



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201313902 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：101118979

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 05 月 28 日

(51)Int. Cl. : C12N5/0783 (2010.01)

(30)優先權：2011/05/26 美國

61/490,505

(71)申請人：吉尼斯生技投資公司 (美國) GENEIUS BIOTECHNOLOGY INVESTMENTS, LLC
(US)

美國

(72)發明人：薩蘭茲 艾佛烈德 SLANETZ, ALFRED E. (US)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：31 共 89 頁

(54)名稱

經調節之免疫優勢治療

MODULATED IMMUNODOMINANCE THERAPY

(57)摘要

本發明關於產生抗次優勢抗原之 T 細胞反應及利用該等細胞以治療性改變細胞恆定性及免疫反應之性質。在較佳之實施態樣中，該等細胞係於病患體外產製，藉以避免該病患之免疫環境之影響。藉由使來自病患之 T 細胞於組織培養中受一或多種次優勢抗原之刺激且生長，然後將該等細胞移植回該病患體內，若足夠細胞經擴增及移植，則於對破壞或誘導免疫耐受性或以其他方式調節針對表現該抗原之細胞或有機體之免疫反應的反應上，該經移植之細胞壓倒內源性優勢 T 細胞。當記憶細胞經建立後，彼等便反應此新穎之免疫優勢體系，因此長久維持所欲之治療效應。事實上，該等對次優勢抗原具反應性之外源性產製之 T 細胞的移植係重新初免及重新平衡該病患之免疫反應，藉以靶向該細胞或有機體內之先前次優勢抗原以產生治療益處。

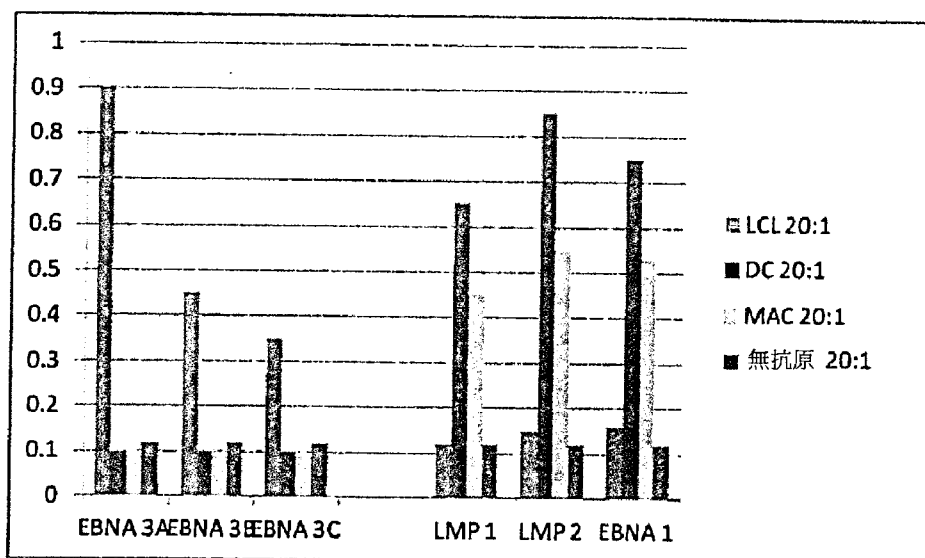


圖 1A

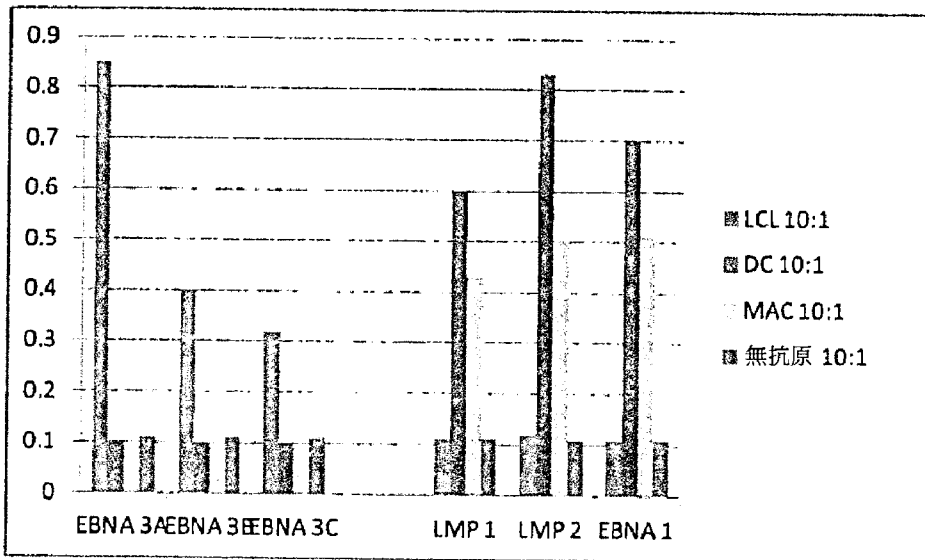


圖 1B

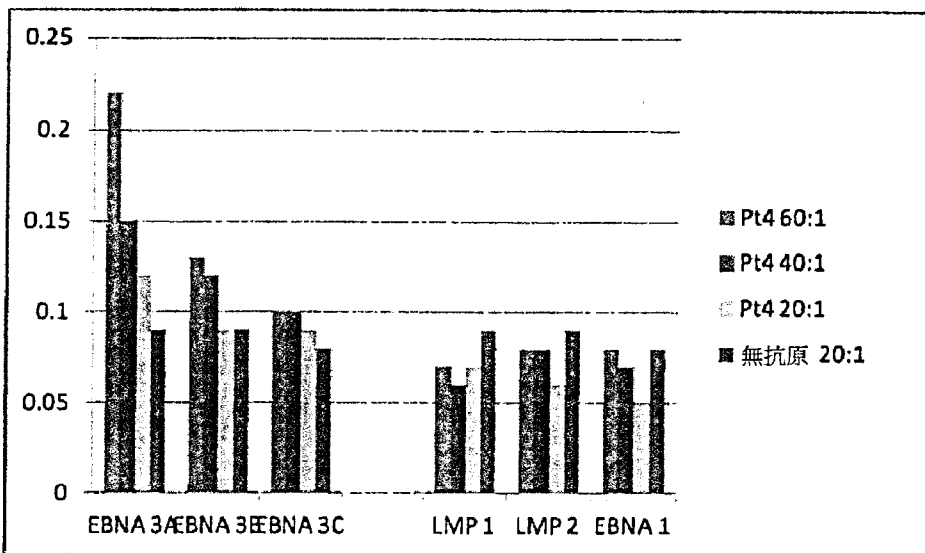


圖 1C



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201313902 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：101118979

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 05 月 28 日

(51)Int. Cl. : C12N5/0783 (2010.01)

(30)優先權：2011/05/26 美國

61/490,505

(71)申請人：吉尼斯生技投資公司 (美國) GENEIUS BIOTECHNOLOGY INVESTMENTS, LLC
(US)

美國

(72)發明人：薩蘭茲 艾佛烈德 SLANETZ, ALFRED E. (US)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：31 共 89 頁

(54)名稱

經調節之免疫優勢治療

MODULATED IMMUNODOMINANCE THERAPY

(57)摘要

本發明關於產生抗次優勢抗原之 T 細胞反應及利用該等細胞以治療性改變細胞恆定性及免疫反應之性質。在較佳之實施態樣中，該等細胞係於病患體外產製，藉以避免該病患之免疫環境之影響。藉由使來自病患之 T 細胞於組織培養中受一或多種次優勢抗原之刺激且生長，然後將該等細胞移植回該病患體內，若足夠細胞經擴增及移植，則於對破壞或誘導免疫耐受性或以其他方式調節針對表現該抗原之細胞或有機體之免疫反應的反應上，該經移植之細胞壓倒內源性優勢 T 細胞。當記憶細胞經建立後，彼等便反應此新穎之免疫優勢體系，因此長久維持所欲之治療效應。事實上，該等對次優勢抗原具反應性之外源性產製之 T 細胞的移植係重新初免及重新平衡該病患之免疫反應，藉以靶向該細胞或有機體內之先前次優勢抗原以產生治療益處。

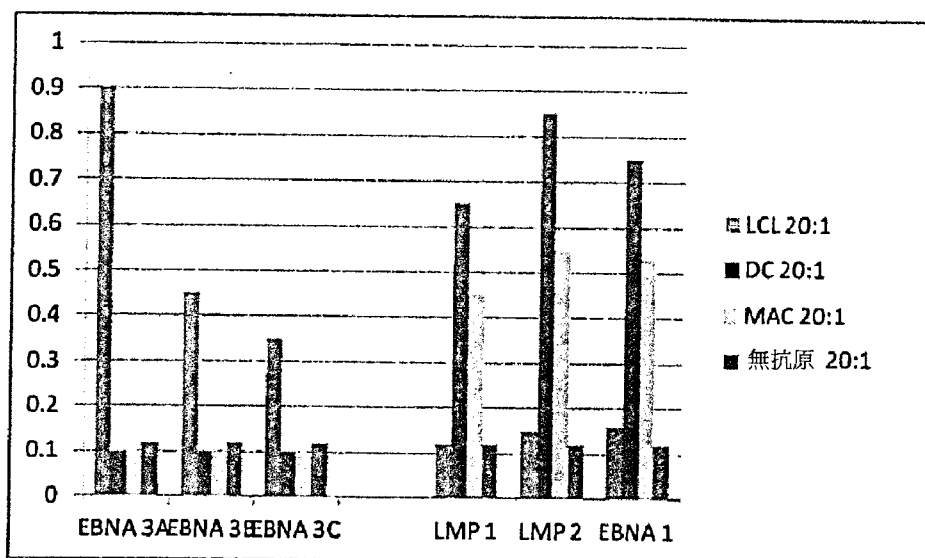


圖 1A

101 11 20

發明專利說明書

(本申請書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：101118979

※申請日：101 年 05 月 28 日

※IPC 分類：C12N5/0783 (2010.01)

一、發明名稱：(中文／英文)

經調節之免疫優勢治療

Modulated immunodominance therapy

二、中文發明摘要：

本發明關於產生抗次優勢抗原之 T 細胞反應及利用該等細胞以治療性改變細胞恆定性及免疫反應之性質。在較佳之實施態樣中，該等細胞係於病患體外產製，藉以避免該病患之免疫環境之影響。藉由使來自病患之 T 細胞於組織培養中受一或多種次優勢抗原之刺激且生長，然後將該等細胞移植回該病患體內，若足夠細胞經擴增及移植，則於對破壞或誘導免疫耐受性或以其他方式調節針對表現該抗原之細胞或有機體之免疫反應的反應上，該經移植之細胞壓倒內源性優勢 T 細胞。當記憶細胞經建立後，彼等便反應此新穎之免疫優勢體系，因此長久維持所欲之治療效應。事實上，該等對次優勢抗原具反應性之外源性產製之 T 細胞的移植係重新初免及重新平衡該病患之免疫反應，藉以靶向該細胞或有機體內之先前次優勢抗原以產生治療益處。

三、英文發明摘要：

The invention involves generating a T cell response to subdominant antigens and using the cells to therapeutically change the cellular homeostasis and nature of the immune response. In a preferred embodiment, the cells are generated outside of the patient avoiding the influence of the patient's immunologic milieu. By stimulating and growing the T cells from a patient in a tissue culture to one or more subdominant antigens and the transplanting them into the patient, if enough cells are expanded and transplanted, the transplanted cells overwhelm the endogenous dominant T cells in the response to either break or induce immune tolerance or otherwise modify the immune response to the cells or organism expressing that antigen. When the memory cells are established they are then reflective of this new immunodominance hierarchy so that the desired therapeutic effect is long lasting. In effect, the transplantation exogenously generated T cells reactive to the subdominant antigens is recapitulating priming and rebalancing the patient's immune response to target previously subdominant antigens in the cells or organism to produce a therapeutic benefit.

四、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無

六、發明說明

相關申請案

本申請案關於美國專利臨時申請案序號 61/490,505 (2011 年 5 月 26 日提出申請)，該案之內容以參照方式整體納入此處。

【發明所屬之技術領域】

本發明涉及經調節之免疫優勢治療之技術領域。

【先前技術】

本發明關於一種用於癌、慢性感染、自體免疫性疾病及移植之新穎治療劑，其係藉由治療性操控細胞恆定性以調整免疫優勢體系。

臨床上對癌之處理係依癌之各種來源部位及最重要的依照疾病階段而異(即腫瘤侵入局部或藉由轉移擴散至其他器官之程度)。手術及/或局部放射線治療通常係原發性腫瘤之治療選擇，轉移疾病之治療則以化學治療、單株抗體或細胞介素治療或全身放射線治療為主。最近，第一個樹突細胞治療(Provenge)被批准用於前列腺癌，其顯示延緩腫瘤進展 4 個月之益處。診斷仍以活體檢查之組織學分析為基礎。分子標誌有時可作為標準，若彼等有助於選擇藥物(例如賀癌平(Herceptin))。然而，建立免疫反應之資料並未成為例行臨床基準。

在初級免疫反應期間，T 細胞在何種環境中看見抗

原，決定後續召回反應之性質。最初辨識事件及該初級細胞所處之微環境可導致許多後果。若抗原係由非專職之抗原呈現細胞(APC)呈現，在處理期間可能僅釋放一小群之表位。若遺漏共同刺激信號諸如 CD28 或 TNF，T 細胞可能失效。根據微環境，T 細胞可分化成調節性 T 細胞、分泌 Th1 細胞介素之輔助型 T 細胞(偏向驅動細胞性免疫反應，伴隨 CD8⁺ CTL 效應細胞之增生)或分泌 Th2 細胞介素之輔助型 T 細胞(偏向驅動體液性免疫反應，伴隨 B 細胞之增生成熟及抗體產製)。此外，免疫反應將演進以使得針對抗原之某些表位或環境中之某些抗原有反應之 T 細胞藉由犧牲該 T 細胞群中對環境中之其他表位或抗原有反應之 T 細胞而生長。由於初級免疫反應消退時細胞呈指數性生長，這些 T 細胞之比例進一步增高且以記憶之形式儲存，以使得在繼發性刺激時，該個體體內之免疫反應係以一小亞群之可能表位為目標。雖然涉及多重機轉，但以作用模型而言，增加生長以主導該族群之 T 細胞係該些針對該免疫反應之優勢表位或抗原有反應者。在初級免疫反應中，彼等藉由犧牲針對次優勢表位有反應之 T 細胞而生長，且藉由記憶以主導後續免疫反應。

在人之免疫系統首次看見抗原之數天期間，對於有限數量之優勢表位具反應性之 T 細胞優勢族群被產生，這些 T 細胞決定後續對該抗原之反應的特性。雖然有多種類型之細胞牽涉其中，與本發明有關之作用模型係基於若對優勢抗原上之優勢表位具反應性之 T 細胞生長成為反應性 T

細胞 (例如 $CD4^+$: TH1、TH2、Treg、濾泡輔助型 T 細胞、TH17、TH22、TH9； $CD8^+$ CTL)，將導致細胞性或體液性免疫反應。然而，若在該優勢族群中之 T 細胞係抑制性 T 細胞 (例如 Treg、TH17、失效之 T 細胞)，將誘導耐受性。對次優勢抗原具反應性之 T 細胞被該些對優勢抗原具反應性之 T 細胞株族群壓倒。

在癌、慢性或潛在性感染之情況中，局部抗原處理 / 呈現及共刺激環境影響對優勢抗原之初級免疫反應，因此對於該腫瘤或感染劑中之優勢抗原之 T 細胞反應係經平衡以傾向耐受性或無效反應，而非有效之效應反應。由於抗原處理及共刺激之差異 (CD28 及細胞介素)，此現象在樹突細胞 (DC) 並非主要抗原呈現細胞 (APC) 之器官中可能加劇，不像 DC 係主要抗原呈現細胞之身體表面。亦廣為周知的是腫瘤及感染劑會產生免疫抑制性環境，此不利於強烈之初級免疫反應。另外，若優勢抗原導致對自身具反應性之細胞，耐受性將被破壞，隨之而來的是自體免疫性。該等耐受性可能因為導致反應之慢性或潛在性病毒之存在而被破壞 (即使慢性地对微弱次優勢抗原之反應)。病毒與自體免疫性具有多重相關性。病毒所在部位之發炎導致釋放其他抗原，同時該病毒抗原提供 T 細胞對該器官反應之幫助，導致自體免疫性。當免疫優勢體系係於初級免疫反應建立並藉由記憶增強後，該病患之免疫系統將在每次遭遇該抗原時有效地複製該相同之反應。

對優勢表位之持續免疫反應可減弱對次優勢表位之反

應 (Wolpert EZ 1998, Kedl RM 2003)。該優勢/次優勢階級可能有所改變。舉例來說，刪除或靜默化抗優勢抗原之 T 細胞反應可導致出現先前無法偵測之抗次優勢表位之反應 (Van derMost RG et al. 1997, Andreansky SS et al. 2005)。類似地，移除表位中之優勢序列不消除對該抗原之反應，反而導致該宿主對先前次優勢表位更為強烈之反應 (Allan JE and Doherty PC 1985, Mylin LM et al. 2000)。

【發明內容】

本發明關於一種用於癌、慢性感染、自體免疫性疾病及移植之新穎治療劑，其係藉由治療性操控細胞恆定性以調整免疫優勢體系。

本發明揭示一種重新平衡對抗原之免疫反應的新穎策略以於癌、慢性及潛在性感染、自體免疫及移植等中提供顯著之治療益處。藉由在經控制之微環境中產生對次優勢表位及次優勢抗原之免疫反應，本發明從根本上改變對疾病之免疫反應之性質以提供治療益處。本發明可於針對抗原之免疫反應發生之前或於先前免疫反應發生之後改變該免疫反應之平衡，或甚至改變正在發生之免疫反應。

本發明關於一種方法，該方法包含識別病患樣本中之優勢抗原或表位及次優勢抗原或表位、培養能辨識該次優勢抗原或表位之 T 細胞及以有效數量之 T 細胞治療病患以改變該病患之免疫優勢體系。

本發明亦關於改變病患之免疫優勢體系之方法，該些方法包含識別病患樣本中至少一種次優勢抗原或表位、培養能辨識該次優勢抗原或表位之 T 細胞及以有效數量之該些 T 細胞治療該病患以提供治療益處。

在一些態樣中，本發明另包含於優勢抗原或表位不存在時培養 T 細胞。在其他態樣中，本發明另包含於富集抑制性 T 細胞或反應性 T 細胞之劑不存在或存在時培養 T 細胞。該劑可包括但不限於生長因子、荷爾蒙或其他免疫細胞。

在一些態樣中，本發明另包含經皮內途徑投予該有效數量之 T 細胞。

在其他態樣中，本發明另包含以調節劑預處理該病患，以於利用該經培養之 T 細胞治療病患以前減少內源性 T 細胞之數量。該調節劑可為(但不限於)化學治療劑。

在一些態樣中，該 T 細胞係自病患之活體外提供。

次優勢抗原或次優勢表位係例如無法被細胞性或體液性免疫反應偵測或僅能被低量偵測之抗原或表位。或者，次優勢抗原或次優勢表位係相較於優勢抗原或優勢表位引起較弱之耐受性或免疫反應之抗原或表位。次優勢抗原舉例來說係病毒性抗原、真菌性抗原、細菌性抗原、寄生蟲性抗原、病原性蛋白顆粒抗原、腫瘤抗原或與自體免疫、過敏、發炎、器官移植排斥或移植物抗宿主病有關之抗原。病毒性抗原舉例來說係慢性或潛在性病毒性抗原。該病毒性抗原係源自 EBV、HPV、HSV、VZV、B 型肝炎病

毒、C 型肝炎病毒、HIV、HTLV、CMV、RSV 或流感病毒。該腫瘤抗原舉例來說係腫瘤相關性抗原、腫瘤特異性抗原或與癌幹細胞或轉移有關之抗原。

本發明亦關於識別病患樣本中之優勢抗原或表位及 / 或次優勢抗原或表位、培養能辨識該次優勢抗原或表位之 T 細胞及以有效數量之該 T 細胞治療病患以改變該病患之免疫優勢體系，藉以誘導該病患之耐受性以治療或預防自體免疫性疾病、過敏、發炎、器官移植排斥或移植物抗宿主病之方法，其中該 T 細胞係抑制性 T 細胞。

本發明亦關於識別病患樣本中之優勢抗原或表位及 / 或次優勢抗原或表位、培養能辨識該次優勢抗原或表位之 T 細胞及以有效數量之該 T 細胞治療病患以改變該病患之免疫優勢體系，藉以誘導該病患之細胞毒性免疫反應以治療或預防感染或癌之方法，其中該 T 細胞係反應性 T 細胞。該感染舉例來說係細菌性、病毒性、寄生蟲性或病原性蛋白顆粒感染。

在本發明之任何方法中，治療或預防疾病、感染、癌或醫學狀況包括緩和或改善疾病、感染、癌或醫學狀況之至少一種症狀。治療性益處包括任何緩和、改善、改進、預防或治療疾病、感染、癌或醫學狀況之至少一種症狀。

在一些態樣中，該病患樣本係血液樣本。

本發明亦關於一種方法，該方法另包含重新檢測該病患，藉由檢查對該次優勢抗原或表位之耐受性或體液性或細胞性免疫反應以測定該治療是否成功地重新平衡該免疫

反應。

除非另行定義，此處所使用之所有技術及科學用語和本發明所屬領域之一般技藝人士所通常瞭解之意義相同。雖然與此處所描述之方法及材料類似或相等者可被用於實施本發明，以下描述適當之方法及材料。所有此處所提及之公開資料、專利申請案、專利及其他參考文獻係以參照方式被整體明示納入。若發生衝突，以本說明書(包括定義)為主。此外，此處描述之材料、方法及實施例僅用來示例而非意圖限制。

本發明之其他特徵及優點將自以下之詳細說明及申請專利範圍中顯而易見並包含於其中。

本發明之詳細說明

A. 定義

用語「抗體」係以最廣泛之意義使用，特別是涵蓋人、非人(例如小鼠)及人化單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及抗體片段只要彼等展現該所欲之生物活性。

用語「抗原」係指可刺激抗體產製或動物體內之 T 細胞反應之化合物、組成物或物質，包括被注射或吸收至動物體內之組成物。抗原與特定體液或細胞性免疫之產物反應，包括該些由異源性免疫原所誘導者。用語「抗原」包括所有相關之抗原性表位。

「抗原呈現細胞」或「APC」係用於呈現抗原給 T 細胞之

免疫系統之細胞。APC 包括樹突細胞、單核球、巨噬細胞、邊緣區庫弗氏 (Kupffer) 細胞、小神經膠質細胞、藍格罕氏 (Langerhans) 細胞、T 細胞及 B 細胞 (見例如 Rodriguez-Pinto and Moreno (2005) Eur. J. Immunol. 35:1097-1105)。

「自體免疫」、「自體免疫疾病」、「自體免疫狀況」或「自體免疫失調」係指與經改變之免疫恆定性有關之一組持續性器官特異性或系統性臨床症狀及徵候，該經改變之免疫恆定性係由經表現之自體免疫貯庫之定性及/或定量缺陷顯現。自體免疫疾病之病狀表現係因自體免疫反應所誘導之結構性或功能性損害所致。自體免疫疾病係以抗自身抗原上之表位的體液性(例如抗體媒介性)、細胞性(例如細胞毒性 T 淋巴細胞媒介性)或二種類型之免疫反應之組合為特徵。罹病個體之免疫系統活化以呈現該些特異性自身抗原之細胞及組織為目標之發炎級聯。破壞該受攻擊之抗原、組織、細胞類型或器官產生該疾病之症狀。

用語「癌」係指以不受調節之細胞生長為特徵之疾病或病狀。癌之實例包括但不限於癌、淋巴瘤、胚細胞瘤及肉瘤。特定癌之實例包括但不限於肺癌、結腸癌、乳癌、睪丸癌、胃癌、胰癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、結直腸癌及前列腺癌。該領域之技藝人士所知之其他癌亦經考慮。

「優勢抗原」或「優勢表位」係指引起強烈耐受性或免疫反應之抗原或表位，該耐受性或免疫反應之特徵可能為對該抗原或表位具特異性之 T 細胞以超過反應 T 細胞之總

量的約 70%之量存在。

用語「表位」係指一組與被特定免疫球蛋白辨識有關之胺基酸殘基，或者在 T 細胞當中係指被 T 細胞受體蛋白質及 / 或主要組織相容性複合體 (MHC) 受體辨識所需之該些殘基。在免疫系統環境中 (試管內或活體內)，表位係分子 (諸如一級、二級和三級肽結構) 及電荷之集合特徵，彼等一起形成被免疫球蛋白、T 細胞受體或 HLA 分子辨識之位點。

「肝炎」係指由肝臟發炎所定義之醫學狀況。

「人白血球抗原」或「HLA」係人第一型或第二型主要組織相容性複合體 (MHC) 蛋白質 (見例如 Stites, et al., IMMUNOLOGY, 8TH ED., Lange Publishing, Los Altos, Calif. (1994))。

「免疫反應」係指免疫系統之細胞 (諸如 B 細胞、T 細胞或單核球) 對刺激的反應。在一實施態樣中，該反應對特定抗原具特異性 (「抗原特異性反應」)。在一實施態樣中，免疫反應係 T 細胞反應，諸如 CD4+ 反應或 CD8+ 反應。在另一實施態樣中，該反應係 B 細胞反應且導致特異性抗體之產製。

免疫優勢係指儘管抗原中有大量可能的表位 (抗原片段)，但觀察到免疫系統之反應集中於有限數量之表位且可被排序為可再現之階級 (Sercarz et al. 1993)。對人工抗原、人病毒包括流感及牛痘及細胞內細菌之免疫反應皆呈現免疫優勢 (Chen WS 1994, Belze GT et al. 2000, Chen W

2000, Tscharke DC 2005)。免疫優勢之最終結果係由一些步驟測定，包括 MHC 結合親和性、細胞處理以產生適當 MHC 結合肽之效率、辨識 MHC 結合肽與 MHC 之間之複合體的 TCR 之可用性及其後續之細胞性免疫調節機轉 (Yewdell JW 2006, Sette A et al. 2009)。

「淋巴細胞」係指一種與身體之免疫防禦有關之白血球。淋巴細胞有二種主要類型：B 細胞及 T 細胞。

「主要組織相容性複合體」或「MHC」係指包含於不同物種中所描述之組織相容性抗原系統之通稱，包括人白血球抗原 (「HLA」)。

「次優勢抗原」或「次優勢表位」係指相較於優勢抗原或優勢表位引起較弱之耐受性或免疫反應之抗原或表位。

用語「治療」係指因應病患所顯現或所欲預防之疾病、疾患或生理狀況所進行之臨床干預。治療之目標包括緩和及/或預防症狀，以及延緩、停止或逆轉疾病、疾患或狀況之進展。「治療」係指治療性治療及預防性或防範性措施。有需要治療者包括該些已經受到疾病或病狀或非所欲之生理狀況之影響者，以及該些欲預防該疾病或病狀或非所欲之生理狀況者。

「腫瘤」係指所有瘤細胞生長及增生 (不論惡性或良性) 及所有癌前及癌細胞及組織。

「__-聚體」係指發生於標靶抗原中之 __ 個胺基酸之線性序列。

B. 辨識/區別次優勢表位與優勢表位之試驗

病患之腫瘤或感染首先係經檢測一群腫瘤相關性、病毒性或其他抗原之存在。此通常藉由腫瘤活體樣本之免疫組織化學進行，或在血液惡性疾病病例使用 FACS 進行。病患之腫瘤或感染係經檢測一群腫瘤相關性、病毒性或其他抗原之存在。此通常藉由腫瘤活體樣本之免疫組織化學進行，或在血液惡性疾病病例使用 FACS 進行。該病患之血液係經採集及測試對於抗該存在之抗原的體液性及細胞性免疫反應。無法被該免疫反應偵測或僅低量偵測之抗原被主動選擇於試管內生長 T 細胞。在該些 T 細胞生長後，彼等可經測試對於再輸注抗原之反應，且病患之血液可經檢測對該等抗原之反應。如此一來，該病患之免疫反應可被有效地重新平衡以提供治療性益處。在較佳之實施態樣中，體液性免疫之檢測可包括但不限於 ELISA 試驗。在較佳之實施態樣中，細胞性免疫之檢測可包括但不限於細胞內細胞介素染色法染細胞介素 (ICS)，包括但不限於干擾素 γ ($\text{IFN } \gamma$) 及腫瘤壞死因子 α ($\text{TNF } \alpha$)。有反應之 T 細胞亞群(例如 CD8、CD4、Treg)亦可於此試驗中檢測。或者，細胞性免疫之檢測可包括但不限於檢測 $\text{IFN } \gamma$ 或 $\text{TNF } \alpha$ 之酶聯免疫斑點法 (ELISPOT) 試驗。在替代性實施態樣中，該 Elispot 或 ICS 可檢測 IL-4、IL-12 (TH2 及 TH1)、IL-10 (Treg) 或 IL-21 (濾泡輔助型 T 細胞亞群)。在另一實施態樣中，該細胞性免疫分析試驗可為對這些或其他細胞介素之細胞內染色 (ICS)。該經測試之

抗原可為完整抗原、表位經刪除之抗原或優勢或次優勢表位。以表位而言，生物資訊軟體可被用於預測將與病患 MHC 結合之表位，這些表位接著係經檢測。在一實施態樣中，此軟體係 Net MHCpan 或在檢測部分所描述之共同表位免疫資訊軟體。以表位而言，四聚體結合可被用來作為替代性檢測以定量 CTL，前提為已知該 HLA 類型。包括該等肽之四聚體係與細胞組合，經染色之細胞與 FACS 被用於測定辨識各四聚體之細胞%。若該病患具有已知之 HLA 類型諸如 HLA A2 可使用此方法。然而，較佳之方法係用於測定體液性反應之 ELISA 及用於測定細胞性反應之 ICS 或 Elispot。在較佳之實施態樣中，CTL 係自週邊血液製備。或者，CTL 係自腫瘤浸潤淋巴細胞(TIL)或自注射部位周圍之 DTH 製備。

DTH 浸潤淋巴細胞可藉由穿孔採集 4 mm 皮膚活體樣本製備，將之磨碎於含 10% FCS 之 RPMI 培養基 1640 (CSL)。單細胞懸浮液係以 1 μ g/ml 植物血凝素(西格瑪(Sigma)公司)刺激，且與經放射線處理之自體 PBMC 共培養並添加 10 IU/ml IL-2 (賽圖斯(Cetus)公司)及 10 ng/ml IL-7 (派普泰克(Peprotech)公司，紐澤西州洛基山市(Rocky Hill, NJ))。每 2 至 3 天補充一次培養基。

在分析體液性免疫反應方面，來自病患之血清係經 1:4 連續稀釋自 1/100 至 1/100000，且與經純化之重組腫瘤抗原(大抵於大腸桿菌(E. coli)製備)用於標準 ELISA。可檢測自 2 至 10000 種以上之抗原。使 1 微克之各種經純

化之蛋白質於攝氏 4 度隔夜吸附至微孔盤(紐克(Nunc)公司)。以 PBS 清洗孔盤，並經 2% FCS/PBS 封閉。病患血清係於 2% FCS/PBS 稀釋，添加至孔盤 2 小時。清洗孔盤，添加山羊抗人 IgG-AP (南方生技(Southern Biotechnology)公司)。孔盤係經清洗，與 Attophose 受質(JBL 生物科技公司)培養 25 分鐘，並立即讀取(CytoFluor 2350，密里博(Millipore)公司)。讀取值係 UV 吸光度。

有二種方法可用於分析細胞性反應。第一種方法關於測定 IFN γ 之酶連接免疫吸附斑點(ELISPOT)試驗。96 孔聚亞乙烯二氟盤(密里博(Millipore)公司，麻州貝德福市(Bedford, MA))係以 5 至 15 $\mu\text{g/ml}$ 之抗 IFN γ 單株抗體 1-DIK (MABTECH 公司，瑞典斯德哥爾摩(Stockholm, Sweden))於攝氏 4 度隔夜包覆。孔槽經清洗，利用 5% 人 AB 血清(凡利亞製藥(Valeant Pharm)公司)封閉。 5×10^6 PBMC (或 5×10^5 CTL 若該試驗係於試管內擴增後進行)與各種抗原之各 2 μM 肽混合物被加至各孔。於攝氏 37 度及 5% CO_2 中隔夜培養(18 小時)。倒掉細胞，以含有 0.05% Tween 20 之 PBS 清洗孔槽。加入 1 $\mu\text{g/ml}$ 經生物素基化之抗 IFN γ 單株抗體 7-B6-1 (MABTECH)於室溫中培養 2 至 4 小時，接著加入經鏈黴抗生物素蛋白共軛之鹼性磷酸酶(MABTECH 或西格瑪奧德里奇(Sigma Aldrich)公司)再培養 2 小時。接著利用 alk-phos 受質套組(Bio-Rad 公司，加州里奇蒙市(Richmond, CA))之 5-溴基-4-氨基-3-吡啶基磷酸酯及硝基藍四唑反應 30 分鐘。利用解剖顯微(SZ

CTV 奧林巴斯 (Olympus) 顯微鏡) 計算斑點數。亦可利用 AIDELISPOT 讀取儀 (自動免疫診斷 (Autoimmun Diagnostika) 公司, 德國斯特拉斯柏格市 (Strassberg, Germany)) 計算斑點。每個斑點係一細胞, 其被報告為每 10^5 PBMC 中之斑點形成細胞 (SFC)。10 $\mu\text{g/ml}$ PHA 可被用來作為陽性對照, 不含肽僅含細胞可作為陰性對照。

第二個方法與 $\text{IFN } \gamma$ 及 $\text{TNF } \alpha$ 之細胞內細胞介素染色有關。 5×10^6 PBMC (或 5×10^5 CTL 若該試驗係於試管內擴增後進行) 係經接種於 100 μl PBS 1% FCS 96 孔盤, 並與欲測試之各種表位或抗原之肽 (終濃度 10^{-5} 至 10^{-9} M) 一起培養。在 IL-2 (150 U/ml)、50 μM β 巯乙醇及布雷菲德菌素 A (1 $\mu\text{g/ml}$) 或 Golgi Plug (BD 生物科技公司 (BD Biosciences), 加州聖地牙哥 (San Diego, CA)) (後面兩種成份皆增加反應性細胞中 $\text{IFN } \gamma$ 或 $\text{TNF } \alpha$ 之累積) 存在下培養 6 小時後, 細胞經離心形成團塊, 以 200 ml PBS 1% FCS 清洗, 然後於 4 度 C 染色標示表面抗原 30 分鐘, CD4 以螢光素異硫氰酸酯染色及 CD8 以別藻藍蛋白 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 染色 (Pharmingen, BD 公司 (Becton Dickinson))。細胞清洗後於冰上經 Cytofix/Cytoperm 通透化 20 分鐘, 接著以經藻紅素共軛之抗 $\text{IFN } \gamma$ (0.4 $\mu\text{g/ml}$) 或抗 $\text{TNF } \alpha$ (0.8 $\mu\text{g/ml}$) 抗體 (Pharmingen, Becton Dickinson) 染色。細胞接著經清洗、固定及重懸於 PBS 1% FCS, 並於 FACScan 流式細胞分析儀中檢測及利用 Cell Quest 軟體分析。或者可使用 FACS Canto 儀 (Becton Dickinson)。其他細胞介素包

括但不限於 IL-12 及 IL-4 可經檢測以測量 TH1 或 TH2 亞群。檢測更廣泛之 T 細胞的細胞介素組可測量 IL-12、IFN γ 、IL-4、IL-10 及 IL-17。濾泡輔助型 T 細胞可被測量為 CD4⁺、CXCR5⁺及 ICOS⁺ 細胞。B 細胞可被測量為 CD19⁺ 及 B220⁺ 細胞。在 T 細胞中之 IL-21 應與 B 細胞活化及抗體之親和性成熟有關，因此也可以被用於此研究。作為 IFN γ 、IL-4 (BD Biosciences)、IL-12、IL-10、IL-17 (R&D 系統公司)及 IL-21 抗體 (R&D systems)分析之替代方案，亦可使用 ELISPOT。ICS 實際分析對不同抗原或表位有反應之 CD8 或 CD4 T 細胞%。其他亦可被分析之細胞亞群包括 Treg。經細胞色素標示之 CD25 單株抗體可被用來作為大部分 Treg 之表面標誌。或者，購自 BD 生物科技公司之經細胞色素標示之人 FoxP3 單株抗體株 259D/C7 係用於在通透化後染色細胞以測量 Treg 細胞%及彼等之狀態。IL-10 亦可被檢測。

NetMHCpan 係一種用於量化預測肽與 HLA-A 及 -B 結合之生物資訊方法(Nielsen M 2007)。一種共同表位預測方法亦已經發展(Mouafts M 2006)。這些方法可被用於分選抗原之所有潛在性 MHC I 表位並排出前 1%之肽，因此預測表位。這些經預測之表位接著可被合成為 9 至 10 聚體之肽並經檢測(例如於病患之 PBMC 或基因轉殖小鼠中檢測受到關注之 HLA 類型)。

具有特定 MHC (例如 HLA A A2)之四聚體係與 8 聚體肽表位一起合成(以第一型 MHC 而言)，若為第二型 MHC

則與 15 聚體肽表位一起合成。該經培養之 T 細胞係經稀釋 1/200 之四聚體於室溫中染色 20 分鐘，接著添加抗 CD8 抗體並繼續染色 30 分鐘。細胞接著經清洗，在 FACS Calibur 流式細胞儀(BD Biosciences)上得到 100,000 並以 Flowjo 軟體(樹星(Tree Star)公司)分析。

在治療後，該病患重新接受檢查，藉由檢查對該次優勢抗原或表位之耐受性或體液性或細胞性免疫反應以測定該治療是否成功地重新平衡該免疫反應。

C. 重新平衡免疫反應

在本發明之一實施態樣中，該免疫反應可藉由使源自病患之 T 細胞在活體外與抗原上之次優勢抗原或次優勢表位一起生長，接著再將該些 T 細胞輸注或投予至該病患體內加以重新平衡。抗次優勢抗原或表位之 T 細胞係於活體外組織培養中生長(遠離該病患之免疫調節環境)。在培養足以壓倒先前之優勢細胞的細胞數量之後，該些細胞被重新輸注至該病患體內以改變該細胞性平衡及治療性切換免疫優勢體系。在其他較佳之實施態樣中，重新導入以作為治療之 T 細胞數量係超過對該抗原、感染性劑、腫瘤或器官具反應性之 T 細胞的 5%。藉由預先以減少內源性 T 細胞之數量的調節劑(即化學治療)處理該病患，可進一步調整該比例以利於該經輸注之細胞。

本發明關於在組織培養中最佳化針對次優勢抗原之 T 細胞生長之方法。在一實施態樣中，該些細胞係於優勢抗

原不存在下生長。此係藉由選擇專職抗原呈現細胞及修飾抗原達成，該抗原呈現細胞並未暴露至優勢抗原且該修飾消除優勢表位或其他限制抗原被處理之能力之成份。

由於該治療性方法需要使 T 細胞富集且對次優勢抗原/表位具理想且完全之反應性，因此有效之生長該等 T 細胞之方法非常重要。其他抗優勢表位及抗原之 T 細胞生長延長產製足夠之特定細胞以改變此比例所需之培養時間。另外，生長出抗優勢表位之細胞不利於重新輸注時適當比例之達成。因此，發展出特別限制導入優勢抗原或表位之 T 細胞培養方法。舉例來說，雖然該方法可廣泛應用於所有腫瘤，但其對於 EBV 惡性腫瘤具有明顯優點，因為該方法不使用經 EBV 轉形之 B 細胞(其表現 EBV 優勢抗原/表位)。當應用於其中顯著 % 之 CTL 對次優勢抗原/表位具反應性之細胞時，該方法亦較為可靠。

單核球衍生性樹突細胞係於試管內自病患之週邊血液單核細胞(PBMC)產製。在較佳之實施態樣中，接種 PBMC 於組織培養角瓶中 2 小時允許單核球之黏附。在替代性實施態樣中，CD14⁺ 磁珠可被用於自 PBMC 分離樹突細胞(美天旖生技(Miltenyi Biotec)公司，加州奧本市(Auburn, CA))。此時，非黏附之細胞被取出並冷凍於 -80 度 C 以供稍後作為 T 細胞之來源。以介白素 4 (IL-4)及顆粒球-巨噬細胞集落刺激因子(GM-CSF)處理該經黏附之單核球導致在大約一週內分化成不成熟之樹突細胞(iDC)。後續以腫瘤壞死因子(TNF)或巨噬細胞條件培養基處理 2 天以進

一步使該 iDC 分化成成熟樹突細胞。這些細胞接著以含有次優勢抗原之肽或質體脈衝 2 小時，然後解凍 PBMC 並加入該經脈衝之樹突細胞。在數小時之後，該些細胞被集合重懸於含有 IL-2 或 IL-15 (以 IL-15 較佳)之培養基以使得能辨識該抗原之 T 細胞於試管內擴增。在某些方法中，IL-7 及 IL-15 被添加以增加 T 細胞之存活。在其他方法中，培養條件係經調整以最佳化某些 T 細胞亞群之生長。舉例來說，IL-12 可被添加以極化成 TH1 細胞。或者，可添加 IL-4 以極化成 TH2。在某些方法中，IL-6 可被添加以預防 Treg 之生長。在另一可用於自體免疫或器官移植應用之變異方法中，低量 IL-2⁺ 雷帕黴素可被添加以刺激 Treg 之生長。更詳細之方法係列示於不同實施例，活體內比較經不同方法產製之細胞(極化該些細胞成為某些 T 細胞亞群)係描述於實施例 3 及圖 3。若 T 細胞係生長於組織培養角瓶，培養基必須於第 14 及 21 天更換。然而，在較佳之實施態樣中，使用生物反應器可減輕此需求，例如氣體通透性生物反應器諸如 Grex (威爾森沃夫(Wilson Wolf)公司)或 Hyperstack (康寧(Corning)公司)。大抵上，投予至病患之足夠細胞可於 2 至 6 週內產製，相對於傳統方法之 12 至 24 週。

在本發明之另一實施態樣中，發明人發展用於過繼轉移拮抗優勢表位已被刪除之抗原的 T 細胞，且顯示可產製更多拮抗次優勢表位之 T 細胞。該等蛋白質或對應之 DNA 疫苗可被用於產製對次優勢表位具廣泛免疫反應之 T

細胞。此策略應廣泛適用於各種類型之疾病以達成對次優勢表位之免疫反應的平衡，包括但不限於 EBV、癌、HIV 或肝炎。在另一實施態樣中，該抗原或編碼彼之質體/重組疫苗被用於免疫病患以誘導對該次優勢抗原之新的廣泛免疫反應。在另一實施態樣中，該次優勢反應性 T 細胞可先經投予，之後利用次優勢抗原疫苗免疫以補強該反應。在另一實施態樣中，該策略可被治療性或預防性使用，其中病患之免疫狀況可經測定以測量罹患疾病之風險，接著利用此處所揭示之任何策略以適當之次優勢抗原初次免疫該病患。

在替代性實施態樣中，該生長之 T 細胞誘導耐受性以預防或治療自體免疫性疾病、過敏、發炎、器官移植排斥或移植物抗宿主病。根據所欲之 T 細胞類型，培養條件可經調整以優先生長或富集該相關亞群包括但不限於 CD8、CD4、TH1、TH2 或 Treg。舉例來說，T 細胞可於某些生長因子、細胞介素、藥物、小分子或其他免疫細胞存在或不存在下生長。在較佳之實施態樣中，次優勢抗原反應性 T 細胞係於經刺激之專職抗原呈現細胞(例如源自樹突細胞、巨噬細胞或 EBV 永生化 B 細胞之單核球)存在下自組織培養中之週邊血液單核細胞(PBMC)產製。

在另一實施態樣中，各種技術被用於調整抗原處理以利於次優勢表位。在本發明之一實施態樣中，此係藉由修飾抗原以消除優勢表位、抑制抗原處理之區域或限制一次呈現給抗原呈現細胞之優勢或次優勢表位之數量達成。這

些修飾增加可辨識之次優勢表位的反應及多樣性(實施例 1, 圖 5)。在替代性實施態樣中, 該經修飾之 LMP1、LMP 2 及 EBNA-1 序列可利用病毒載體諸如腺病毒或牛痘病毒被遞送至 APC。以其他抗原(LMP1 及 EBNA-1)為例, 消除導致不良抗原處理之蛋白質之區域大幅增進對該些抗原上之次優勢表位的免疫反應(實施例 1, 圖 6)。該經修飾之 LMP1、LMP2 及 EBNA-1 序列可利用肽、蛋白質、質體或病毒載體諸如腺病毒或牛痘病毒被遞送至 APC。

在替代性實施態樣中, 蛋白體拮抗劑可在 CTL 產製期間被添加至 APC 及抗原中以增加可經辨識之次優勢表位之數量且增進對該次優勢抗原之反應(實施例 2, 圖 7)。有許多具有不同機轉之蛋白體拮抗劑可用(例如硼替佐米(bortezomib)、氯碘脛喹(clioquinol)、乳胞素(lactacystin)、環氧黴素(epoxomicin)、MG-132、MLN9708、卡非佐米(carfilzomib)(PR-171))。

在替代性實施態樣中, 抗原可與就針對次優勢決定簇之反應而言具有不同同型之抗體呈複合體之形式投予(實施例 3, 圖 13)。該抗原係與結合在毗鄰該所欲之 T 細胞表位之決定簇上之抗體一起注射, 以靶向專職之抗原呈現細胞及引導針對該毗鄰表位之抗原處理。

在本發明之另一實施態樣中, 包含次優勢表位或抗原之質體被用來產製經投予或直接投予至病患之 T 細胞, 該投予係直接經各種途徑投予、與 IFN γ 、IL-21 或其他細胞介素組合投予, 或藉由經脈衝之樹突細胞投予以誘導針

對次優勢抗原之反應。IFN γ 或其他細胞介素可於 T 細胞刺激前被誘導以增加 T 細胞針對次優勢表位之反應性及調整該免疫優勢體系。

在另一實施態樣中，該投予途徑係經調整以改變該免疫優勢體系。疫苗免疫接種之投予途徑決定優勢決定簇之優勢程度。研究發現當經腹腔內投予時，該優勢決定簇僅引起四分之一的反應，皮內投予則引起一半之反應 (Tscharke DC et al. 2006, Tscharke DC et al 2005)。如實施例 3 圖 11 所示，藉由 IM 途徑投予抗原相較於 IP 或 IV 途徑發展針對次優勢表位更強之反應及更廣之反應。因此，調整投予途徑係另一種本發明人主張以調整該免疫優勢體系之活體內機轉。在較佳之實施態樣中，經培養之 T 細胞係藉由皮內投予遞送。藉由靶向不同之 APC (例如巨噬細胞、樹突細胞)，投予途徑改變優勢體系 (實施例 3，圖 12)。

在較佳之實施態樣中，該等抗原係其上具有次優勢表位之病毒性抗原，特別是潛在病毒性抗原或慢性病毒性抗原。舉例來說，該等病毒性抗原係源自選自下列之病毒：EBV、HSV、VZV、B 及 C 型肝炎病毒、HIV 及 HTLV。該等病毒性抗原係例如 EBV、LMP1、LMP2、EBNA-1、HPV E6 或 HPV E7。舉例來說，該等病毒性抗原係與 EBV、HSV、VZV、B 及 C 型肝炎病毒、HIV、HTLV、CMV、RSV 或流感病毒有關。在另一實施態樣中，該等抗原係在其他慢性及潛在性感染性劑上之抗原，例如與細

菌、真菌、寄生蟲或病原性蛋白顆粒有關之劑。在又一實施態樣中，該等抗原係腫瘤抗原，包括但不限於腫瘤相關性抗原、腫瘤特異性抗原、與癌幹細胞或轉移有關之抗原。在其他實施態樣中，該等抗原係與自體免疫、過敏、發炎、器官移植排斥或移植物抗宿主病有關。

在一實施態樣中，病患之免疫優勢體系係藉由識別病患樣本中之優勢抗原或表位及次優勢抗原或表位、培養能辨識該次優勢抗原或表位之 T 細胞及以有效數量之該等 T 細胞治療病患加以改變。

在一實施態樣中，病患之免疫優勢體系係藉由識別病患樣本中之至少一種次優勢抗原或表位、培養能辨識該次優勢抗原或表位之 T 細胞及以有效數量之該等 T 細胞治療該病患以提供治療益處加以改變。

在另一實施態樣中，該 T 細胞係反應性 T 細胞，以有效數量之該 T 細胞治療病患以改變該病患之免疫優勢體系，藉此誘導該病患之細胞毒性免疫反應以用於感染或癌之治療或預防。該感染舉例來說係細菌性、病毒性、寄生蟲性或病原性蛋白顆粒感染。

在本發明之任何方法中，治療或預防疾病、感染、癌或醫學狀況包括緩和或改善該疾病、感染、癌或醫學狀況之至少一種症狀。

D. 治療性方法

1. 癌

優勢及次優勢抗原之臨床免疫分析工作流程

步驟 1：腫瘤活體樣本(免疫組織化學)或血液(IHC、FACS 或 Elisa)抗原 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10

結果：抗原 1、2 及 6 在腫瘤上，其他則否

步驟 2：免疫反應分析

體液性分析

細胞性分析

血清 ELISA

經各抗原刺激之 PBMC 進行

Elispot 或 ICS (至少分析 IFN γ ，

亦可分析 IL-10、IL-4、IL-12 及

IL-21 以測定 T 細胞亞群)

結果：抗原 1 強烈反應(優勢)；抗原 2 及 6 無反應/中度反應(次優勢)

步驟 3：於試管內生長針對次優勢抗原之 T 細胞(CD8 及 CD4)

結果：T 細胞對抗原 2 及 6 具反應性

步驟 4 (一旦治療已建立則為選擇性)：利用細胞性免疫分析試驗證實>5%生長之 T 細胞針對次優勢抗原具反應性(Elispot 或 ICS)

結果：25%之該等 T 細胞對抗原 2 及 6 具反應性

在步驟 5 前提供至少 5%之對次優勢抗原具反應性之 T 細胞

步驟 5：IV 輸注先前經(例如環磷醯胺)調節或未經調節之細胞至病患

步驟 6 (一旦治療已建立可能變成選擇性)：輸注後 2

至 3 週自血液分離 PBMC 以分析免疫反應

結果：細胞性反應：抗原 1 無反應/中度反應；針對抗原 2 及 6 之至少一者具強烈反應(優勢)

步驟 7：評估臨床反應

固體腫瘤反應評估標準(RECIST) (CR、PR)；存活或無疾病進展存活

結果：改善反應率及存活。

在實施例 4 中，此系統性方法係用於治療黑色素瘤。在實施例 5 中，該方法係應用於以多質體 LMP2 治療淋巴瘤。事實上 T 細胞治療改變淋巴瘤之天然病程，從復發-緩解性病程改變至持久性緩解病程。此抗原以及經刪除之 LMP1 及 EBNA-1 亦可被用於治療其他包括 EBV 抗原之腫瘤，包括鼻咽癌、伯奇氏(Burkitts)淋巴瘤、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、霍奇金氏淋巴瘤及一些胃癌等其他癌。在實施例 3 中，類似方法係用於治療肝細胞癌。該等實施例藉由參照方式併入本發明，彼等顯示重新平衡針對次優勢抗原之免疫反應可被廣泛應用於所有形式之癌。

2. 廣泛使用腫瘤上之大量次優勢抗原以產生泛腫瘤類型療法

在另一實施態樣中，本發明人提出若可識別特定腫瘤類型之足夠次優勢抗原，則該類型之腫瘤可利用針對多重次優勢抗原之 T 細胞治療而無須測試該病患。類似地，靶向該相同腫瘤上之多重抗原將降低例如組合化學療法之抗

藥性。舉例來說，發展靶向次優勢抗原 EBV LMP2 及存活之單一 T 細胞系之能力將允許以對該二種抗原具特異性之 T 細胞系靶向大約 80% 之淋巴瘤，其中該 EBV LMP2 抗原係存在於 40% 之淋巴瘤，50% 之淋巴瘤為存活陽性。泛淋巴瘤製品之臨床檢測係如實施例 5 所示。到第 3 年，以泛淋巴瘤製品治療之病患的無疾病進展存活係與在治療前測試抗原之製品的效果相仿。這可能是因為 CTL 針對相同腫瘤上之多種抗原之反應可減少躲避之可能性，就像化學組合療法。以單一 T 細胞製品治療所有淋巴瘤之能力(不一定僅治療單一抗原陽性之亞群)係新穎之產品概念。在本發明之其他實施態樣中，本發明人亦主張用於幾乎任何癌之類似的泛癌製品。

3. 慢性感染

肝炎及肝細胞癌

慢性肝炎之病患不產生 HBs 抗體，但會產生 HBc 抗體 (Ganem D et al 2004)。急性肝炎之病患則產生針對兩種抗原之抗體。>90% 之新生兒及 30% 年齡 1 至 5 歲之兒童發展慢性肝形式，然而 >90% 之成人急性清除該病毒。95% 之肝細胞癌係與 B 型肝炎病毒之慢性感染有關，且 HBs 抗原通常存在 HCC 之細胞表面。由於這些觀察，本發明人選擇探討 HBs 是否為肝炎及肝細胞癌病患中之次優勢抗原及 T 細胞之生長是否可產生能重新平衡免疫反應成為針對次優勢抗原且具治療性之抗 HBs 抗原之 CTL。

根據此發現，我們投予針對 HBs Ag 生長之 CTL 以治療動物肝炎模型中之慢性肝炎，最後用於 HBV 相關性 HCC 病患。在動物模型中，HBVtgRAG 細胞係經投予及測試。接受對照細胞之動物發展慢性肝炎。另外，當動物發展肝炎且接受針對次優勢抗原之 CTL 時，該動物發展急性肝炎但清除該肝炎病毒(實施例 3，圖 9 至 11)。

由於該令人鼓舞之動物資料，本發明使用該 T 細胞重新平衡療法治療肝炎病患。

優勢及次優勢抗原之臨床免疫分析工作流程

步驟 1：肝炎表面抗原及肝炎核心抗原之免疫反應分析

體液性分析

血清 ELISA

細胞性分析

經抗原刺激之 PBMC 進行 Elispot
或 ICS (至少分析 IFN γ ，亦可分析 IL-10、IL-4、IL-12 及 IL-21 以測定 T 細胞亞群)

結果：Hbc 強反應(優勢)；Hbs 無反應/中度反應(次優勢)

步驟 2：於試管內生長針對次優勢抗原之 T 細胞(CD8 及 CD4)

結果：T 細胞對 HBs 抗原有反應

步驟 3 (一旦治療已建立則為選擇性)：利用細胞性免疫分析試驗證實 >5% 生長之 T 細胞針對次優勢抗原具反應性(Elispot 或 ICS)

結果：25%之該等 T 細胞對 HBs 抗原具反應性

在步驟 4 前提供至少 5%之對次優勢抗原具反應性之 T 細胞

步驟 4：IV 輸注先前經(例如環磷醯胺)調節或未經調節之細胞至病患

步驟 5 (一旦治療已建立可能變成選擇性)：輸注後 2 至 3 週自血液分離 PBMC 以分析免疫反應

結果：細胞性分析 HBc 無/中度反應；HBs 強反應(優勢)

步驟 6：評估臨床反應

結果：清除感染

免疫分析係於 5 名 HBV 及 HCC 之病患進行。如預期地，ELISA 顯示高力價之抗 B 型肝炎核心抗原(HBc Ag)之抗體，但不具有抗 B 型肝炎表面抗原(HBs Ag)之抗體(實施例 3，圖 17)。然而，當 PBMC 係經誘導成樹突細胞、經 B 型肝炎核心抗原(HBc Ag)及 B 型肝炎表面抗原(HBs Ag)脈衝，且用於生長來自該相同病患之 PBMC 之 CTL 時，觀察到令人意外之結果。藉由在 Elispot 上之 IFN 產製 T 細胞頻率觀察到一體系：無抗原(10 sfc)<HBsAg(15 sfc)<HBcAg(45 sfc) (實施例 3，圖 14)。此顯示 B 型肝炎表面抗原相較於肝炎核心確實是次優勢抗原。另外，藉由 Elispot (實施例 3，圖 14)及 ICS (實施例 3，圖 15)測定，HBs 之一表位(FLL)似乎為優勢表位。包含此表位之肽被排除，不用於生長該病患之細胞的肽混合物中。

在 HCC 病患中，3/5 接受針對次優勢 HBs 之 T 細胞的病患(實施例 3，圖 16)清除該 HBs 抗原且顯示對 HCC 完全緩解(CR)，隨後肝功能檢測顯示丙胺酸轉胺酶(ALT)暫時升高(實施例 3，圖 17 及 19)。當來自該等病患之 PBMC 於投予後 2 週檢測時，針對 HBs (而非針對 HBc)及針對 HBs 之先前次優勢表位之優勢反應(實施例 3，圖 18)顯示該等病患已重新平衡彼等之免疫優勢體系。該治療及免疫優勢體系切換之結果提供治療益處(實施例 3，圖 17 及 19)。

因此，針對次優勢抗原之 T 細胞過繼免疫療法可被用於清除慢性病毒及治療有該等次優勢抗原存在之癌。另外，免疫分析以引導針對次優勢抗原及表位之 T 細胞產製為多種疾病開創新穎的治療方向。

幾乎任何病毒、細菌、真菌、病原性蛋白顆粒、寄生蟲或其他感染性疾病皆可被治療，包括但不限於 C 型肝炎病毒及 HIV 病毒。其他慢性感染性疾病亦可利用重新平衡加以治療。舉例來說，結核桿菌在許多病患係慢性感染，它只有在免疫系統低下時才被再度活化。在彼之潛伏狀態時，其通常在肺中被肉芽腫包圍。最近關於分枝桿菌吞噬體之蛋白體的研究顯示 MTB 以較高程度抑制樹突細胞相較於巨噬細胞中之抗原呈現(Li et al. 2011)。為達此目的，本發明人提議重新平衡免疫系統以對次優勢表位有反應係對幾乎任何癌或感染性疾病之廣泛治療策略。

4. 自體免疫性

流行病學研究顯示病患發展多發性硬化症之風險與 EBV 抗體力價有關。藉由追蹤成數十萬名個體在感染 EBV 之前及在初次感染之後數年，Ascherio et al.能研究 305 名發展 MS 之病患。他們的風險在 EBV 感染後急遽增加 (Ascherio A et al. 2010)。當與亦為 EBV 帶原者之健康個體比較時，MS 病患中之針對 EBNA-1 400-641 有反應之記憶性 CTL 相較於其他 EBV 抗原上升 (Lunemann JD et al. 2006)。EBNA-1 特異性 Th1 細胞似乎藉由交叉辨識自體抗原或旁觀者機轉而得以維持自體免疫性。另外，基因轉殖小鼠試驗顯示表現 LMP2a 之 B 細胞躲過正常之耐受性檢測點且增加自體免疫性疾病之發展 (Swanson-Mungerson M 2007)。因此，雖然我們研究對 EBV 次優勢表位有反應之 T 細胞以作為 EBV 及 EBV 相關性癌之治療，對 EBV 次優勢表位有反應之 T 細胞亦可能可用於恢復自體免疫性之平衡。藉由生長及導入對 EBV 潛在抗原 (EBNA-1、LMP1 及 LMP2)具反應之 T 細胞，本發明人提出該免疫反應可被重新平衡，重新誘導自體免疫疾病中與 EBV 相關之耐受性。對於與其他自體免疫疾病有關之其他病毒而言亦同。舉例來說，小核糖核酸病毒諸如柯沙奇病毒 (Coxsackievirus) B3 造成心肌炎/擴張型心肌病變、第一型糖尿病、腦炎、肌炎、睪丸炎及肝炎。

在其他實施態樣中，可產製針對器官相關性抗原之 T 細胞，其中器官特異性自體免疫性係經發展。由於免疫優

勢之現象涉及源自在任一時間被處理之所有抗原的表位，因此不需要完全了解哪一個自體抗原在當時造成該自體免疫反應。舉例來說，產製及導入針對膠原蛋白之反應性次優勢表位之 T 細胞至類風濕性關節炎病患之發炎關節，該持續之免疫反應將被重新平衡且將恢復耐受性。導入活性 T 細胞至發炎部位將有益處之想法有違一般認知且出乎意料，但是根據我們的作業模型，重新平衡該部位之免疫反應將恢復對該異常免疫反應之適當控制。治療自體免疫疾病係本發明之另一實施態樣。

5. Treg 於試管內擴增

免疫調節之其中一項原則係平衡 Treg 與其他 T 細胞亞群。本發明之另一實施態樣係極化該活體外 T 細胞生長成 Treg 細胞。在此情況下，我們不靶向次優勢表位，取而代之的是產製針對次優勢表位之 Treg 以作為重新平衡該免疫反應之另一方法。在一實施態樣中，如此產製之 Treg T 細胞被單獨使用以作為治療性製品。在另一實施態樣中，該 Treg 亞群係與源自其他亞群之針對次優勢表位或次優勢抗原生長之 T 細胞組合使用。雖然 Treg 係以非抗原特異性方式利用 FACS 分選擴增，然後利用抗 CD23 及抗 CD28 包覆之珠擴增 (Putnam et al. 2009)，現在沒有人用抗原特異性方式擴增 Treg 以用於過繼免疫療法。此處所述之方法係用於建立對不同抗原具特異性之 Treg，特別是該些於自體免疫疾病、移植物抗宿主病或移植排斥

之免疫反應中呈現優勢之抗原。

Treg 係自自體免疫或移植病患之 PBMC 中分離，利用無菌技術於 GMP 無菌室中，使用 CD4-PerCP(SK3)、CD127-PE (hIL-7R-M21)、CD25 APC (2A3)、CD45RA-PE.Cy7 (L48)及 CD45RO-PE.Cy5 (UCHLI)藉由 FACS 分選 (BD FACS Aria II 高速細胞分選儀)。CD4⁺CD127^{lo/-}CD25⁺ 及 CD4⁺CD127^{lo/-} T 細胞係經分選並收集於含有 10% 人熱不活化之集合 AB 血清 (維里生醫 (Valley Biomedical) 公司，維吉尼亞州溫徹斯特市 (Winchester, VA)) 之 3ml X-Vivo 15 培養基 (龍沙 (Lonza) 公司，馬里蘭州沃克斯維爾市 (Walkersville, MD))。(或者，Treg 可利用包覆該相同抗體之磁珠分離 (美天旖生技 (Miltenyi Biotec) 公司，加州奧本市 (Auburn, CA))。) 該等細胞被以每孔 2.5×10^5 Treg 被接種於 24 孔盤 (科斯達 (Costar) 公司，麻州劍橋市 (Cambridge, MA))，各孔以 1:5 之 Treg : APC 比例含有自 PBMC 製備之樹突細胞 (如上 T 細胞刺激中所述)，該等樹突細胞已經優勢抗原預先脈衝。在培養 18 小時後，自第 1 至 7 天於細胞培養加入雷帕黴素 (100ng/ml；惠氏藥廠 (Wyeth)，紐澤西州麥迪遜 (Madison, NJ))。第 2 天培養體積增加為二倍，添加 300 單位/ml 之 IL-2 (奇隆 (Chiron) 公司，加州艾莫利維爾市 (Emeryville, CA))。細胞經重懸，於第 2、5、7、9 及 12 天添加新鮮培養基及 IL-2。第 9 天，利用肽脈衝樹突細胞重新刺激細胞。或者，抗 CD23/抗 CD28 包覆之微珠 (英維特基

(Invitrogen)公司，加州卡斯巴德市(Carlsbad, CA))可被用於此第二次刺激。另外，氣體通透性生物反應器(諸如Grex)可被用於實施此細胞生長，封閉系統可減少人為操作並促進生長之動力學。在另一變化態樣中，利用經包覆之珠刺激時添加 IL-10，以驅使該 Treg 進一步分化成 Treg1，該 Treg1 分泌高量之 IL-10 及調節 TH1 及 Th2 反應。

自體免疫中之優勢及次優勢抗原之臨床免疫分析工作流程

步驟 1：免疫反應分析

體液性分析

細胞性分析

血清 ELISA

經各抗原刺激之 PBMC 進行

Elispot 或 ICS (至少分析 IFN γ ，

亦可分析 IL-10、IL-4、IL-12 及

IL-21 以測定 T 細胞亞群)

結果：抗原 1 強烈反應(優勢)；抗原 2 無反應/中度反應(次優勢)

步驟 2：於試管內生長針對次優勢抗原之 T 細胞(CD8 及 CD4)；於試管內生長針對優勢抗原之 Treg

結果：T 細胞對次優勢抗原有反應；Treg 對優勢抗原有反應

步驟 3 (一旦治療已建立則為選擇性)：利用細胞性免疫分析試驗證實>5%生長之 T 細胞針對次優勢抗原具反應性，生長之 Treg 針對優勢抗原有反應(Elispot 或 ICS)

結果：25%之該等 T 細胞對抗原具反應性

在步驟 4 前提供至少 5%針對次優勢抗原有反應之 T 細胞，及/或至少 5%對優勢抗原有反應之 Treg 細胞

步驟 4：IV 輸注先前經(例如環磷醯胺)調節或未經調節之細胞至病患

步驟 5 (一旦治療已建立可能變成選擇性)：輸注後 2 至 3 週自血液分離 PBMC 以分析免疫反應

結果：細胞性反應：抗原 1 無反應/中度效應反應；
抗原 2 具強烈 Treg 反應(優勢)

步驟 6：評估臨床反應

自體免疫方面：MS-減少發作，類風濕性關節炎-關節腫脹減少，氣喘-發作次數減少，早期第一型糖尿病-維持胰臟；在移植方面：器官排斥率及移植物抗宿主病減少

結果：改善臨床結果

6. 於自體免疫或移植中投予針對優勢抗原之 Treg

在另一實施態樣中，針對優勢抗原之 Treg 可與 TH1、TH2 或 CTL 亞群之 T 細胞組合，該等 T 細胞本身針對次優勢抗原具反應性。該組合將更完全地轉換免疫反應之平衡至針對次優勢表位。本發明顯示該二種 T 細胞之間於關節炎中之協同性(實施例 6)。

7. 移植

在選擇性實施態樣中，Treg 係利用上述之 Treg 培養條件自健康捐贈者之 PBMC 生長，使用來自其他健康捐贈

者之樹突細胞(或經放射線處理之 PBMC)。以此方式，針對各 MHC 之同種異體反應性 Treg 細胞系係經建立及儲存。如上所討論，80%之 MHC 可被針對 20 至 50 個 MHC 單體型所產製之 Treg 細胞系所涵蓋。各個該等細胞系可被以單劑量等分冷凍於 -80°C 。當實施器官移植或骨髓移植時， 5×10^7 細胞/ m^2 之針對不相符 MHC 有反應之 Treg 亦經移植於該病患體內。如此一來可減輕異體排斥或移植物抗宿主病。

8. 自動化免疫分析測定及封閉系統細胞培養裝置

氣體通透性膜裝置係培養技術之較佳實施態樣。由於該膜具有氣體通透性，因此培養規模係由該膜之表面積及生長細胞所需之培養基體積決定。該等氣體通透性裝置之實例包括 Hyperstack (康寧(Corning)公司)或 Grex (威爾森沃夫(Wilson Wolf)公司)。這類生物反應器之一個有用特徵在於該細胞培養過程係線性可擴充性。作為標準化我們方法之一部分，我們設計滑入標準 CO_2 培養箱之生物反應器版本以用於生產場所。在不同的實施態樣中，我們設計適用於標準堆疊之生物反應器，以用於自動化生產場所中之培養室。設計用於自動化之生物反應器係製成二種尺寸：一種用於生長個別病患之自體細胞，第二種較大版本用於商業生產異體 T 細胞系。在改良方法中，該細胞培養裝置為了自動化係經改良成矩形以滑進標準 CO_2 培養箱之插槽。這是一個重要的優點，因為該氣體通透性膜係

位於角瓶底部，因此若角瓶放在架上該膜將受到阻礙。藉由使該角瓶成為架，該膜將有較好之空氣流動。一個關鍵設計係在角瓶側邊之突緣，它們能支撐該生物反應器之重量。在一實施態樣中，該生物反應器被安裝至不鏽鋼框以形成插入架支撐物之板。在另一實施態樣中，彼等被成型為塑膠之一部分。在一實施態樣中，彼等具有整個架之面積。在另一實施態樣中，彼等包含架之 $\frac{1}{2}$ 、 $\frac{1}{4}$ 、 $\frac{1}{3}$ 或 $\frac{1}{5}$ 。在較佳之實施態樣中，該培養箱係由新布斯維克 (New Brunswick)、福馬 (Forma)、熱電 (ThermoElectron)、紐艾爾 (Nuair) 或艾斯可 (ESCO) 製造。在較佳之實施態樣中，該培養箱可為氣夾式或水夾式或其他設計。在另一實施態樣中，彼等被放入金屬框之架內或在培養室之平面上。在另一較佳之實施態樣中，該平面可移動且由機器操作。在又一實施態樣中，該生物反應器適用於各種商用處理設備，包括但不限於在收集細胞前使細胞回到懸浮狀態之振盪器。

各生物反應器係封閉系統，其具有接口以加入培養基、成份及細胞，且可自該接口收集細胞以用於冷凍及品質控制。在較佳之實施態樣中，該等接口係使流體及細胞進出該生物反應器之管子，該接口之蓋子具有一體化之實心管，其到達該生物反應器底部。在選擇性實施態樣中，該接口係無菌橡膠片，經由該橡膠片可插入針頭或其他探針至該生物反應器，以手動或利用自動化機器注射或移除流體細胞或其他試劑。該等裝置係經條碼編號以利追蹤，

以使各病患及各細胞系皆具有自己專屬之生物反應器。該生物反應器係使用後即丟棄。該等生物反應器之大小亦經設計以適用於自動化細胞培養中之標準機器自動化設備，包括但不限於堆疊、運輸器及搖動攪拌機。圖 31 係該生物反應器之實例。

和生物反應器一樣，商業多用途之免疫分析測定亦被設計以處理抗體之測量力價及針對抗原群之 T 細胞反應。爲了此目的，使用 ELISPOT 測定，因爲其可應用標準之 96 孔盤格式。在較佳之實施態樣中，使用 AIDELISPOT 讀取儀(自動免疫診斷(Autoimmun Diagnostika)公司，德國斯特拉斯柏格市(Strassberg, Germany))以計算斑點。可選擇地，該 96 孔盤被用於輸入細胞至 FACS 以進行 ICS 測定。不論任何情況下，各病患具有他們自己專屬的 96 孔盤，該盤係經條碼編號且所有盤皆爲可棄式。該等商用測定及製造過程係本發明之實施態樣。

【實施方式】

1. 實施例 1：EBV 潛在感染、淋巴瘤及鼻咽癌

藉由測量血液中之抗體得知全世界 90% 之人口曾暴露於 EBV (單核細胞增多症之致病性病毒)。EBV 於 B 細胞中變成潛伏狀態，彼之大部分蛋白質表現關閉，但仍表現非常低量之潛伏抗原 LMP1、LMP2 及有時表現 EBNA-1。這些蛋白質之免疫原性微弱，但係維持該病毒即使彼之潛伏狀態所需。由於彼等主要源自 B 細胞，40% 之淋巴瘤測

試顯示陽性之 EBV 潛伏抗原。因此，這些抗原可作為在過繼細胞治療中所產生之 CTL 反應之標靶。此外，鼻咽癌及其他腫瘤(例如約 10%之胃癌)亦表現 EBV 潛伏抗原。雖然 CTL 已被用於治療 EBV 淋巴瘤，目前利用經 EBV 轉形之 B 細胞重複刺激之產製方法不但耗時(3 至 6 個月)而且費工。另外，以此方式產製抗 LMP2 之 CTL 產生僅一半批量之 T 細胞在製備後具有可偵測之抗 LMP2 反應。本發明人相信此現象之原因是因為源自 EBV 蛋白質之優勢表位存在於該經 EBV 轉形以產製 CTL 之 LCL 細胞，該等細胞在 50%之時間生長超過針對 LMP2 之細胞。在具有大體積腫瘤之病患中，52%經傳統方法產製之 CTL 治療之病患具有完全反應。雖然先前技藝相信所有 CTL 不論有無針對 LMP2 之反應皆為相等物，本發明人認為此可能是臨床反應不一的原因之一。另外，本發明之作業模型預測此為真正原因。因此，增加針對 LMP2 之 CTL 的產製效率可能具有臨床重要性。

雖然其他 CTL 產製方法亦包含於本發明，使用下列方法以產生下列實驗資料：採集 40 ml 至 100 ml 病患週邊血液至採血管。週邊血液單核細胞(PBMC)於 Lymphoprep 溶液上(奈科明(Nycomed)公司，挪威奧斯陸市(Oslo, Norway))藉由離心分離，重懸於含有 10%胎牛血清(FCS)之 RPMI 1640 (吉布可(Gibco)公司，紐約州格蘭德島(Grand Island, NY)) (其包含 2mM L 麩醯胺酸、100 IU/ml 青黴素、100 μ g 鏈黴素/ml) (5×10^6 細胞/ml)，以

10^7 細胞/孔接種於 6 孔盤(科斯達公司(Costar Corp)，麻州劍橋市(Cambridge, MA))。於 37 度 C 培養 2 小時後，非黏附細胞經移除並重懸於含有 10% 聚乙二醇(PEG)之 FCS，裝入試管中，於乾冰上冷凍及儲存於 -80 度 C 冷凍庫。該仍於 6 孔盤中之黏附細胞係以 RPMI + 10% FCS 培養，每 ml 添加 50 ng 之 GM-CSF 及 1000 U 之 IL-4。在第 2 及 4 天以包含上述相同生長因子之新鮮培養基更換一半之培養基。在第 6 天，該培養基以上述之培養基完全更換，並添加 25% 體積之巨噬細胞條件培養基以刺激成熟。巨噬細胞條件培養基係由黏附於免疫球蛋白包覆盤(藉由塗覆 PBS 中之免疫球蛋白且於 4 度 C 隔夜培養製備)之 PBMC 於 RPMI 10% FCS 中以 37 度 C 培養 24 小時後收集上清液，經 0.2 mm 孔徑膜(Acrodisc，吉爾曼科技(Gelman Sciences)公司)過濾產製，使用前儲存於 -20 度 C 可長達 8 週。非黏附細胞係於 2 天之後收集以作為樹突細胞之來源。利用單株抗體實施表面標誌包括 CD54、CD80、CD83 及 CD86 之免疫螢光染色以確保樹突細胞之品質(>50% 之細胞+)。

DC 刺激細胞係於 37 度 C 添加 3 $\mu\text{g/ml}$ 人 $\beta 2$ 微球蛋白之不含血清之 RPMI 1640 中，預先暴露 2 小時於 $\mu\text{g/ml}$ 濃度之蛋白質(肽為 50)。該等細胞接著經清洗，以 10^5 細胞/2 ml 孔接種於添加 5 ng/ml IL-7 之 RPMI 10% FCS。 2×10^6 PBMC 被添加於各孔以作為反應細胞，該反應細胞與刺激細胞之比為 20:1。該培養於第 14 及 21 天於

添加 20 U/ml IL-2 之 RPMI 10% FCS 中以攜帶自體肽之樹突細胞再刺激(若需要分開至其他孔)。

可用於治療病患之 CTL 的釋放測試包括存活率 >70%、細菌及真菌之 7 天陰性培養、內毒素檢測低於 5 EU/ ml、黴漿菌陰性結果、在 ^{51}Cr 釋放試驗中比例 20:1 殺死接受者淋巴胚細胞低於 20%、 $\text{CD}19^+$ B 細胞低於 2%、 $\text{CD}14^+$ 單核球低於 2%及 HLA 特性。

多株 T 細胞群係經採收及用於 5 小時鉻釋放測定以作為效應細胞。在鉻釋放測定中，自 CTL 捐贈者之皮膚活體組織樣本建立纖維母細胞之單層培養，使該細胞單層培養暴露於重組牛痘病毒(每 9 公分培養皿包含 2×10^6 細胞)。轉染 18 小時後收集細胞，以 $^{51}\text{CrO}_4$ 標示 1 小時後清洗三次，用於 5 小時鉻釋放測定中作為標靶。在 γ 計數器上計算之前收集該試驗之上清液至 1%甲醛。

a. 實驗 1：當樹突細胞或經活化之巨噬細胞取代

LCL 被用來作為抗原呈現細胞時，對次優勢表位具反應性之 T 細胞的相對頻率增加。

T 細胞系係自 10 名病患製備，利用 3 種不同的抗原呈現細胞作為刺激細胞：經 EBV 轉形之淋巴胚細胞系(LCL)呈現及擴增；樹突細胞(DC)呈現及細胞介素擴增； $\text{IFN } \gamma$ 巨噬細胞(MAC)呈現及細胞介素擴增。該 3 種細胞中之各者於抗原呈現期間係經 3 種質體之混合物刺激，該 3 種質體表現次優勢抗原 EBNA-1 (刪除胺基酸 90 至 325

之 EBNA-1)、LMP1 (刪除胺基酸 1 至 43 及胺基酸 260 至 315 之 LMP1)及 LMP2 (於 2 種質體中之 LMP2A, 一種表現胺基酸 1 至 399, 第二種植體表現胺基酸 400 至 497)。
使用本發明之方法產製之 T 細胞系接著於 ^{51}Cr 釋放測定中測試。

圖 1A 及 1B: ^{51}Cr 分別於兩種不同比例 20:1 及 10:1 之效應細胞: 標靶細胞 (E/T) (CTL 細胞系: HLA 相符之纖維母細胞)中之釋放, 其中 HLA 相符之纖維母細胞預先經源自該所示抗原之肽混合物脈衝, CTL 利用所示之不同 APC 自代表性病患擴增以生長 CTL 細胞系。

結論: 樹突細胞 (DC) 及巨噬細胞 (MAC) 相較於經 EBV 轉形之 B 細胞 (LCL) 更能選擇性地刺激針對次優勢抗原之 CTL 生長。

圖 1C: ^{51}Cr 於三種不同效應細胞: 標靶細胞 (E/T) 比例 (CTL: HLA 相符之纖維母細胞) 中之釋放, 其中 HLA 相符之纖維母細胞預先經源自該所示抗原之肽混合物脈衝, CTL 源自直接得自該相同病患採血後之 PBMC (培養前)。

結論: 病患對 EBV 優勢抗原具有一些反應, 但相較於 T 細胞培養後具有顯著較高之 E/T 比例。

圖 2: ^{51}Cr 於 20:1 效應細胞: 標靶細胞 (E/T) 比例 (CTL 細胞系: HLA 相符之纖維母細胞) 中之釋放, 其中 HLA 相符之纖維母細胞預先經代表源自 LMP2 之特定 HLA A2 限制性次優勢表位之肽脈衝, CTL 係利用上述三種不同方法自該相同病患製備。

結論：樹突細胞及巨噬細胞相較於 LCL 皆導致針對較多次優勢表位之反應及較高量之 CTL 活性，樹突細胞及巨噬細胞之間針對不同表位之反應強度不同。

圖 3A 及 3B： ^{51}Cr 於 20:1 效應細胞：標靶細胞 (E/T) 比例 (CTL 細胞系：HLA 相符之纖維母細胞) 中之釋放，其中 HLA 相符之纖維母細胞預先經源自 LMP2 之肽脈衝，LCL 之刺激如圖 3A 所示，DC/MAC 之刺激如圖 3B 所示。

結論：樹突細胞及巨噬細胞導致 90% 之病患 CTL 細胞系具有可偵測之 LMP2 反應，相較於 LCL 僅導致 50% 之病患 CTL 細胞系具有可偵測之 LMP2 反應。因此，DC/MAC 處理較為有效且可再現地產製針對次優勢抗原及表位之 T 細胞。

圖 3C：利用巨噬細胞、樹突細胞或 LCL 作為抗原呈現細胞以培養生長之 CTL 細胞系中具有 CD4^+ 、 CD8^+ 及 CD25^+ 之存活 CD3^+ 細胞的百分比。細胞系係以抗 CD3、CD4、CD8 及 CD25 之抗體染色，並經由流式細胞分析評估。

結論：雖然所有方法建立的是 CD8^+ 細胞而非 Treg 細胞，但利用樹突細胞及巨噬細胞作為 APC 相較於利用 LCL 所產製者似乎增加 CD4^+ 細胞之百分比。

酶聯免疫斑點試驗：

酶聯免疫斑點試驗係經實施以測定針對特定抗原所產製之 T 細胞數量。酶聯免疫斑點法之 γ IFN 96 孔聚亞乙

烯二氟盤(密里博(Millipore)公司，麻州貝德福市(Bedford, MA))係以 $15 \mu\text{g/ml}$ 之抗 $\text{IFN } \gamma$ 單株抗體 1-DIK (MABTECH 公司，瑞典斯德哥爾摩(Stockholm, Sweden)) 包覆。 5×10^6 PBMC 被添加至各孔，加入各種蛋白質之各 $2 \mu\text{M}$ 之肽混合物，於 37°C $5\% \text{CO}_2$ 中隔夜培養。丟棄細胞，加入 $1 \mu\text{g/ml}$ 經生物素基化之抗 $\text{IFN } \gamma$ 單株抗體 7-B6-1 (MABTECH)於室溫中培養 2 至 4 小時，接著加入經鏈黴抗生物素蛋白共軛之鹼性磷酸酶(MABTECH)再培養 2 小時。利用 alk-phos 受質套組(Bio-Rad 公司，加州里奇蒙市(Richmond, CA))之 5-溴基-4-氯基-3-吡啶基磷酸酯及硝基藍四唑反應 30 分鐘後，根據樣本之數量，使用解剖顯微鏡或 AIDELISPOT 讀取儀(自動免疫診斷(Autoimmun Diagnostika)公司，德國斯特拉斯柏格市(Strassberg, Germany))計算斑點。每個斑點係一細胞，其被報告為每 10^5 PBMC 之斑點形成細胞(SFC)。在這些試驗中，陽性對照係細胞 + $10 \mu\text{g/ml}$ PHA，陰性對照係僅細胞不含肽。

圖 4：由 Elispot 測量之於試管內生長之每 10^5 T 細胞中之 $\text{IFN } \gamma$ 產製細胞(SFC)。

結論：樹突細胞及巨噬細胞相較於 LCL 更能選擇性擴增針對次優勢抗原之 T 細胞。

最佳化抗原以建立針對次優勢表位之反應

LMP2 係經選擇以最佳化，因為相較於 EBNA-3 其係次優勢抗原，而且利用共同軟體及 PBMC 測定發現，大部

分經辨識之 EBV 次優勢表位似乎皆位於此蛋白質上。爲了增加可辨識之次優勢表位之數量，LMP2 被分開至二或更多個質體上。下列質體係經建構於 p 穿梭質體或 pUC19 質體中，受到 CMV 啟動子及人工 ATG 及 poly A 之控制：

質體 1 LMP2B (胺基酸 1 至 497)

質體 2 LMP2A 1st 外顯子 (胺基酸 1 至 119)

質體 3 LMP2A 2nd 外顯子 (胺基酸 120 至 497)

質體 4 LMP2A (胺基酸 120 至 399)

質體 5 LMP2A (胺基酸 400 至 497)

質體 6 LMP2A (胺基酸 120 至 440)

質體 7 LMP2A (胺基酸 440 至 497)

質體 8 LMP2A (胺基酸 1 至 399)

質體 9 LMP2A (胺基酸 400 至 497)

所有質體皆利用標準程序於 SCS110 菌株 (斯壯特基 (Stratagene) 公司，加州拉荷亞市 (La Jolla, CA)) 中產製，並利用無內毒素質體大量提取套組 (Endo free Plasmid Maxi kit) (Qiagen, Hilden, Germany) 純化。抗原呈現細胞於成熟 24 小時後係經轉染，利用 Amaxa DC Nucleofection 套組 (Amaxa, Koeln, Germany) 以每 10^6 細胞 2 至 20 μ g 質體 DNA 轉染。

LMP2 上之 T 細胞免疫次優勢表位包括但不限於：

LLW 329-337 LLWTLVVLL HLA A 2.01

CLG 426-434 CLGGLLTMOV HLA A 2.01

IED 200-208 IEDPPFNSL HLA B 40.01

SSC 340-350 SSCSSCPLSKI HLA A11.01

TYG 419-427 TYGPVFMCL HLA A24.02

LLS 447-455 LLSAWILTA HLA A2

LTA 453 461 LTAGFLIFL HLA A2

FLY 356-364 FLYALALL HLA A2

這些表位之肽係經合成以用於 ^{51}Cr 釋放試驗，以測試 CTL 針對表現 HLA-A2 之纖維母細胞之反應，該纖維母細胞係自 PBMC 捐贈者之皮膚分離。

圖 5： ^{51}Cr 於 20:1 效應細胞：標靶細胞 (E/T) 比例 (CTL 細胞系：HLA 相符之纖維母細胞) 中之釋放，其中 HLA 相符之纖維母細胞預先經源自 LMP2 之肽脈衝，CTL 細胞系利用分至 1、2、3 或 4 個質體之 LMP2 建立 (1P：497 aa LMP2B；2P：LMP2A 1st 外顯子 (119 aa) 於第 1 質體，LMP2A 2nd 外顯子 (378 aa) 於第 2 質體；3P：LMP2A 1st 外顯子 (119 aa) 於第 1 質體，LMP2A (120 至 399 aa) 於第 2 質體，LMP2A (400 至 497 aa) 於 3rd 質體；4P：LMP2A 1st 外顯子 (119 aa) 於第 1 質體，LMP2A (120 至 399 aa) 於第 2 質體，LMP2A (400 至 440 aa) 於 3rd 質體，LMP2A (440 至 497 aa) 於 4th 質體；2P 2：質體 1 (aa 120 至 440)，質體 2 (aa 440 至 497))。

結論：將 LMP2 分開至至少二個質體 (一質體包含 aa 400 至 497，另一質體包含 399 之前的殘基) 導致針對較多數量之次優勢表位之較強反應。

對應甘胺酸丙胺酸重複結構域之 EBNA-1 胺基酸 90 至 325 係自 EBNA-1 序列刪除及插入 p 穿梭質體中之 CMV 啟動子之控制下。此序列被選擇刪除因為研究顯示其抑制肽之處理。下列 HLA-A2 限制肽被用於評估反應：VLK 574-582 HLA A2。

另外，LMP1 序列係藉由刪除胺基酸 1 至 43 (以預防彼之聚集/防止蛋白體處理)及刪除 260 至 315 (5 份 11 個胺基酸之串聯重複)製備。這些序列係建構於 p 穿梭質體之 CMV 啟動子之控制下並與野生型 LMP1 比較。為了評估反應之廣度，下列 LMP1 之 HLA-A2 限制表位係經製備及測定：

YLL 125-133 YLLEMLWRL HLA A2

YLQ 159-167 YLQQNWWTL HLA A2

TLL 166-174 TLLVDLLWLL HLA A2

LLV 167-175 LLVDLLWLL HLA A2

LLL 92-100 LLLIALWNL HLA A2

RLG 132-140 RLGATIWQL HLA A2

圖 6A 及 6B： ^{51}Cr 於 20:1 效應細胞：標靶細胞 (E/T) 比例 (CTL 細胞系：HLA 相符之纖維母細胞)中之釋放，其中 HLA 相符之纖維母細胞預先經源自 EBNA-1 或 LMP1 之肽脈衝。比較經 EBNA-1 野生型與經 EBNA-1 刪除所建立之 CTL 細胞系，及比較經 LMP1 野生型與經 LMP1 刪除所建立之 CTL 細胞系。

結論：刪除蛋白質中迴避抗原處理之某些區域導致針

對較多次優勢表位之較強反應。

b. 實施例 2

在下列實驗中，T 細胞係如上實施例 1 所述之相同方式生長，但設計不同之變異以增進抗原處理，以利於 T 細胞與該產製之次優勢表位反應。

圖 7：(^{51}Cr 釋放)銘於 20:1 效應細胞：標靶細胞 (E/T) 比例 (CTL 細胞系：HLA 相符之纖維母細胞) 中之釋放，其中 HLA 相符之纖維母細胞預先經代表優勢抗原 (EBNA-3A)、次優勢抗原 (LMP2) 及源自 LMP2 之特定 HLA A2 限制性次優勢抗原之肽脈衝，CTL 係利用二種不同方法自該相同病患製備：一種在抗原呈現期間添加 100 nM 至 300 nM 硼替佐米，另一種則否。

結論：在 CTL 抗原呈現期間添加蛋白體拮抗劑硼替佐米修飾抗原處理以產製針對更廣泛數量之次優勢表位之 CTL，且適度減少對優勢表位之反應。

圖 8：(^{51}Cr 釋放)銘於 20:1 效應細胞：標靶細胞 (E/T) 比例 (CTL 細胞系：HLA 相符之纖維母細胞) 中之釋放，其中 HLA 相符之纖維母細胞預先經代表優勢抗原 (EBNA-3A)、次優勢抗原 (LMP2) 及源自 LMP2 之特定 HLA A2 限制性次優勢抗原之肽脈衝，CTL 係利用二種不同方法自該相同病患製備：一種在抗原呈現之前 12 小時及抗原呈現期間添加 10 ng/ml 干擾素 γ ($\text{IFN } \gamma$)，另一種則否。

結論：在 CTL 抗原呈現期間添加 $\text{IFN } \gamma$ 修飾抗原處理

以產製針對更廣泛數量之次優勢表位之 CTL，且適度減少對優勢表位之反應。該效應於巨噬細胞更強，相較於樹突細胞。

c. 實施例 3：肝炎及肝細胞癌

最近發展之慢性肝炎小鼠模型允許針對 B 型肝炎之原發性及繼發性免疫反應加以研究 (Publicover J et al. 2011)。此 HBVtgRAG 小鼠係具有 C57BL/6 背景之 15 代 HBV 複製基因轉殖小鼠 (HBVRp1) 與 RAG-1 缺損小鼠之雜交小鼠，其組成性地允許病毒複製及釋放病毒粒子，且 RAG-1 缺損令牠們無法產製 T 及 B 細胞。當 10^8 脾細胞自 C57BL/6 小鼠轉移，該免疫系統係經重構，且建立針對肝炎感染之原發性免疫反應模型。若投予脾細胞至年輕 (3 至 4 週齡) 小鼠，該動物 (類似感染 B 型肝炎之小孩) 發展慢性肝炎。和人一樣，牠們清除血清中之 HBc，但血清中之 HBs 仍維持高量 (圖 1)。此慢性肝炎之模型被用於下列實驗。

丙胺酸胺基轉移酶係利用 ALT-L3K 套組 (診斷化學公司 (Diagnostic Chemicals Ltd)) 於 Cobas Miras Plus 分析儀 (羅氏 (Roche) 診斷設備) 上測量。HBs 抗原係利用 ETI-MAX 2 Plus (戴索林 (Diasorin) 公司) 測量；HBs 抗體係利用 ETI-AB-AUK-PLUS 及 ABAU 標準組 (Diasorin) 測量。HBcAB 係利用 ETI-AB-COREK-PLUS (Diasorin) 測量。檢測係於 ELx800 (拜歐泰儀器 (Biotek Instruments)) 上以波

長 450nm 及 630 nm 讀取。

圖 9：慢性 B 型肝炎之 HBVtgRAG 小鼠模型。

T 細胞係利用我們的試驗方法於活體外針對 HBs 生長，該 T 細胞在轉移原始脾細胞後 3 至 4 週經尾靜脈注射。自 1×10^5 實施滴定至 1×10^8 細胞，於 1×10^6 細胞達到高原。如下所述，我們的 T 細胞再平衡治療清除 HBVtgRAG 模型中之慢性肝炎。

圖 10：以對 HBs 抗原具反應性之 T 細胞治療 HBVtgRAG 模型導致急性發炎及清除先前之慢性感染。

在抗原呈現期間使用 IL-4 或 IL-21 作為培養基之補充物時，需要達到高原效應之 T 細胞之量分別為 5×10^5 及 7×10^4 。此細胞數量低於在標準 IL-15 方法中擴增之 T 細胞超過一個對數，顯示在培養期間偏向濾泡輔助型 T 細胞及 TH2 細胞之極化係為有利。相反地，IL-12 之極化增加達到高原所需之細胞數量至 1×10^7 ，以 IL-2 及雷帕黴素極化至 Treg 消除對治療之反應。

不同培養條件導致極化至不同的 T 細胞亞群及不同的達成高原之 T 細胞數量之以清除 HBVtgRAG 小鼠中之肝炎。

培養條件	達成高原之 T 細胞數量
IL-15	1×10^6
IL-15+IL-4	5×10^5
IL-15+IL-12	1×10^7
IL-15+IL-21	7×10^4
IL-2+雷帕黴素	無反應

因此，將 T 細胞極化成不同的 T 細胞亞群具有重要治療效應。

爲了決定 T 細胞治療對於針對不同表位之 T 細胞頻率之影響，針對不同表位之 IFN γ 產製表位之 % 係藉由酶聯免疫斑點法 (ELISPOT) 測定。在移植後第 6 週，自未治療或經高原量之 T 細胞治療之 HBVtgRAG 小鼠收集脾細胞，該 T 細胞係針對 HBs 抗原培養。該等脾細胞係經肝炎核心抗原 (HBc)、肝炎表面抗原 (HBs) 或 HBs 之 2 Kb 限制肽脈衝：ILS 或 WWL。

HBs Ag 190-197 VWLSVIWM K^b

HBs Ag 208-215 ILSPFLPL K^b

觀察到下列結果：

圖 11：HBs T 細胞治療重新平衡該免疫系統至新的優勢體系。

如圖所示，利用我們的方法產製之 T 細胞系產生顯著較高之針對 HBs 之 T 細胞反應及稍微降低之針對 HBc 之反應。該 HBs 反應主要係由針對先前之次優勢表位 (WWL) 之重新反應驅動。因此，在 HBs 內之優勢體系係經 T 細胞重新平衡治療轉換，存在於未治療動物內之反應 (雖然微弱) 係針對優勢表位 (ILS)，針對 HBV 反應之整體平衡被切換以利於先前之次優勢 HBs 抗原而非先前優勢之 HBc 抗原。

HBVtgRAG 小鼠模型亦被用於研究活體內方法是否亦可重新平衡免疫優勢體系。在一態樣中，本發明人經尾靜

脈 (IV)、肌肉內 (IM) 或腹腔內 (IP) 注射於弗氏 (Freund's) 佐劑中之 HBs 抗原。或者，投予每隻小鼠 $100\mu\text{g}$ 之質體 DNA (資料未顯示)。

圖 12：在免疫接種期間抗原經蛋白酶抑制劑處理時，IM 投予途徑導致針對次優勢抗原更廣泛之反應。

如圖所示，IM 投予相較於其他二種投予方式產生 4X 更強之反應，此係與針對次優勢表位之反應有關。另外，當此小鼠係利用蛋白酶體拮抗劑硼替佐米治療且該抗原係經 IM 投予時，針對次優勢表位之反應被進一步增強。

在第二態樣中，進行不同實驗以測定針對抗原之單獨反應及與二種不同同型 (IgG1 及 IgG2a) 之 HBs 反應性小鼠抗體組合投予時之反應：

針對 HBs 抗原之單株抗體

10-H05 小鼠 IgG1 HBsAg (費茲傑拉 (Fitzgerald) 公司，麻州康寇德市 (Concord, MA))

10-H05A 小鼠 IgG2a HBsAg (費茲傑拉 (Fitzgerald) 公司，麻州康寇德市 (Concord, MA))

圖 13：具有 HBs 抗原特異性之 IgG2a 單株抗體 (但非 IgG1 抗體) 導致不同之優勢體系，經由 IV 途徑提供顯著較佳之抗原呈現。

當抗原抗體複合體經靜脈及 IM 投予時，IgG2a 複合體產生較強之針對次優勢表位之反應。另外，本試驗中藉

由 IV 投予發展之免疫反應幾乎與 IM 投予達成之量相同，顯示 IV 投予 IgG2a 免疫複合體可能可以重新平衡活體內之免疫優勢體系。

發明人假設此現象之可能機轉係因 IgG2a 與優先表現於樹突細胞上之高親和性 FcR 結合，因此靶向該 HBs 抗原至樹突細胞。此外，由於 HBs Ag *a* 決定簇第一圈環(胺基酸 124 至 147)係中和抗體所辨識之主要表位，且該 ILS 表位離得較遠，因此可能是 ILS 之抗原處理被加強。

HBV 相關性肝細胞癌之 T 細胞重新平衡治療之臨床試驗

5 名具有 HBV 及 HCC 之 HLA-A *0201 病患係進行免疫測試，以分析彼等之體液性及細胞性免疫反應。治療前之臨床實驗室檢驗顯示高力價之抗 B 型肝炎核心抗原(HBc Ag)之抗體，但不具有抗 B 型肝炎表面抗原(HBs Ag)之抗體(圖 10)。

PBMC 係經誘導成樹突細胞，經 B 型肝炎核心抗原(HBc Ag)及 B 型肝炎表面抗原(HBs Ag)脈衝，且用於自 PBMC 生長 CTL，該 CTL 係藉由 Elispot 測定 IFN γ 。

圖 14：源自病患 3 之 10^5 PBMC 中之斑點形成細胞之數量。

藉由在 Elispot 上之 IFN γ 產製 T 細胞頻率觀察到一體系：無抗原(10 sfc)<HBsAg(15 sfc)<HBcAg(45 sfc)。此顯示 B 型肝炎表面抗原相較於肝炎核心抗原係次優勢抗原。此外，研究 HBs 之 3 種肽(FLL、GLS 及 ILS)：

HBs Ag 20-28 FLLTRILTI HLA-A*201

HBs Ag 185-194 GLSPTVWLSV HLA-A*201

HBs Ag 208-216 ILSPFLPLL HLA-A*201

就針對 HBs 所偵測之微弱反應而言，FLL 肽似乎稍微優勢，但是由於該反應微弱因此藉由 ICS 試驗以證實優勢體系。

細胞內細胞介素染色 (ICS)

5×10^5 CTL 係經重懸及培養於 100 μ l 含肽 (10^{-5} 至 10^{-9} M 終濃度)之 1XPBS 1% FCS 中 1 小時。接著添加 Golgi Plug (BD 生物科技公司 (BD Biosciences)，加州聖地牙哥 (San Diego, CA))，細胞於 37 度 C 5% CO₂ 中培養 5 小時，離心形成團塊，以 200 μ l PBS 1% FCS 清洗，於 4 度 C 染色表面抗原 30 分鐘 (CD4 螢光素異硫氰酸酯及 CD8 別藻藍蛋白 (Pharmlngen, BD 公司 (Becton Dickinson)))。在重懸於固定及通透化溶液後，細胞係以抗人 IFN γ 藻紅素 (Pharmlngen, BD) 1/20 稀釋液於冰上染色 30 分鐘，清洗一次，重懸於 PBS 1% FCS 並於 FACS Canto 上分析 (Becton Dickinson)。

圖 15：ICS 分析針對 HBs 表位之反應。

雖然由 ICS 偵測之反應並不強，該 FLL 表位確實再次顯示相較於其他二個表位之優勢。

5×10^6 PBMC 係自各病患分離，T 細胞根據我們的方法利用 HBs 15 聚體肽混合物作為刺激抗原生長，其中該

肽排除肽 15-30 (以消除 FLL)。IL-4 + IL-15 係於擴增期間使用。 1×10^{10} T 細胞係經取出冷凍，取一等分之細胞進行 Elispot 測試。

圖 16：HBs 細胞係大部分投予至病患之 T 細胞，這些細胞對先前之次優勢抗原具反應性。

如圖所示，經產製之 CTL 細胞系幾乎僅對先前之次優勢 HBs 具反應性，該反應主要係由先前之次優勢表位所驅使。CTL 係藉由 IV 輸注 5×10^7 至 1×10^8 細胞/ m^2 投予，並監測該些病患。

圖 17：病患具有急性肝炎，然後清除肝炎。

在發展急性肝炎之後，該病患緩解及完全清除該肝炎。在第 14 天，再次收集 PBMC 並重新測定細胞性免疫反應。

圖 18：該病患之免疫優勢體系已被重新平衡至先前之次優勢抗原 (HBs) 及該抗原上之先前次優勢表位。

該免疫優勢體系已藉由利用我們的方法所生長之 T 細胞成功地重新平衡。除了清除慢性肝炎以外，該名病患亦具有針對肝細胞癌之完全反應。

圖 19：T 細胞完全緩解該名病患之肝細胞癌。

d. 實施例 4：治療癌之系統性方法

癌之臨床診斷及治療涉及腫瘤之活體檢查及造影，以測定彼之組織來源、分化及局部與系統性轉移之程度。雖然針對腫瘤基因或腫瘤抑制基因中之基因缺陷的診斷及測

定對化學治療或生物劑之敏感性的測試有時係經實施，病患通常根據彼等之特定癌及階段接受手術、化學治療及放射線之組合治療。類似地，雖然不同病患之免疫系統已利用不同之技術研究，此資訊尚未被用於病患之臨床處理。藉由彼等之重新平衡免疫系統之細胞性治療，本發明人得以建立免疫分析於癌病患處理之用途。本發明人發展標準化之免疫分析方法，該方法係用於選擇該病患體內之次優勢抗原及可用於在試管內生長 T 細胞，該等 T 細胞可被再輸入該病患以重新平衡針對腫瘤之免疫反應。在治療後，該病患係經重新分析以測定該治療是否成功地重新平衡該免疫反應。該治療方法係新穎方法且可導致臨床反應及增進存活。該相同之策略可被用於感染性疾病、自體免疫性及器官移植。

第一步驟係識別哪一種腫瘤相關抗原係存在於該病患之腫瘤上。此通常藉由在源自病患之腫瘤的活體樣本上進行免疫組織化學完成。經測試之抗原群將視腫瘤之種類而定。舉例來說，黑色素瘤之抗原包括 NY-ESO-1、SSX-2、Melan A、gp100、MAGE A4、MAGE A1 及酪胺酸酶，將被補充之新的腫瘤相關性抗原係經描述。不是所有腫瘤將表現該群中之所有抗原。以病患腫瘤所具有之抗原而言，針對不同抗原之基準免疫反應係利用上述用於體液性及細胞性免疫反應之系統性分析測定。Elisa 係用於測定針對血清中之各抗原的抗體力價，對該抗原有反應之 T 細胞的 % 係藉由 IFN γ ICS 或 Elispot 測定。利用此方法測

定基準期資料。

圖 20：在病患 1 中針對腫瘤抗原群之 $\text{IFN } \gamma$ ICS 結果

在病患 1 中，該病患之腫瘤具有 NYESO-1、SSX-2、Melan A 及 MAGE A4。ICS 顯示針對 MAGE A4 之強反應，但針對 NYESO-1、SSX-2 及 Melan A 為中度/無反應。該 NYESO-、SSX-2 及 Melan A 抗原因此係經選擇以利用下列方法於試管內培養中生長及擴增 CTL：

自血液分離 5×10^6 PBMC。單核球衍生性樹突細胞係於試管內自病患之週邊血液單核細胞 (PBMC) 產製，藉由接種 PBMC 2 小時於組織培養角瓶以允許單核球黏附。此時，非黏附之細胞被取出並冷凍於 -80°C 以供稍後作為 T 細胞之來源。以介白素 4 (IL-4) 及顆粒球-巨噬細胞集落刺激因子 (GM-CSF) 處理該經黏附之單核球導致在大約一週期間分化成不成熟之樹突細胞 (iDC)。後續以腫瘤壞死因子 (TNF) 處理以進一步使該 iDC 分化成成熟樹突細胞。這些細胞接著被分至 3 個分開之角瓶 (或不論多少個希望用於生長 T 細胞之抗原數量)，該等角瓶中包含添加 45% Click's 培養基 (爾文科技 (Irvine Scientific) 公司，加州聖安娜 (Santa Ana, CA))、2mM Glutamax 1 及 5% 人血清之 RPMI 1640 培養基。各角瓶係利用含有受到關注之抗原的編碼序列之 3 種質體 (或肽混合物) 脈衝 (在此病患中，一者包含 NY-ESO-1，一者包含 SSX-2，第三者包含 Melan A)。該等細胞係經儲存於 37°C 2 小時。同時，PBMC

係經解凍並以 1:20 至 1:100 (PBMC: 樹突細胞)比例加入該經脈衝之樹突細胞中，於 37 度 C 培養 18 小時。三個角瓶之細胞接著被集合並重懸於相同培養基，包含 IL-15 (5ng/ml)以使辨識該抗原之 T 細胞於試管內擴增。使用 Grex 氣體通透性生物反應器(威爾森沃夫(Wilson Wolf)製造公司，明尼蘇達州明尼亞波利(Minneapolis, MN))不須更換培養基，且使該細胞呈指數生長動力學。大抵 3×10^8 至 1.5×10^{10} 細胞係於 3 至 6 週獲得足夠細胞以投予至病患。

T 細胞生長於氣體通透性生物反應器

T 細胞於該氣體通透性膜上生長一層以利於氣體交換，且具有足以生長至所需密度之培養基體積。

試管內培養結束時，T 細胞係於 ICS 試驗中以相同抗原測試：NY-ESO-1、SSX-2、Melan A、gp100、MAGE A4、MAGE A1 及酪胺酸酶。

圖 21：病患 1 之 ICS 測試

根據該測試，針對各次優勢抗原/表位(NY-ESO-1、SSX-2 及 Melan A)具反應之細胞%係經測試。針對各次優勢抗原或表位有反應之細胞總數可利用此%及培養中之 CTL 數量計算。以病患 1 為例，61.4%之細胞對 NY-ESO-1 有反應(圖 21)。

根據此結果，已知劑量之對該次優勢抗原有反應之 CTL 可被投予至該病患。CTL 係以 5×10^6 至 2×10^8 細胞

/m² 投予。

在輸注至病患 2 至 3 週後，再次收集 PBMC 並藉由 ICS 重新測定細胞性免疫反應之資料。

圖 22：病患 1 於治療後之 ICS 細胞性免疫分析。

圖 23：病患 1 之 ELISA 體液性免疫分析(體液性免疫反應之倒數力價係如下圖)。

如免疫體系測試之細胞性及體液性分析所示，該免疫優勢體系係重新平衡以利於先前之次優勢抗原。

臨床發現：

臨床上，該病患係 52 歲男性病人，被診斷為第四期轉移性黑色素瘤。他對氮烯唑胺(Dacarbazine) (DTIC)與 Temodar (替莫唑胺(Temozolomide))化學治療藥物與 IL-2 之組合的組合療法無反應。

T 細胞療法後二年，該病患活著且具有完全反應。如胸腔 CT 掃描可見，肺中之轉移在免疫重新平衡療法 6 個月內完全緩解且維持穩定。

圖 24：T 細胞治療前及後之 CT 掃描

e. 實施例 5：淋巴瘤之 T 細胞療法

150 名復發性侵襲性非霍奇金氏淋巴瘤之成年病患被隨機分成 3 組。A：莫須瘤(Rituxan) + CHOP；B：測定腫瘤中之 EBV LMP1 & LMP2 抗原，然後進行 EBV LMP1 & LMP2 T 細胞重新平衡；C：泛淋巴瘤：不測定抗原；以對 EBV LMP1、LMP2、存活、MAGE A3 有反應之生長 T

細胞治療。40%之淋巴瘤活體樣本經檢測為 EBV LMP2 陽性、50%經檢測為存活陽性，15%經檢測為 MAGE A3 陽性。標準治療 R-CHOP 療法係經使用，投予 5×10^7 至 2×10^8 T 細胞/ m^2 。

圖 25：無疾病進展存活

如圖所示，對腫瘤有反應之 T 細胞提供優於現行標準治療之反應率。雖然在第 1 年發生失敗，在第 1 年後該 CTL 維持病患之緩解。此係免疫系統重新平衡後發揮適當功能之證據。最後，雖然一開始該 EBV LMP T 細胞提供較佳反應，但是到第 3 年其無疾病進展存活達到泛淋巴瘤製品之反應率。另外，現在淋巴瘤係復發-緩解性疾病，病患通常在 18 個月至 2 年內復發。CTL 重新平衡治療改變此過程：一旦病患之免疫系統係經重新平衡，該病患發展維持長期緩解之記憶反應。因此，不像其他淋巴瘤治療，T 細胞治療提供耐久之緩解。

圖 26：T 細胞治療改變疾病之自然史

f. 實施例 6：自體免疫疾病之 T 細胞療法

膠原蛋白誘導性關節炎模型 (CIA) 係類風濕性關節炎 (RA) 之模型，該模型可藉由以異源性膠原蛋白 II (CII) 免疫 DBA/1 小鼠誘導。

6 至 8 週齡之 DBA/1 公鼠係得自傑克森 (Jackson) 實驗室 (緬因州巴爾港 (Bar Harbor, ME))。100 μ g 之牛 CII (Chondrex 公司，華盛頓州雷德蒙市 (Redmond, WA)) 係經

乳化於含有 4 mg/ml 結核桿菌 (*M tuberculosis*) (康德瑞克斯 (Chondrex) 公司) 之 CFA，其經皮下注射於尾。注射後第 5 週，80 至 100% 之未經治療之小鼠皆顯示完全發生疾病。

T 細胞係利用前述之 T 細胞試管內生長之方法生長於下列肽。

第二型膠原蛋白

用於刺激 Treg 生長之 263 至 270 免疫優勢肽 (IL-2 + 雷帕黴素)

用於刺激 T 細胞生長之 286 至 300 次優勢肽 (IL-15)

5×10^6 細胞係於誘導後第 20 天單獨或與相等部分組合投予至各動物。見圖 27。CD25 係 Treg 細胞之標誌。對照動物接受 PBS。見圖 28。

小鼠臨床疾病之嚴重性係利用各肢體 0 至 3 分之評分標準評估每周三次，最高可能總分為 12 分：0 至 1 分正常；1 分單趾輕微發紅或腫脹；2 分腳踝或腕顯著腫脹及發紅；3 分多關節嚴重腫脹及發紅。各組中具有關節炎病灶之動物百分比代表關節炎之發生率。各組中之平均臨床分數反應該疾病之嚴重性。見圖 28 及圖 29。

關節之組織病理學

圖 30A 顯示正常大鼠，圖 30B 顯示經人蛋白聚糖免疫之大鼠，圖 30C 顯示經 T 細胞治療之大鼠。

如圖所示，T 細胞治療顯著降低動物之關節發炎的發生率、嚴重性及量。重新平衡針對次優勢表位生長之 T 細胞與針對優勢表位生長之 Treg 之間的免疫反應似乎具有協同效應。

【圖式簡單說明】

圖 1A、1B 及 1C 顯示 ^{51}Cr 釋放測試之結果。

圖 2 顯示 ^{51}Cr 釋放測試之結果。

圖 3A 及 3B 顯示 ^{51}Cr 釋放測試之結果。圖 3C 顯示存活 APC 之百分比。

圖 4 顯示藉由酶聯免疫斑點法 (ELISPOT) 測量之 IFN γ 產製細胞。

圖 5、6A、6B、7 及 8 顯示 ^{51}Cr 釋放測試之結果。

圖 9 顯示慢性 B 型肝炎之小鼠模型。

圖 10 顯示小鼠模型之處理。

圖 11 顯示針對 HBs 及 HBc 之 T 細胞反應。

圖 12 及 13 顯示不同投予方法之反應。

圖 14 顯示抗原之體系。

圖 15 顯示藉由 ICS 測量之反應。

圖 16 顯示抗原之體系。

圖 17 顯示急性肝炎之後的免疫反應，然後清除肝炎。

圖 18 顯示清除後抗原之體系。

圖 19 顯示 T 細胞完全緩解該病患之肝細胞癌 (左圖治

療前，右圖治療後 8 週)。

圖 20 顯示存在於病患腫瘤內之抗原。

圖 21 顯示對 NY-ESO-1 抗原有反應之細胞。

圖 22 顯示根據本發明之治療後存在之抗原。

圖 23 顯示免疫優勢體系之重新平衡。

圖 24 係本發明之 T 細胞治療前及後之 CT 掃描。

圖 25 顯示治療後無疾病進展之存活。

圖 26 顯示本發明之治療與莫須瘤(Rituxan) + CHOP 之比較。

圖 27 顯示投予至動物之 T 細胞的特徵。

圖 28 顯示試驗小鼠之臨床疾病分數。

圖 29 顯示試驗小鼠之關節炎發生率。

圖 30A、30B 及 30C 顯示正常大鼠、經人蛋白聚糖免疫之大鼠及經 T 細胞治療之大鼠的組織病理學。

圖 31 係用於本發明之療法的生物反應器示意圖。

七、申請專利範圍

1. 一種能辨識病患體內之次優勢抗原或表位之 T 細胞，其係用於改變該病患之免疫優勢體系之方法。

2. 如申請專利範圍第 1 項所使用之 T 細胞，其中該 T 細胞藉由下列步驟獲得：

a. 識別得自該病患之樣本中之至少一種次優勢抗原或表位，及

b. 培養能辨識該次優勢抗原或表位之 T 細胞。

3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所使用之 T 細胞，其中改變免疫優勢體系治療/預防/緩和該病患之感染、癌、發炎、器官移植排斥或移植物抗宿主病。

4. 一種能辨識病患體內之次優勢抗原或表位之 T 細胞之用途，其係用於製造供改變該病患之免疫優勢體系的藥物。

5. 如申請專利範圍第 4 項之用途，其中該 T 細胞藉由下列步驟獲得：

a. 識別得自該病患之樣本中之至少一種次優勢抗原或表位，及

b. 培養能辨識該次優勢抗原或表位之 T 細胞。

6. 如申請專利範圍第 4 或 5 項之用途，其中改變免疫優勢體系治療/預防/緩和該病患之感染、癌、發炎、器官移植排斥或移植物抗宿主病。

7. 一種用於改變病患之免疫優勢體系之 T 細胞群，其係藉由識別得自該病患之樣本中至少一種次優勢抗原或

表位及培養能辨識該次優勢抗原或表位之 T 細胞群而獲得。

8. 如申請專利範圍第 7 項之 T 細胞群，其係用於治療。

9. 如申請專利範圍第 7 項之 T 細胞群，其中該次優勢抗原或表位係無法被細胞性或體液性免疫反應偵測或僅能被低量偵測之抗原或表位。

10. 如申請專利範圍第 7 項之 T 細胞群，其中該次優勢抗原係病毒性抗原、其他感染性劑抗原、腫瘤抗原或與自體免疫、過敏、發炎、器官移植排斥或移植物抗宿主病相關之抗原。

11. 如申請專利範圍第 7 項之 T 細胞群，其中該 T 細胞係於優勢抗原或表位不存在時培養。

12. 如申請專利範圍第 7 項之 T 細胞群，其中該 T 細胞係於富集抑制性 T 細胞或反應性 T 細胞之劑存在或不存在時培養。

13. 如申請專利範圍第 7 項之 T 細胞群，其中有效數量之 T 細胞係經皮內投予以改變免疫優勢體系。

14. 如申請專利範圍第 7 項之 T 細胞群，其中該 T 細胞係抑制性 T 細胞。

15. 如申請專利範圍第 7 項之 T 細胞群，其中該 T 細胞係反應性 T 細胞。

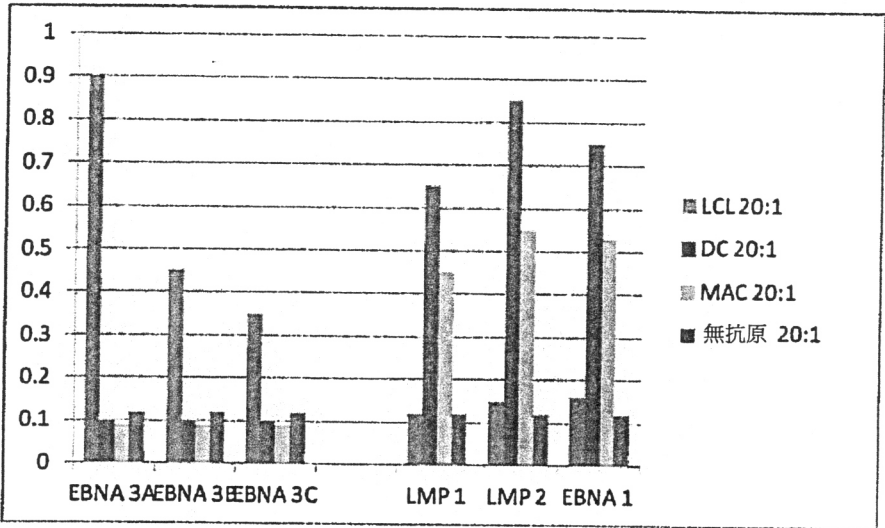


圖 1A

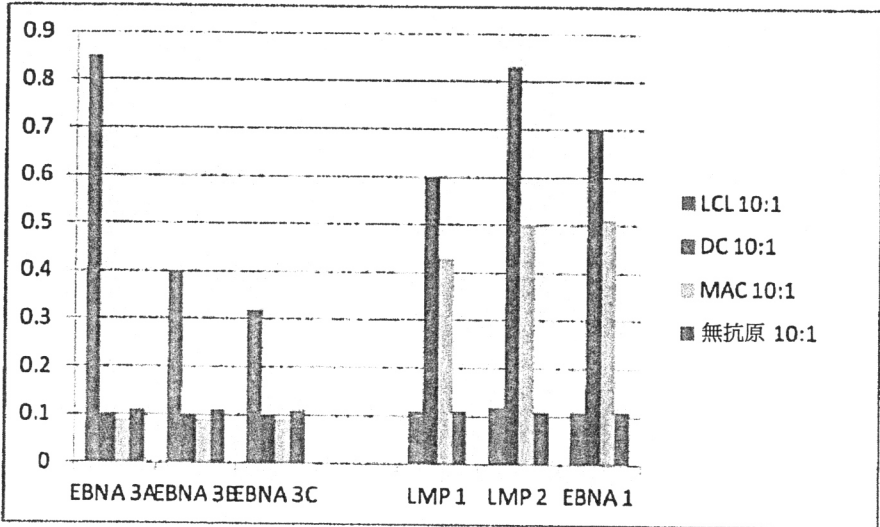


圖 1B

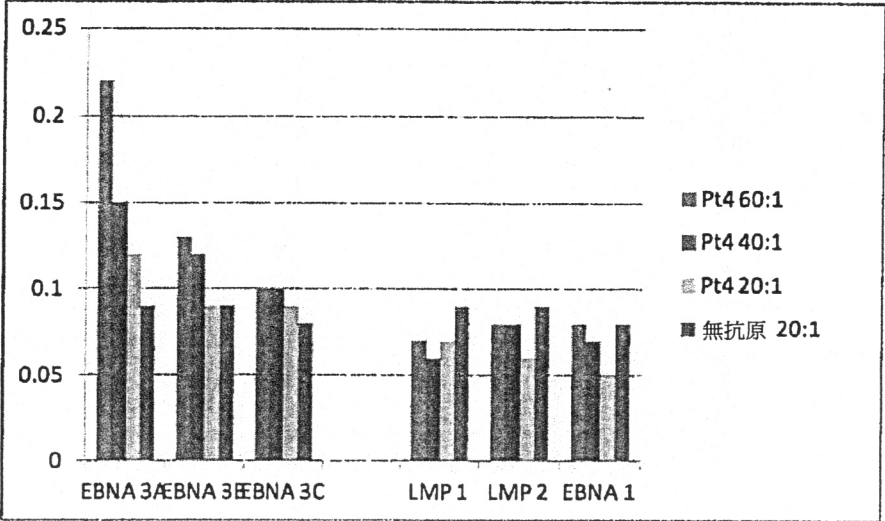


圖 1C

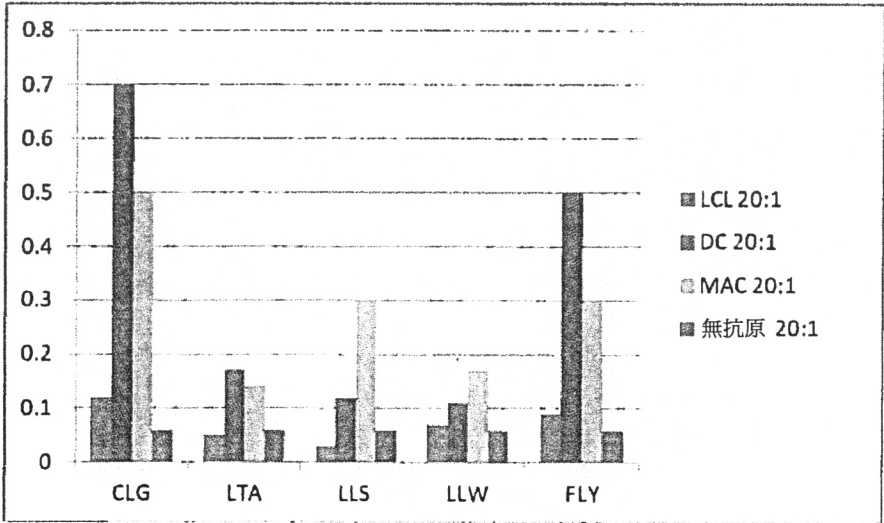


圖 2

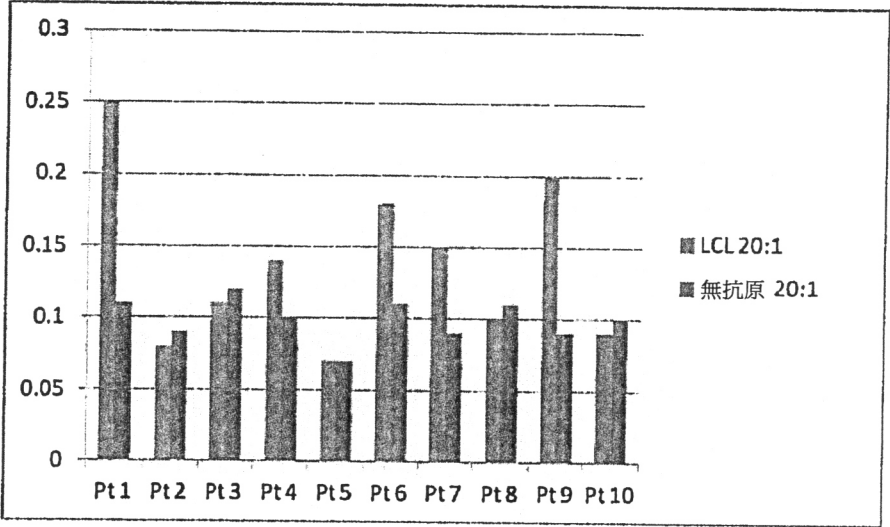


圖 3A

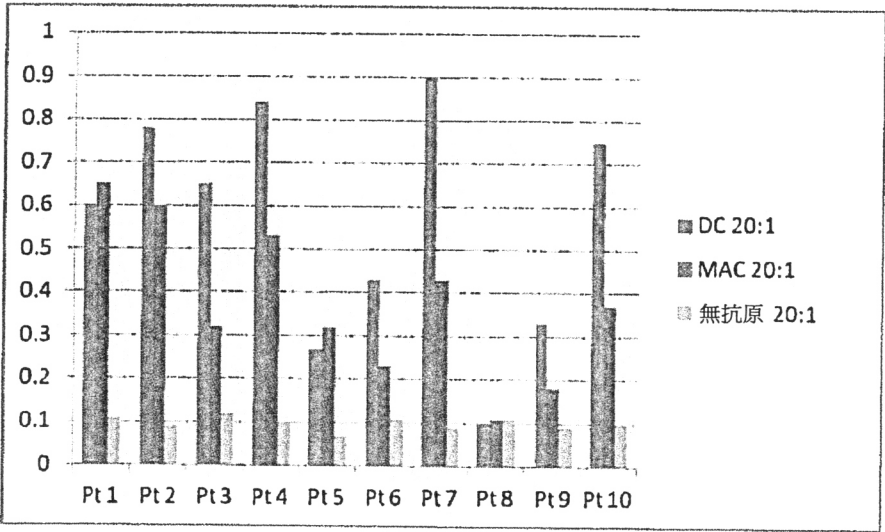


圖 3B

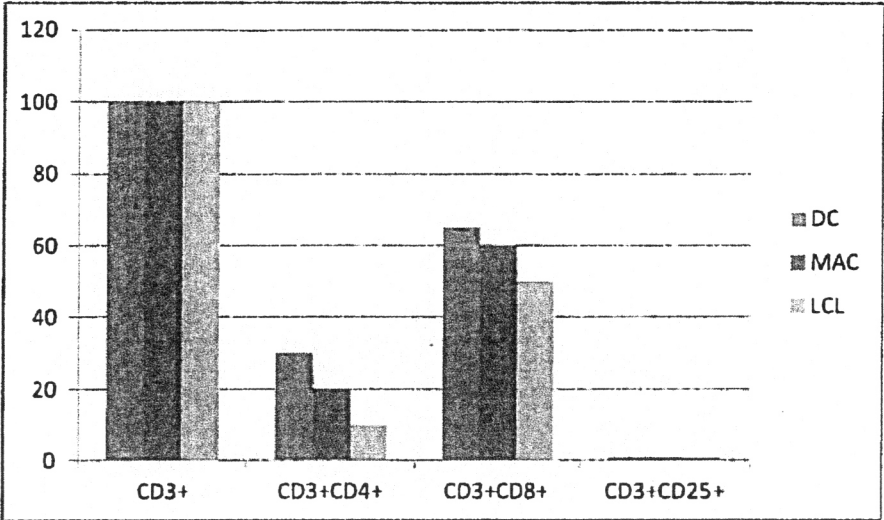


圖 3C

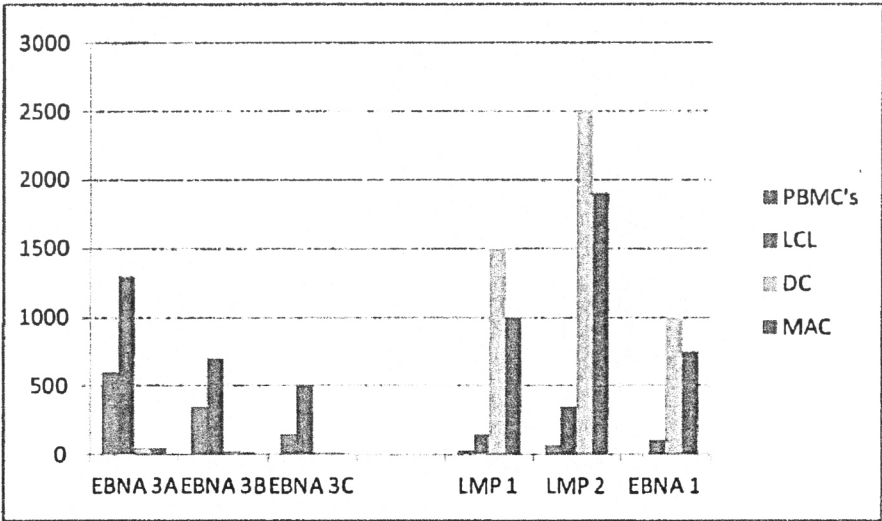


圖 4

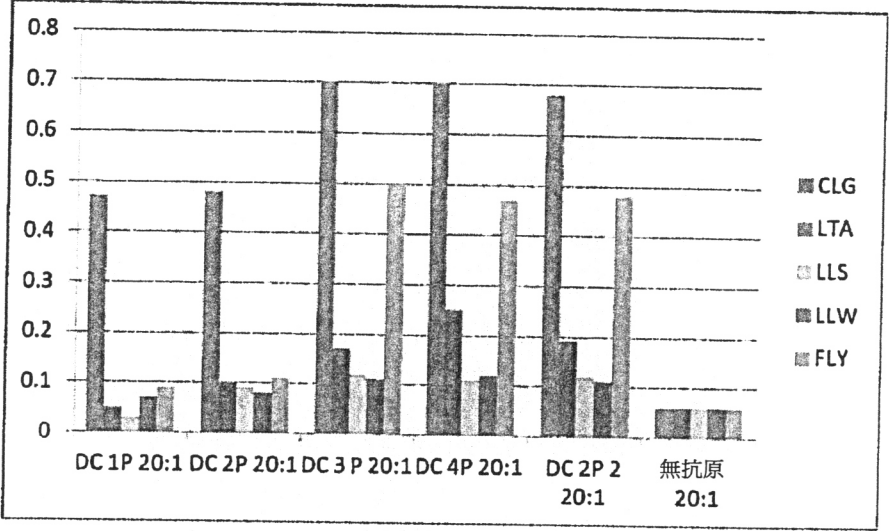


圖5

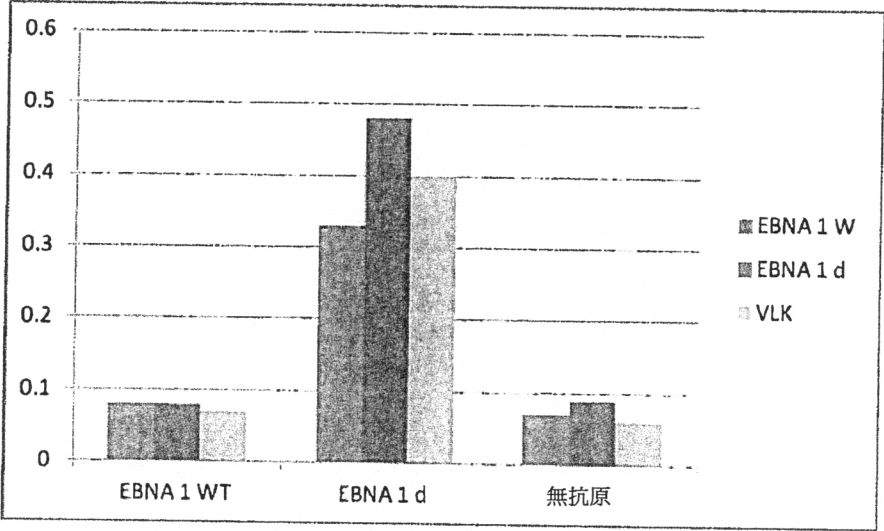


圖6A

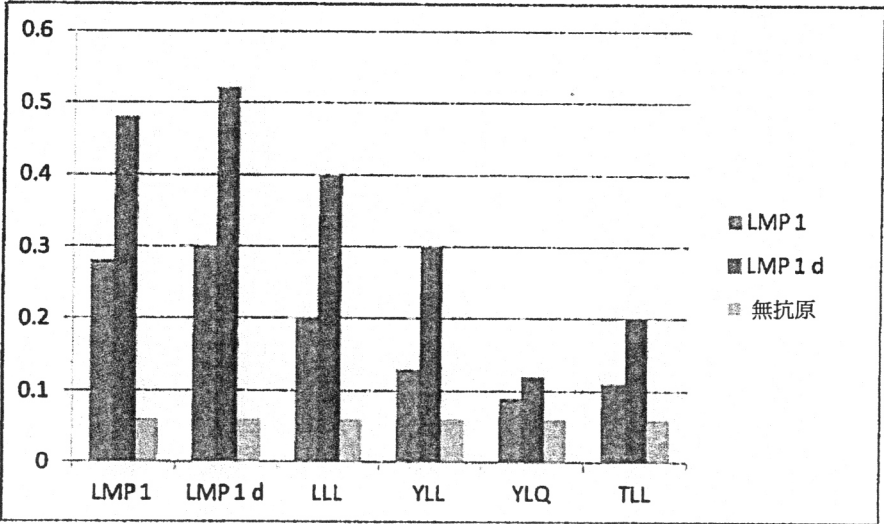


圖 6B

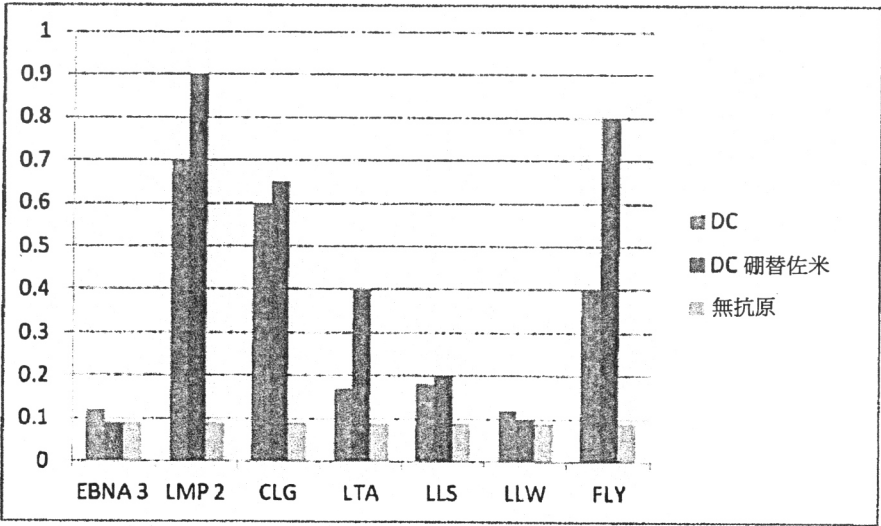


圖 7

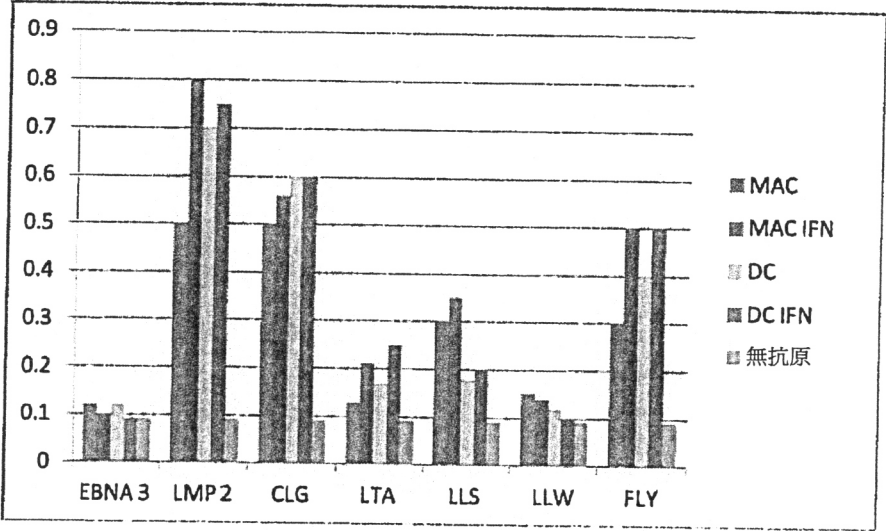


圖 8

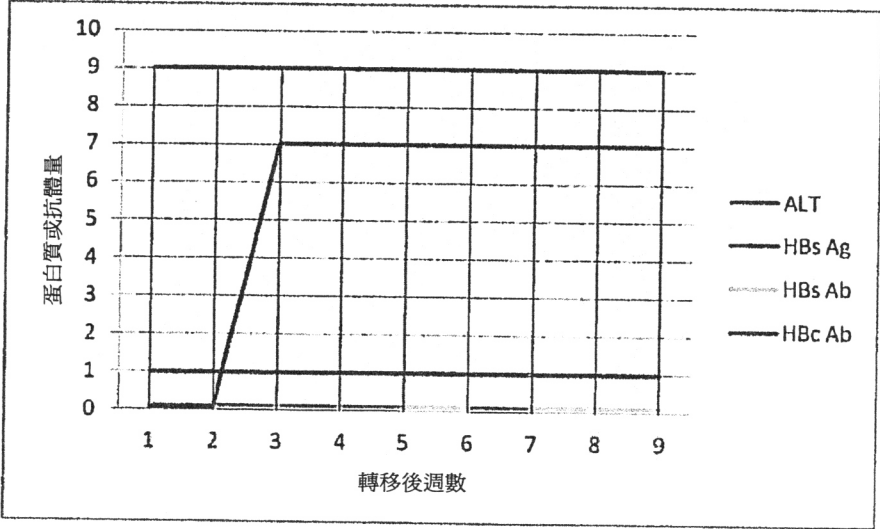


圖 9

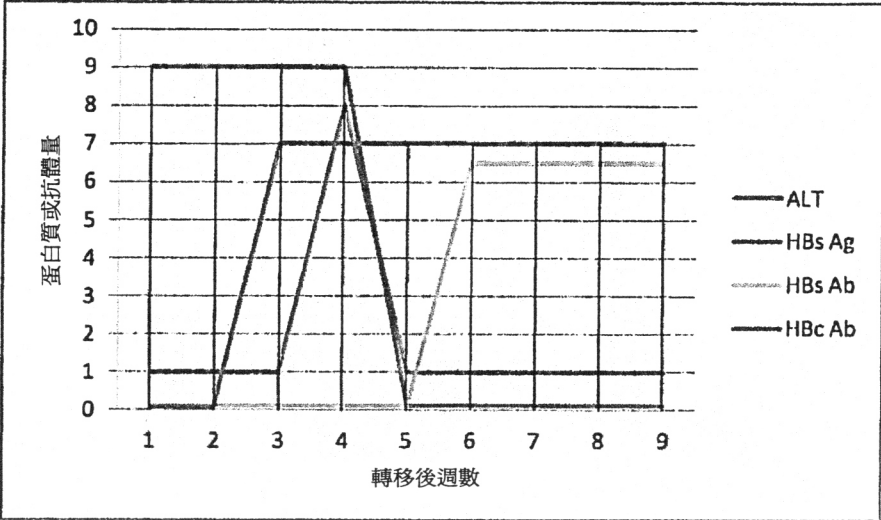


圖 10

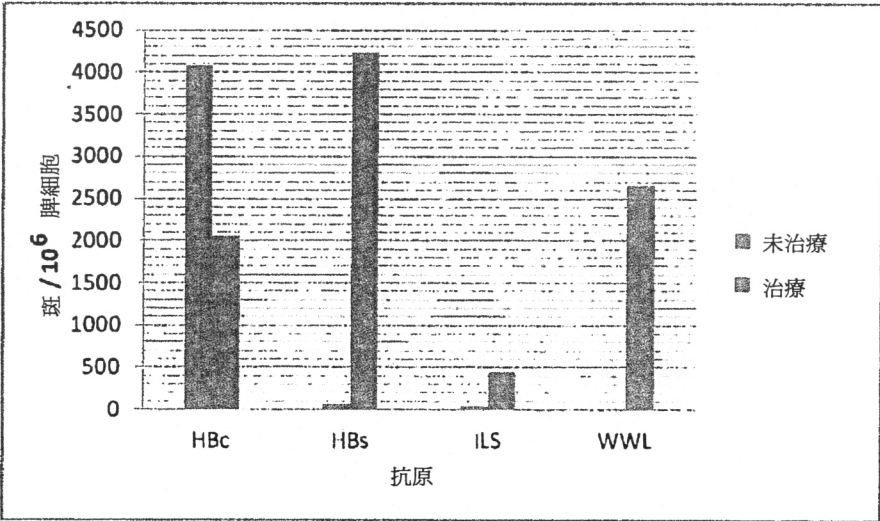


圖 11

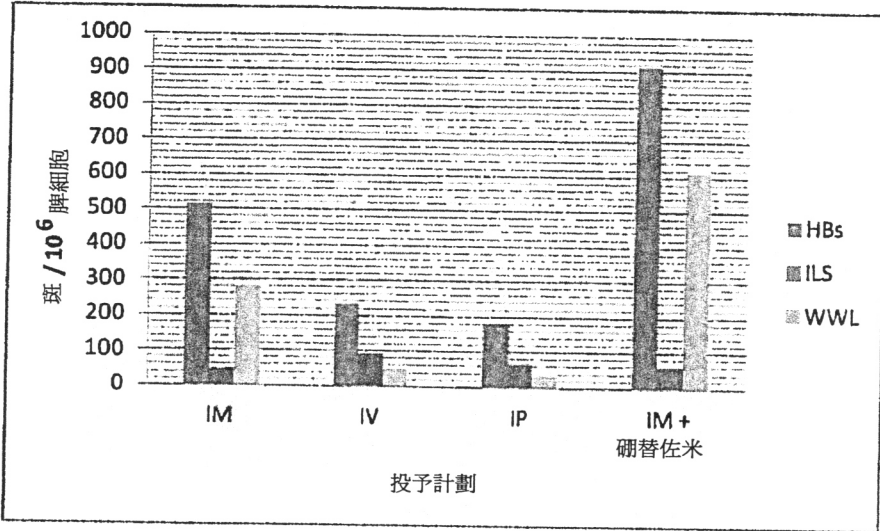


圖12

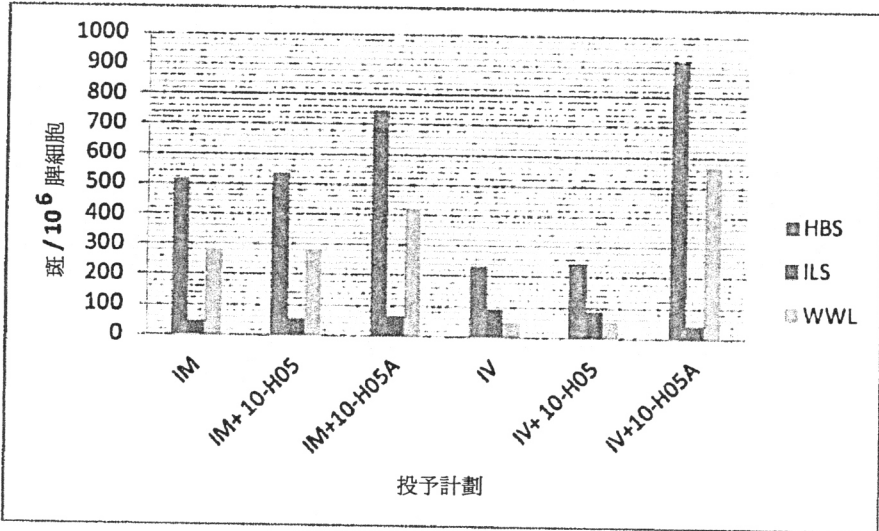


圖13

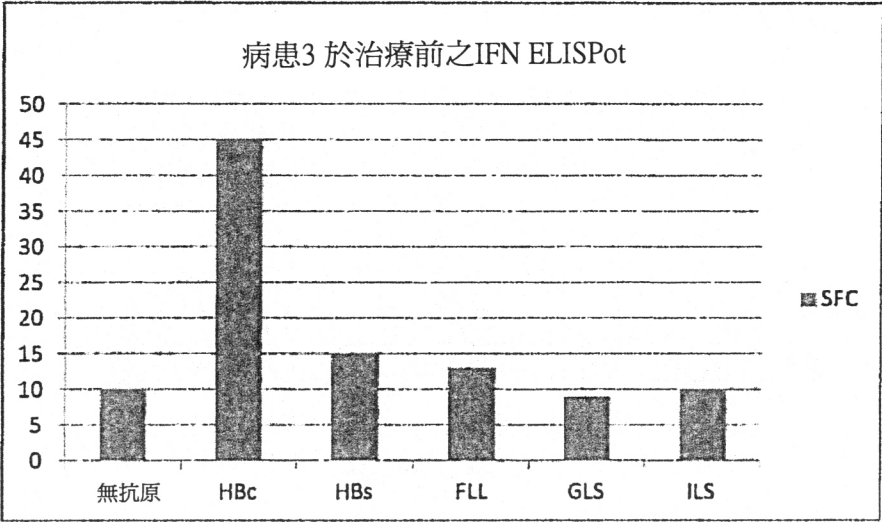


圖14

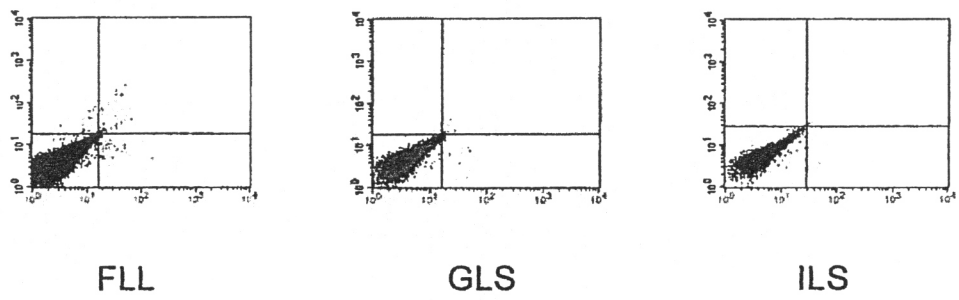


圖15

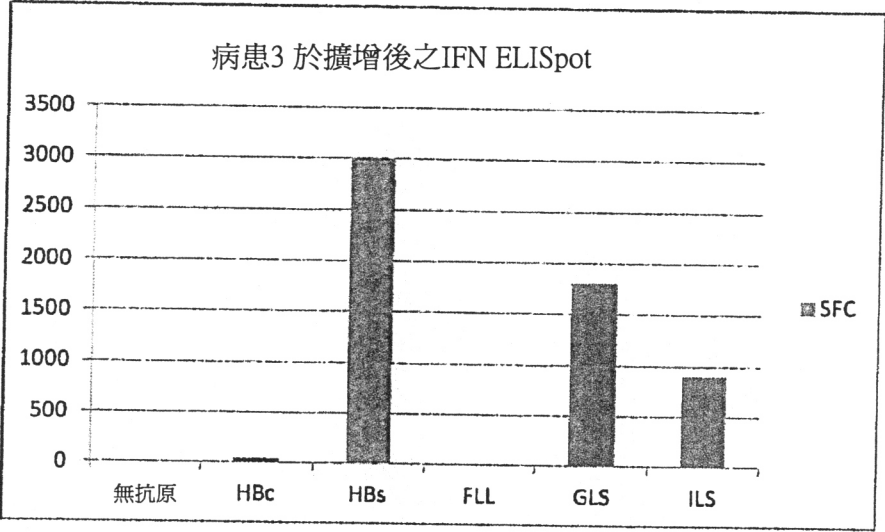


圖 16

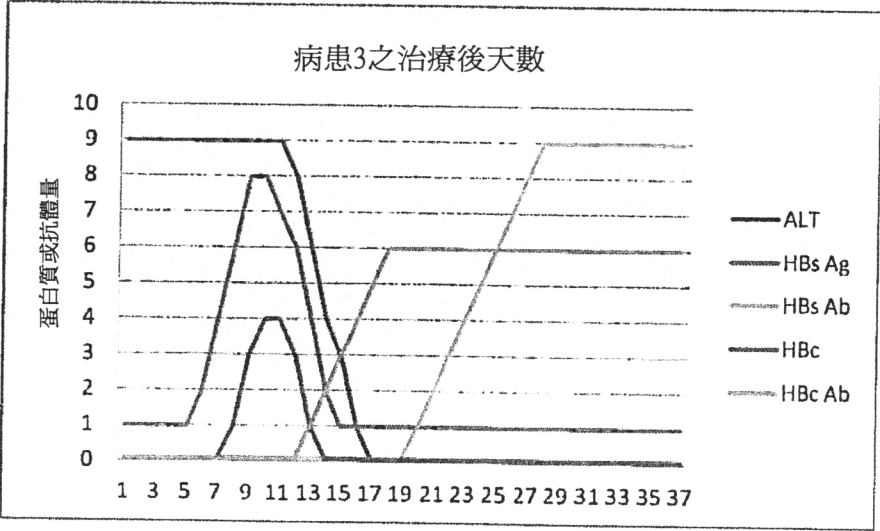


圖 17

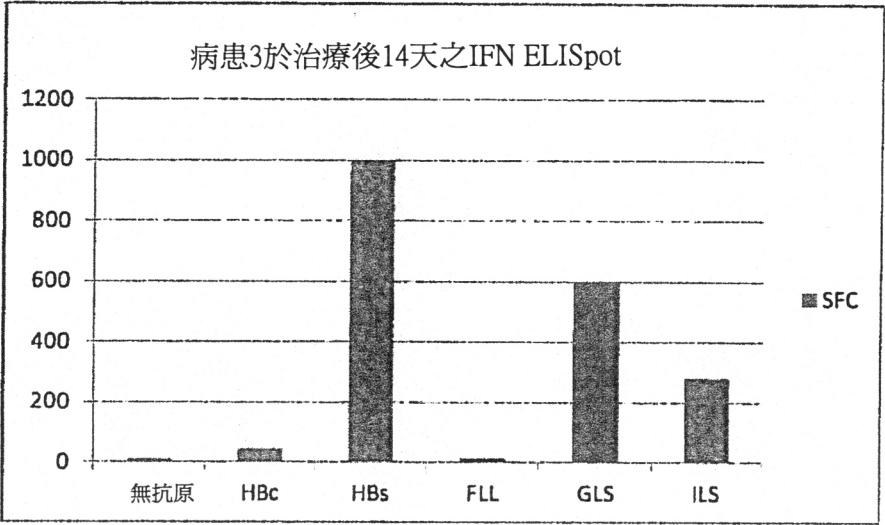


圖18

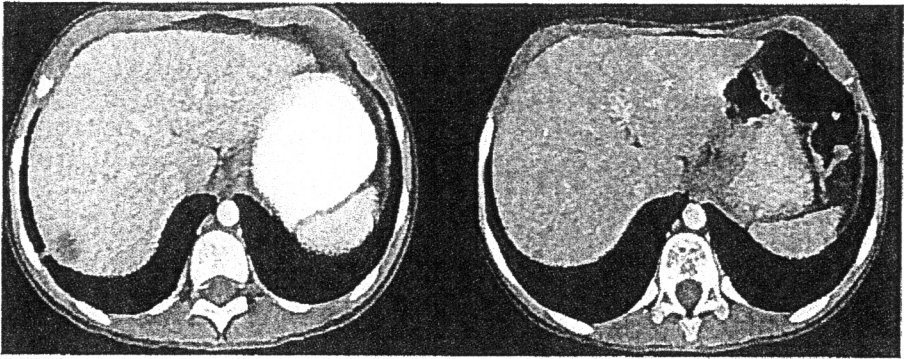


圖19

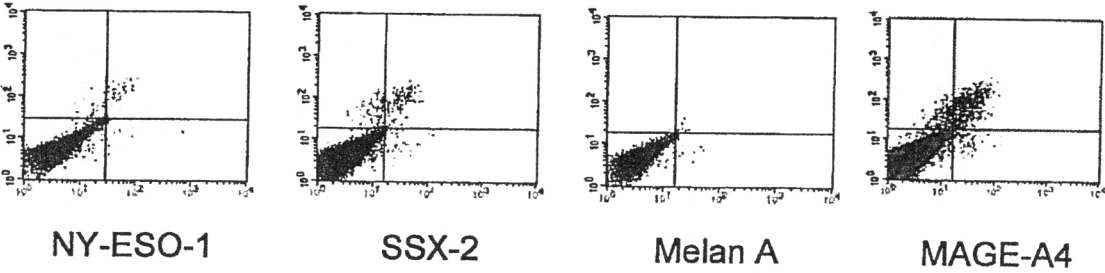


圖 20

ICS Assay- NY-ESO-1

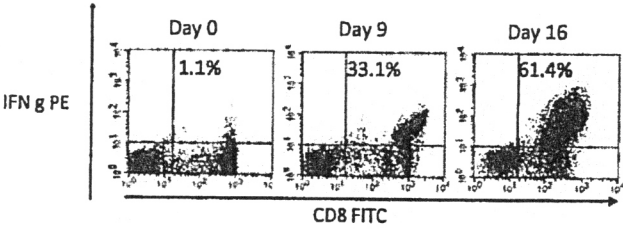


圖 21

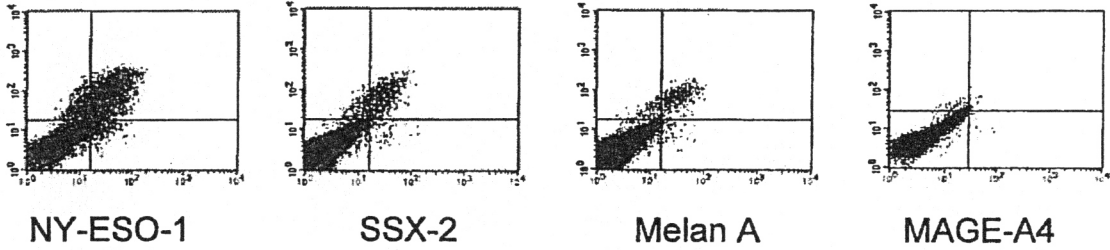


圖22

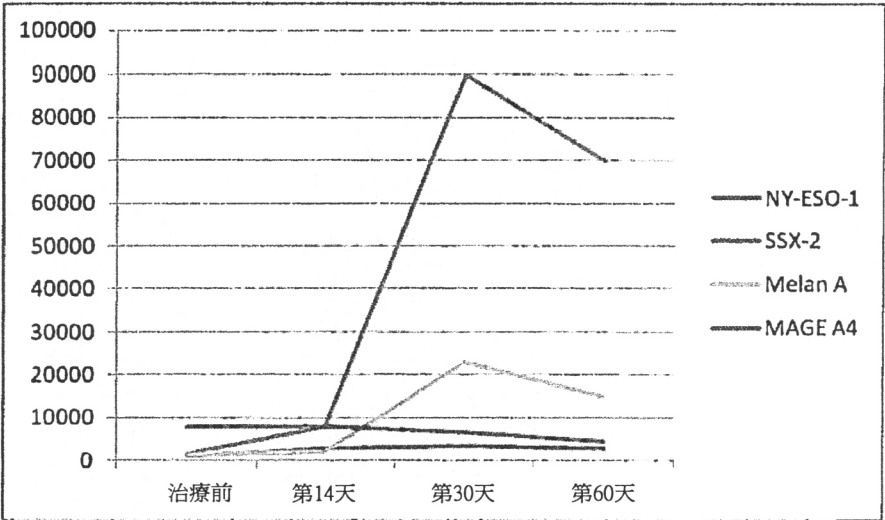


圖23

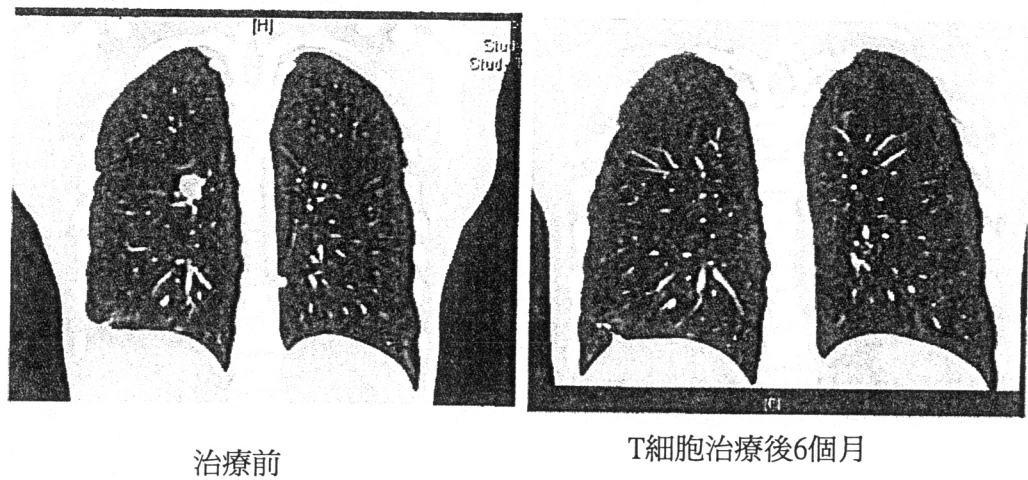


圖 24

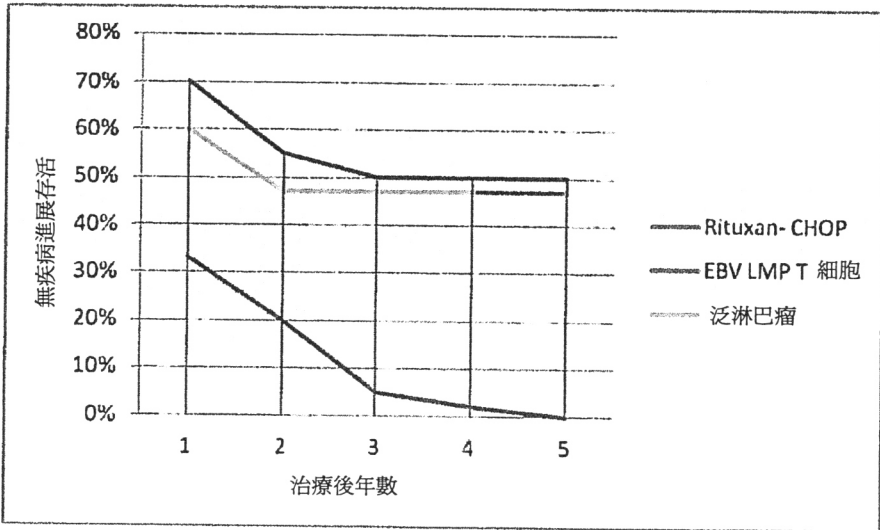


圖 25

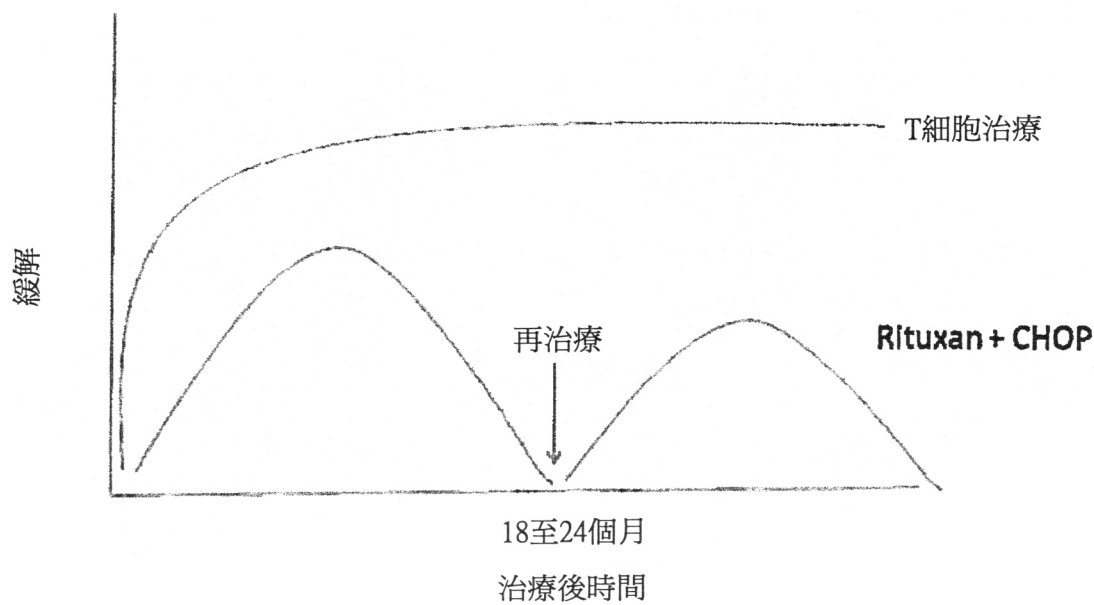


圖 26

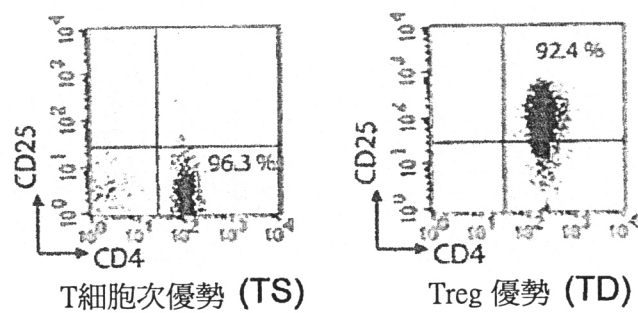


圖 27

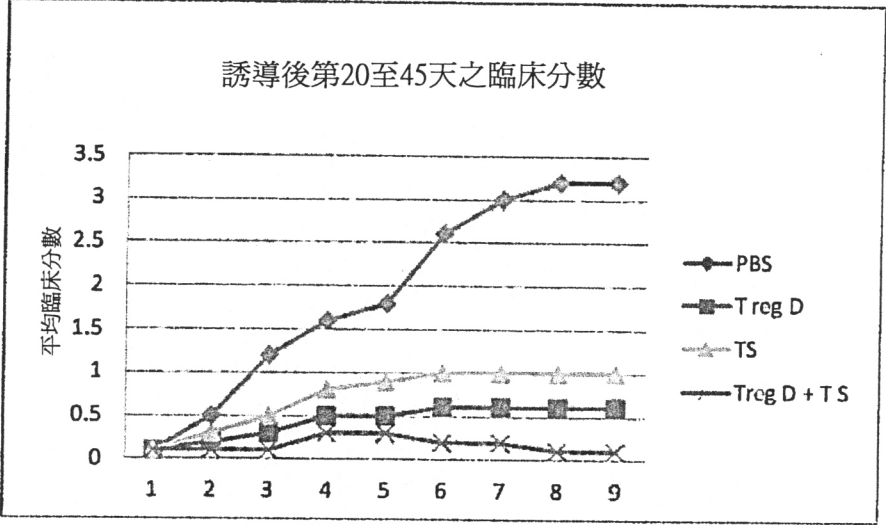


圖28

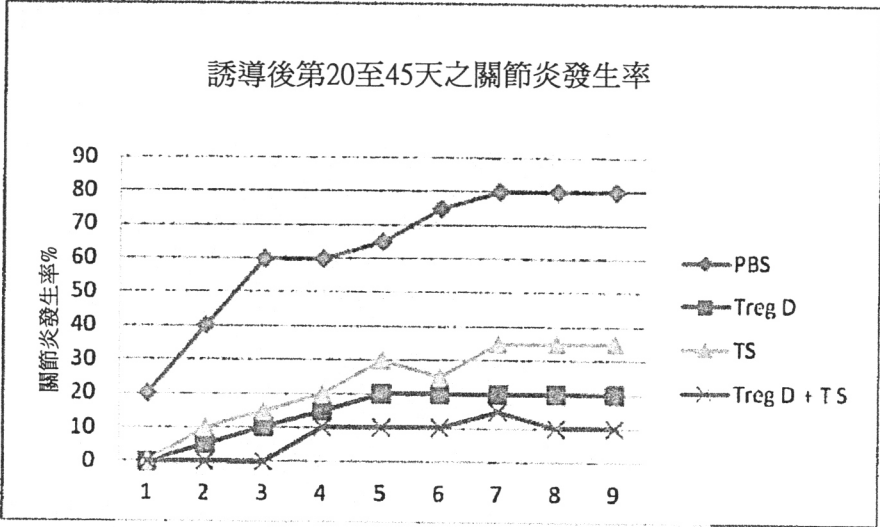


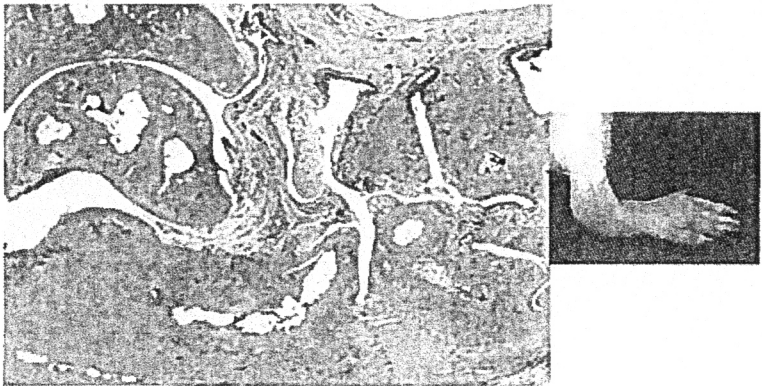
圖29



正常
圖 30A



經人蛋白聚糖免疫
圖 30B



經T細胞治療
圖 30C

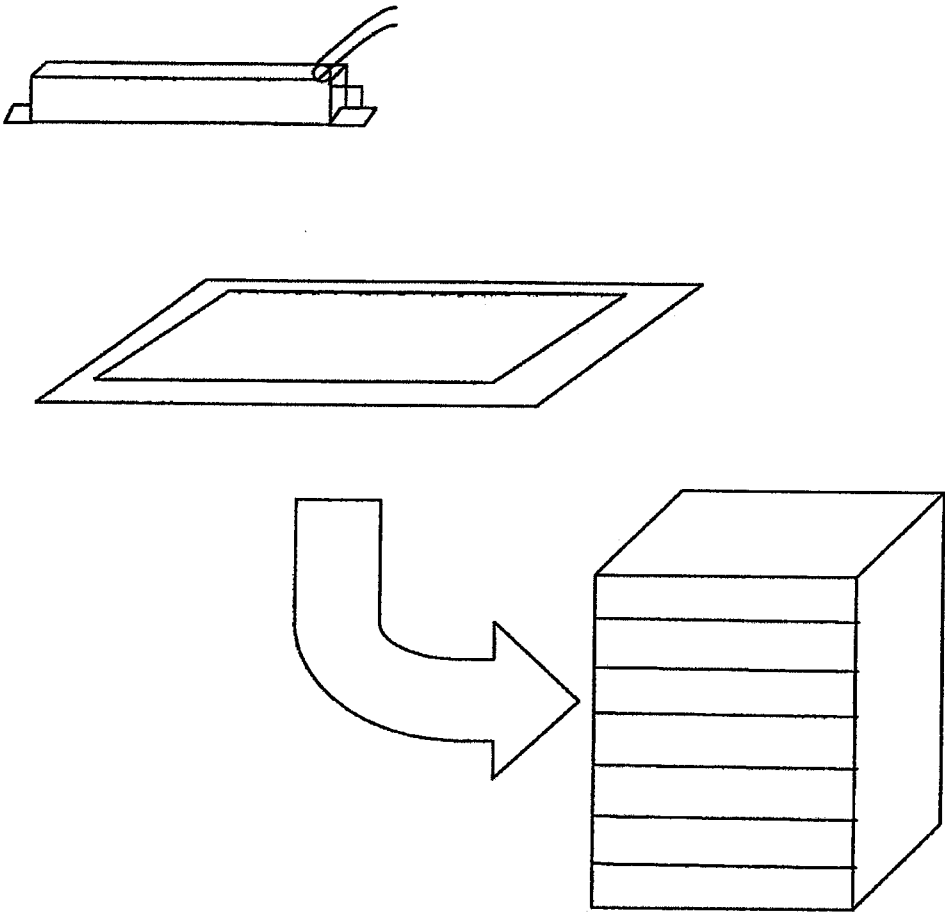


圖31