I867324

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本　**(11)證書號數：TW I867324 B**

(45)公告日： 中華民國 113 (2024) 年 12 月 21 日

(21)申請案號：111130596　(22)申請日： 中華民國 109 (2020) 年 05 月 05 日

(51)Int. Cl.：　*C12N5/0783 (2010.01)*　*A61K35/17 (2015.01)*

A61K39/00 (2006.01)　*A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2019/05/08　美國　62/845,251

(71)申請人：美商百歐恩泰美國公司 (美國) BIONTECH US INC.　(US)

美國

荷蘭施特丁奈德蘭卡克研究所安東尼范列文虎克醫院 (荷蘭) STICHTING HET NEDERLANDS KANKER INSTITUUT ANTONI VAN LEEUWENHOEK ZIEKENHUIS　(NL)

荷蘭

(72)發明人：凡　布仁　瑪立特　M VAN BUUREN, MARIT M. (NL)；蘭卡拉　狄維亞　雷迪 LENKALA, DIVYA REDDY (IN)；寇勒　潔西卡 KOHLER, JESSICA (US)；布朗　芙拉薇安　都瓦勒 BROWN, FLAVIAN DUVALLE (US)；科斯金　克里斯汀娜　莫菲 KUKSIN, CHRISTINA MURPHY (US)；凡　登　柏　朱斯特　惠博 VAN DEN BERG, JOOST HUIBERT (NL)；德柏爾　雷納特 DEBOER, RENATE (NL)；貝可　努兒 BAKKER, NOOR (NL)；舒馬切　東 SCHUMACHER, TON (NL)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

CN　108473956A　US　7276478B2

US　2019024050A1

審查人員：張維纓

申請專利範圍項數：63 項　圖式數：75　共 325 頁

(54)名稱

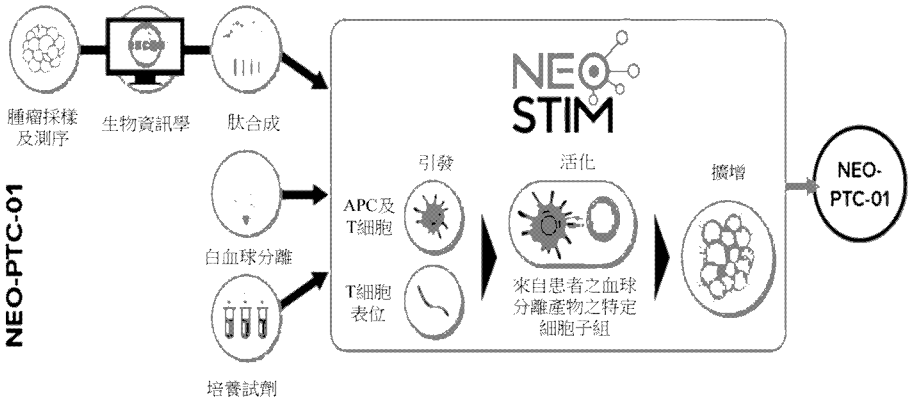
T 細胞製備組合物及方法

(57)摘要

藉由受控離體誘導或擴增來生成抗原特異性 T 細胞可提供高度特異性且有益之 T 細胞療法。本發明提供 T 細胞製備方法及治療性 T 細胞組合物，其可作為個人抗原特異性 T 細胞療法用於治療患有癌症及其他病狀、疾病及病症之個體。

The generation of antigen specific T cells by controlled ex vivoinduction or expansion can provide highly specific and beneficial T cell therapies. The present disclosure provides T cell manufacturing methods and therapeutic T cell compositions which can be used for treating subjects with cancer and other conditions, diseases and disorders personal antigen specific T cell therapy.

指定代表圖：


腫瘤採樣及測序
生物資訊學
肽合成
NEO-PTC-01
白血球分離
培養試劑
NEO STIM
引發
活化
擴增
APC及T細胞
T細胞表位
來自患者之血球分離產物之特定細胞子組
NEO-PTC-01

【圖1A】

專利案號：111130596
原申請案號：109114957
公告本
I867324

【發明摘要】

【中文發明名稱】

T細胞製備組合物及方法

【英文發明名稱】

T CELL MANUFACTURING COMPOSITIONS AND METHODS

【中文】

藉由受控離體誘導或擴增來生成抗原特異性T細胞可提供高度特異性且有益之T細胞療法。本發明提供T細胞製備方法及治療性T細胞組合物，其可作為個人抗原特異性T細胞療法用於治療患有癌症及其他病狀、疾病及病症之個體。

【英文】

The generation of antigen specific T cells by controlled *ex vivo* induction or expansion can provide highly specific and beneficial T cell therapies. The present disclosure provides T cell manufacturing methods and therapeutic T cell compositions which can be used for treating subjects with cancer and other conditions, diseases and disorders personal antigen specific T cell therapy.

【指定代表圖】

圖1A

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

T細胞製備組合物及方法

【英文發明名稱】

T CELL MANUFACTURING COMPOSITIONS AND METHODS

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 腫瘤疫苗通常由腫瘤抗原及免疫刺激分子(例如佐劑、細胞介素或TLR配體)構成，該等腫瘤抗原及免疫刺激分子一起發揮作用以誘導識別且裂解腫瘤細胞之抗原特異性細胞毒性T細胞(CTL)。該等疫苗含有共有組織限制性腫瘤抗原或呈全腫瘤細胞製劑形式之共有及患者特異性抗原之混合物。共有組織限制性腫瘤抗原係理想免疫原性蛋白，其選擇性表現於許多個體之腫瘤中且通常以合成肽或重組蛋白形式遞送至患者。與之相比，全腫瘤細胞製劑係以自體輻照細胞、細胞溶解物、細胞融合體、熱激蛋白製劑或總mRNA形式遞送至患者。因全腫瘤細胞係自自體患者分離，故該等細胞可包含患者特異性腫瘤抗原以及共有腫瘤抗原。最後，存在第三類腫瘤抗原-新抗原，其很少用於疫苗中且由具有可改變胺基酸序列之腫瘤特異性突變(其可為患者特異性或共有性)之蛋白質組成。該等突變蛋白：(a)對於腫瘤細胞而言係獨特的，此乃因突變及其相應蛋白僅存在於腫瘤中；(b)避免了中樞耐受性且由此可能具有免疫原性；(c)提供了用於免疫識別(包含藉由體液免疫性及細胞免疫性二者)之極佳靶。

【0002】 接受性免疫療法或接受性細胞療法(ACT)係將淋巴球轉移至個體中以治療疾病。接受性免疫療法尚未實現其治療眾多種疾病(包含

癌症、感染性疾病、自體免疫疾病、發炎性疾病及免疫缺陷)之潛力。然而，大部分(若非全部)接受性免疫療法策略需要T細胞活化及擴增步驟來生成臨床有效之治療劑量的T細胞。因活細胞培養之固有複雜性及患者間可變性，故用於生成治療劑量之T細胞(包含經改造T細胞)之當前技術仍受限於繁瑣之T細胞製備製程。現有T細胞製備製程不易規模化、不易重複、不可靠或無效，且通常產生可易於消耗及損失效應免疫細胞功能之較差T細胞產物。迄今為止，經改造T細胞接受性免疫療法僅取得有限成功且通常展示可變臨床活性。因此，該等療法不適於廣泛臨床應用。因此，仍需研發用於擴增及誘導具有有益表型及功能之抗原特異性T細胞之組合物及方法。

【發明內容】

【0003】 本發明提供用於臨床研發及應用之新穎及改良之T細胞治療劑。儘管自體T細胞治療可安全使用，但需要進行若干顯著改良以滿足治療標準且該領域中之發展即快速又困難重重。申請者先前所揭示之申請案提供了用於癌症T細胞療法之組合物及方法之標誌性研發(WO2019/094642)。本申請案源自如下驚人發現：在離體免疫細胞製備之不同階段耗竭某些表現特異性標記物之細胞可提供高度免疫原性細胞組合物。本發明亦部分地源自發現了用於抗原性刺激之新改良方法，由此改良用於治療劑研發之細胞組合物。本文提供新方法及組合物，其中至少部分地，選擇性耗竭某些來自離體刺激及細胞擴增環境之免疫細胞可提供新治療組合物及經改良方法。

【0004】 本文提供製備腫瘤抗原特異性T細胞之經改良離體方法，該方法包括：自包括抗原呈現細胞(APC)及T細胞之免疫細胞群體耗竭

CD14+細胞及/或CD25+細胞，由此形成包括APC及T細胞之第一群體之CD14及/或CD25耗竭之免疫細胞群體，其中該免疫細胞群體係來自人類個體之生物試樣；及將包括APC及T細胞之第一群體之CD14及/或CD25耗竭之免疫細胞群體在以下各項存在下培育第一時間段：FMS樣酪胺酸激酶3受體配體(FLT3L)及(A)包括至少一個由患有癌症之人類個體之癌細胞表現之腫瘤抗原表位序列之多肽或(B)編碼該多肽的多核苷酸，由此形成包括經刺激T細胞之細胞群體；擴增包括經刺激T細胞之細胞群體，由此形成包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體，其中腫瘤抗原特異性T細胞包括對包括(i)至少一個腫瘤抗原表位序列及(ii)由(b)(ii)中人類個體之癌細胞或APC表現之MHC蛋白之複合物具有特異性的T細胞；及向人類個體投與包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體，其中包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體總共包括1×10^{8}至1×10^{11}個細胞。

【0005】 本文提供製備腫瘤抗原特異性T細胞之經改良離體方法，該方法包括：自包括抗原呈現細胞(APC)及T細胞之免疫細胞群體耗竭CD14+細胞及/或CD25+細胞，由此形成包括APC及T細胞之第一群體之CD14及/或CD25耗竭之免疫細胞群體，其中該免疫細胞群體係來自人類個體之生物試樣；及將包括APC及T細胞之第一群體之CD14及/或CD25耗竭之免疫細胞群體在以下各項存在下培育第一時間段：FMS樣酪胺酸激酶3受體配體(FLT3L)及(A)包括至少一個由患有癌症之人類個體之癌細胞表現之腫瘤抗原表位序列之多肽或(B)編碼該多肽的多核苷酸；由此形成包括經刺激T細胞之細胞群體；擴增包括經刺激T細胞之細胞群體，由此形成包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體，其中腫瘤抗原特異性T細胞包括對包括(i)至少一個腫瘤抗原表位序列及(ii)由(b)(ii)中人類個體

之癌細胞或APC表現之MHC蛋白之複合物具有特異性的T細胞；及向人類個體投與包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體，其中人類個體：患有不可切除性黑色素瘤，先前已接受PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑及含有CTLA-4抑制劑之方案且具有疾病進展，或已接受PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑至少3個月或當前正接受該抑制劑且具有穩定疾病或無症狀進展性疾病。

【0006】 本文提供製備腫瘤抗原特異性T細胞之經改良離體方法，該方法包括：自包括抗原呈現細胞(APC)及T細胞之免疫細胞群體耗竭CD14+細胞及/或CD25+細胞，由此形成包括APC及T細胞之第一群體之CD14及/或CD25耗竭之免疫細胞群體，其中該免疫細胞群體係來自人類個體之生物試樣；及將包括APC及T細胞之第一群體之CD14及/或CD25耗竭之免疫細胞群體在以下各項存在下培育第一時間段：FMS樣酪胺酸激酶3受體配體(FLT3L)及編碼包括至少兩個由患有癌症之人類個體之癌細胞表現之不同腫瘤抗原表位序列之多肽的mRNA；由此形成包括經刺激T細胞之細胞群體；及擴增包括經刺激T細胞之細胞群體，由此形成包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體，其中腫瘤抗原特異性T細胞包括對包括(i)至少一個腫瘤抗原表位序列及(ii)由(b)(ii)中人類個體之癌細胞或APC表現之MHC蛋白之複合物具有特異性的T細胞。

【0007】 本文提供製備腫瘤抗原特異性T細胞之經改良離體方法，該方法包括：自以下途徑耗竭CD14+細胞及/或CD25+細胞：(i)直接自人類個體之經洗滌及/或冷凍保存之周邊血單核細胞(PBMC)試樣，(ii)自來自人類個體之所含不成熟樹突狀細胞(DC)之百分比與人類個體之周邊血中不成熟DC之百分比大致相同的PBMC試樣，(iii)自來自人類個體之所含

成熟DC之百分比與人類個體之周邊血中成熟DC之百分比大致相同的PBMC試樣，(iv)自來自人類個體之所含不成熟DC與成熟DC之比率與人類個體之周邊血中不成熟DC與成熟DC之比率大致相同的PBMC試樣，(v)自來自人類個體之尚未經受使不成熟DC成熟至成熟DC之步驟的PBMC試樣，(vi)自來自人類個體之所含APC佔總細胞群體之百分比與人類個體之周邊血中APC佔總細胞群體之百分比大致相同的PBMC試樣，(vii)自來自人類個體之所含DC佔總細胞群體之百分比與人類個體之周邊血中DC佔總細胞群體之百分比大致相同的PBMC試樣，(viii)自來自人類個體之所含CD303+細胞佔總細胞群體之百分比與人類個體之周邊血中CD303+佔總細胞群體之百分比大致相同的PBMC試樣，(ix)自來自人類個體之所含CD141+細胞佔總細胞群體之百分比與人類個體之周邊血中CD141+佔總細胞群體之百分比大致相同的PBMC試樣，(x)自來自人類個體之所含巨噬球佔總細胞群體之百分比與人類個體之周邊血中巨噬球佔總細胞群體之百分比大致相同的PBMC試樣,或(xi)自來自人類個體之所含CD19+佔總細胞群體之百分比與人類個體之周邊血中CD19+佔總細胞群體之百分比大致相同的PBMC試樣；由此形成包括APC及T細胞之第一群體之CD14及/或CD25耗竭之PBMC群體；及(b)將包括APC及T細胞之第一群體之CD14及/或CD25耗竭之免疫細胞群體在以下各項存在下培育第一時間段：FMS樣酪胺酸激酶3受體配體(FLT3L)及(A)包括至少一個由患有癌症之人類個體之癌細胞表現之腫瘤抗原表位序列之多肽或(B)編碼該多肽的多核苷酸；由此形成包括經刺激T細胞之細胞群體；及擴增包括經刺激T細胞之細胞群體，由此形成包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體，其中腫瘤抗原特異性T細胞包括對包括(i)至少一個腫瘤抗原表位序列及(ii)由(b)(ii)

中人類個體之癌細胞或APC表現之MHC蛋白之複合物具有特異性的T細胞。

【0008】 在一些實施例中，該方法進一步包括向人類個體投與包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體。

【0009】 在一些實施例中，培育包括將包括APC及T細胞之第一群體之CD14及/或CD25耗竭之免疫細胞群體在以下各項存在下培育第一時間段：(i) FMS樣酪胺酸激酶3受體配體(FLT3L)；及(ii)編碼包括至少兩個由患有癌症之人類個體之癌細胞表現之不同腫瘤抗原表位序列之多肽的mRNA。

【0010】 在一些實施例中，引入包括電穿孔或核轉染。在一些實施例中，電穿孔或核轉染係在不分離來自步驟(a)之APC及T細胞之第一群體之T細胞與APC下實施。

【0011】 在一些實施例中，該方法進一步包括向人類個體投與包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體。在一些實施例中，培育包括將包括APC及T細胞之第一群體之CD14及/或CD25耗竭之免疫細胞群體在以下各項存在下培育第一時間段：(i) FMS樣酪胺酸激酶3受體配體(FLT3L)；及(ii)編碼包括至少兩個由患有癌症之人類個體之癌細胞表現之不同腫瘤抗原表位序列之多肽的mRNA。

【0012】 在一些實施例中，mRNA包括5’帽。在一些實施例中，5’帽係帽-1。在一些實施例中，mRNA包括3’聚A尾部。在一些實施例中，聚A尾部之長度為120至135個核苷酸。在一些實施例中，至少兩個不同腫瘤抗原表位序列之第一腫瘤抗原表位序列經由連接體序列連結至至少兩個不同腫瘤抗原表位序列之第二腫瘤抗原表位序列。在一些實施例中，5’帽

可操作地經由連接體序列連接至編碼至少兩個不同腫瘤抗原表位序列之序列。在一些實施例中，至少兩個不同腫瘤抗原表位序列表現為單一多肽鏈。在一些實施例中，培育包括在LPS及IFNγ存在下培育包括APC及T細胞之第一群體之CD14及/或CD25耗竭之免疫細胞群體。

【0013】 在一些實施例中，至少兩個不同腫瘤抗原表位序列各自之長度為8至12個胺基酸。在一些實施例中，至少兩個不同腫瘤抗原表位序列各自之長度為15至25個胺基酸。在一些實施例中，多肽包括至少3、4、5、6、7、8、9、10個或更多個由患有癌症之人類個體之癌細胞表現之不同腫瘤抗原表位序列。

【0014】 在一些實施例中，包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體總共包括1×10^{8}至1×10^{11}個細胞。在一些實施例中，包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體包括1×10^{8}至1×10^{11}個CD3+細胞。

【0015】 在一些實施例中，人類個體患有不可切除性黑色素瘤。不同於可切除性黑色素瘤，腫瘤浸潤淋巴球(TIL)不能自不可切除性黑色素瘤獲得；因此，TIL不能用於治療不可切除性黑色素瘤。本文所提供之方法及組合物之一個優點在於，其可用於治療不可切除性黑色素瘤。

【0016】 在一些實施例中，人類個體先前接受PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑及含有CTLA-4抑制劑之方案且具有疾病進展。

【0017】 在一些實施例中，人類個體已接受PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑至少3個月或當前正接受該抑制劑且具有穩定疾病或無症狀進展性疾病。

【0018】 在一些實施例中，包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中之CD3+細胞之百分比為總細胞群體的至少40%或50%或60%。

【0019】在一些實施例中，包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中之CD107a+細胞之百分比為腫瘤抗原特異性T細胞群體的至少10%。

【0020】在一些實施例中，包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中之TNFα+細胞之百分比為腫瘤抗原特異性T細胞群體的至少5%。

【0021】在一些實施例中，包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中之IFNγ+細胞之百分比為腫瘤抗原特異性T細胞群體的至少15%。

【0022】在一些實施例中，包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中之TNFα+及IFNγ+細胞之百分比為腫瘤抗原特異性T細胞群體的至少2%。

【0023】在一些實施例中，包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中之TNFα+及CD107a+細胞之百分比為腫瘤抗原特異性T細胞群體的至少0.5%。

【0024】在一些實施例中，包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中之IFNγ+及CD107a+細胞之百分比為腫瘤抗原特異性T細胞群體的至少5%。

【0025】在一些實施例中，包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中之TNFα+及IFNγ+及CD107a+細胞之百分比為腫瘤抗原特異性T細胞群體的至少0.1%。

【0026】在一些實施例中，包括係幼稚T細胞(CD62L+及CD45RA+)之腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中之CD4+ T細胞的百分比為至多15%。

【0027】在一些實施例中，包括係效應記憶性T細胞(CD62L-及CD45RA-)之腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中之CD4+ T細胞的百分比為至少60%。

【0028】在一些實施例中，包括係效應T細胞(CD62L-及CD45RA+)之腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中之CD4+ T細胞的百分比為至多5%。

【0029】在一些實施例中，包括係中央記憶性T細胞(CD62L+及CD45RA-)之腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中之CD4+ T細胞的百分比為至少10%。

【0030】在一些實施例中，包括係幼稚T細胞(CD62L+及CD45RA+)之腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中之CD8+ T細胞的百分比為至多25%。

【0031】在一些實施例中，包括係效應記憶性T細胞(CD62L-CD45RA-)之腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中之CD8+ T細胞的百分比為至少60%。

【0032】在一些實施例中，包括係效應T細胞(CD62L- CD45RA+)之腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中之CD8+ T細胞的百分比為至多10%。

【0033】在一些實施例中，包括係中央記憶性T細胞(CD62L+ D45RA-)之腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中之CD8+ T細胞的百分比為至少15%。

【0034】在一些實施例中，包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體在識別靶細胞時會產生細胞介素且引起去顆粒。

【0035】 在一些實施例中，使用抗檢查點抑制劑療法難以治療人類個體。

【0036】 在一些實施例中，人類個體之年齡為18至75歲。

【0037】 在一些實施例中，人類個體在BRAF基因中具有突變且先前已接受B-raf抑制劑或B-raf/MEK組合療法。

【0038】 在一些實施例中，耗竭包括自來自人類個體之尚未經受使單核球成熟至成熟樹突狀細胞(DC)之步驟之周邊血單核細胞(PBMC)試樣耗竭CD14+細胞及CD25+細胞。

【0039】 在一些實施例中，耗竭進一步包括自來自人類個體之尚未經受使單核球成熟至成熟樹突狀細胞(DC)之步驟之周邊血單核細胞(PBMC)試樣耗竭CD11b+細胞。

【0040】 在一些實施例中，在小於28天內實施步驟(b)及(c)。

【0041】 在一些實施例中，包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中CD8+腫瘤抗原特異性T細胞佔CD8+ T細胞總數之分數為生物試樣中CD8+腫瘤抗原特異性T細胞佔CD8+ T細胞總數之分數的至少兩倍。

【0042】 在一些實施例中，包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中CD4+腫瘤抗原特異性T細胞佔CD4+ T細胞總數之分數為生物試樣中CD4+腫瘤抗原特異性T細胞佔CD4+ T細胞總數之分數的至少兩倍。

【0043】 在一些實施例中，包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中之至少0.1%之CD8+ T細胞係衍生自幼稚CD8+ T細胞的CD8+腫瘤抗原特異性T細胞。

【0044】 在一些實施例中，包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中之至少0.1%之CD4+ T細胞係衍生自幼稚CD4+ T細胞的CD4+腫

瘤抗原特異性T細胞。

【0045】 在一些實施例中，擴增包括(A)使包括經刺激T細胞之細胞群體與第二群體之成熟APC接觸，其中第二群體之成熟APC (i)已與FLT3L一起培育且(ii)呈現至少一個腫瘤抗原表位序列；及(B)使包括經刺激T細胞之細胞群體擴增第二時間段，由此形成經擴增T細胞群體。

【0046】 在一些實施例中，在使包括經刺激T細胞之細胞群體與第二群體之成熟APC接觸之前，第二群體之成熟APC已與FLT3L一起培育至少1天。

【0047】 在一些實施例中，生物試樣係周邊血試樣、白血球分離試樣或血球分離試樣。

【0048】 在一些實施例中，該方法進一步包括收穫包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體，冷凍保存包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體或製備含有包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體之醫藥組合物。

【0049】 在一些實施例中，培育包括將包括APC及T細胞之第一群體之CD14/CD25耗竭之免疫細胞群體在FLT3L及編碼多肽之RNA存在下培育第一時間段。

【0050】 在一些實施例中，患有癌症之人類個體係獲得生物試樣之人類個體。

【0051】 在一些實施例中，多肽之長度為8至50個胺基酸。

【0052】 在一些實施例中，多肽包括至少兩個腫瘤抗原表位序列，每一序列由患有癌症之人類個體之癌細胞表現。

【0053】 在一些實施例中，自包括APC及T細胞之第一群體之免疫

細胞群體耗竭CD14+細胞及/或CD25+細胞包括使包括APC及T細胞之第一群體之免疫細胞群體與CD14結合劑及/或CD25結合劑接觸。

【0054】 在一些實施例中，耗竭進一步包括自包括APC及T細胞之第一群體之免疫細胞群體耗竭CD19+細胞。

【0055】 本文提供製備腫瘤抗原特異性T細胞之離體方法，該方法包括：自包括抗原呈現細胞(APC)及T細胞之免疫細胞群體耗竭CD11b+細胞，由此形成包括APC及T細胞之第一群體之CD11b耗竭之免疫細胞群體，其中該免疫細胞群體係來自人類個體之生物試樣；及將包括APC及T細胞之第一群體之CD11b耗竭之免疫細胞群體在以下各項存在下培育第一時間段：FMS樣酪胺酸激酶3受體配體(FLT3L)及(A)包括至少一個由患有癌症之人類個體之癌細胞表現之腫瘤抗原表位序列之多肽或(B)編碼該多肽的多核苷酸；由此形成包括經刺激T細胞之細胞群體；及擴增包括經刺激T細胞之細胞群體，由此形成包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體，其中腫瘤抗原特異性T細胞包括對包括(i)至少一個腫瘤抗原表位序列及(ii)由(b)(ii)中人類個體之癌細胞或APC表現之MHC蛋白之複合物具有特異性的T細胞。

【0056】 本文提供一種醫藥組合物，其包括包含藉由本文所闡述之方法產生之腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體；及醫藥上可接受之載劑。

【0057】 本文提供一種醫藥組合物，其包括：(a)來自生物試樣之免疫細胞群體，其中免疫細胞群體包括含有對多肽表位具有特異性之T細胞受體(TCR)之經抗原呈現細胞(APC)刺激之T細胞，其中(i)免疫細胞群體中表現CD11b之免疫細胞之量相應地小於生物試樣中表現CD11b之免疫細

胞之量，及/或(ii)免疫細胞群體中表現CD11c之免疫細胞之量相應地大於生物試樣中表現CD11c之免疫細胞之量；及(b)醫藥上可接受之賦形劑。

【0058】 本文提供一種醫藥組合物，其包括：(a)來自生物試樣之免疫細胞群體，其中免疫細胞群體包括含有對多肽表位具有特異性之T細胞受體(TCR)之經抗原呈現細胞(APC)刺激之T細胞，其中經APC刺激之T細胞已與細胞介素一起培育；(b)細胞介素；及(c)醫藥上可接受之賦形劑。

【0059】 本文提供一種醫藥組合物，其包括：(a)來自已投與FMS樣酪胺酸激酶3配體(FLT3L)之個體之生物試樣之免疫細胞群體，其中免疫細胞群體包括含有對多肽表位具有特異性之T細胞受體(TCR)之經抗原呈現細胞(APC)刺激之T細胞；及(b)醫藥上可接受之賦形劑。

【0060】 在一些實施例中，免疫細胞群體係來自個體之生物試樣。

【0061】 在一些實施例中，免疫細胞群體係來自已投與FMS樣酪胺酸激酶3配體(FLT3L)之個體之生物試樣。

【0062】 在一些實施例中，經APC刺激之T細胞已與細胞介素一起培育且其中醫藥組合物進一步包括細胞介素。

【0063】 在一些實施例中，免疫細胞群體中表現CD11b之免疫細胞之量相應地小於生物試樣中表現CD11b之免疫細胞之量。

【0064】 在一些實施例中，免疫細胞群體中表現CD11c之免疫細胞之量相應地大於生物試樣中表現CD11c之免疫細胞之量。

【0065】 在一些實施例中，該群體中表現CD14之免疫細胞之量相應地小於生物試樣中表現CD14之免疫細胞之量。

【0066】 在一些實施例中，該群體中表現CD25之免疫細胞之量相應地小於生物試樣中表現CD25之免疫細胞之量。

【0067】 在一些實施例中，該群體中表現CD19之免疫細胞之量相應地小於生物試樣中表現CD19之免疫細胞之量。

【0068】 在一些實施例中，APC係經FMS樣酪胺酸激酶3受體配體(FLT3L)刺激之APC。

【0069】 在一些實施例中，經APC刺激之T細胞係使用經FLT3L刺激之APC刺激之T細胞。

【0070】 在一些實施例中，細胞介素係IL-7或IL-15或IL-21。

【0071】 在一些實施例中，經APC刺激之T細胞包括由將表位呈現於MHC I類或MHC II類分子上之加載抗原之APC刺激的T細胞。

【0072】 在一些實施例中，加載抗原之APC包括漿細胞樣樹突狀細胞(pDC)、CD11c+ DC、CD1c+ DC或CD141+ DC。

【0073】 在一些實施例中，CD11b細胞包括CD16+單核細胞。

【0074】 在一些實施例中，醫藥組合物進一步包括促進離體細胞生長及維持之試劑，包括生長因子細、胞介素、胺基酸、補充劑或其組合。

【0075】 在一些實施例中，免疫細胞群體中表現CD1c之免疫細胞之量相應地大於生物試樣中表現CD1c之免疫細胞之量。

【0076】 在一些實施例中，免疫細胞群體中表現CD141之免疫細胞或APC之量相應地大於生物試樣中表現CD141之免疫細胞或APC之量。

【0077】 在一些實施例中，包括加載抗原之APC之細胞群體包括大於20%、大於25%、大於30%、大於35%、大於40%、大於45%、大於50%、大於60%或大於70%之CD11c+細胞。

【0078】 在一些實施例中，經APC刺激之T細胞包括由含有小於20%、小於15%、小於10%、小於9%、小於8%、小於7%、小於6%或小

於5% CD11b+細胞之細胞群體刺激之T細胞。

【0079】 在一些實施例中，經APC刺激之T細胞包括由含有大於90% CD11c+細胞之細胞群體刺激之T細胞。

【0080】 在一些實施例中，本文所闡述之醫藥組合物包括由含有大於70%之係CD11c+C、D1c+或CD141+細胞之新抗原性肽表現細胞之細胞群體刺激的T細胞。

【0081】 在一些實施例中，醫藥組合物中之至少60%之T細胞對表位具有特異性。

【0082】 在一些實施例中，與藉由使經分離T細胞與加載抗原之APC在不減少或耗竭CD11b+及/或CD19+細胞下接觸所獲得之細胞組合物相比，本文所闡述之醫藥組合物包括較大比例之誘導或轉化成新抗原引發性T細胞之幼稚T細胞。

【0083】 在一些實施例中，本文所闡述之醫藥組合物包括大於35%之誘導或轉化成對表位具有特異性之抗原特異性活化T細胞之幼稚T細胞。

【0084】 在一些實施例中，與藉由使經分離T細胞與加載抗原之APC在不減少或耗竭CD11b+及/或CD19+細胞下接觸所獲得之細胞組合物相比，本文所闡述之醫藥組合物包括較大比例之癌症新抗原特異性CD8+ T細胞。

【0085】 在一些實施例中，本文所闡述之醫藥組合物包括至少30%之CD8+ T細胞。

【0086】 在一些實施例中，與藉由使經分離T細胞與加載抗原之APC在不減少或耗竭CD11b+及/或CD19+下接觸所獲得之細胞組合物相

比，本文所闡述之醫藥組合物包括較大比例之記憶性T細胞。

【0087】 本文提供治療有需要之個體之癌症之方法，其包括向個體投與本文所闡述之醫藥組合物。

【0088】 本文提供製備包括對多肽表位具有特異性之T細胞受體(TCR)之T細胞之方法，該方法包括(a)自包括抗原呈現細胞及T細胞之免疫細胞群體耗竭表現CD11b之細胞，由此形成包括T細胞之CD11b耗竭之免疫細胞群體；及(b)培育或擴增包括T細胞之CD11b耗竭之免疫細胞群體；其中擴增包括對該表位具有特異性之TCR之記憶性T細胞，或誘導包括對該表位具有特異性之TCR之幼稚T細胞。

【0089】 本文提供製備包括對表位具有特異性之T細胞受體(TCR)之T細胞之方法，該方法包括(a)使包括APC及T細胞之免疫細胞群體富集表現CD11c之細胞，由此形成包括T細胞之富集CD11c之免疫細胞群體；及(b)培育或擴增包括T細胞之富集CD11c之免疫細胞群體；其中擴增包括對該表位具有特異性之TCR之記憶性T細胞，或誘導包括對該表位具有特異性之TCR之幼稚T細胞。在一些實施例中，APC製備方法包括經FMS樣酪胺酸激酶3受體配體(FLT3L)刺激之APC。

【0090】 在一些實施例中，該方法進一步包括製備APC製劑。

【0091】 在一些實施例中，製備APC製劑之方法包括使APC與FLT3L一起培育。

【0092】 在一些實施例中，製備APC製劑之方法包括使APC與多肽或編碼該多肽之多核苷酸一起培育。

【0093】 本文提供治療有需要之個體之癌症之方法，其包括向個體投與來自生物試樣之免疫細胞群體，其中免疫細胞群體包括含有對抗原肽

序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之經抗原呈現細胞(APC)刺激之T細胞，且其中個體已投與FMS樣酪胺酸激酶3配體(FLT3L)。

【0094】 本文提供治療有需要之個體之癌症之方法，其包括：(a)向個體投與FMS樣酪胺酸激酶3受體配體(FLT3L)；及(b)向個體投與來自生物試樣之免疫細胞群體，其中免疫細胞群體包括含有對抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之經抗原呈現細胞(APC)刺激之T細胞。

【0095】 本文提供治療有需要之個體之癌症之方法，其包括：(a)向個體投與來自生物試樣之免疫細胞群體，其中免疫細胞群體包括含有對抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之經抗原呈現細胞(APC)刺激之T細胞；及(b)向個體投與包括抗原肽序列之多肽或編碼抗原肽序列之多核苷酸。

【0096】 在一些實施例中，該方法進一步包括在投與免疫細胞群體之前向個體投與FMS樣酪胺酸激酶3受體配體(FLT3L)。

【圖式簡單說明】

【0097】 **圖1A**繪示抗原特異性T細胞製備方案之實例性示意圖。

【0098】 **圖1B**繪示抗原特異性T細胞製備方案之實例性示意圖。

【0099】 **圖1C**繪示抗原特異性T細胞製備方案之實例性替代示意圖。

【0100】 **圖2**繪示展示藉由長肽或短肽誘導之抗原特異性$CD8^+$記憶性T細胞之分數之實例性結果。「本體」指示，含有用於誘導之T細胞之試樣係全周邊血單核細胞(PBMC)。「$Treg^-$」指示，含有用於誘導之T細胞之試樣係耗竭CD25表現細胞之PBMC。

【0101】 **圖3**繪示實例性流式細胞術分析，其展示經GAS 7肽誘導

之抗原特異性$CD8^+$幼稚T細胞之分數。

【0102】 **圖4**繪示展示對HIV短肽肽池、短先前所鑑別新抗原(PIN)或長PIN之抗原特異性$CD8^+$ T細胞反應之實例性結果。「全PBMC」指示，含有用於誘導之T細胞之試樣係全PBMC。「$CD25^-$ PBMC」指示，含有用於誘導之T細胞之試樣耗竭$CD25^+$細胞。短指示短肽或短聚體；長指示長肽或長聚體。

【0103】 **圖5A**繪示在指示條件下對單一先前所鑑別新抗原(PIN)之抗原特異性$CD8^+$幼稚T細胞反應之實例性流式細胞術分析。

【0104】 **圖5B**繪示在指示條件下對單一先前所鑑別新抗原(PIN)之抗原特異性$CD8^+$幼稚T細胞反應之實例性流式細胞術分析。

【0105】 **圖6**繪示展示在使用來自兩個人類供體之PBMC試樣時對所指示肽之抗原特異性$CD8^+$ T細胞反應之實例性結果。

【0106】 **圖7**繪示在刺激之前及在最多三輪刺激之後對健康供體中所指示突變表位之抗原特異性$CD8^+$ T細胞反應的實例性流式細胞術繪圖。

【0107】 **圖8A**繪示展示對病毒抗原之抗原特異性記憶性$CD8^+$ T細胞反應之結果之實例性條形圖。在最多三輪刺激之後，所有$CD8^+$ T細胞之大約50%對所指示病毒表位(CMV pp65、EBV YVL、EBV BMLF1及Mart-1)具有特異性。

【0108】 **圖8B**繪示對肽加載抗原呈現細胞且然後與加載及未加載病毒抗原之APC一起培育之抗原特異性記憶性$CD8^+$ T細胞反應之回憶分析的實例性結果。來自釋放所指示細胞介素之兩個時間點之$CD8^+$ T細胞之分數繪示於圖表中。

【0109】 **圖9**繪示用於評價所誘導T細胞培養物是否可殺死表現抗原之腫瘤細胞系之細胞毒性分析之實例性結果。展示活及死半胱天冬酶(caspase) 3陽性腫瘤細胞相對於總腫瘤細胞之分數。半胱天冬酶3陽性活腫瘤細胞指示發生早期細胞死亡之細胞。

【0110】 **圖10**繪示對肽加載抗原呈現細胞且然後與加載及未加載PIN之APC一起培育之抗原特異性$CD4^+$ T細胞反應之實例性流式細胞術分析。展示釋放IFNγ之$CD4^+$ T細胞之百分比。

【0111】 **圖11**繪示在使用突變肽或野生型肽再刺激之後釋放IFNγ之抗原特異性$CD4^+$ T細胞之百分比的實例性結果。

【0112】 **圖12**繪示展示對短HIV5肽之抗原特異性$CD8^+$幼稚T細胞反應之實例性流式細胞術分析。展示短期及長期誘導二者。

【0113】 **圖13**繪示展示在使用來自人類供體之全PBMC試樣時對短ME1肽之抗原特異性$CD8^+$幼稚T細胞反應之實例性流式細胞術分析。

【0114】 **圖14**繪示展示在使用來自人類供體之全PBMC試樣時對短HIV3肽之抗原特異性$CD8^+$幼稚T細胞反應之實例性流式細胞術分析。

【0115】 **圖15**繪示展示在使用來自人類供體之全PBMC試樣時對長CSNK1A1肽之抗原特異性$CD8^+$幼稚T細胞反應之實例性流式細胞術分析。

【0116】 **圖16**繪示展示在使用來自耗竭$CD25^+$細胞之人類供體之PBMC試樣時對長CSNK1A1肽之抗原特異性$CD8^+$幼稚T細胞反應的實例性流式細胞術分析。

【0117】 **圖17**繪示展示在使用來自耗竭$CD25^+$細胞之人類供體之PBMC試樣時對短GAS7肽之抗原特異性$CD8^+$幼稚T細胞反應的實例性流

式細胞術分析。

【0118】 **圖18**繪示展示在使用來自耗竭$CD25^+$細胞之人類供體之PBMC試樣時對短ACTN4肽之抗原特異性$CD8^+$幼稚T細胞反應的實例性流式細胞術分析。

【0119】 **圖19A**繪示展示在使用來自耗竭$CD25^+$細胞之人類供體之PBMC試樣時對短ACTN4肽之抗原特異性$CD8^+$幼稚T細胞反應的實例性流式細胞術分析。展示短期誘導。

【0120】 **圖19B**繪示展示在使用來自耗竭$CD25^+$細胞之人類供體之PBMC試樣時對短HIV3肽之抗原特異性$CD8^+$幼稚T細胞反應的實例性流式細胞術分析。展示長期誘導。

【0121】 **圖20**繪示在使用來自人類供體之全PBMC試樣時對短HIV5肽之抗原特異性$CD8^+$幼稚T細胞反應之實例性流式細胞術分析。展示短期及長期誘導二者。

【0122】 **圖21**繪示展示在使用來自人類供體之全PBMC試樣時對短HIV3肽之抗原特異性$CD8^+$幼稚T細胞反應之實例性流式細胞術分析。展示短期誘導。

【0123】 **圖22**繪示展示在使用來自耗竭$CD25^+$細胞之人類供體之PBMC試樣時對短PRDX5肽之抗原特異性$CD8^+$幼稚T細胞反應的實例性流式細胞術分析。展示極短期及長期誘導二者。

【0124】 **圖23**繪示展示在使用來自耗竭$CD25^+$細胞之人類供體之PBMC試樣時對短HIV5肽之抗原特異性$CD8^+$幼稚T細胞反應的實例性流式細胞術分析。展示短期及長期誘導二者。

【0125】 **圖24**繪示生成治療性T細胞組合物之方法實例之示意圖，

該等方法包含擴增記憶性T細胞且誘導幼稚T細胞。

【0126】 **圖25**繪示用以測試T細胞之功能性、表型及/或功能及/或T細胞反應之實例性方法。

【0127】 **圖26**繪示用以測試T細胞之功能性、表型及/或功能及/或T細胞反應之回憶分析之一實例。

【0128】 **圖27A**繪示展示在回憶分析中單獨或以混合物形式獲取之經標記試樣解捲積複用試樣之能力之實例性流式細胞術分析。可解析經獨特標記之試樣且與其他條形碼具有極小交叉污染。

【0129】 **圖27B**繪示展示藉由多聚體染色回憶分析中之9種獨特標記試樣之混合物來檢測抗原特異性$CD8^+$ T細胞之實例性流式細胞術分析。

【0130】 **圖28A**繪示使用經未加載DC及加載新抗原之DC回憶之6種獨特條碼化試樣之回憶分析的實例性流式細胞術分析。

【0131】 **圖28B**繪示在回憶反應分析中與加載指示濃度肽之DC一起培育之具有功能數之$CD4^+$ T細胞之百分比的實例性條形圖。單獨(無條碼化)或在與不相關試樣混合下來分析兩種含有新生$CD4^+$ T細胞反應之經誘導培養物之試樣。條碼化不改變可檢測功能性。自細胞誘發之反應之功能數及量級並不隨試樣條碼化顯著改變。

【0132】 **圖29A**繪示展對病毒抗原之示抗原特異性記憶性$CD8^+$ T細胞反應之結果之實例性條形圖。針對CMV pp65、MART-1以及EBV BRLF1及BMLF1表位之$CD8^+$記憶反應可自起始健康供體材料中之0.23% $CD8^+$ T細胞升至> 60%。

【0133】 **圖29B**繪示對病毒抗原之抗原特異性記憶性$CD8^+$ T細胞反應之回憶分析之實例性結果，且然後使用加載及未加載病毒抗原之DC回

憶該T細胞。來自釋放所指示細胞介素之兩個時間點之$CD8^+$ T細胞之分數繪示於圖表中。

【0134】 **圖30A**繪示藉由檢測且功能性表徵相同培養物中具有多種特異性之新誘導$CD4^+$反應來進行命中鑑別之實例性結果。在所展示實例中，在靶向10個HIV源表位之4份重複培養物中實施誘導，該等HIV源表位係HIV陰性健康供體中之幼稚靶。在具有不同反應等級之4/4生物複製品中檢測抗原特異性反應。

【0135】 **圖30B**繪示藉由檢測且功能性表徵相同培養物中具有多種特異性之新誘導$CD4^+$反應來進行池解捲積之實例性結果。在每一所測試複製品中檢測多種反應，且相同之兩種表位(5號HIV及7號HIV)在每一情形下產生最高量級之反應。

【0136】 **圖30C**繪示藉由檢測且功能性表徵相同培養物中具有多種特異性之新誘導$CD4^+$反應來進行敏感性測定之實例性結果。在池解捲積分析中觀察到每一反應之類似量級。對5號HIV、6號HIV及4號HIV之反應分別顯示0.45μM、0.43μM及9.1μM之EC_{50}。

【0137】 **圖31**繪示抗原特異性T細胞製備方案之實例性示意圖。

【0138】 **圖32**繪示T細胞誘導方案之實例性示意圖。

【0139】 **圖33**繪示樹突狀細胞生成方案之實例性示意圖。

【0140】 **圖34**繪示實例性pMHC多聚體繪圖，其展示在來自以下患者之白血球分離材料中誘導之CD8+ T細胞反應：靶向患者特異性表位：$SRSF1_{E>K}$、$ARAP1_{Y>H}$及$PKDREJ_{G>R}$之黑色素瘤患者；靶向患者特異性表位(AASDH neoORF及7種模型新抗原：$ACTN4_{K>N}$、$CSNK1A1_{S>L}$、DHX40neoORF、$GLI3_{P>L}$、$QARSR_{>W}$、$FAM178B_{P>L}$及$RPS26_{P>L}$之黑色

素瘤患者。第一及第二列中之第一繪圖指示記憶反應且剩餘繪圖指示新生反應。

【0141】 **圖35**繪示$SRSF1_{E>K}$及$ARAP1_{Y>H}$在肽刺激前後之pMHC多聚體繪圖之實例性數據(左圖)，餅形圖繪示在使用加載新抗原之DC再攻擊新抗原特異性T細胞(在pMHC多聚體$^+$ $CD8^+$或CD4+ T細胞上選通)後之功能性。黑色素瘤患者中所誘導之CD8+記憶反應、CD8+新生反應及CD4+新生反應之多功能特徵由1、2或3種功能之組合展示(舉例而言，一或多種功能係產生一或多種選自IFNγ、TNFα、CD107a及4-1BB之因子)。

【0142】 **圖36**繪示黑色素瘤患者中所誘導之記憶反應及新生反應針對突變肽及野生型肽之特異性。使用以不同濃度(X軸：0 μM、0.05 μM、0.2 μM、0.8 μM及3.2 μM)加載突變或野生型新抗原肽之DC攻擊$SRSF1_{E>K}$及$ARAP1_{Y>H}$特異性T細胞反應且量測試樣中之總CD8+ T細胞中之IFN-γ+及/或TNFα+及/或CD107a+細胞(Y軸)；兩種反應皆展示與0μM濃度具有顯著差異且對野生型新抗原肽並無反應。統計學分析：針對經調節p值之FDR，P值：* ≤ 0.05，*** ≤ 0.001，**** ≤ 0.0001。

【0143】 **圖37A**繪示黑色素瘤患者中所誘導之記憶反應之細胞毒性特徵，如藉由$CD8^+CD107a^+$ T細胞之頻率所量化。其亦繪示藉由該等T細胞反應達成之靶細胞殺死，如藉由CAS3+腫瘤細胞之頻率所量化。藉由使用經突變或野生型新抗原轉導之腫瘤細胞再攻擊來評價所誘導CD8+ T細胞反應之細胞毒性能力。使用未轉導腫瘤細胞(親代A375細胞系)或經200aa構築體轉導之腫瘤細胞。該構築體含有突變或野生型序列，突變位於中心。在共培養後量測到CD8+ T細胞上之CD107a及腫瘤細胞上之活性

半胱天冬酶3之上調。靶比率：3.3:1 ($SRSF1_{E>K}$)。

【0144】 **圖37B**繪示黑色素瘤患者中所誘導之記憶反應之細胞毒性特徵之另一實例，如藉由$CD8^+CD107a^+$ T細胞之頻率所量化。其亦繪示藉由該等T細胞反應達成之靶細胞殺死，如藉由CAS3+腫瘤細胞之頻率所量化。藉由使用經突變或野生型新抗原轉導之腫瘤細胞再攻擊來評價所誘導CD8+ T細胞反應之細胞毒性能力。使用未轉導腫瘤細胞(親代A375細胞系)或經200aa構築體轉導之腫瘤細胞。該構築體含有突變或野生型序列，突變位於中心。在共培養後量測到CD8+ T細胞上之CD107a及腫瘤細胞上之活性半胱天冬酶3之上調。紅圓突出顯示pMHC+部分。效應物:靶比率：5:1 ($SRSF1_{E>K}$)。統計學分析：非配對T測試，P值：** ≤ 0.01，**** ≤ 0.0001。

【0145】 **圖37C**繪示黑色素瘤患者中所誘導之新生反應之細胞毒性特徵，如藉由$CD8^+CD107a^+$ T細胞之頻率所量化。其亦繪示藉由該等T細胞反應達成之靶細胞殺死，如藉由CAS3+腫瘤細胞之頻率所量化。藉由使用經突變或野生型新抗原轉導之腫瘤細胞再攻擊來評價所誘導CD8+ T細胞反應之細胞毒性能力。使用未轉導腫瘤細胞(親代A375細胞系)或經200aa構築體轉導之腫瘤細胞。該構築體含有突變或野生型序列，突變位於中心。在共培養後量測到CD8+ T細胞上之CD107a及腫瘤細胞上之活性半胱天冬酶3之上調。圓突出顯示pMHC+部分。效應物:靶比率：0.66:1 (ARAP1Y>H)。統計學分析：非配對T測試，P值：** ≤ 0.01，**** ≤ 0.0001。

【0146】 **圖38A**繪示黑色素瘤患者中之新抗原特異性CD4+ T細胞反應之鑑別。基於在使用加載突變新抗原肽之DC (0.8 μM)再攻擊時IFN-γ

及TNFα（Y軸）之產生來鑑別反應。將$MKRN1_{S>L}$、$CREBBP_{S>L}$及TPCN1K>E鑑別為陽性反應。

【0147】 **圖38B**繪示圖38A中所繪示之CD4+ T細胞反應針對所指示突變肽及野生型肽之特異性。在證實性研究中，使用不同濃度(X軸- 0 μM、0.05 μM、0.2 μM、0.8 μM及3.2 μM)之突變新抗原肽及野生型新抗原肽攻擊圖38A中所展示之CD4T細胞反應且量測試樣中之總CD4+中之IFNγ+及/或TNFα+（Y軸）。兩種CD4+ T細胞反應($MKRN1_{S>L}$及$CREEBP_{S>L}$)展示與0μM濃度具有顯著差異且對野生型新抗原肽並無反應，但$TPCN1_{K>E}$反應對突變新抗原肽及野生型新抗原肽二者皆具有反應性。統計學分析：針對經調節p值之FDR，P值<0.05)；

【0148】 **圖38C**繪示該等CD4+ T細胞反應之多功能性特徵，如由1、2、3或4種功能之組合所展示(舉例而言，一或多種功能係產生一或多種選自IFNγ、TNFα、CD107a及4-1BB之因子)。藉由使用加載突變新抗原肽之DC (0.8 μm)再攻擊來評價所鑑別CD4+ T細胞反應之多功能性。餅形圖中之百分比代表功能性CD4+ T細胞(1、2及/或3種功能)之百分比。繪示代表性數據，其係自患者中所誘導之刺激後CD4+ T細胞反應生成。

【0149】 **圖39**繪示在添加或不添加埃帕司他(Epacadostat)下兩個健康供體中所誘導之記憶反應之功能性，如藉由1、2或3種功能之組合所展示(舉例而言，一或多種功能係產生一或多種選自IFNγ、TNFα及CD107a之因子)。

【0150】 **圖40**繪示在添加或不添加埃帕司他下6個重複誘導中之所誘導新生$CD8^+$ T細胞反應之百分比(「命中率」，4個健康供體中之平均值)。

【0151】 **圖41A**繪示在使用本文所提供之T細胞製備方案誘導之後健康供體中之抗原特異性細胞的絕對數量，其中添加或不添加PD-1阻斷抗體。

【0152】 **圖41B**繪示在使用本文所提供之T細胞製備方案誘導之後健康供體中之抗原特異性細胞的絕對數量，其中添加或不添加PD-1阻斷抗體。

【0153】 **圖42A**繪示新生CD8+ T細胞腔室中之多聚體陽性頻率(以$CD8^+$ T細胞之百分比形式表示)，其中添加或不添加IL-12。

【0154】 **圖42B**繪示新生CD8+ T細胞腔室中之CD8+ T細胞之百分比之實例性圖式，其中添加或不添加IL-12。

【0155】 **圖43**繪示在使用衍生自健康供體之PBMC實施不同抗原呈現細胞富集及抗原加載方案之後幼稚CD8細胞對其具有反應之高免疫原性及低免疫原性抗原之命中率百分比的實例性圖式。亦繪示在使用衍生自健康供體之PBMC且使用Mart-1肽或高免疫原性及低免疫原性抗原實施不同抗原呈現細胞富集及抗原加載方案之後抗原特異性細胞之絕對數量的實例性圖式。

【0156】 **圖44A**繪示在使用來自三個不同健康供體之PBMC實施所指示抗原呈現細胞富集及抗原加載方案之後CD123陽性細胞之實例性流式細胞術結果。

【0157】 **圖44B**繪示在使用來自健康供體之PBMC實施三個抗原呈現細胞富集及抗原加載方案之後所指示CD11c+細胞子組之絕對數量的實例性圖式。處理方式如下：對於基礎Flt3L，僅FLT3L處理；對於CD11b，FLT3L處理且耗竭CD11b表現細胞；對於CD11b-/CD19-，

FLT3L處理且耗竭CD11b表現細胞及CD19表現細胞。

【0158】 **圖45**繪示在使用來自健康供體之PBMC實施三個抗原呈現細胞富集及抗原加載方案之後CD8 T細胞總數及所指示細胞比率之實例性圖式。處理方式如下：對於基礎Flt3L，僅FLT3L處理；對於CD11b，FLT3L處理且耗竭CD11b表現細胞；對於CD11b-/CD19-，FLT3L處理且耗竭CD11b表現細胞及CD19表現細胞。

【0159】 **圖46**繪示在使用來自三個不同健康供體之PBMC實施所指示抗原呈現細胞富集及抗原加載方案之後CD11b陽性細胞之實例性流式細胞術結果。

【0160】 **圖47**繪示在使用來自三個不同健康供體之PBMC實施所指示抗原呈現細胞富集及抗原加載方案之後CD19陽性細胞之實例性流式細胞術結果。

【0161】 **圖48**繪示在實施三個抗原呈現細胞富集及抗原加載方案之後細胞之倍數擴增之實例性圖式。處理方式如下：對於基礎Flt3L，僅FLT3L處理；對於CD11b，FLT3L處理且耗竭CD11b表現細胞；對於CD11b-/CD19-，FLT3L處理且耗竭CD11b表現細胞及CD19表現細胞。

【0162】 **圖49A**繪示指示在使用衍生自健康供體之PBMC實施三個抗原呈現細胞富集及抗原加載方案之後幼稚CD8 T細胞對其具有反應之特異性抗原之數量的實例性數據。對三個健康供體中之結果取平均值。處理方式如下：對於基礎Flt3L，僅FLT3L處理；對於CD11b，FLT3L處理且耗竭CD11b表現細胞；對於CD11b-/CD19-，FLT3L處理且耗竭CD11b表現細胞及CD19表現細胞。數據之實例性圖式展示於底圖中。

【0163】 **圖49B**繪示在使用衍生自健康供體之PBMC實施三個抗原

呈現細胞富集及抗原加載方案之後幼稚CD8細胞對其具有反應之高免疫原性(左圖)及低免疫原性(右圖)抗原之命中率百分比的實例性圖式。對三個健康供體中之結果取平均值。處理方式如下：對於基礎Flt3L，僅FLT3L處理；對於CD11b，FLT3L處理且耗竭CD11b表現細胞；對於CD11b-/CD19-，FLT3L處理且耗竭CD11b表現細胞及CD19表現細胞。

【0164】 **圖50**繪示在使用衍生自健康供體之PBMC實施三個抗原呈現細胞富集及抗原加載方案之後細胞群體中由T細胞對其具有反應之高免疫原性及低免疫原性抗原所活化抗原特異性細胞之數量的實例性圖式。處理方式如下：對於基礎Flt3L，僅FLT3L處理；對於CD11b，FLT3L處理且耗竭CD11b表現細胞；對於CD11b-/CD19-，FLT3L處理且耗竭CD11b表現細胞及CD19表現細胞。

【0165】 **圖51A**繪示在使用衍生自健康供體之PBMC實施三個抗原呈現細胞富集及抗原加載方案之後活細胞百分比之實例性圖式。處理方式如下：對於基礎物，僅FLT3L處理；對於基礎+ CD11b-/CD19-，FLT3L處理且耗竭CD11b表現細胞及CD19表現細胞；對於+ APC，向基礎+ CD11b-/CD19-中添加額外PBMC部分，其中額外部分耗竭CD3、CD19、CD11b、CD25及CD14表現細胞。

【0166】 **圖51B**繪示在使用衍生自健康供體之PBMC實施三個抗原呈現細胞富集及抗原加載方案之後活細胞百分比之實例性圖式。處理方式如下：對於基礎物，僅FLT3L處理；對於基礎+ CD11b-/CD19-，FLT3L處理且耗竭CD11b表現細胞及CD19表現細胞；對於+ APC，向基礎+ CD11b-/CD19-中添加額外PBMC部分，其中額外部分耗竭CD3、CD19、CD11b、CD25及CD14表現細胞。

【0167】 **圖51C**繪示在使用衍生自健康供體之PBMC實施三個抗原呈現細胞富集及抗原加載方案之後活細胞百分比之實例性圖式。處理方式如下：對於基礎物，僅FLT3L處理；對於基礎+ CD11b-/CD19-，FLT3L處理且耗竭CD11b表現細胞及CD19表現細胞；對於+ APC，向基礎+ CD11b-/CD19-中添加額外PBMC部分，其中額外部分耗竭CD3、CD19、CD11b、CD25及CD14表現細胞。

【0168】 **圖51D**繪示指示在使用實例性抗原呈現細胞富集方案時每一供體中CD8細胞對其具有反應之特異性抗原之數量之實例性數據。

【0169】 **圖51E**繪示CD8細胞對其具有反應之所指示肽之命中率百分比之實例性圖式，其中取三個健康供體中之平均值。

【0170】 **圖52A**繪示來自實驗之實例性流式細胞術分析結果，其中在使用加載抗原之APC刺激之前，使用膜滲透胺反應性染料(例如羧基螢光黃琥珀醯亞胺基酯或TagIT Violet™)標記在不同時間下添加至培養製程中之細胞群體。在施加第二刺激時，使用一種染料標記已培養14天之細胞群體，而使用另一染料標記含有加載抗原之APC及T細胞之新製劑之另一細胞群體，且將兩種群體混合至一起以實施再刺激或擴增。藉由每一染料之存在及稀釋速率來標注該等群體中之每一者對整體抗原特異性T細胞池之相對貢獻。在所有情形下，將細胞群體培養14天(第1刺激)，使用一種染料標記，且然後添加至經另一染料標記之另一細胞群體中，另一細胞群體已提前1天(標準方案)、提前4天(領先5天)或提前6天(領先7天)進行抗原刺激。

【0171】 **圖52B**展示三種不同T細胞擴增方案之實例性示意圖示，每一方案使用兩個刺激，包含在與T細胞接觸之前2或5或7天提前開始進行

抗原加載APC。

【0172】 **圖52C**展示在使用**圖52B**中所繪示之三個不同T細胞擴增方案時抗原特異性T細胞數量隨時間而變化之實例性圖形。1，標準方案；2，領先5天；3，領先7天。

【0173】 **圖53**展示經所指示新抗原肽(pep)或新抗原RNA處理之培養物之倍數擴增之實例性圖形。使用抗原(編碼抗原之肽或mRNA)刺激在分離出或去除CD3淋巴球之後CD14/CD25耗竭之PBMC細胞。再引入CD3淋巴球細胞且刺激14天。

【0174】 **圖54**展示經所指示新抗原肽(pep)或新抗原RNA核轉染之培養物中之多聚體陽性抗原特異性細胞之數量的實例性圖形。在T細胞存在下或在不存在T細胞下(-CD3)核轉染培養物。Irr，輻照。

【0175】 **圖55**繪示展示於短期誘導方案中在使用病毒肽或編碼肽之RNA時之抗原特異性CD8+記憶反應及在使用編碼新抗原之肽或RNA時之幼稚反應的實例性流式細胞術分析。

【0176】 **圖56A**繪示生成RNA之實例性製程之示意圖，該RNA包括編碼新抗原之序列且使用該等序列來加載PBMC且活化T細胞。

【0177】 **圖56B**繪示生成RNA之實例性製程之示意圖，該RNA包括編碼新抗原之序列且使用該等序列來加載PBMC且活化T細胞。

【0178】 **圖57A**繪示編碼一串新抗原之實例性RNA序連體構築體之示意圖。

【0179】 **圖57B**繪示**圖57A**中所展示之構築體內呈5’- 3’定向之新抗原串之實例性配置的示意圖。

【0180】 **圖58A**繪示用於納入5’帽結構之實例性mRNA序列之示意

圖，該mRNA編碼序連新抗原串以供表現於PBMC中。在mRNA串中添加「A」核苷酸係用於與CleanCap®技術相容。

【0181】 **圖58B**繪示在PBMC中表現具有不同5'帽結構且編碼序連新抗原串之mRNA之後24小時活細胞百分比之實例性圖式。

【0182】 **圖58C**繪示在PBMC中表現具有不同5'帽結構且編碼序連新抗原串之mRNA之後24小時GFP陽性細胞之總數的實例性圖式。

【0183】 **圖59A**繪示指示使用經修飾核苷酸來製備mRNA之實例性結果。藉由取代mRNA內之所有(完全)或一些(部分)尿苷(U)及胞苷(C)殘基來修飾mRNA。舉例而言，部分C組中所含之30% C殘基由甲基胞苷代替。結果展示對mRNA編碼肽在經轉染PBMC中隨時間之表現之效應。

【0184】 **圖59B**繪示比較包括經取代尿苷及/或胞苷之mRNA之商業及內部製劑對生成多聚體特異性T細胞之效應的實例性數據，該等多聚體特異性T細胞經加載mRNA之PBMC刺激。

【0185】 **圖59C**繪示比較如**圖59B**中所闡述生成之經刺激T細胞之擴增之實例性數據。

【0186】 **圖60A**繪示使用用於表現於細胞中之短聚體(9-10個胺基酸，頂圖)及長聚體(25個胺基酸，底圖)之mRNA構築體之實例性示意圖。

【0187】 **圖60B**繪示多聚體特異性CD8+細胞佔總CD8+細胞之百分比之實例性圖形。展示用於多聚體分析之抗原。

【0188】 **圖60C**繪示檢測多聚體陽性CD8+ T細胞之實例性流式細胞術分析，其比較經短聚體(9-10個胺基酸)及長聚體(25個胺基酸)肽刺激之APC及含有/編碼相同短聚體(9-10個胺基酸)及長聚體(25個胺基酸)肽之

APC。

【0189】 **圖61A**繪示用於轉染**圖61B-61D**中所展示實驗之細胞之實例性RNA構築體之示意圖。

【0190】 **圖61B**繪示來自多聚體分析之結果之實例性圖式。在PBMC處理之所有三種條件下，經RNA轉染之PBMC在生成抗原特異性T細胞方面優於加載肽之PBMC。對於Gli3抗原而言，據觀察，與加載肽之PBMC相比，多聚體陽性細胞增加10倍以上。

【0191】 **圖61C**繪示展示耗竭及不耗竭CD3細胞之每一指示組中之所檢測Gli3多聚體陽性T細胞之實例性流式細胞術數據。CD25+ PBMC轉染直接使得多聚體陽性細胞多於耗竭CD14及CD25細胞之PBMC或自冷凍儲備液解凍之PBMC。

【0192】 **圖61D**繪示來自多聚體分析之結果之實例性圖式。使用編碼25個胺基酸長度之新抗原序列(長聚體)或表位長度新抗原序列(短聚體)之RNA電穿孔經FTL3L細胞過夜處理之PBMC或CD25耗竭的PBMC。使用多聚體技術分析培養物中之新抗原陽性細胞之百分比。

【0193】 **圖61E**繪示來自**圖61D**中所闡述實驗之倍數擴增結果之實例性圖式。使用編碼25個胺基酸長度之新抗原序列(長聚體)或表位長度新抗原序列(短聚體)之RNA電穿孔經FTL3L細胞過夜處理之PBMC或CD25耗竭的PBMC。繪示在培養及兩個刺激之後26天之細胞倍數擴增。

【0194】 **圖62A**繪示用於轉染**圖62B-62D**中所展示實驗之細胞之實例性RNA構築體之示意圖。

【0195】 **圖62B**繪示在使用X軸上之所指示組合成熟之後第26天兩個供體中之ACTN4及Gli3反應性活T細胞數量的實例性圖式。

【0196】 **圖62C**繪示在所指示成熟混合劑存在下生長之活細胞中之Gli3反應性T細胞之百分比的實例性數據。

【0197】 **圖62D**繪示展示在所指示成熟混合劑存在下生長之所檢測Gli3多聚體陽性T細胞之實例性流式細胞術數據。

【0198】 **圖63A**繪示展示使用放射性同位素納入檢測所指示Gli3表位由PBMC之呈現之代表性質譜數據。使用經較重同位素標記之參考肽檢測經編碼多個表位(包含Gli3表位)之mRNA轉染之PBMC及肽表現。

【0199】 **圖63B**繪示在使用編碼每一表位之mRNA轉染PBMC之後隨時間變化所指示表位由HLA-A02:01之最大呈現之百分比的實例性圖式。藉由質譜檢測每一經同位素標記之表位。在轉染之後6小時觀察到最大表面呈現。

【0200】 **圖64A**繪示在回憶分析中新抗原特異性CD8 T細胞中之TNFα及/或IFNγ產生之變化百分比(左圖)或CD107a陽性細胞百分比(右圖)之實例性圖式，該等新抗原特異性CD8 T細胞經增加濃度之用於加載APC之所指示肽攻擊。

【0201】 **圖64B**繪示在多聚體分析中新抗原特異性CD8 T細胞中之TNFα及/或IFNγ產生之變化百分比(左圖)或CD107a陽性細胞百分比(右圖)之實例性圖式，該等新抗原特異性CD8 T細胞經增加濃度之用於加載APC之所指示肽攻擊。

【0202】 **圖65**繪示可視為用於使用mRNA作為免疫原來生成最佳個人T細胞治療產物之準則之實例性範恩圖(Venn diagram)。

【0203】 **圖66**繪示展示選擇用於製備患者特異性T細胞產物之肽序列之步驟之實例性流程圖。

【0204】 **圖67**例示有利於使用藉由**圖1A**中所展示製程製得之T細胞之臨床方式之多個態樣。

【0205】 **圖68**繪示展示藉由多個改造試驗製得之患者特異性T細胞產物之表徵之實例性代表性流式細胞術數據。繪示CD3+佔活細胞之分數(上圖)及CD8+及CD4+佔活CD3+ T細胞之分數(下圖)。

【0206】 **圖69A**繪示展示藉由多個改造試驗製得之患者特異性T細胞產物之表徵之實例性數據圖式。展示多聚體陽性CD8陽性細胞之百分比。

【0207】 **圖69B**繪示展示藉由多個改造試驗製得之患者特異性T細胞產物之表徵之實例性代表性流式細胞術數據。展示對於所指示表位多聚體A陽性及多聚體B陽性CD8細胞之百分比。

【0208】 **圖69C**繪示展示與未加載DC相比在使用加載突變新抗原之DC再攻擊後所鑑別$pMHC^+$ $CD8^+$ T細胞之多功能性之實例性餅形圖。

【0209】 **圖70**繪示指示藉由多個改造試驗製得之患者特異性T細胞產物之$CD4^+$細胞產生IFNγ及/或TNFα之變化的代表性數據。亦繪示展示藉由多個改造試驗製得之患者特異性T細胞產物中之$IFN\gamma^+$及/或$TNF\alpha^+$及/或$CD107a^+$ $CD4^+$細胞之表徵的實例性代表性數據。

【0210】 **圖71**繪示展示藉由多個改造試驗製得之患者特異性T細胞產物中之中央記憶性T細胞(T_{cm})、效應記憶性T細胞(T_{em})、效應T細胞(T_{eff})及幼稚T細胞($T_{幼稚}$)之分數的實例性圖式。中央記憶性T細胞(T_{cm})：$CD62L^+$ $CD45RA^-$，效應記憶性T細胞(T_{em})：$CD62L^-$ $CD45RA^-$，效應T細胞(T_{eff})：$CD62L^-$ $CD45RA^+$，幼稚T細胞($T_{幼稚}$)：$CD62L^+$ $CD45RA^+$。

【0211】 **圖72**繪示來自多聚體分析之數據之實例性圖式，其展示在

使用各種濃度之加載肽之DC攻擊後試樣中所量測之IFN-γ$^+$及/或TNFα$^+$及/或CD107a$^+$細胞佔總CD8$^+$細胞(上圖)或總CD4$^+$ T細胞(下圖)的百分比。展示用於每一圖形之肽。

【0212】 **圖73**繪示指示CD8$^+$ T細胞中之CD107a (頂列)及腫瘤細胞中之活性半胱天冬酶3 (底列)之上調之數據的實例性圖式。在與未轉導或經200胺基酸構築體轉導之A375腫瘤細胞系或加載或未加載肽之A375腫瘤細胞系一起共培養之後獲得量測值。

【0213】 **圖74**繪示指示經誘導T細胞可殺死抗原表現細胞之數據之實例性圖式。測試新抗原特異性T細胞以經由回憶反應分析識別自體腫瘤或加載肽之自體腫瘤。讀出： pMHC$^+$ (CD8$^+$之%)及pMHC$^-$ (CD8$^+$之%) T細胞中之IFN-γ$^+$及/或TNFα$^+$及/或CD107a$^+$ (Y軸)。使用單因子ANOVA指派顯著性，$P < 0.05$。

【0214】 **圖75**繪示用於臨床研究(NEO-PTC-01)中之小組及劑量之實例性示意圖。

【實施方式】

交叉參考

【0215】 本申請案主張2019年5月8日提出申請之美國臨時申請案第62/845,251號之權益，該臨時申請案之全部內容以引用方式併入本文中。

【0216】 T細胞治療預計係相對安全且充分耐受之接受性T細胞產物。然而，基於與該產物有關之風險之評價，存在3個一般種類之與T細胞治療劑有關之潛在毒性：(a)由淋巴耗竭、細胞輸注或細胞介素釋放症候群所致之治療相關毒性；(b)由自體反應性純系之擴增或新抗原特異性T細胞之交叉反應性所致之非腫瘤、脫靶毒性；及(c)由新抗原在非腫瘤組

織上之呈現所致之非腫瘤、在靶毒性。本文闡述基於所發現源自個體腫瘤之獨特突變事件之新抗原新穎免疫治療劑及其用途。因此，本文所闡述之本發明提供產生用於治療疾病之抗原特異性免疫細胞(例如T細胞)之方法及方案。

【0217】 本文提供用於癌症免疫療法之新抗原反應性T細胞組合物。儘管接受性T細胞療法係用於癌症療法之有前景之新方式，但其需要若干改良。通常，T細胞必須對癌細胞具有適當細胞毒性，必須不破壞身體中之非癌細胞，不應損失腫瘤環境中之免疫原性且應提供長期保護。另外，病毒性轉導細胞之使用具有其自身難題。因此，達到達成治療有效組合物之適當平衡需要在複雜過程之幾乎所有步驟中進行若干改良，該治療有效組合可物異性靶向癌細胞而不破壞健康細胞、阻止疾病進展、引起改善或至少實質性腫瘤消退且防止癌症復發。

【0218】 為有利於理解本發明，下文定義諸多術語及片語。

【0219】 抗原係身體中誘導免疫反應之外來物質。「新抗原」係指一類源自蛋白質中之腫瘤特異性變化之腫瘤抗原。新抗原涵蓋(但不限於)源自(例如)蛋白質序列中之取代、框移突變、融合多肽、框內缺失、插入及內源性逆轉錄病毒多肽表現之腫瘤抗原。

【0220】 「新表位」係指不存在於參照物(例如非患病細胞，例如非癌性細胞或種系細胞)中但發現於患病細胞(例如癌細胞)中之表位。此包含以下情況：其中相應表位發現於正常非患病細胞或種系細胞中，但因患病細胞(例如癌細胞)中之一或多個突變，該表位之序列發生改變以產生新表位。

【0221】 「突變」係指某一核酸序列與參考核酸相比之變化或差異

(例如核苷酸取代、添加或缺失)。「體細胞突變」可發生於身體中除生殖細胞(精子及卵子)外之任一細胞中且不傳遞至兒童中。該等改變可(但不總是)引起癌症或其他疾病。在一些實施例中，突變係非同義突變。「非同義突變」係指在轉譯產物中產生胺基酸變化(例如胺基酸取代)之突變(例如核苷酸取代)。「框移」發生於突變破壞基因密碼子週期性(亦稱為「閱讀框」)之正常狀態而使得非天然蛋白質序列發生轉譯時。在基因中可能發生不同突變以達成相同之經改變閱讀框。

【0222】「抗原處理」或「處理」係指使多肽或抗原降解成係該多肽或抗原之片段之處理產物(例如多肽至肽之降解)，且使該等片段中之一或多者與由細胞(例如抗原呈現細胞)呈現至特異性T細胞之MHC分子進行締合(例如經由結合)。

【0223】「抗原呈現細胞」(APC)係指將與MHC分子締合之蛋白質抗原之肽片段呈現於細胞表面上之細胞。該術語包含專職性抗原呈現細胞(例如B淋巴球、單核球、樹突狀細胞、朗格漢斯細胞(Langerhans cell))以及其他抗原呈現細胞(例如角質細胞、內皮細胞、星形細胞、纖維母細胞、少突膠質細胞)。

【0224】術語「親和力」係指結合對之兩個成員(例如人類白血球抗原(HLA)結合肽及種類I或II HLA或肽-HLA複合物及T細胞受體(TCR))之間之結合強度的量度。K_D係指結合對之兩個成員之間之解離常數且單位為莫耳濃度。K_A係指結合對之兩個成員之間之親和力常數且係解離常數之倒數。可以實驗方式(例如藉由表面電漿共振(SPR)使用市售Biacore SPR單元)來測定親和力。$K_{解離}$係指結合對之兩個成員之解離速率常數(例如HLA結合肽及種類I或II HLA或肽-HLA複合物及TCR之解離速率常

數)。$K_{締合}$係指結合對之兩個成員之締合速率常數(例如HLA結合肽及種類I或II HLA或肽-HLA複合物及TCR之締合速率常數)。

【0225】在整個本發明中，「結合數據」結果可以「IC_{50}」形式來表示。親和力亦可表示為抑制濃度50 (IC_{50})，或50%之結合對第一成員(例如肽)被置換之濃度。同樣，$\ln(IC_{50})$係指IC_{50}之自然對數。舉例而言，IC_{50}可為在結合分析中觀察到經標記參考肽之結合抑制50%時測試肽之濃度。考慮到運行分析之條件(例如限制性HLA蛋白濃度及/或經標記參考肽濃度)，該等值可近似於K_D值。用於測定結合之分析在業內已眾所周知且詳細闡述於(例如)PCT公開案WO 94/20127及WO 94/03205及其他公開案(例如Sidney等人，Current Protocols in Immunology 18.3.1 (1998)；Sidney等人，J. Immunol. 154:247 (1995)；及Sette等人，Mol. Immunol. 31:813 (1994))中。或者，可相對於藉由參考標準肽之結合來表示結合。亦可使用其他分析系統來測定結合，該等分析系統包含使用以下各項者：活細胞(例如Ceppellini等人，Nature 339:392 (1989)；Christnick等人，Nature 352:67 (1991)；Busch等人，Int. Immunol. 2:443 (1990)；Hill等人，J. Immunol. 147:189 (1991)；del Guercio等人，J. Immunol. 154:685 (1995))；使用洗滌劑溶解物之無細胞系統(例如Cerundolo等人，J. Immunol. 21:2069 (1991))；固定純化MHC (例如Hill等人，J. Immunol. 152, 2890 (1994)；Marshall等人，J. Immunol. 152:4946 (1994))；ELISA系統(例如Reay等人，EMBO J. 11:2829 (1992))；表面電漿共振(例如Khilko等人，J. Biol. Chem. 268:15425 (1993))；高通量可溶性相分析(Hammer等人，J. Exp. Med. 180:2353 (1994))；及種類I MHC穩定化或組裝之量測(例如Ljunggren等人，Nature 346:476

(1990)；Schumacher等人，Cell 62:563 (1990)；Townsend等人，Cell 62:285 (1990)；Parker等人，J. Immunol. 149:1896 (1992))。

【0226】 在用於論述表位時，術語「衍生」係「製備」之同義詞。衍生表位可自天然來源分離，或其可根據業內標準方案來合成。合成表位可包括人工胺基酸殘基、「胺基酸模擬物」 (例如天然L胺基酸殘基或非天然胺基酸殘基(例如環己基丙胺酸)之D異構體)。所衍生或所製備表位可為天然表位之類似物。術語「衍生自」係指來源或源頭，且可包含天然、重組、未純化、經純化或分化之分子或細胞。舉例而言，經擴增或經誘導抗原特異性T細胞可衍生自T細胞。舉例而言，經擴增或經誘導抗原特異性T細胞可衍生自生物試樣中之抗原特異性T細胞。舉例而言，成熟APC (例如專職性APC)可衍生自非成熟APC (例如不成熟APC)。舉例而言，APC可衍生自單核球(例如$CD14^+$單核球)。舉例而言，樹突狀細胞可衍生自單核球(例如$CD14^+$單核球)。舉例而言，APC可衍生自骨髓細胞。

【0227】 「表位」係分子之集體特徵(例如肽之電荷及一級、二級及三級結構)，其一起形成由另一分子(例如免疫球蛋白、T細胞受體、HLA分子或嵌合抗原受體)識別之位點。舉例而言，表位可為一組參與由特定免疫球蛋白、主要組織相容性複合物(MHC)受體識別之胺基酸殘基；或在T細胞背景中，其為彼等由T細胞受體蛋白及/或嵌合抗原受體識別之殘基。表位可藉由自天然來源分離來製得，或其可根據業內標準方案合成。合成表位可包括人工胺基酸殘基、胺基酸模擬物(例如天然L胺基酸殘基或非天然胺基酸殘基之D異構體)。在整個本發明中，表位可在一些情形下稱為肽或肽表位。在某些實施例中，對本發明肽之長度加以限制。限制長度之實施例出現於在包括本文所闡述表位之蛋白質或肽包括與天然序列具有

100%一致性之區域(亦即胺基酸殘基之鄰接系列)時。為避免(例如)在整個天然分子上理解表位之定義，對與天然肽序列具有100%一致性任一區域之長度加以限制。因此，對於包括本文所闡述之表位及與天然肽序列具有100%一致性之區域之肽而言，與天然序列具有100%一致性之區域通常具有以下長度：小於或等於600個胺基酸殘基、小於或等於500個胺基酸殘基、小於或等於400個胺基酸殘基、小於或等於250個胺基酸殘基、小於或等於100個胺基酸殘基、小於或等於85個胺基酸殘基、小於或等於75個胺基酸殘基、小於或等於65個胺基酸殘基及小於或等於50個胺基酸殘基。在某些實施例中，本文所闡述之「表位」由具有含有小於51個胺基酸殘基之區域之肽包括，該區域與天然肽序列具有100%一致性且以任一增量減少至5個胺基酸殘基(例如50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個胺基酸殘基)。

【0228】「T細胞表位」係指由呈肽-MHC (pMHC)複合物形式之MHC分子結合之肽序列。肽-MHC複合物可由T細胞(例如細胞毒性T淋巴球或T輔助細胞)之TCR識別及結合。

【0229】「T細胞」包含$CD4^+$ T細胞及$CD8^+$ T細胞。術語T細胞亦包含T輔助性1型T細胞及T輔助性2型T細胞二者。T細胞可藉由本申請案中所闡述之方法生成以用於臨床應用。用於(例如)臨床應用之本文所提及之T細胞或接受性T細胞係自生物來源分離之細胞，其經受離體操縱及培養且製成用於特定療法(例如癌症，例如黑色素瘤)之候選藥物。在候選藥物細胞通過適用於臨床應用之特定定性及定量準則時，可將藥物候選指定

為藥品。在一些情形下，藥品係選自諸多候選藥物。在本申請案之上下文中，藥品係T細胞、更具體地T細胞群體或更具體地具有異質特性及亞型之T細胞群體。舉例而言，如本文所揭示之藥品可尤其具有包括CD8+ T細胞、CD4+ T細胞之T細胞群體，其中至少高於某一百分比之細胞展現抗原特異性，某一百分比之每一細胞尤其展現記憶表型。

【0230】「免疫細胞」係指在免疫反應中發揮作用之細胞。免疫細胞係來自造血來源，且包含淋巴球，例如B細胞及T細胞；天然殺手細胞；骨髓樣細胞，例如單核球、巨噬球、嗜酸性球、肥大細胞、嗜鹼性球及顆粒球。

【0231】「免疫原性」肽或「免疫原性」表位或「免疫原性」肽表位係結合至HLA分子且誘導細胞調介性反應或體液反應(例如細胞毒性T淋巴球(CTL)反應、輔助性T淋巴球(HTL)反應及/或B淋巴球反應)之肽。本文所闡述之免疫原性肽係能夠結合至HLA分子且然後誘導細胞調介性反應或體液反應(例如CTL (細胞毒性)反應或HTL反應)之肽。

【0232】「保護性免疫反應」或「治療性免疫反應」係指對衍生自病原性抗原(例如腫瘤抗原)之抗原之CTL及/或HTL反應，其以某一方式預防或至少部分地阻止疾病症狀、副效應或進展。免疫反應亦可包含藉由刺激輔助性T細胞所促進之抗體反應。

【0233】「T細胞受體」(「TCR」)係指發現於T淋巴球(T細胞)表面上之識別結合至主要組織相容性複合物(MHC)分子之抗原之分子，其係天然的抑或部分地或完全以合成方式產生。T細胞識別與各種疾病(例如癌症)或感染性生物體有關之抗原之能力係由其TCR所賦予，TCR係由阿爾法(α)鏈及貝塔(β)鏈或伽馬(γ)及德耳塔(δ)鏈構成。構成該等鏈之蛋白質係

由採用獨特機制來生成巨大TCR多樣性之DNA所編碼。此多亞單元免疫識別受體與CD3複合物締合且結合由MHC種類I及II蛋白呈現於抗原呈現細胞(APC)之表面上之肽。TCR與APC上之肽之結合係T細胞活化中之主要事件。

【0234】 如本文中所使用，「嵌合抗原受體」或「CAR」係指包含免疫球蛋白抗原結合結構域(例如免疫球蛋白可變結構域)及T細胞受體(TCR)恆定結構域之抗原結合蛋白。如本文中所使用，TCR多肽之「恆定結構域」包含膜近端TCR恆定結構域、TCR跨膜結構域及/或TCR細胞質結構域或其片段。舉例而言，在一些實施例中，CAR係包含多肽之單體，該多肽包括連接至TCRβ恆定結構域之免疫球蛋白重鏈可變結構域。在一些實施例中，CAR係包含第一多肽及第二多肽之二聚體，該第一多肽包括連接至TCRα或TCRβ恆定結構域之免疫球蛋白重鏈或輕鏈可變結構域，該第二多肽包括連接至TCRβ或TCRα恆定結構域之免疫球蛋白重鏈或輕鏈可變結構域(例如κ或λ可變結構域)。

【0235】 「主要組織相容性複合物」或「MHC」係可用於控制負責生理學免疫反應之細胞相互作用之基因簇。術語「主要組織相容性複合物」及縮寫「MHC」可包含任一種類之MHC分子(例如MHC I類及MHC II類分子)，且係關於出現於所有脊椎動物中之基因複合物。在人類中，MHC複合物亦稱為人類白血球抗原(HLA)複合物。因此，「人類白血球抗原」或「HLA」係指人類主要組織相容性複合物(MHC)蛋白(例如參見Stites等人，Immunology，第8版，Lange Publishing, Los Altos, Calif. (1994)。關於MHC及HLA複合物之詳述闡述，參見Paul, Fundamental Immunology，第3版，Raven Press, New York (1993)。

【0236】 基因體中之主要組織相容性複合物包括如下基因區：其中表現於細胞表面上之基因產物對於結合及呈現內源性及/或外來抗原且由此調控免疫學過程較為重要。MHC蛋白或分子對於免疫反應中淋巴球與抗原呈現細胞或患病細胞之間之信號傳導較為重要。MHC蛋白或分子結合肽且呈現其以由T細胞受體識別。由MHC編碼之蛋白質可表現於細胞表面上，且向T細胞顯示自體抗原(來自細胞本身之肽片段)及非自體抗原(例如侵襲性微生物之片段)。MHC結合肽可源自蛋白質抗原之蛋白水解裂解且代表潛在淋巴球表位。(例如T細胞表位及B細胞表位)。MHC可將肽傳輸至細胞表面且將其呈現至特定細胞(例如細胞毒性T淋巴球、T輔助細胞或B細胞)。MHC區可分成三個子組，亦即種類I、種類II及種類III。MHC種類I蛋白可含有α鏈及β2-微球蛋白(並非由染色體15編碼之MHC部分)。其可將抗原片段呈現至細胞毒性T細胞。MHC種類II蛋白可含有α鏈及β鏈且其可將抗原片段呈現至T輔助細胞。MHC種類III區可編碼其他免疫組分(例如補體組分及細胞介素)。MHC可為多基因(存在若干MHC種類I及MHC種類II基因)及多晶型(每一基因存在多個等位基因)。

【0237】 「受體」係指能夠結合配體之生物分子或分子群組。受體可用於傳遞細胞、細胞形成或生物體中之資訊。受體包括至少一個受體單元，舉例而言，其中每一受體單元可由蛋白質分子組成。受體具有與配體互補之結構且可使配體作為結合配偶體進行複合。資訊尤其係藉由在配體複合於細胞表面上後之受體之構形變化來傳遞。在一些實施例中，受體應理解為尤其含義MHC I類及II中能夠與配體(尤其具有適宜長度之肽或肽片段)形成受體/配體複合物之蛋白質。「配體」係指具有與受體互補之結構且能夠與此受體形成複合物之分子。在一些實施例中，配體應理解為意

指在胺基酸序列中具有適宜長度及適宜結合基序之肽或肽片段，從而肽或肽片段能夠與MHC蛋白(例如MHC I類或MHC II類蛋白)形成複合物。在一些實施例中，「受體/配體複合物」亦應理解為意指「受體/肽複合物」或「受體/肽片段複合物」，包含呈現肽或肽片段之MHC分子(例如MHC I類或MHC II類分子)。

【0238】「天然」或「野生型」序列係指發現於自然界中之序列。本文所用之術語「天然」係指標的物實際上可發現於自然界中。舉例而言，存在於生物體(包含病毒)中並可自自然界來源分離且尚未在實驗室中人為地有意修飾之肽或核酸係天然的。

【0239】術語「肽」及「肽表位」可在本說明書中與「寡肽」互換使用，且指示一系列通常藉由毗鄰胺基酸殘基之α-胺基與羧基之間之肽鍵彼此連結之殘基。「合成肽」係指自非天然來源獲得(例如人工製得)之肽。該等肽可使用諸如化學合成或重組DNA技術等方法產生。「合成肽」包含「融合蛋白」。

【0240】術語「基序」係指具有界定長度之胺基酸序列中之殘基模式，例如長度小於約15個胺基酸殘基或長度小於約13個胺基酸殘基之肽，例如對於I類HLA基序為約8至約13個胺基酸殘基(例如8、9、10、11、12或13)且對於II類HLA基序為約6至約25個胺基酸殘基(例如6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25)，基序係由特定HLA分子識別。由既定人類HLA等位基因編碼之每一HLA蛋白之基序通常不同。該等基序之不同之處在於其一級及二級錨殘基之模式。在一些實施例中，MHC I類基序鑑別長度為7、8、9、10、11、12或13個胺基酸殘基之肽。在一些實施例中，MHC II類基序鑑別長

度為15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或26個胺基酸殘基之肽。「交叉反應性結合」肽係指結合至結合對成員種類之一個以上成員之肽(例如由I類HLA分子及II類HLA分子二者結合之肽)。

【0241】 術語「殘基」係指藉由醯胺鍵或醯胺鍵模擬物納入肽或蛋白質中或由核酸(DNA或RNA)編碼之胺基酸殘基或胺基酸模擬殘基。用於闡述肽或蛋白質之命名遵循習用實踐。胺基呈現於每一胺基酸殘基之左側(胺基-或N-末端)且羧基呈現於右側(羧基-或C-末端)。在肽表位中提及胺基酸殘基位置時，其係以胺基至羧基方向來編號，其中第一位置係位於表位或肽或蛋白質(其中肽可為其一部分)之胺基末端之殘基。在代表本發明之所選具體實施例之式中，儘管未具體展示，但胺基-及羧基末端係呈其在生理學pH值下之呈現形式，除非另外指定。在胺基酸結構式中，每一殘基通常由標準三字母或單字母名稱來代表。L形式之胺基酸殘基係藉由大寫單字母或三字母符號之大寫第一字母代表，且具有D形式之彼等胺基酸殘基之D形式係由小寫單字母或小寫三字母符號代表。然而，在使用無大寫之三字母符號或全稱時，其可係指L胺基酸殘基。甘胺酸具有不對稱碳原子且簡稱為「Gly」或「G」。通常使用標準單字母符號來指定本文所陳述肽之胺基酸序列。(A，丙胺酸；C，半胱胺酸；D，天門冬胺酸；E，麩胺酸；F，苯丙胺酸；G，甘胺酸；H，組胺酸；I，異白胺酸；K，離胺酸；L，白胺酸；M，甲硫胺酸；N，天門冬醯胺酸；P，脯胺酸；Q，麩醯胺酸；R，精胺酸；S，絲胺酸；T，蘇胺酸；V，纈胺酸；W，色胺酸；及Y，酪胺酸。)

【0242】 「保守胺基酸取代」係其中一個胺基酸殘基經具有類似側鏈之另一胺基酸殘基代替之取代。業內已定義具有類似側鏈之胺基酸殘基

之家族，包含具有鹼性側鏈之胺基酸(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)、具有酸性側鏈之胺基酸(例如天門冬胺酸、麩胺酸)、具有不帶電極性側鏈之胺基酸(例如甘胺酸、天門冬醯胺酸、麩胺醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸)、具有非極性側鏈之胺基酸(例如丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸)、具有β分枝側鏈之胺基酸(例如蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)及具有芳香族側鏈之胺基酸(例如酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)。舉例而言，使用苯丙胺酸取代酪胺酸係保守取代。鑑別不消除肽功能之核苷酸及胺基酸保守取代之方法在業內已眾所周知。

【0243】「醫藥上可接受」係指通常無毒、惰性及/或生理上相容之組合物或組合物組分。「醫藥賦形劑」或「賦形劑」包括諸佐劑、載劑、pH調節劑及緩衝劑、張力調節劑、潤濕劑、防腐劑及諸如此類等材料。「醫藥賦形劑」係醫藥上可接受之賦形劑。

【0244】根據本發明，術語「疫苗」係關於在投與時誘導識別且攻擊病原體或患病細胞(例如癌細胞)之免疫反應(例如細胞或體液免疫反應)之醫藥製劑(醫藥組合物)或產品。疫苗可用於預防或治療疾病。術語「個別化癌症疫苗」或「個人化癌症疫苗」、「個人癌症疫苗」涉及特定癌症患者且意指適用於個別癌症患者之需要或特殊情況之癌症疫苗。

【0245】術語「多核苷酸」及「核酸」可本文中互換使用且係指任一長度之核苷酸聚合物，且包含DNA及RNA (例如mRNA)。核苷酸可為去氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、經修飾核苷酸或鹼基及/或其類似物或任一可藉由DNA或RNA聚合酶納入聚合物中之受質。在一些實施例中，多核苷酸及核酸可為在活體外轉錄之mRNA。在一些實施例中，使用本發明

方法投與之多核苷酸係mRNA。

【0246】 術語「分離」或「生物純」係指材料實質上或基本上不含通常伴隨以天然狀態發現之材料之組分。因此，本文所闡述之經分離肽不含一些或所有通常與肽締合於其原位環境中之材料。舉例而言，「經分離」表位可為不包含衍生表位之蛋白質之整個序列之表位。舉例而言，活動物中所存在之天然多核苷酸或肽並非分離的，但自天然系統中之一些或所有共存材料分離之相同多核苷酸或肽係分離的。此一多核苷酸可為載體之一部分，及/或此一多核苷酸或肽可為組合物之一部分，且仍係「經分離」的，此乃因該載體或組合物並非其天然環境之一部分。經分離RNA分子包含本文所闡述DNA分子之活體內或活體外RNA轉錄物，且進一步包含以合成方式產生之該等分子。在一些實施例中，經分離之多肽、抗體、多核苷酸、載體、細胞或組合物係實質上純的。本文所用之術語「實質上純」係指材料至少50%純(亦即不含污染物)、至少90%純、至少95%純、至少98%純或至少99%純。

【0247】 術語「一致」或「一致性」百分比在兩個或更多個核酸或多肽之情況下係指在比較並比對(視需要引入空位)以獲得最大對應性時，兩個或更多個序列或子序列相同或具有指定百分比之相同核苷酸或胺基酸殘基，其中不將任何保守胺基酸取代視為序列一致性之一部分。一致性百分比可使用序列比較軟體或算法或藉由目測檢查來量測。可用於比對胺基酸或核苷酸序列之各種算法及軟體在業內已眾所周知。該等算法及軟體包含(但不限於) BLAST、ALIGN、Megalign、BestFit、GCG Wisconsin包裝及其變化形式。在一些實施例中，本文所闡述之兩個核酸或多肽實質上一致意指，在比較並比對以獲得最大對應性時，其具有至少70%、至少

75%、至少80%、至少85%、至少90%及在一些實施例中至少95%、96%、97%、98%、99%之核苷酸或胺基酸殘基一致性，如使用序列對比算法或藉由目測檢查所量測。在一些實施例中，在長度為至少約10、至少約20、至少約40-60個殘基、至少約60-80個殘基或其間之任一整數值之序列區域中存在一致性。在一些實施例中，在長於60-80個殘基(例如至少約80-100個殘基)之區域中存在一致性，且在一些實施例中在所比較序列(例如肽之胺基酸序列或核苷酸序列之編碼區)之全長中序列實質上一致。

【0248】 術語「個體」係指擬接受特定治療之任一動物(例如哺乳動物)，包含(但不限於)人類、非人類靈長類動物、犬類、貓類、齧齒類動物及諸如此類。通常，術語「個體」及「患者」可在本文中互換使用且係指人類個體。

【0249】 術語「有效量」或「治療有效量」或「治療效應」係指治療劑有效「治療」個體或哺乳動物之疾病或病症之量。治療有效量之藥物具有治療效應且由此可預防發生疾病或病症；減緩疾病或病症之發生；減緩疾病或病症之進展；在一定程度上減輕一或多種與疾病或病症有關之症狀；減小發病率及死亡率；改良生活品質；或該等效應之組合。

【0250】 術語「治療(treating)」或「治療(treatment)」或「擬治療」或「緩解」或「擬緩解」係指(1)治癒、減緩、減輕所診斷病理性病狀或病症之症狀及/或停止該所診斷病理性病狀或病症之進展之治療措施；及(2)預防或減緩靶向病理性病狀或病症之發展之預防性或預防性措施。因此，需要治療者包含已患有該病症者；易患該病症者；及擬預防該病症者。

【0251】 在用於闡述細胞試樣(例如周邊血單核細胞(PBMC)試樣)

時，術語「耗竭」係指已去除或耗竭細胞亞群體之細胞試樣。舉例而言，耗竭CD25表現細胞之免疫細胞試樣係指已去除或耗竭CD25表現細胞之免疫細胞試樣。舉例而言，可使用一或多種結合劑自試樣去除或耗竭一或多種細胞或細胞類型。舉例而言，可(例如)藉由使用結合至CD14之抗體自PBMC試樣耗竭或去除$CD14^+$細胞。

【0252】「刺激」係指藉由使刺激分子與其同族配體結合以由此調介信號轉導事件來誘導反應。舉例而言，T細胞刺激可係指使T細胞之TCR結合至肽-MHC複合物。舉例而言，T細胞刺激可係指方案1或方案2內之步驟，其中將PBMC與加載肽之APC一起培養。

【0253】術語「富集」係指，組合物或部分中之目標物質已部分地純化，從而該目標物質之濃度實質上高於該物質在未富集成品中之天然含量。術語「經誘導細胞」係指已經影響細胞之蛋白質表現、基因表現、分化狀態、形狀、形態、活力及諸如此類之誘導化合物、細胞或細胞群體處理之細胞。

【0254】可使用「參考」來關聯及/或比較在本發明方法中自患病樣品獲得之結果。通常，可基於一或多種自個體或一或多個不同個體(例如健康個體，例如相同物種之個體)獲得之正常樣品(尤其不受疾病影響之樣品)來獲得「參考」。可根據經驗藉由測試足夠大數量之正常樣品來確定「參考」。

【0255】如本文中所使用，除非另外提及，否則腫瘤係癌性腫瘤，且術語癌症及腫瘤可互換使用於整個文件中。儘管腫瘤係實體組織之癌症，但本文所闡述之若干組合物及方法原則上可適用於血癌(白血病)。

T細胞療法之概述

【0256】 藉由T細胞(例如自體T細胞)之受控離體誘導或擴增來生成抗原特異性T細胞可提供高度特異性且有益之T細胞療法(例如接受性T細胞療法)。本發明提供可用於治療患有癌症及其他病狀、疾病及病症之個體之T細胞製備方法及治療性T細胞組合物。目標係擴增及誘導具有有益表型及功能之抗原特異性T細胞。本發明提供可用於抗原特異性T細胞療法(例如個人或個性化T細胞療法)之T細胞組合物及T細胞製備方法。本文所提供之T細胞組合物可為個人抗原特異性T細胞療法。**圖1**以圖形方式表示與T細胞療法相關之製程之概述，其包含：一方面，鑑別患有癌症之個體中之癌症及癌症特異性抗原，從而產生新抗原性肽；及另一方面，製備用於免疫療法之經活化抗原特異性細胞且投與細胞產物。

用於基於T細胞之療法之新抗原

【0257】 傳統抗原靶向性免疫療法已著眼於腫瘤相關抗原(TAA)、包含癌症睪丸抗原(通常係異常表現於腫瘤中之生殖系限制性基因產物)之抗原或衍生自展示組織特異性表現之基因之抗原。然而，腫瘤亦顯示稱為新抗原之突變基因之蛋白質產物。突變之數量及類型可易於使用次世代測序方式來定義且包含單一胺基酸誤義突變、融合蛋白及長度自一個胺基酸至最多一百個或更多個胺基酸不同之新穎開放閱讀框(neoORF)。新抗原係在表位中包括非沉默突變之抗原，且相同抗原並不表現於同一人類身體內之非癌細胞中。基於突變之抗原尤其具有價值，此乃因該等抗原已繞開中樞耐受性(在正常胸腺發育期間發生之去除自我反應性T細胞之過程)且顯示敏銳之腫瘤特異性。每一非同義(亦即蛋白質編碼)突變可生成可由患者之T細胞識別之新抗原。識別該等新抗原之T細胞可用於直接殺死腫瘤細胞且催化針對腫瘤之較廣泛免疫反應。本文所闡述之方法旨在以患者特

異性方式誘導及擴增該等新抗原反應性T細胞且利用該等細胞進行接受性細胞療法。

【0258】 在一些實施例中，本文所用之新抗原包括點突變。

【0259】 在一些實施例中，本文所用之新抗原包括框移突變。

【0260】 在一些實施例中，本文所用之新抗原包括交叉突變。

【0261】 在一些實施例中，本文所用之新抗原包括藉由插入一個或一個以上核苷酸引起之插入突變。

【0262】 在一些實施例中，本文所用之新抗原包括藉由缺失一個或一個以上核苷酸引起之缺失突變。

【0263】 在一些實施例中，新抗原可藉由插入-缺失(in-del)突變引起。

【0264】 在一些實施例中，抗原或新抗原肽結合HLA蛋白(例如HLA種類I或HLA種類II)。在具體實施例中，抗原或新抗原肽以大於相應野生型肽之親和力結合HLA蛋白。在具體實施例中，抗原或新抗原肽具有至少小於5000 nM、至少小於500 nM、至少小於100 nM、至少小於50 nM或更小之IC_{50}或K_D。

【0265】 在一些實施例中，抗原或新抗原肽之長度可為約8至約50個胺基酸殘基，或長度為約8至約30、約8至約20、約8至約18、約8至約15或約8至約12個胺基酸殘基。在一些實施例中，抗原或新抗原肽之長度可為約8至約500個胺基酸殘基，或長度為約8至約450、約8至約400、約8至約350、約8至約300、約8至約250、約8至約200、約8至約150、約8至約100、約8至約50或約8至約30個胺基酸殘基。

【0266】 在一些實施例中，抗原或新抗原肽之長度可為至少8、9、

10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50個或更多個胺基酸殘基。在一些實施例中，新抗原肽之長度可為至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500個或更多個胺基酸殘基。在一些實施例中，抗原或新抗原肽之長度可為至多8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50個或更少胺基酸殘基。在一些實施例中，抗原或新抗原肽之長度可為至多8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500個或更少胺基酸殘基。

【0267】在一些實施例中，抗原或新抗原肽之總長度為至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少26、至少27、至少28、至少29、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90、至少100、至少150、至少200、至少250、至少300、至少350、至少400、至少450或至少500個胺

基酸。

【0268】在一些實施例中，抗原或新抗原肽之總長度為至多8、至多9、至多10、至多11、至多12、至多13、至多14、至多15、至多16、至多17、至多18、至多19、至多20、至多21、至多22、至多23、至多24、至多25、至多26、至多27、至多28、至多29、至多30、至多40、至多50、至多60、至多70、至多80、至多90、至多100、至多150、至多200、至多250、至多300、至多350、至多400、至多450或至多500個胺基酸。

【0269】在一些實施例中，新抗原肽可具有約0.5至約12、約2至約10或約4至約8之pI值。在一些實施例中，新抗原肽可具有至少4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5或更大之pI值。在一些實施例中，新抗原肽可具有至多4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5或更小之pI值。

【0270】在一些實施例中，抗原或新抗原肽可具有約1 pM至約1 mM、約100 pM至約500 μM、約500 pM至約10 μM、約1 nM至約1 μM或約10 nM至約1 μM之HLA結合親和力。在一些實施例中，抗原或新抗原肽可具有至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、700、800、900 μM或更大之HLA結合親和力。在一些實施例中，抗原或新抗原肽可具有至多2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、700、800、900 μM之HLA結合親和力。

【0271】 在一些實施例中，本文所闡述之抗原或新抗原肽可包括載劑，例如業內所熟知者，例如甲狀腺球蛋白、白蛋白(例如人類血清白蛋白)、破傷風類毒素、聚胺基酸殘基(例如聚L-離胺酸)、聚L-麩胺酸、流行性感冒病毒蛋白、B型肝炎病毒核心蛋白及諸如此類。

【0272】 在一些實施例中，可藉由末端-NH_2醯基化(例如藉由烷醯基(C_1-C_{20})或硫基乙醇醯基乙醯化)、末端-羧基醯胺化(例如氨、甲胺等)來修飾本文所闡述之抗原或新抗原肽。在一些實施例中，該等修飾可提供用於連接至載體或其他分子之位點。

【0273】 在一些實施例中，本文所闡述之抗原或新抗原肽可含有修飾(例如(但不限於)醣基化、側鏈氧化、生物素化、磷酸化、添加表面活性材料(例如脂質))，或可以化學方式進行修飾(例如乙醯化等)。此外，肽中之鍵可不為肽鍵(例如共價鍵、酯或醚鍵、二硫鍵、氫鍵、離子鍵等)。

【0274】 在一些實施例中，本文所闡述之抗原或新抗原肽可含有取代以改良所得肽之物理性質(例如穩定性或溶解性)。舉例而言，可藉由使用α-胺基丁酸(「B」)取代半胱胺酸(C)來修飾抗原或新抗原肽。因其化學性質，半胱胺酸易於形成二硫橋且足以改變肽結構以減小結合能力。使用α-胺基丁酸取代C不僅減輕此問題，且在某些情況下實際上改良結合及交叉結合能力。可在抗原或新抗原肽之任一殘基處(例如在表位或肽內類似物之任一錨或非錨位置處或肽之其他位置處)使用α-胺基丁酸取代半胱胺酸。

【0275】 在一些實施例中，本文所闡述之抗原肽或新抗原肽可包括胺基酸模擬物或非天然胺基酸殘基，例如D-或L-萘基丙胺酸；D-或L-苯基甘胺酸；D-或L-2-噻吩基丙胺酸；D-或L- 1、2、3或4-苊基丙胺酸；D-

或L-3噻吩基丙胺酸；D-或L-(2-吡啶基)-丙胺酸；D-或L-(3-吡啶基)-丙胺酸；D-或L-(2-吡嗪基)-丙胺酸；D-或L-(4-異丙基)-苯基甘胺酸；D-(三氟甲基)-苯基甘胺酸；D-(三氟-甲基)-苯基丙胺酸；D-ρ-氟苯基丙胺酸；D-或L-ρ-聯苯-苯基丙胺酸；D-或L-ρ-甲氧基聯苯苯基丙胺酸；D-或L-2-吲哚(烯丙基)丙胺酸；及D-或L-烷基丙胺酸，其中烷基可為經取代或未經取代之甲基、乙基、丙基、己基、丁基、戊基、異丙基、異丁基、第二異基(sec-isotyl)、異戊基；或非酸性胺基酸殘基。非天然胺基酸之芳香族環包含(例如)噻唑基、噻吩基、吡唑基、苯并咪唑基、萘基、呋喃基、吡咯基及吡啶基芳香族環。具有各種胺基酸模擬物或非天然胺基酸殘基之經修飾肽尤其有用，此乃因其往往表現增加之活體內穩定性。該等肽亦可擁有改良之儲放壽命或製備性質。

【0276】 在一些實施例中，使肽與免疫細胞接觸以活化細胞且使其具有抗原反應性。

【0277】 在一些實施例中，使肽與免疫細胞離體接觸。

【0278】 在一些實施例中，使肽與免疫細胞在活系統(例如人類)中接觸。

【0279】 在一些實施例中，免疫細胞係抗原呈現細胞。

【0280】 在一些實施例中，免疫細胞係T細胞。

【0281】 本發明係關於製備對免疫原性抗原具有特異性之T細胞之方法。

【0282】 本發明亦係關於包括經APC刺激之抗原特異性T細胞之組合物。在一些實施例中，將一或多種抗原肽加載於APC上，其中然後使用加載肽之APC刺激T細胞以產生抗原特異性T細胞。在一些實施例中，抗

原係新抗原。在一些實施例中，用於肽加載之APC係樹突狀細胞。

【0283】 在一些實施例中，肽序列包括不存在於個體之非癌細胞中之突變。在一些實施例中，肽係由個體癌細胞之基因或表現基因編碼。在一些實施例中，肽序列之長度為至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1,000、1,500、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、7,500或10,000個或更多個天然胺基酸。

【0284】 在一些實施例中，肽序列結合至由I類HLA等位基因編碼之蛋白質且具有8-12個天然胺基酸之長度。在一些實施例中，肽序列結合至由II類HLA等位基因編碼之蛋白質且具有16-25個天然胺基酸之長度。在一些實施例中，肽序列包括複數個抗原肽序列。在一些實施例中，複數個抗原肽序列包括至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450或500個抗原肽序列。

【0285】 在一些實施例中，本文所闡述之抗原係新抗原。可藉由業內已知之任一適宜方法來鑑別候選免疫原性新抗原序列。本發明方法可用於(例如)產生對個體疾病具有特異性之療法或產生疾病疫苗。候選免疫原性新抗原可為先前鑑別之新抗原。在一些實施例中，候選免疫原性新抗原可先前未經鑑別。用於本文所闡述之方法及組合物中之候選免疫原性新抗原可對個體具有特異性。在一些實施例中，用於本文所闡述之方法及組合物中之候選新抗原可對複數個個體具有特異性。

【0286】 在動物及人類二者中，突變表位可潛在地有效誘導免疫反應或活化T細胞。在一實施例中，可測定個體中之傳染原(例如病毒)之潛在免疫原性表位。在一實施例中，可測定患有疾病(例如癌症)之個體之潛在免疫原性突變表位。在一些實施例中，用於本文所闡述方法中之潛在免疫原性抗原或新抗原可為表現於生成其之組織類型之腫瘤及細胞中之分化抗原。在一些實施例中，用於本文所闡述方法中之潛在免疫原性抗原或新抗原可為不表現於另一分化組織中之癌症/生殖系抗原。在一些實施例中，用於本文所闡述方法中之潛在免疫原性抗原或新抗原可為突變抗原。舉例而言，用於本文所闡述方法中之候選免疫原性抗原或新抗原肽可包括誤義點突變或經由基因區段之腫瘤特異性易位所生成融合蛋白之抗原或新抗原。在一些實施例中，用於本文所闡述方法中之潛在免疫原性抗原或新抗原可為過度表現之抗原。在一些實施例中，潛在免疫原性抗原或新抗原可發現於腫瘤中。舉例而言，用於本文所闡述方法中之潛在免疫原性抗原或新抗原可包含其在經分化正常組織之細胞中之表現經嚴格調控的蛋白質。

【0287】 可藉由使用次世代測序技術對來自癌症患者之腫瘤組織及健康組織實施基因體或外顯子組測序來測定潛在免疫原性突變表位。舉例而言，可使用次世代測序技術對基於突變頻率及用作抗原或新抗原之能力選擇之基因進行測序。在一實施例中，可分析測序數據以鑑別可結合至個體之HLA分子之潛在免疫原性突變肽。在一實施例中，可使用電腦來分析數據。在另一實施例中，可針對抗原或新抗原肽之存在來分析序列數據。在一實施例中，可藉由對MHC分子之親和力來測定潛在免疫原性抗原或新抗原肽。

【0288】 可藉由直接蛋白質測序來測定潛在免疫原性抗原或新抗原肽。舉例而言，可藉由使用多維質譜技術(例如串聯質譜(MS/MS))對酶促蛋白質消解物進行蛋白質測序來鑑別用於本文所闡述方法中之潛在免疫原性抗原或新抗原肽。

【0289】 可使用重新測序未知蛋白質之高通量方法來鑑別潛在免疫原性抗原或新抗原肽。舉例而言，可使用重新測序未知蛋白質之高通量方法(例如元鳥槍法(meta-shotgun)蛋白質測序)來分析個體腫瘤之蛋白質組以鑑別潛在免疫原性表現新抗原。

【0290】 亦可使用MHC多聚體來鑑別潛在免疫原性抗原或新抗原肽以鑑別抗原特異性T細胞反應。舉例而言，可使用基於MHC四聚體之篩選技術來實施患者試樣中抗原特異性T細胞反應之高通量分析。可使用基於四聚體之篩選技術來初步鑑別潛在免疫原性腫瘤特異性抗原，或替代地作為二級篩選方案來評價患者可能已暴露於哪些潛在免疫原性抗原，由此有利於選擇用於本文所闡述方法中之潛在免疫原性抗原。

【0291】 在一些實施例中，特異性新抗原靶向免疫療法。在一些實施例中，合成新抗原性肽。設計本文所用之新抗原性肽，從而每一肽對HLA抗原具有特異性且可以高結合親和力及特異性結合至HLA抗原。在一些實施例中，基於由發明者生成之高性能HLA結合預測模型來設計本文所用之肽，且已闡述於(例如)下列專利申請案/公開案：WO2011143656、WO2017184590及美國臨時申請案第62/783,914號及第62/826,827號；所有案件皆以引用方式併入本文中。NetMHCIIpan可為當前預測標準，但其可能並不視為準確的。在三個II類基因座(DR、DP及DQ)中，可僅呈現HLA-DR之某些公共等位基因之資料。簡言之，新生成預測模型幫助鑑別

免疫原性抗原肽且可用於研發藥物(例如個性化醫學藥物)，且分離並表徵抗原特異性T細胞，其中機器學習性HLA-肽呈現預測模型包括複數個至少基於訓練資料鑑別之預測變量，其中訓練資料包括：由表現中所細胞HLA蛋白呈現且藉由質譜鑑別之肽之序列的序列資訊；包括胺基酸位置資訊之訓練肽序列資訊，其中訓練肽序列資訊與細胞中所表現之HLA蛋白有關；及代表接收為輸入之胺基酸位置資訊與生成為輸出(基於胺基酸位置資訊及預測變量)之呈現可能性之間之關聯的函數。CD4+ T細胞反應可具有抗腫瘤活性。在現有預測方法中，可在不使用II類預測下展示高CD4+ T細胞反應率(例如NeoVax研究中之60%之SLP表位(在NT-001中為49%)及BioNTech研究中之48%之mRNA表位)。可能尚不明了該等表位是否通常天然呈現(藉由腫瘤或藉由吞噬DC)。因此，期望藉由改良天然呈現之II類表位之鑑別來將高CD4+ T反應率轉變為治療效能。基因表現、酶促裂解及路徑/定位偏離之作用可能尚未得到穩定量化。可能尚不明了自體吞噬(藉由腫瘤細胞之II類呈現)或吞噬作用(腫瘤表位由APC之II類呈現)是否係較相關路徑，但大部分現有MS資料可假定為衍生自自體吞噬。可存在用於學習II類呈現規則之不同資料生成方式，包含現場標準及所提出方式。現場標準可包括提供低通量且需要放射性試劑之親和力量測(其可為NetMHCIIpan預測之基礎)，且其失去處理作用。新方式包括質譜，其中來自細胞系/組織/腫瘤之資料可幫助確定自體吞噬之處理規則(此資料中之大部分已公開)且單等位基因MS可使得能夠確定等位基因特異性結合規則(假定多等位基因MS資料過於複雜以致難以有效學習。新生成預測方法包括訓練機器學習性HLA-肽呈現預測模型，其中訓練包括使用電腦處理器將自一或多種來自表現HLA種類II等位基因之細胞之HLA-肽複合物分離

之HLA-肽的胺基酸位置資訊序列輸入HLA-肽呈現預測模型中；機器學習性HLA-肽呈現預測模型包括：複數個至少基於訓練資料鑑別之預測變量，該訓練資料包括：由表現於細胞中之HLA蛋白呈現且藉由質譜鑑別之肽序列之序列資訊；訓練肽序列資訊包括訓練肽之胺基酸位置資訊，其中訓練肽序列資訊與表現於細胞中之HLA蛋白有關；及代表接收為輸入之胺基酸位置資訊與生成為輸出(基於胺基酸位置資訊及預測變量)之呈現可能性之間之關聯的函數。在一些實施例中，呈現模型在0.1%-10%之回憶率下具有至少0.25之陽性預測值。在一些實施例中，呈現模型在0.1%-10%之回憶率下具有至少0.4之陽性預測值。在一些實施例中，呈現模型在0.1%-10%之回憶率下具有至少0.6之陽性預測值。在一些實施例中，質譜係單等位基因質譜。在一些實施例中，肽由表現於細胞中之HLA蛋白經由自體吞噬來呈現。在一些實施例中，肽由表現於細胞中之HLA蛋白經由吞噬作用來呈現。在一些實施例中，藉由使用複數個品質度量來增加訓練資料之品質。在一些實施例中，複數個品質度量包括常見污染肽去除、高峰強度百分比值(scored peak intensity)、高評分及高質量準確度。在一些實施例中，峰強度百分比值為至少50%。在一些實施例中，峰強度百分比值為至少70%。在一些實施例中，由表現於細胞中之HLA蛋白呈現之肽係由表現於細胞中之單一免疫沈澱性HLA蛋白呈現之肽。在一些實施例中，複數個預測變量包括肽-HLA親和力預測變量。在一些實施例中，複數個預測變量包括源蛋白表現含量預測變量。在一些實施例中，複數個預測變量包括肽可裂解性預測變量。在一些實施例中，由HLA蛋白呈現之肽包括藉由使用反轉資料庫搜索策略搜索肽資料庫鑑別之肽。在一些實施例中，HLA蛋白係HLA-DR蛋白及HLA-DP蛋白或HLA-DQ蛋白。在一些實施例

中，HLA蛋白係選自由以下組成之群之HLA-DR蛋白：HLA-DR蛋白及HLA-DP蛋白或HLA-DQ蛋白。在一些實施例中，HLA蛋白係選自由以下組成之群之HLA-DR蛋白：HLA-DPB1*01:01/HLA-DPA1*01:03、HLA-DPB1*02:01/HLA-DPA1*01:03、HLA-DPB1*03:01/HLA-DPA1*01:03、HLA-DPB1*04:01/HLA-DPA1*01:03、HLA-DPB1*04:02/HLA-DPA1*01:03、HLA-DPB1*06:01/HLA-DPA1*01:03、HLA-DQB1*02:01/HLA-DQA1*05:01、HLA-DQB1*02:02/HLA-DQA1*02:01、HLA-DQB1*06:02/HLA-DQA1*01:02、HLA-DQB1*06:04/HLA-DQA1*01:02、HLA-DRB1*01:01、HLA-DRB1*01:02、HLA-DRB1*03:01、HLA-DRB1*03:02、HLA-DRB1*04:01、HLA-DRB1*04:02、HLA-DRB1*04:03、HLA-DRB1*04:04、HLA-DRB1*04:05、HLA-DRB1*04:07、HLA-DRB1*07:01、HLA-DRB1*08:01、HLA-DRB1*08:02、HLA-DRB1*08:03、HLA-DRB1*08:04、HLA-DRB1*09:01、HLA-DRB1*10:01、HLA-DRB1*11:01、HLA-DRB1*11:02、HLA-DRB1*11:04、HLA-DRB1*12:01、HLA-DRB1*12:02、HLA-DRB1*13:01、HLA-DRB1*13:02、HLA-DRB1*13:03、HLA-DRB1*14:01、HLA-DRB1*15:01、HLA-DRB1*15:02、HLA-DRB1*15:03、HLA-DRB1*16:01、HLA-DRB3*01:01、HLA-DRB3*02:02、HLA-DRB3*03:01、HLA-DRB4*01:01及HLA-DRB5*01:01。在一些實施例中，由HLA蛋白呈現之肽包括藉由比較HLA-肽之MS/MS光譜與肽資料庫中一或多種HLA-肽之MS/MS光譜所鑑別的肽。

【0292】 在一些實施例中，突變係選自由以下組成之群：點突變、剪接位點突變、框移突變、連讀突變及基因融合突變。

【0293】 在一些實施例中，由HLA蛋白呈現之肽具有15-40個胺基酸之長度。在一些實施例中，由HLA蛋白呈現之肽包括藉由以下方式鑑別之肽：(a)自表現單一HLA種類II等位基因之細胞系分離一或多種HLA複合物；(b)自一或多種所分離HLA複合物分離一或多種HLA-肽；(c)獲得一或多種所分離HLA-肽之MS/MS光譜；及(d)自肽資料庫獲得對應於一或多種所分離HLA-肽之MS/MS光譜之肽序列；其中自步驟(d)獲得之一或多個序列鑑別一或多種所分離HLA-肽之序列。

【0294】 可使用各種抗原肽來誘導或擴增T細胞。可使用各種抗原肽來活化抗原呈現細胞(APC)，該等抗原呈現細胞繼而藉由使T細胞與加載抗原之APC接觸來活化T細胞。

【0295】 在一些實施例中，肽包括選自(A)點突變、(B)剪接位點突變、(C)框移突變、(D)連讀突變、(E)基因融合突變及其組合之突變。在一些實施例中，肽包括點突變且以大於相應野生型肽之親和力結合至個體之HLA蛋白。

【0296】 在一些實施例中，肽以小於500 nM、250 nM、150 nM、100 nM、50 nM、25 nM或10 nM之IC_{50}結合至個體之HLA蛋白。在一些實施例中，肽以小於500 nM、250 nM、150 nM、100 nM、50 nM、25 nM或10 nM之IC_{50}或K_D結合至個體之HLA蛋白。在一些實施例中，每一肽結合至由個體表現性HLA等位基因編碼之蛋白質。在一些實施例中，所誘導或擴增之抗原特異性T細胞之TCR以小於500 nM、250 nM、150 nM、100 nM、50 nM、25 nM或10 nM之IC_{50}或K_D結合至肽-HLA複合

物。在一些實施例中，TCR以小於500 nM、250 nM、150 nM、100 nM、50 nM、25 nM或10 nM之IC_{50}或K_D結合至肽-HLA複合物。在一些實施例中，至少一個抗原肽序列中之每一者包括不存在於個體之非癌細胞中之突變。在一些實施例中，至少一個抗原肽序列中之每一者由個體癌細胞之基因或表現基因編碼。

【0297】在一些實施例中，肽之長度為至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1,000、1,500、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、7,500或10,000個或更多個天然胺基酸。在一些實施例中，肽結合至由I類HLA等位基因編碼之蛋白質且具有8-12個天然胺基酸之長度。在一些實施例中，肽結合至由II類HLA等位基因編碼之蛋白質且具有16-25個天然胺基酸之長度。在一些實施例中，肽包括複數個肽。在一些實施例中，複數個肽包括至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450或500個或更多個抗原肽。

【0298】在一些態樣中，本發明提供使用上文所簡述之方法鑑別之肽或編碼肽之多核苷酸(例如具有腫瘤特異性突變之肽、病毒肽或與非癌性疾病有關之肽)。

【0299】在一些實施例中，使用光學方法來選擇或鑑別免疫原性抗原。在一些實施例中，使用條碼化探針來選擇或鑑別免疫原性抗原。在一些實施例中，使用包括靶特異性區域及條碼化區域之條碼化探針來選擇或

鑑別免疫原性抗原。在一些實施例中，靶特異性區域包括雜交至靶多核苷酸之核酸序列或與其具有至少約90%、95%或100%序列互補性之核酸序列。

製備經活化抗原特異性T細胞

【0300】 本文提供刺激T細胞之方法。舉例而言，可使用本文所提供之方法來刺激抗原特異性T細胞。可使用本文所提供之方法來誘導或活化T細胞。舉例而言，可使用本文所提供之方法來擴增經活化T細胞。舉例而言，可使用本文所提供之方法來誘導幼稚T細胞。舉例而言，可使用本文所提供之方法來擴增抗原特異性$CD8^+$ T細胞。舉例而言，可使用本文所提供之方法來擴增抗原特異性$CD4^+$ T細胞。舉例而言，可使用本文所提供之方法來擴增具有記憶表型之抗原特異性$CD8^+$ T細胞。舉例而言，治療組合物可包括抗原特異性CD8+ T細胞。舉例而言，治療組合物可包括抗原特異性記憶性T細胞。

【0301】 可使用包括新抗原性肽或編碼新抗原性肽之多核苷酸之組合物離體活化T細胞。

【0302】 可使用包括加載抗原之抗原呈現細胞之組合物離體活化T細胞。

【0303】 在一些實施例中，APC及/或T細胞係衍生自獲得自個體之生物試樣。

【0304】 在一些實施例中，APC及/或T細胞係衍生自為周邊血單核細胞(PBMC)之生物試樣。

【0305】 在一些實施例中，在獲得用於製備APC及/或T細胞之生物試樣之前，向個體投與FLT3L。

【0306】在一些實施例中，APC及/或T細胞係衍生自為白血球分離試樣之生物試樣。

【0307】在一些實施例中，首先向抗原呈現細胞離體加載新抗原性肽且用於製備經新抗原活化之T細胞。在一些實施例中，本文所提供之組合物包括由APC (例如預加載抗原肽之APC)刺激之T細胞。組合物可包括含有來自試樣(例如生物試樣)之T細胞之免疫細胞群體，其中T細胞包括經APC刺激之T細胞。在一些實施例中，將編碼一或多個新抗原性肽之mRNA引入APC中以表現新抗原性肽。使用該等APC來刺激或活化T細胞。

【0308】在一些實施例中，生物試樣包括一定百分比之至少一種抗原特異性T細胞，在組合物中為至少約0.00001%、0.00002%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%。在一些實施例中，相對於衍生自周邊血或白血球分離之生物試樣中之總細胞計數，生物試樣包括小於0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%或小於10%之經抗原活化之T細胞。在一些實施例中，相對於衍生自周邊血或白血球分離之生物試樣中之總細胞計數，生物試樣包括小於1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%之經抗原活化之T細胞。

在一些實施例中，生物試樣包括抗原幼稚T細胞。在一些實施例中，相對於衍生自周邊血或白血球分離之生物試樣中之總細胞計數，生物試樣包括大於約0.00001%、0.00002%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、

0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%之抗原幼稚細胞。

在一些實施例中，在衍生自周邊血或白血球分離之生物試樣中，組合物中之至少一種抗原特異性$CD8^+$ T細胞之百分比小於約0.00001%、0.00002%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%。在一些實施例中，在衍生自周邊血或白血球分離之生物試樣中，組合物中之至少一種抗原特異性$CD4^+$ T細胞之百分比為至少約0.00001%、0.00002%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%。

在一些實施例中，生物試樣中之至少一種抗原特異性T細胞之百分比為總免疫細胞之至多約0.00001%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%或0.5%。在一些實施例中，生物試樣中之至少一種抗原特異性$CD8^+$ T細胞之百分比為總免疫細胞之至多約0.00001%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%或0.5%。在一些實施例中，生物試樣中之至少一種抗原特異性$CD4^+$ T細胞之百分比為總免疫細胞之至多約0.00001%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%或0.5%。在一些實施例中，生物試樣中之抗原特異性T細胞之百分比為至多約0.5%。在一些實施例中，生物試樣中之新抗原特異性$CD8^+$ T細

胞之百分比為至多約0.5%。在一些實施例中，生物試樣中之抗原特異性$CD4^+$ T細胞之百分比為至多約0.5%。

製備加載新抗原之APC

【0309】 在一些實施例中，組合物包括已與一或多種細胞介素、生長因子或配體(例如結合至APC或T細胞之細胞表面受體之配體)一起培育之免疫細胞群體。該等細胞介素、生長因子及配體之非限制性實例包含(但不限於) GM-CSF、IL-4、IL-7、FLT3L、TNF-α、IL-1β、IL-15、PGE1、IL-6、IFN-α、IFN-γ、R848、LPS、ss-rna40及聚I:C。在一些實施例中，組合物包括已與一或多種APC或APC製劑一起培育之免疫細胞群體。舉例而言，組合物可包括已與一或多種經細胞介素、生長因子及/或配體刺激之APC或經細胞介素、生長因子及/或配體刺激之APC製劑一起培育之免疫細胞群體。舉例而言，組合物可包括已與一或多種經細胞介素刺激之APC或經細胞介素刺激之APC製劑一起培育之免疫細胞群體。舉例而言，組合物可包括已與一或多種經生長因子刺激之APC或經生長因子刺激之APC製劑一起培育之免疫細胞群體。舉例而言，組合物可包括已與一或多種經配體刺激之APC或經配體刺激之APC製劑一起培育之免疫細胞群體。

【0310】 在一些實施例中，APC係自體APC、同種異體APC或人工APC。

【0311】 免疫細胞之特徵在於細胞表面分子。在一些實施例中，較佳地基於細胞表面標記物藉由使用可結合至細胞表面受體之抗體(例如)自生物試樣來選擇免疫細胞。在一些實施例中，負向選擇一些細胞以富集一或多種不表現負向選擇所針對之細胞表面分子之細胞類型。

【0312】在一些實施例中，藉由自可在新抗原性肽存在下培養之APC或前體細胞進行選擇以生成用於活化T細胞之加載新抗原之APC自生物試樣來製備抗原呈現細胞(APC)。用於選擇及/或富集細胞組之一些相關細胞表面標記物闡述於下文中。

【0313】CD1 (分化簇1)係表現於各種人類抗原呈現細胞之表面上之醣蛋白之家族。其與I類MHC分子相關，且參與脂質抗原至T細胞之呈現。

【0314】CD11b或整聯蛋白α M (ITGAM)係一種形成異源二聚體整聯蛋白α-M β-2 ($\alpha_M\beta_2$)分子(亦稱為巨噬球-*1*抗原*(*Mac-1)或*補體受體3*(CR3))之蛋白質亞單元。ITGAM亦稱為CR3A及分化簇分子11b (CD11b)。$\alpha_M\beta_2$之第二鏈係稱為CD18之公共整聯蛋白β_2亞單元，且整聯蛋白$\alpha_M\beta_2$由此屬β_2亞家族(或白血球)整聯蛋白。$\alpha_M\beta_2$表現於許多參與先天性免疫系統之白血球(包含單核球、顆粒球、巨噬球及天然殺手細胞)之表面上。其藉由調控白血球黏附及遷移來介導發炎且參與若干免疫過程(例如吞噬作用、細胞介導之細胞毒性、趨化及細胞活化)。其因能夠結合不活化補體組分3b (iC3b)而參與補體系統。整聯蛋白$\alpha_M\beta_2$之ITGAM (α)亞單元直接參與引起細胞之黏附及擴散，但不能在β2 (CD18)亞單元不存在下調介細胞遷移。

【0315】CD11c (亦稱為整聯蛋白α X (補體組分3受體4亞單元) (ITGAX))係編碼CD11c之基因。CD11c係整聯蛋白α X鏈蛋白。整聯蛋白係由α鏈及β鏈構成之異源二聚體膜主體蛋白。此蛋白質與β 2鏈(ITGB2)組合形成稱為不活化-C3b (iC3b)受體4 (CR4)之白血球特異性整聯蛋白。α X β 2複合物似乎與α M β 2整聯蛋白在使嗜中性球及單核球黏附至經刺

激內皮細胞及補體塗覆顆粒之吞噬作用方面具有重疊性質。CD11c係以高含量發現於大部分人類樹突狀細胞以及單核球、巨噬球、嗜中性球及一些B細胞上之I類跨膜蛋白，其誘導細胞活化且幫助觸發嗜中性球呼吸爆發；並表現於毛細胞白血病、急性非淋巴球性白血病及一些B細胞慢性淋巴球性白血病中。

【0316】 CD14係優先表現於單核球/巨噬球上之表面抗原。其與其他蛋白質協作以調介對細菌脂多醣之先天性免疫反應。選擇式剪接會產生多種編碼相同蛋白質之轉錄物變體。CD14以兩種形式存在，一種形式藉由醣基磷酸肌醇尾部錨定至膜(mCD14)，另一種係可溶性形式(sCD14)。可溶性CD14出現於mCD14脫落之後(48 kDa)或自細胞內囊泡直接分泌(56 kDa)。CD14用作用於檢測細菌脂多醣(LPS)之共受體(與類鐸受體TLR 4及MD-2一起)。CD14可僅在脂多醣結合蛋白(LBP)存在下結合LPS。儘管LPS可視為其主要配體，但CD14亦識別其他病原體相關分子模式例如(脂磷壁酸)。

【0317】 CD25由習用T細胞在刺激之後表現，且已展示，在人類周邊血中，僅$CD4^+CD25^{hi}$T細胞係「抑制劑」。

【0318】 在一些實施例中，APC包括樹突狀細胞(DC)。在一些實施例中，APC係衍生自$CD14^+$單核球。在一些實施例中，可自皮膚、脾、骨髓、胸腺、淋巴結、周邊血或臍帶血獲得APC。在一些實施例中，$CD14^+$單核球係來自個體中包括PBMC之生物試樣。舉例而言，可自個體中包括PBMC之生物試樣分離、富集或純化$CD14^+$單核球。在一些實施例中，使用一或多種細胞介素或生長因子刺激$CD14^+$單核球。在一些實施例中，一或多種細胞介素或生長因子包括GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-

1β、PGE1、IL-6、IL-7、IL-15、IFN-γ、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40、聚I:C或其組合。在一些實施例中，$CD14^+$單核球係來自包括PBMC之第二生物試樣。

【0319】 在一些實施例中，可富集或實質上富集經分離APC群體。在一些實施例中，經分離APC群體係至少30%、至少50%、至少75%或至少90%均質。在一些實施例中，經分離APC群體係至少60%、至少75%或至少90%均質。APC (例如APC)可包含(例如)以培養物形式衍生自單核球樹突狀前體之APC以及存在於組織(例如周邊血、臍帶血、皮膚、脾、骨髓、胸腺及淋巴結)中之內源衍生性APC。

【0320】 可藉由亦由本發明提供之方法來分離APC及實質上富集APC之細胞群體。該等方法通常包含獲得包含APC前體之細胞群體，使APC前體分化為不成熟或成熟APC，且亦可包含自經分化不成熟或成熟APC之群體分離APC。

【0321】 可藉由業內已知方法來獲得APC前體細胞。可(例如)藉由密度梯度分離、螢光活化細胞分選(FACS)、免疫學細胞分離技術(例如淘選)、補體裂解、玫瑰花結(rosetting)、磁細胞分離技術、耐綸(nylon)毛分離及該等方法之組合來分離APC前體。免疫選擇APC之方法包含(例如)使用與APC前體締合之細胞表面標記物之抗體(例如偶合至受質之抗CD34及/或抗CD14抗體)。

【0322】 亦可獲得APC前體之經富集群體。業內已知獲得該等經富集前體群體之方法。舉例而言，可藉由選擇性去除黏附至受質之細胞自組織來源來分離APC前體之經富集群體。使用組織來源(例如骨髓或周邊血)，可使用經商業處理之塑膠受質(例如珠粒或磁珠)自細胞製劑去除黏

附性單核球以獲得富集非黏附性APC前體之群體。

【0323】 亦可藉由使用APC前體黏附受質自組織來源獲得單核球APC前體。舉例而言，使藉由(例如)白血球分離進行分離之周邊血白血球與具有高表面積對體積比率之單核球APC前體黏附受質接觸且分離黏附性單核球APC前體。在其他實施例中，所偶合受質可為具有高表面對體積比率之微粒或纖維性受質，例如微珠、微載體珠粒、糰粒、顆粒、粉末、毛細管、微絨毛膜及諸如此類。另外，微粒或纖維性受質可為玻璃、聚苯乙烯、塑膠、經玻璃塗覆之聚苯乙烯微珠及諸如此類。

【0324】 亦可在活體外培養APC前體以達成分化及/或擴增。業內已知分化/擴增APC前體之方法。通常，可藉由在至少一種誘導APC (例如樹突狀細胞)分化/增殖之細胞介素存在下培養前體來達成擴增。通常，該等細胞介素係顆粒球群落刺激因子(G-CSF)或顆粒球/巨噬球群落刺激因子(GM-CSF)。另外，可使用其他試劑來抑制培養物中之非APC細胞類型之增殖及/或成熟，由此進一步富集APC前體群體。通常，該等試劑包含諸如IL-13、IL-4或IL-15及諸如此類等細胞介素。

【0325】 培養經分離APC前體群體且分化以獲得不成熟或成熟APC。適宜組織培養基包含(例如)(但不限於) AIM-V®、RPMI 1640、DMEM、X-VIVO及諸如此類。組織培養基通常補充有胺基酸、維他命、二價陽離子及細胞介素以促進前體朝向APC表型之分化。通常，促進分化之細胞介素係GM-CSF及/或IL-4。

【0326】 另外，APC前體在擴增、分化及成熟至APC表型期間之培養物可包含血漿以促進APC之發育。典型血漿濃度為約5%。另外，在(例如)藉由黏附至受質來分離APC前體之情形下，可在黏附步驟期間於培養

基中包含血漿以促進培養早期之$CD14^+$表型。黏附期間之典型血漿濃度為約1%或更高。

【0327】 可將單核球APC前體培養任一適宜時間。在某些實施例中，使前體分化為不成熟APC之適宜培養時間可為約1天至約10天(例如約4天至約7天)。可藉由熟習此項技術者已知之方法來監測不成熟APC自前體之分化，例如藉由細胞表面標記物(例如$CD11c^+$、$CD83^{低}$、$CD86^{-/低}$、$HLA\text{-}DR^+$)之存在或不存在。亦可在適當組織培養基中培養不成熟APC以使不成熟APC維持於用於進一步分化或抗原攝取、處理及呈現之狀態中。舉例而言，可在GM-CSF及IL-4存在下維持不成熟APC。

【0328】 在一些實施例中，可在分化之前分離APC前體。在一些實施例中，經分離群體可富集或實質上富集APC前體。在一些實施例中，使用CD14特異性探針分離APC前體。在一實例性實施例中，藉由FACS使用直接偶聯至螢光分子(例如FITC或PE)之CD14特異性探針或使用未標記CD14特異性抗體及對第一抗體具有特異性之經標記第二抗體來檢測CD14表現細胞。亦可藉由FACS分選自$CD14^{低}$及$CD14^-$細胞來分離$CD14^+$細胞。可參照(例如) PBMC源單核球上之CD14染色來決定$CD14^{高}$陽性的選通。通常，CD14特異性結合劑係(例如)抗CD14抗體(例如單株或其抗原結合片段)。適用於本發明中之諸多抗CD14抗體為熟習此項技術者所熟知且許多抗體可商購。可在分離後分化為不成熟APC (CD14陰性)。

【0329】 在另一實施例中，使CD14特異性探針偶合至受質且藉由親和力選擇來分離$CD14^+$細胞。使包含$CD14^+$細胞之細胞群體暴露於偶合受質且使$CD14^+$細胞進行特異性黏附。然後自受質洗滌非黏附性$CD14^-$細胞，且然後洗脫黏附性細胞以獲得實質上富集APC前體之經分離細胞群

體。CD14特異性探針可為(例如)抗CD14抗體。受質可為(例如)市售組織培養板或珠粒(例如玻璃或磁珠)。通常已知使用對表面標記物具有特異性之受質偶合抗體來親和分離細胞群體之方法。

【0330】 在培養期間，不成熟APC可視情況暴露於預定抗原。適宜預定抗原可包含期望T細胞調節之任一抗原。在一實施例中，在前列腺特異性膜抗原(PSMA)存在下培養不成熟APC以用於癌症免疫療法及/或腫瘤生長抑制。其他抗原可包含(例如)細菌細胞、病毒、經部分純化或經純化之細菌或病毒抗原、腫瘤細胞、腫瘤特異性或腫瘤相關抗原(例如腫瘤細胞溶解物、腫瘤細胞膜製劑、自腫瘤分離之抗原、融合蛋白、脂質體及諸如此類)、在其表面上表現抗原之重組細胞、自體抗原及任一其他抗原。任一抗原亦可呈現為肽或重組產生之蛋白質或其部分。在與抗原接觸後，可將細胞培養任一適宜時間以容許抗原攝取及處理、擴增抗原特異性APC群體及諸如此類。

【0331】 舉例而言，在一實施例中，可在抗原攝取後培養不成熟APC以促進不成熟APC成熟成在MHC分子背景中呈現抗原之成熟APC。APC成熟之方法已為人所知。可(例如)藉由在已知成熟因子(例如細胞介素(例如TNF-α、IL-1β或CD40配體)、細菌產物(例如LPS或BCG)及諸如此類)存在下進行培養實施該等成熟。可藉由業內已知方法來監測不成熟APC至成熟APC之成熟，例如藉由量測細胞表面標記物之存在或不存在(例如CD83、CD86及MHC分子之上調)或使用(例如)寡核苷酸陣列測試成熟APC特異性mRNA或蛋白質之表現。

【0332】 視情況，可在適當組織培養基中培養不成熟APC以擴增細胞群體及/或將不成熟APC維持於用於進一步分化或抗原攝取之狀態中。

舉例而言，可在GM-CSF及IL-4存在下維持及/或擴增不成熟APC。同樣，可在抗發炎性分子(例如抗發炎性細胞介素，例如IL-10及TGF-β)存在下培養不成熟APC以抑制不成熟APC之成熟。

【0333】 在另一態樣中，經分離APC群體富集成熟APC。可藉由在如上文所闡述之成熟因子(例如細菌產物及/或促發炎性細胞介素)存在下培養經分化不成熟APC群體以由此誘導成熟來獲得經分離成熟APC群體。可藉由去除CD14+細胞來分離不成熟APC。

【0334】 根據本發明之又一態樣，可在暴露於適宜抗原之前或在暴露後(例如)藉由冷凍保存來保存APC。可使用之冷凍保存劑包含(但不限於)二甲基亞碸(DMSO)、甘油、聚乙烯基吡咯啶酮、聚乙二醇、白蛋白、右旋糖酐、蔗糖、乙二醇、i-赤藻糖醇、D-核糖醇、D-甘露醇、D-山梨醇、i-肌醇、D-乳糖、氯化膽鹼、胺基酸、甲醇、乙醯胺、甘油單乙酸酯及無機鹽。受控之緩慢冷卻速率可能較為關鍵。不同冷凍保存劑及不同細胞類型通常具有不同之最佳冷卻速率。融合期(其中水變成冰)之熱量通常應最少。可藉由使用(例如)可程式化冷凍器件或甲醇浴程序來實施冷卻程序。可程式化冷凍裝置容許測定最佳冷卻速率且有利於標準可重現冷卻。可程式化受控速率冷凍器(例如Cryomed或Planar)允許將冷凍方案調整至期望冷卻速率曲線。

【0335】 在充分冷凍之後，可將APC快速轉移至長期冷凍儲存器皿中。在一典型實施例中，可將試樣冷凍儲存於液氮(-196℃)或其蒸氣(-165℃)中。關於操縱、冷凍保存及長期儲存尤其來自骨髓或周邊血之造血幹細胞考慮因素及程序大多適用於本發明APC。

【0336】 較佳地使冷凍細胞迅速解凍(例如在維持於37-41℃之水浴

中)且在解凍後立即冷凍。可期望處理細胞以防止細胞在解凍後凝集。為防止凝集，可使用各種程序，包含(但不限於)在冷凍之前及/或之後添加DNAse、低分子量右旋糖酐及檸檬酸鹽、羥乙基澱粉及諸如此類。若在人類中具有毒性，則應在治療性使用解凍APC之前去除冷凍保存劑。用以去除冷凍保存劑之一種方式係稀釋至極小濃度。一旦冷凍APC經解凍並恢復，則其即可用於如本文針對未冷凍APC所闡述來活化T細胞。

【0337】 在一態樣中，用於T細胞活化之組合物包括已耗竭一或多種類型之免疫細胞之免疫細胞群體。舉例而言，組合物可包括已耗竭一或多種類型之表現一或多種蛋白質(例如一或多種細胞表面受體)之免疫細胞之免疫細胞群體。在一些實施例中，組合物包括來自生物試樣之免疫細胞群體，該免疫細胞群體包括至少一種包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞，其中該群體中表現CD14及/或CD25之免疫細胞之量相應地不同於生物試樣中表現CD14及/或CD25之免疫細胞之量。舉例而言，組合物可包括來自生物試樣之免疫細胞群體，該免疫細胞群體包括至少一種包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞，其中該群體中表現CD14之免疫細胞之量相應地不同於生物試樣中表現CD14之免疫細胞之量。舉例而言，組合物可包括來自生物試樣之免疫細胞群體，該免疫細胞群體包括至少一種包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞，其中該群體中表現CD25之免疫細胞之量相應地不同於生物試樣中表現CD25之免疫細胞之量。舉例而言，組合物可包括來自生物試樣之免疫細胞群體，該免疫細胞群體包括至少一種包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞，其中該群體中表現CD14

及CD25之免疫細胞之量相應地不同於生物試樣中表現CD14及CD25之免疫細胞之量。舉例而言，組合物可包括來自生物試樣之免疫細胞群體，其中該群體中表現CD14及CD25之免疫細胞之量相應地小於生物試樣中表現CD14及CD25之免疫細胞之量。

【0338】 本文提供製備用於癌症免疫療法之細胞組合物之方法，其包括：I.製備加載抗原之抗原呈現細胞(APC)，其包括：(a)自經FMS樣酪胺酸激酶3配體(FLT3L)預治療之個體獲得周邊血單核細胞(PBMC)；(b)使PBMC與以下各項離體接觸：(i)複數個癌症新抗原肽或一或多個編碼複數個癌症新抗原肽之多核苷酸，且其中每一癌症新抗原肽或其部分結合至由表現於個體中之HLA等位基因編碼之蛋白質，(ii)用於活化細胞之刺激劑，(iii)促進離體細胞生長及維持之試劑，由此獲得細胞群體，及(iv)用於自細胞群體減少或耗竭CD11b+細胞以獲得$CD11b^{低}$或CD11b耗竭且加載抗原之APC；II.使經分離T細胞與$CD11b^{低}$或CD11b耗竭且加載抗原之APC離體接觸；III.製備用於癌症免疫療法之細胞組合物之抗原引發性T細胞。

【0339】 本文提供離體製備腫瘤抗原特異性T細胞之經改良方法，該方法包括(a)自包括抗原呈現細胞(APC)及T細胞之免疫細胞群體耗竭CD14+細胞及/或CD25+細胞，由此形成包括APC及T細胞之第一群體之CD14及/或CD25耗竭之免疫細胞群體，其中該免疫細胞群體係來自人類個體之生物試樣；(b)將來自步驟(a)之APC及T細胞之第一群體在以下各項存在下培育第一時間段：(i) FMS樣酪胺酸激酶3受體配體(FLT3L)及(ii) (A)包括至少一個由患有癌症之人類個體之癌細胞表現之腫瘤抗原表位序列之多肽或(B)編碼該多肽的多核苷酸；由此形成包括經刺激T細胞之

細胞群體；(c)擴增來自步驟(b)之經刺激T細胞，由此形成包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體，其中腫瘤抗原特異性T細胞包括對包括(i)至少一個來自步驟(b)(ii)之腫瘤抗原表位序列及(ii)由(b)(ii)中人類個體之癌細胞或APC表現之MHC蛋白之複合物具有特異性的T細胞。本文提供一種方法，其包括向人類個體投與來自(c)之經擴增細胞群體，其中來自步驟(c)之經擴增細胞群體總共包括1×10^{8}至1×10^{11}個細胞。

【0340】 在一些實施例中，在PBMC分離或白血球分離之前至少約1小時、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、12小時、1天、2天、3天、4天、5天、6天或1週，使用FLT3L預治療個體。在一些實施例中，在PBMC分離或白血球分離之前至少約1週、2週、3週、4週或5週，使用FLT3L預治療個體。

【0341】 在一些實施例中，細胞群體富集CD11c+細胞。在一些實施例中，加載抗原之APC包括樹突狀細胞(DC)。在一些實施例中，加載抗原之APC包括漿細胞樣樹突狀細胞(pDC)。在一些實施例中，加載抗原之APC包括CD1c+ DC。在一些實施例中，加載抗原之APC包括CD141+ DC。在一些實施例中，細胞群體包括巨噬球。在一些實施例中，該方法進一步包括自細胞群體減少或耗竭CD19+細胞以活化或富集經新抗原活化之T細胞。在一些實施例中，該方法進一步包括自細胞群體減少或耗竭CD11b+細胞及CD19+細胞二者以活化或富集經新抗原活化之T細胞。

【0342】 在一些實施例中，該方法進一步包括自細胞群體減少或耗竭CD14+細胞以製備及富集經抗原活化之T細胞。在一些實施例中，該方法進一步包括自細胞群體減少或耗竭CD25+細胞以製備及富集經抗原活化之T細胞。在一些實施例中，該方法進一步包括自細胞群體減少或耗竭

CD19+細胞、CD14+細胞、CD25+細胞或CD11b+細胞中之一或多者以活化或富集經新抗原活化之T細胞。

【0343】 在一些實施例中，用於活化細胞之刺激劑包括FL3TL。

【0344】 在一些實施例中，促進離體細胞生長及維持之試劑包括生長因子、細胞介素、胺基酸、補充劑或其組合。

【0345】 在一些實施例中，加載抗原之APC可刺激T細胞2、3、4、5、6或7天。

【0346】 在一些實施例中，複數個癌症新抗原肽中之每一者長8-30個胺基酸。

【0347】 在一些實施例中，複數個新抗原性肽中之每一者包括新抗原性表位。在一些實施例中，複數個癌症新抗原肽包括2、3、4、5、6、7或8個新抗原性肽；且複數個新抗原性肽中之每一者具有如先前部分中所闡述之新抗原性肽特性。

【0348】 在一些實施例中，用於製備加載抗原之APC之新抗原性肽係包括至少20個胺基酸或至少30個胺基酸或至少40個胺基酸或至少50個胺基酸或其間任一數量之胺基酸之長肽。在一些實施例中，用於製備加載抗原之APC之新抗原性肽包括側接於突變之任一側之胺基酸，該等胺基酸促進了新抗原性肽之內源性處理以增加呈現至T細胞之速率。

【0349】 可以若干方式來設計較長免疫原性肽。在一些實施例中，在預測或已知HLA結合肽時，較長免疫原性肽可由以下各項組成：(1)個別結合肽，其朝向每一相應基因產物之N-末端及C-末端延伸2-5個胺基酸；或(2)一些或所有結合肽之序連體，其中每一結合肽具有延伸序列。在其他實施例中，在測序揭示長(>10個殘基)表位序列(例如存在於腫瘤中

之新表位(例如因產生新穎肽序列之框移、連讀或內含子納入))時，較長新抗原肽可由新穎腫瘤特異性胺基酸之整個片段組成且呈單一較長肽或若干重疊較長肽形式。在一些實施例中，假定使用較長肽可容許藉由患者細胞進行內源性處理且可更有效地呈現抗原並誘導T細胞反應。在一些實施例中，可使用兩個或更多個肽，其中肽發生重疊且在長新抗原肽上有所傾斜。

【0350】 在一些實施例中，複數個新抗原性肽中之每一者包括相同新抗原性表位。在一些實施例中，複數個新抗原性肽包括一個以上新抗原性表位。

【0351】 在一些實施例中，編碼複數個癌症新抗原肽之一或多個多核苷酸係DNA。

【0352】 在一些實施例中，編碼複數個癌症新抗原肽之一或多個多核苷酸插入一或多個哺乳動物表現載體中。

【0353】 在一些實施例中，編碼複數個癌症新抗原肽之一或多個多核苷酸係信使RNA。

【0354】 在一些實施例中，本發明提供包括經修飾核苷之RNA、寡核糖核苷酸及多核糖核苷酸分子。

【0355】 在一些實施例中，本發明提供包括RNA、寡核糖核苷酸及多核糖核苷酸之基因療法載體。

【0356】 在一些實施例中，本發明提供基因療法方法及包括其之基因轉錄沉默方法。

【0357】 在一些實施例中，多核苷酸編碼單一新抗原性肽。

【0358】 在一些實施例中，一個多核苷酸編碼一個以上新抗原性

肽。

【0359】 在一些實施例中，多核苷酸係信使RNA。在一些實施例中，每一信使RNA包括用於兩個或更多個串聯新抗原性肽之編碼序列。

【0360】 在一些實施例中，每一信使RNA包括用於2、3、4、5、6、7、8、9或10個或更多個新串聯抗原性肽之編碼序列。通常，mRNA包括5'-UTR、蛋白質編碼區及3'-UTR。mRNA在細胞中及在活體外僅擁有有限半衰期。在一些實施例中，mRNA係自擴增mRNA。在本發明之上下文中，可藉由自DNA模板進行活體外轉錄來生成mRNA。活體外轉錄方法為熟習此項技術者所已知。舉例而言，存在各種市售活體外轉錄套組。

【0361】 可改良RNA之穩定性及轉譯效率。舉例而言，可藉由一或多個具有穩定效應及/或增加RNA轉譯效率之修飾來穩定RNA且增加其轉譯。該等修飾闡述於(例如)以引用方式併入本文中之PCT/EP2006/009448中。為增加用於本發明之RNA之表現，可在編碼區(亦即編碼所表現肽或蛋白質之序列)內進行修飾，其中不改變所表現肽或蛋白質之序列，從而增加GC含量以增加mRNA穩定性並實施密碼子最佳化，且由此增強細胞中之轉譯。

【0362】 在一些實施例中，mRNA可包含多個新抗原性表位。在一些實施例中，可使用可編碼新生ORF之長多核糖核苷酸序列，例如編碼新生ORF之突變GATA3序列。在一些實施例中，將具有包括編碼新抗原性肽之序列之基因之大部分或甚至整個編碼區的mRNA遞送至免疫細胞中以供內源性處理及抗原呈現。

【0363】 在一些實施例中，用於每一新抗原性肽之編碼序列長24-

120個核苷酸。

【0364】在一些實施例中，mRNA長50-10,000個核苷酸。在一些實施例中，mRNA長100- 10,000個核苷酸。在一些實施例中，mRNA長200-10,000個核苷酸。在一些實施例中，mRNA長50-5,000個核苷酸。在一些實施例中，mRNA長100-5,000個核苷酸。在一些實施例中，mRNA長100-1,000個核苷酸。在一些實施例中，mRNA長300-800個核苷酸。在一些實施例中，mRNA長400-700個核苷酸。在一些實施例中，mRNA長450-600個核苷酸。在一些實施例中，mRNA長至少200個核苷酸。在一些實施例中，mRNA係大於250個核苷酸、大於300個核苷酸、大於350個核苷酸、大於400個核苷酸、大於450個核苷酸、大於500個核苷酸、大於550個核苷酸、大於600個核苷酸、大於650個核苷酸、大於700個核苷酸、大於750個核苷酸、大於800個核苷酸、大於850個核苷酸長、大於900個核苷酸長、大於950個核苷酸長、大於1000個核苷酸長、大於2000個核苷酸長、大於3000個核苷酸長、大於4000個核苷酸長或大於5000個核苷酸長。

【0365】在一些實施例中，修飾編碼一或多個新抗原性肽之mRNA，其中該修飾係關於5’-UTR。在一些實施例中，修飾係關於在5’-UTR中向RNA提供5'帽或5’帽類似物。術語「5'帽」係指發現於mRNA分子之5'端之帽結構，且通常由經由獨特5'至5'三磷酸鹽鍵聯連結至mRNA之鳥苷核苷酸組成。在一些實施例中，此鳥苷在7位處發生甲基化。術語「習用5'帽」係指天然RNA 5'帽，亦即7-甲基鳥苷帽(m G)。在本發明之上下文中，術語「5'帽」包含5'帽類似物，該類似物類似於RNA帽結構且經修飾以能夠在活體內及/或在細胞中穩定RNA及/或增強RNA (若附接至

其上)之轉譯。在一些實施例中，以共轉錄方式將mRNA封端。

【0366】 在一些實施例中，編碼一或多個新抗原性肽之mRNA包括含有聚A尾部之3'-UTR。在一些實施例中，聚A尾部長100-200 bp。在一些實施例中，聚A尾部長於20個核苷酸。在一些實施例中，聚A尾部長於50個核苷酸。在一些實施例中，聚A尾部長於60個核苷酸。在一些實施例中，聚A尾部長於70個核苷酸。在一些實施例中，聚A尾部長於80個核苷酸。在一些實施例中，聚A尾部長於90個核苷酸。在一些實施例中，聚A尾部長於100個核苷酸。在一些實施例中，聚A尾部長於110個核苷酸。在一些實施例中，聚A尾部長於120個核苷酸。在一些實施例中，聚A尾部長於130個核苷酸。在一些實施例中，聚A尾部長於140個核苷酸。在一些實施例中，聚A尾部長於150個核苷酸。在一些實施例中，聚A尾部長於160個核苷酸。在一些實施例中，聚A尾部長於170個核苷酸。在一些實施例中，聚A尾部長於180個核苷酸。在一些實施例中，聚A尾部長於190個核苷酸。在一些實施例中，聚A尾部長於200個核苷酸。在一些實施例中，聚A尾部長於210個核苷酸。在一些實施例中，聚A尾部長於220個核苷酸。在一些實施例中，聚A尾部長於230個核苷酸。在一些實施例中，聚A尾部長於100個核苷酸。在一些實施例中，聚A尾部長於240個核苷酸。在一些實施例中，聚A尾部長於100個核苷酸。在一些實施例中，聚A尾部為約250個核苷酸。

【0367】 在一些實施例中，聚A尾部包括100-250個腺苷單元。在一些實施例中，聚A尾部包括120-130個腺嘌呤單元。在一些實施例中，聚A尾部包括120個腺嘌呤單元。在一些實施例中，聚A尾部包括121個腺嘌呤單元。在一些實施例中，聚A尾部包括122個腺嘌呤單元。在一些實施例

中，聚A尾部包括123個腺嘌呤單元。在一些實施例中，聚A尾部包括124個腺嘌呤單元。在一些實施例中，聚A尾部包括125個腺嘌呤單元。在一些實施例中，聚A尾部具有129個鹼基。

【0368】在一些實施例中，用於兩個連續新抗原性肽之編碼序列由間隔體或連接體隔開。

【0369】在一些實施例中，間隔體或連接體包括最多5000個核苷酸殘基。實例性間隔體序列係GGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGC。另一實例性間隔體序列係GGCGGCAGCCTGGGCGGCGGCGGCAGCGGC。另一實例性間隔體序列係GGCGTCGGCACC。另一實例性間隔體序列係CAGCTGGGCCTG。另一實例性間隔體係編碼離胺酸之序列，例如AAA或AAG。另一實例性間隔體序列係CAACTGGGATTG。

【0370】在一些實施例中，mRNA包括一或多個其他結構以增強抗原表位處理及APC呈現。

【0371】在一些實施例中，連接體或間隔體區域可含有裂解位點。裂解位點可確保將包括表位序列串之蛋白質產物裂解成用於呈現之單獨表位序列。較佳裂解位點位於毗鄰某些表位處以避免序列內表位之不慎裂解。在一些實施例中，編碼表位串之mRNA上之表位及裂解區之設計係非隨機的。

【0372】在某些實施例中，將編碼本發明之新抗原肽之mRNA投與有需要之個體。在一些實施例中，擬投與mRNA包括至少一個經修飾磷酸核苷。

【0373】在一些實施例中，使用新抗原性肽藉由人工抗原呈現細胞

來活化T細胞。在一些實施例中，使用人工架構利用新抗原性肽來活化T細胞，該等人工架構加載有新抗原性肽以及該新抗原性肽可以高親和力結合之MHC抗原。

【0374】 在一些實施例中，其他結構包括來自群MITD、SP1及第10纖連蛋白結構域：10FnIII之蛋白質之編碼特異性結構域。

【0375】 在一些實施例中，使衍生自周邊血或白血球分離之細胞與複數個癌症新抗原肽或編碼複數個癌症新抗原肽之一或多個多核苷酸接觸一次或一次以上以製備加載抗原之APC。

【0376】 在一些實施例中，該方法包括將APC或一或多種APC製劑與包括至少一種細胞介素或生長因子之第一培養基一起培育第一時間段。

【0377】 在一些實施例中，該方法包括將一或多種APC製劑與至少一種肽一起培育第二時間段。

【0378】 在一些實施例中，經富集細胞進一步包括CD1c+細胞。

【0379】 在一些實施例中，細胞群體富集CD11c+及CD141+細胞。

【0380】 在一些實施例中，包括加載抗原之APC之細胞群體包括大於1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%或更多之CD11c+細胞。

【0381】 在一些實施例中，包括加載抗原之APC之細胞群體包括小於95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、20%、10%、8%、7%、6%、5%、4%或更低比例之CD11b+表現細胞。

【0382】 在一些實施例中，包括加載抗原之APC之細胞群體包括大

於1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%之CD11c+新抗原性肽表現細胞。

【0383】 在一些實施例中，包括加載抗原之APC之細胞群體包括大於1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%之係CD11c+ CD1c+或CD141+細胞之新抗原性肽表現細胞。

【0384】 在一些實施例中，加載新抗原之APC包括成熟APC。

【0385】 在一些實施例中，該方法包括自個體獲得包括至少一種APC及至少一種PBMC或至少一種T細胞之生物試樣。

【0386】 在一些實施例中，該方法包括自生物試樣耗竭表現CD14及/或CD25及/或CD19之細胞，由此獲得CD14及/或CD25及/或CD19細胞耗竭試樣。

【0387】 在一些實施例中，該方法包括將CD14及/或CD25及/或CD19細胞耗竭試樣與FLT3L一起培育第一時間段。

【0388】 在一些實施例中，該方法包括將至少一種肽與CD14及/或CD25及/或CD19細胞耗竭試樣一起培育第二時間段，由此獲得第一成熟APC載肽試樣。

使用加載新抗原之APC製備經新抗原活化之T細胞

【0389】 在一些實施例中，將藉由上述方法製得之加載新抗原之APC (APC)與T細胞一起培育以獲得經抗原活化之T細胞。該方法可包括生成至少一種抗原特異性T細胞，其中抗原係新抗原。在一些實施例中，

生成至少一種抗原特異性T細胞包括生成複數個抗原特異性T細胞。

【0390】 在一些實施例中，自個體之生物試樣獲得T細胞。

【0391】 在一些實施例中，自衍生APC之同一個體之生物試樣獲得T細胞。在一些實施例中，自與衍生APC之個體不同之個體之生物試樣獲得T細胞。

【0392】 在一些實施例中，APC及/或T細胞係衍生自為周邊血單核細胞(PBMC)之生物試樣。在一些實施例中，APC及/或T細胞係衍生自為白血球分離試樣之生物試樣。

【0393】 在一些實施例中，APC包括樹突狀細胞(DC)。

【0394】 在一些實施例中，APC係衍生自CD14+單核球，或係富集CD14之APC，或係富集CD141之APC。

【0395】 在一些實施例中，CD14+單核球係自個體中包括周邊血單核細胞(PBMC)之生物試樣所富集。

【0396】 在一些實施例中，APC係PBMC。在一些實施例中，PBMC係新分離之PBMC。在一些實施例中，PBMC係冷凍PBMC。在一些實施例中，PBMC係自個體或患者分離之自體PBMC。

【0397】 在一些實施例中，向PBMC加載抗原，其中抗原可為肽或多肽或編碼肽及多肽之多核苷酸(例如mRNA)。PBMC (單核球、DC吞噬細胞)可藉由吞噬作用吸收抗原且將其處理並呈現於表面上以供T細胞活化。加載於PBMC上之肽或多肽可補充有佐劑以增加免疫原性。在一些實施例中，向PBMC加載核酸抗原。核酸抗原可呈包括編碼一或多種抗原之序列之mRNA形式。在一些實施例中，mRNA抗原加載無需補充佐劑，此乃因(例如) RNA可用作自我佐劑。

【0398】在一些實施例中，PBMC係直接分離或自冷凍試樣解凍，且與一或多種抗原(例如新抗原)或包括新抗原之組合物或一或多種編碼一或多種抗原之核酸或多核苷酸一起培育。在一些實施例中，在將PBMC暴露於一或多種抗原或編碼一或多種抗原之核酸之前，PBMC試樣並不進一步培養以供分化或並不進一步使PBMC內之一或多種細胞組分成熟(例如抗原呈現細胞之成熟或單核球至樹突狀細胞之分化)。在一些實施例中，在將細胞暴露於一或多種抗原或編碼一或多種抗原之核酸或一起培育之前，自新分離PBMC細胞群體或新解凍PBMC群體耗竭或去除一或多種細胞類型。在一些實施例中，自PBMC耗竭CD14+細胞。在一些實施例中，自PBMC耗竭CD25+細胞。在一些實施例中，自PBMC耗竭CD11b+細胞。在一些實施例中，在與一或多種抗原或一或多種編碼一或多種抗原之核酸一起培育之前，自PBMC耗竭CD14+及CD25+細胞。在一些實施例中，自PBMC耗竭CD11b+及/或CD14+及/或CD25+細胞。在一些實施例中，本文所提供之方法包括藉由自人類個體之PBMC試樣耗竭CD14+細胞及/或CD25+細胞來製備腫瘤抗原特異性T細胞，該PBMC試樣中所含不成熟樹突狀細胞(DC)之百分比與人類個體之周邊血中不成熟DC之百分比大致相同。在一些實施例中，本文所提供之方法包括藉由自人類個體之PBMC試樣耗竭CD14+細胞及/或CD25+細胞來製備腫瘤抗原特異性T細胞，該PBMC試樣中所含成熟DC之百分比與人類個體之周邊血中成熟DC之百分比大致相同。在一些實施例中，本文所提供之方法包括藉由自人類個體之PBMC試樣耗竭CD14+細胞及/或CD25+細胞來製備腫瘤抗原特異性T細胞，該PBMC試樣中所含不成熟DC與成熟DC之比率與人類個體之周邊血中不成熟DC與成熟DC之比率大致相同。在一些實施例中，本文所

提供之方法包括藉由自人類個體之PBMC試樣耗竭CD14+細胞及/或CD25+細胞來製備腫瘤抗原特異性T細胞，該PBMC試樣尚未經受使不成熟DC成熟至成熟DC之步驟。

【0399】 在一些實施例中，使用一或多種細胞介素或生長因子刺激CD14+單核球。

【0400】 在一些實施例中，一或多種細胞介素或生長因子包括GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7、IL-15、IFN-γ、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40、聚I:C或其組合。

【0401】 在一些實施例中，CD14+單核球係來自包括PBMC之第二生物試樣。

【0402】 在一些實施例中，第二生物試樣係來自同一個體。

【0403】 在一些實施例中，生物試樣包括周邊血單核細胞(PBMC)。

【0404】 在一些實施例中，在包括IL-7、IL-15、吲哚胺2,3-二氧酶-1 (IDO)抑制劑、抗PD-1抗體、IL-12或其組合之培養基中刺激至少一種抗原特異性T細胞。

【0405】 在一些實施例中，IDO抑制劑係埃帕司他、納伏昔莫德(navoximod)、1-甲基色胺酸或其組合。

【0406】 在一些實施例中，在獲得用於製備APC及/或T細胞之生物試樣之前，向個體投與FLT3L。

【0407】 在一些實施例中，自個體中如本發明先前部分中所闡述之生物試樣獲得T細胞。

【0408】 在一些實施例中，生物試樣係自個體新獲得或係冷凍試

樣。

【0409】在一些實施例中，培育係在至少一種包括以下之細胞介素或生長因子存在下進行：GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7、IL-15、IFN-γ、IFN-α、IL-15、R848、LPS、ss-rna40、聚I:C或其任一組合。

【0410】在一些實施例中，方法包括使用IL-7、IL-15或其組合刺激T細胞。在一些實施例中，方法包括使用IL-7、IL-15或其組合在IDO抑制劑、PD-1抗體或IL-12存在下刺激T細胞。在一些實施例中，在以下各項存在下於適宜T細胞生長條件下離體擴增經刺激T細胞：一或多個腫瘤抗原表位序列或加載一或多個腫瘤抗原表位序列之APC或加載(例如表現)編碼一或多個腫瘤抗原表位序列之核酸序列(例如mRNA序列)之APC、一或多種細胞介素或生長因子(包括GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7、IL-15、IFN-γ、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40、聚I:C或其組合)、FLT3L。在一些實施例中，該方法進一步包括向個體投與抗原特異性T細胞。

【0411】在一些實施例中，該方法包括將如先前部分中所闡述製得之APC與T細胞在包括至少一種細胞介素或生長因子之培養基存在下一起培育以生成經新抗原活化之T細胞。

【0412】在一些實施例中，培育包括將APC製劑之第一APC製劑與T細胞一起培育7天以上。在一些實施例中，經培育T細胞係在APC製劑、細胞介素及生長因子存在下活體外擴增7天以上之經刺激T細胞。

【0413】在一些實施例中，培育包括將APC製劑之第一APC製劑與T細胞一起培育7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或

20天以上。

【0414】在一些實施例中，一或多個時間段之第一時間段為約1、2、3、4、5、6、7、8或9天。

【0415】在一些實施例中，單獨時間段之總時間段小於28天。在一些實施例中，單獨時間段之總時間段係20-27天。在一些實施例中，單獨時間段之總時間段係15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38或39天。

【0416】在一些實施例中，方法包括將APC製劑之第一APC製劑與T細胞一起培育7天以上。在一些實施例中，方法包括將APC製劑之第一APC製劑與T細胞一起培育7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天以上。在一些實施例中，方法包括將APC製劑之第一APC製劑與T細胞一起培育7-20、8-20、9-20、10-20、11-20或12-20天。在一些實施例中，方法包括將APC製劑之第一APC製劑與T細胞一起培育約10-15天。

【0417】在一些實施例中，方法包括將APC製劑之第二APC製劑與T細胞一起培育5-9天。在一些實施例中，方法包括將APC製劑之第二APC製劑與T細胞一起培育5、6、7、8或9天。在一些實施例中，該方法進一步包括在第三時間段之後且在開始第四時間段之前去除第二培養基之一或多種細胞介素或生長因子。

【0418】在一些實施例中，方法包括將APC製劑之第三APC製劑與T細胞一起培育5-9天。在一些實施例中，該方法包括將APC製劑之第三APC製劑與T細胞一起培育5、6、7、8或9天。

【0419】在一些實施例中，該方法包括將APC製劑之第一APC製劑

與T細胞一起培育約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22天，將APC製劑之第二APC製劑與T細胞一起培育約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22天，且將APC製劑之第三APC製劑與T細胞一起培育約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22天。

【0420】 在一些實施例中，該方法係離體實施。在一些實施例中，在含有細胞介素之培養基中培養T細胞。在一些實施例中，細胞介素之實例包含IL-7。在一些實施例中，細胞介素之實例包含IL-15。在一些實施例中，細胞介素之實例包含IL-7及IL-15。在一些實施例中，在包括IL-7及/或IL-15之培養基中培養T細胞。在一些實施例中，T細胞培養物或培養基中之細胞介素之最終濃度為至少0.05 ng/mL、0.1 ng/mL、0.2 ng/mL、0.3 ng/mL、0.4 ng/mL、0.5 ng/mL、0.8 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、3 ng/mL、4 ng/mL、5 ng/mL、6 ng/mL、7 ng/mL、8 ng/mL、9 ng/mL、10 ng/mL、12 ng/mL、15 ng/mL、18 ng/mL或20 ng/mL。在一些實施例中，T細胞培養物或培養基中之IL-7之最終濃度為至少0.05 ng/mL、0.1 ng/mL、0.2 ng/mL、0.3 ng/mL、0.4 ng/mL、0.5 ng/mL、0.8 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、3 ng/mL、4 ng/mL、5 ng/mL、6 ng/mL、7 ng/mL、8 ng/mL、9 ng/mL、10 ng/mL、12 ng/mL、15 ng/mL、18 ng/mL或20 ng/mL。在一些實施例中，T細胞培養物或培養基中之IL-15之最終濃度為至少0.05 ng/mL、0.1 ng/mL、0.2 ng/mL、0.3 ng/mL、0.4 ng/mL、0.5 ng/mL、0.8 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、3 ng/mL、4 ng/mL、5 ng/mL、6 ng/mL、7 ng/mL、8 ng/mL、9 ng/mL、10 ng/mL、12

ng/mL、15 ng/mL、18 ng/mL或20 ng/mL。在一些實施例中，在進一步含有FLT3L之培養基中培養T細胞。在一些實施例中，T細胞培養物或培養基中之FLT3L最終濃度為至少1 ng/mL、2 ng/mL、3 ng/mL、4 ng/mL、5 ng/mL、6 ng/mL、7 ng/mL、8 ng/mL、9 ng/mL、10 ng/mL、12 ng/mL、15 ng/mL、18 ng/mL、20 ng/mL、30 ng/mL、40 ng/mL、50 ng/mL、60 ng/mL、70 ng/mL、80 ng/mL、90 ng/mL、100 ng/mL或200 ng/mL。在一些實施例中，將T細胞在含有FLT3L之培養基中培育、誘導或刺激第一時間段。在一些實施例中，將T細胞在含有額外添加之FLT3L之培養基中培育、誘導或刺激第二時間段。在一些實施例中，將T細胞在含有額外添加之FLT3L之培養基中培育、誘導或刺激第三時間段。在一些實施例中，將T細胞在含有額外添加之FLT3L之培養基中培育、誘導或刺激第四、第五或第六時間段，其中在每一時間段中新添加FLT3L。

【0421】 在一些實施例中，在新抗原(例如由APC呈現之新抗原)存在下培養T細胞，其中培養基包括高鉀$[K]^+$含量。在一些實施例中，在與APC或T細胞一起培育期間，將T細胞在高$[K]^+$含量存在下於培養基中至少培養一定時間段。在一些實施例中，在與APC或T細胞一起培育期間，培養基中之$[K]^+$含量至少改變了一定時間段。在一些實施例中，在T細胞離體培養之時段中，培養基中之含量保持恆定。在一些實施例中，T細胞培養基中之$[K]^+$含量≥ 5 mM。在一些實施例中，T細胞培養基中之$[K]^+$含量≥ 6 mM。在一些實施例中，T細胞培養基中之$[K]^+$含量≥ 7 mM。在一些實施例中，T細胞培養基中之$[K]^+$含量≥ 8 mM。在一些實施例中，T細胞培養基中之$[K]^+$含量≥ 9 mM。在一些實施例中，T細胞培養基中之$[K]^+$

含量≥ 10 mM。在一些實施例中，T細胞培養基中之$[K]^+$含量≥ 11 mM。在一些實施例中，T細胞培養基中之$[K]^+$含量≥ 12 mM。在一些實施例中，T細胞培養基中之$[K]^+$含量≥ 13 mM。在一些實施例中，T細胞培養基中之$[K]^+$含量≥ 14 mM。在一些實施例中，T細胞培養基中之$[K]^+$含量≥ 15 mM。在一些實施例中，T細胞培養基中之$[K]^+$含量≥ 16 mM。在一些實施例中，T細胞培養基中之$[K]^+$含量≥ 17 mM。在一些實施例中，T細胞培養基中之$[K]^+$含量≥ 18 mM。在一些實施例中，T細胞培養基中之$[K]^+$含量≥ 19 mM。在一些實施例中，T細胞培養基中之$[K]^+$含量≥ 20 mM。在一些實施例中，T細胞培養基中之$[K]^+$含量≥ 22 mM。在一些實施例中，T細胞培養基中之$[K]^+$含量≥ 25 mM。在一些實施例中，T細胞培養基中之$[K]^+$含量≥ 30 mM。在一些實施例中，T細胞培養基中之$[K]^+$含量≥ 35 mM。在一些實施例中，T細胞培養基中之$[K]^+$含量≥ 40 mM。在一些實施例中，T細胞培養基中之$[K]^+$含量為約40 mM。

【0422】 在一些實施例中，在培育T細胞與新抗原期間，在至少一定時間段內T細胞培養基中之$[K]^+$含量為約40 mM。在一些實施例中，新抗原可由加載新抗原之APC來呈現。在一些實施例中，測試在$[K]^+$存在下T細胞之T效應功能、CD8+細胞毒性、細胞介素產生及記憶表型。在一些實施例中，在高$[K]^+$存在下生長之T細胞表現效應T細胞表型。在一些實施例中，在高$[K]^+$存在下生長之T細胞表現記憶細胞標記物。在一些實施例中，在高$[K]^+$存在下生長之T細胞不表現T細胞耗竭標記物。

【0423】 在一些實施例中，經刺激T細胞係包括經包括新抗原性肽-MHC複合物之APC刺激之經活化T細胞之免疫細胞群體。在一些實施例中，方法可包括將來自生物試樣之免疫細胞群體與包括肽-MHC複合物之

APC一起培育，由此獲得經刺激免疫細胞試樣；測定經刺激免疫細胞試樣之至少一種免疫細胞之一或多種細胞標記物之表現；及測定經刺激免疫細胞試樣之至少一種免疫細胞與肽-MHC複合物之結合；其中同時測定某些細胞表面標記物或其他決定性標記物(例如細胞內因子)或釋放劑(例如細胞介素等)之表現且測定與新抗原-MHC複合物之結合。在一些實施例中，一或多種細胞標記物包括TNF-α、IFN-γ、LAMP-1、4-1BB、IL-2、IL-17A、顆粒酶B、PD-1、CD25、CD69、TIM3、LAG3、CTLA-4、CD62L、CD45RA、CD45RO、FoxP3或其任一組合。在一些實施例中，一或多種細胞標記物包括細胞介素。在一些實施例中，一或多種細胞標記物包括去顆粒標記物。在一些實施例中，一或多種細胞標記物包括細胞表面標記物。在一些實施例中，一或多種細胞標記物包括蛋白質。在一些實施例中，測定經刺激免疫細胞試樣之至少一種免疫細胞與肽-MHC複合物之結合包括測定經刺激免疫細胞試樣之至少一種免疫細胞與MHC四聚體的結合，該MHC四聚體包括肽-MHC複合物之肽及MHC。在一些實施例中，MHC係I類MHC或II類MHC。在一些實施例中，肽-MHC複合物包括一或多種標記。

【0424】在一些實施例中，藉由檢測藉由活化T細胞釋放之細胞介素來驗證T細胞活化。在一些實施例中，細胞介素係TNF-α、IFN-γ或IL-2中之一或多者。在一些實施例中，藉由特異性抗原結合及細胞介素釋放來驗證T細胞活化。在一些實施例中，藉由在活體外殺死腫瘤細胞之能力來驗證T細胞活化。可使用經活化T細胞之試樣來驗證T細胞之活化狀態。在一些實施例中，自T細胞培養物汲取T細胞試樣以藉由流式細胞術測定細胞組成及活化狀態。

【0425】在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性T細胞之百分比為總T細胞或總免疫細胞之至少約0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性T細胞之百分比為約5%。在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性T細胞之百分比為約7%。在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性T細胞之百分比為約10%。在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性T細胞之百分比為約12%。在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性T細胞之百分比為約15%。在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性T細胞之百分比為約20%。在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性T細胞之百分比為約25%。在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性T細胞之百分比為約30%。在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性T細胞之百分比為約40%。在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性T細胞之百分比為約50%。在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性T細胞之百分比為約60%。在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性T細胞之百分比為約70%。在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性T細胞之百分比為約80%。在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性T細胞之百分比為約90%。

【0426】在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性CD8+ T細胞之百分比為總CD4+ T細胞、總CD8+ T細胞、總T細胞或總免疫細胞之至少約0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、

9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性CD8+ T細胞之百分比為約5%。在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性CD8+ T細胞之百分比為約7%。在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性CD8+ T細胞之百分比為約10%。在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性CD8+ T細胞之百分比為約12%。在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性CD8+ T細胞之百分比為約15%。在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性CD8+ T細胞之百分比為約20%。在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性CD8+ T細胞之百分比為約25%。在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性CD8+ T細胞之百分比為約30%。在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性CD8+ T細胞之百分比為約40%。在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性CD8+ T細胞之百分比為約50%。在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性CD8+ T細胞之百分比為約60%。在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性CD8+ T細胞之百分比為總CD4+ T細胞、總CD8+ T細胞、總T細胞或總免疫細胞之約70%。

【0427】 在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性CD4+ T細胞之百分比為總CD4+ T細胞、總CD8+ T細胞、總T細胞或總免疫細胞之至少約0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、

75%、80%、85%、90%或95%。

【0428】 在一些實施例中，生物試樣中之至少一種抗原特異性T細胞之百分比為總CD4+ T細胞、總CD8+ T細胞、總T細胞或總免疫細胞之至多約0.00001%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%或0.5%。

【0429】 在一些實施例中，生物試樣中之至少一種抗原特異性CD8+ T細胞之百分比為總CD4+ T細胞、總CD8+ T細胞、總T細胞或總免疫細胞之至多約0.00001%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%或0.5%。

【0430】 在一些實施例中，生物試樣中之至少一種抗原特異性CD4+ T細胞之百分比為總CD4+ T細胞、總CD8+ T細胞、總T細胞或總免疫細胞之至多約0.00001%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%或0.5%。

【0431】 在一些實施例中，抗原係新抗原、腫瘤相關抗原、過度表現之抗原、病毒抗原、次要組織相容性抗原或其組合。

【0432】 在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性CD8+ T細胞之數量為至少約1×10^6、2×10^6、5×10^6、1×10^7、2×10^7、5×10^7、1×10^8、2×10^8或5×10^8個抗原特異性CD8+ T細胞。

在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性CD4+ T細胞之數量為至少約1×10^6、2×10^6、5×10^6、1×10^7、2×10^7、5×10^7、1×10^8、2×10^8或5×10^8個抗原特異性CD4+ T細胞。

醫藥組合物

【0433】 本文提供包括免疫細胞群體之組合物(例如醫藥組合物)。

該等組合物可包括至少一種包括T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞。該等組合物可包括至少一種包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞。

【0434】 可使用一或多種生理上可接受之載劑(包含賦形劑及輔助劑)來調配醫藥組合物，該等載劑有助於將活性劑處理成可在醫藥上使用之製劑。適宜調配物可取決於所選投與途徑。適宜地且如業內所理解，可使用熟知技術、載劑及賦形劑中之任一者。

在一些情形下，將醫藥組合物調配為基於細胞之治療劑，例如T細胞治療劑。在一些實施例中，醫藥組合物包括基於肽之療法、基於核酸之療法、基於抗體之療法及/或基於細胞之療法。在一些實施例中，醫藥組合物包括基於肽之治療劑或基於核酸之治療劑，其中核酸編碼多肽。在一些實施例中，醫藥組合物包括基於肽之治療劑或基於核酸之治療劑，其中核酸編碼多肽；其中基於肽之治療劑或基於核酸之治療劑包括於細胞中，其中細胞係T細胞。在一些實施例中，醫藥組合物包括基於抗體之治療劑。組合物可包括對兩種或更多種免疫原性抗原或新抗原肽具有特異性之T細胞。

【0435】 在一態樣中，本文提供一種醫藥組合物，其包括(a)包括來自生物試樣之T細胞之免疫細胞群體，其中T細胞包括至少一種抗原特異性T細胞，該抗原特異性T細胞係經APC刺激之T細胞之且包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)，其中APC係經FLT3L刺激之APC；及(b)醫藥上可接受之賦形劑。

【0436】 在一態樣中，本文提供一種醫藥組合物，其包括：(a)來自生物試樣之免疫細胞群體，其包括至少一種包括對至少一個抗原肽序列具

有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞；及(b)醫藥上可接受之賦形劑；其中該群體中表現CD14及/或CD25之免疫細胞之量相應地不同於生物試樣中表現CD14及/或CD25之免疫細胞之量。在一些實施例中，至少一種抗原特異性T細胞包括至少一種經APC刺激之T細胞。在一些實施例中，該群體中表現CD14及/或CD25之免疫細胞之量相應地小於生物試樣中表現CD14及/或CD25之免疫細胞之量。在一些實施例中，該群體中表現CD14及/或CD25之免疫細胞之量相應地大於生物試樣中表現CD14及/或CD25之免疫細胞之量。在一些實施例中，至少一種抗原特異性T細胞包括至少一種CD4+ T細胞。在一些實施例中，至少一種抗原特異性T細胞包括至少一種CD8+ T細胞。在一些實施例中，至少一種抗原特異性T細胞包括至少一種CD4富集T細胞。在一些實施例中，至少一種抗原特異性T細胞包括至少一種CD8富集T細胞。在一些實施例中，至少一種抗原特異性T細胞包括記憶性T細胞。在一些實施例中，至少一種抗原特異性T細胞包括記憶性CD4+ T細胞。在一些實施例中，至少一種抗原特異性T細胞包括記憶性CD8+ T細胞。在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性T細胞之百分比為總T細胞或總免疫細胞之至少約0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在一些實施例中，組合物中之至少一種抗原特異性CD8+ T細胞之百分比為總CD4+ T細胞、總CD8+ T細胞、總T細胞或總免疫細胞之至少約0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、

25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。

【0437】 除活性成分外，醫藥組合物亦可包含醫藥上可接受之賦形劑、載劑、緩衝劑、穩定劑或熟習此項技術者熟知之其他材料。該等材料應無毒且應不干擾活性成分之效能。載劑或其他材料之精確性質取決於投與途徑。

【0438】 可接受載劑、賦形劑或穩定劑係在所用劑量及濃度下對接受者無毒者，且包含緩衝劑，例如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包含抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(例如十八烷基二甲基苄基氯化銨；氯化六甲雙銨；苯紮氯銨(benzalkonium chloride)、苄索氯銨(benzethonium chloride)；苯酚、丁醇或苄醇；對羥基苯甲酸烷基酯，例如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(少於約10個殘基)多肽；蛋白質，例如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，例如聚乙烯基吡咯啶酮；胺基酸，例如甘胺酸、麩醯胺酸、天門冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單糖、二糖及其他碳水化合物，包含葡萄糖、甘露糖或糊精；鰲合劑，例如EDTA；糖，例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；成鹽相對離子，例如鈉；金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合物)；及/或非離子型表面活性劑，例如TWEEN®、PLURONICS®或聚乙二醇(PEG)。

【0439】 可接受載劑在生理上為所投與患者可接受且保留一起/其中所投與化合物之治療性質。可接受載劑及其調配物通常闡述於(例如)Remington’ pharmaceutical Sciences (第18版，A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA 1990)中。載劑之一種實例係生理學鹽水。醫

藥上可接受之載劑意指涉及將標的化合物自身體之一個器官或部分之投與部位攜載或傳輸至身體之另一器官或部分或活體外分析系統中之醫藥上可接受之材料、組合物或媒劑，例如液體或固體填充劑、稀釋劑、賦形劑、溶劑或囊封材料。可接受載劑與調配物之其他成分相容且對投與個體無害。可接受載劑不應改變新抗原之比活性。

【0440】 在一態樣中，本文提供包含與醫藥投與相容之溶劑(水性或非水性)、溶液、乳液、分散介質、包衣、等滲劑及吸收促進或延遲劑之醫藥上可接受或生理上可接受之組合物。醫藥組合物或醫藥調配物由此係指適用於個體醫藥應用之組合物。組合物可經調配以與特定投與途徑(亦即全身性或局部)相容。因此，組合物包含適於藉由各種途徑投與之載劑、稀釋劑或賦形劑。

【0441】 在一些實施例中，組合物可進一步包括可接受添加劑以改良組合物中之免疫細胞之穩定性。可接受添加劑不會改變免疫細胞之比活性。可接受添加劑之實例包含(但不限於)糖，例如甘露醇、山梨醇、葡萄糖、木糖醇、海藻糖、山梨糖、蔗糖、半乳糖、右旋糖酐、右旋糖、果糖、乳糖及其混合物。可接受添加劑可與可接受之載劑及/或賦形劑(例如右旋糖)進行組合。或者，可接受添加劑之實例包含(但不限於)表面活性劑(例如聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80)，其可增加肽穩定性且降低溶液之膠凝。可以佔溶液0.01%至5%之量將表面活性劑添加至組合物中。添加該等可接受添加劑可增加組合物在儲存中之穩定性及半衰期。

【0442】 可(例如)藉由注射來投與醫藥組合物。用於注射之組合物包含水溶液(在水溶性之情形下)或分散液及用於臨時製備無菌可注射溶液或分散液之無菌粉劑。對於靜脈內投與而言，適宜載劑包含生理學鹽水、

抑菌水或磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)。載劑可為溶劑或分散介質，其含有(例如)水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇及液體聚乙二醇及諸如此類)及其適宜混合物。可藉由(例如)以下方式來維持流動性：利用諸如卵磷酯等包衣，在分散液之情形下藉由維持所需粒徑，以及利用表面活性劑。抗細菌劑及抗真菌劑包含(例如)對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗壞血酸及硫柳汞(thimerosal)。等滲劑(例如糖、多元醇(例如甘露醇、山梨醇)及氯化鈉)可包含於組合物中。可包裝所得溶液以供按原樣使用，或可將其凍乾；可隨後將凍乾製劑在投與之前與無菌溶液合併。對於靜脈內注射或疼痛部位處注射而言，活性成分將呈非經腸可接受之水溶液形式，該水溶液無熱原且具有適宜pH、等滲性及穩定性。熟習此項技術者能夠充分使用(例如)等滲媒劑(例如氯化鈉注射液、林格氏注射液(Ringer's Injection)、乳酸化林格氏注射液)來製備適宜溶液。可視需要包含防腐劑、穩定劑、緩衝劑、抗氧化劑及/或其他添加劑。無菌可注射溶液可藉由以下步驟來製備：將所需量活性成分納入具有上文所列舉成分中之一者或其組合(若需要)之適宜溶劑中，隨後進行過濾滅菌。通常，藉由將活性成分納入含有基本分散介質及來自上文所列舉者之所需其他成分的無菌媒劑中來製備分散液。在使用無菌粉末來製備無菌可注射溶液之情形下，較佳製備方法可為真空乾燥及冷凍乾燥，此自預先經無菌過濾之溶液產生具有活性成分加上任一其他期望成分之粉末。

【0443】 組合物通常可經靜脈內投與，例如藉由注射單位劑量。對於注射而言，活性成分可呈非經腸可接受之水溶液形式，該水溶液實質上無熱原且具有適宜pH、等滲性及穩定性。可使用(例如)等滲媒劑(例如氯化鈉注射液、林格氏注射液、乳酸化林格氏注射液)來製備適宜溶液。可

視需要包含防腐劑、穩定劑、緩衝劑、抗氧化劑及/或其他添加劑。另外，可經由氣溶膠化來投與組合物。

【0444】 在考慮將組合物用於藥劑中或本文所提供之任一方法中時，組合物預計可實質上不含熱原，從而組合物在投與人類患者時並不引起發炎性反應或不安全過敏性反應。熱原組合物之測試及實質上不含熱原之組合物之製備為熟習此項技術者所充分理解且可使用市售套組來達成。

【0445】 可接受載劑可含有用作穩定劑、增加或延遲吸收或增加或延遲清除之化合物。該等化合物包含(例如)碳水化合物，例如葡萄糖、蔗糖或右旋糖酐；低分子量蛋白質；減小肽之清除或水解之組合物；或賦形劑或其他穩定劑及/或緩衝劑。延遲吸收之試劑包含(例如)單硬脂酸鋁及明膠。亦可使用洗滌劑來穩定或增加或降低醫藥組合物(包含脂質體載劑)之吸收。為防止消解，可使化合物與組合物複合以使其抵抗酸性及酶促水解，或可使化合物在適當抗性載劑(例如脂質體)中複合。業內已知防止化合物消解之方式(例如Fix (1996) Pharm Res.13:1760 1764；Samanen (1996) J. Pharm. Pharmacol. 48:119 135；及美國專利第5,391,377號)。

【0446】 可以與劑量調配物相容之方式且以治療有效量來投與組合物。擬投與量取決於擬治療個體、個體免疫系統利用活性成分之能力及期望結合能力程度。需要投與之活性成分之精確量取決於從業人員之判斷且對於每一個體而言係獨特的。用於初始投與及加強注射之適宜方案亦係可變的，但通常進行初始投與，隨後以一或多個小時間隔藉由後續注射或其他投與來投與重複劑量。或者，涵蓋足以維持血液中之濃度之連續靜脈內輸注。

【0447】 在一些實施例中，本發明係關於能夠產生新抗原特異性反

應(例如體液或細胞介導之免疫反應)之免疫原性組合物(例如醫藥組合物)。在一些實施例中，免疫原性組合物包括本文所闡述對應於腫瘤特異性抗原或新抗原之新抗原治療劑(例如肽、多核苷酸、TCR、CAR、含有TCR或CAR之細胞、含有多肽之樹突狀細胞、含有多核苷酸之樹突狀細胞、抗體等)。

【0448】 在一些實施例中，本文所闡述之醫藥組合物能夠產生特異性細胞毒性T細胞反應、特異性輔助性T細胞反應或B細胞反應。

【0449】 在一些實施例中，抗原多肽或多核苷酸可以含有該等多肽或多核苷酸之抗原呈現細胞(例如樹突狀細胞)之形式來提供。在其他實施例中，使用該等抗原呈現細胞刺激用於患者中之T細胞。在一些實施例中，抗原呈現細胞係樹突狀細胞。在相關實施例中，樹突狀細胞係經新抗原肽或核酸脈衝化之自體樹突狀細胞。新抗原肽可為任一產生適當T細胞反應之適宜肽。在一些實施例中，T細胞係CTL。在一些實施例中，T細胞係HTL。因此，本發明之一實施例係一種免疫原性組合物，其含有至少一種經本文所闡述之一或多種新抗原多肽或多核苷酸脈衝化或加載其之抗原呈現細胞(例如樹突狀細胞)。在一些實施例中，該等APC係自體性(例如自體樹突狀細胞)。或者，自患者分離之周邊血單核細胞(PBMC)可加載有離體新抗原肽或多核苷酸。在相關實施例中，將該等APC或PBMC注射回患者中。多核苷酸可為任一能夠轉導樹突狀細胞且由此呈現新抗原肽並誘導免疫性之適宜多核苷酸。在一些實施例中，使用該等抗原呈現細胞(APC) (例如樹突狀細胞)或末梢血單核細胞(PBMC)刺激T細胞(例如自體T細胞)。在相關實施例中，T細胞係CTL。在其他相關實施例中，T細胞係HTL。在一些實施例中，T細胞係$CD8^+$ T細胞。在一些實施例中，T細胞

係$CD4^+$ T細胞。然後將該等T細胞注射至患者中。

【0450】 在一些實施例中，將CTL注射至患者中。在一些實施例中，將HTL注射至患者中。在一些實施例中，將CTL及HTL二者注射至患者中。可同時或依序且以任一順序來投與任一治療劑。

【0451】 在一些實施例中，本文所闡述用於治療性治療之醫藥組合物(例如免疫原性組合物)可經調配用於非經腸、局部、經鼻、經口或局部投與。在一些實施例中，非經腸(例如經靜脈內、經皮下、經真皮內或經肌內)投與本文所闡述之醫藥組合物。在一些實施例中，可經腫瘤內投與組合物。可在手術切除部位處投與組合物以對腫瘤誘導局部免疫反應。在一些實施例中，本文闡述包括新抗原肽溶液之用於非經腸投與之組合物且將免疫原性組合物溶解或懸浮於可接受載劑(例如水性載劑)中。可使用多種水性載劑，例如水、緩衝水、0.9%鹽水、0.3%甘胺酸、玻尿酸及諸如此類。該等組合物可藉由習用熟知滅菌技術來滅菌，或可經無菌過濾。可包裝所得水溶液以供按原樣使用，或可將其凍乾，將凍乾製劑在投與之前與無菌溶液合併。組合物可視需要含有醫藥上可接受之輔助物質以接近生理條件，例如pH調節及緩衝劑、張力調節劑、潤濕劑及諸如此類，例如乙酸鈉、乳酸鈉、氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣、去水山梨醇單月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯等。

【0452】 佐劑增加抗原免疫反應之能力通常表現為顯著增加免疫介導之反應或減少疾病症狀。舉例而言，體液免疫性增加可表現為針對抗原所產生抗體之效價顯著增加，且T細胞活性增加可表現為細胞增殖或細胞毒性或細胞介素分泌之增加。佐劑亦可(例如)藉由將主要之體液反應或T輔助細胞2反應變為主要之細胞反應或T輔助細胞1反應來改變免疫反應。

【0453】業內已知適宜佐劑(參見WO 2015/095811)且包含(但不限於)聚(I:C)、聚-ICLC、STING激動劑、1018 ISS、鋁鹽、Amplivax、AS15、BCG、CP-870,893、CpG7909、CyaA、dSLIM、GM-CSF、IC30、IC31、咪喹莫特(Imiquimod)、ImuFact IMP321、IS貼劑、ISS、ISCOMATRIX、JuvImmune、LipoVac、MF59、單磷醯基脂質A、孟他奈德(Montanide) IMS 1312、孟他奈德ISA 206、孟他奈德ISA 50V、孟他奈德ISA-51、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、PepTel®載體系統、PLG微顆粒、瑞喹莫德(resiquimod)、SRL172、病毒體及其他病毒樣顆粒、YF-17D、VEGF特拉普(VEGF trap)、R848、β-葡聚糖、Pam3Cys、Pam3CSK4、Aquila's QS21刺激子(Aquila Biotech, Worcester, Mass., USA，其係衍生自皂素、分支桿菌提取物及合成細菌細胞壁模擬物)及其他專屬佐劑(例如Ribi's Detox.Quil或Superfos)。已闡述對樹突狀細胞及其製劑具有特異性之若干免疫學佐劑(例如MF59)(Dupuis M等人，Cell Immunol. 1998；186(1):18-27；Allison A C；Dev Biol Stand. 1998；92:3-11) (Mosca等人，Frontiers in Bioscience, 2007；12:4050-4060) (Gamvrellis等人，Immunol & Cell Biol. 2004；82: 506-516)。同樣，可使用細胞介素。若干細胞介素直接涉及影響樹突狀細胞至淋巴樣組織之遷移(例如TNF-α)、加速樹突狀細胞至用於T-淋巴球之有效抗原呈現細胞之成熟(例如GM-CSF、PGE1、PGE2、IL-1、IL-1β、IL-4、IL-6及CD40L) (美國專利第5,849,589號，其全部內容以引用方式併入本文中)及用作免疫佐劑(例如IL-12) (Gabrilovich D I等人，J Immunother Emphasis Tumor Immunol. 1996 (6):414-418)。

【0454】亦報導，CpG免疫刺激性寡核苷酸可增強佐劑在治療環境

中之效應。不受限於理論，CpG寡核苷酸藉由經由類鐸受體(TLR) (主要係TLR9)活化先天性(非適應性)免疫系統來發揮作用。經CpG觸發之TLR9活化可增強對眾多種抗原(包含肽或蛋白質抗原)、活或死病毒、樹突狀細胞免疫原性醫藥組合物、自體細胞免疫原性醫藥組合物以及防治性及治療性免疫原性醫藥組合物中之多醣偶聯物之抗原特異性體液及細胞反應。重要的是，其增強樹突狀細胞之成熟及分化，從而增強TH1細胞之活化且強烈生成細胞毒性T-淋巴球(CTL)，即使在不存在$CD4^+$ T細胞幫助下。由TLR9刺激誘導之TH1偏移得以維持，即使在存在通常促進TH2偏移之佐劑(例如明礬或不完全弗羅因德氏佐劑(incomplete Freund's adjuvant，IFA))下。在與其他佐劑一起調配或共投與或處於調配物(例如微顆粒、奈米顆粒、脂質乳液或類似調配物)中時，CpG寡核苷酸展示極大佐劑活性，此尤其可在抗原相對較弱時用於誘導較強反應。在一些實驗中，其亦可加速免疫反應且使得能夠減小抗原劑量，且與不含CpG之全劑量免疫原性醫藥組合物具有相當之抗體反應(Arthur M. Krieg, Nature Reviews, Drug Discovery, 5，2006年6月，471-484)。美國專利第6,406,705號闡述組合使用CpG寡核苷酸、非核酸佐劑及抗原來誘導抗原特異性免疫反應。市售CpG TLR9拮抗劑係Mologen (Berlin, DE)之dSLIM (雙莖環免疫調節劑)，其係本文所闡述之醫藥組合物之組分。亦可使用其他TLR結合分子，例如結合TLR7、TLR8及/或TLR9之RNA。

【0455】 有用佐劑之其他實例包含(但不限於)經化學修飾之CpG (例如CpR, Idera)、聚(I及/或聚C)(例如聚I:CI2U)、非CpG細菌DNA或RNA、用於TLR8之ssRNA40以及免疫活性小分子及抗體(例如環磷醯胺(cyclophosphamide)、舒尼替尼(sunitinib)、貝伐珠單抗(bevacizumab)、

西樂葆(celebrex)、NCX-4016、西地那非(sildenafil)、他達拉非(tadalafil)、伐地那非(vardenafil)、索拉非尼(sorafinib)、XL-999、CP-547632、帕唑帕尼(pazopanib)、ZD2171、AZD2171、伊匹單抗(ipilimumab)、曲美目單抗(tremelimumab)及SC58175)，該等試劑可用於治療中及/或用作佐劑。熟習此項技術者可易於無需過多實驗即可測定可用於本發明背景中之佐劑及添加劑之量及濃度。其他佐劑包含群落刺激因子，例如顆粒球巨噬球群落刺激因子(GM-CSF，沙格司亭(sargramostim))。

【0456】在一些實施例中，本發明之免疫原性組合物可包括一種以上不同佐劑。另外，本發明涵蓋包括任一佐劑物質(包含上文之任一者或其組合)之醫藥組合物。在一些實施例中，免疫原性組合物包括新抗原治療劑(例如肽、多核苷酸、TCR、CAR、含有TCR或CAR之細胞、含有多肽之樹突狀細胞、含有多核苷酸之樹突狀細胞、抗體等)且佐劑可以任一適當序列單獨投與。

【0457】脂化可分成若干不同類型，例如N-肉豆蔻醯化、棕櫚醯化、GPI-錨添加、異戊二烯化及若干其他類型修飾。N-肉豆蔻醯化係使肉豆蔻酸酯(C14飽和酸)共價附接至甘胺酸殘基。棕櫚醯化係長鏈脂肪酸(C16)至半胱胺酸殘基之硫基酯鍵聯。GPI-錨添加係經由醯胺鍵之醣基-磷酸肌醇(GPI)鍵聯。異戊二烯化係類異戊二烯脂質(例如法尼基(farnesyl)(C-15)、牛龍牛兒基牛龍牛兒基(C-20))至半胱胺酸殘基之硫醚鍵聯。其他類型之修飾可包含S-二醯基甘油藉由半胱胺酸之硫原子之附接、經由絲胺酸或蘇胺酸殘基之O-辛醯基偶聯、S-阿克醇至半胱胺酸殘基之偶聯及膽固醇附接。

【0458】 用於生成脂質化肽之脂肪酸可包含C2 - C30飽和、單不飽和或多不飽和脂肪醯基。實例性脂肪酸可包含棕櫚醯基、肉豆蔻醯基、硬脂醯基及癸醯基。在一些情況下，具有佐劑性質之脂質部分附接至所關注多肽以在不存在外源性佐劑下誘發或增強免疫原性。脂質化肽或脂肽可稱為自我輔助脂肽。上文及本文其他處所闡述之任一脂肪酸可誘發或增強所關注多肽之免疫原性。可誘發或增強免疫原性之脂肪酸可包含櫚醯基、肉豆蔻醯基、硬脂醯基、月桂醯基、辛醯基及癸醯基。

【0459】 可將多肽(例如裸肽或脂質化肽)納入脂質體中。有時，可將脂質化肽納入脂質體中。舉例而言，脂質化肽之脂質部分可自發整合至脂質體之脂質雙層中。因此，脂肽可呈現於脂質體之「表面」上。適於納入調配物中之實例性脂質體包含(且不限於)多層囊泡(MLV)、寡層囊泡(OLV)、單層囊泡(UV)、小單層囊泡(SUV)、中等單層囊泡(MUV)、大單層囊泡(LUV)、巨大單層囊泡(GUV)、多泡性囊泡(MVV)、藉由反相蒸發方法製得之單層或寡層囊泡(REV)、藉由反相蒸發方法製得之多層囊泡(MLV-REV)、穩定多層囊泡(SPLV)、冷凍及解凍MLV (FATMLV)、藉由擠出方法製得之囊泡(VET)、藉由弗氏細胞壓碎器(French press)製得之囊泡(FPV)、藉由融合製得之囊泡(FUV)、去水-再水合囊泡(DRV)及氣泡體(BSV)。

【0460】 端視製備方法，脂質體可為單層或多層，且直徑大小可介於約0.02 μM至大於約10 μm之間。脂質體可吸附許多類型之細胞且然後釋放所納入藥劑(例如本文所闡述之肽)。在一些情形下，脂質體與靶細胞融合，藉此脂質體內容物然後排空至靶細胞中。脂質體可由吞噬細胞內吞。在胞吞後，可在溶酶體內降解脂質體脂質且釋放所囊封藥劑。

【0461】本文所提供之脂質體亦可包括載體脂質。在一些實施例中，載體脂質係磷脂。能夠形成脂質體之載體脂質包含(但不限於)二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼(DPPC)、磷脂醯膽鹼(PC；卵磷脂)、磷脂酸(PA)、磷脂醯甘油(PG)、磷脂醯乙醇胺(PE)、磷脂醯絲胺酸(PS)。其他適宜磷脂進一步包含二硬脂醯基磷脂醯膽鹼(DSPC)、二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼(DMPC)、二棕櫚醯基磷脂醯甘油(DPPG)、二硬脂醯基磷脂醯甘油(DSPG)、二肉豆蔻醯基磷脂醯甘油(DMPG)、二棕櫚醯基磷脂酸(DPPA)、二肉豆蔻醯基磷脂酸(DMPA)、二硬脂醯基磷脂酸(DSPA)、二棕櫚醯基磷脂醯基絲胺酸(DPPS)、二肉豆蔻醯基磷脂醯基絲胺酸(DMPS)、二硬脂醯基磷脂醯基絲胺酸(DSPS)、二棕櫚醯基磷脂醯基乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻醯基磷脂醯基乙醇胺(DMPE)、二硬脂醯基磷脂醯基乙醇胺(DSPE)及諸如此類或其組合。在一些實施例中，脂質體進一步包括調節脂質體形成之固醇(例如膽固醇)。載體脂質可為任何已知非磷酸鹽極性脂質。

【0462】可使用熟知技術將醫藥組合物囊封於脂質體內。亦可採用生物可降解微球體作為本發明之醫藥組合物之載體。

【0463】可以脂質體或微球體(或微顆粒)形式投與醫藥組合物。製備用於投與患者之脂質體及微球體之方法為熟習此項技術者所熟知。基本而言，將材料溶於水溶液中，添加適當磷脂及脂質以及表面活性劑(若需要)，且視需要透析材料或超音波處理。

【0464】由聚合物或蛋白質形成之微球體為熟習此項技術者所熟知，且可經調整以通過胃腸道並直接進入血流中。或者，可將化合物納入微球體或微球體複合物中，並植入以在數天至數月範圍之時間段內緩慢釋

放。

【0465】 亦可向個體投與基於細胞之免疫原性醫藥組合物。舉例而言，適宜地且如業內所理解，可使用熟知技術、載劑及賦形劑中之任一者來調配基於抗原呈現細胞(APC)之免疫原性醫藥組合物。APC包含單核球、單核球源細胞、巨噬球及樹突狀細胞。有時，基於APC之免疫原性醫藥組合物可為基於樹突狀細胞之免疫原性醫藥組合物。

【0466】 可藉由業內熟知之任何方法來製備基於樹突狀細胞之免疫原性醫藥組合物。在一些情形下，可經由離體或活體內方法來製備基於樹突狀細胞之免疫原性醫藥組合物。離體方法可包括在投與患者之前使用經本文所闡述多肽離體脈衝化之自體DC來活化或加載DC。活體內方法可包括使用與本文所闡述多肽偶合之抗體靶向特異性DC受體。基於DC之免疫原性醫藥組合物可進一步包括DC活化劑(例如TLR3、TLR-7-8及CD40激動劑)。基於DC之免疫原性醫藥組合物可進一步包括佐劑及醫藥上可接受之載劑。

【0467】 可使用佐劑來增強在接受免疫原性醫藥組合物之患者中誘發之免疫反應(體液及/或細胞)。有時，佐劑可誘發Th1型反應。另外，佐劑可誘發Th2型反應。Th1型反應之特徵可在於產生諸如IFN-γ等細胞介素，與之相比，Th2型反應之特徵可在於產生諸如IL-4、IL-5及IL-10等細胞介素。

【0468】 在一些態樣中，基於脂質之佐劑(例如MPLA及MDP)可與本文所揭示之免疫原性醫藥組合物一起使用。舉例而言，單磷醯基脂質A(MPLA)係增加脂質體抗原至特異性T淋巴球之呈現之佐劑。另外，亦可使用胞壁醯二肽(MDP)作為與本文所闡述之免疫原性醫藥調配物聯合使用

之適宜佐劑。

【0469】佐劑亦可包括刺激分子(例如細胞介素)。細胞介素之非限制性實例包含：CCL20、α-干擾素(IFNα)、β-干擾素(IFNβ)、γ-干擾素(IFNγ)、血小板源生長因子(PDGF)、TNFα、GM-CSF、表皮生長因子(EGF)、皮膚T細胞虜獲趨化介素(CTACK)、上皮胸腺表現之趨化介素(TECK)、黏膜相關性上皮趨化介素(MEC)、IL-12、IL-15、IL-28、MHC、CD80、CD86、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-18、MCP-1、MIP-la、MIP-1-、IL-8、L-選擇素、P-選擇素、E-選擇素、CD34、GlyCAM-1、MadCAM-1、LFA-1、VLA-1、Mac-1、pl50.95、PECAM、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、CD2、LFA-3、M-CSF、G-CSF、突變體形式之IL-18、CD40、CD40L、血管生長因子、纖維母細胞生長因子、IL-7、神經生長因子、血管內皮生長因子、Fas、TNF受體、Fit、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DRS、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、半胱天冬酶ICE、Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、IκB、惰性NIK、SAP K、SAP-I、JNK、干擾素反應基因、NFκB、Bax、TRAIL、TRAILrec、TRAILrecDRC5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANK配體、Ox40、Ox40配體、NKG2D、MICA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、TAPI及TAP2。

【0470】其他佐劑包含：MCP-1、MIP-la、MIP-lp、IL-8、RANTES、L-選擇素、P-選擇素、E-選擇素、CD34、GlyCAM-1、MadCAM-1、LFA-1、VLA-1、Mac-1、pl50.95、PECAM、ICAM-1、

ICAM-2、ICAM-3、CD2、LFA-3、M-CSF、G-CSF、IL-4、突變體形式之IL-18、CD40、CD40L、血管生長因子、纖維母細胞生長因子、IL-7、IL-22、神經生長因子、血管內皮生長因子、Fas、TNF受體、Fit、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、半胱天冬酶ICE、Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、IκB、惰性NIK、SAP K、SAP-1、JNK、干擾素反應基因、NFκB、Bax、TRAIL、TRAILrec、TRAILrecDRC5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANK配體、Ox40、Ox40配體、NKG2D、MICA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、TAP1、TAP2及其功能片段。

【0471】 在一些態樣中，佐劑可為類鐸受體之調節劑。類鐸受體調節劑之實例包含TLR9激動劑且並不限於類鐸受體之小分子調節劑(例如咪喹莫特)。有時，佐劑係選自細菌類毒素、聚氧丙烯-聚氧乙烯嵌段聚合物、鋁鹽、脂質體、CpG聚合物、水包油型乳液或其組合。有時，佐劑係水包油型乳液。水包油型乳液可包含至少一種油及至少一種表面活性劑，其中油及表面活性劑係生物可降解(可代謝)及生物相容的。乳液中之油滴之直徑可小於5 μm，且可甚至具有亞微米直徑，其中使用微流化器達成該等較小尺寸以提供穩定乳液。可對小於220 nm大小之液滴實施過濾滅菌。

【0472】 在一些情況下，免疫原性醫藥組合物可包含載劑及賦形劑(包含(但不限於)緩衝劑、碳水化合物、甘露醇、蛋白質、多肽或胺基酸(例如甘胺酸)、抗氧化劑、抑菌劑、螯合劑、懸浮劑、增稠劑及/或防腐

劑)、水、油(包含石油、動物、植物或合成來源之油，例如花生油、大豆油、礦物油、芝麻油及諸如此類)、鹽水溶液、右旋糖水溶液及甘油溶液、矯味劑、著色劑、防黏劑及其他可接受添加劑、佐劑或黏合劑、接近生理學條件所需之其他醫藥上可接受之輔助物質(例如pH緩衝劑、張力調節劑、乳化劑、潤濕劑及諸如此類)。賦形劑之實例包含澱粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明膠、麥芽、水稻、麵粉、白堊、矽膠、硬脂酸鈉、甘油單硬脂酸酯、滑石粉、氯化鈉、脫脂奶粉、甘油、丙二醇、水、乙醇及諸如此類。在另一情況下，醫藥製劑實質上不含防腐劑。在其他情況下，醫藥製劑可含有至少一種防腐劑。應認識到，儘管可採用熟習此項技術者已知之任一適宜載劑來投與本文所闡述之醫藥組合物，但載劑類型將端視投與模式而有所變化。

【0473】 免疫原性醫藥組合物可包含防腐劑(例如硫柳汞或2-苯氧基乙醇)。在一些情況下，免疫原性醫藥組合物實質上不含(例如<10 μg/mL)含汞材料(例如無硫柳汞)。可使用α-生育酚琥珀酸鹽來替代含汞化合物。

【0474】 為控制張力，可在免疫原性醫藥組合物中包含生理學鹽(例如鈉鹽)。其他鹽可包含氯化鉀、磷酸二氫鉀、磷酸二鈉鹽及/或氯化鎂或諸如此類。

【0475】 免疫原性醫藥組合物可具有介於200 mOsm/kg與400 mOsm/kg之間、介於240-360 mOsm/kg之間或在290-310 mOsm/kg範圍內之滲透壓。

【0476】 免疫原性醫藥組合物可包括一或多種緩衝液，例如Tris緩衝液；硼酸鹽緩衝液；琥珀酸鹽緩衝液；組胺酸緩衝液(尤其與氫氧化鋁佐劑一起)；或檸檬酸鹽緩衝液。在一些情形下，包含在5-20 mM或10-50

mM範圍內之緩衝液。

【0477】 免疫原性醫藥組合物之pH可介於約5.0與約8.5之間，介於約6.0與約8.0之間，介於約6.5與約7.5之間，或介於約7.0與約7.8之間。

【0478】 免疫原性醫藥組合物可無菌。免疫原性醫藥組合物可為無致熱源(例如含有<1 EU (內毒素單位，標準量度)/劑量)，且可<0.1 EU/劑量。組合物可不含麩質。

【0479】 免疫原性醫藥組合物可包含洗滌劑，例如聚氧乙烯山梨醇酐酯表面活性劑(稱為「Tween」)或辛苯昔醇(octoxynol) (例如辛苯昔醇-9 (Triton X-100)或第三辛基苯氧基聚乙氧基乙醇)。洗滌劑可僅以痕量存在。免疫原性醫藥組合物可包含小於1 mg/mL之辛苯昔醇-10及聚山梨醇酯80中之每一者。其他痕量殘餘組分可為抗生素(例如新黴素(neomycin)、卡那黴素(kanamycin)、多黏菌素(polymyxin) B)。

【0480】 可將免疫原性醫藥組合物調配為業內熟知之於適宜媒劑中之無菌溶液或懸浮液。可藉由習用、熟知無菌技術將醫藥組合物滅菌，或可無菌過濾。可包裝所得水溶液以供按原樣使用，或可將其凍乾，將凍乾製劑在投與之前與無菌溶液合併。

【0481】 包括(例如)活性劑(例如本文所揭示之免疫細胞)與一或多種佐劑之組合之醫藥組合物可經調配以包括某些莫耳比率。舉例而言，可使用約99:1至約1:99之莫耳比率之活性劑(例如本文所闡述之免疫細胞)與一或多種佐劑之組合。在一些情況下，活性劑(例如本文所闡述之免疫細胞)與所組合之一或多種佐劑之莫耳比率範圍可選自約80:20至約20:80、約75:25至約25:75、約70:30至約30:70、約66:33至約33:66、約60:40至約40:60、約50:50及約90:10至約10:90。活性劑(例如本文所闡述之免疫

細胞)與所組合之一或多種佐劑之莫耳比率可為約1:9且在一些情形下可為約1:1。活性劑(例如本文所闡述之免疫細胞)與一或多種佐劑之組合可一起調配於同一劑量單元(例如在一個小瓶、栓劑、錠劑、膠囊、氣溶膠噴霧劑中)；或每一藥劑、形式及/或化合物可調配於單獨單元中(例如兩個小瓶、栓劑、錠劑、兩個膠囊、錠劑及小瓶、氣溶膠噴霧劑及諸如此類)。

【0482】 在一些情況下，免疫原性醫藥組合物可與其他藥劑一起投與。其他藥劑之選擇可至少部分地取決於所治療病狀。其他藥劑可包含(例如)檢查點抑制劑，例如抗PD1劑、抗CTLA4劑、抗PD-L1劑、抗CD40劑或抗TIM3劑(例如抗PD1、抗CTLA4、抗PD-L1、抗CD40或抗TIM3抗體)；或任何對病原體感染(例如病毒感染)具有治療效應之藥劑，包含(例如)用於治療發炎性病狀(例如NSAID)之藥物，例如布洛芬(ibuprofen)、萘普生(naproxen)、乙醯胺酚(acetaminophen)、酮洛芬(ketoprofen)或阿司匹林(aspirin)。舉例而言，檢查點抑制劑可為選自由以下組成之群之PD-1/PD- L1拮抗劑：尼沃魯單抗(nivolumab) (ONO-4538/BMS-936558, MDX1 106, OPDIVO)、派姆單抗(pembrolizumab) (MK-3475, KEYTRUDA)、匹利珠單抗(pidilizumab) (CT-011)及MPDL328OA (ROCHE)。作為另一實例，調配物可另外含有一或多種補充劑(例如維他命C、E或其他抗氧化劑)。

【0483】 可以習用方式使用一或多種生理上可接受之載劑(包括賦形劑、稀釋劑及/或輔助劑)來調配包括活性劑(例如本文所闡述之免疫細胞)與一或多種佐劑之組合之醫藥組合物，該等載劑可(例如)有利於將活性劑處理成可投與之製劑。適當調配物可至少地部分取決於所選投與途徑。可使用諸多投與途徑或模式將本文所闡述之藥劑遞送至患者，包含口服、經

頰、局部、直腸、經皮、經黏膜、皮下、靜脈內及肌內施加以及藉由吸入。

【0484】 活性劑可經調配用於非經腸投與(例如藉由注射，例如濃注或連續輸注)且可以單位劑型以安瓿(ampoule)、預填充注射器、小體積輸注器形式或以添加防腐劑之多劑量容器形式呈現。組合物可呈諸如存於油性或水性媒劑中之懸浮液、溶液或乳液等形式，例如存於水性聚乙二醇中之溶液。

【0485】 在一些實施例中，醫藥組合物包括防腐劑或穩定劑。在一些實施例中，防腐劑或穩定劑係選自細胞介素、生長因子或佐劑或化學物質。在一些實施例中，組合物包括至少一種幫助經由至少一個冷凍-解凍循環來維持細胞活力之試劑。在一些實施例中，組合物包括至少一種幫助經由至少一個以上冷凍-解凍循環來維持細胞活力之試劑。

【0486】 對於可注射調配物而言，媒劑可選自已知適宜者，包含水溶液或油性懸浮液或乳液，其使用芝麻油、玉米油、棉籽油或花生油以及酏劑、甘露醇、右旋糖或無菌水溶液及類似醫藥媒劑。調配物亦可包括生物相容之生物可降解性聚合物組合物，例如聚(乳酸-共-乙醇酸)。該等材料可製成加載有藥物且進一步經包衣或衍生以提供優良持續釋放性能之微球體或奈米球體。適於眼周或眼內注射之媒劑包含(例如)治療劑於注射級水、脂質體及適用於親脂性物質之媒劑中之懸浮液。用於眼周或眼內注射之其他媒劑在業內已眾所周知。

【0487】 在一些情況下，根據常規程序將醫藥組合物調配為適於經靜脈內投與人類之醫藥組合物。通常，用於靜脈內投與之組合物係無菌等滲水性緩衝劑中之溶液。若需要，組合物亦可包含增溶劑及局部麻醉劑

(例如利多卡因(lidocaine))以減輕注射部位處之疼痛。一般而言，成分可單獨供應或以單位劑型混合在一起，例如作為於指示活性劑之量之氣密性密封容器(例如安瓿或小藥囊)中之乾燥凍乾粉劑或無水濃縮物。倘若組合物擬藉由輸注來投與，則可使用含有無菌醫藥級水或鹽水之輸注瓶來分配該組合物。倘若組合物藉由注射來投與，則可提供含有注射用無菌水或鹽水之安瓿，從而可在投與之前混合各成分。

製備方法：

【0488】 本文提供製備抗原特異性T細胞之方法。本文提供製備T細胞組合物(例如治療性T細胞組合物)之方法。舉例而言，方法可包括擴增或誘導抗原特異性T細胞。製備(例如誘導或擴增) T細胞亦可係指製造T細胞，且在廣義上涵蓋分離、刺激、培養、誘導及/或擴增任一類型之T細胞(例如$CD4^+$ T細胞及$CD8^+$ T細胞)之程序。在一態樣中，本文提供製備至少一種包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞之方法，該方法包括將APC與來自生物試樣之耗竭表現CD14及/或CD25之細胞之免疫細胞群體一起培育。在一些實施例中，該方法包括製備至少一種包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞，該方法包括將APC與來自生物試樣之耗竭表現CD11b及/或CD19之細胞之免疫細胞群體一起培育。在一些實施例中，該方法包括將APC與來自生物試樣之耗竭表現任一CD11b及/或CD19及/或CD14及/或CD25或其任一組合之細胞之免疫細胞群體一起培育。

【0489】 在第二態樣中，本文提供製備至少一種包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞之方法，該方法包括將經FMS樣酪胺酸激酶3受體配體(FLT3L)刺激之APC與來自生物

試樣之免疫細胞群體一起培育。

【0490】 在第三態樣中，本文提供製備包括至少一種包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞之醫藥組合物的方法，該方法包括：將FMS樣酪胺酸激酶3受體配體(FLT3L)與來自生物試樣之免疫細胞群體培育第一時間段；且然後將生物試樣之至少一種T細胞與APC一起培育。

【0491】 在第四態樣中，本文提供製備至少一種包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞之方法，該方法包括將來自生物試樣之免疫細胞群體與一或多種APC製劑一起培育一或多個小於28天之單獨時間段(藉由將免疫細胞群體與一或多種APC製劑之第一APC製劑一起培育所測得)，其中擴增至少一種抗原特異性記憶性T細胞，或誘導至少一種抗原特異性幼稚T細胞。

【0492】 在第五態樣中，本文提供製備至少一種包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞之方法，該方法包括將來自生物試樣之免疫細胞群體與3種或更少APC製劑一起培育3個或更少單獨時間段，其中擴增至少一種抗原特異性記憶性T細胞或誘導至少一種抗原特異性幼稚T細胞。

【0493】 在一些實施例中，製備包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR) 之抗原特異性T細胞之方法包括將來自生物試樣之免疫細胞群體與一或多種APC製劑一起培育一或多個單獨時間段，由此刺激T細胞變成抗原特異性T細胞，其中抗原特異性T細胞之百分比為總$CD4^+$ T細胞、總$CD8^+$ T細胞、總T細胞或總免疫細胞之至少約0.00001%、0.00002%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、

0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在一些實施例中，製備包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞之方法包括將來自生物試樣之免疫細胞群體與3種或更少APC製劑一起培育3個或更少單獨時間段，由此刺激T細胞變成抗原特異性T細胞。在一些實施例中，製備包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞之方法包括將來自生物試樣之免疫細胞群體與2種或更少APC製劑一起培育2個或更少單獨時間段，由此刺激T細胞變成抗原特異性T細胞。

【0494】 在一些實施例中，本文提供一種方法，其包括將來自生物試樣之免疫細胞群體與一或多種APC製劑一起培育一或多個單獨時間段，由此刺激T細胞變成抗原特異性T細胞，其中APC製劑係在向APC群體加載抗原之前耗竭表現一或多種細胞表面標記物之細胞之PBMC細胞群體。在一些實施例中，在向APC群體加載抗原之前耗竭CD14+細胞。在一些實施例中，在向APC群體加載抗原之前耗竭CD25+細胞。在一些實施例中，在向APC群體加載抗原之前耗竭CD11b+細胞。在一些實施例中，在向APC群體加載抗原之前耗竭CD19+細胞。在一些實施例中，在向APC群體加載抗原之前耗竭CD3+細胞。在一些實施例中，在向APC群體加載抗原之前耗竭CD25+細胞及CD14+細胞。在一些實施例中，在向APC群體加載抗原之前耗竭CD11b+及CD25+細胞。在一些實施例中，在向APC群體加載抗原之前耗竭CD11b+及CD14+細胞。在一些實施例中，在向APC群

體加載抗原之前耗竭CD11b+、CD14+及CD25+細胞。在一些實施例中，在向APC群體加載抗原之前耗竭CD11b+及CD19+細胞。在一些實施例中，在向APC群體加載抗原之前耗竭CD11b+、CD19+及CD25+細胞。在一些實施例中，在向APC群體加載抗原之前耗竭CD11b+、CD14+、CD19+及CD25+細胞。在一些實施例中，該方法包括向任一上述耗竭APC群體中添加耗竭CD3+細胞之PBMC源APC富集細胞群體。在一些實施例中，耗竭CD3+細胞之PBMC源APC富集細胞群體耗竭CD11b+、CD14+、CD19+或CD25+中之任一者或多者。

【0495】在一些實施例中，生物試樣包括周邊血單核細胞(PBMC)。在一些實施例中，該方法包括向PBMC試樣中添加包括一或多種抗原性肽或編碼其之核酸之組合物，由此向PBMC內之APC加載抗原以供抗原呈現至PBMC中之T細胞。

【0496】在一些實施例中，方法包括：(a)自個體獲得包括至少一種抗原呈現細胞(APC)之生物試樣；(b)自該生物試樣富集表現CD11c之細胞，由此獲得$CD11c^+$細胞富集試樣；(c)將$CD11c^+$細胞富集試樣與至少一種細胞介素或生長因子一起培育第一時間段；(d)將至少一種肽與(c)之$CD11c^+$富集試樣一起培育第二時間段，由此獲得APC載肽試樣；(e)將APC載肽試樣與一或多種細胞介素或生長因子一起培育第三時間段，由此獲得成熟APC試樣；(f)將成熟APC試樣之APC與包括PBMC之CD11b及/或CD14及/或CD25耗竭試樣一起培育第四時間段；(g)將PBMC與成熟APC試樣之APC一起培育第五時間段；(h)將PBMC與成熟APC試樣之APC一起培育第六時間段；及(i)向有需要之個體投與PBMC之至少一種T細胞。

【0497】 在一些實施例中，方法包括：(a)自個體獲得包括至少一種抗原呈現細胞(APC)之生物試樣；(b)自該生物試樣富集表現CD14之細胞，由此獲得$CD14^+$細胞富集試樣；(c)將$CD14^+$細胞富集試樣與至少一種細胞介素或生長因子一起培育第一時間段；(d)將至少一種肽與(c)之$CD14^+$富集試樣一起培育第二時間段，由此獲得APC載肽試樣；(e)將APC載肽試樣與一或多種細胞介素或生長因子一起培育第三時間段，由此獲得成熟APC試樣；(f)將成熟APC試樣之APC與包括PBMC之CD14及/或CD25耗竭試樣一起培育第四時間段；(g)將PBMC與成熟APC試樣之APC一起培育第五時間段；(h)將PBMC與成熟APC試樣之APC一起培育第六時間段；及(i)向有需要之個體投與PBMC之至少一種T細胞。

【0498】 在一些實施例中，方法包括：(a)自個體獲得包括至少一種APC及至少一種PBMC之生物試樣；(b)自生物試樣耗竭表現CD11b及/或CD19之細胞，由此獲得CD11b及/或CD19細胞耗竭試樣；(c)將CD11b及/或CD19細胞耗竭試樣與FLT3L一起培育第一時間段；(d)將至少一種肽與(c)之CD11b及/或CD19細胞耗竭試樣一起培育第二時間段，由此獲得APC載肽試樣；(e)將APC載肽試樣與至少一種PBMC一起培育第三時間段，由此獲得第一經刺激PBMC試樣；(f)將第一經刺激PBMC試樣之PBMC與成熟APC試樣之APC一起培育第四時間段，由此獲得第二經刺激PBMC試樣；(g)將第二經刺激PBMC試樣之PBMC與成熟APC試樣之APC一起培育第五時間段，由此獲得第三經刺激PBMC試樣；(h)向有需要之個體投與第三經刺激PBMC試樣之至少一種T細胞。

【0499】 在一些實施例中，方法包括：(a)自個體獲得包括至少一種APC及至少一種PBMC之生物試樣；(b)自生物試樣耗竭表現CD11b及/或

CD19及/或CD14及/或CD25之細胞，由此獲得CD11b及/或CD19細胞耗竭試樣；(c)將CD11b及/或CD19及/或CD14及/或CD25細胞耗竭試樣與FLT3L一起培育第一時間段；(d)將至少一種肽與(c)之CD11b及/或CD19及/或CD14及/或CD25細胞耗竭試樣一起培育第二時間段，由此獲得APC載肽試樣；(e)將APC載肽試樣與至少一種PBMC一起培育第三時間段，由此獲得第一經刺激PBMC試樣；(f)將第一經刺激PBMC試樣之PBMC與成熟APC試樣之APC一起培育第四時間段，由此獲得第二經刺激PBMC試樣；(g)將第二經刺激PBMC試樣之PBMC與成熟APC試樣之APC一起培育第五時間段，由此獲得第三經刺激PBMC試樣；(h)向有需要之個體投與第三經刺激PBMC試樣之至少一種T細胞。

【0500】 在一些實施例中，方法包括：(a)自個體獲得包括至少一種APC及至少一種PBMC之生物試樣；(b)自生物試樣耗竭表現CD14及/或CD25之細胞，由此獲得CD14及/或CD25細胞耗竭試樣；(c)將CD14及/或CD25細胞耗竭試樣與FLT3L一起培育第一時間段；(d)將至少一種肽與(c)之CD14及/或CD25細胞耗竭試樣一起培育第二時間段，由此獲得APC載肽試樣；(e)將APC載肽試樣與至少一種PBMC一起培育第三時間段，由此獲得第一經刺激PBMC試樣；(f)將第一經刺激PBMC試樣之PBMC與成熟APC試樣之APC一起培育第四時間段，由此獲得第二經刺激PBMC試樣；(g)將第二經刺激PBMC試樣之PBMC與成熟APC試樣之APC一起培育第五時間段，由此獲得第三經刺激PBMC試樣；(h)向有需要之個體投與第三經刺激PBMC試樣之至少一種T細胞。

【0501】 在一些實施例中，製備至少一種包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞之方法包括將APC與

來自生物試樣之耗竭表現CD14及/或CD25之細胞的免疫細胞群體一起培育。

【0502】 在一些實施例中，本文提供製備至少一種包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞之方法，該方法包括將來自生物試樣之免疫細胞群體與一或多種APC製劑一起培育一或多個小於28天之單獨時間段(藉由將免疫細胞群體與一或多種APC製劑之第一APC製劑一起培育所測得)，其中擴增至少一種抗原特異性記憶性T細胞，或誘導至少一種抗原特異性幼稚T細胞。在一些實施例中，本文提供製備至少一種包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞之方法，該方法包括將來自生物試樣之免疫細胞群體與3種或更少APC製劑一起培育3個或更少單獨時間段，其中擴增至少一種抗原特異性記憶性T細胞或誘導至少一種抗原特異性幼稚T細胞。

【0503】 在一些實施例中，製備包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR) 之抗原特異性T細胞之方法包括使免疫細胞群體(例如PBMC)與APC接觸。在一些實施例中，製備包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR) 之抗原特異性T細胞之方法包括將免疫細胞群體(例如PBMC)與APC一起培育一定時間段。在一些實施例中，免疫細胞群體係來自生物試樣。在一些實施例中，免疫細胞群體係來自耗竭CD14表現細胞之試樣(例如生物試樣)。在一些實施例中，免疫細胞群體係來自耗竭CD25表現細胞之試樣(例如生物試樣)。在一些實施例中，免疫細胞群體係來自耗竭CD14表現細胞及CD25表現細胞之試樣(例如生物試樣)。

【0504】 在一些實施例中，製備至少一種包括對至少一個抗原肽序

列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞之方法包括將經FMS樣酪胺酸激酶3受體配體(FLT3L)刺激之APC與來自生物試樣的免疫細胞群體一起培育。在一些實施例中，本文提供製備包括至少一種包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞之醫藥組合物的方法，該方法包括：將FMS樣酪胺酸激酶3受體配體(FLT3L)與來自生物試樣之免疫細胞群體培育第一時間段；且然後將生物試樣之至少一種T細胞與APC一起培育。

【0505】 在一些實施例中，製備至少一種包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞之方法包括使來自試樣(例如生物試樣)的免疫細胞群體與FMS樣酪胺酸激酶3受體配體(FLT3L)接觸。在一些實施例中，製備至少一種包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞之方法包括使來自試樣(例如生物試樣)之免疫細胞群體與經FMS樣酪胺酸激酶3受體配體(FLT3L)刺激的APC接觸。在一些實施例中，製備至少一種包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞之方法包括將來自試樣(例如生物試樣)之免疫細胞群體與經FMS樣酪胺酸激酶3受體配體(FLT3L)刺激的APC一起培育。在一些實施例中，製備包括至少一種包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞之醫藥組合物的方法包括：將FMS樣酪胺酸激酶3受體配體(FLT3L)與來自生物試樣之免疫細胞群體一起培育(例如一定時間段)；且然後使生物試樣之T細胞與APC接觸。在一些實施例中，製備至少一種包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞之方法包括使來自試樣(例如生物試樣)的免疫細胞群體與一或多種APC

製劑接觸。在一些實施例中，製備至少一種包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞之方法包括將來自試樣(例如生物試樣)的免疫細胞群體與一或多種APC製劑一起培育一或多個單獨時間段。在一些實施例中，製備至少一種包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞之方法包括將來自試樣(例如生物試樣)的免疫細胞群體與一或多種APC製劑一起培育1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個單獨時間段。在一些實施例中，一或多個單獨時間段小於28天且係藉由將免疫細胞群體與一或多種APC製劑之第一APC製劑一起培育所計算。

【0506】 在一些實施例中，製備包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞之方法包括將免疫細胞群體與APC一起培育一定時間段，其中免疫細胞群體係來自包括PBMC之生物試樣。在一些實施例中，製備包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞之方法包括將免疫細胞群體與APC一起培育一定時間段，其中免疫細胞群體係來自耗竭CD14及/或CD25表現細胞之生物試樣。

【0507】 在一些實施例中，製備包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞之方法包括將來自生物試樣之免疫細胞群體與經FMS樣酪胺酸激酶3受體配體(FLT3L)刺激的APC一起培育一定時間段。

【0508】 在一些實施例中，製備包括含有對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞之醫藥組合物的方法包括：將FMS樣酪胺酸激酶3受體配體(FLT3L)與來自生物試樣之免疫細胞

群體一起培育；且然後使生物試樣之T細胞與APC接觸。

【0509】 在一些實施例中，製備包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞之方法包括將來自生物試樣的免疫細胞群體與一或多種APC製劑一起培育一或多個單獨時間段，由此誘導或擴增抗原特異性T細胞，其中一或多個單獨時間段小於28天且係藉由將免疫細胞群體與一或多種APC製劑之第一APC製劑一起培育所計算。在一些實施例中，在含有IL-7、IL-15或其組合之培養基中將來自生物試樣之免疫細胞群體與一或多種APC製劑一起培育一或多個單獨時間段。在一些實施例中，培養基進一步包括吲哚胺2,3-二氧酶-1 (IDO)抑制劑、抗PD-1抗體、IL-12或其組合。IDO抑制劑可為埃帕司他、納伏昔莫德、1-甲基色胺酸或其組合。在一些實施例中，IDO抑制劑可增加抗原特異性$CD8^+$細胞之數量。在一些實施例中，IDO抑制劑可維持記憶性$CD8^+$ T細胞反應之功能特徵。PD-1抗體可增加抗原特異性記憶性CD8+ T細胞反應之絕對數量。PD-1抗體可增加經該抗體處理之細胞之增殖速率。添加IL-12可增加抗原特異性細胞及/或增加$CD8^+$ T細胞頻率。

【0510】 在一些實施例中，製備包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞之方法包括將來自生物試樣的免疫細胞群體與一或多種APC製劑一起培育一或多個單獨時間段，由此擴增或誘導抗原特異性T細胞，其中抗原特異性T細胞、抗原特異性$CD4^+$ T細胞或抗原特異性$CD8^+$ T細胞之百分比為總T細胞、總$CD4^+$ T細胞、總$CD8^+$ T細胞、總免疫細胞或總細胞之至少約0.00001%、0.00002%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、

11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。

【0511】 在一些實施例中，製備包括對至少一個抗原肽序列具有特異性之T細胞受體(TCR)之抗原特異性T細胞之方法包括將來自生物試樣之免疫細胞群體與3種或更少APC製劑一起培育3個或更少單獨時間段，由此刺激T細胞變成抗原特異性T細胞。

【0512】 在一些實施例中，免疫細胞群體係來自耗竭CD14及/或CD25表現細胞之生物試樣。在一些實施例中，APC係經FMS樣酪胺酸激酶3受體配體(FLT3L)刺激之APC。在一些實施例中，APC包括一或多種APC製劑。在一些實施例中，APC製劑包括3種或更少APC製劑。在一些實施例中，將APC製劑與免疫細胞一起在一或多個單獨時間段內依序培育。

【0513】 在一些實施例中，生物試樣係來自個體。在一些實施例中，個體係人類。舉例而言，個體可為患者或供體。在一些實施例中，個體患有疾病或病症。在一些實施例中，疾病或病症係癌症。在一些實施例中，抗原特異性T細胞包括$CD4^+$及/或$CD8^+$ T細胞。在一些實施例中，抗原特異性T細胞包括CD4富集T細胞及/或CD8富集T細胞。舉例而言，可自來自個體之包括PBMC之生物試樣分離、富集或純化$CD4^+$ T細胞及/或$CD8^+$ T細胞。在一些實施例中，抗原特異性T細胞係幼稚$CD4^+$及/或幼稚$CD8^+$ T細胞。在一些實施例中，抗原特異性T細胞係記憶性$CD4^+$及/或記憶性$CD8^+$ T細胞。

【0514】 在一些實施例中，至少一個抗原肽序列包括選自以下之突

變：(A)點突變，且癌症抗原肽以小於500 nM之IC_{50}及大於相應野生型肽之親和力結合至個體之HLA蛋白；(B)剪接位點突變；(C)框移突變；(D)連讀突變；(E)基因融合突變；及其組合。在一些實施例中，至少一個抗原肽序列中之每一者結合至由表現於個體中之HLA等位基因編碼之蛋白質。在一些實施例中，至少一個抗原肽序列中之每一者包括不存在於個體之非癌細胞中之突變。在一些實施例中，至少一個抗原肽序列中之每一者係由個體癌細胞之表現基因編碼。在一些實施例中，至少一個抗原肽序列中之一或多者具有8-50個天然胺基酸之長度。在一些實施例中，至少一個抗原肽序列包括複數個抗原肽序列。在一些實施例中，複數個抗原肽序列包括2-50、3-50、4-50、5-5-、6-50、7-50、8-50、9-50或10-50個抗原肽序列。

【0515】在一些實施例中，APC包括加載一或多種包括至少一個抗原肽序列中之一或多者之抗原肽之APC。在一些實施例中，APC係自體APC或同種異體APC。在一些實施例中，APC包括樹突狀細胞(DC)。

【0516】在一些實施例中，方法包括自生物試樣耗竭CD14及/或CD25表現細胞。在一些實施例中，耗竭$CD14^+$細胞包括使CD14結合劑與APC接觸。在一些實施例中，APC係衍生自$CD14^+$單核球。在一些實施例中，APC係自生物試樣所富集。舉例而言，可自來自個體之包括PBMC之生物試樣分離、富集或純化APC。

【0517】在一些實施例中，使用一或多種細胞介素或生長因子刺激APC。在一些實施例中，一或多種細胞介素或生長因子包括GM-CSF、IL-4、FLT3L或其組合。在一些實施例中，一或多種細胞介素或生長因子包括IL-4、IFN-γ、LPS、GM-CSF、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7

或其組合。

【0518】 在一些實施例中，APC係來自第二生物試樣。在一些實施例中，第二生物試樣係來自同一個體。

【0519】 在一些實施例中，該方法中之抗原特異性T細胞之百分比為總T細胞或總免疫細胞之至少約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在一些實施例中，該方法中之抗原特異性T細胞之百分比為總T細胞或總免疫細胞之約0.1%至約5%、約5%至10%、約10%至15%、約15%至20%、約20%至25%、約25%至30%、約30%至35%、約35%至約40%、約40%至約45%、約45%至約50%、約50%至約55%、約55%至約60%、約60%至65%或約65%至約70%。在一些實施例中，該方法中之抗原特異性$CD8^+$ T細胞之百分比為總T細胞或總免疫細胞之至少約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在一些實施例中，該方法中之抗原特異性幼稚$CD8^+$ T細胞之百分比為總T細胞或總免疫細胞之至少約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在一些實施例中，該方法中之抗原特異性記憶性$CD8^+$ T細胞之百分比為總T細胞或總免疫細胞之至少約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在一些實施例中，該方法中之抗原特異性$CD4^+$ T細胞之百分比為總T細胞或總免疫細胞之至少約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在一些

實施例中，該方法中之抗原特異性$CD4^+$ T細胞之百分比為總T細胞或總免疫細胞之至少約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在一些實施例中，生物試樣中之抗原特異性T細胞之百分比為至多約0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在一些實施例中，生物試樣中之抗原特異性$CD8^+$ T細胞之百分比為至多約0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在一些實施例中，生物試樣中之抗原特異性幼稚$CD8^+$ T細胞之百分比為至多約0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在一些實施例中，生物試樣中之抗原特異性記憶性$CD8^+$ T細胞之百分比為至多約0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在一些實施例中，生物試樣中之抗原特異性$CD4^+$ T細胞之百分比為至多約0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。

【0520】在一些實施例中，生物試樣係自個體新獲得或係冷凍試樣。

【0521】在一些實施例中，方法包括將中之一或多種APC製劑與包括至少一種細胞介素或生長因子之第一培養基一起培育第一時間段。在一些實施例中，第一時間段為至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、

12、13、14、15、16或17或18天。在一些實施例中，第一時間段不超過2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18天。在一些實施例中，第一時間段為至少1、2、3、4、5、6、7、8或9天。在一些實施例中，第一時間段不超過3、4、5、6、7、8、9或10天。在一些實施例中，至少一種細胞介素或生長因子包括GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7、IFN-γ、LPS、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40、聚I:C或其任一組合。

【0522】在一些實施例中，方法包括將一或多種APC製劑與至少一種肽一起培育第二時間段。在一些實施例中，第二時間段不超過1小時。

【0523】在一些實施例中，方法包括將一或多種APC製劑與包括一或多種細胞介素或生長因子之第二培養基一起培育第三時間段，由此獲得成熟APC。在一些實施例中，一或多種細胞介素或生長因子包括GM-CSF(顆粒球巨噬球群落刺激因子)、IL-4、FLT3L、IFN-γ、LPS、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7、IFN-α、R848(瑞喹莫德)、LPS、ss-rna40、聚I:C、CpG或其組合。在一些實施例中，第三時間段不超過2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18天。在一些實施例中，第三時間段為至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或17天。在一些實施例中，第三時間段不超過2、3、4或5天。在一些實施例中，第三時間段為至少1、2、3或4天。

【0524】在一些實施例中，該方法進一步包括在第三時間段之後且在開始第四時間段之前去除第二培養基之一或多種細胞介素或生長因子。

用於活體外T細胞誘導之加載抗原之PBMC

【0525】在一些實施例中，本文所提供之方法包括自人類血樣分離

PBMC且直接向PBMC加載抗原。與抗原直接接觸之PBMC可易於藉由吞噬作用吸收抗原且將抗原呈現至可位於培養物中或添加至培養物中之T細胞。在一些實施例中，本文所提供之方法包括自人類血樣分離PBMC，且將編碼一或多種抗原之多核苷酸(例如mRNA)核轉染或電穿孔至PBMC中。在一些實施例中，遞送至PBMC (而非成熟成DC之抗原呈現細胞)之抗原提供了關於時間及製備效率之巨大優點。PBMC可進一步耗竭一或多種細胞類型。在一些實施例中，可在抗原加載之初始時段使PBMC耗竭CD3+細胞且將CD3+細胞放回培養物中以供PBMC刺激CD3+ T細胞。在一些實施例中，PBMC可耗竭CD25+細胞。在一些實施例中，PBMC可耗竭CD14+細胞。在一些實施例中，PBMC可耗竭CD19+細胞。在一些實施例中，PBMC可耗竭CD14及CD25表現細胞二者。在一些實施例中，在抗原加載之前自PBMC試樣耗竭CD11b+細胞。在一些實施例中，在抗原加載之前自PBMC試樣耗竭CD11b+及CD25+細胞。

【0526】 在一些實施例中，在加載抗原之前，可儘可能最低程度地處理自人類血樣分離之PBMC。增加PBMC之處理(例如冷凍及解凍細胞、多個細胞耗竭步驟等)可損害細胞健康及活力。

【0527】 在一些實施例中，PBMC對於療法個體係同種異體的。在一些實施例中，PBMC對於使用抗原特異性T細胞之接受性細胞療法之個體係同種異體的。

【0528】 在一些實施例中，PBMC匹配療法個體之HLA。在一些實施例中，PBMC係同種異體的，且匹配個體之HLA亞型，而CD3+ T細胞係自體的。向PBMC加載各別抗原(例如衍生自諸如RECON等肽呈現分析平臺之分析)，與個體之包括T細胞之PBMC一起共培養以刺激抗原特異性

T細胞。

【0529】 在一些實施例中，使用mRNA作為攝取及抗原呈現之免疫原。與肽抗原相比，使用mRNA來加載PBMC之一個優點在於，RNA係自我輔助性且無需其他佐劑。使用mRNA之另一優點在於，肽係內源性處理及呈現。在一些實施例中，mRNA包括編碼包括表位之9-10個胺基酸肽之短聚體構築體。在一些實施例中，mRNA包括編碼約25個胺基酸肽之長聚體構築體。在一些實施例中，mRNA包括多個表位之序連體。在一些實施例中，序連體可包括一或多個來自相同抗原蛋白之表位。在一些實施例中，序連體可包括一或多個來自若干不同抗原蛋白之表位。若干實施例闡述於實例部分中。PBMC之抗原加載(藉由抗原加載)可包括各種將核酸遞送且納入PBMC中之機制。在一些實施例中，遞送或納入機制包含轉染、電穿孔、核轉染、化學遞送(例如脂質囊封或脂質體調介之遞送)。

【0530】 使用加載抗原之PBMC來刺激T細胞可節省在T細胞刺激之前自PBMC試樣生成DC之方法中所需的成熟時間。在一些實施例中，使用加載抗原之PBMC (例如加載mRNA之PBMC)作為APC可將總製備時間減少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天。在一些實施例中，使用加載抗原之PBMC作為APC可將總製備時間減少3天。在一些實施例中，使用加載抗原之PBMC作為APC可將總製備時間減少4天。在一些實施例中，使用加載抗原之PBMC作為APC可將總製備時間減少5天。在一些實施例中，使用加載抗原之PBMC作為APC可將總製備時間減少6天。在一些實施例中，使用加載抗原之PBMC作為APC可將總製備時間減少7天。

【0531】 在一些實施例中，使用mRNA作為抗原可較佳，此乃因易於設計及製備核酸且易於轉染PBMC。在一些實施例中，加載mRNA之

PBMC可刺激T細胞且生成較高抗原特異性T細胞。在一些實施例中，加載mRNA之PBMC可刺激T細胞且生成較高產率之抗原特異性T細胞。在一些實施例中，加載mRNA之PBMC可刺激T細胞且生成較高程度地呈現輸入抗原(亦即對不同抗原具有反應性)之抗原特異性T細胞。在一些實施例中，加載mRNA之PBMC可刺激在經擴增細胞池中具有至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多抗原反應性之T細胞。在一些實施例中，與加載抗原之習用APC (例如加載肽之DC)相比，加載mRNA之PBMC可刺激具有至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多抗原反應性之T細胞。

治療方法

【0532】 本文提供治療個體之癌症之方法，其包括：I.使加載癌症新抗原之抗原呈現細胞(APC)與經分離T細胞離體接觸，其中加載癌症新抗原之抗原呈現細胞(APC)耗竭CD11b；II. 離體製備用於癌症免疫療法之細胞組合物之癌症新抗原引發性T細胞；及III.在個體中投與用於癌症免疫療法之細胞組合物，其中至少一或多種與癌症相關之病狀或症狀因該投與而減少或改善，由此治療個體，其中加載癌症新抗原之APC及癌症新抗原引發性T細胞各自表現由表現於個體中且新抗原可特異性結合之HLA等位基因編碼之蛋白質。

【0533】 在一些實施例中，該方法進一步包括向個體投與至少一種抗原特異性T細胞中之一或多者。在一些實施例中，藉由注射來投與包括T細胞之治療組合物。在一些實施例中，藉由輸注來投與包括T細胞之治療組合物。在藉由注射投與時，可在水溶液、具體而言生理相容緩衝液(例如漢克氏溶液(Hanks solution)、林格氏溶液(Ringer's solution)或生理學鹽水緩衝液)中調配活性劑。溶液可含有諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散

劑等調配劑。在另一實施例中，醫藥組合物不包括佐劑或任一經添加以增強藉由肽刺激之免疫反應之其他物質。在一些實施例中，該方法進一步包括以本文所闡述之醫藥組合物形式向個體投與至少一種抗原特異性T細胞中之一或多者。在一些實施例中，醫藥組合物包括防腐劑或穩定劑。在一些實施例中，防腐劑或穩定劑係選自細胞介素、生長因子或佐劑或化學物質。在一些實施例中，在自個體收集PBMC試樣開始28天內向個體投與至少一種抗原特異性T細胞。

【0534】 除前述調配物外，活性劑亦可調配為儲積製劑。可藉由植入或透皮遞送(例如經皮下或經肌內)、肌內注射或使用經皮貼劑來投與該等長效調配物。因此，舉例而言，藥劑可使用適宜聚合或疏水性材料(例如作為於可接受油中之乳液)或離子交換樹脂來調配，或作為微溶衍生物(例如微溶鹽)來調配。

【0535】 本文亦提供治療患有疾病、病症或病狀之個體之方法。治療方法可包括向患有疾病、病症或病狀之個體投與本文所揭示之組合物或醫藥組合物。

【0536】 本發明提供包括免疫原性療法之治療方法。提供治療疾病(例如癌症或病毒感染)之方法。根據本文所提供之方法，方法可包括向個體投與有效量之包括免疫原性抗原特異性T細胞之組合物。在一些實施例中，抗原包括病毒抗原。在一些實施例中，抗原包括腫瘤抗原。

【0537】 可製備治療劑之非限制性實例包含基於肽之療法、基於核酸之療法、基於抗體之療法、基於T細胞之療法及基於抗原呈現細胞之療法。

【0538】 在一些其他態樣中，本文提供組合物或醫藥組合物用以製

備用於療法中之藥劑之用途。在一些實施例中，治療方法包括向個體投與有效量之特異性識別免疫原性新抗原肽之T細胞。在一些實施例中，治療方法包括向個體投與有效量之特異性識別免疫原性新抗原肽之TCR (例如表現於T細胞中之TCR)。

【0539】 在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群：癌瘤、淋巴瘤、母細胞瘤、肉瘤、白血病、鱗狀細胞癌症、肺癌(包含小細胞肺癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺腺癌及鱗狀肺癌)、腹膜癌、肝細胞癌、胃癌(gastric or stomach cancer) (包含胃腸道癌)、胰臟癌、神經膠母細胞瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝細胞瘤、乳癌、結腸癌、黑色素瘤、子宮內膜或子宮癌、唾液腺癌、腎癌(kidney or renal cancer)、肝癌、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、肝癌、頭頸癌、結腸直腸癌、直腸癌、軟組織肉瘤、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、B細胞淋巴瘤(包含低級/濾泡性非何傑金氏淋巴瘤(non-Hodgkin’s lymphoma) (NHL)、小淋巴球性(SL) NHL、中級/濾泡性NHL、中級彌漫性NHL、高級免疫母細胞性NHL、高級淋巴母細胞性NHL、高級小無核裂細胞NHL、巨塊型疾病NHL、外套細胞淋巴瘤、AIDS相關淋巴瘤及瓦登斯特隆巨球蛋白血症(Waldenstrom’s macroglobulinemia))、慢性淋巴球性白血病(CLL)、急性淋巴母細胞性白血病(ALL)、骨髓瘤、毛細胞白血病、慢性骨髓母細胞性白血病及移植後淋巴組織增殖性病症(PTLD)、與斑痣性錯構瘤病有關之異常血管增殖、水腫、梅格斯氏症候群(Meigs’ syndrome)及其組合。

【0540】 本文所闡述之方法尤其可用於個性化醫學背景，其中使用根據本文所闡述方法鑑別之免疫原性新抗原肽來研發用於同一個體之治療劑(例如疫苗或治療抗體)。因此，治療個體之疾病之方法可包括：根據本

文所闡述之方法鑑別個體中之免疫原性新抗原肽；及合成肽(或其前體，例如編碼肽之多核苷酸(例如mRNA))；及製備對所鑑別新抗原具有特異性之T細胞；及向個體投與新抗原特異性T細胞。在一些實施例中，治療個體之疾病之方法可包括：根據本文所闡述之方法鑑別個體中之免疫原性新抗原肽；及合成編碼免疫原性新抗原肽或其前體之多核苷酸(例如mRNA)；及製備對所鑑別新抗原具有特異性之T細胞；及向個體投與新抗原特異性T細胞。

【0541】 本文所提供之藥劑及組合物可單獨使用或與習用治療方案(例如手術、輻照、化學療法及/或骨髓移植(自體、同基因、同種異體或非相關))組合使用。可使用本文所闡述之方法鑑別一組腫瘤抗原且用於(例如)大部分癌症患者中。

【0542】 在一些實施例中，除包括免疫原性療法之組合物外，亦可投與至少一種或多種化學治療劑。在一些實施例中，一或多種化學治療劑可屬不同種類之化學治療劑。

【0543】 在實踐本文所提供之治療方法或用途時，可向患有疾病或病狀之個體投與治療有效量之治療劑。治療有效量可端視以下因素廣泛變化：疾病嚴重程度、個體之年齡及相對健康狀況、所用化合物之功效及其他因素。

【0544】 個體可為(例如)哺乳動物、人類、懷孕女性、老年人、成人、青少年、未成年人、兒童、幼兒、嬰兒、新生兒或初生嬰兒。個體可為患者。在一些情形下，個體可為人類。在一些情形下，個體可為兒童(亦即小於青春期年齡之年輕人)。在一些情形下，個體可為嬰兒。在一些情形下，個體可為配方奶粉餵養嬰兒。在一些情形下，個體可為招募於臨

床研究中之個體。在一些情形下，個體可為實驗室動物，例如哺乳動物或齧齒類動物。在一些情形下，個體可為小鼠。在一些情形下，個體可為肥胖或超重個體。

【0545】 在一些實施例中，先前已使用一或多種不同癌症治療方式治療個體。在一些實施例中，先前已使用放射療法、化學療法或免疫療法中之一或多者治療個體。在一些實施例中，已使用一、二、三、四或五線之先前療法治療個體。在一些實施例中，先前療法係細胞毒性療法。

【0546】 在一些實施例中，可使用本文所揭示之方法治療之疾病或病狀係癌症。癌症係往往以不受控方式增殖且在一些情形下發生轉移(擴散)之異常細胞生長。腫瘤可為癌性或良性。良性腫瘤意指腫瘤可生長但不擴散。癌性腫瘤係惡性的，從而意味著其可生長且擴散至身體之其他部分。若癌症發生擴散(轉移)，則新腫瘤與原始(原發性)腫瘤具有相同名稱。

【0547】 本發明方法可用於治療業內已知之任一類型之癌症。擬藉由本發明方法治療之癌症之非限制性實例可包含黑色素瘤(例如轉移性惡性黑色素瘤)、腎癌(例如澄清細胞癌)、前列腺癌(例如激素難治性前列腺腺癌)、胰臟腺癌、乳癌、結腸癌、肺癌(例如非小細胞肺癌)、食管癌、頭頸鱗狀細胞癌、肝癌、卵巢癌、子宮頸癌、甲狀腺癌、神經膠母細胞瘤、神經膠質瘤、白血病、淋巴瘤及其他贅瘤性惡性腫瘤。

【0548】 另外，本文所提供之疾病或病狀包含可使用本發明之治療方法抑制生長之難治性或復發性惡性腫瘤。在一些實施例中，擬藉由本發明之治療方法治療之癌症係選自由以下組成之群：癌瘤、鱗狀癌、腺癌、惡性肉瘤、子宮內膜癌、乳癌、卵巢癌、子宮頸癌、輸卵管癌、原發性腹

膜腔癌、結腸癌、結腸直腸癌、生殖器區鱗狀細胞癌、黑色素瘤、腎細胞癌、肺癌、非小細胞肺癌、肺鱗狀細胞癌、胃癌、膀胱癌、膽囊癌、肝癌、甲狀腺癌、喉癌、唾液腺癌、食管癌、頭頸癌、神經膠母細胞瘤、神經膠質瘤、頭頸鱗狀細胞癌、前列腺癌、胰臟癌、間皮瘤、肉瘤、血液癌、白血病、淋巴瘤、神經瘤及其組合。在一些實施例中，擬藉由本發明方法治療之癌症包含(例如)癌瘤、鱗狀癌(例如子宮頸管、眼瞼、結膜、陰道、肺、口腔、皮膚、膀胱、舌、喉及食管之鱗狀癌)及腺癌(例如前列腺、小腸、子宮內膜、子宮頸管、大腸、肺、胰臟、食管、直腸、子宮、胃、乳腺及卵巢之腺癌)。在一些實施例中，擬藉由本發明方法治療之癌症進一步包含惡性肉瘤(例如肌源性肉瘤)、白血病、神經瘤、黑色素瘤及淋巴瘤。在一些實施例中，擬藉由本發明方法治療之癌症係乳癌。在一些實施例中，擬藉由本發明之治療方法治療之癌症係三陰性乳癌(TNBC)。在一些實施例中，擬藉由本發明之治療方法治療之癌症係卵巢癌。在一些實施例中，擬藉由本發明之治療方法治療之癌症係結腸直腸癌。

【0549】在一些實施例中，擬使用本發明之醫藥組合物治療之患者或患者群體患有實體腫瘤。在一些實施例中，實體腫瘤係黑色素瘤、腎細胞癌、肺癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、結腸癌、膽囊癌、喉癌、肝癌、甲狀腺癌、胃癌、唾液腺癌、前列腺癌、胰臟癌或默克爾細胞癌。在一些實施例中，擬使用本發明之醫藥組合物治療之患者或患者群體患有血液癌。在一些實施例中，患者患有血液癌，例如瀰漫性大B細胞淋巴瘤(「DLBCL」)、何傑金氏淋巴瘤((「HL」)、非何傑金氏淋巴瘤(「NHL」)、濾泡性淋巴瘤(「FL」)、急性骨髓樣白血病(「AML」)或多發性骨髓瘤(「MM」)。在一些實施例中，擬治療之患者或患者群體患有

選自由以下組成之群之癌症：卵巢癌、肺癌及黑色素瘤。

【0550】 可根據本發明預防及/或治療之癌症之具體實例包含(但不限於)下列疾病：腎癌(renal cancer、kidney cancer)、多形性神經膠母細胞瘤、轉移性乳癌；乳癌；乳房肉瘤；神經纖維瘤；神經纖維瘤病；兒科腫瘤；神經母細胞瘤；惡性黑色素瘤；表皮癌；白血病，例如(但不限於)急性白血病、急性淋巴球性白血病、急性骨髓細胞性白血病(例如骨髓母細胞性白血病、前髓細胞性白血病、骨髓單核球性白血病、單核球性白血病、紅白血病及骨髓發育不良症候群)、慢性白血病(例如(但不限於)慢性骨髓細胞性(顆粒球性)白血病、慢性淋巴球性白血病、毛細胞白血病)；真性紅血球增多症；淋巴瘤，例如(但不限於)何傑金氏病(Hodgkin's disease)、非何傑金氏病(non-Hodgkin's disease)；多發性骨髓瘤，例如(但不限於)燜燃型多發性骨髓瘤、非分泌骨髓瘤、骨硬化性骨髓瘤、漿細胞白血病、單發性漿細胞瘤及髓外漿細胞瘤；瓦登斯特隆巨球蛋白血症；未定性之單株丙種球蛋白病；良性單株丙種球蛋白病；重鏈病；骨癌及結締組織肉瘤，例如(但不限於)骨肉瘤、骨髓瘤骨病、多發性骨髓瘤、膽脂瘤誘導性骨肉瘤、骨佩吉特氏病(Paget's disease of bone)、骨肉瘤、軟骨肉瘤、尤恩氏肉瘤(Ewing's sarcoma)、惡性巨細胞腫瘤、骨纖維肉瘤、脊索瘤、骨膜肉瘤、軟組織肉瘤、血管肉瘤(angiosarcoma、hemangiosarcoma)、纖維肉瘤、卡波西氏肉瘤、平滑肌肉瘤、脂肪肉瘤、淋巴管肉瘤、神經鞘瘤、橫紋肌肉瘤及滑膜肉瘤；腦腫瘤，例如(但不限於)神經膠質瘤、星形細胞瘤、腦幹神經膠質瘤、室管膜瘤、少突神經膠質瘤、非神經膠質腫瘤、聽神經鞘瘤、顱咽管瘤、髓母細胞瘤、腦膜瘤、松果體細胞瘤、松果體母細胞瘤及原發性腦淋巴瘤；乳癌，包含(但

不限於)腺癌、小葉(小細胞)癌、導管內癌、髓質乳癌、黏液性乳癌、管狀乳癌、乳頭狀乳癌、佩吉特氏病(Paget's disease) (包含幼年型佩吉特氏病)及發炎性乳癌；腎上腺癌，例如(但不限於)嗜鉻細胞瘤及腎上腺皮質癌；甲狀腺癌，例如(但不限於)乳頭狀或濾泡性甲狀腺癌、髓質甲狀腺癌及間變性甲狀腺癌；胰臟癌，例如(但不限於)胰島素瘤、胃泌素瘤、胰高血糖素瘤、胰腺瘤、促生長素抑制素分泌型腫瘤及類癌或胰島細胞腫瘤；垂體癌，例如(但限於)庫欣氏病(Cushing's disease)、催乳素分泌型腫瘤、肢端肥大症及尿崩症；眼癌，例如(但不限於)眼部黑色素瘤(例如虹膜黑素瘤、脈絡膜黑素瘤及睫狀體黑素瘤)及視網膜母細胞瘤；陰道癌，例如鱗狀細胞癌、腺癌及黑色素瘤；外陰癌，例如鱗狀細胞癌、黑色素瘤、腺癌、基底細胞癌、肉瘤及佩吉特氏病；子宮頸癌，例如(但不限於)鱗狀細胞癌及腺癌；子宮癌，例如(但不限於)子宮內膜癌及子宮肉瘤；卵巢癌，例如(但不限於)卵巢上皮癌、交界瘤、生殖細胞腫瘤及基質腫瘤；子宮頸癌；食管癌，例如(但不限於)鱗狀癌、腺癌、腺樣囊性癌、黏液表皮樣癌、腺鱗狀癌、肉瘤、黑色素瘤、漿細胞瘤、疣狀癌及燕麥細胞(小細胞)癌；胃癌，例如(但不限於)腺癌、真菌樣生長(息肉樣)型癌、潰瘍型癌、淺表擴展型癌、擴散擴展型癌、惡性淋巴瘤、脂肪肉瘤、纖維肉瘤及癌肉瘤；結腸癌；結腸直腸癌、KRAS突變性結腸直腸癌；結腸癌；直腸癌；肝癌，例如(但不限於)肝細胞癌及肝母細胞瘤、膽囊癌，例如腺癌；膽管癌，例如(但不限於)乳突狀癌、結節性癌及擴散性癌；肺癌，例如KRAS突變性非小細胞肺癌、非小細胞肺癌、鱗狀細胞癌(表皮樣癌)、腺癌、大細胞癌及小細胞肺癌；肺癌；睪丸癌，例如(但不限於)生殖細胞腫瘤、精原細胞瘤、間變性癌、經典(典型)癌、生殖細胞癌、非精原細胞

瘤、胚胎性癌、畸胎瘤癌、絨毛膜癌(卵黃囊瘤)；前列腺癌，例如(但不限於)雄激素獨立性前列腺癌、雄激素依賴性前列腺癌、腺癌、平滑肌肉瘤及橫紋肌肉瘤；陰莖癌；口腔癌，例如(但不限於)鱗狀細胞癌；基底癌；唾液腺癌，例如(但不限於)腺癌、黏液表皮樣癌及腺樣囊狀癌；咽癌，例如(但不限於)鱗狀細胞癌及疣狀癌；皮膚癌，例如(但不限於)基底細胞癌、鱗狀細胞癌及黑色素瘤、淺表擴展黑色素瘤、結節性黑色素瘤、小痣型惡性黑色素瘤、肢端著色斑性黑色素瘤；腎癌，例如(但不限於)腎細胞癌、腺癌、腎上腺樣瘤、纖維肉瘤、移行細胞癌(腎盂及/或子宮)；腎癌；維爾姆斯氏腫瘤(Wilms' tumor)；膀胱癌，例如(但不限於)移行細胞癌、鱗狀細胞癌、腺癌、癌肉瘤。另外，癌症包含黏液肉瘤、成骨性肉瘤、內皮肉瘤、淋巴管內皮肉瘤、間皮瘤、滑膜瘤、血管母細胞瘤、上皮癌、囊腺癌、支氣管原癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳突狀癌及乳突狀腺癌。

【0551】在一些實施例中，使用藉由本文所闡述方法生成之接受性T細胞進行治療係關於治療特定患者群體。在一些實施例中，接受性T細胞係針對治療使用某些療法難以治療之患者群體。舉例而言，T細胞係針對治療使用抗檢查點抑制劑療法難以治療之患者群體。在一些實施例中，患者係黑色素瘤患者。在一些實施例中，患者係轉移性黑色素瘤患者。在一些實施例中，本文提供治療不可切除性黑色素瘤患者之方法。在一些實施例中，選擇不可切除性黑色素瘤患者用於本文所闡述之T細胞療法(例如NEO-PTC-01)。不可切除性黑色素瘤個體不能為使用腫瘤浸潤性淋巴球之療法之候選者。在一些實施例中，使用藉由本文所闡述方法生成之接受性T細胞進行治療係關於治療轉移性及不可切除性黑色素瘤患者。在一些實施例中，患者難以使用抗PD1療法治療。在一些實施例中，患者難以使

用抗CTLA-4療法治療。在一些實施例中，患者難以使用抗PD1及抗CTLA-4療法二者治療。在一些實施例中，經靜脈內投與療法。在一些實施例中，療法係藉由注射或輸注來投與。在一些實施例中，經由單一劑量或2、3、4、5、6、7、8、9或10個劑量來投與療法。在一些實施例中，治療或醫藥組合物在每一劑量中包括約10^9或更高總數之細胞。在一些實施例中，治療或醫藥組合物在每一劑量中包括10^10或更高總數之細胞。在一些實施例中，治療或醫藥組合物在每一劑量中包括10^11或更高總數之細胞。在一些實施例中，治療或醫藥組合物在每一劑量中包括10^12或更高總數之細胞。在一些實施例中，向個體投與如本文所闡述具有約10^10至約10^11個總細胞/劑量之治療組合物，其中細胞已驗證品質且已通過發佈準則。

套組

【0552】 本文所闡述之方法及組合物可與投與說明書一起以套組形式提供。通常，套組可包含位於容器中之呈單元劑型形式之期望新抗原治療組合物及投與說明書。其他治療劑(例如細胞介素、淋巴因子、檢查點抑制劑、抗體)亦可包含於套組中。亦可期望之其他套組組分包含(例如)無菌注射器、加強劑量及其他期望賦形劑。

【0553】 本文亦提供用於本文所闡述之一或多種方法中之套組及製品。套組可含有一或多種類型之免疫細胞。套組亦可含有可用於如本文所闡述之抗原特異性免疫細胞(例如新抗原特異性T細胞)產生之試劑、肽及/或細胞。套組可另外含有組成及遞送抗原特異性免疫細胞所需之佐劑、試劑及緩衝液。

【0554】 套組亦可包括載劑、包裝或間隔化以容納一或多個容器(例

如小瓶、管及諸如此類)之容器，每一容器包括擬在本文所闡述方法中使用之單獨要素(例如多肽及佐劑)中之一者。適宜容器包含(例如)瓶子、小瓶、注射器及試管。容器可自諸如玻璃或塑膠等多種材料形成。

【0555】 本文所提供之製品含有包裝材料。醫藥包裝材料之實例包含(但不限於)泡鼓包裝、瓶子、管、袋、容器、瓶子及適於所選調配物及既定投與及治療模式之任一包裝材料。套組通常包含列舉內容物之標記及/或使用說明書及具有使用說明書之包裝插頁。亦可包含一套說明書。

實例

【0556】 藉助下列具體實例來更詳細地闡述本發明。提供下列實例係用於闡釋性目的，而非意欲以任一方式限制本發明。熟習此項技術者將易於識別各種非關鍵參數，該等非關鍵參數可加以改變或修改以獲得本發明之替代實施例。本文所列示之所有專利、專利申請案及印刷出版物之全部內容皆以引用方式併入本文中。

實例匯總：

【0557】 下文之實例1及2係T細胞製備方案(方案1及方案2)之實例。實例性方案之示意圖展示於**圖1B及圖1C**中。實例21-23描述該兩種方案製備APC之步驟。實例12及14-16及表2-5匯總自方案1及2獲得之結果。實例13闡述將測試之方案參數。

【0558】 實例3-7及20係使用方案1及方案2之$CD4^+$記憶性T細胞擴增及$CD8^+$幼稚T細胞誘導之實例性結果。流式細胞術分析結果展示於**圖2B、圖5A及B、圖7、圖10**及**圖12-23**中。

【0559】 實例8-11及16-19係用於評價使用本文所闡述方法擴增或誘導之T細胞之特異性、表型及/或功能之分析的結果實例。**圖25**繪示T細

胞製備製程及使用T細胞之該等分析特異性、表型及/或功能之一般概述。

實例1 -T細胞製備方案1

【0560】 此實例提供T細胞製備方案1之一實例，如**圖1B及1C**中所圖解說明。

材料：

DC培養基(Cellgenix)

CD14微珠，人類，Miltenyi第130-050-201號

細胞介素及/或生長因子

T細胞培養基(AIM V + RPMI 1640 glutamax +血清+ PenStrep)

肽儲備液- 1 mM/肽(HIV A02 - 5-10種肽，HIV B07- 5-10種肽，DOM - 4-8種肽，PIN - 6-12種肽)

程序：

步驟1：用於DC製備之單核球分離

1.基於每一供體之預計DC產率來計算擬解凍PBMC之近似數量。

2.將PBMC解凍且以約1×10^6 - 1×10^8個細胞/mL再懸浮於DC培養基中。

3.添加全能核酸酶(benzonase) (1:1000稀釋度)且鬆開培育器之蓋子。

4.根據製備商方案實施$CD14^+$單核球富集。

5.將富集細胞以1×10^5 - 1×10^7/孔平鋪於6孔板中之DC培養基中，該DC培養基具有一或多種選自GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40及聚I:C之細胞介素及/或生長因子。

步驟2：肽加載及成熟

1.對DC進行計數且根據實驗條件在15 mL管中分裂細胞；0.01-1百萬個細胞/條件。

2.在1200 rpm下旋轉5 min且再懸浮於50 - 400 μL DC培養基中。添加肽且鬆開培育器之蓋子0.5-3 hr。在1 mM/肽之濃度下計算肽池之體積。向每一孔中添加一定體積之A02 (5種肽)及B07 (5種肽)之每一單獨池直至最終濃度為0.001 - 100 μM/肽。

3.在0.5 - 3 hr之後，添加200 μL - 1.5 mL含有成熟混合劑之DC培養基且將細胞轉移至24孔板中。成熟混合劑含有一或多種選自GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40及聚I:C之細胞介素。

步驟3：設定長期刺激(LTS)實驗

1.自DC板之各孔小心去除所有培養基，將每一孔轉移至24孔深孔板之單獨孔中。

2.使用0.5 - 3 mL T細胞培養基洗滌每一孔且與深孔板中之DC培養基合併。

3.向每一孔中添加100 μL - 2 mL T細胞培養基。

4.將DC在1200 rpm下旋轉5 min。

5.去除所有上清液，將DC再懸浮於100 μL - 2 mL T細胞培養基中且轉移回正確孔中。

6.在T細胞培養基中解凍PBMC且以0.5×10^6 - 4×10^6個細胞/mL再懸浮於含有IL-7及IL-15之T細胞培養基中。

7.向每一孔中添加0.5 - 3 mL所製備PBMC。

步驟4：供給LTS

若培養基係黃色，則使用葡萄糖計進行檢查。若葡萄糖保持較高，則向孔中供給含有IL-7及IL-15之培養物。若葡萄糖較低，則在6孔板中擴增細胞(4 mL/孔)且補充IL-15及IL-7。若葡萄糖極低，則在6孔板中擴增至6 mL/孔。

步驟5：供給LTS

每1-4天供給培養物，添加新鮮IL-15/IL-7且在葡萄糖濃度變低時視需要擴增培養物體積。

步驟6：再刺激

對T細胞進行計數且針對新一批加載肽之DC自步驟3進行重複。冷凍剩餘細胞以供分析。

步驟7：供給LTS

每-1-5天供給培養物。

步驟8：再刺激

對T細胞進行計數且針對新一批加載肽之DC自步驟3進行重複。冷凍剩餘細胞以供分析。

步驟9：供給LTS

每1-5天供給培養物。

步驟10

對T細胞進行計數且冷凍以供分析。

實例2 -T細胞製備方案2

此方案可替代實例1中所闡述之方案。

實例2提供如**圖1**中所圖解說明之實例性T細胞製備方案(方案2)。

材料：

AIM V培養基(Invitrogen)

培養基1 (RPMI 1640 glutamax +血清 + PenStrep)

培養基2 (AIM V + RPMI 1640 glutamax +血清+ PenStrep)

程序：

步驟1：將4百萬個PBMC平鋪於24孔板之每一孔(含有一或多種細胞介素)中之培養基2中。一或多種細胞介素係選自GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40及聚I:C。

步驟2：培養基2中之肽加載及成熟

1.以0.001 - 100 μM (對於短聚體)及0.001 - 100 μM (對於長聚體)最終濃度在各別孔中製備所關注儲備肽池(無肽條件除外)且混合。

2.培育0.5 - 3 hr。

3.製備儲備成熟混合劑且在培育之後添加至每一孔中，並混合。成熟混合劑含有一或多種選自GM-CSF、IL-4、FLT3L、TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-6、IL-7、IFN-α、R848、LPS、ss-rna40及聚I:C之細胞介素。

步驟3：以2.5-20體積%之最終濃度將人類血清添加至每一孔中且混合。

步驟4：使用補充有IL-7及IL-15 (各自之最終濃度為0.005-500 ng/mL)之新鮮培養基1小心更換50-90%之培養基。

步驟5：每1-5天使用補充有IL-7及IL-15 (各自之最終濃度為0.005-500 ng/mL)之新鮮培養基1小心更換50-90%之培養基。

倘若孔在非供給之日變為橙色-黃色(在澄清培養基之情形下之葡萄糖讀出)，使用新鮮培養基1及IL-7/IL-15更換25-75%之現有培養基。

步驟6：計數及冷凍(或繼續進行後續步驟以實施T細胞刺激，直至方案1之步驟8及/或步驟10)。

在步驟1至步驟6之培養步驟期間，可根據方案1 「步驟1」及「步驟2」中之程序平行製備加載肽之DC。

對T細胞進行計數且使用新一批加載肽之DC刺激T細胞。冷凍剩餘細胞以供分析。可根據方案1 「步驟3」中之程序來實施T細胞刺激程序。

步驟7：對T細胞進行計數且針對新一批加載肽之DC重複方案1 「步驟3」中之T細胞刺激程序。冷凍剩餘細胞以供分析。

步驟8：對T細胞進行計數且冷凍以供分析。

實例3 - $CD8^+$ T細胞誘導

【0561】 使用來自人類供體之PBMC試樣根據方案1或方案2來實施抗原特異性T細胞誘導。在使用不同方案製備T細胞之後分析$CD8^+$記憶性及幼稚T細胞誘導。可在不同時間點獲取細胞試樣以供分析。使用pMHC多聚體監測誘導培養物中之抗原特異性$CD8^+$ T細胞之分數並用於藉由使用組合編碼來平行檢測多個T細胞反應。**圖2**繪示展示使用方案1 (方案1)及方案2 (方案2)經長肽或短肽誘導之抗原特異性$CD8^+$記憶性T細胞之分數之實例性結果。「本體」指示，含有用於誘導之T細胞之試樣係全PBMC。「$Treg^-$」指示，含有用於誘導之T細胞之試樣係耗竭CD25表現細胞之PBMC。**圖3**繪示T細胞反應分析之實例性結果，其展示在短聚體(短)刺激或長聚體(長)誘導之後對GAS7肽具有反應之抗原特異性$CD8^+$幼稚T細胞之分數，如藉由流式細胞術所分析。可在短期刺激之後觀察到抗

原特異性記憶性T細胞及幼稚PIN特異性T細胞之分數增加。「長」或「長聚體」係用作疫原且長約16-25個胺基酸之肽。「短」或「短聚體」係用作免疫原且長約8-12個胺基酸之肽。

實例4 - $CD8^+$ T細胞誘導

【0562】 在使用不同方案製備T細胞之後分析$CD8^+$ T細胞誘導。將所誘導T細胞與不同抗原肽在測試孔中一起培育且藉由流式細胞術分析對肽具有反應之T細胞之分數。使用pMHC多聚體監測誘導培養物中之抗原特異性$CD8^+$ T細胞之分數且用於藉由使用組合編碼來平行檢測多個T細胞反應。可使用命中率來描述T細胞對抗原肽之反應程度。命中率定義為陽性反應測試孔之數量除以測試孔之總數。一式兩份進行實驗，且在重複孔中證實命中率。**圖4**繪示展示在使用方案1 (方案1)及方案2 (方案2)誘導之後經HIV短肽、先前所鑑別新抗原(PIN)短肽或PIN長肽誘導之$CD8^+$ T細胞之分數的結果實例。「全PBMC」指示，含有用於誘導之T細胞之試樣係全PBMC。「$CD25^-$ PBMC」指示，含有用於誘導之T細胞之試樣耗竭$CD25^+$細胞。展示長及短誘導。**圖6**繪示展示針對兩個人類供體藉由所指示長及短誘導所誘導之係多聚體陽性CD8 T細胞之細胞之分數的實例性結果。

實例5 - $CD4^+$ T細胞反應

【0563】 可使用離體誘導方案(例如上述方案1或2)來誘導$CD4^+$ T細胞針對先前所鑑別新抗原(PIN)之反應。在此實例中，藉由使用方案1監測呈抗原特異性方式之IFNγ產生來鑑別$CD4^+$ T細胞反應。**圖10**展示該流式細胞術分析之代表性實例。最後，藉由使用突變或野生型肽刺激經誘導T細胞群體來展示$CD4^+$ T細胞對突變肽(而非野生型)之反應特異性(**圖11**)。

實例6 -幼稚CD8⁺ T細胞誘導

【0564】 在使用方案1或方案2製備T細胞之後藉由流式細胞術分析幼稚CD8⁺ T細胞誘導。PBMC試樣係來自人類供體1或人類供體2且係全PBMC或CD25⁻耗竭PBMC。在根據**圖1**中之方案進行短或長誘導之後分析細胞試樣。針對不同肽分析所誘導CD8⁺ T細胞之幼稚CD8⁺反應且繪製於**圖12-23**中。

實例7 - CD8⁺幼稚T細胞反應

【0565】 實例1中之T細胞製備方案可成功地用於誘導幼稚腔室中之CD8⁺ T細胞反應。**圖7**展示在兩輪刺激之後針對健康供體中之突變表位所生成兩個CD8⁺ T細胞反應之代表性流式細胞術繪圖。此外，可將來自記憶腔室之CD8⁺ T細胞反應擴增至較高數量。在**圖8A**中所展示之代表性實例中，在最多三輪刺激之後，所有CD8⁺ T細胞之大約50%對免疫顯性表位CMV pp65、EBV YVL、EBV BMLF1及Mart-1具有特異性。所誘導CD8⁺記憶反應在肽回憶分析中顯示多功能性(去顆粒及細胞介素釋放，**圖8B**)。

實例8 -T細胞之流式細胞術分析

【0566】 **圖5A**繪示在圖中所指示條件下使用方案2誘導之CD8⁺幼稚T細胞之ME-1反應之實例性流式細胞術分析。**圖5B**繪示在圖中所指示長聚體誘導下誘導之CD8⁺幼稚T細胞之ME-1反應之流式細胞術分析的實例。據觀察，12.6%之CD8⁺ T細胞在長誘導之後對ME-1具有特異性。

實例9 -所誘導T細胞之細胞毒性分析

【0567】 使用細胞毒性分析來評價所誘導T細胞培養是否可殺死表現抗原之腫瘤細胞系。在此實例中，量測活性半胱天冬酶3在活及死亡腫

瘤細胞上之表現以量化早期細胞死亡及死亡腫瘤細胞。在**圖9**中，所誘導$CD8^+$記憶反應能夠殺死表現抗原之腫瘤靶。

實例10 -所生成$CD8^+$ T細胞之表型分析

【0568】 為分析表型表現，在含有0.1-10% FBS及0.1%疊氮化鈉之PBS (FBS-PBS)中洗滌每一培養物之1×10^4至1×10^6個T細胞，且再懸浮於含有以1:100稀釋之經螢光染料標記之抗體(CD45RA及CD62L)之FBS-PBS中。在冰上培育之後，洗滌細胞且固定以供流式細胞術分析。若所選$CD8^+$ T細胞培養物表現CD62L但不表現CD45RA (不論其對各種肽之反應性如何)，則其可指示，所選T細胞培養物屬$CD8^+$記憶性T細胞子組。

實例11 -$CD8^+$ T細胞之細胞介素產生

【0569】 可分析$CD8^+$ T細胞培養物之細胞介素特徵。首先使用經抗原肽脈衝化之自體APC攻擊T細胞培養物。使用ELISA套組(PharMingen, San Diego, Calif.)定量測定細胞介素特徵。在4℃下使用0.2-4 μg/孔針對人類細胞介素(IL-4、IL-10、TNF-α、IFN-γ)之經純化小鼠單株捕獲抗體(PharMingen)過夜塗覆微量滴定板(96孔，NUNC Maxisorp)。洗滌板且使用10% (w/v)胎牛血清(FBS)使非特異性結合位點飽和0.5-3小時且隨後洗滌。使用PBS稀釋上清液及細胞介素標準品且添加至重複孔中。將板在37℃下培育1-3小時且隨後使用PBS-T洗滌。向每一孔中添加匹配之生物素化檢測抗體且在室溫下培育1-3小時。在洗滌之後，添加與抗生物素蛋白偶聯之辣根過氧化物酶且培育0.5-3小時。使用3,3',5,5'-四甲基聯苯胺(TMB, Sigma)作為顯色基質。在450 nm下使用ELISA讀數儀(Bio-Rad實驗室，Hercules, Calif.)量測光學密度且藉由微量板電腦軟體(Bio-Rad)使用雙重8點標準曲線量化細胞介素濃度。

實例12 -方案1及方案2：匯總

【0570】 在此實例中，來自方案1及方案2刺激方案之結果之匯總提供於下表中。

表1 -來自方案1及2之結果之匯總

		方案1		方案2			
		$CD14^{耗竭}$ / $CD25^{耗竭}$		$CD25^{耗竭}$		$CD14^{耗竭}$ $CD25^{耗竭}$	FLT3L x3
		LTS 37	LTS 38	LTS 37	LTS 38	LTS 38	LTS 38
CD8記憶	整體倍數擴增	30-1200	20-5000	20-100	5-100	5-100	5-100
	絕對數量	1-50×10^6	20-1000×10^6	0.1-1×10^6	2-10×10^6	2-20×10^6	0.5-10×10^6
	功能性	*在刺激3時有所降低*	*在刺激3時有所降低*	*在刺激3時維持不變*	*在刺激3時維持不變*	*在刺激3時維持不變*	*在刺激3時維持不變*
CD8幼稚	命中率/孔	20-40%	0-40%	20-30%	0-20%	10%	0-10%
	命中率/肽	1/11-3/11	0-4/11	2/11	1/11	1/11-3/11	1/11-2/11
	絕對數量	0.1-1×10^6	-	0.01-0.5×10^6	-	-	-
	功能性	TBD*	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD
CD4幼稚	命中率/孔	78-100%	56%	10-100%	50%	70%	TBD
	命中率/肽	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD
	絕對數量	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD
	功能性	*良好*	*良好*	*良好*	TBD	TBD	TBD

TBD* =待測

實例13 -方案1及2參數測試

【0571】 用於測試方案參數之一個實例性實驗可為在患者試樣中以小規模測試方案1。用於測試方案參數之另一實例性實驗可為表徵先前批次中所生成之T細胞產物，包含測試$CD4^+$ T細胞及$CD8^+$ T細胞之功能性且分選抗原特異性細胞並藉由單細胞RNAseq進行表徵。用於測試方案參數之另一實驗實例可為測試DC製備期間之聚ICLC/aCD40L添加且量化T細胞富集。用於測試方案參數之另一實例性實驗可為測試經誘導$CD8^+$幼稚T細胞反應之功能性，包含在殺死分析中評價抗原特異性細胞毒性，使用較寬流動面板實施肽回憶分析以量測分化及耗竭，測定採樣子組之敏感性(肽滴定)及特異性(野生型對突變體，池解捲積)，且富集$CD8^+$以去除來自抗原特異性$CD4^+$ T細胞之旁觀者效應之可能性。用於測試方案參數之另一實例性實驗可為訊問功能性，測定採樣子組之敏感性(肽滴定)及特異性(野生型對突變體，池解捲積)，使用分化及耗竭流動面板實施回憶分析以更佳地理解表型。用於測試方案參數之另一實例性實驗可為分選抗原特異性T細胞($CD8^+$記憶、$CD8^+$幼稚、$CD4^+$幼稚)且藉由單細胞RNAseq進行描述，包含比較不同誘導之表型、比較來自不同腔室之誘導之表型、檢驗動力學。

實例14 -耗竭CD14及/或CD25表現細胞之T細胞輸入可改良$CD4^+$及$CD8^+$幼稚T細胞之誘導

【0572】 下文之表2展示來自方案1 T細胞製備方法之結果，其證實$CD14^-/CD25^-$耗竭可增加$CD8^+$幼稚細胞之命中率且具有一致之$CD4^+$命中率。

表2 - CD14$^-$/CD25$^-$耗竭結果

第33號LTS		**CD14$^-$**	**CD25$^-$**	**CD14$^-$/CD25$^-$**
CD8幼稚命中率%	HD34	20	30	50
	HD35	0	0	10
	平均值	10	15	30
CD4幼稚命中率%	HD34	100	80	90
	HD35	100	100	100
	平均值	100	90	95

實例15 - 使用方案2顯著改良之CD8$^+$幼稚誘導

【0573】 下文之表3A及3B展示來自本文所闡述方案1及方案2T細胞製備方法二者之結果。在所測試之兩個人類供體中，與耗竭CD14表現細胞相比，藉由耗竭CD25表現細胞或耗竭CD25及CD14表現細胞可顯著改良CD8$^+$幼稚誘導。使用FLT3L刺激亦顯著改良CD8$^+$幼稚誘導。

表3A -來自HD35之CD8$^+$幼稚誘導結果

	HD35	方案1 (CD25耗竭) 1/13證實 7.5%成功率				方案2 (本體) 3/13證實 23%成功率				方案2 (CD25耗竭) 5/13證實 39%成功率			
		第19天		第26天		第19天		第26天		第19天		第26天	
		初始	證實	初始	證實	初始	證實	初始	證實	初始	證實	初始	證實
使用短肽誘導	HIV複製物1												
	HIV複製												

	物2											
	HIV複製物3											
	HIV複製物4										HIV-3 0.226%	HIV-3 0.0203%
	HIV複製物5	HIV-5 * 0.0327%	HIV-5 * 0.0691%	HIV-5	HIV-5	HIV-3 0.496%	HIV-3 0.215%	HIV-3 0.33%	HIV-3 0.0722%			
	PIN複製物1											
	PIN複製物2					CSNK1A1 0.135%	CSNK1A1 0.0747%	CSNK1A1 0.219%	CSNK1A1 0.193%			
	PIN複製物3											

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

表3B -來自HD34之$CD8^+$幼稚誘導結果

	HD34	**方案1** 0/13證實 0%成功率				**方案2 本體輸入** 2/13證實 15%成功率				**方案2 CD25耗竭輸入** 2/13證實 15%成功率			
		第19天		**第26天**		**第19天**		**第26天**		**第19天**		**第26天**	
		初始	證實	初始	證實	初始	證實	初始	證實	初始	證實	初始	證實
使用短肽誘導	HIV複製物1									HIV-5 0.358%	HIV-5 0.789%	HIV-5 1.93%	HIV-5 3.61%
	HIV複製物2					HIV-3 & HIV-5 0.017/0.098%	HIV-3 & HIV-5 0.013/0.279%	HIV-5 0.056%	HIV-5 0.173%				
	HIV複製物3												
	HIV複製物4												
	HIV複製物5												
	PIN複製物1									PRDX5	PRDX5 0.119%	PRDX5	PRDX5 0.549%

										0.33%		1.58%	
	PIN複製物2												
	PIN複製物3												
	PIN複製物4												
	PIN複製物5												

實例16 - 針對pMHC特異性試劑之UV調介之肽交換分析。

【0574】 經由HLA特異性單體之UV調介之肽交換及後續多聚化來生成抗原特異性pMHC多聚體。使用該等試劑來檢測抗原特異性T細胞。

【0575】 條件性配體之UV調介之裂解可為時間依賴性。使用下述設置，可在1 min之後檢測肽裂解且可基本上在大約15 min之後完成。通常可使用30至60 min培育時間來確保條件性配體與所關注肽之最佳交換。蛋白質濃度可影響UV調介之裂解之速率，此乃因硝基苯基部分及反應產物二者皆吸收長波長UV光。另外，路徑長度可影響反應速度。可藉由在所關注MHC配體存在下實施UV調介之裂解來恢復在UV暴露時形成之空肽接收MHC分子。在大部分實驗中，使用相對於MHC之100倍莫耳過量之肽。通常使用25 μg/mL之UV敏感性MHC種類I複合物來實施UV誘導之肽交換。然而，可使用最高100-200 μg/mL之I類MHC濃度來實施肽交換

反應。

材料：

【0576】 96孔板(目錄號：651201，聚丙烯96孔微量板，V形，Greiner Bio-one)

UV燈366 nm CAMAG UV Cabinet 3 (目錄號：022.9070, CAMAG)，裝配有UV燈長波UV, 366 nm, 2 × 8 W (目錄號：022.9115, CAMAG)，或Uvitec管光，2 × 15W, 365 nm黑光藍管(模型-LI215BLB，大小：L × W × H，505 × 140 ×117 mm)

使用轉子使微量滴定板離心。

程序：

1. 在96孔板中，向每一孔中添加下列試劑，如**表4**中所展示：

表4

試劑	量	最終濃度
PBS	100 µL	不適
10x 交換肽 (500 µM於PBS中)	12.5 µL	50 µM
10x UV敏感性 MHC I類分子 (250 µg/mL: ~5 µM)	12.5 µL	25 µg/mL (約 0.5 µM)

2. 將96孔板置於UV燈(366nm)下1 hr.，其中UV燈與試樣之間之距離為大約5 cm。

3. 將板在3,300g下旋轉5分鐘。將100 µL上清液(將板保持於避免轉移任一糰粒之角度)轉移至新96孔板中以供下游應用。

實例17 -組裝與螢光染料偶聯之pMHC多聚體

【0577】 可使MHC種類I複合物與經螢光團標記之鏈黴抗生物素蛋白(streptavidin)複合以形成用於T細胞分析之MHC種類I四聚體。常用螢

光團包含別藻藍蛋白及藻紅素，且下文闡述使用該等偶聯物來形成MHC多聚體。然而，亦可使用經鏈黴抗生物素蛋白塗覆之量子點或任何與鏈黴抗生物素蛋白偶合之螢光團來製備用於T細胞檢測之MHC多聚體。

材料：

【0578】 1 mg/mL PE-鏈黴抗生物素蛋白溶液(目錄編號：S866, Molecular Probes)或1 mg/mL APC鏈黴抗生物素蛋白溶液(目錄編號：S868, Molecular Probes)

具有經交換MHC種類I複合物之微量滴定板，含有25 μg/mL pMHC，100 μL/孔。此對應於每孔2.5 μg或0.05 nmol I類MHC。

程序：

1. 生成27 μg/mL鏈黴抗生物素蛋白-PE於PBS中或14.6 μg/mL鏈黴抗生物素蛋白-APC於PBS中之稀釋液，針對每一孔製備100 μL I類MHC。

2. 向 I類MHC中添加鏈黴抗生物素蛋白-PE或鏈黴抗生物素蛋白-APC，以10分鐘間隔連續添加4次(25 μL)。

實例18 -MHC多聚體之組合編碼

UV調介之MHC肽交換

1. 在冰上解凍生物素化p*MHC複合物之儲備溶液。

2. 將所關注生物素化p*MHC複合物在PBS中稀釋至200 μg/mL。每一交換反應需要 60 μL體積。對於擬偶聯至Qdot585之pMHC複合物而言，每一交換反應需要80 μL。

3. 將肽儲備液在PBS中稀釋至400 μM。每一肽最少製備70 μL；對於用於製備擬偶聯至Qdot585之pMHC複合物之肽而言，每一肽最少製備

90 μL。

4. 在具有V形底之96孔聚丙烯微量板中，在每孔中混合60 μL 200 μg/mL具有所選等位基因之p*MHC及60 μL 400 μM肽溶液(最終濃度：100 μg/mL p*MHC及200 μM肽)。對於擬偶聯至Qdot585之pMHC複合物而言，混合80 μL 200 μg/mL p*MHC及80 μL 400 μM肽溶液。

5. 將96孔微量板在室溫下暴露於UV光(約366 nm) 1 hr.。與UV燈之距離應為2-5 cm。

6. 將板在3,300g及室溫下離心5 min。

7. 若包含暫停點，則重複步驟6，且將2 × 50 μL上清液轉移至兩個具有V形底之新96孔聚丙烯微量板中並將其保持於冰上。對於擬偶聯至Qdot585之pMHC複合物而言，轉移2 × 70 μL。注意不要轉移底部糰粒(通常不可見)，此乃因轉移聚集物將潛在地增加最終MHC多聚體染色之背景。

8. 藉由偶聯至螢光染料-鏈黴抗生物素蛋白偶聯物來多聚合pMHC單體。不同偶聯闡述於下文中：選擇A用於偶聯至Qdot605-、625-、655-或705-鏈黴抗生物素蛋白；選擇B用於偶聯至Qdot585-鏈黴抗生物素蛋白；且選擇C用於偶聯至PE-、APC-或PE-Cy7-鏈黴抗生物素蛋白。

(A)偶聯至Qdot605-、625-、655-或705-鏈黴抗生物素蛋白：(i)每50 μL pMHC單體添加3.5 μL Qdot-鏈黴抗生物素蛋白偶聯物(儲備液濃度為1 μM) (直至最終濃度為66 nM)。

(B)偶聯至Qdot585-鏈黴抗生物素蛋白:(i)每70 μL pMHC單體添加4.9 μL Qdot585-鏈黴抗生物素蛋白偶聯物(儲備液濃度為1 μM) (直至最終濃度為66 nM)。

(C)偶聯至PE -、APC-或PE-Cy7-鏈黴抗生物素蛋白：(i)每50 μL pMHC單體添加4.6 μL PE-、APC-或PE-Cy7-鏈黴抗生物素蛋白偶聯物(儲備液濃度為200 μg/mL) (直至最終濃度為16.8 μg/mL)。

9. 混合孔且在冰上偶聯30 min。

10. 添加D-生物素及NaN_3直至最終濃度為25 μM D-生物素及0.02% (wt/vol) NaN_3。藉由向每一孔中添加2.5 μL 20倍儲備溶液(500 μM D-生物素及0.4% (wt/vol) NaN_3)來實施此步驟；對於偶聯至Qdot585之MHC多聚體而言，向每一孔中添加3.5 μL。混合孔且在冰上培育20 min。

11. 將50 μL含有25 μM D-生物素及0.02% (wt/vol) NaN_3之PBS添加至偶聯至PE、APC或PE-Cy7之MHC多聚體中(兩倍稀釋)。

12. 混合不同複合物。在混合時，使用2:1比率之Qdot585與每一其他色彩複合物。以1:1比率混合所有其他色彩複合物。

使用MHC多聚體之T細胞染色

13. 針對所有27種色彩組合混合MHC多聚體以獲得一份即用試樣且將其在3,300g及4℃下離心5 min，並轉移上清液。每一T細胞染色總共需要54 μL上清液(亦即，存在於混合物中之每一個別pMHC複合物需要2 μL)。

14. 將PBMC試樣(或其他相關T細胞試樣)解凍且使用RPMI將其洗滌兩次。建議在解凍後使用DNase進行處理以減少細胞凝結(例如藉由在含有0.025 mg/mL阿法鏈道酶(Pulmozyme)及2.5 mM $MgCl_2$之培養基中使細胞解凍)。

15. 將細胞再懸浮於含有2% (vol/vol) FBS之PBS(FACS緩衝液)中且將其分佈至96孔聚苯乙烯U形底微量板中，每孔最多3×10^6個細胞/200 μL

FACS緩衝液。

16. 將板在室溫下以490g旋轉5 min。

17. 藉由翻轉板來拋棄緩衝液-細胞以糰粒形式保留於孔底部中。

18. 添加54 μL來自步驟13之MHC多聚體且混合孔。

19. 在37℃下培育15 min。

20. 將板移到冰上且添加20 μL來自5×儲備液之抗體混合物。

21. 添加4 μL近紅外死細胞染色劑之40倍稀釋液且混合孔。

22. 在冰上培育30 min。

23. 將板4℃下以490g旋轉5 min。

24. 藉由翻轉板來拋棄上清液。

25. 使用200 μL FACS緩衝液洗滌兩次(在4℃下以490g離心5 min(兩次)且在每一旋轉之後翻轉板以去除上清液)。

26. 將糰粒再懸浮於50-100 μL FACS緩衝液中且將其轉移至1.4 mL或5 mL FACS管中。試樣備用於流式細胞儀上之獲取。

單色補償對照

27. 向11個FACS管(1-11號)中添加100 μL FACS緩衝液及一滴陰性補償珠粒。

28. 向來自步驟27之管1-10中添加一滴抗小鼠Ig-κ補償珠粒且向新管(12號)中添加一滴ArC胺反應性珠粒。

29. 向管1-8中添加5 μL 1 mg/mL抗CD8-生物素且混合。

30. 將管1-8在冰上培育20 min。

31. 使用2 mL FACS緩衝液洗滌管1-8兩次(在4℃下以490g離心5 min)。

32. 向管12 (來自步驟28)中添加1 μL近紅外死細胞染色劑；混合且在室溫下於暗處培育30 min。

33. 將鏈黴抗生物素蛋白-螢光染料偶聯物稀釋10倍(Qdot585除外)，向管1-7中之每一者中添加5 μL，向管8中添加1 μL未稀釋Qdot585-鏈黴抗生物素蛋白，且然後在冰上於暗處培育20 min。

34. 向管9及10 (來自步驟28)中添加5 μL FITC抗體(使用泄放通道抗體中之一者)或5 μL Alexa Fluor 700抗CD8a抗體；在冰上於暗處培育20 min。

35. 使用2 mL FACS緩衝液洗滌管1-11兩次，且使用2 mL PBS洗滌管12兩次(在4℃下以490g離心5 min)。

36. 將所有管再懸浮於150 μL FACS緩衝液中。向管12中添加一滴ArC陰性珠粒且混合。補償對照備用於流式細胞儀上之獲取。

選通策略

37. 首先在淋巴球上選通，且隨後在單一細胞(FSC-α、FSC-W)、活細胞、泄放通道陰性細胞及$CD8^+$細胞上選通。

38. 在8個不同MHC多聚體通道中繪制定義陽性事件之單獨門。

39. 將8個MHC多聚體陽性門反轉以獲得8個選擇每一MHC多聚體通道之$CD8^+$及MHC多聚體陰性細胞之門。

40. 使兩個MHC多聚體陽性群體之門與其他6個MHC多聚體群體中之每一者之反轉門相交。此門組合選擇在兩個且僅兩個MHC多聚體通道中為陽性之$CD8^+$細胞(亦即，若細胞在一個或三個或更多個MHC多聚體通道中係陽性，則將其選通出)。此一門之一實例係PE^+及APC^+及$PE\text{-}Cy7^-$及$Qdot585^-$及$Qdot605^-$及$Qdot625^-$及$Qdot655^-$及$Qdot705^-$。

41. 針對MHC多聚體之所有28種可能兩色組合，製備該等交叉門(闡述於步驟40中)。

42. 連接來自步驟41之所有28個門(例如門1或門2或……或門28)。

43. 使來自步驟39之8個倒置門交叉(PE$^-$及APC$^-$及PE-Cy7$^-$及Qdot585$^-$及Qdot605$^-$及Qdot625$^-$及Qdot655$^-$及Qdot705$^-$)。

44. 連接來自步驟42及43之兩個門。

45. 使用所有可能之兩色代碼製作28點繪圖，該等繪圖展示步驟44中所選通之事件。該等繪圖僅展示對於所有MHC多聚體為陰性或對於兩種MHC多聚體為陽性之CD8$^+$細胞；選通出所有背景事件。

46. 亦使用所有可能之兩色代碼製作展示所有CD8$^+$細胞之28點繪圖。該等繪圖提供良好地指示試樣中之背景值且亦可用於揭示不適當補償。建議比較該等「非選通」繪圖與選通繪圖以獲得分離反應與背景之經驗。此對於低強度群體可尤其重要。

實例19 -螢光細胞條碼化

【0579】 可使用細胞條碼化藉由流式細胞術來實施複用表型及功能分析。可在輕微修改下實施磷流法(phospho flow)以包含FCB標記。在甲醛固定之後，將試樣再懸浮於含有指示濃度之Alexa Fluor或Pacific Blue琥珀醯亞胺基酯之100% 20-25℃甲醇中(通常500 μL/10^{6}個細胞)，其中每一試樣接受不同濃度之螢光染料。在一些情形下，可將試樣再懸浮於甲醇中且然後添加溶於DMSO中(通常以1:50稀釋度)之FCB螢光團。此過程可容許在DMSO中預先製備及儲存FCB染色基質，且此係96孔板實驗所需。在20-25℃下標記15 min之後，使用染色培養基(含有0.5% BSA及0.02%疊氮化鈉之磷酸鹽緩衝鹽水(pH 7.0))將細胞洗滌兩次。在4℃下或更冷下

進行標記可產生極低標記強度，從而容許在-80℃下於甲醇染色溶液中儲存試樣且並不增加FCB染色程度。

【0580】 將具有不同標記之試樣合併至一個FACS管或孔中，且在所得體積大於100 μL時再次粒化。使用磷酸特異性及/或表面標記物抗體對合併之條碼化試樣(通常100 μL)染色，洗滌且藉由流式細胞術分析。可在配備有405 nm、488 nm及633 nm雷射及製備商備用濾波器之BD LSR2流式細胞儀上實施流式細胞術，其中使用用於檢測量子點605之610/20帶通濾波器代替用於瀑布黃(Cascade Yellow)之405 nm八角帶通濾波器。

實例20 - $CD4^+$幼稚誘導

【0581】 使用PIN肽實施方案1及2。評價抗原特異性$CD4^+$幼稚誘導。結果可見於下文之表5中。「Y」指示觀察到T細胞反應。

表5 -來自供體1及2之$CD4^+$幼稚誘導結果

長期誘導讀出		供體2			供體1		
LTS 35號		方案1 ($CD25^-$)	方案2全PBMC	方案2 $CD25^-$	方案1 ($CD25^-$)	方案2全PBMC	方案2 $CD25^-$
使用長肽誘導	PIN複製物1	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	PIN複製物2	Y	Y	Y	Y	-	-
	PIN複製物3	-	Y	Y	Y	Y	-
結果		2/3 66%	3/3 100%	3/3 100%	3/3 100%	2/3 66%	1/3 33%

實例21 -製備製程：DC衍生

表6 -用於DC衍生之實例性方案

步驟1	單核球富集及DC培養	自體細胞 1號血球分離袋
步驟2		單核球富集

步驟3		DC培養
步驟4	肽加載及DC成熟	收穫DC，再懸浮於DC培養基中
步驟5		添加患者特異性肽且培育
步驟6		DC成熟

實例22 -T細胞誘導方案1

表7A -1號T細胞誘導

步驟7	自體細胞 2號血球分離袋
步驟8	$CD25^{+}$耗竭($^{+}$/- $CD14^{+}$耗竭)
驟9	洗滌DC且再懸浮於T細胞培養基中
步驟10	將T細胞與成熟DC (來自DC衍生)一起培育

表7B -2號T細胞誘導

步驟11	洗滌T細胞且再懸浮於T細胞培養基中
步驟12	將T細胞與成熟DC (來自DC衍生)一起培育

表7C -3號T細胞誘導

步驟11	洗滌T細胞且再懸浮於T細胞培養基中
步驟12	將T細胞與成熟DC (來自DC衍生)一起培育

表7D -收穫及冷凍保存

步驟15		T細胞收穫	發佈測試：支原體(Mycoplasma)
步驟16	**藥物物質**	洗滌且懸浮於最終調配物中	發佈測試：無菌性、內毒素、細胞表型、TNC計數、活力、細胞濃度
步驟17	**藥品**	DS填充及冷凍保存 儲存於液氮之蒸氣相中	

實例23 -T細胞誘導方案2

表8A -1號T細胞誘導

步驟7	自體細胞 2號血球分離袋
步驟8	$CD25^+$耗竭(+/- $CD14^+$耗竭)
步驟8a	添加FLT3L
步驟9	添加患者特異性肽且培育
步驟10	將耗竭PMBC與FLT3L及肽一起培育

表8B -2號T細胞誘導

步驟11	洗滌T細胞且再懸浮於T細胞培養基中
步驟12	將T細胞與成熟DC (來自DC衍生)一起培育

表8C -3號T細胞誘導

步驟11	洗滌T細胞且再懸浮於T細胞培養基中
步驟12	將T細胞與成熟DC (來自DC衍生)一起培育

表9 -收穫及冷凍保存

步驟15		T細胞收穫	發佈測試：支原體
步驟16	**藥物物質**	洗滌且懸浮於最終調配物中	發佈測試：無菌性、內毒素、細胞表型、TNC計數、活力、細胞濃度
步驟17	**藥品**	藥物物質填充及冷凍保存 儲存於液氮之蒸氣相中	

實例24 -使用複用、多參數流式細胞術同時檢測$CD4^+$及$CD8^+$新抗原特異性T細胞反應且進行功能表徵

【0582】 因改變蛋白質編碼基因序列之體細胞突變而產生於癌細胞中之新抗原正成為免疫療法之吸引性靶。其獨特地表現於腫瘤細胞上(而非健康組織上)且可由免疫系統識別為外來抗原，從而增加了免疫原性。

研發T細胞製備製程以經由多輪離體T細胞刺激對患者特異性新抗原產生記憶性及新生$CD4^+$及$CD8^+$ T細胞反應，從而生成用於接受性細胞療法中之新抗原反應性T細胞產物。可詳細表徵經刺激T細胞產物以測試該等製程所用之許多潛在變量。

【0583】 為探索T細胞功能性及/或特異性，研發可同時檢測抗原特異性T細胞反應且表徵其量級及功能之分析。此分析採用下列步驟。首先，使用T細胞-APC共培養物來誘發抗原特異性T細胞中之反應性。視情況，採用使用螢光細胞條碼化之試樣複用。為鑑別抗原特異性$CD8^+$ T細胞且檢驗T細胞功能性，使用FACS分析同時探測肽-MHC多聚體染色及多參數細胞內及/或細胞表面細胞標記物染色。此流線型分析之結果證實，其適於研究自健康供體所誘導之T細胞反應。在健康供體中鑑別針對肽所誘導之新抗原特異性T細胞反應。亦比較所誘導T細胞反應之量級、特異性及功能性。**圖25**及**圖26**繪示同時分析T細胞試樣之細胞標記物特徵及MHC四聚體染色之實例性製程。

【0584】 簡言之，使用不同螢光染料在不同濃度下將不同T細胞試樣條碼化(例如參見實例19)。每一試樣接受不同濃度之螢光染料或不同濃度之多種染料之組合。將試樣再懸浮於磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)中且然後添加溶於DMSO中(通常以1:50稀釋度)之螢光團直至最大最終濃度為5 μM。在37℃下標記5 min之後，藉由添加含有蛋白質之培養基(例如含有10%經彙集人類AB型血清之RPMI培養基)來將過量螢光染料驟冷。使用經如上文所闡述之抗原肽脈衝化之自體APC攻擊經獨特條碼化之T細胞培養物。

【0585】 將具有不同標記之試樣合併至一個FACS管或孔中，且在所得體積大於100 μL時再次粒化。使用包含LAMP-1之表面標記物抗體將

合併之條碼化試樣(通常100 μL)染色(例如參見實例11)且與經組裝之與螢光染料偶聯之肽-MHC多聚體一起培育(例如參見上文之實例17及18)。在固定及滲透之後，使用靶向TNF-α及IFN-γ之抗體將試樣另外細胞內染色。

【0586】 然後藉由流式細胞術在流式細胞儀上同時分析合併之條碼化T細胞試樣之細胞標記物特徵及MHC四聚體染色。不同於單獨分析T細胞試樣之細胞標記物特徵及MHC四聚體染色之其他方法，此實例中所闡述同時分析T細胞試樣之細胞標記物特徵及MHC四聚體染色提供了關於為抗原特異性且具有增加之細胞標記物染色之T細胞之百分比的資訊。分析T細胞試樣之細胞標記物特徵及MHC四聚體染色之其他方法單獨測定試樣中之抗原特異性T細胞的百分比，且單獨測定具有增加之細胞標記物染色之T細胞之百分比，從而僅容許使該等頻率建立關聯。此實例中所闡述同時分析T細胞試樣之細胞標記物特徵及MHC四聚體染色並不依賴於抗原特異性T細胞頻率及具有增加之細胞標記物染色T細胞之頻率的相關性；而係，其提供了為抗原特異性且具有增加之細胞標記物染色之T細胞之頻率。此實例中所闡述同時分析T細胞試樣之細胞標記物特徵及MHC四聚體染色容許在單細胞層面上進行測定，彼等細胞係抗原特異性且具有增加之細胞標記物染色。

【0587】 為評估既定誘導製程之成功，使用回憶反應分析，隨後進行複用、多參數流式細胞術面板分析。使用獨特之兩色螢光細胞條形碼標記自誘導培養獲取之試樣。在加載抗原之DC或未加載DC上過夜培育經標記細胞以刺激抗原特異性細胞中之功能反應。第二天，組合經獨特標記之細胞，然後根據下文之**表10**進行抗體及多聚體染色。

表10 -分析靶(標記物)、螢光染料及目的

標記物	螢光染料	目的
CD19/CD16/CD14	BUV395	細胞排除
Live/Dead	近紅外	死細胞排除
CD3	BUV805	譜系選通
CD4	Alexa Fluor 700	譜系選通
CD8	PerCP-Cy5.5	譜系選通
條形碼1	CFSE	試樣複用
條形碼2	TagIT Violet	試樣複用
多聚體1	PE	CD8+抗原特異性
多聚體2	BV650	CD8+抗原特異性
IFNγ	APC	功能性
TNFα	BV711	功能性
CD107a	BV786	細胞毒性
4-1BB	PE/Dazzle 594	活化

【0588】 測定單獨或以混合物形式獲取之經標記試樣完全解捲積複用試樣之能力(**圖27A**)。可完全解析經獨特標記之試樣且與其他條形碼具有極小交叉污染。使用試樣複用來維持藉由多聚體染色對抗原特異性$CD8^+$ T細胞之檢測。分離含有約20%對CMV pp65、EBV BRLF1、EBV BMLF1及/或MART-1具有特異性之$CD8^+$ T細胞之誘導培養試樣，使用9種獨特兩色條形碼標記，且然後合併以用於使用靶向所有4種特異性之四聚體以相同兩色組合(亮紫(brilliant violet) 650 [BV650]及藻紅素[PE])進行染色(**圖27B**)。所有9種條形碼皆產生相當之四聚體染色圖案且檢測四聚體$^+$細胞之頻率。

【0589】 亦在回憶反應分析中分析兩種含有新生$CD4^+$ T細胞反應之經誘導培養物之試樣，其中在無條碼化下單獨進行或與不相關試樣混合

(**圖28A**及**圖28B**)。自細胞誘發之反應之功能數及量級並不隨試樣條碼化顯著改變。

【0590】 經誘導CD8+記憶反應之特異性及功能性之同時分析證實，針對CMV pp65、MART-1及EBV BRLF1及BMLF1表位之$CD8^+$記憶反應可自起始健康供體材料中$CD8^+$ T細胞之0.23%升至> 60% (**圖29A**)

【0591】 藉由在$CD8^+$多聚體$^+$細胞上預選通，選擇性訊問抗原特異性T細胞之功能(**圖29B**)。在暴露於加載抗原之DC時，細胞展現細胞毒性功能(CD107a表面暴露)及IFNγ分泌。

【0592】 亦證實在相同培養物中具有多種特異性之新誘導$CD4^+$反應之檢測及功能表徵。利用抗原特異性功能性來鑑別所誘導$CD4^+$ T細胞反應(**圖30A**)。在所展示實例中，在靶向10個HIV源表位之4份重複培養物中實施誘導，該等HIV源表位係HIV陰性健康供體中之幼稚靶。在所有4份生物複製品中檢測抗原特異性反應。選擇所檢測反應中之三者藉由池解捲積進一步隨訪以鑑別所誘導反應之特異性(**圖30B**)。在每一所測試複製品中檢測多種反應，且相同之兩種表位(5號HIV及7號HIV)在每一情形下誘導最高量級之反應。不受限於任一理論，此可反映此供體中之該等表位由MHC II類單倍型所致之較大免疫原性或靶向幼稚譜中之該等表位之T細胞的較大前體頻率。在DC加載期間藉由肽滴定來測定三種所選反應之抗原敏感性(**圖30C**)。對5號HIV、6號HIV及4號HIV之反應分別顯示0.45 μM、0.43 μM及9.1 μM之EC_{50}。

實例25 -T細胞製備方案3

材料：

AIM V培養基(Invitrogen)

人類FLT3L，臨床前CellGenix第1415-050號，儲備液：50 ng/μL

TNF-α，臨床前CellGenix第1406-050號，儲備液：10 ng/μL

IL-1β，臨床前CellGenix第1411-050號，儲備液：10 ng/μL

PGE1或前列地爾(Alprostadil) - Cayman，來自捷克共和國，儲備液：0.5 μg/μL

R10培養基- RPMI 1640 glutamax + 10%人類血清+ 1% PenStrep

20/80培養基- 18% AIM V + 72% RPMI 1640 glutamax + 10%人類血清 + 1% PenStrep

IL7儲備液：5 ng/μL

IL15儲備液：5 ng/μL

程序：

步驟1：將5百萬個PBMC (或所關注細胞)與FLT3L一起平鋪於24孔板之每一孔中之2 mL AIM V培養基中

步驟2：肽加載及成熟-在AIMV中

1. 在各別孔中混合所關注肽池(無肽條件除外)與PBMC (或所關注細胞)。

2. 培育0.5至4 hr。

3. 在培育之後將成熟混合劑(包含TNF-α、IL-1β、PGE1及IL-7)混合至每一孔中。

步驟3：向每一孔中添加人類血清直至最終濃度為10體積%且混合。

步驟4：將培養基更換為補充有IL7 + IL15之新鮮RPMI+ 10% HS培養基。

步驟5：在培育期期間每1-6天將培養基更換為補充有IL7 + IL15之新

鮮20/80培養基。

步驟6：將5百萬個PBMC (或所關注細胞)與FLT3L一起平鋪於新6孔板之每一孔中之2 mL AIM V培養基中

步驟7：用於再刺激之肽加載及成熟(新板)

1. 在各別孔中混合所關注肽池(無肽條件除外)與PBMC (或所關注細胞)

2. 培育1 hr。

3. 在培育之後將成熟混合劑混合至每一孔中

步驟8：再刺激：

1. 對第一刺激FLT3L培養物進行計數且將5百萬個經培養細胞添加至新再刺激板中。

2. 使培養體積達到5 mL (AIM V)且添加500 µL人類血清(10體積%)

步驟9：去除3ml培養基且添加6ml補充有IL7 + IL15之RPMI+ 10% HS培養基。

步驟10：使用補充有IL7 + IL15之新鮮20/80培養基更換75%之培養基。

步驟11：視需要重複再刺激。

實例26 -使用T細胞製備方案3之實驗數據

【0593】 使用T細胞製備方案3製備T細胞且分析經刺激T細胞。自兩名黑色素瘤患者獲得試樣。使用如實例24中所闡述之類似分析來分析T細胞。**圖34**展示量化自兩名黑色素瘤患者誘導之$CD8^+$ T細胞反應之pMHC多聚體繪圖。如本文中所使用，NEO-STIM係指T細胞製備方案。**圖35**展示黑色素瘤患者中所誘導之記憶性及新生CD8+ T細胞反應之多功

能特徵之數據，如藉由1、2、3或4種功能之組合所展示。一或多種功能係產生一或多種選自IFNγ、TNFα、CD107a及4-1BB之因子)。**圖36**展示黑色素瘤患者中針對突變肽及野生型肽所誘導之記憶性及新生CD8+ T細胞反應之特異性。**圖37A**及**37B**及**37C**展示黑色素瘤患者中所誘導之記憶性及新生反應之細胞毒性特徵，如藉由$CD8^+CD107a^+$ T細胞之頻率所量化(頂圖)。**圖37A**及**37B**及**37C**之底圖展示藉由該等T細胞反應達成之靶細胞殺死，如藉由$CAS3^+$腫瘤細胞之頻率所量化。**圖38A**展示黑色素瘤患者中之新抗原特異性$CD4^+$ T細胞反應之鑑別。**圖38B**展示**圖38A**中所鑑別之該等$CD4^+$ T細胞反應針對突變肽及野生型肽之特異性。**圖38C**展示該等$CD4^+$ T細胞反應之多功能性特徵，如藉由1、2、3或4種功能之組合所展示。一或多種功能係產生一或多種選自IFNγ、TNFα、CD107a及4-1BB之因子。

實例27 -使用T細胞製備方案1或2之實驗數據

【0594】 使用T細胞製備方案1或替代地方案2來製備T細胞。使用如實例24中所闡述之類似分析來分析經刺激T細胞。**圖39**展示在添加或不添加埃帕司他下兩個健康供體(例如HD66及HD63)中所誘導之記憶反應之功能性，如藉由1、2或3種功能(舉例而言，一或多種功能係產生一或多種選自IFNγ、TNFα及CD107a之因子)之組合所展示。**圖40**展示在添加或不添加埃帕司他下6個重複誘導中之所誘導新生CD8+ T細胞反應之百分比(「命中率」，4個健康供體中之平均值)。**圖41A**展示在使用本文所提供之T細胞製備方案誘導之後供體HD55中之抗原特異性細胞的絕對數量，其中添加或不添加PD-1阻斷抗體。**圖41B**展示在使用本文所提供之T細胞製備方案誘導之後供體HD 67中之抗原特異性細胞的絕對數量，其中添加或

不添加PD-1阻斷抗體。**圖42A**展示在添加或不添加IL-12下新生$CD8^+$ T細胞反應內之$pMHC^+$ $CD8^+$ T細胞之分數。**圖42B**展示在添加或不添加IL-12下新生$CD8^+$ T細胞反應內之$CD8^+$ T細胞之百分比。

實例28：針對患者特異性新抗原誘導之免疫反應之深入表徵

【0595】 使用生物資訊學引擎(bioinformatics engine)來預測患者特異性新抗原。使用涵蓋所預測新抗原之合成長肽作為刺激方案中之免疫原以評價免疫原性能力。刺激方案涉及將該等新抗原編碼肽供給至患者源APC中，然後與患者源T細胞一起共培養以引發新抗原特異性T細胞。

【0596】 在刺激方案中納入多輪刺激以引發、活化及擴增記憶性及新生T細胞反應。藉由使用下列分析表徵該等反應來分析該等新抗原特異性T細胞之特異性、表型及功能性：使用利用pMHC多聚體之組合編碼分析來檢測多個新抗原特異性CD8+ T細胞反應。使用利用複用、多參數流式細胞術之回憶反應分析來鑑別及驗證CD4+ T細胞反應。藉由量測促發炎性細胞介素(包含IFN-γ及TNFα)之產生及CD107a (作為去顆粒標記物)之上調來評價CD8+及CD4+ T細胞反應之功能性。使用利用表現新抗原之腫瘤細胞系之細胞毒性分析來理解CD8+ T細胞反應因應於天然處理及呈現之抗原而識別及殺死靶細胞的能力。藉由CD107a在T細胞上之細胞表面上調及活性半胱天冬酶3在表現新抗原之腫瘤細胞上之上調來量測細胞毒性。在此研究中，在IRB批準下獲得黑色素瘤患者試樣(NV6及NV10)。

【0597】 刺激方案可成功地擴增預存在CD8+ T細胞反應且誘導新生CD8+ T細胞反應(**表11**)。

表11

患者	HUGO 符號	全基因名稱	類型
NV10	$SRSF1_{E>K}$ $ARAP1_{Y>H}$ $PKDREJ_{G>R}$	富含絲胺酸及精胺酸之剪接因子1 錨蛋白重複及PH結構域 卵膠之多囊蛋白家族受體	CD8
	$MKRN1_{S>L}$ $CREBBP_{S>L}$ $TPCN1_{K>E}$	Makorin環指蛋白1 CREB結合蛋白 雙孔片段通道1	CD4
NV6	$AASDH_{neoORF}$ $ACTN4_{K>N}$ $CSNK1A1_{S>L}$ $DHX40_{neoORF}$ $GLI3_{P>L}$ $QARS_{R>W}$ $FAM178B_{P>L}$ $RPS26_{P>L}$	胺基己二酸酯-半醛去氫酶 輔肌動蛋白 α 4 酪蛋白激酶 α 1 DEAH-Box解旋酶40 GLI家族鋅指3 麩醯胺醯基-TRNA合成酶 序列相似性家族178成員B 核糖體蛋白S26	CD8

【0598】使用來自黑色素瘤患者NV10之PBMC觀察到，預存在CD8+ T細胞反應自4.5% CD8+ T細胞擴增至72.1% CD8+ T細胞($SRSF1_{E>K}$)。此外，刺激方案可有效誘導兩種針對患者特異性新抗原之假定新生CD8+ T細胞反應($ARAP1_{Y>H}$：6.5% CD8+ T細胞及$PKDREJ_{G>R}$：13.4% CD8+ T細胞；在刺激過程之前未檢測到細胞) (**圖34**)。使用來自另一黑色素瘤患者NV6之PBMC，刺激方案成功地針對先前所闡述之新穎模型新抗原誘導7種不同量級之新生CD8+ T細胞反應最多($ACTN4_{K>N}$、$CSNK1A1_{S>L}$、DHX40neoORF 7、$GLI3_{P>L}$、$QARS_{R>W}$、$FAM178B_{P>L}$及$RPS26_{P>L}$，範圍：0.2% CD8+ T細胞至最多52% CD8+ T細胞)。另外，針對患者特異性新抗原之CD8+記憶性T細胞反應有所擴增(AASDH neoORF，在刺激後最多為13% CD8+ T細胞)。

【0599】更詳細地表徵來自患者NV10之經誘導CD8+ T細胞。在使用加載突變肽之DC再攻擊時，新抗原特異性CD8+ T細胞展現一種、兩種及/或所有三種功能(針對$SRSF1_{E>K}$及$ARAP1_{Y>H}$分別為16.9%及65.5%之

功能CD8+ pMHC+ T細胞(**圖35**)。

【0600】 在使用不同濃度之新抗原肽再攻擊時，經誘導CD8+ T細胞對突變新抗原肽具有顯著反應，但對野生型肽並非如此(**圖36**)。

【0601】 在患者NV10中，使用回憶反應分析利用加載突變新抗原之DC來鑑別CD4+ T細胞反應(**圖38A-38C**)。基於對加載突變新抗原肽之DC之反應性，鑑別出三種CD4+ T細胞反應($MKRN1_{S>L}$、$CREBBP_{S>L}$及$TPCN1_{K>E}$)。在使用突變新抗原肽再攻擊時，該等CD4+ T細胞反應亦展示多功能特徵。31.3%、34.5%及41.9%之CD4+ T細胞展現一種、兩種及/或三種功能；分別為$MKRN1_{S>L}$、$CREBBP_{S>L}$及$TPCN1_{K>E}$反應。

【0602】 亦評價來自患者NV10之所誘導CD8+反應之細胞毒性能力(**圖37A-37C**)。在共培養之後，$SRSF1_{E>K}$及$ARAP1_{Y>H}$反應皆展示，CD8+ T細胞上之CD107a及經突變構築體轉導之腫瘤細胞上之活性半胱天冬酶3顯著上調。

【0603】 使用刺激方案，藉由在患者材料中誘導多種新抗原特異性CD8+及CD4+ T細胞反應可證實，預測之患者特異性新抗原以及模型新抗原係免疫原性。誘導多功能及突變體特異性CD8+及CD4+ T細胞反應之能力證明了預測高品質新抗原及生成強力T細胞反應之能力。在刺激過程結束時存在多個富集新抗原特異性T細胞群體(記憶性及新生)可證實，能夠產生新T細胞反應且生成有效治療癌症患者之癌症免疫療法。

實例29 -選擇性細胞耗竭之效應

【0604】 在此實例中，探究自PBMC培養物選擇性耗非必需細胞對細胞群體、細胞離體擴增速率及經活化T細胞之生成之效應。耗竭研究之目的在於藉由富集必需APC群體(經由耗竭非必需PBMC)來增強CD8 T細

胞引發。

【0605】 自供體HD66、HD67、HD69分離PBMC；且在G-Rex 24孔板中設定細胞培養。在肽濃度：0.4μM (0.4mM肽儲備液)存在下培養細胞。肽池：測試兩組肽：高免疫原性及低免疫原性HIV3、ACTN4、CSNK1A1肽。另外，如同記憶性T細胞反應，使用MART-1來評價具有高前體頻率之細胞之擴增。首先如針對實驗組所指示對PBMC實施耗竭，且然後使用Flt3L刺激。該等組包含CD14/25耗竭(基礎Flt3L)；基礎Flt3L + CD11b耗竭(使用CD11b生物素AB)；基礎Flt3L + CD11b/CD19耗竭(使用CD11b生物素AB、CD19微珠)。

【0606】 讀出-在誘導後第16天實施下列分析：細胞倍數擴增、多聚體分析。細胞計數表示為絕對數量或佔總群體之百分比。**圖46-47**展示在實施所指示耗竭之後第0天之所得細胞。**圖48**展示，耗竭CD11b及CD19細胞對擴增之倍數變化並無效應。**圖49A**及**圖49B**展示，耗竭CD11b或CD11b及CD19實際上增加了幼稚T細胞(其係由加載肽之DC所引發)之命中率。在使用低或高免疫原性肽時，觀察到並無差異。CD11b及CD11b/CD19細胞耗竭展示，在首先使用加載抗原之APC刺激之後抗原特異性CD8+T細胞發生顯著改良。如**圖50**中所展示，對於MART-1肽而言，在單一刺激之後，CD8+抗原特異性T細胞增加兩倍以上(左圖)。在使用高及低免疫原性肽刺激細胞時，發現類似增加。在多個誘導下，增加進一步擴大(數據未展示)。總而言之，pDC及$CD141^+$ DC之增加頻率與改良之T細胞誘導相關。

【0607】 探究藉由自PBMC培養物選擇性耗竭CD3+、CD19+、CD11b+、CD14+及CD25+細胞來進一步富集抗原呈現細胞(APC)對細胞

群體、細胞離體擴增速率及經活化T細胞之生成之效應。自供體HD101、HD113、HD114分離PBMC；且在G-Rex 24孔板中設定細胞培養。如下所述耗竭三組細胞：使5 × 10^6個細胞耗竭CD14/CD25 (基礎)；使5 × 10^6個細胞耗竭CD14/CD25/CD11b/CD19 (基礎+ CD11b/CD19)；使5 × 10^5個細胞耗竭 CD3/CD19/CD11b/CD25/CD14且與5 × 10^6個基礎+ CD11b/CD25細胞混合，且該組在針對此實例所闡述之圖中指定為APC。藉由下列細胞表面標記物來鑑別各個細胞群體：藉由所檢測CD141及Clec9A表現來鑑別CD141+ DC；藉由所檢測CD1c表現來鑑別CD1c+DC；藉由CD303及CD123表現來鑑別漿細胞樣DC (pDC)。如**圖51A-51C**中所展示，pDC係富集組(APC)內之最過度表現之APC。第一刺激期間之APC富集可改良命中率(抗原特異性CD8+T細胞) (**圖51D**及**51E**)。

實例30.較早或較晚刺激性細胞對抗原反應性之貢獻

【0608】 為探究較早或較晚添加之細胞群體對抗原反應性之貢獻，在使用加載抗原之APC刺激之前使用膜滲透胺反應性染料(例如羧基螢光黃琥珀醯亞胺基酯或TagIT Violet™)標記細胞(包含T細胞)，且藉由染料之存在及稀釋速率來觀察抗原特異性T細胞之擴增。在施加第二刺激時，使用一種染料標記已培養14天之細胞群體，而使用另一染料標記含有加載抗原之APC及T細胞之新製劑之另一細胞群體，且將兩種群體混合至一起以實施再刺激或擴增。藉由每一染料之存在及稀釋速率來標注該等群體中之每一者對整體抗原特異性T細胞池之相對貢獻(**圖52A**)。使用此實驗設計，應注意，新製細胞群體在第21天不產生抗原特異性T細胞。應注意，在相對於添加已培養細胞提前4天或6天(分別領先5天或領先7天)而非提前

1天(標準方案，方案展示於**圖52B**中)使用抗原預加載新製APC時，新製T細胞對抗原特異性部分具有重大貢獻。同時，應注意，在使用提前4天或6天預加載之APC再刺激時，已培養T細胞之增殖速率有所減小，從而使得抗原特異性細胞之數量整體而言低於標準方案(**圖52C**)。

實例31-使用編碼新抗原性肽之信使RNA來誘導免疫細胞

【0609】 在此實例中，實施研究以比較使用新抗原性肽及編碼新抗原性肽之信使RNA之免疫細胞誘導。

【0610】 **材料：** AIM V培養基(Invitrogen)；LS管柱，Miltenyi Biotec第130-042-401號，CD14微珠，人類，Miltenyi Biotec第130-050-201號；CD25微珠II，人類，Miltenyi Biotec第130-092-983號；MACS緩衝液：MACS BSA儲備溶液(第130-091-376號)與autoMACS沖洗溶液(Miltenyi Biotec第130-091-22號)之1:20稀釋液；人類FLT3L，臨床前CellGenix第1415-050號儲備液，50ng/μL；CD3微珠，人類，Miltenyi Biotec第130-050-101號；TNF-α，臨床前CellGenix第1406-050號儲備液，10ng/μL；IL-1β，臨床前CellGenix第1411-050號儲備液，10ng/μL；PGE1或前列地爾- Cayman，來自來自捷克共和國，儲備液，0.5μg/μL；AIMV培養基+ 2%、5%、10%人類血清+ 1% PenStrep；IL7儲備液，5ng/ μL；IL15儲備液，5ng/μL；24孔G-Rex板；IVT mRNA (1μg/μL)；RNAse zap；Lonza P3核轉染套組及緩衝液，使用100ul比色皿。

【0611】 **程序：**

第0天：PBMC之CD14及CD25耗竭以及使用FLT3L之處理

1.將PBMC解凍且在AIM V培養基中以10百萬個細胞/mL計數。

2.然後藉由在300×g下離心5分鐘來將細胞粒化且再懸浮於含有全能核酸酶 (1uL/mL)之溫熱培養基中保持1小時。在全能核酸酶處理之後，對細胞進行計數。

3.使用3 mL冷MACS緩衝液將MACS LS管柱洗滌三次。

4.然後將PBMC在300×g下旋轉5分鐘且再懸浮於50mL管中之60uL MACS緩衝液(每10^7個細胞)中

5.將20ul CD25II微珠及20uL CD14微珠添加至細胞加+MAC緩衝液(每10^7個細胞)中且在4℃冰箱中或在冰上培育15分鐘

6.在培育之後，藉由添加冷MACS緩衝液來使細胞總體積達到50mL且將細胞在300×g下旋轉10分鐘。然後傾析上清液且將細胞再懸浮於500 µL (每2×10^8個細胞)中。

7.使細胞通過附接至Miltenyi MidiMACS管柱之LS管柱。然後使用3mL MACS緩衝液將管柱洗滌三次。

8.對通過磁鐵進入收集管中之細胞進行計數且旋轉下來。然後對細胞進行計數且將於2mL AIM V中之5百萬個細胞以及50ng/mL FLT3L平鋪於24孔板中。

第1天：經FLT3L處理之PBMC之核轉染

1.將2 ml AIM V培養基平鋪於24孔GREX板之孔中。將板置於培育器中以與15 mL圓錐形管中之單獨5 mL培養基一起平衡。

2.使用細胞刮鏟，自孔收穫經FLT3L過夜刺激之細胞

3.將所有細胞收集於50mL圓錐形管中且再使用1ml冷培養基洗滌孔。然後將細胞在300×g下旋轉7分鐘

4.根據製備商方案對經FLT3L刺激之PBMC實施CD3分離。自管柱取

下保留於磁鐵上之CD3分離細胞，計數且平鋪至經平衡24孔板之適當孔中並置於培育器中。

5.將自Miltenyi珠粒分離以穿流形式收集之剩餘細胞旋轉下來(300×g，7分鐘)且將糰粒置於冰上。

6.將1μg-10μg適當RNA添加至每一AMAXA nucleocuvette器皿中且置於冰上(使體積保持小於10 μL；視需要使用無RNAse水稀釋RNA)

7.將細胞再懸浮於P3緩衝液中，其中使用100ul P3緩衝液/百萬個細胞/比色皿

8.在nucleocuvette中混合100ul P3緩衝液+細胞與RNA且視需要藉由製備商方案使用CB150、DU100、EA100、EU100或CU110方案進行核轉染。

9.然後將比色皿在冰上培育10分鐘且在培育之後添加100ul預熱培養基。

10. 然後將細胞平鋪於24孔板之適當孔中且置於培育器中。

第2天：細胞成熟及添加人類血清

1.在核轉染之後2-3小時添加含有TNF-α、IL-1β、PGE1、IL-7之成熟混合劑。然後將板放回培育器中。在8-12小時之後，向每一孔中添加人類血清直至人類血清達到孔體積之10%。然後將板添加至培育器中以供培養。

第5、8、10及12天：培養基更換以及IL-7及IL-15供給

1.視需要(取決於培養物生長)向培養物中添加含有10%人類血清且補充有5ng/mL IL-7及5ng/mL IL-15之AIMV。

第12-14天：重複第0天-第2天之方案以再刺激經培養T細胞

第14天：經培養T細胞之再刺激

1.收穫T細胞培養物，計數且以經誘導培養物對經核轉染PBMC之1:1比率更換新核轉染培養物。將人類血清添加至培養物中，從而人類血清於AIMV中之培養物體積為10%。

第16及19天：培養基更換以及IL-7及IL-15供給

1.視需要(取決於培養物生長)向培養物中添加含有10%人類血清且補充有5ng/mL IL-7及5ng/mL IL-15之AIMV。

第19-21天：重複第0天-第2天之方案以再刺激經培養T細胞

第21天：經培養T細胞之再刺激

1.收穫T細胞培養物，計數且以經誘導培養物對經核轉染PBMC之1:1比率更換新核轉染培養物。將人類血清添加至培養物中，從而人類血清於AIMV中之培養物體積為10%。冷凍保存任何其他細胞以供其他分析。

第23及26天：培養基更換以及IL-7及IL-15供給

1.視需要(取決於培養物生長)向培養物中添加含有10%人類血清且補充有5ng/mL IL-7及5ng/mL IL-15之AIMV。

第28天：經誘導T細胞之收穫

2.收穫T細胞培養物，計數且冷凍以供其他分析。

【0612】 **結果：圖53**展示來自上述研究之實例性數據。在研究結束時藉由使用新抗原性肽(顯性肽)或預鑑別新抗原性肽或使用編碼肽之mRNA或編碼不相關mRNA (GFP)之mRNA刺激細胞來評估倍數擴增。經mRNA誘導之細胞展現倍數變化之驚人增加。應注意，僅存在一種用於表現GFP之mRNA組之試樣，且由此實施其他實驗以驗證數據。然而，該趨勢展示，經mRNA誘導之細胞之倍數變化顯著增加。

【0613】 **圖54**展示來自選擇顯性肽(病毒肽混合物)之研究之實例性數據。Irr RNA =不相關RNA。在此實驗中，在使用mRNA誘導之前，在一些試樣中去除CD3+細胞(在圖中指定為-CD3)。比較DOM-RNA及DOM RNA-CD3試樣，其中使用相同mRNA誘導細胞，首先僅自指定為DOM RNA-CD3之組去除CD3細胞，可以看出，存在或不存在CD3並不引起誘導特徵之顯著差異。一般而言，使用編碼新抗原性肽之mRNA進行刺激可高度誘導抗原特異性T細胞，如藉由多聚體陽性細胞所展示。

【0614】 **圖55**展示實例性數據，其中藉由流式細胞術評估在刺激及擴增結束時所獲得之CD8+ T細胞之抗原特異性記憶性T細胞反應。實驗組中藉由病毒肽誘導之CD8+ T細胞展示於**圖54之上圖**中(EBV BMLF肽，左圖；編碼EBV BMLF肽之mRNA，右圖)，其中展示類似之特異性特徵，亦即大約46%之CD8+ T細胞對多聚體具有特異性。**圖55之下圖**(預鑑別ME-1肽，左圖；編碼ME-1肽之mRNA，右圖)展現，使用mRNA具有較高T細胞誘導。此研究展示，可甚至較有益在低免疫原性抗原之情形下使用mRNA進行誘導。

實例32-增加T細胞引發效率及抗原特異性T細胞產率之方法

【0615】 在此實例中，將PBMC與編碼抗原編碼序列之mRNA一起直接電穿孔至PBMC群體中以增加T細胞引發效率及抗原特異性T細胞之產率。該製程由**圖56A及56B**中之簡化工作流程表示。亦可自可靠MHC-肽結合預測平臺基於個體之基因體或外顯子組測序結果及個體特異性新抗原之鑑別來研發用於特定個體之個性化抗原(例如新抗原)。可靠MHC-肽結合預測平臺至少部分地揭示於國際申請案PCT/US2018/017849及PCT/US2019/068084中，該等申請案以引用方式完全併入本文中。在確

定個體之HLA譜後，在預測器中運行對癌症類型具有特異性之潛在抗原表位，且鑑別所預測之主要結合劑。生成一或多個RNA構築體。每一RNA構築體包括編碼包括所鑑別表位之多個抗原之核酸。藉由電穿孔或核轉染將mRNA納入PBMC中。PBMC表現RNA編碼之抗原肽且將其呈現至附近之T細胞中，例如在共培養抗原呈現細胞與T細胞之情形下，例如在PBMC試樣中(**圖56A**)。

【0616】 為實例性平行對比肽及mRNA刺激，使PBMC試樣耗竭CD14及CD25表現細胞且通過基本工作流程，如**圖56B**中所繪示。

用於遞送編碼多個免疫原性表位之多核苷酸之RNA構築體設計以表現於PBMC上供抗原呈現

【0617】 實例性RNA構築體展示於**圖57A**中。RNA構築體包括新抗原串，其中連接編碼多個抗原性表位之多個mRNA序列以生成5’ - 3’序連體。至少一種由mRNA編碼之抗原係新抗原。mRNA包括5’帽、3’聚A尾部及編碼序連抗原串之多核苷酸序列，該多核苷酸序列可操作地連接至啟動子序列(在此情形下由T7啟動子例示)。用於加載PBMC之構築體之編碼新抗原串之序列廣泛變化，此乃因其視情況而有所變化。構築體之新抗原串部分之詳細視圖繪示於**圖57B**中。將裂解序列(例如QLGL及K)小心最佳化且置於編碼序連新抗原串內之一或多種抗原之序列之間。個別地最佳化具體序列以及編碼抗原之序列及裂解序列在單一mRNA鏈中之配置以藉由PBMC達成優良表位呈現，且繼而最大化抗原反應性T細胞之產率。自HIV-3表位、CSNK1A1表位、mCDK4表位、mME1表位及Gli3表位獲得實例性抗原或新抗原序列。嚴格緊靠某些表位編碼序列之裂解促進序列之設計及放置可確保，所編碼表位在轉染mRNA時不會無意地天然裂解於表

位序列內，從而每一表位適於藉由PBMC進行表現及呈現。

5'帽及聚A元件

【0618】 在mRNA中納入及不納入5'帽之情形下來實施實驗。使用具有5'帽(帽1或帽0)之mRNA轉染PBMC。應注意，帽1結構對於有效之mRNA遞送及表現較為重要。**圖58A**展示，將腺苷納入5'-UTR區域處以幫助以共轉錄方式納入帽1結構(CleanCap)。如**圖58B-58C**中所展示，帽1納入在以下方面之優點大於帽0：減小之細胞毒性(**圖58B**)及由mRNA所編碼GFP之較高表現(**圖58C**)。將聚A尾部之長度最佳化。具有約120個核苷酸之聚A尾部視為可有效用於mRNA表現(數據未展示)。

mRNA內之核苷酸修飾及對T細胞誘導之效應：

【0619】 藉由代替胞苷(C)或尿苷(U)殘基來進一步修飾mRNA以增加mRNA穩定性及抗降解性。在此實例中，使用其中修飾所有天然三磷酸尿苷、所有三磷酸胞嘧啶或部分量之兩種核苷之GFP mRNA來核轉染選擇性耗竭CD3、CD14及CD25表現細胞之PBMC，且在不同時間點下追蹤GFP表現。在24小時時實施流式細胞術(中間及底部列)。在72小時時，使用Inucyte量測GFP陽性活細胞(頂部列)。將尿苷殘基修飾成假尿苷且將胞苷修飾成5甲基胞苷，且不同實驗組中之修飾百分比展示於**表13**中。

表13 - mRNA中之尿苷及胞苷修飾

試樣	**取代% (U/C)**
部分UTP	30/0
全UTP	100/0
部分UTP/部分CTP	30/30
全UTP/全CTP	100/100
全UTP/部分CTP	100/30
標準品	0/0

【0620】 如**圖59A-59C**中所展示之數據指示，使用假尿苷及5甲基胞苷部分及完全地取代尿苷及胞苷有助於較佳轉譯且部分UTP取代產生較高數量之新抗原特異性細胞(**圖58B**)。

在使用編碼肽之mRNA刺激APC時之高CD8命中率：

【0621】 以序連新抗原串形式構築短聚體(9-10個胺基酸)或長聚體(25個胺基酸)，如**圖60A**中以圖形方式所展示。使用經如上文所闡述編碼多抗原之mRNA構築體核轉染之PBMC來刺激T細胞，且使用包括相同表位之肽實施同步對比。短及長RNA序列對多聚體產生類似CD8+ T細胞反應性(**表14**)。顯而易見，使用編碼長聚體(及短聚體)之mRNA觀察到穩定CD8反應。

表14 -肽以及RNA長聚體及短聚體調介之活化之對比

		CD8命中率(%)	**平均新抗原+頻率(CD8細胞%)**	**反應多樣性(6個中)**	**CD4反應**
供體1	短肽	7	0.03%	1	N.A.
	長肽	19	0.09%	2	0
	短RNA	11	**1.50%**	2	N.A.
	長RNA	8	0.36%	2	0
供體2	短肽	11	0.03%	2	N.A.
	長肽	17	0.21%	3	1
	短RNA	19	**0.39%**	2	N.A.
	長RNA	20	0.05%	2	0

【0622】 如**圖60B**中所展示，Gli3表位由肽以及mRNA充分表現及呈現，然而，加載之mRNA編碼之Gli3短聚體表位之PBMC產生較多Gli3特異性CD8+ T細胞(如藉由多聚體分析所檢測)。多聚體分析之代表性流式細胞術結果展示於**圖60C**中。與之相比，本文所用之HIV-3或CDK4表

位不能由包括長聚體或短聚體序列之mRNA鏈充分表現。肽短聚體序列生成較高比例之CDK4特異性CD8+ T細胞；且肽長聚體生成HIV-3特異性CD8+ T細胞，且編碼其之mRNA序列不生成各別抗原特異性CD8+ T細胞。

在PBMC誘導下增加之多聚體陽性CD8+ T細胞

【0623】 在此實驗中，以不同方式處理PBMC以耗竭某些群體且探究其擴增及多聚體特異性。藉由使用RNA構築體核轉染以下三組PBMC製劑來測試多聚體特異性T細胞之產率：(i) CD25耗竭PBMC、(ii) CD14及CD25耗竭PBMC、(iii)經冷凍CD14及CD25耗竭PBMC。在製劑(i)中，在核轉染期間T細胞並未如製劑(ii)及(iii)中一般與APC分離。將該等製劑與一組加載肽之PBMC進行比較。在電穿孔之前使用FLT3L處理所有細胞。測試各種mRNA構築體，代表性構築體展示於**圖61A**中。總而言之，耗竭CD25之加載RNA之PBMC展現優良多聚體特異性CD8+ T細胞，如**圖61B**中所表示。加載mRNA之CD25耗竭PBMC優於以類似方式加載RNA之新鮮或冷凍CD14及CD25耗竭細胞，且所有加載RNA之PBMC皆有利於生成對多聚體具有反應性之CD8+ T細胞。在RNA加載步驟之前較小程度地處理PBMC可較為有利。在PBMC群體中耗竭多種細胞組分需要使細胞群體經受多種抗體、洗滌步驟及回收步驟(其等同於細胞之處理應力)。

【0624】 加載mRNA之PBMC展示抗原表現之較大多樣性，如下文之**圖61B**及**表15A**及**表15B**中所展示。CD25耗竭PBMC具有可檢測之Gli3特異性CD8+ T細胞及ME1特異性CD8+T細胞。ME1特異性CD8+ T細胞在所有其他組中可忽略不計。**圖61C**展示指示Gli3特異性細胞之代表性流式細胞術數據。

表15A -供體1

	IL-7 及 IL-15						命中率 (%)	平均頻率	起始材料	免疫原
	1	2	3	4	5	6				
Gli3							83%	6.09%	PBMC (CD25-)	RNA (25聚體表位)
HIV-3							0%			
CSNK1A1							0%			
ME-1							0%			
ACTN-4							0%			
CDK4							0%			
Gli3							100%	0.52%	CD14-25- (冷凍)	
HIV-3							0%			
CSNK1A1							0%			
ME-1							0%			
ACTN-4							0%			
CDK4							0%			
Gli3							100%	0.98%	CD14-25- (基礎組)	
HIV-3							0%			
CSNK1A1							0%			
ME-1							0%			
ACTN-4							0%			
CDK4							0%			

表15B -供體2

	IL-7 及 IL-15						命中率 (%)	平均頻率	起始材料	免疫原
	1	2	3	4	5	6				
Gli3							83%	2.68%	PBMC (CD25-)	(25聚體表位)
HIV-3							0%			
CSNK1A1							0%			
ME-1							67%	2.97%		
ACTN-4							0%			
CDK4							0%			
Gli3							67%	0.12%	CD14-25- (冷凍)	
HIV-3							100%	0.02%		
CSNK1A1							0%			
ME-1							17%	0.01%		
ACTN-4							0%			
CDK4							0%			
Gli3							100%	0.79%	CD14-25- (基礎組)	
HIV-3							67%	0.01%		
CSNK1A1							0%			
ME-1							83%	0.01%		
ACTN-4							0%			
CDK4							0%			

【0625】 使用短聚體或長聚體RNA構築體電穿孔經FLT3L過夜處理

之PBMC及CD25耗竭PBMC，且在兩個刺激之後26天探究抗原特異性(**圖61D**)以及倍數擴增(**圖61D**)。該等數據闡釋，所編碼表位之長度對於達成穩定CD8誘導並不重要，此與在使用肽長聚體及短聚體刺激之情形下之觀察截然不同。

不同成熟混合劑之效應

【0626】 探究用於納入T細胞培養基中以擴增經PBMC刺激之T細胞之細胞介素及生長因子之若干混合劑。培養基中之組分通稱為T細胞成熟混合劑。在一組實例性實驗中，使用如先前所指示之mRNA構築體核轉染來自兩個供體之PBMC，且在來自每一供體細胞之試樣組中測試用於T細胞擴增之不同成熟混合劑。所測試之各種細胞介素混合劑列示於下文之**表15C**中。其他擬測試之細胞介素混合劑包含IFN-γ、LPS、聚I及聚C及CD40；以及TLR-7/8及LPS。

表15C. 成熟混合物中之所測試細胞因子及生長因子混合劑。

組	**成熟混合劑**
1	IFN-γ, LPS
2	TNF-α, IL-1β, IL-6, PGE-2 [TIIP (IL6)]
3	TNF- α, IL-1β, IL-7, PGE-2 [TIIP (IL7)]

【0627】 結果展示於**圖62B-62D**中。添加LPS + IFN-γ使得在第26天具有較多多聚體特異性細胞。亦測試每一表位是否隨時間由PBMC表現或一或多者之表現是否受損。

【0628】 使用RNA電穿孔CD25耗竭之PBMC細胞(繪示於圖60C中)且培養24小時之時段。在指示時間下收穫細胞，粒化且急凍。使HLA-A02:01-肽複合物免疫沈澱且然後洗脫肽，並藉由LC-MS/MS分析。比較自經電穿孔細胞洗脫之肽(輕)與重標記之標準肽(重)以進行陽性鑑別。(**圖**

63A)。**圖63B**展示，肽Gli3、HIV3、mACTN4、mCDK4及mME1中之每一者易於表現為顯性表位。

【0629】 除多聚體分析外，評價亦該等經擴增T細胞之功能性。藉由此方法生成之CD8 T細胞對特定表位具有免疫反應性且在所指示不同劑量下釋放TNF-α及/或IFN-γ或CD107a (**圖64A -64B**)。與上述數據一致，高免疫原性肽(例如Gli3)之細胞介素反應高於生成較少特異性T細胞之肽。**圖65**指示可視為生成最佳產物之準則。

實例33 -T細胞治療劑之製備方案

【0630】 以下文所匯總之多步驟製程來製備T細胞治療產物(**圖66**)。製備製程包括下列步驟：(A)腫瘤生檢：實施腫瘤生檢以提供用於DNA及核糖核酸(RNA)測序之組織。來自患者之周邊血試樣用作「正常」組織對照。(B)測序及生物資訊學：使用患者腫瘤及正常試樣之全外顯子組DNA測序及RNA測序以及腫瘤之RNA測序來鑑別及驗證突變。預測免疫原性表位且排定優先級，並用於設計隨後製備之肽。生物資訊學過程利用了公開可用及專屬軟體組件之組合。**圖66**圖解說明了自經由鑑別患者中之突變來試樣收集至以逐步方式生成肽之功能序列。(C)所選合成肽之製備：製備兩組肽，每組最多30-35個肽。組1使用8 - 11個胺基酸(主要係9 - 10個胺基酸)來特異性靶向經由I類MHC直接結合至抗原呈現細胞(APC)所達成之CD8+細胞生成，且組2使用大約25個胺基酸來特異性靶向在藉由APC內化及再呈現後之CD4+細胞誘導。(D)細胞分離：實施血球分離以提供患者APC及T細胞作為T細胞治療劑之起始材料。(E)抗原呈現細胞之分離：自血球分離起始材料分離抗原自體CD14+樹突狀細胞(抗原呈現細胞)。隨後向該等樹突狀細胞加載上述新抗原肽。(F) T細胞擴增：

將自血球分離產物分離之T細胞與加載肽之樹突狀細胞一起共培育。誘導患者之新抗原特異性T細胞，刺激，且擴增。所得細胞產物能夠直接或間接識別及破壞腫瘤細胞，將其在淋巴球耗竭性化學療法後再輸注至患者中。

【0631】 不期望受限於理論，T細胞治療之作用模式係基於使用識別患者之自有新抗原特異性表位之自體CD3+ T細胞來治療患者。一旦投與患者，抗原特異性T細胞預計會立即在活體內擴增且經由細胞凋亡誘導性配體或所釋放溶解性顆粒消除表現抗原之腫瘤細胞，從而引起患者腫瘤消退及無進展存活。

【0632】 起始材料：患者之自有樹突狀細胞及經由血球分離產生之T細胞(血球分離產物)。在診所中於本地授權之標準方案下根據最佳實踐來實施血球分離。表16指示患者血球分離產物之實例性接受準則。

表16 -患者血球分離產物之接受準則

參數	**接受準則**
目測外觀-細胞溶液	具有最小凝集或無凝集
目測外觀 -袋	非洩漏、損害或破裂性袋
記載及標記	獨特個體識別符匹配書面工作(例如2個獨特識別符)
運輸條件	符合所需運輸條件

【0633】 使用生物資訊學過程來選擇隨後製備且用於製備T細胞產物之患者特異性肽。生物資訊學軟體由藉由申請者許可之可在商業上公開獲得之軟體及專屬算法之組合組成，該等專屬算法用於連續鑑別突變且選擇用於製備肽之序列。生物資訊學過程始於來自標準測序技術之數據。首先，需要軟體算法來鑑別及選擇患者特異性突變。其次，使用標準方式預測所有候選者之肽-MHC結合。組合該等充分確立之技術使得能夠分級及

選擇用於T細胞刺激之肽。已評估所有軟體以證實其適用於預期應用，從而可支持1期臨床試驗。測試專屬算法且加以驗證以符合規範且始終獲得如所預期之所得表位序列選擇。

【0634】 關鍵原材料：製備合成新抗原肽以提供兩組肽，每組最多30-35個肽。基於自生物資訊學過程預測之患者特異性新抗原序列，組1為8聚體至11聚體(用於誘導CD8+新抗原特異性T細胞)且組2為大約25聚體(用於誘導CD4+新抗原特異性T細胞)。

【0635】 合成肽並非遞送至患者之藥品之一部分且由此不構成起始材料。其以至少90%純之純化產物形式獲得及使用。在單核球源DC成熟之前添加肽，隨後添加至患者之T細胞中以誘導刺、激及擴增能夠識別且直接或間接消除患者腫瘤細胞之新抗原特異性T細胞。肽極可能經由降解(在37℃及水性條件下培育延長時間段)、細胞洗滌及製備單元稀釋操作清除且並不作為藥品釋放之一部分進行測試。

【0636】 合成2組肽以幫助確保基於將肽呈現於MHC I類及種類II等位基因二者上來刺激CD8+細胞及CD4+細胞二者。

【0637】 *非臨床研發*：來自活體外藥理學研究之結果迄今為止已證實下列結論：在來自健康供體之細胞中，可自幼稚T細胞腔室誘導新抗原特異性CD4+及CD8+ T細胞-由此潛在地拓寬可識別及消除所關注腫瘤之T細胞譜。可進一步擴增預存在CD8+記憶性T細胞反應。在針對常見病毒表位之T細胞反應之背景中已展示這一點，該等反應之行為方式預計與新抗原特異性記憶性T細胞反應相同。已證實多個T細胞效應功能(亦即新抗原及病毒特異性T細胞之多功能性)，如藉由在刺激後分泌多種發炎性細胞介素所量測，據信，該等功能與臨床有效之免疫反應有關。來自多個組之

研究已證實，擁有效應記憶性表型及中央記憶性表型之T細胞係用於接受性細胞療法之最佳群體。該等群體已展示在轉移後仍存在且亦能夠增加及維持細胞毒性功能。一致地，在培養大約4週之後，T細胞治療產物中之大於75%之新抗原誘導性T細胞具有效應記憶性表型(CD45RA-/CD62L-)。

【0638】 交叉反應性評估已證實，在藉由滴定新抗原肽池及其野生型對應體來予以攻擊時，來自健康供體之新抗原特異性CD4+ T細胞(其係自幼稚腔室所誘導)對突變體具有明顯反應，但對相應天然肽則不。該等發現指示，所誘導T細胞產物對突變靶具有高度特異性。計劃其他研究，包含使用來自具腫瘤患者供體之細胞及基於殺死來自具腫瘤患者供體(卵巢癌及非小細胞癌)之表現所關注新抗原之腫瘤細胞系來證實概念驗證。

【0639】 自衍生樹突狀細胞培養物以完成藥品製備開始，繼續進行製備製程。因此，考慮**表17**中所展示之產物發佈測試方案，在即將填充至輸注袋中之前，將藥物物質(細胞)再懸浮於冷凍保存培養基中。藥品係調配於其最終容器及密閉系統中之藥物物質。

【0640】 藥物物質係再懸浮於冷凍保存培養基中之T細胞治療劑(自體CD3+ T細胞)。

【0641】 藥品係再懸浮於冷凍保存培養基中且填充至最終袋中以供輸注之T細胞治療劑(自體CD3+T細胞)。

發佈測試

外觀測試

【0642】 藉由目測檢驗NEO-PTC-01藥品輸注袋來實施外觀測試。

CD3+ T細胞屬性及純度

【0643】 使用流式細胞術分析來量測NEO-PTC-01之屬性及純度。多色流式細胞術使得能夠分析異質細胞產物且提供基於每一細胞之多參數資訊。用於NEO-PTC- 01測試之流式細胞術方法在分析面板中含有以下4種標記物：CD3、CD14、CD25及live/dead。藉由使NEO-PTC-01之QC冷凍小瓶解凍來實施分析。將細胞添加至96孔板中且使用抗CD3、抗CD14、抗CD25及live dead染色劑進行染色。CD3係T細胞標記物。在面板中包含CD14及CD25以供製程監測。所報告分析結果為活CD3+細胞%。

活力

【0644】 使用台盼藍(Trypan Blue)排除測試根據EP 2.7.29來實施NEO-PTC-01之活力測試。將NEO-PTC-01 QC冷凍小瓶解凍且與台盼藍以1:1比率混合。使用下列方程式來確定活力百分比：

((活細胞)/(總細胞計數)) × 100 =活力百分比。

細胞計數

【0645】 使用NEO-PTC-01之QC冷凍小瓶實施最終細胞計數。使用血球計數器根據EP 2.7.29來實施細胞計數。基於所計數細胞數量、試樣稀釋因子及分析用試樣之體積來測定細胞濃度。使用活細胞計數來確定用於患者之細胞劑量。

內毒素

【0646】 使用Endosafe-可攜式測試系統(PTS)系統(Charles River)且使用NEO-PTC-01之QC冷凍小瓶來實施內毒素測試。Endosafe-PTS系統係分光光度計，其量測與試樣中之內毒素濃度直接相關之色彩強度。藉由使試樣與發色鱟變形細胞溶解物(Limulus Amebocyte Lysate，LAL)進

行反應來產生色彩(動力學發色測試方法)。Endosafe-PTS系統滿足了EP 2.6.14之所有需求。該系統利用FDA許可之可棄式柱。在分析中使用加標回收控制來證實在試樣基質中之抑制/增強之不存在。

支原體

【0647】 使用核酸擴增(NAT)對NEO-PTC-01實施支原體測試。在此方法中，將含有NEO-PTC-01細胞之最終收穫試樣接種至兩類肉汁培養基中。在分析中包含適當陽性(摻加50個群落形成單位(CFU)之支原體之培養液)及陰性對照(摻加鹽水之培養液)。將所接種試樣在35-37℃下培育96±4小時。在培育期結束時，自每一試樣提取DNA。使用DNA作為使用SYBR green作為螢光染料之qPCR反應中之模板。該測試方法與如EP 2.6.7中所闡述使用NAT技術之支原體測試一致。在分析中使用加標回收控制來證實，試樣基質不干擾測試方法檢測支原體污染之能力。

無菌性

【0648】 使用BacT/Alert無菌系統(BioMerieux)來實施NEO-PTC-01之無菌性測試。BacT/Alert系統係基於生長之自動化系統，其利用微生物本身之代謝來鑑別無菌污染。微生物污染物會代謝BacT/Alert瓶中所含之生長培養基且產生CO2副產物。每一小瓶含有比色感測器。隨著感測器吸收由微生物產生之CO2，其產生不可逆色彩變化。一旦達到檢測臨限值，該儀器立即將測試小瓶標誌為陽性。在培育期期間，每10分鐘獲取自動讀數。將BacT/Alert系統用於製程中(第14天上清液，每一個別器皿)及最終調配之NEO-PTC-01。根據EP 2.6.27及EP 2.6.1對NEO-PTC-01最終產物實施無菌性測試直至BacT/Alert系統之驗證完成為止。用於NEO-PTC-01測試之試樣體積為總產物體積之≥1%，且在兩種培養基類型(厭氧

及好氧)之間有所不同。使用產物特異性基質NEO-PTC-01測試來驗證BacT/Alert系統。其他細節提供於部分3.2.P.5.3中。使用該數據來支持<14天之無菌性測試方法。

用以在NEO-PTC-01中評估細胞類型之流式細胞術表徵測試

【0649】 研發流式細胞術面板以評估NEO-PTC-01中之CD3+ T細胞亞群體及非CD3+細胞類型(包含骨髓樣譜系細胞、B細胞及NK細胞)。另外，使用標記物來定義產物之分化狀態。標記物包含CD3、CD4、CD8、Vγ9、CD56、CD14、CD19、CD11c、CD11b、CD62L、CD45RA。將NEO-PTC-01中之CD4+及CD8+亞群體之百分比報告為活CD3+陽性細胞之百分比

NEO-PTC-01中之殘餘IL-7及IL-15之評估

【0650】 在一些實施例中，可使用夾心式免疫分析利用電化學發光檢測分析套組(MesoScale Discovery)來測定NEO-PTC-01中之殘餘IL-7及IL-15之含量。

使用pMHC多聚體之組合編碼分析

【0651】 使用利用肽-MHC (pMHC)多聚體之組合編碼分析來鑑別新抗原特異性CD8+ T細胞反應之數量及量級。T細胞藉由使T細胞受體(TCR)結合至表現於靶細胞之表面上之肽MHC複合物來識別其靶。藉由以重組方式產生pMHC複合物且使該等複合物偶合至螢光團，其可用作藉由流式細胞術檢測抗原特異性T細胞之試劑。針對每一用於NEOPTC- 01製備之患者特異性短肽生成pMHC多聚體。此容許計算新抗原特異性CD8+ T細胞之總分數且鑑別由NEO-PTC-01識別之表位。為實施分析，將NEO-PTC-01解凍，洗滌，且使用pMHC多聚體及一組表面標記物(包含CD8、

CD4、CD14、CD16及CD19)染色。使用流式細胞術量化CD4-/CD14-/CD16-/CD19-、CD8+、pMHC+ T細胞之分數。並無pMHC多聚體試劑可用於鑑別CD4+ T細胞反應。因此，使用抗原回憶分析進行此分析。

抗原回憶分析

【0652】組合使用流式細胞術與24小時回憶分析來評價NEO-PTC-01中之新抗原特異性CD4+ T細胞反應之數量及量級以及所誘導CD4+及CD8+ T細胞之多功能性特徵。將NEO-PTC-01與加載或不加載患者特異性肽之樹突狀細胞一起共培養。在24小時之後，使用兩種分析輸出來表徵細胞產物：•使用流式細胞術鑑別新抗原特異性CD4+ T細胞群體，如藉由與陰性對照相比在靶抗原存在下CD4+ T細胞上之IFNγ及/或TNFα之增加之表現所定義。•使用流式細胞術來評價新抗原特異性CD4+及CD8+ T細胞之多功能特徵。多功能特徵係藉由與陰性對照相比在靶抗原存在下IFNγ、TNFα及/或CD107a之增加之表現來定義。在CD8+反應性之背景中，在CD8+ pMHC+ T細胞上預選通新抗原特異性細胞，然後評價多功能性。

自體腫瘤之識別

【0653】藉由在暴露於自體腫瘤細胞後檢測功能T細胞來確定，存在抗原特異性T細胞且其對呈現於腫瘤細胞表面上之抗原之含量較為敏感。該分析使用衍生自患者之自體腫瘤消解物。將NEO-PTC- 01與自體腫瘤細胞一起共培養4小時。與陰性對照(僅NEOPTC-01)相比在靶抗原存在下IFNγ、TNFα及/或CD107a之增加之表現容許鑑別NEO-PTC-01中能夠識別自體腫瘤之T細胞。

細胞毒性分析

【0654】 使用加載肽或穩定轉導之靶細胞之細胞毒性分析可確定，抗原特異性T細胞在抗原識別後能夠殺死腫瘤細胞。該分析使用黑色素瘤腫瘤細胞系A375，該細胞系可經改造以穩定表現所關注抗原以及相關人類白血球抗原(HLA)等位基因。將NEO-PTC-01與A375腫瘤細胞一起共培養6小時，然後藉由CD8+ T細胞上之CD107a去顆粒及腫瘤細胞上之活性半胱天冬酶3 (早期細胞凋亡之標記物)之上調量測細胞毒性。

【0655】 **表17**展示實例性發佈測試及規範。**表18**展示產物之實例性表徵。

表17 -發佈測試及規範

	測試	**方法**	規範
屬性及功效	總有核細胞計數	血球計數器	≥ 1.0×10^9個細胞
	CD3+細胞屬性	流式細胞術	CD3+陽性：≥ 40%之總細胞群體。
	細胞活力	台盼藍排除	≥ 70%
	CD3+細胞分數	流式細胞術	基於製程研發以及改造試驗數據及分析合格數據來確立定量規範。
純度及安全性	無菌性	Bact Alert	無生長
	內毒素	Endosafe-可攜式測試系統(PTS)系統(Charles River)	≤ 1.0 EU/mL 基於70 kg之平均個體體重之規範。投與個體之內毒素之最終劑量將不超過5.0 EU/kg患者體重/小時。
	支原體[a]	藉由核酸擴增(NAT)檢測支原體DNA	未檢測到(陰性)

a.在收穫T細胞誘導培養物時獲取支原體試樣，該製備步驟中之細胞培養時間最長，但該步驟係在細胞洗滌之前。因此，此製備階段代表了關於檢測污染之風險之最壞情形
縮寫：DNA =去氧核糖核酸；ELISA =酶聯免疫吸附分析；PCR =聚合酶鏈反應

【0656】 為減小在所填充藥品輸注袋中引入污染之風險，發佈測試試樣將自藥物物質製備製程步驟(CD3+ T細胞再懸浮於最終調配物中)獲取。此方式之一個例外係用於支原體測試之所獲取試樣，其係在收穫T細胞培養物時獲取。此係細胞培養時間最長但在細胞洗滌之前之製備步驟。因此，此製備階段代表了關於檢測支原體污染之風險之最壞情形

表18 -表徵測試

製程步驟編號	**製程步驟**	**測試**	**目的**
起始材料	血球分離產物	體積	患者細胞獲取之一致性
		表型	測定患者細胞亞群體之可變性(標記物包含：CD3、CD4、CD8、CD19、CD14、CD16、CD56、CD11c、live/dead)
		使用pMHC多聚體及24-hr回憶分析測定預存在CD4+及CD8+記憶反應之存在	測定預存在新抗原特異性CD4+及CD8+ T細胞在擴增之前之%
		分化狀態	評價血球分離產物在擴增之前之分化狀態(CD3、CD4、CD8、CD45RA、CD62L)
藥品測試	最終調配物中之後再懸浮	表型	測定藥品細胞亞型群體之可變性(標記物包含：CD3、CD4、CD8、CD19、CD14、CD16、CD56、CD11c、live/dead)

		使用pMHC多聚體及24hr回憶分析測定來自幼稚腔室之CD4+/CD8+細胞之誘導	測定自幼稚腔室誘導之細胞群體之%之患者間可變性及範圍
		使用pMHC多聚體及24hr回憶分析測定預存在CD4+及CD8+記憶反應擴增	測定預存在CD4+及CD8+細胞擴增之%之患者間可變性及範圍
		特異性	藉由經由對突變表位而非野生型表位之排他或優先反應性證實新抗原特異性來確立產品一致性
		功能性	1)藉由證實CD4+及CD8+新抗原特異性T細胞因應於加載肽之靶或表現新抗原之腫瘤細胞系(IFNγ、TNFα、41B-B、CD107)之反應的多功能性來確立產品一致性 2)藉由使用經改造細胞系證實細胞殺死(若分析可用)來確立產品一致性

表19 -T細胞治療劑藥品穩定性測試間隔及測試

時間點	**分析**
T初始	細胞計數、活力、屬性、功效、無菌性、內毒素、支原體
T1 M	細胞計數、活力、屬性、功效、無菌性、內毒素
T3 M	細胞計數、活力、屬性、功效
T6 M	細胞計數、活力、屬性、功效、無菌性、內毒素

實例34 - T細胞療法(上文所揭示之T細胞治療劑)在卵巢癌患者中之使用方案

【0657】 此實例闡述經新抗原活化之T細胞療法(下文之「T細胞治療劑」)在鉑敏感性、高級漿液性卵巢癌患者中之所提出開放標記、單臂、I期研究。

【0658】 **主要目標**：評估T細胞治療劑之單一治療輸注在患有鉑敏感性疾病且正經歷無症狀復發之轉移性卵巢癌患者中之安全性。**次要目標**：(i)測定如基於實體腫瘤反應準則(Response Criteria in Solid Tumors，RECIST) v1.1藉由無進展存活所評價之抗腫瘤活性。(ii)測定如藉由無化學療法間隔、至第一後續療法時間及整體存活所評價之抗腫瘤活性。**探索目標**包含：(i)藉由在使用T細胞治療劑治療之前、期間及之後評估細胞免疫反應(包含周邊血及腫瘤生檢二者中之抗原特異性CD8+及CD4+ T細胞反應)來表徵免疫原性。(ii)表徵所輸注細胞之純系擴增、持久性及表型。(iii)使患者反應與探索性生物標記(例如PD-L1表現、體細胞突變負荷及新抗原負荷)建立關聯。

研究設計：劑量評估：

【0659】 將T細胞治療劑(一種自體個性化、新抗原特異性接受性T細胞療法)投與使用不超過一種基於鉑之先前療法治療之鉑敏感性、高等級漿液性卵巢癌患者。在所記載CA 125在至少間隔一週之兩次量測中至少兩倍於基線含量後，招募患者。15名患者計劃完成治療。以劑量遞增形式實施研究，最大劑量為1×10^{11}個CD3+細胞。並不限定最小劑量。因產物之個性化性質，細胞劑量可在患者間有所變化。1×10^{11}個CD3+細胞之最大劑量係基於可比產品(例如TIL療法)。在使用TIL療法之現有研究中，患者已接受多個細胞劑量且在細胞劑量與臨床益處之間尚無任何明確關聯。所輸注細胞之擴增預計可在患者間有所變化。因尚未證實此擴增與患

者體重或體表面積相關，故採用平穩劑量遞增方案。

治療：

【0660】 在釋放T細胞治療劑以投與患者時，其將經受重複放射學評估且使用30mg/kg/d環磷醯胺(cyclophosphamide) (2天，第-5及-4天)及25mg/m^2/d氟達拉濱(fludarabine) (3天，第-3、-2及-1天)開始預處理方案。在第0天時，以單一IV輸注形式投與T細胞治療劑。在前三名患者中評估1 × 10^{10}個CD3+細胞之初始劑量。患者之此劑量值之輸注最少交錯2週以評價毒性。若此劑量值之輸注充分耐受，則第二劑量值(3名患者)接受1 × 10^{11}個CD3+ T細胞。此較高劑量下之細胞輸注亦最少交錯2週以評價毒性。若1 × 10^{11}個細胞之輸注由三名患者充分耐受，則所有後續患者將接受最多1 × 10^{11}個細胞。所有治療皆係在住院環境中投與。T細胞治療劑係根據患者來製備且預計所製備之諸多細胞存在異質性。若所製備劑量在劑量值1中高於1 × 10^{10}個CD3+或在劑量值2中高於1 × 10^{11}個CD3+細胞，則僅給予所製備劑量中代表靶劑量值之部分。若所製備劑量低於該等靶向劑量值，則給予該劑量，但患者將不被視為DLT之評估對象且將出於3+3設計之目的而被代替。最大耐受劑量(MTD)定義：具有可接受副效應之所輸注細胞之最高劑量。

表20 -劑量小組

劑量小組	淋巴耗竭	劑量範圍 (單一靜脈內劑量)
1	氟達拉濱+環磷醯胺	最多1 × 10^{10}個總CD3+細胞
2	氟達拉濱+環磷醯胺	最多1 × 10^{11}個總CD3+細胞

劑量範圍：

【0661】 並不限定最小劑量。因產物之個性化性質，細胞劑量可在

患者間有所變化。1 × 10^{11}個CD3+細胞之最大劑量係基於可比產品(例如TIL療法)。在使用TIL療法之現有研究中，患者已接受多個細胞劑量且在細胞劑量與臨床益處之間尚無任何明確關聯。所輸注細胞之擴增預計可在患者間有所變化。因尚未證實此擴增與患者體重或體表面積相關，故採用平穩劑量遞增方案。在前三名患者中評估1 × 10^{10}個CD3+細胞。若此劑量下之輸注充分耐受，則後續患者將接受最多1 × 10^{11}個CD3+細胞。

劑量限制毒性(DLT)：

【0662】 劑量限制毒性之定義如下：發生於細胞輸注後24小時內之3級或更高等級毒性(與細胞輸注相關)。在使用兩個劑量之1000mg口服(PO)乙醯胺酚或兩個劑量之2mg口服(PO)克雷滿汀(clemastine)時，毒性必須不能在8小時內逆轉至小於或等於2級。3級自體免疫性。毒性必須不能在10天內消退或逆轉至小於或等於2級自體免疫毒性。任一4級自體免疫毒性。任一3級或更高等級之非血液學毒性

【0663】 由淋巴耗竭性化學療法方案或支持性藥劑投與所致之預期毒性將不被視為DLT。

細胞介素釋放症候群(CRS)之定義及治療：

【0664】 細胞介素釋放症候群係免疫系統之嚴重毒性，已使用經嵌合抗原受體(CAR)修飾之T細胞及雙特異性T細胞咬合抗體觀察到該症候群。該等療法之特徵在於超生理學T細胞活化，該活化可產生顯著臨床效能，同時亦誘導明顯且有時嚴重之CRS毒性。CRS係源自與T細胞咬合及增殖有關之細胞介素升高之發炎性症狀之集群。儘管在大部分情形下該等症狀包含輕度發熱及肌痛，但其亦可呈現為嚴重發炎性症候群且伴有血管滲漏、低血壓、肺水腫及凝血病。

【0665】 儘管CRS風險存在於任一免疫活化療法中，但申請者認為，使用T細胞治療劑之CRS風險極低。T細胞治療細胞產物並未進行基因修飾且並不刺激、活化或改造T細胞以在超生理學層面下發揮作用。應注意，使用TIL療法尚未觀察到CRS。

【0666】 根據來自CAR-T細胞臨床研究之CRS經歷，申請者藉由在T細胞輸注後每天量測周邊血C反應蛋白、鐵蛋白及IL-6來監測T細胞輸注後之CRS。已藉由使用介白素-6-受體阻斷抗體托珠單抗(tocilizumab)進行治療來快速逆轉嚴重細胞介素釋放症候群且在此研究中納入託珠單抗以管控嚴重CRS。

安全性評審委員會(SRC)

【0667】 SRC將由現場調查員、委託醫學監測人員、委託研究及研發負責人及特設成員(視需要)組成。連續地仔細評估以確定細胞輸注之毒性、免疫學效應及抗腫瘤效能。

研究階段：

【0668】 (1)針對CA 125預篩選。鉑敏感性患者(定義為對一線鉑化學療法大於或等於6個月之臨床反應)將每三個月經受CA 125測試。基線CA 125含量定義為在完成一線鉑化學療法後前6個月內記載之最低值。

【0669】 在無症狀CA 125上升後之篩選。在檢測到CA 125升至至少兩倍於基線含量後，患者將經受CT掃描以測定疾病負荷程度；所有掃描將在當地評審且視需要集中評審。對具有至少一個可量測疾病部位之患者進行篩選以測定合格性。篩選程序由完整病史組成，包含先前癌症療法及相關手術、並行藥劑、完整體檢、美國東部腫瘤協作組織(Eastern Cooperative Oncology Group，ECOG)體能狀態(PS)、生命體徵、12-導

聯心電圖(ECG)及臨床實驗室評價(血液學、化學、尿分析、懷孕測試、甲狀腺測試)。

【0670】 預治療包含生檢及血球分離。在試驗中招募滿足如上文所闡述之篩選準則之患者。在招募後，在篩選14天內對患者進行腫瘤生檢或手術切除術以獲得用於測序及個別化突變分析之組織。腫瘤生檢必須經福爾馬林(formalin)固定、石蠟包埋(FFPE)，且最少含有30%腫瘤細胞性(如藉由病理學所評價)。平行獲得周邊血試樣以用作「正常」組織對照且用於人類白血球抗原(HLA)種類I及II分型。自腫瘤及正常組織二者生成DNA且呈遞用於全外顯子組測序以鑑別患者之獨特突變情況。對腫瘤RNA平行測序以表徵基因表現。亦將剩餘腫瘤組織呈遞用於腫瘤標記物及免疫細胞標記物之免疫組織化學分析。在預治療期間，患者亦經受最小6個血容量之血球分離。使用自血球分離所分離之T細胞及抗原呈現細胞來生成T細胞治療劑藥品。

【0671】 T細胞治療劑產生。在腫瘤生檢及血球分離後12-16週時段內產生T細胞治療劑。該產品係一種自體個性化、新抗原特異性接受性T細胞療法，其由已使用加載衍生自每一個別患者之腫瘤之新抗原肽之自體抗原呈現細胞離體擴增的CD3+ T細胞組成。新抗原肽對患者腫瘤細胞具有特異性且對於患者而言係獨特的，此乃因其係基於每一患者腫瘤中之突變之序列分析所設計。

治療

【0672】 在釋放患者之T細胞產物時，其將經受重複放射學評估且使用30mg/kg/d環磷醯胺(2天，第-5及-4天)及25mg/m^2/d氟達拉濱(3天，第-3、-2及-1天)開始預處理方案。在第0天時，藉由IV輸注投與T細胞治

療劑。在前三名患者中評估1 × 10^{10}個CD3+細胞之初始靶劑量。對於前三名接受1 × 10^{10}個細胞之患者而言，患者將最少交錯2週以評價毒性。若此劑量值之輸注充分耐受，則第二劑量值患者接受1 × 10^{11}個CD3+細胞。對於前三名接受1 × 10^{11}個細胞之患者而言，此較高劑量下之細胞輸注將最少交錯2週以評價毒性。若1 × 10^{11}個細胞之輸注由三名患者充分耐受，則所有後續患者將在第0天接受最多1 × 10^{11}個細胞之T細胞治療劑之單一輸注。所有治療皆係在住院環境中投與。T細胞治療劑係根據患者來製備且預計存在劑量異質性。若所製備劑量在劑量小組1中大於1 × 10^{10}個CD3+或在劑量小組2中大於1 × 10^{11}個CD3+細胞，則僅給予所製備劑量中代表劑量靶值之部分。若所製備劑量低於該等靶向劑量值，則可給予該劑量，但患者將不被視為DLT之評估對象且將出於3+3設計之目的而被代替。自第1天開始，以5 mcg/kg/天(不超過300 mcg/天)之劑量經皮下投與非格司亭(filgrastim)。繼續每天投與非格司亭直至嗜中性球計數> 1.0 ×10^{9}/L × 3天或> 5.0 ×10^{9}/L為止。若在12-16週生產期期間患者經歷症狀性進展且需要立即治療，則其可保留於研究中且在臨床適當時於第二次復發(如藉由CA 125升至高於基線2倍所記載)時接受T細胞治療。

隨訪

【0673】 此研究之主要治療期係第1週至第52週。在主要治療期期間實施之安全性評價包含不良事件(AE)收集、症狀引導性體檢、生命體徵量測、ECOG PS及安全性實驗室評價。在第12、24及48週實施放射學評價以評估治療反應。在投與非格司亭之後大約4-6週，患者將經受完整腫瘤評估以及毒性及免疫學參數評估。患者在此方案中將不接受其他實驗藥劑。在T細胞治療輸注後在4小時、4天、14天、1個月之時間點且然後

每月自80-120cc周邊血抽吸液獲得用於全面免疫監測之周邊血單核細胞(PBMC)。除治療前之生檢外，必須第20週與第24週之間及/或在疾病進展時實施核心或手術生檢。

實例35 -用於轉移性黑色素瘤之接受性細胞療法之自體新抗原特異性T細胞產物之研發

規模化製程改造、T細胞製備及品質控制

【0674】 在此實例中，展示使用白血球分離自轉移性黑色素瘤患者進行之多個成功製程改造試驗之結果。NEO-STIM係專屬離體誘導製程，生成含有靶向多個來自每一個別患者之腫瘤之新抗原之高度特異性T細胞反應的新抗原特異性T細胞產物(NEO-PTC-01)；該等T細胞反應係多功能的且可識別自體腫瘤。使用本文所闡述之製程開始臨床試驗程式。關於NEO-PTC-01之臨床程式之通用工作流程以圖形方式表示於**圖1A及67**中)。此程式之設想優點概述於**圖67**中。

【0675】 闡述誘導製程NEO-STIM™，其引發、活化且擴增多個新抗原特異性T細胞反應。藥品NEO-PTC-01之特性(特異性、功能性及表型)預計可賦予臨床益處且克服其他細胞療法方式所面臨之難題，包含(但不限於)減小抗原逃逸風險、減小脫靶毒性風險、選擇最佳T細胞表型來促進持久性及腫瘤細胞殺死、涵蓋實體腫瘤中之廣泛臨床機會及利用所生成未改造細胞產物預計具有有限毒性之優點。生成含有靶向多個來自每一個體患者之腫瘤之新抗原之高度特異性T細胞反應的新抗原特異性T細胞產物(NEO-PTC-01)；該等T細胞反應係多功能的且可識別自體腫瘤。

【0676】 藉 由 Netherlands Cancer Institute – Antoni van Leeuwenhoek (NKI-AVL)之生物治療單元使用來自健康供體之PBMC及3

份在IRB批準下獲得之黑色素瘤患者試樣來實施4個製程改造試驗(**表22**)。

【0677】 對於黑色素瘤患者而言，使用T細胞表位預測程式來預測患者特異性新抗原。對於HD108而言，使用限於供體HLA等位基因處之先前所鑑別新抗原及模型抗原來執行NEO-STIM。生成長度為8至25 aa之合成肽。使用NEO-STIM來引發、活化及擴增記憶性及新生T細胞反應，每一器皿使用最多50×10^6個PBMC。

【0678】 藉由使用下列分析表徵該等反應來分析該等新抗原特異性T細胞之特異性、表型及功能性：

- 使用pMHC多聚體之組合編碼分析。
- 詳細流量表徵。標記物包含(但不限於) CD3、CD4、CD8、CD45RA及CD62L。
- 回憶反應分析，其使用複用、多參數流式細胞術來a)鑑別及驗證$CD4^+$ T細胞反應、b)評價$CD8^+$及$CD4^+$ T細胞反應之多功能性及c)評價識別自體腫瘤之能力。量測促發炎性細胞介素IFN-γ及TNFα以及CD107a(作為去顆粒標記物)之上調。
- 細胞毒性分析，其使用表現新抗原之腫瘤細胞系來理解新抗原特異性$CD8^+$ T細胞反應因應於經天然處理且呈現或外源性加載之抗原識別及殺死靶細胞之能力。

結果

【0679】 有利於製備NEO-PTC-01 (接受性T細胞治療產物)之臨床前研發活性成功地使用白血球分離自健康供體及3名轉移性黑色素瘤患者來執行4個製程改造試驗。

【0680】 所生成最終藥品滿足所有4個製程改造試驗之發佈規範(**表**

21)。

表21 -滿足接受準則之藥品之結果

用於所有試驗之NEO-PTC-01之接受準則	
測試	**結果**
細胞計數	通過
活力	通過
T細胞純度/屬性($CD3^+$細胞)	通過
支原體	通過
內毒素	通過
無菌性	通過

【0681】大部分最終藥品由$CD3^+$ T細胞組成(範圍：67.4%至90%)。B細胞、NK細胞及APC構成非$CD3^+$部分(**圖68**)。

【0682】自PBMC誘導19種$CD8^+$及25種$CD4^+$ T細胞反應(每一患者關於$CD8^+$及$CD4^+$ T細胞之範圍分別為4-5及4-7，**表22**，**圖69A-69C**)。來自黑色素瘤患者之PBMC中所誘導之所有T細胞反應皆假定為新生T細胞反應；在未操縱起始材料中未檢測到預存在反應。來自健康供體之PBMC亦係此情形；然而，所鑑別之一種反應係針對MART1，MART1已知在周邊血中具有高前體頻率。因此，此製程成功地自幼稚腔室誘導T細胞反應。另外，在健康供體中，已知具有高前體頻率之T細胞反應有所擴增，此類似於記憶性T細胞反應之擴增。

表22 -用於改造試驗之誘導之設計

試驗編號 ***材料來源***	**所誘導$CD8^+$反應**	**所誘導$CD4^+$反應**
先導試驗 *健康供體*	$REL_{G>R}$, $ZDBF2_{P>L}$, $KXD1_{S>F}$, MART1 & SNA70	$PRKDC_{E>K}$, $MERTK_{E>K}$, $CDK4_{R>C}$, $GAS7_{H>Y}$, $RQDC1_{P>L}$, HIV1 & HIV2

黑色素瘤患者 1	$ZNF226_{H>Y}$, $LRBA_{S>L}$, $DNM2_{I>V}$, $BBS4_{L>F}$, & $GTF2H3_{V>A}$	$PRKDC_{E>K}$, $MARCH7_{S>F}$, $TRAK2_{G>V}$, $RANBP9_{P>S}$, $DNM2_{I>V}$, $MERTK_{E>K}$, $OSBPL8_{L>S}$
黑色素瘤患者 2	$TENM3_{S>L}$ (10mer), $CERK_{P>S}$, $ITPR3_{E>K}$, $TENM3_{S>L}$ (9mer) & $ATP2C1_{E>K}$	$TENM3_{S>L}$, $ARID2_{S>L}$, $ATP2C1_{E>K}$, $CERK_{P>S}$, $ATP5G2_{S>F}$, $TNFRSF10B_{P>L}$, & $ALG13_{G>R}$
黑色素瘤患者 3	$REL_{G>R}$, $PDE8A_{P>S}$, $WWP2_{P>S}$ & $VANGL2_{S>F}$	$ACACA_{H>Y}$, $MYCBP2_{S>F}$, $ALS2_{A>T}$ & $TOR1AIP1_{T>I}$

【0683】 實施進一步表徵以評價經NEO-STIM誘導之$CD8^+$及$CD4^+$ T細胞之多功能性特徵及分化狀態。在使用加載突變肽之DC再攻擊時，新抗原特異性T細胞展現1、2及/或3種功能($CD8^+$及$CD4^+$ T細胞反應之多功能性特徵之實例分別展示於**圖69C**及**圖70** (下圖)中)。**圖70**上圖顯示指示代表性誘導反應中表現IFN-γ及/或TNF-α之$CD4^+$細胞之分數之代表性數據。右上圖繪示指示IFN-γ^+ $CD4^+$ T細胞之實例性流式細胞術繪圖之代表性數據。另外，評價藥品之分化狀態。大部分經NEO-STIM誘導之T細胞係效應記憶性及中央記憶性表型(**圖71**)。

【0684】 經NEO-STIM誘導之T細胞反應展示為對突變表位具有高度特異性。評價所誘導$CD8^+$及$CD4^+$ T細胞反應之特異性且指派為如下2類(**圖72**)：(i)突變體反應性及(ii)野生型交叉反應性。突變體反應性類別係(a)突變體特異性，其展示IFN-γ及/或TNFα針對突變表位而非野生型表位顯著增加；及/或(b)突變體選擇性，其展示IFN-γ及/或TNFα針對突變表位及野生型表位顯著增加。然而，針對突變表位之信號顯著高於野生型表位。野生型交叉反應性類別展示，IFN-γ及/或TNFα針對突變表位及野生

型表位顯著增加。2種信號之間並無顯著差異。總而言之，在$CD4^+$腔室中，檢測到兩個類別之T細胞反應；85%之$CD4^+$ T細胞係突變體反應性且15%與野生型表位具有交叉反應性。在$CD8^+$ T細胞腔室中，全部100%之T細胞皆係突變體反應性(**表23**)。

表23 -所測試所有反應之匯總，使用杜克氏測試(Tukey's test)指派顯著性，$P < 0.05$

先導試驗、ENG-01及ENG-02			
	所測試反應	突變體反應性	野生型交叉反應性
CD4	13	85%	15%
CD8	3	100%	0%

【0685】 最後，針對所鑑別T細胞反應之子組評價經NEO-STIM誘導之T細胞之細胞毒性能力。生成用於先導試驗及ENG-01之經轉導腫瘤細胞系，其表現供體特異性HLA等位基因以及所研究突變。在ENG-02中，使用表現供體特異性HLA等位基因之加載肽之腫瘤細胞(**圖73**)：

i. 針對$REL_{G>R}$ (先導)及$LRBA_{S>L}$ (ENG-01)之$CD8^+$ T細胞反應展示，$CD8^+$ T細胞上之CD107a及經突變構築體轉導之腫瘤細胞上之活性半胱天冬酶3在共培養之後顯著上調。

ii. 針對$TENM3_{S>L}$及$ITPR3_{E>K}$ (ENG-02)之$CD8^+$ T細胞反應展示，腫瘤細胞上之活性半胱天冬酶3及(在$10M3_{S>L}$情形下)$CD8^+$ T細胞上之CD107a在與加載肽之腫瘤靶一起共培養之後顯著上調。

【0686】 重要的是，基於新抗原特異性T細胞上之IFN-γ^+及CD107a之上調，共培養自ENG-01及ENG-02生成之T細胞與可用自體腫瘤消解物可證實，所誘導T細胞能夠直接識別自體腫瘤細胞(**圖74**)。

【0687】 使用此實例性誘導製程，可自黑色素瘤患者之PBMC重複生成治療規模之強力T細胞產物。誘導製程誘導多個CD8+及CD4+ T細胞反應。所誘導T細胞反應係突變體反應性，展示多功能特徵，且具有中央及效應記憶性表型。所誘導T細胞反應具有細胞毒性能力，如藉由在識別表現抗原之腫瘤細胞系後細胞毒性功能有所上調所展示。重要的是，所誘導T細胞培養物可直接識別自體腫瘤。

臨床應用

【0688】 規模化製備之T細胞之實例性臨床應用可為本申請案中所揭示之任一臨床應用，包含(但不限於)治療黑色素瘤、肺癌、胰臟癌、神經膠母細胞瘤、卵巢癌。

【0689】 用於開始臨床試驗之程式中之又一應用匯總於**圖75**中。在本申請案中，患者包含於兩個小組中。小組A：患者難以使用抗PD1治療劑治療且接受抗CTLA-4療法。該等患者經受兩個劑量之上述藥品。(i)向少量患者給予10^8-10^9個細胞之單一療法，且向少量患者給予>10^9-10^10個細胞。小組B：所納入患者在服用抗PD1 3個月時係穩定或無症狀進展者，且接受或不接受小組A中所確定劑量之抗CTLA4。

實例36：患有晚期或轉移性黑色素瘤之NEO-PTC-01 IN患者之開放標記、I期研究

【0690】 此研究將探究NEO-PTC-01，該物質係用於接受性細胞療法之自體個性化T細胞產物，且係離體製得並靶向顯示於腫瘤及腫瘤微環境中之新抗原。新抗原係衍生自DNA中呈現於患者之主要組織相容性複合物(MHC)種類I及種類II等位基因之背景中之突變的腫瘤特異性抗原。新抗原靶向利用個別化方式且提供機會調整每一細胞產物之組成以生成用

於每一患者之個性化T細胞產物。衍生自該產物之細胞預計係中央或效應記憶性表型，能夠實施多種功能(預期作用機制包含識別靶細胞時之細胞介素產生及去顆粒)且預計與野生型表位相比具有高度突變體特異性。添加此新抗原特異性接受性T細胞療法可提供優於檢查點抑制劑SOC療法之顯著臨床益處，包含更持久抗腫瘤反應、症狀控制及長期無腫瘤進展。

研究目標

【0691】 此研究之主要目標係評估NEO-PTC-01在不可切除性或轉移性黑色素瘤患者中之安全性且測定其最高可耐受劑量。此研究之次要目標係：1)測定如藉由無進展存活基於實體腫瘤反應準則(RECIST) v1.1 (Eisenhauer, 2009)所評價之抗腫瘤活性；及2)測定如藉由整體反應率(ORR)、反應持續時間(DOR)及臨床受益率(CBR)所評價之抗腫瘤活性。

研究設計

【0692】 研究NTC-001係NEO-PTC-01在不可切除性或轉移性黑色素瘤患者中之安全性及活性之1期探究。該研究將分如下兩部分實施：部分1 (劑量探索)及部分2 (劑量擴增)。研究之劑量探索部分將以≥ 1×10^8至≤ 1×10^9個細胞之劑量開始NEO-PTC-01療法 且根據3+3劑量遞增設計繼續進行。劑量擴增部分2將在擴增患者小組中測試最高可耐受部分1劑量以進一步定義安全性及耐受性。

研究群體

【0693】 患有不可切除性或轉移性黑色素瘤之18-75歲成人男性及女性，其在使用PD-1/PD-L1抑制劑及CTLA-4抑制劑二者治療的同時已發生進展(部分1)。

介入

【0694】 研究部分1中之患者將以≥ 1×10^8至≤ 1×10^9個細胞之起始劑量接受NEO-PTC-01。研究部分2 (擴增小組)中之患者將以部分1中之最高可耐受劑量接受NEO-PTC-01。

主要研究參數/研究結果

【0695】 主要研究參數係基於以下各項來評價使用NEO-PTC-01進行治療之安全性：不良事件(AE)發生率、嚴重不良事件(SAE)及安全性實驗室值、體檢及生命體徵之變化。根據連續放射學評估(電腦化斷層攝影術[CT]或磁共振成像[MRI])來評價治療臨床反應以測定治療反應及疾病進展(RECIST v1.1)。

次要研究參數/研究結果

【0696】 根據連續放射學評估(電腦化斷層攝影術[CT]或磁共振成像[MRI])來評價治療臨床反應以測定治療反應及疾病進展(RECIST v1.1)。測定整體反應率(ORR)，其定義為達成CR或部分反應(PR)之患者之比例。PFS定義為自首次投用NEO-PTC-01之日期至首次記載進展性疾病(PD)或死亡之日期之時間。DOR定義為首次記載所證實反應之日期至首次記載PD之日期。臨床受益率(CBR)定義為基於RECIST達成CR、PR或SD之患者之比例。至第一後續療法時間定義為自首次投藥日期至第一後續療法之開始日期之時間。與參與相關之負擔及風險之性質及程度、益處及群組相關性。

【0697】 NTC-001係NEO-PTC-01在不可切除性或轉移性黑色素瘤患者中之劑量探索及初次用於人類(FIH)安全性研究。該研究之劑量探索部分係根據3+3劑量遞增設計所設置，從而限制了安全性評估之初始階段中之研究藥物暴露。作為額外之安全預防措施，在劑量小組內，前3名患

者之招募將最少交錯2週間隔。主要風險領域包含淋巴耗竭期間之感染、細胞介素釋放症候群(CRS)可能及非腫瘤、脫靶毒性。其他潛在風險係與其他研究特異性程序(包含腫瘤生檢及白血球分離)有關者。患者將在淋巴耗竭、T細胞產物輸注及嗜中性球回收之初始治療期期間住院以進行住院病人監測。此後，自出院後1-4週開始在門診環境中每週進行臨床檢驗及實驗室監測，隨後在研究剩餘時間中每6週進行訪視。安全性干預將包含遵循環磷醯胺+氟達拉濱淋巴耗竭方案之非格司亭生長因子支持以及細胞介素釋放症候群(CRS)之監測及管控。使用基於腫瘤浸潤淋巴球(TIL)之療法之先前研究可為最相關對比療法。在設計此研究之起始劑量及劑量範圍時應考慮該等研究。較低起始劑量可視為患者中之初始NEO-PTC-01測試中之核心安全性考慮因素。來自腫瘤生檢之評價對於此研究之原理及設計至關重要。在可行時，研究設計容許使用基線腫瘤樣品之存檔試樣。需要輸注後腫瘤生檢及白血球分離試樣來評估安全性及藥效動力學效應(包含與此初次用於人類之研究中之毒性及效能之相關性)。根據方案或機構標準在醫院監測性環境中來實施該等程序。該等風險可視為與不可切除性或轉移性黑色素瘤患者中之潛在NEO-PTC-01臨床益處及疾病進展或對先前療法之次最佳反應(部分2)相關。NEO-PTC-01代表一種新穎之個別化治療方式；添加新抗原特異性自體T細胞療法可提供優於檢查點抑制劑方案之顯著臨床益處。

主要納入準則

1. 願意且能夠給予書面知情同意書之成人(18至75歲)男性及女性。

2. 在組織學上證實患有不可切除性或轉移性黑色素瘤。

3. 部分1：

a.先前已接受PD-1/PD-L1抑制劑(以單一藥劑或組合形式)及含有CTLA-4抑制劑之方案(單一藥劑或組合)。

b.在最後治療方案中已記載疾病進展。

4. 部分2：

a.已接受PD-1/PD-L1抑制劑(以單一藥劑或與CTLA-4之組合形式)至少3個月/當前正在接受。

b.在最新成像評價中已記載穩定疾病(根據RECIST 1.1)或臨床無症狀進展性疾病，該等疾病必須已發生於招募3個月內。

c.在醫學上適於繼續使用PD-1/PD-L1抑制劑療法。

d.在探究者看來受益於基於T細胞之療法之添加。

5. 對於BRAF突變體患者而言：患者必須亦先前已接受靶向療法(B-raf抑制劑或B-raf/MEK組合療法)。

6. 患者必須在臨床上無症狀且預計可保持並無需要抗腫瘤治療之症狀至少16週。

7. 根據RECIST v1.1，具有至少一個可量測疾病部位。

8. 至少一個疾病部位必須可用於腫瘤組織生檢。對於預處理生檢而言，若生檢獲取於招募6個月內，則可使用存檔樣品。

9. ECOG體能狀態為0或1。

10. 自所有與先前治療有關之毒性恢復至可接受基線狀態(實驗室毒性可參見下文之納入限值)或國家癌症研究院常見不良事件術語準則(National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events，NCI CTCAE) 5.0版之等級0或1，不視為安全性風險之毒性除外(例如脫髮)。

11. 篩選實驗室值必須滿足下列準則且應在在研究治療之前28天內獲得：

a.白血細胞(WBC)計數≥ 3 × 10^3/μL

b.絕對嗜中性球計數(ANC) ≥ 1.5 × 10^3/μL

c.血小板計數≥ 100 × 10^3/μL

d.血紅蛋白> 9 g/dL或6mmol/L

e.血清肌酸酐≤ 1.5 ×正常值上限(ULN)或肌酸酐清除(CrCl) ≥ 50 mL/min (藉由Cockcroft-Gault)

f.天門冬胺酸胺基轉移酶(AST)及丙胺酸胺基轉移酶(ALT) ≤ 3 × ULN

g.總膽紅素≤ 1.5 × ULN (吉爾伯特氏症候群(Gilbert Syndrome)患者除外，在該疾病情形下總膽紅素< 3.0 mg/dL係可接受的

h.國際正規化比率(IN R)、凝血酶原時間(PT)或活化部分促凝血酶原激酶時間(aPTT) ≤ 1.5 × ULN，除非患者正接受抗凝血劑療法，只要PT或aPTT在抗凝血劑預期使用之治療範圍內

主要排除準則

1. 年齡大於75歲。

2. 接受三種以上用於轉移性疾病之先前療法。

3. 具有活動性或自體免疫疾病史(已知或懷疑)。允許以下例外：白斑病、I型糖尿病、僅需激素代替之由自體免疫病狀所致之殘餘甲狀腺功能減退、無需全身性治療之牛皮癬或預計不會在不存在外部觸發下復發之病狀。

4. 患有已知活動性中樞神經系統(CNS)轉移及/或癌性腦膜炎。先前

治療腦轉移之患者可參與，條件係：其係穩定的，並無新或擴大腦轉移之證據，且在招募之前至少7天並不使用類固醇。此例外不包含不論臨床穩定性如何亦排除之癌性腦膜炎。

5. 需要靜脈內抗微生物療法之活動性全身感染、凝血病症或心血管、呼吸或免疫系統之其他活動性重大醫學病況(如藉由正壓力鉑或可比測試所證實)、心肌梗塞、臨床顯著之心律不整(例如不受控心房顫動、心室心動過速或二級或三級心臟傳導阻滯)及阻塞性或限制性肺疾病。

6. 在NEO-PTC-01輸注之前14天內患有需要使用皮質類固醇(> 10 mg/天普賴松(prednisone)當量)或其他免疫抑制性藥劑進行全身性治療之病狀。在不存在活動性自體免疫疾病下允許經吸入或局部類固醇及腎上腺代替劑量(5 10 mg/天普賴松當量)。

7. 已知人類免疫缺陷病毒(HIV)感染、活動性慢性B或C型肝炎及/或在探究者看來可干擾參與此研究之與癌症相關之危及生命之病況。

8. 患有任一在探究者看來將干擾參與研究之潛在醫學病狀、精神病學病狀或社交病況。

9. 計劃進行大手術，從預計會干擾研究參與或混淆分析研究數據在能力。

10. 在自篩選訪視至試驗(E01")訪視結束後120第天，正懷孕或哺乳或預計在計劃之試驗持續時間內懷孕或生孩子。自此研究排除哺育女性，此乃因在使用擬投與此研究中之治療劑治療母親後在哺育嬰兒中存在未知之潛在繼發性AE風險。

11. 具有除黑色素瘤外之另一侵襲性惡性腫瘤之歷史，下列情況除外：a.患者已無疾病至少2年且由探究者視為處於復發該惡性腫瘤之低風

險下。b.並未使用全身性化學療法原位治療患者之乳癌、口腔癌或子宮頸癌、皮膚基底細胞或鱗狀細胞癌

用於劑量遞增部分1之患者在標準方案後具有疾病進展，並未延遲或偏離標準治療。對於部分2患者而言，給予NEO-PTC-01且繼續CPI療法。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體之用途，其係用於製備治療人類個體之卵巢癌之藥物，其中該包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體係由包含以下之步驟之方法所產生：

(a) 自包括抗原呈現細胞(APC)及T細胞之免疫細胞群體耗竭CD14+細胞及/或CD25+細胞，由此形成包括APC及T細胞之第一群體之CD14及/或CD25耗竭之免疫細胞群體，其中該免疫細胞群體係來自人類個體之生物試樣；

(b) 將來自步驟(a)之APC及T細胞之該第一群體在以下各項存在下培育第一時間段：

(i) FMS樣酪胺酸激酶3受體配體(FLT3L)，及

(ii) (A)包括至少一個由患有癌症之人類個體之癌細胞表現之腫瘤抗原表位序列的多肽，或(B)編碼該多肽之多核苷酸；

由此形成包括經刺激T細胞之細胞群體；及

(c) 擴增來自步驟(b)之該等經刺激T細胞，由此形成包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體，其中該等腫瘤抗原特異性T細胞包括對包括(i)來自步驟(b)(ii)之該至少一個腫瘤抗原表位序列，及(ii)由(b)(ii)中該人類個體之該等癌細胞或APC表現之MHC蛋白之複合物具有特異性的T細胞。

【請求項2】

一種包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體之用途，其係用於製備治療人類個體中之卵巢癌之藥物，其中該包括腫瘤抗原特異性T細胞

之經擴增細胞群體係由包含以下之步驟之方法所產生：

(a) 自包括抗原呈現細胞(APC)及T細胞之免疫細胞群體耗竭CD14+細胞及/或CD25+細胞，由此形成包括APC及T細胞之第一群體之CD14及/或CD25耗竭之免疫細胞群體，其中該免疫細胞群體係來自人類個體之生物試樣；及

(b) 將包括APC及T細胞之第一群體之CD14及/或CD25耗竭之免疫細胞群體在以下各項存在下培育第一時間段：

(i) FMS樣酪胺酸激酶3受體配體(FLT3L)，及

(ii)編碼多肽之mRNA，該多肽包括至少兩個由患有癌症之人類個體之癌細胞表現之不同腫瘤抗原表位序列；由此形成包括經刺激T細胞之細胞群體；及

(c) 擴增來自步驟(b)之該等經刺激T細胞，由此形成包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體，其中該等腫瘤抗原特異性T細胞包括對包括(i)來自步驟(b)(ii)之該至少二個不同的腫瘤抗原表位序列中之一，及(ii)由(b)(ii)中該人類個體之該等癌細胞或APC表現之MHC蛋白之複合物具有特異性的T細胞。

【請求項3】

一種包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體之用途，其係用於製備治療人類個體中之卵巢癌之藥物，其中該包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體係由包含以下之步驟之方法所產生：

(a) 自來自人類個體之經洗滌及/或冷凍保存之周邊血單核細胞(PBMC)試樣直接耗竭CD14+細胞及/或CD25+細胞；

由此形成包括APC及T細胞之第一群體之CD14及/或CD25耗竭之

PBMC群體；

(b) 將來自步驟(a)之APC及T細胞之該第一群體在以下各項存在下培育第一時間段：

(i) FMS樣酪胺酸激酶3受體配體(FLT3L)，及

(ii) (A)包括至少兩個由患有癌症之人類個體之癌細胞表現之不同腫瘤抗原表位序列的多肽，或(B)編碼該多肽之多核苷酸；

由此形成包括經刺激T細胞之細胞群體；及

(c) 擴增來自步驟(b)之該等經刺激T細胞，由此形成包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體，其中該等腫瘤抗原特異性T細胞包括對包括(i)來自步驟(b)(ii)之該至少一個腫瘤抗原表位序列，及(ii)由(b)(ii)中該人類個體之該等癌細胞或APC表現之MHC蛋白之複合物具有特異性的T細胞。

【請求項4】

如請求項1至3中任一項之用途，其中(b)包括將該編碼該多肽之多核苷酸或該mRNA引入來自步驟(a)之APC及T細胞之該第一群體的該等APC中。

【請求項5】

如請求項4之用途，其中引入包括電穿孔或核轉染。

【請求項6】

如請求項5之用途，其中在不分離來自步驟(a)之APC及T細胞之該第一群體之該等T細胞與該等APC的情形下實施該電穿孔或核轉染。

【請求項7】

如請求項1之用途，其中該包括該至少一個腫瘤抗原表位序列的多肽

包括至少兩個由該人類個體之癌細胞表現之不同腫瘤抗原表位序列。

【請求項8】

如請求項2之用途，其中該mRNA包括5’帽(5’ CAP)。

【請求項9】

如請求項8之用途，其中該5’帽係帽-1(CAP-1)。

【請求項10】

如請求項2之用途，其中該mRNA包括3’聚A尾部(3’ polyA tail)。

【請求項11】

如請求項10之用途，其中該聚A尾部之長度為120至135個核苷酸。

【請求項12】

如請求項7之用途，其中該至少兩個不同腫瘤抗原表位序列之第一腫瘤抗原表位序列經由連接體序列連結至該至少兩個不同腫瘤抗原表位序列之第二腫瘤抗原表位序列。

【請求項13】

如請求項9之用途，其中該5’帽經由連接體序列可操作地連接至該至少兩個不同腫瘤抗原表位序列中之腫瘤抗原表位序列。

【請求項14】

如請求項2或3之用途，其中該至少兩個不同腫瘤抗原表位序列表現為單一多肽鏈。

【請求項15】

如請求項1至3中任一項之用途，其中培育包括進一步在LPS及IFNγ存在下，培育該包括APC及T細胞之第一群體之CD14及/或CD25耗竭之免疫細胞群體。

【請求項16】

如請求項7之用途，其中該至少兩個不同腫瘤抗原表位序列各自之長度為8至12個胺基酸。

【請求項17】

如請求項7之用途，其中該至少兩個不同腫瘤抗原表位序列各自之長度為15至25個胺基酸。

【請求項18】

如請求項7之用途，其中該多肽包括至少3、4、5、6、7、8、9、10個或更多個由患有癌症之人類個體之癌細胞表現之不同腫瘤抗原表位序列。

【請求項19】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該卵巢癌為轉移性卵巢癌。

【請求項20】

如請求項19之用途，其中該人類個體先前已接受含有PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑及CTLA-4抑制劑之方案，且具有疾病進展。

【請求項21】

如請求項19之用途，其中該人類個體已接受或目前正接受PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑至少3個月，且患有穩定疾病或無症狀進展性疾病。

【請求項22】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體包括CD3+細胞，其中該包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中之CD3+細胞之百分比為總細胞群體的至少40%、至少50%或至少60%。

【請求項23】

如請求項22之用途，其中該包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中之CD107a+細胞之百分比為該腫瘤抗原特異性T細胞群體的至少10%。

【請求項24】

如請求項22之用途，其中該包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中之TNFα+細胞之百分比為該腫瘤抗原特異性T細胞群體的至少5%。

【請求項25】

如請求項22之用途，其中該包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中之IFNγ+細胞之百分比為該腫瘤抗原特異性T細胞群體的至少15%。

【請求項26】

如請求項22之用途，其中該包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中之TNFα+及IFNγ+細胞之百分比為該腫瘤抗原特異性T細胞群體的至少2%。

【請求項27】

如請求項22之用途，其中該包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中之TNFα+及CD107a+細胞之百分比為該腫瘤抗原特異性T細胞群體的至少0.5%。

【請求項28】

如請求項22之用途，其中該包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中之IFNγ+及CD107a+細胞之百分比為該腫瘤抗原特異性T細胞群體的至少5%。

【請求項29】

如請求項22之用途，其中該包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中之TNFα+及IFNγ+及CD107a+細胞之百分比為該腫瘤抗原特異性T細胞群體的至少0.1%。

【請求項30】

如請求項22之用途，其中該包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體包括CD4+細胞，其中該包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中係幼稚T細胞(CD62L+及CD45RA+)之CD4+ T細胞之百分比為至多15%。

【請求項31】

如請求項30之用途，其中該包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中係效應記憶性T細胞(CD62L-及CD45RA-)之CD4+ T細胞之百分比為至少60%。

【請求項32】

如請求項30之用途，其中該包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中係效應T細胞(CD62L-及CD45RA+)之CD4+ T細胞之百分比為至多5%。

【請求項33】

如請求項30之用途，其中該包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中係中央記憶性T細胞(CD62L+及CD45RA-)之CD4+ T細胞之百分比為至少10%。

【請求項34】

如請求項22之用途，其中該包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞

群體包括CD8+細胞，其中該包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中係幼稚T細胞(CD62L+及CD45RA+)之CD8+ T細胞之百分比為至多25%。

【請求項35】

如請求項34之用途，其中該包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中係效應記憶性T細胞(CD62L-及CD45RA-)之CD8+ T細胞之百分比為至少60%。

【請求項36】

如請求項34之用途，其中該包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中係效應T細胞(CD62L-及CD45RA+)之CD8+ T細胞之百分比為至多10%。

【請求項37】

如請求項34之用途，其中該包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中係中央記憶性T細胞(CD62L+及CD45RA-)之CD8+ T細胞之百分比為至少15%。

【請求項38】

如請求項34之用途，其中該包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體在識別靶細胞時會產生細胞介素且引起去顆粒。

【請求項39】

如請求項2之用途，其中該人類個體係抗檢查點抑制劑療法難治性的。

【請求項40】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該人類個體在BRAF基因中具有

突變，且先前已接受B-raf抑制劑或B-raf/MEK組合療法。

【請求項41】

如請求項1至3中任一項之用途，其中耗竭包括來自人類個體之周邊血單核細胞(PBMC)試樣耗竭CD14+細胞及CD25+細胞，其中該PBMC尚未經受單核球成熟至成熟樹突狀細胞(DC)之步驟。

【請求項42】

如請求項1至3中任一項之用途，其中耗竭進一步包括自來自人類個體之尚未經受單核球成熟至成熟樹突狀細胞(DC)之步驟之PBMC試樣耗竭CD11b+細胞。

【請求項43】

如請求項1至3中任一項之用途，其中步驟(b)及(c)係在小於28天內實施。

【請求項44】

如請求項1至3中任一項之用途，其中包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中CD8+腫瘤抗原特異性T細胞佔CD8+ T細胞總數之分數為生物試樣中CD8+腫瘤抗原特異性T細胞佔CD8+ T細胞總數之分數的至少兩倍。

【請求項45】

如請求項1至3中任一項之用途，其中包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中CD4+腫瘤抗原特異性T細胞佔CD4+ T細胞總數之分數為生物試樣中CD4+腫瘤抗原特異性T細胞佔CD4+ T細胞總數之分數的至少兩倍。

【請求項46】

如請求項1至3中任一項之用途，其中包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中至少0.1%之該等CD8+ T細胞係衍生自幼稚CD8+ T細胞之CD8+腫瘤抗原特異性T細胞。

【請求項47】

如請求項1至3中任一項之用途，其中包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體中至少0.1%之該等CD4+ T細胞係衍生自幼稚CD4+ T細胞之CD4+腫瘤抗原特異性T細胞。

【請求項48】

如請求項1至3中任一項之用途，其中擴增包括(A)使該包括經刺激T細胞之細胞群體與成熟APC之第二群體接觸，其中該成熟APC之第二群體(i)已與FLT3L一起培育且(ii)呈現至少一個腫瘤抗原表位序列；及(B)將該包括經刺激來自(A)之T細胞之細胞群體擴增第二時間段，由此形成經擴增T細胞群體。

【請求項49】

如請求項48之用途，其中在使該包括經刺激T細胞之細胞群體與該成熟APC之第二群體接觸之前，該成熟APC之第二群體已與FLT3L一起培育至少1天。

【請求項50】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該生物試樣係周邊血試樣、白血球分離試樣或血球分離試樣。

【請求項51】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該方法進一步包括收穫該包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體，冷凍保存該包括腫瘤抗原特異

性T細胞之經擴增細胞群體，或製備含有該包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體之醫藥組合物。

【請求項52】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該多肽之長度為8至50個胺基酸。

【請求項53】

如請求項1至3中任一項之用途，其中自該包括APC及T細胞之第一群體之免疫細胞群體耗竭CD14+細胞及/或CD25+細胞包括，使該包括APC及T細胞之第一群體之免疫細胞群體與CD14結合劑及/或CD25結合劑接觸。

【請求項54】

如請求項1至3中任一項之用途，其中耗竭進一步包括自該包括APC及T細胞之第一群體之免疫細胞群體耗竭CD19+細胞。

【請求項55】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該包括腫瘤抗原特異性T細胞之經擴增細胞群體包括1×10^{8}至1×10^{11}個總細胞(total cells)。

【請求項56】

如請求項55之用途，其中該個體已接受至少一種基於鉑之先前療法治療。

【請求項57】

如請求項56之用途，其中該個體已接受不超過一種基於鉑之先前療法治療。

【請求項58】

如請求項56之用途，其中該個體已經歷無症狀復發。

【請求項59】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該卵巢癌為鉑敏感性的。

【請求項60】

如請求項59之用途，其中該卵巢癌為漿液性卵巢癌(serous ovarian carcinoma)。

【請求項61】

如請求項60之用途，其中該卵巢癌為高級漿液性卵巢癌(high grade serous ovarian carcinoma)。

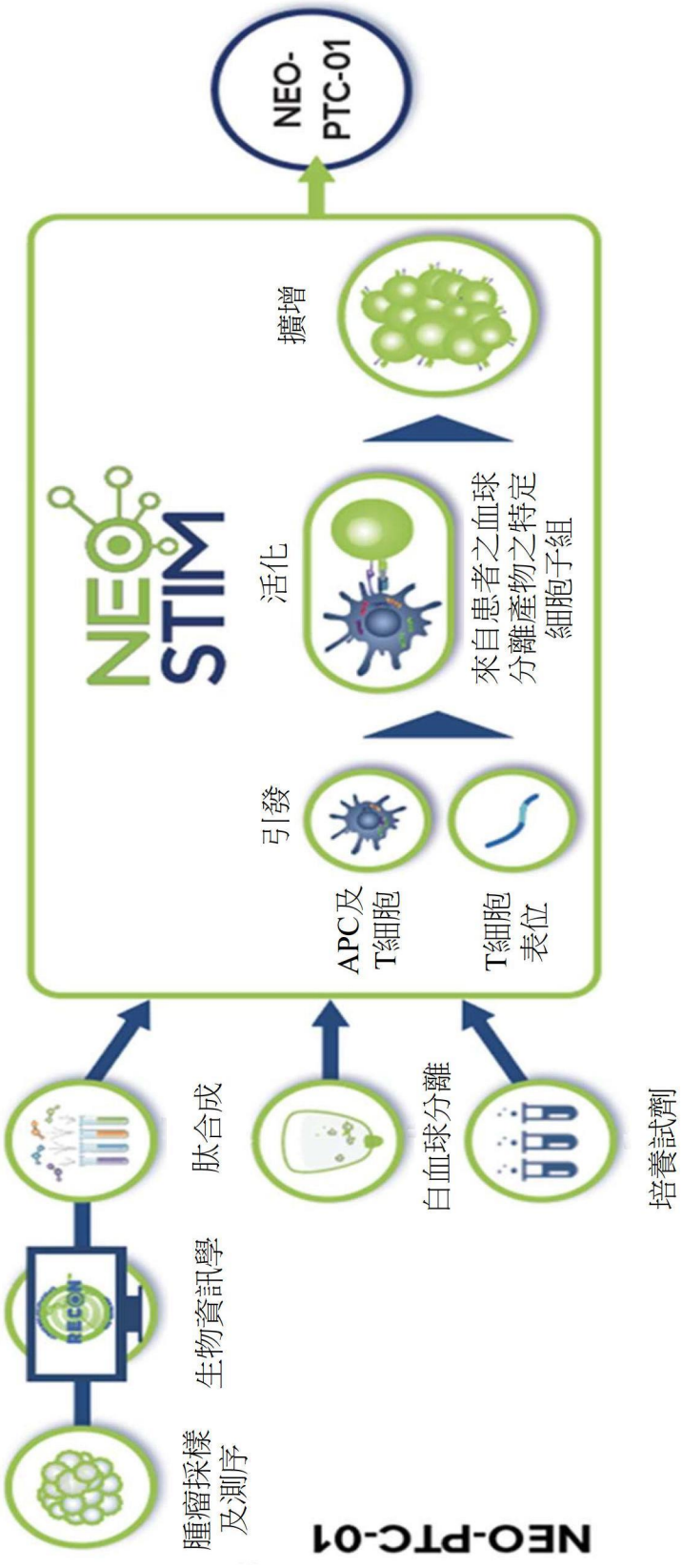
【請求項62】

如請求項60之用途，其中該個體已接受不超過一種基於鉑之先前療法治療且正經歷無症狀復發，且其中該卵巢癌為高級漿液性卵巢癌。

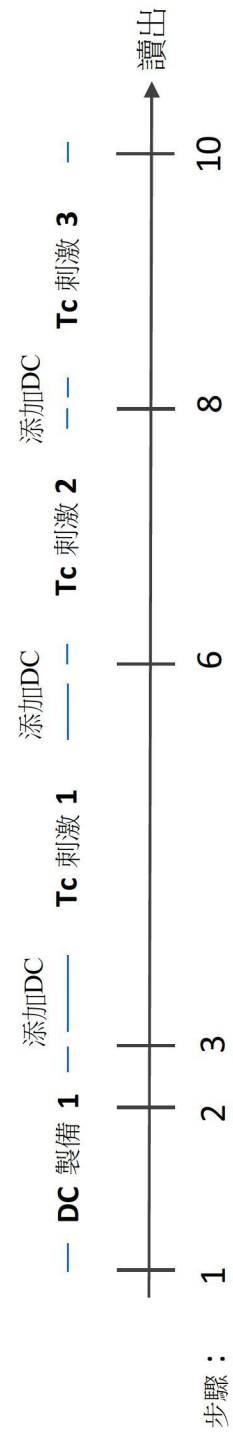
【請求項63】

如請求項61之用途，其中該個體已接受不超過一種基於鉑之先前療法治療且正經歷無症狀復發，且其中該卵巢癌為高級漿液性卵巢癌。

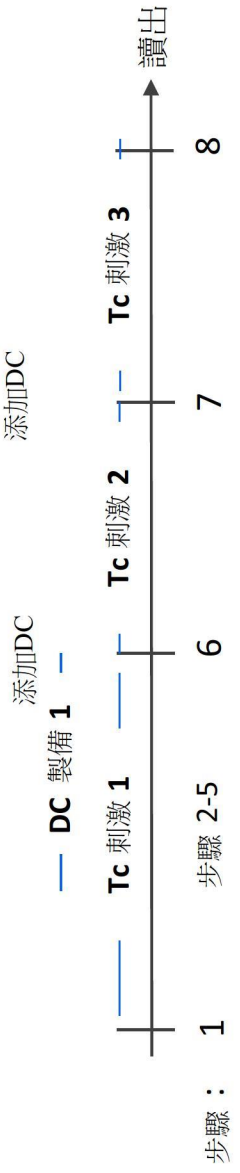
【發明圖式】


NEO-PTC-01
NEO STIM
擴增
活化
來自患者之血球分離產物之特定細胞子組
引發
APC及T細胞
T細胞表位
腫瘤採樣及測序
生物資訊學
肽合成
白血球分離
培養試劑
NEO-PTC-01

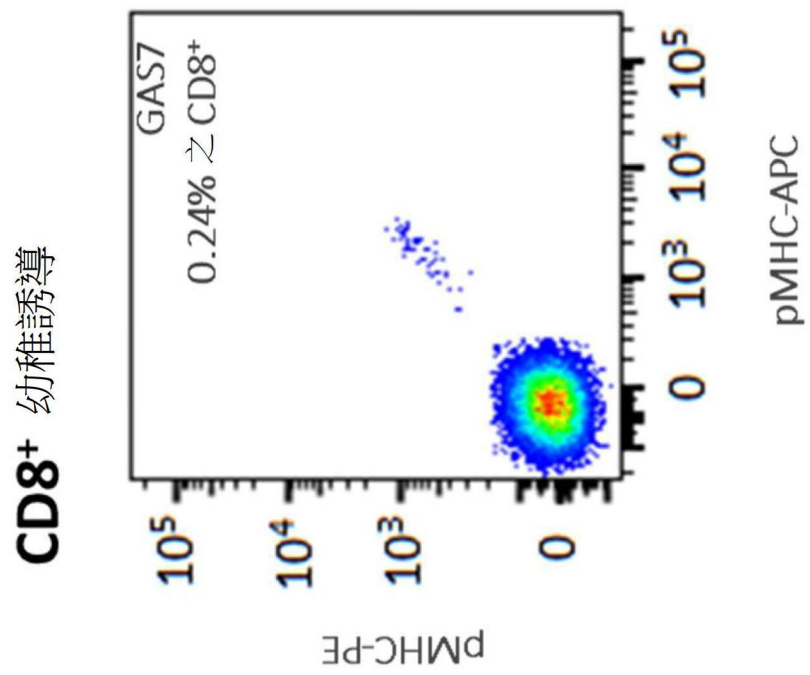
【圖1A】


步驟：
1
2
3
6
8
10
讀出
DC 製備 1
添加DC
Tc 刺激 1
添加DC
Tc 刺激 2
添加DC
Tc 刺激 3

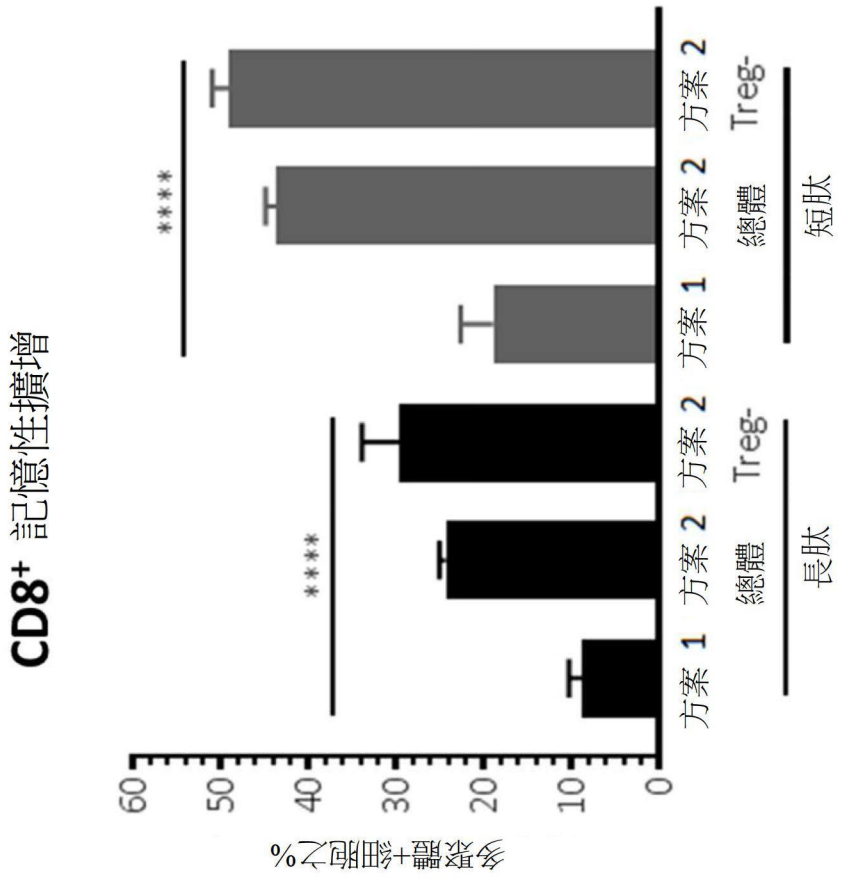
【圖1B】


步驟：
1
步驟 2-5
6
7
8
讀出
DC 製備 1
添加DC
Tc 刺激 1
Tc 刺激 2
Tc 刺激 3
添加DC

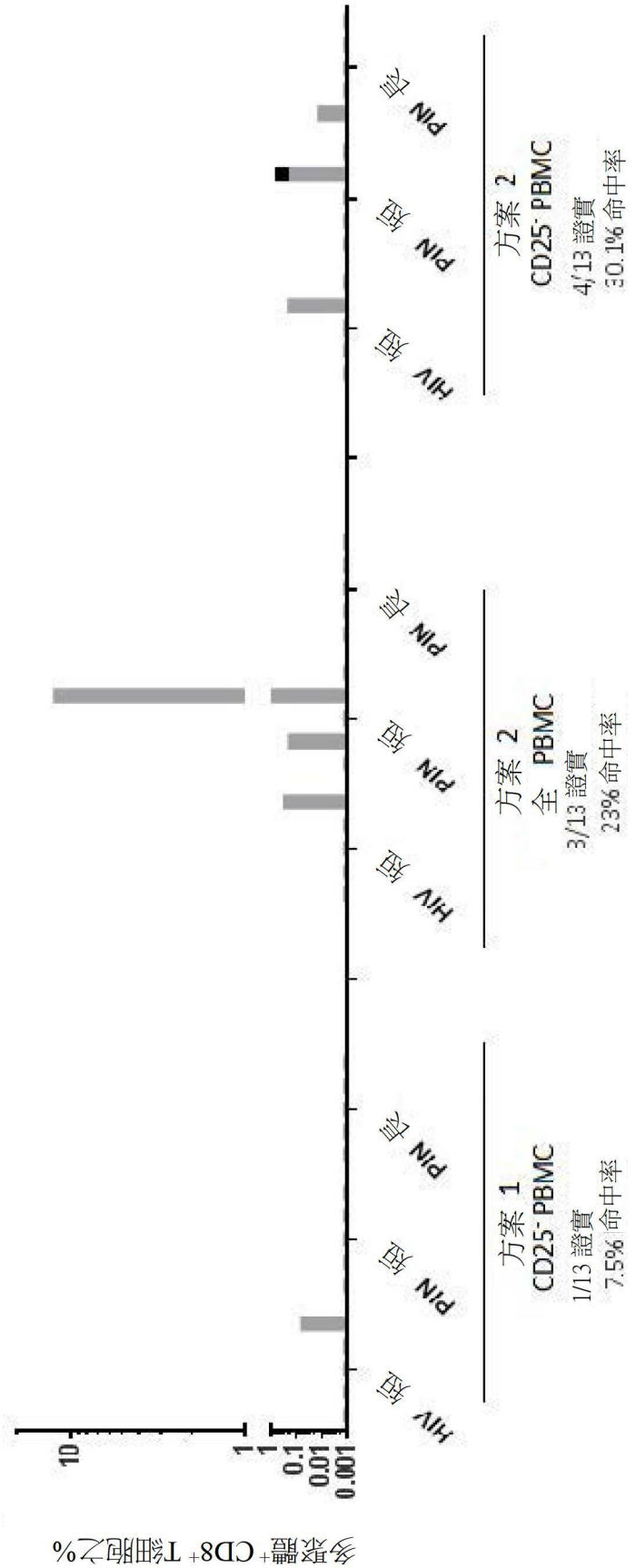
【圖1C】


CD8+ 幼稚誘導
GAS7
0.24% 之 CD8+
pMHC-PE
pMHC-APC
0
10^3
10^4
10^5

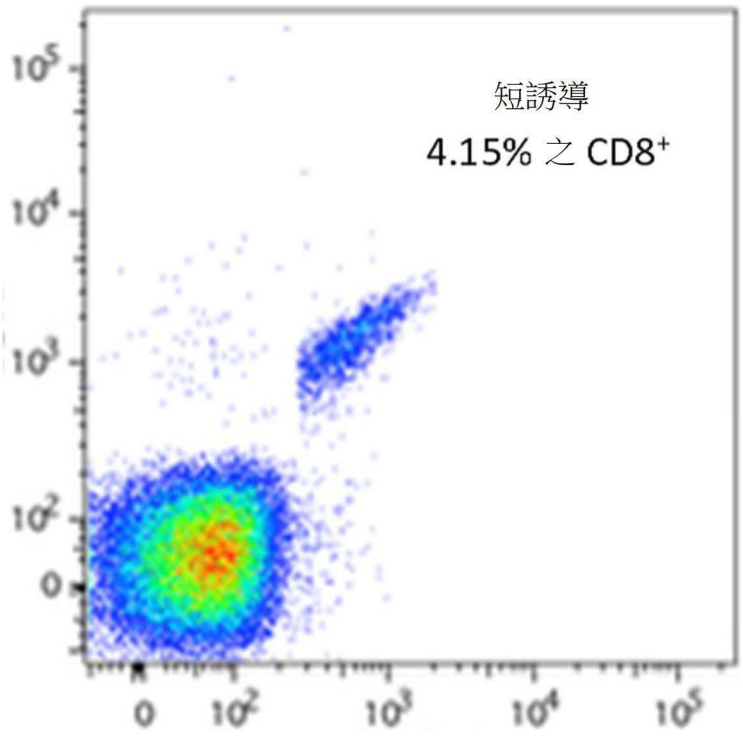
【圖3】


CD8+ 記憶性擴增
多聚體+細胞之%
****
****
方案 1
方案 2
方案 2
方案 1
方案 2
方案 2
Treg-
Treg-
總體
總體
長肽
短肽

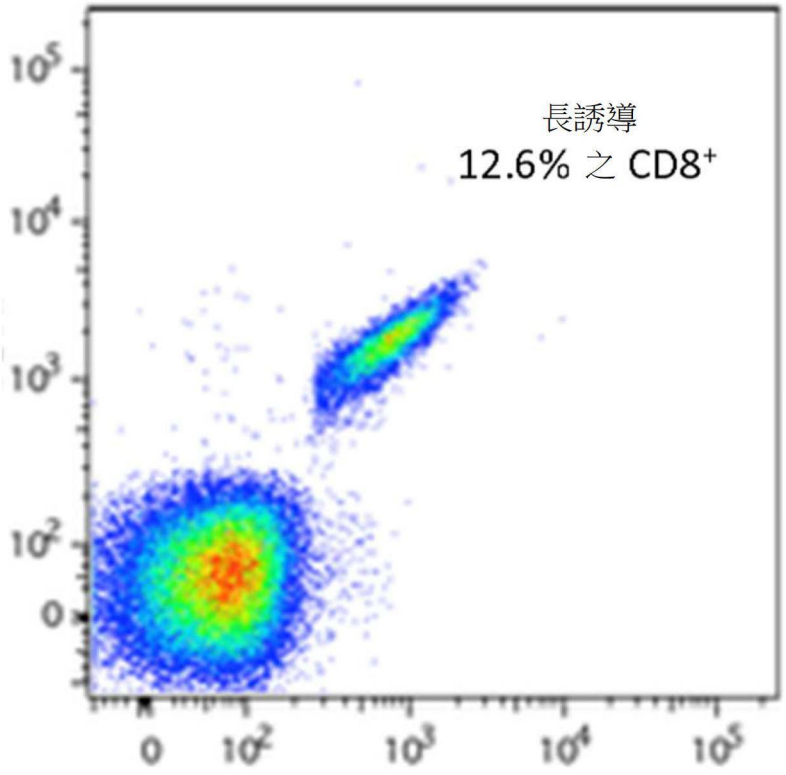
【圖2】


多聚體+ CD8+ T細胞之%
10
1
1
0.1
0.01
0.001
HIV 感
PIN 感
PIN 急
方案 1
CD25- PBMC
1/13 證實
7.5% 命中率
HIV 感
PIN 感
PIN 急
方案 2
全 PBMC
3/13 證實
23% 命中率
HIV 感
PIN 感
PIN 急
方案 2
CD25- PBMC
4/13 證實
30.1% 命中率

【圖4】


短誘導
4.15% 之 CD8+
10^5
10^4
10^3
10^2
0
0
10^2
10^3
10^4
10^5

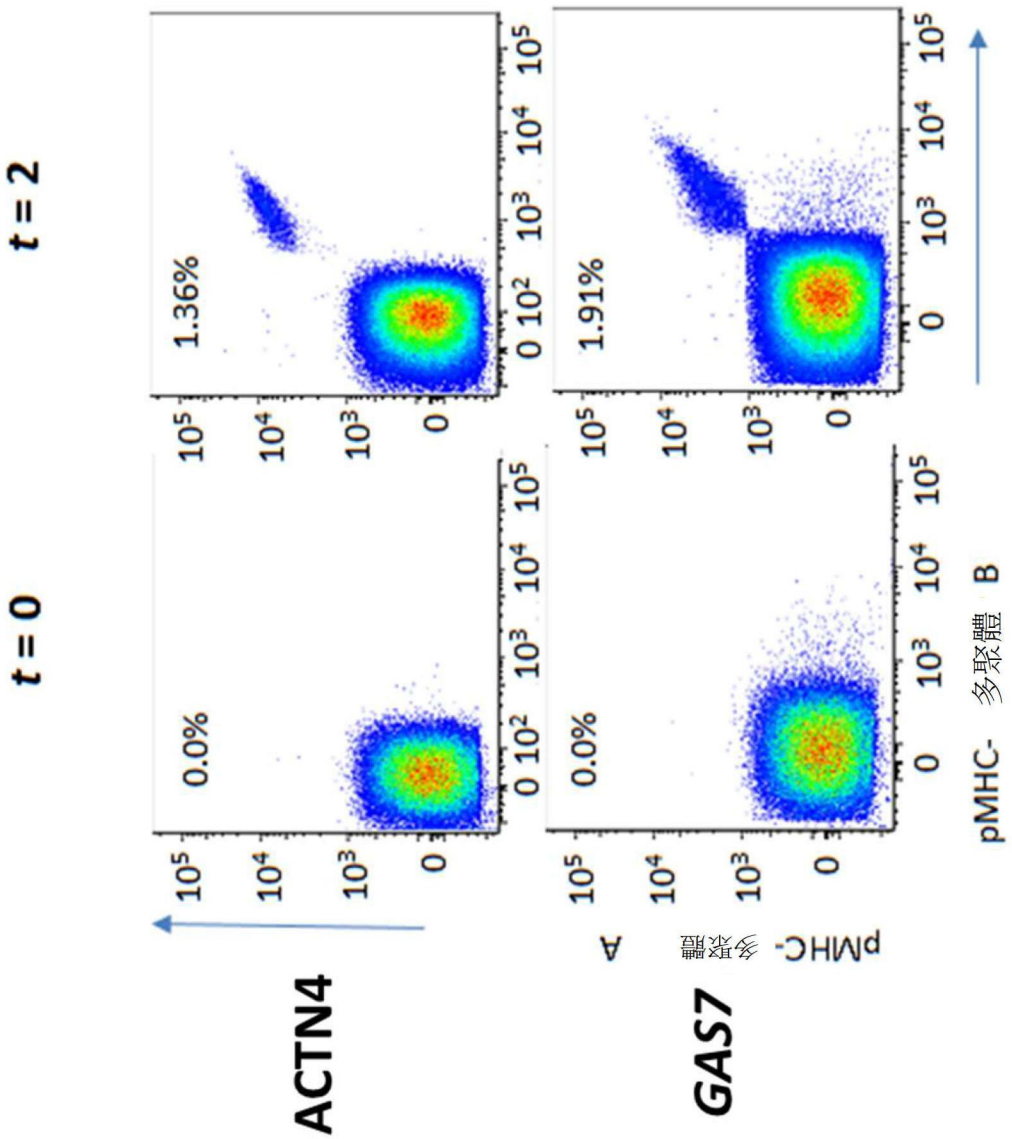
【圖5A】


長誘導
12.6% 之 CD8+
10^5
10^4
10^3
10^2
0
0
10^2
10^3
10^4
10^5

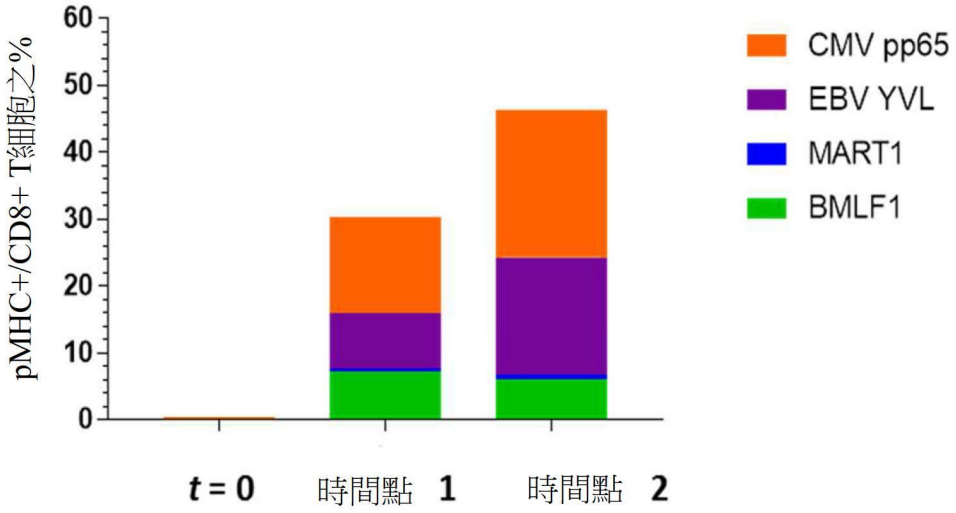
【圖5B】

多聚體+ CD8+ T細胞之%
人類供體 1
人類供體 2
10
1
0.1
0.01
0.001
HIV 前
PIN 前
PIN 後
HIV 後
方案 1
CD25- PBMC
0/13 證實
0% 命中率
方案 2
全 PBMC
1/13 證實
7.5% 命中率
方案 2
CD25- PBMC
2/13 證實
15% 命中率

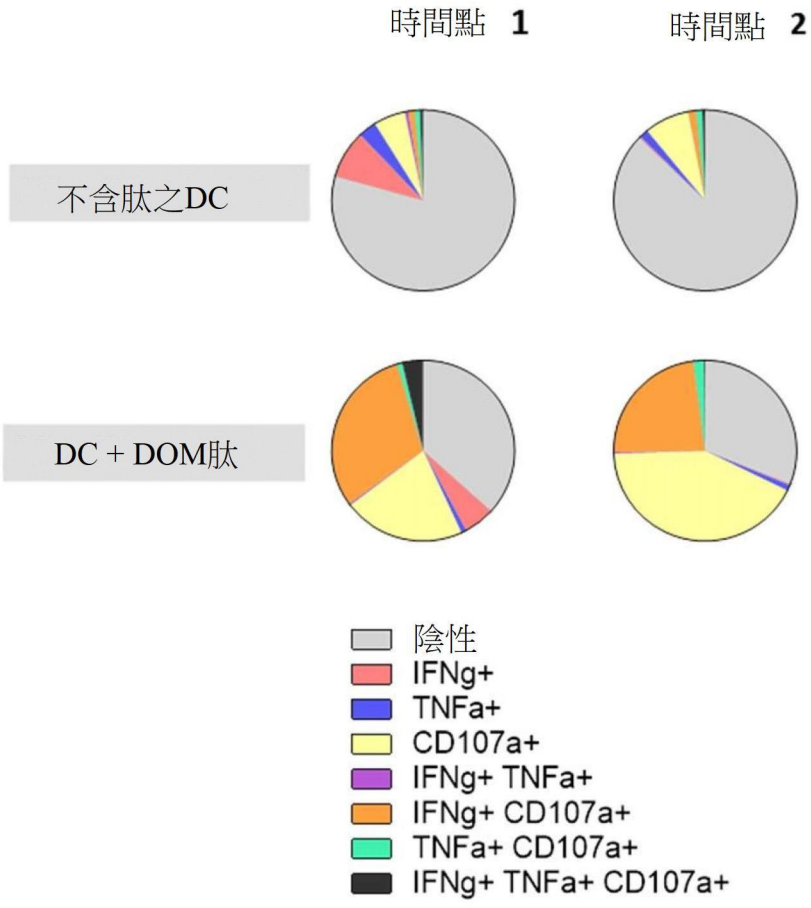
【圖6】



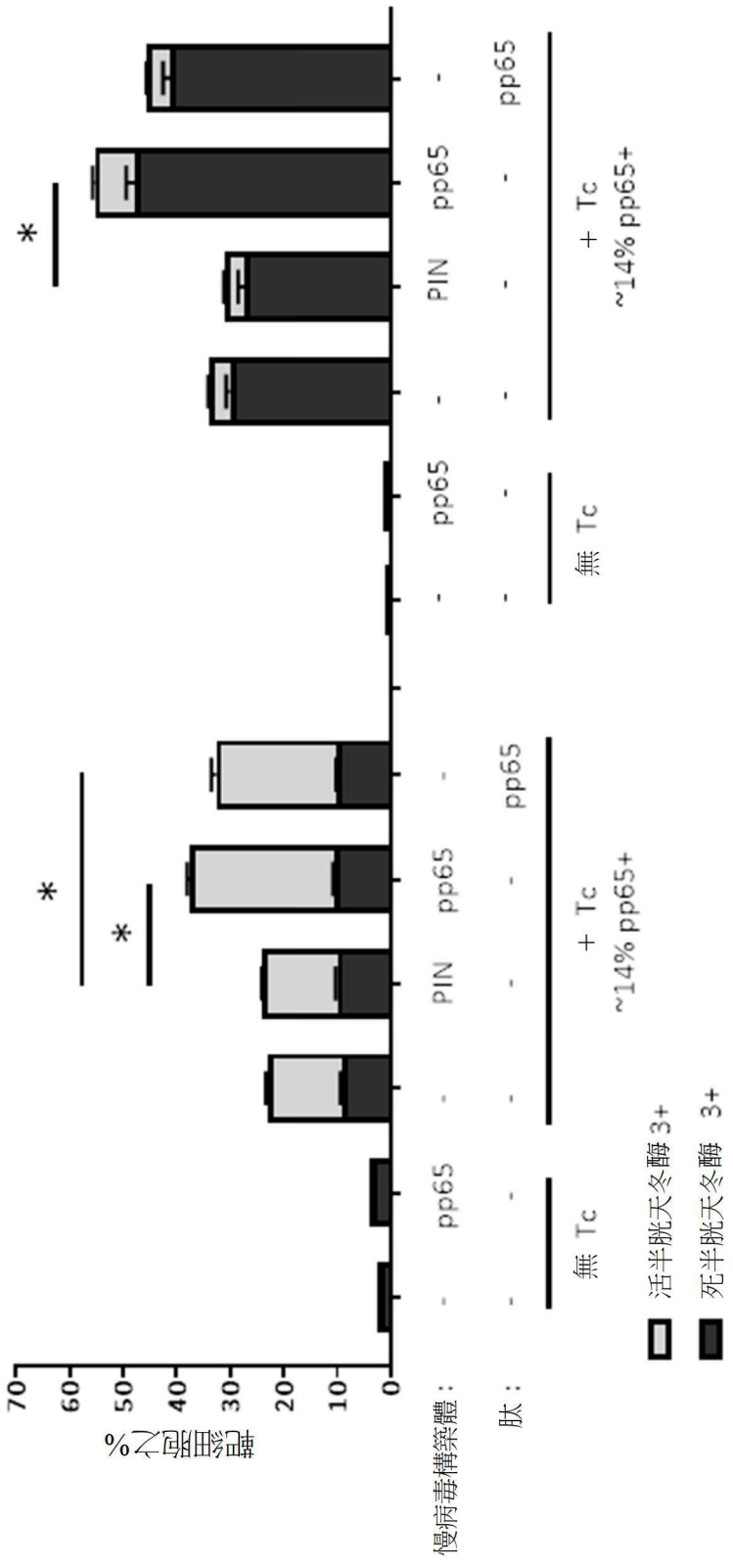
【圖7】


pMHC+/CD8+ T細胞之%
60
50
40
30
20
10
0
CMV pp65
EBV YVL
MART1
BMLF1
t = 0
時間點 1
時間點 2

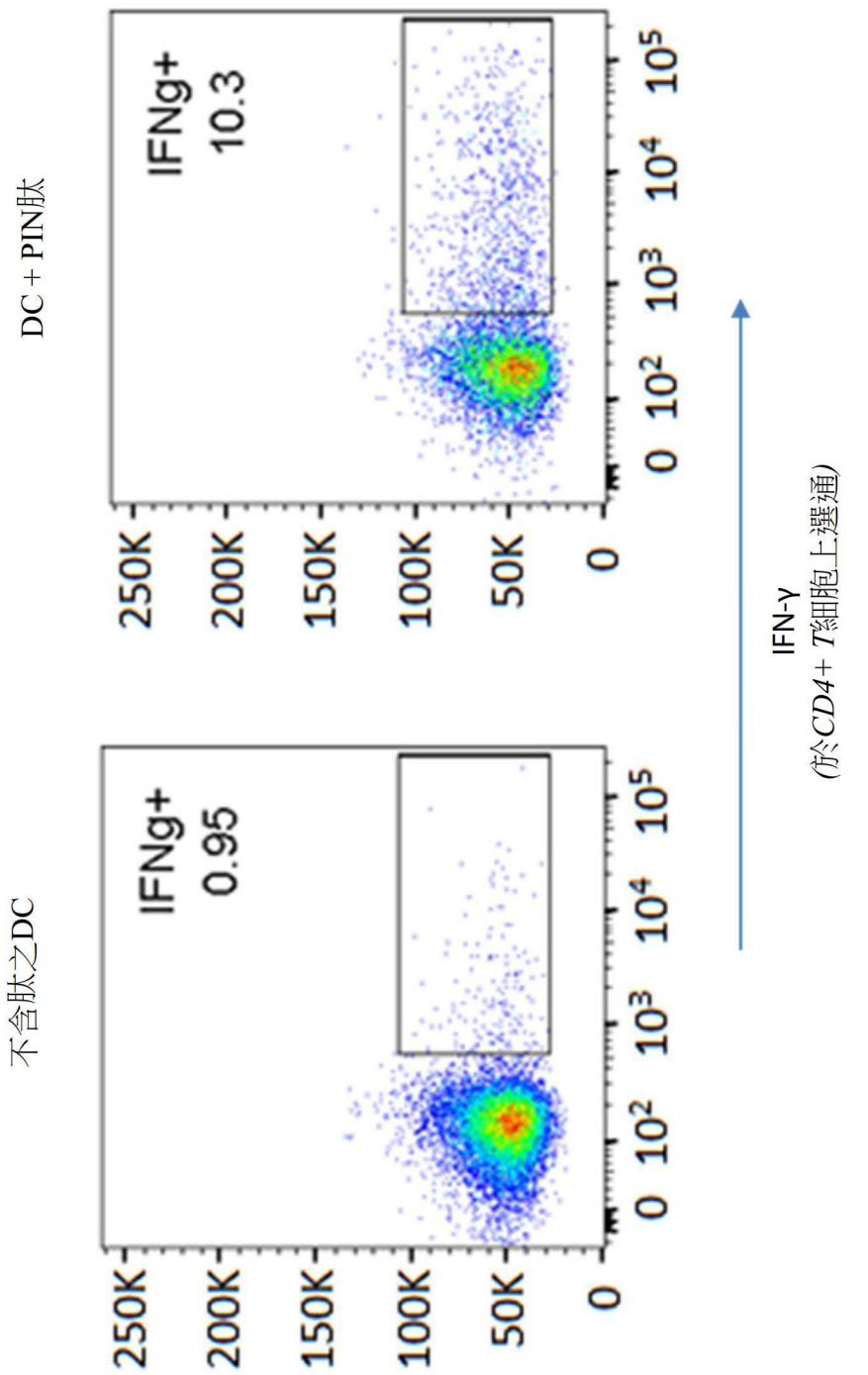
【圖8A】


時間點 1
時間點 2
不含肽之DC
DC + DOM肽
陰性
IFNg+
TNFa+
CD107a+
IFNg+ TNFa+
IFNg+ CD107a+
TNFa+ CD107a+
IFNg+ TNFa+ CD107a+

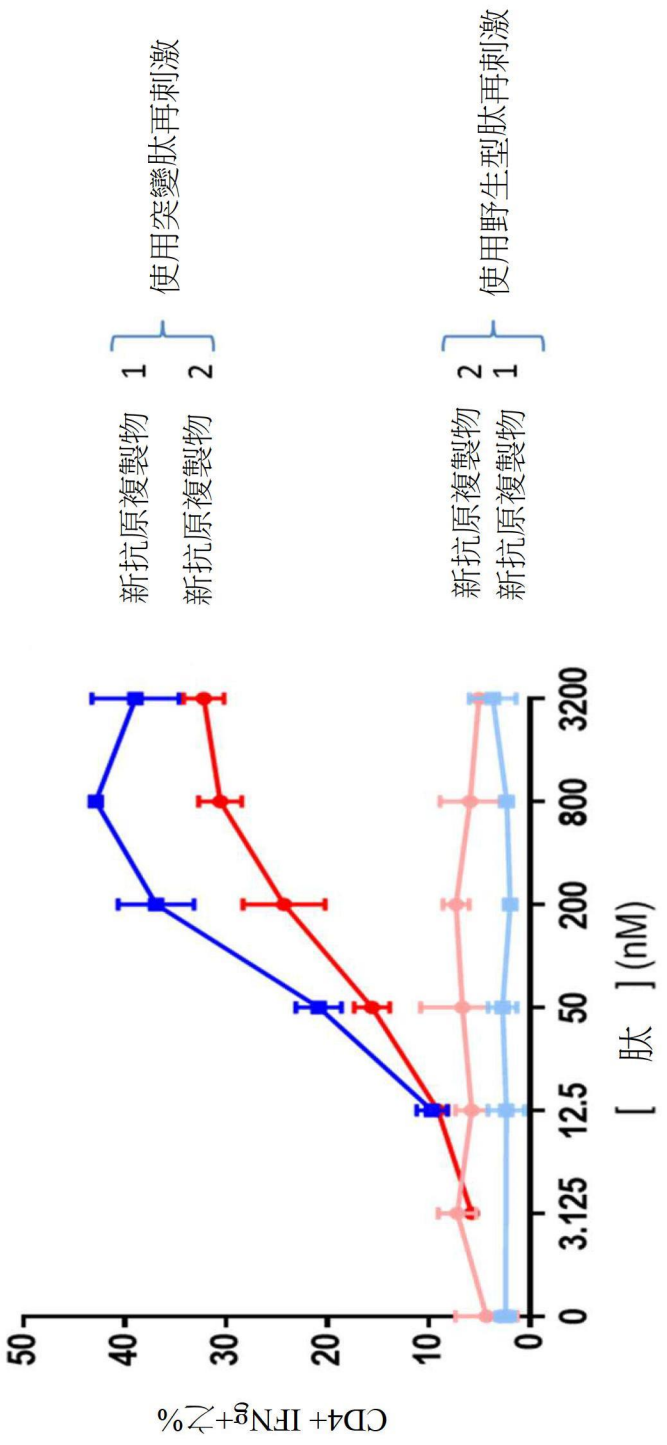
【圖8B】


3hr 共培養
24hr 共培養
*
*
*
*
體細胞之%
0
10
20
30
40
50
60
70
慢病毒構築體：
肽：
-
pp65
PIN
pp65
無 Tc
+ Tc
~14% pp65+
活半胱天冬酶 3+
死半胱天冬酶 3+

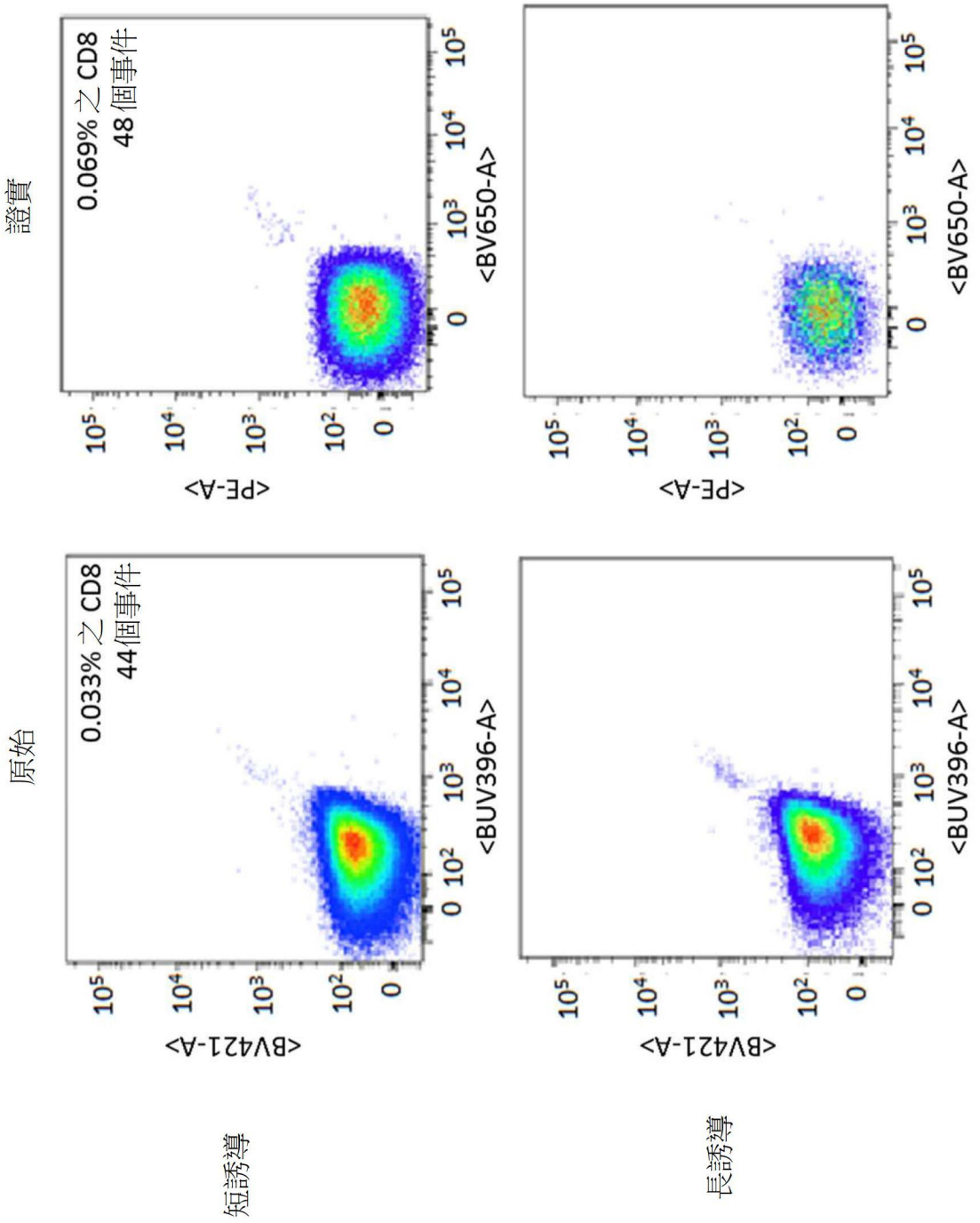
【圖9】


不含肽之DC
DC + PIN肽
IFNg+
0.95
IFNg+
10.3
250K
200K
150K
100K
50K
0
0 10² 10³ 10⁴ 10⁵
IFN-γ
(於CD4+ T細胞上選通)

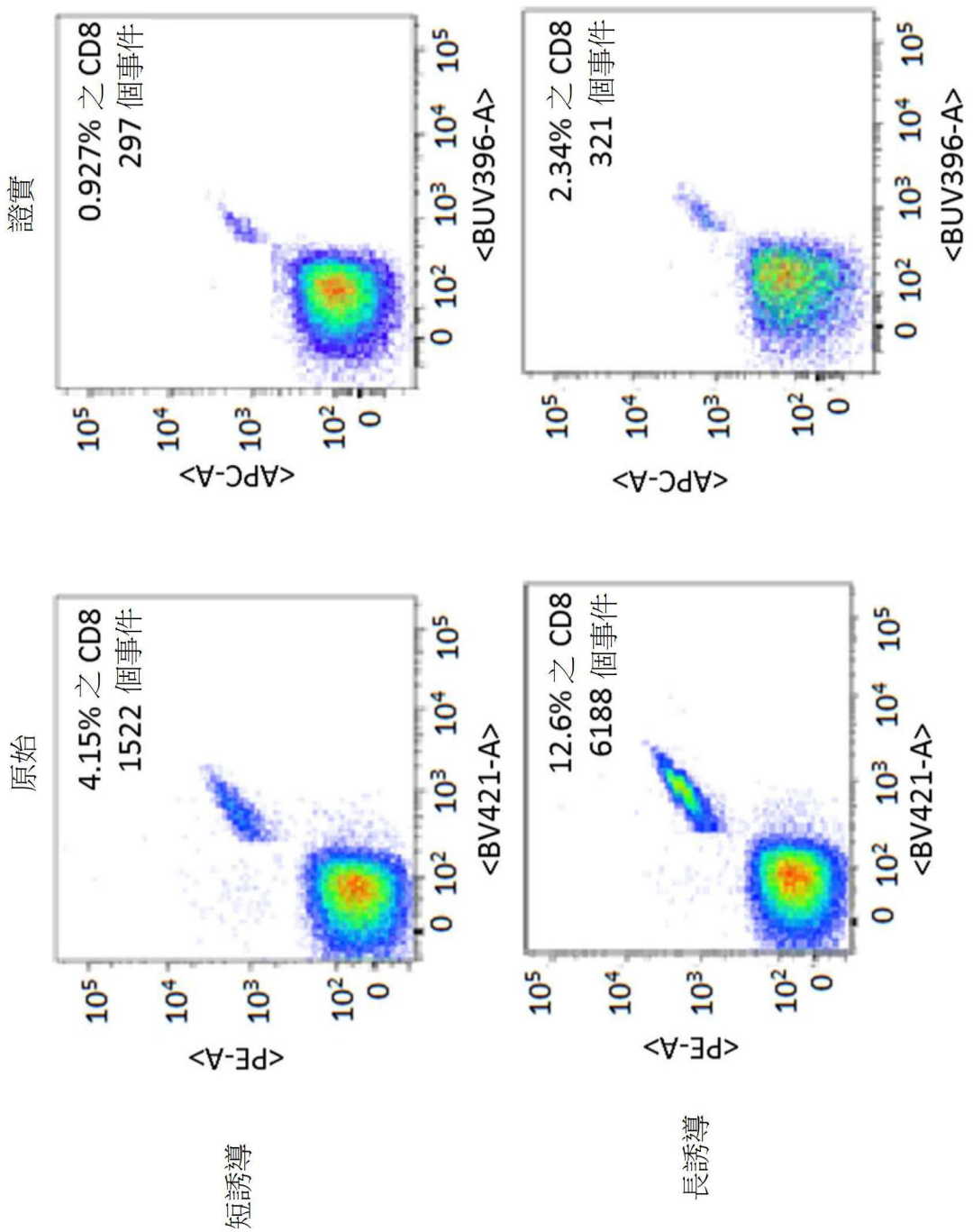
【圖10】


CD4+ IFNg+之%
50
40
30
20
10
0
0
3.125
12.5
50
200
800
3200
[肽] (nM)
新抗原複製物 1
新抗原複製物 2
使用突變肽再刺激
新抗原複製物 2
新抗原複製物 1
使用野生型肽再刺激

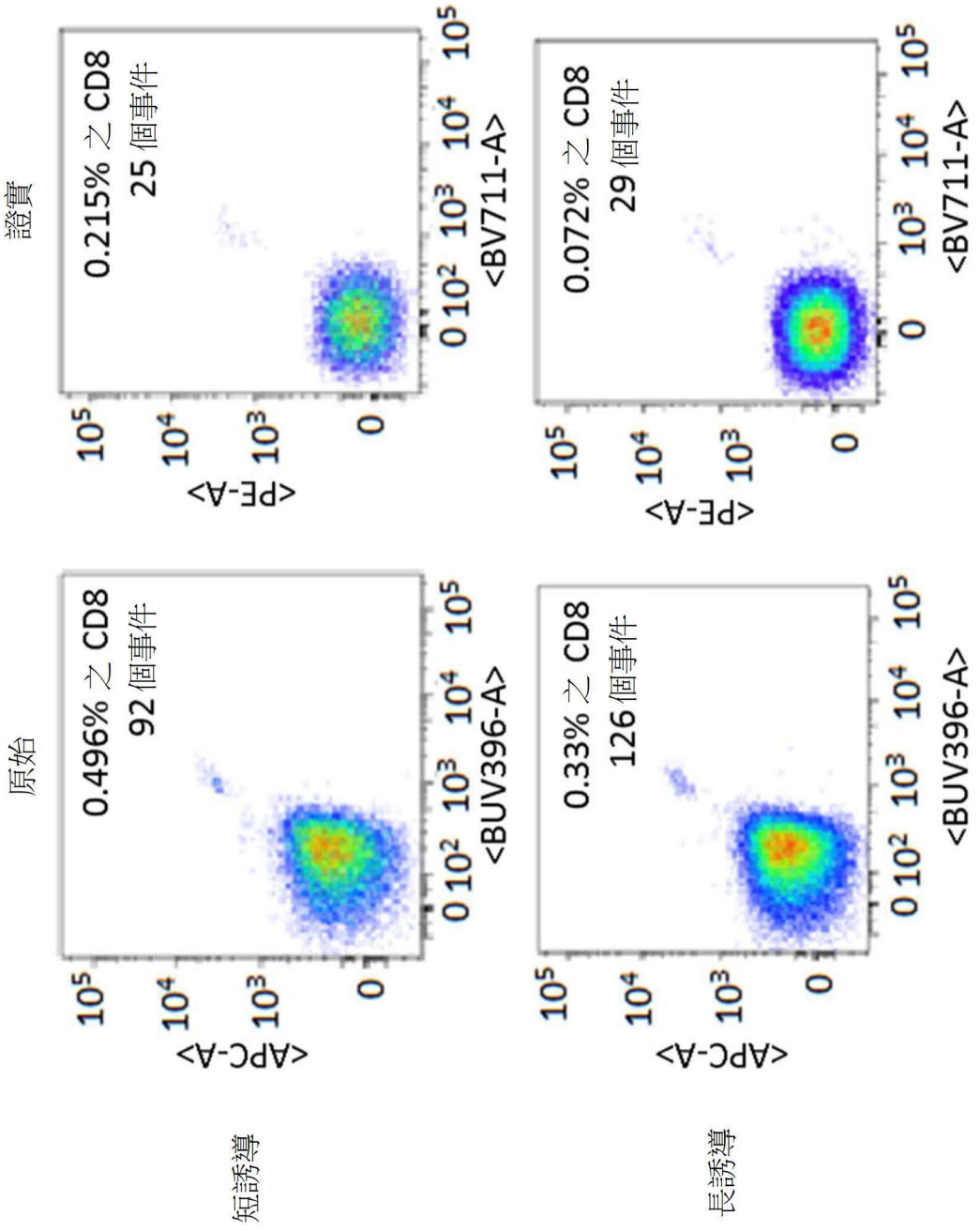
【圖11】


原始
證實
短誘導
長誘導
0.033% 之 CD8
44 個事件
0.069% 之 CD8
48 個事件
<BV421-A>
<BUV396-A>
<PE-A>
<BV650-A>
0
10²
10³
10⁴
10⁵

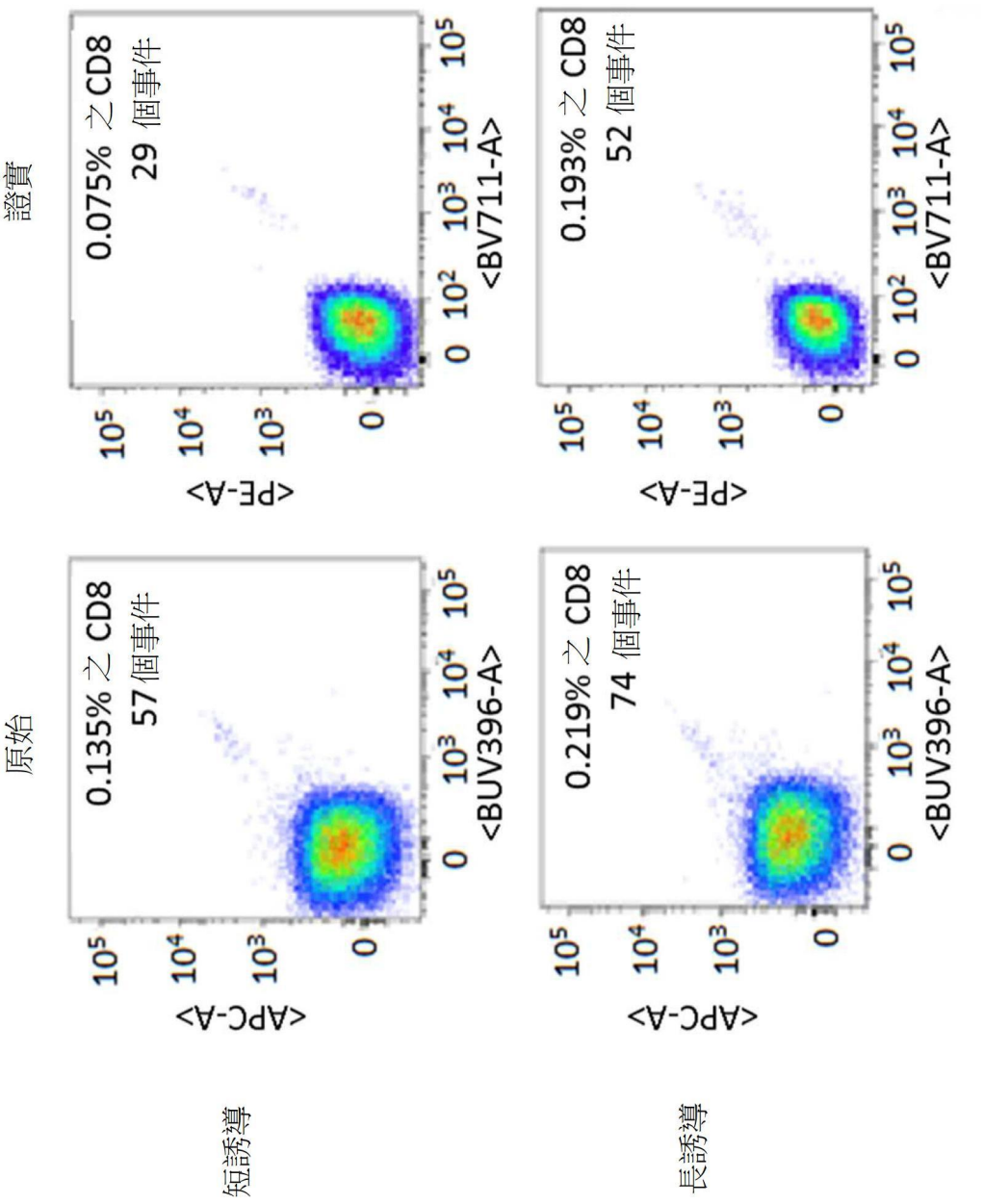
【圖12】


原始
證實
短誘導
長誘導
4.15% 之 CD8
1522 個事件
0.927% 之 CD8
297 個事件
12.6% 之 CD8
6188 個事件
2.34% 之 CD8
321 個事件
<PE-A>
<APC-A>
<BV421-A>
<BUV396-A>
0
10^2
10^3
10^4
10^5

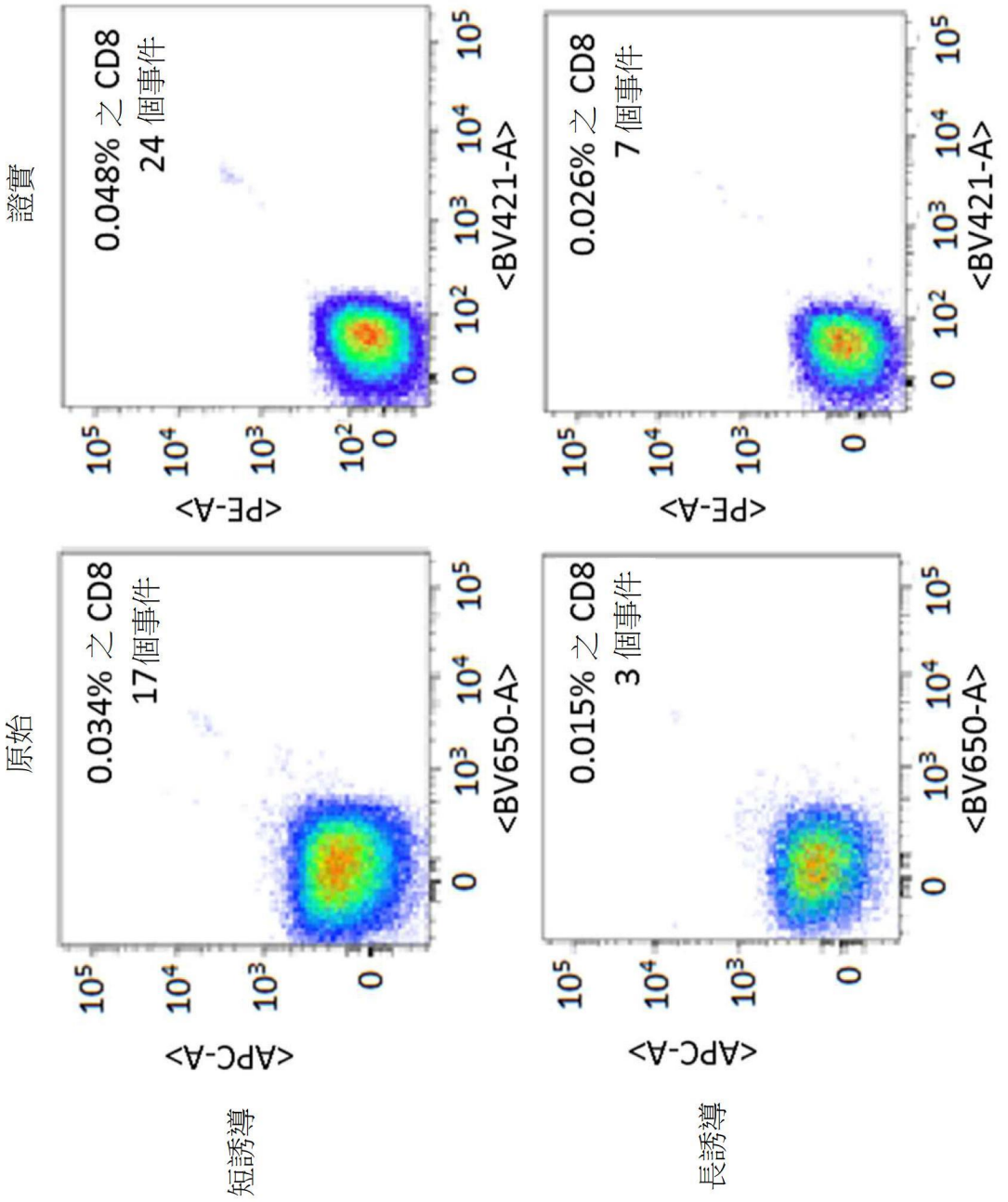
【圖13】


原始
證實
短誘導
長誘導
0.496% 之 CD8
92 個事件
0.215% 之 CD8
25 個事件
0.33% 之 CD8
126 個事件
0.072% 之 CD8
29 個事件
<APC-A>
<PE-A>
<BUV396-A>
<BV711-A>
0
10^2
10^3
10^4
10^5

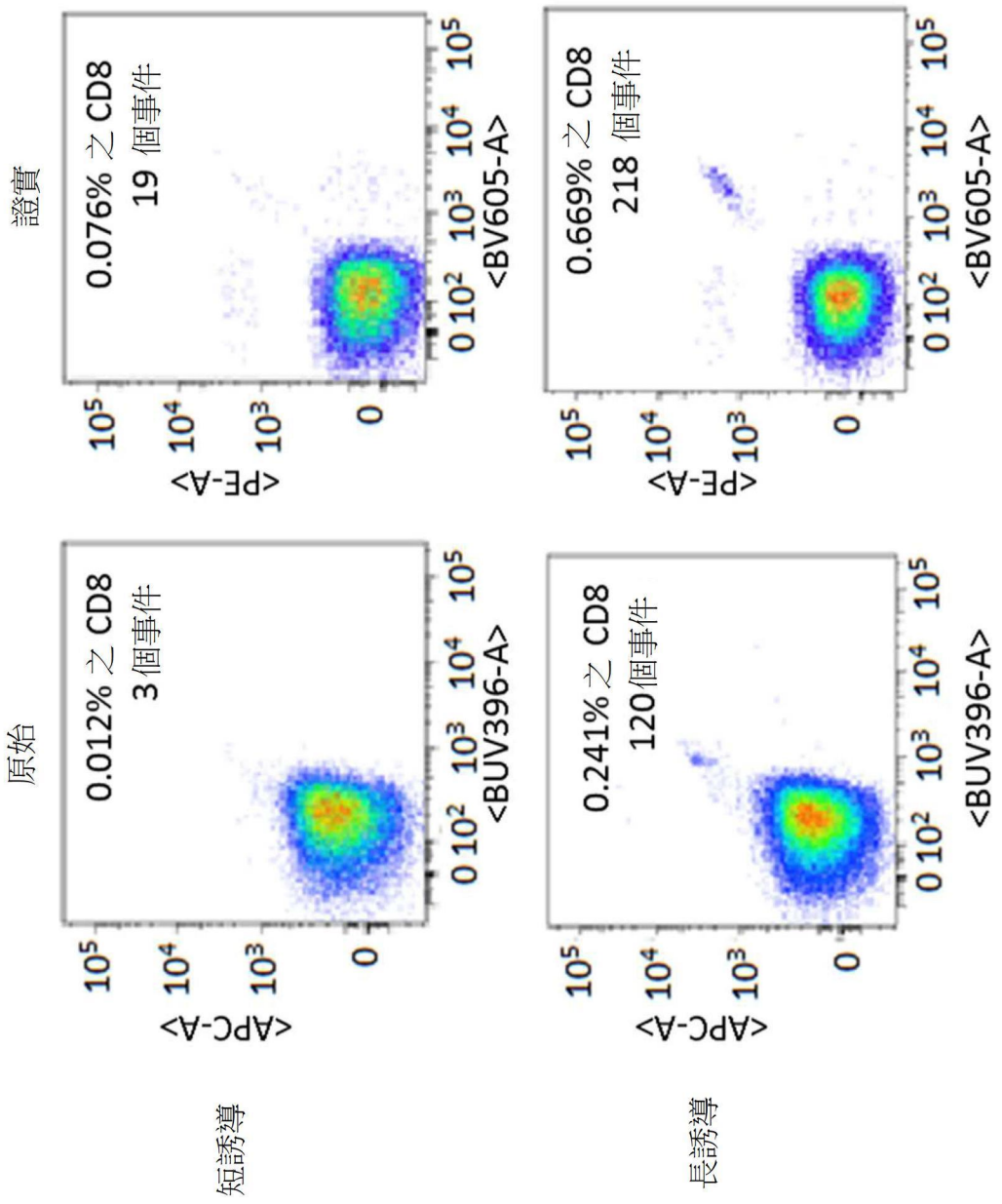
【圖14】


原始
證實
短誘導
長誘導
0.135% 之 CD8
57 個事件
0.075% 之 CD8
29 個事件
0.219% 之 CD8
74 個事件
0.193% 之 CD8
52 個事件
<APC-A>
<PE-A>
<BUV396-A>
<BV711-A>
0
10^3
10^4
10^5
10^2

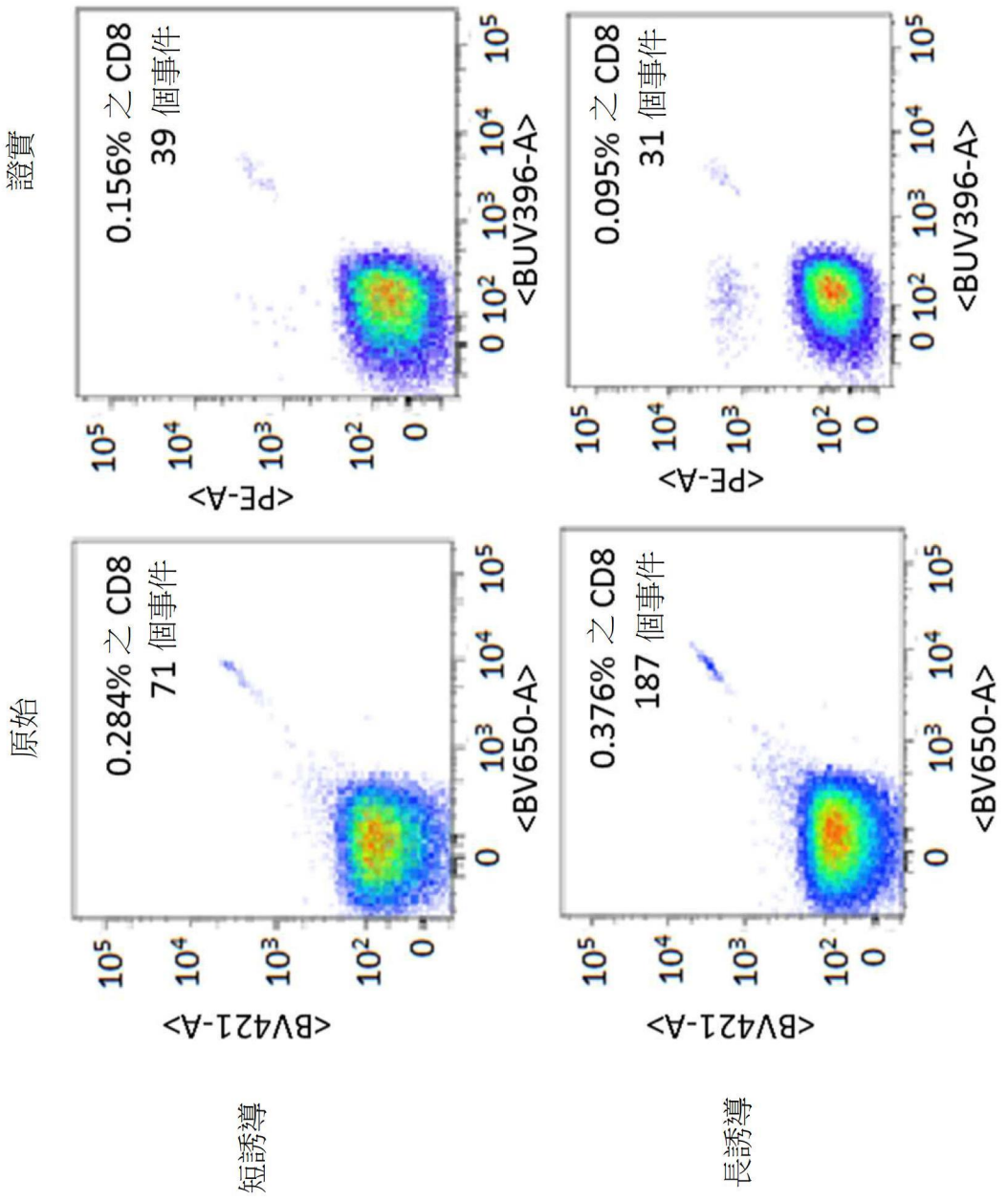
【圖15】


原始
證實
短誘導
長誘導
0.034% 之 CD8
17 個事件
0.048% 之 CD8
24 個事件
0.015% 之 CD8
3 個事件
0.026% 之 CD8
7 個事件
<APC-A>
<PE-A>
<BV650-A>
<BV421-A>
0
10^3
10^4
10^5
10^2

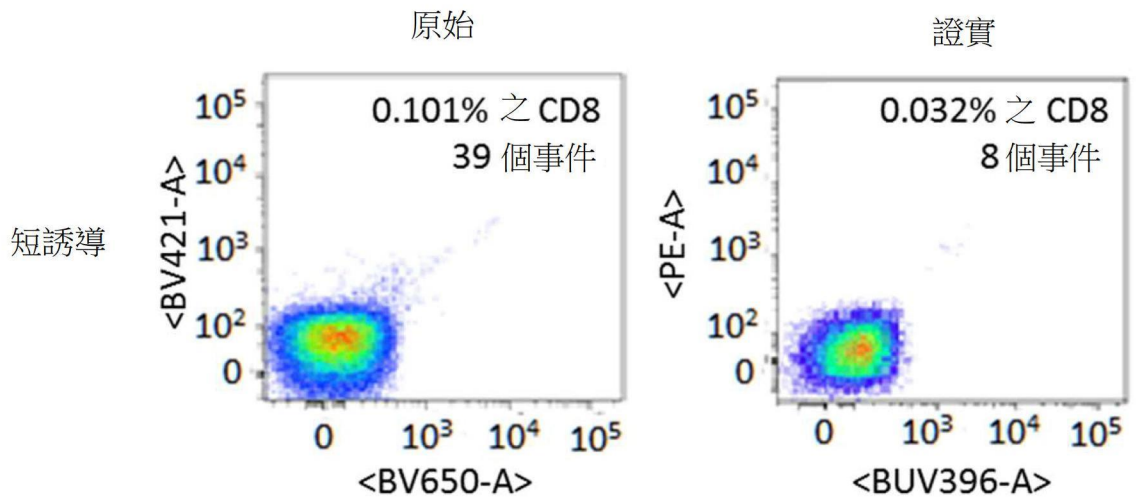
【圖16】


原始
證實
短誘導
長誘導
0.012% 之 CD8
3 個事件
0.076% 之 CD8
19 個事件
0.241% 之 CD8
120 個事件
0.669% 之 CD8
218 個事件
<APC-A>
<PE-A>
<BUV396-A>
<BV605-A>
0
10^2
10^3
10^4
10^5

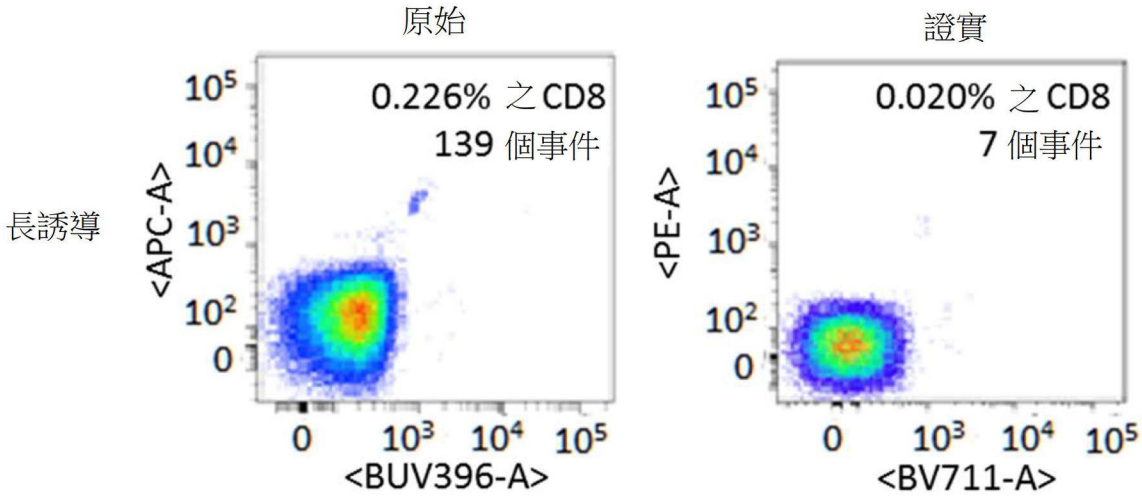
【圖17】


原始
證實
短誘導
長誘導
0.284% 之 CD8
71 個事件
0.156% 之 CD8
39 個事件
0.376% 之 CD8
187 個事件
0.095% 之 CD8
31 個事件
<BV421-A>
<BV650-A>
<PE-A>
<BUV396-A>

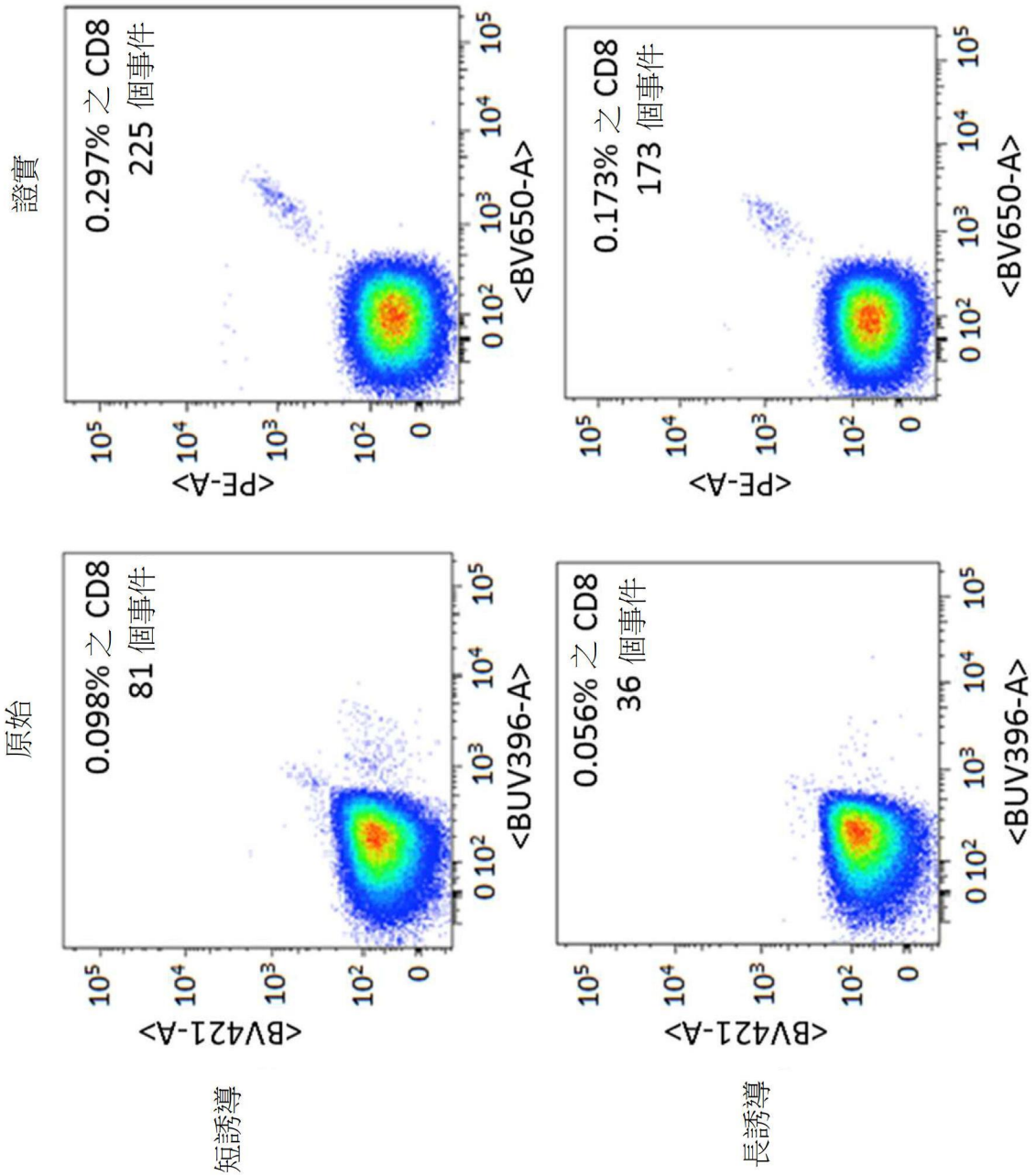
【圖18】


原始
證實
短誘導
0.101% 之 CD8
39 個事件
0.032% 之 CD8
8 個事件
<BV421-A>
<BV650-A>
<PE-A>
<BUV396-A>
10^5
10^4
10^3
10^2
0

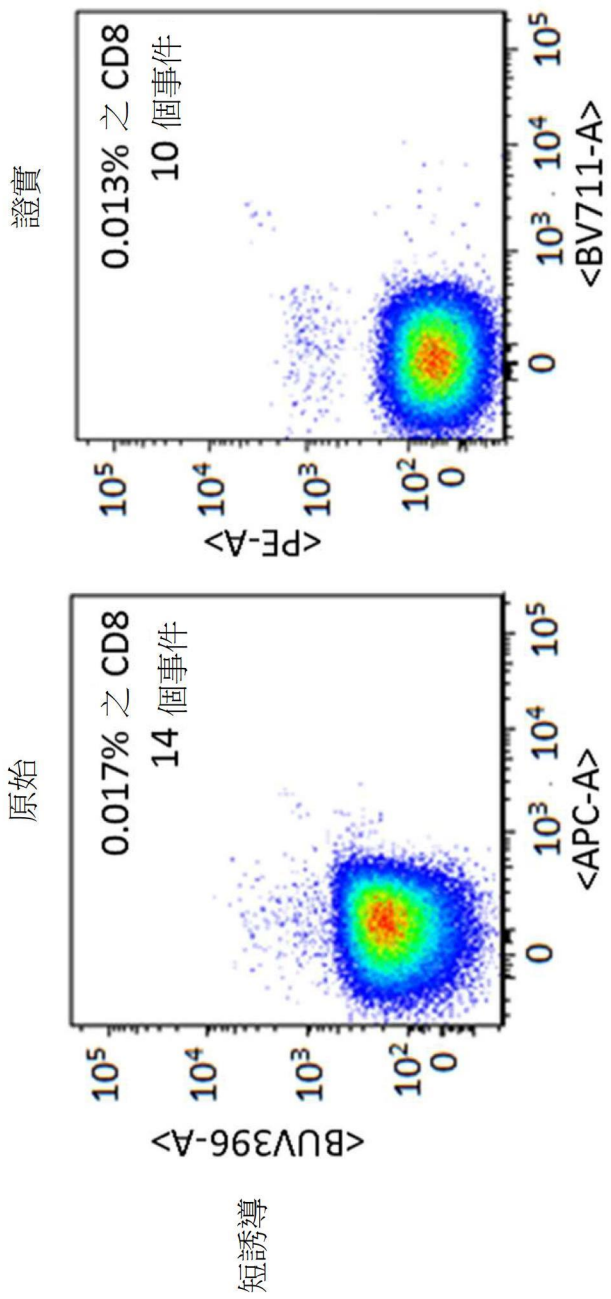
【圖19A】


原始
證實
長誘導
0.226% 之 CD8
139 個事件
0.020% 之 CD8
7 個事件
<APC-A>
<BUV396-A>
<PE-A>
<BV711-A>
10^5
10^4
10^3
10^2
0

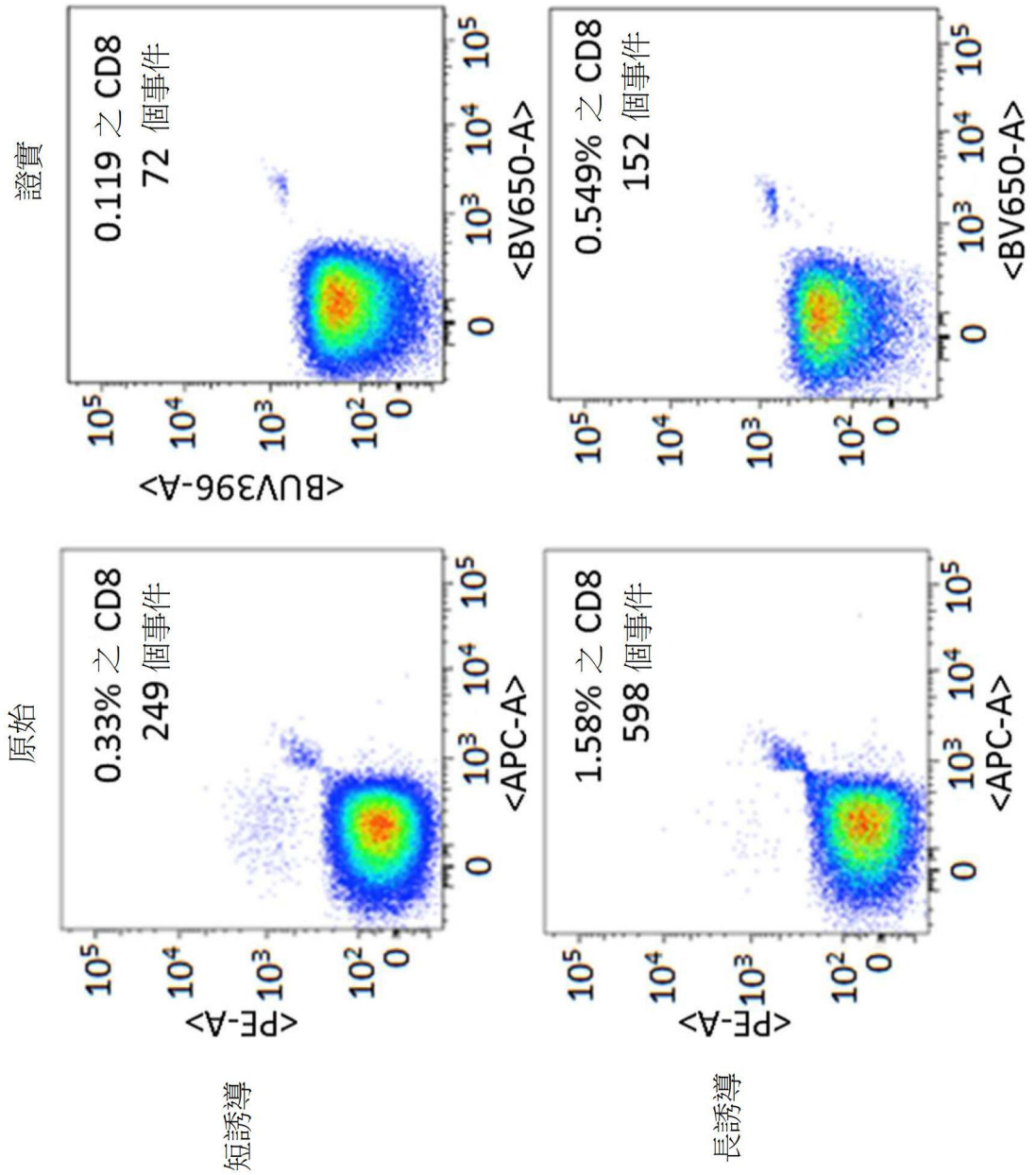
【圖19B】


原始
證實
短誘導
長誘導
0.098% 之 CD8
81 個事件
0.297% 之 CD8
225 個事件
0.056% 之 CD8
36 個事件
0.173% 之 CD8
173 個事件
<BV421-A>
<BUV396-A>
<PE-A>
<BV650-A>

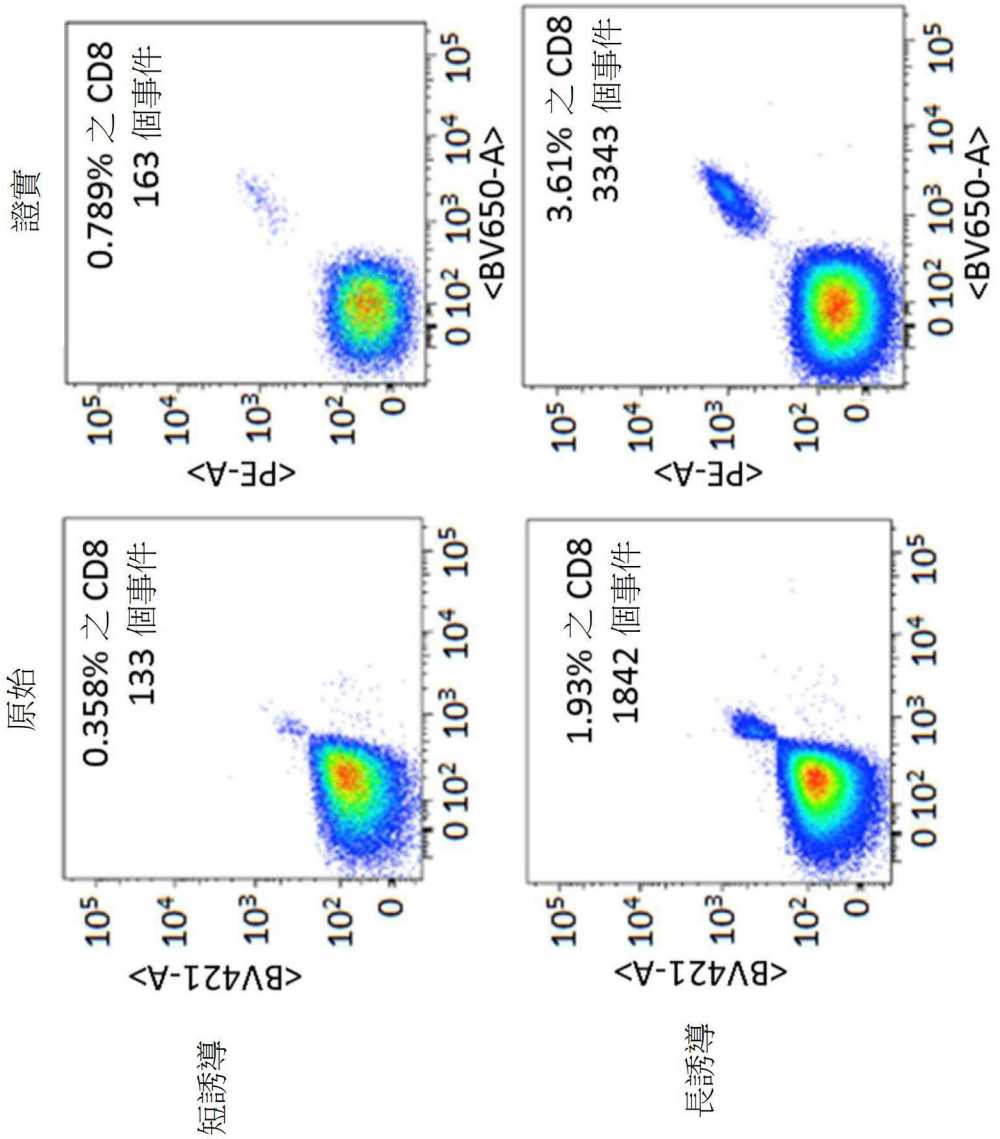
【圖20】


短誘導
原始
0.017% 之 CD8
14 個事件
<BUV396-A>
<APC-A>
證實
0.013% 之 CD8
10 個事件
<PE-A>
<BV711-A>
0
10^2
10^3
10^4
10^5

【圖21】


原始
證實
短誘導
長誘導
0.33% 之 CD8
249 個事件
0.119 之 CD8
72 個事件
1.58% 之 CD8
598 個事件
0.549% 之 CD8
152 個事件
<PE-A>
<APC-A>
<BUV396-A>
<BV650-A>
0
10^2
10^3
10^4
10^5

【圖22】


原始
證實
短誘導
長誘導
0.358% 之 CD8
133 個事件
0.789% 之 CD8
163 個事件
1.93% 之 CD8
1842 個事件
3.61% 之 CD8
3343 個事件
<BV421-A>
<PE-A>
<BV650-A>

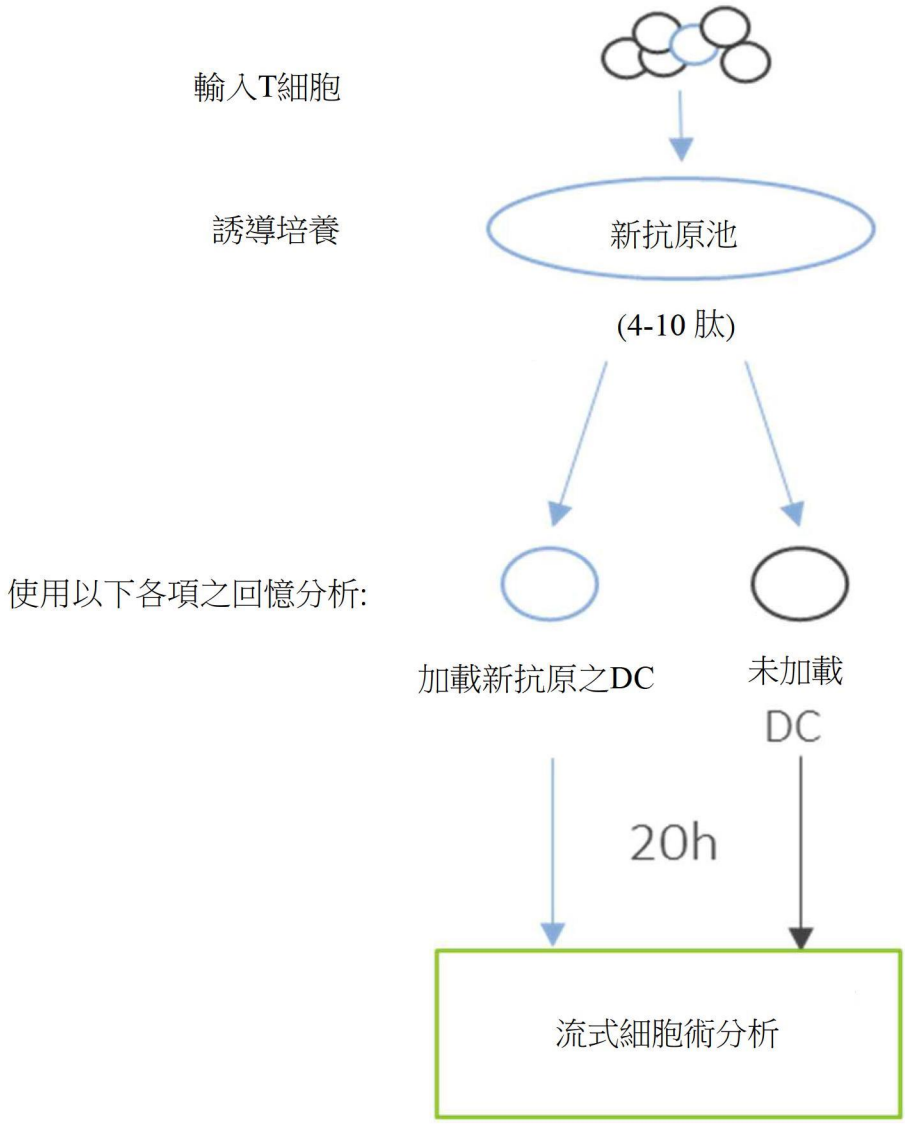
【圖23】

1.擴展預存在記憶反應
2.自幼稚組庫誘導T細胞反應
3.生成具有臨床效能之T細胞產物
增加具有可能已臨床相關之反應之細胞數量
拓寬可潛在地靶向腫瘤之Tc組庫
引導朝向有益之表型及功能

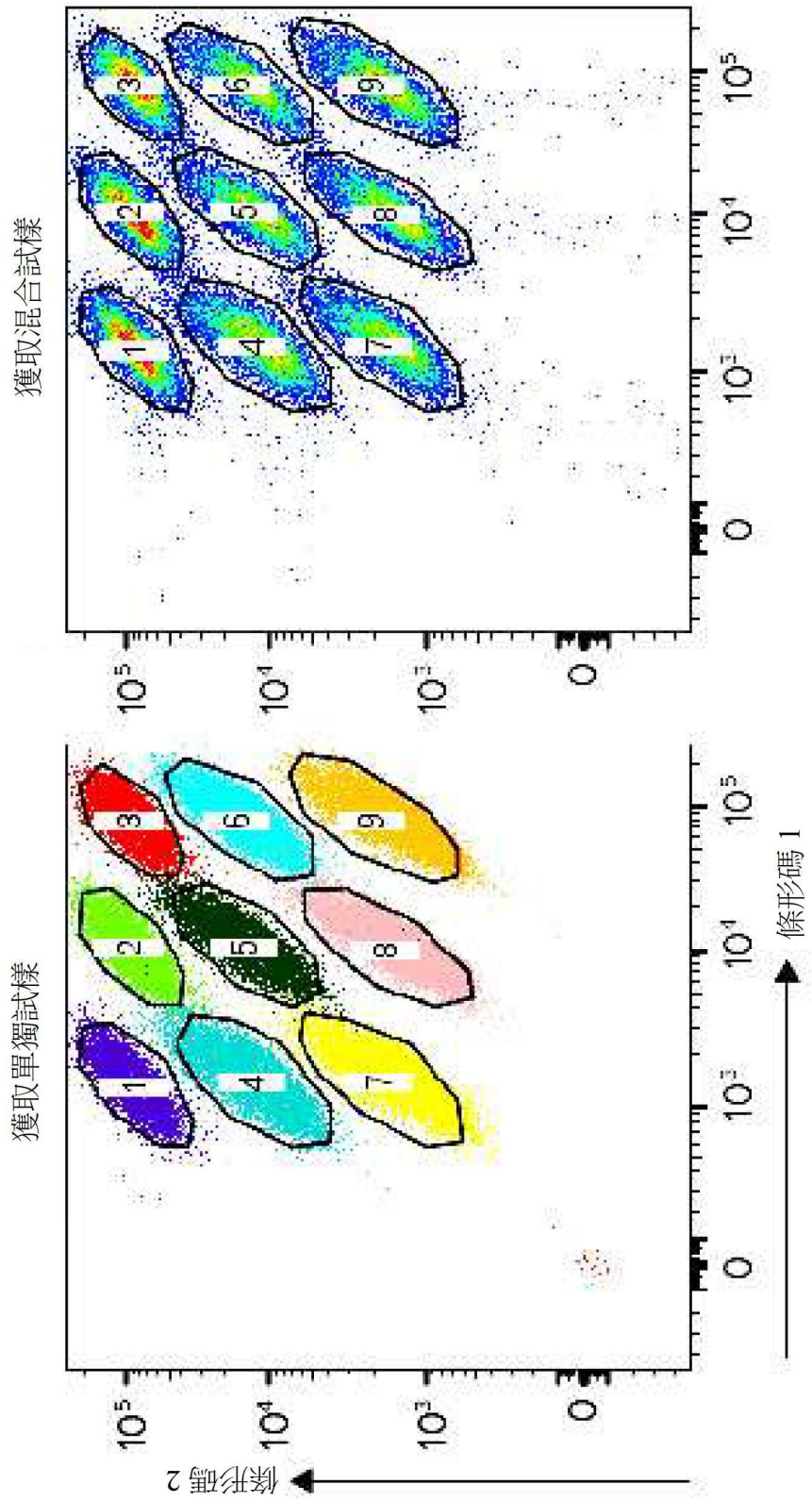
【圖24】

PBMC+DC
(+ 肽)
PBMC+DC
(無肽)
第一時間段
PBMC+DC
(+ 肽)
PBMC+DC
(無肽)
第二時間段
特異性/敏感性分析(例如藉由流式細胞術)、
細胞殺死分析及/或細胞介素釋放分析
1.實施誘導
2.在加載肽之新鮮DC上回憶
3.評價T細胞之特異性、
表型及/或功能

【圖25】


輸入T細胞
誘導培養
新抗原池
(4-10 肽)
使用以下各項之回憶分析:
加載新抗原之DC
未加載
DC
20h
流式細胞術分析

【圖26】

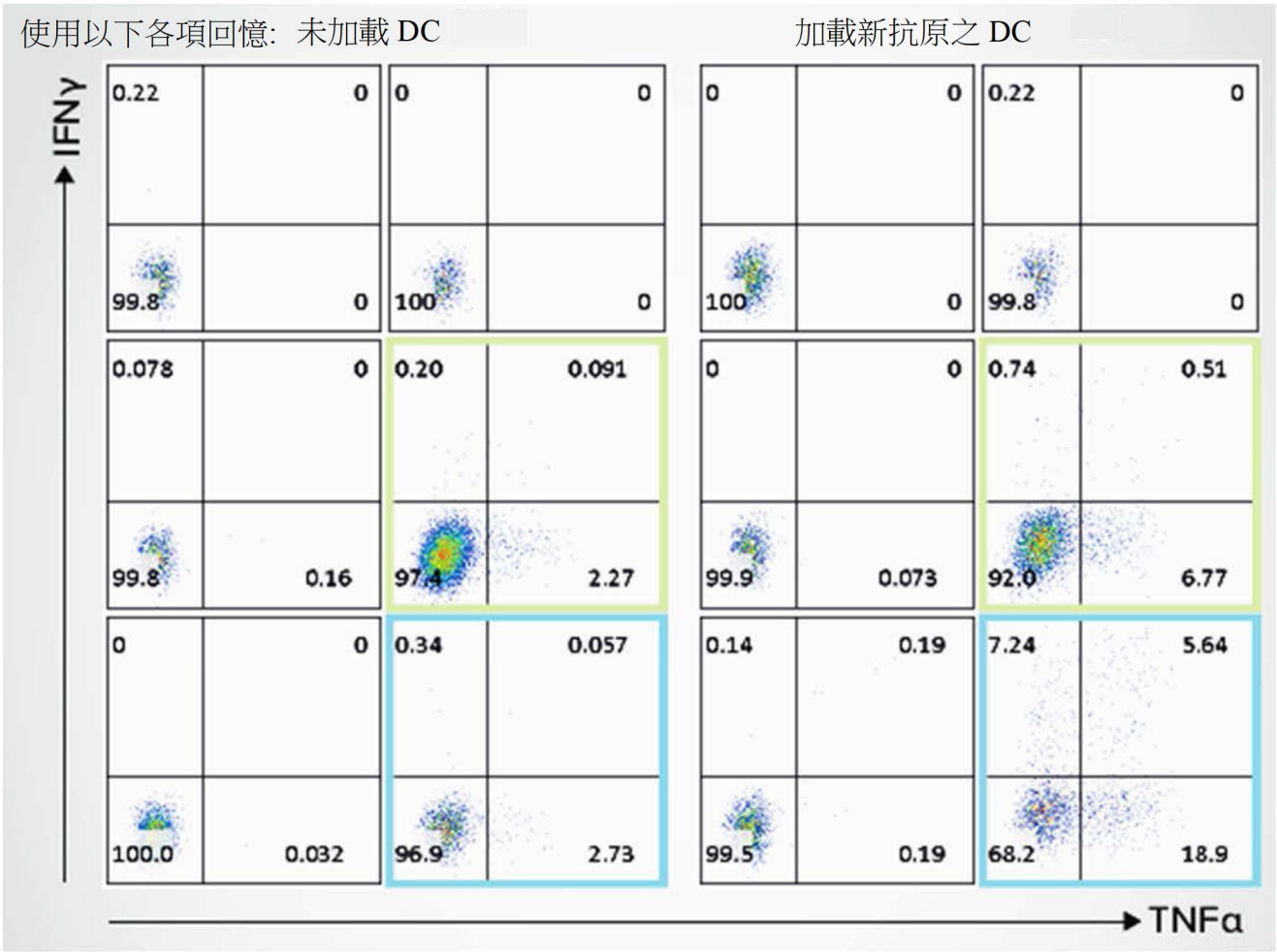


【圖27A】

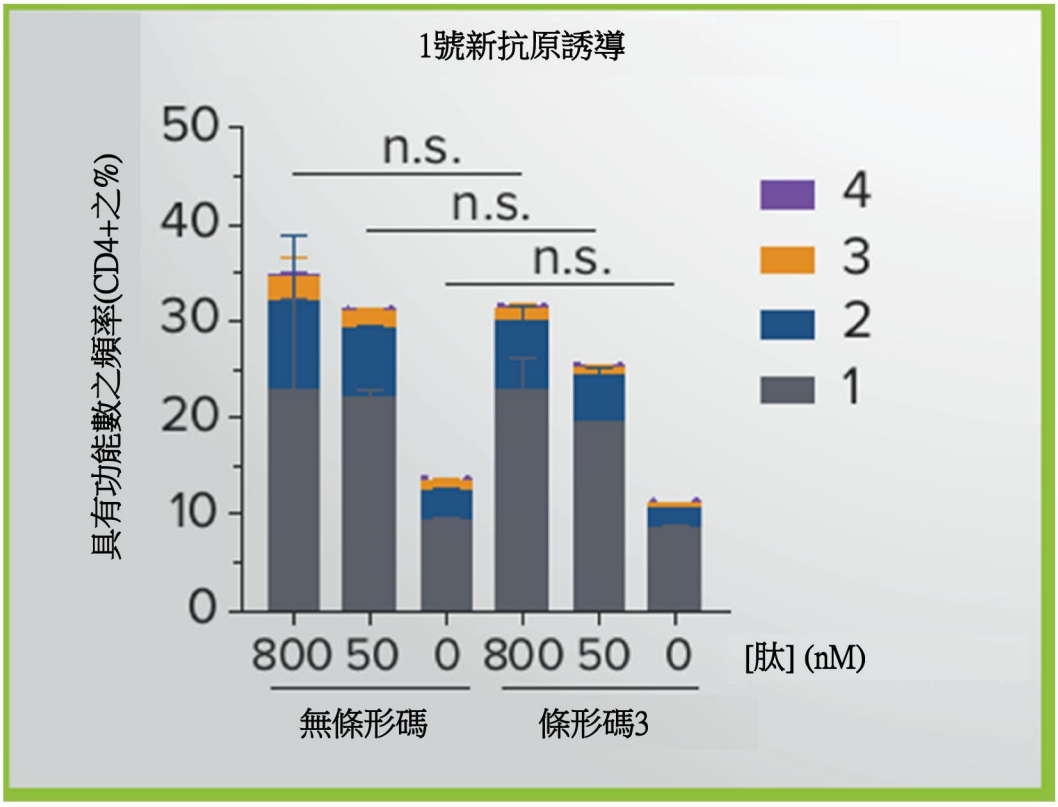
條形碼 2
條形碼 1
BV650 多聚體
PE 多聚體
多聚體+ 24.5
多聚體+ 23.8
多聚體+ 21.5
多聚體+ 23.0
多聚體+ 23.9
多聚體+ 20.2
多聚體+ 24.1
多聚體+ 23.4
多聚體+ 21.3
1
2
3
4
5
6
7
8
9

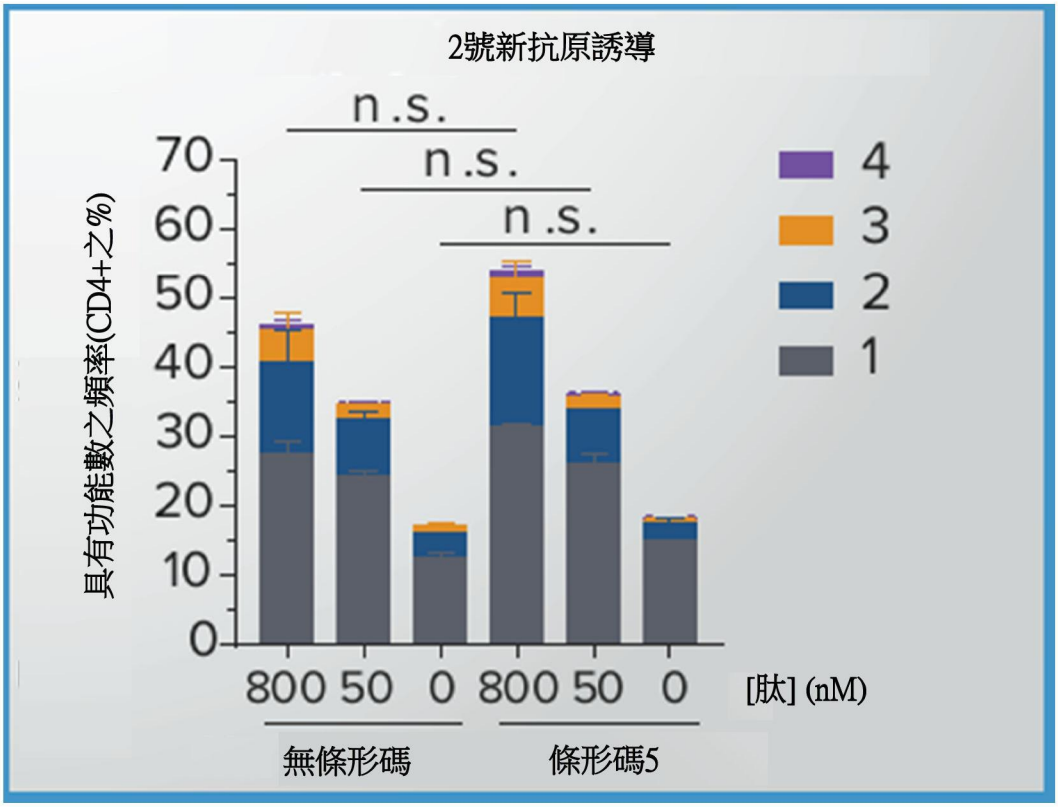
【圖27B】

條形碼 2	條形碼 1
條形碼 4	條形碼3 (1號新抗原誘導)
條形碼 6	條形碼5 (2號新抗原誘導)

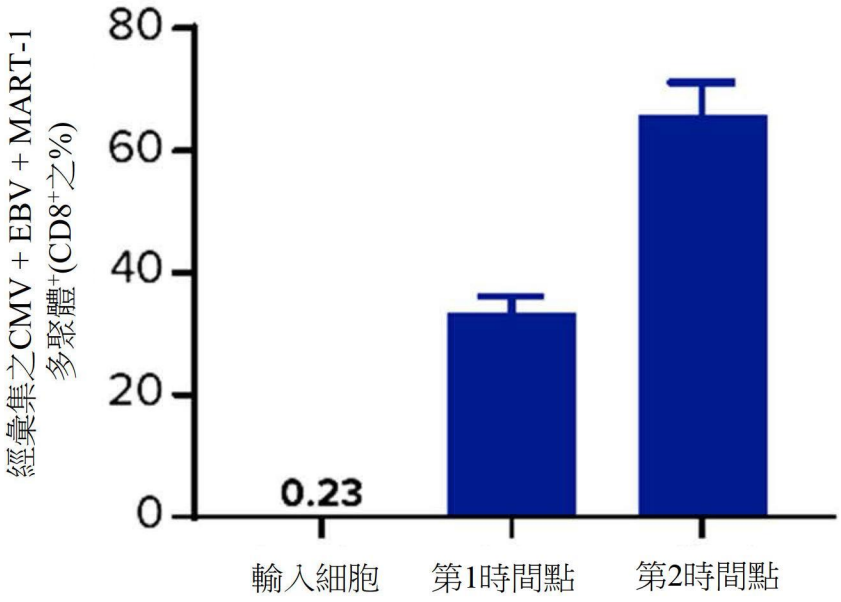


【圖28A】

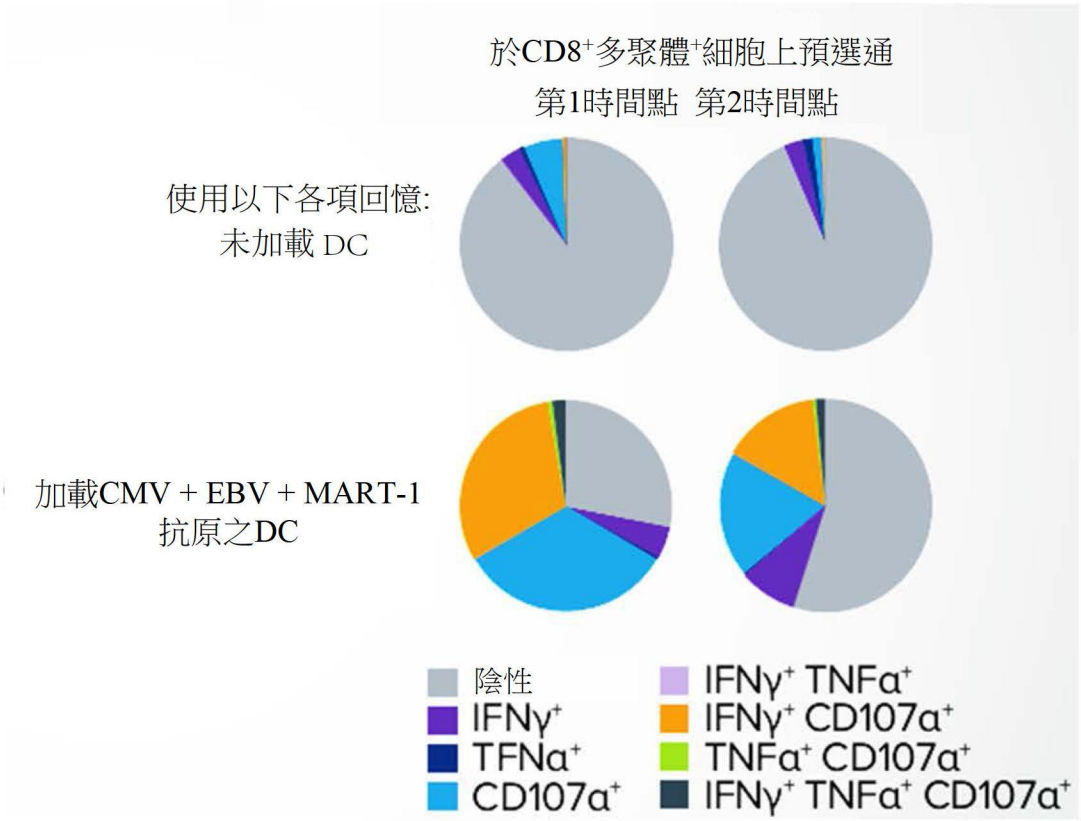

1號新抗原誘導
具有功能數之頻率(CD4+之%)
50
40
30
20
10
0
n.s.
n.s.
n.s.
4
3
2
1
800 50 0 800 50 0
[肽] (nM)
無條形碼
條形碼3


2號新抗原誘導
具有功能數之頻率(CD4+之%)
70
60
50
40
30
20
10
0
n.s.
n.s.
n.s.
4
3
2
1
800 50 0 800 50 0
[肽] (nM)
無條形碼
條形碼5

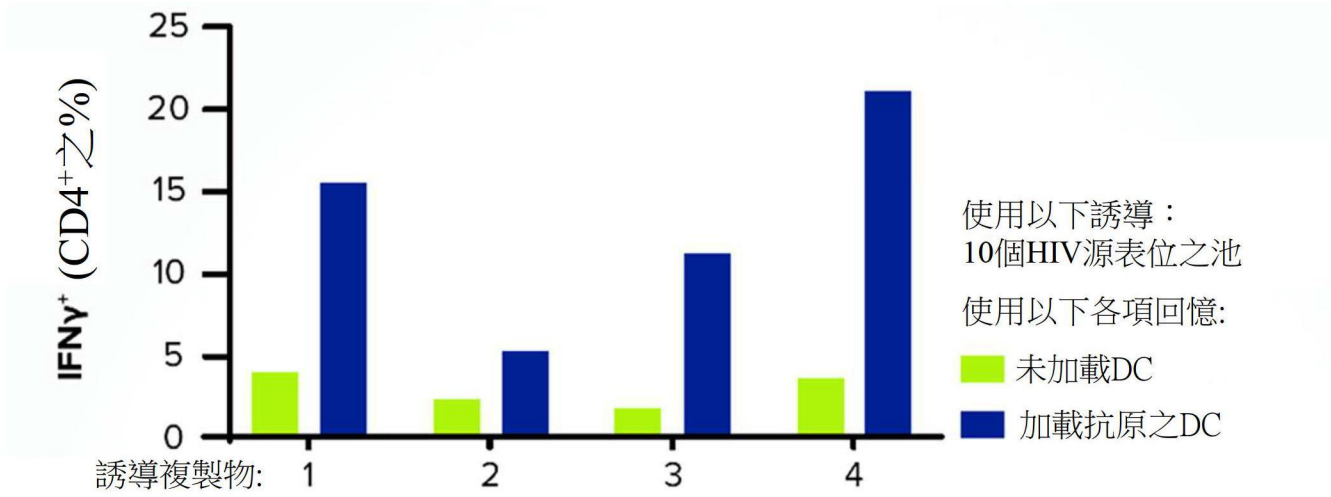
【圖28B】


經彙集之CMV + EBV + MART-1
多聚體+(CD8+之%)
80
60
40
20
0
0.23
輸入細胞
第1時間點
第2時間點

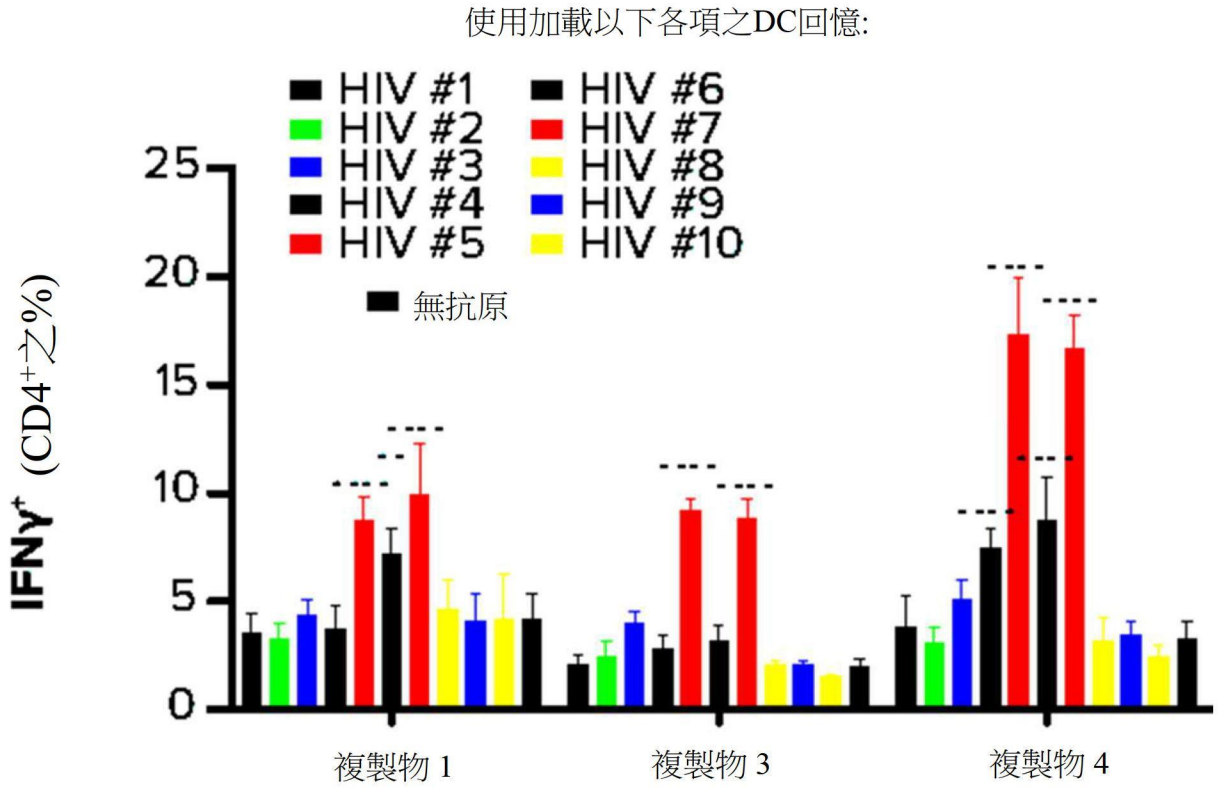
【圖29A】


於CD8+多聚體+細胞上預選通
第1時間點
第2時間點
使用以下各項回憶:
未加載 DC
加載CMV + EBV + MART-1
抗原之DC
陰性
IFNγ+
TFNα+
CD107α+
IFNγ+ TNFα+
IFNγ+ CD107α+
TNFα+ CD107α+
IFNγ+ TNFα+ CD107α+

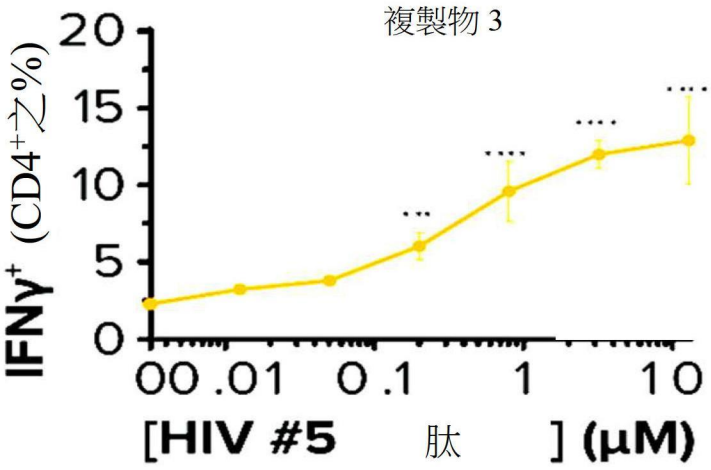
【圖29B】

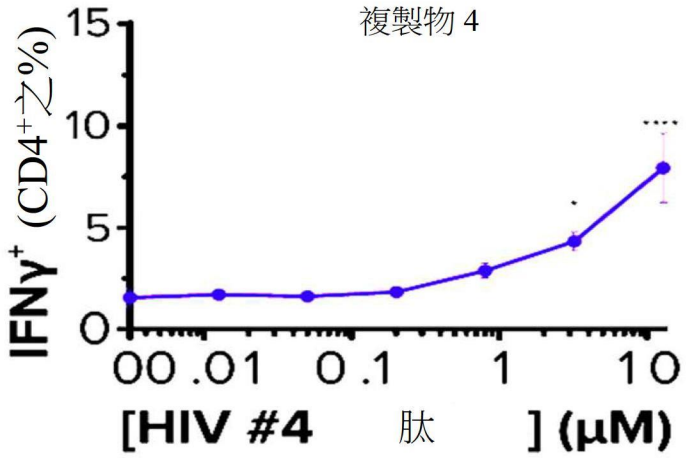

25
20
15
10
5
0
IFNγ+ (CD4+之%)
誘導複製物: 1 2 3 4
使用以下誘導：
10個HIV源表位之池
使用以下各項回憶:
未加載DC
加載抗原之DC

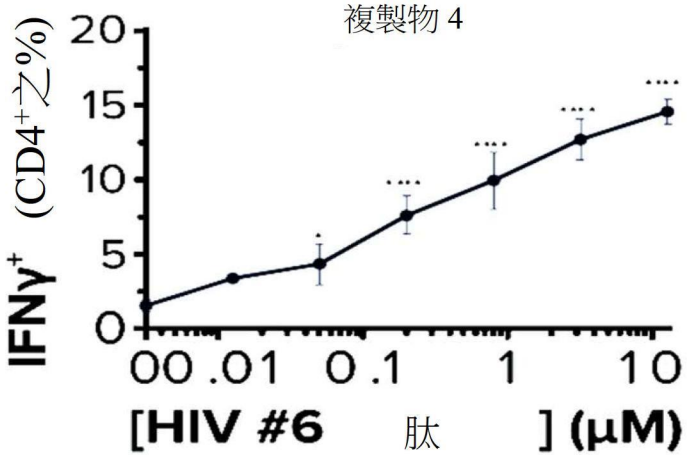
【圖30A】


使用加載以下各項之DC回憶:
HIV #1
HIV #2
HIV #3
HIV #4
HIV #5
HIV #6
HIV #7
HIV #8
HIV #9
HIV #10
無抗原
25
20
15
10
5
0
IFNγ+ (CD4+之%)
複製物 1
複製物 3
複製物 4

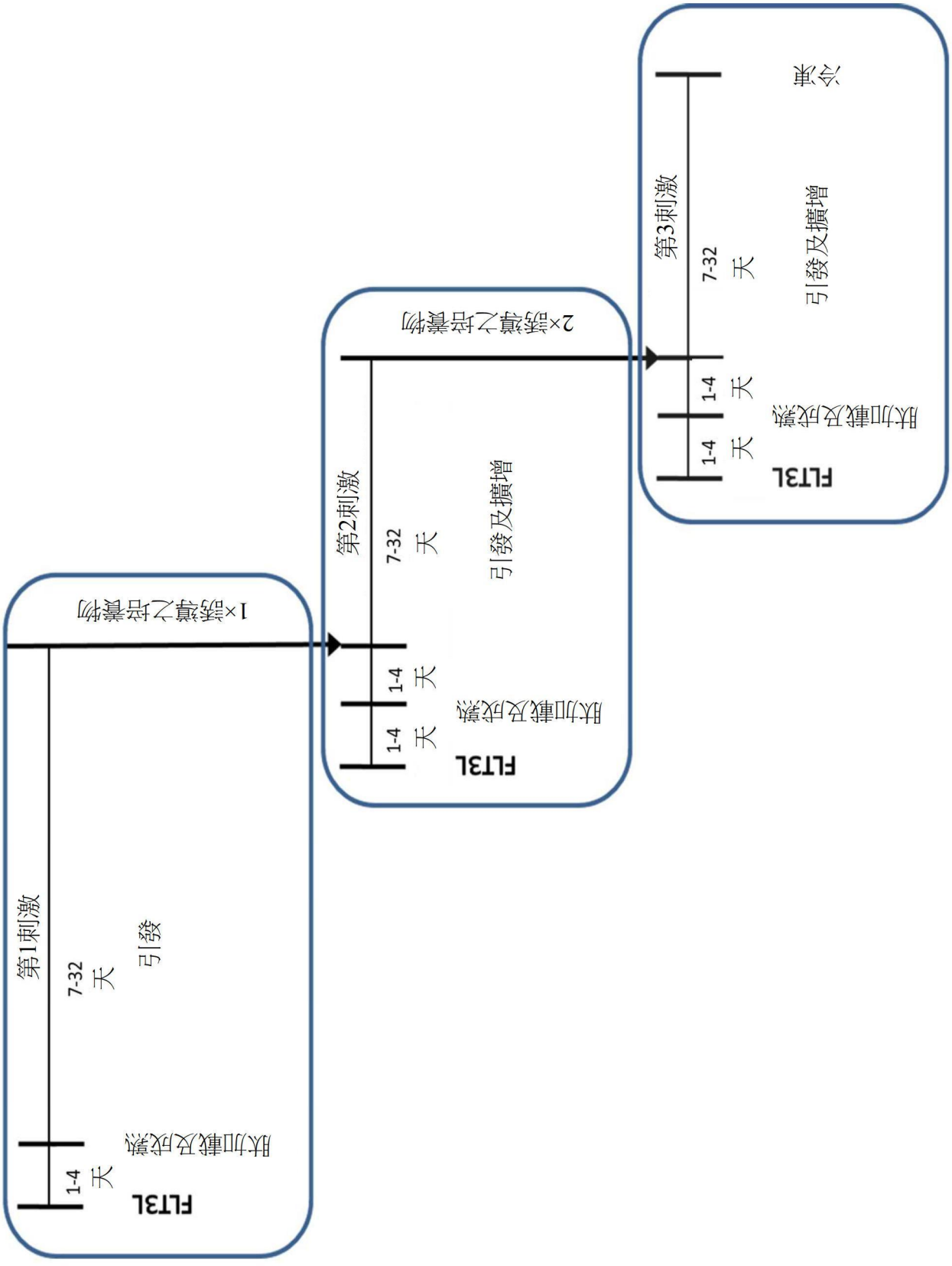
【圖30B】


複製物 3
IFNγ+ (CD4+之%)
20
15
10
5
0
00 .01 0 .1 1 10
[HIV #5 肽] (μM)


複製物 4
IFNγ+ (CD4+之%)
15
10
5
0
00 .01 0 .1 1 10
[HIV #4 肽] (μM)


複製物 4
IFNγ+ (CD4+之%)
20
15
10
5
0
00 .01 0 .1 1 10
[HIV #6 肽] (μM)

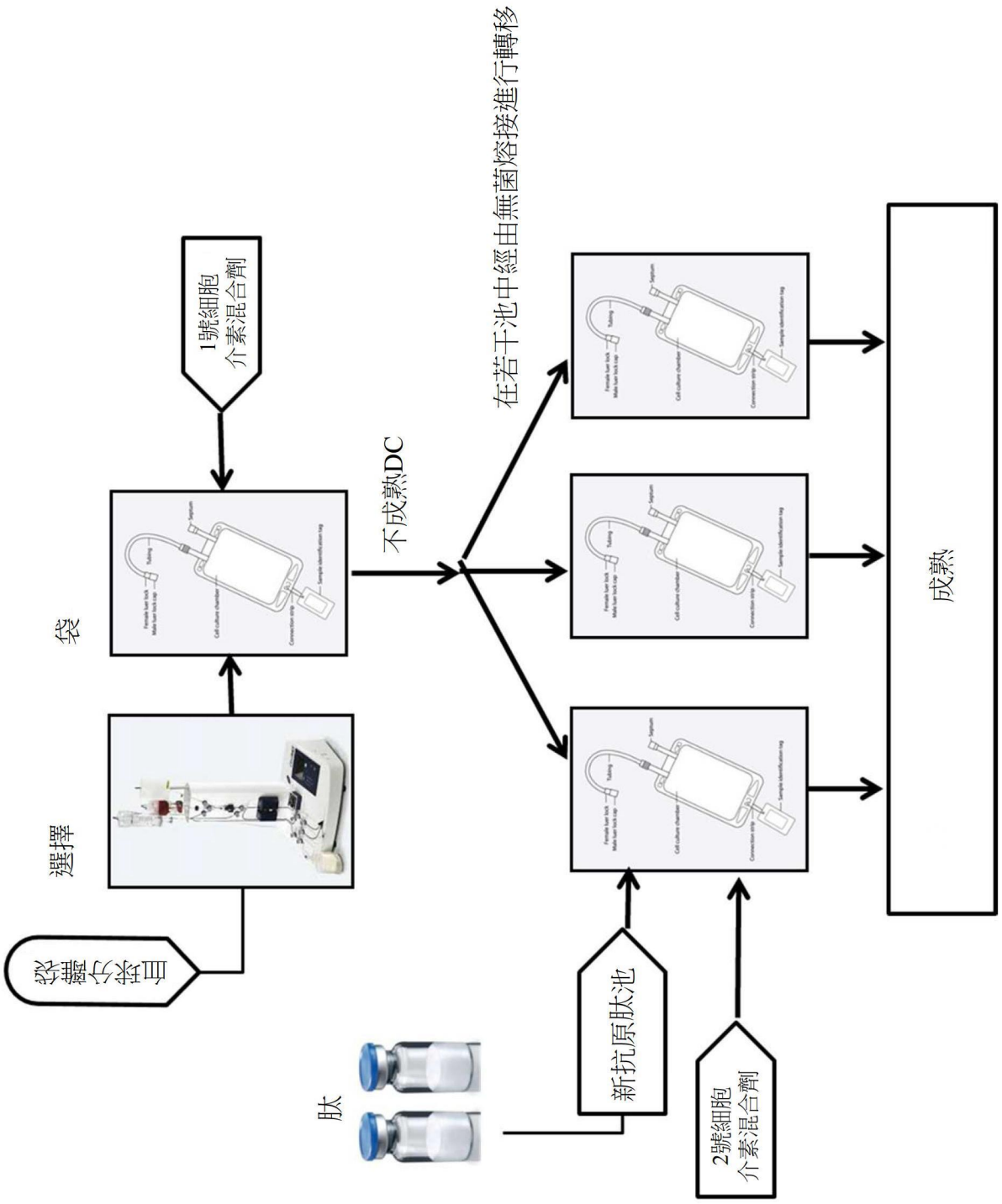
【圖30C】


1×誘導之培養物
第1刺激
7-32
天
引發
FLT3L
1-4
天
肽加載及成熟
2×誘導之培養物
第2刺激
7-32
天
引發及擴增
FLT3L
1-4
天
1-4
天
肽加載及成熟
第3刺激
7-32
天
引發及擴增
冷凍
FLT3L
1-4
天
1-4
天
肽加載及成熟

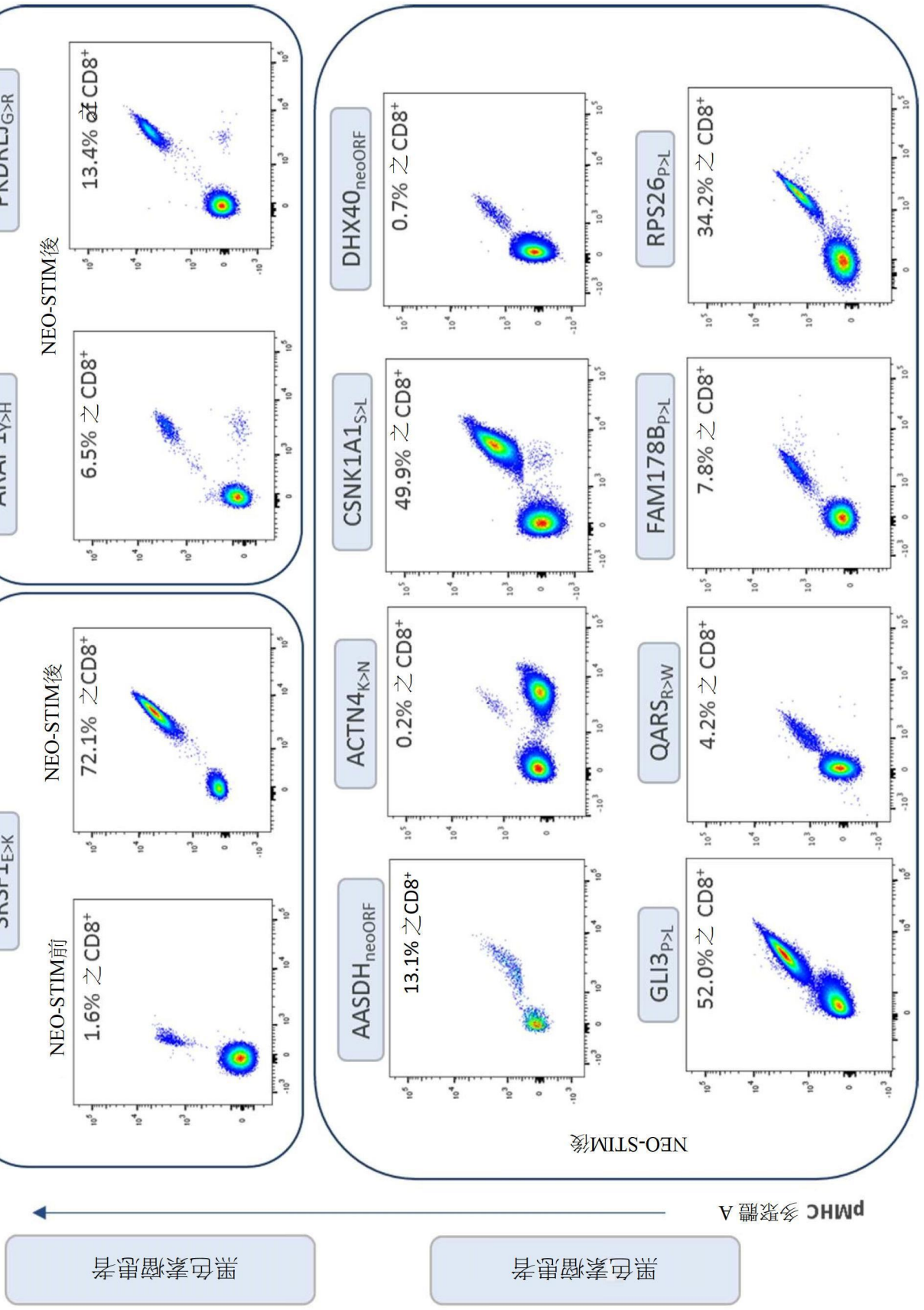
【圖31】

血球分離袋
選擇
T細胞
培養基
添加T細胞
成熟DC池1
成熟DC池2
成熟DC池3
池 1
池 2
池 x
袋
重複此過程以使用DC進行第二(及第三)誘導

【圖32】


白球分離袋
選擇
袋
1號細胞
介素混合劑
不成熟DC
在若干池中經由無菌熔接進行轉移
肽
新抗原肽池
2號細胞
介素混合劑
成熟

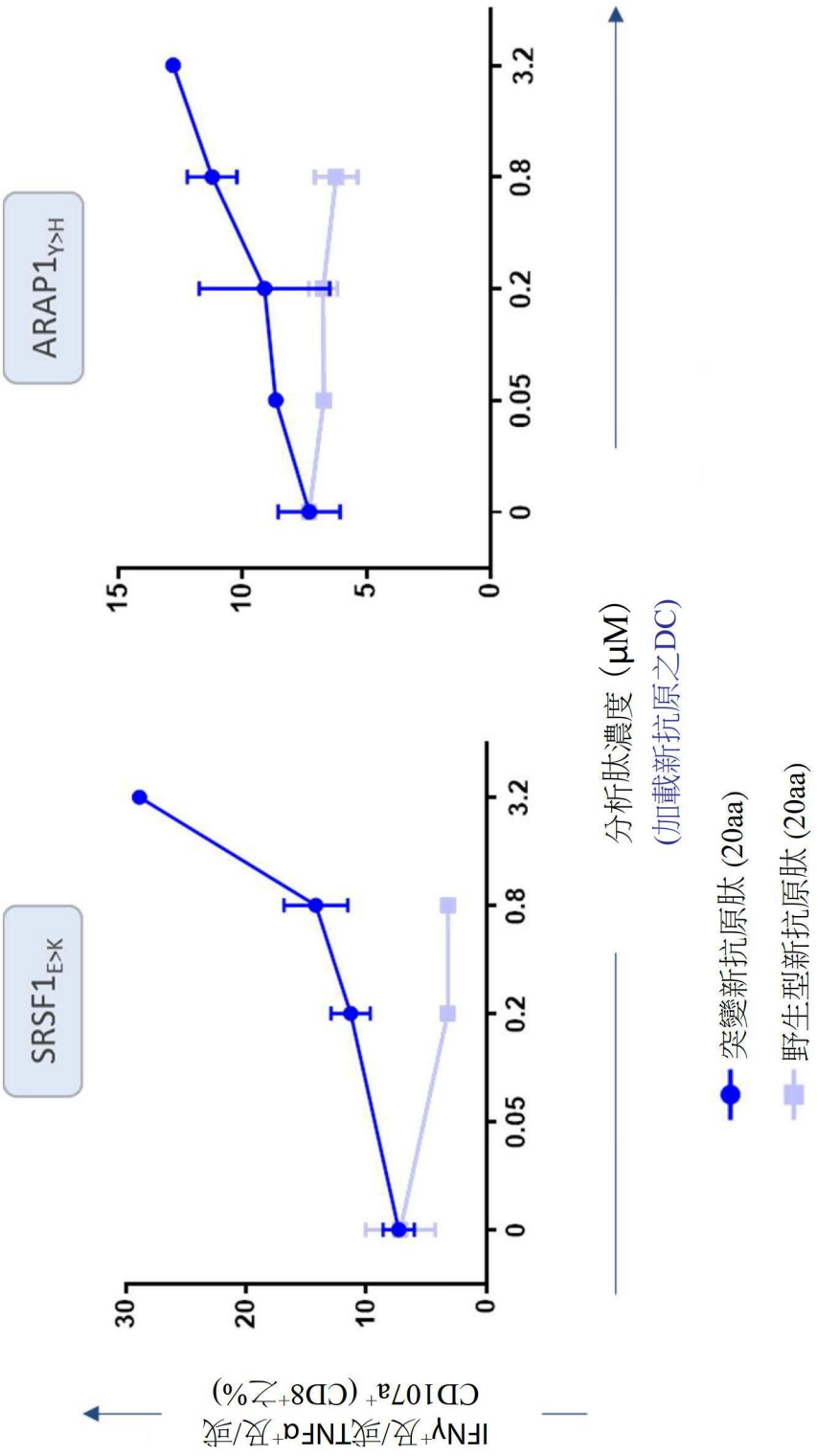
【圖33】


SRSF1E>K
NEO-STIM前
1.6% 之 CD8+
NEO-STIM後
72.1% 之CD8+
ARAP1Y>H
NEO-STIM後
6.5% 之 CD8+
PKDREJG>R
13.4% 之 CD8+
AASDHneoORF
13.1% 之CD8+
ACTN4K>N
0.2% 之 CD8+
CSNK1A1S>L
49.9% 之 CD8+
DHX40neoORF
0.7% 之 CD8+
GLI3P>L
52.0% 之 CD8+
QARSR>W
4.2% 之 CD8+
FAM178BP>L
7.8% 之 CD8+
RPS26P>L
34.2% 之 CD8+
NEO-STIM後
pMHC 多聚體 A
黑色素瘤患者
黑色素瘤患者

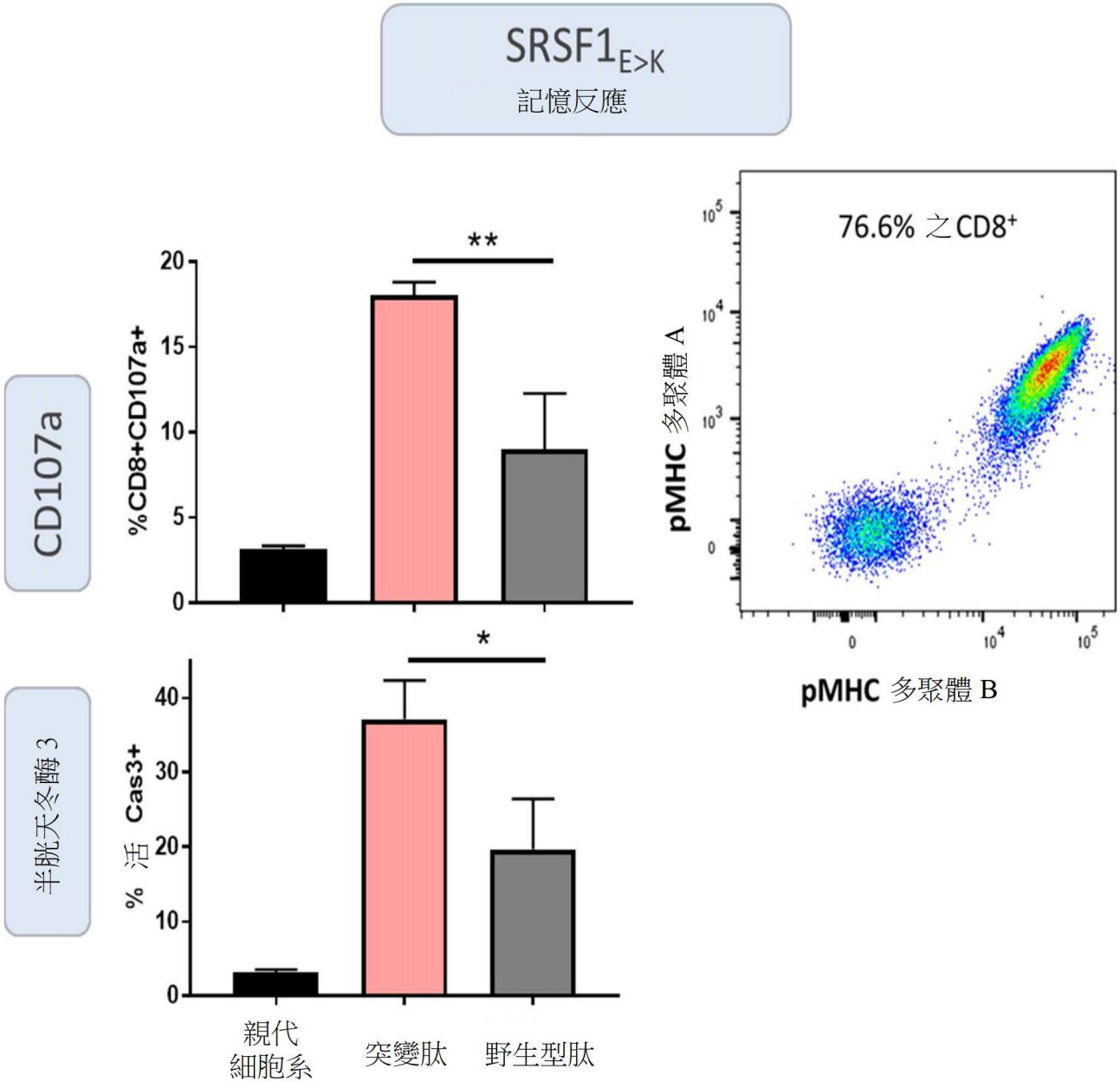
【圖34】

刺激前
刺激後
4.5% 之 CD8+
72.1% 之 CD8+
0.0% 之 CD8+
6.5% 之 CD8+
pMHC 多聚體 A
pMHC 多聚體 B
SRSF1E>K
記憶反應
ARAP1V>H
新生反應
未加載DC
加載新抗原之DC
7.2%
16.9%
6.9%
65.5%
13.1%
34.5%
CD107a+ IFN-γ+ TNFα+
CD107a+ IFN-γ+
CD107a+ TNFα+
IFN-γ+ TNFα+
CD107a+
IFN-γ+
TNFα+
陰性
CREBBP S>L
新生CD4+反應

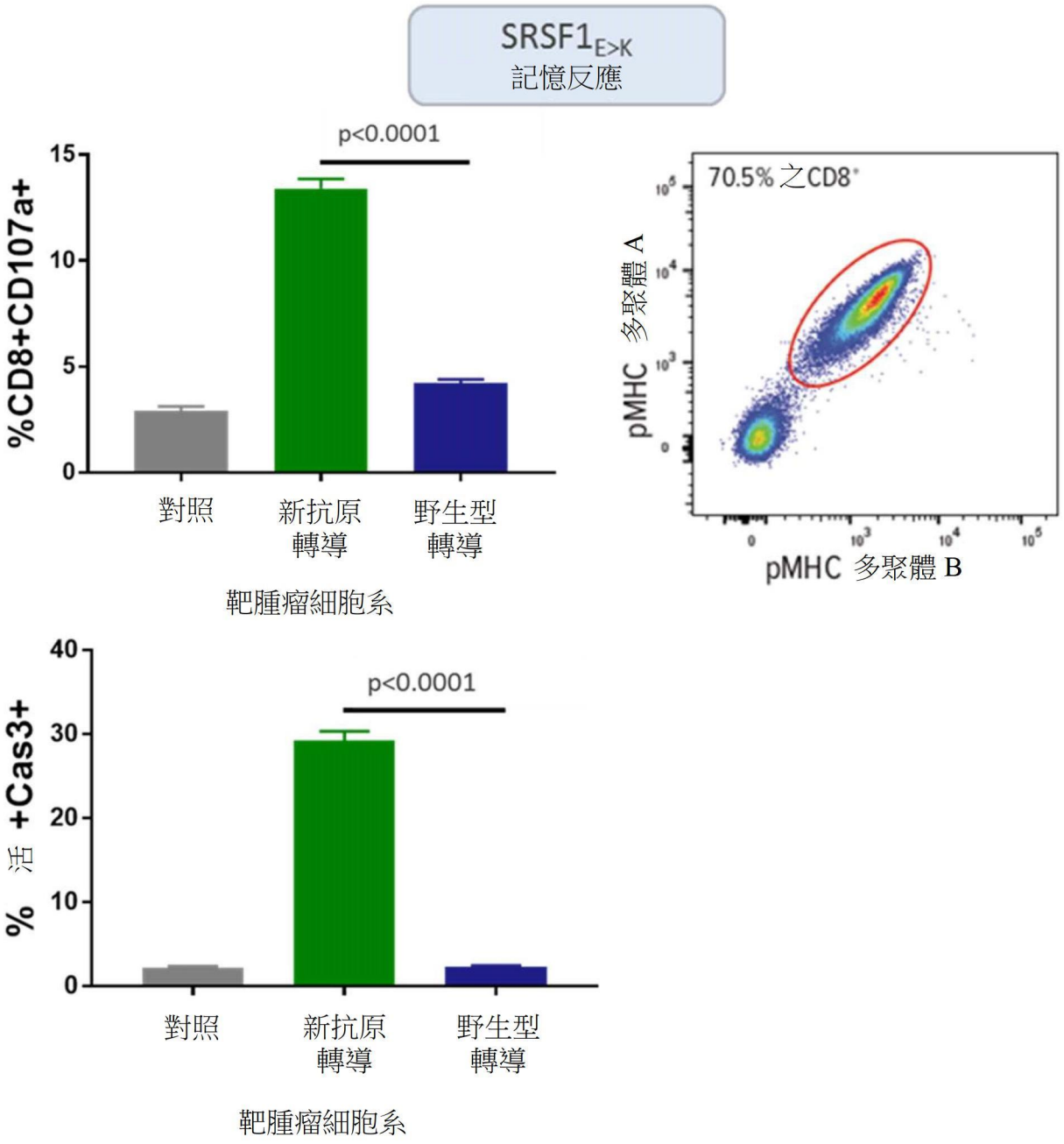
【圖35】


SRSF1E>K
ARAP1Y>H
IFNγ+及/或TNFα+及/或
CD107a+ (CD8+之%)
分析肽濃度（μM）
(加載新抗原之DC)
突變新抗原肽 (20aa)
野生型新抗原肽 (20aa)
0
10
20
30
0
0.05
0.2
0.8
3.2
0
5
10
15

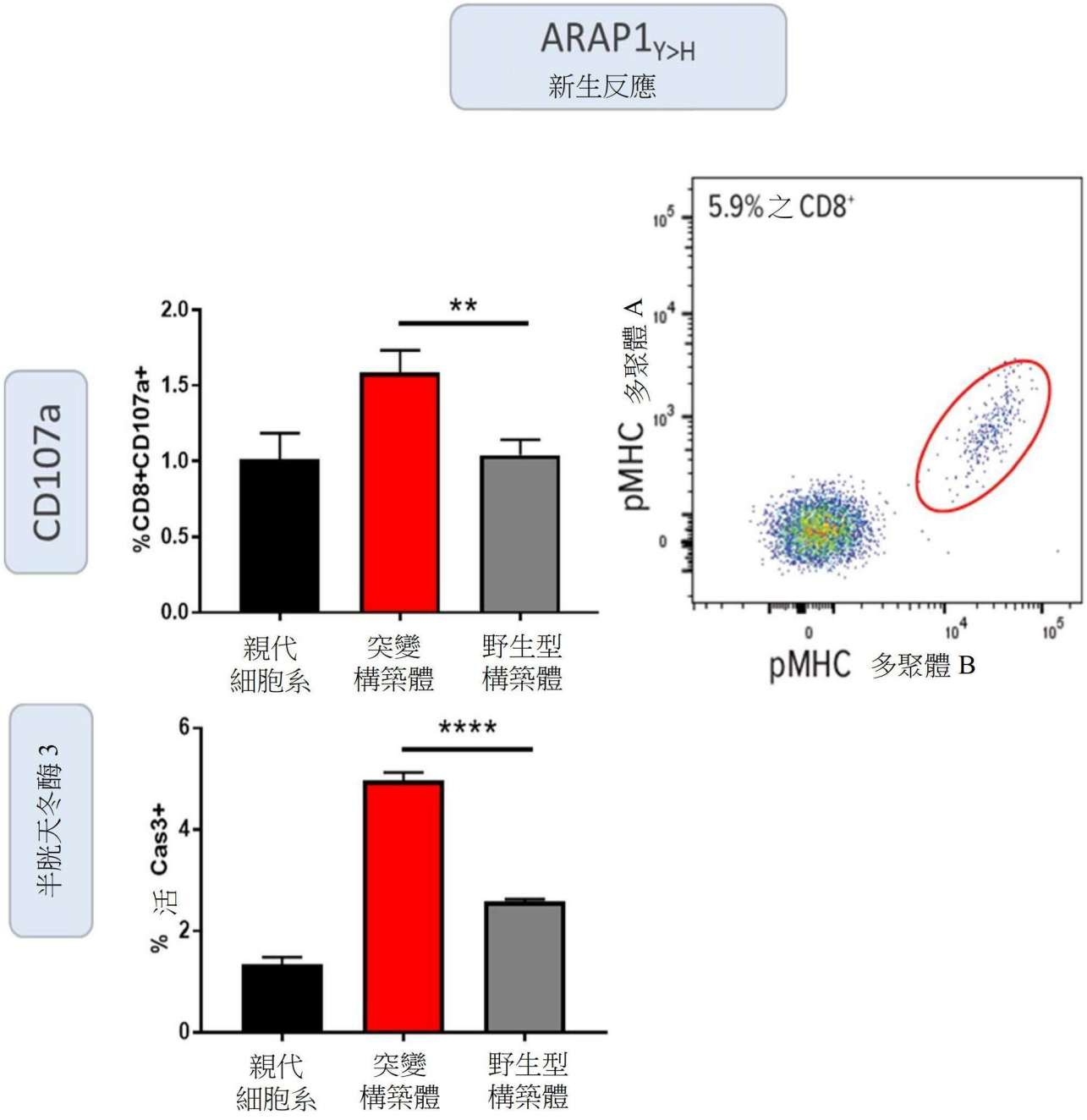
【圖36】


SRSF1E>K
記憶反應
CD107a
%CD8+CD107a+
20
15
10
5
0
**
76.6% 之CD8+
pMHC 多聚體 A
pMHC 多聚體 B
半胱天冬酶 3
% 活 Cas3+
40
30
20
10
0
*
親代
細胞系
突變肽
野生型肽

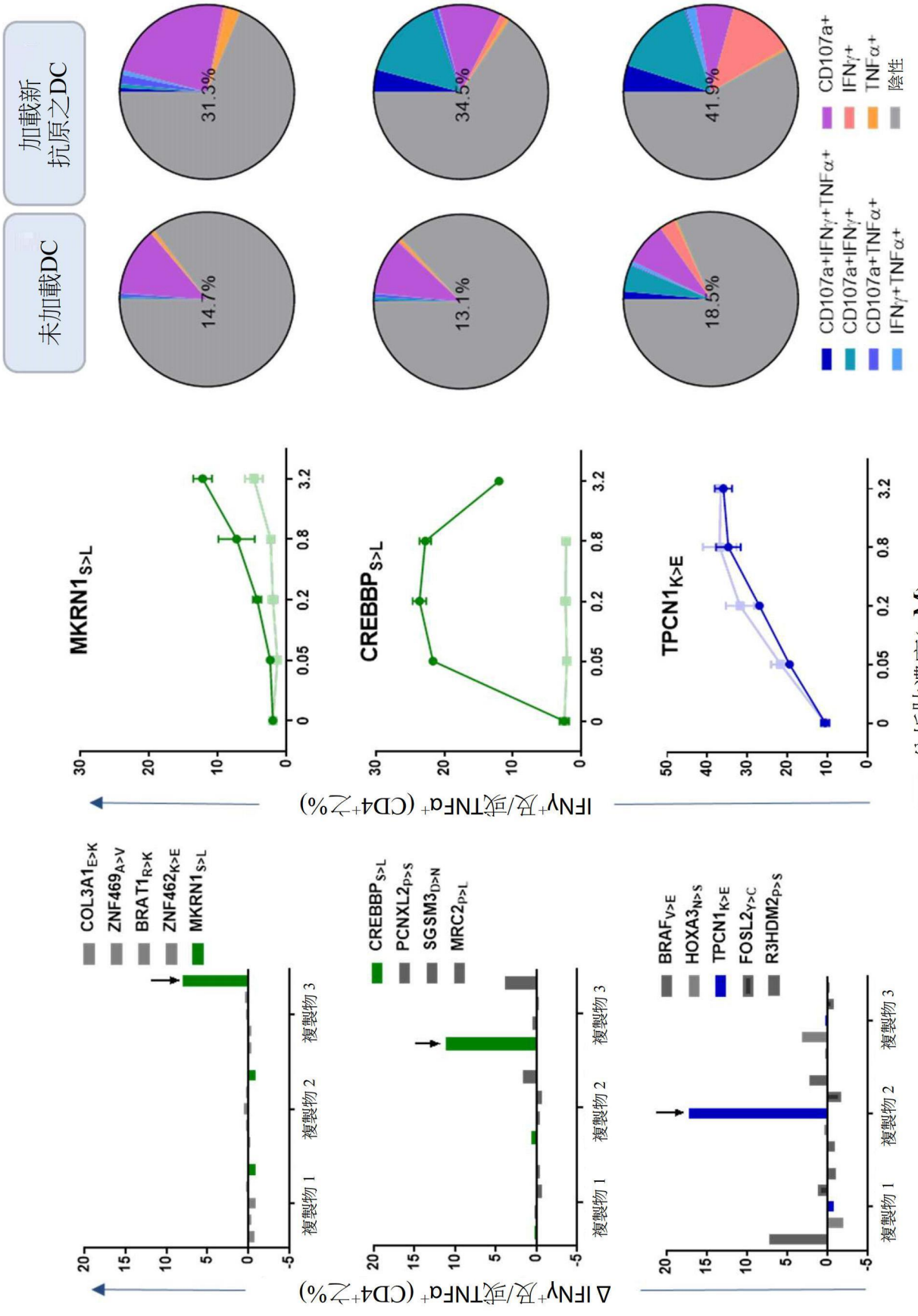
【圖37A】

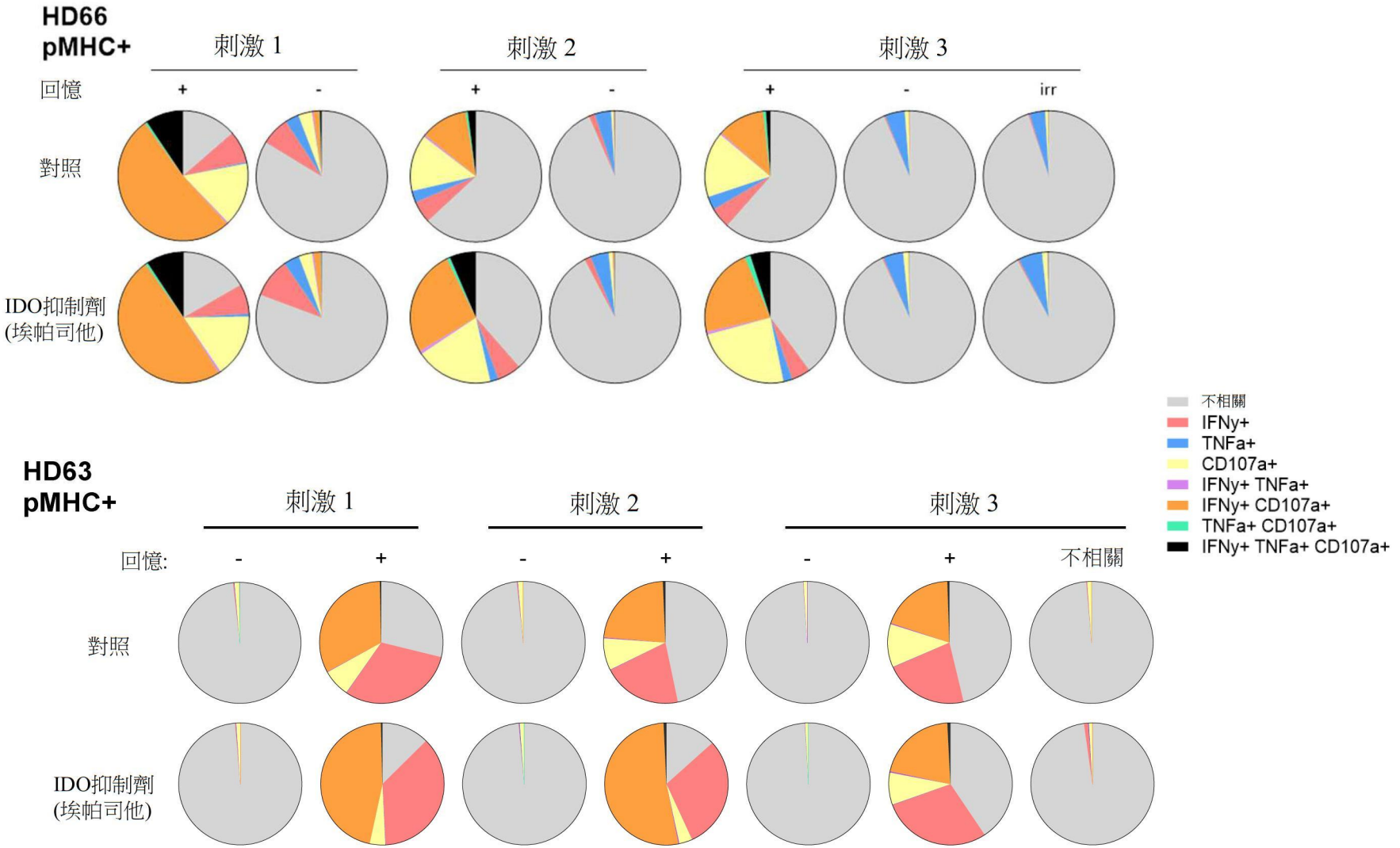

SRSF1E>K
記憶反應
p<0.0001
%CD8+CD107a+
15
10
5
0
對照
新抗原
轉導
野生型
轉導
靶腫瘤細胞系
70.5% 之CD8+
pMHC 多聚體 A
pMHC 多聚體 B
p<0.0001
% 活 +Cas3+
40
30
20
10
0
對照
新抗原
轉導
野生型
轉導
靶腫瘤細胞系

【圖37B】


ARAP1Y>H
新生反應
CD107a
%CD8+CD107a+
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
親代細胞系
突變構築體
野生型構築體
5.9%之 CD8+
pMHC 多聚體 A
pMHC 多聚體 B
半胱天冬酶 3
% 活 Cas3+
6
4
2
0
****
親代細胞系
突變構築體
野生型構築體

【圖37C】


未加載DC
加載新抗原之DC
14.7%
31.3%
13.1%
34.5%
18.5%
41.9%
CD107a+IFNγ+TNFα+
CD107a+IFNγ+
CD107a+TNFα+
IFNγ+TNFα+
CD107a+
IFNγ+
TNFα+
陰性
【圖38C】
MKRN1S>L
CREBBPS>L
TPCN1K>E
IFNγ+及/或TNFα+ (CD4+之%)
分析肽濃度(μM)
【圖38B】
COL3A1E>K
ZNF469A>V
BRAT1R>K
ZNF462K>E
MKRN1S>L
CREBBPS>L
PCNXL2P>S
SGSM3D>N
MRC2P>L
BRAFV>E
HOXA3N>S
TPCN1K>E
FOSL2Y>C
R3HDM2P>S
複製物 1
複製物 2
複製物 3
Δ IFNγ+及/或TNFα+ (CD4+之%)
【圖38A】

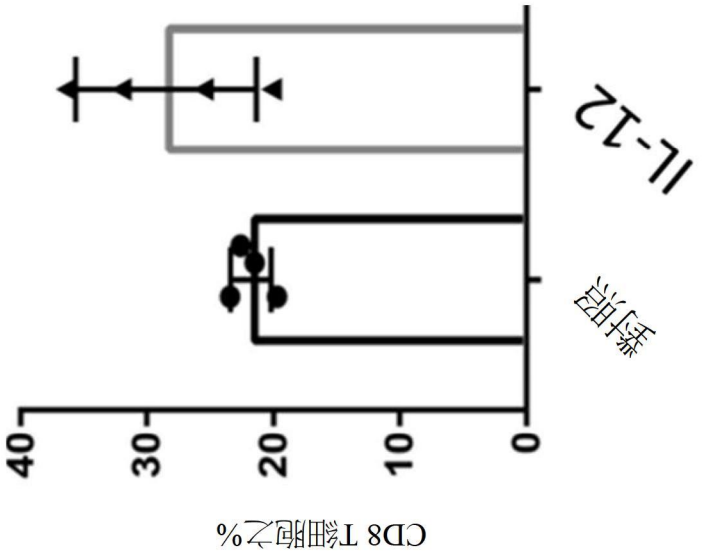

HD66
pMHC+
刺激 1
刺激 2
刺激 3
回憶
+
-
+
-
+
-
irr
對照
IDO抑制劑
(埃帕司他)
HD63
pMHC+
刺激 1
刺激 2
刺激 3
回憶:
-
+
-
+
-
+
不相關
對照
IDO抑制劑
(埃帕司他)
不相關
IFNy+
TNFa+
CD107a+
IFNy+ TNFa+
IFNy+ CD107a+
TNFa+ CD107a+
IFNy+ TNFa+ CD107a+

【圖39】

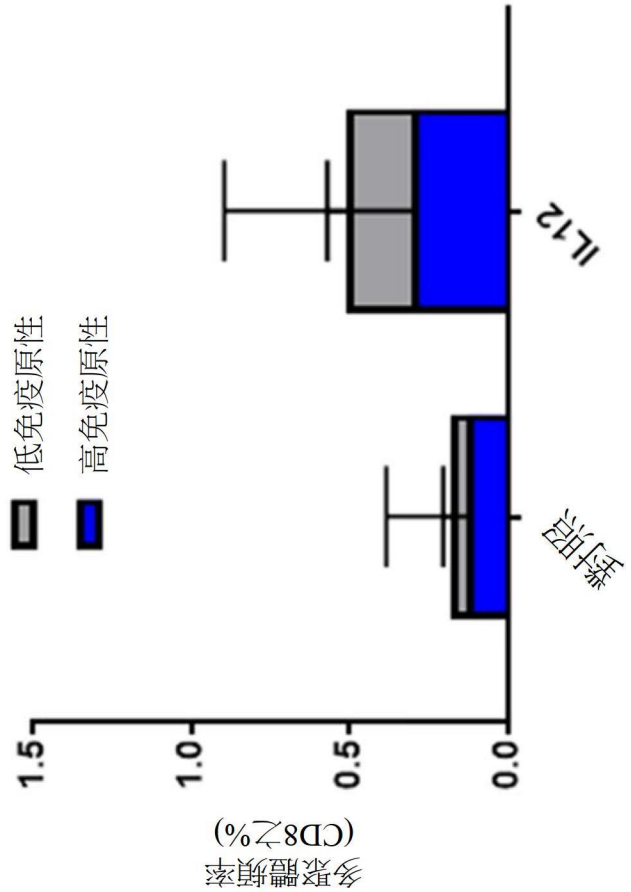
【圖40】

【圖41B】

【圖41A】


CD8 T細胞之%
40
30
20
10
0
IL-12
對照

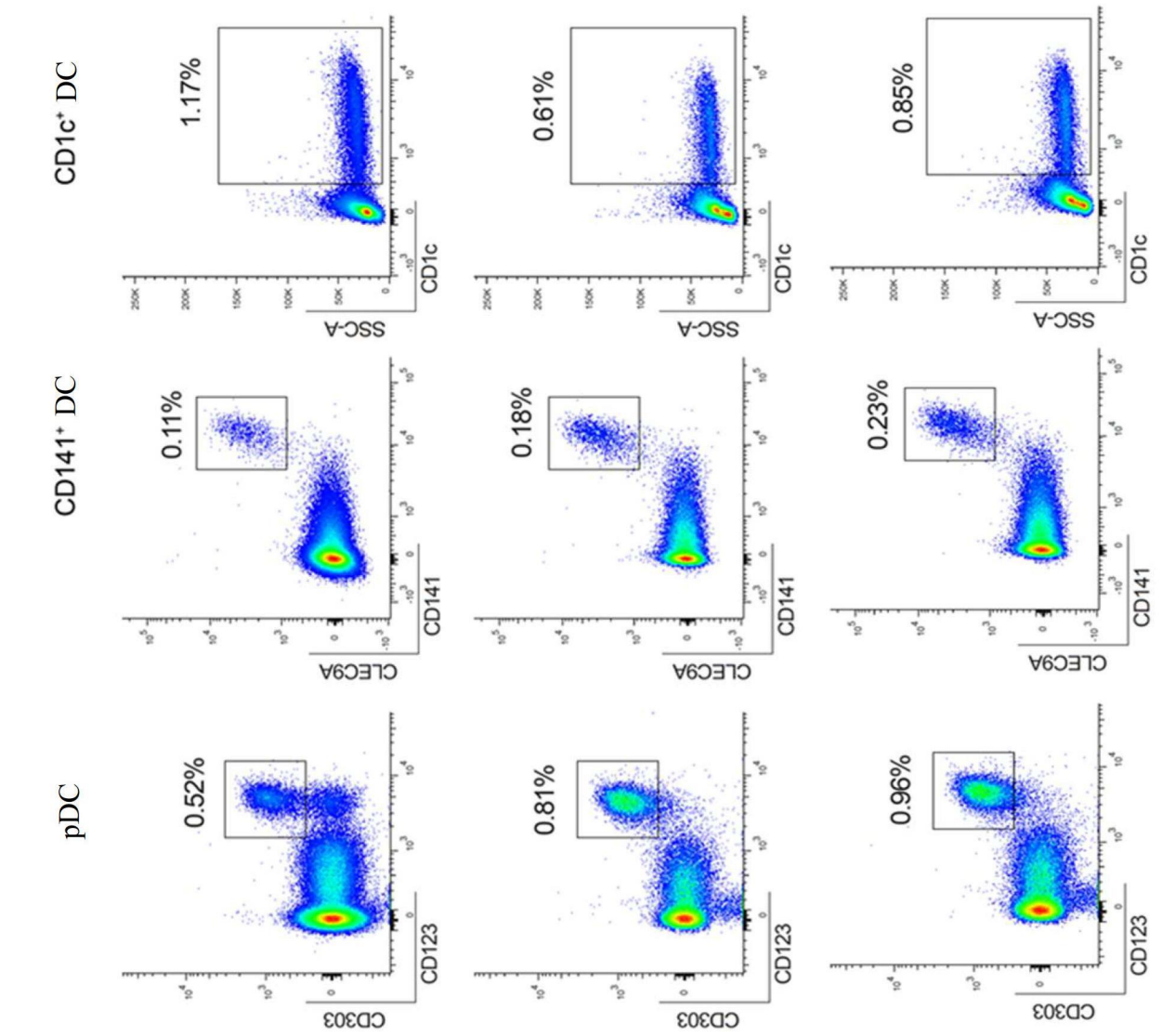
【圖42B】


多聚體頻率
(CD8之%)
1.5
1.0
0.5
0.0
低免疫原性
高免疫原性
IL-12
對照

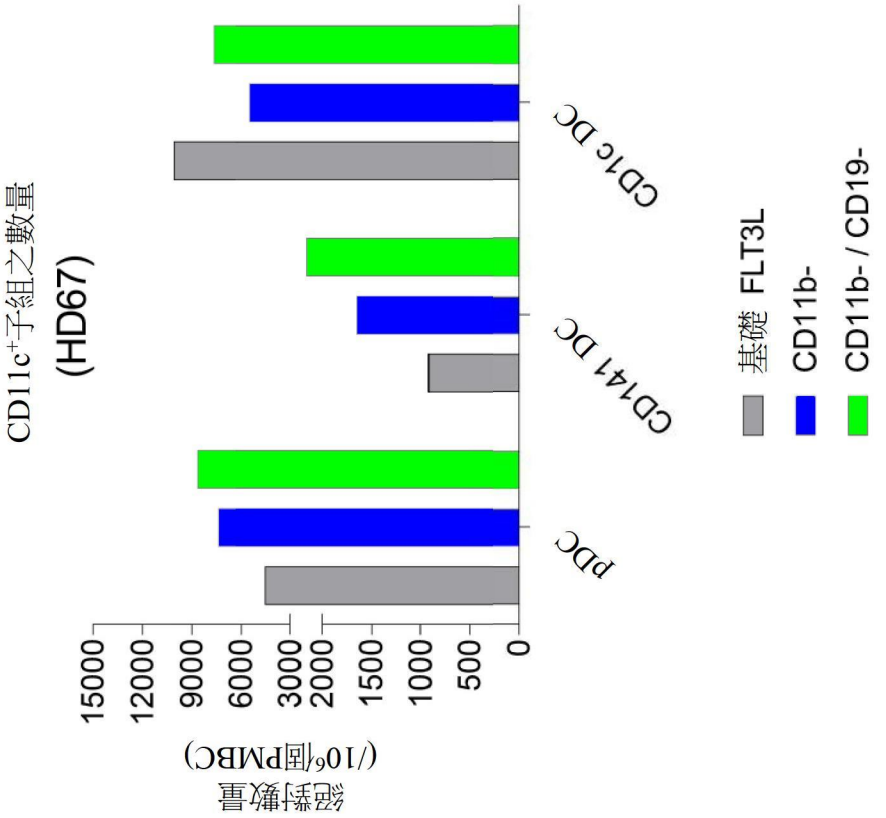
【圖42A】

幼稚CD8 T細胞引發
(高免疫原性肽)
命中率百分比
(供體間平均值)
0
20
40
60
80
***
載體 Flt3L
CD11b
CD11c
CD11b/CD11c
幼稚CD8 T細胞引發
(低免疫原性肽)
命中率百分比
(供體間平均值)
0
10
20
30
40
載體 Flt3L
CD11b
CD11c
CD11b/CD11c
抗原特異性細胞之數量
(Mart-1 肽)
絕對數量(×10⁶)
0
1
2
3
4
**
**
載體 Flt3L
CD11b
CD11c
CD11b/CD11c
抗原特異性細胞之數量
(高及低免疫原性肽)
絕對數量(×10⁶)
0.00
0.02
0.04
0.06
載體 Flt3L
CD11b
CD11c
CD11b/CD11c

【圖43】


預選通：CD3⁻, CD19⁻
頻率：活細胞
pDC
CD141⁺ DC
CD1c⁺ DC
14/25 耗竭
14/25 耗竭 + CD11b 耗竭
14/25 耗竭 + CD11b 及 CD19 耗竭
0.52%
0.11%
1.17%
0.81%
0.18%
0.61%
0.96%
0.23%
0.85%
CD303
CD123
CLEC9A
CD141
SSC-A
CD1c

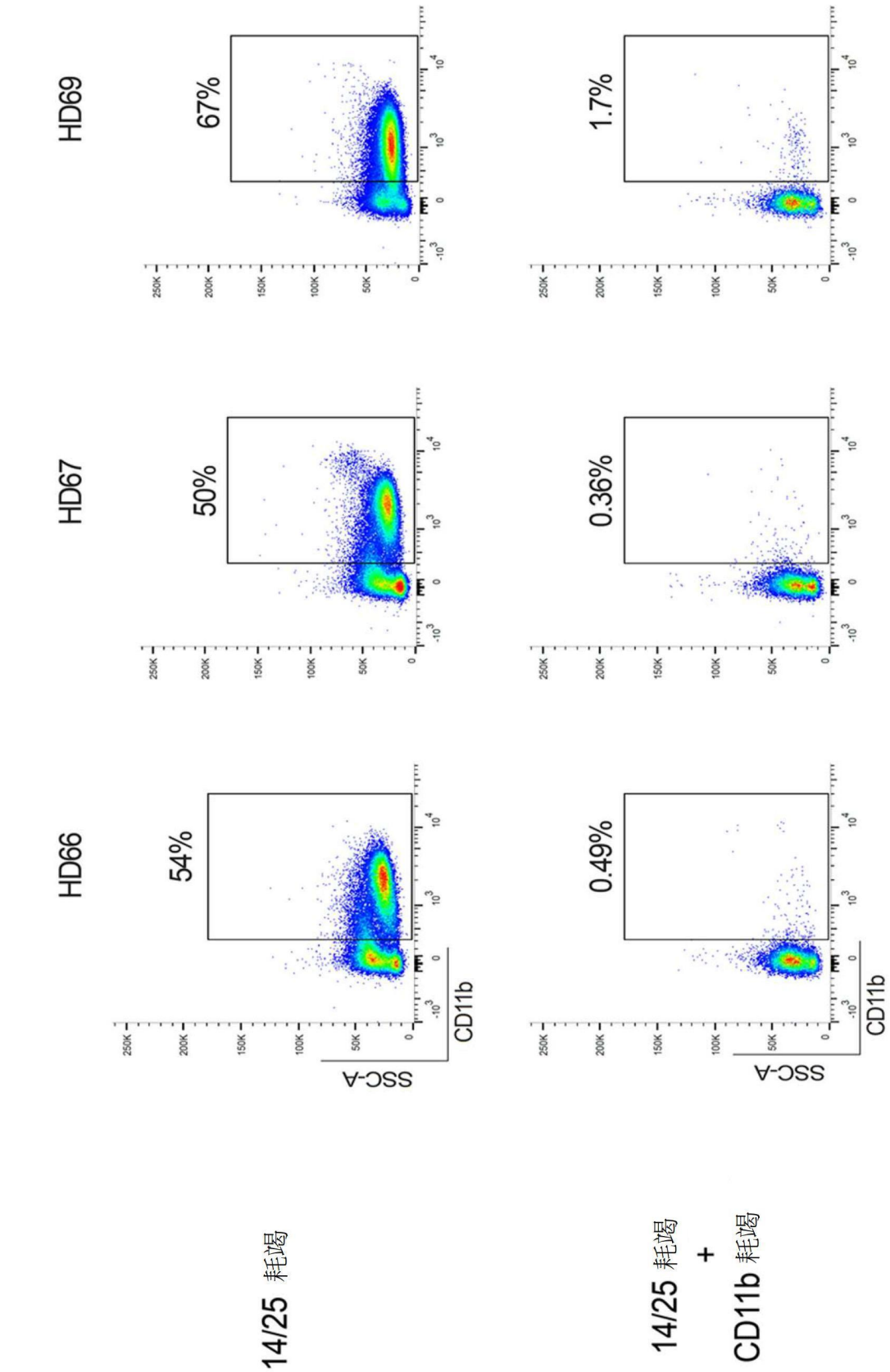
【圖44A】


CD11c+子組之數量
(HD67)
絕對數量
(/10⁶個PMBC)
15000
12000
9000
6000
3000
2000
1500
1000
500
0
pDC
CD141 DC
CD1c DC
基礎 FLT3L
CD11b-
CD11b- / CD19-

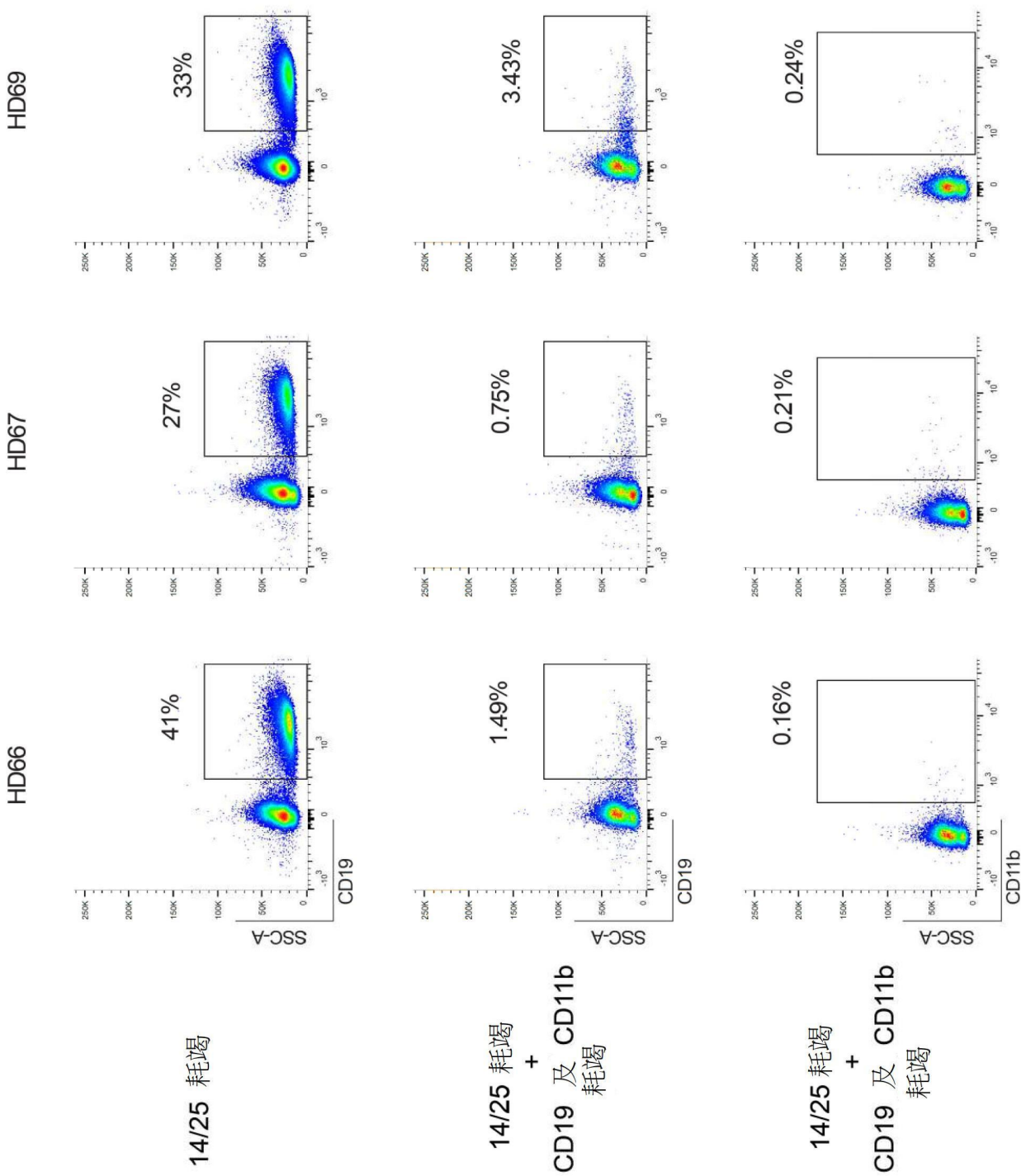
【圖44B】

T細胞：pDC比率
(/10⁶個PMBC)
0
20
40
60
80
漿胚 FLT3L
CD11b-
CD11b-/CD19-
T細胞：CD141⁺ DC比率
(/10⁶個PMBC)
0
100
200
300
400
T細胞：CD1c⁺ DC比率
(/10⁶個PMBC)
0
20
40
60
80
T細胞：樊細胞樣DC比率
(HD67)
T 細胞：CD141⁺ DC 比率
(HD67)
T 細胞：CD1c⁺ DC 比率
(HD67)
CD8 T細胞之數量
(HD67)
絕對數量
(/10⁶個PMBC)
0
100000
200000
300000
400000
500000

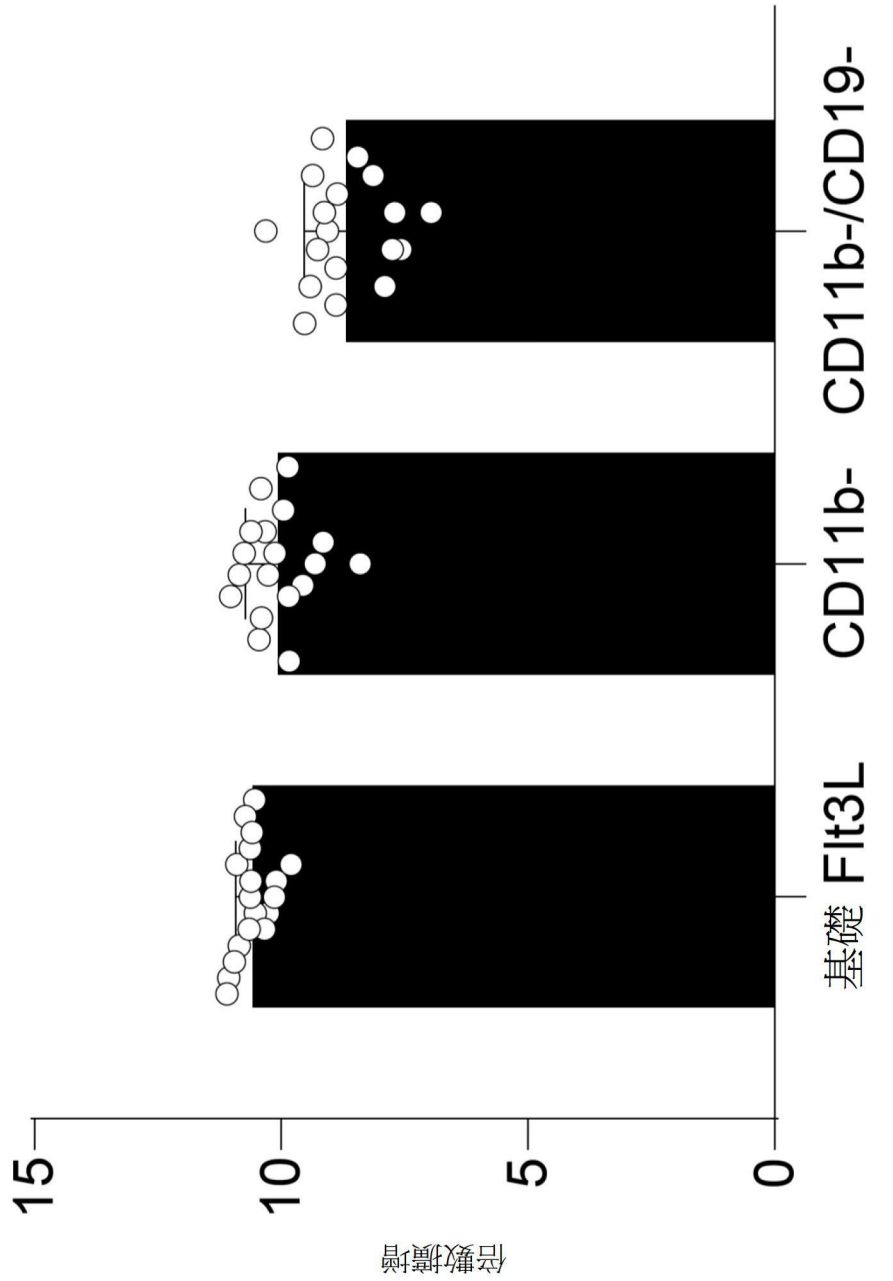
【圖45】


HD66
HD67
HD69
54%
50%
67%
0.49%
0.36%
1.7%
SSC-A
CD11b
14/25 耗竭
14/25 耗竭
+
CD11b 耗竭

【圖46】


HD66
HD67
HD69
41%
27%
33%
1.49%
0.75%
3.43%
0.16%
0.21%
0.24%
SSC-A
CD19
CD11b
14/25 耗竭
14/25 耗竭 + CD19 及 CD11b 耗竭

【圖47】



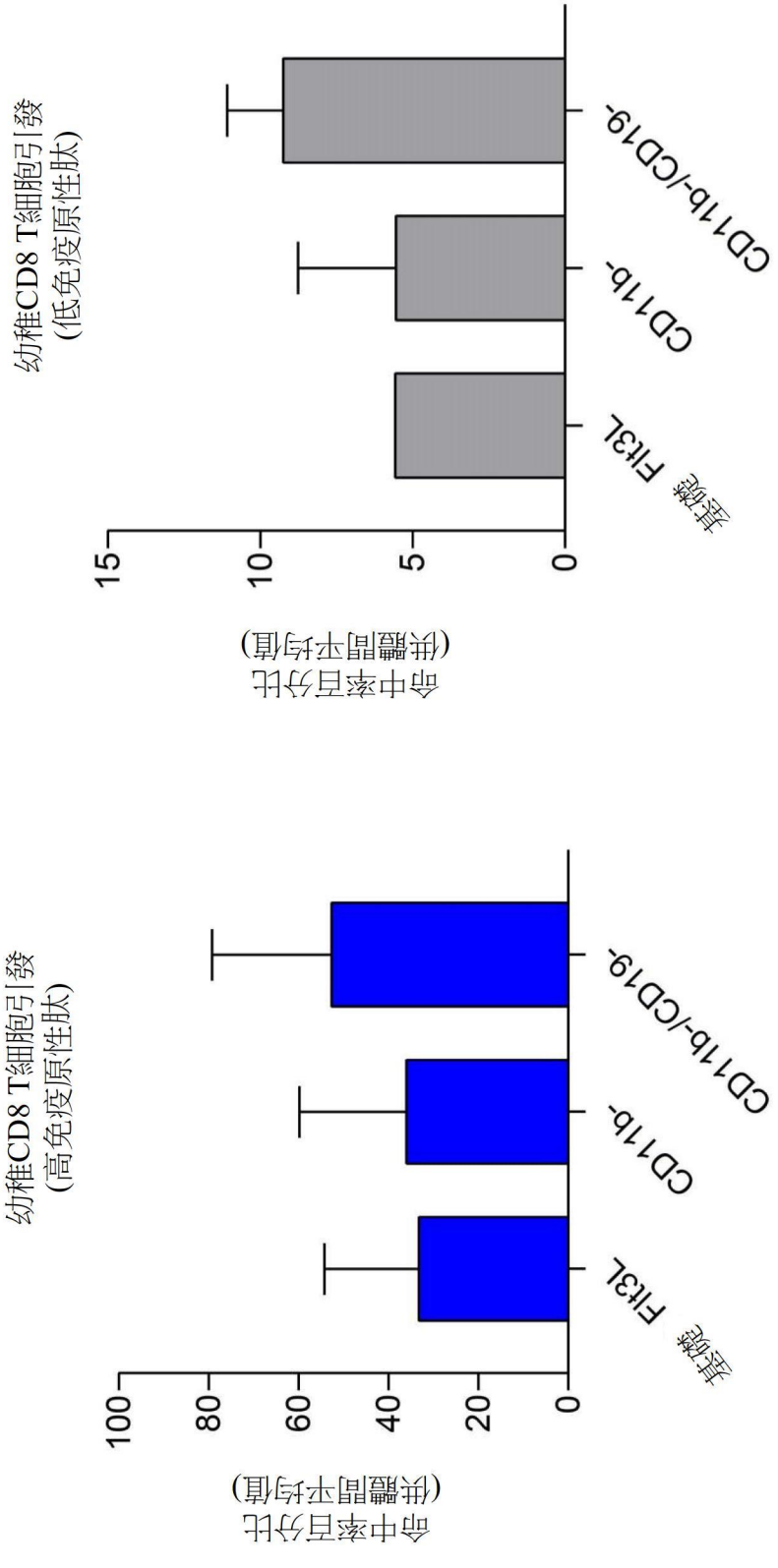
【圖48】

肽 A				1/6
肽 B	2/6	2/6	5/6	
ACTN4	1/6			
HIV3		1/6	2/6	
CSNK1A1				
	FLT3L ctrl	CD11b-	11b-/19-	
	HD66			

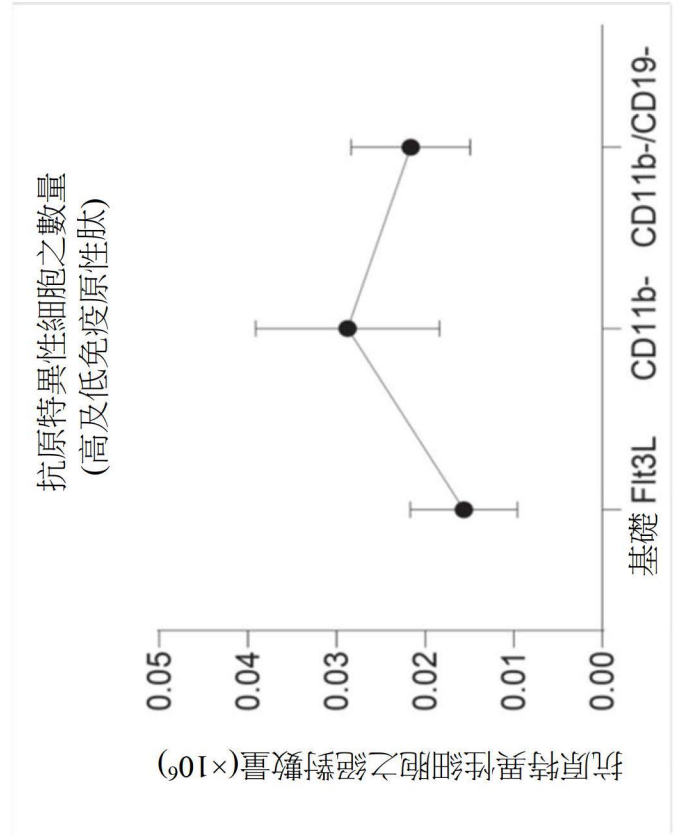
肽 A	5/6	5/6	6/6	
肽 B	4/6	5/6	6/6	
ACTN4				
HIV3		2/6	2/6	
CSNK1A1	1/6			
	FLT3L ctrl	CD11b-	11b-/19-	
	HD67			

肽 A	1/6			
肽 B		1/6	1/6	
ACTN4	1/6			
HIV3				
CSNK1A1			1/6	
	FLT3L ctrl	CD11b-	11b-/19-	
	HD69			

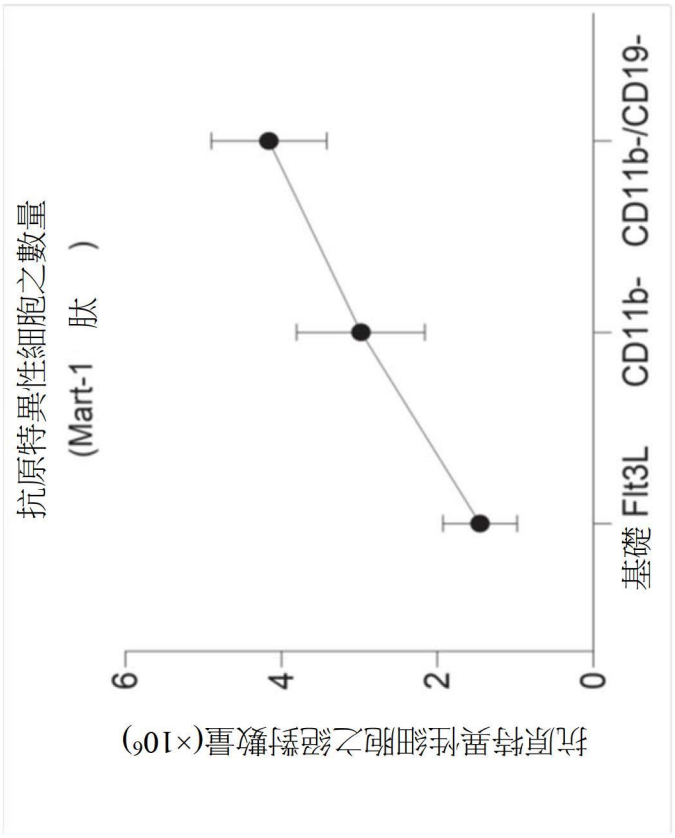
【圖49A】

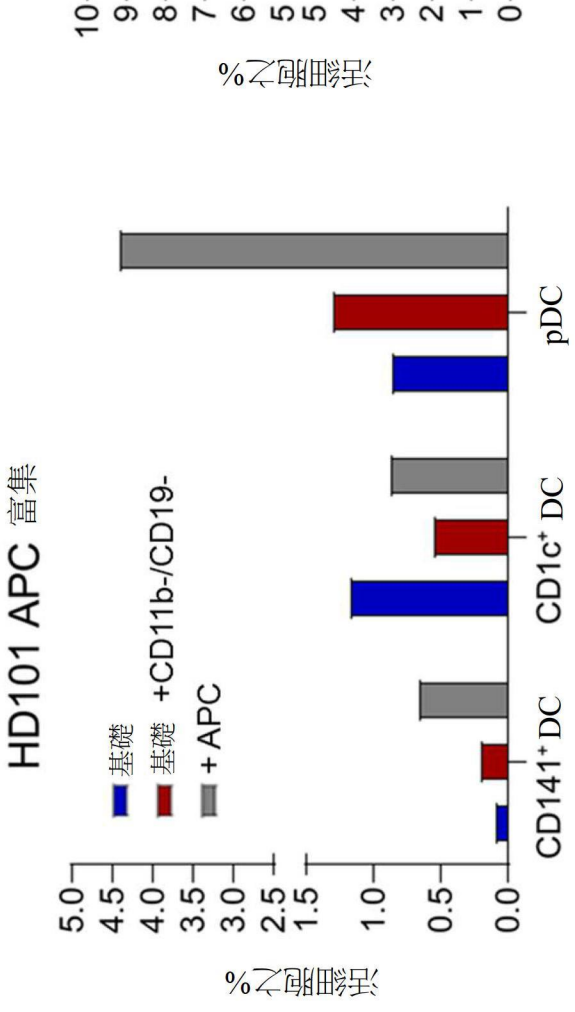

幼稚CD8 T細胞引發
(低免疫原性肽)
命中率百分比
(供體間平均值)
0
5
10
15
無疫苗
Flt3L
CD11b-
CD11b-/CD19-
幼稚CD8 T細胞引發
(高免疫原性肽)
命中率百分比
(供體間平均值)
0
20
40
60
80
100
無疫苗
Flt3L
CD11b-
CD11b-/CD19-

【圖49B】

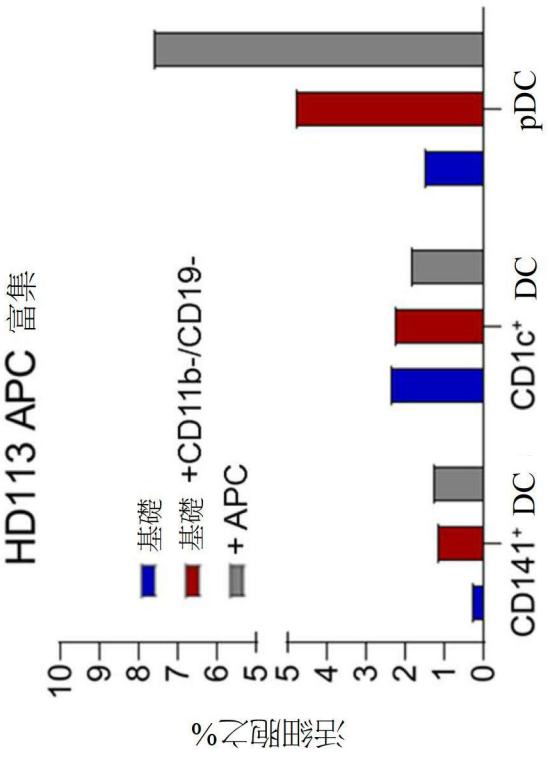

抗原特異性細胞之數量
(高及低免疫原性肽)
抗原特異性細胞之絕對數量(×10⁶)
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
基礎
Flt3L
CD11b-
CD11b-/CD19-

【圖50】

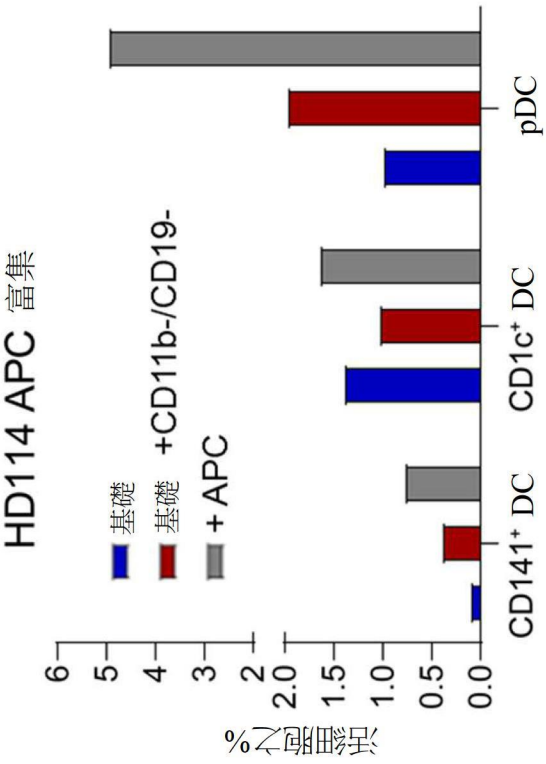

抗原特異性細胞之數量
(Mart-1 肽)
抗原特異性細胞之絕對數量(×10⁶)
6
4
2
0
基礎
Flt3L
CD11b-
CD11b-/CD19-



【圖51A】



【圖51B】



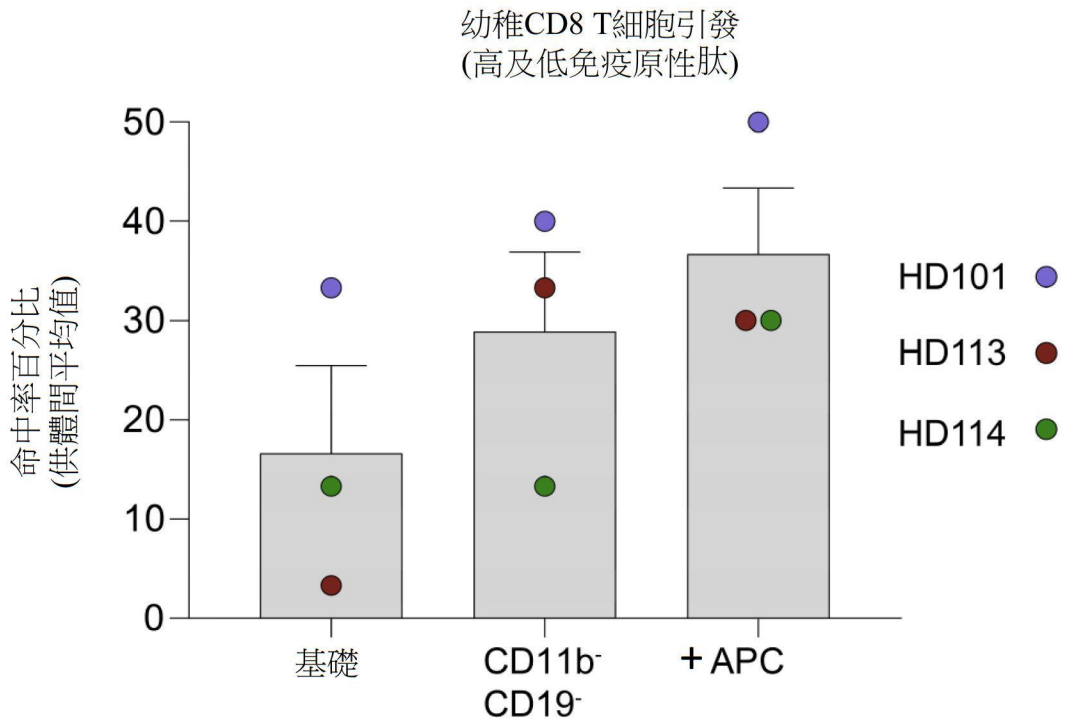
【圖51C】

肽 A	4/6	6/6	5/6
肽 B	3/6	4/6	5/6
ACTN4	2/6		
HIV3		2/6	2/6
CSNK1A1	1/6		3/6
	基礎	CD11b-CD19-	APC
	HD101		

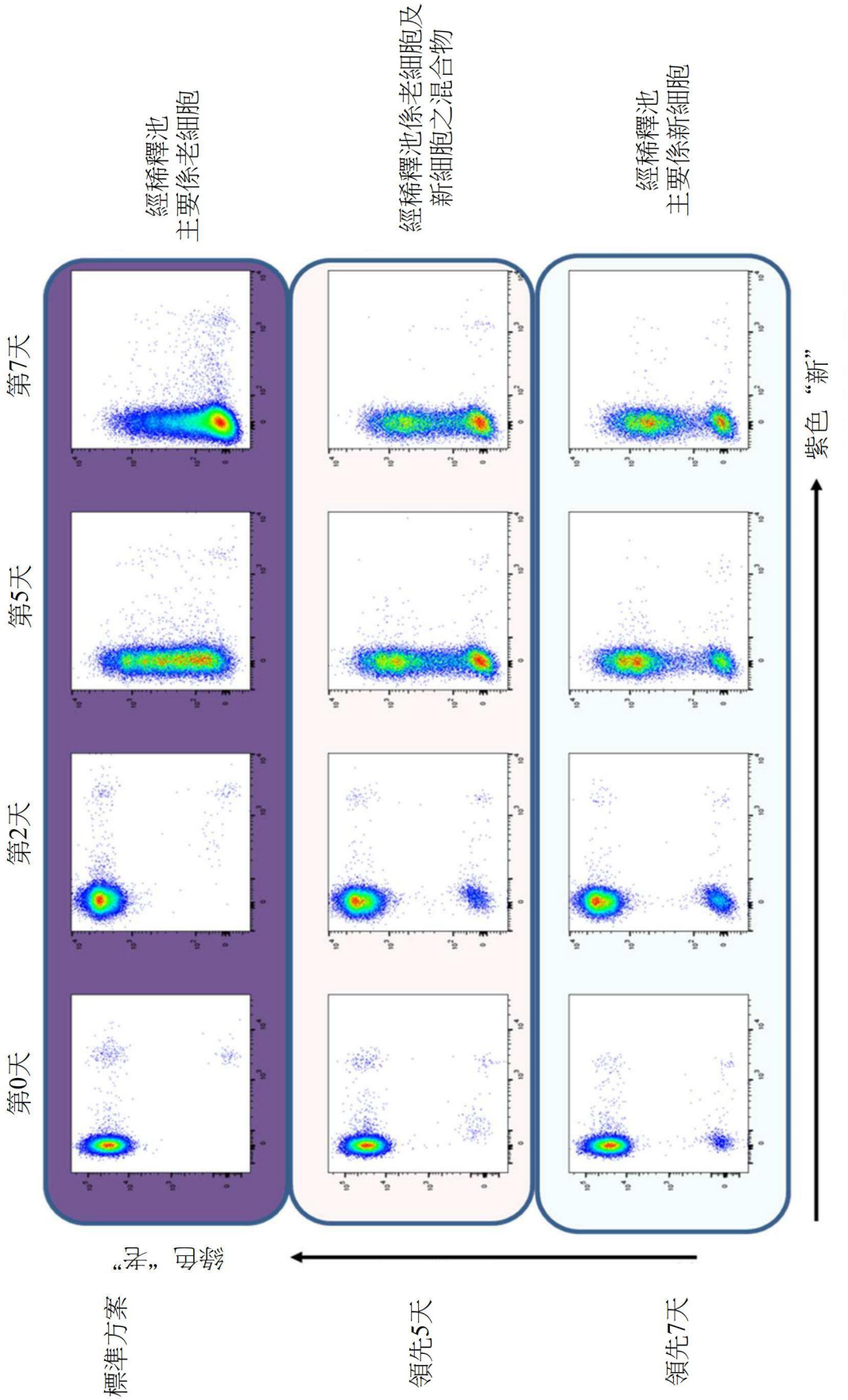
肽 A		3/6	3/6
肽 B		3/6	4/6
ACTN4			1/6
HIV3		1/6	
CSNK1A1	1/6	3/6	1/6
	基礎	CD11b-CD19-	APC
	HD113		

肽 A	1/6	1/6	3/6
肽 B	1/6	2/6	3/6
ACTN4			2/6
HIV3			
CSNK1A1	2/6	1/6	1/6
	基礎	CD11b-CD19-	APC
	HD114		

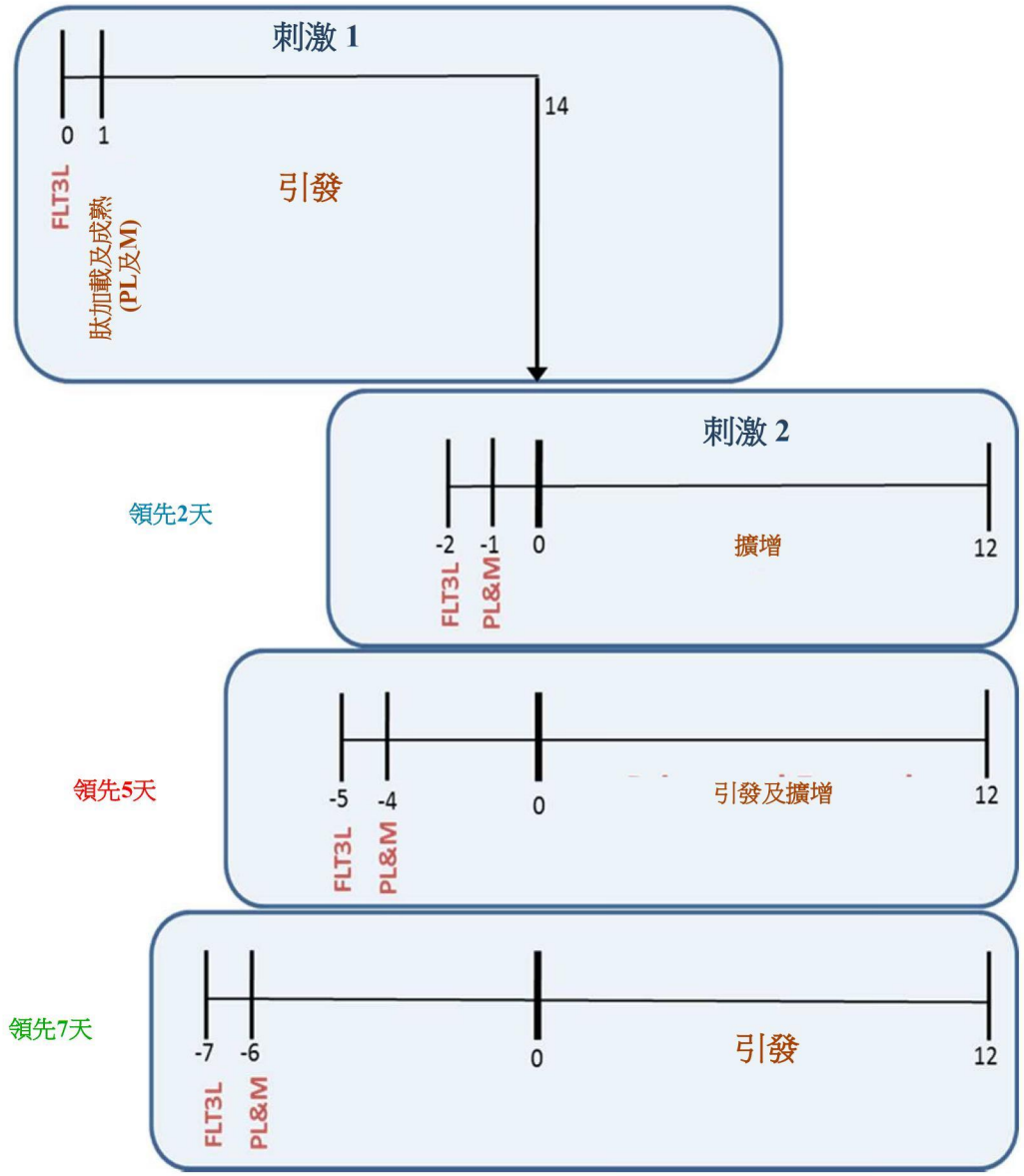
【圖51D】



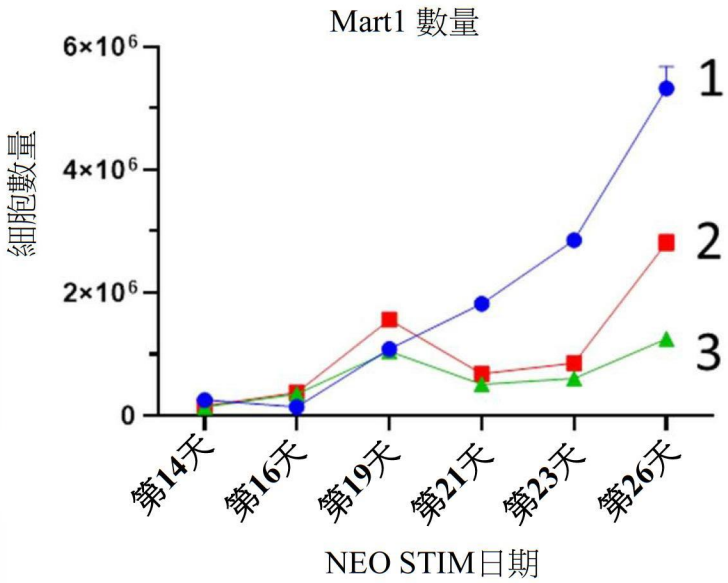
【圖51E】


經稀釋池
主要係老細胞
經稀釋池係老細胞及
新細胞之混合物
經稀釋池
主要係新細胞
第0天
第2天
第5天
第7天
綠色 “本”
紫色 “新”
標準方案
領先5天
領先7天

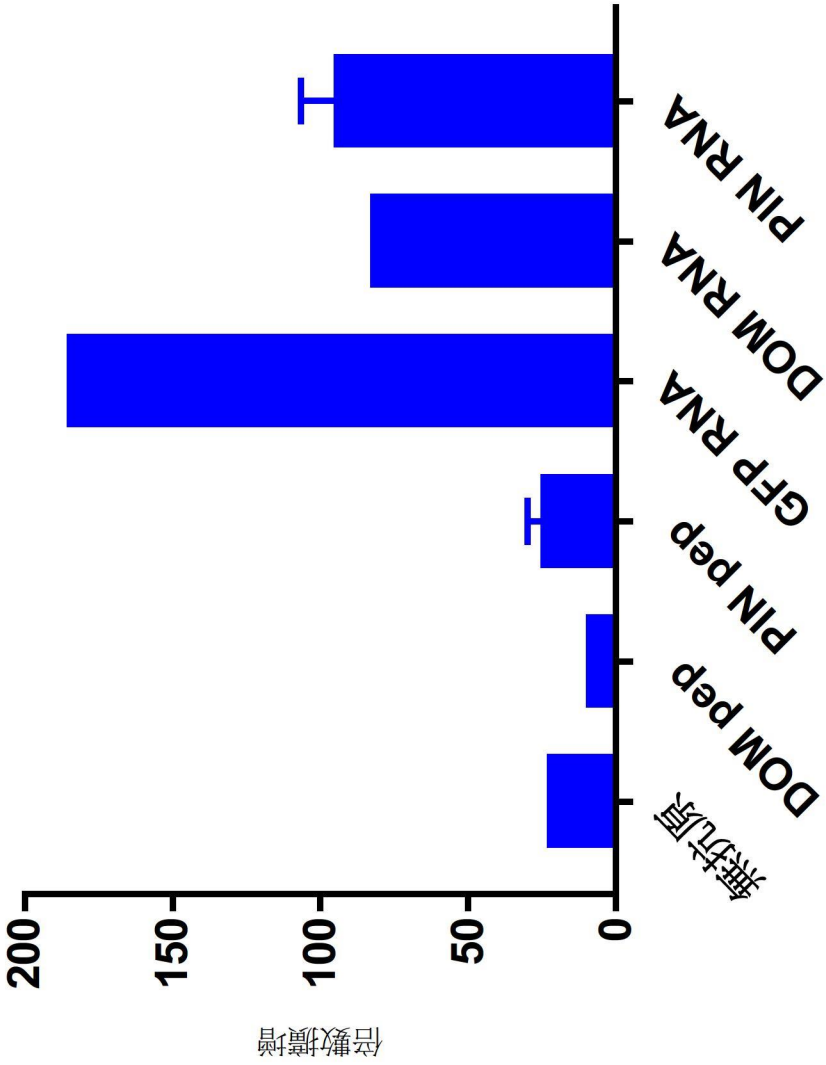
【圖52A】


刺激 1
0
1
14
FLT3L
肽加載及成熟
(PL及M)
引發
刺激 2
領先2天
-2
-1
0
12
FLT3L
PL&M
擴增
領先5天
-5
-4
0
12
FLT3L
PL&M
引發及擴增
領先7天
-7
-6
0
12
FLT3L
PL&M
引發

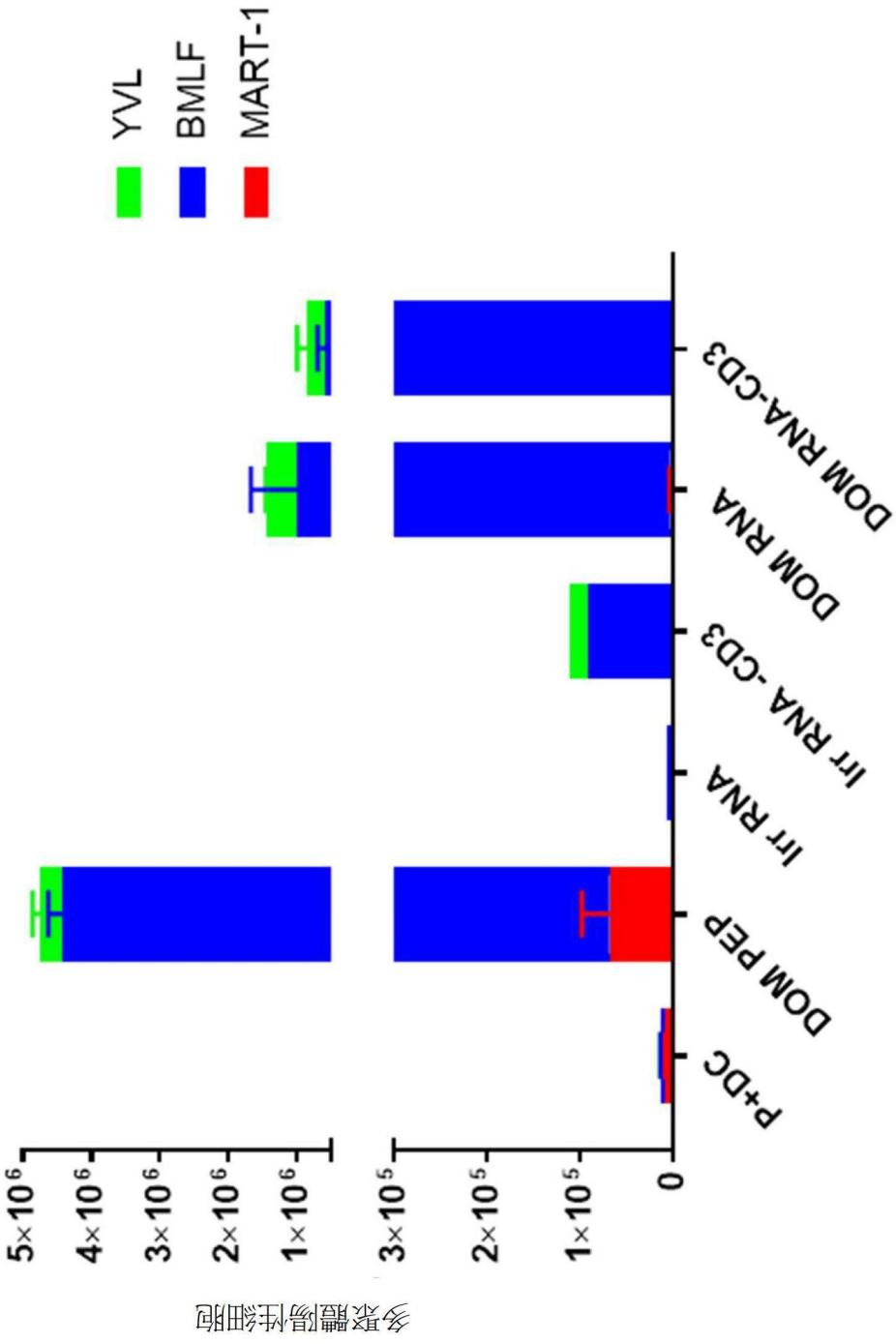
【圖52B】


Mart1 數量
細胞數量
6×10⁶
4×10⁶
2×10⁶
0
1
2
3
第14天
第16天
第19天
第21天
第23天
第26天
NEO STIM日期

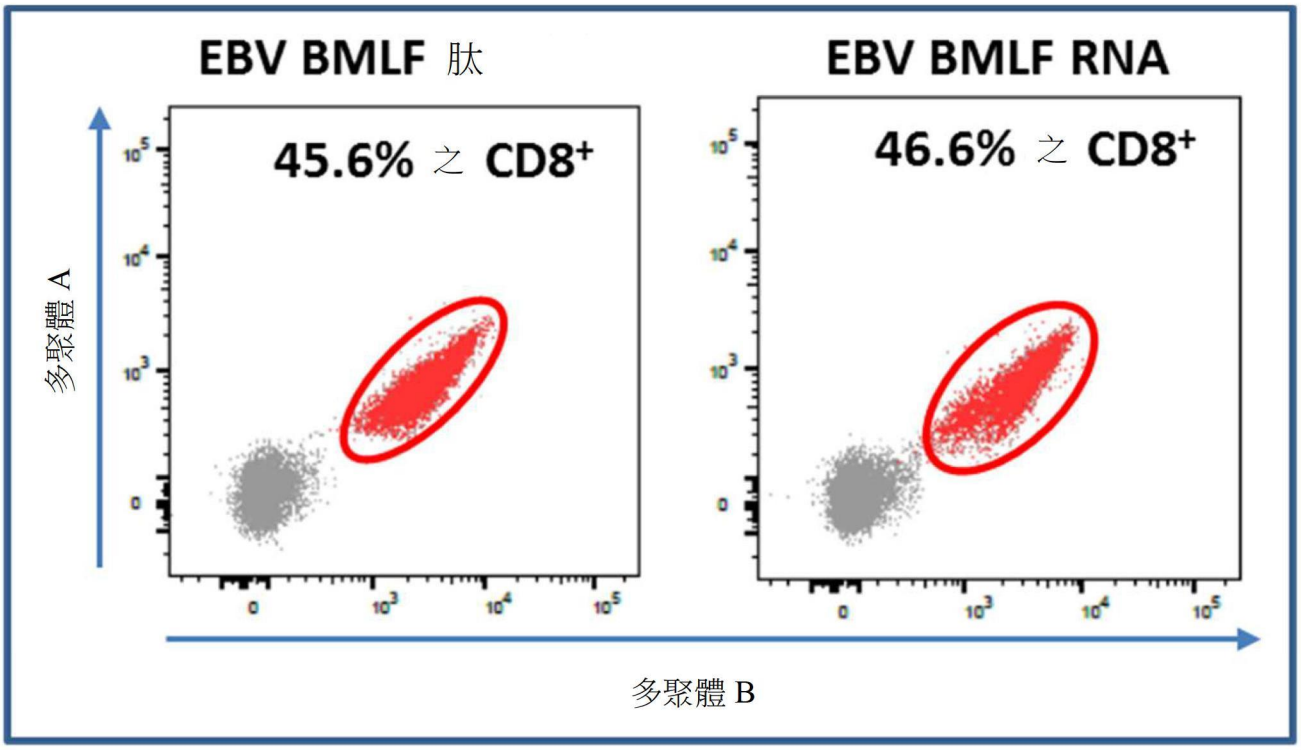
【圖52C】

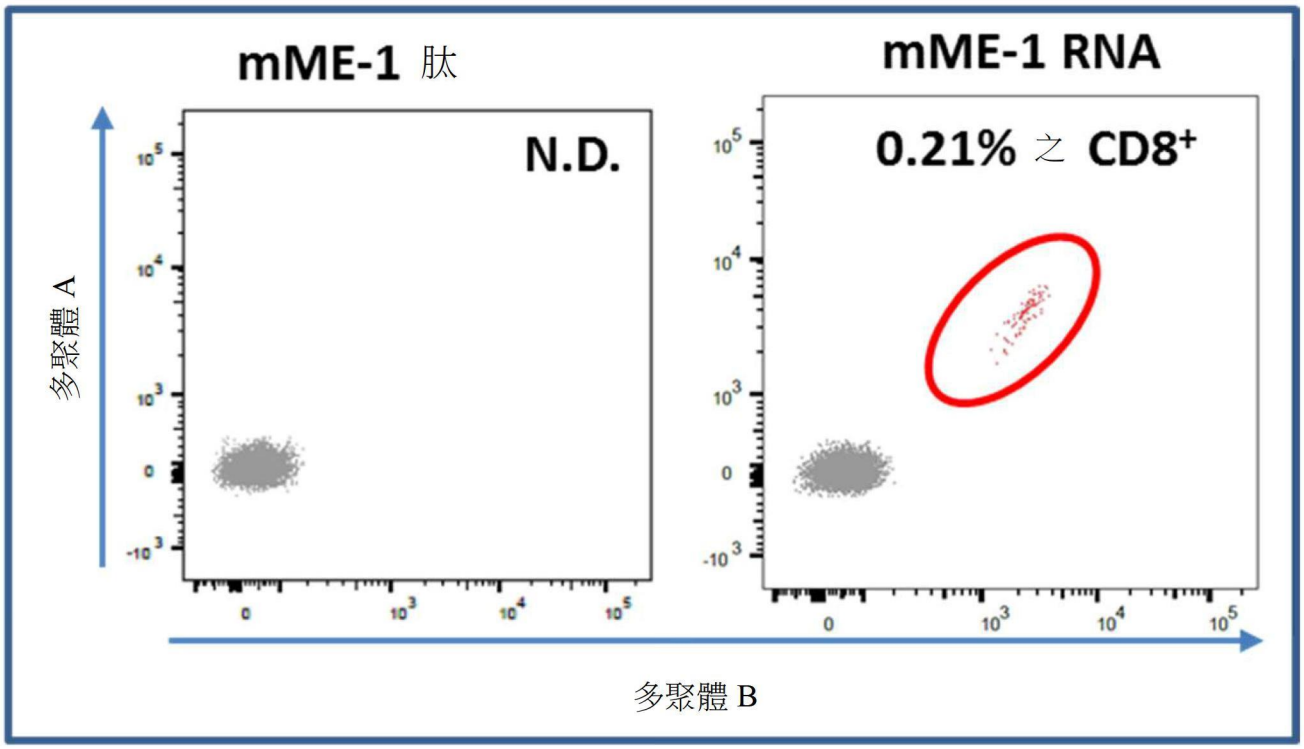


【圖53】


YVL
BMLF
MART-1
5×10^6
4×10^6
3×10^6
2×10^6
1×10^6
3×10^5
2×10^5
1×10^5
0
P+DC
DOM PEP
IFF RNA
IFF RNA -CD3
DOM RNA
DOM RNA-CD3
多聚體陽性細胞

【圖54】

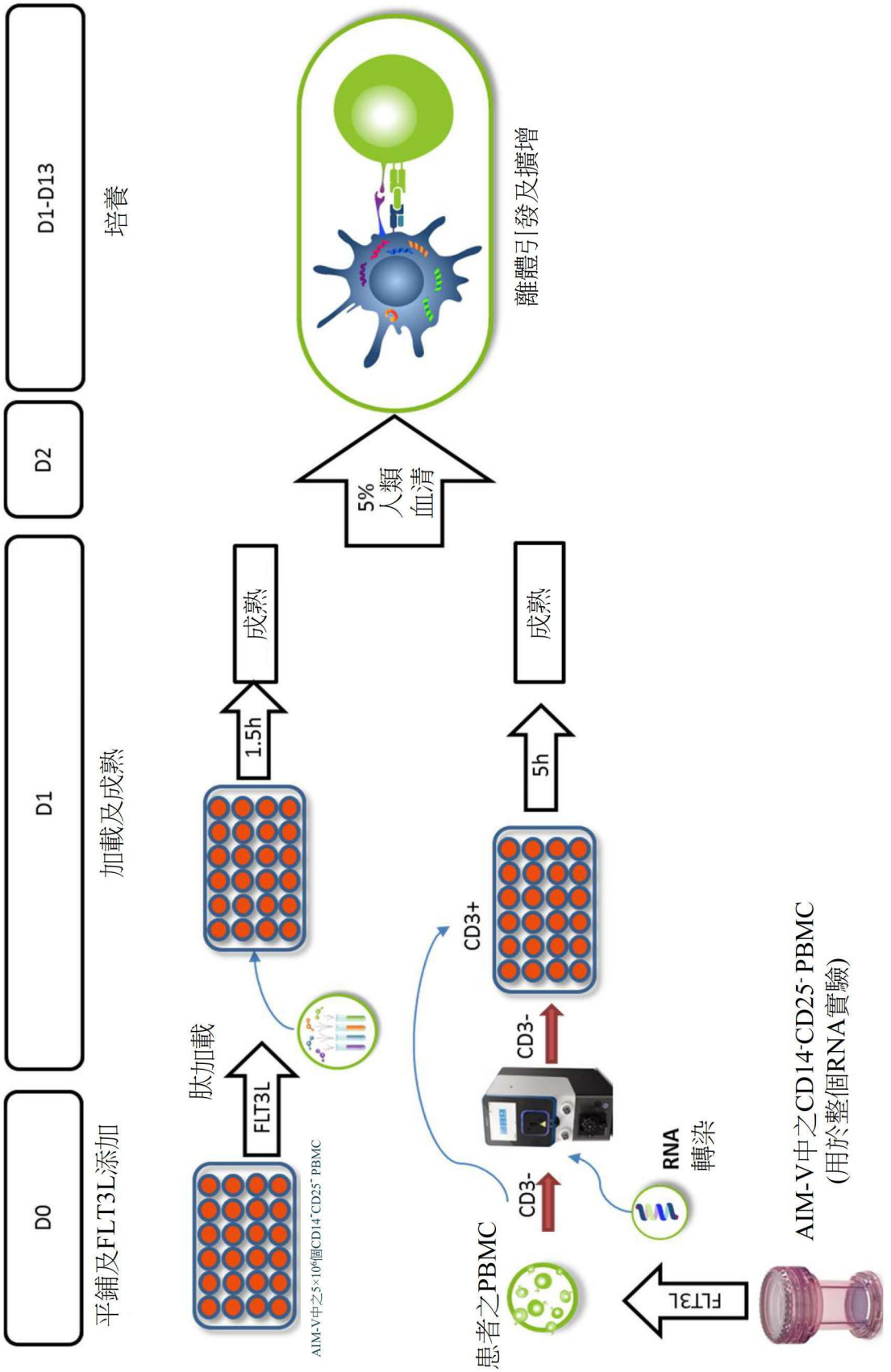

EBV BMLF 肽
45.6% 之 CD8+
EBV BMLF RNA
46.6% 之 CD8+
多聚體 A
多聚體 B


mME-1 肽
N.D.
mME-1 RNA
0.21% 之 CD8+
多聚體 A
多聚體 B

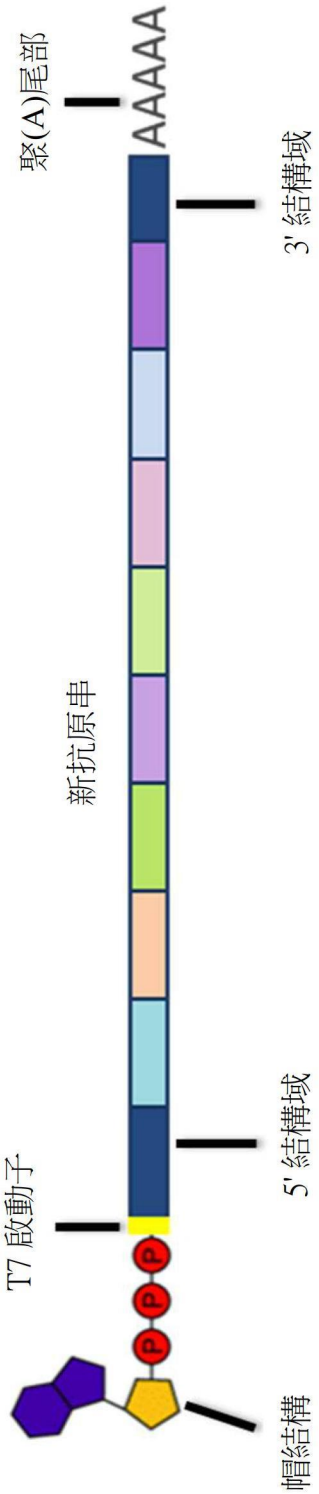
【圖55】

序連之新抗原
AAAAA
聚A尾部
改良表現及
處理之結構域
5’帽
患者特異性新抗原
個人RNA合成
T細胞耗竭
之PBMC
患者之PBMC
向T細胞中再添加APC
離體引發及擴增

【圖56A】


D0
D1
D2
D1-D13
培養
平鋪及FLT3L添加
加載及成熟
肽加載
FLT3L
1.5h
成熟
AIM-V中之5×10⁶個CD14⁻CD25⁻ PBMC
5%
人類
血清
離體引發及擴增
CD3+
CD3-
5h
成熟
CD3-
RNA
轉染
患者之PBMC
FLT3L
AIM-V中之CD14-CD25- PBMC
(用於整個RNA實驗)

【圖56B】


聚(A)尾部
AAAAA
新抗原串
3' 結構域
T7 啟動子
5' 結構域
帽結構

【圖57A】

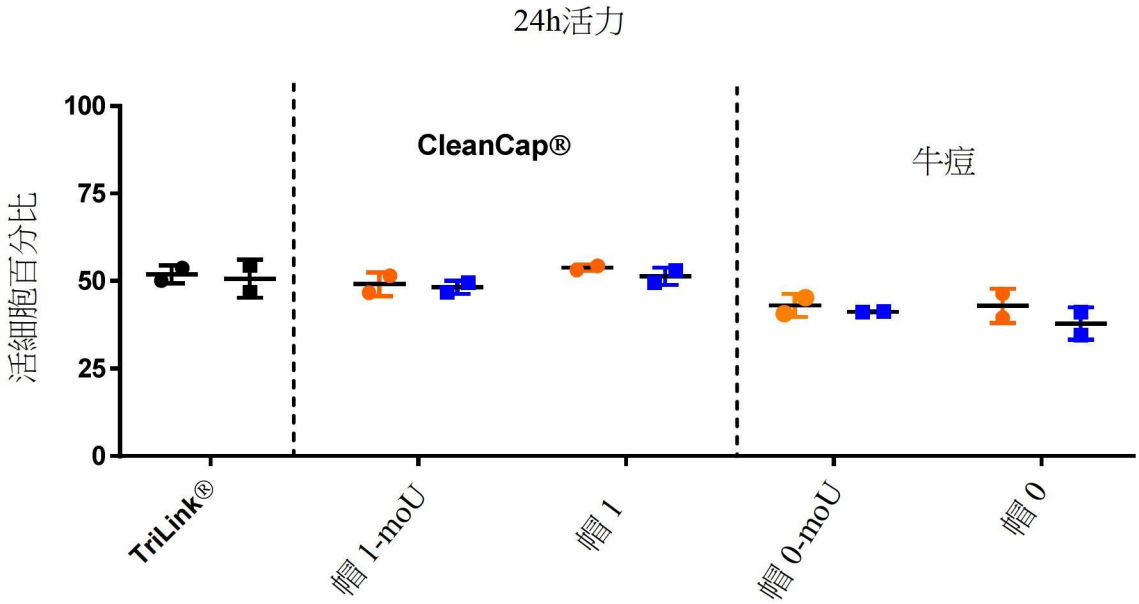

Gli3
K
mACTN4
QLGL
mME-1
mCDK4
K
QLGL
CSNK1A1
HIV-3
K
M

【圖57B】

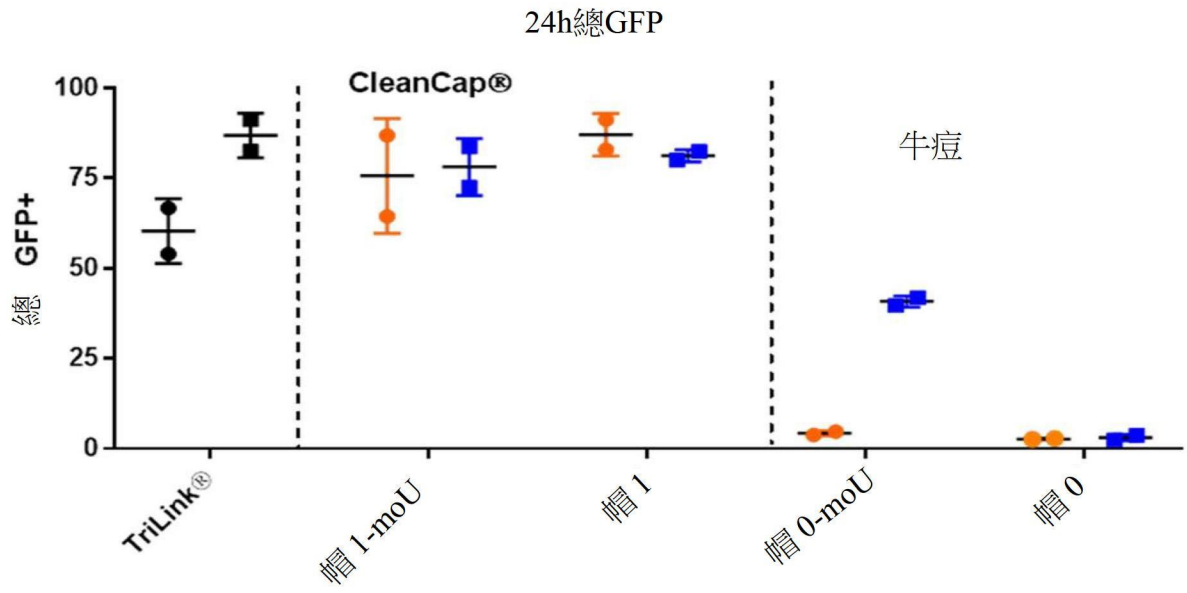
5’ – ACTCACTATAGGNNNNN – 3’

5’ – ACTCACTATAAGGNNNN – 3’

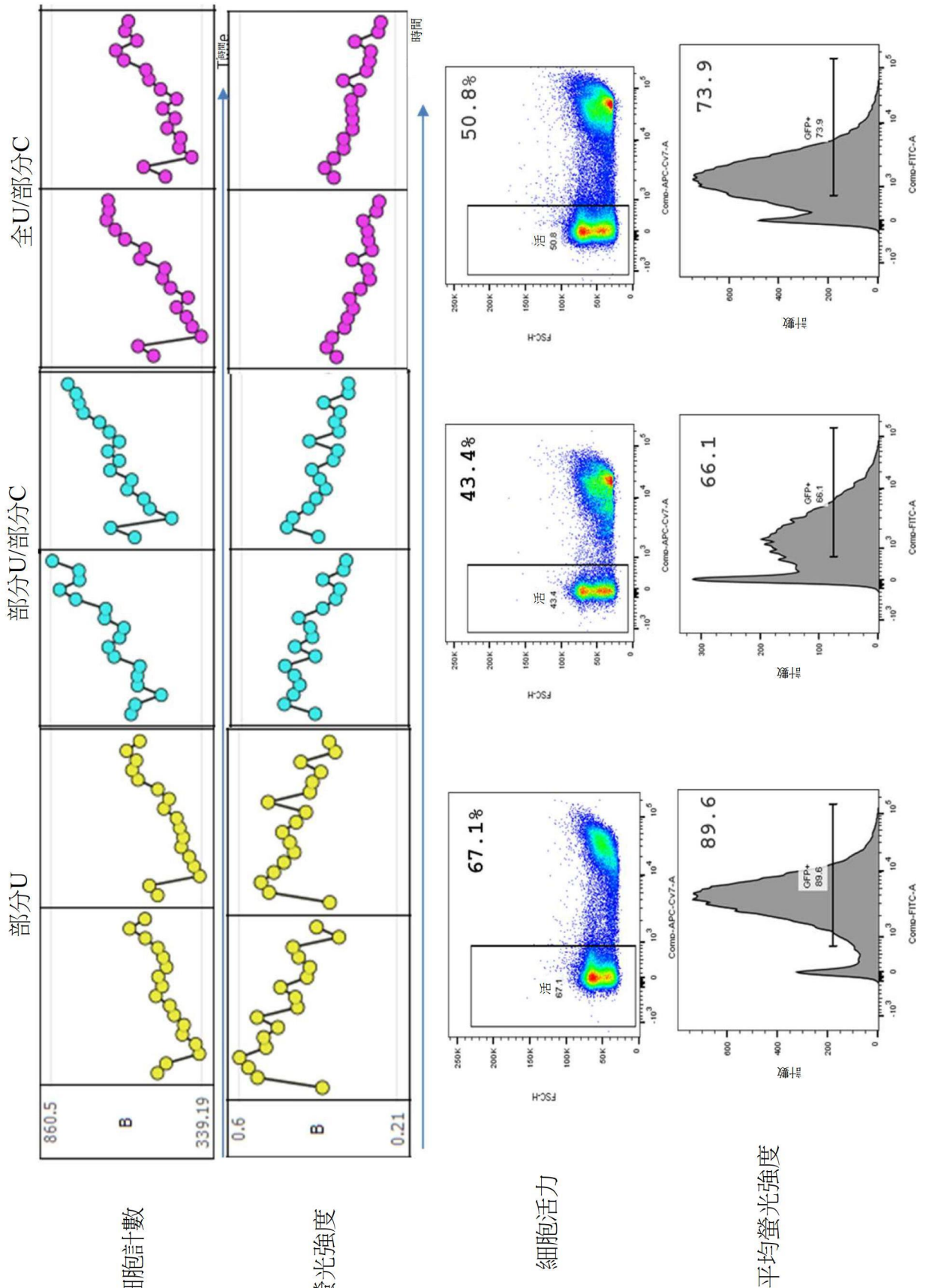
【圖58A】



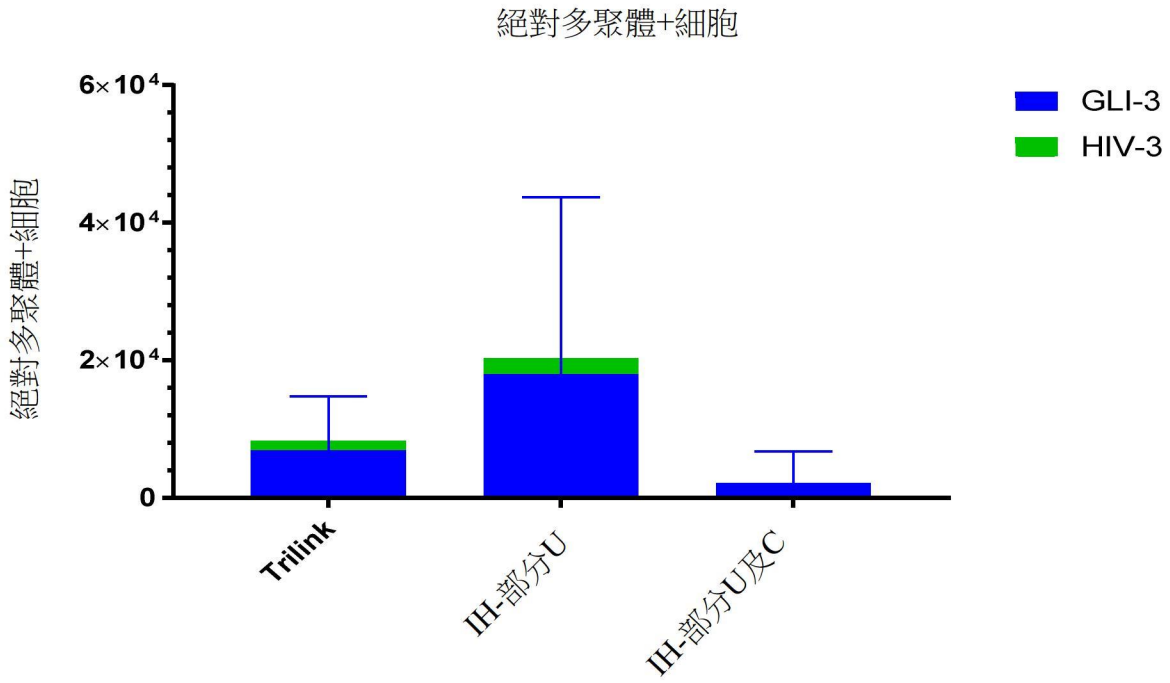
【圖58B】



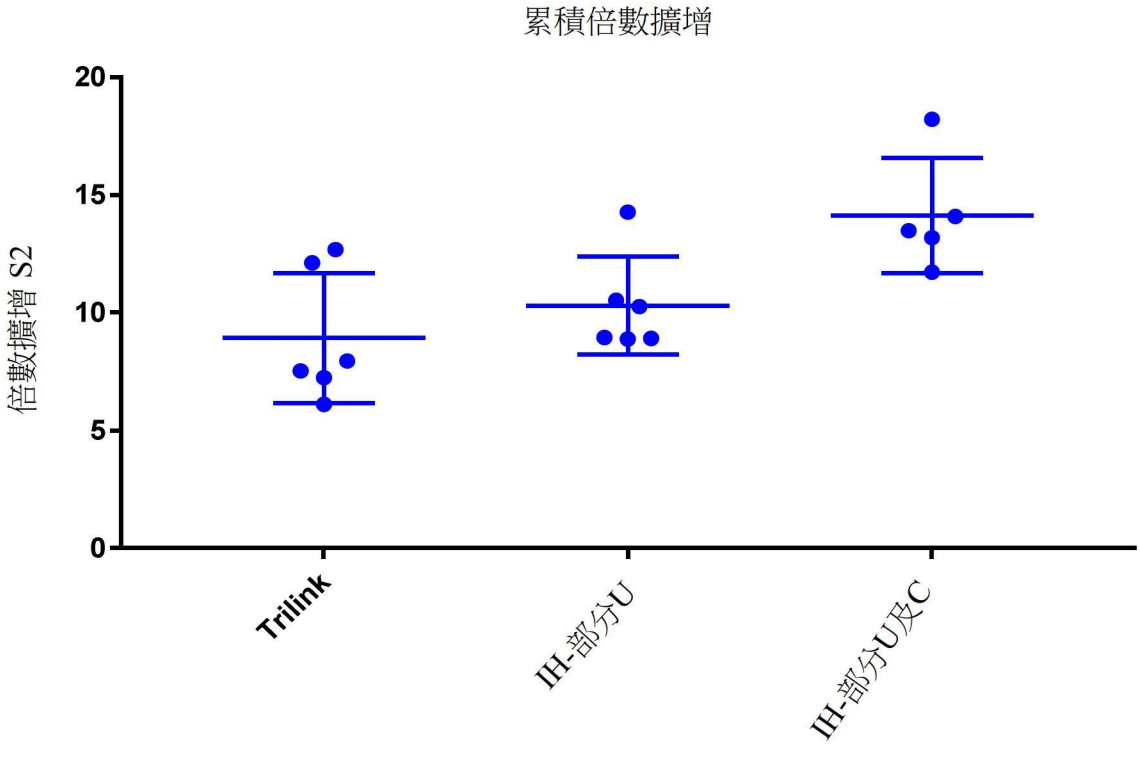
【圖58C】


部分U
部分U/部分C
全U/部分C
平均細胞計數
平均螢光強度
細胞活力
平均螢光強度
860.5
339.19
0.6
0.21
B
時間
67.1%
活
67.1
43.4%
活
43.4
50.8%
活
50.8
89.6
66.1
73.9
GFP+
89.6
GFP+
66.1
GFP+
73.9
FSC-H
Comb-APC-Cy7-A
Comb-FITC-A
計數

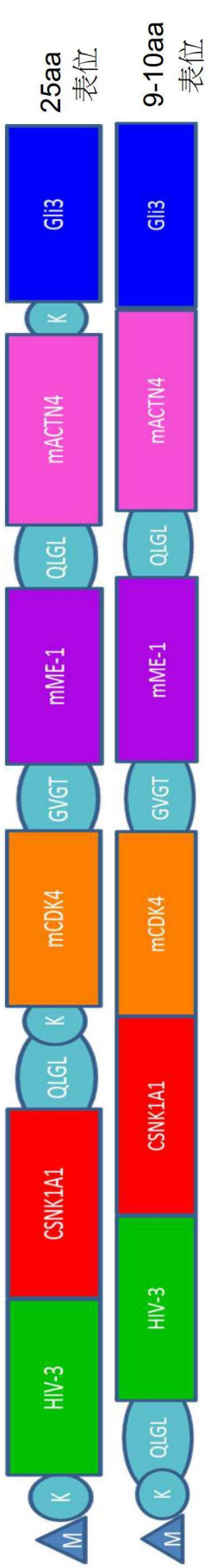
【圖59A】


絕對多聚體+細胞
GLI-3
HIV-3
絕對多聚體+細胞
6×10⁴
4×10⁴
2×10⁴
0
Trilink
IH-部分U
IH-部分U及C

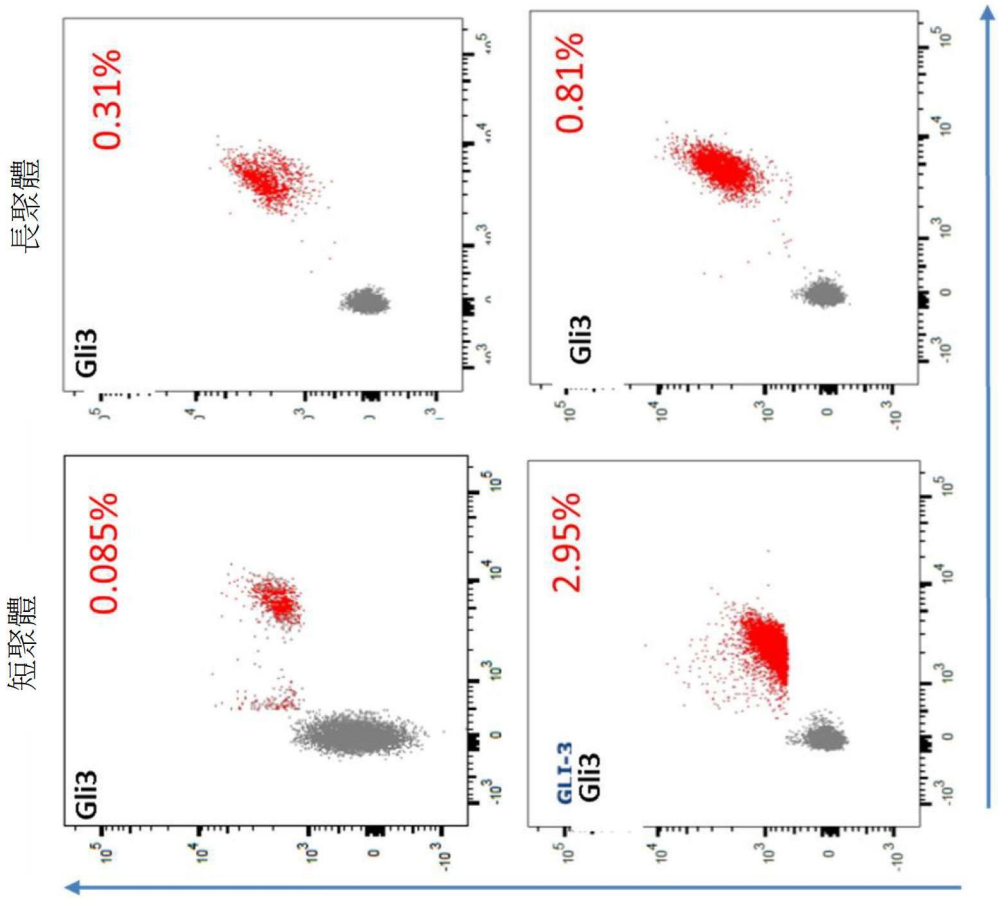
【圖59B】


累積倍數擴增
倍數擴增 S2
20
15
10
5
0
Trilink
IH-部分U
IH-部分U及C

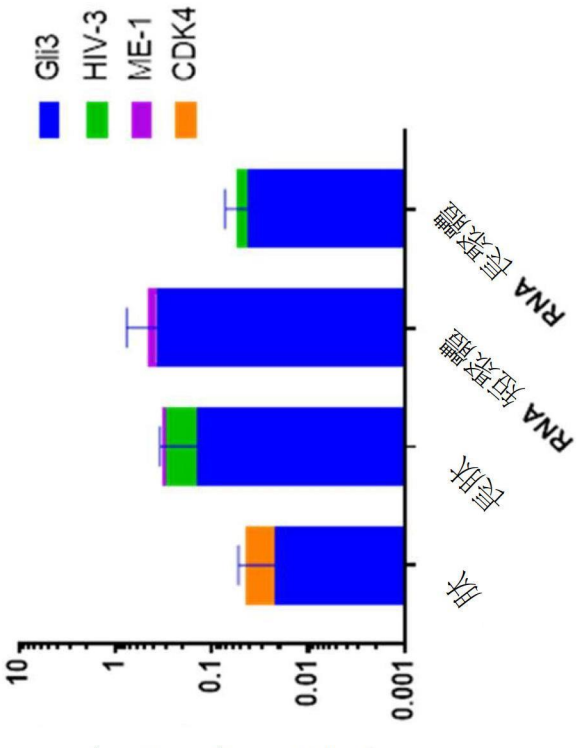
【圖59C】



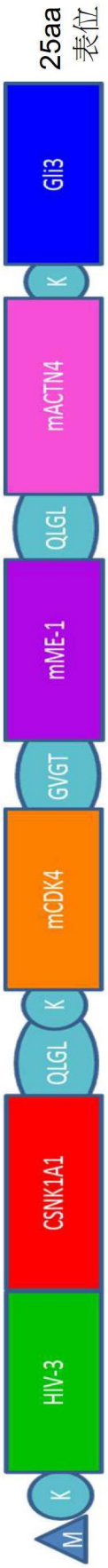
【圖60A】



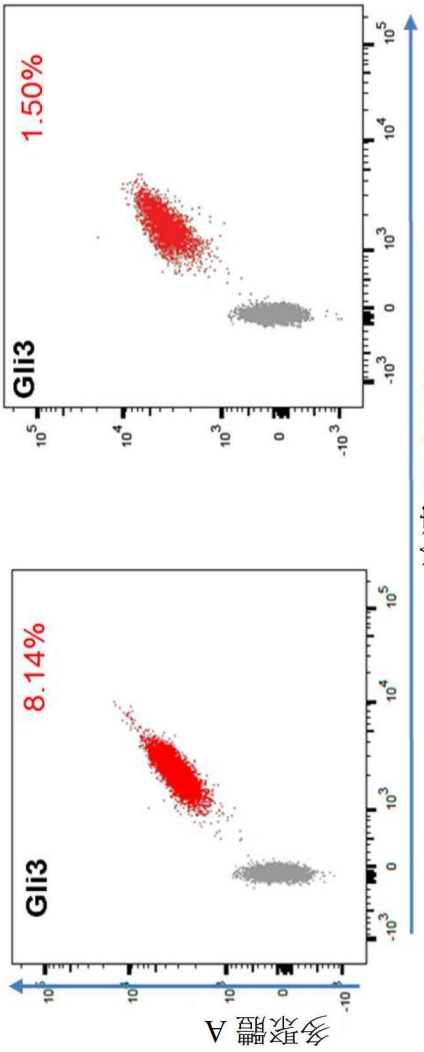
【圖60C】



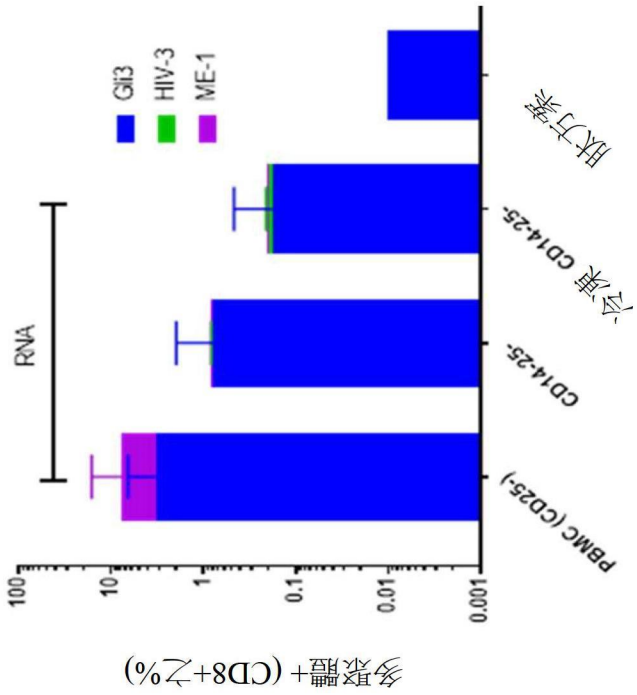
【圖60B】



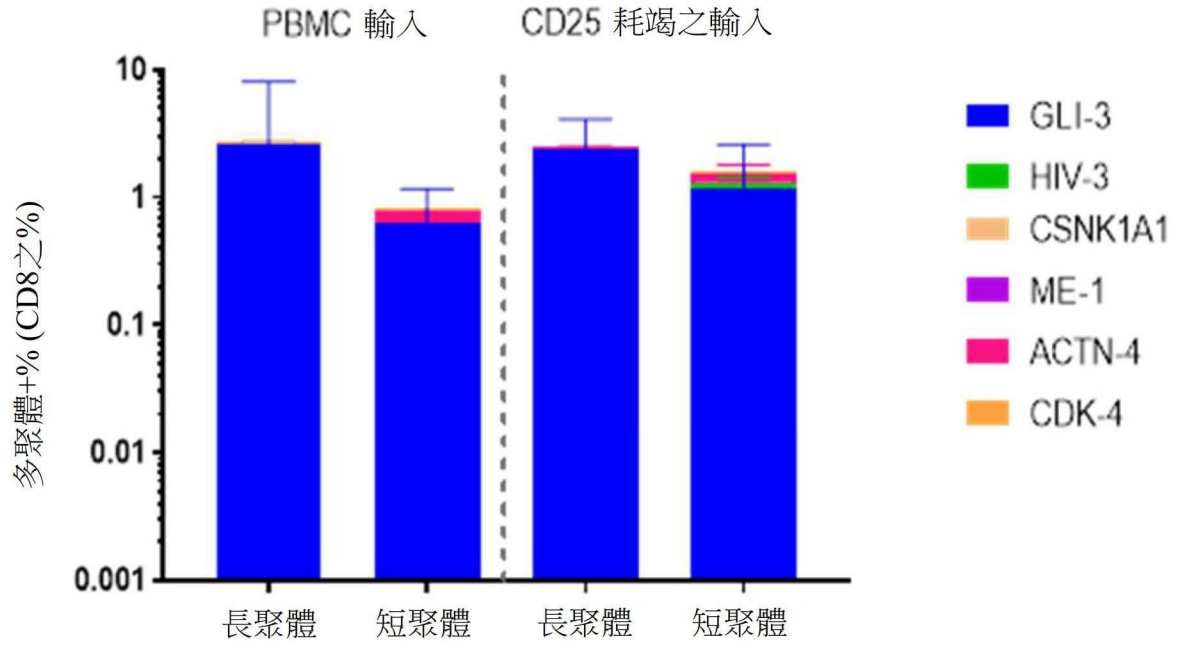
【圖61A】



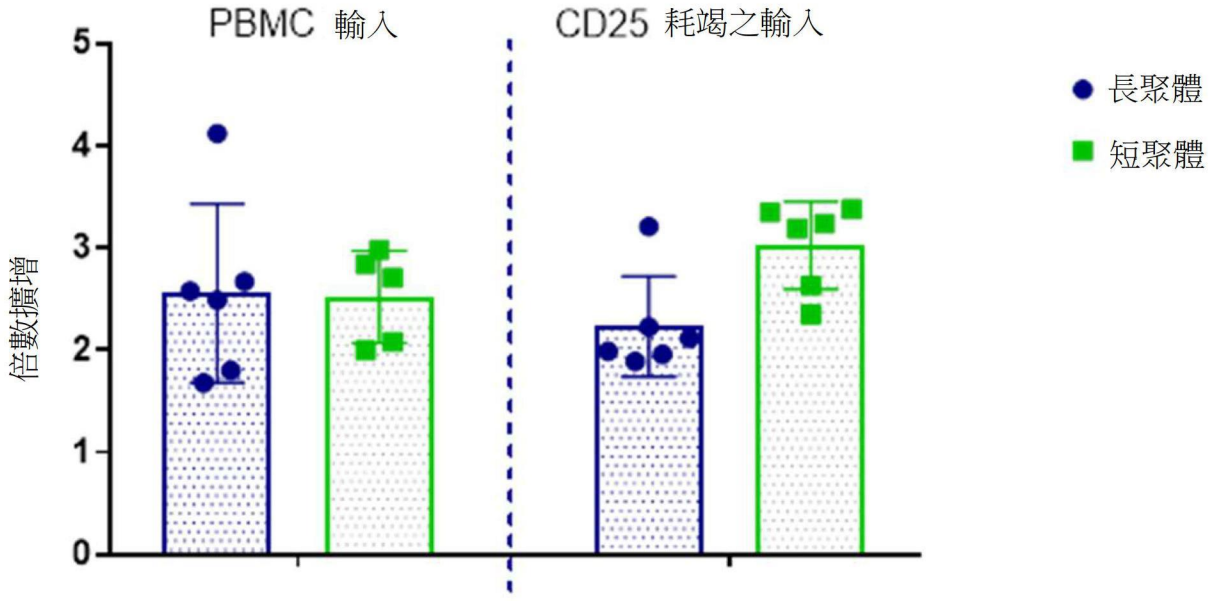
【圖61B】



【圖61C】


PBMC 輸入
CD25 耗竭之輸入
多聚體+% (CD8之%)
10
1
0.1
0.01
0.001
長聚體
短聚體
長聚體
短聚體
GLI-3
HIV-3
CSNK1A1
ME-1
ACTN-4
CDK-4

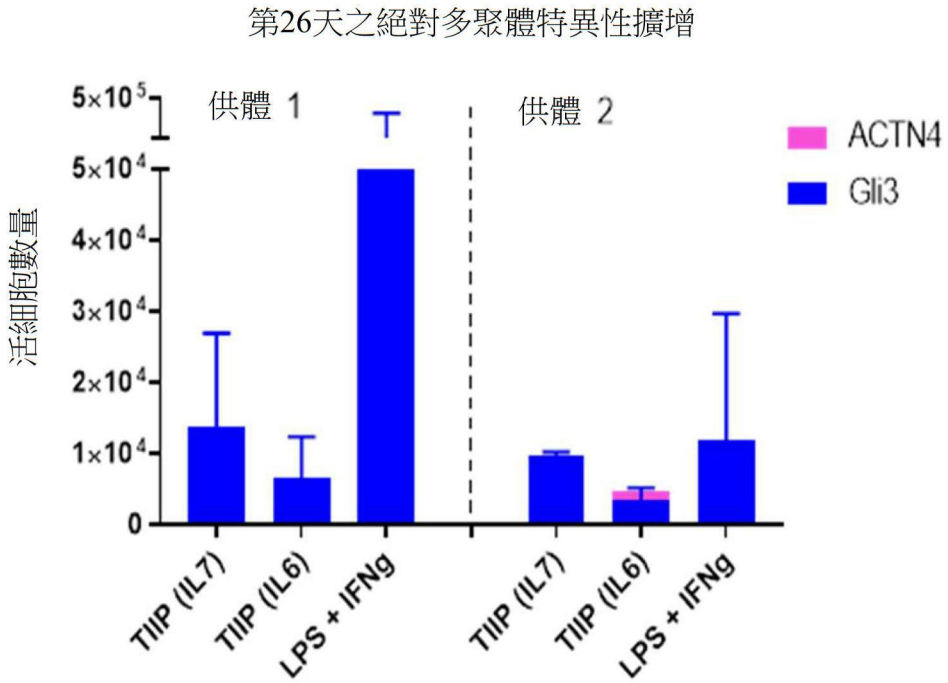
【圖61D】


PBMC 輸入
CD25 耗竭之輸入
倍數擴增
5
4
3
2
1
0
長聚體
短聚體

【圖61E】



【圖62A】

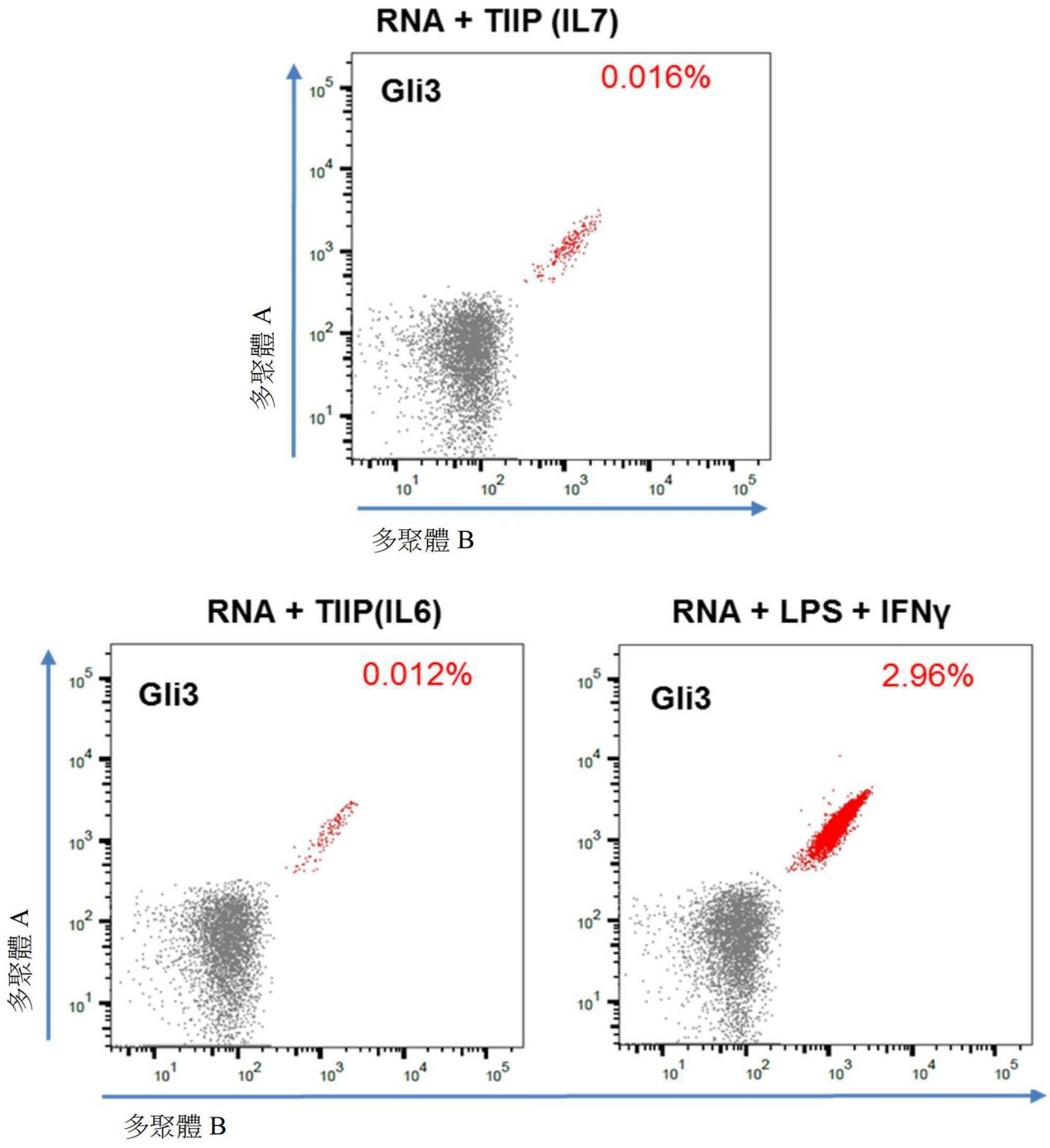


【圖62B】

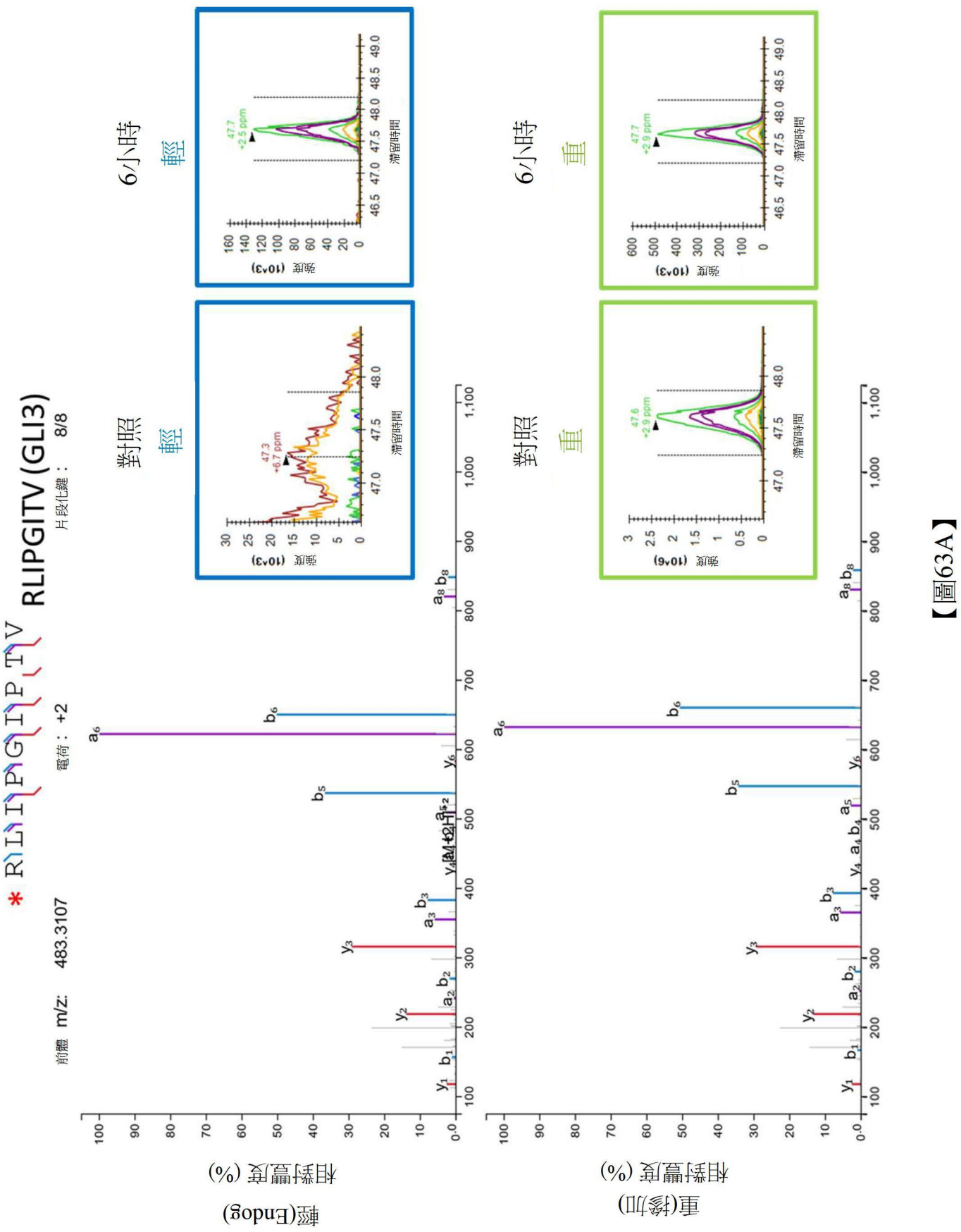
Gli3 命中率

成熟混合劑	供體 1	供體 2
TIIP(IL7)	100%	33%
TIIP(IL6)	100%	67%
LPS+IFNγ	100%	100%

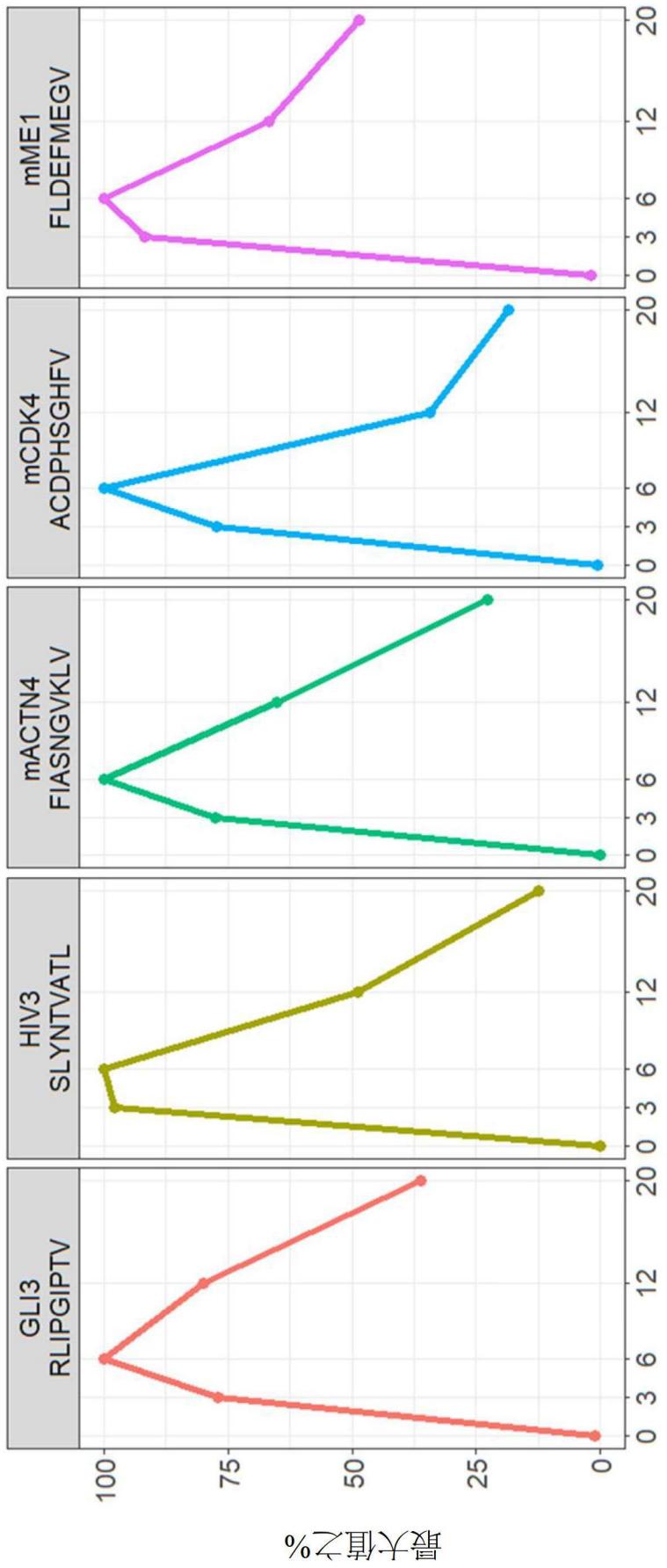
【圖62C】


RNA + TIIP (IL7)
Gli3
0.016%
多聚體 A
多聚體 B
RNA + TIIP(IL6)
Gli3
0.012%
RNA + LPS + IFNγ
Gli3
2.96%
多聚體 A
多聚體 B

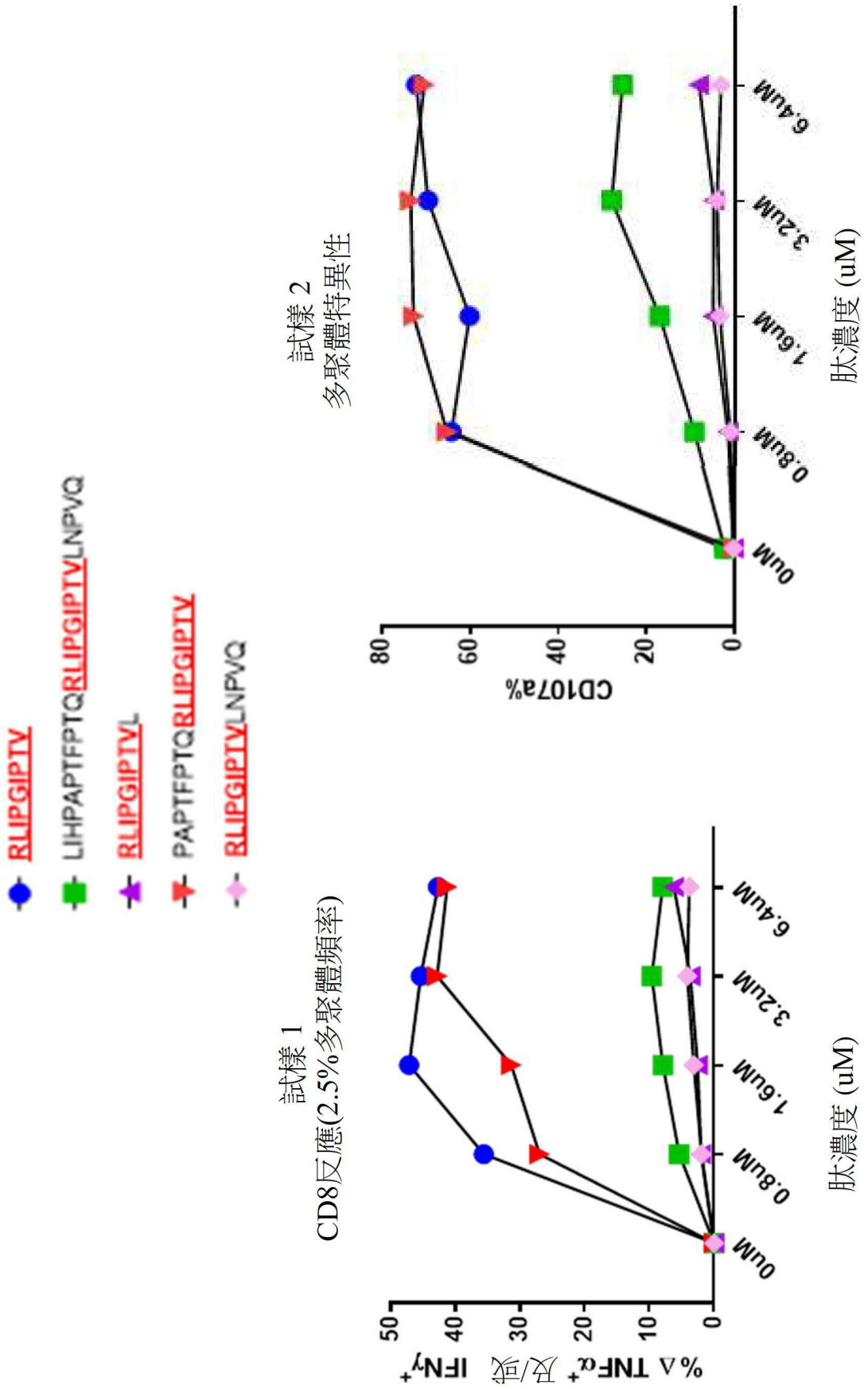
【圖62D】


RLIPGITV(GLI3)
片段化鍵： 8/8
電荷： +2
前體 m/z: 483.3107
對照
輕
6小時
輕
對照
重
6小時
重
滯留時間
強度
輕(Endog)
重(摻加)
相對豐度 (%)

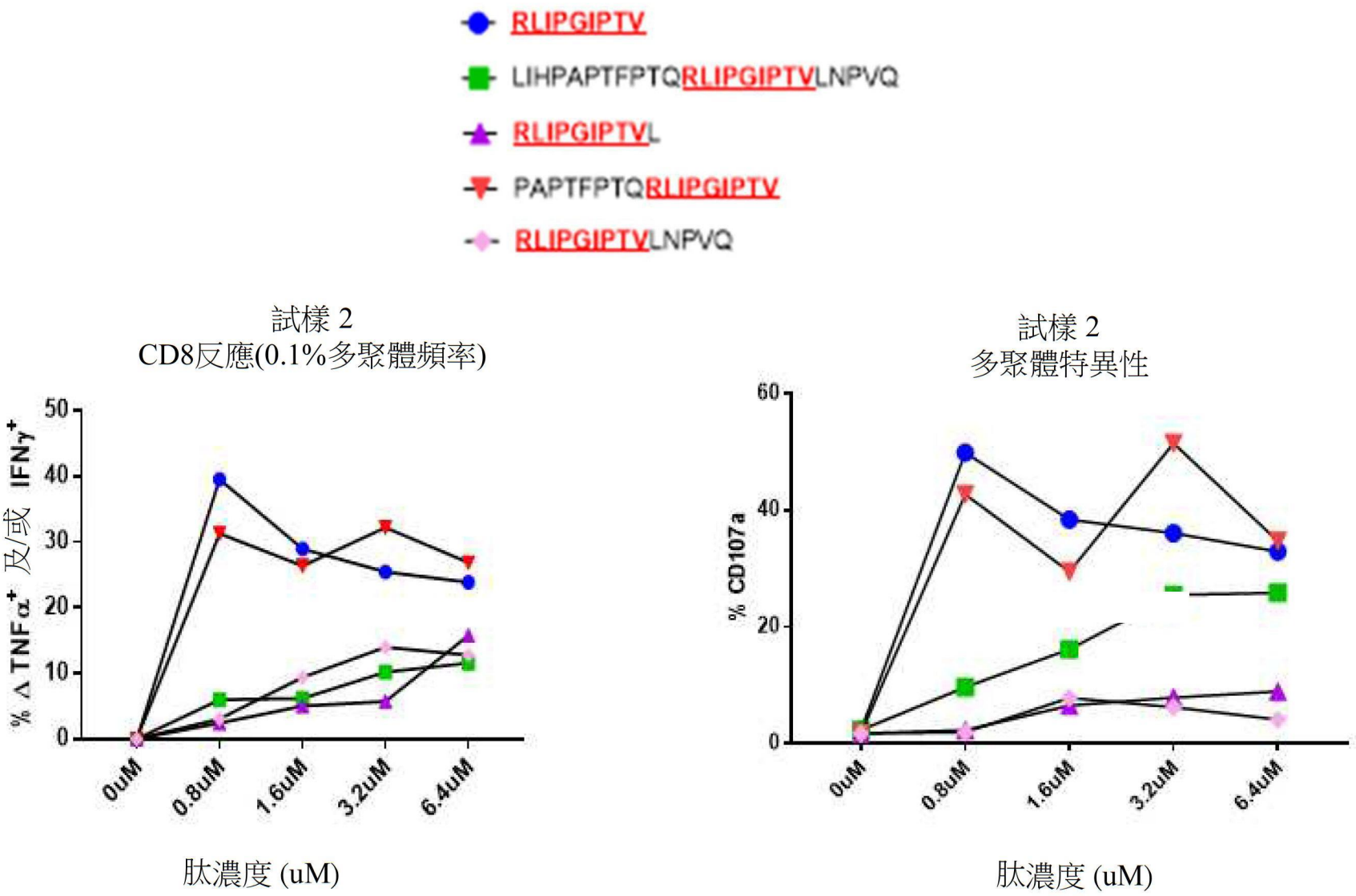
【圖63A】


GLI3
RLIPGIPTV
HIV3
SLYNTVATL
mACTN4
FIASNGVKLV
mCDK4
ACDPHSGHFV
mME1
FLDEFMEGV
0
25
50
75
100
最大值之%
0 3 6 12 20
轉染後時間 (hr)

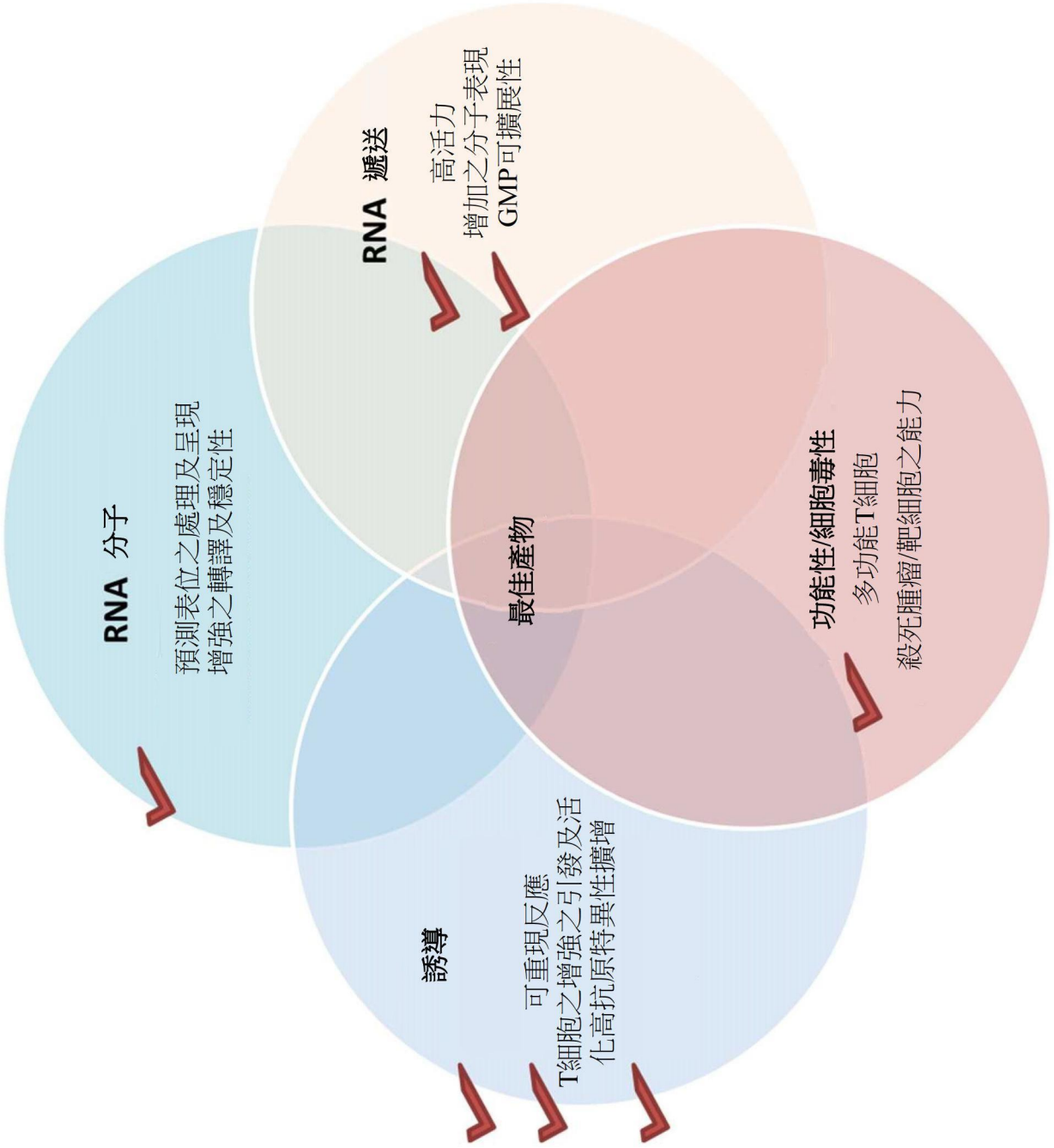
【圖63B】


RLIPGIPTV
LIHPAPTFPTQRLIPGIPTVLNPVQ
RLIPGIPTVL
PAPTFPTQRLIPGIPTV
RLIPGIPTVLNPVQ
試樣 1
CD8反應(2.5%多聚體頻率)
% Δ TNFα+ 及/或 IFNγ+
0
10
20
30
40
50
0uM
0.8uM
1.6uM
3.2uM
6.4uM
肽濃度 (uM)
試樣 2
多聚體特異性
CD107a%
0
20
40
60
80
0uM
0.8uM
1.6uM
3.2uM
6.4uM
肽濃度 (uM)

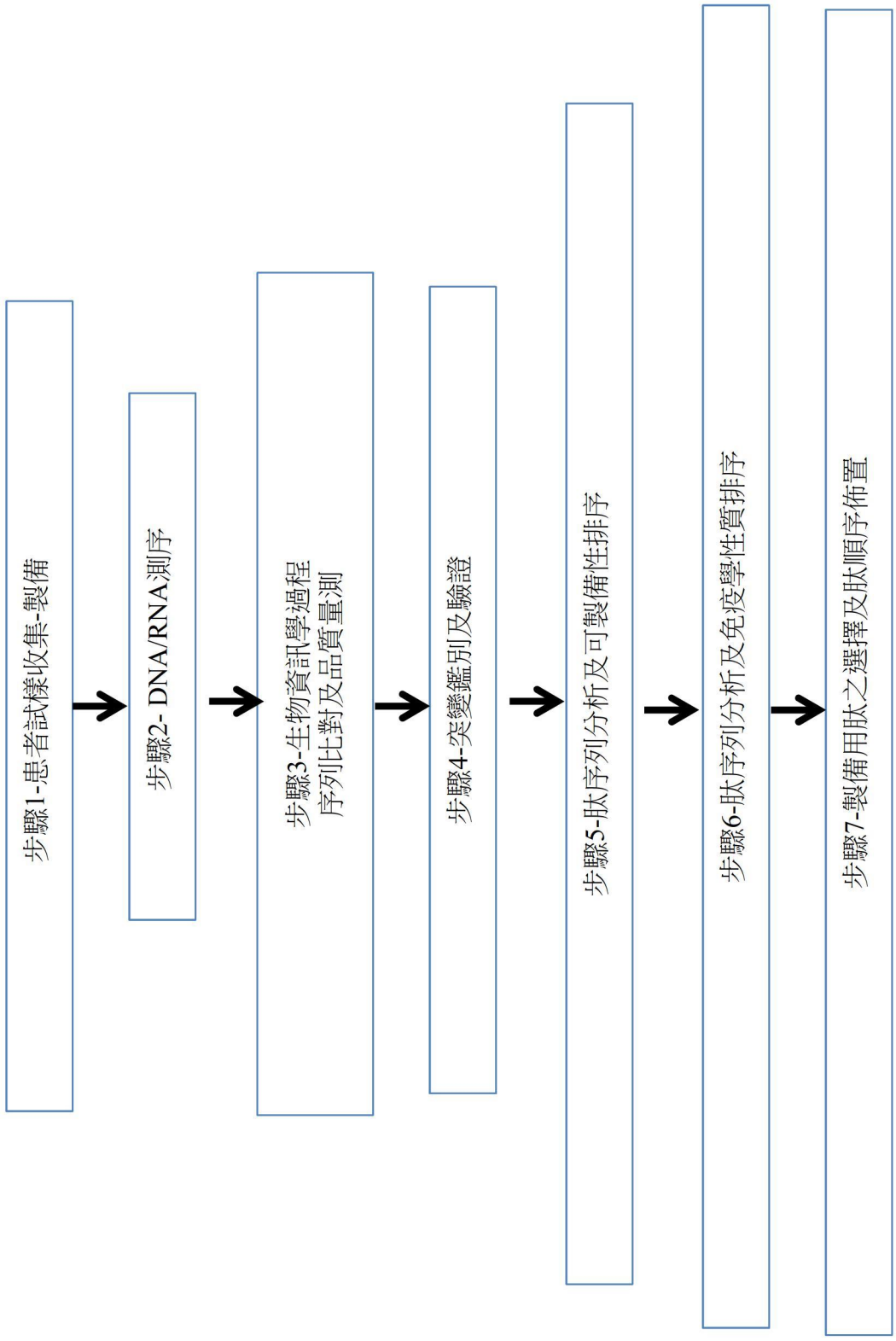
【圖64A】


RLIPGIPTV
LIHPAPTFPTQRLIPGIPTVLNPVQ
RLIPGIPTVL
PAPTFPTQRLIPGIPTV
RLIPGIPTVLNPVQ
試樣 2
CD8反應(0.1%多聚體頻率)
% ΔTNFα+ 及/或 IFNγ+
50
40
30
20
10
0
0uM
0.8uM
1.6uM
3.2uM
6.4uM
肽濃度 (uM)
試樣 2
多聚體特異性
% CD107a
60
40
20
0
0uM
0.8uM
1.6uM
3.2uM
6.4uM
肽濃度 (uM)

【圖64B】


RNA 分子
預測表位之處理及呈現
增強之轉譯及穩定性
RNA 遞送
高活力
增加之分子表現
GMP可擴展性
最佳產物
誘導
可重現反應
T細胞之增強之引發及活化高抗原特異性擴增
功能性/細胞毒性
多功能T細胞
殺死腫瘤/靶細胞之能力

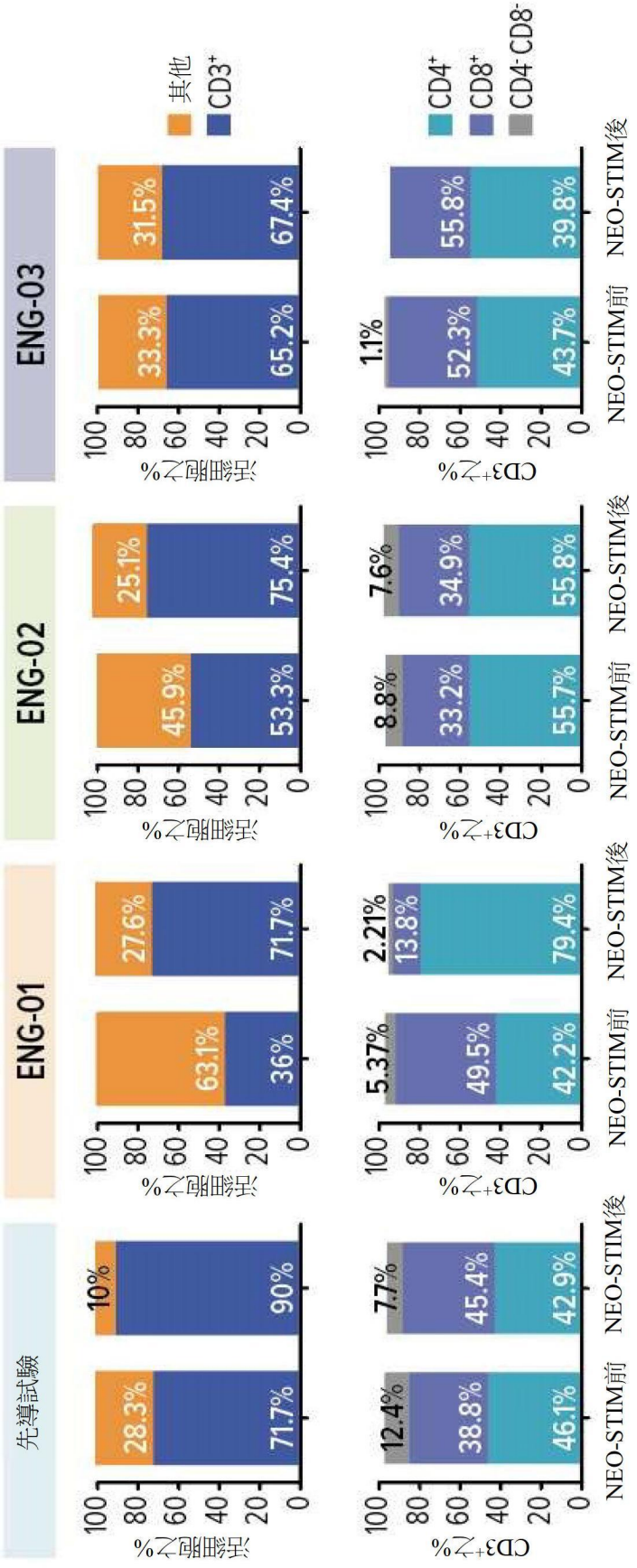
【圖65】


步驟1-患者試樣收集-製備
步驟2- DNA/RNA測序
步驟3-生物資訊學過程
序列比對及品質量測
步驟4-突變鑑別及驗證
步驟5-肽序列分析及可製備性排序
步驟6-肽序列分析及免疫學性質排序
步驟7-製備用肽之選擇及肽順序佈置

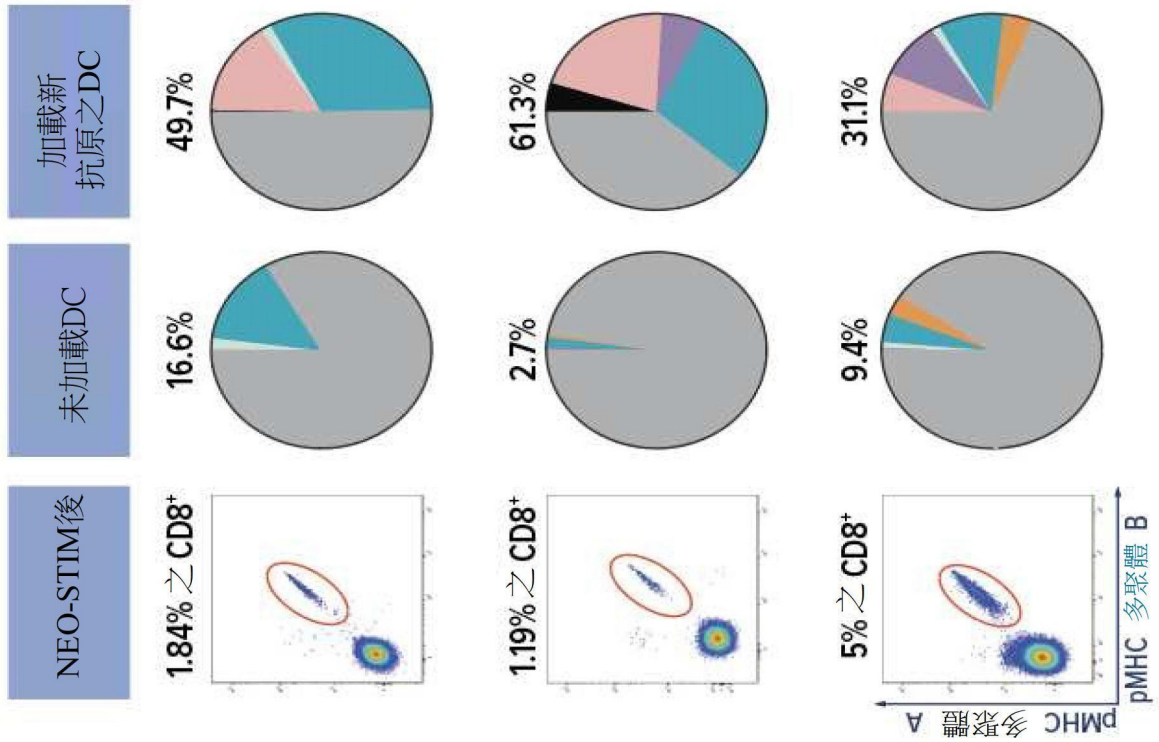
【圖66】

1. 多個腫瘤特異性靶
• 減小抗原逃逸之風險
• 減小脫靶毒性之風險
2. 最佳T細胞表型以驅動持久性及腫瘤細胞殺死
3. 跨實體腫瘤之廣泛臨床機會
4. 未改造產物，具有有限之預期毒性

【圖67】

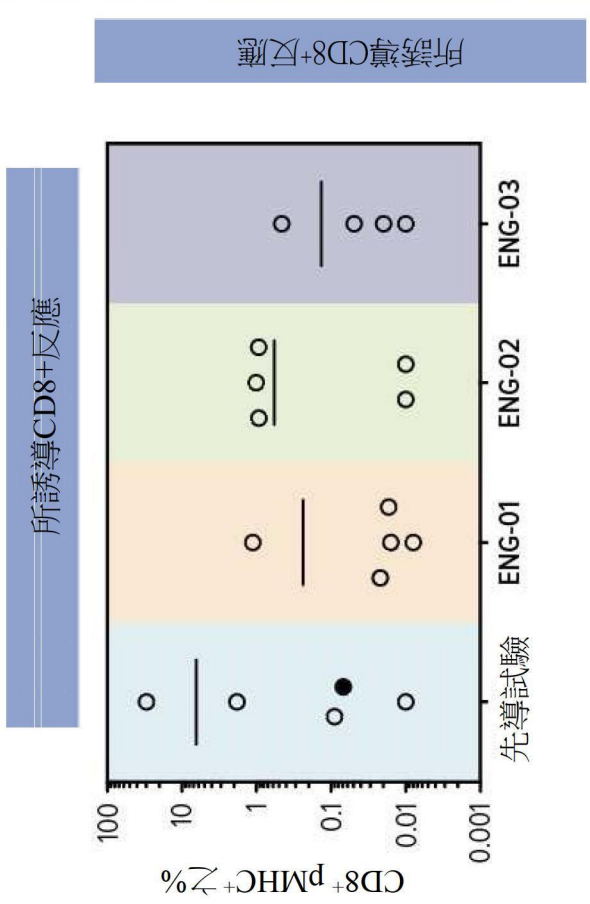

先導試驗
ENG-01
ENG-02
ENG-03
其他
CD3+
CD4+
CD8+
CD4-CD8-
活細胞之%
CD3+之%
NEO-STIM前
NEO-STIM後
28.3%
71.7%
10%
90%
63.1%
36%
27.6%
71.7%
45.9%
53.3%
25.1%
75.4%
33.3%
65.2%
31.5%
67.4%
12.4%
38.8%
46.1%
7.7%
45.4%
42.9%
5.37%
49.5%
42.2%
2.21%
13.8%
79.4%
8.8%
33.2%
55.7%
7.6%
34.9%
55.8%
1.1%
52.3%
43.7%
55.8%
39.8%

【圖68】



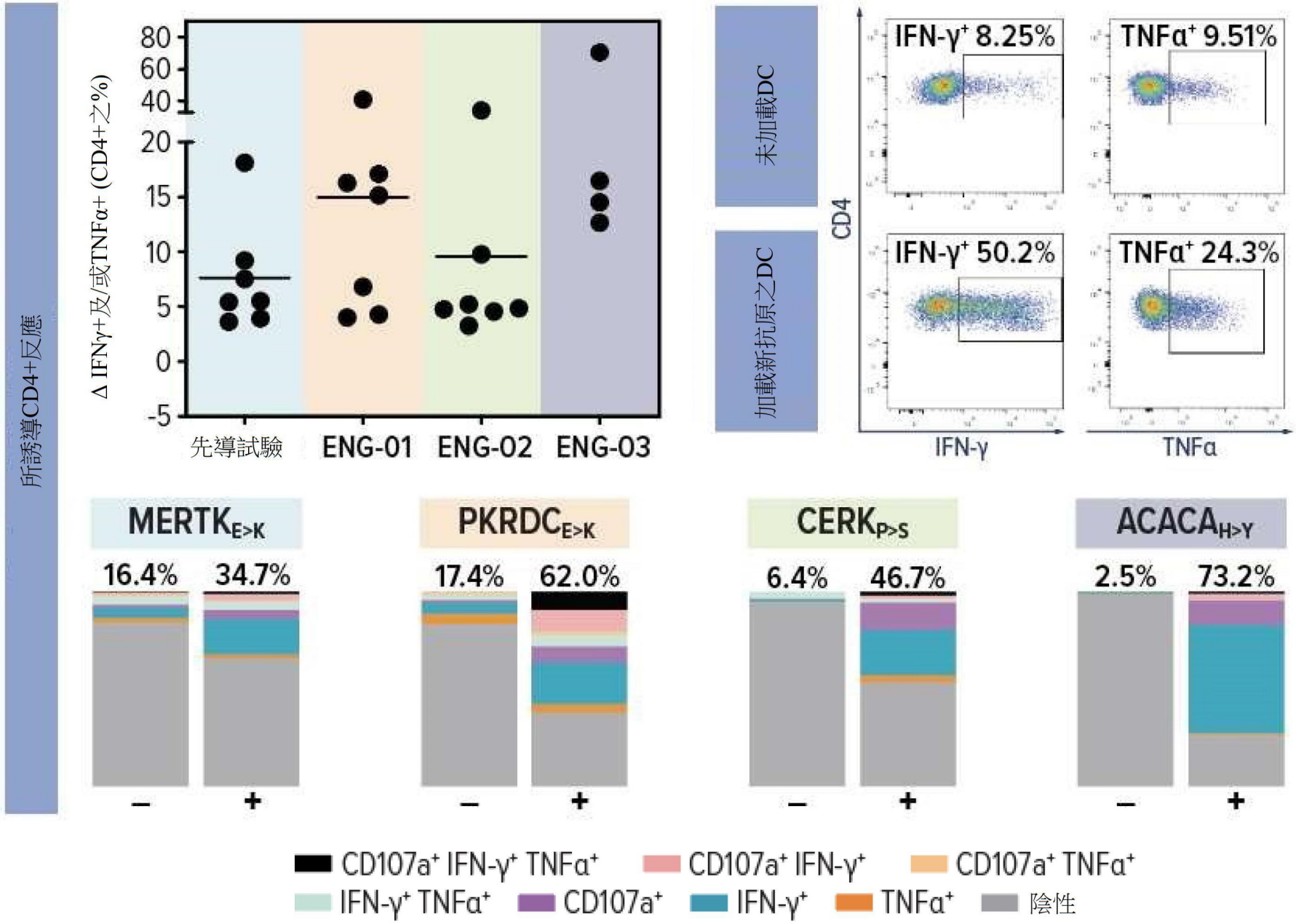
【圖69B】

【圖69C】

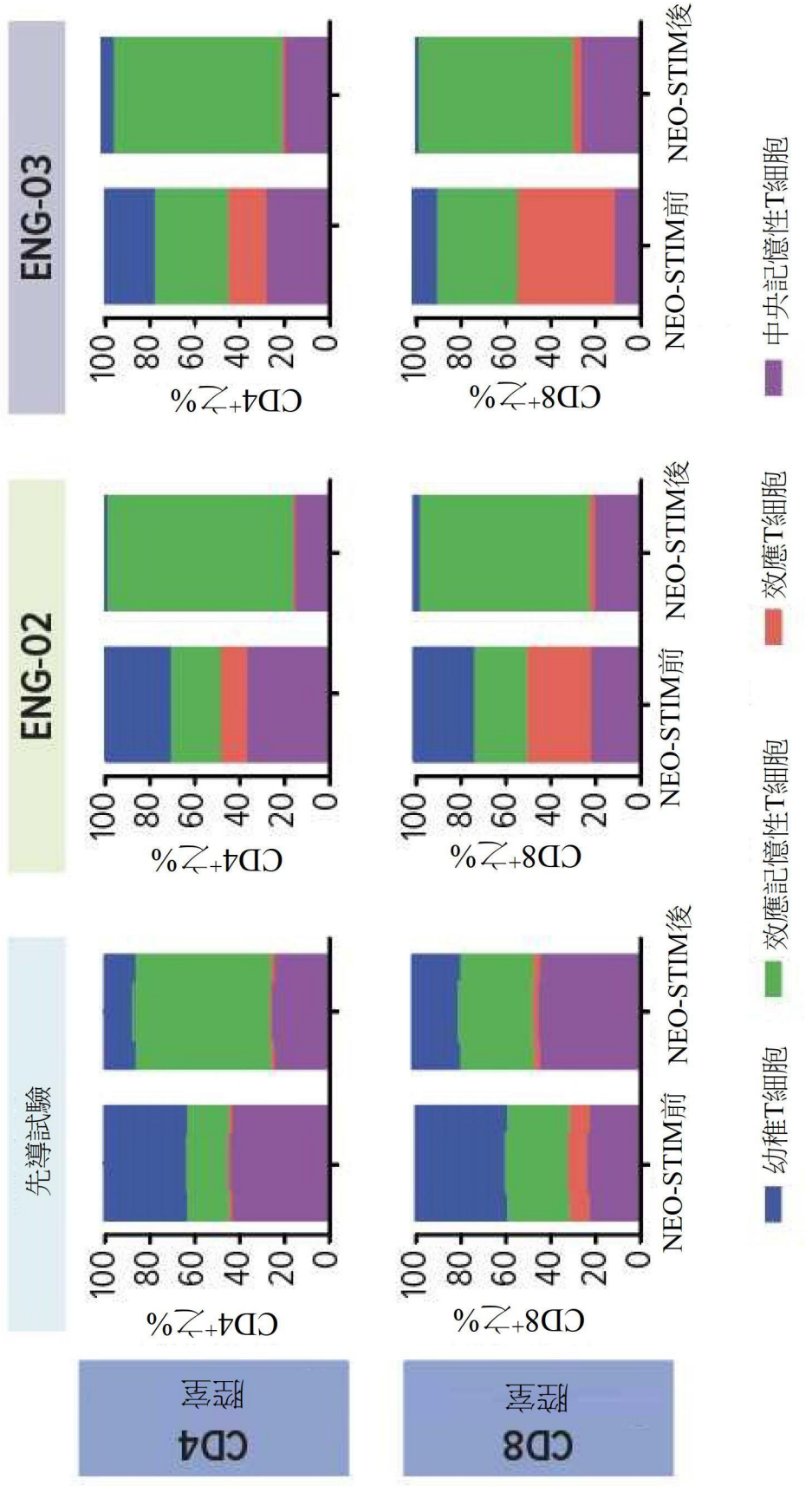


【圖69A】

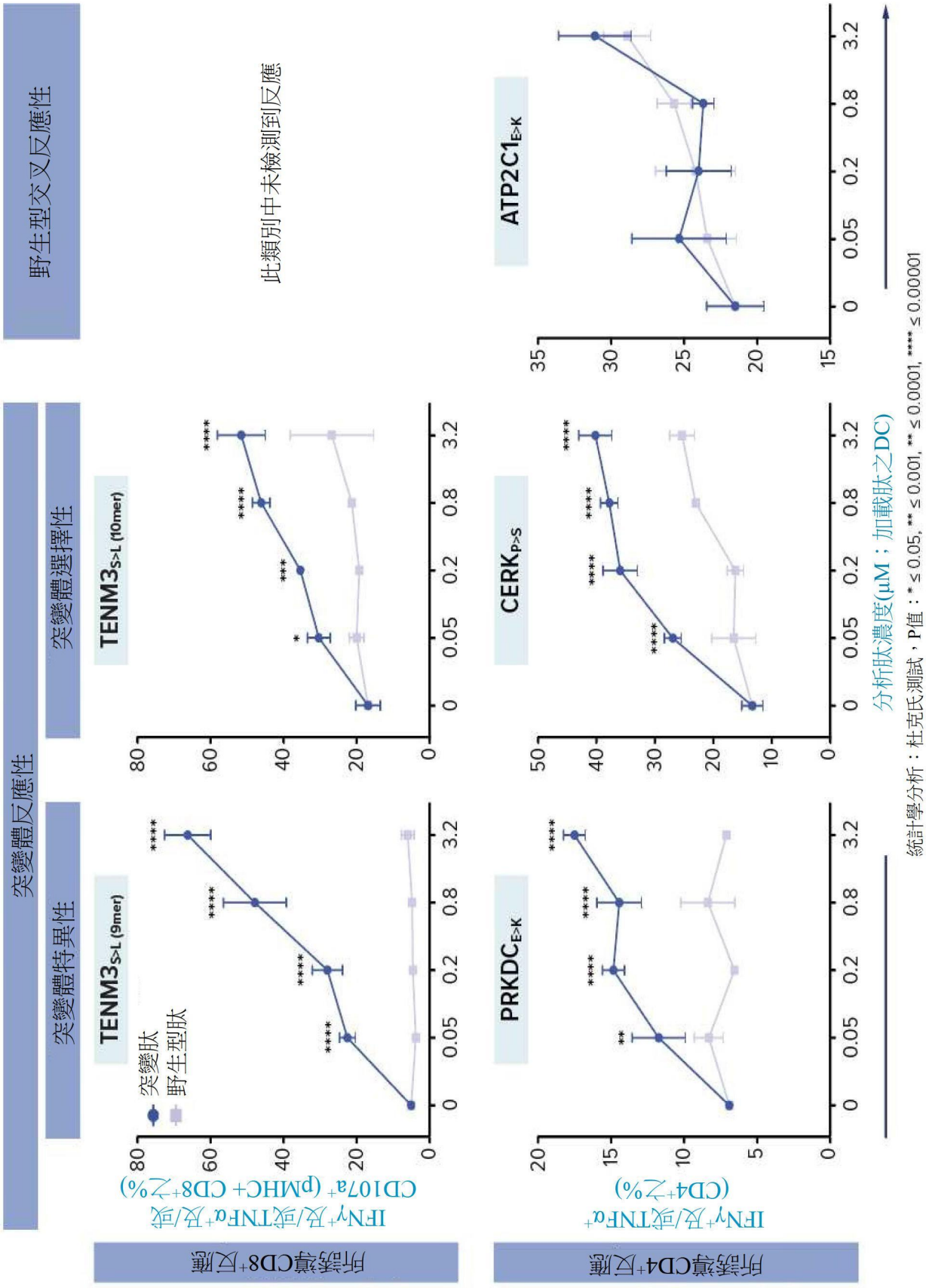
111130596 C249888DA.pdf
表單編號 A0101
第 84 頁，共 89 頁(發明圖式)



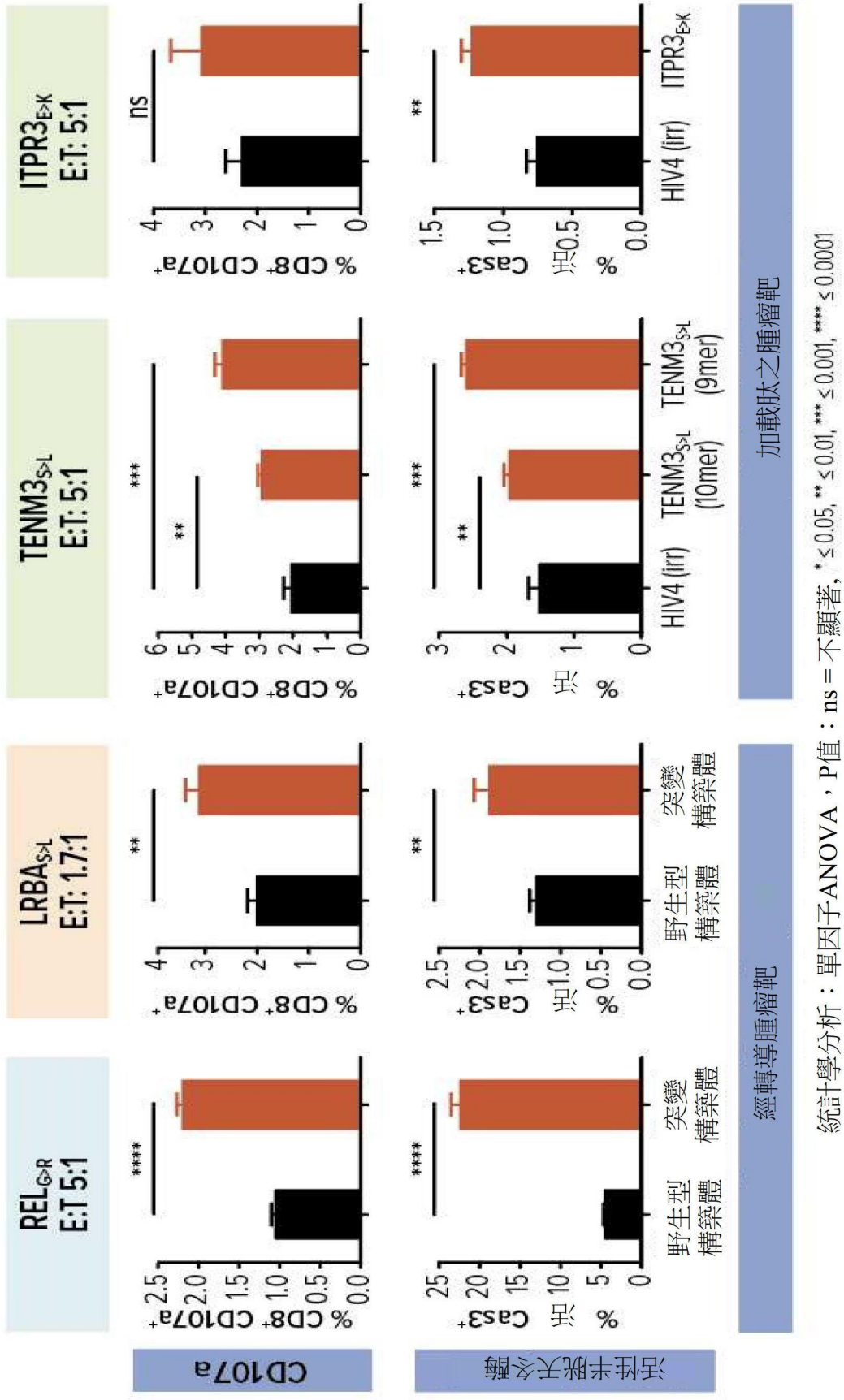
【圖70】


CD4 陣列
CD8 陣列
先導試驗
ENG-02
ENG-03
CD4+Z%
CD8+Z%
100
80
60
40
20
0
NEO-STIM前
NEO-STIM後
幼稚T細胞
效應記憶性T細胞
效應T細胞
中央記憶性T細胞

【圖71】

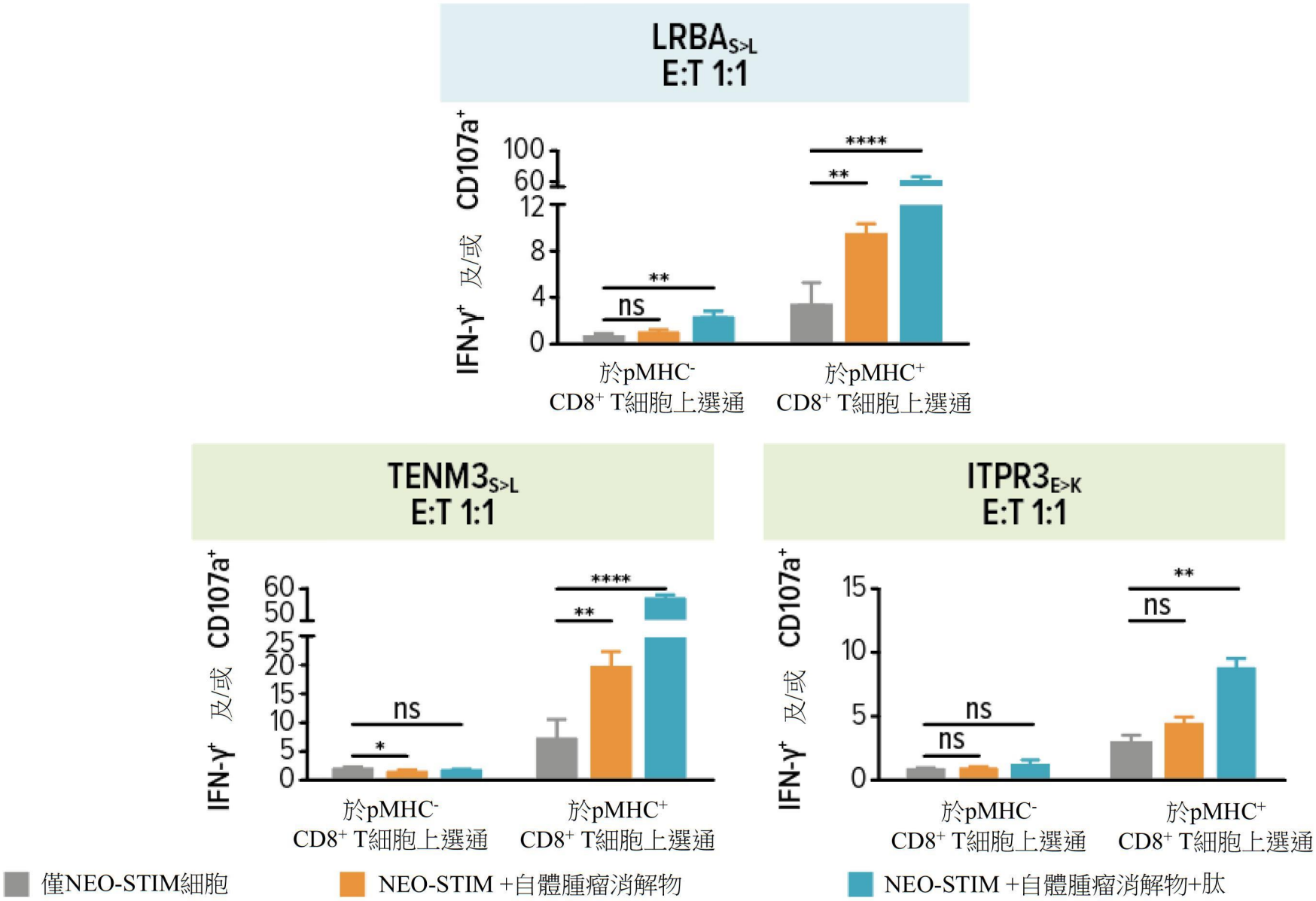

突變體反應性
突變體特異性
突變體選擇性
野生型交叉反應性
TENM3S>L (9mer)
TENM3S>L (10mer)
此類別中未檢測到反應
突變肽
野生型肽
所誘導CD8+反應
IFNγ+及/或TNFα+及/或
CD107a+ (pMHC+ CD8+之%)
PRKDCE>K
CERKP>S
ATP2C1E>K
所誘導CD4+反應
IFNγ+及/或TNFα+
(CD4+之%)
分析肽濃度(μM；加載肽之DC)
統計學分析：杜克氏測試，P值：* ≤ 0.05, ** ≤ 0.001, *** ≤ 0.0001, **** ≤ 0.00001

【圖72】



統計學分析：單因子ANOVA，P值：ns = 不顯著，* ≤ 0.05, ** ≤ 0.01, *** ≤ 0.001, **** ≤ 0.0001

【圖73】


LRBA$_{S>L}$
E:T 1:1
IFN-γ$^+$ 及/或 CD107a$^+$
100
60
12
8
4
0
ns
**
**
****
於pMHC$^-$ CD8$^+$ T細胞上選通
於pMHC$^+$ CD8$^+$ T細胞上選通
TENM3$_{S>L}$
E:T 1:1
IFN-γ$^+$ 及/或 CD107a$^+$
60
50
25
20
15
10
5
0
ns
*
**
****
於pMHC$^-$ CD8$^+$ T細胞上選通
於pMHC$^+$ CD8$^+$ T細胞上選通
ITPR3$_{E>K}$
E:T 1:1
IFN-γ$^+$ 及/或 CD107a$^+$
15
10
5
0
ns
ns
ns
**
於pMHC$^-$ CD8$^+$ T細胞上選通
於pMHC$^+$ CD8$^+$ T細胞上選通
僅NEO-STIM細胞
NEO-STIM +自體腫瘤消解物
NEO-STIM +自體腫瘤消解物+肽

【圖74】

小組A：劑量遞增(單一療法)
針對αPD-1發生進展
且接受αCTLA-4
NEO-PTC-01 劑量 ：10⁹ (n = 3 名患者)
NEO-PTC-01 劑量 ：10¹⁰ (n = 3 名患者)
小組B：劑量擴增
在服用αPD-1 ± αCTLA-4 3
個月時穩定或無症狀進展
NEO-PTC-01劑量：選自小組A
(n =最多20名患者)
試驗目標:
– 安全性
» 臨床活性
» ORR
– 反應持久性
– 免疫監測細
– 胞活力

【圖75】