



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117580946 A

(43) 申请公布日 2024.02.20

(21) 申请号 202280044466.4

(22) 申请日 2022.06.21

(30) 优先权数据

20210100409 2021.06.22 GR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.12.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2022/051581 2022.06.21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/269250 EN 2022.12.29

(71) 申请人 阿基里斯治疗英国有限公司

地址 英国伦敦

(72) 发明人 K·R·纽顿 E·考特斯尤

J·罗宾逊 S·克萨达

H·弗雷泽 S·瑟克尔

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理师 涂滔

(51) Int.Cl.

C12N 5/0783 (2006.01)

权利要求书2页 说明书30页 附图8页

(54) 发明名称

用于产生抗原特异性T细胞的方法

(57) 摘要

本发明涉及用于产生抗原特异性T细胞的方法,及其在用于治疗或预防癌症的方法中的用途。

1. 用于产生包含抗原特异性T细胞的T细胞群体的方法,其中所述方法包括抗原特异性T细胞扩增步骤,随后是非特异性T细胞增长扩增步骤。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法包括:

a) 抗原特异性扩增步骤,其包括将分离的T细胞与已经加载有抗原的抗原呈递细胞共培养,其中所述T细胞和抗原呈递细胞在存在IL-2的条件下进行共培养;和

b) 非特异性增长扩增步骤,其包括在存在抗CD3抗体和/或抗CD28抗体和/或IL-2的条件下培养所述步骤a)中产生的细胞。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其进一步包括在所述抗原特异性扩增步骤之前的非特异性预扩增步骤,优选地包括在存在IL-2和IL-21的条件下培养分离的T细胞。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述非特异性预扩增步骤进一步包括在存在抗CD3抗体、抗CD28抗体、抗CD2抗体和/或IFN  $\gamma$  的条件下培养所述T细胞。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述非特异性预扩增步骤和/或抗原特异性扩增步骤进一步包括在存在IL-15的条件下培养所述T细胞。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法包括以下步骤:

a) 抗原特异性扩增步骤,其包括将所述T细胞与已经加载有抗原的抗原呈递细胞共培养,其中所述T细胞和抗原呈递细胞在存在IL-2和IL-15的条件下进行共培养;和

b) 非特异性增长扩增步骤,其包括在存在抗CD3抗体和/或抗CD28抗体和/或IL-2的条件下培养所述步骤a)中产生的细胞。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其包括以下步骤:

a) 非特异性预扩增步骤,其包括在存在IL-2、IL-15和IL-21的条件下培养分离的T细胞;

b) 抗原特异性扩增步骤,其包括将所述步骤a)中产生的T细胞与已经加载有抗原的抗原呈递细胞共培养,其中所述T细胞和抗原呈递细胞在存在IL-2和IL-15的条件下进行共培养;和

c) 非特异性增长扩增步骤,其包括在存在抗CD3抗体和/或抗CD28抗体和/或IL-2的条件下培养所述步骤b)中产生的细胞。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述非特异性增长扩增步骤包括在存在抗CD3抗体和IL-2的条件下,优选地在存在抗CD3抗体、抗CD28抗体和IL-2的条件下培养所述T细胞。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述非特异性增长扩增步骤包括在存在抗CD3抗体、抗CD28抗体、抗CD2抗体和IL-2的条件下培养所述T细胞。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述非特异性预扩增步骤包括在存在IL-2、IL-15、IL-21、抗CD3抗体、抗CD28抗体和抗CD2抗体的条件下培养所述T细胞。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述预扩增步骤进一步包括在存在IFN  $\gamma$  的条件下培养所述T细胞。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述非特异性预扩增和/或抗原特异性扩增和/或非特异性增长扩增步骤进一步包括在存在血小板裂解物的条件下培养所述T细胞。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述非特异性预扩增步骤中的IL-21

以约0.5至50IU/mL,优选地约32.5IU/mL的浓度存在;

和/或其中所述非特异性预扩增步骤中的IL-2以约1,000至10,000IU/mL,优选地约6,000IU/mL的浓度存在;

和/或其中所述抗原特异性扩增步骤中的IL-2以约10至500IU/mL,优选地约100IU/mL的浓度存在;

和/或其中所述非特异性增长扩增步骤中的IL-2以约1,000至10,000IU/mL,优选地约4,000IU/mL的浓度存在;和/或其中所述IL-15以约10至16,000IU/mL,优选地约160IU/mL的浓度存在。

14.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述非特异性预扩增步骤的培养期间为约7至约21天,优选地约10至18天,更优选地约14至16天的期间;

和/或所述抗原特异性扩增步骤的培养期间为约7至21天,优选地约10至17天的期间;

和/或所述非特异性增长扩增步骤的培养期间为约3至约21天,优选地约7至17天的期间。

15.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述抗原呈递细胞已经加载有肿瘤抗原,和/或其中所述抗原呈递细胞是树突状细胞和/或B细胞。

16.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述抗原是新抗原,优选地是克隆新抗原。

17.通过根据前述权利要求中任一项所述的方法获得的或可获得的T细胞群体或包含所述T细胞群体的T细胞组合物,其中优选地所述群体或组合物包含至少约 $10 \times 10^6$ 个抗原特异性T细胞或至少约0.2%-5%、5%-10%、10%-20%、20%-30%、30%-40%、40%-50%、50%-70%或70%-100%的抗原特异性T细胞。

18.根据权利要求17所述的T细胞群体或组合物,其用于治疗或预防受试者中的癌症,其中优选地所述癌症是膀胱癌、胃癌、食道癌、乳腺癌、结直肠癌、宫颈癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肾癌(肾细胞癌)、肺癌(小细胞癌、非小细胞癌和间皮瘤)、脑癌(例如神经胶质瘤、星形细胞瘤、胶质母细胞瘤)、黑色素瘤、淋巴瘤、小肠癌(十二指肠癌和空肠癌)、白血病、胰腺癌、肝胆肿瘤、生殖细胞癌、前列腺癌、头颈癌、甲状腺癌或肉瘤,并且其中更优选所述受试者是人。

## 用于产生抗原特异性T细胞的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于产生T细胞诸如抗原特异性T细胞的方法,及其在用于治疗或预防癌症的方法中的用途。

### 背景技术

[0002] 癌症免疫疗法使用机体自身的免疫系统来靶向、控制和消除癌症。癌症免疫疗法的一种类型是过继T细胞疗法,其中将T细胞分离或工程化、离体扩增并转移回到患者。该T细胞衍生自患者本身(自体),或者衍生自供体(同种异体)。

[0003] 有效的T细胞疗法可能需要大量的T细胞,以便将足够剂量的T细胞提供至患者。本领域此前已经研究了大量或高剂量T细胞的生成。然而,一些T细胞疗法特别需要T细胞群体含有增加数量的抗原特异性T细胞。具有抗原特异性的T细胞应当具有功能性适合度,以允许他们在T细胞疗法中的有效使用。因此,提供能够递送高剂量的具有增加的抗原特异性以及功能性适合度的T细胞的T细胞疗法是高度期望的。

[0004] 先前的用于生成用于T细胞疗法的T细胞的方法不会特定增加抗原特异性T细胞的剂量,而是针对T细胞的非特异性扩增。此类T细胞不适合于需要T细胞对特定抗原具有特异性的T细胞疗法。因此,本领域需要替代性的和改进的用于产生对特定抗原具有特异性的功能上适合的T细胞群体的方法。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明人已经开发了用于T细胞的抗原特异性扩增的新方法。本发明提供了方法,其用于提供含有比此前所已经达到的更多数量的抗原特异性T细胞的T细胞群体,同时维持T细胞适合度和功能性。本发明的T细胞扩增方法促进在T细胞群体之内产生更大数量的抗原特异性T细胞。

[0007] 根据本发明的方法提供了相对于先前方法的改进,因为可以产生含有大量T细胞的群体,并且其中所述群体含有增加数量或比例的抗原特异性T细胞,并且此外,其中该群体中的T细胞是功能上适合的。T细胞的功能性适合度可以通过评估如下所述的各种标志物来确定。

[0008] 本发明的方法包括抗原特异性T细胞扩增步骤,随后是非特异性扩增步骤。非特异性扩增步骤发挥增长抗原特异性T细胞的数量功能,并且在本文中可称为“增长扩增步骤”。

[0009] 本发明的方法还可以包括在抗原特异性扩增步骤之前非特异性扩增T细胞的任意的步骤。这可以称为“预扩增步骤”。

[0010] 在一方面,本发明提供了用于产生包含抗原特异性T细胞的T细胞群体的方法,其中所述方法包括抗原特异性T细胞扩增步骤,随后是非特异性T细胞扩增步骤(增长扩增步骤)。任选地,抗原特异性扩增步骤也可以在如本文所述的非特异性T细胞预扩增步骤之前。

[0011] 如本文所述的抗原特异性扩增步骤可以增加T细胞群体之内对特定抗原特异的T细胞的数量或比例。

[0012] 在一方面,本发明提供了用于产生包含抗原特异性T细胞的T细胞群体的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0013] a) 抗原特异性扩增步骤,其包括将分离的T细胞与已经加载有抗原的抗原呈递细胞共培养,其中所述T细胞和抗原呈递细胞在存在IL-2的条件下进行共培养;和

[0014] b) 非特异性增长扩增步骤,其包括在存在抗CD3抗体和/或抗CD28抗体和/或抗CD2抗体和/或IL-2的条件下培养步骤a)中产生的T细胞。

[0015] 该方法可以进一步包括在所述抗原特异性扩增步骤之前的非特异性预扩增步骤,其包括在存在IL-2和IL-21的条件下培养分离的T细胞。

[0016] 预扩增步骤可以进一步包括在存在抗CD3抗体、抗CD28抗体、抗CD2抗体和/或IFN $\gamma$ 的条件下培养所述T细胞。

[0017] 在一方面,预扩增步骤可以包括在存在IL-2、IL-15、IL-21、抗CD3抗体、抗CD28抗体和抗CD2抗体的条件下培养所述T细胞。

[0018] 在一方面,抗原特异性扩增步骤包括在存在IL-2和IL-15的条件下共培养T细胞和抗原呈递细胞。

[0019] 抗原特异性扩增步骤可以在包含血清替代物的细胞培养基中进行。在一方面,血清替代物可以包含血小板裂解物。

[0020] 根据本发明的方法可以进一步包括非特异性“预扩增”步骤,其涉及以非抗原特异性方式对分离的T细胞进行初始扩增。

[0021] 在一方面,预扩增步骤包括在存在IL-2和IL-21、存在IL-2和IL-15、或存在IL-2、IL-15和IL-21的条件下培养T细胞。预扩增步骤可以包括在存在血小板裂解物的条件下培养T细胞。预扩增步骤可以进一步包括在存在抗CD3抗体、抗CD3/28抗体或抗CD3/28/2抗体和/或干扰素- $\gamma$ 的条件下培养T细胞,以进一步增加产生的T细胞的数量。

[0022] 在一方面,预扩增步骤具有约7至约21天,例如约14至16天的持续时间。

[0023] 在一方面,T细胞已经从患有癌症的受试者的肿瘤分离。在一方面,分离的T细胞是肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

[0024] “抗原特异性扩增”步骤可以发生在预扩增步骤之后。

[0025] 抗原特异性扩增步骤中所指的抗原呈递细胞优选地是树突状细胞,例如自体树突状细胞。树突状细胞可以产生自从血液样品获得的单核细胞,以提供单核细胞衍生的树突状细胞(MoDC)。在一方面,抗原呈递细胞是自体MoDC,其产生自患者自身的血液样品。

[0026] 在一方面,抗原特异性扩增步骤中的IL-2可以在500U/ml或更低的浓度下使用。

[0027] 在一方面,抗原特异性扩增步骤具有约7至约21天,例如约10天或约17天的持续时间。

[0028] 与预扩增步骤的分离的T细胞相比,抗原特异性扩增步骤可以导致群体中总T细胞数量的增加,以及优选地抗原特异性T细胞数量或比例的增加。

[0029] 在一方面,非特异性增长扩增步骤包括,在存在以下一种或多种的条件下,培养来自抗原特异性扩增步骤的T细胞:

[0030] (i) 抗CD3抗体;

[0031] (ii) 抗CD28抗体;和

[0032] (iii) IL-2。

[0033] 在一方面,非特异性增长扩增步骤可以具有约3天至约21天,例如约7天或约17天的持续时间。

[0034] 与起始群体(例如,预扩增步骤的分离的T细胞和/或抗原特异性扩增步骤中的细胞群体)相比,增长扩增步骤可以导致群体中总T细胞数量的增加,以及优选地抗原特异性T细胞数量的增加。

[0035] 在一方面,预扩增步骤和/或抗原特异性扩增步骤进一步包括在存在IL-15的条件下培养T细胞。

[0036] 在一方面,本发明的方法包括:

[0037] a) 抗原特异性扩增步骤,其包括将分离的T细胞与已经加载有抗原的抗原呈递细胞共培养,其中所述T细胞和抗原呈递细胞在存在IL-2和IL-21的条件下进行共培养;和

[0038] b) 非特异性增长扩增步骤,其包括在存在抗CD3抗体和/或抗CD28抗体和/或IL-2的条件下培养步骤a)中产生的细胞。

[0039] 在一方面,本发明的方法包括:

[0040] a) 非特异性预扩增步骤,其包括在存在IL-2和IL-21的条件下培养分离的T细胞;

[0041] b) 抗原特异性扩增步骤,其包括将分离的T细胞与已经加载有抗原的抗原呈递细胞共培养,其中所述T细胞和抗原呈递细胞在存在IL-2的条件下进行共培养;和

[0042] c) 非特异性增长扩增步骤,其包括在存在抗CD3抗体和/或抗CD28抗体和/或IL-2的条件下培养步骤b)中产生的细胞。

[0043] 在一方面,本发明的方法包括:

[0044] a) 抗原特异性扩增步骤,其包括将所述T细胞与已经加载有抗原的抗原呈递细胞共培养,其中所述T细胞和抗原呈递细胞在存在IL-2、IL-15和IL-21的条件下进行共培养;和

[0045] b) 非特异性增长扩增步骤,其包括在存在抗CD3抗体和/或抗CD28抗体和/或IL-2的条件下培养步骤a)中产生的细胞。

[0046] 在一方面,本发明的方法包括:

[0047] a) 非特异性预扩增步骤,其包括在存在IL-2、IL-15和IL-21的条件下培养分离的T细胞;

[0048] b) 抗原特异性扩增步骤,其包括将所述T细胞与已经加载有抗原的抗原呈递细胞共培养,其中所述T细胞和抗原呈递细胞在存在IL-2和IL-15的条件下进行共培养;和

[0049] c) 非特异性增长扩增步骤,其包括在存在抗CD3抗体和/或抗CD28抗体和/或IL-2的条件下培养步骤b)中产生的细胞。

[0050] 根据本发明的方法可以有利地提供T细胞群体,其中所述T细胞展示出功能性标志物,例如IFN  $\gamma$  的产生和CD25和/或CD27的表达。所述T细胞还可以表达减少量的耗竭标志物CD57。

[0051] 本发明的方法可以有利地提供具有更均匀的CD4<sup>+</sup>细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞的平衡的T细胞群体。例如,如本文所述的本发明的方法可以导致比先前的方法含有更多CD8<sup>+</sup>细胞的T细胞群体。因此,与通过先前的方法达到的T细胞群体相比,T细胞群体对于CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T细胞可以更加平衡。在一方面,T细胞群体包含至少约20%、30%、50%、70%或80%或更多的CD8<sup>+</sup>T细胞。

[0052] 本发明涵盖通过本文所述的任何方法产生的T细胞群体。T细胞群体可以比分离自受试者的T细胞群体具有增加数量的T细胞。T细胞群体可以具有增加比例的对一种或多种特定抗原特异的T细胞。T细胞群体可以富集有对一种或多种特定抗原特异的T细胞。

[0053] 根据本发明的方法可以促进产生T细胞群体,其包含至少约 $10 \times 10^6$ 个抗原特异性T细胞。根据本发明产生的T细胞群体可以向受试者提供至少约 $10 \times 10^6$ 个抗原特异性T细胞的剂量。在一方面,T细胞群体可以包含在约 $10 \times 10^6$ 和约 $1 \times 10^{10}$ 个之间的抗原特异性T细胞,例如在约 $1 \times 10^8$ 和约 $1 \times 10^9$ 个之间的,诸如约 $2 \times 10^8$ 个抗原特异性T细胞。

[0054] 通过本发明的方法产生的T细胞群体可以包含具有CD3+/CD56-表型的T细胞。

[0055] 根据本发明产生的T细胞在用抗原再刺激后可以上调IL-2 (CD25) 表达。在一方面,相同的抗原用于抗原特异性扩增和用于再刺激两者。

[0056] 根据本发明的方法可以产生T细胞群体,其主要包含具有与细胞毒性(杀伤)表型相关联的表型的效应记忆T细胞。

[0057] 根据本发明的方法产生的T细胞群体可以在医学中用作T细胞疗法,优选地用于治疗或预防受试者中的癌症。

[0058] 根据本发明的方法可以在体外或离体进行。

## 附图说明

[0059] 图1:通过特异性/非特异性扩增时段的第0天和第17天处的细胞计数确定的T细胞(CD3+CD56-)的扩增倍数

[0060] 图2:缩放至肿瘤重量的总T细胞剂量(T细胞(CD3+CD56-)的数量)

[0061] 图3:通过IFN  $\gamma$  /TNF $\alpha$ 阳性细胞测量的缩放至肿瘤重量的cNeT剂量/反应性

[0062] 图4:cNeT剂量中的增加倍数。

[0063] 图5:每个过程的CD4+T细胞和CD8+T细胞的记忆表型

[0064] 图6:具有标志物表达的CD8+T细胞和CD4+T细胞的比例(中位数)

[0065] 图7:当用克隆新抗原肽再刺激cNeT时产生的CD25表达水平。

[0066] 图8:生成自8名其他癌症患者的比较每个过程的反应性细胞剂量的数据。

[0067] 图9:与2.6代过程相比的2.8.1代过程的TIL产量中的变化倍数。

[0068] 图10:与2.6代过程相比的2.8.1代过程的cNeT剂量中的变化倍数。

[0069] 图11:与2.8.1代过程相比的2.8.2代过程的TIL产量中的变化倍数。

[0070] 图12:与2.6代和2.8.1代相比的2.6代B细胞和2.8.1代B细胞在T细胞扩增中的变化倍数。

[0071] 图13:与2.8.1代和2.6代相比的2.8.1代B细胞和2.6代B细胞的cNeT的比例的变化倍数。

[0072] 图14:与相应的2.6代B细胞产品相比的2.6代产品中CD4+T细胞和CD8+T细胞的比例。

[0073] 发明详述

[0074] 本发明提供了用于产生T细胞群体的方法,其中所述群体包含抗原特异性T细胞。有利地,如本文所述的本发明的方法促进产生含有增加数量或比例的抗原特异性T细胞的T细胞群体,该T细胞群体是在功能上适合的并合适于用于T细胞疗法。

[0075] 根据本发明的方法包括抗原特异性扩增步骤,其中将T细胞与已经加载有一种或多种抗原的抗原呈递细胞进行共培养,随后是增长T细胞数量的非特异性扩增步骤。对所述抗原特异的(或反应性的)T细胞的数量在特异性扩增步骤中增加。T细胞群体中抗原特异性T细胞的比例或百分比可以增加。

[0076] 在本发明的情况下,术语“扩增(expansion、expand)”指通过诱导T细胞增殖来增加其数量。T细胞可以通过在为T细胞提供促有丝分裂的刺激物的条件下进行离体培养来扩增。

[0077] 所谓“抗原特异性扩增步骤”意指在存在抗原的条件下增加T细胞的数量步骤。抗原的存在导致在总体群体之内,对所述抗原具有特异性的T细胞中的增加或其扩增。此步骤的目的是优先或选择性地扩增结合至一种或多种抗原并对其作出应答的T细胞。因此,与非特异性扩增步骤相比,抗原特异性扩增步骤通常采用较低浓度的IL-2(诸如500U/ml或更低),以便最小化T细胞的任何非特异性扩增。抗原特异性扩增步骤增加总体T细胞群体之内对所述抗原特异的T细胞的比例或百分比,即与对所述抗原非特异的T细胞的比例或百分比相比。

[0078] 在本发明的一方面,抗原特异性扩增步骤包括,在存在IL-2的条件下,将T细胞与已经加载有抗原的抗原呈递细胞(APC)或衍生自抗原的肽进行共培养。当T细胞识别出其由APC呈递的同类抗原(这提供了所需信号之一)连同细胞因子刺激,使得T细胞能够扩增(即增殖)。这个过程允许选择性扩增感兴趣的T细胞。

[0079] 所谓“非特异性增长扩增步骤”意指在不存在抗原的条件下增加T细胞的数量步骤。缺乏抗原导致群体中T细胞中的总体(或总的)增加或扩增,无论这些T细胞的抗原特异性如何。

[0080] 根据本发明的方法可以进一步包括非特异性预扩增步骤,其中在存在IL-2并且任选地具有以下一种或多种的条件下,体外培养分离的T细胞(例如以肿瘤单细胞悬浮液或肿瘤碎片的形式):IL-15、IL-21、抗CD3抗体、抗CD28抗体和/或抗CD2抗体。

#### [0081] 分离的T细胞

[0082] T细胞群体可以从分离自患有肿瘤的受试者的样品中的T细胞生成。样品可以取自肿瘤、外周血(例如外周血单核细胞或PBMC)、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织或来自受试者的其他组织。

[0083] 可以使用本领域技术人员已知的任何数量的技术从采集自受试者的血液样品获得T细胞。例如,可以采用密度梯度分离技术,诸如FICOLL™分离,和/或单采血液成分术(apheresis),诸如白细胞单采术(leukapheresis)。分离用于T细胞疗法的T细胞的额外的方法公开在美国专利公开号2013/0287748中,该专利通过引用以其整体并入本文。

[0084] 在特定的实施方案中,T细胞群体生成自来自肿瘤的样品。换句话说,T细胞群体分离自从待治疗患者的肿瘤获得的样品。此类T细胞在本文中称为“肿瘤浸润淋巴细胞”(TIL)。TIL是已经浸润肿瘤组织的T细胞。

[0085] 根据本发明的方法中分离的T细胞可以是TIL。

[0086] 从肿瘤中分离活检和样品是本领域的常见做法,并且可以根据任何合适的方法进行,并且此类方法将是本领域技术人员已知的。

[0087] 肿瘤可以是实体瘤或非实体瘤。

[0088] 可以使用本领域众所周知的方法分离T细胞。例如,可以通过在含有IL-2的培养基中培养切除的肿瘤碎片或肿瘤单细胞悬浮液来分离TIL。可以基于CD3、CD4或CD8的表达从生成自样品的单细胞悬浮液纯化T细胞。可以通过密度梯度从样品富集T细胞。

#### [0089] 抗原呈递细胞

[0090] 抗原呈递细胞 (APC) 或辅佐细胞是在其表面展示与主要组织相容性复合物 (MHC) 形成复合物的抗原的细胞;这个过程称为抗原呈递。T细胞可以使用其T细胞受体 (TCR) 识别这些复合物。

[0091] 在一方面,抗原呈递细胞是树突状细胞。树突状细胞 (DC) 可以衍生自从血液分离的单核细胞以产生单核细胞衍生的树突状细胞 (MoDC)。在一方面,从获得自患者的血液样品产生DC,以产生自体DC。在优选的方面,DC是自体MoDC。可以使用本领域的标准方法,以从分离的单核细胞产生树突状细胞。例如,Leko等人 (J. Immunol. 2019, 202:3458-3467) 中描述了获得PBMC衍生DC的方案。进一步,DC纯化/分离试剂盒是商业上可获得的,诸如来自 StemCell™ Technologies的EasySep™ DC富集试剂盒。另外,CD14 Microbead和相关联的方案可从Miltenyi Biotec获得 (可在<https://www.miltenyibiotec.com/GB-en/products/cd14-microbeads-human.html#130-050-201>获取)。

[0092] 在一方面,抗原呈递细胞是B细胞。在一方面,B细胞从血液,例如获得自患者的血液样品扩增。在一方面,B细胞从分离自血液样品的CD19+细胞扩增。可以使用任何合适的方法来分离CD19+,诸如使用用抗CD19抗体包被的免疫磁性颗粒进行的阳性选择或阴性选择。CD19纯化/分离试剂和试剂盒是商业上可获得的,诸如例如,CD19 MicroBead或人B细胞分离试剂盒II (Miltenyi Biotec) 和EasySep™ 人CD19阳性选择试剂盒 (StemCell™ Technologies)。另一种方法是使用对CD20或CD22的阳性选择,例如使用CD20或CD22 MicroBead (Miltenyi Biotec)。

[0093] 本领域已知的标准方法可用于从分离的CD19+单核细胞或直接从血液样品或PBMC产生B细胞。例如,使用CD40L、F(ab')<sub>2</sub>片段山羊抗IgA+IgG+IgM、CpG和IL-4的B细胞扩增方案在Kotsiou等人 (Blood 2016, 128:72-81) 中描述。另一种典型的方法是如Su等人 (J Immunol 2016, 197:4163-4176) 所教导的,用表达CD40L的饲养细胞进行培养。B细胞扩增试剂盒是商业上可获得的,诸如来自StemCell™ Technologies的ImmunoCult™ 人B细胞扩增试剂盒和来自Miltenyi Biotec的人B细胞扩增试剂盒。

[0094] 在一方面,分离的CD19+细胞用IL-4、CD40L和CpG进行培养以扩增B细胞。

[0095] 在一方面,B细胞扩增培养基包含在约10至100ng/mL、例如约25至75ng/mL的浓度下的IL-4。在一些实施方案中,B细胞扩增培养基包含约50ng/mL的IL-4。在一个实施方案中,B细胞扩增培养基包含约10ng/mL、约25ng/mL、约30ng/mL、约35ng/mL、约40ng/mL、约45ng/mL、约50ng/mL、约55ng/mL、约60ng/mL、约70ng/mL、约80ng/mL、约90ng/mL或约100ng/mL的IL-4。在实施方案中,B细胞扩增培养基包含在10ng/mL和20ng/mL之间、在20ng/mL和30ng/mL之间、在30ng/mL和40ng/mL之间、在40ng/mL和50ng/mL之间/或在50ng/mL和100ng/mL之间的IL-4。

[0096] 在一方面,B细胞扩增培养基包含在约0.5至约50IU/mL,例如约0.5至约10、12、15或20IU/mL,或替代性的约2.5至25IU/ml的浓度下的CD40L。在一方面,CD40L以约40IU/mL、约35IU/mL、约30IU/mL、约25IU/mL、约20IU/mL、约15IU/mL、约12IU/mL、约10IU/mL、约5IU/

mL、约4IU/mL、约3IU/mL、约2IU/mL、约1IU/mL或约0.5IU/mL的浓度存在。在一方面,CD40L以约12IU/mL的浓度存在。

[0097] 在一方面,B细胞扩增培养基包含在约0.1至约10 $\mu$ g/mL,例如约0.5至约3、4、5或6 $\mu$ g/mL,或替代性地约4至5 $\mu$ g/mL的浓度下的CpG。在一方面,CD40L以约10 $\mu$ g/mL、约9 $\mu$ g/mL、约8 $\mu$ g/mL、约7 $\mu$ g/mL、约6 $\mu$ g/mL、约5 $\mu$ g/mL、约4.5 $\mu$ g/mL、约4 $\mu$ g/mL、约3 $\mu$ g/mL、约2 $\mu$ g/mL、约1 $\mu$ g/mL或约0.5 $\mu$ g/mL的浓度存在。在一方面,CD40L以约4.6 $\mu$ g/mL的浓度存在。

[0098] 抗原呈递细胞可以以从约2:1至约1:100,诸如约1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:10、1:20、1:50或1:75的APC与T细胞的比率进行使用。

[0099] 在一方面,抗原呈递细胞已经用抗原加载。抗原的加载可以通过本领域已知的方法来实现。例如,可以通过用肽脉冲抗原呈递细胞(APC)或通过遗传修饰来加载抗原。在本发明的情况下,术语“抗原”指一种或多种抗原。

[0100] 通过脉冲APC来用抗原加载APC的方法是本领域已知的。例如,Leko等人(J Immunol. 2019, 202: 3458-3467)中描述了通过用包含已鉴定的突变的肽进行脉冲来加载APC的方案。

[0101] 可以用肽形式的抗原加载APC,该肽含有作为单一刺激剂或作为刺激性肽的池的一种或多种已鉴定的突变,诸如包含鉴定为新抗原的突变的肽。例如,Leko等人描述了包括通过将APC与最多达12个单个的肽的池一起孵育来用抗原加载APC的方案,每个肽包含两侧上的翼侧是12个野生型氨基酸的已鉴定的点突变。

[0102] 在一方面,用肽加载未成熟的树突状细胞,然后使其成熟。在另一方面,用肽加载成熟的树突状细胞。在又一方面,在未成熟和成熟时,用肽两次加载树突状细胞。

[0103] 或者,用于通过修饰APC以表达抗原而用抗原加载APC的方法是本领域已知的。例如,可以通过用编码抗原序列的mRNA转染APC来修饰APC以表达该抗原序列。编码抗原序列的mRNA可以是以小基因或串联小基因的形式。APC可以用编码包含已鉴定的突变的肽的mRNA转染作为构建体或作为编码多个此类肽的构建体。例如,Leko等人描述了包括通过用包含最多达12个小基因的串联小基因RNA对APC进行电穿孔来用抗原加载APC的方案,每个小基因包含突变氨基酸的编码序列,其两边翼侧是编码12个野生型氨基酸的序列。

[0104] 在一方面,抗原呈递细胞是能够呈递相关肽的细胞,例如在正确的HLA背景下。此类细胞可以是表达自体HLA分子的自体细胞,或表达匹配的HLA的阵列的非自体细胞。在一方面,人工抗原呈递细胞是经辐照的。

[0105] 术语“肽”在正常意义上使用,以意指通常通过相邻氨基酸的 $\alpha$ -氨基基团和 $\alpha$ -羧基基团之间的肽键彼此连接的一系列残基,通常地L-氨基酸。该术语包括修饰的肽和合成的肽类似物。

[0106] 可以使用化学方法制备肽(Peptide Chemistry, A practical Textbook. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlin.)。例如,肽可以通过固相技术来合成(Roberge JY et al. (1995) Science 269: 202-204),从树脂进行裂解,并通过制备型高效液相色谱法进行纯化(例如,Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principles, WH Freeman and Co, New York NY)。自动化合成可以例如使用ABI 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer) 根据由制造商提供的说明来实现。

[0107] 或者,肽可以通过重组方法或通过从是抗原或包含抗原的多肽进行裂解来制备。

肽的组成可以通过氨基酸分析或测序(例如,Edman降解程序)来证实。

[0108] 如本领域众所周知的,在由主要组织相容性分子(MHC)结合的抗原衍生的肽的情况下,抗原被呈递给T细胞。

[0109] 预测肽是否可能结合至特定MHC分子并因此作为抗原发挥功能的方法是本领域已知的。例如,如下所述,可以使用netMHC(Lundegaard等人)和netMHCpan(Jurtz等人)算法来预测肽的MHC结合。因此,可以用使用任何此类方法预测为可能由一种或多种有相关性的MHC分子呈递的肽来加载APC。作为替代或除此之外,可以使用多个候选肽来用抗原加载APC,每个候选肽包含感兴趣的突变,并且由于肽中感兴趣的突变的位置而彼此不同。

[0110] MHC I类蛋白在机体的大多数有核细胞上形成功能性受体。HLA中有3个主要的MHC I类基因:HLA-A、HLA-B、HLA-C,以及三个次要的基因HLA-E、HLA-F和HLA-G。 $\beta$ 2-微球蛋白与主要基因和次要基因亚基结合而产生异二聚体。

[0111] 结合至MHC I类分子的长度肽通常为7个至13个,更通常为8个至11个氨基酸。通过肽的主链中的原子和所有MHC I类分子的肽结合槽(peptide-binding groove)中的不变位点之间的接触,肽的结合在其两端得以稳定。槽的两端都有不变位点,其结合肽的氨基末端和羧基末端。肽长度中的变化通过肽骨架中的扭结来调节,该扭结通常位于允许所需的柔性的脯氨酸或甘氨酸残基处。

[0112] 存在由HLA基因座编码的3种主要的和2种次要的MHC II类蛋白质。II类的基因组合而形成通常在抗原呈递细胞表面上表达的异二聚体( $\alpha\beta$ )蛋白受体。

[0113] 与MHC II类分子结合的肽的长度通常在8个和20个氨基酸之间,其长度更通常在10个和17个氨基酸之间,并且可以更长(例如最多达40个氨基酸)。这些肽处于沿着MHC II肽结合槽的延伸的构象中,该槽(与MHC I类肽结合槽不同)两端都是开放的。肽主要通过主链原子与沿着肽结合槽的保守残基接触而固定到位。

[0114] 肽可以在肽之内的任何残基位置处包含突变(例如,由SNV编码的非沉默氨基酸取代)。举例来说,能够结合至MHC I类分子的肽的长度通常为7个至13个氨基酸。因此,在包含十三个氨基酸的肽中,该氨基酸取代可以存在于位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13处。

[0115] 在一方面,较长的肽,例如27、28、29、30或31个氨基酸长的肽,可以用于刺激CD4+细胞和CD8+细胞两者。突变可以位于肽中的任何位置处。在一方面,突变位于肽的中心处或在肽的中心附近,例如在位置12、13、14、15或16处。

[0116] 在抗原特异性扩增步骤中,可以使用任何合适数量的抗原,例如10个至300个抗原,诸如25个至250个、50个至200个、70个至185个或100至150个抗原,诸如约10个、20个、50个、75个、100个、125个、150个、175个、200个或250个抗原。

[0117] 细胞因子

[0118] 根据本发明的方法,T细胞可以用本文所述的细胞因子进行培养。

[0119] 术语“IL-2”指被称为白细胞介素-2的T细胞生长因子,并且包括所有形式的IL-2,包括人和哺乳动物形式、保守氨基酸取代、糖基化形式(glycoform)、生物类似物及其变体。例如,术语IL-2涵盖IL-2的人重组形式,诸如Aldesleukin(商品名PROLEUKIN<sup>®</sup>)。阿地白介素(去丙氨酰-1,丝氨酸-125人IL-2)是IL-2的非糖基化人重组形式,具有约15kDa的分子量。如WO 2012/065086中所述,术语IL-2还涵盖IL-2的聚乙二醇化形式。

[0120] 在一方面,在非特异性预扩增步骤中,IL-2以约1,000至约10,000IU/mL的浓度存在。例如,IL-2可以以约4,000至约8,000IU/mL、例如约5,000IU/mL至约7,000IU/mL、优选地约6,000IU/mL的浓度存在。在非特异性预扩增步骤中,IL-2可以在约1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000或10,000IU/mL的浓度下使用。

[0121] 在例如与非特异性预扩增或增长扩增步骤中使用的IL-2浓度的比较中,抗原特异性扩增步骤中使用的IL-2浓度可以描述为“较低的”或“减少的”。较低浓度的IL-2用于促进T细胞应答抗原的选择性扩增并减少非特异性扩增。

[0122] 在优选的方面,在抗原特异性扩增步骤中,IL-2以约10至500IU/mL、例如约50IU/mL至250IU/mL、优选地约100IU/mL的浓度存在。在抗原特异性扩增步骤中,IL-2可以在约50、75、100、150、250或500IU/mL的浓度下使用。

[0123] 在一方面,在非特异性增长步骤和/或非特异性预扩增步骤中,IL-2以约100至10,000IU/mL的浓度存在。例如,IL-2可以以约500至约6,000IU/mL、例如约1,000IU/mL至约5,000IU/mL、或约3,500至约4,500IU/mL、优选地约4,000IU/mL的浓度存在。在非特异性增长扩增步骤中,IL-2可以在约500、1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000或10,000IU/mL的浓度下使用。

[0124] 术语“IL-15”指免疫调节细胞因子白细胞介素15,并且包括所有形式的IL-15,包括人和哺乳动物形式、保守氨基酸取代、糖基化形式(glycoform)、生物类似物及其变体。例如,术语IL-15涵盖IL-15的人重组形式。

[0125] 在一方面,IL-15以约10至1600IU/mL,例如约80至800IU/mL的浓度存在。在一方面,IL-15以约500IU/mL、约400IU/mL、约300IU/mL、约200IU/mL、约180IU/mL、约160IU/mL、约140IU/mL、约120IU/mL或约100IU/mL的浓度存在。在一方面,IL-15以约100IU/mL至约500IU/mL的浓度存在。在另一方面,IL-15以约100至400IU/mL、或约100至300IU/mL、优选地约200IU/mL、更优选地160IU/mL的浓度存在。

[0126] 术语“IL-21”指免疫调节细胞因子白细胞介素21,并且包括所有形式的IL-21,包括人和哺乳动物形式、保守氨基酸取代、糖基化形式(glycoform)、生物类似物及其变体。例如,术语IL-21涵盖IL-21的人重组形式。

[0127] 在一方面,IL-21以约0.5至约50IU/mL,例如约0.5至约10、12、15或20IU/mL,或替代性地约1至5IU/mL、或约2.5至25IU/mL的浓度存在。在一方面,IL-21以约40IU/mL、约35IU/mL、约30IU/mL、约25IU/mL、约20IU/mL、约15IU/mL、约12IU/mL、约10IU/mL、约5IU/mL、约4IU/mL、约3IU/mL、约2IU/mL、约1IU/mL或约0.5IU/mL的浓度存在。在一方面,IL-21以约0.5IU/mL至约50IU/mL、优选地约32.5IU/mL的浓度存在。

[0128] 如本文所指的IL-2、IL-15和/或IL-21的浓度可以是每个扩增步骤开始时的初始浓度。IL-2、IL-15和/或IL-21浓度可以在整个培养步骤中保持恒定(例如通过用重复补料步骤控制浓度),或可以在整个培养过程中变化而不超过指定的最大浓度。

#### [0129] 血清替代物

[0130] 体外培养中的细胞通常补充有血清,例如人衍生的或牛衍生的血清,以便协助细胞生长和维持。然而,出于GMP目的,在生产用于人施用的治疗产品中,如果可避免的话,期望不包含人衍生的或牛衍生的血清。

[0131] 人衍生的或牛衍生的血清的替代选择是商业上可以血清替代物的形式获得的,例

如CTS™ Immune Cell SR(Gibco)。

[0132] 血清替代物的进一步的选择是使用血小板裂解物。血小板裂解物是细胞培养中胎牛血清(FBS)的替代补充剂。其在引起血小板裂解(释放了支持细胞扩增的生长因子)的冻/融循环后获得自血小板。含有血小板裂解物的无FBS细胞培养基是商业上可以GMP质量获得的,并且可以用于细胞疗法的制备中。在优选的方面,血小板裂解物获得自人血液,本文称为人血小板裂解物(hPL)。

[0133] 在本文定义的任何T细胞扩增步骤处,血小板裂解物可以包含在细胞培养基中。在一方面,在预扩增步骤期间存在血小板裂解物。在另一方面,在抗原特异性扩增步骤期间存在血小板裂解物。在又一方面,在非特异性增长扩增步骤期间存在血小板裂解物。优选地,血小板裂解物存在于每个步骤的整个过程中。

[0134] 在一方面,血小板裂解物以约1%至约10%、例如约5%的浓度存在。

[0135] 抗体

[0136] 根据本发明的方法,T细胞可以与如本文所述的抗体一起培养。

[0137] 术语“CD3”指分化簇3。CD3是涉及T细胞活化的蛋白质复合体和T细胞共受体。它由一条CD3  $\gamma$  链、一条CD3 $\delta$ 链和两条CD3 $\epsilon$ 链构成。这些链与T细胞受体和 $\zeta$ 链(zeta链)缔合,以在T淋巴细胞中生成活化信号。

[0138] 抗CD3抗体与CD3的结合刺激T细胞活化。抗CD3抗体是本领域已知的。例如,合适的抗CD3抗体包括OKT3(Muromab)、TRX4(奥特利兹单抗,Otelixizumab)、PRV-031(特普利珠单抗,Teplizumab)和维西珠单抗(Visilizumab)。

[0139] 在一方面,抗CD3抗体是OKT3。

[0140] 在一方面,抗CD3抗体以约0.1至1,000ng/mL,例如约10至1,000ng/mL,例如约30至300ng/mL的浓度存在。在一些实施方案中,细胞培养基包含约30ng/mL的抗CD3抗体。在实施方案中,细胞培养基包含约0.1ng/mL、约0.5ng/mL、约1ng/mL、约2.5ng/mL、约5ng/mL、约7.5ng/mL、约10ng/mL、约15ng/mL、约20ng/mL、约25ng/mL、约30ng/mL、约35ng/mL、约40ng/mL、约50ng/mL、约60ng/mL、约70ng/mL、约80ng/mL、约90ng/mL、约100ng/mL、约200ng/mL、约500ng/mL或约1 $\mu$ g/mL的抗CD3抗体。在实施方案中,细胞培养基包含在0.1ng/mL和1ng/mL之间、在1ng/mL和5ng/mL之间、在5ng/mL和10ng/mL之间、在10ng/mL和20ng/mL之间、在20ng/mL和30ng/mL之间、在30ng/mL和40ng/mL之间、在40ng/mL和50ng/mL之间或在50ng/mL和100ng/mL之间的抗CD3抗体。

[0141] 术语“CD28”指分化簇28。CD28在初始T细胞上组成型表达。CD28的刺激,例如通过抗CD28抗体,提供T细胞活化和存活所需的共刺激信号。合适的抗CD28抗体是本领域已知的。

[0142] 在一方面,抗CD28抗体以约0.1至1,000ng/mL,例如约10至1,000ng/mL,例如约30至300ng/mL的浓度存在。在一些实施方案中,细胞培养基包含约30ng/mL的抗CD28抗体。在实施方案中,细胞培养基包含约0.1ng/mL、约0.5ng/mL、约1ng/mL、约2.5ng/mL、约5ng/mL、约7.5ng/mL、约10ng/mL、约15ng/mL、约20ng/mL、约25ng/mL、约30ng/mL、约35ng/mL、约40ng/mL、约50ng/mL、约60ng/mL、约70ng/mL、约80ng/mL、约90ng/mL、约100ng/mL、约200ng/mL、约500ng/mL或约1 $\mu$ g/mL的抗CD28抗体。在实施方案中,细胞培养基包含在0.1ng/mL和1ng/mL之间、在1ng/mL和5ng/mL之间、在5ng/mL和10ng/mL之间、在10ng/mL和20ng/mL之间、

在20ng/mL和30ng/mL之间、在30ng/mL和40ng/mL之间、在40ng/mL和50ng/mL之间或在50ng/mL和100ng/mL之间的抗CD28抗体。

[0143] 术语“CD2”指分化簇2。CD2是在T细胞和自然杀伤(NK)细胞表面上发现的细胞粘附分子。除了其粘附特性之外,CD2还充当T细胞和NK细胞上的共刺激分子。合适的抗CD2抗体是本领域已知的。

[0144] 在一方面,抗CD2抗体以约0.1至1,000ng/mL,例如约10至1,000ng/mL,例如约30至300ng/mL的浓度存在。在一些实施方案中,细胞培养基包含约30ng/mL的抗CD2抗体。在实施方案中,细胞培养基包含约0.1ng/mL、约0.5ng/mL、约1ng/mL、约2.5ng/mL、约5ng/mL、约7.5ng/mL、约10ng/mL、约15ng/mL、约20ng/mL、约25ng/mL、约30ng/mL、约35ng/mL、约40ng/mL、约50ng/mL、约60ng/mL、约70ng/mL、约80ng/mL、约90ng/mL、约100ng/mL、约200ng/mL、约500ng/mL或约1 $\mu$ g/mL的抗CD2抗体。在实施方案中,细胞培养基包含在0.1ng/mL和1ng/mL之间、在1ng/mL和5ng/mL之间、在5ng/mL和10ng/mL之间、在10ng/mL和20ng/mL之间、在20ng/mL和30ng/mL之间、在30ng/mL和40ng/mL之间、在40ng/mL和50ng/mL之间或在50ng/mL和100ng/mL之间的抗CD2抗体。

[0145] 在一方面,非特异性增长扩增步骤使用抗CD3抗体。在另一方面,非特异性增长扩增步骤使用抗CD3抗体和抗CD28抗体的组合。在另一方面,非特异性增长扩增步骤使用抗CD3抗体、抗CD28抗体和抗CD2抗体的组合。

[0146] 抗CD3抗体和/或抗CD28抗体和/或抗CD2抗体可以是可溶的、存在于辅佐细胞上的、结合至固体表面(例如珠子)的或存在于聚合纳米基质结构或微球中的。

[0147] 在本发明的特定的方面,抗体作为可溶的四聚体抗体复合物提供。四聚体抗体复合物的结合导致细胞表面配体的交联,从而为T细胞活化提供所需的初级信号和共刺激信号。对此类抗体复合物进行设计,以在没有磁珠、饲养细胞或抗原的条件下活化并扩增人T细胞。

[0148] 在一方面,CD3/CD28四聚体抗体复合物用于本文所述的任何非特异性扩增步骤。这种复合物是商业上可获得的(例如来自STEMCELL Technologies, Inc.的ImmunoCult™人CD3/CD28 T细胞活化剂)。

[0149] 在一方面,CD3/CD28/CD2四聚体抗体复合物用于非特异性扩增步骤。这种复合物是商业上可获得的(例如来自STEMCELL Technologies, Inc.的ImmunoCult™人CD3/CD28/CD2 T细胞活化剂)。

[0150] 在另一方面,抗体与允许无菌过滤和过量试剂去除的胶体聚合纳米基质缀合。与人源化CD3抗体和CD28抗体缀合的胶体聚合物纳米基质是商业上可获得的(例如来自Miltenyi Biotec的人T细胞TransAct™)。

[0151] 在进一步的方面,抗体以微球,例如无磁性CD3/CD28微球(例如来自Bio-Techne的Cloudz™ CD3/28)进行提供。

[0152] 在又一方面,磁珠包被有抗体,例如抗CD3抗体和抗CD28抗体(例如来自Thermo Fisher Scientific的Dynabeads™人T活化剂CD3/CD28)。

[0153] 在一方面,本发明提供了用于产生包含抗原特异性T细胞的T细胞群体的方法,其中所述方法包括以下的步骤:

[0154] a) 在存在IL-2、IL-15和IL-21的条件下培养分离的T细胞;和

[0155] b) 将所述T细胞与已经用抗原加载的抗原呈递细胞共培养,其中所述T细胞和抗原呈递细胞在存在IL-2和IL-15的条件下进行共培养。

[0156] 在另一方面,本发明提供了用于产生包含抗原特异性T细胞的T细胞群体的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0157] a) 在存在IL-2和IL-21的条件下培养分离的T细胞;

[0158] b) 将所述T细胞与已经用抗原加载的抗原呈递细胞共培养,其中所述T细胞和抗原呈递细胞在存在IL-2的条件下进行共培养;和

[0159] c) 在存在抗CD3抗体、抗CD28抗体、抗CD2抗体和IL-2的条件下培养步骤b)中产生的细胞。

[0160] 在另一方面,本发明提供了用于产生包含抗原特异性T细胞的T细胞群体的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0161] a) 在存在IL-2、IL-15和IL-21的条件下培养分离的T细胞;

[0162] b) 将所述T细胞与已经用抗原加载的抗原呈递细胞共培养,其中所述T细胞和抗原呈递细胞在存在IL-2和IL-15的条件下进行共培养;和

[0163] c) 在存在抗CD3抗体、抗CD28抗体、抗CD2抗体和IL-2的条件下培养步骤b)中产生的细胞。

[0164] 在一方面,预扩增步骤a)持续约7至约21天,例如约10至约18天。在一方面,预扩增步骤持续约11、12、13、14、15、16或17天。

[0165] 在一方面,预扩增步骤a)包括额外的组分以增加T细胞的非特异性扩增。将进一步的组分(如下详述)添加到预扩增步骤可以导致群体中总T细胞数量增加,并且优选地导致抗原特异性T细胞数量增加。

[0166] 在一方面,预扩增步骤a)包括在存在以下一种或多种的条件下培养分离的T细胞:

[0167] (i) 抗CD3抗体;

[0168] (ii) 抗CD28抗体;和/或

[0169] (iii) 抗CD2抗体。

[0170] 在一方面,预扩增步骤使用抗CD3抗体。在另一方面,预扩增步骤使用抗CD3抗体和抗CD28抗体的组合。在另一方面,预扩增步骤使用抗CD3抗体、抗CD28抗体和抗CD2抗体的组合。

[0171] 在一方面,预扩增步骤使用干扰素 $\gamma$  (IFN $\gamma$ )。干扰素 $\gamma$ 是二聚化的可溶性细胞因子,是干扰素的II型类别的唯一成员,并且在诱导和调节一系列免疫应答中发挥重要作用。合适类型的IFN $\gamma$ 是本领域已知的并且是商业上可获得的,例如来自ThermoFisher的人IFN $\gamma$ 重组蛋白和来自PeproTech的重组人IFN- $\gamma$ 。

[0172] 在一方面,预扩增步骤使用与IFN $\gamma$ 组合的抗CD3抗体。在另一方面,预扩增步骤使用抗CD3抗体、抗CD28抗体和IFN $\gamma$ 的组合。在另一方面,预扩增步骤使用抗CD3抗体、抗CD28抗体和抗CD2抗体以及IFN $\gamma$ 的组合。

[0173] 在一方面,IFN $\gamma$ 以约0.1至1,000ng/mL、例如约10至500ng/mL、例如约5至20ng/mL的浓度存在。在一些实施方案中,细胞培养基包含约10ng/mL的IFN $\gamma$ 。在实施方案中,细胞培养基包含约0.1ng/mL、约0.5ng/mL、约1ng/mL、约2.5ng/mL、约5ng/mL、约7.5ng/mL、约10ng/mL、约15ng/mL、约20ng/mL、约25ng/mL、约30ng/mL、约35ng/mL、约40ng/mL、约50ng/

mL、约60ng/mL、约70ng/mL、约80ng/mL、约90ng/mL、约100ng/mL、约200ng/mL、约500ng/mL或约1 $\mu$ g/mL的IFN  $\gamma$ 。在实施方案中,细胞培养基包含在0.1ng/mL和1ng/mL之间、在1ng/mL和5ng/mL之间、在5ng/mL和10ng/mL之间、在10ng/mL和20ng/mL之间、在20ng/mL和30ng/mL之间、在30ng/mL和40ng/mL之间、在40ng/mL和50ng/mL之间或在50ng/mL和100ng/mL之间的IFN  $\gamma$  抗体。

[0174] 抗CD3抗体和/或抗CD28抗体和/或抗CD2抗体和/或IFN  $\gamma$  可以在预扩增步骤期间的任何时间点进行添加。在一方面,在预扩增步骤即将结束时,例如一旦步骤完成了50%、75%或更多,就添加额外的组分(抗体和/或IFN  $\gamma$ )。因此,可以在预扩增步骤的第5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15天将抗体和/或IFN  $\gamma$  添加至培养物。

[0175] 在一方面,抗原特异性扩增步骤b)持续约7至约21天,例如约10至约17天。在一方面,特定扩增步骤持续约8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18天。

[0176] 在一方面,非特异性增长扩增步骤c)持续约3至约21天。在一方面,增长扩增步骤持续约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或17天。

[0177] 细胞可以每2-3天分割一次,以维持适当的细胞密度。可以添加新鲜细胞因子以维持细胞因子浓度。

#### [0178] T细胞群体

[0179] 本发明进一步提供了通过本发明的方法产生的T细胞群体。

[0180] 根据本发明产生的T细胞群体可以富集有对给定抗原(即靶标)特异的T细胞。即,根据本发明产生的T细胞群体将具有增加数量的靶向一种或多种给定抗原的T细胞。例如,与分离自受试者的样品中的T细胞相比,本发明的T细胞群体将具有增加数量的靶向所述抗原的T细胞。也就是说,该T细胞群体的组成将不同于“初始(native)”T细胞群体(即未经历本文讨论的扩增步骤的群体),因为靶向所述抗原的T细胞的百分比或比例将增加。

[0181] 根据本发明的T细胞群体可以具有至少约0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的靶向给定抗原或一组抗原的T细胞。例如,该T细胞群体可以具有约0.2%-5%、5%-10%、10%-20%、20%-30%、30%-40%、40%-50%、50%-70%或70%-100%的靶向给定抗原或一组抗原的T细胞。在一方面,该T细胞群体具有至少约1%、2%、3%、4%或5%的靶向所述抗原的T细胞,例如至少约2%或至少2%的靶向所述抗原的T细胞。

[0182] 换句话说,该T细胞群体可以具有不超过约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%的不靶向给定抗原的T细胞。例如,该T细胞群体可以具有不超过约95%-20%、99.8%、90%-95%、80%-90%、70%-80%、60%-70%、50%-60%、30%-50%或0-30%的不靶向所述抗原的T细胞。在一方面,该T细胞群体具有不超过约99%、98%、97%、96%或95%的不靶向所述抗原的T细胞,例如不超过约98%或95%的不靶向所述抗原的T细胞。

[0183] 例如,使用抗原扩增的抗原反应性T细胞群体可以比未扩增的T细胞群体具有更高的活性。提及“活性”可以代表T细胞群体对用抗原性肽(例如对应于用于扩增的肽的肽,或

抗原衍生肽的混合物)的再刺激的应答。用于测定该应答的合适方法是本领域已知的。例如,可以测量细胞因子产生(例如可以测量IL-2或IFN  $\gamma$  产生)。提及“更高的活性”包括例如活性的1-5、5-10、10-20、20-50、50-100、100-500、500-1000倍增加。在一方面,该活性可以超过1000倍更高。

[0184] 在优选的实施方案中,本发明提供了多种T细胞或T细胞群体,即多于一种的T细胞,其中所述多种T细胞包含识别给定抗原的T细胞和识别不同抗原的T细胞。因此,本发明提供了识别不同抗原的多种T细胞。或者,多种或群体中的不同T细胞可以具有识别相同抗原的不同TCR。

[0185] 在优选的实施方案中,由多种T细胞识别的抗原的数量为2至1000种。例如,识别的抗原的数量可以是2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950或1000种,优选2至100种。可以有多种具有不同TCR但识别相同抗原的T细胞。

[0186] T细胞群体可以全部或主要由CD8<sup>+</sup>T细胞构成,或全部或主要由CD8<sup>+</sup>T细胞和CD4<sup>+</sup>T细胞的混合物构成,或全部或主要由CD4<sup>+</sup>T细胞构成。

[0187] 辅助性的辅助性T细胞(TH细胞)在免疫过程中协助其他白细胞,免疫过程包括B细胞成熟成浆细胞和记忆B细胞、以及细胞毒性T细胞和巨噬细胞的活化。TH细胞在其表面表达CD4(即它们是CD4<sup>+</sup>T细胞)。当TH细胞被抗原呈递细胞(APC)的表面的MHC II类分子呈递肽抗原时,TH细胞就变成活化的。这些细胞可以分化成几种亚型之一,包括TH1、TH2、TH3、TH17、Th9或TFH,它们分泌不同的细胞因子以促进不同类型的免疫应答。

[0188] 细胞毒性T细胞(TC细胞或CTL)会破坏病毒感染的细胞和肿瘤细胞,并且还涉及移植排斥。CTL在其表面表达CD8(即它们是CD8<sup>+</sup>T细胞)。这些细胞通过与在所有有核细胞表面上的MHC I类相关联的抗原的结合来识别其靶标。通过由调节性T细胞分泌的IL-10、腺苷和其他分子,可以使CD8<sup>+</sup>细胞失活,这预防了自身免疫病。

#### [0189] 功能性特征

[0190] 在一方面,根据本发明的方法产生的T细胞群体具有增加的CD25表达。T细胞可以应答于抗原的再刺激而上调或增加CD25的表达。

[0191] 术语“CD25”指白细胞介素2受体 $\alpha$ 链(IL2RA)。白细胞介素2受体 $\alpha$ 链和 $\beta$ (IL2RB)链连同共同的 $\gamma$ 链(IL2RG)一起构成高亲和力的IL2受体。同二聚 $\alpha$ 链(IL2RA)导致低亲和力受体,而同二聚 $\beta$ (IL2RB)链产生中亲和力受体。CD25与CD4一起在调节性T细胞上表达。

[0192] 在一方面,根据本发明的方法产生的T细胞群体具有增加的CD27表达。CD27是肿瘤坏死因子受体超家族的成员。CD27结合CD70,导致T细胞分化和克隆扩增。CD27在生成T细胞记忆中发挥作用。

[0193] 在一方面,根据本发明的方法产生的T细胞群体具有降低的CD57表达。CD57抗原存在于外周血单核细胞、NK淋巴细胞和T淋巴细胞的亚群体上。人淋巴细胞上的CD57表达可以指示增殖的失能(衰老),尽管CD57阳性细胞也可以展示出高细胞毒性潜力、记忆样特征和有力的效应功能。

[0194] 如本文所讨论的,根据本发明产生的T细胞可以具有增加的IFN  $\gamma$  表达。用于确定IFN  $\gamma$  的表达的合适方法是本领域已知的。

[0195] 本文所述的T细胞可以具有CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>-</sup>表型。

[0196] 在另一方面,根据本发明的方法产生的T细胞群体可以具有更均匀的CD4+细胞和CD8+T细胞的平衡或比率。例如,如本文所述的本发明的方法可以导致比先前的方法含有更高比例的CD8+细胞的T细胞群体。CD8+细胞中的增加可以是有利的(例如,参见Prieto等人, *J Immunother* 2010Jun;33(5):547-56)。因此,与通过先前的方法达到的T细胞群体相比,T细胞群体对于CD4+/CD8+T细胞可以更加平衡。在一方面,T细胞群体可以含有约20%至约80%的CD8+T细胞,诸如约30%至70%的CD8+T细胞,例如至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%或更多的CD8+T细胞。在一个实施方案中,T细胞群体包含至少约50%的CD8+T细胞。

#### [0197] T细胞组合物

[0198] 本发明进一步提供了T细胞组合物,其包含如本文所述的根据本发明的T细胞群体。

[0199] T细胞组合物可以是包含多种如本文所定义的T细胞的药物组合物。药物组合物可以额外地包含药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂。药物组合物可以任选地包含一种或多种其他药学活性多肽和/或化合物。例如,此类配制剂可以是以合适于静脉内输注的形式。

#### [0200] 抗原特异性T细胞

[0201] 可以使用本领域已知的方法进行混合起始T细胞群体中的抗原特异性T细胞的鉴定。例如,可以使用包含抗原肽的MHC多聚体来鉴定抗原特异性T细胞。

[0202] MHC多聚体是MHC分子的寡聚形式,其经设计以在一大群体不相关的T细胞中鉴定并分离对特定抗原具有高亲和力的T细胞。多聚体可以用于展示1类MHC、2类MHC或非经典分子(例如CD1d)。

[0203] 最常见的MHC多聚体是四聚体。这些通常是通过生物素化的可溶性MHC单体产生的,通常在真核细胞或细菌细胞中重组地产生该单体。然后,这些单体结合至骨架,诸如链霉亲和素或亲和素,这形成了四价结构。这些骨架与荧光染料缀合,随后经由例如流式细胞术分离结合的T细胞。

#### [0204] 抗原

[0205] 在本发明的一方面,T细胞群体包含靶向癌症相关联的抗原或肿瘤特异性抗原的T细胞。

[0206] 肿瘤抗原包括以下:CEA、未成熟层粘连蛋白受体、TAG-72、HPV E6和HPV E7、BING-4、钙激活氯离子通道2、细胞周期蛋白B1、9D7、Ep-CAM、EphA3、Her2/neu、端粒酶、间皮素、SAP-1、生存素(survivin)、BAGE家族、CAGE家族、GAGE家族、MAGE家族、SAGE家族、XAGE家族、NY-ESO-1/LAGE-1、PRAME、SSX-2、Melan-A/MART-1、gp100/pmel17、酪氨酸酶、TRP-1/TRP-2、P.多肽(P. polypeptide)、MC1R、前列腺特异性抗原、 $\beta$ -连环蛋白、BRCA1/2、CDK4、CML66、纤连蛋白、MART-2、p53、ras、TGF- $\beta$ RII和MUC1。

[0207] 肿瘤抗原还可以包括以下:707-AP=707丙氨酸脯氨酸,AFP=alpha( $\alpha$ )-甲胎蛋白,ART-4=由T细胞识别的腺癌抗原4,BAGE=B抗原; $\beta$ -连环蛋白/m, $\beta$ -连环蛋白/突变的,Bcr-abl=断裂点簇区-Abelson,CAMEL=黑色素瘤上的CTL识别抗原,CAP-1=癌胚抗原肽1,CASP-8=caspase-8,CDC27m=突变的细胞分裂周期27,CDK4/m=突变的细胞周期蛋白依赖性激酶4,CEA=癌胚抗原,CT=癌症/睾丸(抗原),Cyp-B=亲环素B,DAM=黑色素瘤分化

抗原 (DAM-6和DAM-10的表位是等同的,但基因序列不同)。DAM-6也称为MAGE-B2,并且DAM-10也称为MAGE-B1),ELF2M=突变的延伸因子2,ETV6-AML1=Etsvariant基因6/急性髓系白血病1基因ETS,G250=糖蛋白250,GAGE=G抗原,GnT-V=N-乙酰氨基葡萄糖转移酶V,Gp100=100kD糖蛋白,HAGE=解旋酶抗原,HER-2/neu=人表皮受体2/神经性的,HLA-A\*0201-R170I=HLA-A2基因中 $\alpha$ 2结构域的 $\alpha$ 螺旋的残基170处的精氨酸(R)至异亮氨酸(I)交换,HPV-E7=人乳头状瘤病毒E7,HSP70-2M=突变的热休克蛋白70-2,HST-2=人印戒瘤-2,hTERT或hTRT=人端粒酶逆转录酶,iCE=肠羧酸酯酶,KIAA0205=如数据库中出现的基因名,LAGE=L抗原,LDLR/FUT=低密度脂质受体/GDP-L-岩藻糖: $\beta$ -D-半乳糖苷酶2- $\alpha$ -L-岩藻糖基转移酶,MAGE=黑色素瘤抗原,MART-1/Melan-A=由T细胞识别的黑色素瘤抗原1/黑色素瘤抗原A,MC1R=黑皮质素1受体,肌球蛋白/m=突变的肌球蛋白,uMUC1=粘蛋白1,MUM-1、MUM-2、MUM-3=黑色素瘤广泛突变蛋白1、2、3,NA88-A=患者M88的NAcDNA克隆,NY-ESO-1=New York-食管鳞状1,P15=蛋白15、p190次级bcr-abl=1903KD bcr-abl的蛋白、Pml/RAR $\alpha$ =早幼粒细胞白血病/视黄酸受体 $\alpha$ 、PRAME=黑色素瘤的优先表达抗原、PSA=前列腺特异性抗原、PSM=前列腺特异性膜抗原,RAGE=肾抗原,RU1或RU2=肾广泛存在(renalubiquitous)1或肾广泛存在2,SAGE=肉瘤抗原,SART-1或SART-3=鳞状抗原排斥肿瘤1或鳞状抗原排斥肿瘤3,TEL/AML1=易位Ets家族白血病/急性髓系白血病1,TPI/m=突变的磷酸丙糖异构酶,TRP-1=酪氨酸酶相关蛋白1,或gp75,TRP-2=酪氨酸酶相关蛋白2,TRP-2/INT2=TRP-2/内含子2,WT1=Wilms肿瘤基因。

#### [0208] 新抗原

[0209] 在本发明的一方面,抗原可以是新抗原。

[0210] “新抗原”是由于癌细胞之内的突变而出现的肿瘤特异性抗原。因此,新抗原不由受试者中的健康(即非肿瘤)细胞表达(或以显著较低水平表达)。当在MHC分子的背景下进行呈递时,新抗原可以被加工以生成可以由T细胞识别的不同的肽。如本文所述,新抗原可以用作癌症免疫疗法的基础。本文提及“新抗原”旨在还包括衍生自新抗原的肽。如本文所用,术语“新抗原”旨在涵盖新抗原的免疫原性的任何部分。

[0211] 如本文所指,“抗原”是当以适当的方式呈递给免疫系统或免疫细胞时,其本身或其一部分能够刺激免疫应答的分子。可以使用本领域已知的方法来预测新抗原与特定MHC分子(由特定HLA等位基因编码)的结合。用于预测MHC结合的方法的实例包括由Lundegaard等人、O'Donnell等人、Bullik-Sullivan等人描述的那些。例如,可以使用netMHC(Lundegaard等人)和netMHCpan(Jurtz等人)算法来预测新抗原的MHC结合。新抗原与特定MHC分子的结合是新抗原被所述MHC分子呈递到细胞表面上的先决条件。

[0212] 本文所述的新抗原可以由任何非沉默突变(无论编码或非编码的)引起,与野生型、健康细胞表达的非突变蛋白相比,新抗原改变了癌细胞中的蛋白质和/或其表达。换句话说,该突变导致野生型、健康细胞中不表达或以非常低水平表达的氨基酸序列的表达。例如,突变可以发生在蛋白质的编码序列中,因此改变所得蛋白质的氨基酸序列。这可以称为“编码突变”。作为另一个实例,突变可以发生在剪接位点,因此导致产生含有一组在野生型蛋白质中不同的或不太常见的外显子的蛋白质。作为进一步的实例,突变的蛋白质可以由易位或融合。

[0213] “突变”指与来自相同个体的健康细胞相比,肿瘤细胞中的核苷酸序列(例如DNA或

RNA)中的差异。核苷酸序列中的差异可以导致表达来自相同个体的健康细胞所不表达的蛋白质。在实施方案中,突变可以是以下的一种或多种:单核苷酸变体(SNV)、多核苷酸变体(MNV)、缺失突变、插入突变、插入缺失突变、移码突变、易位、错义突变、剪接位点突变、融合或肿瘤细胞遗传物质的任何其他变化。

[0214] “插入缺失突变”指生物体的核苷酸序列(例如DNA或RNA)中碱基的插入和/或缺失。通常,插入缺失突变发生在生物体的DNA中,优选基因组DNA中。在实施方案中,插入缺失可以是1至100个碱基,例如1至90、1至50、1至23或1至10个碱基。插入缺失突变可以是移码插入缺失突变。移码插入缺失突变是导致核苷酸序列的阅读框发生变化的一个或多个核苷酸的插入或缺失。此类移码插入缺失突变可以生成新的开放阅读框,其通常与由受试者中相应健康细胞中的非突变DNA/RNA编码的多肽高度不同。

[0215] 可以通过外显子组测序、RNA-seq、全基因组测序和/或靶向基因小组(panel)测序和/或单基因的常规桑格测序来鉴定突变。合适的方法是本领域已知的。Boa等人(*Cancer Informatics*.2014;13(Suppl 2):67-82.)和Ares等人(*Cold Spring Harb Protoc*.2014Nov 3;2014(11):1139-48)分别提供了外显子组测序和RNA-seq的描述。可以在例如Kammermeier等人(*J Med Genet*.2014 Nov;51(11):748-55)和Yap KL等人(*Clin Cancer Res*.2014.20:6605)中找到靶向基因小组测序的描述。还参见Meyerson等人,*Nat.Rev.Genetics*,2010和Mardis,Annu Rev Anal Chem,2013。靶向基因测序小组还是商业上可获得的(例如,如由Biocompare所汇总的(<http://www.biocompare.com/Editorial-Articles/161194-Build-Your-Own-Gene-Panels-with-These-Custom-NGS-Targeting-Tools/>))。

[0216] 可以使用本领域已知的方法进行序列比对,以鉴定与来自非肿瘤样品的DNA和/或RNA相比,来自肿瘤样品的DNA和/或RNA中的核苷酸差异(例如SNV)。例如,可以使用由Koboldt等人(*Genome Res*.2012;22:568-576)描述的方法进行与参考样品相比的核苷酸差异。参考样品可以是种系DNA和/或RNA序列。

#### [0217] 克隆新抗原

[0218] 在一方面,新抗原可以是克隆新抗原。

[0219] “克隆新抗原”(有时也称为“树干新抗原”)是源于克隆突变的新抗原。“克隆突变”(有时称为“树干突变”)是存在于来自受试者的一个或多个样品中的基本上每个肿瘤细胞中(或者可以假定存在于衍生样品中的肿瘤遗传物质的基本上每个肿瘤细胞中)的突变。因此,克隆突变可以是存在于来自受试者的一个或多个样品中的每个肿瘤细胞中的突变。例如,克隆突变可以是在肿瘤发生早期发生的突变。

[0220] “亚克隆新抗原”(有时也称为“分支新抗原”)是源于亚克隆突变的新抗原。“亚克隆突变”(有时也称为“分支突变”)是存在于来自受试者的一个或多个肿瘤样品中的细胞的子集或一部分中(或者可以假定存在于衍生样品中的肿瘤遗传物质的肿瘤细胞的子集中)的突变。例如,亚克隆突变可以是肿瘤发生后特定肿瘤细胞中发生的突变的结果,这种突变仅在起源于该细胞的细胞中发现。

[0221] 与受试者的一个或多个样品相关的词语“基本上每个肿瘤细胞”可以指受试者的一个或多个样品中的肿瘤细胞的至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少

99%。

[0222] 因此,克隆新抗原是在整个肿瘤中有效表达的新抗原。亚克隆新抗原是在肿瘤中的细胞或区域的子集或部分中表达的新抗原。‘在整个肿瘤中有效表达’可以意指克隆新抗原在来自所分析的样品的肿瘤的所有区域中表达。

[0223] 应当理解,突变‘在基本上每个肿瘤细胞之内编码(或表达)’的确定指统计计算,并且因此受到统计分析和阈值的影响。

[0224] 同样,克隆新抗原‘在整个肿瘤中有效表达’的确定指统计计算,并且因此受到统计分析和阈值的影响。

[0225] 用于确定新抗原是否是“克隆的”的各种方法是本领域已知的。可以使用任何合适的方法来鉴定克隆新抗原,例如Landau等人(Cell.2013Feb14;152(4):714-26);MacGranahan等人(Science 2016March 25;351(6280):1463-1469);或Roth等人(Nat Methods.2014April;11(4):396-398)中所描述的。

[0226] 举例来说,描述携带突变的癌细胞的比例的癌细胞分数(CCF)可以用于确定突变是克隆的还是亚克隆的。例如,如由Landau等人(Cell.2013Feb14;152(4):714-26)所述,癌细胞分数可以通过整合变体等位基因频率与拷贝数和纯度估计值来确定。

[0227] 合适地,可以计算在各个和每个所分析的肿瘤区域之内鉴定出的所有突变的CCF值。如果仅使用了一个区域(即仅单个样品),那么将仅获得一组CCF值。这将提供关于该肿瘤区域之内的所有肿瘤细胞中存在哪些突变的信息,并从而将提供该突变是克隆的还是亚克隆的指示。如果使用多个肿瘤区域(例如多个样品),那么可以分别获得每个区域的CCF值或者联合获得多个肿瘤区域的一个或多个的CCF值。

[0228] 此类CCF估计还可以用于鉴定可能是克隆的突变。克隆突变可以定义为具有 $\geq 0.75$ 的癌细胞分数(CCF),诸如 $\geq 0.80$ 、 $0.85$ 、 $0.90$ 、 $0.95$ 或 $1.0$ 的CCF的突变。亚克隆突变可以定义为具有 $< 0.95$ 、 $0.90$ 、 $0.85$ 、 $0.80$ 或 $0.75$ 的CCF的突变。在一方面,克隆突变定义为具有 $\geq 0.95$ 的CCF的突变,亚克隆突变定义为具有 $< 0.95$ 的CCF的突变。

[0229] 如所述,确定克隆突变受到统计分析和阈值的影响。CCF估计可以与将概率密度与0和1之间的CCF的多个可能值中的每一个相关联的分布相关联(例如,从该分布导出),从中可以获得置信度的统计估计。例如,如果95%CCF置信区间 $>= 0.75$ ,即估计的CCF的95%置信区间的上界大于或等于 $0.75$ ,那么可以将突变定义为可能是克隆突变。换句话说,如果有具有使得 $P(L < CCF < H) = 95\%$ 而 $H >= 0.75$ 的下界L和上界H的CCF区间,那么可以将突变定义为可能是克隆突变。

[0230] 在一方面,如果CCF的95%置信区间包括 $CCF = 1$ ,那么可以将突变定义为克隆突变。

[0231] 在另一方面,如果突变的癌细胞分数(CCF)达到或超过如上所定义的所需值(例如 $0.75$ 或 $0.95$ )有超过50%的机会或概率,诸如55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更高的机会或概率,那么可以将该突变鉴定为克隆的。换句话说,如果 $P(CCF > 0.75) >= 0.5$ ,那么可以将突变鉴定为克隆的。

[0232] 概率值可以表示为百分比或分数。该概率可以定义为后验概率。

[0233] 在一方面,如果突变具有大于 $0.95$ 的癌细胞分数的概率 $\geq 0.75$ ,那么可以将突变鉴定为克隆的。

[0234] 在另一方面,如果突变的癌细胞分数(CCF)  $\geq 0.95$ 的机会超过50%,那么可以将该突变鉴定为克隆的。

[0235] 在进一步的方面,分别基于它们的CCF超过第一阈值(例如0.95)的后验概率是大于还是小于第二阈值(例如0.5),或者它们的CCF=1大于或小于第三阈值,可以将突变分类为克隆或亚克隆。

[0236] 在另一方面,如果突变具有大于0.75的癌细胞分数的概率 $\geq 0.5$ ,那么可以将突变鉴定为克隆的。

[0237] 在一方面,T细胞群体可以包含靶向多种(即多于一种)克隆新抗原的T细胞。

[0238] 在一方面,克隆新抗原的数量是2-1000种。例如,克隆新抗原的数量可以是2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950或1000种,例如克隆新抗原的数量可以是2至100种。

[0239] 在一方面,T细胞群体包含识别一种克隆新抗原的T细胞和识别不同的克隆新抗原的T细胞。因此,T细胞群体可以包含识别不同克隆新抗原的多种T细胞。

[0240] 在一方面,由T细胞群体识别的克隆新抗原的数量是2-1000种。例如,所识别的克隆新抗原的数量可以是2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950或1000种,例如所识别的克隆新抗原的数量可以是2至100种。

[0241] 在一方面,T细胞识别相同的克隆新抗原。

[0242] 在一方面,新抗原可以是如本文所述的亚克隆新抗原。

[0243] 如上所述,克隆新抗原是在基本上每个肿瘤细胞之内所编码的抗原,即编码新抗原的突变存在于基本上每个肿瘤细胞之内,并且可能在整个肿瘤中有效表达。然而,可以预测克隆新抗原通过由在至少部分肿瘤中丢失的HLA等位基因编码的HLA分子进行呈递。在这种情况下,克隆新抗原实际上可以并不在基本上每个肿瘤细胞上进行呈递。因此,新抗原的呈递可以不是克隆的,即,它并不在基本上每个肿瘤细胞之内进行呈递。国际专利公开号W02019/012296中描述了预测HLA丢失的方法。

[0244] 在如本文所述的本发明的一方面,预测新抗原在基本上每个肿瘤细胞之内进行呈递(即新抗原的呈递是克隆的)。

[0245] 新抗原特异性T细胞疗法

[0246] 根据本发明的T细胞群体可以包含靶向新抗原的T细胞。在本发明的一方面,T细胞群体可以包含靶向克隆新抗原的T细胞。在本发明的语境中,术语“靶向”可以意指T细胞是对新抗原特异的,并且对新抗原产生应答。

[0247] 在一方面,T细胞群体可以包含已经选择性扩增以靶向新抗原(诸如克隆新抗原)的T细胞。

[0248] 也就是说,T细胞群体可以具有增加数量的靶向一种或多种新抗原的T细胞。例如,与分离自受试者的样品中的T细胞相比,本发明的T细胞群体将具有增加数量的靶向新抗原的T细胞。也就是说,该T细胞群体的组成将不同于“初始(native)”T细胞群体(即未经过本文讨论的鉴定和扩增步骤的群体),因为靶向新抗原的T细胞的百分比或比例将增加,和/或该群体中靶向新抗原的T细胞与不靶向新抗原的T细胞的比率将更高,而有利于靶向新抗原的T细胞。

[0249] 根据本发明的T细胞群体可以具有至少约0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的靶向新抗原的T细胞。例如,该T细胞群体可以具有约0.2%-5%、5%-10%、10%-20%、20%-30%、30%-40%、40%-50%、50%-70%或70%-100%的靶向新抗原的T细胞。在一方面,该T细胞群体具有至少约1%、2%、3%、4%或5%的靶向新抗原的T细胞,例如至少约2%或至少2%的靶向新抗原的T细胞。

[0250] 换句话说,该T细胞群体可以具有不超过约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%的不靶向新抗原的T细胞。例如,该T细胞群体可以具有不超过约95%-99.8%、90%-95%、80%-90%、70%-80%、60%-70%、50%-60%、30%-50%或0-30%的不靶向新抗原的T细胞。在一方面,该T细胞群体具有不超过约99%、98%、97%、96%或95%的不靶向新抗原的T细胞,例如不超过约98%或95%的不靶向新抗原的T细胞。

[0251] 例如,使用新抗原肽扩增的新抗原反应性T细胞群体可以比未扩增的T细胞群体具有更高的活性。提及“活性”可以代表T细胞群体对用新抗原肽(例如包含用于扩增的肽(或对应的编码序列)的部分或全部的肽,或抗原衍生肽的混合物)再刺激的应答。用于测定该应答的合适方法是本领域已知的。例如,可以测量细胞因子产生(例如可以测量IL-2或IFN $\gamma$ 产生)。提及“更高的活性”包括例如活性的1-5、5-10、10-20、20-50、50-100、100-500、500-1000倍增加。在一方面,该活性可以超过1000倍更高。

[0252] 在本发明的一方面,在来自受试者的样品中鉴定出能够特异性识别一种或多种新抗原的T细胞,然后通过如本文所述的离体培养来进行扩增。可以使用本领域已知的方法进行混合起始T细胞群体中的新抗原特异性T细胞的鉴定。例如,可以使用包含如本文所述的新抗原肽的MHC多聚体来鉴定新抗原特异性T细胞。

[0253] MHC多聚体是MHC分子的寡聚形式,其经设计以在一大群体不相关的T细胞中鉴定并分离对特定抗原具有高亲和力的T细胞。多聚体可以用于展示1类MHC、2类MHC或非经典分子(例如CD1d)。

[0254] 最常见的MHC多聚体是四聚体。这些通常是通过生物素化可溶性MHC单体产生的,这些单体通常是在真核或细菌细胞中重组产生的。然后,这些单体结合至骨架,诸如链霉亲和素或亲和素,这形成了四价结构。这些骨架与荧光染料缀合,随后经由例如流式细胞术分离结合的T细胞。

[0255] 免疫疗法

[0256] 如本文所述的本发明可以提供用于疗法、特别是免疫疗法的T细胞群体。

[0257] 本发明涵盖如本文所述的T细胞群体或T细胞疗法,其用于预防或治疗受试者中的癌症。

[0258] 本发明涵盖用于治疗患有癌症的受试者的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用如本文所述的T细胞群体或T细胞疗法。

[0259] 本发明还涵盖如本文所述的T细胞群体或T细胞疗法,其用于制备用于预防或治疗受试者中的癌症的药物。

[0260] 本发明进一步涵盖如本文所述的T细胞群体或T细胞疗法在预防或治疗受试者中的癌症中的用途。

[0261] 术语“免疫疗法”指通过包括诱导、增强、抑制或以其他方式修饰免疫应答的方法来治疗患有疾病或在感染疾病或遭受疾病复发的风险下的受试者。免疫疗法的实例包括但不限于T细胞疗法。T细胞疗法可以包括过继性T细胞疗法、自体T细胞疗法、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)疗法、工程化T细胞疗法、嵌合抗原受体(CAR) T细胞疗法、工程化TCR T细胞疗法和同种异体T细胞移植。在国际公开号W02018/002358、W02013/088114、W02015/077607、W02015/143328、W02017/049166和W02011/140170中描述了T细胞疗法的实例。

[0262] 免疫疗法的T细胞可以起源于本领域已知的任何来源。例如，T细胞可以体外分化自造血干细胞群体，或T细胞可以获得自受试者。T细胞可以获得自例如外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。另外，T细胞可以衍生自本领域可获得的一种或多种T细胞系。还可以使用本领域技术人员已知的多种技术，诸如FICOLL™分离和/或单采血液成分术，从采集自受试者的血液单位获得T细胞。分离用于T细胞疗法的T细胞的额外的方法公开在美国专利公开号2013/0287748中，该专利通过引用以其整体并入本文。

[0263] 如本文所述的本发明还涵盖根据本发明的T细胞群体在治疗或预防受试者的癌症中的用途。

[0264] 如本文所述的T细胞群体可以称为T细胞疗法。

[0265] 可以向患者施用单剂量的T细胞疗法。在一方面，仅在第0天向患者施用单剂量的T细胞疗法。在本发明的其他方面，从第0天开始向患者施用多剂量的T细胞疗法。例如，T细胞疗法的剂量数可以是2、3、4、5、6、7、8、9、10或多于10个剂量。

[0266] 给药可以是每年一次、两次、三次、四次、五次、六次或多于六次。或者，给药可以是每月一次、两次、三次、四次、五次、六次或多于六次。在进一步的方面，给药可以是每两周一次、两次、三次、四次、五次、六次或多于六次。在又一方面，给药可以是每周一次、两次、三次、四次、五次、六次或多于六次，例如每周一次或每隔一天一次。

[0267] 只要有必要，就可以继续施用T细胞治疗。

[0268] 如本文所述的T细胞疗法可以在体外、离体或体内使用，例如用于原位治疗，或者用于离体治疗，然后将经处理的细胞施用至机体。

[0269] 在根据如本文所述的本发明的某些方面，例如在如本文所述的T细胞分离和扩增之后，将T细胞疗法再输注到受试者中。用于再输注T细胞的合适方法是本领域已知的。

[0270] 可以以合适的剂量向受试者施用T细胞疗法。剂量方案可以由主治医师和临床因素决定。本领域接受的是，任何一名患者的剂量取决于许多因素，包括患者的尺寸、体表面积、年龄、待施用的特定化合物、性别、施用的时间和途径、总体健康和同时施用的其他药物。

[0271] T细胞疗法可以涉及将给定数量的本文所述的T细胞转移至患者。T细胞的治疗有效量可以是至少约 $10^3$ 个细胞、至少约 $10^4$ 个细胞、至少约 $10^5$ 个细胞、至少约 $10^6$ 个细胞、至少约 $10^7$ 个细胞、至少约 $10^8$ 个细胞、至少约 $10^9$ 个细胞、至少约 $10^{10}$ 个细胞、至少约 $10^{11}$ 个细胞、至少约 $10^{12}$ 个或至少约 $10^{13}$ 个细胞。

[0272] T细胞的其他合适剂量可以如例如W02016/191755、W02019/112932、W02018/

226714、W02018/182817、W02018/129332、W02018/129336、W02018/094167、W02018/081789和W02018/081473中所述。

#### [0273] 经修饰的T细胞

[0274] 在本发明的一方面，T细胞可以是经修饰的T细胞，例如经遗传修饰的T细胞。

[0275] 根据本发明的用于扩增T细胞的方法可以进一步包括修饰（例如通过基因编辑）至少一部分T细胞的步骤。

[0276] T细胞可以通过基因编辑方法进行修饰。基因编辑方法是本领域已知的，并且可以选自CRISPR方法、TALE方法、锌指方法及其组合。

[0277] 在一方面，基因编辑可以引起一种或多种免疫检查点基因表达被沉默或减少，例如选自包含以下基因的组的基因：PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2 (TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD 160、TIGIT、CD96、CRT AM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、ANKRD11、SOCS1和BCOR。

[0278] 在另一方面，基因编辑可以引起一种或多种免疫检查点基因的表达增强，例如选自包含以下基因的组的基因：CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2胞内结构域 (ICD) 和/或NOTCH配体mDLL1。

[0279] W02021/081378中描述了用于基因编辑的方法。

#### [0280] 癌症

[0281] 在一方面，如本文所述的癌症选自肺癌（小细胞肺癌、非小细胞肺癌和间皮瘤）、黑色素瘤、膀胱癌、胃癌、食管癌、乳腺癌（例如三阴性乳腺癌）、结直肠癌、宫颈癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肾癌（肾细胞癌）、脑癌（例如胶质瘤、星形细胞瘤、胶质母细胞瘤）、淋巴瘤、小肠癌（十二指肠癌和空肠癌）、白血病、肝癌（肝细胞癌）、胰腺癌、肝胆肿瘤、生殖细胞癌、前列腺癌、梅克尔细胞癌、头颈癌（鳞状细胞癌）、甲状腺癌、高微卫星不稳定性 (MSI-H) 和肉瘤。

[0282] 在一方面，癌症选自黑色素瘤和非小细胞肺癌 (NSCLC)。

[0283] 在一方面，癌症诸如黑色素瘤或NSCLC，可以是转移性的和/或不能手术的和/或复发的。

[0284] 根据本发明的治疗还可以涵盖靶向衍生自肿瘤的流动肿瘤细胞和/或转移。

#### [0285] 受试者

[0286] 术语“受试者”和“患者”在本文中可互换地使用。

[0287] 在本发明的优选的方面，受试者是哺乳动物，优选地猫、狗、马、驴、绵羊、猪、山羊、牛、小鼠、大鼠、兔或豚鼠，但最优选地，受试者是人。

[0288] 如本文所定义，“治疗”指相对于治疗前的症状，减少、减轻或消除正在被治疗的疾病的一种或多种症状。

[0289] “预防 (prevention)” (或预防 (prophylaxis)) 指延迟或预防疾病的症状的发作。预防可以是绝对的 (使得没有疾病发生)，也可以仅在某些个体中有效或持续有限量的时间地有效。

#### [0290] 给药方案

[0291] 在如本文所述的本发明的一方面,向患者施用单剂量的T细胞疗法。在一方面,仅在第0天向患者施用单剂量的T细胞疗法。在本发明的其他方面,从第0天开始向患者施用多剂量的T细胞疗法。例如,T细胞疗法的剂量数可以是2、3、4、5、6、7、8、9、10或多于10个剂量。

[0292] 给药可以是每年一次、两次、三次、四次、五次、六次或多于六次。或者,给药可以是每月一次、两次、三次、四次、五次、六次或多于六次。在另一方面,给药可以是每两周一次、两次、三次、四次、五次、六次或多于六次。在又一方面,给药可以是每周一次、两次、三次、四次、五次、六次或多于六次,例如每周一次或每隔一天一次。

[0293] 只要有必要,就可以继续施用T细胞治疗。

[0294] IL-2疗法

[0295] 如本文所述的根据本发明的T细胞群体或疗法可以例如在患者的癌症治疗中与IL-2施用组合使用。

[0296] 在一方面,本发明提供了根据本发明的T细胞疗法和小于约2.0MIU/m<sup>2</sup>/天的IL-2剂量,其用于治疗或预防患者中的癌症。在进一步的方面,本发明提供了T细胞疗法,其用于治疗或预防患者中的癌症,其中所述T细胞疗法与IL-2进行施用,并且其中所述IL-2以小于约2.0MIU/m<sup>2</sup>/天的剂量用于施用。

[0297] T细胞疗法和IL-2可以用于单独地、同时地或序贯地施用至患者。

[0298] IL-2可以以以下的剂量进行施用:约1.9MIU/m<sup>2</sup>/天、约1.8MIU/m<sup>2</sup>/天、约1.7MIU/m<sup>2</sup>/天、约1.6MIU/m<sup>2</sup>/天、约1.5MIU/m<sup>2</sup>/天、约1.4MIU/m<sup>2</sup>/天、约1.3MIU/m<sup>2</sup>/天、约1.2MIU/m<sup>2</sup>/天、约1.1MIU/m<sup>2</sup>/天、约1.0MIU/m<sup>2</sup>/天、约0.9MIU/m<sup>2</sup>/天、约0.8MIU/m<sup>2</sup>/天、约0.7MIU/m<sup>2</sup>/天、约0.6MIU/m<sup>2</sup>/天、约0.5MIU/m<sup>2</sup>/天、约0.4MIU/m<sup>2</sup>/天、约0.3MIU/m<sup>2</sup>/天或约0.2MIU/m<sup>2</sup>/天。

[0299] 在一方面,所述IL-2以约1.0MIU/m<sup>2</sup>/天的剂量进行施用。

[0300] 在进一步的方面,每天施用一次所述IL-2。

[0301] 在另一方面,每天施用所述IL-2持续约14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1天,优选地10天。

[0302] 在一方面,施用所述IL-2持续少于14天,例如约13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1天,优选地10天。在一方面,施用所述IL-2持续不超过13天,例如不超过12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1天。

[0303] 所述IL-2的剂量可以是每天相同的。

[0304] 在本发明的一方面,施用至所述患者的IL-2的总剂量不超过约10MIU/m<sup>2</sup>。

[0305] 在一方面,在与T细胞疗法相同的一天,施用所述IL-2的第一剂量。

[0306] 在一方面,向所述患者施用少于14个剂量的所述IL-2。例如,向所述患者施用13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个剂量的所述IL-2。

[0307] 在优选的方面,向所述患者施用10个剂量的所述IL-2。

[0308] 在进一步的方面,在第0至9天每天施用所述IL-2。

[0309] 可以通过任何途径,包括静脉内(IV)和皮下(SC)施用IL-2。低剂量IL-2通常通过皮下注射给予,而高剂量IL-2通常经由静脉内输注施用。在一个特定的方面,皮下施用IL-2。

[0310] 淋巴消减

[0311] 在转移T细胞之前,患者通常会经历淋巴消减疗法。淋巴消减治疗通过在患者中减少内源性淋巴细胞的数量并增加内稳态细胞因子和/或促免疫因子的血清水平来提高T细胞疗法的疗效。国际专利公开号W02004/021995中公开了用于免疫治疗的非骨髓性淋巴消减方案的实例。

[0312] 在一方面,本发明包括施用淋巴消减剂,诸如环磷酰胺和/或氟达拉滨。在一方面,本发明包括在T细胞治疗之前施用环磷酰胺和氟达拉滨。可以调整每种组分的施用时间以最大化效果。如本文所述,可以将施用T细胞疗法的当天指定为第0天。环磷酰胺和氟达拉滨可以在施用T细胞疗法之前的任何时间进行施用。

[0313] 在一方面,环磷酰胺和氟达拉滨的施用在施用T细胞疗法之前至少七天、至少六天、至少五天、至少四天、至少三天、至少两天或至少一天开始。

[0314] 在另一方面,环磷酰胺和氟达拉滨的施用可以在施用T细胞疗法之前至少八、九、十、十一、十二、十三或十四天开始。在一方面,环磷酰胺和氟达拉滨的施用在施用T细胞疗法之前七、六或五天开始。在一个特定的方面,环磷酰胺的施用在施用T细胞疗法之前约七天开始,并且氟达拉滨的施用在施用T细胞疗法之前约五天开始。在另一方面,环磷酰胺的施用在施用T细胞疗法之前约五天开始,并且氟达拉滨的施用在施用T细胞疗法之前约五天开始。

[0315] 可以调整每种组分的施用时间以最大化效果。通常,环磷酰胺和氟达拉滨可以每天施用持续约二、三、四、五、六或七天。如本文所述,可以将向患者施用T细胞疗法的当天指定为第0天。在一些方面,在第0天之前的第7天和第6天(即,第-7天和第-6天),向患者施用环磷酰胺。在其他方面,在第-5天、第-4天和第-3天向患者施用环磷酰胺。在一些方面,在第-5天、第-4天、第-3天、第-2天和第-1天向患者施用氟达拉滨。在其他方面,在第-5天、第-4天和第-3天向患者施用氟达拉滨。环磷酰胺和氟达拉滨可以在同一天或不同天进行施用。在一个特定的方面,在第-6天、第-5天和第-4天向患者施用环磷酰胺和氟达拉滨二者。

[0316] 环磷酰胺和氟达拉滨可以通过任何途径,包括静脉内地(IV)进行施用。在一些方面,环磷酰胺通过IV施用了约30至120分钟。

[0317] 在一个特定的方面,本发明包括调理需要T细胞疗法的患者的方法,其包括向患者施用约500mg/m<sup>2</sup>/天的剂量的环磷酰胺和约60mg/m<sup>2</sup>/天的剂量的氟达拉滨,其中环磷酰胺在第-5、-4和-3天进行施用,并且其中氟达拉滨在第-5、-4和-3天进行施用。

[0318] 在另一个方面,本发明包括调理需要T细胞疗法的患者的方法,其包括向患者施用约300或500mg/m<sup>2</sup>/天的剂量的环磷酰胺和约30或60mg/m<sup>2</sup>/天的剂量的氟达拉滨,其中环磷酰胺在第-7和-6天进行施用,并且其中氟达拉滨在第-5、-4、-3、-2和-1天进行施用。

[0319] 在一方面,每天施用淋巴消减剂,持续3天。在一方面,在施用所述T细胞疗法之前的第-6、-5和-4天施用淋巴消减剂。在一方面,环磷酰胺以在约200mg/m<sup>2</sup>/天和约500mg/m<sup>2</sup>/天之间的剂量进行施用,优选以约300mg/m<sup>2</sup>/天的剂量进行施用。在一方面,氟达拉滨以在约20mg/m<sup>2</sup>/天和50mg/m<sup>2</sup>/天之间的剂量进行施用,优选地以约30mg/m<sup>2</sup>/天的剂量进行施用。在一方面,在细胞输注前第-6、-5和-4天的每天,以约30mg/m<sup>2</sup>的剂量施用氟达拉滨,并以约300mg/m<sup>2</sup>的剂量施用环磷酰胺。

[0320] 在一方面,本发明提供了治疗患者中的癌症的方法,其包括向患者施用:

[0321] (i) 在施用所述T细胞疗法之前,约300mg/m<sup>2</sup>/天的环磷酰胺和约30mg/m<sup>2</sup>/天的氟

达拉滨的淋巴消减方案；

[0322] (ii) 单剂量的T细胞疗法；和

[0323] (iii) 每天施用一次约1.0MIU/m<sup>2</sup>/天的IL-2剂量,持续约10天,其中在与T细胞疗法相同的一天,施用所述IL-2的第一剂量。

[0324] 其他组合疗法

[0325] 如本文所述的本发明还可以与其他合适的疗法组合。

[0326] 根据本发明的用于治疗癌症的方法和用途可以与额外的癌症疗法组合进行。特别地,根据本发明的T细胞组合物可以与检查点阻断疗法、共刺激抗体、化学疗法和/或放射疗法、靶向疗法或单克隆抗体疗法组合施用。

[0327] 检查点抑制剂包括但不限于,例如PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂、Lag-3抑制剂、Tim-3抑制剂、TIGIT抑制剂、BTLA抑制剂和CTLA-4抑制剂。共刺激抗体通过包括但不限于ICOS、CD137、CD27OX-40和GITR的免疫调节受体传递正信号。在优选的实施方案中,检查点抑制剂是CTLA-4抑制剂。

[0328] 合适的免疫检查点抑制剂的实例包括派姆单抗(pembrolizumab)、纳武单抗(nivolumab)、阿替利珠单抗(atezolizumab)、德瓦鲁单抗(durvalumab)、阿维鲁单抗(avelumab)、曲美木单抗(tremelimumab)和伊匹木单抗(ipilimumab)。

[0329] 如本文所用的化学疗法实体指对细胞具有破坏性的实体,即降低细胞活力的实体。化学疗法实体可以是细胞毒性药物。所考虑的化疗剂包括但不限于烷化剂、蒽环类、埃博霉素、亚硝基脲、乙烯亚胺/甲基三聚氰胺、烷基磺酸盐、烷化剂、抗代谢物、嘧啶类似物、表鬼臼毒素、酶诸如L-天冬酰胺酶;生物反应调节剂,诸如IFN $\alpha$ 、IL-2、G-CSF和GM-CSF;铂配合物,诸如顺铂、奥沙利铂和卡铂,蒽二酮类,取代脲,诸如羟基脲,甲基胍衍生物,包括N-甲基胍(MIH)和甲基苄胍,肾上腺皮质抑制剂,诸如米托坦(o,p'-DDD)和氨鲁米特;激素和拮抗剂,包括:肾上腺皮质类固醇拮抗剂,诸如泼尼松及等同物、地塞米松和氨鲁米特;孕激素,诸如己酸羟孕酮、乙酸甲羟孕酮和乙酸甲地孕酮;雌激素,诸如己烯雌酚和乙炔雌二醇等同物;抗雌激素,诸如他莫昔芬;雄激素,包括丙酸睾酮和氟甲睾酮/等同物;抗雄激素,诸如氟他胺、促性腺激素释放激素类似物和亮丙瑞林;非甾体抗雄激素,诸如氟他胺;以及具有化疗剂有效载荷的药物缀合物。

[0330] “组合(in combination)”可以指在施用根据本发明的T细胞组合物之前、同时或之后施用额外的疗法。

[0331] 在一方面,根据本发明的T细胞组合物可以与检查点阻断疗法组合施用。可以在施用T细胞组合物之前和之后两者施用检查点抑制剂。在特定的实施方案中,在T细胞组合物之前施用一个剂量的检查点抑制剂,并且在T细胞组合物之后2周施用另一剂量,并且进一步的剂量持续最长达12个月。在优选的实施方案中,检查点抑制剂是派姆单抗。

[0332] 除了与检查点阻断的组合之外或作为其替代选择,还可以使用包括但不限于TALEN和Crispr/Cas的基因编辑技术对本发明的T细胞组合物进行遗传修饰,以使其对免疫检查点具有抗性。此类方法是本领域已知的,参见例如US20140120622。基因编辑技术可用于防止由T细胞表达的免疫检查点的表达,该免疫检查点包括但不限于PD-1、Lag-3、Tim-3、TIGIT、BTLA CTLA-4及其组合。如本文所讨论的T细胞可以通过任何这些方法进行修饰。

[0333] 还可以对根据本发明的T细胞进行遗传修饰,以表达增加归巢到肿瘤中的分子,

和/或以将炎症介质递送到肿瘤微环境中,这包括但不限于细胞因子、可溶性免疫调节受体和/或配体。

[0334] 试剂盒

[0335] 在一方面,本发明提供了包含如本文所述的T细胞疗法的试剂盒。

[0336] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的不同含义。Singleton,等人,DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY,20 ED.,John Wiley和Sons,New York(1994),以及Hale&Marham,THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY,Harper Perennial,NY(1991)向技术人员提供了本公开中使用的许多术语的通用词典。

[0337] 本公开不限于本文公开的示例性方法和材料,并且与本文描述的那些相似的或等同的任何方法和材料可以用于本公开的方面的实践或测试中。数字范围包括定义该范围的数字。

[0338] 本文提供的标题不是本公开的各个方面或方面的限制,可以通过将说明书作为整体进行参考来获得本公开的各个方面或方面。因此,以下紧接着定义的术语通过将说明书作为整体进行参考来更完整地定义。

[0339] 如本文所用,术语“蛋白质”包括蛋白质、多肽和肽。

[0340] 术语的其他定义可以出现在整个说明书中。在更详细地描述示例性方面之前,应当理解,本公开不限于所描述的特定方面,因此本公开当然可以进行变化。还应理解,本文所使用的术语仅是出于描述特定方面的目的,而不是旨在是限制性的,因为本公开的范围将仅由所附权利要求书限制。

[0341] 当提供数值范围时,应当理解,除非上下文另外明确指出,否则还具体地公开了该范围的上限和下限之间的每个中间值,至下限单位的十分之一。任何所述值或所述范围中的中间值与该所述范围中的任何其他所述值或中间值之间的每个较小范围涵盖在本公开之内。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在该范围中或排除在该范围外,并且其中任一个、零个或两个限制都包括在较小范围内的每个范围也涵盖在本公开之内,而受到所述范围中任何具体排除的限制的影响。当所述范围包括限制的一者或两者时,排除这些所包括的限制的任一个或两个的范围也包括在本公开中。

[0342] 必须注意的是,如本文和所附权利要求中所使用的,单数形式“一个(a,an)”、“该、所述(the)”包括复数指示物,除非上下文另外明确指出。

[0343] 本文使用的术语“包含(comprising,comprises和comprised of)”与“包括(including和includes)”或“含有(containing和contains)”同义,并且是包容性的或开放式的,并且不排除额外的、未陈述的成员、元素或方法步骤。术语“包含(comprising,comprises和comprised of)”还包括术语“由.....组成”。

[0344] 本文所讨论的出版物仅因为其在在本申请的提交日之前的公开而提供。本文中的任何内容均不应解释为承认此类出版物构成本文所附权利要求的现有技术。

[0345] 现将参考以下实施例仅以示例的方式进一步描述本发明。

## 实施例

[0346] 实施例1-抗原的鉴定和产生

[0347] 血液和肿瘤样品获得自每位患者,并进行全外显子组测序(WES)。使用专有的PELEUS™生物信息学平台来执行以下步骤:

[0348] (i) 通过将来自种系(血液)样品及匹配的肿瘤样品的DNA序列数据互相比较及与参考基因组比较,来鉴定患者特异性体细胞突变(包括单核苷酸变异(SNV)、多核苷酸变异(MNV)和插入/缺失(indels));

[0349] (ii) 考虑到来自患者的序列数据使用贝叶斯方法(参见例如McGranahan等人, Science Vol 135:6280, p.1463-1469; Roth等人 Nat Methods. 2014 April; 11(4):396-398) 鉴定出一组可能是克隆的突变;和

[0350] (iii) 设计一组肽,其包含经鉴定为可能是克隆的体细胞突变的组。

[0351] 使用标准肽合成方法来制备所得候选抗原性肽的组。每个肽序列长29个氨基酸,并包含克隆体细胞突变之一和围绕体细胞突变的部分种系序列。每个患者产生在70和185个之间的克隆新抗原肽,用于抗原特异性扩增步骤。

[0352] 实施例2-树突状细胞的产生

[0353] 从每位患者获得血样,并使用密度梯度离心分离外周血单核细胞(PBMC)。根据制造商的程序,使用人磁性抗体细胞分选系统(Miltenyi Biotec)通过CD14+细胞的阳性选择来富集单核细胞。使用GM-CSF和IL-4将单核细胞分化成未成熟的树突状细胞,然后使用TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6和PGE2使其成熟。最后,洗涤树突状细胞并用患者特异性肽进行加载。

[0354] 实施例3-T细胞的扩增

[0355] 使用以下方案扩增TIL:

[0356] 1.2代

[0357] 将肿瘤碎片在含有IL-2(6000IU/mL)和IL-21(32.5IU/ml)的TexMACS培养基中体外培养14天(预扩增)。随后将TIL与肽加载的树突状细胞在含有IL-2(100IU/mL)的培养基中共培养17天(抗原特异性扩增)。

[0358] 1.6代

[0359] 将肿瘤碎片在含有IL-2(6000IU/mL)和IL-21(32.5IU/mL)的TexMACS培养基中体外培养14天(预扩增)。随后将TIL与肽加载的树突状细胞在含有IL-2(100IU/mL)的培养基中共培养10天(抗原特异性扩增)。然后,将TIL在含有1/200稀释的ImmunoCult™人CD3/CD28/CD2 T细胞活化剂和IL-2(4000IU/mL)的培养基中进一步扩增7天(非特异性增长)。

[0360] 2.0代

[0361] 将肿瘤碎片在含有IL-2(6000IU/mL)、IL-15(160IU/mL)、IL-21(32.5IU/mL)和血小板裂解物的TexMACS培养基中体外培养14天(预扩增)。随后将TIL与肽加载的树突状细胞在含有IL-2(100IU/mL)、IL-15(160IU/mL)和血小板裂解物的培养基中共培养17天(抗原特异性扩增)。

[0362] 2.6代

[0363] 将肿瘤碎片在含有IL-2(6000IU/mL)、IL-15(160IU/mL)、IL-21(32.5IU/mL)和血小板裂解物的TexMACS培养基中体外培养14天(预扩增)。随后将TIL与肽加载的树突状细胞在含有IL-2(100IU/mL)、IL-15(160IU/mL)和血小板裂解物的培养基中共培养10天(抗原特异性扩增)。然后,将TIL在含有1/200稀释的ImmunoCult™人CD3/CD28/CD2 T细胞活化剂、血小板裂解物、IL-15(10ng/ml)和IL-2(4000IU/mL)的培养基中进一步扩增7天(非特异性增

长)。

[0364] 实施例4-抗原特异性T细胞的功能表征

[0365] 使用6色TBNK试剂与BD Trucount™ (BD Biosciences),通过流式细胞术确定共培养物在第0天和第17天的T细胞 (CD3+CD56-) 总数。T细胞数量基于每种条件下使用的肿瘤重量和肿瘤切除的总重量进行缩放。

[0366] 在用肽池再刺激和胞内细胞因子染色后,通过流式细胞术测量存在的克隆新抗原反应性T细胞 (cNeT) 的百分比。反应性定义为表达IFN  $\gamma$  和/或TNF $\alpha$ 的T细胞 (CD3+) 的百分比。用单种肽再刺激后的ELISpot用于确定细胞群体中存在的不同克隆新抗原反应性的数量。

[0367] 在CD3、CD56、CD4、CD8、CD45RA、CD197、CD25、CD27和CD57的染色后通过流式细胞术评估细胞表型。记忆表型由CD45RA和CD197表达定义 (初始=CD45RA<sup>+</sup>CD197<sup>+</sup>, 中央记忆=CD45RA<sup>-</sup>CD197<sup>+</sup>, 效应记忆=CD45RA<sup>-</sup>CD197<sup>-</sup>, TEMRA=CD45RA<sup>+</sup>CD197<sup>+</sup>)。对于某些实验,在染色之前用肽池再刺激这些实验的细胞。

[0368] 结果

[0369] 我们完成了比较了三种不同的剂量增长策略的并排的、配对的分析,并确定出,与1.2代过程相比,2.6代过程生成了约10倍高的剂量的克隆新抗原T细胞 (cNeT)。与1.2代相比,2.6代生成了更低百分比 (约2倍) 的cNeT,但这被由该过程递送的显著更高 (>10倍) 的T细胞总数补偿。2.6代能够生成产生等量的关键功能性标志物IFN  $\gamma$  的功能适合的细胞。

[0370] 2.6代在共培养物中提供了最大的总T细胞扩增 (图1) 和最大的T (CD3+CD56-) 细胞剂量 (图2)。2.6代还生成了最高数量的反应性细胞,并因此生成了最高数量的潜在的cNeT剂量 (图3)。2.6代增长了超过15倍的最低的1.2代cNeT剂量。虽然有两次运行仅给出了cNeT剂量中的低倍数变化,但这些运行来自对代1.2非常有效的运行。非常大的倍数变化发生在1.2代中具有非常差的反应性的产品中,因此2.6代有效地挽救了这些产品 (图4)。

[0371] 在CD8+T细胞和CD4+T细胞两者中,2.6代过程主要生成与细胞毒性表型相关联的期望的效应记忆T细胞表型 (图5)。

[0372] 相对于1.2代,2.6代过程递送对表型适合度具有最小影响的高度适合的T细胞。由2.6代过程产生的T细胞产品在CD8+T细胞中显示出较高的活化标志物CD27的表达,以及较低的耗竭标志物CD57的表达。然而,2.6代还显示出IL-2受体CD25的较低表达 (图6)。

[0373] 然而,后续的实验表明,由2.6代过程生成的细胞仍然能够响应于肽再刺激而上调CD25,这表明对IL-2的敏感性得以保持 (图7)。

[0374] 总之,这些结果证明了,在抗原特异性扩增步骤之后使用非特异性增长扩增步骤,增加总T细胞剂量,同时保持T细胞适合度和功能的能力。产品中保持了对克隆新抗原肽的反应性,这导致cNeT剂量增长。

[0375] 实施例5-T细胞的扩增

[0376] 使用上述每个过程,从获得自癌症患者 (n=8) 的肿瘤样品生成cNeT。同上,2.6代生成了最高的反应性细胞剂量 (图8)。

[0377] 实施例6-预扩增步骤期间的非特异性增长

[0378] 使用以下方案扩增T1L:

[0379] 2.8.1代

[0380] 将肿瘤碎片在含有1/200稀释的ImmunoCult™人CD3/CD28/CD2 T细胞活化剂、IL-2 (6000IU/mL)、IL-15 (160IU/mL)、IL-21 (22.5IU/mL)和血小板裂解物的TexMACS培养基中体外培养14天(预扩增)。随后将TIL与肽加载的树突状细胞在含有IL-2 (100IU/mL)、IL-15 (160IU/mL)和血小板裂解物的培养基中共培养10天(抗原特异性扩增)。然后,将TIL在含有1/200稀释的ImmunoCult™人CD3/CD28/CD2 T细胞活化剂、血小板裂解物、IL-15 (160IU/mL)和IL-2 (3000-6000IU/mL)的培养基中进一步扩增7天(非特异性增长)。

#### [0381] 2.8.2代

[0382] 将肿瘤碎片在含有1/200稀释的ImmunoCult™人CD3/CD28/CD2 T细胞活化剂、IL-2 (6000IU/mL)、IL-15 (160IU/mL)、IL-21 (22.5IU/mL)、IFN  $\gamma$  (20ng/mL)和血小板裂解物的TexMACS培养基中体外培养14天(预扩增)。随后将TIL与肽加载的树突状细胞在含有IL-2 (100IU/mL)、IL-15 (160IU/mL)和血小板裂解物的培养基中共培养10天(抗原特异性扩增)。然后,将TIL在含有1/200稀释的ImmunoCult™人CD3/CD28/CD2 T细胞活化剂、血小板裂解物、IL-15 (160IU/mL)和IL-2 (3000-6000IU/mL)的培养基中进一步扩增7天(非特异性增长)。

#### [0383] 结果

[0384] 与2.6代相比,在预扩增(2.8.1代)期间添加ImmunoCult™人CD3/CD28/CD2 T细胞活化剂,在预扩增结束时生成了约2.5倍更高数量的TIL(图9)。由2.6代和2.8.1代生成的cNeT剂量相似,在1/3的患者中,剂量大大增加(约700倍),在2/3的患者中,剂量减少(图10)。

[0385] 在2/4的患者中,与单独添加ImmunoCult™人CD3/CD28/CD2T细胞活化剂相比,在预扩增期组合添加IFN  $\gamma$ 与ImmunoCult™人CD3/CD28/CD2T细胞活化剂(2.8.2代),增加了TIL产量(图11)。

#### [0386] 实施例7-扩增B细胞并用作APC

##### [0387] B细胞的活化和扩增

[0388] 从每位患者获得血样,并使用密度梯度离心分离外周血单核细胞(PBMC)。根据制造商的程序,使用人磁性抗体细胞分选系统(Miltenyi Biotec)通过CD19+细胞的阳性选择来富集B细胞。B细胞在含有12IU/mL CD40L、4.6 $\mu$ g/ml CpG(MACS®GMP CpG-P,Miltenyi Biotec)和50ng/ml IL-4的培养物中活化并扩增14天。最后,B细胞用患者特异性肽进行加载。

#### [0389] 2.6代B细胞

[0390] 将肿瘤碎片在含有1/200稀释的ImmunoCult™人CD3/CD28/CD2 T细胞活化剂、IL-2 (6000IU/mL)、IL-15 (160IU/mL)、IL-21 (22.5IU/mL)和血小板裂解物的TexMACS培养基中体外培养14天(预扩增)。随后将TIL与肽加载的活化的B细胞在含有IL-2 (100IU/mL)、IL-15 (160IU/mL)和血小板裂解物的培养基中共培养10天(抗原特异性扩增)。然后,将TIL在含有1/200稀释的ImmunoCult™人CD3/CD28/CD2 T细胞活化剂、血小板裂解物、IL-15 (160IU/mL)和IL-2 (3000-6000IU/mL)的培养基中进一步扩增7天(非特异性增长)。

#### [0391] 2.8.1代B细胞

[0392] 将肿瘤碎片在含有1/200稀释的ImmunoCult™人CD3/CD28/CD2 T细胞活化剂、IL-2 (6000IU/mL)、IL-15 (160IU/mL)、IL-21 (22.5IU/mL)和血小板裂解物的TexMACS培养基中体

外培养14天(预扩增)。随后将TIL与肽加载的活化的B细胞在含有IL-2(100IU/mL)、IL-15(160IU/mL)和血小板裂解物的培养基中共培养10天(抗原特异性扩增)。然后,将TIL在含有1/200稀释的ImmunoCult™人CD3/CD28/CD2 T细胞活化剂、血小板裂解物、IL-15(160IU/mL)和IL-2(3000-6000IU/mL)的培养基中进一步扩增7天(非特异性增长)。

[0393] 结果

[0394] 在该过程的抗原特异性扩增期,CD40活化的B细胞可以用作树突状细胞的替代选择。如图12中所示,与肽脉冲的B细胞(2.6代B细胞和2.8.1代B细胞)进行共培养导致比用树突状细胞(2.6代和2.8.1代)进行共培养更低的T细胞扩增。与用DC的扩增相比,用B细胞的扩增后存在相似比例的cNeT(图13)。在其中大多数细胞为CD4+的2.6代产品中,相应的2.6代B细胞产品主要为CD8+(图14)。

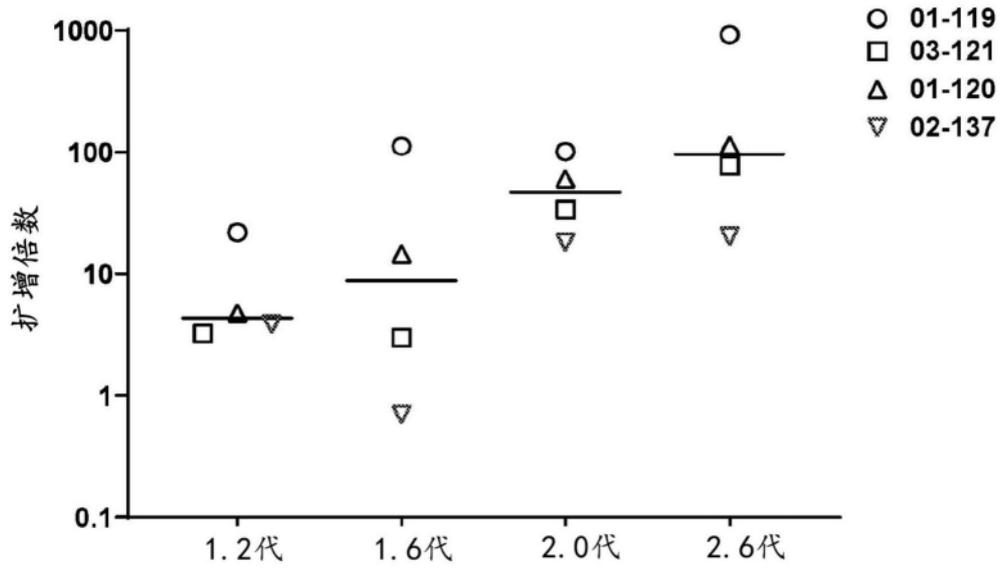


图1

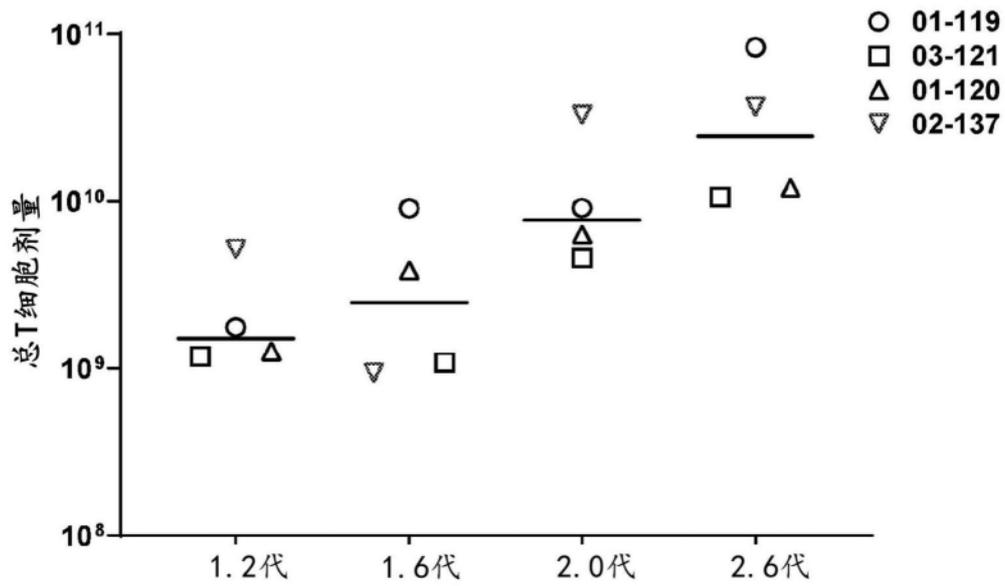


图2

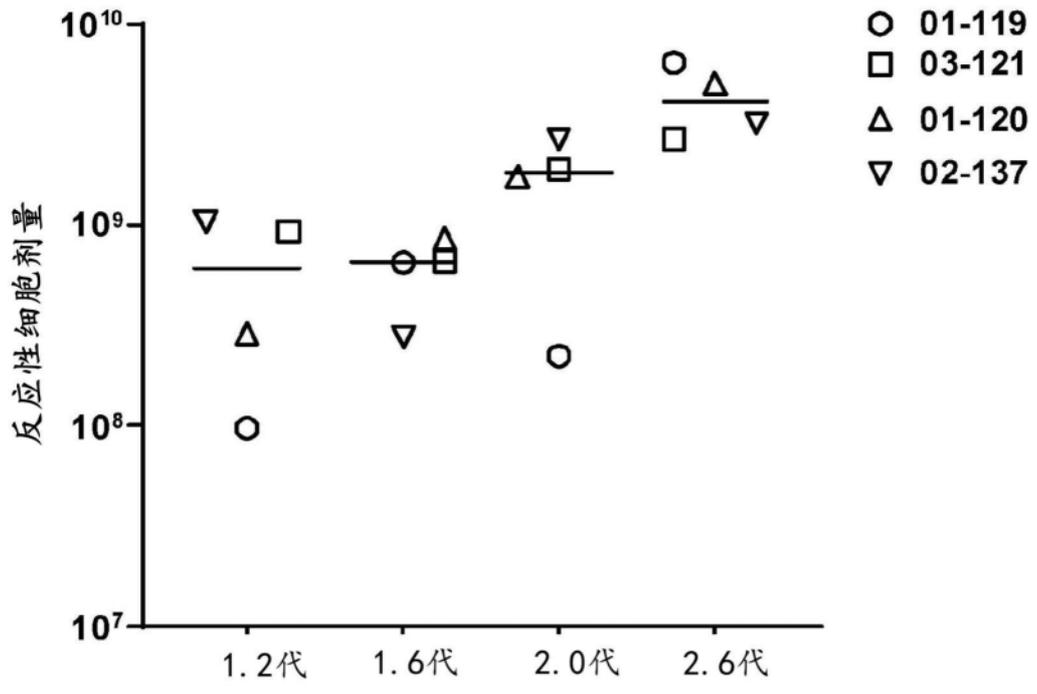


图3

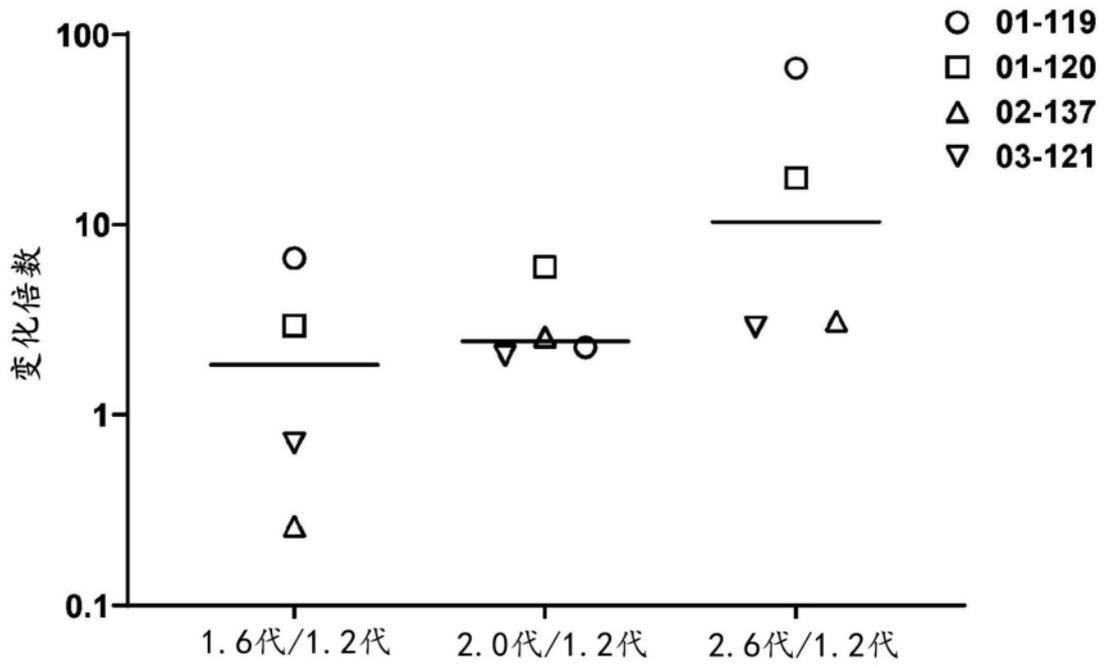


图4

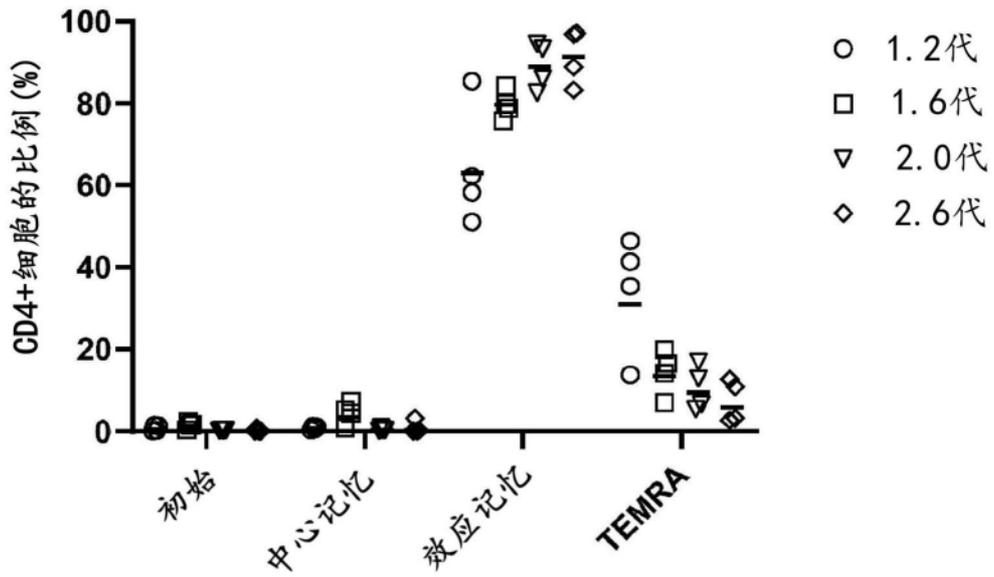


图5

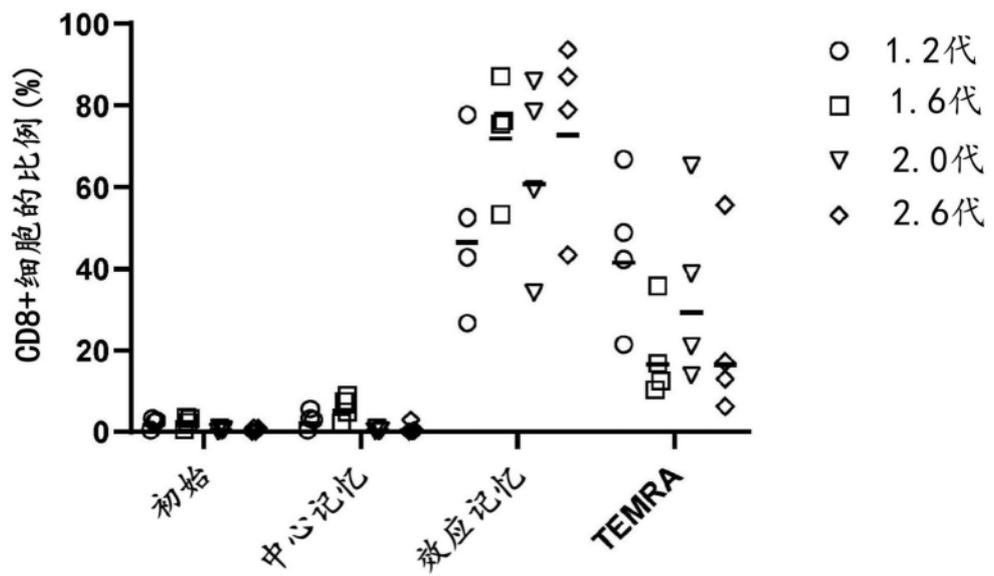


图6

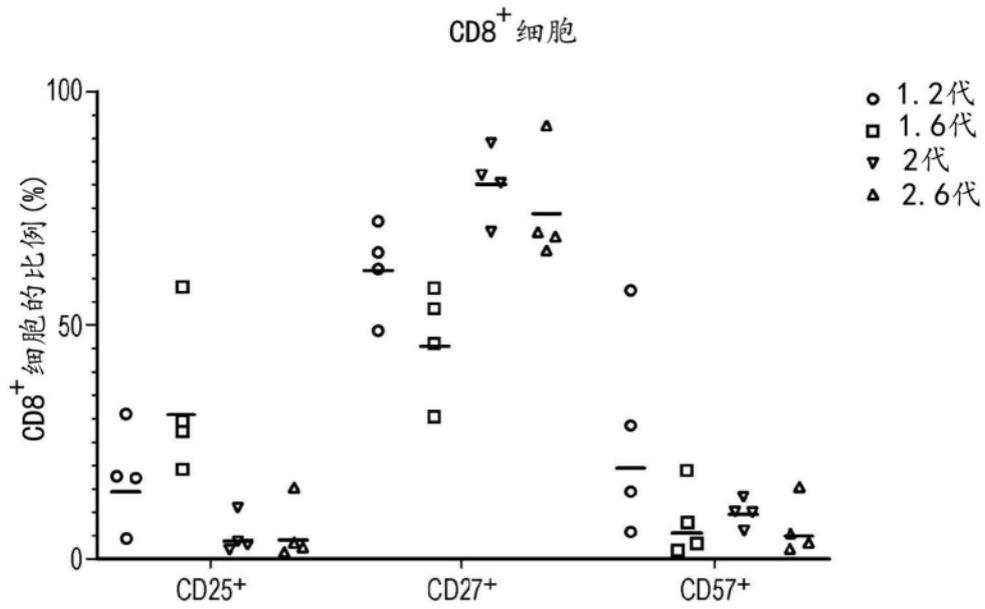


图6

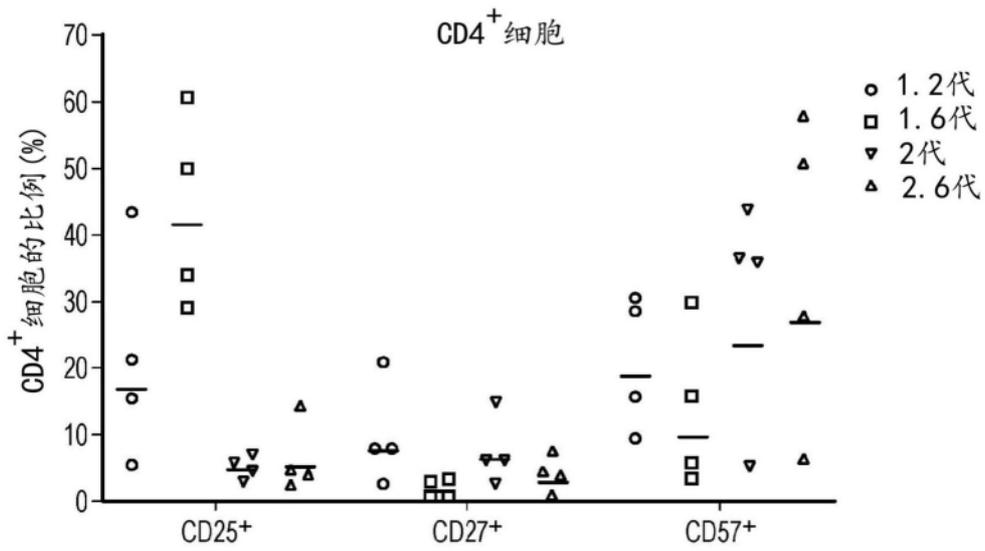


图7

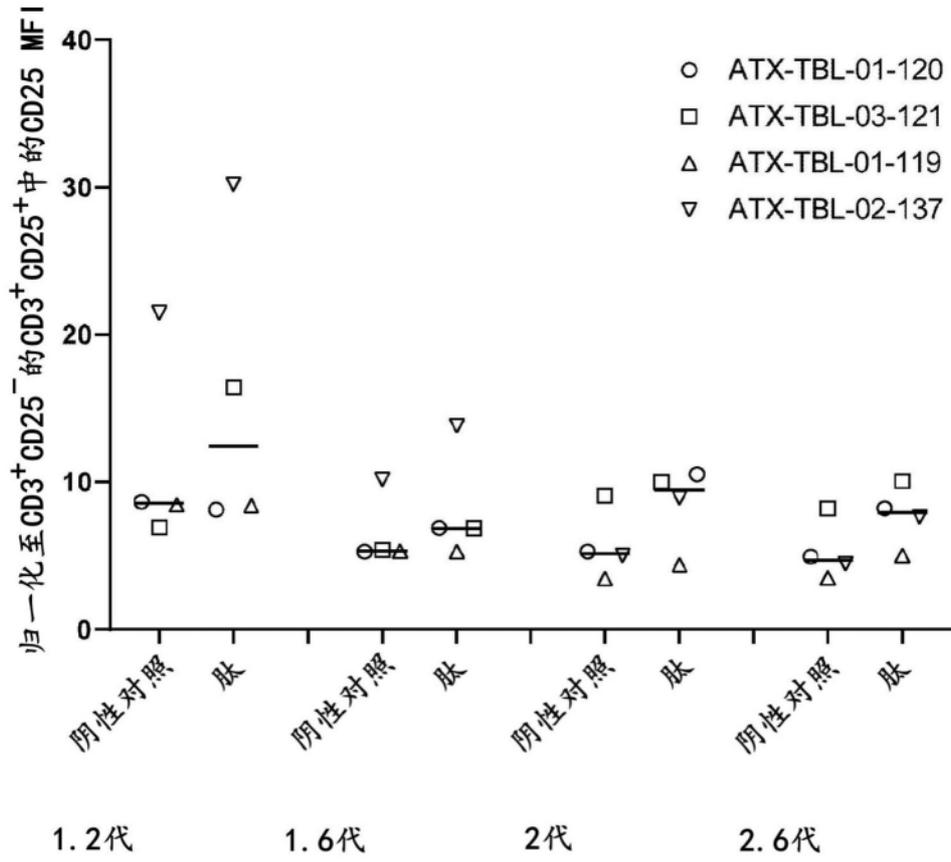


图7

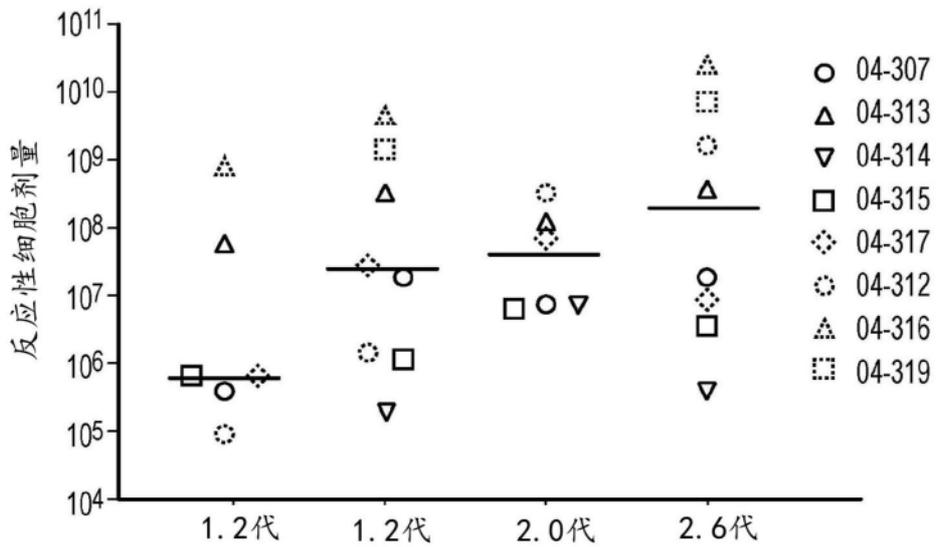


图8

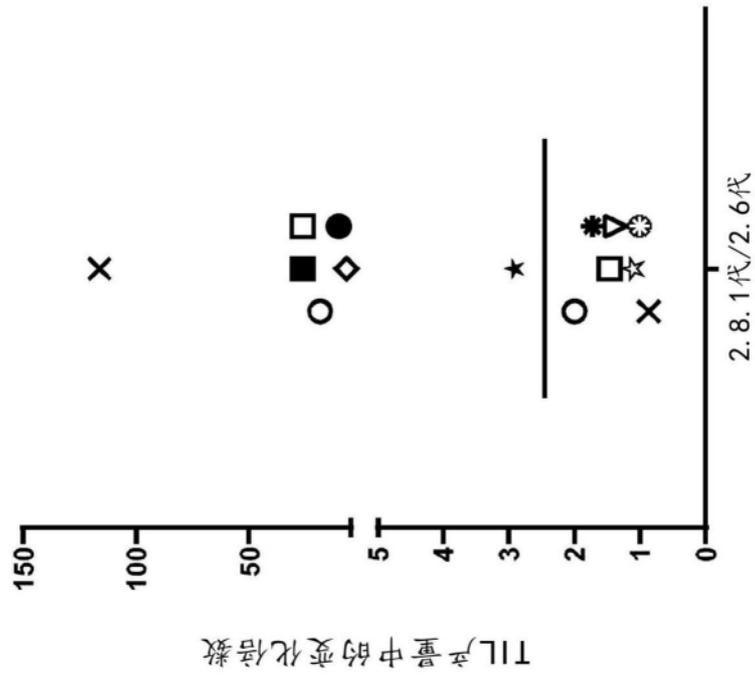


图9

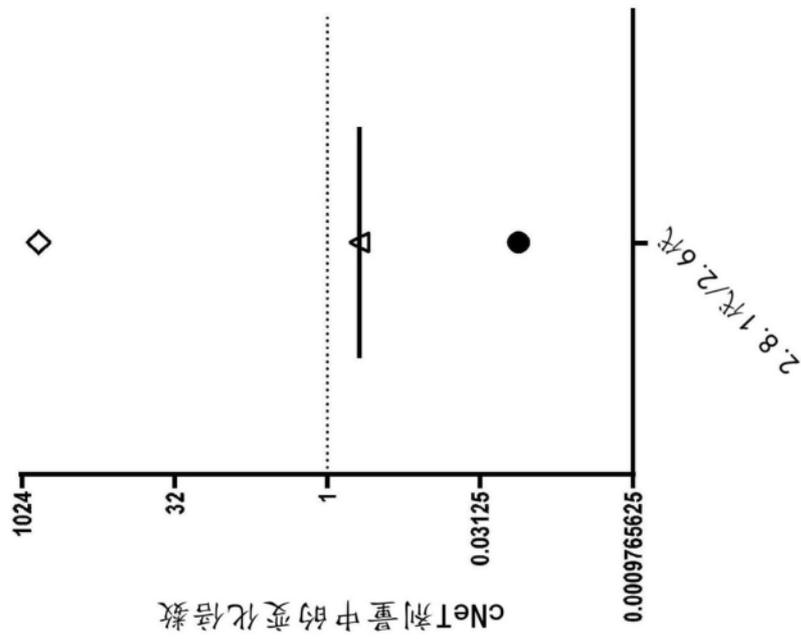


图10

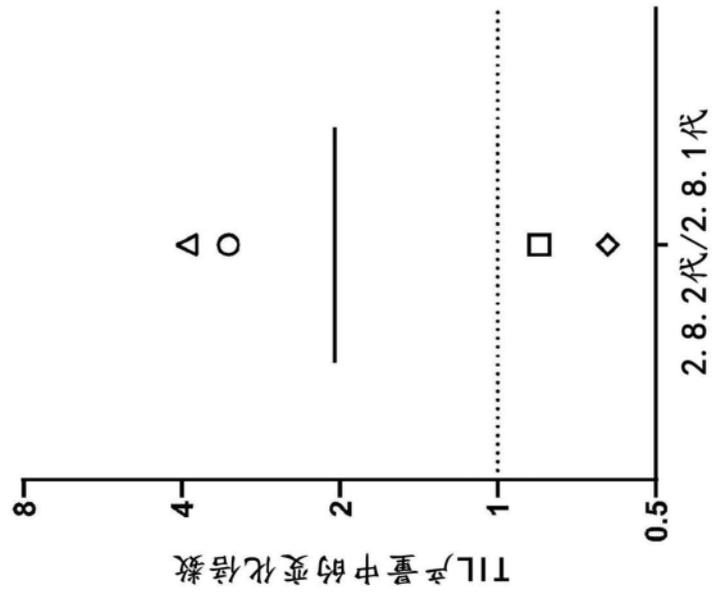


图11

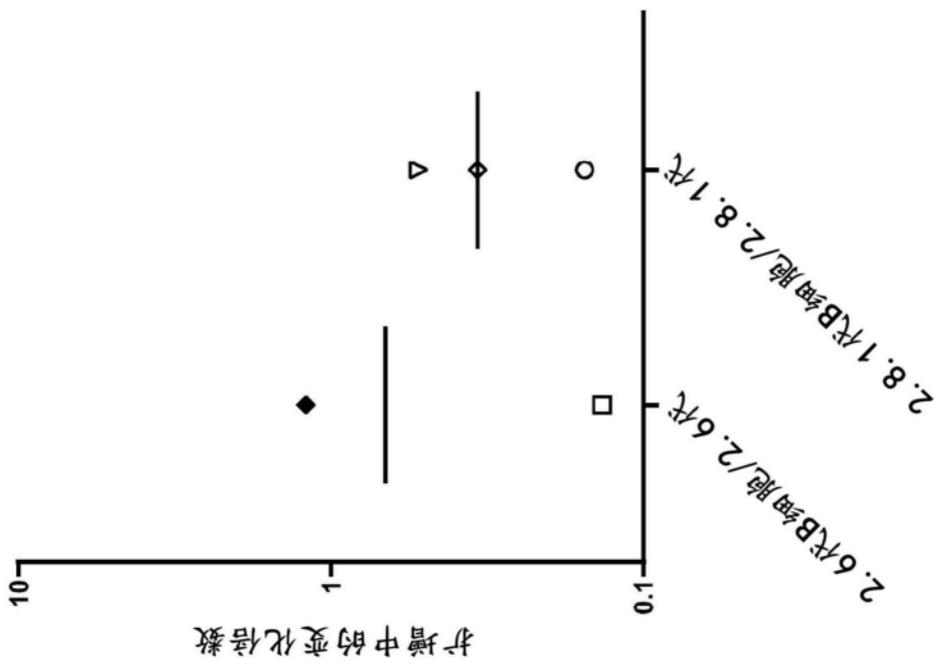


图12

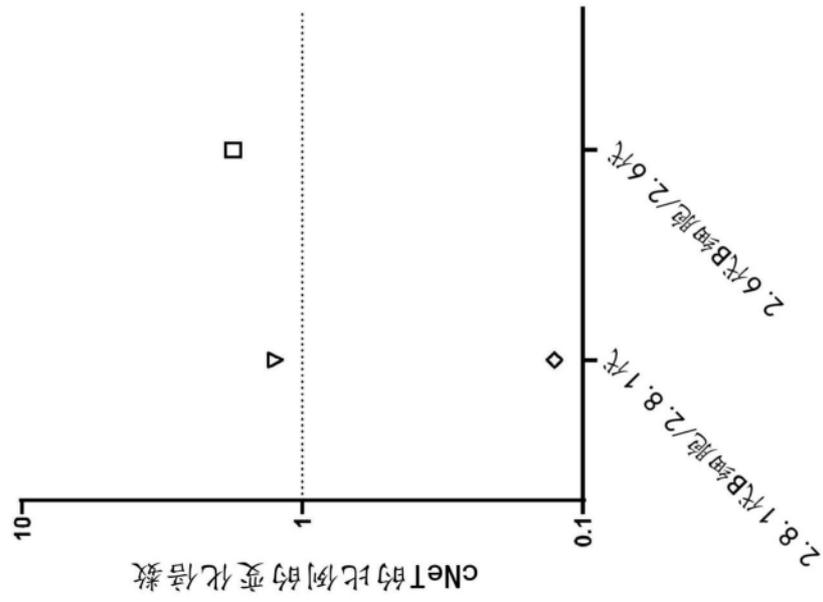


图13

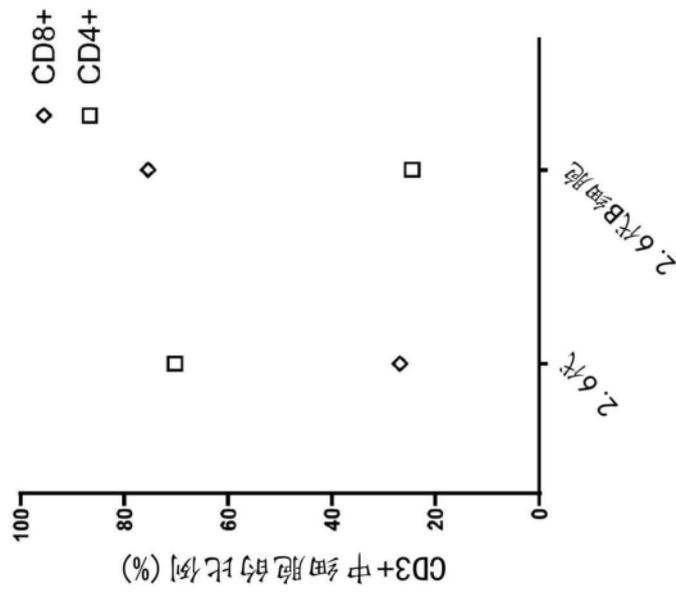


图14