



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112703195 A

(43) 申请公布日 2021.04.23

(21) 申请号 201980047267.7

(22) 申请日 2019.05.16

(30) 优先权数据

62/673,260 2018.05.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.01.14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2019/000588 2019.05.16

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2019/220209 EN 2019.11.21

(71) 申请人 昆士兰医学研究所理事会

地址 澳大利亚昆士兰州

(72) 发明人 R·康纳 C·史密斯

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

代理人 陈迎春 黄革生

(51) Int.Cl.

G07K 7/06 (2006.01)

G07K 7/08 (2006.01)

G07K 14/045 (2006.01)

A61K 38/08 (2019.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

A61K 39/245 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

权利要求书5页 说明书36页 附图5页

(54) 发明名称

用于CMV感染和CMV相关疾病的过继性T细胞
疗法

(57) 摘要

本文提供了免疫原性多肽、组合物和方法，其与基于细胞毒性T细胞 (CTL) 识别的T细胞表位 (例如,CMV表位) 的CMV特异性预防和/或治疗性免疫疗法的开发相关,并且可以用于预防和/或治疗CMV感染、重新激活和/或疾病 (例如,CMV相关的终末器官疾病),尤其是在实体器官移植接受者中。

1. 一种免疫原性肽的库,其包含能够诱导肽特异性T细胞增殖的HLA I类和II类限制性巨细胞病毒(CMV)肽表位,其中所述肽库包含SEQ ID No:25至29中列出的表位氨基酸序列中的至少一个,或其组合。

2. 一种免疫原性肽的库,其包含能够诱导肽特异性T细胞增殖的HLA I类和II类限制性CMV肽表位,其中所述肽库包含至少一个衍生自CMV抗原pp50、pp65、IE-1、gB和gH中的每个的肽表位。

3. 根据权利要求1或2所述的免疫原性肽的库,其进一步包含表1中列出的CMV肽表位氨基酸序列中的至少一个,或其组合。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的免疫原性肽的库,其包含表1中列出的每个CMV肽表位氨基酸序列。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的免疫原性肽的库,其中每个表位通过选自以下的任一个HLA特异性限制:HLA-A*01:01、-A*02:01、-A*23:01、-A*24:02、-B*07:02、-B*08:01、-B*18:01、-B*35:01、-B*35:08、-B*40:01、-B*40:02、-B*41:01、-B*44:02、-C*06:02、-C*07:02、-DRB1*01:01、-DRB1*03:01、-DRB1*04:01、-DRB1*07或-DRB1*11:01。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的免疫原性肽的库,其中所述免疫原性肽能够诱导肽特异性细胞毒性T细胞(CTL)的增殖。

7. 一种生产多功能、CMV特异性细胞毒性T细胞(CTL)的制剂的方法,所述方法包括:

- a) 分离包含CTL的样品;
- b) 将所述样品暴露于权利要求1-6中任一项所述的免疫原性肽的库;和
- c) 收集CTL。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述免疫原性肽的库基本上由表1中列出的每个CMV肽表位氨基酸序列组成。

9. 根据权利要求7或8中任一项所述的方法,其中所述包含CTL的样品包含来自健康供体的外周血单个核细胞(PBMC)。

10. 根据权利要求7或8中任一项所述的方法,其中所述包含CTL的样品包含来自无免疫应答的供体的PBMC。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述供体正在经历免疫抑制疗法。

12. 根据权利要求10或11中任一项所述的方法,其中所述供体是实体器官移植接受者。

13. 根据权利要求10或12中任一项所述的方法,其中所述供体是接受抗病毒疗法的供体。

14. 根据权利要求7至13中任一项所述的方法,其中将步骤b)的暴露的样品孵育至少14天。

15. 根据权利要求14所述的方法,其进一步包括在第0天将步骤b)的暴露的样品与IL-21孵育。

16. 根据权利要求14或15中任一项所述的方法,其进一步包括在第2天将步骤b)的暴露的样品与IL-2孵育。

17. 根据权利要求16所述的方法,其进一步包括每三天添加IL-2。

18. 根据权利要求7至17中任一项所述的方法,其进一步包括将所述CTL施用给患有CMV感染的受试者。

19. 一种在受试者中治疗或预防CMV感染的方法,所述方法包括向受试者施用权利要求7至17中任一项所述的CTL。

20. 通过权利要求7至16中任一项所述的方法制备的CTL。

21. 一种在受试者中治疗或预防CMV感染的方法,所述方法包括向所述受试者施用权利要求20所述的CTL。

22. 根据权利要求20所述的方法,其中暴露于免疫原性肽的库诱导CMV肽特异性T细胞的刺激和增殖。

23. 根据权利要求21所述的方法,其中向受试者施用的CTL是自体的。

24. 根据权利要求21所述的方法,其中所述感染是复发的CMV感染。

25. 根据权利要求21或24中任一项所述的方法,其中所述CMV感染是药物抗性的。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中所述CMV感染是更昔洛韦抗性的。

27. 根据权利要求21-26中任一项所述的方法,其中所述受试者是实体器官移植的接受者。

28. 根据权利要求21-27中任一项所述的方法,其中至少5%的CTL表达CD107a。

29. 根据权利要求21-27中任一项所述的方法,其中至少10%的CTL表达CD107a。

30. 根据权利要求21-27中任一项所述的方法,其中至少20%的CTL表达CD107a。

31. 根据权利要求21-27中任一项所述的方法,其中至少60%的CTL表达CD107a。

32. 根据权利要求21-27中任一项所述的方法,其中至少90%的CTL表达CD107a。

33. 根据权利要求21-27中任一项所述的方法,其中至少5%的CTL表达IFN γ 。

34. 权利要求33所述的方法,其中至少10%的CTL表达IFN γ 。

35. 根据权利要求34所述的方法,其中至少20%的CTL表达IFN γ 。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中至少60%的CTL表达IFN γ 。

37. 根据权利要求36所述的方法,其中至少90%的CTL表达IFN γ 。

38. 根据权利要求21-37中任一项所述的方法,其中至少5%的CTL表达TNF。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中至少10%的CTL表达TNF。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中至少20%的CTL表达TNF。

41. 根据权利要求40所述的方法,其中至少60%的CTL表达TNF。

42. 根据权利要求41所述的方法,其中至少90%的CTL表达TNF。

43. 根据权利要求21-42中任一项所述的方法,其中至少1%的CTL表达IL-2。

44. 根据权利要求43所述的方法,其中至少5%的CTL表达IL-2。

45. 根据权利要求44所述的方法,其中至少10%的CTL表达IL-2。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中至少20%的CTL表达IL-2。

47. 根据权利要求21-27中任一项所述的方法,其中至少20%的CTL表达CD107a、IFN γ 和TNF。

48. 根据权利要求47所述的方法,其中至少43%的CTL表达CD107a、IFN γ 和TNF。

49. 根据权利要求48所述的方法,其中至少55%的CTL表达CD107a、IFN γ 和TNF。

50. 根据权利要求49所述的方法,其中至少90%的CTL表达CD107a、IFN γ 和TNF α 。

51. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述CTL显示出对衍生自多种CMV抗原的多种肽表位的反应性。

52. 根据权利要求51所述的方法,其中所述CTL对多于一种CMV表位具有至少11%的CMV反应性。

53. 根据权利要求52所述的方法,其中所述CTL对多于一种CMV表位具有至少43%的CMV反应性。

54. 根据权利要求53所述的方法,其中所述CTL对多于一种CMV表位具有至少48%的CMV反应性。

55. 根据权利要求54所述的方法,其中所述CTL对多于一种CMV表位具有至少66%的CMV反应性。

56. 根据权利要求55所述的方法,其中所述CTL对多于一种CMV表位具有至少77%的CMV反应性。

57. 根据权利要求56所述的方法,其中所述CTL对多于一种CMV表位具有至少79%的CMV反应性。

58. 根据权利要求51-57中任一项所述的方法,其中所述CTL对表1中列出的任一个CMV肽表位氨基酸序列或其组合具有反应性。

59. 根据权利要求45-51中任一项所述的方法,其中所述CTL对pp50、pp65、IE-1、gB、gH中的任一个或其组合具有反应性。

60. 一种在受试者中治疗或预防CMV重新激活或与CMV相关的病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用权利要求20的CTL。

61. 根据权利要求60所述的方法,其中所述CTL是自体的。

62. 根据权利要求60或61中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括分析CMV肽特异性CTL的多种生物标志物的表达,如果所述CTL表达至少两种生物标志物,则将所述CTL施用给所述受试者。

63. 根据权利要求62所述的方法,其中分析了所述CMV肽特异性CTL的CD107a、TNF和IFN γ 的表达,如果至少10%的CTL表达CD107a、TNF和IFN γ ,则向所述受试者施用所述肽特异性CTL。

64. 根据权利要求63所述的方法,其中如果样品中至少20%的CMV肽特异性CTL表达CD107a、TNF和IFN γ ,则施用CTL。

65. 权利要求63的方法,其中如果样品中至少60%的增生的肽特异性CTL表达CD107a, TNF和IFN γ ,则给予CTL。

66. 根据权利要求63所述的方法,其中如果样品中至少90%的增殖的肽特异性CTL表达CD107a、TNF和IFN γ ,则施用CTL。

67. 根据权利要求60至66中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括分析所述CMV肽特异性CTL的CMV反应性,如果所述反应性针对多于一个肽表位且高于预定阈值,则向所述受试者施用所述肽特异性CTL。

68. 根据权利要求67所述的方法,其中所述阈值为11%。

69. 根据权利要求67所述的方法,其中所述阈值为43%。

70. 根据权利要求67所述的方法,其中所述阈值为48%。

71. 根据权利要求67所述的方法,其中所述阈值为66%。

72. 根据权利要求67所述的方法,其中所述阈值为77%。

73. 根据权利要求67所述的方法,其中所述阈值为79%。
74. 根据权利要求60至73中任一项所述的方法,其中在步骤(a)中将所述样品与一种或多种细胞因子孵育。
75. 根据权利要求60至74中任一项所述的方法,其中所述样品包含PBMC。
76. 根据权利要求75所述的方法,其中所述受试者是无免疫应答的。
77. 根据权利要求75或76中任一项所述的方法,其中所述受试者正在经历免疫抑制疗法。
78. 根据权利要求75至77中任一项所述的方法,其中所述受试者是实体器官移植接受者。
79. 根据权利要求75至78中任一项所述的方法,其中所述受试者正在接受抗病毒疗法。
80. 根据权利要求21至79中任一项所述的方法,所述方法包括向受试者施用一个剂量中的约 1×10^7 CTL。
81. 根据权利要求21至79中任一项所述的方法,所述方法包括向受试者施用一个剂量中的约 1.5×10^7 CTL。
82. 根据权利要求21至79中任一项所述的方法,所述方法包括向受试者施用一个剂量中的约 2×10^7 CTL。
83. 根据权利要求80至82中任一项所述的方法,其中所述剂量每两周施用一次。
84. 根据权利要求21至83中任一项所述的方法,其中所述受试者没有经历由于CTL施用而导致的显著的不良效果。
85. 根据权利要求21至83中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括通过测量所述受试者中的CMV病毒载量来评估过继性T细胞疗法的功效。
86. 根据权利要求85所述的方法,其中在施用CTL后,所述CMV病毒载量降低了约82%。
87. 根据权利要求85所述的方法,其中在施用CTL后,所述CMV病毒载量降低了约95%。
88. 根据权利要求85所述的方法,其中在施用CTL后,所述CMV病毒载量降低了约100%。
89. 根据权利要求21至88中任一项所述的方法,其中受试者的临床症状被改善了。
90. 根据权利要求89所述的方法,其中受试者经历了DNA血症的降低或解决。
91. 根据权利要求89所述的方法,其中受试者经历了CMV相关的终末器官疾病的降低或停止。
92. 根据权利要求89所述的方法,其中受试者经历了抗病毒疗法的停止或使用减少。
93. 一种通过向受试者施用权利要求20的CTL来降低已接受实体器官移植的受试者的CMV病毒载量的方法。
94. 一种通过向受试者施用权利要求20的CTL来治疗或预防已接受实体器官移植的受试者中CMV相关的终末器官疾病的方法。
95. 一种通过向受试者施用权利要求20的CTL来降低或消除已接受实体器官移植的受试者对抗病毒疗法的需要的方法。
96. 一种通过向受试者施用权利要求20的CTL来治疗已接受实体器官移植的受试者中的药物抗性CMV感染、重新激活或相关疾病的方法。
97. 根据权利要求93至96中任一项所述的方法,其中所述受试者患有更昔洛韦抗性CMV感染、重新激活或相关疾病。

98. 根据权利要求93至97中任一项所述的方法,其中所述CTL是自体的CTL。

用于CMV感染和CMV相关疾病的过继性T细胞疗法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求享有2018年5月18日提交的美国临时专利申请系列号62/673,260的优先权的权益,其全部内容通过引用并入本文。

背景技术

[0003] 疱疹病毒代表与各种动物和人类疾病相关的一大类而且近乎普遍存在的真核病毒家族。疱疹病毒科共有几个共同的结构,例如,双链、线性DNA基因组,以及包含二十面体衣壳的病毒体,该二十面体衣壳本身包裹在病毒外皮层和脂质双层中(病毒被膜)。另外,疱疹病毒包含特征性和高度保守的糖蛋白,其携带在疱疹病毒病毒体的脂质双层被膜上。这些糖蛋白中的至少一些在最初病毒粘附到细胞表面以及随后穿透到细胞中时起作用。

[0004] 疱疹病毒家族成员代表重要的人类病原体,其中包括人类巨细胞病毒(CMV)。巨细胞病毒可普遍存在于所有地理位置和社会经济群体中,感染60%至90%的个体。在健康个体中,在初次感染后,CMV会建立潜伏状态,定期重新激活并从粘膜表面脱落,并可能伴有单核细胞增多症样疾病的临床症状,类似于由EB病毒引起的症状,但通常无症状。CMV利用多种免疫调节策略来逃避宿主的免疫反应。此类策略的示例包括抑制干扰素(IFN)和IFN刺激的基因、降解HLA以防止抗原呈递至细胞毒性T细胞、以及调节激活和抑制性配体以阻碍自然杀伤(NK)细胞的功能。

[0005] 但是,在某些情况下,CMV能导致明显的发病率和死亡率。例如,临床管理实体器官移植(SOT)接受者中的CMV感染仍然是一项重大挑战。自基于更昔洛韦的抑制病毒疗法的出现以来,SOT接受者早期CMV相关并发症的发生率已显著降低。因此,通过更昔洛韦的预防性或先天性施用抑制病毒的重新激活,在预防CMV相关疾病中变得至关重要。但是,晚期CMV的重新激活可能更难以管理,尤其是在不能重建抗病毒T细胞免疫的患者中。此外,更昔洛韦抗性CMV重新激活或疾病的出现给临床管理带来了重大困难,由于与药物相关的毒性、免疫调节作用和同种异体移植物丧失,因而具有显著的发病率和死亡率。

[0006] 针对更昔洛韦抗性的CMV,缺乏安全有效的替代疗法选择。使用膦甲酸(foscarnet)或西多福韦的其他抗病毒管理策略与肾毒性相关,并且需要静脉内施用和住院治疗。赋予更昔洛韦抗性的基因也与对膦甲酸和西多福韦的抗性相关。降低免疫抑制可用于改善病毒控制,但增加移植排斥的风险。

[0007] 因此,非常需要新的、改善的方法和组合物,以用于治疗SOT接受者和其他患有CMV相关疾病的患者的CMV感染、重新激活以及相关的并发症和疾病。

发明内容

[0008] 本文提供了免疫原性多肽、组合物和方法,其与基于细胞毒性T细胞(CTL)识别的T细胞表位(例如,CMV表位)的CMV特异性预防和/或治疗性免疫疗法的开发相关,并且可以用于预防和/或治疗CMV感染、重新激活和/或疾病(例如,CMV相关的终末器官疾病),尤其是在实体器官移植接受者中。在一些实施方案中,CMV感染、重新激活和/或疾病是持续的。在某

些实施方案中,CMV感染、重新激活和/或疾病对抗病毒疗法具有抗性。

[0009] 本文还提供了免疫原性肽的库,所述免疫原性肽包含能够诱导肽特异性T细胞增殖的HLA I类和II类限制性巨细胞病毒(CMV)肽表位。在一些实施方案中,免疫原性肽的库包含SEQ ID NO:25至29所示的表位氨基酸序列中的至少一个,或其组合。在某些实施方案中,肽库包含衍生自CMV抗原pp50、pp65、IE-1、gB和gH中的每个的至少一个肽表位。优选地,此类免疫原性肽库还包含表1中列出的CMV肽表位氨基酸序列中的至少一个。更优选地,本发明的免疫原性肽库包含表1中列出的每个CMV肽表位氨基酸序列。在一些实施方案中,本文公开的免疫原性肽库的每个表位是选自以下的任一个HLA特异性的限制性表位:HLA-A*01:01、-A*02:01、-A*23:01、-A*24:02、-B*07:02、-B*08:01、-B*18:01、-B*35:01、-B*35:08、-B*40:01、-B*40:02、-B*41.01、-B*44:02、-C*06:02、-C*07:02、-DRB1*01:01、-DRB1*03:01、-DRB1*04:01、-DRB1*07或-DRB1*11:01。

[0010] 在一些方面,本文提供了制备包含多功能性CMV特异性细胞毒T细胞(CTL)的制剂的方法,其包括以下步骤:a)分离包含CTL的样品;b)将所述样品暴露于权利要求1-6中任一项所述的免疫原性肽的库;和c)收集CTL。在某些实施方案中,免疫原性肽的库基本上由表1中列出的每个CMV肽表位氨基酸序列组成。在一些实施方案中,包含CTL的样品包含来自健康供体的外周血单个核细胞(PBMC)。在一些这样的实施方案中,供体是无免疫应答的。在某些实施方案中,供体正在经历免疫抑制疗法。优选地,供体是实体器官移植接受者。在某些优选的实施方案中,供体正在接受抗病毒疗法。

[0011] 在一些实施方案中,将步骤b)的暴露样品孵育至少14天。细胞因子可以用于本发明的方法中,并且可以包括但不限于IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-12、IL-15和/或IL-21。例如,步骤b)的暴露样品可在第0天与IL-21孵育。在一些这样的实施方案中,步骤b)的暴露样品在第2天与IL-2孵育。优选地,每三天将样品与IL-2孵育。

[0012] 在本发明的某些方面,本文提供了治疗或预防受试者中CMV感染的方法,所述方法包括向受试者施用通过本文公开的方法产生的CTL或其组合物。在一些实施方案中,受试者患有CMV重新激活或CMV相关的病症(例如,CMV相关的终末器官疾病),或处于其风险中。在某些优选的实施方案中,受试者已经接受了实体器官移植。本文还提供了降低或消除已接受实体器官移植的受试者对抗病毒疗法的需要的方法,此类方法包括向受试者施用通过本文公开的方法产生的CTL。

附图说明

[0013] 图1显示了扩增用于过继性免疫疗法的CMV特异性T细胞的表型和功能特征。(A)使用标准TBNK(T细胞、B细胞、NK细胞)分析评估CMV肽库扩增的T细胞的表型特征,测量CD3(T细胞)、CD8(CD8+T细胞)、CD4(CD4+T细胞)、CD16和CD56(NK细胞)和CD19(B细胞)的表面表达。(B)在用CMV肽库或单个HLA匹配的肽再刺激后,针对细胞内产生的IFN- γ ,评估PBMC(离体;暴露于肽之前)或扩增的T细胞(第14天)。数据代表产生IFN- γ 的CD8+T细胞的比例。(C)比较从肾脏或心脏/肺移植患者产生的CMV特异性T细胞反应(D)比较从CMV血清阴性接受者(R-)或CMV血清阳性接受者(R+)产生的CMV特异性T细胞反应。(E)在用CMV肽库恢复(recall)后,评估了CMV肽库刺激的T细胞的细胞内产生的细胞因子(IFN- γ 、TNF、IL-2)和脱颗粒(CD107a)。数据代表产生每种组合的效应子功能(即多功能性)的总抗原特异性T细

胞的比例。

[0014] 图2显示过继性细胞疗法后的免疫学和病毒学作用。(A) 在用CMV肽库刺激后,评估了来自T细胞疗法前和疗法后的患者的PBMC样品中产生IFN- γ 的CMV特异性T细胞。数据代表来自四名对疗法有反应的患者中产生IFN- γ 的CD8+T细胞数和CMV载量(以拷贝/mL计)的覆盖图。阴影区域表示过继性T细胞疗法之前的时间段,箭头表示T细胞输注。(B) 在用CMV肽库刺激后,在PBMC样品上评估多功能性,即细胞因子产生(IFN- γ 、TNF、IL-2)和脱颗粒(CD107a)。热图代表产生每种效应子功能组合的总抗原特异性T细胞的比例。

[0015] 图3显示了T细胞表型的多色分析。图3上组的代表性t分布随机邻居嵌入(tSNE)分析显示患者P1553PAH08在疗法前和疗法后T细胞表型标志物和CMV特异性T细胞(VTE)的表达,表明CD57的表达增加。图3下组的数据代表在对过继性T细胞疗法有反应的三名SOT接受者(P1553PAH08、1553PCH02和1553PCH04)和一名未显示出任何临床反应的SOT接受者(P1553RAH01)中,T细胞疗法后表达CD57的CD8+T细胞的比例和产生CMV特异性IFN- γ 的细胞的百分比的图。

具体实施方式

[0016] 概述

[0017] 通过施用CMV特异性T细胞来重建CMV免疫,为增强对CMV的控制提供了一个有吸引力的选择。如本文所公开的,使用来自多个CMV抗原的多个表位能够诱导广谱的病毒特异性免疫反应,以提供针对病毒相关发病机制的更有效的保护。最优选地,本发明涉及多功能性T细胞的刺激和扩增,所述多功能T细胞,即,能够诱导多种免疫效应子功能的T细胞,相比于例如仅产生单个免疫效应子(例如单个生物标记物,例如细胞因子或CD107a)的细胞,其提供了针对病原体更有效的免疫反应。在慢性感染期间,多功能性较弱、单功能性、甚至“衰竭型”T细胞可能主导免疫反应,从而对针对病毒相关并发症的保护产生负面影响。

[0018] 但是,在SOT接受者的情况中,需要来自高度免疫抑制的个体的自体免疫细胞来产生有效的T细胞疗法。尽管在SOT患者中使用自体CMV特异性T细胞疗法显示了一些有希望的结果,但以前的案例研究也提出了对潜在安全性的关注(Brestrich等人(2009) *Am J Transplant* 9(7):1679-84)。结果,由于认识到从高度免疫抑制的受试者(例如,SOT接受者)产生T细胞的困难,以及与施用T细胞后的移植排斥相关的潜在风险,这种方法的发展受到了限制。

[0019] 定义

[0020] 为了方便起见,这里收集了说明书、实施例和所附权利要求书中使用的某些术语。

[0021] 冠词“一种(a)”和“一种(an)”在本文中用于指该冠词的语法对象中的一个或多个(即,至少一个)。举例来说,“一种元件”是指一个元件或多于一个元件。

[0022] 如本文所用,术语“施用”是指向受试者提供药剂或组合物,包括但不限于由医学专业人员施用和自我施用。此类试剂可以包含例如本文所述的肽、本文提供的抗原呈递细胞和/或本文提供的CTL。

[0023] 如本文所用,术语“受试者”或“接受者”是指选择用于治疗或疗法的人或非人动物。

[0024] 如本文所用,术语“治疗”是指被设计为在临床病理过程中改变被治疗个体的自然

病程的临床干预。理想的治疗效果包括降低进展速度、改善或减轻病理状态、以及缓解或改善特定疾病、疾患或病症的预后。例如，如果缓解或消除了与特定疾病、疾患或病症相关的一种或多种症状，则可以成功“治疗”个体。

[0025] 如本文所用，“预防”病症的治疗剂是指这样的化合物，当在疾患或病症发作之前向统计样品施用，相对于未治疗的对照样品，降低了治疗样品中疾患或病症的发生，或相对于未治疗的对照样品，延迟了疾患或病症的一种或多种症状的发作或降低了其严重程度。

[0026] 如本文所用，短语“药学上可接受的”是指那些试剂、化合物、材料、组合物和/或剂型，在合理的医学判断范围内，适合用于与人和动物组织接触，而没有过度的毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症，相当于合理的获益/风险比。

[0027] 如本文所用，短语“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的材料、组合物或载体，例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂或溶剂包封材料，其涉及将试剂从一个器官或身体的一部分携带或运输到另一个器官或身体的一部分。在与制剂的其他成分相容并且对患者是无害的意义上，载体必须是“可接受的”。可以用作药学上可接受的载体的一些材料的示例包括：(1) 糖，例如乳糖、葡萄糖和蔗糖；(2) 淀粉，例如玉米淀粉和马铃薯淀粉；(3) 纤维素及其衍生物，例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素；(4) 黄芪胶粉；(5) 麦芽；(6) 明胶；(7) 滑石；(8) 赋形剂，例如可可脂和栓剂蜡；(9) 油，例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油、大豆油；(10) 乙二醇，例如丙二醇；(11) 多元醇，例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇；(12) 酯，例如油酸乙酯和月桂酸乙酯；(13) 琼脂；(14) 缓冲剂，例如氢氧化镁和氢氧化铝；(15) 海藻酸；(16) 无热原水；(17) 等渗盐水；(18) 林格氏溶液；(19) 乙醇；(20) pH缓冲溶液；(21) 聚酯、聚碳酸酯和/或聚酞；(22) 药制剂中使用的其他无毒相容物质。

[0028] 术语“结合”或“相互作用”是指缔合，其可以是两个分子之间稳定的缔合，例如TCR和肽/MHC之间稳定的缔合，该缔合是由于，例如，在生理条件下的静电、疏水、离子和/或氢键相互作用产生。

[0029] 如本文所用，“特异性结合”是指TCR结合MHC（例如，I类MHC或II类MHC）上呈递的肽的能力。通常，TCR以至少约 10^{-4} M或更小的 K_D 的亲合力特异性结合其肽/MHC，并且与其结合非特异性的、无关肽/MHC复合物（例如，包含BSA肽或酪蛋白肽的肽/MHC复合物）的亲合力相比，其以至少低10倍、至少低100倍或至少低1000倍的亲合力（以 K_D 表示）结合预定的抗原/结合配偶体。

[0030] 术语“生物样品”、“组织样品”或简称“样品”分别是指从受试者的组织获得的细胞的集合。组织样品的来源可以是实体组织，如来自新鲜的、冷冻的和/或保存的器官、组织样品、活组织检查或抽吸物；血液或任何血液成分、血清、血液；体液，例如脑脊液、羊水、腹膜液或间质液；或来自受试者妊娠或发育中任何时间的细胞。

[0031] 如本文所用，术语“细胞因子”是指影响细胞功能的任何分泌的多肽，其是在免疫、炎性或造血反应中调节细胞之间相互作用的分子。细胞因子包括但不限于单核因子和淋巴因子，无论由哪种细胞产生。例如，单核因子通常是指由单个核细胞，例如巨噬细胞和/或单核细胞产生和分泌的因子。然而，许多其他细胞也产生单核因子，例如自然杀伤细胞、成纤维细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、内皮细胞、脑星形胶质细胞、骨髓基质细胞、表皮角

质细胞和B淋巴细胞。淋巴因子通常是指由淋巴细胞产生的因子。细胞因子的示例包括但不限于白细胞介素-1 (IL-1)、白细胞介素-2 (IL-2)、白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素8 (IL-8)、肿瘤坏死因子- α (TNF α) 和肿瘤坏死因子 β (TNF β)。

[0032] 术语“表位”是指能够特异性结合抗体或TCR的蛋白质决定簇。表位通常由分子的化学活性表面组群组成,例如氨基酸或糖侧链。某些表位可以由抗体能够结合的特定氨基酸序列定义。

[0033] 术语“多核苷酸”和“核酸”可互换使用。它们是指任何长度的核苷酸的聚合形式,即,脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物。多核苷酸可以具有任何三维结构,并且可以执行任何功能。以下是多核苷酸的非限制性示例:基因或基因片段的编码或非编码区、根据连锁分析定义的一个或多个基因座、外显子、内含子、信使RNA (mRNA)、转运RNA、核糖体RNA、核酶、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的DNA、任何序列的分离的RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸,例如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物。如果存在,可以在聚合物组装之前或之后赋予核苷酸结构修饰。例如,可以通过与标记组分缀合进一步修饰多核苷酸。在本文提供的所有核酸序列中,U核苷酸可与T核苷酸互换。

[0034] 术语“载体”是指可以使核酸在生物体、细胞或细胞组分之间增殖和/或转移的手段。载体包括质粒、病毒、噬菌体、原病毒、噬菌粒、转座子和人工染色体等,它们可以自主复制或者不能自主复制、或者可以整合到宿主细胞的染色体中或者不能整合到宿主细胞的染色体中。

[0035] 肽

[0036] 本文提供了包含被细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 识别的疱疹病毒表位的肽,其可用于预防和/或治疗CMV感染、重新激活和/或CMV感染的疾病和/或癌症(例如实体器官移植接受者中的终末器官疾病)。在某些实施方案中,CMV表位是表1中列出的表位。

[0037] 表1:示例性CMV表位

表位序列	HLA 限制	HCMV 抗原	编码	SEQ ID NO:
VTEHDTLLY	A*01:01	pp50	VTE	1
YSEHPTFTSQY	A*01:01	pp65	YSEH	2
NLVPMVATV	A*02:01	pp65	NLV	3
VLEETSVML	A*02:01	IE-1	VLE	4
YILEETSVML	A*02:01	IE-1	YIL	5
AYAQKIFKIL	A*23:01 A*24:02	IE-1	AYA	6
QYDPVAALF	A*24:02	pp65	QYD	7
TPRVTGGGAM	B*07:02	pp65	TPR	8
RIPHERNGFTVL	B*07:02	pp65	RPH	9
ELRRKMMYM	B*08:01	IE-1	ELR	10
ELKRKMIYM	B*08:01	IE-1	ELK	11
QIKVRVDMV	B*08:01	IE-1	QIK	12
DELRRKMMY	B*18:01, B*44:02	IE-1	DEL	13
IPSINVHHY	B*35:01	pp65	IPS	14
CPSQEPMSIYVY	B*35:08	pp65	CPS	15
CEDVPSGKL	B*40:01	pp65	CED	16
HERNGFTVL	B*40:01, B*40:02	pp65	HER	17
EEAIVAYTL	B*40:01, B*44:02	IE-1	EEA	18
QEFFWDANDIY	B*44:02	pp65	QEF	19
TRATKMQVI	C*06:02	pp65	TRA	20
YAYIYTTYL	B*41:01	gB	YAY	21
QAIRETVEL	B*35:01	pp65	QAI	22
CRVLCCYVL	C*07:02	pp65	CRV	23
HELLVLVKAQL	DRB1*11:01	gH	HELL	24
DYSNTHSTRYV	DRB1*07	gB	DYSN	25
QEFFWDANDIYRIFA	DRB3*01:01	pp65	QEFF	26
CMLTITTARSKYPYH	DRB1*04:01	gH	CMLT	27
PLKMLNIPSINVHHY	DRB1*01:01	pp65	PLKM	28
EHPTFTSQYRIQGKL	DRB1*11:01	pp65	EHPT	29
AGILARNLVPMVATV	DRB1*03:01	pp65	AGIL	30
KARAKKDEL*	HLA-B*31:01	IE-1	KAR	31

[0039] *对于患者P1553PAH01,在CMV肽库中补充了IE-1编码的HLA-B*31:01限制性表位KARAKKDEL(R)。

[0040] 在某些方面,本文提供了免疫原性肽的库,所述免疫原性肽包含能够诱导肽特异性T细胞增殖的HLA I类和II类限制性巨细胞病毒(CMV)肽表位。在一些实施方案中,免疫原性肽的库包含SEQ ID NO:25至29所示的表位氨基酸序列中的至少一个,或其组合。在这样的实施方案中,肽库包含衍生自CMV抗原pp50、pp65、IE-1、gB和gH中的每个的至少一个肽表位。优选地,免疫原性肽的库进一步包含表1中列出的CMV肽表位氨基酸序列中的至少一个,或其组合。最优选地,这样的肽库包含表1中列出的每个CMV肽表位氨基酸序列。

[0041] “HLA限制性(即,MHC限制性)”是指给定的T细胞仅在肽与特定的HLA分子结合时才识别肽并对该肽反应。在一些实施方案中,本文公开的免疫原性肽库的每个表位是选自以下的任一个HLA特异性的限制性表位:HLA-A*01:01、-A*02:01、-A*23:01、-A*24:02、-B*07:02、-B*08:01、-B*18:01、-B*35:01、-B*35:08、-B*40:01、-B*40:02、-B*41:01、-B*44:02、-C*06:02、-C*07:02、-DRB1*01:01、-DRB1*03:01、-DRB1*04:01、-DRB1*07或-DRB1*11:01。

[0042] 最优选地,免疫原性肽及其库能够诱导肽特异性细胞毒性T细胞 (CTL) 的增殖。

[0043] 在一些实施方案中,本文提供的肽是全长CMV多肽。在一些实施方案中,本文提供的肽包含CMV病毒多肽的少于100、90、80、70、60、50、40、30、25、20、15或10个连续氨基酸。在一些实施方案中,本文提供的肽包含表1中列出的两个或更多个CMV表位。例如,在一些实施方案中,本文提供的肽包含通过多肽接头连接的两个或更多个表1中列出的CMV表位。在一些实施方案中,本文提供的肽包含至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19个或全部表1中列出的表位。

[0044] 在一些实施方案中,肽的序列包含除了1个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多)保守序列修饰以外的CMV病毒多肽序列。如本文所用,术语“保守序列修饰”是指氨基酸修饰,其不显著影响或改变T细胞受体 (TCR) 和主要组织相容性复合物 (MHC) 上呈递的包含氨基酸序列的肽之间的相互作用。这样的保守修饰包括氨基酸取代、添加(例如,向肽的N或C末端添加氨基酸)和缺失(例如,从肽的N或C末端缺失氨基酸)。保守氨基酸取代是其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基取代的氨基酸取代。具有相似侧链的氨基酸残基家族已在本领域中定义。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸)、具有 β 分支侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳香族侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,本文所述的肽的一个或多个氨基酸残基可以被来自相同侧链家族的其他氨基酸残基取代,并且可以使用本领域已知的方法测试改变的肽对TCR结合的保留。可以通过本领域已知的标准技术将修饰引入抗体中,例如通过定点诱变和PCR介导的诱变。

[0045] 为了确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分比,对序列进行最佳比较目的的比对(例如,为了进行最佳比对,可以在第一和第二氨基酸或核酸序列之一或两者中引入缺口,并且为了比较的目的,可以忽略不相同的序列)。然后比较相应氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的某一位置与第二序列中的相应位置被相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,则分子在该位置是相同的。两个序列之间的同一性百分比是序列共有的相同位置的数目的函数,考虑了需要引入以实现两个序列最佳比对的缺口数和每个缺口的长度。

[0046] 本文还提供了嵌合或融合蛋白。如本文所用,“嵌合蛋白”或“融合蛋白”包含与不同的肽连接的本文提供的一种或多种肽(例如,包含表1所列表位的那些肽),在天然情况下其是不连接的。例如,可以将不同的肽直接地通过肽键或间接地通过化学接头融合至该肽的N-末端或C-末端。在一些实施方案中,本文提供的肽与包含其他CMV表位的多肽连接。在一些实施方案中,本文提供的肽与包含来自其他病毒和/或感染性疾病的表位的肽连接。在一些实施方案中,本文提供的肽与编码癌症相关表位的肽连接。

[0047] 本文提供的嵌合或融合肽可以通过标准重组DNA技术产生。例如,可以根据常规技术将编码不同肽序列的DNA片段在框内连接在一起,例如通过使用平末端或交错末端进行连接、限制性酶消化以提供适当的末端、根据情况填平粘性末端、进行碱性磷酸酶处理以避免不希望连接、和酶促连接。类似地,可以通过包括自动DNA合成仪的常规技术来合成融

合基因。备选地,可以使用锚定引物进行基因片段的PCR扩增,所述锚定引物在两个连续的基因片段之间产生互补的突出端,随后可以被退火和重新扩增以产生嵌合基因序列(参见,例如,Current Protocols in Molecular Biology,Ausubel等人编辑,John Wiley&Sons:1992)。此外,许多已经编码融合部分的表达载体是可商购获得的。

[0048] 在一些方面,本文提供呈递本文所述肽(例如,包含表1列出的表位的肽)的细胞。在一些实施方案中,细胞是哺乳动物细胞。细胞可以是抗原呈递细胞(APC)(例如,抗原呈递t细胞、树突状细胞、B细胞、巨噬细胞或人工抗原呈递细胞,例如aK562细胞)。呈递本文描述的肽的细胞可以通过本领域已知的标准技术产生。例如,可以对细胞进行脉冲以促进肽摄取。在一些实施方案中,用编码本文提供的肽的核酸转染细胞。

[0049] 在一些方面,本文提供了产生抗原呈递细胞(APC)的方法,所述方法包括用本文所述的肽脉冲细胞。产生抗原呈递细胞的示例性方法可以在W02013088114中找到,其整体并入本文。

[0050] 可以使用标准蛋白质纯化技术通过适当的纯化方案从细胞或组织来源中分离本文所述的肽、可以通过重组DNA技术产生本文所述的肽、和/或可以使用标准肽合成技术化学合成本文所述的肽。可通过表达编码本发明的一种或多种肽的核苷酸在原核或真核宿主细胞中产生本文所述的肽。或者,可以通过化学方法合成此类肽。在重组宿主中表达异源肽、肽的化学合成和体外翻译的方法是本领域众所周知的,并在Maniatis等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(1989),第2版,Cold Spring Harbor,N.Y.;Berger和Kimmel,Methods in Enzymology,Volume 152,Guide to Molecular Cloning Techniques(1987),Academic Press,Inc.,San Diego,Calif.;Merrifield,J.(1969) J.Am.Chem.Soc.91:501;Chaiken I.M.(1981)CRC Crit.Rev.Biochem.11:255;Kaiser等人(1989)Science 243:187;Merrifield,B.(1986)Science 232:342;Kent,S.B.H.(1988)Annu.Rev.Biochem.57:957;和Offord,R.E.(1980)Semisynthetic Proteins,Wiley Publishing中进一步描述了,这些文献在本文中引用作为参考。

[0051] 细胞

[0052] 在一些方面,本文提供了抗原呈递细胞(APC),在其表面上表达MHC,所述MHC呈递一种或多种包含本文所述的CMV表位的肽(例如,呈递表1所列的一种或多种CMV表位的APC)。在一些实施方案中,MHC是I类MHC。在一些实施方案中,MHC是II类MHC。在一些实施方案中,I类MHC具有 α 链多肽,其为HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、HLA-g、HLA-K或HLA-L。在一些实施方案中,II类MHC具有 α 链多肽,其为HLA-DMA、HLA-DOA、HLA-DPA、HLA-DQA或HLA-DRA。在一些实施方案中,II类MHC具有 β 链多肽,其为HLA-DMB、HLA-DOB、HLA-DPB、HLA-DQB或HLA-DRB。

[0053] 在一些实施方案中,APC是B细胞、抗原呈递T细胞,树突状细胞或人工抗原呈递细胞(例如,aK562细胞)。可通过从患者样品中提取PBMC并将其粘附到塑料上来制备用于该过程的树突状细胞。通常,单核细胞群粘附,而所有其他细胞都可以被洗掉。然后用IL-4和GM-CSF使粘附的群分化,以产生单核细胞衍生的树突状细胞。可以通过添加IL-1 β 、IL-6、PGE-1和TNF- α (其上调树突状细胞表面上的重要共刺激分子)使这些细胞成熟,然后用一种或多种本文提供的肽转导。

[0054] 在一些实施方案中,APC是人工抗原呈递细胞,例如aK562细胞。在一些实施方案

中,人工抗原呈递细胞被工程化以表达CD80、CD83、41BB-L和/或CD86。示例性的人工抗原呈递细胞,包括aK562细胞,描述于美国专利公开号2003/0147869,其通过引用并入本文。

[0055] 在某些方面,本文提供了产生呈递本文所述的一个或多个CMV表位的APC的方法,所述方法包括使APC与包含CMV表位的肽、或本文所述的CMV表位肽的库、和/或编码一种或多种本文所述的CMV表位肽的核酸接触。在一些实施方案中,辐射APC。

[0056] 在某些方面,本文提供了表达TCR(例如, $\alpha\beta$ TCR或 $\gamma\delta$ TCR)的T细胞(例如,CD4 T细胞和/或CD8 T细胞),所述TCR识别MHC(例如,HLA限制性的)上呈递的本文所述的肽(包含表1中列出的CMV表位的肽)。在一些实施方案中,T细胞是表达TCR的CD8+T细胞(CTL),所述TCR识别I类MHC上呈递的本文所述的肽(例如,HLA-A、-B和-C)。在一些实施方案中,T细胞是CD4+T细胞(辅助性T细胞),其识别在II类MHC上呈递的本文所述的肽(例如,HLA-DP、-DM、-DOA、-DOB、-DQ和-DR)。在某些实施方案中,此类T细胞通过本文公开的任何一种方法制备。

[0057] 在一些实施方案中,本文提供的T细胞可以被工程化以表达嵌合抗原受体(CAR)。科学文献中已经描述了各种CAR。通常,CAR包括细胞外抗原结合结构域(例如,源自抗体可变重链和轻链的scFv)、间隔结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域。因此,在一些实施方案中,CMV特异性T细胞(例如,提供的CMV肽表位-池刺激的CTL)表达CAR,所述CAR靶向与疾病细胞,例如癌细胞(例如肿瘤细胞),相关的细胞外分子(例如,肿瘤抗原,例如,HER2)。

[0058] 在一些方面,本文提供了产生、激活和/或诱导识别本文所述的一种或多种CMV表位的T细胞(例如,CTL)增殖的方法。在一些实施方案中,分离包含CTL的样品(例如,PBMC样品)、使其暴露于本文公开的免疫原性肽的库、并收集刺激的CTL。优选地,免疫原性肽的库基本上由表1中列出的每个CMV肽表位氨基酸序列组成。在某些实施方案中,将暴露的样品孵育至少14天。在一些这样的实施方案中,将暴露的样品在第0天与IL-21孵育。优选地,将暴露的样品在第2天与IL-2孵育。在更优选的实施方案中,暴露样品的孵育包括每三天添加IL-2。

[0059] 在一些实施方案中,PBMC样品来自健康供体。在某些实施方案中,PBMC源自无免疫应答的供体。在一些这样的实施方案中,供体正在经历免疫抑制疗法。在一些实施方案中,供体是实体器官移植接受者。在其他实施方案中,供体正在接受抗病毒疗法。

[0060] 在一些实施方案中,将包含CTL的样品(例如,PBMC样品)与本文提供的APC(例如,在I类MHC复合物上呈递包含本文所述的CMV表位的肽的APC)孵育培养。对于从其获得T细胞的受试者,APC可以是自体的。在一些实施方案中,将含有T细胞的样品与本文提供的APC孵育2次或更多次。在一些实施方案中,在至少一种细胞因子(例如IL-2、IL-4、IL-7、IL-15和/或IL-21)的存在下,将T细胞与APC孵育。使用APC诱导T细胞增殖的示例性方法提供于,例如美国专利公开号2015/0017723中,其通过引用并入本文。

[0061] 在某些方面,本文提供了包含T细胞(例如,本文提供的CMV肽特异性CTL)和/或本文提供的APC的组合物(例如,治疗性组合物)。在一些实施方案中,通过向受试者施用有效量的组合物,此类组合物用于治疗 and/或预防受试者的CMV感染、重新激活和/或疾病。对于受试者,T细胞和/或APC可以是自体的或不是自体的。在一些实施方案中,在将T细胞和/或APC施用于受试者之前,将其存储在细胞库中。在某些实施方案中,受试者可以是实体器官移植接受者。

[0062] 药物组合物

[0063] 在一些方面,本文提供了与药学上可接受的载体一起配制的包含CTL的组合物(例如,药物组合物)或其制剂,以及施用这种药物组合物的方法。

[0064] 在一些实施方案中,组合物可以进一步包含佐剂。如本文所用,术语“佐剂”广义地是指免疫学或药理学试剂,其在体外或体内改变或增强对组合物的免疫应答。例如,佐剂可能增加抗原随时间的存在、帮助吸收抗原呈递细胞抗原、激活巨噬细胞和淋巴细胞、并支持细胞因子的产生。通过改变免疫反应,佐剂可以允许较小剂量的免疫相互作用试剂或制剂,以增加剂量效力或安全性。例如,佐剂可以防止T细胞衰竭,从而增加特定免疫相互作用试剂或制剂的有效性或安全性。佐剂的示例包括但不限于免疫调节蛋白、佐剂65、 α -GalCer、磷酸铝、氢氧化铝、磷酸钙、 β -葡聚糖肽、CpG DNA、GPI-0100、脂质A及其修饰形式(例如,单磷酸化脂质A、脂多糖、Lipovant、Montanide、N-乙酰基-胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷氨酰胺、Pam3CSK4、quil A和海藻糖二霉菌酸酯)。

[0065] 制备这些制剂或组合物的方法包括使本文所述的试剂与载体和任选地,一种或多种辅助成分组合的步骤。通常,通过将本文所述的试剂与液体载体或细分的固体载体或两者均匀且紧密地组合,然后,如果需要,将产品成型来制备制剂。

[0066] 适用于肠胃外施用的本发明的药物组合物包含一种或多种本文所述的试剂,以及一种或多种药学上可接受的无菌等渗水性溶液或非水性溶液、分散液、悬浮液或乳剂、或可以在使用前重构为无菌注射液或分散液的无菌粉末,其中可含有糖、醇、抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂、使制剂与预定接受者的血液等渗的溶质、或悬浮剂或增稠剂。

[0067] 可以在本发明的药物组合物中使用的合适的水性和非水性载体的示例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油,例如橄榄油和可注射的有机酯,例如油酸乙酯。例如,通过使用包衣材料(例如卵磷脂),在分散液的情况下,通过保持所需的粒径,以及通过使用表面活性剂,可以保持适当的流动性。

[0068] 不论选择何种施用途径,都可以通过本领域技术人员已知的常规方法将本发明的试剂(其可以合适的水合形式使用)和/或本发明的药物组合物配制成药学上可接受的剂型。

[0069] 治疗方法

[0070] 在某些实施方案中,本文提供了在受试者中治疗或预防CMV感染、重新激活和/或疾病(例如,实体器官移植接受者中的终末器官疾病)的方法,所述方法包括向受试者施用根据本文提供的方法制备的肽特异性T细胞(或包含所述T细胞的药物组合物)。

[0071] 在一些实施方案中,本文提供了治疗或预防受试者的CMV感染的方法。在某些实施方案中,本文提供了治疗或预防受试者的CMV重新激活或CMV相关病症的方法。在优选的实施方案中,所述方法包括向受试者施用根据本文提供的方法制备的CTL。例如但不限于,根据本文提供的方法,将分离的PBMC样品暴露于免疫原性肽的库。在一些这样的实施方案中,免疫原性肽的库诱导CMV肽特异性T细胞的刺激和增殖。在一些实施方案中,向受试者施用的CTL是自体的。在某些实施方案中,感染是复发性CMV感染。在一些实施方案中,所治疗的受试者是无免疫应答的。例如,在一些实施方案中,受试者患有T细胞缺陷。在一些实施方案中,受试者患有白血病、淋巴瘤或多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,所述受试者感染了HIV和/或患有艾滋病。在一些实施方案中,受试者已经进行了组织、器官和/或骨髓移植。在一

些这样的实施方案中,受试者是实体器官移植接受者。在一些实施方案中,向受试者施用免疫抑制药物。在一些实施方案中,受试者已经和/或正在经历化疗。在一些实施方案中,受试者已经和/或正在经历放疗。

[0072] 在一些实施方案中,还向受试者施用抗病毒药。在一些这样的实施方案中,抗病毒药用于治疗CMV感染(例如,抗病毒药抑制CMV复制)。例如,在一些实施方案中,向受试者施用更昔洛韦、缬更昔洛韦、膦甲酸、西多福韦、阿昔洛韦、福米韦生、马里巴韦、BAY38-4766或GW275175X。在某些实施方案中,CMV感染是药物抗性的。例如,在一些实施方案中,CMV感染是更昔洛韦抗性的。

[0073] 可以通过任何合适的方法,例如流式细胞术评估CMV肽特异性T细胞表达的生物标志物。在一些实施方案中,通过CMV特异性肽刺激CMV肽特异性T细胞,并通过流式细胞术分选。优选地,根据实施例1、4、5或其任何组合中举例说明的方案,对CMV肽特异性T细胞进行刺激和/或表面染色。在一些实施方案中,将CMV肽特异性T细胞与一种或多种对CD107a具有特异性的抗体孵育,然后通过流式细胞术进行分选。在一些实施方案中,将CMV肽特异性T细胞与一种或多种结合细胞内细胞因子的抗体孵育,例如,对IFN γ 、IL-2和/或TNF具有特异性的抗体。在一些实施方案中,将CMV肽特异性T细胞与针对细胞内细胞因子的抗体孵育,然后通过流式细胞术进行分选。

[0074] 在一些方面,本文提供了选择用于过继性免疫疗法的受试者的方法,所述方法通过以下进行:从受试者获得PMBC样品、分离自体T细胞、确定自体T细胞的CMV反应性,如果至少1%、2%、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%、40%、50%、60%、70%或80%的自体T细胞具有CMV反应性,则选择所述受试者用于过继性免疫疗法。

[0075] 在一些方面,本文提供了选择用于过继性免疫疗法的受试者的方法,所述方法通过以下进行:从受试者获得包含T细胞(例如CTL)的样品、分离自体T细胞、和确定自体T细胞的CD107a表达,如果至少1%、2%、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%、40%、50%、60%、70%或80%的自体T细胞表达CD107a,则选择所述受试者用于过继性免疫疗法。

[0076] 在一些方面,本文提供了选择用于过继性免疫疗法的受试者的方法,所述方法通过以下进行:从受试者获得包含T细胞(例如CTL)的样品、分离自体T细胞、确定自体T细胞的IFN γ 表达,如果至少1%、2%、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%、40%、50%、60%、70%或80%的自体T细胞表达IFN γ ,则选择所述受试者用于过继性免疫疗法。

[0077] 在一些方面,本文提供了选择用于过继性免疫疗法的受试者的方法,所述方法通过以下进行:从受试者获得包含T细胞(例如CTL)的样品、分离自体T细胞、确定自体T细胞的TNF表达,如果至少1%、2%、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%、40%、50%、60%、70%或80%的自体T细胞表达TNF,则选择所述受试者用于过继性免

疫疗法。

[0078] 在一些方面,本文提供了选择用于过继性免疫疗法的受试者的方法,所述方法通过以下进行:从受试者获得包含T细胞(例如CTL)的样品、分离自体T细胞、确定自体T细胞的IL-2表达,如果至少1%、2%、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%、40%、50%、60%、70%或80%的自体T细胞表达IL-2,则选择所述受试者用于过继性免疫疗法。

[0079] 在一些实施方案中,该方法进一步包括从受试者获得包含T细胞的样品(例如,从受试者获得PBMC样品)。在一些实施方案中,从样品中分离自体T细胞(例如,CD4+T细胞或CD8+T细胞)。在一些实施方案中,样品主要或完全由自体T细胞组成。

[0080] 本文提供了治疗或预防受试者中CMV感染的方法,所述方法包括向受试者施用表达T细胞受体的免疫原性肽库刺激的T细胞(例如,自体CMV肽特异性CTL),所述T细胞受体特异性结合一种或多种在I类和/或II类MHC上呈递的CMV肽(例如表1中列出的任何一种肽或其组合)。在一些实施方案中,样品中至少1%、2%、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%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的T细胞(例如,CTL)表达CD107a。在一些实施方案中,样品中至少1%、2%、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%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的T细胞(例如,CTL)表达IFN γ 。在一些实施方案中,样品中至少1%、2%、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%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的T细胞(例如,CTL)表达TNF。在一些实施方案中,样品中至少1%、2%、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%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的T细胞(例如,CTL)表达IL-2。

[0081] 在一些实施方案中,样品中至少1%、2%、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%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或90%的T细胞(例如,CTL)表达CD107a和IFN γ 。

[0082] 在一些实施方案中,样品中至少1%、2%、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%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或90%的T细胞(例如,CTL)表达CD107a和TNF。

[0083] 在一些实施方案中,样品中至少1%、2%、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%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或90%的T细胞(例如,CTL)表达CD107a和IL-2。

[0084] 在一些实施方案中,样品中至少1%、2%、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%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或90%的T细胞(例如,CTL)表达IFN γ 和TNF。

[0085] 在一些实施方案中,样品中至少1%、2%、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%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或90%的T细胞(例如,CTL)表达IFN γ 和IL-2。

[0086] 在一些实施方案中,样品中至少1%、2%、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%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或90%的T细胞(例如,CTL)表达TNF和IL-2。

[0087] 在一些实施方案中,样品中至少1%、2%、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%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或90%的T细胞(例如,CTL)表达IFN γ 、TNF和IL-2。

[0088] 在一些实施方案中,样品中至少1%、2%、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%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、

56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或90%的T细胞(例如,CTL)表达CD107a、TNF和IL-2。

[0089] 在一些实施方案中,样品中至少1%、2%、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%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或90%的T细胞(例如,CTL)表达CD17a、IFN γ 和IL-2。

[0090] 在一些实施方案中,样品中至少1%、2%、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%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或90%的T细胞(例如,CTL)表达CD107a、IFN γ 和TNF。

[0091] 在一些实施方案中,样品中至少1%、2%、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%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或90%的T细胞(例如,CTL)表达CD107a、IFN γ 、TNF和IL-2。

[0092] 在本文公开的方法的一些实施方案中,T细胞(例如,CTL)显示出对衍生自多种CMV抗原的多种肽表位的反应性。1%、2%、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%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或90%的T细胞(例如,CTL)对多于一种的CMV表位有反应性。在某些实施方案中,T细胞(例如,CTL)对表1中列出的任一个CMV肽表位氨基酸序列或其组合具有反应性。在一些实施方案中,T细胞(例如,CTL)对pp50、pp65、IE-1、gB、gH中的任一个或其组合具有反应性。

[0093] 可以通过本文公开的任何一种方法,例如通过暴露于免疫原性CMV肽表位的库,在T细胞(例如,CTL)扩增之前或之后,测量和/或分析T细胞生物标志物的表达和/或CMV反应性。

[0094] 在一些实施方案中,在刺激T细胞(例如,CTL)之前定量CMV反应性和生物标志物表

达。替代地或另外地,可以在刺激T细胞(例如,CTL)之后定量CMV反应性和生物标志物表达。在一些实施方案中,通过定量样品中表达CD107a的T细胞的百分比来测量CMV反应性。在一些实施方案中,通过定量样品中表达IFN γ 的T细胞的百分比来测量CMV反应性。在一些实施方案中,通过定量样品中表达TNF的T细胞的百分比来测量CMV反应性。在一些实施方案中,通过定量样品中表达IL-2的T细胞的百分比来测量CMV反应性。在一些实施方案中,CMV反应性测量为表达多种生物标志物(例如,CD107a、IFN γ 、TNF和IL-2中的两个或更多个,优选全部四个)的T细胞的百分比。在一些实施方案中,通过定量样品中表达CD107a、IFN γ 、TNF和IL-2的自体T细胞的百分比来计算CMV反应性。可以在CMV反应性百分比定量之前或之后从样品(例如,PBMC样品或包含T细胞的样品)分离T细胞。因此,在一些实施方案中,CMV反应性是在主要包含T细胞的样品中具有一种或多种所需特征的T细胞的百分比。

[0095] 在一些实施方案中,通过定量样品中表达CD107a的CD8+淋巴细胞的百分比来测量CMV反应性。在一些实施方案中,通过定量样品中表达IFN γ 的CD8+淋巴细胞的百分比来测量CMV反应性。在一些实施方案中,通过定量样品中表达TNF的CD8+淋巴细胞的百分比来测量CMV反应性。在一些实施方案中,通过定量样品中表达IL-2的CD8+淋巴细胞的百分比来测量CMV反应性。在一些实施方案中,CMV反应性测量为表达多种生物标志物(例如,CD107a、IFN γ 、TNF和IL-2中的两个或更多个,优选全部四个)的CD8+淋巴细胞的百分比。可以在CMV反应性百分比定量之前或之后从样品(例如,PBMC样品或CD8+淋巴细胞的样品)中分离CD8+淋巴细胞。因此,在一些实施方案中,CMV反应性是在主要包含CD8+淋巴细胞的样品中具有一种或多种所需特征的CD8+淋巴细胞的百分比。

[0096] 在一些实施方案中,通过定量样品中表达CD107a的CD3+淋巴细胞的百分比来测量CMV反应性。在一些实施方案中,通过定量样品中表达IFN γ 的CD3+淋巴细胞的百分比来测量CMV反应性。在一些实施方案中,通过定量样品中表达TNF的CD3+淋巴细胞的百分比来测量CMV反应性。在一些实施方案中,通过定量样品中表达IL-2的CD3+淋巴细胞的百分比来测量CMV反应性。在一些实施方案中,CMV反应性测量为表达多种生物标志物(例如,CD107a、IFN γ 、TNF和IL-2中的两个或更多个,优选全部四个)的CD3+淋巴细胞的百分比。可以在CMV反应性百分比定量之前或之后从样品(例如,PBMC样品或CD3+淋巴细胞的样品)中分离CD3+淋巴细胞。因此,在一些实施方案中,CMV反应性是在主要包含CD3+淋巴细胞的样品中具有一种或多种所需特征的CD3+淋巴细胞的百分比。

[0097] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括分析CMV肽特异性T细胞(例如CTL)的CD107a、IFN γ 、TNF或IL-2的表达,如果至少1%、2%、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%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或90%的CMV肽特异性T细胞(例如,CTL)表达CD107a、IFN γ 、TNF或IL-2,则向受试者施用CMV肽特异性自体T细胞(例如,CTL)。

[0098] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括分析CMV肽特异性T细胞(例如CTL)的多种生物标志物的表达,如果CMV肽特异性T细胞表达至少两种生物标志物,则向受试者施用

CMV肽特异性T细胞。在一些实施方案中,所述方法进一步包括分析CMV肽特异性T细胞(例如CTL)的CD107a和TNF的表达,如果至少1%、2%、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%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或90%的CMV肽特异性T细胞(例如,CTL)表达CD107a和TNF,则向受试者施用肽特异性自体T细胞(例如,CTL)。

[0099] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括分析CMV肽特异性T细胞(例如CTL)的CD107a和IFN γ 的表达,如果至少1%、2%、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%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或90%的CMV肽特异性T细胞(例如,CTL)表达CD107a和IFN γ ,则向受试者施用CMV肽特异性T细胞(例如,CTL)。

[0100] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括分析增殖的肽特异性自体T细胞(例如CTL)的CD107a和IL-2的表达,如果至少1%、2%、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%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或90%的CMV肽特异性T细胞(例如,CTL)表达CD107a和IL-2,则向受试者施用CMV肽特异性T细胞(例如,CTL)。

[0101] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括分析CMV肽特异性T细胞(例如CTL)的TNF和IL-2的表达,如果至少1%、2%、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%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或90%的CMV肽特异性T细胞(例如,CTL)表达TNF和IL-2,则向受试者施用CMV肽特异性自体T细胞(例如,CTL)。

[0102] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括分析CMV肽特异性T细胞(例如CTL)的IFN γ 和IL-2的表达,如果至少1%、2%、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%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或90%的CMV肽特异性自体T细胞(例如,CTL)表达IFN γ 和IL-2,则向受试者施用CMV肽特异性T细胞(例如,CTL)。

[0103] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括分析增殖的CMV肽特异性T细胞(例如CTL)的IFN γ 和TNF的表达,如果至少1%、2%、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%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或90%的CMV肽特异性T细胞(例如,CTL)表达IFN γ 和TNF,则向受试者施用CMV肽特异性T细胞(例如,CTL)。

[0104] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括分析CMV肽特异性T细胞(例如CTL)的CD107a、IFN γ 和TNF的表达,如果至少1%、2%、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%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或90%的CMV肽特异性T细胞(例如,CTL)表达CD107a、IFN γ 和TNF,则向受试者施用CMV肽特异性T细胞(例如,CTL)。

[0105] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括分析CMV肽特异性T细胞(例如CTL)的CD107a、IFN γ 和IL-2的表达,如果至少1%、2%、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%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或90%的CMV肽特异性T细胞(例如,CTL)表达CD107a、IFN γ 和IL-2,则向受试者施用CMV肽特异性T细胞(例如,CTL)。

[0106] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括分析CMV肽特异性T细胞(例如CTL)的CD107a、IL-2和TNF的表达,如果至少1%、2%、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%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、

72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或90%的CMV肽特异性T细胞(例如,CTL)表达CD107a、IL-2和TNF,则向受试者施用肽特异性T细胞(例如,CTL)。

[0107] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括分析CMV肽特异性T细胞(例如CTL)的IFN γ 、IL-2和TNF的表达,如果至少1%、2%、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%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或90%的CMV肽特异性T细胞(例如,CTL)表达IFN γ 、IL-2和TNF,则向受试者施用CMV肽特异性T细胞(例如,CTL)。

[0108] 在一些实施方案中,如果至少1%、2%、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%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或90%的CMV肽特异性自体T细胞(例如,CTL)表达CD107a、IFN γ 、TNF和IL-2,则向受试者施用自体T细胞(例如,CTL)。

[0109] CMV肽特异性自体T细胞(例如CTL)可以具有至少1%、2%、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%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或90%的CMV反应性。

[0110] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括分析CMV肽特异性T细胞(例如,CTL)的CMV反应性,并且,如果反应性是针对多于一个表位的,并且至少CMV肽特异性T细胞(例如CTL)的阈值百分比(例如,至少1%、2%、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%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%或90%)是具有CMV反应性的,则向受试者施用CMV肽特异性T细胞(例如CTL)。

[0111] 在一些实施方案中,向受试者施用每剂量约 1×10^5 至约 1×10^8 个T细胞。在一些实施方案中,向受试者施用每剂量约 1×10^6 至约 1×10^7 个T细胞。在一些实施方案中,向受试者施用 5×10^6 、 1×10^7 、 1.5×10^7 或 2×10^7 个T细胞(例如,CTL)。可以向受试者施用多个剂量。

在一些实施方案中,施用初始剂量的T细胞(例如,自体CTL),并且例如在治疗过程中以增加的剂量施用一种或多种其他剂量的T细胞(例如,自体CTL)。在一些实施方案中,施用两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个、九个或更多个、或十个或更多个剂量。可以向受试者施用与初始剂量相同或不同的其他剂量。例如,可以施用较低的剂量,然后施用较高的剂量。剂量可以每天一次、每周两次、每周一次、每两周一次、每月一次、每两个月一次、每三个月一次或每六个月一次施用。在一些实施方案中,受试者没有经历任何由于T细胞(例如自体CTL)施用的副作用。

[0112] 在一些方面,所述方法进一步包括通过测量患有CMV感染、重新激活或相关疾病的受试者中的CMV病毒载量来评估过继性免疫疗法的功效。在一些实施方案中,受试者已经接受了实体器官移植。作为非限制性实例,可以通过以下测量CMV病毒载量:从受试者获得第一样品(例如血液样品)、使用本领域已知的方法(优选在CTL施用之前)评估第一样品中的病毒载量、一段时间后,从受试者获得第二样品(优选在CTL施用之后)、评估第二样品中的病毒载量,如果第二样品中的病毒载量小于第一样品中的病毒载量,则CMV感染、重新激活或相关疾病已改善和/或没有进展。可以获取其他样品并将其与之前的样品进行比较。本文还提供了通过向受试者施用免疫原性肽库刺激的T细胞(例如,本文公开的CMV肽特异性自体CTL)降低患有CMV感染、重新激活或相关疾病的受试者中病毒载量的方法。可以通过使用本领域已知的方法测量病毒载量的变化(例如,减少),例如基于核酸的测定法(例如,核酸检测(NAT)和核酸扩增测试(NAAT))或非核酸测试(例如,定量酶免疫测定法)。施用T细胞后,病毒载量可减少约50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0113] 在一些实施方案中,所述方法包括通过向受试者施用免疫原性肽库刺激的T细胞(例如CTL,例如本文所述的CMV肽特异性自体CTL)改善或稳定患有CMV感染、重新激活或相关疾病的受试者的症状或病症。本文还提供了降低或解决DNA血症;和/或降低、稳定或停止感染CMV的受试者中CMV相关的终末器官疾病的方法,所述方法包括向受试者施用免疫原性肽库刺激的T细胞(例如,CTL,例如本文所述的CMV肽特异性自体CTL)。在一些实施方案中,本文还提供了降低或停止感染CMV的抗病毒疗法使用的方法,所述方法包括向受试者施用免疫原性肽库刺激的T细胞(例如,CTL,例如本文所述的CMV肽特异性自体CTL)。在优选的实施方案中,受试者已经接受了实体器官移植。在更优选的实施方案中,受试者患有更昔洛韦抗性CMV感染、重新激活或相关疾病。

[0114] 在一些实施方案中,受试者患有癌症。在一些实施方案中,本文描述的方法可用于治疗任何癌性或癌前肿瘤。在一些实施方案中,癌症表达本文提供的一种或多种CMV表位(例如,表1中列出的CMV表位)。在一些实施方案中,癌症包括实体瘤。可以通过本文提供的方法和组合物治疗的癌症包括但不限于来自膀胱、血液、骨、骨髓、脑、乳腺、结肠、食道、胃肠道、牙龈、头、肾、肝、肺、鼻咽、颈、卵巢、前列腺、皮肤、胃、睾丸、舌或子宫的癌细胞。另外,该癌症可以具体地是以下组织学类型,尽管其不限于这些:恶性肿瘤;癌;未分化癌;巨细胞和梭形细胞癌;小细胞癌;乳头状癌;鳞状细胞癌;淋巴上皮癌;基底细胞癌;毛母质癌;移行细胞癌;乳头状移行细胞癌;腺癌;恶性胃泌素瘤;胆管癌;肝细胞癌;合并肝细胞癌和胆管

癌；小梁腺癌；腺样囊性癌；腺瘤息肉中的腺癌；腺癌，家族性结肠息肉病；实体癌；恶性类癌；支气管肺泡腺癌；乳头状腺癌；发色癌；嗜酸细胞癌；嫌色细胞癌、嗜酸细胞癌、嗜氧腺癌、嗜碱性粒细胞癌、透明细胞腺癌、颗粒细胞癌、滤泡性腺癌、乳头状和滤泡性腺癌、非包膜硬化性癌、肾上腺皮质癌、子宫内膜样癌、皮肤附件癌、顶浆分泌腺癌、皮脂腺癌、耵聍腺癌、粘液表皮样癌、囊腺癌、乳头状囊腺癌、乳头状浆液性囊腺癌、粘液性囊腺癌、粘液腺癌、印戒细胞癌、浸润性导管癌、髓样癌、小叶癌、炎性癌、乳腺佩吉特氏病、腺泡细胞癌、腺鳞癌、鳞状上皮化生的腺癌、恶性胸腺瘤、恶性卵巢恶性间质瘤、恶性卵泡膜细胞瘤、恶性颗粒细胞瘤、和恶性母细胞瘤、塞尔托利细胞瘤、恶性leydig细胞瘤、恶性脂质细胞瘤、恶性神经节旁瘤、恶性乳腺旁神经节瘤、嗜铬细胞瘤、血管肉瘤、恶性黑色素瘤、无黑素性黑色素瘤、浅表扩散黑色素瘤、巨大色素痣中的恶性黑色素瘤、上皮样细胞黑色素瘤、恶性蓝色痣、肉瘤、纤维肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、黏肉瘤、脂肪肉瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、胚胎横纹肌肉瘤、肺泡横纹肌肉瘤、基质肉瘤、恶性混合肿瘤、苗勒氏混合瘤、肾母细胞瘤、肝母细胞瘤、癌肉瘤、恶性间皮瘤、恶性勃勒纳瘤、恶性叶状肿瘤、滑膜肉瘤、恶性间皮瘤、无性细胞瘤、胚胎性癌、恶性畸胎瘤、恶性卵巢甲状腺瘤、绒毛膜癌、恶性中肾瘤、血管肉瘤、恶性血管内皮瘤、卡波西氏肉瘤、恶性血管周细胞瘤、淋巴管肉瘤、骨肉瘤、皮质骨肉瘤、软骨肉瘤、恶性软骨母细胞瘤、间质软骨肉瘤、骨巨细胞瘤、尤因氏肉瘤、恶性牙源性肿瘤、成釉细胞牙肉瘤、恶性成釉细胞瘤、成釉细胞纤维肉瘤、恶性松果体瘤、脊索瘤、恶性神经胶质瘤、室管膜瘤、星形细胞瘤、原生质星形细胞瘤、纤维性星形细胞瘤、星形母细胞瘤、胶质母细胞瘤、多形胶质母细胞瘤 (GBM)、少突胶质细胞瘤、少突胶质母细胞瘤、原始神经外胚层、小脑肉瘤、神经节神经母细胞瘤、成神经细胞瘤、视网膜母细胞瘤、嗅觉神经源性肿瘤、恶性脑膜瘤、神经纤维肉瘤、恶性神经瘤、恶性颗粒细胞瘤、恶性淋巴瘤、霍奇金氏病、霍奇金淋巴瘤、副神经节瘤、小淋巴细胞恶性淋巴瘤、弥漫性大细胞恶性淋巴瘤、滤泡性恶性淋巴瘤、蕈样真菌病、其他指定的非霍奇金淋巴瘤、恶性组织细胞增生症、多发性骨髓瘤、肥大细胞肉瘤、免疫增生性小肠疾病、白血病、淋巴性白血病、浆细胞白血病、红白血病、淋巴肉瘤细胞白血病、骨髓性白血病、嗜碱性白血病、嗜酸性粒细胞白血病、单核细胞性白血病、肥大细胞白血病、巨核细胞白血病、髓样肉瘤和毛细胞白血病。

[0115] 在一些实施方案中，还向受试者施用抗癌化合物。示例性的抗癌化合物包括但不限于阿来珠单抗(**Campath®**)、阿立维甲酸(**Panretin®**)、阿那曲唑 (**Arimidex®**)、贝伐单抗 (**Avastin®**)、贝沙罗汀 (**Targretin®**)、硼替佐米 (**Velcade®**)、博舒替尼 (**Bosulif®**)、本妥昔单抗(**Adcetris®**)、卡博替尼 (Cometriq™)、卡非佐米 (Kyprolis™)、西妥昔单抗(**Erbitux®**)、克唑替尼 (**Xalkori®**)、达沙替尼 (**Sprycel®**)、Denileukin diftitox (**Ontak®**)、盐酸埃罗替尼 (**Tarceva®**)、依维莫司 (**Afinitor®**)、依西美坦 (**Aromasin®**)、氟尔西坦 (**Faslodex®**)、吉非替尼 (**Iressa®**)、依替莫单抗替舒坦 (**Zevalin®**)、甲磺酸伊马替尼 (**Gleevec®**)、依匹木单抗 (Yervoy™)、二甲苯磺酸拉帕替尼 (**Tykerb®**)、来曲唑 (**Femara®**)、尼洛替尼 (**Tasigna®**)、奥法木单抗 (**Arzerra®**)、帕尼单抗 (**Vectibix®**)、盐酸帕唑帕尼 (**Votrient®**)、帕妥珠单抗 (Perjeta™)、普拉曲沙

(Folotyn®)、雷戈非尼 (Stivarga®)、利妥昔单抗(Rituxan®)、罗米地辛(Istodax®)、
甲苯磺酸索拉非尼(Nexavar®)、苹果酸舒尼替尼(Sutent®)、他莫昔芬、替莫罗莫司
(Torisel®)、托瑞米芬(Fareston®)、托西妥单抗和131I-托西妥玛单抗(Bexxar®)、曲妥
珠单抗 (Herceptin®)、维甲酸 (Vesanoid®)、凡德他尼 (Caprelsa®)、维拉非尼
(Zelboraf®)、伏立诺他(Zolinza®)和阿柏西普(Zaltrap®)。

[0116] 在一些实施方案中,还向受试者施用化疗剂。此类化疗剂的实例包括但不限于烷基化剂,例如噻替派 (thiotepa) 和环磷酰胺 (cyclophosphamide); 烷基磺酸盐,例如白消安 (busulfan)、英丙舒凡 (improsulfan) 和哌泊舒凡 (pipsulfan); 氮丙啶 (aziridines), 例如苯并多巴 (benzodopa)、卡波醌 (carboquone)、美多巴 (meturedopa) 和尿多巴 (uredopa); 乙烯亚胺 (ethylenimines) 和甲基戊胺 (methylamelamines), 包括六甲蜜胺 (altretamine)、三亚乙基三聚氰胺 (triethylenemelamine)、三亚乙基磷酰胺 (triethylenephosphoramidate)、三亚乙基硫代磷酰胺 (triethylenethiophosphoramidate) 和三羟甲基三聚氰胺 (trimethylololomelamine); 多聚乙酰 (acetogenins) (特别是 bullatacin 和 Bullatacinone); 喜树碱 (camptothecin) (包括合成的类似物拓扑替康 (topotecan)); 溴他汀 (bryostatin); callystatin; CC-1065 (包括其阿多来新 (adozelesin)、卡折来新 (carzelesin) 和比折来新 (bizelesin) 合成类似物); 隐藻霉素 (cryptophycins) (尤其是隐藻霉素1和隐藻霉素8); 多拉司汀 (dolastatin); 杜卡霉素 (duocarmycin) (包括合成类似物 KW-2189 和 CB1-TM1); 五加素 (eleutherobin); 潘克拉汀 (pancratistatin); sarcodictyin; 海绵抑素 (spongistatin); 氮芥 (nitrogen mustards), 如苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、氯苯那嗪 (chlornaphazine)、氯磷酰胺 (cholophosphamide)、雌莫司汀 (estramustine)、异环磷酰胺 (ifosfamide)、甲氧乙胺 (mechlorethamine)、盐酸氧化氮芥 (mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑 (melphalan)、新恩比兴 (novembichin)、苯芥胆甾醇 (phenesterine)、泼尼莫司汀 (prednimustine)、曲洛磷胺 (trofosfamide)、尿嘧啶芥末 (uracil mustard); 亚硝基脲 (nitrosureas), 例如卡莫司汀 (carmustine)、氯脲霉素 (chlorozotocin)、福莫司汀 (fotemustine)、洛莫斯汀 (lomustine)、尼莫斯汀 (nimustine) 和拉尼莫斯汀 (ranimustine); 抗生素, 例如烯二炔抗生素 (例如, 加利车霉素 (calicheamicin), 特别是 calicheamicin gammall 和 calicheamicin omegall; 达尼霉素 (dynemicin), 包括达尼霉素 A; 双膦酸盐 (bisphosphonates), 如氯膦酸盐 (clodronate); 艾司米星 (esperamicin); 以及新卡司他汀发色团 (neocarzinostatin chromophore) 和相关的色蛋白烯二炔抗生素发色团 (chromoprotein enediyne antibiotic chromophores)、紫胶菌素 (aclacinomysins)、放线菌素 (actinomycin)、Authrarnycin、氮杂色氨酸 (azaserine)、博来霉素 (bleomycins)、放线菌素 C (cactinomycin)、卡拉比星 (carabycin)、卡米霉素 (caminomycin)、卡因菌素 (carzinophilin)、嗜铬菌素 (chromomycinis)、达喜霉素 (dactinomycin)、柔红霉素 (daunorubicin)、地托比星 (detorubicin)、6-重氮-5-氧-L-正亮氨酸 (6-diazo-5-oxo-L-norleucine)、阿霉素 (doxorubicin) (包括吗啉代-阿霉素 (morpholino-doxorubicin)、氰基吗啉代-阿霉素 (cyanomorpholino-doxorubicin)、2-吡

咯啉-阿霉素 (2-pyrrolino-doxorubicin) 和脱氧阿霉素 (deoxydoxorubicin)、表柔比星 (epirubicin)、埃索比星 (esorubicin)、伊达比星 (idarubicin)、马赛霉素 (marcellomycin)、丝裂霉素 (mitomycins), 如丝裂霉素C (mitomycin C)、霉酚酸 (mycophenolic acid)、诺加霉素 (nogalamycin)、寡霉素 (olivomycins)、培洛霉素 (peplomycin)、甲基丝裂霉素 (potfiromycin)、嘌呤霉素 (puromycin)、槲皮素 (quelamycin)、罗比霉素 (rodorubicin)、链霉菌素 (streptonigrin)、链脲霉素 (streptozocin)、杀结核菌素 (tubercidin)、乌苯美司 (ubenimex)、净司他丁 (zinostatin)、佐柔比星 (zorubicin)、抗代谢物, 例如甲氨蝶呤 (methotrexate) 和5-氟尿嘧啶 (5-FU); 叶酸类似物, 例如二甲叶酸 (denopterin)、甲氨蝶呤 (methotrexate)、蝶罗呤 (pteropterin)、三甲蝶呤 (trimetrexate); 嘌呤类似物, 例如氟达拉滨 (fludarabine)、6-巯基嘌呤 (6-mercaptopurine)、硫咪嘌呤 (thiamiprine)、硫鸟嘌呤 (thioguanine); 嘧啶类似物, 例如安西他滨 (ancitabine)、阿扎胞苷 (azacitidine)、6-氮杂尿苷 (6-azauridine)、卡莫呋 (carmofur)、阿糖胞苷 (cytarabine)、双脱氧尿苷 (dideoxyuridine)、多西氟啶 (doxifluridine)、恩诺西汀 (enocitabine)、氟尿苷 (floxuridine); 雄激素, 例如卡普睾酮 (calusterone)、丙酸屈他雄酮 (dromostanolone propionate)、环硫雄醇 (epitiostanol)、美雄烷 (mepitiostane)、睾丸内酯 (testolactone); 抗肾上腺素, 例如氨基谷氨酰胺 (aminoglutethimide)、米托烷 (mitotane)、曲洛司坦 (trilostane); 叶酸补充剂, 例如叶酸 (frolinic acid); 醋葡醛内酯 (aceglatone); 醛磷酰胺糖苷 (aldophosphamide glycoside); 氨基乙酰丙酸 (aminolevulinic acid); 恩尿嘧啶 (eniluracil); 安吡啶 (amsacrine); bestrabucil; 比生群 (bisantrene); edatraxate; 地忒酸胺 (defofamine); 秋水仙胺 (demecolcine); 地吡醌 (diaziquone); 伊尔福尼辛 (elformithine); 依利醋铵 (elliptinium acetate); 埃博霉素 (epothilone); 依托格鲁 (etoglucid); 硝酸镓 (gallium nitrate); 羟基脲 (hydroxyurea); 香菇多糖 (lentinan); lonidainine; 美登木素生物碱 (maytansinoids), 如美登素 (maytansine) 和安丝菌素 (ansamitocins); 米托胍脲 (mitoguazone); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 莫吡坦 (mopidanmol); nitraerine; 喷司他丁 (pentostatin); 蛋氨酸芥 (phenamet); 吡柔比星 (pirarubicin); 洛索蒽醌 (losoxantrone); 鬼臼酸 (podophyllinic acid); 2-乙基酰肼 (2-ethylhydrazide); 丙卡巴肼 (procarbazine); PSK多糖复合物; 丙亚胺 (razoxane); 利索新 (rhizoxin); 西呋喃 (sizofuran); 螺旋锗 (spirogermanium); 细交链孢菌酮酸 (tenuazonic acid); 三亚胺醌 (triaziquone); 2,2',2''-三氯三乙胺 (2,2',2''-trichlorotriethylamine); 单端孢霉烯族毒素 (trichothecenes) (特别是T-2毒素、verracurin A、杆孢菌素A (roridin A) 和胍基啶 (anguidine)); 尿烷 (urethan); 长春地碱 (vindesine); 达卡巴嗪 (dacarbazine); 甘露汀米 (mannomustine); 二溴甘露醇 (mitobronitol); 二溴卫矛醇 (mitolactol); 哌泊溴烷 (pipobroman); gacytosine; 阿拉伯糖苷 ("Ara-C"); 环磷酰胺 (cyclophosphamide); 噻替派 (thiotepa); 紫杉烷 (taxoids), 例如紫杉醇 (paclitaxel) 和多西紫杉醇 (doxetaxel); 苯丁酸氮芥 (chlorambucil); 吉西他滨 (gemcitabine); 6-硫鸟嘌呤 (6-thioguanine); 巯基嘌呤 (mercaptopurine); 甲氨蝶呤 (methotrexate); 铂配位复合物, 例如顺铂 (cisplatin)、奥沙利铂 (oxaliplatin) 和卡铂 (carboplatin); 长春碱 (vinblastine); 铂 (platinum); 依托泊苷 (etoposide) (VP-16); 异环磷酰胺 (ifosfamide); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 长春新碱

(vincristine);长春瑞滨(vinorelbine);诺万隆(novantrone);替尼泊昔(teniposide);依达曲塞(edatrexate);道诺霉素(daunomycin);氨基蝶呤(aminopterin);希罗达(xeloda);伊班膦酸(ibandronate);伊立替康(irinotecan)(例如,CPT-11);拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(difluoromethylornithine)(DMFO);维甲酸(retinoids),例如视黄酸(retinoic acid);卡培他滨(capecitabine);以及任何上述的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0117] 在一些实施方案中,还向受试者施用免疫治疗剂。免疫疗法是指利用受试者的免疫系统治疗和预防病症的治疗,例如,癌症疫苗、细胞因子、利用靶标特异性抗体、T细胞疗法、和树突状细胞疗法。

[0118] 在一些实施方案中,还向受试者施用免疫调节蛋白。免疫调节蛋白的示例包括但不限于B淋巴细胞趋化因子(“巴细胞趋)、C-C基序趋化因子11(“1趋化因子因子调节蛋)、嗜酸性粒细胞趋化蛋白2(“嗜酸性粒细胞趋化蛋白)、粒细胞集落刺激因子(“粒细胞集落刺)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(“粒细胞巨噬细胞)、1-309、细胞间粘附分子1(“细胞间粘附分子)、干扰素 γ (“干扰素 γ 附分)、白介素-1alpha(“1alph)、白介素-1beta(“IL-1 β)、白介素1受体拮抗剂(“体拮抗剂 β ”集)、白介素-2(“2介素剂)、白介素-4(“4介素剂)、白介素-5(“5介素剂)、白介素-6(“6介素剂)、白介素-6可溶性受体(“溶性受体 β ”集)、白介素-7(“7介素体)、白介素-8(“8介素体)、白介素-10(“10素体 β)、白介素-11(“11素体 β)、白介素-12亚基beta(“eta体 β ”集落刺或““ta体 β ”集落刺)、白介素-13(“13素体 β)、白介素-15(“15素体 β)、白介素-16(“16素体 β)、白介素-17(“17素体 β)、趋化因子(C-C基序)配体2(“MCP-1”)、巨噬细胞集落刺激因子(“巨噬细胞集落刺)、gamma干扰素诱导的单核因子(“扰素诱导)、趋化因子(C-C基序)配体2(“体C因子的 α)、趋化因子(C-C基序)配体4(“体C因子的 β)、巨相炎症蛋白-1-delta(“1-del δ)、血小板衍生的生长因子亚基B(“血小板衍生的生长)、趋化因子(C-C基序)配体5、对激活的调节、正常T细胞表达和分泌(“胞表达和分泌)、TIMP金属肽酶抑制剂1(“属肽酶抑制剂)、TIMP金属肽酶抑制剂2(“属肽酶抑制剂)、肿瘤坏死因子、淋巴毒素-alpha(“alpha)、肿瘤坏死因子、淋巴毒素-beta(“beta因)、1型可溶性TNF受体(“体F性a因子)、sTNFR1IAR、脑源性神经营养因子(“脑源性神经)、碱性成纤维细胞生长因子(“碱性成纤)、骨形态发生蛋白4(“生蛋白纤维细)、骨形态发生蛋白5(“骨形态发生蛋)、骨形态发生蛋白7(“骨形态发生蛋)、神经生长因子(“经生长因子蛋)、表皮生长因子(“表皮生长)、表皮生长因子受体(“表皮生长因)、内分泌腺衍生的血管内皮生长因子(“内分泌腺衍生的血)、成纤维细胞生长因子4(“成纤维细胞生)、角质形成细胞生长因子(“角质形成细胞)、生长分化因子15(“5长分化因子生)、胶质细胞衍生的神经营养因子(“胶质细胞衍)、生长激素、结合肝素的EGF样生长因子(“生长因子、结合)、肝细胞生长因子(“肝细胞生)、胰岛素样生长因子结合蛋白1(“胰岛素样生长因子)、胰岛素样生长因子结合蛋白2(“胰岛素样生长因子)、胰岛素样生长因子结合蛋白3(“胰岛素样生长因子)、胰岛素样生长因子结合蛋白4(“胰岛素样生长因子)、胰岛素样生长因子结合蛋白6(“胰岛素样生长因子)、胰岛素样生长因子1(“胰岛素样生长)、胰岛素、巨噬细胞集落刺激因子(“胰岛素、巨噬细胞)、神经生长因子受体(“生长因子受体)、神经营养蛋白-3(“3经营养蛋)、神经营养蛋白-4(“4经营养蛋)、破骨细胞生成抑制因子(“破骨细胞生成抑制因子刺激因子子节)、血小板衍生的生长因子受体(“血小板衍生的生长)、磷脂酰肌醇-聚糖生物合成(“糖生物合成)、Skp、Cullin、

包含F-box的复合物(“复合物x)、干细胞因子受体(“干细胞因子受)、转化生长因子alpha(“lpha因)、转化生长因子beta-1(“eta-1子体)、转化生长因子beta-3(“eta-3子)、血管内皮生长因子(“血管内皮生)、血管内皮生长因子受体2(“血管内皮生长因)、血管内皮生长因子受体3(“血管内皮生长因)、VEGF-D 6Kine、酪氨酸蛋白激酶受体UFO(“FO酸蛋)、细胞素(“细胞素蛋)、粘膜相关的上皮趋化因子(“粘膜相关的上)、趋化因子(C-C基序)配体27(“7C因子的上)、趋化因子(C-X-C基序)配体16(“6X-C的上皮)、C-X-C基序趋化因子5(“序趋化因子上皮)、趋化因子(C-C基序)配体26(“6C因子子上皮趋化因)、粒细胞趋化蛋白2(“粒细胞趋化蛋)、GRO、趋化因子(C-C基序)配体14(“4C因子化蛋)、趋化因子(C-C基序)配体16(“6C因子化蛋)、白介素-9(“9介素子化)、白介素-17F(“17F化蛋白)、白介素-18结合蛋白(“合蛋白F化蛋白趋化因)、白介素-28A(“28A化蛋白)、白介素29(“9介素A化蛋)、白介素31(“1介素A化蛋)、C-X-C基序趋化因子10(“0趋化因子蛋)、趋化因子受体CXCR3(“XCR3受体)、白血病抑制因子(“白血病抑)、轻、趋化因子(C基序)配体(“体、趋化因子子趋化因子e因)、单核细胞趋化蛋白2(“单CP-2”)、单核细胞趋化蛋白3(“单核细胞趋化)、单核细胞趋化蛋白4(“单核细胞趋化)、巨噬细胞衍生的趋化因子(“巨噬细胞)、巨噬细胞迁移抑制因子(“巨噬细胞)、趋化因子(C-C基序)配体20(“0C因子迁移抑)、C-C基序趋化因子19(“9趋化因子移抑)、趋化因子(C-C基序)配体23(“3C因子子移抑)、巨噬细胞刺激蛋白 α 链(“链噬细胞刺)、核小体装配蛋白1样4(“核小体装配蛋)、分泌的磷蛋白1(“骨桥蛋白”)、肺和激活调节的细胞因子(“肺和激活调)、血小板因子4(“血小板因)、基质细胞衍生的因子-1 α (“1 α 细胞衍生的)、趋化因子(C-C基序)配体17(“7C因子衍)、胸腺表达的趋化因子(“胸腺表达的)、胸腺基质淋巴细胞生成素(“胸腺基质淋巴细胞生成素)、CD 166抗原(“原166巴)、分化簇80(“0化簇66)、肿瘤坏死因子受体超家族成员17(“7瘤坏死因)、分化簇14(“4化簇死因)、分化簇30(“0化簇死因)、分化簇40(“0化簇死配体”)、癌胚抗原相关细胞粘附分子1(胆汁糖蛋白)(“糖蛋白相关细胞粘)、死亡受体6(“死亡受体)、脱氧胸苷激酶(“氧胸苷激)、1型膜糖蛋白(“膜糖蛋白酶关细胞”)、受体酪氨酸蛋白激酶erbB-3(“rbB-3蛋)、内皮细胞-白细胞粘附分子1(“细胞选择素”)、凋亡抗原1(“凋亡抗原)、Fms样酪氨酸激酶3(“酪氨酸激酶子白)、肿瘤坏死因子受体超家族成员1(“肿瘤坏死因)、肿瘤坏死因子受体超家族成员14(“4瘤坏死因)、细胞间粘附分子3(“细胞间粘附分子)、IL-1R4、IL-1RI、IL-10Rbeta、IL-17R、IL-2Rgamma、IL-21R、溶酶体膜蛋白2(“溶酶体膜蛋白m)、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(“中性粒细胞明胶酶相关脂质)、CD62L(“D6选择素”)、淋巴管内皮(“淋巴管内皮明胶)、MHC I类多肽相关序列A(“多肽相关序)、MHC I类多肽相关序列B(“多肽相关序)、NRG1-beta1、 β 型血小板衍生的生长因子受体(“血小板衍生的生长因子受)、血小板内皮细胞粘附分子(“血小板内皮细胞粘)、RAGE、甲型肝炎病毒细胞受体1(“甲型肝炎病毒)、肿瘤坏死因子受体超家族成员IOC(“0C坏死因子受体超)、Trappin蛋白转谷氨酰胺酶结合结构域(“白转谷氨酰胺酶结合结)、尿激酶受体(“尿激酶受体)、血管细胞粘附蛋白1(“血管细胞粘附”)、XEDAR、激活素A、Agouti相关蛋白(“关蛋白ti)、核糖核酸酶5(“核糖核酸酶附”白合结构)、血管生成素1、血管生成抑制素、组织蛋白酶S、CD40、隐性家族蛋白IB(“B性家族蛋白素、组)、DAN、Dickkopf相关蛋白1(“关蛋白kop)、E-钙粘蛋白、上皮细胞粘附分子(“粘蛋白、上皮)、Fas配体(FasL或CD95L)、Fc γ RIIB/C、FuUistatin、半乳凝素-7、细胞间粘附分子2(“细胞间粘附分子)、IL-13R1、IL-13R2、IL-17B、IL-2Ra、IL-2Rb、IL-23、LAP、神经元细胞粘附分子(“神经

元细胞粘)、纤溶酶原活化剂抑制剂-1(“1溶酶原活化)、血小板衍生的生长因子受体(“血小板衍生的生长)、抵抗素、基质细胞衍生因子1(“抵抗素、基质细胞)、sgpl30、分泌性卷曲相关蛋白2(“分泌性卷曲)、唾液酸结合免疫球蛋白型凝集素(“白型凝集素免疫球蛋白)、ST2、转化生长因子-转化(“转化生长因子)、Tie-2、血小板生成素(“血小板生)、肿瘤坏死因子受体超家族成员10D(“0D坏死因子受体超)、在髓样细胞上表达的触发受体1(“在髓样细胞上表)、血管内皮生长因子C(“血管内皮生长因)、VEGFR1、脂联素、脂肪酶(Adipsin)(“Adip)、甲胎蛋白(“甲胎蛋白)、血管生成素样4(“血管生成素样n)、Beta-2-微球蛋白(“球蛋白-)、基底细胞粘附分子(“基底细胞粘)、碳水化合物抗原125(“25化合物抗)、癌抗原15-3(“5-3合物抗原)、癌胚抗原(“癌胚抗原)、cAMP受体蛋白(“体蛋白原)、人表皮生长因子受体2(“人表皮生长因)、卵泡抑素、促卵泡激素(“卵泡抑素)、趋化因子(C-X-C基序)配体1(“体X-C)、人绒毛膜促性腺激素(“βHCG)、胰岛素样生长因子1受体(“体子样生G”腺激素)、IL-1sRII、IL-3、IL-18Rb、IL-21、瘦素、基质金属蛋白酶-1(“1、基质金)、基质金属蛋白酶-2(“2质金属蛋白)、基质金属蛋白酶-3(“3质金属蛋白)、基质金属蛋白酶-8(“8质金属蛋白)、基质金属蛋白酶-9(“9质金属蛋白)、基质金属蛋白酶-10(“MMP-10”)、基质金属蛋白酶-13(“MMP-13”)、神经细胞粘附分子(“NCAM-1”)、巢蛋白(“Nidogen-1”)、神经元特异性烯醇酶(“NSE”)、制瘤素M(“OSM”)、降钙素原、催乳素、前列腺特异性抗原(“催乳素)、结合唾液酸的Ig样凝集素9(“凝集素液酸的腺特异)、ADAM 17内肽酶(“肽酶M1)、甲状腺球蛋白、金属蛋白酶抑制剂4(“状腺球蛋白、金)、TSH2B4、含有解聚素和金属蛋白酶结构域的蛋白9(“含有解聚素和金)、血管生成素2、肿瘤坏死因子配体超家族成员13/富含酸性亮氨酸的核磷蛋白32家族成员B(“族成员亮氨酸)、骨形态发生蛋白2(“骨形态发生蛋)、骨形态发生蛋白9(“骨形态发生蛋)、补体成分5a(“a体成分)、组织蛋白酶L、CD200、CD97、Chemerin、肿瘤坏死因子受体超家族成员6B(“B瘤坏死因)、脂肪酸结合蛋白2(“脂肪酸结合蛋)、成纤维细胞活化蛋白、α(“成纤维细)、成纤维细胞生长因子19(“9纤维细胞生长)、半乳凝素-3、肝细胞生长因子受体(“肝细胞生长因)、IFN-alpha/beta R2、胰岛素样生长因子2(“胰岛素样生长)、胰岛素样生长因子2受体(“体胰岛素样生长因子)、白介素-1受体6(“体介素样生长因子)、白介素24(“4介素样生长)、白介素33(“3素素样生长、激肽释放酶14、天冬酰胺基内肽酶(“天冬gumain”)、氧化的低密度脂蛋白受体1(“氧化的低密度)、甘露糖结合凝集素(“甘露糖结)、脑啡肽酶(“脑啡肽酶)、Notch同源物1、易位相关的(果蝇)(“(位相关合凝集素)、肾母细胞瘤过表达(“肾母细胞)、骨激活素、程序性细胞死亡蛋白1(“序性细胞死)、N-乙酰基胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶(“氨酸酰胺酶亡蛋)、Serpina4、分泌的卷曲相关蛋白3(“分泌的卷曲相关)、血栓调节蛋白、Toll样受体2(“受体1节蛋)、肿瘤坏死因子受体超家族成员10A(“0A坏死因子受体超)、转铁蛋白(“转铁蛋白)、WIF-1ACE-2、白蛋白、AMICA、血管生成素4、B细胞活化因子(“胞活化因子)、碳水化合物抗原19-9(“9-9合物抗原)、CD 163、丛集素、CRT AM、趋化因子(C-X-C基序)配体14(“4X-CM抗原)、胱抑素C、Decorin(“ecor)、Dickkopf相关蛋白3(“关蛋白kop)、Delta样蛋白1(“蛋白tao)、胎球蛋白A、肝素结合生长因子1(“肝素结合生)、叶酸受体α(“叶酸受体α长)、弗林蛋白酶、GPCR相关分选蛋白1(“关分选蛋白、因)、GPCR相关分选蛋白2(“关分选P-2”)、粒细胞集落刺激因子受体(“粒细胞集落刺激)、丝氨酸蛋白酶肝素(“蛋白酶肝素刺)、白介素-17B受体(“体7B肝素刺激因子)、白介素27(“7介素肝素刺)、淋巴细胞激活基因3(“淋巴细胞激活)、载脂蛋白A-V(“-V蛋白激活)、胃蛋白酶原I、视黄醇结

合蛋白4 (“视黄醇结合)、SOST、硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (“硫酸乙酰肝素蛋白聚糖体)、肿瘤坏死因子受体超家族成员13B (“3B坏死因)、组织因子途径抑制剂 (“组织因子途)、TSP-1、肿瘤坏死因子受体超家族成员10b (“0b坏死因子受体超)、TRANCE、肌钙蛋白I、尿激酶纤溶酶原激活物 (“尿激酶纤)、钙粘蛋白5、2型或VE-钙粘蛋白 (血管内皮) 也称为CD144 (“D14钙粘蛋白”)、WNT1诱导的信号传导通路蛋白1 (“导的信号传导通) 和核因子 κ 核的受体激活剂 (“受体激活剂)。

[0119] 在一些实施方案中,还向受试者施用免疫检查点抑制剂。免疫检查点抑制广义上是指抑制癌细胞产生的妨碍或下调免疫应答的检查点。免疫检查点蛋白的示例包括但不限于CTLA4、PD-1、PD-L1、PD-L2、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、KIR、LAG3、TIM-3或VISTA。免疫检查点抑制剂可以是结合并抑制免疫检查点蛋白的抗体或其抗原结合片段。免疫检查点抑制剂的示例包括但不限于纳武单抗、派姆单抗、匹立单抗 (pidilizumab)、AMP-224、AMP-514、STI-A1110、TSR-042、RG-7446、BMS-936559、MEDI-4736、MSB-0020718C、AUR-012和STI-A1010。

[0120] 在一些实施方案中,预防性地施用本文提供的组合物 (例如本文提供的疫苗组合物) 以预防癌症和/或CMV感染。在一些实施方案中,施用疫苗以抑制肿瘤细胞扩增。可以在检测患者的癌细胞或CMV感染的细胞之前或之后施用疫苗。抑制肿瘤细胞扩增被理解是指预防、停止、减慢肿瘤细胞的生长或杀死肿瘤细胞。在一些实施方案中,在施用包含本文所述的肽、核酸、抗体或APC的疫苗后,诱导了促炎反应。促炎性免疫反应包括促炎性细胞因子和/或趋化因子的产生,例如产生干扰素 γ (IFN- γ) 和/或白介素2 (IL-2)。促炎性细胞因子和趋化因子是本领域众所周知的。

[0121] 联合疗法包括相继、同时和分别和/或以下述方式共同施用活性化合物,即在施用后续治疗时,所施用的第一试剂的治疗效果并未完全消失。在一些实施方案中,第二试剂可以与第一试剂共同配制或配制成单独的药物组合物。

[0122] 可以改变本文提供的药物组合物中的活性成分的实际剂量水平,以便获得这样一种活性成分的量,其对于特定患者、组合物和施用方式,有效实现期望的治疗反应,而对患者无毒。

[0123] 选择的剂量水平将取决于多种因素,包括所用特定试剂的活性、施用途径、施用时间、所用特定化合物的排泄或代谢速率、治疗持续时间、与所用特定化合物组合使用的其他药物、化合物和/或物质、所治疗患者的年龄、性别、体重、状况、一般健康以及既往病史、以及医学领域众所周知的类似因素。

[0124] 在一些实施方案中,本文提供的方法进一步包括使用本文提供的治疗方法 (例如,通过向受试者施用本文提供的药物组合物) 来治疗所鉴定的受试者。

[0125] 实施例

[0126] 实施例1:患者特征

[0127] 为了评估在患有CMV相关并发症的实体器官移植 (SOT) 接受者中自体T细胞疗法的安全性,选择患者,并且一旦其满足以下四个标准之一,则认为合格:

[0128] (A) 成功的初始疗法之后的CMV重新激活或疾病 (如组织学所定义),例如更昔洛韦抗性CMV重新激活;

[0129] (B) 持续性CMV疾病,即对2周的挽救膦甲酸或其他二线抗病毒试剂无反应,例如,

由于对二线药物治疗不应性导致的复发的CMV再发作；

[0130] (C) 尽管进行了适当的抗病毒疗法,但仍持续存在CMV复制(通过PCR超过6周);或者

[0131] (D) 基于不耐受或终末器官限制(例如肾功能不全、骨髓功能不全)而禁忌抗病毒疗法时的任何CMV重新激活或疾病,例如终末器官CMV疾病或对抗病毒药物疗法的不耐受。

[0132] 根据机构指南施用抗病毒药物疗法。患者每两周接受至多六个剂量的 $1-2 \times 10^7$ 细胞/ m^2 体外扩增的T细胞。在过继性T细胞疗法完成后的28周内,对每位参与者进行安全性、临床症状、病毒载量和免疫重建的监测。如前所述(Hill等人2016Am J Transplant 2010; 10(1):173-9),使用内部的定量测定法进行病毒载量监测。

[0133] 结果

[0134] 表2提供了该研究中参与者的临床特征。该研究中总共包括21位SOT接受者(13位肾脏、8位肺、1位心脏)。随访分析中包括的两名肺移植患者先前已根据治疗药物管理局的特殊准入方案进行了治疗(Holmes-Liew等人Clinical&translational immunology 2015; 4(3):e35;Pierucci等人J Heart Lung Transplant 2016;35(5):685-7)。在分析的21位患者中,有13位SOT接受者被指定进行干预,接受最多六个剂量的过继性T细胞疗法。一名患者在一个剂量后停止疗法,未进行免疫监测。其余八名患者中,有七名由于其临床状况的改善而未接受过继性T细胞疗法,没有为一名患者准备疗法。

[0135] 表2:参与研究的SOT接受者的临床资料

[0136]

病人代码	年龄/性别	器官	募集标准	免疫抑制	抗病毒治疗	药物抗性	CMV 疾病病史	供体/接受者CMV状态
1553PAH01	61M	肾	B,C	TAC; MMF; MePRD	GCV; FOS	Nil	胃、肺、结肠	+/-
1553PAH02	45F	肾	A	TAC; MMF; PRD	VGCV	Nil	结肠	+/+
1553PAH03	57M	肾	A	CSA; PRD	VGCV; GCV	Nil	未检测到	Unk/+
1553PAH04	64F	肾	A	TAC; MMF; PRD	VGCV	Nil	结肠	+/+
1553PAH05	23M	肾	C	TAC; MMF; PRD	VGCV; GCV; FOS; LEF	Nil	结肠炎, 肺炎	+/+
1553PAH06	57M	肾	A	TAC; MMF;	VGCV; GCV	GCV	结肠炎	-/-

[0137]

				PRD				
1553PAH07	26F	肾	A	TAC; MMF; PRD	VGCV; GCV	N.A.	结肠炎	++
1553PAH08	26M	肾	B,C	TAC; MMF; PRD	VGCV; GCV; FOS	Nil	未检测到	+/-
1553PAH09	44M	肾	C	TAC; MMF; PRD; MePRD	VGCV; GCV	Nil	未检测到	+/-
1553PAH10	53F	肾	A	TAC; MMF; PRD	VGCV; GCV	Nil	未检测到	++
1553PAH11	45M	肾	C	TAC; MMF; PRD	VGCV; GCV	Nil	未检测到	+/-
1553PAH12	43F	肾	C	TAC; MMF; PRD	VGCV; GCV	Nil	未检测到	+/-
1553PAH13	53M	肾	A	TAC; MMF; PRD	VGCV; GCV	Nil	未检测到	++
1553PCH01	62M	肺	B	EVR, PRD	GCV; FOS	GCV	食道炎	-/-
1553PCH02	55M	肺	A	TAC; MMF; EVR; AZA; PRD	VGCV; GCV; FOS; IVIG	GCV	结肠炎	++
1553PCH03	62F	肺	C	TAC; MMF; EVR; AZA; MYF	VGCV; GCV; FOS	Nil	肺炎	+/-
1553PCH04	29F	肺	A	CSA;	VGCV;	GCV	肺炎, 结肠	+/-

[0138]

				TAC; MMF; EVR	GCV; FOS; IVIG; LEF		炎	
1553PCH05	66M	肺	A	CSA; TAC; MMF; AZA	VGCV; GCV	Nil	结肠炎, 口腔溃疡	+/-
1553RAH01	64M	肺	D	TAC; PRD	VGCV; GCV	N.A.	肺	+/-
SASRAH01	41F	肺	A,B	TAC; PRD; AZA; EVR; LEF; MePRD	VGCV; GCV; FOS	GCV ULP7 L595S	肝炎, 肺	+/-
SASSVH01	56M	肺	A,B	N.A.	VGCV; GCV; FOS; CDV	GCV; L595S; FOS; UL54; L415N; S734P; I840T	未检测到	+/-
1553PCH06	61M	心脏	D	CSA; MMF	VGCV	Nil	Nil	+/+

[0139] N.A. 没有获得;

[0140] A: 成功的初始疗法后, CMV重新激活或疾病(如组织学所定义)。

[0141] B: 持续性CMV疾病, 即, 对挽救膦甲酸或其他二线抗病毒试剂2周无反应。

[0142] C: 尽管进行了适当的抗病毒疗法, 但仍持续存在CMV复制(通过PCR超过6周)。

[0143] D: 基于不耐受或终末器官限制(例如肾功能不全、骨髓功能不全)而禁忌抗病毒疗法时的任何CMV重新激活或疾病。

[0144] AZA: 硫唑嘌呤(Azathioprine);

[0145] CSA: 环孢菌素(Cyclosporin)

[0146] EVR: 依维莫司(Everolimus);

[0147] LEF: 来氟米特(Leflunomide);

[0148] MePRD: 甲基泼尼松龙; (Methylprednisolone)

[0149] MMF: 麦考酚酯(Mycophenolate);

[0150] PRD: 泼尼松龙(Prednisolone);

[0151] TAC: 他克莫司(Tacrolimus)

[0152] CDV: 西多福韦(Cidofovir);

[0153] FOS: 膦甲酸(Foscarnet);

[0154] GCV:更昔洛韦(Gancyclovir);

[0155] VGCV:缙更昔洛韦(Valgancyclovir)

[0156] 实施例2:T细胞疗法的准备

[0157] 为了产生CMV特异性T细胞疗法,在存在IL-21(第0天,40ng/mL)时,用临床级CMV肽库分别刺激从每位患者获得的外周血单核细胞(PBMC),该库包括pp65、pp50、IE-1、gH和gB的预定义HLA I类和II类限制性肽表位(表1)。然后将刺激的样品在Greiner-10培养瓶(Wilson Wolf Corporation, Saint Paul, MN)中以 $2-5 \times 10^6$ 细胞/cm²的起始细胞密度进行培养。这些培养物在第2天及其后每三天补充IL-2(120IU/mL)。在第14天,收获扩增的T细胞并冷冻在含有10%二甲基亚砜(WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach, 德国)的Alpexex 4(CSL Behring, Broadmeadows, 澳大利亚)中的1mL单剂量等分试样中。输注前测试T细胞是否受到微生物污染,并使用Multitest 6色TBNK试剂(BD Biosciences, San Jose, CA)和细胞内细胞因子染色(如下详述)对表型和功能进行表征。为了进行过继性转移,将T细胞融入19mL临床级生理盐水中,并在5-10分钟期间内静脉内输注。

[0158] 结果

[0159] 从21例患者中的20例成功扩增了CMV特异性T细胞,并通过细胞内IFN- γ 分析评估了其抗原特异性(表3)。CMV肽库扩增的细胞主要是CD3+CD8+T细胞(图1A),中位特异性为51.2%(图1B)。肾和肺/心脏移植接受者(图1C)或移植前CMV血清阳性和CMV血清阴性个体(图1D)之间,产生IFN- γ 的CD8+T细胞的频率无显著差异。在体外扩增后,观察到CMV特异性T细胞的多功能性显著改善,能够产生IFN- γ 、TNF和CD107a的细胞比例增加(图1E)。从大多数患者产生的T细胞显示出对多种CMV抗原编码的多种肽表位的反应性(表3)。

[0160] 表3:来自SOT接受者体外扩增的T细胞的CMV特异性反应性

[0161]

患者代码	器官接受者 HLA 类型	器官供体 HLA 类型	CMV 特异性 T 细胞反应 #		靶向的 CMV 表位
			离体(刺激前)	第 14 天	
1553PAH01	A1 A11 B8 B60	A31 A33 B51 B58	0.24	0.0	N.A.
1553PAH02	A2 A34 B44 B75	A1 A2 B44 B44	5.15	79.9	NLV (pp65, A2); VLE/YIL (IE-1, A2) DEL (IE-1, B44)
1553PAH04	A2 A25 B7 B35	A2 A24 B7 B62	0.43	47.6	RPH (pp65, B7); TPR (pp65, B7)
1553PAH05	A24 A34 B56 Cw1 Cw7	A3 A31 B51 B7	0.05	24.3	QYD (pp65, A24)
1553PAH06	A2 A32 B7 B27	A2 A11 B13 B46	17.67	77.2	NLV (pp65, A2); RPH (pp65, B7); TPR (pp65, B7)
1553PAH07	A2 A2 B44 B51	A2 A2 B7 B44	0	36.5	NLV (pp65, A2)
1553PAH08	A1 A29 B8 B52	A1 A2 B44 B57	0	22.9	VTE (pp50, A1); ELR/K (IE-1, B8);
1553PAH09	A3 A29 B44 B45 Cw6 Cw16	A2 A3 B7 B51	0.09	48.4	TRA (pp65, Cw6)
1553PAH10	A11 A24 B7 B55 Cw7 Cw7	A2 A31 B62 B60	3.14	66.0	RPH (pp65, B7); TPR (pp65, B7); QYD (pp65, A24); AYA (IE-1, A24)
1553PAH11	A3 A24 B35 B60	A2 A23 B44 B62	3.21	59.1	IPS (pp65, B35); AYA (IE-1, A24)
1553PAH12	A25 A68	A1 A11	0.44	61.6	IPS (pp65, B35); ELR/K

	B8 B35	B8 B35			(IE-1, B8)
1553PAH13	A2 A11 B35 B35 Cw4 Cw4	A11 A32 B58 B62 Cw4 Cw7	3.21	60.2	NLV (pp65, A2); IPS (pp65, B35)
1553PCH01*	A3 A31 B38 B65 Cw8	A2 A3 B7 B65	0.00	56.9	KAR (IE-1; A31)
1553PCH02	A1 A3 B42 B57 Cw17	A2 A3 B7 B62	0.87	57.3	TRA (pp65, Cw6); VTE (pp50, A1)
1553PCH03	A1 A3 B7 B8 Cw7 Cw7	A1 A2 B51 B57	8.74	48.0	RPH (pp65, B7); TPR (pp65, B7); YSE (pp65, A1); VTE (pp50; A1); QIK (IE-1; B8); CRV (IE-1; Cw7)
1553PCH04	A2 A11 B44 B50 Cw5 Cw6	A32 A62 B44 B53	6.35	63.6	TRA (pp65, Cw6)
1553PCH05	A2 A3 B27 B49 Cw1 Cw7	A3 A29 B50 B51	1.32	26.9	NLV (pp65, A2)
1553RAH01	A2 A23 B44 B44	N.A.	0.00	31.9	N.A.
SASRAH01**	A1 A11 B7 B35 Cw4 Cw7	N.A.	0.73	11.68	RPH (pp65, B7); TPR (pp65, B7); YSE (pp65, A1); VTE (pp50, A1); IPS (pp65, B35);
SASSVH01**	A1 A3 B7 B8 Cw7 Cw7	N.A.	14.22	43.94	RPH (pp65, B7); TPR (pp65, B7); VTE (pp50; A1); ELR (IE-1; B8); QIK (IE-1; B8);
1553PCH06	A2 A24 B44 B56 Cw1 Cw5	A1 A3 B7 B8	17.13	71.4	NLV (pp65, A2); VLE/YIL (IE-1, A2)

[0163] N.A. 没有获得;

[0164] #CMV反应测定为产生IFN- γ 的CD8⁺T细胞的比例

[0165] *将KAR肽添加到CMV肽库中以进行刺激

[0166] **产生了HLA特异性肽库以生产用于这些患者的T细胞

[0167] 实施例3:过继性免疫治疗后的临床结果

[0168] 接受过继性CMV特异性T细胞疗法的患者均未显示与治疗相关的3、4或5级不良事件(表4)。被认为至少可能归因于T细胞输注的所有不良事件均为1级和2级,包括疲劳和不适。重要的是,未检测到与移植物状态变化相关的不良事件。对指定T细胞疗法干预的患者

进行的临床随访表明,13例患者中有11例表现出客观的症状改善。这些改善包括减少或解决CMV的重新激活和/或疾病,以及改善对抗病毒药物疗法的反应。在11例表现出临床反应的患者中,过继性T细胞疗法之前的病毒载量峰值中位数为 3.2×10^4 CMV拷贝/mL血液(范围为 1.4×10^3 - 3.44×10^5 拷贝)。过继性免疫疗法后,中位病毒载量降至 1.2×10^3 CMV拷贝/mL血液(范围 0 - 7.9×10^3 拷贝;表4)。此外,这些患者中有许多显示出CMV疾病症状的解决(表4)。更重要的是,在完成过继性T细胞疗法后,抗病毒药物疗法的使用被完全停止(5/11)或显著减少(6/11;表5)。

[0169] 结果

[0170] 在一组患者中(由于药物抗性/不耐受、持续性病毒重新激活或相关疾病的证据而募集),没有证据表明在施用T细胞后出现严重的不良事件或对移植物的任何负面影响(见表4)。

[0171] 表4:T细胞疗法后的安全性评估

不良事件*	事件数
1级 - 轻度	
恶心	2
不适	2
[0172] 疲劳	2
味觉改变	2
2级 - 中等	
疲劳	1
口臭	1
[0173] 微血管性溶血性贫血	1

[0174] *可能或大概与T细胞疗法相关的事件。没有被认为明确与T细胞疗法相关的不良事件。

[0175] 表5:过继性T细胞疗法后的临床反应

[0176]

病人代码	器官	输注数	T 细胞总剂量 (x10 ⁶)	输注前载量峰值 (x10 ³)	输注后载量峰值 (x10 ³)	T 细胞输注前的抗病毒疗法	T 细胞疗法后的抗病毒疗法	T 细胞疗法后的临床症状/管理
1553PAH05	肾	1	45.25	1.4	0.32	VGCV; GCV; FOS; LEF	FOS; LEF	解决的 DNA 血症和 CMV 疾病症状
1553PAH06	肾	6	245	12	0.78	VGCV; GCV	Nil	解决的 CMV 疾病症状
1553PAH08	肾	5	226	54	7.9	VGCV; GCV; FOS	VGCV; IVIG	解决的 CMV 疾病症状
1553PAH09	肾	5	180	10	1.4	VGCV; GCV	VGCV	解决的腹泻; 降低的免疫抑制
1553PCH01	肺	6	210	8	0.12	GCV; FOS	Nil	FOS 停止, 没有病毒重新激活
1553PCH02	肺	3	108	48	2.3	VGCV; GCV; FOS; IVIG	Nil	降低 DNA 血症
1553PCH03	肺	2	42	12	45	VGCV; GCV; FOS	GCV	死于多器官衰竭
1553PCH04	肺	6	168	17	2.9	VGCV; GCV; FOS; IVIG; LEF	IVIG; LEF	降低 DNA 血症

[0177]	1553PCH05	肺	6	241	47	0	VGCV; GCV	VGCV	降低 DNA 血症
	1553RAH01	肺	3	104	18.9	17.6	VGCV; GCV	GCV; FOS; IVIG	持续升高 的 CMV PCR, 但是 没有终末 器官疾病
	SASRAH01	肺	4	120	344	1	VGCV; GCV; FOS	Nil	药物依赖 性降低 DNA 血症
	SASSVH01*	肺	2 1	38.7(周 期 1) 22.2(周 期 2)	95.4	2.5	VGCV; GCV; FOS; CDV	CDV	降低 DNA 血症
	1553PCH06	心脏	6	204	1.5	0	VGCV	Nil	T 细胞疗法 后停止 VGCV

[0178] CDV:西多福韦;FOS:膦甲酸;GCV:更昔洛韦;IVIG:静脉CMV免疫球蛋白;LEF:来氟米特;VGCV:缬更昔洛韦

[0179] 实施例4:T细胞治疗后的病毒学和免疫学监测

[0180] 为了评估过继性T细胞疗法对CMV特异性T细胞免疫重建的影响,免疫疗法后进行了纵向细胞内细胞因子分析,并在每位患者中进行了病毒学监测。简而言之,为了表征T细胞疗法和从随访血样中分离的PBMC,用CMV肽表位刺激细胞,并使用细胞内细胞因子测定法评估IFN- γ 、TNF和IL-2的表达以及CD107动员,如前所述(Smith C等人Oncoimmunology 2017;6(2):e1273311)。使用具有FACSDiva软件(BD Biosciences)的BD LSR Fortessa获取细胞。采集后,使用FlowJo软件(FlowJo LLC,Ashland,OR)进行Boolean分析。

[0181] 结果

[0182] 图2显示了来自四名SOT患者的代表性数据,这些患者显示出对过继性免疫疗法的客观反应。阴影框代表分析期间的预处理,箭头代表每次输注自体体外扩增的CMV特异性T细胞。该分析揭示了与病毒血症控制相关的治疗后免疫重建的证据。这在患者1553PAH08中得到最好的例证,该患者的产生IFN- γ 的CMV特异性T细胞的比例从首次输注前的0.03%增加到随访期结束时的9.3%,同时病毒载量减少,抗病毒药物疗法停止(图2A)。开始输注T细胞后,外周血T细胞免疫的类似改善在其他患者中也很明显,包括1553PAH09、1553PCH02和1553PCH04(图2A)。尽管在采用过继性T细胞疗法之前持续进行免疫抑制疗法,但仍观察到这些患者的免疫重建(表2)。免疫重建的同时,还观察到CMV特异性T细胞反应的功能质量的改善,其特征是共表达IFN- γ 、TNF和CD107的T细胞比例增加(图2B)。相反,对疗法无临床反应的患者1553RAH01在疗法后未显示免疫重建的证据(数据未显示)。1553PCH03患者无法进行随访的免疫学分析,该患者在疗法开始后因与CMV感染相关的并发症早期死亡。尽管患者1553PAH06和1553PCH05表现出临床改善,但过继性T细胞疗法后其外周血CMV特异性T细胞

的频率没有变化(数据未显示)。

[0183] 实施例5:T细胞表型的多色分析

[0184] 为了表征过继性T细胞疗法和重建后CMV特异性T细胞的表型,将从每位患者获得的T细胞与别藻蓝蛋白标记的MHC I类多聚体孵育,所述多聚体对HLA-A2限制性表位NLV(pp65)、HLA-A1限制性表位VTE pp65)、HLA-B7限制性表位TPR和RPH(pp65)或HLA-B8限制性表位ELR和ELK(IE-1)具有特异性。为了评估表面表型,然后将细胞与以下抗体在4℃下进一步孵育30分钟:抗-CD45RA FITC、抗-CD8 PerCP-Cy5.5、抗-CCR7 AF700、抗-CD95 BV421、抗-CD28 BV480、抗-CD57-生物素,随后是SA-BV605、抗-CD27 PE、抗-CD19 PE-Cy5、抗-CD4 PE-Cy7和活的/死的NIR;(使用具有FACSDiva软件的BD LSR Fortessa(BD Biosciences)采集细胞)。使用FlowJo软件(TreeStar)和t分布随机邻居嵌入(tSNE)分析进行采集后分析,以定义疗法后的免疫表型变化。

[0185] 结果

[0186] 图3上组的代表性tSNE分析显示了患者P1553PAH08在疗法前和疗法后T细胞表型标志物和CMV特异性T细胞(VTE)的表达,并证明了CD57的表达增加。图3下组的数据代表在对过继性T细胞疗法有反应的三名SOT接受者(P1553PAH08、1553PCH02和1553PCH04)和一名未显示出任何临床反应的SOT接受者(P1553RAH01)中,T细胞疗法后表达CD57的CD8+T细胞的比例和产生CMV特异性IFN- γ 的细胞的百分比的重叠。

[0187] 结论总结

[0188] 与健康CMV血清阳性个体产生的CMV特异性T细胞相反,对于造血干细胞移植(HSCT)接受者的施用(Fuji等人Current opinion in infectious diseases 2017;30(4):372-6;Tzannou等人J Clin Oncol 2017;35(31):3547-57),SOT接受者中自体CMV特异性免疫疗法取决于从免疫抑制的个体产生CMV特异性T细胞的能力。然而,如本文所公开的,成功产生了来自21名患者中的20名的CMV特异性T细胞。尽管采用了严格的免疫抑制方案来防止移植排斥,但大多数患者能够引发CMV特异性T细胞反应,并且在某些情况下,在其PBMC中具有T细胞扩增之前高的前体频率。根据最近的报道(Snyder LD,Chan C,Kwon D等人,Polyfunctional T-Cell Signatures to Predict Protection from Cytomegalovirus after Lung Transplantation.Am J Respir Crit Care Med 2016;193(1):78-85),注意到SOT接受者外周血中CMV特异性T细胞中存在功能缺陷;其特征在于表达TNF和IFN- γ 的能力降低。重要的是,在体外刺激后,该表型可以逆转,其中大多数扩增的CMV特异性T细胞共同表达CD107a、TNF和IFN- γ 。

[0189] 病毒学和免疫学监测提供了证据,证明过继性免疫疗法后免疫重建对SOT患者的病毒控制具有潜在的益处。在多名患者中有明确的证据表明,免疫重建与病毒重新激活的降低或解决相一致。对于已发展成药物抗性、正在经历CMV相关终末器官疾病或之前有这种病史的SOT接受者,这一点尤其重要。此外,本文公开的过继性T细胞疗法可与免疫抑制疗法同时安全地使用,以预防无法耐受标准抗病毒药物疗法的患者中CMV相关的并发症。

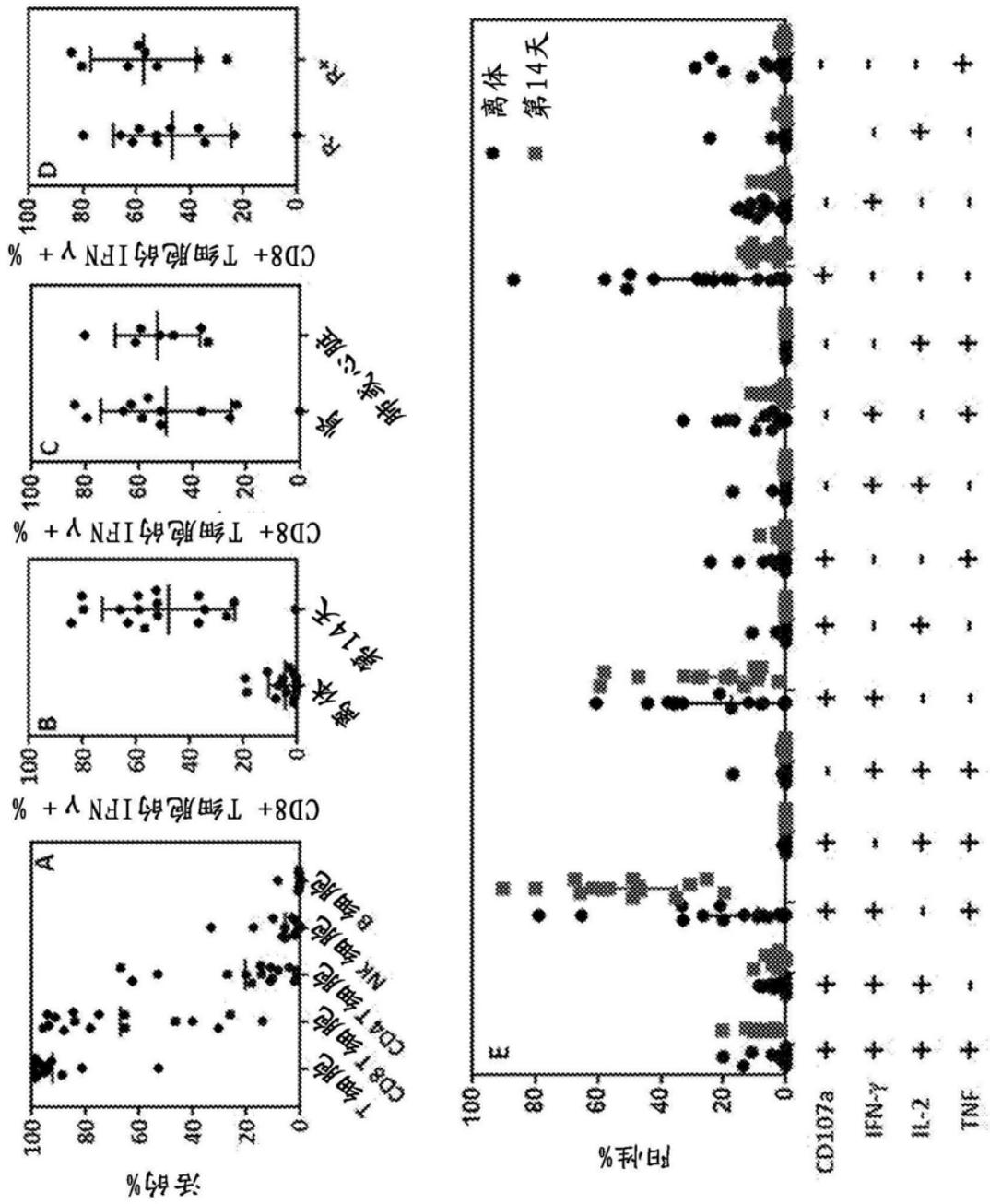


图1

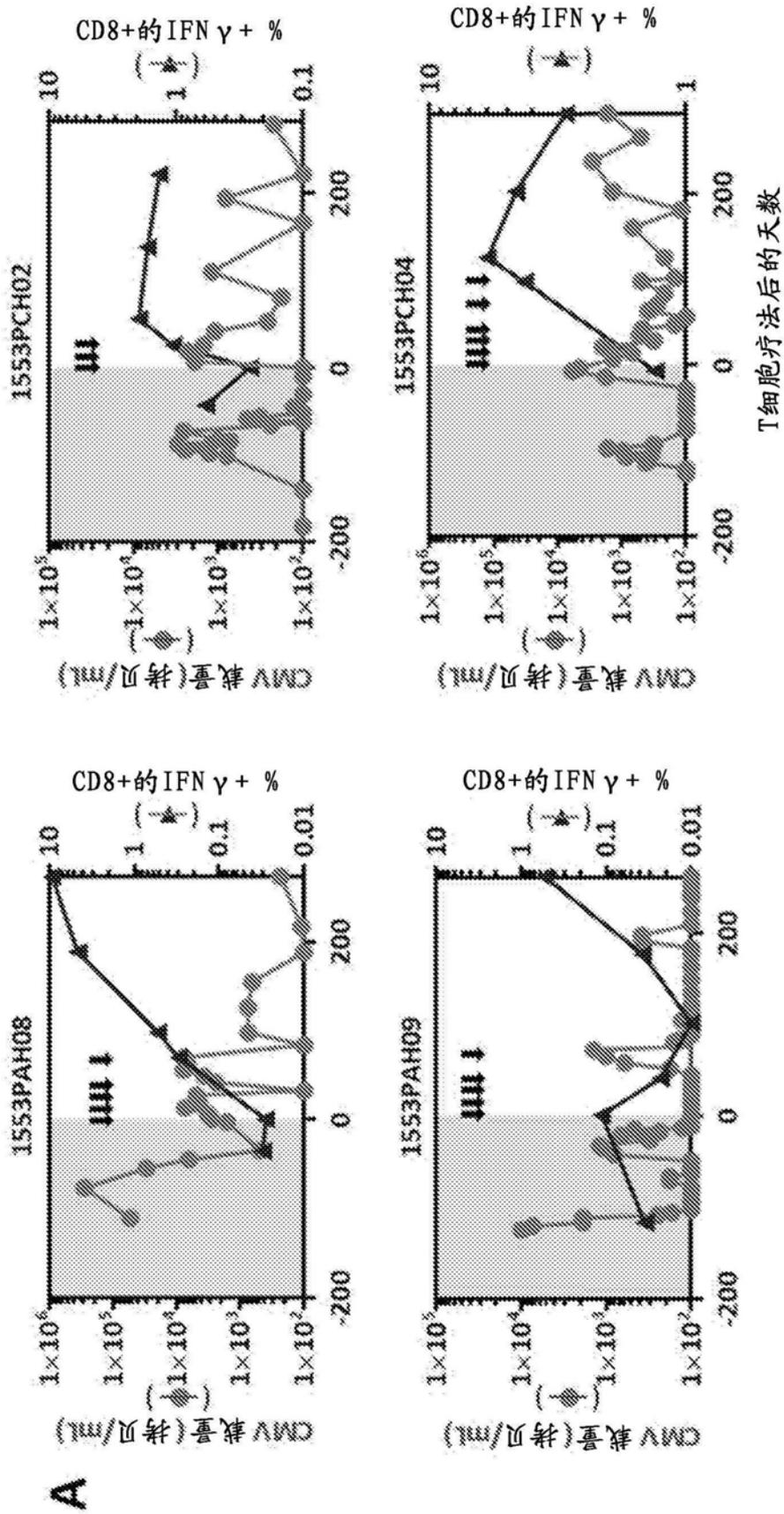


图2

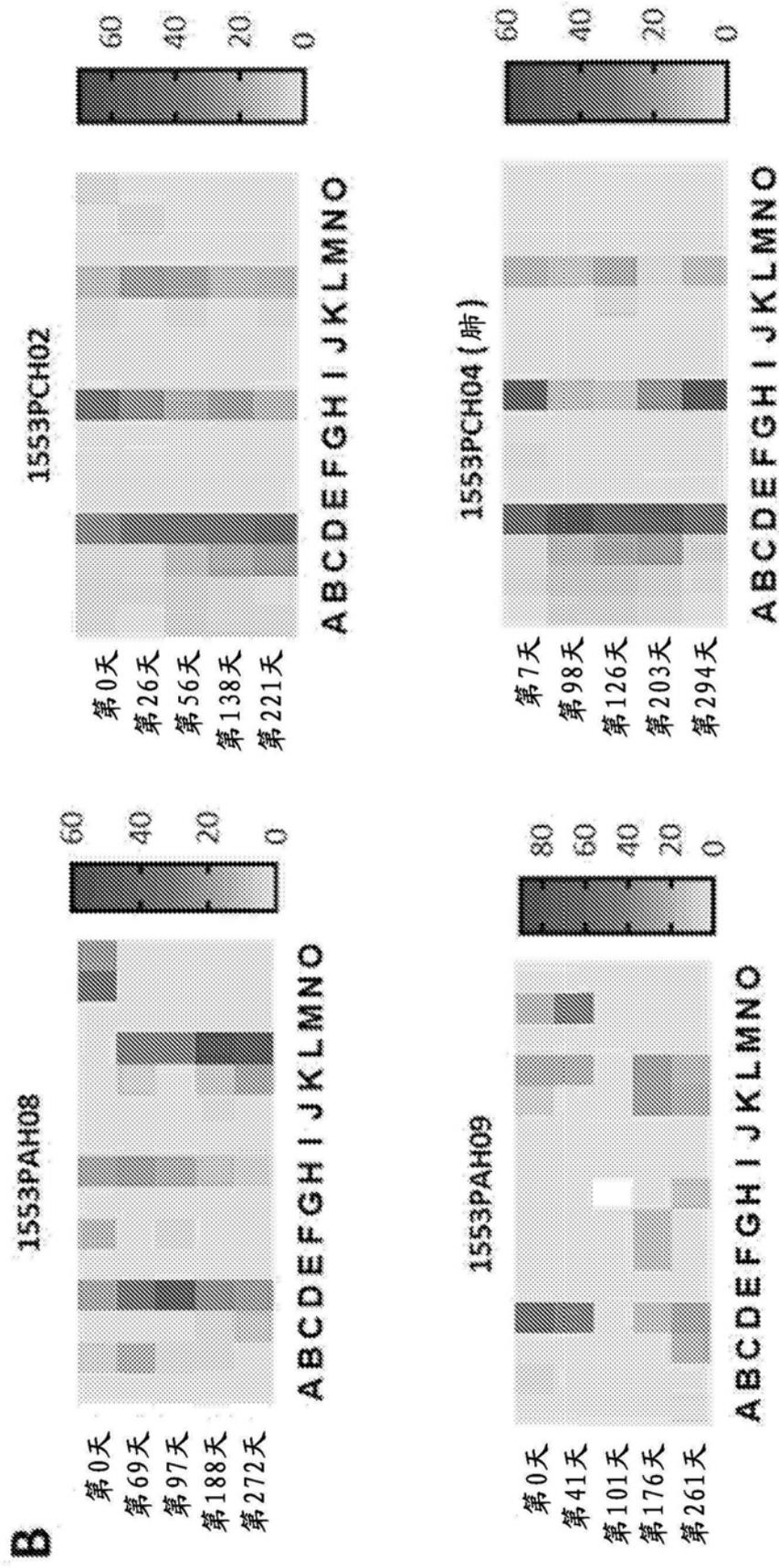


图2续

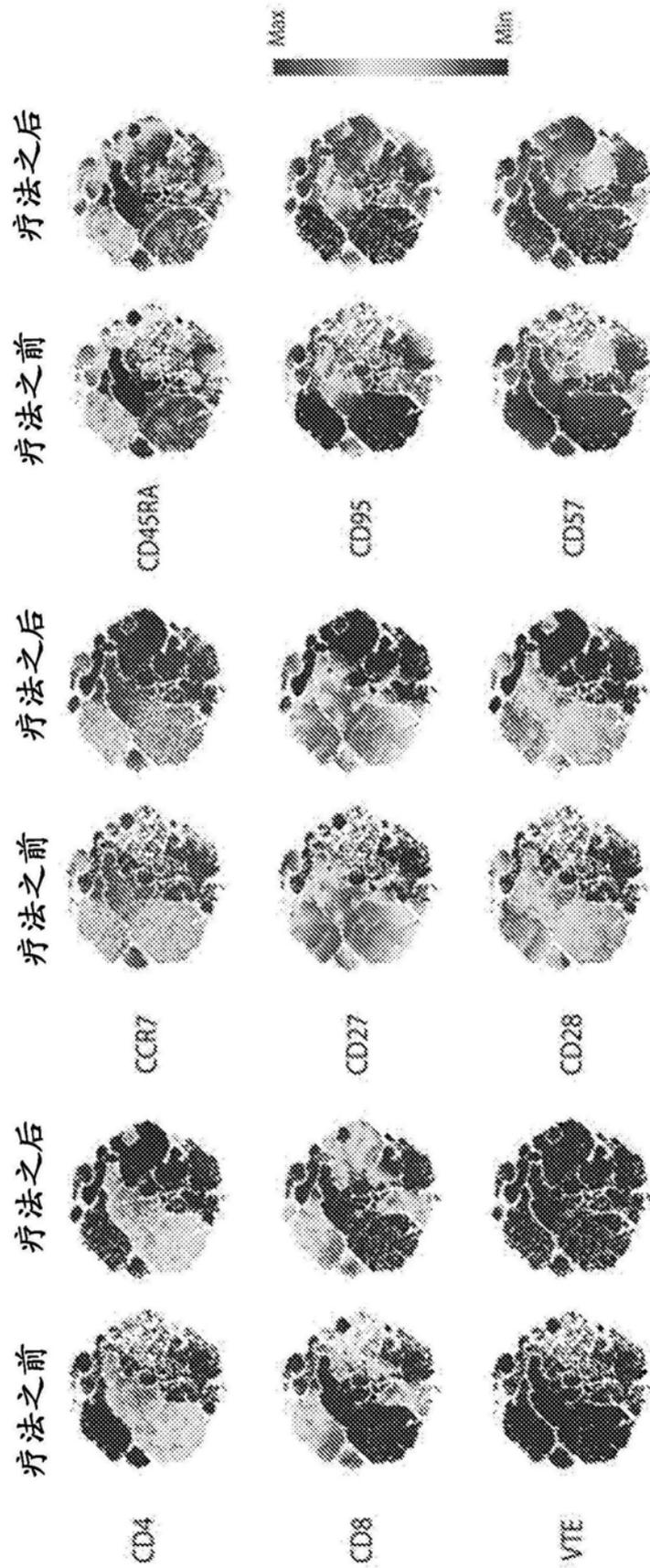


图3

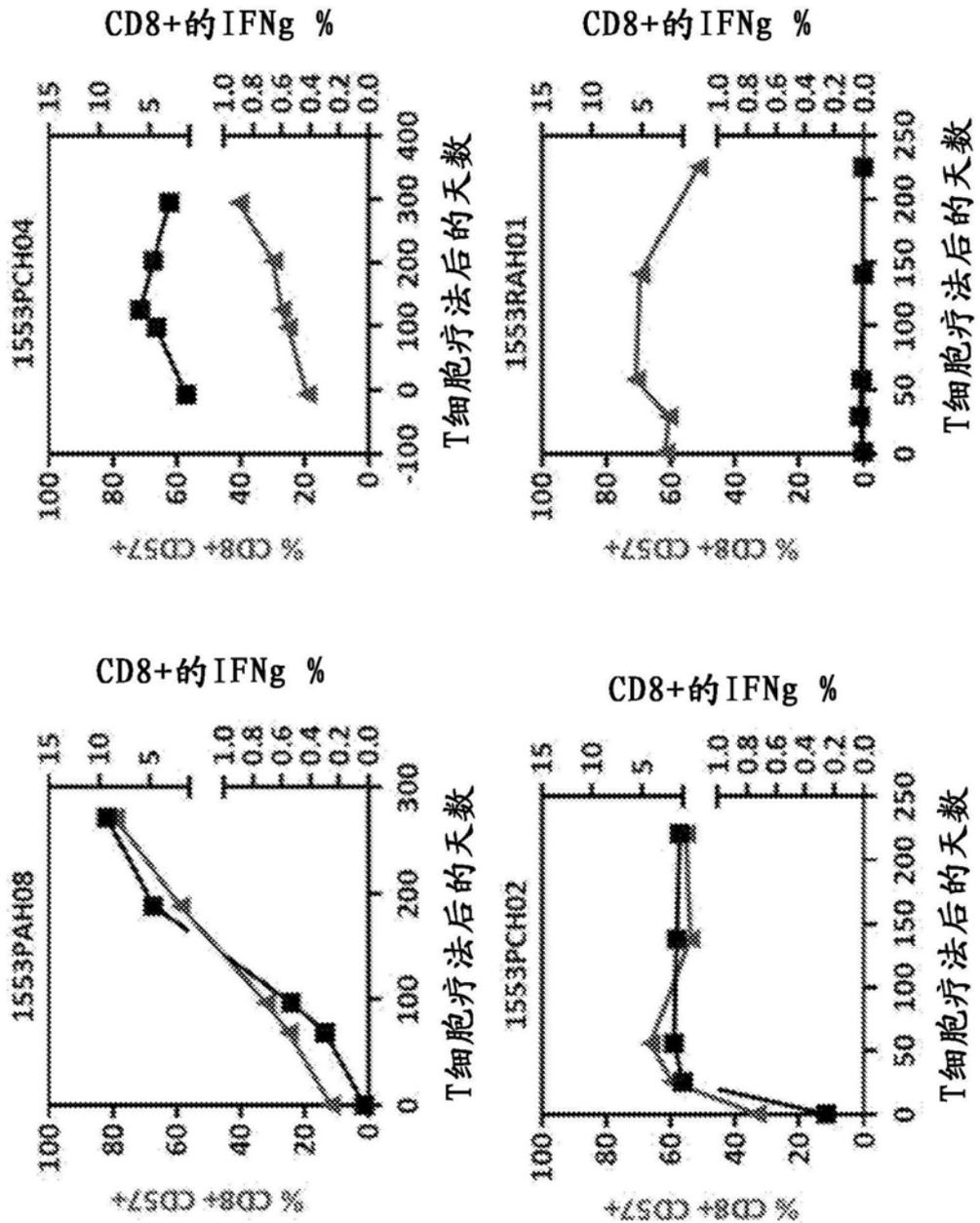


图3续