(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111733131 A
(43)申请公布日 2020.10.02

(21)申请号 202010606868.1
(22)申请日 2014.07.14
(30)优先权数据
61/846,161 2013.07.15 US
(62)分案原申请数据
201480044285.7 2014.07.14
(71)申请人 美国卫生和人力服务部
地址 美国马里兰州
(72)发明人 克里斯蒂安·S·欣里西斯
史蒂文·A·罗森伯格
(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限责任公司 11204
代理人 王达佐 洪欣
(51)Int.Cl.
C12N 5/0783(2010.01)
C12Q 1/02(2006.01)

权利要求书1页 说明书24页 附图18页

(54)发明名称

制备抗人乳头瘤病毒抗原的T细胞的方法

(57)摘要

公开了制备分离的人乳头瘤病毒(HPV)-特异性T细胞群的方法,其包括将HPV阳性肿瘤样品分成多个碎块;分别培养所述多个碎块;从培养的多个碎块中获得T细胞;检测用于特异性自体HPV阳性肿瘤识别的T细胞;选择显示出特异性自体HPV阳性肿瘤识别的T细胞;以及扩增所选择的T细胞数目以产生用于过继性细胞疗法的HPV特异性T细胞群。还公开了采用上述T细胞治疗或者预防癌症的相关方法。

CN 111733131 A

1.制备人乳头瘤病毒(HPV)特异性T细胞群的方法,所述方法包括:

将HPV阳性肿瘤样品分成多个碎块;

在仅存在一种细胞因子的情况下分别培养所述多个碎块;

从培养的多个碎块中获得T细胞;

检测用于特异性自体HPV阳性肿瘤识别和HPV抗原识别中的一种或两种的T细胞;

选择显示出特异性自体HPV阳性肿瘤识别和HPV抗原识别中的一种或两种的T细胞;以及

扩增所选择的T细胞数目以产生HPV特异性T细胞群。

2.如权利要求1所述的方法,其中扩增所选择的T细胞数目包括采用(i)受辐射的同种异体饲养细胞和(ii)受辐射的自体饲养细胞中的一种或两种,以及(iii)OKT3抗体和(iv)白细胞介素(IL)-2中的一种或两种扩增细胞数目。

3.如权利要求1或2所述的方法,其中所述细胞因子是IL-2。

4.制备HPV特异性T细胞群的方法,所述方法包括:

将HPV阳性肿瘤样品分成多个碎块;

分别培养所述多个碎块;

从培养的多个碎块中获得T细胞;

检测用于特异性自体HPV阳性肿瘤识别和HPV抗原识别中的一种或两种的T细胞;

选择显示出特异性自体HPV阳性肿瘤识别和HPV抗原识别中的一种或两种的T细胞;以及

采用(i)OKT3抗体和(ii)白细胞介素(IL)-2中的一种或两种扩增所选择的T细胞数目以产生HPV特异性T细胞群。

5.如权利要求4所述的方法,其中分别培养所述多个碎块包括在仅存在一种细胞因子的情况下培养所述多个碎块。

6.如权利要求5所述的方法,其中所述细胞因子是IL-2。

7.如权利要求4-6中任一项所述的方法,其中扩增所选择的T细胞数目还包括采用受辐射的同种异体饲养细胞和受辐射的自体饲养细胞中的一种或两种。

8.如权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述HPV特异性T细胞群识别HPV 16阳性癌细胞。

9.如权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述HPV特异性T细胞群识别HPV 16E6。

10.如权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述HPV特异性T细胞群识别HPV 16E7。

制备抗人乳头瘤病毒抗原的T细胞的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求于2013年7月15日提交的美国临时专利申请第61/846,161号的权益,所述临时专利申请通过引用整体并入本文。

[0003] 关于联邦政府资助研究与开发的声明

[0004] 本发明是由美国国立卫生研究院国家癌症研究所在政府支持下完成的,项目编号为BC010984-05。政府拥有本发明的某些权利。

[0005] 发明背景

[0006] 一些癌症类型,例如宫颈癌的主要原因是人乳头瘤病毒(HPV)感染。尽管在诸如化疗的治疗中取得进展,但包括HPV相关癌症在内的许多癌症的预后可能很差。因此,存在对癌症,特别是HPV相关癌症的其他治疗的未得到满足的需求。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明的实施方案提供了制备HPV特异性T细胞群的方法,所述方法包括:将HPV阳性肿瘤样品分成多个碎块;在仅存在一种细胞因子的情况下分别培养多个碎块;从培养的多个碎块中获得T细胞;检测用于特异性自体HPV阳性肿瘤识别和HPV抗原识别中的一种或两种的T细胞;选择显示出特异性自体HPV阳性肿瘤识别和HPV抗原识别中的一种或两种的T细胞;以及扩增所选择的T细胞数目以产生HPV特异性T细胞群。

[0009] 本发明的另一个实施方案提供了制备HPV特异性T细胞群的方法,该方法包括:将HPV阳性肿瘤样品分成多个碎块;分别培养多个碎块;从培养的多个碎块中获得T细胞;检测用于特异性自体HPV阳性肿瘤识别和HPV抗原识别中的一种或两种的T细胞;选择显示出特异性自体HPV阳性肿瘤识别和HPV抗原识别中的一种或两种的T细胞;以及采用(i)OKT3抗体和(ii)白细胞介素(IL)-2中的一种或两种扩增所选择的T细胞数目以产生HPV特异性T细胞群。

[0010] 本发明的又一实施方案提供了治疗或预防哺乳动物中的癌症的方法,该方法包括:将HPV阳性肿瘤样品分成多个碎块;分别培养多个碎块;从培养的多个碎块中获得T细胞;检测用于特异性自体HPV阳性肿瘤识别和HPV抗原识别中的一种或两种的T细胞;选择显示出特异性自体HPV阳性肿瘤识别和HPV抗原识别中的一种或两种的T细胞;扩增所选择的T细胞数目以产生用于过继性细胞疗法的HPV特异性T细胞群;以及以有效治疗或预防哺乳动物中的癌症的量向哺乳动物施用扩增数目的T细胞。

[0011] 如前面所述的方法,其中所述HPV特异性T细胞群识别HPV 18阳性癌细胞。

[0012] 如前面所述的方法,其中所述HPV特异性T细胞群识别HPV 18E6。

[0013] 如前面所述的方法,其中所述HPV特异性T细胞群识别HPV 18E7。

[0014] 本发明的一个实施方案提供了按照前面所述的方法制备的HPV特异性T细胞群,其用于治疗或预防哺乳动物中的癌症。

[0015] 本发明的另一个实施方案提供了如下述方法制备的HPV特异性T细胞群,其用于治疗或预防哺乳动物中的癌症,所述方法包括:将HPV阳性肿瘤样品分成多个碎块;分别培养所述多个碎块;从培养的多个碎块中获得T细胞;检测用于特异性自体HPV阳性肿瘤识别和

HPV抗原识别中的一种或两种的T细胞;选择显示出特异性自体HPV阳性肿瘤识别和HPV抗原识别中的一种或两种的T细胞;以及扩增所选择的T细胞数目以产生用于过继性细胞疗法的HPV特异性T细胞群。

[0016] 在一个实施方案中,所述癌症为宫颈癌、口咽癌、肛门癌、肛管癌、直肠肛门癌、阴道癌、外阴癌或阴茎癌。

[0017] 在一个实施方案中,所述癌症是HPV阳性癌症。

[0018] 在一个实施方案中,用于上述用途的HPV特异性T细胞群,还包括非清髓性淋巴清除化疗剂。

[0019] 在一个实施方案中,用于上述用途的HPV特异性T细胞群,其中

[0020] (a)所述T细胞被修饰以表达促进所述T细胞生长和活化的T细胞生长因子;或(b)将促进所述T细胞生长和活化的T细胞生长因子与所述T细胞同时或在所述T细胞之后施用于哺乳动物。

[0021] 附图简述

[0022] 图1A是显示在与靶标gp100肽库(有阴影的柱)或HPV 18 E7肽库(无阴影的柱)共培养后,由1号患者的22个肿瘤碎块(F1-F22)产生的效应肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)或黑色素瘤TIL分泌的干扰素-γ(IFN-γ)(pg/mL)的图。

[0023] 图1B是显示在与靶自体肿瘤细胞系(无阴影的柱)或624细胞(黑色素瘤细胞系)(有阴影的柱)共培养后,效应黑色素瘤TIL或由1号患者的22个肿瘤碎块(F1-F22)产生的TIL分泌的IFN-γ(pg/mL)的图。

[0024] 图2A是显示在与靶自体肿瘤细胞(有阴影的柱)、自体组织的外周血单核细胞(PBMC)(有正斜线阴影的柱),与所有I类基因座匹配的肿瘤细胞(有反斜线阴影的柱),HLA不匹配的HeLa细胞(有纵条纹的柱)或HLA不匹配的CaSki细胞(有横条纹的柱)共培养后,由1号患者的F16、F17或F22肿瘤碎块产生的效应TIL,或给予患者用于治疗的细胞(“输液袋”)分泌的IFN-γ(pg/mL)的图。

[0025] 图2B是显示在单独培养(无肿瘤)或与用针对HLA-A、HLA-B、HLA-C的沉默RNA或针对不相关靶标的RNA(非靶向)的自体肿瘤细胞共培养后,由1号患者的效应TIL分泌的IFN-γ(pg/mL)的图。

[0026] 图2C是显示在无抗体(黑色柱)、有抗HLA-A2抗体(有反斜线阴影的柱)或抗II类抗体(有正斜线阴影的柱)的情况下,在与靶细胞(效应/靶细胞:1号患者的TIL/自体肿瘤细胞;DMF5/624细胞;或F15/HPV18E6$_{121-135}$)共培养后,由效应TIL分泌的IFN-γ(pg/mL)的图。白色柱表示单独培养的效应细胞。

[0027] 图3是显示在与gp100肽库(白色柱)、OKT3抗体(有横条纹的柱)或用HPV 18 E7肽库(黑色柱)、HPV 18 E7肽库和W6/32(有细的正斜线阴影的柱)、HPV 16 E7$_{11-19}$(有粗的正斜线阴影的柱)、HPV 16 E7$_{11-19}$和W6/32(有方格的柱)、HPV 16 E7$_{11-19}$和HB145(有垂直交叉的柱)、HPV 18E6$_{121-135}$(有反斜线阴影的柱)、HPV 18 E6$_{121-135}$和W6/32(有交叉的柱)或HPV 18 E6$_{121-135}$和HB 145(有白色勾勒黑色长方形的柱)脉冲刺激的树突细胞(DC)共培养后,由1号患者的F16或F22肿瘤碎块的效应TIL;给予患者用于治疗的细胞(“输液袋”);黑色素瘤TIL1、2或3(从黑色素瘤肿瘤培养的TIL);mE7TCR(经转导以表达针对HPV 16 E7$_{11-19}$的TCR的T细胞);或F15TIL(来自另一名患者的TIL,其对HPV 18 E6$_{121-135}$具有反应性,为II类限制性

的,因此可以用HB145封闭)分泌的IFN-γ(pg/mL)的图。

[0028] 图4A和4B是显示在与gp100肽库(灰色柱)或HPV 18 E7肽库(黑色柱)共培养后,由1号患者的F16肿瘤碎块克隆的效应TIL的1-24号克隆(A)或24-48号克隆(B)分泌的IFN-γ(pg/mL)的图。

[0029] 图5是显示在与用HPV 18 E6肽库(黑色柱)、HPV 18 E7肽库(灰色柱)或gp100肽库(对照)脉冲刺激的树突细胞共培养后,由12号患者的36个不同的肿瘤碎块(F1-F36)或黑色素瘤TIL(DM5)(对照)分泌的IFN-γ(pg/mL)的图。

[0030] 图6是显示在与用编码绿色荧光蛋白(GFP)(白色柱)或HPV 18E6(灰色柱)的慢病毒载体转导的DC或用gp100肽库(有正斜线阴影的柱)或HPV 18 E6肽库(有反斜线阴影的柱)脉冲刺激的DC共培养后,由12号患者的F1肿瘤碎块或黑色素瘤TIL1、2或3产生的效应TIL分泌的IFN-γ(pg/mL)的图。有横条纹的柱表示与OKT3抗体培养的TIL。

[0031] 图7A是显示在单独培养(灰色柱)或与HPV18 E6肽库(黑色柱)共培养后,1、3、12和20号克隆分泌的肿瘤坏死因子(TNF)α(pg/mL)的图。

[0032] 图7B是显示在单独培养(白色柱)或与HPV18 E6肽库(灰色柱)或HPV18 E6肽子库1(有正斜线阴影的柱)、子库2(有反斜线阴影的柱)、子库3(有横条纹的柱)、子库4(有纵条纹的柱)或子库5(黑色柱)共培养后,3、12和20号克隆分泌的TNFα(pg/mL)的图。

[0033] 图7C是显示在单独培养(白色柱)或与HPV18 E6的30号肽(有点状的柱)、31号肽(黑色柱)、32号肽(灰色柱)、33号肽(有纵条纹的柱)、34号肽(有正斜线阴影的柱)、35号肽(有反斜线阴影的柱)、36号肽(有方型的柱)或37号肽(有交叉缝式的柱)共培养后,3、12和20号克隆分泌的TNFα(pg/mL)的图。

[0034] 图8A-8C是显示在与自体PBMC(P12)或来自供体1-6之一的PBMC共培养后,3(A)、12(B)和20号(C)克隆分泌的TNFα(pg/mL)的图。

[0035] 图9A是显示在与用HPV 18 $E6_{77-91}$(无阴影的柱)或HPV 18 $E6_{121-135}$肽(有阴影的柱)脉冲刺激的自体PBMC(P12)或DRB1*15、DQB1*06供体PBMC、DRB1*15供体PBMC或DQB1*06供体PBMC共培养后,12号患者的F15肿瘤碎块的3号克隆分泌的IFN-γ(pg/mL)的图。

[0036] 图9B是显示在具有针对HLA-DR(有横条纹的柱)、HLA-DQ(有反斜线阴影的柱)、HLA-DP(有正斜线阴影的柱)的抗体、泛I类抗体(黑色柱)或泛II类抗体(白色柱)的情况下,在与用HPV 18 $E6_{121-135}$肽冲刺激的PBMC或与624细胞共培养的mF5T细胞(经转导以表达抗MART-1的TCR)共培养后,12号患者的F15肿瘤碎块的20号克隆分泌的IFN-γ(pg/mL)的图。

[0037] 图10是显示在与用HPV 16 E6肽库(有反斜线阴影的柱)、HPV 16E7肽库(有正斜线阴影的柱)或gp100肽库(对照)(黑色条)脉冲刺激的树突细胞共培养后,来自4号患者的24个不同的肿瘤碎块(F1-F24)的效应TIL或黑色素瘤TIL(对照)分泌的IFN-γ(pg/mL)的图。星号(*)表示TIL输注入患者。

[0038] 图11A是显示在与用HPV 16 E7肽库(有阴影的柱)或不用肽(无阴影的柱)脉冲刺激的树突细胞共培养后,来自4号患者的CD8阳性效应TIL克隆分泌的IFN-γ(pg/mL)的图。

[0039] 图11B是显示在与用HPV 16 E7肽库(有阴影的柱)或不用肽(无阴影的柱)脉冲刺激的树突细胞共培养后,来自4号患者的CD4阳性效应TIL克隆分泌的IFN-γ(pg/mL)的图。

[0040] 图11C是显示在与用HPV 16 E6肽库(有阴影的柱)或不用肽(无阴影的柱)脉冲刺激的树突细胞共培养后,来自4号患者的CD8阳性效应TIL克隆分泌的IFN-γ(pg/mL)的图。

[0041] 图11D是显示在与用HPV 16 E6肽库(有阴影的柱)或不用肽(无阴影的柱)脉冲刺激的树突细胞共培养后,来自4号患者的CD4阳性效应TIL克隆分泌的IFN-γ(pg/mL)的图。

[0042] 图12A-B是用过继性细胞疗法治疗前(A)和治疗后九个月(B)的4号患者胸部的计算机断层扫描(CT)。A中的箭头指向腹主动脉旁淋巴结中的癌性病灶。

[0043] 图12C-D是用过继性细胞疗法治疗前(C)和治疗后九个月(D)的4号患者胸部的CT扫描。C中的箭头指向左肺门淋巴结中的癌性病灶。

[0044] 图12E-F是用过继性细胞疗法治疗前(E)和治疗后九个月(F)的4号患者骨盆的CT扫描。E中的箭头指向髂总淋巴结中的癌性病灶。

[0045] 图13是显示在与用HPV 18 E6肽库(有反斜线阴影的柱)、HPV 18E7肽库(有正斜线阴影的柱)或gp100肽库(对照)(黑色柱)脉冲刺激的树突细胞共培养后,来自8号患者的24个不同的肿瘤碎块的效应TIL或黑色素瘤TIL(对照)分泌的IFN-γ(pg/mL)的图。星号(*)表示TIL输注入患者。

[0046] 图14A-B是用过继性细胞疗法治疗前(A)和治疗后两个月(B)的8号患者肝脏的磁共振成像(MRI)扫描。A中的箭头指向癌性肝部肿块。

[0047] 图14C-D是用过继性细胞疗法治疗前(C)和治疗后两个月(D)的8号患者腹部的CT扫描。C中的箭头指向腹膜后淋巴结中的癌性病灶。

[0048] 图14E-F是用过继性细胞疗法治疗前(E)和治疗后两个月(F)的8号患者腹部的CT扫描。E中的箭头指向癌性腹壁肿块。

[0049] 图14G-H是用过继性细胞疗法治疗前(G)和治疗后两个月(H)的8号患者骨盆的CT扫描。G中的箭头指向癌性左结肠周肿块。

[0050] 图15A是显示在HPV-TIL输注后各时间点(月数)的4号患者的腹主动脉旁(圆形)、左门(正方形)、右门(Δ)和髂总(▽)的肿瘤尺寸测量值(从基线的变化%)的图。

[0051] 图15B是显示在HPV-TIL输注后各时间点(月数)的8号患者的腹壁(圆形)、腹主动脉旁(正方形)、左骨盆(Δ)和右输尿管(▽)的肿瘤尺寸测量值(从基线的变化%)的图。

[0052] 图16A-D是8号患者延迟钆增强的T1加权MRI图像。A和C各自显示治疗前肝表面的肿瘤。B和D显示治疗后11个月均无肿瘤。A和C中的箭头指示肿瘤的位置。

[0053] 图17A是治疗后各时间点(天数)测量的4号患者血清细胞因子水平(pg/ml)的图。测量的细胞因子包括白细胞介素(IL)-2(实心圆)、IL-4(正方形)、IL-6(▲)、IL-13(▼)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)(菱形)和肿瘤坏死因子α(TNF-α)(空心圆)。施用于患者的细胞因子标有下划线。

[0054] 图17B是治疗后各天测量的8号患者的血清细胞因子水平(pg/ml)的图。测量的细胞因子包括IL-2(实心圆)、IL-5(实心正方形)、IL-6(▲)、IL-8(▼)、G-CSF(菱形)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP)-1(空心圆)和TNF-a(空心正方形)。施用于患者的细胞因子标有下划线。

[0055] 图18A-D是显示待施用于4号患者(A和C)或8号患者(B和D)的TIL针对HPV E6(有阴影的柱)、HPV E7(有阴影的柱)或爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)(对照)的反应性的图,如通过IFN-γ的分泌(pg/ml)(A和B)和ELISPOT分析(C和D)测定。无阴影的柱代表来自同一名患者的EBV反应性的T细胞的反应性(对照)。

[0056] 图19A-B是显示在输注TIL后不同时间点(天数)时的4号患者(A)和8号患者(B)的淋巴细胞计数(细胞个数/mm^3)的图。计数的细胞包括CD8T细胞(正方形)、CD4T细胞(圆形)、NK细胞(▲)和B细胞(▼)。

[0057] 图19C-D是显示在输注TIL后不同时间点(月数)时在4号患者(C)或8号患者(D)的外周血中检测到的HPV反应性T细胞的图,如通过IFN-γ (pg/ml)测量的。测量针对HPV E6(灰色柱)、HPV E7(黑色柱)或gp100(对照)(无阴影的柱)的反应性。

[0058] 图19E-F是显示输注TIL之后不同时间点(月数)时在4号患者(E)或8号患者(F)的外周血中检测到的HPV反应性T细胞定量的图,如通过ELISPOT测量的。测量针对HPV E6(灰色柱)、HPV E7(黑色柱)或gp100(对照)(无阴影的柱)的反应性。

[0059] 图20A-J是用过继性细胞疗法治疗前(A、C、E、G和I)和治疗后四个月(B、D、F、H和J)患有转移性扁桃体癌的13号患者的磁共振成像(MRI)扫描。箭头指向肺和右肺门的多个恶性肿瘤。

[0060] 图21A-B是用过继性细胞疗法治疗前(A)和治疗后18个月(B)4号患者胸部的CT扫描。A中的箭头指向腹主动脉旁淋巴结的癌性病灶。

[0061] 图21C-D是用过继性细胞疗法治疗前(C)和治疗后18个月(D)4号患者胸部的CT扫描。C中的箭头指向左门病灶和隆突下病灶。

[0062] 图21E-F是用过继性细胞疗法治疗前(E)和治疗后18个月(F)4号患者胸部的CT扫描。E中的箭头指向双门病灶。

[0063] 图21G-H是用过继性细胞疗法治疗前(G)和治疗后18个月(H)4号患者骨盆的CT扫描。G中的箭头指向髂总淋巴结中的癌性病灶。

[0064] 图22A-B是用过继性细胞疗法治疗前(A)和治疗后11个月(B)8号患者腹部的CT扫描。A中的箭头指向腹膜后淋巴结的癌性病灶。

[0065] 图22C-D是用过继性细胞疗法治疗前(C)和治疗后11个月(D)8号患者腹部的CT扫描。C中的箭头指向癌性腹壁肿块和腹膜后肿瘤。

[0066] 图22E-F是用过继性细胞疗法治疗前(E)和治疗后11个月(F)8号患者腹部的CT扫描。E中的箭头指向癌性结肠周肿块。

[0067] 图22G-H是用过继性细胞疗法治疗前(G)和治疗后11个月(H)8号患者骨盆的CT扫描。G中的箭头指向癌性左骨盆肿块。H中的三角指向输尿管支架。

[0068] 发明详述

[0069] 已发现人乳头瘤病毒(HPV)特异性T细胞群可以被制备用于多种应用,例如过继性细胞疗法。本发明的方法可以产生可用于治疗多种病况,如癌症的细胞。

[0070] 本发明的方法提供了很多优势。例如,本发明的方法可以以适合于临床使用的等级和规模从HPV阳性癌症有利地产生T细胞。此外,本发明的方法可以有利地产生能够识别HPV抗原E6和E7的T体细胞,所述HPV抗原E6和E7由癌细胞组成性和特异性地表达而正常细胞不表达。因此,不受特定理论或机制的束缚,认为由本发明方法产生的T细胞有利地靶向癌细胞的破坏,同时最小化或消除正常的、非癌性细胞的破坏,从而降低毒性,例如使毒性最小化或消除毒性。另外,由于本发明方法的实施方案包括非清髓性化疗,本发明的方法可以有利地用于治疗不符合涉及全身照射(TBI)治疗条件的患者,例如,在治疗前已经经历了清髓性疗法,例如放疗的患者;具有共病状况的患者;以及具有少于$2x10^6$个$CD34^+$细胞/kg的

患者。此外，本发明的治疗癌症的方法可以有利地、成功地治疗或预防HPV阳性癌症，此类癌症不响应于其它治疗类型，诸如，例如，单独的化疗、手术或辐射。

[0071] 本发明的实施方案包括从哺乳动物获得HPV阳性肿瘤样品。肿瘤样品可以以任何合适的方式，例如活检或手术切除从哺乳动物获得。

[0072] 在实施方案中，方法可以包括检测肿瘤样品的HPV感染。HPV可以是任何HPV亚型。优选地，HPV亚型是HPV 16或HPV 18。检测可以包括检测HPV感染的细胞特异性表达任何蛋白(如，抗原)，诸如，例如HPV 16 E6、HPV 16 E7、HPV 18 E6和HPV 18 E7中的任何一种或多种的表达，编码HPV特异蛋白的任何RNA的表达，或它们的组合。HPV感染的检测可以以本领域中已知的任何合适的方式进行。示例性的HPV检测可包括基于逆转录酶(RT)聚合酶链式反应(PCR)的基因分型和Western印迹中的任何一种或多种。肿瘤样品可以对HPV感染的任何亚型，诸如，例如HPV 16或HPV 18感染呈阳性，。

[0073] 本发明的实施方案包括将HPV阳性肿瘤样品分成多个碎块。肿瘤样品可以被分成任何合适数目的碎块，诸如，例如4、8、12、16、20、24、28、32、36、40或更多碎块。优选地，肿瘤样品被分成24个碎块。肿瘤样品可以以任何合适的方式，如机械地(采用如gentleMACS™分离器，Miltenyi Biotec，Auburn，CA分散肿瘤)或酶促地(如胶原酶或DNA酶)分割。

[0074] 本发明的实施方案包括分别培养多个碎块。在这方面，碎块可以在分别的容器，如分别的板或板的分别的孔中培养。多个碎块可以以任何合适的方式培养。例如，碎块可以在气体可渗透容器中培养，如美国专利申请公开号2012/0244133中所述。在本发明的实施方案中，肿瘤碎块可以在存在两种或更多种细胞因子组合的情况下进行培养。然而，在优选的实施方案中，方法包括在仅存在一种细胞因子的情况下培养肿瘤碎块。细胞因子可以是任何合适的细胞因子，诸如，例如白细胞介素(IL)-2、IL-7、IL-15或IL-12。优选地，细胞因子是IL-2。肿瘤碎块可以在任何合适量(如从约30IU/mL到约6,000IU/mL，优选地约6,000IU/mL)的细胞因子中培养。优选地，方法包括在约6,000IU/mL IL-2中培养肿瘤碎块。

[0075] 方法可以包括从培养的多个碎块中获得T细胞。方法可以包括培养T细胞直到汇合(如，在24孔板中约$2x10^6$个淋巴细胞/毫升)，如，从约12天到约28天。

[0076] 方法可以包括检测用于特异性自体HPV阳性肿瘤识别和HPV抗原识别中的一种或两种的T细胞。特异性自体HPV阳性肿瘤识别可以以本领域中已知的任何方法，如通过与自体HPV阳性肿瘤细胞共培养后测量细胞因子的释放(如，干扰素(IFN)-γ)进行检测。如果，例如，与自体HPV阳性肿瘤细胞的共培养导致以下情形中的一种或多种的IFN-γ的释放，T细胞可以被认为是能够识别HPV阳性肿瘤细胞：(i)IFN-γ的量是单独培养T细胞(背景)时测量的IFN-γ的量的两倍；(ii)为至少约200pg/mL或更多(如，200pg/mL或更多、300pg/mL或更多、400pg/mL或更多、500pg/mL或更多、600pg/mL或更多、700pg/mL或更多、1000pg/mL或更多、5,000pg/mL或更多、7,000pg/mL或更多、10,000pg/mL或更多、或20,000pg/mL或更多)；及(iii)被MHC I类抗体阻断大于约40％、大于约50％或大于约60％。

[0077] 特异性HPV抗原识别可以以本领域中已知的任何方法检测，所述方法为如通过与已经用HPV抗原肽脉冲刺激的抗原阴性抗原递呈细胞(如，树突细胞)共培养后测量的细胞因子(如，IFN-γ)的释放。在与用低浓度的HPV 16或HPV 18肽(如，约0.05ng/mL至约5ng/mL、0.05ng/mL、0.1ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL或5ng/mL)脉冲刺激的抗原阴性抗原递呈细胞共培养后，如果，例如，IFN-γ的释放是以下情形的IFN-γ的释放中的一种或两种，T细胞可

以被认为是能够识别HPV抗原：(i)IFN-γ的量是T细胞与用阴性对照肽脉冲刺激的抗原递呈细胞培养时测量的IFN-γ的量的两倍；(ii)为至少200pg/mL或更多(如，200pg/mL或更多、300pg/mL或更多、400pg/mL或更多、500pg/mL或更多、600pg/mL或更多、700pg/mL或更多、1000pg/mL或更多、5，000pg/mL或更多、7，000pg/mL或更多、10，000pg/mL或更多、或20，000pg/mL或更多)。在与用高浓度的HPV肽脉冲刺激的抗原阴性抗原递呈细胞共培养后，T细胞也可以分泌IFN-γ。

[0078] HPV抗原可以是任何HPV抗原。例如，HPV抗原可以是HPV 16E6、HPV 16 E7、HPV 18 E6和HPV 18 E7中的任何一种或多种。然而，在一些实施方案中，T细胞群仅可以特异性识别一种HPV抗原，在一些实施方案中，T细胞群可以特异性识别超过一种HPV抗原。在这方面，T细胞群可能包括多种T细胞，每种T细胞具有不同的HPV特异性。例如，T细胞群可以包括一些特异性识别HPV 16 E6的T细胞和其它特异性识别HPV 16 E7的T细胞，或T细胞群可以包括一些特异性识别HPV 18 E6的T细胞和其它特异性识别HPV 18 E7的T细胞。

[0079] 方法可以包括选择显示出特异性自体HPV阳性肿瘤识别和HPV抗原识别中的一种或两种的T细胞。在本发明的实施方案中，虽然检测用于特异性自体HPV阳性肿瘤识别和HPV抗原识别中的一种或两种的T细胞可以鉴别那些含有识别HPV的T细胞的培养物，但是那些含有HPV反应性T细胞的培养物也可能含有对其它非HPV肿瘤抗原具有反应性的另外的T细胞。因此，所选择的T细胞群可包括具有多种特异性的多克隆T细胞。在本发明的另一实施方案中，检测鉴别出仅含有识别HPV的T细胞的培养物。在这方面，所选择的T细胞群可包括仅具有HPV特异性的T细胞。

[0080] 方法可以进一步包括扩增所选择的T细胞数目来产生HPV特异性的T细胞群。快速扩增使得抗原特异性T细胞的数目在约10至14天的时段内，优选约14天增加了至少约100倍(或200、300、400、500、600、700、800、900倍，或更多)。更优选地，快速扩增在约10至约14天的时段内，优选约14天增加了至少约1000倍(或1500、2000、2500、3000倍，或更多)。最优等选地，快速扩增在约10至14天的时段内，优选约14天增加了至少约1000倍至约3000倍。

[0081] T细胞数目的扩增可以通过如例如美国专利8,034,334；美国专利8,383,099；美国专利申请公开号2012/0244133；Dudley等，J.Immunother.，26：332-42(2003)；和Riddell et al.，J.Immunol.Methods，128：189-201(1990)中所述的本领域中已知的许多方法中的任一个来实现。例如，在存在饲养淋巴细胞和白细胞介素-2(IL-2)或白细胞介素-15(IL-15)，优选IL-2的情况下，可以采用非特异性T细胞受体刺激快速扩增T细胞数目。非特异性T细胞受体刺激物可以包括大约30ng/mL的OKT3，一种小鼠单克隆抗CD3抗体(可从Ortho-McNeil，Raritan，N.J.获得)。可选地，T细胞数目可以通过癌症抗原(一种或多种，包括其抗原部分，如表位，或细胞)的体外刺激而快速地扩增，癌症抗原可在存在T细胞生长因子如300IU/mL IL-2或IL-15，优选IL-2的情况下，由载体，如0.3μM MART-1：26-35(27L)或gp100：209-217(210M)任选地表达。体外诱导的T细胞数目可以通过用脉冲刺激到抗原递呈细胞上的癌症的相同抗原的再刺激快速地扩增。在实施方案中，T细胞数目在气体可渗透容器中扩增，如美国专利申请公开号2012/0244133中所述。

[0082] 在本发明的实施方案中，方法包括采用(i)受辐射的同种异体饲养细胞和(ii)受辐射的自体饲养细胞中的一种或两种，以及(iii)OKT3抗体和(iv)T细胞生长因子，如IL-2或IL-5，优选IL-2中的一种或两种扩增T细胞数目。方法可以包括采用(i)受辐射的同种异

体饲养细胞和(ii)受辐射的自体饲养细胞中的一种或两种,以及(iii)OKT3抗体和(iv)白细胞介素(IL)-2中的一种或两种扩增T细胞数目。优选地,方法包括采用(i)受辐射的同种异体饲养细胞和(ii)受辐射的自体饲养细胞中的一种或两种,以及(iii)OKT3抗体和(iv)白细胞介素(IL)-2中的两种扩增T细胞数目。在特别优选的实施方案中,方法包括采用(i)受辐射的同种异体饲养细胞,(ii)OKT3抗体和(iii)白细胞介素(IL)-2扩增T细胞数目。

[0083] 在另一实施方案中,方法包括采用(i)OKT3抗体和(ii)白细胞介素(IL)-2中的一种或两种,任选地与受辐射的同种异体饲养细胞和受辐射的自体饲养细胞中的一种或两种联合使用扩增所选择的T细胞数目来产生HPV特异性T细胞群。在这方面,本发明的实施方案提供了制备HPV特异性T细胞群的方法,该方法包括:将HPV阳性肿瘤样品分成多个碎块;分别培养多个碎块;从培养的多个碎块中获得T细胞;检测用于特异性自体HPV阳性肿瘤识别和HPV抗原识别中的一种或两种的T细胞;选择显示出特异性自体HPV阳性肿瘤识别和HPV抗原识别中的一种或两种的T细胞;以及采用(i)OKT3抗体和(ii)白细胞介素(IL)-2中的一种或两种扩增所选择的T细胞数目来产生HPV特异性T细胞群。分割肿瘤样品、培养肿瘤碎块、获得T细胞、检测T细胞、选择T细胞以及扩增所选择的T细胞数目可以如本文关于本发明的其它方面的描述进行。

[0084] 通过本发明方法产生的扩增数目的T细胞群可以特异性识别HPV阳性细胞,如HPV阳性癌细胞。T细胞识别的细胞可以对任何HPV亚型,诸如,例如HPV 16或HPV 18呈阳性,。可选地或此外,通过本发明方法产生的T细胞群可以特异性地识别任何HPV抗原,诸如,例如HPV 16 E6、HPV 16 E7、HPV 18 E6和HPV 18 E7中的任何一种或多种。然而,在一些实施方案中,T细胞群可以仅特异性识别一种HPV抗原,在一些实施方案中,T细胞群可以特异性识别超过一种HPV抗原。在这方面,扩增数目的T细胞群可以包括多种T细胞,每种T细胞具有不同的HPV特异性。例如,扩增数目的T细胞群可以包括一些特异性识别HPV 16 E6的T细胞和其它特异性识别HPV 16E7的T细胞,或T细胞群可以包括一些特异性识别HPV 18 E6的T细胞和其它特异性地识别HPV 18 E7的T细胞。通过本发明方法产生的扩增数目的T细胞群特异性识别HPV阳性细胞和特异性识别HPV抗原的能力可以如本文关于本发明其它方面的描述进行测量。

[0085] 通过本发明方法产生的T细胞群可以用于治疗或预防HPV相关的病况,如癌症。因此,本发明的另一实施方案提供了治疗或预防哺乳动物中的癌症的方法,该方法包括根据本文描述的任何本发明方法制备HPV特异性T细胞群以及以有效治疗或预防哺乳动物癌症的量向哺乳动物施用T细胞群。

[0086] 本发明的另一实施方案提供了治疗或预防哺乳动物中的癌症的方法,该方法包括:将HPV阳性肿瘤样品分成多个碎块;分别培养多个碎块;从培养的多个碎块中获得T细胞;检测用于特异性自体HPV阳性肿瘤识别和HPV抗原识别中的一种或两种的T细胞;选择显示出特异性自体HPV阳性肿瘤识别和HPV抗原识别中的一种或两种的T细胞;扩增所选择的T细胞数目来产生用于过继性细胞疗法的HPV特异性T细胞群;以及以有效治疗或预防哺乳动物癌症的量向哺乳动物施用扩增数目的T细胞群。分割肿瘤样品、培养肿瘤碎块、获得T细胞、检测T细胞、选择T细胞以及扩增所选择的T细胞数目可以如本文关于本发明其它方面的描述进行。本发明的另一实施方案提供了治疗或预防哺乳动物中病况的方法,该方法包括根据本文描述的任何本发明方法制备HPV特异性T细胞群以及以有效治疗或预防哺乳动物

中病况的量向哺乳动物施用T细胞群，其中所述病况是癌症、HPV 16感染或HPV阳性初癌。

[0087] 本发明的实施方案包括向哺乳动物施用非清髓性淋巴清除化疗。非清髓性淋巴清除化疗可以是任何适合的这类疗法，可以通过任何合适的途径施用。非清髓性淋巴清除化疗可以包括环磷酰胺和氟达拉滨的施用，特别是如果癌症是HPV阳性癌症(其是转移性的)的情况下。施用环磷酰胺和氟达拉滨的优选途径是静脉注射。同样地，可以施用任何合适剂量的环磷酰胺和氟达拉滨。优选地，施用两天约60mg/kg的环磷酰胺，此后施用五天约25mg/m^2的氟达拉滨，特别是如果癌症是HPV阳性癌症的情况下。在本发明的实施方案中，在施用T细胞前施用非清髓性淋巴清除化疗。

[0088] 本发明的实施方案包括，在施用非清髓性淋巴清除化疗后，向哺乳动物施用本文描述的任何本发明方法制备的HPV特异性T细胞群。

[0089] T细胞可以通过本领域中已知的任何合适的途径施用。优选地，T细胞以动脉内或静脉内输注施用，所述输注优选持续约30至约60分钟。施用途径的其它实例包括腹膜内施用、鞘内施用和淋巴管内施用。

[0090] 同样地，可以使用任何合适剂量的T细胞。优选地，施用约1.0x10^{10}个T细胞至约13.7x 10^{10}个T细胞，平均约5.0x 10^{10}个T细胞，特别是如果癌症是HPV阳性癌症的情况下。可选地，施用约1.2x 10^{10}个至约4.3x 10^{10}个T细胞。

[0091] 在本发明的实施方案中，本文描述的任何方法还可以包括使HPV特异性T细胞群与药学上可接受的载体结合。药学上可接受的载体可以是适合过继性细胞疗法的任何药学上可接受的载体。例如，药学上可接受的载体可以包括任何等渗载体，诸如，例如生理盐水(约0.90％w/v的NaCl水溶液，约300mOsm/L的NaCl水溶液或9.0g/L的NaCl水溶液)，NORMOSOL R电解质溶液(Abbott，Chicago，IL)，PLASMA-LYTE A(Baxter，Deerfield，IL)，约5％葡萄糖水溶液或林格氏乳酸盐水溶液。在实施方案中，药学上可接受的载体补充有人血清白蛋白。

[0092] 本发明的实施方案包括在快速扩增细胞前为了$CD8^+$T细胞而富集培养的T细胞。在T细胞培养之后，采用例如CD8微珠分离(如，采用$CliniMACS^{plus}$ CD8微珠系统(Miltenyi Biotec))消耗T细胞中的CD4+细胞并富集$CD8^+$细胞。不受特定理论的束缚，认为一些T细胞培养物的$CD8^+$富集显示出可能在总培养物中不明显的体外肿瘤识别，以及改善其它培养物中的体外肿瘤识别。此外，认为富集的$CD8^+$T细胞在临床规模的快速扩增中表现出比总的T细胞更可靠和更可预测。

[0093] 本发明的实施方案包括在快速扩增细胞前富集用于$CD4^+$T细胞的培养的T细胞。在T细胞培养之后，采用例如CD4微珠分离(如，采用$CliniMACS^{plus}$ CD8微珠系统(Miltenyi Biotec))消耗T细胞中的CD8+细胞并富集CD4+细胞。

[0094] 在实施方案中，将促进自体T细胞生长和活化的T细胞生长因子与自体T细胞同时或在自体T细胞之后施用于哺乳动物。T细胞生长因子可以是促进自体T细胞生长和活化的任何合适的生长因子。合适的T细胞生长因子的实例包括白细胞介素(IL)-2、IL-7、IL-15和IL-12，它们可以被单独地使用或以不同组合使用，如IL-2和IL-7，IL-2和IL-15，IL-7和IL-15，IL-2、IL-7和IL-15，IL-12和IL-7，IL-12和IL-15或IL-12和IL2。IL-12是优选的T细胞生长因子。

[0095] 在实施方案中，自体T细胞被修饰以表达促进自体T细胞生长和活化的T细胞生长因子。合适的T细胞生长因子包括，例如，上述那些中的任何T细胞生长因子。合适的修饰方

法是本领域已知的。参见，例如，Green和Sambrook，Molecular Cloning:A Laboratory Manual，4th ed.，Cold Spring Harbor Press，Cold Spring Harbor，NY 2012；和Ausubel等，Current Protocols in Molecular Biology，Greene Publishing Associates and John Wiley&Sons，NY，1994。期望修饰的自体T细胞表达高水平的T细胞生长因子。T细胞生长因子编码序列，如IL-12的编码序列在本领域中容易获得，同样，与T细胞生长因子编码序列可操作连接的启动子促进高水平表达。

[0096] T细胞生长因子可以通过任何合适的途径施用。如果施用超过一种T细胞生长因子，它们可以同时或按任何顺序依序施用，以及通过相同的途径或不同的途径施用。优选地，T细胞生长因子，如IL-2，作为弹丸注射(bolus injection)静脉内施用。T细胞生长因子的剂量可以基于患者的耐受性来选择。例如，T细胞生长因子可以直到出现一种或多种限制性不良事件时才被施用。期望T细胞生长因子，如IL-2的剂量是本领域普通技术人员认为高的剂量。优选地，施用约720,000IU/kg剂量的IL-2，一天三次，直至耐受，特别是当癌症是HPV阳性癌症的情况下。优选地，施用约5至约15次剂量的IL-2，平均为约9次剂量。

[0097] 在实施方案中，自体T细胞可以被修饰以表达对HPV抗原，如，本文描述的任何HPV抗原具有抗原特异性的T细胞受体(TCR)。合适的修饰方法是本领域已知的。参见，例如Green和Sambrook以及Ausubel，见上文。例如，可以利用Heemskerk等Hum Gene Ther.19:496-510(2008)和Johnson等Blood 114:535-46(2009)中描述的转导技术，将T细胞转导成表达对HPV抗原具有抗原特异性的T细胞受体(TCR)。

[0098] 关于本发明方法，癌症可以是任何癌症，包括任何的急性淋巴细胞性癌症、急性骨髓性白血病、腺泡状横纹肌肉瘤、骨癌、脑癌、乳腺癌、肛门癌、肛管癌或直肠肛门癌、眼癌、肝内胆管癌、关节癌，颈癌、胆囊癌或胸膜癌、鼻癌、鼻腔癌或中耳癌、口腔癌、阴道癌、外阴癌、慢性淋巴细胞白血病、慢性骨髓性癌症、结肠癌、食道癌、宫颈癌、胃肠道类癌肿瘤、胶质瘤、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、肾癌、喉癌、肝癌、肺癌、恶性间皮瘤、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、鼻咽癌、非霍奇金淋巴瘤、口咽癌、卵巢癌、阴茎癌、胰腺癌、腹膜癌、网膜癌和肠系膜癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、皮肤癌、小肠癌、软组织癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、输尿管癌和膀胱癌。优选的癌症是宫颈癌、口咽癌、肛管癌、肛肠癌、阴道癌、外阴癌或阴茎癌。特别优选的癌症是HPV阳性癌症。HPV阳性癌症可以是，例如HPV 16阳性癌症或HPV 18阳性癌症。虽然最常见的与HPV感染相关的癌症包括宫颈癌、口咽癌、肛门癌、肛管癌、直肠肛门癌、阴道癌、外阴癌和阴茎癌，但本发明方法可以用于治疗任何HPV阳性癌症，包括在其它解剖区出现的那些癌症。

[0099] 如本文所用，术语“哺乳动物”是指任何哺乳动物，包括但不限于，啮齿目的哺乳动物，如小鼠和仓鼠，以及兔形目的哺乳动物，如兔。优选的是哺乳动物来自食肉目，包括猫科动物(猫)和犬科动物(犬)。更优选的是哺乳动物来自偶蹄目，包括牛科动物(牛)和猪科动物(猪)、或奇蹄目，包括马科动物(马)。最优选的是哺乳动物是灵长目、猿(Ceboids)目或猴(Simoids)(猴)或类人猿亚目(人和猿)。特别优选的哺乳动物是人。

[0100] 本文使用的术语“治疗”和“预防”以及源自于此的词不必暗示100％或完全治疗或预防。相反，存在不同程度的治疗或预防，其被本领域普通技术人员认为具有潜在的益处或治疗效果。在这方面，本发明方法可以提供任何量或任何水平的治疗或预防哺乳动物的癌症。此外，本发明方法提供的治疗或预防可以包括正在治疗或预防的疾病例如癌症的一种

或多种状况或症状的治疗或预防。例如，本发明方法提供的治疗或预防可以包括促进肿瘤的消退。另外，为了本文的目的，“预防”可以涵盖延迟疾病或其症状或状况的发作。

[0101] 以下实施例进一步阐明本发明，但当然不应理解为以任何方式限制其范围。

[0102] 实施例1

[0103] 本实施例显示制备用于过继性细胞疗法的HPV阳性肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的方法。

[0104] 在进行肿瘤切除前，患者被登记入临床协议中，并且签署了由美国国家癌症研究所的机构审查委员会(Institutional Review Board of the National Cancer Institute)批准的知情同意书。从患者身上切除肿瘤。采用逆转录酶(RT)聚合酶链式反应(PCR)基因分型检测肿瘤的HPV 16E6、HPV 16 E7、HPV 18 E6和HPV 18 E7表达。

[0105] 采用酶消化和锐性分离获得的肿瘤碎块(1-2mm^3)建立了HPV 16 E6阳性的、HPV E7阳性的、HPV 18 E6阳性的和HPV E7阳性的TIL的多个(24)独立的培养物。来自肿瘤消化的TIL通过培养单细胞悬浮液(5x 10^5/mL)产生，所述单细胞悬浮液是在含有胶原酶、透明质酸酶和DNA酶的培养基中过夜酶消化肿瘤碎块获得的。含有肿瘤碎块和消化物的培养物在含有完全培养基(CM)和IL-2(6000IU/mL，ChironCorp.，Emeryville，CA)的2mL的孔中于含有5％CO_2的湿润的37℃培养箱中开始培养。CM包括含有谷氨酰胺的RPMI1640+10％的人AB血清、25mM HEPES、10μg/mL庆大霉素和5.5x 10^{-5}M 2-巯基乙醇。开始后五天，从孔中吸出一半的培养基并用新鲜的CM和IL-2替换，此后根据需要每两到三天替换一次培养基。在这些条件下，淋巴细胞将首先溶解孔中的贴壁细胞，然后开始繁殖和生长。

[0106] 通常在开始后约12-28天，TIL培养物达到了最初2-mL孔的汇合生长并且消除了贴壁的肿瘤细胞。实际上，会有约4x 10^6个淋巴细胞来自每个最初的肿瘤碎块或消化物孔。将单个24孔板的所有孔合并，将获得大约5x 10^7个TIL细胞。

[0107] 当被指定用于TIL产生的培养物在2-mL孔中扩增到汇合时，检测它们的HPV特异反应性。由于TIL大量建立(通常每个肿瘤24组)，单独地计数每个TIL培养物是不可行的。TIL特异性分析测量每单位体积的活性而非每个细胞的活性。充分地混合每个孔，洗涤100微升的淋巴细胞(估计为1x10^5个细胞)以及将其与自体肿瘤消化物或用HPV16和HPV 18 E6和E7MACS PEPTIVATOR肽库脉冲刺激的自体单核细胞源性的树突细胞(DC)共培养过夜。该肽库包括具有11个氨基酸重叠的15-mer的肽，这覆盖了E6或E7(HPV 16或HPV 18)的全序列。肽库的纯度超过75％并且是低内毒素的。IFN-γ的释放然后用酶联免疫吸附测定(ELISA)进行测量。结果显示在表A中。

[0108] 表A

[0109]

患者编号	癌症的原发部位	HPV 类型	肽反应性(肿瘤碎块的数目)[1]	肿瘤消化反应性(肿瘤碎块的数目)[2]
1	子宫颈	HPV-18	E7(22)	有(4)
2	扁桃体	HPV-16	E7(5)	-
3	子宫颈	HPV-18	E6(7)，E7(19)	有(3)
4	子宫颈	HPV-16	E6(18)，E7(23)	没有
5	子宫颈	HPV-16	E6(1)	没有
6	未知(颈)	HPV-16	E6(23)，E7(22)	-
7	子宫颈	HPV-18	E6(1)，E7(5)	-
8	子宫颈	HPV-18	E7(3)	-
9	子宫颈	HPV-18	无	没有
10	未知(骨盆)	HPV-16	E6(1)	有(1)
11	子宫颈	HPV-18	无	没有
12	子宫颈	HPV-18	E6，E7	-
13	肛门	HPV-16	无	-
14	肛门	HPV-16	E6	-
15	子宫颈	HPV-16	E6，E7	-

[0110] [1]被定义为至少一个肿瘤碎块的浓度＞200pg/mL以及是背景的两倍(阴性对照肽库)。

[0111] [2]被定义为IFN-γ的浓度＞200pg/mL，是背景的两倍(单独的TIL)，以及被W6/32MHC I类抗体阻断＞50％。

[0112] “-”表示未检测。

[0113] HPV反应的TIL数目的快速扩增采用之前描述(Dudley等，JImmunother.，26:332-42(2003)和Riddell等，J.Immunol.Methods，128:189-201(1990))的快速扩增方案((REP)进行。简而言之，TIL细胞在气体可渗透的G-REX培养瓶中培养，所述培养瓶装有在含有30ng/mL抗CD3抗体和6000IU/mL IL-2的完全培养基(CM)中的200倍过量辐射(40Gy)的同种异体外周血单核“饲养”细胞。在第5天，采用含有6000IU/mL IL-2的CM替换一半培养基，此后根据需要分开细胞。TIL扩增平均超过3000倍。

[0114] 实施例2

[0115] 本实施例显示来自1号患者的TIL的反应性。

[0116] 来自1号患者的22个不同的肿瘤碎块(F1-F22)如实施例1所述产生TIL。来自1号患者的TIL或黑色素瘤TIL(对照)与用HPV 18 E7肽库或gp100肽库(对照)脉冲刺激的树突细胞共培养并且测量IFN-γ。结果显示在图1A-1B中。如图1A-1B所示，来自1号患者的22号肿瘤碎块的TIL能识别自体肿瘤细胞系，而不能识别HPV 18 E7多肽。

[0117] 来自1号患者F16、F17或F22的肿瘤碎块的TIL或给予患者用于治疗的细胞(“输液袋”)与自体肿瘤、来自自体组织的外周血单核细胞(PBMC)、与所有I类基因座匹配的肿瘤细胞、HeLa细胞(HLA不匹配)或CaSki细胞(HLA不匹配)共培养。测量IFN-γ。结果显示在图2A中。如图2A所示,来自F16和F22肿瘤碎块的TIL显示出自体肿瘤识别能力。

[0118] 用针对HLA-A、HLA-B、HLA-C的沉默RNA或不相关RNA(非靶向的)转染自体肿瘤细胞并将其与来自1号患者的TIL共培养。测量IFN-γ。结果显示在图2B中。如图2B所示,来自1号患者的TIL的识别能力通过HLA-A沉默减弱。

[0119] 在无抗体、有抗HLA-A2抗体或抗II类抗体的情况下,将效应/靶细胞(1号患者的TIL/自体肿瘤细胞;DMF5/624细胞;或12号患者(P12)的F15/HPV18$E6_{121-135}$)单独培养或共培养。DMF5细胞是经转导以表达针对MART-1的MHC I类限制性TCR的T细胞。结果显示在图2C中。如图2C所示,来自1号患者的TIL的识别不受HLA-A*02封闭的抑制,这表明来自1号患者的TIL的识别是HLA-A*01限制性肿瘤识别。1号患者的单体型是HLA-A*01、HLA-A*02。

[0120] 将来自1号患者F16或F22肿瘤碎块的TIL;给予患者用于治疗的细胞(“输液袋”);黑色素瘤TIL1、2或3(从黑色素瘤肿瘤培养的TIL);mE7TCR(来自经转导以表达针对HPV 16 $E7_{11-19}$的TCR的PBMC的T细胞);或F15TIL(来自另一名患者的TIL,其对HPV 18 $E6_{121-135}$具有反应性,为II类限制性的,并且因此可以用HB145封闭)与gp100肽库、OKT3抗体或用HPV 18 E7肽库、HPV 18 E7肽库和W6/32、HPV 16 $E7_{11-19}$、HPV 16 $E7_{11-19}$和W6/32、HPV 16 $E7_{11-19}$和HB145、HPV 18 $E6_{121-135}$、HPV18 $E6_{121-135}$和W6/32或HPV 18 $E6_{121-135}$和HB 145脉冲刺激的DC共培养。结果显示在图3中。如图3所示,来自1号患者的F16肿瘤碎块的TIL对HPV 18 E7肽显示出I类限制性识别。

[0121] 实施例3

[0122] 本实施例显示来自1号患者的16号肿瘤碎块的TIL克隆用以分离HPV 18 E7反应性的CD8阳性T细胞。

[0123] 将DC加载有HPV 18 E7并且与来自1号患者的16号(F16)肿瘤碎块的TIL共培养。采用荧光激活细胞分选(FACS)来分选4-1BB阳性细胞的TIL。将分选的细胞在96孔板中进行培养,其中每孔具有两个细胞。选择对gp100肽库或HPV 18 E7肽库具有肿瘤反应性的克隆。结果显示在图4A和4B中。如图4A和4B所示,采用基于4-1BB的FACS分选使来自F16肿瘤碎块的CD8阳性T细胞克隆产生具有E7肽库反应性的两个克隆(12和21)的分离。

[0124] 实施例4

[0125] 本实施例显示来自12号患者的实施例1中产生的TIL的反应性。

[0126] 将来自12号患者的36个不同的肿瘤碎块(F1-F36)如实施例1所述产生TIL。来自12号患者的TIL或黑色素瘤TIL(对照)与用HPV 18E6肽库、HPV 18 E7肽库或gp100肽库(对照)脉冲刺激的树突细胞共培养并且测量IFN-γ。结果显示在图5中。如图5所示,来自12号患者的F1和F15肿瘤碎块的TIL显示出最高水平的IFN-γ产量。

[0127] 用HPV 18 E6慢病毒载体或绿色荧光蛋白(GFP)慢病毒载体转导自体DC。其它自体细胞用gp100肽库或HPV 18 E6肽库脉冲刺激。经转导的细胞与来自12号患者的F1肿瘤碎块的TIL,或黑色素瘤TIL1、2或3进行共培养。结果显示在图6中。如图6所示,12号患者的F1肿瘤碎块产生的TIL识别HPV 18 E6转导的DC,这表明TIL靶向自然加工和递呈的抗原。

[0128] 实施例5

[0129] 本实施例显示来自12号患者的1号和15号肿瘤碎块的TIL克隆的反应性用于分离HPV 18 E6反应性的CD8阳性T细胞。

[0130] 将DC加载有HPV 18E6并且与来自12号患者的1号和15号肿瘤碎块的TIL共培养。采用FACS分选来分选4-1BB阳性细胞的TIL。细胞被进一步分选为CD4阳性和CD8阳性细胞群。将分选的细胞在96孔板中进行培养,其中每孔具有两个细胞。筛选对HPV 18 E6肽库具有肿瘤反应性的克隆。来自F1的CD4阳性细胞的480个孔中,14个孔中的CD4阳性细胞出现生长,2个孔中的CD4阳性细胞具有反应性。来自F1的CD8阳性细胞的912个孔中,33个孔中的CD8阳性细胞出现生长,所有孔中的CD8阳性细胞均无反应性。来自F15的CD4阳性细胞的470个孔中,163个孔中的CD4阳性细胞出现生长,32个孔中的CD4阳性细胞具有反应性。来自F15的CD8阳性细胞的960个孔中,41个孔中的CD8阳性细胞出现生长,所有孔中的CD8阳性细胞均无反应性。

[0131] 还检测了CD4分选的细胞的反应性,如在与HPV 18 E6肽库(涵盖了全部E6蛋白的库)、无肽、HPV 18 E6蛋白的子库或HPV 18 E6肽库中的30-37号肽共培养后,测量肿瘤坏死因子(TNF)α的分泌。每个子库包括最初肽库的一部分。结果显示在图7A-7C中。如图7A-7C所示,来自12号患者的F1肿瘤碎块的3、12和20号克隆对HPV 18 E6具有反应性。产生的CD4阳性T细胞克隆识别具有11个氨基酸重叠的两个连续的15-mer。肽共有表位HPV 18 $E6_{125-135}$。

[0132] 实施例6

[0133] 本实施例显示12号患者的F15肿瘤碎块产生的克隆以HLA-DRB1*15限制性方式识别HPV 18 $E6_{121-135}$。

[0134] 3、12和20号克隆与具有表B所示的单体型的供体PBMC共培养。用HPV 18 $E6_{121-135}$脉冲刺激供体PBMC。

[0135] 表B

[0136]

	HLA-DR		HLA-DQ		HLA-DP	
供体 1	13:02	15:01	06	06	04:02	03:01
供体 2	03:01	04:01	02	03:02	04:02	02:01
供体 3	13:01	15	06	06	02:01	03:01
供体 4	03	07:01	02:01	02:02	04:01	01:01
供体 5	01:02	14	05:01	05:03	04:01	0501
供体 6	01:01	13:02	05:01	06	5:02	9:01
12 号患者	03	15:01	02	06:02	04:01	09

[0137] 测量TNFα的分泌。结果显示在图8A-8C中。如图8A-8C所示,12号患者的F15碎块产生的克隆识别脉冲刺激到与HLA-DRB1*15和HLA-DQB1*06均匹配的PBMC的$HPV18E6_{121-135}$,但不识别仅与HLA-DQB1*06匹配的PBMC的$HPV18E6_{121-135}$,这表明该克隆是HLA-DRB1*15限制性的。HLA-DRB1*15的表型等位基因频率是25%。

[0138] 来自12号患者的F15肿瘤碎块的3号克隆的TIL与自体PBMC或用HPV 18 $E6_{77-91}$或HPV 18 $E6_{121-135}$脉冲刺激的供体PBMC共培养。结果显示在图9A中。如图9A所示,来自12号患

者的F15肿瘤碎块的3号克隆的TIL识别仅与DRB1*15匹配的PBMC，但不识别仅与DRB1*06匹配的PBMC。

[0139] 来自12号患者的F15肿瘤碎块的20号克隆的TIL在存在针对HLA-DR、HLA-DQ、HLA-DP的抗体、泛I类抗体或泛II类抗体的情况下与HPV 18 $E6_{121-135}$共培养。泛I类和II类抗体分别阻断能结合MHC I类或II类分子的T细胞。结果显示在图9B中。如图9B所示，来自12号患者的F15肿瘤碎块的20号克隆的TIL识别同源肽的能力受到针对HLA-DR的封闭抗体的抑制。如图9A和9B所示，来自12号患者的F15肿瘤碎块的TIL以DRB1*15限制性方式识别HPV 18 $E6_{121-135}$。

[0140] 实施例7

[0141] 本实施例显示来自4号和8号患者的TIL的反应性。

[0142] 将来自4号患者或8号患者的24个不同的肿瘤碎块(F1-F24)如实施例1所述产生TIL。来自4号患者的TIL或黑色素瘤TIL(对照)与用HPV 16 E6肽库、HPV 16 E7肽库或gp100肽库(对照)脉冲刺激的自体DC共培养并且测量IFN-γ。结果显示在图10中。如图10所示，来自F4、F5、F14、F19和F22肿瘤碎块的TIL在针对用HPV 16 E6和E7肽库脉冲刺激的自体DC显示出反应性的那些肿瘤碎块中。

[0143] 来自8号患者的TIL或黑色素瘤TIL(对照)与用HPV 18 E6肽库、HPV 18 E7肽库或gp100肽库(对照)脉冲刺激的自体DC共培养并且测量IFN-γ。结果显示在图13中。如图13所示，产生了针对用HPV 18E7肽库脉冲刺激的自体DC显示出反应性的TIL。

[0144] 实施例8

[0145] 本实施例显示来自4号患者的肿瘤碎块的TIL的克隆用于分离HPV反应性CD4和CD8阳性T细胞。

[0146] 将DC加载有HPV 16 E6或HPV 16 E7并且与来自4号患者的肿瘤碎块的TIL共培养。采用FACS，分别分选4-1BB阳性细胞的HPV16 E6和HPV 16 E7反应性的TIL。细胞数目如实施例1所述进行扩增。通过FACS，细胞被进一步分选为4-1BB阳性细胞。将分选的细胞在96孔板中进行培养，其中每孔具有两个细胞。细胞被进一步分选成CD4阳性和CD8阳性细胞群。筛选对HPV 16 E6或E7肽库具有肿瘤反应性的克隆。

[0147] 结果显示在图11A-11D中。如图11A-11D所示，产生了对HPV 16 E6和E7具有反应性的CD8阳性和CD4阳性T细胞克隆。

[0148] 实施例9

[0149] 本实施例显示采用抗HPV T细胞的过继性细胞疗法治疗癌症。

[0150] 本研究的纳入标准包括(1)复发的/难治的或转移性的宫颈癌或来自任何部位的高危HPV阳性癌症以及(2)具有使用铂类药物的先前化疗，包括放化疗。

[0151] 从患者身上切除肿瘤。如实施例1所述，从肿瘤中获得TIL，使其生长，扩增TIL的数目，以及筛选扩增数目的TIL的HPV反应性。

[0152] 患者接受在第7天和6天静脉注射(IV)环磷酰胺(60mg/kg/天)以及在第5天至第1天静脉注射氟达拉滨(25mg/m^2/天)的非清髓性淋巴清除的准备方案。

[0153] 在第0天将TIL静脉内施用于患者。在第0天至第4天，将高剂量的阿地白介素(白细胞介素(IL)-2)(720,000IU/kg)静脉内施用于患者。

[0154] 在初始治疗方案结束后(被定义为阿地白介素施用的最后一天)4-6周，对患者进

行全面的肿瘤评估。如果患者的病情稳定或肿瘤缩小，重复全面评估每月进行一次，保持约3-4个月，然后每3-4个月进行一次直到满足研究标准。代表所有相关器官的最多10个病灶的所有可测量的病灶被确定为靶病灶，并且在基线进行记录和测量。所有其它病灶(或疾病部位)被确定为非靶病灶并且也在基线进行记录。病灶根据实体瘤疗效评价标准(RECIST)指南(1.0版)进行评估，如表C(靶病灶)和表D中(非靶病灶)所示。

[0155] 表C

[0156]

完全应答(CR)	所有靶病灶消失
部分应答(PR)	以基线最长直径总和作为参考，靶病灶的最长直径(LD)总和至少减少 30%。
进展(PD)	以从开始治疗或一个或多个新的病灶出现时记录的最小 LD 总和作为参考，靶病灶的 LD 总和增加至少 20%。
病情稳定(SD)	以最小 LD 总和作为参考，既无足够的缩小以符合 PR，也无足够的增加以符合 PD。

[0157] 表D

[0158]

完全应答(CR)	所有非靶病灶消失以及肿瘤标志物水平正常
未完全应答	一个或多个非靶病灶持续存在
进展(PD)	出现一个或多个新病灶。存在非靶病灶明确进展

[0159] 11名患者进行了治疗。结果总结在表E中。表E

[0160]

患者	性别	年龄	原发部位	组织学	疾病部位	先前的全身治疗	TIL 部位	细胞数目 ($x10^9$)	IL-2 剂量	应答 (持续月数)
1	F	30	宫颈	腺鳞状	肺、门、腹膜后、髂骨、阴道断端	顺铂	肺	101	7	NR
2	M	54	扁桃体	鳞状	颈部、软组织	多烯紫杉醇、顺铂、5-氟尿嘧啶(FU)、西妥昔单抗	颈部软组织	89	1	NR
3	F	53	宫颈	鳞状	肺、肝、骨盆	顺铂、紫杉醇、卡铂、托泊替康、伊沙匹隆、第 I 阶段	肺	126	3	PR(2)
4	F	35	宫颈	鳞状	纵膈、门、肺	顺铂、吉西他滨、托泊替康、紫杉醇	气管旁淋巴结 (paratracheal node)	152	2	PR (9+)

[0161]

5	F	55	宫颈	鳞状	腋窝、腹壁	卡铂、5-FU、依立替康	腋窝淋巴结 (LN)		7	NR
6	M	60	未知 (颈部)	鳞状	肝、颈部、骨、胸壁、腹膜后、门静脉周围	卡铂、顺铂、卡培他滨	肝	150	6	NR
7	F	44	宫颈	鳞状	纵膈、锁骨上、脑	顺铂	主肺动脉 (AP)窗 LN	90	5	NR
8	F	37	宫颈	腺	腹膜内、腹膜后、腹壁、肝表面	顺铂	右上(RUQ) 腹膜内	75	8	PR(2+)
9	F	59	宫颈	腺	腹壁、肺	顺铂、卡铂、紫杉醇、贝伐单抗	肺	33	8	待定
10	F	58	未知 (骨盆)	鳞状	纵膈、门、肺	顺铂、5-FU、卡铂、紫杉醇、西妥昔单抗、依立替康	AP 窗 LN	32	2	待定
11	F	31	宫颈	腺鳞状	肝周的、骨盆的	顺铂、紫杉醇	盲肠周腹膜内			

[0162] NR＝无应答

[0163] 如表E所示，有八名患者的结果可用，用HPV反应性TIL的过继性细胞疗法产生了三名客观应答者(OR)，其全部是部分应答者(PR)。两个部分应答在治疗后持续了两个月(3和4号患者)，一个部分应答(8号患者)在治疗后持续了九个月。

[0164] 在治疗前和治疗后九个月对4号患者的胸部和骨盆进行了计算机断层扫描(CT)。结果显示在图12A-F中。如图12A-B所示，腹主动脉旁淋巴结中的癌性病灶在治疗后九个月缩小了100％。如图12C-D所示，左肺门淋巴结中的癌性病灶在治疗后九个月也缩小了100％。如图12E-F所示，髂总淋巴结中的癌性病灶在治疗后九个月也缩小了100％。

[0165] 在治疗前和治疗后两个月对8号患者的肝脏进行了磁共振成像(MRI)扫描。结果显示在图14A-14B中。如图14A-B所示，治疗后两个月肝的癌性肿块缩小了100％。在治疗前和治疗后两个月对8号患者的腹部和骨盆也进行了CT扫描。结果显示在图14C-H中。如图14C-D所示，腹膜后淋巴结中的癌性病灶也缩小了100％。如图14E-F所示，腹壁中的癌性肿块也缩小了100％。此外，如图14G-H所示，癌性左结肠周的肿块大幅度缩小。

[0166] 实施例10

[0167] 本实施例提供了实施例9中描述的临床研究的更新结果，所述结果是在获得实施例9中描述的结果后九个月获得的。本实施例显示采用抗HPV T细胞的过继性细胞疗法治疗癌症。

[0168] 方法：用所选择的具有HPV E6-和E7-反应性的肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)(HPV-TIL)治疗转移性HPV+癌症的临床试验如实施例9所述进行。在HPV-TIL输注之前进行非清髓性调节，随后施用高剂量的阿地白介素，如实施例9所述。HPV反应性通过ELISPOT、IFN-γ的产量和CD137表达分析进行评估。

[0169] 结果：在本研究中治疗了九名宫颈癌患者。他们接受了81x 10^9个T细胞的中值(范围是33至152x 10^9个)作为单次输注。输注的细胞对6/8号患者中的高危HPV E6/或E7具有反应性。无HPV反应性的两名患者对治疗无应答。具有HPV反应性的六名患者中的三名患者通过RECIST显示出客观的肿瘤应答(1名患者为PR和2名患者为CR)。一名患者具有39％的最佳应答。具有广泛转移的两名患者有完全的肿瘤应答，其在治疗后持续了18和11个月。一名完全应答的患者患有化疗难治性HPV-16+鳞状细胞癌(实施例9中的4号患者)，另一名患有化疗难治性HPA-18+腺癌(实施例9中的8号患者)。两名患者在治疗后都显示出HPV反应性T细胞的长期重新住入。一名患者中的HPV特异性T细胞的增加频率在13个月后是可检测的，另一名患者中的HPV特异性T细胞的增加频率在6个月后是可检测的。对治疗无应答的具有HPV反应性TIL的两名患者未显示出HPV反应性T细胞的重新住入。

[0170] 在本研究中也治疗了六名非宫颈癌患者。一名患者经历了客观的临床应答，即转移性扁桃体癌的部分应答，其在治疗后持续了四个月(图20A-J)。

[0171] 结果显示在表F-G中。

[0172] 表F

[0173]

HPV-TIL 宫颈癌群组									
患者	年龄	组织学	HPV 类型	疾病部位	先前的全身治疗	TIL 部位	细胞数目 ($x10^9$)	IL-2 剂量	应答(持续月数)*
1	30	腺鳞状	HPV-18	肺、门、腹膜后、髂骨、阴道断端	顺铂	肺	101	7	PD
3	53	鳞状	HPV-18	肺、肝、骨盆	顺铂、紫杉醇、卡铂、托泊替康、伊沙匹隆，第 I 阶段	肺	126	3	PR(3)
4	35	鳞状	HPV-16	纵膈、门、肺、髂骨	顺铂、吉西他滨、托泊替康、紫杉醇	气管旁淋巴结	152	2	CR(18+)
5	55	鳞状	HPV-16	腋窝、腹壁	卡铂、5-FU、依立替康	腋窝 LN	81	7	PD
7	44	鳞状	HPV-18	纵膈、锁骨上、脑部	顺铂	AP 窗 LN	90	5	PD
8	37	腺	HPV-18	结肠周围、腹膜后、腹壁、肝表面	顺铂	RUQ 腹膜内	75	8	CR(11+)
9	59	腺	HPV-18	腹壁、肺	顺铂、卡铂、紫杉醇、贝伐单抗	肺	33	8	PD
11	31	腺鳞状	HPV-18	肝周、骨盆	顺铂、紫杉醇	盲肠周	46	9	PD
12	37	腺	HPV-18	骨盆、腹膜后、腋窝、纵膈、肺	卡铂、紫杉醇、依匹木单抗 (ipilimumab)	锁骨上 LN	70	1	PD

[0174] *从细胞输注的月数测量

[0175] 表G

[0176]

HPV-TIL 非宫颈癌群组										
患者	性别	年龄	原发部位	组织学	疾病部位	先前的全身治疗	TIL 部位	细胞数目 ($x10^9$)	IL-2 剂量	应答(持续月数)*
头部和颈部										
2	M	54	扁桃体	鳞状	颈部、软组织	多烯紫杉醇、顺铂、5-FU、西妥昔单抗	颈部软组织	89	1	PD
6	M	60	未知(颈部)	鳞状	肝、颈部、骨、胸壁、腹膜后、门静脉周	卡铂、顺铂、卡培他滨	肝	150	6	PD
13	M	60	扁桃体	鳞状	肺、门	多烯紫杉醇、顺铂、贝伐单抗、西妥昔单抗、吉西他滨	肺	131	5	PR(4+)
肛门										
10	F	58	未知(有AIN 的骨盆)	鳞状	纵膈、门、肺	顺铂、5-FU、卡铂、紫杉醇、西妥昔单抗、依立替康	AP 窗 LN	32	2	PD
14	F	49	肛门	鳞状	纵膈、腹膜后、骨盆	5-FU、丝裂霉素、顺铂、卡铂、蛋白结合型紫杉醇	颈部 LN	69	3	PD
15	F	58	肛门	鳞状	肝、腹膜后、骨盆	5-FU、丝裂霉素、顺铂	肝	48	6	PD
*从细胞输注的月数测量										

[0177] 这些数据显示HPV-TIL可以介导转移性宫颈癌的持久的完全消退以及细胞疗法可以介导上皮性恶性肿瘤的完全消退。这些数据还显示HPV-TIL可以介导转移性扁桃体癌的消退。

[0178] 实施例11

[0179] 本实施例进一步描述了在采用抗HPV T细胞的过继性细胞疗法的实施例10中获得的完全肿瘤应答。

[0180] 方法

[0181] HPV-TIL的产生:肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)从离体肿瘤的2mm碎块生长而来,如先前所述(Dudley等,J.Immunother.,26(4):332-42(2003))。淋巴细胞生长两到三周后,通过流式细胞术评估培养物的细胞组成以及通过如下述“HPV癌蛋白反应性的评估”部分描述的干扰素(IFN)-γ的产量分析评估培养物对HPV型特异性E6和E7的反应性。流式细胞术分析

用对CD3、CD4、CD8和CD56具有特异性的荧光抗体(BD Biosciences)进行。基于对HPV癌蛋白的反应性、快速生长、高的T细胞纯度和高频率的CD8+T细胞筛选用于另外扩增的培养物。用于治疗的细胞数目的扩增用G-REX气体可渗透培养瓶的快速扩增方案完成(Dudley等,J.Immunother.,26(4):332-42(2003);Jin等,J.Immunother.,35(3):283-92(2012))。核准输注产品的活细胞数、T细胞纯度(流式细胞术)、效价(IFN-γ产量)、无菌(微生物学研究)和无肿瘤细胞(细胞病理学)。

[0182] 患者治疗:患者患有转移性宫颈癌和可测量的疾病。需要在主要的放化疗或转移性背景中使用铂类药剂的先前治疗。预处理方案包括每天60mg/kg的环磷酰胺,持续两天,然后,每天IV 25mg/m^2的氟达拉滨,持续五天。在20-30分钟时间内IV施用细胞。720,000IU/kg/剂量的阿地白介素在细胞输注的24小时内通过静脉注射开始施用,并且每八小时重复一次直到由于毒性停止或者达到15次的最大剂量。非格司亭在细胞输注后的第二天开始施用,并且持续到重新获得中性粒细胞计数为止。

[0183] 肿瘤应答:基线影像学研究在预处理方案开始前的四周内获得。后续的影像在治疗后六周、三次评估的每月、三次评估的每三个月以及然后两次评估的每6个月获得。

[0184] HPV癌蛋白反应性的评估:HPV反应性通过将T细胞(40,000至100,000个细胞)与加载有涵盖了E6、E7、gp100或EBNA1和BZLF1(Miltenyi Biotec,Bergisch Gladbach,Germany)的1μM肽库的自体未成熟的树突细胞(40,000个细胞)共培养来确定。肽库包括与11个氨基酸重叠的15-mer肽。树突细胞是从外周血单核细胞(PBMC)的贴壁部分产生,或者通过在补充有10%人血清和1000IU/mL GM-CSF以及500IU/mL的IL-4的DMEM中培养五至六天使用磁珠分离(Miltenyi Biotec)从PBMC分离的CD14+细胞产生的。抗EBV的对照T细胞是在治疗前通过在含有补充有10%人血清和3000IU/mL IL-2的AIM-V/RPMI培养基中将PBMC与EBNA1和BZLF1肽库(10μg/mL)共培养产生的。对于IFN-γ产量分析,上清液中的IFN-γ的浓度在过夜共培养后确定(R&D Systems(Minneapolis,MN)或Thermo Fisher Scientific(Waltham,MA))。

[0185] ELISPOT(Mabtech(Cincinnati,OH))分析根据制造商的说明书进行。简而言之,用10,000个效应细胞和40,000个靶细胞接种预涂捕获抗体(1-DlK克隆,Mabtech)的ELIIP板(来自于Millipore(Billerica,MA)的WAIPSWU)。在孵育16-18个小时之后,IFN-γ的分泌通过添加生物素化的抗IFN-γ抗体(7-B6-1生物素,Mabtech)在室温保持两小时来检测。在与链霉亲和素-碱性磷酸酶孵育一小时后,加入底物试剂(5-溴-4-氯-3'-吲哚基磷酸酯对甲苯胺/氯化硝基四氮唑蓝,Kirkegaard&Perry Laboratories,Inc.(Gaithersburg,MD))以使得斑点形成。斑点形成通过用自来水冲洗而终止。采用免疫斑点自动读数仪(Cellular Technology,Ltd.(ShakerHeights,OH))计数斑点。如果超出阴性对照的两倍以及大于10个斑点/孔,则针对E6或E7的ELIPSOT反应被定义为阳性。

[0186] CD137上调分析通过在共培养20-24小时后采用流式细胞术分析进行(Wolfl等,Blood,110(1):201-10(2007))。用针对CD137、CD4、CD8和CD3的荧光抗体(BD Biosciences,San Jose,CA)标记细胞。在用BDFACSCANTO II细胞分析仪(BD Biosciences)进行数据采集前,用碘化丙啶(BD Pharmingen,Franklin Lakes,New Jersey)复染所述细胞。数据用FLOWJO软件,Mac version 10(TreeStar,Ashland,OR)进行分析。

[0187] 免疫组织化学:在NCI的病理学实验室中,根据标准程序,在来自福尔马林固定、石

蜡包埋的转移性肿瘤的4μM切片上进行免疫组织化学染色。在脱蜡、复水和抗原修复后，肿瘤切片与抗人CD4克隆1F6(Novocastra,Wetzlar,Germany)在1:80的稀释度下孵育2小时，与抗人CD8克隆CD8/144B(Dako Corp.,Glostrup,Denmark)在1:50的稀释度下孵育2小时，或与抗人p16克隆JC8(Santa Cruz,Dallas,Texas)在1:200的稀释度下孵育32分钟。CD4染色玻片在AUTOSTAINER Link 48(Dako Corp.)上进行染色，用ENVISION FLEX+检测系统(Dako Corp.)进行可视化观察。CD8和p16染色玻片在VENT ANA Benchmark XT(Ventana Medical Systems,Tucson,AZ)上进行染色，用ULTRAVIEW检测系统(Ventana Medical Systems)进行可视化观察。用10x显微镜拍摄图像。

[0188] 来自外周血的淋巴细胞亚群的测定:用手动区分测定的全血计数在临床中心血液学实验室进行。T、B和NK细胞的淋巴细胞表型分析由美国国立卫生研究院免疫学流式细胞实验室(NIH Immunology Flow Cytometry Laboratory)采用标准化标准进行。

[0189] 实时逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR):使用RNEASY试剂盒(Qiagen,Valencia,CA)从新鲜肿瘤组织的2mm碎块中分离RNA。逆转录第一链DNA的合成采用QSCRIPT cDNA超混液(Quanta BioSciences,Gaithersburg,MD)进行。定制的TAQMAN引物和探针序列(AppliedBiosciences,Foster City,CA)被用于HPV16-E6、HPV16-E7、HPV18-E6和HPV18-E7。现成的3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物探针组被用于标准化癌蛋白的表达水平(Hs02758991_gl,Applied Biosciences,Foster City,CA)。RT-PCR在7500快速实时PCR系统(Applied Biosciences)上进行。

[0190] 血清细胞因子水平分析:根据制造商的说明书，采用BIO-PLEX Pro人细胞因子17重分析(Bio-Rad Laboratories)测量用HPV-TIL治疗前后收集的患者血清中的17种细胞因子的水平(IL-1β、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-13、IL-17、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞-单核细胞集落刺激因子(GM-CSF)、IFN-γ、单核细胞趋化蛋白(MCP)-1、巨噬细胞炎症蛋白(MIP)-1β和肿瘤坏死因子(TNF)-α。细胞因子水平通过BIO-PLEX 200系统(Bio-Rad)获得。

[0191] 病例报告

[0192] 4号患者在用HPV-TIL治疗前14个月被诊断患有3B期低分化的、鳞状细胞宫颈癌。该患者首先用顺铂、长春新碱和争光霉素治疗，随后用吉西他滨+顺铂的放化疗和近距离放射疗法治疗。两个月后，在气管旁(活检证实)、隆突下和双侧肺门淋巴结检测到转移性癌症。在病情进展前，她接受了四个周期的拓扑替康和紫杉醇治疗，然后参与了实施例9和10描述的临床试验。从切除的气管旁淋巴结中制备HPV-TIL。该患者接受了淋巴细胞减少型化疗，随后接受了152x 10^9个HPV-TIL的单次静脉内输注和两剂量的阿地白介素。由于患者疲劳而停止阿地白介素给药。她在细胞输注后的12天，造血功能恢复后出院。

[0193] 8号患者在用HPV-TIL治疗前17个月被诊断患有IB2期子宫颈腺癌。她的原发性肿瘤用顺铂的放化疗治疗，随后用近距离放射疗法治疗。五个月后，注意到她患有放化疗难治性原发肿瘤(活检证实)。挽救性手术确定腹主动脉旁和髂淋巴结转移以及残留的盆腔疾病。她的癌症进展到涉及其它的腹膜后淋巴结和肝表面，并且她患有右肾积水和双侧肺栓塞，这需要输尿管支架及抗凝治疗。然后，按照本实施例描述的方案采用两个腹膜结节产生的HPV-TIL治疗该患者。她接受了淋巴细胞减少型化疗，随后接受了75x 10^9个HPV-TIL细胞和八次剂量的阿地白介素。由于缺氧继发性肺水肿(需要补充氧气和解决利尿)而停止阿地

白介素给药。细胞输注后11天出院。

[0194] 完全临床应答

[0195] 两名患者在治疗前均患有弥散性进行性疾病(图12A-F;图14A-H;图15A-B;图16A-D;图21A-H和图22A-H)。4号患者患有转移性肿瘤,涉及到了腹主动脉旁纵膈淋巴结、双侧肺门、隆突下淋巴结和髂淋巴结(图15A;图12A-F和图21A-H)。8号患者患有转移性癌症,涉及至少七个部位:两个肿瘤在肝表面,腹主动脉旁和主动脉腔静脉淋巴结,腹壁,左侧骨盆有一个结肠周肿块以及一个结节阻塞了右侧输尿管(图15B;图14A-H;图16A-D和图22A-H)。每名患者用单次T细胞输注治疗,这使得数月之内出现了肿瘤消退(图15A-B)。两名患者均经历了客观的完全肿瘤应答,所述完全肿瘤应答在治疗后持续了18和11个月(图21A-H(4号患者)和图22A-H(8号患者)。在阻塞右侧输尿管的肿瘤消退后,先前放置的输尿管支架从8号患者的体内取出(图22G和H)。两名患者均未接受其它治疗。两名患者均恢复全职工作。

[0196] HPV-TIL的毒性

[0197] 不存在与细胞输注相关的急性毒性。无自身免疫性不良事件发生。两名患者均表现出短暂的血清细胞因子升高(图17A-B),这与发烧有关,但两名患者均未患上严重的细胞因子释放综合征。测定冻存血清中的细胞因子水平。对下述细胞因子进行了检测:IL-1β、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12(p70)、IL-13、IL-17、G-CSF、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、IFN-γ、MCP-1、巨噬细胞炎症蛋白1β(MIP-1β)和TNF-α。显示出在两次连续测量中大于基线两倍的水平的细胞因子。细胞输注后每八小时给药阿地白介素(4号患者接受了两剂量,8号患者接受了8剂量)。GCSF在细胞输注后的第二天开始每天施用,并且持续到中性粒细胞计数恢复为止(4号患者接受了11剂量,8号患者接受了9剂量)。

[0198] 将阿地白介素按照方案设计给药至耐受性,4号患者由于疲劳停止,8号患者由于呼吸困难停止。3级和4级不良事件在表H中列出。最常见的毒性是血液学效应和淋巴细胞减少型预处理方案(环磷酰胺和氟达拉滨)的预期效应。

[0199] 表H

毒性	4号患者	8号患者
贫血	×	×
中性粒细胞减少症	×	×
淋巴细胞减少症	×	×
白细胞减少症	×	×
血小板减少症	×	×
发热性中性粒细胞减少症	×	×
感染		×
疲劳	×	×
恶心/呕吐	×	
昏厥†		×
下消化道(GI)出血*		×
血尿症*		×
低磷酸盐血症	×	

[0200] †治疗后15天不明病因的单次发作。

[0201] *与放射性膀胱炎和结肠炎有关。

[0202] 肿瘤抗原表达和T细胞浸润

[0203] 用于HPV-TIL产生的被切除的转移性肿瘤是4号患者的鳞状细胞癌和8号患者的腺癌。恶性细胞表达p16INK4A,其为高危型HPV感染的敏感指标。通过实时逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)测定每名患者的肿瘤的HPV类型及HPV-TIL的靶抗原E6和E7的表达水平。4号患者是HPV-16+癌症,8号患者是HPV-18+癌症。来自两名患者肿瘤中的T细胞浸润显示出混合成分,4号患者中主要是CD8+细胞,8号患者中主要是CD4+细胞。CD4+和CD8+T细胞从切除的肿瘤中生长。对于4号患者而言,输注的HPV-TIL由19%的CD4+和79%的CD8+T细胞组成,对于8号患者而言,输注的HPV-TIL由15%的CD4+和87%的CD8+T细胞组成。

[0204] HPV-TIL靶向的HPV癌蛋白

[0205] 施用于4号患者的HPV-TIL针对E6和E7癌蛋白均具有反应性,如通过干扰素(IFN)-γ的产量和ELISPOT分析显示(图18A和C)。5%和大于7%的输注细胞对E6或E7显示出应答,分别通过ELISPOT分析显示(图18C和D)。E6应答是CD8+T细胞介导的,E7应答是CD4+和CD8+T细胞介导的。总之,14%的输注细胞显示出HPV反应性,如通过CD137上调分析测量。对于8号患者,HPV-TIL对E7具有反应性(图18B),通过ELISPOT分析有4%的T细胞对抗原有应答(图18D)。该应答主要由CD4+T细胞介导。

[0206] 癌蛋白反应性的T细胞的重新住入

[0207] HPV-TIL输注之后外周血中的CD4+和CD8+T细胞数目快速增加,但是NK和B细胞数目没有快速增加(图19A-B)。输注的T细胞数目的扩增与外周血T细胞对HPV癌蛋白反应性的

确立和持久性相关，这通过IFN-γ产量、ELISPOT和CD137上调分析测量(图19C-F)。两名患者在治疗前对E6或E7具有(如有的话)很少的反应性。治疗后，4号患者获得了强大的E6和E7的T细胞识别能力。对于8号患者，该识别能力较弱，但是仍可检测出，与输注的T细胞一致，仅针对E7。治疗后一个月，4号患者的12％的外周血T细胞是癌蛋白反应性的(7％针对E6，5％针对E7)(图19E)。在细胞输注后4个月和13个月，针对这些抗原的反应性与显示出癌蛋白识别能力的1％的外周血T细胞持续存在(图19E)。在治疗后一个月，8号患者显示出0.4％的HPV反应性T细胞(图19F)。在治疗后三和六个月，虽然水平较低，但反应性持续存在(图19D和F)。与输注的HPV-TIL中的T细胞亚群的反应性相一致，对于4号患者而言，重新住入患者体内的HPV特异性T细胞主要是E6和E7反应性的CD8+细胞，对8号患者而言，重新住入患者体内的HPV特异性T细胞主要是E7反应性的CD4+T细胞。

[0208] 实施例12

[0209] 本实施例提供了4号和8号患者的来自实施例10和11中描述的临床研究的更新结果，这些结果是在实施例10和11中描述的结果获得后的4个月获得的。本实施例显示使用抗HPV T细胞的过继性细胞疗法治疗癌症。

[0210] 如实施例10和11所述被治疗的4号和8号患者的客观的完全肿瘤应答分别在治疗后22个月和15个月仍持续着。

[0211] 本文引用的所有参考文献，包括出版物、专利申请和专利在此通过引用并入，其程度如同每份参考文献单独地和具体地表示为通过引用并入并且在本文以其整体示出。

[0212] 在描述本发明的上下文中(特别是在以下权利要求的上下文中)使用的术语“一个/一种”和“所述”和“至少一种/一个”以及类似的指示物应被解释为覆盖单数和复数两者，除非本文另外指出或与上下文明显矛盾。术语“至少一种/一个”之后一项或多项列表(例如，“A和B中的至少一种/一个”)的使用应被解释为意指选自列出的项中的一项(A或B)或两个或更多个列出的项的组合(A和B)，除非本文另外指出或与上下文明显矛盾。术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”应被解释为开放式的术语(即意指“包括，但不限于”)，除非另外指明。本文数值的范围的描述仅旨在用作分别提及属于范围内的每个单独数值的速记法，除非另外指出，并且每个单独的数值均并入说明书中如同其被单独的列举出一样。本文所述的所有方法可以以任何合适的顺序进行，除非本文另外指出或与上下文明显矛盾。本文提供的任何和所有的实例或示例性语言(例如，“诸如”)的使用仅仅意图更好地阐明本发明，并且不会对以其它方式要求保护的本发明范围构成限制。不应将本说明书中的语言解释为表明任何未要求保护的组分对实施本发明是必要的。

[0213] 本发明的优选实施方案在本文中描述，包括发明人已知的实施该发明的最佳模式。对本领域的普通技术人员来说，阅读上述说明后这些优选的实施方案中的改变可以是显而易见的。发明人期望熟练的技术人员酌情利用这些改变，并且发明人意欲以不同于本文具体描述的方式实施该发明。因此，在适用法律允许的情况下，本发明包括在所附的权利要求中所引用主题的所有修改和等同物。此外，在其所有可能的改变中上述要素的任何组合涵盖于本发明中，除非本文另外说明或上下文中明显矛盾。

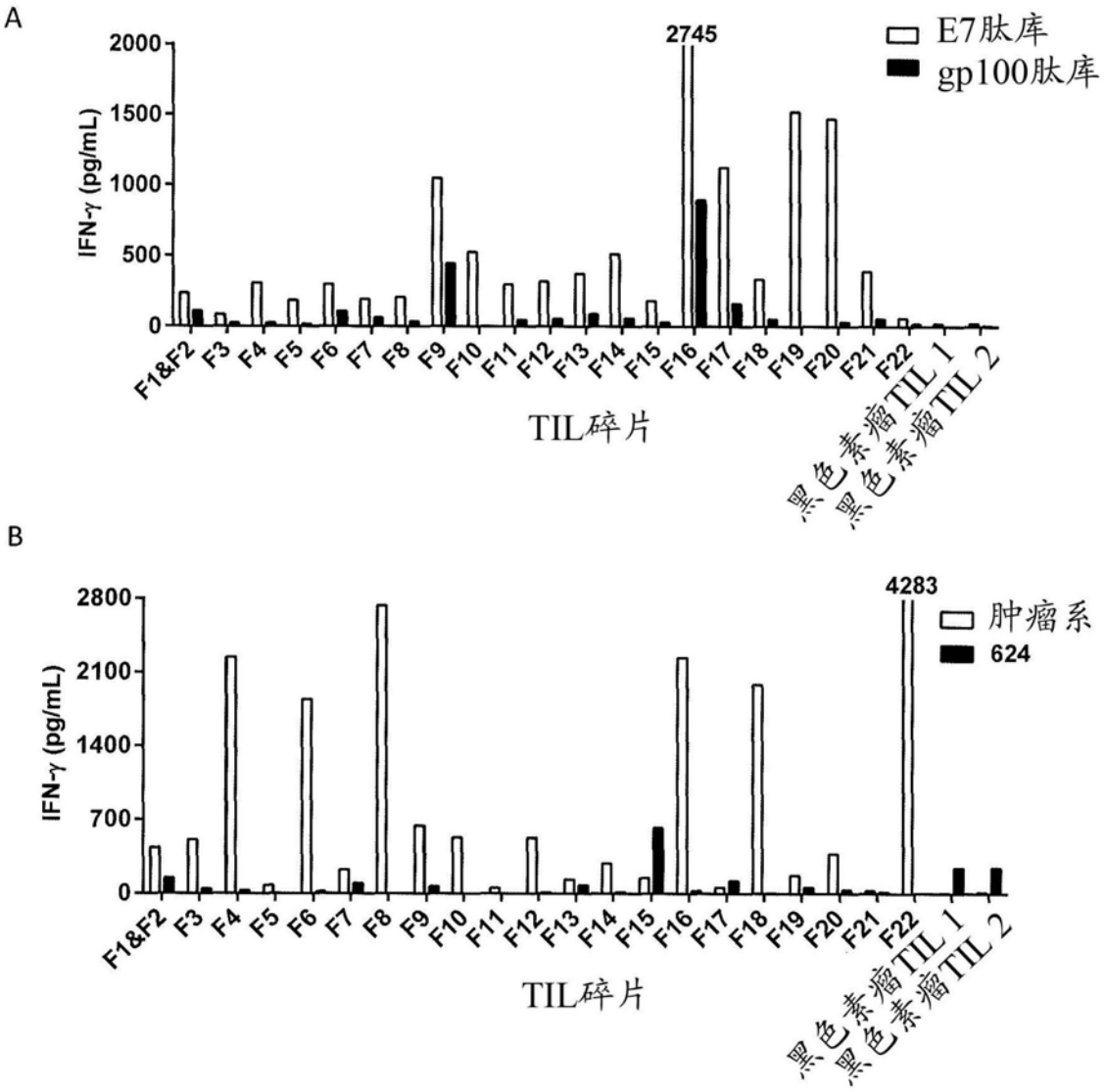
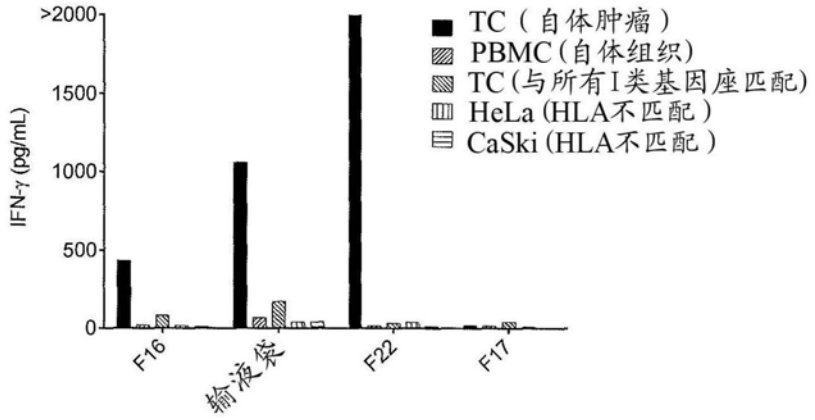
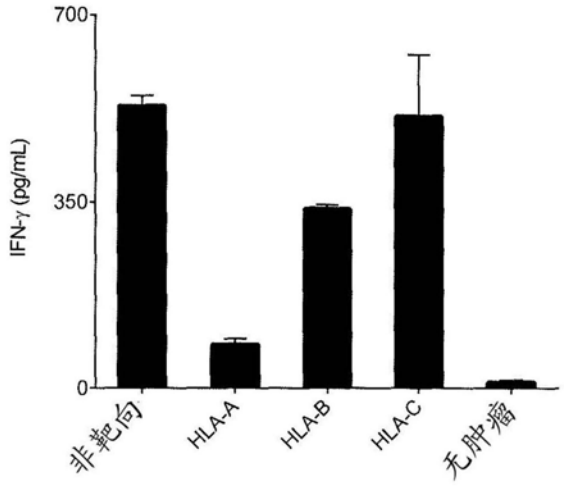

A
2745
E7肽库
gp100肽库
IFN-γ (pg/mL)
2000
1500
1000
500
0
F1&F2 F3 F4 F5 F6 F7 F8 F9 F10 F11 F12 F13 F14 F15 F16 F17 F18 F19 F20 F21 F22
TIL碎片
黑色素瘤TIL 1
黑色素瘤TIL 2
B
4283
肿瘤系
624
IFN-γ (pg/mL)
2800
2100
1400
700
0
F1&F2 F3 F4 F5 F6 F7 F8 F9 F10 F11 F12 F13 F14 F15 F16 F17 F18 F19 F20 F21 F22
TIL碎片
黑色素瘤TIL 1
黑色素瘤TIL 2

图1

A


>2000
1500
1000
500
0
IFN-γ (pg/mL)
TC（自体肿瘤）
PBMC（自体组织）
TC（与所有I类基因座匹配）
HeLa（HLA不匹配）
CaSki（HLA不匹配）
F16
输液袋
F22
F17

B


700
350
0
IFN-γ (pg/mL)
非靶向
HLA-A
HLA-B
HLA-C
无肿瘤

C

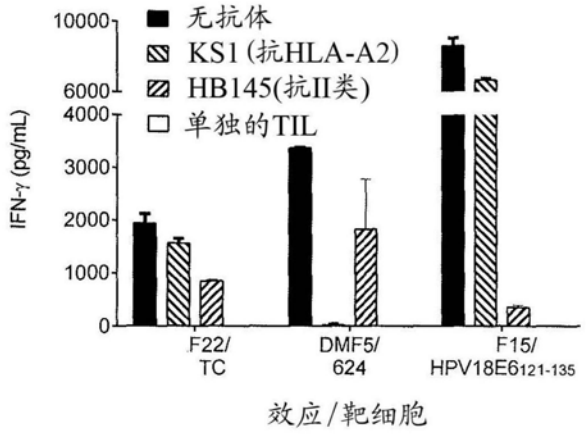

10000
6000
4000
3000
2000
1000
0
IFN-γ (pg/mL)
无抗体
KS1（抗HLA-A2）
HB145（抗II类）
单独的TIL
F22/
TC
DMF5/
624
F15/
HPV18E6121-135
效应/靶细胞

图2

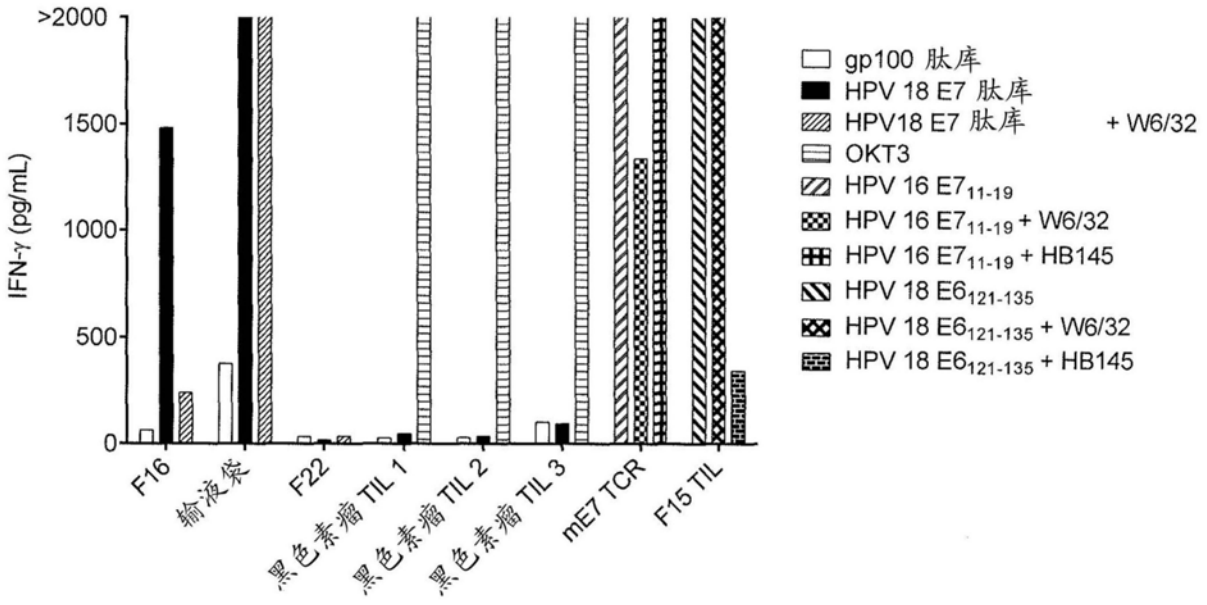

>2000
1500
1000
500
0
IFN-γ (pg/mL)
F16
输液袋
F22
黑色素瘤 TIL 1
黑色素瘤 TIL 2
黑色素瘤 TIL 3
mE7 TCR
F15 TIL
gp100 肽库
HPV 18 E7 肽库
HPV18 E7 肽库 + W6/32
OKT3
HPV 16 E7$_{11-19}$
HPV 16 E7$_{11-19}$ + W6/32
HPV 16 E7$_{11-19}$ + HB145
HPV 18 E6$_{121-135}$
HPV 18 E6$_{121-135}$ + W6/32
HPV 18 E6$_{121-135}$ + HB145

图3

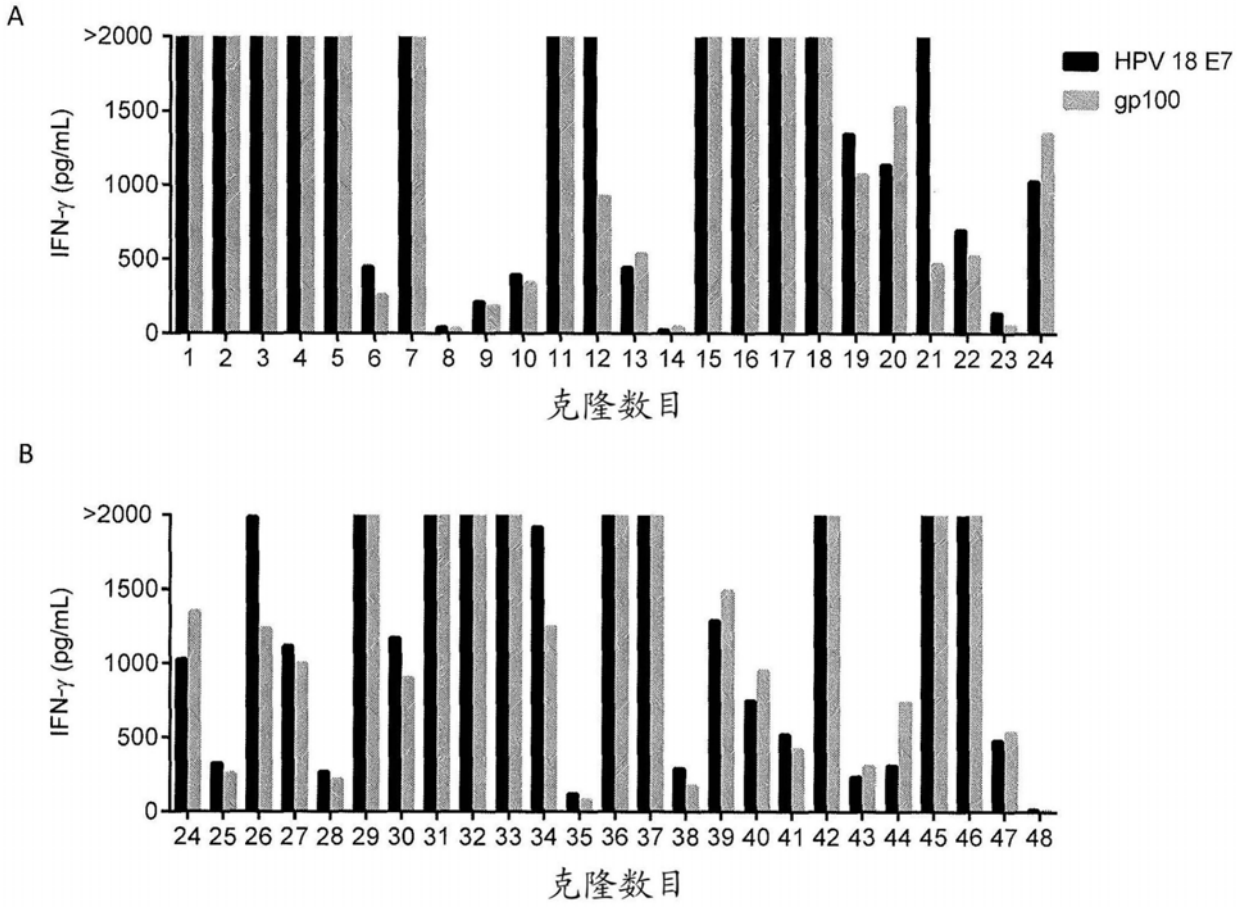

A
>2000
1500
1000
500
0
IFN-γ (pg/mL)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
克隆数目
HPV 18 E7
gp100
B
>2000
1500
1000
500
0
IFN-γ (pg/mL)
24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48
克隆数目

图4

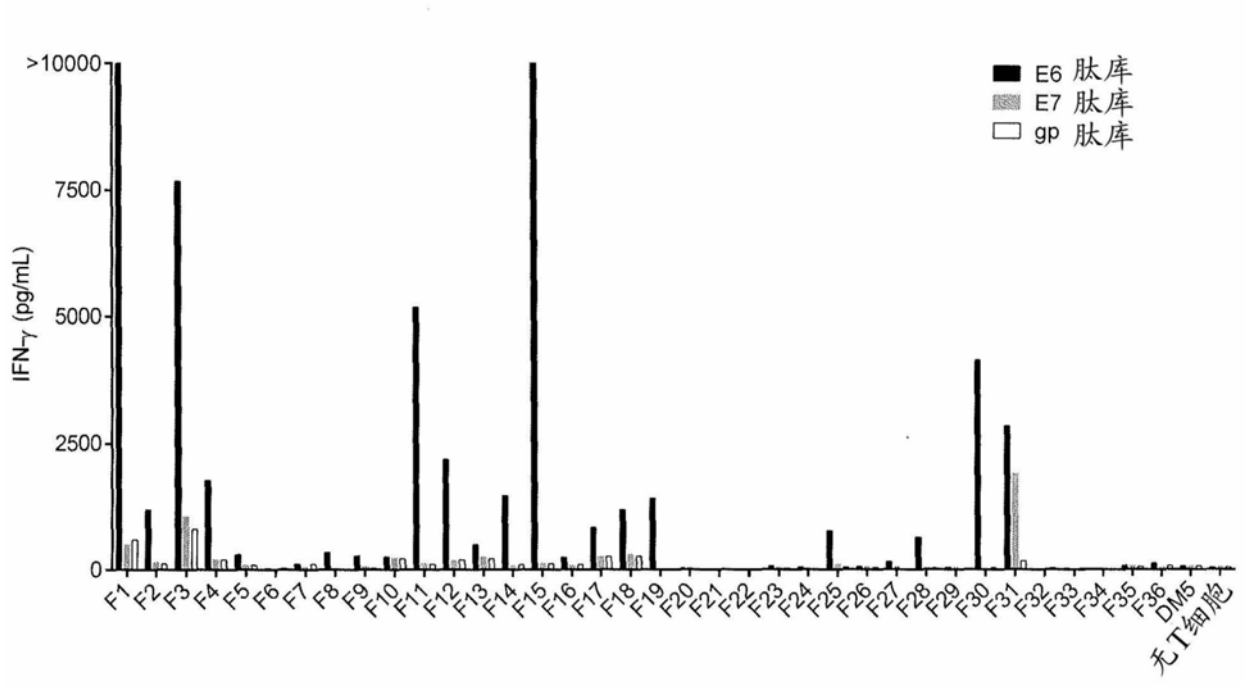

>10000
7500
5000
2500
0
IFN-γ (pg/mL)
E6 肽库
E7 肽库
gp 肽库
F1 F2 F3 F4 F5 F6 F7 F8 F9 F10 F11 F12 F13 F14 F15 F16 F17 F18 F19 F20 F21 F22 F23 F24 F25 F26 F27 F28 F29 F30 F31 F32 F33 F34 F35 F36 DMS
无T细胞

图5

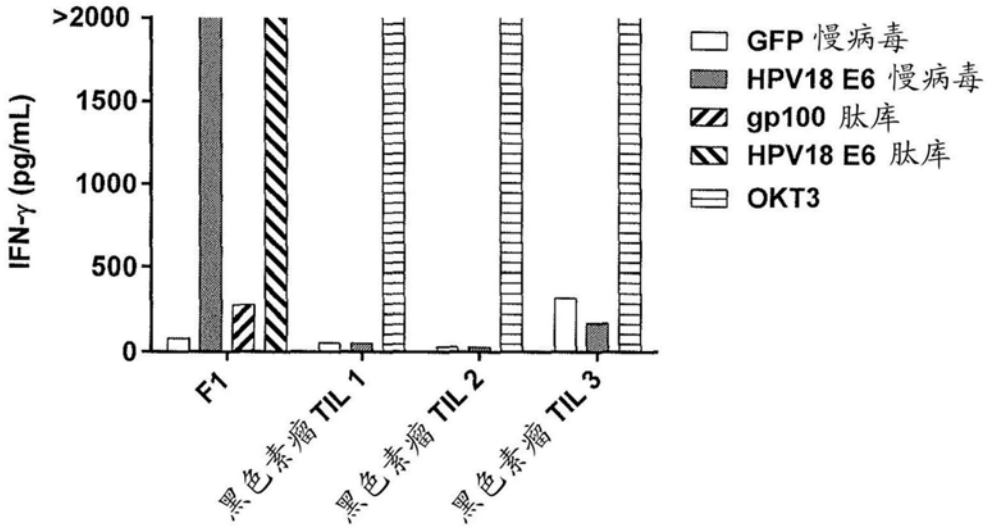

>2000
1500
1000
500
0
IFN-γ (pg/mL)
GFP 慢病毒
HPV18 E6 慢病毒
gp100 肽库
HPV18 E6 肽库
OKT3
F1
黑色素瘤 TIL 1
黑色素瘤 TIL 2
黑色素瘤 TIL 3

图6

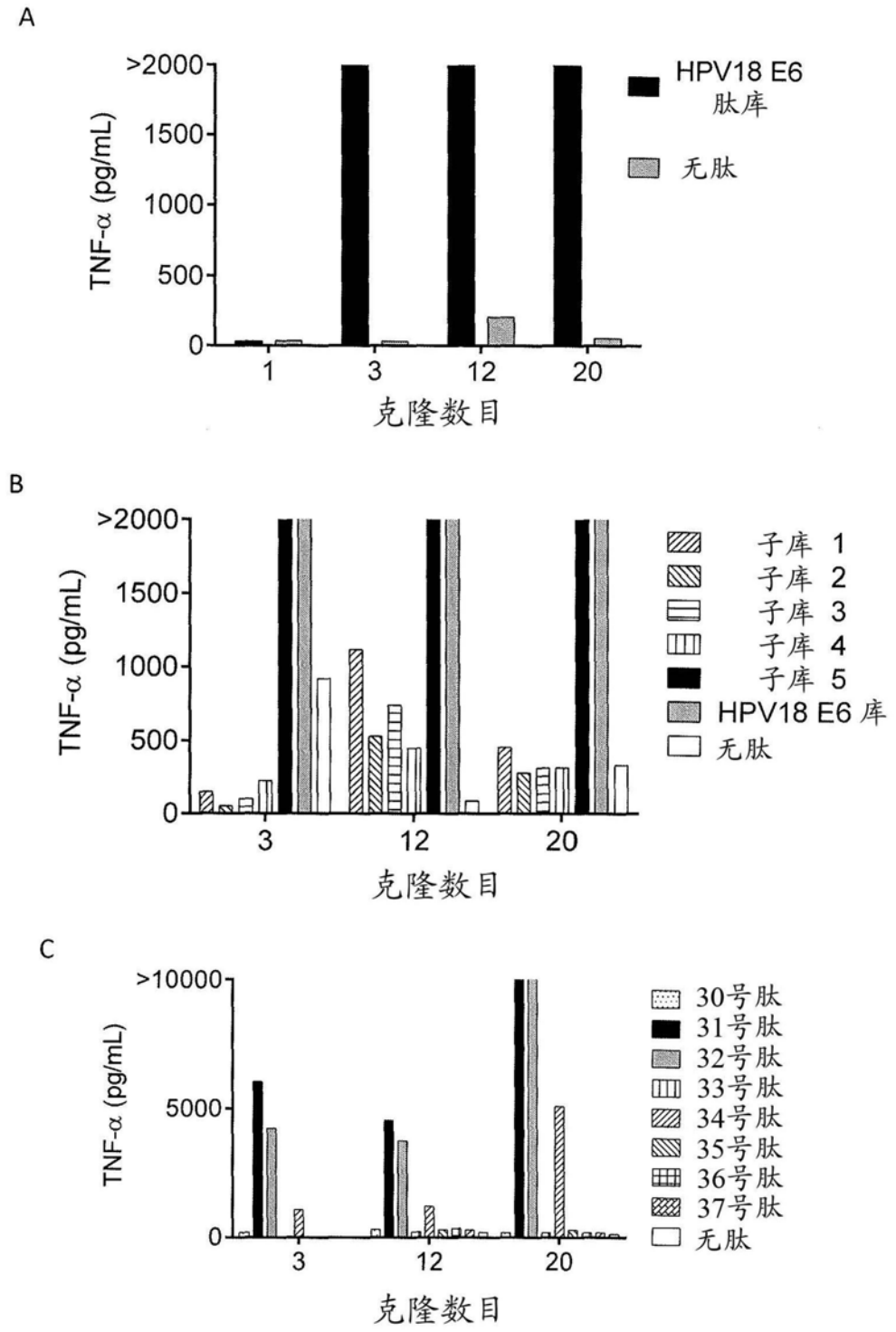

A
>2000
1500
1000
500
0
TNF-α (pg/mL)
1
3
12
20
克隆数目
HPV18 E6
肽库
无肽
B
>2000
1500
1000
500
0
TNF-α (pg/mL)
3
12
20
克隆数目
子库 1
子库 2
子库 3
子库 4
子库 5
HPV18 E6 库
无肽
C
>10000
5000
0
TNF-α (pg/mL)
3
12
20
克隆数目
30号肽
31号肽
32号肽
33号肽
34号肽
35号肽
36号肽
37号肽
无肽

图7

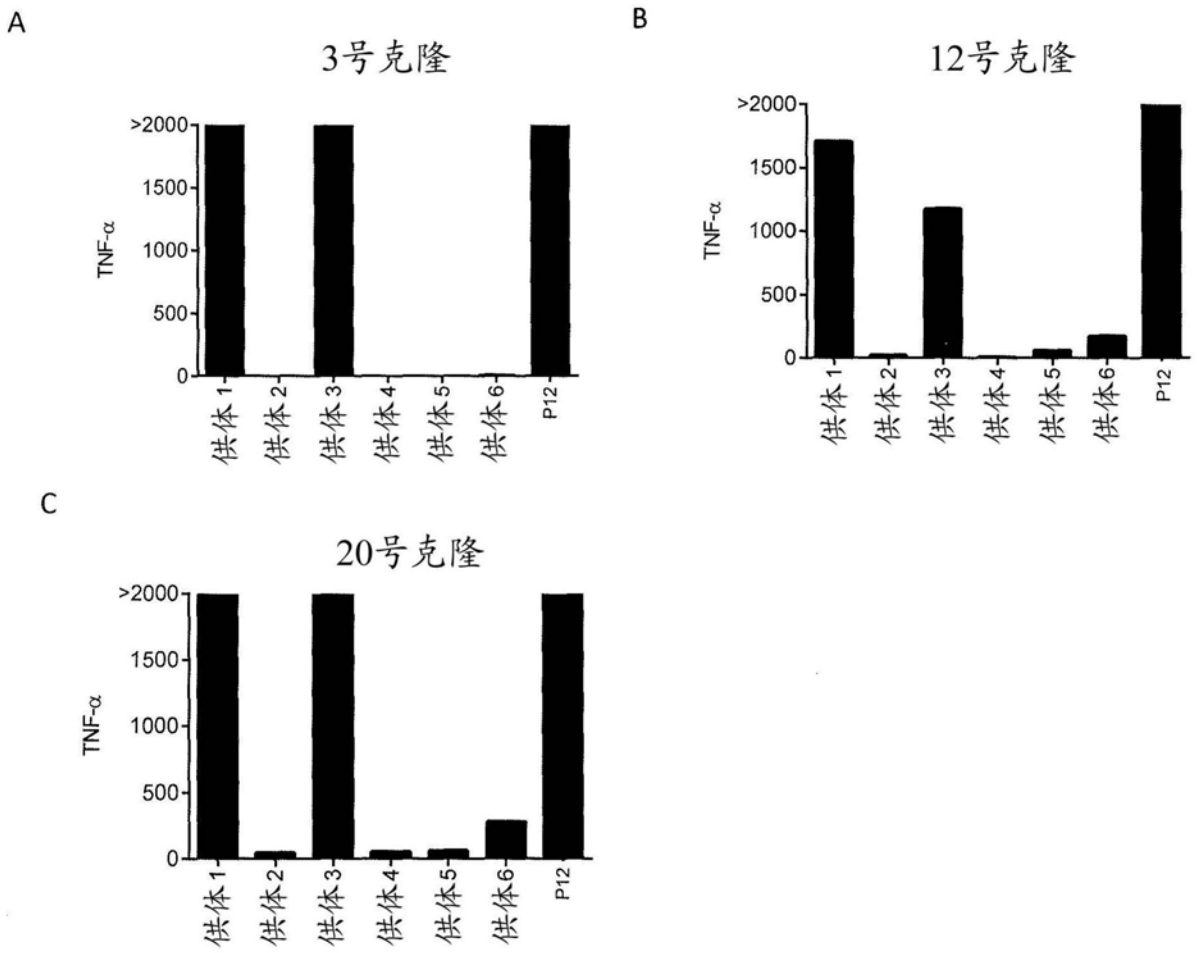

A
3号克隆
TNF-α
>2000
1500
1000
500
0
供体1
供体2
供体3
供体4
供体5
供体6
P12
B
12号克隆
TNF-α
>2000
1500
1000
500
0
供体1
供体2
供体3
供体4
供体5
供体6
P12
C
20号克隆
TNF-α
>2000
1500
1000
500
0
供体1
供体2
供体3
供体4
供体5
供体6
P12

图8

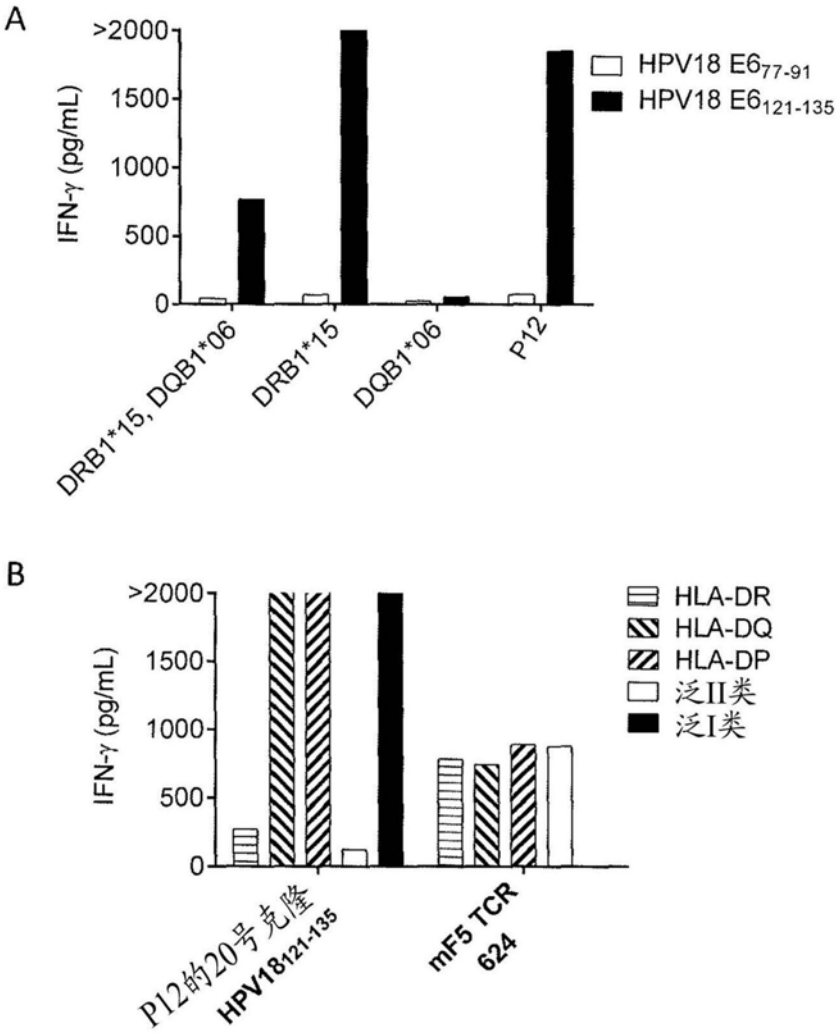

A
>2000
1500
1000
500
0
IFN-γ (pg/mL)
HPV18 E6$_{77-91}$
HPV18 E6$_{121-135}$
DRB1*15, DQB1*06
DRB1*15
DQB1*06
P12
B
>2000
1500
1000
500
0
IFN-γ (pg/mL)
HLA-DR
HLA-DQ
HLA-DP
泛II类
泛I类
P12的20号克隆
HPV18$_{121-135}$
mF5 TCR
624

图9

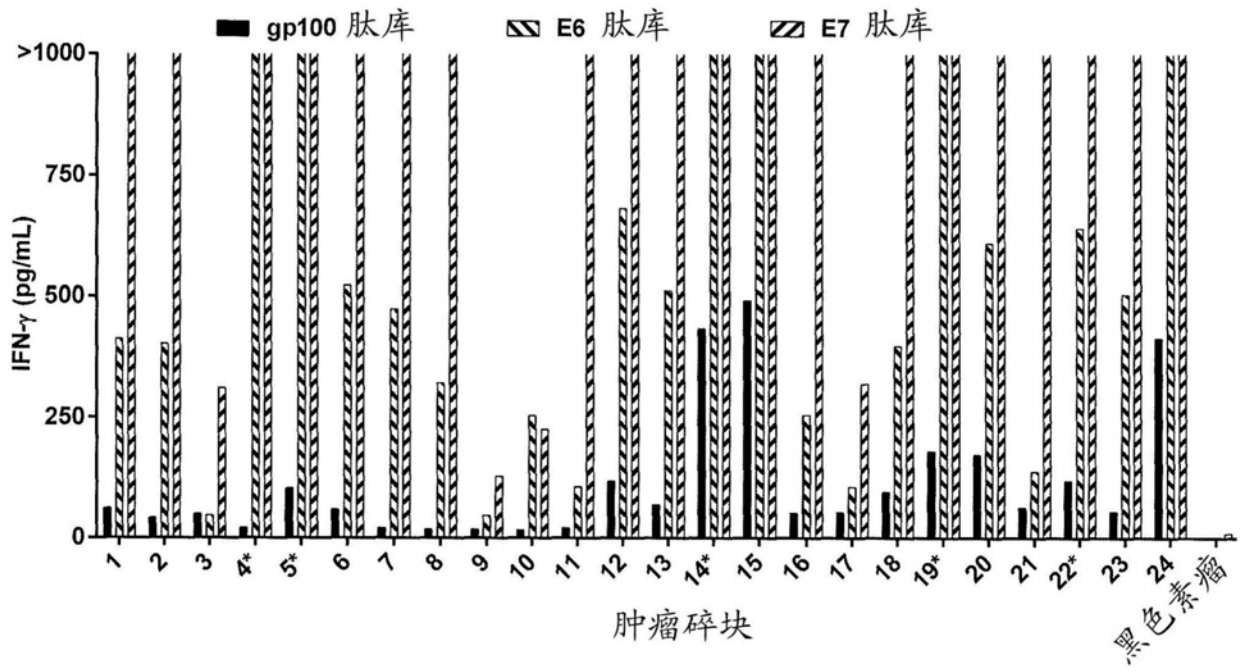

gp100 肽库
E6 肽库
E7 肽库
>1000
750
500
250
0
IFN-γ (pg/mL)
1
2
3
4*
5*
6
7
8
9
10
11
12
13
14*
15
16
17
18
19*
20
21
22*
23
24
肿瘤碎块
黑色素瘤

图10

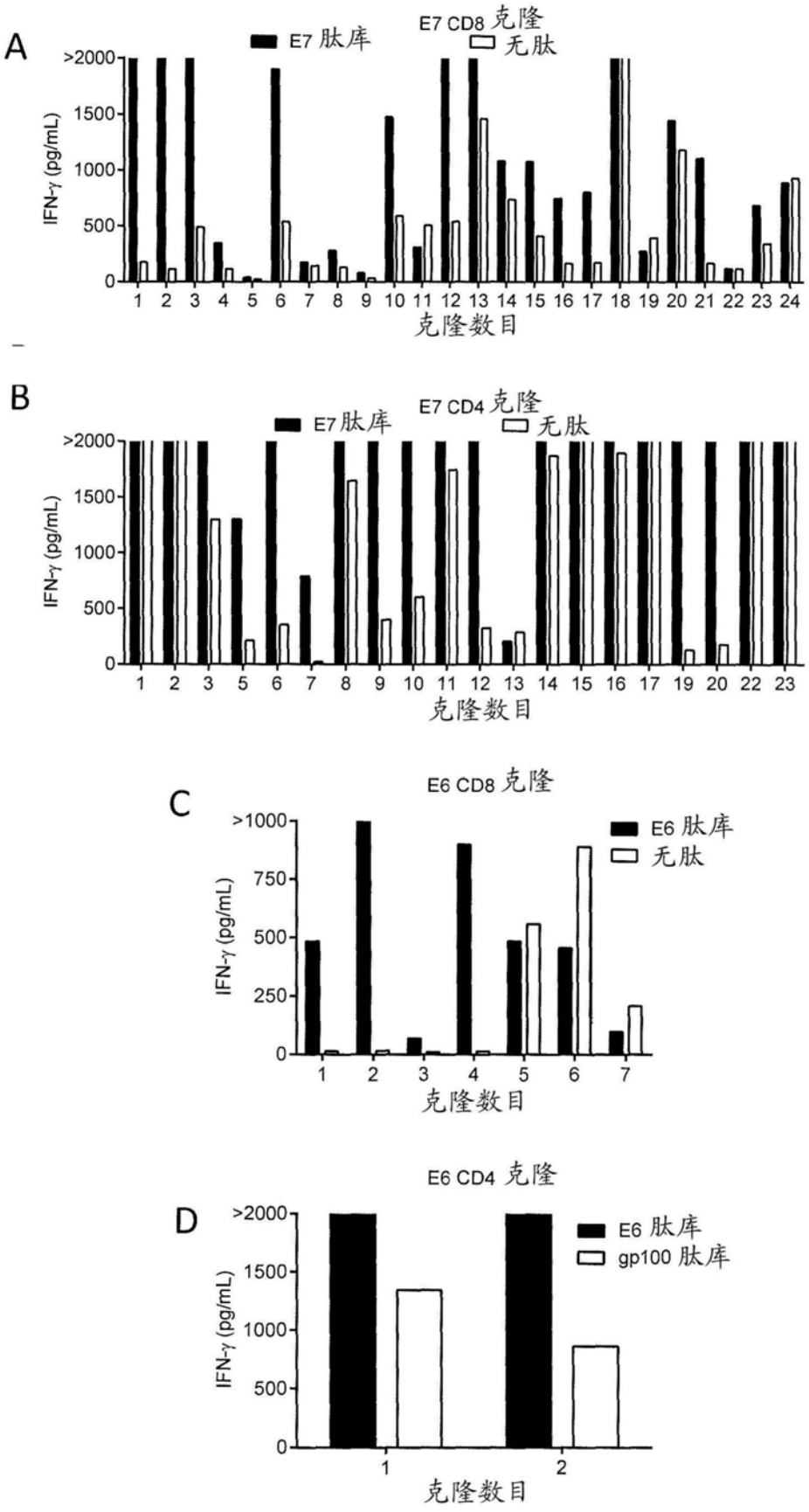

A
E7 肽库
E7 CD8 克隆
无肽
IFN-γ (pg/mL)
>2000
1500
1000
500
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
克隆数目
B
E7肽库
E7 CD4 克隆
无肽
IFN-γ (pg/mL)
>2000
1500
1000
500
0
1 2 3 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 19 20 22 23
克隆数目
C
E6 CD8 克隆
E6 肽库
无肽
IFN-γ (pg/mL)
>1000
750
500
250
0
1 2 3 4 5 6 7
克隆数目
D
E6 CD4 克隆
E6 肽库
gp100 肽库
IFN-γ (pg/mL)
>2000
1500
1000
500
0
1 2
克隆数目

图11

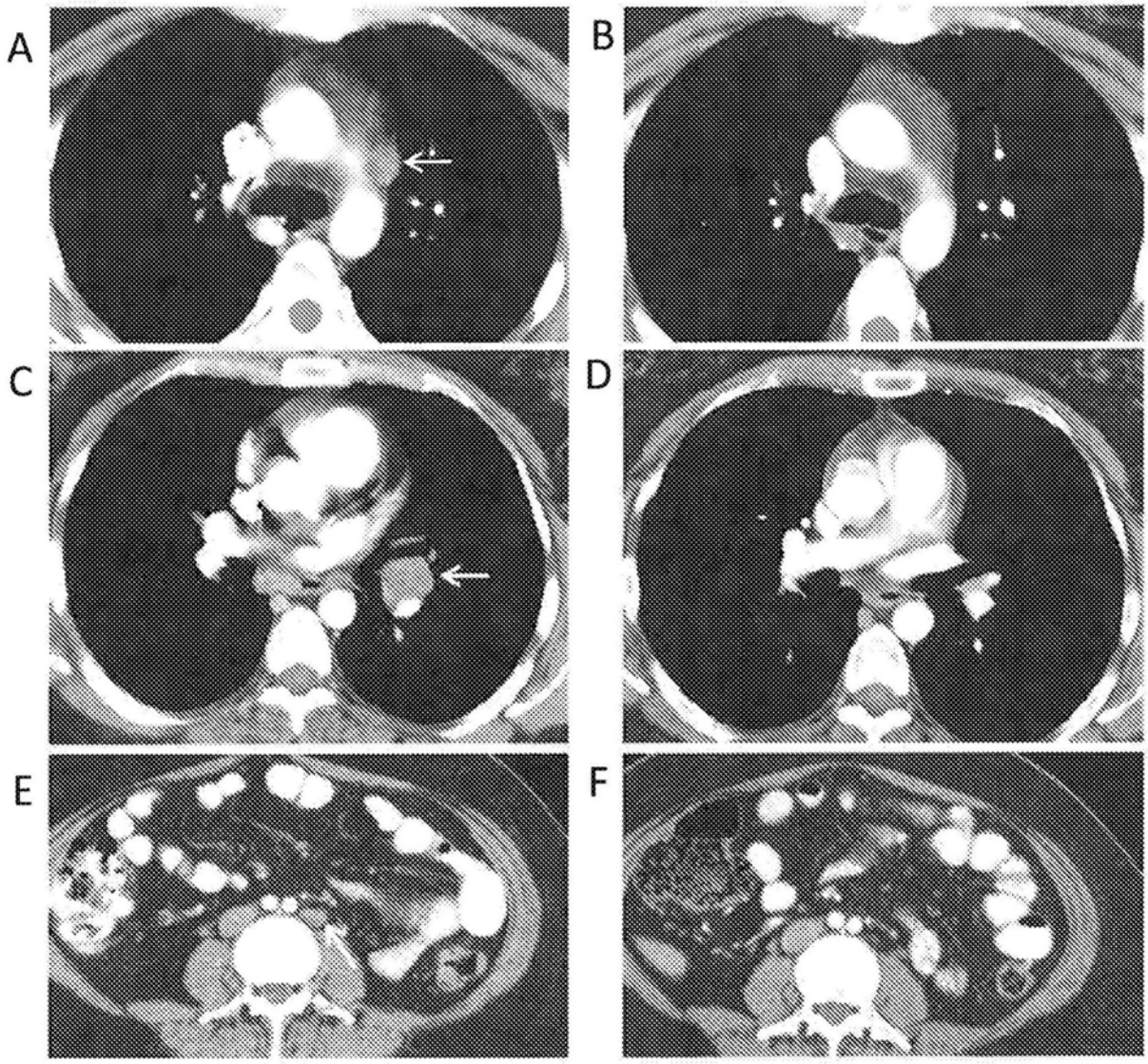


图12

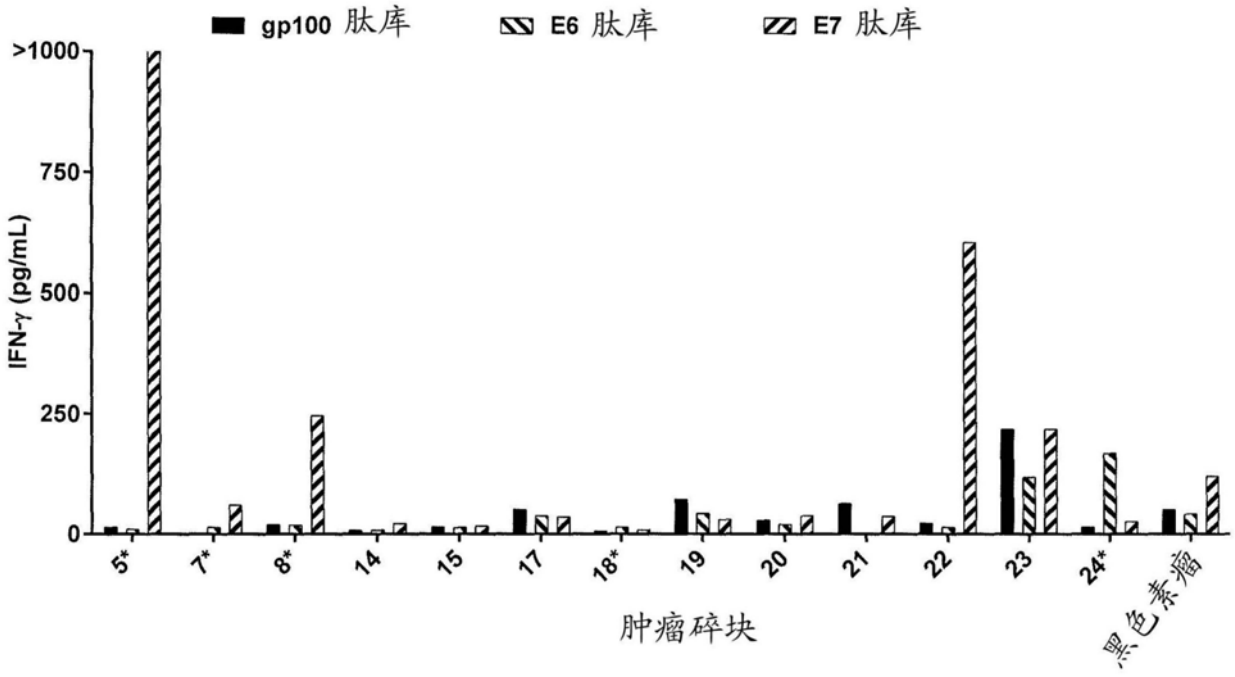

gp100 肽库
E6 肽库
E7 肽库
>1000
750
500
250
0
IFN-γ (pg/mL)
5*
7*
8*
14
15
17
18*
19
20
21
22
23
24*
黑色素瘤
肿瘤碎块

图13

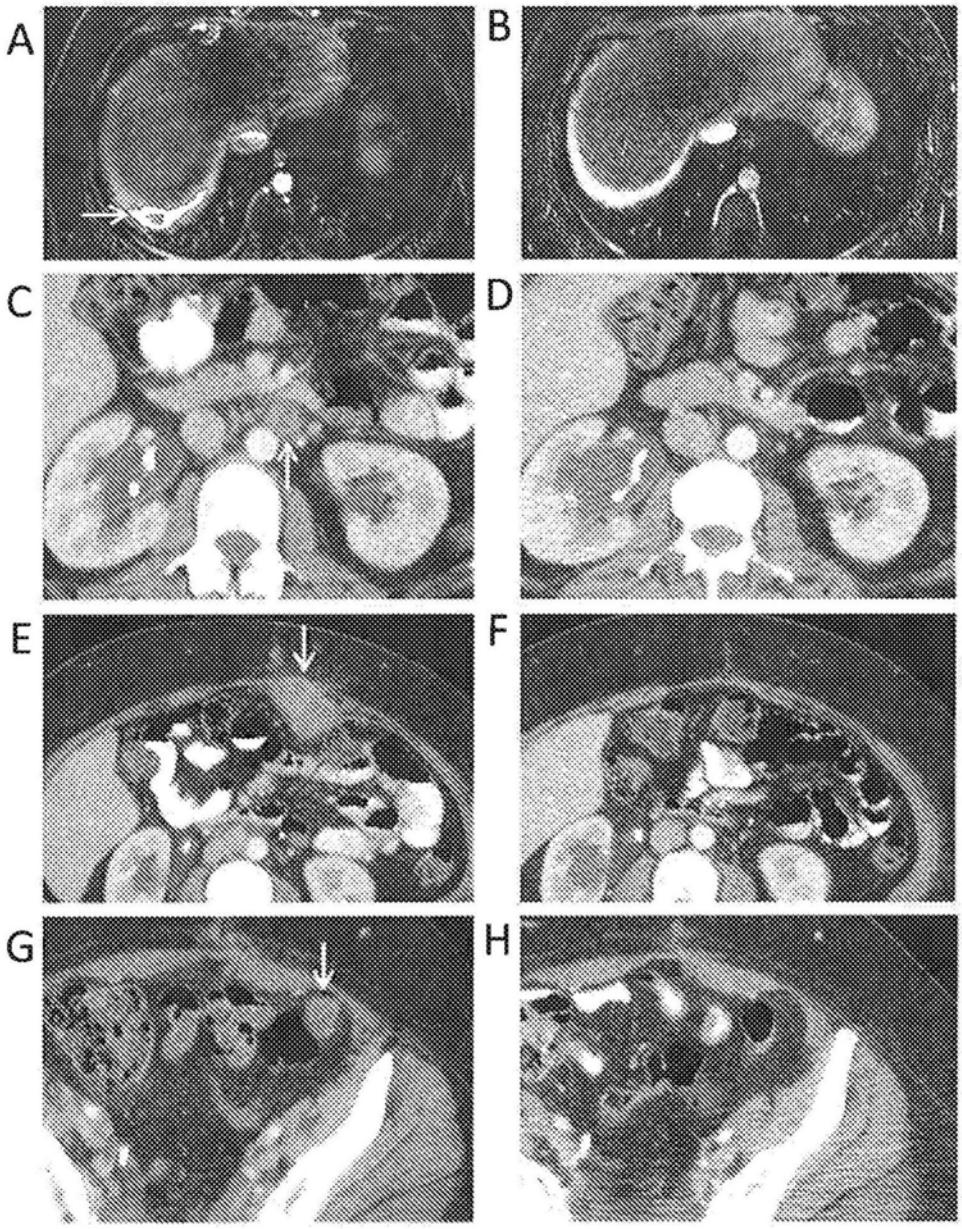


图14

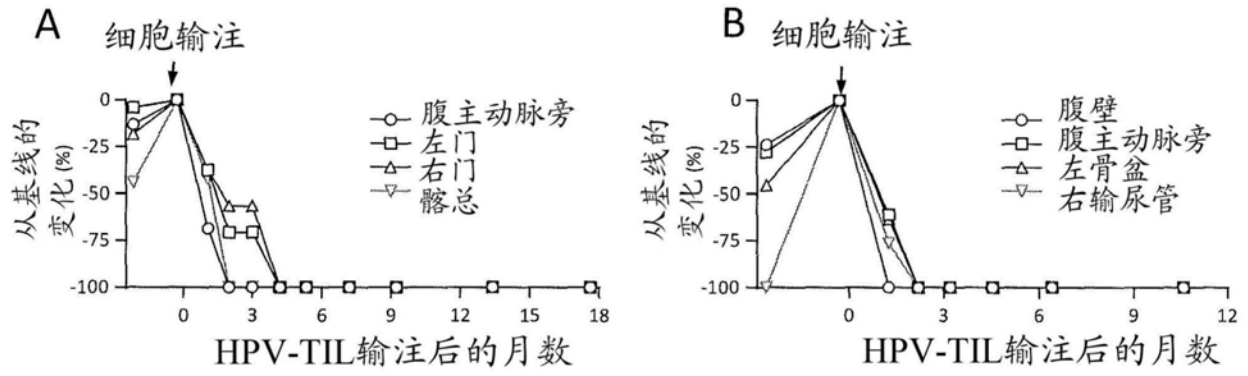

A
细胞输注
从基线的变化(%)
0
-25
-50
-75
-100
0
3
6
9
12
15
18
HPV-TIL输注后的月数
腹主动脉旁
左门
右门
髂总
B
细胞输注
从基线的变化(%)
0
-25
-50
-75
-100
0
3
6
9
12
HPV-TIL输注后的月数
腹壁
腹主动脉旁
左骨盆
右输尿管

图15

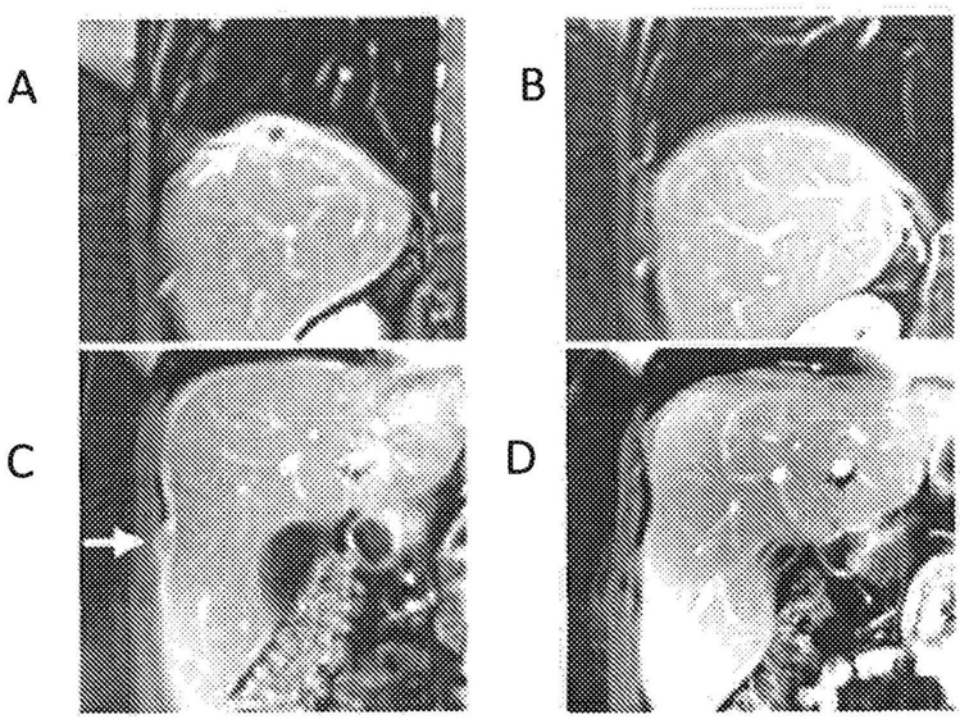

A
B
C
D

图16

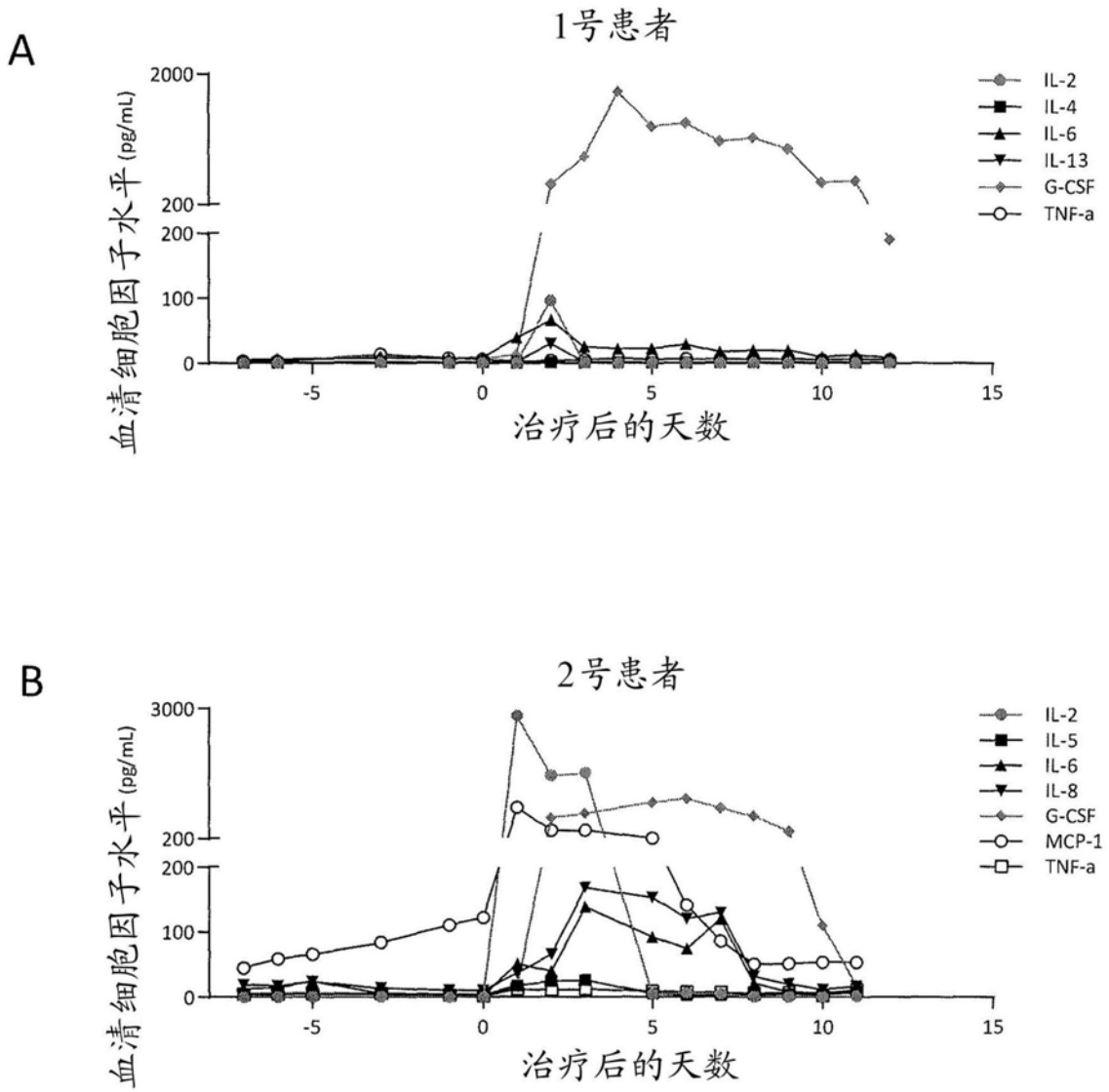

A
1号患者
血清细胞因子水平 (pg/mL)
2000
200
200
100
0
-5
0
5
10
15
治疗后的天数
IL-2
IL-4
IL-6
IL-13
G-CSF
TNF-a
B
2号患者
血清细胞因子水平 (pg/mL)
3000
200
200
100
0
-5
0
5
10
15
治疗后的天数
IL-2
IL-5
IL-6
IL-8
G-CSF
MCP-1
TNF-a

图17

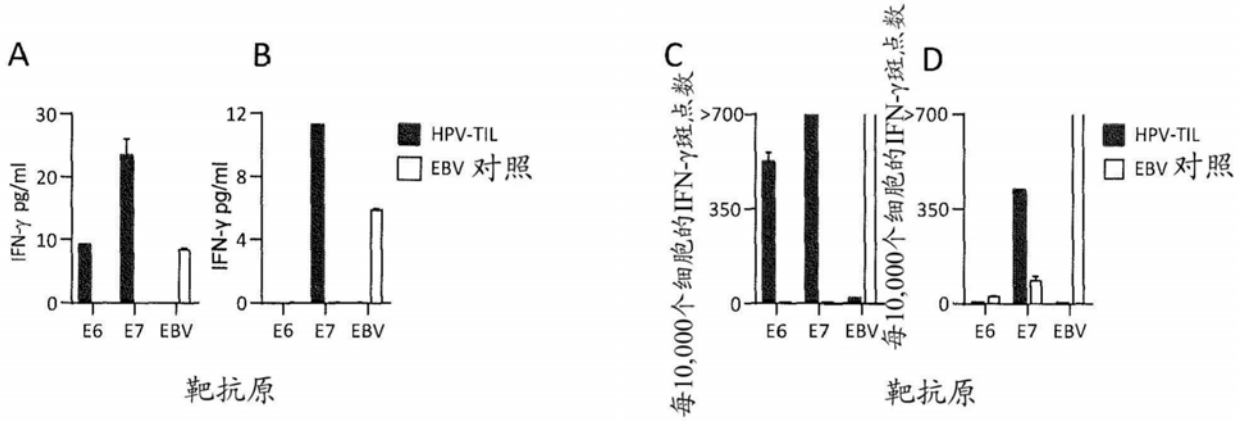

A
IFN-γ pg/ml
30
20
10
0
E6
E7
EBV
B
IFN-γ pg/ml
12
8
4
0
E6
E7
EBV
HPV-TIL
EBV 对照
靶抗原
C
每10,000个细胞的IFN-γ斑点数
>700
350
0
E6
E7
EBV
D
每10,000个细胞的IFN-γ斑点数
700
350
0
E6
E7
EBV
HPV-TIL
EBV 对照
靶抗原

图18

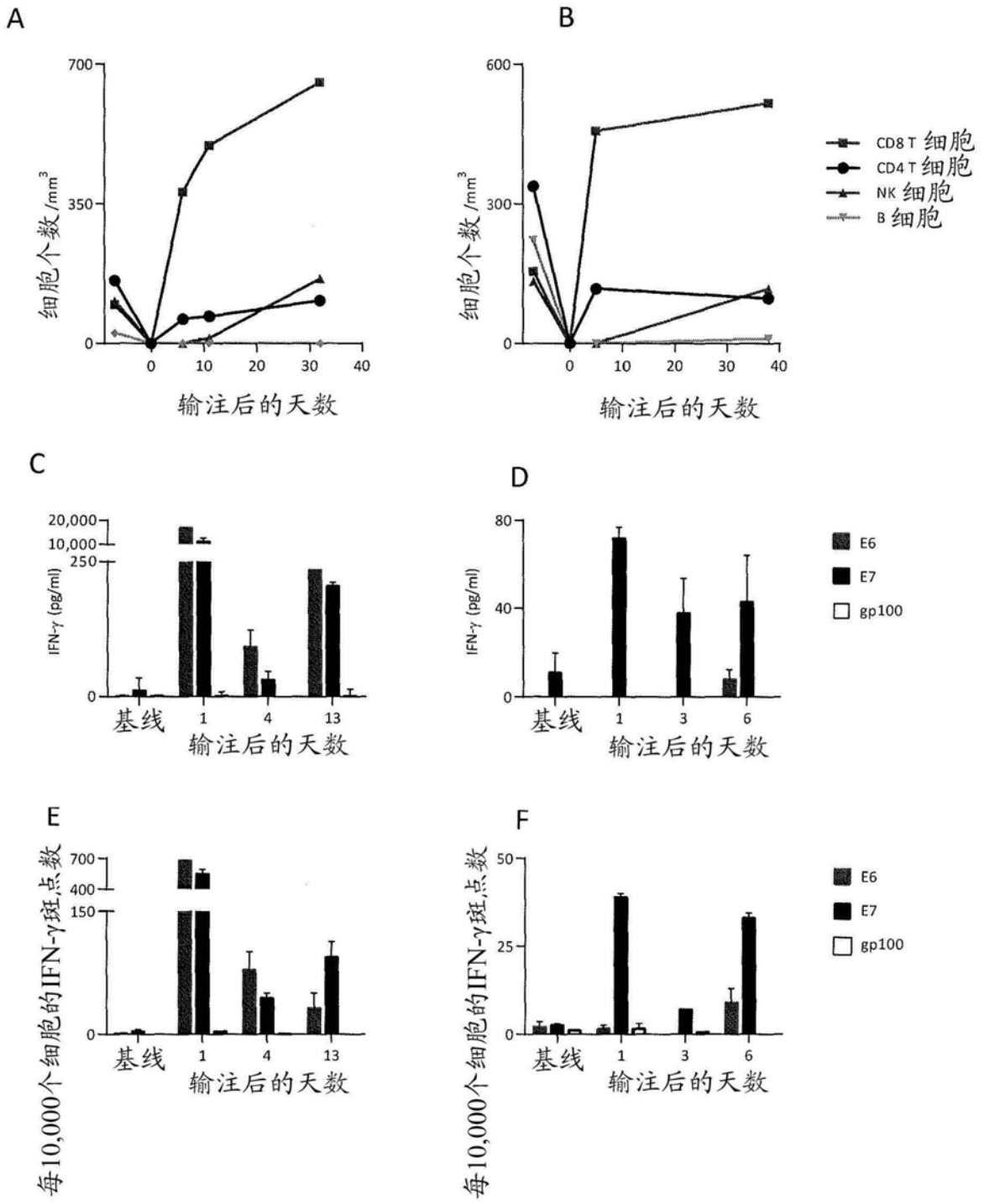

A
700
350
0
细胞个数/mm3
0 10 20 30 40
输注后的天数
B
600
300
0
细胞个数/mm3
0 10 20 30 40
输注后的天数
CD8 T 细胞
CD4 T 细胞
NK 细胞
B 细胞
C
20,000
10,000
250
0
IFN-γ (pg/ml)
基线 1 4 13
输注后的天数
D
80
40
0
IFN-γ (pg/ml)
基线 1 3 6
输注后的天数
E6
E7
gp100
E
700
400
150
0
每10,000个细胞的IFN-γ斑点数
基线 1 4 13
输注后的天数
F
50
25
0
每10,000个细胞的IFN-γ斑点数
基线 1 3 6
输注后的天数
E6
E7
gp100

图19

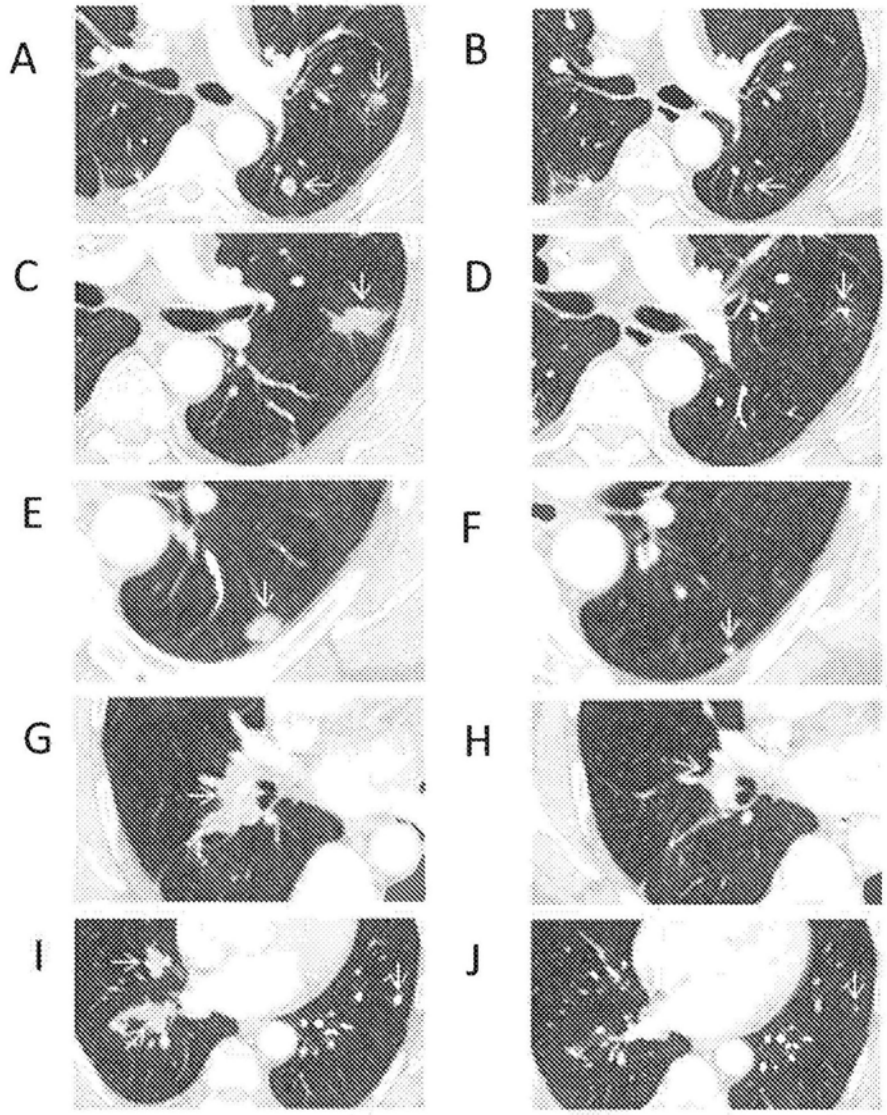


图20

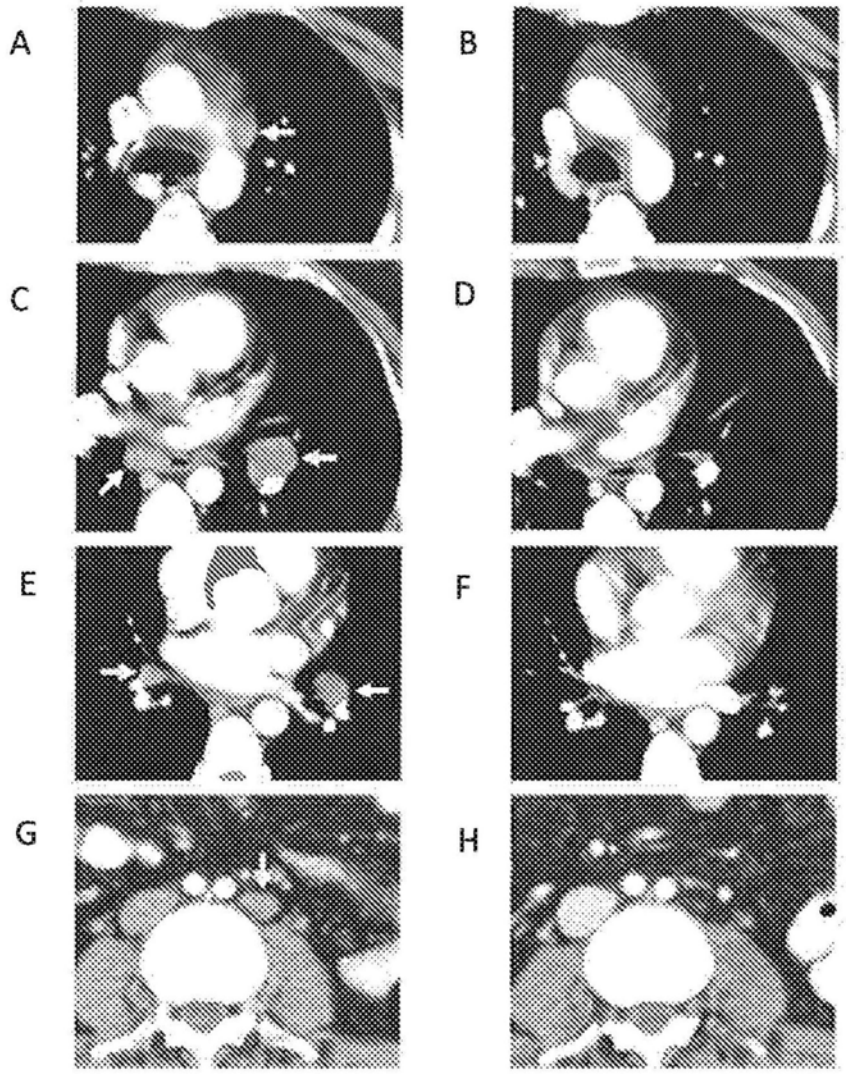


图21

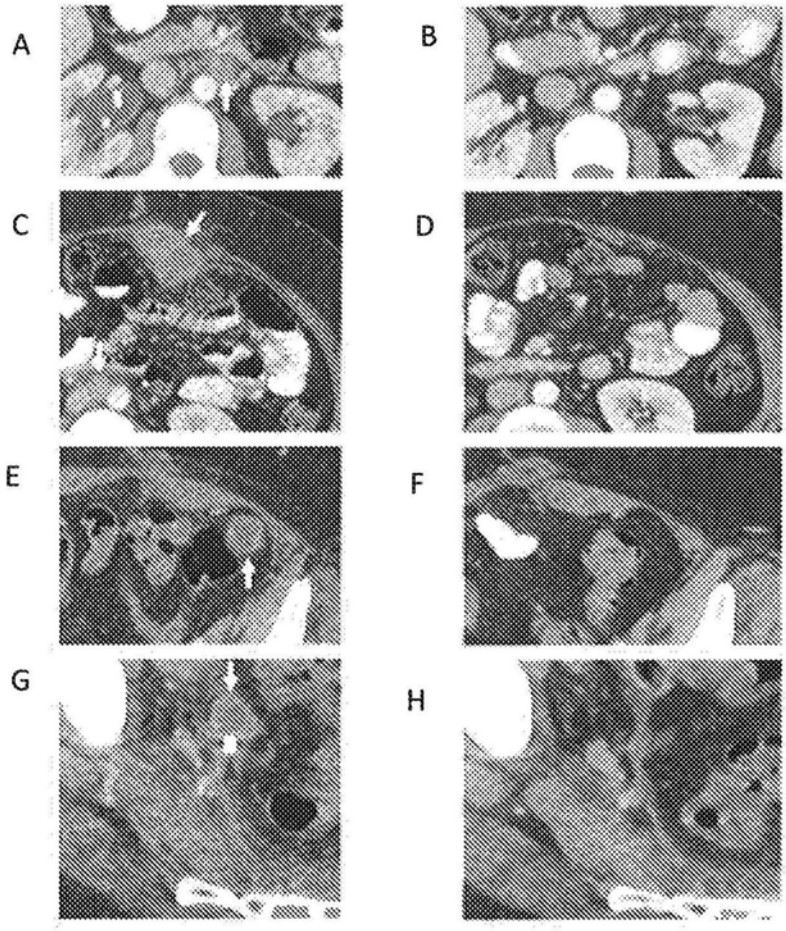


图22