



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110177558 B

(45) 授权公告日 2025. 02. 28

(21) 申请号 201780066129.4  
 (22) 申请日 2017.09.13  
 (65) 同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 110177558 A  
 (43) 申请公布日 2019.08.27  
 (30) 优先权数据  
 62/395,438 2016.09.16 US  
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日  
 2019.04.25  
 (86) PCT国际申请的申请数据  
 PCT/US2017/051284 2017.09.13  
 (87) PCT国际申请的公布数据  
 W02018/052947 EN 2018.03.22  
 (73) 专利权人 贝勒医学院  
 地址 美国得克萨斯  
 (72) 发明人 C·M·汝尼 N·拉普特瓦多伊尔  
 S·沙尔玛 D·瓦格纳  
 (74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所  
 有限公司 11038  
 专利代理师 张小勇

(51) Int.Cl.  
 G12N 5/0783 (2010.01)  
 A61K 40/42 (2025.01)  
 A61K 40/46 (2025.01)  
 A61K 40/11 (2025.01)  
 A61P 31/20 (2006.01)  
 A61P 31/12 (2006.01)  
 A61P 35/00 (2006.01)  
 A61P 31/22 (2006.01)  
 A61P 31/18 (2006.01)  
 (56) 对比文件  
 CN 104769104 A, 2015.07.08  
 S. Lam 等. Developing Multi-HIV  
 Antigen Specific T Cells as a Component  
 of a Cure Strategy.《PepMix™ ULTRA Peptide  
 Pools APPLICATION NOTE IMMUNOLOGY》. 2015,  
 D Teschner 等. Depletion of naive T  
 cells using clinical grade magnetic  
 CD45RA beads: a new approach for GVHD  
 prophylaxis.《Bone Marrow Transplant》  
 .2013,第49卷(第1期),138-144. (续)

审查员 崔力方

权利要求书2页 说明书22页 附图31页

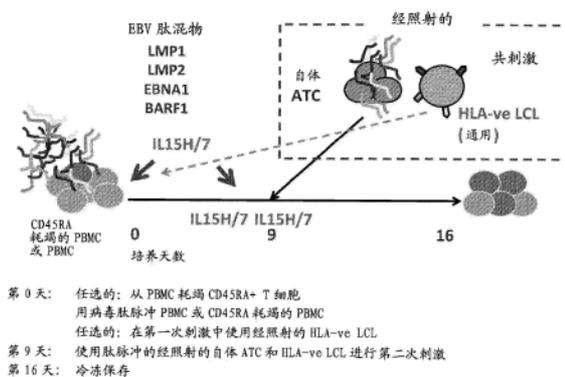
(54) 发明名称

用于病毒特异性T细胞的活化和扩增的平台

(57) 摘要

本公开内容的实施方案涉及及用于与非HPV病毒相关的疾病和恶性肿瘤或非病毒相关的疾病和恶性肿瘤的免疫疗法的方法和组合物,例如其中VST编码特异性针对非病毒性癌症的CAR和能够使用病毒、病毒疫苗或溶瘤病毒在体外或体内刺激VST。在具体的实施方案中,方法涉及靶向HIV、EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV的一种或多种抗原的免疫细胞的产生,包括具有使用IL-7和IL-15但非IL-2、IL-4或两者的刺激步骤的方法。其他具体实施方案在某些细胞(例如共刺激细胞和某些抗原呈递细胞)的存在下利用刺

激。



CN 110177558 B

[接上页]

**(56) 对比文件**

Sytse J Piersma, Marij J P Welters, Jeanette M van der Hulst, Judith N Kloth, Kitty M C Kwappenberg, Baptist J Trimbos, Cornelis J M Melief, Bart W Hellebrekers, Gert Jan Fleuren, Gemma G Kenter, Rienk Offringa, Sjoerd H van der Burg. Human

papilloma virus specific T cells infiltrating cervical cancer and draining lymph nodes show remarkably frequent use of HLA-DQ and -DP as a restriction element. International Journal of Cancer. 2008, 第122卷 (第3期), 第487页及图1.

1. 一种产生Epstein-Barr病毒 (EBV) 特异性T细胞的方法,其包括在存在IL-7和IL-15的情况下并且在不存在IL-2的情况下用抗原呈递细胞刺激外周血T细胞群的步骤,其中所述抗原呈递细胞暴露于肽文库或预先暴露于肽文库,其中:

(a) 所述方法在不存在IL-4的情况下进行;和

(b) 所述方法包括耗竭外周血T细胞中的CD45RA阳性细胞;

并且其中所述肽文库包含对应于至少一种类型的EBV的一种或多种抗原的肽,其中所述肽对应于病毒肽内存在的连续氨基酸序列并且长度为至少或不超过8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸,并且其中所述肽在序列上与其他肽重叠3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个氨基酸。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述刺激在不存在IL-6、IL-12、IL-21或其组合的情况下发生。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中与正常水平相比,外周血T细胞群具有以下一种或多种的降低的水平:1) NK细胞;2) 能够作为旁邻细胞生长的幼稚细胞;和/或3) T调节细胞。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中外周血单核细胞 (PBMC) 或由其获得的外周血T细胞进行降低以下一种或多种的水平的步骤:1) NK细胞;2) 能够作为旁邻细胞生长的幼稚细胞;3) T调节细胞和/或4) 抑制性骨髓细胞。

5. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述外周血T细胞存在于PBMC群中或从其获得或分离。

6. 根据权利要求3所述的方法,其中耗竭PBMC或单采血液成分术产物的以下中的一种或多种:1) NK细胞;2) 能够作为旁邻细胞生长的幼稚细胞;和/或3) T调节细胞。

7. 根据权利要求4所述的方法,其中群体中的PBMC是非贴壁PBMC。

8. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述抗原呈递细胞是树突细胞或PBMC。

9. 根据权利要求1或2所述的方法,其中刺激步骤在共刺激细胞的存在下发生。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述共刺激细胞是CD80+、CD86+、CD83+、4-1BBL+或其组合,或其中所述共刺激细胞是HLA阴性淋巴母细胞样细胞。

11. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述刺激在活化的T细胞、树突细胞、PBMC或HLA阴性共刺激细胞的存在下发生。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中当刺激在活化的T细胞、树突细胞、PBMC或HLA阴性共刺激细胞的存在下发生时,该刺激步骤不是第一刺激步骤。

13. 根据权利要求11所述的方法,其中活化的T细胞对个体是自体的。

14. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述刺激在肽混物、肽混物脉冲的自体活化T细胞的存在下、在HLA阴性共刺激细胞的存在下或在这两种都存在的情况下发生。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中当刺激在肽混物脉冲的自体活化T细胞的存在下、在HLA阴性共刺激细胞的存在下或在这两种都存在的情况下发生时,该刺激步骤不是第一刺激步骤。

16. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述肽文库包含长度为15个氨基酸的肽。

17. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述文库中的肽在序列上与其他肽重叠11个氨基酸。

18. 根据权利要求1或2所述的方法,其中通过第一刺激步骤产生的T细胞可能受一个或多个后续刺激步骤的影响。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中后续刺激步骤在IL-7和IL-15的存在下发生。

20. 根据权利要求18所述的方法,其中后续刺激步骤在活化的T细胞、共刺激细胞、IL-7和IL-15的存在下发生。

21. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述方法在不存在将由所述方法产生的T细胞暴露于预先暴露于肽文库的活化B细胞的情况下进行。

22. 根据权利要求1或2所述的方法,其中修饰细胞以从表达载体表达基因产物。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中修饰细胞以表达嵌合抗原受体、 $\alpha\beta$ T细胞受体或其组合。

24. 根据权利要求1-23中任一项所述的方法产生的治疗有效量的T细胞在制备药物中的用途,所述药物用于治疗已暴露于EBV、对于EBV是血清阳性的、或者患有与EBV相关的疾病的个体。

25. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述方法的一个或多个步骤不存在外源添加的IL-2。

26. 一种刺激特异性针对EBV的T细胞的方法,包括在存在IL-7和IL-15但不存在IL-2和IL-4以及存在共刺激细胞的情况下用抗原呈递细胞刺激特异性针对EBV的T细胞,其中所述抗原呈递细胞预先暴露于一种或多种肽,其中所述肽对应于至少一种类型的EBV的一种或多种抗原,其中所述肽对应于病毒肽内存在的连续氨基酸序列并且长度为至少或不超过8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸,并且其中所述肽在序列上与其他肽重叠3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个氨基酸,并且其中耗竭抗原呈递细胞的CD45RA阳性细胞。

27. 一种产生用于EBV相关疾病的治疗性T细胞的方法,所述方法包括在存在IL-7和IL-15但不存在IL-2和IL-4以及存在共刺激细胞的情况下用抗原呈递细胞刺激特异性针对EBV的T细胞的步骤,其中所述抗原呈递细胞预先暴露于一种或多种肽,其中所述肽对应于至少一种类型的EBV的一种或多种抗原,其中所述肽对应于病毒肽内存在的连续氨基酸序列并且长度为至少或不超过8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸,并且其中所述肽在序列上与其他肽重叠3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个氨基酸,其中所述刺激产生用于EBV相关疾病的T细胞治疗剂,其中耗竭抗原呈递细胞的CD45RA阳性细胞。

## 用于病毒特异性T细胞的活化和扩增的平台

[0001] 本申请要求2016年9月16日提交的美国临时专利申请系列号62/395,438的优先权,其通过引用整体并入本文。

[0002] 关于美国联邦政府赞助的研究或开发的声明

[0003] 本发明是在美国国立卫生研究院/国家癌症研究所授予的3300028311和3300028312下由美国政府支持完成的。美国政府拥有本发明的某些权利。

### 技术领域

[0004] 本公开内容至少涉及免疫学、细胞生物学、分子生物学和医学领域,包括癌症医学。

[0005] 背景

[0006] 抗原特异性T细胞活化和扩增需要3个信号。信号1需要T细胞受体 (TCR) 结合其同源肽-MHC复合物。信号2需要刺激T细胞表面上的共刺激受体,以及信号3来源于细胞因子。在体外,约每7至14天需要这些信号一次以维持抗原特异性T细胞的扩增。在这些信号中的任何一个均不存在的情况下,T细胞将不能增殖并且可能变得无反应或死亡。这些需要引入了若干挑战,特别是当活化来自癌症患者的肿瘤抗原特异性T细胞时,其肿瘤抗原特异性T细胞通常是无反应的(对活化无反应)或以其他方式功能失调。

[0007] 已经解决的抗原特异性T细胞活化和扩增的主要挑战包括:

[0008] 1. 肿瘤诱导的T细胞无反应性。循环T细胞已被肿瘤无反应化并且难以从癌症患者的血液扩增;和

[0009] 2. 独有的抗原特异性CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞的扩增需要用在HLA I类和II类分子上均表达肿瘤抗原的自体抗原呈递细胞和共刺激分子重复刺激抗原特异性T细胞。如果刺激过于强力,则非特异性旁邻细胞扩增,从而稀释抗原特异性T细胞。

[0010] 自体树突细胞 (DC) 是强力的抗原呈递细胞,但它们的数量是有限的;它们不会分裂并且它们的单核细胞前体少于血液单核细胞 (PBMC) 的10%。将需要大量的血液来获得足够的DC以用于T细胞扩增(300mL至1升的血液)。

[0011] 自体EBV转化的B淋巴母细胞样细胞系 (LCL) 也是优异的抗原呈递细胞,但是从患者建立LCL需要至少6周,并且LCL表达与更弱的EBV和非EBV抗原竞争的高免疫原性EBV抗原。

[0012] 本公开内容解决了与抗原特异性T细胞活化和扩增相关的各种问题,并且缓解了本领域长期以来对用有效免疫疗法治疗病毒相关疾病和恶性肿瘤的需要。

[0013] 概述

[0014] 本公开内容涉及牵涉免疫原性识别特定靶标的免疫系统细胞的方法和组合物。在一些实施方案中,本发明涉及靶向在个体中引发免疫应答的生物学部分的病毒特异性T细胞 (VST) (也可称为病毒抗原特异性T细胞或抗原特异性T细胞) 的开发。在具体的实施方案中,本公开内容涉及靶向病毒抗原(包括病毒疾病相关抗原)的VST的开发。本公开内容的实施方案包括产生CD8<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞和不进行杀伤但产生一种或多种细胞因子的细胞。

在一些情况下,产生细胞毒性T细胞的混合物,并且在一些情况下,混合物靶向多于一种病毒抗原,包括多于一种病毒的多于一种抗原。在特定的实施方案中,病毒不是人乳头瘤病毒(HPV)。本公开内容的实施方案涉及非HPV特异性T细胞的产生和/或扩增。

[0015] 本公开内容的实施方案涉及用于向感染非HPV病毒或患有与HPV无关的病毒相关疾病和恶性肿瘤(包括与某些病毒相关的癌症)的个体提供治疗的方法和组合物。在具体的实施方案中,本公开内容涉及用于能够靶向病毒相关的医学病症并且是其治疗方法的过继性细胞免疫疗法的方法和组合物。

[0016] 在某些方面,本公开内容涉及靶向例如来自EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒、HIV和/或VZV的抗原的多种T细胞的开发。本发明提供了对产生具有针对来自EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV的抗原的特异性的T细胞系的方法的显著且非显而易见的改进,其中所述病毒不是HPV。

[0017] 在本公开内容的一些实施方案中,个体需要本发明的方法和/或组合物。在某些实施方案中,例如个体已经暴露于EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV(其存在可能为个体所知或可能不为个体所知),或者例如个体被怀疑已经暴露于EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV或处于暴露于EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV的风险。在某些实施方案中,例如个体患有或怀疑患有与EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV相关的疾病或处于患有与EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV相关的疾病的风险,或已经接种EBV、CMV、腺病毒、VZV或痘苗病毒。

[0018] 在该方法的至少一部分的具体实施方案中,与EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV相关的某些抗原以一种或多种肽的形式呈递给APC,所述肽跨越某些抗原中的一些或全部。可以在肽混合物(其可以称为肽混合物(pepmix))文库中将抗原肽提供给APC。在本公开内容的某些方面,存在用于暴露于APC的各种肽混合物的汇集。在MHC分子上呈递抗原的APC可以在某些条件下暴露于外周血T细胞,以导致特异性针对某种或某些病毒抗原的T细胞的刺激。

[0019] 在一些实施方案中,存在刺激外周血细胞例如外周血T细胞的方法,其中该方法包括在白细胞介素(IL)-7和IL-15的存在下并且,在至少一些情况下,在不存在一种或多种其他细胞因子例如IL-6和/或IL-12的情况下,用抗原呈递细胞刺激外周血T细胞,其中抗原呈递细胞预先暴露于一种或多种肽,其中所述肽包含对应于非HPV病毒的一种或多种蛋白质的至少部分序列的序列。

[0020] 用于刺激特异性针对非HPV病毒或特异性针对来自非HPV病毒的抗原的T细胞的方法包括在IL-7和IL-15的存在下和任选地在共刺激细胞的存在下用抗原呈递细胞刺激特异性针对病毒或抗原的T细胞,其中抗原呈递细胞预先暴露于一种或多种肽,其中所述肽包含对应于病毒的一种或多种蛋白质的至少部分序列的序列。

[0021] 在一些情况下,存在产生用于非HPV病毒相关疾病的治疗性T细胞的方法,包括在IL-7和IL-15中的一种或多种的存在下并且,在至少一些情况下,任选地在不存在一种或多种其他细胞因子例如IL-6和/或IL-12的情况下用抗原呈递细胞刺激外周血T细胞的步骤,其中抗原呈递细胞预先暴露于一种或多种肽,其中所述肽包含对应于非HPV病毒的一种或多种蛋白质的至少部分序列的序列,其中所述刺激产生用于不是HPV相关疾病的病毒相关疾病和恶性肿瘤的T细胞治疗剂。

[0022] 在具体的实施方案中,存在产生用于不是HPV相关疾病的病毒相关疾病和恶性肿瘤的治疗性T细胞的方法,包括在IL-7和IL-15中的一种或多种的存在下并且任选地在共刺激细胞的存在下用抗原呈递刺激特异性针对病毒或病毒抗原的T细胞的步骤,其中抗原呈递细胞预先暴露于一种或多种肽,其中所述肽包含对应于非HPV病毒的一种或多种蛋白质的至少部分序列的序列,其中所述刺激产生用于一种或多种病毒相关疾病和恶性肿瘤的T细胞治疗剂。

[0023] 在一些情况下,被刺激的外周血T细胞是从预先刺激的外周血细胞获得的,例如在IL-7和IL-15的存在下并且在至少一些情况下任选地在一种或多种其他细胞因子例如IL-6和/或IL-12的存在下用抗原呈递细胞刺激外周血细胞,其中抗原呈递细胞预先暴露于一种或多种肽,其中所述肽包含至少对应于非HPV病毒的一种或多种蛋白质的至少部分序列的序列。因此,在刺激外周血T细胞之前,该方法可以进一步包括在IL-7和IL-15的存在下并且在至少一些情况下在IL-6和/或IL-12的存在下用抗原呈递细胞刺激外周血细胞,其中抗原呈递细胞预先暴露于一种或多种肽,其中所述肽包含对应于非HPV病毒的一种或多种蛋白质的至少部分序列的序列,从而产生外周血T细胞。

[0024] 在一些实施方案中,一种或多种肽包含对应于非HPV病毒的一种或多种蛋白质的至少部分序列的序列。在一些实施方案中,一种或多种肽可以是肽文库,其也可以称为肽的集合。在具体的实施方案中,该方法可产生特异性针对EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV或来自EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV的抗原的T细胞。在一些实施方案中,该方法可以扩增存在于外周血T细胞中的特异性针对EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV或来自EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV的抗原的T细胞群。

[0025] 在本公开内容的一种或多种方法中使用的APC包括例如单核细胞、树突细胞(DC)、B-母细胞(B-Blast, BB)和/或PBMC。在特定实施方案中,抗原呈递细胞是活化的T细胞。

[0026] 在一些实施方案中,特异性针对非HPV病毒或特异性针对非来自HPV的抗原的T细胞的刺激不是第一刺激步骤。作为被刺激细胞的T细胞可以是预先刺激的产物。在某些实施方案中,特异性针对非HPV病毒或特异性针对非来自HPV的抗原的T细胞的刺激包括在白细胞介素(IL)-7、IL-15的存在下并且在一种或多种类型的共刺激细胞的存在下用抗原呈递细胞刺激特异性针对病毒或病毒抗原的T细胞。

[0027] 在一些实施方案中,该方法可以产生特异性针对非HPV病毒或特异性针对不是HPV抗原的抗原的T细胞。在一些实施方案中,该方法可以扩增特异性针对非HPV的病毒或抗原的T细胞群。

[0028] 在具体的实施方案中,在IL-7和IL-15的存在下刺激外周血T细胞任选地在不存在IL-2的情况下发生。在一些实施方案中,在IL-7和IL-15的存在下刺激外周血T细胞任选地在不存在至少IL-4的情况下发生;尽管在某些情况下添加IL-4,例如以增加CD4+T细胞。在一些实施方案中,在IL-7和IL-15的存在下刺激外周血T细胞任选地在不存在IL-6的情况下发生。在一些实施方案中,在IL-7和IL-15的存在下刺激外周血T细胞可选择地可以在不存在IL-7和/或IL-15的情况下发生。在一些实施方案中,在IL-7和IL-15的存在下刺激外周血T细胞任选地在不存在IL-12的情况下发生。在一些实施方案中,在IL-7和IL-15的存在下刺激外周血T细胞任选地在不存在IL-21的情况下发生。

[0029] 在一些实施方案中,本公开内容的方法中使用的外周血T细胞可以存在于外周血

单核细胞 (PBMC) 群中或者从其获得或分离。群体中的PBMC可以是非贴壁PBMC, 或可以是CD45RA耗竭的PBMC (例如, 以消除Treg、NK细胞和幼稚T细胞的组合)。例如, 抗原呈递细胞可以是树突细胞、B-母细胞或PBMC。

[0030] 本公开内容的方法包括产生用于非HPV的病毒相关疾病和恶性肿瘤的治疗性T细胞的方法。细胞的刺激可以产生T细胞, 其是用于非HPV相关疾病的病毒相关疾病和恶性肿瘤的治疗剂。在一些实施方案中, 提供了产生用于HPV相关疾病的治疗性T细胞的方法, 该方法包括:

[0031] (i) 刺激外周血细胞, 其中该方法包括在白细胞介素 (IL) -7和IL-15的存在下并且任选地在不存在IL-6和/或IL-12的情况下用抗原呈递细胞刺激外周血T细胞, 其中抗原呈递细胞预先暴露于一种或多种肽, 其中所述肽包含对应于非HPV病毒的一种或多种蛋白质的至少部分序列的序列; 或

[0032] (ii) 在白细胞介素 (IL) -7和IL-15的存在下并且任选地在不存在IL-6和/或IL-12的情况下, 用抗原呈递细胞刺激从 (i) 获得的T细胞, 其中抗原呈递细胞预先暴露于一种或多种肽, 其中所述肽包含对应于病毒的一种或多种蛋白质的至少部分序列的序列, 其中 (ii) 任选重复一次或多次;

[0033] (iii) 在IL-7和IL-15的存在下并且任选地在共刺激细胞的存在下, 用抗原呈递细胞刺激从 (ii) 获得的T细胞, 其中抗原呈递细胞预先暴露于一种或多种肽, 其中所述肽包含对应于病毒的一种或多种蛋白质的至少部分序列的序列, 其中 (iii) 任选重复一次或多次。

[0034] 在一些实施方案中, (i) 和 (ii) 中使用的抗原呈递细胞是单核细胞、树突细胞 (DC)、B-母细胞 (BB) 或PBMC。在一些实施方案中, (iii) 中使用的抗原呈递细胞是活化的T细胞、树突细胞 (DC)、B-母细胞 (BB) 或PBMC。在一些实施方案中, (iii) 中使用的抗原呈递细胞不同于 (i) 和/或 (ii) 中使用的抗原呈递细胞。在优选的实施方案中, (iii) 中使用的抗原呈递细胞是活化的T细胞。

[0035] 在特定实施方案中, 刺激在共刺激细胞的存在下发生。在一些实施方案中, 共刺激细胞是选自CD80+细胞、CD86+细胞、CD83+细胞、4-1BBL+细胞及其组合的一种或多种细胞类型。共刺激细胞可以是CD80+/CD86+/CD83+/4-1BBL+细胞。共刺激细胞可以是HLA阴性淋巴母细胞样细胞。

[0036] 在一些特定实施方案中, 本公开内容的方法用于产生特异性针对EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV的T细胞。在一些特定的实施方案中, 本公开内容的方法用于产生特异性针对与EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV相关的疾病和恶性肿瘤的T细胞。

[0037] 在一些实施方案中, 外周血T细胞可以从已知感染或怀疑感染或接种EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV的个体获得。抗原呈递细胞可以从已知感染或怀疑感染或接种EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV的个体获得。

[0038] 在一些实施方案中, 该方法可以在不存在将通过该方法产生的T细胞暴露于预先暴露于肽文库的活化B细胞的情况下发生。

[0039] 在一些实施方案中, 抗原呈递细胞对于预期用所获得的治疗性T细胞治疗的个体可以是自体的或同种异体的。

[0040] 在一些实施方案中, 一种或多种肽包含对应于EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV的一种或多种蛋白质的至少部分序列的序列。这些肽可以对应于病毒蛋白中存在的连

续氨基酸序列。肽的长度可以是至少或不超过8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸,或者长度为15个氨基酸。肽的集合可以形成文库,并且文库中的肽可以与其他肽在序列上以任何合适的量重叠,包括例如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个氨基酸。肽可包含对应于病毒蛋白的序列。

[0041] 可以分离和/或纯化通过本公开内容的方法产生的T细胞,例如从其他细胞中分离/纯化。

[0042] 在一些实施方案中,将通过本公开内容的方法产生的治疗有效量的T细胞提供给已暴露于非HPV病毒或患有不是来自HPV的病毒相关疾病的个体。在相关方面,提供了通过本公开内容的方法产生的T细胞,其用于治疗不是来自HPV的病毒相关疾病。在另一个相关方面,提供了通过本公开内容的方法产生的T细胞的用途,其用于制备用于治疗不是来自HPV的病毒相关疾病的药物。

[0043] 在特定实施方案中,本公开内容的方法包括使用病毒来促进用一种或多种工程化受体(例如嵌合抗原受体(CAR))修饰的VST的扩增。例如,如果病毒是VZV并且VST是VZV特异性的(VZVST),那么VZV疫苗(例如,ZOSTAVAX或VARIVAX)可以用于在输注后刺激CAR修饰的VZVST的增殖。如果VST特异性针对溶瘤病毒如腺病毒、马拉巴(maraba)病毒或痘苗病毒或VSV,那么溶瘤病毒(OV)不仅可以杀死肿瘤细胞,还可以刺激特异性针对该溶瘤病毒的CAR修饰的T细胞。然后CAR修饰的OV特异性T细胞(CAR-OVST)可以通过CAR杀死未感染的或转移的肿瘤细胞。

[0044] 待治疗的个体可以是人。个体可以是患者。个体可以已暴露于EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV,或患有与EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV相关的疾病。该疾病可以是肿瘤,例如任何类型的癌症。

[0045] 个体可以已经接受、正在接受或将接受针对该疾病的另外的疗法,包括在适当时另外的癌症疗法,例如手术、放射、激素疗法、化疗、免疫疗法或其组合。

[0046] 个体可以被确定为患有不是来自HPV的病毒相关癌症。

[0047] 根据本公开内容的涉及细胞刺激步骤的方法可以在体外或离体进行。术语“体外”旨在包括在实验室条件下或培养物中使用材料、生物物质、细胞和/或组织的研究。“离体”是指在生物体外例如在人体或动物体外存在或发生的物质,其可以在从生物体取出的组织(例如整个器官)或细胞上。

[0048] 在一个实施方案中,存在刺激外周血细胞的方法,该方法包括在白细胞介素(IL)-7和IL-15的存在下用抗原呈递细胞刺激外周血T细胞,其中所述抗原呈递细胞预先暴露于一种或多种肽,其中所述肽包含对应于一种或多种非HPV病毒的一种或多种蛋白质的至少部分序列的序列。

[0049] 在特定实施方案中,存在产生病毒抗原特异性T细胞的方法,包括在IL-7和IL-15(例如, $\geq 100\text{ng/mL}$ )的存在下用抗原呈递细胞刺激外周血T细胞群的步骤,其中抗原呈递细胞暴露于或预先暴露于肽文库,其中所述肽包含对应于一种或多种非HPV病毒的一种或多种蛋白质的至少部分序列的序列。

[0050] 在该方法的特定实施方案中,与正常水平相比,外周血T细胞群具有以下一种或多种的降低的水平:1)NK细胞;2)能够作为旁邻细胞生长的幼稚细胞;和/或3)T调节细胞,例如当已经耗竭起始PBMC或单采血液成分术(apheresis)产物中的CD45RA+细胞时。在某些情

况下, PBMC或其获得的外周血T细胞可能受(subject to)降低以下一种或多种的水平的影响: 1) NK细胞; 2) 能够作为旁邻细胞生长的幼稚细胞; 和/或3) T调节细胞。外周血T细胞可以存在于外周血单核细胞(PBMC)群中, 或者从其获得或分离。可耗竭PBMC或单采血液成分术产物的以下中的一种或多种: 1) NK细胞; 2) 能够作为旁邻细胞生长的幼稚细胞; 和/或3) T调节细胞。PBMC可以是CD45RA耗竭的PBMC。群体中的PBMC可以是非贴壁PBMC。在具体的实施方案中, 可耗竭PBMC的作为抑制性骨髓细胞的骨髓细胞, 例如通过贴壁或通过其他耗竭方法。

[0051] 本公开内容所涵盖的病毒包括来自疱疹病毒科的那些病毒, 或者是痘病毒、腺病毒、多瘤病毒、慢病毒、弹状病毒或其他溶瘤病毒。在具体的实施方案中, 病毒选自Epstein-Barr病毒(EBV)、巨细胞病毒(CMV)、腺病毒、痘苗病毒和/或水痘带状疱疹病毒(VZV)、HIV、流感、马拉巴病毒、水泡性口炎病毒或任何其他溶瘤病毒。

[0052] 在具体实施方案中, 在本公开内容的方法中使用的抗原呈递细胞可以是树突细胞或PBMC。

[0053] 在本公开内容所涵盖的方法中, 刺激步骤在不存在IL-6、IL-12、IL-2、IL-4、IL-21或其组合的情况下发生。在某些实施方案中, 刺激步骤在共刺激细胞的存在下发生, 例如CD80+、CD86+、CD83+、4-1BBL+或其组合的共刺激细胞, 或其中共刺激细胞是HLV阴性淋巴母细胞样细胞。刺激可以在活化的T细胞、树突细胞、PBMC或HLA阴性共刺激细胞的存在下发生。刺激可以在活化的T细胞、树突细胞、PBMC或HLA阴性共刺激细胞的存在下发生, 该刺激步骤不是第一刺激步骤。活化的T细胞对于个体可以是自体的。刺激可以在肽混合物、肽混合物脉冲的自体活化的T细胞的存在下、在HLA阴性共刺激细胞的存在下或在这两种都存在的情况下发生。在具体情况下, 当刺激在肽混合物脉冲的自体活化的T细胞的存在下、在HLA阴性共刺激细胞的存在下或在这两种都存在的情况下发生时, 该刺激步骤不是第一刺激步骤。在这种情况下, 进行两次刺激, 并且第二次刺激在共刺激细胞和肽混合物脉冲的自体活化的T细胞(AATC)的存在下发生。

[0054] 用于本公开内容的方法的肽文库可包含长度为至少或不超过8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或更多个氨基酸的肽。在具体情况下, 肽文库包含长度为15个氨基酸的肽和/或该文库中的肽与其他肽在序列上重叠11个氨基酸。

[0055] 在某些实施方案中, 通过第一刺激步骤产生的T细胞经历一个或多个后续刺激步骤, 例如在IL-7和IL-15存在下发生的后续刺激步骤。后续刺激步骤可以在活化的T细胞、共刺激细胞、IL-7和/或IL-15的存在下发生。在具体情况下, 该方法在不存在将通过该方法产生的T细胞暴露于预先暴露于肽文库的活化B细胞的情况下发生。

[0056] 在一些情况下, 通过该方法产生的细胞经修饰以从表达载体表达基因产物, 例如经修饰以表达嵌合抗原受体、 $\alpha\beta$ T细胞受体或其组合。

[0057] 在某些情况下, 通过该方法产生的治疗有效量的T细胞被提供给个体, 其已暴露于EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒、HIV和/或VZV, 对于EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒、HIV和/或VZV是血清阳性的, 或患有与EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒、HIV和/或VZV相关的疾病。在具体方面, 个体被确定为患有与EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒、HIV和/或VZV相关的医学病症。在某些实施方案中, 癌症是非病毒性癌症。

[0058] 在具体情况下,该方法的一个或多个步骤不存在外源添加的IL-4、IL-2或两者。

[0059] 在一个实施方案中,存在刺激特异性针对非HPV病毒的T细胞的方法,包括在IL-7和IL-15的存在下并且在共刺激细胞的存在下用抗原呈递细胞刺激特异性针对病毒的T细胞,其中抗原呈递细胞预先暴露于一种或多种肽,其中所述肽包含对应于非HPV病毒的一种或多种蛋白质的至少部分序列的序列。

[0060] 在另一个实施方案中,存在产生用于病毒相关疾病或非病毒相关疾病的治疗性T细胞的方法,该方法包括在IL-7和IL-15中的一种或多种的存在下并且在共刺激细胞的存在下用抗原呈递细胞刺激特异性针对非HPV病毒的T细胞的步骤,其中抗原呈递细胞预先暴露于一种或多种肽,其中所述肽包含对应于非HPV病毒的一种或多种蛋白质的至少部分序列的序列,其中刺激产生治疗病毒相关疾病或恶性肿瘤的T细胞。

[0061] 本公开内容至少包括以下内容:

[0062] 1.一种刺激外周血细胞的方法,该方法包括在白细胞介素(IL)-7和IL-15的存在下用抗原呈递细胞刺激外周血T细胞,其中抗原呈递细胞预先暴露于一种或多种肽,其中所述肽包含对应于一种或多种非人乳头瘤病毒(HPV)的病毒的一种或多种蛋白质的至少部分序列的序列。

[0063] 2.一种产生病毒抗原特异性T细胞的方法,包括在IL-7和IL-15的存在下用抗原呈递细胞刺激外周血T细胞群的步骤,其中抗原呈递细胞暴露于或预先暴露于肽文库,其中所述肽包含对应于一种或多种非HPV病毒的一种或多种蛋白质的至少部分序列的序列。

[0064] 3.段落1或2的方法,其中IL-15的浓度 $\geq 100\text{ng/mL}$ 。

[0065] 4.段落1、2或3的方法,其中刺激在不存在IL-6、IL-12、IL-2、IL-4、IL-7、IL-21或其组合的情况下发生。

[0066] 5.段落1-4中任一段的方法,其中与正常水平相比,外周血T细胞群具有以下一种或多种的降低的水平:1)NK细胞;2)能够作为旁邻细胞生长的幼稚细胞;和/或3)T调节细胞。

[0067] 6.段落5的方法,其中PBMC或由其获得的外周血T细胞可能受降低以下一种或多种的水平的步骤的影响:1)NK细胞;2)能够作为旁邻细胞生长的幼稚细胞;和/或3)T调节细胞。

[0068] 7.段落1-6中任一段的方法,其中所述病毒来自疱疹病毒科或是痘病毒、腺病毒、多瘤病毒、慢病毒、弹状病毒或其他溶瘤病毒。

[0069] 8.段落1-7中任一段的方法,其中所述病毒选自Epstein-Barr病毒(EBV)、巨细胞病毒(CMV)、腺病毒、痘苗病毒和/或水痘带状疱疹病毒(VZV)、HIV、流感、马拉巴病毒、水泡性口炎病毒和溶瘤病毒。

[0070] 9.段落1-8中任一段的方法,其中外周血T细胞存在于外周血单核细胞群(PBMC)中或从其获得或分离。

[0071] 10.段落6或9的方法,其中耗竭PBMC或单采血液成分术产物的以下中的一种或多种:1)NK细胞;2)能够作为旁邻细胞生长的幼稚细胞;和/或3)T调节细胞。

[0072] 11.段落10的方法,其中PBMC是CD45RA耗竭的PBMC和/或是CD45RO耗竭的PBMC。

[0073] 12.段落6或9-11中任一段的方法,其中群体中的PBMC是非贴壁PBMC。

[0074] 13.段落1-12中任一段的方法,其中所述抗原呈递细胞是树突细胞或PBMC。

- [0075] 14.段落1-12中任一段的方法,其中刺激步骤在共刺激细胞的存在下发生。
- [0076] 15.段落14的方法,其中共刺激细胞是CD80+、CD86+、CD83+、4-1BBL+或其组合,或其中所述共刺激细胞是HLA阴性淋巴母细胞样细胞。
- [0077] 16.段落1-15中任一段的方法,其中刺激在活化的T细胞、树突细胞、PBMC或HLA阴性共刺激细胞的存在下发生。
- [0078] 17.段落16的方法,其中当刺激在活化的T细胞、树突细胞、PBMC或HLA阴性共刺激细胞的存在下发生时,该刺激步骤不是第一刺激步骤。
- [0079] 18.段落16或17的方法,其中活化的T细胞对个体是自体的。
- [0080] 19.段落1-18中任一段的方法,其中所述刺激在肽混合物、肽混合物脉冲的自体活化T细胞的存在下、在HLA阴性共刺激细胞的存在下或在这两种都存在的情况下发生。
- [0081] 20.段落19的方法,其中当刺激在肽混合物、肽混合物脉冲的自体活化T细胞的存在下、在HLA阴性共刺激细胞的存在下或在这两种都存在的情况下发生时,刺激步骤不是第一刺激步骤。
- [0082] 21.段落1-20中任一段的方法,其中所述肽文库包含长度为至少或不超过8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或更多个氨基酸的肽。
- [0083] 22.段落1-21任一项的方法,其中肽文库包含长度为15个氨基酸的肽。
- [0084] 23.段落1-22中任一段的方法,其中文库中的肽在序列上与其他肽重叠11个氨基酸。
- [0085] 24.段落1-23中任一段的方法,其中通过第一刺激步骤产生的T细胞可能受一个或多个后续刺激步骤的影响。
- [0086] 25.段落24的方法,其中后续刺激步骤在IL-7和IL-15的存在下发生。
- [0087] 26.段落24或25的方法,其中后续刺激步骤在活化的T细胞、共刺激细胞、IL-7和IL-15的存在下发生。
- [0088] 27.段落1-26中任一段的方法,其中所述方法在不存在将由所述方法产生的T细胞暴露于预先暴露于肽文库的活化B细胞的情况下进行。
- [0089] 28.段落1-27中任一段的方法,其中修饰细胞以从表达载体表达基因产物。
- [0090] 29.段落29的方法,其中修饰细胞以表达嵌合抗原受体、 $\gamma$   $\delta$ T细胞受体或其组合。
- [0091] 30.段落1-29中任一段的方法,其中将通过所述方法产生的治疗有效量的T细胞提供给已暴露于EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒、HIV和/或VZV,对于EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒、HIV和/或VZV是血清阳性的,或者患有与EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒、HIV和/或VZV相关的疾病的个体。
- [0092] 31.段落1-30中任一项所述的方法,其中所述个体被确定为患有与EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒、HIV和/或VZV相关的医学病症。
- [0093] 32.段落1-31中任一段的方法,其中所述方法的一个或多个步骤不存在外源添加的IL-4、IL-2或两者。
- [0094] 33.一种刺激特异性针对非HPV病毒的T细胞的方法,包括在IL-7和IL-15的存在下以及在共刺激细胞的存在下用抗原呈递细胞刺激特异性针对所述病毒的T细胞,其中所述抗原呈递细胞预先暴露于一种或多种肽,其中所述肽包含对应于非HPV病毒的一种或多种

蛋白质的至少部分序列的序列。

[0095] 34.一种产生用于病毒相关疾病或非病毒相关疾病的治疗性T细胞的方法,所述方法包括在IL-7和IL-15中的一种或多种的存在下以及在共刺激细胞的存在下刺激特异性针对非HPV病毒的T细胞的步骤,其中所述抗原呈递细胞预先暴露于一种或多种肽,其中所述肽包含对应于非HPV病毒的一种或多种蛋白质的至少部分序列的序列,其中所述刺激产生用于病毒相关疾病的T细胞治疗剂。

[0096] 前面已经相当广泛地概述了本发明的特征和技术优点,以便可以更好地理解随后的本发明的详细描述。在下文中将描述本发明的附加特征和优点,其形成本发明权利要求的主题。本领域技术人员应该理解,所公开的概念和具体实施方案可以容易地用作修改或设计用于实现本发明相同目的的其他结构的基础。本领域技术人员还应该认识到,这种等同构造不脱离所附权利要求中阐述的本发明的精神和范围。当结合附图考虑时,从以下描述将更好地理解被认为是本发明的特征的新颖特征(关于其组织和操作方法)以及其他目的和优点。然而,应该清楚地理解,提供每个附图仅仅是为了举例说明和描述的目的,而不是作为对本发明的限制的定义。

[0097] 附图的简要说明

[0098] 为了更完整地理解本发明,现在参考以下结合附图的描述。

[0099] 图1举例说明了本公开内容的病毒特异性T细胞(VST)产生方法的一般实施方案。

[0100] 图2显示了与使用IL-4和IL-7的已知方法相比,使用IL-7和IL-15的本公开内容方法的改善的特异性。

[0101] 图3显示了在IL-7和IL-15的存在下生长的淋巴瘤患者EBVST的改善的特异性。

[0102] 图4显示了高剂量的IL-15增加了VST的特异性。

[0103] 图5显示高剂量的IL-15增加中枢记忆EBVST。

[0104] 图6显示了来自一些患者的EBVST中过量的NK细胞生长。

[0105] 图7举例说明了从CD45RA耗竭的PBMC产生肽混合物活化的EBVST。

[0106] 图8显示了CD45RA耗竭降低了从健康供体扩增的EBVST中CD3-CD56+NK细胞的频率。

[0107] 图9显示了去除CD45RA+细胞增加EBVST的增殖。

[0108] 图10显示了CD45RA耗竭增强了EBVST的倍数扩增。

[0109] 图11显示了CD45RA耗竭在第二次刺激结束时(第16天)增强EBVST的抗原特异性。

[0110] 图12显示了CD45RA耗竭增强EBVST的抗原特异性。

[0111] 图13显示了在第三次刺激后持续的CD45RA耗竭的EBVST的增加的抗原特异性。

[0112] 图14显示了CD45RA耗竭降低淋巴瘤患者EBVST中NK细胞群副产物(outgrowth)。

[0113] 图15显示了CD45RA耗竭增加淋巴瘤患者EBVST中抗原特异性T细胞的频率。

[0114] 图16显示了CD45RA耗竭增加来自淋巴瘤患者的EBVST中的抗原特异性。

[0115] 图17显示了CD45RA耗竭对淋巴瘤患者EBVST的增殖的影响。

[0116] 图18显示了CD45RA耗竭增强针对肽混合物脉冲的自体活化T细胞(aATC)的细胞溶解活性。

[0117] 图19举例说明了产生特异性针对EBV、CMV、腺病毒、BK病毒和HHV6的T细胞(多病毒特异性T细胞)的实施方案。

- [0118] 图20显示了多病毒特异性T细胞的扩增。
- [0119] 图21显示了多病毒特异性T细胞的抗原特异性。
- [0120] 图22显示了第一次刺激后VZV特异性VST的增殖。
- [0121] 图23显示了第二次刺激后VZVST的扩增。
- [0122] 图24显示了第一次刺激后(第8天)VZVST的特异性。
- [0123] 图25显示了第二次刺激后(第16天)VZVST的特异性。
- [0124] 图26举例说明了来自HIV血清阳性供体的HIV特异性T细胞的制造。
- [0125] 图27显示了在第二次刺激中K562细胞的最佳扩增。
- [0126] 图28显示了在K562的存在下,HIV抗原特异性T细胞(HIVST)仅在两次刺激后扩增至临床相关数量。
- [0127] 图29显示了HIVST对多种HIV抗原具有特异性。
- [0128] 图30显示了HIVST包含混合的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞。
- [0129] 图31显示了HIVST能够裂解抗原脉冲和HIV感染的靶标。
- [0130] 详细描述
- [0131] 本申请的范围不旨在限于说明书中描述的过程、机器、制造、物质组成、装置、方法和步骤的特定实施方案。
- [0132] 为了与长期存在的专利法惯例保持一致,当在本说明书(包括权利要求)中与词语包括一起使用时,词语“一个(a)”和“一种(an)”表示“一个或多个/一种或多种”。本发明的一些实施方案可以由本发明的一个或多个要素、方法步骤和/或方法组成或基本上由其组成。考虑了本文所述的任何方法或组合物能够相对于本文所述的任何其他方法或组合物实施。
- [0133] 本公开内容涉及治疗性T细胞的生产和使用,所述治疗性T细胞用于需要EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV特异性T细胞的个体,包括用于治疗与个体中的一种或多种这些病毒相关的医学病症。在一些实施方案中,本公开内容涉及用于非病毒性癌症的治疗性T细胞的产生和使用;在这种情况下,一种或多种CAR在VST中表达,并且疫苗接种或溶瘤病毒用于通过其T细胞受体刺激CAR-VST。在具体的实施方案中,在IL-7和IL-15的存在下刺激APC时产生治疗性T细胞,其中APC预先暴露于针对一种或多种病毒抗原的肽文库。
- [0134] 在特定方面,本公开内容解决了与过继性T细胞转移相关的挑战。例如,为了解决肿瘤诱导的T细胞无反应性,本发明人评估了细胞因子的各种组合,并确定至少在一些情况下高剂量的IL-15与IL-7结合促进无反应性抗原特异性T细胞的扩增(图2)。因此,对于第一次刺激,抗原特异性T细胞通过在IL7(10ng/mL)和IL15(100ng/mL)的存在下用重叠肽文库(例如包含重叠11个氨基酸并跨越目的蛋白质的15聚体氨基酸的肽混物)脉冲PBMC活化。在本文中本发明人已经评估了来自几种不同病毒的抗原以制备病毒特异性T细胞(VST)。
- [0135] 为了解决抗原呈递细胞的一个问题,本发明人已经评估了抗原呈递细胞复合物,其中用肽脉冲的自体活化的T细胞提供信号1(T细胞受体(TCR)与其同源肽-MHC复合物的结合),和HLA阴性LCL提供共刺激(信号2)。另一种人工共刺激细胞系是经遗传修饰以表达CD80、CD86、CD83和4-1BB配体的HLA阴性K562细胞系。在这种情况下,对不同的细胞类型反式提供共刺激。在这种情况下,必须不存在HLA抗原,因为这些分子是强力的抗原并且能够活化同种特异性T细胞,并且EV-LCL天然地表达一系列共刺激分子。

[0136] 此策略能够诱导对刺激性抗原具有特异性的VST的对数倍数扩增。因为在一些供体中这种策略有效地扩增了NK细胞,所以本发明人还引入了耗竭步骤。例如,可耗竭PBMC的CD45RA+T细胞。这不仅耗竭NK细胞,还耗竭幼稚T细胞和天然T调节细胞。从CD45RA耗竭的PBMC生长的VST具有更高的抗原特异性,显示更大的倍数扩增并具有最少的NK细胞。进一步地,只要在一些个体首先耗竭PBMC的RA+T细胞,发明人就能够从他们生长VST。

[0137] I. 病毒抗原和肽混物的产生

[0138] 本公开内容的方法利用将肽混合物呈递给T细胞的抗原呈递细胞。这种“加载的”APC在暴露于外周血T细胞用于刺激之前产生,并且加载的APC的产生可以或可以不由执行外周血T细胞的刺激步骤的个体或实体进行。因此,在一些实施方案中,向APC提供有效量的肽文库,作为最终产生治疗性病毒特异性T细胞(VST)或抗原特异性T细胞的方法的一部分。在本公开内容的方法中,在刺激步骤之前,将APC暴露于足够量的肽文库。在特定情况下,文库包含跨越部分或全部相同抗原的肽的混合物(“肽混物”)。在特定的实施方案中,用于APC的肽是非天然的。

[0139] 在利用来自一种或多种抗原的肽的混合物文库时,各种肽可以来自给定蛋白质的任何部分,但在具体情况下,肽跨越蛋白质的大部分或全部长度,其中肽的序列至少部分重叠以促成特定抗原的整个所需区域的覆盖。在一些情况下,肽跨越肽对应的相应抗原的长度或一个或多个已知表位或结构域。某些区域可以被跨越该区域长度的肽覆盖,包括例如区域诸如N-末端结构域、C-末端结构域、细胞外结构域或细胞内结构域。

[0140] 肽所来源自其的抗原是EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV的抗原,其可以是任何种类,但在具体实施方案中,抗原使得它们允许细胞毒性T细胞分别靶向与EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV感染相关的医学病症。在特定实施方案中,所述肽来源于或具有对应于EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒或VZV中的至少一种类型的一种或多种抗原的至少一部分的序列。在一些情况下,肽混物文库包括对应于来自单一病毒的一种或多种抗原的肽,并且那些肽可以或可以不提供所讨论的整个抗原的序列覆盖。在其他情况下,肽混物文库包括对应于来自多于一种病毒的一种或多种抗原的肽,并且那些肽可以提供或不提供所讨论的整个抗原的序列覆盖。肽混物可以或可以不富集对应于一种或多种某些抗原的一个或多个某些区域或对应于一种或多种某些抗原的整体的肽。

[0141] 本公开内容中使用的肽混物可以来自商业上可获得的肽文库和/或可以合成产生。可用文库的实例包括来自JPT Technologies (Springfield,VA)或Miltenyi Biotec (Auburn,CA)的文库。例如,基于病毒抗原的已知序列,本领域技术人员将具有足够的信息以能够产生对应于其示例性相应序列的肽。例如,基于来自这些众所周知的病毒的抗原的已知序列,本领域技术人员将具有足够的信息以能够产生对应于其示例性相应序列的肽。

[0142] 在特定的实施方案中,文库由对应于它们各自的抗原的一定长度的肽组成,尽管在一些情况下文库由具有两种或更多种不同长度的肽的混合物组成。肽可以具有一定长度,并且它们可以在序列上以一定的量重叠,尽管在一些文库中可能存在重叠长度的变化。例如,在特定的实施方案中,肽长度为至少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或35或更多个氨基酸。在特定实施方案中,肽之间存在例如至少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或34个氨基酸长度的重叠。在具体的实施方案中,肽长15个

氨基酸并且彼此重叠11个氨基酸。不同肽的混合物可包括任何比例的不同肽,但在一些实施方案中,每种特定肽在混合物中以与另一特定肽基本相同的量存在。尽管肽的序列中抗原的重叠可以是随机的并且基本上甚至是在抗原的给定区域上,但是在一些实施方案中,文库可以富集一种或多种特定肽,例如已知编码例如表位或其部分的一种或多种肽。

[0143] 在特定实施方案中,特定抗原蛋白的肽混合物包含例如8至10个氨基酸长的所有可能的HLA I类表位。在具体的实施方案中,较长的肽用于覆盖特定肽的所有II类表位。在一些情况下,表位的一系列长度是12-25个氨基酸。

[0144] II. 产生和使用治疗性VST的方法

[0145] A. 产生治疗性VST

[0146] 在某些方面,本公开内容涉及靶向来自EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV中的至少一种的一种或多种抗原的VST的开发。

[0147] 在产生T细胞的方法中,外周血T细胞初始用已经暴露于跨越一些或全部的至少一种病毒抗原的一种或多种肽的APC刺激。可以将抗原肽作为肽混合物文库提供给APC,并且可以将多个肽混合物文库提供给相同的APC集合。在一些实施方案中,该集合包括免疫显性抗原和亚显性抗原。

[0148] 在本公开内容的实施方案中,产生治疗性T细胞并且可以将其提供给具有病毒感染或处于具有间接或直接由病毒感染导致的病毒相关医学病症的风险的个体,或者提供给具有非病毒感染的肿瘤的个体。在产生治疗性T细胞的方法中,在某些条件下,将外周血T细胞与载有肽文库的APC混合,所述肽文库跨越来自一种或多种病毒的部分或全部的一种或多种病毒抗原。在具体的实施方案中,对于刺激步骤,T细胞驻留在PBMC群体内。

[0149] 因此,尽管外周血T细胞的来源可以是任何种类,但在具体实施方案中,来源是PBMC,并且在一些情况下,在所述方法中使用多个PBMC,其中所述多个PBMC包含外周血T细胞。可以至少部分地从PBMC分离或纯化外周血T细胞。在一些情况下,PBMC是非贴壁的,并且在一些情况下,PBMC是CD45RA耗竭的(其中耗竭发生在PBMC暴露于APC之前)。在具体的实施方案中,与正常标准相比,外周血T细胞具有减少数量的CD45RA阳性细胞。通过使用本领域的标准手段,包括例如磁性标记和分离(例如,使用**Miltenyi®** Biotec柱或StemSep™磁珠),可以耗竭外周血T细胞或PBMC的某些细胞。如本文所用的术语“耗竭”是指在其中基本上不含CD45RA阳性细胞的外周血T细胞或PBMC。在一些情况下,“耗竭”是指CD45RA阳性细胞与外周血T细胞或PBMC的原始集合中的那些细胞的数量相比一定百分比的减少。CD45RA阳性细胞的数量从外周血T细胞或PBMC的原始集合中减少,因为它们被特异性地操作以去除CD45RA阳性细胞。在一些情况下,在操作原始集合以除去CD45RA阳性细胞后,从外周血T细胞或PBMC的原始集合中至少有85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的CD45RA阳性和/或CD45RO阳性细胞减少。在一些实施方案中,可以使用磁珠或塑料粘附来去除骨髓细胞。

[0150] 在一些实施方案中,存在产生靶向来自EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV的至少一种抗原的T细胞的方法,并且这通常通过使多个PBMC与多个APC接触而发生,所述APC加载来自肽文库的肽,所述肽对应于来自EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV的一种或多种特定病毒抗原。在具体的实施方案中,两个细胞群的暴露允许T细胞的扩增。在特定实施方案中,刺激步骤在一种或多种特定细胞因子的存在下发生。在某些实施方案中,一种或多种

细胞因子是IL-7和/或IL-15,但在替代实施方案中,细胞因子选自IL-2、IL-15、IL-7、IL-21、IL-12、IL-6、IL-4及其组合。在具体的实施方案中,该方法的一个或多个步骤不在IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-12和/或IL-21的存在下发生,尽管可选地,可以使用IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-12和/或IL-21。提及细胞因子的存在是指外源添加的细胞因子的存在,即排除细胞培养物中存在或分泌的任何细胞因子。在一些实施方案中,所述肽进一步定义为在序列上重叠以跨越部分或全部的非HPV抗原的病毒抗原的肽。例如,在某些方面,肽重叠至少10个氨基酸,特别是11个,并且在一些实施方案中,肽的长度为至少12个或更多个氨基酸,特别是长度为15个氨基酸。

[0151] 选择适当量或浓度的给定细胞因子以包含在细胞培养物中是在本领域普通技术人员的能力范围内。举例来说,以下是某些白细胞介素的列表和可以使用的适当浓度的实例:

[0152] 白细胞介素6 (IL-6) :50至150ng/ml,以下之一:约50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml、100ng/ml、110ng/ml、120ng/ml、130ng/ml、140ng/ml或150ng/ml;

[0153] 白细胞介素7 (IL-7) :5至15ng/ml,以下之一:约5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、11ng/ml、12ng/ml、13ng/ml、14ng/ml或15ng/ml;

[0154] 白细胞介素12 (IL-12) :5至15ng/ml,以下之一:约5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、11ng/ml、12ng/ml、13ng/ml、14ng/ml或15ng/ml;

[0155] 白细胞介素15 (IL-15) :5至15ng/ml,以下之一:约5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、11ng/ml、12ng/ml、13ng/ml、14ng/ml或15ng/ml。

[0156] 下表1提供了本公开内容的方法的某些实施方案的实例。

[0157] 表1:方法的要素的实例

实施方案	实施方案的实例
T 细胞的来源	白细胞分离术产物 单采血液成分术产物 外周血单核细胞 (PBMC) 非贴壁 PBMC CD45RA 耗竭的 PBMC 耗竭骨髓细胞
用于第一次刺激的抗原呈递细胞 (APC)	树突细胞 (DC) 或 PBMC 或单核细胞
[0158] 用于第一次刺激的细胞因子	IL15、IL-7、IL21、IL12、IL-6、IL-4 的组合 (尽管在具体实施方案中未使用 IL-4)
抗原	用于 EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或 VZV 的病毒肽混合物
用于第二次刺激的 APC	DC PBMC 自体活化的 T 细胞 (AATC) + HLA 阴性共刺激细胞
用于第 3 次和随后的刺激的 APC	Px-AATC+ HLA 阴性共刺激细胞
共刺激细胞	表达 CD86、4-1BB-L、CD83 和 CD80 的 K562 或 HLA 阴性淋巴母细胞样细胞系 (LCL)

[0159] 因此,在特定实施方案中,将T细胞群(其中群体可包含一些、大多数或基本上所有T细胞或其中T细胞群在另一细胞群内,例如在PBMC内)暴露于APC群以产生具有特定特征的

T细胞系,至少包括:a) 靶向病毒抗原的有效性;b) 多克隆性(polyclonality);c) TH1偏倚;d) 最低限度分化的记忆类型;或e) 其组合。在具体的实施方案中,细胞可以是最低限度分化的,但在一些情况下,它们可能并非全部是,并且大部分可能在某种程度上是分化的。

[0160] 在一些情况下,T细胞被刺激不止一次,并且不同的刺激步骤可以或不将细胞群暴露于相同的条件。在具体的实施方案中,第一次刺激具有与后续刺激不同的条件,包括第二次刺激和/或第三次刺激。在具体的实施方案中,该方法的第一刺激步骤利用作为载有肽混物的DC或载有肽混物的PBMC的APC并利用IL-7和IL-15,尽管在替代实施方案中该步骤利用选自IL15、IL-7、IL21、IL12、IL-6和/或IL-4的一种或多种细胞因子。该刺激步骤可任选地重复一次或多次。

[0161] 在所述方法的某些实施方案中,在外周血T细胞(或PBMC)初始暴露于肽混物或APC后第8天和第10天之间,可能在第8天、第9天或第10天(但很少更晚)再次刺激PBMC,然后在第15天、第16天或第17天可以进行随后的再次刺激(参见图7作为一个具体实施方案的实例)。

[0162] 在一些情况下,在第一刺激步骤之后的刺激步骤(包括第一刺激步骤的可选重复),在第一次刺激之后获得的所得T细胞(并且其可以驻留于异质细胞群中)可以暴露于载有肽混物的DC或载有肽混物的PBMC和/或肽混物脉冲的自体活化的T细胞和/或HLA阴性的共刺激细胞。通常在第8至10天用肽混物脉冲的AATC与HLA-ve共刺激细胞组合的第二次刺激后产生足够的细胞。偶尔可能需要使用相同的抗原呈递复合物的第三次刺激。可用于任何刺激步骤的共刺激细胞至少包括表达CD86、4-1BB和/或CD83的细胞和/或HLA阴性淋巴母细胞样细胞。在具体情况下,共刺激细胞可以是基因修饰的K562细胞。

[0163] 在一些实施方案中,在该方法的步骤期间,修饰培养中的细胞。在具体的实施方案中,修饰细胞以携带表达基因产物的多核苷酸,所述基因产物使细胞对特定目的或功能有效或更有效,例如有效或更有效地靶向特定靶标和/或增强例如T细胞介导的细胞毒性的功能。在具体的实施方案中,修饰细胞以表达某种非天然受体,其允许T细胞有效或更有效地靶向期望的靶细胞,例如表达某种抗原的靶细胞。在具体的实施方案中,修饰细胞以表达嵌合抗原受体(CAR),等等。可以在方法过程中的特定时间点修饰细胞以表达表达载体(其可以是病毒(包括逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒等)或非病毒的,例如转座子如piggyBac),例如在培养的第2天和第5天之间引入载体,例如使得载体在具有长期再增殖潜力的T细胞中表达。在具体的实施方案中,细胞在每次刺激后约3天内暴露于表达载体,但在这种情况下,修饰发生在具有较少长期潜力的更分化的T细胞中(这在特定情况下是期望的,例如如果基因修饰细胞的长期表达不是期望的,例如在转基因具有潜在毒性的情况下)。

[0164] 在具体的实施方案中,修饰细胞以表达靶向癌抗原的CAR,例如EphA2、HER2、GD2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、5T4、8H9、 $\alpha_v\beta_6$ 整联蛋白、B细胞成熟抗原(BCMA)B7-H3、B7-H6、CAIX、CA9、CD19、CD20、CD22、 $\kappa$ 轻链、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPCAM、ERBB3、ERBB4、ErbB3/4、FAP、FAR、FBP、胎儿AchR、叶酸受体 $\alpha$ 、GD2、GD3、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2、IL11Ra、IL13Ra2、KDR、Lambda、Lewis-Y、MCSP、间皮素、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2D配体、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSC1、PSMA、ROR1、Sp17、SURVIVIN、TAG72、TEM1、TEM8、VEGFR2、癌胚抗原、HMW-MAA、VEGF受体

和/或存在于肿瘤细胞外基质(例如纤连蛋白、肌腱蛋白的肿瘤变体)或肿瘤的坏死区域中的其他示例性抗原和其他肿瘤相关抗原或通过例如基因组分析和/或肿瘤的差异表达研究鉴定的可作用突变。

[0165] B. 使用治疗性VST

[0166] 在某些实施方案中,将通过本公开内容的方法产生的细胞提供给有此需要的个体用于治疗医学病症或靶向病毒感染或病毒相关癌症或非病毒相关癌症,其中没有医学病症的症状可被检测到或已经表现出来。如本文所用,“治疗(treatment)”或“医治(treating)”包括对疾病或病理状况的症状或病理学的任何有益或期望的作用,并且可包括所治疗的疾病或病症的一种或多种可测量标志物的甚至最小程度的减少。治疗可任选地涉及疾病或病症的症状的减轻或改善,或疾病或病症的进展的延迟。“治疗”不一定表示完全根除或治愈疾病或病症或其相关症状。

[0167] 在本公开内容所涵盖的方法中,治疗性T细胞用于治疗由单一非HPV病毒直接或间接引起的病毒相关疾病,或以其他方式提供给对于单一非HPV病毒血清阳性的个体。在其他情况下,治疗性T细胞用于治疗由多于一种病毒直接或间接引起的疾病。在治疗性T细胞集合中,每个T细胞及其后代对来自一种病毒的一种抗原中的仅一种肽具有特异性,并且在产生治疗性T细胞集合时,扩增一群T细胞克隆,它们一起具有多特异性,例如针对每种病毒抗原中的多个表位。

[0168] 在本公开内容的至少一些方法中,将由此产生的治疗有效量的VST施用于个体,例如,已知患有或怀疑患有或易患与EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV相关的疾病的个体。在具体的实施方案中,细胞通过注射施用,例如静脉内、肌肉内、皮内、皮下、腹膜内注射等。在一些实施方案中,VST可以是多克隆CD4+和CD8+VST。PBMC对个体可以是同种异体的或对个体是自体的。

[0169] 在某些情况下,用本公开内容的细胞治疗肿瘤,并且肿瘤可以是良性的、恶性的或能够导致癌症的癌前病变。因此,可以在癌前病变阶段和/或在病变成为恶性后用本公开内容的方法产生的细胞治疗个体。个体可能患有早期或晚期癌症,并且本领域技术人员知道产生细胞的方法可以针对这样的不同癌症阶段进行定制,例如通过对于APC利用来自与早期相对晚期癌症相关的抗原的肽。在具体的实施方案中,癌症可以是原发性、转移性、复发性、难治性的等。

[0170] 在一些情况下,可以在施用细胞之前确定与医学病症相关的病毒,尽管在一些情况下不确定病毒类型。在具体的实施方案中,特异性针对EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV的细胞对分别对EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV呈阳性的个体具有活性。在某些情况下,对本文所包含的病毒之一特异性的细胞用非病毒肿瘤的受体进行基因修饰,然后输注用于治疗非病毒性肿瘤,以便病毒或病毒抗原能够用于刺激T细胞的体内扩增,例如通过接种或使用溶瘤病毒或内源病毒。

[0171] 在其中该方法的刺激步骤的APC一起装载不同病毒抗原的肽混物的情况下,通过这些APC扩增的T细胞的施用结果通过个体是否已经暴露于病毒来确定。例如,在特定实施方案中,如果个体被某种病毒感染,则只有特异性针对该病毒的T细胞才会响应,这是因为感染初始会刺激针对该病毒的T细胞应答。那些T细胞将在个体中扩增,然后变成记忆T细胞,并且其数量将高于从未被活化的特异性针对另一种病毒的T细胞。

[0172] 被治疗的个体可能已知患有与病毒相关的疾病、怀疑患有病毒相关疾病、或处于病毒相关疾病的风险中。被治疗的个体可能存在病毒,但是还没有任何与病毒相关的医学病症的有害症状。个体可能处于非HPV病毒相关疾病的风险中,鉴于使其暴露于非HPV病毒的环境或事件。

[0173] 在一些实施方案中,将通过本公开内容的方法产生的细胞的一次或多次施用被提供给有此需要的个体。多次施用之间的时间长度可以是任何合适的持续时间(包括数天、数周、数月或数年),只要随后的施用对癌症有效。在向个体提供细胞的多于一次施用的情况下,细胞所靶向的抗原可以是或可以不是与较早施用中使用的细胞相同的抗原。例如,在细胞的第一次施用,它们可以靶向一种病毒抗原,而在细胞的另一次施用中,细胞在至少一些情况下靶向不同的抗原,包括来自不同的病毒。

[0174] 在一些情况下,通过本领域的任何合适方法任选地确定个体患有病毒感染。可以采用感染诊断方法,例如利用PCR、Southern印迹杂交、原位杂交的DNA测试,并且例如这些方法可以或可以不与其他方法结合使用。

[0175] 在具体的实施方案中,个体是免疫受损的(例如,其可以定义为其利用免疫系统对抗感染性疾病或癌症的能力受损或完全不存在的个体)。在具体的实施方案中,例如免疫受损的个体已经进行了干细胞移植(包括造血干细胞移植)、已经进行了器官移植和/或已经接受过一种或多种癌症治疗,包括化疗或放射,或者已经感染了HIV。在某些情况下,个体已经获得或遗传了免疫缺陷障碍。在一些实施方案中,向对于其疾病和/或其治疗免疫受损的那些提供了本公开内容的方法和/或组合物。

[0176] A. Epstein-Barr病毒

[0177] Epstein-Barr病毒(EBV)也称为人疱疹病毒4(HHV-4),其是人疱疹病毒科中八种已知病毒之一。作为实例,EBV引起传染性单核细胞增多症、一些形式的癌症(至少包括霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、胃癌、鼻咽癌、NK/T淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤和平滑肌肉瘤)、以及与人类免疫缺陷病毒(HIV)有关的某些病症,包括毛状白斑和中枢神经系统淋巴瘤。在本公开内容的方法中,使用细胞治疗EBV感染或一种或多种EBV相关的医学病症。

[0178] 尽管EBV编码约90种蛋白质,但这些蛋白质中的有限部分在EBV相关恶性肿瘤中表达。大约80个基因参与病毒裂解周期,并且大约9个基因与病毒潜伏期相关。在一些肿瘤中,仅表达4种EBV基因,而在其他肿瘤中仅表达2种EBV基因。最近,已经显示一些肿瘤经历流产病毒复制并表达早期病毒蛋白,并且它们还显示出表达来自裂解周期的意外转录物。所有这些提供的转录物可编码VST的潜在靶抗原。通常人们能够靶向被认为是EBV 2型潜伏期抗原的LMP1、LMP2、BARF1和EBNA1。然而,在一些情况下,还可以例如靶向早期病毒蛋白,例如由BZLF1、BRLF1、BMLF1编码的那些蛋白或意外的转录物例如BXL1/2等。

[0179] B. 巨细胞病毒

[0180] 巨细胞病毒(CMV),也称为人疱疹病毒-5,是疱疹病毒科的病毒。除非受感染的个体是婴儿或免疫受损的(例如器官或组织或细胞移植受体,包括例如异基因骨髓移植后),CMV感染通常不会导致疾病。尽管CMV的任何抗原可以用本公开内容的方法产生的细胞靶向,但在具体实施方案中,抗原是立即早期抗原IE1和外皮(tegument)蛋白pp65。

[0181] C. 腺病毒

[0182] 腺病毒能够引起普通感冒、咽喉痛(咽炎)、支气管炎、肺炎、腹泻、红眼病(结膜

炎)、发烧、膀胱炎、胃肠炎和神经系统疾病。健康个体可能很少受到与腺病毒相关的严重疾病或死亡的影响。然而,婴儿和免疫系统较弱或存在呼吸道疾病或心脏病的人处于发生腺病毒感染引发严重疾病的风险较高。

[0183] 本公开内容的细胞可以靶向任何腺病毒抗原,但在具体实施方案中,抗原是六邻体蛋白和/或五邻体蛋白。

[0184] D. 痘苗病毒

[0185] 痘苗病毒(也称为VACV或VV)是在奶牛中引起牛痘但是已经提供了针对天花的有效疫苗的痘病毒,其可以用本公开内容的方法产生的细胞进行治疗。尽管痘苗病毒的任何抗原可以用本公开内容的方法产生的细胞靶向,但在特定情况下,抗原是E3L、A10L/121L、H3L/093L、G5R/074R、C7L/018R、B22R/189R、D8L、E5R、E4L、f17R、A17L和/或L4R。

[0186] E. 水痘带状疱疹病毒

[0187] 水痘带状疱疹病毒(VZV)是已知感染人和脊椎动物的八种疱疹病毒之一。VZV在儿童、青少年和年轻人中引起水痘,并且在成人和一些儿童中引起带状疱疹(带状疱疹)。VZV以许多名称而闻名,包括水痘病毒(chickenpox virus)、水痘病毒(varicella virus)、带状疱疹病毒和3型人疱疹病毒(HHV-3)。

[0188] 可用作肽源(或其序列)的VZV抗原包括任何衣壳、包膜或可溶性抗原。具体实例包括V抗原、S抗原、IE61、IE62、IE63、gE和ORF10。

[0189] 用于VZV的疫苗(**VARIVAX®**和**ZOSTAVAX®**)包含导致人中的有限感染的减毒活病毒。

[0190] III. 药物组合物

[0191] 根据本公开内容,术语“药物组合物”涉及用于施用于个体的组合物。在优选的实施方案中,药物组合物包含含有治疗性免疫细胞的组合物,用于肠胃外、透皮、腔内、动脉内、鞘内或静脉内施用或直接注射入癌症。特别考虑了通过输注或注射将药物组合物施用于个体。合适组合物的施用可以通过不同方式进行,例如通过静脉内、皮下、腹膜内、肌肉内、局部或皮内施用。

[0192] 本公开内容的药物组合物可以进一步包含药学上可接受的载体。合适的药物载体的实例是本领域熟知的并且包括磷酸盐缓冲盐水溶液,并且细胞可以在适于输注蛋白质例如人血清白蛋白的无菌缓冲液中用于输注。

[0193] 剂量方案将由已由适当的当地和联邦监管机构批准的临床方案确定。如医学领域所熟知的,任何一名患者的剂量取决于许多因素,例如患者的体型和体表面积。施用的具体剂量可以是 $5 \times 10^6/m^2$ 至 $5 \times 10^9/m^2$ 。能够通过定期评估来监测进展情况。

[0194] 在涉及针对病毒抗原产生的VST的本公开内容的某些实施方案中,对于临床方面将本公开内容的方法与有效治疗与病毒相关的一种或多种医学病症的其他药剂组合。

[0195] IV. 本公开内容的试剂盒

[0196] 本文所述的任何组合物可包含在试剂盒中。在非限制性实例中,肽混物的文库可以包含在试剂盒中,可以在试剂盒中提供任何类型的细胞,和/或可以在试剂盒中提供用于操纵肽混物和/或细胞的试剂。试剂盒中可包括细胞因子或产生它们的方法(例如编码它们的载体)。可以包括细胞培养试剂和/或装置。组分以合适的容器装置提供。

[0197] 试剂盒可包含本公开内容的适当等分的组合物。试剂盒的组分可以以水性介质或

冻干形式包装。试剂盒的容器装置通常包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶子、注射器或其他容器装置,其中可以放置组分,并且优选是适当地等分的。在试剂盒中存在多于一种组分的情况下,试剂盒通常还包含第二、第三或其他另外的容器,其中可以单独放置另外的组分。然而,组分的各种组合可包含在小瓶中。本发明的试剂盒通常还包括用于容纳严格限制的组分用于商业销售的装置。这种容器可包括注射或吹塑塑料容器,所需的小瓶保留在其中。

[0198] 然而,试剂盒的组分可以作为干燥粉末提供。当试剂和/或组分以干粉形式提供时,能够通过添加合适的溶剂来重构粉末。考虑了溶剂也可以在另一容器装置中提供。

[0199] 在一些情况下,用于检测病毒感染的试剂和/或装置可包括在试剂盒中。实例包括拭子、刮刀、细胞刷、载玻片、盖玻片、细胞学样品收集容器等。用于病毒感染的其他药物可包括在试剂盒中。

## 实施例

[0200] 提供以下实施例是为了更全面地举例说明本发明的优选实施方案。然而,它们决不应被解释为限制本发明的广泛范围。

[0201] 实施例1

[0202] 产生治疗性T细胞

[0203] 在本公开内容的一些实施方案中,存在一种机制,通过该机制人们能够快速产生T细胞(包含多克隆(例如,CD4+和CD8+)VST)的单一制剂,其对于来源于一种或多种可证明致命的人类病毒的多种抗原始终是特异性的。本公开内容易于适应临床实施,并且能够用作“现成的”抗病毒剂,包括用于EBV、CMV、腺病毒、痘苗病毒和/或VZV。该方法和组合物易于适应临床实施,并且可用作个体的安全有效的抗病毒剂。

[0204] 在具体的实施方案中,用单核细胞衍生的树突细胞在存在或不存在特异性辅助细胞因子的情况下刺激外周血T细胞,所述树突细胞载有跨越抗原蛋白的肽混合物(重叠11个氨基酸(aa)的15聚体的肽文库)。得到的T细胞系可以用载有肽混合物的活化细胞进一步扩增。

[0205] 在该方法的具体实施方案中,细胞因子IL-7和IL-15的存在是有用的。这些T细胞系具有多克隆性、多T细胞亚群呈现(包括记忆区室)和TH1偏倚的期望特征,并消除病毒靶标。本公开内容提供了可以从患有病毒相关癌症的患者中稳健地产生病毒导向的T细胞系。由于该技术可扩展且符合良好制造程序,因此这些细胞系可用于含有病毒相关医学病症的患者的过继性细胞免疫治疗。

[0206] 转向所述方法的细节,在某些情况下,DC加载有病毒抗原肽混合物文库。在这种情况下,细胞系能够识别一种或多种病毒抗原。在至少某些情况下,T细胞的扩增发生在IL-7和IL-15而非IL-2的存在下。在该方法的条件下IL-7和IL-15的存在可能或可能不在刺激和扩增的每个步骤。在一些实施方案中,在DC的初始产生/扩增后病毒特异性T细胞的扩增利用在共刺激细胞(CD80/CD86/CD83/4-1BBL或其它)和IL-7和IL-15的存在下的装载有肽混合物的自体的多克隆的活化T细胞。采用这些条件,T细胞扩增以比没有这种条件的情况更快的速率发生,并且在不损失特异性的情况下发生。

[0207] 实施例2

[0208] 产生非HPV抗原特异性T细胞

[0209] 转向本公开内容的特定实施方案,本文描述了用于产生特异性针对非HPV病毒的

抗原特异性免疫细胞(例如T细胞)的方法。在特定实施方案中,所述方法对至少EBV、CMV、腺病毒、VZV、痘苗病毒、HIV、BK和HHV6是有效的,但是所述方法也可对其他病毒有效。与本领域已知的方法相比,这些方法的修改解决了缺陷,例如在一些病毒特异性抗原特异性T细胞系中低频率的病毒特异性抗原特异性T细胞和/或例如高频率的NK细胞。

[0210] 在第一次刺激中,在具体实施方案中,不存在DC,如本领域的其他方法中一样。在该方法的步骤中可耗竭用作T细胞来源的PBMC的某些细胞,例如耗竭CD45RA<sup>+</sup>细胞。

[0211] 在该方法的任何步骤中细胞的培养可以在某些细胞因子或其组合的存在下发生,并且可能需要实现这些细胞因子的某些水平。在具体的实施方案中,该方法的一个或多个步骤以高(100ng至1000ng/mL)剂量的IL15和IL-7发生。在具体情况下,在该方法的一个或多个步骤中,使用共刺激细胞。尽管多种共刺激细胞可能是有用的,但在具体实施方案中,细胞是HLA阴性LCL。

[0212] 图1描述了用于产生病毒特异性T细胞的本公开内容方法的步骤。如其中所示,在第0天,用病毒肽脉冲PBMC(其可能或可能不耗竭某些细胞,例如CD45RA<sup>+</sup>T细胞);作为EBV的实例,使用涵盖LMP1、LMP2、EBNA1和/或BARF1的部分或全部的肽。在用肽脉冲任何类型的PBMC的第一步中,可存在细胞因子,包括某种一种或多种细胞因子,包括细胞因子的某些组合。例如,在初始脉冲步骤中,使用IL7和/或IL15,包括人IL15(IL15H)。在该第一步中,可能或可能不存在共刺激细胞,包括经照射的HLA-ve LCL。在第二次刺激中,将细胞暴露于肽脉冲的经照射的自体抗原T细胞,并且在至少一些情况下还暴露于共刺激细胞,例如HLA-ve LCL。该步骤可以或可以不在一种或多种细胞因子(包括某些组合,例如IL7和/或IL15,包括IL15H)的存在下发生。继续培养适当的时间跨度(例如许多天)后,可以使用细胞或可以将其冷冻保存。

[0213] 如上所述,本公开内容的实施方案提供对本领域中使用的某些方法的改进。图2显示了在IL-7和IL-15(代替IL-4和IL-7)存在下发生的EB病毒特异性T细胞(EBVST)的改善的特异性的结果。

[0214] 仅作为实例,本公开内容的方法是针对淋巴瘤患者开发的,其T细胞对其肿瘤细胞中表达的病毒抗原是无反应性的。本公开内容的方法的具体实施方案改善淋巴瘤患者EBVST的抗原特异性,并通过在一个或多个步骤中至少利用IL-15来克服无反应性(图3)。因此,使用IL-15代替IL-4增加了患者EBVST中抗原特异性T细胞的频率。然而,在至少一些情况下,其中IL-15已用于培养的患者中的EBVST缺乏特异性,因此优化剂量或IL-15。例如,质疑IL-15剂量是否过高,从而诱导非特异性T细胞的扩增。事实上,优化研究(图4)显示较高剂量的IL-15更好地增加特异性(100ng/mL相比于5ng/mL的标准剂量)。图5显示了高剂量的IL-15增加中枢记忆EBVST。

[0215] 解决了来自一些患者和健康供体的EBVST中过量的NK细胞副产物。在存在NK细胞优先副产物的情况下,在具体情况下,其可归因于IL-15的存在(NK细胞群似乎在IL-15和IL-7中生长的细胞系中加剧)和/或可能是可归因于使用K562cs(经过基因修饰以表达CD80、CD83、CD86和4-1BBL的经照射的HLA阴性K562细胞)(图6)或IL15和K562细胞的组合。为了解决这个问题,开发了一些条件以避免过量的NK细胞副产物。在具体的实施方案中,在T细胞活化之前利用了从PBMC耗竭的CD45RA<sup>+</sup>细胞。CD45RA是一种幼稚T细胞标记物,其也在天然T调节细胞和NK细胞上表达,因此这种耗竭应该去除NK细胞。在其他实施方案中,通过

耗竭表达CD45RA的细胞来富集CD45RO阳性细胞。此外,该步骤应该去除能够抑制抗原特异性T细胞生长的T调节细胞,特别是在癌症患者中,并且还去除能够作为旁邻细胞生长并稀释抗原特异性T细胞的幼稚细胞。可以通过任何合适的方法进行耗竭,但是在具体的实施方案中,使用磁性标记和分离(例如,使用**Miltenyi®** Biotec柱)进行耗竭。还可以使用抗体利用磁珠或纳米气泡来耗竭细胞。

[0216] 来自CD45RA耗竭的PBMC的肽混合物活化的EBVST的产生在图7中示出。如图所示,耗竭全部PBMC的CD45RA,并且从第0天或第1天开始,在IL-7和IL-15的存在下将第一次刺激(S1) EBV肽混合物加入到耗竭的细胞中以产生EBVST。在S1结束时和在第二次刺激S2开始时(例如,在第8天至第10天),将EBVST在存在IL-7和IL-15但不存在IL-2的情况下暴露于足量的EBV-肽混合物脉冲ATC和足量的共刺激细胞(例如K562cs细胞),以产生所需的肽混合物活化的EBVST。图8显示了CD45RA耗竭(使用**Miltenyi®**柱和GMP级CD45RA-缀合的珠子耗竭健康供体的CD45RA+PBMC)降低EBVST中CD3-CD56+NK细胞的频率的结果。此后,EBVST的增殖增加(图9)。图10示出了在第二刺激步骤结束时从健康供体耗竭CD45RA后EBVST的增强的倍数扩增。此外,CD45RA耗竭在第二次刺激结束时(例如,第16天)增强EBVST的抗原特异性(图11和12,均显示健康供体的数据)。在第三次刺激后,CD45RA耗竭的EBVST的抗原特异性增加(图13)。

[0217] 将CD45RA耗竭的效果在淋巴瘤患者中进行表征,选择这样的患者是因为他们的在没有耗竭的情况下生长的EBVST显示出高频率的NK细胞,或者因为它们未能生长或显示出抗原特异性。图14显示了在五个淋巴瘤患者中第二刺激步骤结束时的总NK细胞群,证明CD45RA耗竭减少了淋巴瘤患者EBVST中NK细胞群的生长,并且这种耗竭增加了抗原特异性T细胞的频率(如通过在第二次刺激结束时IFN- $\gamma$ 释放ELIspot测定法所示的)(图15)。该实验在用于第一次刺激的树突细胞的不存在下进行。类似于健康供体的结果,CD45RA耗竭增加了来自淋巴瘤患者的EBVST中的抗原特异性(图16)。淋巴瘤患者的EBVST的增殖在图17中示出。此外,CD45RA耗竭增强了针对肽混合物脉冲的自体活化T细胞(aATC)的细胞溶解活性;在效应子与靶标比例为20:1时观察到百分比裂解(图18)。

[0218] 图19举例说明了特异性针对EBV、CMV、腺病毒、BKG病毒和HHV6的多病毒特异性T细胞的产生。仅作为示例,肽混合物包括来自EBV的EBNA1、LMP2和BZLF1的肽;CMV的IE和pp65;腺病毒的六邻体蛋白和五邻体蛋白,BK的LT和VP1,和HHV6的U11、U14和U90。如图所示,包含跨越这些病毒抗原中的每一种的部分或全部的肽的肽混合物在第0天在IL7和高剂量IL15的存在下暴露于PBMC。在第9天开始第二次刺激时,在IL7和高剂量IL15的存在下将肽混合物活化的ATC和共刺激细胞(例如K562cs细胞)暴露于细胞。在第三刺激步骤时,例如从第16天开始,在IL7和IL15H的存在下将另一轮肽混合物活化的ATC和共刺激细胞(例如K562cs细胞)暴露于细胞,最终产生多病毒(m)VST(D23)细胞。

[0219] 图20显示了该方法的实施方案的后续刺激步骤时和之后的总倍数扩增。检查了多病毒特异性T细胞的抗原特异性,并且扩增对所有5种病毒具有特异性的T细胞(图21)。

[0220] 在具体的实施方案中,可以使用本公开内容的方法产生CAR修饰的T细胞。图22显示了第一次刺激后VZV特异性VST的增殖,再次比较了本公开内容的方法与使用树突细胞的方法;在第二次刺激后,DC启动的VST和PBMC启动的VST之间的增殖或VZVST的扩增没有显著

差异(图23)。图24和25显示了在第8天的第一次刺激后(图24)和第16天的第二次刺激后(图25)VZV特异性VST的特异性。在特定情况下,并且不受理论束缚,这样的结果是因为如果抗原不在肿瘤细胞中表达,则它们不是无反应性的。

[0221] 总之,在本实施例的具体说明中,本文提供了使用IL4/7中的树突细胞扩增的EBVST与本文包括的方法的比较。如所证明的,除了消除在第一次刺激中对树突状细胞的需要以外,高剂量IL-15和IL-7增加了健康供体和患者中EBVST的倍数扩增以及增加了健康供体和患者中EBV-抗原特异性T细胞的频率。该策略对多种病毒(EBV、CMV、腺病毒、BK病毒、HHV6和VZV)有效,并且对逆转录病毒转导的病毒特异性T细胞有效。最后,本文证明的数据显示CD45RA耗竭导致例如EBVST中更广泛和更高的抗原特异性和降低的NK细胞群。

[0222] 实施例3

[0223] 产生HIV抗原特异性T细胞

[0224] 在一个实施方案中,用本公开内容的方法产生特异性针对HIV抗原的T细胞。图26举例说明了从HIV血清阳性供体制备HIV特异性T细胞的一个实施方案。图27显示了在第二次刺激中具有K562细胞的细胞的最佳扩增。其中,对于DC仅在2次刺激(15-16天)+1周后显示结果。在第二次刺激期间,K562存在时的扩增高于没有K562的扩增。图28表明,在K562存在下,HIV抗原特异性T细胞(HIVST)仅在2次刺激后扩增至临床相关数量。

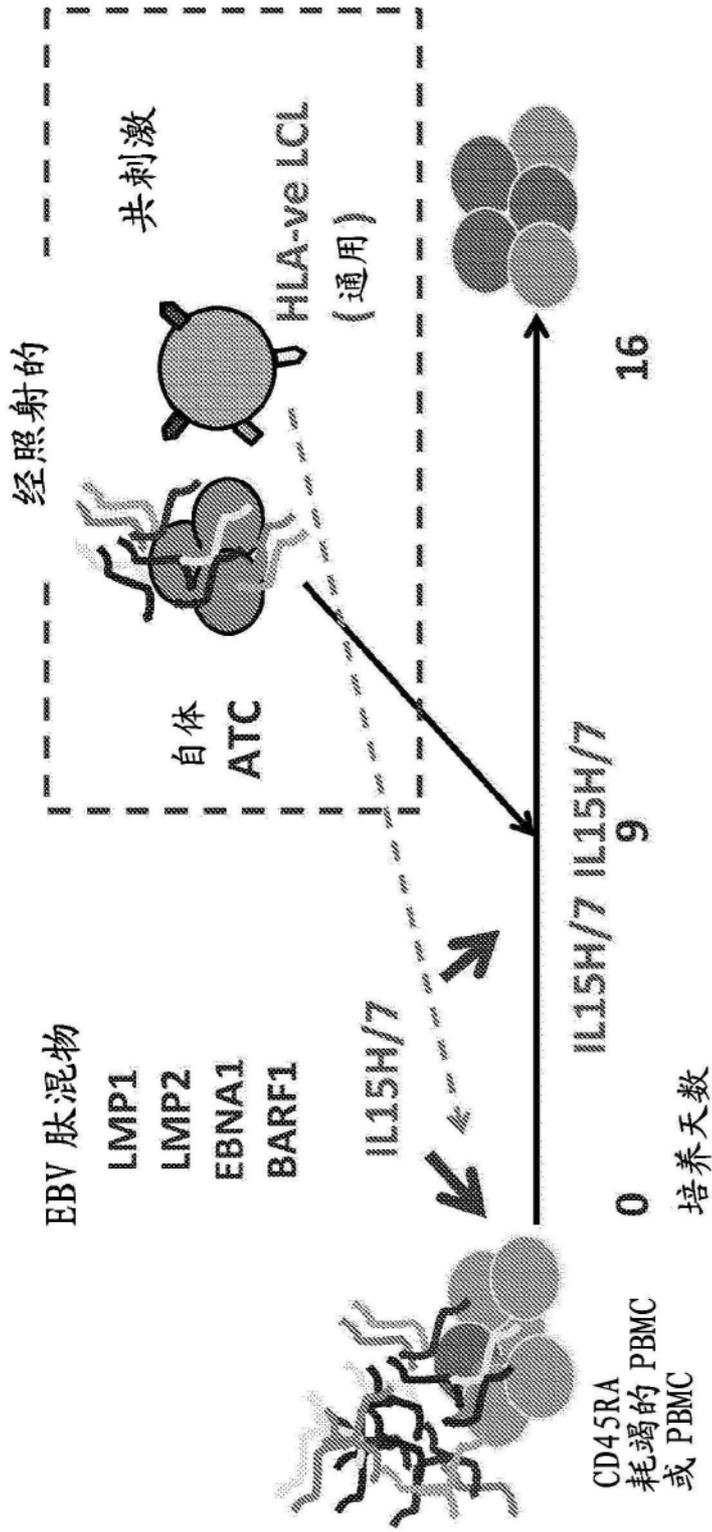
[0225] 图29显示HIVST对多种HIV抗原具有特异性。在ELIspot测定中,通过响应于每种HIV抗原的个体肽混物的干扰素(IFN)- $\gamma$ 分泌来评估HIVST的特异性。在ELIspot测定中,通过响应于每种HIV抗原的个体肽混物的干扰素(IFN)- $\gamma$ 分泌来评估HIVST的特异性。对于所有3种抗原,所有细胞系都是多特异性的。在第一次验证中,在第一次刺激后观察到等同的抗原特异性。在第二次刺激期间添加K562没有丧失特异性。在第二次刺激结束时,高剂量IL-15具有优势。对于第二次验证,在第一次刺激后存在高背景。在ARM2(高IL-15)中观察到比ARM1(低IL-15)更高的对GAG、POL和NEF的特异性。阴性对照包括<10个斑点/1e5HIVST。

[0226] 图30显示HIVST包含混合的CD4+和CD8+T细胞。尽管存在一定比例的CD4+T细胞,但细胞系主要是CD3+CD8+T细胞。T细胞系含有CD3-CD56+NK细胞亚群。在第一次验证中,在ARM1中存在相似的表型,其具有更多的CD3-CD56+CD16+NK细胞和更少的CD3+T细胞。在第二次验证中,ARM2(高IL-15)中的CD4+与CD8+细胞的比率较高(更平衡且较少的NK细胞)。因为已知CD4+T细胞提供CD8+T细胞辅助,有助于记忆、持久性和效应功能,所以HIV的任何T细胞免疫治疗方法都利用CD4+T细胞是至关重要的。虽然输注低百分比的CD4+T细胞似乎违反直觉,但过去已输注非CD4耗竭的T细胞,并且未观察到病毒载量的显著增加。

[0227] 图31表明HIVST能够裂解抗原脉冲和HIV感染的靶标。为了评估HIVST的细胞溶解特异性,本发明人将HIVST与一组<sup>51</sup>铬(<sup>51</sup>Cr)标记的自体肽混物-ATC靶细胞一起孵育。重要的是,HIVST是特异性的,因为没有观察到活化的自体靶细胞单独的裂解。使用4小时<sup>51</sup>铬释放测定法测量HIVST裂解抗原表达靶标的能力。靶细胞由自体PHA-母细胞(PHA-blast)组成,其用培养基或Gag、Pol或Nef肽混物脉冲并加载铬。HIVST与仅用它们所特异性针对的抗原(这是通过IFN- $\gamma$  ELIspot测定预先确定的)脉冲的靶细胞一起培养。

[0228] 尽管已经详细描述了本发明及其优点,但是应该理解,在不脱离由所附权利要求限定的本发明的精神和范围的情况下,可以进行各种改变、替换和变更。此外,本申请的范围不旨在限于说明书中描述的过程、机器、制造、物质组成、装置、方法和步骤的特定实施方

案。本领域普通技术人员从本发明的公开内容将容易理解,可以根据本发明使用目前存在或稍后开发的与根据本文描述的实施方案执行基本相同功能或实现基本相同结果的过程、机器、制造、物质组成、装置、方法或步骤。因此,所附权利要求旨在在其范围内包括这样的过程、机器、制造、物质组成、装置、方法或步骤。



- 第 0 天: 任选的: 从 PBMC 耗竭 CD45RA+ T 细胞用病毒肽脉冲 PBMC 或 CD45RA 耗竭的 PBMC
- 第 9 天: 任选的: 在第一次刺激中使用经照射的 HLA-ve LCL 使用肽脉冲的经照射的自体 ATC 和 HLA-ve LCL 进行第二次刺激
- 第 16 天: 冷冻保存

图1

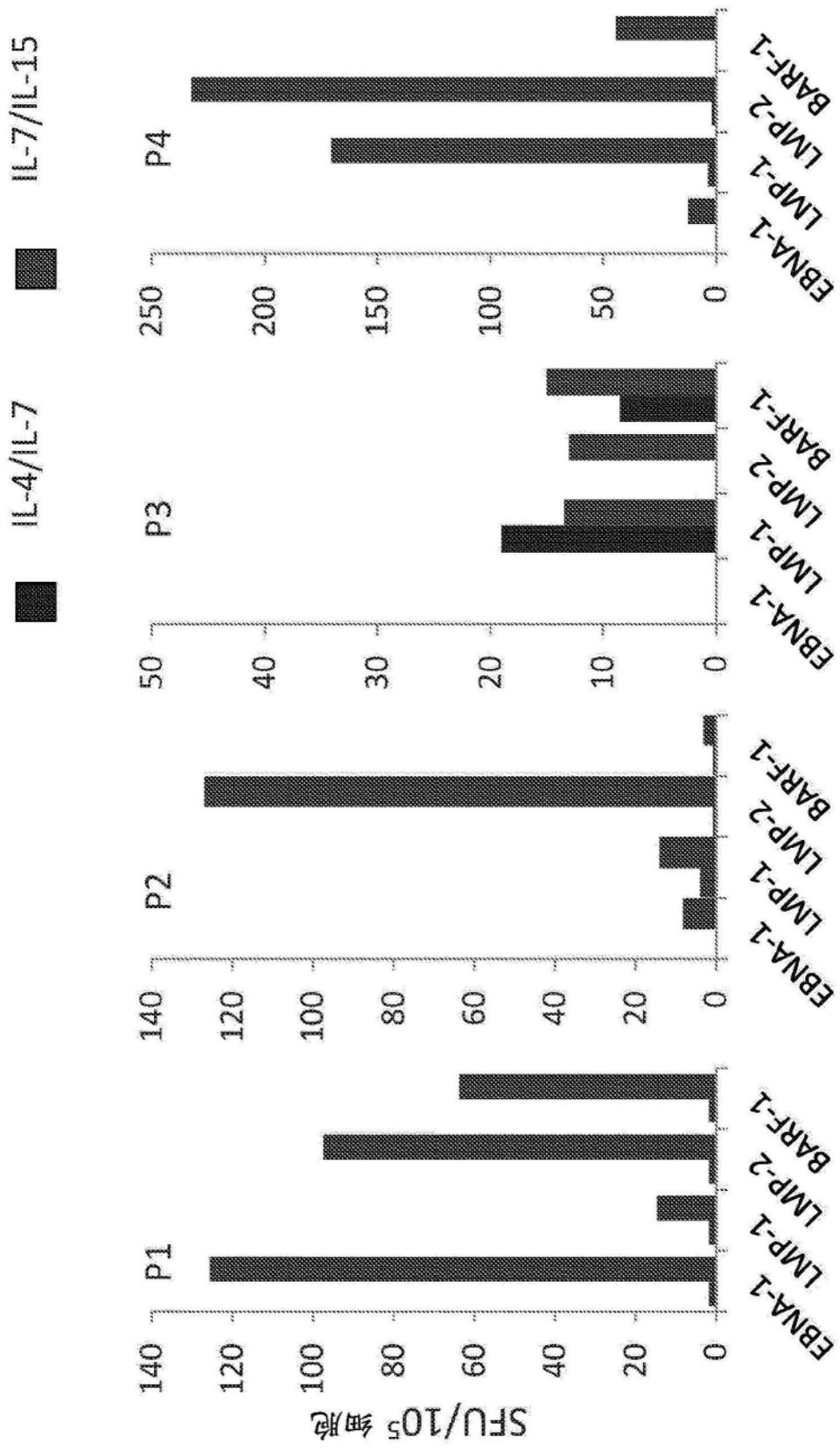


图2

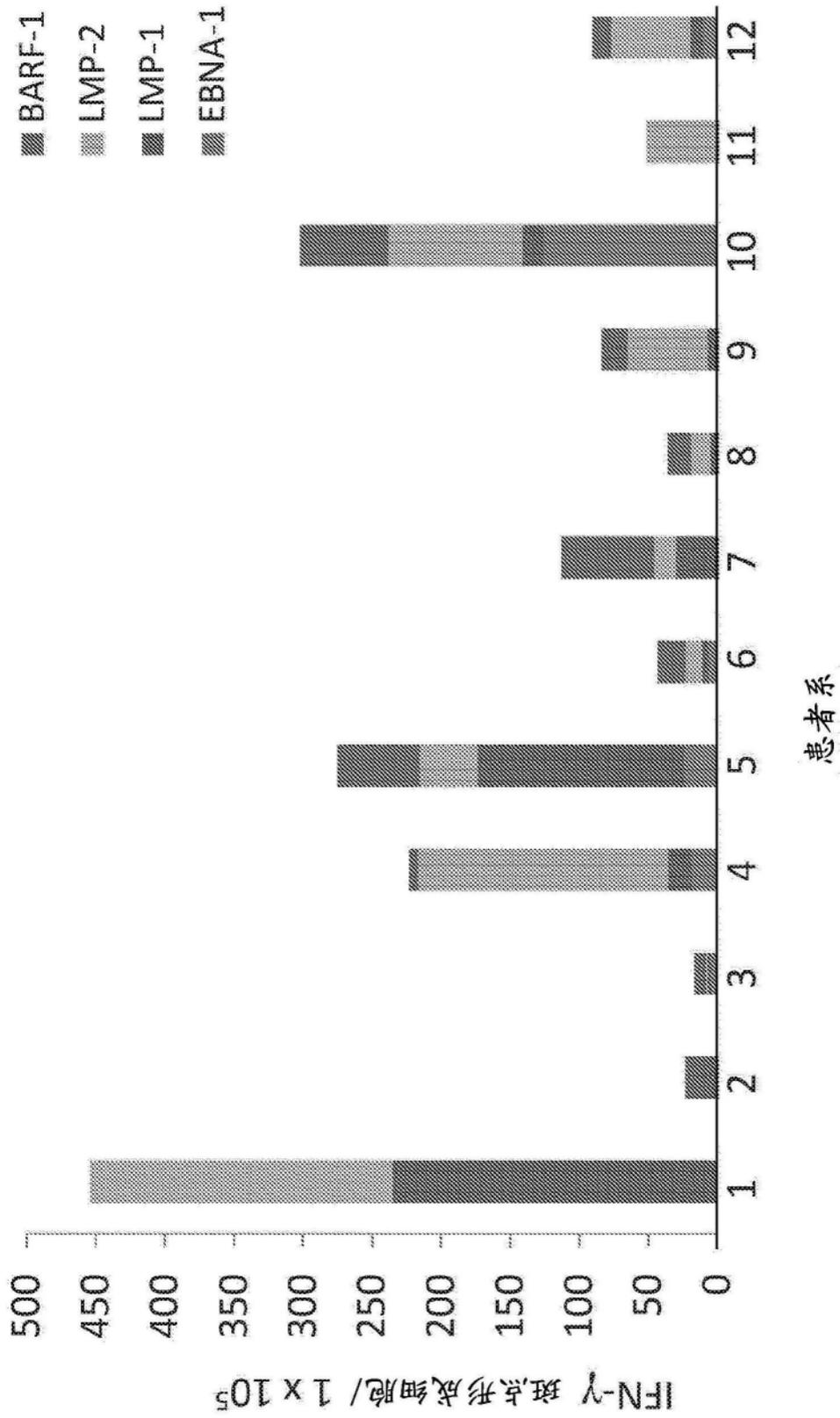


图3

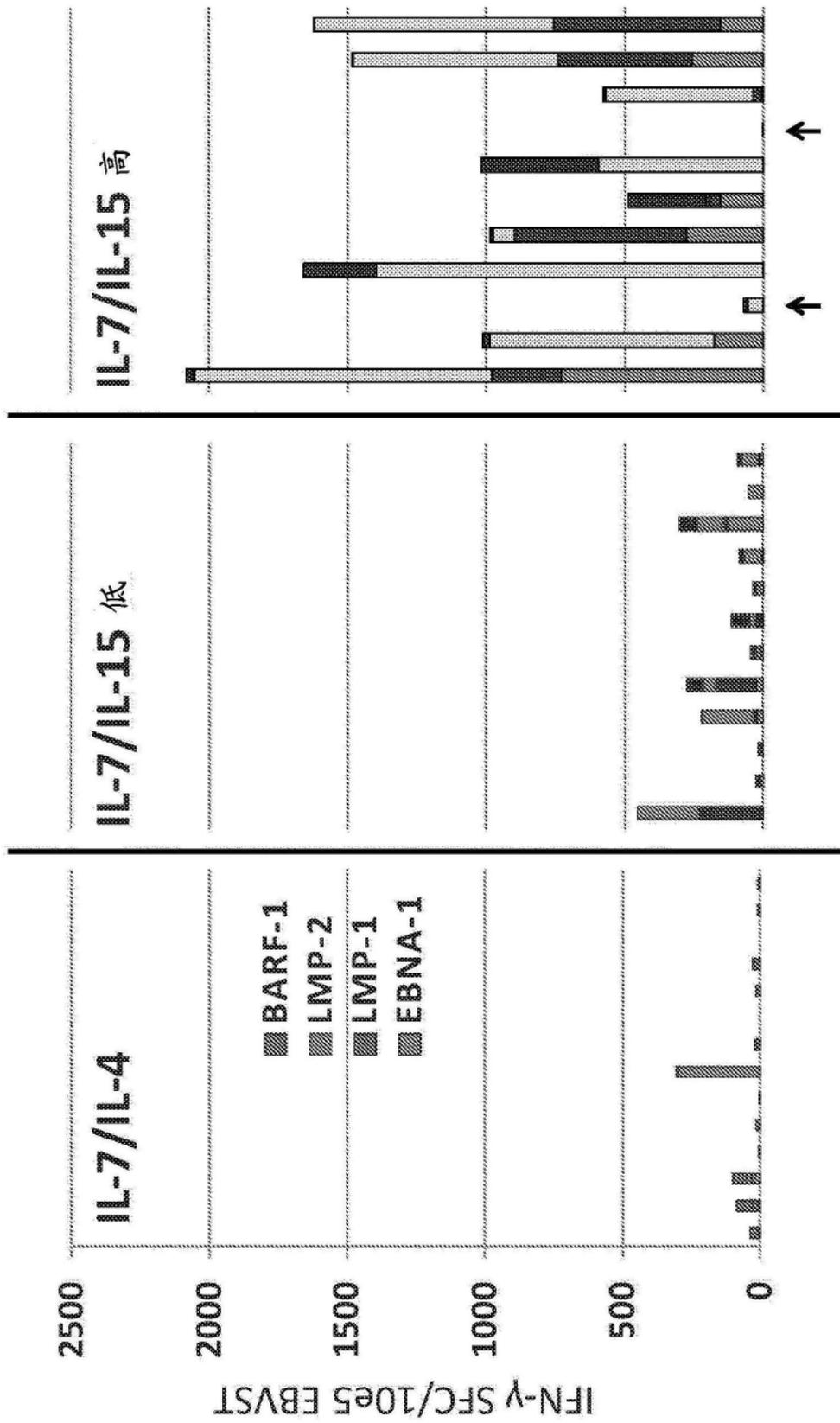


图4

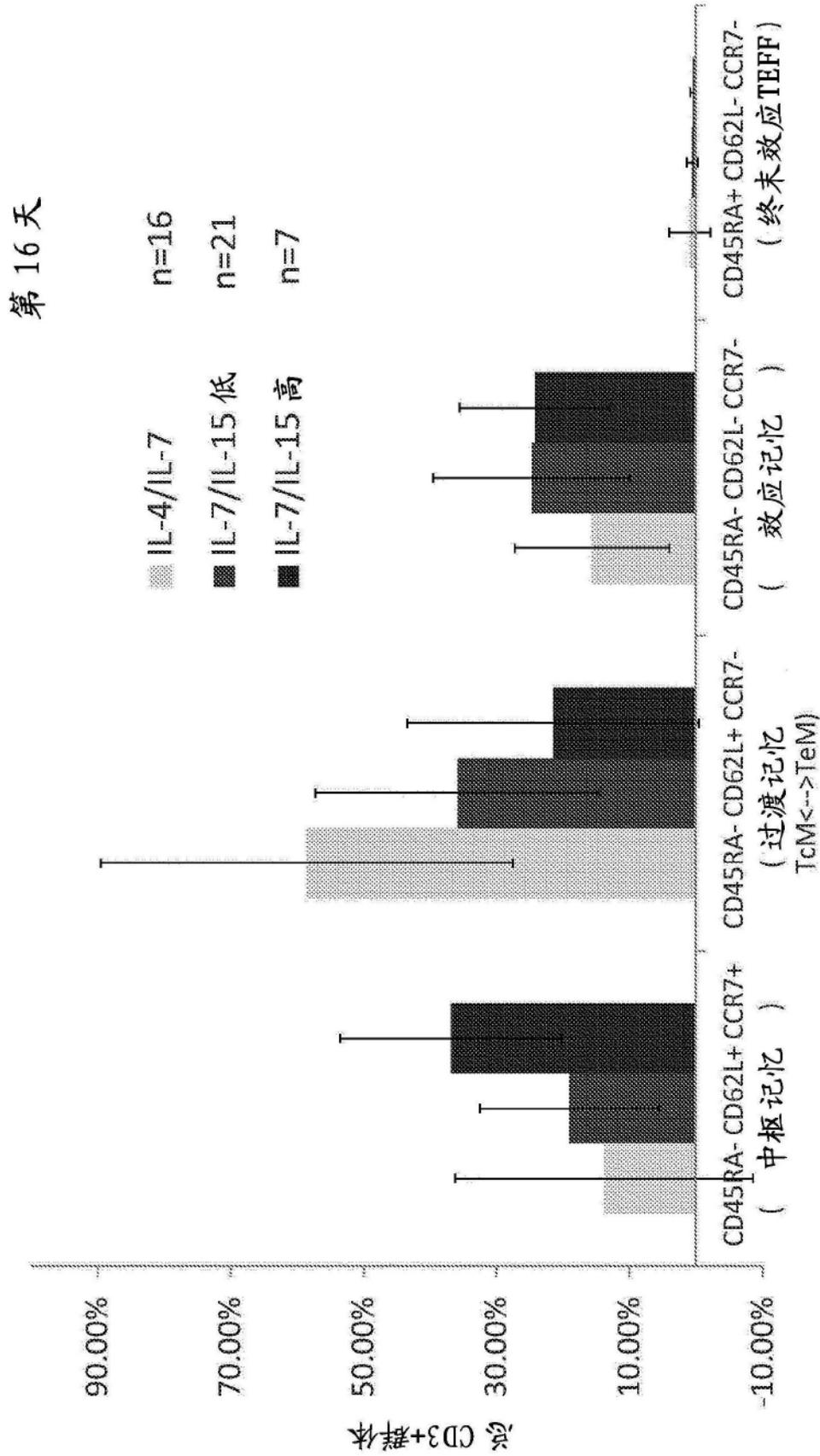
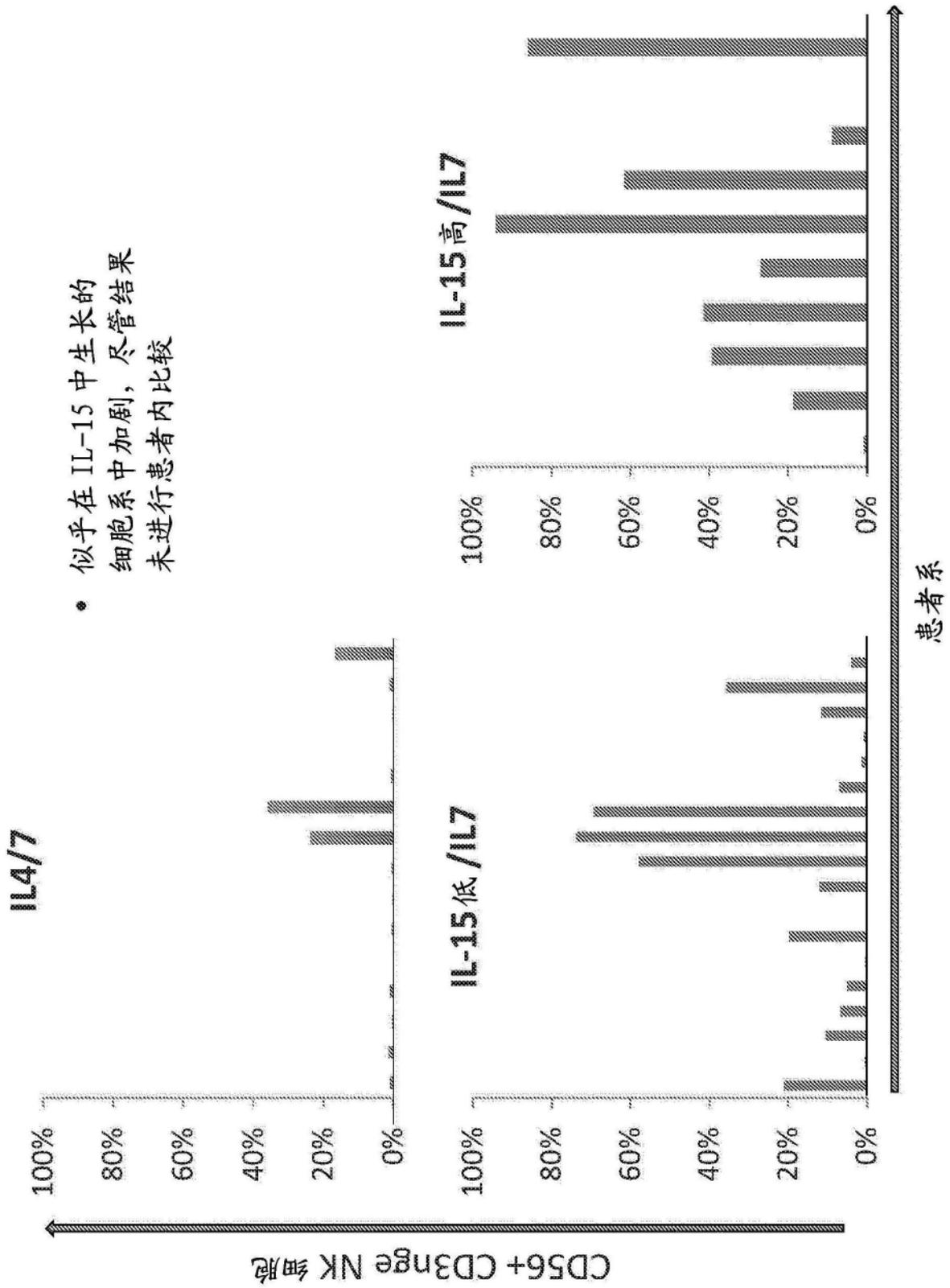


图5



- 似乎在 IL-15 中生长的细胞系中加剧，尽管结果未进行患者内比较

图6

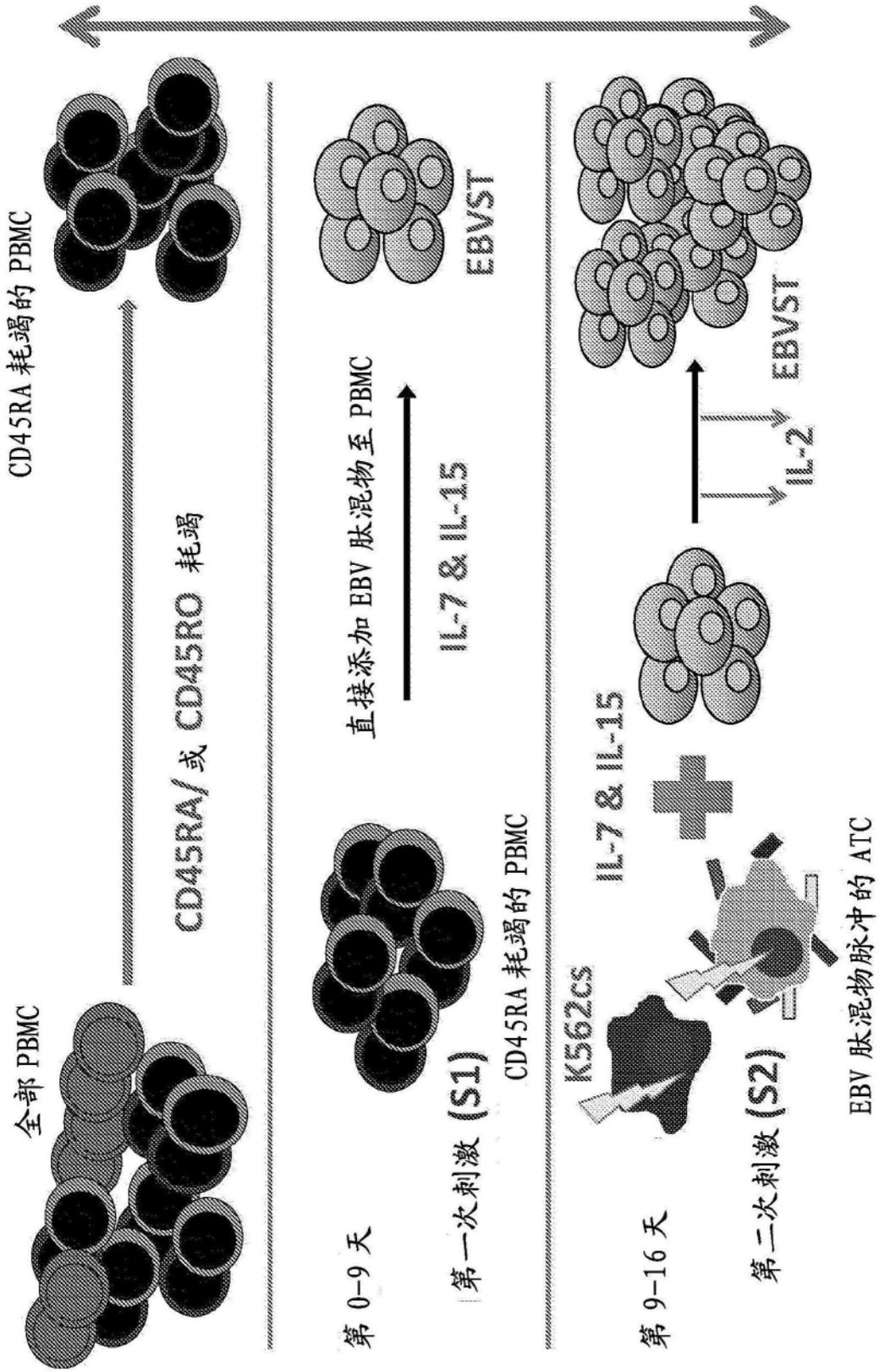


图7

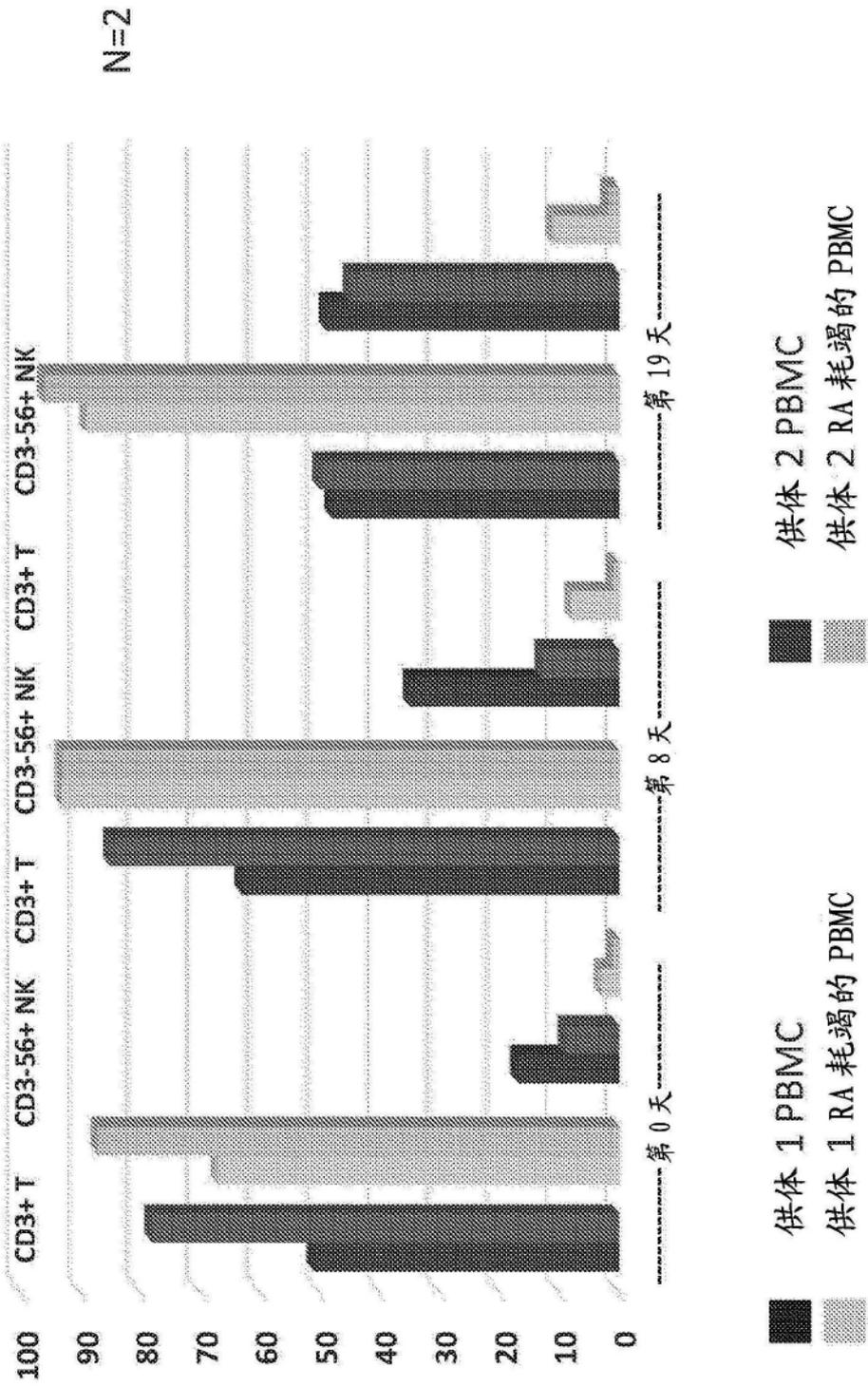


图8

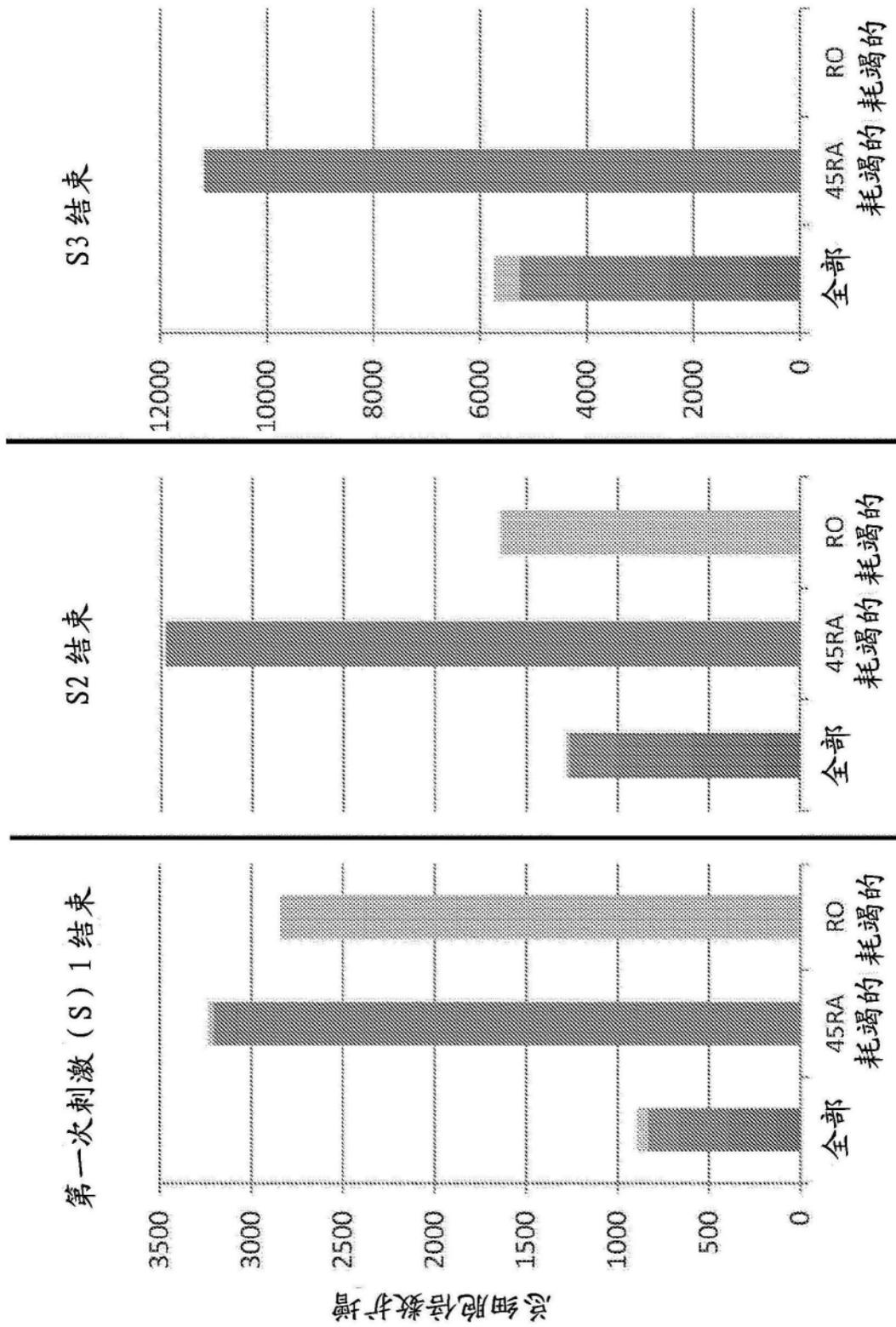


图9

健康供体 EBVST 的第二次刺激结束

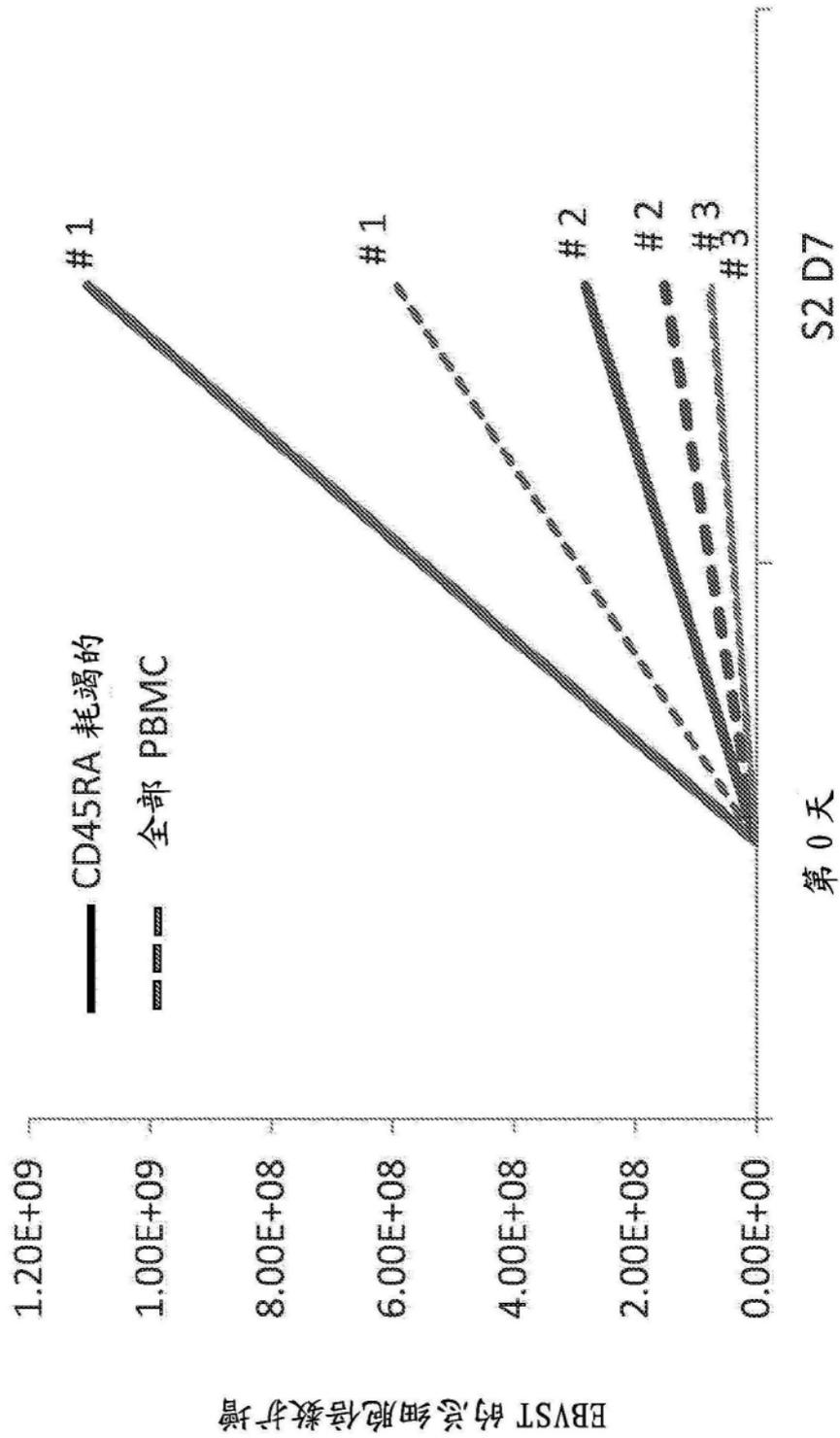


图10

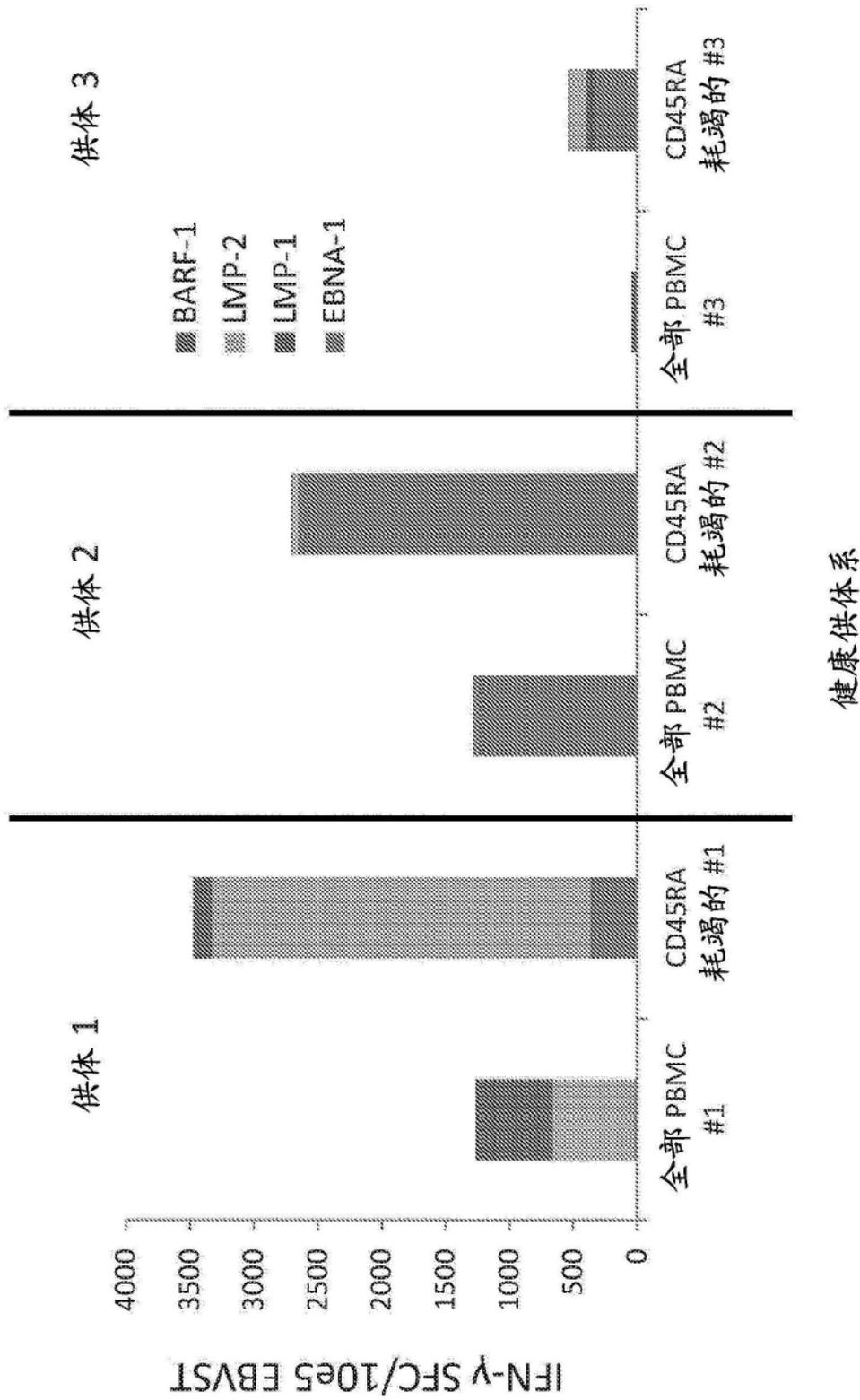


图11

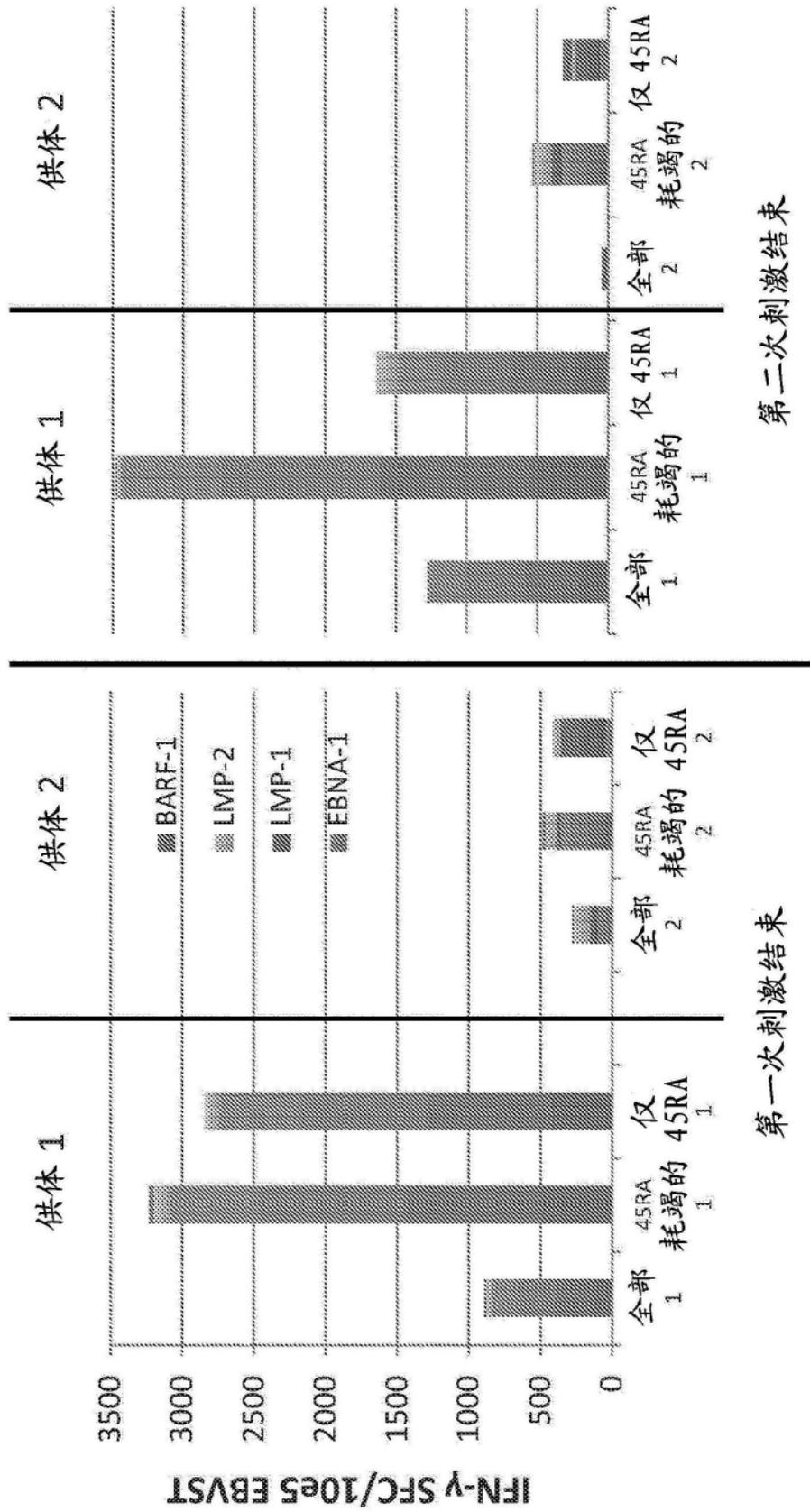
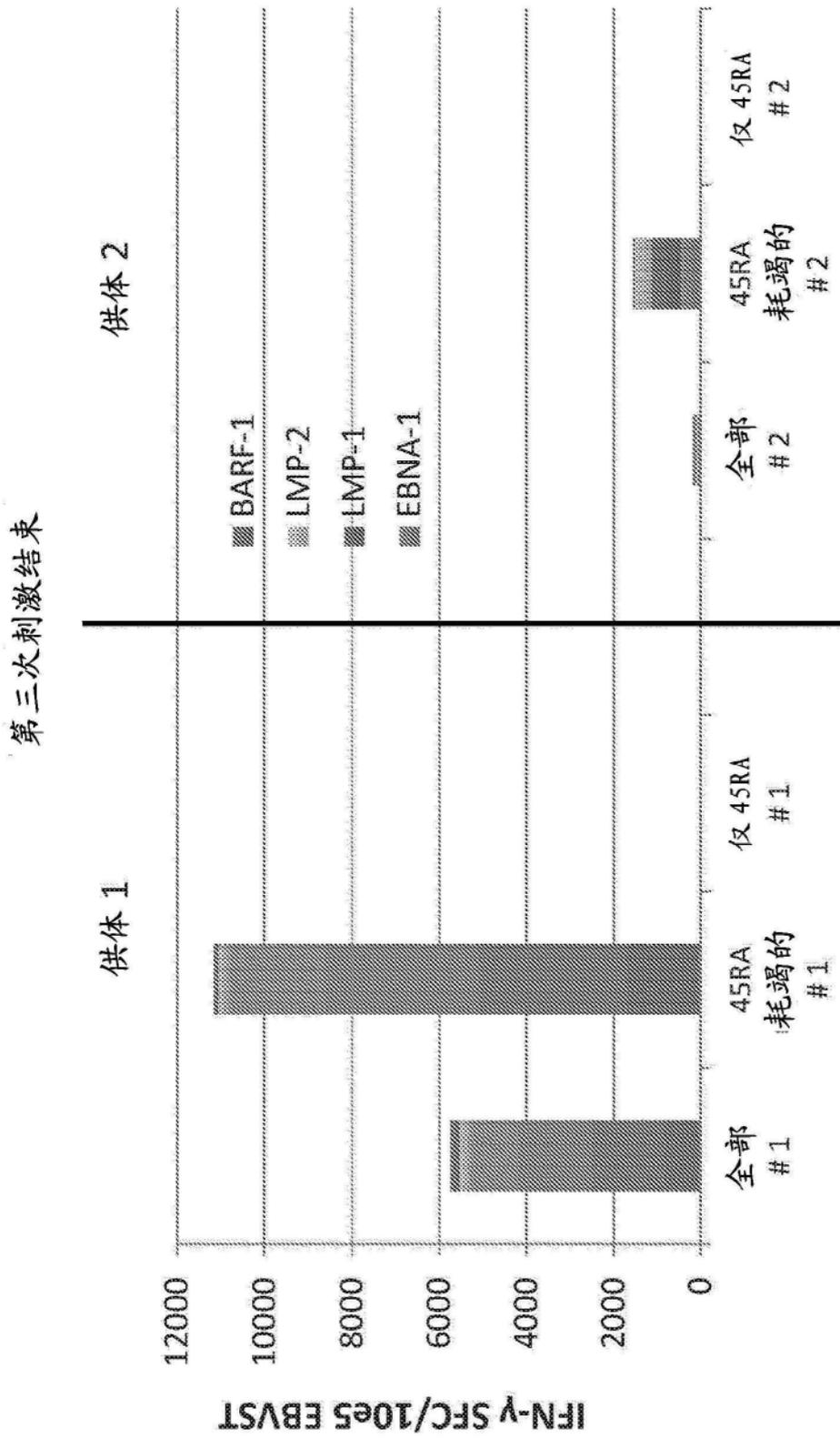


图12



注: CD45RA+细胞在第二次刺激之后不能扩增

图13

5个淋巴瘤患者中在第二次刺激结束时的总NK细胞群

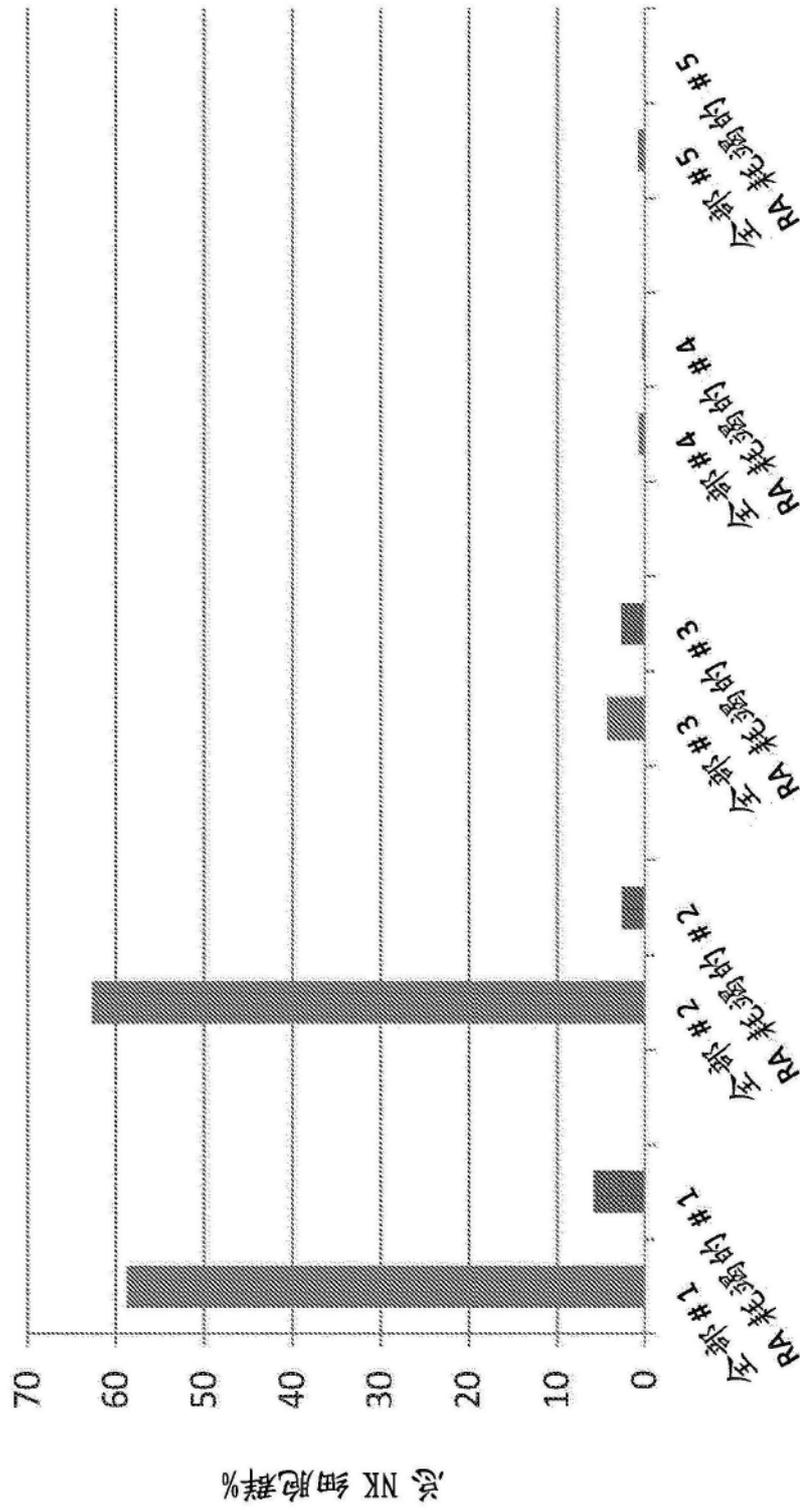
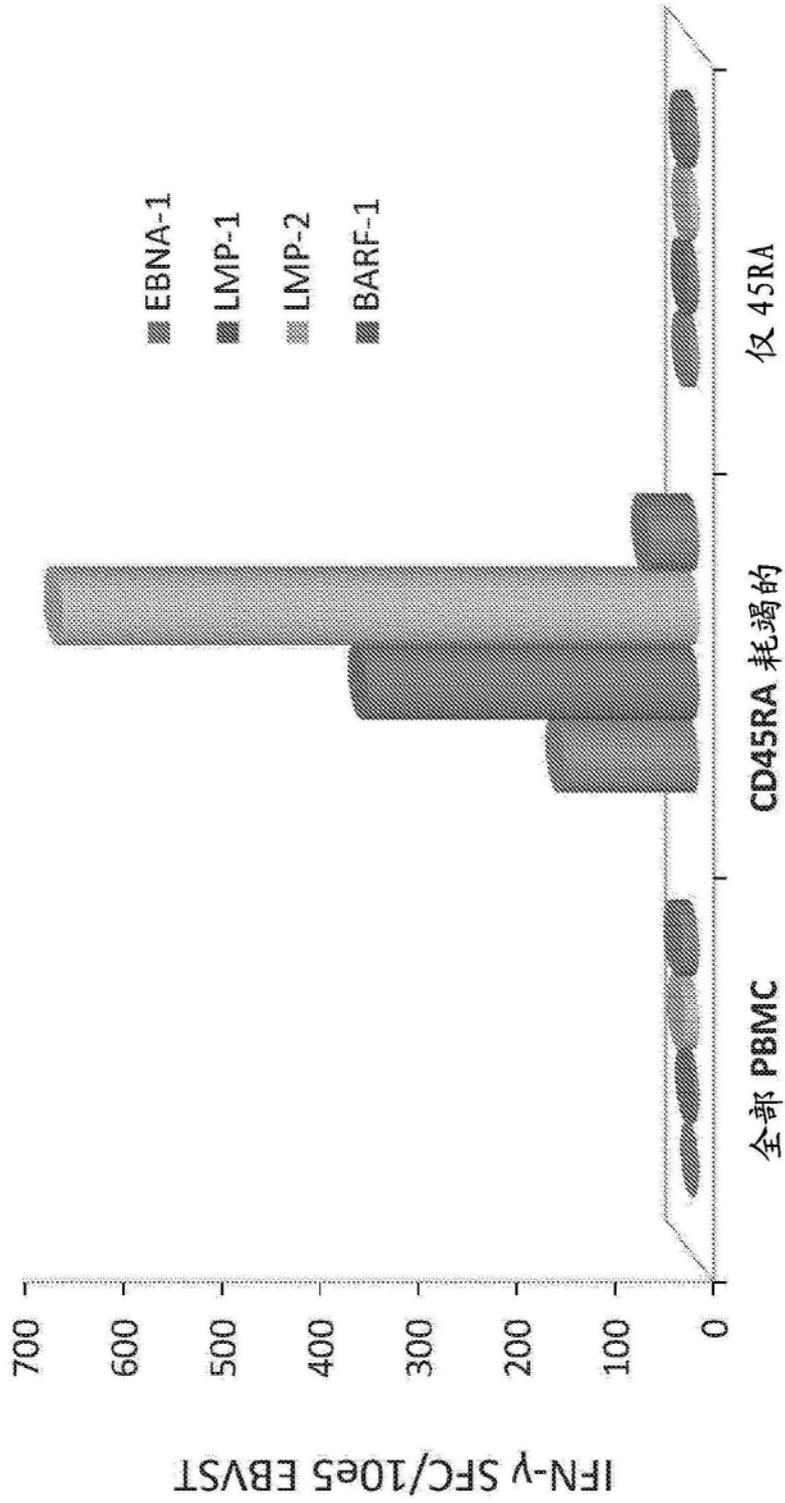


图14

在第二次刺激结束时的 IFN- $\gamma$  释放 ELISPOT 测定



\* 全部 PBMC 具有 DC, 但耗竭条件在不使用 DC 的情况下生成

图15

S2 后第 7 天对 EBVST 的 IFN- $\gamma$  反应

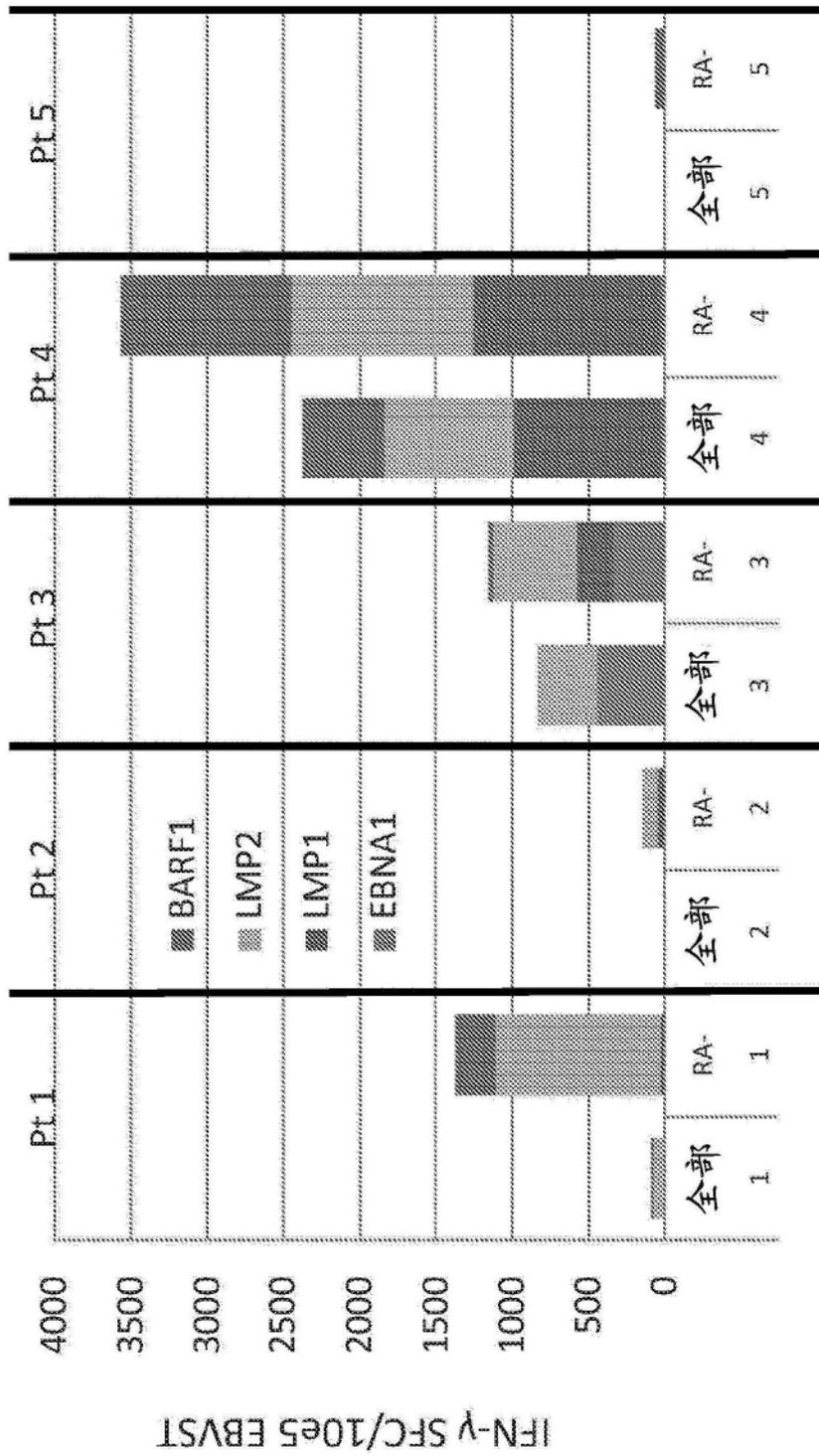


图16

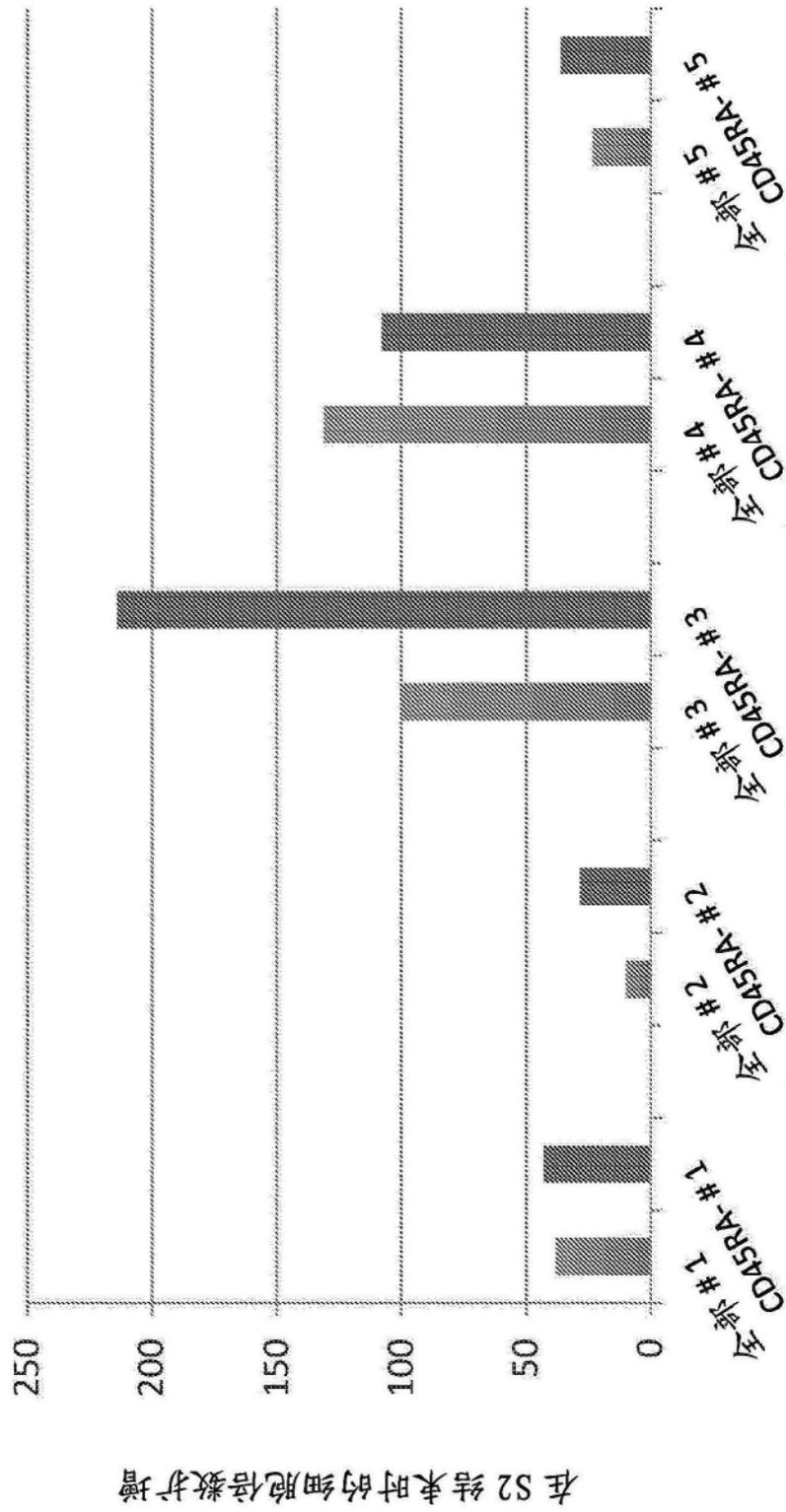


图17



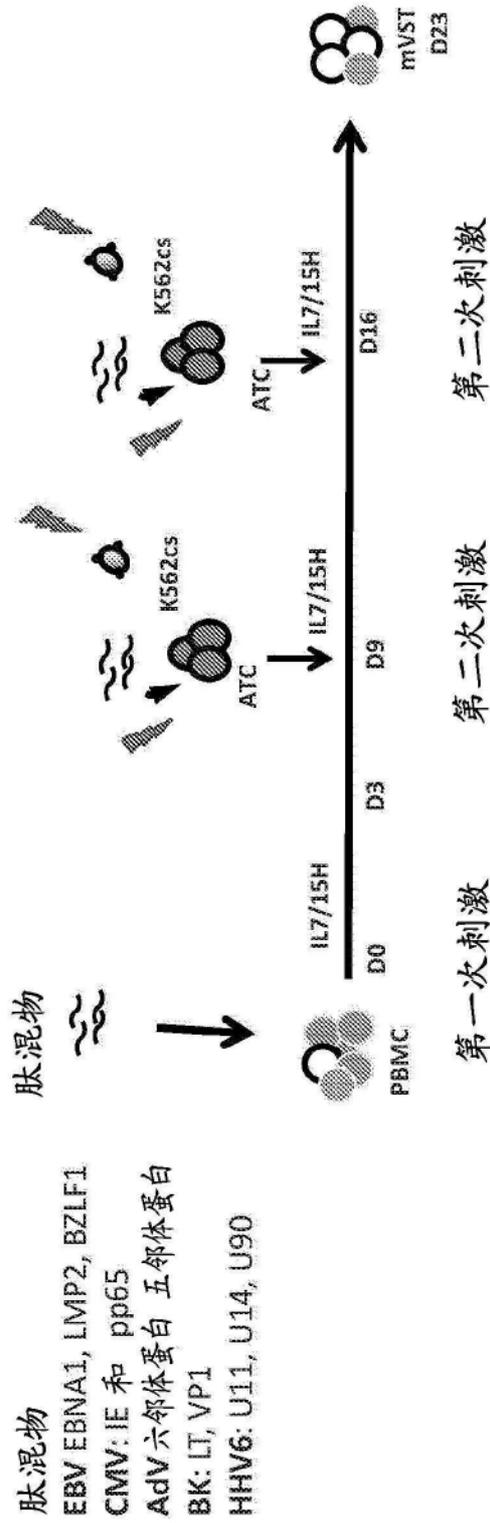


图19

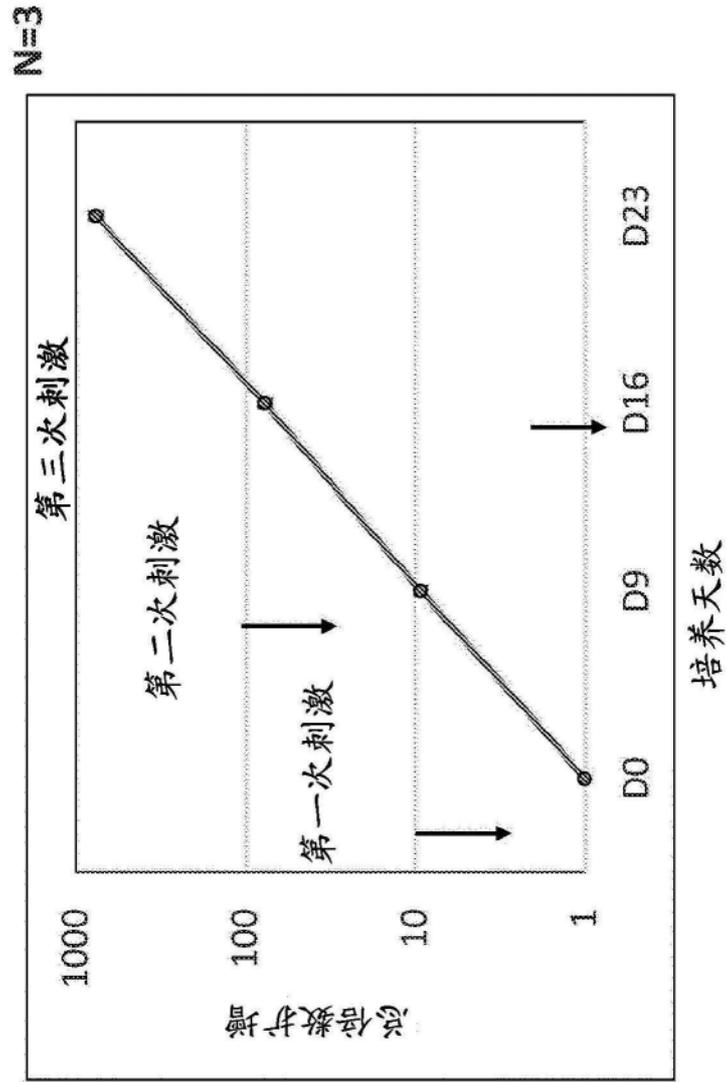


图20

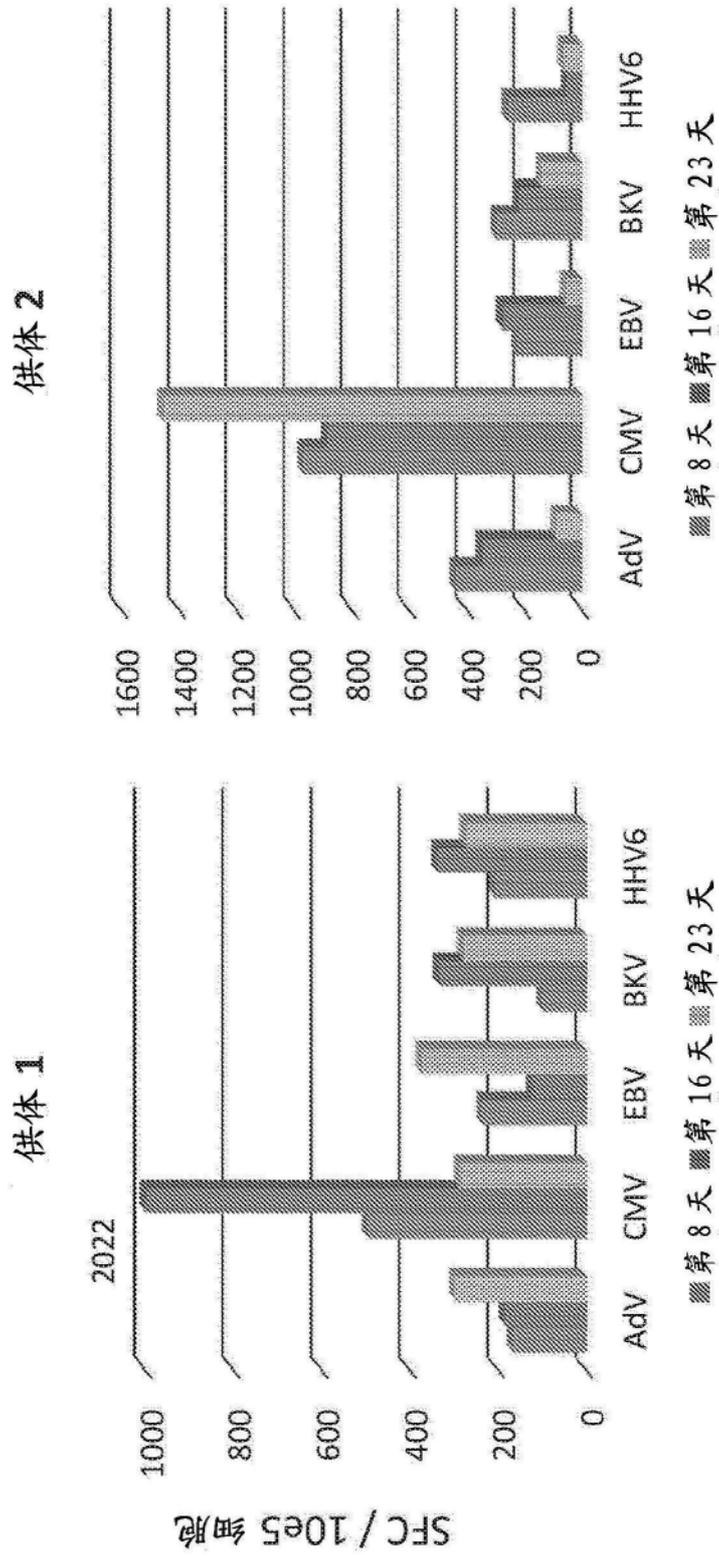
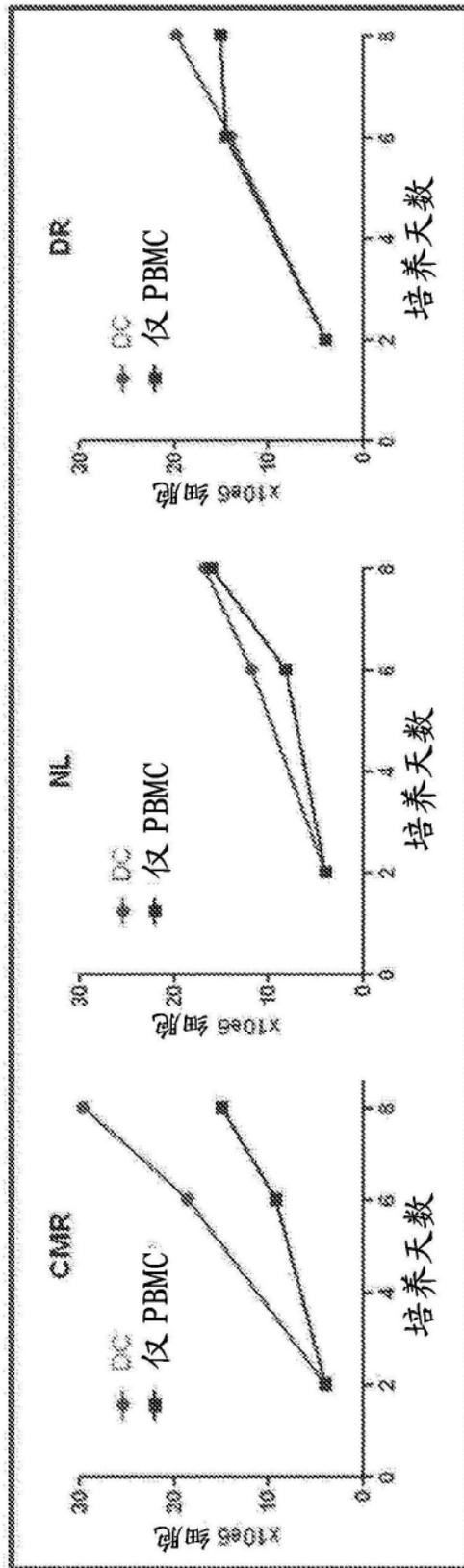


图21



DC 和 PBMC 起始的 VST 之间在扩增上没有显著差异 ( $p=0.25$ )

图22

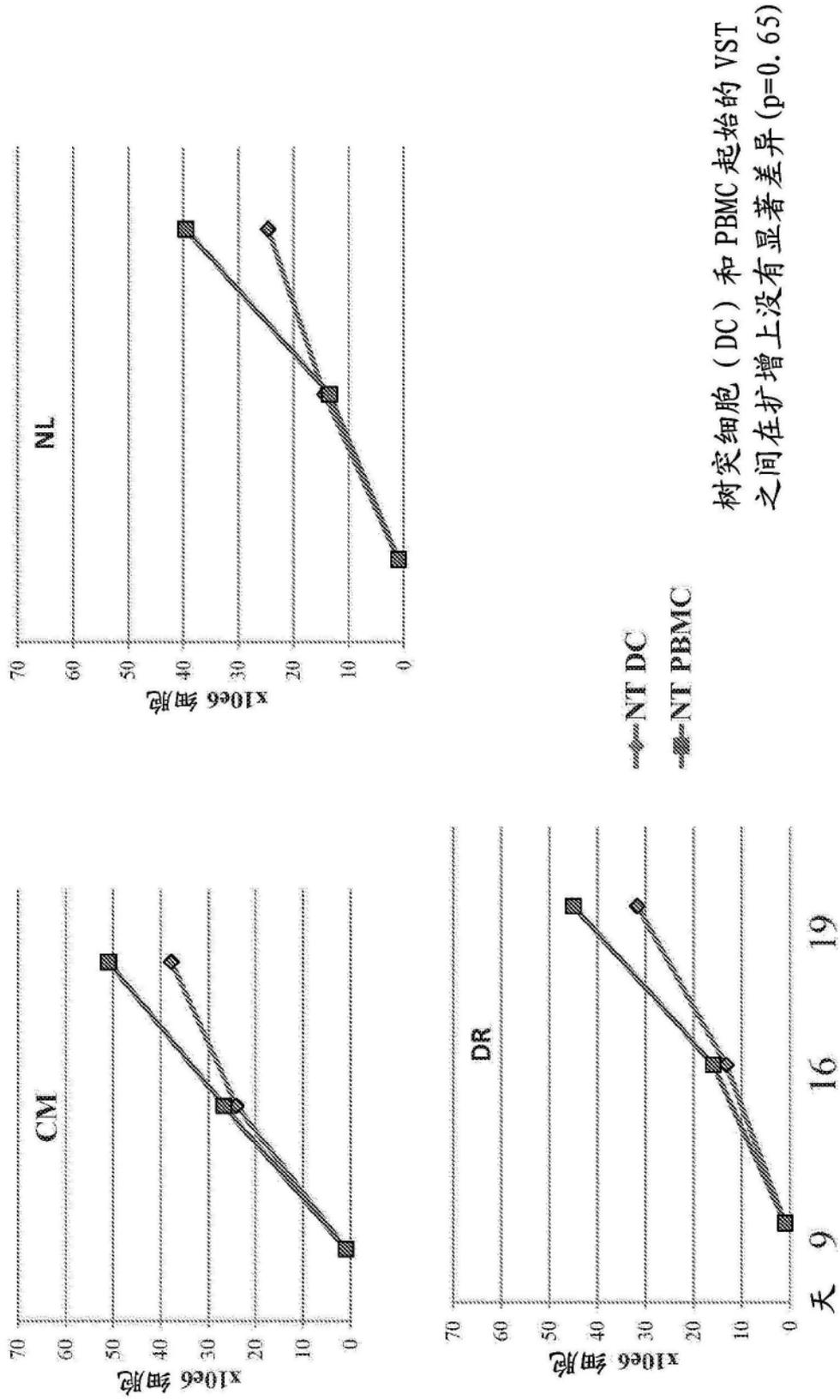


图23

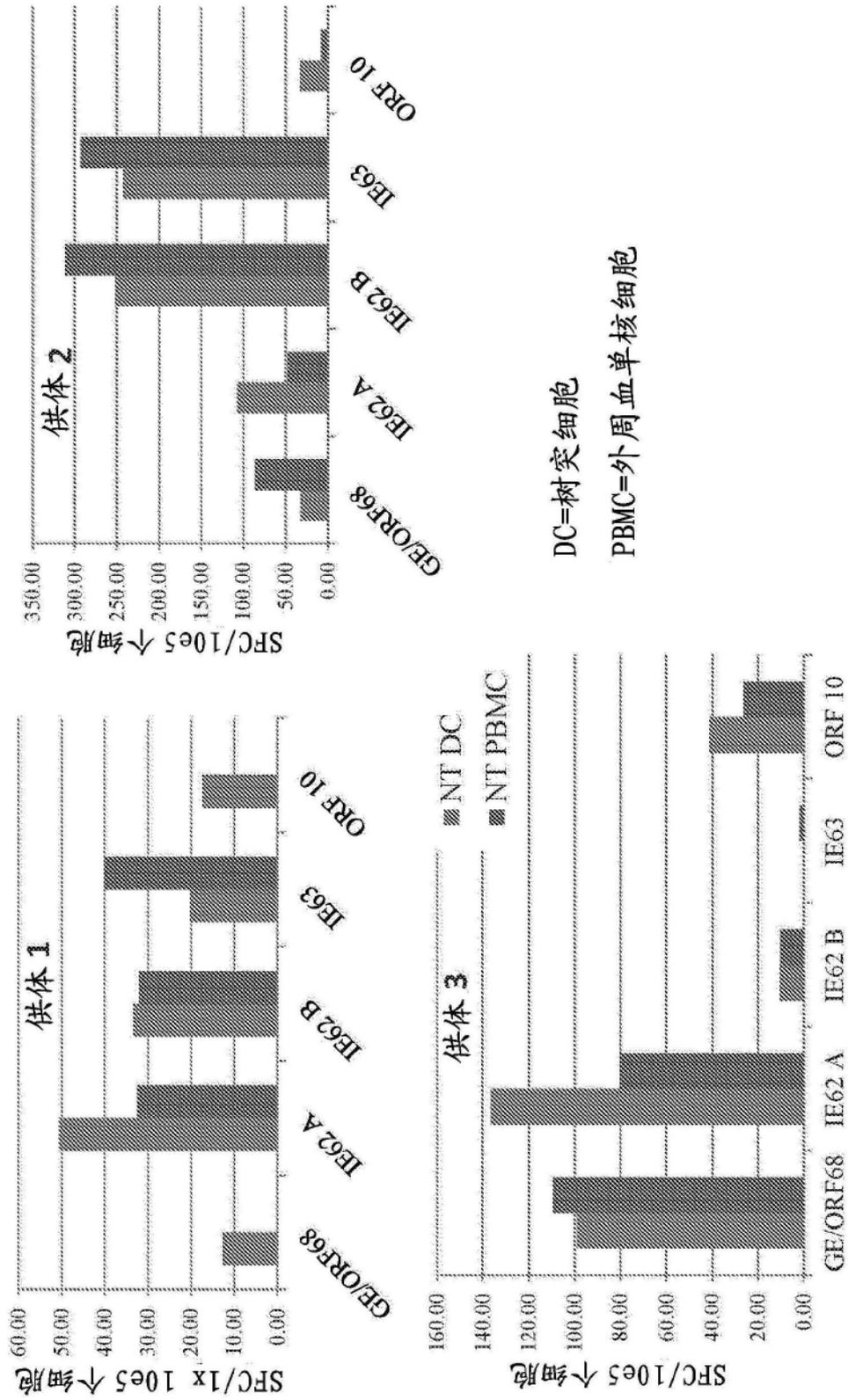


图24

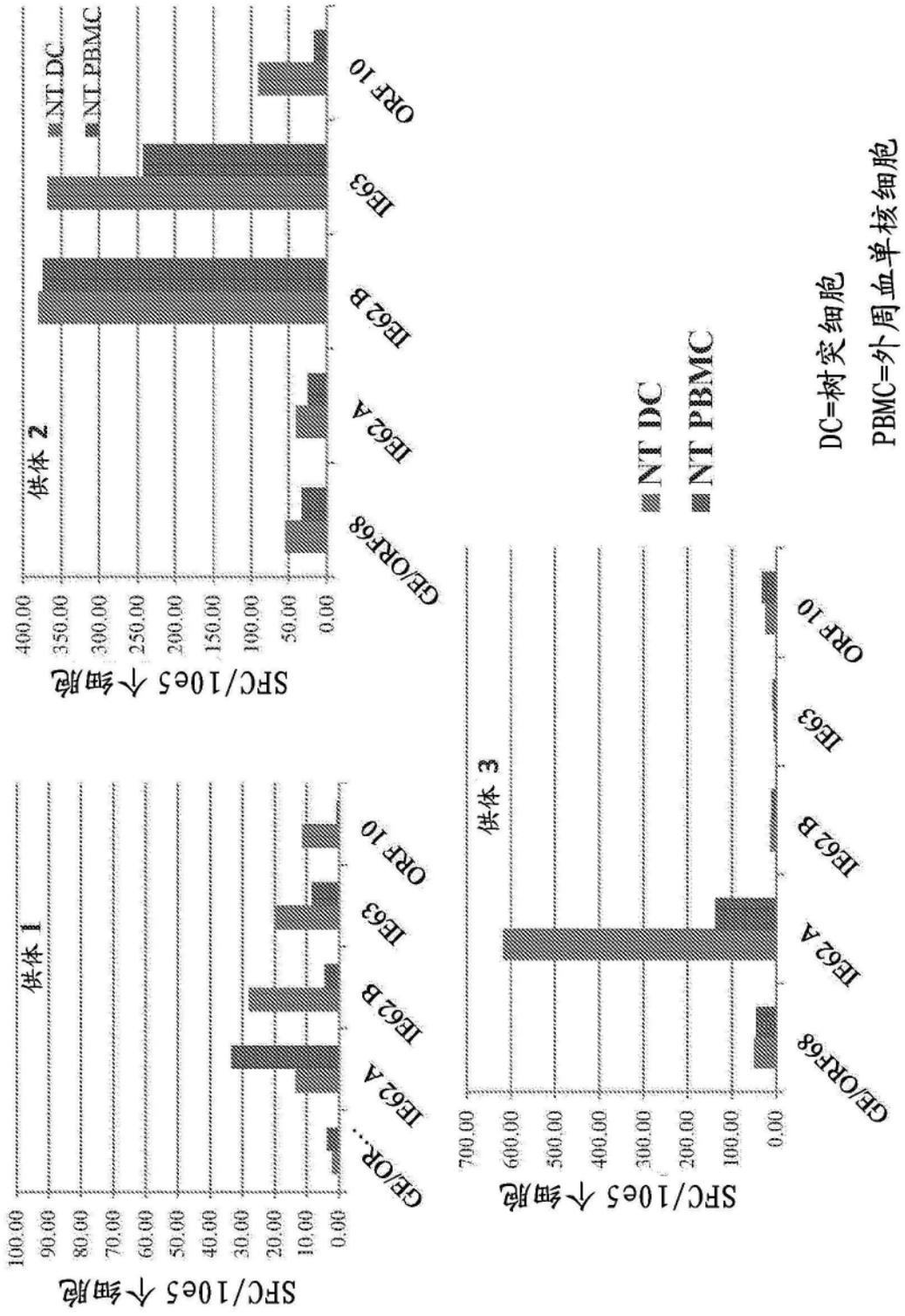


图25

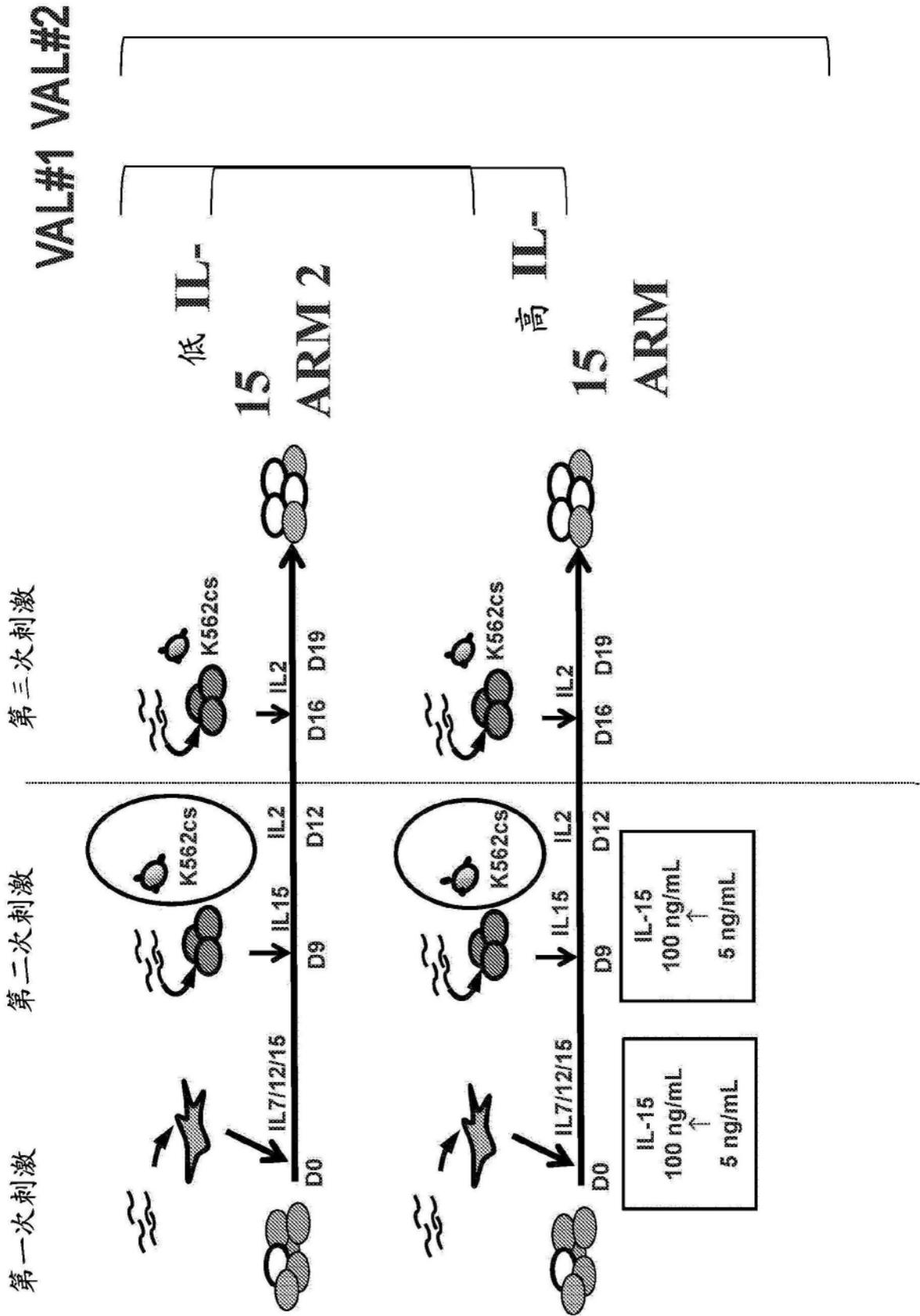


图26

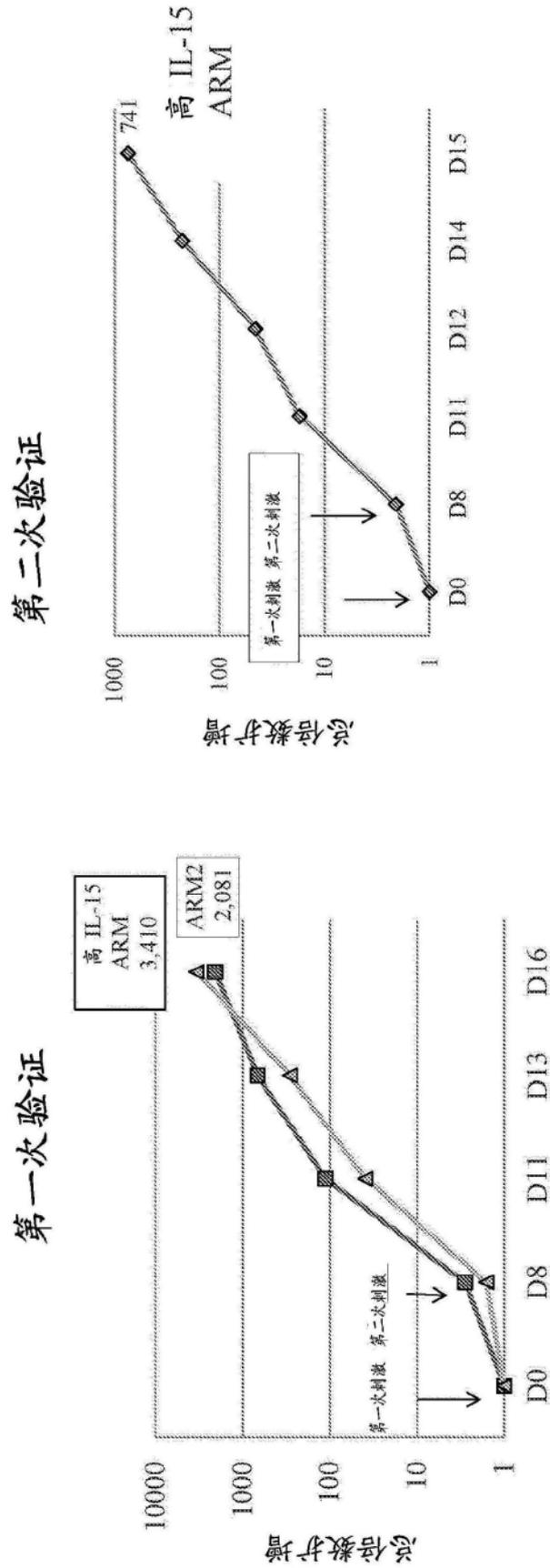
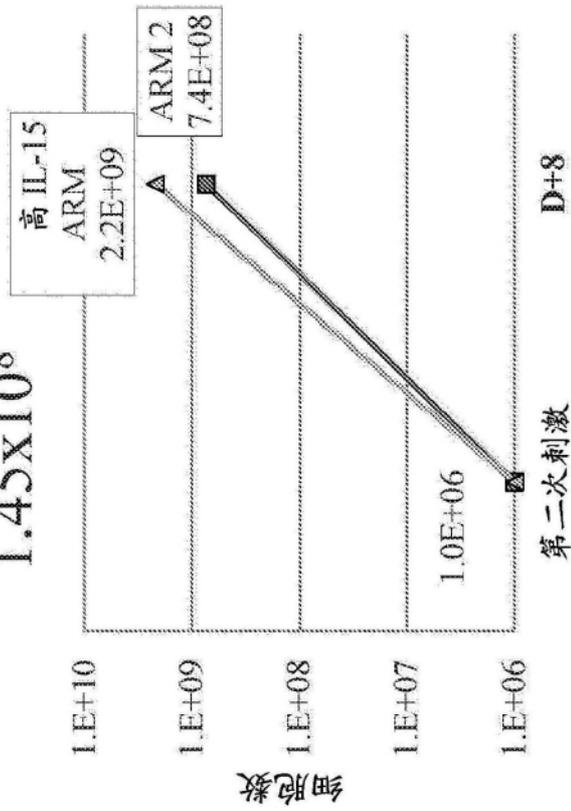


图27

第一次验证

最少细胞要求:

$1.45 \times 10^8$



第二次验证

最少细胞要求:  $1.45 \times 10^8$

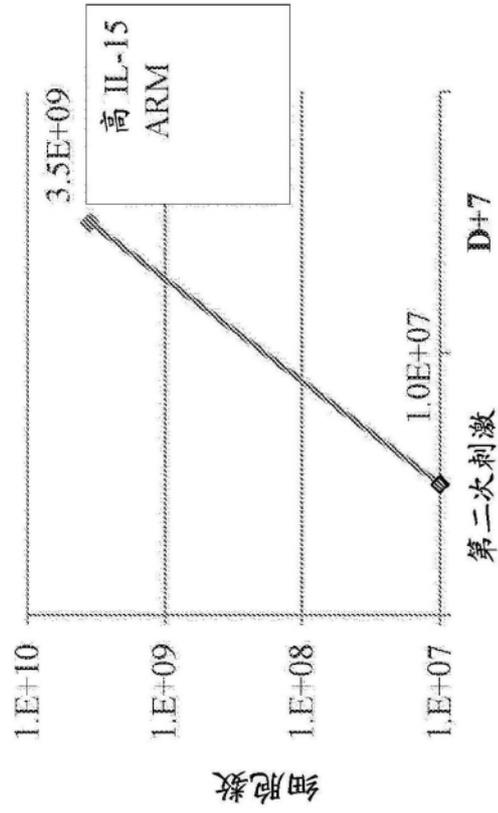


图28

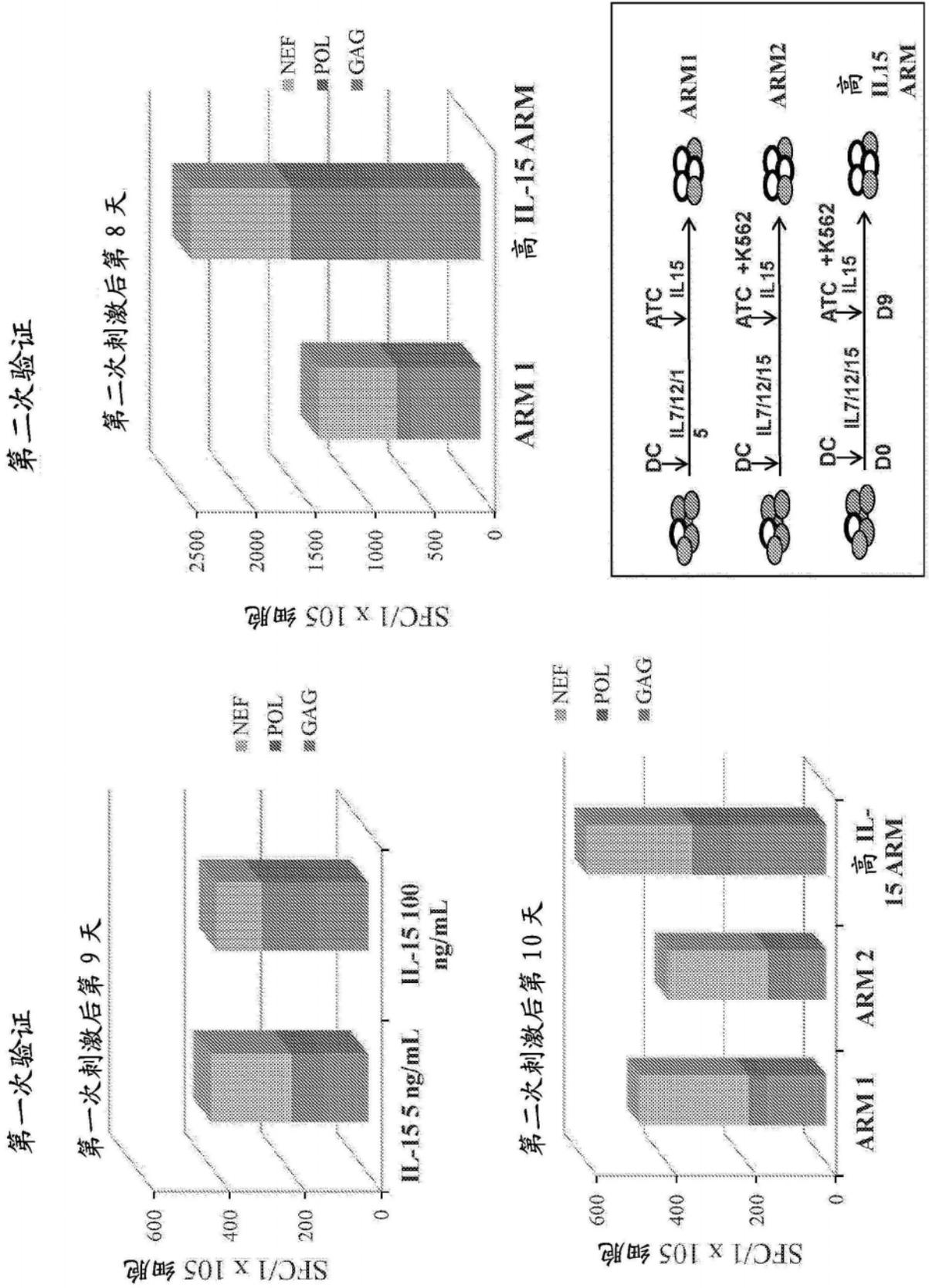
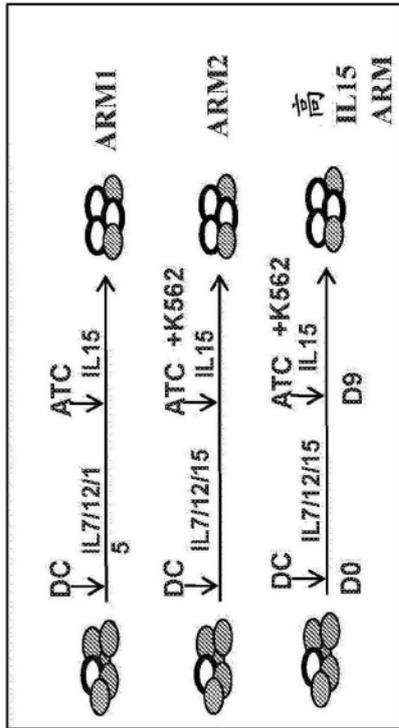
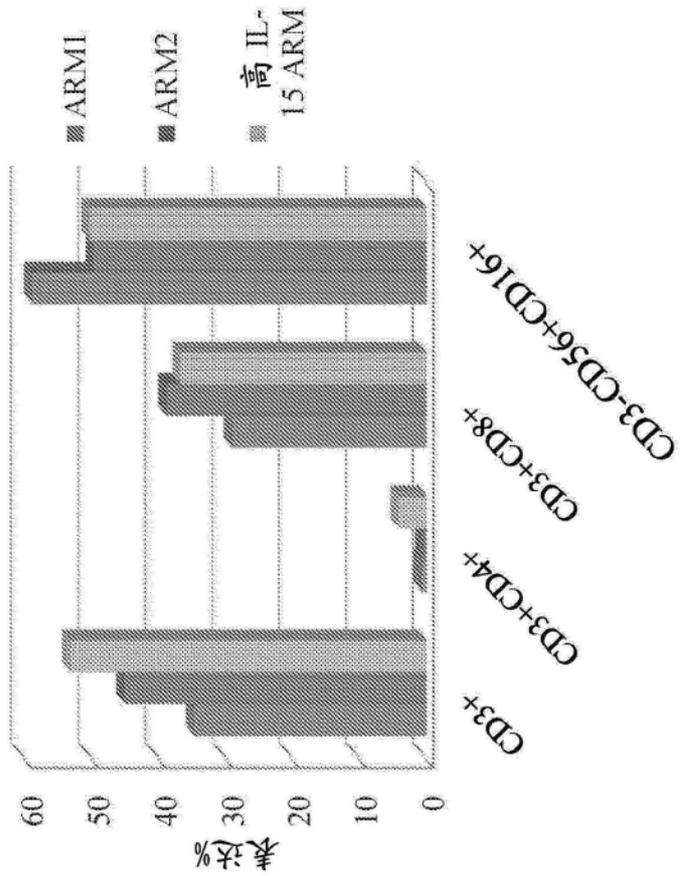


图29



第一次验证



第二次验证

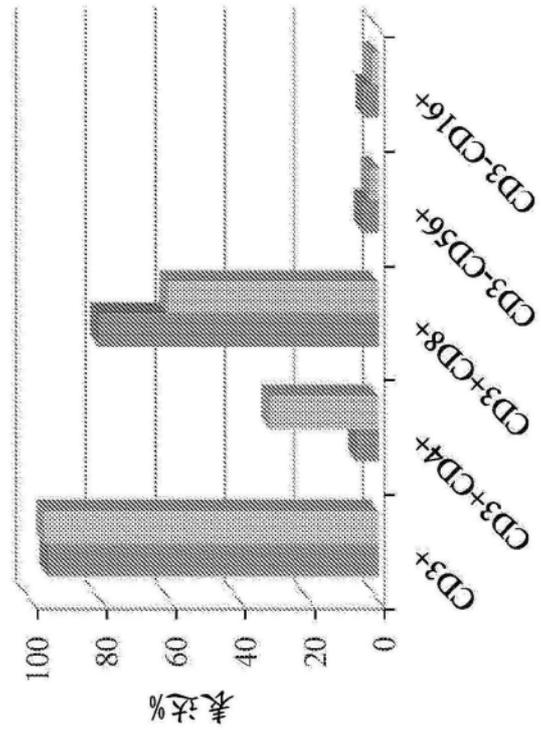


图30

### 第一次验证

肽混合物-ATC



### 第二次验证

肽混合物-ATC

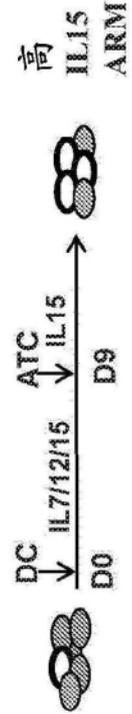
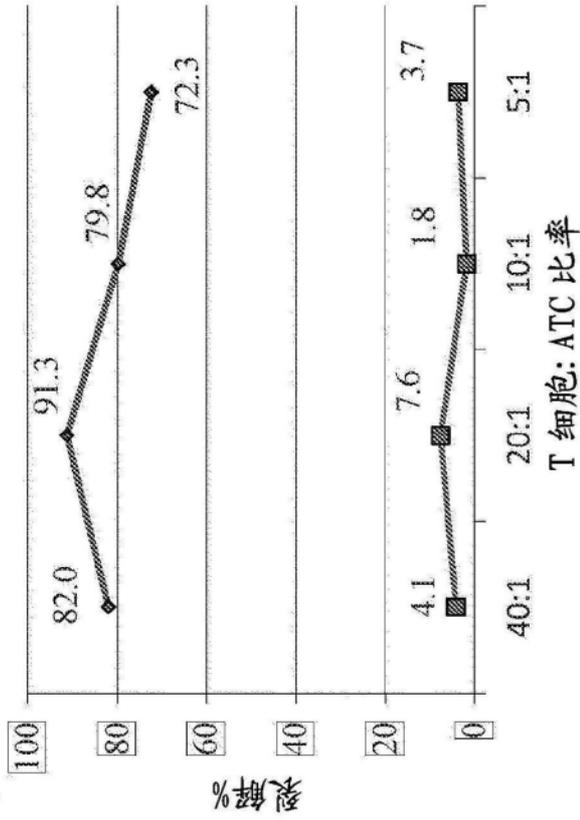


图31