



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102905534 B

(45) 授权公告日 2016. 03. 02

(21) 申请号 201180019660. 9

(22) 申请日 2011. 04. 06

(30) 优先权数据

61/321, 370 2010. 04. 06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 10. 18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/031359 2011. 04. 06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/127129 EN 2011. 10. 13

(73) 专利权人 埃克瑟赛特医疗私人有限公司

地址 新加坡新加坡城

(72) 发明人 约翰·W·霍拉迪

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 申基成 郑霞

(51) Int. Cl.

A61K 35/15(2015. 01)

A61K 39/00(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

(56) 对比文件

US 20040028692 A1, 2004. 02. 12,

US 20040028692 A1, 2004. 02. 12,

US 5605885 A, 1997. 02. 25,

CN 1446583 A, 2003. 10. 08,

US 20090123441 A1, 2009. 05. 14,

CN 101085349 A, 2007. 12. 12,

郭芳 等. 外泌体及其抗肿瘤作用机制. 《生命的化学》. 2007, 第 27 卷 (第 1 期), 72-75.

柯奇周. 树突状细胞在肿瘤中的研究进展. 《国际肿瘤学杂志》. 2006, 第 33 卷 (第 3 期), 179-181.

F Kashanchi 等. Electroporation of viral transactivator proteins into lymphocyte suspension cells. 《Nucleic acids research》. 1992, 第 20 卷 (第 17 期), 4673-4674.

S Lohmann 等. CD83+ human dendritic cells transfected with tumor peptide cDNA by electroporation induce specific T-cell responses: A potential tool for gene immunotherapy. 《Cancer gene therapy》. 2000, 第 7 卷 (第 4 期), 605-614.

审查员 汤怀武

权利要求书1页 说明书9页

(54) 发明名称

治疗癌症的方法

(57) 摘要

本发明涉及治疗具有肿瘤或其他代谢紊乱的动物的组合物和方法。特别地, 本公开的主题涉及使由于肿瘤和其他代谢紊乱脱落的外泌体电穿孔到免疫细胞 (例如树突细胞和 T 细胞) 中的方法。使电穿孔的免疫细胞施用至具有肿瘤的动物导致针对肿瘤和肿瘤治疗的免疫应答增强。

1. 被电穿孔肿瘤外泌体的动物的树突细胞在制备用于治疗具有所述肿瘤的所述动物的药物中的用途。
2. 权利要求 1 所述的用途,其中所述动物是人。
3. 权利要求 1 所述的用途,其中所述药物还包含促乳泌素激动剂或多巴胺拮抗剂。

治疗癌症的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2010 年 4 月 6 日提交的美国临时专利申请 No. 61/321,370 的权益，并且该公开通过引用的方式全部并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及治疗具有肿瘤或其他代谢紊乱的动物的组合物和方法。特别地，本公开的主题涉及分离和纯化由于肿瘤和其他代谢紊乱脱落的外泌体的方法。然后，使用电穿孔以将来自外泌体的蛋白和编码一种或多种蛋白或多肽的核苷酸序列插入抗原递呈细胞（例如树突细胞）或其他免疫细胞（例如 T 细胞），然后向动物施加抗原递呈细胞或其他免疫细胞，以增强免疫应答。

背景技术

[0004] 癌症是由控制失效引起的疾病，所述控制通常管理细胞增殖、分化和细胞存活。进行恶性转化的细胞逃离正常生长控制，入侵周围组织，并且可最终迁移至机体内的其他位点以建立继发瘤。癌症疗法通常包括外科手术（用于实体瘤），然后单独或联合实施细胞毒性药物或放射，以杀死癌细胞。检测和治疗癌症的继续追求已经发现训练机体的免疫系统的方式，以通过下列方式精心努力地杀死癌细胞：激活激素和细胞免疫系统以特异性攻击生长的癌细胞，并节省生命所需要的正常细胞。

[0005] 治疗癌症的一种提出的方法是训练抗原递呈细胞例如树突细胞。树突细胞是形成动物的免疫系统的一部分的免疫细胞。它们的主要功能是处理抗原材料，并且将其递呈到免疫系统的其他细胞的表面上，因此起到抗原递呈细胞的作用。它们起到固有和适应性免疫性之间的信使的作用。树突细胞以少量不成熟状态存在于血液中。一旦激活，它们迁移至淋巴组织，其中它们和 T 与 B 淋巴细胞相互作用以使适应性免疫应答初始化和成形。树突细胞可以分离和纯化自动物。

[0006] 另外提出的治疗癌症的方法是直接训练 T 淋巴细胞，T 淋巴细胞是细胞免疫性激活所需要的免疫应答的一部分。

[0007] 治疗癌症的一种策略已经使用流式电穿孔将生长性恶性肿瘤的基因内容物插入树突细胞中。流式电穿孔的一种应用是使用该技术来使恶性细胞从患者中生长性肿瘤中除去，并且将它们（或它们胞溶的内容物）插入树突细胞中。这导致训练树突细胞，使得当它们回到供体时，细胞和体液免疫应答启动以攻击恶性细胞。该方法的限制是恶性细胞电穿孔到供体的树突细胞中的可用性。这要求癌性组织的组织切片，这是外科手术用于组织切片的内在问题，不能确保组织切片含有相关恶性组织样品，并且多种类型的癌症不适于组织切片。

[0008] 之前的研究表明癌细胞从生长性肿瘤脱落较小基因信息包，称为外泌体。由正常和病理条件下细胞分泌的外泌体含有蛋白、DNA 和功能 RNA 分子包括 mRNA 和 miRNA，其可以从一种细胞运送至另外细胞，从而影响受体细胞的蛋白产生。肿瘤外泌体不同于由正常

细胞脱落的外泌体。它们在癌症患者中更多,并且它们在增加的肿瘤生长、血管形成和从免疫-监视逃脱中发挥重要作用 (Nilsson et al., Br J Cancer (2009) 100 :1603-1607)。外泌体内所含的基因材料和蛋白是它们恶性源细胞的生物指纹。

[0009] 因此,现有技术中存在下列需要:通过指导动物本身的免疫系统至癌细胞来用于治疗癌症的新型组合物和方法。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明涉及分离和纯化由于肿瘤和其他代谢紊乱脱落的外泌体、然后使用电穿孔将外泌体材料插入树突细胞、T 淋巴细胞或其他相关免疫细胞中的方法。基因和蛋白信息的该周围环境将被树突细胞、T 淋巴细胞或其他相关免疫细胞加工,从而使得它们能够对恶性疾病以及代谢紊乱启动细胞和体液应答。认识到的是,激活的免疫系统将攻击和使错误的细胞失效,并且能够恢复体内平衡和健康。

[0012] 发明详述

[0013] 本发明涉及用于治疗增殖性病患例如但不限于癌症和 / 或肿瘤的方法和组合物。更具体地,本发明包括治疗动物中肿瘤的方法,包括向动物施用有效量的包含一种或多种抗原递呈细胞的组合物,其中一种或多种抗原递呈细胞用一种或多种外泌体源自肿瘤(下文称为“肿瘤外泌体”)电穿孔。在优选实施方案中,抗原递呈细胞是树突细胞。

[0014] 另外优选的实施方案包括通过施用有效量的包含一种或多种 T 淋巴细胞的组合物来治疗动物中的肿瘤的方法,其中一种或多种 T 淋巴细胞用一种或多种外泌体源自肿瘤电穿孔。T 淋巴细胞或“T 细胞”是以细胞-介导的免疫性发挥作用的一组白血细胞。细胞-介导的免疫性或“细胞-介导的免疫应答”是指当它们紧密接近它们的靶细胞时,由淋巴细胞例如 T 淋巴细胞提供的免疫防御。细胞-介导的免疫应答还包括响应于特定抗原的淋巴细胞激活。

[0015] 如本文和所附权利要求书使用的,单数形式“a”,“an”和“the”包括复数形式,除非上下文明确地指示不是这样。因此,例如涉及“化合物”是指一种或多种这样的化合物,并且包括本领域技术人员已知的等同形式等。

[0016] 术语“动物”包括人,并且更特别地包括哺乳动物。

[0017] 如本文使用的,“抗原递呈细胞”或“APC”是指能够处理和将抗原递呈至淋巴细胞或另外免疫效应细胞的细胞。抗原递呈细胞的例子包括但不限于巨噬细胞、胰岛-树突细胞、泡囊树突细胞、B 细胞、单核细胞、成纤维细胞和纤维细胞。如本文使用的,“修饰”以递呈至抗原表位是指抗原递呈细胞通过天然或重组方法而操纵以递呈抗原表位。例如抗原递呈细胞可以通过下列方式来修饰:使用至少一种肿瘤外泌体和抗原递呈细胞电穿孔,以修饰抗原递呈细胞来表达肿瘤多肽。

[0018] 如本文使用的,术语治疗(“treating”,“treat”或“to treat”)是指预防、减缓、部分或完全减轻、或治愈疾病或肿瘤。如本文使用的,治疗癌症可包括癌细胞的增殖降低、去分化、或扩散或其组合。这包括不同组织的癌症和不同阶段的癌症,包括但不限于白血病,脑癌,前列腺癌,肝癌,卵巢癌,胃癌,结直肠癌,咽喉癌,乳腺癌,皮肤癌,黑色素瘤,肺癌,肉瘤,子宫颈癌,睾丸癌,膀胱癌,内分泌癌,子宫内膜癌,食道癌,神经胶质瘤,淋巴瘤,神经母细胞瘤,骨肉瘤,胰癌,恶性体癌,肾癌,鼻咽癌等。根据本发明治疗肿瘤包括肿瘤尺寸减小、肿瘤生长降低、以及肿瘤转移的减少。如本文使用的,术语“肿瘤”是指异常

组织团块,并且包括良性和恶性团块。

[0019] 术语“肿瘤外泌体”是指含有肿瘤多肽、肿瘤 DNA 和 / 或肿瘤 RNA 的外泌体,并且包括源自特定类型的癌症的外泌体,包括但不限于前列腺小体。当细胞膜的片段自发地内陷并且胞吞时细胞内产生外泌体。该内在化的片段破碎为更小的囊泡,所述囊泡随后将从细胞中排出。当含有多种较小囊泡的后期内涵体融合细胞膜、从而引起囊泡从细胞中释放时,更晚阶段发生。囊泡(一旦释放称为“外泌体”)由嵌有初始细胞膜共有的配体(即多肽)的脂膜筏。由正常和病理条件下细胞分泌的外泌体含有蛋白、DNA 和功能 RNA 分子包括 mRNA 和 miRNA,其可以从一种细胞运送至另外细胞,从而影响受体细胞的蛋白产生。该 RNA 称为“体外往复性 RNA”或“外泌体 RNA”。

[0020] 外泌体可得自来自动物的生物样品或组织样品。在优选实施方案中,肿瘤外泌体分离自生物样品,包括但不限于血液样品、尿液样品和肿瘤腹水样品。外泌体可通过下列方式从动物样品中分离:离心技术、超滤技术或识别外泌体表面上表达的蛋白(例如 EGF 受体、ICAM-1、VEGF 或 LMP1(EB 病毒潜伏膜蛋白 1))的亲色和色谱技术。亲和色谱技术还可以使用结合之前鉴别的外泌体生物标志物的抗体或其他材料,所述外泌体生物标志物显示为位于外泌体的外表上。外泌体生物标志物列表可在下列文献中找到:Nilsson et al, British Journal of Cancer 100(10):1603-7(2009);和 Skoget al, Nature Cell Biology 10(12)1-7(2008)。外泌体可通过本领域已知的方法来纯化,例如下列文献中教导的那些方法:美国专利申请 No. 12/695,910, Gastpar et al. Cancer Research, 65(12):5238-5248, Simpson et al, Expert Review Proteomics 6(3):267-283(2009) Cabby et al, Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma, Int. Immunol. 17(7)879-887(2005)。涉及该说明书的该和所有文献通过引用的方式全部并入本文。

[0021] 在一个实施方案中,从癌细胞释放或胞外分泌的外泌体转染到抗原递呈细胞例如树突细胞中。任何转染方法可用于将外泌体或外泌体内容物插入抗原递呈细胞中。在一个实施方案中,电穿孔是这样的转染方法,该方法用于将外泌体或外泌体内容物插入抗原递呈细胞中。任何抗原递呈细胞涵盖用于本发明的方法,并且可以是自身细胞或异源细胞。本领域技术人员熟悉电穿孔的方法。

[0022] 电穿孔可以是例如流式电穿孔或静态电穿孔。因此,如本文使用的,术语“转染的”包括电穿孔。肿瘤外泌体电穿孔到抗原递呈细胞例如树突细胞(或如下面所述的 T 淋巴细胞)中导致这些细胞以肿瘤特异性方式,和以可能肿瘤转移特异性方式引发。肿瘤外泌体用于引发树突细胞、T 淋巴细胞或其他免疫细胞提供相对引发这些细胞的其他方法的优点,因为肿瘤外泌体起到肿瘤 RNA 和肿瘤蛋白的预-浓缩包的作用,它们涉及癌症和 / 或肿瘤的转移。因此,用肿瘤外泌体电穿孔的细胞应该递呈、或激活以识别较高量的这些抗原 / 蛋白,所述抗原 / 蛋白涉及癌症或肿瘤的扩增和 / 或增殖,从而导致针对这些非常抗原 / 蛋白的增强的免疫应答、以及癌症或肿瘤的更成功的治疗。

[0023] 在一个实施方案中,电穿孔抗原递呈细胞的方法包括使用下列所述的电穿孔装置:美国专利公开 20030073238 或 Van Meirvenne et al, Cancer Gene Therapy 9:787-797(2002),通过引用的方式并入本文。电穿孔的方法和装置还描述于例如公开的 PCT 申请 No. WO 03/018751 和 WO2004/031353;美国专利申请序列 No. 10/781,440,10/080,272

和 10/675,592；以及美国专利 No. 5,720,921,6,074,605,6,090,617,6,773,669,6,090,617,6,485,961,6,617,154,5,612,207,所有文献通过引用并入。流式电穿孔中使用的另外设备描述于美国专利公开 20080138877 和美国专利 No. 6,773,669,其通过引用的方式全部并入本文。

[0024] 应该理解,术语“肿瘤外泌体”包括完整肿瘤外泌体和破碎的肿瘤外泌体。就此而言,术语“完整”包括但不限于外泌体是全部、完全或未损坏的。术语“破碎”包括但不限于外泌体是断裂、分开或分离的。可能的是电穿孔本身扰断外泌体,并且导致破碎的外泌体。如本文使用的,“肿瘤外泌体裂解物”包括破碎之前肿瘤外泌体内部的破碎的外泌体和材料。肿瘤外泌体内的材料包括肿瘤 RNA、肿瘤 DNA 和肿瘤蛋白。应该理解,如本文使用的,术语“肿瘤 RNA”是指源自肿瘤外泌体的 RNA。此外还如本文使用的,术语“肿瘤 DNA”是指源自肿瘤外泌体的 DNA,并且术语“肿瘤蛋白”是指源自肿瘤外泌体的蛋白或肽。

[0025] 因此,本发明包括:电穿孔完整外泌体到抗原递呈细胞、T 淋巴细胞或其他免疫细胞中、电穿孔外泌体碎片到抗原递呈细胞、T 淋巴细胞或其他免疫细胞中、电穿孔肿瘤外泌体裂解物到抗原递呈细胞、T 淋巴细胞或其他免疫细胞中、以及电穿孔扩增的肿瘤 RNA 和 / 或扩增的肿瘤 DNA 到抗原递呈细胞、T 淋巴细胞或其他免疫细胞中。在一些实施方案中,来自肿瘤外泌体裂解物的 RNA 分离、逆转录并扩增,之后和肿瘤外泌体裂解物重新联合以产生肿瘤裂解物 / 肿瘤 DNA 混合物。然后肿瘤裂解物 / 肿瘤 DNA 混合物电穿孔到树突细胞、T 细胞或其他免疫细胞中。在其他实施方案中,在电穿孔之前,来自肿瘤外泌体裂解物的 RNA 分离、逆转录、扩增和翻译到肿瘤蛋白中。在这些实施方案中,肿瘤蛋白和肿瘤外泌体裂解物重新联合以产生肿瘤裂解物 / 肿瘤蛋白混合物。该混合物电穿孔到树突细胞、T 细胞或其他免疫细胞中。

[0026] 因此,本发明包括治疗具有肿瘤的动物的方法,包括向动物施用有效量的包含一种或多种抗原递呈细胞的组合物,其中一种或多种抗原递呈细胞用一种或多种肿瘤外泌体或肿瘤外泌体裂解物电穿孔。在优选实施方案中,电穿孔的抗原递呈细胞包括电穿孔后的肿瘤 RNA、肿瘤 DNA、肿瘤蛋白或其任意组合。在进一步优选实施方案中,抗原递呈细胞和肿瘤外泌体或肿瘤外泌体裂解物源自待治疗的动物。

[0027] 本发明还包括治疗具有肿瘤的动物的方法,包括向动物施用有效量的包含一种或多种 T 淋巴细胞的组合物,其中一种或多种 T 淋巴细胞用一种或多种肿瘤外泌体或肿瘤外泌体裂解物电穿孔。在优选实施方案中,电穿孔的 T 淋巴细胞包括电穿孔后的肿瘤 RNA、肿瘤 DNA、肿瘤蛋白或其任意组合。在进一步优选实施方案中,T 淋巴细胞和肿瘤外泌体或肿瘤外泌体裂解物源自待治疗的动物。

[0028] 本文还提供方法,其中通过向动物施用有效量的包含一种或多种 T 淋巴细胞的组合物来治疗动物中的肿瘤,其中一种或多种 T 淋巴细胞使用包含编码肿瘤多肽的肿瘤 RNA 的一种或多种肿瘤外泌体电穿孔。下面更详细地定义“肿瘤多肽”。在优选实施方案中,肿瘤多肽据信或显示和动物中的肿瘤相关。本发明还包括治疗动物中的肿瘤的方法,包括向动物施用有效量的包含一种或多种抗原递呈细胞的组合物,其中一种或多种抗原递呈细胞用包含编码肿瘤多肽的肿瘤 RNA 的一种或多种肿瘤外泌体电穿孔。在优选实施方案中,肿瘤多肽据信或显示和动物中的肿瘤相关。

[0029] 在某些实施方案中,树突细胞或“DC”是优选类型的抗原递呈细胞。树突细胞以

这样的方式修饰、转化或改变,该方式使得它们递呈抗原表位,所述抗原表位使免疫应答导向至获得插入的外泌体的细胞。因此,本发明还包括治疗动物中的肿瘤的方法,包括向动物施用有效量的包含一种或多种树突细胞的组合物,其中一种或多种树突细胞用一种或多种肿瘤外泌体或肿瘤外泌体裂解物电穿孔。

[0030] 树突细胞发挥作用以加工抗原材料,并且递呈表面上的抗原材料至免疫系统的其他细胞。树突细胞还可以通过诱导祖先细胞变成树突细胞而获得。树突细胞发现于多种非-淋巴组织中,但是可以通过输入淋巴或血流迁移至淋巴器官的 T- 依赖性区域。在非-淋巴器官中,树突细胞(包括胰岛细胞和间质树突细胞)。在淋巴和血液中,它们分别包括输入淋巴面纱细胞和血液树突细胞。在淋巴器官中,它们包括淋巴树突细胞和趾状突细胞。树突细胞和祖先可得自外周血液、骨髓、肿瘤-渗透性细胞、癌旁组织-渗透性细胞、淋巴结、脾脏、皮肤、脐血或任何其他合适的组织或流体。

[0031] 树突细胞便利地分为“不成熟”和“成熟”细胞,它们允许简便方式来在两种良好表征的表现型之间进行区别。然而,该命名系统不应该理解为排出分化的所有可能的中间阶段。不成熟树突细胞的特征为具有抗原摄取和加工的较高能力的抗原递呈细胞,其相关于 Fey 受体、甘露糖受体和 DEC-205 标志物的高度表达。“不成熟树突细胞”也称为未成熟到这样阶段的树突细胞,在该阶段它们能够引出 T 或 B 细胞应答。一旦树突细胞接触可递呈的抗原,其变成激活为“成熟树突细胞”。

[0032] 在一个实施方案中,成熟树突细胞用外泌体电穿孔。该优选的实施方案避过成熟树突细胞的内在的抗原摄取限制。成熟树突细胞典型地特征为 Fey 受体、甘露糖受体和 DEC-205 标志物的较低表达,而非负责 T 细胞激活的细胞表面分子的较高表达(例如 I 类和 II 类 NMC、粘附分子(例如 CD54 和 CD11)和共-刺激分子(例如 CD40、CD80 和 CD86))。它们表征为抗原递呈时的高效。树突细胞可通过下列方式体内分化:将细胞因子例如 GM-CSF, IL-4, IL-13 和 / 或 TNF α 的联合增加至从外周血液收获的单核细胞培养物。可选地,收获自外周血液、脐血或骨髓的 CD34 阳性细胞可通过下列方式分化为树突细胞:增加至诱导树突细胞成熟和增殖的 GM-CSF, IL-3, TNF α , CD40 配体, LPS, flt3 配体和 / 或其他化合物的培养基联合。

[0033] 因此,如本文使用的,术语“树突细胞”包括但不限于:胰岛-树突细胞、间质树突细胞、泡囊树突细胞、输入淋巴面纱树突细胞、血液树突细胞、淋巴树突细胞、趾状突树突细胞、成熟树突细胞和不成熟树突细胞。

[0034] 在优选实施方案中,树突细胞分离自接受本文所述的治疗或施用的动物。本发明包括治疗动物中的肿瘤的方法和增强动物中的免疫应答的方法,其中一种或多种不成熟树突细胞分离自动物,然后一种或多种不成熟树突细胞:1) 用一种或多种肿瘤外泌体或肿瘤外泌体裂解物电穿孔;2) 体外成熟的;和 3) 施用至动物。本发明还包括治疗动物中的肿瘤的方法和增强动物中的免疫应答的方法,其中一种或多种不成熟树突细胞分离自动物,然后一种或多种不成熟树突细胞 1) 用一种或多种肿瘤外泌体或肿瘤外泌体裂解物电穿孔;和 2) 施用至动物。在这些实施方案中,树突细胞可以施用至动物的特定位置以体内成熟(参见美国专利 No. 7, 785, 583, 其通过引用的方式全部并入本文)。本发明甚至进一步包括治疗动物中的肿瘤的方法和增强动物中的免疫应答的方法,其中一种或多种成熟树突细胞分离自动物,树突细胞:1) 体外成熟的,2) 用一种或多种肿瘤外泌体或肿瘤外泌体裂解

物电穿孔 ;和 3) 施用至动物。本发明甚至还包括治疗动物中的肿瘤的方法和增强动物中的免疫应答的方法,其中一种或多种成熟树突细胞分离自动物,然后一种或多种树突细胞 :1) 用一种或多种肿瘤外泌体或肿瘤外泌体裂解物电穿孔 ;和 2) 施用至动物。

[0035] 在某些实施方案中,本发明提供在动物中引导针对肿瘤的免疫应答的方法和组合物。例如,用一种或多种肿瘤外泌体电穿孔的抗原递呈细胞可以以免疫刺激组合物或细胞疫苗施用至动物。在特定的实施方案中,用得自癌细胞的一种或多种肿瘤外泌体电穿孔的抗原递呈细胞以免疫刺激组合物或疫苗施用至动物。

[0036] 在某些实施方案中,本发明提供涉及增强针对上述癌症和 / 或肿瘤细胞的免疫应答的方法和组合物。在优选实施方案中,通过在动物中增强针对肿瘤或癌症多肽的免疫应答,实现在动物中增强针对肿瘤或癌症的免疫应答。因此,本发明提供在动物中增强针对肿瘤的免疫应答的方法,该方法包括 :向动物施用包含有效量的包含一种或多种电穿孔的抗原递呈细胞或一种或多种电穿孔的 T 淋巴细胞的组合物,其中一种或多种电穿孔的抗原递呈细胞或 T 淋巴细胞用一种或多种肿瘤外泌体或肿瘤外泌体裂解物电穿孔。在优选实施方案中,电穿孔的抗原递呈细胞或 T 淋巴细胞包括电穿孔后的肿瘤 RNA、肿瘤 DNA、肿瘤蛋白或其任意组合。在进一步优选的实施方案中,抗原递呈细胞或 T 淋巴细胞以及肿瘤外泌体或肿瘤外泌体裂解物源自待治疗的动物。

[0037] 在其他或进一步优选的实施方案中,抗原递呈细胞是树突细胞。因此,本发明提供在动物中增强针对肿瘤的免疫应答的方法,包括 :向动物施用有效量的包含一种或多种电穿孔的树突细胞的组合物,其中一种或多种电穿孔的树突细胞用一种或多种肿瘤外泌体或肿瘤外泌体裂解物电穿孔。在优选实施方案中,电穿孔的树突细胞包括电穿孔后的肿瘤 RNA。在进一步优选实施方案中,树突细胞以及肿瘤外泌体或肿瘤外泌体裂解物源自待治疗的动物。

[0038] 在其他实施方案中,提供在动物中增强针对一种或多种肿瘤多肽的免疫应答的方法,包括 :向动物施用有效量的包含一种或多种电穿孔的抗原递呈细胞的组合物,其中一种或多种电穿孔的抗原递呈细胞用一种或多种肿瘤外泌体或肿瘤外泌体裂解物电穿孔。在优选实施方案中,电穿孔的抗原递呈细胞是树突细胞,并且包括电穿孔后的肿瘤 RNA。在进一步优选的实施方案中,树突细胞以及肿瘤外泌体或肿瘤外泌体裂解物源自待治疗的动物。在甚至进一步优选的实施方案中,肿瘤多肽据信或显示源自动物中的肿瘤。

[0039] 如本文使用的,“免疫应答”定义为识别抗原的机体防御反应,该反应可以通过任何免疫效应细胞或其任意组合的作用或激活来实现,包括但不限于 B 细胞、T 细胞、天然杀伤细胞 (NK 细胞)、树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞。术语“抗原”是指源自物质的肽或脂质,包括但不限于诱导免疫应答的病毒、真菌、细菌、病原体、肿瘤和自反应性细胞。如本文使用的,术语“多肽”是指氨基酸或氨基酸类似物的任何聚合物,而无论尺寸和功能。

[0040] 增强针对肿瘤多肽的免疫应答包括通过免疫效应细胞识别或递呈肿瘤多肽的任何部分或片段。这样识别的肿瘤多肽的部分可以是连续或非连续间距的氨基酸。如本文使用的,术语“肿瘤多肽”是指和存在肿瘤或肿瘤生长相关的任何多肽,包括相对于非 - 肿瘤细胞以增加的量由肿瘤细胞表达的任何多肽。在一些实施方案中,肿瘤多肽在肿瘤细胞中表达,但在非 - 肿瘤细胞中不表达。研究者报道,来自癌症患者的外泌体含有用于诊断

目的的癌症用生物标志物（参见 Nilsson et al, British Journal of Cancer 100(10) : 1603-7 (2009) 和 Skog et al, Nature Cell Biology 10(12) 1-7 (2008), 其通过引用的方式全部并入本文）。因此, 术语“肿瘤多肽”包括前面阐述的所有这些外泌体生物标志物。

[0041] 如本文使用的, 激活 (“activation” 或 “activating”) 是指刺激 B 细胞、T 细胞或任何免疫效应细胞以增殖和 / 或分化。因此, 例如, “激活的 B 细胞”是指已经信号传导以增殖和 / 或分化的 B 细胞。此外, 例如 “激活的 T 细胞”是指已经信号传导以增殖和 / 或分化的 T 细胞。这和典型的静止的幼稚 B 细胞相反。本领域技术人员将熟悉鉴别激活的 B 细胞的方法。一种方法是简便观察激活的 B 细胞的增殖。其他方案包括评价在激活的 B 细胞中上调的一种或多种分子例如共 - 刺激分子（例如 CD80、CD86）或粘附分子（例如 ICAM-1）的表达。其他效应细胞的类似分析可通过本发明的方法来区别它们的激活。

[0042] 在本发明的某些方面中, B 细胞群得自动物。细胞可以通过本领域已知的任何方法获得。在优选实施方案中, 细胞得自受试者的外周血液。在某些实施方案中, 受试者具有白血病。

[0043] 联合治疗

[0044] 在一些实施方案中, 可期望使用这些转染的癌症和 / 或肿瘤细胞与有效治疗癌症的其他药剂或方法联合治疗。“抗癌”剂能够例如通过下列方式而对受试者中的癌症产生不利影响: 杀死癌细胞、诱导癌细胞的凋亡、降低癌细胞的生长速率、降低转移的发生率或数量、降低肿瘤尺寸、抑制肿瘤生长、降低血液供应至肿瘤或癌症细胞、促进针对癌细胞或肿瘤的免疫应答、预防或抑制癌症的发展、或增加患有癌症的受试者的生命期。更通常地, 将提供联合量的这些其他组合物, 该量有效地杀死或抑制细胞的增殖。该方法可包括使细胞同时接触表达构建体以及药剂或多种因子。这可以通过下列方式来实现: 使细胞接触单一组合物或药物制剂（包括两种药剂）或使细胞同时接触两种不同组合物或制剂, 其中一种组合物包括转染的癌细胞, 并且另一种包括第二药剂。

[0045] 化疗剂和放射剂耐性的肿瘤细胞在临床肿瘤学中表现出主要问题。当前癌症研究的一个目标是通过将其联合免疫疗法而发现方式以改善化疗和放射疗法的效果。在本发明的上下文中, 涵盖电穿孔的树突细胞可以联合化疗、放疗或其他免疫疗法干预而类似地使用。

[0046] 1. 化疗法

[0047] 癌症治疗包括基于治疗的和化学与放射的多种联合疗法。本领域技术人员将熟悉化疗剂的范围和可利用的联合。化疗剂包括例如顺氯氨铂 (CDDP), 卡铂, 丙卡巴肼, 氮芥, 环磷酰胺, 喜树碱, 异环磷酰胺, 美法仑, 苯丁酸氮芥, 白消安, nitrosurea, 更生霉素, 道诺霉素, 阿霉素, 博来霉素, plicomycin, 丝裂霉素, 依托泊苷 (VP 16), 它莫西芬, 雷洛昔芬, 雌激素受体结合剂, 紫杉醇, gemcitabine, 诺维本, 法呢基 - 蛋白转移酶抑制剂, 顺铂, 5- 氟尿嘧啶, 长春新碱, 长春灭瘟碱和甲氨蝶呤, 或上述任何类似物或衍生物变体。

[0048] 2. 放射疗法

[0049] 引起 DNA 损坏并且已经广泛使用的其他因素包括 γ - 射线、X- 射线、和用于肿瘤细胞的放射性同位素的定向递送。还涵盖其他形式的 DNA 损坏因素, 例如微波和 UV- 辐射。最可能的是, 所有这些因素对于 DNA、DNA 前体、DNA 的复制和修复、以及染色体的装配和保持而产生较大的损坏。X- 射线的剂量范围为: 延长时间 (3 至 4wk) 的每日剂量 50 至 200 伦

琴,单剂量 2000 至 6000 伦琴。放射性同位素的剂量范围变化较大,并且取决于同位素的半衰期、发射的辐射强度和类型、以及赘生性细胞的摄取。

[0050] 当应用于细胞时,术语“接触”和“暴露”在本文中用于描述这样的方法,通过该方法治疗构建体和化疗剂或放射剂递送至靶细胞,或者和靶细胞直接并排放置。为了实现细胞杀死或停滞,两种药剂以杀死细胞或预防其分开的联合有效率而递送至细胞。

[0051] 3. 免疫疗法

[0052] 本发明的电穿孔的树突细胞可以联合免疫疗法的其他形式来施用。免疫疗法通常依靠使用免疫效应细胞和分子来靶向和破坏癌细胞。免疫效应子可以例如肿瘤细胞表面上一些标志物的特异性抗体。抗体单独可以起到治疗效应子的作用,或者其可吸收其他细胞以实际影响细胞杀死。抗体还可以缔合药物或毒素(化疗、放射性核素、蓖麻毒 A 链、霍乱毒素、百日咳毒素等),并且可仅仅用作靶向剂。可选地,效应子可以是负载表面分子的淋巴细胞,所述表面分子直接或间接和肿瘤细胞靶相互作用。各种效应细胞包括细胞毒性 T 细胞和 NK 细胞。本发明是电穿孔的树突细胞还可以联合淋巴细胞刺激剂施用,包括但不限于刺激内源性促乳泌素释放的促乳泌素激动剂活多巴胺拮抗剂,如美国专利 No. 5,605,885 中所述,其通过引用的方式全部并入本文。

实施例

[0053] 实施例 1 来自生物样品的外泌体的纯化

[0054] 在知会同意后从下列获得样品:来自动物的癌细胞样品例如肿瘤组织切片、或来自动物的生物流体的样品,例如血液、尿液、淋巴液或唾液。微囊泡部分通过差速离心制备。首先,细胞以 500g 在 10℃ 球粒化 20min 并抛弃,然后另外的细胞碎片通过以 16000g 在 10℃ 离心 20min 除去,然后通过 0.45mm 过滤装置(Millipore)过滤。然后滤液中的微囊泡以 100,000g 在 10℃ 超速离心(Beckman Ti70rotor)90 分钟而球粒化。为了电子显微镜研究,微囊泡通过下列方式另外纯化:以 20 和 40%蔗糖梯度超速离心,然后使用过滤的磷酸盐-缓冲的盐水(PBS)洗涤。

[0055] 肿瘤-特异性外泌体或肿瘤外泌体使用识别在外泌体表面上表达的蛋白(例如 EGF 受体, ICAM-1, VEGF, MAGE-1 和 / 或 LMP1 (EB 病毒潜伏膜蛋白 1)) 的亲色谱技术而分离自微囊泡球粒。

[0056] 实施例 2 肿瘤细胞外泌体的纯化和树突细胞的转染

[0057] 传代 1-15 的癌细胞在无微囊泡的培养基(含有 5% dFBS 的 DMEM)中培养,并且在 48 小时后收集来自 4×10^7 细胞的调节的培养基。

[0058] 微囊泡通过差速离心纯化。简言之,癌细胞-调节的培养基以 300g 离心 10 分钟以消除细胞污染。上清液以 16,500g 进一步离心 20 分钟,并通过 0.22 μ m 过滤器过滤。微囊泡以 110,000g 超速离心 70 分钟而球粒化。微囊泡球粒在 13ml PBS 中洗涤,并且再次球粒化和重新混悬于 PBS 中。微粒体使用 DC 蛋白测定法(Bio-Rad)来测量它们的蛋白含量。来自健康对照和癌症患者的血清微粒体在 PBS 中稀释至 13ml,并且在离心之前无菌过滤。

[0059] 遵循 Lutz et al. 描述的方案产生骨髓-源树突细胞。简言之,骨髓细胞分离自后肢,并用红血细胞溶缓冲液来处理。细胞以 10mL 的完全培养基(DMEM, 补充 5% 热-失活的 FCS, 2mM 谷氨酰胺, 50M 2-ME, 100U/mL 青霉素, 100g/mL 链霉素和 20ng/mL rmo GM-CSF)

中的 2×10^6 细胞接种于 10-cm 细菌 Petri 盘 (Falcon-Becton Dickinson, Erembodegem, Belgium)。在培养 3 天时,加入含有 20ng/mL rmo GM-CSF 的 10mL 的培养基。在第 5 天,50% 的培养基用含有 20ng/mL rmo GM-CSF 的培养基更新。在第 7 天,细胞用于 mRNA 电穿孔,并且根据实验设计树突细胞和源自大肠杆菌血清型 055 :B5 (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium) 的 LPS 以 0.1g/mL 的浓度进一步成熟。

[0060] 树突细胞也可以通过刺激其他免疫细胞以分化或去分化来制备。

[0061] 在转染之前,树突细胞立即在 PBS (Invitrogen-Life Technologies) 中洗涤两次,并且通过以 1500rpm 离心 10 分钟收集。细胞重新混悬于 Opti-MEM (Invitrogen-Life Technologies) 至最终浓度 20×10^6 细胞 /mL。随后,200L 的细胞混悬液在 0.4-cm 间隔无菌一次性电穿孔吸收池中混合 20g 的 mRNA,并且使用 Easyject Plus 设备 (Equibio, Kent, UK) 电穿孔。按下列进行细胞转染 :300V 的电压脉冲,联合 150F 的电容和 6 毫秒的脉冲时间。在电穿孔后,细胞立即重新混悬于新鲜完全培养基,并且在 37°C 下补充 7% CO_2 的湿润气氛中进一步孵育。

[0062] 实施例 3 树突细胞的流式电穿孔

[0063] 得自来自癌症动物的癌细胞或生物流体的外泌体通过流式电穿孔系统引入患者的自身细胞,例如美国专利公开 20030059945 中描述那种,其通过引用的方式全部并入本文。

[0064] 树突细胞得自动物。可以获得不成熟或成熟树突细胞。如果获得不成熟树突细胞,树突细胞可以在电穿孔之前或之后成熟。对于电穿孔,树突细胞重新混悬于 B&K 脉冲缓冲液 (125mM KCl, 15mM NaCl, 1.2mM MgCl_2 , 25mM Hepes, 3mM 葡萄糖, pH 7.4), 并且使用流式电穿孔系统用 pTM7 (100ug/mL) 遵循下列脉冲参数转染,例如在美国专利公开 20030059945 中描述的那种 :2.1KV/cm, 400ms, 4 次脉冲, 1.25 秒间隔, 并且以 0.1mL/s 流动。然后树突细胞在脉冲培养基中孵育 20 分钟,之后使细胞回到供体动物。使用该流式电穿孔系统的之前研究表明约 75% 的细胞群可以被转染。

[0065] 实施例 4 树突细胞施用至动

[0066] 根据实施例 3 的方法电穿孔的树突细胞体外成熟,并且随后施用至待治疗的动物,或在电穿孔之后直接施用至动物。当在没有之前体外成熟的条件下施用树突细胞时,可以使用描述于美国专利 No. 7,785,583 的原位成熟的方法 (包括施用途径)。

[0067] 在不偏离本发明的范围和精神的情况下,本领域技术人员将明白本发明所述的实施方案的多种改变和变化。尽管已经结合特定优选的实施方案来描述了本发明,但是应该理解所要求的本发明不应该不恰当地限制为这些特定实施方案。事实上,本领域技术人员显而易见的实施本发明的所述方式的各种变化旨在为本发明所覆盖。