



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111629748 A

(43)申请公布日 2020.09.04

(21)申请号 201880074419.8

(22)申请日 2018.09.20

(30)优先权数据

62/561,044 2017.09.20 US

62/656,679 2018.04.12 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.05.15

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/051971 2018.09.20

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/060558 EN 2019.03.28

(71)申请人 耐克西缪恩有限公司

地址 美国马里兰州

(72)发明人 马赛厄斯·厄可 克丽丝蒂·琼斯

金素贞 劳伦·苏亚雷斯

肯·卡特 斯科特·卡莫

丹·贝德纳里克

(74)专利代理机构 北京安杰律师事务所 11627

代理人 吴立 杨剑

(51)Int.Cl.

A61K 39/00(2006.01)

G12N 13/00(2006.01)

B03C 1/28(2006.01)

权利要求书5页 说明书21页

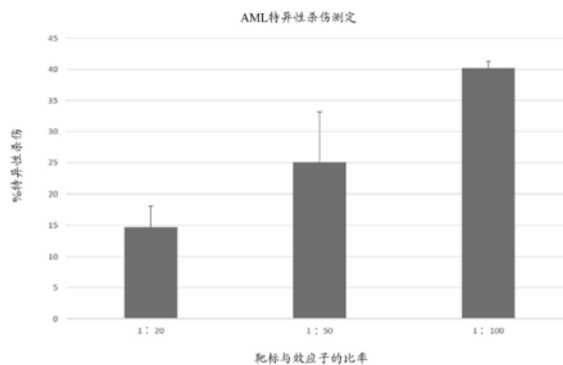
序列表4页 附图14页

(54)发明名称

用于过继疗法的包含抗原特异性细胞的细胞组合物

(57)摘要

本发明提供了适合用于过继免疫疗法的分离的细胞组合物,以及制造所述细胞组合物的方法和利用所述细胞组合物治疗的方法。所述组合物包含在药学上可接受的载体中的至少约 10^6 个对一种或多种靶肽抗原有特异性的CD8+T细胞。在各个实施方案中,所述组合物主要是CD8+T细胞,并且所述组合物中至少约20%的T细胞表现出中枢记忆表型或效应记忆表型,从而从经受自然选择的天然T细胞库提供稳健且持久的过继疗法。



1. 一种适合用于过继免疫疗法的分离的细胞组合物,所述组合物包含在药学上可接受的载体中的:至少 10^6 个对一种或多种靶肽抗原有特异性的CD8+T细胞,其中所述组合物中至少20%的T细胞表现出中枢记忆表型或效应记忆表型。

2. 如权利要求1所述的分离的细胞组合物,其中所述CD8+T细胞对1至100种靶肽抗原有特异性。

3. 如权利要求1所述的分离的细胞组合物,其中T细胞对所述组合物中靶肽抗原的特异性是通过MHC多聚体染色来界定的。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的分离的细胞组合物,其中所述靶肽抗原是肿瘤相关抗原。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的分离的细胞组合物,其中一种或多种靶肽抗原是来源于肿瘤的或肿瘤特异性的新生抗原。

6. 如权利要求1至3中任一项所述的分离的细胞组合物,其中一种或多种靶肽抗原是细菌性抗原、病毒性抗原、真菌性抗原或寄生性抗原。

7. 如权利要求1至6中任一项所述的分离的细胞组合物,所述组合物包含对至少一种、两种、三种、四种或五种靶肽抗原有特异性的CD8+T细胞。

8. 如权利要求7所述的分离的细胞组合物,其中所述靶肽抗原中至少一种被低频前体T细胞识别。

9. 如权利要求1至8中任一项所述的分离的细胞组合物,其中所述细胞组合物为至少90%的T细胞。

10. 如权利要求9所述的分离的细胞组合物,其中所述细胞组合物为至少98%的T细胞。

11. 如权利要求1至9中任一项所述的分离的细胞组合物,其中所述细胞组合物为至少5%的对所述靶肽抗原有特异性的CD8+T细胞。

12. 如权利要求11所述的分离的细胞组合物,其中所述细胞组合物为至少10%的对所述靶肽抗原有特异性的CD8+T细胞。

13. 如权利要求12所述的分离的细胞组合物,其中所述细胞组合物为至少15%的对所述靶肽抗原有特异性的CD8+T细胞。

14. 如权利要求4或5中任一项所述的分离的细胞组合物,其中所述细胞组合物还包含对细菌性病原体、病毒性病原体和/或真菌性病原体有特异性的CD8+T细胞。

15. 如权利要求14所述的分离的细胞组合物,其中所述对细菌性病原体、病毒性病原体,或真菌性病原体有特异性的CD8+T细胞包括对流感病毒、CMV、EBV和/或腺病毒的抗原有特异性的T细胞。

16. 如权利要求1至15中任一项所述的分离的细胞组合物,其中所述T细胞是至少30%的中枢记忆T细胞和效应记忆T细胞。

17. 如权利要求16所述的分离的细胞组合物,其中所述T细胞是至少50%的中枢记忆T细胞和效应记忆T细胞。

18. 如权利要求16所述的分离的细胞组合物,其中所述T细胞是至少70%的中枢记忆T细胞和效应记忆T细胞。

19. 如权利要求16所述的分离的细胞组合物,其中所述T细胞是至少80%的中枢记忆T细胞和效应记忆T细胞。

20. 如权利要求16至19中任一项所述的分离的细胞组合物,其中对所述一种或多种靶抗原具有特异性的所述T细胞是至少50%的中枢记忆T细胞和效应记忆T细胞。

21. 如权利要求20所述的分离的细胞组合物,其中对所述一种或多种靶抗原具有特异性的所述T细胞是至少60%的中枢记忆T细胞和效应记忆T细胞。

22. 如权利要求20所述的分离的细胞组合物,其中对所述一种或多种靶抗原具有特异性的所述T细胞是至少70%的中枢记忆T细胞和效应记忆T细胞。

23. 如权利要求20所述的分离的细胞组合物,其中对所述一种或多种靶抗原具有特异性的所述T细胞是至少80%的中枢记忆T细胞和效应记忆T细胞。

24. 如权利要求1至23中任一项所述的分离的细胞组合物,其中所述中枢记忆T细胞和效应记忆T细胞是10:90至90:10的中枢记忆细胞:效应记忆细胞。

25. 如权利要求24所述的分离的细胞组合物,其中所述中枢记忆T细胞和效应记忆T细胞是25:75至75:25的中枢记忆细胞:效应记忆细胞。

26. 如权利要求24所述的分离的细胞组合物,其中所述中枢记忆细胞和效应记忆细胞是40:60至60:40的中枢记忆T细胞:效应记忆T细胞。

27. 如权利要求1至26中任一项所述的分离的细胞组合物,其中所述T细胞是低于20%终末分化的。

28. 如权利要求27所述的分离的细胞组合物,其中所述T细胞是低于10%终末分化的。

29. 如权利要求27所述的分离的细胞组合物,其中所述T细胞是低于10%终末分化的。

30. 如权利要求1至29中任一项所述的分离的细胞组合物,其中所述组合物包含低于20%的原始细胞。

31. 如权利要求30所述的分离的组合物,其中所述组合物包含低于10%的原始细胞。

32. 如权利要求30所述的分离的组合物,其中所述组合物包含低于5%的原始细胞。

33. 如权利要求30所述的分离的组合物,其中所述组合物包含低于1.5%的原始细胞。

34. 如权利要求1至33中任一项所述的分离的组合物,所述组合物还包含T记忆干细胞。

35. 如权利要求34所述的分离的组合物,所述组合物包含约5%至约25%的T记忆干细胞。

36. 如权利要求1至35中任一项所述的分离的细胞组合物,其中所述CD8+T细胞在激活后表现出多功能性表型。

37. 如权利要求1至36中任一项所述的分离的细胞组合物,其中所述细胞组合物为低于10%的CD4+T细胞。

38. 如权利要求37所述的分离的细胞组合物,其中所述细胞组合物为低于5%的CD4+T细胞。

39. 如权利要求37所述的分离的细胞组合物,其中所述细胞组合物为低于2%的CD4+T细胞。

40. 如权利要求37所述的分离的细胞组合物,其中所述细胞组合物为低于1.5%的CD4+T细胞。

41. 如权利要求37所述的分离的细胞组合物,其中所述细胞组合物为低于1%的CD4+T细胞。

42. 如权利要求1至41中任一项所述的细胞组合物,其中所述组合物未包含表达嵌合抗

原受体或重组TCR的T细胞。

43. 如权利要求1至42中任一项所述的细胞组合物,其中所述组合物是通过从源细胞富集对所述靶肽抗原有特异性的CD8⁺T细胞;和/或从源细胞扩增对所述靶肽抗原有特异性的CD8⁺T细胞而产生的。

44. 如权利要求43所述的细胞组合物,其中源细胞来自患者或HLA匹配的供体。

45. 如权利要求43所述的细胞组合物,其中所述供体细胞是通过白细胞单采分离的。

46. 如权利要求43所述的细胞组合物,其中所述源细胞是从患者的肿瘤中分离的。

47. 如权利要求43所述的细胞组合物,其中所述源细胞是血沉棕黄层级分。

48. 如权利要求43至47中任一项所述的分离的细胞组合物,其中在富集之前或扩增之前去除所述细胞源中的CD4⁺T细胞。

49. 如权利要求43至48中任一项所述的分离的细胞组合物,其中所述源细胞是CD8⁺富集的源细胞。

50. 如权利要求43至49中任一项所述的分离的细胞组合物,其中所述细胞源是NK细胞去除的源细胞。

51. 如权利要求43至50中任一项所述的分离的细胞组合物,其中所述抗原特异性T细胞是通过具有MHC I类配体和任选的共刺激配体的aAPC富集的。

52. 如权利要求51所述的分离的细胞组合物,其中所述aAPC包含共刺激配体,其为结合CD28的配体。

53. 如权利要求52所述的分离的细胞组合物,其中所述共刺激配体是单克隆抗体或其一部分,其为CD28的激动剂。

54. 如权利要求1至53中任一项所述的分离的细胞组合物,其中所述富集是采用顺磁性aAPC进行的磁富集,并且其中任选地将所述细胞和aAPC在磁场存在下培育至少一分钟。

55. 如权利要求1至53中任一项所述的分离的细胞组合物,其中所述富集是采用顺磁性aAPC进行的磁富集,并且其中任选地将所述细胞和aAPC在磁场存在下培育至少五小时或培养持续时间。

56. 如权利要求1至55中任一项所述的分离的细胞组合物,其中将所述细胞和aAPC在磁场存在下培育不超过约五小时。

57. 如权利要求1至53中任一项所述的分离的细胞组合物,其中所述抗原特异性T细胞是在不使用磁场的情况下富集和/或扩增的。

58. 如权利要求43至53中任一项所述的分离的细胞组合物,其中将所述富集的细胞在培养中扩增1至4周。

59. 如权利要求58所述的分离的细胞组合物,其中将所述细胞在MIP-1 β 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-15、IL-21和INF- γ 中一种或多种以及任选的IL-10的存在下在培养中扩增。

60. 如权利要求58所述的分离的细胞组合物,其中将所述细胞在MIP-1 β 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-15、IL-21和INF- γ 中两种或三种以及任选的IL-10的存在下在培养中扩增。

61. 如权利要求60所述的分离的细胞组合物,其中将所述细胞在MIP-1 β 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-21和INF- γ 中一种、两种、三种、四种或五种以及任选的IL-10的存在下在培

养中扩增。

62. 如权利要求60所述的分离的细胞组合物, 其中将所述细胞在选自MIP-1 β 、IL-1 β 和IL-6的至少一种细胞因子以及任选的IL-10的存在下在培养中扩增。

63. 如权利要求60所述的分离的细胞组合物, 其中将所述细胞在IL-4存在下扩增。

64. 如权利要求60所述的分离的细胞组合物, 其中将所述细胞在IL-4和IL-6存在下扩增。

65. 如权利要求60所述的分离的细胞组合物, 其中将所述细胞在IL-4和IL-1 β 存在下扩增。

66. 如权利要求60所述的分离的细胞组合物, 其中将所述细胞在IL-4、IL-6和IL-1 β 存在下扩增。

67. 如权利要求60所述的分离的细胞组合物, 其中将所述细胞在IL-2、IL-4和IL-6存在下扩增。

68. 如权利要求60所述的分离的细胞组合物, 其中将所述细胞在IL-2、IL-4、IL-6、INF- γ 和IL-1 β 以及任选的IL-10存在下在培养中扩增。

69. 如权利要求1至68中任一项所述的分离的细胞组合物, 其中功能性aAPC在所述组合物中检测不到, 或者所述组合物包含低于1%的所述aAPC材料。

70. 如权利要求1至69中任一项所述的分离的细胞组合物, 其中一种或多种靶肽抗原选自生存素、WT-1、PRAME、细胞周期蛋白A1和PR3的肽表位。

71. 一种适合用于过继免疫疗法的分离的细胞组合物, 所述组合物包含在药学上可接受的载体中的:

至少90%的CD8+T细胞和低于5%的CD4+T细胞;

所述CD8+细胞包含至少 10^6 个对1至10种靶肽抗原有特异性的CD8+T细胞, 以及对细菌性病原体、病毒性病原体、真菌性病原体和/或寄生性病原体有特异性的CD8+T细胞,

其中至少30%的所述CD8+T细胞是比率为25:75至75:25的中枢记忆T细胞和效应记忆T细胞, 其中低于10%的所述CD8+T细胞为终末分化的T细胞, 并且低于10%的CD8+细胞为原始细胞; 并且

其中至少50%的对所述靶肽抗原有特异性的CD8+T细胞是比率为25:75至75:25的中枢记忆T细胞和效应记忆T细胞, 是低于10%终末分化的T细胞, 并且是低于10%的原始细胞。

72. 如权利要求71所述的分离的细胞组合物, 所述组合物包含至少95%的CD8+T细胞和低于2%的CD4+T细胞。

73. 如权利要求71或72所述的分离的细胞组合物, 所述组合物包含 10^7 或 10^8 个对所述靶肽抗原有特异性的CD8+T细胞。

74. 如权利要求71至73中任一项所述的分离的细胞组合物, 所述组合物包含低于5%终末分化的T细胞和/或低于5%的原始细胞。

75. 如权利要求71至73中任一项所述的分离的细胞组合物, 所述组合物还包含约5%至约20%的T记忆干细胞。

76. 如权利要求71至75中任一项所述的分离的细胞组合物, 其中所述靶肽抗原是肿瘤相关抗原, 并且任选地与恶性血液病相关。

77. 如权利要求71至76中任一项所述的分离的细胞组合物, 其中一种或多种靶肽抗原

选自生存素、WT-1、PRAME、细胞周期蛋白A1和PR3的肽表位。

78. 一种治疗患有癌症的患者的方法,所述方法包括向有需要的患者施用权利要求1至77中任一项所述的细胞组合物。

79. 如权利要求78所述的方法,其中所述患者患有血液学癌症。

80. 如权利要求79所述的方法,其中所述血液学癌症在同种异体干细胞移植后复发。

81. 如权利要求79或80所述的方法,其中所述患者患有急性髓性白血病(AML)或骨髓增生异常综合征。

82. 如权利要求78至81中任一项所述的方法,其中所述患者在施用所述细胞疗法之前还接受了淋巴细胞清除疗法或细胞减灭疗法或免疫调节疗法。

83. 如权利要求78至82中任一项所述的方法,其中在治疗后可为所述细胞疗法进一步提供或不提供细胞因子支持。

用于过继疗法的包含抗原特异性细胞的细胞组合物

[0001] 优先权

[0002] 本申请要求美国临时申请号62/561,044 (提交日期:2017年9月20日) 和美国临时申请号62/656,679 (提交日期:2018年4月12日) 的权益,每个临时申请均通过引用的方式整体并入本文。

背景技术

[0003] 过继免疫疗法,例如供体淋巴细胞输注,用于治疗造血干细胞移植(HSCT)后白血病复发,以提高移植物抗白血病(GVL)效应。这些途径常常需要几个月才能生效,并且需要非常大的细胞剂量,这会导致重大的移植物抗宿主病(GVHD)风险。请参阅McLaughlin L等人,Adoptive T-cell therapies for refractory/relapsed leukemia and lymphoma; current strategies and recent advances.*Ther.Adv.Hematol.* 2015 Vol.6 (6) 295-307。

[0004] 在当前的疗法可选方案下,例如HSCT后复发的白血病患者的结局是黯淡的。虽然过继细胞疗法可以提供一些益处,但能够提供的靶标特异性细胞数量往往不足且高度可变,并且很难从供体淋巴细胞离体激活和扩增原始T细胞群体,尤其是就在健康个体的外周血中往往极低甚至检测不到的癌症特异性CTL前体而言。Quintarelli C等人,Cytotoxic T lymphocytes directed to the preferentially expressed antigens of melanoma (PRAME) target chronic myeloid leukemia.*Blood* 2008; 112:1876-1885。进一步地,细胞疗法例如嵌合抗原受体(CAR) T细胞和自然杀伤细胞疗法趋于诱导在体内不够稳健和/或持久性有限的疲乏的细胞表型,并且可以表现出中靶的非组织毒性(on target off-tissue toxicity)。参阅Cruz和Bollard,T-cell and natural killer cell therapies for hematological malignancies after hematopoietic stem cell transplantation; enhancing the graft-versus-leukemia effect.*Haematologica* 2015;100 (6) 709-719。进一步地,由于工程化的单一靶标,这些疗法的灵活性通常有限。

[0005] 需要细胞组合物以供更有效、更安全的过继免疫疗法可选方案使用(包括以供患有白血病或淋巴瘤(包括急性或慢性白血病)的患者以及可能从过继免疫疗法中获益的其他患者使用)。在各个方面和实施方案中,本发明解决了这些需要。

发明内容

[0006] 在各个方面和实施方案中,本发明提供了适用于过继免疫疗法的分离的细胞组合物,以及制造细胞组合物的方法和利用细胞组合物治疗的方法。该组合物包含在药学上可接受的载体中的至少约 10^6 个对一种或多种靶肽抗原有特异性的CD8+T细胞。在各个实施方案中,该组合物主要是CD8+T细胞,并且该组合物中至少约20%的T细胞表现出中枢记忆表型或效应记忆表型,从而从经受自然选择的天然T细胞库提供稳健且持久的过继疗法。该细胞组合物不包含表达嵌合抗原受体或重组TCR的T细胞,因此在各个实施方案中,提供了那些常常会产生较疲乏的T细胞表型和较不持久的应答以及较高的毒性的技术的替代方

法。

[0007] 在各个实施方案中,该细胞组合物包含至少约 10^7 个对靶肽抗原有特异性的CD8+T细胞,或至少约 10^8 个、至少约 10^9 个或至少约 10^{10} 个对靶肽抗原有特异性的CD8+T细胞,以提供稳健的靶细胞破坏和体内长持久性。例如,为了治疗急性髓性白血病(AML)或骨髓增生异常综合征,该细胞组合物可包含对WT1、PRAME、生存素(Survivin)和细胞周期蛋白A1肽抗原有特异性的T细胞。

[0008] 在各个实施方案中,该组合物中的T细胞(和/或对靶抗原有特异性的T细胞)为至少约50%的中枢记忆T细胞或效应记忆T细胞,或者在一些实施方案中为至少约70%的中枢记忆细胞或效应记忆细胞,或至少约80%的中枢记忆T细胞或效应记忆T细胞。在一些实施方案中,记忆细胞来自约25:75至约75:25的中枢记忆细胞:效应记忆细胞。该细胞组合物包含低于约20%终末分化的记忆T细胞(例如 T_{emra} 细胞)和不超过约20%的原始细胞。在一些实施方案中,该细胞组合物包含约5%至约25%的T记忆干细胞(T_{SCM})。这种细胞表型可以使用利用顺磁性人工抗原呈递细胞(aAPC)和重组T细胞生长因子混合物的富集和扩增过程来创建和/或控制。

[0009] 在各个实施方案中,该细胞组合物为至少90%的CD8+T细胞(例如,CD3+CD8+细胞)。例如,该分离的细胞组合物的特征可为具有低于约10%或低于约5%的CD4+T细胞。当离体扩增CD8+T细胞时,CD4+细胞具有使CD8+细胞过度生长并竞争生长信号的趋势,并且对于稳健、持久的体内应答而言不是必需的。

[0010] 在各个实施方案中,该抗原特异性T细胞在激活后显示出多功能性表型。例如,T细胞在激活后对以下的两种或更多种呈阳性:针对IL-2、IFN- γ 产生、TNF- α 产生和CD107A的胞内染色。在各个实施方案中,至少50%或至少70%的抗原特异性T细胞显示出这些标记物中的至少两种。在各个实施方案中,至少50%或至少70%的抗原特异性T细胞显示出这些标记物中的至少三种,或者在一些实施方案中,显示出这些标记物中的全部四种。

[0011] 根据各个实施方案的细胞组合物可通过富集和扩增过程进行制备。在一些实施方案中,对一种或多种靶抗原(例如肿瘤相关抗原或病毒相关抗原)有特异性的CD8+细胞被富集。即使当源淋巴细胞中主要为原始细胞时,这种细胞群体也能够培养中快速扩增,以达到本文中所述的细胞组合物。富集可以使用顺磁珠进行以主动选择细胞群体,这由于T细胞表面受体的强效磁聚集而可以具有激活原始细胞的额外优势。例如,顺磁珠或纳米颗粒可能含有呈递肽抗原的单体或多聚的(例如,二聚的)HLA配体,以及在相同或不同颗粒上的共刺激信号,例如CD28的激动剂(例如,CD28的抗体激动剂)。在一些实施方案中,CD28+细胞也被富集,这可以与抗原特异性富集同时进行。

[0012] 在各个实施方案中,靶肽抗原为肿瘤或癌症相关抗原,包括来源于肿瘤的、肿瘤特异性的抗原和新生抗原。对肿瘤相关抗原有特异性的T细胞常常非常罕见,并且在许多情况下在健康个体的外周血中检测不到。这常常是在病毒特异性T细胞和肿瘤抗原特异性T细胞之间观察到的区别。

[0013] 在一些实施方案中,该靶肽抗原包括至少一种与病原体相关或来源于病原体的靶肽抗原,所述病原体为例如病毒、细菌、真菌或寄生病原体。例如,至少一种肽抗原可能与HIV、肝炎(例如,乙型、丙型或丁型)CMV、EB病毒(EBV)、流感、疱疹病毒(例如,HSV 1或2或水痘带状疱疹)和腺病毒相关。例如,CMV是在器官移植患者中发现的最常见的病毒性病原

体,并且是接受骨髓或外周血干细胞移植的患者发病率和死亡率的主要原因。已知病毒激活与癌症生物学有牵连。

[0014] 在另外的其他实施方案中,该细胞组合物包含对肿瘤相关抗原具有特异性的T细胞,其中病原体相关T细胞作为旁观者细胞提供。特别地,通过基于HLA肽和抗CD28的选择对CD8+T细胞进行富集,旁观者细胞将被富集并被扩增,特别是当使用能够在不存在抗原特异性激活的情况下驱动这些细胞的一些非特异性扩增的T细胞生长因子混合物时。在这些实施方案中,虽然该组合物中大部分是对靶肽具有特异性的T细胞(例如,5%到75%),但其余的T细胞(约0.25%到约25%)提供了一些针对常见病原体的免疫系统重建,这在移植后特别有益或在具有病毒病因学的癌症中是有益的。

[0015] 一些实施方案在扩增期间采用影响T细胞的增殖和/或分化的T细胞生长因子。特别有用的细胞因子包括MIP-1 β 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、IFN- γ 。在这些或其他实施方案中,将细胞在选自MIP-1 β 、IL-1 β 和IL-6的一种、两种或三种细胞因子存在下在培养中扩增。在一些实施方案中,细胞因子进一步包含IL-10。可将细胞在培养中扩增1至4周,例如约10天到约21天。

[0016] 在其他方面中,本发明提供了制造细胞组合物的方法,包括通过用如本文中所述的aAPC富集和扩增。特别地,在从源淋巴细胞(例如,来自健康供体)中去除CD4+细胞后,针对对靶肽抗原具有特异性的T细胞,以及在一些实施方案中针对CD28+细胞富集抗原特异性的CD8+T细胞。靶细胞可以利用纳米颗粒或微粒子aAPC(例如通过磁场诱导的细胞表面受体聚集离体激活T细胞的顺磁性颗粒)进行富集。包括乳胶或其他基于聚合物的颗粒在内的其他材料也可以用于使细胞表面受体聚集(无磁诱导的聚集)。然后,可以将富集的T细胞快速地离体扩增,包括使用重建的T细胞生长因子(例如,包含从MIP-1 β 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、IFN- γ 中选择的因子)。在一些实施方案中,将细胞在选自MIP-1 β 、IL-1 β 和IL-6的一种、两种或三种细胞因子以及任选的IL-10存在下在培养中扩增。在一些实施方案中,生长因子包含IL-2、IL-4、IL-6、INF- γ 和IL-1 β 或者基本由IL-2、IL-4、IL-6、INF- γ 和IL-1 β 组成。

[0017] 在其他方面中,本发明提供了用于过继细胞疗法的方法,包括用于治疗患有癌症的患者和/或接受过同种异体干细胞移植的患者的方法,所述患者接受了或未接受淋巴清除疗法、减瘤疗法、免疫调节疗法(在施用细胞疗法之前)。在治疗后可为所述细胞疗法进一步提供或不提供细胞因子支持。在一些实施方案中,该患者患有血液学癌症,该血液学癌症在一些实施方案中在同种异体干细胞移植后复发。在一些实施方案中,该患者患有急性髓性白血病(AML)或骨髓增生异常综合征。例如,在一些实施方案中,该细胞组合物包含对WT1、PRAME、生存素和细胞周期蛋白A肽抗原具有特异性的T细胞。但是,在其他实施方案中,癌症包括各种类型的实体瘤,包括癌、肉瘤和淋巴瘤。本文中描述了示例性靶肽抗原。

[0018] 在一些实施方案中,该患者患有感染性疾病或处于感染性疾病的风险中。例如,接受过HSCT的患者因免疫受损状态而处于感染性疾病的特定风险中。可被治疗或预防的感染性疾病包括细菌、病毒、朊病毒、真菌、寄生虫、蠕虫等引起的感染性疾病。此类疾病包括AIDS、乙型/丙型肝炎、CMV感染、EB病毒(EBV)感染、流感、疱疹病毒感染(包括带状疱疹)和腺病毒感染。

[0019] 其他方面和实施方案从下面的详细描述来看将是显而易见的。

附图说明

[0020] 图1显示,从供体淋巴细胞离体富集和扩增的MART-1特异性T 细胞表现出多功能性表型,包括对IL-2(增殖和记忆)、IFN- γ (激活其他T细胞、记忆、MHC上调)、TNF- α (促炎)和CD107A(颗粒酶释放、细胞毒活性)的细胞内染色。大部分T细胞表现出至少三种功能性表型。

[0021] 图2显示,使用顺磁aAPC从供体淋巴细胞离体富集和扩增的 MART-1和AML特异性T细胞主要为中枢记忆(T_{cm})和效应记忆(T_{em})表型。

[0022] 图3显示抗原特异性T细胞可以分批富集和扩增。该图还示出了对Prame₁₀₀ RHAMM、WT1和生存素抗原肽有特异性的T细胞的分批富集和扩增。

[0023] 图4显示,在单独刺激和扩增情况下的组合物具有一致的AML 抗原特异性T细胞水平。单独刺激和扩增过程一致地产生约15%抗原特异性T细胞。

[0024] 图5显示,同时发生的刺激/扩增过程产生与单独刺激/扩增相当的AML特异性T细胞频率。所示出的通过分批刺激/扩增制备的组合物具有约47%抗原特异性T细胞。

[0025] 图6显示,产生的T细胞显示出对AML肿瘤细胞(THP-1细胞系)的抗原特异性杀伤。AML特异性T细胞针对来自WT-1、PRAME 和生存素的5个表位。

[0026] 图7显示,用于离体扩增的细胞因子混合物影响所得细胞的数量和表型。重组的T细胞生长因子(TF)包括IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-21、IFN- γ 和MIP1 β 。

[0027] 图8示出了在MART-1特异性富集和扩增后第7天时病毒特异性旁观者T细胞的存在。

[0028] 图9示出了MART-1特异性富集和扩增后第14天时病毒特异性旁观者T细胞的存在。

[0029] 图10示出了AML特异性富集和扩增后第14天时病毒特异性旁观者T细胞的存在。这些细胞主要具有记忆表型。

[0030] 图11示出了在MART-1特异性富集和扩增过程中对CMV特异性旁观者T细胞的检测。病毒特异性旁观者细胞的百分比保持恒定至第14天,而MART-1特异性T细胞的百分比急剧升高。

[0031] 图12示出了使用重组T细胞生长因子混合物(IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-21、IFN- γ 和MIP1- β)进行MART-1特异性富集和扩增后第14天时对病毒特异性旁观者细胞的检测,该混合物改善了这些旁观者细胞的扩增。

[0032] 图13具有两张图(图13A和图13B),示出了通过利用重组T细胞生长因子混合物(IL-2、IL-4、IL-6、IFN- γ 和IL1- β)的富集和扩增过程产生的Mart-1特异性T细胞的特异性和表型。Mart-1特异性T细胞(图13A,右图)占培养物的约35%,并表现出中枢记忆表型(约89%)和效应记忆表型(约9%)。总培养物表现出约66%中枢记忆和约32%效应记忆的表型。

具体实施方式

[0033] 在各个方面和实施方案中,本发明提供了适用于过继免疫疗法的分离的细胞组合物,以及制造该组合物的方法和利用该细胞组合物治疗的方法。该组合物包含在药理学上可接受的载体中的至少约 10^6 个对一种或多种靶肽抗原具有特异性的CD8+T细胞。在各个实施方案中,该组合物中至少约20%的T细胞显示出中枢记忆表型或效应记忆表型,从而提供

了稳健且持久性的过继疗法。该细胞组合物不包含表达嵌合抗原受体或重组TCR的T细胞，因此在各个实施方案中，提供了那些常常会产生较疲乏的T细胞表型和较不持久的应答的技术的替代方法。

[0034] 如本文中所示，术语“一种或多种靶肽抗原”或“靶抗原”指的是离体用于例如结合人工抗原呈递细胞 (aAPC) 或专业抗原呈递细胞 (pAPC) 平台 (例如树突细胞) 来富集和/或扩增所需CD8⁺细胞群体的肽抗原。采用aAPC或pAPC激活和扩增来自供体或患者淋巴细胞的CTL。在一些实施方案中，靶肽抗原是负载至aAPC上的用于离体富集和扩增特异性CD8⁺T细胞的肽表位。因此，术语“对靶肽抗原有特异性”意指该T细胞经历过利用靶抗原进行的抗原刺激。

[0035] 在各个实施方案中，该细胞组合物包含至少约 10^7 个对靶肽抗原有特异性的CD8⁺T细胞，或至少约 10^8 个、至少约 10^9 个或至少约 10^{10} 个对靶肽抗原有特异性的CD8⁺T细胞，以提供稳健的靶细胞破坏。在一些实施方案中，该细胞组合物含有 1×10^7 至 1×10^9 个对靶抗原有特异性的CD8⁺T细胞，或者在一些实施方案中，含有 5×10^7 至 5×10^8 个对靶抗原有特异性的CD8⁺T细胞。例如，该组合物可以每毫升包含约 5×10^5 至约 5×10^6 个细胞，体积为50ml至200ml。在某些实施方案中，该组合物的体积为 ≤ 100 ml (例如，50ml至100 ml)。在各个实施方案中，该组合物的细胞至少70%是活的，并且在无菌培养基中提供，该培养基可为冷冻保护剂培养基 (例如，10% DMSO)。

[0036] 该组合物的细胞主要为CD8⁺细胞毒性淋巴细胞 (CTL)，也基本上具有中枢记忆表型或效应记忆表型。CTL通常包括以下表型群体：原始细胞、T记忆干细胞 (T_{scm})、中枢记忆细胞、效应记忆细胞和终末分化的记忆细胞。根据本发明的实施方案，对靶抗原有特异性的T细胞基本上由中枢记忆表型和效应记忆表型构成。在一些实施方案中，对靶抗原有特异性的T细胞进一步包含T记忆干细胞 (T_{scm})。该细胞组合物因此提供了持久性应答，包括在一些实施方案中抗原特异性T细胞在体内持续至少约1个月，或至少约3个月，或至少约6个月，或至少约12个月，或至少约18个月，或至少约两年。

[0037] 原始T细胞已在骨髓中分化，并成功地经历了胸腺中正负中枢选择过程。原始T细胞被认为是成熟的，并且与激活的或记忆T细胞不同，没有遇到其同源抗原。原始T细胞可以根据L-选择素 (CD62L) 的表面表达和激活标记物的缺失进行表征。在原始状态中，T细胞一般是静止的，不分裂的。根据本公开，原始T细胞被定义为CD62L⁺和CD45RA⁺。

[0038] 记忆T细胞包括T记忆干细胞 (T_{scm})、中枢记忆T细胞和效应记忆T细胞。记忆T细胞先前对其同源抗原有应答。在第二次遇到同源抗原时，记忆T细胞可以繁殖以形成更快、更强大的免疫应答。记忆T细胞至少包括效应记忆表型和中枢记忆表型。记忆T细胞亚型具有长的寿命，并且在重新暴露于其同源抗原后可以快速扩增成大量效应T细胞。

[0039] T记忆干细胞 (T_{scm}) 在本文中被定义为CD45RA⁺，并且被定义为具有选自CXCR3⁺、CD95⁺、CD11a⁺和CD58⁺的至少两种标记物 (或在一些实施方案中，至少三种或全部四种标记物)。该记忆亚群具有干细胞样的自我更新能力以及重建记忆T细胞和效应T细胞亚群的多潜能能力。 T_{scm} 细胞可代表循环T淋巴细胞的一小部分 (例如， $> 5\%$)，并且具有响应于抗原再暴露而迅速增殖并释放炎性细胞因子的能力。因此， T_{scm} 细胞是记忆T细胞亚群的子集。 T_{scm} 细胞表型可以如本文所公开的那样使用利用顺磁性人工抗原呈递细胞 (aAPC) 和重组T细胞生长因子混合物的富集和扩增过程来创建和/或控制。

[0040] 根据本公开,中枢记忆T细胞(T_{cm} 细胞)被定义为CD62L⁺和 CD45RA⁻。这种记忆亚群通常在淋巴结和外周循环中被发现。效应记忆T细胞(T_{em} 细胞)被定义为CD62L⁻和CD45RA⁻。这些记忆T细胞缺乏淋巴结归巢受体,因此在外周循环和组织中被发现。TEMRA代表重新表达CD45RA的终末分化的效应记忆细胞。这些细胞没有分裂能力,并且为CD62L⁻和CD45RA⁺。

[0041] T_{cm} 细胞显示出自我更新的能力,并且根据本发明的实施方案,对获得长寿命效应是重要的。 T_{em} 细胞也具有一定的自我更新能力,并且强烈表达对细胞毒性功能至关重要的基因。 T_{emra} 细胞也提供稳健的细胞毒性功能,但没有显示自我更新的能力。

[0042] 各个实施方案中的组合物包含基本上由 T_{scm} 、 T_{cm} 和 T_{em} 细胞构成的CTL,以平衡效应持续时间与对恶性肿瘤或其他靶细胞的有效破坏。

[0043] 在各个实施方案中,该组合物中的T细胞为至少约30%的中枢记忆细胞和效应记忆细胞,或者至少约40%的中枢记忆细胞或效应记忆细胞,或者至少约50%的中枢记忆T细胞或效应记忆T细胞,或者在一些实施方案中为至少约70%的中枢记忆细胞或效应记忆细胞,或至少约80%的中枢记忆T细胞或效应记忆T细胞。在一些实施方案中,该记忆细胞为约10:90至约90:10的中枢记忆细胞:效应记忆细胞。在一些实施方案中,该组合物中的T细胞为约25:75至约75:25 的中枢记忆细胞:效应记忆细胞。在一些实施方案中,该记忆T细胞为约40:60至约60:40的中枢记忆T细胞:效应记忆T细胞。在一些实施方案中,该细胞组合物包含低于约20%终末分化的记忆T细胞(例如, T_{emra} 细胞),或低于约10%或低于约5%或低于约4%终末分化的记忆T细胞。在各个实施方案中,该CD8⁺T细胞含有不超过约20%的原始细胞,或在一些实施方案中,含有不超过约15%的原始细胞,或不超过约10%的原始细胞,或不超过约5%的原始细胞,或不超过约4%的原始细胞,或不超过约3%的原始细胞,或不超过约2%的原始细胞,或不超过约1.5%的原始细胞,或不超过约1%的原始细胞。在各个实施方案中,该CD8⁺T细胞含有约5%至约25%的 T_{scm} 细胞,或在一些实施方案中,含有约5%至约20%的 T_{scm} 细胞,或约5%至约15%的 T_{scm} 细胞。

[0044] 在各个实施方案中,对靶抗原具有特异性的T细胞为至少约30%的中枢记忆细胞和效应记忆细胞,或者至少约40%的中枢记忆细胞或效应记忆细胞,或者至少约50%的中枢记忆T细胞或效应记忆T细胞,或者在一些实施方案中为至少约70%的中枢记忆细胞或效应记忆细胞,或至少约80%的中枢记忆T细胞或效应记忆T细胞。在一些实施方案中,这些记忆细胞为约10:90至约90:10的中枢记忆细胞:效应记忆细胞。在一些实施方案中,这些T细胞为约25:75至约75:25 的中枢记忆细胞:效应记忆细胞。在一些实施方案中,该记忆T细胞为约40:60至约60:40的中枢记忆T细胞:效应记忆T细胞。对一种或多种靶抗原具有特异性的T细胞为低于约20%终末分化的记忆T细胞(例如,TEMRA细胞),或低于约10%或低于约5%或低于约4%终末分化的记忆T细胞。在各个实施方案中,对靶抗原具有特异性的T细胞含有不超过约20%的原始细胞,或在一些实施方案中,含有不超过约15%的原始细胞,或不超过约10%的原始细胞,或不超过约5%的原始细胞,或不超过约2%或1.5%或1%的原始细胞。在各个实施方案中,对靶抗原具有特异性的T细胞含有约5%至约25%的 T_{scm} 细胞,或在一些实施方案中,含有约5%至约20%的 T_{scm} 细胞,或约5%至约15%的 T_{scm} 细胞。此表型可以通过利用顺磁性人工抗原呈递细胞(aAPC)的富集和扩增过程构建。

[0045] 在各个实施方案中,该细胞组合物为至少90%的T细胞,或至少95%的T细胞,或至少98%或至少99%的T细胞。就本公开而言,T细胞的特征在于CD3⁺细胞。T细胞一般为CD8

+。例如,该分离的细胞组合物的特征可为具有低于约10%或低于约5%的CD4+T细胞,或在一些实施方案中,具有低于约2%、低于约1.5%或低于约1%的CD4+T细胞。当离体扩增CD8+T细胞时,CD4+细胞具有使CD8+细胞过度生长并竞争生长信号的趋势,并且对于稳健、持久的应答而言不是必需的。

[0046] 据描述,多功能性CD4+和CD8+T细胞的存在与对采用肽新生抗原的癌症疫苗疗法的应答相关。Ott PA等人,An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma,*Nature* 547 (7662):217-221 (2017)。CD4+和CD8+T细胞被进一步描述为对介导肿瘤细胞破坏是重要的。参阅Tran E,Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+T cells in a patient with epithelial cancer,*Science* 344,641-645 (2014);Sahin U等人,Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer,*Nature* 547 (7662):222-226 (2017)。根据本公开,据认为过继性细胞组合物仅需要提供大量的抗原特异性CD8+T细胞用于稳健的持久性应答,特别是当抗原特异性CD8+T细胞是以足够数量提供的并且基本上为中枢记忆表型和效应记忆表型时。在各个实施方案中,该抗原特异性CD8+T细胞还包含T记忆干细胞。

[0047] 在各个实施方案中,细胞组合物基本上为CD28+。

[0048] 在各个实施方案中,该抗原特异性T细胞在激活后显示出多功能性表型。例如,在激活后,T细胞对以下中的两种或更多种呈阳性:针对作为增殖和记忆的标记物的IL-2;激活其他T细胞并诱导MHC 的记忆与上调的IFN- γ 产生;促炎标记物TNF- α 的产生;以及作为粒酶释放和细胞毒性活性的标记物的CD107A的胞内染色。在各个实施方案中,至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%或至少80%的抗原特异性T细胞显示出这些标记物中的至少三种。在各个实施方案中,至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%或至少80%的抗原特异性T细胞显示出这些标记物中的全部四种。在一些实施方案中,多功能性是使用靶杀伤测定进行评估或定量的,所述靶杀伤测定评估了CD8+细胞毒性T细胞溶解呈递与MHC 复合的靶抗原的靶细胞的能力。

[0049] 根据各个实施方案的细胞组合物可以通过富集对一种或多种靶抗原(例如,肿瘤相关抗原或病毒相关抗原)有特异性的CD8+细胞进行制备。即使当源淋巴细胞中主要为原始细胞时,这种细胞群体也能够培养中快速扩增,以达到本文中所述的细胞组合物。可以使用CD4+细胞去除微珠将CD4+细胞从淋巴细胞中去除(在抗原特异性富集前或抗原特异性富集后)。CD8+细胞的抗原特异性富集可以使用顺磁珠进行以主动选择细胞群体,并且由于T细胞表面受体的强效磁聚集,它可以具有激活原始细胞的额外优势。例如,顺磁珠或纳米颗粒可能含有呈递肽抗原的单体或多聚的(例如,二聚的)HLA配体以及共刺激信号,在一些实施方案中,例如CD28的激动剂(例如,CD28的抗体激动剂)。在WO 2016/044530和PCT/US2017/22663(均通过引用的方式整体并入本文)中描述了根据这些实施方案的示例性方法。

[0050] 在一些实施方案中,CD28+细胞也被富集,这可以与抗原特异性富集同时进行。CD28在T细胞上表达,并且是T细胞激活和存活所需的共刺激信号。CD28是在原始T细胞上组成性表达的唯一B7受体。在不存在CD28共刺激的情况下原始T细胞的TCR与MHC-抗原复合物的缔合可得到无变应性的T细胞。在一些实施方案中,CD28+细胞未被富集,但CD28激动剂在富集过程中以可溶解的形式添加,或者以与非顺磁珠缀合的形式添加。在一些实施方案

中,在抗原特异性富集之后将CD28(以缀合形式或非缀合形式)添加至细胞中,目的是激活细胞用于扩增期。

[0051] 在各个实施方案中,对靶抗原有特异性的T细胞(例如,凭借由 aAPC或pAPC展示的肽)对1至约100种靶抗原,或1至约75种靶抗原,或1至约50种靶抗原,或1至约25种靶抗原,或1至约20种靶抗原,或1至约15种靶抗原,或1至10种靶抗原,或1至5种靶抗原具有特异性。在各个实施方案中,存在至少3种或至少4种或至少5种靶抗原。在一些实施方案中,不同的靶抗原可以包括重叠的肽表位。对这些肽抗原有特异性的T细胞可以被分批富集和扩增,从而允许进行细胞组合物的快速、平行生产。在一些实施方案中,该组合物含有对5至15种或5至10种肽抗原有特异性的T细胞。针对该组合物中靶肽抗原的T细胞特异性是通过本领域中众所周知的MHC多聚体染色(例如,二聚体或四聚体染色)来界定的。

[0052] 例如,纳米aAPC的混合物(每种aAPC均可呈递不同的独特靶抗原)可以用于同时富集针对多种抗原的T细胞。例如,可以同时从淋巴细胞源富集对2至10种抗原有特异性的T细胞。在该实施方案中,将合并许多不同的纳米aAPC批次(每批携带不同的MHC肽),并用于同时富集针对每种感兴趣的抗原的T细胞。将产生的T细胞汇集物针对这些抗原中的每种抗原来激活,并在培养中一起扩增。这些抗原可能与单一疗法干预相关;例如,单一肿瘤或恶性细胞上存在的多种抗原。

[0053] 靶肽抗原通常适合于由HLA-A、B或C分子复合物呈递,并且在一些实施方案中适合于由HLA-A2分子复合物呈递。

[0054] 在各个实施方案中,该靶肽抗原为肿瘤或癌症相关抗原,包括来源于肿瘤的抗原或肿瘤特异性的抗原。对肿瘤相关抗原有特异性的T细胞常常非常罕见,并且在许多情况下在健康个体的外周血中检测不到。进一步地,该细胞常常为原始表型,特别是当使用供体T淋巴细胞时。参阅Quintarelli等人,Cytotoxic T lymphocytes directed to the preferentially expressed antigens of melanoma (PRAME) target chronic myeloid leukemia. Blood 2008;112:1876-1885。这常常是在病毒特异性T细胞和肿瘤抗原特异性T细胞之间观察到的区别。

[0055] “肿瘤相关抗原”或“癌症特异性抗原”包括由作为其来源的肿瘤或恶性细胞专一性地表达的独特肿瘤或癌症抗原、在许多肿瘤中表达但在正常成人组织中不表达的共有肿瘤抗原(癌胚抗原),以及也由产生肿瘤的正常组织表达的组织特异性抗原。肿瘤相关抗原可为例如胚胎抗原、具有异常翻译后修饰的抗原、分化抗原、突变致癌基因或肿瘤抑制基因的产物、融合蛋白,或致癌病毒蛋白。

[0056] 在一些实施方案中,该靶肽抗原包括一种或多种与血液癌症相关或来源于血液癌症的抗原,该血液癌例如白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。例如,恶性血液病可为急性髓性白血病、慢性髓性白血病、儿童急性白血病、非霍奇金淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、骨髓增生异常综合征、恶性皮肤T细胞、蕈样肉芽肿、非MF皮肤T细胞淋巴瘤、淋巴瘤样丘疹病和富含T细胞的皮肤淋巴样增生。在其他实施方案中,该靶肽抗原包括一种或多种与实体瘤相关或来源于实体瘤的抗原,该实体瘤包括黑色素瘤、结肠癌、十二指肠癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、导管癌、肝癌、胰腺癌、肾癌、子宫内膜癌、睾丸癌、胃癌、口腔黏膜异常增生、息肉病、头颈部癌、侵袭性口腔癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、间皮瘤、移行和鳞状细胞尿道癌、脑癌、神经母细胞瘤和胶质瘤。

[0057] 多种肿瘤相关抗原是本领域中已知的。癌胎抗原和胚胎抗原包括癌胚抗原和甲胎蛋白(通常仅在发育中的胚胎中高度表达,但经常分别被肝脏和结肠的肿瘤高度表达)、MAGE-1和MAGE-3(在黑色素瘤、乳腺癌和胶质瘤中表达)、胎盘碱性磷酸酶唾液酸化-路易斯X(在腺癌中表达)、CA-125和CA-19(在胃肠道肿瘤、肝脏肿瘤和妇科肿瘤中表达)、TAG-72(在结直肠癌中表达)、上皮糖蛋白2(在很多癌中表达)、胰癌胚抗原、5T4(在胃癌中表达)、甲胎蛋白受体(在多种肿瘤类型(特别是乳腺肿瘤)中表达)和M2A(在生殖细胞瘤变中表达)。

[0058] 肿瘤相关分化抗原包括酪氨酸酶(在黑色素瘤中表达)和特定的表面免疫球蛋白(在淋巴瘤中表达)。

[0059] 突变致癌基因或肿瘤抑制基因产物包括Ras和p53(这二者在许多肿瘤类型中表达)、Her-2/neu(在乳腺癌和妇科癌症中表达)、EGF-R、雌激素受体、孕激素受体、视网膜母细胞瘤基因产物、myc(与肺癌相关)、ras、p53、与乳腺肿瘤相关的非突变体、MAGE-1和MAGE-3(与黑色素瘤、肺癌和其他癌症相关)。融合蛋白包括BCR-ABL,其是在慢性髓系白血病中表达的。致癌病毒蛋白包括在宫颈癌中发现的HPV 16、E6和E7型。

[0060] 组织特异性抗原包括黑素转铁蛋白和MUC1(在胰腺癌和乳腺癌中表达);CD10(先前称为常见的急性淋巴母细胞白血病抗原或CALLA)或表面免疫球蛋白(在B细胞白血病和淋巴瘤中表达);IL-2受体、T细胞受体、CD45R、CD4+/CD8+的 α 链(在T细胞白血病和淋巴瘤中表达);前列腺特异性抗原和前列腺酸性磷酸酶(在前列腺癌中表达);GP 100、MelanA/Mart-1、酪氨酸酶、gp75/棕色、BAGE和S-100(在黑色素瘤中表达);细胞角蛋白(在各种癌中表达);以及CD19、CD20和CD37(在淋巴瘤中表达)。

[0061] 肿瘤相关抗原还包括改变的糖脂和糖蛋白抗原,例如含神经氨酸的鞘糖脂(例如,在黑色素瘤和一些脑肿瘤中表达的GM2和GD2);可在癌中异常表达的血型抗原,特别是T和唾液酸化的Tn抗原;以及黏蛋白,如CA-125和CA-19-9(在卵巢癌上表达)或低糖基化MUC-1(在乳腺癌和胰腺癌上表达)。

[0062] 例如,在一些实施方案中,一种或多种靶抗原与膀胱癌相关,例如NY-ESO-1、MAGE-A10和MUC-1抗原中的一种或多种。在一些实施方案中,一种或多种靶抗原与脑癌相关,并且可能包括NY-ESO-1、生存素和CMV抗原中的一种或多种。在一些实施方案中,一种或多种靶抗原与乳腺癌相关,并且可能包括MUC-1、生存素、WT-1、HER-2和CEA抗原中的一种或多种。在一些实施方案中,一种或多种靶抗原与宫颈癌相关,并且可能包括HPV抗原。在一些实施方案中,一种或多种靶抗原与结直肠癌相关,并且可能包括NY-ESO-1、生存素、WT-1、MUC-1和CEA抗原中的一种或多种。在一些实施方案中,一种或多种靶抗原与食管癌相关,并且可能包括NY-ESO-1抗原。在一些实施方案中,一种或多种靶抗原可能与头颈癌相关,并且可能包括HPV抗原。在一些实施方案中,该靶抗原与肾癌或肝癌相关,并且可能包括NY-ESO-1抗原。在一些实施方案中,该靶抗原与肺癌相关,并且可能包括NY-ESO-1、生存素、WT-1、MAGE-A10和MUC-1抗原中的一种或多种。在一些实施方案中,一种或多种靶抗原与黑色素瘤相关,并且可能包括NY-ESO-1、生存素、MAGE-A10、MART-1和GP-100中的一种或多种。在一些实施方案中,一种或多种靶抗原与卵巢癌相关,并且可能包括NY-ESO-1、WT-1和间皮素抗原中的一种或多种。在一些实施方案中,一种或多种靶抗原与前列腺癌相关,并且可能包括生存素、hTERT、PSA、PAP和PSMA抗原中的一种或多种。在一些实施方案中,该靶抗原与肉瘤

相关,并且可能包括NY-ESO-1抗原。在一些实施方案中,一种或多种靶抗原与淋巴瘤相关,并且可能包括EBV抗原。在一些实施方案中,一种或多种靶抗原与多发性骨髓瘤相关,并且可能包括NY-ESO-1、WT-1 和SOX2抗原中的一种或多种。

[0063] 在一些实施方案中,一种或多种靶抗原与急性髓性白血病或骨髓增生异常综合征相关,并且可能包括生存素、WT-1、PRAME、RHAMM、PR3和细胞周期蛋白A1抗原中的一种或多种(包括1、2、3、4或5种)。在一些实施方案中,该靶抗原包括来自下文表1的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10种或全部靶抗原。

[0064] 表1:示例性AML靶肽抗原

抗原	肽名称/位置	序列	SEQ ID NO:	
[0065]	WT-1	126-134	RMFPNAPYL	SEQ ID NO:1
		235-243	CMTWNQMNL	SEQ ID NO:2
		37-45	VLDFAPPGA	SEQ ID NO:3
	187-195	SLGEQQYSV	SEQ ID NO:4	
[0066]	Prame	P100	VLDGLDVLL	SEQ ID NO:5
		P435	NLTHVLYPV	SEQ ID NO:6
		P142	SLYSFPEPEA	SEQ ID NO:7
		P300	ALYVDSLFFL	SEQ ID NO:8
		P425	SLLQHLLIGL	SEQ ID NO:9
	生存素	ELT 95-104	ELTLGEFLKL	SEQ ID NO:10
		LDR 104-113	LDRERAKNKI	SEQ ID NO:11
	细胞周期蛋白A1	227-235	FLDRFLSCM	SEQ ID NO: 12
		341-351	SLIAAAAFCLA	SEQ ID NO: 13

[0067] 在一些实施方案中,一种或多种靶肽抗原为新生抗原。例如,在一些实施方案中,鉴定出对患者有特异性的新生抗原并合成该新生抗原用于加载aAPC。在一些实施方案中,通过对患者恶性肿瘤的遗传分析(例如,通过对恶性细胞的核酸测序),然后通过预测性生物信息学来鉴定3至10种新生抗原。在一些实施方案中,该抗原为自然的非突变的癌症抗

原,其中很多是已知的。

[0068] 在各个实施方案中,通过低频前体T细胞识别出至少一种靶肽抗原。根据这些实施方案,本发明使得这些细胞能够被快速地激活和扩增用于过继疗法。

[0069] 在一些实施方案中,该靶肽抗原包括至少一种与病原体相关或来源于病原体的抗原,所述病原体为例如病毒、细菌、真菌或寄生病原体。例如,至少一种肽抗原可能与HIV、肝炎(例如,甲型、乙型、丙型或丁型)CMV、EB病毒(EBV)、流感、疱疹病毒(例如,HSV 1 或2或水痘带状疱疹)和腺病毒相关。例如,CMV是在器官移植患者中发现的最常见的病毒性病原体,并且是接受骨髓或外周血干细胞移植的患者发病率和死亡率的主要原因。这是由于这些患者的免疫受损状况所致,该免疫受损状况允许血清阳性患者中的潜伏病毒再激活或血清阴性个体中出现机会性感染。在这些实施方案中,患者可接受包含对病原体抗原有特异性的T细胞的过继性免疫疗法。该方法可能需要在移植手术开始前产生源自患者或适当的供体的病毒特异性CTL。

[0070] 在一些实施方案中,至少一种靶抗原为病原体相关抗原,包括与原生动物、细菌、真菌(单细胞和多细胞)、病毒、朊病毒、胞内寄生虫、蠕虫和其他感染因子相关的抗原。

[0071] 细菌抗原包括革兰氏阳性球菌、革兰氏阳性杆菌、革兰氏阴性菌、厌氧菌的抗原,例如放线菌科、芽孢杆菌科、巴尔通体科、博德特菌科(Bordetellae)、噬纤维菌科(Captophagaceae)、棒杆菌科、肠杆菌科、军团菌科、微球菌科、分枝杆菌科、诺卡菌科、巴斯德菌科、假单胞菌科、螺旋体科、弧菌科的生物以及不动杆菌属、布鲁杆菌属、弯曲杆菌属、丹毒丝菌属、爱文菌属(Ewingella)、弗朗西丝菌属、加德纳菌属、螺杆菌属、雷夫癣菌属(Levine)、李斯特菌属(Listeria)、链杆菌属和吸收障碍菌属(Tropheryma)的生物。

[0072] 原生动物感染因子的抗原包括三日疟原虫(malarial plasmodia)、利什曼原虫属物种、锥虫属物种和血吸虫属物种的抗原。

[0073] 真菌抗原包括曲霉属、芽生菌属、念珠菌属、球孢菌属、隐球菌属、组织胞浆菌属、副球孢子菌属(Paracoccidioides)、孢子丝菌属、毛霉菌目的生物、诱发产色霉菌病(chromycosis)和足分支菌病的生物,以及发癣菌属、小孢子菌属、表皮癣菌属和马拉色菌属的生物的抗原。

[0074] 病毒肽抗原包括但不限于腺病毒、单纯疱疹病毒、乳头状瘤病毒、呼吸道合胞病毒、痘病毒、HIV、流感病毒、EBV、肝炎和CMV的抗原。特别有用的病毒肽抗原包括HIV蛋白,例如HIV gag蛋白(包括但不限于膜锚定(MA)蛋白、核心衣壳(CA)蛋白和核衣壳(NC)蛋白)、HIV聚合酶、流感病毒基质(M1)蛋白和流感病毒核衣壳(NP)蛋白、乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎核心蛋白(HBcAg)、戊型肝炎蛋白(HBeAg)、乙型肝炎DNA聚合酶、丙型肝炎抗原等。

[0075] 在一些实施方案中,该靶肽抗原包括一种或多种肿瘤相关抗原以及一种或多种病毒相关抗原(例如CMV、EBV、流感或腺病毒),以便提供抗肿瘤应答,同时抵御使HSCT后恢复复杂化的常见病原体。

[0076] 接受过HSCT的患者因免疫受损状态而处于感染性疾病的特定风险中。这些患者的免疫受损状况允许血清阳性患者中潜伏病毒再激活或血清阴性个体中出现机会性感染。例如,移植后淋巴组织增生性疾病(PTLD)发生在相当一部分移植患者中,是由EB病毒(EBV)感染所致的。据认为,美国约90%的成人群体中存在EBV感染。活跃的病毒复制和感染受免疫

系统的控制,但与CMV的情况一样,因移植疗法而免疫受损的个体失去对T细胞群的控制,这允许病毒再激活。这代表了移植方案的严重阻碍。EBV还可能参与了多种血液和非血液癌症的肿瘤促进。

[0077] 在另外的其他实施方案中,该细胞组合物包含对肿瘤相关抗原具有特异性的T细胞,其中病原体相关T细胞作为旁观者细胞提供。特别地,通过基于利用HLA肽复合物和抗CD28选择来对CD8⁺T细胞进行富集,旁观者细胞将被富集并被扩增,特别是当使用能够在不存在抗原特异性激活的情况下驱动这些细胞的一些非特异性扩增的T细胞生长因子混合物时。在这些实施方案中,虽然该组合物中大部分是对靶肽具有特异性的T细胞(例如,5%到75%,或10%到50%),但剩余的T细胞提供了一些针对常见病原体的免疫系统重建,这在移植后特别有益。例如,该组合物可包含对CMV、EBV、流感和腺病毒具有特异性的T细胞。在每种情况下,病原体特异性T细胞可以以占该组合物的0.1%到约4%的量存在。

[0078] 在各个实施方案中,本发明涉及通过富集和扩增抗原特异性CD8⁺T细胞制备的组合物。前体T细胞可从患者或从合适的HLA匹配的供体获得。源T细胞可为新鲜样本或冷冻样本。前体T细胞可从包含WBC的许多来源获取,包括外周血单核细胞(PBMC)、骨髓、淋巴结组织、脾脏组织、血沉棕黄层级分和肿瘤。在一些实施方案中,前体T细胞是使用本领域的人员或技术人员已知的任何数量的技术从受试者收集的血液单位中获取的。例如,来自个体的循环血的前体T细胞可通过单采或白细胞单采获得。单采产品通常含有淋巴细胞,包括T细胞和前体T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞和血小板。白细胞单采是一种从血样中分离白细胞的实验室程序。

[0079] 可以对通过单采收集的细胞进行洗涤,以除去血浆成分并将细胞置于适当的缓冲液或培养基中用于后续处理步骤。洗涤步骤可通过本领域技术人员已知的方法,例如通过使用半自动“流通式”离心机来完成。洗涤后,可将细胞再混悬于各种生物相容的缓冲液,例如不含钙不含镁的PBS中。可替代地,可以除去单采样品中的不需要的组分,并将细胞直接再混悬于培养基中。

[0080] 如果需要,可以通过溶解红细胞并除去单核细胞(例如,通过经PERCOLL™梯度离心),从外周血淋巴细胞中分离前体T细胞。

[0081] 在某些实施方案中,通过白细胞单采收集白细胞,随后可例如通过去除样本中的CD4⁺细胞和/或正富集CD8⁺细胞来富集CD8⁺T细胞。在一些实施方案中,去除其他细胞类型,例如NK细胞。然后,可对富含CD8的细胞进一步进行抗原特异性T细胞的富集。

[0082] 在各个实施方案中,使包含免疫细胞(例如CD8⁺T细胞)的样本与具有磁特性的人工抗原提呈细胞(aAPC)接触。顺磁材料对磁场具有小的正磁化率。这些材料受磁场吸引,当除去外场时,材料不保留磁性。示例性顺磁材料包括但不限于镁、钼、锂、钽和铁氧化物。适合磁富集的顺磁珠可从市场上获取(DYNABEADS™,MACS MICROBEADS™,Miltenyi Biotec)。在一些实施方案中,该aAPC颗粒是右旋糖酐铁珠(例如,右旋糖酐包被的氧化铁珠)。

[0083] 抗原呈递复合物包含抗原结合槽,并且一般为MHC I类,其可以被连接或栓接以提供二聚的或多聚的MHC。在一些实施方案中,该MHC为单体的,但它们在纳米颗粒上的密切缔合足以实现亲合与激活。在一些实施方案中,该MHC为二聚的。二聚的MHC I类配体可以通过与免疫球蛋白重链序列融合来进行构建,该免疫球蛋白重链序列然后通过一个或多个二硫键进行缔合(与相关的轻链缔合或不与相关的轻链缔合)。MHC多聚体可以通过经由肽或化

学接头的直接栓接而产生,或者可以通过经由生物素部分与抗生蛋白链菌素缔合而形成多聚体。在一些实施方案中,该抗原呈递复合物为涉及与免疫球蛋白序列的融合的MHC I类复合物。

[0084] 美国专利6,268,411(其通过引用的方式整体纳入本文)中描述了具有免疫球蛋白序列的MHC I类分子复合物。这些MHC I类分子复合物可在免疫球蛋白重链的末端以构象完整的方式形成。与抗原肽结合的MHC I类分子复合物能够稳定地与抗原特异性淋巴细胞受体(例如,T细胞受体)结合。在各个实施方案中,该免疫球蛋白重链序列不是全链长的,但是包含Ig铰链区以及CH1、CH2和/或CH3结构域中的一个或多个。Ig序列可以包含或不包含可变区,但在存在可变区序列的情况下,可变区可为完整的或部分的。该复合物还可包含免疫球蛋白轻链。如W0 2016/105542(其通过引用的方式整体并入本文)中所述的,缺乏可变链序列(并且缺乏任何轻链)的MHC I类配体(例如,HLA-Ig)以与颗粒定点缀合的方式被采用。

[0085] 示例性MHC I类分子复合物包含至少两种融合蛋白。第一融合蛋白包含第一MHC I类 α 链和第一免疫球蛋白重链(或其包含铰链区的部分),并且第二融合蛋白包含第二MHC I类 α 链和第二免疫球蛋白重链(或其包含铰链区的部分)。第一和第二免疫球蛋白重链缔合形成MHC I类分子复合物,其包含两个MHC I类肽结合槽。该免疫球蛋白重链可为IgM、IgD、IgG1、IgG3、IgG2 β 、IgG2 α 、IgG4、IgE 或IgA的重链。在一些实施方案中,使用IgG重链形成MHC I类分子复合物。如果需要多价MHC I类分子复合物,可以使用IgM或IgA 重链来分别提供五价或四价分子。

[0086] 示例性I类分子包括HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E,并且这些分子可以单独或以任何组合使用。在一些实施方案中,该抗原呈递复合物为HLA-A2配体。如本文中使用的术语MHC在每个例子中均可用HLA替代。

[0087] 一些实施方案中的免疫球蛋白序列为人源化单克隆抗体序列。

[0088] aAPC可含有“信号2”,例如抗-CD28配体。信号2一般为影响分子的T细胞,即对前体T细胞或抗原特异性T细胞具有生物影响的分子。在某些实施方案中,信号2是T细胞共刺激分子。T细胞共刺激分子有助于激活抗原特异性T细胞。此类分子包括但不限于与CD28(包括抗体)、CD80(B7-1)、CD86(B7-2)、B7-H3、4-1BB、4-1BBL、CD27、CD30、CD134(OX-40L)、B7h(B7RP-1)、CD40、LIGHT特异性结合的分子,与HVEM特异性结合的抗体,与CD40L特异性结合的抗体以及与OX40特异性结合的抗体。在一些实施方案中,该共刺激分子(信号2)是抗体(例如,单克隆抗体)或其一部分,例如F(ab')₂、Fab、scFv或单链抗体或其他抗原结合片段。在一些实施方案中,该抗体是人源化单克隆抗体或其具有抗原结合活性的部分,或者是全人抗体或其具有抗原结合活性的部分。

[0089] 可以采用的共刺激配体的组合(在相同或不同的纳米颗粒上)包括抗CD28/抗CD27和抗CD-28/抗41BB。这些共刺激配体的比率可以改变以影响扩增。

[0090] W0 2014/209868中描述了示例性信号1和信号2配体,该文描述了这样的配体,其具有游离巯基(例如,未配对的半胱氨酸),使得恒定区可与具有适当化学官能团的纳米颗粒载体偶联。

[0091] 对纳米aAPC有用的黏附分子可以用于介导纳米aAPC与T细胞或与T细胞前体的黏附。有用的黏附分子包括例如ICAM-1和LFA-3。

[0092] 在一些实施方案中,信号1是由肽-HLA-A2复合物提供,信号2 是由B7.1-Ig或抗

CD28提供。示例性抗CD28单克隆抗体为9.3mAb (Tan等人, J.Exp.Med.1993 177:165), 其在某些实施方案中可以被人源化, 并且/或者以完全的完整抗体或其抗原结合片段的形式与珠缀合。

[0093] 磁激活可发生2分钟至5小时, 或5分钟至至2小时, 随后在培养中扩增至少5天, 并且在一些实施方案中可达2周或达3周。在一些实施方案中, 磁激活发生至少2分钟, 但短于30分钟 (例如, 约5 或10分钟)。可对所得CD8⁺T细胞进行表型表征, 以确认T记忆干细胞 (T_{scm}) 以及高中枢记忆表型和效应记忆表型的存在。

[0094] 一些实施方案在扩增期间采用影响T细胞的增殖和/或分化的T 细胞生长因子。T细胞生长因子的实例包括细胞因子 (例如, 白介素、干扰素) 和超抗原。如果需要, 细胞因子可以存在于包含融合蛋白的分子复合物中, 或者可以被aAPC包裹, 或者以可溶解形式提供。特别有用的细胞因子包括MIP-1 β 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、IFN- γ 和CXCL10。在一些实施方案中, 该生长因子包括来自MIP-1 β 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-15、IL-21 和INF- γ 的3、4、5或6种。在这些或其他实施方案中, 该细胞在选自MIP-1 β 、IL-1 β 和IL-6的一种、两种、三种细胞因子以及任选的 IL-10存在下在培养中扩增。在一些实施方案中, 该细胞未在IL-7和 /或IL-21和/或IL-15存在下进行培养。细胞可以在培养中扩增1至4 周, 例如约2周 (约14天) 或约3周。

[0095] 在一些实施方案中, 将该细胞在4至8种细胞因子存在下在培养中扩增, 以达到T细胞扩增 (包括抗原特异性T细胞扩增)、激活和记忆表型间之间的平衡。在一些实施方案中, 将该细胞在IL-4存在下扩增。在一些实施方案中, 将该细胞在IL-4和IL-6存在下扩增。在一些实施方案中, 将该细胞在IL-4和IL-1 β 存在下扩增。在一些实施方案中, 将该细胞在IL-4、IL-6和IL-1 β 存在下扩增。在一些实施方案中, 将该细胞在IL-2、IL-4和IL-6存在下扩增。在一些实施方案中, 将该细胞在IL-2、IL-4、IL-6、INF- γ 和IL-1 β 存在下扩增。在一些实施方案中, 将该细胞在IL-10存在下进一步扩增。

[0096] 在一些实施方案中, 生长因子由或基本上由IL-2、IL-4、IL-6、INF- γ 和IL-1 β 以及任选的IL-10组成。

[0097] 在一些实施方案中, IL-2在培养开始时以10至200国际单位 (IU) /ml, 例如约20至约100IU/ml, 或约20至约60IU/ml的量存在。在一些实施方案中, IL-2在培养开始时以约30至约50IU/ml (例如, 约40IU/ml) 的量存在。IL-2IU (86/500NIBSC) 可用增殖测定 (例如, 使用CTLL-2细胞系) 进行测定, 如例如Gearing和Bird (1987) 在 Lymphokines and Interferons, A Practical Approach. Clemens, MJ等人 (编著): IRL Press. 295中所述的。在一些实施方案中, IL-2在培养开始时以约2至约25ng/ml, 例如约5至约15ng/ml的量存在。

[0098] 在这些或独立的实施方案中, IL-4在培养开始时以0.2至25国际单位 (IU) /ml, 例如约0.5至约10IU/ml, 或约0.5至约5IU/ml的量存在。在一些实施方案中, IL-4在培养开始时以约1IU/ml的量存在。IL-4IU (88/656NIBSC) 可使用增殖测定 (例如, 使用TF-1细胞系) 进行界定, 如例如Kitamura T.等人 (1991) IL-1 up-regulates the expression of cytokine receptors on a factor-dependent human hemopoietic cell line, TF-1. Int. Immunol. 3:571-577中所述的。在一些实施方案中, IL-4在培养开始时以约0.2至约2ng/mL, 例如约0.2至约1ng/ml (例如, 约 0.5ng/ml) 的量存在。

[0099] 在这些或独立的实施方案中, IL-6可在培养开始时以10至200 国际单位 (IU) /ml,

例如约25至约100IU/ml,例如25至75IU/ml的量存在。在一些实施方案中,IL-6在培养开始时以约40至约60 IU/ml(例如,约50IU/ml)的量存在。IL-6IU(89/548NIBSC)可使用增殖测定(例如,使用B9细胞系)来界定,如例如Gaines-Das RE和Poole S.(1993)在The international standard for interleukin-6.Evaluation in an international collaborative study.J.Immunol.Methods 160:147-153中所述的。在一些实施方案中,IL-6在培养开始时以约0.2至约10ng/ml,例如约0.2至约5ng/ml(例如,约0.5-2ng/ml)的量存在。

[0100] 在这些或独立的实施方案中,干扰素 γ (INF- γ)可在培养开始时以10至200国际单位(IU)/ml,例如约20至约100IU/ml,例如20至60 IU/ml的量存在。在一些实施方案中,INF- γ 在培养开始时以约30至约50IU/ml(例如,约40IU/ml)的量存在。INF- γ IU(87/586NIBSC)可使用抗病毒测定(例如,使用被EMC感染的HeLa细胞)进行界定,如例如在Meager A.(1987)Lymphokines and interferons,a Practical Approach.Clemens,MJ等人(编著):IRL Press.129中所述的。在一些实施方案中,INF- γ 在培养开始时以约0.5至约20ng/ml,例如约1 至约10ng/ml(例如,1至5ng/ml)的量存在。

[0101] IL-1 β 可在培养开始时以5至100国际单位(IU)/ml,例如约10 至约50IU/ml,例如10至约30IU/ml的量存在。在一些实施方案中,IL-1 β 在培养开始时以约10至约20IU/ml(例如,约15IU/ml)的量存在。IL-1 β IU(86/680NIBSC)可使用增殖测定(例如,使用D.10.G4.1细胞)进行界定,如例如Poole,S.和Gaines-Das,RE(1991)The international standard for interleukin-1 beta.Evaluation in an international collaborative study.J.Immunol.Methods142:1-13中所描述的。在一些实施方案中,IL-1 β 在培养开始时以约0.2至约5ng/ml,例如约0.2至约2ng/ml,或者约0.2至约1ng/ml的量存在。

[0102] 在各个实施方案中,该细胞是在包含IL-2、IL-4、IL-6、INF- γ 和IL-1 β 或者由IL-2、IL-4、IL-6、INF- γ 和IL-1 β 组成的生长因子混合物存在下培养的。在一些实施方案中,IL-2和INF- γ 的相对活性(按相应的IU界定)为约0.5:1至约1:0.5(例如,约1:1)。在这些或独立的实施方案中,IL-2和IL-6的相对活性(按相应的IU界定)为约0.5:1至1:0.5。在这些或独立的实施方案中,IL-1 β 相对于IL-2、IL-6和/或INF- γ 的相对活性(按相应的IU界定)是1:4至1:2(例如,1:3)。在这些或独立的实施方案中,IL-4相对于IL-2、IL-6和/或INF- γ 的相对活性(按相应的IU界定)是1:30至1:60。在这些或独立的实施方案中,IL-4相对于IL-1 β 的相对活性(按相应的IU界定)是约1:5至约1:25,例如约1:10至约1:20。

[0103] 在一些实施方案中,培养开始时每种生长因子(IL-2、IL-4、IL-6、INF- γ 和IL-1 β)的比活性(IU),可以表示为当培养物中所有生长因子的总IU被视为100%时的百分比。例如,在一些实施方案中,培养物中每种生长因子的百分比可以如下:

[0104] 20%至40%IL-2(例如,20至30%IL-2);

[0105] 0.5%至5%IL-4(例如,1至3%IL-4);

[0106] 25%至50%IL-6(例如,30至40%IL-6);

[0107] 20%至40%INF- γ (例如,20至30%INF- γ);以及

[0108] 5%至20%IL-1 β (例如,5至15%IL-1 β)。

[0109] aAPC纳米颗粒可以由任何材料制成,并且材料可以根据所需的磁特性适当选择,并且可以包括例如金属,例如铁、镍、钴,或稀土金属的合金。顺磁材料也包括镁、钼、锂、钽

和铁氧化物。适合于富集材料(包括细胞)的顺磁珠可从市场上获取,并且包括右旋糖酐铁珠,例如右旋糖酐包被的氧化铁珠。在不需要磁特性的本发明的方面中,纳米颗粒也可由非金属或有机(例如,高分子)材料,例如纤维素、陶瓷、玻璃、尼龙、聚苯乙烯、橡胶、塑料或乳胶制成。用于制备纳米颗粒的示例性材料是聚(乳酸-乙醇酸)共聚物(PLGA)或PLA及其共聚物,其可与这些实施方案结合使用。可以采用的包括聚合物和共聚物在内的其他材料包括PCT/US2014/25889(其通过引用的方式整体并入本文)中所述的材料。

[0110] 在各个实施方案中,该颗粒的大小(例如,平均直径)在约10至约500nm范围内,或在约40至约400nm范围内,或在约100nm至约400nm范围内。对于磁聚集而言,在一些实施方案中优选该纳米颗粒的大小在10至250nm范围内或在20至100nm范围内。在细胞-纳米颗粒界面处的受体-配体相互作用尚不清楚。但是,纳米颗粒结合和细胞激活对膜空间组织敏感,该膜空间组织在T细胞激活过程中特别重要,并且磁场可以用于操控被簇结合的纳米颗粒以提高激活。例如,T细胞激活诱导持续增强的纳米级TCR聚集状态,纳米颗粒对这种聚集敏感,而较大颗粒则不会。

[0111] 此外,纳米颗粒与TCR簇的相互作用可以用于增强受体触发。T细胞激活受信号转导蛋白的团聚介导,其中“信号转导簇”跨越数百纳米,在T细胞-APC接触位点的边缘初步形成并向内迁移。如本文所述,外部磁场可以用于富集抗原特异性T细胞(包括罕见的原始细胞)并用于驱动与TCR结合磁性纳米aAPC的团聚,从而导致TCR簇团聚和原始T细胞激活增强。磁场可以对顺磁性颗粒施加适当的强大作用力,但在其他方面是生物惰性的,这使它们成为控制颗粒行为的有力工具。与顺磁性纳米aAPC结合的T细胞在外部施加的磁场存在下被激活。纳米aAPC本身被磁化,并被场源和场中附近的纳米颗粒吸引,从而诱导珠并且因此诱导TCR团聚以提升aAPC介导的激活。

[0112] 激活化学可以用于实现分子与纳米颗粒表面的特异性稳定连接。有多种方法可以用于使蛋白质连接至官能团。例如,在一个两步的工艺中,可使用常见的交联剂戊二醛将蛋白质胺基团连接至胺化的纳米颗粒表面。由此得到的连接键在水解上是稳定的。其他方法包括使用含有n-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯(其与蛋白质上的胺反应)的交联剂、含有活性卤素(其与含胺、巯基或组氨酸的蛋白质反应)的交联剂、含有环氧化物(其与胺或巯基反应)的交联剂、马来酰亚胺基团与巯基基团之间的缀合,以及蛋白醛基的形成(其通过用高碘酸盐氧化侧接糖部分,接着还原胺化来进行)。

[0113] 当在相同或不同的颗粒上同时使用时,特定配体的比率可以改变,以增加纳米颗粒在抗原或共刺激配体呈递中的有效性。例如,纳米颗粒可以与HLA-A2-Ig和抗CD28(或其他信号2配体)以多种比率,例如约30:1、约25:1、约20:1、约15:1、约10:1、约5:1、约3:1、约2:1、约1:1、约0.5:1、约0.3:1、约0.2:1、约0.1:1或约0.03:1进行偶联。在一些实施方案中,该比率是2:1至1:2。与载体偶联的蛋白质总量可为例如约250mg/ml、约200mg/ml、约150mg/ml、约100 mg/ml,或约50mg/ml颗粒。由于诸如细胞因子释放和生长的效应子功能与T细胞激活和分化相比,对信号1与信号2有不同要求,因此这些功能可以单独测定。

[0114] 在某些实施方案中,该aAPC是50至150nm范围内的顺磁颗粒,其中PDI(大小分布)低于0.2,或在一些实施方案中低于0.1。aAPC可具有0至-10mV,例如约-2至-6mV的表面电荷。aAPC每个颗粒可具有10至120个配体,例如每个颗粒约25至约100个配体,其中配体通过在免疫球蛋白序列的Fc区中引入的游离半胱氨酸而与颗粒缀合。颗粒可含有约1:1比率的

HLA二聚体:抗CD28,其可以存在于相同或不同的颗粒群上。纳米颗粒提供了同源T细胞的强有力的扩增,同时表现出对非同源TCR无刺激,即使在被动加载肽抗原的情况下也是如此。颗粒在冻干形式下可稳定至少两年或三年。

[0115] 在富集和扩增后,样本的抗原特异性T细胞组分将为至少约5%,或至少约10%,或至少约15%,或至少约20%,或至少约25%的抗原特异性T细胞。进一步地,这些T细胞一般显示出记忆表型(包括中枢记忆干细胞和效应记忆干细胞,以及T记忆干细胞)。从分离自患者的原始样本,将各个实施方案中的抗原特性T细胞扩增(在约7天中)约100倍到约10,000倍,例如至少约100倍,或至少约200倍。在2周后,抗原特异性T细胞在各个实施方案中扩增了至少1,000倍或至少约2,000倍、至少约3,000倍、至少约4,000倍或至少约5,000倍。在一些实施方案中,两周后抗原特异性T细胞扩增了大于5,000倍或大于10,000倍。在扩增一周或两周后,得到至少约 10^6 或至少约 10^7 或至少约 10^8 或至少约 10^9 个抗原特异性T细胞。

[0116] 合适的培育条件(培养基、温度等)包括用于培养T细胞或T细胞前体的条件,以及用于使用DC或人工抗原呈递细胞诱导抗原特异性T细胞形成的本领域已知的条件。

[0117] 该细胞组合物可以通过包括静脉输注、动脉内施用、淋巴管内施用和肿瘤内施用在内的任何适当的途径施用于患者。

[0118] 在一些实施方案中,患者在通过过继转移接受细胞组合物之前(或者任选地在通过过继转移接受细胞组合物之后)接受一种或多种检查点抑制剂的免疫疗法。在各个实施方案中,一种或多种检查点抑制剂靶向CTLA-4或PD-1/PD-L1中的一种或多种,它们可以包括针对此类靶标的抗体,例如单克隆抗体或其部分或其人源化或完全人源化的版本。在一些实施方案中,该检查点抑制剂疗法包含伊匹木单抗(ipilimumab)或可瑞达(帕博利珠单抗)。

[0119] 在一些实施方案中,该患者接受约1至5轮过继免疫疗法(例如,一轮、两轮、三轮、四轮或五轮过继免疫疗法)。在一些实施方案中,过继免疫疗法的每次施用与一轮检查点抑制剂疗法同时进行或在一轮检查点抑制剂疗法之后(例如,在一轮检查点抑制剂疗法之后约1天至约1周)进行。在一些实施方案中,在给予检查点抑制剂剂量后约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天或约1周提供过继免疫疗法。在一些实施方案中,该患者仅接受细胞组合物的单次施用。

[0120] 在一些方面中,本发明提供了个体化癌症免疫疗法的方法。该方法是通过使用aAPC来鉴定患者将对其作出应答的抗原,并随后向患者施用适当的载肽aAPC,或随后离体富集和扩增抗原特异性T细胞来完成的。

[0121] 全基因组测序极大地改变了我们对癌症生物学的理解。癌症测序已经产生关于许多人类癌症发展所涉及的分子过程的重要数据。已在参与调节以下三个主要细胞过程的途径的主要基因中鉴定出驱动突变:(1)细胞命运;(2)细胞存活;(3)基因组维持。Vogelstein等人,Science 339,1546-58(2013)。

[0122] 全基因组测序也有可能彻底改变我们的癌症免疫疗法途径。测序数据可以提供有关癌症免疫疗法的共享靶标以及个性化靶标的信息。原则上,突变蛋白是免疫系统的外来物,是推定的肿瘤特异性抗原。实际上,测序工作已经定义了数百个,甚至数千个潜在相关的免疫靶标。有限的研究已经证明,针对这些新表位的T细胞应答可以在癌症患者中发现或由癌症疫苗诱导。但是,此类针对特定癌症的应答的频率和患者之间共享此类应答的程度

尚不清楚。我们对肿瘤特异性免疫应答的了解有限的一个主要原因是，目前验证潜在免疫相关靶标的途径繁琐且耗时。

[0123] 尽管中枢耐受消除了T细胞对自身蛋白的应答，但致癌突变诱导了针对其可以形成T细胞应答的新表位。来源于全外显子测序的突变目录提供了用于鉴定此类新表位的起点。使用HLA结合预测算法 (Srivastava, PLoS One 4, e6094 (2009)), 预测每种癌症可以具有达7 至10个新表位。一种相似的途径预测了数百种肿瘤新表位。然而，此类算法预测T细胞应答的准确度可能很低，预计仅10%的预测HLA 结合表位在HLA的背景下结合 (Lundegaard C, Immunology 130, 309-18 (2010))。因此，预测的表位必须针对是否存在对抗这些潜在新表位的 T细胞应答来进行验证。

[0124] 在某些实施方案中，使用纳米aAPC系统筛选用于在多种癌症中或在特定患者癌症中诱导T细胞应答的新表位。可以例如通过全外显子测序对癌症进行基因分析。

[0125] 候选肽列表可以由突变蛋白中重叠的九个氨基酸窗口生成。将选择含有突变氨基酸的全部九个AA窗口和每种蛋白质的2个非突变“对照品”。将使用包括Net MHC和稳定基质方法 (SMM) 在内的 MHC结合预测算法的共识，对这些候选肽的MHC结合进行计算评估。纳米-aAPC和MHC结合算法是主要针对HLA-A2等位基因开发的。可以调节共识预测的灵敏度截止值，直至鉴定出可处理数量的含突变的肽 (~500) 和非突变对照肽 (~50)。

[0126] 在示例性实施方案中，该细胞组合物包含在药学上可接受的载体中的：至少90%的CD8+T细胞和小于5%的CD4+T细胞；至少 10^6 个对1至10种肿瘤相关靶肽抗原具有特异性的CD8+T细胞，以及对细菌、病毒和/或真菌病原体具有特异性的CD8+T细胞，其中至少30%的CD8+T细胞为比率为25:75至75:25的中枢记忆T细胞和效应记忆T 细胞，其中低于10%的CD8+T细胞为终末分化的T细胞。在一些实施方案中，对肿瘤相关靶肽抗原具有特异性的CD8+T细胞中至少有 50%为比率为25:75至75:25的中枢记忆T细胞和效应记忆T细胞，其中低于10%的CD8+T细胞为终末分化的T细胞。在一些实施方案中，该细胞组合物还包含约5%至约20%的T记忆干细胞 (T_{scm})，或约 5%至约15%的T记忆干细胞。

[0127] 该细胞组合物还包含适合静脉输注并且可适合作为冷冻保护剂的药学上可接受的载体。示例性载体是DMSO (例如，约10%)。细胞组合物可在单位小瓶或袋中提供，并且冷冻储存至使用。单位剂量可包含约 5×10^5 至约 5×10^6 个细胞/ml，体积为50至200ml。在某些实施方案中，该组合物的体积为 ≤ 100 ml (例如，50ml至100ml)。

[0128] 在一些方面中，本发明提供了治疗患有癌症的患者的方法，其包括向有需要的患者施用本文所述的细胞组合物。

[0129] 在一些实施方案中，该患者患有血液学癌症，该血液学癌症在一些实施方案中在同种异体干细胞移植后复发。在一些实施方案中，该患者患有急性髓性白血病 (AML) 或骨髓增生异常综合征。

[0130] 可以根据本公开治疗的其他癌症包括在历史上引发不良免疫应答或具有高复发率的癌症。示例性癌症包括各种类型的实体瘤，包括癌、肉瘤和淋巴瘤。在各个实施方案中，该癌症是黑色素瘤 (包括转移性黑素瘤)、结肠癌、十二指肠癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、导管癌、肝癌、胰腺癌、肾癌、子宫内膜癌、睾丸癌、胃癌、口腔黏膜异常增生、息肉病、头颈部癌、侵袭性口腔癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、间皮瘤、移行和鳞状细胞尿道癌、脑癌、神经母细胞瘤和胶质瘤。在各个实施方案中，该癌症是I期、II期、III期或IV期癌症。在一些实施

方案中,该癌症是转移性的和/或复发性的,和/或是不可切除的。

[0131] 在一些实施方案中,该患者是化疗和/或检查点抑制剂疗法难治性的。

[0132] 在一些实施方案中,该患者还接受低剂量细胞因子疗法,该疗法可提高持久性和体内应答。

[0133] 在一些实施方案中,该癌症是恶性血液病,包括白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。例如,恶性血液病可为急性髓性白血病、慢性髓性白血病、儿童急性白血病、非霍奇金淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、骨髓增生异常综合征、恶性皮肤T细胞、蕈样肉芽肿、非MF皮肤T细胞淋巴瘤、淋巴瘤样丘疹病和富含T细胞的皮肤淋巴样增生。在示例性实施方案中,该患者患有血液学癌症,例如急性髓性白血病(AML)或骨髓增生异常综合征,并且在一些实施方案中,该患者在同种异体干细胞移植后复发。在一些实施方案中,该疗法不会诱导GVHD。

[0134] 在一些实施方案中,该患者除了接受过同种异体干细胞移植外还接受过淋巴细胞清除疗法、细胞减灭疗法或免疫调节疗法(在施用细胞疗法之前)。在一些实施方案中,在治疗后可为所述细胞疗法进一步提供或不提供细胞因子支持。

[0135] 在一些实施方案中,该患者患有感染性疾病或处于感染性疾病的风险中。例如,接受过HSCT的患者因免疫受损状态而处于感染性疾病的特定风险中。可被治疗或预防的感染性疾病包括细菌、病毒、朊病毒、真菌、寄生虫、蠕虫等引起的感染性疾病。此类疾病包括AIDS、乙型/丙型肝炎、CMV感染、EB病毒(EBV)感染、流感、疱疹病毒感染(包括带状疱疹)和腺病毒感染。例如,CMV是在器官移植患者中发现的最常见的病毒性病原体,并且是接受骨髓或外周血干细胞移植的患者发病率和死亡率的主要原因。这是由于这些患者的免疫受损状况所致,该免疫受损状况允许血清阳性患者中的潜伏病毒再激活或血清阴性个体中出现机会性感染。在这些实施方案中,患者可接受包含对病原体抗原有特异性的T细胞的过继性免疫疗法。该方法可能需要在移植手术开始前产生源自患者或适当的供体的病毒特异性CTL。

[0136] PTLD发生在很大一部分移植患者中,且由EB病毒(EBV)感染所致。据认为,美国约90%的成人群体中存在EBV感染。活跃的病毒复制和感染受免疫系统的控制,但与CMV的情况一样,因移植疗法而免疫受损的个体失去对T细胞群的控制,这允许病毒再激活。这代表了移植方案的严重阻碍。EBV还可能参与了多种血液和非血液癌症的肿瘤促进。

[0137] 本发明的其他方面和实施方案对熟练技术人员来说将是显而易见的。

[0138] 实施例

[0139] 抗原特异性T细胞是从通过白细胞单采分离的供体细胞富集和扩增的。采用CD4微珠通过负选择去除细胞中的CD4⁺细胞。通过将所得细胞与顺磁性纳米颗粒(右旋糖酐包被的氧化铁纳米颗粒,直径约80至200nm)共同培育,以在所得细胞中富集抗原特异性T细胞。该纳米颗粒具有与表面缀合的二聚体HLA配体(呈递靶肽抗原)以及激动性抗CD28单克隆抗体。二聚的HLA配体含有两个包含肽结合槽的HLA-A2结构域,每个结构域均融合至Ig铰链区的臂。将二聚的HLA-Ig与 β_2 微球蛋白共表达。WO 2016/044530和WO 2016/105542(它们均通过引用的方式整体并入本文)中公开了配体和aAPC构建体。

[0140] 将细胞在顺磁性aAPC存在下培育,然后在磁场存在下培育约5分钟。然后,回收与颗粒缔合的细胞并离体扩增不同时长(一般1至2周)。在生长因子存在下扩增。对于两周培

养时间,在第1天和第7天添加生长因子。在第7天用aAPC重新刺激细胞。

[0141] 还分批对抗原特异性T细胞进行富集和扩增。例如,图3示出了 AML特异性肽Prame 100RHAMM、WT1和生存素的分批富集和扩增。在第7天时,该细胞含有1.4%的Prame特异性、1.8%的RHAMM 特异性、7.0%的WT1特异性和2.3%的生存素特异性。在该实施方案中,总抗原特异性T细胞组分为12.5%。通过四聚体染色对T细胞进行表征。

[0142] 图4显示,经过2周的单独刺激和扩增的组合物具有一致的AML 抗原特异性T细胞水平。单独刺激和扩增过程一致地产生约15%抗原特异性T细胞。

[0143] 图5显示,同时发生的刺激/扩增过程产生与单独刺激/扩增相当的AML特异性T细胞频率。所示出的通过分批刺激/扩增制备的组合物具有约47%抗原特异性T细胞。

[0144] 图6显示,产生的T细胞显示出对AML肿瘤细胞(THP-1细胞系)的抗原特异性杀伤。AML特异性T细胞针对来自WT-1、PRAME 和生存素的5个表位。在1至100(靶标与效应子的比率)情况下,约40%的靶细胞被杀伤。

[0145] 如图7中所示,用于离体扩增的细胞因子混合物可以影响所得细胞的数量和表型。

[0146] 进一步表征细胞的表型:原始(CD62L+、CD45RA+)、中枢记忆(CD62L+、CD45RA-)、效应记忆(CD62L-、CD45RA-)和终末分化的记忆(CD62L-、CD45RA+)。从供体淋巴细胞离体富集和扩增的 MART-1和AML特异性T细胞主要为中枢记忆和效应记忆表型。参见图2。特别是对于AML肽类而言,在三个代表性实验中,原始细胞存在量为3.82%、14.2%和14.8%。终末分化的记忆细胞存在量为3.82%、3%和6.7%。同时,抗原特异性细胞的中枢记忆组分和效应记忆组分为92.3%、82.8%和78.52%。

[0147] 通过激活表型,即针对IL-2(增殖和记忆)、IFN- γ (激活其他T细胞、记忆、MHC上调)、TNF- α (促炎)和CD107A(颗粒酶释放、细胞毒活性)染色来对细胞进行表征。参见图1。如所示,大部分细胞具有3个或者甚至4个功能。例如,32.5%的细胞在激活后产生IL-2和IFN- γ ,94.2%的细胞在激活后产生TNF- α 和CD107a。

[0148] 通过四聚体染色进一步定量对病毒抗原具有特异性的旁观者细胞。图8示出了在MART-1特异性富集和扩增后第7天时病毒特异性旁观者T细胞的存在。图9示出了在MART-1特异性富集和扩增后第14天时病毒特异性旁观者T细胞的存在。这些细胞也主要具有中枢记忆表型和效应记忆表型。图10示出了在AML特异性富集和扩增后第14天时病毒特异性旁观者T细胞的存在。图11示出了在MART-1特异性富集和扩增过程中对CMV特异性旁观者T细胞的检测。病毒特异性旁观者细胞的百分比保持恒定至第14天(介于0.5%和1%之间),而MART-1特异性T细胞的百分比急剧升高。

[0149] 图12示出了在MART-1特异性富集和扩增后第14天使用重组T 细胞生长因子混合物(IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-21、IFN- γ 和MIP1- β)对病毒特异性旁观者细胞的检测,展示了针对Adeno、CMV、EBV 和流感病毒上的多个表位的病毒特异性T细胞的维持和旁观者扩增。

[0150] 如图13A和图13B中所示,在扩增期间在以下细胞因子的存在下通过富集和扩增过程产生Mart-1特异性T细胞:IL-2、IL-4、IL-6、IFN- γ 和IL1- β 。在表1中示出了这种细胞因子混合物的组成。

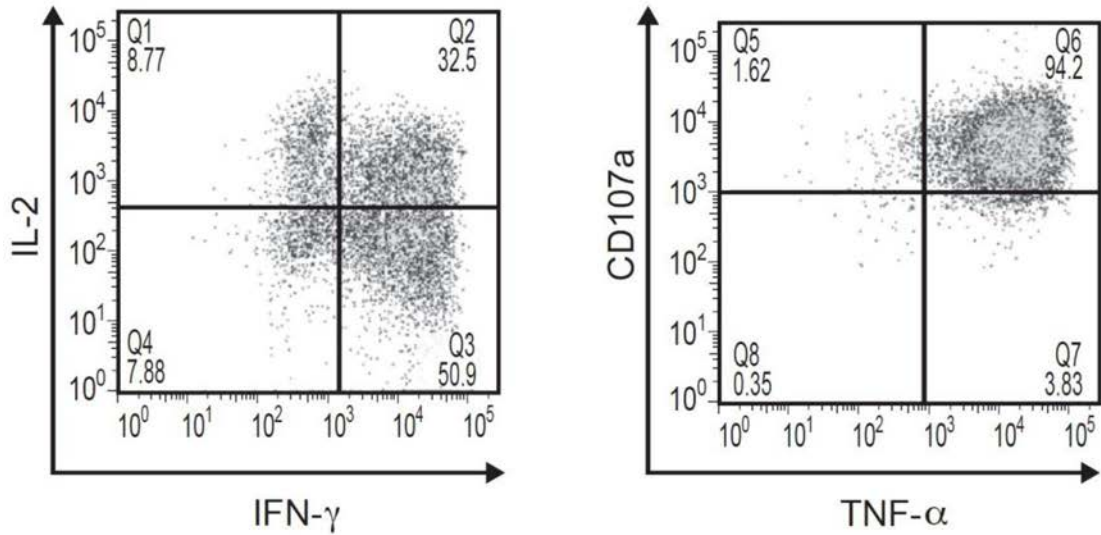
[0151] 表1:扩增期的细胞因子混合物

	细胞因子	最终培养基中的比活性(IU/ml)	储备溶液 50X 中的比活性(IU/ml)
[0152]	IL-2	40	2000
	IL-4	2.5	125
	IL-6	50	2500
	IFN γ	40	2000
	IL-1 β	15	750

[0153] 在这个实验中,如前文所述的那杨富集 6.74×10^9 个来自健康供体的CD8+淋巴细胞。富集后,存在总共 2.81×10^8 个细胞。在扩增第 14天时,存在总共 5.28×10^8 个细胞,显示总细胞扩增了1.88倍。第 14天时这些扩增的细胞对MART-1的特异性为约35%,存活为约94%(图13B)。假定 10^5 个前体细胞中约1个有MART-1特异性,则 MART-1特异性细胞扩增了约2776倍。

[0154] 在评价总培养物时,T细胞具有约66%的中枢记忆表型和约32%的效应记忆表型。低于2%的细胞为原始细胞,并且 T_{EMRA} 细胞的量可忽略不计。进一步地,MART-1特异性细胞为约89%的中枢记忆细胞和约9%的效应记忆细胞,原始细胞数低于2%, T_{EMRA} 细胞数可忽略不计。

<220>
<223> 合成多肽
<400> 8
Ala Leu Tyr Val Asp Ser Leu Phe Phe Leu
1 5 10
<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成多肽
<400> 9
Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu
1 5
<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成多肽
<400> 10
Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu
1 5 10
<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成多肽
<400> 11
Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys Ile
1 5 10
<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成多肽
<400> 12



针对以下的胞内染色:

- IL-2 (增殖&记忆)
- IFN-g (激活其他T细胞、记忆、MHC的上调)
- TNF-a (促炎)
- CD107A (颗粒酶释放、细胞毒性活性)

多功能性

(IL2, IFN-γ, TNF-α, CD107a)

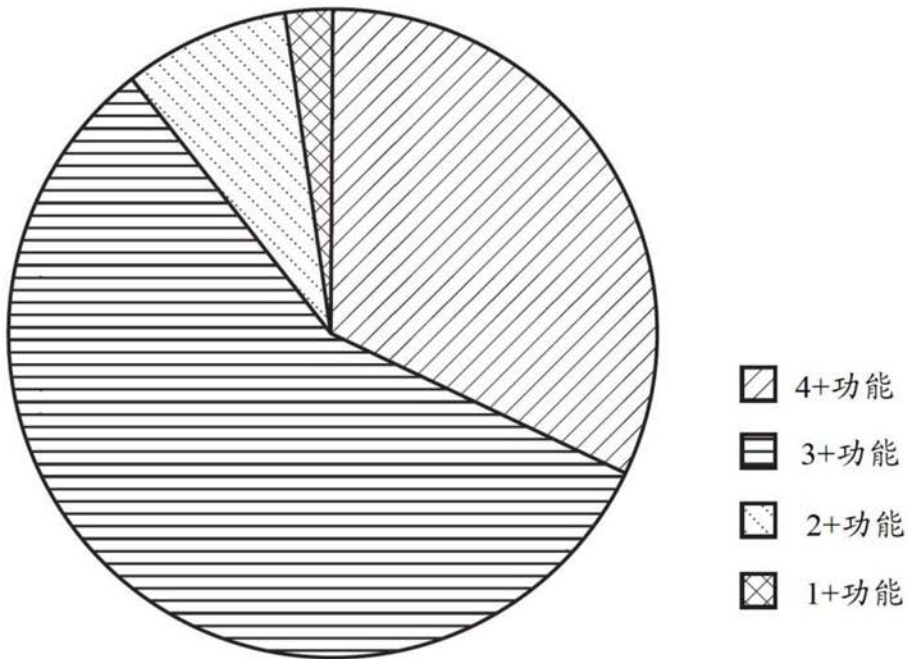


图1

实验	特异性	%原始	% T _{cm} + T _{em}	% T _{emRA}
1	Mart-1	4.13	95.5 (80/15.5)	0.29
2	Mart-1	3.13	96.6 (78/18)	0.3
3	Mart-1	6.47	91.4 (56/40)	3.1
4	Mart-1	3.9	93.6 (51/42)	2.47
5	Mart-1	4.45	93.9 (60/33)	1.64
6	Mart-1	5.2	91.8 (46/46)	3
7	Mart-1	3.6	95.2 (81/14)	1.24
8	Mart-1	4.7	92.8 (67/26)	2.35
9	Mart-1	3.6	94.2 (60/34)	2.2
10	Mart-1	5	90.5 (69/21)	2.3
1	AML	3.82	92.3 (60/32)	3.82
2	AML	14.2	82.8 (72/10)	3
3	AML	14.8	78.52 (70/8)	6.7

图2

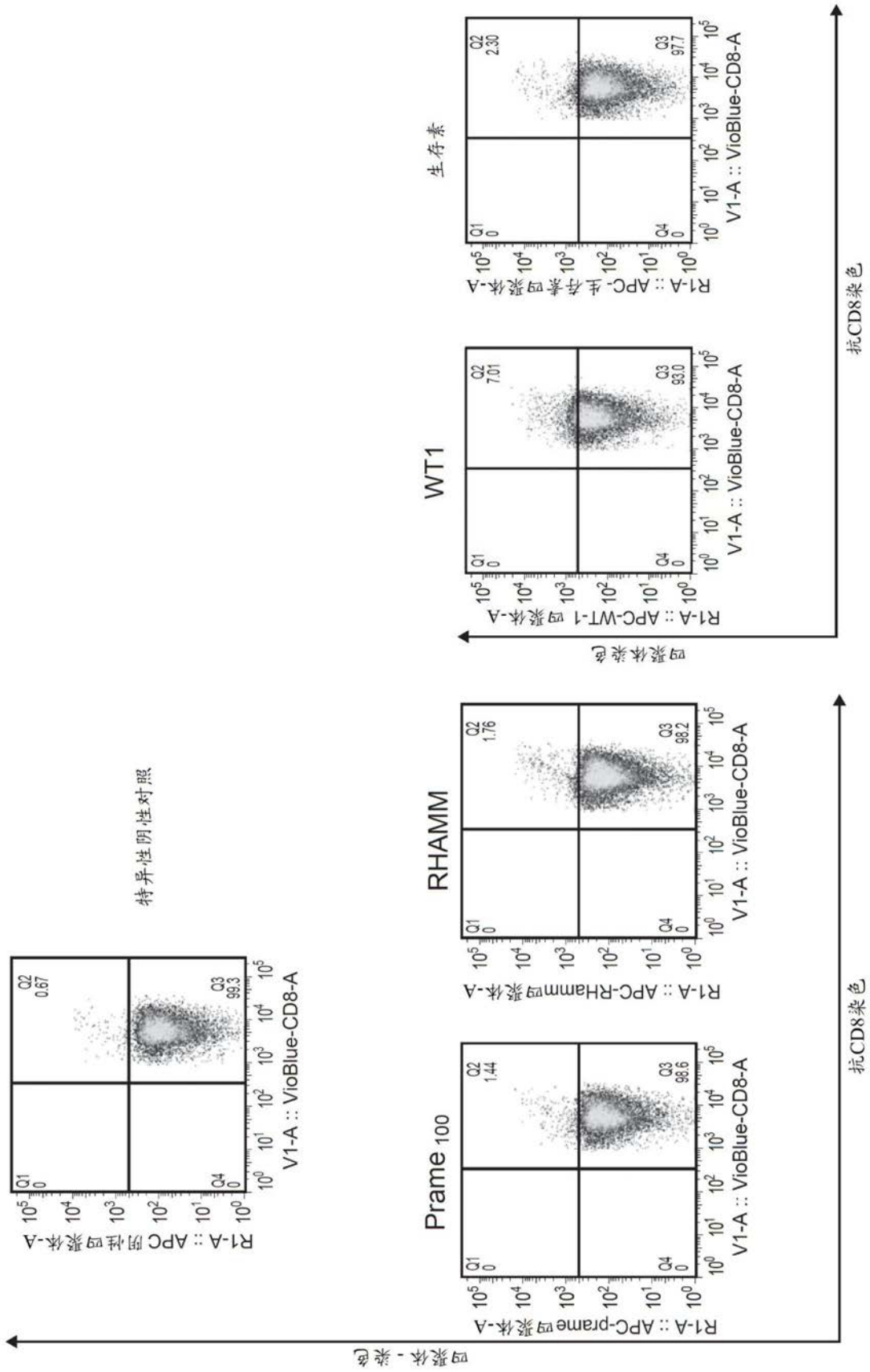


图3

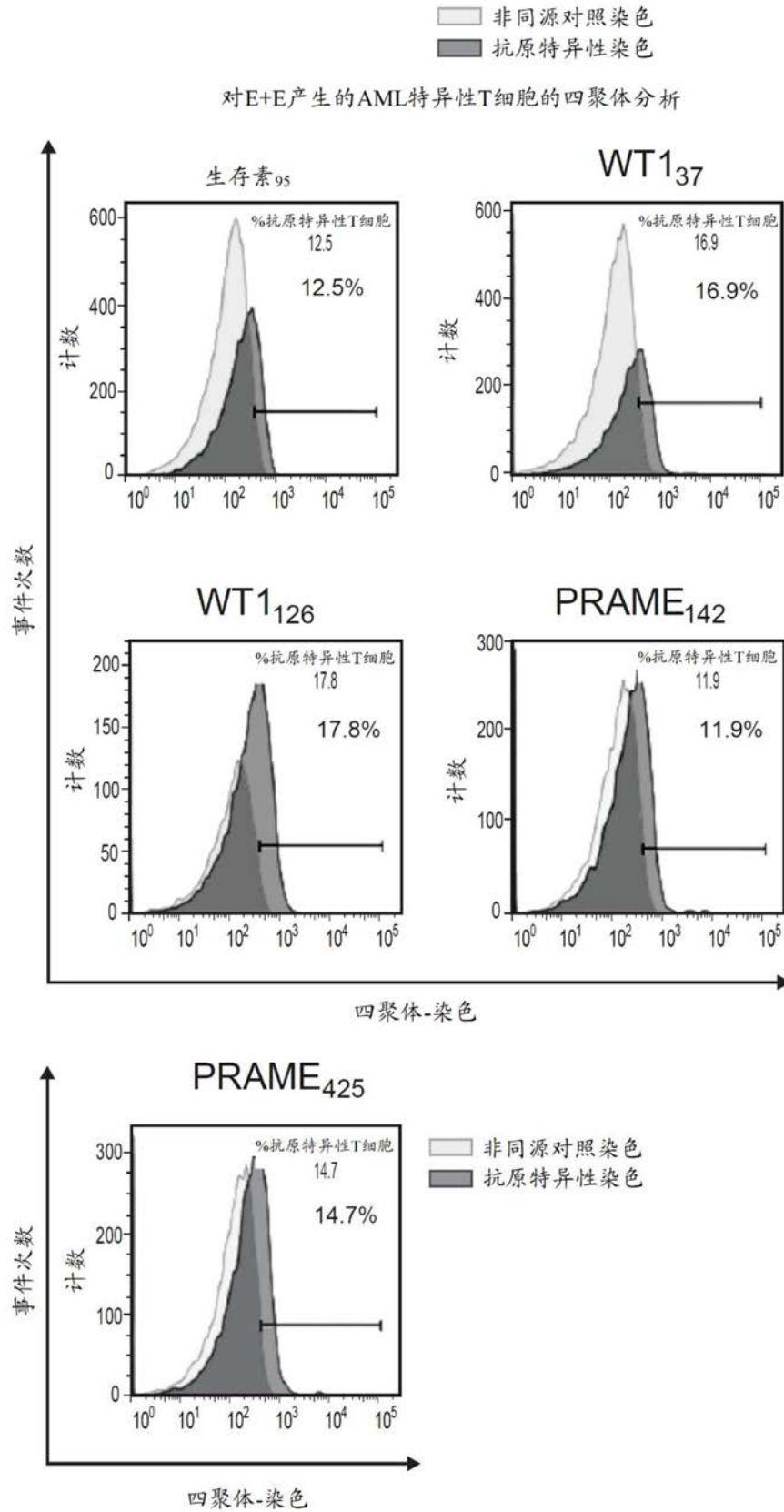


图4

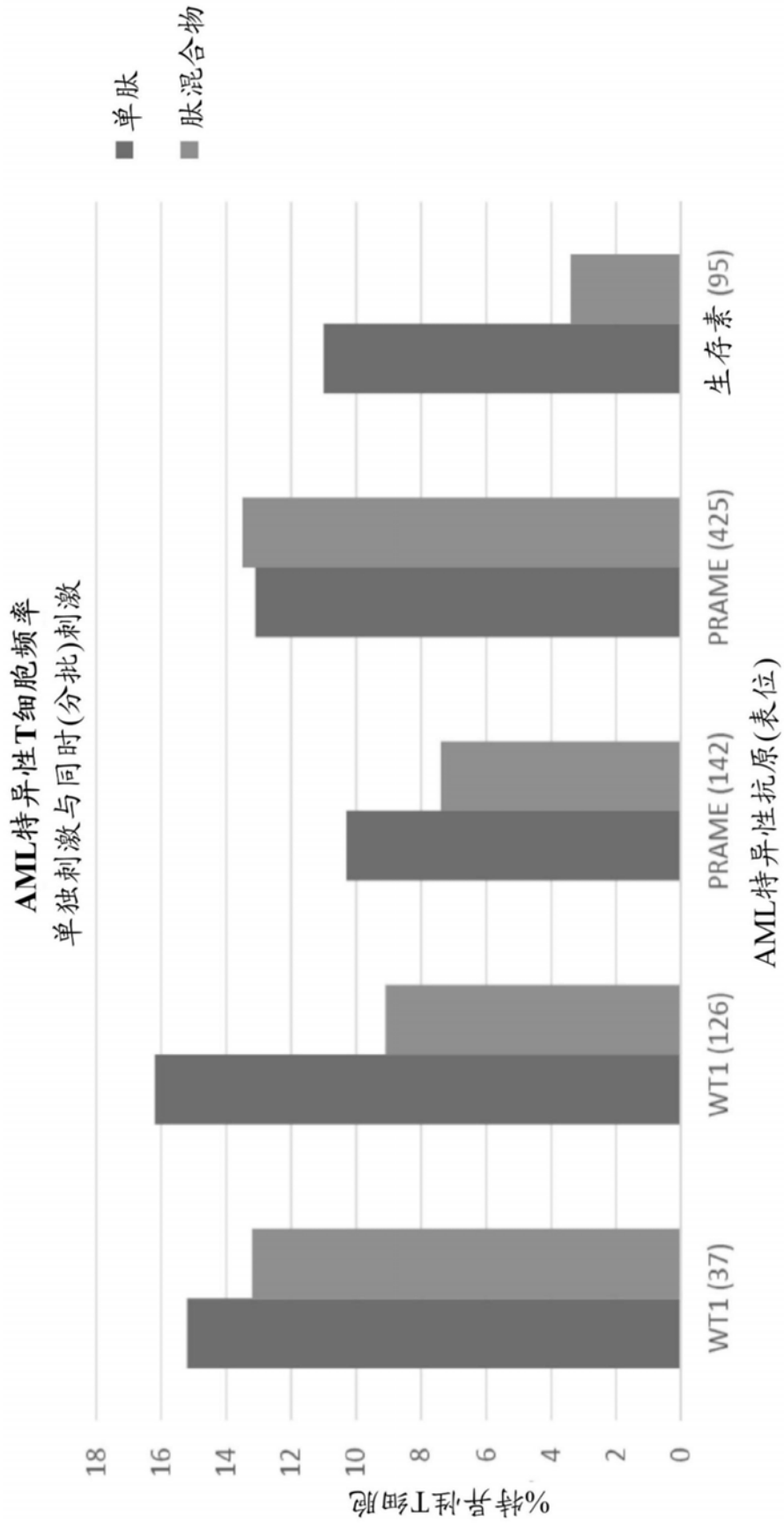


图5

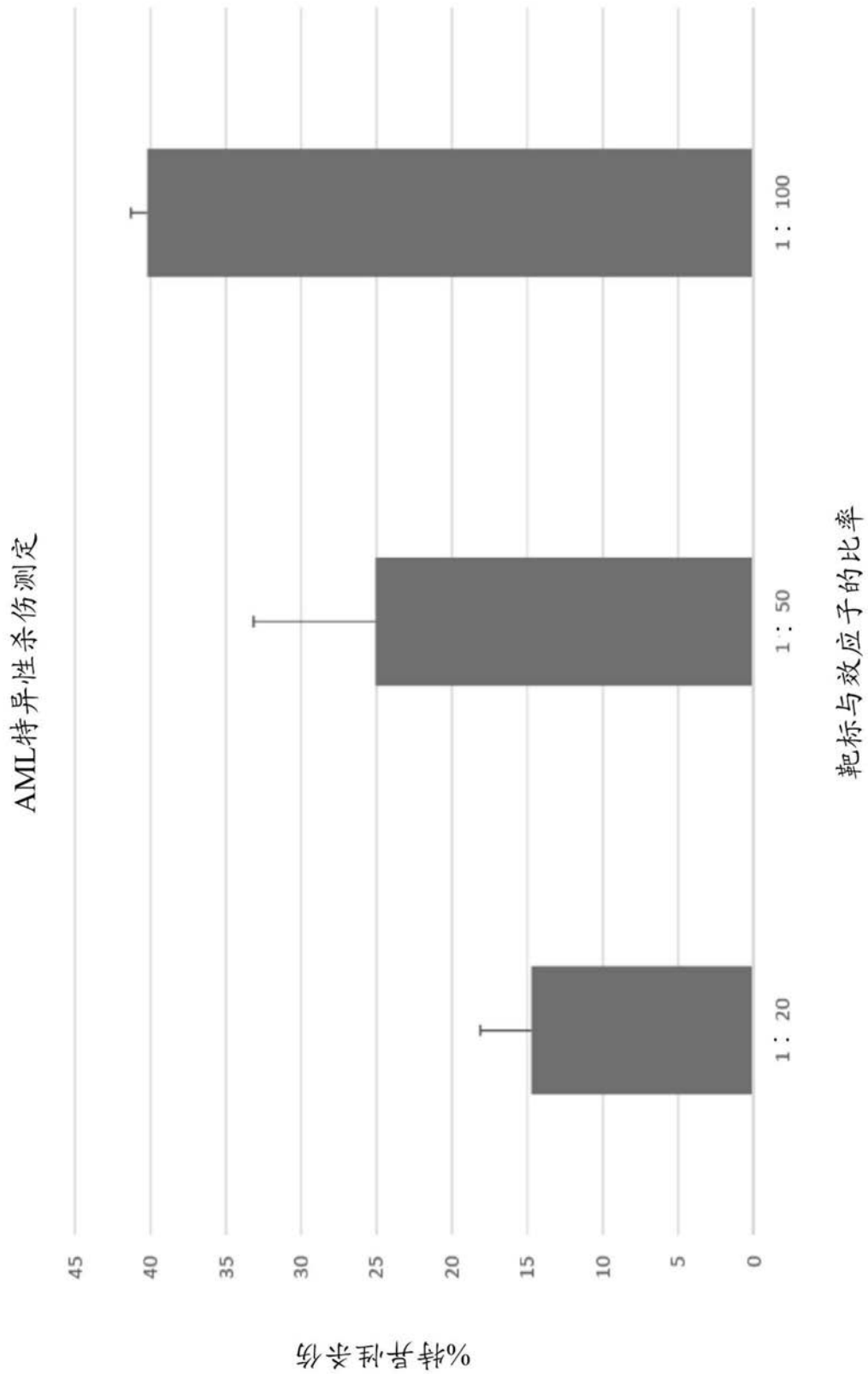


图6

途径	细胞因子	% Tet +	总细胞数 x10 ⁶	% Tcm/Tem
A	TF	31.2	3.26	57/42
B	rTF (5D) (IL-1b, 2, 4, 6, 21 IFNg, MIP1b)	16.9	1.79	60/37
C	rTF (6)	11.6	2.03	53/43
D	rTF (7)	14.1	1.94	49/42
E	Miltenyi 混合物 (IL-7, 15, 21)	1.7	5.9	62/34
F	Woelfel/Greenberg 混合物 IL21 (第1天), IL7, 15(第3天)	0.8	1.59	68/22 (8个原始 细胞)

图7

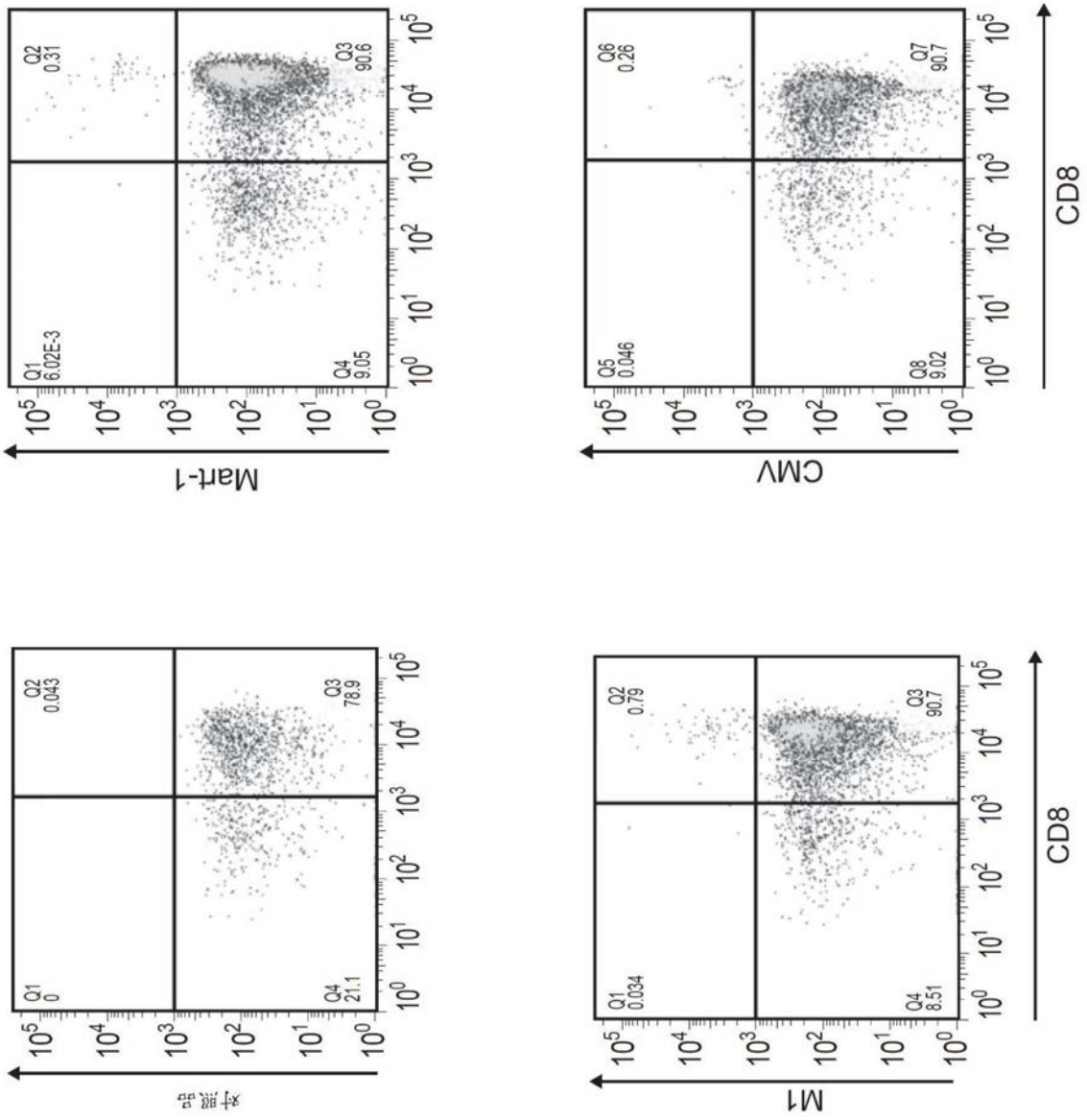


图8

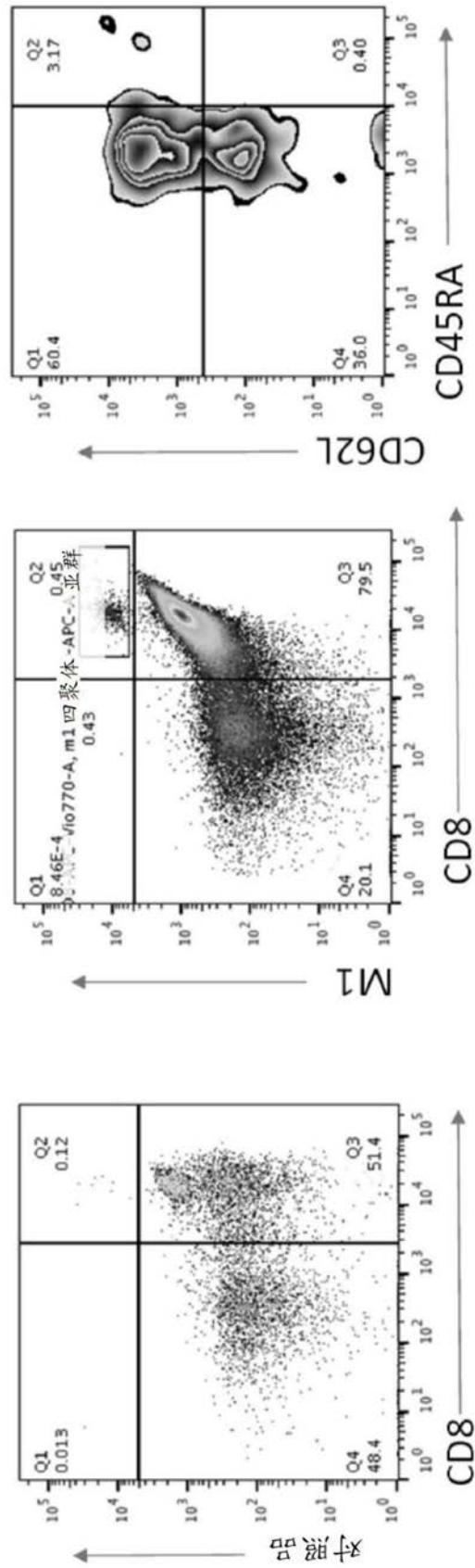


图9

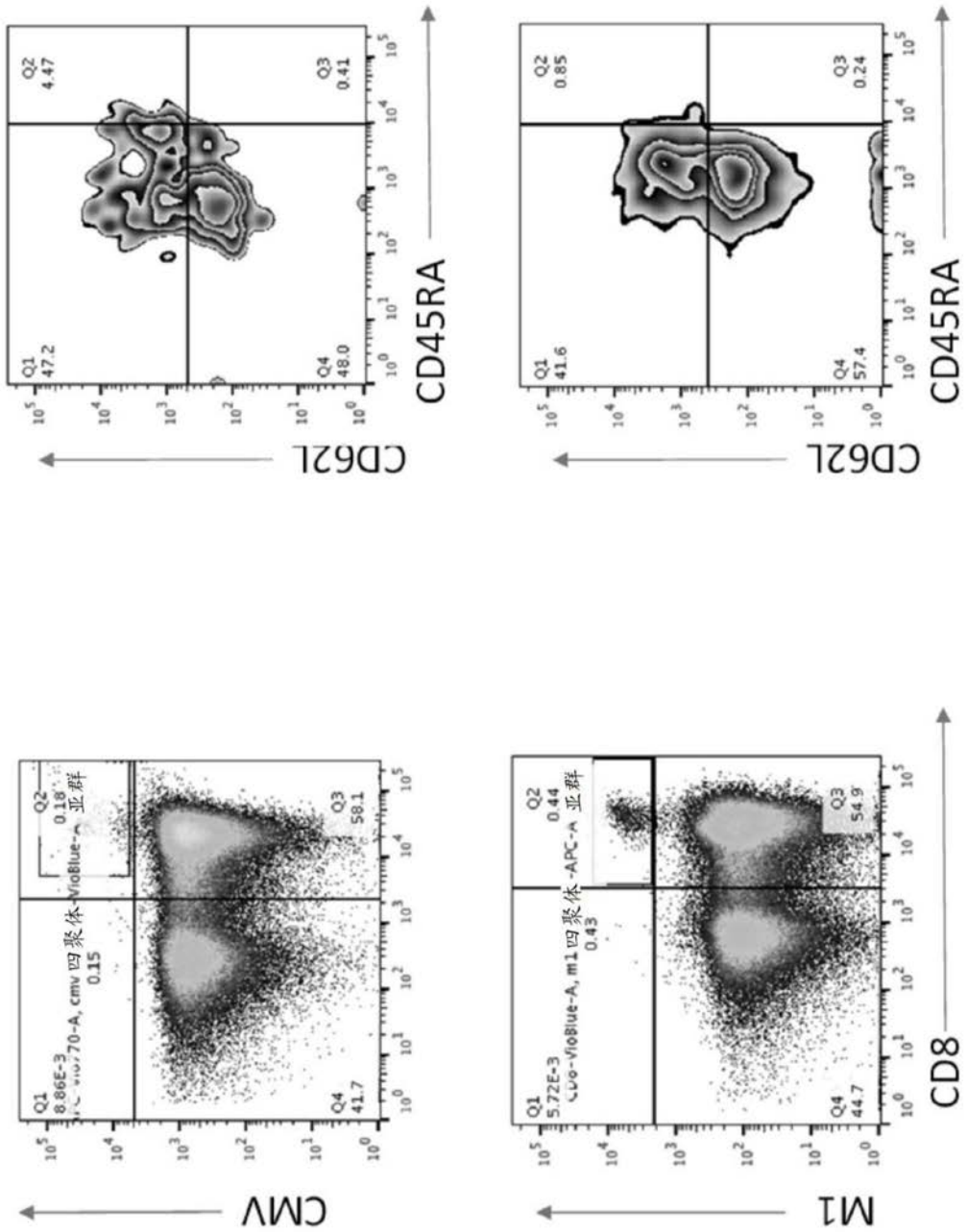


图10

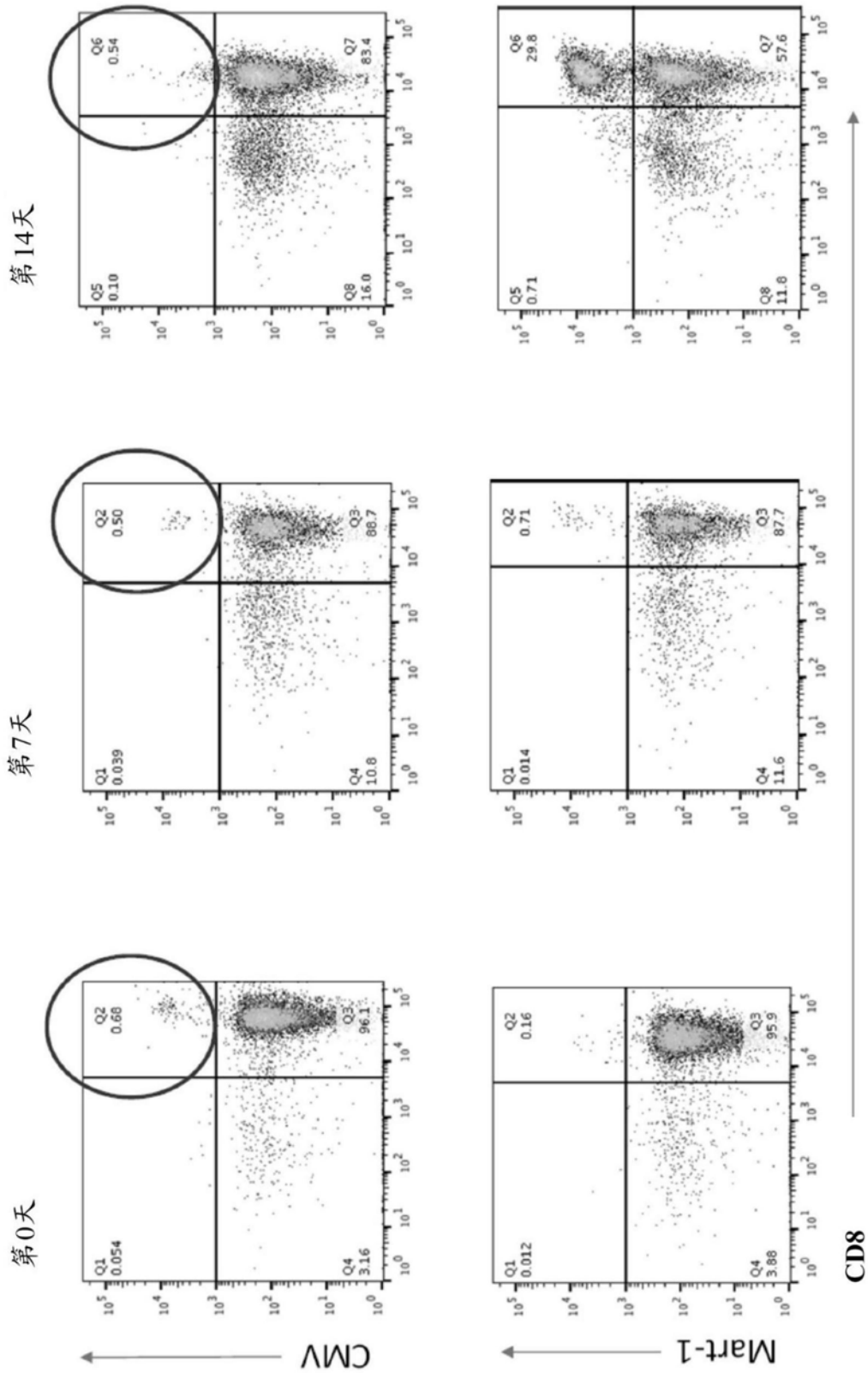


图11

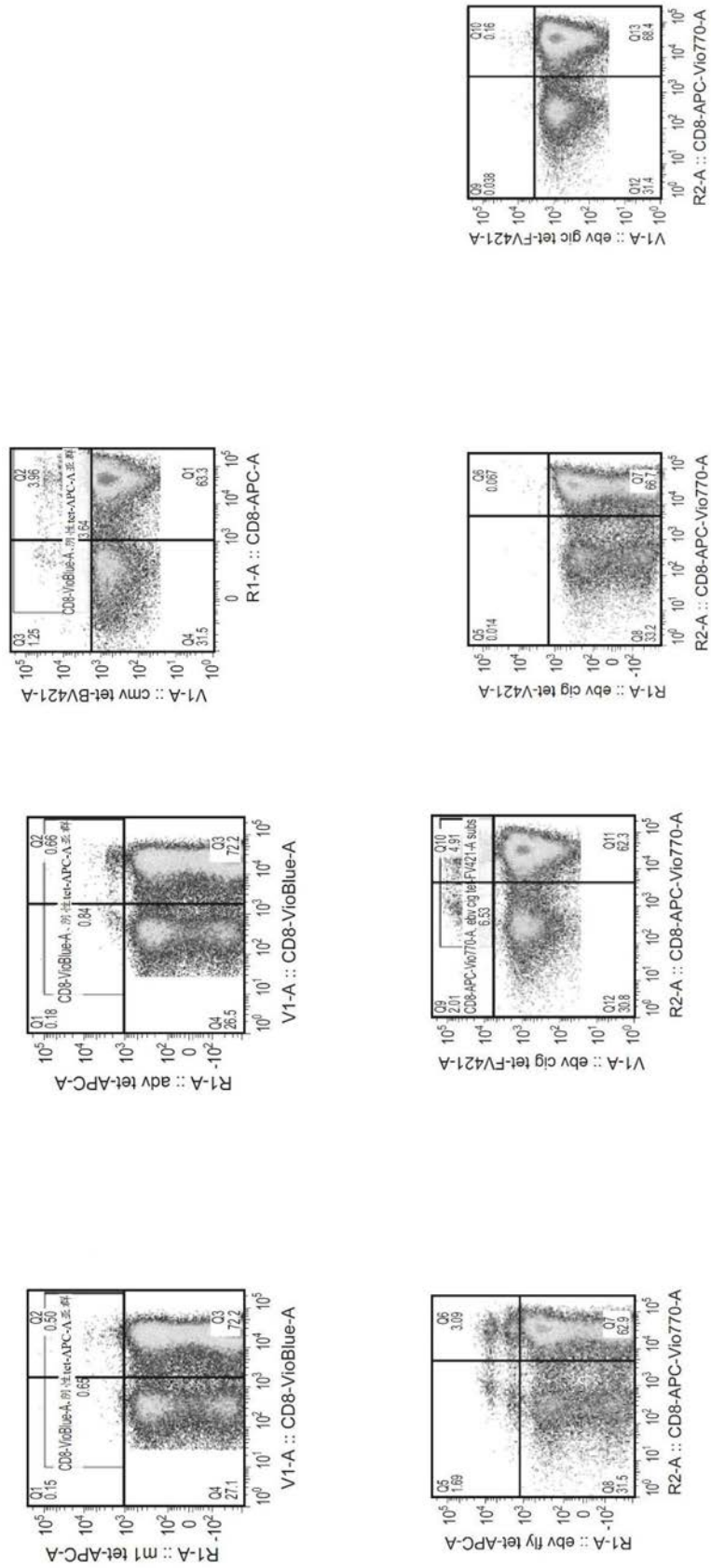


图12

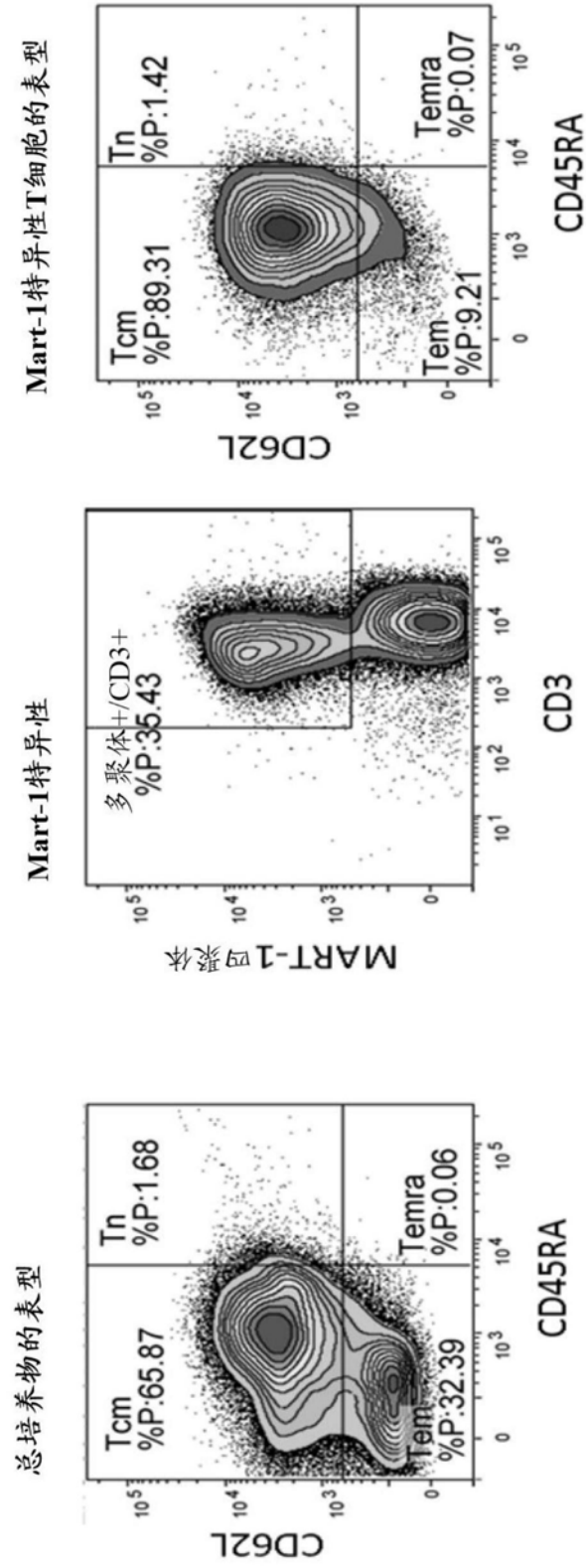


图13A

抗原									
MART-1	6.74 X10 ⁹	2.81 x10 ⁸	5.28 x10 ⁸	93.8%	1.88	2776	Mart-1特异性T细胞的扩增倍数 (基于除去CD4的leucopak中每个 10 ⁵ 个Mart-1前体T细胞中1个 是Mart-1特异性T细胞的假设)		

图13B