



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108245673 A

(43)申请公布日 2018.07.06

(21)申请号 201810168834.1

A61K 35/17(2015.01)

(22)申请日 2011.08.22

A61P 35/00(2006.01)

(30)优先权数据

61/401,881 2010.08.20 US

61/495,055 2011.06.09 US

(62)分案原申请数据

201180040232.4 2011.08.22

(71)申请人 免疫创新治疗有限公司

地址 以色列耶路撒冷

(72)发明人 迈克尔·哈-诺伊

(74)专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事

务所(普通合伙) 11201

代理人 李志东 贾玉

(51)Int.Cl.

A61K 39/00(2006.01)

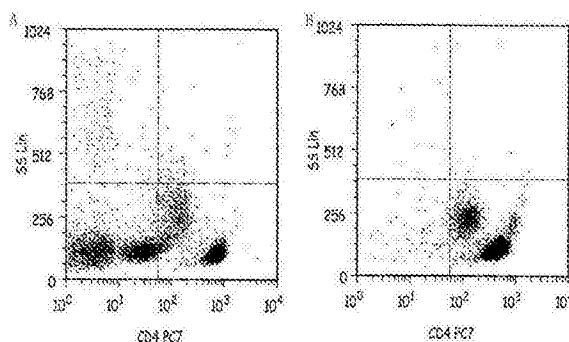
权利要求书1页 说明书11页 附图6页

(54)发明名称

表达Th1特性和溶细胞性质的细胞

(57)摘要

已经产生具有Th1特性和溶细胞活性的新细胞类型。这些Th1/杀伤细胞为CD4⁺细胞,CD4⁺细胞从外周血纯化且被操作以具有Th1特性,例如类似于细胞毒性T-细胞(CTL)的、结合溶细胞活性的产生IFN- γ 的。CTL活性以病变细胞为目标,而不以正常细胞为目标。Th1/杀伤细胞的溶细胞活性通过粒酶B-穿孔素机制介导且导致病变细胞的凋亡性死亡。生产和使用这些Th1/杀伤细胞的方法包括从外周血分离出CD4⁺细胞,激活CD4⁺T-细胞以形成Th1/杀伤细胞,以及向患者给药具有溶细胞活性的Th1/杀伤细胞,其中Th1/杀伤细胞对于该患者是同种异体的。



1. 一种组合物,包括幼稚Th1/杀伤细胞,
其中所述Th1/杀伤细胞具有Th1特性和对肿瘤细胞系的直接溶细胞活性;
其中所述Th1/杀伤细胞为离体的激活的幼稚CD4⁺细胞,所述Th1/杀伤细胞表达粒酶B和穿孔素,所述Th1/杀伤细胞是通过以下获得的:在不加入外源性细胞因子的情况下通过使CD3和CD28细胞表面分子发生交联而激活所述幼稚CD4⁺细胞、冷冻所述激活的细胞、然后通过使CD3和CD28细胞表面分子发生交联而再次激活所述细胞,
其中所述组合物包含使所述细胞保持激活状态的试剂。
2. 如权利要求1所述的组合物,其中所述溶细胞活性包括NK特性。
3. 如权利要求1所述的组合物,其中所述Th1/杀伤细胞表达IFN- γ 。
4. 如权利要求1所述的组合物,其中所述Th1/杀伤细胞具有被大幅度降低的IL-4表达或无IL-4表达。
5. 如权利要求1所述的组合物,其中所述Th1/杀伤细胞来自健康供体的外周血。
6. 如权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包括至少约 1×10^7 个细胞。
7. 如权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包括至少约 1×10^8 个细胞。
8. 如权利要求1所述的组合物,其中所述Th1/杀伤细胞的溶细胞活性特异性灭活病变细胞而不灭活来自健康供体的细胞;并且其中所述病变细胞优选地包括癌细胞、受感染细胞或其组合。
9. 如权利要求1所述的组合物,其中所述肿瘤细胞系为ARH77。
10. 如权利要求1-9中任一项所述的组合物在制备药物中的用途,所述药物用于破坏患者体内的病变细胞。
11. 如权利要求10所述的用途,其中所述病变细胞包括癌细胞、受感染细胞或其组合。

表达Th1特性和溶细胞性质的细胞

背景技术

[0001] 治疗性癌症疫苗接种是一类免疫疗法。免疫疗法是一种新的治疗方式,其出现以使化学疗法、放射疗法和外科结合作为用于治疗癌症的一类药物。免疫治疗方法试图利用免疫系统的力量以治疗疾病。治疗性疫苗接种是这样一种类型的免疫疗法,其是针对现有的肿瘤、病毒和细菌性病原体的潜在的治愈性疗法。治疗性疫苗一般由来源于目标疾病的抗原源和旨在增强所需的免疫反应的佐剂组成。在一些治疗性疫苗治疗方案中,活免疫细胞(来源于宿主(自体),或来源于供体(同种异体))为治疗性疫苗的组分。自体 and 同种异体的活免疫细胞(例如树突细胞、NK细胞和T-细胞)也可在用于治疗癌症的免疫疗法治疗方案中使用。

[0002] 淋巴细胞是脊椎动物的免疫系统的一部分,且包括大颗粒淋巴细胞和小淋巴细胞。大颗粒淋巴细胞包括天然杀伤细胞(NK细胞)。小淋巴细胞由T-细胞和B细胞组成。NK细胞是先天免疫系统的一部分,且在保护动物免受肿瘤和受病毒感染细胞侵害中起重要作用。NK细胞可以通过多组织相容性复合物(multihistocompatibility complex) (MHC) I类表面分子将受感染细胞和肿瘤细胞与未感染的细胞区分开。NK细胞响应于细胞因子被激活,且在激活时释放破坏受感染细胞或肿瘤细胞的细胞毒性颗粒,例如穿孔素和粒酶(granzyme) B。NK细胞以细胞表面标记CD16+和CD56+为特征,但不表达CD4。

[0003] T-细胞和B-细胞是适应性免疫反应的一部分,且识别非自身抗原。B-细胞通过抗体产生响应非自身抗原。不同类型的T-细胞以不同方式响应非自身抗原。细胞毒性T细胞(CTL)以标记CD3+、CD8+和TCR $\alpha\beta$ 为特征,而不表达CD4。肿瘤特异性CD8+CTL主要负责肿瘤消除。此外,CTL可以特异性识别肿瘤细胞,而不攻击相同组织的正常细胞。CTL产生毒性颗粒,毒性颗粒包含效力大的酶,效力大的酶包括粒酶B和穿孔素,其引起病变细胞或癌细胞死亡。

[0004] T辅助细胞以细胞表面标记CD3+、CD4+和TCR $\alpha\beta$ 为特征。T辅助细胞产生细胞因子或其他分子,细胞因子或其他分子通过其他细胞或分子引导免疫反应。还未知T辅助细胞直接介导细胞的杀死,因而通常不包含细胞毒性颗粒,例如粒酶B或穿孔素。T辅助细胞的子分类为两种类型:T辅助细胞1型(Th1)和T辅助细胞2型(Th2)。Th1细胞介导细胞免疫且对于免疫介导的肿瘤根除是关键的,而Th2细胞介导体液免疫或抗体免疫。Th1细胞和Th2细胞是反调节的,增加Th1细胞会下调Th2细胞,反之亦然。

[0005] 已经开发了各种各样的免疫治疗方法和组合物,以增强或抑制患者的免疫反应。细胞治疗方法经常包括离体操作,例如细胞的增殖、分化和/或激活以及将这些细胞转移给向患者作为治疗。

[0006] 过继免疫疗法(adoptive immunotherapy)包括从患者中除去淋巴细胞,增强淋巴细胞的离体抗癌活性,将细胞生长至大临床相关数目,然后将细胞返回到患者。

[0007] 过继免疫疗法的最初实验包括从患者血液中分离出淋巴细胞,且在淋巴因子白细胞介素-2(IL-2)、免疫刺激物的存在下使淋巴细胞生长。然后将细胞返回到患者。这些淋巴细胞被称为淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK)。

[0008] 使用从肿瘤本身分离出的淋巴细胞获得针对肿瘤细胞的更强的反应。使这些肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL) 在 IL-2 的存在下生长, 且返回到身体以攻击肿瘤。

[0009] 过继免疫疗法是一种形式的免疫疗法, 其中离体处理的细胞被引入身体内。临床前研究表明, 抗肿瘤活性可以通过使用白细胞介素-2 以及离体激活和扩增的自体淋巴细胞而增强。并且, 高剂量药团 (bolus) 白细胞介素-2 疗法的第一目标反应在接受白细胞介素 2 以及 LAK 细胞的患者中被观察到, 其中 LAK 细胞是通过体外激活经淋巴去除术 (lymphopheresis) 收获的自体外周血淋巴细胞制备的, 且最初, 似乎白细胞介素-2/LAK 的组合比仅白细胞介素-2 活性更高。IL-2 是由 Th1 辅助细胞产生的细胞因子。在临床研究未能证明向 IL-2 添加激活的 LAK 或 TIL 细胞比仅 IL-2 更有效之后, 采用过继免疫疗法的兴趣下降了。

[0010] CD4+T (Th) 细胞对于激活和调节宿主针对感染的防御的大多数方面是至关重要的, 且对于细胞毒性 CD8+ 淋巴细胞 (CTL) 的充分作用是至关重要的。大部分肿瘤免疫学的研究已经集中于天然存在的自体肿瘤特异性 T 细胞, 天然存在的自体肿瘤特异性 T 细胞主要是 CD8+ 且可以从黑色素瘤和其他一些肿瘤分离出。这些细胞可以在体外扩增和再输入。这种类型的过继免疫疗法已经导致在一些患者中的目标肿瘤反应和长期生存, 这些患者的疾病对于其他干预措施是难治的。虽然有使用 CD8+ 细胞毒性 T 细胞作为过继免疫疗法的丰富临床经验, 临床反应不佳强调需要提高这些疗法, 以达到更高比例的患者中的肿瘤排斥。

[0011] 由于缺乏 CD4+T 细胞的辅助, CD8+ 淋巴细胞可能在很大程度上未能保持体内功能。在体外, CD8+ 细胞在暴露于 MHC 相容的细胞系时释放出大量的干扰素- γ (IFN- γ), 且溶解自体抗原阳性和 MHC I 类-阳性肿瘤。然而, 肿瘤细胞的遗传不稳定性时常导致处理和呈现内源性抗原的能力的损失, 内源性抗原使得肿瘤成为 CD8+ 溶细胞 T 细胞的固有不可靠的目标。此外, CD8+T 细胞似乎缺乏协调广大抗肿瘤反应的内在能力, 其似乎是一些 CD4+T 细胞亚群固有的。

[0012] 虽然 CTL 过继转移的免疫疗法已在许多动物模型中证明有希望, 这些结果对人类的翻译已经证明是困难的和难取得的。CD4+ 细胞 (尤其是 Th1 亚型) 将是有吸引力的可用免疫疗法医疗设备的附加物, 以为过继转移的 CD8+ 杀伤细胞提供天然的“帮助”。然而, 在利用天然存在的肿瘤特异性 CD4+ 细胞进行处理方面存在重大障碍。在任何给定患者人群中与 CD4+ 辅助细胞结合的 II 类 HLA 的遗传多样性比在 CD8+ 溶细胞 (杀伤) T-细胞中发现的 I 类 HLA 的情况复杂得多, 使识别表位和 TCR 更有问题。此外, CD4+T-细胞比 CD8+ 细胞在体外扩增更差, 且培养条件显著影响它们的特性。最后, 缺乏基于肿瘤特异性 CD4+ 细胞的现实的动物模型。这些因素已经限制使用 CD4+T 细胞的翻译研究, 且已经限制其临床应用。

[0013] 本发明公开了一种用于生产临床相关数目 CD4+ 细胞的方法, CD4+ 细胞也含有溶细胞颗粒酶 B 和穿孔素, 且都作为 Th1 细胞 (产生 IFN- γ 而不产生 IL-4) 起作用, 且具有用于治疗性癌症疫苗和过继免疫细胞治疗方案的 NK 样活性 (识别和杀伤肿瘤细胞而不识别和杀伤正常细胞)。

发明内容

[0014] 基于细胞的治疗性癌症疫苗 (细胞免疫疗法) 有希望作为新的毒性最小的用于治疗癌症的方法。这种方法的希望已在动物模型中被证明, 但将这种希望翻译到临床是困难

的 (Bodey, Bodey 等, 2000)。最近FDA批准第一个细胞免疫治疗药物, Provenge® (sipuleucel-T), 用于治疗无症状或症状最轻的转移性去势抵抗性前列腺癌的自体树突细胞免疫疗法 (Kantoff, Higano等), 已经恢复了开发改善的用于临床应用的细胞治疗产品的热情。

[0015] 因为成功地翻译在动物中开发的细胞免疫治疗策略的免疫介导的抗肿瘤机制已证明是困难的, 代替地我们集中于翻译已经已知引起显著的临床抗肿瘤效应的抗肿瘤免疫机制。有争议的是, 人类有史以来曾经描述的效力最大和最有效的免疫介导的抗肿瘤机制是在非骨髓性调节和移植HLA配对的干细胞之后发生的移植物抗肿瘤 (GVT) 效应 (Barrett和Childs 2000; Childs 2000; Resnick, Shapira等2005)。不幸的是, 这些GVT效应经常伴随有慢性移植物抗宿主病 (GVHD) 毒性。慢性GVHD与显著的发病率相关联, 且是同种异体造血干细胞移植之后的晚期死亡率的主要原因 (Lee, Klein等2002), 显著地限制了GVT机制的临床应用。

[0016] 将有益的GVT效应与有害的GVHD效应分离是困难的, 因为这些效应是相互关联的和成比例的, 因为抑制GVHD的操作也降低GVT效应 (Li, Giver等2009)。通过分析已知的相互关联的GVT和GVHD效应的免疫介导机制, 假设可能可以开发同种异体细胞免疫疗法代替分离GVT效应/GVHD效应, 这将通过将移植物-到-宿主逆转至宿主-到-移植物而保持免疫机制的相互关系 (Har-Noy和Slavin 2008)。效应方向的成功逆转将导致与无毒的宿主抗移植物 (HVG) 排斥效应结合的宿主抗肿瘤 (HVT) 效应。

[0017] 假设表达高密度CD40L且产生大量干扰素 (IFN)- γ 的故意错配对的、激活的、同种异体Th1细胞将能够引起结合的HVT/HVG效应。在化学疗法难治性B细胞白血病/淋巴瘤的动物模型中试验这种假设 (Har-Noy, Zeira等2008)。这些研究证明, 只有当连接至抗-CD3/抗-CD28-包被的微珠子的Th1细胞被激活且给药时, 显著的HVT/HVG活性才可能由离体分化同种异体Th1细胞引起。另外的研究表明, 这些同种异体CD3/CD28-交联的Th1细胞具有: 能够将全身性占优势的Th2免疫转换到占优势的Th1免疫的免疫调节效应; 以及用于促进Th1特异性免疫发展和肿瘤免疫避免 (immunoavoidance) 机制失调的辅助效应 (Har-Noy, Zeira等2009)。鉴于这些数据, 为了将这种实验方法翻译到临床的可能性对人类版本的Th1移植物进行研究。

[0018] 有显著的与同种异体Th1细胞的离体分化和扩增相关联的调节的和逻辑的关心, 其需要被克服以便使用这些细胞用于人类临床研究。一个这样的问题是, 小鼠版本的同种异体Th1细胞需要使用外源细胞因子、IL-2、IL-12和抗-IL-4mAb, 以引起小鼠Th1细胞的离体分化。本发明公开了用于生产人类同种异体Th1细胞的符合GMP要求的方法的成功发展, 无需使用外源细胞因子, 导致批与批之间的一致相同和为了作为人类生物药物分类的功能特性。在表征所产生的同种异体移植细胞时, 人类的生产方法导致一个意外的发现。由本文所描述的方法产生的同种异体Th1细胞不仅发展了Th1特性, 而且发展了NK样特性。具有Th1活性和NK样活性的组合的同种异体移植物是独特的, 而在正常的血液循环中没有描述。本发明的方法包括纯化的、休止的具有混合记忆和幼稚表型 (分别为CD45RA和CD45RO) 的 (CD25⁻), CD4⁺T-细胞的离体培养。该细胞在没有外源细胞因子的情况下利用固定化的抗-CD3/抗-CD28mAb被激活多次。9天之后该细胞扩增25至100倍, 且分化为CD4⁺、CD45RO⁺、CD25⁺、CD62^{hi}细胞。该中间细胞可以储存于液氮中多年。当需要用于患者给药时, 前体细胞利用

CD3/CD28mAb包被的微珠子孵育4h。在这最后4小时孵育的过程中,前体细胞进一步分化,以减少表达CD62L和增加表达CD40L和CD25。最后的CD4⁺、CD45RO⁺、CD40L^{hi}、CD62L^{lo}、CD25⁺细胞产生 $>1000\text{pg}/10^6\text{IFN-}\gamma$ 细胞和 $<50\text{pg}/10^6\text{IL-4}$ 细胞(Th1表型),且表达粒酶B和穿孔素的溶细胞颗粒,且表现出NK样活性和溶解肿瘤细胞而不溶解正常细胞的能力。

附图说明

[0019] 图1A和图1B是分别说明CD4⁺选择之前和之后的细胞表型的来自CD4表面抗原的免疫染色的流式细胞仪图。

[0020] 图2A是说明具有休止的CD4幼稚(CD4、CD45RA)细胞的源细胞的表型的一系列流式细胞仪图。

[0021] 图2B是说明培养成激活的CD4记忆细胞(CD4、CD45RO和CD25)之后表型的变化的一系列流式细胞仪图。

[0022] 图3是说明CD62L在激活之前CAC中和在激活之后CFB中从高到低的表达的变化的流式细胞仪图。

[0023] 图4A至图4C是说明在CFB中的增加表达的分别在CD4⁺细胞、CAC和CFB中的CD40L表达谱的图。

[0024] 图5是直接杀伤试验的曲线图且说明了CFB可以杀死来自肿瘤细胞系、ARH77的细胞。

[0025] 图6A是粒酶B由CAC表达的图。

[0026] 图6B粒酶B由CFB表达的图。

[0027] 图6C是示出在CFB中检测出穿孔素的蛋白质印迹图片。

[0028] 图7是在有EGTA的情况下和在没有EGTA的情况下穿孔素-粒酶B活性的曲线图。

具体实施方式

[0029] 本公开涉及包括具有独特特性的细胞的组合物。该组合物包括具有Th1辅助细胞性质以及溶细胞颗粒和NK活性的细胞类型的细胞。具有Th1特性和NK特性的组合的CD4⁺T-细胞可以为具有各种各样的疾病的患者提供实质治疗能力。Th1特性可以包括,例如,产生IFN- γ 而不产生IL-4。NK特性可以包括利用粒酶B和穿孔素的表达杀死肿瘤细胞但不杀死正常细胞。

[0030] 本发明包括使这种新细胞类型分化和扩增至用于过继免疫疗法的临床相关数目的方法。用于获得新细胞的方法可以包括使T-细胞,特别是CD4⁺T-细胞从外周血或其他T-细胞源分离出。这些CD4⁺T-细胞可以根据本文描述的方法分化和扩增至临床相关数目且用于免疫疗法。出人意料地,根据这些方法制备的CD4⁺T-细胞可以表现出与一般在NK/CTL细胞中发现的溶细胞活性类似的溶细胞活性,且还可以表现出Th1特性和活性。

[0031] 一般地,T辅助细胞不直接表现出溶细胞活性,而是产生细胞因子和其他因子,细胞因子和其他因子然后引出例如NK细胞和CTL的其他细胞以灭活或杀死病变细胞。在本组合物中的CD4⁺T-细胞可以直接杀死病变细胞且产生细胞因子以刺激例如NK细胞的其他细胞,其他细胞然后实现溶细胞活性。这些CD4⁺T-细胞的溶细胞活性通过导致肿瘤细胞或受感染细胞的杀死的粒酶B和穿孔素介导。

[0032] 本文提到的溶细胞活性涉及通过靶肿瘤细胞或细胞系的效应细胞的直接杀死,当它们与靶细胞相互作用时。直接杀死可以通过仅存在效应物和靶细胞而不存在其他细胞类型而发生。

[0033] 本发明中描述的新细胞类型本文被称为Th1/杀伤细胞(Th1/killer cells)。Th1/杀伤细胞可以表现出Th1特性、杀死肿瘤细胞而不杀死正常细胞以及通过粒酶B和穿孔素表达机制的NK活性表达的组合物。

[0034] 本文提到的临床相关数目细胞涉及足够数目Th1/杀伤细胞以直接或间接引起抗肿瘤效应。一般给药的Th1/杀伤细胞的数目在单个剂量中为至少 1×10^6 个细胞,优选至少 1×10^7 数目细胞,且更优选至少约 1×10^8 数目细胞。具有更大量细胞的剂量也在本发明的范围内。优选地足够量细胞从单个血液供体生产,以产生用于多个患者的足够剂量。临床相关数目包括用于至少一个患者的足够细胞,更优选用于高达10个患者的足够细胞,且最优选用于100个以上患者的足够细胞。

[0035] 本发明的组合物可以向具有各种各样的病变细胞的患者给药。患者可以是动物、人或其他哺乳动物。病变细胞可以是癌细胞或来自受感染组织的细胞。病变细胞可以是被病毒和/或细菌性病原体感染的。组合物可以向具有实体瘤的患者给药,实体瘤例如乳腺癌、肺癌、结肠癌、胃癌、胰腺癌等等。组合物也可以向具有血液系统恶性肿瘤(例如,慢性淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤和非霍奇金淋巴瘤)或病毒感染性疾病(例如,乙型或丙型肝炎、疱疹、HIV)和其他障碍的患者给药。

[0036] 本文描述的组合物是活细胞。活细胞是指当通过适当的试验技术(例如台盼蓝排除法、MTT或ATP水平的生物发光检测)测定时>70%的细胞是能存活的,以便该细胞能够在适当的条件下离体操作,例如扩增、分化和/或激活。然而,组合物可以包括一些灭活的细胞、辐射的细胞和/或不能存活的细胞和无生命组分。

[0037] 该组合物一般包括最初例如从供体的血液获得的CD4+细胞。供体可以是无疾病的或正常的。CD4+可以本文描述的方式被处理,然后被配制用于输注到相同的供体或有关或无关的受体。

[0038] CD4+源细胞优选从外周血纯化。CD4细胞可以各种各样的方式纯化。一般地,CD4+细胞通过正向选择从外周血的血沉棕黄层(buffy coat)纯化。CD4+从血沉棕黄层的正向选择可以例如通过使用从Miltenyi Biotec(奥本,加州)获得的磁性珠子和柱子而进行。这可以导致细胞组合物,该细胞组合物比约90%纯CD4+细胞更大,优选比约95%纯CD4+细胞更大,且更优选比约98%纯CD4+细胞更大。

[0039] 从血沉棕黄层分离出且作为用于生产Th1/杀伤细胞的源材料的CD4+细胞可以许多细胞表面标记的表达为特征。从外周血的血沉棕黄层纯化的CD4+细胞的种群可以具有CD45RA/CD45RO标记的混合种群。CD4+T-细胞一般主要是CD25-。优选地,源CD4+细胞大部分是幼稚的(表达CD45RA而不表达CD45RO)。也可以根据CD62L表达和CD40L表达对源CD4+T-细胞进行评估。一般地,源CD4+T-细胞表达非常低量的CD40L。CD62L的表达可以是双峰的(高的和低的)平均荧光强度(MFI)峰。源CD4+细胞优选具有高CD62L表达。

[0040] 源CD4+T-细胞可以被处理以通过多个激活步骤分化成Th1/杀伤细胞。优选地,CD4+细胞在9天内每三天被激活。这些CD4+细胞优选通过CD3和CD28细胞表面分子的交联而被激活,CD3和CD28的交联可以通过加入固定化的抗-CD3和CD28单克隆抗体而实现。一般地,

Th1/杀伤细胞通过在细胞培养物中的分化和扩增而获得。多次激活的CD4+细胞从细胞培养物收获且冷冻储存在液氮中。向患者给药之前,细胞最后一次被激活。使激活剂与细胞结合。连接有激活剂的细胞在装置中被配制,装置例如注射器,适合用于输注或注射。本文使用的“激活”是指细胞表面分子被例如单克隆抗体的试剂结合以及这些试剂被交联剂交联。这种类型的激活例如在美国专利No.7,435,592和美国专利No.7,402,431中被描述,这两者都通过引用并入本文。

[0041] CD4+T-细胞可以各种各样的方式被激活,各种各样的方式包括通过使用固定化的对于T-细胞表面分子特异性的单克隆抗体。适当的激活的T-细胞例如在美国专利No.7,435,592中被描述。细胞优选具有细胞表面部分,细胞表面部分被单克隆抗体或其他结合剂结合,单克隆抗体或其他结合剂然后被交联。这些单克隆抗体和/或结合剂优选被例如固定在固体表面以激活T-细胞的试剂交联。这些在本文被称为在培养物中激活的细胞(CAC)。这些离体制备的可以被冷冻用于将来使用或被配制用于输注。CAC例如可以被等分且冷冻在液氮罐的气相中。CAC能够始终满足预先定义的标识和功能释放标准,如以下所描述的。建立过程和最终质量控制试验,以保证无菌和无内毒素状态。

[0042] 在一个示例性实施例中,CD4+T-细胞在从Invitrogen,卡尔斯巴德,加州获得的CD3/CD28ClinEx Vivo Dynal珠子的存在下培养9天。细胞在生命细胞培养瓶(Baxter Scientific,迪尔菲尔德,伊利诺斯州)中在37℃和5%CO₂下生长且在培养的3天和6天利用珠子再刺激。在培养物中9天之后,可以除去珠子且细胞可以被称为CAC。为了激活培养细胞的其他方法也在本发明的范围内。

[0043] 在一些优选的实施例中,离体制备的CAC冷冻储存,直到需要用于患者给药或其他用途。向患者给药之前,CAC被解冻(如果必要的话),洗涤且通过交联例如CD3和CD28的细胞表面结合部分而在营养介质中再激活,如例如在美国专利No.7,402,431中描述的。CAC,与激活剂和交联剂一起,然后可以被洗涤且转移到无营养缓冲液,例如配制品缓冲液。在配制品缓冲液中的再激活的细胞在本文被称为配制品缓冲液中的细胞(CFB)。CFB在本文也可以被称为Th1/杀伤细胞。CFB和Th1/杀伤细胞可以在本文可互换地使用。

[0044] Th1/杀伤细胞可以被包装在注射器或其他适当的容器中,且转移到床旁检测现场,如果需要的话。Th1/杀伤细胞然后可以向患者给药用于治疗目的。Th1/杀伤细胞可以被静脉内给药,腹膜内给药,皮内给药,或通过其他适当的方法给药。Th1/杀伤细胞,一旦转移到无营养缓冲液,具有有限的保存期限。细胞可以每毫升至少约10⁶个细胞、优选每毫升约10⁷个细胞或更高的密度被配制。在一些实施例中,细胞可以每毫升约10⁸个细胞或更高的密度被配制。细胞的特定浓度可由细胞的特定用途和治疗方案确定。

[0045] 除了Th1/杀伤细胞之外,该组合物还可以包括许多其他组分。这些组分可以包括,例如,将细胞保持在所需的激活状态的试剂。在一个示例性实施例中,该组合物可以包括将T-细胞保持在激活状态的试剂,例如以下在示例中描述的Dynabeads ClinExVivo™。

[0046] 一般地,将细胞转移到适合输注到患者的无营养缓冲液。细胞可以在各种各样的无营养缓冲液中。本文提到的无营养缓冲液是缺乏支持细胞增殖和/或扩增的适当组分的任何类型的介质、缓冲液或其他液体。

[0047] 无营养缓冲液一般是等渗的,USP无菌的,无热原的,且含有保持活细胞完整的适当的组分和/或缓冲体系,且许可用于人类胃肠外使用。在一个示例性实施例中,无营养缓

冲液是配制品缓冲液,配制品缓冲液是具有1%人血清白蛋白的Plasmalyte A (Baxter Scientific,迪尔菲尔德,伊利诺斯州)。(McKesson,旧金山,加州)

[0048] 在Th1/杀伤细胞的实施例中,对于细胞的激活信号被保持,甚至当细胞被转移到无营养缓冲液。例如,在细胞通过交联细胞表面结合部分而被激活的实施例中,交联优选保持在无营养缓冲液中。在储存过程中交联的保持可能对于解除储存之后恢复该组合物的是关键的。

[0049] 该组合物中的Th1/杀伤细胞可以表现出功能特性的新组合。这些功能包括Th1特性和与NK功能类似的溶细胞功能。Th1/杀伤细胞一般生产IFN- γ ,且实质减少生产或不生产IL-4。优选地,IL-4生产量为低于50pg/10⁶细胞,而IFN- γ 生产量为大于1000pg/10⁶细胞。

[0050] Th1/杀伤细胞的另外的功能特性可以包括,例如,表达功能分子,例如CD40L、FasL、穿孔素和粒酶B,共刺激分子4-1BBL、CD28、CTLA4,和TNF-相关激活诱导的细胞因子(TRANSC),TWEAK,PD-1,B7族,粘附分子例如整合蛋白、钙粘着蛋白和选择素;以及分泌各种各样的细胞因子和趋化因子;以及表达这些细胞因子和趋化因子的受体。Th1/杀伤细胞可以产生和分泌大量细胞因子。产生的细胞因子可以是,例如,IFN α ,GM-CSF和TNF- α ,仅分泌残留IL4。

[0051] 本文所描述的Th1/杀伤细胞也可以表现出溶细胞活性。溶细胞活性与CTL/NK细胞的特性类似。一般地,CTL/NK细胞以及Th1/杀伤细胞的溶细胞活性对于肿瘤细胞或病变细胞是特异性的,但不是对于正常细胞特异性的。换言之,Th1/杀伤细胞可以杀死病变细胞,但不杀死正常细胞。溶细胞活性可以通过各种各样的机制发生。溶细胞活性例如可以通过粒酶B-穿孔素机制发生。溶细胞活性可以通过细胞溶解或细胞凋亡导致细胞破坏。Th1/杀伤细胞的溶细胞活性可以被EGTA阻止。例如约1mM的EGTA的浓度可以降低激活的Th1细胞的溶细胞活性。

[0052] 本发明的Th1/杀伤细胞可以表达分子粒酶B和穿孔素。无论是幼稚的或通过分化、激活等等成熟之后,粒酶B和穿孔素一般不在CD4+T-细胞中被表达。激活的Th1细胞中的粒酶B和穿孔素的量可以变化。一般地,被表达的粒酶B和穿孔素的量足以破坏病变细胞。

[0053] 在一些优选的实施例中,本发明包括组合物,该组合物包括Th1/杀伤细胞。这些Th1/杀伤细胞可以灭活包括骨髓瘤肿瘤细胞系的各种各样的肿瘤细胞,例如ARH77细胞。病变细胞的灭活可以通过对EGTA敏感的机制实现。效应细胞(Th1/杀伤细胞)与靶细胞(病变细胞)的比可以变化。效应物与靶细胞的比可以为至少1:9,优选至少1:5,更优选至少1:1。

[0054] 本发明包括一种用于破坏病变细胞的方法。病变细胞可以在患者中。患者例如可以具有癌症或包含由于受病毒感染的受感染组织。患者可以具有实体瘤或血液系统恶性肿瘤。该方法可以包括向患者给药包括本文描述的Th1/杀伤细胞的组合物。Th1/杀伤细胞优选对于患者是同种异体的。同种异体细胞可以来自一个正常的同种异体供体。可选地,同种异体细胞可以从多个供体获得且组合成治疗性组合物。优选地,患者与同种异体细胞之间的组织相容性适配被最大化。患者与同种异体细胞之间的某些组织相容性可以耐受,且仍然可以导致所需的效应。

[0055] Th1/杀伤细胞可以包括皮内、静脉内、腹腔内等等的各种各样的途径向患者给药。患者可以给药一个剂量或多个剂量。向患者给药的细胞的数目可以变化,且可能取决于特定的疾病、患者、激活方法和其他因素。一般地,向患者给药至少10⁷个激活的Th1细胞,优选

至少 10^8 个细胞,且更优选至少约 10^9 个细胞。

[0056] 本发明还包括一种通过给药包括Th1/杀伤细胞的组合物治疗患者的方法。患者可以接受一个或多个剂量的Th1/杀伤细胞。剂量的量和频率可以变化,且可以取决于特定的疾病。在一些优选的实施例中,Th1/杀伤细胞对于患者是同种异体的,且向患者给药Th1/杀伤细胞引起随同宿主抗移植效应一起的宿主抗肿瘤效应,而没有移植抗宿主疾病。

[0057] 示例

[0058] 材料:PE-缀合的CD40L从Beckman Coulter,Brea,加州购买。7-氨基-放线菌素D (7-AAD) (1000x)从Cayman Chemical Co.,安阿伯,密歇根州购买。PlasmaLyte A从Baxter Scientific,迪尔菲尔德,伊利诺斯州购买。人血清白蛋白 (HAS) 从McKesson,旧金山,加州购买。FcR结合抑制剂从eBioscience,圣地亚哥,加州购买。Dynabeads ClinExVivo™从Invitrogen,卡尔斯巴德,加州购买。

[0059] 在培养物中激活的细胞 (CAC) 的制备-CD4+T-细胞在从Invitrogen获得的CD3/CD28ClinEx Vivo Dynal珠子的存在下培养9天。(位置)。细胞在生命细胞培养瓶 (Baxter) 中在37℃和5%CO₂下生长且在培养的3天和6天利用珠子再刺激。在培养物中9天之后,可以除去珠子且这些细胞被称为CAC。

[0060] 配制品缓冲液中的细胞 (CFB) 的制备-将CAC放置到cRPMI介质中用于洗涤。记录时间以表示配制方案的开始。将cRPMI中的细胞离心,除去上清液,且细胞再悬浮在cRPMI缓冲液中。细胞活力通过使用台盼蓝试验而测定。使用活细胞的总细胞数目和浓度来确定能存活的细胞的百分数。如果样品具有大于80%的细胞活力,那么步骤继续进行用于再激活和配制细胞。

[0061] CAC细胞以 1×10^7 个细胞/毫升的浓度再悬浮。再激活以 1×10^7 个细胞/毫升的活细胞浓度进行。根据体积,再激活在24孔板、6孔板或75cm³烧瓶中进行。加入Dynabeads ClinExVivo™ CD3/CD28以再激活细胞且在36℃至38℃和5%CO₂下孵育4小时。

[0062] 孵育约4小时之后,然后将细胞除去且转移到具有最终配制品缓冲液 (FFB) 的50毫升管。FFB是具有1%HAS的PlasmaLyte A。将再激活的细胞离心,除去上清液,且再悬浮在FFB中。这些被称为配制品缓冲液中的细胞 (CFB)。

[0063] 将CFB以每毫升 10^7 个细胞的浓度再悬浮在FFB中。将CFB再悬浮用于ID、IT或IV给药。将1毫升细胞悬浮液作为ID配制品加入3毫升注射器中。IT和IV配制品分别为3毫升和5毫升。将具有适当的配制品的注射器储存在具有约4℃的平均温度的制冷条件下。

[0064] 储存之后样品的收获-在不同时间点收集细胞和上清液。时间点如下:0 (初始);在室温 (RT) 下2小时;在4℃下48小时;以及在4℃下48小时,接着是在RT下2小时。

[0065] 在每个时间点,收集100微升细胞悬浮液且将细胞以400g在4℃下旋转5min。然后将上清液转移到另一管用于随后使用ELISA检测IFN- γ 。将细胞再悬浮在150微升染色缓冲液中用于流式细胞术。在一些实验中,将细胞再悬浮在100微升cRPMI介质中且在培养箱中在37℃下用5%CO₂培养24h。24h孵育之后取出上清液且通过ELISA检测IFN- γ 。

[0066] 流式细胞术 (CD40L和7-AAD)-将来自上面 (150微升) 的50微升细胞悬浮液转移到3个微量离心管中,分别以未染色的、CD40L和7-AAD标记。将未染色的管在冰上孵育20min。对于CD40L管,将细胞用FcR结合抑制剂根据制造厂家的说明书在冰上预孵育20分钟。然后将40微升染色缓冲液 (PBS+1%FBS) 和10微升PE-CD40L抗体加入细胞悬浮液中且在冰上在黑

暗中孵育另外20min。

[0067] 通过7-AAD的流式细胞术测试细胞活力。7-AAD插入死亡或受损的细胞的DNA中,因而阳性细胞的测定是细胞活力的指示物。对于7-AAD管,将该管以400g在6℃下离心5min。除去上清液之后,将细胞沉底再悬浮在100微升1x 7-AAD溶液中。将该管在冰上在黑暗中孵育15min。将1ml的染色缓冲液加入CD40L管,然后将3个管一起离心。丢弃上清液之后,将细胞沉淀再悬浮在0.4毫升染色缓冲液中且使FACS进行。

[0068] 示例1-CD4+细胞的纯化和细胞表型。获得正常供体外周血且来自血沉棕黄层的CD4+细胞使用从Mitenyi Biotec (奥本,加州)获得的磁性珠子和柱子纯化。图1是侧向散射(细胞的测量尺寸和密度)对CD4的流式细胞仪图。图1说明CD4+细胞为总种群的约46% (N=22)。对于CD4+细胞正向选择之后,结果是98.69%纯CD4+细胞 (N=22)。如可以从图1B看到的,过柱之后CD4+的种群含有淋巴细胞和单核细胞。

[0069] 因为每批从不同供体生产,在生产开始和结束时测试抗原标记。测试CD4+细胞(图2A)对在培养物中激活的细胞(CAC)(图2B)的细胞表型。结果说明从幼稚CD4+表型(CD45RA+)到记忆表型(CD45RO+)的非常一致的变化。图2A示出CD4+细胞分别对于CD45RA、CD45RO和CD25的表型。图2B示出为了分别表面表达CD45RA、CD45RO和CD25进行9天培养和分析之后CAC的表型。从混合CD45RA/CD45RO种群,获得CD45RA阴性CD45RO阳性种群。在扩增过程开始时CD25+细胞为大约10%。在9天时,CD25+为大约85%。这与细胞的激活状态一致。图2A示出柱之后的CD4+细胞显示出CD45RA+细胞(平均值=44.76% n=29)、CD45RO+ (平均值=53.44% n=29)和CD25+ (平均值=10.83% n=29)的幼稚表型。图2B说明在培养物中连续刺激9天之后,表型变化为Th记忆样细胞。CD45RA激烈下降(平均值=4.22% n=29),CD45RO+上升到97.8的平均值(n=29),且CD25+也上升到90.03%的平均值(n=29)。

[0070] CD62L表达谱-图3说明在0天,CD4+种子细胞表现出具有在大约 10^3 处的最大峰的双峰CD62L平均荧光强度(MFI)(平均算术平均值为541 n=17)。MFI在9天之后在培养物中增加至1541的平均算术平均值(CAC),然后在最后4小时激活之后变得显著更低(190.3的平均算术平均值)(CFB)。

[0071] CD40L表达谱--CD40L在CAC上表达的密度在利用CD3/CD28珠子激活4小时之后在CAC的表面上不断增加。图4示出比较在0天的CD4+ (图4A)、最后激活之前9天收获的CAC (图4B)以及4小时激活之后、CFB (图4C)的代表性批的CD40L表达的算术平均值和百分数的变化。如可以看到的,未激活的细胞与激活的细胞之间的差异在CD40L+细胞的百分数方面不大,而在算术平均值方面较大(对于CAC平均值AM为20 (n=29)而对于CFB平均值为112 (n=29))。

[0072] 在最后激活过程中细胞因子的分泌-将来自每个生产批的9天收获的样品利用CD3/CD28珠子激活4小时,且将上清液收集和测试用于使用ELISA试验进行细胞因子生产(IFN γ , IL-4, IL-8, TNF α 和GM-CSF)。表1示出这些实验的结果。

[0073] 表1

[0074]

批号	IFN γ	IL4	GM-CSF	TNF α
068C	2,178.3	0.00	647.9	1,338.3
069C	2,500.0	0.00	809.9	1,245.8
070C	5,469.1	0.00	1,595.9	1,994.9
071C	6,995.4	0.00	1,739.3	2,799.0
072C	806.6	0.00	251.1	117.7
073C	2,931.5	0.00	596.6	358.3
074C	462.9	0.00	0.0	105.3
075C	2,722.5	0.00	927.0	1,189.7
076C	4,118.0	0.30	752.0	576.7
078C	1,072.0	0.00	294.2	393.1
080C	3,846.7	0.90	1,878.4	1,828.4
081C	9,702.8	0.35	9,030.4	1,522.9
082C	6,662.4	0.76	3,984.9	869.0
083C	910.8	0.00	344.4	365.5
087C	2,257.6	0.00	764.6	736.8

[0075]

088C	4,342.1	0.00	2,539.4	3,961.5
090C	1,021.4	1.00	402.0	810.5
094C	1,420.2	1.03	733.6	757.2
097C	703.2	1.16	327.7	989.4
平均值 (n=15)	3,816.0	0.29	1,779.7	1,358.8

[0076] 仅使用IFN γ 和IL-4值用于功能释放标准。对于19个连续批的结果如表1(值以pg/10⁶细胞/4小时表示)所示。记录的平均值仅包括通过的批。

[0077] 示例2-通过激活的Th1/杀伤细胞的直接杀伤。为了测试是否CFB可以对肿瘤细胞有直接作用,测试该细胞杀死ARH77细胞系的能力。该细胞系为建立的骨髓瘤细胞系。将ARH77细胞在CFSE中染色以将ARH77细胞与CFB区别开。使CFB与染色的ARH77细胞以不同效应物(CFB)与靶(ARH77)混合18小时。该时间之后,加入7AAD,且使用FC500MPL流式细胞仪获得细胞。对不同CAC批以及对新鲜和解冻的CFB重复该实验。仅ARH77,具有DynaBeads、CD4+细胞的ARH77或具有CAC的ARH77没有显著的死亡(小于10%)数据,未示出。图5所示的结果说明CFB,而不是CAC、CD4+细胞或珠子,对ARH77细胞系有直接杀伤作用。

[0078] 直接杀伤作用的性质被检验以看看是否该作用是由于穿孔素-粒酶途径引起的。使用内部染色技术和蛋白质印迹技术来对穿孔素和粒酶B染色。图6A说明CAC非常少地表达粒酶B,如可以看到的。图6B说明CFB表达大量粒酶B。图6C说明只有通过使用蛋白质印迹才可以检测到穿孔素。泳道1是激活的PBMC的萃取液,作为阳性对照。泳道2&4是来自不同批的CAC,泳道3&5是来自相同批的CFB。

[0079] 还进行抑制试验以说明直接杀伤机制的性质。将CFB与以上描述的ARH77细胞混合,且加入以下表2所示的不同抑制剂。将针对CD40L和/或FAS-L的抗体加入CFB:ARH77混合物中。表2说明甚至最高浓度也没有阻止杀伤分布。

[0080] 表2

[0081]

	抗 C40L	没有抑制	0.1 μ g/ml	1 μ g/ml	20 μ g/ml
抗 Fas-L			35.48	35.92	35.5
没有抑制		33.85			
1ng/ml	36.55		34.55		

[0082]

10ng/ml	38.86				
200ng/ml	38.97				30.0

[0083] 检验EGTA对直接杀伤机制的作用。EGTA阻止穿孔素的聚合且作为穿孔素/粒酶B机制的抑制剂起作用。将1mM EGTA加入以上描述的直接杀伤试验。如图7所示,1mM EGTA将杀伤降低50%的平均值(n=7)配对t检验P值为0.0002。CFB表现出的直接杀伤作用来自穿孔素-粒酶途径。

[0084] 尽管已经参考一些优选实施例描述了本发明,本领域技术人员将认识到在不脱离本发明的精神和范围的情况下可以在形式和细节上进行改变。

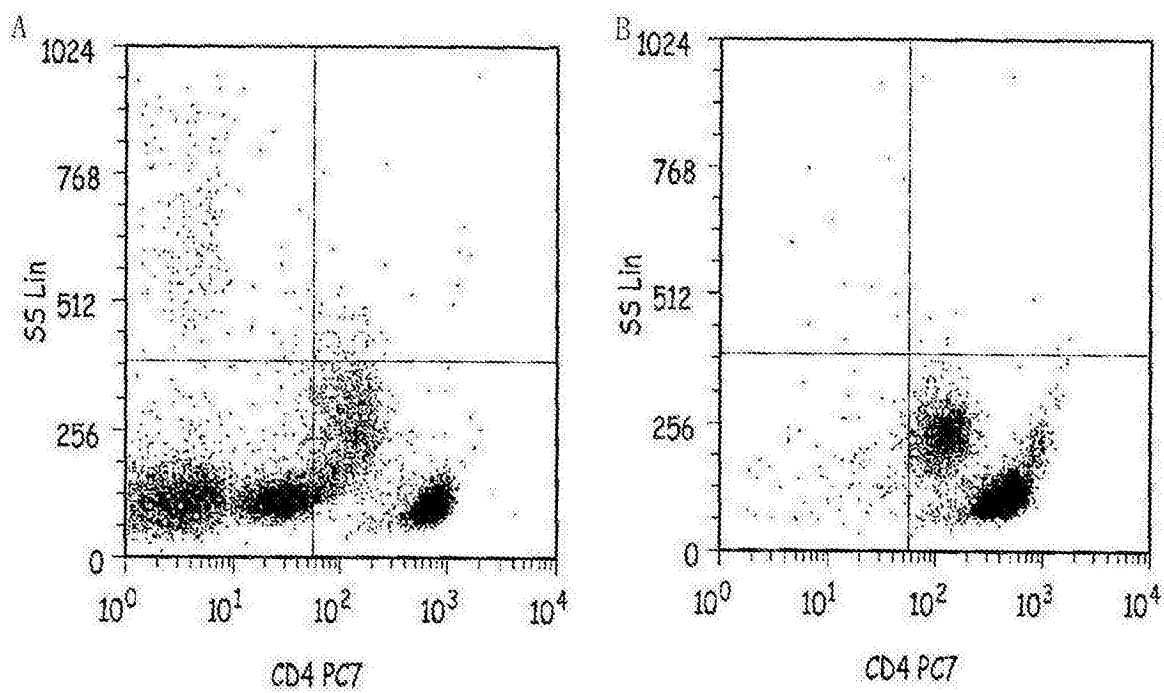


图1

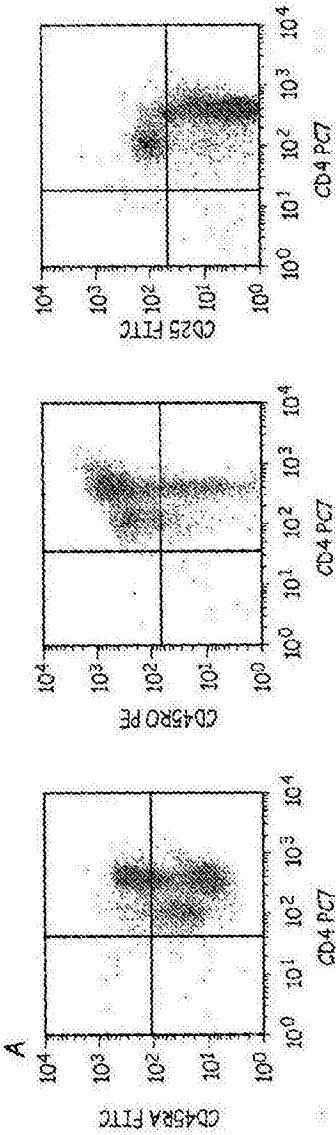


图2A

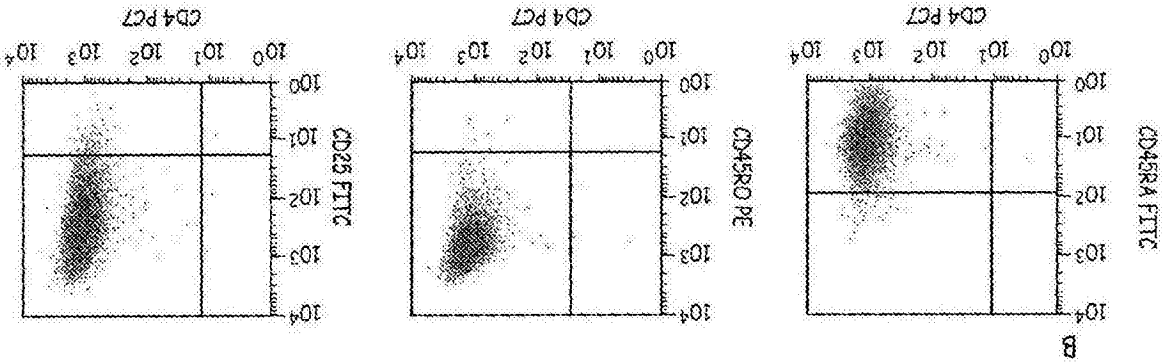


图2B

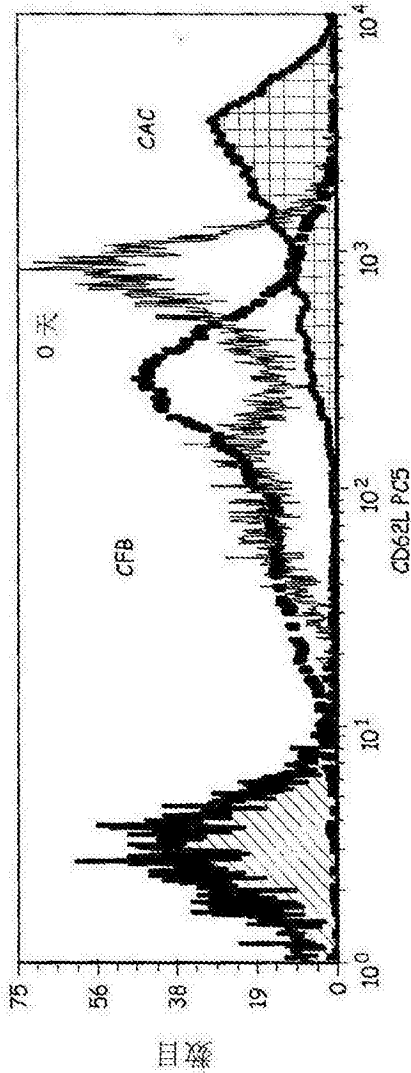


图3

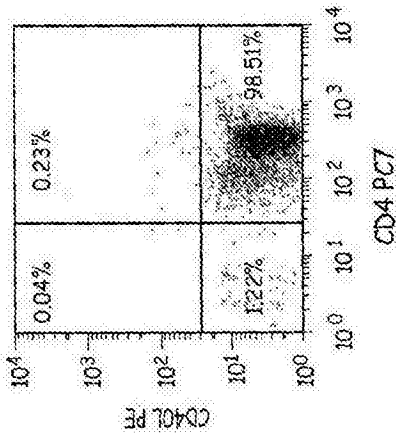


图4A

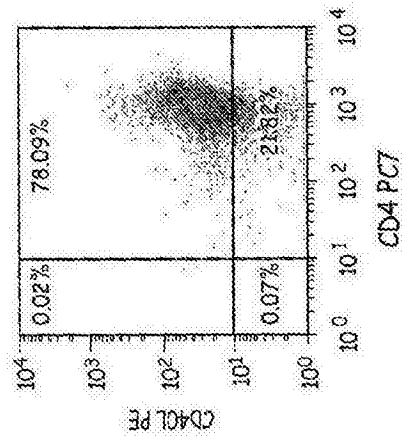


图4B

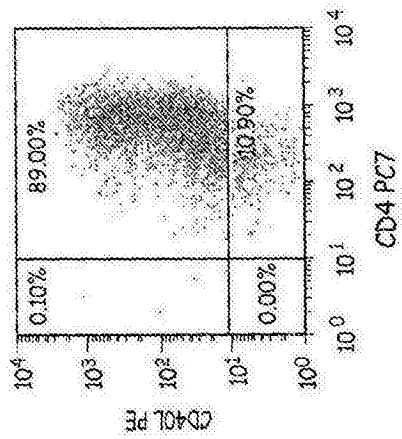


图4C

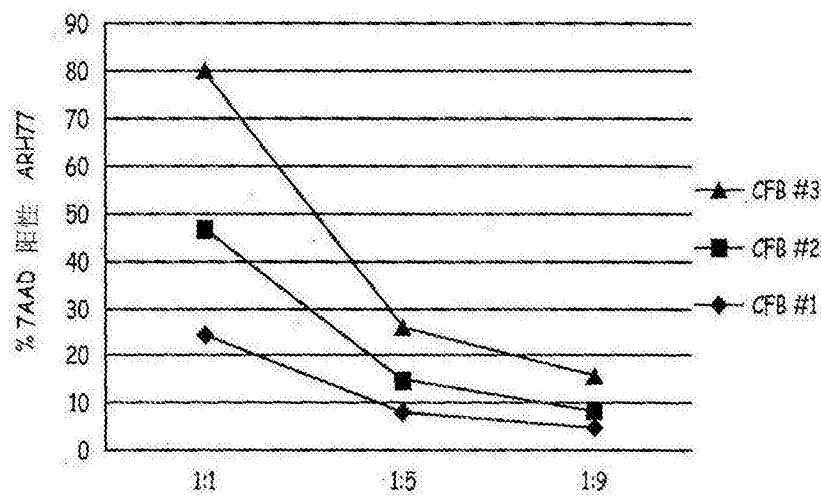


图5

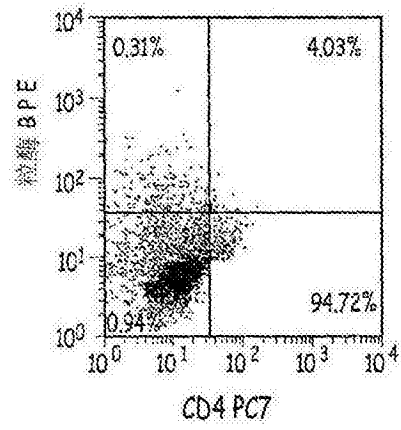


图6A

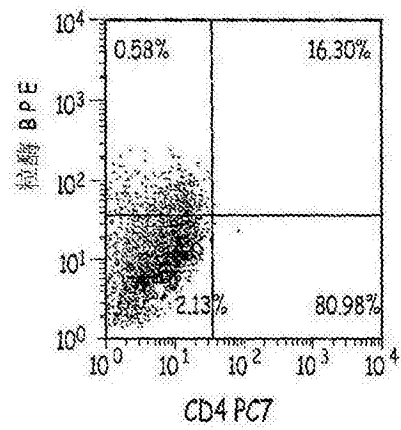


图6B

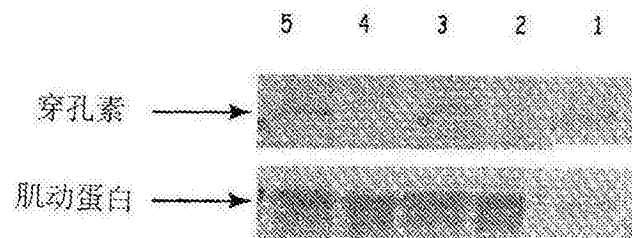


图6C

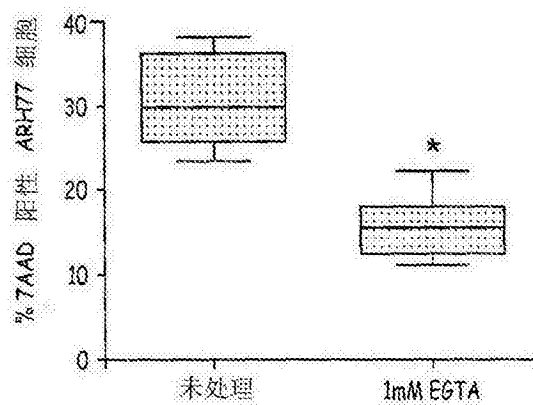


图7