



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101072582 B

(45) 授权公告日 2012.06.27

(21) 申请号 200580041799.8

(22) 申请日 2005.12.06

(30) 优先权数据

60/633,175 2004.12.06 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007.06.06

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/043985 2005.12.06

(87) PCT申请的公布数据

W02006/062917 EN 2006.06.15

(73) 专利权人 赛生制药有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 古斯塔沃·安东尼奥·莫威格利亚

阿尔弗雷德·R·鲁道夫

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 封新琴 陈桢

(51) Int. Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1367829 A, 2002.09.04, 权利要求 23、24.

W0 2004003174 A2, 2004.01.08, 权利要求 5.

US 20030124136 A1, 2003.07.03, 说明书第

16 段、第 43 段、第 44 段、第 81 段、第 86 段.

US 6537585 B1, 2003.03.25, 第 5 栏第 29 行, 第 6 栏第 32-53 行, 第 19 栏第 61 行, 第 20 栏第 3-4 行.

W0 2004087067 A2, 2004.10.14, 说明书第 10 页第 2 段.

蔡在龙, 毛积芳. 肿瘤疫苗与肿瘤免疫治疗研究进展. 实用肿瘤杂志 18 6. 2003, 18(6), 第 435 页右栏第 2-3 段.

Pratima Shrivastava, Sukh Mahendra Singh, Nisha Singh. Effect of Thymosin Alpha I on the Antitumor Activity of Tumor-Associated Macrophage-Derived Dendritic Cells. Journal of Biotechnology Science 11 5. 2004, 11(5), 摘要.

Ramsey M Dallal and Michael T Lotze. The dendritic cell and human cancer vaccines. Current Opinion in Immunology 12 5. 2000, 12(5), 583-588.

Eli Gilboa, Smita K. Nair, H. Kim Lyerly. Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines. Cancer Immunol Immunother 46 2. 1998, 46(2), 82-87.

审查员 李娟娟

权利要求书 1 页 说明书 15 页

(54) 发明名称

作为癌症疫苗佐剂的 α 胸腺肽

(57) 摘要

用于增加受试者体内癌症疫苗功效的药物组合和方法, 利用了免疫应答触发癌症疫苗和疫苗功效增加量的 α 胸腺肽, 所述疫苗能引发受试者体内免疫系统应答, 所述 α 胸腺肽增强了所述受试者体内的所述免疫系统应答; 其中所述癌症疫苗和所述 α 胸腺肽可以分别给药或一起给药。

1. 用于治疗受试者癌症和用于增加受试者体内癌症疫苗功效的药物组合产品,由以下构成:

- a) 免疫应答触发癌症疫苗,其能引发所述受试者的免疫系统应答;和
- b) 疫苗功效增加量的 α 胸腺肽,其增加了所述受试者的所述免疫系统应答;
- c) 其中所述癌症疫苗和所述 α 胸腺肽可以分别给药或一起给药;

其中所述受试者为人,所述疫苗为树突细胞疫苗,所述 α 胸腺肽为 Ta1;

所述疫苗的量 of $1 \times 10^{-9} \text{g}$ 至 $1 \times 10^{-3} \text{g}$,所述 α 胸腺肽的量为 0.1-20mg。

2. 根据权利要求 1 所述的药物组合产品,其中所述疫苗的量 of $1 \times 10^{-8} \text{g}$ 至 $1 \times 10^{-4} \text{g}$,所述 α 胸腺肽的量为 0.5-10mg。

3. 根据权利要求 2 所述的药物组合产品,其中所述 TAI 的量为 1.6-3.2mg。

4. 根据权利要求 1 所述的药物组合产品,其中所述癌症为乳腺癌。

5. 根据权利要求 1 所述的药物组合产品,其中所述癌症选自如下组成的组:原发性黑色素瘤、转移性黑色素瘤、腺癌、鳞状细胞癌、鳞腺细胞癌、胸腺瘤、淋巴瘤、肉瘤、肺癌、肝癌、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、白血病、子宫癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌、结肠癌、多发性骨髓瘤、成神经细胞瘤、NPC、膀胱癌、子宫颈癌、肾癌、脑癌、骨癌、子宫癌、胃癌和直肠癌。

6. 根据权利要求 1 所述的药物组合产品,其还包含一种或多种药学上可接受的载体。

7. 权利要求 1 的药物组合产品在制备用于增加受试者体内癌症疫苗功效的药物中的应用,所述药物组合产品由以下构成:

- a) 免疫应答触发癌症疫苗,其能引发所述受试者体内的免疫系统应答;
- b) 疫苗功效增加量的 α 胸腺肽,其增加了所述受试者体内的所述免疫系统应答;和
- c) 其中所述癌症疫苗和所述 α 胸腺肽可以分别给药或一起给药;

所述应用包括给予所述受试者所述免疫应答触发癌症疫苗,并给予所述受试者所述 α 胸腺肽,其中所述疫苗和所述 α 胸腺肽为分别给药或一起给药;

其中所述受试者为人,所述疫苗为树突细胞疫苗,所述 α 胸腺肽为 Ta1;所述疫苗的量 of $1 \times 10^{-9} \text{g}$ 至 $1 \times 10^{-3} \text{g}$,所述 α 胸腺肽的量为 0.1-20mg。

8. 根据权利要求 7 所述的应用,其中所述疫苗的给药量为 $1 \times 10^{-8} \text{g}$ 至 $1 \times 10^{-4} \text{g}$,所述 α 胸腺肽的量为 0.5-10mg。

9. 根据权利要求 8 所述的应用,其中所述 TAI 以 1.6-3.2mg 的量给药。

10. 根据权利要求 9 所述的应用,其中所述 TAI 与所述疫苗同时给药。

11. 根据权利要求 9 所述的应用,其中所述疫苗和所述 TAI 为通过注射给药。

12. 根据权利要求 7 所述的应用,其中将所述组合给药至受试者多次。

13. 根据权利要求 12 所述的应用,其中在给药期间,将所述疫苗给药至所述受试者 4-10 次。

14. 根据权利要求 13 所述的应用,其中在给药期间,将所述疫苗每隔两周给药至所述受试者。

15. 根据权利要求 14 所述的应用,其中在所述的给药期间,所述 TAI 为每周两次给药。

16. 根据权利要求 15 所述的应用,其中所述给药期间为六个月。

17. 根据权利要求 7 所述的应用,其中所述药物组合还包含一种或多种药学上可接受的载体。

作为癌症疫苗佐剂的 α 胸腺肽

[0001] 交叉参考相关申请

[0002] 本申请要求 2004 年 12 月 6 日申请的系列号 No. 60/633, 175 的美国临时申请的利益。

发明领域

[0003] 本发明涉及癌症治疗领域。

[0004] 发明背景

[0005] 在全世界,癌症是死亡的主要原因。癌症治疗的非特异性方法如外科手术、化学疗法和放射疗法已经在选择性群体的受试者中取得了成功。免疫疗法构成了用于癌症治疗的新领域。一般原则是给接受治疗的受试者提供能增加抗肿瘤细胞的免疫学活性的能力。在最近几年,出现了许多策略,目前其正在研究中。这些策略包括:异源淋巴细胞 (allogenic lymphocytes) 的递送、免疫反应性细胞的瘤内植入、能产生肿瘤特异性免疫应答的全身性疫苗接种等。在该领域还存在用于改进抗癌治疗和组合物的需要。

[0006] 发明简述

[0007] 根据本发明,用于增加受试者体内癌症疫苗功效的药物组合和方法,利用了免疫应答触发癌症疫苗和疫苗功效增加量的 α 胸腺肽,所述疫苗能引发受试者体内免疫系统应答,所述 α 胸腺肽增强了所述受试者的所述免疫系统应答;其中所述癌症疫苗和所述 α 胸腺肽可以分别给药或一起给药。优选实施方案的说明

[0008] 本发明涉及受试者肿瘤和癌症的治疗,所述受试者优选哺乳动物受试者,最优选人类受试者。晚期癌症对通常的癌症治疗方法有抗性。某些癌症疫苗在减少或终止疾病进程和增加存活率方面已显示出某些活性,其中所述的减少或终止疾病进程与肿瘤应答有关或无关。给药 α 胸腺肽例如胸腺法新 (胸腺素 α -1) 对癌症患者的疫苗治疗具有积极的佐剂效果,对于包括不对单独的癌症疫苗 (例如树突细胞免疫) 产生应答的晚期癌症患者可同时减小肿瘤大小和增加存活率。

[0009] 本发明涉及癌症和肿瘤的治疗。在一个实施方案中,本发明涉及 α 胸腺肽例如免疫调节剂物质胸腺法新在治疗患有肿瘤性疾病的患者的免疫刺激活性,所述肿瘤性疾病例如癌症,包括但不限于接受肿瘤疫苗治疗的乳腺癌等。这些包括在用癌症疫苗治疗的患者由于加入 α 胸腺肽引起的治疗反应得改进,所述癌症疫苗如树突细胞疫苗,但不仅限于这种癌症疫苗。本发明用乳腺癌的治疗来举例说明。然而,可使用本发明治疗的癌症可包括,但不限于原发性黑素瘤、转移性黑素瘤,腺癌、鳞状细胞癌、鳞腺细胞癌 (adenosquamous cell carcinoma)、胸腺瘤、淋巴瘤、肉瘤、肺癌、肝癌、非霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkins lymphoma)、霍奇金淋巴瘤 (Hodgkins lymphoma)、白血病、子宫癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌、结肠癌、多发性骨髓瘤、成神经细胞瘤、NPC、膀胱癌、子宫颈癌、肾癌、脑癌、骨癌、子宫癌、胃癌、直肠癌等。

[0010] α 胸腺肽包含胸腺素 α 1 (TAI) 肽,该胸腺素 α 1 包括天然存在的 TAI、合成的 TAI、重组 TAI 和具有基本上类似于 TAI 的生物活性的它们的生物学活性类似物,所述重组

体 TAI 具有天然存在的 TAI 的氨基酸序列、基本上与其类似的氨基酸序列或它们缩短形式的序列,所述生物学活性类似物具有取代的、缺失的、延长的、替换的或其它的修饰序列,例如与 TAI 具有充分的氨基酸同源性,以致它们以基本上与如 TAI 基本上相同的活动方式起作用的 TAI 衍生肽。 α 胸腺肽的适宜剂量可以为约 0.001-10mg/kg/ 天。

[0011] 术语“胸腺素 α 1”和“TAI”指具有在美国专利号 4,079,137 中公开的氨基酸序列的肽,将其公开的内容以引用方式并入本文。

[0012] α 胸腺肽的有效量为癌症疫苗增强量,其可以是相当于约 0.1-20mgTAI,优选 0.5-10mg TAI 的剂量单位。更优选地,剂量单位包括约 1-4mg 的 TAI。最优选地,剂量单位包括约 1.6-3.2mg 的 TAI。

[0013] 胸腺素 α 1(TAI),起初是从胸腺素成分 5(TF5) 中分离的,已经进行了测序和化学合成。TAI 为具有分子量为 3108 的 28 个氨基酸肽。

[0014] 根据本发明优选的实施方案使用的癌症疫苗为树突细胞疫苗。

[0015] 根据本发明,癌症疫苗可以按任意有效剂量给药。这样的剂量可落于约 1×10^{-9} g 至 1×10^{-3} g 范围内。在其它实施方案中,适宜有效的癌症疫苗剂量可以为约 1×10^{-8} g 至约 1×10^{-4} g。所述癌症疫苗可以以任意有效剂量数 (effective number of doses) 给药受试者,例如 1-20 或更多个剂量。优选地,癌症疫苗可以以多剂量给药,例如约 2 至约 15 个剂量,更优选约 4-10 个剂量,最优选约 6 个剂量。在特别优选的实施方案,在给药期间,以每三周给药约一次的频率将疫苗给药至受试者的健康淋巴结。

[0016] 在优选的实施方案,给予受试者免疫应答触发癌症疫苗并给予受试者 α 胸腺肽,其中疫苗和 α 胸腺肽可分别给药或一起给药。在一个实施方案中, α 胸腺肽与疫苗基本上同时给药,至少在给予疫苗期间给药。在优选的实施方案,疫苗和 α 胸腺肽为注射给药。优选地,疫苗和 α 胸腺肽两者被给药至受试者多次。在优选的实施方案,在给药期间, α 胸腺肽为每周两次给药。特别优选地是,给药期间持续约六个月。在一个实施方案中,本发明适于治疗对只进行癌症疫苗治疗没有应答的受试者的癌症。

[0017] 在特别优选的实施方案, α 胸腺肽以约 1-4mg (例如约 1.6-3.2mg) 的药物剂量单位皮下注射给药,每周两次,且与癌症疫苗的给药相联合。然而,应当理解包含 α 胸腺肽和 / 或癌症疫苗的药物剂量单位可以按用于通过任意适宜的途径给药的任意适宜的方式配制。

[0018] 根据本发明实施方案的一个方面,包含 α 胸腺肽的剂量单位是基于常规给予受试者。例如,剂量单位可以每日一次以上、每日一次、每周一次、每月一次等给药。剂量单位可以是以两次 - 每周为基础给药,即每周两次,例如每三天一次。 α 胸腺肽的剂量单位也可以以三次每周,即每周三次为基础给药,。

[0019] α 胸腺肽和疫苗的给药可通过任意适宜的方法进行,例如注射、输注或口服。在特别优选的实施方案,给药为通过注射。

[0020] 当疫苗和胸腺肽同时给药时,它们可以以包括疫苗和 α 胸腺肽的单一组合物的方式提供。

[0021] 包括疫苗和 / 或 α 胸腺肽的组合物也可以包括一种或多种可药理学上可接受的载体和任选的其它治疗成分。适于注射或输注的制剂包括水性和非水性无菌注射液和水性和非水性无菌混悬剂,所述无菌注射液可任选地包含抗氧剂、缓冲剂、抑菌剂和能使制剂与目

的接收者的血液等压的溶质,所述无菌混悬剂可包括悬浮剂和增稠剂。所述制剂可存在于单位剂量或多剂量容器中,例如密封的安瓿和小瓶,并且可以保存在冻结干燥的(冻干)条件,在立即使用前仅需要加入无菌液体载体,例如注射用水。

[0022] 晚期癌症对通常的癌症治疗法有抗性。某些癌症疫苗显示出降低或终止疾病进程和增加存活率的活性。给药 α 胸腺肽例如胸腺法新(胸腺素 $\alpha-1$) 对疫苗治疗具有积极作用,既减小肿瘤大小和又增加存活率,所述疫苗治疗包括在对单独的癌症疫苗(例如树突细胞免疫)没有应答的晚期癌症患者中这一情形。

[0023] 有三个系统负责保持人体的内环境稳定:免疫系统、内分泌系统和神经系统。免疫系统负责促进细胞和组织修复和分化,以及通过保持它们的内环境和外环境来保持它们的同一性。因此,免疫系统的两个主要功能为调节功能和效应物功能。这两个功能都是在针对有机体需要的动态应答中通过的相同细胞群来进行的。

[0024] 免疫系统在癌症治疗中起积极作用,可预防器官功能障碍和赘生物的出现。从治疗学观点来看,癌症中的免疫疗法指实质上通过各种试剂例如疫苗、T 细胞输注或细胞因子来刺激免疫系统。这些试剂可以通过几种作用机理起作用:

[0025] 1) 通过刺激抗肿瘤应答;2) 通过降低抑制剂的机理;

[0026] 3) 通过改变肿瘤细胞以增加它们的免疫原性,和使它们对免疫防御更敏感;

[0027] 4) 通过改善细胞毒类药物或放射疗法的耐受性。

[0028] 癌症是由各种存在于编码涉及细胞生长的蛋白质的基因中的遗传缺陷引起的。免疫系统的组件,抗体和 T 细胞对于识别或应答有缺陷的基因无效,但是它们可识别引起癌症的基因编码的异常蛋白质和对其应答。免疫系统可通过 B 和 T 淋巴细胞攻击癌症。

[0029] 抗体是通过 B 细胞应答外源物质而生成的蛋白质。每种抗体结合特定的抗原。抗体的主要保护效应通过增强“补体”系统的效果来进行,所述“补体”系统是约 20 个不同蛋白质的集合。当抗体结合抗原时,抗体上特定的活性部位被活化。该部位结合补体系统的分子和引起级联反应。调理作用和吞噬作用都在更重要的补体效果之中。它们通过嗜中性粒细胞和巨噬细胞强有力地活化吞噬作用。这类抗体介导的效应被称为抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(ADCC)。ADCC 具有催化 T 细胞活性的优点,就像消化的外源细胞蛋白质作为肽而存在于抗原递呈细胞(APC)主要组织相容性复合体(MHC)分子上。抗体也显示出可通过阻断生长机制来杀死细胞,特别是在癌细胞中。

[0030] 细胞毒性 T 细胞(CD8+) - 细胞对 I 类 MHC 分子有特异性,并且对在细胞表面上表达的肽抗原反应(当肽抗原作为蛋白质或肽片段在 MHC 内呈现时)。肽和 MHC 一起活化 T 细胞。这些 T 细胞通过用酶穿孔其膜或触发细胞凋亡或自我毁灭途径来破坏这些侵入的细胞,从而破坏载体细胞。

[0031] 辅助 T 细胞(CD4+) 为免疫系统活性的调节剂。CD4+T 细胞也识别 II 类 MHC。CD4+T 细胞通过分泌细胞因子(如白细胞介素-2(IL2))来促进免疫应答,所述细胞因子刺激细胞毒性 T 细胞应答(T-辅助细胞 1)或者抗体反应(T-辅助细胞 2)。这些细胞因子刺激 B 细胞生成抗体,或促进 CD8+T 细胞的生成。CD4+T 细胞形成一系列称为细胞因子的蛋白质介质,其作用于免疫系统的其它细胞,促进了整个免疫系统应答的作用。

[0032] 癌细胞(瘤细胞)的遗传改变引起出现了与非改变的成熟细胞不同的分子。这些不同的分子,称为肿瘤抗原或肿瘤相关抗原;为效应器反应的靶点。

[0033] 同时,瘤细胞生成能诱导其自身 DNA 复制和其自身分化进程的细胞因子,例如干扰素 β ,其通过病毒感染的细胞分泌,可终止邻近细胞上的病毒复制。

[0034] 其它的细胞因子,例如 IL6 和转化生长因子 β (TGF β),不能成功地寻找到遗传损害的修复;尽管它们诱导细胞分化,但是它们抑制 Th1 效应物免疫系统的作用。

[0035] 引起细胞转化过程的毒性效应可损害免疫防护能力(免疫监视),诱导基因突变和免疫抑制。而且,新的瘤细胞,尝试修复其改变了的 DNA 未成功,促进了 TGF β 和 / 或诱导对其免疫耐受的相关细胞因子的生成,所以,遗传学改变的细胞产生肿瘤。

[0036] 最近的调查研究表明肿瘤为免疫原性的,它们产生长期的免疫记忆是有可能的。另一个要点为改变癌症患者长期存活的肿瘤复发。某些患者最初可对这样的常规治疗如化学疗法、外科手术或放射产生应答,但是肿瘤可复发。已知在长期跟踪调查中,经过肾移植的患者估计比一般人群总体上具有 3 至 5 倍高的癌症发病率,其可能是部分由于它们长期的免疫抑制。

[0037] 抗原为可被免疫系统的细胞识别和破坏的外源物质。当细胞变成癌性时,它们生成新的、非亲代的抗原。免疫系统可识别这些抗原是外源的,并包封或甚至破坏所述癌细胞。病毒蛋白质-乙型肝炎病毒(HBV),爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)和人乳头状瘤病毒(HPV)-分别在肝细胞癌、淋巴瘤和子宫颈癌的发展中是重要的。致癌蛋白质、糖基化的蛋白质和糖类为肿瘤抗原。这些蛋白质中的很多蛋白质在多种肿瘤类型中均出现,已经定义了 500 多种肿瘤抗原。

[0038] 在患有癌症的患者的身体的免疫应答似乎不会足够坚固。癌表达的蛋白质可以导致免疫应答。

[0039] 疫苗接种

[0040] 对于为什么会存在无效的免疫应答,有许多原因。细胞因子环境不允许 CD4+T 细胞扩增。当肿瘤生长时,它们可以由以下机制分泌免疫抑制因子:通过直接调节免疫应答,例如结合免疫受体分子和预防它们暴露于受病毒感染的细胞的表面上的病毒蛋白质;或者,通过来自肿瘤自身的分泌因子,其下调了免疫系统活化。

[0041] 免疫耐受性为肿瘤免疫逃逸的主要机理。免疫治疗策略的设计可有效的根除癌细胞。癌细胞主要通过以下方式使"自身"更具有免疫原性:使用免疫系统激活剂、提供抗原递呈细胞或实际地将这些肿瘤抗原蛋白质的一些预先消化成免疫原性的肽。

[0042] 临床上有用的肿瘤疫苗必须对多种蛋白质免疫,靶向参与恶性转化的重要蛋白质。以这种方式,使用称为免疫调节剂的药物或物质可以增强或改善固有的免疫应答,改善了疫苗接种作用的组织学和临床效果。成功的免疫疗法应当致力于处理免疫系统调节的活性,以破坏癌细胞和防止其复发。

[0043] 在一个优选的实施方案中,本发明致力于上述两种免疫活性。活的和修饰的自体肿瘤细胞可用于增加自体固有的树突细胞(DC)。在特定的组织培养物中使这两种类型的细胞的共培养物生长发育,以将初级 DC(**naïve** DC) 分化为效应物反应诱导物 DC。将这些 DC 注入健康的淋巴结,以引发 T 细胞对患者肿瘤细胞的效应物反应。

[0044] 该方法是安全的,对患者产生最小的毒性,以及对晚期和熟知的肿瘤产生重要的和持续的抗癌活性。

[0045] 下述首先描述了参与免疫监视的肿瘤抗原和细胞以及对应的肿瘤逃逸形式。

[0046] 接着描述了目前使用的主要免疫疗法策略。然后描述了本发明的治疗方法、其原理、可能的作用机理和与其它方法相比的优点。

[0047] 肿瘤抗原 (TA) :相关的肿瘤抗原可以被分成两个主要类别。第一个种类包括那些仅在肿瘤细胞中发现的特异性肿瘤抗原 (STA),其代表免疫攻击的理想靶点。第二个种类包括肿瘤相关抗原 (TAA),其发现于肿瘤细胞以及某些正常细胞中,其中它们的分子的定量和定性表达使它们可用于区分肿瘤细胞与正常细胞。肿瘤免疫疗法的目的是通过控制和增强对 STA 和 TAA 的免疫应答来有效地治疗癌症。在恶性黑色素瘤和肾细胞癌的某些情况下观察到的自发性缓解为实现这一目的的证据。

[0048] 肿瘤特异性抗原 (TSA) :这些抗原仅仅在瘤细胞内检测到。这些抗原已经在来自实验动物的肿瘤中和在来自人类病毒源的蛋白质、突变的致癌基因和与恶性表型有关的蛋白质中识别出,自发突变可能是由基因组不稳定性引起,其为恶性细胞的特征。

[0049] 用于通过主要组织相容性复合体 (MHC) 将抗原递呈至 T 细胞的途径的阐明不仅解释了改变的细胞膜蛋白质可被作为抗原检测,而且解释了内部或内在化的蛋白质可变成特异性肿瘤抗原。T 细胞识别小的肽,所述肽衍生自胞质蛋白质的细胞降解,并且插入到 MHC 分子的肽槽中。随后,这些肽与 MHC 分子一起转运至细胞表面。因此,任何异常细胞的蛋白质都为可能的免疫药剂,而不只是在膜中检测到的那些蛋白质。然后,在肿瘤细胞中由突变的等位基因 (如在 p53 中) 产生的非功能性蛋白质可潜在地是特异性肿瘤抗原。肿瘤相关抗原 (TAA) :TAA 为可由某些正常细胞在特定的分化阶段中表达的肿瘤细胞分子。其在相关的其它细胞系或分化标记物中定量表达或联合表达或两者的组合可用于鉴别转化细胞。最好的特征化的 TAA 为癌胚抗原,其在胚胎发生期间表达,但在正常的成熟组织中不存在或几乎不可检测到。原型 TAA 为癌胚抗原 (CEA)。α 胎儿球蛋白和 MAGE 蛋白质家族被归入这种抗原中。

[0050] 免疫监视

[0051] 遗传转化细胞表现出的抗原蛋白质在质或量方面与正常细胞中的蛋白质不同 (分别为 STA 和 TAA)。一旦肿瘤已经构成,在固有的和适应的免疫应答中均起作用的细胞和体液组分在破坏转化细胞和肿瘤的应答中起作用。

[0052] 参与免疫监视过程的细胞为:

[0053] 自然杀伤细胞 (NK) :它们识别和破坏 MHC 衍生细胞。这些细胞通过形成进入靶细胞膜的孔来执行它们的功能。这些孔由细胞质膜中的 perforine 分子自组装组成。这些细胞的结构与补体 C9 有几分相关,其排列产生孔,粒酶类型的细胞溶解酶可很容易地穿过该孔。在肿瘤细胞表面上的受体 Fas 和 TNF α 的活化构成了第二种机理。这两种现象都活化细胞凋亡。这些由于不存在 MHC 分子而引起的细胞溶解活性为相当于固有的免疫应答的活性。另一方面,自然杀伤细胞也参与针对抗肿瘤的抗体活性。这些细胞通过它们的 Fc 受体粘着在肿瘤细胞表面上,引起上述的溶解现象 (perforine, Fas 活化, TNF α 攻击)。该活性被认为是对肿瘤的适应性免疫应答的一部分。

[0054] 由于这些功能,自然杀伤细胞成为破坏病毒诱导的肿瘤细胞和开始时的小肿瘤的主要相关的原因,所述自然杀伤细胞在干扰素和白细胞间介素 2 作用下活化。这些白细胞素增强了 NK 细胞的溶解活性。NK 细胞据说是被活化的 (LAK, Leukin Activated Killers)。

[0055] 作为固有的 NK 应答的瘤细胞破坏被甚至觉察不到存在的 MHC I 膜蛋白抑制。然而,

当这是由于针对肿瘤的抗体的溶解活性时,该存在不会抑制 NK 应答。

[0056] 吞噬细胞:具有吞噬活性的细胞,其具有特异性抗肿瘤作用机理,其可用于治疗目的。当被 T 淋巴细胞活化时,这些细胞可以转移进入肿瘤细胞:溶菌酶、超氧自由基、一氧化氮和 TNF,它们通过不同的机理破坏肿瘤细胞,然而,它们最重要的抗肿瘤活性是通过它们的抗原呈递能力实施的,主要是通过它们的 CD4 淋巴细胞的呈递能力。已知肿瘤在其表面不含有 MHC2 分子;因此,它们不能显示出其对辅助细胞的特征性肿瘤抗原。活化的巨噬细胞可进行这些抗原呈递和诱导调控的和效应物 CD4+ 淋巴细胞两者的活化。它们也将抗原呈递给 CD8+ 和 B 细胞。在免疫系统中,关于它们的吞噬细胞和细胞呈递特征方面,最熟练的细胞 (skillful cells) 为树突细胞。一个树突细胞可以接触多达 1000 个初级的 CD4 淋巴细胞,因此,在有机体中,树突细胞被认为是最有效的。由于此,它们已被用于治疗目的。目前,它们被认为是最好的佐剂,因为在人工控制的介质中,它们诱导抗肿瘤的任意免疫系统的刺激作用。树突细胞也是肿瘤细胞抑制性分泌物的靶点。前列腺素、TGF β 和 IL10,肿瘤分泌物对巨噬细胞有副作用,其通过诱导以排异反应为特征的抑制性(和调控性)淋巴群而产生。

[0057] 淋巴细胞:效应物群 CD4 和 CD8 的 T 淋巴细胞在抗癌作用中是最有效的。不幸地,它们的抑制性 T 细胞群的出现和发展能使肿瘤发育和使其转移性地扩散至全身。这些抑制性淋巴细胞已经表现出作为在其细胞膜中具有 CD25 阳性标记物的 CD4 淋巴细胞亚群的特征。T 细胞的效应物应答直接杀死肿瘤细胞,且活化其余的免疫系统组分。针对 CD4 和 CD8 群的抗癌免疫性是抗原特异性的。这些淋巴细胞不仅在患者的外周血液中可检测到,而且在肿瘤浸润细胞中也能检测到。如前所述,CD4 细胞活性在抗肿瘤应答的量和质方面都是最重要的。然而,其作用取决于通过相应特异性细胞进行的抗原呈递,因为肿瘤不表达 MHC II 分子。相反地,细胞毒性 T 细胞可识别 MHC I 中的细胞抗原。然而,在常规条件下以及由于它们不含共刺激分子,肿瘤细胞诱导特异性抗肿瘤的 CD8 细胞的无反应性,正相反,活化的 CD8 淋巴细胞不需要用于肿瘤溶胞的这些共刺激信号。它们使用的溶胞机理类似于 NK 细胞使用的那些:细胞凋亡和在细胞质膜中的孔形成。

[0058] B 细胞:受者对肿瘤免疫产生应答的潜在功能曾经是由于在患者的血清中临时检测到反应性抗癌抗体而提议的。基本的作用机理为通过抗体 (ADCC) 的细胞溶解。补体辅助的抗菌破坏机理似乎在抗癌斗争中起较小的作用。终于,某些实验支持了下述思想:特异性抗体对肿瘤的攻击导致促进免疫应答的抗原消失;从而产生(通过阴性选择)抗该溶解机理的细胞群。然而,很显然,如果抗体引起细胞膜中 MHC I 复合物的消失,细胞会变得对 NK 细胞的破坏敏感。某些单克隆抗体,例如抗致癌基因 HER2-NEU 的蛋白质的赫赛汀 (herceptin) 已经被研究用于其治疗用途和商业销售。该分子在 25% 的卵巢和乳房转移酶的细胞中表达, FDA 已经批准其用于患有这种病症的患者的治疗用途。这些抗体的第二种为 rituximad,其直接抗 CD20 细胞决定子,正是由于这个原因,其被成功地用于治疗 B 淋巴瘤。目前,其它的抗体正在临床上研究中。

[0059] 肿瘤细胞免疫学:肿瘤细胞存在某些分子,其可以是炎性抗癌应答的靶点。然而,尽管可识别这些抗原的淋巴细胞已经从邻近肿瘤的血液中分离出,但是这些不能产生有效的抗赘生物的效应物功能。肿瘤细胞的细胞学特性解释或尝试解释这些现象:肿瘤细胞在它们的表面上没有包含 MHCII 复合物,这就是它们不能递呈它们的 ATP 至 CD4 淋巴细胞和

它们具有较差 MHC I 复合物表达的原因。

[0060] 这些性质产生对 NK 细胞活性的抑制,和在 CD8 细胞中较差的活化应答。该最后的现象由那些在它们的表面上没有存在共刺激分子的大多数肿瘤细胞恶化。该用于共刺激分子的受体的缺乏引起无反应性 CD8 淋巴细胞的发展。

[0061] 肿瘤细胞高度地分泌抗炎物质。这些物质中的某些仍然没有被确定。前列腺素通过阻断巨噬细胞的活化而产生作用。该物质通过同时给药消炎痛或 COX2 抑制剂来抑制。肿瘤细胞也可以产生大量的 TGF β 和 IL10。这些细胞因子为控制细胞分化的分子。由于肿瘤细胞缺乏足够的细胞分化,它们也缺乏能控制这些物质合成产生的负调节信号。存在如下研究:其显示出胰腺瘤、乳腺癌、神经胶质瘤、SCLC 等的转移性潜能与这些细胞因子合成之间的平行。它们的最主要的作用是调节抗原呈递细胞,以使得它们诱导抗肿瘤抗原的特异性的抑制性淋巴细胞出现。

[0062] 免疫系统和肿瘤之间的动力学关系:用于混合培养肿瘤和肿瘤细胞的技术已经使对与黑素瘤肽反应的细胞毒性 T 细胞的抗原组合物进行了详细的研究。这些已经被克隆,并通过氨基酸序列用于表征特异性肿瘤抗原。在这些研究中,有三个重要的发现。第一个:黑素瘤具有可被细胞毒性 T 细胞识别的至少五个不同的抗原。第二个发现是细胞毒性 T 淋巴细胞与黑色素瘤抗原反应的事实不会在体内扩展。这表明以前提及的抗原当在体内时不是免疫原性的。第三个发现为在体外和也可能在体内这些抗原表达的阴性选择的可能性是由于存在特异性细胞毒性 T 细胞。这些发现提供了肿瘤免疫疗法的希望。同时,所述发现显示出这些抗原在自然形式中不是高免疫原性的,它们对有关体内选择肿瘤细胞的可能性给出了警告,其不能通过细胞毒性 T 细胞识别和清除。

[0063] 为了能够生长,肿瘤必须产生一系列动力学逃逸机制 (escapemechanisms)。如果面临任何抗癌策略,肿瘤通过形成新的逃逸形式的自体适应来应答。

[0064] 异常分子的检测通过特异性抗体的出现产生初级的体液免疫应答,其随后被 ADCC 破坏。NK 和多形核细胞积极参与这些现象。这诱导了相关表面抗原低表达或者甚至不存在的表达的那些细胞群中的选择性。同时,被破坏的细胞的吞噬作用诱导针对那些细胞内抗原的延迟的细胞免疫应答,所述抗原可存在于 class I 类 MHC 分子中。对如下细胞进行了新的选择:承载不同的抗原的细胞和/或没有共刺激分子的细胞。最后,具有较高无分化水平的细胞的选择与抑制因子的增加直接相关,所述抑制因子例如由肿瘤产生的白细胞介素 10 和 TGF β 。这些物质诱导树突细胞,因此,它们成为特异性的抑制性细胞的启动因子。这些现象使肿瘤的耐受性得到了提高,其具有以绝对自由 (absolute freedom) 的方式生长和扩散的可能性。那些基于免疫系统处理的治疗方法,忽视了细胞群这些动力学,该方法会失败,这是因为使用特异性技术的单一作用方法会引起以前提到的选择现象和随后很长时间的失败结果。不考虑方法的功效和能量,应答单一免疫疗法作用的肿瘤的百分比为小于 20%。因此,为了在适当的时间引出预期效果,必须使用包括所描述的动力学方法的组合。

[0065] 免疫疗法

[0066] 尽管宿主的免疫系统通常不足以控制肿瘤生长,但是为了有利于肿瘤根除,存在几种可能的免疫系统的处理和改善的迹象。其中一些为:在大部分肿瘤细胞中存在可识别的肿瘤抗原,可检测到宿主应答,尽管这些应答是无效用的;和更好地理解肿瘤细胞拒绝免疫应答的机理。最新的技术突破产生了用于肿瘤抗原免疫疗法的新的可能性。在这些中,

我们发现：用于淋巴细胞亚群的分离、肿瘤抗原的鉴定和纯化、抗原选择 T 细胞的研究、细胞因子引起的免疫应答的增强、和靶向于肿瘤抗原表面的抗体生成的技术。

[0067] 抗肿瘤抗原的单克隆抗体 (MAB)，单独使用或结合毒素使用，可控制肿瘤生长。

[0068] 单克隆抗体的出现暗示了靶向和破坏肿瘤的可能性。合适的同型的特异性肿瘤抗体可通过 NK 细胞指导肿瘤细胞溶胞，和通过它们的 Fc 受体活化 NK 细胞。为了做到这一点，应当发现一种特异性肿瘤抗原，其为细胞膜的一种分子。此后，将小鼠用选择性抗原进行免疫。然后，将小鼠的脾切除，分离其组织，获得淋巴细胞细胞混悬液。然后，将淋巴细胞与来自骨髓瘤的细胞融合，所述骨髓瘤产生 IgG。获得的杂交细胞混悬液称为杂交瘤。通过在 96 孔培养皿上将其稀释来培养。以使融合细胞的一些进入各室中的方式层铺它们。然后，使它们生长，分析各室中的上层清液，以测定其中细胞克隆产生的抗体。然后，扩展分泌 IgG 的克隆，分析产生的抗体，以测定其识别相同的细胞类型但来自不同患者的不同肿瘤的特异性和功效。此后，扩展所选择的克隆。将要使用的抗体从这些克隆的上层清液中提取。如果，通过利用分子工程，抗体的 Fc 部分被来自人类来源的类似物替换；该分子的抗原性将降低。这些被称为“人源化的”抗体。

[0069] 最近，FDA 已经批准利用人源化的单克隆抗体用于治疗乳腺癌，该抗体被称为 herceptin。该抗体与生长因子 HER-2/neu 的受体反应。该受体在患有乳腺癌的几乎四分之一的患者中过表达。这一过表达与通过 T 细胞对 HER-2/neu 诱导的抗癌应答有关，尽管 HER-2/neu 与较差的预后有关。herceptin 被认为通过阻断受体和其天然的配位体之间的相互作用而起作用，因此，减少了受体的表达水平。当与常规化学疗法组合时，该抗体的效果可增加。

[0070] 存在第二种 FDA 批准的抗体，称为美罗华 (Rituximab)，其通过识别 CD20 起作用。其用于治疗 B 细胞非霍奇金淋巴瘤。CD20 的联合和聚合发出诱导淋巴细胞细胞凋亡的信号。

[0071] 结合发射放射性同位素的单克隆抗体通常能使肿瘤显影，以便于检测肿瘤扩散和提供诊断。

[0072] 在第一个报告的用单克隆抗体成功治疗的肿瘤中，抗个体基因型抗体被用于靶向那些免疫球蛋白表达相应个体基因型的 B 细胞。治疗的第一部分通常导致缓解；但是肿瘤会以突变体的形式再现，且其不会与在初步治疗中使用的抗体结合。该事件代表遗传不稳定性明确的实例，其使肿瘤逃避了治疗。

[0073] 肿瘤特异性或肿瘤选择性单克隆抗体的治疗用途中存在的问题为在单克隆抗体联合后细胞的杀死效率低和在肿瘤肿块中抗体的穿透效率低。第一个问题通常可以通过将毒素结合至抗体而得以避免。该过程产生称为免疫毒素的试剂。用于该过程的优选指出的两种毒素为蓖麻蛋白链 A 和假单胞菌属毒素。这两种方法需要抗体内在化，以使得在胞吞的室中从抗体分子中分离毒素分子；如此能使毒素链穿透和随后杀死所述细胞。

[0074] 使用结合单克隆抗体的两种其它的测定意味着抗体分子和化学疗法药物，例如阿霉素的联合或该分子和放射性同位素的联合。

[0075] 在第一种情况下，针对来自肿瘤细胞表面抗原的特异性单克隆抗体在其位点浓集药物。在内在化后，药物在内涵体中释放，并且行使其细胞抑制或细胞毒素功效。结合放射性同位素的单克隆抗体将放射性浓集于肿瘤位点。如它们杀死邻近的肿瘤细胞一样，这两

种方法都是有益的,因为一旦释放药物或放射性发射被释放,它们可感染接近那些结合抗体的细胞。

[0076] CEA,癌胚抗原,为单克隆抗体的肿瘤抗原靶点的一个实例。复发性结肠直肠癌可以通过抗 CEA 的放射性标记的单克隆抗体来检测。目前,这一方法为用于诊断和治疗该赘生物的试验阶段。

[0077] 树突细胞

[0078] DC 已被证明是“母性 (Mother Nature) 的”抗原呈递细胞,所述抗原呈递细胞天然地起处理和递送外源抗原和“危险”信号至淋巴结,并产生保护性免疫应答。当 DC 为活化的和“成熟的”时,它们似乎用于处理 T 细胞刺激更有效。DC 通常存在于皮肤及其它脏器中,其中它们将遭遇病原体及其它抗原;和在早期试验中,将它们用抗原刺激后,皮内注射它们已经显示出诱导黑素瘤和结肠直肠癌退化。

[0079] DC 来自骨髓。IL3、SCF、Flt3L、TNF 和 GM-CSF 影响其早期分化。最后的细胞因子促进前分化形式的增殖,且有利于这些细胞释放至血流中。尽管如此,DC 为已知产生天然 T 细胞免疫应答的最有效的载体,并且可用于处理和递送癌症抗原特异性疫苗。

[0080] 基于负载肿瘤抗原的树突细胞 (DC) 的治疗性癌症疫苗有特别的益处,因为 DC 免疫中起中枢性作用。DC 可在全身发现,特别在可以为有传染性的生物体侵入门户的区域中。大量动物模型的研究已显示出负载肿瘤抗原的 DC 可保护其免受肿瘤攻击,并且 DC- 基免疫可减慢以前植入的肿瘤的发展。例如,用负载源自 B16 黑素瘤细胞系抗原的树突细胞赋予免疫性的小鼠可预防植入的肿瘤的发展。

[0081] 为了模拟 DC 生理性迁移至局部的淋巴结,通过不同给药途经使用 DC: 静脉内 (IV)、皮下 (SC)、皮内注射、节内、淋巴管内和瘤内给药。细胞因子与 DC 一起给药可促进免疫法诱导的免疫应答。在本发明中,用作免疫刺激剂的胸腺素新改善了非应答患者中对 DC 疫苗接种的临床应答。

[0082] 通常,大多数 DC 疫苗 - 基研究遵循这些类似的方案。患者经受白细胞除去法以产生 DC。通常,将这些新鲜的 DC 的一部分用于第一次免疫,而其余的冷藏保存用于后来的用途。DC 为用抗原负载的,并且有益处的负载策略应在免疫前进行,尽管在某些研究中,负载是在低温贮藏前进行的,以使 DC 疫苗随时可在解冻后使用。用于免疫的理想间隔或持续时间为未知的,但是通常它们为每 1 至 3 周一次给予。负载无关的抗原的 DC 被包括在内,作为用于免疫法的阳性和阴性对照。然后,抽取周围血液用于检测免疫应答的诱导;但是为了对最终产品上进行广泛免疫分析,可重复进行白细胞除去法。现在,多种测试都正在用于临床试验。除了测定体内活性,有可能通过测定应答赋予免疫性抗原的细胞因子生成、增殖或 T 细胞的溶细胞活性来表征体外 T 细胞应答。

[0083] 当进行的试验是一般性试验时,DC 疫苗是良好耐受性的,具有较小的毒性。存在用其它可能的肿瘤学疫苗(细胞疫苗、黑素瘤疫苗、单独的 allogeneic 细胞疫苗或与其与 BCG 的组合、牛痘肿瘤溶解剂、无细胞的上清液疫苗、遗传的疫苗接种、病毒载体疫苗)进行的试验。

[0084] 已经进行了用于增加肿瘤学疫苗接种的免疫原性的许多尝试:它们包括:钥孔虫戚血兰素 (KLH):为一种由加利福尼亚和墨西哥海岸发现的有壳海洋生物产生的蛋白质,所述海洋生物被称为锁眼青贝。KLH 为一类引起免疫应答和作为癌细胞抗原的载体起作用

的大蛋白。癌症抗原通常为相对小的蛋白质,其可能对免疫系统来说是看不见的。KLH 提供了用于被称为 T- 辅助细胞的免疫细胞的另外识别位点,并且其可促进被称为细胞毒素性 T- 淋巴细胞 (CTLs) 的其它免疫细胞的活化。

[0085] 卡介苗 (BCG): 为一种肺结核细菌的灭活形式,通常被用于预防接种抗 TB。BCG 被加入到某些癌症疫苗中,希望其能提高对疫苗抗原的免疫应答。不能透彻地理解的是为什么 BCG 对于引出免疫应答可能特别有效。然而,BCG 已经与其它疫苗使用了多年,所述其它疫苗包括用于肺结核的疫苗。

[0086] 白细胞介素 -2 (IL-2): 为一种由身体的免疫系统产生的蛋白质,其可提高被称为自然杀伤细胞的某些特异性免疫系统细胞的杀死癌症的能力。尽管其可以活化免疫系统,许多研究人员相信单独的 IL-2 将不足以预防癌症复发。某些癌症疫苗使用 IL-2 来提高对特异性癌症抗原的免疫应答。单核粒性白细胞 - 集落刺激因子 (GM-CSF): 为一种刺激抗原呈递细胞增殖的蛋白质。

[0087] QS21: 为一种植物提取液,当将其加入到某些疫苗中时,其可改善免疫应答。

[0088] 这些意味着促进了对癌症疫苗的生物反应。曾经没有人描述广谱的免疫刺激剂药物胸腺素 α 1 (胸腺法新) 作为免疫刺激剂与癌症疫苗联合使用。我们发现该药剂可改善或促进对树突疫苗接种 (肿瘤学疫苗) 的生物反应。我们在乳腺癌患者中使用该免疫刺激剂药物,取得良好的应答,所述患者对树突细胞疫苗不存在上述应答。

[0089] 胸腺法新 α 1 或 T α 1, 为一种以其免疫调节作用和在某些疾病中相关治疗潜力而使用的肽,所述疾病包括慢性肝炎 B 和 C、爱滋病 (AIDS)、原发性免疫缺陷疾病、对疫苗接种的应答降低和癌症。在这些病症中其功效的基础主要是通过调节免疫应答性。该药物已显示出对许多免疫系统参数具有有益效果和促进了 T 细胞分化和成熟。

[0090] 胸腺法新 α 1 最初是作为天然物质从胸腺组织中分离的。其为 28 个氨基酸的纯的、合成性氨基末端酰化的肽 (分子量 3108)。现在,TAI 为通过固相肽合成而制备的。

[0091] 内源性胸腺法新可在血清中发现,其中在健康成年人中通过免疫测定测量的水平为 0.1 至 1 ng/mL。循环性胸腺法新的来源和释放和调节机理都是未知的。有可能胸腺法新具有细胞内受体,因为在有机溶剂中,它可以折成结构化螺旋,因而,可穿过独立的膜。

[0092] 胸腺法新刺激干细胞产生成熟 T 细胞的量增加。给培养物中的人 CD34 干细胞中加入胸腺法新可促进胸腺生成素,导致总的 CD3T 细胞数量和白细胞间介素 -7 (IL-7) 的合成,IL-7 对胸腺细胞的成熟很关键。增加的占优势的亚群为辅助 T 细胞 (CD4)。

[0093] 在患有慢性肝炎 B24 和癌症的患者中,CD3、CD4 和 CD8 细胞的生成增加。在多种动物模型、普通的人类受试者和 HIV- 感染患者中,NK- 细胞活性增强。

[0094] 胸腺法新可增加 IFN γ 、IL-2、IL-3 的生成,和增加 IL-2 受体被有丝分裂原或抗原活化后的表达。T 细胞因子,即 IFN γ 和 IL-2 生成增加的模式证实胸腺法新促进了 Th1 型的免疫应答,和诱导 IL-2 生成的显著增加以及减少了 Th2 细胞因子 IL-4 和 IL-10。

[0095] 在体外的胸腺细胞中,胸腺法新以剂量相关性方式抗地塞米松诱导的细胞凋亡。功效主要体现在 CD4CD8 双阳性不成熟的 T 细胞中。受到来自患肿瘤小鼠的血清刺激的胸腺细胞的细胞凋亡也通过用胸腺素处理而减少。

[0096] 胸腺法新已经在人类中被研究作为疫苗增强剂用于治疗有传染性的疾病 (乙型肝炎 B、肝炎 C、获得性免疫缺损综合症),和用于某些癌症,但是没有人使用它作为癌症疫

苗的免疫调节剂。

[0097] 该药物在某些动物癌症模型中已显示出功效,并且已显示出改善了免疫功能。许多癌症受试者具有降低的细胞免疫,并且某些癌症的发展似乎与免疫系统对肿瘤减弱的抑制有关。

[0098] 可解释胸腺法新怎样改善对癌症疫苗的临床应答的准确作用机理不是十分了解。这一作用可能与药物显示出的许多机理有关,和 / 或与其它迄今为止还未知的机理有关。其可能与观察到的对 Th1 和 CI 反应的细胞因子极化有关,其反过来创造环境以诱导 DC 来引发效应器而不是抑制剂的免疫活性。

[0099] 胸腺法新为安全药物,其可能的副作用相当低。

[0100] 如本文描述的,DC-TBH 为一种主动免疫疗法,其包括用自体树突细胞 (DC) 对患者周期性免疫,所述树突细胞与融合活化的自体 B 细胞 (TBH) 的自体肿瘤细胞共培养。

[0101] TBH 被用作肿瘤抗原的来源,DC 被用作抗原递呈细胞。

[0102] 在优选的实施方案中,本发明存在某些特性:其在患有晚期肿瘤疾病的患者中用于获得良好的治疗结果是有利的。尽管如在外科刀片处理的情况下,建议获得大量细胞,但是通过精细穿刺活检获得的肿瘤细胞数量是足够 TBH 加工的。用这种方法,患者可免于经受任意不必要的外科风险。另一方面,如下所述的,转移抗原性似乎在每个不同的器官中不同。因此,优选地是利用非侵入性方法以获得来自患者的基本上每个转移部位的肿瘤细胞。

[0103] B 淋巴细胞为一次活化形成的细胞,由于它们的功效,其为免疫系统中第二种最大功效类的抗原呈递细胞。另一方面,如果 B 细胞培养物被 IL6 刺激,它们可继续生长至少 6 个月。在细胞融合后,该 IL6 的敏感性可被传送至 TBH 群。

[0104] 因此,TBH 可由一些肿瘤细胞产生,并在体外保持和扩展数月,而不损失其潜能和抗原的多样性。

[0105] 一旦将 DC 暴露于该杂合体,它们基本上俘获所有可能存在于自然状态的不同肿瘤细胞群中的肿瘤抗原。这些抗原与一组以活化 B 细胞为特征的共刺激和粘合分子一起存在于 TBH 表面上,这样就赋予它们最大效率的俘获和通过 DC 的加工,即使在低浓度水平。

[0106] 参与治疗的 DC 的治疗作用的功效似乎与获得这些细胞的来源直接相关。

[0107] 根据书目汇编,约 68% 用 DC 处理的患者出现肿瘤块降低超过 50%,所述的 DC 是通过来自幼稚和成熟的动员髓骨获得的;而在用体外通过 CD34+ 或循环单核细胞的分化而产生的 DC 处理的患者情况下的降低低于 20%。

[0108] 在本文中描述的示例性的方法中使用的 DC 为从用低剂量 GMCSF 刺激五天的患者的血沉棕黄层中获得的。这有助于成熟的和未成熟类型和低流 CD34+ 的收集。另一方面,使用 GMCSF 和 TNF 单独培养 3 天且不含有 IL4 的体外培养物使效应物 DC 分化,并预防其它可能出现的细胞形式例如 CD34+、CD14+ 或单核细胞的分化。

[0109] 当被用于免疫的 DC 是通过沉淀或通过使用不包含 CD34+ 和 CD14+ 的抗体混合物阴性选择获得时,发现在免疫应答和患者存活率之间没有显著的统计学差异。

[0110] 示例性的方法

[0111] DC 来自骨髓。IL3、SCF、Fit3L、TNF 和 GMCSF 影响其早期分化。最后的细胞因子促进前分化形式的增殖,且有利于这些细胞释放至血流中。

[0112] 皮下给药 GMCSF 引出 DC 进入血液的重要通道。

[0113] 然后,在通过血浆分离置换法和随后的阴性选择获得的血样中,有可能以治疗学有用的数量分离它们,为了上述目的,使用用于 DC 的 StemSep™ 试剂盒,由 Stem Cell Technology, Vancouver, Canada 提供。我们已使用的 GMCSF 为大肠杆菌中的人重组体,其由 Argentina 的 Cassara Laboratory 制备。我们已选择的剂量为 150 μ g,每日傍晚(在约 7pm)给药,给药五个连续作业日。根据该剂量和给药日程表,功效与获得的 DC 数量高度相关,并且粒细胞低度增加,副作用出现的少。在那时,来自骨髓源递送至血流的 DC 具有:

[0114] (1) 穿过毛细血管壁的能力。它们也具有差的流动性。(2) 极大的吞噬能力,但抗原呈递容量 (antigen presentation capacity) 差。

[0115] (3) 它们不能定义为它们是否诱导效应物或耐受性反应。

[0116] 它们加入组织中,其中它们停留在准备状态 (alert),且通过小环境的细胞因子起作用,以及用于吞噬作用,它们分化为成熟型需要其它特性:

[0117] (1) 它们的膜受体突变,且它们获得从组织迁移至毛细淋巴管和穿过它们的能力。它们获得极大的流动性,但减弱 (loose) 了它们的流过毛细血管壁的能力。

[0118] (2) 它们减弱它们的吞噬能力,但是增加了它们的抗原递呈能力。(3) 它们定义自身为调节剂或效应物免疫反应的诱导物。

[0119] 治疗说明

[0120] 样品是从患者的不同转移性病灶中获得的。通过在实验室中进行血浆分离置换法和之后的净化过程,患者的 B 细胞被纯化,并且通过加入 IL4 和 IL6 体外活化 48 小时。最后,受试者被用活化的 B 细胞杂合体自身或者用与患者的树突细胞培养的 B 细胞杂合体赋予免疫性。将这种免疫应用于免疫健康淋巴结,每三周一次。同时,在免疫期间以及在完成疫苗接种方法后的随后六个月内,在傍晚 (7:00pm 至 9:00 之间),每三天受试者接受 1.6mg 皮下给药胸腺法新。这一疫苗接种计划可,包括例如 4 至 10 倍剂量,尽管这些数量不是唯一的。

[0121] B 细胞是通过血液成分 (hemapheresis) 从患者的外周血液的血沉棕黄层中获得的。然后,将来自血浆分离置换法的产物接种在 Ficoll-Hypaque 梯度上。在上间期 (superior interphase) 获得的单核细胞环为 B 细胞的来源,其为通过使用 Vancouver 的 Stem Cell Technology 提供的市售试剂盒进行阴性选择分离的。将 B 细胞培养在不含血清而富含 IL4 和 IL6 的介质中。

[0122] 肿瘤样品是通过外科或穿刺活检获得的。同时存在的细胞学证实提取物在两种情况下都采用。肿瘤样品为用机械方法分离的。将获得的单细胞混悬液培养在不含血清而富含人白蛋白、胰岛素和表皮生长因子的介质中。

[0123] 然后,利用聚乙二醇溶液融合活化的淋巴细胞和分离的肿瘤细胞。TBH 细胞的形成是通过含有抗 CD20 作为 B 细胞标记物和为肿瘤细胞源的抗细胞角蛋白或抗 vimentine 作免疫二重染控制的。然后,将杂合体培养在不含血清而富含胰岛素、表皮生长因子和 IL6 的介质中。

[0124] 自体的 DC 是从动员骨髓的血液成分中提出获得的。动员是通过用 GMCSF 刺激患者 5 天进行的。在第六天,经由血浆分离置换法收集相当于两次血容量处理的血沉棕黄层。

[0125] 不成熟的和分化的 DC 的混合群浓集在患者的血沉棕黄层中。这种浓集和纯化步骤可通过差示粘附法 (differential adhesion technique) 或者通过阴性选择来进行。在

前者中,将单核细胞层压在组织培养烧瓶上,四小时后,轻轻地处置上层清液。然后,将粘附细胞培养在适当的如下所述的组织培养基中。在阴性选择法中,将单核细胞用抗下述物质的 8 种单克隆抗体 (MAB) 的混合物培养:CD3、CD14、CD16、CD19、CD34、CD56、CD66b 和血型糖蛋白 A。每个单克隆抗体结合免疫磁珠。标记的细胞悬液同穿过磁场来纯化。保留标记的细胞,将未标记的细胞收集在无菌管中。获得的未标记的细胞悬液由 50% (40-60%) 不成熟的和成熟的 DC 混悬液组成。

[0126] 在不含血清而富含人白蛋白、GMCSFrh 和 TNFrh 的介质中,将自体富集的 DC 混悬液用自体的 TBH 共培养三天。

[0127] 在 DC 被培养 72 小时后,清洗它们,浓集,并且注射入一名患者的健康淋巴结中,接着进行相应得安全、纯度和效价试验后,。

[0128] 该方法存在某些特性:其在患有晚期肿瘤疾病的患者中对用于获得良好的治疗结果的可能是有利的。

[0129] 尽管如在外科刀片处理的情况下,在获得大量细胞方面具有优势,但是通过精细穿刺活检获得的肿瘤细胞数量是足够 TBH 加工的。转移抗原性似乎在每个不同的器官中是不同的。因此,依靠非侵害性方法从患者的每个转移部位获得肿瘤细胞是非常重要的。

[0130] B 淋巴细胞为一次活化形成的细胞,其为免疫系统中第二种最大功效类的抗原呈递细胞。另一方面,如果用 IL6 刺激 B 细胞培养物,它们仍可生长至少 6 个月。在细胞融合后,该 IL6 敏感性被递送到 TBH 群。

[0131] 因此, TBH 可以由一些肿瘤细胞产生,并在体外保持和扩展数月,而不损失其潜能和抗原的多样性。

[0132] 一旦将 DC 暴露于该杂合体,它们基本上俘获所有可能存在于自然状态的不同肿瘤细胞群中的肿瘤抗原。这些抗原与一组以活化 B 细胞为特征的共刺激和粘合分子一起存在于 TBH 表面上,所述共刺激和粘合分子赋予它们最大效率的通过 DC 俘获和加工,即处于低浓度水平。

[0133] 因为从体外成熟和激活过程的开始, TBH 就存在于 DC 中,这使得在其中 DC 能进行该过程的短期期间内能结合肿瘤抗原。肿瘤抗原被细胞内含后不久, DC 的处理和呈递抗原的能力达到最大的有效程度。它们也显示出从血管迁移至组织的能力。

[0134] 如此,淋巴结内注射似乎比 DC 疫苗的输血法更有效。

[0135] 然而,通过从动员骨髓获得的 DC 导致在单次过程中获得细胞数量低。当利用代表整个肿瘤的抗原或通过来自肿瘤细胞和 DC 的杂合体刺激这些 DC 时,样品可以通过时间分成不同部分,以获得效率,所述抗原例如来自外科片 (surgical piece) 的肿瘤溶解产物。

[0136] 从临床发展的观点来看,仅仅某些患者单独用肿瘤疫苗接种具有自发良好的发展。已知患有抗化疗、放疗和激素疗法的晚期乳腺癌的患者具有低存活率。

[0137] 已经研究了自体的树突细胞疫苗 (DCV) 的方法,其可改善受试者的结果。胸腺法新(ZADAXIN®)已经显示出增加 Th1 应答,其与肿瘤退化有关。下述研究旨在评价树突细胞和胸腺法新是否对晚期乳腺癌患者的结果具有积极效果,所述患者不应答单独的疫苗疗法。

[0138] 本发明通过下述实施例来阐述,其不意味着对其限制。

[0139] 实施例

[0140] 治疗十八名患有抗化疗、放疗和激素疗法的晚期乳腺癌患者。

[0141] 所有的患者为患有 4 类乳腺癌（具有转移）的女性。

[0142] 年龄分级为 39 至 71 岁之间。

[0143] 用树突细胞疫苗处理患者（符合协议：Annals of Oncology2004-Vol15. Supp. 3Abs:iii40-Dendritic Cell Vaccine for Metastases Breast Cancer）。

[0144] 在第二次疫苗接种过程后，测定细胞免疫，如果其为 $\geq 20\text{ULPI}$ (Linfocytic Proliferative Index)，继续进行疫苗接种。

[0145] 如果应答为 $<20\text{ULPI}$ ，将患者分成 5 名和 7 名患者组的两组（随机的）。5 名患者接受树突细胞疫苗加胸腺法新（在 6 个月期间，为 1.6mg/tw ）。其余的 7 名患者，不接受免疫刺激，而接受程序化枝状疫苗接种过程。

[0146] 该免疫疗法方案成功的关键点为患者在第二次 DC 疫苗后具有的早期免疫应答。

[0147] 使用众所周知的称为淋巴细胞增殖测试的体外测试来测定患者免疫应答。简言之，纯化来自患者的单核细胞，并且将其以 10:1 的比例与患者肿瘤细胞的混悬液混合（3000 淋巴单核细胞对 300 肿瘤细胞）。在多孔板中接种混合的细胞悬液，在 37°C 培养。96 小时，通过收集细胞并用自动白血球计数器计数。

[0148] 如果计数的单核细胞数高于 20000 细胞 (Lymphocyte Proliferation Index-LPI of 20U)，则患者具有良好的结果：具有有效的肿瘤应答和长的存活期。相反，如果在混合细胞培养物后，单核细胞没有达到该数量，则患者具有差的应答，存活期为明显比免疫应答患者短些。

[0149] 胸腺法新治疗是一种 Th1 应答的重要免疫增强剂，其涉及肿瘤排斥反应。

[0150] 对于在第二次 DC 免疫后，具有 LPI 低于 20U 的五名年龄在 39 至 71 岁的连续晚期乳腺癌患者，用胸腺法新（6 个月期间， 1.6mg/每周两次 ）加 4 次额外的树突细胞疫苗过程处理。胸腺法新能改善 LPI，大多数治疗的患者显示出有效的肿瘤应答。

[0151] 收集来自于总共 18 名治疗的转移性乳腺癌患者的临床应答和存活率数据，为了进行一个病例的连续统计分析，我们将总人群分成三组。

[0152] 在第一组 ($n = 7$) 中，患者接受 6 次树突细胞免疫（每 3 周一次），在第二次疫苗后，具有淋巴细胞增殖指数 (LPI) $>20\text{U}$ （免疫应答）。

[0153] 在第 2 组 ($n = 6$) 中，患者接受 6 次树突细胞免疫，在第二次疫苗后，具有 $<20\text{U}$ 的 LPI（无免疫应答）。

[0154] 在第 3 组 ($n = 5$) 中，患者接受 6 次树突细胞免疫，在第二次疫苗后，具有 $<20\text{U}$ 的 LPI（无免疫应答），且它们接受胸腺法新（ 1.6mg/每周两次 ）。

[0155] 免疫应答是通过淋巴细胞增殖试验测定的。在 6 个月观察到结果，在第 1 组 100% 的患者（应答组）、在第 2 组 50% 患者（无应答组）和在第 3 组（无应答组，用胸腺法新处理）80% 患者肿瘤减小 $>50\%$ 。

[0156] 在 12 个月内，在第一组中，患者存活率为 57%，在第二组为 0%，在第 3 组为 80%。

[0157] 我们可看到在第二次疫苗接种后，对 DCV 治疗的免疫应答 (LPI $>20\text{U}$) 与肿瘤尺寸减小和患者存活期延长有关。用胸腺法新处理对晚期乳腺癌患者有积极效果，所述患者不应答树突细胞免疫。与没有接受胸腺法新的免疫者应答组和未免疫应答组相比，胸腺法新处理组的患者存活率较高（参见表 1）。

[0158] 表 1 显示了在 6 月内的临床应答和在 12 月内的患者存活率。

[0159] 表 1

[0160]

在 6 月内的临床应答和在 12 月内的患者存活率。			
处 理 应 答方式	n	肿瘤减小 > 50% 的患者	患者存活率
第 1 组 (应答组)	7	100%	57%
第 2 组 (无应答组)	6	50%	0%
第 3 组 (无应答组, 用胸腺法新 处理)	5	80%	80%

[0161] 处理患有转移乳腺癌的 18 名患者的过去观察结果。第一组 (n = 7) 中, 患者接受 6 次树突细胞免疫 (每 3 周一次), 在第二次疫苗后, 具有淋巴细胞增殖指数 (LPI) > 20U (免疫应答)。

[0162] 第 2 组 (n = 6) 中, 患者接受 6 次树突细胞免疫, 在第二次疫苗后, 具有 < 20U 的 LPI (非免疫应答)。

[0163] 第 3 组 (n = 5) 中, 患者接受 6 次树突细胞免疫, 在第二次疫苗后, 具有 < 20U 的 LPI (无免疫应答), 且它们接受胸腺法新 (1.6mg/ 每周两次)。

[0164] 结果: 在 6 个月中, 看到: 在第 1 组 100% 的患者 (应答组)、在第 2 组 50% 患者 (无应答组) 和在第 3 组 (无应答组, 用胸腺法新处理) 80% 患者肿瘤减小 > 50%。在 12 个月内, 患者的存活率在第 1 组为 57%, 在第 2 组为 0%, 在第 3 组为 80%。

[0165] 这些免疫刺激剂药物的应用不仅限于用树突细胞疫苗处理的患有乳腺癌的患者; 反而, 它可以改善患有其它类型癌症的患者中树突细胞疫苗的开发和临床结果。胸腺法新也可以改善其他种类的免疫疫苗的临床结果。