

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7656331号
(P7656331)

(45)発行日 令和7年4月3日(2025.4.3)

(24)登録日 令和7年3月26日(2025.3.26)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 6 1 K	35/17 (2025.01)	A 6 1 K	35/17
A 6 1 P	31/16 (2006.01)	A 6 1 P	31/16
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12
請求項の数 26 (全44頁)			
(21)出願番号	特願2021-557608(P2021-557608)	(73)特許権者	391058060
(86)(22)出願日	令和2年3月25日(2020.3.25)		ベイラー カレッジ オブ メディシン
(65)公表番号	特表2022-527293(P2022-527293 A)		BAYLOR COLLEGE OF M EDICINE
(43)公表日	令和4年6月1日(2022.6.1)		アメリカ合衆国、テキサス 7 7 0 3 0
(86)国際出願番号	PCT/US2020/024726		、ヒューストン、ワン ベイラー プラザ
(87)国際公開番号	WO2020/198366		(番地なし)
(87)国際公開日	令和2年10月1日(2020.10.1)	(74)代理人	110000729
審査請求日	令和5年3月27日(2023.3.27)		弁理士法人ユニアス国際特許事務所
(31)優先権主張番号	62/823,446	(72)発明者	リーン、アン マリー
(32)優先日	平成31年3月25日(2019.3.25)		アメリカ合衆国 テキサス州 7 7 0 3 0
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	、ヒューストン、ワン ベイラー プラザ
			、ベイラー カレッジ オブ メディシン内
			ヴェラ ヴァルデス、フアン フェルナンド
			アメリカ合衆国 テキサス州 7 7 0 3 0
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 複数の呼吸器ウイルス抗原に特異的なT細胞及びその作製方法及び治療での使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

複数のウイルス抗原を認識する細胞傷害性Tリンパ球（CTL）のポリクローナル集団を含む組成物であって、前記複数のウイルス抗原が、以下の抗原を含む、組成物；

（a）パラインフルエンザウイルス（PIV）抗原：PIV抗原M、PIV抗原HN、PIV抗原N、及び、PIV抗原F；

（b）呼吸器合胞体ウイルス（RSV）抗原：RSV抗原N、及び、RSV抗原F；

（c）インフルエンザ抗原：インフルエンザ抗原NP1、及び、インフルエンザ抗原MP1；並びに、

（d）ヒトメタニューモウイルス（hMPV）抗原：hMPV抗原M、hMPV抗原M2-1、hMPV抗原F、及び、hMPV抗原N；

10

ここで、該組成物は、少なくとも7日間の培養において細菌及び真菌に対して陰性であり、5EU/ml未満のエンドトキシンを示し、マイコプラズマに対して陰性である。

【請求項2】

前記PIVが、ヒトパラインフルエンザウイルス3型（PIV3）である、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記複数の抗原が、PIV抗原M、PIV抗原HN、PIV抗原N、PIV抗原F、インフルエンザ抗原NP1、インフルエンザ抗原MP1、RSV抗原N、RSV抗原F、hMPV抗原M、hMPV抗原M2-1、hMPV抗原F及びhMPV抗原Nからなる、請

20

求項 1 又は 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記 C T L が、

a . 無視できるアロ反応性；

b . 患者から回収された抗原特異的 T 細胞の活性化誘導細胞死が、同じ患者から回収されたが I L - 7 及び I L - 4 の両方の存在下で培養されなかった対応する抗原特異的 T 細胞よりも少ないこと；及び

c . 7 0 % を超える生存率

から選択される 1 つ以上の特性を示す、請求項 1 から 3 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記 C T L が、P I V、R S V、インフルエンザ、及び h M P V からの複数のウイルス抗原の全部又は一部にまたがる複数の重複ペプチドを含む、1 つ又は複数のペプミックスライブラリに対する反応性 T 細胞を含む、請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記ペプミックスが化学合成されたものであり、任意選択的に > 9 0 % である純度である、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記ペプチドが、少なくとも 7 アミノ酸長である、請求項 5 又は 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記ペプチドが、3 アミノ酸の重複がある、請求項 5 から 7 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記ペプチドが、それぞれ 1 5 アミノ酸長であり、1 1 アミノ酸の重複がある、請求項 5 から 7 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 1 0】

前記 C T L が T h 1 極性化される、請求項 1 から 9 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 1 1】

前記 C T L がウイルス抗原発現標的細胞を溶解可能である、請求項 1 から 1 0 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 1 2】

前記 C T L が非感染自己又は同種異系標的細胞を顕著に溶解させない、請求項 1 から 1 1 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 1 3】

静脈内送達用に処方される請求項 1 から 1 2 の何れか一項に記載の組成物を含む医薬組成物。

【請求項 1 4】

標的細胞を溶解させるための薬剤の製造における、請求項 1 から 1 2 の何れか一項に記載の組成物又は請求項 1 3 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 1 5】

前記組成物が、インピボで対象に投与できるように処方される、請求項 1 4 に記載の使用。

【請求項 1 6】

必要とする対象においてウイルス感染を処置又は予防するための薬剤の製造における、請求項 1 から 1 2 の何れか一項に記載の組成物又は請求項 1 3 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 1 7】

前記薬剤が、 $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ C T L / m² で投与できるように処方される、請求項 1 4 から 1 6 の何れか一項に記載の使用。

【請求項 1 8】

前記対象が免疫無防備状態である、請求項 1 5 から 1 7 の何れか一項に記載の使用。

【請求項 1 9】

10

20

30

40

50

前記対象が、急性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病又は慢性肉芽腫性疾患を有する、請求項 1 5 から 1 8 の何れか一項に記載の使用。

【請求項 2 0】

前記対象が、前記 C T L を受ける前に、

- a . 強度軽減前処置を伴う適合血縁ドナー移植；
- b . 骨髄破壊的前処置を伴う適合非血縁ドナー移植；
- c . 強度軽減前処置を伴うハプロー致移植；又は
- d . 骨髄破壊的前処置を伴う適合血縁ドナー移植

を受けた、請求項 1 5 から 1 9 の何れか一項に記載の使用。

【請求項 2 1】

前記対象が、

- a . 固形臓器移植を受けたことがある；
- b . 化学療法を受けたことがある；
- c . H I V 感染症を有する；
- d . 遺伝的免疫不全を有する；及び／又は
- e . 同種異系幹細胞移植を受けたことがある、

請求項 1 5 から 2 0 の何れか一項に記載の使用。

【請求項 2 2】

前記組成物が、複数の治療のために対象に投与できるように処方される、請求項 1 5 から 2 1 の何れか一項に記載の使用。

【請求項 2 3】

前記ウイルス感染が、パラインフルエンザウイルス 3 型、呼吸器合胞体ウイルス、インフルエンザ及びヒトメタニューモウイルスを含む群から選択される、請求項 1 5 から 2 2 の何れか一項に記載の使用。

【請求項 2 4】

前記対象がヒトである、請求項 1 5 から 2 3 の何れか一項に記載の使用。

【請求項 2 5】

複数のウイルス抗原を認識する細胞傷害性 T リンパ球 (C T L) のポリクローナル集団を含む、T 細胞療法で使用するための組成物の製造方法であって、前記複数のウイルス抗原が、以下の抗原を含む、製造方法；

(a) パラインフルエンザウイルス (P I V) 抗原：P I V 抗原 M、P I V 抗原 H N、P I V 抗原 N、及び、P I V 抗原 F；

(b) 呼吸器合胞体ウイルス (R S V) 抗原：R S V 抗原 N、及び、R S V 抗原 F；

(c) インフルエンザ抗原：インフルエンザ抗原 N P 1、及び、インフルエンザ抗原 M P 1；並びに、

(d) ヒトメタニューモウイルス (h M P V) 抗原：h M P V 抗原 M、h M P V 抗原 M 2 - 1、h M P V 抗原 F、及び、h M P V 抗原 N；

ここで、該組成物は、少なくとも 7 日間の培養において細菌及び真菌に対して陰性であり、5 E U / m l 未満のエンドトキシンを示し、マイコプラズマに対して陰性である、製造方法。

【請求項 2 6】

前記 P I V が、ヒトパラインフルエンザウイルス 3 型 (P I V 3) である、請求項 2 5 に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0 0 0 1】

本願は、2 0 1 9 年 3 月 2 5 日出願の米国仮出願第 6 2 / 8 2 3 , 4 4 6 号明細書の優先権を主張し、この出願は、その全体において参照により本明細書中に組み込まれる。

【技術分野】

【0 0 0 2】

10

20

30

40

50

本開示の実施形態は、少なくとも細胞生物学、分子生物学、免疫学及び医学の分野に関する。

【背景技術】

【0003】

ウイルス感染は、様々な障害に対する治療選択肢である同種間造血幹細胞移植（アロ - H S C T）後の病的状態及び死亡の深刻な原因である。しかし、移植後、移植片対宿主病（G V H D）、原発性疾患の再発及びウイルス感染が依然として病的状態及び死亡の主な原因となっている。呼吸器合胞体ウイルス、インフルエンザ、パラインフルエンザウイルス及びヒトメタニューモウイルスを含む、市中感染する呼吸器ウイルスによる気道感染は、肺炎及び細気管支炎を含む重度の症状を引き起こし、同種異系造血幹細胞移植レシピエントの最大40%で検出され、致死的となり得る。アデノウイルス（A d V）、ライノウイルス及び、S A R S - C o V、S A R S - C o V - 2、M E R S - C o Vを含むコロナウイルス株を含む他の呼吸器ウイルス並びに一般に免疫無防備状態の患者が罹患する流行性C o Vもまた、特に免疫無防備状態の個体において重度の症状を引き起こし得、最近のS A R S - C o V 2パンデミックは、このような感染を処置及び予防するために我々がいかに準備不足であるかを明らかにした。有効な抗ウイルス薬がないこと、及び養子移入されたエクスピボ増殖ウイルス特異的T細胞が潜在性（エプスタイン・バー・ウイルス、サイトメガロウイルス、B Kウイルス、ヒトヘルペスウイルス6）及び溶菌性（アデノウイルス）ウイルスの両方の処置に臨床的に有益であり得ることを実証する発明者らのグループからのデータを考慮して、発明者らは、この免疫療法アプローチを呼吸器ウイルスに拡張する可能性を調べた。抗ウイルス薬は、一部のウイルスには利用可能であるが、必ずしも有効ではなく、新規治療の必要性が強調される。これらのウイルス感染症を処置するための1つの戦略は、養子T細胞移入によるものであり、それにより、ウイルス特異的T細胞（V S T）を、エクスピボで健康なドナーの末梢血から増殖させ、次いで、ウイルス感染がある個体、例えば幹細胞移植レシピエントに注入する。

【0004】

A d v、E B V、C M V、B K、H H V 6を標的とするインビトロで増殖させたドナー由来及び第三者のウイルス特異的T細胞は、ウイルス感染が起こっている幹細胞移植患者に養子移入した場合に安全であることが示されている。ウイルス特異的T細胞は、A d v、E B V、C M V、B K及びH H V 6に対する抗ウイルス免疫を再構成し、疾患の排除に有効であり、インビボでかなりの増殖を示した。養子移入されたインビトロ増殖ウイルス特異的T細胞はまた、患者に養子移入された場合に安全であり、臨床的利益を伴うことが示されている。

【0005】

本開示の実施形態は、ウイルス感染を制御し、1つ以上の疾患症状を改善/排除するために、エクスピボ増殖させた非遺伝子改変ウイルス特異的T細胞を投与することによる特定のウイルスに対する治療を提供することによって、当技術分野における長年の必要性を満たす。

【発明の概要】

【0006】

いくつかの実施形態では、本開示は、複数のウイルス抗原を認識するウイルス特異的Tリンパ球（V S T）のポリクローナル集団を含む組成物を提供し、この複数のウイルス抗原は、P I V由来の少なくとも1つの第1の抗原と、1つ以上の第2のウイルス由来の少なくとも1つの第2の抗原と、を含む。いくつかの実施形態では、V S Tは、末梢血単核細胞（P B M C）を複数のペプミックスライブラリと接触させることによって作製され、各ペプミックスライブラリは、ウイルス抗原の少なくとも一部にまたがる複数の重複ペプチドを含有し、複数のペプミックスライブラリのうち少なくとも1つは、P I V - 3由来の第1の抗原にまたがり、複数のペプミックスライブラリのうち少なくとも1つのさらなるペプミックスライブラリは、各第2の抗原にまたがる。いくつかの実施形態では、V S Tは、T細胞を複数のペプミックスライブラリで刺激した樹状細胞（D C）と接触させる

10

20

30

40

50

ことによって作製され、各ペプミックスライブラリは、ウイルス抗原の少なくとも一部にまたがる複数の重複ペプチドを含有し、複数のペプミックスライブラリのうち少なくとも1つは、PIV-3由来の第1の抗原にまたがり、複数のペプミックスライブラリのうち少なくとも1つのさらなるペプミックスライブラリは、各第2の抗原にまたがる。いくつかの実施形態では、VSTは、PIV-3抗原をコードする少なくとも1つのDNAプラスミド及び各第2の抗原をコードする少なくとも1つのDNAプラスミドでヌクレオフェクトされた樹状細胞(DC)とT細胞を接触させることによって作製される。いくつかの実施形態では、プラスミドは、少なくとも1つのPIV-3抗原及び少なくとも1つの第2の抗原をコードする。いくつかの実施形態では、VSTはCD4+Tリンパ球及びCD8+Tリンパ球を含む。いくつかの実施形態では、VSTはT細胞受容体を発現する。いくつかの実施形態では、VSTはMHC拘束性Tリンパ球を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の第2のウイルスは、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、インフルエンザ、ヒトメタニューモウイルス(hMPV)及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、1つ以上の第2のウイルスは、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、インフルエンザ、ヒトメタニューモウイルス及びそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の第2のウイルスは、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、インフルエンザ、ヒトメタニューモウイルス及びそれらの組み合わせからなる。いくつかの実施形態では、本組成物は、1、2、3又は4つの第1の抗原を含む。いくつかの実施形態では、第1の抗原は、PIV-3抗原M、PIV-3抗原HN、PIV-3抗原N、PIV-3抗原F及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、4つの第1の抗原は以下の通りである：PIV-3抗原M、PIV-3抗原HN、PIV-3抗原N及びPIV-3抗原F。いくつかの実施形態では、本組成物は、2又は3つの第2のウイルスを含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、3つの第2のウイルスを含む。いくつかの実施形態では、この3つの第2のウイルスは、インフルエンザ、RSV及びhMPVである。いくつかの実施形態では、本組成物は、各第2のウイルスあたり少なくとも2つの第2の抗原を含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、1、2、3、4、5、6、7又は8個の第2の抗原を含む。いくつかの実施形態では、第2の抗原は、インフルエンザ抗原NP1、インフルエンザ抗原MP1、RSV抗原N、RSV抗原F、hMPV抗原M、hMPV抗原M2-1、hMPV抗原F、hMPV抗原N及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第2の抗原は、インフルエンザ抗原NP1、インフルエンザ抗原MP1又は両方を含む。いくつかの実施形態では、第2の抗原は、RSV抗原N、RSV抗原F又はその両方を含む。いくつかの実施形態では、第2の抗原は、hMPV抗原M、hMPV抗原M2-1、hMPV抗原F、hMPV抗原N及びそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、第2の抗原は、インフルエンザ抗原NP1、インフルエンザ抗原MP1、RSV抗原N、RSV抗原F、hMPV抗原M、hMPV抗原M2-1、hMPV抗原F、hMPV抗原Nのそれぞれを含む。いくつかの実施形態では、複数の抗原は、PIV-3抗原M、PIV-3抗原HN、PIV-3抗原N、PIV-3抗原F、インフルエンザ抗原NP1、インフルエンザ抗原MP1、RSV抗原N、RSV抗原F、hMPV抗原M、hMPV抗原M2-1、hMPV抗原F及びhMPV抗原Nを含む。いくつかの実施形態では、複数の抗原は、PIV-3抗原M、PIV-3抗原HN、PIV-3抗原N、PIV-3抗原F、インフルエンザ抗原NP1、インフルエンザ抗原MP1、RSV抗原N、RSV抗原F、hMPV抗原M、hMPV抗原M2-1、hMPV抗原F及びhMPV抗原Nからなるか又は基本的にそれらからなる。いくつかの実施形態では、VSTは、IL-7及びIL-4の両方の存在下でエキスピボで培養される。いくつかの実施形態では、複数ウイルスVSTは、対象への投与のための準備ができるように、培養の9~18日以内に十分に増殖している。いくつかの実施形態では、VSTは、(a)無視できるアロ反応性；(b)対象から回収された抗原特異的T細胞の活性化誘導細胞死が、同じ対象から回収されたがIL-7及びIL-4の両方の存在下で培養されなかった対応する抗原特異的T細胞よりも少ないこと；及び(c)70%を超える生存率から選択される1つ以上の特性を示す。い

10

20

30

40

50

くつかの実施形態では、本組成物は、培養下で少なくとも7日間、細菌及び真菌に対して陰性であり；5 EU/ml未満のエンドトキシンを示し、マイコプラズマについて陰性である。いくつかの実施形態では、ペプミックスは化学合成されたものであり、任意選択的に>90%の純度である。いくつかの実施形態では、VSTはTh1極性化されている。いくつかの実施形態では、VSTはウイルス抗原発現標的細胞を溶解することが可能である。いくつかの実施形態では、VSTは、非感染自己又は同種異系標的細胞を顕著に溶解させない。

【0007】

本開示はまた、静脈内送達用に処方された、本明細書中で開示される組成物の何れか1つを含む医薬組成物を提供し、この組成物は、培養下で少なくとも7日間細菌及び真菌に対して陰性であり；5 EU/ml未満のエンドトキシンを示し、マイコプラズマについて陰性である。例えばいくつかの実施形態では、本開示は、複数のウイルス抗原を認識するウイルス特異的Tリンパ球(VST)のポリクローナル集団を含む医薬組成物を提供し、この複数のウイルス抗原は、PIV由来の少なくとも1つの第1の抗原と、1つ以上の第2のウイルス由来の少なくとも1つの第2の抗原と、を含む。いくつかの実施形態では、第2のウイルスは、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、インフルエンザ及びヒトメタニューモウイルスを含む。いくつかの実施形態では、VSTは、末梢血単核細胞(PBMC)を複数のペプミックスライブラリと接触させることによって作製され、各ペプミックスライブラリは、ウイルス抗原の少なくとも一部にまたがる複数の重複ペプチドを含有し、複数のペプミックスライブラリのうち少なくとも1つはPIV-3由来の第1の抗原にまたがり、複数のペプミックスライブラリのうち少なくとも1つのさらなるペプミックスライブラリは各第2の抗原にまたがり、医薬組成物は静脈内送達用に処方され、この組成物は培養下で少なくとも7日間細菌及び真菌に対して陰性であり；5 EU/ml未満のエンドトキシンを示し、マイコプラズマについて陰性である。

【0008】

本開示はまた、本明細書中で開示される組成物又は医薬組成物の何れか1つ以上で標的細胞を溶解させる方法も提供する。例えば、いくつかの実施形態では、本開示は、複数のウイルス抗原を認識するウイルス特異的Tリンパ球(VST)のポリクローナル集団と標的細胞を接触させることを含む、標的細胞を溶解させる方法を提供し、複数のウイルス抗原は、PIV由来の少なくとも1つの第1の抗原と、1つ以上の第2のウイルス由来の少なくとも1つの第2の抗原と、を含む。いくつかの実施形態では、第2のウイルスは、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、インフルエンザ及びヒトメタニューモウイルスを含む。いくつかの実施形態では、VSTは、末梢血単核細胞(PBMC)を複数のペプミックスライブラリと接触させることによって作製され、各ペプミックスライブラリは、ウイルス抗原の少なくとも一部にまたがる複数の重複ペプチドを含有し、複数のペプミックスライブラリのうち少なくとも1つは、PIV-3由来の第1の抗原にまたがり、複数のペプミックスライブラリのうち少なくとも1つのさらなるペプミックスライブラリは、各第2の抗原にまたがる。いくつかの実施形態では、接触は、対象においてインビボで行われる。いくつかの実施形態では、接触は、対象へのVSTの投与を介してインビボで行われる。

【0009】

本開示はまた、ウイルス感染の処置又は予防を必要とする対象に、本明細書中で開示される組成物又は医薬組成物の何れか1つ以上を投与することを含む、ウイルス感染を処置又は予防する方法を提供する。例えば、いくつかの実施形態では、本開示は、ウイルス感染の処置又は予防を必要とする対象に、複数のウイルス抗原を認識するウイルス特異的Tリンパ球(VST)のポリクローナル集団を投与することを含み、この複数のウイルス抗原が、PIV由来の少なくとも1つの第1の抗原と、1つ以上の第2のウイルス由来の少なくとも1つの第2の抗原と、を含む、ウイルス感染を処置又は予防する方法を提供する。いくつかの実施形態では、第2のウイルスは、呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、インフルエンザ及びヒトメタニューモウイルスを含む。いくつかの実施形態では、VSTは、末梢血単核細胞(PBMC)を複数のペプミックスライブラリと接触させることによって

10

20

30

40

50

作製され、各ペプミックスライブラリは、ウイルス抗原の少なくとも一部にまたがる複数の重複ペプチドを含有し、複数のペプミックスライブラリのうち少なくとも1つは、PIV-3由来の第1の抗原にまたがり、複数のペプミックスライブラリのうち少なくとも1つのさらなるペプミックスライブラリは、各第2の抗原にまたがる。いくつかの実施形態では、対象にVST $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ 個/m²を投与する。いくつかの実施形態では、対象にVSTを複数回投与する。一実施形態では、対象にVSTを投与し、次いで対象のウイルス量を監視し、ウイルス量が増加する場合、対象にVSTの2回目の投与を行う。いくつかの実施形態では、対象は免疫無防備状態である。いくつかの実施形態では、対象は急性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病又は慢性肉芽腫性疾患を有する。いくつかの実施形態では、対象は、VSTを受ける前に、(a)強度軽減前処置を伴う適合血縁ドナー移植；(b)骨髄破壊的前処置を伴う適合非血縁ドナー移植；(c)強度軽減前処置を伴うハプロ一致移植；又は(d)骨髄破壊的前処置を伴う適合血縁ドナー移植を受けた。いくつかの実施形態では、対象は、(a)固形臓器移植を受けたことがある；(b)化学療法を受けたことがある；(c)HIV感染を有する；(d)遺伝的免疫不全を有する；及び/又は(e)同種異系幹細胞移植を受けたことがある。いくつかの実施形態では、本組成物は、対象に複数回投与される。いくつかの実施形態では、本組成物の投与は、対象におけるウイルス感染を効果的に処置又は予防し、ウイルス感染症は、パラインフルエンザウイルス3型、呼吸器合胞体ウイルス、インフルエンザ、ヒトメタニューモウイルス及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、対象はヒトである。

10

20

【0010】

本開示はまた、複数のウイルス抗原を認識するVSTのポリクローナル集団を含む組成物を提供し、この複数のウイルス抗原は、パラインフルエンザウイルス3型(PIV-3)、呼吸器合胞体ウイルス、インフルエンザ、ヒトメタニューモウイルス及びそれらの組み合わせから選択される少なくとも1つの抗原を含む。いくつかの実施形態では、VSTは、複数のウイルス抗原を認識し、この複数のウイルス抗原は、パラインフルエンザウイルス3型、呼吸器合胞体ウイルス、インフルエンザ及びヒトメタニューモウイルスのそれぞれに由来する少なくとも1つの抗原を含む。いくつかの実施形態では、VSTは、複数のウイルス抗原を認識し、この複数のウイルス抗原は、パラインフルエンザウイルス3型、呼吸器合胞体ウイルス、インフルエンザ及びヒトメタニューモウイルスのそれぞれに由来する少なくとも2つの抗原を含む。いくつかの実施形態では、複数の抗原は、PIV-3抗原M、PIV-3抗原HN、PIV-3抗原N、PIV-3抗原F、インフルエンザ抗原NP1、インフルエンザ抗原MP1、RSV抗原N、RSV抗原F、hMPV抗原M、hMPV抗原M2-1、hMPV抗原F及びhMPV抗原Nを含むか、それらからなるか又は基本的にそれらからなる。いくつかの実施形態では、本組成物は、静脈内送達用に処方される医薬組成物である。いくつかの実施形態では、本組成物は、培養下で少なくとも7日間、細菌及び真菌に対して陰性であり；SEU/ml未満のエンドトキシンを示し、マイコプラズマについて陰性である。

30

【0011】

本開示はまた、複数のウイルス抗原を認識するVSTのポリクローナル集団を含む組成物と標的細胞を接触させることを含み、この複数のウイルス抗原が、パラインフルエンザウイルス3型(PIV-3)、呼吸器合胞体ウイルス、インフルエンザ及びヒトメタニューモウイルスから選択される少なくとも1つの抗原を含む、標的抗原を溶解させる方法も提供する。いくつかの実施形態では、本組成物は医薬組成物である。いくつかの実施形態では、接触は、対象においてインピボで行われる。いくつかの実施形態では、接触は、対象へのVSTの投与を介してインピボで行われる。

40

【0012】

本開示はまた、ウイルス感染症の処置又は予防を必要とする対象の細胞に、複数のウイルス抗原を認識するVSTのポリクローナル集団を含む組成物を投与することを含み、この複数のウイルス抗原が、パラインフルエンザウイルス3型(PIV-3)、呼吸器合胞

50

体ウイルス、インフルエンザ及びヒトメタニューモウイルスから選択される少なくとも1つの抗原を含む、ウイルス感染症を処置又は予防する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本組成物は医薬組成物である。いくつかの実施形態では、本組成物は、対象に複数回投与される。いくつかの実施形態では、本組成物の投与は、対象におけるウイルス感染症を効果的に処置又は予防し、このウイルス感染は、パラインフルエンザウイルス3型、呼吸器合胞体ウイルス、インフルエンザ及びヒトメタニューモウイルスからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、対象はヒトである。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】健康なドナーからのポリクローナルの複数呼吸器ウイルス特異的T細胞（マルチ-R-VST）の作製。図1Aは、マルチR-VST作製プロトコルの概略図を示す。図1Bは、トリパンプルー排除を用いた細胞計数に基づく、10日間にわたって達成された増殖倍率を示す（ $n = 12$ ）。製造の実行は、約10～18日間の範囲であり得る。図1C及び図1Dは、増殖細胞の表現型を示す（平均±SEM、 $n = 12$ ）。図1Eは、増殖したCD4+T細胞集団内のTreg（CD4+CD25+FoxP3+）の最小検出を示す（平均±SEM、 $n = 8$ ）。

10

【0014】

【図2】マルチR-VSTの特異性及び富化。図2Aは、各標的ウイルス由来の個々の刺激抗原への曝露後の増殖T細胞株内のウイルス反応性T細胞の特異性を示す。データは、平均±SEM SFC / 2×10^5 （ $n = 12$ ）として提示する。図2Bは、特異性の富化倍率を示す（PBMIC対マルチR-VST； $n = 12$ ）。図2Cは、1人の代表的なドナーにおけるウイルス刺激後のCD4ヘルパー（上）及びCD8細胞傷害性T細胞（下）からのICSによって評価される場合の、IFN産生を示し（ドットプロットはCD3+細胞でゲーティングした）、一方、図2Dは、スクリーニングされた9名のドナーについての結果の要約を示す（平均±SEM）。図2Eは、個々の刺激抗原に应答するドナー由来VST株の数を示す。図2Fは、各標的ウイルス由来のプールした刺激抗原の滴定濃度に曝露した後の、増殖T細胞株内のウイルス反応性T細胞の特異性を示す。データは、平均±SEM SFC / 2×10^5 （ $n = 7$ ）として提示する。図2Gは、各標的ウイルス由来の個々の刺激抗原への曝露後の、健康なドナーの末梢血中のCARV特異的T細胞の頻度を示す。データは、平均±SEM SFC / 5×10^5 （ $n = 12$ ）として提示する。

20

30

【0015】

【図3】マルチR-VSTはポリクローナル性であり、多機能性である。図3Aは、1人の代表的なドナーにおけるICSによって評価される場合の、CD3+T細胞からのIFN及びTNFの二重産生を示し、一方、図3Bは、スクリーニングした9名のドナーからの結果の要約を示す（平均±SEM）。図3Cは、マルチプレックスビーズアレイによって測定した場合の、マルチR-VSTのサイトカインプロファイルを示し、一方、図3Dは、ELISPOTアッセイによってグランザイムBの産生を評価する。結果をSFC / 2×10^5 投与量VSTとして報告する（平均±SEM、 $n = 9$ ）。

【0016】

40

【図4】マルチ-R-VSTはウイルス感染標的に対して反応性がある。図4Aは、無負荷PHA芽球を対照として用い、自己ペプミックスを適用したPHA芽球を標的として使用した（E:T 40:1； $n = 8$ ）、標準的な4時間Cr51放出アッセイによって評価したマルチR-VSTの細胞溶解能を示す。結果は、特異的溶解のパーセンテージ（平均±SEM）として示す。図4Bは、マルチ-R-VSTが示す活性が、Cr51放出アッセイによって評価した場合に、非感染自己又は同種異系PHA芽球の何れに対しても無視できるものであることを明らかにする。図4Cは、無負荷PHA芽球を対照として用い、自己ペプミックスを適用したPHA芽球を標的として使用して（E:T 40:1、20:1、10:1、5:1）、標準的な4時間Cr51放出アッセイによって評価した、マルチR-VSTの細胞傷害性の活性を示す。結果は、特異的溶解のパーセンテージ（平

50

均 ± S E M、n = 8) として示す。

【 0 0 1 7 】

【図 5】H S C T レシピエントの末梢血中の呼吸器合胞体ウイルス (R S V) 及びヒトメタニューモウイルス (h M P V) 特異的 T 細胞の検出。I F N E L I s p o t を読み出し情報として使用して、感染ウイルスに対する特異性について、3 回感染した 2 名の H S C T レシピエントから単離した P B M C を試験した。図 5 A 及び図 5 B は、内因性 R S V 特異的 T 細胞の検出可能な増加と一致した、制御された R S V 関連 U R T I を有する 2 名の患者からの結果を示し、一方で図 5 C は、内因性 h M P V 特異的 T 細胞の増殖とともに、h M P V - L R T I のクリアランスを示す。A L C : 絶対リンパ球数。

【 0 0 1 8 】

【図 6】H S C T レシピエントの末梢血中の R S V 及びパラインフルエンザ (P I V - 3) 特異的 T 細胞の検出。I F N E L I s p o t を読み出し情報として使用して、感染ウイルスに対する特異性について、3 回感染した 3 名の H S C T レシピエントから単離した P B M C を試験した。図 6 A 及び図 6 B は、内因性ウイルス特異的 T 細胞の検出可能な増加と一致した、制御された R S V 及び P I V 関連 U R T I 並びに L R T I を有する 2 名の患者からの結果を示す。図 6 C は、ウイルスに対する T 細胞応答を開始することができなかった、進行中の P I V 関連重度 U R T I を有する患者からの結果を示す。A L C : 絶対リンパ球数。

【 0 0 1 9 】

【図 7】R S V ゲノムの構造及び形態。

【 0 0 2 0 】

【図 8】R S V - V S T 作製プロトコルの概略図。

【 0 0 2 1 】

【図 9】R S V - V S T の特性評価。図 9 A は、トリパンブルー排除を用いた細胞計数に基づく、10 日間にわたって達成された増殖倍率を示す。図 9 B 及び図 9 C は、増殖した細胞の表現型を示す。

【 0 0 2 2 】

【図 10】R S V - V S T は多機能である。図 10 A は、E l i S p o t アッセイによって評価した場合の C D 3 + T 細胞からの I F N 産生を示す。図 10 B は、E L I s p o t アッセイによるグランザイム B の産生を示す。結果は S F C / 2×10^5 投与量 V S T として報告する (平均 ± S E M、n = 9)。

【 0 0 2 3 】

【図 11】マルチプレックスビーズアレイによって測定した場合の R S V - V S T のサイトカインプロファイル。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 2 4 】

(定義)

本明細書で使用される場合、特許請求の範囲及び / 又は明細書中で「含む (c o m p r i s i n g) 」という用語と組み合わせて使用される場合の「a」又は「an」という単語の使用は、「1つ」を意味し得るが、「1つ以上」、「少なくとも1つ」及び「1つ又は複数」の意味とも一致する。本発明の一部の実施形態は、本発明の1つ以上の要素、方法段階及び / 又は方法からなり得るか又は本質的にそれらからなり得る。本明細書中に記載のあらゆる方法又は組成物が本明細書中に記載のあらゆる他の方法又は組成物に関して実行され得ることが企図される。

【 0 0 2 5 】

数値の直前の「約」という用語は、数値の ± 0 % ~ 10 %、± 0 % ~ 10 %、± 0 % ~ 9 %、± 0 % ~ 8 %、± 0 % ~ 7 %、± 0 % ~ 6 %、± 0 % ~ 5 %、± 0 % ~ 4 %、± 0 % ~ 3 %、± 0 % ~ 2 %、± 0 % ~ 1 %、± 0 % ~ 1 % 未満、又はその中の値の何れかの他の値若しくは値の範囲を意味する。例えば、「約 40」は、40 の ± 0 % ~ 10 % (即ち 36 ~ 44) を意味する。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 6 】

特許請求の範囲における「又は」という用語の使用は、選択すべき状況のみを指すように明示的に示されない限り、又は選択肢が相互に排他的でない限り、「及び／又は」を意味するために使用されるが、本開示は、選択すべき状況のみ及び「及び／又は」を指す定義を支持する。

【 0 0 2 7 】

本明細書で使用される場合、「ウイルス抗原」という用語は、本質的にタンパク質性である抗原を指す。特定の実施形態では、ウイルス抗原はコートタンパク質である。ウイルス抗原の具体例としては、EBV、CMV、AdV、BK、JCウイルス、HHV 6、RSV、インフルエンザ、パラインフルエンザ、ボカウイルス、コロナウイルス、ライノウイルス、LCMV、流行性耳下腺炎、麻疹、hMPV、パルボウイルスB、ロタウイルス、メルケル細胞ウイルス、単純ヘルペスウイルス、HPV、HIV、HTLV 1、HHV 8、C型肝炎、B型肝炎、HTLV 1、単純ヘルペスウイルス、ウエストナイルウイルス、ジカウイルス及びエボラから選択される少なくとも1つのウイルス由来の抗原が挙げられる。

10

【 0 0 2 8 】

「抗原特異的T細胞株」又は「ウイルス特異的T細胞」又は「ウイルス特異的T細胞株」という用語は、関心のある1つ又は複数のウイルスに対する特異性及び効力を有するポリクローナルT細胞株を指すために本明細書中で交換可能に使用される。本明細書中に記載のように、1つ又は複数のウイルス抗原は、末梢血単核細胞中のナイティブT細胞に提示され、ナイティブCD4+及びCD8+T細胞集団は、前記ウイルス抗原に応答して増殖する。例えば、抗原特異的T細胞株又はEBVのウイルス特異的T細胞は、EBVを認識し得、それによってEBVに特異的なT細胞を増殖させる。別の例では、アデノウイルス及びBKに対する抗原特異的T細胞株又はウイルス特異的T細胞は、AdVとBKの両方を認識し得、それによってアデノウイルス及びBKに特異的なT細胞を増殖させる。

20

【 0 0 2 9 】

本明細書中で使用される場合、「患者」又は「対象」又は「個体」という用語は、ヒト、飼育動物、家畜並びに動物園、スポーツ及びペット動物、例えばイヌ、ウマ、ネコ、並びにウシ、ヒツジ、ブタ及びヤギを含む農業用動物を含む何らかの哺乳動物を指すために本明細書中で交換可能に使用される。1つの特定の哺乳動物は、成人、小児及び高齢者を含むヒトである。対象はまた、イヌ、ネコ及びウマを含むペット動物でもあり得る。家畜動物の例としては、ブタ、ウシ、ヒツジ及びヤギが挙げられる。

30

【 0 0 3 0 】

本明細書中で使用される場合、「処置する(treat)」、「処置すること(treating)」、「処置(treatment)」などの用語は、別段の指定がない限り、このような用語が適用される疾患、障害若しくは状態、又はこのような疾患、障害若しくは状態の1つ以上の症状を、逆転させる、緩和する、そのプロセスを阻害する、又は予防することを指し、症状若しくは合併症の発症を予防するための、又は症状若しくは合併症を緩和するための、又は疾患、状態若しくは障害を排除するための、本明細書中に記載される組成物、医薬組成物若しくは剤形の何れかの投与を含む。一部の例では、処置は治療的又は改善的である。

40

【 0 0 3 1 】

本明細書中で使用される「投与すること(administering)」、「投与する(administer)」、「投与(administration)」などの用語は、治療薬を、このような治療薬による処置を必要とする対象に、移送、送達、導入又は輸送する何らかの方式を指す。このような方式には、眼内、経口、局所、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮内、鼻腔内及び皮下投与が含まれるが限定されない。

【 0 0 3 2 】

本明細書で使用される場合、「含む(comprise)」、「含むこと(comprising)」、「含む(includes)」、「含むことincluding)」、

50

「有する (has)」、「有すること (having)」、「含有する (contains)」、「含有すること (containing)」、「特徴とする (characterized by)」又はそれらの何らかの他の変形物は、そうでないことが明示的に示されるあらゆる限定を条件として、列挙される構成要素を非排他的に含むことを包含することを意図する。例えば、要素のリスト (例えば、構成要素又は特徴又は段階) を「含む」組成物及び/又は方法は、必ずしもそれらの要素 (又は構成要素若しくは特性若しくは段階) のみに限定されないが、明示的に列挙されていないか又は組成物及び/又は方法に固有である他の要素 (又は構成要素若しくは特性若しくは段階) を含み得る。

【0033】

本明細書中で使用される場合、「からなる (consists of)」及び「からなること (consisting of)」という句は、示されていない何らかの要素、段階又は構成要素を除外する。例えば、特許請求の範囲で使用される「からなる (consists of)」又は「からなること (consisting of)」は、通常それに付随する不純物 (即ち所与の構成要素内の不純物) を除き、特許請求の範囲に具体的に列挙される構成要素、材料又は工程に特許請求の範囲を限定する。「からなる (consists of)」又は「からなること (consisting of)」という語句が、プリアンプルの直後ではなく、請求項の本体の節に現れる場合、「からなる (consists of)」又は「からなること (consisting of)」という語句は、その節に記載されている要素 (又は構成要素又は段階) のみに限定し; 他の要素 (又は構成要素) は、全体として特許請求の範囲から除外されない。

【0034】

本発明の他の目的、特徴及び利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。しかし、本発明の精神及び範囲内の様々な変更及び修正がこの詳細な説明から当業者に明らかになるので、詳細な説明及び特定の例は、本発明の特定の実施形態を示しているが、単なる例示として与えられていることを理解されたい。

【0035】

以下の考察は、本発明の様々な実施形態に関する。「発明」という用語は、いかなる特定の実施形態を指すことも、又はそうでなければ本開示の範囲を限定することも意図するものではない。これらの実施形態のうちの1つ以上を使用し得るが、開示される実施形態は、特許請求の範囲を含む本開示の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない、又はそうでなければ使用されるべきではない。さらに、当業者は、以下の説明が広範な適用を有し、何れかの実施形態の考察が、その実施形態の例示のみを意図し、特許請求の範囲を含む開示の範囲がその実施形態に限定されることを明確にすることを意図しないことを理解するであろう。

概要

【0036】

様々な実施形態では、本開示は、ウイルス感染症 (例えば呼吸器ウイルス感染症) 及び関連疾患を処置又は予防するための組成物及び方法を提供する。本開示は、ウイルス感染を制御し、症状を排除するための、エクスピボで増殖させた、遺伝子改変がない、ウイルス特異的T細胞 (VST) の投与による、そのような感染の予防又は処置に関する。いかなる理論にも束縛されることを望むものではないが、VSTは、ウイルス由来ペプチドを提示する標的細胞上で発現される主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 分子に結合するそれらのネイティブT細胞受容体 (TCR) を介してウイルス感染細胞を認識し、死滅させる。

【0037】

呼吸器合胞体ウイルス (RSV)、インフルエンザ、パラインフルエンザウイルス (PIV) 及びヒトメタニューモウイルス (hMPV) を含む、市中感染する呼吸器ウイルス (CARV) による呼吸器ウイルス感染は、同種異系造血幹細胞移植 (アロHSC T) レシピエントの最大40%で検出され、これらのレシピエントは、致命的となり得る細気管支炎及び肺炎などの重度の疾患を引き起こし得る。RSV誘発性細気管支炎は、1歳未満

の小児の入院の最も多い理由であるが、Center for Disease Control (CDC) は、毎年インフルエンザの発症が世界中で最大 3560 万件、入院は 140,000 ~ 710,000 件にのぼり、米国だけで疾患管理にかかる費用は年間およそ 871 億ドルであり、12,000 ~ 56,000 人が死亡していると推定している。

【0038】

従って、CARV は世界中で罹患及び死亡の主な原因となっており、免疫系がナイーブ（例えば幼児）であるか又は易感染性である個体が最も脆弱である。例えば、同種異系造血幹細胞移植（HSCT）レシピエントでは、CARV 関連呼吸器ウイルス疾患の発生率が 40% と高い（5）。殆どの患者が最初は鼻漏、咳及び発熱を呈する一方、症例のおよそ 50% で感染症が下気道に進行し、肺炎及び細気管支炎を含む重度の症状が見られ、死亡率が 23 ~ 50% であることを特徴とする（6 ~ 9）。hMPV（10）及びPIV（11）については承認された予防ワクチンも抗ウイルス薬もなく、インフルエンザについては、患者が HSCT の少なくとも 6 ヶ月後でないとい予防ワクチンは適応とされない（12）。エアロゾル化リバビリン（RBV）は RSV の処置について FDA の承認を得ているが、非常に高額であり（5 日間コース = 149,756 ドル）、投与が物流上困難であり、患者を取り囲むエアロゾルテントに接続する特殊な噴霧装置を必要とする（13 ~ 16）。従って、臨床的問題が多い CARV に対する承認済みの抗ウイルス剤がなく、エアロゾル化 RBV の投与が高コストであり、複雑であることから、代替処置戦略の必要性が強調される。

【0039】

アデノウイルス（AdV）、ライノウイルス及びコロナウイルス株、SARS-CoV、SARS-CoV-2、MERS-CoV 並びに免疫適格患者及び免疫無防備状態の患者の両方に罹患する流行性 CoV を含む他の呼吸器ウイルス。これらは、特に免疫無防備状態の個体において重度の症状を引き起こし得、2020 年の SARS-CoV2 パンデミックは、不用意なヒトが、この感染及び関連疾患をどのようにして処置及び予防すべきかを明らかにした。この恐ろしいパンデミックの結果、既に世界中で何千人もが死亡し、医療崩壊及び数十年間見られなかった世界的な経済の崩壊がもたらされた。従って、これらのウイルスを処置するための新しい治療法が緊急に必要とされていることは明らかである。本開示は、そのような治療を提供する。

【0040】

いくつかの実施形態では、本開示は、健康な予備スクリーニング済みの血清陽性ドナーから得られた末梢血単核細胞（PBMC）から作製された VST を提供し、これは部分的に HLA が一致した「即納」製品として入手可能である。従って、本開示は、1 つ以上のウイルスに対する特異性を有する VST を含む VST 製品及びウイルス感染を処置又は予防するためにそのような VST を使用する方法を提供する。

【0041】

いくつかの実施形態では、本明細書中に記載の VST は、1 つ以上のウイルス（例えば 1 つ以上の呼吸器ウイルス）又はより具体的にはウイルスによって発現される 1 つ以上の抗原に应答する（又は「それに特異的である」）。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載の VST は、1 つのウイルスのみに应答する。例えば、一実施形態では、本開示は、1 つ以上の RSV 抗原に対する特異性を有する VST のポリクローナル集団を提供する。いくつかの例では、このような RSV 特異的 VST は、複数の RSV 抗原に対する特異性を有する T 細胞を含む。いくつかの実施形態では、本開示はまた、このような RSV 特異的 VST を投与することによって、対象における RSV 感染を処置する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示はまた、このような RSV 特異的 VST を投与することによって、対象における RSV 感染を予防する方法を提供する。このような実務は、RSV 以外のあらゆる単一のウイルスに適用され得る。

【0042】

いくつかの実施形態では、本明細書中に記載の VST は複数のウイルス（例えば本明細書中で開示される何れかの 1 つ以上のウイルス）に应答する。特定の実施形態では、本開

10

20

30

40

50

示は、複数の呼吸器ウイルス（例えば本明細書中で開示される呼吸器ウイルスの何れか1つ以上）に应答する複数の呼吸器ウイルス特異的T細胞（マルチ-R-VST）を提供する。特定の態様では、マルチR-VSTは、インフルエンザ、RSV、hMPV、PIV及びそれらの組み合わせから選択されるウイルスによって発現される1つ以上の呼吸器ウイルス抗原に対する特異性を有する。特定の実施形態では、マルチR-VSTは、インフルエンザ、RSV、hMPV及びPIVのそれぞれによって発現される抗原に対する特異性を有する。特定の態様では、マルチR-VSTは、インフルエンザ、RSV、hMPV、PIV3及びそれらの組み合わせから選択されるウイルスによって発現される1つ以上の呼吸器ウイルス抗原に対する特異性を有する。特定の実施形態では、マルチR-VSTは、インフルエンザ、RSV、hMPV及びPIV3のそれぞれによって発現される抗原に対する特異性を有する。いくつかの実施形態では、インフルエンザ抗原は、インフルエンザA抗原NP1である。いくつかの実施形態では、インフルエンザ抗原は、インフルエンザA抗原MP1である。いくつかの実施形態では、インフルエンザ抗原は、NP1及びMP1の組み合わせである。いくつかの実施形態では、RSV抗原はRSV Nである。いくつかの実施形態では、RSV抗原はRSV Fである。いくつかの実施形態では、RSV抗原は、RSV N及びFの組み合わせである。いくつかの実施形態では、hMPV抗原はFである。いくつかの実施形態では、hMPV抗原はNである。いくつかの実施形態では、hMPV抗原はM2-1である。いくつかの実施形態では、hMPV抗原はMである。いくつかの実施形態では、hMPV抗原は、F、N、M2-1及びMの組み合わせである。いくつかの実施形態では、PIV抗原はMである。いくつかの実施形態では、PIV抗原はHNである。いくつかの実施形態では、PIV抗原はNである。いくつかの実施形態では、PIV抗原はFである。いくつかの実施形態では、PIV抗原は、M、HN、N及びFの組み合わせである。いくつかの実施形態では、本開示はまた、対象にこのようなマルチ-R-VSTを投与することによって、対象におけるPIV、インフルエンザ、RSV及び/又はhMPV感染を処置する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示はまた、対象にこのようなマルチ-R-VSTを投与することによって、対象におけるPIV、インフルエンザ、RSV及び/又はhMPV感染を予防する方法を提供する。いくつかの実施形態では、PIV3抗原はMである。いくつかの実施形態では、PIV3抗原はHNである。いくつかの実施形態では、PIV3抗原はNである。いくつかの実施形態では、PIV3抗原はFである。いくつかの実施形態では、PIV3抗原は、M、HN、N及びFの組み合わせである。いくつかの実施形態では、本開示はまた、対象にこのようなマルチ-R-VSTを投与することによって、対象におけるPIV3、インフルエンザ、RSV及び/又はhMPV感染を処置する方法も提供する。いくつかの実施形態では、本開示はまた、対象にこのようなマルチ-R-VSTを投与することによって、対象におけるPIV3、インフルエンザ、RSV及び/又はhMPV感染を予防する方法も提供する。このような実務は、あらゆる複数のウイルスに適用され得る。

【0043】

特定の一実施形態では、本開示は、PIV抗原M、PIV抗原HN、PIV抗原N、PIV抗原F、インフルエンザ抗原NP1、インフルエンザ抗原MP1、RSV抗原N、RSV抗原F、hMPV抗原M、hMPV抗原M2-1、hMPV抗原F及びhMPV抗原Nのそれぞれに特異性を有するマルチR-VSTのポリクローナル集団を含む組成物を提供する。ポリクローナル集団は、CD4+及びCD8+VSTの両方を含み得る。ポリクローナル集団が対象に投与され得る。対象は、PIV、インフルエンザ、RSV及び/又はhMPV感染を有し得る。対象においてPIV、インフルエンザ、RSV及び/又はhMPV感染を処置する方法は、対象にマルチR-VSTのポリクローナル集団を投与することを含み得る。対象においてPIV、インフルエンザ、RSV及び/又はhMPV感染を予防する方法は、対象にマルチR-VSTのポリクローナル集団を投与することを含み得る。

【0044】

特定の一実施形態では、本開示は、PIV3抗原M、PIV3抗原HN、PIV3抗原

N、P I V 3 抗原 F、インフルエンザ抗原 N P 1、インフルエンザ抗原 M P 1、R S V 抗原 N、R S V 抗原 F、h M P V 抗原 M、h M P V 抗原 M 2 - 1、h M P V 抗原 F 及び h M P V 抗原 N のそれぞれに特異性を有するマルチ R - V S T のポリクローナル集団を含む組成物を提供する。ポリクローナル集団は、C D 4 + 及び C D 8 + V S T の両方を含み得る。ポリクローナル集団が対象に投与され得る。対象は、P I V 3、インフルエンザ、R S V 及び / 又は h M P V 感染を有し得る。対象において P I V 3、インフルエンザ、R S V 及び / 又は h M P V 感染を処置する方法は、対象にマルチ R - V S T のポリクローナル集団を投与することを含み得る。対象において P I V 3、インフルエンザ、R S V 及び / 又は h M P V 感染を予防する方法は、対象にマルチ R - V S T のポリクローナル集団を投与することを含み得る。

10

【 0 0 4 5 】

いくつかの実施形態では、本開示は、複数のウイルス抗原を認識する V S T のポリクローナル集団を含む組成物を提供し、この複数のウイルス抗原は、P I V 由来の少なくとも 1 つの第 1 の抗原及び 1 つ以上のさらなるウイルス由来の少なくとも 1 つの第 2 の抗原を含む。いくつかの特定の実施形態では、本開示は、複数のウイルス抗原を認識する V S T のポリクローナル集団を含む組成物を提供し、この複数のウイルス抗原は、P I V 3 由来の少なくとも 1 つの第 1 の抗原と、1 つ以上のさらなるウイルス由来の少なくとも 1 つの第 2 の抗原と、を含む。さらなるウイルスは、インフルエンザ、R S V、h M P V、A d V、コロナウイルス又はそれらの組み合わせを含み得る。V S T は、1 つ以上のさらなるウイルスによって発現されるさらなる抗原を認識し得、このさらなる抗原は、P I V 抗原 M (例えば P I V 3 抗原 M)、P I V 抗原 H N (例えば P I V 3 抗原 H N)、P I V 抗原 N (例えば P I V 3 抗原 N)、P I V 抗原 F (例えば P I V 3 抗原 F)、インフルエンザ抗原 N P 1、インフルエンザ抗原 M P 1、R S V 抗原 N、R S V 抗原 F、h M P V 抗原 M、h M P V 抗原 M 2 - 1、h M P V 抗原 F、h M P V 抗原 N 及び A d V 抗原 H e x o n、A d V 抗原 P e n t o n 及びそれらの組み合わせからなる群のうち 1 つ以上又は全てを含み得る。さらなる抗原は、いくつかの実施形態では、1 つ以上のコロナウイルス抗原を含み得る。例えば、さらなる抗原は、1 つ以上のコロナウイルス (例えば S A R S - C o V 又は S A R S - C o V 2) 抗原を含み得る。いくつかの実施形態では、コロナウイルス抗原は、n s p 1 ; n s p 3 ; n s p 4 ; n s p 5 ; n s p 6 ; n s p 1 0 ; n s p 1 2 ; n s p 1 3 ; n s p 1 4 ; n s p 1 5 ; n s p 1 6 ; スパイク (S) ; エンベロープタンパク質 (E) ; マトリクスタンパク質 (M) ; ヌクレオカプシドタンパク質 (N) からなる群から選択される 1 つ以上の S A R S - C o V 2 抗原を含む。いくつかの実施形態では、S A R S - C o V 2 抗原は、S A R S - C o V - 2 (A P 3 A) ; S A R S - C o V - 2 (N S 7) ; S A R S - C o V - 2 (N S 8) ; S A R S - C o V - 2 (O R F 1 0) ; S A R S - C o V - 2 (O R F 9 B) ; 及び S A R S - C o V - 2 (Y 1 4) からなる群から選択される 1 つ以上の抗原をさらに含む。

20

30

【 0 0 4 6 】

さらなる抗原は、いくつかの実施形態では、さらに又は代替的に、E B V、C M V、A d V、B K、J C ウイルス、H H V 6、R S V、インフルエンザ、パラインフルエンザ、ボカウイルス、ライノウイルス、コロナウイルス、L C M V、流行性耳下腺炎、麻疹、ヒトメタニューモウイルス、パルボウイルス B、ロタウイルス、メルケル細胞ウイルス、単純ヘルペスウイルス、H P V、H I V、H T L V 1、H H V 8、C 型肝炎、B 型肝炎、H T L V 1 及びウエストナイルウイルス、ジカウイルス、エボラから選択されるウイルス由来であり得る。いくつかの実施形態では、E B V 抗原は、L M P 2、E B N A 1、B Z L F 1 及びそれらの組み合わせ由来である。いくつかの実施形態では、C M V 抗原は、I E 1、p p 6 5 及びそれらの組み合わせ由来である。いくつかの実施形態では、アデノウイルス抗原は、H e x o n、P e n t o n 及びそれらの組み合わせ由来である。いくつかの実施形態では、B K ウイルス抗原は、V P 1、ラーゲ T 及びそれらの組み合わせ由来である。いくつかの実施形態では、H H V 6 抗原は、U 9 0、U 1 1、U 1 4 及びそれらの組み合わせ由来である。

40

50

【 0 0 4 7 】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのペプミックスは、RSV、インフルエンザ、PIV又はhMPV由来の抗原（又は抗原の一部）をカバーする。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのペプミックスは、RSV、インフルエンザ、PIV、hMPV、コロナウイルス（例えばSARS-CoV又はSARS-CoV2）又はそれらの組み合わせに由来する抗原（又は抗原の一部）をカバーする。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのペプミックスは、RSV、インフルエンザ、PIV3、hMPV又はそれらの組み合わせ由来の抗原（又は抗原の一部）をカバーする。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのペプミックスは、RSV、インフルエンザ、PIV3、hMPV、コロナウイルス（例えばSARS-CoV又はSARS-CoV2）又はそれらの組み合わせ由来の抗原（又は抗原の一部）をカバーする。

10

【 0 0 4 8 】

いくつかの実施形態では、第1の抗原はPIV抗原である。例えば、いくつかの実施形態では、第1の抗原はPIV抗原Mであり得る。いくつかの実施形態では、第1の抗原はPIV抗原HNであり得る。いくつかの実施形態では、第1の抗原はPIV抗原Nであり得る。いくつかの実施形態では、第1の抗原はPIV抗原Fであり得る。いくつかの実施形態では、第1の抗原は、PIV抗原M、PIV抗原HN、PIV抗原N及びPIV抗原Fの何らかの組み合わせであり得る。いくつかの実施形態では、本組成物は1つの第1の抗原を含み得る。いくつかの実施形態では、本組成物は2つの第1の抗原を含み得る。いくつかの実施形態では、本組成物は3つの第1の抗原を含み得る。いくつかの実施形態では、本組成物は4つの第1の抗原を含み得る。いくつかの実施形態では、4つの第1の抗原は、PIV抗原M、PIV抗原HN、PIV抗原N及びPIV抗原Fを含み得る。

20

【 0 0 4 9 】

いくつかの実施形態では、第1の抗原はPIV3抗原である。例えば、いくつかの実施形態では、第1の抗原はPIV3抗原Mであり得る。いくつかの実施形態では、第1の抗原はPIV3抗原HNであり得る。いくつかの実施形態では、第1の抗原はPIV3抗原Nであり得る。いくつかの実施形態では、第1の抗原はPIV3抗原Fであり得る。いくつかの実施形態では、第1の抗原は、PIV3抗原M、PIV3抗原HN、PIV3抗原N及びPIV3抗原Fの何らかの組み合わせであり得る。いくつかの実施形態では、本組成物は1つの第1の抗原を含み得る。いくつかの実施形態では、本組成物は2つの第1の抗原を含み得る。いくつかの実施形態では、本組成物は3つの第1の抗原を含み得る。いくつかの実施形態では、本組成物は4つの第1の抗原を含み得る。いくつかの実施形態では、4つの第1の抗原は、PIV3抗原M、PIV3抗原HN、PIV3抗原N及びPIV3抗原Fを含み得る。

30

【 0 0 5 0 】

いくつかの実施形態では、1つ以上の第2のウイルスはRSVであり得る。いくつかの実施形態では、1つ以上の第2のウイルスはインフルエンザであり得る。いくつかの実施形態では、1つ以上の第2のウイルスはhMPVであり得る。いくつかの実施形態では、1つ以上の第2のウイルスは、RSV、インフルエンザ及びhMPVを含み得る。いくつかの実施形態では、1つ以上の第2のウイルスは、RSV、インフルエンザ及びhMPVからなり得る。いくつかの実施形態では、1つ以上の第2のウイルスは、本明細書中に記載のような何れかの適切なウイルスから選択され得る。

40

【 0 0 5 1 】

いくつかの実施形態では、本組成物は、2又は3つの第2のウイルスを含み得る。いくつかの実施形態では、本組成物は、3つの第2のウイルスを含み得る。いくつかの実施形態では、この3つの第2のウイルスは、インフルエンザ、RSV及びhMPVを含み得る。いくつかの実施形態では、本組成物は、各第2のウイルスあたり少なくとも2つの第2の抗原を含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、1つの第2の抗原を含む。いくつかの実施形態では、本組成物は2つの第2の抗原を含む。いくつかの実施形態では、本組成物は3つの第2の抗原を含む。いくつかの実施形態では、本組成物は4つの第2の抗原

50

を含む。いくつかの実施形態では、本組成物は5つの第2の抗原を含む。いくつかの実施形態では、本組成物は6つの第2の抗原を含む。いくつかの実施形態では、本組成物は7つの第2の抗原を含む。いくつかの実施形態では、本組成物は8個の第2の抗原を含む。いくつかの実施形態では、本組成物は9個の第2の抗原を含む。いくつかの実施形態では、本組成物は10個の第2の抗原を含む。いくつかの実施形態では、本組成物は11個の第2の抗原を含む。いくつかの実施形態では、本組成物は12個の第2の抗原を含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、本明細書中に記載のような本組成物に適した何れかの数の第2の抗原を含む。

【0052】

いくつかの実施形態では、第2の抗原はインフルエンザ抗原NP1であり得る。いくつかの実施形態では、第2の抗原はインフルエンザ抗原MP1であり得る。一部の実施形態では、第2の抗原はRSV抗原Nであり得る。一部の実施形態では、第2の抗原はRSV抗原Fであり得る。一部の実施形態では、第2の抗原はhMPV抗原Mであり得る。一部の実施形態では、第2の抗原はhMPV抗原M2-1であり得る。いくつかの実施形態では、第2抗原は、hMPV抗原Fであり得る。いくつかの実施形態では、第2抗原は、hMPV抗原Nであり得る。いくつかの実施形態では、第2の抗原は、インフルエンザ抗原NP1、インフルエンザ抗原MP1、RSV抗原N、RSV抗原F、hMPV抗原M、hMPV抗原M2-1、hMPV抗原F及びhMPV抗原Nの何れかの組み合わせであり得る。

10

【0053】

いくつかの実施形態では、第2の抗原はインフルエンザ抗原NP1を含む。いくつかの実施形態では、第2の抗原はインフルエンザ抗原MP1を含む。いくつかの実施形態では、いくつかの実施形態では、第2の抗原は、インフルエンザ抗原NP1及びインフルエンザ抗原MP1の両方を含む。いくつかの実施形態では、第2の抗原はRSV抗原Nを含む。いくつかの実施形態では、第2の抗原はRSV抗原Fを含む。いくつかの実施形態では、第2の抗原は、RSV抗原N及びRSV抗原Fの両方を含む。

20

【0054】

いくつかの実施形態では、第2の抗原はhMPV抗原Mを含む。いくつかの実施形態では、第2の抗原はhMPV抗原M2-1を含む。いくつかの実施形態では、第2の抗原はhMPV抗原Fを含む。いくつかの実施形態では、第2の抗原はhMPV抗原Nを含む。いくつかの実施形態では、第2の抗原は、hMPV抗原M、hMPV抗原M2-1、hMPV抗原F及びhMPV抗原Nの組み合わせを含む。

30

【0055】

いくつかの実施形態では、第2の抗原は、インフルエンザ抗原NP1、インフルエンザ抗原MP1、RSV抗原N、RSV抗原F、hMPV抗原M、hMPV抗原M2-1、hMPV抗原F及びhMPV抗原Nのそれぞれを含む。いくつかの実施形態では、複数の抗原は、PIV抗原M、PIV抗原HN、PIV抗原N、PIV抗原F、インフルエンザ抗原NP1、インフルエンザ抗原MP1、RSV抗原N、RSV抗原F、hMPV抗原M、hMPV抗原M2-1、hMPV抗原F及びhMPV抗原Nを含む。いくつかの実施形態では、複数の抗原は、PIV抗原M、PIV抗原HN、PIV抗原N、PIV抗原F、インフルエンザ抗原NP1、インフルエンザ抗原MP1、RSV抗原N、RSV抗原F、hMPV抗原M、hMPV抗原M2-1、hMPV抗原F及びhMPV抗原Nからなる。いくつかの実施形態では、複数の抗原は、基本的に、PIV抗原M、PIV抗原HN、PIV抗原N、PIV抗原F、インフルエンザ抗原NP1、インフルエンザ抗原MP1、RSV抗原N、RSV抗原F、hMPV抗原M、hMPV抗原M2-1、hMPV抗原F及びhMPV抗原Nからなる。いくつかの実施形態では、第2の抗原は、本明細書中に記載のような組成物に対する何らかの適切な抗原を含み得る。

40

【0056】

いくつかの実施形態では、第2の抗原は、インフルエンザ抗原NP1、インフルエンザ抗原MP1、RSV抗原N、RSV抗原F、hMPV抗原M、hMPV抗原M2-1、h

50

M P V 抗原 F 及び h M P V 抗原 N のそれぞれを含む。いくつかの実施形態では、複数の抗原は、P I V 3 抗原 M、P I V 3 抗原 H N、P I V 3 抗原 N、P I V 3 抗原 F、インフルエンザ抗原 N P 1、インフルエンザ抗原 M P 1、R S V 抗原 N、R S V 抗原 F、h M P V 抗原 M、h M P V 抗原 M 2 - 1、h M P V 抗原 F 及び h M P V 抗原 N を含む。いくつかの実施形態では、複数の抗原は、P I V 3 抗原 M、P I V 3 抗原 H N、P I V 3 抗原 N、P I V 3 抗原 F、インフルエンザ抗原 N P 1、インフルエンザ抗原 M P 1、R S V 抗原 N、R S V 抗原 F、h M P V 抗原 M、h M P V 抗原 M 2 - 1、h M P V 抗原 F 及び h M P V 抗原 N からなる。いくつかの実施形態では、複数の抗原は、基本的に、P I V 3 抗原 M、P I V 3 抗原 H N、P I V 3 抗原 N、P I V 3 抗原 F、インフルエンザ抗原 N P 1、インフルエンザ抗原 M P 1、R S V 抗原 N、R S V 抗原 F、h M P V 抗原 M、h M P V 抗原 M 2 - 1、h M P V 抗原 F 及び h M P V 抗原 N からなる。いくつかの実施形態では、第 2 の抗原は、本明細書中に記載のような組成物に対する何らかの適切な抗原を含み得る。

10

【 0 0 5 7 】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される組成物中の V S T は、P B M C を複数のペプミックスライブラリと接触させることによって作製される。いくつかの実施形態では、各ペプミックスライブラリは、ウイルス抗原の少なくとも一部にまたがる複数の重複ペプチドを含有する。いくつかの実施形態では、複数のペプミックスライブラリの少なくとも 1 つは、P I V 由来の第 1 の抗原にまたがる。いくつかの実施形態では、複数のペプミックスライブラリの少なくとも 1 つは、P I V 3 由来の第 1 の抗原にまたがる。いくつかの実施形態では、複数のペプミックスライブラリのうちの少なくとも 1 つのさらなるペプミックスライブラリは、各第 2 抗原にまたがる。

20

【 0 0 5 8 】

いくつかの実施形態では、本明細書中で開示される V S T は、少なくとも 1 つの D N A プラスミドでヌクレオフェクトされた樹状細胞 (D C) などの抗原提示細胞 (A P C) と T 細胞を接触させることによって作製される。いくつかの実施形態では、D N A プラスミドは、1 つの抗原の少なくとも一部をコードし得る。いくつかの実施形態では、D N A プラスミドは P I V 抗原 (例えば P I V 3 抗原) をコードし得る。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの D N A プラスミドは、各第 2 の抗原をコードする。いくつかの実施形態では、プラスミドは、少なくとも 1 つの P I V 抗原及び少なくとも 1 つの第 2 抗原をコードする。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載の組成物は、C D 4 + T リンパ球及び C D 8 + T リンパ球を含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、T 細胞受容体を発現する V S T を含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、M H C 拘束性 V S T を含む。

30

【 0 0 5 9 】

いくつかの実施形態では、本開示は、インフルエンザ、R S V、h M P V、P I V 及び 1 つ以上のさらなるウイルスから選択される 1 つ以上の呼吸器ウイルスに対する特異性がある複数の呼吸器ウイルスに特異的な T 細胞 (マルチ - R - V S T) を提供する。P I V 抗原は P I V 3 由来であり得る。例えば、いくつかの例において、さらなるウイルスは、コロナウイルスを含む。コロナウイルスは、アルファコロナウイルスであり得る。例えば、特定の実施形態では、アルファコロナウイルスは、H C o V - E 2 2 9、H C o V - N L 6 3 及びそれらの組み合わせから選択される。特定の実施形態では、アルファコロナウイルスは、H C o V - E 2 2 9 及び H C o V - N L 6 3 のそれぞれを含む。コロナウイルスはベータコロナウイルスであり得る。例えば、特定の実施形態では、ベータコロナウイルスは、S A R S - C o V、S A R S - C o V 2、M E R S - C o V、H C o V - H K U 1、H C o V - O C 4 3 及びそれらの組み合わせから選択される。特定の実施形態では、ベータコロナウイルスは、S A R S - C o V、S A R S - C o V 2、M E R S - C o V、H C o V - H K U 1、H C o V - O C 4 3 のそれぞれ及びそれらの組み合わせを含む。いくつかの例では、さらなるウイルスはアデノウイルスを含む。いくつかの例では、さらなるウイルスは、E B V、C M V、A d V、B K、J C ウイルス、H H V 6、ボカウイルス、ライノウイルス、コロナウイルス、L C M V、流行性耳下腺炎、麻疹、パルボウイルス

40

50

B、ロタウイルス、メルケル細胞ウイルス、単純ヘルペスウイルス、HPV、HIV、HTLV1、HHV8、C型肝炎、B型肝炎、HTLV1、ウエストナイルウイルス、ジカウイルス、エボラ及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。

【0060】

一実施形態では、本開示は、インフルエンザ、RSV、hMPV、PIV及びコロナウイルス（例えばSARS-CoV2）に対する特異性を有するマルチR-VSTを提供する。一実施形態では、本開示は、インフルエンザ、RSV、hMPV、PIV、1つ以上のAdV及びコロナウイルス（例えばSARS-CoV又はSARS-CoV2）に対する特異性を有するマルチR-VSTを提供する。一実施形態では、本開示は、インフルエンザ、RSV、hMPV、PIV3及びコロナウイルス（例えばSARS-CoV2）に対する特異性を有するマルチR-VSTを提供する。一実施形態では、本開示は、インフルエンザ、RSV、hMPV、PIV3、1つ以上のAdV及びコロナウイルス（例えばSARS-CoV又はSARS-CoV2）に対する特異性を有するマルチR-VSTを提供する。

10

【0061】

いくつかの実施形態では、VSTは、IL-7及びIL-4の両方の存在下でエクスピボで培養し得る。いくつかの実施形態では、マルチウイルスVSTは、患者への投与のための準備ができるように、培養の9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、14日間、15日間、16日間、17日間、18日間、19日間、20日間（その間の全ての範囲及び部分範囲を含む）以内に十分に増殖した。典型的な製造実行（上記条件での培養／増殖）は、10～18日間、より典型的には14～16日間である。いくつかの実施形態では、マルチウイルスVSTは、本明細書中に記載のような組成物に適した何れかの日数内に十分に増殖した。

20

【0062】

本開示は、無視できるアロ反応性を示すVSTを含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本組成物は、患者から回収された抗原特異的T細胞の活性化誘導細胞死が、同じ患者から回収された対応する抗原特異的T細胞よりも少ないVSTを含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、IL-7及びIL-4の両方の存在下で培養されない。いくつかの実施形態では、VSTを含む組成物は、70%を超える生存率を示す。

【0063】

いくつかの実施形態では、本組成物は、培養下で少なくとも1日間、少なくとも2日間、少なくとも3日間、少なくとも4日間、少なくとも5日間、少なくとも6日間、少なくとも7日間、少なくとも8日間、少なくとも9日間、少なくとも10日間、細菌及び真菌に対して陰性である。いくつかの実施形態では、本組成物は、培養中少なくとも7日間、細菌及び真菌に対して陰性である。いくつかの実施形態では、本組成物は、1EU/ml未満、2EU/ml未満、3EU/ml未満、4EU/ml未満、5EU/ml未満、6EU/ml未満、7EU/ml未満、8EU/ml未満、9EU/ml未満、10EU/ml未満のエンドトキシンを示す。いくつかの実施形態では、本組成物は、5EU/ml未満のエンドトキシンを示す。いくつかの実施形態では、本組成物はマイコプラズマに対して陰性である。

30

40

【0064】

いくつかの実施形態では、VSTのポリクローナルを構築するために使用されるペプミックスは化学合成される。いくつかの実施形態では、ペプミックスは、任意選択的に、>10%、>20%、>30%、>40%、>50%、>60%、>70%、>80%又は>90%（これらの間の全ての範囲及び部分範囲を含む）の純度である。いくつかの実施形態では、ペプミックスは、任意選択的に>90%の純度である。

【0065】

いくつかの実施形態では、VSTはTh1極性化されている。いくつかの実施形態では、VSTはウイルス抗原発現標的細胞を溶解させることが可能である。いくつかの実施形態では、VSTは、他の適切なタイプの抗原発現標的細胞を溶解させることが可能である

50

。いくつかの実施形態では、本組成物中のV S Tは、非感染自己標的細胞を顕著に溶解させない。いくつかの実施形態では、本組成物中のV S Tは、非感染自己同種異系標的細胞を顕著に溶解させない。

【0066】

本開示は、静脈内送達のために処方される何らかの組成物を含む医薬組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本組成物は、培養中、少なくとも1日間、少なくとも2日間、少なくとも3日間、少なくとも4日間、少なくとも5日間、少なくとも6日間、少なくとも7日間、少なくとも8日間、少なくとも9日間、少なくとも10日間、細菌に対して陰性である。いくつかの実施形態では、本組成物は、培養中少なくとも7日間、細菌に対して陰性である。いくつかの実施形態では、本組成物は、培養中、少なくとも1日間、少なくとも2日間、少なくとも3日間、少なくとも4日間、少なくとも5日間、少なくとも6日間、少なくとも7日間、少なくとも8日間、少なくとも9日間、少なくとも10日間、真菌に対して陰性である。いくつかの実施形態では、本組成物は、培養中少なくとも7日間、真菌に対して陰性である。

10

【0067】

いくつかの実施形態では、本医薬組成物は、1 EU/ml未満、2 EU/ml未満、3 EU/ml未満、4 EU/ml未満、5 EU/ml未満、6 EU/ml未満、7 EU/ml未満、8 EU/ml未満、9 EU/ml未満、10 EU/ml未満のエンドトキシンを示す。一部の実施形態では、本医薬組成物はマイコプラズマに対して陰性である。

【0068】

本開示はまた、本明細書中で開示されるV S T（例えば、PIV、インフルエンザ、RSV及びhMPVに対する特異性を有する本明細書中で開示されるマルチR - V S Tなど）の1つ以上の有効量を対象に投与することを含む、ウイルス感染を処置又は予防する方法も提供する。本開示はまた、本明細書中で開示されるV S Tの何れか（例えば、PIV、インフルエンザ、RSV及びhMPVに対する特異性を有する本明細書中で開示されるマルチR - V S Tなど）を含む組成物（例えば医薬組成物）及び本明細書中で開示されるV S Tを含むそのような医薬組成物の1つ以上の有効用量を対象に投与することを含む、ウイルス感染を処置又は予防する方法も提供する。

20

ペプミックスライブラリの作製

【0069】

本開示のいくつかの実施形態では、ペプチドのライブラリをPBMCに提供して、最終的にV S Tを作製する。ライブラリは、特定の場合には、同じ抗原の一部又は全部に及ぶペプチドの混合物（「ペプミックス」）を含む。本開示で利用されるペプミックスは、特定の態様では、15アミノ酸長であり、互いに11アミノ酸重複するペプチドを含む市販のペプチドライブラリからのものであり得る。一部の 경우에는、それらは合成により作製され得る。例としては、JPT Technologies (Springfield, VA) 又はMiltenyi Biotec (Auburn, CA) からのものが挙げられる。特定の実施形態では、ペプチドは、例えば、少なくとも7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34又は35以上のアミノ酸長であり、特定の実施形態では、例えば、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33又は34アミノ酸長の重複がある。

30

40

【0070】

いくつかの実施形態では、ペプミックスで使用されるアミノ酸は、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99、少なくとも99.9%（それらの間の全ての範囲及び部分範囲を含む）の純度

50

を有する。いくつかの実施形態では、ペプミックス中でここで使用されるアミノ酸は、少なくとも70%の純度を有する。

【0071】

異なるペプチドの混合物は、異なるペプチドの何れかの比を含み得るが、いくつかの実施形態では、各特定のペプチドは、別の特定のペプチドと実質的に同じ数で混合物中に存在する。広範な特異性を有するマルチウイルス細胞傷害性T細胞のためのペプミックスを調製及び産生する方法は、その全体において参照により組み込まれる米国特許出願公開第2018/0187152号明細書に記載されている。

VSTの作製

【0072】

いくつかの実施形態では、VSTを作製する方法は、ドナーから得られた血液から、単核細胞(MNC)を単離するか、又は単離されたMNCを有することを含む。いくつかの実施形態では、MNCはPBMCである。MNC及びPBMCは、当業者に公知の方法を使用することによって単離される。例として、PBMCを単離するために密度遠心分離(勾配)(Ficoll-Paque)を使用し得る。他の例では、新たに採取した血液を含む細胞調製チューブ(CPT)及びSepMateチューブをPBMCの単離に使用し得る。

【0073】

いくつかの実施形態では、MNCはPBMCである。例として、PBMCは、リンパ球、単球及び樹状細胞を含み得る。例として、リンパ球は、T細胞、B細胞及びNK細胞を含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書中で使用される場合のMNCは、培養されるか又は凍結保存される。いくつかの実施形態では、細胞を培養又は凍結保存する工程は、抗原特異的T細胞を刺激し、増殖させるために、適切な培養条件下で培養中の細胞を1つ(又はその一部)又は複数の抗原と接触させることを含み得る。いくつかの実施形態では、1つ以上の抗原は1つ以上のウイルス抗原を含み得る。

【0074】

いくつかの実施形態では、細胞を培養又は凍結保存する工程は、適切な培養条件下で培養中の細胞を1つ以上の抗原からの1つ以上のエピトープと接触させることを含み得る。いくつかの実施形態では、1つ以上の抗原、又は1つ以上の抗原からの1つ以上のエピトープとMNC又はPBMCを接触させることは、個々のドナーのMNC又はPBMCのそれぞれに由来する抗原特異的T細胞のポリクローナル集団を刺激し、増殖させる。いくつかの実施形態では、抗原特異的T細胞株は凍結保存され得る。

【0075】

いくつかの実施形態では、1つ以上の抗原は、タンパク質全体の形態であり得る。いくつかの実施形態では、1つ以上の抗原は、各抗原の配列の一部又は全部にまたがる一連の重複ペプチドを含むペプミックスであり得る。いくつかの実施形態では、1つ以上の抗原は、タンパク質全体及び、各抗原の配列の一部又は全部にまたがる一連の重複ペプチドを含むペプミックスとの組み合わせであり得る。

【0076】

いくつかの実施形態では、PBMC又はMNCの培養は、ガス透過性培養表面を含む容器で行われる。一実施形態では、容器は、ガス透過性部分を有する注入バッグ又は剛性容器である。一実施形態では、容器はG-Rex(登録商標)バイオリアクターである。一実施形態では、容器は、本明細書中に記載のようなPBMC又はMNCを培養するのに適切である何らかの容器、バイオリアクターなどであり得る。

【0077】

いくつかの実施形態では、PBMC又はMNCは、1つ以上のサイトカインの存在下で培養される。いくつかの実施形態では、サイトカインはIL4である。いくつかの実施形態では、サイトカインはIL7である。いくつかの実施形態では、サイトカインは、IL4及びIL7である。いくつかの実施形態では、サイトカインは、IL4及びIL7を含むが、IL2を含まない。いくつかの実施形態では、サイトカインは、本明細書中に記載

10

20

30

40

50

の P B M C 又は M N C の培養に適切であるサイトカインの何らかの組み合わせであり得る。

【 0 0 7 8 】

いくつかの実施形態では、M N C 又は P B M C の培養は、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 又はそれを超える異なるペプミックスの存在下であり得る。複数のペプチドであるペプミックスは、抗原の配列の一部又は全体に及ぶ一連の重複ペプチドを含む。いくつかの実施形態では、M N C 又は P B M C は、複数のペプミックスの存在下で培養され得る。この場合、各ペプミックスは、複数のペプミックス中の他のペプミックスのそれぞれによってカバーされる抗原とは異なる少なくとも 1 つの抗原をカバーする。いくつかの実施形態では、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 又はそれを超える抗原が、複数のペプミックスによってカバーされる。いくつかの実施形態では、少なくとも 2 つの異なるウイルス由来の少なくとも 1 つの抗原が、複数のペプミックスによってカバーされる。

10

【 0 0 7 9 】

いくつかの実施形態では、ペプミックスは 15 m e r のペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ペプミックスは、本明細書中に記載の方法に適切であるペプチドを含む。いくつかの実施形態では、抗原にまたがるペプミックス中のペプチドは、8 アミノ酸、9 アミノ酸、10 アミノ酸、11 アミノ酸、12 アミノ酸、13 アミノ酸、14 アミノ酸、15 アミノ酸の配列で重複する。いくつかの実施形態では、抗原にまたがるペプミックス中のペプチドは、配列が 11 アミノ酸重複する。

20

【 0 0 8 0 】

いくつかの実施形態では、P B M C 又は M N C は、インフルエンザ A 抗原 N P 1 及びインフルエンザ A 抗原 M P 1、R S V 抗原 N 及び F、h M P V 抗原 F、N、M 2 - 1 及び M 並びに P I V 抗原 M、H N、N 及び F にまたがるペプミックスの存在下で培養される。いくつかの実施形態では、P B M C 又は M N C は、インフルエンザ A 抗原 N P 1 及びインフルエンザ A 抗原 M P 1、R S V 抗原 N 及び F、h M P V 抗原 F、N、M 2 - 1 及び M 及び P I V 抗原 M、H N、N 及び F、及び本明細書中で開示される 1 つ以上のコロナウイルス（例えば S A R S - C o V 又は S A R S - C o V 2）抗原にまたがるペプミックスの存在下で培養される。いくつかの実施形態では、P B M C 又は M N C は、E B V 抗原 L M P 2、E B N A 1、及び B Z L F 1、C M V 抗原 I E 1 及び p p 6 5、アデノウイルス抗原 H e x o n 及び P e n t o n、B K ウイルス抗原 V P 1 及び ラージ T 及び H H V 6 抗原 U 9 0、U 1 1 及び U 1 4 にまたがるペプミックスの存在下で培養される。いくつかの実施形態では、抗原特異的 T 細胞は、抗原特異的細胞傷害性について試験される。

30

【 0 0 8 1 】

本開示は、標的細胞を本明細書中に記載の組成物又は医薬組成物と接触させることを含む、標的細胞を溶解させる方法を提供する。いくつかの実施形態では、標的細胞と組成物又は医薬組成物との間の接触は、対象においてインビボで行われる。いくつかの実施形態では、標的細胞と組成物又は医薬組成物との間の接触は、対象への V S T の投与を介してインビボで行われる。いくつかの実施形態では、対象はヒトである。

【 0 0 8 2 】

本開示は、ウイルス感染の処置又は予防を必要とする対象に、本明細書中に記載の組成物又は医薬組成物を投与することを含む、ウイルス感染を処置又は予防する方法を提供する。いくつかの実施形態では、V S T は、 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^9$ V S T / m²、 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^8$ V S T / m²、 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^7$ V S T / m²、 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^8$ V S T / m²、 $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^9$ V S T / m²（その間の全ての範囲及び部分範囲を含む）で対象に投与される。いくつかの実施形態では、V S T は対象に投与される。いくつかの実施形態では、対象は免疫無防備状態である。いくつかの実施形態では、P I V 感染を有する対象に、P I V、R S V、h M P V 及びインフルエンザに特異的な本明細書中で開示されるマルチ R - V S T を投与する。いくつかの実施形態では、マルチ R - V S T は、それらが作製されるウイルスとは異なるウイルス感染に対して有効であるような

40

50

交差特異性を有する。例えば、例により限定されるものではないが、いくつかの実施形態では、マルチ R - V S T 中の P I V 特異的 V S T は、P I V 3 抗原に対して作製される。いくつかの実施形態では、処置される P I V 感染は P I V 3 である。いくつかの実施形態では、処置される P I V 感染は、P I V 3 以外の血清型である。いくつかの実施形態では、R S V 感染を有する対象に、P I V、R S V、h M P V 及びインフルエンザに特異的な本明細書中で開示されるマルチ R - V S T を投与する。いくつかの実施形態では、h M P V 感染を有する対象に、P I V、R S V、h M P V 及びインフルエンザに特異的な本明細書中で開示されるマルチ R - V S T を投与する。いくつかの実施形態では、インフルエンザ感染を有する対象に、P I V、R S V、h M P V 及びインフルエンザに特異的な本明細書中で開示されるマルチ R - V S T を投与する。いくつかの実施形態では、コロナウイルス（例えば S A R S - C o V 又は S A R S - C o V 2）感染を有する対象に、P I V、R S V、h M P V、インフルエンザ及びコロナウイルス（例えば S A R S - C o V 又は S A R S - C o V 2）に特異的な本明細書中で開示されるマルチ R - V S T を投与する。

【 0 0 8 3 】

いくつかの実施形態では、対象は、1 つ以上の医学的状態を有し得る。いくつかの実施形態では、対象は、V S T を受ける前に、強度軽減前処理を行って、適合血縁ドナー移植を受ける。いくつかの実施形態では、対象は、V S T を受ける前に骨髄破壊的前処置を行って、適合非血縁ドナー移植を受ける。いくつかの実施形態では、対象は、V S T を受ける前に強度軽減前処置を行って、ハプロ一致移植を受ける。いくつかの実施形態では、対象は、V S T を受ける前に骨髄破壊的前処置を行って、適合血縁ドナー移植を受ける。いくつかの実施形態では、対象は固形臓器移植を受けたことがある。いくつかの実施形態では、対象は化学療法を受けたことがある。いくつかの実施形態では、対象は H I V 感染を有する。いくつかの実施形態では、対象は遺伝的免疫不全を有する。いくつかの実施形態では、対象は同種異系幹細胞移植を受けたことがある。いくつかの実施形態では、対象は、よりウイルス感染し易くなる、及び / 又はウイルス感染後に顕著な有害転帰を有するようになる既存の状態を有する。例えば、いくつかの実施形態では、対象は心血管系疾患を有する。いくつかの実施形態では、対象は糖尿病を有する。いくつかの実施形態では、対象は慢性呼吸器疾患を有する。いくつかの実施形態では、対象は高血圧を有する。いくつかの実施形態では、対象は癌を有する。いくつかの実施形態では、対象は肥満である。いくつかの実施形態では、対象は高齢者である。いくつかの実施形態では、対象は、この段落に記載されるような複数の医学的状態を有する。いくつかの実施形態では、対象は、この段落に記載されるような全ての医学的状態を有する。いくつかの実施形態では、患者は、コロナウイルス（例えば S A R S - C o V 又は S A R S - C o V 2）に感染している。いくつかの実施形態では、患者は C O V I D - 1 9 と診断されている。いくつかの実施形態では、患者は免疫無防備状態である。本明細書中で使用される場合、免疫無防備状態とは、免疫系が減弱していることを意味する。例えば、免疫無防備状態の患者は、感染症及び他の疾患と戦う能力が低下している。いくつかの実施形態では、患者は、その疾患もしくは状態又は別の疾患もしくは状態を処置するために患者が受けた処置に起因して免疫無防備状態にある。いくつかの実施形態では、免疫無防備状態の原因は年齢によるものである。一実施形態では、免疫無防備状態の原因は、若齢であることに起因する。一実施形態では、免疫無防備状態の原因は、高齢であることに起因する。いくつかの実施形態では、患者は移植療法を必要としている。いくつかの実施形態では、対象は、コロナウイルス（例えば S A R S - C o V 又は S A R S - C o V 2）による感染以外の他の医学的状態を有しない。いくつかの実施形態では、対象は急性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病又は慢性肉芽腫性疾患を有する。

【 0 0 8 4 】

いくつかの実施形態では、治療有効性は、V S T 細胞株の投与後に測定される。他の実施形態では、治療有効性は、感染のウイルス血症回復に基づいて測定される。他の実施形態では、治療有効性は、感染のビルリック (v i r u r i c) 回復に基づいて測定される。他の実施形態では、治療有効性は、患者からの試料中のウイルス量の消散に基づいて測

10

20

30

40

50

定される。他の実施形態では、治療有効性は、肺における疾患の回復を追跡するための胸部画像を介して測定される。いくつかの実施形態では、試料は鼻腔スワブに由来する。他の実施形態では、治療有効性は、感染のウイルス血症回復、感染のビルリック (v i r u r i c) 回復及び患者からの試料中のウイルス量の消散に基づいて測定される。いくつかの実施形態では、治療有効性は、患者の末梢血中で検出可能なウイルス量を監視することによって測定される。いくつかの実施形態では、治療有効性は、肉眼的血尿の解消を含む。いくつかの実施形態では、治療有効性は、患者及び／又は臨床医によって報告される転帰を調べる C T C A E - P R O 又は同様の評価ツールによって測定される場合の出血性膀胱炎の症状の軽減を含む。

【 0 0 8 5 】

いくつかの実施形態では、試料は、患者由来の組織試料から選択される。いくつかの実施形態では、試料は、患者由来の体液試料から選択される。いくつかの実施形態では、試料は、患者由来の脳脊髄液 (C S F) から選択される。いくつかの実施形態では、試料は、患者由来の B A L から選択される。いくつかの実施形態では、試料は、患者由来の糞便から選択される。

【 0 0 8 6 】

いくつかの実施形態では、本明細書中に記載のような組成物は、対象に複数回投与される。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載のような組成物は、対象に 1 回を超えて投与される。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載のような組成物は、2 回を超えて対象に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載のような組成物は、3 回を超えて対象に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載のような組成物は、4 回を超えて対象に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載のような組成物は、5 回を超えて対象に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載のような組成物は、6 回を超えて対象に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載のような組成物は、7 回を超えて対象に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載のような組成物は、8 回を超えて対象に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載のような組成物は、対象に 9 回を超えて投与される。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載のような組成物は、対象に 10 回を超えて投与される。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載のような組成物は、対象にとって適切な回数、対象に投与される。組成物の複数回投与が個体に提供される場合、投与間の期間は、1 ~ 24 時間、1 ~ 7 日、1 ~ 4 週間、1 ~ 12 ヶ月、又はそれより長く、それらの間の全ての範囲及び部分範囲を含め、何れかの適切な長さであり得る。

【 0 0 8 7 】

いくつかの実施形態では、V S T のポリクローナル集団 (例えばマルチ R - V S T) を含む本明細書中に記載の 2 つ以上の組成物を組み合わせて対象に投与する。2 つ以上の組成物を連続的に又は同時に対象に投与し得る。2 つ以上の組成物をプールし、単一の組成物として投与し得る。2 つ以上の組成物を別々の組成物として別々の時点で投与し得る。一実施形態では、P I V、インフルエンザ、R S V 及び h M P V に特異性を有する V S T のポリクローナル集団を含む第 1 のマルチ R - V S T 組成物を対象に投与し、別のウイルスに特異性を有する V S T のポリクローナル集団を含む第 2 の別個の V S T 組成物も対象に投与する。特定の実施形態では、他のウイルスは、コロナウイルス (例えば S A R S - C o V 2) である。いくつかの実施形態では、P I V、インフルエンザ、R S V、及び h M P V に特異性を有する V S T のポリクローナル集団を含む第 1 のマルチ R - V S T 組成物のプールと、別のウイルスに特異性を有する V S T のポリクローナル集団を含む第 2 の V S T 組成物と、を含む単一の組成物を対象に投与する。特定の実施形態では、他のウイルスは、コロナウイルス (例えば S A R S - C o V 2) である。いくつかの実施形態では、他のウイルスは、B V、C M V、A d V、B K、J C ウイルス、H H V 6、R S V、インフルエンザ、パラインフルエンザ、ボカウイルス、コロナウイルス、ライノウイルス、L C M V、流行性耳下腺炎、麻疹、h M P V、パルボウイルス B、ロタウイルス、メルケル細胞ウイルス、単純ヘルペスウイルス、H P V、H I V、H T L V 1、H H V 8、C 型

10

20

30

40

50

肝炎、B型肝炎、HTLV 1、単純ヘルペスウイルス、ウエストナイルウイルス、ジカウイルス及びエボラから選択される。

【0088】

いくつかの実施形態では、本組成物の投与は、対象におけるウイルス感染を効果的に処置又は予防する。いくつかの実施形態では、ウイルス感染はPIVである。いくつかの実施形態では、ウイルス感染はPIV3である。いくつかの実施形態では、ウイルス感染はRSVである。いくつかの実施形態では、ウイルス感染はインフルエンザである。いくつかの実施形態では、ウイルス感染はhMPVである。いくつかの実施形態では、ウイルス感染は、コロナウイルス（例えばSARS-CoV又はSARS-CoV2）である。いくつかの実施形態では、ウイルス感染はSARS-CoVである。いくつかの実施形態では、ウイルス感染はMERS-CoVである。いくつかの実施形態では、ウイルス感染はHCoV-HKU1である。いくつかの実施形態では、ウイルス感染は、及びHCoV-OC43である。いくつかの実施形態では、ウイルス感染はHCoV-E229である。いくつかの実施形態では、ウイルス感染はHCoV-NL63である。

10

【0089】

本開示は、複数のウイルス抗原を認識するVSTのポリクローナル集団を含む組成物を提供する。本開示は、複数のウイルス抗原が少なくとも1つの抗原を含むことを提供する。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの抗原は、コロナウイルス（例えばSARS-CoV又はSARS-CoV2）であり得る。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの抗原は、PIV由来であり得る。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの抗原は、RSV抗原であり得る。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの抗原は、インフルエンザ由来であり得る。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの抗原は、hMPV由来であり得る。

20

【0090】

いくつかの実施形態では、本開示は、PIV、RSV、インフルエンザ及びhMPVのそれぞれからの少なくとも1つの抗原を含む複数のウイルス抗原を認識するVSTのポリクローナル集団を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、PIV、RSV、インフルエンザ及びhMPVのそれぞれからの少なくとも2つの抗原を含む複数のウイルス抗原を含む複数のウイルス抗原を認識するVSTのポリクローナル集団を提供する。いくつかの実施形態では、複数の抗原は、PIV抗原M、PIV抗原HN、PIV抗原N、PIV抗原F、インフルエンザ抗原NP1、インフルエンザ抗原MP1、RSV抗原N、RSV抗原F、hMPV抗原M、hMPV抗原M2-1、hMPV抗原F及びhMPV抗原Nを含む。いくつかの実施形態では、複数の抗原は、PIV抗原M、PIV抗原HN、PIV抗原N、PIV抗原F、インフルエンザ抗原NP1、インフルエンザ抗原MP1、RSV抗原N、RSV抗原F、hMPV抗原M、hMPV抗原M2-1、hMPV抗原F及びhMPV抗原Nの何れかから選択され得る。いくつかの態様では、VSTのポリクローナル集団は、インフルエンザ、RSV、PIV及び/又はhMPVに感染した患者に投与される。

30

【0091】

本開示の少なくともいくつかの方法では、作製されたVSTを個体、例えば免疫無防備状態の個体に投与する。いくつかの場合、個体は、同種異系幹細胞移植を受けたことがあるか、又は有していることになる。特定の実施形態では、細胞は、例えば静脈内、筋肉内、皮内、皮下、腹腔内注射などの注射によって投与される。いくつかの実施形態では、個体はリンパ腫又は白血病を有する。いくつかの実施形態では、VSTは、ポリクローナルCD4+及びCD8+VSTとしてさらに定義される。PBMCは、個体に対して同種異系であってもよいし、又は個体に対して自己であってもよい。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、細胞分裂を刺激する1つ以上の組成物、例えばフィトヘマグルチニンなどにVSTを曝露する段階をさらに含み；いくつかの態様では、この化合物はマイトジェンである。

40

【0092】

50

いくつかの実施形態では、本開示は、静脈内送達のために処方される本明細書中に記載のような組成物を含む医薬組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書中で開示されるVSTの集団と、1つ以上の担体、賦形剤、希釈剤、緩衝剤及び/又は送達ビヒクルと、を含む医薬組成物を提供する。いくつかの特定の実施形態では、本開示は、静脈内送達のために処方される本明細書中に記載の1つ以上のVST組成物を含む医薬組成物を提供する。特定の実施形態では、静脈内送達のために処方される組成物は、それらの培養培地中で懸濁又は再懸濁される本明細書中で開示される増殖VSTの1つ以上を含み得る。静脈内送達のために処方される組成物は、追加的又は代替的に、適切な担体、賦形剤、希釈剤、緩衝剤及び/又は送達ビヒクル中で再懸濁される1つ又は増殖VSTを含み得る。特定の実施形態では、静脈内送達のために処方される組成物は、生理食塩水中で再懸濁される本明細書で開示される増殖VSTの1つ以上を含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載のような組成物は、細菌に対して陰性である。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載のような組成物は、真菌に対して陰性である。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載のような組成物は、培養下で、少なくとも1日間、少なくとも2日間、少なくとも3日間、少なくとも4日間、少なくとも5日間、少なくとも6日間、少なくとも7日間、少なくとも8日間、少なくとも9日間、少なくとも10日間、細菌又は真菌に対して陰性である。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載のような組成物は、培養下で少なくとも7日間、細菌又は真菌に対して陰性である。

【0093】

いくつかの実施形態では、静脈送達のために処方される医薬組成物は、1EU/ml未満、2EU/ml未満、3EU/ml未満、4EU/ml未満、5EU/ml未満、6EU/ml未満、7EU/ml未満、8EU/ml未満、9EU/ml未満、10EU/ml未満のエンドトキシンを示す。いくつかの実施形態では、静脈内送達用に処方される医薬組成物は、マイコプラズマに対して陰性である。

【実施例】

【0094】

実施例1

方法

別段の指示がない限り、以下に提供される実施例は、以下の材料及び方法を利用した。

フローサイトメトリー

免疫表現型検査

【0095】

CD3、CD25、CD28、CD45RO、CD279(PD-1)[Becton Dickinson(BD), Franklin Lakes, NJ]、CD4、CD8、CD16、CD62L、CD69(Beckman Coulter, Brea, CA)及びCD366(TIM-3)(BioLegend, San Diego, CA)に対するモノクローナル抗体でマルチ-R-VSTを表面染色した。細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)(Sigma-Aldrich)中でペレット化し、次いで、抗体を飽和量(5µl)で添加し、続いて4で15分間温置した。その後、細胞を洗浄し、300µlのPBS中で再懸濁し、少なくとも20,000個の生細胞をGallios(商標)Flow Cytometer上で取得し、Kaluzza(登録商標)Flow Analysis Software(Beckman Coulter)で分析した。

細胞内サイトカイン染色(ICS)

【0096】

マルチ-R-VSTを回収し、VST培地中で再懸濁し(2x10⁶/ml)、96ウェルプレートのウェルあたり200µlを添加した。ブレフェルジンA(1µg/ml)、モネンシン(1µg/ml)、CD28及びCD49d(1µg/ml)(BD)と一緒に200ngの個々の試験又は対照(無関係な非ウイルス性、例えばSURVIVIN, WT1)ペプミックスとともに一晚細胞を温置した。次に、VSTをPBSで洗浄し、ペレット化し、CD8及びCD3(5µl/抗体/チューブ)で4にて15分間表面

染色し、次いで、洗浄し、ペレット化し、固定し、C y t o f i x / C y t o p e r m 溶液 (B D) で暗所において4 で20分間透過処理した。P e r m / W a s h B u f f e r (B D) で洗浄した後、細胞を10 μ l の I F N 及び T N F 抗体 (B D) と4にて暗所で30分間、温置した。次いで、細胞を P e r m / W a s h B u f f e r で2回洗浄し、少なくとも50,000個の生細胞を G a l l i o s (商標) フローサイトメーターで取得し、K a l u z a (登録商標) F l o w A n a l y s i s S o f t w a r e で分析した。

F o x P 3 染色

【0097】

製造者の説明書に従って e B i o s c i e n c e F o x P 3 キット (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c , W a l t h a m , M A) を使用して F o x P 3 染色を行った。簡単に述べると、1 \times 10⁶個の細胞を C D 3、C D 4 及び C D 2 5 抗体で表面染色し、次いで洗浄し、1 m l の固定 / 透過処理緩衝液中で再懸濁し、暗所にて4 で1時間、温置した。P B S で洗浄した後、細胞を透過処理緩衝液中で再懸濁し、5 μ l のアイソタイプ又は F o x P 3 抗体 (クローン P C H 1 0 1) とともに4 で30分間、温置し、次いで洗浄し、G a l l i o s (商標) フローサイトメーター上で取得し、続いて K a l u z a (登録商標) F l o w A n a l y s i s S o f t w a r e で分析した。

機能研究

酵素結合免疫スポット (E L I s p o t)

【0098】

E L I s p o t 分析を使用して、I F N 及び グランザイム B 分泌細胞の頻度を定量した。簡潔に述べると、P B M C 及び マルチ R - V S T をそれぞれ 5 \times 10⁶ 及び 2 \times 10⁶ 個細胞 / m l で V S T 培地中で再懸濁し、100 μ l の細胞を各 E L I s p o t ウェルに添加した。個々の刺激 [N P 1、M P 1 (インフルエンザ) ; N、F (R S V) ; F、N、M 2 - 1、M (h M P V) ; M、H N、N、F (P I V)] 又は対照ペプミックス (S u r v i v i n、W T 1) での直接刺激 (500 n g / ペプチド / m l) 後に抗原特異的活性を測定した。ブドウ球菌エンテロトキシン B (S E B) (1 μ g / m l) 及び P H A (1 μ g / m l) をそれぞれ P B M C 及び V S T に対する陽性対照として使用した。20時間の温置後、プレートを前述のように発色させ、室温で一晩乾燥させ、次いで、定量化のために Z e l l n e t C o n s u l t i n g (ニューヨーク) に送った。スポット形成細胞 (S F C) 及び投入細胞数をプロットし、V S T に対する特異性閾値を 30 S F C / 2 \times 10⁵ 個投入細胞と定義した。

マルチプレックス

【0099】

M I L L I P L E X H i g h S e n s i t i v i t y H u m a n C y t o k i n e P a n e l (M i l l i p o r e , B i l l e r i c a , M A) を用いて、マルチ - R - V S T サイトカインプロファイルを評価した。2 \times 10⁵ 個の V S T を p e p m i x (N P 1、M P 1、

【0100】

N、F、F、N、M 2 - 1、M、M、H N、N 及び F) (1 μ g / m l) で一晩刺激した。その後、上清を回収し、2連のウェルにプレーティングし、抗体固定化ビーズとともに4で一晩温置し、次いで洗浄し、ビオチン化検出抗体とともに室温で1時間播種した。最後に、ストレプトアビジン - フィコエリスリンを室温で30分間添加した。試料を洗浄し、x P O N E N T ソフトウェアを使用して L u m i n e x 200 (X M A P T e c h n o l o g y) 上で分析した。

クロム放出アッセイ

【0101】

標準的な4時間クロム (C r 5 1) 放出アッセイを使用して、標的として自己抗原負荷 P H A 芽球 (20 n g / ペプミックス / 1 \times 10⁶ 標的細胞) を用いてマルチ R - V S T の特異的な細胞溶解活性を測定した。40 : 1、20 : 1、10 : 1 及び 5 : 1 のエフェ

10

20

30

40

50

クター：標的（E：T）比を使用して、特異的溶解を分析した。特異的溶解のパーセンテージを〔（実験の放出 - 自発的放出） / （最大放出 - 自発的放出）〕 × 100で計算した。マルチR - V S T株の自己反応及びアロ反応の可能性を測定するために、自己及び同種異系P H A芽球のみを標的として使用した。

実施例 2

健常ドナーからのポリクローナルマルチR - V S Tの作製

【0102】

本研究では、発明者らは、エキスピボで増殖させたT細胞を使用して、複数の臨床的に問題のある呼吸器ウイルスを標的化する可能性を調査した。具体的には、発明者らは、インフルエンザ、RSV、hMPV及びPIVに対する特異性を有するV S Tを作製し、活動性感染を首尾よく制御した移植レシピエントにおける臨床的有效性を実証した。

10

背景

【0103】

CARV関連の急性の上及び下RTIは、公衆衛生の大きな問題であり、幼児、高齢者及び免疫系が抑制されているか又は損なわれている者が最も脆弱である（1～3）。これらの感染は、咳、呼吸困難及び喘鳴を含む症状を付随し、二重／複数の共存感染が一般的であり、5歳未満の小児では40%を超え得る頻度であり、罹患及び入院のリスク上昇を伴う（22～26）。免疫無防備状態の同種異系H S C Tレシピエントの中で、最大40%が、軽度（鼻漏、咳及び発熱を含む関連症状）～重度（細気管支炎及び肺炎）の範囲に及び得るCARV感染を経験し、関連する死亡率はL R T I患者で50%もの高さである（5～9）。治療選択肢は限られている。hMPV及びPIVについては、現在承認されている予防ワクチンも治療用抗ウイルス薬もないが、ヌクレオシド類似体RBVの適応外使用及びDAS - 181（組換えシアリダーゼ融合タンパク質）の研究使用は臨床的な効果が限定的であった（10、11、27、28）。予防のための年1回のインフルエンザワクチンは、同種異系H S C Tレシピエントに対しては移植後少なくとも6ヶ月まで推奨されず（そして、強化化学療法又は抗B細胞抗体のレシピエントでは除外される）、一方でノイラミニダーゼ阻害剤は、活動性感染症の処置に常に有効であるとは限らない（12）。RSVの場合、エアロゾル化RBVは、乳児及び小児における重度の細気管支炎の処置についてFDAから承認されており、H S C Tレシピエントにおける上又は下RTIの予防及びRSV肺炎の処置のためにも適応外使用される（13、15、16）。しかし、薬物送達のために面倒な噴霧装置及び人工呼吸システムが必要であること並びに関連コストが高額になることによって、その広範な使用が限られる。例えば、2015年では、エアロゾル化RBVのコストは1日当たり29,953ドルであり、典型的な治療コースは5日間である（14）。従って、抗ウイルス剤のコストが高いことと合わせて、承認された処置がないことから、発明者らは、この患者集団でのCARV感染予防及び／又は処置のための養子移入T細胞の使用に対する可能性を探ることとした。

20

30

【0104】

CARVのウイルス制御に介在する際の機能的T細胞免疫の極めて重要な役割は、最近になってようやく注目を集めるようになった。例えば、RSV URTIを有する181名のH S C T患者の後ろ向き研究から、感染がL R T Iに進行する患者を同定する際の重要な決定因子としてリンパ球減少症（ALC 100/mm³と定義される）が報告されたが、一方でRSV中和抗体レベルは疾患進行と顕著な関連はなかった（29）。さらに、RSV L R T Iについて処置されたH S C Tを有するか又は有しない血液悪性腫瘍の154名の成人患者の最近の後ろ向き分析では、リンパ球減少症はより高い死亡率と有意に関連していた（30）。これらの研究は両方とも、インピボでの防御免疫への介在における細胞性免疫の重要性を示唆している。

40

ドナー及び細胞株

【0105】

Baylor College of Medicine IRB承認プロトコール（H - 7634、H - 7666）を使用して、インフォームドコンセントがある健康なボラン

50

ティア及びH S C Tレシピエントから末梢血単核細胞 (P B M C) を得て、フィットヘマグルチニン (P H A) 芽球及びマルチR - V S T を作製するために使用した。P H A 芽球を以前に報告されたように生成させ (2 0) 、インターロイキン2 (I L 2) (1 0 0 U / m L ; N I H , B e t h e s d a , M a r y l a n d) (2 日ごとに補充) を添加したV S T 培地 [4 5 % R P M I 1 6 4 0 (H y C l o n e L a b o r a t o r i e s , L o g a n , U t a h) 、4 5 % C l i c k ' s 培地 (I r v i n e S c i e n t i f i c , S a n t a A n a , C a l i f o r n i a) 、2 m M G l u t a M A X T M - I (L i f e T e c h n o l o g i e s , G r a n d I s l a n d , N e w Y o r k) 及び1 0 % ヒトA B 血清 (V a l l e y B i o m e d i c a l , W i n c h e s t e r , V i r g i n i a)] 中で培養した。V S T 生成

10

複数の呼吸器ウイルスに特異的なT細胞の作製及び表現型の特徴評価

【0106】

発明者らは、以下の方法によって、インフルエンザ、R S V、h M P V 及びP I V に対して反応性がある細胞のサブ集団を含有するウイルス特異的T細胞 (V S T) T細胞株を作製した：

【0107】

P B M C (2.5×10^7) を上記のように回収し、次いで、I L 7 (2 0 n g / m l) 、I L 4 (8 0 0 U / m l) (R & D S y s t e m s , M i n n e a p o l i s , M N) 及びペプミックス (2 n g / ペプチド / m l) を添加した1 0 0 m l のV S T 培地を含むG - R e x 1 0 (W i l s o n W o l f M a n u f a c t u r i n g C o r p o r a t i o n , S t . P a u l , M N) に移し、3 7 ° C 、5 % C O 2 で1 0 ~ 1 3 日間培養した (図1 A) 。

20

【0108】

ペプミックスは、インフルエンザA抗原 (N P 1 、M P 1) 、R S V 抗原 (N 、F) 、h M P V 抗原 (F 、N 、M 2 - 1 、M) (J P T P e p t i d e T e c h n o l o g i e s , B e r l i n , G e r m a n y) 及び抗原P I V 抗原 (M 、H N 、N 、F) (G e n e m e d S y n t h e s i s , S a n A n t o n i o , T X を参照) にまたがるペプチドライブラリ (1 5 m e r 、1 1 a a 重複) であった。凍結乾燥ペプミックスをジメチルスルホキシド (D M S O) (S i g m a - A l d r i c h) 中で再構成し、使用するまで - 8 0 ° C で保存した。

30

結果

【0109】

1 0 ~ 1 3 日間にわたって、発明者らは、細胞の平均8 . 5 倍の増加を達成した (図1 B) [P B M C 0.25×10^7 個 / cm^2 から平均細胞 $1.9 \pm 0.2 \times 10^7$ 個 / cm^2 に増加 (中央値 : 2.05×10^7 、範囲 : 細胞 $0.6 \sim 2.82 \times 10^7$ 個 / cm^2 ; $n = 12$) 。発明者らは、フローサイトメトリーを使用して、上記のように増殖させた細胞の免疫表現型を解析した。増殖した細胞は、ほぼ排他的にC D 3 + T細胞 ($96.2 \pm 0.6\%$; 平均 \pm S E M) から構成され、C D 4 / C D 2 5 / F o x P 3 + 染色によって評価した場合、制御T細胞増殖の証拠はなく、細胞傷害性 (C D 8 + ; $18.1 \pm 1.3\%$) T細胞及びヘルパー (C D 4 + ; $74.4 \pm 1.7\%$) T細胞の混合物 [図1 C] を伴っていた [図1 E] 。さらに、増殖させた細胞は、活性化マーカーC D 2 5 ($50.2 \pm 3.8\%$) 、C D 6 9 ($52.8 \pm 6.3\%$) 、C D 2 8 ($85.8 \pm 2\%$) の上方制御並びにセントラル (C D 4 5 R O + / C D 6 2 L + : $61.4 \pm 3\%$) 及びエフェクターメモリーマーカー (C D 4 5 R O + / C D 6 2 L - : $20.3 \pm 2.3\%$) の発現によって証明されるように、エフェクター機能及び長期記憶と一致する表現型を示し、最小限のP D 1 ($6.9 \pm 1.4\%$) 又はT i m 3 ($13.5 \pm 2.3\%$) の表面発現があった [図1 C ~ 1 D] 。

40

【0110】

従って、本明細書中で開示される方法は、消耗の兆候なく活性化細胞傷害性及びヘルパーT細胞のポリクローナル集団の急速な増殖をもたらし、このことから、呼吸器ウイルス

50

抗原に対する特異性を有する V S T の増殖が示唆される。

実施例 3

マルチ R - V S T の抗ウイルス特異性の特徴評価

【 0 1 1 1 】

次に、増殖した集団が抗原特異的であったか否かを決定するために、発明者らは、個々の刺激抗原のそれぞれを免疫原として使用して、I F N 及びグランザイム B 分泌細胞 E L I s p o t アッセイを行った。E L I s p o t 分析を上記のように行った。作製した 1 2 の系統は全て、標的ウイルスの全てに対して反応性があることが証明された [表 1、図 2 E]。

【表 1】

表 1：個々の刺激抗原に対する増殖 V S T 株の反応性

ドナー	インフルエンザ		R S V		h M P V				P I V			
	N P 1	M P 1	N	F	M	M2-1	F	N	M	F	N	H N
1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	✓	x	✓	✓
2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4	✓	✓	✓	✓	✓	x	✓	✓	✓	✓	x	x
5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
6	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	✓	x	x	✓
7	✓	✓	✓	✓	✓	x	✓	x	✓	✓	x	x
8	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	✓	✓	✓	x
9	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	x	x
1 0	✓	✓	✓	✓	x	✓	x	x	✓	x	x	x
1 1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	✓
1 2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	x	✓	✓	✓	✓	x

【 0 1 1 2 】

図 2 A は、各刺激抗原に対する活性の大きさをまとめており、一方で図 2 F は、ウイルス抗原の滴定濃度に対する発明者らの増殖 V S T の応答を示す。注目すべきことに、培養 1 0 ~ 1 3 日間にわたって、発明者らは、 14.6 ± 4.3 倍 (P I V - H N) ~ 50.4 ± 9.9 倍 (R S V - N) のウイルス特異的 T 細胞の富化を達成した [図 2 B ; ドナー P B M C 内の C A R V 反応性 T 細胞の前駆体頻度を図 2 G で要約する]。まとめると、これらのデータから、呼吸器ウイルス特異的 T 細胞がメモリープール内に存在し、G M P に準拠した製造法を使用してエキスピボで容易に増幅され得ることが示唆される。

【 0 1 1 3 】

次に、ウイルス特異性が C D 4 + 又は C D 8 + 又は両方の T 細胞サブセットとともに含有されたか否かを評価するために、発明者らは、C D 4 + 及び C D 8 + I F N 産生細胞においてゲーティングして、I C S を実施した。図 2 C は、両方の T 細胞区画 [(C D 4 + : インフルエンザ - 5.28% ; R S V - 11% ; h M P V - 6.57% ; P I V - 3.37%)、(C D 8 + : インフルエンザ - 2.26% ; R S V - 4.36% ; h M P V - 2.69% ; P I V - 2.16%)] で検出された 4 つ全てのウイルスに対する活性を有する 1 名のドナーからの代表的な結果を示し、一方で図 2 D は、スクリーニングした 9 名のドナーについての結果の要約を示し、発明者らのマルチ R - V S T がポリクローナル及び多特異性であることを確認した。

【 0 1 1 4 】

従って、これらのデータから、これらの方法が、ポリクローナルであり、C D 4 + T 細胞及び C D 8 + T 細胞の両方を含むマルチ R - V S T を生成させることが確認される。

実施例 4

マルチ R - V S T のインビトロ有効性の評価

【0115】

複数の炎症促進性サイトカインの産生及びエフェクター分子の発現は、細胞溶解機能の増強及びインビボT細胞活性の向上と相関することが示されている。従って、発明者らは次に、抗原曝露後の発明者らのマルチR-VSTのサイトカインプロファイル調べた。図3で示されるように、IFN 産生細胞の大部分はまた、プロトタイプのTh2/抑制性サイトカインのベースラインレベル[図3C-右パネル]でLuminoxアレイによって測定されるように[図3C-左パネル]、GM-CSFに加えてTNF も産生した[図3A-1名のドナーからの詳細なICSの結果; 9名のドナーに対する結果の要約; 図3B]。さらに、抗原刺激時に、発明者らの細胞はエフェクター分子グランザイムBを産生し、これらの増殖細胞の細胞溶解能が示唆された[図3D、n=9]。まとめると、このデータから、発明者らのマルチR-VSTのTh1極性化及び多機能特性が明らかになる。

10

【0116】

インビトロでのこれらの増殖細胞の細胞溶解能を調べるために、マルチ-R-VSTを自己Cr51標識PHA芽球と共培養し、ウイルスペプミックスを負荷し、非負荷PHA芽球を対照とした。図4A及び図4Cで示されるように、ウイルス抗原が負荷された標的は、発明者らの増殖マルチ-R-VST(40:1 E:T-インフルエンザ:13±5%、RSV:36±8%、hMPV:26±7%、PIV:22±5%、n=8)によって特異的に認識され溶解された。最後に、これらのVSTは単一の刺激のみを受けたにもかかわらず、HLAミスマッチPHA芽球を標的として使用した場合、非感染自己標的に対する活性の証拠も、同種反応性(移植片対宿主の可能性)の証拠もなかった[図4B]。これらの細胞が同種異系HSC Tレシピエントに投与されるべきである場合、これは重要な検討事項である。

20

【0117】

従って、マルチ-R-VSTはインビトロ有効性を有し、安全である。

実施例5

マルチR-VSTのインビボ有効性の評価

【0118】

マルチR-VSTの潜在的な臨床的関連性を評価するために、発明者らは、活動性の/最近のCARV感染を有する同種異系HSC Tレシピエントが、活動性ウイルスエピソード中/その後に高レベルの反応性T細胞を示したか否かを調べた。図5Aは、強度軽減前処置を伴う適合血縁ドナー(MRD)移植を受けた急性骨髄性白血病(AML)の64歳男性である患者#1の結果を示す。患者は、HSC Tの9ヶ月後に重度のURTIを発症し、PCR分析によってRSV関連であることが確認された。患者は感染時には免疫抑制ではなかったが、肺の炎症を制御するために感染診断日にプレドニゾン投与された。4週間以内に、その患者の症状は特異的抗ウイルス処置なしで回復した。T細胞免疫がウイルスクリアランスに寄与したか否かを評価するために、発明者らは、その患者の感染の過程にわたってRSV特異的T細胞の循環頻度を分析した。感染の直前に、この患者はRSV抗原N及びF(6.5 SFC/5×10⁵ PBMC)に対して非常に弱い応答を示した。しかし、ウイルス曝露の1ヶ月以内に、RSV特異的T細胞はインビボで増殖し(527 SFC/5×10⁵ PBMC)、図5Aで見られるように、反応性細胞の81倍の増加を表し、その後低下し、ウイルスクリアランスと一致していた。注目すべきことに、観察されたRSV特異的応答はリンパ球/CD4+数の全体的な増加に従わず、従ってT細胞増殖がウイルス主導であり、一般的な免疫再構成に起因しないことを示した。同様に、骨髓破壊的前処置を伴う適合非血縁ドナー(MUD)移植を受けた急性リンパ芽球性白血病(ALL)の23歳男性である患者#2は、タクロリムスの漸減投与中、HSC Tの5ヶ月後に重度のRSV関連URTIを発症した。その患者の感染は、リバビリンの投与と一致して、1週間以内に症状が回復した。内因性免疫がウイルスクリアランスにも寄与するか否かを調べるために、発明者らは反応性T細胞数を経時的に監視した。図5Bで見られるように、ウイルスクリアランスは、RSV特異的T細胞の循環頻度の増加(ピーク9

30

40

50

3 SFC / 5×10^5 PBMC) と関連し、その後ベースラインレベルに戻った。同じ患者が、続発する肺炎球菌性肺炎のために移植後7ヶ月で入院し、同時に痰中でhMPVが検出された(PCRによる)。その患者の肺炎を抗生物質で処置し、その後の疾患からの回復及びウイルスクリアランスは、hMPV特異的T細胞(F、N、M2-1及びMに対して反応性)の顕著な増殖と一致し、4SFCから70SFCのピークまで増加し、その後ベースラインレベルまで低下した[図5C]。再び、観察されたRSV及びhMPV特異的応答は、リンパ球/CD4+数の全体的な増加とは無関係であった。図6は、CARV感染を発症した3名のさらなるHSCトレシピエントの結果を示す。患者#3は、強度軽減前処置を伴うハプロ一致移植を受けたAMLの15歳女性であり、移植の5週間後に、タクロリムス投与中、RSV誘発性URTI及びLRTIを発症した。患者にリバビリンを投与し、感染は4週間以内に消散した。発明者らは、RSV反応性T細胞を経時的に監視し、図6Aで見られ得るように、ウイルスクリアランスは、RSV特異的T細胞の頻度の著しい上昇(0から506SFC / 5×10^5 PBMC)と一致した。同様に、骨髄破壊的前処置を伴うMUD移植を受けたALLの10歳男性患者である患者#4は、タクロリムス投与中、HSCの1ヶ月後にPIV3関連URTI及びLRTIを発症した。その患者の感染は、リバビリンの投与と一致して、5週間以内に症状が消散した。内因性免疫がウイルスクリアランスにも寄与するか否かを調べるために、発明者らはPIV3反応性T細胞数を経時的に監視した。図6Bで見られるように、ウイルスクリアランスは、PIV3抗原M、HN、N及びFに特異的なT細胞の循環頻度の上昇(ピーク38SFC / 5×10^5 PBMC)を伴い、その後低下した。最後に、発明者らは、骨髄破壊的前処置を伴うMRD移植を受け、シクロスポリン投与中、HSCの4ヶ月後に重度のPIV3関連URTIを発症した慢性肉芽腫性疾患の3歳男性である患者#5を示す。患者にはリバビリンを投与されたが、(最後の評価時点で)疾患症状を示し続け、PIV3特異的T細胞を実証することができなかった(図6C)。まとめると、これらのデータから、免疫無防備状態の患者でのウイルス感染の制御におけるCARV特異的T細胞のインビボでの関連性が示唆される。

結論

【0119】

呼吸器合胞体ウイルス(RSV)、インフルエンザ、パラインフルエンザウイルス(PIV)及びヒトメタニューモウイルス(hMPV)を含む、市中感染する呼吸器ウイルス(CARV)による呼吸器ウイルス感染は、同種異系造血幹細胞移植(アロHSC)トレシピエントの最大40%で検出され、これらのレシピエントは、致命的となり得る細気管支炎及び肺炎などの重度の疾患を引き起こし得る。これらのCARVのための承認された抗ウイルス剤及び養子移入されたエクスピボ増殖ウイルス特異的T細胞(VST)が、アロ-HSCのレシピエントにおける潜伏[エプスタイン・バー・ウイルス(EBV)、サイトメガロウイルス(CMV)、BKウイルス(BKV)、ヒトヘルペスウイルス6(HHV6)]ウイルス及び溶菌性[アデノウイルス(AdV)]ウイルスの両方の処置のために臨床的に有益であり得ることを実証するデータがないことを考えると、このアプローチを少なくともインフルエンザ、RSV、hMPV及びPIV3に拡大する可能性を探求することが考えられた。

【0120】

従って、発明者らは、健康なドナー由来のPBMCを、特定の標的ウイルス[インフルエンザ-NP1及びMP1; RSV-N及びF; hMPV-F、N、M2-1及びM; PIV3-M、HN、N及びF]由来の免疫原性抗原にまたがるペプミックスのカクテル(重複するペプチドライブラリ)に曝露し、続いてG-Rex中で活性化サイトカインの存在下で増殖させた。10~13日間にわたって、発明者らは平均8.5倍の増殖を達成した(0.25×10^7 PBMC / cm² から平均 $1.9 \pm 0.2 \times 10^7$ 細胞 / cm² まで増加; n = 12)。培養物は、CD3+T細胞(96.2 ± 0.6%; 平均 ± SEM)、細胞傷害性(CD8+)T細胞及びヘルパー(CD4+)T細胞の混合物をほぼ排他的に含み、活性化マーカーCD25、CD69及びCD28の上方制御並びにセントラル

10

20

30

40

50

(CD45RO+ / CD62L+) 及びエフェクターメモリモーカー (CD45RO+ / CD62Li) の発現が上方制御され、PD1又はTim3が最小限であることによって証明されるように、表現型は即時エフェクター機能及び長期持続性と一致していた。個々の刺激抗原のそれぞれを免疫原として使用してIFN- γ ELISpotアッセイでマルチ呼吸VSTの抗ウイルス特異性を試験した。スクリーニングした12種類の系統は全て、各標的ウイルスに対して反応性があった [インフルエンザ: 平均 735 ± 75.6 SFC / 2×10^5 、RSV: 758 ± 69.8 、hMPV: 526 ± 100.8 、PIV3: 391 ± 93.7]。増殖させたVSTは、TNF α 、GM-CSF及びグランザイムBの産生によって証明されるように、Th1極性化エフェクター細胞であり、Th2 / 抑制性サイトカインはベースラインレベルのみであった。

10

【0121】

細胞を標準的なCr51放出アッセイで試験し、この細胞は、ウイルスペプミックスを負荷した自己PHA芽球を溶解させることが可能であり (40:1 E:T - インフルエンザ: $13 \pm 5\%$ 、RSV: $36 \pm 8\%$ 、hMPV: $26 \pm 7\%$ 、PIV: $22 \pm 5\%$ 、 $n = 8$)、自己反応性又は同種反応性の証拠はなく、これにより、HSCトレシピエントにおける臨床使用のためのそれらの選択性及びそれらの安全性の両方が証明された。

【0122】

最後に、これらの所見の臨床的意義を評価するために、発明者らは、活動性RSV、hMPV及びPIV3感染を有する5名の同種異系HSCトレシピエントの末梢血を調べた。これらの患者のうち4名は、内因性反応性T細胞の増幅及びその後のウイルス排除時のベースラインレベルへの復帰と一致して、1～5週間以内にウイルスを制御することに成功したが、一方で1名の患者は感染ウイルスに対する免疫応答を開始することができず、これまで感染を同様に排除することができなかった。このデータは、エクスピボ増殖細胞の養子移入が、自身の細胞性免疫が欠如している患者において臨床的に有益であるはずであることを示唆する。

20

【0123】

結論として、発明者らは、GMPに準拠した製造法を使用して、4つの標的ウイルス: インフルエンザ、RSV、hMPV及びPIV3に由来する12種類の免疫優性抗原に対する特異性を有するポリクローナル (CD4+ 及びCD8+) 複数呼吸器 (マルチ-R) - VSTの単一調製物を迅速に作製することが実現可能であることを示した。増殖した細胞は、Th1に極性化され、多機能性であり、非感染自己又は同種異系標的に対する活性を伴わずにウイルス抗原発現標的細胞に反応して死滅させることが選択的に可能であり、ウイルス標的に対するそれらの選択性及び臨床使用に対するそれらの安全性の両方が証明される。様々な実施形態では、このような複数の呼吸器ウイルスを標的とした細胞 (マルチR - VST) は、免疫無防備状態の個体におけるものを含む、制御されていないCARV感染を有する免疫無防備状態の個体に対して広範囲の利益を提供する。

30

実施例6

健康なドナーからのポリクローナルRSV特異的VSTの作製

【0124】

RSVは、特に危険な呼吸器疾患である。これにより、米国で毎年57,000人を超える幼児 (<5歳) が入院し、米国においては成人 (>65歳) で毎年177,000人が入院し、14,000人が死亡している (Centers for Disease Control and Prevention)。RSVは、肺炎などの疾患を引き起こす下気道感染症に進行することが多いが、これは致死的であり得 (Paulsen and Danziger-Isakov, Clin Chest Med 38 (2017))、同種異系造血幹細胞移植又は固形臓器移植を受けた患者を含む免疫無防備状態の個体における疾患の主な原因である。さらに、リバビリンは、RSVによって引き起こされる重度の肺炎を有する小児を処置することについてFDAに承認されているものの、この処置は費用が高額であり、投与が難しく、毒性の問題を付随しており、他の患者群に対しては承認されていない。従って、効果的なRSV処置が当技術分野で大いに必要とされている。

40

50

【 0 1 2 5 】

図 7 で示されるように、上記の実施例に記載のマルチ - R - V S T に含まれていた R S V 抗原 N 及び F に加えて、R S V ゲノムには他の抗原：G、M 2 - 1、M、N S 1、N S 2、M 2 - 2、P、L 及び S H も含まれる（図 7）。ペプミックス R S V 抗原 N 及び F のみを用いて作製されたにもかかわらず、R S V 感染症を処置するための発明者らのマルチ R - V S T の有効性が実証されたので、発明者らは、より広範囲の R S V 抗原に対する特異性を有する V S T を発明者らが作製し得るか否かを調べることを目指した。

【 0 1 2 6 】

その目的のために、P B M C を実施例 1 に記載されるように単離し、図 8 で示されるように、 2.5×10^6 個 / cm^2 の P B M C を、実施例 1 及び 2 に記載されるように 10 ~ 15 日間、I L 4、I L 7 及び上記 R S V 抗原の全てをカバーするペプミックスとともに培養した。

結果

【 0 1 2 7 】

10 日間にわたって、発明者らは平均およそ 5 倍の細胞増加を達成した（図 9 A）。発明者らは、フローサイトメトリーを使用して、上記のように増殖させた細胞の免疫表現型を解析した。増殖した細胞には、細胞傷害性（C D 8 +；約 33%）T 細胞及びヘルパー（C D 4 +；約 66%）T 細胞の混合物とともに、ほぼ排他的に C D 3 + T 細胞が含まれていた [図 9 B]。さらに、増殖させた細胞は、活性化マーカー C D 2 5、C D 6 9 及び C D 2 8 の上方制御及び最小限の P D 1 又は T i m 3 表面発現によって証明されるように、エフェクター機能及び長期記憶と一致する表現型を示した [図 9 C]。

【 0 1 2 8 】

発明者らは、抗原曝露後の発明者らの R S V - V S T のサイトカインプロファイル調べた。図 10 A で示されるように、V S T は、R S V 抗原 N、F、及び G に応答して大量の I F N 産生し、他の R S V 抗原の添加によって誘導された応答は弱かった。ペプミックス刺激後にグランザイム B 産生の同様のプロファイルが見られ、これらの増殖細胞の細胞溶解能が示唆された [図 10 B]。さらに、T h 1 サイトカイン G M - C S F、I F N 及び T N F （図 11 A）並びに T h 2 サイトカイン I L - 5、I L - 6 及び I L - 10（図 11 B）の分析から、R S V 特異的 V S T が T h 1 に傾斜することが明確に示された。まとめると、これらのデータから、発明者らのマルチ R - V S T の T h 1 極性化及び多機能特性が明らかになる。

【 0 1 2 9 】

従って、本明細書中で開示される方法により、枯渇の兆候なく、活性化細胞傷害性 T 細胞及びヘルパー T 細胞のポリクローナル集団の急速な増殖が起こり、R S V 抗原に対する特異性を有する V S T の増殖が示唆される。

【 0 1 3 0 】

上述した様々な実施形態を組み合わせ、さらなる実施形態を提供し得る。本明細書中で言及され、及び / 又は出願データシートに列挙される米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願及び非特許刊行物は全て、その全体において参照により本明細書に組み込まれる。実施形態の態様は、必要に応じて、またさらなる実施形態を提供するために様々な特許、出願及び刊行物の概念を使用するために修正され得る。

【 0 1 3 1 】

上記の詳細な説明に照らして、これら及び他の変更が実施形態に対して行われ得る。一般に、以下の特許請求の範囲において、使用される用語は、特許請求の範囲を明細書及び特許請求の範囲で開示される特定の実施形態に限定すると解釈されるべきではなく、このような特許請求の範囲が権利を有する同等物の全範囲とともに全ての可能な実施形態を含むと解釈されるべきである。従って、特許請求の範囲は本開示によって限定されない。

参考文献

- 1 . Hodinka RL. Respiratory RNA Viruses. Microbiol Spectr. 2016;4(4).
- 2 . Gill PJ, Richardson SE, Ostrow O, et al. Testing for Respiratory Viruses in

Children: To Swab or Not to Swab. *JAMA Pediatr.* 2017;171(8):798-804.

3 . Nair H, Simoes EA, Rudan I, et al. Global and regional burden of hospital admissions for severe acute lower respiratory infections in young children in 2010: a systematic analysis. *Lancet.* 2013;381(9875):1380-1390.

4 . Shi T, McAllister DA, O'Brien KL, et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet.* 2017;390(10098):946-958.

5 . Paulsen GC, Danziger-Isakov L. Respiratory Viral Infections in Solid Organ and Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clin Chest Med.* 2017;38(4):707-726.

10

6 . Abbas S, Raybould JE, Sastry S, et al. Respiratory viruses in transplant recipients: more than just a cold. *Clinical syndromes and infection prevention principles.* *Int J Infect Dis.* 2017;62:86-93.

7 . Hutspardol S, Essa M, Richardson S, et al. Significant Transplantation-Related Mortality from Respiratory Virus Infections within the First One Hundred Days in Children after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21(10):1802-1807.

8 . Lin R, Liu Q. Diagnosis and treatment of viral diseases in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Hematol Oncol.* 2013;6:94.

20

9 . Renaud C, Xie H, Seo S, et al. Mortality rates of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus lower respiratory tract infections in hematopoietic cell transplantation recipients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013;19(8):1220-1226.

10 . Shah DP, Shah PK, Azzi JM, et al. Human metapneumovirus infections in hematopoietic cell transplant recipients and hematologic malignancy patients: A systematic review. *Cancer Lett.* 2016;379(1):100-106.

11 . Shah DP, Shah PK, Azzi JM, et al. Parainfluenza virus infections in hematopoietic cell transplant recipients and hematologic malignancy patients: A systematic review. *Cancer Lett.* 2016;370(2):358-364.

30

12 . Chemaly RF, Shah DP, Boeckh MJ. Management of respiratory viral infections in hematopoietic cell transplant recipients and patients with hematologic malignancies. *Clin Infect Dis.* 2014;59 Suppl 5:S344-351.

13 . Beaird OE, Freifeld A, Ison MG, et al. Current practices for treatment of respiratory syncytial virus and other non-influenza respiratory viruses in high-risk patient populations: a survey of institutions in the Midwestern Respiratory Virus Collaborative. *Transpl Infect Dis.* 2016;18(2):210-215.

14 . Chemaly RF, Aitken SL, Wolfe CR, et al. Aerosolized ribavirin: the most expensive drug for pneumonia. *Transpl Infect Dis.* 2016;18(4):634-636.

15 . Griffiths C, Drews SJ, Marchant DJ. Respiratory Syncytial Virus: Infection, Detection, and New Options for Prevention and Treatment. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30(1):277-319.

40

16 . Walsh EE. Respiratory Syncytial Virus Infection: An Illness for All Ages. *Clin Chest Med.* 2017;38(1):29-36.

17 . Papadopoulou A, Gerdemann U, Katari UL, et al. Activity of broad-spectrum T cells as treatment for AdV, EBV, CMV, BKV, and HHV6 infections after HSCT. *Sci Transl Med.* 2014;6(242):242ra83.

18 . Tzannou I, Papadopoulou A, Naik S, et al. Off-the-Shelf Virus-Specific T Cells to Treat BK Virus, Human Herpesvirus 6, Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, and Adenovirus Infections After Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Tr

50

ansplantation. *J Clin Oncol*. 2017;35(31):3547-3557.

19 . Aguayo-Hiraldo PI, Arasaratnam RJ, Tzannou I, et al. Characterizing the Cellular Immune Response to Parainfluenza Virus 3. *J Infect Dis*. 2017;216(2):153-161.

20 . Gerdemann U, Keirnan JM, Katari UL, et al. Rapidly generated multivirus-specific cytotoxic T lymphocytes for the prophylaxis and treatment of viral infections. *Mol Ther*. 2012;20(8):1622-1632.

21 . Tzannou I, Nicholas SK, Lulla P, et al. Immunologic Profiling of Human Metapneumovirus for the Development of Targeted Immunotherapy. *J Infect Dis*. 2017;216(6):678-687.

22 . Goka E, Vallety P, Mutton K, et al. Influenza A viruses dual and multiple infections with other respiratory viruses and risk of hospitalisation and mortality. *Influenza Other Respir Viruses*. 2013;7(6):1079-1087.

23 . Goka EA, Vallety PJ, Mutton KJ, et al. Single, dual and multiple respiratory virus infections and risk of hospitalization and mortality. *Epidemiol Infect*. 2015;143(1):37-47.

24 . Kouni S, Karakitsos P, Chranioti A, et al. Evaluation of viral coinfections in hospitalized and non-hospitalized children with respiratory infections using microarrays. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(8):772-777.

25 . Lim FJ, de Klerk N, Blyth CC, et al. Systematic review and meta-analysis of respiratory viral coinfections in children. *Respirology*. 2016;21(4):648-655.

26 . Stefanska I, Romanowska M, Donevski S, et al. Co-infections with influenza and other respiratory viruses. *Adv Exp Med Biol*. 2013;756:291-301.

27 . Salvatore M, Satlin MJ, Jacobs SE, et al. DAS181 for Treatment of Parainfluenza Virus Infections in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients at a Single Center. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(5):965-970.

28 . Zenilman JM, Fuchs EJ, Hendrix CW, et al. Phase 1 clinical trials of DAS181, an inhaled sialidase, in healthy adults. *Antiviral Res*. 2015;123:114-119.

29 . Kim YJ, Guthrie KA, Waghmare A, et al. Respiratory syncytial virus in hematopoietic cell transplant recipients: factors determining progression to lower respiratory tract disease. *J Infect Dis*. 2014;209(8):1195-1204.

30 . Vakil E, Sheshadri A, Faiz SA, et al. Risk factors for mortality after respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection in adults with hematologic malignancies. *Transpl Infect Dis*. 2018;20(6):e12994.

31 . Gerdemann U, Katari UL, Papadopoulou A, et al. Safety and clinical efficacy of rapidly-generated trivirus-directed T cells as treatment for adenovirus, EBV, and CMV infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Mol Ther*. 2013;21(11):2113-2121.

32 . Heslop HE, Slobod KS, Pule MA, et al. Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood*. 2010;115(5):925-935.

33 . Leen AM, Christin A, Myers GD, et al. Cytotoxic T lymphocyte therapy with donor T cells prevents and treats adenovirus and Epstein-Barr virus infections after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood*. 2009;114(19):4283-4292.

34 . Doubrovina E, Oflaz-Sozmen B, Prockop SE, et al. Adoptive immunotherapy with unselected or EBV-specific T cells for biopsy-proven EBV+ lymphomas after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2012;119(11):2644-2656.

35 . Feucht J, Opherke K, Lang P, et al. Adoptive T-cell therapy with hexon-s

10

20

30

40

50

pecific Th1 cells as a treatment of refractory adenovirus infection after HSC T. Blood. 2015;125(12):1986-1994.

36. Feuchtinger T, Opher K, Bethge WA, et al. Adoptive transfer of pp65-specific T cells for the treatment of chemorefractory cytomegalovirus disease or reactivation after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. Blood. 2010;116(20):4360-4367.

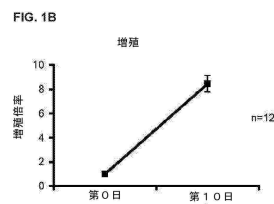
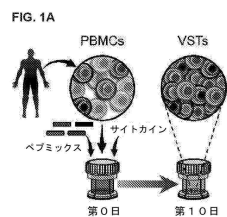
37. Peggs KS, Verfurth S, Pizzey A, et al. Cytomegalovirus-specific T cell immunotherapy promotes restoration of durable functional antiviral immunity following allogeneic stem cell transplantation. Clin Infect Dis. 2009;49(12):1851-1860.

38. Chen L, Zanker D, Xiao K, et al. Immunodominant CD4+ T-cell responses to influenza A virus in healthy individuals focus on matrix 1 and nucleoprotein. J Virol. 2014;88(20):11760-11773.

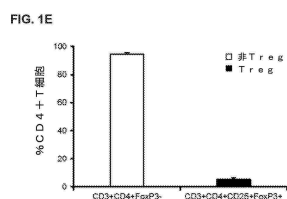
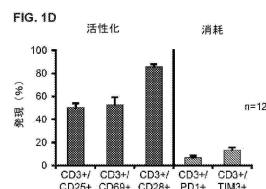
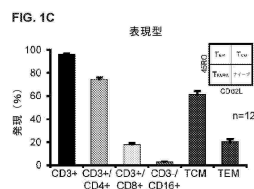
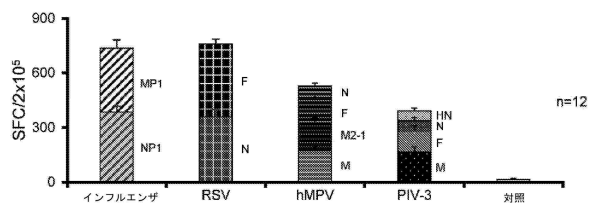
39. Grant EJ, Quinones-Parra SM, Clemens EB, et al. Human influenza viruses and CD8(+) T cell responses. Curr Opin Virol. 2016;16:132-142.

【図面】

【図 1】



【図 2 A】



10

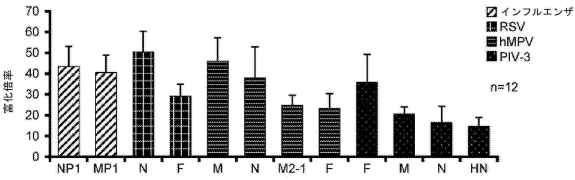
20

30

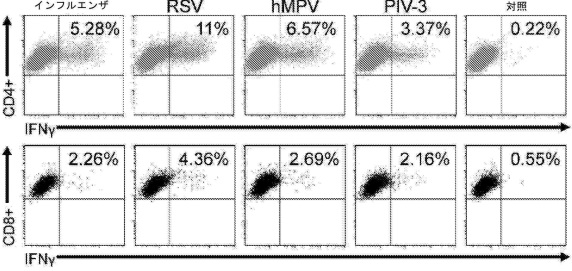
40

50

【図 2 B】

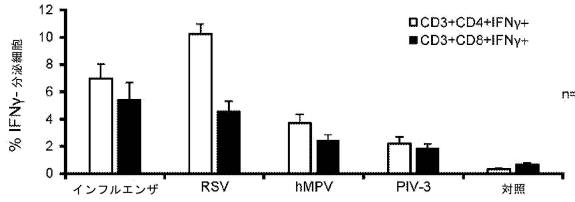


【図 2 C】

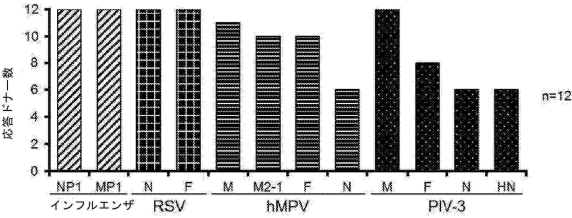


10

【図 2 D】



【図 2 E】



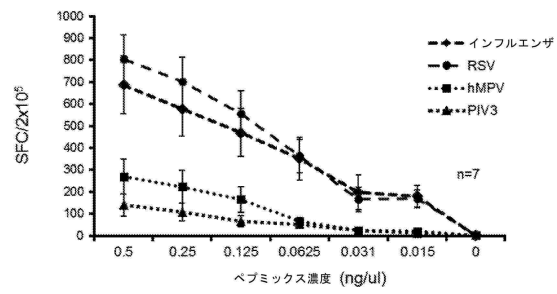
20

30

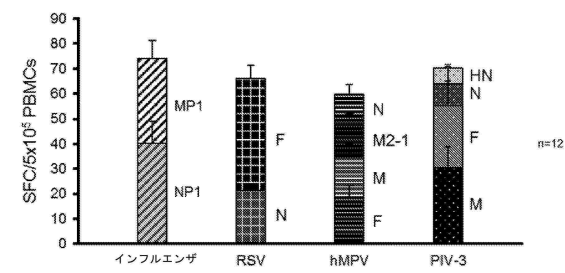
40

50

【 図 2 F 】



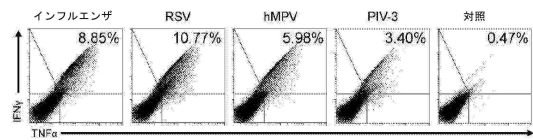
【 図 2 G 】



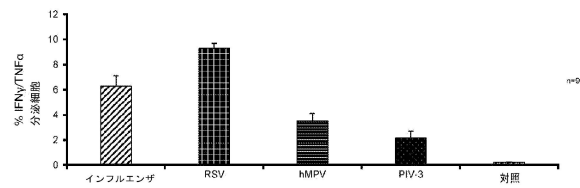
10

20

【 図 3 A 】



【 図 3 B 】

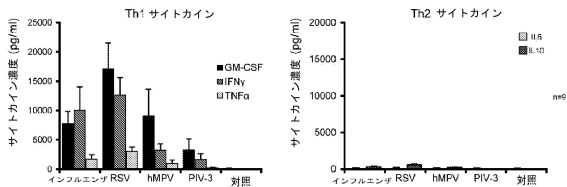


30

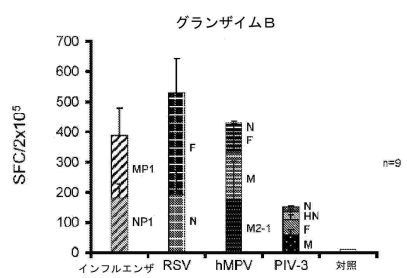
40

50

【図 3 C】



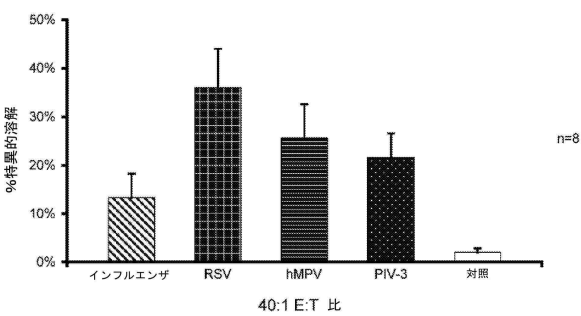
【図 3 D】



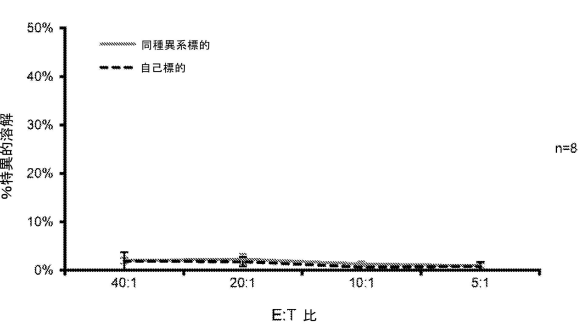
10

20

【図 4 A】



【図 4 B】

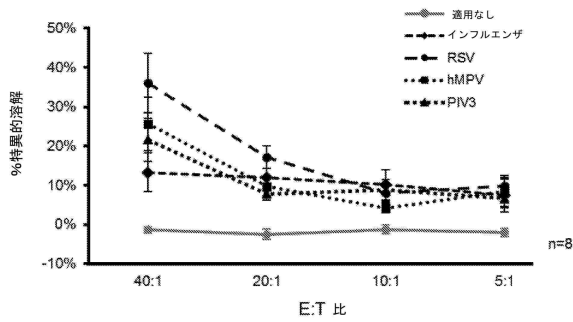


30

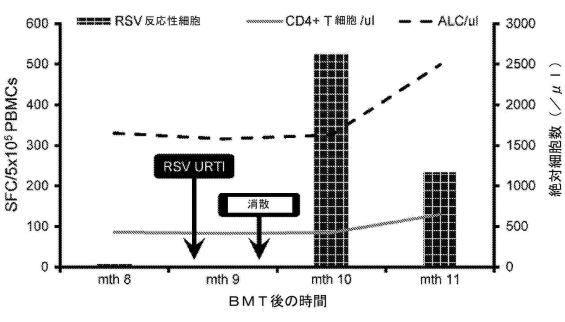
40

50

【図 4 C】

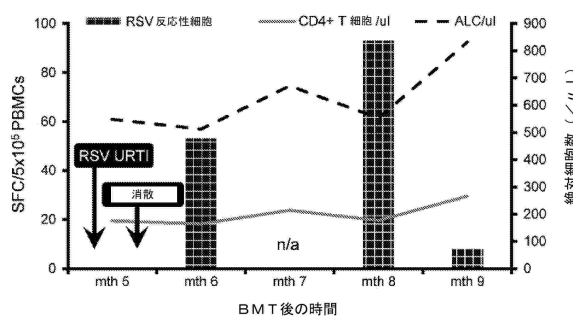


【図 5 A】

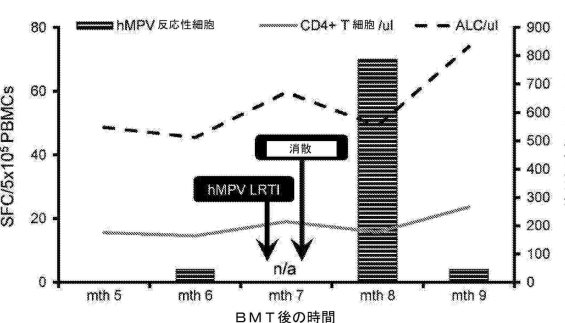


10

【図 5 B】



【図 5 C】

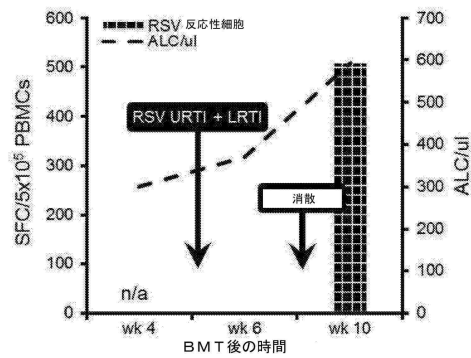


30

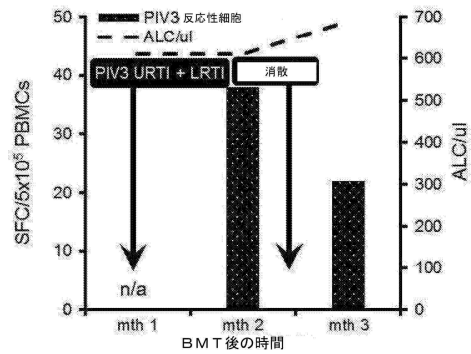
40

50

【図 6 A】

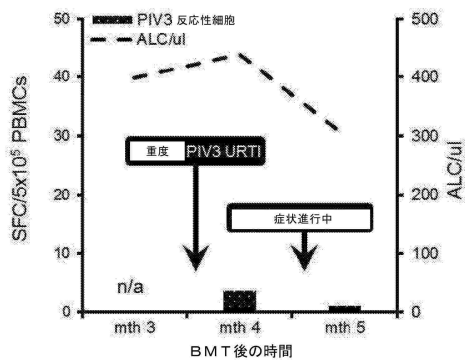


【図 6 B】

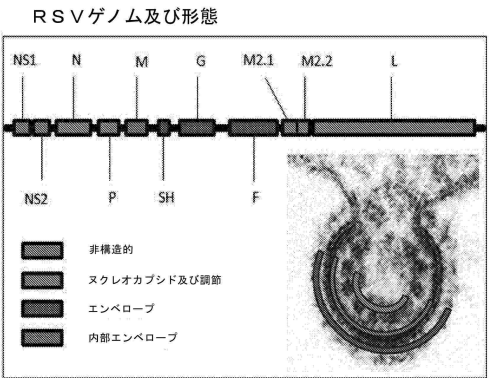


10

【図 6 C】



【図 7】



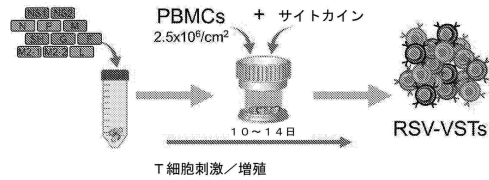
20

30

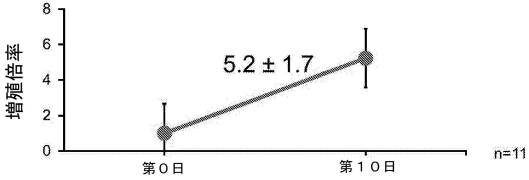
40

50

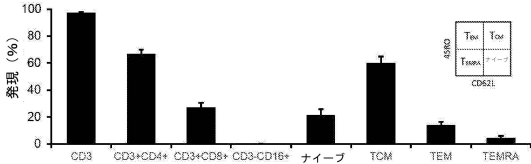
【図 8】



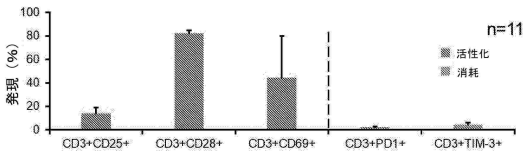
【図 9 A】



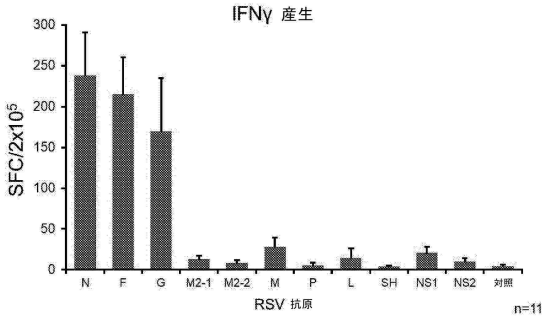
【図 9 B】



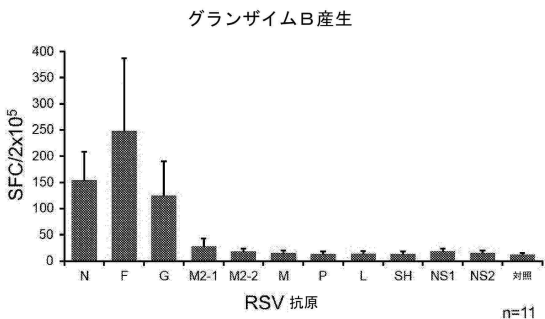
【図 9 C】



【図 10 A】



【図 10 B】



10

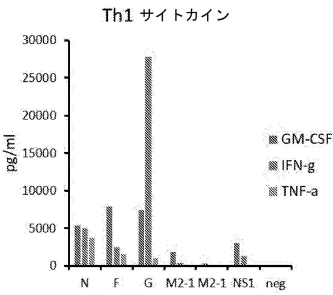
20

30

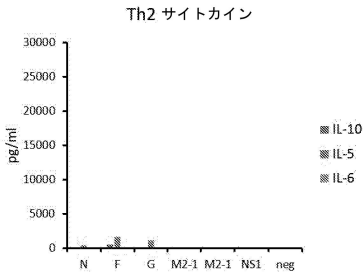
40

50

【 図 1 1 A 】



【 図 1 1 B 】



n=7

10

20

30

40

50

フロントページの続き

、ヒューストン、ワン ベイラー プラザ、ベイラー カレッジ オブ メディスン内

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献

特表 2 0 1 3 - 5 0 2 2 3 5 (J P , A)

特表 2 0 0 3 - 5 1 6 1 4 8 (J P , A)

特表 2 0 1 8 - 5 2 9 3 3 9 (J P , A)

伊藤康彦 外, ヒト型パラインフルエンザウイルスの抗原構造, ウイルス, 1989, Vol.39, No.1, p.29-45

JOHNSTONE C et al. , Relevance of viral context and diversity of antigen-processing routes for respiratory syncytial virus cytotoxic T-lymphocyte epitopes , Journal of General Virology , 2008年09月 , Vol.89 , p.2194-2203

ZHONG W et al. , Genome-wide characterization of a viral cytotoxic T lymphocyte epitope repertoire , The Journal of Biological Chemistry , 2003年09月05日 , Vol.278 , No.46 , p.45135-45144

Fu TM et al. , Protective cellular immunity: cytotoxic T-lymphocyte responses against dominant and recessive epitopes of influenza virus nucleoprotein induced by DNA immunization , Journal of Virology , 1997年04月 , Vol.71 , No.4 , p.2715-2721

Guillermina AM et al. , Mapping and Characterization of the Primary and Anamnestic H-2d-Restricted Cytotoxic T-Lymphocyte Response in Mice against Human Metapneumovirus , Journal of Virology , 2007年10月15日 , Vol.81 , No.20 , p.11461-11467

Herd KA et al. , Cytotoxic T-lymphocyte epitope vaccination protects against human metapneumovirus infection and disease in mice , Journal of Virology , 2006年02月 , Vol.80 , No.4 , p.2034-2044

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 5 / 0 0 - 5 / 2 8

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

G o o g l e