(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111867618 B
(45)授权公告日 2025.03.04

(21)申请号 201880085909.8
(22)申请日 2018.11.08
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111867618 A
(43)申请公布日 2020.10.30
(30)优先权数据
62/583,229 2017.11.08 US
62/588,590 2017.11.20 US
62/618,445 2018.01.17 US
62/737,625 2018.09.27 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.07.08
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/059896 2018.11.08
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/094642 EN 2019.05.16
(73)专利权人 百欧恩泰美国公司
地址 美国马萨诸塞州
专利权人 荷兰癌症研究所基金会- 安东尼·范·列文虎克医院
(72)发明人 马里特·M·范布伦
迪维亚·瑞迪·伦卡拉
约斯特·赫伊伯特·凡丹伯格
杰西卡·科勒 马修·戈德斯坦
艾德·弗里奇 雷纳特·德贝尔
托恩·舒马赫 努尔·巴克
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 武晶晶
(51)Int.Cl.
A61K 39/00(2006.01)
A61K 35/15(2006.01)
(56)对比文件
US 2010330056 A1,2010.12.30
US 7276478 B2,2007.10.02
WO 2006110582 A1,2006.10.19
审查员 陈皓

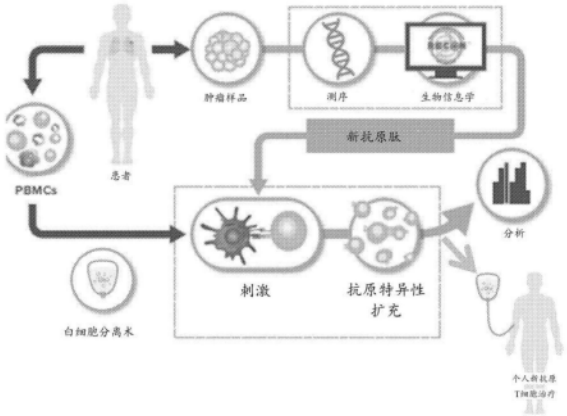
权利要求书3页 说明书107页 附图52页

(54)发明名称

T细胞制备组合物和方法

(57)摘要

通过受控的离体诱导或扩充产生抗原特异性T细胞可以提供高度特异性和有益的T细胞疗法。本公开提供了T细胞制备方法和治疗性T细胞组合物,其可用于治疗患有癌症和其他病况、疾病和病症的受试者,个体抗原特异性T细胞疗法。



CN 111867618 B

1.一种药物组合物,其包含:

(a)来自生物样品的离体扩增的免疫细胞群体,该生物样品包含抗原呈递细胞(APC)和T细胞,其中所述离体扩增的免疫细胞群体包含APC刺激的肿瘤抗原特异性T细胞,该T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR),

其中:

所述群体中表达CD14的免疫细胞的量和表达CD25的免疫细胞的量成比例地小于所述生物样品中表达CD14的免疫细胞的量和表达CD25的免疫细胞的量;以及

(b)药学上可接受的赋形剂;并且

其中:

(i)在所述包含APC刺激的肿瘤抗原特异性T细胞的离体扩增的免疫细胞群体中,至少0.1%的CD8+T细胞为源自幼稚CD8+T细胞的CD8+肿瘤抗原特异性T细胞;并且

(ii)在所述包含APC刺激的肿瘤抗原特异性T细胞的体外扩增的免疫细胞群中,至少0.1%的CD4+T细胞为源自幼稚CD4+T细胞的CD4+肿瘤抗原特异性T细胞。

2.根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述生物样品为来自患有癌症的人类受试者的外周血单核细胞(PBMC),并且其中在所述生物样品中表达CD14的免疫细胞和表达CD25的免疫细胞分别自所述生物样品中耗尽。

3.根据权利要求2所述的药物组合物,其中所述至少一个抗原肽序列以小于500nM的K_D或IC_{50}结合由人类受试者表达的HLA等位基因所编码的蛋白质。

4.根据权利要求2所述的药物组合物,其中所述至少一个抗原肽序列中的每一个由人类受试者的癌细胞的表达基因编码,并且包含在人类受试者的非癌细胞中不存在的突变。

5.根据权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述至少一个抗原肽序列中的一个或多个具有8至50个天然存在的氨基酸的长度。

6.根据权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述至少一个抗原肽序列包含至少2个抗原肽序列。

7.根据权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述药物组合物中至少一种抗原特异性$CD8^+$T细胞的百分比是所述药物组合物中全部$CD8^+$T细胞的至少1%。

8.根据权利要求7所述的药物组合物,其中所述药物组合物中至少一种抗原特异性$CD8^+$T细胞的百分比是所述药物组合物中全部$CD8^+$T细胞的至少5%。

9.根据权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述药物组合物中至少一种抗原特异性$CD8^+$T细胞的数目是至少$1x10^6$个抗原特异性$CD8^+$T细胞。

10.根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述APC刺激的肿瘤抗原特异性T细胞经过与APC、所述至少一个抗原肽序列和FLT3L一起孵育。

11.权利要求1或2的药物组合物在制备用于癌症治疗的药物中的用途。

12.一种制备包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞群体的离体方法,该方法包括

(a)提供来自耗尽表达CD14的细胞和表达CD25的细胞的生物样品的免疫细胞群体,所述免疫细胞群体包含抗原呈递细胞(APC)和T细胞;

(b)将FLT3L和至少一种包含所述至少一种抗原肽序列的肽与来自(a)的所述免疫细胞群体一起孵育第一时间段,从而获得第一刺激的T细胞样品;以及

(c)扩增所述第一刺激的T细胞样品以获得抗原特异性T细胞群体，

其中：

(i)在所述抗原特异性T细胞群体中，至少0.1％的CD8+T细胞为源自幼稚CD8+T细胞的CD8+肿瘤抗原特异性T细胞；并且

(ii)在所述抗原特异性T细胞群体中，至少0.1％的CD4+T细胞为源自幼稚CD4+T细胞的CD4+肿瘤抗原特异性T细胞。

13.根据权利要求12所述的方法，其中(b)中的孵育包括将来自所述生物样品的所述免疫细胞群体与一种或多种APC制品一起孵育一个或多个单独时间段，所述第一时间段是从所述免疫细胞群体孵育起不到28天。

14.根据权利要求13所述的方法，其中所述方法进一步包括将来自所述生物样品的所述免疫细胞群体与3种或更少的APC制品一起孵育3个或更少的单独时间段。

15.根据权利要求14所述的方法，其中所述一种或多种APC制品中的至少两种包含FLT3L刺激的APC。

16.根据权利要求15所述的方法，其中所述一种或多种APC制品中的至少三种包含FLT3L刺激的APC。

17.根据权利要求12或13所述的方法，其中孵育包括将包括APC和T细胞的所述免疫细胞群体孵育超过7天。

18.根据权利要求17所述的方法，其中所述APC包括负载有一种或多种抗原肽的APC，所述抗原肽包含所述至少一个抗原肽序列中的一个或多个。

19.根据权利要求17所述的方法，其中所述APC是自体APC或同种异体APC。

20.根据权利要求19所述的方法，其中所述APC包括树突细胞(DC)。

21.根据权利要求20所述的方法，其中所述DC是$CD141^{+}$DC。

22.根据权利要求12或13所述的方法，其中所述方法进一步包括从所述生物样品中消耗表达CD14的细胞和表达CD25的细胞，从而从耗尽表达CD14的细胞和表达CD25的细胞的生物样品获得所述免疫细胞群体。

23.根据权利要求12或13所述的方法，其中所述方法进一步包括消耗表达CD19的细胞。

24.根据权利要求22所述的方法，其中消耗表达CD14的细胞和表达CD25的细胞包括使CD14或CD25结合剂与所述生物样品的细胞结合。

25.根据权利要求12或13所述的方法，其中所述方法进一步包括生产用于在有需要的受试者中治疗癌症的药物，其中所述药物包括所述至少一种抗原特异性T细胞中的一种或多种。

26.根据权利要求12或13所述的方法，其中孵育进一步包括将一种或多种APC制品与所述第一刺激的T细胞样品一起孵育超过7天。

27.根据权利要求26所述的方法，其中所述方法包括将所述一种或多种APC制品中的至少一种与包含至少一种细胞因子或生长因子的第一介质一起孵育第一时间段。

28.根据权利要求27所述的方法，其中所述方法包括将所述一种或多种APC制品中的至少一种与包含一种或多种细胞因子或生长因子的第二介质一起孵育第二或者第三时间段，从而获得成熟的APC。

29.根据权利要求28所述的方法，其中所述方法进一步包括在所述第三时间段后去除

所述第二介质的所述一种或多种细胞因子或生长因子。

30.根据权利要求26所述的方法,其中所述APC制品中的APC用一种或多种细胞因子或生长因子进行刺激。

31.根据权利要求30所述的方法,其中所述一种或多种细胞因子或生长因子包括GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40、聚I:C或其组合。

32.根据权利要求12或13所述的方法,其中所述抗原是新抗原、肿瘤相关抗原、病毒抗原、次要组织相容性抗原或其组合。

33.根据权利要求12或13所述的方法,其中所述方法离体进行。

34.根据权利要求28所述的方法,其中所述方法包括将来自耗尽表达CD14的细胞和表达CD25的细胞的所述生物样品的免疫细胞群体与FLT3L一起孵育第一时间段。

35.根据权利要求12或13所述的方法,其中所述方法包括将至少一种肽与来自耗尽表达CD14的细胞和表达CD25的细胞的生物样品的免疫细胞群体一起孵育第二时间段,从而获得第一成熟APC肽负载的样品。

36.根据权利要求35所述的方法,其中所述方法包括将所述第一成熟APC肽负载的样品与至少一种T细胞一起孵育第三时间段,从而获得第一刺激的T细胞样品。

37.根据权利要求13所述的方法,其中所述一个或多个单独时间段是至少1小时。

38.根据权利要求37所述的方法,其中所述一个或多个单独时间段是4至40小时。

39.根据权利要求14所述的方法,其中所述免疫细胞群体包含所述APC或所述一种或多种APC制品中的至少一种。

40.根据权利要求12或13所述的方法,其中所述方法包括将FLT3L和至少一种肽与来自耗尽了表达CD14的细胞和表达CD25的细胞的所述生物样品的免疫细胞群体一起孵育,其中所述FLT3L与所述免疫细胞群体一起孵育所述第一时间段,并且其中所述至少一种肽与所述免疫细胞群体一起孵育第一肽刺激时间段,从而获得第一刺激的T细胞样品,其中所述免疫细胞群体包含至少一种T细胞和至少一种APC。

41.根据权利要求40所述的方法,其中所述方法进一步包括将FLT3L和至少一种肽与至少一种APC一起孵育,其中所述FLT3L与所述至少一种APC一起孵育第二时间段,并且其中所述至少一种肽与所述至少一种APC一起孵育第二肽刺激时间段,从而获得第一成熟APC肽负载的样品;以及将所述第一成熟APC肽负载的样品与所述第一刺激的T细胞样品一起孵育,从而获得第二刺激的T细胞样品。

42.根据权利要求41所述的方法,其中所述方法进一步包括将FLT3L和至少一种肽与至少一种APC一起孵育,其中所述FLT3L与所述至少一种APC一起孵育第三时间段,并且其中所述至少一种肽与所述至少一种APC一起孵育第三肽刺激时间段,从而获得第二成熟APC肽负载的样品;以及将第二成熟APC肽负载的样品与所述第二刺激的T细胞样品一起孵育,从而获得第三刺激的T细胞样品。

43.根据权利要求42所述的方法,其中所述方法包括用所述第一或第二或第三刺激的T细胞样品中的至少一种T细胞制备药物。

T细胞制备组合物和方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2017年11月8日提交的第62/583,229号美国临时申请、2017年11月20日提交的第62/588,590号美国临时申请、2018年1月17日提交的第62/618,445号美国临时申请和2018年9月27日提交的第62/737,625号美国临时申请的权益,这些申请通过引用整体并入本文。

背景技术

[0003] 肿瘤疫苗通常由肿瘤抗原和免疫刺激分子(例如佐剂、细胞因子或TLR配体)组成,它们共同作用以诱导识别并裂解肿瘤细胞的抗原特异性细胞毒性T细胞(CTL)。这类疫苗含有共有的组织限制性肿瘤抗原或完整肿瘤细胞制品形式的共有抗原和患者特定抗原的混合物。共有的组织限制性肿瘤抗原是在许多个体的肿瘤中具有选择性表达的理想的免疫原性蛋白质,并且通常作为合成肽或重组蛋白递送给患者。相比之下,完整肿瘤细胞制品作为自体辐照的细胞、细胞裂解物、细胞融合物、热休克蛋白制品或总mRNA递送给患者。由于完整肿瘤细胞是从自体患者中分离的,因此该细胞可以包括患者特定肿瘤抗原以及共有的肿瘤抗原。最后,还有第三类肿瘤抗原——很少在疫苗中使用的新抗原,其由具有导致氨基酸序列改变的肿瘤特异性突变(可以是患者特定的或共有的)的蛋白质组成。这类突变蛋白质:(a)作为突变对肿瘤细胞是独特的,并且其相应的蛋白质仅存在于肿瘤中;(b)避免中枢耐受,因此更有可能具有免疫原性;(c)提供出色靶标以供免疫识别,包括被体液免疫和细胞免疫识别。

[0004] 过继免疫疗法或过继细胞疗法(ACT)是将基因修饰的T淋巴细胞转移至受试者以治疗疾病。过继免疫疗法尚未意识到其治疗众多疾病的潜力,包括癌症、感染性疾病、自身免疫性疾病、炎性疾病和免疫缺陷。然而,大多数(如果不是全部)过继免疫疗法都需要T细胞活化和扩充步骤来产生临床有效的治疗剂量的T细胞。由于活细胞培养的固有复杂性以及患者之间的差异,目前用于产生治疗剂量的T细胞(包括工程化T细胞)的技术仍然受到繁琐的T细胞制备工艺的限制。现有的T细胞制备工艺不容易放大、不可重复、不可靠或者低效,并且常常产生劣质的T细胞产物,其可能易于耗竭并丧失效应免疫细胞功能。迄今为止,工程化T细胞过继免疫疗法仅获得了有限的成功,并且常规地表现出可变的临床活性。因此,这类疗法不适合广泛的临床使用。因此,仍然需要开发用于扩充和诱导具有有利表型和功能的抗原特异性T细胞的组合物和方法。

发明内容

[0005] 在一些方面,本文提供了一种药物组合物,其包含:来自生物样品的免疫细胞群体以及药学上可接受的赋形剂,该生物样品包含至少一种抗原特异性T细胞,该抗原特异性T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR);其中所述群体中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的量与所述生物样品中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的量成比例地不同。在一些方面,本文提供了一种药物组合物,其包含:来自生物样品的免疫细胞群体

以及药学上可接受的赋形剂,该生物样品包含至少一种抗原特异性T细胞,该抗原特异性T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR);其中所述群体中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的量不同于所述生物样品中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的量。在一些方面,本文提供了一种药物组合物,其包含:来自生物样品的免疫细胞群体以及药学上可接受的赋形剂,该生物样品包含至少一种抗原特异性T细胞,该抗原特异性T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR);其中所述群体中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的百分比不同于所述生物样品中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的百分比。在一些方面,本文提供了一种药物组合物,其包含:来自生物样品的免疫细胞群体以及药学上可接受的赋形剂,该生物样品包含至少一种抗原特异性T细胞,该抗原特异性T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR);其中所述群体中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的浓度不同于所述生物样品中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的浓度。

[0006] 在一些方面,本文提供了一种组合物,其包含来自生物样品的免疫细胞群体,其中所述群体中表达CD14和CD25的免疫细胞的量成比例地小于所述生物样品中表达CD14和CD25的免疫细胞的量。在一些方面,本文提供了一种组合物,其包含来自生物样品的免疫细胞群体,其中所述群体中表达CD14和CD25的免疫细胞的量小于所述生物样品中表达CD14和CD25的免疫细胞的量。在一些方面,本文提供了一种组合物,其包含来自生物样品的免疫细胞群体,其中所述群体中表达CD14和CD25的免疫细胞的百分比小于所述生物样品中表达CD14和CD25的免疫细胞的百分比。在一些方面,本文提供了一种组合物,其包含来自生物样品的免疫细胞群体,其中所述群体中表达CD14和CD25的免疫细胞的浓度小于所述生物样品中表达CD14和CD25的免疫细胞的浓度。

[0007] 在一些方面,本文提供了一种包含免疫细胞群体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物,所述免疫细胞群体包含来自生物样品的T细胞,其中所述T细胞包含至少一种抗原特异性T细胞,该抗原特异性T细胞是抗原呈递细胞(APC)刺激的T细胞,并且包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR),其中所述APC是FLT3L刺激的APC。

[0008] 在一些方面,本文提供了一种包含免疫细胞群体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物,该免疫细胞群体包含来自生物样品的T细胞,其中所述T细胞包含至少一种抗原特异性T细胞,该抗原特异性T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR);其中所述至少一种抗原特异性T细胞是总T细胞、总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞或总免疫细胞的至少约0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%;并且其中所述生物样品包含一种或多种抗原特异性T细胞,其中所述生物样品中的一种或多种抗原特异性T细胞是所述生物样品中总T细胞、总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞或总免疫细胞的总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至多约0.00001%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%或0.05%。在一些方面,本文提供了一种包含免疫细胞群体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物,该免疫细胞群体包含从生物样品扩充或诱导的T细胞,其中从生物样品扩充或诱导的T细胞包含至少一种抗原特异性T细胞,所述抗原特异性T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR);其中所述至少一种抗原特异性T细胞的量、浓度或百分比是所述生物样品中抗原特异性T细胞或总T细胞的量、浓度或百分比的至少约1.1、1.2、

1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.6、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900或1000倍。在一些方面，本文提供了一种包含免疫细胞群体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物，该免疫细胞群体包含来自生物样品的T细胞，其中所述T细胞包含至少一种抗原特异性T细胞，该抗原特异性T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)；其中所述至少一种抗原特异性T细胞包含扩充或诱导的抗原特异性T细胞，其从所述生物样品中扩充或诱导至少约1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.6、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900或1000倍。在一些方面，本文提供了一种包含免疫细胞群体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物，该免疫细胞群体包含来自生物样品的$CD4^+$T细胞，其中所述$CD4^+$T细胞包含至少一种抗原特异性$CD4^+$T细胞，所述抗原特异性$CD4^+$T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)；其中所述至少一种抗原特异性$CD4^+$T细胞是总T细胞、总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞或总免疫细胞的的至少约0.1％、0.5％、1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％、16％、17％、18％、19％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％或95％；并且其中所述生物样品包含一种或多种抗原特异性$CD4^+$T细胞，其中所述生物样品中的所述一种或多种抗原特异性$CD4^+$T细胞是所述生物样品中总T细胞、总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞或总免疫细胞的总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至多约0.00001％、0.00005％、0.0001％、0.0005％、0.001％、0.005％、0.01％或0.05％。在一些实施方案中，药物组合物包含免疫细胞群体和药学上可接受的赋形剂，该免疫细胞群体包含来自生物样品的$CD4^+$T细胞，其中所述$CD4^+$T细胞包含至少一种抗原特异性$CD4^+$T细胞，所述抗原特异性$CD4^+$T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)；其中所述至少一种抗原特异性$CD4^+$T细胞是总$CD8^+$T细胞的至少约0.1％、0.5％、1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％、16％、17％、18％、19％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％或95％；并且其中所述生物样品包含一种或多种抗原特异性$CD4^+$T细胞，其中所述生物样品中的所述一种或多种抗原特异性$CD4^+$T细胞是所述生物样品中总$CD4^+$T细胞的至多约0.00001％、0.00005％、0.0001％、0.0005％、0.001％、0.005％、0.01％或0.05％。在一些方面，本文提供了一种包含免疫细胞群体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物，该免疫细胞群体包含从生物样品扩充或诱导的$CD4^+$T细胞，其中所述从生物样品扩充或诱导的$CD4^+$T细胞包含至少一种抗原特异性$CD4^+$T细胞，所述抗原特异性$CD4^+$T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)；其中所述至少一种抗原特异性T细胞的量、浓度或百分比是所述生物样品中抗原特异性$CD4^+$T细胞、总$CD4^+$T细胞或总T细胞的量、浓度或百分比的至少约1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.6、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900或1000倍。在一些方面，本文提供了一种包含免疫细胞群体和药学上

可接受的赋形剂的药物组合物,该免疫细胞群体包含来自生物样品的$CD4^+$T细胞,其中所述$CD4^+$T细胞包含至少一种抗原特异性$CD4^+$T细胞,所述抗原特异性$CD4^+$T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR);其中所述至少一种抗原特异性$CD4^+$T细胞包含扩充或诱导的抗原特异性$CD4^+$T细胞,其从所述生物样品中扩充或诱导至少约1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.6、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900或1000倍。在一些方面,本文提供了一种包含免疫细胞群体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物,该免疫细胞群体包含来自耗尽表达CD25的细胞或表达CD25和CD14的细胞的生物样品的$CD4^+$T细胞,其中所述$CD4^+$T细胞包含至少一种抗原特异性$CD4^+$T细胞,所述抗原特异性$CD4^+$T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR);其中所述至少一种抗原特异性$CD4^+$T细胞包含扩充或诱导的抗原特异性$CD4^+$T细胞,其从所述生物样品中扩充或诱导至少约1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.6、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475或500倍。在一些方面,本文提供了一种包含免疫细胞群体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物,该免疫细胞群体包含来自生物样品的$CD8^+$T细胞,其中所述$CD8^+$T细胞包含至少一种抗原特异性$CD8^+$T细胞,所述抗原特异性$CD8^+$T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR);其中所述至少一种抗原特异性$CD8^+$T细胞是总T细胞、总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞或总免疫细胞的至少约0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%;并且其中所述生物样品包含一种或多种抗原特异性$CD8^+$T细胞,其中所述生物样品中的所述一种或多种抗原特异性$CD8^+$T细胞是所述生物样品中总T细胞、总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞或总免疫细胞的总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至多约0.00001%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%或0.05%。在一些实施方案中,药物组合物包含免疫细胞群体和药学上可接受的赋形剂,该免疫细胞群体包含来自生物样品的$CD8^+$T细胞,其中所述$CD8^+$T细胞包含至少一种抗原特异性$CD8^+$T细胞,所述抗原特异性$CD8^+$T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR);其中所述至少一种抗原特异性$CD8^+$T细胞是总$CD8^+$T细胞的至少约0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%;并且其中所述生物样品包含一种或多种抗原特异性$CD4^+$T细胞,其中所述生物样品中的所述一种或多种抗原特异性$CD8^+$T细胞是所述生物样品中的总$CD8^+$T细胞的至多约0.00001%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%或0.05%。在一些方面,本文提供了一种包含免疫细胞群体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物,该免疫细胞群体包含从生物样品扩充或诱导的$CD8^+$T细胞,其中所述从生物样品扩充或诱导的$CD8^+$T细胞包含至少一种抗原特异性$CD8^+$T细胞,所述抗原特异性$CD8^+$T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR);其中所述至少一种抗原特异性T细胞的量、浓度或百分比是所述生物样品中抗原特

异性CD8$^+$T细胞、总CD8$^+$T细胞或总T细胞的量、浓度或百分比的至少约1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.6、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900或1000倍。在一些方面,本文提供了一种包含免疫细胞群体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物,该免疫细胞群体包含来自生物样品的CD8$^+$T细胞,其中所述CD8$^+$T细胞包含至少一种抗原特异性CD8$^+$T细胞,所述抗原特异性CD8$^+$T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR);其中所述至少一种抗原特异性CD8$^+$T细胞包含扩充或诱导的抗原特异性CD4$^+$T细胞,其从所述生物样品扩充或诱导至少约1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.6、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900或1000倍。在一些方面,本文提供了一种包含免疫细胞群体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物,该免疫细胞群体包含来自生物样品的CD8$^+$T细胞,其中所述CD8$^+$T细胞包含至少一种抗原特异性CD8$^+$T细胞,所述抗原特异性CD8$^+$T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR);其中所述至少一种抗原特异性CD8$^+$T细胞包含扩充或诱导的抗原特异性CD8$^+$T细胞,其从所述生物样品扩充或诱导至少约1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.6、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900倍。

[0009] 在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞包含至少一种APC刺激的T细胞。在一些实施方案中,所述群体中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的量成比例地小于所述生物样品中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的量。在一些实施方案中,所述群体中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的量成比例地大于所述生物样品中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的量。在一些实施方案中,所述群体中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的百分比小于所述生物样品中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的百分比。在一些实施方案中,所述群体中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的百分比大于所述生物样品中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的百分比。在一些实施方案中,所述群体中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的浓度小于所述生物样品中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的浓度。在一些实施方案中,所述群体中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的浓度大于所述生物样品中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的浓度。

[0010] 在一些实施方案中,所述生物样品来自受试者。在一些实施方案中,所述受试者是人。在一些实施方案中,所述受试者患有疾病或病症。在一些实施方案中,该疾病或病症为癌症。在一些实施方案中,该癌症选自卵巢癌、肺癌和黑素瘤。

[0011] 在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞包含至少一种CD4$^+$T细胞。在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞包含至少一种CD8$^+$T细胞。在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞包含至少一种CD4富集的T细胞。在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞包含至少一种CD8富集的T细胞。在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞包含记忆T细胞。在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细

胞包含幼稚T细胞。在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞包含记忆$CD4^+$T细胞。在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞包含扩充的记忆$CD4^+$T细胞。在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞包含幼稚$CD4^+$T细胞。在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞包含诱导的幼稚$CD4^+$T细胞。在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞包含记忆$CD8^+$T细胞。在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞包含扩充的记忆$CD8^+$T细胞。在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞包含幼稚$CD8^+$T细胞。在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞包含诱导的幼稚$CD8^+$T细胞。

[0012] 在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞在包含IL-7、IL-15、吲哚胺2,3-双加氧酶-1(IDO)抑制剂、抗PD-1抗体、IL-12或其组合的介质中进行刺激。在一些实施方案中,该IDO抑制剂是epacadostat、navoximod、1-甲基色氨酸或其组合。

[0013] 在一些实施方案中,所述至少一个抗原肽序列包含选自以下的突变:(A)点突变,(B)剪接位点突变,(C)移码突变,(D)通读突变,(E)基因融合突变,及其组合。在一些实施方案中,所述至少一个抗原肽序列以比相应的野生型肽更大的亲和力结合受试者的HLA蛋白。在一些实施方案中,所述至少一个抗原肽序列以小于500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nM或10nM的K_D或IC_{50}结合受试者的HLA蛋白。在一些实施方案中,所述至少一个抗原肽序列中的每一个结合由受试者表达的HLA等位基因所编码的蛋白质。在一些实施方案中,所述TCR以小于500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nM或10nM的K_D或IC_{50}结合肽-HLA复合物。在一些实施方案中,所述至少一个抗原肽序列中的每一个包含在受试者的非癌细胞中不存在的突变。在一些实施方案中,所述至少一个抗原肽序列中的每一个由受试者的癌细胞的基因或表达基因编码。

[0014] 在一些实施方案中,所述至少一个抗原肽序列中的一个或多个的长度为至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1,000、1,500、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、7,500或10,000个天然存在的氨基酸。在一些实施方案中,所述至少一个抗原肽序列中的一个或多个与I类HLA等位基因编码的蛋白质结合,并且其长度为8-12个天然存在的氨基酸。在一些实施方案中,所述至少一个抗原肽序列中的一个或多个与II类HLA等位基因编码的蛋白质结合,并且其长度为16-25个天然存在的氨基酸。

[0015] 在一些实施方案中,所述至少一个抗原肽序列包含多个抗原肽序列。在一些实施方案中,所述多个抗原肽序列包含至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20,21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450或500个抗原肽序列。在一些实施方案中,所述抗原是新抗原、肿瘤相关抗原、过表达的抗原、病毒抗原、次要组织相容性抗原或其组合。

[0016] 在一些实施方案中,所述APC是一种或多种APC制品。在一些实施方案中,所述APC包括负载有一种或多种抗原肽的APC,所述一种或多种抗原肽包含所述至少一个抗原肽序列中的一个或多个。在一些实施方案中,所述APC是自体APC、同种异体APC或人工APC。在一些实施方案中,所述APC包括树突细胞(DC)。在一些实施方案中,所述APC来源于$CD14^+$单核细胞。在一些实施方案中,所述APC是CD14富集的APC。在一些实施方案中,所述APC是CD141富集的APC。在一些实施方案中,所述$CD14^+$单核细胞从包含PBMC的来自受试者的生物样品中富集。在一些实施方案中,所述$CD14^+$单核细胞用一种或多种细胞因子或生长因子进行刺

激。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞因子或生长因子包括GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40、聚I:C或其组合。

[0017] 在一些实施方案中,所述$CD14^+$单核细胞来自包含PBMC的第二生物样品。在一些实施方案中,第二生物样品来自同一受试者。

[0018] 在一些实施方案中,所述生物样品包含外周血单核细胞(PBMC)。

[0019] 在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞包含多个抗原特异性T细胞。在一些实施方案中,所述组合物中所述至少一种抗原特异性T细胞的百分比是总T细胞或总免疫细胞的至少约0.00001%、0.00002%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在一些实施方案中,所述组合物中至少一种抗原特异性$CD8^+$T细胞的百分比是总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至少约0.00001%、0.00002%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在一些实施方案中,所述组合物中至少一种抗原特异性$CD4^+$T细胞的百分比是总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至少约0.00001%、0.00002%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在一些实施方案中,所述生物样品中所述至少一种抗原特异性T细胞的百分比是总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至多约0.00001%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%或0.5%。在一些实施方案中,所述生物样品中所述至少一种抗原特异性$CD8^+$T细胞的百分比是总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至多约0.00001%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%或0.5%。在一些实施方案中,所述生物样品中所述至少一种抗原特异性$CD4^+$T细胞的百分比是总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至多约0.00001%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%或0.5%。

[0020] 在一些实施方案中,所述药物组合物包含:来自生物样品的免疫细胞群体以及药学上可接受的赋形剂,该生物样品包含至少一种抗原特异性T细胞,所述抗原特异性T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR);其中所述群体中表达CD19和/或CD16的免疫细胞的量不同于所述生物样品中表达CD19和/或CD16的免疫细胞的量。在一些实施方案中,所述药物组合物包含:来自生物样品的免疫细胞群体和药学上可接受的赋形剂,该生物样品包含至少一种抗原特异性T细胞,所述抗原特异性T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR);其中所述群体中表达CD19和/或CD16的免疫细胞的量小于所述生物样品中表达CD19和/或CD16的免疫细胞的量。

[0021] 在一些方面,本文提供了一种治疗方法,其包括向患有疾病或病症的受试者施用本文所述的组合物。

[0022] 在一些方面,本文提供了使用本文所述的组合物来制备用于治疗的药物的方法。

[0023] 在一个方面,本文提供了一种制备至少一种包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法,该方法包括将APC与来自耗尽表达CD25或CD14和CD25的细胞的生物样品的免疫细胞群体一起孵育,其中所述至少一种抗原特异性T细胞包含一定量的扩充或诱导的抗原特异性T细胞,该量是使用包括以下步骤的方法扩充或诱导的抗原特异性T细胞的量的至少约1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.6、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475或500倍:将APC与来自耗尽表达CD14的细胞的生物样品的免疫细胞群体一起孵育。在一个方面,本文提供了一种制备至少一种包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性$CD4^+$T细胞的方法,该方法包括将APC与来自耗尽表达CD25或CD14和CD25的细胞的生物样品的免疫细胞群体一起孵育,其中所述至少一种抗原特异性$CD4^+$T细胞包含一定量的扩充或诱导的抗原特异性$CD4^+$T细胞,该量是使用包括以下步骤的方法扩充或诱导的抗原特异性$CD4^+$T细胞的量的至少约1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.6、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475或500倍:将APC与来自耗尽表达CD14的细胞的生物样品的免疫细胞群体一起孵育。在一个方面,本文提供了一种制备至少一种包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性$CD8^+$T细胞的方法,该方法包括将APC与来自耗尽表达CD25或CD14和CD25的细胞的生物样品的免疫细胞群体一起孵育,其中所述至少一种抗原特异性$CD8^+$T细胞包含一定量的扩充或诱导的抗原特异性$CD8^+$T细胞,该量是使用包括以下步骤的方法扩充或诱导的抗原特异性$CD8^+$T细胞的量的至少约1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.6、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475或500倍:将APC与来自耗尽表达CD14的细胞的生物样品的免疫细胞群体一起孵育。

[0024] 在一些实施方案中,所述生物样品被进一步消耗表达CD19的细胞。在一些实施方案中,所述生物样品被进一步消耗表达CD19的细胞。在一些实施方案中,所述APC是FLT3L刺激的APC。在一些实施方案中,孵育免疫细胞群体在含有IL-7、IL-15或其组合的介质中进行。在一些实施方案中,所述介质进一步包含吲哚胺2,3-双加氧酶-1(IDO)抑制剂、抗PD-1抗体、IL-12或其组合。在一些实施方案中,该IDO抑制剂是epacadostat、navoximod、1-甲基色氨酸或其组合。

[0025] 在一方面,本文提供了一种制备包含至少一种抗原特异性T细胞的药物组合物的方法,该抗原特异性T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR),该方法包括:将FMS样酪氨酸激酶3受体配体(FLT3L)与来自生物样品的免疫细胞群体一起孵育第一时间段;之后将所述生物样品中的至少一种T细胞与APC一起孵育,其中所述至少一种抗原特异性T细胞包含一定量的扩充或诱导的抗原特异性T细胞,该量是使用以下方法扩充或诱导的抗原特异性T细胞的量的至少约1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.6、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、

25、30、35、40、45、50、55、60、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475或500倍:该方法不包括将FMS样酪氨酸激酶3受体配体(FLT3L)与来自生物样品的免疫细胞群体孵育第一时间段;并且其包括之后将所述生物样品中的至少一种T细胞与APC一起孵育。在一个方面,本文提供了一种制备包含至少一种抗原特异性$CD4^+$T细胞的药物组合物的方法,该抗原特异性$CD4^+$T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR),该方法包括:将FMS样酪氨酸激酶3受体配体(FLT3L)与来自生物样品的免疫细胞群体一起孵育第一时间段;之后将所述生物样品中的至少一种$CD4^+$T细胞与APC一起孵育,其中所述至少一种抗原特异性$CD4^+$T细胞包含一定量的经扩充或诱导的抗原特异性$CD4^+$T细胞,该量是使用以下方法扩充或诱导的抗原特异性$CD4^+$T细胞的量的至少约1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.6、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475或500倍:该方法不包括将FMS样酪氨酸激酶3受体配体(FLT3L)与来自生物样品的免疫细胞群体孵育第一时间段;并且其包括之后将所述生物样品中的至少一种$CD4^+$T细胞与APC一起孵育。在一个方面,本文提供了一种制备包含至少一种抗原特异性$CD8^+$T细胞的药物组合物的方法,该抗原特异性$CD8^+$T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR),该方法包括:将FMS样酪氨酸激酶3受体配体(FLT3L)与来自生物样品的免疫细胞群体一起孵育第一时间段;之后将所述生物样品中的至少一种$CD8^+$T细胞与APC一起孵育,其中所述至少一种抗原特异性$CD8^+$T细胞包含一定量的经扩充或诱导的抗原特异性$CD8^+$T细胞,该量是使用以下方法扩充或诱导的抗原特异性$CD8^+$T细胞的量的至少约1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.6、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475或500倍:该方法不包括将FMS样酪氨酸激酶3受体配体(FLT3L)与来自生物样品的免疫细胞群体孵育第一时间段;并且其包括之后将所述生物样品中的至少一种$CD8^+$T细胞与APC一起孵育。

[0026] 在一个方面,本文提供了一种制备至少一种包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法,该方法包括将APC与来自耗尽表达CD14和/或CD25的细胞的生物样品的免疫细胞群体一起孵育。

[0027] 在一个方面,本文提供了一种制备至少一种包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法,该方法包括将FMS样酪氨酸激酶3受体配体(FLT3L)刺激的APC与来自生物样品的免疫细胞群体一起孵育。

[0028] 在一个方面,本文提供了一种制备包含至少一种抗原特异性T细胞的药物组合物的方法,所述抗原特异性T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR),所述方法包括:将FMS样酪氨酸激酶3受体配体(FLT3L)与来自生物样品的免疫细胞群体一起孵育第一时间段;之后将所述生物样品的至少一种T细胞与APC一起孵育。

[0029] 在一个方面,本文提供了一种制备至少一种包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法,该方法包括将来自生物样品的免疫细胞群体与一种或多种APC制品一起孵育一个或多个单独时间段,所述时间段是从所述免疫细胞群体与所述一种或多种APC制品中的第一APC制品孵育起不到28天,其中至少一种抗原特

异性记忆T细胞被扩充,或者至少一种抗原特异性幼稚T细胞被诱导。

[0030] 在一个方面,本文提供了一种制备至少一种包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法,该方法包括将来自生物样品的免疫细胞群体与3种或更少的APC制品一起孵育3个或更少的单独时间段,其中至少一种抗原特异性记忆T细胞被扩充,或者至少一种抗原特异性幼稚T细胞被诱导。

[0031] 在一些实施方案中,所述免疫细胞群体来自耗尽了表达CD14和/或CD25的细胞的生物样品。

[0032] 在一些实施方案中,所述APC是FLT3L刺激的APC。在一些实施方案中,至少一种所述APC制品包含FLT3L刺激的APC。在一些实施方案中,至少两种所述APC制品包含FLT3L刺激的APC。在一些实施方案中,至少三种所述APC制品包含FLT3L刺激的APC。在一些实施方案中,每种所述APC制品包含FLT3L刺激的APC。

[0033] 在一些实施方案中,所述APC包含一种或多种APC制品。在一些实施方案中,所述APC制品包含3种或更少的APC制品。在一些实施方案中,所述APC制品与所述免疫细胞在一个或多个单独时间段内顺序地孵育。在一些实施方案中,所述生物样品来自受试者。在一些实施方案中,所述受试者是人。在一些实施方案中,所述受试者患有疾病或病症。在一些实施方案中,该疾病或病症为癌症。在一些实施方案中,该癌症选自卵巢癌、肺癌和黑素瘤。

[0034] 在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞包含至少一种$CD4^+$T细胞。在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞包含至少一种$CD8^+$T细胞。在一些实施方案中,至少一种抗原特异性T细胞包含至少一种CD4富集的T细胞。在一些实施方案中,至少一种抗原特异性T细胞包含至少一种CD8富集的T细胞。在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞包含至少一种记忆T细胞。在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞包含至少一种幼稚T细胞。在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞包含至少一种记忆$CD4^+$T细胞。在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞包含至少一种幼稚$CD4^+$T细胞。在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞包含至少一种记忆$CD8^+$T细胞。在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞包含至少一种幼稚$CD8^+$T细胞。

[0035] 在一些实施方案中,所述至少一个抗原肽序列包含选自以下的突变:(A)点突变,(B)剪接位点突变,(C)移码突变,(D)通读突变,(E)基因融合突变,及其组合。在一些实施方案中,所述至少一个抗原肽序列包含点突变,并且以比相应的野生型肽更大的亲和力结合受试者的HLA蛋白。在一些实施方案中,所述至少一个抗原肽序列以小于500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nM或10nM的K_D或IC_{50}结合受试者的HLA蛋白。在一些实施方案中,所述至少一个抗原肽序列中的每一个结合由受试者表达的HLA等位基因所编码的蛋白质。在一些实施方案中,所述TCR以小于500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nM或10nM的K_D或IC_{50}结合肽-HLA复合体。在一些实施方案中,所述至少一个抗原肽序列中的每一个包含在受试者的非癌细胞中不存在的突变。在一些实施方案中,所述至少一个抗原肽序列中的每一个由受试者的癌细胞的基因或表达基因编码。在一些实施方案中,所述至少一个抗原肽序列中的一个或多个的长度为至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1,000、1,500、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、7,500或10,000个天然存在的氨基酸。在一些实施方案中,所述至少一个抗原肽序列中的一个或多个与I类HLA等位基因编

码的蛋白质结合,并且其长度为8-12个天然存在的氨基酸。在一些实施方案中,所述至少一个抗原肽序列中的一个或多个与II类HLA等位基因编码的蛋白质结合,并且其长度为16-25个天然存在的氨基酸。在一些实施方案中,所述至少一个抗原肽序列包含多个抗原肽序列。在一些实施方案中,所述多个抗原肽序列包含至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20,21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450或500个抗原肽序列。在一些实施方案中,所述抗原是新抗原、肿瘤相关抗原、病毒抗原、次要组织相容性抗原或其组合。

[0036] 在一些实施方案中,方法包括从生物样品中消耗表达CD14和/或CD25的细胞。在一些实施方案中,消耗表达CD14和/或CD25的细胞包括将CD14和/或CD25结合剂与APC或所述APC制品的APC结合。在一些实施方案中,所述CD14和/或CD25结合剂是生物素化的。在一些实施方案中,消耗表达CD14和/或CD25的细胞进一步包括将固体支持物上的抗生物素试剂与所述CD14和/或CD25结合剂结合。在一些实施方案中,所述CD14和/或CD25结合剂附着于固体支持物。

[0037] 在一些实施方案中,所述APC或APC制品的APC包含载有一种或多种抗原肽的APC,所述抗原肽包含所述至少一个抗原肽序列中的一个或多个。在一些实施方案中,所述APC或APC制品的APC是自体APC或同种异体APC。在一些实施方案中,所述APC或APC制品的APC包括树突细胞(DC)。在一些实施方案中,所述APC或APC制品的APC来源于$CD14^+$单核细胞。在一些实施方案中,所述APC制品或APC制品的APC从生物样品中富集。在一些实施方案中,所述APC或APC制品的APC用一种或多种细胞因子或生长因子进行刺激。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞因子或生长因子包括GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40、聚I:C或其组合。

[0038] 在一些实施方案中,所述APC或APC制品的APC来自第二生物样品。在一些实施方案中,第二生物样品来自同一受试者。在一些实施方案中,所述生物样品包含外周血单核细胞(PBMC)。

[0039] 在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞包含多个抗原特异性T细胞。在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞的百分比是总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至少约0.00001%、0.00002%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在一些实施方案中,至少一种抗原特异性$CD8^+$T细胞的百分比是总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至少约0.00001%、0.00002%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在一些实施方案中,至少一种抗原特异性$CD4^+$T细胞的百分比是总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至少约0.00001%、0.00002%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、

65％、70％、75％、80％、85％、90％或95％。在一些实施方案中,生物样品中所述至少一种抗原特异性T细胞的百分比是总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至多约0.00001％、0.00005％、0.0001％、0.0005％、0.001％、0.005％、0.01％、0.05％、0.1％或0.5％。在一些实施方案中,生物样品中所述至少一种抗原特异性$CD8^+$T细胞的百分比是总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至多约0.00001％、0.00005％、0.0001％、0.0005％、0.001％、0.005％、0.01％、0.05％、0.1％或0.5％。在一些实施方案中,生物样品中所述至少一种抗原特异性$CD4^+$T细胞的百分比是总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至多约0.00001％、0.00005％、0.0001％、0.0005％、0.001％、0.005％、0.01％、0.05％、0.1％或0.5％。

[0040] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括将所述至少一种抗原特异性T细胞中的一种或多种施用于受试者。

[0041] 在一些实施方案中,所述单独时间段的总时间段少于28天。在一些实施方案中,孵育包括将所述APC制品的第一APC制品与所述T细胞孵育超过7天。在一些实施方案中,方法包括将一种或多种APC制品中的APC与包含至少一种细胞因子或生长因子的第一介质一起孵育第一时间段。在一些实施方案中,所述至少一种细胞因子或生长因子包括GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40、聚I:C或其任意组合。在一些实施方案中,方法包括将一种或多种APC制品与至少一种肽一起孵育第二时间段。在一些实施方案中,方法包括将一种或多种APC制品中的APC与包含一种或多种细胞因子或生长因子的第二介质一起孵育第三时间段,从而获得成熟APC。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞因子或生长因子包括GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40、聚I:C或其组合。在一些实施方案中,所述方法进一步包括在所述第三时间段之后且开始所述第四时间段之前去除所述第二介质的所述一种或多种细胞因子或生长因子。

[0042] 在一些实施方案中,所述方法离体进行。

[0043] 在一些实施方案中,所述生物样品从受试者新鲜获得或是冷冻的样品。

[0044] 在一些实施方案中,所述方法包括从受试者获得生物样品,该生物样品包含至少一种APC和至少一种PBMC。

[0045] 在一些实施方案中,所述方法包括从生物样品中消耗表达CD14和/或CD25的细胞,从而获得CD14和/或CD25细胞耗尽的样品。

[0046] 在一些实施方案中,所述方法包括将CD14和/或CD25细胞耗尽的样品与FLT3L一起孵育第一时间段。

[0047] 在一些实施方案中,所述方法包括将至少一种肽与CD14和/或CD25细胞耗尽的样品一起孵育第二时间段,从而获得第一成熟APC肽负载的样品。

[0048] 在一些实施方案中,所述方法包括将所述第一成熟APC肽负载的样品与至少一种PBMC一起孵育第三时间段,从而获得第一刺激的PBMC样品。

[0049] 在一些实施方案中,所述方法包括将第一刺激的PBMC样品的PBMC与成熟APC样品的FLT3L刺激的APC一起孵育第四时间段,从而获得第二刺激的PBMC样品。

[0050] 在一些实施方案中,所述方法包括将第一刺激的PBMC样品的PBMC与FLT3L和成熟APC样品的第二APC肽负载的样品一起孵育第四时间段,从而获得第二刺激的PBMC样品。

[0051] 在一些实施方案中,所述方法包括将第一刺激的PBMC样品的PBMC与FLT3L和成熟APC样品的FLT3L刺激的APC一起孵育第四时间段,从而获得第二刺激的PBMC样品。

[0052] 在一些实施方案中,所述方法包括将第二刺激的PBMC样品的PBMC与成熟APC样品的FLT3L刺激的APC一起孵育第五时间段,从而获得第三刺激的PBMC样品。

[0053] 在一些实施方案中,所述方法包括将第二刺激的PBMC样品的PBMC与FLT3L和成熟APC样品的第三种APC肽负载的样品一起孵育第五时间段,从而获得第三刺激的PBMC样品。

[0054] 在一些实施方案中,所述方法包括将第二刺激的PBMC样品的PBMC与FLT3L和成熟APC样品的FLT3L刺激的APC一起孵育第五时间段,从而获得第三刺激的PBMC样品。

[0055] 在一些实施方案中,所述方法包括向有需要的受试者施用第一刺激的PBMC样品的至少一种T细胞。在一些实施方案中,所述方法包括向有需要的受试者施用第二刺激的PBMC样品的至少一种T细胞。在一些实施方案中,所述方法包括向有需要的受试者施用第三刺激的PBMC样品的至少一种T细胞。

[0056] 在一些实施方案中,第一刺激的PBMC样品的PBMC的孵育在IL-7、IL-15或其组合的存在下进行。在一些实施方案中,第一刺激的PBMC样品的PBMC的孵育在吲哚胺2,3-双加氧酶-1(IDO)抑制剂、抗PD-1抗体、IL-12或其组合的存在下进行。在一些实施方案中,第二刺激的PBMC样品的PBMC的孵育在IL-7、IL-15或其组合的存在下进行。在一些实施方案中,第二刺激的PBMC样品的PBMC的孵育在吲哚胺2,3-双加氧酶-1(IDO)抑制剂、抗PD-1抗体、IL-12或其组合的存在下进行。

[0057] 在一个方面,本文提供了一种方法,其包括:从受试者获得生物样品,所述生物样品包含至少一种抗原呈递细胞(APC);从所述生物样品中富集表达CD14的细胞,从而获得$CD14^+$细胞富集的样品;将所述$CD14^+$细胞富集的样品与至少一种细胞因子或生长因子一起孵育第一时间段;将至少一种肽与$CD14^+$细胞富集的样品一起孵育第二时间段,从而获得APC肽负载的样品;将所述APC肽负载的样品与一种或多种细胞因子或生长因子一起孵育第三时间段,从而获得成熟APC样品;将所述成熟APC样品的APC与包含PBMC的CD14和/或CD25耗尽的样品一起孵育第四时间段;将PBMC与成熟APC样品的APC一起孵育第五时间段;将PBMC与成熟APC样品的APC一起孵育第六时间段;并且将所述PBMC的至少一种T细胞施用于有需要的受试者。

[0058] 在一个方面,本文提供一种方法,其包括:从受试者获得生物样品,所述生物样品包含至少一种APC和至少一种PBMC;从所述生物样品中消耗表达CD14和/或CD25和/或CD19的细胞,从而获得CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品;将CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品与FLT3L一起孵育第一时间段;将至少一种肽与CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品一起孵育第二时间段,从而获得APC肽负载的样品;将所述APC肽负载的样品与至少一种PBMC一起孵育第三时间段,从而获得第一刺激的PBMC样品;将所述第一刺激的PBMC样品的PBMC与成熟APC样品的APC一起孵育第四时间段,从而获得第二刺激的PBMC样品;任选地,将所述第二刺激的PBMC样品的PBMC与成熟APC样品的APC一起孵育第五时间段,从而获得第三刺激的PBMC样品;将所述第一、第二或第三刺激的PBMC样品中的至少一种T细胞施用于有需要的受试者。

[0059] 在一个方面,本文提供了一种方法,其包括从受试者获得生物样品,所述生物样品包含至少一种APC和至少一种PBMC;从所述生物样品中消耗表达CD14和/或CD25和/或CD19

的细胞,从而获得CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品;将CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品与FLT3L一起孵育第一时间段;将至少一种肽与CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品一起孵育第二时间段,从而获得APC肽负载的样品;将所述APC肽负载的样品与至少一种PBMC孵育第三时间段,从而获得第一刺激的PBMC样品;任选地,将所述第一刺激的PBMC样品的PBMC与成熟APC样品的FLT3L刺激的APC一起孵育第四时间段,从而获得第二刺激的PBMC样品;任选地,将所述第二刺激的PBMC样品的PBMC与成熟APC样品的FLT3L刺激的APC一起孵育第五时间段,从而获得第三刺激的PBMC样品;将所述第一、第二或第三刺激的PBMC样品中的至少一种T细胞施用于有需要的受试者。

[0060] 在一个方面,本文提供一种方法,其包括:从受试者获得生物样品,所述生物样品包含至少一种APC和至少一种PBMC;从所述生物样品中消耗表达CD14和/或CD25和/或CD19的细胞,从而获得CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品;将CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品与FLT3L一起孵育第一时间段;将至少一种肽与CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品一起孵育第二时间段,从而获得第一APC肽负载的样品;将所述第一APC肽负载的样品与至少一种PBMC孵育第三时间段,从而获得第一刺激的PBMC样品;任选地,将所述第一刺激的PBMC样品的PBMC与FLT3L和成熟APC样品的第二APC肽负载的样品一起孵育第四时间段,从而获得第二刺激的PBMC样品;任选地,将所述第二刺激的PBMC样品的PBMC与FLT3L和成熟APC样品的第三APC肽负载的样品一起孵育第五时间段,从而获得第三刺激的PBMC样品;将所述第一、第二或第三刺激的PBMC样品中的至少一种T细胞施用于需要其的受试者。

[0061] 在一个方面,本文提供了一种方法,其包括:从受试者获得生物样品,所述生物样品包含至少一种APC和至少一种PBMC;从所述生物样品中消耗表达CD14和/或CD25和/或CD19的细胞,从而获得CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品;将CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品与FLT3L一起孵育第一时间段;将至少一种肽与CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品一起孵育第二时间段,从而获得第一APC肽负载的样品;将所述第一APC肽负载的样品与至少一种PBMC孵育第三时间段,从而获得第一刺激的PBMC样品;任选地,将所述第一刺激的PBMC样品的PBMC与FLT3L和成熟APC样品的FLT3L刺激的APC一起孵育第四时间段,从而获得第二刺激的PBMC样品;任选地,将所述第二刺激的PBMC样品的PBMC与FLT3L和成熟APC样品的FLT3L刺激的APC一起孵育第五时间段,从而获得第三刺激的PBMC样品;将所述第一、第二或第三刺激的PBMC样品中的至少一种T细胞施用于有需要的受试者。

[0062] 在一个方面,本文提供了一种方法,其包括确定刺激的免疫细胞样品中至少一种免疫细胞的一种或多种细胞标志物的表达;以及确定所述刺激的免疫细胞样品中至少一种免疫细胞与肽-MHC复合物的结合;其中确定表达和确定结合同时进行。在一些实施方案中,所述刺激的免疫细胞样品是用包含肽-MHC复合物的APC刺激的免疫细胞群体。在一些实施方案中,所述免疫细胞群体来自生物样品。

[0063] 在一个方面,本文提供了一种方法,其包括将来自生物样品的免疫细胞群体与包含肽-MHC复合物的APC一起孵育,从而获得刺激的免疫细胞样品;确定所述刺激的免疫细胞样品中至少一种免疫细胞的一种或多种细胞标志物的表达;以及确定所述刺激的免疫细胞样品中至少一种免疫细胞与肽-MHC复合物的结合;其中确定表达和确定结合同时进行。

[0064] 在一些实施方案中,所述一种或多种细胞标志物包括TNF-α、IFN-γ、LAMP-1、4-

1BB、IL-2、IL-17A、粒酶B、PD-1、CD25、CD69、TIM3、LAG3、CTLA-4、CD62L、CD45RA、CD45RO、FoxP3或其任何组合。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞标志物包括细胞因子。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞标志物包括脱粒标志物。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞标志物包括细胞表面标志物。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞标志物包括蛋白质。在一些实施方案中,确定所述刺激的免疫细胞样品的至少一种免疫细胞与肽-MHC复合物的结合包括确定所述刺激的免疫细胞样品的至少一种免疫细胞与包含所述肽和肽-MHC复合物的MHC的MHC四聚体的结合。在一些实施方案中,所述MHC是I类MHC或II类MHC。在一些实施方案中,所述肽-MHC复合物包含一种或多种标记物。在一些实施方案中,来自生物样品的免疫细胞群体包含两个或更多个样品,每个样品包含来自一个或多个生物样品的免疫细胞群体。在一些实施方案中,所述两个或更多个样品用两种或更多种样品标记物进行标记。在一些实施方案中,确定表达和确定结合包括荧光激活细胞分选(FACS)。在一些实施方案中,确定表达和确定结合包括单细胞分析。在一些实施方案中,确定表达和确定结合包括确定既表达一种或多种细胞标志物又与肽-MHC复合物结合的免疫细胞的百分比。在一些实施方案中,所述标记物包括荧光团。在一些实施方案中,所述免疫细胞群体包括代表本文所述组合物的免疫细胞群体的免疫细胞群体。

[0065] 在根据马库什群组或其他替代分组描述本发明的方面或实施方案的情况下,本发明不仅包括作为整体列出的整个群组,而且还单独包括该群组中的每个成员以及主要群组中的所有可能的亚组,并且还包括缺少一个或多个群组成员的主要群组。本发明还设想明确排除要求保护的发明中的任何群组成员中的一个或多个。

[0066] 援引并入

[0067] 本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请均为了所有目的通过引用整体并入本文,其程度犹如特别地且单独地指出每个单独的出版物、专利或专利申请通过引用而并入。例如,本文提到的所有出版物和专利均为了描述和公开出版物中所述的试剂盒、组合物和方法学的目的通过引用整体并入本文,其可与本文所述的方法、试剂盒和组合物结合使用。本文所讨论的文件仅针对其在本申请的申请日之前的公开内容而提供。本文的任何内容都不应解释为承认本文所述的发明人无权因在先发明或由于任何其他原因而先于此公开。

附图说明

[0068] 图1A描绘了抗原特异性T细胞制备方案的示例示意图。

[0069] 图1B描绘了抗原特异性T细胞制备方案的示例示意图。

[0070] 图2描绘了示例结果,其显示由长肽或短肽诱导的抗原特异性$CD8^+$记忆T细胞的分数。“Bulk”表示含有用于诱导的T细胞的样品是完全的外周血单核细胞(PBMC)。“Treg”表示含有用于诱导的T细胞的样品是耗尽了表达CD25的细胞的PBMC。

[0071] 图3描绘了示例流式细胞术分析,其显示了用GAS 7肽诱导的抗原特异性$CD8^+$幼稚T细胞的分数。

[0072] 图4描绘了示例结果,其显示了抗原特异性$CD8^+$T细胞对HIV短肽、先前鉴定的短新抗原(PIN)或长PIN的肽池的应答。“完全PBMC”表示包含用于诱导的T细胞的样品是完全PBMC。“CD25 PBMC”表示含有用于诱导的T细胞的样品耗尽了CD25+细胞。

[0073] 图5A描绘了在所示条件下,抗原特异性$CD8^+$幼稚T细胞对单个先前鉴定的新抗原(PIN)的应答的示例流式细胞术分析。

[0074] 图5B描绘了在所示条件下,抗原特异性$CD8^+$幼稚T细胞对单个先前鉴定的新抗原(PIN)的应答的示例流式细胞术分析。

[0075] 图6描绘了示例结果,其显示了使用来自两个人供体的PBMC样品,抗原特异性$CD8^+$T细胞对所示肽的应答。

[0076] 图7描绘了在健康供体中,在刺激之前和最多三轮刺激之后,抗原特异性$CD8^+$T细胞对所示突变表位的应答的示例流式细胞术图。

[0077] 图8A描绘了示例性条形图,其显示了抗原特异性记忆$CD8^+$T细胞对病毒抗原的应答的结果。在最多三轮刺激之后,所有$CD8^+$T细胞中约50%对所示病毒表位(CMV pp65、EBV YVL、EBV BMLF1和Mart-1)是特异性的。

[0078] 图8B描绘了回忆测定的示例结果,该回忆测定涉及抗原特异性记忆$CD8^+$T细胞对肽负载的抗原呈递细胞的应答,然后与负载有和不负载病毒抗原的APC一起孵育。图中描绘了释放所示细胞因子的两个时间点的$CD8^+$T细胞分数。

[0079] 图9描绘了用于评估诱导的T细胞培养物是否可以杀死表达抗原的肿瘤系的细胞毒性测定的示例结果。显示了活的和死亡的胱天蛋白酶3阳性肿瘤细胞相对于总肿瘤细胞的分数。胱天蛋白酶3阳性活肿瘤细胞表明细胞正在经历早期细胞死亡。

[0080] 图10描绘了示例流式细胞术分析,其涉及抗原特异性$CD4^+$T细胞对肽负载的抗原呈递细胞的应答,然后与负载有和不负载PIN的APC一起孵育。显示了释放IFNγ的$CD4^+$T细胞的百分比。

[0081] 图11描绘了用突变型肽或野生型肽重新刺激后释放IFNγ的抗原特异性$CD4^+$T细胞的百分比的示例结果。

[0082] 图12描绘了示例流式细胞术分析,其显示了抗原特异性$CD8^+$幼稚T细胞对短HTV5肽的应答。显示了短期和长期诱导。

[0083] 图13描绘了示例性流式细胞术分析,其显示了使用来自人供体的完全PBMC样品,抗原特异性$CD8^+$幼稚T细胞对短ME1肽的应答的分数。显示了短期和长期诱导。

[0084] 图14描绘了示例流式细胞术分析,其显示了使用来自人供体的完全PBMC样品,抗原特异性$CD8^+$幼稚T细胞对短HTV3肽的应答。显示了短期和长期诱导。

[0085] 图15描绘了示例流式细胞术分析,其显示了使用来自人供体的完全PBMC样品,抗原特异性$CD8^+$幼稚T细胞对长CSNK1A1肽的应答。显示了短期和长期诱导。

[0086] 图16描绘了示例流式细胞术分析,其显示了使用耗尽CD25+细胞的来自人供体的PBMC样品,抗原特异性$CD8^+$幼稚T细胞对长CSNK1A1肽的应答。显示了短期和长期诱导。

[0087] 图17描绘了示例流式细胞术分析,其显示了使用耗尽$CD25^+$细胞的来自人供体的PBMC样品,抗原特异性$CD8^+$幼稚T细胞对短GAS7肽的应答。显示了短期和长期诱导。

[0088] 图18描绘了示例流式细胞术分析,其显示了使用耗尽$CD25^+$细胞的来自人供体的PBMC样品,抗原特异性$CD8^+$幼稚T细胞对短ACTN4肽的应答。显示了短期和长期诱导。

[0089] 图19A描绘了示例流式细胞术分析,其显示了使用耗尽$CD25^+$细胞的来自人供体的PBMC样品,抗原特异性$CD8^+$幼稚T细胞对短ACTN4肽的应答。显示了短期诱导。

[0090] 图19B描绘了示例流式细胞术分析,其显示了使用耗尽$CD25^+$细胞的来自人供体的

PBMC样品,抗原特异性$CD8^+$幼稚T细胞对短HIV3肽的应答。显示了长期诱导。

[0091] 图20描绘了使用来自人供体的完全PBMC样品,抗原特异性$CD8^+$幼稚T细胞对短HIV5肽的应答的示例流式细胞术分析。显示了短期和长期诱导。

[0092] 图21描绘了示例流式细胞术分析,其显示了使用来自人供体的完全PBMC样品,抗原特异性$CD8^+$幼稚T细胞对短HIV3肽的应答。显示了短期诱导。

[0093] 图22描绘了示例流式细胞术分析,其显示了使用耗尽$CD25^+$细胞的来自人供体的PBMC样品,抗原特异性$CD8^+$幼稚T细胞对短PRDX5肽的应答。显示了极短期和长期诱导。

[0094] 图23描绘了示例流式细胞术分析,其显示了使用耗尽$CD25^+$细胞的来自人供体的PBMC样品,抗原特异性$CD8^+$幼稚T细胞对短HIV5肽的应答。显示了短期和长期诱导。

[0095] 图24描绘了用于产生治疗性T细胞组合物的方法的实例的示意图,该方法包括记忆性T细胞的扩充和幼稚T细胞的诱导。

[0096] 图25描绘了测试T细胞的功能性、表型和/或功能和/或T细胞应答的方法的实例。

[0097] 图26描绘了用来测试T细胞的功能性、表型和/或功能和/或T细胞应答的回忆测定的实例。

[0098] 图27A描绘了示例流式细胞术分析,其显示了在回忆测定中单独地或作为混合物获取的经标记的样品对多路化样品去卷积的能力。独特标记的样品得到解析,而与其他条形码不发生或发生最小的交叉污染。

[0099] 图27B描绘了示例流式细胞术分析,其显示了在回忆测定中通过对九种独特标记的样品的混合物进行多聚体染色来检测抗原特异性$CD8^+$T细胞。

[0100] 图28A描绘了使用六种独特条形码标记的样品进行的回忆测定的示例流式细胞术分析,其中用未负载的DC和负载新抗原的DC进行回忆。

[0101] 图28B描绘了在回忆应答测定中,与负载所示浓度的肽的DC一起孵育的具有功能数的$CD4^+$T细胞的百分比的示例条形图。在不进行条形码标记的情况下单独分析或与无关样品混合地分析含有从头$CD4^+$T细胞应答的两种诱导培养物的样品。条形码标记没有改变可检测的功能性。从细胞中引发的功能数和应答量级在样品条形码标记的情况下并没有显著改变。

[0102] 图29A描绘了示例性条形图,其显示了抗原特异性记忆$CD8^+$T细胞对病毒抗原的应答的结果。对CMV pp65、MART-1和EBV BRLF1和BMLF1表位的$CD8^+$记忆应答可以从起始健康供体材料中的$CD8^+$T细胞的0.23%升高至>60%。

[0103] 图29B描绘了回忆测定的示例结果,该回忆测定涉及抗原特异性记忆$CD8^+$T细胞对病毒抗原的应答,然后用负载有和未负载病毒抗原的DC进行回忆。图中描绘了释放所示细胞因子的两个时间点的$CD8^+$T细胞分数。

[0104] 图30A描绘了通过在相同培养物中对具有多种特异性的从头诱导的$CD4^+$响应进行检测和功能表征来进行命中鉴定的示例结果。在所示的示例中,在针对10个HIV衍生抗原决定簇的四个复制培养物中进行了诱导,这些表位是HIV阴性健康供体的幼稚靶标。在4/4个生物学重复中检测到抗原特异性应答,应答的量级有所不同。

[0105] 图30B描绘了通过在相同培养物中对具有多种特异性的从头诱导的$CD4^+$应答进行检测和功能表征来进行池去卷积的示例结果。在每个测试的重复中均检测到多个应答,在每种情况下,相同的两个表位(HIV#5和HIV#7)产生了最高量级的应答。

[0106] 图30C描绘了通过在相同培养物中对具有多种特异性的从头诱导的$CD4^+$响应进行检测和功能表征来确定灵敏度的示例性结果。在池去卷积分析中,对于每个应答观察到相似的量级。对HIV#5、HIV#6和HIV#4的应答显示EC_{50}分别为0.45μM、0.43μM和9.1μM。

[0107] 图31描绘了抗原特异性T细胞制备方案的示例示意图。

[0108] 图32描绘了T细胞诱导方案的示例示意图。

[0109] 图33描绘了树突细胞产生方案的示例示意图。

[0110] 图34描绘了示例性pMHC多聚体图,其显示了来自针对患者特定表位$SRSF1_{E>K}$、$ARAP1_{Y>H}$和$PKDREJ_{G>R}$的黑素瘤患者和针对患者特定表位(AASDHneoORF和七种模型新抗原:$ACTN4_{K>N}$、$CSNK1A1_{S>L}$、DHX40neoORF、$GLI3_{P>L}$ $QARSR_{>W}$、$FAM178B_{P>L}$和$RPS26_{P>L}$)的黑素瘤患者的白细胞分离材料中诱导的$CD8^+$T细胞应答。第一行和第二行中的第一幅图指示记忆应答,其余的图指示从头应答。

[0111] 图35描绘了$SRSF1_{E>K}$和$ARAP1_{Y>H}$在肽刺激之前和之后的pMHC多聚体图的示例数据(左图),饼图描绘了用负载有新抗原的DC再次攻击后新抗原特异性T细胞的功能性;对pMHC多聚体+$CD8^+$或$CD4^+$T细胞进行门控。在黑色素瘤患者中诱导的$CD8^+$记忆、$CD8^+$从头和$CD4^+$从头应答的多功能图谱由1、2或3种功能的组合示出(例如,一种或多种功能是选自IFNγ、TNFα、CD107a和4-1BB的一种或多种因子的产生)。

[0112] 图36描绘了在黑素瘤患者中针对突变型和野生型肽诱导的记忆和从头应答的特异性。$SRSF1_{E>K}$和$ARAP1_{Y>H}$特异性T细胞应答用负载有不同浓度(X轴:0μM,0.05μM,0.2μM,0.8μM和3.2μM)的突变型或野生型新抗原肽的DC进行攻击,并测量样品中总$CD8^+$T细胞的IFN-γ+和/或TNFα+和/或CD107a+(Y轴);两种应答均显示出与0μM浓度的显著差异,而对野生型新抗原肽无反应性。统计分析:FDR调整p值,P值:*≤0.05,***≤0.001,****≤0.0001。

[0113] 图37A描绘了根据$CD8^+CD107a^+$T细胞的频率量化的,在黑素瘤患者中诱导的记忆应答的细胞毒性谱。它还描绘了这些T细胞应答的靶细胞杀伤,如根据aCAS3+肿瘤细胞的频率所量化的。通过用突变型或野生型新抗原转导的肿瘤细胞重新攻击来评估诱导的$CD8^+$T细胞应答的细胞毒性能力。使用未转导的肿瘤细胞(亲代A375系)或用200aa构建体转导的肿瘤细胞。该构建体包含突变型或野生型序列,在中心的突变。共培养后测量了$CD8^+$T细胞上CD107a的上调和肿瘤细胞上活性胱天蛋白酶3的上调。目标比例:3.3:1($SRSF1_{E>K}$)。

[0114] 图37B描绘了根据$CD8^+CD107a^+$T细胞的频率量化的,在黑素瘤患者中诱导的记忆应答的细胞毒性谱的另一个实例。它还描绘了这些T细胞应答的靶细胞杀伤,如根据aCAS3+肿瘤细胞的频率所量化的。通过用突变型或野生型新抗原转导的肿瘤细胞重新攻击来评估诱导的$CD8^+$T细胞应答的细胞毒性能力。使用未转导的肿瘤细胞(亲代A375系)或用200aa构建体转导的肿瘤细胞。该构建体包含突变型或野生型序列,在中心的突变。共培养后测量了$CD8^+$T细胞上CD107a的上调和肿瘤细胞上活性胱天蛋白酶3的上调。红色圆圈突出显示pMHC+部分。效:靶比:5:1($SRSF1_{E>K}$)。统计分析:未配对T检验,**≤0.01,****≤0.0001。

[0115] 图37C描绘了根据$CD8^+CD107a^+$T细胞的频率量化的,在黑素瘤患者中诱导的从头应答的细胞毒性谱。它还描绘了这些T细胞应答的靶细胞杀伤,如根据aCAS3+肿瘤细胞的频率所量化的。通过用突变型或野生型新抗原转导的肿瘤细胞重新攻击来评估诱导的$CD8^+$T细胞应答的细胞毒性能力。使用未转导的肿瘤细胞(亲代A375系)或用200aa构建体转导的肿瘤细胞。该构建体包含突变型或野生型序列,在中心的突变。共培养后测量了$CD8^+$T细胞上

CD107a的上调和肿瘤细胞上活性胱天蛋白酶3的上调。红色圆圈突出显示pMHC+部分。效:靶比:0.66:1(ARAP1Y>H)。统计分析:未配对T检验,**≤0.01,****≤0.0001。

[0116] 图38A描绘了黑素瘤患者中新抗原特异性$CD4^+$T细胞应答的鉴定。基于当用突变型新抗原肽负载的DC(0.8μM)再次攻击时IFN-γ和TNFα的产生(Y轴)来鉴定应答。$MKRN1_{S>L}$、$CREBBP_{S>L}$和TPCN1K>E被鉴定为阳性应答。

[0117] 图38B描绘了针对所示突变型和野生型肽的在图38A中描绘的$CD4^+$T细胞应答的特异性。在验证性研究中,图38A中所示的CD4 T细胞应答用不同浓度(X轴-0μM,0.05μM,0.2μM,0.8μM和3.2μM)的突变型和野生型新抗原肽进行攻击,并测量样品中总CD4+的IFNγ+和/或TNFα+(Y轴)。CD4+T细胞应答中的两个($MKRN1_{S>L}$和$CREEBP_{S>L}$)显示出对10μM浓度的显著差异,并且对野生型新抗原肽无反应性,但是$TPCN1_{K>E}$应答对突变型和野生型新抗原肽均具有反应性。统计分析:FDR调整p值,P值<0.05;

[0118] 图38C描绘了这些CD4+T细胞应答的多功能性谱,如1、2、3或4个功能的组合所示(例如,一个或多个功能是一种或多种选自IFNγ、TNFα、CD107a和4-1BB的因子的产生)。通过用突变型新抗原肽负载的DC(0.8μm)再次攻击来评估鉴定的CD4+T细胞应答的多功能性。饼图中的百分比表示功能性CD4+T细胞(1、2和/或3个功能)的百分比。所描绘的代表性数据是由患者体内诱导的刺激后CD4+T细胞应答产生的。

[0119] 图39描绘了在添加或不添加Epacadostat的情况下,在两个健康供体(例如,HD66和HD63)中诱导的记忆应答的功能性,如1、2或3个功能的组合所示(例如,一个或多个功能是一种或多种选自IFNγ、TNFα和CD107α的因子的产生)。

[0120] 图40描绘了在添加或不添加Epacadostat的情况下,在六次重复诱导中诱导的从头$CD8^+$T细胞应答百分比(“命中率”,在四个健康供体之间取平均)。

[0121] 图41A描述了在添加或不添加PD-1阻断抗体的情况下,在用本文提供的T细胞制备方案诱导后,来自供体HD55的抗原特异性细胞的绝对数。

[0122] 图41B描绘了在添加或不添加PD-1阻断抗体的情况下,在用本文提供的T细胞制备方案诱导后,来自供体HD67的抗原特异性细胞的绝对数。

[0123] 图42A描绘了在添加或不添加IL-12的情况下,从头$CD8^+$T细胞应答的$pMHC^+CD8^+$T细胞的分数。

[0124] 图42B描绘了在添加或不添加IL-12的情况下,从头$CD8^+$T细胞应答的$CD8^+$T细胞的百分比。

[0125] 图43描绘了本文描述的方法的示例。使用生物信息引擎预测患者特定的新抗原,覆盖预测的新抗原的合成长肽在刺激方案中用作免疫原,以评估免疫原性能力。该刺激方案包括将这些新抗原编码肽供给患者来源的APC,然后将其与患者来源的T细胞共培养,以引发抗原特异性T细胞。

具体实施方式

[0126] 本文描述了新型免疫治疗剂及其用途,这是基于由对个体肿瘤独特的突变事件引起的新抗原的发现。因此,本文描述的本公开提供了创建用于治疗疾病的抗原特异性免疫细胞,例如T细胞的方法和方案。

[0127] 定义

[0128] 本文使用的术语仅用于描述特定情况的目的,而非限制性的。除非上下文另有明确规定,否则如本文所用的单数形式“一个”、“一种”和“该”也意欲包括复数形式。此外,就具体实施方式和/或权利要求书中使用的术语“包括”、“包含”、“具有”或其变化形式而言,这些术语旨在以与术语“包含”类似的方式为包含性的。

[0129] 应当理解,诸如“包含”等术语可以具有美国专利法中赋予它的含义;例如,该术语可以意指“包括”、“含有”等;而诸如“基本上由.....组成”和“基本由.....组成”的术语具有美国专利法中赋予它们的含义,例如,其允许有未明确引述的元素,但排除现有技术中发现的或影响本发明的基本特征或新颖特征的元素。本文中的任何内容均不作为承诺。

[0130] 在诸如“A和/或B”的短语中使用的术语“和/或”在本文中旨在包括A和B两者;A或B;A(单独);和B(单独)。同样地,在诸如“A、B和/或C”的短语中使用的术语“和/或”旨在包含以下实施方案中的每一个:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

[0131] 术语“约”或“大约”可意指在本领域普通技术人员测定的特定值的可接受误差范围内,该可接受误差范围将部分取决于该值如何测量或测定,即,测量系统的局限性。例如,根据相关领域中的实践,“约”可指在1个或大于1个标准偏差内。或者,“约”可指给定值的最多20%、最多10%、最多5%或最多1%的范围。或者,特别是对于生物系统或过程,该术语可指在数值的数量级内,在5倍以内,更优选在2倍以内。在本申请和权利要求书中描述特定值的情况下,除非另有说明,否则应推定术语“约”意指在该特定值的可接受误差范围内。

[0132] 为了便于理解本公开,下面定义了许多术语和短语。

[0133] “新抗原”是指由蛋白质的肿瘤特异性改变产生的一类肿瘤抗原。新抗原包括但不限于由例如蛋白质序列的置换、移码突变、融合多肽、框内缺失、插入和内源性逆转录病毒多肽的表达产生的肿瘤抗原。

[0134] “新表位”是指不存在于诸如非病变细胞,例如非癌细胞或种系细胞等参考中但在病变细胞,例如癌细胞中发现的表位。这包括以下情况:在正常的非癌细胞或种系细胞中发现相应的表位,但是由于病变细胞,例如癌细胞中的一个或多个突变,该表位的序列被改变从而产生新表位。

[0135] “参考”可以用来将本公开的方法中获得的结果与疾病标本相关联并且/或者进行比较。通常,“参考”可以基于一个或多个正常标本获得,特别是不受疾病影响的标本,其获自个体或一个或多个不同的个体(例如健康个体),如同一物种的个体。“参考”可以通过检测足够大量的正常标本来凭经验确定。

[0136] “突变”是指与参考核酸相比核酸序列的变化或差异(例如,核苷酸置换、添加或缺失)。“体细胞突变”可发生在除生殖细胞(精子和卵子)之外的身体的任何细胞中并且不会传递给孩子。这些改变可以(但不总是)导致癌症或其他疾病。在一些实施方案中,突变是非同义突变。“非同义突变”是指导致翻译产物中的氨基酸改变如氨基酸置换的突变(例如,核苷酸置换)。当突变破坏基因密码子周期性的正常相(也称为“阅读框”)时,发生“移码”,从而导致非天然蛋白质序列的翻译。基因中的不同突变可以实现相同的改变的阅读框。

[0137] 术语“亲和力”是指结合对的两个成员(例如,人白细胞抗原(HLA)结合肽与I类或II类HLA,或肽-HLA复合物与T细胞受体(TCR))之间结合强度的量度。K_D是指结合对的两个成员之间的解离常数,并且具有摩尔浓度单位。K_A是指结合对的两个成员之间的亲和常数,

是解离常数的倒数。亲和力可以通过实验确定,例如使用市售Biacore SPR单元通过表面等离子体共振(SPR)确定。K_{off}是指结合对的两个成员的解离速率常数(例如,HLA结合肽与I或II类HLA或肽-HLA复合物与TCR的解离速率常数)。K_{on}是指结合对的两个成员的缔合速率常数(例如,HLA结合肽与I或II类HLA或肽-HLA复合物与TCR的缔合速率常数)。

[0138] 在整个公开内容中,"结合数据"结果可以用"IC_{50}"表示。亲和力也可以表示为抑制浓度50(IC_{50}),或50%的结合对第一成员(例如肽)被替代时的浓度。同样,$\ln(IC_{50})$是指IC_{50}的自然对数。例如,IC_{50}可以是结合测定中观察到标记的参考肽结合的50%抑制时测试肽的浓度。考虑到运行测定的条件(例如,限制HLA蛋白浓度和/或标记的参考肽浓度),这些值可接近K_D值。用于确定结合的测定是本领域公知的,并且详细描述于例如PCT公开WO 94/20127和WO 94/03205以及其他出版物如Sidney等人,Current Protocols in Immunology 18.3.1(1998);Sidney等人,J.Immunol.154:247(1995);和Sette等人,Mol.Immunol.31:813(1994)中。或者,结合可以相对于参考标准肽的结合来表示。结合也可以使用其他测定系统来确定,包括使用以下系统的测定系统:活细胞(例如,Ceppellini等人,Nature 339:392(1989);Christnick等人,Nature 352:67(1991);Busch等人,Int.Immunol.2:443(1990);Hill等人,J.Immunol.147:189(1991);del Guercio等人,J.Immunol.154:685(1995))、使用去污剂裂解物的无细胞系统(例如,Cerundolo等人,J.Immunol.21:2069(1991))、固定化纯化的MHC(例如,Hill等人,J.Immunol.152,2890(1994);Marshall等人,J.Immunol.152:4946(1994))、ELISA系统(例如,Reay等人,EMBO J.11:2829(1992))、表面等离子体共振(例如,Khilko等人,J.Biol.Chem.268:15425(1993));高通量可溶相测定(Hammer等人,J.Exp.Med.180:2353(1994))以及I类MHC稳定化或组装的测量(例如,Ljunggren等人,Nature 346:476(1990);Schumacher等人,Cell 62:563(1990);Townsend等人,Cell 62:285(1990);Parker等人,J.Immunol.149:1896(1992))。

[0139] 当用来讨论表位时,术语"衍生的"是"制备的"的同义词。衍生的表位可以从天然来源分离或者可以根据本领域的标准方案合成。合成表位可以包含人工氨基酸残基"氨基酸模拟物",如天然存在的L氨基酸残基的D异构体或诸如环己基丙氨酸的非天然氨基酸残基。衍生的或制备的表位可以是天然表位的类似物。术语"来源于"是指起源或来源,并且可以包括天然存在的、重组的、未纯化的、纯化的或分化的分子或细胞。例如,扩充或诱导的抗原特异性T细胞可以来源于T细胞。例如,扩充或诱导的抗原特异性T细胞可以来源于生物样品中的抗原特异性T细胞。例如,成熟的APC(例如,专职APC)可以来源于未成熟的APC(例如,未成熟APC)。例如,APC可以来源于单核细胞(例如,$CD14^+$单核细胞)。例如,树突细胞可以来源于单核细胞(例如,$CD14^+$单核细胞)。例如,APC可以来源于骨髓细胞。

[0140] "表位"是分子的特征集合(例如,肽的电荷以及一级、二级和三级肽结构),它们一起形成被另一分子(例如,免疫球蛋白、T细胞受体、HLA分子或嵌合抗原受体)识别的位点。例如,表位可以是参与被特定免疫球蛋白识别的一组氨基酸残基;主要组织相容性复合物(MHC)受体;或者在T细胞的情况下,被T细胞受体蛋白和/或嵌合抗原受体识别的那些残基。表位可以通过从天然来源分离来制备,或者它们可以根据本领域的标准方案进行合成。合成表位可以包含人工氨基酸残基——氨基酸模拟物(如天然存在的L氨基酸残基的D异构体或非天然存在的氨基酸残基)。在整个公开内容中,表位在一些情况下可以被称为肽或肽表位。在某些实施方案中,对本公开的肽的长度具有限制。当包含本文所述表位的蛋白质或肽

包含与天然序列具有100％同一性的区域(即,连续的一系列氨基酸残基)时,发生长度受限的实施方案。为了避免表位的定义例如在整个天然分子上读取,对与天然肽序列具有100％同一性的任何区域的长度进行限制。因此,对于包含本文所述表位及与天然肽序列具有100％同一性的区域的肽,与天然序列具有100％同一性的区域通常具有以下长度:少于或等于600个氨基酸残基、少于或等于500个氨基酸残基、少于或等于400个氨基酸残基、少于或等于250个氨基酸残基、少于或等于100个氨基酸残基、少于或等于85个氨基酸残基、少于或等于75个氨基酸残基、少于或等于65个氨基酸残基以及少于或等于50个氨基酸残基。在某些实施方案中,本文所述的“表位”被包含在具有以低至5个氨基酸残基的任一增量少于51个氨基酸残基的区域的肽中,该区域与天然肽序列具有100％的同一性;具有例如50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸残基。

[0141] “T细胞表位”是指以肽-MHC(pMHC)复合物的形式被MHC分子结合的肽序列。肽-MHC复合物可以被T细胞(例如,细胞毒性T淋巴细胞或T辅助细胞)的TCR识别并结合。

[0142] “T细胞”包括$CD4^+$T细胞和$CD8^+$T细胞。术语T细胞还包括T辅助1型T细胞和T辅助2型T细胞。

[0143] “免疫细胞”是指在免疫应答中起作用的细胞。免疫细胞是造血来源的,并且包括淋巴细胞,如B细胞和T细胞;自然杀伤细胞;髓样细胞,如单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞和粒细胞。

[0144] “免疫原性”肽或“免疫原性”表位或“免疫原性”肽表位是这样的肽,其与HLA分子结合,并且诱导细胞介导的应答或体液应答,例如,细胞毒性T淋巴细胞(CTL)应答、辅助性T淋巴细胞(HTL)应答和/或B淋巴细胞应答。本文所述的免疫原性肽能够与HLA分子结合,之后诱导针对该肽的细胞介导的应答或体液应答(例如,CTL(细胞毒性)应答或HTL应答)。

[0145] “保护性免疫应答”或“治疗性免疫应答”是指针对来源于致病性抗原(例如,肿瘤抗原)的抗原的CTL和/或HTL应答,其以某种方式阻止或至少部分地阻止疾病症状、副作用或进展。免疫应答还可以包括通过刺激辅助T细胞促进的抗体应答。

[0146] “T细胞受体”(“TCR”)是指天然的或部分或完全合成产生的分子,其发现于识别与主要组织相容性复合物(MHC)分子结合的抗原的T淋巴细胞(T细胞)的表面。T细胞识别与多种疾病(例如,癌症)或传染性生物体相关的抗原的能力由其TCR赋予,TCR由alpha(α)链和beta(β)链或由gamma(γ)和delta(δ)链构成。构成这些链的蛋白质由DNA编码,其采用独特的机理生成了TCR的巨大多样性。这种多亚单元免疫识别受体与CD3复合物相关联,并与抗原呈递细胞(APC)表面上的MHC I类和II类蛋白质所呈递的肽相结合。TCR与APC上的肽的结合是T细胞活化中的核心事件。

[0147] 如本文所用的,“嵌合抗原受体”或“CAR”是指抗原结合蛋白,其包括免疫球蛋白抗原结合域(例如免疫球蛋白可变域)和T细胞受体(TCR)恒定域。如本文所用的,TCR多肽的“恒定域”包括膜近端TCR恒定域、TCR跨膜域和/或TCR胞质域或其片段。例如,在一些实施方案中,CAR是单体,其包括包含与TCRβ恒定域连接的免疫球蛋白重链可变域的多肽。在一些实施方案中,CAR为二聚体,其包括:包含与TCRα或TCRβ恒定域连接的免疫球蛋白重链或轻链可变域的第一多肽,以及包含与TCRβ或TCRα恒定域连接的免疫球蛋白重链或轻链可变域(例如,κ或λ可变域)的第二多肽。

[0148] “主要组织相容性复合物”或“MHC”是在控制导致生理免疫应答的细胞相互作用中起作用的基因簇。术语“主要组织相容性复合物”和缩写“MHC”可包括任何类别的MHC分子，如MHC I类和MHC II类分子，并且涉及在所有脊椎动物中存在的基因的复合物。在人类中，MHC复合物也被称为人白细胞抗原(HLA)复合物。因此，“人白细胞抗原”或“HLA”是指人主要组织相容性复合物(MHC)蛋白(参见，例如，Stites等人，Immunology，第8版，Lange Publishing，Los Altos，Calif.(1994))。关于MHC和HLA复合物的详细描述，参见Paul，Fundamental Immunology，第3版，Raven Press，New York(1993)。

[0149] 基因组中的主要组织相容性复合物包含遗传区域，其在细胞表面上表达的基因产物对于结合和呈递内源性和/或外源性抗原至关重要，并且因此用于调节免疫过程。MHC蛋白或分子对于免疫反应中淋巴细胞与抗原呈递细胞或病变细胞之间的信号传导至关重要。MHC蛋白或分子结合肽并将其呈递以供T细胞受体识别。由MHC编码的蛋白质可以在细胞表面上表达，并向T细胞显示自身抗原(来自细胞本身的肽片段)和非自身抗原(例如，侵入微生物的片段)。MHC结合肽可以由蛋白质抗原的蛋白水解切割产生，并代表潜在的淋巴细胞表位(例如，T细胞表位和B细胞表位)。MHC可以将肽转运到细胞表面，并在那里将其呈递给特定的细胞，如细胞毒性T淋巴细胞、T辅助细胞或B细胞。MHC区域可分为三个子组：I类、II类和III类。MHC I类蛋白可以包含α链和β2-微球蛋白(不是15号染色体编码的MHC的一部分)。他们可以将抗原片段呈递给细胞毒性T细胞。MHC II类蛋白可以包含α和β链，它们可以将抗原片段呈递给T辅助细胞。MHC III类区域可以编码其他免疫成分，如补体成分和细胞因子。MHC既可以是多基因的(有若干个MHC I类和MHC II类基因)，也可以是多态性的(每个基因有多个等位基因)。

[0150] “抗原加工”或“加工”是指将多肽或抗原降解成加工产物(该加工产物是所述多肽或抗原的片段(例如，多肽降解成肽))以及将这些片段中的一个或多个(例如，经由结合)与MHC分子缔合以供由细胞(例如，抗原呈递细胞)呈递给特定T细胞。

[0151] “抗原呈递细胞”(APC)是指在其细胞表面上呈递与MHC分子关联的蛋白质抗原的肽片段的细胞。该术语包括专职抗原呈递细胞(例如，B淋巴细胞、单核细胞、树突细胞、郎格汉斯细胞)以及其他抗原呈递细胞(例如，角质形成细胞、内皮细胞、星形胶质细胞、成纤维细胞、少突胶质细胞)。

[0152] “受体”是指能够结合配体的生物分子或分子分组。受体可以用来在细胞、细胞形成或生物体中传递信息。受体包含至少一个受体单元，例如，其中每个受体单元可以由蛋白质分子组成。受体具有与配体的结构互补的结构，并且可以作为结合配偶体与配体复合。具体通过配体在细胞表面上复合后受体的构象变化来传递信息。在一些实施方案中，受体应被理解为尤其是指能够与配体(特别是合适长度的肽或肽片段)形成受体/配体复合物的MHC I类和II类的蛋白质。“配体”是指具有与受体的结构互补的结构并且能够与该受体形成复合物的分子。在一些实施方案中，配体应被理解为意指在其氨基酸序列中具有合适长度和合适结合基序的肽或肽片段，以使得肽或肽片段能够与诸如MHC I类或MHC II类蛋白的MHC蛋白质形成复合物。在一些实施方案中，“受体/配体复合物”还应被理解为意指“受体/肽复合物”或“受体/肽片段复合物”，其包括呈递肽或肽片段的MHC分子，如MHC I类或II类分子。

[0153] “天然”或“野生型”序列是指在自然界中发现的序列。如本文所用的，术语“天然存

在的”是指对象可以在自然界中发现的事实。例如,存在于生物体(包括病毒)中并且可以从自然界的来源中分离并且在实验室中没有被人工有意修饰的肽或核酸是天然存在的。

[0154] 术语“肽”和“肽表位”在本说明书中可以与“寡肽”互换使用,是指通常通过相邻氨基酸残基的α-氨基和羧基之间的肽键彼此连接的一系列残基。“合成肽”是指从非天然来源中获得的肽,例如是人造的。可以使用诸如化学合成或重组DNA技术等方法产生这类肽。“合成肽”包括“融合蛋白”。

[0155] 术语“基序”是指所限定长度的氨基酸序列中的残基模式,例如,长度小于约15个氨基酸残基或长度小于约13个氨基酸残基的肽,例如,对于I类HLA基序,具有约8至约13个(例如,8、9、10、11、12或13个)氨基酸残基,而对于II类HLA基序,具有约6至约25个(例如,6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个)氨基酸残基,其被特定的HLA分子所识别。对于由给定的人HLA等位基因编码的每种HLA蛋白,基序通常是不同的。这些基序的一级和二级锚定残基的模式不同。在一些实施方案中,MHC I类基序识别长度为7、8、9、10、11、12或13个氨基酸残基的肽。在一些实施方案中,MHC II类基序识别长度为15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或26个氨基酸残基的肽。“交叉反应性结合”肽是指与结合对成员类别的多于一个成员结合的肽(例如,被I类HLA分子和II类HLA分子均结合的肽)。

[0156] 术语“残基”是指通过酰胺键或酰胺键模拟物并入肽或蛋白质中或者被核酸(DNA或RNA)编码的氨基酸残基或氨基酸模拟残基。用来描述肽或蛋白质的命名法遵循常规实践。氨基呈现于每个氨基酸残基的左侧(氨基端或N-末端)且羧基呈现于右侧(羧基端或C-末端)。当在肽表位中提及氨基酸残基位置时,在氨基至羧基方向上对氨基酸残基进行编号,其中第一个位置是位于表位或表位可能是其一部分的肽或蛋白质的氨基末端的残基。在代表本发明所选择的具体实施方案的通式中,除非另有说明,否则氨基端和羧基端基团(尽管没有具体显示)是它们在生理pH值下呈现的形式。在氨基酸结构式中,每个残基通常用标准的三字母或单字母命名表示。氨基酸残基的L-形式由大写单字母或首字母大写的三字母符号表示,而具有D-形式的那些氨基酸残基的D-形式由小写单字母或小写三字母符号表示。然而,当使用没有大写字母的三字母符号或全名时,它们也可以指L氨基酸残基。甘氨酸没有不对称碳原子,并简称为“Gly”或“G”。本文所述的肽的氨基酸序列通常使用标准单字母符号表示。(A,丙氨酸;C,半胱氨酸;D,天冬氨酸;E,谷氨酸;F,苯丙氨酸;G,甘氨酸;H,组氨酸;I,异亮氨酸;K,赖氨酸;L,亮氨酸;M,甲硫氨酸;N,天冬酰胺;P,脯氨酸;Q,谷氨酰胺;R,精氨酸;S,丝氨酸;T,苏氨酸;V,缬氨酸;W,色氨酸;Y,酪氨酸)。

[0157] “保守氨基酸置换”是其中一个氨基酸残基被另一个具有相似侧链的氨基酸残基替代的氨基酸置换。本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族,包括碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、β-分支侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。例如,用苯丙氨酸置换酪氨酸是保守置换。鉴定不消除肽功能的核苷酸和氨基酸保守置换的方法是本领域公知的。

[0158] “药学上可接受的”是指通常无毒、惰性和/或生理学相容的组合物或组合物组分。“药用赋形剂”或“赋形剂”包括诸如佐剂、载体、pH调节剂和缓冲剂、张度调节剂、润湿剂、防

腐剂等材料。“药用赋形剂”为药学上可接受的赋形剂。

[0159] 根据本公开,术语“疫苗”涉及在施用后诱导免疫应答(例如细胞或体液免疫应答)的药物制品(药物组合物)或产品,其识别并攻击病原体或病变细胞,如癌细胞。疫苗可以用于预防或治疗疾病。术语“个体化癌症疫苗”或“个性化癌症疫苗”、“个人癌症疫苗”涉及特定癌症患者,并且意指癌症疫苗适应于个体癌症患者的需要或特殊情况。

[0160] 术语“多核苷酸”和“核酸”在本文中可以互换使用,并且指任何长度的核苷酸聚合物,包括DNA和RNA(例如,mRNA)。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基和/或它们的类似物,或可以通过DNA或RNA聚合酶掺入聚合物中的任何底物。在一些实施方案中,多核苷酸和核酸可以是体外转录的mRNA。在一些实施方案中,使用本发明方法施用的多核苷酸是mRNA。

[0161] 术语“分离的”或“生物学纯的”是指这样的材料,其实质上或基本上不含在其天然状态下被发现时通常伴随该材料的组分。因此,本文所述的分离的肽不含有在其原位环境中通常与该肽关联的一些或全部物质。例如,“分离的”表位可以是不包括衍生出该表位的蛋白质的全序列的表位。例如,存在于活动物中的天然存在的多核苷酸或肽不是分离的,但从天然系统中的一些或全部共存物质中分离出的相同的多核苷酸或肽是分离的。这样的多核苷酸可以是载体的一部分,并且/或者这样的多核苷酸或肽可以是组合物的一部分,并且仍然是“分离的”,因为这样的载体或组合物不是其天然环境的一部分。分离的RNA分子包括本文所述的DNA分子的体内或体外RNA转录物,并且还包括以合成方式产生的这类分子。在一些实施方案中,分离的多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物是基本上纯的。如本文所用的术语“基本上纯的”是指至少50%纯(即,不含污染物)、至少90%纯、至少95%纯、至少98%纯或至少99%纯的物质。

[0162] 在两个或更多个核酸或多肽的语境中,术语“相同”或百分比“同一性”是指当针对最大对应度进行比较和比对(如果必要,引入空位)时,两个或更多个序列或子序列是相同的或具有特定百分比的相同核苷酸或氨基酸残基,不考虑任何保守氨基酸置换作为序列同一性的一部分。可以使用序列比较软件或算法或通过目视检查来测量百分比同一性。可用来获得氨基酸或核苷酸序列比对的各种算法和软件是本领域公知的。这些包括但不限于BLAST、ALIGN、Megalign、BestFit、GCG Wisconsin Package及其变化形式。在一些实施方案中,本文所述的两种核酸或多肽基本上相同,意指当针对最大对应度进行比较和比对时,如使用序列比较算法或通过目视检查所测量的,它们具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%并且在一些实施方案中具有至少95%、96%、97%、98%、99%的核苷酸或氨基酸残基同一性。在一些实施方案中,在长度为至少约10、至少约20、至少约40-60个残基、至少约60-80个残基或其间任何整数值个残基的序列区域中存在同一性。在一些实施方案中,同一性存在于长于60-80个残基如至少约80-100个残基的区域中,并且在一些实施方案中,该序列在所比较的序列的全长,如肽的氨基酸序列或核苷酸序列的编码区上基本相同。

[0163] 术语“受试者”是指任何动物(例如哺乳动物),包括但不限于人、非人灵长类动物、犬科动物、猫科动物、啮齿动物等,其将是特定治疗的接受者。通常,在提到人类受试者时,术语“受试者”和“患者”在本文中可互换使用。

[0164] 术语“有效量”或“治疗有效量”或“治疗效果”是指对于“治疗”受试者或哺乳动物

的疾病或病症有效的治疗剂的量。治疗有效量的药物具有治疗效果,因此可以预防疾病或病症的发展;减缓疾病或病症的发展;减缓疾病或病症的进展;在一定程度上缓解与疾病或病症相关的一种或多种症状;降低发病率和死亡率;提高生活质量;或这些效果的组合。

[0165] 术语"治疗"或"缓解"是指:(1)治愈、减缓、减轻经诊断的病理状况或病症的症状,和/或中止该病理状况或病症的进展的治疗措施;和(2)预防或减缓目标病理状况或病症的发展的预防性或防范性措施。因此,需要治疗的受试者包括已经患有该病症的受试者;易于患该病症的受试者;以及要预防该病症的受试者。

[0166] 当用于描述细胞样品(例如,外周血单核细胞(PBMC)样品)时,术语"耗尽的"是指其中细胞亚群已被去除或消耗的细胞样品。例如,耗尽了表达CD25的细胞的免疫细胞样品是指其中已经除去或耗尽了表达CD25的细胞的免疫细胞样品。例如,一种或多种结合剂可用于从样品中去除或消耗一种或多种细胞或细胞类型。例如,可以例如通过使用与CD14结合的抗体从PBMC样品中消耗或去除$CD14^+$细胞。

[0167] "刺激"是指通过刺激分子与其同源配体的结合诱导的反应,从而介导信号转导事件。例如,对T细胞的刺激可以指T细胞的TCR与肽-MHC复合物的结合。例如,对T细胞的刺激可以指方案1或方案2中的步骤,其中PBMC与负载肽的APC一起培养。

[0168] 术语"富集"是指其中目标种类已经部分纯化的组合物或级分,使得目标种类的浓度大大高于未富集的最终产物中自然存在的种类水平。术语"诱导的细胞"是指已经用影响细胞的蛋白质表达、基因表达、分化状态、形状、形态、活力等的诱导性化合物、细胞或细胞群体处理过的细胞。

[0169] T细胞疗法及其制备的概述

[0170] 通过T细胞(例如自体T细胞)的受控离体诱导或扩充来产生抗原特异性T细胞可以提供高度特异性和有益的T细胞疗法(例如,过继T细胞疗法)。本公开提供了T细胞制备方法和治疗性T细胞组合物,其可用于治疗患有癌症和其他病况、疾病和病症的受试者。目的是扩充和诱导具有良好表型和功能的抗原特异性T细胞。本公开提供了用于制备可用于抗原特异性T细胞疗法(例如,个人或个性化T细胞疗法)的T细胞的组合物和方法。本文提供的T细胞组合物可以是个人抗原特异性T细胞疗法。

[0171] 本文提供了刺激T细胞的方法。例如,本文提供的方法可用来刺激抗原特异性T细胞。本文提供的方法可用来扩充或诱导抗原特异性T细胞。例如,本文提供的方法可用来扩充抗原特异性记忆T细胞。例如,本文提供的方法可用来诱导抗原特异性幼稚T细胞。例如,本文提供的方法可用来扩充抗原特异性$CD8^+$记忆T细胞。例如,本文提供的方法可用来诱导抗原特异性$CD8^+$幼稚T细胞。例如,本文提供的方法可用来扩充抗原特异性$CD4^+$记忆T细胞。例如,本文提供的方法可用来诱导抗原特异性$CD4^+$幼稚T细胞。本文还提供了包含抗原特异性T细胞的治疗组合物。例如,治疗组合物可包含抗原特异性记忆T细胞。例如,治疗组合物可包含抗原特异性幼稚T细胞。本文还提供了本文所述的治疗组合物的使用方法或使用其进行治疗的方法。

[0172] T细胞组合物

[0173] 本文提供了包含免疫细胞群体的组合物(例如药物组合物)。所述组合物可以包含至少一种包含T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞。所述组合物可以包含至少一种抗原特异性T细胞,所述抗原特异性T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体

(TCR)。

[0174] 在一些实施方案中,本文提供的组合物包含被APC如预负载抗原肽的APC刺激的T细胞。所述组合物可包含免疫细胞群体,该免疫细胞群体包含来自样品(例如生物样品)的T细胞,其中所述T细胞包含APC刺激的T细胞。在一些实施方案中,组合物包含已经与一种或多种细胞因子、生长因子或配体如与APC或T细胞的细胞表面受体结合的配体一起孵育的免疫细胞群体。此类细胞因子、生长因子和配体的非限制性实例包括但不限于GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40和聚I:C。在一些实施方案中,组合物包含已经与一种或多种APC或APC制品一起孵育的免疫细胞群体。例如,组合物可以包含已经与一种或多种细胞因子、生长因子和/或配体刺激的APC或细胞因子、生长因子和/或配体刺激的APC制品一起孵育的免疫细胞群体。例如,组合物可以包含已经与一种或多种细胞因子刺激的APC或细胞因子刺激的APC制品一起孵育的免疫细胞群体。例如,组合物可包含已经与一种或多种生长因子刺激的APC或生长因子刺激的APC制品一起孵育的免疫细胞群体。例如,组合物可包含已经与一种或多种配体刺激的APC或配体刺激的APC制品一起孵育的免疫细胞群体。

[0175] 在一些实施方案中,APC是自体APC、同种异体APC或人工APC。在一些实施方案中,APC包括树突细胞(DC)。在一些实施方案中,APC来源于$CD14^+$单核细胞。在一些实施方案中,APC可获自皮肤、脾脏、骨髓、胸腺、淋巴结、外周血或脐带血。在一些实施方案中,$CD14^+$单核细胞来自包含PBMC的来自受试者的生物样品。例如,可以从包含PBMC的来自受试者的生物样品中分离、富集或纯化$CD14^+$单核细胞。在一些实施方案中,用一种或多种细胞因子或生长因子刺激$CD14^+$单核细胞。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞因子或生长因子包括GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40、聚I:C或其组合。在一些实施方案中,$CD14^+$单核细胞来自包含PBMC的第二生物样品。

[0176] 在一些实施方案中,分离的$CD14^+$APC群体可以是富集的或基本上是富集的。在一些实施方案中,分离的$CD14^+$APC群体是至少30%、至少50%、至少75%或至少90%同质的。在一些实施方案中,分离的$CD14^+$APC群体是至少60%、至少75%或至少90%同质的。APC,如$CD14^+$APC,可以包括,例如,在培养中衍生自单核树突前体的APC,以及存在于诸如外周血、脐带血、皮肤、脾脏、骨髓、胸腺和淋巴结等组织中的内源衍生的APC。

[0177] 可以通过本发明另外提供的方法分离$CD14^+$APC和基本上富含$CD14^+$APC的细胞群体。该方法通常包括获得包括APC前体的细胞群体,将APC前体分化成未成熟或成熟的APC,并且还可以包括从分化的未成熟或成熟APC群体中分离$CD14^+$APC。

[0178] APC前体细胞可以通过本领域已知的方法获得。可以通过例如密度梯度分离、荧光激活细胞分选(FACS)、免疫细胞分离技术如淘选、补体裂解、玫瑰花结、磁性细胞分离技术、尼龙毛分离以及这类方法的组合来分离APC前体。免疫选择APC的方法包括,例如,使用针对与APC前体缔合的细胞表面标志物的抗体,例如偶联至基底的抗CD34和/或抗CD14抗体。

[0179] 也可以获得富集的APC前体群体。获得这类富集的前体群体的方法是本领域已知的。例如,可以通过选择性去除粘附在基底上的细胞从组织来源中分离出富集的APC前体群体。使用诸如骨髓或外周血的组织来源,可以使用商业处理的塑料基底(例如,珠或磁珠)从细胞制品中去除粘附的单核细胞,以获得非粘附性APC前体富集的群体。

[0180] 单核细胞APC前体也可以通过使用APC前体粘附基底从组织来源获得。例如,使通

过例如白细胞分离术分离的外周血白细胞与具有高表面积:体积比的单核APC前体粘附基底接触,并分离粘附的单核APC前体。在另外的实施方案中,偶联的基底可以是具有高表面:体积比的颗粒状或纤维状基底,例如微珠、微载体珠、丸粒、颗粒、粉末、毛细管、微孔膜等。此外,颗粒或纤维状基底可以是玻璃、聚苯乙烯、塑料、玻璃涂覆的聚苯乙烯微珠等。

[0181] 还可以在体外培养APC前体以供分化和/或扩充。APC前体的分化/扩充方法是本领域已知的。通常,可通过在至少一种诱导APC(例如树突细胞)分化/增殖的细胞因子的存在下培养前体来实现扩充。通常,这些细胞因子是粒细胞集落刺激因子(G-CSF)或粒细胞/噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。另外,其他试剂可用于抑制培养物中非APC细胞类型的增殖和/或成熟,从而进一步富集APC前体群体。通常,此类试剂包括细胞因子,例如,IL-13、IL-4或IL-15等。

[0182] 培养分离的APC前体群体并进行分化,以获得未成熟或成熟的APC。合适的组织培养基包括,例如但不限于AIM-V®、RPMI 1640、DMEM、X-VIVO15®等。组织培养基通常补充有氨基酸、维生素、二价阳离子和细胞因子,以促进前体向APC表型的分化。通常,促进分化的细胞因子是GM-CSF和/或IL-4。

[0183] 此外,在APC表型的扩充、分化和成熟期间,APC前体的培养物可以包括血浆以促进$CD14^+$APC的发展。典型的血浆浓度约为5%。另外,例如在通过粘附至基底而分离APC前体的情况下,在粘附步骤期间可在培养基中包含血浆,以促进培养早期的$CD14^+$表型。粘附过程中的典型血浆浓度约为1%或更高。

[0184] 单核细胞APC前体可以培养任何合适的时间。在某些实施方案中,用于使前体分化为未成熟APC的合适的培养时间可以是约1天至约10天,例如约4天至约7天。可以通过本领域技术人员已知的方法,例如通过存在或不存在细胞表面标志物(例如,$CD11c^+$、$CD83^{低}$、$CD86^{-/低}$、$HLA\text{-}DR^+$),来监测从前体分化未成熟APC。还可以在适当的组织培养基中培养未成熟的APC,以保持未成熟的APC处于进一步分化或抗原摄取、加工和呈递的状态。例如,未成熟的APC可以在GM-CSF和IL-4的存在下维持。

[0185] 从APC前体分化后,可以分离$CD14^+$细胞以获得分离的$CD14^+$APC群体。通常,在成熟之前从富集或基本富集的APC中分离$CD14^+$APC的情况下,对于未成熟的$CD14^+$APC而言,分离的群体将被富集或基本富集。通常,$CD14^+$APC的分离包括使要从中分离$CD14^+$细胞的细胞群体与CD14特异性探针接触。在一个示例性的实施方案中,使用直接缀合至荧光分子(例如,FITC或PE)的CD14特异性探针,或用对CD14为特异性的未标记抗体和对第一抗体为特异性的标记的第二抗体,通过FACS检测表达CD14的细胞。也可以通过FACS分选将$CD14^+$细胞与$CD14^{低}$和$CD14^-$细胞分离。可以参考例如PBMC来源的单核细胞上的CD14染色来确定$CD14^{高}$阳性的门控。通常,CD14特异性结合剂是,例如,抗CD14抗体(例如,其单克隆或抗原结合片段)。许多适用于本发明的抗CD14抗体是技术人员公知的,并且许多可以商业购得。

[0186] 在另一个实施方案中,将CD14特异性探针偶联至基底,并且通过亲和力选择分离$CD14^+$细胞。将包括$CD14^+$细胞的细胞群体暴露于偶联的基底,并使$CD14^+$细胞特异性粘附。然后从基底上洗去未粘附的$CD14^-$细胞,然后洗脱粘附的细胞以获得基本上富集$CD14^+$APC的分离的细胞群体。CD14特异性探针可以是,例如,抗CD14抗体。基底可以是例如可商购获得的组织培养板或珠子(例如,玻璃或磁珠)。使用基底偶联的表面标志物特异性的抗体来亲和分离细胞群体的方法是众所周知的。

[0187] 在培养期间,未成熟的APC(CD14⁻未成熟APC的分离群体或分离前的总未成熟APC)可以任选地暴露于预定的抗原。合适的预定抗原可包括希望对其进行T细胞调节的任何抗原。在一个实施方案中,未成熟的APC在前列腺特异性膜抗原(PSMA)的存在下培养,以用于癌症免疫治疗和/或肿瘤生长抑制。其他抗原可包括例如细菌细胞、病毒、部分纯化或纯化的细菌或病毒抗原、肿瘤细胞、肿瘤特异性或肿瘤相关抗原(例如,肿瘤细胞裂解物、肿瘤细胞膜制品、从肿瘤分离的抗原、融合蛋白、脂质体等)、在其表面表达抗原的重组细胞、自身抗原和其他任何抗原。任何抗原也可以作为肽或重组产生的蛋白质或其部分呈现。与抗原接触后,可以将细胞培养任何合适的时间,以允许抗原摄取和加工,以扩大抗原特异性APC群体等。

[0188] 例如,在一个实施方案中,可以在抗原摄取后培养不成熟的APC,以促进不成熟的APC成熟为在MHC分子的环境中呈递抗原的成熟APC。APC成熟的方法是已知的。例如,可以通过在已知的成熟因子如细胞因子(例如,TNF-α、IL-1β或CD40配体)、细菌产物(例如,LPS或BCG)等的存在下培养来进行这样的成熟。可以通过本领域已知的方法,例如,通过测量细胞表面标志物的存在与否(例如CD83、CD86和MHC分子的上调)或使用例如寡核苷酸阵列检测成熟APC特异性mRNA或蛋白质的表达,来监测未成熟的APC向成熟APC的成熟。

[0189] 任选地,可以在合适的组织培养基中培养未成熟的APC以扩充细胞群体和/或保持未成熟的APC处于用于进一步分化或抗原摄取的状态。例如,可以在GM-CSF和IL-4的存在下维持和/或扩充未成熟的APC。也可以在抗炎分子例如抗炎细胞因子(例如IL-10和TGF-β)的存在下培养未成熟的APC,以抑制未成熟的APC成熟。

[0190] 在另一方面,分离的$CD14^+$APC群体富集成熟的APC。通过在如上所述的成熟因子(例如,细菌产物和/或促炎细胞因子)的存在下培养分离的$CD14^+$未成熟APC群体,从而诱导成熟,可以获得分离的$CD14^+$成熟APC群体。任选地,可以培养$CD14^+$和$CD14^-$未成熟APC(从APC前体分化)的混合群体,以诱导成熟,如上所述监测成熟阶段,并且在成熟APC富集的合适阶段,如上所述分离$CD14^+$细胞以获得富集或基本富集$CD14^+$成熟APC的分离的群体。

[0191] 根据本发明的又一个方面,例如,可以在暴露于前列腺癌抗原之前或之后通过冷冻保存来保存APC。可以使用的冷冻保存剂包括但不限于二甲基亚砜(DMSO)、甘油、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇、白蛋白、葡聚糖、蔗糖、乙二醇、异赤藓醇、D-核糖醇、D-甘露醇、D-山梨醇、肌醇、D-乳糖、氯化胆碱、氨基酸、甲醇、乙酰胺、单乙酸甘油酯和无机盐。受控的缓慢冷却速率可能是关键的。不同的冷冻保护剂和不同的细胞类型通常具有不同的最佳冷却速率。水变成冰的熔化阶段的热量通常应当是最小的。冷却过程可以通过使用例如可编程冷冻装置或甲醇浴程序来进行。可编程的冷冻设备允许确定最佳冷却速率,并有助于标准的可重复冷却。可编程控制速率的冷冻器,如Cryomed或Planar,允许将冷冻方案调整到所需的冷却速率曲线。

[0192] 在彻底冷冻后,APC可以迅速转移到长期低温储存容器中。在典型的实施方案中,可以将样品在液氮(-196℃)或其蒸气(-165℃)中低温存储。对于造血干细胞,特别是来自骨髓或外周血的造血干细胞的操作、冷冻保存和长期保存的考虑因素和程序,在很大程度上适用于本发明的APC。

[0193] 冷冻的细胞优选地快速解冻(例如在保持在37-41℃的水浴中),并在解冻后立即冷却。为了防止细胞在融化时结块,可能需要处理细胞。为了防止结块,可以使用各种程序,

包括但不限于在冷冻之前和/或之后添加DNA酶、低分子量葡聚糖和柠檬酸盐、羟乙基淀粉等。如果冷冻保护剂对人体有毒,则应在融化的APC进行治疗性使用之前将其去除。除去冷冻保护剂的一种方法是稀释至极微小的浓度。一旦冷冻的APC已经融化并回收,就可以如本文关于非冷冻的APC所述将它们用于激活T细胞。

[0194] 在一些实施方案中,组合物包含已经耗尽一种或多种类型的免疫细胞的免疫细胞群体。例如,组合物可以包含已经耗尽表达一种或多种蛋白质,例如一种或多种细胞表面受体的一种或多种类型的免疫细胞的免疫细胞群体。在一些实施方案中,组合物包含来自生物样品的免疫细胞群体,该生物样品包含至少一种抗原特异性T细胞,所述抗原特异性T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR),其中该群体中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的量与该生物样品中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的量成比例地不同。例如,组合物可包含来自生物样品的免疫细胞群体,该生物样品包含至少一种抗原特异性T细胞,所述抗原特异性T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR),其中该群体中表达CD14的免疫细胞的量与该生物样品中表达CD14的免疫细胞的量成比例地不同。例如,组合物可包含来自生物样品的免疫细胞群体,该生物样品包含至少一种抗原特异性T细胞,所述抗原特异性T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR),其中该群体中表达CD25的免疫细胞的量与该生物样品中表达CD25的免疫细胞的量成比例地不同。例如,组合物可包含来自生物样品的免疫细胞群体,该生物样品包含至少一种抗原特异性T细胞,所述抗原特异性T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR),其中该群体中表达CD14和CD25的免疫细胞的量与该生物样品中表达CD14和CD25的免疫细胞的量成比例地不同。例如,组合物可包含来自生物样品的免疫细胞群体,其中该群体中表达CD14和CD25的免疫细胞的量成比例地小于在该生物样品中表达CD14和CD25的免疫细胞的量。

[0195] 在一些实施方案中,组合物包含免疫细胞群体,该免疫细胞群体包含来自样品(例如,生物样品)的T细胞,其中所述T细胞包含APC刺激的T细胞,其中APC是FLT3L刺激的APC。例如,组合物可包含免疫细胞群体,该免疫细胞群体包含来自样品(例如,生物样品)的T细胞,其中所述T细胞包括APC刺激的T细胞和包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞,其中APC是FLT3L刺激的APC。在一些实施方案中,所述组合物包含免疫细胞群体,该免疫细胞群体包含来自生物样品的T细胞,其中所述T细胞包含至少一种抗原特异性T细胞,所述抗原特异性T细胞是APC刺激的T细胞并且包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR),其中APC是FLT3L刺激的APC,并且其中该群体中抗原特异性T细胞的量成比例地大于该生物样品中抗原特异性T细胞的量。在一些实施方案中,T细胞包含多个抗原特异性T细胞,所述抗原特异性T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)。在一些实施方案中,所述T细胞包含多个抗原特异性T细胞,所述抗原特异性T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的多个T细胞受体(TCR)。在一些实施方案中,所述T细胞包含多个抗原特异性T细胞,所述抗原特异性T细胞包含对多个抗原肽序列具有特异性的多种T细胞受体(TCR)。例如,该组合物中的多个抗原特异性T细胞可包含10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、1000、1500、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10,000、11,000、12,000、13,000、14,000、15,000、16,000、17,000、18,000、19,000、20,000、25,

000、30,000、35,000、40,000、45,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、100,000、200,000、300,000、400,000、500,000、600,000、700,000、800,000、900,000、$1x10^6$、$2x10^6$、$3x10^6$、$4x10^6$、$5x10^6$、$6x10^6$、$7x10^6$、$8x10^6$、$9x10^6$、$1x10^7$、$2x10^7$、$3x10^7$、$4x10^7$、$5x10^7$、$6x10^7$、$7x10^7$、$8x10^7$、$9x10^7$、$1x10^8$、$2x10^8$、$3x10^8$、$4x10^8$、$5x10^8$、$6x10^8$、$7x10^8$、$8x10^8$、$9x10^8$、$1x10^9$、$2x10^9$、$3x10^9$、$4x10^9$、$5x10^9$、$6x10^9$、$7x10^9$、$8x10^9$、$9x10^9$、$1x10^{10}$、$2x10^{10}$、$3x10^{10}$、$4x10^{10}$、$5x10^{10}$、$6x10^{10}$、$7x10^{10}$、$8x10^{10}$、$9x10^{10}$、$1x10^{11}$、$2x10^{11}$、$3x10^{11}$、$4x10^{11}$、$5x10^{11}$、$6x10^{11}$、$7x10^{11}$、$8x10^{11}$、$9x10^{11}$、$1x10^{12}$、$2x10^{12}$、$3x10^{12}$、$4x10^{12}$、$5x10^{12}$、$6x10^{12}$、$7x10^{12}$、$8x10^{12}$或$9x10^{12}$个抗原特异性T细胞。例如,对至少一个抗原肽序列具有特异性的所述多个T细胞受体(TCR)可包含10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900或1000个不同的对所述至少一个抗原肽序列具有特异性的TCR。例如,对多个抗原肽序列具有特异性的所述多个T细胞受体(TCR)可包含10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900或1000个不同的对所述多个抗原肽序列具有特异性的TCR。例如,所述多个抗原肽序列可包含10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900或1000个不同的抗原肽序列。

[0196] 在一些实施方案中,组合物或药物组合物包含来自生物样品的免疫细胞群体。在一些实施方案中,该免疫细胞包含多个抗原特异性T细胞。在一些实施方案中,每个抗原特异性T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)。在一些实施方案中,组合物或药物组合物包含免疫细胞群体,其中该群体中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的量小于生物样品中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的量。在一些实施方案中,药物组合物进一步包含药学上可接受的赋形剂。

[0197] 在一些实施方案中,本文提供的药物组合物包含:来自生物样品的免疫细胞群体和药学上可接受的赋形剂,该生物样品包含至少一种抗原特异性T细胞,该抗原特异性T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR);其中该群体中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的量与该生物样品中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的数量成比例地不同。

[0198] 在一些实施方案中,本文提供的组合物包含来自生物样品的免疫细胞群体,其中该群体中表达CD14和CD25的免疫细胞的量成比例地小于该生物样品中表达CD14和CD25的免疫细胞的量。

[0199] 在一些实施方案中,本文提供的药物组合物包含:免疫细胞群体和药学上可接受的赋形剂,该免疫细胞群体包含来自生物样品的T细胞,其中所述T细胞包含至少一种抗原特异性T细胞,所述抗原特异性T细胞是APC刺激的T细胞并且包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR),其中该APC是FLT3L刺激的APC。在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞包含至少一种APC刺激的T细胞。在一些实施方案中,所述群体中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的量成比例地小于所述生物样品中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的量。在一些实施方案中,所述群体中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的量成比例地大于所述生物样品中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的量。

[0200] 在一些实施方案中,药物组合物包含$CD4^+$T细胞,其中$CD4^+$T细胞占抗原特异性T细胞的百分比为至少约2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或

90％。在一些实施方案中,药物组合物包含幼稚$CD8^+$T细胞,其中幼稚$CD8^+$T细胞占抗原特异性T细胞的百分比为至少约0.2％、0.5％、1％、2％、3％、4％、5％、10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％或90％。在一些实施方案中,药物组合物包含记忆$CD8^+$T细胞,其中记忆$CD8^+$T细胞占抗原特异性T细胞的百分比为至少约0.2％、0.5％、1％、2％、3％、4％、5％、10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％或90％。

[0201] 在一些实施方案中,药物组合物包含免疫细胞群体和药学上可接受的赋形剂,该免疫细胞群体包含来自生物样品的T细胞,其中所述T细胞包含APC刺激的T细胞和包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞,其中所述APC是FLT3L刺激的APC。

[0202] 在一些实施方案中,药物组合物包含免疫细胞群体和药学上可接受的赋形剂,该免疫细胞群体包含来自生物样品的T细胞,其中所述T细胞包含多种新抗原特异性T细胞,所述新抗原特异性T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR);其中T细胞中抗原特异性T细胞的百分比为至少约0.5％、1％、1.5％、2％、2.5％、3％、3.5％、4％、4.5％、5％、10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％或80％。

[0203] 在一些实施方案中,所述新抗原特异性T细胞包含APC刺激的T细胞。在一些实施方案中,群体中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的百分比小于生物样品中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的百分比。在一些实施方案中,所述生物样品来自受试者。在一些实施方案中,所述受试者是人。在一些实施方案中,所述受试者患有疾病或病症。在一些实施方案中,该疾病或病症为癌症。在一些实施方案中,新抗原特异性T细胞包含$CD4^+$和/或$CD8^+$T细胞。在一些实施方案中,新抗原特异性T细胞包含CD4富集的T细胞和/或CD8富集的T细胞。例如,可以从包含PBMC的来自受试者的生物样品中分离、富集或纯化$CD4^+$T细胞或$CD8^+$T细胞。在一些实施方案中,新抗原特异性T细胞是幼稚$CD4^+$和/或幼稚$CD8^+$T细胞。在一些实施方案中,幼稚T细胞的特征在于L-选择蛋白(CD62L)的表面表达。在一些实施方案中,幼稚T细胞的特征在于不存在一种或多种活化标志物CD25、CD44或CD69。在一些实施方案中,幼稚T细胞的特征在于不存在记忆CD45RO同种型。在一些实施方案中,幼稚T细胞的特征在于功能性IL-7受体的表达,该功能性IL-7受体由亚单位IL-7受体-α,CD127和共同的γ链,CD132组成。在一些实施方案中,所述至少一种新抗原肽序列包含选自以下的突变:(A)点突变,并且癌症新抗原肽以小于500nM的IC_{50}和比相应野生型肽更大的亲和力结合受试者的HLA蛋白,(B)剪接位点突变,(C)移码突变,(D)通读突变,(E)基因融合突变,及其组合。在一些实施方案中,所述至少一个新抗原肽序列中的每一个与受试者表达的HLA等位基因所编码的蛋白质结合。在一些实施方案中,所述至少一个新抗原肽序列中的每一个包含在受试者的非癌细胞中不存在的突变。在一些实施方案中,所述至少一个新抗原肽序列中的每一个由受试者的癌细胞的表达基因编码。

[0204] 在一些实施方案中,所述至少一个新抗原肽序列中的一个或多个具有8-50个天然存在的氨基酸的长度。在一些实施方案中,所述至少一个新抗原肽序列包含多个新抗原肽序列。在一些实施方案中,所述多个新抗原肽序列包含2-50、3-50、4-50、5-50、6-50、7-50、8-50、9-50或10-50个新抗原肽序列。

[0205] 在一些实施方案中,APC是一种或多种APC制品。在一些实施方案中,APC包括负载有一种或多种新抗原肽的APC,所述一种或多种新抗原肽包含所述至少一种新抗原肽序列

中的一种或多种。在一些实施方案中,APC是自体APC或同种异体APC。

[0206] 在一些实施方案中,APC包括树突细胞(DC)。在一些实施方案中,APC来源于$CD14^+$单核细胞。在一些实施方案中,$CD14^+$单核细胞从包含PBMC的来自受试者的生物样品中富集。例如,可以从包含PBMC的来自受试者的生物样品中分离、富集或纯化$CD14^+$。

[0207] 在一些实施方案中,用一种或多种细胞因子或生长因子刺激$CD14^+$单核细胞。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞因子或生长因子包括GM-CSF、IL-4、FLT3L或其组合。在一些实施方案中,$CD14^+$单核细胞来自包含PBMC的第二生物样品。在一些实施方案中,第二生物样品来自同一受试者。

[0208] 在一些实施方案中,所述生物样品包含外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施方案中,所述组合物中所述至少一种抗原特异性T细胞的百分比是总T细胞或总免疫细胞的至少约0.00001%、0.00002%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在一些实施方案中,所述组合物中至少一种抗原特异性$CD8^+$T细胞的百分比是总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至少约0.00001%、0.00002%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在一些实施方案中,所述组合物中至少一种抗原特异性$CD4^+$T细胞的百分比是总CD4+T细胞、总CD8+T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至少约0.00001%、0.00002%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在一些实施方案中,所述生物样品中所述至少一种抗原特异性T细胞的百分比是总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至多约0.00001%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%或0.5%。在一些实施方案中,所述生物样品中所述至少一种抗原特异性$CD8^+$T细胞的百分比是总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至多约0.00001%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%或0.5%。在一些实施方案中,所述生物样品中所述至少一种抗原特异性$CD4^+$T细胞的百分比是总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至多约0.00001%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%或0.5%。在一些实施方案中,所述生物样品中抗原特异性T细胞的百分比至多为约0.5%。在一些实施方案中,所述生物样品中新抗原特异性$CD8^+$T细胞的百分比至多为约0.5%。在一些实施方案中,所述生物样品中抗原特异性$CD4^+$T细胞的百分比至多为约0.5%。

[0209] 在一些实施方案中,药物组合物中抗原特异性T细胞的百分比为总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至少约0.00001%、0.00002%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、

35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在一些实施方案中,药物组合物中抗原特异性$CD8^+$T细胞的百分比为总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至少约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在一些实施方案中,药物组合物中抗原特异性幼稚$CD8^+$T细胞的百分比为总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至少约0.00001%、0.00002%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在一些实施方案中,药物组合物中抗原特异性记忆$CD8^+$T细胞的百分比为总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的0.00001%、0.00002%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在一些实施方案中,药物组合物中抗原特异性$CD4^+$T细胞的百分比为总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至少约0.00001%、0.00002%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。

[0210] 制备方法

[0211] 本文提供了抗原特异性T细胞的制备方法。本文提供了制备T细胞组合物如治疗性T细胞组合物的方法。例如,方法可以包括扩充或诱导抗原特异性T细胞。制备(例如,诱导或扩充)T细胞也可以指制备T细胞,并且广泛涵盖分离、刺激、培养、诱导和/或扩充任何类型的T细胞(例如,$CD4^+$T细胞和$CD8^+$T细胞)的程序。在第一方面,本文提供了一种制备至少一种包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法,该方法包括将APC与来自耗尽表达CD14和/或CD25的细胞的生物样品的免疫细胞群体一起孵育。

[0212] 在第二方面,本文提供了一种制备至少一种包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法,该方法包括将FMS样酪氨酸激酶3受体配体(FLT3L)刺激的APC与来自生物样品的免疫细胞群体一起孵育。

[0213] 在第三方面,本文提供了一种制备药物组合物的方法,该药物组合物包含至少一种包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞,所述方法包括:将FMS样酪氨酸激酶3受体配体(FLT3L)与来自生物样品的免疫细胞群体一起孵育第一时间段;之后将生物样品的至少一种T细胞与APC一起孵育。

[0214] 在第四方面,本文提供了一种制备至少一种包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法,该方法包括将来自生物样品的免疫细胞群体与一种或多种APC制品一起孵育一个或多个单独时间段,所述时间段是从所述免疫细胞群体与所述一种或多种APC制品中的第一APC制品孵育起不到28天,其中至少一种抗原特异性记忆T细胞被扩充,或者至少一种抗原特异性幼稚T细胞被诱导。

[0215] 在第五方面,本文提供了一种制备至少一种包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法,该方法包括将来自生物样品的免疫细胞群体与3个或更少的APC制品一起孵育3个或更少的时间段,其中至少一种抗原特异性记忆T细胞被扩充,或者至少一种抗原特异性幼稚T细胞被诱导。

[0216] 在一些实施方案中,制备包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法包括将来自生物样品的免疫细胞群体与一种或多种APC制品一起孵育一个或多个单独时间段,从而刺激T细胞成为抗原特异性T细胞,其中抗原特异性T细胞的百分比为总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至少约0.00001%、0.00002%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在一些实施方案中,制备包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法包括包括将来自生物样品的免疫细胞群体与3种或更少的APC制品一起孵育3个或更少的单独时间段,从而刺激T细胞成为抗原特异性T细胞。在一些实施方案中,制备包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法包括将来自生物样品的免疫细胞群体与2种或更少的APC制品一起孵育2个或更少的单独时间段,从而刺激T细胞成为抗原特异性T细胞。

[0217] 在一些实施方案中,方法包括:(a)从受试者获得生物样品,该生物样品包含至少一种抗原呈递细胞(APC);(b)从该生物样品富集表达CD14的细胞,从而获得$CD14^+$细胞富集的样品;(c)将所述$CD14^+$细胞富集的样品与至少一种细胞因子或生长因子一起孵育第一时间段;(d)将至少一种肽与(c)的$CD14^+$细胞富集的样品一起孵育第二时间段,从而获得APC肽负载的样品;(e)将APC肽负载的样品与一种或多种细胞因子或生长因子一起孵育第三时间段,从而获得成熟APC样品;(f)将所述成熟APC样品的APC与包含PBMC的CD14和/或CD25耗尽的样品一起孵育第四时间段;(g)将PBMC与成熟APC样品的APC一起孵育第五时间段;(h)将PBMC与成熟APC样品的APC一起孵育第六时间段;(i)将PBMC的至少一种T细胞施用于有需要的受试者。

[0218] 在一些实施方案中,方法包括:(a)从受试者获得生物样品,该生物样品包含至少一种APC和至少一种PBMC;(b)从生物样品中消耗表达CD14和/或CD25的细胞,从而获得CD14和/或CD25细胞耗尽的样品;(c)将CD14和/或CD25细胞耗尽的样品与FLT3L一起孵育第一时间段;(d)将至少一种肽与(c)的CD14和/或CD25细胞耗尽的样品一起孵育第二时间段,从而获得APC肽负载的样品;(e)将APC肽负载的样品与至少一种PBMC一起孵育第三时间段,从而获得第一刺激的PBMC样品;(f)将第一刺激的PBMC样品的PBMC与成熟APC样品的APC一起孵育第四时间段,从而获得第二刺激的T细胞样品;(g)将第二刺激的PBMC样品的PBMC与成熟APC样品的APC一起孵育第五时间段,从而获得第三刺激的PBMC样品;(h)将第三刺激的PBMC样品中的至少一种T细胞施用于有需要的受试者。

[0219] 在一些实施方案中,制备至少一种包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法包括将APC与来自耗尽表达CD14和/或CD25的细胞的生物样品的免疫细胞群体一起孵育。

[0220] 在一些实施方案中,本文提供了一种制备至少一种包含对至少一个抗原肽序列具

有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法,该方法包括将来自生物样品的免疫细胞群体与一种或多种APC制品一起孵育一个或多个单独时间段,所述时间段是从所述免疫细胞群体与所述一种或多种APC制品中的第一APC制品孵育起不到28天,其中至少一种抗原特异性记忆T细胞被扩充,或者至少一种抗原特异性幼稚T细胞被诱导。在一些实施方案中,本文提供了一种制备至少一种包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法,该方法包括将来自生物样品的免疫细胞群体与3种或更少的APC制品一起孵育3个或更少的单独时间段,其中至少一种抗原特异性记忆T细胞被扩充,或者至少一种抗原特异性幼稚T细胞被诱导。

[0221] 在一些实施方案中,制备包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法包括使免疫细胞(例如,PBMC)群体与APC接触。在一些实施方案中,制备包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法包括将免疫细胞(例如,PBMC)群体与APC一起孵育一段时间。在一些实施方案中,该免疫细胞群体来自生物样品。在一些实施方案中,该免疫细胞群体来自耗尽了表达CD14的细胞的样品(例如,生物样品)。在一些实施方案中,该免疫细胞群体来自耗尽了表达CD25的细胞的样品(例如,生物样品)。在一些实施方案中,免疫细胞群体来自耗尽了表达CD14的细胞和表达CD25的细胞的样品(例如,生物样品)。

[0222] 在一些实施方案中,制备至少一种包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法包括将FMS样酪氨酸激酶3受体配体(FLT3L)刺激的APC与来自生物样品的免疫细胞群体一起孵育。在一些实施方案中,本文提供了制备包含至少一种抗原特异性T细胞的药物组合物的方法,所述抗原特异性T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR),所述方法包括:将FMS样酪氨酸激酶3受体配体(FLT3L)与有来自生物样品的免疫细胞群体一起孵育第一时间段;之后将该生物样品的至少一种T细胞与APC一起孵育。

[0223] 在一些实施方案中,制备至少一种包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法包括使来自样品(例如,生物样品)的免疫细胞群体与FMS样酪氨酸激酶3受体配体(FLT3L)接触。在一些实施方案中,制备至少一种包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法包括使来自样品(例如,生物样品)的免疫细胞群体与FMS样酪氨酸激酶3受体配体(FLT3L)刺激的APC接触。在一些实施方案中,制备至少一种包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法包括将来自样品(例如,生物样品)的免疫细胞群体与FMS样酪氨酸激酶3受体配体(FLT3L)刺激的APC一起孵育。在一些实施方案中,制备包含至少一种抗原特异性T细胞(所述至少一种抗原特异性T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR))的药物组合物的方法包括将FMS样酪氨酸激酶3受体配体(FLT3L)与来自生物样品的免疫细胞群体一起孵育(例如一段时间);然后将该生物样品的T细胞与APC接触。在一些实施方案中,制备至少一种包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法包括使来自样品(例如,生物样品)的免疫细胞群体与一种或多种APC制品接触。在一些实施方案中,制备至少一种包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法包括将来自样品(例如,生物样品)的免疫细胞群体与一种或多种APC制品一起孵育一个或多个单独时间段。在一些实施方案中,

制备至少一种包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法包括将来自样品(例如,生物样品)的免疫细胞群体与一种或多种APC制品一起孵育1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个单独时间段。在一些实施方案中,从免疫细胞群体与所述一种或多种APC制品中的第一APC制品一起孵育起计算,所述一个或多个单独时间段少于28天。

[0224] 在一些实施方案中,制备包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法包括将免疫细胞群体与APC一起孵育一段时间,其中该免疫细胞群体来自包含PBMC的生物样品。在一些实施方案中,制备包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法包括将免疫细胞群体与APC一起孵育一段时间,其中该免疫细胞群体来自耗尽了表达CD14和/或CD25的细胞的生物样品。

[0225] 在一些实施方案中,制备包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法包括将来自生物样品的免疫细胞群体与FMS样酪氨酸激酶3受体配体(FLT3L)刺激的APC一起孵育一段时间。

[0226] 在一些实施方案中,制备包含抗原特异性T细胞(所述抗原特异性T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR))的药物组合物的方法包括将FMS样酪氨酸激酶3受体配体(FLT3L)与来自生物样品的免疫细胞群体一起孵育;然后将该生物样品的T细胞与APC接触。

[0227] 在一些实施方案中,制备包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法包括将来自生物样品的免疫细胞群体与一种或多种APC制品孵育一个或多个单独时间段,从而诱导或扩充抗原特异性T细胞,其中从免疫细胞群体与所述一种或多种APC制品中的第一APC制品一起孵育起计算,所述一个或多个单独时间段少于28天。在一些实施方案中,来自生物样品的免疫细胞群体与一种或多种APC制品孵育一个或多个单独时间段在含有IL-7、IL-15或其组合的介质中进行。在一些实施方案中,该介质进一步包含吲哚胺2,3-双加氧酶-1(IDO)抑制剂、抗PD-1抗体、IL-12或其组合。该IDO抑制剂可以是epacadostat、navoximod、1-甲基色氨酸或其组合。在一些实施方案中,IDO抑制剂可以增加抗原特异性$CD8^+$细胞的数目。在一些实施方案中,IDO抑制剂可以维持记忆$CD8^+$T细胞应答的功能谱。PD-1抗体可以增加抗原特异性记忆$CD8^+$T细胞应答的绝对数。PD-1抗体可以增加用这种抗体处理的细胞的增殖速率。IL-12的添加可以导致抗原特异性细胞的增加和/或$CD8^+$T细胞的频率增加。

[0228] 在一些实施方案中,制备包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法包括将来自生物样品的免疫细胞群体与一种或多种APC制品一起孵育一个或多个单独时间段,从而扩充或诱导抗原特异性T细胞,其中抗原特异性T细胞、抗原特异性$CD4^+$T细胞或抗原特异性$CD8^+$T细胞的百分比为总T细胞、总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总免疫细胞或总细胞的至少约0.00001%、0.00002%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。

[0229] 在一些实施方案中,制备包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法包括将来自生物样品的免疫细胞群体与3种或更少的APC制品一起孵育3个或更少的单独时间段,从而刺激T细胞成为抗原特异性T细胞。

[0230] 在一些实施方案中,免疫细胞群体来自耗尽了表达CD14和/或CD25的细胞的生物样品。在一些实施方案中,APC是FMS样酪氨酸激酶3受体配体(FLT3L)刺激的APC。在一些实施方案中,APC包含一种或多种APC制品。在一些实施方案中,APC制品包含3种或更少的APC制品。在一些实施方案中,将APC制品与免疫细胞在一个或多个单独时间段内顺序地孵育。

[0231] 在一些实施方案中,所述生物样品来自受试者。在一些实施方案中,所述受试者是人。例如,所述受试者可以是患者或供体。在一些实施方案中,所述受试者患有疾病或病症。在一些实施方案中,该疾病或病症为癌症。在一些实施方案中,所述抗原特异性T细胞包含$CD4^+$和/或$CD8^+$T细胞。在一些实施方案中,所述抗原特异性T细胞包含CD4富集的T细胞和/或CD8富集的T细胞。例如,可以从包含PBMC的来自受试者的生物样品中分离、富集或纯化$CD4^+$T细胞和/或$CD8^+$T细胞。在一些实施方案中,抗原特异性T细胞是幼稚$CD4^+$和/或幼稚$CD8^+$T细胞。在一些实施方案中,抗原特异性T细胞是记忆$CD4^+$和/或记忆$CD8^+$T细胞。

[0232] 在一些实施方案中,所述至少一种抗原肽序列包含选自以下的突变:(A)点突变,并且癌抗原肽以小于500nM的IC_{50}和比相应野生型肽更大的亲和力结合受试者的HLA蛋白,(B)剪接位点突变,(C)移码突变,(D)通读突变,(E)基因融合突变,及其组合。在一些实施方案中,所述至少一个抗原肽序列中的每一个与受试者表达的HLA等位基因所编码的蛋白质结合。在一些实施方案中,所述至少一个抗原肽序列中的每一个包含在受试者的非癌细胞中不存在的突变。在一些实施方案中,所述至少一个抗原肽序列中的每一个由受试者的癌细胞的表达基因编码。在一些实施方案中,所述至少一个抗原肽序列中的一个或多个具有8-50个天然存在的氨基酸的长度。在一些实施方案中,所述至少一个抗原肽序列包含多个抗原肽序列。在一些实施方案中,所述多个抗原肽序列包含2-50、3-50、4-50、5-50、6-50、7-50、8-50、9-50或10-50个抗原肽序列。

[0233] 在一些实施方案中,APC包括负载有一种或多种抗原肽的APC,所述一种或多种抗原肽包含至少一个抗原肽序列中的一个或多个。在一些实施方案中,APC是自体APC或同种异体APC。在一些实施方案中,APC包括树突细胞(DC)。

[0234] 在一些实施方案中,方法包括从生物样品中消耗表达CD14和/或CD25的细胞。在一些实施方案中,消耗$CD14^+$细胞包括使CD14结合剂与APC接触。在一些实施方案中,APC来源于$CD14^+$单核细胞。在一些实施方案中,APC从生物样品富集。例如,可以从包含PBMC的来自受试者的生物样品中分离、富集或纯化APC。

[0235] 在一些实施方案中,用一种或多种细胞因子或生长因子刺激APC。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞因子或生长因子包括GM-CSF、IL-4、FLT3L或其组合。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞因子或生长因子包括IL-4、GM-CSF、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7或其组合。

[0236] 在一些实施方案中,APC来自第二生物样品。在一些实施方案中,第二生物样品来自同一受试者。

[0237] 在一些实施方案中,所述生物样品包含外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施方案中,所述方法中抗原特异性T细胞的百分比为总T细胞或总免疫细胞的至少约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在一些实施方案中,该方法中抗原特异性T细胞的百分比为总T细胞或总免疫细胞的约0.1%至约5%、约5%至10%、约10%至15%、约15%至20%、约20%至25%、约25%至

30％、约30％至35％、约35％至约40％、约40％至约45％、约45％至约50％、约50％至约55％、约55％至约60％、约60％至65％或约65％至约70％。在一些实施方案中，该方法中抗原特异性$CD8^+$T细胞的百分比为总T细胞或总免疫细胞的至少约1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％、16％、17％、18％、19％或20％。在一些实施方案中，该方法中抗原特异性幼稚$CD8^+$T细胞的百分比为总T细胞或总免疫细胞的至少约1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％、16％、17％、18％、19％或20％。在一些实施方案中，该方法中抗原特异性记忆$CD8^+$T细胞的百分比为总T细胞或总免疫细胞的至少约1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％、16％、17％、18％、19％或20％。在一些实施方案中，该方法中抗原特异性$CD4^+$T细胞的百分比为总T细胞或总免疫细胞的至少约1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％、16％、17％、18％、19％或20％。在一些实施方案中，该方法中抗原特异性$CD4^+$T细胞的百分比为总T细胞或总免疫细胞的至少约1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％、16％、17％、18％、19％或20％。在一些实施方案中，生物样品中抗原特异性T的百分比为至多约0.5％、1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％、16％、17％、18％、19％或20％。在一些实施方案中，生物样品中抗原特异性$CD8^+$T细胞的百分比为至多约0.5％、1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％、16％、17％、18％、19％或20％。在一些实施方案中，生物样品中抗原特异性幼稚$CD8^+$T细胞的百分比为至多约0.5％、1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％、16％、17％、18％、19％或20％。在一些实施方案中，生物样品中抗原特异性记忆$CD8^+$T细胞的百分比为至多约0.5％、1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％、16％、17％、18％、19％或20％。在一些实施方案中，生物样品中抗原特异性$CD4^+$T细胞的百分比为至多约0.5％、1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％、16％、17％、18％、19％或20％。

[0238] 在一些实施方案中，方法包括用IL-7、IL-15或其组合刺激T细胞。在一些实施方案中，方法包括在IDO抑制剂、PD-1抗体或IL-12的存在下用IL-7、IL-15或其组合刺激T细胞。在一些实施方案中，该方法进一步包括将抗原特异性T细胞施用于受试者。

[0239] 在一些实施方案中，所述一个或多个时间段中的第一时间段为大约1、2、3、4、5、6、7、8或9天。

[0240] 在一些实施方案中，所述单独时间段的总时间段少于28天。在一些实施方案中，所述单独时间段的总时间段为20-27天。在一些实施方案中，所述单独时间段的总时间段为15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38或39天。

[0241] 在一些实施方案中，方法包括将APC制品的第一APC制品与T细胞一起孵育超过7天。在一些实施方案中，方法包括将APC制品的第一APC制品与T细胞一起孵育超过7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。在一些实施方案中，方法包括将APC制品的第一APC制品与T细胞一起孵育7-20、8-20、9-20、10-20、11-20或12-20天。在一些实施方案中，方法包括将APC制品的第一APC制品与T细胞一起孵育约10-15天。

[0242] 在一些实施方案中，方法包括将APC制品的第二APC制品与T细胞一起孵育5-9天。

在一些实施方案中,方法包括将APC制品的第二APC制品与T细胞一起孵育5、6、7、8或9天。

[0243] 在一些实施方案中,方法包括将APC制品的第三APC制品与T细胞一起孵育5-9天。在一些实施方案中,该方法包括将APC制品的第三APC制品与T细胞一起孵育5、6、7、8或9天。

[0244] 在一些实施方案中,方法包括将APC制品的第一APC制品与T细胞一起孵育约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22天,将APC制品的第二种APC制品与T细胞一起孵育约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22天,并将APC制品的第三种APC制品与T细胞一起孵育约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22天。

[0245] 在一些实施方案中,生物样品是从受试者新鲜获得的或是冷冻的样品。

[0246] 在一些实施方案中,方法包括将一种或多种APC制品与包含至少一种细胞因子或生长因子的第一介质一起孵育第一时间段。在一些实施方案中,第一时间段为至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或17或18天。在一些实施方案中,第一时间段不超过2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18天。在一些实施方案中,第一时间段是至少1、2、3、4、5、6、7、8或9天。在一些实施方案中,第一时间段不超过3、4、5、6、7、8、9或10天。在一些实施方案中,所述至少一种细胞因子或生长因子包括GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40、聚I:C或其任意组合。

[0247] 在一些实施方案中,方法包括将一种或多种APC制品与至少一种肽一起孵育第二时间段。在一些实施方案中,第二时间段不超过1小时。

[0248] 在一些实施方案中,方法包括将一种或多种APC制品与包含一种或多种细胞因子或生长因子的第二种介质一起孵育第三时间段,从而获得成熟的APC。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞因子或生长因子包括GM-CSF(粒细胞巨噬细胞集落刺激因子)、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7、IFN-α、R848(瑞喹莫德)、LPS、ss-rna40、聚I:C、CpG或其组合。在一些实施方案中,第三时间段不超过2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18天。在一些实施方案中,第三时间段是至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或17天。在一些实施方案中,第三时间段不超过2、3、4或5天。在一些实施方案中,第三时间段是至少1、2、3或4天。

[0249] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括在第三时间段之后且在第四时间段开始之前去除第二介质的一种或多种细胞因子或生长因子。

[0250] 在一些实施方案中,所述方法离体进行。

[0251] 在一些实施方案中,制备T细胞的方法包括从受试者获得包含APC的生物样品。在一些实施方案中,该方法包括从生物样品中富集$CD14^+$细胞,从而获得$CD14^+$富集的样品。在一些实施方案中,方法包括将$CD14^+$富集的样品与包含至少一种细胞因子或生长因子的第一介质一起孵育第一时间段。在一些实施方案中,方法包括将至少一种肽与$CD14^+$富集的样品一起孵育第二时间段,从而获得APC肽负载的样品。在一些实施方案中,方法包括将APC肽负载的样品与包含一种或多种细胞因子或生长因子的第二介质一起孵育第三时间段,从而获得成熟APC样品。在一些实施方案中,方法包括使成熟APC样品的APC与外周血单核细胞(PBMC)和包含至少一种细胞因子或生长因子的第三介质接触第四时间段。在一些实施方案中,方法包括将PBMC与成熟APC样品的APC一起孵育第五时间段。在一些实施方案中,方法包括将PBMC与成熟APC样品的APC一起孵育第六时间段。在一些实施方案中,方法包括将PBMC

的T细胞施用于需要其的受试者。

[0252] 在一些其他实施方案中,制备T细胞的方法包括从受试者获得包含APC的生物样品。在一些实施方案中,该方法包括从生物样品中富集$CD14^+$细胞,从而获得$CD14^+$富集的样品。在一些实施方案中,方法包括将$CD14^+$富集的样品与包含至少一种细胞因子或生长因子的第一介质一起孵育至少或至多或大约30、40或50分钟;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。

[0253] 在一些实施方案中,方法包括将至少一种肽与$CD14^+$富集的样品一起孵育至少或至多或大约30、40或50分钟;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天,从而获得APC肽负载的样品。在一些实施方案中,方法包括将APC肽负载的样品与包含一种或多种细胞因子或生长因子的介质一起孵育至少或最多或大约30、40或50分钟;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天,从而获得成熟APC样品。在一些实施方案中,方法包括使成熟APC的APC与PBMC和包含至少一种细胞因子或生长因子的介质接触至少或最多或大约30、40或50分钟;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。在一些实施方案中,一方法包括将PBMC与成熟APC样品的APC一起孵育至少或至多或大约30、40或50分钟;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。在一些实施方案中,方法包括将PBMC与成熟APC样品的APC一起孵育至少或至多或大约30、40或50分钟;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。在一些实施方案中,该方法包括将PBMC的T细胞施用于有需要的受试者。

[0254] 在一些实施方案中,方法包括:(a)从受试者获得生物样品,该生物样品包含至少一种抗原呈递细胞(APC);(b)从生物样品富集表达CD14的细胞,从而获得$CD14^+$细胞富集的样品;(c)将$CD14^+$细胞富集的样品与至少一种细胞因子或生长因子一起孵育第一时间段;(d)将至少一种肽与(c)的$CD14^+$细胞富集的样品一起孵育第二时间段,从而获得APC肽负载的样品;(e)将APC肽负载的样品与一种或多种细胞因子或生长因子一起孵育第三时间段,从而获得成熟APC样品;(f)将成熟APC样品的APC与包含PBMC的CD14和/或CD25耗尽的样品一起孵育第四时间段;(g)将PBMC与成熟APC样品的APC一起孵育第五时间段;(h)将PBMC与成熟APC样品的APC一起孵育第六时间段;(i)将PBMC的至少一种T细胞施用于有需要的受试者。在一些实施方案中,第一时间段是至少或至多或大约30、40或50分钟;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。在一些实施方案中,第二时间段是至少或至多或大约30、40或50分钟;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。在一些实施方案中,第三时间段是至少或至多或大约30、40或50分钟;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、

17、18、19或20天。在一些实施方案中,第四时间段是至少或至多或大约30、40或50分钟;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。在一些实施方案中,第五时间段是至少或至多或大约30、40或50分钟;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。

[0255] 在一些实施方案中,方法包括:(a)从受试者获得生物样品,该生物样品包含至少一种APC和至少一种PBMC;(b)从生物样品中消耗表达CD14和/或CD25和/或CD19的细胞,从而获得CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品;(c)将CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品与FLT3L一起孵育第一时间段;(d)将至少一种肽与(c)的CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品一起孵育第二时间段,从而获得APC肽负载的样品;(e)将APC肽负载的样品与至少一种PBMC一起孵育第三时间段,从而获得第一刺激的PBMC样品;(f)将第一刺激的PBMC样品的PBMC与成熟APC样品的APC一起孵育第四时间段,从而获得第二刺激的PBMC样品;(g)任选地,将第二刺激的PBMC样品的PBMC与成熟APC样品的APC一起孵育第五时间段,从而获得第三刺激的PBMC样品;(h)将第一、第二或第三刺激的PBMC样品中的至少一种T细胞施用于有需要的受试者。在一些实施方案中,第一时间段是至少或至多或大约30、40或50分钟;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。在一些实施方案中,第二时间段是至少或至多或大约30、40或50分钟;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。在一些实施方案中,第三时间段是至少或至多或大约30、40或50分钟;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。在一些实施方案中,第四时间段是至少或至多或大约30、40或50分钟;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。在一些实施方案中,第五时间段是至少或至多或大约30、40或50分钟;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。

[0256] 在一些其他实施方案中,制备T细胞的方法包括:(a)从受试者获得包含APC和T细胞的生物样品;(b)将生物样品与包含至少一种细胞因子或生长因子的第一介质一起孵育第一时间段;(c)将至少一种肽与(c)的生物样品一起孵育第二时间段,从而获得APC肽负载的样品;(d)将APC肽负载的样品与包含一种或多种细胞因子或生长因子的第二介质一起孵育第三时间段,从而获得成熟APC样品;(e)在第三时间段之后,将成熟APC样品与人血清一起孵育第四时间段;(f)将生物样品与一种或多种细胞因子一起孵育第五时间段;(g)将生物样品的T细胞施用于有需要的受试者。在一些实施方案中,至少一种细胞因子或生长因子包含FLT3L。在一些实施方案中,第一时间段为至少5小时、至少8小时、至少10小时、至少12小时、至少15小时、至少20小时、至少22小时、至少1天、至少2天、至少3天、至少4天或至少5天。在一些实施方案中,第二时间段为至少30分钟、40分钟、50分钟、1小时、2小时或3小时。在一些实施方案中,第三时间段为至少10小时、至少12小时、至少15小时、至少20小时、至少22小时、至少1天、至少2天、至少3天、至少4天或至少5天。在一些实施方案中,第四时间段是

约2、3或4天。在一些实施方案中,第五时间段是至少4、5、6、7、8、9、10、11或12天。在一些实施方案中,第一时间段是至少或至多或大约30、40或50分钟;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。在一些实施方案中,第二时间段至少或至多或大约30、40或50分钟;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。在一些实施方案中,第三时间段是至少或至多或大约30、40或50分钟;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。在一些实施方案中,第四时间段是至少或至多或大约30、40或50分钟;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。在一些实施方案中,第五时间段是至少或至多或大约30、40或50分钟;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。

[0257] 诱导或扩充的T细胞可包含各种类型的T细胞。在一些实施方案中,抗原特异性T细胞包含至少一种$CD4^+$T细胞。在一些实施方案中,抗原特异性T细胞包含至少一种$CD8^+$T细胞。在一些实施方案中,抗原特异性T细胞包含至少一种CD4富集的T细胞。在一些实施方案中,抗原特异性T细胞包含至少一种CD8富集的T细胞。在一些实施方案中,抗原特异性T细胞包含至少一种记忆T细胞。在一些实施方案中,抗原特异性T细胞包含至少一种幼稚T细胞。在一些实施方案中,抗原特异性T细胞包含至少一种记忆$CD4^+$T细胞。在一些实施方案中,抗原特异性T细胞包含至少一种幼稚$CD4^+$T细胞。在一些实施方案中,抗原特异性T细胞包含至少一种记忆$CD8^+$T细胞。在一些实施方案中,抗原特异性T细胞包含至少一种幼稚$CD8^+$T细胞。

[0258] 各种抗原肽可用于诱导或扩充T细胞。在一些实施方案中,肽包含选自以下的突变:(A)点突变,(B)剪接位点突变,(C)移码突变,(D)通读突变,(E)基因融合突变,及其组合。在一些实施方案中,肽包含点突变,并且以比相应野生型肽更大的亲和力结合受试者的HLA蛋白。在一些实施方案中,肽以小于500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nM或10nM的IC_{50}结合受试者的HLA蛋白。在一些实施方案中,肽以小于500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nM或10nM的IC_{50}或K_D结合受试者的HLA蛋白。在一些实施方案中,每个肽结合由受试者表达的HLA等位基因所编码的蛋白质。在一些实施方案中,诱导或扩充的抗原特异性T细胞的TCR以小于500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nM或10nM的IC_{50}或K_D结合肽-HLA复合物。在一些实施方案中,TCR以小于500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nM或10nM的IC_{50}或K_D结合肽-HLA复合物。在一些实施方案中,所述至少一个抗原肽序列中的每一个包含在受试者的非癌细胞中不存在的突变。在一些实施方案中,所述至少一个抗原肽序列中的每一个由受试者的癌细胞的基因或表达的基因编码。在一些实施方案中,肽的长度为至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1,000、1,500、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、7,500或10,000个或更多个天然存在的氨基酸。在一些实施方案中,肽结合由I类HLA等位基因编码的蛋白质,并且具有8-12个天然存在的氨基酸的长度。在一些实施方案中,肽结合由II类HLA等位基因编码的蛋白质,并且具有16-25个天然存在的氨基酸的长度。在一些实施方案中,肽包含多个肽。在一些实施方案中,所述多个肽包含至少2、

3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450或500个或更多个抗原肽。

[0259] 在各个实施方案中,APC用于刺激/诱导T细胞。在一些实施方案中,APC或APC制品的APC负载有一种或多种抗原肽。在一些实施方案中,APC或APC制品的APC是自体APC或同种异体APC。在一些实施方案中,APC或APC制品的APC包括树突细胞(DC)。在一些实施方案中,所述方法包括从生物样品中消耗表达CD14和/或CD25的细胞。在一些实施方案中,该方法包括从生物样品中消耗表达CD19的细胞。在一些实施方案中,消耗表达CD14和/或CD25的细胞包括将CD14和/或CD25结合剂与APC制品的APC或APC结合。在一些实施方案中,CD14和/或CD25结合剂是生物素化的。在一些实施方案中,消耗表达CD14和/或CD25的细胞包括将固体支持物上的抗生物素试剂与CD14和/或CD25结合剂结合。在一些实施方案中,将CD14和/或CD25结合剂连接至固体支持物。在一些实施方案中,消耗表达CD19的细胞包括将CD19结合剂与APC或APC制品的APC结合。在一些实施方案中,CD19结合剂是生物素化的。在一些实施方案中,消耗表达CD19的细胞包括将固体支持物上的抗生物素试剂与CD19结合剂结合。在一些实施方案中,CD19结合剂附着于固体支持物。在一些实施方案中,APC或APC制品的APC来源于$CD14^+$单核细胞。在一些实施方案中,APC或APC制品的APC是CD141富集的APC或CD141富集的树突细胞。

[0260] 在一些实施方案中,APC或APC制品中的APC是从生物样品富集的。在一些实施方案中,APC或APC制品中的APC用一种或多种细胞因子或生长因子进行刺激。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞因子或生长因子包括GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40、聚I:C或其组合。在一些实施方案中,APC或APC制品中的APC来自第二生物样品。在一些实施方案中,第二生物样品来自同一受试者。在一些实施方案中,所述生物样品包含外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施方案中,生物样品从受试者新鲜获得或是冷冻的样品。

[0261] 在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞的百分比是总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至少约0.00001%、0.00002%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在一些实施方案中,至少一种抗原特异性$CD8^+$T细胞的百分比是总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至少约0.00001%、0.00002%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在一些实施方案中,至少一种抗原特异性$CD4^+$T细胞的百分比是总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至少约0.00001%、0.00002%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。

[0262] 在一些实施方案中,所述生物样品中所述至少一种抗原特异性T细胞的百分比是

总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至多约0.00001％、0.00005％、0.0001％、0.0005％、0.001％、0.005％、0.01％、0.05％、0.1％、0.2％、0.3％、0.4％0.5％、0.6％、0.7％、0.8％、0.9％或1％。在一些实施方案中,所述生物样品中至少一种抗原特异性$CD8^+$T细胞的百分比是总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至多约0.00001％、0.00005％、0.0001％、0.0005％、0.001％、0.005％、0.01％、0.05％、0.1％、0.2％、0.3％、0.4％0.5％、0.6％、0.7％、0.8％、0.9％或1％。在一些实施方案中,所述生物样品中至少一种抗原特异性$CD4^+$T细胞的百分比是总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至多约0.00001％、0.00005％、0.0001％、0.0005％、0.001％、0.005％、0.01％、0.05％、0.1％、0.2％、0.3％、0.4％0.5％、0.6％、0.7％、0.8％、0.9％或1％。

[0263] 在一些实施方案中,方法进一步包括将所述至少一种抗原特异性T细胞中的一种或多种施用于受试者。在一些实施方案中,所述单独时间段的总时间段少于28天。在一些实施方案中,孵育包括将所述APC制品的APC制品与所述T细胞孵育超过7天。在一些实施方案中,孵育包括将所述APC制品的第一、第二、第三或第四APC制品与所述T细胞孵育超过7天。在一些实施方案中,所述方法包括将一种或多种APC制品中的APC与包含至少一种细胞因子或生长因子的第一介质一起孵育第一时间段。在一些实施方案中,第一时间段是至少或至多或大约30、40或50分钟;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。在一些实施方案中,所述至少一种细胞因子或生长因子包括GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40、聚I:C或其任意组合。在一些实施方案中,所述方法包括将一种或多种APC制品与至少一种肽一起孵育第二时间段。在一些实施方案中,第二时间段是至少或至多或大约30、40或50分钟;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。在一些实施方案中,所述方法包括将一种或多种APC中的APC与包含一种或多种细胞因子或生长因子的第二介质一起孵育第三时间段,从而获得成熟APC。在一些实施方案中,第三时间段是至少或至多或大约30、40或50分钟;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞因子或生长因子包括GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40、聚I:C或其组合。在一些实施方案中,所述方法进一步包括在所述第三时间段之后且开始所述第四时间段之前去除所述第二介质的所述一种或多种细胞因子或生长因子。在一些实施方案中,第四时间段是至少或至多或大约30、40或50分钟;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时;或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。在一些实施方案中,所述抗原是新抗原、肿瘤相关抗原、病毒抗原、次要组织相容性抗原或其组合。在一些实施方案中,所述方法离体进行。在一些实施方案中,所述至少一种抗原特异性T细胞包含多个抗原特异性T细胞。

[0264] 抗原呈递细胞(APC)及其制备方法

[0265] 在一些实施方案中,方法包括用抗原呈递细胞(APC)诱导或刺激或扩充T细胞。在接触T细胞之前,可以将抗原肽预装载到APC中。在一些实施方案中,扩充或诱导抗原特异性T细胞的方法包括用APC刺激包含T细胞的免疫细胞群体。在一些实施方案中,免疫细胞群体

来自耗尽了表达CD14和/或CD25的细胞的生物样品。在一些实施方案中,APC是FLT3L刺激的APC。在一些实施方案中,所述APC包含一种或多种APC制品。在一些实施方案中,所述一种或多种APC制品中的至少一种包含FLT3L刺激的APC。在一些实施方案中,所述一种或多种APC制品包含3种或更少的APC制品。在一些实施方案中,将一种或多种APC制品与免疫细胞在一个或多个单独时间段内顺序地孵育。

[0266] 抗原呈递细胞(APC)在其细胞表面上与MHC分子结合呈递蛋白质抗原的肽片段。呈递的肽与MHC分子相缔合,作为APC细胞表面上的肽-MHC复合物(pMHC)。肽-MHC复合物的加工和呈递可能涉及一系列连续阶段,包括:蛋白酶介导的蛋白质消化;由与抗原加工(TAP)相关的转运蛋白介导的肽转运到内质网(ER)中;用新合成的MHC分子形成肽-MHC I分子;和肽-MHC分子转运到细胞表面。

[0267] 一些APC可激活抗原特异性T细胞。例如,包含与pMHC相互作用的T细胞受体(TCR)的T细胞可在形成TCR-pMHC时被激活、刺激、诱导或扩充。在一些实施方案中,抗原呈递细胞的MHC(例如,I类MHC或II类MHC)可以负载有肽,并通过将编码抗原肽或包含待呈递的肽序列的多肽核酸(例如,RNA)引入APC中来由APC呈递。

[0268] 从生物学的角度来看,为了使体细胞突变产生免疫应答,需要满足几个条件:包含该突变的等位基因应在细胞中表达,该突变应在蛋白质编码区内并且非同义,翻译的蛋白质应与被蛋白酶体或其他细胞蛋白质降解途径裂解,并且包含突变的表位应由MHC复合物呈递,呈递的表位应被TCR识别,最后,TCR-pMHC复合物应启动信号级联,该级联激活T细胞。

[0269] 单核细胞可以在血液中循环,然后进入组织,在那里它们可以分化为巨噬细胞和树突细胞。典型的单核细胞通常以CD14细胞表面受体的高水平表达为特征。单核细胞和B细胞可能是有能力的APC,尽管它们的抗原呈递能力似乎仅限于先前致敏的T细胞的重新激活。这些细胞类型可能无法直接激活功能上幼稚的或未引发的T细胞群体。专职抗原呈递细胞通过吞噬作用或通过受体介导的内吞作用非常有效地内化抗原,随后在其膜上展示与MHC分子结合的抗原片段。T细胞识别抗原呈递细胞膜上的抗原-MHC分子复合物并与其相互作用。随后由抗原呈递细胞产生其他共刺激信号,从而导致T细胞的活化。共刺激分子的表达是专职抗原呈递细胞的典型特征。

[0270] 专职抗原呈递细胞可以通过吞噬作用或通过受体介导的内吞作用非常有效地内化抗原,随后在其膜上展示与MHC分子结合的抗原片段。T细胞可以识别APC膜上的抗原-MHC分子复合物并与其相互作用。随后APC可以产生另外的共刺激信号,从而导致T细胞的活化。共刺激分子的表达可以是专职抗原呈递细胞的定义性特征。专职APC的示例可以包括但不限于树突细胞(DC)、巨噬细胞和B细胞。专职APC可能表达高水平的MHC II类、ICAM-1和B7-2。

[0271] 专职抗原呈递细胞的主要类型之一是树突细胞,其具有最广泛的抗原呈递范围。专职抗原呈递细胞的其他主要类型包括巨噬细胞、B细胞和某些活化的上皮细胞。树突细胞是经由MHC II类和I类抗原呈递途径将抗原(例如,外周组织中捕获的抗原)呈递给T细胞的白细胞群体。树突细胞能够激活幼稚的和先前已引发的T细胞(例如记忆T细胞)。树突细胞(DC)可以是经由MHC I类和II类抗原呈递途径将外周组织中捕获的抗原呈递给T细胞的白细胞群体。树突细胞可以是免疫应答的有效诱导物,并且这些细胞的活化可以是诱导抗肿瘤免疫的关键步骤。树突细胞是免疫应答的有效诱导物,并且这些细胞的活化是诱导抗肿

瘤免疫的关键步骤。

[0272] 树突细胞可以分类为“未成熟的”和“成熟的”细胞,其可以用作区分两种充分表征的表型的简单方法。然而,这种命名法不应被解释为排除所有可能的中间分化阶段。未成熟的树突细胞可以被表征为具有高抗原摄取和加工能力的抗原呈递细胞,其与Fcγ受体和甘露糖受体的高表达相关。成熟表型的特征通常可以是这些标志物的较低表达以及负责T细胞活化的细胞表面分子如I类和II类MHC、粘附分子(例如,CD54和CD11)以及共刺激分子(例如,CD40、CD80、CD86和4-1BB)的高表达。成熟的树突细胞可以是$CD11b^+$、$CD11c^+$、$HLA\text{-}DR^+$、$CD80^+$、$CD86^+$、$CD54^+$、$CD3^-$、$CD19^-$、$CD14^-$、$CD141^+$(BDCA-3)和/或$CD1a^+$。树突细胞成熟可以被称为树突细胞活化的状态,在该状态下,这类抗原呈递树突细胞导致T细胞引发,而未成熟树突细胞的呈递导致耐受。树突细胞成熟可以由通过以下物质检测的具有具有微生物特征的生物分子引起:先天受体(例如细菌DNA、病毒RNA、内毒素等)、促炎性细胞因子(例如TNF、白介素和干扰素)、CD40L对树突细胞表面上CD40的连接,以及从经历细胞死亡的细胞中释放的物质。可以诱导树突细胞成熟的细胞因子的其他非限制性实例包括IL-4、GM-CSF、TNF-α、IL-1β、PGE1和IL-6。例如,树突细胞可以通过在体外用细胞因子如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和肿瘤坏死因子α(TNF-α)培养骨髓细胞而得到。例如,树突细胞可以来源于从PBMC分离的$CD14^+$单核细胞。可用于将单核细胞衍生为树突细胞的细胞因子或生长因子包括但不限于GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40和聚I:C。

[0273] 通常,非专职抗原呈递细胞不组成型表达MHC II类蛋白。MHC II类蛋白通常仅在通过某些细胞因子如IFN-γ刺激非专职抗原呈递细胞时表达。

[0274] 抗原呈递细胞(APC)的来源通常可以是组织来源,其包括能够在体外表达和呈递抗原肽的APC或APC前体。在一些实施方案中,当负载有靶RNA和/或用必要的细胞因子或因子处理时,APC能够增殖并变成专职的APC。

[0275] 在一个方面,APC前体细胞能够在体外增殖并成熟为树突细胞(DC)。尽管可以使用许多组织来源,但是典型的组织来源可以包括脾脏、胸腺、组织活检、肿瘤、输入淋巴、淋巴结、骨髓、单采血液分离术或白细胞分离产品和/或外周血。在某些实施方案中,单采血液制品、骨髓和外周血可以是来源。也富含生长因子的胎儿组织、胎儿或脐带血也可以用作获得APC和/或前体APC的血液来源。前体细胞的实例包括但不限于胚胎干细胞、$CD34^+$细胞、单核细胞祖细胞、单核细胞和前B细胞。例如,APC可以来源于包含单核细胞或$CD34^+$细胞的前体细胞。

[0276] 在一个方面,APC和/或前体APC的来源可以是单采血液分离术或白细胞分离产品。可以使用本领域已知的单采血液分离术程序收集细胞(例如Bishop等人,Blood,vol.83,No.2,pp.610-616(1994))。单采血液分离产品通常可含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞和血小板。在一个实施方案中,可以洗涤通过单采血液成分术收集的细胞以去除血浆部分并将细胞置于合适的缓冲液或培养基中,以用于随后的处理步骤。在本发明的另一个实施方案中,可以用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤细胞。在替代的实施方案中,洗涤溶液可能缺少钙,并且可能缺少镁,或者可能缺少许多(即便不是全部)二价阳离子。洗涤步骤可以通过本领域技术人员已知的方法来完成,例如通过使用半自动的“流通式”离心机。洗涤后,可将细胞重悬于多种生物相容性缓冲液,例如无Ca^{2+}、无

Mg^{2+}的PBS中。或者,可以去除单采样品中的不需要的组分,并将细胞直接重悬于培养基中。

[0277] APC可以从多种来源制备,包括人类和非人灵长类、其他哺乳动物和脊椎动物。在某些实施方案中,APC可以从人类或非人脊椎动物的血液制备。也可以从丰富的白细胞群体中分离APC。白细胞群体可以通过本领域技术人员已知的方法制备。这样的方法通常包括收集肝素化血液、单采血液分离术或白细胞去除术、血沉棕黄层的制备、玫瑰花结、离心、密度梯度离心(例如,使用Ficoll、硅胶和蔗糖)、差异裂解非白细胞和过滤。也可以通过从受试者收集血液,除纤以去除血小板并溶解红细胞来制备白细胞群体。白细胞群体可任选地富集单核树突细胞前体。

[0278] 根据白细胞富集群体的所需用途,可以从多种受试者中获得血细胞群体。该受试者可以是健康受试者。或者,可以从需要免疫刺激的受试者(例如,癌症患者或其他免疫刺激对其有益的患者)获得血细胞。同样,可从需要免疫抑制的受试者,例如患有自身免疫性疾病(例如类风湿性关节炎、糖尿病、狼疮、多发性硬化等)的患者获得血细胞。也可以从HLA匹配的健康个体获得白细胞群体。

[0279] 当血液用作APC的来源时,可以使用维持其活力的常规方法获得血液白细胞。根据本发明的在一个方面,可以将血液稀释到可以包含或可以不包含肝素或其他合适的抗凝剂的介质中。血液与介质的体积大约为1比1。可以通过在4℃下以大约1,000rpm(150g)在介质中离心血液来浓缩细胞。可以通过将细胞重悬于本领域已知的任何会溶解红细胞的溶液中,从而消除血小板和红细胞,例如氯化铵。例如,混合物可以是体积比约为1:1的介质和氯化铵。可以通过离心浓缩细胞,并在所需溶液中洗涤,直到获得基本不含血小板和红细胞的白细胞群体。组织培养中常用的任何等渗溶液都可以用作从血小板和红细胞中分离白细胞的介质。这样的等渗溶液的例子可以是磷酸盐缓冲盐水、Hanks平衡盐溶液和完全生长培养基。APC和/或APC前体细胞也可以通过淘洗来纯化。

[0280] 在一个实施方案中,APC和/或前体APC的分离可以通过以下方式进行:将ficoll处理的全血或单采处理的外周血与一种或多种无关或非抗体偶联的顺磁性颗粒(一批细胞约1小瓶珠子或4×10^9个珠子(一般约$5\times10_8$至约2×10^{10}个细胞)在22至37℃的温度下预孵育约30分钟至2小时,然后磁性去除附着或吞噬顺磁性颗粒的细胞。可以使用本领域可用的标准方法进行这种分离。例如,可以使用任何磁分离方法,包括各种可商购的方法(例如,DYNAL®Magnetic Particle Concentrator(DYNAL MPC®))。可以通过本领域普通技术人员已知的多种方法来监测分离的证实,包括在所述分离之前和之后对细胞进行流式细胞术分析。

[0281] 可以在适当培养容器或器皿中合适的培养基中培养APC以形成初级培养物。在某些实施方案中,培养基可以补充一种或多种细胞因子。合适的培养容器或器皿可以是任何具有组织培养相容表面的容器。实例包括各种用于组织培养的袋子、烧瓶、滚瓶、培养皿和多孔板。还可使用经过某种物质处理过的表面,该物质例如是胶原蛋白或聚L-赖氨酸,或对特定细胞类型具有特异性的抗体来促进细胞粘附的表面,前提是它们可以如下所述允许细胞的差异附着。表面也可以被化学处理,例如通过电离。可以以约10^5至10^7个细胞/cm^2的初始细胞密度接种细胞。在一个方面,可以以10^6个细胞/cm^2接种细胞。

[0282] 在一个实施方案中,使来自所选组织来源的原代培养物在湿度、CO_2和pH的标准组织培养条件下于约37℃孵育,直到细胞群体充分粘附至基底,以允许分离出非贴壁细胞。与

单核细胞相反,血液中一些不成熟的APC最初不粘附于塑料,特别是不成熟的DC,因此可以在过夜培养后分离前体。单核细胞和成纤维细胞可包含大多数粘附细胞,通常在约30分钟至约24小时内粘附于基底。在某些方面,非贴壁细胞可在约1至16小时之间与贴壁细胞分离。非贴壁细胞可在约1至2小时分离。不会去除大量贴壁细胞的任何方法均可用于将贴壁细胞与非贴壁细胞分离。在某些方面,可以通过简单的摇动或移液来去除细胞。在某些方面,移液可能是最优选的。

[0283] 可以将根据本发明的方法分离的组成前体APC的贴壁细胞(例如单核细胞)在湿度、CO_2和pH的标准组织培养条件下在约37℃下孵育,直到细胞群体达到未成熟的APC阶段。在某些方面,根据本公开,可以将粘附细胞一起孵育4小时至7天的时间。然而,本领域普通技术人员将容易地意识到,孵育时间和条件可以变化。取决于前体细胞的来源,未成熟的APC可以是$CD14^-$或$CD14^+$。不成熟的APC也可能表达CD1a,CD40,CD86,CD54和MHC II类的中间水平(可以通过流式细胞术分析将样品细胞上的标志物表达水平与MHC II类阴性细胞和已知表达高水平MHC II类的细胞上的表达水平进行比较)。未成熟的APC通常不表达CCR7。

[0284] 在本公开的某些方面,不必从APC分离T细胞。例如,在一个实施方案中,包含APC和T细胞的PBMC可以如本文所述暴露于抗原,并且所得的抗原特异性T细胞如本文所述进一步扩充。

[0285] 在本发明的某些方面,不需要本文所述的APC或T细胞来源于自体来源。因此,APC和T细胞可获自匹配或未匹配的供体,或获自细胞系、T细胞系或体外生长的其他细胞。匹配单倍型的方法是本领域已知的。此外,可以从异种来源获得APC和T细胞或其上清液,例如,可以使用小鼠、大鼠、非人灵长类动物和猪细胞。

[0286] APC的合适制品包括例如树突细胞和单核细胞。在其他实施方案中,APC可以是活化的非标称APC,例如B细胞、细胞或上皮或内皮细胞。APC可以是不成熟的或成熟的。APC和T细胞通常共培养约6至约48小时,尽管更长和更短的时间在本发明的范围内。共培养通常可以进行足够的时间以激活T细胞,但短于分化和/或成熟大量未成熟APC或APC前体所需的时间。

[0287] 在某些实施方案中,单核树突细胞前体可以例如通过使富集的白细胞或单核细胞与单核树突细胞前体粘附基底接触而分离。简而言之,当富集的白细胞或单核细胞群体与基底接触时,细胞群体中的单核树突细胞前体或单核细胞可以粘附于基底。其他白细胞可表现出与基底的降低的结合亲和力,从而使单核树突细胞前体优先富集在基底表面上。合适的基底包括颗粒状基底,例如玻璃颗粒、塑料颗粒、玻璃涂覆的塑料颗粒、玻璃涂覆的聚苯乙烯颗粒、微毛细管和微绒毛膜。可以任选地处理基底的表面以增强单核树突细胞前体对基底的粘附。基底的表面可以涂覆有例如蛋白质、细胞因子、血浆和/或单核细胞结合蛋白。在使富含白细胞或单核细胞的细胞群体与粘附单核树突细胞前体的基底接触后,单核树突细胞前体粘附至基底,从而在基底上形成包含单核树突细胞前体的复合物。单核树突细胞前体结合可以例如通过使用抗细胞表面标志物抗体(例如抗CD14抗体)的抗体检测、通过FACS正向和侧向散射分析等来监测。在一些实施方案中,白细胞群体可与基底接触约5至约300分钟,更通常约30至约120分钟。单核树突细胞前体复合物可任选地用合适的洗涤缓冲液洗涤以除去非特异性结合的白细胞。合适的洗涤缓冲液包括组织培养基、磷酸盐缓冲盐水、Dulbecco磷酸盐缓冲盐水等。培养基可以补充氨基酸、维生素和/或激素,以促进单核

树突细胞前体的活力和/或增殖。可以通过FACS对洗涤缓冲液的正向和侧向散射分析、通过对洗脱的细胞进行细胞表面标志物染色等方法来监测洗涤效果。通常,可以将复合物洗涤数次以除去非特异性结合的白细胞。粘附的单核树突细胞前体可以从基底上洗脱下来。例如,可以通过用含有0.4%EDTA或其他无毒螯合剂的磷酸盐缓冲盐水处理从基底上洗脱前体。单核树突细胞前体通常可在不使用胰蛋白酶或其他蛋白酶的情况下从基底上洗脱。

[0288] 在其他实施方案中,可以根据技术人员已知的其他方法分离树突细胞(例如,O'Doherty等人,J.Exp.Med.178:1067-76(1993);Young and Steinman,J.Exp.Med.171:1315-32(1990);Freudenthal and Steinman,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:7698-702(1990);Macatonia等人,Immunol.67:285-89(1989);Markowicz and Engleman,J.Clin.Invest.85:955-61(1990);美国专利5,994,126和5,851,756)。免疫选择树突细胞的方法包括,例如,使用针对与树突细胞前体关联的细胞表面标志物的抗体,例如与基质偶联的抗CD34和/或抗CD14抗体(例如,Bernhard等人,Cancer Res.55:1099-104(1995);Caux等人,Nature360:258-61(1992))或与完全分化的树突细胞相关的那些,如CD 11c、CD54、CD83、CD80和CD86。

[0289] 在其他实施方案中,APC可以是炎性或其他激活条件下的非标称APC。例如,非标称APC可以包括被干扰素-γ刺激的上皮细胞、T细胞、B细胞和/或被诱导APC活性的因子或条件激活的单核细胞。可以根据本领域已知的方法来制备这类非标称的APC。

[0290] 根据APC的类型,可以根据需要对APC进行培养、扩充、分化和/或成熟。可以在任何合适的培养容器,例如培养板、烧瓶、培养袋和生物反应器中培养APC。

[0291] 在某些实施方案中,可以在合适的培养基或生长培养基中培养APC,以维持和/或扩大制剂中APC的数目。可以根据分离的APC的类型选择培养基。例如,成熟的APC,例如成熟的树突细胞,可以在适合其维持和扩充的生长培养基中培养。培养基可以补充有氨基酸、维生素、抗生素、二价阳离子等。另外,细胞因子、生长因子和/或激素可包含在生长培养基中。例如,为了维持和/或扩充成熟的树突细胞,可以添加细胞因子,例如粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和/或白介素4(IL-4)。在其他实施方案中,可以培养和/或扩充未成熟的APC。未成熟的树突细胞可以保留摄取靶mRNA和加工新抗原的能力。在一些实施方案中,未成熟树突细胞可以在适于其维持和培养的培养基中培养。培养基可以补充有氨基酸、维生素、抗生素、二价阳离子等。另外,细胞因子、生长因子和/或激素可包含在生长培养基中。

[0292] 其他未成熟的APC可以类似地进行培养或扩充。未成熟的APC的制剂可以被成熟以形成成熟的APC。APC的成熟可以在暴露于抗原肽期间或之后发生。在某些实施方案中,未成熟树突细胞的制剂可以成熟。合适的成熟因子包括,例如,细胞因子TNF-α、细菌产物(例如,BCG)等。在另一个方面,分离的APC前体可用于制备未成熟APC的制品。APC前体可以进行培养、分化和/或成熟。在某些实施方案中,单核树突细胞前体可在补充有氨基酸、维生素、细胞因子和/或二价阳离子的合适培养基的存在下培养,以促进单核树突细胞前体向未成熟树突细胞的分化。在一些实施方案中,APC前体是从PBMC分离的。PBMC可以获自供体,例如人供体,并且可以新鲜使用或冷冻以备将来使用。在一些实施方案中,APC由一种或多种APC制品制备。在一些实施方案中,APC包括负载有一种或多种抗原肽的APC,所述一种或多种抗原肽包含至少一个抗原肽序列中的一个或多个。在一些实施方案中,APC是自体APC、同种异体APC或人工APC。

[0293] 在一些实施方案中,APC前体是单核细胞。在一些实施方案中,该单核细胞是$CD14^+$单核细胞。在一些实施方案中,通过抗CD14抗体分离单核细胞。在一些实施方案中,将分离的单核细胞以10^5至10^7个细胞/孔接种在2mL培养基中。在一些实施方案中,将分离的单核细胞以约3×10^6细胞/孔接种在2mL培养基中。在一些实施方案中,分离的单核细胞在含有细胞因子或生长因子的培养基中培养。在一些实施方案中,分离的单核细胞在含有GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40、聚I:C或其组合的培养基中培养。在一些实施方案中,分离的单核细胞在进行成熟之前培养至少2天、至少3天、至少4天、至少5天或至少6天。在一些实施方案中,单核细胞在培养基中离体衍生为树突细胞。在一些实施方案中,衍生的树突细胞进一步离体成熟并负载有抗原肽。在一些实施方案中,将衍生的树突细胞在含有一种或多种抗原肽的培养基中培养。在一些实施方案中,该抗原肽是新抗原肽。新抗原肽的实例包括但不限于HIV短肽、HIV长肽、先前鉴定的新抗原(PIN)短肽和PIN长肽。在一些实施方案中,将衍生的树突细胞在含有一种或多种新抗原肽的培养基中培养至少30分钟、至少50分钟、至少1小时或至少2小时。在一些实施方案中,在与抗原肽孵育之后,将衍生的树突细胞与一种或多种细胞因子进一步孵育。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞因子包括GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40、聚I:C或其组合。

[0294] 在一些实施方案中,完全PBMC用于制备APC,其可以进一步用于刺激T细胞。在一些实施方案中,将PBMC在含有FMS样酪氨酸激酶3受体配体(FLT3L)的培养基中培养。在一些实施方案中,消耗PBMC的T调节细胞(T_{reg}细胞),然后在含有FLT3L的培养基中培养。在一些实施方案中,消耗PBMC的$CD14^+$细胞,然后在含有FLT3L的培养基中培养。在一些实施方案中,消耗PBMC的$CD25^+$细胞,然后在含有FLT3L的培养基中培养。在一些实施方案中,消耗PBMC的$CD25^+$和$CD14^+$细胞,然后在含有FLT3L的培养基中培养。在一些实施方案中,消耗PBMC的$CD25^+$、$CD14^+$细胞和CD19+细胞,然后在含有FLT3L的培养基中培养。在一些实施方案中,将PBMC在含有FLT3L的培养基中培养,然后去除$CD14^+$细胞。在一些实施方案中,将PBMC在含有FLT3L的培养基中培养,然后去除$CD25^+$细胞。在一些实施方案中,将PBMC在含有FLT3L的培养基中培养,然后去除$CD14^+$细胞和$CD25^+$细胞。在一些实施方案中,分离的$CD14^+$单核细胞在含有FLT3L的培养基中培养。在一些实施方案中,在含有FLT3L的培养基中培养后,将PBMC(完全,$CD14^+$耗尽,$CD25^+$耗尽,$CD25^+$/$CD14^+$耗尽或$CD25^+$/$CD14^+$/$CD19^+$耗尽)或分离的$CD14^+$单核细胞在含有一种或多种抗原的培养基中培养。在一些实施方案中,PBMC或分离的$CD14^+$单核细胞在含有一种或多种成熟细胞因子的培养基中培养。成熟细胞因子的实例包括但不限于GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40、聚I:C或其组合。成熟的细胞因子可以以各种浓度加入细胞培养物或培养基中。在一些实施方案中,将成熟细胞因子以至少0.05ng/mL、0.1ng/mL、0.2ng/mL、0.3ng/mL、0.4ng/mL、0.5ng/mL、0.8ng/mL、1ng/mL、2ng/mL、3ng/mL、4ng/mL、5ng/mL、6ng/mL、7ng/mL、8ng/mL、9ng/mL、10ng/mL、12ng/mL、15ng/mL、18ng/mL或20ng/mL的终浓度加入细胞培养物或培养基中。在一些实施方案中,将成熟细胞因子以至少0.05μg/mL、0.1μg/mL、0.2μg/mL、0.3μg/mL、0.4μg/mL、0.5μg/mL、0.8μg/mL、1μg/mL、2μg/mL、3μg/mL、4μg/mL、5μg/mL、6μg/mL、7μg/mL、8μg/mL、9μg/mL或10μg/mL的终浓度加入细胞培养物或培养基中。在一些实施方案中,将成熟细胞因子以至少10U/mL、20U/mL、30U/mL、40U/mL、50U/mL、80U/mL、100U/mL、200U/mL、500U/mL、800U/mL、

1000U/mL、1500U/mL、2000U/mL或2500U/mL的终浓度加入细胞培养物或培养基中(如本文所用的,酶单位是根据制造商的方案计算的)。在一些实施方案中,将用于APC制备的PBMC培养物(完全PBMC或耗尽某些细胞的PBMC)进行进一步的孵育或细胞因子处理以诱导或刺激T细胞。在这种情况下,使用相同的细胞培养物进行APC制备(例如,成熟和肽负载)和T细胞诱导或刺激。在另一些情况下,APC制品是与用于T细胞刺激的PBMC群体分离的细胞群体。

[0295] 在一些实施方案中,所述方法包括将一种或多种APC或一种或多种APC制品与肽一起孵育,从而产生负载有肽的APC样品。例如,该方法可以包括将一种或多种APC或一种或多种APC制品与一种或多种或多种浓度为0.001-100μM的肽一起孵育,从而产生负载有肽的APC样品。例如,该方法可以包括将一种或多种APC或一种或多种APC制品与浓度至少约为0.001μM、0.005μM、0.01μM、0.02μM、0.03μM、0.04μM、0.05μM、0.08μM、0.09μM、0.1μM、0.2μM、0.3μM、0.4μM、0.5μM、0.6μM、0.7μM、0.8μM、0.9μM、1μM、2μM、3μM、4μM、5μM、6μM、7μM、8μM、9μM、10μM、20μM、30μM、40μM、50μM、60μM、70μM、80μM、90μM或100μM的一种或多种或更多种肽一起孵育。例如,该方法可以包括将一种或多种APC或一种或多种APC制品与浓度至多约为0.001μM、0.005μM、0.01μM、0.02μM、0.03μM、0.04μM、0.05μM、0.08μM、0.09μM、0.1μM、0.2μM、0.3μM、0.4μM、0.5μM、0.6μM、0.7μM、0.8μM、0.9μM、1μM、2μM、3μM、4μM、5μM、6μM、7μM、8μM、9μM、10μM、20μM、30μM、40μM、50μM、60μM、70μM、80μM、90μM或100μM的一种或多种或更多种肽一起孵育。例如,该方法可以包括将一种或多种APC或一种或多种APC制品与浓度约为0.001μM、0.005μM、0.01μM、0.02μM、0.03μM、0.04μM、0.05μM、0.08μM、0.09μM、0.1μM、0.2μM、0.3μM、0.4μM、0.5μM、0.6μM、0.7μM、0.8μM、0.9μM、1μM、2μM、3μM、4μM、5μM、6μM、7μM、8μM、9μM、10μM、20μM、30μM、40μM、50μM、60μM、70μM、80μM、90μM或100μM的一种或多种或更多种肽一起孵育。例如,该方法可以包括将一种或多种APC或一种或多种APC制品与浓度至少约为0.001μM、0.005μM、0.01μM、0.02μM、0.03μM、0.04μM、0.05μM、0.08μM、0.09μM、0.1μM、0.2μM、0.3μM、0.4μM、0.5μM、0.6μM、0.7μM、0.8μM、0.9μM、1μM、2μM、3μM、4μM、5μM、6μM、7μM、8μM、9μM、10μM、20μM、30μM、40μM、50μM、60μM、70μM、80μM、90μM或100μM的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20种或更多种肽一起孵育。例如,该方法可以包括将一种或多种APC或一种或多种APC制品与浓度至多约为0.001μM、0.005μM、0.01μM、0.02μM、0.03μM、0.04μM、0.05μM、0.08μM、0.09μM、0.1μM、0.2μM、0.3μM、0.4μM、0.5μM、0.6μM、0.7μM、0.8μM、0.9μM、1μM、2μM、3μM、4μM、5μM、6μM、7μM、8μM、9μM、10μM、20μM、30μM、40μM、50μM、60μM、70μM、80μM、90μM或100μM的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20种或更多种肽一起孵育。例如,该方法可以包括将一种或多种APC或一种或多种APC制品与浓度约为0.001μM、0.005μM、0.01μM、0.02μM、0.03μM、0.04μM、0.05μM、0.08μM、0.09μM、0.1μM、0.2μM、0.3μM、0.4μM、0.5μM、0.6μM、0.7μM、0.8μM、0.9μM、1μM、2μM、3μM、4μM、5μM、6μM、7μM、8μM、9μM、10μM、20μM、30μM、40μM、50μM、60μM、70μM、80μM、90μM或100μM的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20种或更多种肽一起孵育。

[0296] T细胞

[0297] T细胞属于一组被称为淋巴细胞的白细胞,在细胞介导的免疫中起核心作用。T细胞包括$CD4^+$T细胞(辅助性T细胞)和$CD8^+$T细胞(细胞毒性T细胞)。$CD4^+$T细胞在免疫过程中可帮助其他白细胞,该免疫过程包括B细胞的成熟以及细胞毒性T细胞和巨噬细胞的活化。$CD4^+$T细胞在通过抗原呈递细胞(APC)表面上表达的MHC II类分子呈递肽抗原时被激活。一旦

被激活,T细胞就可以迅速分裂并分泌调节主动免疫应答的细胞因子。$CD8^+$T细胞可以破坏病毒感染的细胞和肿瘤细胞,并且还可参与移植排斥。$CD8^+$T细胞可以通过结合与MHC I类缔合的抗原而识别它们的靶标,该MHC I类存在于身体几乎每种细胞的表面上。大多数T细胞具有T细胞受体(TCR)。T细胞识别与多种癌症或传染性生物体相关的抗原的能力由其TCR赋予,TCR由alpha(α)链和beta(β)链或由gamma(γ)和delta(δ)链构成。构成这些链的蛋白质由DNA编码,其采用独特的机理生成了TCR的多样性。这种多亚单位免疫识别受体可与CD3复合物缔合,并与抗原呈递细胞(APC)表面上的MHC I类和II类蛋白质所呈递的肽相结合。T细胞活化中的第一个信号可以通过T细胞受体与另一个细胞上的MHC呈递的短肽结合来提供。这确保仅激活具有对该肽特异的TCR的T细胞。伴侣细胞通常是抗原呈递细胞,如专职抗原呈递细胞,在幼稚应答的情况下通常是树突细胞,尽管B细胞和巨噬细胞可能是重要的APC。TCR与APC上的抗原肽的结合可以是T细胞活化中的核心事件,其在T细胞与APC之间的接触点上的免疫突触处发生。

[0298] 每个TCR含有可变互补决定区(CDR),以及框架区(FR)和恒定区。α和β链可变域的第三互补决定区(CDR3)环的氨基酸序列很大程度上分别决定了由β链基因座中可变性(Vβ)、多样性(Dβ)和连接(Jβ)基因区段之间,以及α链基因座中类似的Vα和Jα基因区段之间的重组引起的αβT细胞的序列多样性。多种这类基因区段在TCRα和β链基因座中的存在允许大量不同的CDR3序列得到编码。在TCR基因重排过程中,在Vβ-Dβ、Dβ-Jβ和Vα-Jα连接处的核苷酸的独立添加和缺失进一步增加了CDR3序列多样性。在该方面,免疫能力反映在TCR的多样性中。γδTCR与αβTCR的区别在于其编码的受体与先天免疫系统紧密相互作用。TCRγδ在发育的早期表达,具有特定的解剖分布,具有独特的病原体和小分子特异性,并且具有广谱的先天性和适应性细胞相互作用。在个体发生早期,因为TCRγδ细胞的有限的子集在产前占据了多种组织,所以建立了TCRγV和J区段表达的偏向模式。

[0299] 可以根据本领域已知的方法制备T细胞。T细胞可以是富集的T细胞制品、APC耗尽的细胞制品或基本上纯化的T细胞制品。T细胞可以是混合的T细胞群体或纯化的T细胞亚群。T细胞可以是富集的T细胞制品,其含有相对于分离的T细胞群体增加的数目或百分比的T细胞。

[0300] 可以从各种淋巴组织获得T细胞或T细胞的子集。T细胞可以获自多种来源,包括外周血单核细胞(PBMC)、骨髓、胸腺、组织活检、肿瘤、淋巴结组织、肠相关淋巴组织、粘膜相关淋巴组织、脾组织、淋巴组织和肿瘤。如本文所用的术语“外周血淋巴细胞”(PBL)及其语法等同语可指在血液(例如,外周血)中循环的淋巴细胞。外周血淋巴细胞可指不定位于器官的淋巴细胞。外周血淋巴细胞可包括T细胞、NK细胞、B细胞或其任意组合。

[0301] 所述方法可包括从受试者中分离T细胞。所述方法可包括获得从受试者中分离的T细胞。T细胞可以从T细胞系获得。T细胞可以从自体来源获得。T细胞可以从同种异体来源获得。T细胞也可以获自异种来源,例如小鼠、大鼠、非人灵长类和猪。

[0302] T细胞可以是APC耗尽的细胞制品。T细胞可以基本不含APC。例如,T细胞可包含分离75%以上的APC的T细胞。在一些实施方案中,外周血单核细胞(PBMC)可获自血液,例如在肝素化小瓶中。PBMC可通过离心与红细胞分离,并从界面回收PBMC。回收的PBMC任选地可以洗涤(例如用PBS)。

[0303] T细胞纯化可例如通过阳性或阴性选择来实现,包括但不限于使用针对CD2、CD3、

CD4、CD5、CD8、CD14、CD16、CD19和/或CD25的抗体。可以通过阳性或阴性选择技术分离特定的T细胞亚群,如$CD28^+$、$CD4^+$、$CD8^+$、$CD45RA^+$和/或$CD45RO^+$T细胞。例如,可以通过阳性或阴性选择技术分离$CD45RO^+$、$CD14^-$和/或$CD25^-$T细胞。例如,可以通过阳性或阴性选择技术分离$CD45RA^+$、$CD14^-$和/或$CD25^-$T细胞。例如,可以通过阳性或阴性选择技术分离$CD3^+$、$CD14^-$和/或$CD25^-$T细胞。例如,可以通过阳性或阴性选择技术分离$CD28^+$、$CD14^-$和/或$CD25^-$T细胞。例如,可以通过阳性或阴性选择技术分离$CD4^+$、$CD14^-$和/或$CD25^-$T细胞。例如,可以通过阳性或阴性选择技术分离$CD8^+$、$CD14^-$和/或$CD25^-$T细胞。例如,可以通过阴性选择技术分离$CD14^-$和/或$CD25^-$T细胞。例如,可以通过阴性选择技术分离$CD19^-$T细胞。例如,可以通过阴性选择技术分离$CD16^-$T细胞。例如,可以使用CD3/CD28缀合的磁珠来阳性选择$CD3^+$和$CD28^+$T细胞。在本发明的一个方面,可以通过组合针对阴性选择的细胞特有的表面标志物的抗体的组合来实现通过阴性选择富集T细胞群体。例如,可以通过使用针对CD19、CD16、CD14、CD25或其任何组合的抗体进行阴性选择来完成T细胞群体的富集。例如,可以通过使用针对CD19、CD16、CD25和/或CD14的抗体的组合进行阴性选择来完成T细胞群体的富集。

[0304] 例如,T细胞样品可以包含来自受试者循环血液的细胞,并且可以通过单采血液分离术或白细胞分离术获得。T细胞样品可包含淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞和/或血小板。可以去除T细胞样品中不希望的成分,并将剩余的T细胞悬浮在培养基中。例如,可以洗涤细胞以除去血浆部分。例如,可通过裂解红细胞并通过PERCOLL™梯度离心从外周血淋巴细胞中分离T细胞。

[0305] 在各种实施方案中,本文提供了包含T细胞的组合物和方法。在一些实施方案中,T细胞包含具有TCRα和TCRβ链的TCR。在一些实施方案中,T细胞包含具有TCRγ和TCRδ链的TCR。在一些实施方案中,T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)。在一些实施方案中,抗原特异性T细胞包含至少一种$CD4^+$T细胞。在一些实施方案中,抗原特异性T细胞包含至少一种$CD8^+$T细胞。在一些实施方案中,抗原特异性T细胞包含至少一种CD4富集的T细胞。在一些实施方案中,抗原特异性T细胞包含至少一个CD8富集的T细胞。在一些实施方案中,抗原特异性T细胞包含记忆T细胞。在一些实施方案中,抗原特异性T细胞包含幼稚T细胞。在一些实施方案中,抗原特异性T细胞包含记忆$CD4^+$T细胞。在一些实施方案中,抗原特异性T细胞包含幼稚$CD4^+$T细胞。在一些实施方案中,抗原特异性T细胞是记忆$CD8^+$T细胞。在一些实施方案中,抗原特异性T细胞包含幼稚$CD8^+$T细胞。在一些实施方案中,抗原肽序列包含选自以下的突变:(A)点突变,(B)剪接位点突变,(C)移码突变,(D)通读突变,(E)基因-融合突变,及其组合。在一些实施方案中,抗原肽序列以比相应野生型肽更大的亲和力结合受试者的HLA蛋白。在一些实施方案中,抗原肽序列以小于500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nM或10nM的K_D或IC_{50}结合受试者的HLA蛋白。在一些实施方案中,每个肽序列结合由受试者表达的HLA等位基因所编码的蛋白质。在一些实施方案中,本文所述的组合物的T细胞的TCR以小于500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nM或10nM的K_D或IC_{50}结合肽-HLA复合物。

[0306] 在一些实施方案中,T细胞在含有细胞因子的培养基中培养。细胞因子的实例包括IL-7和IL-15。在一些实施方案中,T细胞培养物或培养基中的细胞因子的终浓度为至少0.05ng/mL、0.1ng/mL、0.2ng/mL、0.3ng/mL、0.4ng/mL、0.5ng/mL、0.8ng/mL、1ng/mL、2ng/mL、3ng/mL、4ng/mL、5ng/mL、6ng/mL、7ng/mL、8ng/mL、9ng/mL、10ng/mL、12ng/mL、15ng/mL、

18ng/mL或20ng/mL。在一些实施方案中,T细胞培养物或培养基中的IL-7的终浓度为至少0.05ng/mL、0.1ng/mL、0.2ng/mL、0.3ng/mL、0.4ng/mL、0.5ng/mL、0.8ng/mL、1ng/mL、2ng/mL、3ng/mL、4ng/mL、5ng/mL、6ng/mL、7ng/mL、8ng/mL、9ng/mL、10ng/mL、12ng/mL、15ng/mL、18ng/mL或20ng/mL。在一些实施方案中,T细胞培养物或培养基中的IL-15的终浓度为至少0.05ng/mL、0.1ng/mL、0.2ng/mL、0.3ng/mL、0.4ng/mL、0.5ng/mL、0.8ng/mL、1ng/mL、2ng/mL、3ng/mL、4ng/mL、5ng/mL、6ng/mL、7ng/mL、8ng/mL、9ng/mL、10ng/mL、12ng/mL、15ng/mL、18ng/mL或20ng/mL。在一些实施方案中,将T细胞在进一步包含FLT3L的培养基中培养。在一些实施方案中,T细胞培养物或培养基中的FLT3L的终浓度为至少1ng/mL、2ng/mL、3ng/mL、4ng/mL、5ng/mL、6ng/mL、7ng/mL、8ng/mL、9ng/mL、10ng/mL、12ng/mL、15ng/mL、18ng/mL、20ng/mL、30ng/mL、40ng/mL、50ng/mL、60ng/mL、70ng/mL、80ng/mL、90ng/mL、100ng/mL或200ng/mL。在一些实施方案中,将T细胞在含有FLT3L的培养基中孵育、诱导或刺激第一时间段。在一些实施方案中,将T细胞在含有另外添加的FLT3L的培养基中孵育、诱导或刺激第二时间段。在一些实施方案中,将T细胞在含有额外添加的FLT3L的培养基中孵育、诱导或刺激第三时间段。在一些实施方案中,将T细胞在含有额外添加的FLT3L的培养基中孵育、诱导或刺激第四、第五或第六时段,在每个时段中用新鲜添加的FLT3L。

[0307] 抗原

[0308] 本公开涉及用于制备对免疫原性抗原为特异性的T细胞的方法。本公开还涉及包含用APC刺激的抗原特异性T细胞的组合物。在一些实施方案中,将一种或多种抗原肽加载到APC上,其中然后用加载肽的APC刺激T细胞以产生抗原特异性T细胞。在一些实施方案中,该抗原是新抗原。在一些实施方案中,用于肽加载的APC是树突细胞。

[0309] 在一些实施方案中,肽序列包含在受试者的非癌细胞中不存在的突变。在一些实施方案中,肽由受试者的癌细胞的基因或表达的基因所编码。在一些实施方案中,肽序列的长度为至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1,000、1,500、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、7,500或10,000个或更多个天然存在的氨基酸。在一些实施方案中,肽序列结合由I类HLA等位基因编码的蛋白质,并且具有8-12个天然氨基酸的长度。在一些实施方案中,肽序列结合由II类HLA等位基因编码的蛋白质,并且具有16-25个天然存在的氨基酸的长度。在一些实施方案中,肽序列包含多个抗原肽序列。在一些实施方案中,多个抗原肽序列包含至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450或500个抗原肽序列。

[0310] 在一些实施方案中,本文所述的抗原是新抗原。候选免疫原性新抗原序列可以通过本领域已知的任何合适方法来鉴定。本公开的方法可用于例如产生针对受试者疾病的特异性疗法或产生针对疾病的疫苗。候选免疫原性新抗原可以是先前鉴定的新抗原。在一些实施方案中,候选免疫原性新抗原可能先前未被鉴定。用于本文所述的方法和组合物中的候选免疫原性新抗原可以对受试者是特异性的。在一些实施方案中,用于本文描述的方法和组合物中的候选新抗原可以对多个受试者是特异性的。

[0311] 在动物和人类中,突变的表位在诱导免疫应答或激活T细胞方面都可能有效。在一个实施方案中,可以确定受试者中诸如病毒的传染原的潜在免疫原性表位。在一个实施方

案中,可以确定患有疾病如癌症的受试者的潜在的免疫原性突变的表位。在一些实施方案中,供本文描述的方法使用的潜在的免疫原性抗原或新抗原可以是在肿瘤和产生它们的组织类型的细胞中表达的分化抗原。在一些实施方案中,供本文所述方法使用的潜在的免疫原性抗原或新抗原可以是在另一分化组织中未表达的癌症/种系抗原。在一些实施方案中,供本文所述方法使用的潜在的免疫原性抗原或新抗原可以是突变的抗原。例如,供本文所述方法使用的候选免疫原性抗原或新抗原肽可包含错义点突变或通过基因区段的肿瘤特异性易位产生的融合蛋白的抗原或新抗原。在一些实施方案中,供本文所述方法使用的潜在的免疫原性抗原或新抗原可以是过表达的抗原。在一些实施方案中,可以在肿瘤中发现潜在的免疫原性抗原或新抗原。例如,供本文所述方法使用的潜在的免疫原性抗原或新抗原可以包括其表达在分化的正常组织的细胞中受到严格调节的蛋白质。

[0312] 可以使用下一代测序技术,通过对癌症患者的肿瘤组织和健康组织进行基因组或外显子组测序来确定潜在的免疫原性突变表位。例如,可以使用下一代测序技术对基于其突变频率和充当抗原或新抗原的能力选择的基因进行测序。在一个实施方案中,可以分析测序数据以鉴定可以结合受试者的HLA分子的潜在的免疫原性突变的肽。在一个实施方案中,可以使用计算机来分析数据。在另一个实施方案中,可以分析序列数据中抗原或新抗原肽的存在。在一实施方案中,可以通过潜在的免疫原性抗原或新抗原肽对MHC分子的亲和力来确定。

[0313] 潜在的免疫原性抗原或新抗原肽可以通过直接蛋白质测序来确定。例如,使用多维质谱技术(例如,串联质谱(MS/MS))的酶促蛋白消化物的蛋白质测序可用于鉴定供本文所述方法使用的潜在的免疫原性抗原或新抗原肽。

[0314] 用于未知蛋白质从头测序的高通量方法可用于鉴定潜在的免疫原性抗原或新抗原肽。例如,用于未知蛋白质的从头测序的高通量方法,例如meta-shotgun蛋白质测序,可用于分析受试者肿瘤的蛋白质组,以鉴定潜在的免疫原性表达的新抗原。

[0315] 还可以使用MHC多聚体来鉴定潜在的免疫原性抗原或新抗原肽,以鉴定抗原特异性T细胞应答。例如,可以使用基于MHC四聚体的筛选技术对患者样品中的抗原特异性T细胞应答进行高通量分析。基于四聚体的筛选技术可用于潜在免疫原性肿瘤特异性抗原的初步鉴定,或者可替代地用作二次筛选方案,以评估患者可能已经接触过哪些潜在免疫原性抗原,从而有助于选择供本文所述方法使用的潜在的免疫原性抗原。

[0316] 在一些实施方案中,可以分析或表征免疫细胞。例如,可以分析或表征本文所述的组合物的免疫细胞。在一些实施方案中,方法可以包括确定被刺激的免疫细胞样品中至少一个免疫细胞的一种或多种细胞标志物的表达;以及确定刺激的免疫细胞样品中至少一种免疫细胞与肽-MHC复合物的结合;其中确定表达和确定结合同时进行。在一些实施方案中,刺激的免疫细胞样品是用包含肽-MHC复合物的APC刺激的免疫细胞群体。在一些实施方案中,免疫细胞群体来自生物样品。在一些实施方案中,方法可以包括将来自生物样品的免疫细胞群体与包含肽-MHC复合物的APC一起孵育,从而获得刺激的免疫细胞样品。确定刺激的免疫细胞样品中至少一种免疫细胞的一种或多种细胞标志物的表达;以及确定刺激的免疫细胞样品中至少一种免疫细胞与肽-MHC复合物的结合;其中确定表达和确定结合同时进行。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞标志物包括TNF-α、IFN-γ、LAMP-1、4-1BB、IL-2、IL-17A、酶B、PD-1、CD25、CD69、TIM3、LAG3、CTLA-4、CD62L、CD45RA、CD45RO、FoxP3或其任

何组合。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞标志物包括细胞因子。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞标志物包括脱粒标记物。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞标志物包括细胞表面标志物。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞标志物包括蛋白质。在一些实施方案中,确定刺激的免疫细胞样品的至少一种免疫细胞与肽-MHC复合物的结合包括确定刺激的免疫细胞样品的至少一种免疫细胞与包含所述肽和肽-MHC复合物的MHC的MHC四聚体的结合。在一些实施方案中,该MHC是I类MHC或II类MHC。在一些实施方案中,肽-MHC复合物包含一种或多种标记物。在一些实施方案中,来自生物样品的免疫细胞群体包含两个或更多个样品,每个样品包含来自一个或多个生物样品的免疫细胞群体。在一些实施方案中,两个或更多个样品用两个或更多个样品标记物标记。在一些实施方案中,确定表达和确定结合包括荧光激活细胞分选(FACS)。在一些实施方案中,确定表达和确定结合包括单细胞分析。在一些实施方案中,确定表达和确定结合包括确定既表达一种或多种细胞标志物又与肽-MHC复合物结合的免疫细胞的百分比。在一些实施方案中,标记物包括荧光团。在一些实施方案中,免疫细胞群体包括代表本文所述组合物的免疫细胞群体的免疫细胞群体。在一些实施方案中,表达TNF-α、IFN-γ、LAMP-1、4-1BB、IL-2、IL-17A、粒酶B、PD-1、CD25、CD69、TIM3、LAG3、CTLA-4、CD62L、CD45RA、CD45RO、FoxP3、CD3、CD28、CD4、CD8或任何组合和/或不表达CD14、CD19、CD16、CD25或其任何组合的免疫细胞群体可以进行分析和表征。例如,该方法可以包括分析或表征特定的T细胞亚群,如表达TNF-α、IFN-γ、LAMP-1、4-1BB、IL-2、IL-17A、粒酶B、PD-1、CD25、CD69、TIM3、LAG3、CTLA-4、CD62L、CD45RA、CD45RO、FoxP3、CD3、CD28、CD4、CD8或任何组合和/或不表达CD14、CD19、CD16、CD25或其任何组合的T细胞亚群。例如,该方法可以包括分析或表征不表达CD14、CD25、CD19、CD16或其任何组合的免疫细胞群体。

[0317] 在一些实施方案中,可以确定免疫细胞群体中一种或多种细胞标志物的表达。例如,该方法可以包括确定TNF-α、IFN-γ、LAMP-1、4-1BB、IL-2、IL-17A、粒酶B、PD-1、CD25、CD69、TIM3、LAG3、CTLA-4、CD62L、CD45RA、CD45RO、FoxP3、CD14、CD25、CD19、CD16或其任何组合的表达。例如,方法可以包括将来自生物样品的免疫细胞群体与包含肽-MHC复合物的APC一起孵育,从而获得刺激的免疫细胞样品;确定刺激的免疫细胞样品中至少一种免疫细胞的TNF-α、IFN-γ、LAMP-1、4-1BB、IL-2、IL-17A、粒酶B、PD-1、CD25、CD69、TIM3、LAG3、CTLA-4、CD62L、CD45RA、CD45RO、FoxP3、CD14、CD25、CD19、CD16或其任何组合的表达;确定刺激的免疫细胞样品中至少一种免疫细胞与肽-MHC复合物的结合;其中确定表达和确定结合同时进行。

[0318] 供本文所述方法使用的潜在的免疫原性抗原或新抗原肽可以是已知的抗原或新抗原序列。例如,供本文所述方法使用的潜在的免疫原性抗原或新抗原肽可以来自抗原或新抗原序列的数据库。

[0319] 在一些方面,本公开提供了使用本文所述方法鉴定的肽(例如,具有肿瘤特异性突变的肽、病毒肽或与非癌性疾病相关的肽)或编码该肽的多核苷酸。

[0320] 在一些实施方案中,使用光学方法来选择或鉴定免疫原性抗原。在一些实施方案中,使用条形码探针来选择或鉴定免疫原性抗原。在一些实施方案中,使用包含靶标特异性区域和条形码化区域的条形码化探针来选择或鉴定免疫原性抗原。在一些实施方案中,靶标特异性区域包含与靶多核苷酸的核酸序列杂交或具有至少约90%、95%或100%序列互

补性的核酸序列。

[0321] 在一些实施方案中,使用测序方法来鉴定免疫原性抗原。根据本发明可以使用任何合适的测序方法,例如,下一代测序(NGS)技术。第三代测序方法可能在未来取代NGS技术以加速该方法的测序步骤。为了阐明的目的:在本发明上下文中的术语“下一代测序”或“NGS”意指与被称为Sanger化学法的“常规”测序方法相比的所有高通量测序技术,其通过将整个基因组分成小块,沿整个基因组平行随机读取核酸模板。这类NGS技术(也称为大规模平行测序技术)能够在非常短的时间内,例如1-2周内,例如1-7天内或少于24个小时内,提供全基因组、外显子组、转录组(基因组的所有转录序列)或甲基化组(基因组的所有甲基化序列)的核酸序列信息,并且原则上允许单细胞测序方法。可商购获得的或文献中提到的多个NGS平台可以在本发明的背景中使用,例如,在WO 2012/159643中详细描述的那些NGS平台。

[0322] 在某些实施方案中,抗原或新抗原肽或其表位可以包含但不限于约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29、约30、约31、约32、约33、约34、约35、约36、约37、约38、约39、约40、约41、约42、约43、约44、约45、约46、约47、约48、约49、约50、约60、约70、约80、约90、约100、约110、约120个或更多个氨基酸残基以及其中可得出的任何范围。在具体的实施方案中,免疫原性抗原或其表位等于或少于100个氨基酸。

[0323] 在一些实施方案中,MHC I类的抗原或新抗原肽或其表位的长度为13个或更少的残基,并且通常由约8至约11个残基,尤其是9或10个残基组成。在一些实施方案中,MHC II类的免疫原性抗原或新抗原肽或其表位的长度为9-24个残基。

[0324] 可以用几种方式设计较长的免疫原性肽。在一些实施方案中,当HLA结合肽被预测或已知时,较长的免疫原性肽可以由以下组成:(1)向每个相应基因产物的N-末端及C-末端延伸2-5个氨基酸的单个结合肽;或(2)一些或所有结合肽与每个结合肽的延伸序列的串接。在其他实施方案中,当测序揭示肿瘤中存在长(>10个残基)表位序列,例如新表位时(例如,由于导致新的肽序列的移码、通读或内含子包含),较长的新抗原肽可由作为单个较长的肽或几个重叠的较长肽的整个新肿瘤特异性氨基酸段组成。在一些实施方案中,推测使用较长的肽允许患者细胞进行内源性加工,并且可以导致更有效的抗原呈递和T细胞应答诱导。在一些实施方案中,可以使用两种或更多种肽,其中肽重叠并铺在长的新抗原肽上。

[0325] 在一些实施方案中,抗原或新抗原肽结合HLA蛋白(例如,HLA I类或HLA II类)。在具体的实施方案中,抗原或新抗原肽以比相应的野生型肽更大的亲和力结合HLA蛋白。在具体的实施方案中,抗原或新抗原肽的IC_{50}或K_D至少低于5000nM、至少低于500nM、至少低于100nM、至少低于50nM或更低。

[0326] 在一些实施方案中,抗原或新抗原肽的长度可以是约8至约50个氨基酸残基,或约8至约30,约8至约20,约8至约18,约8至约15,或约8至约12个氨基酸残基。在一些实施方案中,抗原或新抗原肽的长度可以是约8至约500个氨基酸残基,或约8至约450、约8至约400、约8至约350、约8至约300、约8至约250、约8至约200、约8至约150、约8至约100、约8至约50或约8至约30个氨基酸残基。

[0327] 在一些实施方案中,抗原或新抗原肽的长度可以是至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、

41、42、43、44、45、46、47、48、49、50个或更多个氨基酸残基。在一些实施方案中，新抗原肽的长度可以是至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500个或更多个氨基酸残基。在一些实施方案中，抗原或新抗原肽的长度可以是至多8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50个或更少的氨基酸残基。在一些实施方案中，抗原或新抗原肽的长度可以是至多8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500个或更少的氨基酸残基。

[0328] 在一些实施方案中，抗原或新抗原肽具有至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少26、至少27、至少28、至少29、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90、至少100、至少150、至少200、至少250、至少300、至少350、至少400、至少450或至少500个氨基酸的总长度。

[0329] 在一些实施方案中，抗原或新抗原肽具有至多8、至多9、至多10、至多11、至多12、至多13、至多14、至多15、至多16、至多17、至多18、至多19、至多20、至多21、至多22、至多23、至多24、至多25、至多26、至多27、至多28、至多29、至多30、至多40、至多50、至多60、至多70、至多80、至多90、至多100、至多150、至多200、至多250、至多300、至多350、至多400、至多450或至多500个氨基酸的总长度。

[0330] 在一些实施方案中，新抗原肽可以具有约0.5至约12、约2至约10或约4至约8的pI值。在一些实施方案中，新抗原肽可以具有至少4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5或更高的pI值。在一些实施方案中，新抗原肽可以具有至多4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5或更低的pI值。

[0331] 在一些实施方案中，抗原或新抗原肽可以具有约1pM至约1mM、约100pM至约500μM、约500pM至约10μM、约1nM至约1μM或约10nM至约1μM的HLA结合亲和力。在一些实施方案中，抗原或新抗原肽可以具有至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、700、800、900μM或更高的HLA结合亲和力。在一些实施方案中，抗原或新抗原肽可以具有至多2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、700、800、900μM的HLA结合亲和力。

[0332] 在一些实施方案中，本文所述的抗原或新抗原肽可以包括诸如本领域公知的那些载体，例如甲状腺球蛋白、诸如人血清白蛋白的白蛋白、破伤风类毒素、聚氨基酸残基(诸如聚L-赖氨酸、聚L-谷氨酸)、流感病毒蛋白、乙型肝炎病毒核心蛋白等。

[0333] 在一些实施方案中，本文所述的抗原或新抗原肽可以通过末端-NH_2酰化(例如通过烷酰基(C_1-C_{20})或硫代羟乙酰基乙酰化)、末端羧基酰胺化(例如氨、甲胺等)进行修饰。在一些实施方案中，这些修饰可以提供用于与支持体或其他分子连接的位点。

[0334] 在一些实施方案中，本文所述的抗原或新抗原肽可以包含修饰，诸如但不限于糖基化、侧链氧化、生物素化、磷酸化、添加表面活性物质(例如脂质)，或可以进行化学修饰，例如乙酰化等。此外，肽中的键可以是除了肽键之外的键，例如共价键、酯键或醚键、二硫

键、氢键、离子键等。

[0335] 在一些实施方案中,本文所述的抗原或新抗原肽可以包含置换以改变所得肽的物理性质(例如,稳定性或溶解性)。例如,可以通过用α-氨基丁酸(“B”)置换半胱氨酸(C)来修饰抗原或新抗原肽。由于其化学性质,半胱氨酸具有形成二硫键的倾向,并且在结构上充分改变肽以降低结合能力。用α-氨基丁酸置换C不仅可以缓解这个问题,而且在某些情况下实际上改善了结合和交叉结合能力。用α-氨基丁酸置换半胱氨酸可以发生在抗原或新抗原肽的任何残基上,例如在肽内表位或类似物的锚定或非锚定位置或肽的其他位置上。

[0336] 在一些实施方案中,本文所述的抗原肽或新抗原肽可以包含氨基酸模拟物或非天然氨基酸残基,例如D-或L-萘丙氨酸;D-或L-苯基甘氨酸;D-或L-2-噻吩基丙氨酸;D-或L-1、2、3或4-芘基丙氨酸;D-或L-3噻吩基丙氨酸;D-或L-(2-吡啶基)-丙氨酸;D-或L-(3-吡啶基)-丙氨酸;D-或L-(2-吡嗪基)-丙氨酸;D-或L-(4-异丙基)-苯基甘氨酸;D-(三氟甲基)-苯基甘氨酸;D-(三氟-甲基)-苯丙氨酸;D-ρ-氟苯丙氨酸;D-或L-ρ-联苯基-苯丙氨酸;D-或L-ρ-甲氧基联苯基苯丙氨酸;D-或L-2-吲哚(烯丙基)丙氨酸;以及D-或L-烷基丙氨酸,其中烷基可以是取代或未取代的甲基、乙基、丙基、己基、丁基、戊基、异丙基、异丁基、仲丁基(sec-isotyl)、异戊基或非酸性氨基酸残基。非天然氨基酸的芳环包括例如噻唑基、噻吩基、吡唑基、苯并咪唑基、萘基、呋喃基、吡咯基和吡啶基芳环。具有各种氨基酸模拟物或非天然氨基酸残基的修饰肽是特别有用的,因为它们倾向于显示增加的体内稳定性。这样的肽还可以具有改善的保质期或制备性质。

[0337] 可以用多种方式测定肽稳定性。例如,肽酶和各种生物介质如人血浆和血清已经用于测定稳定性。参见,例如,Verhoef等人,Eur.J.Drug Metab.Pharmacokinetics 11:291(1986)。使用25%人血清(v/v)测定方便地测定本文所述肽的半衰期。方案如下:将合并的人血清(AB型,非热灭活的)在使用前通过离心进行破坏。然后用RPMI-1640或另一种合适的组织培养基将血清稀释至25%。以预定的时间间隔,将少量反应溶液取出并添加至6%三氯乙酸(TCA)水溶液或乙醇中。将混浊的反应样品冷却(4℃)15分钟,然后进行旋转以使沉淀的血清蛋白成团。然后使用稳定性特异性色谱条件,通过反相HPLC确定肽的存在。

[0338] 在一些实施方案中,本文所述的抗原或新抗原肽可以是溶液、冻干的或可以是晶体形式。

[0339] 在一些实施方案中,本文所述的抗原或新抗原肽可以通过重组DNA技术或化学合成经由合成而制备,或者可以从诸如原始肿瘤或病原生物体的天然来源中分离。表位可以单独合成或直接或间接地连接在肽中。尽管本文所述的抗原或新抗原肽基本上不含其他天然存在的宿主细胞蛋白质及其片段,但在一些实施方案中,该肽可以通过合成进行缀合以与天然片段或颗粒连接。

[0340] 在一些实施方案中,可以根据常规技术在溶液中或在固体支持体上合成肽。各种自动合成器可商购获得,并可根据已知方案进行使用。(参见,例如,Stewart&Young,olid Phase Peptide Synthesis,第2版,Pierce Chemical Co.,1984)。此外,可以使用化学连接将各个肽进行连接,以产生仍然在本发明范围内的较大的肽。

[0341] 或者,可以使用重组DNA技术,其中将插入表达载体中的编码肽的核苷酸序列转化或转染到合适的宿主细胞中,并在适于表达的条件下培养。这些方法通常是本领域已知的,如在Sambrook等人,Molecular Cloning,a Laboratory Manual,Cold Spring Harbor

Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989)中所概述的。因此,包含一个或多个本文所述的表位或由其组成的重组肽可以用于呈递合适的T细胞表位。

[0342] 在一个方面,本文所述的本公开还提供了包含一种、至少两种或多于两种抗原肽或新抗原肽的组合物。在一些实施方案中,本文所述的组合物含有至少两种不同的肽。在一些实施方案中,所述至少两种不同的肽来源于相同的多肽。不同的多肽是指肽的长度不同、氨基酸序列不同或两者均不同。所述肽来源于已知或已被发现含有肿瘤特异性突变的任何多肽。在一些实施方案中,分离的抗原或新抗原肽由具有点突变(导致天然肽的氨基酸置换)的基因编码。

[0343] 药物组合物

[0344] 可以使用一种或多种生理学上可接受的载体来配制药物组合物,所述载体包括赋形剂和助剂,其有助于将活性剂加工成可药用的制品。合适的制剂可取决于选定的给药途径。任何公知的技术、载体和赋形剂均可作为如本领域所理解的合适的技术、载体和赋形剂。

[0345] 在某些情况下,将药物组合物配制成基于细胞的治疗剂,例如T细胞治疗剂。在一些实施方案中,药物组合物包含基于肽的疗法、基于核酸的疗法、基于抗体的疗法和/或基于细胞的疗法。在一些实施方案中,药物组合物包含基于肽的治疗剂或基于核酸的治疗剂,其中该核酸编码多肽。在一些实施方案中,药物组合物包含基于抗体的治疗剂。组合物可以包含对两种或更多种免疫原性抗原或新抗原肽具有特异性的T细胞。

[0346] 除了活性成分以外,药物组合物还可包含药学上可接受的赋形剂、载体、缓冲液、稳定剂或本领域技术人员公知的其他物质。这样的物质应该是无毒的,并且不应干扰活性成分的功效。载体或其他物质的确切性质将取决于给药途径。

[0347] 可接受的载体、赋形剂或稳定剂是那些在所用剂量和浓度下对接受者无毒的载体、赋形剂或稳定剂,并且包括缓冲液,如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵、苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐抗衡离子,如钠;金属络合物(例如,Zn-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂如TWEEN®、PLURONICS®或聚乙二醇(PEG)。

[0348] 可接受的载体对施用的患者而言在生理学上是可接受的,并且保持所施用的化合物的治疗特性。可接受的载体及其制剂一般性地描述于例如,Remington'pharmaceutical Sciences(第18版,A.Gennaro,Mack Publishing Co.,Easton,PA 1990)中。载体的一个实例是生理盐水。药学上可接受的载体是参与从一个器官或身体部分的给药部位到另一个器官或身体部分,或在体外测定系统中,携带或转运主题化合物的药学上可接受的物质、组合物或媒介物,如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封材料。可接受的载体与制剂的其他成分相容,并且对被施用的受试者无害。可接受的载体也不应改变新抗原的比活性。

[0349] 在一个方面,本文提供了药学上可接受的或生理学上可接受的组合物,其包含与

药物施用相容的溶剂(水性或非水性)、溶液、乳液、分散介质、包衣材料、等渗剂和吸收促进剂或延迟剂。因此,药物组合物或药物制剂是指适合于在受试者中药物使用的组合物。组合物可配制成与特定给药途径(即全身或局部)相容。因此,组合物包含适合于通过各种途径给药的载体、稀释剂或赋形剂。

[0350] 在一些实施方案中,组合物可以进一步包含可接受的添加剂,以改善免疫细胞在组合物中的稳定性。可接受的添加剂可以不改变免疫细胞的比活性。可接受的添加剂的实例包括但不限于糖,如甘露醇、山梨醇、葡萄糖、木糖醇、海藻糖、山梨糖、蔗糖、半乳糖、葡聚糖、右旋糖、果糖、乳糖及其混合物。可接受的添加剂可以与可接受的载体和/或赋形剂如右旋糖组合。或者,可接受的添加剂的实例包括但不限于用来增加肽的稳定性并减少溶液的胶凝的表面活性剂,如聚山梨酯20或聚山梨酯80。表面活性剂可以以溶液的0.01%至5%的量添加至组合物中。这类可接受的添加剂的添加增加了组合物在储存中的稳定性和半衰期。

[0351] 药物组合物可以例如通过注射施用。用于注射的组合物包括水溶液(其为水溶性的)或分散液和用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。对于静脉内给药,合适的载体包括生理盐水、抑菌水或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)的溶剂或分散介质及其合适的混合物。例如,可通过使用诸如卵磷脂等涂层,在分散体的情况下通过维持所需的颗粒大小,以及通过使用表面活性剂来维持流动性。抗细菌剂和抗真菌剂包括,例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸和硫柳汞。可在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇如甘露醇、山梨醇和氯化钠。所得的溶液可以被包装以供原样使用,或冻干;冻干的制品随后可在施用前与无菌溶液合并。对于静脉内注射,或在患处注射,活性成分将是肠胃外可接受的水溶液的形式,其无热原并具有合适的pH、等渗性和稳定性。本领域相关技术人员能够使用例如等渗媒介物如氯化钠注射液、林格氏注射液、乳酸林格氏注射液来制备合适的溶液。根据需要,可包含防腐剂、稳定剂、缓冲液、抗氧化剂和/或其他添加剂。可通过将所需量的活性成分与以上列举的一种成分或成分的组合(如果需要)一起并入合适的溶剂中,然后过滤除菌,来制备无菌可注射溶液。通常,通过将活性成分并入含有碱性分散介质和以上列举的所需其他成分的无菌媒介物中来制备分散体。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法可以是真空干燥和冷冻干燥,该方法从其先前过滤除菌的溶液得到活性成分加任何附加所需成分的粉末。

[0352] 例如,组合物可以常规地静脉内施用,例如通过注射单位剂量。对于注射,活性成分可以是肠胃外可接受的水溶液的形式,其基本不含热原,并具有合适的pH、等渗性和稳定性。可以使用例如等渗媒介物如氯化钠注射液、林格氏注射液、乳酸林格氏注射液来制备合适的溶液。根据需要,可包含防腐剂、稳定剂、缓冲液、抗氧化剂和/或其他添加剂。另外,组合物可经由雾化施用。

[0353] 当考虑将组合物用于药品或本文提供的任何方法时,预期该组合物可基本不含热原,从而使得该组合物在施用于人类患者时不会引起炎性反应或不安全的变态反应。测试组合物的热原以及制备基本不含热原的组合物是本领域普通技术人员公知的,并且可以使用可商购获得的试剂盒来完成。

[0354] 可接受的载体可含有使吸收稳定、增加或延迟或者使清除增加或延迟的化合物。

这样的化合物包括,例如,碳水化合物,如葡萄糖、蔗糖或葡聚糖;低分子量蛋白质;减少肽的清除或水解的组合物;或赋形剂或其他稳定剂和/或缓冲液。延迟吸收的试剂包括,例如,单硬脂酸铝和明胶。去污剂也可用来稳定或增加或减少药物组合物(包括脂质体载体)的吸收。为了防止被消化,可将化合物与组合物复合,以使其对酸和酶促水解具有抗性,或者可将化合物在适当的抗性载体如脂质体中复合。保护化合物免遭消化的手段是本领域已知的(例如,Fix(1996)Pharm Res.13:1760 1764;Samanen(1996)J.Pharm.Pharmacol.48:119 135;和美国专利5,391,377)。

[0355] 组合物可以以与剂量制剂相容的方式并以治疗有效量施用。待施用的量取决于待治疗的受试者、受试者免疫系统利用活性成分的能力以及期望的结合能力的程度。需要施用的活性成分的精确量取决于从业者的判断,并且对于每个个体是特定的。用于初始施用和加强注射的合适方案也是不同的,但典型的是先初始施用,然后通过随后的注射或其他施用以一个或多个小时的间隔进行重复给药。或者,考虑足以维持血液浓度的连续静脉内输注。

[0356] 在一些实施方案中,本发明涉及一种免疫原性组合物,例如能够引发新抗原特异性应答(例如,体液或细胞介导的免疫应答)的药物组合物。在一些实施方案中,该免疫原性组合物包含与肿瘤特异性抗原或新抗原相对应的本文所述的新抗原治疗剂(例如,肽、多核苷酸、TCR、CAR、含有TCR或CAR的细胞、含有多肽的树突细胞、含有多核苷酸的树突细胞、抗体等)。

[0357] 在一些实施方案中,本文所述的药物组合物能够引起特异性细胞毒性T细胞应答、特异性辅助T细胞应答或B细胞应答。

[0358] 在一些实施方案中,抗原多肽或多核苷酸可以作为含有这类多肽或多核苷酸的抗原呈递细胞(例如,树突细胞)而提供。在其他实施方案中,这类抗原呈递细胞用来刺激用于患者的T细胞。在一些实施方案中,该抗原呈递细胞是树突细胞。在相关实施方案中,该树突细胞是用新抗原肽或核酸脉冲的自体树突细胞。该新抗原肽可以是产生适当T细胞应答的任何合适的肽。在一些实施方案中,该T细胞是CTL。在一些实施方案中,该T细胞是HTL。因此,本公开的一个实施方案是一种免疫原性组合物,其含有至少一种用一种或多种本文所述新抗原多肽或多核苷酸脉冲或加载的抗原呈递细胞(例如树突细胞)。在一些实施方案中,这样的APC是自体的(例如,自体树突细胞)。或者,从患者中分离的外周血单核细胞(PBMC)可以离体加载新抗原肽或多核苷酸。在相关实施方案中,将这样的APC或PBMC注射回患者体内。所述多核苷酸可以是能够转导树突细胞的任何合适的多核苷酸,从而导致新抗原肽的呈递和免疫的诱导。在一些实施方案中,这样的抗原呈递细胞(APC)(例如,树突细胞)或外周血单核细胞(PBMC)用来刺激T细胞(例如,自体T细胞)。在相关实施方案中,该T细胞是CTL。在其他相关的实施方案中,该T细胞是HTL。在一些实施方案中,该T细胞是$CD8^+$T细胞。在一些实施方案中,该T细胞是$CD4^+$T细胞。然后将这样的T细胞注射到患者体内。在一些实施方案中,将CTL注射到患者体内。在一些实施方案中,将HTL注射到患者体内。在一些实施方案中,将CTL和HTL均注射到患者体内。任一治疗剂的施用可以同时或依次且以任何顺序进行。

[0359] 在一些实施方案中,本文所述的用于治疗性处置的药物组合物(例如免疫原性组合物)可被配制用于肠胃外、局部、经鼻、口服或外部给药。在一些实施方案中,本文所述的

药物组合物通过肠胃外施用,例如静脉内、皮下、皮内或肌肉内施用。在一些实施方案中,该组合物可以肿瘤内施用。可以在手术切除部位施用该组合物以诱导对肿瘤的局部免疫应答。在一些实施方案中,本文描述了用于肠胃外施用的组合物,其包含新抗原肽的溶液,并且将免疫原性组合物溶解或悬浮在可接受的载体例如水性载体中。可以使用多种水性载体,例如水、缓冲水、0.9%盐水、0.3%甘氨酸、透明质酸等。这些组合物可以通过常规的公知灭菌技术灭菌,或者可以过滤除菌。所得的水溶液可以被包装以供原样使用,或冻干,在施用前将冻干的制品与无菌溶液合并。该组合物可含有为接近生理条件所需的药学上可接受的辅助性物质,如pH调节剂和缓冲剂、张度调节剂、润湿剂等,例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、失水山梨醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯等。

[0360] 佐剂增加对抗原的免疫应答的能力通常体现为免疫介导的反应的显著增加或疾病症状的减少。例如,体液免疫的增加可以体现为针对抗原的抗体滴度的显著增加,并且T细胞活性的增加可以体现为增加的细胞增殖或细胞毒性或细胞因子分泌。佐剂还可以改变免疫应答,例如,通过将主要为体液或2型T辅助细胞的应答改变为主要为细胞或1型T辅助细胞的应答。

[0361] 合适的佐剂是本领域已知的(参见WO2015/095811),并且包括但不限于聚(I:C)、聚-ICLC、STING激动剂、1018ISS、铝盐、Amplivax、AS15、BCG、CP-870,893、CpG7909、CyaA、dSLIM、GM-CSF、IC30、IC31、咪喹莫特、ImuFact IMP321、IS Patch、ISS、ISCOMATRIX、JuvImmune、LipoVac、MF59、单磷酰脂质A、Montanide IMS 1312、Montanide ISA 206、Montanide ISA 50V、Montanide ISA-51、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、PepTel® 载体系统、PLG微粒、瑞喹莫德、SRL172、病毒小体和其他病毒样颗粒、YF-17D、VEGF trap、R848、β-葡聚糖、Pam3Cys、Pam3CSK4、衍生自皂苷的Aquila的QS21刺激子(Aquila Biotech,Worcester,Mass.,USA)、分枝杆菌提取物和合成细菌细胞壁模拟物以及其他专有佐剂,如Ribi的Detox.Quil或Superfos。已经描述了几种对树突细胞特异性的免疫佐剂(Dupuis M等人,Cell Immunol.1998;186(1):18-27;Allison A C;Dev Biol Stand.1998;92:3-11)(Mosca等人,Frontiers in Bioscience,2007;12:4050-4060)(Gamvrellis等人,Immunol&Cell Biol.2004;82:506-516)。也可以使用细胞因子。几种细胞因子与影响树突细胞向淋巴组织迁移(例如TNF-α)、加速树突细胞成熟为T淋巴细胞的有效抗原呈递细胞(例如,GM-CSF、PGE1、PGE2、IL-1、IL-1β、IL-4、IL-6和CD40L)(美国专利5,849,589,其通过引用整体并入本文)以及充当免疫佐剂(例如,IL-12)(Gabrilovich D I等人,J Immunother Emphasis Tumor Immunol.1996(6):414-418)直接相关。

[0362] 还报道了CpG免疫刺激性寡核苷酸在治疗环境中增强佐剂的效果。不受理论束缚,CpG寡核苷酸通过经由Toll样受体(TLR)(主要是TLR9)激活先天(非适应性)免疫系统起作用。CpG触发的TLR9活化增强对多种抗原的抗原特异性体液和细胞应答,该抗原包括肽或蛋白质抗原、活病毒或杀死的病毒、树突细胞免疫原性药物组合物、自体细胞免疫原性药物组合物和预防性及治疗性免疫原性药物组合物二者中的多糖缀合物。重要的是,它增强了树突细胞的成熟和分化,从而导致增强的TH1细胞的活化和强细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的生成,即使在不存在CD4 T细胞帮助的情况下。即使在诸如明矾或不完全弗氏佐剂(IFA)等通常促进TH2偏倚的佐剂的存在下,由TLR9刺激所诱导的TH1偏倚也得以维持。当与其他佐剂一起配制或共同施用或在制剂如微粒、纳米颗粒、脂质乳剂或类似制剂中时,CpG寡核苷酸

显示出甚至更大的佐剂活性,这对于在抗原相对较弱时诱导强烈应答尤其有用。它们还可以加速免疫应答并使抗原剂量能够降低,在一些试验中与不含CpG的全剂量免疫原性药物组合物具有相当的抗体应答(Arthur M.Krieg,Nature Reviews,Drug Discovery,5,2006年6月,471-484)。美国专利6,406,705描述了组合使用CpG寡核苷酸、非核酸佐剂和抗原来诱导抗原特异性免疫应答。一种可商购获得的CpG TLR9拮抗剂是Mologen(Berlin,DE)的dSLIM(双茎环免疫调节剂),其为本文所述的药物组合物的组分。还可以使用其他TLR结合分子,如RNA结合TLR7、TLR8和或TLR9。

[0363] 有用的佐剂的其他实例包括但不限于化学修饰的CpG(例如CpR,Idera)、聚(I:C)(例如聚I:CI2U)、非CpG细菌DNA或RNA、针对TLR8的ssRNA40以及免疫活性小分子和抗体,如环磷酰胺、舒尼替尼、贝伐珠单抗、西乐葆(Celebrex)、NCX-4016、西地那非、他达拉非、伐地那非、索拉非尼、XL-999、CP-547632、帕唑帕尼、ZD2171、AZD2171、伊匹木单抗、曲美木单抗和SC58175,它们可以治疗性地和/或作为佐剂起作用。可用于本发明上下文中的佐剂和添加剂的量和浓度可由技术人员容易地确定,而无需过多的实验。另外的佐剂包括集落刺激因子,如粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF,沙格司亭)。

[0364] 在一些实施方案中,根据本公开的免疫原性组合物可包含超过一种不同的佐剂。此外,本发明包括药物组合物,其包含任何佐剂物质,包括上述任何佐剂及其组合。在一些实施方案中,该免疫原性组合物包含新抗原治疗剂(例如,肽、多核苷酸、TCR、CAR、含有TCR或CAR的细胞、含有多肽的树突细胞、含有多核苷酸的树突细胞、抗体等),并且佐剂可以以任何合适的顺序单独施用。

[0365] 脂化可以分为几种不同的类型,如N-肉豆蔻酰化、棕榈酰化、GPI-锚添加、异戊烯化和几种其他类型的修饰。N-肉豆蔻酰化是肉豆蔻酸酯(C_{14}饱和酸)与甘氨酸残基的共价附接。棕榈酰化是长链脂肪酸(C_{16})与半胱氨酸残基的硫酯连接。GPI-锚添加是通过酰胺键的糖基-磷脂酰肌醇(GPI)连接。异戊烯化是类异戊二烯脂质(例如法呢基(C-15)、香叶酰香叶酰(C-20))与半胱氨酸残基的硫醚连接。其他类型的修饰可包括通过半胱氨酸的硫原子的S-二酰基甘油的附接、经由丝氨酸或苏氨酸残基的O-辛酰基缀合、与半胱氨酸残基的S-archaeol缀合以及胆固醇附接。

[0366] 用于生成脂化肽的脂肪酸可包括C_2至C_{30}饱和的、单不饱和的或多不饱和的脂肪酰基。示例性脂肪酸可包括棕榈酰基、肉豆蔻酰基、硬脂酰基和癸酰基。在一些情况下,具有佐剂性质的脂质部分附接至感兴趣的多肽,以在不存在外源佐剂的情况下引发或增强免疫原性。脂化肽或脂肽可以被称为自身佐剂脂肽。上文和本文其他地方描述的任何脂肪酸可以引发或增强感兴趣的多肽的免疫原性。可以引发或增强免疫原性的脂肪酸可包括棕榈酰基、肉豆蔻酰基、硬脂酰基、月桂酰基、辛酰基和癸酰基。

[0367] 可以将诸如裸肽或脂化肽的多肽并入脂质体中。有时,可以将脂化肽并入脂质体中。例如,脂化肽的脂质部分可以自发地整合到脂质体的脂双层中。因此,脂肽可以呈现于脂质体的“表面”上。适合并入制剂中的示例性脂质体包括但不限于多层囊泡(MLV)、寡层囊泡(OLV)、单层囊泡(UV)、小单层囊泡(SUV)、中等尺寸单层囊泡(MUV)、大单层囊泡(LUV)、巨单层囊泡(GUV)、多泡囊泡(MVV)、通过反相蒸发法制备的单层或寡层囊泡(REV)、通过反相蒸发法制备的多层囊泡(MLV-REV)、稳定的多层囊泡(SPLV)、冷冻和解冻的MLV(FATMLV)、通过挤出法制备的囊泡(VET)、通过弗式压碎器制备的囊泡(FPV)、通过融合制备的囊泡

(FUV)、脱水-再水化囊泡(DRV)和泡沫体(BSV)。

[0368] 取决于制备方法,脂质体可以是单层或多层的,并且可以在尺寸上不等,直径范围为约0.02μm至大于约10μm。脂质体可以吸附许多类型的细胞,然后释放并入的试剂(例如,本文所述的肽)。在一些情况下,脂质体与靶细胞融合,由此脂质体的内容物随后排空到靶细胞中。脂质体可以被吞噬细胞内吞。内吞作用之后可以是脂质体脂质的溶酶体内降解和包封剂的释放。

[0369] 本文提供的脂质体还可包含载体脂质。在一些实施方案中,该载体脂质是磷脂。能够形成脂质体的载体脂质包括但不限于二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、磷脂酰胆碱(PC;卵磷脂)、磷脂酸(PA)、磷脂酰甘油(PG)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰丝氨酸(PS)。其他合适的磷脂还包括二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、二硬脂酰基磷脂酰甘油(DSPG)、二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油(DMPG)、二棕榈酰磷脂酸(DPPA);二肉豆蔻酰磷脂酸(DMPA)、二硬脂酰磷脂酸(DSPA)、二棕榈酰基磷脂酰丝氨酸(DPPS)、二肉豆蔻酰基磷脂酰丝氨酸(DMPS)、二硬脂酰基磷脂酰丝氨酸(DSPS)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(DSPE)等或其组合。在一些实施方案中,脂质体还包含调节脂质体形成的甾醇(例如胆固醇)。载体脂质可以是任何已知的非磷酸极性脂质。

[0370] 可以使用已知的技术将药物组合物包封在脂质体内。可生物降解的微球也可以用作本发明药物组合物的载体。

[0371] 药物组合物可以在脂质体或微球(或微粒)中施用。制备用于施用于患者的脂质体和微球的方法是本领域技术人员已知的。基本上,将材料溶解在水溶液中,加入适当的磷脂和脂质以及表面活性剂(如果需要),并且按照需要对材料进行透析或超声处理。

[0372] 由聚合物或蛋白质形成的微球体是本领域技术人员已知的,并且可以适合于通过胃肠道直接进入血流。或者,可以并入化合物并植入微球或微球复合物,以供在数天至数月的时间内缓慢释放。

[0373] 基于细胞的免疫原性药物组合物也可以施用于受试者。例如,基于抗原呈递细胞(APC)的免疫原性药物组合物可以使用如本领域所理解的任何已知的技术、载体和赋形剂配制。APC包括单核细胞、单核细胞衍生的细胞、巨噬细胞和树突细胞。有时,基于APC的免疫原性药物组合物可以是基于树突细胞的免疫原性药物组合物。

[0374] 基于树突细胞的免疫原性药物组合物可通过本领域已知的任何方法制备。在一些情况下,可以通过离体或体内方法制备基于树突细胞的免疫原性药物组合物。该离体方法可包括使用以本文所述的多肽离体脉冲的自体DC,以在施用于患者之前激活或负载DC。该体内方法可包括使用与本文所述的多肽相偶联的抗体靶向特异性DC受体。基于DC的免疫原性药物组合物可以进一步包含DC激活剂,如TLR3、TLR-7-8和CD40激动剂。基于DC的免疫原性药物组合物可以进一步包含佐剂和药学上可接受的载体。

[0375] 佐剂可用于增强在接受免疫原性药物组合物的患者中引发的免疫应答(体液和/或细胞应答)。有时,佐剂可引发Th1型应答。其他时候,佐剂可以引发Th2型应答。Th1型应答的特征可在于产生诸如IFN-γ等细胞因子,相反,Th2型应答的特征可在于产生诸如IL-4、IL-5和IL-10等细胞因子。

[0376] 在一些方面,基于脂质的佐剂,如MPLA和MDP,可以与本文公开的免疫原性药物组

合物一起使用。例如,单磷酰脂质A(MPLA)是引起脂质体抗原向特异性T淋巴细胞的呈递增加的佐剂。此外,胞壁酰二肽(MDP)也可以与本文所述的免疫原性药物制剂一起用作合适的佐剂。

[0377] 佐剂还可包含刺激分子,如细胞因子。细胞因子的非限制性实例包括:CCL20、a-干扰素(IFNα)、β-干扰素(IFNβ)、γ-干扰素(IFNγ)、血小板衍化生长因子(PDGF)、TNFα、GM-CSF、表皮生长因子(EGF)、皮肤T细胞吸引趋化因子(CTACK)、表皮胸腺表达趋化因子(TECK)、粘膜相关上皮细胞趋化因子(MEC)IL-12、IL-15,、IL-28、MHC、CD80、CD86、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-18、MCP-1、MIP-la、MIP-1-、IL-8、L-选择蛋白、P-选择蛋白、E-选择蛋白、CD34、GlyCAM-1、MadCAM-1、LFA-1、VLA-1、Mac-1、pl50.95、PECAM、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、CD2、LFA-3、M-CSF、G-CSF、IL-18的突变体形式、CD40、CD40L、血管生长因子、成纤维细胞生长因子、IL-7、神经生长因子、血管内皮生长因子、Fas、TNF受体、Fit、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DRS、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、胱天蛋白酶ICE、Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、IκB、无活性NIK、SAP K、SAP-I、JNK、干扰素应答基因、NFκB、Bax、TRAIL、TRAILrec、TRAILrecDRC5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANK LIGAND、Ox40、Ox40 LIGAND、NKG2D、MICA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、TAPI和TAP2。

[0378] 其他的佐剂包括:MCP-1、MIP-la、MIP-lp、IL-8、RANTES、L-选择蛋白、P-选择蛋白、E-选择蛋白、CD34、GlyCAM-1、MadCAM-1、LFA-1、VLA-1、Mac-1、pl50.95、PECAM、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、CD2、LFA-3、M-CSF、G-CSF、IL-4、IL-18的突变体形式、CD40、CD40L、血管生长因子、成纤维生长因子、IL-7、IL-22、神经生长因子、血管内皮生长因子、Fas、TNF受体、Fit、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、胱天蛋白酶ICE、Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、IκB、无活性NIK、SAP K、SAP-1、JNK、干扰素应答基因、NFκB、Bax、TRAIL、TRAILrec、TRAILrecDRC5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANK LIGAND、Ox40、Ox40 LIGAND、NKG2D、MICA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、TAP1、TAP2及其功能片段。

[0379] 在一些方面,佐剂可以是toll样受体的调节剂。铎样受体调节剂的实例包括TLR9激动剂并且不限于铎样受体的小分子调节剂(诸如咪喹莫特)。有时,佐剂选自细菌类毒素、聚氧丙烯-聚乙二醇嵌段聚合物、铝盐、脂质体、CpG聚合物、水包油乳液或其组合。有时,佐剂是水包油乳液。水包油乳液可包含至少一种油和至少一种表面活性剂,其中油和表面活性剂是可生物降解的(可代谢的)和生物相容的。乳液中的油滴直径可小于5μm,甚至可具有亚微米级直径,这些小尺寸通过微流化器实现以提供稳定的乳液。尺寸小于220nm的小液滴可以进行过滤除菌。

[0380] 在一些情况下,免疫原性药物组合物可包括载体和赋形剂(包括但不限于缓冲液、碳水化合物、甘露醇、蛋白质、多肽或氨基酸如甘氨酸、抗氧化剂、抑菌剂、螯合剂、悬浮剂、增稠剂和/或防腐剂)、水、油(包括石油、动物、植物或合成来源的那些油,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等)、盐溶液、右旋糖水溶液和甘油溶液、调味剂、着色剂、防粘剂和其他可接受的添加剂、佐剂或粘合剂,接近生理条件所需的其他药学上可接受的辅助物质,如pH缓冲剂、张度调节剂、乳化剂、润湿剂等。赋形剂的实例包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙

烯、乙二醇、水、乙醇等。在另一种情况下,药物制剂基本上不含防腐剂。在其他情况下,药物制剂可含有至少一种防腐剂。应当认识到,虽然本领域普通技术人员已知的任何合适的载体可用于施用本文所述的药物组合物,但载体的类型将根据给药模式而变化。

[0381] 免疫原性药物组合物可包括防腐剂,如硫柳汞或2-苯氧基乙醇。在一些情况下,免疫原性药物组合物基本上不含(例如,<10μg/mL)汞物质,例如,不含硫柳汞。α-生育酚琥珀酸酯可用作汞化合物的替代物。

[0382] 为了控制张度,免疫原性药物组合物中可包含生理盐,如钠盐。其他盐可包括氯化钾、磷酸二氢钾、磷酸二钠和/或氯化镁等。

[0383] 免疫原性药物组合物可具有200mOsm/kg至400mOsm/kg、240-360mOsm/kg或290-310mOsm/kg的重量摩尔渗透压浓度。

[0384] 免疫原性药物组合物可包含一种或多种缓冲液,如Tris缓冲液;硼酸盐缓冲液;琥珀酸盐缓冲液;组氨酸缓冲液(特别是含有氢氧化铝佐剂);或柠檬酸盐缓冲液。在一些情况下,缓冲液以5-20或10-50mM包含在内。

[0385] 免疫原性药物组合物的pH可以是约5.0至约8.5、约6.0至约8.0、约6.5至约7.5或约7.0至约7.8。

[0386] 免疫原性药物组合物可以是无菌的。免疫原性药物组合物可以是无热原的,例如,每剂量含有<1EU(内毒素单位,标准量度),且每剂量可为<0.1EU。该组合物可以不含麸质。

[0387] 免疫原性药物组合物可包含去污剂,例如,聚氧乙烯失水山梨醇酯表面活性剂(称为"吐温")或辛苯聚醇(如辛苯聚醇-9(Triton X-100)或叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇)。去污剂可以仅以痕量存在。免疫原性药物组合物可包含各自小于1mg/mL的辛苯聚醇-10和聚山梨醇酯80。痕量的其他残余组分可以是抗生素(例如新霉素、卡那霉素、多粘菌素B)。

[0388] 免疫原性药物组合物可在本领域公知的合适的媒介物中配制成无菌溶液或悬浮液。药物组合物可以通过常规的公知灭菌技术灭菌,或者可以过滤除菌。所得的水溶液可以被包装以供原样使用,或冻干,在施用前将冻干的制品与无菌溶液合并。

[0389] 例如包含活性剂(如本文公开的免疫细胞)的药物组合物与一种或多种佐剂组合可以配制成具有一定的摩尔比。例如,可以使用活性剂如本文所述的免疫细胞与一种或多种佐剂组合的约99:1至约1:99的摩尔比。在一些情况下,活性剂如本文所述的免疫细胞与一种或多种佐剂组合的摩尔比的范围可选自约80:20至约20:80;约75:25至约25:75、约70:30至约30:70、约66:33至约33:66、约60:40至约40:60;约50:50;以及约90:10至约10:90。活性剂如本文所述的免疫细胞与一种或多种佐剂组合的摩尔比可以是约1:9,并且在一些情况下可以是约1:1。活性剂如本文所述的免疫细胞与一种或多种佐剂组合,可以一起配制在同一剂量单位中,例如一个小瓶、栓剂、片剂、胶囊、气雾剂喷剂中;或者每种药剂、形式和/或化合物可以配制在单独的单位中,例如两个小瓶、两个栓剂、两个片剂、两个胶囊、一个片剂和一个小瓶、气雾剂喷剂等中。

[0390] 在一些情况下,免疫原性药物组合物可与额外的药剂一起施用。额外的药剂的选择可以至少部分地取决于所治疗的病况。额外的药剂可包括,例如,检查点抑制剂,如抗PD1、抗CTLA4、抗PD-L1、抗CD40或抗TIM3剂(例如,抗PD1、抗CTLA4、抗PD-L1、抗CD40或抗TIM3抗体);或对病原体感染(例如病毒感染)具有治疗效果的任何药剂,包括,例如,用来治疗炎性状况的药物,如NSAID,例如,布洛芬、萘普生、对乙酰氨基酚、酮洛芬或阿司匹林。例

如,检查点抑制剂可以是PD-1/PD-L1激动剂,其选自:纳武单抗(ONO-4538/BMS-936558,MDX1 106,OPDIVO)、派姆单抗(MK-3475,KEYTRUDA)、pidilizumab(CT-011)和MPDL3280A(ROCHE)。作为另一个实例,制剂可以另外含有一种或多种补充剂,如维生素C、E或其他抗氧化剂。

[0391] 包含活性剂如本文所述免疫细胞与一种或多种佐剂的组合的药物组合物,可以使用一种或多种生理学上可接受的载体以常规方式配制,该生理学上可接受的载体包括赋形剂、稀释剂和/或助剂,例如促进将活性剂加工成可以施用的制剂的载体。合适的制剂可以至少部分依赖于所选的给药途径。本文所述的药剂可以使用多种给药途径或模式(包括口服、颊部、局部、直肠、经皮、经粘膜、皮下、静脉内和肌肉内施用,以及通过吸入)递送至患者。

[0392] 活性剂可以被配制用于肠胃外给药(例如,通过注射,例如,团注或连续输注),并且可以在安瓿、预填充注射器、小体积输注中或在添加防腐剂的多剂量容器中以单位剂量形式呈现。该组合物可以采取诸如油性或水性媒介物中的悬浮液、溶液或乳液的形式,例如在水性聚乙二醇中的溶液。

[0393] 对于可注射制剂,媒介物可以选自本领域已知合适的那些媒介物,包括水溶液或油性悬浮液或乳液,其具有麻油、玉米油、棉子油或花生油,以及酏剂,甘露糖醇、右旋糖或无菌水溶液,以及类似的药物媒介物。该制剂还可包含可生物相容的、可生物降解的聚合物组合物,如聚(乳酸-共-乙醇酸)。这些材料可以制成微米球或纳米球,负载药物,并进一步包覆或衍生化以提供优异的持续释放性能。适用于眼周或眼内注射的媒介物包括,例如,治疗剂在注射级水、脂质体及适合于亲脂性物质的媒介物中的悬浮液。用于眼周或眼内注射的其他媒介物是本领域公知的。

[0394] 在一些情况下,药物组合物按照常规程序配制成适合于对人体静脉内施用的药物组合物。一般而言,用于静脉内给药的组合物是在无菌等渗水性缓冲液中的溶液。当需要时,该组合物还可以包含增溶剂和局部麻醉剂如利多卡因以减轻注射部位的疼痛。通常,成分分开供应或混合在一起以单位剂型供应,例如,作为在指示活性剂的量的密封容器如安瓿或小药囊(sachette)中的干冻干粉或无水浓缩物。当通过输注施用组合物时,其可以用含有无菌药物级水或盐水的输注瓶分配。当通过注射施用组合物时,可以提供无菌注射用水或盐水的安瓿以使成分可以在给药前混合。

[0395] 当通过注射施用时,活性剂可以在水性溶液中配制,特别是在生理上相容的缓冲液如Hanks溶液、林格氏液或生理盐水缓冲液中配制。该溶液可含有配制用剂,如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。在另一个实施方案中,药物组合物不包含佐剂或其他任何为了增强被肽刺激的免疫应答而添加的物质。

[0396] 除了先前描述的制剂外,活性剂也可以被配制成贮库型(depot)制剂。这样的长效制剂可通过植入或经皮递送(例如皮下或肌肉内)、肌肉内注射或使用透皮贴剂来施用。因此,例如,药剂可以与合适的聚合物材料或疏水材料(例如,在可接受的油中的乳液)或离子交换树脂一起配制,或者配制为微溶的衍生物,例如,配制为微溶的盐。

[0397] 在一些情况下,包含一种或多种药剂的药物组合物在局部施用或在特定感染部位处或附近注射时发挥局部和区域效应。例如粘性液体、溶液、悬浮液、基于二甲基亚砜(DMSO)的溶液、脂质体制剂、凝胶、胶冻、乳膏、洗剂、软膏、栓剂、泡沫剂或气雾喷剂的直接

局部应用可用于局部施用,以产生例如局部和/或区域效应。用于这类制剂的药学上适合的媒介物包括例如低级脂肪族醇、聚二醇(例如,甘油或聚乙二醇)、脂肪酸酯、油、脂肪、硅氧烷等。这类制品还可以包含防腐剂(例如,对羟基苯甲酸酯)和/或抗氧化剂(例如,抗坏血酸和生育酚)。另外参见Dermatological Formulations:Percutaneous absorption,Barry(Ed.),Marcel Dekker Incl,1983。在另一个实施方案中,包含转运体、载体或离子通道抑制剂的局部/外用制剂用来治疗表皮或粘膜病毒感染。

[0398] 药物组合物可以含有佐剂,如亲水性或亲脂性胶凝剂、亲水性或亲脂性活性剂、防腐剂、抗氧化剂、溶剂、芳香剂、填充剂、防晒剂、气味吸收剂和染料。这些各种佐剂的量是在所考虑的领域中常规使用的量,并且例如为组合物总重量的约0.01%至约20%。根据它们的性质,可将这些佐剂引入脂肪相、水相和/或脂质囊泡中。

[0399] 治疗方法

[0400] 本文还提供了治疗患有疾病、病症或病况的受试者的方法。治疗方法可以包括向患有病、病症或病况的受试者施用本文公开的组合物或药物组合物。

[0401] 本公开提供了包括免疫原性疗法的治疗方法。提供了治疗疾病(如癌症或病毒感染)的方法。方法可以包括根据本文提供的方法向受试者施用有效量的包含免疫原性抗原特异性T细胞的组合物。在一些实施方案中,该抗原包括病毒抗原。在一些实施方案中,该抗原包括肿瘤抗原。

[0402] 可以制备的治疗剂的非限制性实例包括基于肽的治疗剂、基于核酸的治疗剂、基于抗体的治疗剂、基于T细胞的治疗剂和基于抗原呈递细胞的治疗剂。

[0403] 在一些其他方面,本文提供了组合物或药物组合物在制备用于治疗的药物中的用途。在一些实施方案中,治疗方法包括向受试者施用有效量的特异性识别免疫原性新抗原肽的T细胞。在一些实施方案中,治疗方法包括向受试者施用有效量的TCR,其特异性识别免疫原性新抗原肽,例如在T细胞中表达的TCR。

[0404] 在一些实施方案中,所述癌症选自癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤、白血病、鳞状细胞癌、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状上皮癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌(包括胃肠道癌)、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、黑素瘤、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、头颈癌、结直肠癌、直肠癌、软组织肉瘤、卡波济肉瘤、B细胞淋巴瘤(包括低度/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL)、小淋巴细胞(SL)NHL、中度/滤泡性NHL、中度弥漫性NHL、高度免疫原性NHL、高度淋巴细胞NHL、高度小型非裂解细胞NHL、大肿块疾病NHL、套细胞淋巴瘤、AIDS相关淋巴瘤和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性淋巴母细胞性白血病(ALL)、骨髓瘤、毛细胞白血病、慢性成纤维细胞白血病和移植后淋巴增生性疾病(PTLD),与斑痣性错构瘤病、水肿、Meigs综合征相关的异常血管增生,及其组合。

[0405] 本文描述的方法在个性化医学环境中特别有用,其中根据本文描述的方法鉴定的免疫原性新抗原肽被用于为同一个体开发治疗剂(如疫苗或治疗性抗体)。因此,治疗受试者疾病的方法可以包括根据本文所述的方法鉴定受试者中的免疫原性新抗原肽;合成所述肽(或其前体);以及制备对已鉴定出的新抗原具有特异性的T细胞;并将新抗原特异性T细胞施用于受试者。

[0406] 本文提供的药剂和组合物可单独使用或与常规治疗方案如手术、放射、化学疗法

和/或骨髓移植(自体、同基因、同种异体或无关)联合使用。例如,可以使用本文所述的方法鉴定一组肿瘤抗原,并且其可用于例如大部分癌症患者中。

[0407] 在一些实施方案中,除包含免疫原性治疗剂的组合物外,还可以施用至少一种或多种化疗剂。在一些实施方案中,所述一种或多种化疗剂可属于不同类别的化疗剂。

[0408] 在实施本文提供的治疗或使用方法时,可以将治疗有效量的治疗剂施用于患有疾病或病况的受试者。治疗有效量可以根据疾病的严重程度、受试者的年龄和相对健康状况、所用化合物的效力和其他因素而广泛地变化。

[0409] 受试者可以是,例如,哺乳动物、人、孕妇、老年人、成年人、青少年、青春期前儿童、儿童、幼儿、婴儿、新生儿或新生婴儿。受试者可以是患者。在一些情况下,受试者可以是人。在一些情况下,受试者可以是儿童(即青春期以下的年轻人)。在一些情况下,受试者可以是婴儿。在一些情况下,受试者可以是配方奶粉喂养的婴儿。在一些情况下,受试者可以是加入临床研究的个体。在一些情况下,受试者可以是实验室动物,例如哺乳动物或啮齿动物。在一些情况下,受试者可以是小鼠。在一些情况下,该受试者可以是肥胖的或超重的受试者。

[0410] 在一些实施方案中,受试者先前已经用一种或多种不同的癌症治疗方式进行了治疗。在一些实施方案中,受试者先前已经用放射疗法、化学疗法或免疫疗法中的一种或多种进行了治疗。在一些实施方案中,受试者已经用一、二、三、四或五线先前疗法进行了治疗。在一些实施方案中,先前的疗法是细胞毒性疗法。

[0411] 在一些实施方案中,可以用本文公开的方法治疗的疾病或病况是癌症。癌症是细胞的异常生长,往往以不受控制的方式增殖,在某些情况下会转移(扩散)。肿瘤可以是癌性或良性的。良性肿瘤是指肿瘤可以生长但不能扩散。癌性肿瘤是恶性的,这意味着它可以生长并扩散到身体的其他部位。如果癌症扩散(转移),则新肿瘤与原始(原发)肿瘤的名称相同。

[0412] 本公开的方法可以用于治疗本领域已知的任何类型的癌症。通过本公开的方法治疗的癌症的非限制性实例可以包括黑素瘤(例如,转移性恶性黑素瘤)、肾癌(例如,透明细胞癌)、前列腺癌(例如,激素难治性前列腺腺癌)、胰腺腺癌、乳腺癌、结肠癌、肺癌(例如非小细胞肺癌)、食管癌、头颈部鳞状细胞癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、甲状腺癌、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、白血病、淋巴瘤和其他肿瘤性恶性肿瘤。

[0413] 另外,本文提供的疾病或病况包括使用本发明的治疗方法可抑制其生长的难治性或复发性恶性肿瘤。在一些实施方案中,通过本公开的治疗方法治疗的癌症选自癌、鳞状癌、腺癌、肉瘤、子宫内膜癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、输卵管癌、原发性腹膜癌、结肠癌、结直肠癌、生殖器区域的鳞状细胞癌、黑素瘤、肾细胞癌、肺癌、非小细胞肺癌、肺鳞状细胞癌、胃癌、膀胱癌、胆囊癌、肝癌、甲状腺癌、喉癌、唾液腺癌、食管癌、头颈癌、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、头颈部鳞状细胞癌、前列腺癌、胰腺癌、间皮瘤、肉瘤、血液系统癌症、白血病、淋巴瘤、神经瘤及其组合。在一些实施方案中,通过本公开的方法治疗的癌症包括例如癌、鳞状癌(例如子宫颈管、眼睑、结膜、阴道、肺、口腔、皮肤、膀胱、舌头、喉和食道的癌症)和腺癌(例如,前列腺、小肠、子宫内膜、子宫颈管、大肠、肺、胰腺、食道、直肠、子宫、胃、乳腺和卵巢的癌症)。在一些实施方案中,将通过本公开的方法治疗的癌症进一步包括肉瘤(例如,肌原性肉瘤)、白血病、神经瘤、黑素瘤和淋巴瘤。在一些实施方案中,将通过本公开的方法治疗

的癌症是乳腺癌。在一些实施方案中,将通过本公开的治疗方法治疗的癌症是三阴性乳腺癌(TNBC)。在一些实施方案中,将通过本公开的治疗方法治疗的癌症是卵巢癌。在一些实施方案中,将通过本公开的治疗方法治疗的癌症是结直肠癌。

[0414] 在一些实施方案中,待用本公开的药物组合物治疗的患者或患者群体患有实体瘤。在一些实施方案中,该实体瘤是黑素瘤、肾细胞癌、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、胆囊癌、喉癌、肝癌、甲状腺癌、胃癌、唾液腺癌、前列腺癌、胰腺癌或默克尔细胞癌。在一些实施方案中,待用本公开的药物组合物治疗的患者或患者群体患有血液系统癌症。在一些实施方案中,患者患有血液系统癌症,如弥漫性大B细胞淋巴瘤(“DLBCL”)、霍奇金淋巴瘤(“HL”)、非霍奇金淋巴瘤(“NHL”)、滤泡性淋巴瘤(“FL”)、急性髓样白血病(“AML”)或多发性骨髓瘤(“MM”)。在一些实施方案中,待治疗的患者或患者群体的癌症选自卵巢癌、肺癌和黑素瘤。

[0415] 根据本公开可以预防和/或治疗的癌症的具体实例包括但不限于以下:肾癌、肾脏癌、多形性胶质母细胞瘤、转移性乳腺癌;乳腺癌;乳腺肉瘤;神经纤维瘤;神经纤维瘤病;小儿肿瘤;神经母细胞瘤;恶性黑素瘤;表皮癌;白血病,例如但不限于急性白血病,急性淋巴细胞白血病,急性髓细胞性白血病,如成髓细胞性、早幼粒细胞性、骨髓单核细胞性、单核细胞性和红白血病,以及骨髓增生异常综合征;慢性白血病,例如但不限于慢性髓细胞性(粒细胞性)白血病、慢性淋巴细胞性白血病、毛细胞白血病;真性红细胞增多症;淋巴瘤,例如但不限于霍奇金病、非霍奇金病;多发性骨髓瘤,例如但不限于郁积型多发性骨髓瘤、非分泌性骨髓瘤、骨硬化性骨髓瘤、浆细胞白血病、孤立性浆细胞瘤和髓外浆细胞瘤;瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症;意义不明的单克隆丙种球蛋白病;良性单克隆丙种球蛋白病;重链病;骨癌和结缔组织肉瘤,例如但不限于骨骼肉瘤、骨髓瘤骨病、多发性骨髓瘤、胆脂瘤诱发的骨肉瘤、佩吉特骨病、骨肉瘤、软骨肉瘤、尤因肉瘤、恶性巨细胞瘤、骨纤维肉瘤、脊索瘤、骨膜肉瘤、软组织肉瘤、血管肉瘤(血管内皮瘤)、纤维肉瘤、卡波西肉瘤、平滑肌肉瘤、脂肪肉瘤、淋巴管肉瘤、神经鞘瘤、横纹肌肉瘤和滑膜肉瘤;脑瘤,例如但不限于神经胶质瘤、星形细胞瘤、脑干神经胶质瘤、室管膜瘤、少突神经胶质瘤、非神经胶质瘤、听神经鞘瘤、颅咽管瘤、髓母细胞瘤、脑膜瘤、松果体细胞瘤、松果体母细胞瘤和原发性脑淋巴瘤;乳腺癌,包括但不限于腺癌、小叶(小细胞)癌、导管内癌、髓样乳腺癌、粘液性乳腺癌、小管性乳腺癌、乳头状乳腺癌、佩吉特病(包括青少年佩吉特病)和炎性乳腺癌;肾上腺癌,例如但不限于嗜铬细胞瘤和肾上腺皮质癌;甲状腺癌,例如但不限于乳头状或滤泡状甲状腺癌、髓样甲状腺癌和间变性甲状腺癌;胰腺癌,例如但不限于胰岛素瘤、胃泌素瘤、胰高血糖素瘤、VIP瘤、分泌促生长素抑制素的肿瘤以及类癌或胰岛细胞瘤;垂体癌,例如但不限于库欣病、分泌催乳素的肿瘤、肢端肥大症和尿崩症;眼癌,例如但不限于眼黑素瘤,如虹膜黑素瘤、脉络膜黑素瘤和睫状体黑素瘤,以及视网膜母细胞瘤;阴道癌,如鳞状细胞癌、腺癌和黑素瘤;外阴癌,如鳞状细胞癌、黑素瘤、腺癌、基底细胞癌、肉瘤和佩吉特病;宫颈癌,例如但不限于鳞状细胞癌和腺癌;子宫癌,例如但不限于子宫内膜癌和子宫肉瘤;卵巢癌,例如但不限于卵巢上皮癌、交界瘤、胚细胞瘤和基质肿瘤;食管癌,例如但不限于鳞状癌、腺癌、腺样囊性癌、粘液表皮样癌、腺鳞癌、肉瘤、黑素瘤、浆细胞瘤、疣状癌和燕麦细胞(小细胞)癌;胃癌,例如但不限于腺癌、蕈状(息肉样)、溃疡性、浅表扩散、弥散性扩散、恶性淋巴瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤和癌肉瘤;结肠癌;结直肠癌;KRAS突变结直肠癌;结肠癌;直肠癌;肝癌,例如但不限于肝细胞

癌和肝母细胞瘤;胆囊癌,如腺癌;胆管癌,例如但不限于乳头状、结节状和弥漫性;肺癌,如KRAS突变的非小细胞肺癌、非小细胞肺癌、鳞状细胞癌(表皮样癌)、腺癌、大细胞癌和小细胞肺癌;肺癌;睾丸癌,例如但不限于生殖细胞瘤、精原细胞瘤、间变性、经典(典型)、精细胞癌、非精原细胞瘤、胚胎性癌、畸胎瘤、绒毛膜癌(卵黄囊瘤),前列腺癌,例如但不限于雄激素非依赖性前列腺癌、雄激素依赖性前列腺癌、腺癌、平滑肌肉瘤和横纹肌肉瘤;松果体癌;口腔癌,例如但不限于鳞状细胞癌;基底癌;唾液腺癌,例如但不限于腺癌、粘液表皮样癌和腺样囊性癌;咽癌,例如但不限于鳞状细胞癌和疣状;皮肤癌,例如但不限于基底细胞癌、鳞状细胞癌和黑素瘤,浅表扩散性黑素瘤、结节性黑素瘤、痣样恶性黑素瘤、肢端着色斑性黑素瘤;肾癌,例如但不限于肾细胞癌、腺癌、肾上腺样瘤、纤维肉瘤、移行细胞癌(肾盂和/或子宫);肾癌;维尔姆斯瘤;膀胱癌,例如但不限于移行细胞癌、鳞状细胞癌、腺癌、癌肉瘤。另外,癌症包括粘液肉瘤、骨原性肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、间皮瘤、滑膜瘤、血管母细胞瘤、上皮癌、囊腺癌、支气管癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌和乳头状腺癌。

[0416] 试剂盒

[0417] 本文所述的方法和组合物可以与给药说明书一起以试剂盒形式提供。通常,该试剂盒可包括在容器中的单位剂型形式的所需新抗原治疗组合物和给药说明书。该试剂盒中还可包括附加治疗剂,例如细胞因子、淋巴因子、检查点抑制剂、抗体。其他可能需要的试剂盒组分包括,例如,无菌注射器、加强剂量和其他所需的赋形剂。

[0418] 本文还提供了与本文所述的一种或多种方法一起使用的试剂盒和制品。该试剂盒可含有一种或多种类型的免疫细胞。该试剂盒还可含有可用于如本文所述产生抗原特异性免疫细胞(例如新抗原特异性T细胞)的试剂、肽和/或细胞。该试剂盒可以进一步含有组成和递送该抗原特异性免疫细胞所必需的佐剂、试剂和缓冲液。

[0419] 试剂盒还可包括载具、包装或容器,该容器被区室化为容纳一个或多个容器如小瓶、管等,每个容器包含将在本文描述的方法中使用的一种单独元素,如多肽和佐剂。合适的容器包括,例如,瓶子、小瓶、注射器和试管。该容器可由多种材料如玻璃或塑料形成。

[0420] 本文提供的制品含有包装材料。药物包装材料的实例包括但不限于泡罩包装、瓶子、管、袋、容器、瓶子,和任何适于选定制剂和预期给药和治疗模式的包装材料。试剂盒一般包括列出了内容物的标签和/或使用说明书,以及带有使用说明的包装插页。还可包括一套说明书。

[0421] 实施方案段落

[0422] [1]一种药物组合物,其包含:(a)来自生物样品的免疫细胞群体,所述生物样品包含至少一种抗原特异性T细胞,所述抗原特异性T细胞包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR),和(b)药学上可接受的赋形剂;其中群体中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的量与生物样品中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的数量成比例地不同。

[0423] [2]一种包含来自生物样品的免疫细胞群体的组合物,其中群体中表达CD14和CD25的免疫细胞的量成比例地小于生物样品中表达CD14和CD25的免疫细胞的量。

[0424] [3]一种药物组合物,其包含(a)包含来自生物样品的T细胞的免疫细胞群体,其中所述T细胞包含至少一种抗原特异性T细胞,所述抗原特异性T细胞是APC刺激的T细胞并包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR),其中所述APC是FLT3L刺激的APC;和(b)药学上可接受的赋形剂。

[0425] [4]段落[1]的组合物,其中所述至少一种抗原特异性T细胞包含至少一种APC刺激的T细胞。

[0426] [5]段落[1]、[3]和[4]中任一项的组合物,其中群体中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的量成比例地小于生物样品中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的量。

[0427] [6]段落[1]、[3]和[4]中任一项的组合物,其中群体中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的量成比例地大于生物样品中表达CD14和/或CD25的免疫细胞的量。

[0428] [7]段落[1]-[6]中任一项的组合物,其中所述生物样品来自受试者。

[0429] [8]段落[7]的组合物,其中所述受试者是人。

[0430] [9]段落[7]或[8]的组合物,其中所述受试者患有疾病或病症。

[0431] [10]段落[9]的组合物,其中所述疾病或病症是癌症。

[0432] [11]段落[10]的组合物,其中所述癌症选自卵巢癌、肺癌和黑素瘤。

[0433] [12]段落[1]-[11]中任一项的组合物,其中所述至少一种抗原特异性T细胞包含至少一种$CD4^+$T细胞。

[0434] [13]段落[1]-[12]中任一项的组合物,其中所述至少一种抗原特异性T细胞包含至少一种$CD8^+$T细胞。

[0435] [14]段落[1]-[13]中任一项的组合物,其中所述至少一种抗原特异性T细胞包含至少一种CD4富集的T细胞。

[0436] [15]段落[1]-[14]中任一项的组合物,其中所述至少一种抗原特异性T细胞包含至少一种富含CD8富集的T细胞。

[0437] [16]段落[1]-[15]中任一项的组合物,其中所述至少一种抗原特异性T细胞包括记忆T细胞。

[0438] [17]段落[1]-[16]中任一项的组合物,其中所述至少一种抗原特异性T细胞包括幼稚T细胞。

[0439] [18]段落[1]-[17]中任一项的组合物,其中所述至少一种抗原特异性T细胞包括记忆$CD4^+$T细胞。

[0440] [19]段落[1]-[18]中任一项的组合物,其中所述至少一种抗原特异性T细胞包含幼稚$CD4^+$T细胞。

[0441] [20]段落[1]-[19]中任一项的组合物,其中所述至少一种抗原特异性T细胞包括记忆$CD8^+$T细胞。

[0442] [21]段落[1]-[20]中任一项的组合物,其中所述至少一种抗原特异性T细胞包含幼稚$CD8^+$T细胞。

[0443] [22]段落[1]-[21]中任一项的组合物,其中所述至少一个抗原肽序列包含选自以下的突变:(A)点突变,(B)剪接位点突变,(C)移码突变,(D)通读突变,(E)基因融合突变,及其组合。

[0444] [23]段落[1]-[22]中任一项的组合物,其中所述至少一个抗原肽序列以比相应的野生型肽更大的亲和力结合受试者的HLA蛋白。

[0445] [24]段落[1]-[23]中任一项的组合物,其中所述至少一个抗原肽序列以小于500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nM或10nM的KD或IC50结合受试者的HLA蛋白。

[0446] [25]段落[1]-[24]中任一项的组合物,其中所述至少一个抗原肽序列的每一个结

合由受试者表达的HLA等位基因所编码的蛋白质。

[0447] [26]段落[1]-[25]中任一项的组合物,其中所述TCR以小于500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nM或10nM的KD或IC50结合肽-HLA复合物。

[0448] [27]段落[1]-[26]中任一项的组合物,其中所述至少一个抗原肽序列中的每一个包含在受试者的非癌细胞中不存在的突变。

[0449] [28]段落[1]-[27]中任一项的组合物,其中所述至少一个抗原肽序列的每一个由受试者的癌细胞的基因或表达的基因编码。

[0450] [29]段落[1]-[28]中任一项的组合物,其中所述至少一个抗原肽序列中的一个或多个的长度为至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1,000、1,500、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、7,500或10,000个天然存在的氨基酸。

[0451] [30]段落[1]-[29]中任一项的组合物,其中所述至少一个抗原肽序列中的一个或多个与由I类HLA等位基因编码的蛋白质结合,并且具有8-12个天然存在原氨基酸的长度。

[0452] [31]段落[1]-[30]中任一项的组合物,其中所述至少一个抗原肽序列中的一个或多个结合由II类HLA等位基因编码的蛋白质,并且长度为16-25个天然存在的氨基酸。

[0453] [32]段落[1]-[31]中任一项的组合物,其中所述至少一个抗原肽序列包含多个抗原肽序列。

[0454] [33]段落[32]的组合物,其中多个抗原肽序列包含至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450或500个抗原肽序列。

[0455] [34]段落[3]-[33]的组合物,其中所述APC是一种或多种APC制品。

[0456] [35]段落[3]-[34]中任一项的组合物,其中所述APC是成熟的APC。

[0457] [36]段落[3]-[35]中任一项的组合物,其中所述APC包括负载有一种或多种抗原肽的APC,所述抗原肽包含所述至少一个抗原肽序列中的一个或多个。

[0458] [37]段落[3]-[36]中任一项的组合物,其中所述APC是自体APC、同种异体APC或人工APC。

[0459] [38]段落[3]-[37]中任一项的组合物,其中所述APC包括树突细胞(DC)。

[0460] [39]段落[4]-[38]中任一项的组合物,其中所述APC来源于$CD14^+$单核细胞,或是CD14富集的APC,或CD141富集的APC。

[0461] [40]段落[39]的组合物,其中所述$CD14^+$单核细胞从来自受试者的包含外周血单核细胞(PBMC)的生物样品富集。

[0462] [41]段落[39]或[40]的组合物,其中所述$CD14^+$单核细胞用一种或多种细胞因子或生长因子进行刺激。

[0463] [42]段落[41]的组合物,其中所述一种或多种细胞因子或生长因子包含GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40、聚I:C或其组合。

[0464] [43]段落[39]-[42]中任一项的组合物,其中所述CD14+单核细胞来自包含PBMC的第二生物样品。

[0465] [44]段落[43]的组合物,其中第二生物样品来自同一受试者。

[0466] [45]段落[1]-[44]中任一项的组合物,其中所述生物样品包含外周血单核细胞

(PBMC)。

[0467] [46]段落[1]和[3]-[45]中任一项的组合物,其中所述至少一种抗原特异性T细胞在包含IL-7、IL-15、吲哚胺2,3-双加氧酶-1(IDO)抑制剂、抗PD-1抗体,IL-12或其组合中进行刺激。

[0468] [47]段落[46]的组合物,其中所述IDO抑制剂是epacadostat、navoximod、1-甲基色氨酸或其组合。

[0469] [48]段落[1]-[47]中任一项的组合物,其中所述至少一种抗原特异性T细胞在所述组合物中的百分比为总T细胞或总免疫细胞的至少约0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。

[0470] [49]段落[1]-[48]中任一项的组合物,其中所述组合物中至少一种抗原特异性$CD8^+$T细胞的百分比为总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至少约0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、

[0471] 17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%、。

[0472] [50]段落[1]-[49]中任一项的组合物,其中所述组合物中至少一种抗原特异性$CD4^+$T细胞的百分比为总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至少约0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、

[0473] 17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。

[0474] [51]段落[1]-[50]中任一项的组合物,其中所述生物样品中至少一种抗原特异性T细胞的百分比为总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至多约0.00001%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%或0.5%。

[0475] [52]段落[1]-[51]中任一项的组合物,其中所述生物样品中至少一种抗原特异性$CD8^+$T细胞的百分比为总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至多约0.00001%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%或0.5%。

[0476] [53]段落[1]-[52]中任一项的组合物,其中所述生物样品中至少一种抗原特异性$CD4^+$T细胞的百分比为总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至多约0.00001%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%或0.5%。

[0477] [54]段落[1]-[53]中任一项的组合物,其中所述抗原是新抗原、肿瘤相关抗原、过表达的抗原、病毒抗原、次要组织相容性抗原或其组合。

[0478] [55]段落[1]-[54]中任一项的组合物,其中所述组合物中至少一种抗原特异性$CD8^+$T细胞的数目为至少为至少约$1x10^6$、$2x10^6$、$5x10^6$、$1x10^7$、$2x10^7$、$5x10^7$、$1x10^8$、$2x10^8$或$5x10^8$个抗原特异性$CD8^+$T细胞。

[0479] [56]段落[1]-[54]中任一项的组合物,其中所述组合物中至少一种抗原特异性$CD4^+$T细胞的数目为至少约$1x10^6$、$2x10^6$、$5x10^6$、$1x10^7$、$2x10^7$、$5x10^7$、$1x10^8$、$2x10^8$或$5x10^8$个抗原特异性$CD4^+$T细胞。

[0480] [57]段落[1]-[56]中任一项的组合物,其中所述至少一种抗原特异性T细胞包含多种抗原特异性T细胞。

[0481] [58]段落[1]-[57]中任一项的组合物,其中所述群体中表达CD19和/或CD16的免疫细胞的量小于所述生物样品中表达CD19和/或CD16的免疫细胞的数量。

[0482] [59]一种治疗方法,其包括向患有疾病或病毒的受试者施用[1]或[3]-[58]中任一项的组合物。

[0483] [60]段落[1]或[3]-[58]中任一项的组合物在制备用于治疗的药物中的用途。

[0484] [61]一种制备至少一种包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法,该方法包括将APC与来自耗尽表达CD14和/或CD25的细胞的生物样品的免疫细胞群体一起孵育。

[0485] [62]一种制备至少一种包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法,该方法包括将FMS样酪氨酸激酶3受体配体(FLT3L)刺激的APC与来自生物样品的免疫细胞群体一起孵育。。

[0486] [63]一种制备至少一种包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法,该方法包括:(a)将FMS样酪氨酸激酶3受体配体(FLT3L)与来自生物样品的免疫细胞群体一起孵育第一时间段;以及(b)此后,将所述生物样品的至少一种T细胞与APC一起孵育。

[0487] [64]一种制备至少一种包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法,该方法包括将来自生物样品的免疫细胞群体与一种或多种APC制品一起孵育一个或多个单独时间段,所述时间段是从所述免疫细胞群体与所述一种或多种APC制品中的第一APC制品孵育起不到28天,其中至少一种抗原特异性记忆T细胞被扩充,或者至少一种抗原特异性幼稚T细胞被诱导

[0488] [65]一种制备至少一种包含对至少一个抗原肽序列具有特异性的T细胞受体(TCR)的抗原特异性T细胞的方法,该方法包括将生物样品中的免疫细胞群体与3种或更少的APC制品一起孵育3个或更少的单独时间段,其中至少一种抗原特异性记忆T细胞被扩充,或者至少一种抗原特异性幼稚T细胞被诱导。

[0489] [66]段落[62]-[65]中任一项的方法,所述免疫细胞群体来自耗尽了表达CD14和/或CD25的细胞的生物样品。

[0490] [67]段落[61]或[66]的方法,其中所述生物样品被进一步消耗表达CD19的细胞。

[0491] [68]段落[61]或[63]的方法,其中所述APC是FLT3L刺激的APC。

[0492] [69]段落[64]-[67]中任一项的方法,其中在包含IL-7、IL-15或其组合的介质中进行免疫细胞群体的孵育。

[0493] [70]段落[69]的方法,其中所述介质进一步包含吲哚胺2,3-双加氧酶-1(IDO)抑制剂、抗PD-1抗体、IL-12或其组合。

[0494] [71]段落[70]的方法,其中所述IDO抑制剂是epacadostat、navoximod、1-甲基色氨酸或其组合。

[0495] [72][64]-[71]中任一段的方法,其中至少一种所述APC制品包含FLT3L刺激的APC。

[0496] [73]段落[64]-[71]中任一项的方法,其中至少两种所述APC制品包含FLT3L刺激

的APC。

[0497] [74]段落[64]-[71]中任一项的方法,其中至少三种所述APC制品包含FLT3L刺激的APC。

[0498] [75]段落[64]-[71]中任一项的方法,其中每种APC制品包含FLT3L刺激的APC。

[0499] [76]段落[61]-[63]中任一项的方法,其中所述APC包含一种或多种APC制品。

[0500] [77]段落[61]-[76]中任一项的方法,其中所述一种或多种APC制品包含3种或更少的APC制品。

[0501] [78]段落[64]-[77]中任一项的方法,其中将所述一种或多种APC制品与免疫细胞在一个或多个单独时间段内顺序地孵育。

[0502] [79]段落[61]-[78]中任一项的方法,其中所述一种或多种APC制品中的至少一种是来自生物样品的APC。

[0503] [80]段落[61]-[79]中任一项的方法,其中所述免疫细胞群体包含APC或所述一种或多种APC制品中的至少一种。

[0504] [81]段落[61]-[79]中任一项的方法,其中所述免疫细胞群体不包含APC,所述免疫细胞群体不包含一种或多种APC制品中的一种。

[0505] [82]段落[61]-[81]中任一项的方法,其中所述方法包括将FLT3L和至少一种肽与来自生物样品的免疫细胞群体一起孵育,其中所述FLT3L与所述免疫细胞群体孵育第一时间段,并且其中至少一种肽与免疫细胞群体孵育第一肽刺激时间段,从而获得第一刺激的T细胞样品,其中所述免疫细胞群体包含至少一种T细胞和至少一种APC。

[0506] [83]段落[82]的方法,其中所述方法包括将FLT3L和至少一种肽与至少一种APC一起孵育,其中所述FLT3L与所述至少一种APC一起孵育第二时间段,并且其中所述至少一种肽与至少一种APC一起孵育第二个肽刺激时间段,从而获得第一成熟APC肽负载的样品;并且第一个成熟APC肽负载的样品与第一刺激的T细胞样品一起孵育,从而获得第二刺激的T细胞样品。

[0507] [84]段落[83]的方法,其中所述方法包括将FLT3L和至少一种肽与至少一种APC一起孵育,其中所述FLT3L与所述至少一种APC一起孵育第三时间段,并且其中所述至少一种肽与至少一种APC一起孵育第三肽刺激时间段,从而获得第二成熟APC肽负载的样品;将第二成熟APC肽负载的样品与第二刺激的T细胞样品一起孵育,从而获得第三刺激的T细胞样品。

[0508] [85]段落[61]-[84]中任一项的方法,其中所述生物样品来自受试者。

[0509] [86]段落[85]的方法,其中所述受试者是人。

[0510] [87]段落[85]或[86]的方法,其中所述受试者患有疾病或病症。

[0511] [88]段落[87]的方法,其中所述疾病或病症是癌症。

[0512] [89]段落[88]的方法,其中所述癌症选自卵巢癌、肺癌和黑素瘤。

[0513] [90]段落[61]-[89]中任一项的方法,其中所述至少一种抗原特异性T细胞包括至少一种$CD4^+$T细胞。

[0514] [91]段落[61]-[90]中任一项的方法,其中所述至少一种抗原特异性T细胞包括至少一种$CD8^+$T细胞。

[0515] [92]段落[61]-[91]中任一项的方法,其中所述至少一种抗原特异性T细胞包括至

少一种CD4富集的T细胞。

[0516] [93]段落[61]-[92]中任一项的方法,其中所述至少一种抗原特异性T细胞包括至少一种CD 8富集的T细胞。

[0517] [94]段落[61]-[93]中任一项的方法,其中所述至少一种抗原特异性T细胞包括至少一种记忆T细胞。

[0518] [95]段落[61]-[94]中任一项的方法,其中所述至少一种抗原特异性T细胞包括至少一种幼稚T细胞。

[0519] [96]段落[61]-[95]中任一项的方法,其中所述至少一种抗原特异性T细胞包括至少一种记忆$CD4^+$T细胞。

[0520] [97]段落[61]-[96]中任一项的方法,其中所述至少一种抗原特异性T细胞包括至少一种幼稚$CD4^+$T细胞。

[0521] [98]段落[61]-[97]中任一项的方法,其中所述至少一种抗原特异性T细胞包括至少一种记忆$CD8^+$T细胞。

[0522] [99]段落[61]-[98]中任一项的方法,其中所述至少一种抗原特异性T细胞包含至少一种幼稚$CD8^+$T细胞。

[0523] [100]段落[61]-[99]中任一项的方法,其中所述至少一个抗原肽序列包含选自以下的突变:(A)点突变,(B)剪接位点突变,(C)移码突变,(D)通读突变,(E)基因融合突变,及其组合。

[0524] [101]段落[61]-[100]中任一项的方法,其中所述至少一个抗原肽序列包含点突变,并且以比相应野生型肽更大的亲和力结合受试者的HLA蛋白。

[0525] [102]段落[61]-[101]中任一项的方法,其中所述至少一个抗原肽序列以小于500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nM或10nM的IC50结合至受试者的HLA蛋白。,

[0526] [103]段落[61]-[102]中任一项的方法,其中所述至少一个抗原肽序列中的每一个与由受试者表达的HLA等位基因所编码的蛋白质结合。

[0527] [104]段落[61]-[103]中任一项的方法,其中所述TCR以小于500nM、250nM、150nM、100nM、50nM、25nM或10nM的KD结合肽-HLA复合物。

[0528] [105]段落[61]-[104]中任一项的方法,其中所述至少一个抗原肽序列中的每一个包含在受试者的非癌细胞中不存在的突变。

[0529] [106]段落[61]-[105]中任一项的方法,其中所述至少一个抗原肽序列的每一个由受试者的癌细胞的基因或表达的基因编码。

[0530] [107]段落[61]-[106]中任一项的方法,其中所述至少一个抗原肽序列中的一个或多个的长度为至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1,000、1,500、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、7,500或10,000个天然存在的氨基酸。

[0531] [108]段落[61]-[107]中任一项的方法,其中所述至少一个抗原肽序列中的一个或多个与I类HLA等位基因编码的蛋白质结合,并且其长度为8-12个天然存在的氨基酸。

[0532] [109]段落[61]-[108]中任一项的方法,其中所述至少一个抗原肽序列中的一个或多个与II类HLA等位基因编码的蛋白质结合,并且其长度为16-25个天然存在的氨基酸。

[0533] [110][61]-[109]中任一项的方法,其中所述至少一个抗原肽序列包含多个抗原肽序列。

[0534] [111]段落[110]的方法,其中所述多个抗原肽序列包含至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20,21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450或500个抗原肽序列。

[0535] [112]段落[61]-[111]中任一项的方法,其中所述APC或所述APC制品中的APC包括负载有一种或多种抗原肽的APC,所述抗原肽包含所述至少一个抗原肽序列中的一个或多个。

[0536] [113]段落[61]-[112]中任一项的方法,其中所述APC或APC制品中的APC是自体APC或同种异体APC。

[0537] [114]段落[61]-[113]中任一项的方法,其中所述APC或APC制品中的APC包括树突细胞(DC)。

[0538] [115]段落[114]的方法,其中所述DC是CD141+DC。

[0539] [116]段落[61]-[114]中任一项的方法,其中所述方法包括从所述生物样品消耗表达CD14和/或CD25的细胞。

[0540] [117]段落[116]的方法,其中所述方法进一步包括从所述生物样品消耗表达CD19的细胞。

[0541] [118]段落[116]或[116]的方法,其中消耗表达CD14或CD25或CD19的细胞包括将CD14或CD25或CD19结合剂与APC或APC制品的APC结合。

[0542] [119]段落[118]的方法,其中所述CD14或CD25或CD19结合剂是生物素化的。

[0543] [120]段落[118]或[119]的方法,其中消耗表达CD14或CD25或CD19的细胞进一步包括将固体支持物上的抗生物素试剂与CD14或CD25或CD19结合剂结合。

[0544] [121]段落[118]-[120]中任一项的方法,其中所述CD14或CD25或CD19结合剂附着于固体支持物。

[0545] [122]段落[61]-[121]中任一项的方法,其中段落[61]-[63]或[66]-[121]中任一项的APC,或段落[64]-[121]中任一项的APC制品的APC来源于CD14+单核细胞,或者是CD14富集的APC,或者是CD141富集的APC。

[0546] [123]段落[61]-[122]中任一项的方法,其中段落[61]-[63]或[66]-[122]中任一项的APC,或段落[64]-[122]中任一项的APC制品的APC从生物样品中富集。

[0547] [124]段落[61]-[123]中任一项的方法,其中段落[61]-[63]或[66]-[123]中任一项的APC,或段落[64]-[123]中任一项的APC制品的APC用一种或多种细胞因子或生长因子进行刺激。

[0548] [125]段落[124]的方法,其中所述一种或多种细胞因子或生长因子包括GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40、聚I:C或其组合。

[0549] [126]段落[61]-[125]中任一项的方法,其中段落[61]-[63]或[66]-[125]中任一项的APC,或段落[64]-[125]中任一项的APC制品的APC来自第二生物学样品。

[0550] [127]段落[126]的方法,其中第二生物样品来自同一受试者。

[0551] [128]段落[61]-[127]中任一项的方法,其中所述生物样品包含外周血单核细胞(PBMC)。

[0552] [129]段落[61]-[128]中任一项的方法,其中所述至少一种抗原特异性T细胞的百分比为总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至少约0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。

[0553] [130]段落[61]-[129]中任一项的方法,其中所述至少一种抗原特异性$CD8^+$T细胞的百分比为总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至少约0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。

[0554] [131]段落[61]-[130]中任一项的方法,其中所述至少一种抗原特异性$CD4^+$T细胞的百分比为总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至少约0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。

[0555] [132]段落[61]-[131]中任一项的方法,其中所述生物样品中至少一种抗原特异性T细胞的百分比为总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至多约0.00001%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%或0.5%。

[0556] [133]段落[61]-[132]中任一项的方法,其中所述生物样品中至少一种抗原特异性$CD8^+$T细胞的百分比为总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至多约0.00001%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%或0.5%。

[0557] [134]段落[61]-[133]中任一项的方法,其中所述生物样品中至少一种抗原特异性$CD4^+$T细胞的百分比为总$CD4^+$T细胞、总$CD8^+$T细胞、总T细胞或总免疫细胞的至多约0.00001%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%或0.5%。

[0558] [135]段落[61]-[134]中任一项的方法,其中所述方法进一步包括将所述至少一种抗原特异性T细胞中的一种或多种施用于受试者。

[0559] [136]段落[61]-[135]中的任一项的方法,其中所述单独时间段的总时间段少于28天。

[0560] [137]段落[61]-[136]中任一项的方法,其中孵育包括将APC制品的第一APC制品与T细胞一起孵育超过7天。

[0561] [138]段落[61]-[137]中任一项的方法,其中孵育包括将APC制品的第一APC制品与T细胞一起孵育超过7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。

[0562] [139]段落[61]-[138]中任一项的方法,其中所述生物样品是从受试者新鲜获得的或是冷冻的样品。

[0563] [140]段落[61]-[139]中任一项的方法,其中所述方法包括将所述APC或一种或多种APC制品与包含至少一种细胞因子或生长因子的第一介质一起孵育第一时间段。

[0564] [141]段落[140]的方法,其中所述至少一种细胞因子或生长因子包括GM-CSF、IL-

4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40、聚I:C或其组合。

[0565] [142]段落[140]或[141]的方法,其中所述方法包括将一种或多种APC制品与至少一种肽一起孵育第二时间段。

[0566] [143]段落[140]-[142]中任一项的方法,其中所述方法包括将段落[61]-[63]或[66]-[142]中任一项的APC或段落[64]-[142]中任一项的一种或多种APC制品与包含一种或多种细胞因子或生长因子的第二介质一起孵育第三时间段,从而获得成熟的APC。

[0567] [144]段落[143]的方法,其中所述一种或多种细胞因子或生长因子包括GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40、聚I:C或其组合。

[0568] [145]段落[143]或[144]的方法,其中所述方法进一步包括在第三时间段之后且在第四时间段开始之前去除第二介质的一种或多种细胞因子或生长因子。

[0569] [146]段落[61]-[145]中任一项的方法,其中用一种或多种细胞因子或生长因子刺激所述APC制品中的APC。

[0570] [147]段落[61]-[146]中任一项的方法,其中所述抗原是新抗原、肿瘤相关抗原、病毒抗原、次要组织相容性抗原或其组合。

[0571] [148]段落[61]-[147]中任一项的方法,其中所述方法离体进行。

[0572] [149]段落[61]-[148]中任一项的方法,其中所述至少一种抗原特异性T细胞包括多种抗原特异性T细胞。

[0573] [150]段落[61]-[149]中任一项的方法,其中所述方法包括从受试者获得生物样品,所述生物样品包含至少一种APC和至少一种PBMC或至少一种T细胞。

[0574] [151]段落[61]-[150]中任一项的方法,其中所述方法包括从生物样品中消耗表达CD14和/或CD25和/或CD19的细胞,从而获得CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品。

[0575] [152]段落[61]-[151]中任一项的方法,其中所述方法包括将CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品与FLT3L一起孵育第一时间段。

[0576] [153]段落[61]-[152]中任一项的方法,其中所述方法包括将至少一种肽与CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品一起孵育第二时间段,从而获得第一成熟APC肽负载的样品。

[0577] [154]段落[61]-[153]中任一段的方法,其中该方法包括将第一APC肽加载的样品与至少一种T细胞一起孵育第三时间段,从而获得第一刺激的T细胞样品。

[0578] [155]段落[154]的方法,其中在IL-7、IL-15或其组合的存在下进行第一APC肽负载的样品与至少一种T细胞的孵育。

[0579] [156]段落[155]的方法,其中在具有吲哚胺2,3-双加氧酶-1(IDO)抑制剂、抗PD-1抗体、IL-12或其组合的存在下进行第一APC肽负载的样品与至少一种T细胞的孵育。

[0580] [157]段落[156]的方法,其中所述IDO抑制剂是epacadostat、navoximod、1-甲基色氨酸或其组合。

[0581] [158]段落[61]-[157]中任一项的方法,其中所述方法包括将第一刺激的T细胞样品的T细胞与成熟APC样品的FLT3L刺激的APC一起孵育第四时间段,从而获得第二刺激的T细胞样品。

[0582] [159]段落[61]-[157]中任一项的方法,其中所述方法包括将第一刺激的T细胞样品的T细胞与FLT3L和成熟APC样品的第二APC肽负载的样品一起孵育第四时间段,从而获得

第二刺激的T细胞样品。

[0583] [160]段落[61]-[157]中任一项的方法,其中所述方法包括将第一刺激的T细胞样品的T细胞与FLT3L和成熟APC样品的FLT3L刺激的APC一起孵育第四时间段,从而获得第二刺激的T细胞样品。

[0584] [161]段落[158]-[160]中任一项的方法,其中在IL-7、IL-15或其组合的存在下进行所述第一刺激的T细胞样品的T细胞的孵育。

[0585] [162]段落[161]的方法,其中在吲哚胺2,3-双加氧酶-1(IDO)抑制剂、抗PD-1抗体、IL-12或其组合的存在下进行第一刺激的T细胞样品的T细胞的孵育。

[0586] [163]段落[162]的方法,其中所述IDO抑制剂是epacadostat、navoximod、1-甲基色氨酸或其组合。

[0587] [164]段落[61]-[163]中任一项的方法,其中所述方法包括将第二刺激的T细胞样品的T细胞与成熟APC样品的FLT3L刺激的APC一起孵育第五时间段,从而获得第三刺激的T细胞样品。

[0588] [165]段落[61]-[163]中任一项的方法,其中所述方法包括将第二刺激的T细胞样品的T细胞与FLT3L和成熟APC样品的第三APC肽负载的样品一起孵育第五时间段,从而获得第三刺激的T细胞样品。

[0589] [166]段落[61]-[163]中任一项的方法,其中所述方法包括将第二刺激的T细胞样品的T细胞与FLT3L和成熟APC样品的FLT3L刺激的APC一起孵育第五时间段,从而获得第三刺激的T细胞样品。

[0590] [167]段落[164]-[166]中任一项的方法,其中在IL-7、IL-15或其组合的存在下进行第二刺激的T细胞样品的T细胞的孵育。

[0591] [168]段落[167]的方法,其中在吲哚胺2,3-双加氧酶-1(IDO)抑制剂、抗PD-1抗体、IL-12或其组合的存在下进行第二刺激的T细胞样品的T细胞的孵育。

[0592] [169]段落[168]的方法,其中所述IDO抑制剂是epacadostat、navoximod、1-甲基色氨酸或其组合。

[0593] [170]段落[61]-[169]中任一项的方法,其中所述一个或多个单独时间段、所述三个或更少的单独时间段、所述第一时间段、所述第二时间段、所述第三时间段、所述第四时间段或所述第五时间段是至少1小时、至少2小时、至少3小时、至少4小时、至少5小时、至少6小时、至少7小时、至少8小时、至少9小时、至少10小时、至少11小时、至少12小时、至少13小时、至少14小时、至少15小时、至少16小时、至少17小时、至少18小时、至少19小时、至少20小时、至少21小时、至少22小时、至少23小时、至少24小时、至少25小时、至少26小时、至少27小时、至少28小时、至少29小时、至少30小时、至少31小时、至少32小时、至少33小时、至少34小时、至少35小时、至少36小时、至少37小时、至少38小时、至少39小时或至少40小时。

[0594] [171]段落[61]-[170]中任一项的方法,其中所述一个或多个单独时间段、所述三个或更少的单独时间段、所述第一时间段、所述第二时间段、所述第三时间段、所述第四时间段或所述第五时间段是1至4小时、1至3小时、1至2小时、4至40小时、7至40小时、4至35小时、4至32小时、7至35小时或7至32小时。

[0595] [172]段落[61]-[171]中任一项的方法,其中所述方法包括将第一或第二或第三或第三刺激的T细胞样品中的至少一种T细胞施用于有需要的受试者。

[0596] [173]一种方法,其包括:(a)从受试者获得生物样品,所述生物样品包含至少一种抗原呈递细胞(APC);(b)从生物样品富集表达CD14的细胞,从而获得CD14+细胞富集的样品;(c)将所述$CD14^+$细胞富集的样品与至少一种细胞因子或生长因子一起孵育第一时间段,(d)将至少一种肽与(c)的所述$CD14^+$细胞富集的样品一起孵育第二时间段,从而获得APC肽负载的样品;(e)将所述APC肽负载的样品与一种或多种细胞因子或生长因子一起孵育第三时间段,从而获得成熟APC样品;(f)将成熟APC样品的APC与包含T细胞的CD14和/或CD25和/或CD19耗尽的样品一起孵育第四时间段;(g)将所述T细胞与成熟APC样品的APC一起孵育第五时间段;(h)将所述T细胞与成熟APC样品的APC一起孵育第六时间段;以及(i)将所述T细胞中的至少一种T细胞施用于有需要的受试者。

[0597] [174]一种方法,其包括:(a)从受试者获得生物样品,所述生物样品包含至少一种APC和至少一种T细胞;(b)从生物样品中消耗表达CD14和/或CD25和/或CD19的细胞,从而获得CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品;(c)将CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品与FLT3L一起孵育第一时间段;(d)将至少一种肽与(c)的CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品一起孵育第二时间段,从而获得APC肽负载的样品;(e)将APC肽负载的样品与至少一种T细胞一起孵育第三时间段,从而获得第一刺激的T细胞样品;(f)将第一刺激的T细胞样品的T细胞与成熟APC样品的APC一起孵育第四时间段,从而获得第二刺激的T细胞样品;(g)任选地,将第二刺激的T细胞样品的T细胞与成熟APC样品的APC一起孵育第五时间段,从而获得第三刺激的T细胞样品;(h)将第一、第二或第三刺激的T细胞样品中的至少一种T细胞施用于有需要的受试者。

[0598] [175]一种方法,其包括:(a)从受试者获得生物样品,所述生物样品包含至少一种APC和至少一种T细胞;(b)从生物样品中消耗表达CD14和/或CD25和/或CD19的细胞,从而获得CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品;(c)将CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品与FLT3L一起孵育第一时间段;(d)将至少一种肽与(c)的CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品一起孵育第二时间段,从而获得APC肽负载的样品;(e)将APC肽负载的样品与至少一种T细胞一起孵育第三时间段,从而获得第一刺激的T细胞样品;(f)任选地,将第一刺激的T细胞样品的T细胞与成熟APC样品的FLT3L刺激的APC一起孵育第四时间段,从而获得第二刺激的T细胞样品;(g)任选地,将第二刺激的T细胞样品的T细胞与成熟APC样品的FLT3L刺激的APC一起孵育第五时间段,从而获得第三刺激的T细胞样品;(h)将第一、第二或第三刺激的T细胞样品中的至少一种T细胞施用于有需要的受试者。

[0599] [176]一种方法,其包括:(a)从受试者获得生物样品,所述生物样品包含至少一种APC和至少一种T细胞;(b)从生物样品中消耗表达CD14和/或CD25和/或CD19的细胞,从而获得CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品;(c)将CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品与FLT3L一起孵育第一时间段;(d)将至少一种肽与(c)的CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品一起孵育第二时间段,从而获得第一APC肽负载的样品;(e)将第一APC肽负载的样品与至少一种T细胞一起孵育第三时间段,从而获得第一刺激的T细胞样品;(f)任选地,将第一刺激的T细胞样品的T细胞与FLT3L和成熟APC样品的第二APC肽负载的样品一起孵育第四时间段,从而获得第二刺激的T细胞样品;(g)任选地,将第二刺激的T细胞样品的T细胞与FLT3L和成熟APC样品的第三APC肽负载的样品一起孵育第五时间段,从而获得第三刺激的T细胞样品,(h)将第一、第二或第三刺激的T细胞样品中的至少一种T细胞施用于有

需要的受试者。

[0600] [177]一种方法,其包括:(a)从受试者获得生物样品,所述生物样品包含至少一种APC和至少一种T细胞;(b)从生物样品中消耗表达CD14和/或CD25和/或CD19的细胞,从而获得CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品;(c)将CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品与FLT3L一起孵育第一时间段;(d)将至少一种肽与(c)的CD14和/或CD25和/或CD19细胞耗尽的样品一起孵育第二时间段,从而获得第一APC肽负载的样品;(e)将第一APC肽负载的样品与至少一种T细胞一起孵育第三时间段,从而获得第一刺激的T细胞样品;(f)任选地,将第一刺激的T细胞样品的T细胞与FLT3L和成熟APC样品的FLT3L刺激的APC一起孵育第四时间段,从而获得第二刺激的T细胞样品;(g)任选地,将第二刺激的T细胞样品的T细胞与FLT3L和成熟APC样品的FLT3L刺激的APC一起孵育第五时间段,从而获得第三刺激的T细胞样品;(h)将第一、第二或第三刺激的T细胞样品中的至少一种T细胞施用于有需要的受试者。

[0601] [178]一种方法,其包括(a)将FLT3L和至少一种肽与来自生物样品的免疫细胞群体一起孵育,其中所述FLT3L与所述免疫细胞群体一起孵育第一时间段,并且其中所述至少一种肽与免疫细胞群体一起孵育第一肽刺激时间段,从而获得第一刺激的T细胞样品,其中免疫细胞群体包含至少一种T细胞和至少一种APC;(b)任选地,将FLT3L和至少一种肽与至少一种APC一起孵育,其中所述FLT3L与所述至少一种APC一起孵育第二时间段,并且其中所述至少一种肽与所述至少一种APC一起孵育第二肽刺激时间段,从而获得第一成熟APC肽负载的样品;将第一成熟APC肽负载的样品与第一刺激的T细胞样品一起孵育,从而获得第二刺激的T细胞样品;(c)任选地,将FLT3L和至少一种肽与至少一种APC一起孵育,其中所述FLT3L与所述至少一种APC一起孵育第三时间段,并且其中所述至少一种肽与所述至少一种APC一起孵育第三肽刺激时间段,从而获得第二成熟APC肽负载的样品;并将第二成熟APC肽负载的样品与第二刺激的T细胞样品一起孵育,从而得到第三刺激的T细胞样品;以及(d)将第一刺激的T细胞样品、第二刺激的T细胞样品或第三刺激的T细胞样品中的至少一种T细胞施用于有需要的受试者。

[0602] [179]一种方法,其包括(a)确定刺激的免疫细胞样品中至少一个免疫细胞的一种或多种细胞标志物的表达,以及(b)确定刺激的免疫细胞样品中所述至少一个免疫细胞与肽-MHC复合物的结合;其中确定表达和确定结合同时进行。

[0603] [180]段落[179]的方法,其中所述刺激的免疫细胞样品包括被包含肽-MHC复合物的APC刺激的免疫细胞群体。

[0604] [181]段落[179]或[180]的方法,其中所述免疫细胞群体来自生物样品。

[0605] [182]一种方法,其包括:(a)将生物样品中的免疫细胞群体与包含肽-MHC复合物的APC一起孵育,从而获得刺激的免疫细胞样品;

[0606] (b)确定刺激的免疫细胞样品中至少一种免疫细胞的一种或多种细胞标志物的表达;以及(c)确定刺激的免疫细胞样品中至少一种免疫细胞与肽-MHC复合物的结合;其中确定表达和确定结合同时进行。

[0607] [183]段落[179]-[182]中任一项的方法,其中所述一种或多种细胞标志物包括TNF-α、IFN-γ、LAMP-1、4-1BB、IL-2、IL-17A、粒酶B、PD-1、CD25、CD69、TIM3、LAG3、CTLA-4、CD62L、CD45RA、CD45RO、FoxP3或其任何组合。

[0608] [184]段落[179]-[183]中任一项的方法,其中确定所述刺激的免疫细胞样品的所述至少一种免疫细胞与所述肽-MHC复合物的结合包括确定所述刺激的免疫细胞样品的至少一种免疫细胞与包含所述肽和肽-MHC复合物的MHC的MHC四聚体的结合。

[0609] [185]段落[179]-[184]中任一项的方法,其中所述MHC是I类MHC或II类MHC。

[0610] [186]段落[179]-[185]中任一项的方法,其中所述肽-MHC复合物包含一种或多种标记物。

[0611] [187]段落[179]-[186]中任一项的方法,其中来自生物样品的免疫细胞群体包含两个或更多个样品,每个样品包含来自一个或多个生物样品的免疫细胞群体。

[0612] [188]段落[187]的方法,其中述两个或更多个样品用两种或更多种样品标记物进行标记。

[0613] [189]段落[179]-[188]中任一项的方法,其中确定表达和确定结合包括荧光激活细胞分选(FACS)。

[0614] [190]段落[179]-[189]中任一项的方法,其中确定表达和确定结合包括单细胞分析。

[0615] [191]段落[179]-[190]中任一项的方法,其中确定表达和确定结合包括确定既表达一种或多种细胞标志物又与肽-MHC复合物结合的免疫细胞的百分比。

[0616] [192]段落[186]或[187]的方法,其中所述标记物包括荧光团。

[0617] [193]段落[179]-[192]中任一项的方法,其中所述免疫细胞群体包括代表段落[1]-[58]中任一项的组合物的免疫细胞群体的免疫细胞群体。

[0618] 实施例

[0619] 将通过以下具体实施例更详细地描述本公开内容。提供以下实施例是为了说明的目的,并非旨在以任何方式限制本发明。本领域技术人员将容易地认识到可以改变或修改以产生根据本发明的替代实施方案的多种非关键参数。本文列出的所有专利、专利申请和印刷出版物均通过引用整体并入本文。

[0620] 实施例的概述:

[0621] 下面的实施例1和2是T细胞制备方案(方案1和方案2)的示例。示例方案的示意图在图1A和图1B中示出。实施例21-23描述了制备APC和这两个方案的步骤。实施例12和14-16以及表2-5总结了从方案1和2获得的结果。实施例13描述了将要测试的方案的参数。

[0622] 实施例3-7和20是使用方案1和方案2的$CD4^+$记忆T细胞扩充和$CD8^+$幼稚T细胞诱导的结果的实施例。流式细胞术分析结果示于图2B、图5A和B、图7、图10和图12-23中。

[0623] 实施例8-11和16-19是用于评估使用本文所述方法扩充或诱导的T细胞的特异性、表型和/或功能的测定结果的实例。图25描绘了T细胞制备过程和这些测定分析T细胞的特异性、表型和/或功能的总体概述。

[0624] 实施例1-T细胞制备方案1

[0625] 该实施例提供了如图1所示的T细胞制备方案1的示例。

[0626] 材料:

[0627] DC介质(Cellgenix)

[0628] CD14微珠,人,Miltenyi#130-050-201

[0629] 细胞因子和/或生长因子

[0630] T细胞培养基(AIM V+RPMI 1640glutamax^{+}血清+PenStrep)

[0631] 肽储备液-每种肽1mM(HIV A02-5-10种肽,HIV B07-5-10种肽,DOM-4-8种肽,PIN-6-12种肽)

[0632] 步骤1:用于DC制备的单核细胞分离

[0633] 1.根据每个供体的预期DC产量,计算要解冻的PBMC的大约数目。

[0634] 2.解冻PBMC,并以约1x10^{6}-1x10^{8}个细胞/mL的浓度重悬于DC介质中。

[0635] 3.加入benzonase(1:1000稀释),然后将盖拧松放入培养箱中。

[0636] 4.根据制备商方案进行CD14^{+}单核细胞富集。

[0637] 5.在含有一种或多种选自GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40和聚I:C的细胞因子和/或生长因子的DC介质中,以每孔1x10^{5}-1x10^{7}在6孔板中接种富集的细胞。

[0638] 步骤2:肽加载和成熟

[0639] 1.对DC进行计数并根据实验条件将细胞分入15mL试管中;每个条件0.01-1百万个细胞。

[0640] 2.以1200rpm旋转5分钟,然后重悬于50-400μL DC介质中。加入肽,并将盖拧松放入培养箱中放置0.5-3小时。计算每种肽在浓度为1mM下的肽池体积。对于每种肽的终浓度0.001-100μM,每孔添加一定体积的A02(5种肽)和B07(5种肽)的单独的池。

[0641] 3.0.5-3小时后,将200μL加入含成熟混合物的1.5mL DC介质中,并将细胞转移至24孔板。

[0642] 成熟混合物包含一种或多种选自GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40和聚I:C的细胞因子。

[0643] 步骤3:建立长期刺激(LTS)实验

[0644] 1.小心地从DC板的孔中取出所有介质,然后将每个孔转移到24孔深孔模块中的单独孔中。

[0645] 2.用0.5-3mL T细胞培养基洗涤每个孔,并在深孔模块中与DC介质混合。

[0646] 3.将100μL添加至每孔2mL T细胞培养基中。

[0647] 4.在1200rpm下旋转DC 5分钟。

[0648] 5.除去所有上清液,将DC重悬于100μL至2mL T细胞培养基中,然后转移回正确的孔中。

[0649] 6.在T细胞培养基中解冻PBMC,并以0.5x10^{6}-4x10^{6}个细胞/mL的浓度重悬于含有IL-7和IL-15的T细胞培养基中。

[0650] 7.向每个孔中添加0.5-3mL准备好的PBMC。

[0651] 步骤4:进料LTS

[0652] 用葡萄糖仪检查介质是否为黄色。如果葡萄糖水平仍然很高,则向孔中供应含有IL-7和IL-15的培养物。如果葡萄糖水平低,则将细胞扩大至6孔板(4mL/孔)并补充IL-15和IL-7。如果葡萄糖水平非常低,则在6孔板中扩大至6mL/孔。

[0653] 步骤5:供应LTS

[0654] 每1-4天供应培养物,添加新鲜的IL-15/IL-7,并在葡萄糖浓度变低时根据需要扩大培养体积。

[0655] 步骤6:重新刺激

[0656] 进行T细胞计数,并在新一批加载肽的DC上从步骤3开始重复。冷冻剩余的细胞以供分析。

[0657] 步骤7:提供LTS

[0658] 每-1-5天供应一次培养物。

[0659] 步骤8:重新刺激

[0660] 进行T细胞计数,并在新一批加载肽的DC上从步骤3开始重复。冷冻剩余的细胞以供分析。

[0661] 步骤9:供应LTS

[0662] 每1-5天供应一次培养物。

[0663] 步骤10

[0664] 进行T细胞计数,并冷冻以供分析。

[0665] 实施例2-T细胞制备方案2

[0666] 该方案可以替代实施例1中描述的方案。

[0667] 实施例2提供了如图1所示的示例T细胞制备方案(方案2)。

[0668] 材料:

[0669] AIM V介质(Invitrogen)

[0670] 培养基1(RPMI 1640谷氨酰胺+血清+PenStrep)

[0671] 培养基2(AIM V+RPMI 1640谷氨酰胺+血清+PenStrep)

[0672] 程序:

[0673] 步骤1:在24孔板的每个孔中,将400万个PBMC接种于培养基2中,其中含有一种或多种细胞因子。一种或多种细胞因子选自GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40和聚I:C。

[0674] 步骤2:培养基2中的肽加载和成熟

[0675] 1.在各个孔中制备感兴趣的储备肽池(无肽条件除外),短聚体的最终浓度为0.001-100μM,长聚体的最终浓度为0.001-100μM,并混合。

[0676] 2.孵育0.5-3小时。

[0677] 3.制备储备成熟混合物,并在孵育和混合后添加到每个孔中。成熟混合物包含选自以下的一种或多种细胞因子:GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40和聚I:C。

[0678] 步骤3:将人血清以2.5-20%(体积)的最终浓度添加到每个孔中并混合。

[0679] 步骤4:用新鲜的培养基1小心地替换50-90%的培养基,培养基1中补充有IL-7和IL-15,至终浓度均为0.005-500ng/mL。

[0680] 步骤5:每1-5天用新鲜的培养基1小心地替换50-90%的培养基,培养基1中补充有IL-7和IL-15,至终浓度均为0.005-500ng/mL。

[0681] 如果孔在非供应日从橙色变为黄色(在透明培养基的情况下,葡萄糖读数),则用新鲜的培养基1和IL-7/IL-15更换25-75%的现有培养基。

[0682] 步骤6:计数并冷冻(或进行以下步骤以使T细胞刺激转至方案1的步骤8和/或步骤10)。

[0683] 在步骤1到步骤6的培养步骤中,可以根据方案1“步骤1”和“步骤2”中的程序并行制备负载肽的DC。

[0684] 进行T细胞计数,并用新一批负载有肽的DC刺激T细胞。冷冻剩余细胞以供分析。T细胞刺激程序可以按照方案1“步骤3”中的程序进行。

[0685] 步骤7:对新一批负载有肽的DC进行T细胞计数,并按照方案1“步骤3”重复T细胞刺激程序。冷冻剩余的细胞以供分析。

[0686] 步骤8:计数T细胞并冷冻以进行分析。

[0687] 实施例3-$CD8^+$T细胞诱导

[0688] 根据方案1或方案2使用来自人供体的PBMC样品进行抗原特异性T细胞诱导。在使用不同的方案制备T细胞之后,分析了$CD8^+$记忆和幼稚T细胞的诱导。可以在不同时间点取细胞样品进行分析。pMHC多聚体用于监测诱导培养物中抗原特异性$CD8^+$T细胞的比例,并用于通过组合编码并行检测多个T细胞应答。图2描绘了示例性结果,其显示了使用方案1(方案1)和方案2(方案2)由长肽或短肽诱导的抗原特异性$CD8^+$记忆T细胞的分数。“Bulk”表示含有用于诱导的T细胞的样品是完全的PBMC。“Treg”表示含有用于诱导的T细胞的样品是耗尽了表达CD25的细胞的PBMC。图3描绘了T细胞应答测定的示例性结果,其显示了在短期刺激或诱导后通过流式细胞术分析的对GAS7肽应答的抗原特异性$CD8^+$幼稚T细胞的分数(在该实施例中,培养的长度从刺激开始起算)。短期刺激后,可以观察到抗原特异性记忆T细胞和幼稚PIN特异性T细胞的分数增加。

[0689] 实施例4-$CD8^+$T细胞诱导

[0690] 使用不同的方案制备T细胞后,分析了$CD8^+$T细胞的诱导。将诱导的T细胞与不同抗原肽在测试孔中孵育,并通过流式细胞术分析对肽有反应的T细胞的分数。pMHC多聚体用于监测诱导培养物中抗原特异性$CD8^+$T细胞的比例,并用于通过使用组合编码平行检测多个T细胞应答。命中率可用于描述T细胞对抗原肽的反应程度。命中率被定义为阳性反应测试孔的数目除以测试孔的总数。一式两份进行实验,并在双份孔中证实了命中率。图4描绘了结果的示例,其显示了使用方案1(方案1)和方案2(方案2)诱导后,用HIV短肽、先前鉴定的新抗原(PIN)短肽或PIN长肽诱导的$CD8^+$T细胞的分数。“完全PBMC”表示包含用于诱导的T细胞的样品是完全的PBMC。“$CD25^-$PBMC”表示含有用于诱导的T细胞的样品中$CD25^+$细胞已耗尽。显示了短期和长期诱导。图6描绘了示例性结果,其显示了使用来自两个人供体的PBMC样品长期诱导的$CD8^+$T细胞的分数。

[0691] 实施例5-$CD4^+$T细胞应答

[0692] 可以使用离体诱导方案诱导$CD4^+$T细胞对先前鉴定的新抗原(PIN)的应答。在该实施例中,通过以抗原特异性方式监测IFNγ的产生来鉴定$CD4^+$T细胞应答。图10显示了这类流式细胞术分析的代表性实例。最后,通过用突变型或野生型肽刺激诱导的T细胞群体,显示了$CD4^+$T细胞对突变型肽具有特异性,而对野生型则没有(图11)。

[0693] 实施例6-幼稚$CD8^+$T细胞诱导

[0694] 在使用方案1或方案2进行T细胞制备后,通过流式细胞术分析幼稚$CD8^+$T细胞诱导。PBMC样品来自人供体1或人供体2,是完全PBMC或$CD25^-$耗尽的PBMC,根据图1中的方案在短期或长期诱导后分析细胞样品。针对不同的肽分析了诱导的$CD8^+$T细胞的幼稚$CD8^+$应答,并绘制在图12-23中。

[0695] 实施例7-$CD8^+$幼稚T细胞应答

[0696] 实施例1中的T细胞制备方案可以成功地用于从幼稚区室诱导$CD8^+$T细胞应答。图7示出了在在健康供体中,在两轮刺激之后,针对突变表位产生的两个$CD8^+$T细胞应答的代表性流式图。而且,来自存储区室的$CD8^+$T细胞应答可以扩充到高数目。在图8A所示的代表性示例中,在多达三轮刺激之后,所有$CD8^+$T细胞中约50%对免疫优势表位CMV pp65,EBV YVL,EBV BMLF1和Mart-1具有特异性。诱导的$CD8^+$记忆应答在肽回忆测定中显示出多功能性(脱粒和细胞因子释放,图8B)。

[0697] 实施例8-T细胞的流式细胞术分析

[0698] 图5A描绘了使用方案2在图中所示条件下诱导的$CD8^+$幼稚T细胞的ME-1应答的示例性流式细胞术分析。图5B描绘了在图中指示的条件下诱导的$CD8^+$幼稚T细胞的ME-1应答的流式细胞术分析的实例。长诱导后,观察到12.6%的$CD8^+$T细胞对ME-1具有特异性。

[0699] 实施例9-诱导的T细胞的细胞毒性测定

[0700] 细胞毒性试验用于评估诱导的T细胞培养物是否可以杀死表达抗原的肿瘤细胞系。在该实施例中,测量了活性胱天蛋白酶3在存活和死亡的肿瘤细胞上的表达,以量化早期细胞死亡和死亡的肿瘤细胞。在图9中,诱导的$CD8^+$记忆应答能够杀死表达抗原的肿瘤靶标。

[0701] 实施例10-产生的$CD8^+$T细胞的表型分析

[0702] 可以表征实施例1中产生的$CD8^+$T细胞系的表型表达、细胞因子谱和对自体靶细胞的特异性细胞毒活性。为了分析表型表达,可以将每种培养物的$1x10^4$-$1x10^6$ T细胞在含有0.1-10%FBS和0.1%叠氮化钠的PBS(FBS-PBS)中洗涤,并重悬于含有1:100稀释的荧光染料标记的抗体(CD45RA和CD62L)的FBS-PBS中。在冰上孵育后,将细胞洗涤并固定以进行流式细胞术分析。如果选择的CD8 T细胞培养物表达CD62L而不表达CD45RA,无论它们对各种肽的反应性如何,都可以表明选择的T细胞培养物属于$CD8^+$记忆T细胞亚群。

[0703] 实施例11-$CD8^+$T细胞的细胞因子产生

[0704] 可以分析$CD8^+$T细胞培养物的细胞因子概况。首先用抗原肽脉冲的自体APC攻击T细胞培养物。细胞因子谱将使用ELISA试剂盒(PharMingen,San Diego,Calif.)定量确定。将微量滴定板(96-孔,NUNC Maxisorp)在4℃下用0.2-4μg/孔的纯化小鼠捕获人细胞因子单克隆抗体(IL-4、IL-10、TNF-α、IFN-γ)(PharMingen)包被过夜。将板洗涤并将非特异性结合位点用10%(w/v)的胎牛血清(FBS)饱和0.5-3小时,然后洗涤。将上清液和细胞因子标准液用PBS稀释,并一式两份加入孔中。将板在37℃下孵育1-3小时,然后用PBS-T洗涤。将匹配的生物素化检测抗体添加到每个孔中,并在室温下孵育1-3小时。洗涤后,加入抗生物素蛋白缀合的辣根过氧化物酶并孵育0.5-3小时。3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB,Sigma)用作显色基底。使用ELISA酶标仪(Bio-Rad Laboratories,Hercules,CA)在450nm处测量光密度,并通过Microplate计算机软件(Bio-Rad)使用双八点标准曲线对细胞因子浓度进行定量。

[0705] 实施例12-方案1和方案2:概述

[0706] 表1.方案1和2的结果概述

[0707]

		方案1		方案2			
		CD14^{耗尽} / CD25^{耗尽}		CD25^{耗尽}		CD14^{耗尽} CD25^{耗尽}	FLT3L x3
		LTS 37	LTS 38	LTS 37	LTS 38	LTS 38	LTS 38
CD8记忆	批量扩充倍数	30-1200	20-5000	20-100	5-100	5-100	5-100
	绝对数	1-50x10^6	20-1000x10^6	0.1-1x10^6	2-10x10^6	2-20x10^6	0.5-10x10^6
	功能性	*在刺激3时降低*	*在刺激3时降低*	*在刺激3时保持*	*在刺激3时保持*	*在刺激3时保持*	*在刺激3时保持*
CD8幼稚	命中率/孔	20-40%	0-40%	20-30%	0-20%	10%	0-10%
	命中率/肽	1-3/11	0-4/11	2/11	1/11	1-3/11	1-2/11
	绝对数	0.1-1x10^6	-	0.01-0.5x10^6	-	-	-
	功能性	TBD*	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD
CD4幼稚	命中率/孔	78-100%	56%	10-100%	50%	70%	TBD
	命中率/肽	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD
	绝对数	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD
	功能性	*好*	*好*	*好*	TBD	TBD	TBD

[0708] TBD*＝待确定

[0709] 实施例13-方案1和2参数测试

[0710] 用于测试方案参数的示例实验可以是在患者样品中以小规模测试方案1。用于测试方案参数的另一个示例实验可以是表征先前批次中生成的T细胞产物,包括测试$CD4^+$T细胞和$CD8^+$T细胞的功能以及分选抗原特异性细胞并通过单细胞RNAseq进行表征。用于测试方案参数的实验的另一个示例可以是在DC制备期间测试聚-ICLC/aCD40L的添加并量化T细胞富集。用于测试方案参数的另一示例实验可以是测试诱导的$CD8^+$幼稚T细胞应答的功能,包括在杀伤测定中评估抗原特异性细胞毒性,以更宽的流量面板进行肽回忆测定以测量分化和耗竭,对部分命中确定敏感性(肽滴定)和特异性(WT对突变体,池解卷积),并富集$CD8^+$以消除抗原特异性$CD4^+$T细胞的旁观者效应的可能性。用于测试方案参数的另一个示例实验可以是询问功能,确定部分命中的敏感性(肽滴定)和特异性(WT对突变体,池解卷积),使用分化和耗竭流面板进行回忆测定以更好地了解表型。用于测试方案参数的另一个示例实验可以是通过单细胞RNAseq对抗原特异性T细胞($CD8^+$记忆,$CD8^+$幼稚,$CD4^+$幼稚)进行分类,包括比较不同诱导的表型,比较来自不同区室的诱导表型,检查动力学。

[0711] 实施例14-消耗表达CD14和/或CD25的细胞的T细胞输入物改善了对$CD4^+$和$CD8^+$幼稚T细胞的诱导。

[0712] 以下表2显示了来自方案1T细胞制备方法的结果,表明$CD14^-/CD25^-$的消耗可以增加$CD8^+$初始命中率并具有一致的$CD4^+$命中率。

[0713] 表2.$CD14^-/CD25^-$消耗结果

[0714]

LTS#33		CD14⁻	CD25⁻	CD14⁻/CD25⁻
CD8 幼稚命中率%	HD34	20	30	50
	HD35	0	0	10
	平均值	10	15	30
CD4 幼稚命中率%	HD34	100	80	90
	HD35	100	100	100
	平均值	100	90	95

[0715] 实施例15-使用方案1和方案2显著改善了CD8幼稚诱导。

[0716] 以下表3A和3B显示了来自本文所述的方案1和方案2T细胞制备方法的结果。在测试的两个人供体中,与使用表达CD14的细胞耗尽相比,使用表达CD25的细胞耗尽或表达CD25和CD14的细胞耗尽,$CD8^+$幼稚诱导显著改善。使用FLT3L刺激,$CD8^+$幼稚诱导也显著改善。

[0717] 表3A.来自HD35的$CD8^+$幼稚诱导结果

[0718]

HD 35		方案 1 (CD25 耗尽) 1/13 证实 7.5%成功率				方案 2 (批量) 3/13 证实 23%成功率				方案 2 (CD25 耗尽) 5/13 证实 39%成功率			
		第 19 天		第 26 天		第 19 天		第 26 天		第 19 天		第 26 天	
		初始	证实	初始	证实	初始	证实	初始	证实	初始	证实	初始	证实
用短肽诱导	HIV 重复 1												
	HIV 重复 2												
	HIV 重复 3												
	HIV 重复 4											HIV-3 0.226%	HIV-3 0.0203%
	HIV 重复 5	HIV-5 * 0.0327%	HIV-5 * 0.0691%	HIV-5	HIV-5	HIV-3 0.496%	HIV-3 0.215%	HIV-3 0.33%	HIV-3 0.0722%				
	PIN 重复 1												
	PIN 重复 2					CSNK 1A1 0.135%	CSNK 1A1 0.0747%	CSNK 1A1 0.219%	CSNK 1A1 0.193%				
	PIN 重复 3												

[0719]

	PIN重复4					ME-1 4.15%	ME-1 0.927%	ME-1 12.6%	ME-1 2.34%	GAS7/ACTN4 0.012/0.284%	GAS7/ACTN4 0.076/0.156%	GAS7/ACTN4 0.241/0.376%	GAS7/ACTN4 0.669/0.095%
	PIN重复5									ACTN4 0.101%	ACTN4 0.032%		
木	PIN长重复1									CSNK1A1 0.0342%	CSNK1A1 0.0482%	CSNK1A1 0.0156%	CSNK1A1 0.0265%
	PIN长重复2												
	PIN长重复3												

[0720] 表3B.来自HD34的$CD8^+$幼稚诱导结果

[0721]

		方案1 0/13 证实 0%成功率				方案2 批量输入 2/13 证实 15%成功率				方案2 CD25耗尽输入 2/13 证实 15%成功率			
	HD34	第19天		第26天		第19天		第26天		第19天		第26天	
		初始	证实	初始	证实	初始	证实	初始	证实	初始	证实	初始	证实
用短肽诱导	HIV重复1									HIV-5 0.358%	HIV-5 0.789%	HIV-5 1.93%	HIV-5 3.61%
	HIV重复2					HIV-3 & HIV-5 0.017/0.098%	HIV-3 & HIV-5 0.013/0.279%	HIV-5 0.056%	HIV-5 0.173%				
	HIV重复3												
	HIV重复4												
	HIV重复												

[0722]

	5										
	PIN 重复 1								PRDX5 0.33%	PRDX5 0.119%	PRDX5 1.58%	PRDX5 0.549%
	PIN 重复 2											
	PIN 重复 3											
	PIN 重复 4											
	PIN 重复 5											

[0723] 实施例16-UV介导的肽交换测定

[0724] UV介导的条件配体的裂解可以是时间依赖性的。通过以下描述的设置,可以在1分钟后检测到肽的切割,并且在大约15分钟后可以基本完成。通常可以使用30至60分钟的孵育时间,以确保条件性配体与目标肽的最佳交换。蛋白质浓度可能会影响UV介导的裂解速率,因为硝基苯基部分和反应产物都吸收长波长的UV光。此外,路径长度可能会影响反应速度。可以通过在感兴趣的MHC配体存在下进行UV介导的裂解来挽救在UV暴露下形成的空的肽受体MHC分子。在大多数实验中,使用的肽相对于MHC为100倍摩尔过量。紫外线诱导的肽交换常规使用25μg/mL的紫外线敏感的I类MHC复合物进行。但是,肽交换反应可以使用浓度高达100-200μg/mL的MHC I类进行。

[0725] 材料:

[0726] 96孔板(目录号:651201聚丙烯微孔板96孔V尖形,Greiner Bio-one)

[0727] 366nm紫外线灯CAMAG UV Cabinet 3(目录号:022.9070,CAMAG),装有长波紫外线UV灯,366nm,2 x 8W(目录号:022.9115,CAMAG)或Uvitec灯管,带2 x 15W,365nm黑色蓝光灯管(型号-LI215 BLB尺寸L xW x H 505 x 140 x 117mm)

[0728] 带转子的微量滴定板离心机。

[0729] 程序:

[0730] 1.在96孔板中,向每个孔中添加以下试剂:

[0731]

试剂	量	终浓度
PBS	100 μL	不适用
10x 交换肽(500 μM,在 PBS 中)	12.5 μL	50 μM
10x UV-敏感 MHC I 类分子 (250 μg/mL; ~5 μM)	12.5 μL	25 μg/mL (约 0.5 μM)

[0732] 2.将96孔板置于紫外线灯(366nm)下1小时,紫外线灯与样品之间的距离约为5厘米。

[0733] 3.以3,300g的转速旋转平板5分钟。将100μL上清液(将板保持一定角度以避免转移任何沉淀)转移到新的96孔板中以用于下游应用。

[0734] 实施例17-组装荧光染料缀合的pMHC多聚体

[0735] MHC I类复合物可与荧光团标记的链霉亲和素复合形成MHC I类四聚体,用于T细胞分析。常用的荧光团包括别藻蓝蛋白和藻红蛋白,与这些缀合物的MHC多聚体的形成描述如下。然而,链霉亲和素包被的量子点也可以用于制备用于T细胞检测的MHC多聚体。

[0736] 材料:

[0737] PE-链霉亲和素溶液1mg/mL(目录号:S866,Molecular Probes)或APC链霉亲和素溶液1mg/mL(目录号:S868,Molecular Probes)带有交换的I类MHC复合物的微量滴定板,每100孔中含25μg/mL的pMHC。这相当于每孔2.5μg或0.05nmol I类MHC。

[0738] 程序:

[0739] 1.在PBS中产生27μg/mL的链霉亲和素-PE或PBS中14.6μg/mL的链霉亲和素-APC的稀释液,为I类MHC的每个孔制备100μL。

[0740] 2.通过以10分钟为间隔的四次连续添加25μL将链霉亲和素-PE或-APC添加到I类MHC中。

[0741] 实施例18-MHC多聚体的组合编码

[0742] 紫外线介导的MHC肽交换

[0743] 1.在冰上解冻生物素化的p*MHC复合物的储备液。

[0744] 2.将感兴趣的生物素化p*MHC复合物在PBS中稀释至200μg/mL。每个交换反应需要60μL的体积。为了使pMHC复合物缀合至Qdot585,每个交换反应需要80μL。

[0745] 3.在PBS中将肽储备液稀释至400μM。每个肽至少准备70μL;对于用于使pMHC复合物与Qdot585缀合的肽,至少要制备90μl。每个肽。

[0746] 4.在带有V型底部的96孔聚丙烯微孔板中,每孔混合60μL所选等位基因的200μg/mL p*MHC和60μL 400μM肽溶液(最终浓度:100μg/mL p*MHC和200μM肽)。为了将pMHC复合物缀合至Qdot585,将80μL的200μg/mL p*MHC和80μL的400μM肽溶液混合。

[0747] 5.在RT下将96孔微孔板暴露于紫外光(约366nm)1小时。到紫外线灯的距离应为2-5厘米。

[0748] 6.在室温下将板以3,300g离心5分钟

[0749] 7.如果包括暂停点,则重复步骤6,然后将2×50μL上清液转移到两个带有V型底部的新鲜96孔聚丙烯微孔板中,并置于冰上。为了使pMHC复合物缀合至Qdot585,转移2×70μL。注意不要转移底部沉淀物(通常是不可见的),因为聚集物的转移可能会增加最终MHC多聚体染色的背景。

[0750] 8.通过与荧光染料-链霉亲和素偶联物偶联,使pMHC单体多聚。差异缀合描述如下:用于与Qdot605-、625-、655-或705-链霉亲和素缀合的选项A;选项B与Qdot585-链霉亲和素缀合;选项C与PE-、APC-或PE-Cy7-链霉亲和素结合。

[0751] (A)与Qdot605-、625-、655-或705-链霉亲和素的缀合:(i)每50μL pMHC单体添加3.5μL Qdot-链霉亲和素缀合物(储备液浓度1μM)(终浓度为66nM)。

[0752] (B)与Qdot585-链霉亲和素的缀合:(i)每70μL pMHC单体添加4.9Qdot585-链霉亲和素缀合物(储备液浓度1μM)(至终浓度66nM)。

[0753] (C)与PE-、APC-或PE-Cy7-链霉亲和素的缀合:(i)每50μL加入4.6μL PE-、APC-或PE-Cy7-链霉亲和素缀合物(储备液浓度200μg/mL)pMHC单体(终浓度为16.8μg/mL)。

[0754] 9.充分混合,在冰上静置30分钟。

[0755] 10.添加D-生物素和NaN_3至终浓度25μM D-生物素和0.02%

[0756] (wt/vol)的NaN_3。通过向每个孔中添加2.5μL 20倍储备液(500μM D-生物素和0.4%(wt/vol)NaN_3)来进行操作;对于缀合至Qdot585的MHC多聚体,向每个孔中添加3.5μL。充分混合并在冰上孵育20分钟。

[0757] 11.将50μl的含有25μM D-生物素和0.02%(wt/vol)的NaN_3的PBS加入缀合至PE、APC或PE-Cy7的MHC多聚体(两倍稀释)。

[0758] 12.混合不同的复合物。混合时,将Qdot585与所有其他有色复合物的比例为2:1。以1:1比例混合所有其他有色复合物。

[0759] 使用MHC多聚体对T细胞的染色

[0760] 13.将所有27种颜色组合的MHC多聚体混合,以获得一个即用型样品,并在4℃下以3,300g离心5分钟,然后转移上清液。每次T细胞染色总共需要54μl的上清液(即混合物中每个单独的pMHC复合物为2μl)。

[0761] 14.解冻PBMC样品(或其他相关的T细胞样品),并用RPMI洗涤两次。建议在解冻后用DNase处理以减少细胞凝集(例如,通过在含有0.025mg/mL Pulmozyme和2.5mM $MgCl_2$的培养基中解冻细胞)。

[0762] 15.将细胞重悬于含2%(vol/vol)FBS(FACS缓冲液)的PBS中,然后将它们分配到96孔聚苯乙烯U型底微孔板中,在200μLFACS缓冲液中每孔最多$3x10^6$个细胞。

[0763] 16.在室温下以490g的转速旋转平板5分钟。

[0764] 17.通过将板倒置而丢弃缓冲液—细胞以沉淀形式留在孔的底部。

[0765] 18.加入来自步骤13的54μl MHC多聚体并充分混合。

[0766] 19.在37℃下孵育15分钟。

[0767] 20.将板移至冰上,并从5×储备液中加入20μL抗体混合物。

[0768] 21.加入4μL近红外死细胞染色剂的40倍稀释液并充分混合。

[0769] 22.在冰上孵育30分钟。

[0770] 23.在4℃下以490g的转速旋转平板5分钟。

[0771] 24.颠倒培养皿,倒出上清液。

[0772] 25.用200μl FACS缓冲液洗涤两次(在490g下于4℃离心5分钟两次,每次旋转后将板倒置以除去上清液)。

[0773] 26.将沉淀重悬于50-100μL FACS缓冲液中,并将其转移至1.4mL或5mL FACS管中。现在可以将样品准备在流式细胞仪上进行采集。单色补偿对照

[0774] 27.向11个FACS管中添加100μL FACS缓冲液和一滴阴性补偿珠(第1-11号)。

[0775] 28.将一滴抗小鼠Ig-κ补偿珠添加到步骤27中的1-10管中,并将一滴ArC胺反应性珠粒加到新管中(12号)。

[0776] 29.将5μL 1mg/mL抗CD8-生物素添加至试管1-8中并混合。

[0777] 30.在冰上将试管1-8孵育20分钟。

[0778] 31.用2mL FACS缓冲液洗涤试管1-8两次(在4℃下以490g离心5分钟)。

[0779] 32.将1μL的近IR死细胞染色剂添加至试管12(来自步骤28);混合并在黑暗中于室温孵育30分钟。

[0780] 33.将链霉亲和素-荧光染料偶联物稀释十倍(除Qdot585以外),将各5μL添加到试管1-7中,向试管8添加1μL的未稀释Qdot585-链霉亲和素,然后在黑暗中的冰上孵育20分钟。

[0781] 34.将5μL FITC抗体(使用一种转储通道抗体)或5μL的Alexa Fluor 700抗CD8a抗体添加至试管9和10(来自步骤28);在黑暗中在冰上孵育20分钟。

[0782] 35.用2mL FACS缓冲液洗涤试管1-11两次,用2mL PBS洗涤试管12两次(在490g下于4℃离心5分钟)。

[0783] 36.将所有试管重悬于150μL FACS缓冲液中。将一滴ArC阴性珠加入试管12并混合。补偿对照已准备好在流式细胞仪上进行采集。

[0784] 门控策略

[0785] 37.首先在淋巴细胞上,然后在单细胞(FSC-α、FSC-W)、活细胞、转储通道阴性细胞和$CD8^+$细胞上进行门控操作。

[0786] 38.绘制单独的门,以定义八个不同的MHC多聚体通道中的阳性事件。

[0787] 39.反转八个MHC多聚体阳性门,以获得八个门,其为每个MHC多聚体通道选择$CD8^+$和MHC多聚体阴性细胞。

[0788] 40.将两个MHC多聚体阳性群体的门相交,将其他六个MHC多聚体群体中的每个群体的门相交。门的这种组合选择在两个且仅两个MHC多聚体通道中为阳性的$CD8^+$细胞(即,如果一个细胞在一个或三个或更多MHC多聚体通道中为阳性,则将其选出)。这样的门的一个例子是PE^+和APC^+和$PE\text{-}Cy7^-$和$Qdot585^-$和$Qdot605^-$和$Qdot625^-$和$Qdot655^-$和$Qdot705^-$。

[0789] 41.对MHC多聚体的所有28种可能的两种颜色组合进行这些相交的门(在步骤40中进行描述)。

[0790] 42.加入步骤41中的所有28个门(例如,门1或门2或...或门28)。

[0791] 43.与步骤39中的八个反向门相交(PE^-和APC^-和$PE\text{-}Cy7^-$和$Qdot585^-$和$Qdot605^-$和$Qdot625^-$和$Qdot655^-$和$Qdot705^-$)。

[0792] 44.从步骤42和43连接两个门。

[0793] 45.用所有可能的双色代码绘制28个点图,显示在步骤44中为门控的事件。这些图将仅显示对于所有MHC多聚体均为阴性或对两个为阳性的$CD8^+$细胞;所有背景事件都被排除。

[0794] 46.还用所有可能的双色代码绘制28个点图,显示所有$CD8^+$细胞。这些图将很好地指示样品中的背景水平,也可用于揭示不当补偿。建议将这些“相加”图与门控图进行比较,以获取将响应与背景分离的经验。

[0795] 这对于低强度群体尤其重要。

[0796] 实施例19-荧光细胞条形码化磷流

[0797] 细胞条形码可用于通过流式细胞仪进行多重表型和功能分析。可以对磷酸流进行轻微的修改以包括FCB标记。甲醛固定后,将样品重悬于含有指定浓度的Alexa Fluor或太平洋蓝琥珀酰亚胺酯的100%20-25℃甲醇(通常每10 6个细胞500μL)中,每个样品接受不同浓度的荧光染料。在某些情况下,可以将样品重悬在甲醇中,然后添加溶于DMSO(通常以1:50稀释)的FCB荧光团。可以这样做,以便事先进行FCB染色基质的制备和在DMSO中的保存,这是96孔板实验所必需的。在20-25℃标记15分钟后,将细胞用染色培养基(含有0.5%

BSA和0.02％叠氮化钠的磷酸盐缓冲盐水(pH 7.0)洗涤两次。在4℃或更低温度下进行标记会产生非常低的标记强度,从而允许在-80℃下将样品存储在甲醇染色溶液中,而不会增加FCB染色水平。

[0798] 差异标记的样品将合并到一个FACS管或孔中,如果结果体积大于100μL,则再次沉淀。合并的条形码样品(通常为100μL)将用磷酸特异性和/或表面标记抗体染色,洗涤并通过流式细胞仪进行分析。可以在配备405nm、488nm和633nm激光器以及制备商的备用滤光片的BD LSR2流式细胞仪上进行流式细胞术,用610/20带通滤光片代替Cascade Yellow的405nm八边形带通滤光片量子点605。

[0799] 实施例20-$CD4^+$幼稚诱导

[0800] 方案1和2使用PIN肽进行。评估了抗原特异性$CD4^+$初始诱导。结果见以下表4。

[0801] 表4-来自供体1和2的$CD4^+$幼稚诱导结果

[0802]

长期诱导读出		供体 2			供体 1		
LTS#35		方案 1 ($CD25^-$)	方案 2 完全 PBMC	方案 2 $CD25^-$	方案 1 ($CD25^-$)	方案 2 完全 PBMC	方案 2 $CD25^-$

[0803]

用长肽诱导	PIN 重复 1	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	PIN 重复 2	Y	Y	Y	Y	-	-
	PIN 重复 3	-	Y	Y	Y	Y	-
结果		2/3 66%	3/3 100%	3/3 100%	3/3 100%	2/3 66%	1/3 33%

[0804] 实施例21-制备过程:DC derivation

[0805]

步骤 1		自体细胞 成分输血袋#1
步骤 2	单核细胞富集和 DC 培养	单核细胞富集
步骤 3		DC 培养
步骤 4		DC 收获，重悬于 DC 介质
步骤 5	肽负载和 DC 成熟	添加患有特定的肽并孵育
步骤 6		DC 成熟

[0806] 实施例22-T细胞诱导方案1

[0807] T细胞诱导#1

[0808]

步骤 7	自体细胞 成分输血袋#2
步骤 8	$CD25^+$消耗 ($^+$/- $CD14^+$消耗)
步骤 9	T 细胞培养基中的 T 细胞洗涤和重悬
步骤 10	T 细胞与成熟 DC 孵育(来自 DC Derivation)

[0809] T细胞诱导#2

[0810]

步骤 11	T 细胞培养基中的 T 细胞洗涤和重悬
步骤 12	T 细胞与成熟 DC 孵育(来自 DC Derivation)

[0811] T细胞诱导#3

[0812]

步骤 11	T 细胞培养基中的 T 细胞洗涤和重悬
步骤 12	T 细胞与成熟 DC 孵育(来自 DC Derivation)

[0813] 收获和冷冻保存

步骤 15		T 细胞收获	发布测试：支原体
步骤 16	**原料药(DS)**	在最终制剂中洗涤和悬浮	发布测试：无菌性、内毒素、细胞表型、TNC 计数、活力、细胞浓度、效力
步骤 17	**药物产品 (DP)**	DS 填充和冷冻保存 保存于液氮蒸汽相	

[0814] 实施例23-T细胞诱导方案2

[0815] T细胞诱导#1

[0816]

步骤 7	自体细胞 成分输血袋#2
步骤 8	$CD25^+$消耗 ($^+$/- $CD14^+$消耗)
步骤 8a	添加 FLT3L

[0817]

步骤 9	添加患有特定的肽并孵育
步骤 10	耗尽的 PMBC 与 FLT3L 和肽一起孵育

[0818] T细胞诱导#2

[0819]

步骤 11	T 细胞培养基中的 T 细胞洗涤和重悬
步骤 12	T 细胞与成熟 DC 孵育(来自 DC Derivation)

[0820] T细胞诱导#3

[0821]

步骤 11	T 细胞培养基中的 T 细胞洗涤和重悬
步骤 12	T 细胞与成熟 DC 孵育(来自 DC Derivation)

[0822] 收获和冷冻保存

[0823]

步骤 15		T 细胞收获	发布测试：支原体
步骤 16	**原料药(DS)**	在最终制剂中洗涤和悬浮	发布测试：无菌性、内毒素、细胞表型、TNC 计数、活力、细胞浓度、效力
步骤 17	**药物产品(DP)**	DS 填充和冷冻保存 保存于液氮蒸汽相	

[0824] 实例24-使用多路化、多参数流式细胞术同时检测$CD4^+$和$CD8^+$新抗原特异性T细胞应答并进行功能表征

[0825] 新抗原是由癌细胞突变产生的，这些变异来自改变蛋白质编码基因序列的体细胞突变，目前正成为免疫治疗的诱人靶标。它们在肿瘤细胞上的独特表达不同于健康组织，并可能被免疫系统识别为外来抗原，增加免疫原性。开发了T细胞制备工艺以通过多轮离体T细胞刺激来提高记忆力和从头产生$CD4^+$和$CD8^+$T细胞对患者特定新抗原的反应，从而产生新抗原反应性T细胞产物以供使用在过继细胞疗法中。刺激的T细胞产物的详细表征可用于测

试这些过程利用的许多潜在变量。

[0826] 为了探测T细胞的功能和/或特异性,开发了一种测定,以同时检测抗原特异性T细胞应答并表征其大小和功能。该测定采用以下步骤。首先使用T细胞-APC共培养物在抗原特异性T细胞中引发反应。任选地,采用使用荧光细胞条形码的样品多路化。为了鉴定抗原特异性CD8+T细胞并检查T细胞功能,使用FACS分析同时探测肽-MHC多聚体的染色和多参数细胞内和/或细胞表面细胞标志物的染色。简化测试的结果证明了其在研究由健康供体诱导的T细胞应答中的应用。在健康的供体中鉴定出针对肽的新抗原特异性T细胞应答。还比较了诱导的T细胞应答的大小、特异性和功能性。图25和图26描绘了用于同时分析T细胞样品的细胞标志物谱和MHC四聚体染色的示例性方法。

[0827] 简言之,将不同的T细胞样品用不同浓度的不同荧光染料条形码化(参见例如实施例19)。每个样品接受不同浓度的荧光染料或不同浓度的多种染料的组合。将样品重悬浮于磷酸盐缓冲盐水(PBS)中,然后添加溶解在DMSO中的荧光团(通常以1:50的稀释度)至最大终浓度为5μM。在37℃标记5分钟后,通过添加含蛋白质的培养基(例如含有10%合并的人AB型血清的RPMI培养基)。如上所述,用抗原肽脉冲的自体APC攻击独特条形码化的T细胞培养物。

[0828] 将差异标记的样品合并到一个FACS管或孔中,如果生成的体积大于100,则再次沉淀。将合并的带条形码的样品(通常为100pL)用包括LAMP-1的表面标记抗体染色(请参见,例如11)并与组装的荧光染料缀合的肽-MHC多聚体一起孵育(参见例如以上实施例17和18)。固定和透化后,将样品另外用靶向TNF-α和IFN-γ的抗体进行细胞内染色。

[0829] 然后通过流式细胞仪在流式细胞仪上同时分析合并的条形码T细胞样品的细胞标志物谱和MHC四聚体染色。与分别分析T细胞样品的细胞标志物特征和MHC四聚体染色的其他方法不同,本实施例中描述的T细胞样品的细胞标志物特征和MHC四聚体染色的同时分析提供了有关T细胞百分比的信息。既具有抗原特异性,又具有增加的细胞标志物染色。分析T细胞样品的细胞标志物特征和MHC四聚体染色的其他方法,分别确定抗原特异性样品的T细胞百分比,单独确定细胞标志物染色增加的T细胞百分比,仅允许关联这些频率。在该实施例中描述的T细胞样品的细胞标志物谱和MHC四聚体染色的同时分析不依赖于抗原特异性T细胞的频率与细胞标志物染色增加的T细胞的频率的相关性。相反,它提供了既具有抗原特异性又具有增加的细胞标志物染色的T细胞频率。在该实施例中描述的T细胞样品的细胞标志物谱和MHC四聚体染色的同时分析允许在单个细胞水平上确定那些既是抗原特异性的又具有增加的细胞标志物染色的细胞。

[0830] 为了评估给定诱导过程的成功性,使用了回忆应答测定,然后进行了多路化、多参数流式细胞仪面板分析。取自诱导培养物的样品用独特的双色荧光细胞条形码标记。将标记的细胞在负载抗原的DC或未负载DC上孵育过夜,以刺激抗原特异性细胞中的功能应答。第二天,根据下表将独特标记的细胞合并,然后进行抗体和多聚体染色。

[0831]

标志物	荧光染料	目的
CD19/CD16/CD14	BUV395	细胞排除
活/死	Near-IR	死细胞排除
CD3	BUV805	谱系门控
CD4	Alexa Fluor 700	谱系门控
CD8	PerCP-Cy5.5	谱系门控
条形码 1	CFSE	样品多路化
条形码 2	TagIT Violet	样品多路化
多聚体 1	PE	CD8+抗原特异性
多聚体 2	BV650	CD8+抗原特异性
IFNγ	APC	功能性

[0832]

TNFα	BV711	功能性
CD107a	BV786	细胞毒性
4-1BB	PE/Dazzle 594	活化

[0833] 确定了通过标记获得的完全分离卷积多路化样品的能力,所述分离的样品是分别获得或作为混合物获得的(图27A)。独特标记的样品可以完全分离,而不会与其他条形码产生交叉污染。通过多聚体染色对抗原特异性CD8+T细胞的检测通过样品多路化维持。分离含有约20%对CMV pp65、EBV BRLF1、EBV BMLF1和/或MART-1有特异性的CD8+T细胞的诱导培养物样品,用九个独特的双色条形码标记,然后合并用靶向所有四个特异性的四聚体在相同的两种颜色组合(亮紫色650[BV650]和藻红蛋白[PE])中进行染色(图27B)。所有九个条形码产生可比较的四聚体染色模式和四聚体+细胞的检测频率。

[0834] 还在回忆应答测定中分析了两种含有从头$CD4^+$T细胞应答的诱导培养物的样品,其单独进行而没有条形码或与无关样品混合(图28A和图28B)。从细胞中引发的功能数量和反应强度在样品条形码的作用下并没有明显改变。

[0835] 对诱导的CD8+记忆应答的特异性和功能性的同时分析表明,在初始健康供体中,针对CMV pp65、MART-1和EBV BRLF1和BMLF1表位的$CD8^+$记忆应答可以从$CD8^+$T细胞的0.23%升高至>60%(图29A)

[0836] 通过在$CD8^+$多聚体$^+$细胞上预选通,选择性地探询了抗原特异性T细胞的功能(图29B)。暴露于抗原负载的DC时,细胞表现出细胞毒性功能(CD 107a表面暴露)和IFNγ分泌。

[0837] 还证实了在同一培养物中从头诱导的具有多种特异性的CD4+应答的检测和功能表征。利用抗原特异性功能来鉴定诱导的$CD4^+$T细胞应答(图30A)。在所示的示例中,在针对10个HIV衍生抗原决定簇的四个复制培养物中进行了诱导,这些抗原决定簇是HIV阴性健康供体的初次靶标。在所有四个生物学重复中检测到抗原特异性应答。通过池反卷积选择检测到的应答中的三个用于进一步随访,以鉴定诱导应答的特异性(图30B)。在每个重复测试中均检测到多种应答,并且在每种情况下,相同的两个表位(HIV#5和HIV#7)诱导出最高的

应答量级。不受任何理论的束缚,这可能反映了这些表位在该供体中的更高的免疫原性,这是由于II类MHC单倍型或在初始库中靶向这些表位的T细胞的前体频率更高。在DC加载期间通过肽滴定确定对于三种选择的应答的对抗原的敏感性(图30C)。对HIV#5、HIV#6和HIV#4的应答分别表明EC_{50}为0.45μM、0.43μM和9.1μM。

[0838] 实施例25-T细胞制备方案3

[0839] 材料:

[0840] AIM V介质(Invitrogen)

[0841] 人类FLT3L,临床前CellGemx#1415-050储备液50ngμL

[0842] TNF-α,临床前CellGenix#1406-050,储备液10ngμL

[0843] IL-1β,临床前CellGenix#1411-050,储备液10ng/uL

[0844] PGE1或Alprostadil-Cayman from Czech Republic储备液0.5μg/μL

[0845] R10培养基-RPMI 1640谷氨酰胺+10%人血清+1%PenStrep

[0846] 20/80培养基-18%AIM V+72%RPMI 1640 glutamax+10%人血清+1%PenStrep

[0847] IL7储备液5ng L

[0848] IL1储备液5ng/μL

[0849] 程序:

[0850] 步骤1:在2mL AIM V培养基中,用FLT3L在24孔板的每个孔中接种500万个PBMC(或目标细胞)

[0851] 步骤2:AIMV中的肽加载和成熟

[0852] 1.将感兴趣的肽池(无肽条件除外)与各自孔中的PBMC(或中间细胞)混合。

[0853] 2.孵育1小时。

[0854] 3.孵育后,将成熟混合物(包括TNF-α、IL-1β、PGE1和IL-7)混合到每个孔中。

[0855] 步骤3:将人血清以10%体积的最终浓度添加到每个孔中并混合。

[0856] 步骤4:用补充了IL7+IL15的新鲜RPMI+10%HS介质替换介质。

[0857] 步骤5:每1-6天孵育期间,用新鲜的补充IL7+IL15的20/80培养基替换培养基。

[0858] 步骤6:在2ml AIM V培养基中,用FLT3L在新的6孔板的每个孔中接种500万个PBMC(或感兴趣的细胞)

[0859] 步骤7:重新刺激的肽加载和成熟(新板)

[0860] 1.将感兴趣的肽池(无肽条件除外)与各自孔中的PBMC(或感兴趣的细胞)混合

[0861] 2.孵育1小时。

[0862] 3.孵育后将成熟混合物混合到每个孔中

[0863] 步骤8:重新刺激:

[0864] 1.计数第一个刺激性FLT3L培养物,并将500万个培养细胞添加到新的再刺激板中。

[0865] 2.使培养物体积达到5mL(AIM V),并添加500ul人血清(按体积计10%)

[0866] 步骤9:取出3ml培养基,并添加6ml补充有IL7+IL15的RPMI+10%HS培养基。

[0867] 步骤10:用补充有IL7+IL15的新鲜20/80培养基替换75%的培养基。

[0868] 步骤11:如果需要,重复重新刺激。

[0869] 实施例26-使用T细胞制备方案3的实验数据

[0870] 使用T细胞制备方案3制备T细胞,并分析刺激的T细胞。样品取自两名黑色素瘤患者。使用与实施例24中所述类似的测定分析T细胞。图34显示了pMHC多聚体图,该图量化了从两名黑素瘤患者中诱导的CD8+T细胞应答。如本文所用的,NEO-STIM是指T细胞制备方案。图35显示了在黑素瘤患者中诱导的记忆和从头应答的多功能图谱数据,如1、2、3或4种功能的组合所示。一种或多种功能是产生选自IFNγ、TNFα、CD107a和4-1BB的一种或多种因子。图36显示了在黑素瘤患者中诱导的针对突变和野生型肽的记忆和从头应答的特异性。图37A和37B和37C显示了在黑素瘤患者中诱导的记忆和从头应答的细胞毒性谱,其通过$CD8^+$ $CD107a^+$T细胞的频率定量(上图)。图37A和37B和37C的下图显示了通过这些T细胞应答杀死靶细胞,如通过$aCAS3^+$肿瘤细胞的频率所量化的。图38A显示了在黑素瘤患者中新抗原特异性CD4+T细胞应答的鉴定。图38B显示了在图38中鉴定的这些$CD4^+$T细胞应答的特异性。图38A为突变型和野生型肽。图38C显示了这些$CD4^+$T细胞应答的多官能谱,如1、2、3或4个功能的组合所示。一种或多种功能是产生选自IFNγ、TNFα、CD107a和4-1BB的一种或多种因子。

[0871] 实施例27-使用T细胞制备方案1或2的实验数据

[0872] 使用T细胞制备方案1或替代方案2制备T细胞。使用与实施例24中所述类似的测定法分析受刺激的T细胞。图39显示了在有或没有添加Epacadostat的情况下在两个健康供体(例如HD66和HD63)中诱导的记忆应答的功能,如1、2或3个功能的组合所显示(例如,一个或多个功能是产生一种或多种选自IFNγ、TNFα和CD107α的因子)。图40显示在添加或不添加Epacadostat的六次重复诱导中诱导的从头$CD8^+$T细胞应答百分比("命中率",在四个健康供体之间取平均)。图41A显示了用本文提供的T细胞制备方案诱导后,有或没有添加PD-1阻断抗体,来自供体HD55的抗原特异性细胞的绝对数。图41B显示在用本文提供的T细胞制备方案诱导后,有或没有添加PD-1阻断抗体,来自供体HD 67的抗原特异性细胞的绝对数。图42A显示在添加或不添加IL-12的情况下从头$CD8^+$T细胞应答的$pMHC^+CD8^+$T细胞分数。图42B显示了在添加或不添加IL-12的情况下从头$CD8^+$T细胞应答中$CD8^+$T细胞的百分比。

[0873] 实施例28:使用患者特定新抗原诱导的免疫应答的深度表征

[0874] 使用生物信息引擎预测患者特定的新抗原。在刺激方案中,将覆盖预测的新抗原的合成长肽用作免疫原,以评估免疫原性。刺激方案包括将这些新抗原编码肽供应至患者来源的APC,然后将其与患者来源的T细胞共培养以引发新的抗原特异性T细胞。

[0875] 刺激方案中包含多轮刺激,以引发、激活和扩充记忆以及从头的T细胞应答。通过使用以下测定表征这些应答,分析了这些新抗原特异性T细胞的特异性、表型和功能:使用pMHC多聚体的组合编码分析用于检测多种新抗原特异性$CD8^+$T细胞应答。使用多路化、多参数流式细胞术进行的回忆应答测定用于鉴定和验证$CD4^+$T细胞应答。通过测量促炎细胞因子(包括IFN-γ和TNFa)的产生以及CD107a上调作为脱颗粒的标志物来评估CD8+和CD4+T细胞应答的功能。使用表达新抗原的肿瘤细胞系进行细胞毒性试验,以了解CD8+T细胞应答识别和杀死针对天然加工并呈递的抗原的靶细胞的能力。通过T细胞上CD107a的细胞表面上调和表达新抗原的肿瘤细胞上活性胱天蛋白酶3的上调来测量细胞毒性。在这项研究中,黑色素瘤患者样品(NV6和NV10)是在IRB批准下获得的。

[0876] 刺激方案成功扩充了先前存在的CD8+T细胞应答,并诱导了从头CD8+T细胞应答(表1)。

[0877] 表1

[0878]

患者	HUGO 符号	全基因名称	类型
NV10	$SRSF1_{E>K}$ $ARAP1_{Y>H}$ $PKDREJ_{G>R}$	丝氨酸和精氨酸富含剪接因子 1 锚蛋白重复和 PH 域 针对 Egg Jelly 的多囊蛋白家族受体	CD8
	$MKRN1_{S>L}$ $CREBBP_{S>L}$ $TPCN1_{K>E}$	Makorin 环指蛋白 1 CREB 结合蛋白 双孔区域通道 1	CD4
NV6	$AASDH_{neoORF}$ $ACTN4_{K>N}$ $CSNK1A1_{S>L}$ $DHX40_{neoORF}$ $GLI3_{P>L}$ $QARS_{R>W}$ $FAM178B_{P>L}$ $RPS26_{P>L}$	氨基乙二酸半醛脱氢酶 辅肌动蛋白 Alpha 4 酪蛋白激酶 1 Alpha 1 DEAH-盒解旋酶 40 GLI 家族锌指 3 谷氨酰胺酰-TRNA 合成酶 具有序列相似性 178 的家族成员 B 核糖体蛋白 S26	CD8

[0879] 使用来自黑素瘤患者NV10的PBMC,观察到先前存在的CD8+T细胞应答从4.5%的CD8+T细胞扩充到72.1%的CD8+T细胞($SRSF1E_{>K}$)。此外,刺激方案可有效诱导两种针对患者特定新抗原的从头CD8+T细胞应答($ARAP1_{Y>H}$:6.5%的CD8+T细胞,$PKDREJ_{G>R}$:13.4%的CD8+T细胞;在刺激过程之前未检测到细胞(图34)。刺激方案使用来自另一位黑色素瘤患者NV6的PBMC成功诱导了针对先前描述的和新型模型新抗原的7种从头的CD8+T细胞应答,量级最大($ACTN4_{K>N}$ $CSNK1A1_{S>L}$ DHX40neoORF 7,$GLI3_{P>L}$,$QARS_{R>W}$,$FAM178B_{P>L}$和$RPS26_{P>L}$,范围:0.2%的CD8+T细胞,最高52%的CD8+T细胞)。此外,针对患者特定新抗原的CD8+记忆T细胞应答得到了扩充(AASDHneoORF,刺激后高达13%的CD8+T细胞)。

[0880] 对来自患者NV10的诱导CD8+T细胞进行了更详细的表征。在用突变的肽加载的DC再次攻击时,新抗原特异性CD8+T细胞表现出一种、两种和/或所有三种功能(对于$SRSF1_{E>K}$和$ARAP1_{Y>H}$,分别具有16.9%和65.5%的功能性CD8+pMHC+T细胞(图35)。

[0881] 当用不同浓度的新抗原肽再次攻击时,诱导的CD8+T细胞对突变的新抗原肽有显著的应答,而对野生型肽没有显著的应答(图36)。

[0882] 在患者NV 10中,使用具有突变的新抗原负载的DC的回忆应答测定鉴定了CD4+T细胞应答(图38A-C)。鉴定出三种CD4+T细胞应答($MKRN1_{S>L}$、$CREBBP_{S>L}$和$TPCN1_{K>E}$)是基于与负载突变型新抗原肽的DC的反应性。当用突变新抗原肽再次挑战时,这些CD4+T细胞应答也显示出多功能性特征。31.3%、34.5%和41.9%的CD4+T细胞显示一种、两种和/或三种功能;$MKRN1_{S>L}$、$CREBBP_{S>L}$和$TPCN1_{K>E}$应答。

[0883] 还评估了来自患者NV10的诱导的CD8+应答的细胞毒性能力(图37A-C)。共培养后,$SRSF1_{E>K}$和$ARAP1_{Y>H}$应答均显示CD8+T细胞上的CD107a显著上调,而用突变体构建体转导的肿瘤细胞上的活性胱天蛋白酶3显著上调。

[0884] 使用模拟方案,通过在患者材料中诱导多种新抗原特异性CD8+和CD4+T细胞应答,

可以确定预测的患者特定新抗原以及模型新抗原具有免疫原性。诱导多功能和突变体特异性CD8+和CD4+T细胞应答的能力证明了预测高质量新抗原和产生有效T细胞应答的能力。在刺激过程结束时,存在多个富集的新抗原特异性T细胞群体(记忆和从头),证明了产生新的T细胞应答并产生有效的癌症免疫疗法来治疗癌症患者的能力。

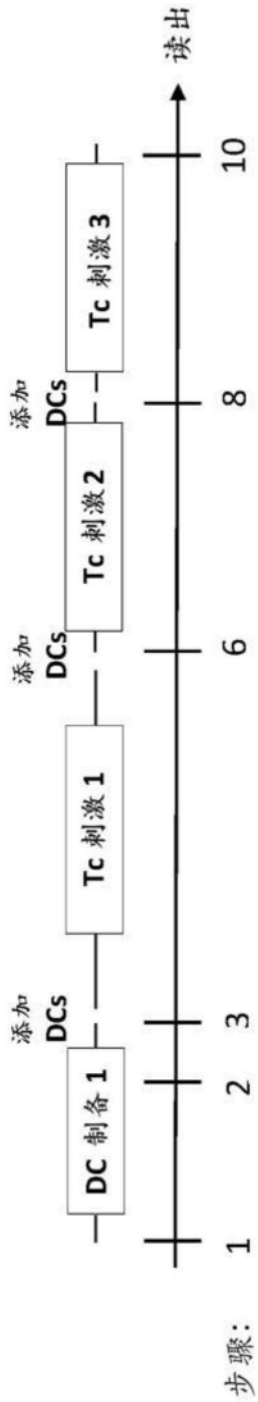


图1A

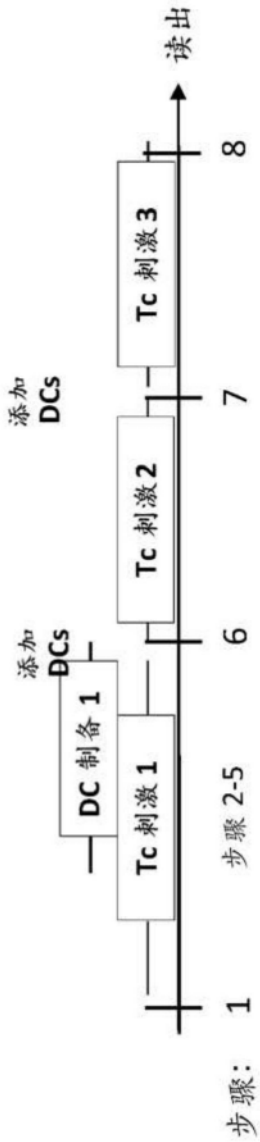


图1B

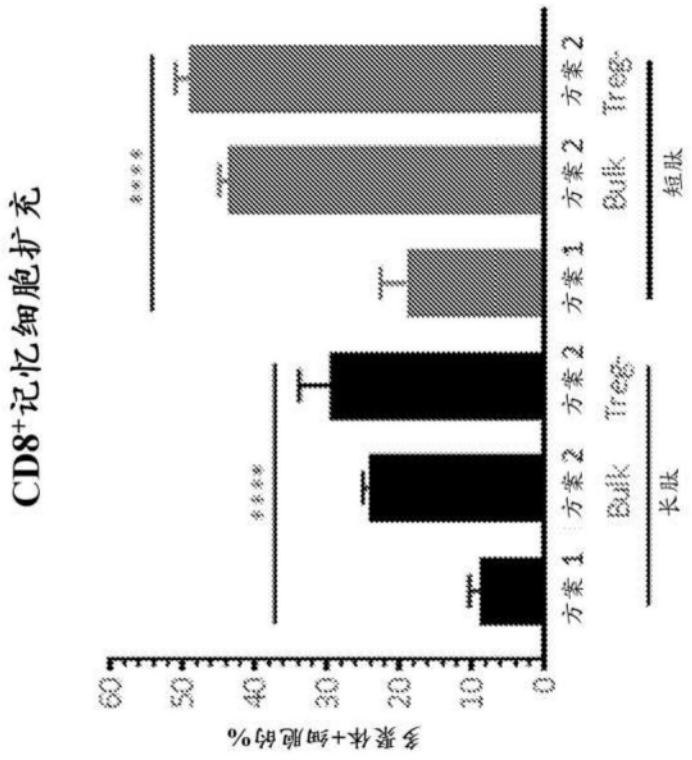

CD8+记忆细胞扩充
多聚体+细胞的%
0
10
20
30
40
50
60
****
****
方案1
方案2
Bulk
Treg
方案1
方案2
Bulk
Treg
长肽
短肽

图2

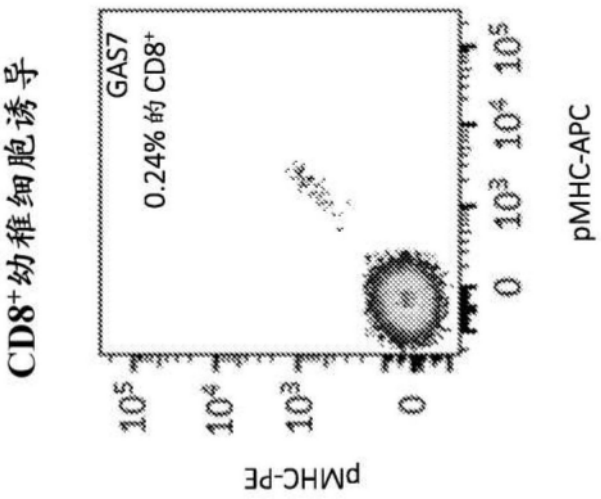

CD8+幼稚细胞诱导
GAS7
0.24% 的 CD8+
pMHC-PE
pMHC-APC
0
10³
10⁴
10⁵

图3

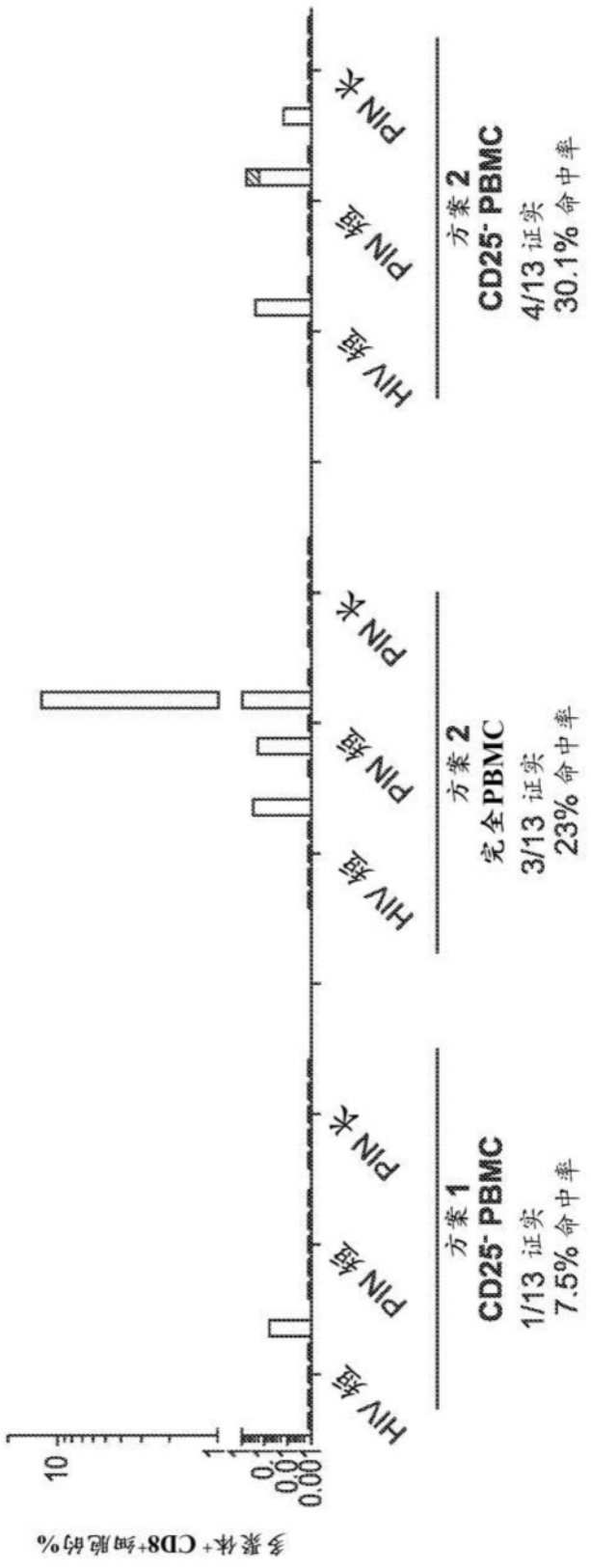

多聚体+ CD8+细胞的%
10
1
0.1
0.01
0.001
HIV 肽
PIN 肽
PIN 水
方案 1
CD25- PBMC
1/13 证实
7.5% 命中率
HIV 肽
PIN 肽
PIN 水
方案 2
完全PBMC
3/13 证实
23% 命中率
HIV 肽
PIN 肽
PIN 水
方案 2
CD25- PBMC
4/13 证实
30.1% 命中率

图4

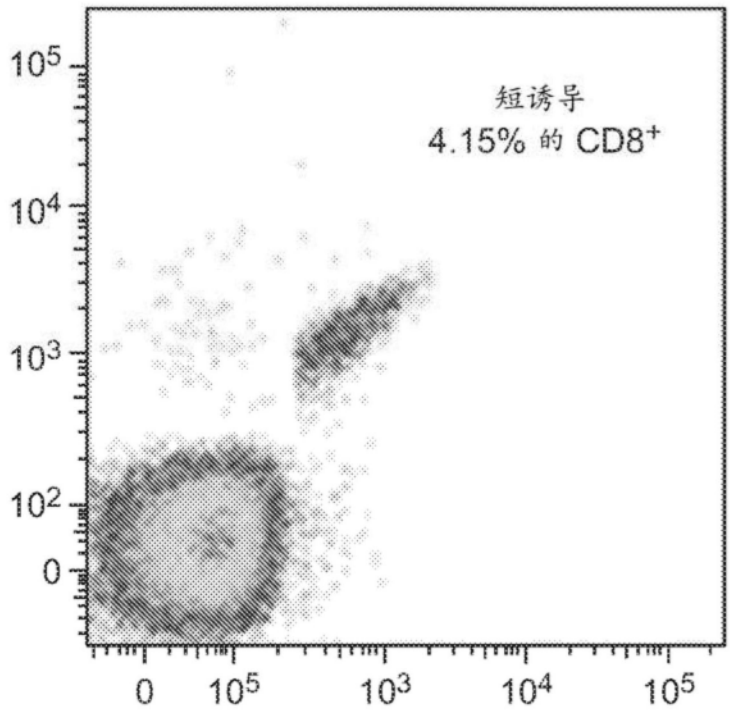

短诱导
4.15% 的 CD8+
10^5
10^4
10^3
10^2
0
0
10^5
10^3
10^4
10^5

图5A

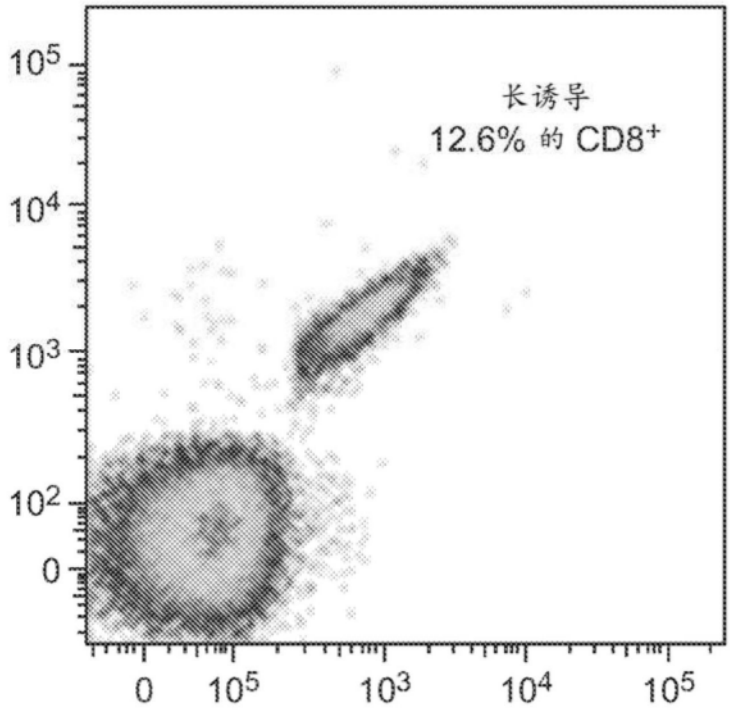

长诱导
12.6% 的 CD8+
10^5
10^4
10^3
10^2
0
0
10^5
10^3
10^4
10^5

图5B

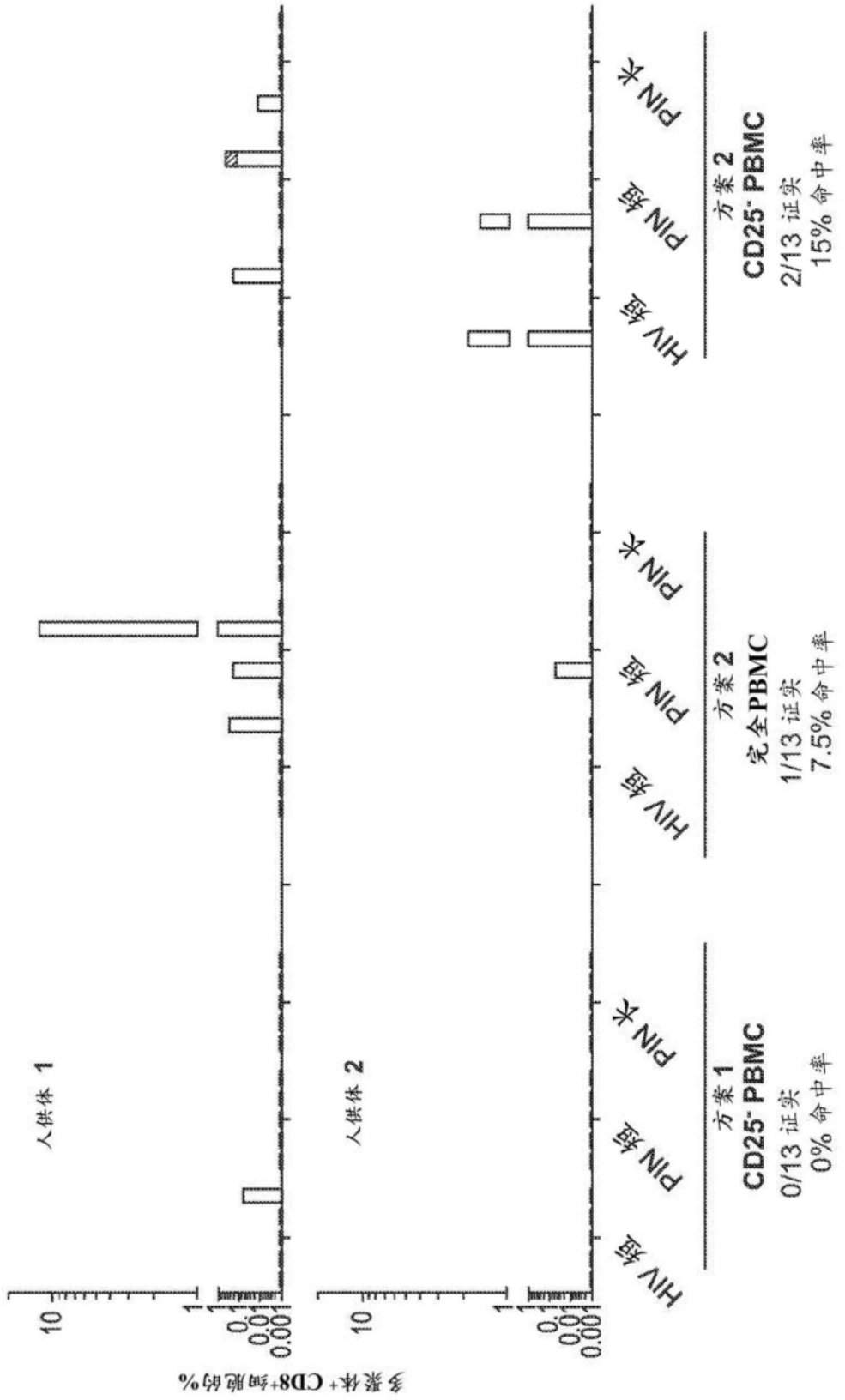

多聚体+ CD8+细胞的%
人供体 1
人供体 2
10
1
0.1
0.01
0.001
HIV 库
PIN 库
PIN 米
方案 1
CD25- PBMC
0/13 证实
0% 命中率
方案 2
完全PBMC
1/13 证实
7.5% 命中率
方案 2
CD25- PBMC
2/13 证实
15% 命中率

图6

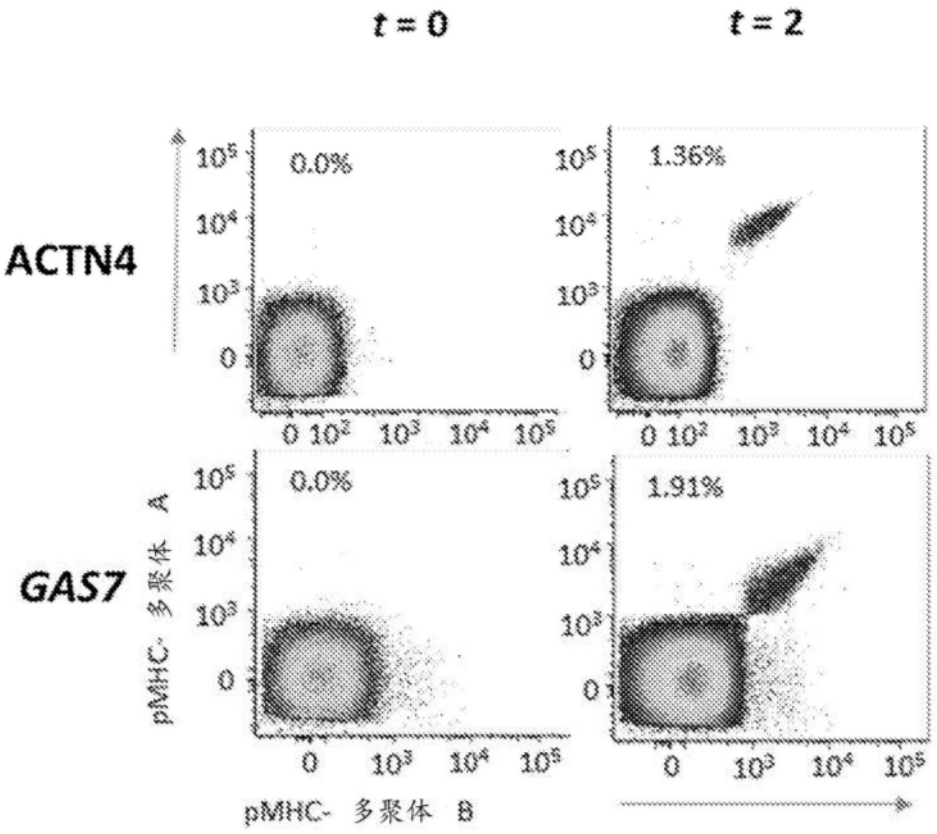

t = 0
t = 2
ACTN4
GAS7
0.0%
1.36%
0.0%
1.91%
pMHC- 多聚体 A
pMHC- 多聚体 B

图7

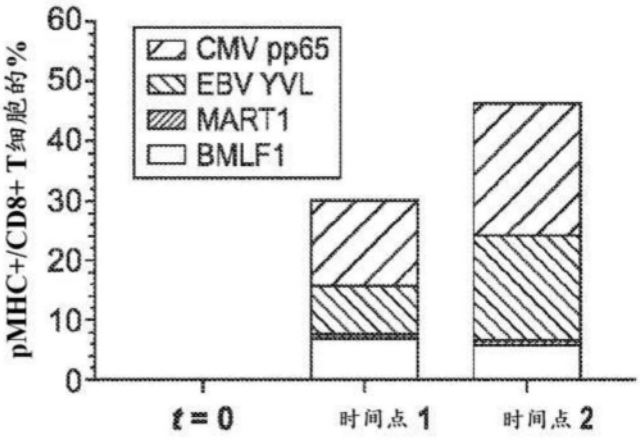

pMHC+/CD8+ T细胞的%
CMV pp65
EBV YVL
MART1
BMLF1
t = 0
时间点 1
时间点 2

图8A

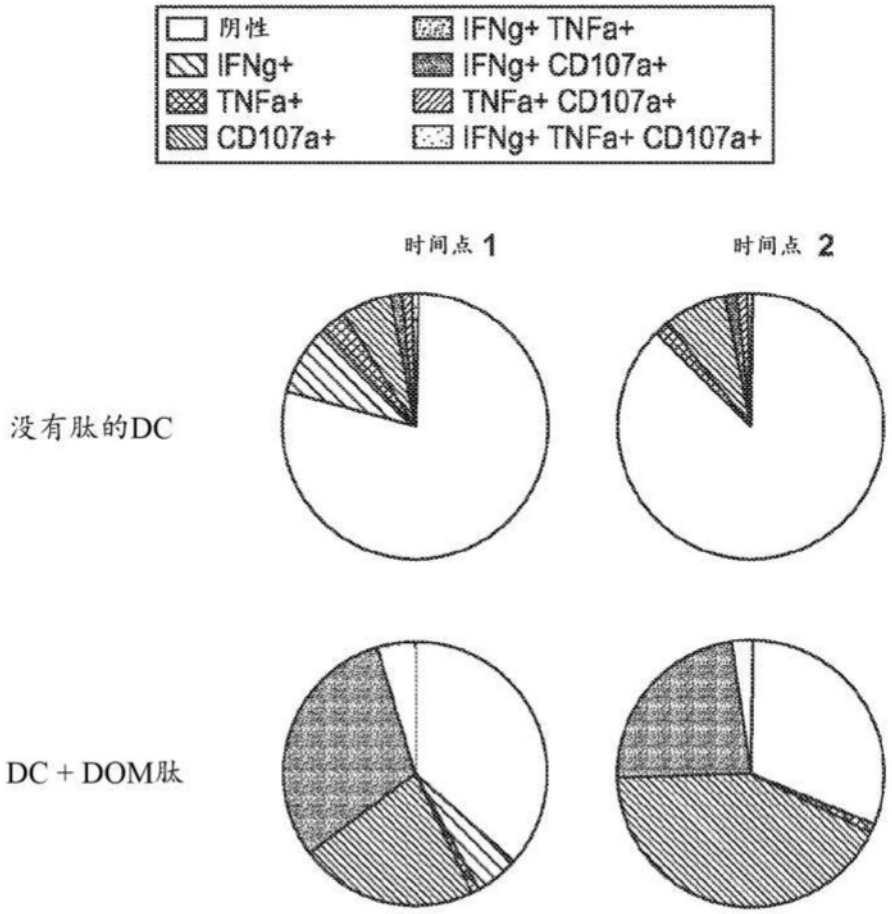

阴性
IFNg+
TNFa+
CD107a+
IFNg+ TNFa+
IFNg+ CD107a+
TNFa+ CD107a+
IFNg+ TNFa+ CD107a+
时间点 1
时间点 2
没有肽的DC
DC + DOM肽

图8B

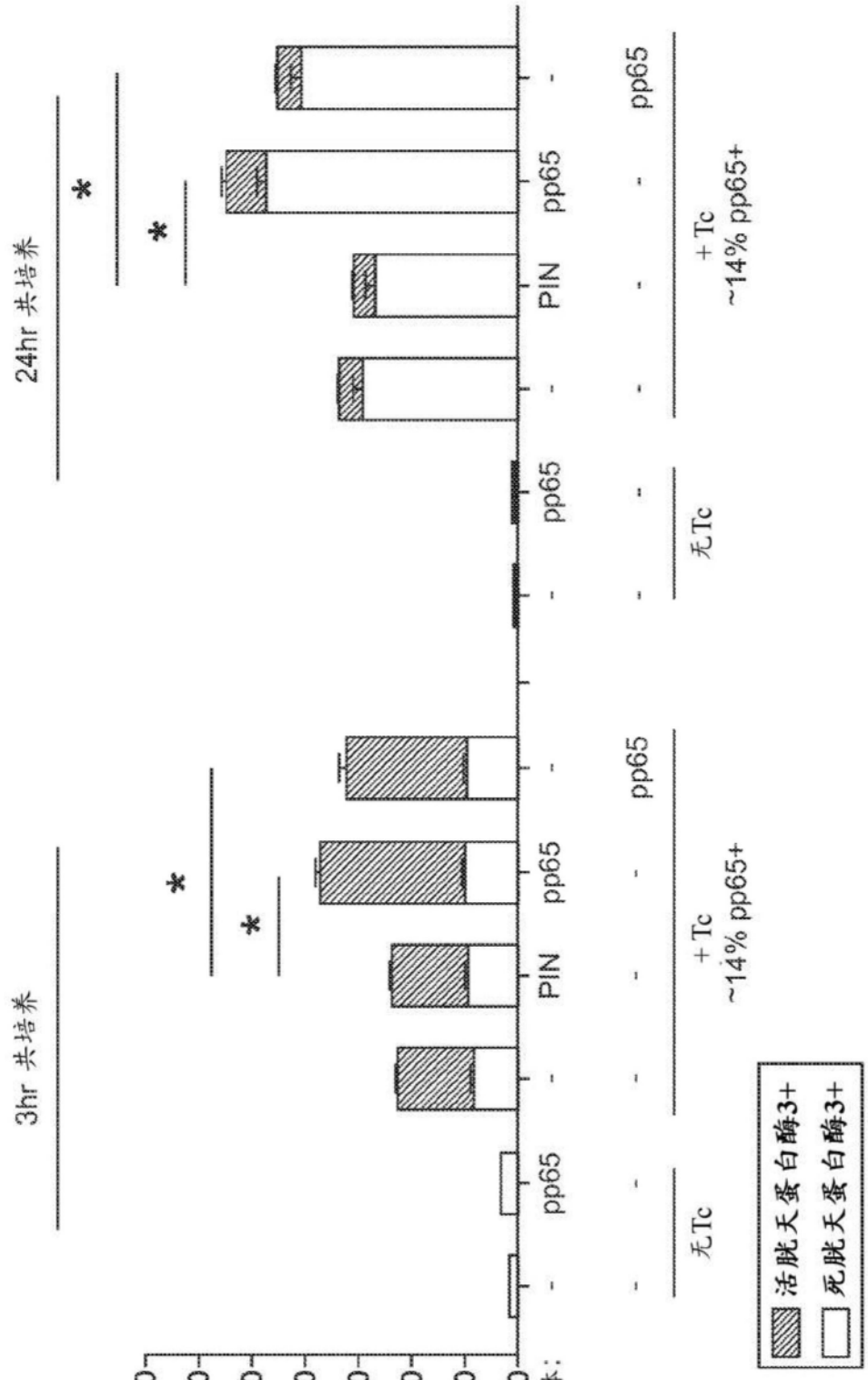

3hr 共培养
24hr 共培养
*
*
*
*
70
60
50
40
30
20
10
0
%杀细胞的
慢病毒构建体:
-
pp65
-
PIN
pp65
-
-
pp65
-
PIN
pp65
-
肽
-
-
-
-
-
-
-
-
-
-
无Tc
+Tc
~14% pp65+
无Tc
+Tc
~14% pp65+
活胱天蛋白酶3+
死胱天蛋白酶3+

图9

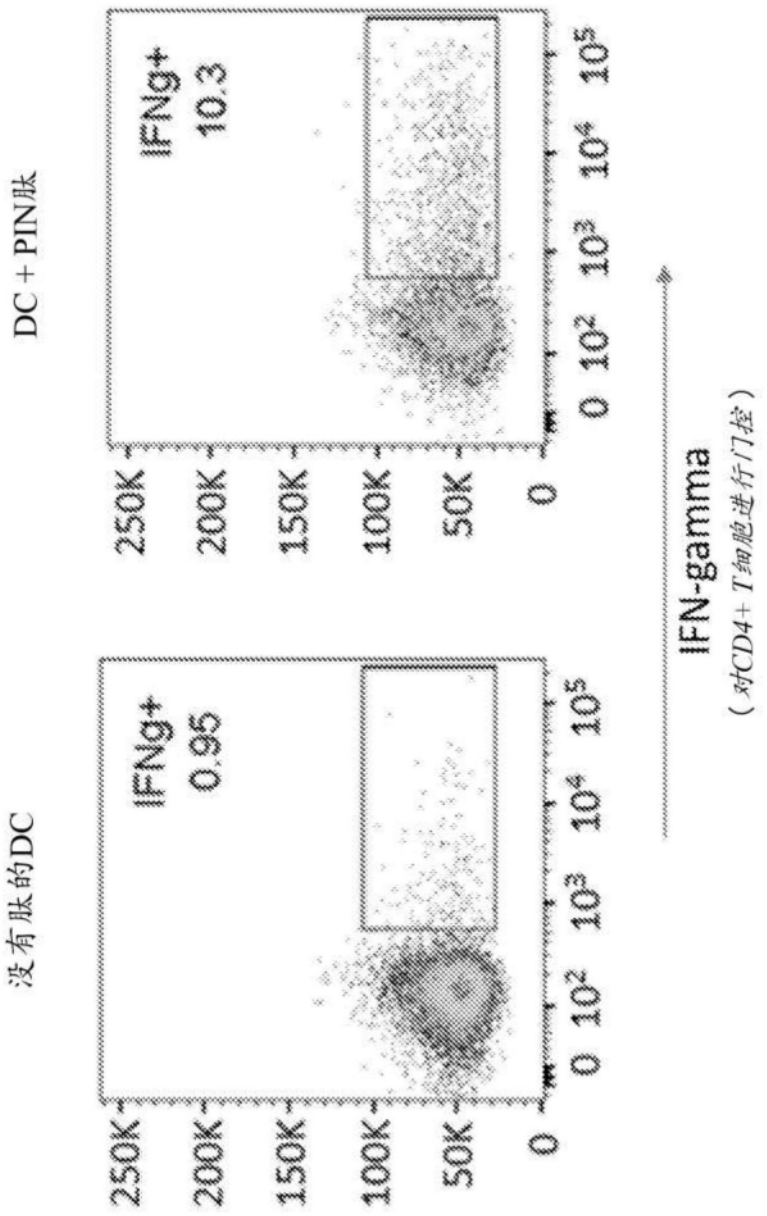

DC + PIN肽
IFNg+
10.3
250K
200K
150K
100K
50K
0
0 10² 10³ 10⁴ 10⁵
没有肽的DC
IFNg+
0.95
250K
200K
150K
100K
50K
0
0 10² 10³ 10⁴ 10⁵
IFN-gamma
(对CD4+ T细胞进行门控)

图10

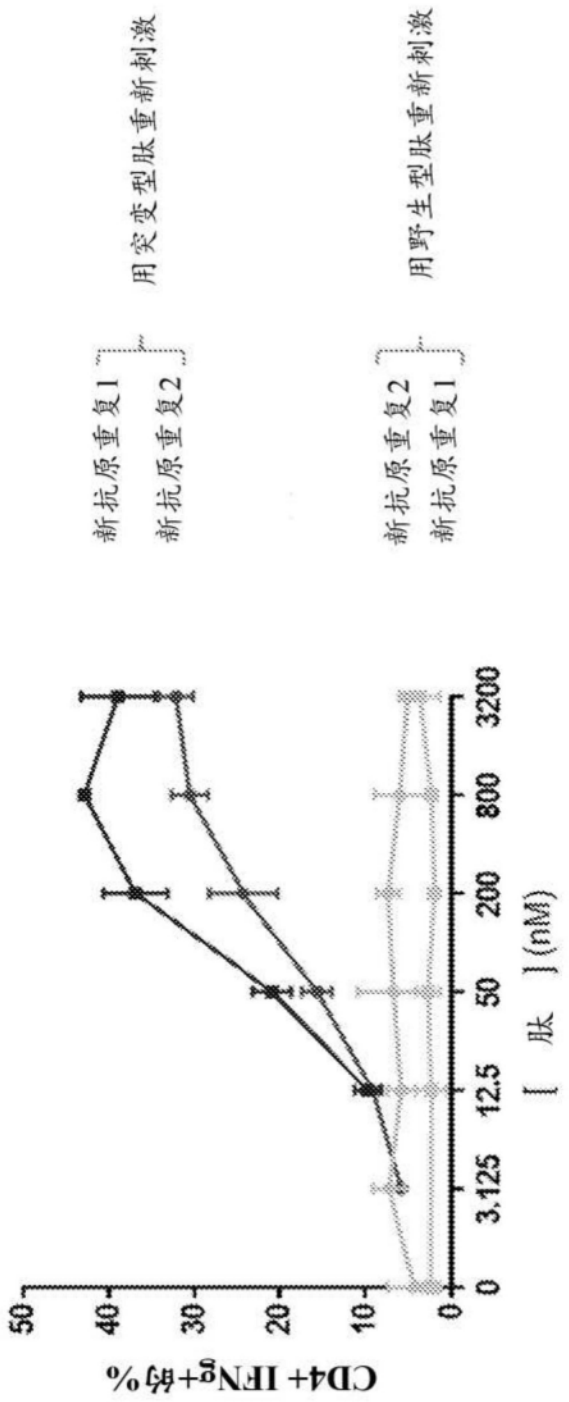

用突变型肽重新刺激
用野生型肽重新刺激
新抗原重复1
新抗原重复2
新抗原重复2
新抗原重复1
CD4+ IFNγ+的%
50
40
30
20
10
0
0
3.125
12.5
50
200
800
3200
[肽](nM)

图11

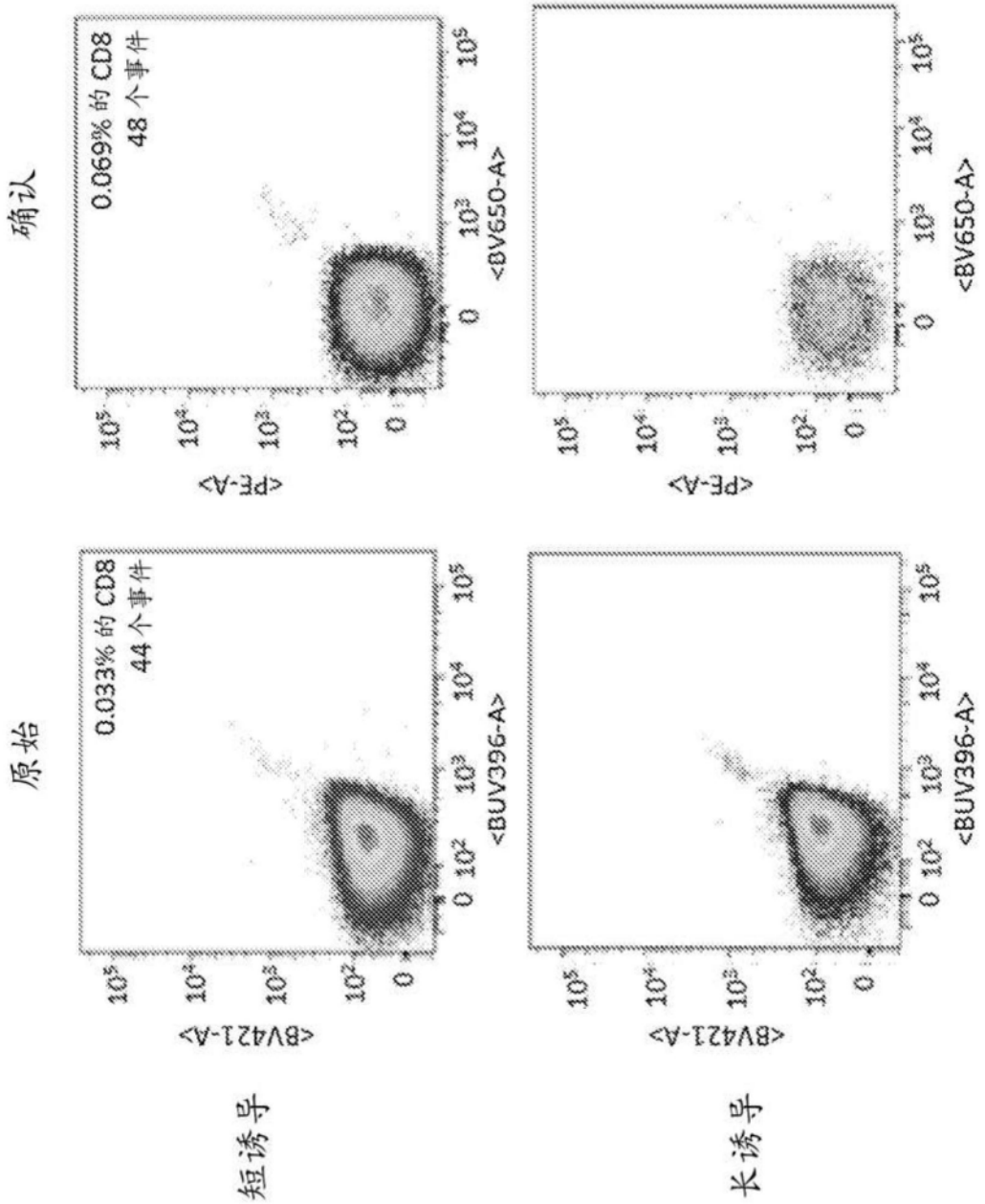

确认
原始
0.069% 的 CD8
48 个事件
0.033% 的 CD8
44 个事件
<PE-A>
<BV650-A>
<BV421-A>
<BUV396-A>
短诱导
长诱导

图12

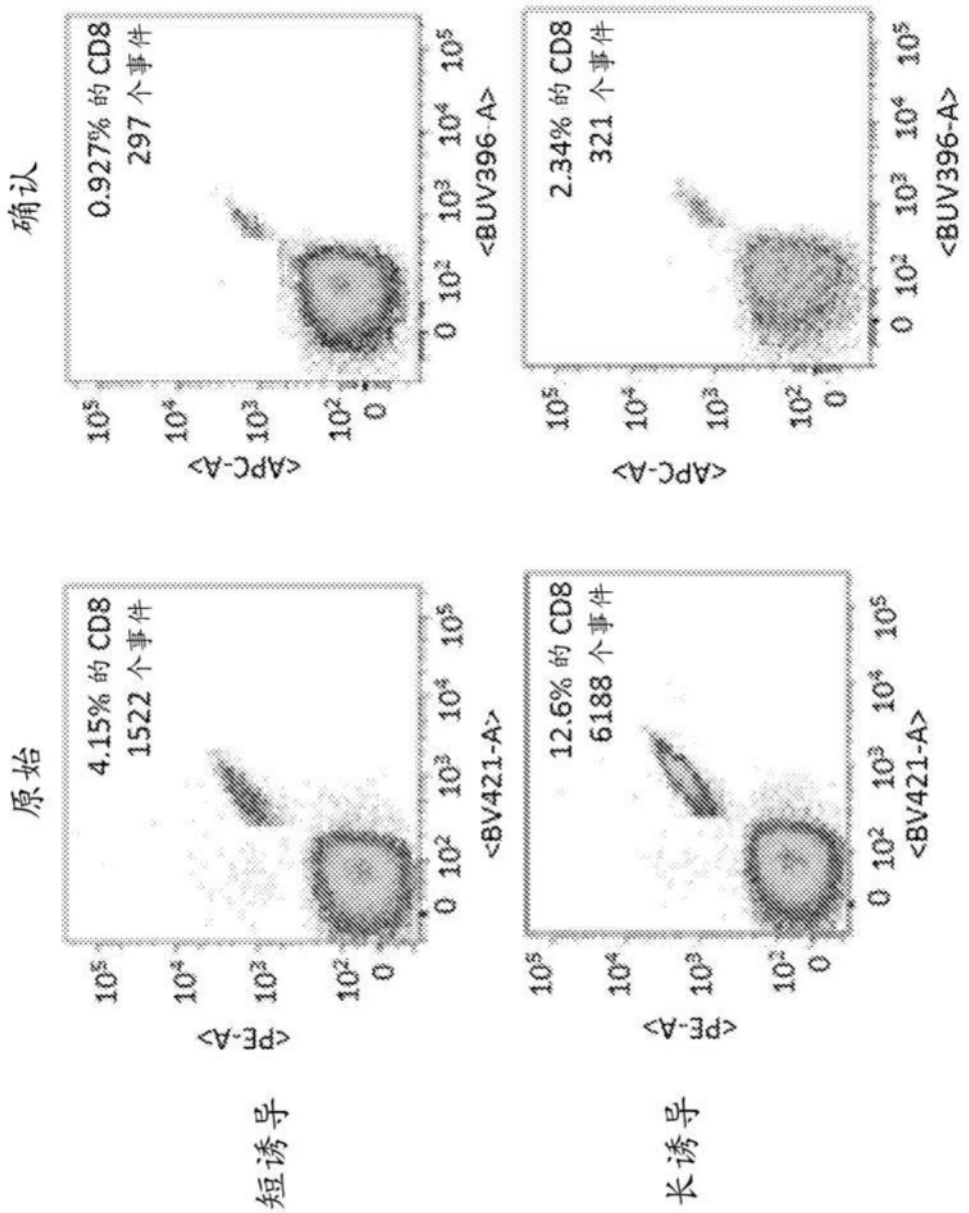

原始
确认
短诱导
长诱导
4.15% 的 CD8
1522 个事件
0.927% 的 CD8
297 个事件
12.6% 的 CD8
6188 个事件
2.34% 的 CD8
321 个事件
<PE-A>
<APC-A>
<BV421-A>
<BUV396-A>
0
10^2
10^3
10^4
10^5

图13

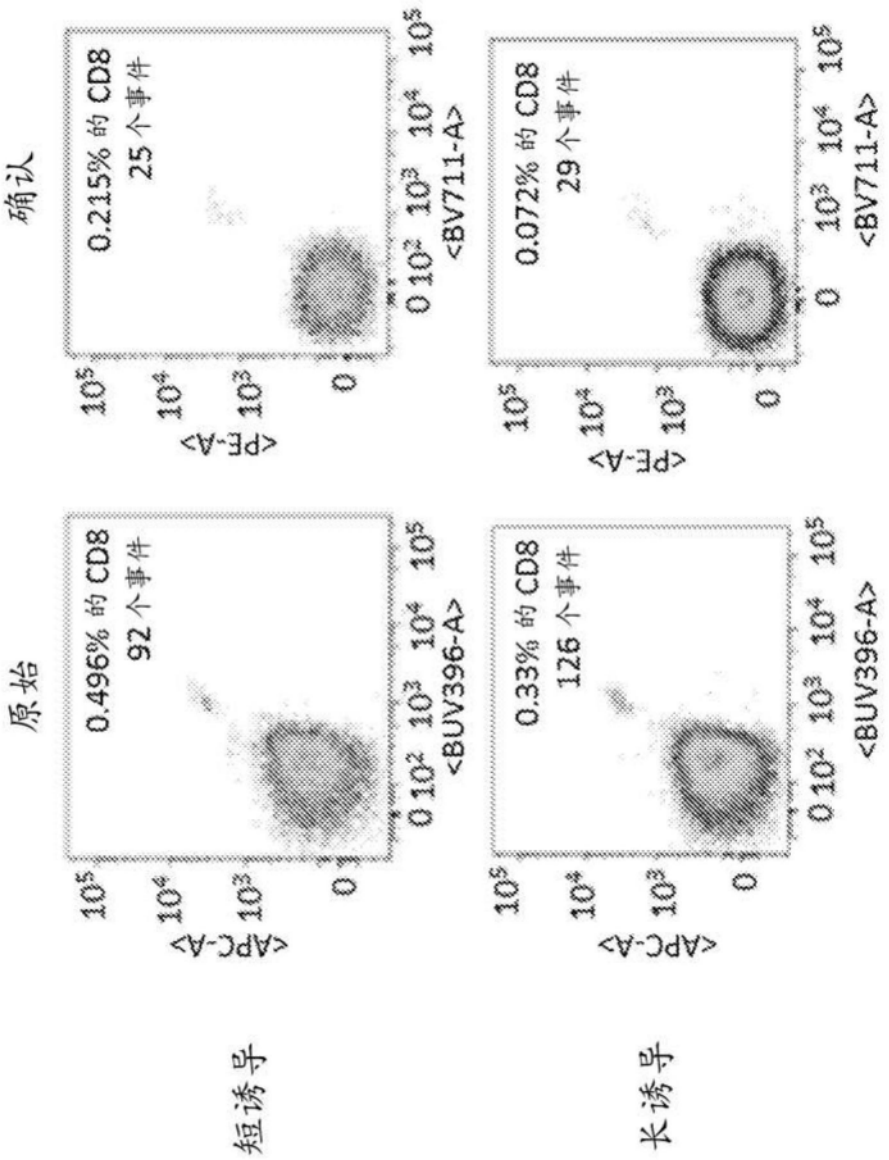

确认
原始
短诱导
长诱导
0.215% 的 CD8
25 个事件
0.072% 的 CD8
29 个事件
0.496% 的 CD8
92 个事件
0.33% 的 CD8
126 个事件
<PE-A>
<APC-A>
<BV711-A>
<BUV396-A>

图14

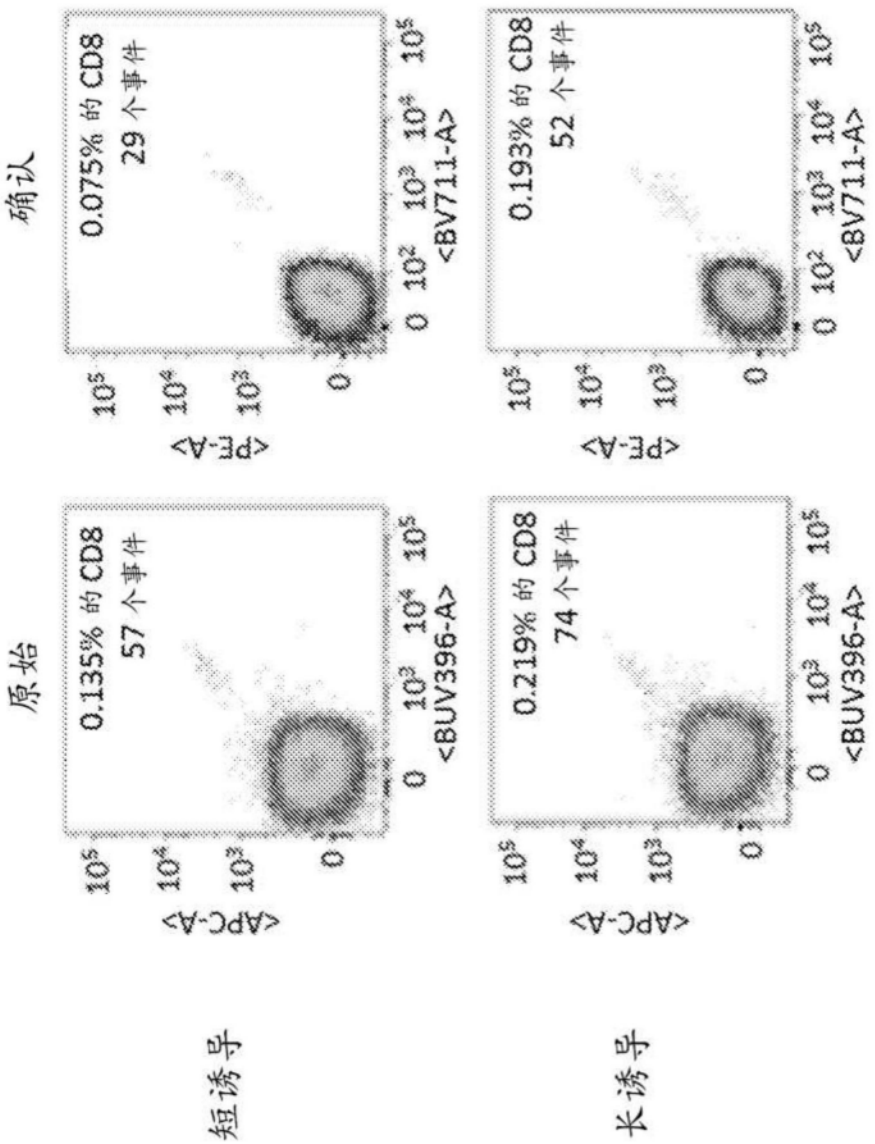

确认
原始
短诱导
长诱导
0.075% 的 CD8
29 个事件
0.193% 的 CD8
52 个事件
0.135% 的 CD8
57 个事件
0.219% 的 CD8
74 个事件
<PE-A>
<APC-A>
<BV711-A>
<BUV396-A>
0
10²
10³
10⁴
10⁵

图15

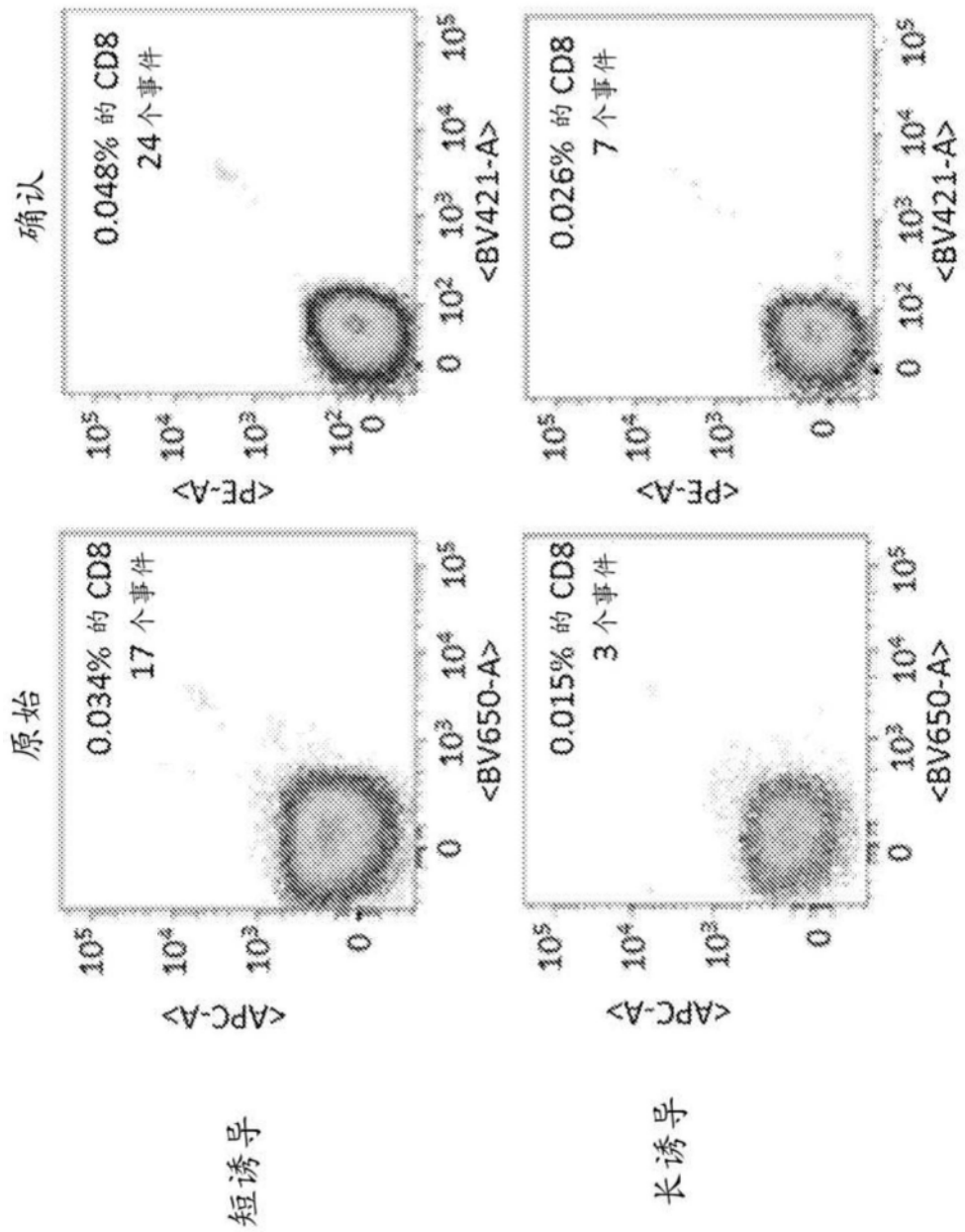

确认
原始
0.048% 的 CD8
24 个事件
0.026% 的 CD8
7 个事件
0.034% 的 CD8
17 个事件
0.015% 的 CD8
3 个事件
<PE-A>
<APC-A>
<BV421-A>
<BV650-A>
短诱导
长诱导

图16

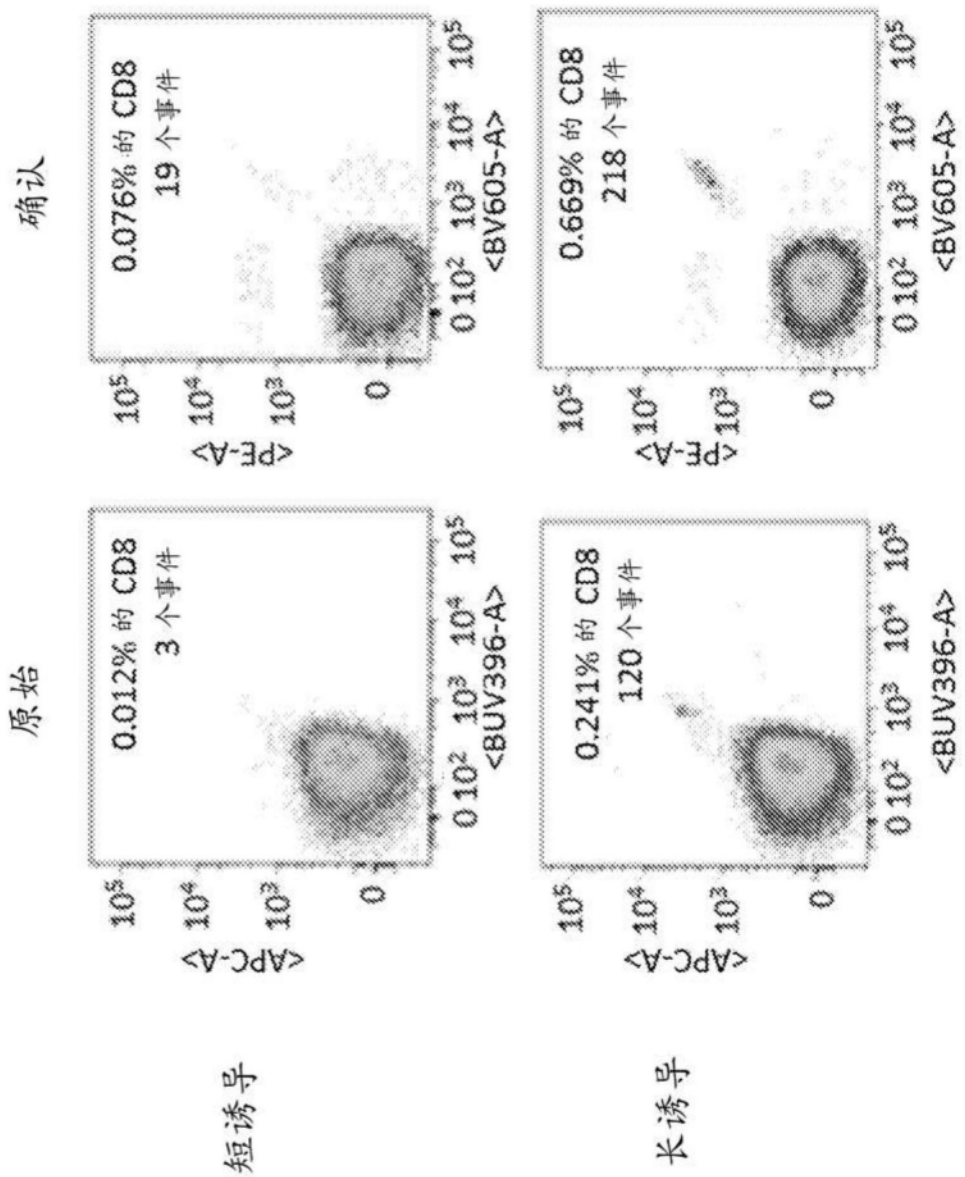

确认
原始
短诱导
长诱导
0.076% 的 CD8
19 个事件
0.669% 的 CD8
218 个事件
0.012% 的 CD8
3 个事件
0.241% 的 CD8
120 个事件
<PE-A>
<APC-A>
<BV605-A>
<BUV396-A>

图17

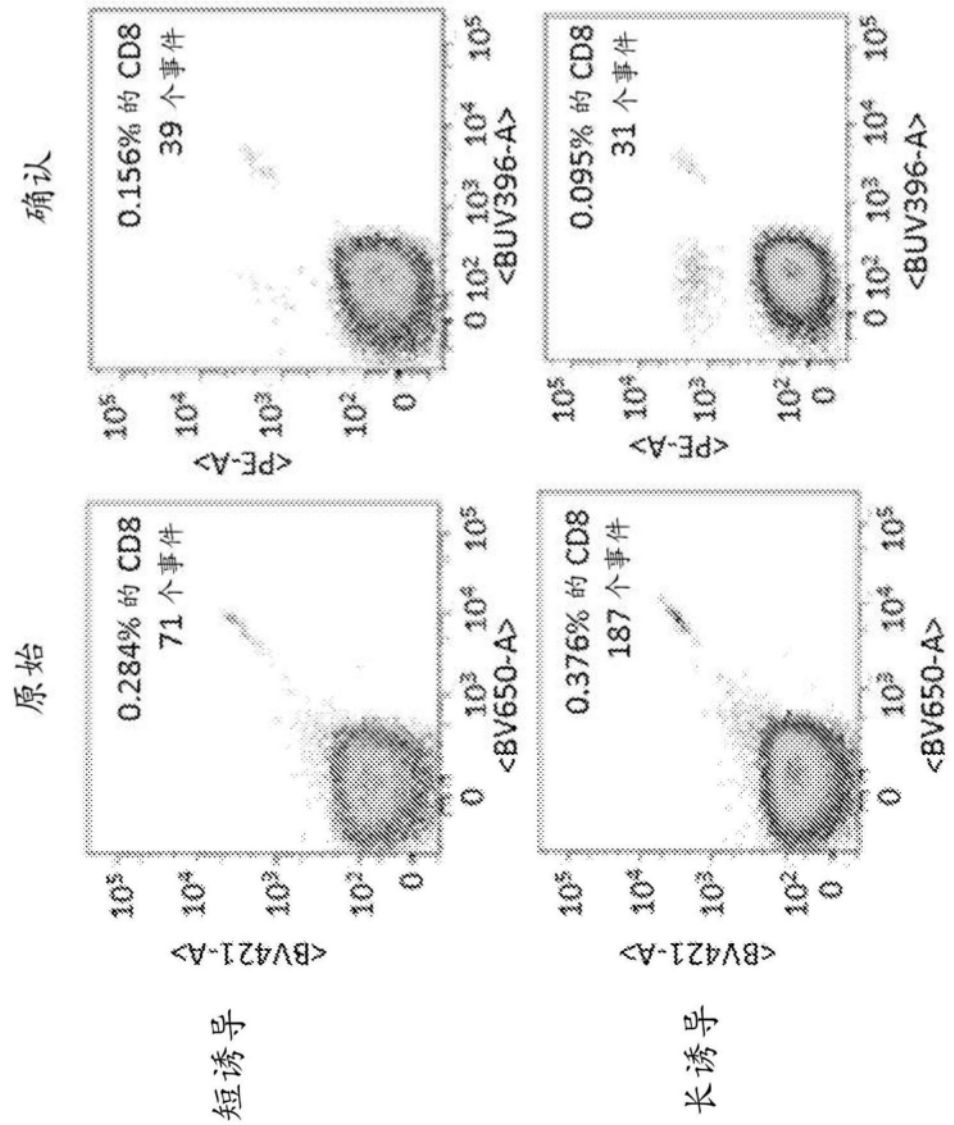

确认
原始
短诱导
长诱导
0.156% 的 CD8
39 个事件
0.095% 的 CD8
31 个事件
0.284% 的 CD8
71 个事件
0.376% 的 CD8
187 个事件
<PE-A>
<BUV396-A>
<BV421-A>
<BV650-A>
0
10^2
10^3
10^4
10^5

图18

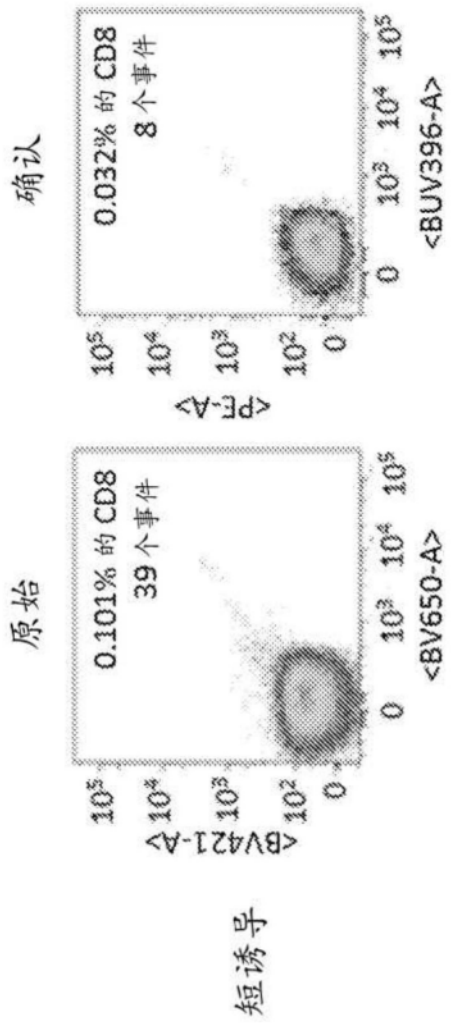

确认
0.032% 的 CD8
8 个事件
<PE-A>
<BUV396-A>
原始
0.101% 的 CD8
39 个事件
<BV421-A>
<BV650-A>
短诱导

图19A

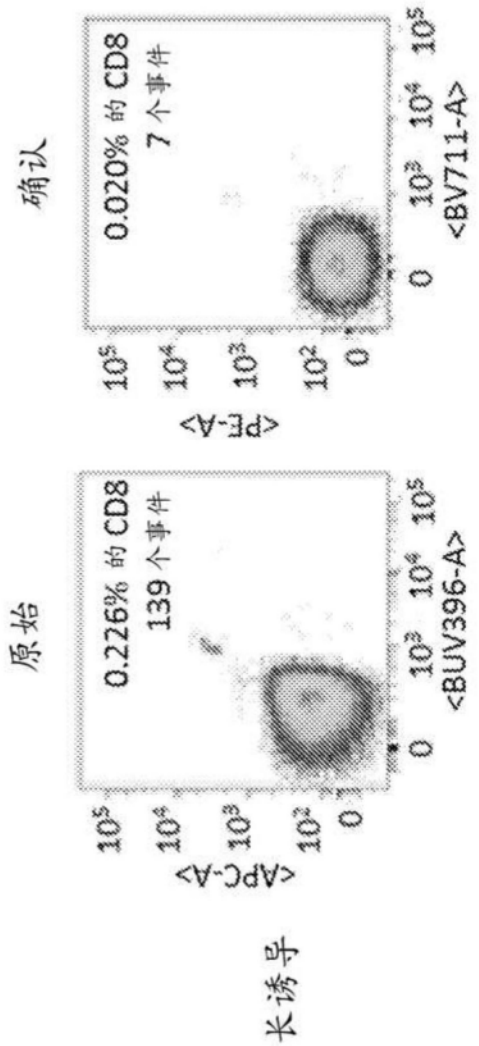

确认
0.020% 的 CD8
7 个事件
<PE-A>
<BV711-A>
原始
0.226% 的 CD8
139 个事件
<APC-A>
<BUV396-A>
长诱导

图19B

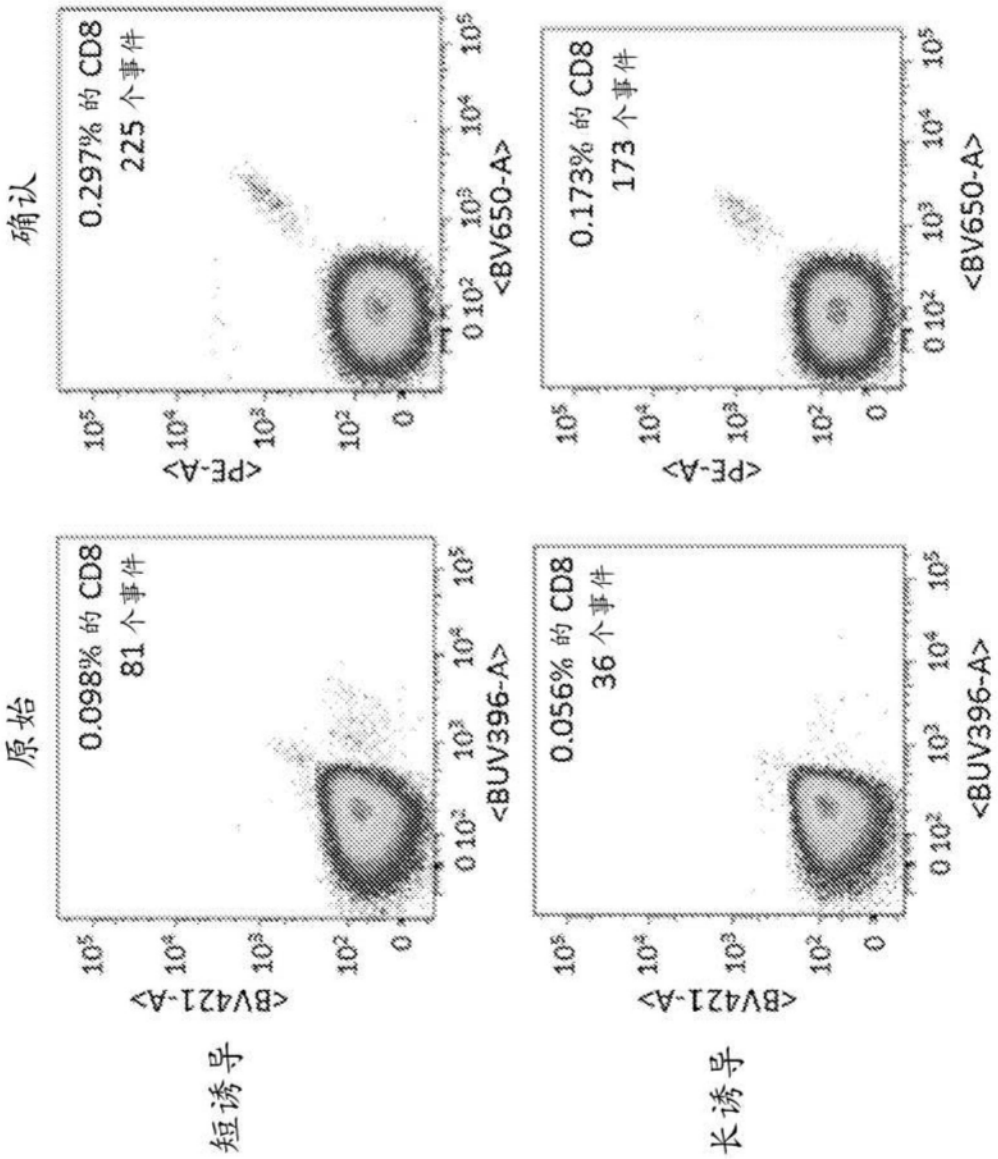

确认
原始
短诱导
长诱导
0.297% 的 CD8
225 个事件
0.173% 的 CD8
173 个事件
0.098% 的 CD8
81 个事件
0.056% 的 CD8
36 个事件
<PE-A>
<BV650-A>
<BV421-A>
<BUV396-A>
0
10^2
10^3
10^4
10^5

图20

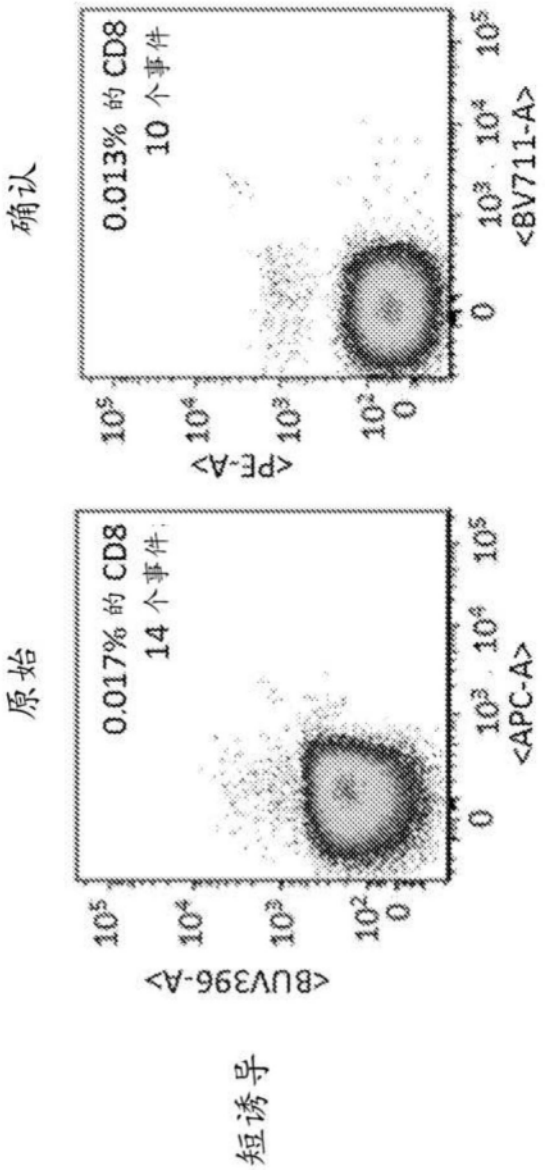

确认
原始
0.013% 的 CD8
10 个事件
0.017% 的 CD8
14 个事件
<PE-A>
<BV711-A>
<BUV396-A>
<APC-A>
短诱导

图21

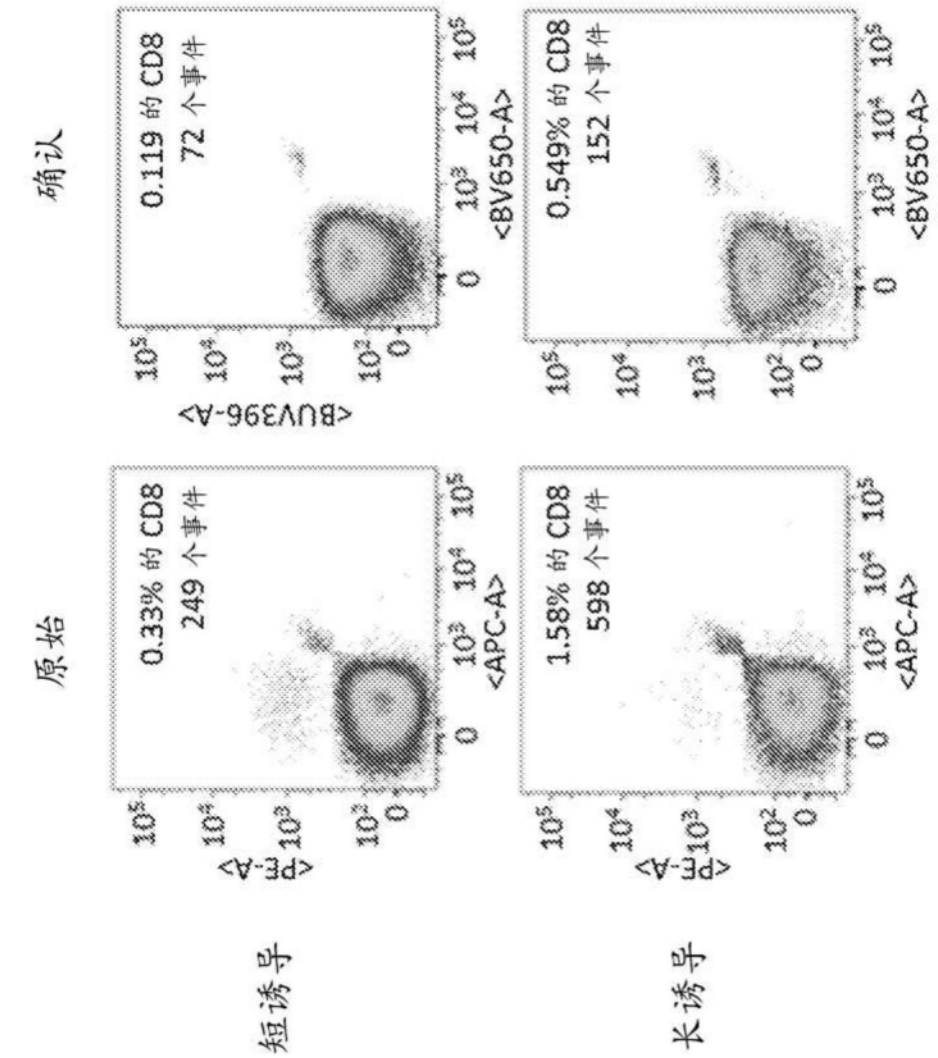

确认
原始
短诱导
长诱导
0.119 的 CD8
72 个事件
0.549% 的 CD8
152 个事件
0.33% 的 CD8
249 个事件
1.58% 的 CD8
598 个事件
<BUV396-A>
<BV650-A>
<APC-A>

图22

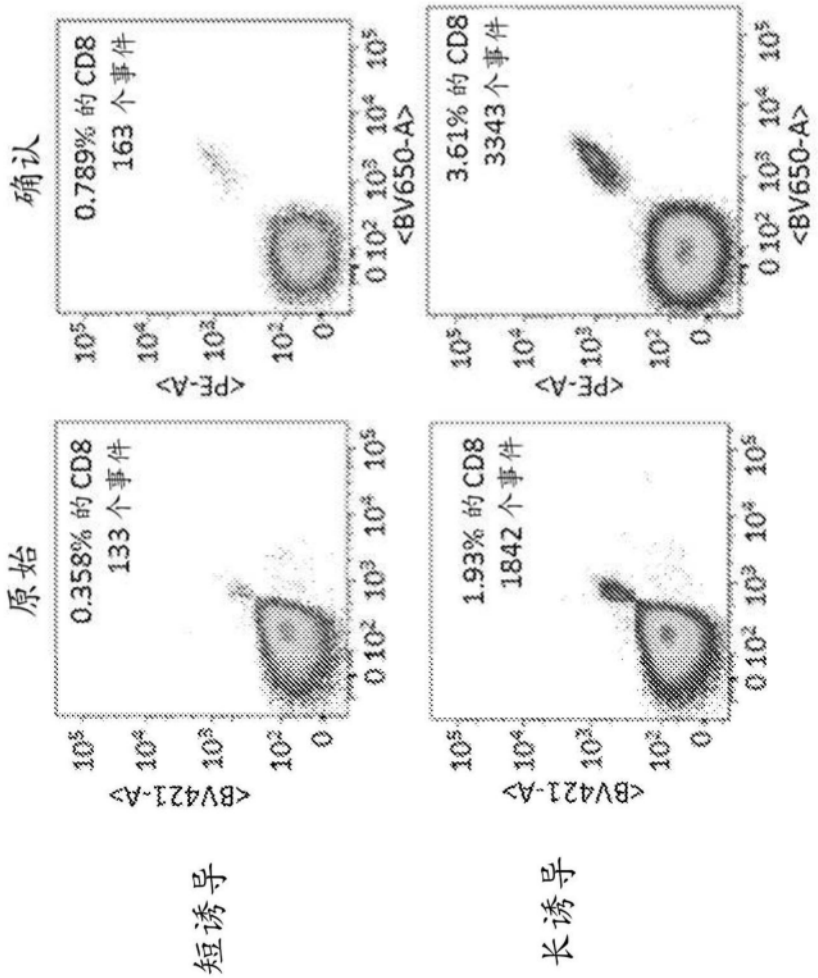

确认
原始
0.789% 的 CD8
163 个事件
3.61% 的 CD8
3343 个事件
0.358% 的 CD8
133 个事件
1.93% 的 CD8
1842 个事件
<PE-A>
<BV650-A>
<BV421-A>
短诱导
长诱导

图23

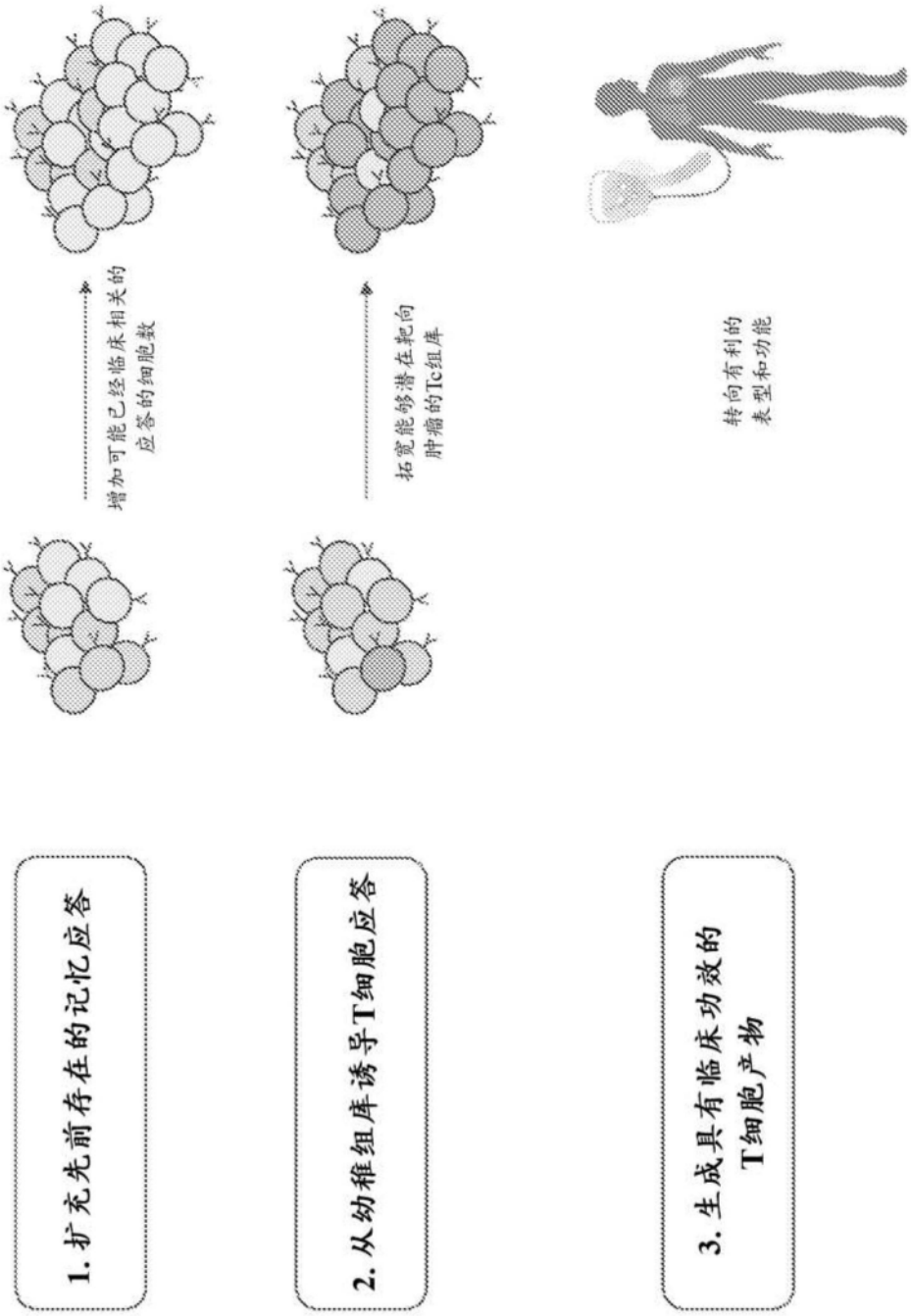

1. 扩充先前存在的记忆应答
增加可能已经临床相关的应答的细胞数
2. 从幼稚组库诱导T细胞应答
拓宽能够潜在靶向肿瘤的Tc组库
3. 生成具有临床功效的T细胞产物
转向有利的表型和功能

图24

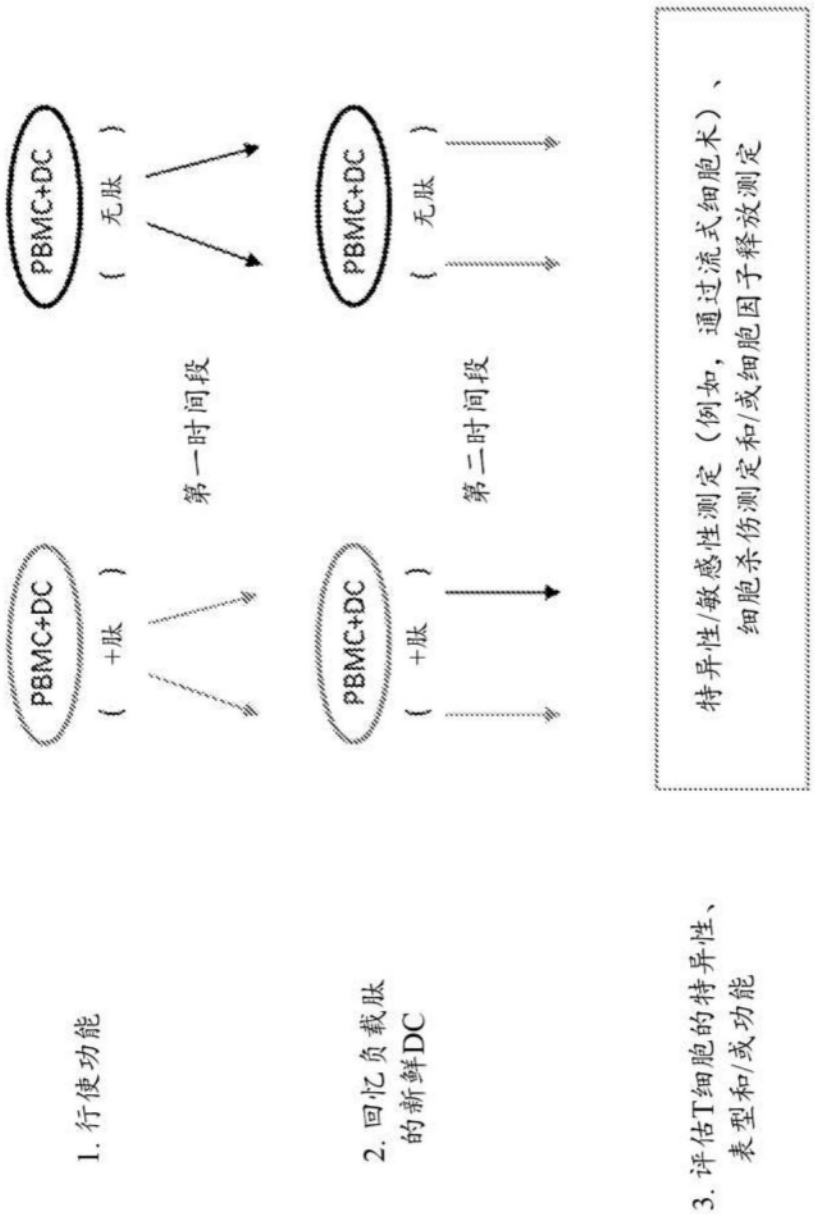

PBMC+DC
（ 无肽 ）
PBMC+DC
（ +肽 ）
第一时间段
PBMC+DC
（ 无肽 ）
PBMC+DC
（ +肽 ）
第二时间段
特异性/敏感性测定（例如，通过流式细胞术）、
细胞杀伤测定和/或细胞因子释放测定
1. 行使功能
2. 回忆负载肽
的新鲜DC
3. 评估T细胞的特异性、
表型和/或功能

图25

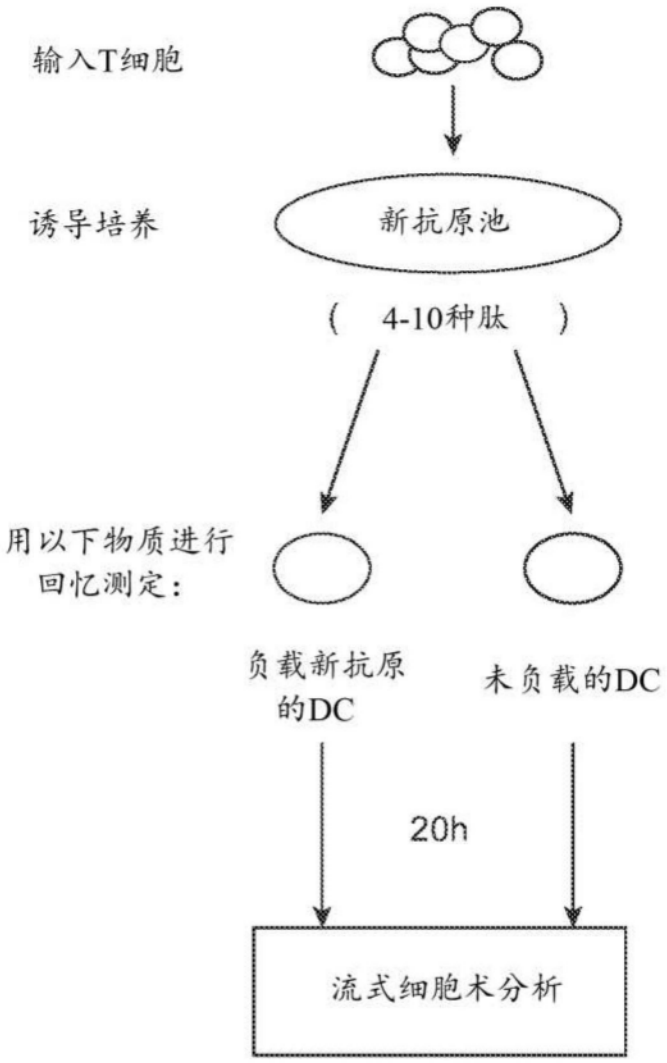

输入T细胞
诱导培养
新抗原池
(4-10种肽)
用以下物质进行
回忆测定:
负载新抗原
的DC
未负载的DC
20h
流式细胞术分析

图26

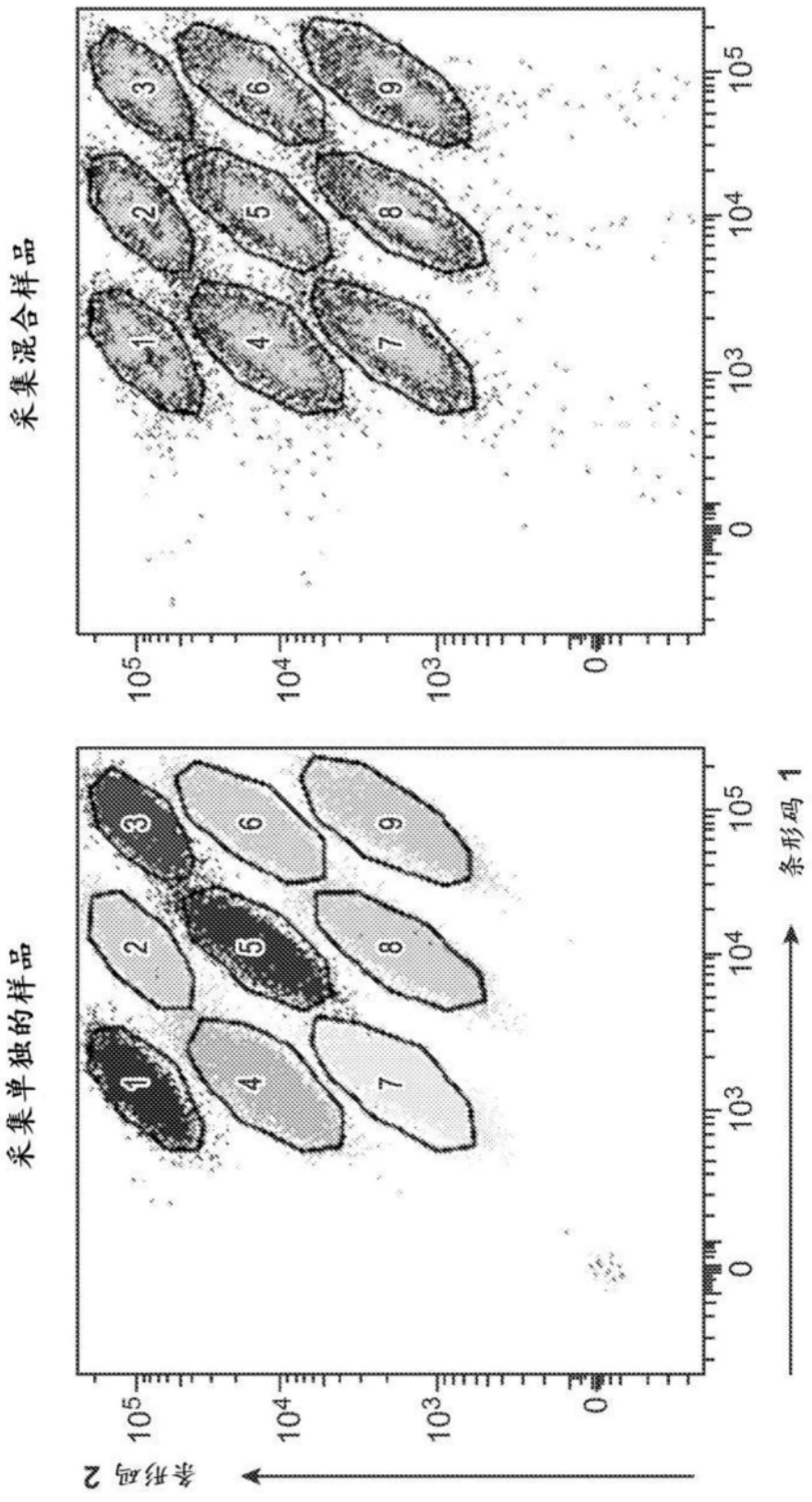


图27A

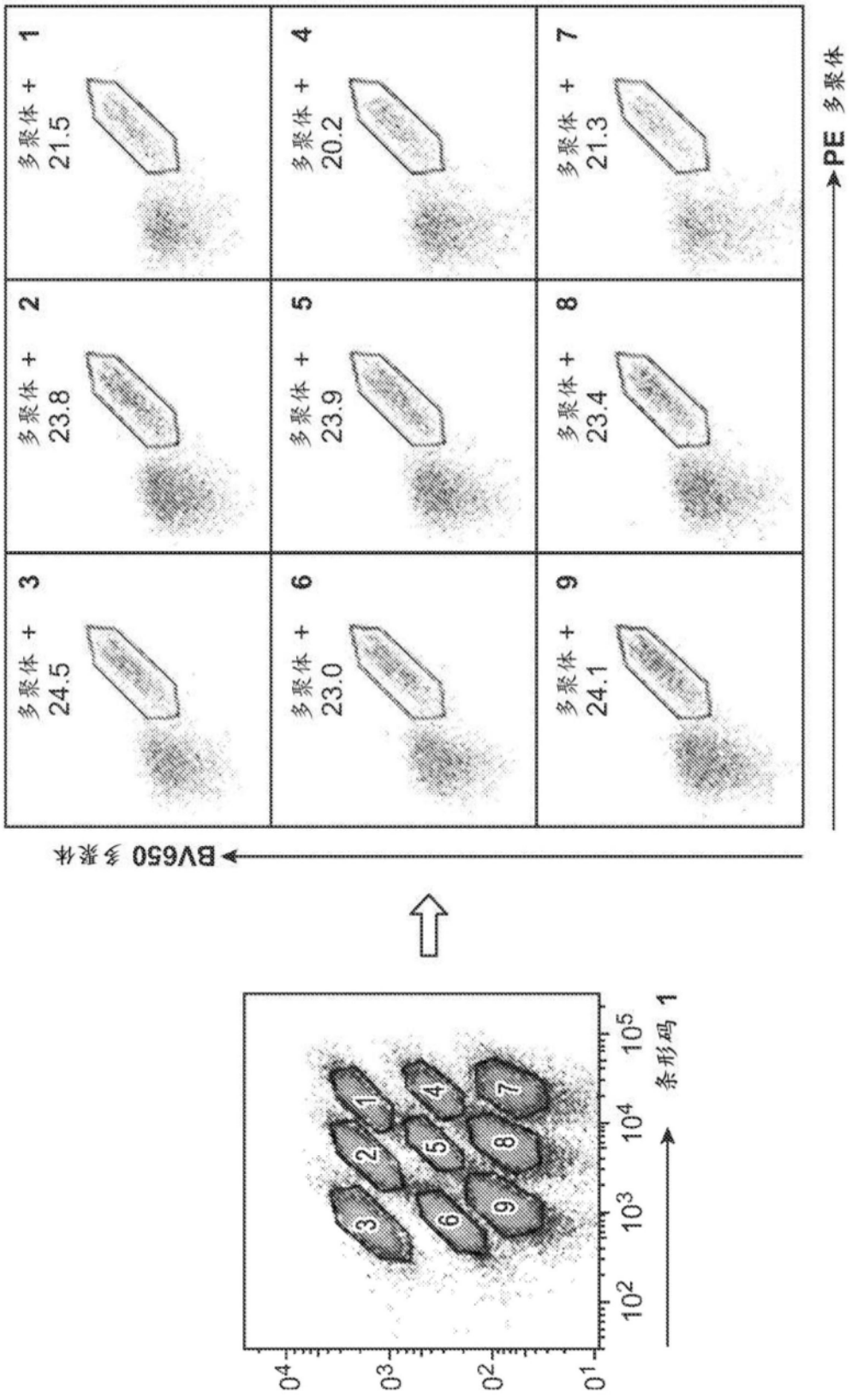

1
多聚体 +
21.5
2
多聚体 +
23.8
3
多聚体 +
24.5
4
多聚体 +
20.2
5
多聚体 +
23.9
6
多聚体 +
23.0
7
多聚体 +
21.3
8
多聚体 +
23.4
9
多聚体 +
24.1
PE 多聚体
BV650 多聚体
条形码 1
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5

图27B

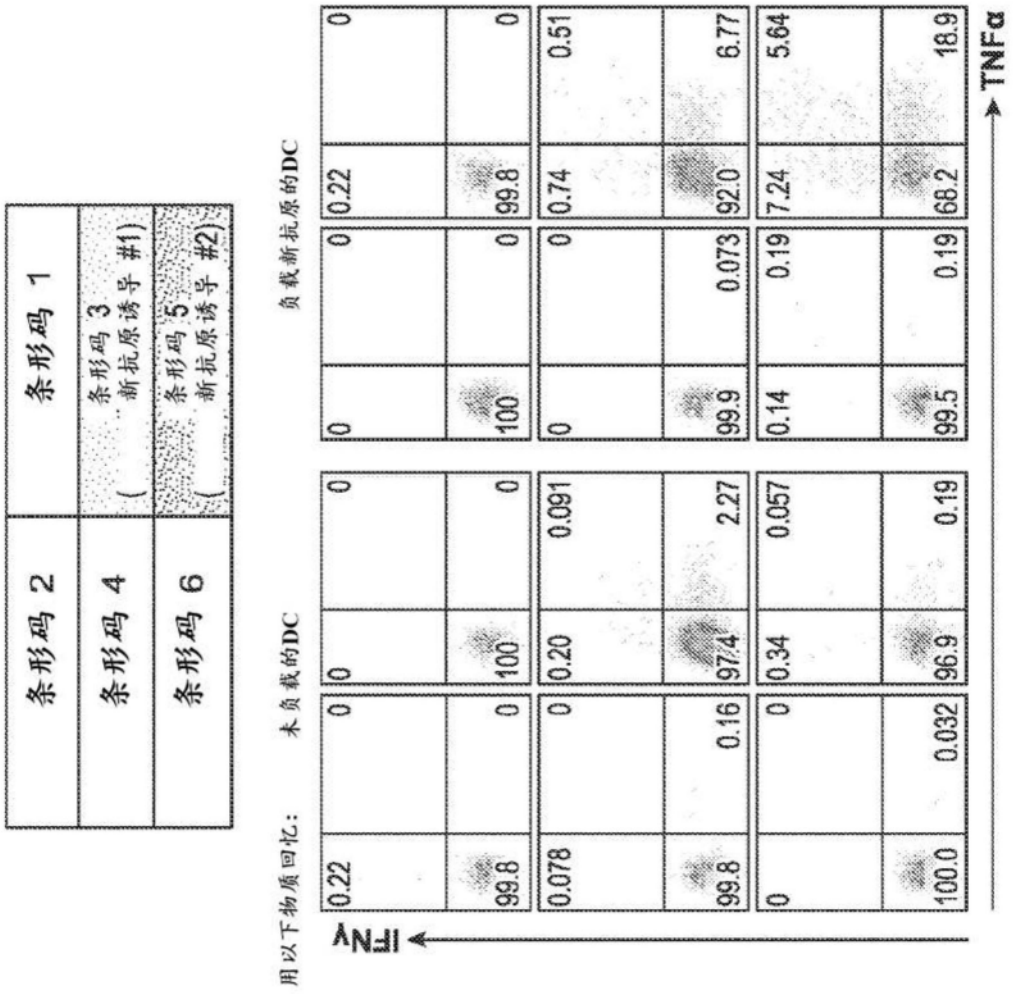

条形码 1
条形码 2
条形码 3
(新抗原诱导 #1)
条形码 4
条形码 5
(新抗原诱导 #2)
条形码 6
用以下物质回忆：
未负载的DC
负载新抗原的DC
IFNγ
TNFα
0.22
99.8
0
0
0
100
0
0
0.22
99.8
0
0
0
100
0
0
0.078
99.8
0
0.16
0.20
97.4
0.091
2.27
0
0.34
0.057
96.9
0.19
0.74
92.0
0.51
6.77
0
99.9
0
0.073
0.14
99.5
0.19
0.19
7.24
68.2
5.64
18.9
0
100.0
0
0.032

图28A

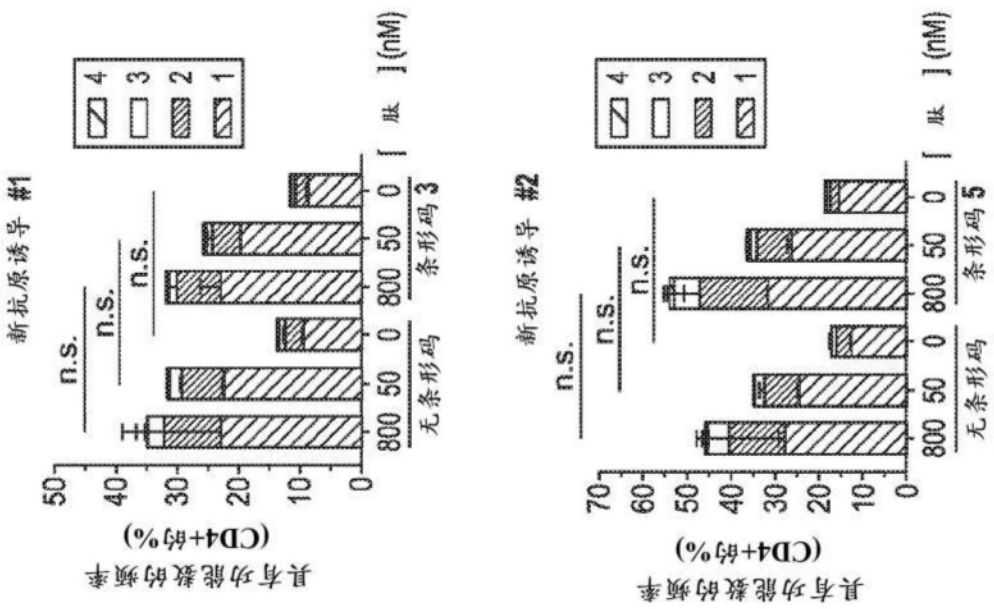

新抗原诱导 #1
新抗原诱导 #2
具有功能数的频率
(CD4+的%)
n.s.
无条形码
条形码 3
条形码 5
[肽] (nM)
800 50 0 800 50 0
1 2 3 4

图28B

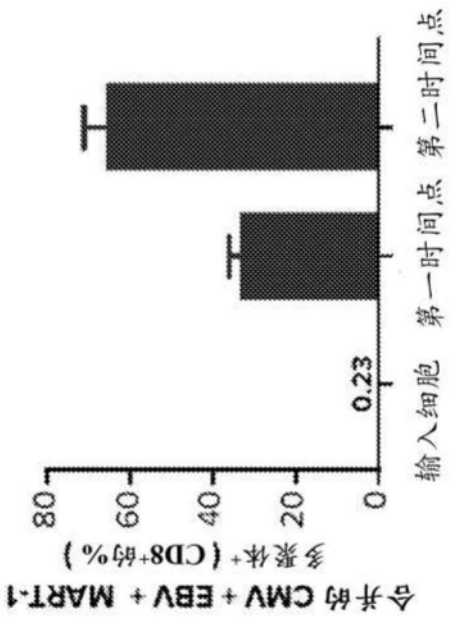

合并的 CMV + EBV + MART-1
多聚体+ (CD8+的%)
0.23
输入细胞 第一时间点 第二时间点

图29A

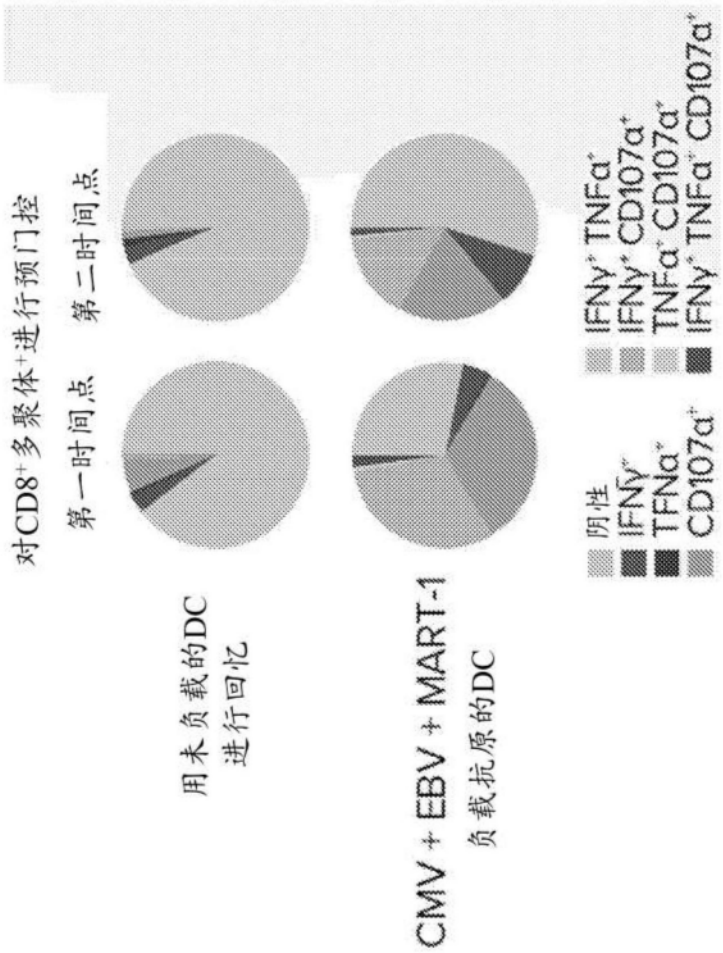

对CD8+多聚体+进行预门控
第一时间点
第二时间点
用未负载的DC
进行回忆
CMV + EBV + MART-1
负载抗原的DC
阴性
IFNγ+
TFNα+
CD107α+
IFNγ+ TNFα+
IFNγ+ CD107α+
TNFα+ CD107α+
IFNγ+ TNFα+ CD107α+

图29B

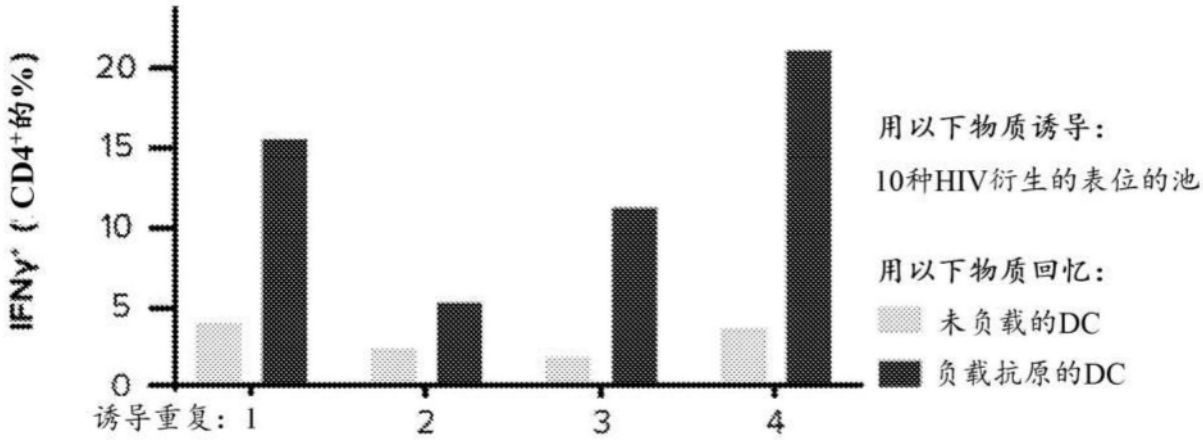

IFNγ+ (CD4+的%)
20
15
10
5
0
诱导重复: 1
2
3
4
用以下物质诱导:
10种HIV衍生的表位的池
用以下物质回忆:
未负载的DC
负载抗原的DC

图30A

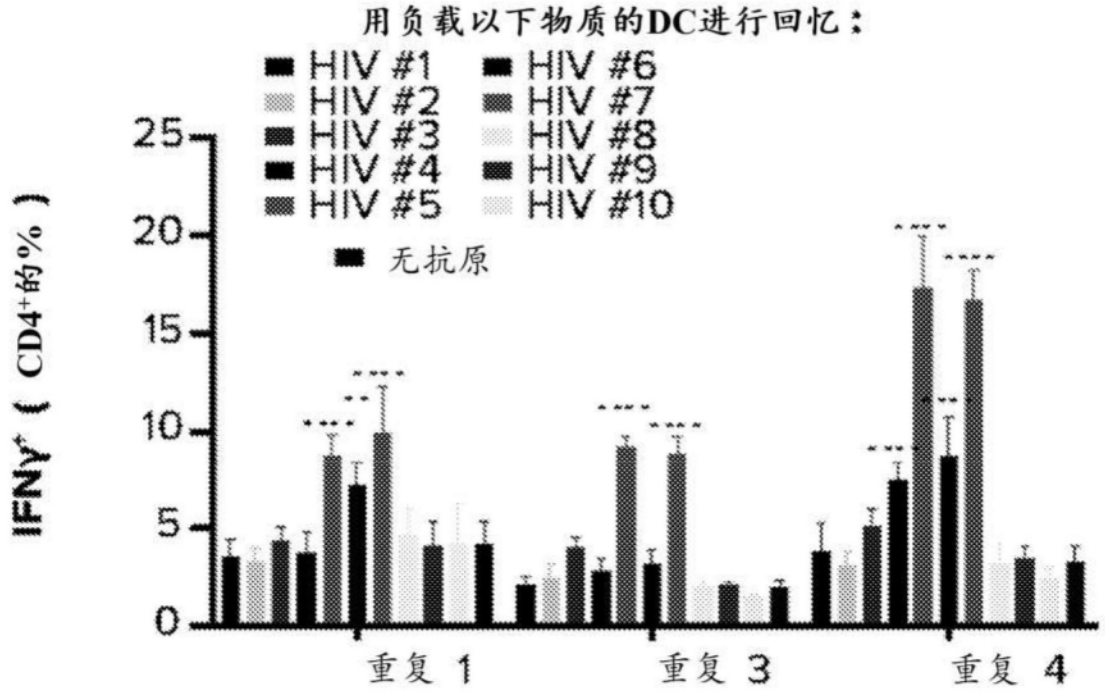

用负载以下物质的DC进行回忆：
HIV #1
HIV #2
HIV #3
HIV #4
HIV #5
HIV #6
HIV #7
HIV #8
HIV #9
HIV #10
无抗原
IFNγ+（CD4+的%）
25
20
15
10
5
0
重复 1
重复 3
重复 4

图30B

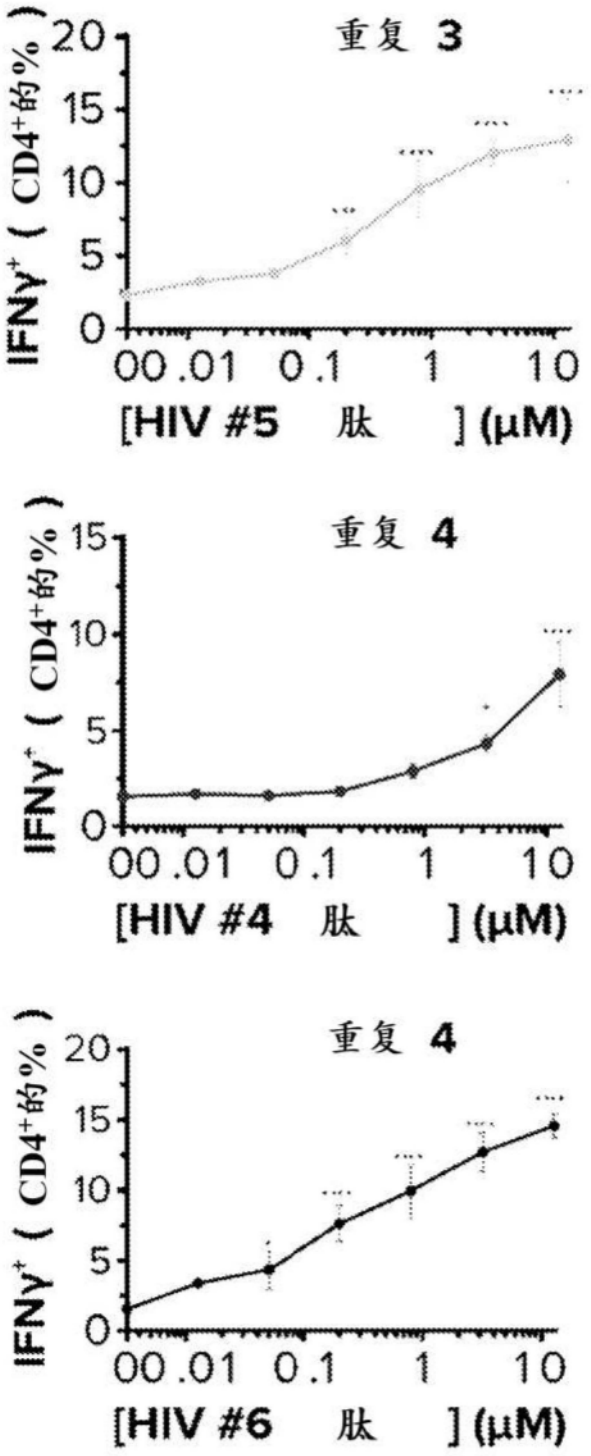

重复 3
IFNγ+ (CD4+的%)
20
15
10
5
0
00.01 0.1 1 10
[HIV #5 肽] (μM)
重复 4
IFNγ+ (CD4+的%)
15
10
5
0
00.01 0.1 1 10
[HIV #4 肽] (μM)
重复 4
IFNγ+ (CD4+的%)
20
15
10
5
0
00.01 0.1 1 10
[HIV #6 肽] (μM)

图30C

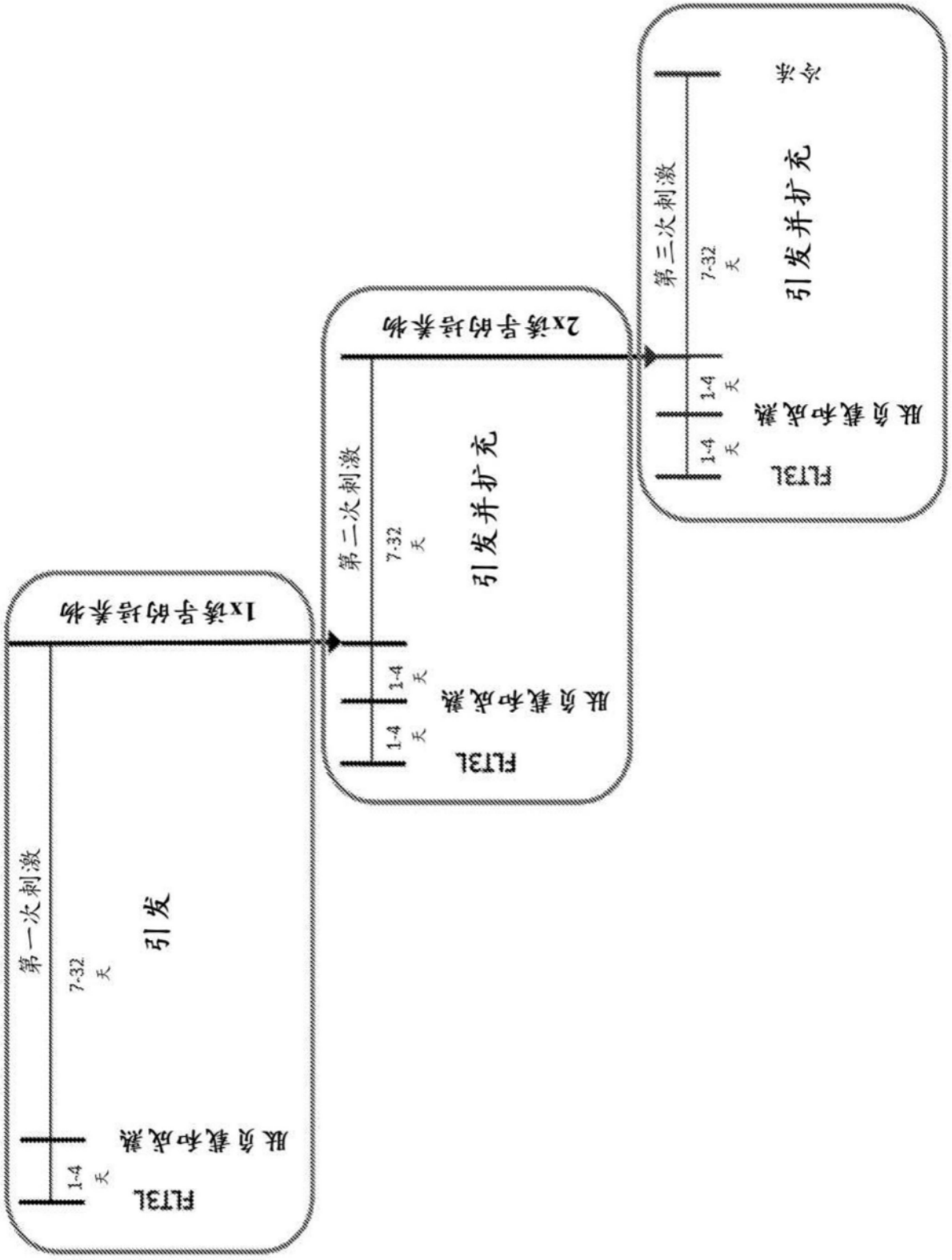

1x诱导的培养物
第一次刺激
7-32
天
引发
皮内载布成熟
FLT3L
1-4
天
2x诱导的培养物
第二次刺激
7-32
天
引发并扩充
皮内载布成熟
FLT3L
1-4
天
1-4
天
第三次刺激
7-32
天
引发并扩充
冷冻
皮内载布成熟
FLT3L
1-4
天
1-4
天

图31

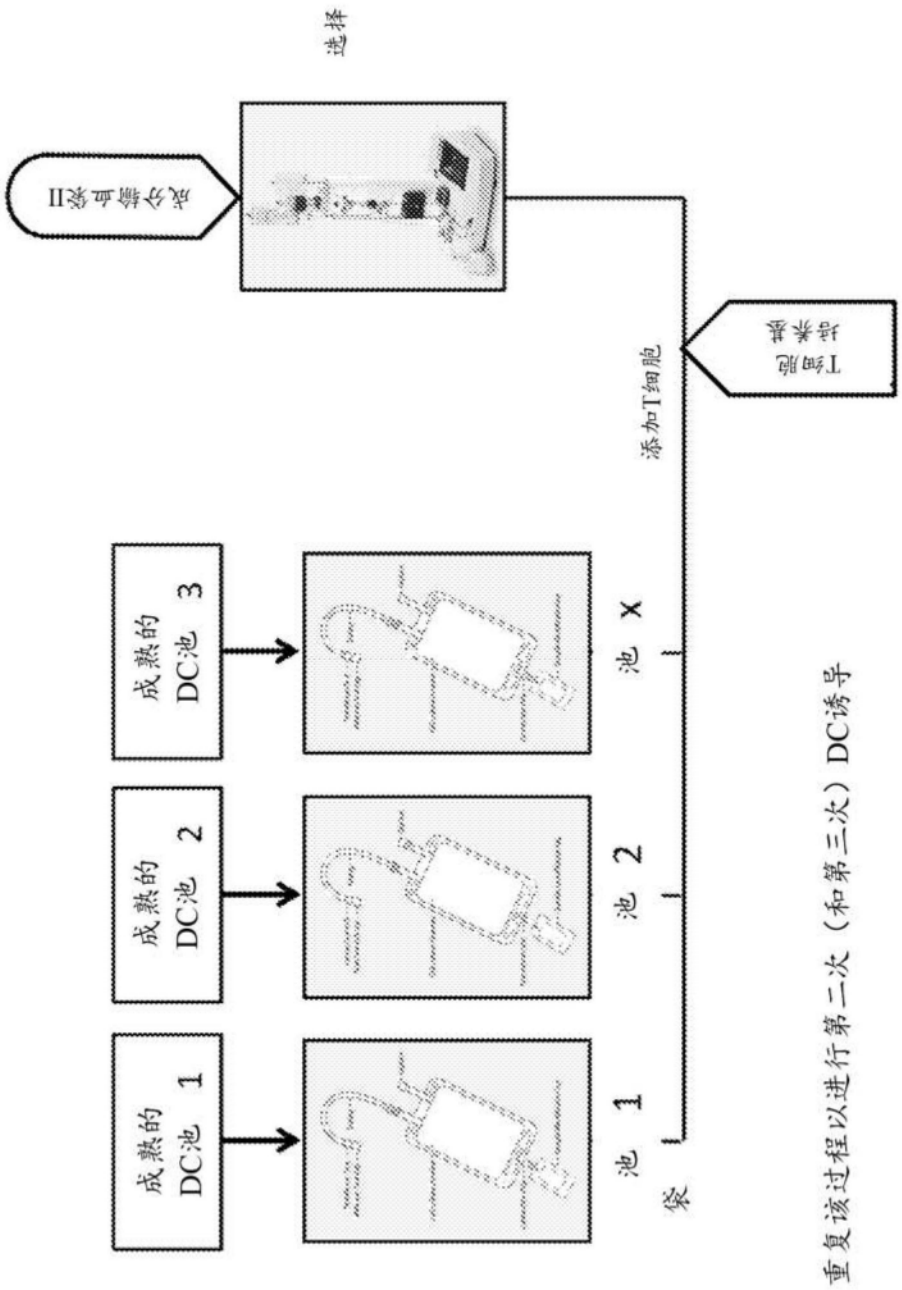

选择
成熟的 DC池 1
成熟的 DC池 2
成熟的 DC池 3
池 1
池 2
池 X
添加T细胞
重复该过程以进行第二次（和第三次）DC诱导

图32

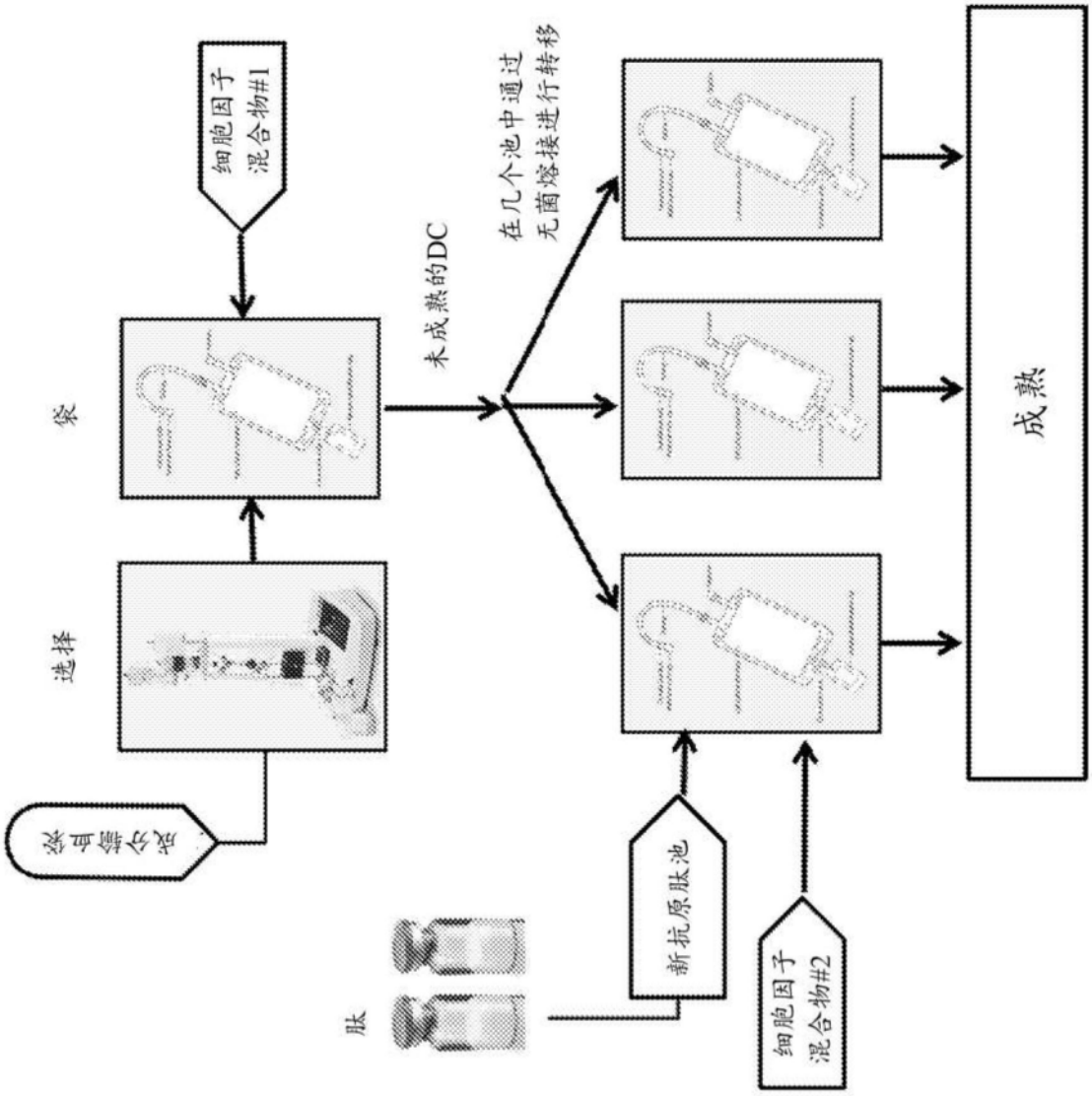


图33

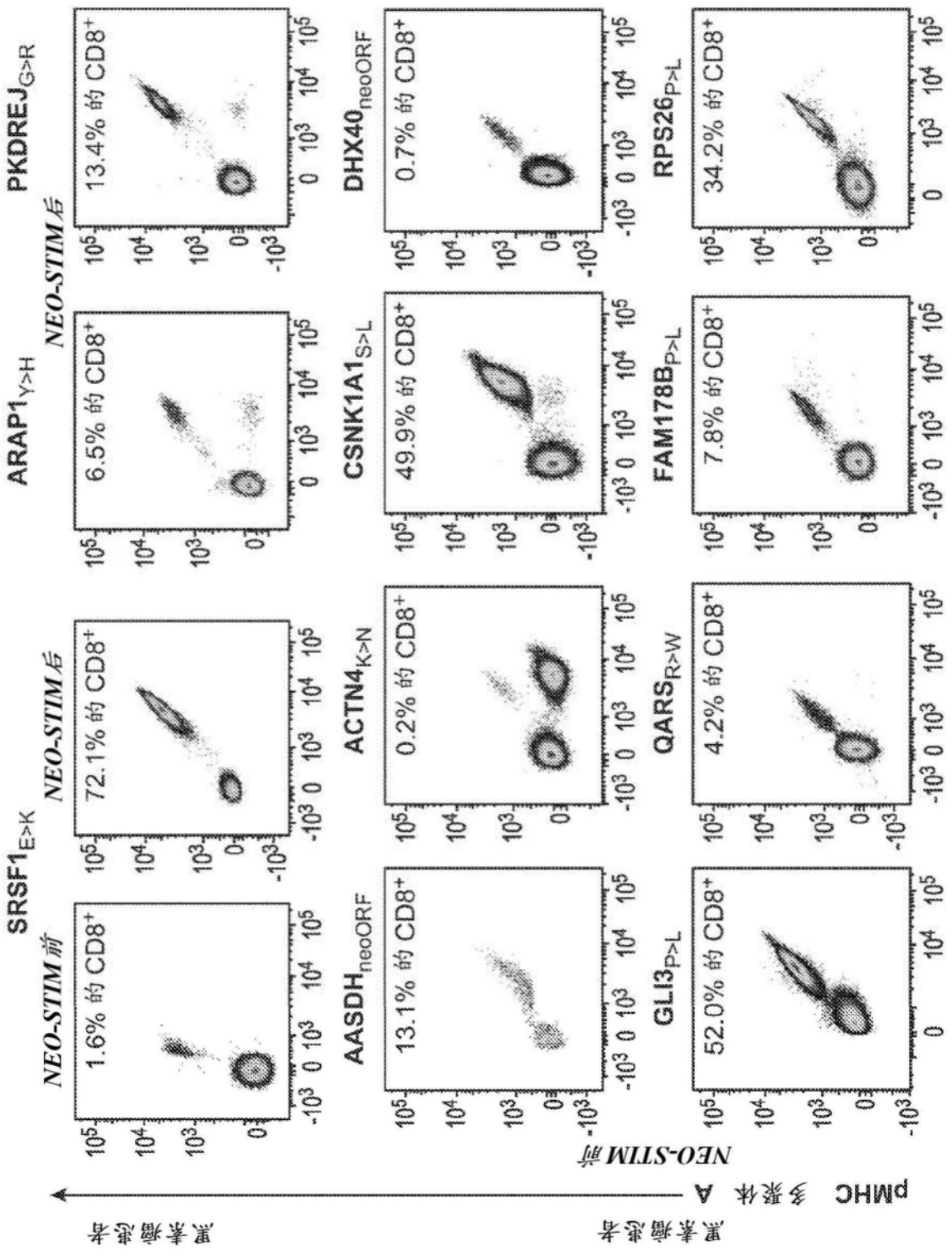

SRSF1E>K
NEO-STIM前
NEO-STIM后
ARAP1Y>H
PKDREJG>R
AASDHneoORF
ACTN4K>N
CSNK1A1S>L
DHX40neoORF
FAM178BP>L
RPS26P>L
GLI3P>L
QARSR>W
1.6% 的 CD8+
72.1% 的 CD8+
6.5% 的 CD8+
13.4% 的 CD8+
13.1% 的 CD8+
0.2% 的 CD8+
49.9% 的 CD8+
0.7% 的 CD8+
7.8% 的 CD8+
34.2% 的 CD8+
52.0% 的 CD8+
4.2% 的 CD8+
黑素瘤患者
黑素瘤患者
pMHC 多聚体 A
NEO-STIM前

图34

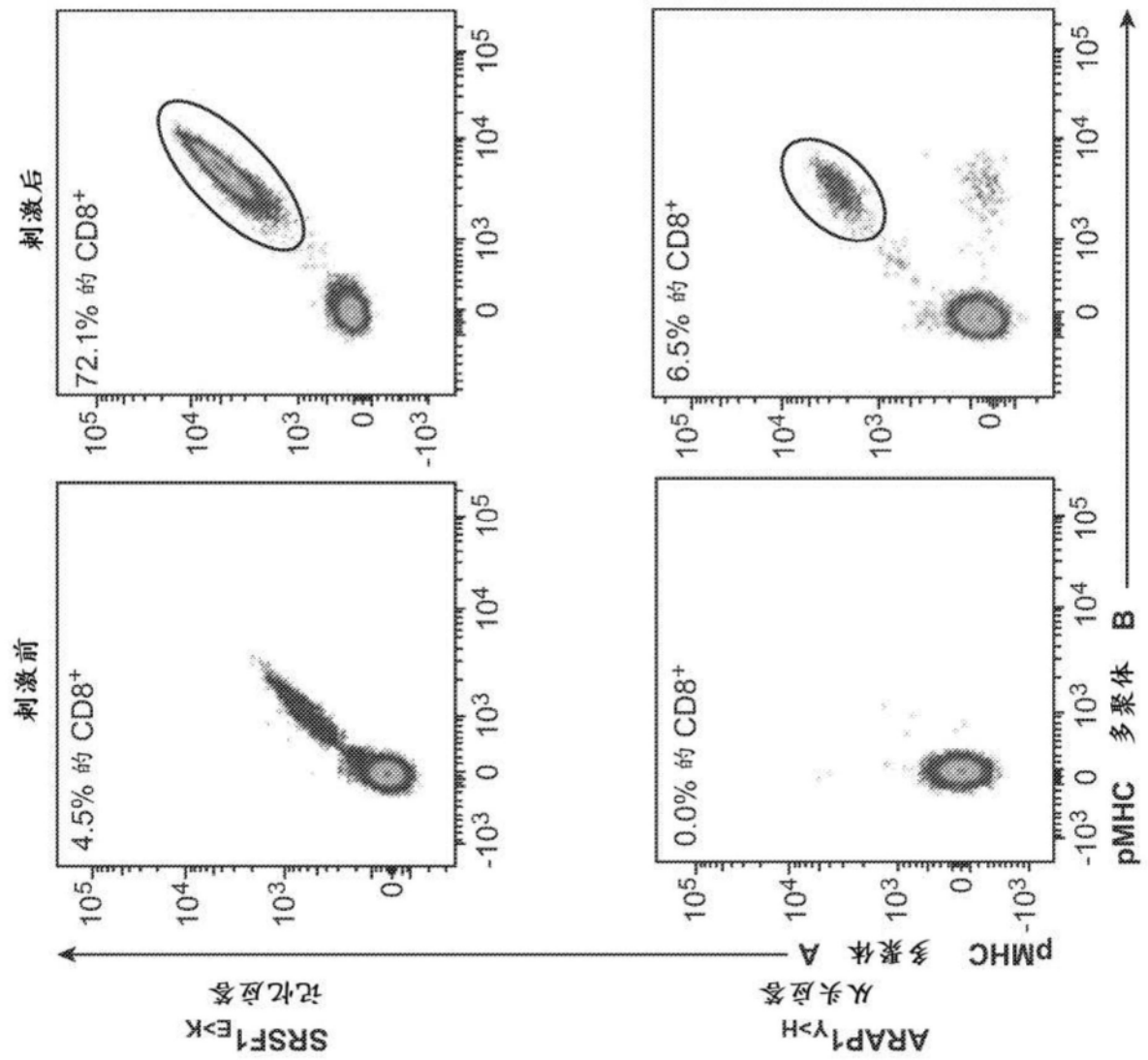

刺激后
刺激前
72.1% 的 CD8+
4.5% 的 CD8+
6.5% 的 CD8+
0.0% 的 CD8+
SRSF1E>K
记忆应答
ARAP1Y>H
从头应答
pMHC 多聚体 A
pMHC 多聚体 B

图35

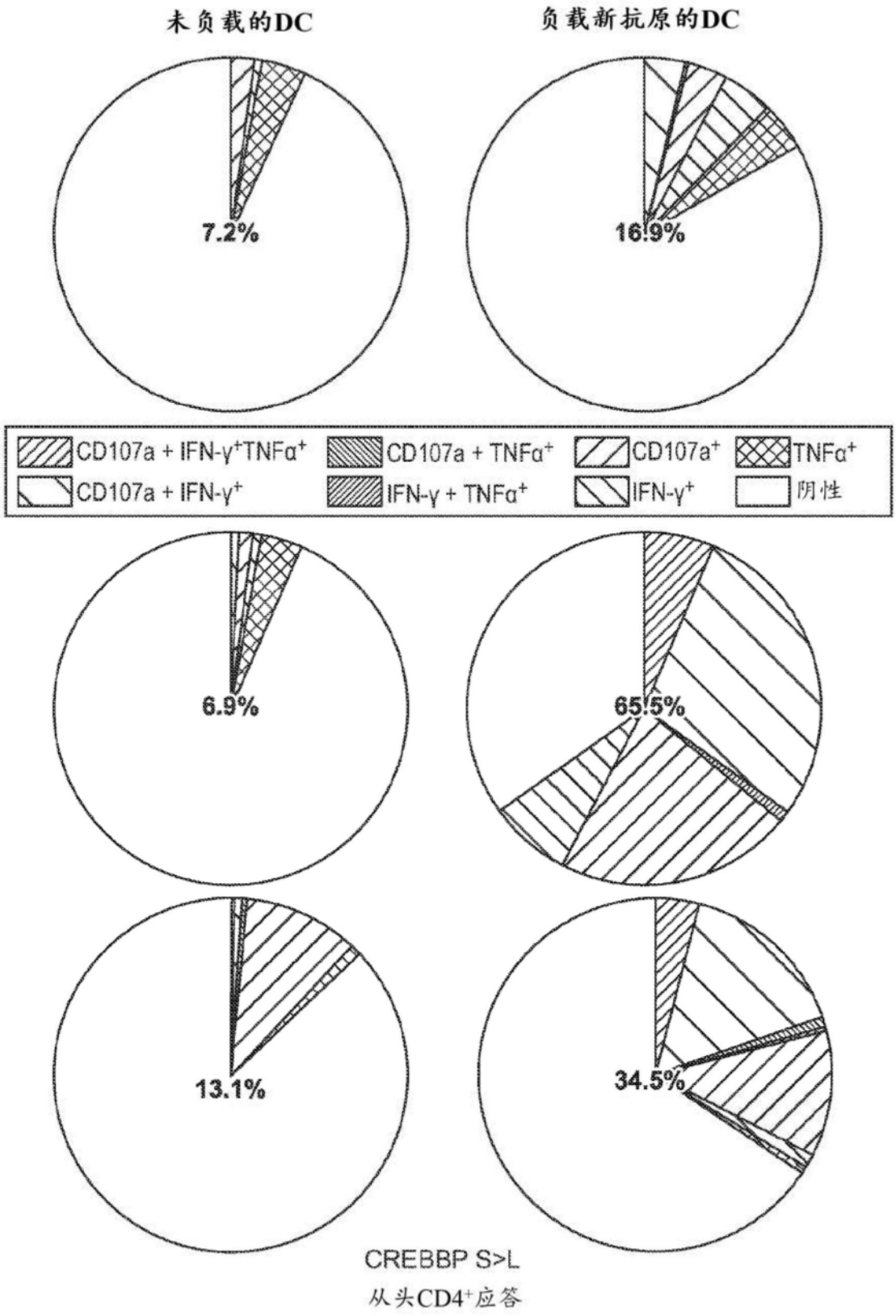

未负载的DC
负载新抗原的DC
7.2%
16.9%
CD107a + IFN-γ+TNFα+
CD107a + TNFα+
CD107a+
TNFα+
CD107a + IFN-γ+
IFN-γ + TNFα+
IFN-γ+
阴性
6.9%
65.5%
13.1%
34.5%
CREBBP S>L
从头CD4+应答

图35(续)

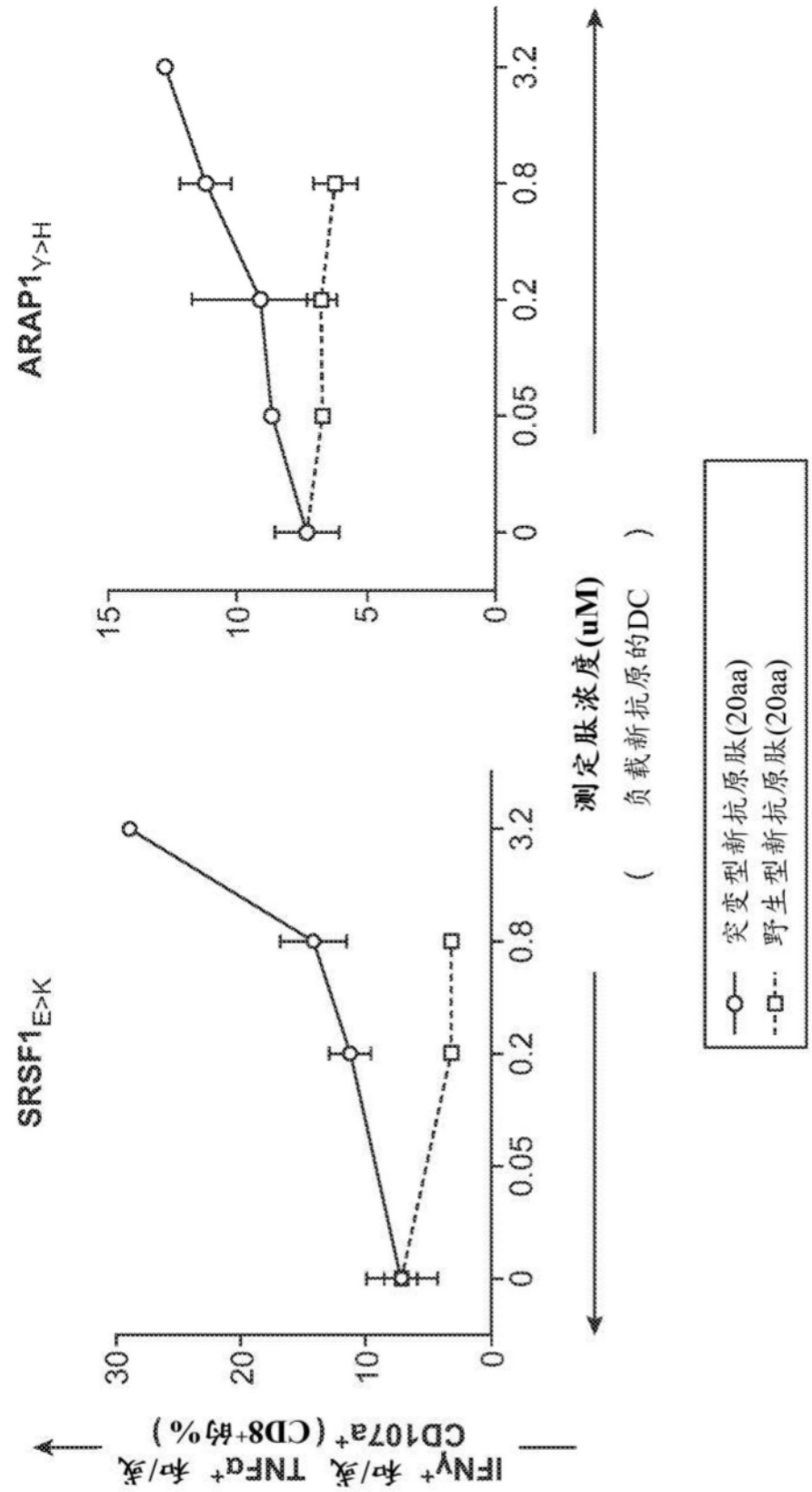

SRSF1E>K
ARAP1Y>H
IFNγ+ 和/或 TNFα+ 和/或
CD107a+ (CD8+的%)
30
20
10
0
15
10
5
0
0
0.05
0.2
0.8
3.2
测定肽浓度(uM)
(负载新抗原的DC)
突变型新抗原肽(20aa)
野生型新抗原肽(20aa)

图36

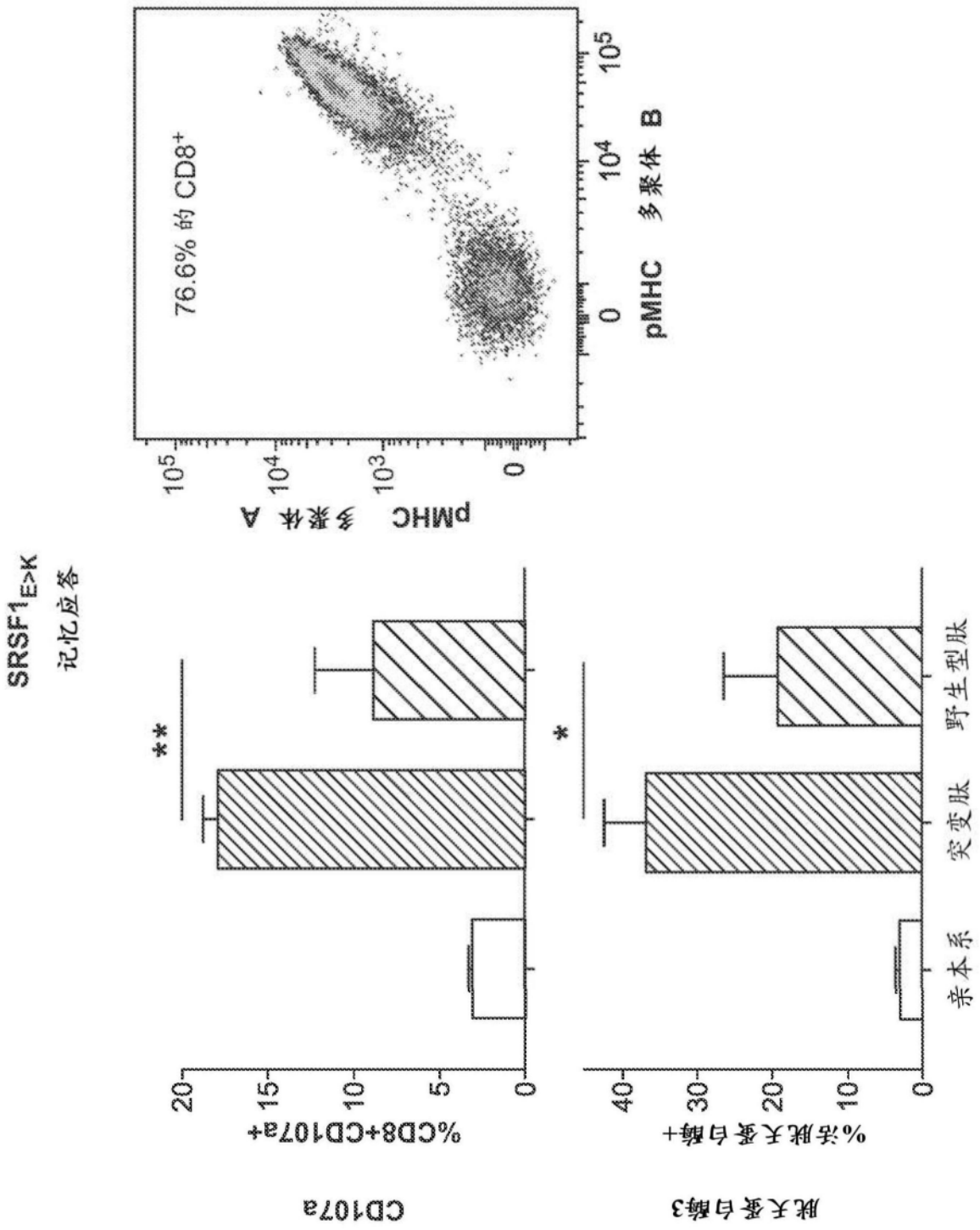

SRSF1E>K
记忆应答
76.6% 的 CD8+
pMHC 多聚体 A
pMHC 多聚体 B
%CD8+CD107a+
CD107a
%活胱天蛋白酶+
胱天蛋白酶3
亲本系
突变肽
野生型肽
**
*

图37A

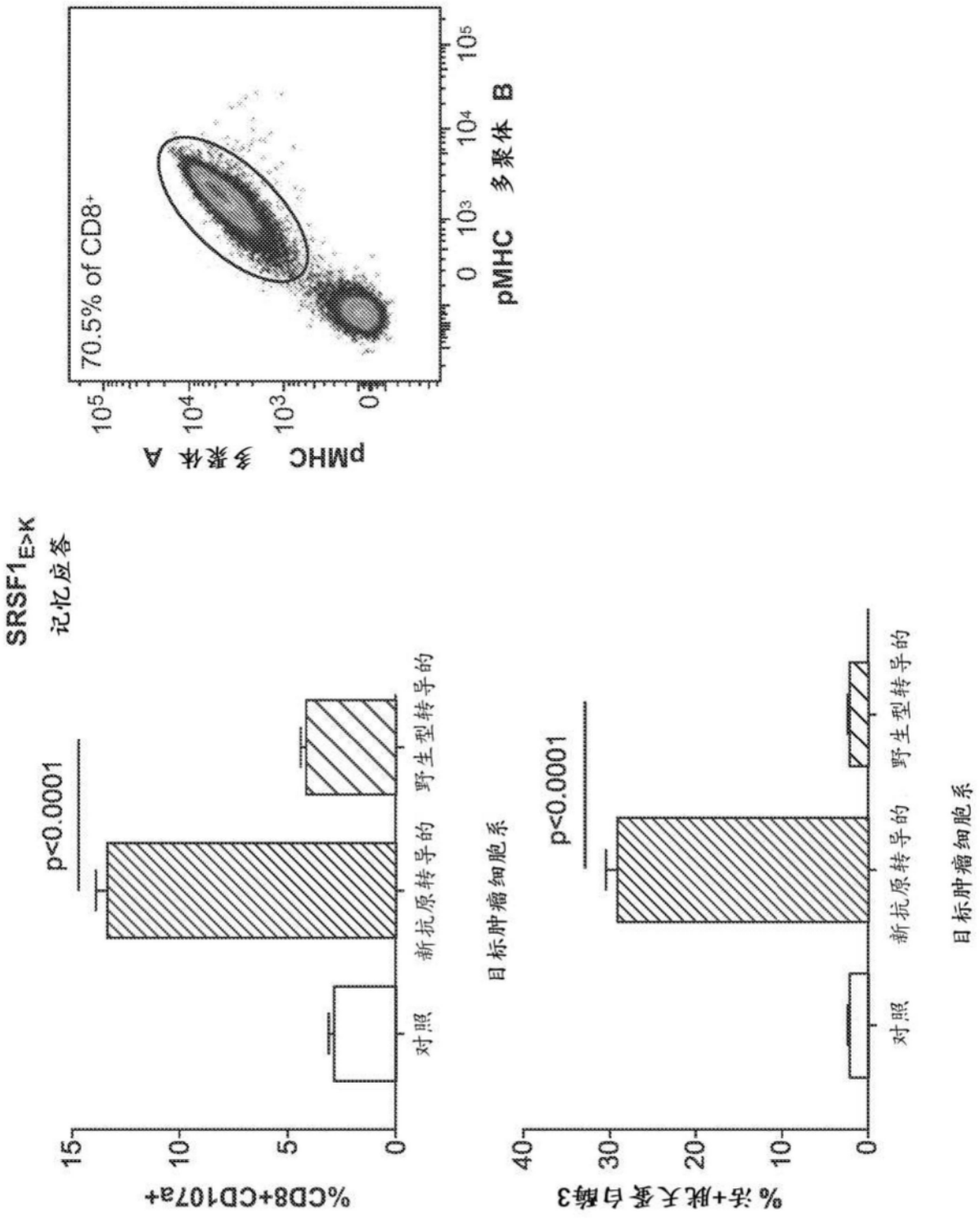

70.5% of CD8+
pMHC 多聚体 A
pMHC 多聚体 B
SRSF1E>K
记忆应答
p<0.0001
%CD8+CD107a+
对照
新抗原转导的
野生型转导的
目标肿瘤细胞系
p<0.0001
% 活+胱天蛋白酶3
对照
新抗原转导的
野生型转导的
目标肿瘤细胞系

图37B

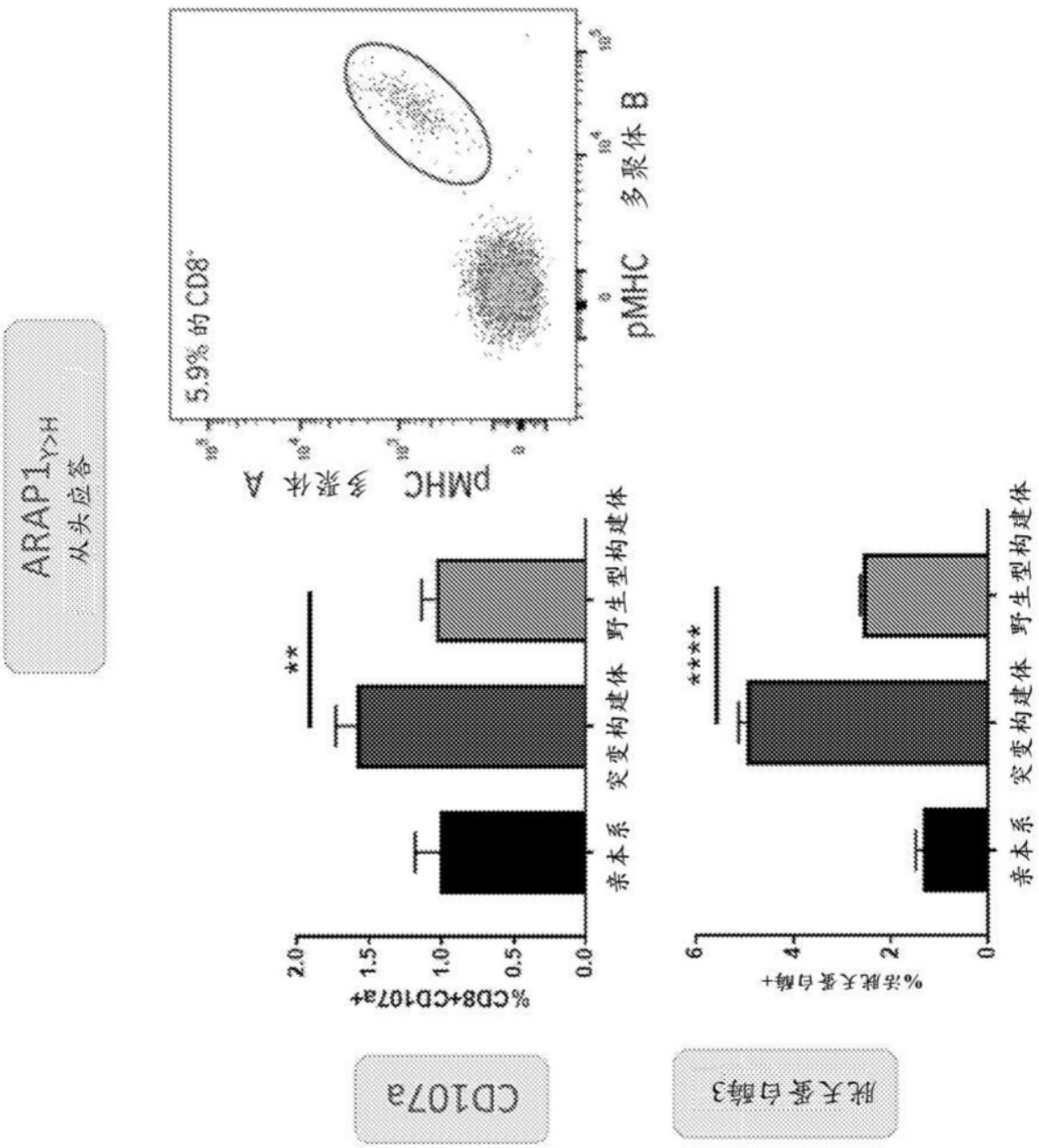

ARAP1Y>H
从头应答
5.9% 的 CD8+
pMHC 多聚体 B
pMHC 多聚体 A
%CD8+CD107a+
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
亲本系
突变构建体
野生型构建体
CD107a
%活肽天冬白酶+
6
4
2
0
****
亲本系
突变构建体
野生型构建体
肽天冬白酶3

图37C

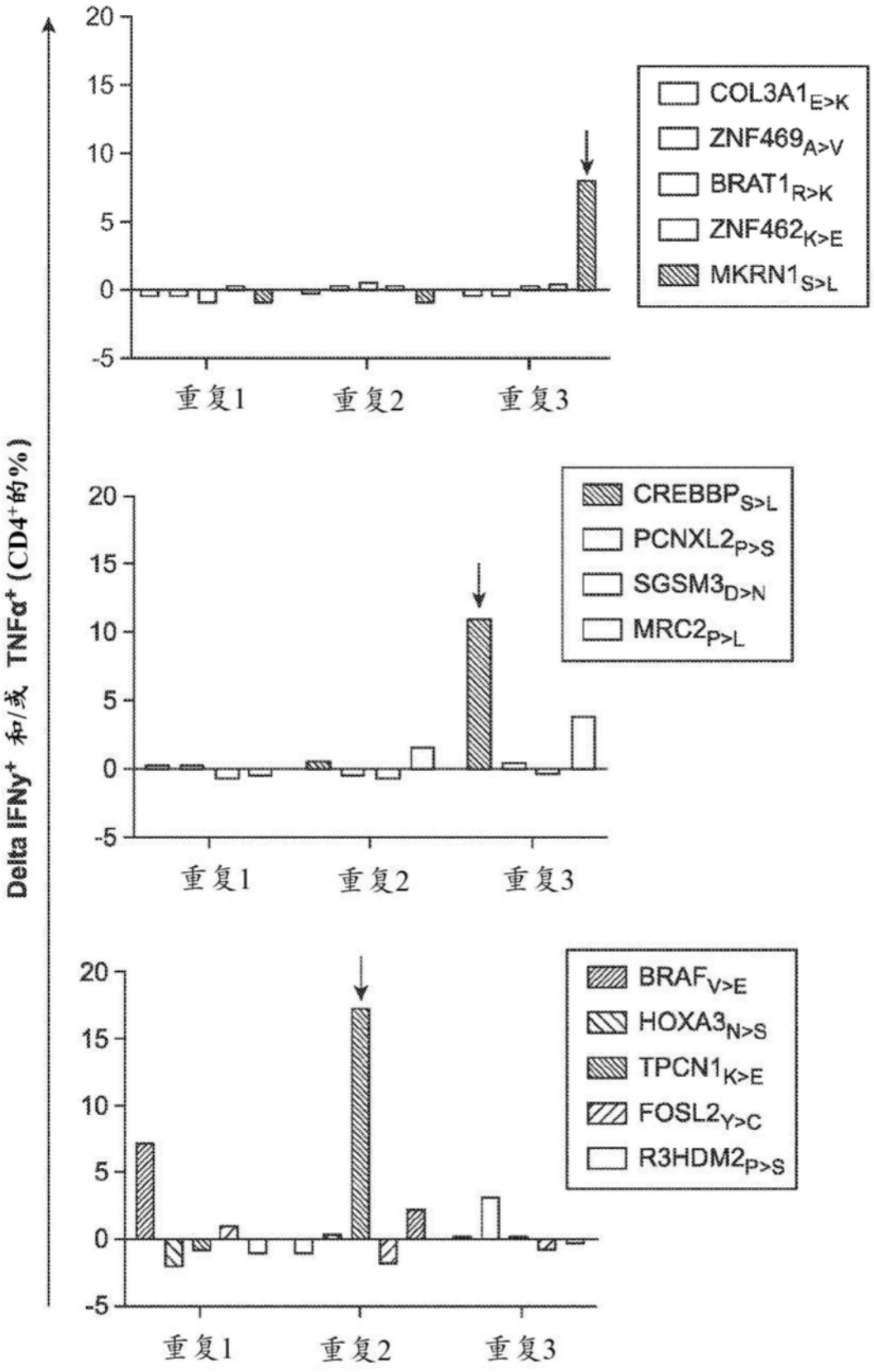

Delta IFNγ+ 和/或 TNFα+ (CD4+的%)
20
15
10
5
0
-5
重复1
重复2
重复3
COL3A1E>K
ZNF469A>V
BRAT1R>K
ZNF462K>E
MKRN1S>L
CREBBPS>L
PCNXL2P>S
SGSM3D>N
MRC2P>L
BRAFV>E
HOXA3N>S
TPCN1K>E
FOSL2Y>C
R3HDM2P>S

图38A

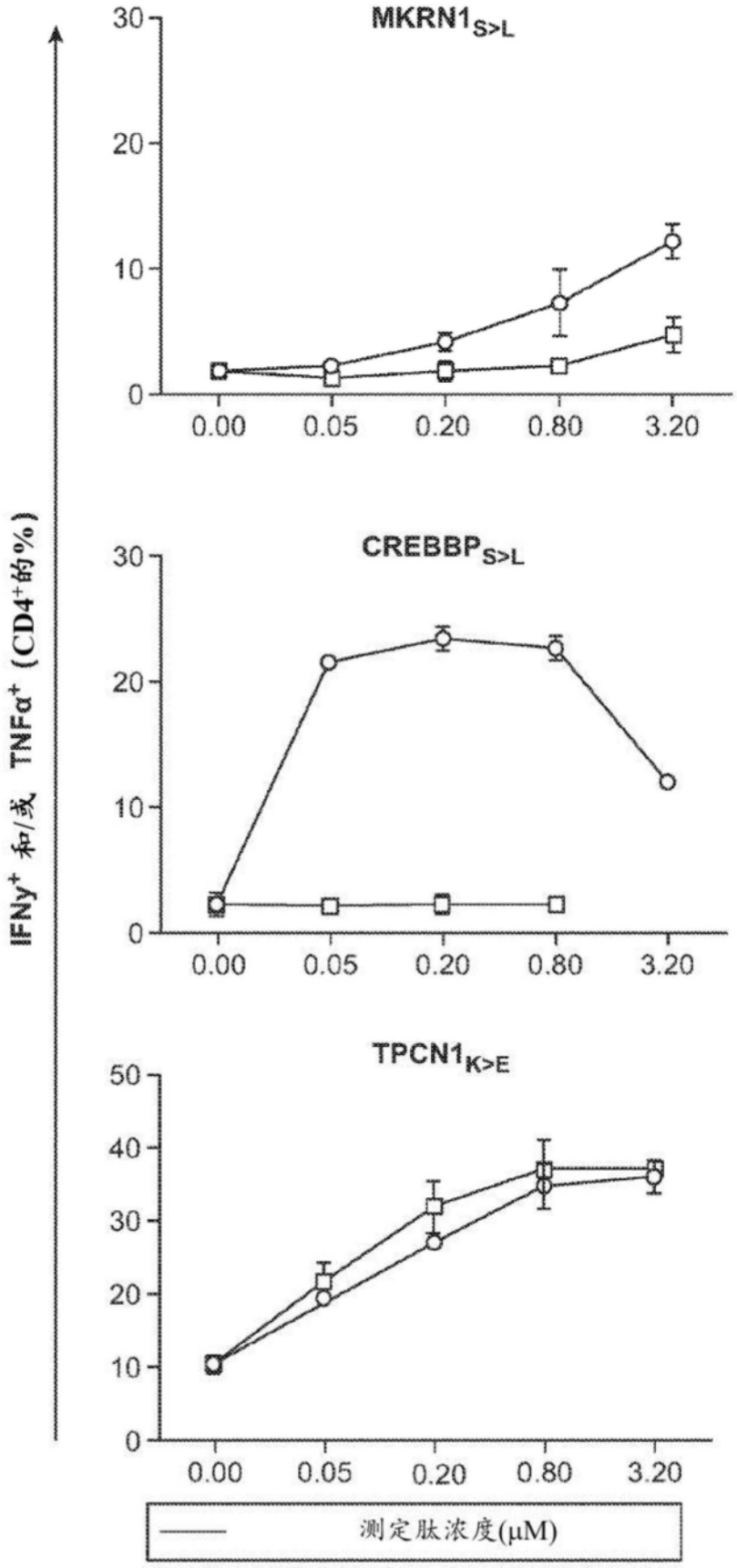

MKRN1S>L
CREBBPS>L
TPCN1K>E
IFNγ+ 和/或 TNFα+ (CD4+的%)
0
10
20
30
40
50
0.00
0.05
0.20
0.80
3.20
测定肽浓度(μM)

图38B

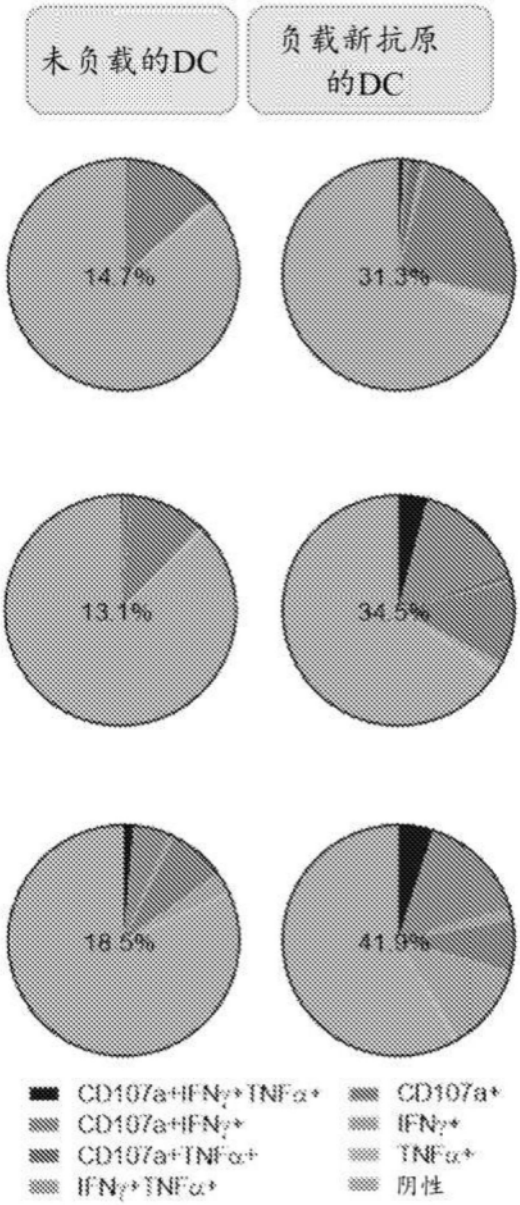

未负载的DC
负载新抗原的DC
14.7%
31.3%
13.1%
34.5%
18.5%
41.9%
CD107a+IFNγ+TNFα+
CD107a+IFNγ+
CD107a+TNFα+
IFNγ+TNFα+
CD107a+
IFNγ+
TNFα+
阴性

图38C

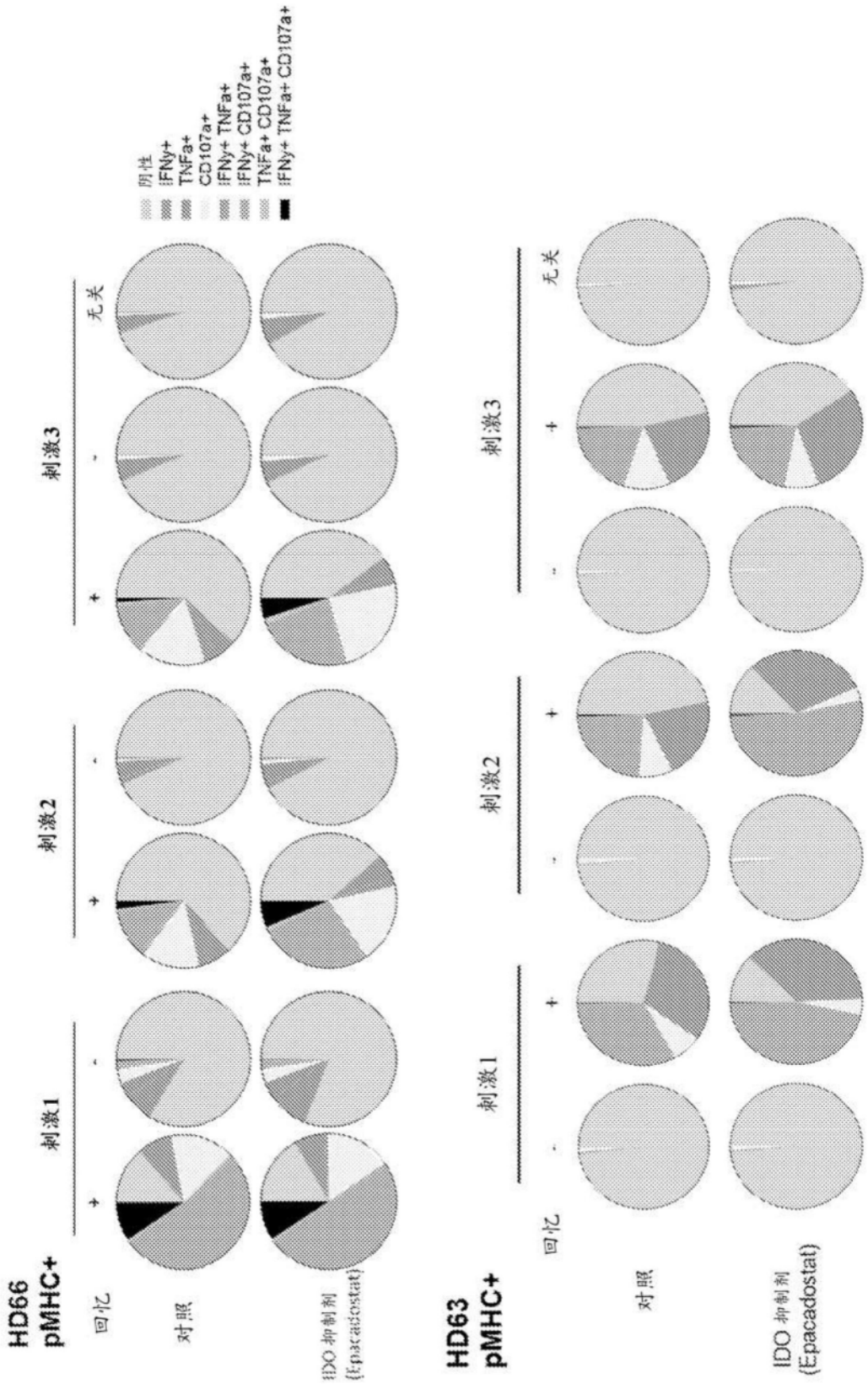

HD66
pMHC+
刺激1
刺激2
刺激3
回忆
对照
IDO 抑制剂
(Epacadostat)
无关
阴性
IFNγ+
TNFa+
CD107a+
IFNγ+ TNFa+
IFNγ+ CD107a+
TNFa+ CD107a+
IFNγ+ TNFa+ CD107a+
HD63
pMHC+
刺激1
刺激2
刺激3
回忆
对照
IDO 抑制剂
(Epacadostat)
无关

图39

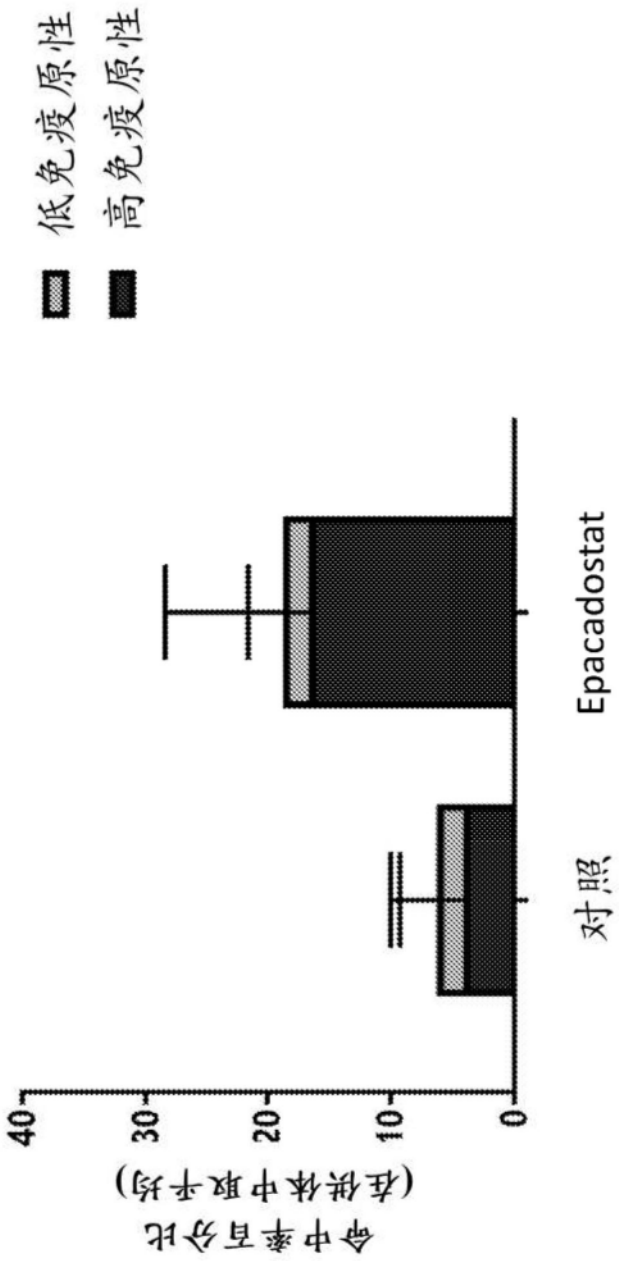


图40

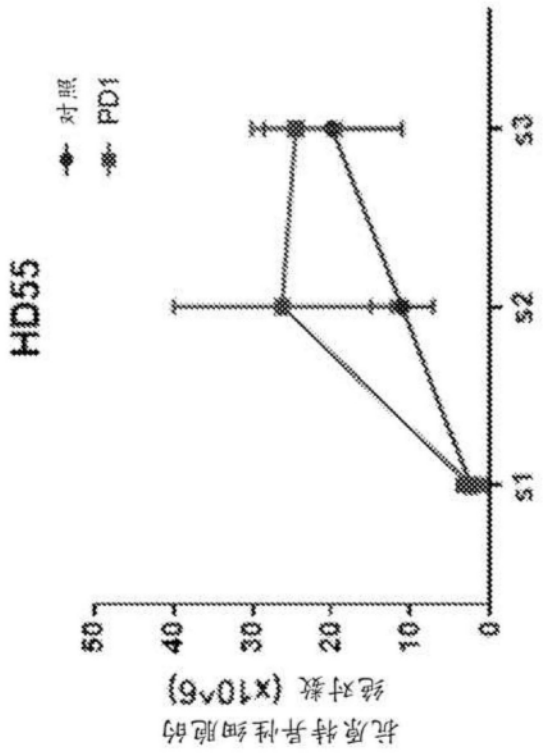

HD55
对照
PD1
S1
S2
S3
0
10
20
30
40
50
抗原特异性细胞的
绝对数 (x10^6)

图41A

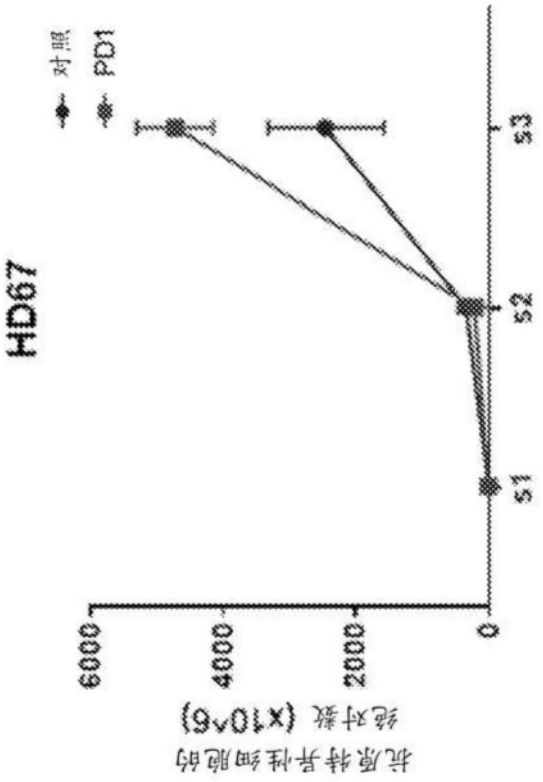

HD67
对照
PD1
S1
S2
S3
0
2000
4000
6000
抗原特异性细胞的
绝对数 (x10^6)

图41B

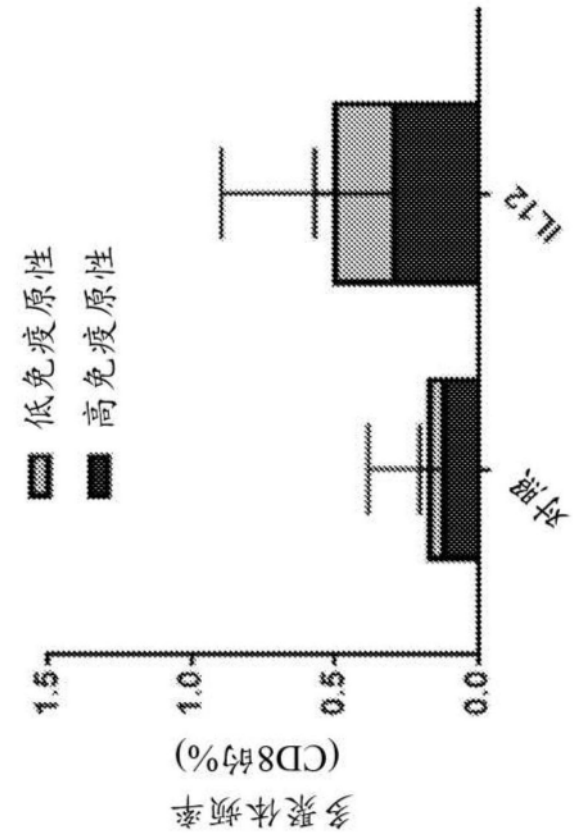

多聚体频率
(CD8的%)
1.5
1.0
0.5
0.0
对照
IL12
高免疫原性
低免疫原性

图42A

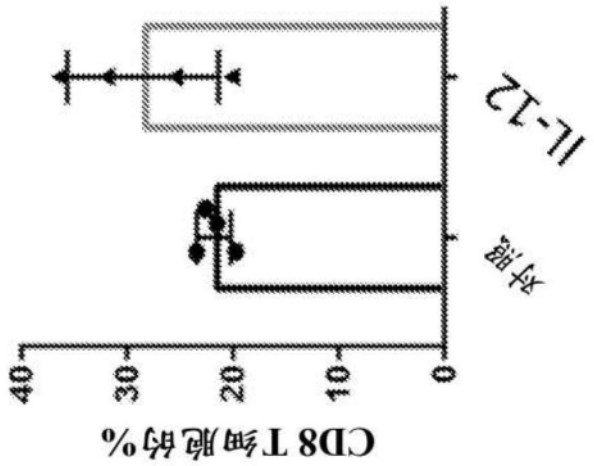

CD8 T细胞的%
40
30
20
10
0
对照
IL-12

图42B

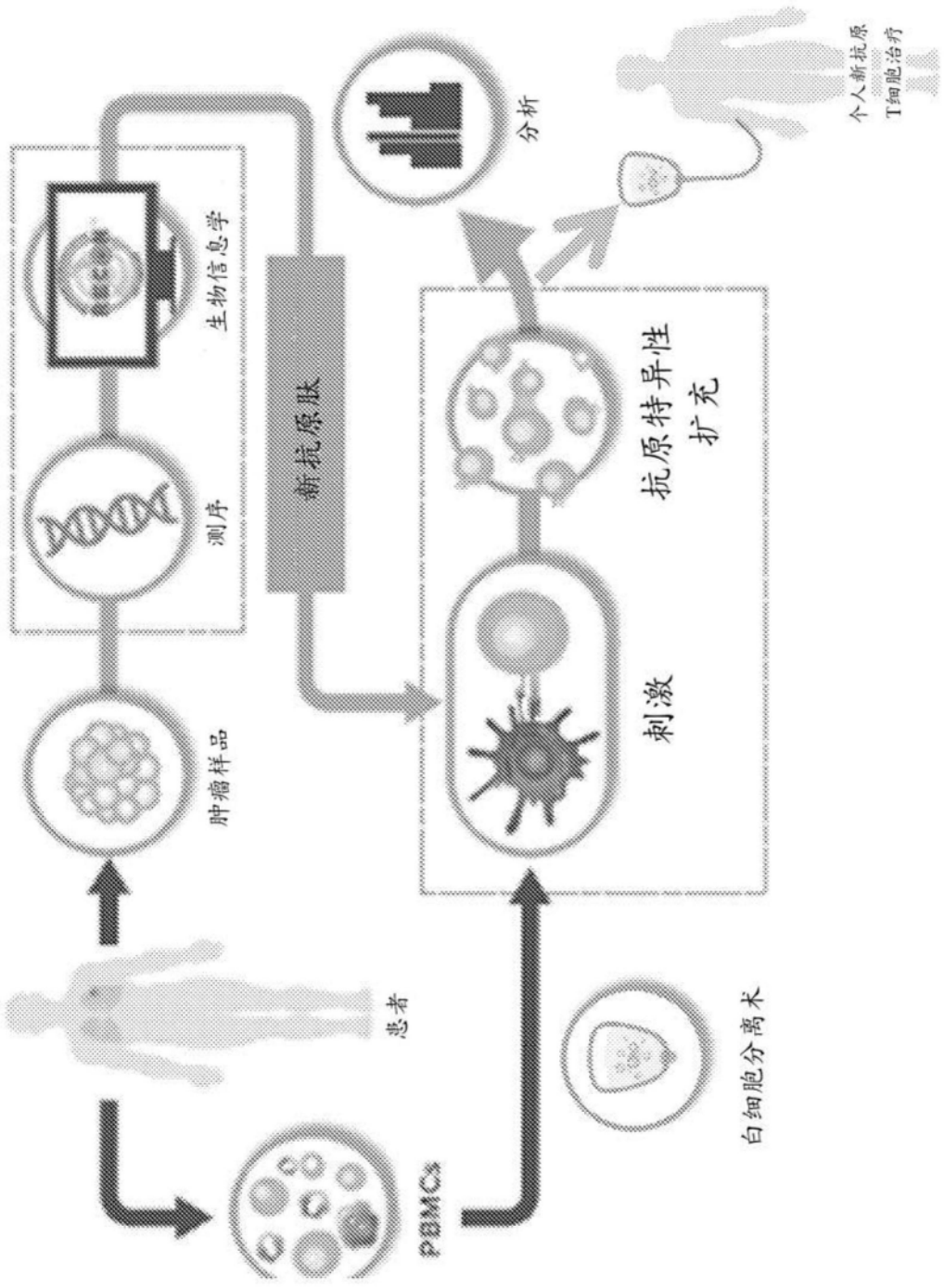


图43