



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110099687 A

(43)申请公布日 2019.08.06

(21)申请号 201780056996.X

(22)申请日 2017.08.18

(30)优先权数据

62/376,680 2016.08.18 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.03.15

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/047515 2017.08.18

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/035413 EN 2018.02.22

(71)申请人 UAB研究基金会

地址 美国阿拉巴马州

申请人 因赛瑟斯医疗有限公司

(72)发明人 史蒂文·A·里希 威廉·何

劳伦斯·S·兰姆

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 刘成春 蒋洪之

(51)Int.Cl.

A61K 31/495(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

C07K 14/705(2006.01)

权利要求书2页 说明书24页 附图9页

(54)发明名称

用于癌症免疫疗法的组合物和方法

(57)摘要

本发明提供用于治疗癌症的用于联合疗法的组合物和方法,该联合疗法包括向有需要的患者施用耐药性免疫疗法、免疫检查点抑制剂和化学治疗。

1. 一种用于治疗有需要的患者的癌症的方法,其包括以下步骤:
 - i. 获得包含 γ δ T-细胞、天然杀伤 (NK) 细胞或其任何组合的分离的细胞毒性免疫细胞群,其中所述细胞毒性免疫细胞群经遗传修饰以对一种或多种治疗剂具有抗性;
 - ii. 向患者施用有效量的一种或多种治疗剂,其中步骤 (i) 的遗传修饰的细胞毒性免疫细胞对所述治疗剂具有抗性;
 - iii. 向患者施用步骤 (i) 的经遗传修饰的细胞毒性免疫细胞群;和
 - iv. 向患者施用有效量的至少一种免疫检查点抑制剂。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述癌症选自神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、淋巴瘤、黑色素瘤、成神经细胞瘤、非小细胞肺癌、肾细胞癌和小细胞肺癌。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述癌症为神经胶质瘤、成胶质细胞瘤或成神经细胞瘤。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述分离的细胞毒性免疫细胞包括 γ δ T-细胞、NK 细胞,并且进一步任选地包括其他免疫活性细胞。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述分离的细胞毒性免疫细胞经遗传修饰以编码烷基鸟嘌呤转移酶 (AGT)、P140KMGMT、O⁶甲基鸟嘌呤DNA甲基转移酶 (MGMT)、L22Y-DHFR、胸苷酸合成酶、二氢叶酸还原酶或多重耐药性-1蛋白 (MDR1)。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述分离的细胞毒性免疫细胞经遗传修饰以编码 P140KMGMT。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂靶向CTLA-4、PDL1、PDL2、PD1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD160 (也称为BY55)、CGEN-15049、CHK1激酶、CHK2激酶、A2aR、OX40或B-7家族配体。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述检查点抑制剂靶向PD-1、PDL1、PDL2或CTLA-4。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂选自曲美母单抗、抗OX40、PD-L1单克隆抗体 (抗B7-H1;MEDI4736)、MK-3475、**OPDIVO®**/纳武单抗、CT-011、BY55单克隆抗体、AMP224、BMS-936559、MPLDL3280A、MSB0010718C、**YERVOY®**/伊匹单抗和派姆单抗(**KEYTRUDA®**)。
10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述治疗剂选自烷化剂;代谢拮抗剂;DNA去甲基化剂;取代的核苷酸;取代的核苷;抗肿瘤抗生素;植物来源的抗肿瘤剂;顺铂;卡铂;依托泊苷;甲氨蝶呤 (MTX);三甲氨蝶呤 (TMTX);替莫唑胺;雷替曲塞;S-(4-硝基苄基)-6-硫代肌苷 (NBMPR);6-苄基鸟嘌呤 (6-BG);亚硝基脲;阿糖胞苷;喜树碱;以及它们的任何治疗衍生物。
11. 根据权利要求1所述的方法,其中所述分离的细胞毒性免疫细胞经遗传修饰以对两种治疗剂具有抗性,所述两种治疗剂选自烷化剂;代谢拮抗剂;DNA去甲基化剂;取代的核苷酸;取代的核苷;抗肿瘤抗生素;植物来源的抗肿瘤剂;顺铂;卡铂;依托泊苷;甲氨蝶呤 (MTX);三甲氨蝶呤 (TMTX);替莫唑胺;雷替曲塞;S-(4-硝基苄基)-6-硫代肌苷 (NBMPR);6-苄基鸟嘌呤 (6-BG);亚硝基脲;阿糖胞苷;喜树碱;以及它们的任何治疗衍生物。
12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述两种治疗剂为替莫唑胺和甲氨蝶呤。
13. 根据权利要求11所述的方法,其中所述分离的细胞毒性免疫细胞已经用耐药性基因烷基鸟嘌呤转移酶 (AGT) 和二氢叶酸还原酶进行遗传修饰。

14. 根据权利要求1所述的方法,其中步骤(iii)的所述经遗传修饰的免疫细胞的施用和步骤(iv)的所述检查点抑制剂的施用基本上同时或顺序发生。

15. 一种组合物,其包括至少一种检查点抑制剂和分离的细胞毒性免疫细胞群,所述细胞毒性免疫细胞群包含 $\gamma\delta$ T-细胞、NK细胞或它们的任何组合,其中大于约50%的所述细胞毒性免疫细胞群表达对化学治疗剂具有抗性的多肽。

16. 根据权利要求15所述的组合物,其中所述分离的细胞毒性免疫细胞群包含约50%至约95%的 $\gamma\delta$ T-细胞,并包括约5%至约25%的NK细胞。

17. 根据权利要求15所述的方法,其中所述检查点抑制剂靶向PD-1、PDL1、PDL2或CTLA-4。

18. 根据权利要求15所述的方法,其中所述细胞毒性免疫细胞经遗传修饰以编码烷基鸟嘌呤转移酶(AGT)、P140KMGMT、 O^6 甲基鸟嘌呤DNA甲基转移酶(MGMT)、L22Y-DHFR、胸苷酸合成酶、二氢叶酸还原酶或多重耐药性-1蛋白(MDR1)。

19. 根据权利要求1所述的方法,其中所述分离的细胞毒性免疫细胞衍生自人类诱导性多能干细胞(hiPSC)。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述分离的细胞毒性免疫细胞包括 $\gamma\delta$ T-细胞。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述分离的细胞毒性免疫细胞还包括NK细胞。

用于癌症免疫疗法的组合物和方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2016年8月18日提交的第62/376,680号美国临时专利申请的优先权,上述申请的全部教导通过引用并入本文。

背景技术

[0003] 尽管在癌症检测和治疗领域已经取得了显著进展,但晚期和转移性癌症的治疗仍然是一项重大挑战。细胞毒性化学治疗剂仍然是最常用和成功使用的抗癌治疗之一。然而,它们不是一致有效的,并且这些试剂与引入的新疗法诸如免疫疗法是存在问题的。例如,由于试剂的非特异性毒性特征,化学治疗剂可能对强健的抗肿瘤免疫活性细胞的建立是有害的。靶向细胞增殖途径的基于小分子的疗法也可能妨碍抗肿瘤免疫的建立。在免疫治疗方法中发现的进一步并发症是肿瘤细胞通过下调MHC-I类抗原表达,在肿瘤或效应细胞表面呈递免疫检查点分子或将可溶性肿瘤配体脱落到血浆中导致效应细胞受体下调,从而超过身体免疫反应的能力。这些过程导致肿瘤看起来正常,但导致逃避免疫系统攻击。然而,如果暂时性有效的化学治疗方案可以与新的免疫活性细胞疗法和免疫检查点抑制剂组合,那么可以实现抗肿瘤疗法的显著改善。

[0004] 已经鉴定了几种可以潜在地用于赋予靶向免疫细胞耐药性的耐药性基因,并且基因治疗技术的进步使得可以测试在耐药性基因治疗研究中使用这些基因的可行性。例如,shRNA策略用于降低次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HPRT)的水平,其对6-硫鸟嘌呤(6-thioquanine)具有抗性。此外,编码人烷基鸟嘌呤转移酶(hAGT)的耐药性基因MGMT是一种DNA修复蛋白,其对诸如亚硝基脲和替莫唑胺(TMZ)的烷化剂的细胞毒性作用具有抗性。6-苄基鸟嘌呤(6-benzylguanine)(6-BG)是AGT的抑制剂,其可增强亚硝基脲的毒性,并与TMZ共同施用以增强该药剂的细胞毒性作用。编码AGT变体的MGMT的几种突变形式对6-BG的失活具有高度抗性,但保留了修复DNA的能力。基于P140KMGMT的耐药性基因疗法已显示赋予小鼠、犬、恒河猴和人类细胞、尤其是造血细胞的化学保护。

[0005] 肿瘤细胞通常表达揭示其癌性的细胞表面分子。然而,这些相同的细胞也可以在其表面上呈现模拟正常细胞的免疫检查点分子,从而避免免疫攻击。免疫检查点通常通过特异性受体/配体对(包括CTLA-4和PD-1)之间的相互作用来调节。CTLA-4、PD-1及其配体是共信号分子的CD28-B7家族的成员,其在T-细胞功能和其他细胞功能的所有阶段中起重要作用。PD-1受体在活化的T-细胞(和B细胞)表面表达,并且在正常情况下与其在抗原呈递细胞(例如树突细胞或巨噬细胞)表面上表达的配体(PD-L1和PD-L2)结合。这种相互作用将信号发送到T-细胞并基本上将其关闭或抑制它。癌细胞通过在其表面上驱动高水平的PD-L1表达来利用该系统。这允许它们获得对PD-1途径的控制并关闭T-细胞表达可能进入肿瘤微环境的PD-1,从而抑制抗癌免疫应答。

[0006] 检查点抑制剂通过阻断受体/配体对(例如CTLA-4或PD-1)使T-细胞产生免疫应答,从而提供了揭露肿瘤细胞的手段。已获得美国食品和药物管理局(U.S. Food and Drug Administration)加速批准的六种免疫检查点抑制剂是伊匹单抗(ipilimumab)

(YERVOY®)、派姆单抗 (pembrolizumab) (KEYTRUDA®)、阿特殊单抗 (atezolizumab) (TECENTRIQ®)、度伐单抗 (durvalumab) (IMFINZI™)、阿维鲁单抗 (avelumab) (BAVENCIO) 和纳武单抗 (nivolumab) (OPDIVO®)。YERVOY®是一种单克隆抗体,可靶向T-细胞表面的CTLA-4,并被批准用于治疗黑色素瘤。KEYTRUDA®靶向PD-L1,用于治疗黑色素瘤和非小细胞肺癌。OPDIVO®也靶向PD-1,并被批准用于治疗黑色素瘤、肾细胞癌和非小细胞肺癌。可能被证明有效的其他检查点靶标为TIM-3、LAG-3、各种B-7配体、CHK1和CHK2激酶、BTLA、A2aR等。

[0007] 通常,与检查点抑制剂治疗相关的活性和高客观缓解率 (ORR) 与具有高突变负荷的肿瘤有关。突变频率通常与高的新抗原信号传导相关,导致肿瘤免疫原性增加。

[0008] 2017年5月,美国食品和药物管理局 (FDA) 准予加速批准派姆单抗用于成人和儿童患者,他们罹患无法切除的或已转移的、在先前的治疗之后已经进展的微卫星不稳定性高 (MSI-H) 或错配修复缺陷 (dMMR) 实体瘤,并且对替代治疗选择不满意,或者罹患在用氟嘧啶、奥沙利铂和伊立替康治疗后已经进展的MSI-H或dMMR结肠直肠癌。这是FDA首次批准用于组织/部位不可知的指征。dMMR患者存在缺陷,无法纠正导致超突变状态的基因突变。

[0009] 临床数据已经证明,在诸如结肠直肠癌的癌症中,用检查点抑制剂治疗的ORR通常为0%,由于其高突变负荷,dMMR患者的ORR增加至62% (Le DT, et al. ASCO 2015. Abstract LBA100)。同样,Hodges等人的分析 (Neuro-Oncology, 19 (8), 1047-1057, 2017) 证明成胶质细胞瘤 (GBM) 通常具有低突变负荷,仅分析了3.5%的那些GBM,证明了高肿瘤突变负荷。然而,在那些具有dMMR的GBM患者中,Boufett等人发现它们具有比其他高级别肿瘤更高的突变负荷 (JCO, 2016 34:19, 2206-2211)。Boufett等人描述了两名患有复发性多病灶性GBM的儿科患者的显著和持久的反应,这些患者在用单药剂纳武单抗治疗时以目前的标准疗法很难治疗。dMMR突变使这两名患者对检查点抑制有反应,但他们对标准疗法的反应失败也可能是由于dMMR。这支持了表明通常GBM不具有显著的免疫原性并且当用检查点抑制剂治疗时不太可能表现出显著的ORR的数据。

[0010] 自2005年以来,第一线的GBM的标准化护理治疗一直是Stupp协议,涉及用化学疗法替莫唑胺 (TMZ) 的治疗 (Stupp et al., N Engl J Med 2005;352:987-996 March 10, 2005)。TMZ是一种烷化剂,可导致双链DNA断裂。TMZ通过在DNA中产生O⁶-甲基鸟嘌呤 (O⁶MeG) 加合物起作用,这将导致错配和形成GC至AT点突变 (Roos et al., Cancer Letters 332 (2013) 237)。用TMZ有效治疗的抗性机制是O⁶-甲基鸟嘌呤-甲基转移酶 (MGMT), 其从O⁶位置去除甲基加合物。在具有功能性MMR系统的细胞中,GC至AT点突变将在两次DNA复制循环后引起双链断裂。正如Roos所说,“O⁶MeG不直接引发细胞凋亡;它需要MMR和DNA复制”。因此,那些新诊断的GBM患者,由于高突变负荷和新抗原负担,最有可能对免疫疗法和/或检查点抑制作出反应,也是最不可能对常规烷化化学治疗有反应的患者。这种认识将解释观察到MMR和MLH1突变实际上是GBM患者存活的阴性预后因子 (Draaisma et al., Acta Neuropathol Commun. 2015;3:88)。这些患者对用TMZ的常规治疗没有应答。

[0011] 本发明提供了针对该挑战的解决方案。虽然由dMMR引起的超突变可以导致更强的免疫原性 (immunogenic) 信号传导,但它们也可能导致对标准化学治疗剂的低反应和低存活率。通过引起双链DNA断裂,TMZ已经证明能够驱动肿瘤中的超突变和更强的免疫原性信

号传导。通过采用化学治疗来人工创建超突变,可以保持肿瘤对标准治疗的敏感性,如果还可以在化学治疗期间保持淋巴细胞存活,那么能同时增加肿瘤免疫原性和对检查点抑制的反应性。

[0012] 不幸的是,随着时间的推移,TMZ驱动的超突变可能导致MMR系统中的突变,导致对TMZ和其他烷化剂的敏感性降低。不受理论的束缚,由TMZ或其他烷化剂引起的超突变最可能是亚克隆特征11突变,其可能不会引起长期免疫原性(Alexandrov et al., Nature, Vol 500, 22 Aug. 2013)。然而,较短的时间,我们的数据表明,双链断裂的启动可以触发DNA损伤反应,导致肿瘤细胞表面上NKG2D受体配体的瞬时上调,并引发先天免疫应答的激活和抗药性 γ δ T细胞的肿瘤杀伤(Lamb et al., PLOS ONE, Vol 8, Issue 1, Jan. 2013)。

[0013] 因此,本发明在癌症进展的早期同时靶向两种机制。不受理论的束缚,由TMZ引起的DNA损伤导致毛细血管扩张性共济失调突变(ATM)和与DNA损伤反应相关的共济失调毛细血管扩张Rad-3相关(ATR)蛋白激酶的上调。DNA损伤反应以及ATM和ATR的上调导致诸如肿瘤细胞表面上的MICA/B和ULBP16的NKG2D配体的上调并启动抗肿瘤免疫应答。通过杀死大部分对化学治疗敏感的肿瘤,同时通过DNA损伤上调免疫反应并通过检查点抑制来消除免疫细胞,我们寻求为癌症患者创造更强、更持久的反应。

[0014] 因此,仍然迫切需要增强、替代或补充目前治疗癌症的方法的联合疗法,特别是那些对化学治疗表现出短暂反应的癌症。包含耐药性免疫活性细胞、免疫检查点抑制剂和化学治疗的联合疗法提供了这样的补充方法。

发明内容

[0015] 本发明提供用于治疗癌症的联合疗法,其包含用于增强免疫活性细胞对癌症的免疫应答的组合物和方法,包括在化学治疗期间保护免受药物诱导的毒性,从而允许联合施用免疫疗法和化学治疗,称为“耐药性免疫疗法”的抗癌治疗与一种或多种周期和/或剂量的免疫检查点抑制剂联合。检查点抑制剂和耐药性免疫疗法的联合可以以任何顺序或基本上同时顺序施用。耐药性免疫疗法包括分离的细胞毒性免疫细胞的遗传修饰。优选地,使用本领域已知的任何方法对分离的细胞毒性免疫细胞进行遗传修饰。优选地,遗传修饰方法包括但不限于:基于HIV的慢病毒系统或基因编辑系统。优选地,基因编辑系统包括定向核酸内切酶的使用,该核酸内切酶包括但不限于:锌指核酸酶(ZFN)、类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN),或蛋白,如Cas9,其与成簇的规律间隔的短回文重复(CRISPR)相关联,以将具有耐药性的遗传元件传递到免疫活性细胞系中。与未修饰的细胞相比,基因工程免疫活性细胞对特定的化学治疗细胞毒性剂产生显著的抗性;然而,在存在或不存在化学治疗剂的情况下,耐药性不影响基因工程细胞杀死靶癌细胞的能力。例如,Spencer H.T.在US2015/0017137中描述了这种耐药性免疫疗法。

[0016] 本发明提供治疗患者癌症的方法,其包括以下步骤:获得任选富集的和/或任选扩增的细胞毒性免疫细胞群,其中细胞毒性免疫细胞包括经遗传修饰以对治疗剂具有抗性的细胞;向有需要的患者施用有效量的基因工程细胞对其具有抗性的治疗剂与遗传修饰的细胞毒性免疫细胞群的组合,并进一步向患者施用有效量的至少一种免疫检查点抑制剂,从而治疗患者的癌症。

[0017] 优选地,用于本发明组合物和方法的细胞毒性免疫细胞群包含 γ δ T-细胞。优选

地,细胞毒性免疫细胞群包含约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的 $\gamma\delta$ T-细胞。优选地,细胞毒性免疫细胞群包含约50%至约95%的 $\gamma\delta$ T-细胞。优选地,用于本发明组合物和方法的细胞毒性免疫细胞群包含 $\gamma\delta$ T-细胞和天然杀伤(NK)细胞。优选地,细胞毒性免疫细胞群包含约1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%或更多的NK细胞。优选地,细胞毒性免疫细胞群包含约5%至约25%的NK细胞。优选地,用于本发明组合物和方法的细胞毒性免疫细胞群包含 $\gamma\delta$ T-细胞、NK细胞和其他免疫活性细胞,其他免疫活性细胞包括但不限于:单核细胞、树突细胞和巨噬细胞。优选地,用于本发明组合物和方法的细胞毒性免疫细胞群包含衍生自人类诱导性多能干细胞(hiPSC)的 $\gamma\delta$ T-细胞。

[0018] 优选地,用于本发明组合物和方法的细胞毒性免疫细胞群包含NK细胞。优选地,用于本发明组合物和方法的细胞毒性免疫细胞群包含NK细胞和 $\gamma\delta$ T-细胞。优选地,细胞毒性免疫细胞群包含约1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%或更多的NK细胞。优选地,细胞毒性免疫细胞群包含约5%至约25%的NK细胞。优选地,用于本发明组合物和方法的细胞毒性免疫细胞群包含NK细胞、 $\gamma\delta$ T-细胞和其他免疫活性细胞,其他免疫活性细胞包括但不限于:单核细胞、树突细胞和巨噬细胞。优选地,用于本发明组合物和方法的细胞毒性免疫细胞群包含衍生自人类诱导性多能干细胞(hiPSC)的NK细胞。

[0019] 优选地,获得经遗传修饰以对治疗剂具有抗性的细胞毒性免疫细胞群的步骤包括:从诸如人类个体或动物个体的个体中获得细胞毒性免疫细胞群,例如通过从个体中获得生物样品,包括但不限于:包括肿瘤活组织检查的血液或组织样品。样品可任选地富集细胞毒性免疫细胞和其他免疫活性细胞和/或样品中存在的细胞可任选地扩增以增加样品中存在的细胞群。细胞毒性免疫细胞优选包含与启动子可操作连接的异源核酸序列的载体进行稳定转化或基因编辑,其中异源核酸序列编码使细胞对一种或多种化学治疗剂具有抗性的多肽。

[0020] 优选地,本发明提供用于治疗患者癌症的系统,其包括具有抑制癌细胞存活特征的细胞毒性治疗剂;包含 $\gamma\delta$ T-细胞、NK细胞或其任意组合的细胞毒性免疫细胞群,并且任选地进一步包括其他免疫活性细胞,其中细胞毒性免疫细胞经遗传修饰以对细胞毒性治疗剂具有抗性;以及阻断癌细胞上的细胞表面蛋白的免疫检查点抑制剂。

[0021] 优选地,本发明提供用于治疗患者的成胶质细胞瘤的系统,其包括具有抑制癌细胞存活并在癌细胞中诱导应激蛋白的特征的治疗剂;细胞毒性免疫细胞群,其中细胞毒性免疫细胞包括 $\gamma\delta$ T-细胞、NK细胞或其任何组合,并且任选地进一步包括其他免疫活性细胞,其中细胞毒性免疫细胞经遗传修饰以对治疗剂具有抗性;与阻断癌细胞上的细胞表面蛋白的免疫检查点抑制剂联合。

[0022] 优选地,用于本发明组合物和方法的细胞毒性免疫细胞群包含 $\gamma\delta$ T-细胞,其中大于约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%的 $\gamma\delta$ T-细胞表达对化学治疗剂具有抗性的多肽,或包含 $\gamma\delta$ T-细胞的分离的组合物,其中大于约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%的 $\gamma\delta$ T-细胞包含编码对化学治疗剂具有抗性的多肽的核酸,或基本上由 $\gamma\delta$ T-细胞组成的分离的组合物,该T-细胞包含编码对化学治疗剂具有抗性的多肽的核酸。优选地,对化学治疗剂具有抗性的多肽为O⁶甲基鸟嘌呤DNA甲基转移酶(MGMT)、二氢叶酸还原酶(L22Y-DHFR)的耐药性变体、胸苷酸合成酶和/或多种耐

药性-1蛋白 (MDR1)。

[0023] 优选地,用于本发明组合物和方法的细胞毒性免疫细胞群包含NK细胞,其中大于约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%的NK细胞表达对化学治疗剂具有抗性的多肽。优选地,用于本发明组合物和方法的细胞毒性免疫细胞包含NK细胞,其中大于约50%的NK细胞表达对化学治疗剂具有抗性的多肽。优选地,用于本发明组合物和方法的细胞毒性免疫细胞群包含NK细胞,其中大于约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%的NK细胞包含编码对化学治疗剂具有抗性的多肽的核酸。优选地,用于本发明组合物和方法的细胞毒性免疫细胞包含NK细胞,其中大于约50%的NK细胞包含编码对化学治疗剂具有抗性的多肽的核酸。优选地,由NK细胞表达的对化学治疗剂具有抗性的多肽为O⁶甲基鸟嘌呤DNA甲基转移酶 (MGMT)、二氢叶酸还原酶 (L22Y-DHFR) 的耐药性变体、胸苷酸合成酶和/或多重耐药性-1蛋白 (MDR1)。

[0024] 优选地,本发明提供包含至少一种检查点抑制剂和分离的细胞毒性免疫细胞群的组合物,该细胞毒性免疫细胞包含 γ δ T-细胞、NK细胞或其任何组合,其中大于约5%、优选大于约50%的细胞毒性免疫细胞群表达对能够抑制癌细胞存活的治疗剂具有抗性的多肽。

附图说明

[0025] 本发明的上述内容和其他目的、特征和优点将从以下对本发明优选实施方案的更具体的描述中变得很明显,如附图中所示,其中相同的附图标记在不同的视图中指代相同的部分。附图不一定按比例绘制,而是将重点放在说明本发明的原理上。

[0026] 图1显示在来自供体1的PBMC的体外培养之前,在 γ δ T细胞上的检查点分子表达。

[0027] 图2显示来自供体1的体外富集的 γ δ T细胞上的检查点分子的上调。

[0028] 图3显示在来自供体2的PBMC的体外培养之前,在 γ δ T细胞上的检查点分子表达。

[0029] 图4显示来自供体2的体外富集的 γ δ T细胞上的检查点分子的上调。

[0030] 图5显示用IL2和Zol刺激后人 γ δ T细胞上的PD-1和CTLA-4的上调。

[0031] 图6显示成胶质细胞瘤肿瘤细胞上的PD-L1表达。

[0032] 图7显示GMP生产的 γ δ T细胞的细胞毒性。

具体实施方式

[0033] 本发明不限于所描述的特定实施方案,因此当然可以改变。还应理解,本文使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,而不是限制性的,因为本发明的范围仅受所附权利要求的限制。

[0034] 在提供一系列值的情况下,应当理解,在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(除非上下文另有明确规定),以及在所述范围内的任何其他所述值或中间值,都包含在本发明内。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在较小范围内,并且也包括在本发明内,受所述范围内任何特别排除的限制。在所述范围包括一个或两个限制的情况下,排除那些包括的限制之一或两者的范围也包括在本发明中。

[0035] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。尽管与本文描述的那些类似或等同的任何方法和材料也可用于本发明的实践或测试,但现在描述优选的方法和材料。

[0036] 本说明书中引用的所有出版物和专利均通过引用并入本文,如同每个单独的出版物或专利被具体地且单独地指出通过引用并入本文,并且通过引用并入本文以公开和描述与所引用的出版物相关的方法和/或材料。任何出版物的引用是在其提交日之前的发明,并且不应被解释为承认本发明无权凭借在先发明而先于这些出版物。此外,提供的出版日期可能与可能需要独立确认的实际出版日期不同。

[0037] 本说明书描述了化学、合成有机化学、生物化学、生物学、分子生物学、分子成像等技术,这些技术在本领域的技术范围内,除非另有说明。这些技术在文献中有充分说明。

[0038] 提出以下实施例以向本领域普通技术人员提供如何实施方法和使用本文公开和要求保护的组合物和化合物的完整发明和描述。

[0039] 除非另有说明,否则本发明不限于特定的材料、试剂、反应材料、制造方法等,因为它们可以变化。还应理解,本文使用的术语仅用于描述特定特征的目的,而不是限制性的。在本发明中,还可以以逻辑上可能的不同顺序执行步骤。

[0040] 必须注意,如说明书和所附权利要求中所使用的,单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指示物,除非上下文另有明确说明。因此,例如,提及“支持物”包括多个支持物。在本说明书和随附的权利要求中,将参考许多术语,除非相反的意图是很明显的,否则这些术语将被定义为具有以下含义。

[0041] 定义

[0042] 在描述和要求保护所公开的主题时,将根据下面给出的定义使用以下术语。

[0043] “施用”是指将本发明的化合物、包含细胞群的生物材料或其组合引入到人或动物个体中。一种优选的化合物施用途径为静脉内施用。其他优选的化合物施用途径可以为腹膜内或胸膜内、或通过导管进入脑。然而,可以使用任何施用途径,例如口服、局部、皮下、腹膜、动脉内、吸入、阴道、直肠、鼻腔、引入脑脊髓液或滴入体腔。还考虑直接注射到靶组织部位,例如实体瘤。

[0044] 本文所用的术语“治疗剂”是指可与癌细胞相互作用的化合物或其衍生物,从而降低细胞的增殖状态和/或杀死细胞。治疗剂的实例包括但不限于化学治疗剂,其包括但不限于烷化剂(例如环磷酰胺、异环磷酰胺);代谢拮抗剂(例如甲氨蝶呤(MTX)、5-氟尿嘧啶或其衍生物);取代的核苷酸;取代的核苷;DNA去甲基化剂(也称为抗代谢物;例如阿扎胞苷);抗肿瘤抗生素(如丝裂霉素、阿霉素);植物来源的抗肿瘤剂(例如长春新碱、长春地辛、**TAXOL®**、紫杉醇、白蛋白结合型紫杉醇(abraxane));顺铂;卡铂;依托泊苷等。这些试剂可以进一步包括但不限于:抗癌剂三甲氨蝶呤(TMTX);替莫唑胺;雷替曲塞(raltitrexed);S-(4-硝基苄基)-6-硫代肌苷(NBMPR);6-苄基鸟嘌呤(6-benzylguanidine)(6-BG);亚硝基脲类[例如,双氯亚硝基脲(BCNU;卡莫司汀)、洛莫司汀(CCNU)+/-丙卡巴肼和长春新碱(PCV方案)、福莫司汀];阿糖胞苷;以及喜树碱;或它们的任何治疗衍生物。

[0045] 本文所用的术语“治疗有效量”是指所施用的化合物或治疗活性组合物的量,其将在一定程度上缓解所治疗的疾病、病症或疾病的一种或多种症状。关于与不受调节的细胞分裂相关的癌症或病理学,治疗有效量是指具有以下效果的量:(1)减小肿瘤大小,(2)抑制(即,在某种程度上减慢,优选停止)异常细胞分裂例如癌细胞分裂,(3)预防或减少癌细胞的转移,和/或(4)在一定程度上缓解(或优选地,消除)一种或多种与病理相关的症状,该症状与不受调节的或异常的细胞分裂相关或由其引起,包括例如癌症或血管生成。

[0046] 本文所用的术语“用于治疗”或“治疗”疾病(或症状或病症)是指预防疾病发生在可能易患该疾病但尚未患病或尚未表现出疾病的症状的人类个体或动物个体中(预防性治疗),抑制疾病(减缓或阻止其发展),缓解疾病的症状或副作用(包括姑息治疗),并引起疾病消退。关于癌症,这些术语还意味着可以增加患有癌症的个体的预期寿命或减少疾病的一种或多种症状。关于癌症,“治疗”还包括增强或延长个体中的抗肿瘤反应。

[0047] 如本文所用,“联合”、“联合疗法”和/或“联合治疗方案”的任何形式的施用是指至少两种治疗活性药物或组合物,其可以以单独的或组合的制剂同时施用,或者在数分钟、数小时或数天间隔的不同时间顺序施用,但以某种方式共同作用以提供所需的治疗反应。

[0048] 如本文所用,术语“增强”是指允许个体或肿瘤细胞改善其响应本文公开的治疗的能力。例如,增强的响应可以包括响应能力的至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%或更多的增加。如本文所用,“增强”还可以指增加对治疗有反应的个体的数量,例如包括化学治疗、耐药性免疫活性细胞和免疫检查点抑制剂的联合疗法。例如,增强的反应可以指对治疗有反应的个体的总百分比,其中该百分比为至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%或更多。

[0049] 本文所用的术语“个体”和“患者”包括人、哺乳动物(例如、猫、狗、马等)、活细胞和其他活生物体。活生物体可以像例如单个真核细胞一样简单,也可以像哺乳动物一样复杂。典型的患者为哺乳动物,特别是灵长类动物,尤其是人类。对于兽医应用,各种各样的个体都将是合适的,例如牲畜,例如牛、绵羊、山羊、奶牛、猪等;家禽,例如鸡、鸭、鹅、火鸡等;以及家养动物,特别是宠物,例如狗和猫。对于诊断或研究应用,多种哺乳动物都将是合适的个体,包括啮齿动物(例如小鼠、大鼠、仓鼠)、兔、灵长类动物和猪,例如近交系猪等。优选地,系统包括样品和个体。术语“活宿主”是指上面提到的存活且未死亡的宿主或生物。术语“活宿主”是指整个宿主或生物体,而不仅仅是从活宿主切除的部分(例如,肝脏或其他器官)。

[0050] 本文所用的术语“ $\gamma\delta$ T-细胞(gamma delta T-cells)”是指在其表面上表达不同T-细胞受体(TCR)的一小部分T-细胞。大多数T-细胞具有由称为 α -TCR链和 β -TCR链的两个糖蛋白链组成的TCR。相反,在 $\gamma\delta$ T-细胞中,TCR由一条 γ -链和一条 δ -链组成。这组T-细胞通常比 $\alpha\beta$ T-细胞少得多,但在被称为上皮内淋巴细胞(IEL)的淋巴细胞群中的肠粘膜中发现其最高丰度。激活 $\gamma\delta$ T-细胞的抗原分子仍然很大程度上未知。然而, $\gamma\delta$ T-细胞的特殊之处在于它们似乎不需要抗原处理和肽表位的MHC呈递,尽管有一些能识别MHC IB类分子。此外, $\gamma\delta$ T-细胞被认为在识别脂质抗原中具有显著作用,并且对应激相关抗原例如MIC-A和MIC-B有反应。

[0051] 本文所用的术语“人类诱导性多能干细胞”(hiPSC)是指一种多能干细胞,其可以直接从已经重编程为能够生成任何其他类型的人类细胞例如治疗性免疫活性细胞的胚胎样多能状态的诸如皮肤或血细胞的人成体细胞中产生。可从不同的个体获得人成体细胞,从中可以从待治疗的患者或成体细胞获得hiPSC。可以用例如逆转录病毒系统或慢病毒系统引入编码能够将成体细胞转化为多能干细胞的转录因子的基因,从而将人成体细胞转化为多能干细胞。

[0052] 如本文所用,术语“抗体”是指免疫球蛋白或其部分,并且包括任何包含抗原结合

位点的多肽,无论来源、来源种类、生产方法和特征。抗体可以由重链和/或轻链或其片段组成。本发明的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包括但不限于:多克隆、单克隆、多特异性、人、人源化、灵长类化或嵌合抗体、单链抗体、表位结合片段,例如Fab、Fab'和F(ab')₂、Fd、Fvs、单链Fvs(scFv)、单链抗体、二硫键连接的Fvs(sdFv)、包含VL或VH结构域的片段、由Fab表达文库产生的片段、和抗个体基因型(抗Id)抗体。ScFv分子是本领域已知的,并且描述于例如第5,892,019号美国专利中。本发明的免疫球蛋白或抗体分子可以是任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或免疫球蛋白分子的亚类。

[0053] 如本文所用,术语“生物治疗”或“生物药物”是指在生物来源中生产的或从生物来源提取的任何医药产品。生物药物不同于化学合成的药物产品。生物药物的实例包括疫苗、血液或血液成分、过敏原制剂、体细胞、基因疗法、组织、重组治疗性蛋白质,包括抗体治疗剂和融合蛋白质,以及活细胞。生物制剂可以由糖、蛋白质或核酸或这些物质的复杂组合组成,或者可以为生物实体,例如细胞和组织。生物制剂分离自各种天然来源-人类、动物或微生物-并且可以通过生物技术方法和其他技术生产。生物治疗剂的具体实例包括但不限于免疫刺激剂、T细胞生长因子、白细胞介素、抗体、融合蛋白和疫苗,例如癌症疫苗。

[0054] 如本文所用,术语“癌症”应给出其普通含义,作为其中异常细胞无控制地分裂的疾病的一般术语。特别地,并且在本发明实施方案的背景下,癌症是指与血管生成相关的癌症。癌细胞可以侵入附近的组织,并可以通过血液和淋巴系统传播到身体的其他部位。有几种主要类型的癌症,例如,恶性上皮肿瘤(carcinoma)是从皮肤或者排列或覆盖内部器官的组织开始的癌症。肉瘤是从骨骼、软骨、脂肪、肌肉、血管或其他结缔组织或支持组织开始的癌症。白血病是从血液形成组织(例如骨髓)开始的癌症,并且导致产生大量异常血细胞并进入血流。淋巴瘤是从免疫系统细胞开始的癌症。

[0055] 当正常细胞失去其作为特定的、受控制的和协调单位的行为时,就会形成肿瘤。通常,实体瘤是异常的组织块,组织通常不包含囊肿或液体区域(一些脑肿瘤确实有囊肿、充满液体的中央坏死区域)。单个肿瘤甚至可能在其中具有不同的细胞群,具有不同的已经出问题的过程。实体瘤可以是良性的(非癌性的)或恶性的(癌性的)。不同类型的实体瘤以形成它们的细胞类型命名。实体瘤的实例是肉瘤、恶性上皮肿瘤和淋巴瘤。白血病(血液癌症)通常不形成实体瘤。

[0056] 代表性癌症包括但不限于成人急性淋巴细胞白血病;儿童急性淋巴细胞白血病;成人急性髓细胞白血病;肾上腺皮质癌;儿童肾上腺皮质癌;AIDS-相关淋巴瘤;AIDS-相关的恶性肿瘤;肛门癌;儿童小脑星形细胞瘤;儿童脑星形细胞瘤;肝外胆管癌;膀胱癌;儿童膀胱癌;骨癌,骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤;儿童成胶质细胞瘤;成人成胶质细胞瘤;儿童脑干神经胶质瘤;成人脑肿瘤;脑肿瘤,儿童脑干神经胶质瘤;脑肿瘤,儿童小脑星形细胞瘤;儿童脑肿瘤,脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤;儿童脑肿瘤,室管膜瘤;儿童脑肿瘤,成神经管细胞瘤;儿童脑肿瘤,幕上原始神经外胚层肿瘤;儿童脑肿瘤,视觉通路和下丘脑神经胶质瘤;儿童脑肿瘤(其他);乳腺癌;乳腺癌和妊娠;儿童乳腺癌;男性乳腺癌;儿童支气管腺瘤/类癌;儿童类癌肿瘤;胃肠道类癌肿瘤;肾上腺皮质癌;胰岛细胞癌;未知原发癌;原发性中枢神经系统淋巴瘤;儿童小脑星形细胞瘤;儿童脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤;宫颈癌;儿童癌症;慢性淋巴细胞白血病;慢性骨髓性白血病;慢性骨髓增生性疾病;肌腱鞘透明

细胞肉瘤;结肠癌;儿童结直肠癌;皮肤T-细胞淋巴瘤;子宫内膜癌;儿童室管膜瘤;卵巢上皮癌;食道癌;儿童食道癌;尤因氏家族肿瘤(Ewing's Family of Tumor);儿童颅外生殖细胞肿瘤;性腺外生殖细胞肿瘤;肝外胆管癌;眼癌,眼内黑色素瘤;眼癌,视网膜母细胞瘤;胆囊癌;胃癌(胃);儿童胃癌(胃);胃肠道类癌肿瘤;儿童颅外生殖细胞肿瘤;性腺外生殖细胞肿瘤;卵巢生殖细胞肿瘤;妊娠滋养细胞肿瘤;儿童脑干神经胶质瘤;儿童视觉通路和下丘脑神经胶质瘤;毛细胞白血病;头颈癌;成人(原发性)肝细胞癌(肝癌);儿童(原发性)肝细胞癌(肝癌);成人霍奇金氏淋巴瘤;儿童霍奇金氏淋巴瘤;在妊娠期间的霍奇金氏淋巴瘤;下咽骨癌;儿童下丘脑和视觉通路神经胶质瘤;眼内黑色素瘤;胰岛细胞癌(内分泌胰腺);卡波西氏肉瘤;肾癌;喉癌;儿童喉癌;成人白血病,急性淋巴细胞;儿童白血病,急性淋巴细胞;成人白血病,急性髓细胞;儿童白血病,急性髓细胞;白血病,慢性淋巴细胞;白血病,慢性粒细胞;毛细胞白血病;唇和口腔癌;成人(原发性)肝癌;儿童(原发性)肝癌;非小细胞肺癌;小细胞肺癌;成人急性淋巴细胞白血病;淋巴细胞白血病,儿童急性;慢性淋巴细胞白血病;AIDS-相关的淋巴瘤;中枢神经系统(原发性)淋巴瘤;皮肤T-细胞淋巴瘤;成人霍奇金氏淋巴瘤;儿童霍奇金氏淋巴瘤;在妊娠期间的霍奇金氏淋巴瘤;成人非霍奇金氏淋巴瘤;儿童非霍奇金氏淋巴瘤;在妊娠期间的非霍奇金氏淋巴瘤;原发性中枢神经系统淋巴瘤;瓦尔登斯特伦(Waldenstrom's)巨球蛋白血症;男性乳腺癌;成人恶性间皮瘤;儿童恶性间皮瘤;恶性胸腺瘤;儿童成神经管细胞瘤;黑色素瘤;眼内黑色素瘤;默克尔细胞癌;恶性间皮瘤;具有隐蔽原发性的转移性鳞状颈癌;儿童多发性内分泌肿瘤综合征;多发性骨髓瘤/浆细胞肿瘤;蕈样真菌病(Mycosis Fungoides);骨髓增生异常综合征;慢性骨髓性白血病;儿童急性骨髓性白血病;多重骨髓瘤;慢性骨髓增生性疾病;鼻腔和鼻窦癌;鼻咽癌;儿童鼻咽癌;成神经细胞瘤;神经纤维瘤;成人非霍奇金氏淋巴瘤;儿童非霍奇金氏淋巴瘤;在妊娠期间的非霍奇金氏淋巴瘤;非小细胞肺癌;儿童口腔癌;口腔和唇癌;口咽癌;骨肉瘤/骨恶性纤维组织细胞瘤;儿童卵巢癌;卵巢上皮癌;卵巢生殖细胞肿瘤;卵巢低恶性潜在肿瘤;胰腺癌;儿童胰腺癌;胰岛细胞胰腺癌;鼻旁窦和鼻腔癌;甲状旁腺癌;阴茎癌;嗜铬细胞瘤;儿童松果体和幕上原始神经外胚层肿瘤;垂体瘤;浆细胞肿瘤/多发性骨髓瘤;胸膜肺部肿瘤;妊娠和乳腺癌;妊娠和霍奇金氏淋巴瘤;妊娠和非霍奇金氏淋巴瘤;原发性中枢神经系统淋巴瘤;成人原发性肝癌;儿童原发性肝癌;前列腺癌;直肠癌;肾细胞(肾)癌;儿童肾细胞癌;肾盂和输尿管过渡细胞癌;视网膜母细胞瘤;儿童横纹肌肉瘤;唾液腺癌;儿童唾液腺癌;肉瘤,尤因氏家族肿瘤;卡波西氏肉瘤;肉瘤(骨肉瘤)/骨恶性纤维组织细胞瘤;肉瘤,儿童横纹肌肉瘤;成人软组织肉瘤;儿童软组织肉瘤;塞扎里综合征;皮肤癌;儿童皮肤癌;皮肤癌(黑色素瘤);梅克尔细胞皮肤癌;小细胞肺癌;小肠癌;成人软组织肉瘤;儿童软组织肉瘤;具有隐蔽原发性的转移性鳞状颈癌;胃(胃)癌;儿童胃(胃)癌;儿童幕上原始神经外胚层肿瘤;皮肤T-细胞淋巴瘤;睾丸癌;儿童胸腺瘤;恶性胸腺瘤;甲状腺癌;儿童甲状腺癌;肾盂和输尿管的移行细胞癌;妊娠期的滋养细胞肿瘤;儿童的未知原发灶的癌症;儿童的不寻常的癌症;输尿管和肾盂过渡细胞癌;尿道癌;子宫肉瘤;阴道癌;儿童视觉通路和下丘脑神经胶质瘤;外阴癌;瓦尔登斯特罗姆巨球蛋白血症;以及威尔姆斯瘤等。

[0057] 肿瘤可分为恶性的或良性的。在这两种情况下,细胞都存在异常的聚集和增殖。在恶性肿瘤的情况下,这些细胞表现得更积极,获得增加的侵袭性。最终,肿瘤细胞甚至可以具有摆脱它们起源的微观环境的能力,扩散到身体的另一个区域(环境非常不同,通常不利

于它们的生长),并在这个新的位置继续快速生长和分裂。这称为转移。一旦恶性细胞转移,实现治愈就更加困难。良性肿瘤具有较少的侵入倾向并且不太可能转移。

[0058] 脑肿瘤在脑内广泛传播,但通常不会在脑外转移。胶质瘤在大脑内部非常具有侵袭性,甚至可以穿过大脑半球。但是,它们确实以不受控制的方式分裂。根据它们的位置,它们可能像恶性病变一样危及生命。这方面的一个实例是大脑中的良性肿瘤,它可以生长并占据头骨内的空间,导致对大脑的压力增加。

[0059] 如本文所用,术语“富集的”是指相对于在如本文所公开的富集之前相同的一种或多种细胞类型样品的总百分比,样品中存在的一种或多种细胞毒性免疫细胞类型(例如, γ δ T-细胞和/或NK细胞)的总百分比增加。例如,对于一种或多种类型的细胞毒性免疫细胞“富集”的样品可以包含样品中一种或多种细胞毒性免疫细胞类型的约10%至100%,而在富集之前样品中一种或多种细胞毒性免疫细胞的总百分比为例如0%-10%。优选地,富集的样品包含至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的一种或多种类型的细胞毒性免疫细胞。可以使用标准技术(例如,流式细胞术技术)对样品富集一种或多种细胞类型。

[0060] 如本文所用,术语“高度富集的”是指增加样品中一种或多种细胞毒性免疫细胞类型的总百分比,使得一种或多种细胞毒性免疫细胞类型可包含在样品中的至少约70%至约100%的细胞毒性免疫细胞类型,而富集前相同类型的细胞毒性免疫细胞的总百分比为例如0%-10%。优选地,高度富集的样品包含至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多的一种或多种类型的细胞毒性免疫细胞。可以使用标准技术(例如,流式细胞术技术)对样品高度富集一种或多种细胞类型。

[0061] 本文所用的关于样品中一种或多种细胞毒性免疫细胞扩增的术语“扩增的”和“扩增”是指样品中一种或多种细胞毒性免疫细胞的数量增加,例如至少约2倍,优选约5倍,优选至少10倍,优选约至少50倍或更多。细胞毒性免疫细胞群的扩增可以通过本领域已知的许多方法完成。例如,在存在饲养淋巴细胞和白细胞介素-2(IL-2)或白细胞介素-15(IL-15)(优选IL-2)的情况下,使用非特异性T-细胞受体刺激可以快速扩增T-细胞。非特异性T-细胞受体刺激物可包括约30ng/ml的OKT3,一种小鼠单克隆抗CD3抗体(可从ORTHOMCNEIL®,Raritan,N.J.获得)。或者,在T-细胞生长因子,例如300IU/ml IL-2或IL-15、优选IL-2的存在下,可以通过用一种或多种癌症的抗原(包括其抗原部分,例如表位或细胞)体外刺激外周血单核细胞(PBMC)来快速扩增T-细胞,该抗原可以任选地从载体中表达,例如人白细胞抗原A2(HLA-A2)结合肽,例如0.3 μ M MART-1:26-35(27L)或gp100:209-217(210M)。

[0062] 如本文所用,术语“融合蛋白”是指嵌合分子,其包括例如具有至少一个靶结合位点和至少一个异源部分(即与其不是天然结合的部分)的免疫球蛋白抗原结合结构域。氨基酸序列通常可以存在于融合多肽中聚集在一起的单独蛋白质中,或者它们通常可以存在于同一蛋白质中,但是在融合多肽中以新的排列方式存在。融合蛋白可以例如通过化学合成产生,或通过产生和翻译其中肽区以所需关系编码的多肽来产生。

[0063] 本文所用的术语“减少癌症”是指肿瘤块的大小或体积减小,个体中转移的肿瘤数量减少,增殖状态下(癌细胞繁殖的程度)癌细胞的数量减少等。

[0064] 如本文所用,术语“分离的”和分离的细胞群“是指从个体中发现它们的组织或状

态中移出的细胞或多个细胞。该术语还可包括根据以下这些参数分离的细胞,例如但不限于:细胞表面标志物,报告标志物,例如染料或标签。

[0065] 本文所用的术语“表达的”或“表达”是指从基因转录以产生RNA核酸分子,其至少部分地与基因的两条核酸链之一的区域互补。本文所用的术语“表达的”或“表达”还指从所述RNA核酸分子翻译以产生蛋白、多肽或其部分或片段。

[0066] 本文所用的术语“启动子”是指确定来自RNA聚合酶的转录起始位点的DNA序列。“启动子-近端元件”可以为转录起始位点的约200个碱基对内的调节序列。

[0067] 术语“重组细胞”是指具有在自然界中彼此不共价连接的核酸区段的新组合的细胞。可以使用本领域技术人员可获得的多种核酸操作技术将新的核酸区段组合引入生物体中。重组细胞可以是单个真核细胞、或单个原核细胞、或哺乳动物细胞。重组细胞可以含有为外基因组的载体。外基因组核酸载体不插入细胞的基因组中。重组细胞可以进一步含有为基因组内的载体或其部分。术语“基因组内”定义为掺入重组细胞基因组内的核酸构建体。

[0068] 本文所用的术语“重组核酸”和“重组DNA”是指在真核或原核细胞中非天然存在的至少两种核酸序列的组合。核酸序列包括但不限于核酸载体、基因表达调控元件、复制起点、当表达时具有抗生素抗性的合适基因序列、蛋白质编码序列等。术语“重组多肽”意指包括通过重组DNA技术产生的多肽,使得其与天然存在的多肽在位置、纯度或结构上不同。通常,这种重组多肽将以与通常在自然界中观察到的量不同的量存在于细胞中。

[0069] 这里使用的术语“可操作地”或“可操作地连接”是指编码和控制序列的配置,以便执行所需的功能。因此,与编码序列可操作地连接的控制序列能够影响编码序列的表达。当DNA聚合酶结合启动子序列并将编码序列转录成可翻译成编码蛋白质的mRNA时,编码序列与细胞中转录调节区可操作地连接或受转录调节区的控制。控制序列不需要与编码序列邻接,只要它们起到指导其表达的作用即可。因此,例如,插入的非翻译但转录的序列可以存在于启动子序列和编码序列之间,并且启动子序列仍然可以被认为与编码序列“可操作地连接”。

[0070] 与诸如编码序列和控制序列的核酸序列相关的术语“异源的”和“外源的”表示通常与重组构建体的区域或与特定染色体基因座不相关的和/或通常不与特定细胞相关的序列。因此,核酸构建体的“异源”区域为在另一种核酸分子内的或附着的核酸的可识别区段,其在自然界中未发现与其他分子结合。例如,构建体尖端的异源区域可以包括编码序列,其侧翼是与天然编码序列无关的序列。异源编码序列的另一个实例是其中编码序列本身未在自然界中发现的构建体(例如,具有与天然基因不同的密码子的合成序列)。类似地,用通常不存在于宿主细胞中的构建体转化的宿主细胞将被认为是用于本发明的目的的异源的。

[0071] 优选地,启动子将通过添加或缺失序列进行修饰,或用替代序列替换,包括天然和合成序列以及可以是合成和天然序列的组别的序列。许多真核启动子包含两种类型的识别序列:TATA盒和上游启动子元件。前者位于转录起始位点的上游,参与指导RNA聚合酶在正确位点启动转录,而后者似乎确定转录速率并且位于TATA盒的上游。增强子元件也可以刺激来自连接的启动子的转录,但许多仅在特定的细胞类型中起作用。源自病毒的许多增强子/启动子元件,例如SV40、劳斯氏肉瘤病毒(RSV)和CMV启动子在多种细胞类型中具有活性,并且被称为“组成型”或“普遍存在的”。插入克隆位点的核酸序列可以具有编码目标多

肽的任何开放阅读框架,条件是编码序列编码目的多肽时,其应该缺少可以阻断合适的 mRNA 分子产生和/或产生异常剪接或异常 mRNA 分子的隐蔽剪接位点。

[0072] 主要使用的终端区域将是便利性之一,因为终端区域看起来是相对可互换的。终端区域对于预期的目标核酸序列可以是天然的,或者可以源自另一来源。

[0073] 如本文所用,术语“靶向疗法”是指靶向免疫系统的任何方面的任何治疗分子。

[0074] 本文所用的术语“载体”是指由单链、双链、环状或超螺旋的 DNA 或 RNA 组成的多核苷酸。典型的载体可以包含以适当距离可操作地连接的以下元件,以允许功能性基因表达:复制起点、启动子、增强子、5' mRNA 前导序列、核糖体结合位点、核酸盒、终止和多腺苷酸化位点,以及选择标记序列。在特定应用中可以省略这些元件中的一个或多个。核酸盒可包括用于插入待表达的核酸序列的限制性位点。在功能性载体中,核酸盒含有待表达的核酸序列,包括翻译起始和终止位点。

[0075] 构建载体以使特定编码序列位于具有适当调节序列的载体中,相对于控制序列的编码序列的定位和定向使得编码序列在控制或调节序列的“控制”下转录。为了实现这一目的,可能需要修饰编码特定目的蛋白质的序列。例如,在某些情况下,可能需要修改序列,使其可以以适当的方向附着到控制序列;或保持阅读框架。可以在插入载体之前将控制序列和其他调节序列连接到编码序列。或者,可以将编码序列直接克隆到已经含有控制序列的表达载体和在控制序列的调控下处于阅读框内的适当限制性位点。

[0076] 本文所用的术语“基于慢病毒的载体”是指设计用于以位点特异性方式将外源多核苷酸序列可操作地插入宿主基因组中的慢病毒载体。基于慢病毒的靶向载体可以基于但不限于例如 HIV-1、HIV-2、猴免疫缺陷病毒 (SIV) 或猫免疫缺陷病毒 (FIV)。优选地,基于慢病毒的靶向载体是基于 HIV 的靶向载体。该载体可包含 HIV 的多核苷酸序列的全部或部分。

[0077] 术语“转化”、“转导”和“转换”都表示将多核苷酸引入受体细胞或细胞中。

[0078] 联合耐药免疫疗法与免疫检查点抑制剂

[0079] 对癌症的化学治疗的主要限制是药物诱导的免疫毒性,其导致免疫活性细胞的杀死和有效免疫系统的丧失,否则其将抵抗不期望的感染或提供对癌细胞的防御。对抗化学治疗的严重毒性作用的一种策略是通过引入设计用于表达具有耐药性的 cDNA 序列的逆转录病毒载体选择性地遗传修饰细胞毒性免疫活性细胞,其可以主动靶向那些能够抵抗同时给予化学治疗剂的癌细胞。

[0080] 免疫检查点蛋白调节免疫系统中的 T 细胞功能。T 细胞在细胞介导的免疫中起重要作用。检查点蛋白质与特定配体相互作用,这些配体将信号发送到 T 细胞并基本上关闭或抑制 T 细胞功能。癌细胞通过在其表面上驱动高水平的检查点蛋白表达来利用该系统,这导致控制在进入肿瘤微环境的 T 细胞表面上表达检查点蛋白的 T 细胞,从而抑制抗癌免疫应答。因此,检查点蛋白的抑制将导致 T 细胞功能的恢复和对癌细胞的免疫应答。检查点蛋白的实例包括但不限于:CTLA-4、PDL1 (B7-H1、CD274)、PDL2 (B7-DC、CD273)、PD1、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (B7-S1、B7x、VCTN1)、BTLA (CD272)、HVEM、TIM3 (HAVcr2)、GAL9、LAG3 (CD223)、VISTA、KIR、2B4 (CD244;属于 CD2 分子家族并在所有 NK、 $\gamma \delta$ 和记忆 CD8⁺ ($\alpha\beta$) T 细胞中表达)、CD160 (也称为 BY55)、CGEN-15049、CHK1 和 CHK2 激酶、OX40、A2aR 和各种 B-7 家族配体。

[0081] 程序性细胞死亡蛋白 1 (PD-1) 是 288 个氨基酸的细胞表面蛋白分子,其在 T 细胞和

pro-B细胞上表达并在其命运/分化中起作用。PD-1具有两个配体PD-L1和PD-L2,它们是B7家族的成员。PD-L1蛋白在响应LPS和GM-CSF处理的巨噬细胞和树突细胞(DC)上被上调,并且在TCR和B细胞受体信号传导时在T细胞和B细胞上被上调。PD-1负调节T细胞应答。

[0082] PD-1在肿瘤特异性逃避免疫监视中发挥作用。已经证明PD-1在慢性骨髓性白血病(CML)和急性骨髓性白血病(AML)中的肿瘤特异性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)中高度表达。PD-1也在黑色素瘤浸润性T淋巴细胞(TIL)中上调[Dotti (2009) Blood 114 (8):1457-58]。已发现肿瘤表达PD-1配体PDL-1和PDL-2。例如,PDL-1存在于成胶质细胞瘤中,尤其是在间充质亚型中。(Nat Rev Neurol 2015;11:504-515)。肿瘤中PDL-1和PDL-2的表达,以及CTL中PD-1的上调,可能是T细胞功能丧失和CTL介导有效抗肿瘤免疫应答的能力丧失的促成因素。研究人员已经证明,在慢性感染淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)的小鼠中,抗PD-1抗体的施用阻断了PD-1-PDL相互作用并且能够恢复一些T细胞功能(增殖和细胞因子分泌),并导致病毒载量的降低(Barber et al (2006) Nature 439 (9):682-687)。

[0083] 肿瘤细胞本身表达PD-L1,并且被认为通过该机制限制T细胞应答。进一步显示PD-1的抑制导致效应T细胞的扩增和B16黑色素瘤模型中T调节细胞群的限制。阻断PD-1、CTLA-4或IDO(吡啶胺2,3-双加氧酶)可恢复IL-2的产生,并允许肿瘤微环境中存在的CD8+ T细胞的增殖增加。已经显示抗PDL1治疗拯救并允许抗原特异性疫苗产生的CD8+ T细胞扩增以排斥肿瘤。这些数据表明PD-1/PD-L1轴调节活化的肿瘤特异性T细胞。

[0084] 黑色素瘤、非小细胞肺癌和肾细胞癌的临床试验已经显示出一些抗PD-1阻断患者的抗肿瘤反应。还描述了在晚期黑色素瘤、非小细胞肺癌、前列腺癌、肾细胞癌、膀胱癌和结肠直肠癌的情况下PD-1抑制的显著益处。小鼠模型的研究已将这一证据应用于神经胶质瘤治疗。已经描述了当施用IDO、CTLA-4和PD-L1抑制剂的联合治疗时肿瘤浸润性Treg减少和存活增加。

[0085] 目前有几种PD-1抑制剂正在临床试验中进行测试。CT-011是针对PD-1的人源化IgG1单克隆抗体。最近完成了经历自体干细胞移植的弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)个体的II期临床试验。初步结果显示,70%的个体在随访期结束时无进展,而对照组为47%;82%的个体存活,而对照组为62%。该试验确定CT-011不仅可以阻断PD-1功能,还可以增强自然杀伤细胞的活性,从而加强抗肿瘤免疫反应。

[0086] BMS 936558为靶向PD-1试剂的完全人IgG4单克隆抗体。在I期试验中,在患有晚期治疗难治性恶性肿瘤的个体中每两周施用BMS-936558显示出持久的部分或完全消退。在患有黑色素瘤(28%)和肾细胞癌(27%)的个体中观察到最显著的反应率,但在患有非小细胞肺癌(NSCLC)的个体中也观察到显著的临床活性,并且一些反应持续存在超过一年。它的耐受性也相对较好;14%的个体发生等级 ≥ 3 的不良事件。

[0087] BMS 936559为靶向PD-1配体PD-L1的完全人IgG4单克隆抗体。I期结果显示,每两周一次服用这种药物可以产生持久的反应,尤其是在患有黑色素瘤的个体中。取决于晚期NSCLC、黑色素瘤、RCC或卵巢癌患者的癌症类型,客观缓解率范围为6%-17%,部分个体的反应持续一年或更长时间。

[0088] MK 3475为I期开发中的人源化IgG4抗PD-1单克隆抗体,在一项由五部分组成的研究中评估该药物在患有进展性、局部晚期或转移性癌、黑色素瘤或NSCLC的患者中的剂量、安全性和耐受性。

[0089] MPDL 3280A为一种单克隆抗体,也靶向PD-L1,在患有BRAF V600突变转移性黑色素瘤的个体中与BRAF抑制剂维莫非尼(vemurafenib)联合,以及在有或没有化学治疗的患有晚期实体瘤的个体中与靶向血管内皮生长因子受体(VEGFR)的贝伐单抗联用进行I期检测。

[0090] AMP 224为第二PD-1配体、PD-L2和IgG1的细胞外结构域的融合蛋白,其具有阻断PD-L2/PD-1相互作用的潜力。AMP-224作为患有晚期癌症的个体的单药治疗目前正在进行I期测试。

[0091] Medi 4736为一种抗PD-L1抗体,用于晚期恶性黑色素瘤、肾细胞癌、NSCLC和结肠直肠癌患者的I期临床试验。

[0092] CTLA4(细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白)为一种下调免疫系统的蛋白质受体。CTLA4存在于T-细胞表面,其导致细胞免疫攻击抗原。可以通过刺激T-细胞上的CD28受体来开启T-细胞攻击。可以通过刺激CTLA4受体来关闭T-细胞攻击。同类第一的免疫疗法,伊匹单抗(YERVOY®),一种靶向T-细胞表面CTLA-4的单克隆抗体,用于治疗黑色素瘤。

[0093] 优选地,本发明提供治疗有需要的个体的癌症的方法,包括向个体施用治疗剂联合耐药免疫活性细胞和免疫检查点抑制剂。优选地,检查点抑制剂为生物治疗剂或小分子。优选地,检查点抑制剂为单克隆抗体、人源化抗体、完全人抗体、融合蛋白或它们的组合。优选地,检查点抑制剂抑制检查点蛋白,该检查点蛋白可以为CTLA-4、PDL1、PDL2、PD1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD160、CGEN-15049、CHK1、CHK2、A2aR、OX40、B-7家族配体或它们的组合。优选地,检查点抑制剂与检查点蛋白的配体相互作用,该检查点蛋白可以为CTLA-4、PDL1、PDL2、PD1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD160、CGEN-15049、CHK1、CHK2、OX40、A2aR、B-7家族配体或它们的组合。

[0094] 优选地,治疗剂为化学治疗剂、免疫刺激剂、T-细胞生长因子、白细胞介素、抗体、疫苗或它们的任何组合。优选地,白细胞介素为IL-7或IL-15。优选地,白细胞介素为糖基化的IL-7。

[0095] 优选地,耐药性免疫活性细胞、治疗剂和检查点抑制剂可以同时或以任何顺序依次施用、单独施用,或者施用一个,然后同时施用另外两个、或者同时施用两个,然后施用第三个。优选地,在治疗剂和免疫检查点抑制剂之前施用耐药性免疫活性细胞。优选地,检查点抑制剂为PD-1抑制剂或CTLA-4抑制剂。

[0096] 优选地,用于本发明组合物和方法的细胞毒性免疫细胞群包含 γ δ T-细胞、NK细胞或其任何组合。优选地,细胞毒性免疫细胞群包含约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的 γ δ T-细胞。优选地,细胞毒性免疫细胞群包含约50%至约95%的 γ δ T-细胞。优选地,用于本发明组合物和方法的细胞毒性免疫细胞群包含 γ δ T-细胞和天然杀伤(NK)细胞。优选地,细胞毒性免疫细胞群包含约1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%或更多的NK细胞。优选地,细胞毒性免疫细胞群包含约5%至约25%的NK细胞。

[0097] 优选地,用于本发明组合物和方法的分离的细胞毒性免疫细胞组合物包含 γ δ T-细胞、NK细胞或它们的任何组合,并任选地还包含其他免疫活性细胞,包括但不限于:单核细胞、巨噬细胞和树突细胞,其中组合物中存在大于约5%、大于约10%、大于约20%、大于约30%、大于约40%、大于约50%或更多的表达对化学治疗剂具有抗性的多肽的细胞毒性

免疫细胞。优选地,根据本发明使用的分离的细胞毒性免疫细胞的组合物包含 $\gamma\delta$ T-细胞、NK细胞或它们的任何组合,其中至少约50%或更多的 $\gamma\delta$ T-细胞(当存在时)和大于约50% NK细胞(当存在时)表达对化学治疗剂具有抗性的多肽。优选地,对化学治疗剂具有抗性的多肽为O⁶甲基鸟嘌呤DNA甲基转移酶(MGMT)、二氢叶酸还原酶(L22Y-DHFR)的耐药性变体、胸苷酸合成酶、多重耐药性-1蛋白(MDR1)。

[0098] 优选地,本发明提供治疗个体的癌症的方法,其包括:向有需要的个体施用免疫检查点抑制剂联合化学治疗剂和免疫活性细胞的化学治疗抗性组合物,该组合物包含 $\gamma\delta$ T-细胞、NK细胞或它们的任何组合,并且还任选地包含其他免疫活性细胞,包括但不限于:经遗传工程改造以表达对化学治疗剂具有抗性的多肽的单核细胞、巨噬细胞和树突细胞。在该环境中,包含耐药性 $\gamma\delta$ T-细胞、NK细胞或其任何组合的组合物在体外产生和扩增可以允许与化学治疗和检查点抑制剂同时施用基于免疫活性细胞的治疗,潜在地改善肿瘤清除同时建立并维持抗肿瘤免疫,这可能导致长期肿瘤清除。优选地,免疫活性细胞经基因工程改造以表达至少一种、至少两种、至少三种或更多种不同的肿瘤识别部分,其中每种肿瘤识别部分识别肿瘤抗原。

[0099] 优选地,本发明提供治疗癌症、尤其是癌性肿瘤的方法。本发明的方法联合使用可以杀死或减少癌细胞增殖的化学治疗剂与免疫疗法和免疫检查点抑制剂,从而有效地消除那些产生耐药性或以其他方式逃避化学治疗剂的癌细胞。本发明的方法提供分离细胞毒性免疫细胞,包括但不限于:来自待治疗患者或来自其他来源的 $\gamma\delta$ T-细胞,如在Lamb L.S.的第7,078,034号美国专利中所述,其全部内容通过引用并入本文。然后可以用包含编码多肽的异源核苷酸序列的核酸载体转染分离的细胞,该多肽对选择的细胞化学治疗剂具有抗性。然后,需要治疗癌症、尤其是肿瘤的患者可以在化学治疗剂和检查点抑制剂之前、之后或与化学治疗剂和检查点抑制剂一起接受一剂或多剂量的转染的T-细胞。该药物本身虽然旨在对靶癌细胞有毒,并且会降低细胞的增殖和活力,但也可能诱导肿瘤的微环境,以减少局部肿瘤来源的免疫抑制,并改善细胞向肿瘤的迁移,以及在应激相关蛋白的癌细胞的细胞表面上的形成。例如,转染的 $\gamma\delta$ T-细胞具有能够识别并因此靶向这种应激相关配体的特征,从而特异性地或优先地靶向癌细胞。

[0100] 优选地,包含 $\gamma\delta$ T-细胞、NK细胞或它们的组合的遗传修饰的细胞毒性免疫细胞可以通过例如但不限于:直接注射到肿瘤块中、递送至进入肿瘤块的血管或两者的组合。例如,预期通过插入肿瘤块中的空心针(cannulated needle)或导管、腔内切除后、腹膜内或心室内的直接植入,可将细胞递送至患者脑中的成胶质细胞瘤块。

[0101] 优选地,在联合免疫疗法和化学治疗以治疗人类个体或动物患者的癌症的一些方案中,可将细胞因子(IL-2、IL-12、GM-CSF等)递送至患者以促进细胞毒性淋巴细胞的形成。在其他方法中,可以使用抗CD137特异性抗体。CD137为受体的肿瘤坏死因子(TNF)/神经生长因子(NGF)家族的成员,并且由活化的T-和B-淋巴细胞及单核细胞表达;已发现其配体在免疫应答的调节中起重要作用。抗CD137单克隆抗体可以特异性结合表达CD137的免疫细胞,例如活化的T-细胞和新鲜分离的小鼠树突细胞(DC),从而刺激针对肿瘤细胞的免疫应答,尤其是细胞毒性T-细胞应答。

[0102] 优选地,本发明提供治疗患者癌症的方法,其包括以下步骤:获得细胞毒性免疫细胞群,其中分离的细胞毒性免疫细胞经遗传修饰以对治疗剂具有抗性;向有需要的患者施

用有效量的治疗剂;向患者施用分离的遗传修饰的细胞毒性免疫细胞群,于是将细胞毒性免疫细胞递送至肿瘤中;并向患者施用有效量的免疫检查点抑制剂,从而减少患者的癌症。

[0103] 优选地,细胞毒性免疫细胞为 $\gamma\delta$ T-细胞。优选地,细胞毒性免疫细胞为 $\gamma\delta$ T-细胞和天然杀伤(NK)细胞。优选地,细胞毒性免疫细胞为 $\gamma\delta$ T-细胞、NK细胞,并且可以进一步包括其他免疫活性细胞,包括但不限于:单核细胞、巨噬细胞和树突细胞。优选地,细胞毒性免疫细胞可以从患有癌症的患者中分离。优选地,细胞毒性免疫细胞可以从患有癌症的患者以外的来源分离。

[0104] 优选地,细胞毒性免疫细胞为衍生自人类诱导性多能干细胞(hiPSC)的 $\gamma\delta$ T-细胞。优选地,细胞毒性免疫细胞为 $\gamma\delta$ T-细胞和衍生自人类诱导性多能干细胞(hiPSC)的NK细胞。优选地,细胞毒性免疫细胞衍生自人类诱导性多能干细胞(hiPSC)且为 $\gamma\delta$ T-细胞、NK细胞,并且可以进一步包括其他免疫活性细胞,包括但不限于:单核细胞、巨噬细胞和树突细胞。优选地,多能干细胞可以从患有癌症的患者中分离。优选地,多能干细胞可以从患有癌症的患者以外的来源分离。

[0105] 优选地,治疗剂的特征在于,当细胞接受异源核酸时,细胞对所述治疗剂产生抗性,并且其中异源核酸在细胞中表达。优选地,治疗剂可以为选自以下的细胞毒性化学治疗剂:

[0106] 烷化剂(例如环磷酰胺、异环磷酰胺);代谢拮抗剂(例如甲氨蝶呤(MTX)、5-氟尿嘧啶或其衍生物);DNA去甲基化剂(也称为抗代谢物;例如阿扎胞苷);取代的核苷酸;取代的核苷;抗肿瘤抗生素(如丝裂霉素、阿霉素);植物来源的抗肿瘤剂(例如长春新碱、长春地辛、TAXOL®、紫杉醇、abraxane);顺铂;卡铂;依托泊苷等。这些试剂可以进一步包括但不限于:抗癌剂三甲氨蝶呤(TMTX);替莫唑胺;雷替曲塞;S-(4-硝基苄基)-6-硫代肌苷(NBMPR);6-苄基鸟嘌呤(6-BG);亚硝基脲类[例如,双氯亚硝基脲(BCNU;卡莫司汀)、洛莫司汀(CCNU)+/-丙卡巴肼和长春新碱(PCV方案)、福莫司汀];阿糖胞苷;喜树碱;以及它们的任何治疗衍生物。

[0107] 优选地,获得经遗传修饰以对治疗剂具有抗性的细胞毒性免疫细胞群的步骤包括:从诸如人类个体或动物个体的个体中获得细胞毒性免疫细胞群,例如通过从个体中获得生物样品,包括但不限于:包含肿瘤活组织检查的血液或组织样品。任选地可富集样品以获得细胞毒性免疫细胞和其他免疫活性细胞,和/或任选地可扩增样品中存在的细胞以增加样品中存在的细胞群。优选地,包含与启动子可操作连接的异源核酸序列的载体来稳定转染或基因编辑细胞,其中异源核酸序列编码使细胞对一种或多种治疗剂如化学治疗剂具有抗性的多肽。优选地,可以有效地维持稳定转染的细胞毒性免疫细胞群。

[0108] 优选地,治疗剂可以为三甲氨蝶呤或甲氨蝶呤,异源核酸序列编码二氢叶酸还原酶或其衍生物。优选地,治疗剂可以为替莫唑胺或其治疗活性衍生物,并且异源核酸序列可以编码O⁶甲基鸟嘌呤DNA甲基转移酶或其衍生物。优选地,化学治疗剂可以为顺铂、阿霉素或紫杉醇、或其治疗活性衍生物,并且异源核酸序列可以编码多重耐药性-1蛋白(MDR1)或其衍生物。

[0109] 优选地,可以将分离的遗传修饰的细胞毒性免疫细胞、治疗剂和免疫检查点抑制剂共同施用于患者。优选地,可以将遗传修饰的细胞毒性免疫细胞、治疗剂和免疫检查点抑制剂顺序施用于患者。优选地,可以将遗传修饰的细胞毒性免疫细胞、治疗剂和免疫检查点

抑制剂同时施用于患者。优选地,将遗传修饰的细胞毒性免疫细胞直接施用于肿瘤或近端的血管并导入肿瘤。优选地,肿瘤为成胶质细胞瘤。

[0110] 优选地,免疫检查点抑制剂可以为生物治疗剂或小分子。优选地,检查点抑制剂为单克隆抗体、人源化抗体、完全人抗体、融合蛋白、抗原结合片段或它们的组合。优选地,检查点抑制剂抑制检查点蛋白,该检查点蛋白可以为CTLA-4、PDL1、PDL2、PD1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD160、CGEN-15049、CHK1、CHK2、A2aR、OX40、B-7家族配体或它们的组合。优选地,检查点抑制剂与检查点蛋白的配体相互作用,该检查点蛋白可以为CTLA-4、PDL1、PDL2、PD1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD160、CGEN-15049、CHK1、CHK2、A2aR、OX40、B-7家族配体或它们的组合。示例性免疫检查点抑制剂包括曲美母单抗 (Tremelimumab) (CTLA-4阻断抗体)、抗OX40、PD-L1单克隆抗体 (抗B7-H1; MEDI4736)、MK-3475 (PD-1阻断剂)、**OPDIVO®**/纳武单抗 (抗-PD1抗体)、CT-011 (抗PD1抗体)、BY55单克隆抗体、AMP224 (抗PDL1抗体)、BMS-936559 (抗PDL1抗体)、MPLDL3280A (抗PDL1抗体)、MSB0010718C (抗PDL1抗体) 和**YERVOY®**/伊匹单抗 (抗CTLA-4检查点抑制剂)。检查点蛋白配体包括但不限于PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、CD28、CD86和TIM-3。

[0111] 优选地,本发明提供一类抑制CTLA-4的免疫检查点抑制剂药物的用途。用于本发明方法的合适的抗CTLA4拮抗剂包括但不限于:抗CTLA4抗体、人抗CTLA4抗体、小鼠抗CTLA4抗体、哺乳动物抗CTLA4抗体、人源化抗CTLA4抗体、单克隆抗CTLA4抗体、多克隆抗CTLA4抗体、嵌合抗CTLA4抗体、MDX-010 (伊匹单抗)、曲美母单抗、抗CD28抗体、抗CTLA4adnectins、抗CTLA4结构域抗体、单链抗CTLA4片段、重链抗CTLA4片段、轻链抗CTLA4片段和激动 (agonize) 共刺激途径的CTLA4抑制剂。优选地,另外的抗CTLA4拮抗剂包括但不限于以下的抑制剂:任何能够破坏CD28抗原与其同源配体结合的能力的、抑制CTLA4与其同源配体结合的能力的、通过共刺激途径增强T-细胞响应的、破坏B7与CD28和/或CTLA4结合的能力的、破坏B7激活共刺激途径的能力的、破坏CD80与CD28和/或CTLA4结合的能力的、破坏CD80激活共刺激途径的能力的、破坏CD86与CD28和/或CTLA4结合的能力的、破坏CD86激活共刺激途径的能力的、以及破坏共刺激途径的通常被激活的抑制剂。这必然包括CD28、CD80、CD86、CTLA4的小分子抑制剂以及共刺激途径的其他成员;针对CD28、CD80、CD86、CTLA4以及共刺激途径的其他成员的抗体;针对CD28、CD80、CD86、CTLA4以及共刺激途径的其他成员的反义分子;针对CD28、CD80、CD86、CTLA4以及共刺激途径的其他成员的adnectins;CD28、CD80、CD86、CTLA4的RNAi抑制剂 (单链和双链) 以及共刺激途径的其他成员、其他抗CTLA4拮抗剂。

[0112] 优选地,免疫刺激剂、T-细胞生长因子和白细胞介素可以与检查点抑制剂和耐药性免疫疗法联合使用。免疫刺激剂为通过诱导其任何组分的活化或增加其活性来刺激免疫系统的物质 (药物和营养素)。免疫刺激剂包括但不限于:细菌疫苗、集落刺激因子、干扰素、白细胞介素、其他免疫刺激剂、治疗性疫苗、疫苗组合和病毒疫苗。T-细胞生长因子为刺激T-细胞增殖的蛋白质。T-细胞生长因子的实例包括IL-2、IL-7、IL-15、IL-17、IL21和IL-33。

[0113] 优选地,本发明提供包含至少一种检查点抑制剂和分离的细胞毒性免疫细胞群的组合物,该分离的细胞毒性免疫细胞群包含 γ δ T-细胞、NK细胞或其任何组合,其中大于约5%、优选大于约50%的细胞毒性免疫细胞群表达对化学治疗剂具有抗性的多肽。优选地,组合物包含至少一种检查点抑制剂和包含 γ δ T-细胞和NK细胞的分离的细胞毒性免疫细胞

群,其中约50%至约95%的细胞毒性免疫细胞群为 $\gamma\delta$ T-细胞,并且其中约5%至约25%的细胞毒性免疫细胞群为NK细胞。

[0114] 优选地,本文公开的治疗剂、免疫检查点抑制剂、生物治疗剂或药物组合物可以通过各种途径施用至个体,包括例如口服或胃肠外,例如静脉内、肌肉内、皮下、眼内、囊内、腹膜内、直肠内、脑池内、肿瘤内、血管内、皮内或例如分别使用皮肤贴剂或透皮离子电渗疗法通过皮肤被动或促进吸收。治疗剂、检查点抑制剂、生物治疗剂或药物组合物也可以施用于病理状态的部位,例如,通过静脉内或动脉内进入血管供应至肿瘤。

[0115] 优选地,免疫检查点抑制剂以小于0.0001mg/kg、0.0001-0.001mg/kg、0.001-0.01mg/kg、0.01-0.05mg/kg、0.05-0.1mg/kg、0.1-0.2mg/kg、0.2-0.3mg/kg、0.3-0.5mg/kg、0.5-0.7mg/kg、0.7-1mg/kg、1-2mg/kg、2-3mg/kg、3-4mg/kg、4-5mg/kg、5-6mg/kg、6-7mg/kg、7-8mg/kg、8-9mg/kg、9-10mg/kg、至少10mg/kg、或其任何组合剂量施用。优选地,检查点抑制剂施用每周至少一次、每周至少两次、每周至少三次、每两周至少一次、或每个月或每两个月至少一次。优选地,检查点抑制剂以单剂、两剂、三剂、四剂、五剂或六剂或更多剂的形式施用。

[0116] 优选地,本发明提供用于治疗患者癌症的系统,其包含具有抑制癌细胞存活特征的细胞毒性治疗剂、分离的细胞毒性免疫细胞群和免疫检查点抑制剂,其中细胞毒性免疫细胞经遗传修饰以对治疗剂具有抗性。优选地,细胞毒性免疫细胞群包含 $\gamma\delta$ T-细胞、NK细胞或其任何组合。优选地,细胞毒性免疫细胞群包含 $\gamma\delta$ T-细胞和天然杀伤细胞,并且任选地包含其他免疫活性细胞。优选地,细胞毒性免疫细胞群可以包含与启动子可操作地连接的异源核酸序列,其中异源核酸序列编码多肽,当在细胞中表达时多肽对细胞治疗剂具有抗性。优选地,治疗剂为选自以下的细胞毒性化学治疗剂:烷化剂(例如环磷酰胺、异环磷酰胺);代谢拮抗剂(例如甲氨蝶呤(MTX)、5-氟尿嘧啶或其衍生物);DNA去甲基化剂(也称为抗代谢物;例如阿扎胞苷);取代的核苷酸;取代的核苷;抗肿瘤抗生素(如丝裂霉素、阿霉素);植物来源的抗肿瘤剂(例如长春新碱、长春地辛、TAXOL®、紫杉醇、abraxane);顺铂;卡铂;依托泊苷等。这些试剂可以进一步包括但不限于:抗癌剂三甲氨蝶呤(TMTX);替莫唑胺;雷替曲塞;S-(4-硝基苄基)-6-硫代肌苷(NBMPR);6-苄基鸟嘌呤(6-BG);亚硝基脲类[例如、双氯亚硝基脲(BCNU;卡莫司汀)、洛莫司汀(CCNU)+/-丙卡巴肼和长春新碱(PCV方案)、福莫司汀];阿糖胞苷;喜树碱;以及它们的任何治疗衍生物。

[0117] 优选地,治疗剂为三甲氨蝶呤或甲氨蝶呤、异源核酸序列编码二氢叶酸还原酶或它们的衍生物。优选地,治疗剂为替莫唑胺或其治疗剂衍生物,以及异源核酸序列编码O⁶甲基鸟嘌呤DNA甲基转移酶(MGMT)或其衍生物。优选地,治疗剂为亚硝基脲或其治疗剂衍生物,以及异源核酸序列编码O⁶甲基鸟嘌呤DNA甲基转移酶(MGMT)或其衍生物。

[0118] 优选地,免疫检查点抑制剂为生物治疗剂或小分子。优选地,检查点抑制剂是单克隆抗体、人源化抗体、完全人抗体、融合蛋白、抗原结合片段或它们的组合。优选地,检查点抑制剂抑制检查点蛋白,该检查点蛋白可以为CTLA-4、PDL1、PDL2、PD1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD160、CGEN-15049、CHK1、CHK2、A2aR、OX40、B-7家族配体或它们的组合。优选地,检查点抑制剂与检查点蛋白的配体相互作用,该检查点蛋白可以为CTLA-4、PDL1、PDL2、PD1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD160、CGEN-15049、CHK1、CHK2、A2aR、OX40、B-7家族配体或它们的组合。示例性免疫检

查点抑制剂包括曲美母单抗 (CTLA-4阻断抗体)、抗OX40、PD-L1单克隆抗体 (抗B7-H1; MEDI4736)、MK-3475 (PD-1阻断剂)、**OPDIVO®**/纳武单抗 (抗-PD1抗体)、CT-011 (抗PD1抗体)、BY55单克隆抗体、AMP224 (抗PDL1抗体)、BMS-936559 (抗PDL1抗体)、MPLDL3280A (抗PDL1抗体)、MSB0010718C (抗PDL1抗体) 和**YERVOY®**/伊匹单抗 (抗CTLA-4检查点抑制剂)。检查点蛋白配体包括但不限于PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、CD28、CD86和TIM-3。

[0119] 优选地,本发明涵盖抑制CTLA-4的一类检查点抑制剂药物的用途。用于本发明方法的合适的抗CTLA4拮抗剂包括但不限于:抗CTLA4抗体、人抗CTLA4抗体、小鼠抗CTLA4抗体、哺乳动物抗CTLA4抗体、人源化抗CTLA4抗体、单克隆抗CTLA4抗体、多克隆抗CTLA4抗体、嵌合抗CTLA4抗体、MDX-010 (伊匹单抗)、曲美母单抗、抗CD28抗体、抗CTLA4adnectins、抗CTLA4结构域抗体、单链抗CTLA4片段、重链抗CTLA4片段、轻链抗CTLA4片段和激动共刺激途径的CTLA4抑制剂。

[0120] 优选地,另外的抗CTLA4拮抗剂包括但不限于以下的抑制剂:任何能够破坏CD28抗原与其同源配体结合的能力的、抑制CTLA4与其同源配体结合的能力的、通过共刺激途径增强T-细胞响应的、破坏B7与CD28和/或CTLA4结合的能力的、破坏B7激活共刺激途径的能力的、破坏CD80与CD28和/或CTLA4结合的能力的、破坏CD80激活共刺激途径的能力的、破坏CD86与CD28和/或CTLA4结合的能力的、破坏CD86激活共刺激途径的能力的、以及破坏共刺激途径的通常被激活的抑制剂。这必然包括CD28、CD80、CD86、CTLA4的小分子抑制剂以及共刺激途径的其他成员;针对CD28、CD80、CD86、CTLA4以及共刺激途径的其他成员的抗体;针对CD28、CD80、CD86、CTLA4以及共刺激途径的其他成员的反义分子;针对CD28、CD80、CD86、CTLA4以及共刺激途径的其他成员的adnectins;CD28、CD80、CD86、CTLA4的RNAi抑制剂(单链和双链)、以及共刺激途径的其他成员、其他抗CTLA4拮抗剂。

[0121] 优选地,可以使用免疫刺激剂、T-细胞生长因子和白细胞介素。免疫刺激剂是通过诱导其任何组分的活化或增加其活性来刺激免疫系统的物质(药物和营养素)。免疫刺激剂包括但不限于:细菌疫苗、集落刺激因子、干扰素、白细胞介素、其他免疫刺激剂、治疗性疫苗、疫苗组合和病毒疫苗。T-细胞生长因子为刺激T-细胞增殖的蛋白质。T-细胞生长因子的实例包括II-2、IL-7、IL-15、IL-17、IL21和IL-33。

[0122] 优选地,本文公开的治疗剂、免疫检查点抑制剂、生物治疗剂或药物组合物可以通过各种途径施用至个体,包括例如口服或胃肠外,例如静脉内、肌肉内、皮下、眼内、囊内、腹膜内、直肠内、脑池内、肿瘤内、血管内、皮内或例如分别使用皮肤贴剂或透皮离子电渗疗法通过皮肤被动或促进吸收。治疗剂、检查点抑制剂、生物治疗剂或药物组合物也可以施用于病理状态的部位,例如,通过静脉内或动脉内进入血管供应至肿瘤。

[0123] 优选地,在实施本发明方法中施用的药剂的总量可以作为单剂量、或作为丸剂或通过推注在相对短的时间内施用于个体,或者可以使用分次治疗方案施用,其中在一段持续时间内施用多剂量。本领域技术人员将知道,治疗个体病理状况的组合物的量取决于许多因素,包括个体的年龄和一般健康状况以及施途径和待施用的治疗次数。鉴于这些因素,技术人员将根据需要调整特定剂量。

[0124] 优选地,检查点抑制剂以小于0.0001mg/kg、0.0001-0.001mg/kg、0.001-0.01mg/kg、0.01-0.05mg/kg、0.05-0.1mg/kg、0.1-0.2mg/kg、0.2-0.3mg/kg、0.3-0.5mg/kg、0.5-0.7mg/kg、0.7-1mg/kg、1-2mg/kg、2-3mg/kg、3-4mg/kg、4-5mg/kg、5-6mg/kg、6-7mg/kg、7-

8mg/kg、8-9mg/kg、9-10mg/kg、至少10mg/kg、或其任何组合剂量施用。优选地、检查点抑制剂施用每周至少一次、每周至少两次、每周至少三次、每两周至少一次、或每个月或每两个月至少一次。优选地，检查点抑制剂以单剂、两剂、三剂、四剂、五剂或六剂或更多剂的形式施用。

[0125] 优选地，本发明提供用于治疗患者的成胶质细胞瘤的系统，其包含具有抑制癌细胞存活并在癌细胞中诱导应激蛋白的特征的治疗剂；分离的细胞毒性免疫细胞群，其中细胞毒性免疫细胞包含 γ δ T-细胞、NK细胞或其任何组合，并且还任选地包含其他免疫活性细胞，其中细胞毒性免疫细胞群经遗传修饰以对治疗剂具有抗性；以及检查点抑制剂。优选地，细胞毒性免疫细胞群包含与启动子可操作地连接的异源核酸序列，其中异源核酸序列编码当在细胞中表达时对细胞治疗剂具有抗性的多肽。

[0126] 优选地，治疗剂为细胞毒性化学治疗剂，其选自：烷化剂、代谢拮抗剂、抗肿瘤抗生素和植物来源的抗肿瘤剂。

[0127] 优选地，治疗剂选自：三甲氨蝶呤 (TMTX)、甲氨蝶呤 (MTX)、替莫唑胺、雷替曲塞 (reltiritrexed)、S-(4-硝基苄基)-6-硫代肌苷 (NBMPR)、喜树碱、6-苄基鸟嘌呤 (6-benzylguanidine)、阿糖胞苷，以及它们的任何治疗衍生物。

[0128] 优选地，治疗剂为三甲氨蝶呤或甲氨蝶呤、异源核酸序列编码二氢叶酸还原酶或其衍生物。

[0129] 优选地，免疫检查点抑制剂可以为生物治疗剂或小分子。优选地，检查点抑制剂为单克隆抗体、人源化抗体、完全人抗体、融合蛋白、抗原结合片段或它们的组合。优选地，检查点抑制剂抑制检查点蛋白，该检查点蛋白可以为CTLA-4、PDL1、PDL2、PD1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD160、CGEN-15049、CHK1、CHK2、A2aR、OX40、B-7家族配体或它们的组合。优选地，检查点抑制剂与检查点蛋白的配体相互作用，该检查点蛋白可以为CTLA-4、PDL1、PDL2、PD1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD160、CGEN-15049、CHK1、CHK2、A2aR、OX40、B-7家族配体或它们的组合。示例性免疫检查点抑制剂包括曲美母单抗 (CTLA-4阻断抗体)、抗OX40、PD-L1单克隆抗体 (抗B7-H1；MEDI4736)、MK-3475 (PD-1阻断剂)、**OPDIVO®**/纳武单抗 (抗-PD1抗体)、CT-011 (抗PD1抗体)、BY55单克隆抗体、AMP224 (抗PDL1抗体)、BMS-936559 (抗PDL1抗体)、MPLDL3280A (抗PDL1抗体)、MSB0010718C (抗PDL1抗体) 和**YERVOY®**/伊匹单抗 (抗CTLA-4检查点抑制剂)。检查点蛋白配体包括但不限于PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、CD28、CD86和TIM-3。

[0130] 优选地，本发明涵盖抑制CTLA-4的特定类别的免疫检查点抑制剂药物的用途。用于本发明方法的合适的抗CTLA4拮抗剂包括但不限于：抗CTLA4抗体、人抗CTLA4抗体、小鼠抗CTLA4抗体、哺乳动物抗CTLA4抗体、人源化抗CTLA4抗体、单克隆抗CTLA4抗体、多克隆抗CTLA4抗体、嵌合抗CTLA4抗体、MDX-010 (伊匹单抗)、曲美母单抗、抗CD28抗体、抗CTLA4adnectins、抗CTLA4结构域抗体、单链抗CTLA4片段、重链抗CTLA4片段、轻链抗CTLA4片段和激动 (agonize) 共刺激途径的CTLA4抑制剂。

[0131] 优选地，另外的抗CTLA4拮抗剂包括但不限于以下的抑制剂：任何能够破坏CD28抗原与其同源配体结合的能力的、抑制CTLA4与其同源配体结合的能力的、通过共刺激途径增强T-细胞响应的、破坏B7与CD28和/或CTLA4结合的能力的、破坏B7激活共刺激途径的能力的、破坏CD80与CD28和/或CTLA4结合的能力的、破坏CD80激活共刺激途径的能力的、破坏

CD86与CD28和/或CTLA4结合的能力的、破坏CD86激活共刺激途径的能力的、以及破坏共刺激途径的通常被激活的抑制剂。这必然包括CD28、CD80、CD86、CTLA4的小分子抑制剂以及共刺激途径的其他成员；针对CD28、CD80、CD86、CTLA4以及共刺激途径的其他成员的抗体；针对CD28、CD80、CD86、CTLA4以及共刺激途径的其他成员的反义分子；针对CD28、CD80、CD86、CTLA4以及共刺激途径的其他成员的adnectins；CD28、CD80、CD86、CTLA4的RNAi抑制剂（单链和双链）、以及共刺激途径的其他成员、其他抗CTLA4拮抗剂。

[0132] 优选地，可以使用免疫刺激剂、T-细胞生长因子和白细胞介素。免疫刺激剂为通过诱导其任何组分的活化或增加其活性来刺激免疫系统的物质（药物和营养素）。免疫刺激剂包括但不限于：细菌疫苗、集落刺激因子、干扰素、白细胞介素、其他免疫刺激剂、治疗性疫苗、疫苗组合和病毒疫苗。T-细胞生长因子为刺激T-细胞增殖的蛋白质。T-细胞生长因子的实例包括II-2、IL-7、IL-15、IL-17、IL21和IL-33。

[0133] 优选地，本文公开的治疗剂、免疫检查点抑制剂、生物治疗剂或药物组合物可以通过各种途径施用至个体，包括例如口服或胃肠外，例如静脉内、肌肉内、皮下、眼内、囊内、腹膜内、直肠内、脑池内、肿瘤内、血管内、皮内或例如分别使用皮肤贴剂或透皮离子电渗疗法通过皮肤被动或促进吸收。治疗剂、检查点抑制剂、生物治疗剂或药物组合物也可以施用于病理状态的部位，例如，通过静脉内或动脉内进入血管供应至肿瘤。

[0134] 优选地，在实施本发明方法中施用的药剂的总量可以作为单剂量、或作为丸剂或通过推注在相对短的时间内施用于个体，或者可以使用分次治疗方案施用，其中在一段持续时间内施用多剂量。本领域技术人员将知道，治疗个体病理状况的组合物的量取决于许多因素，包括个体的年龄和一般健康状况以及施用途径和待施用的治疗次数。鉴于这些因素，技术人员将根据需要调整特定剂量。

[0135] 优选地，检查点抑制剂以小于0.0001mg/kg、0.0001-0.001mg/kg、0.001-0.01mg/kg、0.01-0.05mg/kg、0.05-0.1mg/kg、0.1-0.2mg/kg、0.2-0.3mg/kg、0.3-0.5mg/kg、0.5-0.7mg/kg、0.7-1mg/kg、1-2mg/kg、2-3mg/kg、3-4mg/kg、4-5mg/kg、5-6mg/kg、6-7mg/kg、7-8mg/kg、8-9mg/kg、9-10mg/kg、至少10mg/kg、或其任何组合剂量施用。优选地、检查点抑制剂施用每周至少一次、每周至少两次、每周至少三次、每两周至少一次、或每个月或每两个月至少一次。优选地，检查点抑制剂以单剂、两剂、三剂、四剂、五剂或六剂或更多剂的形式施用。

[0136] 应当注意，比例、浓度、量和其他数值数据在本文中可以有范围形式表示。应当理解，这种范围形式是为了方便和简洁而使用的，因此，应该以灵活的方式解释为不仅包括明确列举作为范围限制的数值，而且还包括所有个体。包含在该范围内的数值或子范围，如同明确列举每个数值和子范围一样。为了说明，“约0.1%至约5%”的浓度范围应该被解释为不仅包括明确列举的约0.1重量%至约5重量%的浓度，但也包括个别浓度（例如，1%、2%、3%和4%）和指定范围内的子范围（例如，0.5%、1.1%、2.2%、3.3%和4.4%）。术语“约”可包括±1%、±2%、±3%、±4%、±5%、±6%、±7%、±8%、±9%或±10%或更多被修改的数值。此外，短语“约‘x’到‘y’”包括“约‘x’到约‘y’”。

[0137] 在不背离本发明的精神和原理的情况下，可以对上述发明进行许多变化和修改。所有这些修改和变化都包括在本发明的范围内，并受所附权利要求的保护。

[0138] 实施例

[0139] 以下实施例是以举例说明的方式提供的,不应解释为以任何方式限制本发明。

[0140] 实施例1-癌症治疗范例

[0141] 将包含化学治疗剂、耐药性 $\gamma\delta$ -T-细胞和/或耐药性天然杀伤细胞以及免疫检查点抑制剂的联合疗法用于治疗癌症患者。化学治疗剂选自烷化剂(例如环磷酰胺、异环磷酰胺)、代谢拮抗剂(例如甲氨蝶呤(MTX)、5-氟尿嘧啶或其衍生物)、抗肿瘤抗生素(例如丝裂霉素、阿霉素)、植物来源的抗肿瘤剂(例如,长春新碱、长春地辛、TAXOL®、紫杉醇、abraxane)、顺铂、卡铂、依托泊苷等。这些试剂可进一步包括但不限于抗癌剂三甲氨蝶呤(TMTX)、替莫唑胺、雷替曲塞、S-(4-硝基苄基)-6-硫代肌苷(NBMPR)、6-苄基鸟嘌呤(6-BG)、双氯亚硝基脲(BCNU)、阿糖胞苷和喜树碱、或它们的任何治疗衍生物。耐药性 $\gamma\delta$ -T-细胞和天然杀伤细胞对化学治疗剂具有抗性。免疫检查点抑制剂单独使用或与其他免疫检查点抑制剂联合使用,其他免疫检查点抑制剂选自免疫检查点蛋白CTLA-4、PDL1 (B7-H1、CD274)、PDL2 (B7-DC、CD273)、PD1、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (B7-S1、B7x、VCTN1)、BTLA (CD272)、HVEM、TIM3 (HAVcr2)、GAL9、LAG3 (CD223)、VISTA、KIR、2B4 (CD244;属于CD2分子家族,并在所有NK、 $\gamma\delta$ 和记忆CD8⁺($\alpha\beta$) T-细胞中表达)、CD160(也称为BY55)、CGEN-15049、CHK 1和CHK2激酶、OX40、A2aR和各种B-7家族配体。

[0142] 与化学治疗联合的免疫疗法活性的评价

[0143] 反应评估标准包括基于实体瘤反应评估标准的评价(WHO;World Health Organization Offset Publication No.48,1979);RECIST(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors;J Natl Cancer Inst 2000;92:205-16;Eisenhauer EA et al.,Eur J Cancer 2009;45:228-47);免疫相关反应标准(Jedd WE et al.,Clin Cancer Res 2009;15(23),7412-7420);以及iRANO(Immunotherapy Response Assessment in Neuro-Oncology;Okada H et al.,Lancet Oncol 2015Nov;16(15):e534-42)。

[0144] 结果

[0145] 作为另外的联合疗法的化学治疗,其包括耐药性 $\gamma\delta$ -T-细胞(和/或耐药性天然杀伤细胞)和免疫检查点蛋白抑制剂,其导致增强或延长的抗肿瘤反应;医学上有利的反应;与单独化学治疗或与耐药性 $\gamma\delta$ -T-细胞(和/或耐药性天然杀伤细胞)联合的化学治疗相比,增加的或协同的抗肿瘤活性;基线病灶(lesions)收缩,无新病变;肿瘤消退;持久稳定的疾病,总肿瘤负荷可能稳步下降;肿瘤总负荷增加后的反应;以及在存在新病变时的反应。其他临床发现可能包括通过肿瘤大小的增加来衡量的肿瘤浸润淋巴细胞的增加;以及长期的生存提升。

[0146] 例如,替莫唑胺(TMZ)治疗的肿瘤在肿瘤细胞表面上表达增加数量的应激配体,例如MICA、MICB和ULBP1-6。耐药性 $\gamma\delta$ -T-细胞和/或耐药性天然杀伤细胞促进肿瘤细胞的杀伤,其受体(例如NKG2D)识别肿瘤特异性应激配体。然而,肿瘤细胞可以酶促切割MICA和MICB,释放可溶性MICA和MICB。当被血浆中的效应细胞受体结合时,这可导致受体表达的下调,导致免疫逃逸。已发现诸如TMZ的化学治疗增加肿瘤组织上应激配体的细胞表面表达,而没有显著增加血浆中可溶性配体的浓度。对CTLA-4抗体抑制剂的应答已证明能够产生针对诸如MICA的NKG2D配体的体液应答。这些反应导致可溶性MICA的减少,这可以允许肿瘤表面上扩增的应激配体表达以增强耐药性 $\gamma\delta$ -T-细胞和/或耐药性天然杀伤细胞对肿瘤细胞的杀伤作用。

[0147] 实施例2-神经胶质瘤和 γ δ T-细胞中检查点分子表达和功能的分析

[0148] 评价GMP生产的 γ δ T-细胞和成胶质细胞瘤肿瘤细胞上的检查点分子表达,并评估体外富集的 γ δ T-细胞的功能。

[0149] 方法

[0150] γ δ T-细胞的离体扩增

[0151] 从健康供体采集的人血清成分产品从Hemacare (Van Nuys CA) 购得。将产品转移到UAB细胞治疗实验室GMP设备 (UAB Cell Therapy Laboratory GMP facility)。对于静态培养:所有操作均在100级层流罩中进行,该层流罩由10K/ISO 7级分级空气流围绕。将产物用HBSS (Hank's平衡盐溶液) v/v稀释,并通过Ficoll上的密度梯度分离来分离单核细胞 (Sigma-Aldrich;St.Louis,MO)。收获细胞间期并在HBSS中洗涤2次。将细胞团块重悬于补充有2mM唑来膦酸 (Novartis;Basel HV) 和100 μ /mL IL2 (Miltenyi Biotec Ltd;Bergisch Gladbach,Germany) 的CTSTMOpTmizerTM T-细胞膨胀无血清培养基 (ThermoFisher Scientific;Waltham,MA) 中。将细胞在标准T150或T75烧瓶中培养。对于封闭系统培养:使用GMP级试剂在生物安全柜下的ISO 7洁净室中进行所有操作,包括培养基、储备液和缓冲液的制备。使用定制的细胞处理程序和TS520管组,在CLINIMACS PRODIGY (Miltenyi Biotec Ltd;Bergisch Gladbach,Germany) 生物反应器中进行产物的自动Ficoll分离和培养。然后使用唑来膦酸盐 (Zometa;Novartis,Basel) 和白细胞介素-2 (Miltenyi Biotec Ltd;Bergisch Gladbach,Germany) (ZOL/IL-2) 的组合在CLINIMACS PRODIGY®的CentriCult-Unit中扩增细胞,在OpTmizer中无血清培养 (ThermoFisher Scientific;Waltham,MA)。将培养物保持在1-2 \times 10⁶个细胞/ml的密度,并每隔一天补充IL-2 100 μ /mL,直到第13天收获细胞。连续监测该过程以定期确定与烧瓶中的小规模培养物比较的扩增和表型的动力学。在培养13天后,对扩增的 γ δ T-细胞进行表型分析,并针对标准白血病细胞系和神经胶质瘤肿瘤细胞测定细胞毒性。

[0152] 流式细胞术分析

[0153] 多参数流式细胞术分析用于确定供体PBMC和培养产物中的表型和功能特征。使用DuraClone T-细胞亚群 (Beckman Coulter) 加抗PD-1、抗-CTLA-4和抗-PD-L1组,使用流式细胞术监测检查点分子的表达和 γ δ T-细胞富集。在培养第1天和第13天分析产物样品。使用流式细胞术分析新鲜解离的PDX衍生的成胶质细胞瘤肿瘤细胞的PD-L1表达。用PDRBlock (Biolegend) 将PDX衍生的成胶质细胞瘤细胞的单细胞悬浮液阻断15分钟,然后用PD-L1抗体和相应的同种型 (IgG1) 染色。在BD fortessa X-20流式细胞仪上获得染色的细胞。

[0154] 基于流式细胞术的细胞毒性评估

[0155] 使用针对K562细胞的体外细胞毒性测定法测定细胞产物的效力。使用基于流式细胞术的细胞毒性测定,在第13天评估扩增的 γ δ T-细胞对人白血病细胞系 (K562) 和肿瘤细胞 (JX22T、JX12T和JX59T) 的细胞毒性。基本细胞毒性测定试剂盒 (Basic Cytotoxicity Assay Kit) (<https://immunochemistry.com>) 包括两种荧光试剂:CFSE和7-AAD。绿色荧光膜着色剂CFSE用于标记靶细胞 (K562)。以增加的效应器与靶标比例加入未染色的效应细胞,并在加入7-AAD前与靶细胞一起孵育4小时,红色荧光活/死染色,然后采集并用流式细胞仪分析。细胞毒性计算为检测到红色通道的绿色靶细胞的百分比。公式:细胞毒性% = #死细胞/#活细胞+#死细胞*100。

[0156] 结果与讨论

[0157] 将来自两个健康供体(供体1:043692;供体2:043988)的新鲜分离的PBMC用于体外 γ δ T-细胞的扩增。在通过流式细胞术检查检查点表达后,我们注意到扩增的 γ δ T-细胞中PD-1和CTLA-4和PD-L1的上调。在第13天,PD-1增加超过20%,CTLA-4表达范围为3-6%。有趣的是,PD-L1在两个供体中也被上调(>9%) [图1-4]。与未转导的 γ δ T-细胞相比,观察到MGMT转导的 γ δ T-细胞中检查点分子的表达水平没有显著变化。与刺激的培养物相比,还观察到静息(无IL2和ZOL) γ δ T-细胞上PD-1和CTLA-4的中度下调[图5]。

[0158] 还通过流式细胞术分析PDX衍生的神经胶质瘤细胞上的PD-L1表达。与同种型对照相比,PD-L1受体表达较低或不可检测。PD-L1表达的百分比从JX12T(0%)、JX22T(1.8%)和JX59T(10.4%)变化[图6]。

[0159] 接下来,我们检查了免疫抑制受体的阻断对于 γ δ T-细胞增加对癌细胞的细胞毒性的能力是否有任何影响[图7]。在含有浓度为20 μ g/ml的一种或多种检查点抗体的分析混合物中,用生产的 γ δ T-细胞以20:1的比例攻击神经胶质瘤肿瘤细胞(JX22T、JX12T、JX59T)和K562(由慢性骨髓性白血病建立的细胞系)。观察到K562[PD-L1(52%)、CTLA-4(5%)、CTLA-4+PD-1(7%)、PD-1(7%)的高水平的细胞溶解活性。对于PD-1(3%)、CTLA-4(2) PD-1+CTLA-4(5)组合和PD-L1(8)阻断,观察到JX12T肿瘤细胞的肿瘤细胞裂解的适度增加。然而,检查点阻断没有增加MGMT修饰的 γ δ T-细胞对JX22T和JX59T的细胞毒性。

[0160] 我们观察到成胶质细胞瘤肿瘤细胞不表达显著水平的PD-L1,与Garg等人已经发表报道一致[Preclinical efficacy of immune-checkpoint monotherapy does not recapitulate corresponding biomarkers-based clinical predictions in glioblastoma. *OncoImmunology*, 2016]。Joseph等人的研究在成胶质细胞瘤肿瘤浸润性骨髓细胞中发现高水平的PD-L1表达[Immunosuppressive tumor-infiltrating myeloid cells mediate adaptive immune resistance via a PD-1/PD-L1 mechanism in glioblastoma, *Neuro-Oncology* 9(6), 796-806, 2017]。由于神经胶质瘤肿瘤微环境中的髓样/基质间表达高水平的PD-L1,并且我们观察到GMP生产的T-细胞/ γ δ T-细胞上调PD-1,因此我们提出一项综合治疗计划,包括使用PD-1、PD-L1阻断抗体和替莫唑胺和局部输注MGMT表达 γ δ T-细胞进行系统性治疗,以有效治疗成胶质细胞瘤,达到较高的客观缓解率。

[0161] 本文提及的专利和科学文献建立了本领域技术人员可获得的知识。本文引用的所有美国专利和公开的或未公开的美国专利申请通过引用结合到本文中。本文引用的所有公开的外国专利和专利申请均通过引用并入本文。本文引用的所有其他公开的参考文献、资料、手稿和科学文献在此引入作为参考。

[0162] 虽然已经参考优选实施方案具体示出和描述了本发明,但是本领域技术人员将理解,在不脱离所附权利要求所包含的本发明的范围的情况下,可以在形式和细节上进行各种改变。还应该理解的是,在不脱离所附权利要求所包含的本发明的范围的情况下,本文描述的实施方案都不是相互排斥的,并且可以以各种方式组合。

供体 ID: 043692 在体外培养PBMC之前，检查点分子在 $\gamma\delta$ T 细胞上的表达

第1天

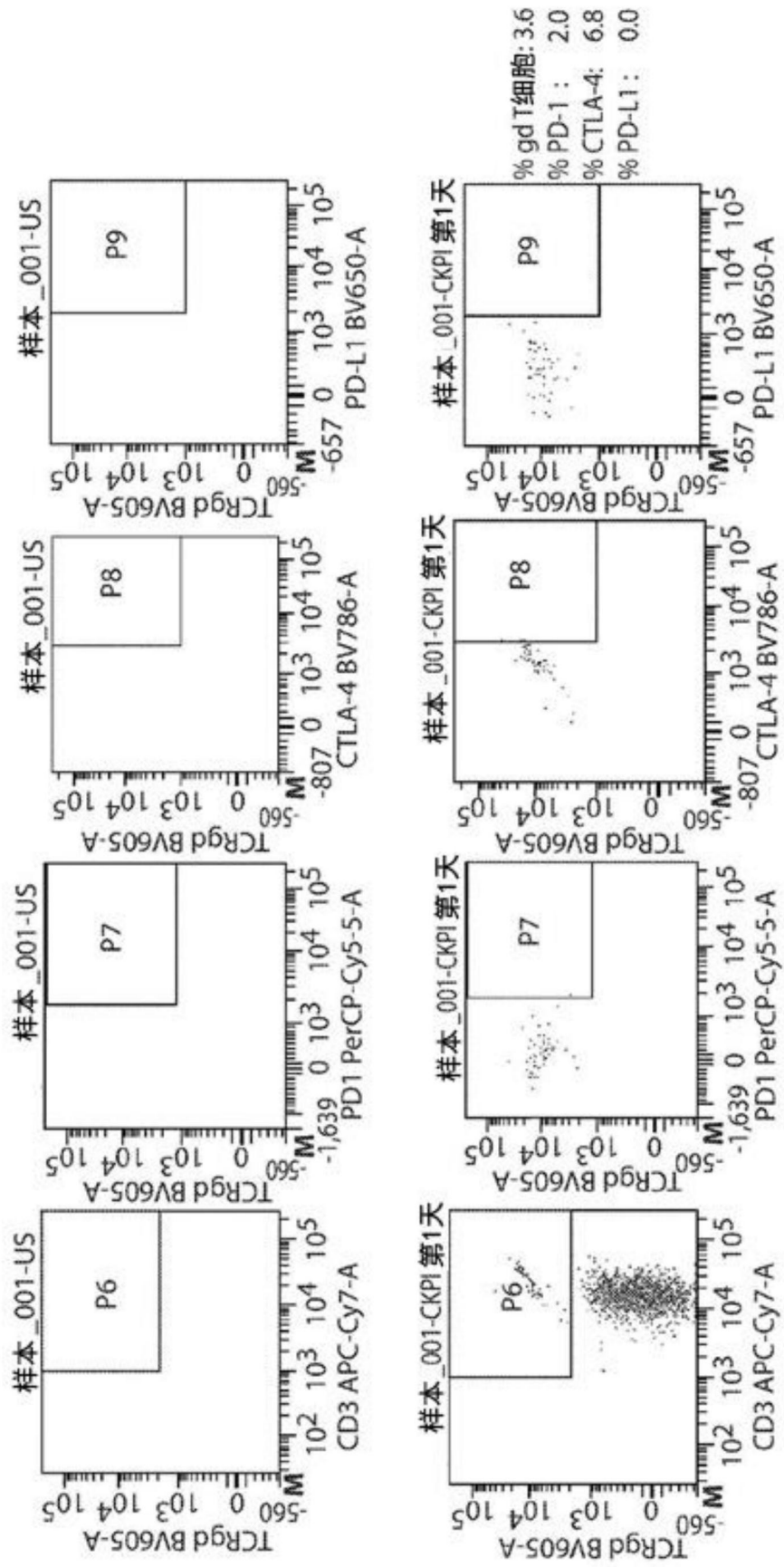
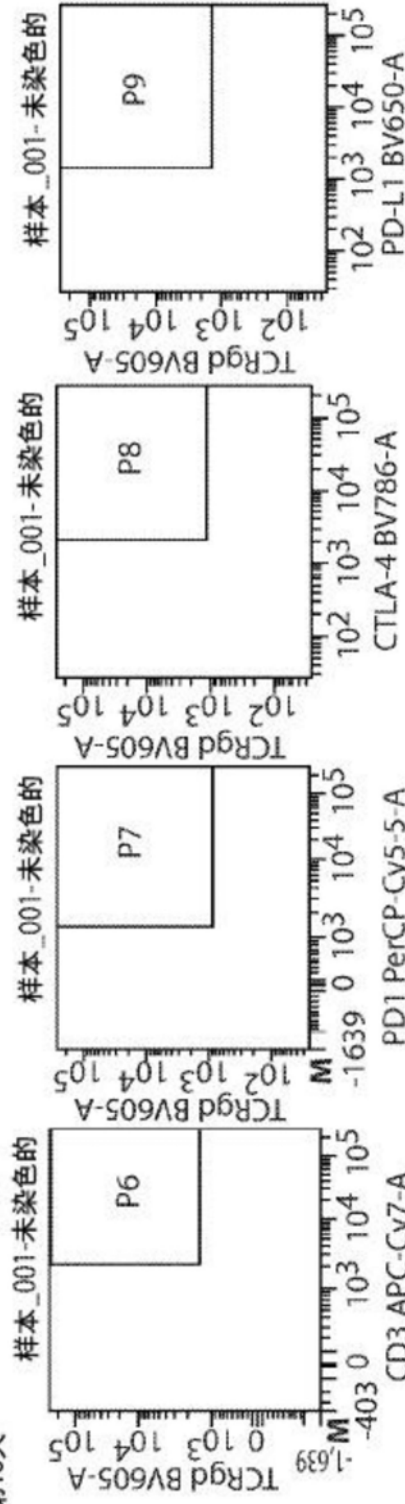


图1

体外富集的 $\gamma\delta$ T 细胞上检查点分子的上调

供体 ID: 043692

第13天



未转导的

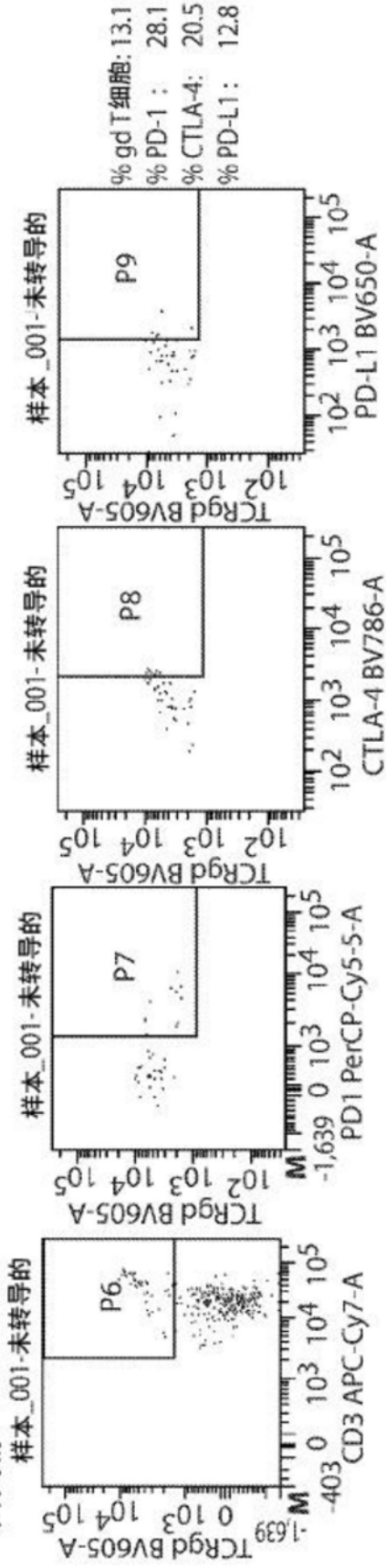


图2

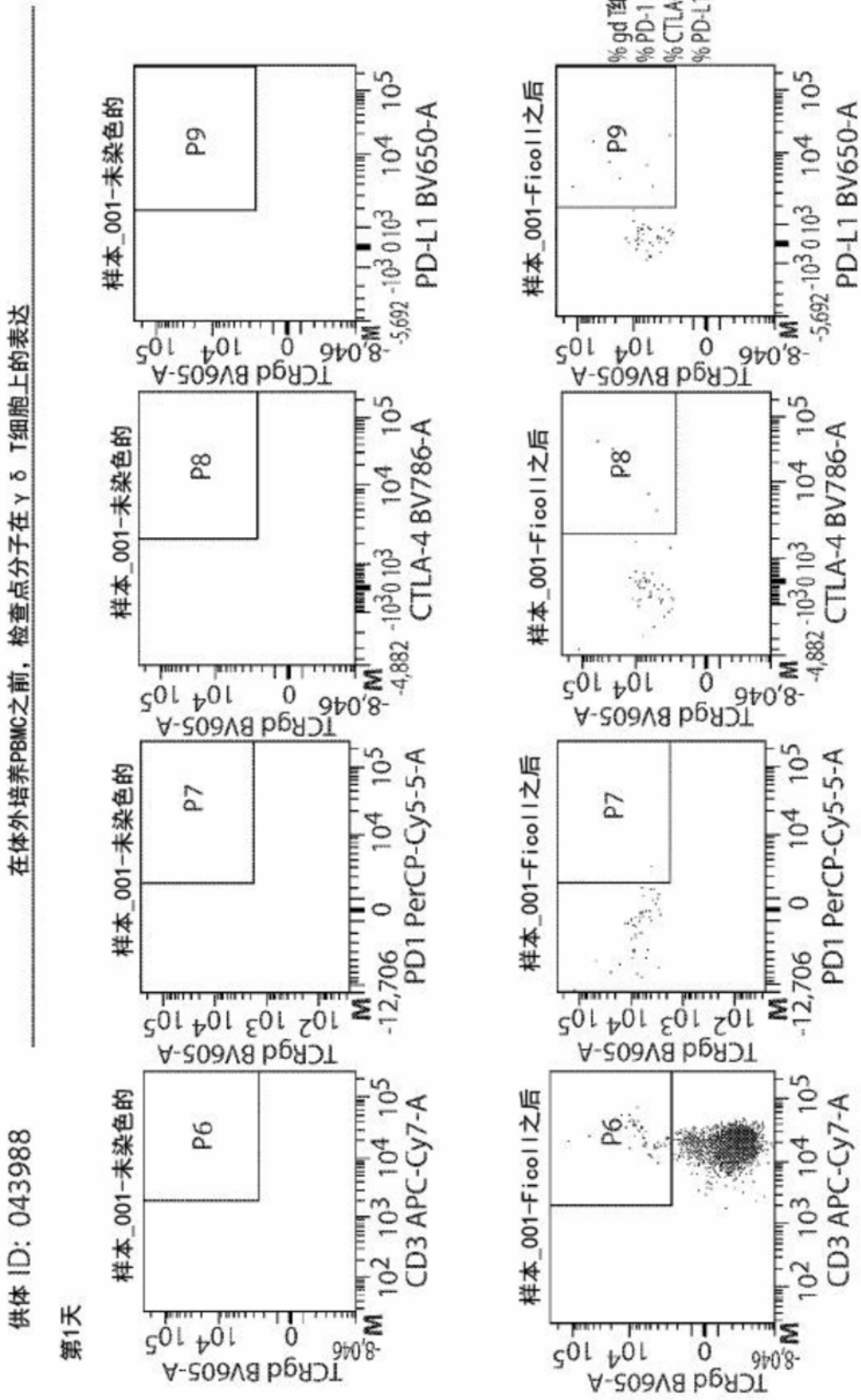


图3

供体 ID: 043988

体外富集的 $\gamma\delta$ T 细胞上检查点分子的上调

第13天:

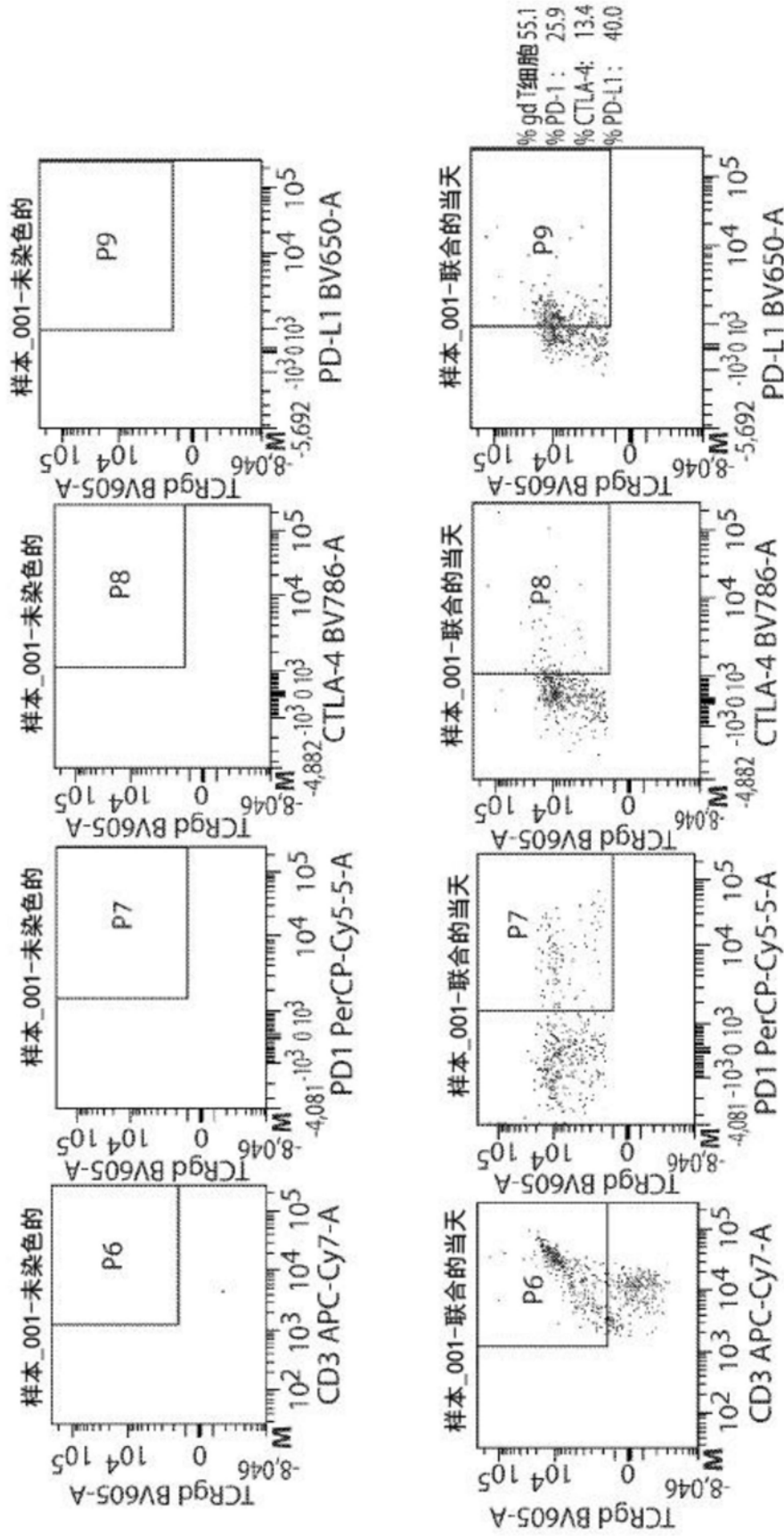


图4

用IL2和Zol1刺激后,人γδ T细胞上PD-1和CTLA-4的上调

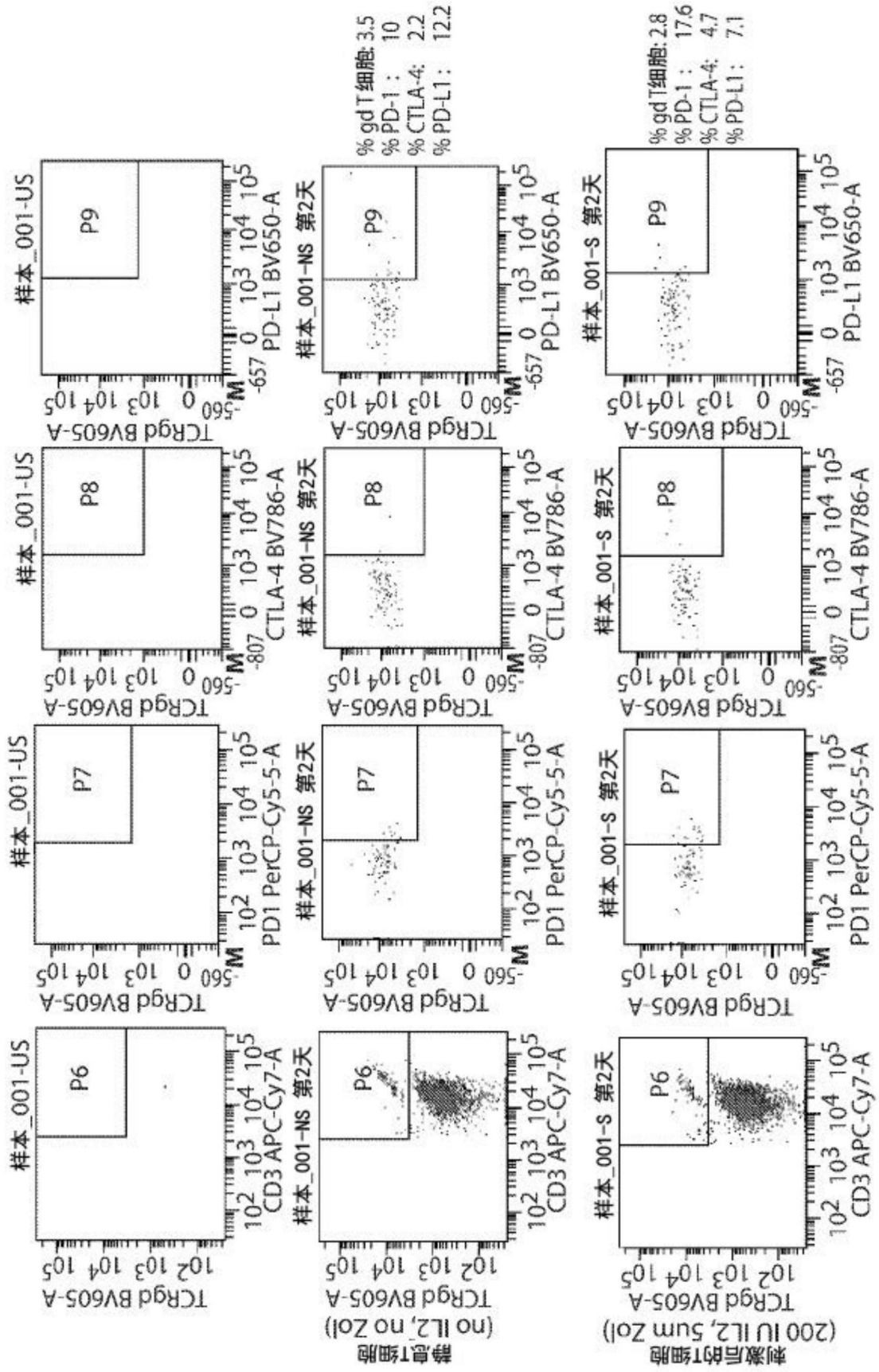


图5

PD-1在成胶质细胞瘤肿瘤细胞上的表达

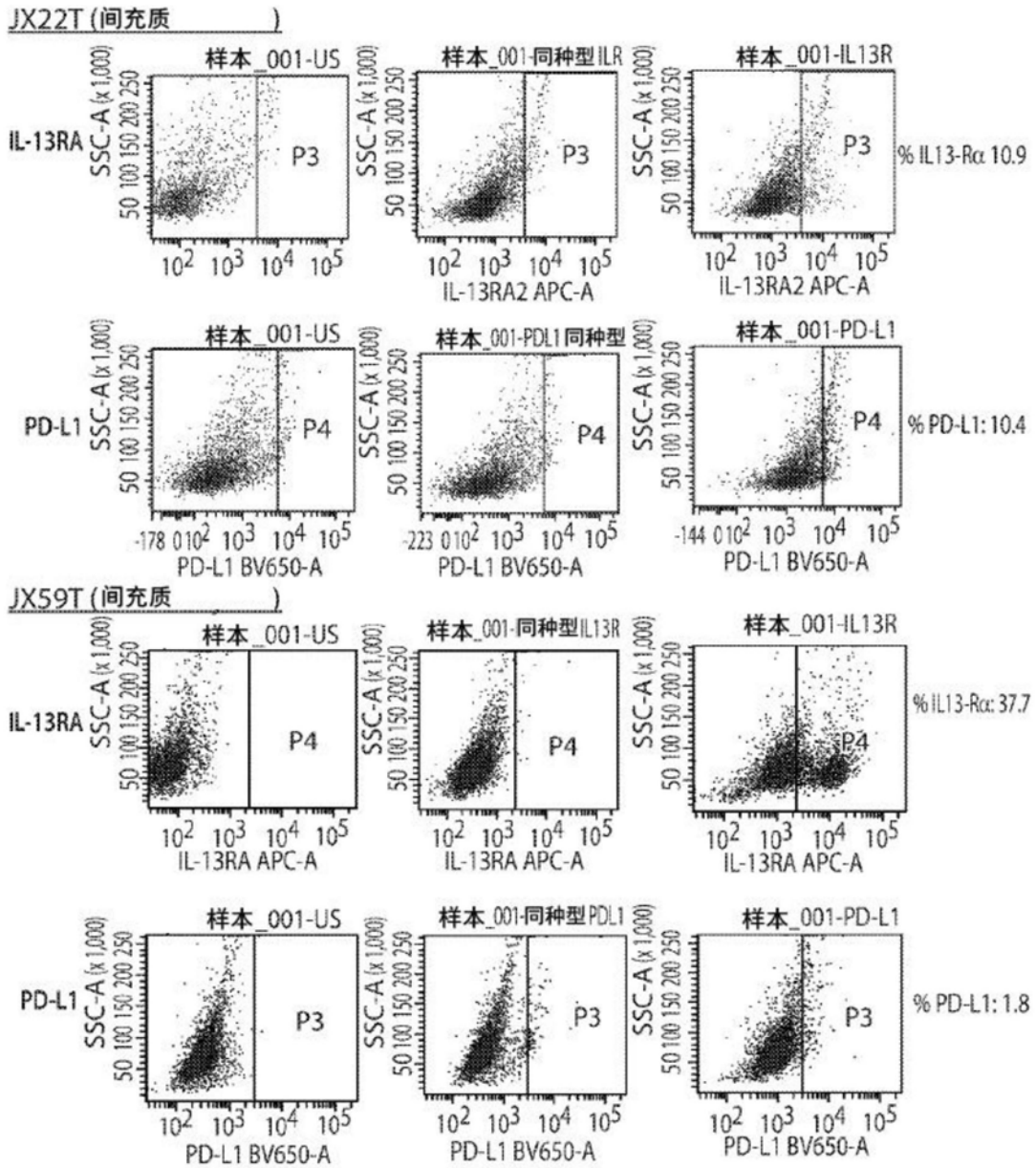


图6

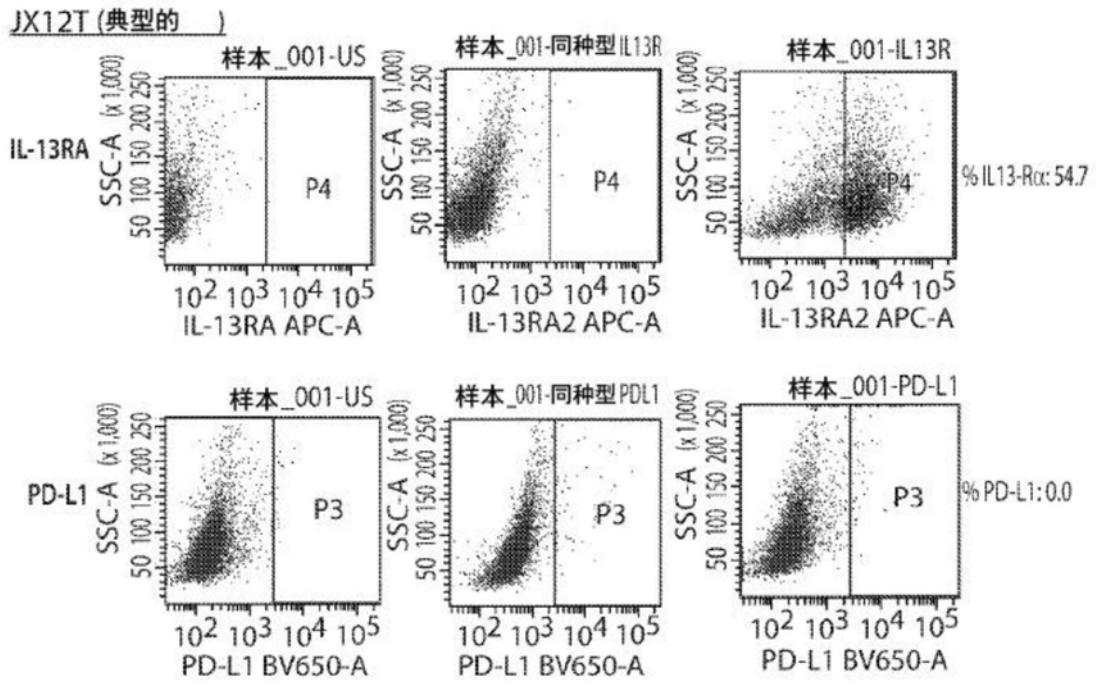
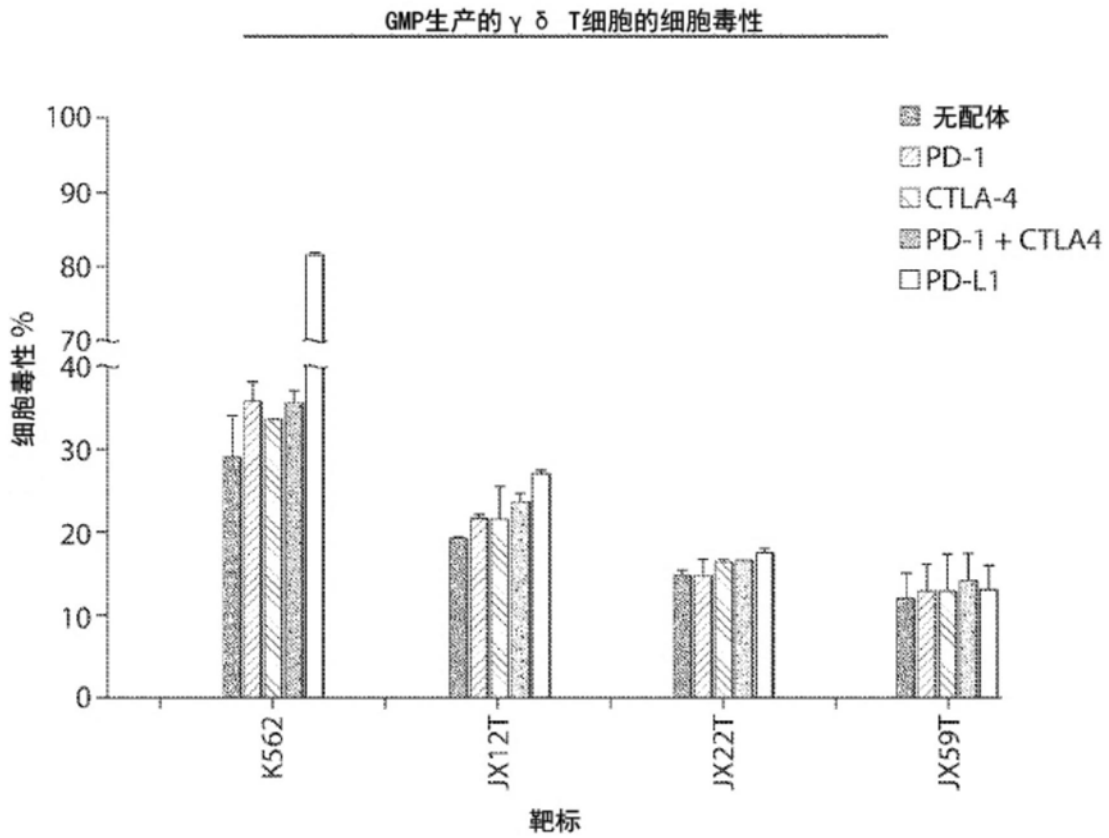


图6(续)



癌细胞	无配体 (20 ug/ml)	PD-1 (20 ug/ml)	CTLA-4 (20 ug/ml)	PD-1+CTLA-4 (20 ug/ml)	PD-L1 (20 ug/ml)
K562	28.95	35.7	33.5	35.5	81.35
JX12T	19.05	21.55	21.4	23.6	26.95
JX22T	14.55	14.5	16.2	16.35	17.45
JX59T	12.5	12.65	12.6	14	12.8

图7