



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108449994 B

(45) 授权公告日 2021.10.01

(21) 申请号 201680062740.5

(73) 专利权人 贝勒医学院

(22) 申请日 2016.09.19

地址 美国得克萨斯

(65) 同一申请的已公布的文献号

(72) 发明人 A · M · 利恩 P · 阿瓜尤-希拉尔多
I · 赞诺 J · F · V · 维拉

申请公布号 CN 108449994 A

(43) 申请公布日 2018.08.24

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038
代理人 傅宇昌

(30) 优先权数据

62/220,884 2015.09.18 US

(51) Int.CI.

G01N 33/50 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

G01N 33/569 (2006.01)

2018.04.26

G01N 33/574 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61K 39/00 (2006.01)

PCT/US2016/052487 2016.09.19

(87) PCT国际申请的公布数据

审查员 胡晓佳

W02017/049291 EN 2017.03.23

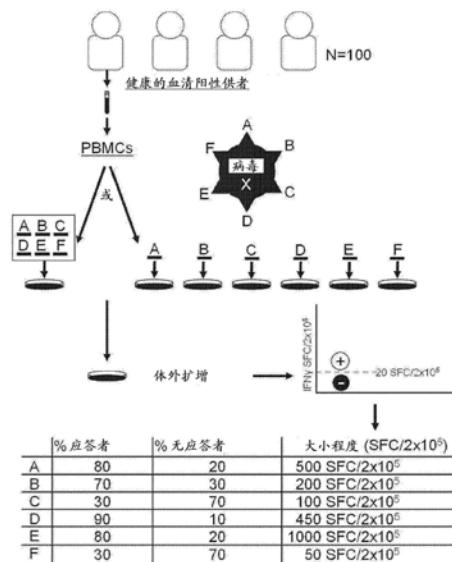
权利要求书2页 说明书32页 附图46页

(54) 发明名称

来自病原体的免疫原性抗原鉴定以及与临床效力的相关性

(57) 摘要

本公开内容的实施方案涉及用于鉴定来自特定病原体的抗原是否是免疫原性的(包括其免疫原性的级别)的方法。其他实施方案涉及T细胞的属性与其临床效力之间的相关性,例如其数学表示。



1. 用于建立关于病原体或癌症的抗原的免疫显性的分级体系的方法,所述方法包括下列步骤:

(a) 使从个体中获得的外周血单核细胞即PBMC在体外培养中暴露于两种或更多种来自病原体或癌症的抗原,这在允许识别所述抗原的T细胞大量增殖的条件下进行,从而产生经扩增的T细胞,

(b) 将所述经扩增的T细胞分成多个分开的培养物,并且将所述抗原之一添加到所述经扩增的T细胞的分开的培养物中的每一个之中,

(c) 测量来自所述经扩增的T细胞的分开的培养物的生物学活性的大小程度,

(d) 通过测量针对无关靶标或针对未操作的PBMC的生物学活性的大小程度来测定非特异性应答水平作为阈值,所述无关靶标为不由所述病原体或癌症表达的抗原,

(e) 将来自所述经扩增的T细胞的分开的培养物中的每一个的生物学活性的大小程度与所述阈值进行比较以区别作为应答者的经扩增的T细胞培养物和作为无应答者的经扩增的T细胞培养物,

(f) 如果步骤(e)中的生物学活性超过所述阈值,那么将经扩增的T细胞培养物鉴定为应答者,和如果步骤(e)中的生物学活性未超过所述阈值,那么将经扩增的T细胞培养物鉴定为无应答者,

(g) 使用从多个个体中获得的PBMC进行相同的方法,并且对于所述两种或更多种来自病原体或癌症的抗原中的每一种,测定相对于所评价的个体数目而言所述经扩增的T细胞培养物为应答者的频率和相对于所评价的个体数目而言所述经扩增的T细胞培养物为无应答者的频率,和

(h) 基于下述数学公式来建立所述抗原的免疫显性的分级体系:

(应答者的% + 1) x 应答的大小程度

$$(无应答者的% + 1)$$

其中所述“应答的大小程度”为在步骤(c)中所测量的生物学活性的大小程度,所述“应答者的%”为在(f)中鉴定出的具有超过所述阈值的生物学活性的T细胞培养物的%,和所述“无应答者的%”为在(f)中鉴定出的具有未超过所述阈值的生物学活性的T细胞培养物的%。

2. 权利要求1的方法,其中所述病原体为病毒、真菌或细菌。

3. 权利要求1的方法,其中所述生物学活性包括从由下列各项组成的组中选择的一种或多种效应分子的产生:IFN γ 、IL2、粒酶B、GM-CSF和TNF α 。

4. 权利要求2的方法,其中所述病毒为呼吸道病毒。

5. 权利要求4的方法,其中所述呼吸道病毒为副流感病毒或偏肺病毒。

6. 权利要求5的方法,其中所述副流感病毒为III型。

7. 权利要求5的方法,其中所述偏肺病毒为人偏肺病毒。

8. 用于获得信息的方法,所述信息用于测定关于病原体或癌症的抗原的免疫原性,所述方法包括下列步骤:

(a) 使来自个体的PBMC和/或T细胞在体外暴露于两种或更多种来自病原体或癌症的抗原,这在允许识别所述抗原的T细胞大量增殖的条件下进行,从而产生经扩增的T细胞,

- (b) 将大量扩增的T细胞分成分开的培养物以获得经扩增的T细胞培养物，
- (c) 将在每一个培养物内的T细胞暴露于所述抗原之一, 其中在每一个培养物中的T细胞展示出生物学活性, 并测量所展示出的生物学活性的大小程度,
- (d) 通过测量没有暴露于任何所述两种或更多种来自病原体或癌症的抗原的细胞的生物学活性来建立关于生物学活性的阈值即阈值生物学活性,
- (e) 将 (c) 的每个生物学活性的大小程度与 (d) 的阈值生物学活性进行比较,
- (f) 将 (c) 的具有超过所述阈值生物学活性的生物学活性大小程度的T细胞鉴定为对于所述抗原的应答者, 和将 (c) 的具有未超过所述阈值生物学活性的生物学活性大小程度的T细胞鉴定为对于所述抗原的无应答者,
- (g) 用来自多个另外个体的PBMC和/或T细胞重复步骤 (a) - (f) , 并且鉴定对于所述两种或更多种来自病原体或癌症的抗原中的每一种的应答者的%, 并且测定相对于所评价的个体数目而言所述经扩增的T细胞培养物为应答者的频率和相对于所评价的个体数目而言所述经扩增的T细胞培养物为无应答者的频率, 和
- (h) 基于下述数学公式来测定所述两种或更多种来自病原体或癌症的抗原中的每一种的免疫原性:

(应答者的% + 1) x 应答的大小程度

(无应答者的% + 1) ,

其中所述“应答的大小程度”为在步骤 (c) 中所测量的生物学活性的大小程度, 所述“应答者的%”为在 (f) 中鉴定出的具有超过所述阈值生物学活性的生物学活性大小程度的T细胞培养物的%, 和所述“无应答者的%”为在 (f) 中鉴定出的具有未超过所述阈值生物学活性的生物学活性大小程度的T细胞培养物的%。

来自病原体的免疫原性抗原鉴定以及与临床效力的相关性

[0001] 本申请要求2015年9月18日提交的美国临时专利申请系列号62/220,884(其通过提及而以其整体合并入本文)的优先权。

技术领域

[0002] 本公开内容的实施方案至少涉及细胞生物学、分子生物学、免疫学和医学的领域。

[0003] 发明背景

[0004] 造血干细胞移植(HSCT)是用于各种各样恶性和非恶性病症的优先选择的治疗。但是,在移植后,移植物抗宿主病(GVHD)、原发疾病复发和病毒感染依然是发病率和死亡率的主要原因。在大多数同种异体移植受者中检测到病毒感染。虽然对于有些病毒是可得的,但是抗病毒药物并不总是有效的,从而突显了对于新型疗法的需要。用于治疗这些病毒感染的一个策略是用过继T细胞转移,其至少包括例如来自供者的病毒特异性T细胞(VST)的输注。用VST方法,例如可以从供者中提取细胞,离体扩增病毒特异性群体,和最后将T细胞产物输注入干细胞移植受者中。

[0005] 当过继性地转移至具有病毒感染的干细胞移植患者时,靶向Adv、EBV、CMV、BK、HHV6的体外扩增的来自供者的第三方VST已显示出是安全的。关于Adv、EBV、CMV、BK和HHV6的经VST重构的抗病毒免疫力在清除疾病中是有效的,并且展示出可观的体内扩增。当过继性地转移至患者时,过继性地转移的经体外扩增的自体的癌症特异性T细胞也已显示出是安全的并且与临床益处相关联。

[0006] 通过提供用于某些病原体和癌症抗原的疗法和还有准备好去鉴定哪些抗原是免疫原性的和临幊上有效的,本公开内容的实施方案满足了本领域中长期感到的需要。

[0007] 发明简述

[0008] 本公开内容的实施方案涉及用于产生免疫疗法(包括用于鉴定在一种或多种用于哺乳动物个体例如人或狗的免疫疗法中将会是在临幊上有效的一种或多种抗原)的方法、组合物和/或系统。所述方法的实施方案涉及哪些来自病原体或癌症细胞的抗原是适当地免疫原性的,以便用于在哺乳动物中的一种或多种治疗性应用。在某些实施方案中,所述病原体为例如病毒、细菌或真菌。

[0009] 在特别的实施方案中,本公开内容的方法涉及对于来自所讨论的病原体和/或癌症细胞的抗原群组的免疫原性的测定,并且涉及基于合适的生物学测定的免疫原性的定级。基于其免疫原性的抗原分级体系的确定可以在考虑对于个体来说合适的免疫性疗法时使用,所述个体具有所述病原体或癌症,和对于来自所述病原体和/或癌症的暴露和/或疾病易感或者处于关于来自所述病原体和/或癌症的暴露和/或疾病的风险中。在特别的实施方案中,所述合适的免疫性疗法包括基于关于特定病原体或癌症的抗原的免疫显性的最合适免疫性疗法。

[0010] 在各种不同的实施方案中,鉴定了至少两种来自病原体或癌症的抗原并且定量了其免疫原性水平。然后,可以基于其免疫原性水平来对所述抗原按次序进行评级,从而可以就这些抗原中的哪些应当用作用于免疫疗法的靶标来做出决定。

[0011] 基于抗原分级体系的确定而设计的免疫性疗法可以是任何类别的,但是在特别的实施方案中,所述免疫性疗法包括疫苗、过继细胞疗法、单克隆抗体、双特异性抗体(BITES)、溶瘤病毒或其组合。所述免疫疗法可以包括过继T细胞疗法(幼稚T细胞受体(TCR)、经改造的TCR或CAR T细胞),尽管可以使用其他类型的免疫细胞,包括NK细胞、NK T细胞、间充质基质细胞(MSC)和树突细胞(DC)。所述免疫疗法可以依赖于免疫细胞的产生和使用,所述免疫细胞包括依赖于天然的或经改造的T细胞受体的那些和依赖于NK细胞、NK T细胞、间充质基质细胞(MSC)和树突细胞(DC)的那些。例如,可以设计这样的T细胞疗法,其攻击病原体或癌症的最具免疫原性的抗原中的至少两种,目的是破坏各自的致病细胞或癌症细胞。这样的疗法可以包括T细胞制备过程,其产生能够识别来自病原体或癌症的最具免疫原性的抗原靶标中的至少两种的T细胞。在备选的实施方案中,所述T细胞疗法靶向仅一种来自病原体或癌症的抗原。

[0012] 在某些实施方案中,测定多于一种来自病原体或癌症的抗原的免疫原性并将其定级成分级体系,以用于在考虑将所述一种或多种抗原用于在对于个体的疗法时使用,所述个体已经暴露于所述病原体(包括已患上直接地或间接地由所述病原体引起的疾病),或者可能暴露于所述病原体,或者具有癌症或处于发展出癌症的风险中,或者由于暴露于所述病原体而处于发展出癌症的风险中。

[0013] 在特别的实施方案中,进行评价以建立信息库,其可以用于将值分配给给定抗原的免疫原性水平。如下来建立信息库:a)使从暴露于病原体的个体或癌症患者中获得的外周血单核细胞(PBMC)经历体外培养过程,其使PBMC暴露于两种或更多种来自所述病原体的抗原或两种或更多种来自所述癌症的抗原,优选地在Th-1极化细胞因子存在下;b)允许进行一个时间段以让识别所述抗原的T细胞大量增殖;c)将该培养物分成与在步骤a中存在的抗原数目一样多的分开的培养物,并且将所述抗原中的仅一种添加到每个培养物中,从而每个培养物包含原始抗原之一并且每个培养物包含不同于其他培养物的抗原;d)测量生物学活性(这可以称为生物学度量(biological measurement));e)平行地或在不同的时间(其也许成为历史参考),通过在体外评估在没有在体外顺次地或平行地暴露于步骤c的相同试剂的PBMC中出现的生物学活性来建立关于生物学活性的阈值;f)将步骤c的培养物中的每一个的生物学活性与该阈值进行比较,并且将具有超过该阈值的生物学活性的那些归类为应答者和将不具有超过该阈值的生物学活性的那些归类为无应答者;和g)作为步骤a-f的结果,知道了相对于所评价的个体数目而言应答者和无应答者的频率,并且知道了相对于该阈值而言和相对于零而言应答者的生物学活性的大小程度。

[0014] 技术人员认识到,在特别的方面,阈值是在测量生物学活性的过程中的噪声。存在多于一种用于建立阈值的方式。例如,如上面所描述的,可以将PBMC暴露于在该过程中所使用的每一种抗原并且可以测量随后的生物学活性以建立阈值。备选地,例如,也可以用未包括在步骤a中的抗原攻击步骤c的培养物。这两种方法都将会检测噪声并由此建立阈值,该阈值对于暴露于待被归类为应答者的目的抗原的培养物来说需要被超过。

[0015] 在某些实施方案中,存在用于表征关于病原体或癌症的免疫原性抗原的方法,其中包括下列步骤:提供或产生多个T细胞群组,其中每个T细胞群组对于来自所述病原体或癌症的一种抗原是特异性的;在来自其各自抗原的攻击后,对来自于来自每个群组的细胞的可定量的生物学应答进行检定,其中相对于阈值量测量生物学应答的所定量的输出以测定

来自每个群组的应答的效力和大小程度,其中所述效力为在群体中具有超过阈值量的生物学应答的个体的百分比;和基于来自每个群组的应答的效力和大小程度之间的数学关系,对每种抗原的免疫原性进行定级。

[0016] 在其他实施方案中,建立这样的公式,所述公式使用变量(包括应答者的百分比和无应答者的百分比以及生物学应答的大小程度)来将值分配给抗原,所述值越高,那么被分配给特定抗原的免疫原性水平就越高。

[0017] 在其他实施方案中,建立这样的公式,所述公式使用变量(包括应答者的百分比和无应答者的百分比以及生物学应答的大小程度)来将值分配给抗原,所述值越高,那么被分配给特定抗原的免疫原性水平就越高。

[0018] 本文中提供了用于示例性的病毒X、细菌Y、肿瘤Z和还有特别的但示例性的病毒(例如副流感病毒III型(PIV3)和人偏肺病毒(hMPV))的免疫特性谱剖析的方法的实例。在特别的实施方案中,分别测定关于PIV3和hMPV的多种抗原的免疫原性并将其在疗法中进行使用。

[0019] 在特别的实施方案中,本公开内容的方法和组合物涉及过继T细胞疗法以预防或治疗感染,例如在HSCT之后。在特别的情况下,本公开内容包括用于预防或治疗病毒感染的疗法,其至少包括用于由例如PIV(至少包括PIV3)、hMPV、巨细胞病毒、BK病毒、人疱疹病毒6、腺病毒、EB病毒、BK病毒、RSV、流感病毒、副流感病毒、博卡病毒(Bocavirus)、冠状病毒、LCMV、腮腺炎病毒、麻疹病毒、偏肺病毒、细小病毒B、轮状病毒、西尼罗病毒、JC或HHV7所引起的感染。可以治疗来自任何病毒感染的病毒,包括来自下列科之一的病毒:腺病毒科(Adenoviridae)、小RNA病毒科(Picornaviridae)、疱疹病毒科(Herpesviridae)、嗜肝DNA病毒科(Hepadnaviridae)、黄病毒科(Flaviviridae)、逆转录病毒科(Retroviridae)、正粘病毒科(Orthomyxoviridae)、副粘病毒科(Paramyxoviridae)、乳多空病毒科(Papovaviridae)、多瘤病毒科(Polyomavirus)、弹状病毒科(Rhabdoviridae)或披膜病毒科(Togaviridae)。

[0020] 可以包含目的病原体的细菌至少包括下列:例如,炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、汉氏巴尔通氏体(*Bartonella henselae*)、五日热巴尔通氏体(*Bartonella quintana*)、百日咳巴尔通氏体(*Bordetella pertussis*)、布氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)、嘎氏疏螺旋体(*Borrelia garinii*)、阿氏疏螺旋体(*Borrelia afzelii*)、回归热疏螺旋体(*Borrelia recurrentis*)、流产布鲁氏菌(*Brucella abortus*)、狗布鲁氏菌(*Brucella canis*)、马尔他布鲁氏菌(*Brucella melitensis*)、猪布鲁氏菌(*Brucella suis*)、空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)、肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*)、砂眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)、鹦鹉热嗜衣原体(*Chlamydophila psittaci*)、肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)、艰难梭菌(*Clostridium difficile*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)、白喉棒杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、土拉热弗朗西丝氏菌(*Francisella tularensis*)、流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、问号钩端螺旋体(*Leptospira interrogans*)、圣他罗西亚钩端螺旋体(*Leptospira santarosai*)、韦氏钩端

螺旋体 (*Leptospira weili*)、野口氏钩端螺旋体 (*Leptospira noguchii*)、单核细胞增生利斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)、麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*)、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、溃疡分枝杆菌 (*Mycobacterium ulcerans*)、肺炎枝原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)、淋病奈瑟氏球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、立氏立克次氏体 (*Rickettsia rickettsii*)、伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、索氏志贺氏菌 (*Shigella sonnei*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、腐生葡萄球菌 (*Staphylococcus saprophyticus*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*)、解脲尿枝原体 (*Ureaplasma urealyticum*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、鼠疫耶尔森氏菌 (*Yersinia pestis*)、小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*) 或假结核耶尔森氏菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*)。

[0021] 在特别的实施方案中,本公开内容的方法和组合物还涉及过继T细胞疗法以预防或治疗癌症,包括从由下列各项组成的组中选择的癌症:急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性粒细胞白血病(AML)、肾上腺皮质癌、肾上腺皮质癌症、AIDS-相关癌症、卡波西肉瘤、AIDS-相关淋巴瘤、原发性CNS淋巴瘤、肛门癌症、阑尾癌症、星形细胞瘤、非典型畸胎样/棒状肿瘤、基底细胞癌、胆管癌症、膀胱癌症、骨癌症(包括尤因肉瘤和骨肉瘤和恶性纤维组织细胞瘤)、乳腺癌症、支气管肿瘤、伯基特淋巴瘤、胃肠道类癌肿瘤、类癌肿瘤、心(心脏)肿瘤、胚胎肿瘤、生殖细胞肿瘤、淋巴瘤、宫颈癌症、胆管癌、脊索瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性粒细胞白血病(CML)、慢性骨髓增生性瘤、结肠直肠癌症、颅咽管瘤、皮肤T-细胞淋巴瘤、原位导管癌(DCIS)、胚胎肿瘤、子宫内膜癌症、室管膜瘤、食管癌症、成感觉神经细胞瘤、颅外生殖细胞肿瘤、生殖腺外生殖细胞肿瘤、输卵管癌症、恶性骨纤维组织细胞瘤和骨肉瘤、胆囊癌症、胃部(胃)癌症、胃肠道类癌肿瘤、胃肠道基质肿瘤(GIST)、颅外生殖细胞肿瘤、生殖腺外生殖细胞肿瘤、卵巢癌症、睾丸癌症、妊娠滋养层成瘤性疾病、神经胶质瘤、多毛细胞白血病、头与颈癌症、心脏肿瘤、肝细胞癌症、朗格汉斯细胞组织细胞增多症、霍奇金淋巴瘤、咽下部癌症、眼内黑素瘤、胰岛细胞肿瘤、胰腺神经内分泌肿瘤、胰腺癌症、卡波西肉瘤、喉癌症、喉乳头状瘤病、白血病、唇与口腔癌症、肝脏癌症、肺癌、非霍奇金淋巴瘤、骨恶性纤维组织细胞瘤、骨肉瘤、黑素瘤、眼内黑素瘤、梅克尔细胞癌、皮肤癌症、间皮瘤、恶性间皮瘤、具有隐匿原发灶的转移性鳞状细胞颈癌症、涉及NUT基因的中线道癌、嘴癌症、头与颈癌症、多发性内分泌腺瘤形成综合征、多发性骨髓瘤/浆细胞瘤、蕈样肉芽肿病、骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常性/骨髓增生性瘤、慢性骨髓增生性瘤、慢性粒细胞白血病(CML)、鼻腔与鼻旁窦癌症、鼻咽癌症、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、口癌症、唇与口腔癌症、口咽癌症、口腔癌症、骨肉瘤、胰腺癌症、乳头状瘤病、副神经节瘤、鼻旁窦与鼻腔癌症、甲状旁腺癌症、阴茎癌症、咽癌症、嗜铬细胞瘤、垂体肿瘤、浆细胞瘤/多发性骨髓瘤、胸膜肺母细胞瘤、原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤、腹膜癌症、前列腺癌症、直肠癌症、结肠直肠癌症、肾细胞(肾脏)癌症、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌症、唾液腺肿瘤、肉瘤、骨肉瘤、横纹肌肉瘤、子宫肉瘤、子宫癌症、血管肿瘤、塞泽里综合征、皮肤癌症、小细胞肺癌、小肠癌症、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、鳞状细胞颈癌症、胃部(胃)癌症、皮肤T-

细胞淋巴瘤、睾丸癌症、咽喉癌症、胸腺瘤、胸腺癌、甲状腺癌症、甲状腺肿瘤、肾盂和输尿管的移行细胞癌症、尿道癌症、子宫癌症、子宫内膜癌症、子宫肉瘤、阴道癌症、血管肿瘤、外阴癌症、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(非霍奇金淋巴瘤)和维尔姆斯肿瘤。

[0022] 通过阅读下面的说明书并参考构成其一部分的附图或者为了本公开内容的目的而给出的本发明的目前优选的实施方案的任何实例，其他的和进一步的目标、特征和优点将会是明显的并且最终更容易被理解。

[0023] 附图简述

[0024] 图1图解说明了关于示例性的病毒X的免疫原性抗原鉴定的例子，其包括将PBMC暴露于多种抗原，随后为再攻击和测定阈值和鉴定应答者和无应答者。

[0025] 图2提供了用于对图1中的每种抗原的免疫原性进行定级和鉴定抗原分级体系的数学公式的例子。

[0026] 图3显示了基于图2中的抗原分级体系来选择特异性抗原的一个例子。

[0027] 图4显示了基于图2中的抗原分级体系来选择特异性抗原的一个例子。

[0028] 图5显示了基于图2中的抗原分级体系来选择特异性抗原的一个例子。

[0029] 图6图解说明了关于示例性的细菌Y的免疫原性抗原鉴定的例子，其包括将PBMC暴露于多种抗原，随后为再攻击和测定阈值和鉴定应答者和无应答者。

[0030] 图7提供了用于对图6中的每种抗原的免疫原性进行定级和鉴定抗原分级体系的数学公式的例子。

[0031] 图8显示了基于图7中的抗原分级体系来选择特异性抗原的一个例子。

[0032] 图9显示了基于图7中的抗原分级体系来选择特异性抗原的一个例子。

[0033] 图10显示了基于图7中的抗原分级体系来选择特异性抗原的一个例子。

[0034] 图11图解说明了关于示例性的肿瘤Z的免疫原性抗原鉴定的例子，其包括将PBMC暴露于多种抗原，随后为再攻击和测定阈值和鉴定应答者和无应答者。

[0035] 图12提供了用于对图11中的每种抗原的免疫原性进行定级和鉴定抗原分级体系的数学公式的例子。

[0036] 图13显示了基于图12中的抗原分级体系来选择特异性抗原的一个例子。

[0037] 图14显示了基于图12中的抗原分级体系来选择特异性抗原的一个例子。

[0038] 图15显示了基于图12中的抗原分级体系来选择特异性抗原的一个例子。

[0039] 图16图解说明了HMPV分子和其基因产物，包括 $3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5'$ 。

[0040] 图17显示了对于hMPV的T细胞应答的一个例子。

[0041] 图18显示了对于hMPV的T细胞应答的一个例子，包括抗原分级体系。

[0042] 图19提供了相应于hMPV评级的T细胞得分的示例。

[0043] 图20图解说明了PIV3分子和其基因产物，包括N-P-M-F-HN-L。

[0044] 图21提供了对于PIV3的T细胞应答的一个例子。

[0045] 图22显示了对于PIV3的T细胞应答的一个例子，包括抗原分级体系。

[0046] 图23提供了相应于PIV3评级的T细胞得分的示例。

[0047] 图24显示了这样的例子，其中将粒酶B用于测定用于应答者对无应答者的百分比以表征针对病原体的免疫应答。

[0048] 图25显示了靶向抗原M和N的PIV3-特异性T细胞的频率，其在第155天和第162天之

间展示出特别的富集。

[0049] 图26显示了PIV3T细胞用于控制病毒感染的临床相关性的例子,其中PIV3-特异性T细胞的频率的增加与在骨髓移植(BMT)后具有主动感染的代表性患者中的感染症状和病毒检测具有逆相关。

[0050] 图27图解说明了针对不同hMPV抗原的免疫T细胞应答的临床相关性。

[0051] 图28图解说明了评级的治疗性应用,其中将病毒X的顶级靶标鉴定为抗原来源。

[0052] 图29图解说明了评级的治疗性应用,其中将细菌Y的顶级靶标鉴定为抗原来源。

[0053] 图30图解说明了评级的治疗性应用,其中将肿瘤Z的顶级靶标鉴定为抗原来源。

[0054] 图31显示了T细胞产物的表型特征。

[0055] 图32显示了通过关于抗原M和HN的细胞内细胞因子染色所检测出的CD4+和CD8+的抗原特异性。

[0056] 图33图解说明了hMPV T细胞制备的一个例子。

[0057] 图34显示了来自图33中所显示的例子的T细胞的扩增。

[0058] 图35显示了hMPV ST的表型。

[0059] 图36提供了与HMVP-特异性T细胞一起进行培养的结果,其导致HMPV靶细胞的逐步下降。

[0060] 图37显示图35中的细胞是抗原特异性的,如通过关于相关抗原的细胞内细胞因子染色所检测出的。

[0061] 图38显示了用于关于T细胞产物的定义的数学关系的一个例子。

[0062] 图39显示了对于腺病毒特异性T细胞,在第0、10和20天评估培养物的特异性和溶细胞能力。

[0063] 图40显示了对于BK病毒特异性T细胞,在第0、10和20天评估培养物的特异性和溶细胞能力。

[0064] 图41显示了对于CMV特异性T细胞,在第0、10和20天评估培养物的特异性和溶细胞能力。

[0065] 图42图解说明了向患者施用从外周血或白细胞去除术产物产生的抗原特异性T细胞。

[0066] 图43图解说明了特异性T细胞的现货使用。

[0067] 图44提供了何时将T细胞产物给予或不给予患者的数学例子。

[0068] 图45显示了如由图44中的数学例子所定义用CMV-特异性T细胞产物进行治疗的具有主动CMV感染的患者的临床结果。

[0069] 图46显示了如由图44中的数学例子所定义用EBV-特异性T细胞产物进行治疗的具有主动EBV感染的患者的临床结果。

[0070] 图47显示了如由图44中的数学例子所定义用BKV-特异性T细胞产物进行治疗的具有主动BKV感染的患者的临床结果。

[0071] 发明详述

[0072] 如在本文中所使用的,当与权利要求书和/或说明书中的术语“包含(包括)”相联合地使用时,单词“a”或“an”的使用可以意味着“一个(种)”,但它也与“一个(种)或多个(种)”、“至少一个(种)”和“一个(种)或多于一个(种)”的含义相一致。本发明的一些实施方

案可以由或基本上由本发明的一个或多个要素、方法步骤和/或方法组成。考虑了，本文中所描述的任何方法或组合物可以相对于本文中所描述的任何其他方法或组合物来实施。

[0073] 如在本文中所使用的，术语“生物学活性”被定义为例如下列方面的生物学变化：效应分子例如IFN γ 、粒酶B、IL2、TNF α 的产生，靶细胞的特异性裂解，或者细胞表面分子例如CD25、CD69、CD27、CD28或CD107a/b的表达。

[0074] I. 总的实施方案

[0075] 在本公开内容的一些实施方案中，个体需要本公开内容的方法和/或组合物。在特别的实施方案中，所述个体是免疫受损的（其例如可以被定义为这样的个体，其用免疫系统对抗感染性疾病的能力由于任何原因是受损的或完全缺乏的）。在特别的实施方案中，所述免疫受损的个体已具有干细胞移植，已具有器官移植，等等。在另一个特别的实施方案中，所述个体具有癌症或处于发展出癌症的风险中。

[0076] 本公开内容的实施方案涉及关于病原体或癌症的免疫显性分级体系的建立，和在代表性的情况下，所述病原体为PIV（至少包括PIV3）、hMPV、巨细胞病毒、BK病毒、人疱疹病毒6、腺病毒、EB病毒、BK病毒、RSV、流感病毒、副流感病毒、博卡病毒、冠状病毒、LCMV、腮腺炎病毒、麻疹病毒、偏肺病毒、细小病毒B、轮状病毒、西尼罗病毒、JC或HHV7。癌症抗原可以来自例如肺、乳腺、脑、结肠、皮肤、前列腺、胰腺、子宫内膜、肾脏、卵巢、睾丸、骨、脾脏、肝脏、胆囊、甲状腺、食管、肠、膀胱、直肠、肛门、胃、头与颈、咽喉、垂体腺的癌症或者多发性骨髓瘤或淋巴瘤。在特别的实施方案中，当所述病原体为病毒时，用于区分应答者和无应答者的活性阈值的例子为在ELIspot测定法中大于20个IFN γ 斑点形成细胞(SFC) / 2×10^5 个输入细胞或10个粒酶B SFC / 2×10^5 个输入细胞的值。本领域技术人员认识到，这些代表了用于定义活性阈值的生物学活性的例子。然而，依赖于用于测量生物学活性的测定法/工具，用于定义生物学活性的数字阈值的例子易于变化。

[0077] 在特别的实施方案中，在来自病原体的抗原的免疫原性等级的确定中使用一个或多个数量生物学应答。在特别的实施方案中，所述应答用于鉴定关键的T细胞活性水平，包括可以用于确定应答者对无应答者的水平。在某些实施方案中，数量生物学应答为在识别特定的靶标后由T细胞产生（例如，从细胞分泌的）或表达（例如，在细胞上膜结合的）化合物。在特别的实施方案中，所述化合物为IL1 α 、IL1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-12 (p35+p40)、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17a、IL-17B、IL-17F、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23 (p90+p43)、IL-25、IL-26、IL-27 (p28+EBI3)、IL-28A/B/IL29A、IL-30 (IL-27的p28亚基)、IL-31、IL-32、IL-33、IL-35 (p35+EBI3)、TNF α 、LT α 、LT β 、LIGHT、OX40L、CD25、CD45、CD40L、FASL、CD27L、CD30L、4-1BBL、TRAIL、RANK配体、GM-CSF、IFN γ 、LIF、MIF、TGF β 1、TGF β 2和/或TGF β 3。在特别的实施方案中，所述化合物为IL2、IFN γ 、粒酶B、CD25、穿孔蛋白、GM-CSF和/或TNF α 。在一些实施方案中，所述生物学应答为在用同族抗原（例如CD25、CD27、CD28、CD45、CD69和/或CD107）进行刺激后，一种或多种标志物的上调。

[0078] 技术人员认识到，术语“SFC”是相对于酶联免疫吸附斑点(ELIspot)技术来进行使用的，所述ELIspot技术鉴定表达或分泌特定的目的化合物的细胞。所述技术采取使用固定在合适的膜上的靶蛋白特异性抗体。由以变化的密度进行铺板的目的细胞所产生的化合物被识别所述化合物的一抗捕获，然后通过也特异于所述化合物的经标记的二抗来可视化。该反应的列举为用于在本文中所公开的某些方法的生物标志物。

[0079] II. 免疫原性抗原的鉴定和其效力级别

[0080] 本公开内容的特别的实施方案提供了与鉴定特别适合于产生一种或多种类型的免疫疗法和/或在一种或多种类型的免疫疗法中使用的免疫原性抗原相关的方法和组合物。在特别的实施方案中，在抗原集合中，来自所述集合的一种或多种抗原被鉴定为比其他抗原更具免疫原性。所述抗原集合可以是来自相同实体，例如来自相同病原体或来自相同癌症类型的多种抗原（包括肿瘤抗原）。在一些情况下，所述抗原集合包括来自病原体或癌症的可能抗原中的一些或大多数，而在某些情况下，所述抗原集合包括来自病原体或癌症的所有可能抗原。所述病原体可以为例如病毒、细菌或真菌。

[0081] 在总的实施方案中，在用抗原对T细胞进行至少第一次和第二次攻击并随后测定反映了T细胞的应答有效性的数学值（其中所述测定在第二次或后来的攻击后发生）后，对于来自病原体或癌症的各种抗原的一系列免疫原性进行定级。作为例子，在体外用抗原集合刺激来自个体的T细胞，并且该初始刺激可以要么用为了暴露于T细胞而汇集的不同抗原，要么用为了暴露于T细胞而分开的不同抗原来发生。在某些情况下，所述刺激可以在或不在Th1-极化细胞因子存在下发生。在合适数量的时间（例如，2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12天）后，使所述T细胞经历第二次攻击，但在第二次攻击中，使所述T细胞分开地（不汇集）暴露于不同抗原。在合适数量的时间（例如，15分钟-72小时）后，评价所述T细胞的一个或多个生物学应答，例如以定量方式。例如，作为生物学应答，可以评估一种或多种某些化合物（包括例如由细胞产生和分泌的，或者为了细胞表面表达而产生的）的产生，作为所述T细胞的活性的量度。所述测量可以在将所述T细胞暴露于第二次或后来的攻击后一定的时间段（例如，15分钟-72小时）之后发生。

[0082] 可以依照一个、两个或多个值来表征用于特定抗原的方法的定量输出。在特别的实施方案中，所述定量输出包括：1) 其T细胞子代有效地识别特定抗原的供者的数目，和2) T细胞应答的大小程度（例如，SFC的数目/一定数目的输入T细胞）。

[0083] 在特别的实施方案中，设定通过其定性地确定所述T细胞是否对所述抗原作出应答的阈值。用于定义活性阈值的参数如上面所定义，并且包括通过测量针对无关靶标（不由目的病原体或肿瘤表达的抗原）或针对未操作的PBMC的生物学活性的大小程度来测定非特异性应答水平。然后，该非特异性应答水平建立基线以区别应答者和无应答者。因此，在某些实施方案中，相对于阈值量测量生物学应答的所定量的输出，以测定来自每个特异于一种抗原的T细胞群组的应答的效力和大小程度。在至少一些实施方案中，所述效力包括在群体中具有超过阈值量的生物学应答的个体的百分比。具有比阈值更大的应答大小程度的T细胞被认为是应答者，而具有小于阈值的应答值的那些被认为是无应答者。

[0084] 在特别的实施方案中，建立通过其定性地测定T细胞对于所述抗原的应答大小程度的阈值。非特异性应答可以基于针对无关靶标（不由目的病原体或肿瘤表达的抗原）或针对未操作的PBMC的生物学活性来测定。这建立了用于区分应答者与无应答者的阈值。当应答上升超过所建立的非特异性应答，表明是应答者。当应答未上升超过所建立的非特异性应答，表明是无应答者。因此，在某些实施方案中，相对于阈值量测量生物学应答的所定量的输出，以测定来自每个特异于一种抗原的T细胞群组的应答的效力和大小程度。在至少一些实施方案中，所述效力包括在群体中具有超过阈值量的生物学应答的个体的百分比。具有比阈值更大的应答大小程度的T细胞被认为是应答者，而具有小于阈值的应答值的那些

被认为是无应答者。

[0085] T细胞应答的定量可以通过任何合适的计量标准(例如培养物中的细胞的在细胞内鉴定的、分泌的或在细胞表面上的一个或多个变化)来测量。可以测量某些化合物的产生,所述化合物是可溶的或不可溶的,分泌的或不分泌的。此类化合物可以是任何类别的,但在特别的实施方案中,它们是细胞因子。待测量的特殊化合物的例子包括IL1 α 、IL1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-12(p35+p40)、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17a、IL-17B、IL-17F、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23(p90+p43)、IL-25、IL-26、IL-27(p28+EBI3)、IL-28A/B/IL29A、IL-30(IL-27的p28亚基)、IL-31、IL-32、IL-33、IL-35(p35+EBI3)、TNF α 、LT α 、LT β 、LIGHT、OX40L、CD40L、FASL、CD27L、CD30L、4-1BBL、TRAIL、RANK配体、GM-CSF、IFN γ 、LIF、MIF、TGF β 1、TGF β 2、TGF β 3及其组合。在评价细胞表面表型变化的情况下,可以测量例如CD11a、CD11c、CD16、CD25、CD27、CD28、CD31、CD38、CD40L、CD43、CD44、CD45、CD49d、CD62L、CD69、CD95、CD122、CD127、CXCR3、CCR5、CCR6、CCR7和/或KLRG-1的表达水平。在一些情况下,评估细胞内和细胞外变化,并且此类变化可以包括例如IL-1 β 、IL2、IL4、IL6、IL12、IFN γ 、TNF α 、TGF β 、CD107和/或GM-CSF的产生/表达。

[0086] 在特别的实施方案中,在数学关系中与生物学活性的大小程度一起使用应答者的百分比和无应答者的百分比,所述生物学活性响应于对于旨在引发生物学应答(在特别的实施方案中,其可以表示IFN γ SFC的测量)的所希望的试剂的暴露。在特别的情况下,所述数学关系包括应答者的百分比和应答的大小程度的乘积与无应答者的百分比之比。在特别的情况下,所述数学关系为应答者的百分比加1乘以应答的大小程度的乘积,并除以无应答者的百分比加1。

[0087] 在特别的实施方案中,在数学关系中与生物学应答(在特别的实施方案中,其可以表示IFN γ 的测量)的大小程度一起使用应答者的百分比和无应答者的百分比。在特别的情况下,所述数学关系包括应答者的百分比和应答的大小程度的乘积与无应答者的百分比之比。在特别的情况下,所述数学关系为(应答者的百分比+1)和应答的大小程度的乘积,并除以(无应答者的百分比+1)。

[0088] 在特别的实施方案中,对于特定的生物学度量,应答者的百分比与应答的大小程度的数学关系以数学公式来表示。虽然可以应用多于一个公式,但在特别的实施方案中,所述公式如下:

$$\frac{(\text{应答者的百分比} + 1) \times \text{生物学应答的大小程度}}{(\text{无应答者的百分比} + 1)}.$$

[0089] 一旦对于每种抗原确定了来自该数学关系的值,那么就可以比较对于每种抗原的值并且定级成分级体系,例如最有效的抗原至最不有效的抗原的分级体系。该免疫原性谱为需要选择最合适抗原(例如以在免疫疗法中使用)的使用者提供了信息。在特别的实施方案中,在使用该方法后,可以从可能抗原的集合中选择出最有效的抗原中的1、2、3或更多种以用作用于免疫疗法的抗原。在特别的实施方案中,仅选择根据所述方法的输出最具免疫原性的抗原,而在其他情况下,可以选择2、3、4或更多种根据所述方法的输出最具免疫原性的抗原。在特别的情况下,可以根据所述方法的输出选择最具免疫原性的抗原,此外还可以选择根据所述方法的输出第二最具免疫原性的抗原,根据所述方法的输出第三最具免疫

原性的抗原,和/或根据所述方法的输出第四最具免疫原性的抗原,等等。采用在本公开内容的方法中所鉴定的最有效的抗原的免疫疗法可以是任何类别的,包括疫苗、免疫原性组合物、过继T细胞转移等等。

[0091] 在某些实施方案中,可以给具有与病原体相关的医学状况或关于病原体来说血清阳性的或者具有癌症或处于关于癌症的风险中的个体提供治疗有效量的基于在本文中所描述的用于表征免疫原性抗原的方法而设计的免疫疗法。

[0092] 在下面的实施例部分中提供了鉴定关于示例性病原体的免疫原性抗原和对其免疫原性/效力进行定级的特别的实例。

[0093] III. 免疫细胞与其临床效力之间的数学相关性和其他相关性

[0094] 在本公开内容的特别的实施方案中,存在用于测定某些免疫细胞(例如T细胞、NK细胞或NK T细胞)的效力的方法和组合物。所述细胞可以基于上面所描述的抗原免疫显性分级体系的确定来进行改造或不进行改造。在特别的实施方案中,将细胞产物的生物学特征与效力(包括临床效力)相关联。

[0095] 在特别的实施方案中,在用抗原例如病原体抗原或癌症(包括肿瘤)抗原进行初始和/或第二次或后来的刺激后,产生T细胞。可以测量所述T细胞的特异性和细胞毒性以对关于某一抗原特异性T细胞群组的临床效力提供洞察力。在这样做时,对于所述T细胞评估一个或多个生物学度量,例如从细胞分泌的化合物的量和/或在细胞上的细胞表面标志物的量。一个或多个生物学度量可以是细胞内的或在细胞表面上。所述测量可以在将所述T细胞暴露于一次或多次刺激后一定的时间段之后发生,例如在一次或多次刺激后大约15分钟但不迟于72小时之内。

[0096] 在特别的实施方案中,可以将关于这样的T细胞的生物学度量的值与关于不相关实体例如不相关或无关靶标(例如,在特定的目的病原体或癌症中不存在的抗原)的值进行比较。在至少某些实例中,所述不相关实体为未操作的细胞,包括未操作的PBMC。在至少某些情况下,通过使用关于所讨论的T细胞的生物学度量的值与未操作的细胞对应物的值之比来确定关于给定抗原的应答者的百分比。在特别的情况下,通过将关于所述细胞的生物学度量的值除以未操作的细胞对应物的生物学度量的值来确定关于给定抗原的应答者的百分比。在至少一些实施方案中,在这样的计算后,当结果大于或等于1时,在该方法测试了其T细胞的个体被认为是应答者;当计算结果小于1时,那么在该方法测试了其T细胞的个体被认为是无应答者。

[0097] 在关于所述T细胞的特异性的背景下,可以测试在所述细胞暴露于抗原后(例如具有至少两次分开的对于抗原的暴露),所述细胞产生某种化合物的能力。在特别的实施方案中,取决于对于所述细胞测量哪种化合物的产生,当针对关于特定病原体或癌症的所有抗原的产生化合物的斑点形成细胞(SFC)的总和 \geq 某一值的SFC/ 2×10^5 个输入细胞时,认为所述细胞是特异性的。例如,对于IFN γ 产生,用于测量应答的基线为 ≥ 20 个SFC/ 2×10^5 个输入细胞,尽管对于粒酶B,用于测量应答的基线为 ≥ 10 个SFC/ 2×10^5 个输入细胞。

[0098] 在测量关于所述细胞的细胞毒性的背景下,所述细胞毒性可以通过标准的杀伤测定法(包括共培养测定法,负载有/表达抗原的靶标的非放射性和放射性标记)来进行测定。一个特别的实施方案包括铬释放测定法,其中T细胞用作效应子,和靶标为用所讨论的抗原进行冲击的经铬标记的自体PHA母细胞。效应子与靶标的比例可以为(或者可以为至少或不

大于)5:1、10:1、15:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、45:1、50:1、55:1、60:1、65:1、70:1、75:1、80:1、85:1、90:1或95:1等。如果用相关抗原进行冲击的PHA母细胞的特异性裂解的百分比高于由无关T细胞产物或未操作的PBMC所介导的裂解,那么认为所述细胞针对特定的病原体或肿瘤抗原是细胞毒性的。在一些条件下,可以认为在该测定法中的活性阈值为在40:1的效应子与靶标的比例下10%的特异性裂解(例如,在减去表达不相关肽(例如,其在目的病原体或肿瘤中不存在的)的靶细胞的非特异性杀伤的百分比后)。

[0099] 可以用数学方法,依照抗原特异性和/或细胞毒性来测定关于特定的抗原特异性T细胞群组的临床效力。在特别的实施方案中,关于所述细胞的效力的定量值通过数学关系来获得,所述数学关系使用了关于抗原特异性T细胞和未操作的对照细胞(例如未操作的PBMC)的生物学度量的值,并且使用了关于特异性杀伤的值。

[0100] 考虑了抗原特异性和细胞毒性的特别的数学公式的一个例子包括下述:

$$[0101] \quad {}_R(TB) + {}_R(TK) \geq 1$$

[0102] - 其中_RTB被定义为 $[(Tbio-P)+1]/[(Tbio-U)+1]$,其当 ≥ 1 时,将会等价于1的_RTB值,和当<1时,将会相应于0的_RTB值;和

[0103] - _RTK被定义为 $[TSpec-P/TCSpec]$,其当 ≥ 1 时,将会等价于1的_RTK值,和当<1时,将会相应于0的_RTK值(参见图38)。

[0104] Tbio-P被定义为体外T细胞产物的生物学特征,和Tbio-U为未操作的PBMC或无关抗原的生物学特征。TSpec-P,或体外T细胞产物的特异性杀伤能力,被定义为在减去在预先规定的效应子与靶标的比例下由未操作的PBMC非特异性地杀伤表达无关肽(即在目的病原体或肿瘤内不存在的抗原或标志物)的靶细胞的百分比(TCSpec)后,在预先规定的效应子与靶标的比例(例如,40:1的效应子与靶标的比例)下经裂解的表达同族抗原的HLA-匹配的靶细胞的百分比。

[0105] 在特别的实施方案中,当对于上面提及的公式,_R(TB)+_R(TK)的计算大于或等于1时,那么所测试的T细胞群将会是临幊上有效的。可以向有此需要的个体以治疗有效量施用此类细胞。当对于上面提及的公式,_R(TB)+_R(TK)的计算小于1时,所测试的T细胞群将会不是临幊上有效的。可以不向有此需要的个体以治疗有效量施用此类细胞。

[0106] 在下面的实施例部分中提供了经改造的免疫细胞与其临幊效力之间的数学相关性的特别的实例。

[0107] 最后,如果如由公式_R(TB)+_R(TK) ≥ 1 所定义的,多个产物对于临幊使用是可用的,那么可以在转换为二进制输出之前使用原始数字数据_R(TB)和/或_R(TK)对产物进行评级。备选地,可以应用补充公式 $\alpha({}_R(TB)) + \beta({}_R(TK)) = \phi$ 。在该补充公式中,φ被定义为临幊效力变量(值越高,产物“越好”)。

$$[0108] \quad \alpha({}_R(TB)) + \beta({}_R(TK)) = \phi$$

[0109] - 其中_RTB被定义为得自 $[(Tbio-P)+1]/[(Tbio-U)+1]$ 的值,

[0110] - 其中_RTK被定义为得自 $[(%TSpec-P)/TCSpec]$ 的值,

[0111] - 其中α和β被定义为取决于变量(包括但不限于治疗性应用、制备过程、肽混合物、细胞系等)的加权系数,

[0112] - 其中φ被定义为临幊效力值,其可以用于确定在治疗性产物中的临幊效力的评级。

[0113] IV. 产生抗原特异性T细胞的方法

[0114] 在特别的实施方案中,本公开内容涉及靶向至少一种来自病原体(包括病毒、细菌或真菌)的抗原或其他疾病相关抗原(包括肿瘤抗原)的抗原特异性T细胞的开发。在本公开内容的某些方面,本公开内容涉及靶向来自例如至少一种病毒的抗原的抗原特异性T细胞的开发。

[0115] 在一个实施方案中,健康的供者提供样品,例如血液样品或leukopak的白细胞去除术产物。获得PBMC并将其暴露于整个病原体或者病原体的一个或多个部分。也可以将所述细胞暴露于一种或多种细胞因子。在培养中至少48小时后,将所述细胞分级分离入多个管中并用独个抗原进行再攻击。也可以将所述细胞暴露于一种或多种细胞因子。

[0116] 本公开内容的实施方案涉及具有针对一种或多种病原体或癌症抗原的特异性的抗原特异性T细胞的产生。在某些实施方案中,具有这样的特异性的抗原特异性T细胞的产生在制备此类细胞系中不使用树突细胞,尽管在备选的实施方案中,在标准方法中使用树突细胞。在一些情况下,将抗原以跨越了该抗原的一些部分或全部的一种或多种肽的形式呈递给PBMC。可以以肽混合物文库(其可以称为pepmix)将抗原性肽提供给PBMC。在本公开内容的其他方面,在制备抗原特异性T细胞中,本公开内容允许汇集各种pepmix。

[0117] 在本公开内容的一些实施方案中,在本文中所包括的抗原选择方法之后,存在用于产生靶向至少一种、两种或更多种来自一种、两种或更多种病毒的抗原的抗原特异性T细胞的方法,其包括下列步骤:使外周血单核细胞群组与至少两个肽文库相接触,所述肽文库每个包含相应于特定的病毒抗原的肽;和在一种或多种细胞因子存在下扩增所述细胞群组。在特别的实施方案中,所述方法在扩增抗原特异性T细胞之前,在没有将所述文库暴露于分离的经肽冲击的树突细胞的情况下发生。在某些实施方案中,所述一种或多种细胞因子选自由下列各项组成的组:IL4、IL7、IL12、IL21、IL15、IL6及其组合。在一些实施方案中,所述肽被进一步定义为依次重叠以跨越病毒抗原的部分或全部的肽。例如,在某些方面,所述肽重叠至少三个、四个、五个或六个氨基酸,和在一些实施方案中,所述肽的长度为至少六个、七个或八个或更多个氨基酸。

[0118] 在至少一些本公开内容的方法中,向个体例如免疫受损的个体施用由此产生的抗原特异性T细胞。在一些情况下,所述个体已具有同种异体干细胞移植植物。在特别的实施方案中,例如通过注射(例如静脉内、肌内、真皮内、皮下、腹膜内注射等)来施用所述细胞。在一些实施方案中,所述个体具有淋巴瘤或白血病。在一些实施方案中,所述抗原特异性T细胞被进一步定义为多克隆的CD4+和CD8+抗原特异性T细胞。所述PBMC可以是对于所述个体来说同种异体的,或者可以是对于所述个体来说自体的。

[0119] 在个体中的感染(或者其风险或易感性)可以来自任何类别的病原体,但在特别的实施方案中,所述感染是一种或多种病毒的结果。所述致病病毒可以是任何类别的,但在特别的实施方案中,它来自下列科之一:腺病毒科、小RNA病毒科、疱疹病毒科、嗜肝DNA病毒科、黄病毒科、逆转录病毒科、正粘病毒科、副粘病毒科、乳多空病毒科、多瘤病毒科、弹状病毒科、沙粒病毒科(Arenaviridae)、杯状病毒科(caliciviridae)、冠状病毒科(coronaviridae)、细小病毒科(parvoviridae)、呼肠孤病毒科(reoviridae)、痘病毒科(poxviridae)或披膜病毒科。在一些实施方案中,所述病毒产生免疫显性的或亚显性的抗原,或者产生这两种类别。在特别的情况下,所述病毒选自由下列各项组成的组:EBV、CMV、

腺病毒、BK病毒、HHV6、RSV、流感病毒、副流感病毒、博卡病毒、冠状病毒、LCMV、腮腺炎病毒、麻疹病毒、偏肺病毒、细小病毒B、轮状病毒、西尼罗病毒、西班牙流感病毒及其组合。

[0120] 在一些方面,所述感染是致病细菌的结果,并且本公开内容可应用于任何类型的致病细菌。示例性的致病细菌至少包括:例如,炭疽芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、汉氏巴尔通氏体、五日热巴尔通氏体、百日咳巴尔通氏体、布氏疏螺旋体、嘎氏疏螺旋体、阿氏疏螺旋体、回归热疏螺旋体、流产布鲁氏菌、狗布鲁氏菌、马尔他布鲁氏菌、猪布鲁氏菌、空肠弯曲杆菌、肺炎衣原体、砂眼衣原体、鹦鹉热嗜衣原体、肉毒梭菌、艰难梭菌、产气荚膜梭菌、破伤风梭菌、白喉棒杆菌、粪肠球菌、屎肠球菌、大肠杆菌、土拉热弗朗西丝氏菌、流感嗜血菌、幽门螺杆菌、嗜肺军团菌、问号钩端螺旋体、圣他罗西亚钩端螺旋体、韦氏钩端螺旋体、野口氏钩端螺旋体、单核细胞增生利斯特氏菌、麻风分枝杆菌、结核分枝杆菌、溃疡分枝杆菌、肺炎枝原体、淋病奈瑟氏球菌、脑膜炎奈瑟氏球菌、铜绿假单胞菌、立氏立克次氏体、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、索氏志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌、无乳链球菌、肺炎链球菌、酿脓链球菌、苍白密螺旋体、解脲尿枝原体、霍乱弧菌、鼠疫耶尔森氏菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌或假结核耶尔森氏菌。

[0121] 在一些方面,所述感染是致病真菌的结果,并且本公开内容可应用于任何类型的致病真菌。示例性的致病真菌至少包括:假丝酵母属 (*Candida*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、隐球酵母属 (*Cryptococcus*)、组织孢浆菌属 (*Histoplasma*)、肺囊虫 (*Pneumocystis*)、葡萄穗霉属 (*Stachybotrys*)、芽酵母属 (*Blastomyces*)、球孢子菌属 (*Coccidioides*)、枝孢属 (*Cladosporium*)、突脐蠕孢属 (*Exserohilum*)、马尔尼菲青霉 (*Penicillium marneffei*)、毛霉菌 (*mucormycetes*)、孢子丝菌属 (*Sporothrix*) 或癣 (*Tinea*)。

[0122] 在本公开内容的一些实施方案中,所述个体可以处于癌症的风险中或具有癌症,并且本公开内容可应用于任何类型的癌症。所述癌症可以是任何类别或起源的,但在特别的实施方案中,它是下列类型的:癌、肉瘤、白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、黑素瘤、脑和脊髓肿瘤、生殖细胞肿瘤、母细胞瘤、神经内分泌肿瘤、类癌肿瘤和良性肿瘤。在特别的情况下,所述癌症选自由下列各项组成的组:急性淋巴细胞白血病 (ALL)、急性粒细胞白血病 (AML)、肾上腺皮质癌、肾上腺皮质癌症、AIDS-相关癌症、卡波西肉瘤、AIDS-相关淋巴瘤、原发性CNS淋巴瘤、肛门癌症、阑尾癌症、星形细胞瘤、非典型畸胎样/棒状肿瘤、基底细胞癌、胆管癌症、膀胱癌症、骨癌症(包括尤因肉瘤和骨肉瘤和恶性纤维组织细胞瘤)、乳腺癌症、支气管肿瘤、伯基特淋巴瘤、胃肠道类癌肿瘤、类癌肿瘤、心(心脏)肿瘤、胚胎肿瘤、生殖细胞肿瘤、淋巴瘤、宫颈癌症、胆管癌、脊索瘤、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、慢性粒细胞白血病 (CML)、慢性骨髓增生性瘤、结肠直肠癌症、颅咽管瘤、皮肤T-细胞淋巴瘤、原位导管癌 (DCIS)、胚胎肿瘤、子宫内膜癌症、室管膜瘤、食管癌症、成感觉神经细胞瘤、颅外生殖细胞肿瘤、生殖腺外生殖细胞肿瘤、输卵管癌症、恶性骨纤维组织细胞瘤和骨肉瘤、胆囊癌症、胃部(胃)癌症、胃肠道类癌肿瘤、胃肠道基质肿瘤 (GIST)、颅外生殖细胞肿瘤、生殖腺外生殖细胞肿瘤、卵巢癌症、睾丸癌症、妊娠滋养层成瘤性疾病、神经胶质瘤、多毛细胞白血病、头与颈癌症、心脏肿瘤、肝细胞癌症、朗格汉斯细胞组织细胞增多病、霍奇金淋巴瘤、咽下部癌症、眼内黑素瘤、胰岛细胞肿瘤、胰腺神经内分泌肿瘤、胰腺癌症、卡波西肉瘤、喉癌症、喉乳头状瘤病、白血病、唇与口腔癌症、肝脏癌症、肺癌症、非霍奇金淋巴瘤、骨恶性纤维组织细胞瘤、骨肉瘤、黑素瘤、眼内黑素瘤、梅克尔细胞癌、皮肤癌症、间皮瘤、恶性间皮瘤、具有隐

匿原发灶的转移性鳞状细胞颈癌症、涉及NUT基因的中线道癌、嘴癌症、头与颈癌症、多发性内分泌腺瘤形成综合征、多发性骨髓瘤/浆细胞瘤、蕈样肉芽肿病、骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常性/骨髓增生性瘤、慢性骨髓增生性瘤、慢性粒细胞白血病(CML)、鼻腔与鼻旁窦癌症、鼻咽癌症、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌症、口癌症、唇与口腔癌症、口咽癌症、口腔癌症、骨肉瘤、胰腺癌症、乳头状瘤病、副神经节瘤、鼻旁窦与鼻腔癌症、甲状腺旁腺癌症、阴茎癌症、咽癌症、嗜铬细胞瘤、垂体肿瘤、浆细胞瘤/多发性骨髓瘤、胸膜肺母细胞瘤、原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤、腹膜癌症、前列腺癌症、直肠癌症、结肠直肠癌症、肾细胞(肾脏)癌症、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌症、唾液腺肿瘤、肉瘤、骨肉瘤、横纹肌肉瘤、子宫肉瘤、子宫癌症、血管肿瘤、塞泽里综合征、皮肤癌症、小细胞肺癌症、小肠癌症、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、鳞状细胞颈癌症、胃部(胃)癌症、皮肤T-细胞淋巴瘤、睾丸癌症、咽喉癌症、胸腺瘤、胸腺癌、甲状腺癌症、甲状腺肿瘤、肾盂和输尿管的移行细胞癌症、尿道癌症、子宫癌症、子宫内膜癌症、子宫肉瘤、阴道癌症、血管肿瘤、外阴癌症、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(非霍奇金淋巴瘤)和维尔姆斯肿瘤。

[0123] 在本公开内容的一些实施方案中,最后向PBMC提供肽文库以产生抗原特异性T细胞。在特别的情况下,所述文库包含跨越相同抗原的部分或全部的肽混合物(“pepmix”)。在某些方面,在本公开内容中所使用的pepmix可以来自商购可得的肽文库,例如其由长度为15个氨基酸并且相互重叠11个氨基酸的肽组成。在一些情况下,它们可以以商业方式获得和/或通过合成产生。例子包括来自JPT Technologies(Springfield,VA)或Miltenyi Biotec(Auburn,CA)的那些。在特别的实施方案中,所述肽的长度为例如至少7、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或35个或更多个氨基酸,并且在特别的实施方案中,存在长度为例如至少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、31、32、33或34个氨基酸的重叠。所述不同肽的混合物可以包括任何比例的不同肽,尽管在一些实施方案中每种特定肽以与另一种特定肽基本上相同的数目存在于混合物中。

[0124] 在特别的实施方案中,可以在单独的或补充有细胞因子的合适的培养基中培养与本公开内容相关的任何类别的细胞,并且可以在透气的培养装置(例如G-Rex10(Wilson Wolf Manufacturing Corporation,New Brighton,MN))、其他培养仪器、生物反应器或系统或者组织培养平板中培养它们。可以重新补足培养基和/或细胞因子,并且可以在一个合适的时间段后分开培养基。在特别的实施方案中,采用一种或多种特定细胞因子,包括例如IL7、IL4、IL15、IL12、IL21和/或IL2。

[0125] 制备T细胞的实施方案可以包括使外周血单核细胞群组与一个、两个或更多个肽文库相接触的步骤,其中所述肽文库每个包含相应于一种或多种特定抗原的肽;和在一种或多种细胞因子(任选地,IL4、IL15、IL21、IL12、IL6和/或IL7)存在下扩增所述细胞群组。

[0126] V. 本公开内容的试剂盒

[0127] 可以将在本文中所描述的任何组合物包含在试剂盒中。在一个非限制性的例子中,可以将细胞、细胞因子、样品提取器械、细胞培养基、细胞培养瓶、肽、蛋白质、病毒和/或其他试剂包含在试剂盒中。

[0128] 所述试剂盒可以包含适当地等分的、在本公开内容中所使用的组合物。所述试剂盒的组分可以要么在水性介质中要么以冻干形式进行包装。所述试剂盒的容器工具通常将

会包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶子、注射器或其他容器工具,向其中可以放置组分,并且优选地,适当地等分的。当在所述试剂盒中存在多于一种组分时,所述试剂盒通常还将会包含第二个、第三个或其他额外的容器,向其中可以分开地放置额外的组分。但是,可以在小瓶中包含组分的各种组合。本公开内容的试剂盒还将会典型地包括紧密密封地包含组合物以用于商业销售的工具。此类容器可以包括注射或吹制成型的塑料容器,在其中保持所希望的小瓶。在特别的实施方案中,所述试剂盒包含一种或多种用于获得血液细胞和/或骨髓细胞的工具。

[0129] 当在一种和/或多种液体溶液中提供所述试剂盒的组分时,所述液体溶液为水溶液,其中无菌水溶液是特别优选的。所述组合物也可以配制成可注射组合物。在该情况下,所述容器工具可以本身是注射器、移液管和/或其他诸如此类的器械,从其中可以将该制剂施加至身体的受感染区域,注射入动物中,和/或甚至施加至所述试剂盒的其他组分和/或与所述试剂盒的其他组分相混合。但是,所述试剂盒的组分可以作为经干燥的粉末来提供。当作为干粉末来提供试剂和/或组分时,可以通过添加合适的溶剂来对粉末进行重构。想象到,所述溶剂也可以提供在另一个容器工具中。

实施例

[0130] 在此所提供的实施例被包括用于证明本公开内容的特别的实施方案。本领域技术人员应当意识到,在下面的实施例中所公开的技术代表了被发明人发现在发明的实施中很好地起作用的技术,并因此可以被认为是对于其实施的优选模式。但是,按照本公开内容,本领域技术人员应当意识到可以在所公开的特别的实施方案中进行许多变化,并且仍然获得相像或相似的结果,而不背离本公开内容的精神和范围。

[0131] 实施例1

[0132] 免疫原性抗原鉴定和与临床效力的相关性

[0133] 在特别的实施方案中,本公开内容涉及用于鉴定来自病原体(病毒、细菌或真菌)和/或癌症的抗原的过程,所述抗原是免疫原性的并具有重要的治疗性应用。在某些方面,所述过程涉及将整个生物(例如病毒)的部分或全部划分为称为抗原的片段,并且建立显著的治疗性抗原靶标的等级。然后,可以将该信息用于选择在生物中的特别有用的片段或片段组合,以用于开发治疗,例如疫苗、过继细胞疗法或其任何组合。重要的是,该过程包括免疫原性抗原的鉴定,并因此不受限于单一HLA类型,不像以前的方法,其可以在表位/HLA-限制的水平上起作用。

[0134] 关于此的一个例子可以包括下面的情景,其中将病毒X划分为6个片段,或抗原,命名为A、B、C、D、E和F(图1)。然后,将病毒X的这些片段化组分用于实施从健康个体中分离的PBMC或T细胞的体外刺激(该刺激可以以汇集在一起的方式或独个地用这些片段来发生)。在该例子中,将从100(例如,最少5,没有最大)名健康的对于病毒X来说血清阳性的个体中获得的T细胞与独个的或汇集的片段化靶标一起,在Th1-极化细胞因子存在下在体外培养10天的时间段(例如,在6-14天的范围内)。在该初始的T细胞攻击后,提取T细胞并再次进行攻击,但是这次仅用独个的片段(抗原)。在该第二次攻击后,就其应答对T细胞进行评估。一种用于评估T细胞应答的方法是评价IFN γ 产生,尽管已知并且可以使用其他用于评价T细胞应答的方法。在该例子中,使用IFN γ ELIspot来评估IFN γ 产生。然后,可以对该信息进行

加工,以确定应答者对无应答者的阈值以及应答的大小程度。对于每种所测量的生物学活性,关于不同的病原体(包括病毒)和癌症的活性阈值(其可以被称为基准)可以是或不可以是相同的值。例如,不同的病毒可以采用用于测量IFN γ 产生的阈值,如20个SFC/ 2×10^5 。作为另一个例子,不同的病毒可以采用用于测量粒酶B的阈值,如10个SFC/ 2×10^5 。

[0135] 通过使用该技术,应答者的阈值被测定为高于30个SFC/ 2×10^5 个输入T细胞的值。关于生物学活性的应答阈值可以为(或者可以为至少或不大于)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、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、700、725、750、775、800、825、850、875、900、925、950、975、1000、1250、1500、1750、2000、2250、2500、3000、3500、4000、4500或更大的SFC/ 2×10^5 。

[0136] 在图1中所图解说明的这些结果的一个例子如下:

[0137] 抗原A被80%的供者($n=80$)所识别,具有500个SFC/ 2×10^5 个输入T细胞的平均值;

[0138] 抗原B被70%的供者($n=70$)所识别,具有200个SFC/ 2×10^5 个输入T细胞的平均值;

[0139] 抗原C被30%的供者($n=30$)所识别,具有100个SFC/ 2×10^5 个输入T细胞的平均值;

[0140] 抗原D被90%的供者($n=90$)所识别,具有450个SFC/ 2×10^5 个输入T细胞的平均值;

[0141] 抗原E被80%的供者($n=80$)所识别,具有1000个SFC/ 2×10^5 个输入T细胞的平均值;

[0142] 抗原F被30%的供者($n=30$)所识别,具有50个SFC/ 2×10^5 个输入T细胞的平均值。

[0143] 为了接下来定义免疫显性分级体系,发明人开发了TC(T细胞)-测试,其考虑了应答性供者的频率和反应性T细胞的数目这两者。所述公式如下:

(应答者的% + 1) x 应答的大小程度 (SFC/2 × 10⁵)

[0144] **(无应答者的% + 1)**。

[0145] 因此,可以将TC-得分施加给靶抗原中的每一个,如在图2中所显示的。通过使用该公式,例如,抗原A被施加了1928.5的得分,抗原B被施加了458.1的得分,抗原C被施加了43.6的得分,抗原D被施加了3722.7的得分,抗原E被施加了3857.1的得分,和抗原F被施加了21.8的得分。因此,可以将所述抗原组织成下面的免疫显性分级体系:

[0146] E>D>A>B>C>F。

[0147] 因此,为了向被病毒X感染的患者提供保护性免疫力,下面呈现了所希望的靶标或靶标组合的鉴定(图3、4和5):

[0148] (a) 最具免疫显性的靶抗原(抗原E)

[0149] (b) 两个最具免疫显性的靶标的组合(E+D)

[0150] (c) 三个最具免疫显性的靶标的组合 (E+D+A)

[0151] (d) 四个最具免疫显性的靶标的组合 (E+D+A+B)

[0152] (e) 五个最具免疫显性的靶标的组合 (E+D+A+B+C)

[0153] (f) 六个最具免疫显性的靶标的组合 (E+D+A+B+C+F)。

[0154] 重要的是注意,上面所描述的方法可以应用于除病毒以外的其他病原体,包括但不限于细菌、寄生虫和真菌,以及肿瘤。

[0155] 因此,上面所描述的过程的第二个例子可以包括下面的情景,其中将细菌Y划分为8个片段,或抗原,命名为A、B、C、D、E、F、G和H。通过使用上面所描述的过程,在图6中所图解说明的关于细菌Y的结果的一个例子如下:

[0156] 抗原A被90%的供者 (n=90) 所识别,具有 $20\text{SFC}/2 \times 10^5$ 个输入T细胞的平均值;

[0157] 抗原B被50%的供者 (n=50) 所识别,具有 $800\text{SFC}/2 \times 10^5$ 个输入T细胞的平均值;

[0158] 抗原C被70%的供者 (n=70) 所识别,具有 $1000\text{SFC}/2 \times 10^5$ 个输入T细胞的平均值;

[0159] 抗原D被30%的供者 (n=30) 所识别,具有 $300\text{SFC}/2 \times 10^5$ 个输入T细胞的平均值;

[0160] 抗原E被20%的供者 (n=20) 所识别,具有 $150\text{SFC}/2 \times 10^5$ 个输入T细胞的平均值;

[0161] 抗原F被60%的供者 (n=60) 所识别,具有 $600\text{SFC}/2 \times 10^5$ 个输入T细胞的平均值;

[0162] 抗原G被40%的供者 (n=40) 所识别,具有 $450\text{SFC}/2 \times 10^5$ 个输入T细胞的平均值;

[0163] 抗原H被80%的供者 (n=80) 所识别,具有 $50\text{SFC}/2 \times 10^5$ 个输入T细胞的平均值。

[0164] 通过使用TC-测试来确定免疫显性分级体系,并将TC-得分施加给细菌Y靶抗原中的每一个,如在图7中所图解说明的。例如,抗原A被施加了167.45的得分,抗原B被施加了800的得分,抗原C被施加了2290.32的得分,抗原D被施加了130.99的得分,抗原E被施加了38.89的得分,抗原F被施加了892.68的得分,抗原G被施加了302.46的得分,和抗原H被施加了192.86的得分。因此,可以将所述抗原组织成下面的分级体系:

[0165] C>F>B>G>H>A>D>E。

[0166] 因此,为了向被细菌Y感染的患者提供保护性免疫力,下面呈现了所希望的靶标或靶标组合的鉴定(图8、9和10):

[0167] (a) 最具免疫显性的靶抗原 (抗原C)

[0168] (b) 两个最具免疫显性的靶标的组合 (C+F)

[0169] (c) 三个最具免疫显性的靶标的组合 (C+F+B)

[0170] (d) 四个最具免疫显性的靶标的组合 (C+F+B+G)

[0171] (e) 五个最具免疫显性的靶标的组合 (C+F+B+G+H)

[0172] (f) 六个最具免疫显性的靶标的组合 (C+F+B+G+H+A)

[0173] (g) 六个最具免疫显性的靶标的组合 (C+F+B+G+H+A)

[0174] (h) 七个最具免疫显性的靶标的组合 (C+F+B+G+H+A+D)

[0175] (i) 七个最具免疫显性的靶标的组合 (C+F+B+G+H+A+D+E)。

[0176] 鉴定免疫显性抗原分级体系的第三个例子可以包括下面的情景,其中将肿瘤Z划分为4个片段,或抗原,命名为A、B、C、D、E(图11)。

[0177] 在该例子中,将从100名具有肿瘤Z的个体中获得的T细胞与独个的或汇集的片段化靶标一起,在Th1-极化细胞因子存在下在体外培养10天的时间段。在该初始的T细胞攻击后,提取T细胞并再次进行攻击,但是这次仅用抗原。在该第二次攻击后,使用IFN γ ELIspot来评估IFN γ 产生。

[0178] 应答者的阈值被测定为高于20个SFC/ 2×10^5 个输入T细胞的值。但是,关于生物学活性的应答阈值可以为(或者可以为至少或不大于)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、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、700、725、750、775、800、825、850、875、900、925、950、975、1000、1250、1500、1750、2000、2250、2500、3000、3500、4000、4500或更大的SFC/ 2×10^5 。

[0179] 这些结果的一个例子如下:

[0180] 抗原A被95%的供者(n=95)所识别,具有225个SFC/ 2×10^5 个输入T细胞的平均值;

[0181] 抗原B被70%的供者(n=70)所识别,具有700个SFC/ 2×10^5 个输入T细胞的平均值;

[0182] 抗原C被10%的供者(n=10)所识别,具有50个SFC/ 2×10^5 个输入T细胞的平均值;

[0183] 抗原D被20%的供者(n=20)所识别,具有300个SFC/ 2×10^5 个输入T细胞的平均值;

[0184] 抗原E被75%的供者(n=75)所识别,具有655个SFC/ 2×10^5 个输入T细胞的平均值。

[0185] 通过使用TC-测试来确定应答分级体系,并将TC-得分施加给靶抗原中的每一个,如在图11中所显示的。例如,抗原A被分配了3600的得分;抗原B被分配了1603.23的得分;抗原C被施加了6.04的得分;抗原D被分配了130.99;和抗原E被分配了38.89的得分。因此,可以将所述抗原组织成下面的分级体系(图12):

[0186] A>E>B>D>C。

[0187] 因此,为了向具有肿瘤Z的患者提供保护性免疫力,下面呈现了所希望的靶标或靶标组合的鉴定(图13、14和15):

[0188] (a) 最具免疫显性的靶抗原(抗原A)

[0189] (b) 两个最具免疫显性的靶标的组合(A+E)

[0190] (c) 三个最具免疫显性的靶标的组合(A+E+B)

[0191] (d) 四个最具免疫显性的靶标的组合(A+E+B+D)

[0192] (e) 五个最具免疫显性的靶标的组合(A+E+B+D+C)。

[0193] 实施例2

[0194] 鉴定关于HMPV的免疫显性分级体系

[0195] 人偏肺病毒(HMPV)是在婴儿、老年人和免疫受损的个体中的急性呼吸系统疾病的重要致病因子(Wen SC&Williams JV Clin.Vaccine Immunol.2015)。

[0196] 病毒学

[0197] HMPV是副粘病毒科中的肺病毒亚科(Pneumovirinae)偏肺病毒属(Metapneumovirus)的有包膜负义单链RNA病毒。HMPV基因组以3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5'这一顺序包含8个基因,其编码9种蛋白质(图16)。

[0198] 在病毒粒子表面上存在三种跨膜糖蛋白:小疏水(SH)蛋白,高度糖基化的推测的附着蛋白(G),和融合(F)糖蛋白,其介导病毒融合和进入。虽然SH蛋白的功能还不清楚,但是数项研究暗示了该蛋白质在抑制先天和适应性免疫应答中的作用。基质蛋白(M)在病毒膜下方覆盖病毒粒子的里层,并且与RSV M蛋白类似地,在病毒装配和出芽中发挥作用。RNA基因组被核蛋白(N)完全包壳从而形成核壳体(有时称为核糖核蛋白复合物)。N蛋白、磷蛋白(P)、M2-1蛋白和大RNA依赖性RNA聚合酶蛋白(L)与RNA基因组相联合,从而形成病毒RNA聚合酶复合物。第二个M(M2)基因编码两种蛋白质:M2-1,其促进RSV中的转录持续合成能力,并且对于全长mRNA的合成来说是必不可少的;和M2-2,其平衡转录和基因组复制(Wen SC和Williams JV Clin.Vaccine Immunol.2015)。

[0199] 传播

[0200] HMPV被认为是通过与受污染的分泌物(其可以包括唾液、飞沫或大颗粒气溶胶)的直接或密切接触来传播的。HMPV RNA在症状开始后五天至两周在排泄物中被发现。但是,接触传染性程度是未知的,因为在来自感染恢复的患者的呼吸系统样品中的HMPV RNA的检测本身并不表明活的接触传染性病毒颗粒(Haas LE等人,Viruses 2013)。

[0201] 流行病学和临床特征

[0202] HMPV通常在儿科群体中被发现,其中在小于2岁的儿童中具有高的易感率(Panda S等人,Int.J.Infect.Dis.2014)。在对于在25年时间段期间从表现有急性呼吸系统疾病的在其他方面健康的儿童中获得的鼻洗涤样本进行的一项回顾性研究中,20%的鼻洗涤样本包含HMPV RNA或活病毒(在培养中恢复的)。被HMPV感染的儿童的平均年龄为11.6个月,并且大多数疾病在晚冬/早春发生(Wen SC&Williams JV Clin.Vaccine Immunol.2015)。

[0203] 在成人中HMPV感染的比例在3%-7.1%之间变化。这在住院的成人中更高(在4.3%-13.2%的范围内变动)(Haas LE等人,Viruses 2013)。在成人中的HMPV感染通常仅显示轻微的流感样症状。然而,在一些成人病例(尤其是老年成人)中,可以出现严重的并发症例如慢性阻塞性肺疾病(COPD)。相比于儿童而言,在成人中更可能出现呼吸困难。在数名免疫受损的患者(例如,肺移植受者、具有血液恶性肿瘤的患者和造血干细胞移植受者)中也已报道了HMPV感染(Panda S等人,Int.J.Infect.Dis.2014)。这些患者中的临床过程被延长,并且可能发展出呼吸衰竭(Haas LE等人,Viruses 2013)。

[0204] 预防和治疗

[0205] 虽然目前还不存在有被许可在人中使用的HMPV疫苗,但是已在动物模型中研究了各种策略,包括使用灭活病毒、亚单位蛋白、病毒样颗粒、活的减毒病毒和嵌合病毒。

[0206] 已开发出了数种单克隆抗体以靶向HMPV融合蛋白。两种鼠类MAb(MAb 234和MAb 338)展示出与F蛋白的高亲和力结合,并且当在动物模型中预防性或治疗性地施用时是有效的。类似地,人单克隆抗体MPE8和54G10在小鼠模型中展示出针对HMPV的预防性和治疗性

效力。

[0207] 对于人中的HMPV感染的治疗主要是支持性的。利巴韦林(一种核苷类似物)显示出在体外和在BALB/c小鼠中都具有针对HMPV的效力。然而,利巴韦林是昂贵的,可以引起不利效应(例如溶血性贫血),并且是一种潜在的致畸剂。此外,还没有进行过受控试验以研究其在治疗HMPV感染中的效力,尽管存在有许多无对照的报道。已向具有严重HMPV感染的患者施用了利巴韦林,在一些情况下与静脉内免疫球蛋白(IVIg)一起。IVIg在体外具有针对HMPV的抗病毒活性,尽管它需要大的流体体积的输注,并且与在具有先天性心脏疾病的儿童中的不利事件相关联(Wen SC&Williams JV Clin.Vaccine Immunol.2015)。

[0208] 免疫应答和保护作用的相关方

[0209] 适应性免疫应答(体液和细胞免疫)是针对HMPV的保护性免疫力的最重要的方面。的确,动物研究显示,抗体的被动转移足以保护免于HMPV复制。T细胞对于病毒清除来说也是重要的。在BALB/c小鼠中,CD4+和CD8+T细胞这两者的耗竭在HMPV攻击后导致更高的病毒滴度(Wen SC&Williams JV Clin.Vaccine Immunol.2015)。另外,具有先前的HMPV呼吸系统疾病的人患者显示出具有对于HMPV蛋白质的CD8+T细胞应答(Wen SC&Williams JV Clin.Vaccine Immunol.2015)。因此,评估HMPV的免疫显性分级体系对于开发新的治疗策略来说是必需的。

[0210] 建立关于hMPV的免疫显性分级体系

[0211] 通过应用在实施例1中所描述的过程和TC-测试,下面呈现了关于hMPV的T细胞应答的新的表征:

[0212] 将hMPV划分为下列片段:SH、M、L、G、F、M2-2、P、M2-1和N。应答者的百分比对于SH来说为3.4%,对于M来说为79.3%,对于L来说为44.8%,对于G来说为31%,对于F来说为96.5%,对于M2-2来说为0%,对于P来说为68.9%,对于M2-1来说为79.3%,和对于N来说为86.2%;并且应答的大小程度对于SH来说为34,对于M来说为154,对于L来说为125,对于G来说为62,对于F来说为300,对于M2-2来说为0,对于P来说为130,对于M2-1来说为167,和对于N来说为220。通过应用TC-测试,我们鉴定出,TC-得分对于SH来说为1.53,对于M来说为569.87,对于L来说为101.87,对于G来说为28.34,对于F来说为6500,对于M2-2来说为0,对于P来说为283.08,对于M2-1来说为617.97,和对于N来说为1178.38(图17-18)。通过应用TC-得分,发明人如下对不同的hMPV抗原进行了评级(图19):

[0213] F>N>M2-1>M>P>L>G>SH>M2-2。

[0214] 因此,为了向被HMPV感染的患者提供保护性免疫力,下面呈现了所希望的靶标或靶标组合的鉴定(图19):

[0215] (a) 最具免疫显性的靶抗原(抗原F)

[0216] (b) 两个最具免疫显性的靶标的组合(F+N)

[0217] (c) 三个最具免疫显性的靶标的组合(F+N+M2-1)

[0218] (d) 四个最具免疫显性的靶标的组合(F+N+M2-1+M)

[0219] (e) 五个最具免疫显性的靶标的组合(F+N+M2-1+M+P)

[0220] (f) 六个最具免疫显性的靶标的组合(F+N+M2-1+M+P+L)

[0221] (g) 七个最具免疫显性的靶标的组合(F+N+M2-1+M+P+L+G)

[0222] (h) 八个最具免疫显性的靶标的组合(F+N+M2-1+M+P+L+G+SH)

[0223] (i) 九个最具免疫显性的靶标的组合 (F+N+M2-1+M+P+L+G+SH+M2-2)。

[0224] 实施例3

[0225] 鉴定关于PIV3的免疫显性分级体系

[0226] 人副流感病毒3型 (PIV3) 是呼吸道病原体,并且是在婴儿和非常年幼的儿童中的细支气管炎和肺炎的主要原因 (Zvirbliene A等人, *Viral Immunology* 2009)。除了年幼的儿童外,PIV3还对老年人和免疫受损的成人造成威胁。PIV3感染还在接受了造血干细胞移植 (HSCT) 的患者中引起导致死亡 (35% - 75%) 的严重疾病 (Nichols WG等人, *Blood* 2001; Maziarz RT等人, *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; Sasaki M等人, *Emerging Infect. Dis.* 2013)。

[0227] 病毒学

[0228] PIV3是副粘病毒科呼吸道病毒属 (Respirovirus) 的代表。它是包含具有负极性的单链RNA基因组的有包膜RNA病毒。PIV3基因组包含大约15,500个核苷酸,其被组织成以不变的顺序N-P-M-F-HN-L编码至少六种结构蛋白质 (图20)。

[0229] 通过在病毒粒子包膜上的血凝素-神经氨酸酶 (HN) 糖蛋白与在细胞膜蛋白质上的唾液酸的结合而发动了PIV3对宿主细胞的感染。然后,融合 (F) 蛋白介导了病毒包膜与宿主细胞质膜之间的融合。这释放出病毒核壳体,其由被核蛋白 (N) 紧紧结合并与磷蛋白 (P) 和大RNA依赖性RNA聚合酶 (L) 蛋白相关联的病毒基因组组成。核壳体结合的聚合酶指导将病毒基因拷贝成分开的mRNA转录物,并且还指导RNA基因组的复制。子代核壳体进行装配,并被包装入从质膜出芽的病毒粒子中。基质 (M) 蛋白包覆包膜的内表面,并且刺突样糖蛋白F和HN从包膜的外表面凸出 (Schmidt AC等人, *Expert Rev Respir. Med.* 2012)。

[0230] 传播

[0231] 病毒传播通过来自手的接触传染性分泌物或大颗粒气溶胶直接接种入眼睛、鼻子或罕见地嘴中而发生 (Maziarz RT等人, *Biol Blood Marrow Transplant* 2010)。PIV3的复制在覆盖呼吸道里层的表面上皮细胞中发生。感染典型地在鼻子和咽喉的粘膜中开始,但是感染性病毒也可以直接传播至下呼吸道 (LRT) (Schmidt AC等人, *Expert Rev Respir. Med.* 2012)。

[0232] 流行病学和临床特征

[0233] 在美国每年大约18,000名婴儿和儿童因为由PIV3引起的下呼吸道感染 (LRTI) 而住院。细支气管炎和肺炎是最常见的临床表现 (Henrickson KJ *Clin. Microbiology Rev.* 2003)。除了年幼的儿童外,PIV3在免疫受损的儿童和成人 (例如移植受者) 中也是高度成问题的。例如,5-7%的成年HSCT受者被PIV3感染;其中的大约24-50%发展出严重的LRTI,例如肺炎,并且这些患者中的22-75%死于呼吸衰竭 (Henrickson KJ *Clin. Microbiology Rev.* 2003)。一项回顾性研究发现,25%的具有PIV3感染的儿科HSCT患者发展出肺炎并且33%死于该病 (Lujan-Zilberman J等人, *Clin Infect. Dis.* 2001)。类似地,PIV3已显示出在移植后直至5年在肺移植受者中引起严重的LRTI和死亡 (8%) (Vilchez RA.等人, *Clin Infect. Dis.* 2001)。

[0234] 预防和治疗

[0235] 关于PIV3疫苗的目前方法包括鼻内施用活的减毒毒株、使用HN和F蛋白的亚单位策略、重组牛/人病毒和使用反求遗传学进行改造的毒株。事实上,两种研究性的疫苗

(rhPIV3cp45(或MEDI-560),其是通过低温传代而开发出的PIV3的减毒毒株;和B/hPIV3-RSV-F(或MEDI-534),其是cDNA-衍生的嵌合牛/人PIV3)目前正在I期临床试验中进行测试。安全性和免疫原性数据的分析还悬而未决(Schmidt AC等人,Expert Rev Respir. Med. 2012)。

[0236] 被发现具有针对副粘病毒(包括PIV3)的体外抗病毒活性的试剂包括神经氨酸酶抑制剂(例如,扎那米韦)、蛋白质合成抑制剂(嘌呤霉素)、核酸合成抑制剂、苯并噻唑衍生物、1,3,4-噻二唑-2-基氨基、碳环3-脱氮腺苷、抗坏血酸、橄榄酸钙(calcium elenolate)和欧洲变豆菜(Sanicula europaea)提取物。至今,这些化合物或药物中没有一个找到临床应用(Henrickson KJ Clin. Microbiology Rev. 2003)。

[0237] 利巴韦林是用于终止病毒RNA合成和病毒mRNA加帽的鸟苷类似物。已在用气溶胶化的和口服的利巴韦林进行治疗的免疫受损的患者中报道了降低的PIV3脱落和临床改善的无对照的报道。然而,Fred Hutchinson癌症中心(Fred Hutchinson Cancer Center)的一篇最近的综述证明,已建立的PIV3肺炎对于气溶胶化的利巴韦林应答欠佳(Nicholas WG等人,Biol. Blood Marrow Transpl. 2001)。目前还不存在具有经证实的针对PIV3的临床效力的抗病毒药物(Henrickson KJ Clin. Microbiology Rev. 2003)。

[0238] 免疫应答和保护作用的相关方

[0239] PIV3感染可以在被感染的宿主中诱导强有力的体液和细胞免疫应答。血清和粘膜中和抗体这两者都可以提供针对疾病的持久保护(Schmidt AC等人,Expert Rev Respir. Med. 2012)。类似地,细胞毒性T-淋巴细胞应答看起来在被PIV3感染期间在从LRT中清除病毒之中是重要的(Henrickson KJ Clin. Microbiology Rev. 2003)。因此,评估PIV3的免疫显性分级体系对于开发新的治疗策略来说是必需的。

[0240] 建立关于PIV3的免疫显性分级体系

[0241] 通过应用在实施例1中所描述的过程和TC-测试,下面呈现了关于PIV3的T细胞应答的新的表征:

[0242] 将PIV3划分为下列片段:HN、蛋白C、PP、Large、M、N和Fusion。应答者的百分比对于HN来说为88.2%,对于蛋白C来说为47%,对于PP来说为47%,对于Large来说为47%,对于M来说为94.1%,对于N来说为64.7%,和对于Fusion来说为47%;并且应答的大小程度对于HN来说为131,对于蛋白C来说为214.6,对于PP来说为203.7,对于Large来说为115.8,对于M来说为261.2,对于N来说为160,和对于Fusion来说为175.7。通过应用TC-测试,我们鉴定出,TC-得分对于HN来说为912.91,对于蛋白C来说为190.76,对于PP来说为181.07,对于Large来说为102.93,对于M来说为3600,对于N来说为289.59,和对于Fusion来说为156.18(图21和22)。通过应用TC-得分,发明人如下对不同的PIV3抗原进行了评级(图23):

[0243] M>HN>Large>N>蛋白C>PP>Fusion>Large。

[0244] 因此,为了向被PIV3感染的患者提供保护性免疫力,下面呈现了所希望的靶标或靶标组合的鉴定(图13):

[0245] (a) 最具免疫显性的靶抗原(抗原M)

[0246] (b) 两个最具免疫显性的靶标的组合(M+HN)

[0247] (c) 三个最具免疫显性的靶标的组合(M+HN+N)

[0248] (d) 四个最具免疫显性的靶标的组合(M+HN+N+蛋白C)

- [0249] (e) 五个最具免疫显性的靶标的组合 (M+HN+N+蛋白C+PP)
- [0250] (f) 六个最具免疫显性的靶标的组合 (M+HN+N+蛋白C+PP+Fusion)
- [0251] (g) 七个最具免疫显性的靶标的组合 (M+HN+Large+N+蛋白C+PP+Fusion+Large)。

[0252] 实施例4

[0253] 应答者的百分比的鉴定

[0254] 如在图18和22中所显示的,和作为一个例子,IFN γ 产生的阈值可以用于鉴定关键的T细胞活性水平,其可以用于确定应答者对无应答者。但是,本领域技术人员将会认识到,该阈值不是IFN γ 产生专有的,并且可以被在识别相关靶标后由T细胞所产生的(如由细胞分泌的并从细胞培养物的上清液中测量的)或表达的(如固定在细胞膜上的不可溶性标志物)任何其他生物学标志物(包括但不限于例如IL2、粒酶B、CD25、GM-CSF和TNFa)所替换。所有此类标志物都可以用于通过首先鉴定非特异性应答的阈值来确定应答者对无应答者。非特异性应答的水平可以通过针对无关抗原(例如,未在初始T细胞刺激中使用的抗原)所检测的生物学活性的大小程度来鉴定。例如,当分析对于编码5种抗原(A、B、C、D、E)的病毒的免疫应答时,无关抗原将会是来自不同病毒的抗原F或者针对未操作的PBMC。在特别的实施方案中,这已被测定为20个SFC/ 2×10^5 (对于IFN γ) 和10个SFC/ 2×10^5 (对于粒酶B)。图24显示了一个例子,其中将粒酶B用于测定应答者对无应答者的百分比以用于表征针对病原体的免疫应答。

[0255] 实施例5

[0256] TC-得分鉴定临幊上相关的靶标

[0257] 为了证实通过TC-得分建立的分级体系的临幊相关性,发明人在具有主动感染的患者中分析了针对PIV3的免疫T细胞应答。如在图25中所显示的,靶向抗原M和N的PIV3-特异性T细胞的频率在第155天和第162天之间展示出特别的富集,这与随后的临幊症状的改善相关联,其在到第167天时减退。PIV3T细胞用于控制病毒感染的临幊相关性的另一个例子显示在图26中,其中PIV3-特异性T细胞的频率的增加与在骨髓移植(BMT)后具有主动感染的单个代表性患者中存在的感染症状和通过PCR的病毒检测具有逆相关。

[0258] 图27图解说明了针对不同hMPV抗原的免疫T细胞应答的临幊相关性。该图显示了在具有主动HMPV感染的单个代表性患者中检测到的针对蛋白F、N、M、M2-1和P具有反应性的T细胞的频率,所述感染的症状于在外周血中检测到这些T细胞之后消退。

[0259] 使用T-细胞靶向评级最高的抗原

[0260] 图28、29和30图解说明了该评级的治疗性应用,其中将给定病原体或癌症的顶级靶标鉴定为抗原来源。然后,用此的培养条件将会导致随后的特异于给定靶标的T细胞的富集。

[0261] 用于治疗使用的PIV3-特异性T细胞的产生

[0262] 将从健康的PIV3-血清阳性的个体中分离的PBMC与叠盖住完整的蛋白M和HN的肽一起在Th1-极化细胞因子存在下培养10天的时间段。图31显示了T细胞产物的表型特征,和图32显示了通过关于抗原M和HN的细胞内细胞因子染色所检测出的CD4+和CD8+的抗原特异性。

[0263] 用于治疗使用的hMPV-特异性T细胞的产生

[0264] 使用G-Rex培养系统(或任何其他细胞培养平台、生物反应器或组织培养平板),将

从健康的hMPV-血清阳性的个体中分离的PBMC与叠盖住完整蛋白质的肽一起在Th1-极化细胞因子存在下培养10天的时间段,如在图33中所图解说明的。该过程导致T细胞的显著扩增,如在图34中所图解说明的。在检查后,这些经扩增的细胞是多克隆的(图35),并且被发现是抗原特异性的,如通过关于相关抗原的细胞内细胞因子染色所检测出的(图37)。为了评价该经扩增的T细胞产物的抗病毒特性,将HLA匹配的靶细胞用HMPV肽进行冲击并用PKH染料进行标记,并且以1:1的比例与HMPV-特异性T细胞一起进行培养。如在图36中所显示的,与病毒特异性T细胞一起进行的培养导致HMPV靶细胞的逐步下降,在培养的第0、2和4天后从35.5%至18.7%至6.4%。因此,随着时间推移,存在被感染的细胞的杀伤。

[0265] 实施例6

[0266] 关于产物的临床效力的鉴定

[0267] 产物组成

[0268] 在某些实施方案中,发明人已鉴定了与临床效力相关的最终产物的生物学特征的例子。

[0269] 在特别的实施方案中,下面的关于如何鉴定产物是否将会在患者中具有临床效力的描述与在本文中的涉及确定关于病原体的抗原的免疫原性分级体系的其他实施方案不相关。即,具有某些抗原的T细胞可以经历下面的表征方法,不管其各自抗原是基于免疫原性分级体系而选择的还是基于其他抗原选择方法的,还是随机的。

[0270] 病毒特异性T细胞的表征

[0271] 身份:在一些情况下,细胞的身份可以通过HLA分型来确定。在至少一些情况下,最终产物包含来自供者的细胞。因此,在某些实施方案中,最终产物的HLA类型应当与供者血液的相同。

[0272] 表型分析:最佳的体外T细胞持久性和活性需要辅助性T细胞(CD4+)和细胞毒性T细胞(CD8+)这两者。因此,表型分析可以用于确定产物是否由多克隆T细胞构成。

[0273] 特异性:产物的抗病毒特异性可以在体外通过将经扩增的细胞暴露于独个合成肽文库中的每一个并评估其识别合成肽文库中的每一个的能力来进行评估。例如,一种用于评估产物特异性的方法涉及通过使用IFN γ ELIspot测试来测试这些细胞在合成肽暴露后产生细胞因子干扰素 γ (IFN γ)的能力。在该测试中,将细胞再次暴露于用于刺激的病毒抗原中的每一种。当针对来自靶病毒的所有抗原的产生IFN γ 的斑点形成细胞(SFC)的总和 \geq 20个SFC/ 2×10^5 个输入细胞(作为活性阈值的一个例子)时,产物被认为对于病毒X来说是特异性的。

[0274] 细胞毒性:可以在标准的杀伤测定法中测量产物的细胞毒性特异性,其中细胞用作效应子并且靶标为例如用相关pepmix进行冲击的经铬标记的PHA母细胞。效应子与靶标的比例可以为(或者可以为至少或不大于)5:1、10:1、15:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、45:1、50:1、55:1、60:1、65:1、70:1、75:1、80:1、85:1、90:1、95:1等。自体或同种异体PHA母细胞(单独的或负载有无关pepmix的)可以用作特异性和同种异体反应性对照。例如,在至少某些情况下,如果在40:1的效应子与靶标的比例下用相关pepmix进行冲击的PHA母细胞的特异性裂解的百分比 \geq 10%,那么产物被认为显示出针对病毒X的细胞毒性特异性。当在基线水平(其通过使用未操作的PBMC作为效应子或者评估针对用无关抗原进行冲击的靶细胞的T细胞产物的活性来建立)之上时,在给定的效应子与靶标的比例下的靶细胞杀伤被认

为是抗原特异性的。

[0275] 下面呈现了允许本领域技术人员鉴定产物组成的数学表示。

[0276] 产物定义

[0277] 产物被定义为从体外培养物中分离的T细胞,其特征在于:

[0278] $(\text{R}_{\text{TB}}) + (\text{R}_{\text{TK}}) \geq 1$

[0279] -其中_RTB被定义为 $[(\text{Tbio-P})+1]/[(\text{Tbio-U})+1]$,其当 ≥ 1 时,将会等价于1的_RTB值,和当<1时,将会相应于0的_RTB值;和

[0280] -_RTK被定义为 $[(\% \text{TSpec-P})/\text{TCspec}]$,其当 ≥ 1 时,将会等价于1的_RTK值,和当<1时,将会相应于0的_RTK值(参见图38)。

[0281] Tbio-P被定义为体外T细胞产物的生物学活性,和Tbio-U为噪声阈值的生物学活性,其如先前所描述的,可以是当在目的抗原存在下时未操作的PBMC的生物学活性,或者当在不感兴趣的无关抗原存在下时体外T细胞产物的生物学活性。这样的生物学活性可以包括但不限于,例如IFN γ 、IL2、GM-CSF和TNF α 产生,和标志物例如CD25、CD45、CD27、CD28、CD69和CD107的上调。

[0282] TSpec-P,或体外T细胞产物的特异性杀伤能力,被定义为在减去在预先规定的效应子与靶标的比例下由未操作的PBMC非特异性地杀伤表达无关肽(即在目的病原体或肿瘤内不存在的抗原或标志物)的靶细胞的百分比后,在预先规定的效应子与靶标的比例(例如,40:1的效应子与靶标的比例)下经裂解的表达同族抗原的HLA-匹配的靶细胞的百分比。

[0283] 倘若多个产物对于临床施用是可用的,那么可以将补充公式 $[\alpha(\text{RTB}) + \beta(\text{RTK}) = \phi]$ 应用于按优先顺序对产物进行评级。

[0284] $\alpha(\text{RTB}) + \beta(\text{RTK}) = \phi$

[0285] 其中_RTB被定义为得自 $[(\text{Tbio-P})+1]/[(\text{Tbio-U})+1]$ 的值,

[0286] 其中_RTK被定义为得自 $[(\% \text{TSpec-P})/\text{TCspec}]$ 的值,

[0287] 其中 α 和 β 被定义为取决于变量(包括但不限于治疗性应用、制备过程、肽混合物、细胞系等)的加权系数,

[0288] 其中 ϕ 被定义为临床效力值,其可以用于确定在治疗性产物中的临床效力的评级。

[0289] 实施例1是在产物中存在的生物学特征的一个实例。

[0290] Tbio-P=200个SFC/ 2×10^5 IFN γ

[0291] Tbio-U=50个SFC/ 2×10^5 IFN γ

[0292] TSpec-P=40%

[0293] TCspec=10%

[0294] $\alpha=1$

[0295] $\beta=5$

[0296] $\text{R}_{\text{TB}} = [(\text{Tbio-P})+1]/[(\text{Tbio-U})+1]$

[0297] $\text{R}_{\text{TB}} = [(200)+1]/[(50)+1] = 3.94$

[0298] 因此,

[0299] $\text{R}_{\text{TB}} = 1$

[0300] $\text{R}_{\text{TK}} = [(\text{TSpec-P}) / (\text{TCspec})]$

[0301] $R_{TK} = [(40\%) / (10\%)] = 4$

[0302] 因此，

[0303] $R_{TK} = 1$ 。

[0304] 因此，该实施例相当于由 $(R_{TB}) + (R_{TK}) \geq 1$ 所定义的产物。另外，该产物的临床效力为 23.94，如由 $\alpha (R_{TB}) + \beta (R_{TK}) = \Phi$ 所定义的。

[0305] 实施例 2 是在产物中存在的生物学特征的一个实例。

[0306] $T_{bio-P} = 100 \text{ 个SFC} / 2 \times 10^5 \text{ 粒酶B}$

[0307] $T_{bio-U} = 10 \text{ 个SFC} / 2 \times 10^5 \text{ 粒酶B}$

[0308] $T_{Spec-P} = 5\%$

[0309] $T_{C Spec} = 10\%$

[0310] $\alpha = 1$

[0311] $\beta = 5$

[0312] $R_{TB} = [(T_{bio-P}) + 1] / [(T_{bio-U}) + 1]$

[0313] $R_{TB} = [(100) + 1] / [(10) + 1] = 9.18$

[0314] 因此，

[0315] $R_{TB} = 1$

[0316] $R_{TK} = [(T_{Spec-P}) / (T_{C Spec})]$

[0317] $R_{TK} = [(5\%) / (10\%)] = 0.5$

[0318] 因此，

[0319] $R_{TK} = 0$ 。

[0320] 因此，实施例 2 相当于由 $(R_{TB}) + (R_{TK}) \geq 1$ 所定义的产物。另外，该产物的临床效力为 11.68，如由 $\alpha (R_{TB}) + \beta (R_{TK}) = \Phi$ 所定义的。

[0321] 由于实施例 1 和 2 两者都相当于由 $(R_{TB}) + (R_{TK}) \geq 1$ 所定义的产物，因而临床效力值 (Φ) 将会有助于确定产物选择，如果患者有资格接受来自实施例 1 和 2 的这两种产物。更大的 Φ 值表示具有更高的特异性和杀伤能力的产物，并因此可以对产物进行评级。在该情况下，实施例 1 相当于用于向患者施用的“高级的”产物，基于其 Φ 临床效力变量。

[0322] 实施例 3 是在产物中不存在的生物学特征的一个实例。

[0323] $T_{bio-P} = 50 \text{ 个SFC} / 2 \times 10^5 \text{ IL2}$

[0324] $T_{bio-U} = 70 \text{ 个SFC} / 2 \times 10^5 \text{ IL2}$

[0325] $T_{Spec-P} = 9\%$

[0326] $T_{C Spec} = 10\%$

[0327] $\alpha = 1$

[0328] $\beta = 5$

[0329] $R_{TB} = [(T_{bio-P}) + 1] / [(T_{bio-U}) + 1]$

[0330] $R_{TB} = [(50) + 1] / [(70) + 1] = 0.7$

[0331] 因此，

[0332] $R_{TB} = 0$

[0333] $R_{TK} = [(T_{Spec-P}) / (10\%)]$

[0334] ${}_{\text{R}}\text{TK} = [(9\%) / (10\%)] = 0.9$

[0335] 因此，

[0336] ${}_{\text{R}}\text{TK} = 0.$

[0337] 因此，实施例3不相当于由 $({}_{\text{R}}\text{TB}) + ({}_{\text{R}}\text{TK}) \geq 1$ 所定义的产物。

[0338] 实施例7

[0339] 产物制备

[0340] 被定义为特征在于 $({}_{\text{R}}\text{TB}) + ({}_{\text{R}}\text{TK}) \geq 1$ 的体外T细胞的产物可以通过各种制备过程来获得。下面的描述涉及用于确定某些T细胞是否是在治疗上有用的实施方案。下面呈现了一些制备实例：

[0341] 1. 病毒特异性T细胞的制备和深低温保存

[0342] 使从来自健康供者的外周血或白细胞去除术产物中得到的单核细胞与一个或多个重叠合成肽文库(其包括由病毒X所表达的一种或多种抗原的序列的全部或部分)相接触。在合成肽暴露之后，在单核细胞内的抗原特异性T细胞被激活并且在体外制备过程中扩增。在该实施例中，单核细胞将会被激活并且在体外扩增9-11天，这通过下述方式来进行：将它们添加至透气的培养装置(例如G-Rex培养装置)或组织培养平板，连同补充有Th1细胞因子(例如但不限于IL7和IL4)的T细胞培养基和跨越病毒X的一种或多种抗原的整个序列的临床级肽混合物(pepmix)一起。除了临床级肽混合物(pepmix)外，本领域技术人员将会认识到，抗原来源还可以包括，例如病毒的重组蛋白质、DNA、编码抗原的RNA等等。在特别的情况下，所述产物满足由 $({}_{\text{R}}\text{TB}) + ({}_{\text{R}}\text{TK}) \geq 1$ 所设定的标准，因此例如可以将它进行深低温保存，以用于将来的临床使用。

[0343] 备选地，可以实施额外的抗原刺激(在培养的第10-13天)，其中再次用对于病毒X的一种或多种抗原来说特异的pepmix冲击抗原呈递细胞(其可以是自体单核细胞(或)OKT3母细胞(或)PHA母细胞(作为例子))，然后进行辐射(80Gy)，并随后用作刺激物。在第2次刺激的时候，将会给培养物补充Th1细胞因子(例如但不限于IL4+IL7、IL15、IL2、IL21、IL12或其组合)，和在3天后，给培养物补充IL2或IL15、IL7、IL21、IL4或其组合。在培养19-23天后，从G-Rex培养装置或组织培养平板中收获特异于病毒X的细胞，汇集到大小合适的无菌容器中，并进行计数。将细胞通过离心进行洗涤，然后以对于患者输注来说合适的等分试样重悬浮在冰冷的冷冻培养基中直至 1×10^7 个细胞/mL的浓度。在这个时候，或者在冷冻7天之内，可以使合适数目的细胞、在洗涤之前和之后的培养物上清液以及最终细胞悬浮液的等分试样经历内毒素测试和微生物学筛选。同时，可以取合适数目的细胞用于产物表征，其包括例如HLA分型、表型、特异性和/或溶细胞功能。

[0344] 在特别的实施方案中，在第一次抗原刺激后直至第二次抗原刺激(参见图39-41作为例子)的时间可以是任何合适的时间，并且可以取决于各种原因(例如所使用的抗原)而变化。在特别的实施方案中，在第一次抗原刺激和第二次抗原刺激之间的天数为(或者为至少或不多于)1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、25、30、35、40、45、50或更多天。在其他实施方案中，在第二次抗原刺激后的时间可以是任何合适的时间，并且可以取决于各种原因(例如所使用的抗原)而变化。在特别的实施方案中，在第二次抗原刺激和随后的步骤(例如，关于培养的终点、细胞的测试、细胞的治疗使用等等)之间的天数为(或者为至少或不多于)1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、

21、25、30、35、40、45、50或更多天。

[0345] 2. 病毒特异性T细胞的表征

[0346] 身份:细胞的身份将会通过HLA分型来确定。最终产物由来自供者的细胞组成。因此,最终产物的HLA类型应当与供者血液的相同。

[0347] 表型分析:最佳的体外T细胞持久性和活性需要辅助性T细胞 (CD4+) 和细胞毒性T细胞 (CD8+) 这两者。因此,表型分析用于确定产物是否由多克隆T细胞构成。

[0348] 特异性:产物的抗病毒特异性可以在体外通过将经扩增的细胞暴露于独个合成肽文库中的每一个并评估其识别合成肽文库中的每一个的能力来进行评估。例如,一种用于评估产物特异性的方法涉及通过使用IFN γ ELIspot测试来测试这些细胞在合成肽暴露后产生细胞因子干扰素 γ (IFN γ) 的能力。在该测试中,将细胞再次暴露于用于刺激的病毒抗原中的每一种。当针对来自靶病毒的所有抗原的产生IFN γ 的斑点形成细胞 (SFC) 的总和 \geq 20个SFC/ 2×10^5 个输入细胞时,产物被认为对于病毒X来说是特异性的。

[0349] 细胞毒性:可以在标准的杀伤测定法中测量产物的细胞毒性特异性,其中细胞用作效应子并且靶标为用相关pepmix进行冲击的PHA母细胞。自体或同种异体PHA母细胞(单独的或负载有无关pepmix的)可以用作特异性和同种异体反应性对照。如果在40:1的效应子与靶标的比例下用相关pepmix进行冲击的PHA母细胞的特异性裂解的百分比 $\geq 10\%$,那么产物被认为显示出针对病毒X的细胞毒性。

[0350] 3. 数据

[0351] 将上面所描述的用于制备和表征对于病毒的免疫显性抗原来说特异性的T-细胞的方法用于产生对于腺病毒 (AdV) 、BK病毒 (BKV) 和巨细胞病毒 (CMV) (仅作为例子) 来说特异性的T-细胞。

[0352] 3.1. 腺病毒

[0353] 腺病毒仍然是在免疫受损的个体中的发病率和死亡率的主要原因,在所述免疫受损的个体中它可以产生肺炎、出血性膀胱炎、肾炎、结肠炎、肝炎和脑炎。用于疾病治疗的最经常使用的药物为西多福韦,但临床益处在具有明显的病毒性疾病的患者中是有限的并且相关联的肾毒性是主要关切。此外,在没有预期性的随机化的受控试验的情况下,该药物的效力仍然是不确定的 (Leen AM等人,Biol.Blood Marrow Transpl.2006)。鉴于病毒清除已显示与检测到循环性AdV-特异性T细胞相关联,因而过继T细胞转移已被视为备选的治疗选项 (Feuchtinger T.等人,Br.J.Hematol.2005)。

[0354] 为了产生腺病毒特异性T细胞,使从来自健康供者的外周血产物中得到的单核细胞激活并在体外扩增,这通过下述方式来进行:将它们添加至G-Rex培养装置,连同补充有细胞因子IL7和IL4的T细胞培养基和跨越腺病毒的最具免疫显性的抗原(即六邻体 (Hexon) 和五邻体 (Penton))的整个序列的临床级肽混合物 (pepmix) 一起。对于第二次刺激(在培养的第10-13天),再次用特异于六邻体和五邻体的pepmix冲击自体PBMC,然后进行辐射 (80Gy),并随后用作APC,随后为在补充有IL4和IL7和后来补充有IL2的培养基中进行扩增。在第0、10和20天评估培养物的特异性和溶细胞能力,如在图39中所显示的。相比于在第0天的未操作的PBMC而言,在第10天的培养物显示出针对六邻体和针对五邻体的T细胞的频率的大量增加(分别为28.7和32.3倍增加),如通过>20个产生IFN γ 的SFC所证明的。在第20天的培养物显示出超过第10天培养物的T细胞特异性的进一步增加(分别地,六邻体或五邻体

反应性细胞具有2.7和1.9倍增加)。重要的是,在第20天的培养物包含接受了第二次刺激的细胞,所述第二次刺激赋予经扩增的细胞以杀伤负载有抗原的靶细胞的能力,如通过负载有腺病毒抗原的靶细胞的>10%的细胞毒性所证明的。

[0355] 3.2.BK病毒

[0356] BKV是一种普遍存在的多瘤病毒,其在>90%的普通群体中建立潜伏的无症状感染。但是,在实体器官和HSCT同种异体移植受者这两者中,病毒再激活是时常发生的并且与循环性BKV-特异性T细胞的不存在相关联。因此,BKV的尿脱落 在60-80%的HSCT受者中发生(Tomblyn M等人,Bone Marrow Transpl.2009),并且在5-15%中发展为BKV-相关的出血性膀胱炎(PVHC),从而导致延长的住院期、严重的发病率和增加的死亡率。目前,仍然不存在用于治疗BK病毒感染的经批准的抗病毒试剂。

[0357] 为了产生BK病毒特异性T细胞,使从来自健康供者的外周血中得到的单核细胞激活并在体外扩增,这通过下述方式来进行:将它们添加至G-Rex培养装置,连同补充有细胞因子IL7和IL4的T细胞培养基和跨越BKV的最具免疫显性的抗原(即LT和VP1)的整个序列的临床级肽混合物(pepmix)一起。对于第二次刺激(在培养的第10-13天),再次用特异于LT和VP1的pepmix冲击自体PBMC,然后进行辐射(80Gy),并随后用作APC,随后为在补充有IL4和IL7和后来补充有IL2的培养基中进行扩增。在第0、10和20天评估培养物的特异性和溶细胞能力,如在上面所描述的和在图40中所显示的。相比于在第0天的幼稚培养物而言,在第10天的培养物显示出LT-特异性和VP1-特异性的频率的大量增加(分别为316.8和38.6倍增加),如通过>20个产生IFN γ 的SFC所证明的。在第20天的培养物显示出超过第10天培养物的T细胞特异性的进一步增加(分别地,LT-反应性和VP1-反应性细胞具有2.7和1.9倍增加)。重要的是,这些培养物包含接受了第二次刺激的细胞,所述第二次刺激赋予经扩增的细胞以杀伤负载有抗原的靶细胞的能力,如通过负载有BK病毒抗原的靶细胞的>20%的细胞毒性所证明的。

[0358] 3.3.巨细胞病毒

[0359] 巨细胞病毒(CMV)是通常在具有免疫能力的个体中引起无症状感染的潜伏性β-疱疹病毒。它在大约70%的健康成人中持续存在,并且在上皮细胞、成纤维细胞和单核细胞中进行复制。在干细胞受者中CMV的再激活可以导致显著的发病率和死亡率,具有临床表现,其包括间质性肺炎、胃肠炎、发热、肝炎、脑炎和视网膜炎(Boeckh M等人,Biol.Blood Marrow Transpl.2003)。细胞介导的免疫被认为是在控制CMV感染中的最重要的因素,并且CMV-特异性CD4+和CD8+淋巴细胞在防止原发感染和后续的再激活这两者的免疫保护作用中发挥重要作用。

[0360] 为了产生CMV-特异性T细胞,使从来自健康供者的外周血中得到的单核细胞激活并在体外扩增,这通过下述方式来进行:将它们添加至G-Rex培养装置,连同补充有细胞因子IL7和IL4的T细胞培养基和跨越CMV的最具免疫显性的抗原(即IE1和pp65)的整个序列的临床级肽混合物(pepmix)一起。对于第二次刺激(在培养的第10-13天),再次用特异于IE1和pp65的pepmix冲击自体PBMC,然后进行辐射(80Gy),并随后用作APC,随后为在补充有IL4和IL7和后来补充有IL2的培养基中进行扩增。在第0、10和20天评估培养物的特异性和溶细胞能力,如在上面所描述的和在图41中所显示的。相比于在第0天的幼稚培养物而言,在第10天的培养物显示出IE1和pp65的频率的大量增加(分别为6.66和5.7倍增加),如通过>20

一个产生IFN γ 的SFC所证明的。在第20天的培养物显示出超过第10天培养物的T细胞特异性的进一步增加(分别地,IE1-反应性和pp65-反应性细胞具有1.1和1.4倍增加)。重要的是,这些培养物包含接受了第二次刺激的细胞,所述第二次刺激赋予经扩增的细胞以杀伤负载有抗原的靶细胞的能力,如通过负载有CMV抗原的靶细胞的>20%的细胞毒性所证明的。

[0361] 在该部分中,描述了对于病毒的一种或多种免疫显性抗原来说明特异性的T细胞的制备和表征。通过提供3个例子(AdV、BK病毒和CMV),发明人显示了该过程是坚实的和可重现的。另外,该过程允许人们产生病毒特异性T细胞,其具有针对免疫显性抗原的>20个IFN γ SFC的特异性和主要可归因于在制备过程中所包括的第二次刺激的>10%的细胞毒性。因此,该过程可以用于产生和表征特异于任何病毒(包括hMPV和PIV3)的T细胞,如先前所描述的。

[0362] 4. 范围

[0363] 通过上面所描述的过程而制备和表征的抗原特异性T细胞可以在供者特异性设置和第3方设置这两者中使用。这两种设置在下面详细地描述。

[0364] 4.1. 供者特异性设置

[0365] 在该设置中,遵照在第1部分中所概括的步骤,从外周血或白细胞去除术产物产生抗原特异性T细胞。然后,可以向患者施用这些细胞。这概括在图42中。

[0366] 4.2. 第三方设置

[0367] 在该设置中,遵照在第1部分中所概括的相似步骤,从外周血或白细胞去除术产物产生抗原特异性T细胞并进行深低温保存。然后,可以向许多部分地HLA-匹配的受者施用这些细胞,如在图43中所概括的。

[0368] 产物的使用

[0369] 下面的描述涉及如何确定产物是否是在治疗上有用的。在特别的实施方案中,产物的使用可以通过下式来定义:

[0370] $[(R_{TB}) + (R_{TK})] \times Th$, 其当 ≥ 1 时, 向患者施用, 和当 < 1 时, 不施用。

[0371] 在该等式中,

[0372] $Th = HLA_p$ 对 HLA_{Pt} (共有等位基因的数目), 其当 ≥ 1 时, 等价于1的Th值, 和当 < 1 时, 相应于0的Th值

[0373] HLA_p = 产物的HLA类型

[0374] HLA_{Pt} = 患者的HLA类型。

[0375] 实施例1举例说明了这样的情景, 其中将会向特别的患者施用产物。

[0376] $Tbio-P = 212 \text{ SFC} / 2 \times 10^5 IL2$

[0377] $Tbio-U = 44 \text{ SFC} / 2 \times 10^5 IL2$

[0378] $TSpec-P = 5\%$

[0379] $TCSpec = 10\%$

[0380] $R_{TB} = [(Tbio-P) + 1] / [(Tbio-U) + 1]$

[0381] $R_{TB} = [(212) + 1] / [(44) + 1] = 4.7$

[0382] 因此,

[0383] $R_{TB} = 1$

[0384] $R_{TK} = [TSpec-P] / [TCSpec]$

[0385] ${}_{\text{R}}\text{TK} = [(5\%) / (10\%)] = 0.5$

[0386] 因此,

[0387] ${}_{\text{R}}\text{TK} = 0$

[0388] $\text{HLA}_{\text{P}} = \text{A}(2, 31), \text{B}(35, 51), \text{DR}(3, 4), \text{DQ}(2, 4)$

[0389] $\text{HLA}_{\text{Pt}} = \text{A}(2, 11), \text{B}(27, 35), \text{DR}(4, 8), \text{DQ}(3, 4)$

[0390] HLA_{P} 对 $\text{HLA}_{\text{Pt}} = 4$

[0391] 因此, $\text{Th} = 1$

[0392] $[({}_{\text{R}}\text{TB}) + ({}_{\text{R}}\text{TK})] \times \text{Th}$

[0393] $[(1) + (0)] \times 1 = 1$ 。

[0394] 因此, 该产物将会被施用给该特定的患者。

[0395] 实施例2举例说明了这样的情景, 其中将会向特别的患者施用产物。

[0396] $\text{Tbio-P} = 500 \text{ 个SFC} / 2 \times 10^5 \text{ IL2}$

[0397] $\text{Tbio-U} = 10 \text{ 个SFC} / 2 \times 10^5 \text{ IL2}$

[0398] $\text{TSpec-P} = 55\%$

[0399] $\text{TCspec} = 10\%$

[0400] ${}_{\text{R}}\text{TB} = [(\text{Tbio-P}) + 1] / [(\text{Tbio-U}) + 1]$

[0401] ${}_{\text{R}}\text{TB} = [(500) + 1] / [(10) + 1] = 45.5$

[0402] 因此,

[0403] ${}_{\text{R}}\text{TB} = 1$

[0404] ${}_{\text{R}}\text{TK} = [(\text{TSpec-P}) / (\text{TCspec})]$

[0405] ${}_{\text{R}}\text{TK} = [(55\%) / (10\%)] = 5.5$

[0406] 因此,

[0407] ${}_{\text{R}}\text{TK} = 1$

[0408] $\text{HLA}_{\text{P}} = \text{A}(2, 24), \text{B}(8, 14), \text{DR}(1, 3), \text{DQ}(2, 5)$

[0409] $\text{HLA}_{\text{Pt}} = \text{A}(2, 23), \text{B}(15, 44), \text{DR}(7, 13), \text{DQ}(3, 3)$

[0410] HLA_{P} 对 $\text{HLA}_{\text{Pt}} = 1$

[0411] 因此, $\text{Th} = 1$

[0412] $[({}_{\text{R}}\text{TB}) + ({}_{\text{R}}\text{TK})] \times \text{Th}$

[0413] $[(1) + (1)] \times 1 = 2$ 。

[0414] 因此, 该产物将会被施用给该特定的患者。

[0415] 实施例3举例说明了这样的情景, 其中将不会向患者施用产物。

[0416] $\text{Tbio-P} = 1200 \text{ 个SFC} / 2 \times 10^5 \text{ IL2}$

[0417] $\text{Tbio-U} = 54 \text{ 个SFC} / 2 \times 10^5 \text{ IL2}$

[0418] $\text{TSpec-P} = 87\%$

[0419] $\text{TCspec} = 10\%$

[0420] ${}_{\text{R}}\text{TB} = [(\text{Tbio-P}) + 1] / [(\text{Tbio-U}) + 1]$

[0421] ${}_{\text{R}}\text{TB} = [(1200) + 1] / [(54) + 1] = 21.8$

[0422] 因此,

[0423] ${}_{\text{R}}\text{TB} = 1$

[0424] ${}_{\text{R}}\text{TK} = [(\text{TSpec-P}) / (\text{TCSpec})]$

[0425] ${}_{\text{R}}\text{TK} = [(87\%) / (10\%)] = 8.7$

[0426] 因此，

[0427] ${}_{\text{R}}\text{TK} = 1$

[0428] $\text{HLA}_{\text{P}} = \text{A}(1, 24), \text{B}(8, 14), \text{DR}(11, 8), \text{DQ}(2, 5)$

[0429] $\text{HLA}_{\text{Pt}} = \text{A}(2, 23), \text{B}(15, 44), \text{DR}(7, 13), \text{DQ}(3, 3)$

[0430] HLA_{P} 对 $\text{HLA}_{\text{Pt}} = 0$

[0431] 因此, $\text{Th} = 0$

[0432] $[({}_{\text{R}}\text{TB}) + ({}_{\text{R}}\text{TK})] \times \text{Th}$

[0433] $[(1) + (1)] \times 0 = 0$ 。

[0434] 因此, 该产物将不会被施用给该特定的患者。

[0435] 一个实施例代表了用通过 $({}_{\text{R}}\text{TB}) + ({}_{\text{R}}\text{TK}) \geq 1$ 所定义并通过 $[({}_{\text{R}}\text{TB}) + ({}_{\text{R}}\text{TK})] \times \text{Th} \geq 1$ 所选择的CMV-特异性T细胞产物进行治疗的具有主动CMV感染的患者的临床结果。如在图45中所显示的, 在施用CMV-特异性T细胞后, 在患者的外周血中存在有病毒载量的随后下降(通过PCR所检测的), 其与通过IFN γ ELIspot所检测的CMV-特异性T细胞的增加具有逆相关。

[0436] 一个实施例代表了用通过 $({}_{\text{R}}\text{TB}) + ({}_{\text{R}}\text{TK}) \geq 1$ 所定义并通过 $[({}_{\text{R}}\text{TB}) + ({}_{\text{R}}\text{TK})] \times \text{Th} \geq 1$ 所选择的EBV-特异性T细胞产物进行治疗的具有主动病毒感染的患者的临床结果。如在图46中所显示的, 在施用EBV-特异性T细胞后, 在患者的外周血中存在有病毒载量的随后下降(通过PCR所检测的), 其与通过IFN γ ELIspot所检测的EBV-特异性T细胞的增加具有逆相关。

[0437] 该实施例代表了用通过 $({}_{\text{R}}\text{TB}) + ({}_{\text{R}}\text{TK}) \geq 1$ 所定义并通过 $[({}_{\text{R}}\text{TB}) + ({}_{\text{R}}\text{TK})] \times \text{Th} \geq 1$ 所选择的BKV-特异性T细胞产物进行治疗的具有主动病毒感染的患者的临床结果。如在图47中所显示的, 在施用BKV-特异性T细胞后, 在患者的尿中存在有病毒载量的随后下降(通过PCR所检测的), 其与通过IFN γ ELIspot所检测的BKV-特异性T细胞的增加具有逆相关。

[0438] 虽然已详细地描述了本发明的实施方案及其优点, 但是应当理解, 可以在此进行各种变化、替换和改变, 而不背离由所附的权利要求书所定义的本发明的精神和范围。此外, 本申请的范围并不意欲局限于在本说明书中所描述的过程、机器、制造、物质组成、手段、方法和步骤的特定实施方案。正如本领域技术人员将会从本发明的公开内容中容易地意识到的, 根据本发明, 可以使用执行与在本文中所描述的相应实施方案基本上相同的功能或取得与在本文中所描述的相应实施方案基本上相同的结果的、目前存在或以后开发的过程、机器、制造、物质组成、手段、方法或步骤。因此, 所附的权利要求书意欲在其范围内包括此类过程、机器、制造、物质组成、手段、方法或步骤。

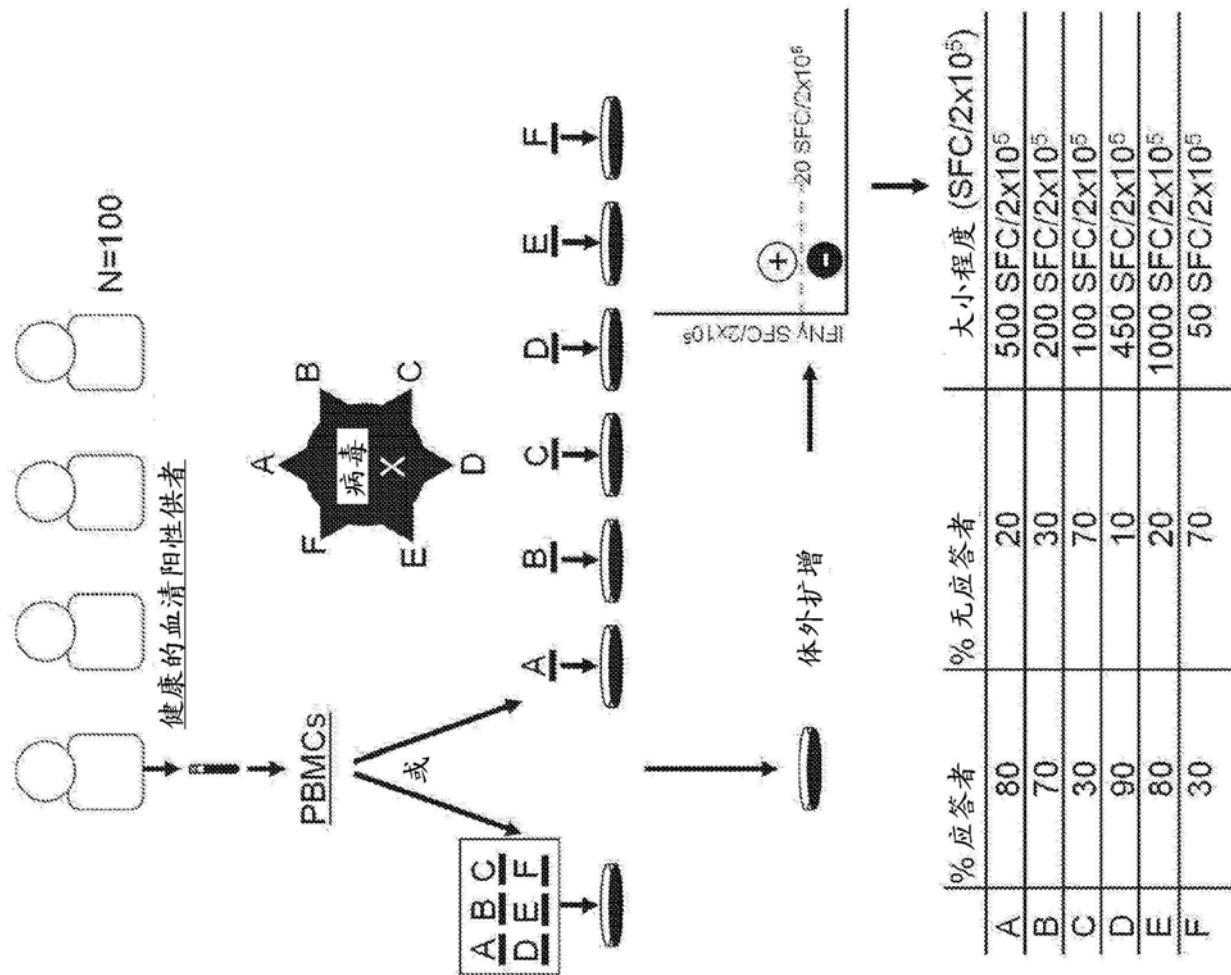


图1

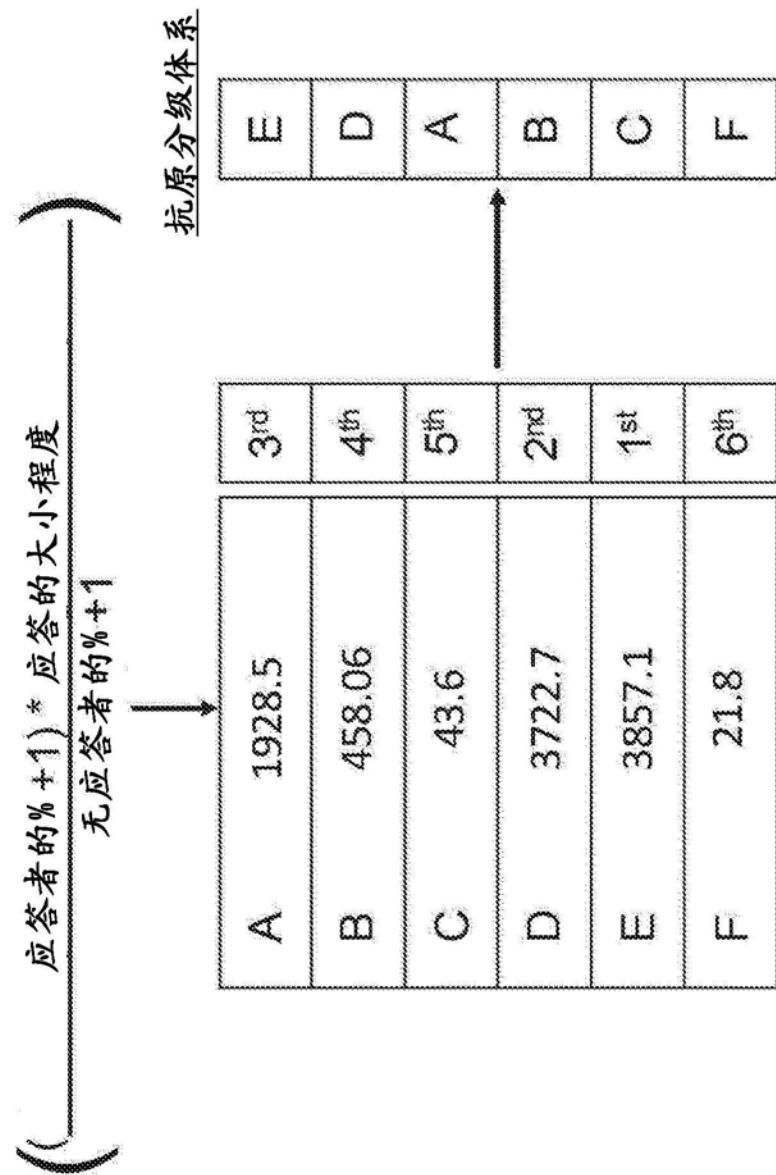


图2

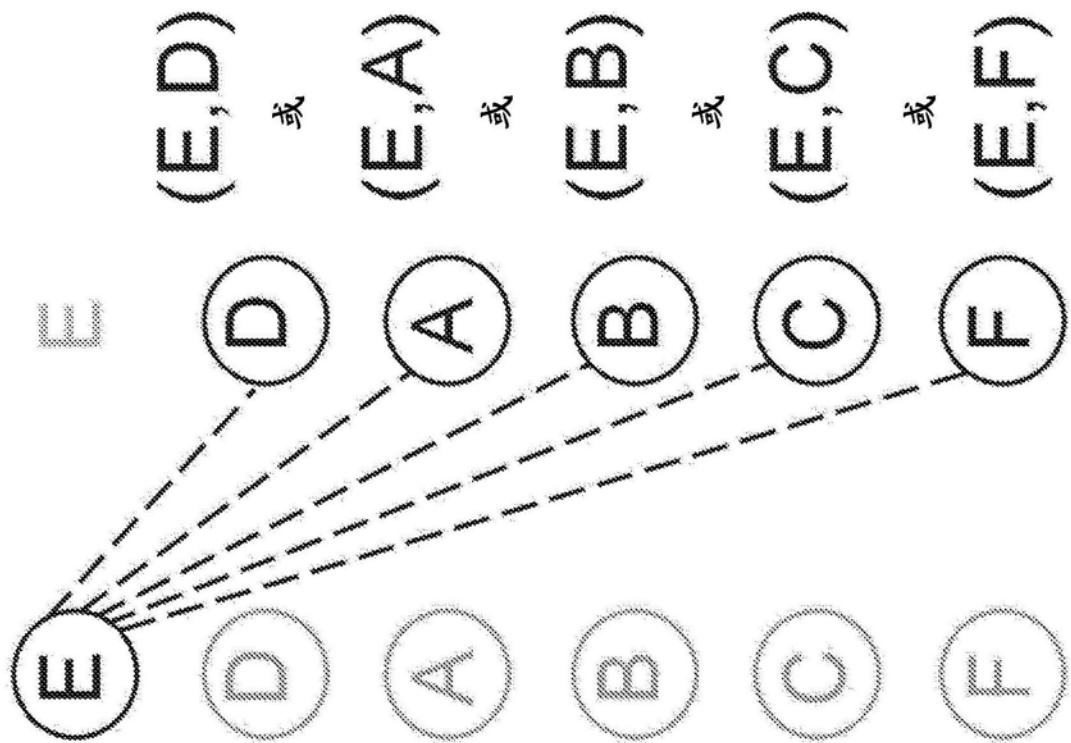


图3

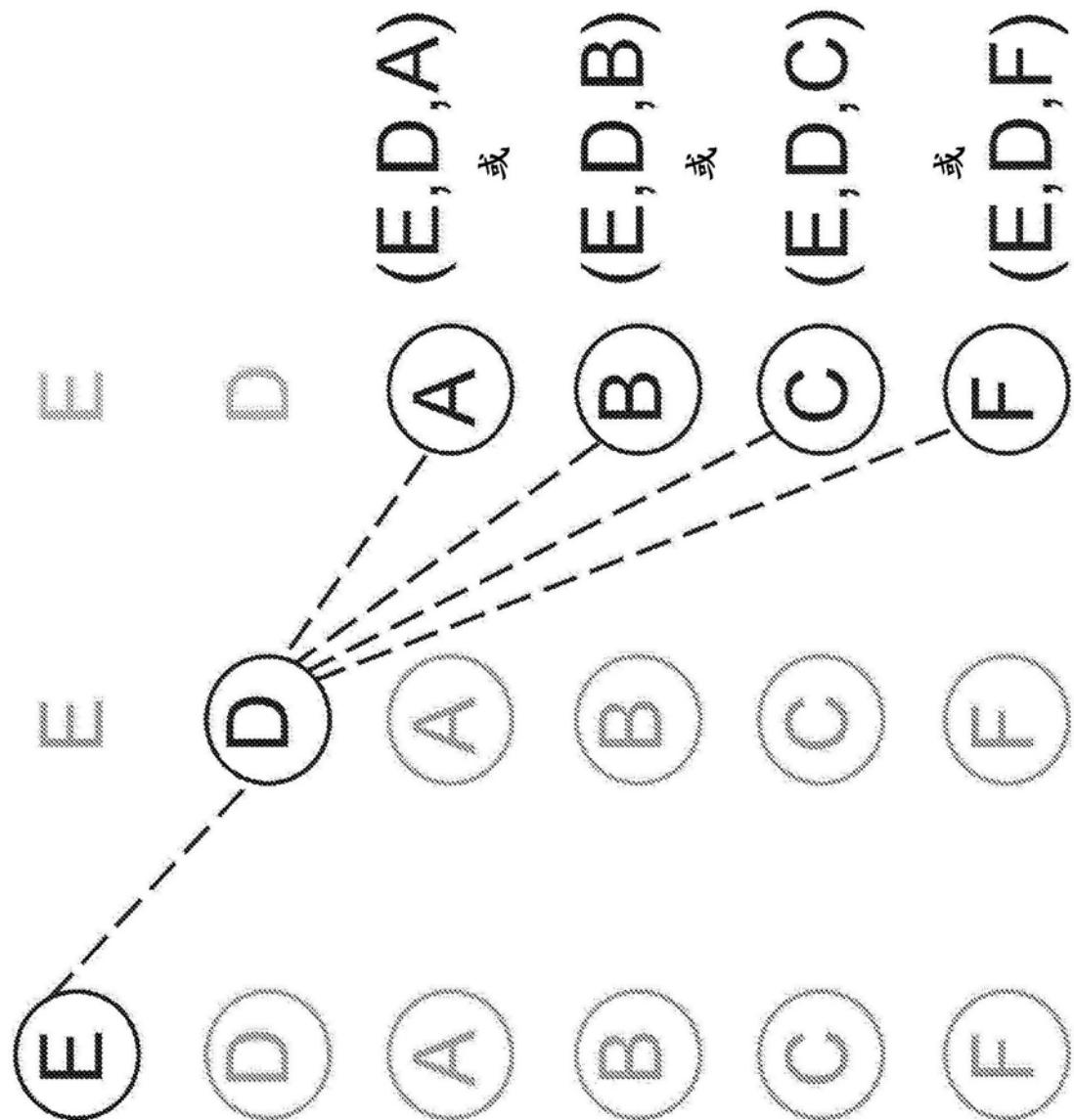


图4

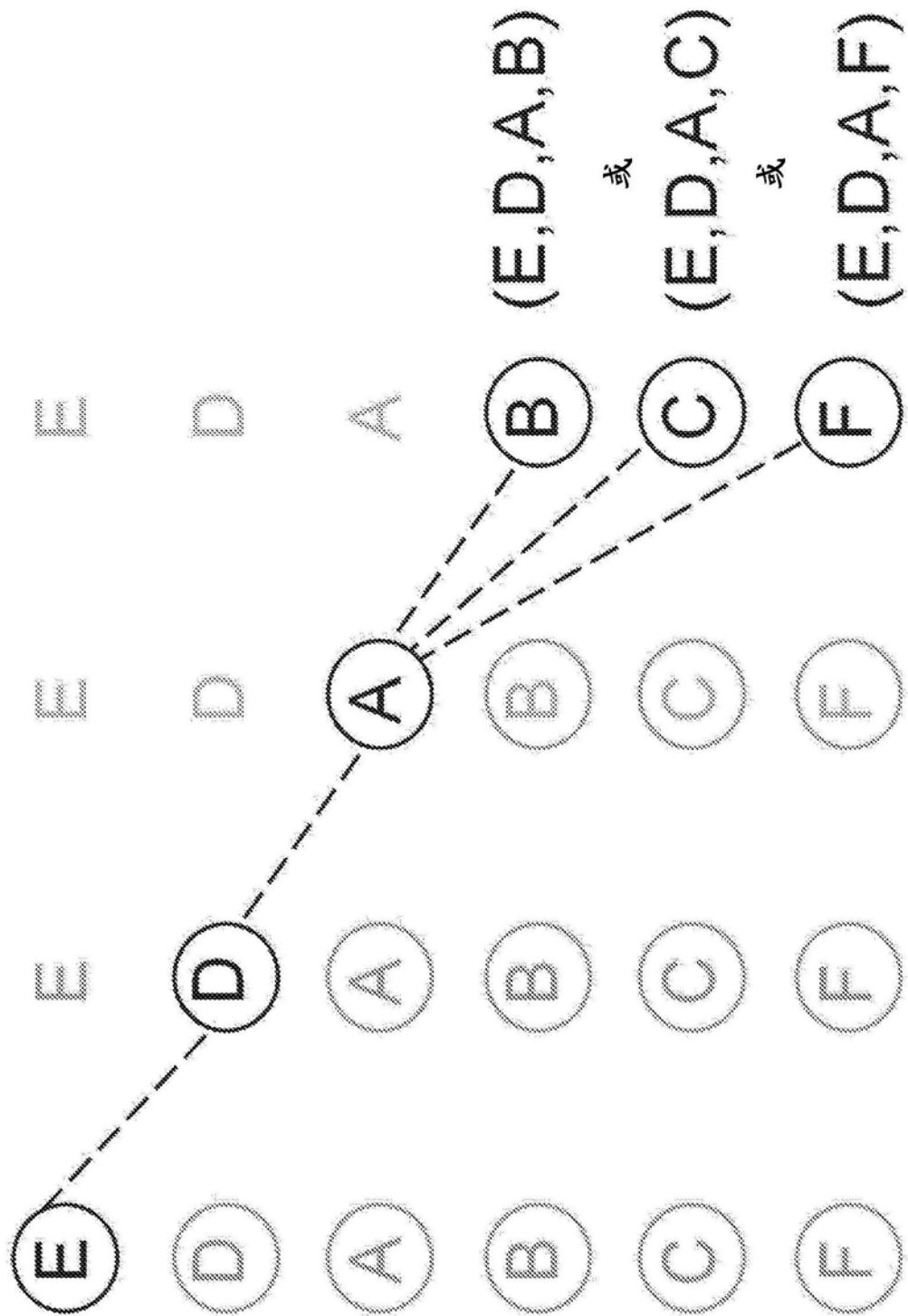


图5

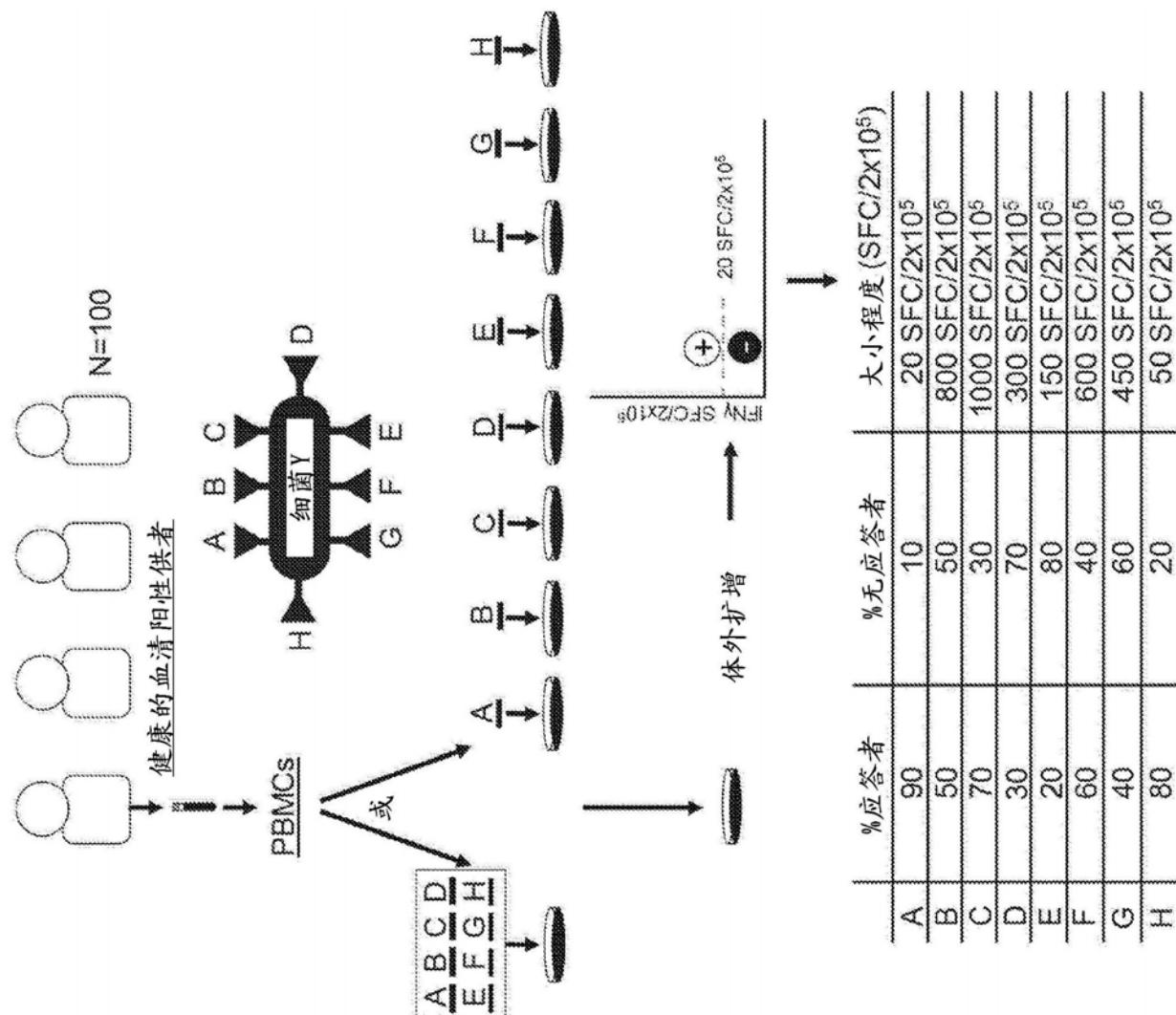


图6

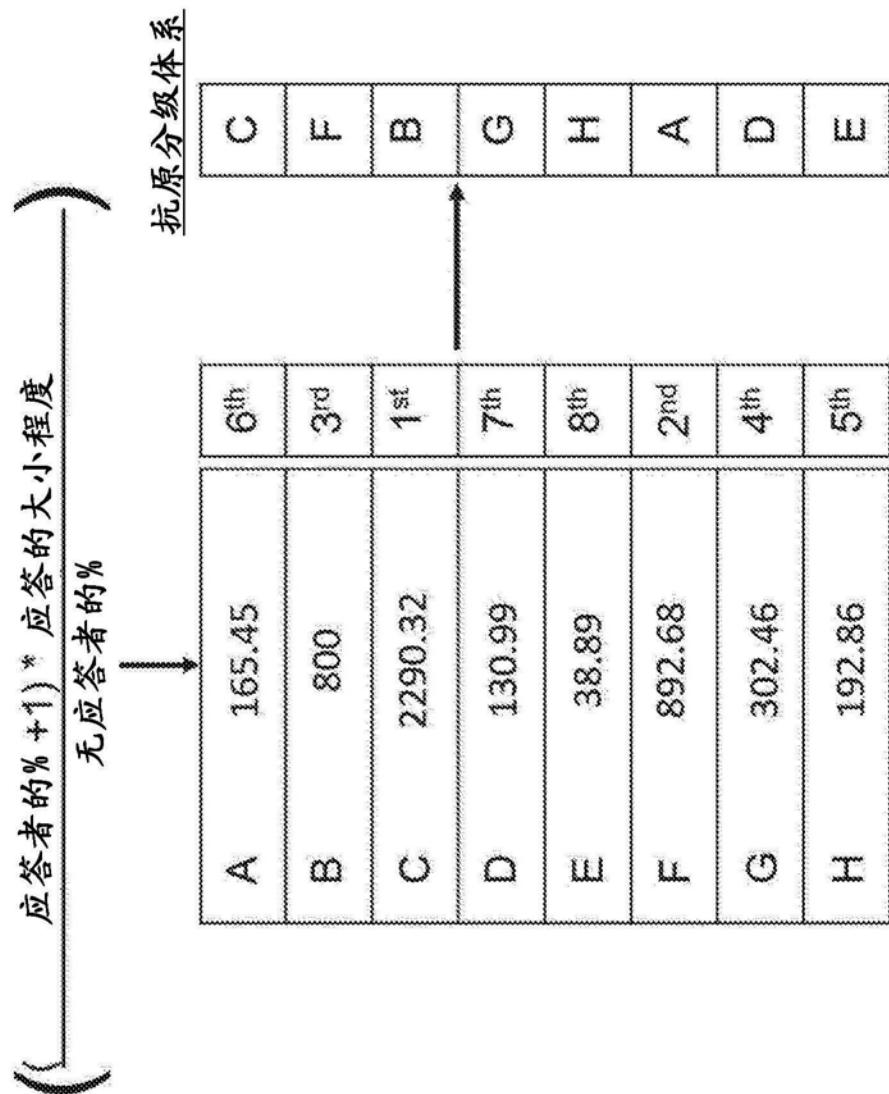


图7

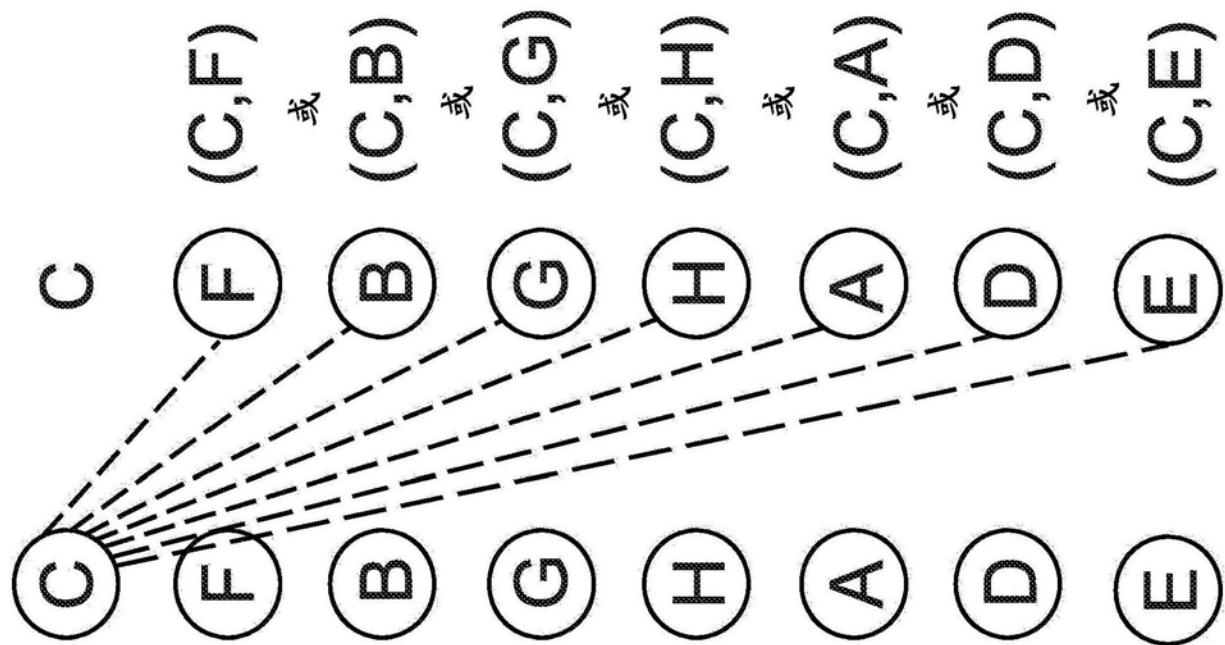


图8

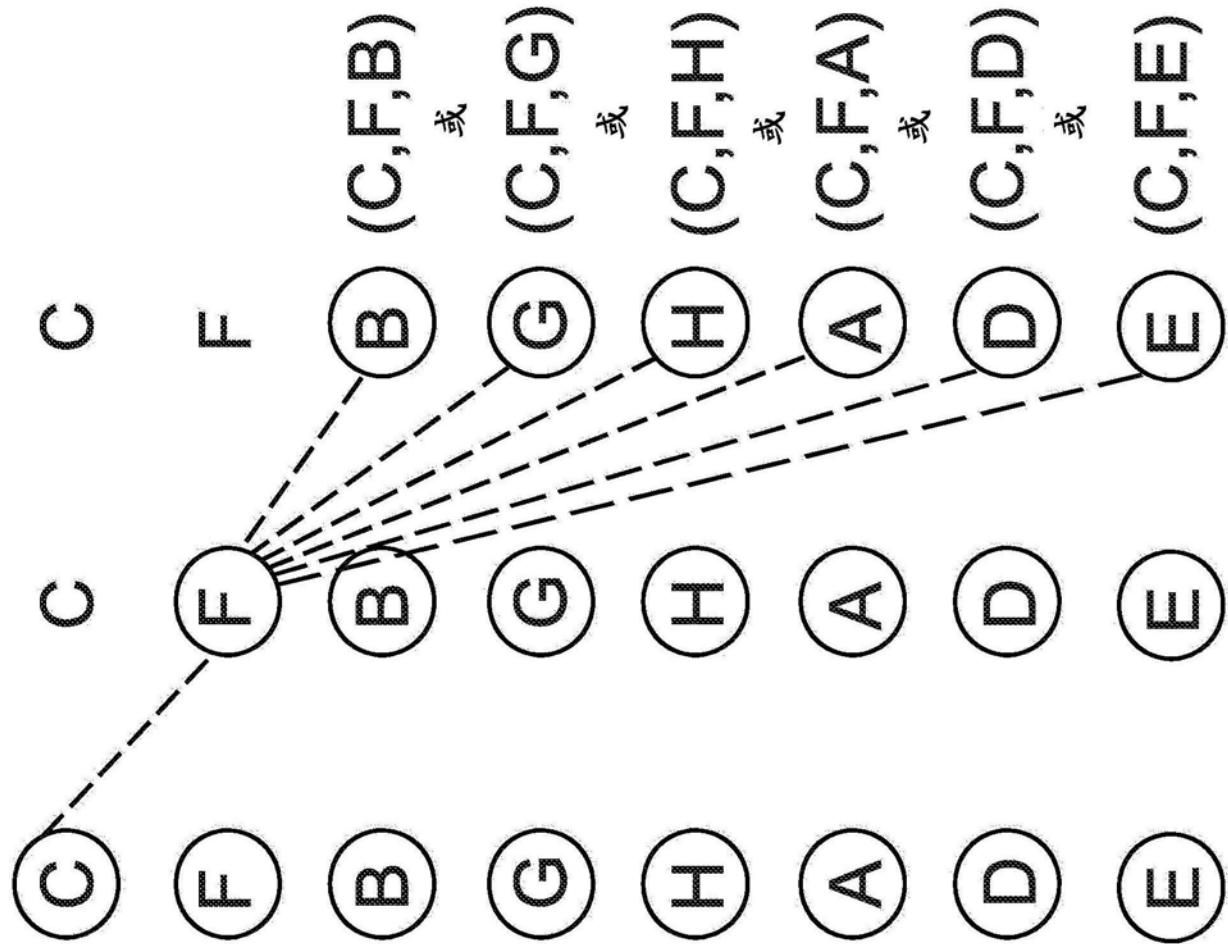


图9

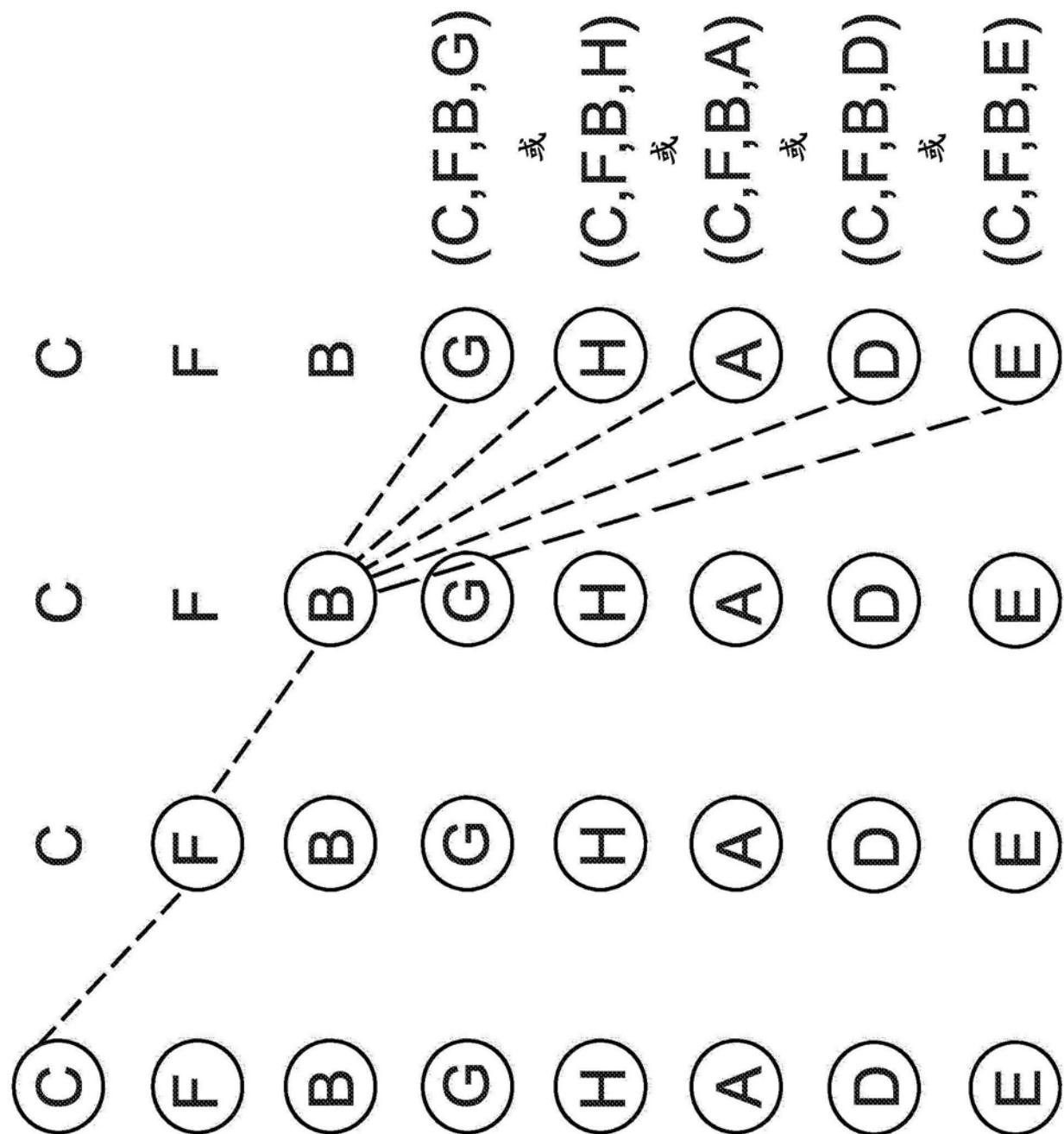


图10

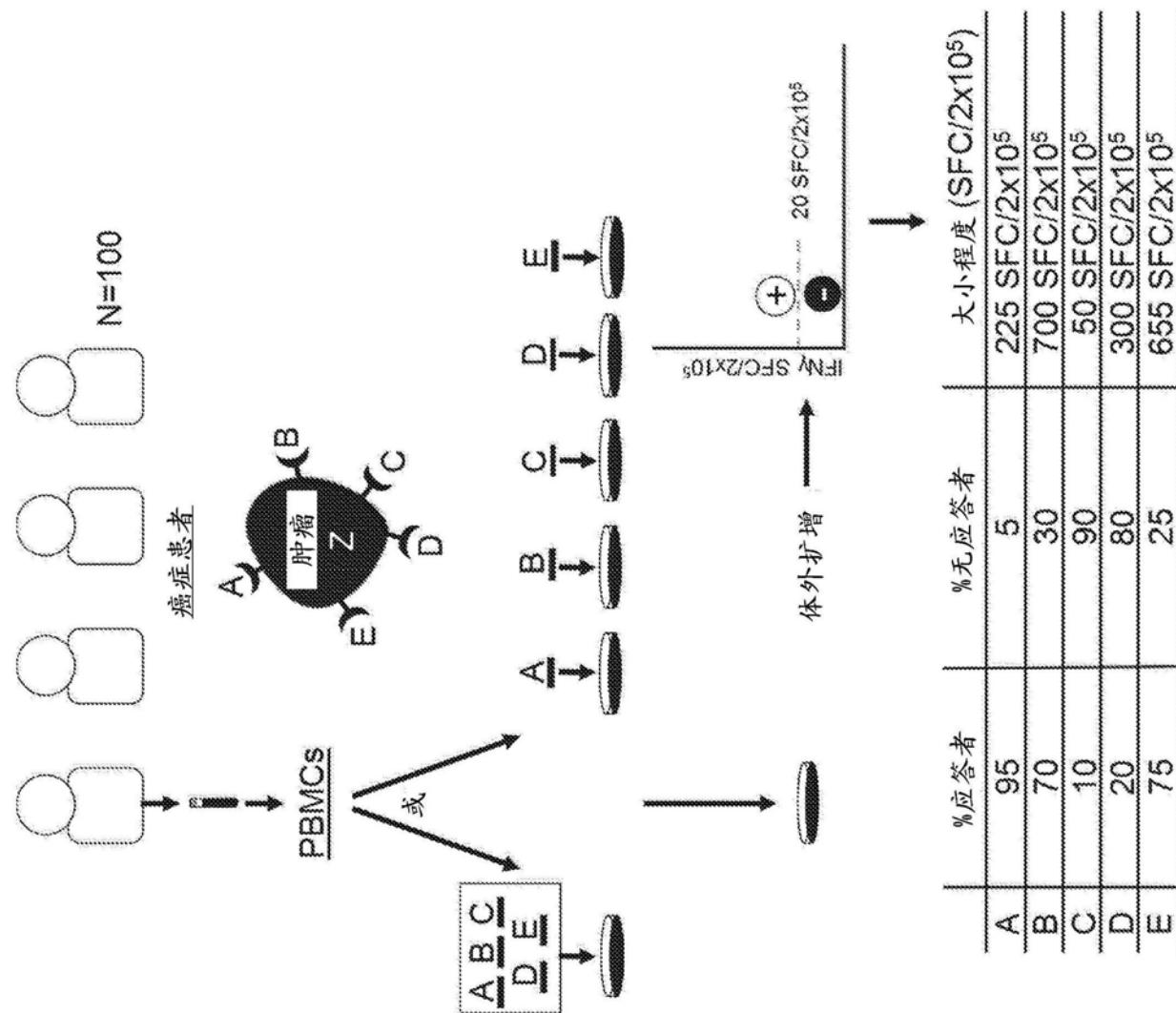


图11

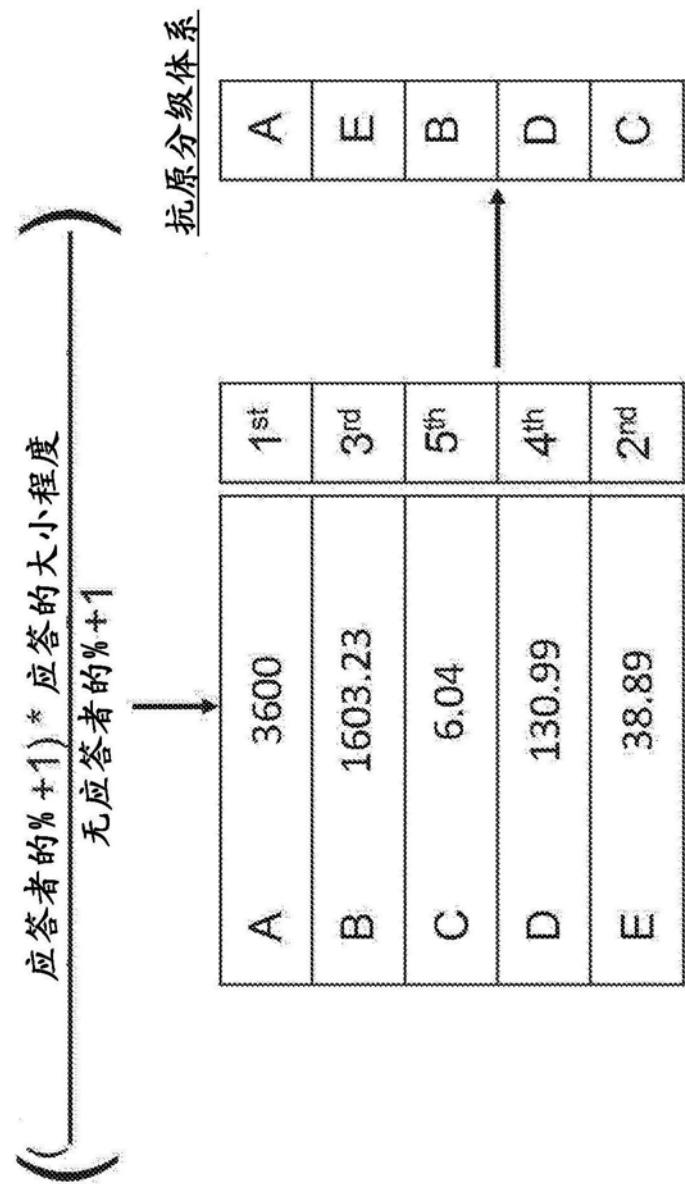


图12

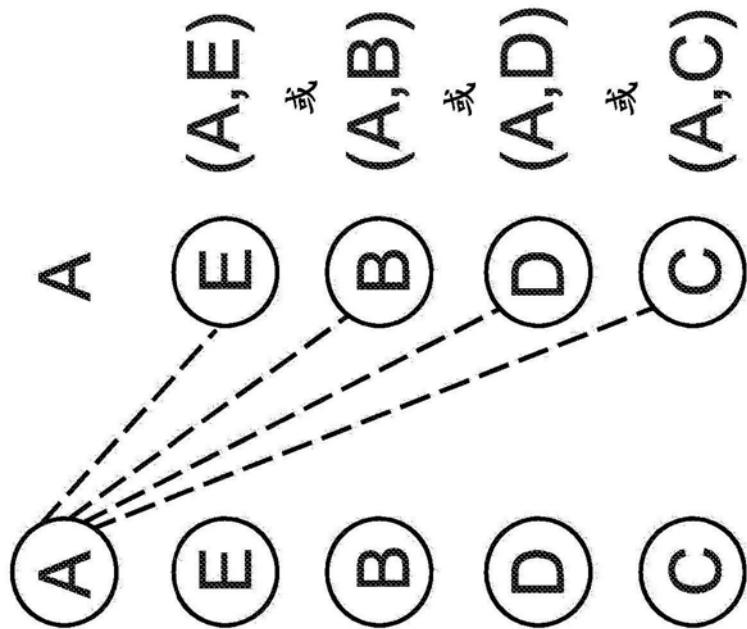


图13

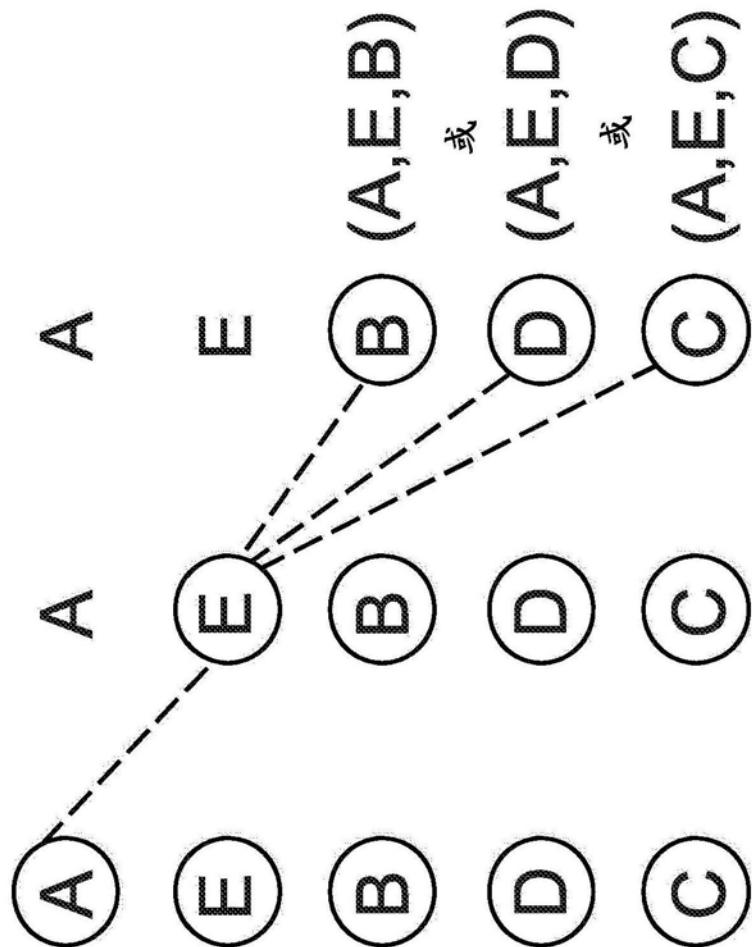


图14

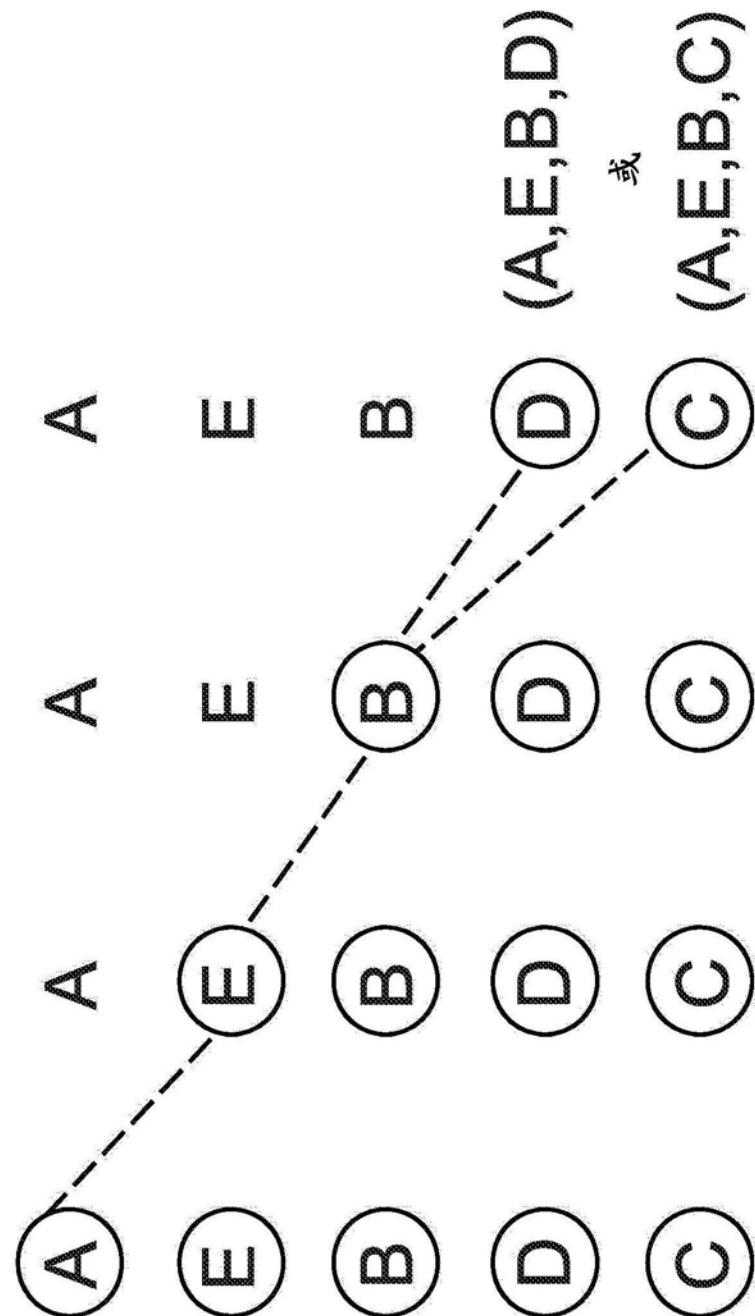


图15

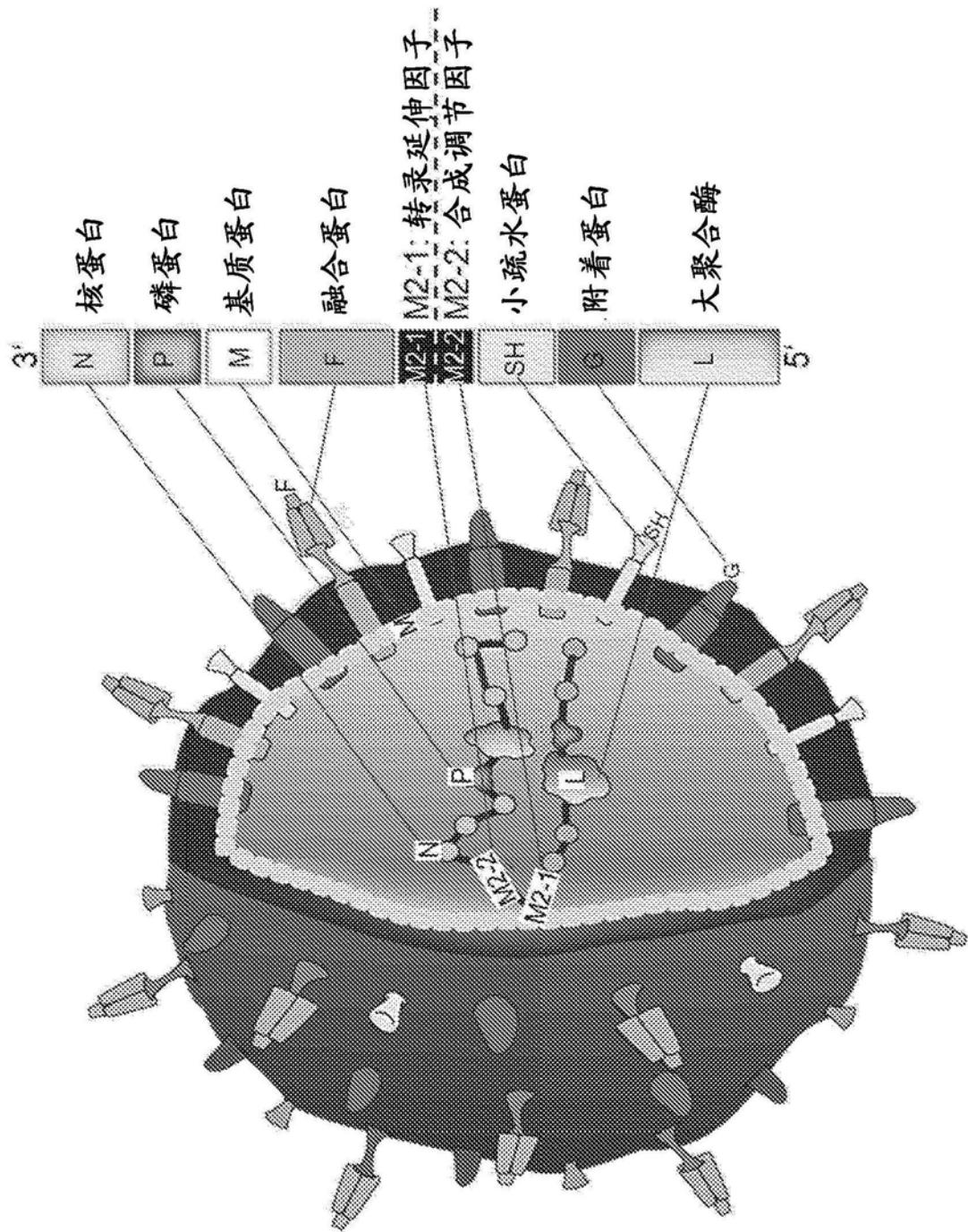


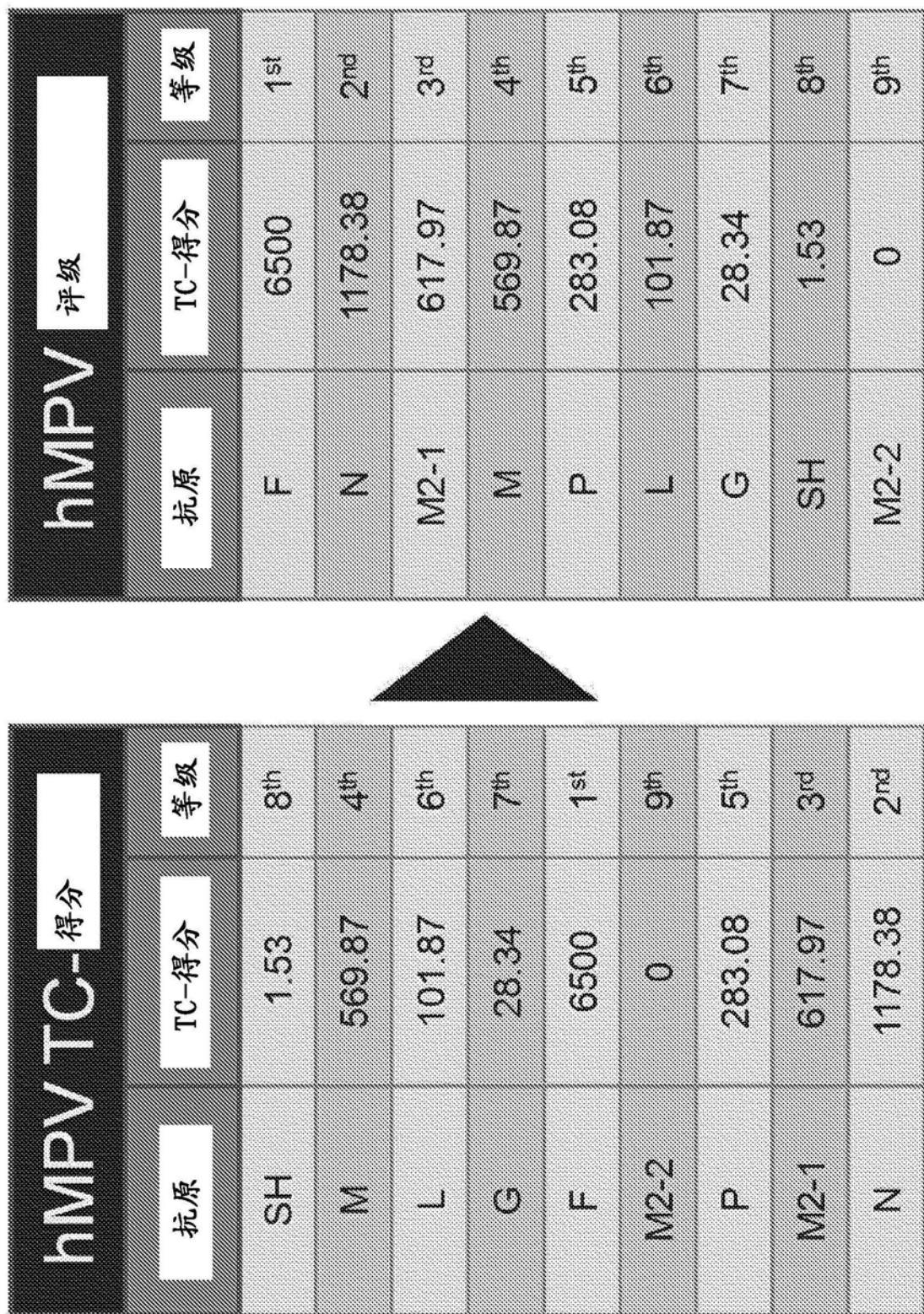
图16

抗原	(+)%	(-)%	大小程度 $SFC/2 \times 10^6$
	(+)%	(-)%	
SH	3.4	96.6	34
M	79.3	20.7	154±24
L	44.8	55.2	125±22
G	31.0	69.0	62±18
F	96.5	3.5	300±52
M2-2	0	0	0
P	68.9	31.1	130±24
M2-1	79.3	20.7	167±21
N	86.2	13.8	220±33

图17

抗原	(+) %		大小程度 $S=C/2 \times 10^5$		TC-得分	等级
	(+)	(-)	34	1.53		
SH	3.4	96.6				8 th
M	79.3	20.7	154±24	569.87	4 th	
L	44.8	55.2	125±22	101.87	6 th	
G	31.0	69.0	62±18	28.34	7 th	
F	96.5	3.5	300±52	6500	1 st	
M2-2	0	0	0	0	9 th	
P	68.9	31.1	130±24	283.08	5 th	
M2-1	79.3	20.7	167±21	617.97	3 rd	
N	86.2	13.8	220±33	1178.38	2 nd	

图18



hMPV 评级

TC-得分	抗原	等级
F	6500	1 st
N	1178.38	2 nd
M2-1	617.97	3 rd
M	569.87	
L	101.87	
G	28.34	
P	283.08	5 th
M2-2	0	9 th
P	283.08	5 th
M2-1	617.97	3 rd
N	1178.38	2 nd

hMPV TC- 得分手

TC-得分	抗原	等级
SH	1.53	8 th
M	569.87	4 th
L	101.87	6 th
G	28.34	7 th
F	6500	1 st
M2-2	0	9 th
P	283.08	5 th
M2-1	617.97	3 rd
N	1178.38	2 nd

图19

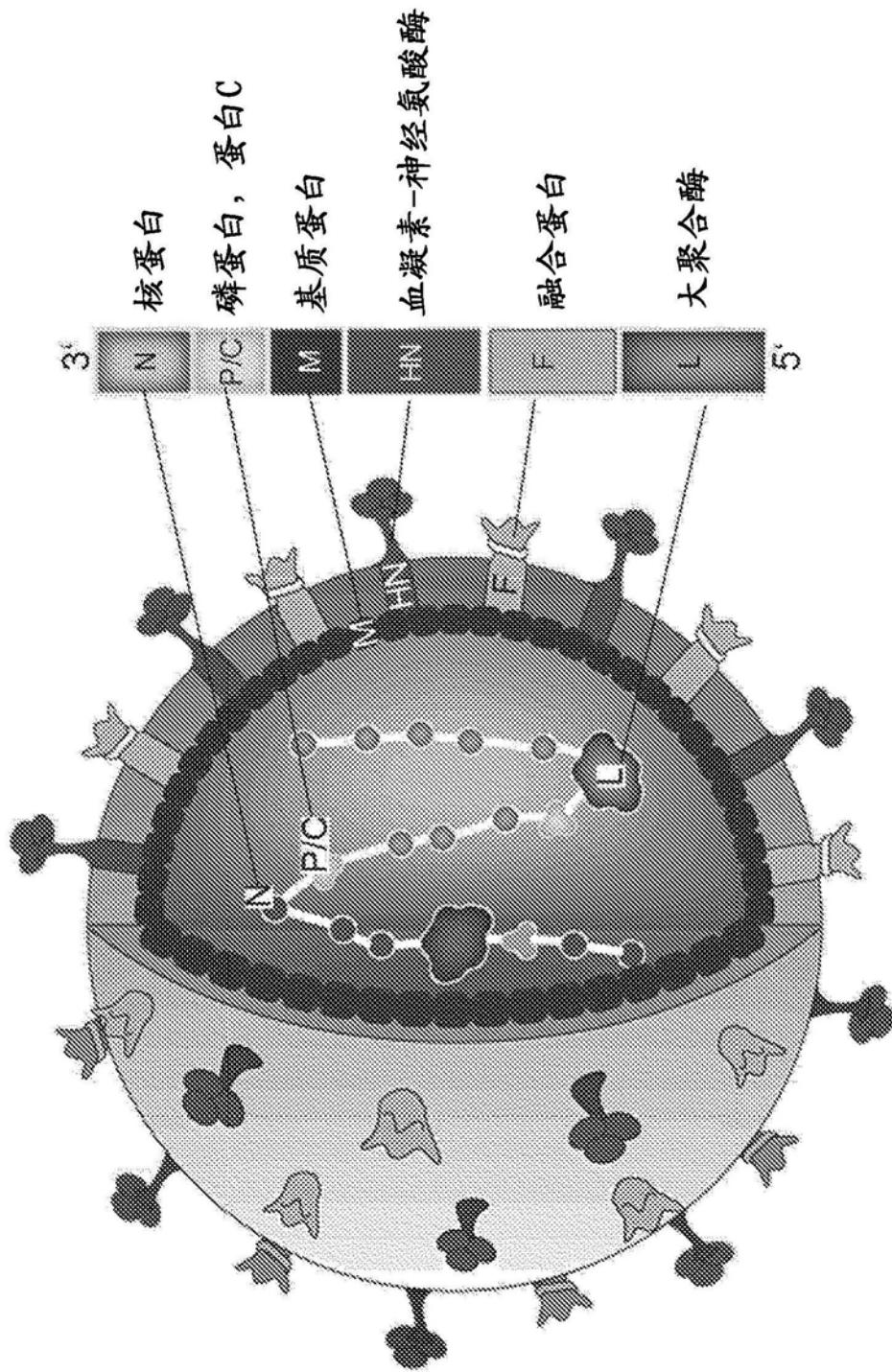


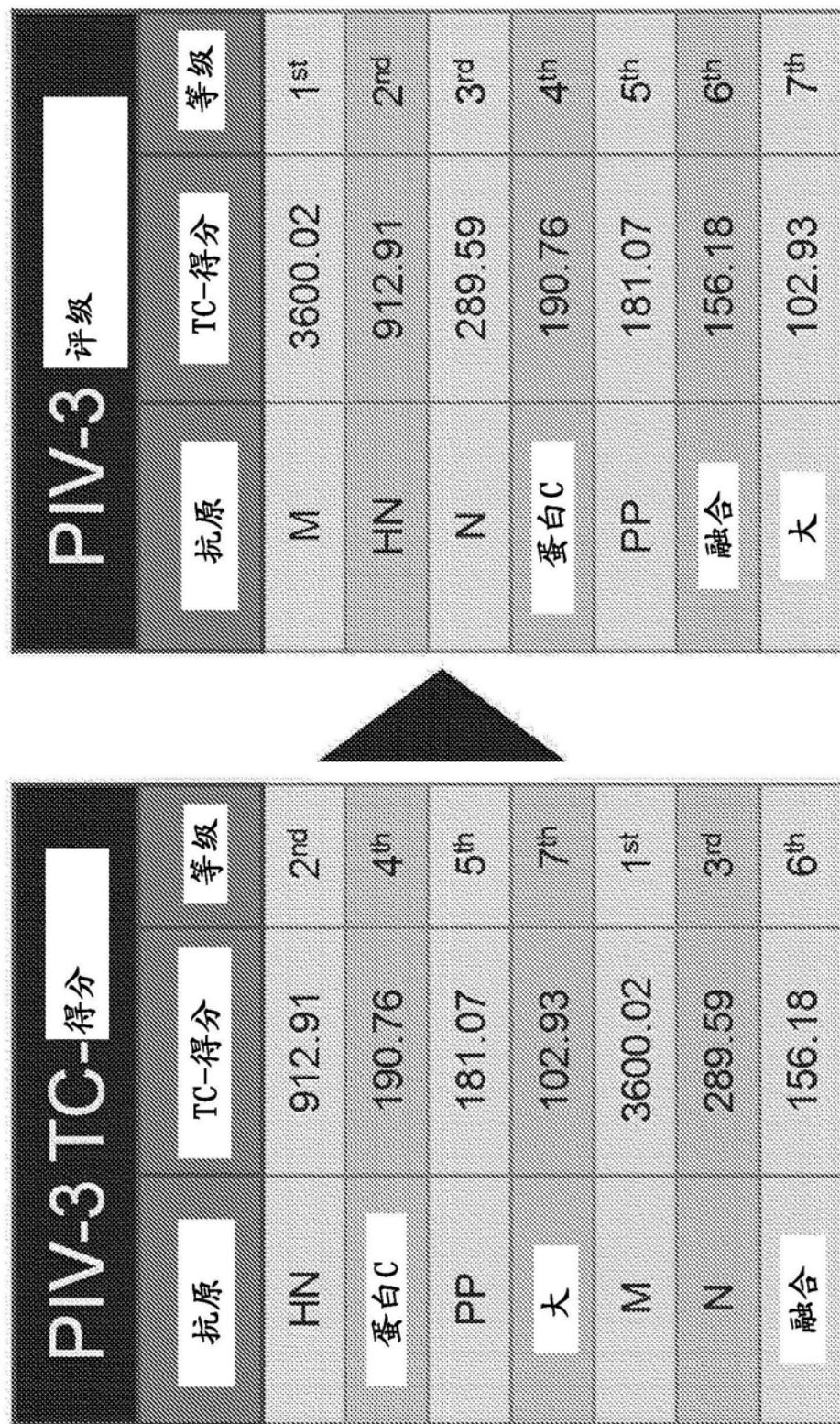
图20

抗原	对于PIV-3的T细胞应答		大小程度 SFC/2×10 ³
	(+) %	(-) %	
HN	88.2	11.8	131 ± 18
蛋白C	47	53	214.6 ± 31
PP	47	53	203.7 ± 25
大	47	53	115.8 ± 16
M	94.1	5.9	261.2 ± 28
N	64.7	35.3	160 ± 19
融合	47	53	175.7 ± 26

图21

抗原	大小程度		TC-得分 $SFC/2 \times 10^3$	等级
	(+)	(-)		
HN	88.2	11.8	131 ± 18	912.91
蛋白C	47	53	214.6 ± 31	190.76
PP	47	53	203.7 ± 25	181.07
大	47	53	115.8 ± 16	102.93
M	94.1	5.9	261.2 ± 28	3600.02
N	64.7	35.3	160 ± 19	289.59
融合	47	53	175.7 ± 26	156.18

图22



PIV-3 评级

抗原	TC-得分	等级
M	3600.02	1 st
HN	912.91	2 nd
蛋白C	190.76	4 th
PP	181.07	5 th
大	102.93	7 th

PIV-3 TC-得分

抗原	TC-得分	等级
M	3600.02	1 st
HN	912.91	2 nd
N	289.59	3 rd
蛋白C	190.76	4 th
PP	181.07	5 th
融合	156.18	6 th
大	102.93	7 th

图23

		粒酶B		$n=13$	
		大小程度		TC-得分	
		$SFC/2 \times 10^5$			
抗原	(+)%	(-)%			
F	12	88		103 ± 27	1113
M	12	88		42 ± 8	454
M2-1	10	90		92 ± 18	299
P	8	92		44 ± 15	70

图24

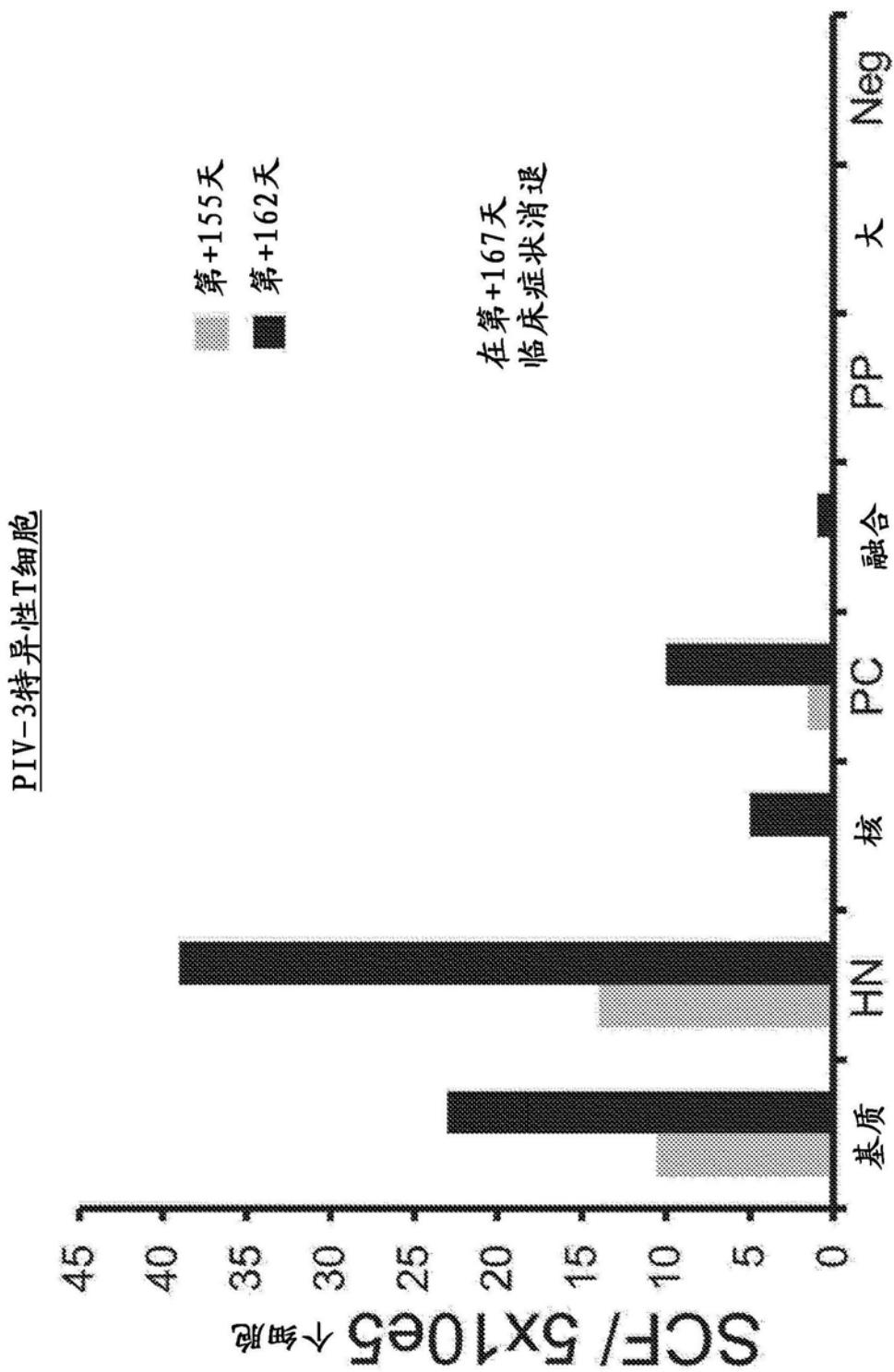


图25

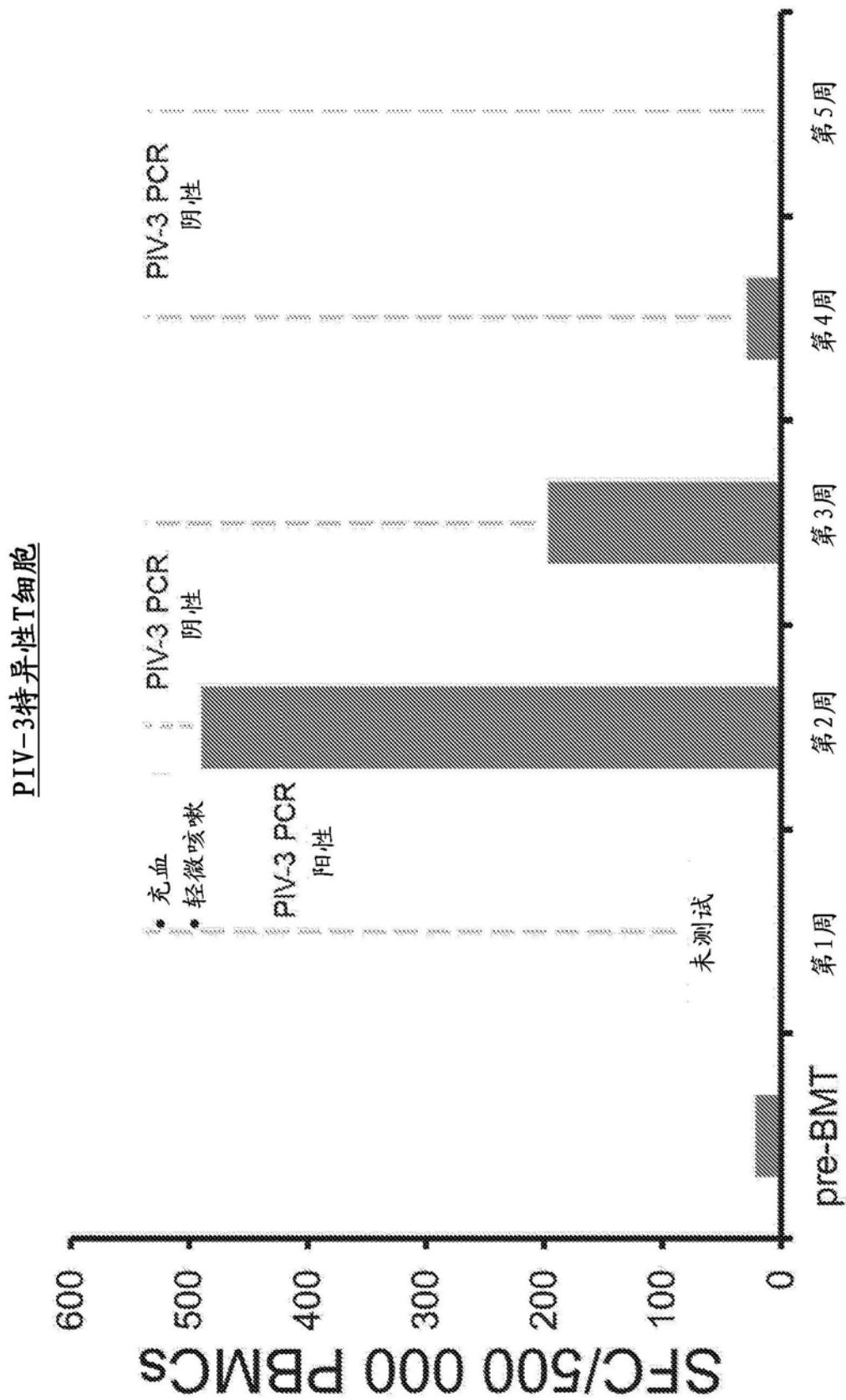


图26

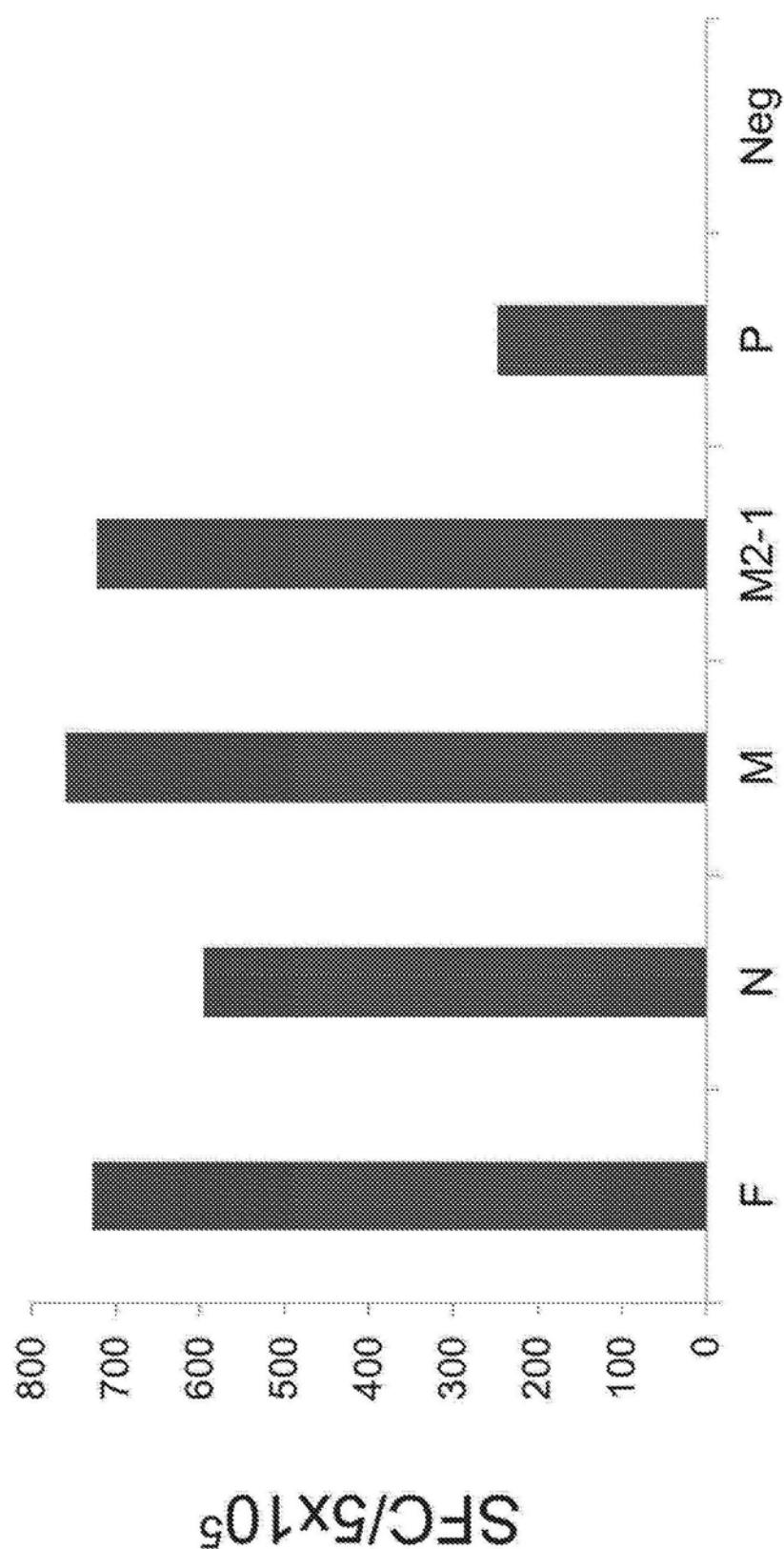


图27

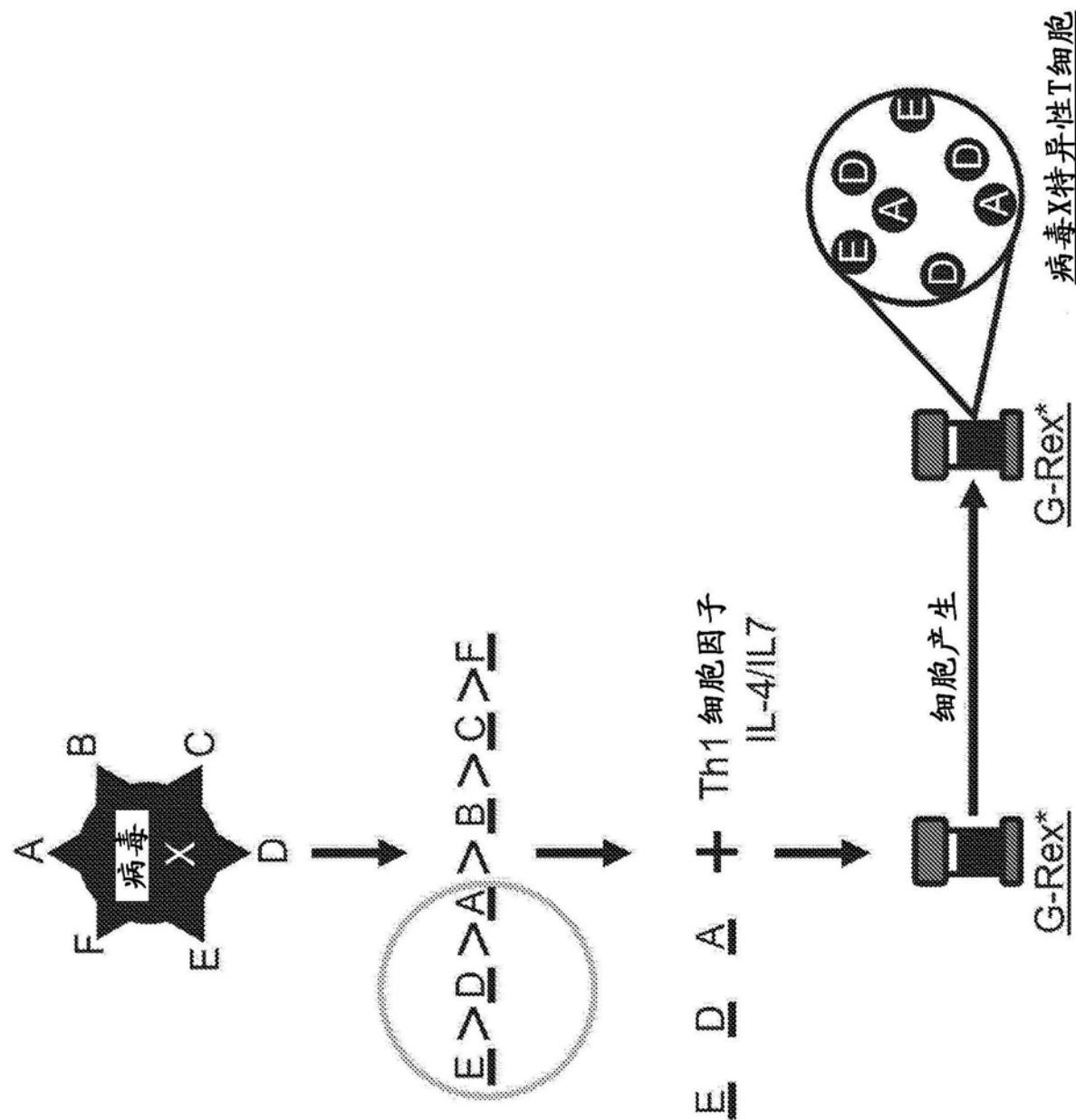


图28

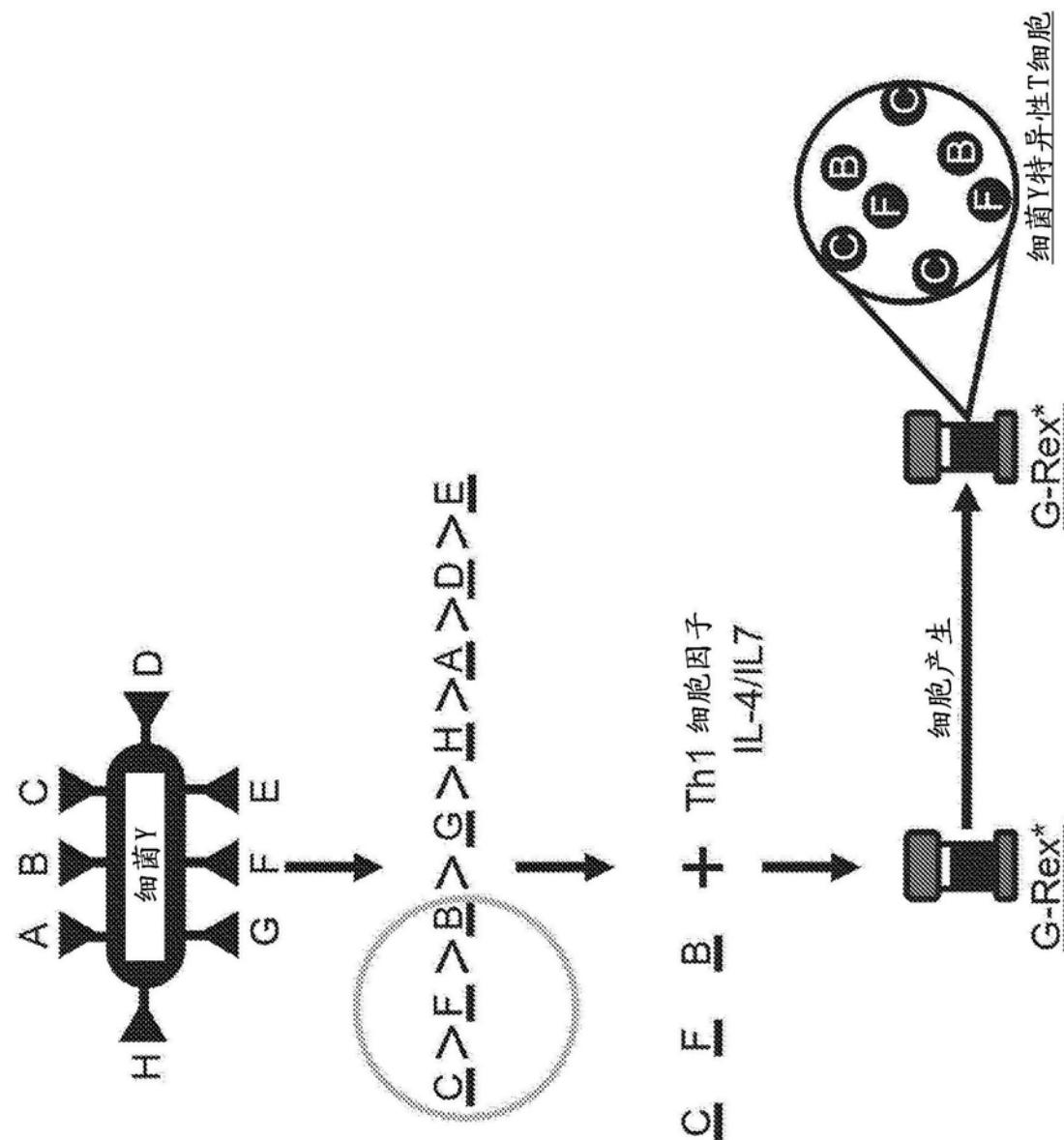


图29

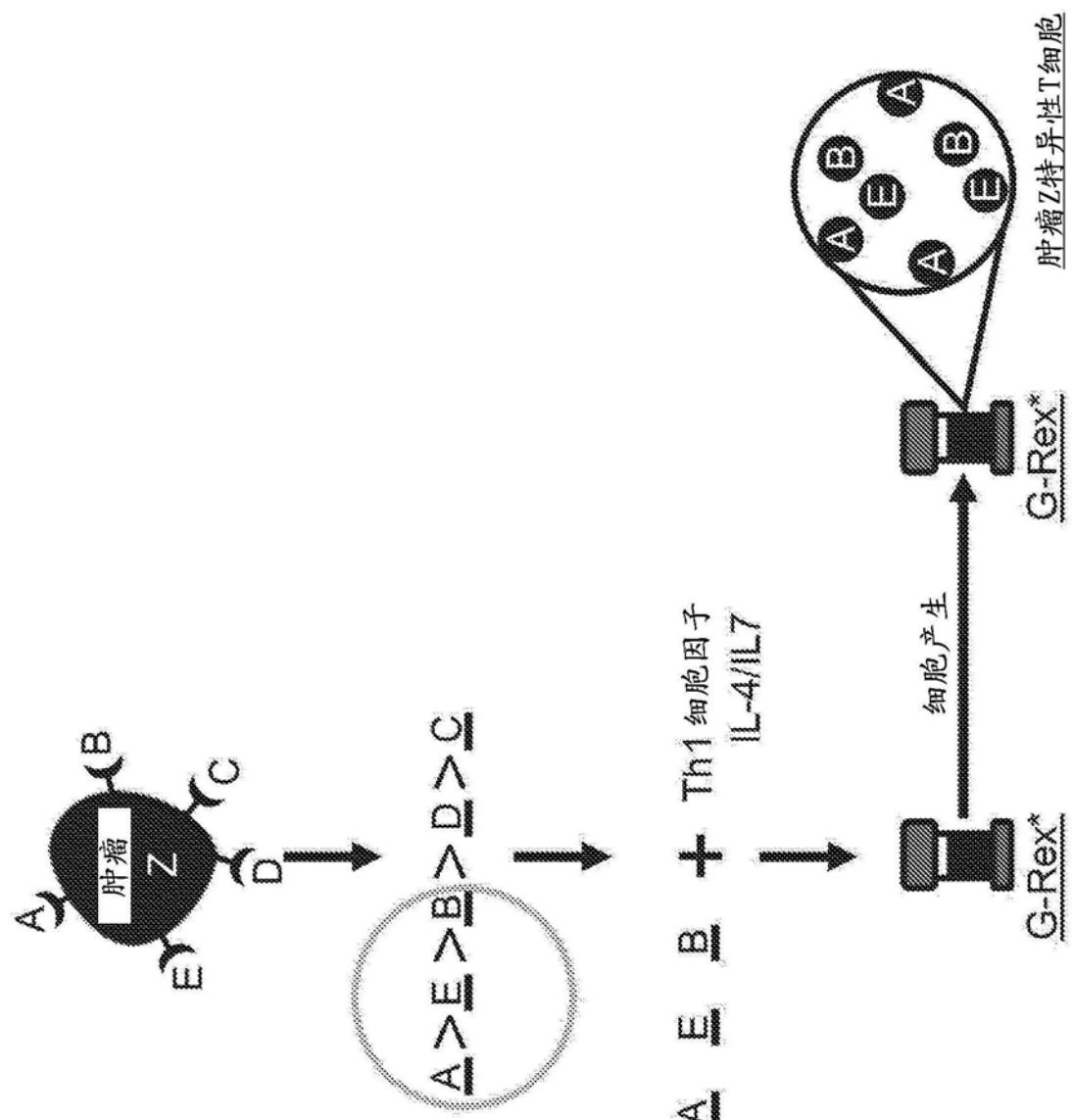


图30

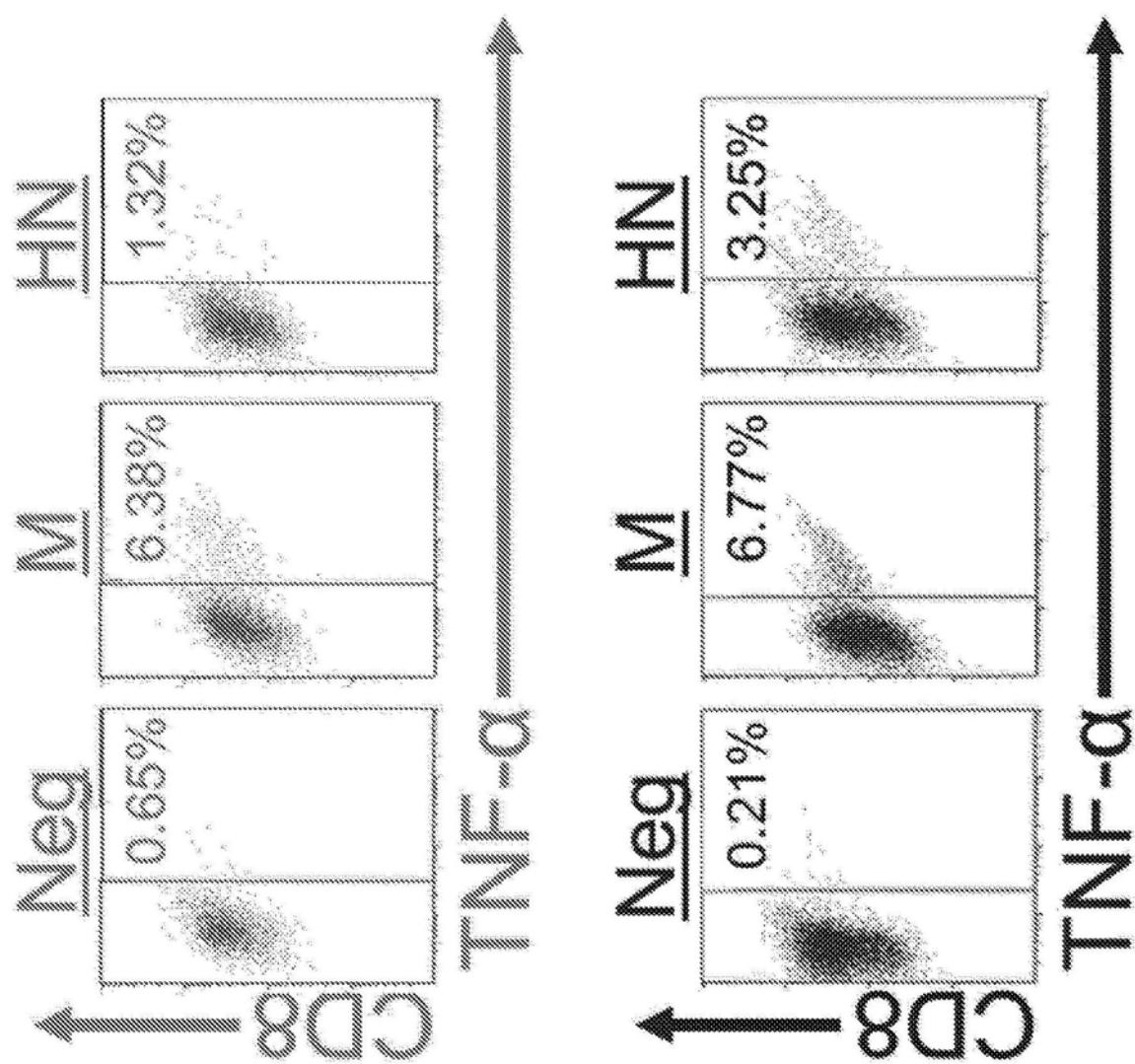


图31

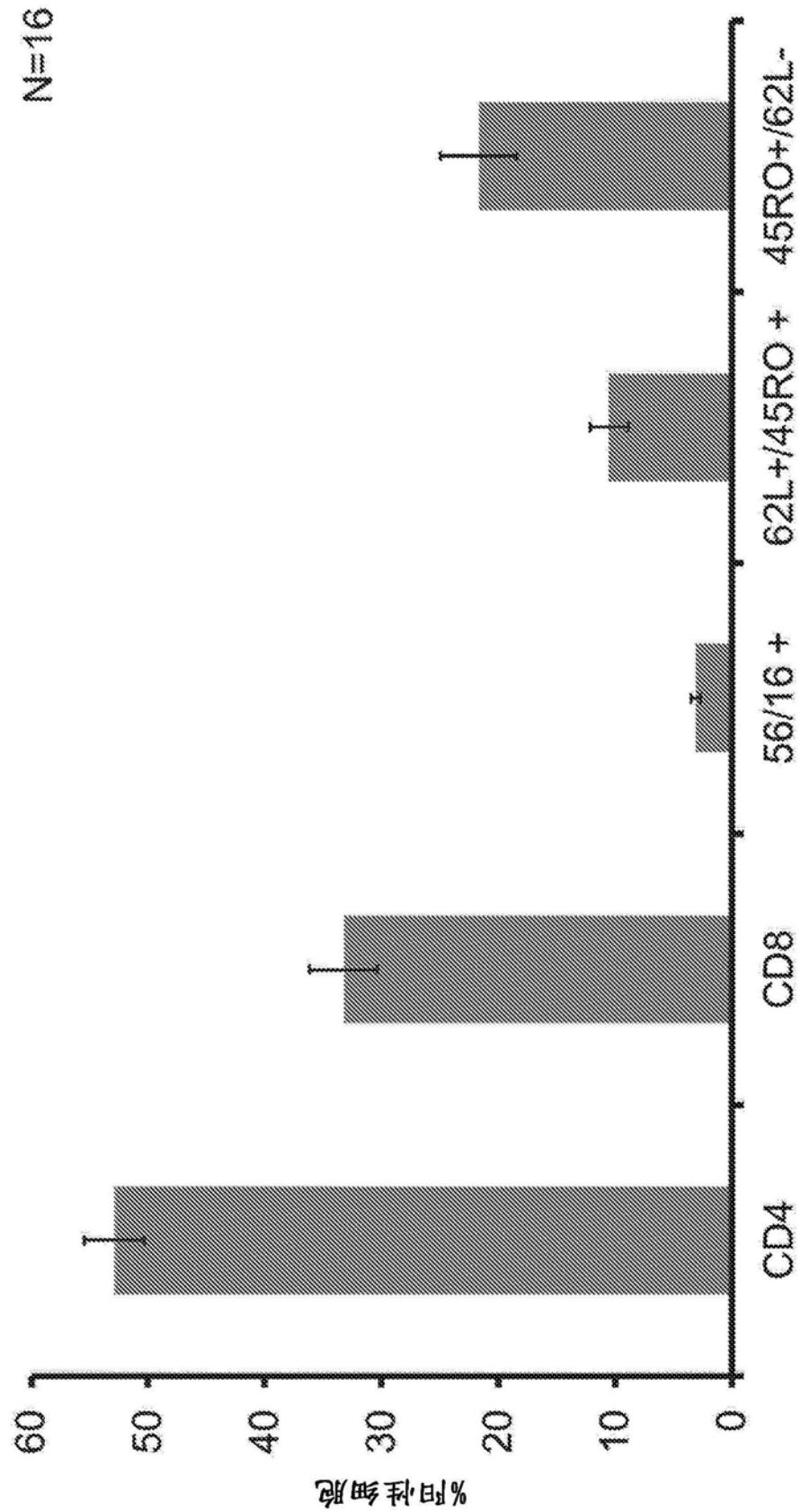


图32

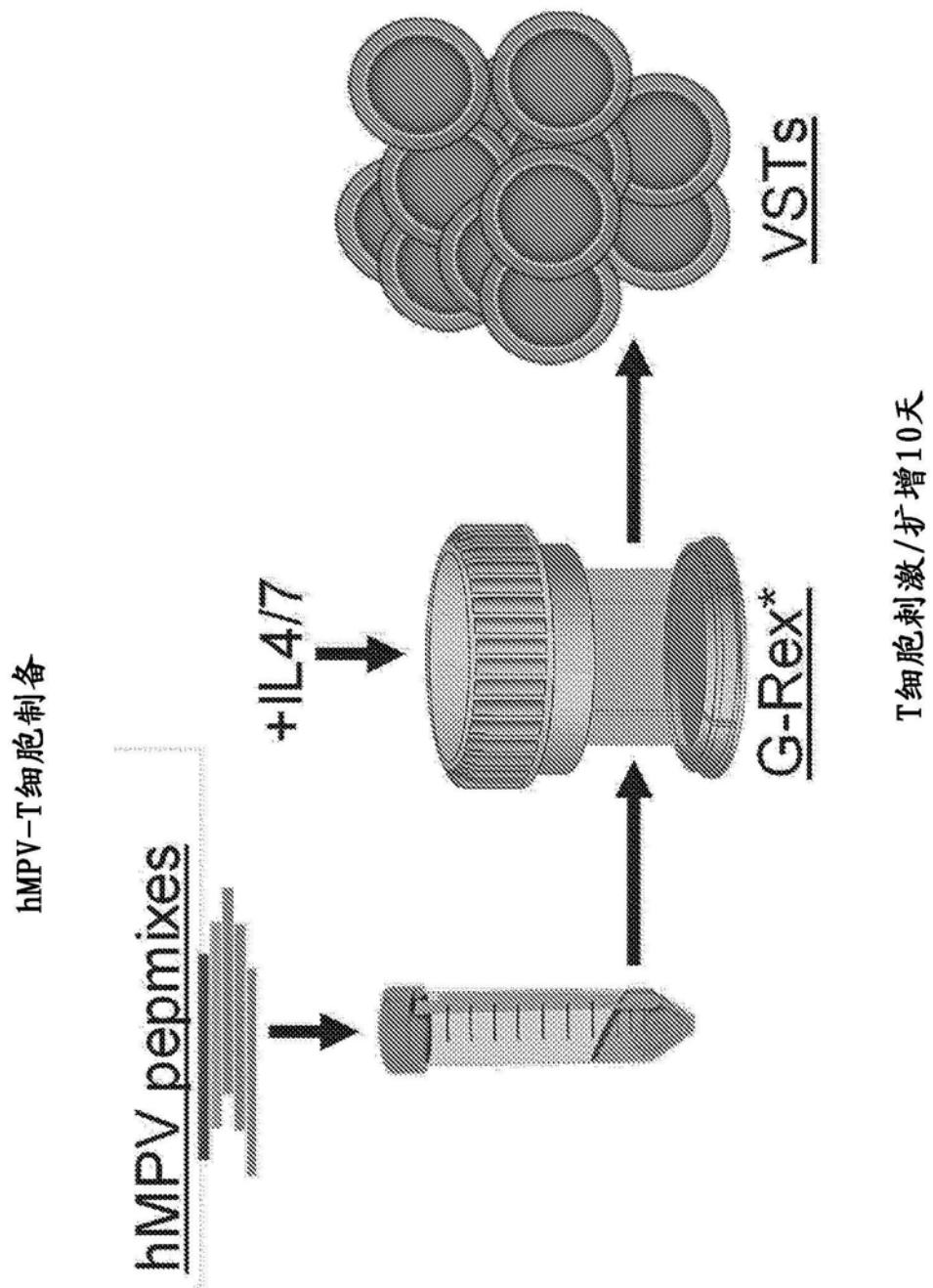


图33

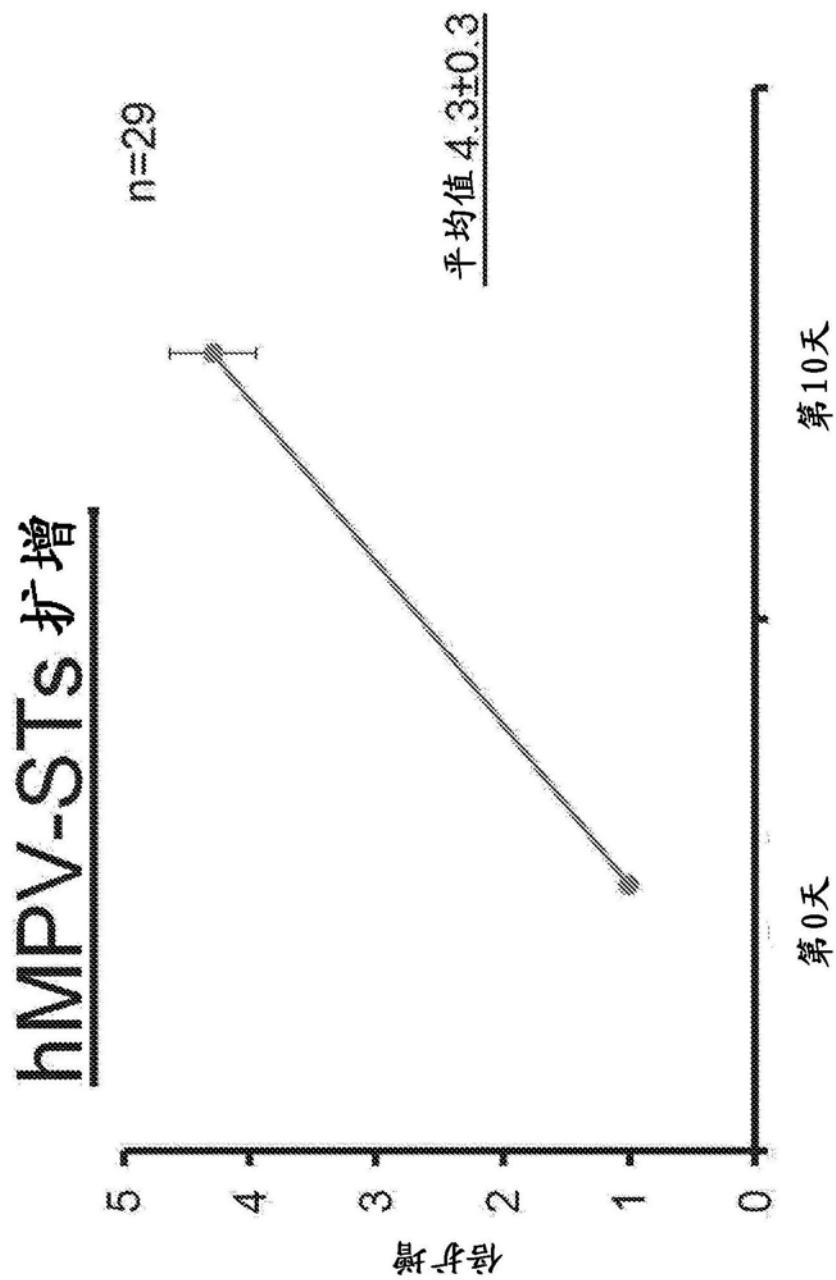


图34

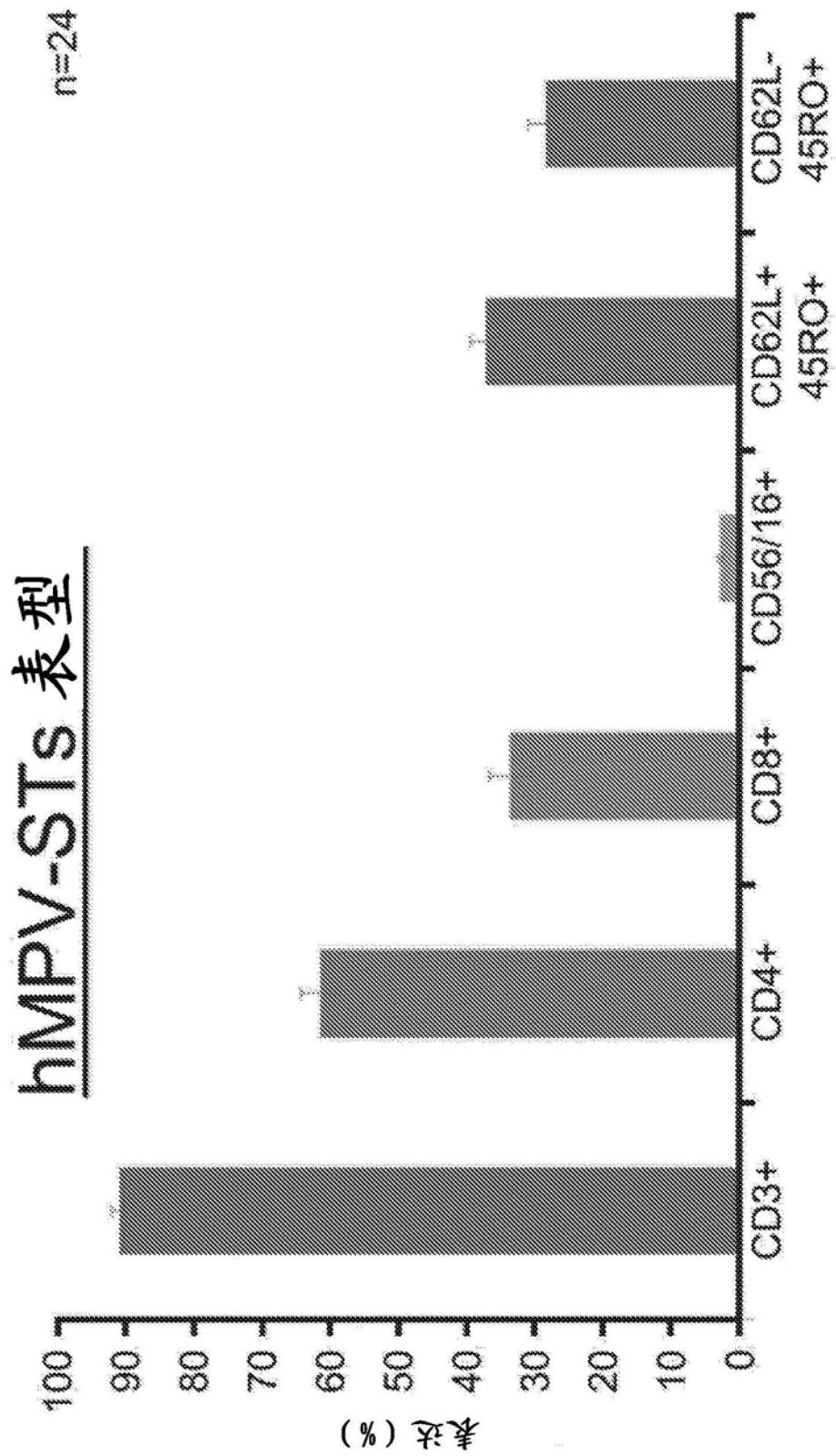


图35

共培养实验

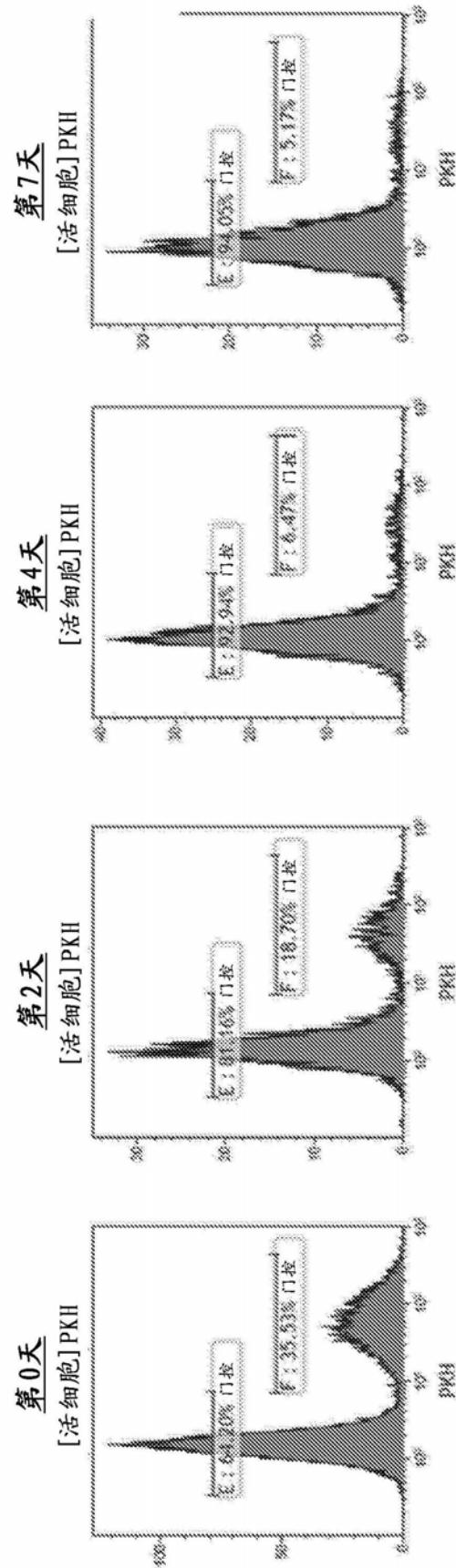


图36

功能：细胞因子产生CD4/8

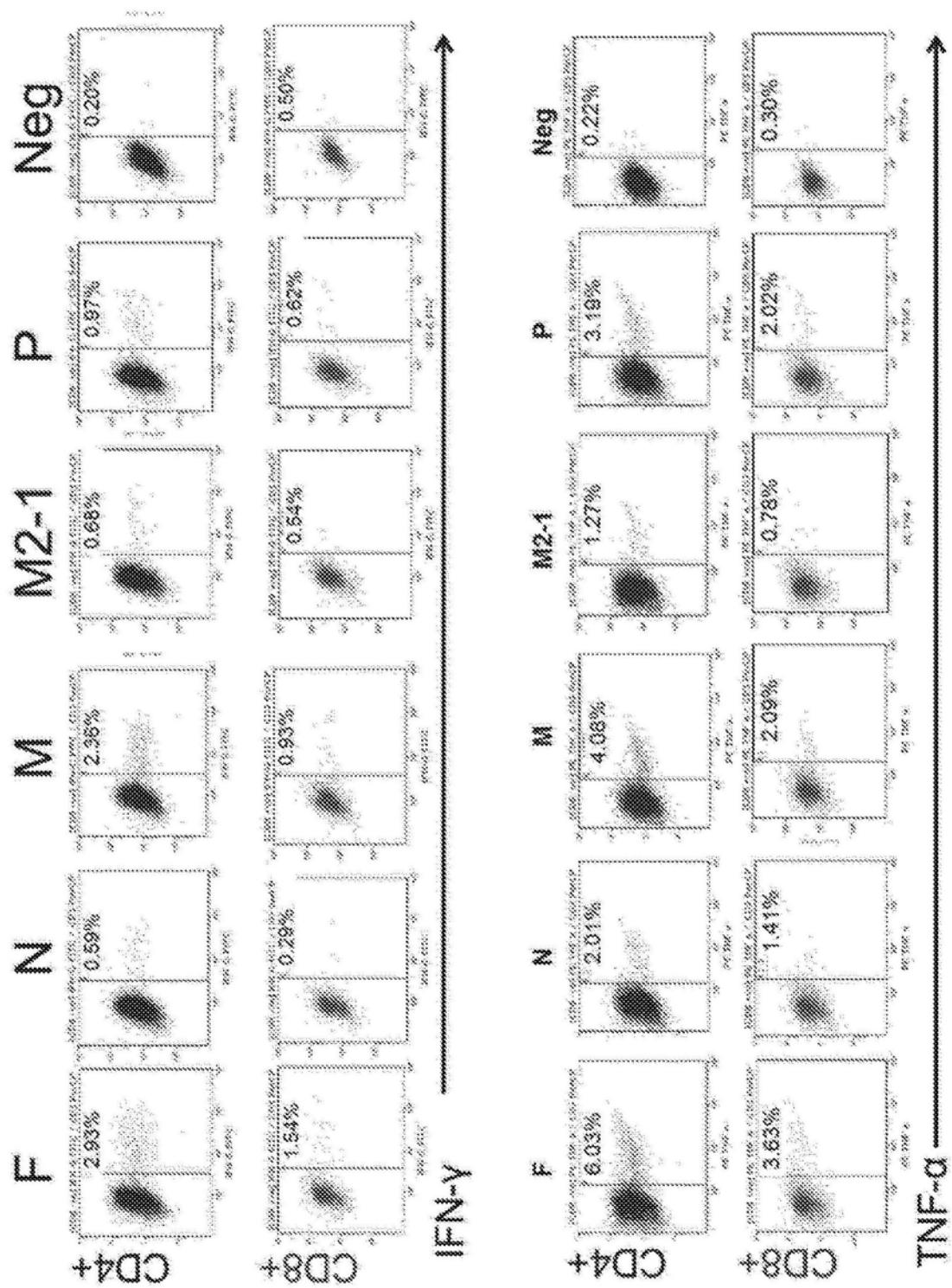


图37

产物定义



T细胞的体外培养

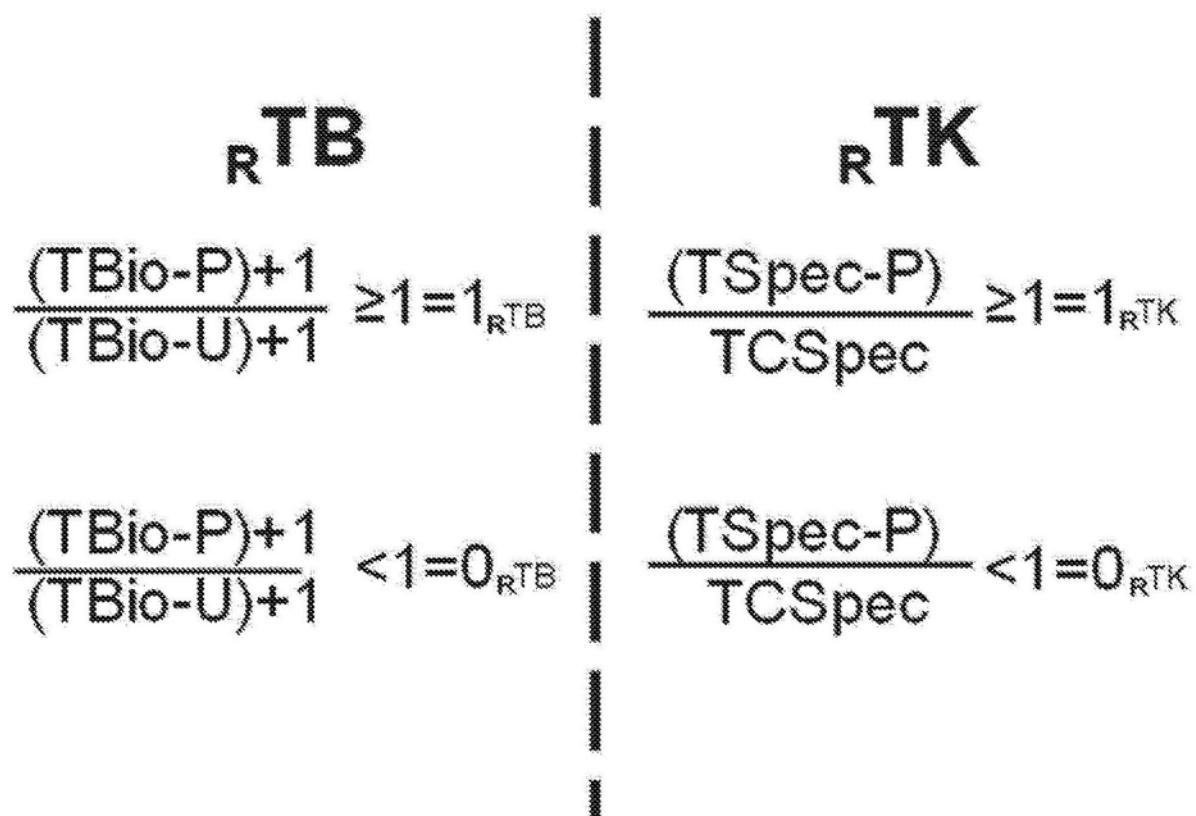


图38

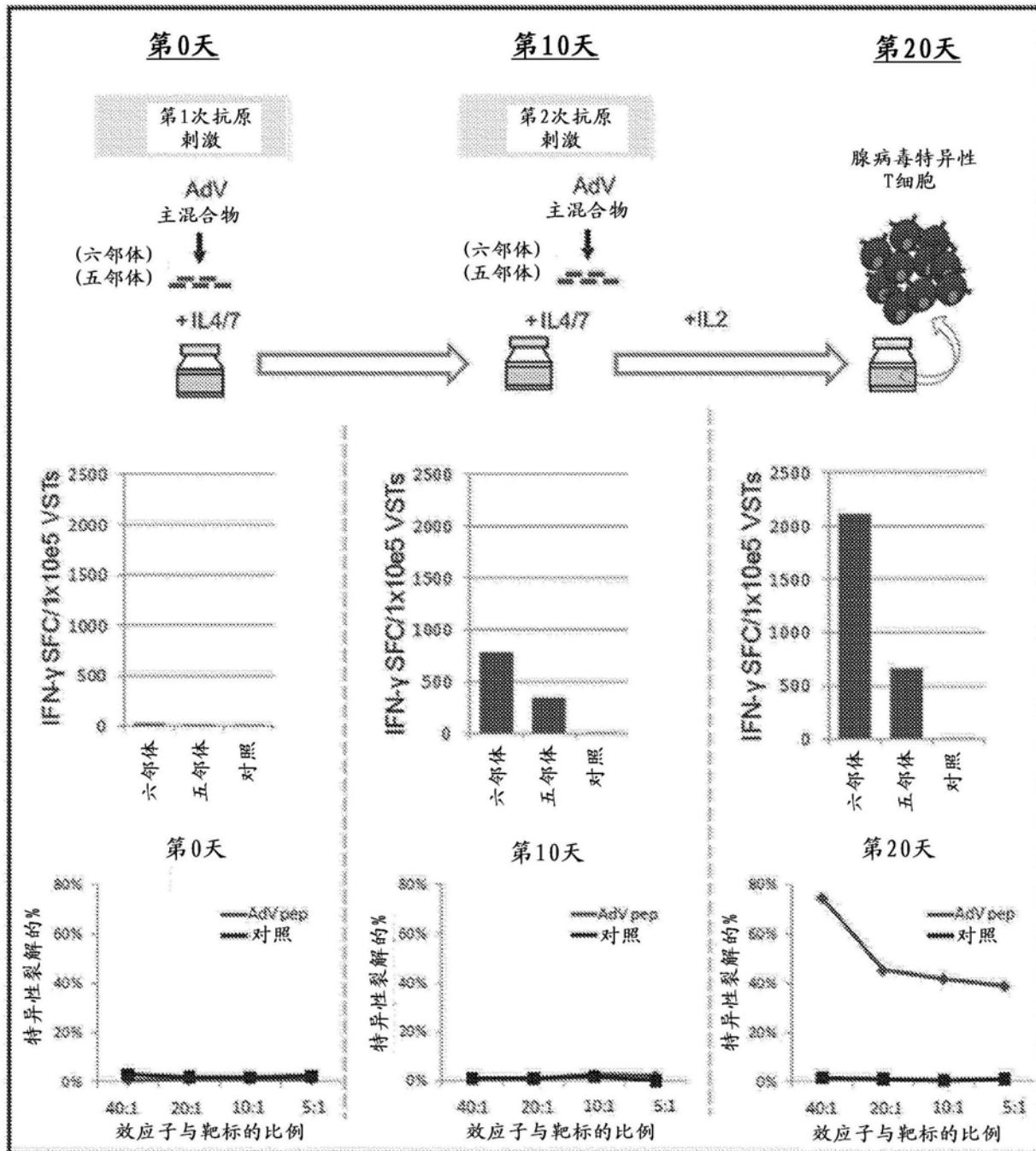


图39

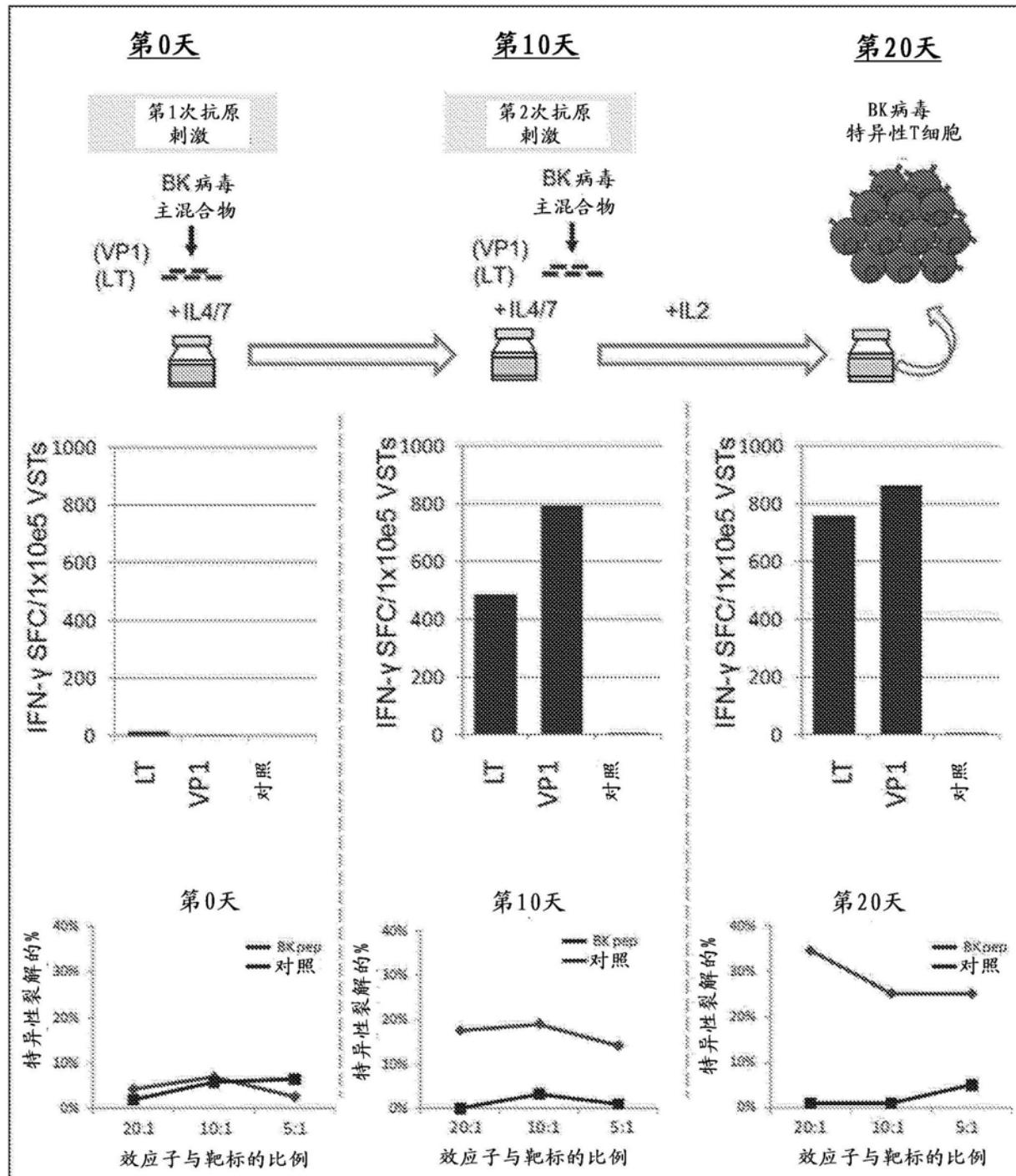


图40

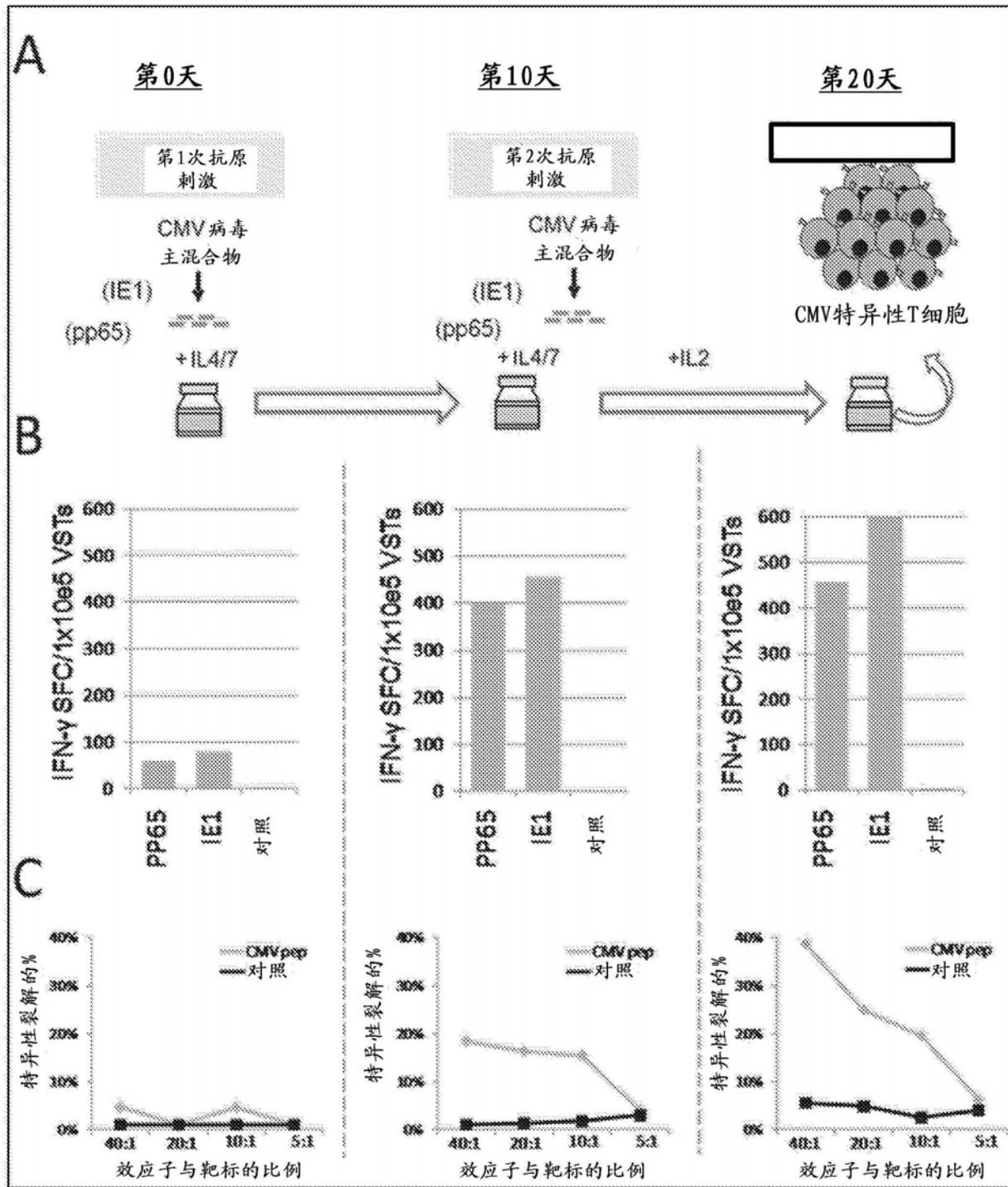


图41

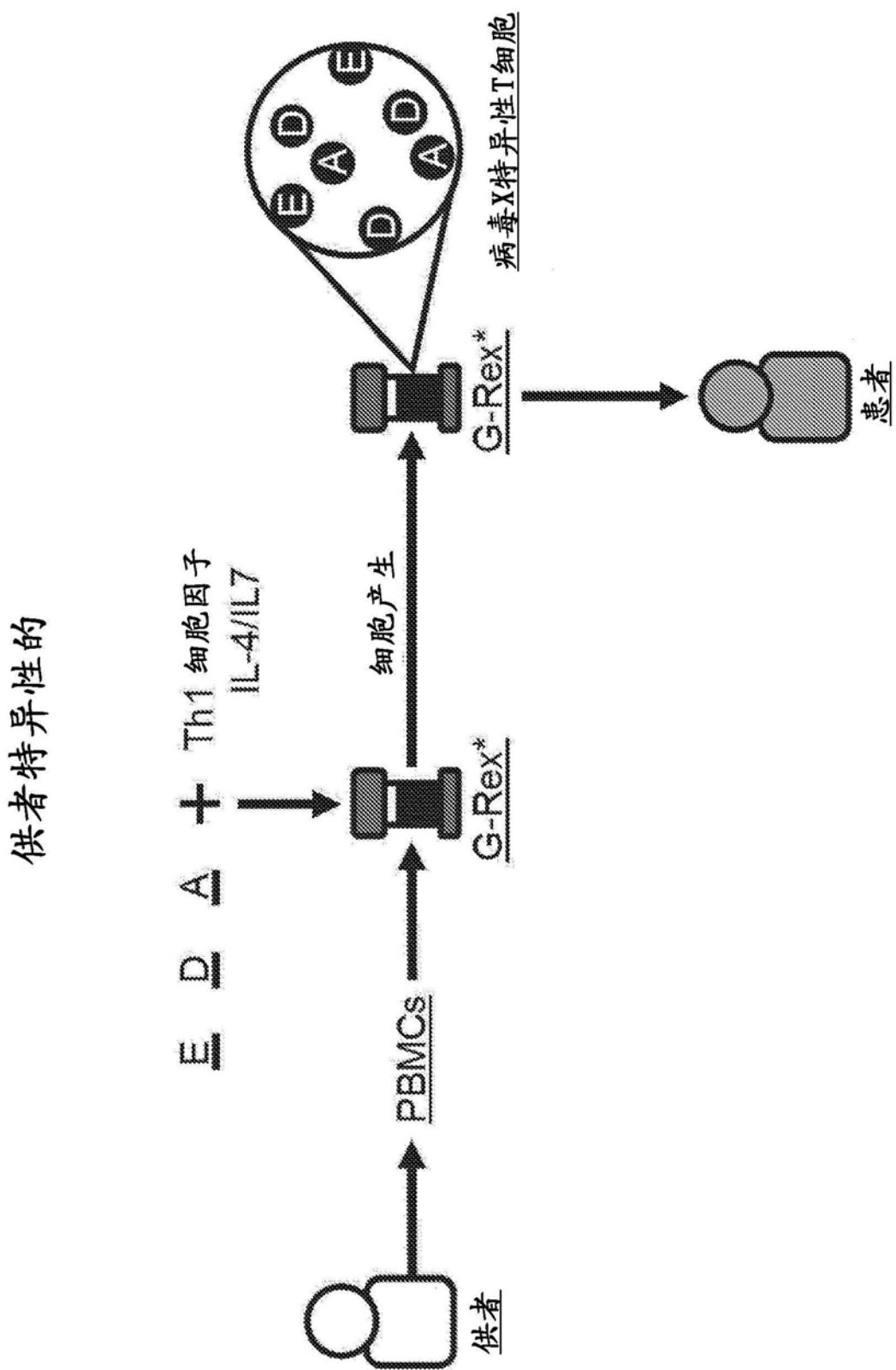


图42

特异性T细胞的现货使用

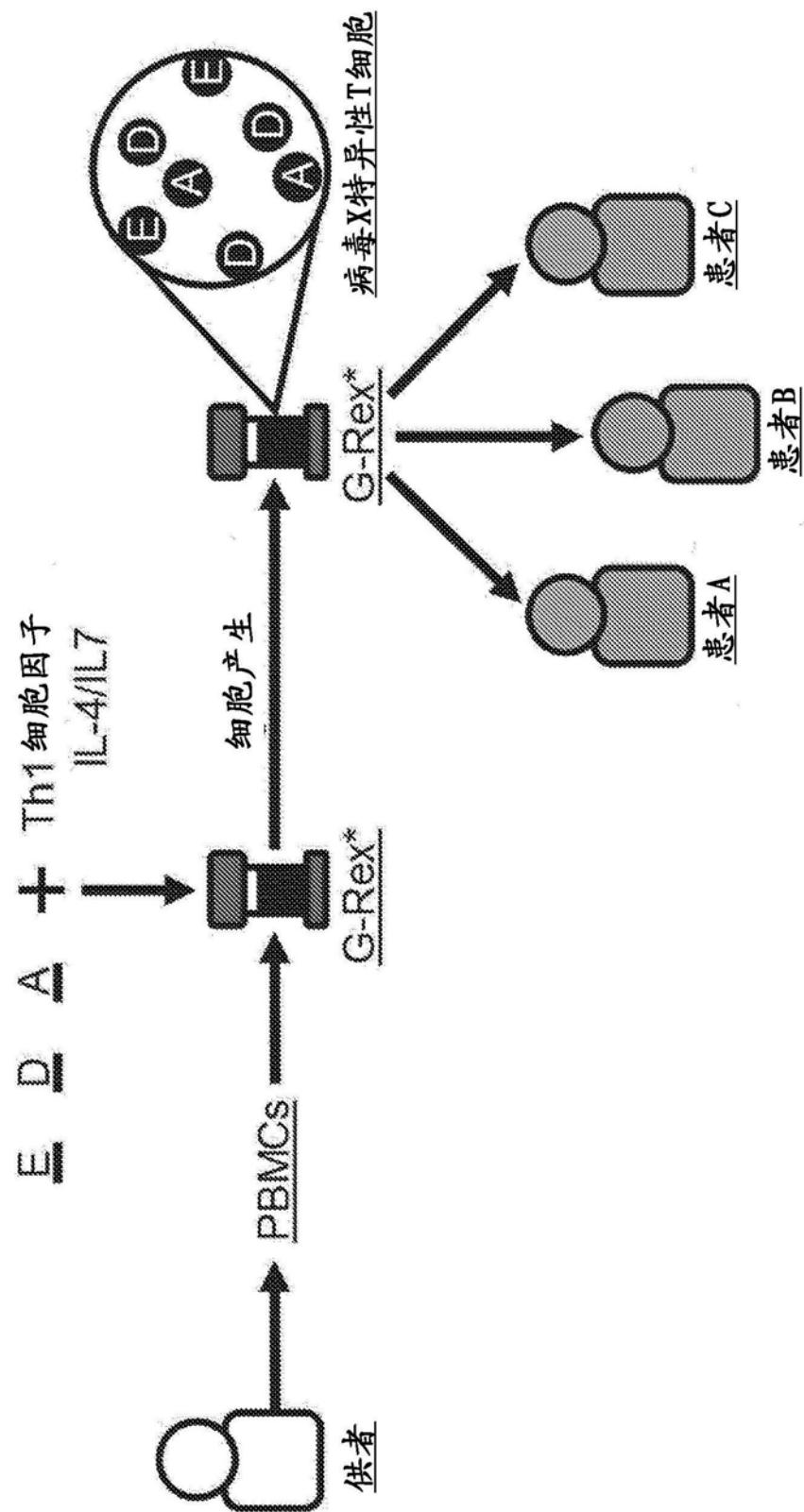


图43

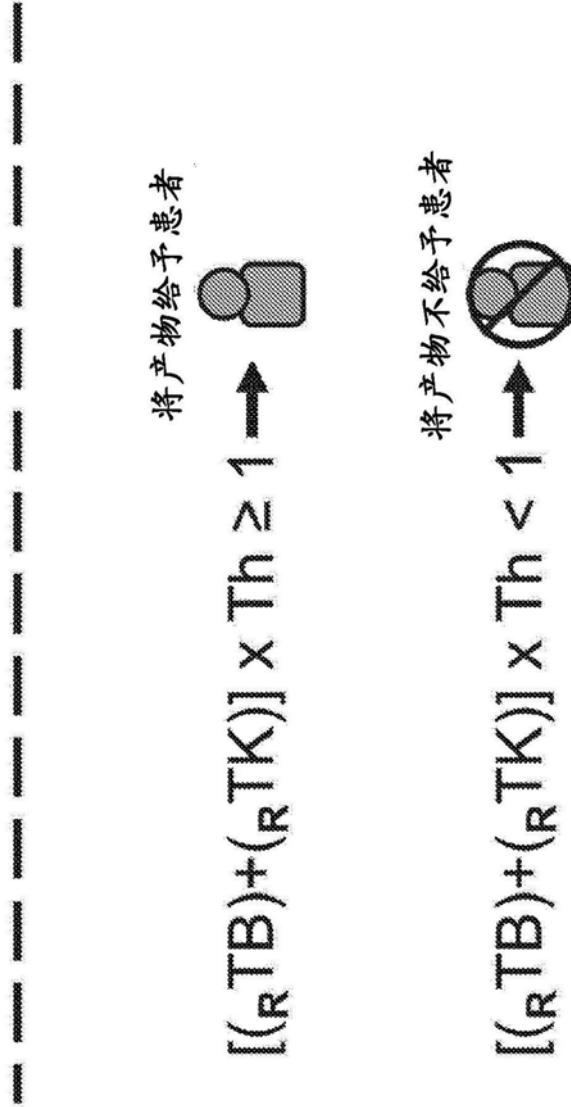
产物使用
$$HLA_P \text{ vs } HLA_{Pt} \geq 1 = 1^{(Th)}$$
$$HLA_P \text{ vs } HLA_{Pt} < 1 = 0^{(Th)}$$


图44

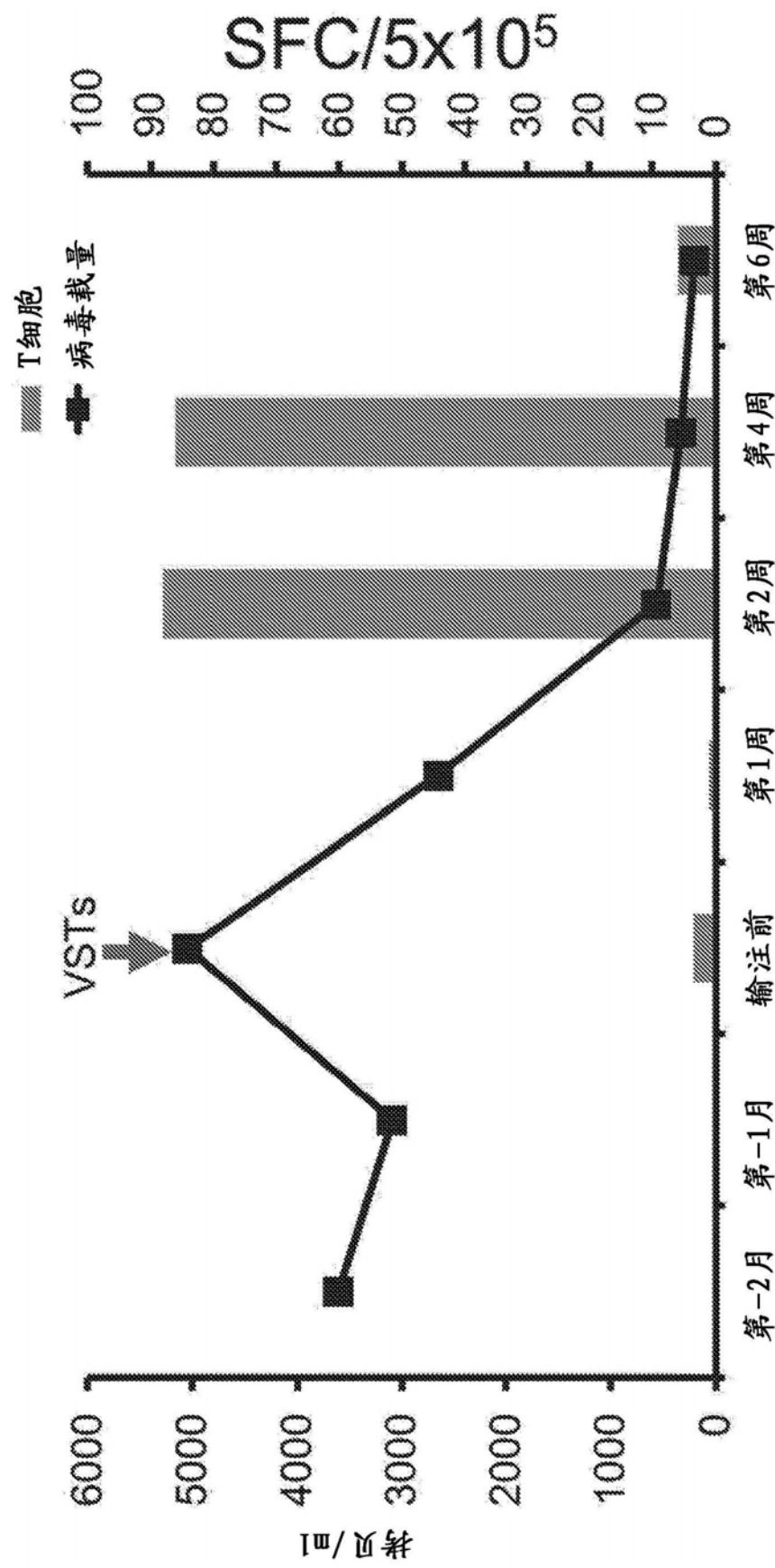
CMV临床应答

图45

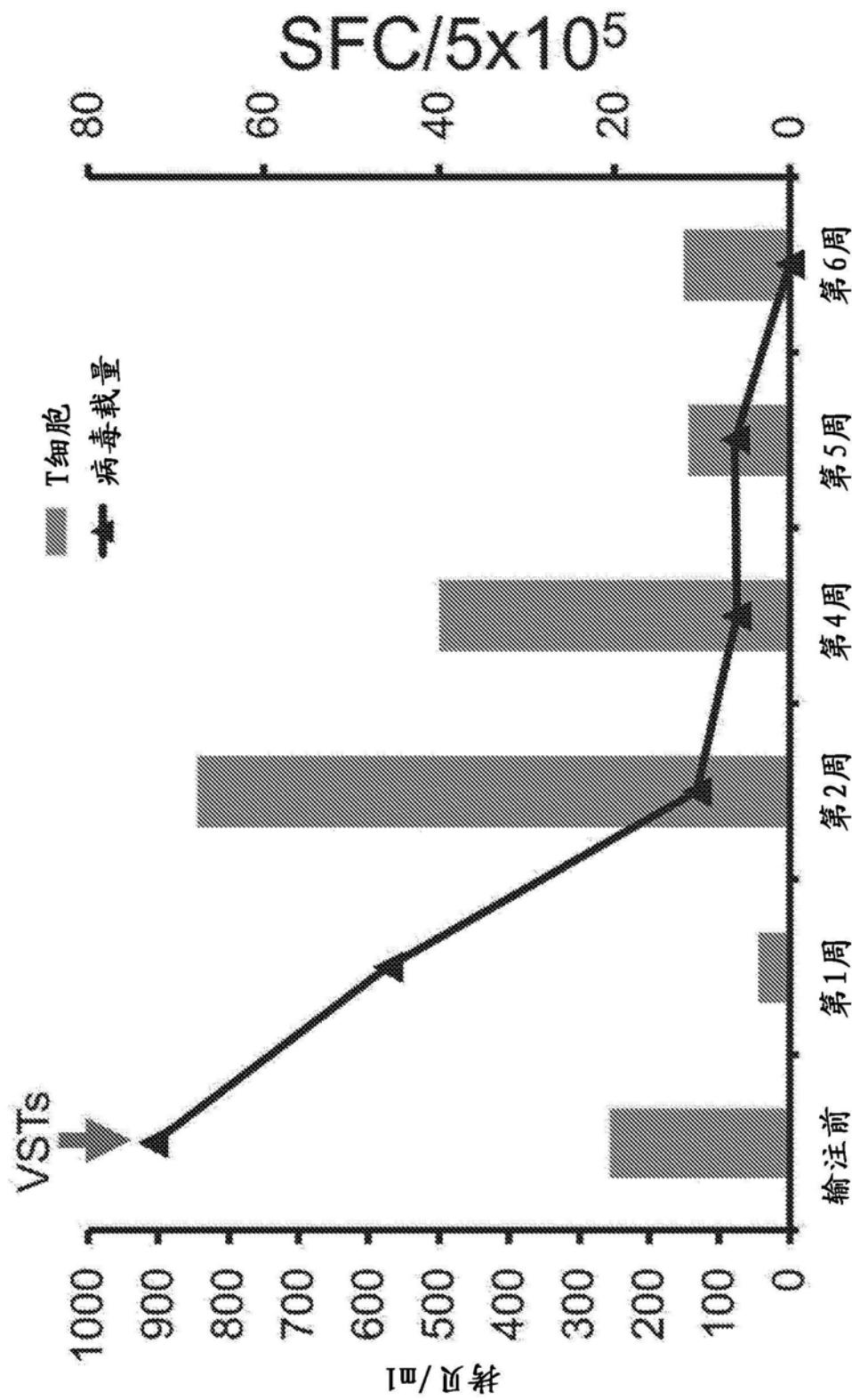
EBV临床应答

图46

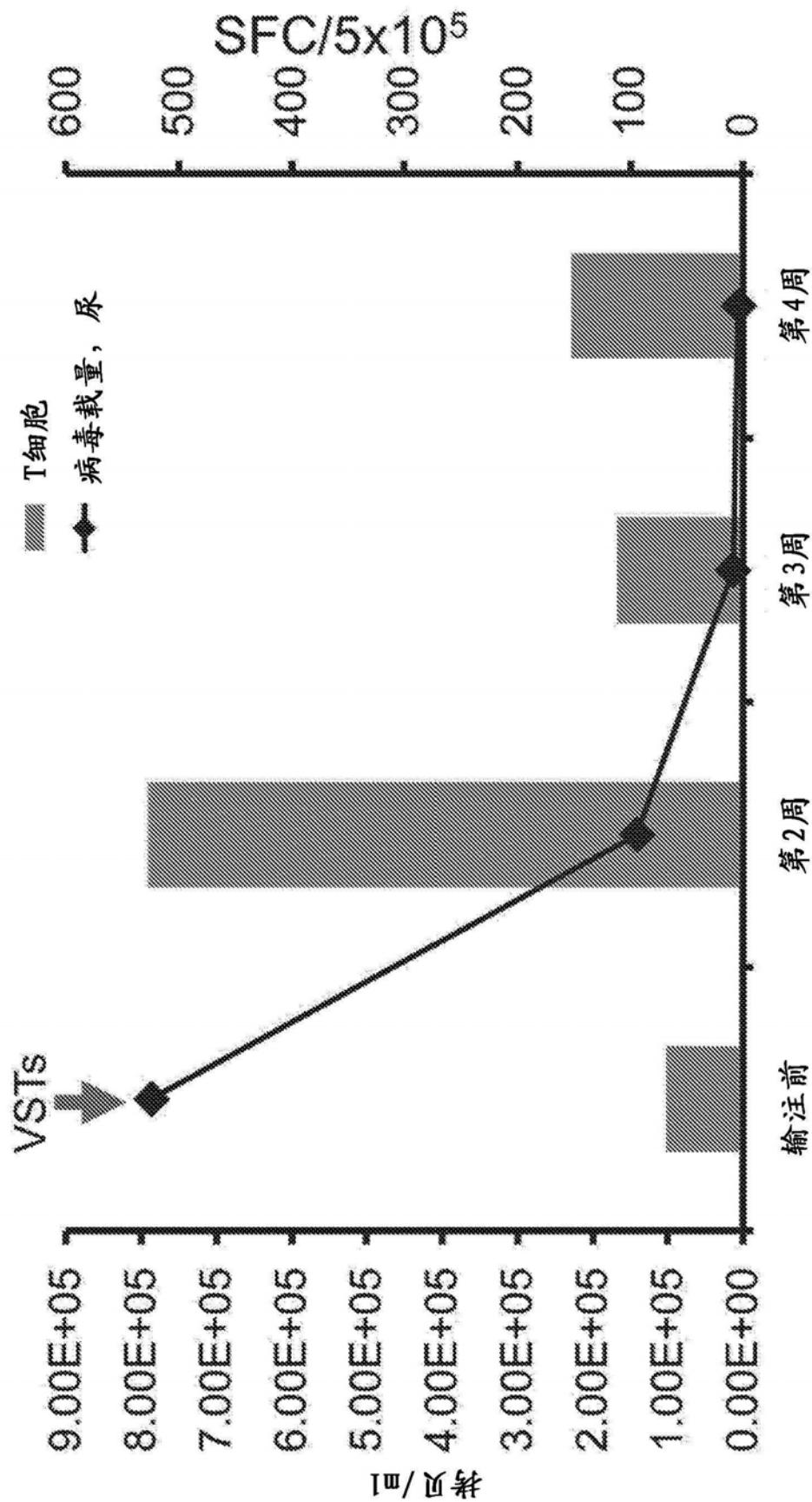
BKV临床应答

图47