改进的 T 细胞治疗方法

技术领域

本发明属于生物医药领域。具体而言，本发明涉及改进的 T 细胞治疗方法。更具体而言，本发明涉及通过用表达癌症相关抗原的活细胞刺激来增强治疗性 T 细胞(如 CAR-T 或 TCR-T 细胞)的癌症治疗效力。

发明背景

目前，对于 B 细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)的儿童患者，多药化疗方案和/或靶向治疗已实现高的完全缓解率，但在成人中仍具有不良预后，并且复发/难治性 B-ALL 对所有患者来说都是一个很大的挑战。淋巴细胞耗竭化疗随后进行 CD19 靶向性嵌合抗原受体修饰的 T (CAR-T)细胞疗法是一种新型治疗方法，并且证明在成人和儿童患有复发/难治性 B-ALL、慢性淋巴细胞性白血病和淋巴瘤的患者中具有很强的响应。来自这些研究的新数据表明，所递送的显著小剂量的 CAR-T 细胞可以消除很大的疾病负荷。然而，长期随访表明，大部分患者的缓解不能持久。由于 CAR-T 细胞持续性差，CD19 阳性肿瘤会复发。因此，目前认为延长功能性 CAR-T 细胞在体内的存在时间对维持持续缓解可能很重要。

CAR 一般包含细胞外抗原结合结构域(单克隆抗体的单链可变片段(scFV))和活化 T 细胞的胞内信号传导结构域。基因工程化改造的 CAR-T 细胞以主要组织相容性复合物(MHC)非依赖性方式高效对抗抗原阳性肿瘤细胞。目前，研究人员致力于寻求改善 CAR-T 细胞效能的方法。其中一种可行的方法是修改 CAR 的结构，例如应用第二代或第三代甚至第四代 CAR，其组合了激活信号域和共刺激信号域，并且能够改善 T 细胞扩增和持续性。在体外扩增和过继输注后，源自不同 T 细胞亚群的 CAR-T 细胞在体内增殖和持续的能力是不同的。与根据效应记忆 T 细胞制备的 CD19 靶向性 CAR-T 细胞相比，由纯化的初始 T 细胞或中央记忆 T 细胞制备的 CD19 靶向性 CAR-T 细胞在消除 CD19+肿瘤中更有效。并且效率的协同增强可以通过递送具有确定比例的衍生自 CD8/CD4T 细胞的 CAR-T 细胞来实现。目前使用

的 CAR-T 细胞保留内源性 T 细胞受体(TCR)，而 TCR 和 CAR 串扰的生物学十分复杂。CAR 和 TCR 的伴随激活极大地削弱了 CD8+CAR-T 细胞的体内功效；相反，CD4+CAR-T 细胞在存在 TCR 和 CAR 抗原的情况下保持其体内持续存活的能力。

尽管开发新的 CAR 结构并且精确确定 CAR-T 细胞的来源可能有助于改进 CAR-T 的应用，这些策略却不能从根本上促进 CAR-T 细胞的免疫记忆的产生，免疫记忆的产生对于适应性免疫应答是必不可少的。而且 CAR-T 细胞的重复施用倾向于诱导针对那些经工程化的 T 细胞的免疫清除。因此，本领域仍然需要新的 CAR-T 细胞治疗策略，特别是能够诱导 CAR-T 细胞免疫记忆的策略。

发明简述

在第一方面，本发明提供了一种在对象中治疗癌症的方法，包括以下步骤：

(a) 给所述对象施用特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞；和

(b) 给所述对象施用表达所述癌症相关抗原的细胞。

在第二方面，本发明提供了一种在对象中预防癌症进展或复发的方法，其中所述对象已经经历使用特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞的癌症治疗，所述方法包括给所述对象施用表达癌症相关抗原的细胞。

在第三方面，本发明提供一种用于在对象中治疗癌症的组合，其包含特异性靶向癌症相关抗原的治疗性T细胞和表达所述癌症相关抗原的细胞。

在第四方面，本发明提供本发明第三方面的组合在制备用于在对象中治疗癌症的药物中的用途。

在第五方面，表达癌症相关抗原的细胞在制备用于在对象中治疗癌症的药物中的用途，其中所述药物还包含特异性靶向所述癌症相关抗原的治疗性 T 细胞。

在第六方面，本发明提供表达癌症相关抗原的细胞在制备用于在对象中预防癌症进展或复发的药物中的用途，其中所述对象已经经历使用特异性靶向所述癌症相关抗原的治疗性 T 细胞的癌症治疗。

在第七方面，本发明提供特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞在制备用于在对象中治疗癌症的药物中的用途，其中所述药物还包含表达所

述癌症相关抗原的细胞。

在第八方面，本发明提供表达癌症相关抗原的细胞，其用于与特异性靶向所述癌症相关抗原的治疗性 T 细胞组合在对象中治疗癌症。

在第九方面，本发明提供表达癌症相关抗原的细胞，其用于在对象中预防癌症进展或复发，其中所述对象已经经历使用特异性靶向所述癌症相关抗原的治疗性 T 细胞的癌症治疗。

在第十方面，本发明提供特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞，其用于与表达所述癌症相关抗原的细胞组合在对象中治疗癌症。

在第十一方面，本发明提供药盒，其包含特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞和/或表达所述癌症相关抗原的细胞，所述药盒用于通过本发明的方法在对象中治疗癌症或预防癌症进展或复发。

附图简述

图 1. B-NDG 小鼠的产生和表征。(A) 通过 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术的 *Il2rg* 基因缺失靶向策略的示意图。(B) 通过流式细胞术检测 NOD-scid 和 B-NDG 小鼠的外周血和脾脏中的不同淋巴细胞群体。数字表示给定表型的阳性细胞的百分比。(C) 6 周龄 C57BL/6、裸鼠、Rag2-/-，NOD-scid 和 B-NSG 小鼠分别通过尾静脉注射植入 5×10^5 个 Raji 细胞。生物发光的相对水平以伪彩显示，红色和蓝色代表最强和最弱的光通量。(D) 显示每个时间点的总通量并且每个数据点表示平均值(n=10)。(E) CD19-FITC 识别的 Raji 细胞计数显示为通过细胞计数记录的图。通过拟合对数曲线计算 Raji 细胞计数与总通量之间的相关性，R^2=0.90。(F) B-NDG 小鼠在第 17 或 18 天死亡，但其他小鼠在第 30 天存活。(G) CD19 在 Raji-Fluc 细胞表面高度表达，Fluc 的发光强度与 Raji-Fluc 细胞的数量正相关。

图 2. 体外 CD19 CAR-T 细胞的效率。(A) 抗 CD19 CAR 的结构。(B) 来自 PBMC 供体的 CAR-T 细胞的体外培养的总结，包括活细胞百分比、CAR-T 细胞的总细胞计数和 CAR-T 细胞的百分比。(C) 在 CAR-T/Raji 比率为 1:1、3:1 和 6:1 时 CAR-T 细胞对体外 Raji 细胞的细胞毒效应。

图 3. 低剂量活肿瘤细胞的再刺激促进了 CAR-T 细胞的免疫记忆的产生。(A) 分开测量不同组中器官和组织的通量。(B) 低剂量活肿瘤细胞的再植入可促进肿瘤清除并延长总体存活。(C) 低剂量活肿瘤细胞的再植入可延

缓复发。(D)每组的平均总通量。LT：低剂量再植入；MT：中剂量再植入；HT：高剂量再植入。

图 4. 辐射后死亡的肿瘤细胞的再植入不起作用。(A) 分开测量不同组中器官和组织的通量。(B)和(C) 辐射后死亡的肿瘤细胞的再植入不能延长总体存活和无复发存活。CAR-T 细胞双重处理的效果与单一处理相同。(D)通过 qPCR 测量小鼠外周血中 CAR-T 细胞的数量。

图 5. CAR-T-19 和 aT19 细胞的表征。(A) 显示 CAR-19 基因构建体的结构和原代活化的 T 细胞的 CAR-T-19 转导效率的示意图。(B) 人 CD19 基因构建体的结构和原代活化的 T 细胞的 CD19 转导效率。(C) CAR-T-19 细胞在 CAR-T-19:CD19-K562 或 K562 比例为 1:1、3:1 和 6:1 时对 CD19-K562 或 K562 细胞的细胞毒性作用；以及 CAR-T-19 细胞在 CAR-T-19:Raji-Fluc 或 aT19 比率为 0.3:1、1:1 和 3:1 时对 Raji-Fluc 或 aT19 细胞的细胞毒性作用。

图 6. 活 Raji 肿瘤细胞对 CAR-T 细胞的再刺激增加存活率并延迟肿瘤复发。在 D0 静脉内(i.v.)注射 Raji-Fluc 细胞(每只小鼠 2×10^5 个细胞；A1、A2、A3、NT 和 P 组)。在注射 Raji-Fluc 细胞后的 D5，小鼠接受 i.v.注射 CAR-T-19 细胞(每只小鼠 2×10^7 个细胞；A1、2、3、NT 组)。在 D10，给小鼠 i.v.注射不同剂量的 Raji-Fluc 细胞(A1 和 PA1 组：5×10^4；A2 和 PA2 组：1.5×10^5；和 A3 和 PA3 组：5×10^5)。PA 组用作 A 组的对照。(A) 显示动物实验的时间表的示意图。(B) 生物发光图像，显示不同组小鼠的器官和组织中的总通量。根据不同剂量的再植入的 Raji-Fluc 细胞构建 Kaplan-Meier 存活曲线以监测全身性疾病的根除(C)以及估计无复发的存活(D)。

图 7. 用辐射后死亡的肿瘤细胞再刺激 CAR-T 细胞是无效的。在 D0 静脉内(i.v.)注射 Raji-Fluc 细胞(每只小鼠 2×10^5 个细胞；A1、A2、A3、NT 和 P 组)。在注射 Raji-Fluc 细胞后的 D5，小鼠接受 i.v.注射 CAR-T-19 细胞(每只小鼠 2×10^7 个细胞；A1、A2、A3、NT 组)。在 D10，给小鼠 i.v.注射不同剂量的辐射的 Raji-Fluc 细胞(A1 和 PA1 组：5×10^4；A2 和 PA2 组：1.5×10^5；和 A3 和 PA3 组：5×10^5)。PA 组用作 A 组的对照。(A) 显示动物实验的时间表的示意图。(B) 生物发光图像，显示不同组小鼠的器官和组织中的总通量。根据不同剂量的再植入的经辐射的 Raji-Fluc 细胞的构建

Kaplan-Meier 存活曲线以监测全身性疾病的根除(C)并估计无复发的存活(D)。(E)定量聚合酶链式反应用于在植入 Raji-Fluc 细胞后检测 A 组和 NT 组血液中的 CAR+细胞。图表显示来自每组的血液样品中的 CAR 基因拷贝数。

图 8. 用 CAR-T-19 和 aT19 细胞的连续处理促进记忆 CAR-T 细胞的产生。在 D0 静脉内(i.v.)注射 Raji-Fluc 细胞(每只小鼠 2×10^5 个细胞；A1、NT、aT19 和 P 组)。在注射 Raji-Fluc 细胞后的 D7，小鼠接受 i.v.注射 CAR-T-19 细胞(每只小鼠 2×10^7 个细胞；A1、NT、aT19 组)。在 D10，A1 组小鼠接受了 i.v.注射 5×10^4 个细胞，aT19 组小鼠接受 i.v.注射 5×10^5 个细胞，其他组没有接受注射。(A) 显示动物实验的时间表的示意图。(B) 生物发光图像，显示不同组小鼠的器官和组织中的总通量。(C) 构建 Kaplan-Meier 生存曲线以监测全身性疾病的根除。定量聚合酶链式反应用于检测在 D10、D20 和 D30 的血液(D)和脾脏(E)中的 CAR+细胞，图表显示来自每组的样品中的 CAR 基因拷贝数。(F) 外周血中 CAR+和 CD45RO+细胞的百分比。

发明详述

除非另有指示或定义，否则所有所用术语均具有本领域中的通常含义，该含义将为本领域技术人员所了解。参考例如标准手册，如 Sambrook et al.,“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”；Lewin,“Genes VIII”；及 Roitt et al.,“Immunology”(第 8 版)，以及本文中引用的一般现有技术；此外，除非另有说明，否则未具体详述的所有方法、步骤、技术及操作均可以且已经以本身已知的方式进行，该方式将为本领域技术人员所了解。亦参考例如标准手册、上述一般现有技术及其中引用的其他参考文献。

先前的临床试验已经确定了 CAR-T 免疫疗法在癌症治疗特别是 B 细胞恶性肿瘤中的有效性。通过 CAR-T 细胞治疗癌症的下一步是延长缓解的持续时间。

针对 CD19 的 CAR-T 治疗对复发/难治性 B-ALL 患者的缓解率可达 67%～90%；然而，无复发期只有 2 个月到 3 年不等。CD19 CAR-T 治疗后有两种复发模式，一种是由于 CAR-T 细胞体内持续性不够造成的 CD19 阳性肿瘤复发；另一种是在大约 20%患者中出现的由于在体内存在 CAR-T 细胞时 CD19-丢失而造成的复发，这样的丢失可能是由克隆选择或肿瘤演变

造成。当前研究人员倾向于在患者外周血中的 CAR-T 细胞减少或消失时向患者额外再注射 CAR-T 细胞，但此种方案临床效果差异很大，表明 CAR-T 剂量增加可能不是 CAR-T 能力体内持续存在的关键。

在本发明的具体实施例中，发明人成功构建了 Raji-B-NDG 小鼠模型以研究 CD19 CAR-T 疗法的效率。在用 CD19 CAR-T 细胞处理后，缓解的小鼠在第 20 天(D20)出现不同程度的复发，然后在 D28-36 内死亡，表明在初始接触抗原并消除肿瘤细胞后，注入的 CAR-T 细胞逐渐减少，导致最终复发而没能有效地进行控制。复发的原因可能在于以下两点。首先，小鼠的荧光检测显示仅在具有丰富血流的器官(如脾脏和心脏)中实现了理想的肿瘤抑制效果，而在具有较少的血管分支的器官(如肝和脑)中没有有效杀死肿瘤细胞，这表明复发可能来自这些组织。其次，肿瘤复发的时间很重要，大多数 PBMC 的寿命不超过 4 周。CAR-T 细胞在注射前的长达 12 天的体外增殖时间在加上注射后到复发前的 20 天大致与 PBMC 的 27 天寿命一致。因此，起始剂量的 CAR-T 消除了大部分 Raji 细胞，导致缺乏抗原刺激，因而增殖受阻且寿命被消耗掉，CAR-T 数量减少直到肿瘤复发。

为了最大化 CAR-T 的特异性杀伤效应，应在临床应用中解决治疗性细胞寿命和抗原刺激的问题。在本发明的具体实施例中，当在 D10 肿瘤细胞基本上已经被 CAR-T 消除时，测试了肿瘤细胞(Raji-Fluc)或表达肿瘤抗原如 CD19 的细胞(如 T 细胞)再接种的效果。出乎意料的是，与单次植入组(成瘤)相比较，低剂量再植入组(再刺激)维持更长时间的无肿瘤复发状态，一半以上的小鼠存活 36 天以上，表明在同一抗原重复刺激下发生免疫记忆，对重复注入的同一抗原的快速反应导致肿瘤细胞的持续抑制。随后，发明人研究了来自辐射后死亡的 Raji 细胞的抗原是否可以刺激 CAR-T 细胞。再次出乎意料的是，结果表明再植入死亡的肿瘤细胞不能唤醒 CAR-T 细胞的记忆，导致小鼠的短存活时间。这表明 CAR-T 细胞只能被携带抗原的活细胞激活。本发明人还令人惊奇地发现重复性施用 CAR-T 的疗法不能延迟肿瘤的复发，这为多次 CAR-T 输注的无效提供了更多证据。不期望受任何理论限制，认为低剂量的表达癌症相关抗原的活细胞的刺激可促进 CAR-T 细胞免疫记忆的产生，从而导致延迟复发和延长存活。

因此在第一方面，本发明提供了一种在对象中治疗癌症的方法，包括以下步骤：

(a) 给所述对象施用特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞；和

(b) 给所述对象施用表达所述癌症相关抗原的细胞。

在一些实施方案中，所述治疗性 T 细胞施用一或多次，优选一次。在一些实施方案中，表达所述癌症相关抗原的细胞施用一或多次，优选一次。

在一些实施方案中，在施用所述治疗性 T 细胞之后施用所述表达癌症相关抗原的细胞。例如，在施用所述治疗性 T 细胞约 1 天、约 2 天、约 3 天、约 4 天、约 5 天、约 6 天、约 7 天、约 8 天、约 9 天、约 10 天、约 11 天、约 12 天、约 13 天、约 14 天、约 15 天、约 16 天、约 17 天、约 18 天、约 19 天、约 20 天或约 21 天后施用表达所述癌症相关抗原的细胞。

在一些实施方案中，在施用所述治疗性 T 细胞使得癌症细胞负荷降低后，施用表达所述癌症相关抗原的细胞。例如，在癌症细胞负荷降低至少大约 5%、至少大约 10%、至少大约 20%、至少大约 30%、至少大约 40%、至少大约 50%、至少大约 60%、至少大约 70%、至少大约 80%、至少大约 90%后，施用表达所述癌症相关抗原的细胞。在一些实施方案中，在癌症通过施用所述治疗性 T 细胞而完全缓解之后，施用表达所述癌症相关抗原的细胞。对象中癌症细胞负荷的变化可以通过本领域已知的各种方法确定。例如，对于血液癌症，可以通过对循环细胞进行流式细胞术确定癌症细胞负荷。又例如，对于实体瘤，可以通过临床上常用的成像方法(如核磁共振、CT、PET-CT 等)确定肿瘤负荷。或者，可以通过检测肿瘤标志物来确定肿瘤负荷。在一些实施方案中，在施用表达所述癌症相关抗原的细胞前，可以通过检测所述治疗性 T 细胞的含量来确定肿瘤负荷的变化，例如所述治疗性 T 细胞的含量与肿瘤负荷负相关。

在一些实施方案中，在施用所述治疗性 T 细胞后，当所述治疗性 T 细胞在所述对象体内的量下降时，施用表达所述癌症相关抗原的细胞。所述治疗性 T 细胞在所述对象体内的量可以通过例如流式细胞术或定量 PCR 的方法检测。例如，如果所述治疗性 T 细胞是 CAR-T 细胞，可以通过 PCR 检测来自对象的样品中 CAR 编码基因的拷贝数。当 CAR 编码基因的拷贝数出现下降时，施用表达所述癌症相关抗原的细胞。

因此，在一些实施方案中，所述方法还包括在施用所述治疗性 T 细胞后，监测所述对象体内的肿瘤负荷和/或所述治疗性 T 细胞的量的步骤。

在一些实施方案中，在施用一或多次所述治疗性 T 细胞之后，施用一

或多次所述表达癌症相关抗原的细胞。在一些实施方案中，在施用一次所述治疗性 T 细胞之后，施用一或多次所述表达癌症相关抗原的细胞。在一些实施方案中，使用一或多次所述治疗性 T 细胞且在每次施用所述治疗性 T 细胞之后，施用一或多次所述表达癌症相关抗原的细胞。在一些实施方案中，在施用一次所述治疗性 T 细胞之后，施用一次所述表达癌症相关抗原的细胞。在一些实施方案中，在施用所述治疗性 T 细胞之后，施用一或多次所述表达癌症相关抗原的细胞。在一些实施方案中，在施用所述治疗性 T 细胞之后，施用一次所述表达癌症相关抗原的细胞。

在一些实施方案中，以治疗有效量施用所述治疗性 T 细胞。如本文所用，治疗性 T 细胞的治疗有效量是指使用后能够降低癌症细胞负荷的治疗性 T 细胞的量，例如使癌症细胞负荷降低至少大约 5%、至少大约 10%、至少大约 20%、至少大约 30%、至少大约 40%、至少大约 50%、至少大约 60%、至少大约 70%、至少大约 80%、至少大约 90%或者使癌症完全缓解的量。在本发明各方面的一些实施方案中，所述治疗性 T 细胞的有效量为约 10^4 至约 10^9 个细胞，例如约 10^4、约 10^5、约 10^6、约 10^7、约 10^8 或约 10^9 个细胞。在一些实施方案中，根据对象体重确定治疗性 T 细胞的施用量，例如约 10^4 细胞/kg 体重至约 10^9 个细胞/kg 体重，例如约 10^4、约 10^5、约 10^6、约 10^7、约 10^8 或约 10^9 个细胞/kg 体重。

在一些实施方案中，以刺激有效量施用表达癌症相关抗原的细胞。如本文所用，表达癌症相关抗原的细胞的刺激有效量是指在施用后能够延长之前施用的治疗性 T 细胞的体内持续性(增强免疫记忆)和/或延长对象整体存活期和/或延长对象无复发存活期的量。在本发明各方面的一些实施方案中，所述表达癌症相关抗原的细胞的刺激有效量为约 10^3 至约 10^6 个细胞，例如约 10^3、约 10^4、约 10^5 或约 10^6 个细胞。优选施用低剂量的所述表达癌症相关抗原的细胞，例如约 10^4 个细胞。在一些实施方案中，根据对象体重确定表达癌症相关抗原的细胞的施用量，约 10^3 至约 10^6 个细胞/kg 体重，例如约 10^3、约 10^4、约 10^5 或约 10^6 个细胞/kg 体重。在一些实施方案中，根据所施用的治疗性 T 细胞的量确定表达癌症相关抗原的细胞的施用量。例如，所施用的治疗性 T 细胞的量与表达癌症相关抗原的细胞的量的比例为约 1:1 至约 1000:1 之间的任意比例或更高的比例，例如约 1:1、约 2:1、约 3:1、约 4:1、约 5:1、约 6:1、约 7:1、约 8:1、约 9:1、约 10:1、约 50:1、

约 100:1 或约 1000:1 或更高。

在本发明各个方面的一些实施方案中，通过施用表达癌症相关抗原的活细胞对体内已有的治疗性 T 细胞(如 CAR-T 细胞)进行刺激，可以使治疗性 T 细胞的体内持续性增加至少大约 5%、至少大约 10%、至少大约 20%、至少大约 30%、至少大约 40%、至少大约 50%、至少大约 60%、至少大约 70%、至少大约 80%、至少大约 90%、至少大约 100%、至少大约 150%、至少大约 200%、至少大约 300%或更高。在本发明各个方面的一些实施方案中，通过施用表达癌症相关抗原的活细胞对体内已有的治疗性 T 细胞(如 CAR-T 细胞)进行刺激，可以使对象整体存活期延长至少大约 5%、至少大约 10%、至少大约 20%、至少大约 30%、至少大约 40%、至少大约 50%、至少大约 60%、至少大约 70%、至少大约 80%、至少大约 90%、至少大约 100%、至少大约 150%、至少大约 200%、至少大约 300%或更长。在本发明各个方面的一些实施方案中，通过施用表达癌症相关抗原的活细胞对体内已有的治疗性 T 细胞(如 CAR-T 细胞)进行刺激，可以使对象缓解后的无复发存活期延长至少大约 5%、至少大约 10%、至少大约 20%、至少大约 30%、至少大约 40%、至少大约 50%、至少大约 60%、至少大约 70%、至少大约 80%、至少大约 90%、至少大约 100%、至少大约 150%、至少大约 200%、至少大约 300%或更长。

在本发明各方面的一些实施方案中，治疗性 T 细胞是包含外源 T 细胞受体(TCR)的 T 细胞(TCR-T 细胞)。在一些实施方案中，所述外源 TCR(通常包含α和β链)特异性结合癌症相关抗原。

在本发明各方面的一些实施方案中，治疗性 T 细胞是包含嵌合抗原受体(CAR)的 T 细胞(CAR-T 细胞)。本领域已经开发了多种的 CAR-T 细胞，例如第一至第四代 CAR-T 细胞、被修饰去除抑制性信号的 CAR-T 细胞等，这些都可以应用于本发明。

在本发明各方面的一些实施方案中，CAR 包含针对癌症相关抗原的细胞外抗原结合结构域。所述细胞外抗原结合结构域例如可以是单克隆抗体、合成的抗体、人抗体、人源化抗体、单域抗体、抗体单链可变区(scFV)，以及其抗原结合片段。在一些优选实施方式中，所述细胞外抗原结合结构域是 scFV。例如，所述细胞外抗原结合结构域可以衍生自一或多种已知抗体包括任何商业可获得的抗体，如 FMC63、利妥昔单抗(rituximab)、阿仑珠

单抗(alemtuzumab)、依帕珠单抗(epratuzumab)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、比伐珠单抗(bivatuzumab)、西妥昔单抗(cetuximab)、拉贝珠单抗(labetuzumab)、帕利珠单抗(palivizumab)、司韦单抗(sevirumab)、妥韦单抗(tuvirumab)、巴利昔单抗(basiliximab)、达克珠单抗(daclizumab)、英利昔单抗(infliximab)、奥马珠单抗(omalizumab)、依法珠单抗(efalizumab)、凯利昔单抗(Keliximab)、西利珠单抗(siplizumab)、那他珠单抗(natalizumab)、克立昔单抗(clenoliximab)、培马单抗(pemtumomab)、依屈洛单抗(Edrecolomab)、坎妥珠单抗(Cantuzumab)等。

在本发明各方面的一些实施方案中，所述 CAR 还包括跨膜结构域和细胞内信号转导结构域。根据本发明的 CAR 的细胞内信号转导结构域负责细胞外配体结合结构域与靶结合之后的细胞内信号转导，导致激活免疫细胞和免疫应答。细胞内信号转导结构域具有激活表达 CAR 的免疫细胞的至少一种正常效应子功能的能力。例如，T 细胞的效应子功能可以是细胞溶解活性或辅助活性，包括细胞因子的分泌。

用于 CAR 的细胞内信号转导结构域可以是细胞质序列，例如但不限于 T 细胞受体和共同受体(它们一致地起作用从而在抗原受体接合之后启动信号转导)的细胞质序列，以及任何这些序列的衍生物或变体以及具有相同功能能力的任何合成序列。细胞内信号转导结构域包括两种不同类型的细胞质信号转导序列：那些启动抗原依赖性初级激活的序列，以及那些以抗原非依赖性方式作用以提供次级或共刺激信号的序列。初级细胞质信号转导序列可以包括称为 ITAM 的免疫受体酪氨酸激活基序的信号转导基序。本发明中使用的 ITAM 的非限制性实例可以包括衍生自 TCRζ、FcRγ、FcRβ、FcRε、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b 和 CD66d 的那些。在一些实施方案中，CAR 的细胞内信号转导结构域可以包括 CD3ζ 信号转导结构域。在一些实施方案中，本发明的 CAR 的细胞内信号转导结构域还包括共刺激结构域。在一些实施方案中，所述共刺激结构域选自 41BB 共刺激结构域或 CD28 共刺激结构域。

CAR 在细胞的表面上表达。因此，CAR 可以包括跨膜结构域。本发明的 CAR 的合适跨膜结构域具有以下能力：(a)在细胞表面表达，优选免疫细胞，例如但不限于淋巴细胞或自然杀伤(NK)细胞，和(b)与配体结合结构域和细胞内信号转导结构域相互作用，用于指导免疫细胞对预定靶细胞的细

胞应答。跨膜结构域可以衍生自天然来源或合成来源。跨膜结构域可以衍生自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。作为非限制性实例，跨膜结构域可以衍生自 T 细胞受体的亚基如 α 亚基、β 亚基、γ 或 δ 亚基，组成 CD3 复合物的多肽，IL-2 受体的 p55(α 链)、p75(β 链)或 γ，Fc 受体的亚基链，特别是 Fcγ 受体 III 或 CD 蛋白。或者，跨膜结构域可以是合成的，并且可以主要包括疏水性残基，如亮氨酸和缬氨酸。在一些实施方案中，所述跨膜结构域衍生自人 CD8α 链。跨膜结构域可以进一步包括位于细胞外配体结合结构域和所述跨膜结构域之间的铰链区域。所述铰链区域例如来自 CD8、CD4 或 CD28 的胞外区。在一些实施方案中，所述铰链区域是人 CD8α 链的一部分。

在本发明各方面的一些具体实施方案中，本发明中使用的 CAR 可以包括特异性结合癌症相关抗原的细胞外抗原结合结构域、CD8α 铰链和跨膜结构域、CD3ζ 信号转导结构域、和 4-1BB 共刺激结构域。

在一具体实施方式中，本发明的 CAR (针对 CD19)包含如下 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列：

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLN
WYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGN
TLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVS
LPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQ
TDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRP
EACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP
FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR
EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:1)。

在一具体实施方式中，本发明的 CAR (针对 CD19)由如下 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列编码：

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGC
CGCCAGGCCGGACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGG
GAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAAT
TGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATCTACCATACATCAAG
ATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATT

CTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAG
GGTAATACGCTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAGATCACAGGTG
GCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGGCGGATCTGAGGTGAAACTGC
AGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTCACATGCAC
TGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGCTGGATTCGCCAGCCTCCAC
GAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAAT
TCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTT
TCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAA
CATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGAACCTCAGTC
ACCGTCTCCTCAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCA
TCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGG
GCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCC
TTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTACTGCAA
ACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTAC
AAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAG
GAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACC
AGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTA
CGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAG
AAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGC
GGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCA
CGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTT
CACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:2)。

在本发明各方面的一些实施方案中，表达所述癌症相关抗原的细胞是活细胞。在一些实施方案中，所述癌症相关抗原表达于所述活细胞的表面。在一些实施方案中，表达所述癌症相关抗原的细胞不是癌症细胞。在一些实施方案中，表达所述癌症相关抗原的细胞是被遗传工程化改造为表达所述抗原的细胞。所述细胞的类型不特别限制，其可以衍生自分离的原代细胞，或衍生自细胞系。在一些实施方案中，表达所述癌症相关抗原的细胞衍生自外周血细胞例如外周血单个核细胞(PBMC)。在一些实施方案中，表达所述癌症相关抗原的细胞衍生自免疫细胞，例如巨噬细胞、树突状细胞、浆细胞、粒细胞、肥大细胞、淋巴细胞(炎性 T 淋巴细胞、细胞毒性 T 淋巴

细胞、调节性 T 淋巴细胞、或辅助性 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞)等。在一些实施方案中，细胞可以衍生自 CD34+细胞。在一些实施方案中，细胞可以衍生自 T 淋巴细胞例如 CD4+T 淋巴细胞或 CD8+T 淋巴细胞。在一些实施方案中，细胞可以衍生自 B 淋巴细胞。

在本发明各方面的一些实施方案中，所述治疗性 T 细胞和/或所述表达癌症相关抗原的细胞衍生自对象的自体细胞。如本文所用，“自体”是指用于治疗对象的细胞、细胞系或细胞群源自所述对象。在一些实施方案中，所述治疗性 T 细胞和/或所述表达癌症相关抗原的细胞衍生自异体细胞，例如源自与所述对象人类白细胞抗原(HLA)相容的供体。可以使用标准方案将来自供体的细胞转化为非同种异体反应性细胞，并根据需要进行复制，从而产生可以施用至一个或多个患者的细胞。

本发明的治疗性 T 细胞和/或表达癌症相关抗原的细胞可以通过本领域已知的多种手段制备。例如，可以用包含 CAR 或 TCR 编码序列的表达构建体转导 T 细胞来获得 CAR-T 细胞或 TCR-T 细胞。例如，可以将包含癌症相关抗原的编码序列的表达构建体转导细胞来获得表达所述癌症相关抗原的细胞。本领域技术人员能够容易地构建适合于蛋白表达的表达构建体。

本发明的细胞可以通过各种非限制性方法从许多非限制性来源获得，包括外周血单个核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。在一些实施方案中，可以使用本领域技术人员可用和已知的细胞系。在一些实施方案中，细胞可以衍生自健康供体或来自诊断为癌症的患者。在一些实施方案中，细胞可以是呈现不同表型特征的细胞的混合群体的一部分。

本发明的细胞如 T 细胞可以在遗传修饰之前或之后被活化和扩增。T 细胞可以在体外或体内扩增。通常，本发明的 T 细胞可以例如通过与刺激 CD3 TCR 复合物和 T 细胞表面上的共刺激分子以产生 T 细胞活化信号的试剂接触来扩增。例如，可以使用诸如钙离子载体 A23187、佛波醇 12-肉豆蔻酸酯 13-乙酸酯(PMA)、或有丝分裂凝集素如植物血凝素(PHA)的化学品来产生 T 细胞的活化信号。在一些实施方案中，T 细胞群体可以通过在体外与例如抗 CD3 抗体或其抗原结合片段、或固定在表面上的抗 CD2 抗体接触被活化，或通过与蛋白激酶 C 激活剂(例如，苔藓抑素)连同钙离子载体的接触来活化。例如，在适合于刺激 T 细胞增殖的条件下，T 细胞群可与抗

CD3 抗体和抗 CD28 抗体接触。适用于 T 细胞培养的条件包括可能含有增殖和活力所必需的因子的合适培养基(例如 Minimal Essential Media 或 RPMI Media 1640、或 X-vivo 5、(Lonza))，其中必需的因子包括血清(例如胎牛或人类血清)、白介素-2(IL-2)、胰岛素、IFN-γ、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-2、IL-15、TGFp 和 TNF，或本领域技术人员已知的用于细胞生长的添加剂。其它用于细胞生长的添加剂包括但不限于表面活性剂、人血浆蛋白粉、和还原剂如 N-乙酰-半胱氨酸和 2-巯基乙酸。培养基可以包括 RPMI 1640、A1M-V、DMEM、MEM、a-MEM、F-12、X-Vivo 1 和 X-Vivo 20、Optimizer、氨基酸、丙酮酸钠和维生素、无血清或适量补充的血清(或血浆)或一组明确的激素、和/或一定量的足以使 T 细胞生长和扩增的细胞因子。靶细胞可以保持在支持生长所必需的条件下，例如适当的温度(例如 37℃)和环境(例如，空气加 5%CO_2)。暴露于不同刺激时间的 T 细胞可能表现出不同的特征。

如本文所用“对象”是指患有或者易于患有可以通过本发明的方法、组合或药物组合物治疗的疾病或病症的生物体。非限制性例子包括人、牛、大鼠、小鼠、狗、猴、山羊、绵羊、母牛、鹿，及其它非哺乳动物。在优选实施方案中，对象是人。

在第二方面，本发明提供了一种在对象中预防癌症进展或复发的方法，其中所述对象已经经历施用特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞的治疗(癌症治疗)，所述方法包括给所述对象施用表达癌症相关抗原的细胞。所述治疗性 T 细胞或表达癌症相关抗原的细胞如本文所定义。

在一些实施方案中，表达所述癌症相关抗原的细胞施用一或多次，优选一次。

在一些实施方案中，在施用所述治疗性 T 细胞约 1 天、约 2 天、约 3 天、约 4 天、约 5 天、约 6 天、约 7 天、约 8 天、约 9 天、约 10 天、约 11 天、约 12 天、约 13 天、约 14 天、约 15 天、约 16 天、约 17 天、约 18 天、约 19 天、约 20 天或约 21 天后施用表达所述癌症相关抗原的细胞。

在一些实施方案中，在所述治疗性 T 细胞使得癌症细胞负荷降低后，施用表达所述癌症相关抗原的细胞。例如，在癌症细胞负荷降低至少大约 5%、至少大约 10%、至少大约 20%、至少大约 30%、至少大约 40%、至少大约 50%、至少大约 60%、至少大约 70%、至少大约 80%、至少大约 90%后，施用表达所述癌症相关抗原的细胞。在一些实施方案中，在癌症通过

施用所述治疗性 T 细胞而完全缓解之后，施用表达所述癌症相关抗原的细胞。

在一些实施方案中，在施用所述治疗性 T 细胞后，当所述治疗性 T 细胞在所述对象体内的量下降时，施用表达所述癌症相关抗原的细胞。所述治疗性 T 细胞在所述对象体内的量可以通过例如流式细胞术或定量 PCR 的方法检测。例如，如果所述治疗性 T 细胞是 CAR-T 细胞，可以通过 PCR 检测来自对象的样品中 CAR 编码基因的拷贝数。当 CAR 编码基因的拷贝数出现下降时，施用表达所述癌症相关抗原的细胞。

因此，在一些实施方案中，所述方法还包括在施用所述治疗性 T 细胞后，监测所述对象体内的肿瘤负荷和/或所述治疗性 T 细胞的量的步骤。

在一些实施方案中，以刺激有效量施用所述表达癌症相关抗原的细胞。如本文所用，表达癌症相关抗原的细胞的刺激有效量是指在施用后能够延长之前施用的治疗性 T 细胞的体内持续性(增强免疫记忆)和/或延长对象整体存活期和/或延长对象无复发存活期的量。在一些实施方案中，所述表达癌症相关抗原的细胞的刺激有效量为约 10^3 至约 10^6 个细胞，例如约 10^3、约 10^4、约 10^5 或约 10^6 个细胞。优选施用低剂量的所述表达癌症相关抗原的细胞，例如约 10^4 个细胞。在一些实施方案中，根据对象体重确定表达癌症相关抗原的细胞的施用量，约 10^3 至约 10^6 个细胞/kg 体重，例如约 10^3、约 10^4、约 10^5 或约 10^6 个细胞/kg 体重。在一些实施方案中，根据之前患者所接受的治疗性 T 细胞的量确定表达癌症相关抗原的细胞的施用量。例如，所施用的治疗性 T 细胞的量与表达癌症相关抗原的细胞的量的比例为约 1:1 至约 1000:1 之间的任意比例或更高的比例，例如约 1:1、约 2:1、约 3:1、约 4:1、约 5:1、约 6:1、约 7:1、约 8:1、约 9:1、约 10:1、约 50:1、约 100:1 或约 1000:1 或更高。

在第三方面，本发明提供一种用于在对象中治疗癌症的组合，其包含特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞和表达所述癌症相关抗原的细胞。在一些实施方案中，所述组合用于通过本发明第一方面的方法在对象中治疗癌症。在一些实施方案中，所述组合包含治疗有效量的所述治疗性 T 细胞和刺激有效量的所述表达癌症相关抗原的细胞。所述治疗性 T 细胞或表达癌症相关抗原的细胞如本文所定义。

在第四方面，本发明提供本发明第三方面的组合在制备用于在对象中

治疗癌症的药物中的用途。在一些实施方案中，所述药物用于通过本发明第一方面的方法在对象中治疗癌症。

在第五方面，本发明提供表达癌症相关抗原的细胞在制备用于在对象中治疗癌症的药物中的用途。例如，所述药物用于与特异性靶向所述癌症相关抗原的治疗性 T 细胞组合来在对象中治疗癌症。在一些实施方案中，其中所述药物还包含特异性靶向所述癌症相关抗原的治疗性 T 细胞。在一些实施方案中，表达癌症相关抗原的细胞与特异性靶向所述癌症相关抗原的治疗性 T 细胞独立存在于所述药物中，例如独立地置于不同的容器中。在一些实施方案中，所述药物用于通过本发明第一方面的方法在对象中治疗癌症。所述治疗性 T 细胞或表达癌症相关抗原的细胞如本文所定义。

在第六方面，本发明提供表达癌症相关抗原的细胞在制备用于在对象中预防癌症进展或复发的药物中的用途，其中所述对象已经经历施用特异性靶向所述癌症相关抗原的治疗性 T 细胞的治疗(癌症治疗)。在一些实施方案中，所述药物包含刺激有效量的所述表达癌症相关抗原的细胞。在一些实施方案中，所述药物用于通过本发明第二方面的方法在对象中预防癌症进展或复发。所述治疗性 T 细胞或表达癌症相关抗原的细胞如本文所定义。

在第七方面，本发明提供特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞在制备用于在对象中治疗癌症的药物中的用途，其中所述药物还包含表达所述癌症相关抗原的细胞。在一些实施方案中，特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞与表达癌症相关抗原的细胞独立存在于所述药物中，例如独立地置于不同的容器中。在一些实施方案中，所述药物用于通过本发明第一方面的方法在对象中治疗癌症。所述治疗性 T 细胞或表达癌症相关抗原的细胞如本文所定义。

在第八方面，本发明提供表达癌症相关抗原的细胞，其用于与特异性靶向所述癌症相关抗原的治疗性 T 细胞组合在对象中治疗癌症。在一些实施方案中，所述表达癌症相关抗原的细胞用于通过本发明第一方面的方法在对象中治疗癌症。所述治疗性 T 细胞或表达癌症相关抗原的细胞如本文所定义。

在第九方面，本发明提供表达癌症相关抗原的细胞，其用于在对象中预防癌症进展或复发，其中所述对象已经经历使用特异性靶向所述癌症相关抗原的治疗性 T 细胞的治疗(癌症治疗)。在一些实施方案中，所述表达癌

症相关抗原的细胞用于通过本发明第二方面的方法在对象中预防癌症进展或复发。所述治疗性 T 细胞或表达癌症相关抗原的细胞如本文所定义。

在第十方面，本发明提供特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞，其用于与表达所述癌症相关抗原的细胞组合在对象中治疗癌症。在一些实施方案中，所述特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞用于通过本发明第一方面的方法在对象中治疗癌症。所述治疗性 T 细胞或表达癌症相关抗原的细胞如本文所定义。

在第十一方面，本发明提供药盒，其包含特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞和/或表达所述癌症相关抗原的细胞，所述药盒用于通过本发明的方法在对象中治疗癌症或预防癌症进展或复发。在一些实施方案中，表达癌症相关抗原的细胞与特异性靶向所述癌症相关抗原的治疗性 T 细胞独立存在于所述药盒中，例如独立地置于不同的容器中。所述治疗性 T 细胞或表达癌症相关抗原的细胞如本文所定义。

本发明所述的细胞或药物中还可以包含“药物可接受赋形剂”或“药物可接受载体”，其是指有助于活性物质给予对象且对象吸收的物质，其可以包括在本发明的药物组合物中而不引起患者的显著毒副作用。药物可接受赋形剂的非限制性例子包括水、NaCl、生理盐水、乳酸化 Ringer's、正常蔗糖、正常葡萄糖、粘合剂、填充剂、崩解剂、润滑剂、包衣、甜味剂、香味剂、盐溶液(如 Ringer's 溶液)、醇、油、明胶、碳水化合物如乳糖、直链淀粉或淀粉、脂肪酸脂、羟甲基纤维素、聚乙烯比咯烷酮和着色剂等。这种制备物可以被灭菌，如果希望，可以与辅助制剂如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、影响渗透压的盐、缓冲剂、着色剂和/或芳香物质等混合，这些辅助制剂不与本发明的细胞有害反应。本领域技术人员理解其它药物赋形剂也可以用于本发明。

本发明所述癌症相关抗原优选是癌症特异性抗原，包括但不限于 CD16、CD64、CD78、CD96、CLL1、CD116、CD117、CD71、CD45、CD71、CD123、CD138、ErbB2(HER2/neu)、癌胚抗原(CEA)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、表皮生长因子受体(EGFR)、EGFR 变体 III (EGFRvIII)、CD19、CD20、CD30、CD40、双唾液酸神经节苷脂 GD2、导管上皮粘蛋白、gp36、TAG-72、鞘糖脂、神经胶质瘤相关的抗原、β-人绒毛膜促性腺激素、α 胎儿球蛋白(AFP)、外源凝集素反应性 AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CA

IX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2(AS)、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶(prostase)、前列腺酶特异性抗原(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGA-1a、p53、Prostein、PSMA、存活和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1 (PCTA-1)、MAGE、ELF2M、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、肝配蛋白 B2、CD22、胰岛素生长因子(IGF1)-I、IGF-II、IGFI 受体、间皮素、呈递肿瘤特异性肽表位的主要组织相容性复合体(MHC)分子、5T4、ROR1、Nkp30、NKG2D、肿瘤基质抗原、纤维连接蛋白的额外结构域 A(EDA)和额外结构域 B (EDB)、腱生蛋白-C 的 A1 结构域(TnC A1)、成纤维细胞相关蛋白(fap)、CD3、CD4、CD8、CD24、CD25、CD33、CD34、CD133、CD138、Foxp3、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、GM-CSF、细胞因子受体、内皮因子、BCMA (CD269、TNFRSF17) 、 TNFRSF17 (UNIPROT Q02223) 、 SLAMF7(UNIPROT Q9NQ25)、GPRC5D(UNIPROT Q9NZD1)、FKBP11(UNIPROT Q9NYL4)、KAMP3、ITGA8 (UNIPROT P53708)和 FCRL5(UNIPROT Q68SN8)。在一具体实施方案中，所述癌症相关抗原是 CD19。

本发明所述的癌症的非限制性的例子包括肺癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、黑色素瘤、肾癌、膀胱癌、乳腺癌、肝癌、淋巴瘤、恶性血液病、头颈癌、胶质瘤、胃癌、鼻咽癌、喉癌、宫颈癌、子宫体瘤和骨肉瘤。可以用本发明的方法或药物组合物治疗的其他癌症的例子包括：骨癌、胰腺癌、皮肤癌、前列腺癌、皮肤或眼内恶性黑色素瘤、子宫癌、肛区癌、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、阴道癌、阴户癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病(包括急性髓细胞样白血病、慢性髓细胞样白血病、急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病)、儿童实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性 CNS 淋巴瘤、肿瘤血管发生、脊柱肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮状癌、鳞状细胞癌、T 细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症，包括石棉诱发的癌症，以及所述癌症的组合。在一具体实施方案中，所述癌症是 B 细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)。

本发明各个方面中，所述治疗或预防方法可以结合一种或多种选自以下一组针对癌症的疗法：抗体治疗、化学治疗、细胞因子治疗、树突状细胞治疗、基因治疗、激素治疗、激光治疗和放射治疗。

根据本发明的细胞或组合或药物的施用可以以任何方便的方式进行，包括通过注射、输注、植入或移植。本文所述的细胞或组合或药物施用可以通过静脉内、淋巴内、皮内、肿瘤内、髓内、肌内或腹膜内施用。在一个实施方案中，本发明的细胞或组合或药物优选通过静脉内注射施用。

实施例

下面将通过实施例的方式进一步说明本发明，但并不因此将本发明限制在所描述的实施例范围中。

材料和方法

CRISPR/Cas9 介导的 B-NDG 小鼠产生

CRISPR/Cas9 介导的 B-NDG 小鼠由 Beijing Biocytogen Co., Ltd.生成。简而言之，涉及 sgRNA 靶向位于 *Il2rg* 基因座的第一个和最后一个外显子侧翼的靶区域。对于每个靶位点，通过 CRISPR 设计工具(http://crispr.mit.edu/)确定 4 种候选 sgRNA 并使用 UCA 试剂盒(北京 Biocytogen)筛选靶向活性。选择两种 sgRNA 注射到小鼠受精卵中。体外转录的 Cas9 mRNA 和 sgRNA 以不同浓度混合并共注射至 NOD-scid 小鼠的受精卵中。注射后，存活的受精卵转移进 KM 假孕雌性的输卵管。从 F0 原代修饰小鼠中，进一步产生了 *Il2rg* 缺陷的杂合和纯合小鼠(B-NDG 小鼠)。所有小鼠均保持在特定的无病原体设施中。

细胞系

将 293-T 细胞(ATCC，CRL-3216)在补充有 10％FBS 和 100U/ml 青霉素/链霉素的 DMEM (Hyclone，Logan，Utah，USA)中培养。Raji (ATCC，CCL-86)、Raji-Fluc (军事医学科学院，北京；通过转染编码荧光素和嘌呤霉素抗性的慢病毒载体而衍生自 Raji 细胞)、CD19-K562 和 K562 细胞(Genomeditech，上海)在补充有 10％FBS 和 100 U/ml 青霉素/链霉素的 RPMI 1640 中培养。通过将细胞暴露于 40Gy 钴辐射获得经辐照的 Raji-Fluc 细胞。所有培养基和抗生素均购自 Gibco Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)。

基于慢病毒的载体的构建、制备和滴定

抗 CD19 CAR 包括 CD19 特异性 FMC63 mAb 的 scFv，CD8 的铰链和跨膜区域，4-1BB 共刺激结构域和 TCR 复合物的胞内 CD3ζ链。抗 CD19 CAR 基因被克隆进慢病毒载体 pPVLV2(Pharosvaccine Inc.，Gyeonggi，Republic of Korea)中。该载体用于产生 CAR-T-19 细胞。

通过用 CD19 编码序列取代抗 CD19 CAR 编码序列产生 aT19 慢病毒表达构建体。该载体用于产生 aT19 细胞。

表达所述抗 CD19 CAR 或 CD19 的慢病毒如下生成：在含 10％FBS 的 DMEM 中生长的 293T 细胞用慢病毒载体质粒和 pMDLg/pRRE、pRSV-Rev 和 pMD.G 包装质粒使用 PEI (Polysciences Inc.，Warrington，PA，USA)转染试剂共转染。转染 24 小时后，培养基替换为补充有 2％FBS、1mM 丙酮酸钠和 2mM L-谷氨酰胺的 DMEM。培养基交换后再 24 小时后，收集病毒上清液，超滤浓缩并用 293T 细胞滴定。为了确定功能性转导单位/mL，用连续稀释的浓缩的慢病毒制备物转导 293T 细胞。72 小时后，收集细胞并进行流式细胞术分析。

产生 CAR-T-19 细胞和 aT19 细胞

通过收集自健康志愿者的血液获得新鲜的外周血单个核细胞(PBMC)。将 PBMC 立即在含有 90％人 AB 血清加 10％二甲亚砜的培养基中使用或在所述培养基中冷冻保存用于将来使用。PBMC 用包被有抗 CD3 和抗 CD28 单克隆抗体的顺磁磁珠(Invitrogen，Carlsbad，CA，USA)以 3:1 的比率刺激 24 个小时。T 细胞活化后，将细胞以 1×10^6/mL 重悬在 IMSF100 培养基中，在 8μg/ml 聚凝胺(SIGMA，圣路易斯，MO，USA)的存在下，与慢病毒载体混合。感染复数(MOI)为 0.5-2，并转移到 12 孔板中。将板在环境温度下使用水平转子离心机在 1200g 离心 2 小时，随后转移到 37℃，5％CO_2 培养箱中。孵育 24 小时后，收集转导的细胞并用 IMSF100 培养基洗涤，然后将细胞在补充有 500 IU/mL IL-2 (BMI，韩国)的培养基中孵育。之后每 2 或 3 天更换培养基和 IL-2(300 IU/mL)，培养物维持在 37℃/5％CO_2，直至注射到小鼠中。其中 CAR-T-19 细胞为表达抗 CD19 CAR 的 T 细胞。aT19 细胞为表达 CD19 的 T 细胞。

流式细胞术

为了检测小鼠中的 T、B 和 NK 细胞和 CAR-T 细胞，使用 Becton Dickinson(BD)荧光激活细胞分选(FACS)标准按照制造商的方案进行多色流式细胞分析。从右心室采集外周血。通过 BD 细胞滤器收集和过滤脾细胞。血液中的红细胞和脾细胞通过裂解溶液耗竭。通过用包括 PerCP-CD3、FITC-CD4、PE-CD8、FITC-CD19 和 APC-CD49 的抗体单染色或双染色检测白细胞。所有抗体购自 Biolegend。

通过流式细胞术进行免疫表型分析。通过用以下特异性抗体染色细胞来监测 CAR 基因转导的功效：CD45(PerCP-Vio770)、CD3(FITC)、CD4(Vio Green)、CD16(APC)、CD56(APC)、CD19(APC-Vio770)、CD14(Vio Blue; Miltenyi Biotec，Bergisch Gladbach，Germany)。转导的 T 细胞用生物素-SP(长间隔物)AffiniPure F(ab')片段山羊抗小鼠 IgG，F(ab')2 片段特异性(Jackson ImmunoResearch Lab)标记，然后用链霉抗生物素蛋白-PE(BD Biosciences)或 CARTEST-19 (CytoCares Inc.，中国上海)标记，然后通过 CytoFLEX 流式细胞仪检测。使用 CytExpert(2.0)软件分析数据。

从小鼠收获的白细胞和脾细胞用 FITC-CD45、PE-CAR、FITC-CD19 和 APC-CD45RO(BD，NJ)染色，并在 FACSCanto II 流式细胞仪(BD)中检查。收集脾细胞并通过 BD 细胞过滤器过滤。通过在裂解溶液(BD)中孵育 5 分钟来耗尽血液和脾细胞制剂中的红细胞。

动物实验

本研究中的小鼠根据实验动物关怀评估和鉴定协会制定的指导方针进行饲养和操作。研究得到了 NIFDC 机构动物护理和使用委员会的批准。四周龄的雌性 BALB/c、C57BL/6、NOD-scid 和 B-NDG 小鼠获得自 NIFDC 实验动物资源研究所(中国北京)。在 D0，小鼠通过尾静脉注射移植 5×10^5 个 Raji-Fluc 细胞，随后在第 5 天(D5)天或第 6 天(D6)植入 2×10^7 个 CAR-T-19 细胞。在 CAR-T 记忆实验中，在 D10 或 D11 注射不同剂量的 Raji-Fluc 细胞、经辐照的 Raji-Fluc 细胞或 aT19 细胞。在指定的时间点观察所有小鼠的生物发光信号。在指定时间点获得血液样品进行荧光激活细胞分选和定量实时 PCR(qPCR)分析。

生物发光成像分析

简言之，使用 IVIS-Lumina II 成像系统(PerkinElmer，Baltimore，MD)获得小鼠的生物发光成像。通过腹膜内注射戊巴比妥钠(75mg/kg 体重)麻醉小鼠。然后在 10 分钟后使其接受腹膜内注射 D-荧光素(75mg/kg 体重；PE)。使用 Living Image 软件(Caliper Life Sciences)分析图像，并将数据表示为总通量(光子/s)。如果产生的最大生物发光值超过 1×10^6 通量，并且生物发光面积在随后的时间点不再小于 1×10^6 通量，则将该时间点记录为肿瘤复发的时间。

CAR-T-19 细胞的细胞毒性

通过流式细胞术测量 CAR-T-19 细胞杀死 K562、CD19-K562、aT19 和 Raji-Fluc 细胞的能力。简而言之，将靶细胞(K562、CD19-K562、Raji-Fluc 或 aT19)转移到离心管中并用 CFSE 染色。接下来，调整靶细胞:CAR-T-19 细胞比率并分别以不同比例接种细胞(K562 或 CD19-K562:CAR-T-19 = 1:1、1:3 或 1:6；aT19 或 Raji-Fluc:CAR-T-19 = 1:0.3、1:1 或 1:3)。未转导的 T 细胞记录为 NC(阴性对照)。孵育 20-24 小时后，通过流式细胞术分析 CFSE+ 7-AAD+细胞的百分比。

定量检测 CAR-T 细胞

通过 qPCR 检测从小鼠外周血和脾中分离的 CAR-T-19 细胞中 CAR 基因的存在。简而言之，使用 QIAamp DNA Mini Kit(Qiagen，GER)提取 DNA，并在 IMPLEN N50 超微紫外分光光度计(IMPLEN，N80 TOUCH)中定量。将提取的 DNA 保存在-20℃直至需要。使用 4-1BB 引物(Invitrogen)和探针(Thermo Fisher Scientific)对 DNA(100ng)进行 PCR 扩增，以检测 CAR 基因的表达(CD19 4-1BB F 引物，5'-TGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAG-3'；CD19 4 -1BB R 引物，5'-GCGCTCCTGCTGAACTTC-3'; CD19 4-1BB MGB 探针，5'-ACTCTCAGTTCACATCCTC-3'))。

使用 StepOnePlus 荧光实时定量 PCR 仪(Thermo Fisher)进行 PCR。使用 Step One Software v2.3 分析结果。

统计

所有图表均使用 GraphPad Prism 6.0 软件生成所有的统计学比较均采用

非参数单因素方差分析或 Student t 检验，P 值<0.05 为统计学显著(*)，P <0.01(**)为非常显著。

实施例 1、Raji-B-NDG 小鼠模型的产生和表征

具有无效 *Il2rg* 的非肥胖糖尿病严重联合免疫缺陷(NOD-scid)小鼠缺乏成熟 T 细胞、B 细胞和天然杀伤(NK)细胞，并且缺乏细胞因子信号传导，导致多种癌症类型更好的植入。在本实施例中，用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术从 NOD-scid 小鼠中缺失 *Il2rg* 基因，从而制备 B-NDG 小鼠(图 1A)。观察到 B-NDG 小鼠可存活、可繁殖并且没有显示任何明显的身体异常。与 NOD-scid 小鼠相比，FACS 分析显示 B-NDG 小鼠的脾和外周血具有较低数量的 CD19+B 细胞、CD4+和 CD8+T 细胞(图 1B)。NOD-scid 小鼠具有高百分比的 CD49b + NK 细胞(脾脏 20.90％，外周血 24.10％)，而 B-NDG 小鼠无功能性 NK 细胞(脾脏 1.45％，外周血 5.95％)。因此，通过基因组编辑产生的 B-NDG 小鼠在表型上与 NSG 小鼠相似。

快速增长的非霍奇金淋巴瘤细胞系 Raji 细胞被基因工程化来稳定表达萤火虫荧光素酶报告基因用于生物发光成像(Raji-Fluc)。通过流式细胞术检测 Raji-Fluc 细胞表面的 CD19 发光丰度。结果显示，CD19 在 Raji-Fluc 细胞上高表达(图 1G)。体外加入 Fluc 的相应底物后，Fluc 的发光强度与 Raji-Fluc 细胞的数量正相关(R^2=0.99，图 1G)。

为了进一步研究所获得的 B-NDG 小鼠模型的能力，6 周龄的五种不同小鼠品系(包括作为正常对照的 CB57/L 小鼠、作为部分免疫缺陷组的裸鼠和 rag2-/-小鼠、NOD-scid 和 B-NDG 小鼠)通过尾静脉注射移植 Raji-Fluc 细胞。B-NDG 小鼠中在植入后(PI)第四天(D4)检测到生物发光信号，16 天后增加 1000 倍(图 1C 和 D)。流式细胞术分析表明 CD19+Raji 细胞在 B-NDG 小鼠的外周血中爆发，与生物发光信号的相关性 R^2=0.90(图 1E)。然而，在 CB57/L、rag2-/-、裸鼠、甚至 NOD-scid 小鼠中无法检测到 Raji-Fluc 细胞。所有这四种小鼠在 D30 PI 存活，而 7 只 B-NDG 小鼠在 D18 PI 死亡，另外 3 只死于 D19(图 1C、D 和 F)。这些数据证明 B-NDG 小鼠中 Raji 细胞植入效果要好得多，并且可以用作测试治疗剂例如 CAR-T 细胞的模型。

实施例 2、CD19 靶向性 CAR-T 细胞的体外和体内效率

T 细胞活化后，从志愿者分离的 PBMC 用第二代 CAR(图 2A)进行转导。结果表明，CD19 CAR-T 细胞的比例随着培养时间的延长而增加，在 D12 达到 20%，并且细胞的总数在感染后 D10 大于 1×10^8(图 2B)。当在与 CD19+Raji 细胞体外共培养时，培养 12 天的 CD19 CAR-T 细胞，在效应细胞/靶细胞比例为大约 3:1 的情况下，显示 50%以上的对 Raji 细胞的杀灭作用。为了进一步验证 CD19 CAR-T 细胞的体内抗肿瘤作用，B-NDG 小鼠通过尾静脉注射 5×10^5 Raji-Fluc 细胞，随后在 5 天后植入 2×10^7 的 CD19 CAR-T 细胞。CD19 CAR-T 治疗四天后(D9)，这些经治疗的小鼠的生物发光信号接近于未接种肿瘤的小鼠(图 3A)，表明 CD19 CAR-T 细胞成功介导了体内肿瘤清除。

实施例 3、Raji 肿瘤的复发来源

尽管 CAR-T 细胞很有效，但是 B-NDG 小鼠最终因肿瘤死亡。为了找到 Raji 细胞复发的来源，测试了小鼠全部主要器官的生物发光。结果表明 Raji 细胞在脾脏、心脏和皮肤显著地被 CD19 CAR-T 细胞清除。例如，脾脏中，CAR-T 细胞处理后生物发光减少 1000 倍(图 3A)。然而，CD19 CAR-T 在其它器官并不都如此有效，特别是在肝脏和脑中(图 3A)。隐藏在这些器官中的不能被 CAR-T 有效清除的残余 Raji 细胞可能是肿瘤复发的原因。

实施例 4、低剂量活肿瘤细胞的刺激有助于 CAR T 细胞的免疫记忆的产生

为了测试 CAR-T 细胞是否因肿瘤微环境而发生改变，导致其无法识别和杀死 Raji 细胞并导致疾病复发，在 D10 PI 未检测到生物发光的情况下，向 CD19 CAR-T 处理过的小鼠中重新植入不同量的 Raji-Fluc 细胞(A1：5×10^4，A2：5×10^5，A3：5×10^6)。未再接种 Raji-Fluc 细胞的小鼠用作对照(SNT)。在 SNT 组中，能够持续观察到生物发光，直到全部小鼠死亡。在再植入一天后，全部小鼠快速发展出疾病。令人意想不到的是，再植入 9 天后，几乎所有的 Raji 细胞都被清除(图 3A)。再植入组的生存优于 SNT 组($P<0.05$，图 3A 和 B)。A1 组的三只小鼠存活超过 200 天。如果某一时间点小鼠的最大生物发光值超过 1×10^6 通量，并且在随后的时间点生物发光面积不再低于 1×10^6 通量，则该时间点记录为肿瘤复发时间。与其他各组相比，用低剂量 Raji-Fluc 细胞再接种可延长无复发时间(图 3A 和 C)。然后分析不同时

间点不同组的平均生物发光强度。低剂量再植入组的信号接近空白对照组的信号(图 3D)，而其他组的信号不同程度地增加，表明复发是由 CAR 的不良持续性而并其能力不足所致，并且低剂量肿瘤细胞的抗原刺激促进 CAR-T 细胞的免疫记忆的产生。

实施例 5、再植入辐射后死亡的肿瘤细胞不起作用

在临床上注射活肿瘤细胞是不可行的，因此测试辐射后死亡肿瘤细胞是否可以刺激 CAR-T 细胞的免疫记忆。由于当前本领域中多次输注 CAR-T 细胞是克服其持续性不足的主要策略，设计了重复 CAR-T 治疗的小鼠模型。如图 4 所示，在第 5 天(D5)进行 CAR-T 细胞治疗后，Raji-B-NDG 小鼠在 D10 注射不同剂量的经辐射的 Raji-Fluc 细胞(rRaji-Fluc，A1：5×10^4，A2：5×10^5，A3：5×10^6)。三组接种相同剂量 rRaji-Fluc 的 B-NDG 小鼠作为经辐射细胞对照组(PA1/PA2/PA3)。无 rRaji-FLuc 植入的小鼠作为单次处理组(SNT)。双重处理组(DNT)的小鼠在 D10 注射 2×10^7 个 CAR-T 细胞。小鼠中可观察到生物发光信号，直到 SNT 组全部小鼠死亡。与 SNT 组相比，再植入 rRaji-Fluc 细胞不能延长小鼠的整体存活期和无复发存活期(图 4B 和 C)。SNT 组与 DNT 组无显著性差异，说明双重处理无效。A1/A2/A3/SNT 组小鼠外周血中 CAR-T 细胞的数量在相似的时间达到峰值(图 4D)。由于两次注射 CAR-T 细胞，DNT 组的峰值时间晚于其他组。A1 组的 CAR-T 细胞减少速率慢于 A2/A3/SNT 组，表明低剂量 rRaji-Fluc 细胞的刺激倾向于促进 CAR-T 细胞的维持。

实施例 6、使用表达 CD19 的 T 细胞(aT19)的再刺激

CAR 基因构建体包含源自 CD19 特异性 FMC63 mAb 的 scFv、CD8 的铰链和跨膜区域、和 4-1BB 胞质结构域，以及 TCR 复合物的胞内 CD3ζ 链(图 5A)。pEF1α 是 CAR 基因启动子。通过用人 CD19 替换 CAR 转基因产生 aT19 构建体(图 5B)。用 CAR-19 或 CD19 构建体(aT19)转导从获自健康志愿者的 PBMC 分离的 T 细胞。表 1 显示了实验中使用的 CAR-T-19、活 Raji-Fluc、经辐照的 Raji-Fluc 和 aT19 细胞的表型和数量。接下来，进行细胞毒性测定以检查 CAR-T-19 细胞的杀伤能力。在与 CD19+Raji 或 aT19 细胞进行体外共培养后，CAR-T-19 细胞以> 3:1 的效应物/靶标比例杀死超过

50％的 Raji-Fluc 细胞或 aT19，而当 T 细胞与对照 K562 细胞共培养时几乎没有观察到细胞毒性作用(图 5C)。

表 1. 实验中使用的活 Raji-Fluc、经辐照的 Raji-Fluc 和 aT19 细胞的数量，以及 CAR-T-19 表型和数量

实验	CD4+	CD8+	CAR+	CAR-T 细胞数量	再刺激细胞数量
活 Raji-Fluc 再刺激	63.09%	32.04%	50.45%	2×10^7	5×10^4 5×10^5 5×10^6
经辐照的 Raji-Fluc 再刺激	42.63%	53.52%	62.85%	2×10^7	5×10^4 5×10^5 5×10^6
aT19 再刺激	43.00%	54.08%	70.95%	2×10^7	5×10^5

CAR-T-19 治疗然后施用活 Raji-Fluc 细胞可延长 Raji-B-NDG 小鼠的存活

阳性组和 NC 组中的小鼠单独接受肿瘤细胞或仅接受 PBS，并分别记录为 P 组或 N 组(n=3/组)。NT 组中的小鼠在没有刺激的情况下接受 CAR-T-19 细胞(n=5/组)。A 组被指定为免疫记忆测试组；该组中的小鼠接受三种不同剂量的再刺激细胞中的一种(A1 组，5×10^4 细胞；A2 组，1.5×10^5 细胞；和 A3 组，5×10^5 细胞)(n = 5/组)。PA1、2 和 3 组分别用作每组 A 的对照组(n =3/组)。这些组列于表 2 中。图 6A 示出肿瘤细胞、CAR-T 细胞和再刺激细胞的使用时间线。

表 2. 在再刺激实验中使用的 Raji-Fluc 细胞的数量

时间/注射的细胞类型	A1 (n=5)	A2 (n=5)	A3 (n=5)	P (n=3)	N (n=3)	NT (n=5)	PA1 (n=3)	PA2 (n=3)	PA3 (n=3)
D0/Raji-Fluc	5×10^5	5×10^5	5×10^5	5×10^5	/	5×10^5	/	/	/
D5/CAR-T	2×10^7	2×10^7	2×10^7	/	2×10^7	2×10^7	/	/	/
D10/Raji-Fluc	5×10^4	1.5×10^5	5×10^5	/	/	/	5×10^4	1.5×10^5	5×10^5

在注射后(PI)D4 获得的体内成像结果显示，接受 Raji-Fluc 细胞的小鼠的总通量(>2.2×10^6)远高于未接受 Raji-Fluc 细胞的小鼠(<1.6×10^6；NC 组)，表明小鼠模型构建成功(图 6B)。在 PI 的 D5，小鼠接受(或不接受)2×10^7 个 CAR-T-19 细胞。D9 上的成像显示接受 CAR-T-19 细胞的所有小鼠(除了 P 组中的那些)的总通量显著降低(图 6B)，表明 CAR-T-19 细胞有效杀死 Raji-Fluc 细胞。

接下来，为了研究 Raji-Fluc 细胞是否刺激残留的 CAR-T-19 细胞的生长，产生记忆细胞，并延长 CAR-T-19 治疗的效果，小鼠在 PI 的 D10 接受了随后的 Raji-Fluc 细胞注射。如图 6B 所示，P 组中的所有小鼠均死于 PI 的 D18-23。PA1/2/3 组中的所有小鼠分别死于 D31-33/D27-31/D28。由于 PA3 组中的小鼠接受与 P 组小鼠相同数量的肿瘤细胞，因此存活时间与 D20-24 相似。N 组中的一只小鼠以不明原因死于 D71；另外两只幸存了 200 多天。NT 组中的所有 5 只小鼠均死于 D82。对于 A1 组小鼠，荧光信号从 D11 到 D24 逐渐下降，并且 D34 没有检测到 Raji-Fluc 细胞(图 6B)；该组中的三只小鼠在 D200 无肿瘤。在 A2 组中，三只小鼠死于 D96，而另外两只小鼠在没有肿瘤的情况下存活至 D100 (图 6B)。在 A3 组中，一只小鼠在 D40 死于不明原因，三只因肿瘤复发在 D56、D80 和 D86 死亡，并且另一只死于 D96。总之，这些结果表明，用肿瘤细胞再刺激的小鼠存活的时间长于没用肿瘤细胞再刺激的小鼠(图 6C，$P<0.05$)。此外，用低剂量的 Raji-Fluc 细胞重新接种导致无复发存活率显著增加(图 6D)。最后，检查了不同时间点不同组的平均生物发光强度。由低剂量再刺激组产生的信号与由空白对照组产生的信号非常相似(图 6B)，而由其他组产生的信号不同程度地增加，表明用低剂量肿瘤细胞的再刺激扩增 CAR-T-19 细胞群并清除 Raji-Fluc 细胞。

用 CAR-T-19 细胞随后用经辐照的 Raji-Fluc 细胞对 Raji-B-NDG 小鼠进行连续治疗并不能延长生存期

给患者注射活肿瘤细胞是不可行的。因此，接下来研究**经辐照**死亡的肿瘤细胞是否以与活细胞相似的方式增加 CAR-T-19 细胞的功效。这组实验使用与活细胞实验相同的小鼠组。施用的细胞的组和数量显示在表 3 中。时间线见图 7A。如前所述，在 PI 的不同时间进行生物发光成像。发现用**经**

辐照的死亡 Raji-Fluc 细胞再刺激 CAR-T-19 细胞不会增加总体存活率和无复发存活率(图 7B 和 C)。

表 3. 用于再刺激的经辐照的 Raji-Fluc 细胞的数量

时间/注射的细胞类型	A1 (n=6)	A2 (n=6)	A3 (n=6)	NT (n=6)	P (n=3)	N (n=3)	PA1 (n=3)	PA2 (n=3)	PA3 (n=3)
D0/Raji-Fluc	5×10^5	5×10^5	5×10^5	5×10^5	5×10^5	/	/	/	/
D5/CAR-T	2×10^7	2×10^7	2×10^7	2×10^7	/	/	/	/	/
D10/辐射的 Raji-Fluc	5×10^4	1.5×10^5	5×10^5	/	/	/	5×10^4	5×10^5	5×10^6

另外，在 D0 / D5 / D10 / D15 / D20 上测量了从小鼠内眦获得的血液的 CAR 拷贝数(代表 CAR +细胞数)。如图 7E 所示，A1、A2、A3 和 NT 组中 CAR-T-19 细胞的数量同时达到峰值。此外，在 D10 用辐射的肿瘤细胞再刺激后，CAR 拷贝数没有增加(图 7E)。这些结果表明，用辐射的死亡肿瘤细胞再刺激不会增加残留 CAR-T-19 细胞的生长或促进记忆 CAR-T-19 细胞的产生。

用 CAR-T-19 细胞处理小鼠，然后用 aT19 细胞再刺激，增加 CAR+细胞的数量和 CAR+记忆细胞的百分比，并延长生存期

Raji-Fluc 细胞是具有高增殖能力的肿瘤细胞。因此，如果患者接受刺激剂量的 Raji 细胞，则存在这些细胞将形成肿瘤的风险。这显然是不可接受的。因此，使用携带人 CD19 基因的 T 细胞(aT19 细胞)代替 Raji-Fluc 细胞来再刺激 CAR-T-19 细胞。注射时间和使用的细胞数列于表 4 中。阳性/NC 组(P 和 N 组)中的小鼠分别接受肿瘤细胞或仅接受 PBS。NT 组中的小鼠接受单剂量的 CAR-T-19 细胞，没有随后剂量的刺激细胞。A1 组用 Raji-Fluc 细胞(n = 4)再刺激，而 aT19 组用 aT19 细胞(n=6)再刺激 (图 8A)。此外，在 D10、D20 和 D30 上从内眦取血(图 8D)。结果显示，aT19 组小鼠的存活时间明显长于 NT 组小鼠；aT19 组中的三只小鼠存活至 D160(图 8C)。

表 4. 用于再刺激的 Raji-Fluc 或 aT19 细胞的剂量

时间/注射	NC (n=6)	A1 (n=4)	NT (n=5)	aT19 (n=6)	PC (n=1)
D0/Raji-Fluc	/	5×10^5	5×10^5	5×10^5	5×10^5
D6/CAR-T	/	2×10^7	2×10^7	2×10^7	/
D11/Raji-Fluc 或 aT19	/	5×10^4	/	5×10^5	/

为了阐明延长的存活和延迟的肿瘤复发是由于 CAR-T-19 细胞的增殖和随后在抗原阳性细胞再刺激后产生记忆 CAR-T-19 细胞，使用 qPCR 来测量 CAR 拷贝数并使用流式细胞术测量 D10、D20 和 D30 外周血和脾中 CAR+和 CD45RO+细胞的百分比。QPCR 显示 NT 组小鼠血液中的 CAR 拷贝数随时间下降(从 1175 拷贝到 295 拷贝)，而 aT19 组小鼠血液中的 CAR 拷贝数随着时间的推移而增加(从 1224 拷贝到 6824 拷贝)，尤其是在 D10 后(图 8D)。正如预期的那样，NT 组小鼠血液中 CAR+细胞百分比降低(从 3.28％降至 0.29％)，而 aT19 组小鼠血液中 CAR+细胞百分比增加(从 9.6％增至 13.0％)(数据未显示)。除 CAR+细胞外，还测量了 CD45RO+(记忆)细胞的百分比。如图 8F 所示，NT 组血液中 CAR+ CD45RO+细胞的百分比从 0.44％(D20)略微下降至 0.37％(D30)，而 aT19 组血液中的百分比从 0.34％(D20)上升至 0.86％(D30)，证实在 aT19 细胞再刺激后产生记忆 CAR-T-19 细胞。此外，检查了小鼠中 CAR+细胞、CD45RO+细胞和总通量(肿瘤负荷)之间的关系。结果显示，总通量与两种类型细胞的数量呈负相关，表明 CAR 拷贝数的检测可用于估计残留肿瘤负荷。

讨论

过去十年中，CAR-T 细胞疗法取得了进展；然而，许多障碍尚待克服。其中，延长 CAR-T 细胞在体内的功效和减少 CAR-T 治疗的副作用是最重要的。CAR-T 细胞的功效可以通过优化胞外识别 [19,20] 和 CAR 介导的细胞内信号转导 [21](通过调整 CAR +细胞的比例和类型实现)[22] 以及同时使用靶向药物 [23] 等策略来延长。通过调整 CAR-T 细胞的剂量和同时使用免疫抑制药物，

可以降低与 CAR-T 治疗相关的毒性和副作用[24]。对疫苗采取了类似的方法，这些方法不断优化，以便在更长的时间内提供有效的保护，同时减少不良反应[25]。最常见的疫苗接种方案涉及多次免疫或甚至使用不同的免疫原来增强免疫应答。以 HIV 疫苗策略为例，初级和加强免疫分别包含病毒抗原和核酸，分别增加抗体保护的持续时间和增加免疫激活[26]。然而，对于 CAR-T 细胞疗法，多次接种增加了成本和毒性但降低了功效。

在本申请中，令人惊奇地发现，通过在 CAR-T 细胞施用后，使用表达肿瘤抗原的细胞(例如 aT19 细胞)进行再刺激，可以通过增加细胞有效的时间和减少其副作用来优化 CAR-T 治疗(例如 CAR-T-19 治疗)。

肿瘤抗原的丧失或较短的有效性意味着肿瘤倾向于在 CAR-T 细胞治疗后复发。肿瘤抗原的丧失是常见的免疫逃逸策略，这在 ALL 中是常见的。潜在的机制涉及表型谱系和选择型剪接的转换[27]。此外，必须将 CAR-T 细胞的数量维持在长时间控制肿瘤所需的最低水平。有很多复杂的原因导致难以维持 CAR-T 细胞的数量；这些包括针对 CAR 的免疫反应、细胞衰老诱导的增殖能力丧失和活化诱导的细胞死亡。通过优化用于产生 CAR 的结构和条件，可以减少对 CAR 的免疫应答。由于 T 细胞活化和增殖需要持续的免疫刺激，携带肿瘤抗原的细胞是诱导 CAR-T 细胞增殖的最佳刺激信号。在本申请中，在 D5 给小鼠注射 CAR-T 细胞，并然后将它们暴露于大剂量的肿瘤(抗原阳性)细胞。CAR-T 细胞迅速增殖并杀死肿瘤细胞直至 D9，此时血液中可检测到很少的肿瘤细胞。然而，当它们未暴露于抗原介导的刺激时，T 细胞的增殖能力降低。因此，发现 CAR-T 细胞的数量随着时间的推移而下降，并最终不能抑制残留癌细胞的增殖。SNT 组小鼠血液中 CAR+细胞百分比从 D20 至 D30 逐渐下降。然而，如果在癌细胞几乎完全消除后注射第二“抗原”(即 aT19 细胞)，则再刺激 CAR-T 细胞并保持其增殖能力。此外，本申请的结果表明，在 D30 不仅 CAR+细胞数量显著高于 D20 而且 CD45RO+记忆细胞百分比显著高于 D20，这进一步巩固了 CAR-T 介导的免疫力。因此，aT19 细胞起到类似于加强免疫的作用。接受连续治疗的小鼠的无复发生存期和总生存期优于接受单一治疗的小鼠(单独使用 CAR-T 细胞)，这表明连续免疫可能是一种更安全，更有效的延长 CAR-T 细胞在临床环境中的有效时间的策略。

CAR-T 治疗可能导致严重病例的细胞因子释放综合征(CRS；通常称为

“细胞因子风暴”)，这可能危及生命[3,28,29,30]。这是 CAR-T 疗法除了脱靶效应最严重的副作用之一。CAR-T 细胞可以被肿瘤细胞激活，并且免疫系统又可以被 CAR-T 细胞释放的细胞因子激活。如果释放大量炎症因子，这可能导致发烧、低血压、呼吸窘迫、多器官功能障碍、神经调节障碍和其他症状[28]。CRS 通常在 CAR-T 注射后的前 2 周内发生，尽管潜在的机制尚不清楚。使用抗细胞因子单克隆抗体或糖皮质激素的早期干预可降低 CRS 的风险[31]。有证据表明，CRS 的严重程度与接种的 CAR-T 细胞数和肿瘤负荷正相关[4,22,32,33,34]。在这里，通过用 CAR-T 细胞然后用 aT19 细胞的连续“免疫”，在小鼠中产生持续的免疫应答。这可以减少每次接种所需的 CAR-T 细胞数量和随时间推移所需的接种次数，从而降低 CRS 的可能性和/或严重性。

本申请数据表明 aT19 细胞具有临床实用性。这是因为这些细胞来自与 CAR-T-19 细胞相同的来源。临床上，自体 PBMC 可用于产生这些细胞，这可有效避免移植物对抗宿主疾病。此外，CAR-T 细胞通过 CD19 分子而不是其他免疫信号识别 aT19 细胞，从而确保特异性。最后，通过用 CD19 基因取代 CAR 抗体的 Fab 片段构建 aT19 转导片段；这将消除体内正常组织中的任何脱靶效应。例如，CAR-T-Her2 可以攻击肺粘膜上皮并引起肺水肿，这在严重的情况下可能是致命的[35]。因此，从临床角度来看，使用 aT19 细胞的连续“免疫”应该是可行的。在本申请中，因为在 D9 没有检测到肿瘤，在 D10 给小鼠注射了 aT19 细胞。此时，靶细胞的丢失可能导致 CAR-T 细胞攻击宿主组织。然而，CAR-T-19 细胞的增殖率可能由于抗原特异性刺激的丧失而降低，而非特异性攻击宿主的 T 细胞可以连续增殖。因此，在 D10 注射 aT19 细胞以维持 CAR-T-19 细胞。

临床上，可以根据 CAR-T 细胞的数量调整 aT19 施用的时间。在这里，通过 qPCR 测量血液中的 CAR 拷贝数来估计 CAR-T 细胞的数量。结果与流式细胞术提供的结果一致。此外，血液样品中 CAR+细胞的数量与荧光值(总通量)(其代表体内残留肿瘤)之间存在负相关。然而，人体中的循环系统比小鼠更长且更复杂，并且临床中给予的 CAR-T 的剂量远大于给予小鼠的剂量。因此，在 CAR-T 细胞治疗后的第一周内，人体内的癌细胞可能无法完全清除，并且血液中的 CAR 拷贝数将继续增加。随后，当 CAR+拷贝的数量开始下降时，CAR-T 细胞的数量逐渐下降并且它们被新生成的 T 细胞

替换。此时应考虑用 aT19 细胞进行免疫。连续监测 CAR+拷贝数，然后及时接种 aT19 细胞可能是在这种情况下临床应用 aT19 细胞的可行方法。

总之，用 CAR-T 细胞处理过的小鼠注射 Raji-Fluc 细胞、辐射的 Raji-Fluc 细胞或 aT19 细胞。结果显示，用活 Raji-Fluc 细胞和 aT19 细胞再刺激 CAR-T 细胞延长了无复发存活率和总体存活率，而用辐射的(死亡)Raji-Fluc 细胞再刺激则没有延长无复发存活率和总体存活率。aT19 的连续治疗增加了血液中 CAR +和 CD45RO +细胞的百分比，证实了记忆 CAR-T 细胞的产生。

参考文献

1. Curran E, Stock W. How I treat acute lymphoblastic leukemia in older adolescents and young adults. *Blood* 2015, **125**(24)**:** 3702-3710.
2. Forman SJ, Rowe JM. The myth of the second remission of acute leukemia in the adult. *Blood* 2013, **121**(7)**:** 1077-1082.
3. Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, Cui YK, Delbrook C, Feldman SA, *et al.* T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 2015, **385**(9967)**:** 517-528.
4. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, *et al.* Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *The New England journal of medicine* 2014, **371**(16)**:** 1507-1517.
5. Brentjens RJ, Riviere I, Park JH, Davila ML, Wang X, Stefanski J, *et al.* Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood* 2011, **118**(18)**:** 4817-4828.
6. Porter DL, Hwang WT, Frey NV, Lacey SF, Shaw PA, Loren AW, *et al.* Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Science translational medicine* 2015, 7(303)**:** 303ra139.
7. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *The New England journal of medicine* 2011, **365**(8)**:** 725-733.
8. Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, Somerville RP, Carpenter RO, Stetler-Stevenson M, *et al.* Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2015, **33**(6)**:** 540-549.
9. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, *et al.* Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *The New England journal of medicine* 2013, **368**(16)**:** 1509-1518.
10. Park JH, Riviere I, Gonen M, Wang X, Senechal B, Curran KJ, *et al.* Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *The New England journal of medicine* 2018, **378**(5)**:** 449-459.
11. Riddell SR, Sommermeyer D, Berger C, Liu LS, Balakrishnan A, Salter A, *et al.* Adoptive therapy with chimeric antigen receptor-modified T cells of defined subset composition. *Cancer journal* 2014, **20**(2)**:** 141-144.
12. Wang X, Berger C, Wong CW, Forman SJ, Riddell SR, Jensen MC. Engraftment of human central memory-derived effector CD8+ T cells in immunodeficient mice. *Blood* 2011, **117**(6)**:** 1888-1898.

13. Berger C, Jensen MC, Lansdorp PM, Gough M, Elliott C, Riddell SR. Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *The Journal of clinical investigation* 2008, **118**(1): 294-305.
14. Sommermeyer D, Hudecek M, Kosasih PL, Gogishvili T, Maloney DG, Turtle CJ, *et al.* Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo. *Leukemia* 2016, **30**(2): 492-500.
15. Tae-Wook C, J Shawn J, Punita P, Hallahan CW, Mary ML, Shuying L, *et al.* Relationship between the size of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reservoir in peripheral blood CD4+ T cells and CD4+:CD8+ T cell ratios in aviremic HIV-1-infected individuals receiving long-term highly active antiretroviral therapy. *Journal of Infectious Diseases* 2002, **185**(11): 1672-1676.
16. R P B, L Y H, G C L, C C L, C H R, F Y H, *et al.* Prevention of perinatally transmitted hepatitis B virus infections with hepatitis B immune globulin and hepatitis B vaccine. *The Lancet* 2014, **384**(9959): 2053-2063.
17. Sabrina K, Qi Z, Michael S, Fran?Ois-Loic C, Els V, Buchholz CJ. CD19 and CD20 Targeted Vectors Induce Minimal Activation of Resting B Lymphocytes. *Plos One* 2013, **8**(11): e79047.
18. Loos H, Blok-Schut B, van Doorn R, Hoksbergen R, Brutel de la Riviere A, Meerhof L. A method for the recognition and separation of human blood monocytes on density gradients. *Blood* 1976, **48**(5): 731-742.
19. Grada Z, Hegde M, Byrd T, Shaffer DR, Ghazi A, Brawley VS, *et al.* TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy. *Mol Ther Nucleic Acids* 2013, **2**: e105.
20. Ruella M, Barrett DM, Kenderian SS, Shestova O, Hofmann TJ, Perazzelli J, *et al.* Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies. *J Clin Invest* 2016, **126**(10): 3814-3826.
21. Chmielewski M, Abken H. TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert Opin Biol Ther* 2015, **15**(8): 1145-1154.
22. Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, Gooley TA, Cherian S, Hudecek M, *et al.* CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest* 2016, **126**(6): 2123-2138.
23. Cherkassky L, Morello A, Villena-Vargas J, Feng Y, Dimitrov DS, Jones DR, *et al.* Human CAR T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition. *J Clin Invest* 2016, **126**(8): 3130-3144.
24. Gust J, Hay KA, Hanafi LA, Li D, Myerson D, Gonzalez-Cuyar LF, *et al.* Endothelial Activation and Blood-Brain Barrier Disruption in Neurotoxicity after Adoptive Immunotherapy with CD19 CAR-T Cells. *Cancer Discov* 2017, **7**(12): 1404-1419.
25. Lewis GK, DeVico AL, Gallo RC. Antibody persistence and T-cell balance: two key factors confronting HIV vaccine development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014, **111**(44): 15614-15621.
26. Day TA, Kublin JG. Lessons learned from HIV vaccine clinical efficacy trials. *Current HIV research* 2013, **11**(6): 441-449.
27. Sotillo E, Barrett DM, Black KL, Bagashev A, Oldridge D, Wu G, *et al.* Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy. *Cancer Discov* 2015, **5**(12): 1282-1295.
28. Bonifant CL, Jackson HJ, Brentjens RJ, Curran KJ. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Molecular therapy oncolytics* 2016, **3**: 16011.
29. Davila ML, Riviere I, Wang X, Bartido S, Park J, Curran K, *et al.* Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Science translational medicine* 2014, **6**(224): 224ra225.
30. Lee DW, Gardner R, Porter DL, Louis CU, Ahmed N, Jensen M, *et al.* Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood* 2014, **124**(2):

188-195.

31. Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, Hudecek M, Pender B, Robinson E, *et al.* Immunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a defined ratio of CD8+ and CD4+ CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells. *Science translational medicine* 2016, **8**(355)**:** 355ra116.
32. Park JH, Geyer MB, Brentjens RJ. CD19-targeted CAR T-cell therapeutics for hematologic malignancies: interpreting clinical outcomes to date. *Blood* 2016, **127**(26)**:** 3312-3320.
33. Geyer MB, Brentjens RJ. Review: Current clinical applications of chimeric antigen receptor (CAR) modified T cells. *Cytotherapy* 2016, **18**(11)**:** 1393-1409.
34. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, *et al.* Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *The New England journal of medicine* 2013, **368**(16)**:** 1509-1518.
35. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2010, **18**(4)**:** 843-851.

权 利 要 求 书

1. 一种在对象中治疗癌症的方法，包括以下步骤：

(a) 给所述对象施用特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞；和

(b) 给所述对象施用表达所述癌症相关抗原的细胞。

2. 权利要求 1 的方法，所述治疗性 T 细胞施用一或多次，优选一次。

3. 权利要求 1 或 2 的方法，表达所述癌症相关抗原的细胞施用一或多次，优选一次。

4. 权利要求 1-3 中任一项的方法，其中在施用所述治疗性 T 细胞之后施用所述表达癌症相关抗原的细胞。

5. 权利要求 4 的方法，其中在施用所述治疗性 T 细胞 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、8 天、9 天、10 天、11 天、12 天、13 天、14 天、15 天、16 天、17 天、18 天、19 天或 20 天后施用表达所述癌症相关抗原的细胞。

6. 权利要求 1-5 中任一项的方法，其中在施用所述治疗性 T 细胞使得癌症细胞负荷降低后，施用表达所述癌症相关抗原的细胞；或者在施用所述治疗性 T 细胞后，当所述治疗性 T 细胞在所述对象体内的量下降时，施用表达所述癌症相关抗原的细胞。

7. 权利要求 6 的方法，其中在癌症细胞负荷降低至少大约 5%、至少大约 10%、至少大约 20%、至少大约 30%、至少大约 40%、至少大约 50%、至少大约 60%、至少大约 70%、至少大约 80%、至少大约 90%后，施用表达所述癌症相关抗原的细胞。

8. 权利要求 1-7 中任一项的方法，其中在癌症通过施用所述治疗性 T 细胞而完全缓解之后，施用表达所述癌症相关抗原的细胞。

9. 权利要求 1-8 中任一项的方法，其中所述治疗性 T 细胞以治疗有效量施用，例如施用约 10^4 至约 10^9 个所述治疗性 T 细胞。

10. 权利要求 1-9 中任一项的方法，其中所述表达癌症相关抗原的细胞以刺激有效量施用，例如施用约 10^3 至约 10^6 个所述表达癌症相关抗原的细胞。

11. 权利要求 1-10 中任一项的方法，所述治疗性 T 细胞是包含外源 T 细胞受体(TCR)的 T 细胞(TCR-T 细胞)或包含嵌合抗原受体(CAR)的 T 细胞

(CAR-T 细胞)。

12. 权利要求 11 的方法，所述外源 TCR 特异性结合癌症相关抗原，所述 CAR 包含针对癌症相关抗原的细胞外抗原结合结构域。

13. 权利要求 11 或 12 的方法，所述 CAR 包括特异性结合癌症相关抗原的细胞外抗原结合结构域如 scFv、CD8α 铰链和跨膜结构域、CD3ζ 信号转导结构域、和 4-1BB 共刺激结构域。

14. 权利要求 1-13 中任一项的方法，所述表达癌症相关抗原的细胞是活细胞，优选地，所述细胞不是癌症细胞。

15. 权利要求 14 的方法，所述癌症相关抗原表达于所述活细胞的表面。

16. 权利要求 1-15 中任一项的方法，所述表达癌症相关抗原的细胞衍生自免疫细胞。

17. 权利要求 1-16 中任一项的方法，所述治疗性 T 细胞和/或所述表达癌症相关抗原的细胞衍生自对象的自体细胞。

18. 权利要求 1-16 中任一项的方法，所述治疗性 T 细胞和/或所述表达癌症相关抗原的细胞衍生自异体细胞，例如源自与所述对象 HLA 相容的供体。

19. 一种在对象中预防癌症进展或复发的方法，其中所述对象已经经历使用特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞的癌症治疗，所述方法包括给所述对象施用表达癌症相关抗原的细胞。

20. 权利要求 19 的方法，其中表达所述癌症相关抗原的细胞施用一或多次，优选一次。

21. 权利要求 19 或 20 的方法，其中在用所述治疗性 T 细胞治疗 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、8 天、9 天、10 天、11 天、12 天、13 天、14 天、15 天、16 天、17 天、18 天、19 天或 20 天后施用表达所述癌症相关抗原的细胞。

22. 权利要求 19-21 任一项所述的方法，其中在所述治疗性 T 细胞使得癌症细胞负荷降低后，施用表达所述癌症相关抗原的细胞。

23. 权利要求 22 的方法，其中在癌症细胞负荷降低至少大约 5%、至少大约 10%、至少大约 20%、至少大约 30%、至少大约 40%、至少大约 50%、至少大约 60%、至少大约 70%、至少大约 80%、至少大约 90%后，施用表达所述癌症相关抗原的细胞。

24. 权利要求 19-23 任一项所述的方法，在癌症通过用所述治疗性 T 细胞治疗而完全缓解之后，施用表达所述癌症相关抗原的细胞。

25. 权利要求 19-24 中任一项的方法，其中所述表达癌症相关抗原的细胞以刺激有效量施用，例如施用约 10^3 至约 10^6 个所述表达癌症相关抗原的细胞。

26. 权利要求 19-25 中任一项的方法，所述治疗性 T 细胞是包含外源 T 细胞受体(TCR)的 T 细胞(TCR-T 细胞)或包含嵌合抗原受体(CAR)的 T 细胞(CAR-T 细胞)。

27. 权利要求 26 的方法，所述外源 TCR 特异性结合癌症相关抗原，所述 CAR 包含针对癌症相关抗原的细胞外抗原结合结构域。

28. 权利要求 26 或 27 的方法，所述 CAR 包括特异性结合癌症相关抗原的细胞外抗原结合结构域如 scFv、CD8α 铰链和跨膜结构域、CD3ζ 信号转导结构域、和 4-1BB 共刺激结构域。

29. 权利要求 19-28 中任一项的方法，所述表达癌症相关抗原的细胞是活细胞，优选地，所述细胞不是癌症细胞。

30. 权利要求 29 的方法，所述癌症相关抗原表达于所述活细胞的表面。

31. 权利要求 19-30 中任一项的方法，所述表达癌症相关抗原的细胞衍生自免疫细胞。

32. 权利要求 19-31 中任一项的方法，所述治疗性 T 细胞和/或所述表达癌症相关抗原的细胞衍生自对象的自体细胞。

33. 权利要求 19-31 中任一项的方法，所述治疗性 T 细胞和/或所述表达癌症相关抗原的细胞衍生自异体细胞，例如源自与所述对象 HLA 相容的供体。

34. 一种用于在对象中治疗癌症的组合，其包含特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞和表达所述癌症相关抗原的细胞。

35. 权利要求 34 的组合，其用于通过权利要求 1-18 中任一项的方法在对象中治疗癌症。

36. 权利要求 34 或 35 的组合，其包含治疗有效量的所述治疗性 T 细胞和刺激有效量的所述表达癌症相关抗原的细胞。

37. 权利要求 34-36 中任一项的组合在制备用于在对象中治疗癌症的药物中的用途，例如，所述药物用于根据权利要求 1-18 中任一项的方法在对

象中治疗癌症。

38. 表达癌症相关抗原的细胞在制备用于在对象中治疗癌症的药物中的用途，任选地，所述药物还包含特异性靶向所述癌症相关抗原的治疗性 T 细胞。

39. 表达癌症相关抗原的细胞在制备用于在对象中预防癌症进展或复发的药物中的用途，其中所述对象已经经历使用特异性靶向所述癌症相关抗原的治疗性 T 细胞的癌症治疗。

40. 一种药盒，其包含特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞和/或表达所述癌症相关抗原的细胞，所述药盒用于通过权利要求 1-18 中任一项的方法在对象中治疗癌症或通过权利要求 19-33 中任一项的方法在对象中预防癌症进展或复发。

41. 前述权利要求中任一项的方法、组合、用途、药物或药盒，其中所述癌症相关抗原选自 CD16、CD64、CD78、CD96、CLL1、CD116、CD117、CD71、CD45、CD71、CD123、CD138、ErbB2(HER2/neu)、癌胚抗原(CEA)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、表皮生长因子受体(EGFR)、EGFR 变体 III (EGFRvIII)、CD19、CD20、CD30、CD40、双唾液酸神经节苷脂 GD2、导管上皮粘蛋白、gp36、TAG-72、鞘糖脂、神经胶质瘤相关的抗原、β-人绒毛膜促性腺激素、α 胎儿球蛋白(AFP)、外源凝集素反应性 AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CA IX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2(AS)、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶(prostase)、前列腺酶特异性抗原(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGA-1a、p53、Prostein、PSMA、存活和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1 (PCTA-1)、MAGE、ELF2M、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、肝配蛋白 B2、CD22、胰岛素生长因子(IGF1)-I、IGF-II、IGFI 受体、间皮素、呈递肿瘤特异性肽表位的主要组织相容性复合体(MHC)分子、5T4、ROR1、Nkp30、NKG2D、肿瘤基质抗原、纤维连接蛋白的额外结构域 A(EDA)和额外结构域 B (EDB)、腱生蛋白-C 的 A1 结构域(TnC A1)、成纤维细胞相关蛋白(fap)、CD3、CD4、CD8、CD24、CD25、CD33、CD34、CD133、CD138、Foxp3、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、GM-CSF、细胞因子受体、内皮因子、BCMA (CD269、TNFRSF17)、TNFRSF17 (UNIPROT Q02223)、SLAMF7(UNIPROT Q9NQ25) 、 GPRC5D(UNIPROT Q9NZD1) 、FKBP11(UNIPROT Q9NYL4)、KAMP3、ITGA8 (UNIPROT P53708)和

FCRL5(UNIPROT Q68SN8)，优选地，所述癌症相关抗原是 CD19。

42. 前述权利要求中任一项的方法、组合、用途、药物或药盒，其中所述癌症选自肺癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、黑色素瘤、肾癌、膀胱癌、乳腺癌、肝癌、淋巴瘤、恶性血液病、头颈癌、胶质瘤、胃癌、鼻咽癌、喉癌、宫颈癌、子宫体瘤、骨肉瘤、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、前列腺癌、子宫癌、肛区癌、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、阴道癌、阴户癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病(包括急性髓细胞样白血病、慢性髓细胞样白血病、急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病)、儿童实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性 CNS 淋巴瘤、肿瘤血管发生、脊柱肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮状癌、鳞状细胞癌、T 细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症，包括石棉诱发的癌症，以及所述癌症的组合，优选地，所述癌症是 B 细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)。