



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109890405 A

(43)申请公布日 2019.06.14

(21)申请号 201780063783.X

(74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司
72003

(22)申请日 2017.08.18

代理人 吴小瑛 付文川

(30)优先权数据

62/377,051 2016.08.19 US

(51)Int.Cl.

A61K 38/19(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 38/20(2006.01)

2019.04.16

A61K 39/395(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

C07K 16/28(2006.01)

PCT/US2017/047477 2017.08.18

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/035395 EN 2018.02.22

(71)申请人 布鲁克林免疫治疗有限公司

地址 美国纽约

(72)发明人 J·W·哈登 N·L·贝琳斯丁

J·E·伊根

权利要求书7页 说明书36页

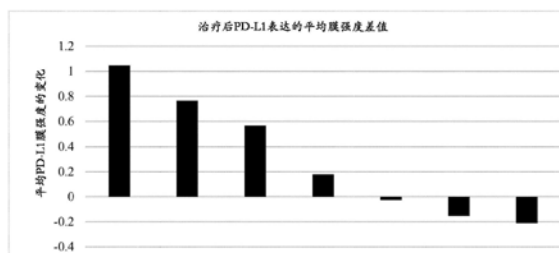
序列表4页 附图3页

(54)发明名称

PD-1/PD-L1抑制剂和/或CTLA-4抑制剂与含
有多种细胞因子组分的生物制剂用于治疗癌症
的用途

(57)摘要

本公开的方面涉及治疗癌症的方法,例如,
通过向患有癌症的受试者给予具有多种细胞因
子组分的原代细胞衍生的生物制剂与程序性细
胞死亡配体1(PD-L1)或程序性细胞死亡1(PD-1)
的拮抗剂和/或与细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4
(CTLA-4)的拮抗剂的组合。本公开的其他方面涉
及鉴定用PD-L1或PD-1的拮抗剂和/或CTLA-4的
拮抗剂治疗的受试者的方法或评估受试者对PD-
L1或PD-1的拮抗剂和/或CTLA-4的拮抗剂有响应
的可能性的方法。



1. 一种治疗受试者中的癌症的方法,该方法包括:
 - a) 向患有癌症的受试者给予有效量的包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ 的原代细胞衍生的生物制剂;和
 - b) 向该受试者给予有效量的程序性细胞死亡配体1 (PD-L1) 或程序性细胞死亡1 (PD-1) 的拮抗剂,其中给予该原代细胞衍生的生物制剂和给予该拮抗剂发生在受试者的不同部位和/或发生在不同时间。
2. 如权利要求1所述的方法,其中至少一次给予该原代细胞衍生的生物制剂发生在至少一次给予该拮抗剂之前。
3. 如权利要求2所述的方法,其中至少一次给予该原代细胞衍生的生物制剂发生在至少一次给予该拮抗剂之前并且至少再一次给予该原代细胞衍生的生物制剂发生在至少一次给予该拮抗剂之后。
4. 如权利要求1所述的方法,其中至少一次给予该拮抗剂发生在至少一次给予该原代细胞衍生的生物制剂之前。
5. 如权利要求4所述的方法,其中至少一次给予该拮抗剂发生在至少一次给予该原代细胞衍生的生物制剂之前并且至少再一次给予该拮抗剂发生在至少一次给予该原代细胞衍生的生物制剂之后。
6. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中经皮下地或经外淋巴给予该原代细胞衍生的生物制剂,并且静脉内或口服给予该拮抗剂。
7. 如权利要求1至6中任一项所述的方法,其中每天给予一次该原代细胞衍生的生物制剂长达10天,并且每两周至四周给予一次该PD-L1或PD-1的拮抗剂。
8. 如权利要求1至7中任一项所述的方法,其中该拮抗剂是反义寡核苷酸、短干扰RNA (siRNA)、小分子、肽、或抗体。
9. 如权利要求8所述的方法,其中该拮抗剂是抗体。
10. 如权利要求9所述的方法,其中该抗体是人抗体或人源化抗体。
11. 如权利要求9或10所述的方法,其中该抗体对PD-L1具有特异性。
12. 如权利要求11述的方法,其中该抗体选自下组,该组由以下组成:阿特殊单抗、度伐单抗、BMS-936559和阿维鲁单抗。
13. 如权利要求8所述的方法,其中该拮抗剂是CA-170。
14. 如权利要求9或10所述的方法,其中该抗体对PD-1具有特异性。
15. 如权利要求14所述的方法,其中该抗体选自下组,该组由以下组成:纳武单抗、皮立珠单抗、派姆单抗、MEDI-0680和REGN2810。
16. 如权利要求8所述的方法,其中该拮抗剂是AMP-224。
17. 如权利要求1至16中任一项所述的方法,其中在给予该原代细胞衍生的生物制剂之前,该受试者难以用该拮抗剂治疗。
18. 如权利要求1至17中任一项所述的方法,其中受试者的肿瘤中的PD-L1水平在给予该原代细胞衍生的生物制剂之后增加。
19. 一种治疗受试者中的癌症的方法,该方法包括:
 - a) 向患有癌症的受试者给予有效量的包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ 的原代细胞衍生的生物制剂;和

b) 向该受试者给予有效量的程序性细胞死亡配体1 (PD-L1) 或程序性细胞死亡1 (PD-1) 的拮抗剂, 其中该拮抗剂选自下组, 该组由以下组成: 纳武单抗、皮立珠单抗、派姆单抗、MEDI-0680、REGN2810、AMP-224、阿特殊单抗、度伐单抗、BMS-936559、阿维鲁单抗和CA-170。

20. 如权利要求1至19中任一项所述的方法, 其中向该受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括IL-1 β 国际单位 (IU) 与IL-2IU比率为0.45至1.37、IFN- γ IU与IL-2IU比率为0.19至0.39、TNF- α IU与IL-2IU比率为0.53至1.26、IL-6IU与IL-2IU比率为1.16至6.06、和IL-8IU与IL-2IU比率为0.15至0.51。

21. 如权利要求1至20中任一项所述的方法, 其中向该受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括各自至少1IU的IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8和TNF- α 。

22. 如权利要求1至21任一项所述的方法, 其中向该受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括22-657国际单位 (IU) 或220-6,700pcg的IL-1 β 、29-478IU或1730-28,100pcg的IL-2、10-185IU或560-10,900pcg的IFN- γ 、29-600IU或580-12,000pcg的TNF- α 、34-2,895IU或260-22,100pcg的IL-6、和5-244IU或4,610-243,600的IL-8。

23. 如权利要求1至22中任一项所述的方法, 其中该原代细胞衍生的生物制剂进一步包含GM-CSF和G-CSF。

24. 如权利要求1至23中任一项所述的方法, 该方法进一步包括向该受试者给予化学抑制剂, 该化学抑制剂选自下组, 该组由以下组成: 烷化剂、抗代谢物、抗生素和免疫调节剂。

25. 如权利要求24所述的方法, 其中该烷化剂是环磷酰胺。

26. 如权利要求1至25中任一项所述的方法, 该方法进一步包括向该受试者给予NSAID, 该NSAID选自下组, 该组由以下组成: 吲哚美辛、布洛芬、塞来昔布、罗非考昔及其组合。

27. 如权利要求26所述的方法, 其中该NSAID是吲哚美辛。

28. 如权利要求1至27中任一项所述的方法, 该方法进一步包括向该受试者给予锌。

29. 如权利要求1至28中任一项所述的方法, 该方法进一步包含给予有效量的细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA-4) 拮抗剂。

30. 如权利要求29所述的方法, 其中该CTLA-4拮抗剂是反义寡核苷酸、短干扰RNA (siRNA)、小分子、肽、或抗体。

31. 如权利要求30所述的方法, 其中该CTLA-4拮抗剂是抗体。

32. 如权利要求31所述的方法, 其中该抗体是人抗体或人源化抗体。

33. 如权利要求32所述的方法, 其中该抗体选自下组, 该组由以下组成: 伊匹单抗和曲美木单抗。

34. 一种选择进行治疗的受试者的方法, 该方法包括:

a) 测定从受试者获得的肿瘤样本中的PD-L1水平, 该受试者患有癌症并且已被给予包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ 的原代细胞衍生的生物制剂; 和

b) 如果肿瘤样本中的PD-L1水平高于PD-L1的阈值水平, 则向该受试者给予有效量的PD-L1或PD-1的拮抗剂。

35. 如权利要求34所述的方法, 其中测定包括进行一种测定法以检测PD-L1的水平。

36. 如权利要求35所述的方法, 其中该测定法选自下组, 该组由以下组成: 原位杂交、RT-qPCR、微阵列分析、多重RNA表达分析、RNA-seq、免疫组织化学测定、流式细胞术、多重蛋白测定和蛋白质印迹测定。

37. 如权利要求34至36中任一项所述的方法,其中肿瘤样本中的PD-L1水平是肿瘤样本中的细胞膜中的PD-L1水平。

38. 如权利要求37所述的方法,其中测定包括进行免疫组织化学测定并且PD-L1的阈值水平是肿瘤样本中的49%活肿瘤细胞的部分或完全细胞膜染色。

39. 如权利要求34至38中任一项所述的方法,该方法进一步包括在测定步骤之前向该受试者给予该原代细胞衍生的生物制剂。

40. 如权利要求34至39中任一项所述的方法,其中该拮抗剂是反义寡核苷酸、短干扰RNA (siRNA)、小分子、肽、或抗体。

41. 如权利要求40所述的方法,其中该拮抗剂是抗体。

42. 如权利要求41所述的方法,其中该抗体是人抗体或人源化抗体。

43. 如权利要求41或42所述的方法,其中该抗体对PD-L1具有特异性。

44. 如权利要求43所述的方法,其中该抗体选自下组,该组由以下组成:阿特殊单抗、度伐单抗、BMS-936559和阿维鲁单抗。

45. 如权利要求40所述的方法,其中该拮抗剂是CA-170。

46. 如权利要求41或42所述的方法,其中该抗体对PD-1具有特异性。

47. 如权利要求46所述的方法,其中该抗体选自下组,该组由以下组成:纳武单抗、皮立珠单抗、派姆单抗、MEDI-0680和REGN2810。

48. 如权利要求40所述的方法,其中该拮抗剂是AMP-224。

49. 如权利要求34至48中任一项所述的方法,其中向该受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括IL-1 β 国际单位 (IU) 与IL-2IU比率为0.45至1.37、IFN- γ IU与IL-2IU比率为0.19至0.39、TNF- α IU与IL-2IU比率为0.53至1.26、IL-6IU与IL-2IU比率为1.16至6.06、和IL-8IU与IL-2IU比率为0.15至0.51。

50. 如权利要求34至49中任一项所述的方法,其中向该受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括各自至少1IU的IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8和TNF- α 。

51. 如权利要求34至50中任一项所述的方法,其中该原代细胞衍生的生物制剂包括22-657国际单位 (IU) 或220-6,700pcg的IL-1 β 、29-478IU或1730-28,100pcg的IL-2、10-185IU或560-10,900pcg的IFN- γ 、29-600IU或580-12,000pcg的TNF- α 、34-2,895IU或260-22,100pcg的IL-6、和5-244IU或4,610-243,600的IL-8。

52. 如权利要求34至51中任一项所述的方法,其中该原代细胞衍生的生物制剂进一步包含GM-CSF和G-CSF。

53. 一种评估受试者对PD-L1或PD-1拮抗剂有响应的可能性的方法,该方法包括:

a) 向患有表达低于PD-L1阈值水平的第一PD-L1水平的癌症的受试者给予包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ 的原代细胞衍生的生物制剂;和

b) 在给予该原代细胞衍生的生物制剂之后测定该受试者的肿瘤样本中的第二PD-L1水平,其中高于PD-L1的阈值水平的第二PD-L1水平指示该受试者将对PD-L1或PD-1的拮抗剂有响应。

54. 如权利要求53所述的方法,其中测定包括进行一种测定法以检测第二PD-L1水平。

55. 如权利要求54所述的方法,其中该测定法选自下组,该组由以下组成:原位杂交、RT-qPCR、微阵列分析、多重RNA表达分析、RNA-seq、免疫组织化学测定、流式细胞术、多重蛋

白测定和蛋白质印迹测定。

56. 如权利要求53至55中任一项所述的方法,其中该第二PD-L1水平是肿瘤样本中的细胞膜中的PD-L1水平。

57. 如权利要求56所述的方法,其中测定包括进行免疫组织化学测定并且PD-L1的阈值水平是肿瘤样本中的至少49%活肿瘤细胞的部分或完全细胞膜染色。

58. 如权利要求1至57中任一项所述的方法,其中该癌症选自下组,该组由以下组成:黑色素瘤、肺癌(例如非小细胞肺癌(NSCLC))、肾细胞癌(RCC)、前列腺癌、卵巢癌、结肠直肠癌(CRC)、肾癌、胃癌、乳腺癌、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、血液恶性肿瘤(例如,急性骨髓性白血病(AML)、多发性骨髓瘤(MM)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤)、胰腺癌、膀胱癌、头颈部鳞状细胞癌(H&NSCC,也称为SCCHN)、泌尿生殖癌、晚期皮肤性鳞状细胞癌、肝转移癌、间皮瘤、胃食管癌、梅克尔细胞癌和尿路上皮癌。

59. 一种治疗受试者中的癌症的方法,该方法包括:

a) 向患有癌症的受试者给予有效量的包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ 的原代细胞衍生的生物制剂;和

b) 向该受试者给予有效量的细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)的拮抗剂,其中给予该原代细胞衍生的生物制剂和给予该拮抗剂发生在受试者的不同部位和/或发生在不同时间。

60. 如权利要求59所述的方法,其中至少一次给予该原代细胞衍生的生物制剂发生在至少一次给予该拮抗剂之前。

61. 如权利要求60所述的方法,其中至少一次给予该原代细胞衍生的生物制剂发生在至少一次给予该拮抗剂之前并且至少再一次给予该原代细胞衍生的生物制剂发生在至少一次给予该拮抗剂之后。

62. 如权利要求61所述的方法,其中至少一次给予该拮抗剂发生在至少一次给予该原代细胞衍生的生物制剂之前。

63. 如权利要求62所述的方法,其中至少一次给予该拮抗剂发生在至少一次给予该原代细胞衍生的生物制剂之前并且至少再一次给予该拮抗剂发生在至少一次给予该原代细胞衍生的生物制剂之后。

64. 如权利要求59至63中任一项所述的方法,其中经皮下地或经外淋巴给予该原代细胞衍生的生物制剂,并且静脉内给予该拮抗剂。

65. 如权利要求59至64中任一项所述的方法,其中每天给予一次该原代细胞衍生的生物制剂长达10天,并且每三周至十二周给予一次该拮抗剂。

66. 如权利要求59至65中任一项所述的方法,其中该拮抗剂是反义寡核苷酸、短干扰RNA(siRNA)、小分子、肽、或抗体。

67. 如权利要求66所述的方法,其中该拮抗剂是抗体。

68. 如权利要求67所述的方法,其中该抗体是人抗体或人源化抗体。

69. 如权利要求68所述的方法,其中该抗体选自下组,该组由以下组成:伊匹单抗和曲美木单抗。

70. 如权利要求69至69中任一项所述的方法,其中在给予该原代细胞衍生的生物制剂

之前,该受试者难以用该拮抗剂治疗。

71. 如权利要求59至70中任一项所述的方法,其中受试者的肿瘤中的CTLA-4水平在给予该原代细胞衍生的生物制剂之后增加。

72. 一种治疗受试者中的癌症的方法,该方法包括:

a) 向患有癌症的受试者给予有效量的包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ 的原代细胞衍生的生物制剂;和

b) 向该受试者给予有效量的细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA-4) 的拮抗剂,其中该拮抗剂选自下组,该组由以下组成:伊匹单抗和曲美木单抗。

73. 如权利要求59至72中任一项所述的方法,其中向该受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括IL-1 β 国际单位 (IU) 与IL-2IU比率为0.45至1.37、IFN- γ IU与IL-2IU比率为0.19至0.39、TNF- α IU与IL-2IU比率为0.53至1.26、IL-6IU与IL-2IU比率为1.16至6.06、和IL-8IU与IL-2IU比率为0.15至0.51。

74. 如权利要求59至73中任一项所述的方法,其中向该受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括各自至少1IU的IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8和TNF- α 。

75. 如权利要求59至74任一项所述的方法,其中向该受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括22-657国际单位 (IU) 或220-6,700pcg的IL-1 β 、29-478IU或1730-28,100pcg的IL-2、10-185IU或560-10,900pcg的IFN- γ 、29-600IU或580-12,000pcg的TNF- α 、34-2,895IU或260-22,100pcg的IL-6、和5-244IU或4,610-243,600的IL-8。

76. 如权利要求59至75中任一项所述的方法,其中该原代细胞衍生的生物制剂进一步包含GM-CSF和G-CSF。

77. 如权利要求59至76中任一项所述的方法,该方法进一步包括向该受试者给予化学抑制剂,该化学抑制剂选自下组,该组由以下组成:烷化剂、抗代谢物、抗生素和免疫调节剂。

78. 如权利要求77所述的方法,其中该烷化剂是环磷酰胺。

79. 如权利要求59至78中任一项所述的方法,该方法进一步包括向该受试者给予NSAID,该NSAID选自下组,该组由以下组成:吲哚美辛、布洛芬、塞来昔布、罗非考昔及其组合。

80. 如权利要求79所述的方法,其中该NSAID是吲哚美辛。

81. 如权利要求59至80中任一项所述的方法,该方法进一步包括向该受试者给予锌。

82. 如权利要求59至81中任一项所述的方法,该方法进一步包括给予有效量的PD-1或PD-L1拮抗剂。

83. 如权利要求82所述的方法,其中该PD-1或PD-L1拮抗剂是反义寡核苷酸、短干扰RNA (siRNA)、小分子、肽、或抗体。

84. 如权利要求83所述的方法,其中该PD-1或PD-L1拮抗剂是抗体。

85. 如权利要求84所述的方法,其中该抗体是人抗体或人源化抗体。

86. 如权利要求83所述的方法,其中该PD-1或PD-L1拮抗剂选自下组,该组由以下组成:纳武单抗、皮立珠单抗、派姆单抗、MEDI-0680、REGN2810、AMP-224、阿特珠单抗、度伐单抗、BMS-936559、阿维鲁单抗和CA-170。

87. 一种选择进行治疗的受试者的方法,该方法包括:

a) 测定从受试者获得的肿瘤样本中的CTLA-4水平,该受试者患有癌症并且已被给予包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ 的原代细胞衍生的生物制剂;和

b) 如果肿瘤样本中的CTLA-4水平高于CTLA-4的阈值水平,则向该受试者给予有效量的CTLA-4的拮抗剂。

88. 如权利要求87所述的方法,其中测定包括进行一种测定法以检测CTLA-4水平。

89. 如权利要求88所述的方法,其中该测定法选自下组,该组由以下组成:原位杂交、RT-qPCR、微阵列分析、多重RNA表达分析、RNA-seq、免疫组织化学测定、流式细胞术、多重蛋白测定和蛋白质印迹测定。

90. 如权利要求87至89中任一项所述的方法,该方法进一步包括在测定步骤之前向该受试者给予该原代细胞衍生的生物制剂。

91. 如权利要求87至89中任一项所述的方法,其中该拮抗剂是反义寡核苷酸、短干扰RNA (siRNA)、小分子、肽、或抗体。

92. 如权利要求91所述的方法,其中该拮抗剂是抗体。

93. 如权利要求92所述的方法,其中该抗体是人抗体或人源化抗体。

94. 如权利要求93所述的方法,其中该抗体选自下组,该组由以下组成:伊匹单抗和曲美木单抗。

95. 如权利要求87至94中任一项所述的方法,其中向该受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括IL-1 β 国际单位 (IU) 与IL-2IU比率为0.45至1.37、IFN- γ IU与IL-2IU比率为0.19至0.39、TNF- α IU与IL-2IU比率为0.53至1.26、IL-6IU与IL-2IU比率为1.16至6.06、和IL-8IU与IL-2IU比率为0.15至0.51。

96. 如权利要求87至95中任一项所述的方法,其中向该受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括各自至少1IU的IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8和TNF- α 。

97. 如权利要求87至96中任一项所述的方法,其中该原代细胞衍生的生物制剂包括22-657国际单位 (IU) 或220-6,700pcg的IL-1 β 、29-478IU或1730-28,100pcg的IL-2、10-185IU或560-10,900pcg的IFN- γ 、29-600IU或580-12,000pcg的TNF- α 、34-2,895IU或260-22,100pcg的IL-6、和5-244IU或4,610-243,600的IL-8。

98. 如权利要求87至97中任一项所述的方法,其中该原代细胞衍生的生物制剂进一步包含GM-CSF和G-CSF。

99. 一种评估受试者对CTLA-4拮抗剂有响应的可能性的方法,该方法包括:

a) 向患有表达低于CTLA-4阈值水平的第一CTLA-4水平的癌症的受试者给予包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ 的原代细胞衍生的生物制剂;和

b) 在给予该原代细胞衍生的生物制剂之后测定该受试者的肿瘤样本中的第二CTLA-4水平,其中高于CTLA-4的阈值水平的第二CTLA-4水平指示该受试者将对CTLA-4的拮抗剂有响应。

100. 如权利要求99所述的方法,其中测定包括进行一种测定法以检测第二CTLA-4水平。

101. 如权利要求100所述的方法,其中该测定法选自下组,该组由以下组成:原位杂交、RT-qPCR、微阵列分析、多重RNA表达分析、RNA-seq、免疫组织化学测定、流式细胞术、多重蛋白测定和蛋白质印迹测定。

102. 如权利要求59至101中任一项所述的方法,其中该癌症选自下组,该组由以下组成:黑色素瘤、肺癌(例如非小细胞肺癌(NSCLC))、肾细胞癌(RCC)、前列腺癌、卵巢癌、结肠直肠癌(CRC)、肾癌、胃癌、乳腺癌、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、血液恶性肿瘤(例如,急性骨髓性白血病(AML)、多发性骨髓瘤(MM)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤)、胰腺癌、膀胱癌、头颈部鳞状细胞癌、泌尿生殖癌、晚期皮肤性鳞状细胞癌、肝转移癌、间皮瘤、胃食管癌、梅克尔细胞癌和尿路上皮癌。

PD-1/PD-L1抑制剂和/或CTLA-4抑制剂与含有多种细胞因子组分的生物制剂用于治疗癌症的用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35U.S.C.§119(e)要求2016年8月19日提交的美国临时申请号US62/377,051的权益,将其内容通过引用以其全文并入本文。

背景技术

[0003] PD-1和PD-L1抑制剂是用于治疗各种形式的癌症的检查点抑制剂。不幸的是,PD-L1在肿瘤微环境中的表达(这可能是与PD-1/PD-L1抑制剂的疗效相关的和可能甚至是PD-1/PD-L1抑制剂的疗效所必需的重要参数之一)因肿瘤类型变化并且在个体患者中不同(参见,例如Taube等人,Clin Cancer Res[临床癌症研究];20(19):5064-74(2014);以及Sunshine和Taube,Current Opinion in Pharmacology[药理学最新观点],23:32-38(2015))。CTLA-4抑制剂也是检查点抑制剂,其正在被开发用于治疗各种形式的癌症。CTLA-4表达也显示与CTLA-4抑制剂的疗效相关。因此,仍然需要增加受益于用PD-1/PD-L1和/或CTLA-4抑制剂治疗的患者的比例,或者增加对此类抑制剂的响应程度。

发明内容

[0004] 本公开的方面涉及利用原代细胞衍生的生物制剂来提高程序性细胞死亡配体1(PD-L1)、程序性细胞死亡1(PD-1)和/或细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)的拮抗剂的疗效(例如用于治疗癌症)的方法和组合物。如本文所描述,已经出人意料地发现向癌症患者的淋巴结远端给予包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ 的原代细胞衍生的生物制剂导致肿瘤内的PD-L1和CTLA-4的强烈局部上调。PD-L1在肿瘤细胞上、在浸润性免疫细胞上和在肿瘤微环境中的表达与PD-1/PD-L1拮抗剂疗效紧密相关并且可能是PD-1/PD-L1拮抗剂疗效所必需的(参见,例如Taube等人,Clin Cancer Res[临床癌症研究];20(19):5064-74(2014);Sunshine和Taube,Current Opinion in Pharmacology[药理学最新观点],23:32-38(2015);Garon等人N Engl J Med[新英格兰医学杂志],372:2018-2028(2015);Schmid等人European Cancer Congress[欧洲癌症大会],文摘号3017(2015);和Carbognin等人PLoS ONE[公共科学图书馆期刊]10(6):e0130142.(2015))。增加的CTLA-4表达也显示与增加的CTLA-4拮抗剂疗效相关(参见,例如,Jamieson等人Gene-expression profiling to predict responsiveness to immunotherapy[基因表达谱分析预测对免疫疗法的响应性].Cancer Gene Therapy[癌症基因疗法](2017)24:134-140和Van Allen等人Genomic correlates of response to CTLA-4blockade in metastatic melanoma[对转移性黑色素瘤中CTLA-4阻滞剂的响应的基因组相关性].Science[科学](2015)350(6257):207-211)。因此,不希望受理论束缚,预期给予原代细胞衍生的生物制剂(其如本文所证明地导致肿瘤本身或浸润肿瘤的免疫细胞对PD-L1的上调)将增加PD-L1或PD-1拮抗剂的疗效,例如通过增加对拮抗剂有响应的患者的数量和/或通过使拮抗剂响应更强烈。相似地,再次不希望受理论束缚,预期给予原代细胞衍生的生物制剂(其如本文所证明地导致

CTLA-4在肿瘤微环境(大概在浸润肿瘤的免疫细胞上)中的上调)将增加CTLA-4拮抗剂的疗效,例如通过增加对拮抗剂有响应的患者的数量和/或通过使拮抗剂响应更强烈。

[0005] 在一些方面,本公开提供了治疗受试者(例如人受试者)中的癌症或癌前病变的方法,该方法包括(a)向患有癌症或癌前病变的受试者给予有效量的包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ (例如,人IL-1 β 、人IL-2、人IL-6、人IL-8、人TNF- α 和人IFN- γ)的原代细胞衍生的生物制剂;和(b)向该受试者给予有效量的程序性细胞死亡配体1(PD-L1)或程序性细胞死亡1(PD-1)的拮抗剂,其中给予该原代细胞衍生的生物制剂和给予该拮抗剂发生在受试者的不同部位和/或发生在不同时间。

[0006] 在一些实施例中,至少一次给予该原代细胞衍生的生物制剂发生在至少一次给予该拮抗剂之前。在一些实施例中,至少一次给予该原代细胞衍生的生物制剂发生在至少一次给予该拮抗剂之前并且至少再一次给予该原代细胞衍生的生物制剂发生在至少一次给予该拮抗剂之后。在一些实施例中,至少一次给予该拮抗剂发生在至少一次给予该原代细胞衍生的生物制剂之前。在一些实施例中,至少一次给予该拮抗剂发生在至少一次给予该原代细胞衍生的生物制剂之前并且至少再一次给予该拮抗剂发生在至少一次给予该原代细胞衍生的生物制剂之后。

[0007] 在一些实施例中,经皮下地或经外淋巴给予该原代细胞衍生的生物制剂,并且静脉内或口服给予该拮抗剂。在一些实施例中,每天给予一次该原代细胞衍生的生物制剂,持续10天,并且每两周至四周给予一次该PD-L1或PD-1的拮抗剂。

[0008] 在一些实施例中,该拮抗剂是反义寡核苷酸、短干扰RNA(siRNA)、小分子、肽、或抗体。在一些实施例中,该拮抗剂是抗体。在一些实施例中,该抗体是人抗体或人源化抗体。在一些实施例中,该抗体是PD-L1特异性的。在一些实施例中,该抗体选自下组,该组由以下组成:阿特珠单抗(atezolizumab)、度伐单抗(durvalumab)、BMS-936559和阿维鲁单抗(avelumab)。在一些实施例中,该拮抗剂是CA-170。在一些实施例中,该抗体是PD-1特异性的。在一些实施例中,该抗体选自下组,该组由以下组成:纳武单抗、皮立珠单抗(pidilizumab)、派姆单抗、MEDI-0680和REGN2810。在一些实施例中,该拮抗剂是AMP-224。

[0009] 在一些实施例中,在给予该原代细胞衍生的生物制剂之前,受试者难以用该拮抗剂治疗。在一些实施例中,受试者的肿瘤中的PD-L1水平在给予该原代细胞衍生的生物制剂之后增加。

[0010] 在一些实施例中,向受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括IL-1 β 国际单位(IU)与IL-2IU比率为0.45至1.37、IFN- γ IU与IL-2IU比率为0.19至0.39、TNF- α IU与IL-2IU比率为0.53至1.26、IL-6IU与IL-2IU比率为1.16至6.06、和IL-8IU与IL-2IU比率为0.15至0.51。在一些实施例中,向受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括各自至少1IU的IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8和TNF- α 和IFN- γ 。在一些实施例中,向受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括各自至少2IU的IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8和TNF- α 和IFN- γ 。在一些实施例中,向受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括各自至少3IU的IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8和TNF- α 和IFN- γ 。在一些实施例中,向受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括22-657国际单位(IU)的IL-1 β 、29-478IU的IL-2、10-185IU的IFN- γ 、29-600IU的TNF- α 、34-2,895IU的IL-6和5-244IU的IL-8。IU值可以如本文所描述进行计算。在一些实施例中,向受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂

的有效量包括220-6,700pcg的IL-1 β 、1730-28,100pcg的IL-2、560-10,900pcg的IFN- γ 、580-12,000pcg的TNF- α 、260-22,100pcg的IL-6和4,610-243,600pcg的IL-8。在一些实施例中,该原代细胞衍生的生物制剂进一步包含GM-CSF和G-CSF。

[0011] 在一些实施例中,该方法进一步包括向受试者给予化学抑制剂,该化学抑制剂选自下组,该组由以下组成:烷化剂、抗代谢物、抗生素和免疫调节剂。在一些实施例中,该烷化剂是环磷酰胺。在一些实施例中,该方法进一步包括向受试者给予NSAID,该NSAID选自下组,该组由以下组成:吲哚美辛、布洛芬、塞来昔布、罗非考昔及其组合。在一些实施例中,该NSAID是吲哚美辛。在本文提供的任何方法的一些实施例中,该方法进一步包括向受试者给予锌。

[0012] 在一些实施例中,该方法进一步包括向受试者给予有效量的细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA-4) 拮抗剂。在一些实施例中,该CTLA-4拮抗剂是反义寡核苷酸、短干扰RNA (siRNA)、小分子、肽、或抗体。在一些实施例中,该CTLA-4拮抗剂是抗体(例如,人抗体或人源化抗体)。在一些实施例中,该CTLA-4拮抗剂是选自下组的抗体,该组由以下组成:伊匹单抗和曲美木单抗。

[0013] 在一些实施例中,该癌症选自下组,该组由以下组成:黑色素瘤、肺癌(例如非小细胞肺癌(NSCLC)或SCLC)、肾细胞癌(RCC)、前列腺癌、卵巢癌、结肠直肠癌(CRC)、肾癌、胃癌、乳腺癌、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、血液恶性肿瘤(例如,急性骨髓性白血病(AML)、多发性骨髓瘤(MM)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤)、胰腺癌、膀胱癌、头颈部鳞状细胞癌(H&NSCC,也称为SCCHN)、泌尿生殖癌、晚期皮肤性鳞状细胞癌、肝转移癌、间皮瘤、胃食管癌、梅克尔细胞癌和尿路上皮癌。

[0014] 在其他方面,本公开提供了治疗受试者(例如人受试者)中的癌症或癌前病变的方法,该方法包括(a)向患有癌症或癌前病变的受试者给予有效量的包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ (例如,人IL-1 β 、人IL-2、人IL-6、人IL-8、人TNF- α 和人IFN- γ)的原代细胞衍生的生物制剂;和(b)向受试者给予有效量的程序性细胞死亡配体1(PD-L1)或程序性细胞死亡1(PD-1)的拮抗剂,其中该拮抗剂选自下组,该组由以下组成:纳武单抗、皮立珠单抗、派姆单抗、MEDI-0680、REGN2810、AMP-224、阿特珠单抗、度伐单抗、BMS-936559、阿维鲁单抗和CA-170。

[0015] 在一些实施例中,向受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括IL-1 β 国际单位(IU)与IL-2IU比率为0.45至1.37、IFN- γ IU与IL-2IU比率为0.19至0.39、TNF- α IU与IL-2IU比率为0.53至1.26、IL-6IU与IL-2IU比率为1.16至6.06、和IL-8IU与IL-2IU比率为0.15至0.51。在一些实施例中,向受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括各自至少1IU的IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8和TNF- α 和IFN- γ 。在一些实施例中,向受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括各自至少2IU的IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8和TNF- α 和IFN- γ 。在一些实施例中,向受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括各自至少3IU的IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8和TNF- α 和IFN- γ 。在一些实施例中,向受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括22-657国际单位(IU)的IL-1 β 、29-478IU的IL-2、10-185IU的IFN- γ 、29-600IU的TNF- α 、34-2,895IU的IL-6和5-244IU的IL-8。在一些实施例中,向受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括220-6,700pcg的IL-1

β 、1730-28, 100pcg的IL-2、560-10, 900pcg的IFN- γ 、580-12, 000pcg的TNF- α 、260-22, 100pcg的IL-6和4, 610-243, 600pcg的IL-8。在一些实施例中, 该原代细胞衍生的生物制剂进一步包含GM-CSF和G-CSF。

[0016] 在一些实施例中, 该方法进一步包括向受试者给予化学抑制剂, 该化学抑制剂选自下组, 该组由以下组成: 烷化剂、抗代谢物、抗生素和免疫调节剂。在一些实施例中, 该烷化剂是环磷酰胺。在一些实施例中, 该方法进一步包括向受试者给予NSAID, 该NSAID选自下组, 该组由以下组成: 吡罗美辛、布洛芬、塞来昔布、罗非考昔及其组合。在一些实施例中, 该NSAID是吡罗美辛。在本文提供的任何方法的一些实施例中, 该方法进一步包括向受试者给予锌。

[0017] 在一些实施例中, 该方法进一步包括向受试者给予有效量的细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA-4) 拮抗剂。在一些实施例中, 该CTLA-4拮抗剂是反义寡核苷酸、短干扰RNA (siRNA)、小分子、肽、或抗体。在一些实施例中, 该CTLA-4拮抗剂是抗体 (例如, 人抗体或人源化抗体)。在一些实施例中, 该CTLA-4拮抗剂是选自下组的抗体, 该组由以下组成: 伊匹单抗和曲美木单抗。

[0018] 在一些实施例中, 该癌症选自下组, 该组由以下组成: 黑色素瘤、肺癌 (例如非小细胞肺癌 (NSCLC) 或小细胞肺癌 (SCLC))、肾细胞癌 (RCC)、前列腺癌、卵巢癌、结肠直肠癌 (CRC)、肾癌、胃癌、乳腺癌、弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL)、血液恶性肿瘤 (例如, 急性骨髓性白血病 (AML)、多发性骨髓瘤 (MM)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、慢性骨髓性白血病 (CML)、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤)、胰腺癌、膀胱癌、头颈部鳞状细胞癌 (H&NSCC, 也称为SCCHN)、泌尿生殖癌、晚期皮肤性鳞状细胞癌、肝转移癌、间皮瘤、胃食管癌、梅克尔细胞癌和尿路上皮癌。

[0019] 在又其他方面, 本公开提供了选择要进行治疗的受试者 (例如, 人受试者) 的方法, 该方法包括 (a) 测定从受试者获得的肿瘤样本中的PD-L1的水平, 该受试者患有癌症或癌前病变并且已被给予包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ (例如, 人IL-1 β 、人IL-2、人IL-6、人IL-8、人TNF- α 和人IFN- γ) 的原代细胞衍生的生物制剂; 和 (b) 如果肿瘤样本中的PD-L1水平高于PD-L1的阈值水平, 则向该受试者给予有效量的PD-L1或PD-1的拮抗剂。

[0020] 在一些实施例中, 测定包括进行一种测定法以检测PD-L1的水平。在一些实施例中, 该测定法选自下组, 该组由以下组成: 原位杂交、RT-qPCR、微阵列分析、多重RNA表达分析、RNA-seq、免疫组织化学测定、流式细胞术、多重蛋白测定和蛋白质印迹测定。在一些实施例中, 肿瘤样本中的PD-L1水平是在肿瘤样本中的细胞膜 (例如, 肿瘤细胞膜、免疫浸润细胞膜、和/或基质细胞膜) 中的PD-L1水平。在一些实施例中, 测定包括进行免疫组织化学测定并且PD-L1的阈值水平是肿瘤样本中的49%活肿瘤细胞的部分或完全细胞膜染色。在一些实施例中, 该方法进一步包括在测定步骤之前向受试者给予该原代细胞衍生的生物制剂。

[0021] 在一些实施例中, 该拮抗剂是反义寡核苷酸、短干扰RNA (siRNA)、小分子、肽、或抗体。在一些实施例中, 该拮抗剂是抗体。在一些实施例中, 该抗体是人抗体或人源化抗体。在一些实施例中, 该抗体是PD-L1特异性的。在一些实施例中, 该抗体选自下组, 该组由以下组成: 阿特殊单抗、度伐单抗、BMS-936559和阿维鲁单抗。在一些实施例中, 该拮抗剂是CA-170。在一些实施例中, 该抗体是PD-1特异性的。在一些实施例中, 该抗体选自下组, 该组由

以下组成：纳武单抗、皮立珠单抗 (pidilizumab)、派姆单抗、MEDI-0680和REGN2810。在一些实施例中，该拮抗剂是AMP-224。

[0022] 在一些实施例中，向受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括IL-1 β 国际单位 (IU) 与IL-2IU比率为0.45至1.37、IFN- γ IU与IL-2IU比率为0.19至0.39、TNF- α IU与IL-2IU比率为0.53至1.26、IL-6IU与IL-2IU比率为1.16至6.06、和IL-8IU与IL-2IU比率为0.15至0.51。在一些实施例中，该原代细胞衍生的生物制剂包括各自至少1IU的IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8和TNF- α 和IFN- γ 。在一些实施例中，向受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括各自至少2IU的IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8和TNF- α 和IFN- γ 。在一些实施例中，向受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括各自至少3IU的IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8和TNF- α 和IFN- γ 。在一些实施例中，该原代细胞衍生的生物制剂包括22-657国际单位 (IU) 的IL-1 β 、29-478IU的IL-2、10-185IU的IFN- γ 、29-600IU的TNF- α 、34-2,895IU的IL-6和5-244IU的IL-8。在一些实施例中，向受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括220-6,700pcg的IL-1 β 、1730-28,100pcg的IL-2、560-10,900pcg的IFN- γ 、580-12,000pcg的TNF- α 、260-22,100pcg的IL-6和4,610-243,600pcg的IL-8。在一些实施例中，该原代细胞衍生的生物制剂进一步包含GM-CSF和G-CSF。

[0023] 在一些实施例中，该癌症选自下组，该组由以下组成：黑色素瘤、肺癌（例如非小细胞肺癌 (NSCLC) 和SCLC）、肾细胞癌 (RCC)、前列腺癌、卵巢癌、结肠直肠癌 (CRC)、肾癌、胃癌、乳腺癌、弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL)、血液恶性肿瘤（例如，急性骨髓性白血病 (AML)、多发性骨髓瘤 (MM)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、慢性骨髓性白血病 (CML)、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤）、胰腺癌、膀胱癌、头颈部鳞状细胞癌 (H&NSCC, 也称为SCCHN)、泌尿生殖癌、晚期皮肤性鳞状细胞癌、肝转移癌、间皮瘤、胃食管癌、梅克尔细胞癌和尿路上皮癌。

[0024] 在其他方面，本公开提供了评估受试者（例如，人受试者）对PD-L1或PD-1拮抗剂有响应的可能性的方法，该方法包括 (a) 向患有表达低于PD-L1的阈值水平的第一PD-L1水平的癌症或癌前病变的受试者给予包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ （例如，人IL-1 β 、人IL-2、人IL-6、人IL-8、人TNF- α 和人IFN- γ ）的原代细胞衍生的生物制剂；和 (b) 在给予该原代细胞衍生的生物制剂之后测定受试者的肿瘤样本中的第二PD-L1水平，其中高于PD-L1的阈值水平的第二PD-L1水平指示该受试者将对PD-L1或PD-1的拮抗剂有响应。

[0025] 在一些实施例中，测定包括进行一种测定法以检测第二PD-L1水平。在一些实施例中，该测定法选自下组，该组由以下组成：原位杂交、RT-qPCR、微阵列分析、多重RNA表达分析、RNA-seq、免疫组织化学测定、流式细胞术、多重蛋白测定和蛋白质印迹测定。在一些实施例中，第二PD-L1水平是在肿瘤样本中的细胞膜（例如，肿瘤细胞膜、免疫浸润细胞膜、和/或基质细胞膜）中的PD-L1水平。在一些实施例中，测定包括进行免疫组织化学测定并且PD-L1的阈值水平是肿瘤样本中的至少49%活肿瘤细胞的部分或完全细胞膜染色。

[0026] 在一些实施例中，该癌症选自下组，该组由以下组成：黑色素瘤、肺癌（例如非小细胞肺癌 (NSCLC) 或SCLC）、肾细胞癌 (RCC)、前列腺癌、卵巢癌、结肠直肠癌 (CRC)、肾癌、胃癌、乳腺癌、弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL)、血液恶性肿瘤（例如，急性骨髓性白血病 (AML)、多发性骨髓瘤 (MM)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、慢性骨髓性白血病 (CML)、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤）、胰腺癌、膀胱癌、头颈部鳞

状细胞癌 (H&NSCC, 也称为SCCHN)、泌尿生殖癌、晚期皮肤性鳞状细胞癌、肝转移癌、间皮瘤、胃食管癌、梅克尔细胞癌和尿路上皮癌。

[0027] 在又其他方面, 本公开提供了治疗受试者 (例如, 人受试者) 中的癌症的方法, 该方法包括: 向患有癌症的受试者给予有效量的包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ (例如, 人IL-1 β 、人IL-2、人IL-6、人IL-8、人TNF- α 和人IFN- γ) 的原代细胞衍生的生物制剂; 并且向该受试者给予有效量的细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA-4) 的拮抗剂, 其中给予该原代细胞衍生的生物制剂和给予该拮抗剂发生在受试者的不同部位和/或发生在不同时间。

[0028] 在一些实施例中, 至少一次给予该原代细胞衍生的生物制剂发生在至少一次给予该拮抗剂之前。在一些实施例中, 至少一次给予该原代细胞衍生的生物制剂发生在至少一次给予该拮抗剂之前并且至少再一次给予该原代细胞衍生的生物制剂发生在至少一次给予该拮抗剂之后。在一些实施例中, 至少一次给予该拮抗剂发生在至少一次给予该原代细胞衍生的生物制剂之前。在一些实施例中, 至少一次给予该拮抗剂发生在至少一次给予该原代细胞衍生的生物制剂之前并且至少再一次给予该拮抗剂发生在至少一次给予该原代细胞衍生的生物制剂之后。在一些实施例中, 经皮下地或经外淋巴给予该原代细胞衍生的生物制剂, 并且静脉内给予该拮抗剂。在一些实施例中, 每天给予一次该原代细胞衍生的生物制剂长达10天, 并且每三周至十二周给予一次该拮抗剂。

[0029] 在一些实施例中, 该CTLA-4拮抗剂是反义寡核苷酸、短干扰RNA (siRNA)、小分子、肽、或抗体。在一些实施例中, 该拮抗剂是抗体。在一些实施例中, 该抗体是人抗体或人源化抗体。在一些实施例中, 该抗体选自下组, 该组由以下组成: 伊匹单抗和曲美木单抗。

[0030] 在一些实施例中, 在给予该原代细胞衍生的生物制剂之前, 受试者难以用该拮抗剂治疗。在一些实施例中, 受试者的肿瘤中的CTLA-4水平在给予该原代细胞衍生的生物制剂之后增加。

[0031] 在一些实施例中, 向受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括IL-1 β 国际单位 (IU) 与IL-2IU比率为0.45至1.37、IFN- γ IU与IL-2IU比率为0.19至0.39、TNF- α IU与IL-2IU比率为0.53至1.26、IL-6IU与IL-2IU比率为1.16至6.06、和IL-8IU与IL-2IU比率为0.15至0.51。在一些实施例中, 向受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括各自至少1IU的IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8和TNF- α 。在一些实施例中, 向受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括22-657国际单位 (IU) 或220-6,700pcg的IL-1 β 、29-478IU或1730-28,100pcg的IL-2、10-185IU或560-10,900pcg的IFN- γ 、29-600IU或580-12,000pcg的TNF- α 、34-2,895IU或260-22,100pcg的IL-6和5-244IU或4,610-243,600的IL-8。在一些实施例中, 该原代细胞衍生的生物制剂进一步包含GM-CSF和G-CSF。

[0032] 在一些实施例中, 该方法进一步包括向受试者给予化学抑制剂, 该化学抑制剂选自下组, 该组由以下组成: 烷化剂、抗代谢物、抗生素和免疫调节剂。在一些实施例中, 该烷化剂是环磷酰胺。在一些实施例中, 该方法进一步包括向受试者给予NSAID, 该NSAID选自下组, 该组由以下组成: 吲哚美辛、布洛芬、塞来昔布、罗非考昔及其组合。在一些实施例中, 该NSAID是吲哚美辛。在一些实施例中, 该方法进一步包括向受试者给予锌。

[0033] 在一些实施例中, 该方法进一步包括给予有效量的PD-1或PD-L1拮抗剂。在一些实施例中, 该PD-1或PD-L1拮抗剂是反义寡核苷酸、短干扰RNA (siRNA)、小分子、肽、或抗体。在

一些实施例中,该PD-1或PD-L1拮抗剂是抗体。在一些实施例中,该抗体是人抗体或人源化抗体。在一些实施例中,该PD-1或PD-L1拮抗剂选自下组,该组由以下组成:纳武单抗、皮立珠单抗、派姆单抗、MEDI-0680、REGN2810、AMP-224、阿特珠单抗、度伐单抗、BMS-936559、阿维鲁单抗和CA-170。

[0034] 在一些实施例中,该癌症选自下组,该组由以下组成:黑色素瘤、肺癌(例如非小细胞肺癌(NSCLC)或SCLC)、肾细胞癌(RCC)、前列腺癌、卵巢癌、结肠直肠癌(CRC)、肾癌、胃癌、乳腺癌、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、血液恶性肿瘤(例如,急性骨髓性白血病(AML)、多发性骨髓瘤(MM)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤)、胰腺癌、膀胱癌、头颈部鳞状细胞癌、泌尿生殖癌、晚期皮肤性鳞状细胞癌、肝转移癌、间皮瘤、胃食管癌、梅克尔细胞癌和尿路上皮癌。

[0035] 在另一方面,本公开提供了治疗受试者(例如,人受试者)中的癌症的方法,该方法包括向患有癌症的受试者给予有效量的包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ (例如,人IL-1 β 、人IL-2、人IL-6、人IL-8、人TNF- α 和人IFN- γ)的原代细胞衍生的生物制剂;并且向该受试者给予有效量的CTLA-4的拮抗剂,其中该拮抗剂选自下组,该组由以下组成:伊匹单抗和曲美木单抗。

[0036] 在一些实施例中,向受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括IL-1 β 国际单位(IU)与IL-2IU比率为0.45至1.37、IFN- γ IU与IL-2IU比率为0.19至0.39、TNF- α IU与IL-2IU比率为0.53至1.26、IL-6IU与IL-2IU比率为1.16至6.06、和IL-8IU与IL-2IU比率为0.15至0.51。在一些实施例中,向受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括各自至少1IU的IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8和TNF- α 。在一些实施例中,向受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括22-657国际单位(IU)或220-6,700pcg的IL-1 β 、29-478IU或1730-28,100pcg的IL-2、10-185IU或560-10,900pcg的IFN- γ 、29-600IU或580-12,000pcg的TNF- α 、34-2,895IU或260-22,100pcg的IL-6和5-244IU或4,610-243,600的IL-8。在一些实施例中,该原代细胞衍生的生物制剂进一步包含GM-CSF和G-CSF。

[0037] 在一些实施例中,该方法进一步包括向受试者给予化学抑制剂,该化学抑制剂选自下组,该组由以下组成:烷化剂、抗代谢物、抗生素和免疫调节剂。在一些实施例中,该烷化剂是环磷酰胺。在一些实施例中,该方法进一步包括向受试者给予NSAID,该NSAID选自下组,该组由以下组成:吲哚美辛、布洛芬、塞来昔布、罗非考昔及其组合。在一些实施例中,该NSAID是吲哚美辛。在一些实施例中,该方法进一步包括向受试者给予锌。

[0038] 在一些实施例中,该方法进一步包括给予有效量的PD-1或PD-L1拮抗剂。在一些实施例中,该PD-1或PD-L1拮抗剂是反义寡核苷酸、短干扰RNA(siRNA)、小分子、肽、或抗体。在一些实施例中,该PD-1或PD-L1拮抗剂是抗体。在一些实施例中,该抗体是人抗体或人源化抗体。在一些实施例中,该PD-1或PD-L1拮抗剂选自下组,该组由以下组成:纳武单抗、皮立珠单抗、派姆单抗、MEDI-0680、REGN2810、AMP-224、阿特珠单抗、度伐单抗、BMS-936559、阿维鲁单抗和CA-170。

[0039] 在一些实施例中,该癌症选自下组,该组由以下组成:黑色素瘤、肺癌(例如非小细胞肺癌(NSCLC)或SCLC)、肾细胞癌(RCC)、前列腺癌、卵巢癌、结肠直肠癌(CRC)、肾癌、胃癌、乳腺癌、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、血液恶性肿瘤(例如,急性骨髓性白血病(AML)、多

发性骨髓瘤(MM)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤)、胰腺癌、膀胱癌、头颈部鳞状细胞癌、泌尿生殖癌、晚期皮肤性鳞状细胞癌、肝转移癌、间皮瘤、胃食管癌、梅克尔细胞癌和尿路上皮癌。

[0040] 在又其他方面,本公开提供了选择要进行治疗的受试者(例如,人受试者)的方法,该方法包括测定从受试者获得的肿瘤样本中的CTLA-4的水平,该受试者患有癌症并且已被给予包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ (例如,人IL-1 β 、人IL-2、人IL-6、人IL-8、人TNF- α 和人IFN- γ)的原代细胞衍生的生物制剂;并且如果肿瘤样本中的CTLA-4水平高于CTLA-4的阈值水平,则向该受试者给予有效量的CTLA-4的拮抗剂。在一些实施例中,测定包括进行一种测定法以检测CTLA-4的水平。在一些实施例中,该测定法选自下组,该组由以下组成:原位杂交、RT-qPCR、微阵列分析、多重RNA表达分析、RNA-seq、免疫组织化学测定、流式细胞术、多重蛋白测定和蛋白质印迹测定。

[0041] 在一些实施例中,该方法进一步包括在测定步骤之前向受试者给予该原代细胞衍生的生物制剂。在一些实施例中,该拮抗剂是反义寡核苷酸、短干扰RNA(siRNA)、小分子、肽、或抗体。在一些实施例中,该拮抗剂是抗体。在一些实施例中,该抗体是人抗体或人源化抗体。在一些实施例中,该抗体选自下组,该组由以下组成:伊匹单抗和曲美木单抗。

[0042] 在一些实施例中,向受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括IL-1 β 国际单位(IU)与IL-2IU比率为0.45至1.37、IFN- γ IU与IL-2IU比率为0.19至0.39、TNF- α IU与IL-2IU比率为0.53至1.26、IL-6IU与IL-2IU比率为1.16至6.06、和IL-8IU与IL-2IU比率为0.15至0.51。在一些实施例中,向受试者给予的该原代细胞衍生的生物制剂的有效量包括各自至少1IU的IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8和TNF- α 。在一些实施例中,该原代细胞衍生的生物制剂包括22-657国际单位(IU)或220-6,700pcg的IL-1 β 、29-478IU或1730-28,100pcg的IL-2、10-185IU或560-10,900pcg的IFN- γ 、29-600IU或580-12,000pcg的TNF- α 、34-2,895IU或260-22,100pcg的IL-6和5-244IU或4,610-243,600的IL-8。在一些实施例中,该原代细胞衍生的生物制剂进一步包含GM-CSF和G-CSF。

[0043] 在一些实施例中,该癌症选自下组,该组由以下组成:黑色素瘤、肺癌(例如非小细胞肺癌(NSCLC)或SCLC)、肾细胞癌(RCC)、前列腺癌、卵巢癌、结肠直肠癌(CRC)、肾癌、胃癌、乳腺癌、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、血液恶性肿瘤(例如,急性骨髓性白血病(AML)、多发性骨髓瘤(MM)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤)、胰腺癌、膀胱癌、头颈部鳞状细胞癌、泌尿生殖癌、晚期皮肤性鳞状细胞癌、肝转移癌、间皮瘤、胃食管癌、梅克尔细胞癌和尿路上皮癌。

[0044] 在其他方面,提供了评估受试者(例如,人受试者)对CTLA-4拮抗剂有响应的可能性的方法,该方法包括向患有表达低于CTLA-4的阈值水平的第二CTLA-4水平的癌症的受试者给予包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ (例如,人IL-1 β 、人IL-2、人IL-6、人IL-8、人TNF- α 和人IFN- γ)的原代细胞衍生的生物制剂;并且在给予该原代细胞衍生的生物制剂之后测定受试者的肿瘤样本中的第二CTLA-4水平,其中高于CTLA-4的阈值水平的第二CTLA-4水平指示该受试者将对CTLA-4的拮抗剂有响应。在一些实施例中,测定包括进行一种测定法以检测第二CTLA-4水平。在一些实施例中,该测定法选自下组,该组由以下组成:

原位杂交、RT-qPCR、微阵列分析、多重RNA表达分析、RNA-seq、免疫组织化学测定、流式细胞术、多重蛋白测定和蛋白质印迹测定。在一些实施例中，该癌症选自下组，该组由以下组成：黑色素瘤、肺癌（例如非小细胞肺癌（NSCLC）或SCLC）、肾细胞癌（RCC）、前列腺癌、卵巢癌、结肠直肠癌（CRC）、肾癌、胃癌、乳腺癌、弥漫性大B细胞淋巴瘤（DLBCL）、血液恶性肿瘤（例如，急性骨髓性白血病（AML）、多发性骨髓瘤（MM）、慢性淋巴细胞白血病（CLL）、慢性骨髓性白血病（CML）、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤）、胰腺癌、膀胱癌、头颈部鳞状细胞癌、泌尿生殖癌、晚期皮肤性鳞状细胞癌、肝转移癌、间皮瘤、胃食管癌、梅克尔细胞癌和尿路上皮癌。

[0045] 在以上提供的任何方法的一些实施例中，该原代细胞衍生的生物制剂可以用如本文所描述的细胞因子的组合（例如，包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ ）取代，该组合可以一起（例如，在细胞因子混合物中）或分别给予。

附图说明

[0046] 以下附图构成本说明书的一部分并且被包括在本说明书内以进一步说明本公开的某些方面，通过参考这些附图中的一个或多个并结合本文给出的具体实施例的详细描述可以更好地理解本公开的这些方面。

[0047] 图1是在用实例1中描述的原代细胞衍生的生物制剂治疗方案治疗之前（活组织检查）和在用该原代细胞衍生的生物制剂治疗方案治疗之后（切除）的来自患者的肿瘤切片的一组照片。将这些肿瘤切片用淋巴细胞生物标志物（包括CD68、CD8、CD4、CD8/FOXP3和CD4/FOXP3）的抗体进行染色。图1显示在切除样本中存在更多染色，这表明治疗后CD4和CD8T细胞的淋巴细胞浸润到肿瘤中。

[0048] 图2是显示以下的图：在对用实例1所述的原代细胞衍生的生物制剂治疗方案治疗（手术前）的7名患者进行治疗后，PD-L1表达的平均膜强度的差值。每个条形代表一名患者。Y轴显示在用原代细胞衍生的生物制剂治疗之前和之后，平均PD-L1膜强度的变化。图2显示在用原代细胞衍生的生物制剂治疗后，4名患者的PD-L1表达增加。

[0049] 图3是显示以下的图：在对用实例1中所述的原代细胞衍生的生物制剂治疗方案治疗的7名患者进行治疗后（手术之前），CTLA-4的mRNA表达水平的变化。每个条形代表一名患者。Y轴显示在用原代细胞衍生的生物制剂治疗之前和之后，CTLA-4mRNA表达水平的变化。图3显示在用原代细胞衍生的生物制剂治疗之后，5名患者的CTLA-4表达增加。

具体实施方式

[0050] 本公开涉及如下组合物和方法，这些组合物和方法利用原代细胞衍生的生物制剂来诱导和/或增强对PD-1/PD-L1拮抗剂和/或CTLA-4拮抗剂的治疗性响应，来使受试者对用PD-1/PD-L1拮抗剂和/或CTLA-4拮抗剂的治疗有响应，或来选择用PD-1/PD-L1拮抗剂和/或CTLA-4拮抗剂进行治疗的受试者。

[0051] 原代细胞衍生的生物制剂

[0052] 在一些方面，本公开涉及原代细胞衍生的生物制剂例如在如本文所描述的方法或组合物中的用途。如本文使用的，术语“原代细胞衍生的生物制剂”是包含多种细胞因子组分（优选非重组细胞因子）的生物制剂组合物，该生物制剂组合物衍生或获得自原代细胞，

例如已经用丝裂原和4-氨基喹诺酮抗生素刺激的人单核细胞。示例性的原代细胞衍生的生物制剂是IRX-2 (参见,例如,Egan等人(2007) J Immunother [免疫学期刊] 30 (6) :624-633 (其描述了表1中的一批示例性IRX-2),以及如在美国专利号8,470,562中描述的IRX-2,将以上文献各自以其全文通过引用并入本文)。IRX-2是通过用植物凝集素(PHA)和环丙沙星刺激纯化的人白细胞(单核细胞)而产生的原代细胞衍生的生物制剂。IRX-2包括以下细胞因子:人IL-1 β 、人IL-2、人IL-6、人IL-8、人TNF- α 和人IFN- γ (它们被认为是该生物制剂中最有效的组分)以及人GM-CSF和人G-CSF。在一些实施例中,该原代细胞衍生的生物制剂包含白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-2 (IL-2)、白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-8 (IL-8)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和干扰素- γ (IFN- γ)。在一些实施例中,该原代细胞衍生的生物制剂包含人IL-1 β 、人IL-2、人IL-6、人IL-8、人TNF- α 和人IFN- γ 。在一些实施例中,该原代细胞衍生的生物制剂进一步包含粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和粒细胞集落刺激因子(G-CSF)。在一些实施例中,该原代细胞衍生的生物制剂进一步包含人GM-CSF和人G-CSF。

[0053] 在一些实施例中,该原代细胞衍生的生物制剂被递送至受试者,例如以有效增加PD-L1和/或CTLA-4表达的量递送。在一些实施例中,递送至受试者的原代细胞衍生的生物制剂的量使用该原代细胞衍生的生物制剂中存在的国际单位(IU)或IU/毫升(IU/mL)的一种或多种细胞因子来定义。每种细胞因子的IU和IU/mL由英国国家生物制品品与控制研究所(National Institute of Biological Standards and Controls, NIBSC)确立并且分配代码,该代码在下表中提供。有关每个代码的信息可以通过参考NIBSC网站(nibsc.org)获得。IU和IU/mL可以通过使用下表中提供的合适的R&D系统测试试剂盒以皮克(pcg)或pcg/毫升(pcg/mL)测量细胞因子单位来确定,这些细胞因子单位分别使用下表中提供的转换因子被转换为IU或IU/mL,这些转换因子是从R&D系统测试试剂盒手册中获得的值。

[0054]

细胞因子	转换因子: pcg/mL 至 IU/mL (将 pcg/mL 乘以转换因子得到 IU/mL)	NIBSC 标准代码	R&D 系统测试试剂盒目录#
IL-1 β	0.098	86/552	DLB50
IL-2	0.017	86/500	D2050
IFN- γ	0.017	82/587	DIF50
TNF- α	0.050	88/786	DTA00C
IL-6	0.131	89/548	D6050
IL-8	0.001	89/520	D8000C
G-CSF	0.120	88/502	DCS50
GM-CSF	0.008	88/646	DGM00

[0055] 在一些实施例中,递送至受试者的该原代细胞衍生的生物制剂的量包含各自至少1IU (例如,至少1IU、至少2IU或至少3IU)的IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8和TNF- α 、以及IFN- γ ,例如,人IL-1 β 、人IL-2、人IL-6、人IL-8、人TNF- α 和人IFN- γ 。在一些实施例中,该原代细胞衍生的生物制剂进一步包含GM-CSF和G-CSF,例如人GM-CSF和人G-CSF,并且递送至受试者的该原代细胞衍生的生物制剂的量包含至少0.05IU (例如,至少0.05IU、至少0.1IU或至少1IU)的GM-CSF和至少1IU (例如,至少1IU、至少2IU或至少3IU)的G-CSF。

[0056] 在一些实施例中,递送至受试者的该原代细胞衍生的生物制剂的量包含22-657IU (例如30-147IU)的IL-1 β ,例如人IL-1 β ;29-478IU (例如67-156IU)的IL-2,例如人IL-2;10-185IU (例如13-53IU)的IFN- γ ,例如人IFN- γ ;29-600IU (例如36-150IU)的TNF- α ,例如人TNF- α ;34-2,895IU (例如89-524IU)的IL-6,例如人IL-6;和5-244IU (例如10-64IU)的IL-8,例如人IL-8。在一些实施例中,该原代细胞衍生的生物制剂进一步包含GM-CSF和G-CSF,例如人GM-CSF和人G-CSF,并且递送至受试者的该原代细胞衍生的生物制剂的量包含7-456IU (例如7-84IU)的G-CSF和0.08-28IU (例如2-6IU)的GM-CSF。

[0057] 在一些实施例中,递送至受试者的该原代细胞衍生的生物制剂的量包含浓度范围为22-657IU/mL (例如30-147IU/mL)的IL-1 β ,例如人IL-1 β ;浓度范围为29-478IU/mL (例如67-156IU/mL)的IL-2,例如人IL-2;浓度范围为10-185IU/mL (例如13-53IU/mL)的IFN- γ ,例如人IFN- γ ;浓度范围为29-600IU/mL (例如36-150IU/mL)的TNF- α ,例如人TNF- α ;浓度范围为34-2,895IU/mL (例如89-524IU/mL)的IL-6,例如人IL-6;浓度范围为5-244IU/mL (例如10-64IU/mL)的IL-8,例如人IL-8。在一些实施例中,该原代细胞衍生的生物制剂进一步包含GM-CSF和G-CSF,例如人GM-CSF和人G-CSF,并且递送至受试者的该原代细胞衍生的生物制剂的量包含浓度范围为7-456IU/mL (例如7-84IU/mL)的G-CSF和浓度范围为0.08-28IU/mL (例如2-6IU/mL)的GM-CSF。

[0058] 在一些实施例中,递送至受试者的该原代细胞衍生的生物制剂的量包含相对于该原代细胞衍生的生物制剂中存在的IL-2的量的比例的一定比例的各种细胞因子。在一些实施例中,特定细胞因子的比例的下限可以通过取该特定细胞因子的最低IU值(例如,本文所述的最低IU值)并将其除以IL-2的最低IU值(例如,本文所述的最低IU值)来计算。在一些实施例中,特定细胞因子的比例的上限可以通过取该特定细胞因子的最高IU值(例如,本文所述的最高IU值)并将其除以IL-2的最高IU值(例如,本文所述的最高IU值)来计算。在一些实施例中,递送至受试者的该原代细胞衍生的生物制剂的量包含IL-1 β IU (例如,人IL-1 β IU)与IL-2IU (例如,人IL-2IU)的比例为0.45至1.37 (例如,0.45至0.94);IFN- γ IU (例如,人IFN- γ IU)与IL-2IU (例如,人IL-2IU)的比例为0.19至0.39 (例如,0.19至0.34);TNF- α IU (例如,人TNF- α IU)与IL-2IU (例如,人IL-2IU)的比例为0.53至1.26 (例如,0.53至0.96);IL-6IU (例如,人IL-6IU)与IL-2IU (例如,人IL-2IU)的比例为1.16至6.06 (例如,1.32至3.35);和IL-8IU (例如,人IL-8IU)与IL-2IU (例如,人IL-2IU)的比例为0.15至0.51 (例如,0.15至0.41)。在一些实施例中,该原代细胞衍生的生物制剂进一步包含GM-CSF和G-CSF,例如人GM-CSF和人G-CSF,并且递送至受试者的该原代细胞衍生的生物制剂的量包含G-CSF IU (例如,人G-CSF IU)与IL-2IU (例如,人IL-2IU)的比例为0.11至0.95 (例如,0.11至0.54)和GM-CSF IU (例如,人GM-CSF IU)与IL-2IU (例如,人IL-2IU)的比例为0.002至0.06 (例如,0.03至0.04)。

[0059] 在一些实施例中,递送至受试者的原代细胞衍生的生物制剂的量使用该原代细胞衍生的生物制剂中存在的pcg或pcg/mL的一种或多种细胞因子来定义。在一些实施例中,递送至受试者的该原代细胞衍生的生物制剂的量包含220-6,700pcg (例如310-1,500pcg)的IL-1 β ,例如人IL-1 β ;1730-28,100pcg (例如3,960-9,200pcg)的IL-2,例如人IL-2;560-10,900pcg (例如750-3,100pcg)的IFN- γ ,例如人IFN- γ ;580-12,000pcg (例如720-3,000pcg)的TNF- α ,例如人TNF- α ;260-22,100pcg (例如680-4,000pcg)的IL-6,例如人IL-6;和4,610-

243,600pcg (例如10,390-63,800pcg) 的IL-8, 例如人IL-8。在一些实施例中, 该原代细胞衍生的生物制剂进一步包含GM-CSF和G-CSF, 例如人GM-CSF和人G-CSF, 并且递送至受试者的该原代细胞衍生的生物制剂的量包含60-3,800pcg (例如, 60-700pcg) 的G-CSF和10-3,500pcg (例如, 250-800pcg) 的GM-CSF。

[0060] 在一些实施例中, 递送至受试者的该原代细胞衍生的生物制剂的量包含浓度范围为220-6,700pcg/mL (例如310-1,500pcg/mL) 的IL-1 β , 例如人IL-1 β ; 浓度范围为1,730-28,100pcg/mL (例如3,960-9,200pcg/mL) 的IL-2, 例如人IL-2; 浓度范围为560-10,900pcg/mL (例如750-3,100pcg/mL) 的IFN- γ , 例如人IFN- γ ; 浓度范围为580-12,000pcg/mL (例如720-3,000pcg/mL) 的TNF- α , 例如人TNF- α ; 浓度范围为260-22,100pcg/mL (例如680-4,000pcg/mL) 的IL-6, 例如人IL-6; 浓度范围为4,610-243,600pcg/mL (例如10,390-63,800pcg/mL) 的IL-8, 例如人IL-8。在一些实施例中, 递送至受试者的该原代细胞衍生的生物制剂的量包含浓度范围为300-1,400pcg/mL的IL-1 β , 例如人IL-1 β ; 浓度范围为4,000-8,000pcg/mL的IL-2, 例如人IL-2; 浓度范围为1,000-3,800pcg/mL的IFN- γ , 例如人IFN- γ ; 以及浓度范围为1,000-4,300pcg/mL的TNF- α , 例如人TNF- α 。在一些实施例中, 该原代细胞衍生的生物制剂进一步包含GM-CSF和G-CSF, 例如人GM-CSF和人G-CSF, 并且递送至受试者的该原代细胞衍生的生物制剂的量包含浓度范围为60-3,800pcg/mL (例如60-700pcg/mL) 的G-CSF和浓度范围为10-3,500pcg/mL (例如250-800pcg/mL) 的GM-CSF。

[0061] 产生原代细胞衍生的生物制剂 (例如IRX-2) 的示例性方法公开于美国专利号8,470,562、5,632,983和5,698,194中, 将这些专利全部通过引用并入本文。例如, 该原代细胞衍生的生物制剂可以通过以下来制备: 纯化从人供体获得的单核细胞 (MNC), 过夜孵育这些MNC, 用丝裂原 (例如, 用PHA连续刺激或脉冲刺激) 和4-氨基喹诺酮抗生素 (例如, 用环丙沙星连续刺激) 刺激这些MNC以产生细胞因子, 通过过滤去除该丝裂原, 通过过滤澄清这些细胞因子以获得最初的原代细胞衍生的生物制剂上清液, 并且使用阴离子交换色谱法和病毒过滤来使该最初的原代细胞衍生的生物制剂上清液与DNA和外源因子分离, 从而产生例如包含人IL-1 β 、人IL-2、人IL-6、人IL-8、人TNF- α 和人IFN- γ 的原代细胞衍生的生物制剂。

[0062] 其他示例性的原代细胞衍生的生物制剂和产生原代细胞衍生的生物制剂的方法例如公开于美国专利号6,896,879中, 将该专利通过引用并入本文。

[0063] PD-L1或PD-1的拮抗剂

[0064] 在一些方面, 本公开涉及程序性细胞死亡配体1 (PD-L1) 或程序性细胞死亡1 (PD-1) 的拮抗剂及其在本文所述的组合物和方法中的用途。

[0065] 如本文使用的PD-1拮抗剂是一种例如通过与PD-1结合而抑制或阻止PD-1活性的药剂。PD-1拮抗剂可降低在细胞或生物体中的PD-1活性, 例如, 与未暴露在PD-1拮抗剂下的细胞或生物体相比降低5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或100%。PD-1是属于免疫球蛋白超家族的细胞表面受体并且在T细胞、B细胞和巨噬细胞上表达。人PD-1是由基因PDCD1 (Genbank Entrez ID 5133) 编码的。PD-1作为免疫检查点起作用并且负调节免疫应答, 例如通过引发细胞死亡 (细胞凋亡) 并且因此抑制CD8⁺T-细胞和其他免疫细胞的活化、扩增、和/或功能。已发现PD-L1 (PD-1的配体) 由若干种癌症高表达并且若干种PD-1拮抗剂正在被研发或被批准用于治疗癌症。

[0066] PD-1活性可能受到选择性结合PD-1并阻断PD-1活性的抗体的干扰。PD-1的活性还

可被除结合PD-1的抗体之外的分子抑制或阻断。此类分子包括蛋白质(例如融合蛋白)、小分子和肽,例如,结合PD-1但不活化PD-1的PD-L1和PD-L2的肽模拟物。结合并降解或抑制编码PD-1的DNA或mRNA的药剂也可充当PD-1拮抗剂。实例包括抗PD-1 siRNA和抗PD-1反义寡核苷酸。

[0067] 示例性PD-1拮抗剂包括在美国公开20130280265、20130237580、20130230514、20130109843、20130108651、20130017199、20120251537和20110271358以及欧洲专利EP 2170959B1中所描述的那些,将全部这些公开通过引用并入本文。其他的示例性PD-1拮抗剂描述于以下:Curran等人,PNAS,107,4275(2010);Topalian等人,New Engl.J.Med.[新英格兰医学杂志]366,2443(2012);Brahmer等人,New Engl.J.Med.[新英格兰医学杂志]366,2455(2012);Dolan等人,Cancer Control[癌症控制]21,3(2014);和Sunshine等人,Curr.Opin.in Pharmacol.[药理学最新观点]23(2015)。

[0068] 示例性PD-1拮抗剂包括:纳武单抗(例如,来自百时美施贵宝公司(Bristol-Myers Squibb)的**OPDIVO®**),结合PD-1的完全人IgG4单克隆抗体;皮立珠单抗(例如,来自CureTech公司的CT-011),结合PD-1的人源化IgG1单克隆抗体;派姆单抗(例如,来自默克公司(Merck)的**KEYTRUDA®**),结合PD-1的人源化IgG4-κ单克隆抗体;MEDI-0680(阿斯利康公司(AstraZeneca)/医学免疫公司(MedImmune)),结合PD-1的单克隆抗体;和REGN2810(再生元公司(Regeneron)/赛诺菲公司(Sanofi)),结合PD-1的单克隆抗体。另一示例性的PD-1拮抗剂是AMP-224(葛兰素史克公司(Glaxo Smith Kline)和安普利免疫公司(Amplimmune)),由程序性细胞死亡配体2(PD-L2)的胞外域和结合PD-1的人IgG1的Fc区构成的重组融合蛋白。

[0069] 如本文使用的PD-L1拮抗剂是一种例如通过与PD-L1结合而抑制或阻止PD-L1活性的药剂。PD-L1拮抗剂可降低在细胞或生物体中的PD-L1活性,例如,与未暴露在PD-L1拮抗剂下的细胞或生物体相比降低5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或100%。

[0070] PD-L1是具有免疫球蛋白V样和C样结构域的1型跨膜蛋白。PD-L1是PD-1受体的配体。人PD-L1是由CD274基因(Genbank Entrez ID 29126)编码的。PD-L1由造血细胞(例如B细胞和T细胞)以及非造血细胞表达。将PD-L1与PD-1结合导致PD-1的活化,这导致引发细胞死亡(细胞凋亡)和抑制上述免疫应答,例如,抑制CD8⁺T细胞和其他免疫细胞的活化、扩增、和/或功能。PD-L1也结合CD80(也称为B7-1)。

[0071] PD-L1活性可被选择性地与PD-L1结合并且阻断PD-L1活性的分子阻断,例如通过阻断与PD-1和/或B7-1的相互作用和PD-1和/或B7-1的活化。PD-L1的活性还可被除结合PD-L1的抗体之外的分子抑制或阻断。此类分子包括蛋白质(例如融合蛋白)、小分子和肽。结合并降解或抑制编码PD-L1的DNA或mRNA的药剂也可充当PD-L1拮抗剂。实例包括抗PD-L1 siRNA和抗PD-L1反义寡核苷酸。

[0072] 示例性PD-L1拮抗剂包括在美国公开20090055944、20100203056、20120039906、20130045202、20130309250和20160108123中所描述的那些,将全部这些公开通过引用并入本文。其他示例性PD-L1拮抗剂描述于Sunshine等人,Curr.Opin.in Pharmacol.[药理学最新观点]23(2015)中。

[0073] PD-L1拮抗剂包括例如:阿特珠单抗(也称为MPDL3280A或TECENTRIQ™,基因科技公

司 (Genentech) / 罗氏公司 (Roche)) , 结合PD-L1的人单克隆抗体; 度伐单抗 (也称为MEDI4736或IMFINZI™, 阿斯利康公司 (AstraZeneca) / 医学免疫公司 (MedImmune)) , 结合PD-L1的人免疫球蛋白IgG1 κ 单克隆抗体; BMS-936559 (百时美施贵宝公司) , 结合PD-L1的完全人IgG4单克隆抗体; 阿维鲁单抗 (也称为MSB 0010718C或BAVENCIO® , 默克公司 (Merck KGaA) / 辉瑞公司 (Pfizer)) , 结合PD-L1的完全人IgG1单克隆抗体; 和CA-170 (澳瑞基因公司 (Aurigene) / 库里斯公司 (Curis)) , PD-L1的小分子拮抗剂。

[0074] 在一些实施例中, 该PD-1或PD-L1拮抗剂是抗体, 例如人源化抗体或人抗体。如本文使用的, 术语“抗体”是指与特定抗原 (例如PD-L1或PD-1) 特异性结合的免疫球蛋白分子, 并且包括多克隆、单克隆、基因工程化的和用其他方法改造的形式的抗体, 包括但不限于嵌合抗体、人源化抗体、完全人抗体、异源偶联抗体 (例如, 双特异性抗体、双抗体、三抗体和四抗体)、以及抗体的抗原结合片段 (包括例如Fab'、F(ab')₂、Fab、Fv、rIgG和scFv片段)。此外, 除非另有说明, 否则术语“单克隆抗体”意指包括能够特异性结合抗原的完整分子以及抗体片段 (例如像, Fab和F(ab')₂片段)。抗体可包括来自任何免疫球蛋白 (例如IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4亚型、IgA (包括IgA1和IgA2)、IgE、IgD或IgM) 的免疫球蛋白恒定结构域。

[0075] CTLA-4的拮抗剂

[0076] 在一些方面, 本公开涉及细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA-4) 的拮抗剂及其在本文所述的组合物和方法中的用途。

[0077] 如本文使用的CTLA-4拮抗剂是一种例如通过与CTLA-4结合而抑制或阻止CTLA-4活性的药剂。CTLA-4拮抗剂可降低在细胞或生物体中的CTLA-4活性, 例如, 与未暴露在CTLA-4拮抗剂下的细胞或生物体相比降低5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或100%。CTLA-4 (也称为CTLA4和CD152) 是属于免疫球蛋白超家族的细胞表面受体并且在T细胞上表达。人CTLA-4是由基因CTLA4 (Genbank Entrez ID 1493) 编码的。CTLA-4作为免疫检查点起作用并且例如通过向T细胞传递抑制信号来负调节免疫应答。

[0078] CTLA-4活性可能受到选择性结合CTLA-4并阻断CTLA-4活性的抗体的干扰。CTLA-4的活性还可被除结合CTLA-4的抗体之外的分子抑制或阻断。此类分子包括蛋白质 (例如融合蛋白)、小分子和肽, 例如, 结合CTLA-4但不活化CTLA-4的CD80或CD86的肽模拟物。结合并降解或抑制编码CTLA-4的DNA或mRNA的药剂也可充当CTLA-4拮抗剂。实例包括抗CTLA-4siRNA和抗CTLA-4反义寡核苷酸。

[0079] 示例性CTLA-4拮抗剂包括在以下文献中描述的那些: PCT公开号WO 2001/014424、WO 2012/118750, 欧洲专利号EP 1212422B1, 美国专利号5,811,097、5,855,887、6,051,227、6,984,720、7,034,121、7,824,679、8,017,114、8,475,790、8,318,916、8,685,394, 美国公开号2002/0039581、2005/0201994和2009/0117037, 将全部这些公开通过引用并入本文。其他示例性CTLA-4拮抗剂描述于Hurwitz等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国科学院院报], 95 (17) :10067-10071 (1998); Camacho等人, J. Clin. Oncology [临床肿瘤学杂志], 22 (145) : 文摘号2505 (2004) (抗体CP-675206); Mokyr等人, Cancer Res. [癌症研究], 58: 5301-5304 (1998); 以及Lipson和Drake, Clin Cancer Res [临床癌症研究]; 17 (22) 2011年11月15日, 将全部这些文献以其全文通过引用并入本文。

[0080] 示例性CTLA-4拮抗剂包括: 伊匹单抗 (YERVOY® , 百时美施贵宝公司) , 其是针

对CTLA-4的重组人IgG1单克隆抗体;和曲美木单抗/CP-675,206(阿斯利康公司;医学免疫公司;辉瑞公司),其是针对CTLA-4的人IgG2单克隆抗体。

[0081] 在一些实施例中,该CTLA-4拮抗剂是抗体,例如人源化抗体或人抗体。该CTLA-4抗体可是任何类型的抗体,包括多克隆、单克隆、基因工程化的和用其他方法改造的形式的抗体,包括但不限于嵌合抗体、人源化抗体、完全人抗体、异源偶联抗体(例如,双特异性抗体、双抗体、三抗体、和四抗体)、以及抗体的抗原结合片段(包括例如Fab'、F(ab')₂、Fab、Fv、rIgG和scFv片段)。

[0082] 治疗方法和药物组合物

[0083] 在一些方面,本公开涉及治疗方法,例如治疗癌症或癌前病变的方法。在一些实施例中,该方法包括a)向患有癌症或癌前病变的受试者给予有效量的如本文所描述的原代细胞衍生的生物制剂(例如,包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ);和b)向该受试者给予有效量的如本文所描述的PD-L1或PD-1的拮抗剂。在一些实施例中,该方法包括a)向患有癌症或癌前病变的受试者给予有效量的如本文所描述的原代细胞衍生的生物制剂(例如,包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ);和b)向该受试者给予有效量的如本文所描述的CTLA-4的拮抗剂。在一些实施例中,该方法包括a)向患有癌症或癌前病变的受试者给予有效量的如本文所描述的原代细胞衍生的生物制剂(例如,包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ);和b)向该受试者给予有效量的如本文所描述的CTLA-4的拮抗剂和有效量的如本文所描述的PD-L1或PD-1的拮抗剂。

[0084] 在一些实施例中,给予该原代细胞衍生的生物制剂和该PD-L1或PD-1拮抗剂和/或该CTLA-4拮抗剂发生在不同的时间(例如,其中将该原代细胞衍生的生物制剂和该PD-L1或PD-1拮抗剂和/或该CTLA-4拮抗剂作为单独的组合物给予,并且至少一次给予该原代细胞衍生的生物制剂发生在与至少一次给予该PD-L1或PD-1拮抗剂和/或该CTLA-4拮抗剂不同的时间)和/或在受试者的不同部位给予(例如,通过不同的给药途径,其中将该原代细胞衍生的生物制剂和该PD-L1或PD-1拮抗剂和/或该CTLA-4拮抗剂作为不同的组合物给予)。在该方法的一些实施例中,当该PD-L1或PD-1拮抗剂和该CTLA-4拮抗剂组合使用时,一起给予该PD-L1或PD-1拮抗剂和该CTLA-4拮抗剂。在一些实施例中,在不同的时间给予该PD-L1或PD-1拮抗剂和该CTLA-4拮抗剂。

[0085] 在一些实施例中,该原代细胞衍生的生物制剂和该PD-L1或PD-1拮抗剂和/或该CTLA-4拮抗剂在同一天但是在受试者的不同部位给予(例如,通过不同的给予途径,其中将该原代细胞衍生的生物制剂和该PD-L1或PD-1拮抗剂和/或该CTLA-4拮抗剂作为不同的组合物给予)。在一些实施例中,静脉内或口服给予该PD-L1或PD-1拮抗剂。在一些实施例中,静脉内给予该CTLA-4拮抗剂。在一些实施例中,经皮下地、经外淋巴(例如,通过皮下注射或导管插入术进入淋巴结周围组织)、通过导管、结内地、癌周地、或瘤内给予该原代细胞衍生的生物制剂。在一些实施例中,经外淋巴或结内给予该原代细胞衍生的生物制剂至以下淋巴结床的一个或多个中:腋、颈、锁骨上、锁骨下、三角肌、腹股沟、股骨、纵隔、胸肌下、内乳、和/或腹膜后淋巴结床。

[0086] 在一些实施例中,在至少一个剂量的PD-L1或PD-1拮抗剂之前给予至少一个剂量的原代细胞衍生的生物制剂。在一些实施例中,在至少一个剂量的CTLA-4拮抗剂之前给予至少一个剂量的原代细胞衍生的生物制剂。在一些实施例中,在至少一个剂量的CTLA-4拮

抗剂和至少一个剂量的PD-L1或PD-1拮抗剂之前给予至少一个剂量的原代细胞衍生的生物制剂。在一些实施例中,在至少一个剂量的PD-L1或PD-1拮抗剂之后给予至少一个剂量的原代细胞衍生的生物制剂。在一些实施例中,在至少一个剂量的CTLA-4拮抗剂之后给予至少一个剂量的原代细胞衍生的生物制剂。在一些实施例中,在至少一个剂量的CTLA-4拮抗剂和至少一个剂量的PD-L1或PD-1拮抗剂之后给予至少一个剂量的原代细胞衍生的生物制剂。在一些实施例中,给予该原代细胞衍生的生物制剂发生在该PD-L1或PD-1拮抗剂之前和之后。在一些实施例中,给予该原代细胞衍生的生物制剂发生在该CTLA-4拮抗剂之前和之后。在一些实施例中,给予该原代细胞衍生的生物制剂发生在该CTLA-4拮抗剂和该PD-L1或PD-1拮抗剂之前和之后。在一些实施例中,给予该PD-L1或PD-1拮抗剂发生在该原代细胞衍生的生物制剂之前和之后。在一些实施例中,给予该CTLA-4拮抗剂发生在该原代细胞衍生的生物制剂之前和之后。在一些实施例中,给予该CTLA-4拮抗剂和该PD-L1或PD-1拮抗剂发生在该原代细胞衍生的生物制剂之前和之后。

[0087] 在一些实施例中,该原代细胞衍生的生物制剂和该PD-L1或PD-1拮抗剂和/或该CTLA-4拮抗剂的给予发生多个周期。在一些实施例中,给予该原代细胞衍生的生物制剂持续一个或多个长达10天(例如,4、5或10天)的周期,例如每天给予一次,持续长达10天(例如,每天一次,持续4、5或10天),其中这些天是连续的或可以包括未递送该生物制剂的一天或多(例如1、2、3、4、或5)天(例如周末期间)。在一些实施例中,该一个或多个长达10天的周期是一个或多个涉及多种药剂的21天周期的一部分。在一些实施例中,对于每个21天的周期,在第1天给予环磷酰胺(例如,静脉内,300mg/m²);每天给予吡哌美辛(例如,25mg,口服,每天三次)、奥美拉唑(例如,20mg,口服)和锌(例如,15至30mg,口服),持续21天;并且从每个周期的第4天开始,每天给予如本文所描述的原代细胞衍生的生物制剂(例如,包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ),持续4、5或10天(例如,连续地,或以中间间隔一天或多天的、连续日的两个区段)。示例性的剂量方案示于下表中。

[0088] 如本文所描述的原代细胞衍生的生物制剂的示例性21天剂量方案

[0089]

药剂	剂量	给予途径	治疗天数
环磷酰胺	300 mg/m ²	IV	1
吡哌美辛	25 mg TID (每天三次)	口服	1-21
含锌的多种维生素	含 15 至 30 mg 锌的 1 片	口服	1-21
奥美拉唑	20 mg	口服	1-21

[0090]

原代细胞衍生的生物制剂（例如，IRX-2）	剂量定义为230 IU 的在生物制剂中的IL-2, 每天给予（双侧注射115 IU 的IL-2）	在癌症区域的淋巴结处或附近皮下注射	在第4天与第15天之间的任何十天
-----------------------	--	-------------------	------------------

[0091] 在一些实施例中,给予该PD-L1或PD-1拮抗剂持续一个或多个二至四周的周期,其中该拮抗剂的给予在每个周期中每二至四周发生一次或每天发生一次(例如,每个周期中每两周一次、每三周一次、每四周一次或每天一次)。在一些实施例中,给予该CTLA-4拮抗剂持续一个或多个三至十二周的周期,其中该拮抗剂的给予每三周至十二周发生一次(例如,每三周一次、每四周一次、每八周一次或每十二周一次)。

[0092] 在一些实施例中,本文所述的方法利用一种剂量方案,在该剂量方案中,给予该原代细胞衍生的生物制剂持续如上所述的长达10天的周期(任选地作为以上描述的21天周期的一部分)并且给予该PD-L1或PD-1拮抗剂持续如上所述的二至四周的周期,其中重复该剂量方案至少一次(例如,每年重复1、2、3或4次)。在该方案的一些实施例中,在该PD-L1或PD-1拮抗剂之前给予该原代细胞衍生的生物制剂。在该方案的其他实施例中,在该原代细胞衍生的生物制剂之前给予该PD-L1或PD-1拮抗剂。

[0093] 在一些实施例中,本文所述的方法利用一种剂量方案,在该剂量方案中,给予该原代细胞衍生的生物制剂持续如上所述的长达10天的周期(任选地作为以上描述的21天周期的一部分)并且给予该CTLA-4拮抗剂持续如上所述的三至十二周的周期,其中重复该剂量方案至少一次(例如,每年重复1、2、3或4次)。在该方案的一些实施例中,在该CTLA-4拮抗剂之前给予该原代细胞衍生的生物制剂。在该方案的其他实施例中,在该原代细胞衍生的生物制剂之前给予该CTLA-4拮抗剂。

[0094] 在一些实施例中,本文所述的方法利用一种剂量方案,在该剂量方案中,给予该原代细胞衍生的生物制剂持续如上所述的长达10天的周期(任选地作为以上描述的21天周期的一部分),给予该CTLA-4拮抗剂持续如上所述的三至十二周的周期,并且给予该PD-L1或PD-1拮抗剂持续如上所述的二至四周的周期,其中重复该剂量方案至少一次(例如,每年重复1、2、3或4次)。在该方案的一些实施例中,在该CTLA-4拮抗剂和PD-L1或PD-1拮抗剂之前给予该原代细胞衍生的生物制剂。在该方案的其他实施例中,在该原代细胞衍生的生物制剂之前给予该CTLA-4拮抗剂和PD-L1或PD-1拮抗剂。

[0095] 在本文提供的方法中任何一种的一些实施例中,该方法进一步包括给予另外的药剂。在一些实施例中,该另外的药剂是化学抑制剂,该化学抑制剂选自下组,该组由以下组成:烷化剂(例如,环磷酰胺)、抗代谢物、抗生素和免疫调节剂。在一些实施例中,该另外的药剂是NSAID,该NSAID选自下组,该组由以下组成:吲哚美辛、布洛芬、塞来昔布、罗非考昔及其组合。在一些实施例中,该另外的药剂是锌。在一些实施例中,该另外的药剂是环磷酰胺、吲哚美辛和锌的组合。

[0096] 药剂的“有效量”通常是指足以引发所希望的生物响应(例如治疗该病症)的量。如

本领域普通技术人员所理解的, 本文所述药剂的有效量可以根据诸如所治疗的病症、给予方式以及受试者的年龄、身体组成和健康等因素而变化。有效量可以涵盖改进整体疗法、减少或避免该病症的症状或病因、或增强另一种治疗剂的治疗功效的量。

[0097] 对于癌症的治疗, 有效量是足以在癌症治疗中提供治疗益处 (例如减缓、停止或逆转癌细胞的生长和/或杀死癌细胞)、或者减少或消除一种或多种与癌症相关的症状的量。

[0098] 在一些实施例中, 原代细胞衍生的生物制剂的有效量是足以增加受试者的肿瘤中的PD-L1表达水平的量和/或足以实现和/或增强如本文所述的PD-1或PD-L1拮抗剂的治疗功效的量。在一些实施例中, 原代细胞衍生的生物制剂的有效量是足以增加受试者的肿瘤中的CTLA-4表达水平的量和/或足以实现和/或增强如本文所述的CTLA-4拮抗剂的治疗功效的量。在一些实施例中, 原代细胞衍生的生物制剂的有效量是足以增加受试者的肿瘤中的PD-L1和CTLA-4表达水平的量和/或足以实现和/或增强如本文所述的PD-1或PD-L1拮抗剂和CTLA-4拮抗剂的治疗功效的量。

[0099] 抗体 (例如抗PD-1和抗PD-L1抗体) 的示例性有效量包括每1-4周0.01mg/kg至20mg/kg。抗体 (例如抗CLTA-4抗体) 的其他示例性有效量包括每3-12周3mg/kg至15mg/kg。在实施例中, 只要该疾病 (例如癌症) 持续存在, 就持续就行这样的给予。示例性PD-1和PD-L1拮抗剂以及CLTA-4的剂量方案和给予途径的实例示于下表中并且预期用于本文所述的任何方法中。

[0100]

PD-1 拮抗剂	剂量方案 (例如给药的量和时间)	给予途径
纳武单抗 (OPDIVO®)	3 mg/kg 每 2 周一次, 或 240 mg 每 2 周一次	经 60 分钟静脉输注
皮立珠单抗 (CT-011)	1.5、3 mg/kg 或 6 mg/kg, 每 2 周一次或每月一次	经 2 小时静脉输注
派姆单抗 (KEYTRUDA®)	2 mg/kg 每 3 周一次, 或 200 mg 每 3 周一次	经 30 分钟静脉输注
MEDI-0680	每两周一次, 持续一年	静脉输注
REGN2810	3 mg/kg, 每两周一次	经 30 分钟静脉输注
AMP-224	高达 10 mg/kg, 每两周一次	静脉输注
PD-L1 拮抗剂	剂量方案 (给药的量和时间)	给予途径
阿特珠单抗 (TECENTRIQ™)	1200 mg, 每三周一次	经 60 分钟静脉输注
度伐单抗 (IMFINZI™)	10 mg/kg 每两周一次, 或 1500 mg 每 14、21 或 28 天一次	经 1 小时静脉输注
BMS-936559	0.3、1、3 或 10 mg/kg (任选地作为递增方案), 每两周一次	静脉输注
阿维鲁单抗 (BAVENCIO®)	10 mg/kg 或 5 mg/kg, 每两周一次	经 60 分钟静脉输注
CA-170	每天一次, 持续 21 天	口服

[0101]

CTLA-4 拮抗剂	剂量方案 (给药的量和时间)	给予途径
伊匹单抗 (YERVOY®)	3 mg/kg, 每三周一次 (例如, 总计高达四个剂量)	经 90 分钟静脉输注
曲美木单抗	15 mg/kg 或 75 mg, 每 4、8 或 12 周一次 (例如, 总计高达四个剂量)	静脉输注

[0102] 在一些实施例中, 递送至受试者的该原代细胞衍生的生物制剂的量包含各自至少 1IU (例如, 至少 1IU、至少 2IU 或至少 3IU) 的 IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8 和 TNF- α 、以及 IFN- γ , 例如, 人 IL-1 β 、人 IL-2、人 IL-6、人 IL-8、人 TNF- α 和人 IFN- γ 。在一些实施例中, 该原代细胞衍生的生物制剂进一步包含 GM-CSF 和 G-CSF, 例如人 GM-CSF 和人 G-CSF, 并且递送至受试者的

该原代细胞衍生的生物制剂的量包含至少0.05IU(例如,至少0.05IU、至少0.1IU或至少1IU)的GM-CSF和至少1IU(例如,至少1IU、至少2IU或至少3IU)的G-CSF。在一些实施例中,递送至受试者的该原代细胞衍生的生物制剂的量包含22-657IU(例如,30-147IU)的IL-1 β ,例如人IL-1 β ;29-478IU(例如,67-156IU)的IL-2,例如人IL-2;10-185IU(例如,13-53IU)的IFN- γ ,例如人IFN- γ ;29-600IU(例如,36-150IU)的TNF- α ,例如人TNF- α ;34-2,895IU(例如,89-524IU)的IL-6,例如人IL-6;和5-244IU(例如,10-64IU)的IL-8,例如人IL-8。在一些实施例中,该原代细胞衍生的生物制剂进一步包含GM-CSF和G-CSF,例如人GM-CSF和人G-CSF,并且递送至受试者的该原代细胞衍生的生物制剂的量包含7-456IU(例如7-84IU)的G-CSF和0.08-28IU(例如2-6IU)的GM-CSF。

[0103] 在一些实施例中,递送至受试者的该原代细胞衍生的生物制剂的量包含相对于该原代细胞衍生的生物制剂中存在的IL-2的量的一定比例的各种细胞因子。在一些实施例中,递送至受试者的该原代细胞衍生的生物制剂的量包含IL-1 β IU(例如,人IL-1 β IU)与IL-2IU(例如,人IL-2IU)的比例为0.45至1.37(例如,0.45至0.94);IFN- γ IU(例如,人IFN- γ IU)与IL-2IU(例如,人IL-2IU)的比例为0.19至0.39(例如,0.19至0.34);TNF- α IU(例如,人TNF- α IU)与IL-2IU(例如,人IL-2IU)的比例为0.53至1.26(例如,0.53至0.96);IL-6IU(例如,人IL-6IU)与IL-2IU(例如,人IL-2IU)的比例为1.16至6.06(例如,1.32至3.35);和IL-8IU(例如,人IL-8IU)与IL-2IU(例如,人IL-2IU)的比例为0.15至0.51(例如,0.15至0.41)。在一些实施例中,该原代细胞衍生的生物制剂进一步包含GM-CSF和G-CSF,例如人GM-CSF和人G-CSF,并且递送至受试者的该原代细胞衍生的生物制剂的量包含G-CSF IU(例如,人G-CSF IU)与IL-2IU(例如,人IL-2IU)的比例为0.11至0.95(例如,0.11至0.54)和GM-CSF IU(例如,人GM-CSF IU)与IL-2IU(例如,人IL-2IU)的比例为0.002至0.06(例如,0.03至0.04)。

[0104] 在一些实施例中,如本文所述的原代细胞衍生的生物制剂的有效量包含一浓度范围为22-657IU/mL(例如,30-147IU/mL)的IL-1 β ,例如人IL-1 β ;浓度范围为29-478IU/mL(例如,67-156IU/mL)的IL-2,例如人IL-2;浓度范围为10-185IU/mL(例如,13-53IU/mL)的IFN- γ ,例如人IFN- γ ;浓度范围为29-600IU/mL(例如36-150IU/mL)的TNF- α ,例如人TNF- α ;浓度范围为34-2,895IU/mL(例如89-524IU/mL)的IL-6,例如人IL-6;浓度范围为5-244IU/mL(例如10-64IU/mL)的IL-8,例如人IL-8。在一些实施例中,该原代细胞衍生的生物制剂进一步包含GM-CSF和G-CSF,例如人GM-CSF和人G-CSF,并且有效量的原代细胞衍生的生物制剂进一步包含浓度范围为7-456IU/mL(例如,7-84IU/mL)的G-CSF和浓度范围为0.08-28IU/mL(例如,2-6IU/mL)的GM-CSF。在一些实施例中,有效量的如本文所述的原代细胞衍生的生物制剂包含浓度范围为300-1,400pg/mL的IL-1 β ,例如人IL-1 β ;浓度范围为4,000-8,000pg/mL的IL-2,例如人IL-2;浓度范围为1,000-3,800pg/mL的IFN- γ ,例如人IFN- γ ;以及浓度范围为1,000-4,300pg/mL的TNF- α ,例如人TNF- α 。

[0105] 在一些实施例中,递送至受试者的该原代细胞衍生的生物制剂的量包含220-6,700pg(例如,310-1,500pg)的IL-1 β ,例如人IL-1 β ;1,730-28,100pg(例如,3,960-9,200pg)的IL-2,例如人IL-2;560-10,900pg(例如,750-3,100pg)的IFN- γ ,例如人IFN- γ ;580-12,000pg(例如,720-3,000pg)的TNF- α ,例如人TNF- α ;260-22,100pg(例如,680-4,000pg)的IL-6,例如人IL-6;和4,610-243,600pg(例如,10,390-63,800pg)的IL-

8, 例如人IL-8。在一些实施例中, 该原代细胞衍生的生物制剂进一步包含GM-CSF和G-CSF, 例如人GM-CSF和人G-CSF, 并且递送至受试者的该原代细胞衍生的生物制剂的量包含60-3, 800pcg (例如, 60-700pcg) 的G-CSF和10⁻³, 500pcg (例如, 250-800pcg) 的GM-CSF。

[0106] 在一些实施例中, 有效量的如本文所述的原代细胞衍生的生物制剂包含浓度范围为220-6, 700pcg/mL (例如, 310-1, 500pcg/mL) 的IL-1 β , 例如人IL-1 β ; 浓度范围为1730-28, 100pcg/mL (例如3, 960-9, 200pcg/mL) 的IL-2, 例如人IL-2; 浓度范围为560-10, 900pcg/mL (例如750-3, 100pcg/mL) 的IFN- γ , 例如人IFN- γ ; 浓度范围为580-12, 000pcg/mL (例如720-3, 000pcg/mL) 的TNF- α , 例如人TNF- α ; 浓度范围为260-22, 100pcg/mL (例如680-4, 000pcg/mL) 的IL-6, 例如人IL-6; 浓度范围为4, 610-243, 600pcg/mL (例如10, 390-63, 800pcg/mL) 的IL-8, 例如人IL-8。在一些实施例中, 该原代细胞衍生的生物制剂进一步包含GM-CSF和G-CSF, 例如人GM-CSF和人G-CSF, 并且有效量的原代细胞衍生的生物制剂进一步包含浓度范围为60-3, 800pcg/mL (例如, 60-700pcg/mL) 的G-CSF和浓度范围为10⁻³, 500pcg/mL (例如, 250-800pcg/mL) 的GM-CSF。

[0107] 本文所述的任何药剂 (例如, 如本文所述的原代细胞衍生的生物制剂、PD-1/PD-L1拮抗剂、或CTLA-4拮抗剂) 可以被配制为药物组合物。术语“药物组合物”是指呈使得活性成分的生物活性有效的形式的制剂。在一些实施例中, 药物组合物包含如本文所述的药剂 (例如, 如本文所述的原代细胞衍生的生物制剂、PD-1/PD-L1拮抗剂、或CTLA-4拮抗剂) 和药学上可接受的载体。如本文使用的, “药学上可接受的载体”包括当与活性成分组合时允许该成分保持生物活性并且与受试者的免疫系统不反应的任何材料。实例包括但不限于任何标准药物载体, 例如磷酸盐缓冲盐水溶液、水、白蛋白、乳剂 (例如油/水乳剂) 和各种类型的润湿剂。用于气溶胶给予或肠胃外给予的优选的稀释剂是磷酸盐缓冲盐水、生理盐水 (0.9%)、或5%右旋糖。通过众所周知的常规方法配制包含此类载体的组合物 (参见, 例如, Remington, The Science and Practice of Pharmacy [药物科学与实践] 第20版 Mack Publishing [麦克出版公司], 2000)。

[0108] 本文所述的任何药剂 (例如, 原代细胞衍生的生物制剂、PD-1/PD-L1拮抗剂、或CTLA-4拮抗剂) 可以根据所治疗的具体病症的需要通过任何合适的途径给予。例如, 本文所述的药剂 (例如, 如本文所述的原代细胞衍生的生物制剂、PD-1/PD-L1拮抗剂、或CTLA-4拮抗剂) 可以通过肠胃外 (例如, 静脉内、动脉内、腹膜内、鞘内、心室内、尿道内、胸骨内、颅内、肌肉内、骨内、结内、真皮内和皮下)、癌周、瘤内或口服给予。在一些实施例中, 将如本文所述的原代细胞衍生的生物制剂给予到淋巴结内或淋巴结附近, 例如通过外淋巴注射 (例如皮下注射或导管插入术) 到受试者中的肿瘤区域的引流淋巴结附近的组织。在一些实施例中, 经皮下地、通过导管、结内地、癌周地、或经外淋巴给予该原代细胞衍生的生物制剂。在一些实施例中, 经外淋巴或结内给予该原代细胞衍生的生物制剂至以下淋巴结床的一个或多个中: 腋、颈、锁骨上、锁骨下、三角肌、腹股沟、股骨、纵隔、胸肌下、内乳、和/或腹膜后淋巴结床。在一些实施例中, 静脉内或口服给予如本文所描述的PD-1/PD-L1拮抗剂。在一些实施例中, 静脉内给予如本文所描述的CTLA-4拮抗剂。然而, 应理解的是, 本文所描述的药剂 (例如, 如本文所描述的原代细胞衍生的生物制剂、PD-1/PD-L1拮抗剂、或CTLA-4拮抗剂) 的给予途径可根据所治疗的受试者的类型、所治疗的疾病 (例如, 癌症的类型)、以及疾病的严重程度而变化。

[0109] 在本文所描述的方法中的任何一种的一些实施例中,原代细胞衍生的生物制剂和/或PD-1/PD-L1拮抗剂是作为新辅助疗法(例如,在手术之前)、辅助疗法(例如,在手术之后)、或作为用于已确定的、复发的或转移性疾病的治疗给予的。在本文所描述的方法中的任何一种的一些实施例中,原代细胞衍生的生物制剂和/或CTLA-4拮抗剂是作为新辅助疗法(例如,在手术之前)、辅助疗法(例如,在手术之后)、或作为用于已确定的、复发的或转移性疾病的治疗给予的。在本文所描述的方法中的任何一种的一些实施例中,原代细胞衍生的生物制剂、CTLA-4拮抗剂和PD-1/PD-L1拮抗剂是作为新辅助疗法(例如,在手术之前)、辅助疗法(例如,在手术之后)、或作为用于已确定的、复发的或转移性疾病的治疗给予的。

[0110] 选择受试者或评估可能性的方法

[0111] 本公开的其他方面涉及评估或选择的方法。在一些实施例中,提供了选择进行治疗的受试者的方法。在一些实施例中,该方法包括a)测定从受试者获得的肿瘤样本中的PD-L1和/或CTLA-4水平,该受试者患有癌症或癌前病变并且已被给予如本文所描述的原代细胞衍生的生物制剂(例如,包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ);和b)如果肿瘤样本中的PD-L1水平高于PD-L1的阈值水平,则向该受试者给予有效量的如本文所描述的PD-L1或PD-1拮抗剂,和/或如果肿瘤样本中的CTLA-4水平高于CTLA-4的阈值水平,则向该受试者给予有效量的如本文所描述的CTLA-4拮抗剂。在一些实施例中,该方法进一步包括在测定步骤之前向受试者给予原代细胞衍生的生物制剂。在一些实施例中,PD-L1和/或CTLA-4的水平是蛋白水平。在一些实施例中,PD-L1和/或CTLA-4的水平是mRNA水平。

[0112] 在一些实施例中,提供了评估受试者对PD-L1或PD-1拮抗剂和/或CTLA-4拮抗剂有响应的可能性的方法。在一些实施例中,该方法包括a)向患有表达低于PD-L1和/或CTLA-4的阈值水平的第一PD-L1和/或CTLA-4水平的癌症或癌前病变的受试者给予本文所描述的原代细胞衍生的生物制剂(例如,包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ);和(b)在给予原代细胞衍生的生物制剂之后测定受试者的肿瘤样本中的第二PD-L1和/或CTLA-4水平,其中高于PD-L1和/或CTLA-4的阈值水平的第二PD-L1和/或CTLA-4水平指示该受试者将对PD-L1拮抗剂和/或CTLA-4拮抗剂有响应。

[0113] 本文考虑了任何适当的阈值水平。在一些实施例中,该阈值水平是在给予如本文所描述的原代细胞衍生的生物制剂(例如,包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 、和IFN- γ)之前,来自受试者的肿瘤样本中的PD-L1水平(例如,细胞膜(例如肿瘤细胞膜、免疫浸润细胞膜、和/或基质细胞膜)上的PD-L1蛋白水平)和/或CTLA-4水平。因此,在一些实施例中,该方法进一步包括通过在给予如本文所描述的原代细胞衍生的生物制剂(例如,包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 、和IFN- γ)之前测量来自受试者的肿瘤样本中的PD-L1和/或CTLA-4水平(例如,由肿瘤样本中的肿瘤细胞表达的PD-L1水平,和/或由肿瘤样本中的浸润性免疫细胞表达的PD-L1和/或CTLA-4水平)来测定该阈值水平。在一些实施例中,该阈值水平是预先定义的PD-L1和/或CTLA-4水平。在一些实施例中,该阈值水平是在一组受试者(例如,一组患有癌症或癌前病变、不对PD-L1或PD-1拮抗剂和/或CTLA-4拮抗剂有响应的受试者)中的水平。在一些实施例中,该阈值水平为不存在PD-L1和/或CTLA-4,例如,肿瘤样本中不存在PD-L1和/或CTLA-4。在一些实施例中,该阈值水平是用于测量PD-L1和/或CTLA-4水平的测定法的可变性的基础标准偏差。在一些实施例中,PD-L1的阈值水平是肿瘤样本中的49%活肿瘤细胞的部分或完全细胞膜染色。先前描述了这样的阈值水平(Garon等人N Engl

J Med. [新英格兰医学杂志] 2015年5月21日; 372 (21) : 2018-28) 并且其可以使用例如可商购的PD-L1 IHC 22C3 pharmDx试剂盒 (达科公司 (Dako), 产品编号SK00621) 进行测定。在一些实施例中, 该阈值水平是阴性对照样本 (例如已知对PD-L1为阴性的组织或细胞, 例如扁桃体组织样本的内皮、成纤维细胞和表面上皮; 和/或已知对CTLA-4为阴性的组织或细胞, 例如非淋巴组织) 中的PD-L1和/或CTLA-4水平。

[0114] 在本文所描述的任何方法的一些实施例中, 使用一种测定法测量PD-L1的水平 (例如, PD-L1 mRNA的水平或PD-L1蛋白的水平) 和/或CTLA-4的水平 (例如, CTLA-4 mRNA的水平或CTLA-4蛋白的水平)。预期任何合适的测定法用于检测PD-L1和/或CTLA-4的水平。示例性测定法例如公开于Current Protocols in Molecular Biology [分子生物学实验指南], Wiley Online Library [威利在线图书馆] 和其他类似的方案数据库中。用于检测PD-L1和/或CTLA-4 mRNA水平的示例性测定法包括RNA印迹、核酸酶保护测定、原位杂交、RT-qPCR、微阵列分析、多重RNA表达分析 (例如, MultiOmyx™ 或使用可购于Nanostring Technologies® 或Illumina® 的基于条码的产品) 和RNA测序 (RNA-seq)。用于检测PD-L1和/或CTLA-4蛋白水平的示例性测定法包括免疫组织化学测定、流式细胞术、多重蛋白测定 (例如, MultiOmyx™) 或利用例如对PD-L1具有特异性的抗体 (例如, 可购于达科公司的单克隆小鼠抗PD-L1, 即克隆22C3) 或对CTLA-4具有特异性的抗体的蛋白质印迹测定。在一些实施例中, 该测定法是免疫组织化学测定, 其可以使用试剂盒进行, 例如PD-L1 IHC 22C3 pharmDx试剂盒 (达科公司, 产品编号SK00621)。在进行选择或评估的方法中任何一种的一些实施例中, 该肿瘤样本是福尔马林固定的样本。例如, 肿瘤样本是福尔马林固定和石蜡包埋的, 将该样本切片, 将这些切片用PD-L1的单克隆抗体 (例如, 22C3小鼠单克隆抗体) 和/或CTLA-4的单克隆抗体进行DAB (3,3'-二氨基联苯胺) 染色并且用苏木精复染, 并且将这些切片固定在载玻片上用于评估。在另一实例中, 肿瘤样本是福尔马林固定和石蜡包埋的, 将该样本切片, 将这些切片用PD-L1和/或CTLA-4的单克隆抗体进行荧光染色, 并且例如使用PerkinElmer OPAL™ 系统分析这些切片。在另一实例中, 肿瘤样本是福尔马林固定和石蜡包埋的, 将该样本切片, 将这些切片用PD-L1和/或CTLA-4的单克隆抗体进行荧光染色, 任选地结合其他生物标志物的染色, 并且例如使用可购于新基因组学实验室 (NeoGenomics Laboratories) 的MultiOmyx™ 系统分析这些切片。

[0115] 在进行选择或评估的方法中任何一种的一些实施例中, 如果受试者被选择或者评估表明该受试者可能对如本文所描述的PD-1或PD-L1拮抗剂有响应, 则用如本文所描述的PD-1或PD-L1拮抗剂治疗该受试者。在进行选择或评估的方法中任何一种的一些实施例中, 如果受试者被选择或者评估表明该受试者可能对如本文所描述的CTLA-4拮抗剂有响应, 则用如本文所描述的CTLA-4拮抗剂治疗该受试者。

[0116] 受试者

[0117] 本文所描述的方法使用受试者, 例如患有或疑似患有癌症或癌前病变的受试者。在一些实施例中, 该受试者是哺乳动物受试者, 例如患有或疑似患有癌症或癌前病变的人受试者。其他示例性受试者包括非人灵长类动物、猪、马、绵羊、牛、兔、狗、猫、大鼠和小鼠。

[0118] 在一些实施例中, 该受试者具有表达一定水平的PD-L1的肿瘤。在一些实施例中, 该肿瘤不表达PD-L1。在一些实施例中, 该肿瘤表达低于如本文所描述的阈值水平的PD-L1水平 (例如, 肿瘤样本中的49%活肿瘤细胞的部分或完全细胞膜染色)。

[0119] 在一些实施例中,该受试者具有包含浸润性免疫细胞的肿瘤,这些浸润性免疫细胞表达一定水平的PD-L1和/或CTLA-4。在一些实施例中,这些浸润性免疫细胞不表达PD-L1和/或CTLA-4。

[0120] 在一些实施例中,该受试者是患有癌症的受试者,例如患有癌症的人受试者。在一些实施例中,该癌症选自下组,该组由以下组成:黑色素瘤、肺癌(例如非小细胞肺癌(NSCLC)或小细胞肺癌(SCLC))、肾细胞癌(RCC)、前列腺癌、卵巢癌、结肠直肠癌(CRC)、肾癌、胃癌、乳腺癌、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、血液恶性肿瘤(例如,急性骨髓性白血病(AML)、多发性骨髓瘤(MM)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤)、胰腺癌、膀胱癌、头颈部鳞状细胞癌(H&NSCC,也称为SCCHN)、泌尿生殖癌、晚期皮肤性鳞状细胞癌、肝转移癌、间皮瘤、胃食管癌、梅克尔细胞癌和尿路上皮癌。在一些实施例中,该PD-1或PD-L1拮抗剂选自下表,并且该癌症是下表中针对所选的PD-1或PD-L1拮抗剂的癌症。在一些实施例中,该CTLA-4拮抗剂选自下表,并且该癌症是下表中针对所选的CTLA-4拮抗剂的癌症。

[0121]

PD-1 拮抗剂	示例性癌症
纳武单抗 (OPDIVO®)	黑色素瘤、非小细胞肺癌 (NSCLC)、肾细胞癌 (RCC)、前列腺癌、霍奇金淋巴瘤、卵巢癌、结肠直肠癌 (CRC)、泌尿生殖癌、肾癌、胃癌、三阴性乳腺癌
皮立珠单抗 (CT-011)	黑色素瘤、滤泡性淋巴瘤 (FL)、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL)、血液恶性肿瘤 (AML、NHL、MM、CLL、霍奇金淋巴瘤)、胰腺癌
派姆单抗 (KEYTRUDA®)	黑色素瘤、NSCLC、膀胱癌、霍奇金淋巴瘤、乳腺癌、胃癌、头颈部鳞状细胞癌 (SCCHN)、泌尿生殖癌、尿路上皮癌
MEDI-0680	黑色素瘤、透明细胞 RCC、B 细胞淋巴瘤
REGN2810	晚期皮肤性鳞状细胞癌、淋巴瘤
AMP-224	恶性实体瘤或皮肤 T 细胞淋巴瘤、黑色素瘤、卵巢癌、结肠直肠癌
PD-L1 拮抗剂	示例性癌症
阿特珠单抗 (TECENTRIQ™)	黑色素瘤、NSCLC、SCLC、RCC、膀胱癌、乳腺癌、泌尿生殖癌、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、肾肿瘤、头颈癌、卵巢癌、结肠直肠癌、尿路上皮癌
度伐单抗 (IMFINZI™)	NSCLC、SCCHN、结肠直肠癌、肝转移癌、胃癌、乳腺癌、胰腺癌、间皮瘤、淋巴瘤、肺癌、黑色素瘤、胃食管癌、卵巢癌、尿路上皮癌
BMS-936559	黑色素瘤、NSCLC、RCC、卵巢癌、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、慢性骨髓性白血病
阿维鲁单抗 (BAVENCIO®)	RCC、NSCLC、胃癌、霍奇金淋巴瘤、卵巢癌、尿路上皮癌、梅克尔细胞癌
CA-170	晚期实体瘤、晚期淋巴瘤、黑色素瘤、非小细胞肺癌、肾细胞癌、霍奇金淋巴瘤、三阴性乳腺癌、头颈癌、结肠直肠癌、胃癌、膀胱癌和卵巢癌
CTLA-4 拮抗剂	示例性癌症
伊匹单抗 (YERVOY®)	转移性黑色素瘤、肺癌、前列腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌、尿路上皮癌
曲美木单抗	肺癌、B 细胞淋巴瘤、胃癌、膀胱癌、头颈部鳞状细胞癌、毛细胞白血病、间皮瘤、黑色素瘤、乳腺癌、肾细胞癌、卵巢癌、肝细胞癌、结肠直肠癌

[0122] 在一些实施例中,该受试者是患有癌前病变的受试者,例如患有癌前病变的人受试者。在一些实施例中,该癌前病变选自下组,该组由以下组成:宫颈上皮内瘤样病变(CIN,例如III级CIN)和外阴上皮内瘤样病变(VIN,例如III级VIN)。

[0123] 在一些实施例中,该受试者对治疗(例如,用如本文所描述的PD-1或PD-L1拮抗剂和/或如本文所描述的CTLA-4拮抗剂的治疗)是难治的。如果病症(例如,癌症)对治疗具有抗性或随着时间的推移变得对治疗具有抗性(例如,该受试者对如本文所描述的PD-1或PD-L1拮抗剂和/或CTLA-4拮抗剂有响应并且随着时间的推移变得对拮抗剂具有抗性),则受试者可能对治疗是难治的。在一些实施例中,该受试者在给予如本文所描述的原代细胞衍生的生物制剂之后变得对治疗有响应。

[0124] 试剂盒

[0125] 本公开的其他方面涉及试剂盒,例如适合进行本文所描述的方法(例如,治疗癌症或癌前病变)的试剂盒。在一些实施例中,提供了试剂盒,该试剂盒包含如本文所描述的原代细胞衍生的生物制剂(例如,包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ)和如本文所描述的PD-L1或PD-1的拮抗剂(例如,纳武单抗、皮立珠单抗、派姆单抗、MEDI-0680、REGN2810、AMP-224、阿特珠单抗、度伐单抗、BMS-936559、阿维鲁单抗、或CA-170)。在一些实施例中,提供了试剂盒,该试剂盒包含如本文所描述的原代细胞衍生的生物制剂(例如,包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ)和如本文所描述的CTLA-4的拮抗剂(例如,伊匹单抗或曲美木单抗)。在一些实施例中,提供了试剂盒,该试剂盒包含如本文所描述的原代细胞衍生的生物制剂(例如,包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ)、如本文所描述的PD-L1或PD-1的拮抗剂(例如,纳武单抗、皮立珠单抗、派姆单抗、MEDI-0680、REGN2810、AMP-224、阿特珠单抗、度伐单抗、BMS-936559、阿维鲁单抗、或CA-170)和如本文所描述的CTLA-4的拮抗剂(例如,伊匹单抗或曲美木单抗)。在一些实施例中,该原代细胞衍生的生物制剂在一个或多个第一组容器中提供并且PD-L1或PD-1的拮抗剂和/或CTLA-4的拮抗剂在一个或多个第二组容器中提供。在一些实施例中,该一个或多个第一组容器包含治疗有效量的用于治疗癌症或癌前病变的该原代细胞衍生的生物制剂,并且该一个或多个第二组容器包含治疗有效量的用于治疗癌症或癌前病变的PD-L1或PD-1拮抗剂和/或CTLA-4拮抗剂。在一些实施例中,该一个或多个第一组容器包含浓缩量的该原代细胞衍生的生物制剂,其可被现场稀释用于向受试者给予或可允许更小体积的该原代细胞衍生的生物制剂被给予受试者(例如,治疗有效量的本文所描述的原代细胞衍生的生物制剂可以浓缩两倍、三倍、四倍、五倍、十倍、100倍、1000倍或更多倍)。在一些实施例中,该原代细胞衍生的生物制剂、PD-L1或PD-1的拮抗剂和/或CTLA-4的拮抗剂是冷冻或冻干的。在一些实施例中,该试剂盒进一步包含用于进行如本文所描述的方法(例如,治疗受试者中的癌症或癌前病变)的说明书。在一些实施例中,该试剂盒进一步包含用于给予该原代细胞衍生的生物制剂、PD-L1或PD-1的拮抗剂和/或CTLA-4的拮抗剂的一个或多个递送装置,例如注射器或导管。

[0126] 细胞因子的组合

[0127] 在一些方面,本公开涉及细胞因子的组合(分别给予或一起给予,例如,以细胞因子混合物的形式)例如在如本文所描述的方法或组合物中的用途。细胞因子的组合可以包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、IFN- γ 和TNF- α (例如,人IL-1 β 、人IL-2、人IL-6、人IL-8、人IFN- γ 和人TNF- α),其可包括天然的、重组的或聚乙二醇化的细胞因子或者天然的、重组的或聚乙二醇化的细胞因子的混合物。在一些实施例中,细胞因子的组合可进一步包括其他的天然的、重组的或聚乙二醇化的细胞因子,例如GM-CSF和G-CSF(例如,人GM-CSF和G-CSF)。在一些实施例中,细胞因子可以被聚乙二醇化以增加体内细胞因子的半衰期和/或以减少体

内细胞因子蛋白的免疫原性或毒性(参见,例如,美国专利公开US 2004/0136952)。

[0128] 以下提供了示例性成熟人细胞因子蛋白序列,其可用于产生细胞因子(例如重组的或聚乙二醇化的细胞因子)以包括在细胞因子的组合中。用于产生细胞因子的组合(例如包含天然的、重组的、和/或聚乙二醇化的细胞因子的细胞因子混合物)的方法是本领域已知的(参见,例如,美国专利号4,738,927、4,992,367,美国专利申请公开号US 2004/0136952 A1,以及Mehvar, Modulation of the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Proteins by Polyethylene Glycol Conjugation[聚乙二醇偶联对蛋白质的药代动力学和药效学的调节], J Pharm Pharmaceut Sci[药学与制药科学杂志]3(1):125-136(2000))。

[0129] 人IL-1 β

[0130]

APVRSLNCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALHLQGDMEQQVVF SMSFVQGEESNDKIPVALGL
KEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIEINNKLFEFESAQFPNWYIST
SQAENMPVFLGGTKGGQDITDFTMQFVSS (SEQ ID NO: 1)

[0131] 人IL-2

[0132]

LSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK
KATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADE
TATIVEFLNRWITFCQSIIS (SEQ ID NO: 2)

[0133] 人IL-6

[0134]

VPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYILDGISALRKETCNKSNMCESSKEALAENNLN
LPKMAEKDGC FQSGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNR FESSEEQARAVQMSTKVL IQF
LQKKAKNLD AITTPDPTNASLLTKLQAQNQWLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM
(SEQ ID NO: 3)

[0135] 人IL-8

[0136]

EGAVLPRSAKELRCQCIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKE
NWXQRVVEKFLKRAENS (SEQ ID NO: 4)

[0137] 人IFN- γ

[0138]

QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKD
DQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHEL IQVMAELSPAA
KTGKRKRSQMLFRG (SEQ ID NO: 5)

[0139] 人TNF- α

[0140]

PVAHVVANPQAEGLQWLNRANALLANGVELRDNLVVPSEGLYLIYSQVLFKQGQCPSTH
VLLTHTISRIVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEP IYLGGVFQLEKGDRLSAE
INRPDYLDFAESGQVYFGII (SEQ ID NO: 6)

[0141] 在一些实施例中,细胞因子的组合(其可以分别或一起递送)包含各自至少1IU(例如,至少1IU、至少2IU或至少3IU)的IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8和TNF- α 、以及IFN- γ ,例如,人IL-1 β 、人IL-2、人IL-6、人IL-8、人TNF- α 和人IFN- γ 。在一些实施例中,细胞因子的组合(其可以分别或一起递送)进一步包含GM-CSF和G-CSF,例如人GM-CSF和人G-CSF,并且细胞因子的组合包含至少0.05IU(例如,至少0.05IU、至少0.1IU或至少1IU)的GM-CSF和至少1IU(例如,至少1IU、至少2IU或至少3IU)的G-CSF。

[0142] 在一些实施例中,细胞因子的组合(其可以分别或一起递送)包含相对于递送的IL-2量的一定比例的各细胞因子。在一些实施例中,细胞因子的组合(其可以分别或一起递送)包含IL-1 β IU(例如,人IL-1 β IU)与IL-2IU(例如,人IL-2IU)的比例为0.45至1.37(例如,0.45至0.94);IFN- γ IU(例如,人IFN- γ IU)与IL-2IU(例如,人IL-2IU)的比例为0.19至0.39(例如,0.19至0.34);TNF- α IU(例如,人TNF- α IU)与IL-2IU(例如,人IL-2IU)的比例为0.53至1.26(例如,0.53至0.96);IL-6IU(例如,人IL-6IU)与IL-2IU(例如,人IL-2IU)的比例为1.16至6.06(例如,1.32至3.35);和IL-8IU(例如,人IL-8IU)与IL-2IU(例如,人IL-2IU)的比例为0.15至0.51(例如,0.15至0.41)。在一些实施例中,细胞因子的组合(其可以分别或一起递送)进一步包含GM-CSF和G-CSF,例如人GM-CSF和人G-CSF,并且递送至受试者的细胞因子的组合的量包含G-CSF IU(例如,人G-CSF IU)与IL-2IU(例如,人IL-2IU)的比例为0.11至0.95(例如,0.11至0.54)和GM-CSF IU(例如,人GM-CSF IU)与IL-2IU(例如,人IL-2IU)的比例为0.002至0.06(例如,0.03至0.04)。

[0143] 在一些实施例中,细胞因子的组合(其可以分别或一起递送)包含22-657IU(例如,30-147IU)的IL-1 β ,例如人IL-1 β ;29-478IU(例如,67-156IU)的IL-2,例如人IL-2;10-185IU(例如,13-53IU)的IFN- γ ,例如人IFN- γ ;29-600IU(例如,36-150IU)的TNF- α ,例如人TNF- α ;34-2,895IU(例如,89-524IU)的IL-6,例如人IL-6;和5-244IU(例如,10-64IU)的IL-8,例如人IL-8。在一些实施例中,细胞因子的组合(其可以分别或一起递送)进一步包含GM-CSF和G-CSF,例如人GM-CSF和人G-CSF,并且细胞因子的组合包含7-456IU(例如,7-84IU)的G-CSF和0.08-28IU(例如,2-6IU)的GM-CSF。在一些实施例中,细胞因子的组合(其可以分别或一起递送)包含浓度范围为22-657IU/mL(例如,30-147IU/mL)的IL-1 β ,例如人IL-1 β ;浓度范围为29-478IU/mL(例如,67-156IU/mL)的IL-2,例如人IL-2;浓度范围为10-185IU/mL(例如,13-53IU/mL)的IFN- γ ,例如人IFN- γ ;浓度范围为29-600IU/mL(例如36-150IU/mL)的TNF- α ,例如人TNF- α ;浓度范围为34-2,895IU/mL(例如89-524IU/mL)的IL-6,例如人IL-6;浓度范围为5-244IU/mL(例如10-64IU/mL)的IL-8,例如人IL-8。在一些实施例中,细胞因子的组合(其可以分别或一起递送)进一步包含GM-CSF和G-CSF,例如人GM-CSF和人G-CSF,并且细胞因子的组合包含浓度范围为7-456IU/mL(例如,7-84IU/mL)的G-CSF和浓度范围为0.08-28IU/mL(例如,2-6IU/mL)的GM-CSF。

[0144] 在一些实施例中,细胞因子的组合(其可以分别或一起递送)包含220-6,700pcg(例如,310-1,500pcg)的IL-1 β ,例如人IL-1 β ;1730-28,100pcg(例如,3,960-9,200pcg)的

IL-2, 例如人IL-2; 560-10,900pcg (例如, 750-3,100pcg) 的IFN- γ , 例如人IFN- γ ; 580-12,000pcg (例如, 720-3,000pcg) 的TNF- α , 例如人TNF- α ; 260-22,100pcg (例如, 680-4,000pcg) 的IL-6, 例如人IL-6; 和4,610-243,600pcg (例如, 10,390-63,800pcg) 的IL-8, 例如人IL-8。在一些实施例中, 细胞因子的组合 (其可以分别或一起递送) 进一步包含GM-CSF和G-CSF, 例如人GM-CSF和人G-CSF, 并且细胞因子的组合包含60-3,800pcg (例如, 60-700pcg) 的G-CSF和10-3,500pcg (例如, 250-800pcg) 的GM-CSF。在一些实施例中, 细胞因子的组合 (其可以分别或一起递送) 包含浓度范围为300-1,400pcg/mL的IL-1 β , 例如人IL-1 β ; 浓度范围为4,000-8,000pcg/mL的IL-2, 例如人IL-2; 浓度范围为1,000-3,800pcg/mL的IFN- γ , 例如人IFN- γ ; 以及浓度范围为1,000-4,300pcg/mL的TNF- α , 例如人TNF- α 。

[0145] 在一些实施例中, 细胞因子的组合 (其可以分别或一起递送) 包含浓度范围为220-6,700pcg/mL (例如, 310-1,500pcg/mL) 的IL-1 β , 例如人IL-1 β ; 浓度范围为1730-28,100pcg/mL (例如3,960-9,200pcg/mL) 的IL-2, 例如人IL-2; 浓度范围为560-10,900pcg/mL (例如750-3,100pcg/mL) 的IFN- γ , 例如人IFN- γ ; 浓度范围为580-12,000pcg/mL (例如720-3,000pcg/mL) 的TNF- α , 例如人TNF- α ; 浓度范围为260-22,100pcg/mL (例如680-4,000pcg/mL) 的IL-6, 例如人IL-6; 浓度范围为4,610-243,600pcg/mL (例如10,390-63,800pcg/mL) 的IL-8, 例如人IL-8。在一些实施例中, 细胞因子的组合 (其可以分别或一起递送) 进一步包含GM-CSF和G-CSF, 例如人GM-CSF和人G-CSF, 并且细胞因子的组合包含浓度范围为60-3,800pcg/mL (例如, 60-700pcg/mL) 的G-CSF和浓度范围为10-3,500pcg/mL (例如, 250-800pcg/mL) 的GM-CSF。

[0146] 在一些方面, 本公开涉及利用如本文所描述的细胞因子的组合的治疗 (例如, 治疗癌症或癌前病变) 方法。在一些实施例中, 该方法包括a) 向患有癌症或癌前病变的受试者给予有效量的如本文所描述的细胞因子的组合 (例如, 包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ); 和b) 向该受试者给予有效量的如本文所描述的PD-L1或PD-1的拮抗剂。在一些实施例中, 该方法包括a) 向患有癌症或癌前病变的受试者给予有效量的如本文所描述的细胞因子的组合 (例如, 包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ); 和b) 向该受试者给予有效量的如本文所描述的CTLA-4的拮抗剂。在一些实施例中, 该方法包括a) 向患有癌症或癌前病变的受试者给予有效量的如本文所描述的细胞因子的组合 (例如, 包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ); 和b) 向该受试者给予有效量的如本文所描述的CTLA-4的拮抗剂和有效量的如本文所描述的PD-L1或PD-1的拮抗剂。

[0147] 在一些实施例中, 给予细胞因子的组合和PD-L1或PD-1拮抗剂和/或CTLA-4拮抗剂的发生在不同时间并且/或被给予受试者的不同部位 (例如, 通过不同的给予途径)。在该方法的一些实施例中, 当该PD-L1或PD-1拮抗剂和该CTLA-4拮抗剂组合使用时, 一起给予该PD-L1或PD-1拮抗剂和该CTLA-4拮抗剂。在一些实施例中, 在不同的时间给予该PD-L1或PD-1拮抗剂和该CTLA-4拮抗剂。

[0148] 在一些实施例中, 在同一天但是在受试者的不同部位给予该细胞因子的组合和PD-L1或PD-1拮抗剂和/或CTLA-4拮抗剂 (例如, 通过不同的给予途径)。在一些实施例中, 静脉内或口服给予该PD-L1或PD-1拮抗剂。在一些实施例中, 静脉内给予该CTLA-4拮抗剂。在一些实施例中, 经皮下地、通过导管、结内地、癌周地、瘤内、或经外淋巴 (例如, 通过皮下注射或导管插入术进入淋巴结周围组织) 给予细胞因子的组合。

[0149] 在一些实施例中,在至少一个剂量的PD-L1或PD-1拮抗剂之前给予至少一个剂量的细胞因子的组合(分开或一起,例如,作为细胞因子混合物)。在一些实施例中,在至少一个剂量的CTLA-4拮抗剂之前给予至少一个剂量的细胞因子的组合。在一些实施例中,在至少一个剂量的CTLA-4拮抗剂和至少一个剂量的PD-L1或PD-1拮抗剂之前给予至少一个剂量的细胞因子的组合。在一些实施例中,在至少一个剂量的PD-L1或PD-1拮抗剂之后给予至少一个剂量的细胞因子的组合(分开或一起,例如,作为细胞因子混合物)。在一些实施例中,在至少一个剂量的CTLA-4拮抗剂之后给予至少一个剂量的细胞因子的组合。在一些实施例中,在至少一个剂量的CTLA-4拮抗剂和至少一个剂量的PD-L1或PD-1拮抗剂之后给予至少一个剂量的细胞因子的组合。在一些实施例中,给予细胞因子的组合(分开或一起,例如,作为细胞因子混合物)发生在PD-L1或PD-1拮抗剂之前和之后。在一些实施例中,给予细胞因子的组合发生在CTLA-4拮抗剂之前和之后。在一些实施例中,给予细胞因子的组合发生在CTLA-4拮抗剂和PD-L1或PD-1拮抗剂之前和之后。在一些实施例中,给予PD-L1或PD-1拮抗剂发生在细胞因子的组合(分开或一起,例如,作为细胞因子混合物)之前和之后。在一些实施例中,给予CTLA-4拮抗剂发生在细胞因子的组合之前和之后。在一些实施例中,给予CTLA-4拮抗剂和PD-L1或PD-1拮抗剂发生在细胞因子的组合之前和之后。

[0150] 在一些实施例中,细胞因子的组合(分开或一起,例如,作为细胞因子混合物)和PD-L1或PD-1拮抗剂和/或CTLA-4拮抗剂的给予发生多个周期。在一些实施例中,给予细胞因子的组合(分开或一起,例如,作为细胞因子混合物)持续一个或多个10天的周期,例如每天给予一次,持续10天,其中这10天是连续的或可以包括未递送该生物制剂的一天或多(例如1、2、3、4、或5)天(例如周末期间)。在一些实施例中,该一个或多个10天的周期是涉及多种药剂的一个或多个21天周期的一部分。在一些实施例中,对于每个21天的周期,在第1天给予环磷酰胺(例如,静脉内,300mg/m²);每天给予吲哚美辛(例如,25mg,口服,每天三次)、奥美拉唑(例如,20mg,口服)和锌(例如,15至30mg,口服),持续21天;并且从每个周期的第4天开始,每天给予如本文所描述的细胞因子的组合(分开或一起,例如,作为细胞因子混合物)(例如,包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ),持续10天(例如,连续地,或以中间间隔一天或多天的两个5天的区段)。

[0151] 在一些实施例中,给予该PD-L1或PD-1拮抗剂持续一个或多个二至四周的周期,其中该拮抗剂的给予在每个周期中每二至四周发生一次(例如,每个周期中每两周一次、每三周一次、或每四周一次)。在一些实施例中,给予该CTLA-4拮抗剂持续一个或多个三至十二周的周期,其中该拮抗剂的给予每三周至十二周发生一次(例如,每三周一次、每四周一次、每八周一次或每十二周一次)。

[0152] 在一些实施例中,本文所述的方法利用一种剂量方案,在该剂量方案中,给予该细胞因子的组合(分开或一起,例如,作为细胞因子混合物)持续如上所述的10天的周期(任选地作为如上所述的21天周期的一部分)并且给予该PD-L1或PD-1拮抗剂持续如上所述的二至四周的周期,其中重复该剂量方案至少一次(例如,每年重复1、2、3或4次)。在该方案的一些实施例中,在该PD-L1或PD-1拮抗剂之前给予该细胞因子的组合(分开或一起,例如,作为细胞因子混合物)。在该方案的其他实施例中,在该细胞因子的组合(分开或一起,例如,作为细胞因子混合物)之前给予该PD-L1或PD-1拮抗剂。

[0153] 在一些实施例中,本文所述的方法利用一种剂量方案,在该剂量方案中,给予该细

胞因子的组合(分开或一起,例如,作为细胞因子混合物)持续如上所述的长达10天的周期(任选地作为以上描述的21天周期的一部分)并且给予该CTLA-4拮抗剂持续如上所述的三至十二周的周期,其中重复该剂量方案至少一次(例如,每年重复1、2、3或4次)。在该方案的一些实施例中,在该CTLA-4拮抗剂之前给予该细胞因子的组合。在该方案的其他实施例中,在该原代细胞衍生的生物制剂之前给予该CTLA-4拮抗剂。

[0154] 在一些实施例中,本文所述的方法利用一种剂量方案,在该剂量方案中,给予该细胞因子的组合(分开或一起,例如,作为细胞因子混合物)持续如上所述的长达10天的周期(任选地作为以上描述的21天周期的一部分),给予该CTLA-4拮抗剂持续如上所述的三至十二周的周期,并且给予该PD-L1或PD-1拮抗剂持续如上所述的二至四周的周期,其中重复该剂量方案至少一次(例如,每年重复1、2、3或4次)。在该方案的一些实施例中,在该CTLA-4拮抗剂和PD-L1或PD-1拮抗剂之前给予该细胞因子的组合。在该方案的其他实施例中,在该细胞因子的组合之前给予该CTLA-4拮抗剂和PD-L1或PD-1拮抗剂。

[0155] 在一些实施例中,提供了试剂盒,该试剂盒包含如本文所描述的细胞因子的组合(分开或一起,例如,作为细胞因子混合物)(例如,包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ)和如本文所描述的PD-L1或PD-1拮抗剂(例如,纳武单抗、皮立珠单抗、派姆单抗、MEDI-0680、REGN2810、AMP-224、阿特殊单抗、度伐单抗、BMS-936559、阿维鲁单抗、或CA-170)。在一些实施例中,提供了试剂盒,该试剂盒包含如本文所描述的细胞因子的组合(分开或一起,例如,作为细胞因子混合物)(例如,包含IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ)和如本文所描述的CTLA-4拮抗剂(例如,伊匹单抗或曲美木单抗)。在一些实施例中,提供了试剂盒,该试剂盒包含细胞因子的组合(分开或一起,例如,作为细胞因子混合物)、如本文所描述的PD-L1或PD-1拮抗剂(例如,纳武单抗、皮立珠单抗、派姆单抗、MEDI-0680、REGN2810、AMP-224、阿特殊单抗、度伐单抗、BMS-936559、阿维鲁单抗、或CA-170)和如本文所描述的CTLA-4拮抗剂(例如,伊匹单抗或曲美木单抗)。在一些实施例中,该细胞因子的组合(分开或一起,例如,作为细胞因子混合物)在一个或多个第一组容器中提供并且该PD-L1或PD-1拮抗剂和/或CTLA-4拮抗剂在一个或多个第二组容器中提供。在一些实施例中,该一个或多个第一组容器包含治疗有效量的用于治疗癌症或癌前病变的该细胞因子的组合(分开或一起,例如,作为细胞因子混合物),并且该一个或多个第二组容器包含治疗有效量的用于治疗癌症或癌前病变的该PD-L1或PD-1拮抗剂和/或CTLA-4拮抗剂。在一些实施例中,该细胞因子的组合(分开或一起,例如,作为细胞因子混合物)、PD-L1或PD-1拮抗剂和/或CTLA-4拮抗剂是冷冻或冻干的。在一些实施例中,该试剂盒进一步包含用于进行如本文所描述的方法(例如,治疗受试者中的癌症或癌前病变)的说明书。在一些实施例中,该试剂盒进一步包含用于给予该细胞因子的组合(分开或一起,例如,作为细胞因子混合物)、PD-L1或PD-1拮抗剂和/或CTLA-4拮抗剂的一个或多个递送装置,例如注射器或导管。

[0156] 不需要进一步详细阐述,相信本领域的技术人员可以根据上述描述最大程度地利用本公开。因此,以下具体实施例被解释为仅是说明性的,而不是以任何方式对其余的公开内容进行限制。出于本文参考的目的或主题,本文引用的所有出版物都通过引用并入。

[0157] 实例

[0158] 实例1. 原代细胞衍生的生物制剂增加淋巴细胞浸润和PD-L1表达

[0159] 随着癌症免疫疗法的出现,癌症的治疗最近有了发展。现在检查点抑制剂(CI)是

一种基本的、新的治疗癌症的方式,有更为确定的手术、放疗和化疗方式,并为许多患者提供了新的治疗希望。派姆单抗和纳武单抗被批准用于一线转移性黑色素瘤(用B-Raf抑制剂或伊匹单抗治疗失败的转移性黑色素瘤)、以及基于铂的治疗失败的非小细胞肺癌的治疗。最近,派姆单抗被批准用于肾癌的二线治疗,并且阿特珠单抗(TECENTRIQ™)是被批准用于膀胱癌的第一PD-L1抑制剂。度伐单抗还获得了突破性的指定,用于无法手术或复发的转移性膀胱癌。

[0160] IRX-2是一种原代细胞衍生的生物制剂,其具有由强免疫原(PHA)刺激的供体外周血单核细胞产生的多种细胞因子组分。该IRX-2生物制剂包含多种细胞因子(包括IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 和IFN- γ),这些细胞因子协同发挥作用以产生强烈的免疫应答。IRX-2对免疫系统的不同细胞具有多种作用,包括通过抗原递呈细胞活化并增强抗原,增加T细胞的增殖和细胞溶解能力并保护其免于细胞凋亡,以及增加NK细胞的数量和活性(Egan等人(2007) *J Immunother*[免疫学期刊] 30(6):624-633; Czystowska等人(2009) *Cell Death Differ*[细胞死亡与分化] 16(5):708-718; Czystowska等人(2011) *Cancer immunology, immunotherapy:CII*[癌症免疫学、免疫疗法:CII] 60(4):495-506; Schilling等人(2012) *Cancer immunology, immunotherapy:CII*[癌症免疫学、免疫疗法:CII] 61(9):1395-1405; Schilling等人(2013) *PLoS One*[公共科学图书馆期刊] 8(2):e47234; 和 Schilling等人(2012) *J Mol Med*[分子医学杂志](柏林) 90(2):139-147)。临床上,IRX-2方案(其使用IRX-2、环磷酰胺、吡哆美辛和锌)已显示是安全的,具有有利的毒性特征(Freeman等人(2011) *Am J Clin Oncol*[美国临床肿瘤学杂志] 34(2):173-178)。通过对来自多中心2a期试验的治疗前和治疗后肿瘤标本的详细分析获得了重要的临床概念验证,其中在25名可评估患者中的21名中观察到IRX-2方案后淋巴细胞浸润的增加(Berinstein等人(2012) *Cancer immunology, immunotherapy*. [癌症免疫学、免疫疗法] *Increased lymphocyte infiltration in patients with head and neck cancer treated with the IRX-2 immunotherapy regimen*. [用IRX-2免疫治疗方案治疗的头颈癌患者的淋巴细胞浸润增加] 61(6):771-782)。

[0161] 回顾性地分析了在上述2a期试验中治疗的7名受试者的另外生物标志物的表达以表征浸润物并阐明肿瘤微环境中的抑制机制,该抑制机制可以告知可增强肿瘤特异性免疫应答的免疫干预。向受试者给予的IRX-2方案(如下表所示)为21天方案,包括在第4天至第15天之间持续10天每天给予IRX-2,第1天给予环磷酰胺,并且第1-21天给予吡哆美辛、锌以及质子泵抑制剂。

[0162]

药剂	剂量	给予途径	治疗天数
IRX-2	每天 230 单位 双侧注射 115 单位	皮下	在第 4 天和第 15 天之间的 任何十天 (例如, 第 4-8 天和第 11-15 天)
环磷酰胺	300 mg/m ²	IV	1
吡哌美辛	25 mg TID	口服	1-21
含锌的多种维生素	1 片	口服	1-21
质子泵抑制剂	治疗剂量	口服	1-21

[0163] 通过在每次注射中递送给受试者的剂量中存在的115个IL-2国际单位(IU)来定义IRX-2剂量。

[0164] 将患者活组织检查的福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)样本(用IRX-2治疗前)与原发恶性肿瘤切除样本(用IRX-2治疗后)进行比较,并使用PerkinElmer OPAL™系统对标志物(包括CD4、CD8、PD-L1、CD68、FoxP3和细胞角蛋白)进行染色。对于PD-L1表达,使用来自斯普林生物公司(Spring Bio)的兔单克隆抗体克隆SP142进行染色。在细胞膜上测量PD-L1表达并报告为平均归一化荧光。在肿瘤组织内建立用于鉴定PD-L1细胞群的膜荧光的四个水平(箱(bins))的门控设置。使用这些门控设置,将肿瘤中的细胞分配到四个PD-L1表达箱(0-3+)中的一个中。结果以直方图表示,并用于计算肿瘤中PD-L1的H评分。还报道了肿瘤和非肿瘤组织部分中CD68+细胞的平均膜PD-L1强度。

[0165] 使用H&E染色,通过多重免疫组织化学(IHC)对7位匹配的患者进行的分析证实了先前的结果,即,IRX-2治疗导致淋巴细胞浸润(LI)增加以及巨噬细胞浸润增加(图1示出了一位示例性患者)。

[0166] 然后该系统用于评估PD-L1检查点途径的表达和表达变化。在7名患者中的4名中,在IRX-2治疗后PD-L1有显著的增加(图2)。因此,IRX-2增加了淋巴细胞浸润和PD-L1表达,这表明该IRX-2方案可能正在引发肿瘤特异性免疫应答。

[0167] 尽管在许多不同肿瘤类型中使用检查点抑制剂得到的结果是有希望的并且已经提供了免疫治疗方法的概念验证,但已达到了仅有约20%-30%的治疗患者受益于检查点抑制的平台期。通过组合不同的检查点抑制剂进一步改善了该益处,但不幸的是,该方法与增加的毒性特征相关(Postow等人(2015) *The New England Journal of Medicine* [新英格兰医学杂志] 372 (21) :2006-2017)。具有诸如LI、PD-L1表达、突变负荷和错配修复酶的状态等响应的生物标志物已被用于选择更可能有响应的患者(Rizvi等人(2015) *Cancer immunology*. [癌症免疫学] *Science* [科学] 348 (6230) :124-128; Garon等人(2015) *The New England Journal of Medicine* [新英格兰医学杂志] 372 (21) :2018-2028; 和Le等人(2015) *The New England Journal of Medicine* [新英格兰医学杂志] 372 (26) :2509-2520)。然而,根本的挑战是研发增加肿瘤中PD-L1表达的策略,因为肿瘤中的PD-L1表达似乎是用此类抑制剂治疗的患者的临床结果的单一最重要因素(参见,例如,Taube等人, *Clin Cancer Res* [临床癌症研究]; 20 (19) :5064-74 (2014); Sunshine和Taube, *Current Opinion in*

Pharmacology [药理学最新观点], 23:32-38 (2015); and; 和Carbognin等人PLoS ONE [公共科学图书馆期刊] 10 (6): e0130142. (2015)。本文数据显示, 在给予IRX-2之后几名患者中的PD-L1表达增加。这表明在IRX-2治疗后应用PD-1/PD-L1抑制剂可以增加PD-1/PD-L1抑制剂的治疗活性和/或增加能够对PD-1/PD-L1抑制有响应的患者群体。

[0168] 实例2. 原代细胞衍生的生物制剂增加CTLA-4表达

[0169] 还回顾性地分析了在上述实例1中描述的2a期试验中治疗的7名受试者的CTLA-4表达。

[0170] 将患者活组织检查的福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 样本 (用IRX-2治疗之前) 与原发肿瘤切除样本 (用IRX-2治疗后) 进行比较。将一个FFPE组织切片用苏木精和伊红 (HE) 染色, 并由病理学家检查以描绘肿瘤区域。平均肿瘤细胞含量为60% (最小30%)。根据制造商的方案, 通过高纯度微小RNA FFPE分离试剂盒 (罗氏公司, 瑞士巴塞尔) 或高纯度FFPE RNA微小试剂盒 (罗氏公司) 从5- μ m切片的肿瘤区域分离MiRNA或总RNA。简而言之, 首先将组织切片用二甲苯脱石蜡并用乙醇洗涤。然后裂解组织并用蛋白酶K在55°C处理3小时。此后, 将裂解物施加到旋转柱上, 并且在洗涤步骤后, 将miRNA在50 μ l洗脱缓冲液中洗脱。将总RNA在40 μ l洗脱缓冲液中洗脱两次。然后, 根据制造商的方案, 使用Clean&Concentrator-5™试剂盒 (Zymo研究公司 (Zymo Research), 美国加利福尼亚州尔湾 (Irvine, CA, USA)) 纯化并浓缩RNA。在 Qubit® 3.0 荧光计 (赛默飞世尔科技公司 (Thermo Fisher Scientific)) 上利用 NanoDrop™ 2000 (Implen股份有限公司 (Implen GmbH), 德国慕尼黑) 或 Qubit® RNA BR 测定试剂盒 (赛默飞世尔科技公司, 美国马萨诸塞州沃尔瑟姆 (Waltham, MA, USA)) 来测量RNA产量。在芯片实验室 (Lab-on-a-Chip) 2100 生物分析仪 (安捷伦科技公司 (Agilent Technologies), 美国加利福尼亚州圣克拉拉 (Santa Clara, CA, USA)) 上测定RNA质量。由于来自FFPE材料的RNA可能具有低质量 (RIN值<2), 因此不能只根据RIN (RNA完整性数值) 值排除样本。根据制造商的说明书, 使用nCounter® PanCancer免疫分析组 (Nanostring技术公司 (Nanostring Technologies), 美国华盛顿州西雅图 (Seattle, WA, USA)) 测量来自总RNA的CTLA-4mRNA水平。

[0171] 然后该系统用于评估CTLA-4检查点途径的表达和表达变化。在7名患者中的5名中, 在IRX-2治疗后CTLA-4基因表达有显著的增加 (图3)。因此, IRX-2增加CTLA-4表达, 这进一步表明该IRX-2方案可能正在引发CTLA4免疫调节途径的功能性肿瘤特异性免疫应答和生理诱导。

[0172] 先前已经显示, CTLA-4的预处理水平的增加预示着对CTLA4阻滞剂的阳性临床响应 (参见, 例如, Jamieson等人Gene-expression profiling to predict responsiveness to immunotherapy [基因表达谱分析预测对免疫疗法的响应性]. Cancer Gene Therapy [癌基因疗法] (2017) 24:134-140和Van Allen等人Genomic correlates of response to CTLA-4blockade in metastatic melanoma [对转移性黑色素瘤中CTLA-4阻滞剂的响应的基因组相关性]. Science [科学] (2015) 350 (6257): 207-211)。本文数据显示, 在给予IRX-2之后几名患者中的CTLA-4表达增加。这表明在IRX-2治疗后应用CTLA-4抑制剂可以增加CTLA-4抑制剂的治疗活性和/或增加能够对CTLA-4抑制有响应的患者群体。

[0173] 其他实施例

[0174] 本说明书中公开的所有特征能以任何组合方式来组合。本说明书中公开的每个特

征可以由用于相同、等同或类似目的的替代特征代替。因此,除非另有明确说明,否则所公开的每个特征仅仅是等效或类似特征的通用系列的示例。

[0175] 根据以上描述,本领域技术人员可以容易地确定本公开的基本特征,并且在不脱离其精神和范围的情况下,可以对本公开进行各种改变和修改以使其适应各种用途和条件。因此,其他实施例也在权利要求书内。

[0176] 等同原则

[0177] 尽管已经在本文描述并展示了几个发明实施例,但本领域普通技术人员应容易想象用于执行功能和/或获得结果和/或在本文描述的优点中的一个或多个的多种其他装置和/或结构,并且此类变型和/或修改中的每者都被视为是在本文描述的发明实施例的范围内。更一般地说,本领域的普通技术人员应容易理解,在本文描述的所有参数、尺寸、材料以及配置意味着为示例性的,并且实际参数、尺寸、材料和/或配置将取决于发明传授内容所用于的一种或多种具体应用。本领域的普通技术人员仅仅使用常规实验便认识到或能够确认在本文描述的具体发明实施例的许多等效形式。因此,应理解的是,前述实施例是仅借助于实例来呈现,并且在所附权利要求书及其等效形式的范围内,发明实施例可以按与具体地描述和要求不同的方式来实践。本公开的发明实施例涉及本文描述的每个单独特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法。另外,如果此类特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法不是相互矛盾的,则两个或更多个此类特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法的任何组合也被包括在本公开的发明范围之内。

[0178] 如在本文限定并使用的所有定义应当被理解成凌驾于所限定术语的字典定义、通过引用而并入的文件中的定义和/或一般含义。

[0179] 本文公开的所有参考文献、专利和专利申请都相对于每个被引用的主题通过引用而并入,这在一些情况下可以包括文件的全部内容。

[0180] 如本文在说明书中使用的,不定冠词“一个/种(a和an)”除非明确地作相反指示,否则应当理解为是指“至少一个/种”。

[0181] 如本文在说明书和权利要求书中使用的,短语“和/或(and/or)”应当理解为意味着元素中的“任一者或两者(either or both)”如此联合,即,多个元素在一些情况下联合地存在并且在其他情况下分离地存在。用“和/或”列出的多个元素应以相同的方式理解,即,如此联合的元素中的“一个或多个”。除了通过“和/或”项具体指明的元素之外还可以任选地存在其他元素,而无论与具体指明的那些元素相关还是无关。因此,作为非限制性实例,当与开放式语言(如“包括”)结合使用时,对“A和/或B”的引用在一个实施例中能够仅指代A(任选地包括B以外的元件);而在另一实施例中,仅指代B(任选地包括A以外的元件);而在又一个实施例中,指代A和B两者(任选地包括其他元件);等。

[0182] 如本文在说明书中和权利要求中使用的,“或”应理解为具有与上文定义的“和/或”相同的含义。例如,当在列表中划分多个项时,“或”或“和/或”应解释为包容性的,例如,包含多个要素或要素列表中的至少一个要素,但也包含一个以上的要素,并且可选地包含额外的未列出的项。只有清楚地作出相反指示的术语,例如“仅一个”或“确切一个”或在权利要求中使用时为“由……组成”,是指包含多个要素或要素列表中的确切一个要素。一般来说,当之前有排他性术语、如“任一个”、“之一”、“……中的仅一个”、或“……中的确切一个”时,本文使用的术语“或”应当仅被解释为指示排他性的替代项(例如,“一个或另一个但

非两者”)。当在权利要求中使用时,“基本上由……组成”应具有其在专利法领域中使用的普通含义。

[0183] 如本文在说明书中和权利要求中使用的,参引一个或多个要素的列表的短语“至少一个”应理解是指选自该要素列表中的任意一个或多个要素中的至少一个要素,但不一定包含该要素列表内具体列出的各个和所有要素中的至少一个要素,并且不排除要素列表中的要素的任何组合。这个定义还允许可以可选地存在除了短语“至少一个”所指的、在要素列表中明确指明的要素之外的要素,无论是与明确指明的那些要素相关还是不相关。因此,作为非限制性实例,在一个实施例中,“A和B中的至少一个”(或等效地,“A或B中的至少一个”,或等效地,“A和/或B中的至少一个”)可以指至少一个:任选地包括超过一个A而不存在B(以及任选地包括除了B之外的元件);在另一实施例中,指至少一个,任选地包括超过一个B,而不存在A(以及任选地包括除了A之外的元件);在另一实施例中,指至少一个,任选地包括超过一个A,以及指至少一个,任选地包括超过一个B(以及任选地包括其他元件);等。

[0184] 还应理解的是,除非明确地作相反指示,否则在本文所要求保护的包括多于一个步骤或动作的任何方法中,所述方法的步骤或动作的顺序不一定限于所述方法的步骤或动作被叙述的顺序。

[0185] 在权利要求书中,以及在以上说明书中,所有过渡性短语,诸如“包含(comprising)”、“包括(including)”、“携带(carrying)”、“具有(having)”、“含有(containing)”、“涉及(involving)”、“持有(holding)”、“由……构成(composed of)”等应理解为开放性的,即,意味着包括但不限于。如美国专利局专利审查程序手册第2111.03节所述,只有过渡性短语“由……组成”和“基本上由……组成”应分别是封闭式或半封闭式过渡性短语。

<400> 2

Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu Val Thr Asn Ser Ala Pro
 1 5 10 15
 Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu
 20 25 30
 Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro
 35 40 45
 Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala
 50 55 60
 Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu
 65 70 75 80
 Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro
 85 90 95
 Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly
 100 105 110
 Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile
 115 120 125
 Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser
 130 135 140

<210> 3

<211> 183

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 3

Val Pro Pro Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln
 1 5 10 15
 Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu
 20 25 30
 Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met
 35 40 45
 Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro
 50 55 60
 Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu
 65 70 75 80
 Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr
 85 90 95
 Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg
 100 105 110
 Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys

115	120	125
Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala		
130	135	140
Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met		
145	150	155
Thr Thr His Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser		
	165	170
Leu Arg Ala Leu Arg Gln Met		
180		

<210> 4

<211> 79

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 4

Glu Gly Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala Lys Glu Leu Arg Cys Gln Cys		
1	5	10
Ile Lys Thr Tyr Ser Lys Pro Phe His Pro Lys Phe Ile Lys Glu Leu		
	20	25
Arg Val Ile Glu Ser Gly Pro His Cys Ala Asn Thr Glu Ile Ile Val		
	35	40
Lys Leu Ser Asp Gly Arg Glu Leu Cys Leu Asp Pro Lys Glu Asn Trp		
50	55	60
Val Gln Arg Val Val Glu Lys Phe Leu Lys Arg Ala Glu Asn Ser		
65	70	75

<210> 5

<211> 138

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 5

Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn		
1	5	10
Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile		
	20	25
Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln		
	35	40
Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln		
50	55	60
Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys		
65	70	75
		80

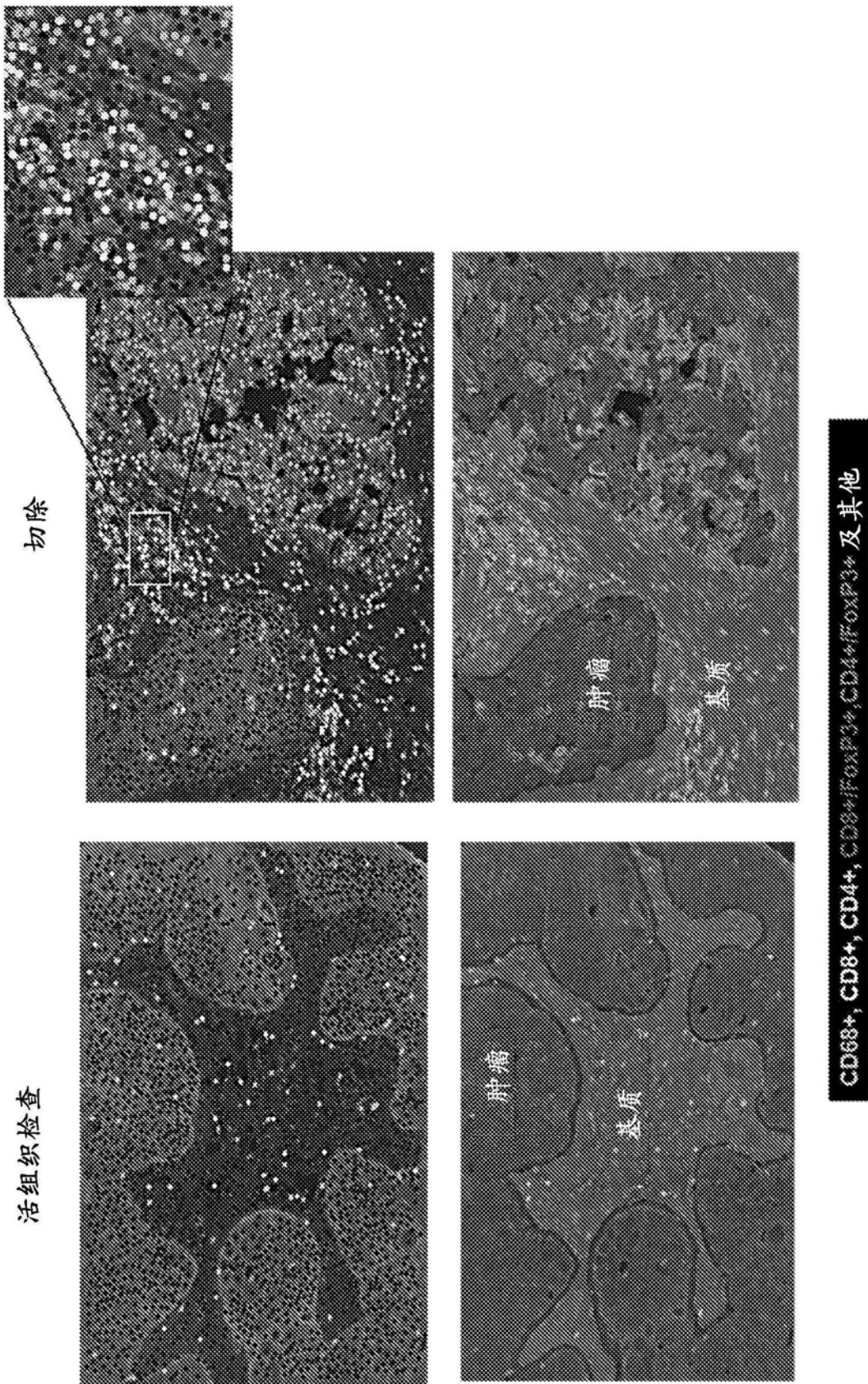


图1

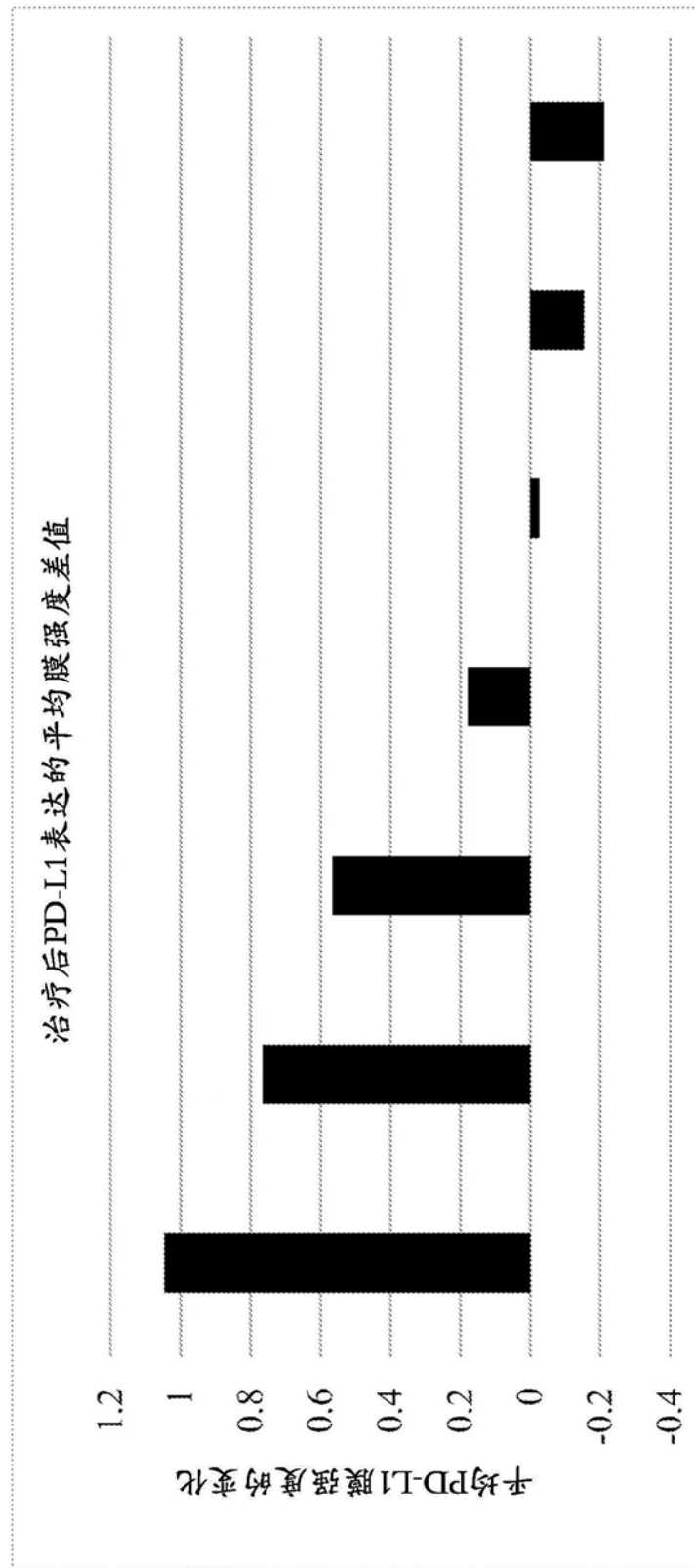


图2

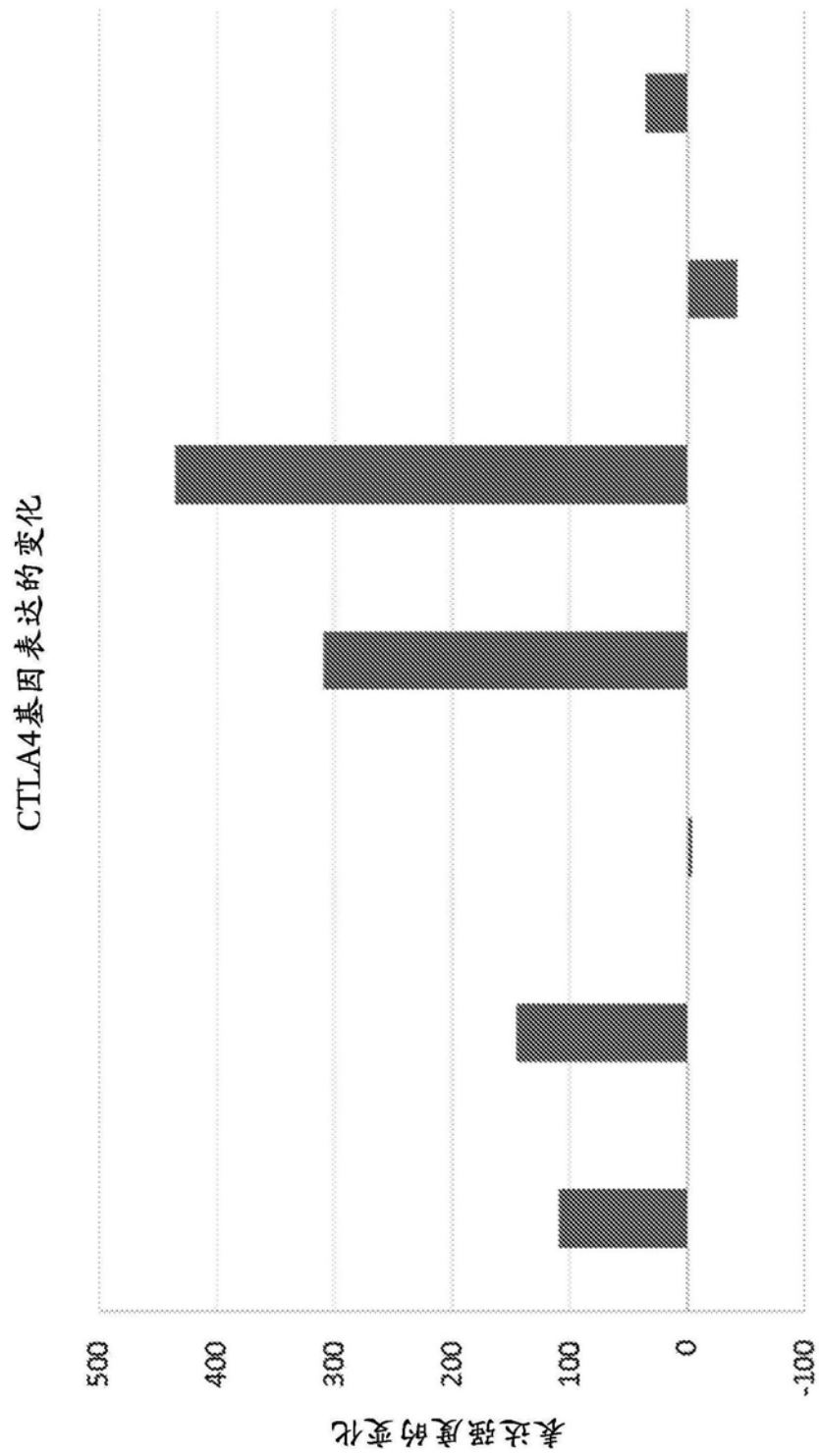


图3