射)至对象相兼容的生理溶液中。

[0300] 技术人员会理解“生理溶液”可涵盖在培养时间内不导致白血细胞死亡的溶液。在一些实施方案中,生理溶液在2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52小时中不导致死亡。在其他实施方案中,48小时或30小时。

[0301] 在一实施方案中,将白血细胞(例如吞噬细胞如巨噬细胞、单核细胞或吞噬细胞,或者B、T或NK细胞)和凋亡细胞在生理溶液中温育至少30min。这个培养时间允许吞噬作用开始以及细胞因子和其他有益物质的分泌。

[0302] 在一实施方案中,这样的生理溶液不抑制通过白细胞衍生的巨噬细胞消除凋亡白血细胞。

[0303] 在培养或共培养步骤结束时,任选地从培养的凋亡细胞或共培养的细胞分离上清液。从细胞分离上清液的技术是本领域已知的。例如,可采集和/或过滤和/或离心上清液以消除细胞和碎片。例如,可以将所述上清液在室温下以3000rpm离心15分钟以将其从细胞分离。

[0304] 在使用之前可以将上清液“灭活”,例如通过辐照。因此,制备凋亡细胞上清液的方法可包括任选的额外的辐照步骤f)。所述“辐照”步骤可考虑为消毒方法,其使用足够率的X-射线辐照(25-45Gy)以杀死微生物,如灭活血液产品常规进行的。

[0305] 在本领域中认为上清液的辐照是安全的。目前常规性地对捐献的血液进行辐照程序以预防对WBC的反应。

[0306] 在一实施方案中,如本文详细描述,将凋亡细胞上清液配制入适合向对象施用的药物组合物中。

[0307] 在一实施方案中,将最终产物储存在+4℃下。在另一实施方案中,最终产物在接下来的48小时内使用。

[0308] 在一实施方案中,凋亡细胞上清液如凋亡细胞-吞噬细胞上清液或包含所述上清液的药物组合物可被冻干例如用于在-80℃下储存。

[0309] 在一具体实施方案中,如WO 2014/106666的实施例1所述,可利用胸腺细胞作为凋亡细胞制备凋亡细胞-吞噬细胞上清液。分离之后,将胸腺细胞辐照(例如用35X-格雷辐照)并在完全DMEM培养基中培养例如6小时以允许凋亡发生。平行地,从腹膜腔分离巨噬细胞,洗涤并在完全RPMI (10%FBS、Peni-Strepto、EAA、Hepes、NaP和2-巯基乙醇)中培养。然后将巨噬细胞和凋亡细胞洗涤并在不含酚的X-vivo培养基中以1/5巨噬细胞/凋亡细胞比例共培养另外48小时时间。然后,收集上清液,离心以消除碎片,并且可冷冻或冻干用于保存。巨噬细胞富集可以通过FACS针对F4/80的阳性染色证实。凋亡可通过FACS利用对膜联蛋白-V的阳性染色和7AAD排除证实。

[0310] 在一实施方案中,与获得自单独培养的巨噬细胞或凋亡细胞的上清液相比,凋亡细胞上清液在TGF-β水平上富集,活性和潜在形式的TGF-β均是。在一实施方案中,与单独培养的巨噬细胞相比IL-10水平也升高,并且与单独培养的凋亡细胞相比IL-10水平大幅提高。在另一实施方案中,炎性细胞因子如IL-6不可检测,并且IL-1β和TNF不可检测或水平非常低。

[0311] 在一实施方案中,当与来自单独培养的巨噬细胞或来自单独培养的凋亡细胞的上清液比较时,除了TGF-β和IL-10,凋亡细胞上清液具有升高水平的IL-1ra、TIMP-1、CXCL1/KC和CCL2/JE/MCP1,这可能牵涉上清液控制炎症的致耐受性作用。

[0312] 在另一具体实施方案中,如WO 2014/106666的实施例3所述,人凋亡细胞-吞噬细胞上清液可制备自用凋亡PBMC培养的衍生自外周血单个核细胞(PBMC)的巨噬细胞的共培养物。因此,PBMC通过例如Ficoll梯度离心分离自来自健康志愿者的cytapheresis袋。然后将PBMC平板接种在完全RPMI培养基(10%FBS,1%青霉素/链霉素)中90min。然后,去除非粘附T-细胞并利用例如35Gy剂量的X-射线辐照使其凋亡,并且在完全RPMI环境中培养4天(包括培养的前48hr之后的细胞洗涤),以允许凋亡发生。平行地,将粘附的T-细胞在补充了50μg/mL重组人M-CSF的完全RPMI环境中培养4天,包括在前48hr之后细胞洗涤。在4-天培养期结束时,将单核细胞衍生的巨噬细胞和凋亡细胞洗涤并以1个巨噬细胞比5个凋亡细胞的比例在X-vivo培养基中一起再培养48小时。然后收集来自后来培养的上清液,离心以消除细胞和碎片,并且可冷冻或冻干用于保存和随后使用。

[0313] 在一实施方案中,如WO 2014/106666所述,人凋亡细胞-吞噬细胞上清液可在6天中获得自外周血单核细胞(PBMC)。利用培养中的M-CSF添加4天以获得PBMC衍生的巨噬细胞,以及另外2天用于PBMC衍生的巨噬细胞与凋亡细胞的共培养,对应于在第0天分离的非粘附PBMC。

[0314] 在一实施方案中,如WO 2014/106666所述,可以独立于供体或PBMC的来源(cytapheresis或血沉棕黄层)获得标准化的人凋亡细胞-吞噬细胞上清液。塑料-粘附步骤足以获得富集的单核细胞的大量起始群体(粘附在塑料培养皿上之后20-93%的CD14+细胞)。此外,这类粘附T-细胞证实非常低的B和T-细胞存在(1.0%的CD19+B细胞和12.8%的CD3+T-细胞)。在M-CSF的存在下培养粘附T-细胞4天之后,单核细胞衍生的巨噬细胞的比例从0.1%显著增加至77.7%的CD14+CD206+HLA-DR+巨噬细胞。在那时,可将单核细胞衍生的巨噬细胞与凋亡非粘附PBMC(如通过膜联蛋白V染色和7AAD排除所示47.6%凋亡)共培养以

在48小时中产生凋亡细胞-吞噬细胞上清液。

[0315] 在一实施方案中,收集的凋亡细胞-吞噬细胞上清液包含比单独单核细胞衍生的巨噬细胞或在炎性条件(+LPS)中处理的单核细胞衍生的巨噬细胞的培养上清液中显著更多的潜在TGF,并且仅包含痕量或低水平的炎性细胞因子如IL-1 β 或TNF。

[0316] 在一实施方案中,包含凋亡细胞上清液的组合物进一步包含抗凝剂。在一实施方案中,所述抗凝剂选自由肝素、酸性柠檬酸盐葡萄糖(ACD)配方A和它们的组合组成的组。

[0317] 在一实施方案中,包含凋亡细胞上清液的组合物进一步包含甲泼尼龙。在一实施方案中,甲泼尼龙的浓度不超过30 μ g/ml。

[0318] 在一实施方案中,所述组合物可以等于约 200×10^6 个细胞/千克体重(对于70kg对象)的衍生自通过cytapheresis获得的约 14×10^9 个CD45+细胞共培养的凋亡细胞上清液的总剂量或等分量使用。在一实施方案中,这样的总剂量作为衍生自约 100×10^6 个细胞/千克体重的上清液的单位剂量施用,和/或作为单位剂量以每周间隔施用,在另一实施方案中,两者都有。根据这个实施方案的合适总剂量包括衍生自约 10×10^6 -约 4×10^9 个细胞/千克体重的上清液的总剂量。在另一实施方案中,所述上清液衍生自约 40×10^6 -约 1×10^9 个细胞/千克体重。在另一实施方案中,所述上清液衍生自约 80×10^6 -约 500×10^6 个细胞/千克体重。在另一实施方案中,所述上清液衍生自约 160×10^6 -约 250×10^6 个细胞/千克体重。根据这个实施方案的合适单位剂量包括衍生自约 4×10^6 -约 400×10^6 个细胞/千克体重的上清液的单位剂量。在另一实施方案中,所述上清液衍生自约 8×10^6 -约 200×10^6 个细胞/千克体重。在另一实施方案中,所述上清液衍生自约 16×10^6 -约 100×10^6 个细胞/千克体重。在另一实施方案中,所述上清液衍生自约 32×10^6 -约 50×10^6 个细胞/千克体重。

[0319] 在另一实施方案中,施用衍生自约 10×10^6 个凋亡细胞的共培养的凋亡细胞上清液的剂量。在另一实施方案中,施用衍生自 10×10^7 个凋亡细胞的剂量。在另一实施方案中,施用衍生自 10×10^8 个凋亡细胞的剂量。在另一实施方案中,施用衍生自 10×10^9 个凋亡细胞的剂量。在另一实施方案中,施用衍生自 10×10^{10} 个凋亡细胞的剂量。在另一实施方案中,施用衍生自 10×10^{11} 个凋亡细胞的剂量。在另一实施方案中,施用衍生自 10×10^{12} 个凋亡细胞的剂量。在另一实施方案中,施用衍生自 10×10^5 个凋亡细胞的剂量。在另一实施方案中,施用衍生自 10×10^4 个凋亡细胞的剂量。在另一实施方案中,施用衍生自 10×10^3 个凋亡细胞的剂量。在另一实施方案中,施用衍生自 10×10^2 个凋亡细胞的剂量。

[0320] 在一实施方案中,施用衍生自 35×10^6 个凋亡细胞的凋亡细胞上清液的剂量。在另一实施方案中,施用衍生自 210×10^6 个凋亡细胞的剂量。在另一实施方案中,施用衍生自 70×10^6 个凋亡细胞的剂量。在另一实施方案中,施用衍生自 140×10^6 个凋亡细胞的剂量。在另一实施方案中,施用衍生自 35 - 210×10^6 个凋亡细胞的剂量。

[0321] 在一实施方案中,如本文详细讨论的,凋亡细胞上清液或包含所述凋亡细胞上清液的组合物可通过本领域已知的任何方法施用,包括但不限于静脉内、皮下、结节内(intranodal)、肿瘤内、鞘内、胸膜内、腹腔内和直接至胸腺。

[0322] 令人惊讶的是,凋亡细胞上清液(如凋亡细胞-吞噬细胞上清液)减少与细胞因子风暴相关的细胞因子如IL-6的产生。另一细胞因子IL-2不参与细胞因子释放综合征,虽然其通过DC和巨噬细胞少量分泌。但是,CAR-T-细胞的存活和增殖需要它,并且主要由这些T-细胞产生。出乎意料的是,凋亡细胞上清液(如凋亡细胞-吞噬细胞上清液)不降低IL-2水平

至足以负面影响CAR T-细胞的存活。

[0323] 在一实施方案中,凋亡细胞上清液(如凋亡细胞-吞噬细胞上清液)影响巨噬细胞和DC中的细胞因子表达水平,但是不影响T-细胞自身中的细胞因子表达水平。因此出乎意料的是,凋亡细胞上清液可用于增强CAR T-细胞疗法或树突细胞疗法。

[0324] 在另一实施方案中,凋亡细胞上清液触发T-细胞的死亡,但是不通过细胞因子表达水平的改变。

[0325] 在另一实施方案中,凋亡细胞上清液(如凋亡细胞-吞噬细胞上清液)拮抗巨噬细胞和树突细胞的启动以分泌细胞因子,否则放大细胞因子风暴。在另一实施方案中,凋亡细胞上清液增加抑制炎症反应和/或预防细胞因子过量释放的Tregs。

[0326] 在一实施方案中,凋亡细胞上清液(如凋亡细胞-吞噬细胞上清液)的施用抑制一种或多种促炎细胞因子。在一实施方案中,所述促炎细胞因子包含IL-1 β 、IL-6、TNF- α 或IFN- γ ,或者它们的任何组合。在另一实施方案中,凋亡细胞上清液的施用促进一种或多种抗炎细胞因子的分泌。在一实施方案中,所述抗炎细胞因子包含TGF- β 、IL10或PGE2,或者它们的任何组合。

[0327] 在另一实施方案中,凋亡细胞上清液(如凋亡细胞-吞噬细胞上清液)的施用抑制暴露于TLR配体之后的树突细胞成熟。在另一实施方案中,凋亡细胞上清液的施用产生潜在的致耐受性树突细胞,在一实施方案中,其能够迁移,并且在另一实施方案中,所述迁移是由于CCR7。在另一实施方案中,凋亡细胞上清液的施用引发各种信号传导事件,在一实施方案中其是TAM受体信号传导(Tyro3、Ax1和Mer),在一实施方案中,其抑制抗原呈递细胞中的炎症。在一实施方案中,Tyro-3、Ax1和Mer构成受体酪氨酸激酶(RTK)的TAM家族,其特征在于激酶结构域内的保守序列和粘附分子样胞外结构域。在另一实施方案中,凋亡细胞上清液的施用激活MerTK激活信号传导。在另一实施方案中,凋亡细胞上清液的施用激活磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/AKT途径,在一实施方案中,其负向调节NF- κ B。在另一实施方案中,凋亡细胞上清液的施用负向调节炎症小体,在一实施方案中,其导致促炎细胞因子分泌、DC成熟或它们的组合的抑制。在另一实施方案中,凋亡细胞上清液的施用上调抗炎基因如Nr4a、Thbs1或它们的组合的表达。在另一实施方案中,凋亡细胞上清液的施用诱导高水平的AMP,在一实施方案中,其以泛连接蛋白1依赖性方式积累。在另一实施方案中,凋亡细胞上清液的施用抑制炎症。

[0328] 组合物

[0329] 在一实施方案中,本文公开了一种用于治疗如本文描述的症状或疾病的药物组合物。在另一实施方案中,药物组合物包含遗传修饰的免疫细胞或其遗传修饰的受体。在另一实施方案中,遗传修饰的免疫细胞包含T-细胞。在另一实施方案中,遗传修饰的免疫细胞包含嵌合抗原受体CAR T-细胞。在另一实施方案中,遗传修饰的免疫细胞包含细胞毒性T淋巴细胞。在另一实施方案中,遗传修饰的免疫细胞包含树突细胞。在另一实施方案中,遗传修饰的免疫细胞包含自然杀伤细胞。在另一实施方案中,遗传修饰的受体包含T-细胞受体。

[0330] 在另一实施方案中,用于治疗如本文描述的症状或疾病的药物组合物包含有效量的遗传修饰的免疫细胞或其遗传修饰的受体,如本文所述在药学可接受的赋形剂中。在另一实施方案中,用于治疗如本文描述的症状或疾病的药物组合物包含有效量的如本文描述的CAR T-细胞和药学可接受的赋形剂。在另一实施方案中,用于治疗如本文描述的症状或

疾病的药物组合物包含有效量的如本文描述的细胞毒性T细胞和药学可接受的赋形剂。在另一实施方案中,用于治疗如本文描述的症状或疾病的药物组合物包含有效量的如本文描述的遗传修饰的树突细胞和药学可接受的赋形剂。在另一实施方案中,用于治疗如本文描述的症状或疾病的药物组合物包含有效量的如本文描述的遗传修饰的自然杀伤细胞和药学可接受的赋形剂。在另一实施方案中,用于治疗如本文描述的症状或疾病的药物组合物包含有效量的如本文描述的遗传修饰的T-细胞受体和药学可接受的赋形剂。

[0331] 在另一实施方案中,如本文描述的症状或疾病是肿瘤或癌症。在另一实施方案中,本文公开了一种包含遗传修饰的免疫细胞或其受体的组合物,例如CAR T-细胞,其结合至如本文描述的所关注的蛋白质或肽。在另一实施方案中,所关注的蛋白质或肽包含肿瘤抗原或其片段。

[0332] 在另一实施方案中,本文公开且在本文公开的方法中使用的组合物包含凋亡细胞或凋亡细胞上清液,以及药学可接受的赋形剂。在另一实施方案中,包含有效量的遗传修饰的免疫细胞或其遗传修饰的受体的组合物可以是与包含凋亡细胞群体或凋亡细胞上清液相同的组合物。在另一实施方案中,包含有效量的CAR T-细胞、或细胞毒性T-细胞、或遗传修饰的树突细胞、或遗传修饰的自然杀伤细胞的组合物可以是与包含凋亡细胞群体或凋亡细胞上清液相同的组合物。在另一实施方案中,包含有效量的遗传修饰的T-细胞受体的组合物可以是与包含凋亡细胞群体或凋亡细胞上清液相同的组合物。在另一实施方案中,包含有效量的选自包含CAR T-细胞、细胞毒性T-细胞、自然杀伤细胞或树突细胞的遗传修饰的免疫细胞的组的组合物不是与包含凋亡细胞群体或凋亡细胞上清液相同的组合物。在另一实施方案中,一种组合物包含表达嵌合抗原受体T-细胞(CAR T-细胞),以及凋亡细胞或凋亡细胞上清液,以及药学可接受的赋形剂。在另一实施方案中,包含有效量的遗传修饰的T-细胞受体的组合物不是与包含凋亡细胞群体或凋亡细胞上清液相同的组合物。

[0333] 在另一实施方案中,组合物中包含的凋亡细胞包含处于早期凋亡状态的凋亡细胞。在另一实施方案中,组合物中包含的凋亡细胞是汇集的第三方供体细胞。在另一实施方案中,本文公开的组合物中包含的凋亡细胞上清液采集自早期凋亡细胞。在另一实施方案中,本文公开的组合物中包含的凋亡细胞上清液采集自汇集的第三方供体细胞。

[0334] 在一实施方案中,包含遗传修饰的免疫细胞(如CAR T-细胞)的组合物进一步包含额外的药物组合物用于预防、抑制或调节患有细胞因子释放综合征或经历细胞因子风暴的患者中的细胞因子释放。在另一实施方案中,包含遗传修饰的免疫细胞如(CAR T-细胞)和凋亡细胞的组合物进一步包含额外的药物组合物用于预防、抑制或调节患有细胞因子释放综合征或经历细胞因子风暴的患者中的细胞因子释放。在另一实施方案中,包含遗传修饰的免疫细胞(如CAR T-细胞)和凋亡细胞上清液的组合物进一步包含额外的药物组合物用于预防、抑制或调节患有细胞因子释放综合征或经历细胞因子风暴的患者中的细胞因子释放。

[0335] 在一实施方案中,包含遗传修饰的免疫细胞(如TCR T-细胞)的组合物进一步包含额外的药物组合物用于预防、抑制或调节患有细胞因子释放综合征或经历细胞因子风暴的患者中的细胞因子释放。在另一实施方案中,包含遗传修饰的免疫细胞(如TCR T-细胞)和凋亡细胞的组合物进一步包含额外的药物组合物用于预防、抑制或调节患有细胞因子释放综合征或经历细胞因子风暴的患者中的细胞因子释放。在另一实施方案中,包含遗传修饰

的免疫细胞(如TCR T-细胞)和凋亡细胞上清液的组合物进一步包含额外的药物组合物用于预防、抑制或调节患有细胞因子释放综合征或经历细胞因子风暴的患者中的细胞因子释放。

[0336] 在一实施方案中,包含遗传修饰的免疫细胞(如树突细胞)的组合物进一步包含额外的药物组合物用于预防、抑制或调节患有细胞因子释放综合征或经历细胞因子风暴的患者中的细胞因子释放。在另一实施方案中,包含遗传修饰的免疫细胞(如树突细胞)和凋亡细胞的组合物进一步包含额外的药物组合物用于预防、抑制或调节患有细胞因子释放综合征或经历细胞因子风暴的患者中的细胞因子释放。在另一实施方案中,包含遗传修饰的免疫细胞(如树突细胞)和凋亡细胞上清液的组合物进一步包含额外的药物组合物用于预防、抑制或调节患有细胞因子释放综合征或经历细胞因子风暴的患者中的细胞因子释放。

[0337] 在一实施方案中,包含遗传修饰的免疫细胞(如NK细胞)的组合物进一步包含额外的药物组合物用于预防、抑制或调节患有细胞因子释放综合征或经历细胞因子风暴的患者中的细胞因子释放。在另一实施方案中,包含遗传修饰的免疫细胞(如NK细胞)和凋亡细胞的组合物进一步包含额外的药物组合物用于预防、抑制或调节患有细胞因子释放综合征或经历细胞因子风暴的患者中的细胞因子释放。在另一实施方案中,包含遗传修饰的免疫细胞(如NK细胞)和凋亡细胞上清液的组合物进一步包含额外的药物组合物用于预防、抑制或调节患有细胞因子释放综合征或经历细胞因子风暴的患者中的细胞因子释放。

[0338] 在一实施方案中,额外的药物组合物包含CTLA-4阻断剂,在一实施方案中,其是依匹木单抗。在另一实施方案中,如本文公开的,额外的药物组合物包含 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物。在另一实施方案中,如本文公开的,额外的药物组合物包含基于碲的化合物。在另一实施方案中,如本文公开的,额外的药物组合物包含免疫调节药物。在另一实施方案中,额外的药物组合物包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于碲的化合物或免疫调节化合物,或者它们的任何组合。

[0339] 在一实施方案中,包含遗传修饰的免疫细胞(如CAR T-细胞)的组合物以及包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、凋亡细胞、或凋亡细胞上清液、基于碲的化合物、或免疫调节剂中任一种的药物组合物包含单一组合物。在另一实施方案中,包含遗传修饰的免疫细胞(如CAR T-细胞)的组合物以及包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、凋亡细胞、或凋亡细胞上清液、基于碲的化合物、或免疫调节剂、或者它们的任何组合中任一种的药物组合物包含多个组合物,其中在一实施方案中是CAR T-细胞的每种遗传修饰的免疫细胞、CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、凋亡细胞、凋亡细胞上清液、基于碲的化合物、或免疫调节剂、或者它们的任何组合各自包含在单独的组合物中。在另一实施方案中,包含在一实施方案中是CAR T-细胞的遗传修饰的免疫细胞的组合物以及包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、凋亡细胞、凋亡细胞上清液、基于碲的化合物、或免疫调节剂、或者它们的任何组合中任一种的药物组合物包含多个组合物,其中在一实施方案中是CAR T-细胞的遗传修饰的免疫细胞、CTLA-4阻断剂、或 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于碲的化合物、或免疫调节剂、或者它们的任何组合在遗传修饰的免疫细胞(如CAR T-细胞)、组合物以及凋亡细胞、或凋亡细胞上清液中存在被包含在单独的组合物中。

[0340] 在一实施方案中,包含遗传修饰的免疫细胞(如TCR T-细胞)的组合物以及包含

CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、凋亡细胞、或凋亡细胞上清液、基于碲的化合物、或免疫调节剂中任一种的药物组合物包含单一组合物。在另一实施方案中,包含遗传修饰的免疫细胞(如TCRT-细胞)的组合物以及包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、凋亡细胞、或凋亡细胞上清液、基于碲的化合物、或免疫调节剂、或者它们的任何组合中任一种的药物组合物包含多个组合物,其中在一实施方案中是TCR T-细胞的每种遗传修饰的免疫细胞、CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、凋亡细胞、凋亡细胞上清液、基于碲的化合物、或免疫调节剂、或者它们的任何组合各自包含在单独的组合物中。在另一实施方案中,包含在一实施方案中是TCR T-细胞的遗传修饰的免疫细胞的组合物以及包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、凋亡细胞、凋亡细胞上清液、基于碲的化合物、或免疫调节剂、或者它们的任何组合中任一种的药物组合物包含多个组合物,其中在一实施方案中是TCR T-细胞的每种遗传修饰的免疫细胞、CTLA-4阻断剂、或 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于碲的化合物、或免疫调节剂、或者它们的任何组合在遗传修饰的免疫细胞(如TCR T-细胞)、组合物以及凋亡细胞、或凋亡细胞上清液中存在被包含在单独的组合物中。

[0341] 在一实施方案中,包含遗传修饰的免疫细胞(如树突细胞)的组合物以及包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、凋亡细胞、或凋亡细胞上清液、基于碲的化合物、或免疫调节剂中任一种的药物组合物包含单一组合物。在另一实施方案中,包含遗传修饰的免疫细胞(如树突细胞)的组合物以及包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、凋亡细胞、或凋亡细胞上清液、基于碲的化合物、或免疫调节剂、或者它们的任何组合中任一种的药物组合物包含多个组合物,其中在一实施方案中是树突细胞的每种遗传修饰的免疫细胞、CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、凋亡细胞、凋亡细胞上清液、基于碲的化合物、或免疫调节剂、或者它们的任何组合各自包含在单独的组合物中。在另一实施方案中,包含在一实施方案中是树突细胞的遗传修饰的免疫细胞的组合物以及包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、凋亡细胞、凋亡细胞上清液、基于碲的化合物、或免疫调节剂、或者它们的任何组合中任一种的药物组合物包含多个组合物,其中在一实施方案中是树突细胞的遗传修饰的免疫细胞、CTLA-4阻断剂、或 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于碲的化合物、或免疫调节剂、或者它们的任何组合在遗传修饰的免疫细胞(如树突细胞)、组合物、以及凋亡细胞、或凋亡细胞上清液中存在被包含在单独的组合物中。

[0342] 在一实施方案中,包含遗传修饰的免疫细胞(如NK细胞)的组合物以及包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、凋亡细胞、或凋亡细胞上清液、基于碲的化合物、或免疫调节剂中任一种的药物组合物包含单一组合物。在另一实施方案中,包含遗传修饰的免疫细胞(如NK细胞)的组合物以及包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、凋亡细胞、或凋亡细胞上清液、基于碲的化合物、或免疫调节剂、或者它们的任何组合中任一种的药物组合物包含多个组合物,其中在一实施方案中是NK细胞的每种遗传修饰的免疫细胞、CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、凋亡细胞、凋亡细胞上清液、基于碲的化合物、或免疫调节剂、或者它们的任何组合各自包含在单独的组合物中。在另一实施方案中,包含在一实施方案中是NK细胞的遗传修饰的免疫细胞的组合物以及包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、凋亡细胞、凋亡细胞上清液、基于碲的

化合物、或免疫调节剂、或者它们的任何组合中任一种的药物组合物包含多个组合物,其中在一实施方案中是NK细胞的遗传修饰的免疫细胞、CTLA-4阻断剂、或 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于碲的化合物、或免疫调节剂、或者它们的任何组合在遗传修饰的免疫细胞(如NK细胞)、组合物以及凋亡细胞、或凋亡细胞上清液中存在被包含在单独的组合物中。

[0343] 技术人员会理解“药物组合物”可涵盖一种或多种本文描述的活性成分与其他化学组分如生理学上合适的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进将化合物施用至生物体。

[0344] 技术人员会理解短语“生理学上可接受的载体”、“药学可接受的载体”、“生理学上可接受的赋形剂”和“药学可接受的赋形剂”可交换使用,可涵盖不对生物体造成显著刺激且不废除施用的活性成分的生物学活性和特性的载体、赋形剂或稀释剂。

[0345] 技术人员会理解“赋形剂”可涵盖添加至药物组合物以进一步促进活性成分的施用的惰性物质。在一实施方案中,赋形剂包括碳酸钙、磷酸钙、各种糖和类型的淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油以及聚乙二醇。

[0346] 药物的配制和施用的技术在“Remington's Pharmaceutical Sciences,”Mack Publishing Co., Easton, PA最新版本中找到,其援引加入本文。

[0347] 在一实施方案中,组合物同时施用。在一可选实施方案中,组合物在不同时间施用。在另一实施方案中,包含凋亡细胞的组合物在输注遗传修饰的免疫细胞或其受体之前施用。在另一实施方案中,包含凋亡细胞的组合物在CAR-T-细胞输注之前施用。在另一实施方案中,包含凋亡细胞的组合物在细胞毒性T-细胞输注之前施用。在另一实施方案中,包含凋亡细胞的组合物在自然杀伤细胞输注之前施用。在另一实施方案中,包含凋亡细胞的组合物在树突细胞输注之前施用。在另一实施方案中,包含凋亡细胞的组合物在输注遗传修饰的T-细胞受体之前施用。

[0348] 在另一实施方案中,包含凋亡细胞上清液的组合物在输注遗传修饰的免疫细胞或其受体之前施用。在另一实施方案中,包含凋亡细胞上清液的组合物在CAR-T-细胞输注之前施用。在另一实施方案中,包含凋亡细胞上清液的组合物在细胞毒性T-细胞输注之前施用。在另一实施方案中,包含凋亡细胞上清液的组合物在自然杀伤细胞输注之前施用。在另一实施方案中,包含凋亡细胞上清液的组合物在树突细胞输注之前施用。在另一实施方案中,包含凋亡细胞上清液的组合物在输注遗传修饰的T-细胞受体之前施用。

[0349] 在另一实施方案中,包含凋亡细胞上清液的组合物在输注遗传修饰的免疫细胞或其受体之前施用。在另一实施方案中,包含凋亡细胞的组合物在遗传修饰的免疫细胞或其受体输注之前约24小时施用。在另一实施方案中,包含凋亡细胞的组合物在CAR T-细胞、或细胞毒性T-细胞、或自然杀伤细胞、或树突细胞或遗传修饰的T-细胞受体输注之前约24小时施用。在另一实施方案中,包含凋亡细胞上清液的组合物在CAR T-细胞或细胞毒性T-细胞、或自然杀伤细胞、或树突细胞或遗传修饰的T-细胞受体输注之前约24小时施用。在另一实施方案中,包含凋亡细胞的组合物在CAR-T-细胞或细胞毒性T-细胞、或自然杀伤细胞、或树突细胞或遗传修饰的T-细胞受体输注之前约2小时、4小时、6小时、8小时、10小时、12小时、14小时、16小时、18小时、20小时、22小时、24小时、36小时、48小时、60小时或72小时施用。在另一实施方案中,包含凋亡细胞上清液的组合物在CAR T-细胞或细胞毒性T-细胞、或自然杀伤细胞、或树突细胞或遗传修饰的T-细胞受体输注之前约2小时、4小时、6小时、8小

时、10小时、12小时、14小时、16小时、18小时、20小时、22小时、24小时、36小时、48小时、60小时或72小时施用。每种可能性代表如本文公开的单独实施方案。

[0350] 在另一实施方案中,包含凋亡细胞的组合物在输注遗传修饰的免疫细胞或其遗传修饰的受体之后施用。在另一实施方案中,包含凋亡细胞的组合物在CAR-T-细胞或细胞毒性T-细胞、或自然杀伤细胞、或树突细胞或遗传修饰的T-细胞受体输注之后施用。在另一实施方案中,包含凋亡细胞上清液的组合物在输注遗传修饰的免疫细胞或其遗传修饰的受体之后施用。在另一实施方案中,包含凋亡细胞上清液的组合物在CAR T-细胞或细胞毒性T-细胞、或自然杀伤细胞、或树突细胞或遗传修饰的T-细胞受体输注之后施用。在另一实施方案中,包含凋亡细胞的组合物在CAR-T-细胞或细胞毒性T-细胞、或自然杀伤细胞、或树突细胞或遗传修饰的T-细胞受体输注之后约24小时施用。在另一实施方案中,包含凋亡细胞的组合物在输注遗传修饰的免疫细胞或其遗传修饰的受体之后施用。在另一实施方案中,包含凋亡细胞上清液的组合物在CAR T-细胞或细胞毒性T-细胞、或自然杀伤细胞、或树突细胞或遗传修饰的T-细胞受体输注之后约24小时施用。在另一实施方案中,包含凋亡细胞的组合物在CAR-T-细胞或细胞毒性T-细胞、或自然杀伤细胞、或树突细胞或遗传修饰的T-细胞受体输注之后约2小时、4小时、6小时、8小时、10小时、12小时、14小时、16小时、18小时、20小时、22小时、24小时、36小时、48小时、60小时或72小时施用。在另一实施方案中,包含凋亡细胞上清液的组合物在CAR T-细胞或细胞毒性T-细胞、或自然杀伤细胞、或树突细胞或遗传修饰的T-细胞受体输注之后约2小时、4小时、6小时、8小时、10小时、12小时、14小时、16小时、18小时、20小时、22小时、24小时、36小时、48小时、60小时或72小时施用。每种可能性代表如本文公开的单独实施方案。

[0351] 制剂

[0352] 本文公开的包含遗传修饰的免疫应答细胞或包含凋亡细胞或包含凋亡细胞上清液或者它们的任何组合的组合物可方便地提供为无菌液体制品,例如,等渗水溶液、悬浮液、乳液、分散剂或粘性组合物,可将其缓冲至选定的pH,液体制品通常比凝胶、其他粘性组合物和固体组合物更容易制备。此外,液体组合物在某种程度上更方便施用,特别是通过注射。在另一方面,粘性组合物可被配制在适当的粘度范围内以提供更长的与特定组织接触的时间。液体或粘性组合物可包含载体,其可以是溶剂或分散介质,其包含例如水、盐水、磷酸缓冲盐水、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)以及它们的合适混合物。

[0353] 无菌可注射溶液可通过将实施本文公开的方法中利用的遗传修饰的免疫应答细胞或凋亡细胞上清液加入需要量的适当溶剂与各种量的其他成分(如期望的)中来制备。这类组合物可与合适的载体、稀释剂和赋形剂如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等混合。还可将所述组合物冻干。所述组合物可包含辅助物质如湿润剂、分散剂或乳化剂(例如,甲基纤维素),pH缓冲剂,凝胶或粘度增强添加剂,防腐剂、增香剂、颜料等,取决于施用途径和期望的制品。可以查询援引加入本文的标准教科书如“REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE”,第17版,1985以制备合适的制品,无需过度实验。

[0354] 可以添加增强组合物的稳定性和无菌性的各种添加剂,包括抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲剂。预防微生物的活动可通过各种抗细菌剂和抗真菌剂如对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、酚、山梨酸等来确保。可注射药物形式的延长的吸收可通过使用延迟吸收的物质来实现,例如单硬脂酸铝和明胶。但是,根据本文的公开,使用的任何媒介物、稀释

剂或添加剂必须与遗传修饰的免疫应答细胞或它们的祖代相兼容。

[0355] 所述组合物可以是等渗的,即,它们可以具有与血液和泪液相同的渗透压。如本文公开的组合物的期望等渗性可利用氯化钠或者其他药学可接受的物质如右旋糖、硼酸、酒石酸钠、丙二醇或者其他无机或有机溶质完成。氯化钠可以是优选的,特别是对于包含钠离子的缓冲液。

[0356] 如果期望,可利用药学可接受的增稠剂将所述组合物的粘度保持在选定水平。可优选甲基纤维素,因为其可容易和经济地获得,并且易于使用。

[0357] 其他合适的增稠剂包括例如黄原胶、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、卡波姆等。增稠剂的优选浓度取决于选定的物质。重点是使用会达到选定粘度的量。显然,合适载体和其他添加剂的选择取决于施用的确切途径和特定剂型的性质,例如,液体剂型(例如,所述组合物是否配制为溶液、悬浮液、凝胶或其他液体形式,如定时释放形式或充液形式)。

[0358] 本领域技术人员会认识到所述组合物的成分应当选择为化学惰性的,并且不会影响如本文公开的方法中描述的遗传修饰的免疫应答细胞的生存力或效力。对于化学和制药原理中的技术人员这不成问题,或者从这个公开和本文中引用的文件中参考标准教科书或通过简单实验(不包括过度实验)可以容易地避免问题。

[0359] 关于本文公开的遗传修饰的免疫应答细胞的治疗用途的一个考虑是达到最佳效果必需的细胞量。待施用的细胞量会随着治疗的对象变化。在一实施方案中,向人对象施用 10^4 - 10^{10} 、 10^5 - 10^9 或 10^6 - 10^8 个本文公开的遗传修饰的免疫应答细胞。更有效的细胞可以以甚至更少的数量施用。在一些实施方案中,向人对象施用至少约 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 和 5×10^8 个本文公开的遗传修饰的免疫应答细胞。认为是有效剂量的精确确定可基于每个对象的个体因素,包括它们的大小、年龄、性别、体重和特定对象的症状。本领域技术人员从这个公开和本领域的知识可以容易地确定剂量。

[0360] 技术人员可以容易地确定组合物中以及本文公开的方法中施用的细胞以及任选存在的添加剂、媒介物和/或载体的量。通常,任何添加剂(除了活性细胞和/或药物之外)以0.001-50%(重量)溶液的量存在于磷酸缓冲盐水中,并且活性成分以微克至毫克的数量级存在,如约0.0001-约5wt%。在另一实施方案中约0.0001-约1wt%。在另一实施方案中,约0.0001-约0.05wt%或约0.001-约20wt%。在进一步的实施方案中,约0.01-约10wt%。在另一实施方案中,约0.05-约5wt%。当然,对于向动物或人施用的任何组合物,以及对于施用的任何特定方法,因此优选确定:毒性,如通过在合适的动物模型例如啮齿动物如小鼠中确定致死剂量(LD)和LD50;以及,组合物的剂量,其中成分的浓度和施用组合物的时机,其引发合适的应答。基于技术人员的知识、这个公开和本文中引用的文件,这类确定不需要过度实验。并且,可以确定顺序施用的时间而无需过度实验。

[0361] 核酸序列、载体、细胞

[0362] 在一实施方案中,本文公开了一种编码如本文所述的嵌合抗原受体(CAR)的分离的核酸序列用于如本文公开的组合物和方法。

[0363] 在另一实施方案中,本文公开了一种包含编码如本文所述的嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列的载体。

[0364] 在一实施方案中,本文公开了一种编码如本文所述的遗传修饰的T-受体(TCR)的分离的核酸序列用于如本文公开的组合物和方法。在另一实施方案中,本文公开了一种包

含编码如本文所述的遗传修饰的T-受体 (TCR) 的核酸序列的载体。

[0365] 免疫应答细胞 (例如, T-细胞、CTL细胞、NK细胞) 的遗传修饰可通过用重组DNA构建体转导基本上同质的细胞组合物来完成。在一实施方案中, 逆转录病毒载体 (γ -逆转录病毒或慢病毒) 用于将DNA构建体引入细胞。例如, 可以将编码结合抗原 (例如, 肿瘤抗原、或变体、或其片段) 的受体的多核苷酸克隆入逆转录病毒载体, 并且表达可被其内源启动子、逆转录病毒长末端重复或所关注的靶细胞类型特异性的启动子启动。还可使用非病毒载体。

[0366] 非病毒方法也可用于在细胞中蛋白质的表达。例如, 可通过在脂质体转染 (Feigner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:7413, 1987; Ono et al., Neuroscience Letters 17:259, 1990; Brigham et al., Am. J. Med. Sci. 298:278, 1989; Staubinger et al., Methods in Enzymology 101:512, 1983)、脱唾液酸血清类粘蛋白 (asialoorosomucoid)-聚赖氨酸缀合 (Wu et al., Journal of Biological Chemistry 263:14621, 1988; Wu et al., Journal of Biological Chemistry 264:16985, 1989) 的存在下施用核酸或者通过在手术条件下微注射 (Wolff et al., Science 247:1465, 1990) 将核酸分子引入细胞。基因转移的其他非病毒方式包括利用磷酸钙、DEAE葡聚糖、电穿孔和原生质体融合体外转染。脂质体对于将DNA递送入细胞也可能是有益的。将正常基因移植入对象的受影响组织还可通过将正常核酸离体转移入可培养的细胞类型 (例如, 自体或异源原代细胞或其子代), 之后将所述细胞 (或其后代) 注射入靶组织或全身性注射来完成。还可以利用转座酶或靶向核酸酶 (例如锌指核酸酶、大范围核酸酶或TALE核酸酶) 衍生或获得重组受体。瞬时表达可通过RNA电穿孔获得。用于多核苷酸治疗方法的cDNA表达可从任何合适的启动子 (例如, 人巨细胞病毒 (CMV)、猿猴病毒40 (SV40) 或金属硫蛋白启动子) 指导, 并且通过任何适当的哺乳动物调节元件或内含子 (例如延伸因子1a增强子/启动子/内含子结构) 调节。例如, 如果期望, 已知优先指导特定细胞类型中的基因表达的增强子可被用来指导核酸的表达。使用的增强子可包括但不限于表征为组织或细胞特异性增强子的那些。或者, 如果基因组克隆用作治疗构建体, 调节可通过同源调节序列, 或者如果期望, 通过衍生自异源来源的调节序列介导, 包括上文描述的任何启动子或调节元件。

[0367] 在另一实施方案中, 本文公开了一种包含载体的细胞, 所述载体包含编码如本文公开的嵌合抗原受体 (CAR) 的核酸序列。

[0368] 药物盒

[0369] 在一实施方案中, 本文公开了一种用于在接受表达嵌合抗原受体T-细胞 (CAR T-细胞) 癌症疗法的对象中抑制或减少细胞因子释放综合征 (CRS) 或细胞因子风暴发生率的药物盒, 所述药物盒包含如本文公开的CAR T-细胞和凋亡细胞, 单独或预混的。

[0370] 在另一实施方案中, 本文公开了一种用于在接受表达嵌合抗原受体T-细胞 (CAR T-细胞) 癌症疗法的对象中抑制或减少细胞因子释放综合征 (CRS) 或细胞因子风暴发生率的药物盒, 所述药物盒包含如本文公开的CAR T-细胞和凋亡细胞上清液, 单独或预混的。

[0371] 本文公开了用于抑制或减少通过治疗或预防瘤形成、病原体感染、免疫疾病特征或同种异体移植细胞因子释放综合征 (CRS) 或细胞因子风暴发生率, 或者通过治疗、预防、抑制、减少发生率、改善或缓解癌症或肿瘤产生的细胞因子释放综合征 (CRS) 或细胞因子风暴发生率的药物盒。在一实施方案中, 所述药物盒包括治疗性或预防性组合物, 其包含单位剂型中的有效量的如本文公开的免疫应答细胞和凋亡细胞。在另一实施方案中, 所述药物

盒包括治疗性或预防性组合物,其包含单位剂型中的有效量的如本文公开的免疫应答细胞和凋亡细胞上清液。在特定实施方案中,所述细胞进一步包含共刺激配体。在另一实施方案中,药物盒进一步包含额外的药物,其选自包含CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其片段或其类似物、基于砷的化合物或免疫调节剂的组,或者它们的任何组合。在一些实施方案中,所述药物盒包含无菌容器,其包含治疗性或预防性疫苗,这类容器可以是盒、安瓿、瓶、小瓶、管、袋、小袋、透明包装或本领域已知的其他合适的容器形式。这类容器可以由塑料、玻璃、层压纸、金属箔或适合盛放药物的其他材料制成。

[0372] 如果期望,将免疫应答细胞以及凋亡细胞或凋亡细胞上清液与说明书一起提供,所述说明书针对将所述细胞施用至患有或有风险发展瘤形成、病原体感染、免疫病症或同种异体移植或肿瘤或癌症的对象。说明书一般包括关于所述组合物在治疗或预防瘤形成、病原体感染、免疫病症、同种异体移植、肿瘤或癌症中的用途的信息。在其他实施方案中,说明书包括以下至少一种:治疗剂的说明;治疗或预防瘤形成、病原体感染、免疫病症或同种异体移植、癌症、肿瘤或其症状的剂量方案和施用;注意事项;警示;适应症;禁忌症(counter-indication);过量信息;不良反应;动物药理学;临床研究;和/或参考文献。说明书可直接打印在容器上(当存在时),或者作为用于容器的标签,或者作为在容器中或随容器提供的单独的纸张、小册子、卡片或文件夹。

[0373] 技术人员会理解术语“抗原识别受体”可涵盖能够对抗原结合应答的激活免疫细胞(例如,T-细胞)的受体。示例性抗原识别受体可以是天然或内源T-细胞受体或者嵌合抗原受体,其中肿瘤抗原结合结构域融合至能够激活免疫细胞(例如,T-细胞)的胞内信号传导结构域。

[0374] 技术人员会理解术语“抗体”不仅表示完整的抗体分子,而且还表示保留免疫原结合能力的抗体分子片段。这类片段也是本领域公知的,并且在体外和体内经常采用。因此,技术人员会理解术语“抗体”不仅表示完整的免疫球蛋白分子,而且还表示公知的活性片段 $F(ab^1)_2$ 和Fab。缺少完整抗体的Fc片段的 $F(ab')_2$ 和Fab片段更快地从循环清除,并且可具有更少的完整抗体的非特异性组织结合(Wahl et al., J.Nucl.Med.24:316-325(1983)。本文公开的抗体包含整个天然抗体、双特异性抗体;嵌合抗体;Fab、Fab'、单链V区片段(scFv)、融合多肽和非常规抗体。

[0375] 技术人员会理解术语“单链可变片段”或“scFv”涵盖共价连接以形成 $VH::VL$ 异源二聚体的免疫球蛋白的重链(VH)和轻链(VL)的可变区的融合蛋白。重链(VH)和轻链(VL)直接连接或通过编码肽的接头(例如,30、15、20、25个氨基酸)连接,其连接VH的N-端与VL的C-端,或者VH的C-端与VL的N-端,所述接头通常富含甘氨酸用于柔性,以及丝氨酸或苏氨酸用于溶解性。尽管去除恒定区并引入接头,scFv蛋白仍然保留原始免疫球蛋白的特异性。如Huston等人所述,单链Fv多肽抗体可表达自包括VH-和VL-编码序列的核酸(Proc.Nat.Acad.Sci.USA,85:5879-5883,1988)。还参见美国专利号5,091,513、5,132,405和4,956,778;以及美国专利公开号20050196754和20050196754。已描述具有抑制活性的拮抗scFv(参见,例如,Zhao et al.,Hybridoma(Larchmt)2008 27(6):455-51;Peter et al.,J Cachexia Sarcopenia Muscle 2012August 12;Shieh et al.,J Immunol2009 183(4):2277-85;Giomarelli et al.,Thromb Haemost 2007 97(6):955-63;Fife et al.,J Clin Invest 2006 116(8):2252-61;Brocks et al.,Immunotechnology 1997 3(3):173-

84; Moosmayer et al., *Ther Immunol* 1995 2(10):31-40)。已描述具有刺激活性的激动性 scFv (参见, 例如, Peter et al., *J Biol Chem* 2003 25278(38):36740-7; Xie et al., *Nat Biotech* 1997 15(8):768-71; Ledbetter et al., *Crit Rev Immunol* 1997 1(5-6):427-55; Ho et al., *Biochim Biophys Acta* 2003 1638(3):257-66)。

[0376] “亲和性”表示结合强度的度量。不受理论束缚, 亲和性取决于抗体结合位点和抗原决定簇之间立体化学匹配的紧密度, 它们之间接触面积的大小以及带电荷和疏水基团的分布。亲和性还包括术语“亲合力”, 其是指形成可逆复合物之后抗原-抗体键的强度。计算抗体对抗原亲和性的方法是本领域已知的, 包括使用结合实验以计算亲和性。功能测定(例如, 流式细胞术测定)中的抗体活性也是抗体亲和性的反映。可利用功能测定(例如, 流式细胞术测定)表型性表征和比较抗体和亲和性。

[0377] 技术人员会理解术语“嵌合抗原受体”或“CAR”可涵盖融合至能够激活或刺激免疫细胞的胞内信号传导结构域的抗原结合结构域。在一实施方案中, CAR的胞外结合结构域由衍生自融合小鼠或人源化单克隆抗体的可变重链和轻链区的单链可变片段(scFv)组成。或者, 可以使用衍生自Fab's (代替来自抗体, 例如, 获得自Fab文库)的scFv, 在各种实施方案中, 将这种scFv融合至跨膜结构域并且然后至胞内信号传导结构域。在各种实施方案中, 选择CAR以对抗原具有高亲和性或亲合力。

[0378] 多肽和类似物

[0379] 本文公开的方法还包括以在免疫应答细胞中表达时增强它们的抗肿瘤活性的方式修饰的抗MUC1、CD28、CD3 ζ 以及各种scFv多肽或其片段(例如, 人源化单克隆抗体)。在某些实施方案中, 本文公开的方法包括通过在序列中产生改变优化氨基酸序列或核酸序列。这类改变可包括某些突变、缺失、插入或翻译后修饰。本文提供的公开进一步包括本文公开的任何天然存在的多肽的类似物。类似物可通过氨基酸序列差异、翻译后修饰或两者不同于本文公开的天然存在的多肽。本文公开的类似物一般表现出与本文公开的天然存在的氨基酸序列的全部或部分至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同性。序列比较的长度为至少5、10、15或20个氨基酸残基。在另一实施方案中, 至少25、50或75个氨基酸残基。在另一实施方案中, 超过100个氨基酸残基。同样, 在确定相同度的示范性方法中, 可使用BLAST程序, e^{-3} - e^{-100} 之间的可能性评分表示密切相关的序列。修饰包括多肽的体内和体外化学衍生化, 例如, 乙酰化、羧化、磷酸化或糖基化; 这类修饰可发生在多肽合成或加工期间或者用分离的修饰酶处理之后。类似物还可通过一级序列中的改变不同于本文公开的天然存在的多肽。这些包括遗传变体, 天然或诱导的(例如, 通过辐照或暴露于硫酸乙烷甲基随机诱变导致, 或者如 Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed.), CSH Press, 1989, 或上文所述的 Ausubel et al位点特异性诱变所致)。还包括环化的肽、分子和类似物, 其包含除L-氨基酸以外的残基, 例如, D-氨基酸或者非天然存在或合成的氨基酸, 例如, β 或 γ 氨基酸。

[0380] 非蛋白质类似物具有设计以模仿本文公开的蛋白质的功能性活性的化学结构。根据本文公开的方法施用这类类似物。这类类似物可超过原始多肽的生理活性。类似物设计的方法是本领域公知的, 并且类似物的合成可根据这类方法通过修饰化学结构进行, 从而所得的类似物在免疫应答细胞中表达时增加原始多肽的抗肿瘤活性。这些化学修饰包括但不限于取代可替换的R基团以及改变参考多肽的特定碳原子的饱和程度。在另一实施方案

中,蛋白质类似物相对抵抗体内降解,在施用导致更加延长的疗效。测量功能性活性的测定包括但不限于下文实施例中描述的那些。

[0381] 术语“免疫抑制活性”描述诱导细胞(例如,激活的免疫应答细胞)中的信号转导或蛋白表达的改变,导致免疫应答减少。已知通过它们的结合抑制或减少免疫应答的多肽包括CD47、PD-1、CTLA-4和它们的相应配体,包括SIRPa、PD-L1、PD-L2、B7-1和B7-2。这类多肽存在于肿瘤微环境中,并且抑制对肿瘤细胞的免疫应答。在各种实施方案中,抑制、阻断或拮抗免疫抑制多肽和/或它们的配体的相互作用增强免疫应答细胞的免疫应答。

[0382] 术语“免疫刺激活性”描述细胞(例如,激活的免疫应答细胞)中信号转导的诱导或蛋白质表达的改变,导致免疫应答增加。免疫刺激活性可包括促炎活性。已知通过它们的结合刺激或增加免疫应答的多肽包括CD28、OX-40、4-1BB和它们的相应配体,包括B7-1、B7-2、OX-40L和4-1BBL。这类多肽存在于肿瘤微环境中,并且激活对肿瘤细胞的免疫应答。在各种实施方案中,促进、刺激或激动促炎多肽和/或它们的配体增强免疫应答细胞的免疫应答。

[0383] 可用于本文公开的方法的核酸分子包括编码本文公开的多肽或其片段的任何核酸分子。这类核酸分子不必与内源核酸序列100%相同,但是通常表现出基本相同性。与内源序列具有“基本相同性”的多核苷酸通常能够与双链核酸分子的至少一条链杂交。“杂交”表示配对以在各种严格条件下,在互补多核苷酸序列(例如,本文描述的基因)或其部分之间形成双链分子。(参见,例如,Wahl,G.M.and S.L.Berger(1987)Methods Enzymol.152:399;immel,A.R.(1987)Methods Enzymol.152:507)。

[0384] 技术人员会理解术语“基本上相同”可涵盖与参考氨基酸序列(例如,本文描述的任一种氨基酸序列)或核酸序列(例如,本文描述的任一种核酸序列)表现出至少50%相同性的多肽或核酸分子。在一实施方案中,这样的序列在氨基酸水平或核酸与用于比较的序列至少60%、80%或85%、90%、95%或甚至99%相同。

[0385] 通常利用序列分析软件测量序列相同性(例如,Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group,University of Wisconsin Biotechnology Center,1710University Avenue,Madison,Wis.53705,BLAST,BESTFIT,GAP或PILEUP/PRETTYBOX程序)。这样的软件通过对各种取代、缺失和/或其他修饰指定同源度匹配度相同或相似序列。保守取代通常包括以下组内的取代:甘氨酸、丙氨酸;缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸;天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺;丝氨酸、苏氨酸;赖氨酸、精氨酸;以及苯丙氨酸、酪氨酸。在确定相同度的示例性方法中,可使用BLAST程序, e^{-3} 和 e^{-100} 之间的可能性评分表示密切相关的序列。

[0386] 技术人员会理解术语“类似物”可涵盖具有参考多肽或核酸分子的功能的结构相关的多肽或核酸分子。

[0387] 技术人员会理解术语“配体”可涵盖结合至受体的分子。特别地,配体结合另一细胞上的受体,允许细胞对细胞识别和/或相互作用。

[0388] 技术人员会理解术语“组成型表达”可涵盖所有生理学条件下的表达。

[0389] 技术人员会理解术语“疾病”可涵盖损伤或干扰细胞、组织或器官的正常功能的任何症状或病症。疾病的实例包括瘤形成或细胞的病原体感染。

[0390] 技术人员会理解术语“有效量”可涵盖足以具有疗效的量。在一实施方案中,“有效量”是足以阻止、改善或抑制瘤形成的持续增殖、生长或转移(例如,侵袭或迁移)的量。

[0391] 技术人员会理解术语“瘤形成”可涵盖特征在于细胞或组织的病理性增殖及其随后迁移至或侵袭其他组织或器官的疾病。瘤形成生长通常是不受控制和发展的,并且在不会引发或会引起正常细胞的中止、增加的条件下发生。瘤形成可影响各种细胞类型、组织或器官,包括但不限于选自由以下器官组成的组:膀胱、骨、脑、乳房、软骨、神经胶质、食道、输卵管、胆囊、心脏、肠、肾、肝、肺、淋巴结、神经组织、卵巢、胰、前列腺、骨骼肌、皮肤、脊髓、脾、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、气管、泌尿生殖道、输尿管、尿道、子宫和阴道,或者它们的组织或细胞类型。瘤形成包括癌症,如肉瘤、癌或浆细胞瘤(浆细胞的恶性肿瘤)。

[0392] 技术人员会理解术语“病原体”可涵盖能够引起疾病的病毒、细菌、真菌、寄生虫或原生动植物。

[0393] 技术人员会理解术语“肿瘤抗原”或“肿瘤相关抗原”可涵盖与正常或非IS瘤形成细胞相比在肿瘤细胞上独特或差异表达的抗原(例如,多肽)。关于本文公开的组合物和方法,肿瘤抗原包括肿瘤表达的能够通过抗原识别受体(例如,CD 19、MUC1)激活或诱导免疫应答或者能够通过受体-配体结合(例如,CD47、PD-L1/L2、B7.1/2)抑制免疫应答的任何多肽。

[0394] 技术人员会理解术语“病毒抗原”可涵盖病毒表达的能够诱导免疫应答的多肽。

[0395] 术语“包含”、“含有”意图具有美国专利法中赋予它们的广泛含义,并且可以表示“包括(includes)”等。相似地,术语“由…组成”和“基本上由…组成”具有美国专利法中赋予它们的含义。设想如本文公开的组合物和方法包含活性成分或指定步骤,由活性成分或指定步骤组成,或者基本上由活性成分或指定步骤组成。

[0396] 技术人员会理解术语“治疗”可涵盖试图改变治疗的个体或细胞的病程的临床干预,并且可预防性进行或在临床病理过程中进行。治疗的疗效包括但不限于预防疾病的发生或复发、缓解症状、减少疾病的任何直接或间接病理结果、防止转移、降低疾病发展速率、改善或缓解疾病状态以及缓解或改善的预后。通过预防疾病或病症的发展,治疗不仅可预防受影响或诊断的对象或者怀疑患有病症的对象中由于病症的恶化,而且治疗还可预防有病症风险或怀疑患有病症的对象中病症的发生或病症的症状。

[0397] 技术人员会理解术语“对象”可涵盖脊椎动物,在一实施方案中,指哺乳动物,并且在另一实施方案中,指人。在一实施方案中,对象还可以指家养动物如奶牛、绵羊、马、猫、狗以及实验室动物如小鼠、大鼠、沙鼠、仓鼠等。

[0398] 在一实施方案中,本文公开了CAR T-细胞,其中CAR涉及所关注的肽。在一实施方案中,CAR结合至所关注的肽。在另一实施方案中,CAR靶向所关注的肽。在另一实施方案中,CAR激活所关注的肽。在另一实施方案中,CAR是所关注的肽的配体。在另一实施方案中,所关注的肽是CAR的配体。这些实施方案中每个均考虑为本文公开的部分。

[0399] 在一实施方案中,如本文公开的免疫细胞不是T-细胞。在另一实施方案中,如本文公开的免疫细胞不是NK细胞。在另一实施方案中,如本文公开的免疫细胞不是CTL。在另一实施方案中,如本文公开的免疫细胞不是调节性T-细胞。在另一实施方案中,所述免疫细胞不是人胚胎干细胞。在另一实施方案中,所述免疫细胞不是由其可以分化淋巴样细胞的多能干细胞。

[0400] 使用方法

[0401] 免疫疗法的一种方法包括工程化患者自身的免疫细胞以产生会识别并攻击他们

的肿瘤的遗传修饰的免疫细胞。如本文所述,采集免疫细胞并遗传修饰,例如以在它们的细胞表面上产生嵌合抗原受体(CAR),其会允许免疫细胞如T-细胞识别肿瘤或癌细胞上的特异性蛋白抗原。然后将遗传修饰的免疫细胞如CAR T-细胞的扩大群体施用至患者。在一实施方案中,施用的细胞在患者的身体中增殖并且识别和杀死在它们表面上包含抗原的癌组织和肿瘤细胞。在另一实施方案中,施用的细胞在患者的身体中增殖并且识别和杀死肿瘤相关抗原,这导致癌组织和肿瘤细胞的死亡。

[0402] 在一实施方案中,本文公开了在经历CAR T-细胞癌症疗法的对象中抑制或减少细胞因子释放综合征或细胞因子风暴发生率的方法,以及在经历细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的对象中减少或抑制细胞因子产生的方法,所述方法包括施用包含凋亡细胞或凋亡细胞上清液的组合物的步骤。在另一实施方案中,本文公开了在接受CAR T-细胞癌症疗法的对象中治疗细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的方法。在另一实施方案中,本文公开了在接受CAR T-细胞癌症疗法的对象中预防细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的方法。在另一实施方案中,本文公开了在接受CAR T-细胞癌症疗法的对象中缓解细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的方法。在另一实施方案中,本文公开了在接受CAR T-细胞癌症疗法的对象中改善细胞因子释放综合征或细胞因子风暴的方法。在另一实施方案中,施用凋亡细胞或凋亡上清液或其组合物不减少CAR T-细胞疗法的效力。

[0403] 在一实施方案中,本文公开了在接受表达嵌合抗原受体T-细胞(CAR T-细胞)癌症疗法的对象中抑制或减少细胞因子释放综合征(CRS)或细胞因子风暴发生率的方法,其中所述方法包括向所述对象施用包含凋亡细胞的组合物或凋亡细胞上清液或其组合物的步骤。在另一实施方案中,抑制或减少细胞因子释放综合征(CRS)或细胞因子风暴的发生率通过测量接受表达嵌合抗原受体T-细胞癌症疗法并施用凋亡细胞或凋亡细胞上清液的对象中的细胞因子水平来确定。在另一实施方案中,将测量的细胞因子水平与未接受CAR T-细胞癌症疗法的对象中的细胞因子水平进行比较。在另一实施方案中,将测量的细胞因子水平与未施用凋亡细胞或凋亡细胞上清液的对象中的细胞因子水平进行比较。在另一实施方案中,将测量的细胞因子水平与对照对象进行比较。

[0404] 在另一实施方案中,与接受CAR T-细胞癌症疗法且不施用所述凋亡细胞或所述凋亡细胞上清液或其组合物的对象相比,促炎细胞因子的水平在所述对象中降低。在另一实施方案中,与接受CAR T-细胞癌症疗法且不施用所述凋亡细胞或所述凋亡细胞上清液或其组合物的对象相比,本文公开的方法减少或抑制至少一种促炎细胞因子的产生水平。

[0405] 在另一实施方案中,本文公开的方法可进一步包含施用额外的药物。或者,本文公开的方法可包含施用额外的药物以及凋亡细胞或凋亡细胞上清液。在进一步的实施方案中,额外的药物可以是增强或改善CAR T-细胞癌症疗法的那些化合物或组合物,或者它们的任何组合。在进一步的实施方案中,增强或改善CAR T-细胞癌症疗法的额外的药物包括CTLA-4阻断剂、 α -1抗胰蛋白酶或其功能片段或其类似物、基于铈的化合物、或免疫调节剂,或者它们的任何组合。在另一实施方案中,额外的药物包括凋亡细胞或凋亡上清液。在另一实施方案中,如本文所述,在所述CAR T-细胞癌症疗法之前、同时或之后施用额外的药物。

[0406] 在一实施方案中,在一实施方案中是托珠单抗的IL-6受体激动剂与如本文公开的组合物和方法一起使用。

[0407] 在一实施方案中,过继转移的T-细胞在淋巴细胞减少的宿主中更有效移植和扩

增。因此,在一实施方案中,在转移CAR T-细胞或其他修饰的免疫细胞之前使对象接受淋巴细胞耗竭。在另一实施方案中,接受CAR T-细胞的对象是给定的T-细胞支持性细胞因子。

[0408] 在一实施方案中,所述T-细胞是效应T-细胞。在另一实施方案中,所述T-细胞是幼稚T-细胞。在另一实施方案中,所述T-细胞是中央记忆(T_{CM}) T-细胞。在另一实施方案中,所述T-细胞是Th17细胞。在另一实施方案中,所述T-细胞是T干记忆细胞。在另一实施方案中,所述T-细胞具有高复制能力。在另一实施方案中,T-扩增发生在患者中。在另一实施方案中,可将少量细胞转移至患者。在另一实施方案中,T-细胞扩增发生在体外。在另一实施方案中,可将大量细胞转移至患者,可将细胞和/或上清液多次转移至患者,或者它们的组合。

[0409] 在一实施方案中,CAR T-细胞的优点是因为它们是细胞表面分子特异性的,它们克服MHC限制的TCR识别的限制,并且避免肿瘤通过抗原呈递或人白细胞抗原表达的损伤逃逸。

[0410] 在一实施方案中,本文公开了一种减少对象中的肿瘤负荷的方法,所述方法包括向所述对象施用如本文所述的任何组合物的步骤。

[0411] 在一实施方案中,减少肿瘤负荷包括减少对象中肿瘤细胞的数量。在另一实施方案中,减少肿瘤负荷包括减少对象中的肿瘤大小。在另一实施方案中,减少肿瘤负荷包括根除对象中的肿瘤。

[0412] 在另一实施方案中,本文公开了一种诱导对象中的肿瘤细胞死亡的方法,所述方法包括向所述对象施用如本文所述的任何组合物的步骤。在另一实施方案中,如本文公开的诱导对象中的肿瘤细胞死亡的方法包括施用包含工程化嵌合抗原受体的免疫细胞如NK细胞或T-细胞与至少一种额外的药物以减少对象中的毒性细胞因子释放或“细胞因子释放综合征”(CRS)或“严重细胞因子释放综合征”(sCRS)或“细胞因子风暴”。

[0413] 在另一实施方案中,本文公开了一种增加或延长患有瘤形成的对象的生存期的方法,所述方法包括向所述对象施用如本文所述的任何组合物的步骤。在另一实施方案中,增加或延长对象的生存期的方法包括施用包含工程化嵌合抗原受体的免疫细胞如NK细胞或T-细胞与至少一种额外的药物以减少对象中的毒性细胞因子释放或“细胞因子释放综合征”(CRS)或“严重细胞因子释放综合征”(sCRS)或“细胞因子风暴”。

[0414] 在另一实施方案中,本文公开了一种增加或延长患有瘤形成的对象的生存期的方法,所述方法包括向所述对象施用如本文所述的任何组合物的步骤。

[0415] 在另一实施方案中,本文公开了一种预防对象中的瘤形成的方法,所述方法包括向所述对象施用如本文所述的任何组合物的步骤。

[0416] 在一实施方案中,瘤形成选自由以下组成的组:血癌、B细胞白血病、多发性骨髓瘤、淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、卵巢癌或它们的组合。

[0417] 在另一实施方案中,本文公开了一种治疗有此需要的对象中的血癌的方法,所述方法包括向所述对象施用如本文所述的任何组合物的步骤。在一实施方案中,血癌选自由以下组成的组:B细胞白血病、多发性骨髓瘤、急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病和非霍奇金淋巴瘤。

[0418] 在一实施方案中,如本文公开的一种在经历细胞因子释放综合征或细胞因子风暴或者易受细胞因子释放综合征或细胞因子风暴影响的对象中减少或抑制细胞因子产生的方法减少或抑制细胞因子产生。在另一实施方案中,所述方法减少或抑制促炎细胞因子产

生。在进一步的实施方案中,所述方法减少或抑制至少一种促炎细胞因子。在另一实施方案中,其中所述对象接受CAR T-细胞癌症疗法,所述方法不减少所述CAR T-细胞癌症疗法的效力。

[0419] 本文提供的方法包括以有效达到期望效果的量施用本文公开的T-细胞、NK细胞或CTL细胞,它缓解现有症状或预防复发。对于治疗,施用的量是有效产生期望效果的量。有效量可通过一次或一系列施用来提供。有效量可通过团注或连续输注提供。

[0420] 技术人员会认识到“有效量”(或“治疗有效量”)可涵盖在治疗时足以产生有益或期望的临床结果的量。有效量可以以一个或多个剂量施用至对象。关于治疗,有效量是足以缓解、改善、稳定、逆转或延缓疾病发展,或者减少疾病的病理后果的量。有效量一般由医生在具体情况的基础上确定,并且在本领域的技术内。当确定适当剂量以达到有效量时,通常考虑几个因素。这些因素包括对象的年龄、性别和体重,治疗的症状,症状的严重程度以及施用的抗原结合片段的形式和有效浓度。

[0421] 对于利用抗原特异性T-细胞如CAR T-细胞的过继免疫疗法,通常输注 10^6 - 10^{10} (例如, 10^9)范围中的细胞剂量。在将遗传修饰的细胞施用入宿主和随后的分化时,诱导特异性针对特定抗原的T-细胞。T-细胞的“诱导”可包括例如通过缺失或无能灭活抗原特异性T-细胞。灭活特别可用于例如在自身免疫性病症中建立或重新建立耐受性。修饰的细胞可通过本领域已知的任何方法施用,包括但不限于静脉内、皮下、结节内、肿瘤内、鞘内、胸膜内、腹腔内和直接至胸腺。在一实施方案中,所述T-细胞不腹腔内施用。在一实施方案中,所述T-细胞肿瘤内施用。

[0422] 包含如本文公开的遗传修饰的免疫应答细胞(例如,T-细胞、N细胞、CTL细胞或它们的祖代)的组合物可以全身提供或直接提供至对象用于治疗瘤形成、病原体感染或感染性疾病。在一实施方案中,将本文公开的细胞直接注射入所关注的器官中(例如,受瘤形成影响的器官)。或者,将包含遗传修饰的免疫应答细胞的组合物间接提供至所关注的器官,例如,通过施用入循环系统(例如,肿瘤血管)。可以在施用细胞之前、期间或之后提供扩增和分化剂以在体外或体内增加T-细胞、NK细胞或CTL细胞的产生。

[0423] 修饰的细胞可在任何生理学可接受的媒介物中施用,通常血管内,虽然还可将它们引入骨或其他方便部位,在那里细胞可以找到再生和分化的适当部位(例如,胸腺)。通常,施用至少 1×10^5 个细胞,最终达到 1×10^{10} 或更多。本文公开的遗传修饰的免疫应答细胞可包含纯化的细胞群体。本领域技术人员可利用各种公知的方法如荧光激活细胞分选术(FACS)容易地确定群体中遗传修饰的免疫应答细胞的百分比。在一些实施方案中,包含遗传修饰的免疫应答细胞的群体中的纯度范围是约50-约55%、约55-约60%和约65-约70%。在其他实施方案中,纯度是约70-约75%、约75-约80%、约80-约85%。在进一步的实施方案中,纯度是约85-约90%、约90-约95%和约95-约100%。本领域技术人员可容易地调整剂量(例如,纯度降低可能需要剂量增加)。可通过注射、导管等引入细胞。如果期望,还可包括因子,包括但不限于白介素,例如IL-2、IL-3、IL-6、IL-1₁、IL7、IL12、IL15、IL21以及其他白介素,集落刺激因子,如G-、M-和GM-CSF,干扰素,例如 γ -干扰素和促红细胞生成素。

[0424] 组合物包括药物组合物,所述药物组合物包含遗传修饰的免疫应答细胞或它们的祖代以及药学可接受的载体。施用可以是自体的或异源的。例如,免疫应答细胞或祖代可以获得自一个对象,并且施用至相同对象或不同的相兼容对象。本文公开的外周血衍生的免

疫应答细胞或它们的子代(例如,体内、离体或体外衍生的)可通过局部注射施用,包括导管施用、全身性注射、局部注射、静脉内注射或肠胃外施用。当施用如本文公开的治疗性组合物时(例如,包含遗传修饰的免疫应答细胞的药物组合物),其一般配制于单位剂量可注射形式中(溶液剂、混悬剂、乳剂)。

[0425] 在另一实施方案中,本文公开了一种制备包含如本文公开的CAR T-细胞或其他免疫细胞以及凋亡细胞或凋亡细胞上清液的组合物的方法,所述方法包括将编码结合至所关注的抗原的CAR的核酸序列引入T-细胞或免疫细胞。在一替代实施方案中,包含如本文公开的CAR T-细胞或其他免疫细胞的组合物与包含凋亡细胞或凋亡上清液的组合物分开。

[0426] 技术人员会理解遗传修饰的免疫细胞如CAR修饰的T细胞引发的抗肿瘤免疫应答可以是主动或被动免疫应答。此外,CAR介导的免疫应答可以是过继免疫治疗方法的部分,其中CAR修饰的T-细胞诱导CAR中抗原结合部分特异性的免疫应答。

[0427] 技术人员会理解免疫治疗可涵盖免疫效应细胞和分子以靶向并摧毁癌细胞的用途。免疫效应子可以是例如肿瘤细胞表面上一些标志物特异性的抗体。单独的抗体可用作治疗的效应子,或者其可募集其他细胞来真正影响细胞杀死。所述抗体还可以缀合至药物或毒素(化疗剂、放射性核素、蓖麻毒蛋白A链、霍乱毒素、百日咳毒素),并且仅用作靶向剂。或者,效应子可以是携带与肿瘤细胞靶标直接或间接相互作用的表面分子的淋巴细胞。各种效应细胞包括细胞毒性T细胞和NK细胞。

[0428] 恶性肿瘤

[0429] 在一些实施方案中,在治疗、预防、抑制、减少发生率、改善或缓解癌症或肿瘤的方法中利用CAR T-细胞,其中所述方法包括施用表达嵌合抗原受体T-细胞(CAR T-细胞)的步骤。如本文公开的,为了抑制或减少CRS或细胞因子风暴的发生率,这些方法可以进一步包括施用额外的药物。

[0430] 在一实施方案中,所述癌症是B-细胞恶性肿瘤。在一实施方案中,所述B-细胞恶性肿瘤是白血病。在另一实施方案中,所述B-细胞恶性肿瘤是急性淋巴细胞白血病(ALL)。在另一实施方案中,所述B-细胞恶性肿瘤是慢性淋巴细胞白血病。

[0431] 在一实施方案中,所述癌症是白血病。在一实施方案中,所述癌症是淋巴瘤。在一实施方案中,所述淋巴瘤是大B-细胞淋巴瘤。

[0432] 在一实施方案中,所述肿瘤是实体瘤。在另一实施方案中,实体瘤是缺少囊或液体区域的异常组织块。在另一实施方案中,实体瘤是通过除血液、骨髓或淋巴细胞以外的身体组织细胞的异常生长形成的赘生物(细胞的新生长)或损伤(解剖结构的损伤或生理功能的紊乱)。在其他实施方案中,实体瘤由异常的细胞块组成,其可来源于不同组织类型如肝、结肠、乳房或肺,并且其最初在其细胞起源的器官中生长。但是,这类癌症可通过疾病晚期中的转移性肿瘤生长扩散至其他器官。

[0433] 在一实施方案中,所述肿瘤是实体瘤。在另一实施方案中,实体瘤的实例是肉瘤、癌和淋巴瘤。

[0434] 在另一实施方案中,所述实体瘤包含肾上腺皮质肿瘤(腺瘤和癌)、癌、结肠直肠癌、硬纤维瘤、促纤维增生性小圆细胞肿瘤、内分泌肿瘤、尤文肉瘤、生殖细胞瘤、肝母细胞瘤、肝细胞癌、黑素瘤、神经母细胞瘤、骨肉瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、除横纹肌肉瘤以外的软组织肉瘤以及维耳姆斯瘤。在一实施方案中,所述实体瘤是乳房肿瘤。在另一实施

方案中,所述实体瘤是前列腺癌。在另一实施方案中,所述实体瘤是结肠癌。在一实施方案中,所述肿瘤是脑瘤。在另一实施方案中,所述肿瘤是胰腺肿瘤。在另一实施方案中,所述肿瘤是结肠直肠肿瘤。

[0435] 在另一实施方案中,如本文公开的组合物和方法对肉瘤和癌具有治疗和/或预防效力(例如,纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、尼罗河管癌(nile duct carcinoma)、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、维耳姆斯瘤、子宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜细胞瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突胶质细胞瘤、神经鞘瘤、脑膜瘤、黑素瘤、神经母细胞瘤以及视网膜母细胞瘤)。如本文公开的组合物和方法可以用来治疗、预防、抑制、改善、减少发生率或缓解本领域已知的任何实体瘤。

[0436] 在另一实施方案中,所述肿瘤是血液肿瘤。在一实施方案中,血液肿瘤是影响血液、骨髓和淋巴结的癌症类型。血液肿瘤可以衍生自两种主要血液细胞谱系之一:髓系和淋巴样细胞系。髓系细胞系通常产生粒细胞、红细胞、血小板、巨噬细胞和mast-细胞,而淋巴样细胞系产生B、T、NK和浆细胞。淋巴瘤(例如霍奇金淋巴瘤)、淋巴细胞白血病和骨髓瘤衍生自淋巴样系,而急性和慢性髓性白血病(AML、CML)、骨髓增生异常综合征和骨髓增生性疾病的起源是髓系的。

[0437] 在另一实施方案中,如本文公开的组合物和方法对白血病(例如,急性白血病、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性粒细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、急性粒单核细胞白血病、急性单核细胞白血病、急性红白血病、慢性白血病、慢性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤(霍奇金病、非霍奇金病)、华氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)、重链疾病具有治疗和/或预防效力。如本文公开的组合物和方法可以用来治疗、预防、抑制、改善、减少发生率或缓解本领域已知的任何血液肿瘤。

[0438] 在一实施方案中,本文公开了如本文公开的多肽或肽结构域中任一种的活性片段。技术人员会理解术语“片段”可涵盖至少5、10、13或15个氨基酸。在其他实施方案中,片段是至少20个连续氨基酸。本文公开的片段可通过本领域技术人员已知的方法产生或者可由正常蛋白加工所致(例如,从新生多肽去除生物活性不需要的氨基酸或者通过替代的mRNA剪接或替代的蛋白加工事件去除氨基酸)。

[0439] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”在最广泛的意义上可交换使用,并且特别指多克隆抗体、单克隆抗体或它们的任何片段,其保留抗体的结合活性。在某些实施方案中,本文公开的方法包括使用嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0440] 技术人员会理解术语“多克隆抗体(或抗体)”可涵盖针对相同抗原的不同决定簇(表位)的不同抗体的群体。

[0441] 技术人员会理解术语“单克隆抗体(或抗体)”可涵盖基本上均质的抗体群体,即,包含群体的单独抗体是相同的,除了可能少量存在的天然存在的突变。单克隆抗体针对单个抗原位点。

[0442] 本文公开的单克隆抗体可利用由Kohler等人, Nature, 256:495 (1975) 首先描述的杂交瘤方法制备, 或者可通过重组DNA方法制备(参见例如, 美国专利第4,816,567号)。

[0443] 在杂交瘤方法中, 将小鼠或其他适当的宿主动物如仓鼠免疫以引发产生或能够产生特异性地结合至用于免疫的蛋白质的抗体的淋巴细胞。所关注的蛋白质的抗体一般在动物中通过皮下(sc)或腹腔内(ip)注射所关注的期望蛋白质和佐剂而产生。在一实施方案中, 用偶联至作为载体蛋白的匙孔血蓝蛋白(KLH, Sigma Aldrich)的所关注的蛋白质免疫动物。

[0444] 利用本领域公知的方法制备用于动物免疫的所关注的蛋白质。例如, 所关注的蛋白质可通过重组方法或通过肽合成方法制备。

[0445] 或者, 可将淋巴细胞体外免疫, 然后利用合适的融合剂如聚乙二醇与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986))。

[0446] 单克隆抗体的结合亲和力可例如通过Munson等人, Anal Biochem., 107:220 (1980)的Scatchard分析确定。

[0447] 本文公开的抗体可利用组合文库制备以筛选具有期望活性的合成抗体克隆。原理上, 通过利用本领域公知的方法筛选噬菌体文库选择合成抗体克隆, 所述噬菌体文库包含展示融合至噬菌体外壳蛋白的抗体可变区(Fv)的各种片段的噬菌体。

[0448] 技术人员会理解术语“保留抗体结合活性的其任何片段”可涵盖抗体的一部分, 其可包含抗体的抗原结合或其可变区, 能够结合至完整抗体的靶抗原。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段。

[0449] 这些抗体片段可通过重组技术或通过传统方式如酶促消化产生。6个抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个相同的抗原结合片段, 称作“Fab”, 每个具有单个结合位点, 以及残余的“Fc”片段。胃蛋白酶处理产生F(ab')₂片段, 其具有两个抗原结合位点且仍然能够交联抗原。“Fv”是包含完整的抗原识别和结合位点的最小抗体片段。

[0450] 利用本领域公知的方法制备本文公开的多克隆抗体和单克隆抗体。

[0451] 在一实施方案中, 本文公开了CAR T-细胞或相关组合物, 其中CAR是T-细胞内源的。在一实施方案中, “内源”包含在细胞或组织中正常表达的核酸分子(例如, cDNA、DNA或RNA分子)或多肽。

[0452] 在另一实施方案中, 本文公开了CAR T-细胞或相关组合物, 其中CAR是T-细胞外源的。在一实施方案中, “外源”包含不是内源性存在于细胞中, 或者不以足以达到在人工过量表达时获得的功能效果的水平存在的核酸分子或多肽。技术人员会理解术语“外源”因此会涵盖细胞中表达的任何重组核酸分子或多肽, 如外来的、异源的和过量表达的核酸分子和多肽。

[0453] 在一实施方案中, 本文公开了免疫细胞, 在一实施方案中, CAR T-细胞, 其中所述T-细胞是对象自体的。在另一实施方案中, CAR T-细胞对对象是异源的。在一实施方案中, CAR T-细胞是同种异体的。在一实施方案中, CAR T-细胞是通用的同种异体CAR T-细胞。在另一实施方案中, T-细胞可以是自体的、同种异体的或者体外衍生自工程化的祖细胞或干细胞。

[0454] 在另一实施方案中, 本文描述的CAR T-细胞和凋亡细胞均衍生自相同来源。在进

一步的实施方案中,本文描述的CAR T-细胞和凋亡细胞均衍生自对象(图1)。在一可选实施方案中,本文描述的CAR T-细胞和凋亡细胞衍生自不同来源。在另一实施方案中,CAR T-细胞是自体的,而本文描述的凋亡细胞是同种异体的(图2)。技术人员会理解,相似地,凋亡细胞上清液可以制备自细胞,所述细胞衍生自与CAR T-细胞相同的来源,在一实施方案中,其可以是自体细胞,或者凋亡细胞上清液可以制备自细胞,所述细胞衍生自与CAR T-细胞的来源不同的来源。

[0455] 技术人员会理解术语“异源”可涵盖衍生自不同生物体的组织、细胞、核酸分子或多肽。在一实施方案中,异源蛋白质是最初克隆自或衍生自不同的T-细胞类型或与受体不同种并且通常不存在于细胞或获得自细胞的样品中的蛋白质。

[0456] 技术人员会理解术语“自体”可涵盖其中供体和受体是同一个人的组织、细胞、核酸分子或多肽。

[0457] 技术人员会理解术语“同种异体”可涵盖衍生自相同物种的不同对象的组织、细胞、核酸分子或多肽。在一实施方案中,同种异体的供体细胞在遗传上不同于受体。

[0458] 在另一实施方案中,如本文公开的组合物和方法利用联合疗法,用如本文公开的凋亡细胞或凋亡上清液,以及一种或多种CTLA-4-阻断剂如依匹木单抗。在一实施方案中,CTLA-4是有助于保持自身耐受性的T-细胞激活的有效抑制剂。在一实施方案中,在另一实施方案中是抗体的抗CTLA-4阻断剂的施用产生T-细胞激活的净效应。在另一实施方案中,如本文公开的组合物和方法利用包含凋亡细胞、CAR T-细胞以及一种或多种CTLA-4-阻断剂的联合疗法。

[0459] 在某些情况下,相对于未修饰的氨基酸序列,如本文公开的方法中使用的多肽包含至少一个保守氨基酸取代。在其他情况下,所述多肽包含非保守氨基酸取代。在这类情况下,相对于缺少这样的氨基酸取代的多肽,具有这类修饰的多肽表现出增加的稳定性或更长的半衰期。

[0460] 在一实施方案中,如本文公开的方法可以表现为如本文所述的组合物在如本文所述的各种治疗和预防目的中的用途,或者,如本文所述的组合物在制备药物或治疗组合物或用于如本文所述的各种治疗和预防目的的组合物中的用途。

[0461] 在一实施方案中,如本文公开的组合物和方法包含各种成分或步骤。但是,在另一实施方案中,如本文公开的组合物和方法基本上由各种成分或步骤组成,其中可包括其他成分或步骤。在另一实施方案中,如本文公开的组合物和方法由各种成分或步骤组成。

[0462] 在一些实施方案中,术语“包含”可涵盖包括本领域可能已知的影响组合物效力的组合物的其他成分。在一些实施方案中,术语“基本上由…组成”包含组合物,其具有表达嵌合抗原受体T-细胞(CAR T-细胞),以及凋亡细胞或任何凋亡细胞上清液。但是,可包括不直接参与组合物的效用的其他成分。在一些实施方案中,术语“由…组成”涵盖如本文所述的任何形式或实施方案中的具有表达嵌合抗原受体T-细胞(CAR T-细胞)以及凋亡细胞或凋亡细胞上清液的组合物。

[0463] 在一实施方案中,“治疗”包含治疗性治疗,而“预防”包含预防或防范措施,其中目的是防止或减轻如上文所述的靶标病理状况或病症。因此,在一实施方案中,治疗可包括直接影响或治愈、压制、抑制、预防、减少疾病、病症或症状的严重程度,延迟疾病、病症或症状的发生,减少疾病、病症或症状相关症状,或者它们的组合。因此,在一实施方案中,“治疗”、

“改善”和“缓解”是指延迟发展,加快缓解,诱导缓解,增强缓解,加速恢复,增加替代疗法的效力或减少对替代疗法的抗性,或者它们的组合。在一实施方案中,“预防”是指延迟症状的发生,防止疾病复发,减少复发的次数或频率,增加症状发作之间的潜伏期,或者它们的组合。在一实施方案中,“压制”或“抑制”是指减轻症状的严重程度,减轻急性发作的严重程度,减少症状的数量,减少疾病相关症状的发生率,减少症状的潜伏期,改善症状,减少继发症状,减少继发感染,延长患者生存期,或者它们的组合。

[0464] 在一实施方案中,如本文公开的组合物施用一次。在另一实施方案中,所述组合物施用两次。在另一实施方案中,所述组合物施用三次。在另一实施方案中,所述组合物施用四次。在另一实施方案中,所述组合物施用至少四次。在另一实施方案中,所述组合物施用超过四次。

[0465] 在一实施方案中,如本文公开的CAR T-细胞施用一次。在另一实施方案中,CAR T-细胞施用两次。在另一实施方案中,CAR T-细胞施用三次。在另一实施方案中,CAR T-细胞施用四次。在另一实施方案中,CAR T-细胞施用至少四次。在另一实施方案中,所述组合物施用超过四次。

[0466] 在一实施方案中,如本文公开的组合物是治疗性组合物。在另一实施方案中,如本文公开的组合物具有治疗效力。

[0467] 在一实施方案中,本文公开了一种组合物,其与包含单独的CAR T-细胞的组合物相比提供减少的炎性细胞因子或趋化因子释放,但是与包含单独的CAR T-细胞的组合物相比具有可比的细胞毒性。

[0468] 技术人员会理解术语“约”可涵盖与所示数字或数字的范围0.0001-5%的偏差。此外,其可涵盖与所示数字或数字的范围1-10%的偏差。此外,其可涵盖与所示数字或数字的范围多达25%的偏差。

[0469] 技术人员会理解单数形式“一个”、“一种”,“这个”和“该”包括复数指代,除非上下文另有明确指定。例如,术语“一种药物”或“至少一种药物”可包括许多药物,包括其混合物。

[0470] 在这个申请中,本文公开的各种实施方案可以以范围形式显示。应当理解范围形式的描述仅为了方便和简洁,并且不应当理解为对本公开范围的僵硬限制。因此,范围的描述应当考虑具有具体公开的所有可能的亚范围以及该范围内的单独数值。例如,范围的描述如1-6应当考虑具有具体公开的亚范围如1-3、1-4、1-5、2-4、2-6、3-6等,以及该范围内的单独数字,例如,1、2、3、4、5和6。无论范围的宽度这都适用。

[0471] 无论何时在本文中显示数字范围,其表示包括所示范围内的任何引用的数字(分数或整数)。短语第一所示数字和第二所示数字“之间的范围”以及“从”第一所示数字“至”第二所示数字“的范围”在本文中可交换使用,并且表示包括第一和第二所示数字以及之间的所有分数和整数数字。

[0472] 示出以下实施例以便更充分地说明本文公开的实施方案。但是,它们不应当理解为限制本公开的广泛范围。

实施例

[0473] 实施例1:凋亡细胞疗法在施用CAR T-细胞疗法的对象中预防细胞因子风暴

[0474] 材料和方法

[0475] 重组DNA构建体

[0476] 开发CAR,其重新靶向T-细胞针对特定肿瘤相关抗原的特异性。开发对照CAR,其引导T-细胞至无关的肿瘤相关抗原。用于背景的CAR是武装的CAR T或第4代CAR T-细胞。在一实施方案中,还将细胞工程化以表达连接至IL-2和IL-15受体使用的β-链的跨膜和胞内结构域的IL-4受体α亚基的胞外结构域,允许通过添加IL-4扩增T-细胞。

[0477] T4+T-细胞的逆转录病毒转导和培养

[0478] 血液样品获得自健康志愿者和癌症患者。可以在基因转移之前利用CD3/CD28包被的顺磁珠(1:1珠/细胞比例;Life Technologies)或PHA(5mg/ml;Sigma-Aldrich)激活T-细胞。激活的T-细胞的逆转录病毒转导利用PG13逆转录病毒包装细胞进行。当指示时,利用在良好制造规范(GMP)下制造的SFG T4病毒载体进行转导,然后利用透气袋中的GMP级IL-4(30ng/ml)进行T-细胞的扩增。

[0479] 细胞和细胞培养

[0480] 将表达萤火虫萤光素酶的肿瘤细胞系在适当培养基中增殖,例如,补充了10%FBS(Sigma-Aldrich)、GlutaMAX和抗生素抗真菌剂溶液(Life Technologies)的DMEM(Lonza, Basel, Switzerland)。

[0481] 流式细胞术

[0482] 利用生物素化的Ab和链霉抗生物素蛋白-PE(Life Technologies)检测CAR的表达。为了定量来自小鼠的器官中的肿瘤抗原表达,利用注射器柱塞将解剖的组织在PBS中匀浆并通过100-μm细胞滤器过滤。用红细胞裂解液(Miltenyi Biotec, Bisley, U.K.)处理之后,利用4%多聚甲醛固定细胞(37°C保持10min),利用冰冷的甲醇透化30min,并且用40% D10/60% PBS洗涤。然后,将细胞用兔抗肿瘤抗原抗体或作为对照的兔血清(Dako, Ely, U.K.)随后猪F(ab₉)₂抗兔IgG-FITC(Dako)温育。或者,通过流式细胞术证实人肿瘤抗原受体的表达。在所有情况下,前向散射/侧向散射栅用来鉴定结构域T-细胞群体存在。利用FACSCalibur流式细胞仪与CellQuest Pro软件进行流式细胞术。

[0483] 细胞因子分析

[0484] 利用ELISA药物盒、流式微球阵列(Th1/Th2/Th17;BD Biosciences)如制造商所述分析上清液和血清。例如,可以对促炎细胞因子进行分析,在一种情况下其是IL-6。

[0485] 细胞毒性测定

[0486] 通过结晶紫染色可见肿瘤细胞单层的破坏。如制造商所述,利用MTT测定(Life Technologies)定量肿瘤细胞生存力。

[0487] 体外萤光素酶测定

[0488] 如制造商所述,利用萤光素酶测定系统药物盒(Promega, Madison, WI)测定总计 0.5×10^6 转导的(以及匹配的未转导的细胞作为对照)。利用酶标仪用Omega软件读取测定。

[0489] 体内研究

[0490] 将肿瘤细胞(1×10^6)在PBS中腹腔内注射(i.p.)或在200ml人工基底膜(matrigel)(BD Biosciences)中s.c.接种入小鼠。通过生物发光成像(BLI)证实肿瘤移植,并且在T-细胞施用之前将小鼠分为具有相似信号强度的组。利用IVIS Lumina II或Spectrum(PerkinElmer)用Living Image软件(PerkinElmer)进行成像,利用large

binning用于T-细胞成像。为了评价T-细胞的体内毒性,从小鼠采集器官,福尔马林固定并进行组织病理学分析。结果

[0491] CAR T-细胞针对并破坏表达所关注的靶标的肿瘤细胞

[0492] 所关注的肿瘤相关抗原在健康小鼠组织中低水平表达,并且表达在小鼠中的肿瘤上。

[0493] 在体外,人CAR T快速破坏肿瘤细胞单层,而对照T-细胞不破坏肿瘤细胞。此外,用表达肿瘤相关抗原的肿瘤细胞刺激T-细胞之后观察到细胞因子产生。作为对照,测试未转化的小鼠细胞的人CAR T-细胞激活。未转化的小鼠细胞也刺激人CAR T-细胞,证实它们也表达肿瘤相关抗原。未转化的小鼠细胞不刺激人CAR T-细胞。

[0494] CAR T-细胞疗法诱导细胞因子释放综合征

[0495] 向3组不含肿瘤的小鼠以及具有肿瘤的小鼠施用(i.p.或直接进入肿瘤)增加剂量的CAR T-细胞(3×10^6 、 10×10^6 或 30×10^6)。在最高剂量,不含肿瘤的小鼠和具有肿瘤的小鼠证实24h内低迷的行为、竖毛和减少的活动性,伴随有快速体重减轻然后48hr内死亡。人干扰素- γ 和小鼠IL-6在来自给予最高剂量的CAR T-细胞的小鼠的血液样品中可检测。接受高剂量的针对不同肿瘤抗原的CAR T-细胞的动物未表现出体重减轻或行为改变。

[0496] 凋亡细胞的施用抑制或减少CAR T-细胞疗法诱导的细胞因子释放综合征发生率

[0497] 将给予最高剂量的CAR T-细胞的一组小鼠同时施用 2.10×10^8 /kg凋亡细胞,以前证实这是安全和有效的剂量。接受CAR T+凋亡细胞的小鼠具有显著降低水平的小鼠IL-6、较低的体重减轻和减少的死亡率。

[0498] 实施例2:凋亡细胞对细胞因子风暴的影响没有对CAR-T细胞效力的负面影响

[0499] 目的:测试凋亡细胞或衍生自凋亡细胞的上清液对细胞因子风暴标志物细胞因子以及CAR T-细胞对肿瘤和癌细胞效力的影响。

[0500] 方法:

[0501] 利用报道在小鼠中诱导细胞因子风暴的实体瘤模型(van der Stegen et al., 2013ibid)。在这个模型中,将T细胞用靶向某些ErbB二聚体的嵌合抗原受体(CAR)工程化($T4^+$ CAR-T细胞),其经常在特定实体瘤如头颈肿瘤和卵巢癌中高度上调。利用CD3微珠从分离自外周血的PBMC分离T-细胞。构建包含嵌合T4+受体的载体并转导入分离的T-细胞,导致T4+CAR T-细胞。对于本文中进行的实验,购买T4+CAR T-细胞(Creative Biolabs (NY USA)或Promab Biotechnologies (CA USA))。图3示出利用流式细胞术和抗CD124单克隆抗体验证T4+CAR T-细胞上 $4\alpha\beta$ (嵌合细胞因子受体)的细胞表面表达(Wilkie et al., ibid)。此外,进行PCR程序并验证转导的T细胞中载体的存在。

[0502] 使用SKOV3-luc卵巢腺癌组织培养细胞(Wilkie et al., ibid)。SKOV3-luc高表达ErbB受体,并且是 $T4^+$ CAR-T细胞的靶标(van der Stegen et al., 2013, ibid)。操纵这些SKOV3-luc细胞以组成型表达萤火虫萤光素酶基因,允许在体外追踪细胞增殖以及在体内追踪肿瘤生长和衰退。

[0503] 凋亡细胞

[0504] 通过白细胞去除术过程从健康、合格的供体采集富集的单个核细胞级分。该过程在Hadassah Ein Kerem分离单元进行。在白细胞去除术完成之后立即将采集的细胞加工并储存在液氮中。为了制备凋亡细胞(ApoCell),将冻存的细胞解冻,洗涤,然后在50mg/mL甲

基泼尼松龙 (Pfizer, NY, USA) 和10%自体血浆的存在下在37℃下于5%CO₂中温育6小时。在温育结束时,收集细胞,洗涤并用根据下游应用选择的缓冲液重悬。利用膜联蛋白V和PI (MBL, MA, USA) 染色 (分别≥40%和≤15%) 通过流式细胞仪确定ApoCell的凋亡和生存力。利用FCS表达软件分析结果。

[0505] 凋亡细胞上清液

[0506] 将8x10⁶个凋亡细胞/接种/孔于12-孔板中。24小时之后将细胞离心 (290g, 4摄氏度, 10分钟)。收集上清液并等分冷冻在-80度下直至使用。不同数量的细胞用来制备上清液。一些等分试样包含浓缩的上清液。

[0507] 单核细胞分离

[0508] 利用Ficoll (GE healthcare, United Kingdom) 从获得自健康、合格供体的外周血\血沉棕黄层分离PBMC。使细胞在RPMI1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) 中浓度为15x10⁶个细胞/ml, 并且在0.9ml液滴中接种于35mm板 (Corning, NY, USA) 的中间。然后将板在37℃下于5%CO₂中温育1小时。在温育结束时, 将细胞用PBS (Biological industries, Beit Haemek, Israel) 洗涤3次, 并且利用光学显微镜确定粘附。然后将细胞用完全培养基 (RPMI1640+10%热灭活的FBS+1%Glutamax+1%PenStrep, 全部来自Gibco) 温育。

[0509] 还使用单核细胞分离的替代方法, 其中人单个核细胞通过密度梯度离心分离自肝素化的外周血。然后通过磁珠分离 (Miltenyi Biotec., Auburn, CA, USA) 阳性选择单核细胞为CD14⁺级分, 阳性选择B-细胞为CD22⁺, 以及阴性选择T-细胞为CD14-CD22-级分, 将分离的单个核细胞分为单核细胞、B-细胞和T-细胞群体。对于单核细胞, 纯度大于95%。

[0510] 对于巨噬细胞分化, 在粘附结束时, 将细胞用PBS洗涤3次, 然后用RPMI1640+1% Glutamax+1%PenStrep和10%热灭活的人AB血清 (Sigma, MO, USA) 温育。将细胞在37℃和5%下温育7-9天, 在第3天和第6天更换培养基。通过光显微镜通过形态学确定分化。

[0511] 来自apo+单核细胞的上清液

[0512] 将CD14⁺单核细胞用如上文制备的凋亡细胞以1:16的比例培养24h。单核细胞的数量为: 12-孔板中0.5x10⁶个细胞/孔, 而凋亡细胞的数量为: 12-孔板中8x10⁶个细胞/孔。温育24小时之后将细胞离心 (290g, 4摄氏度, 10分钟)。收集上清液并等分冷冻在-80度下直至使用。可以以不同比例的单核细胞: 凋亡细胞和/或利用其他来源的细胞如巨噬细胞和树突细胞进行相似的过程。

[0513] 结果:

[0514] 步骤1: T4⁺CAR-T细胞针对SKOV3-luc肿瘤细胞的活性的验证

[0515] 为了证实T4⁺CAR-T细胞活性, 将SKOV3-luc的单层暴露于1,000,000 (一百万) T4⁺CAR-T细胞或1,000,000 (一百万) 未转导的T细胞。24h温育之后, 与未转导的T细胞对照相比, T4⁺CAR-T细胞减少SKOV3-luc增殖30% (图4), 显示T4⁺CAR-T细胞的抗肿瘤活性。

[0516] 步骤2: 将单独T4⁺CAR-T细胞抗SKOV3-luc肿瘤细胞的活性与暴露于凋亡细胞后的活性进行比较

[0517] 测试凋亡细胞 (ApoCell) 和凋亡细胞上清液 (ApoSup和ApoMon Sup) 以确定它们是否干扰T4⁺CAR-T细胞抗肿瘤活性。将SKOV3-luc肿瘤细胞与凋亡细胞温育1小时, 然后添加T4⁺CAR-T细胞 (500,000, 五十万) 或T4⁺未转导的T细胞 (500,000, 五十万) (1:2T4⁺CAR-T细

胞比凋亡细胞的比例)。然后将肿瘤细胞/凋亡细胞/T4⁺CAR T-细胞共培养48h。将对照SKOV3-luc肿瘤细胞与T4+CAR-T细胞和Hartman溶液(凋亡细胞的媒介物)共培养48h,但是没有凋亡细胞。

[0518] 结果显示48h温育之后,T4+CAR-T细胞抗肿瘤活性优于用未转导的T细胞温育。用凋亡细胞上清液进行相似的温育。令人惊讶的是,暴露或未暴露于凋亡细胞或凋亡细胞上清液,T4+CAR T-细胞抗肿瘤活性是可比的。(图5)。

[0519] 步骤3:凋亡细胞对改善、减少或抑制CAR-T治疗所致的细胞因子风暴的影响

[0520] 然后检测凋亡细胞减少细胞因子风暴的效果。IL-6是在细胞因子风暴中释放的原型促炎细胞因子(Lee DW et al. (2014) Blood 124 (2):188-195),并且经常用作细胞因子风暴反应的。

[0521] 建立以模仿体内CAR T-细胞疗法环境的培养。将SKOV3-luc肿瘤细胞在人单核细胞-巨噬细胞和T4+CAR T-细胞的存在下培养。培养基中测量的IL-6浓度为大约500-600pg/ml。IL-6的这个浓度代表细胞因子风暴。

[0522] 出乎意料的是,在SKOV3-luc肿瘤细胞、人单核细胞-巨噬细胞、T4+CAR-T细胞的培养基中测量的IL-6水平显著降低,其中肿瘤细胞以前已用凋亡细胞温育1小时(1:2T4+CAR-T细胞比凋亡细胞的比例)。相似地,在SKOV3-luc肿瘤细胞、人单核细胞-巨噬细胞、T4+CAR-T细胞的培养基中测量的IL-6水平显著降低,其中肿瘤细胞以前已用凋亡细胞上清液温育1小时。IL-6浓度的这种减少代表细胞因子风暴减少(图6)。

[0523] 得出结论,出乎意料地,凋亡细胞和凋亡细胞上清液不废除CAR-T细胞对肿瘤细胞增殖的影响,同时它们下调促炎细胞因子如IL-6,其描述为导致发病的主要细胞因子。

[0524] 步骤4:利用广泛细胞因子的分析

[0525] 为了进一步评价对实验过程中未产生但是在人细胞因子风暴期间的临床环境中出现的细胞因子可能更广泛范围和水平的影响,将LPS(10ng/ml)添加至上文列出的SKOV3-luc培养条件。预期LPS的添加指数增加细胞因子风暴水平。如预期的,LPS的添加增加细胞因子风暴影响,并且结果IL-6水平增加至约30,000pg/ml。已知在细胞因子风暴期间高水平表达的其他细胞因子表现出升高的水平,例如:TNF- α (250-300pg/ml)、IL-10(200-300pg/ml)、IL1- α (40-50pg/ml)和IL-18(4-5pg/ml)。如图7所示,暴露于凋亡细胞甚至在细胞因子风暴的指数状态期间将IL-6的水平降低至几乎正常的水平,该水平可能在临床环境中见到并且在用CAR T-细胞的实验过程中并不总是见到。这种影响在其他促炎细胞因子中是相似的,具有归一化水平的细胞因子TNF- α 、IL-10、IL1 α 、IL-1 β 和IL-18,减少20-90%。当利用凋亡细胞上清液代替凋亡细胞时发现相似的结果。

[0526] 结论

[0527] 已记录CAR-T细胞疗法在大量患者中引起细胞因子风暴。这里示出的这些结果证实,令人惊讶地,凋亡细胞和凋亡细胞上清液能够减少细胞因子风暴而不影响CAR-T细胞杀死肿瘤细胞的效力。

[0528] 虽然本文已说明和描述本文公开的某些特征,但是对于本领域技术人员许多修改、取代、改变和等同物现在会出现。因此,应当理解所附权利要求意图覆盖所有这类修改和改变,如落在本文公开的真实精神内。

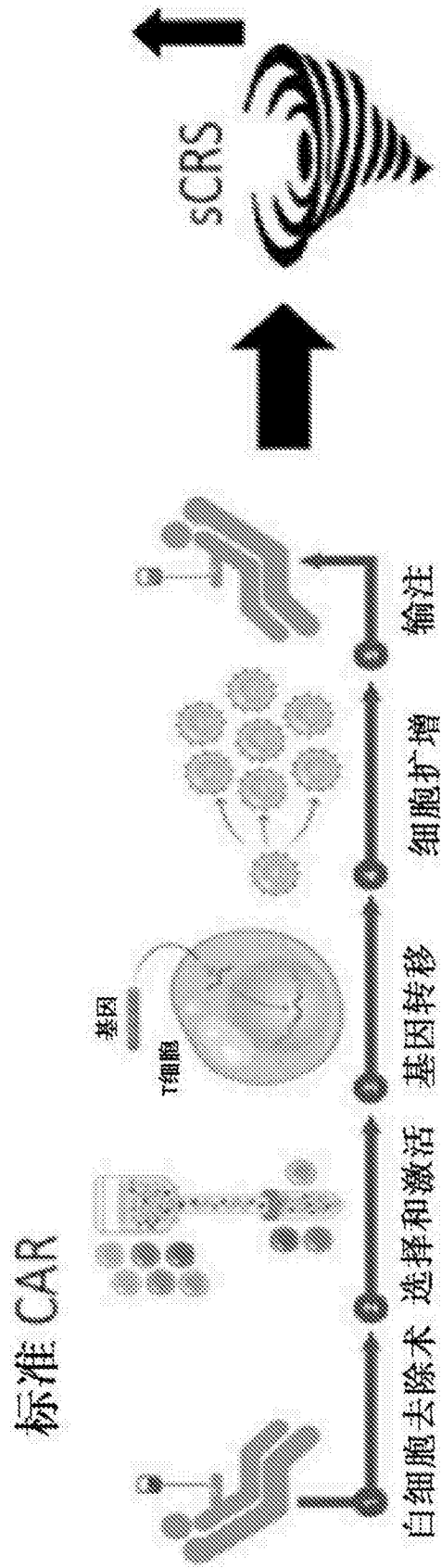


图1A

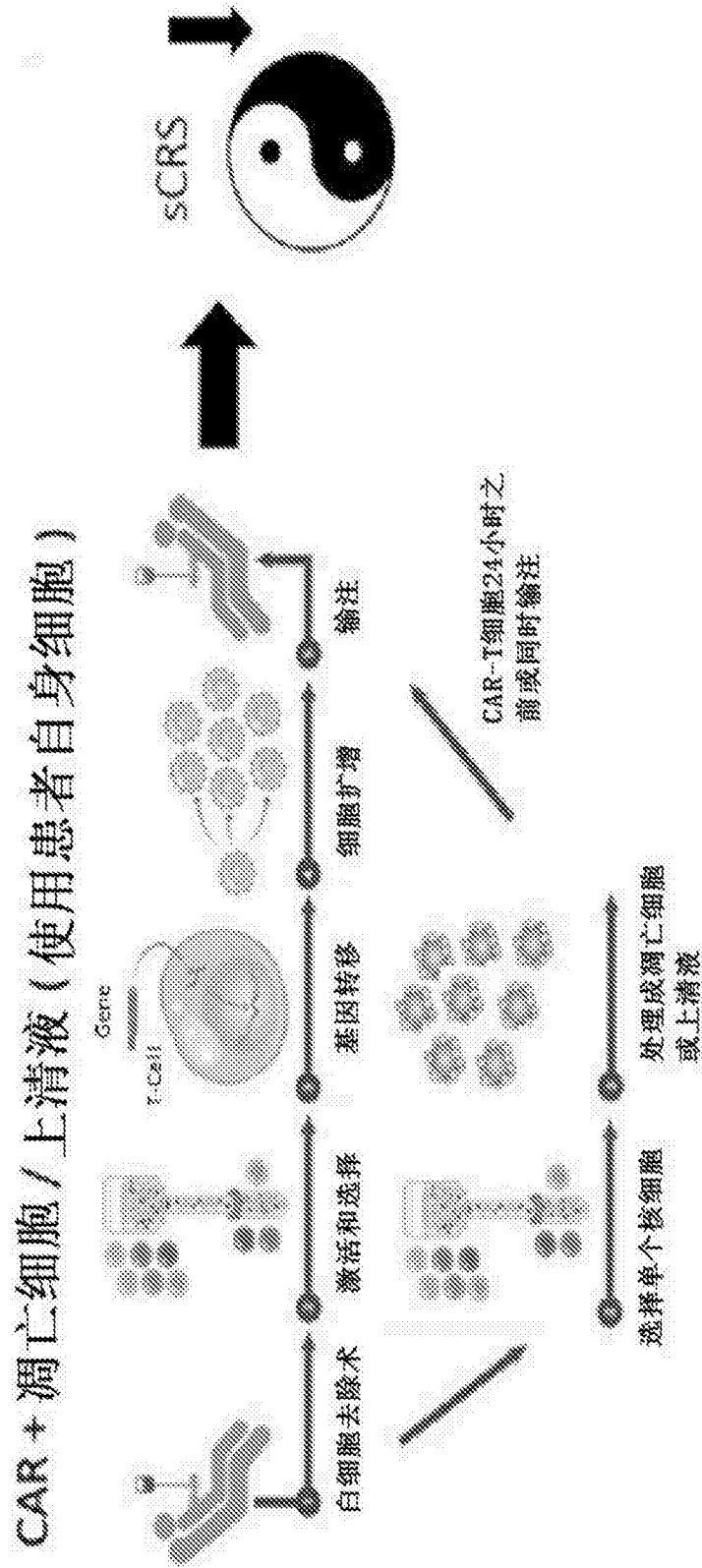


图1B

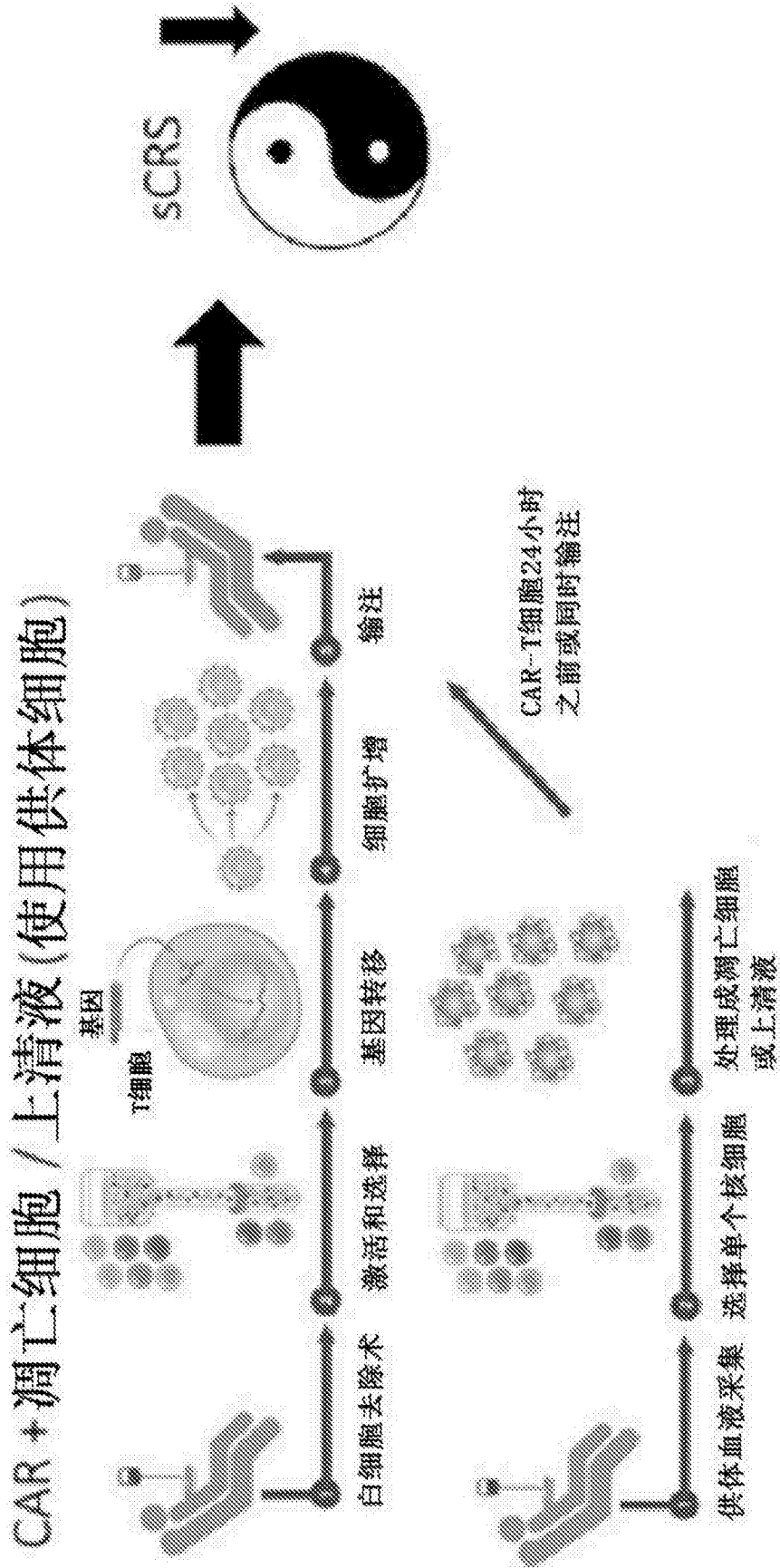


图2

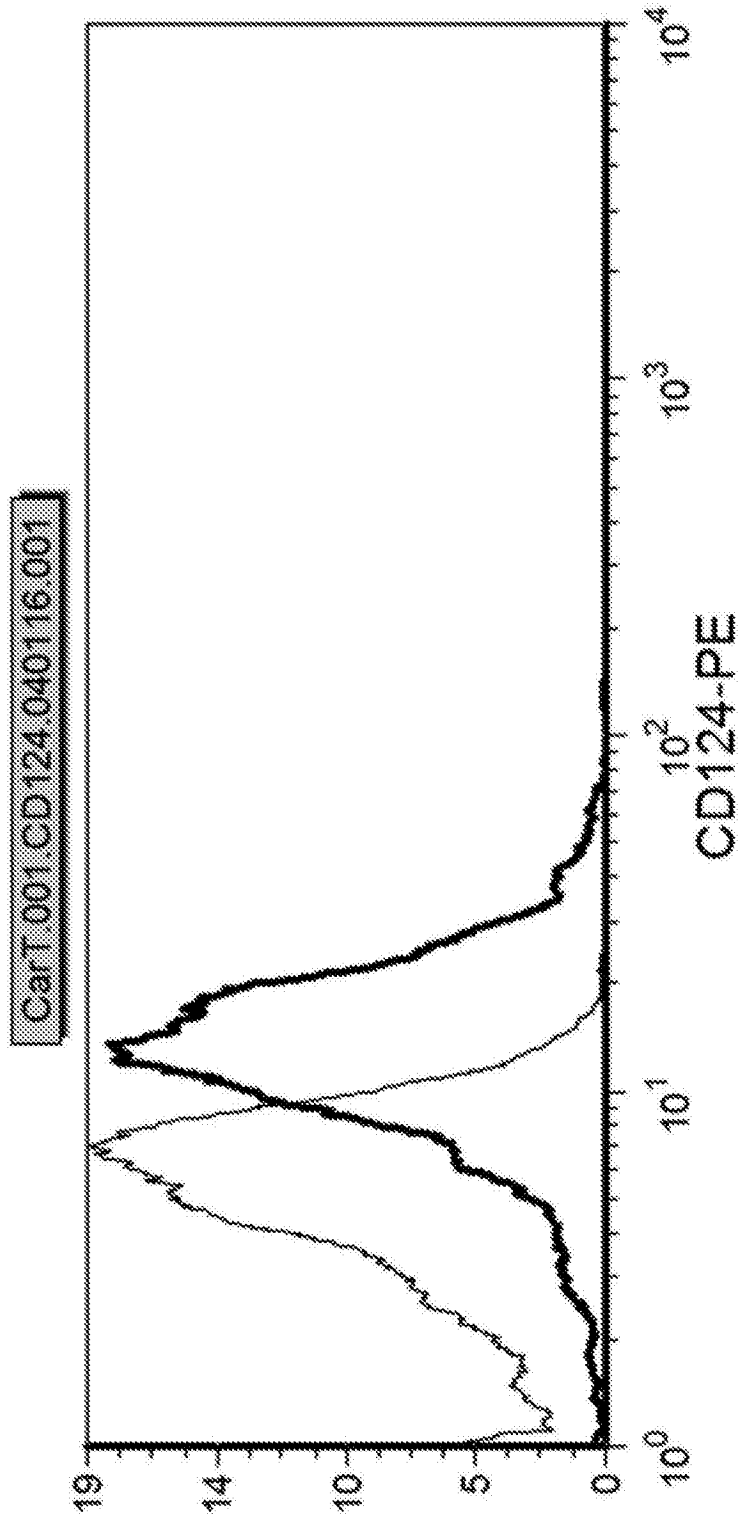


图3

T4+CAR-T细胞细胞毒性测定

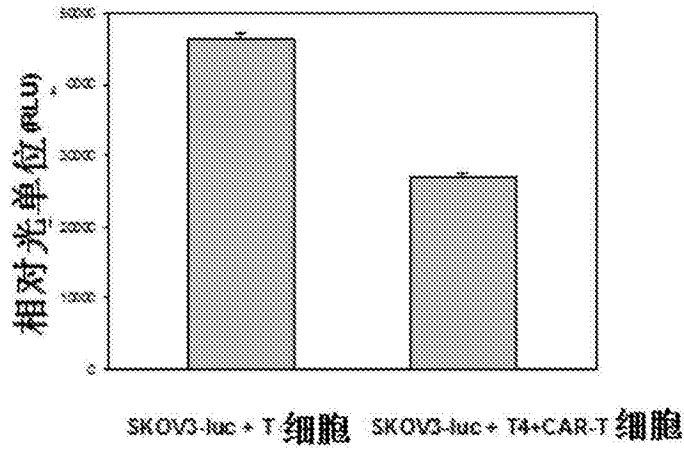


图4

T4+ CAR-T 细胞在凋亡细胞存在下细胞毒性测定

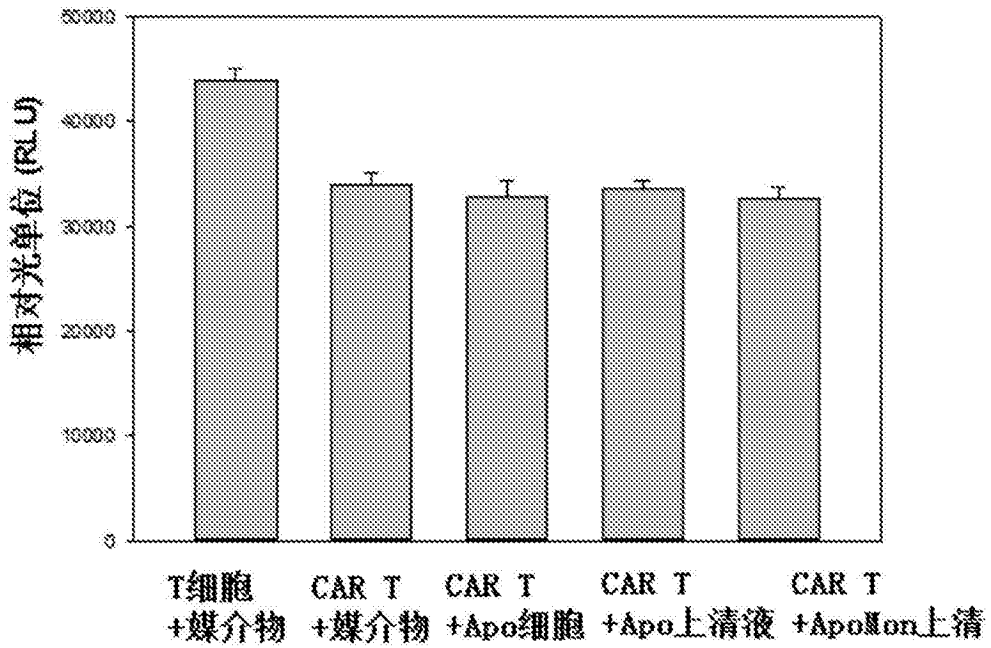


图5

在T4+CAR-T细胞细胞毒性测定中IL-6分泌

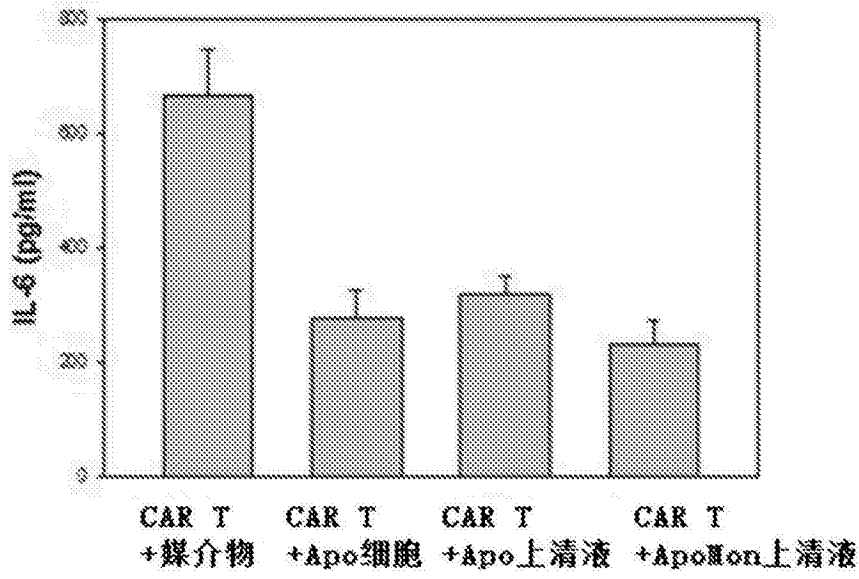


图6

LPS存在下的IL-6分泌

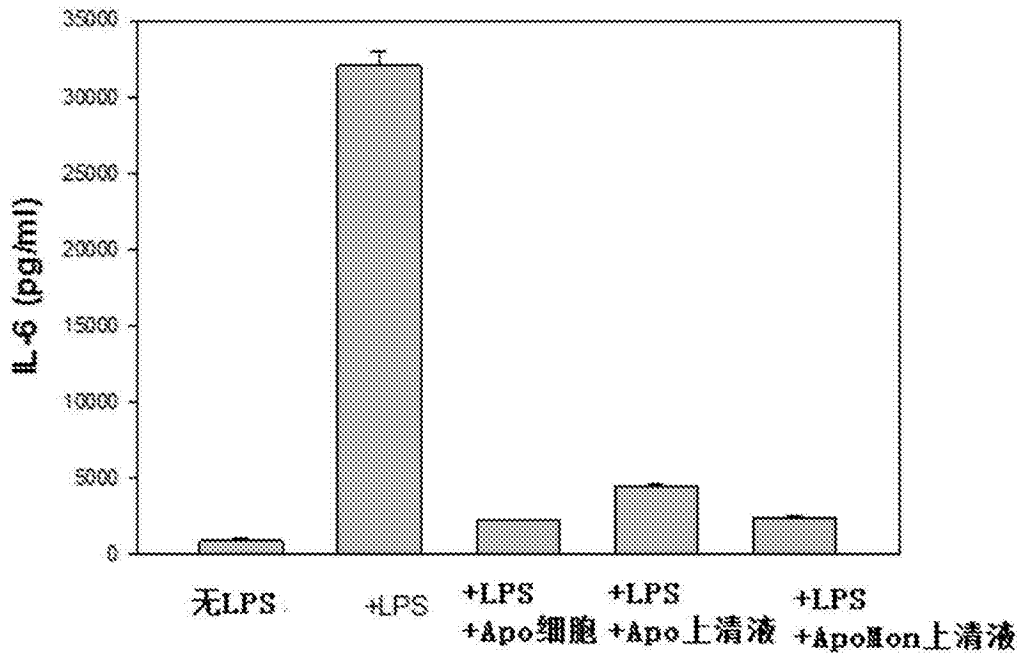


图7