(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105457020 A
(43)申请公布日 2016.04.06

(21)申请号 201510883465.0

(22)申请日 2010.12.15

(30)优先权数据
61/286,551 2009.12.15 US
12/967,910 2010.12.14 US

(62)分案原申请数据
201080057506.6 2010.12.15

(71)申请人 免疫创新治疗有限公司
地址 以色列耶路撒冷

(72)发明人 迈克尔·哈-诺伊

(74)专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事务所(普通合伙) 11201
代理人 李志东

(51)Int.Cl.
A61K 39/00(2006.01)
A61K 38/17(2006.01)
A61K 38/19(2006.01)
A61K 38/20(2006.01)
A61K 38/21(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

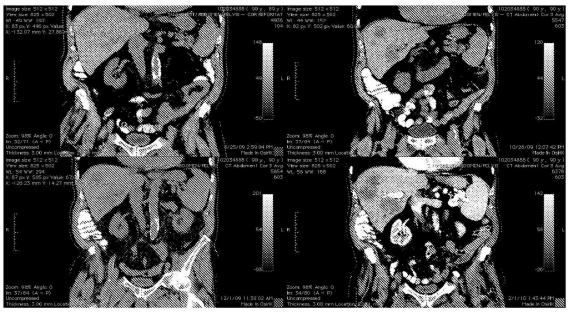
权利要求书1页 说明书10页 附图1页

(54)发明名称

肿瘤液化的方法和组合物

(57)摘要

本发明涉及用于免疫治疗癌症的组合物和方法。具体地,描述了一种癌症免疫疗法,其可以实现系统性液化实体瘤和转移瘤,而无论它们位于身体何处。该组合物包含被激活的同种异体Th1细胞,在其被适当给药时,导致肿瘤的液化。该方法包括给药预致敏剂量的治疗组合物,消融选定的肿瘤病变同时瘤内注射该组合物,然后输注治疗组合物。这些步骤能够实现继发于免疫细胞浸润的系统性肿瘤液化,并导致免疫介导的肿瘤根除。



CN 105457020 A

1.一种治疗组合物在制备药物中的用途，所述药物用于将实体瘤转化为液化状态，所述液化状态是由CT扫描确定，其中所述治疗组合物包含：

至少一种外源性抗原；

至少一种I型炎症细胞因子；以及

至少一种能够引致树突细胞成熟化的效应分子；

所述实体瘤包括乳腺癌，结肠癌，卵巢癌，肉瘤，鳞状细胞癌，肺癌，膀胱/输尿管癌，胰脏癌，黑色素瘤，肾癌，骨癌，淋巴结和食道转移性癌。

2.根据权利要求1所述的用途，其中所述外源性抗原为同种异体抗原。

3.根据权利要求2所述的用途，其中所述外源性抗原表达于T细胞上。

4.根据权利要求1所述的用途，其中所述炎症细胞因子产生于活性免疫细胞。

5.根据权利要求1所述的用途，其中所述效应分子为CD40L。

6.根据权利要求1所述的用途，其中所述炎症细胞因子为选自下列的一种或者更多种：IFN-γ、IL-2、TNF-α、TNF-β、GM-CSF和IL-12。

7.根据权利要求1所述的用途，其中所述效应分子表达于免疫细胞表面。

8.根据权利要求1所述的用途，其中所述效应分子为Toll样受体的配体。

9.根据权利要求3所述的用途，其中所述T细胞为CD4+T细胞。

10.根据权利要求9所述的用途，其中所述CD4+T细胞为Th1细胞。

11.根据权利要求10所述的用途，其中所述Th1细胞是被激活的。

12.根据权利要求11所述的用途，其中所述Th1细胞是通过CD3和CD28表面分子的交联而被激活的。

13.根据权利要求12所述的用途，其中所述CD3和CD28表面分子的交联是由固定化抗-CD3和抗-CD28单克隆抗体实现的。

14.根据权利要求13所述的用途，其中所述抗-CD3和抗-CD28单克隆抗体固定化在纳米或微米微粒上。

15.根据权利要求14所述的用途，其中所述纳米或微米微粒是生物可降解的。

16.根据权利要求1所述的用途，其中所述组合物分散于适合输注的介质中。

17.根据权利要求16所述的用途，其中所述组合物被包装于注射器中。

18.根据权利要求1所述的用途，其中所述组合物嵌入晶片或芯片中。

肿瘤液化的方法和组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请是申请日为2010年12月15日、申请号为201080057506.6、发明名称为“肿瘤液化的方法和组合物”的分案申请。

技术领域

[0003] 本发明涉及治疗疾病的免疫治疗方法。更具体地，本发明涉及用于导致肿瘤液态化的治疗疾病的药物和方法。

背景技术

[0004] 所知的最精确、最强大和最安全的疾病预防和治疗机制，是在没有医疗介入的情况下，结合先天免疫元素和适应性免疫元素的与生俱来的“灭菌式(sterilizing)”免疫应答以清除身体内种类繁多的外源性病原体。免疫系统被设计为“记忆”清除过的外源性抗原以便对再次感染快速发动免疫应答。即使癌症患者的免疫系统，也可以识别外源性抗原(例如在病毒和细菌中发现的外源性抗原)并对其发动应答，足以从身体中彻底破坏和消除这些外源性抗原。这种灭菌式免疫应答的猛烈性和特异性可以被以下方式证明，未充分抑制的免疫系统可以在保留自身组织的同时完全破坏大的移植器官如肾、肝或心脏。这种针对外源性抗原的免疫力的破坏效果将有益于癌症治疗，如果这种效果可以被再定向到肿瘤。

[0005] 免疫疗法致力于发展针对疾病特别是癌症利用、引导和控制免疫应答的方法。治疗癌症的疫苗是一种旨在用现有癌症训练患者的免疫系统，将其肿瘤细胞识别为外源性抗原的免疫疗法。如果肿瘤被免疫系统识别为外源性病原体，则理论上免疫应答可以被引发，该免疫应答可能导致免疫细胞破坏大的肿瘤、找出并破坏转移性肿瘤细胞，无论它们位于体内何处。成功的免疫治疗后，免疫系统的“记忆”清除过的外源性细胞的能力，使免疫系统在没有任何额外治疗下可以消除任何复发的癌细胞，很像免疫系统防止机会性感染。

[0006] 治疗癌症的免疫治疗方法是目前癌症治疗策略的非常理想的替代疗法。与免疫介导的抗肿瘤机制不同，目前手术、放疗和化疗的方式在单细胞水平上不具有抗肿瘤特异性。因此，对于这些现有方式，清除所有肿瘤细胞在技术上是不可行的。如果没有清除所有肿瘤细胞，则治疗后癌症复发是一种普遍的结果。此外，目前的方式会导致对治疗的肿瘤抗性而不是肿瘤消除的“记忆”。

[0007] 许多癌症疫苗领域的研究按照传统疫苗开发策略，重点研究寻找独特的肿瘤抗原(正常细胞没有)，称为肿瘤特异性抗原(TSA)，或寻找癌细胞上过度表达的肿瘤相关抗原(TAA)。TAA是自身性抗原，因此不能将肿瘤识别为外源性的，而是实现了肿瘤细胞和正常细胞的免疫性区别。含有TAA的癌症疫苗也会采用增强这些抗原的能力以刺激抗肿瘤免疫反应的方法。

[0008] 癌症疫苗的发展已经沿着一条途径寻求方法以增强这些TAA的免疫原性，从而它们可以被用于刺激治疗性免疫力。例如，与免疫性佐剂混合(如MF59，不完全Freund’s佐剂，QS-21皂甙，和芽孢杆菌卡介苗[卡介苗])、更具免疫原性衍生物的合成、与免疫源性蛋白缀

合和对树突细胞直接脉冲等方法均已被研究开发，但没有显著的成功。免疫疗法的成功率在临床仍然低得可怜。

[0009] 尽管目前的免疫治疗方法几乎完全没有引起临床上显著的抗肿瘤应答，许多使用这些方法的临床试验目前仍然正在被工业界和学术界的赞助商进行。这些免疫疗法在临床上持续发展的原因之一，可能是因为对目前提供给晚期癌症患者高发病率治疗的替代疗法的需求。尽管免疫疗法尚未显示具有令人印象深刻的临床疗效，但是它已经被证实是一种低毒性的方法。另一方面，尽管在过去20年对高毒性化学疗法的应答率一直在升高，但对总体5年存活率的影响几乎没有。化学疗法显示出的对存活率的轻微增长在生活质量方面付出了严重代价。

发明内容

[0010] 一种治疗组合物包括至少一种外源性抗原，至少一种I型炎症细胞因子和至少一种能够引致树突细胞成熟化的效应分子。

[0011] 还公开了一种将肿瘤转化为液体状态的方法。该方法包括利用包含外源性抗原的治疗组合物进行预致敏(priming)，以便建立针对外源性抗原的Th1免疫力，消融选定的肿瘤或复数个肿瘤，其中所述消融导致所述肿瘤的至少一部分死亡。

[0012] 还公开了一种方法，该方法包括在邻近所述死亡肿瘤病变处建立炎症微环境，并激活适应性和先天免疫细胞。

[0013] 公开了一种刺激和维持患者中Th1应答的方法，该方法包括，利用治疗组合物对患者进行预致敏，以及对患者周期性给药该治疗组合物，其中，治疗组合物包含至少一种外源性抗原，至少一种能够引致树突细胞成熟化的效应分子和至少一种Th1细胞因子。

[0014] 还描述了另外一种方法用于液化患者肿瘤，该方法包括，利用治疗组合物对患者进行预致敏，使用导致肿瘤坏死的方法消融肿瘤，瘤内给药所述治疗组合物，以及输注该治疗组合物以激活适应性和先天免疫细胞，其中所述治疗组合物包含至少一种外源性抗原、至少一种能够引致树突细胞成熟化的效应分子和至少一种Th1细胞因子。

[0015] 另一种液化患者肿瘤的方法包括，在患者中建立从头Th1应答，同时抑制Th2应答；提供由癌细胞坏死性死亡所产生的肿瘤抗原的来源；提供与Th1应答相一致的炎症环境，用于响应所述肿瘤抗原的树突细胞的成熟化；以及通过维持Th1应答使肿瘤免疫逃逸机制无效。

附图说明

[0016] 图1包含了几个CT扫描的图像；

[0017] 图2是一个说明活检结果的图像。

具体实施方式

[0018] 本发明描述了用于治疗癌症患者的治疗组合物和方法。本发明描述了适当对癌症患者给药，其可以实现系统性液化肿瘤的治疗药剂。该组合物一般包括以下主要成分：(1)外源性抗原，(2)I型细胞因子，和(3)能够引致树突细胞(DC)成熟化的效应分子，优选CD40L。

[0019] 本发明还描述了液化肿瘤的方法，其通过刺激肿瘤患者有效Th1免疫应答，用原位疫苗的方法产生抗肿瘤免疫力，进而激活患者先天和适应性免疫力同时使肿瘤免疫逃逸机制无效。该方法还包括抑制Th2应答，通常可以由刺激Th1免疫应答来完成。该方法进一步包括通过Treg细胞实现免疫抑制机制的反向调节。

[0020] 肿瘤的“液化(liquidation)”是指肿瘤减小或完全缺乏血液供给，同时CT扫描显示病灶为密度低或黑暗，相比于治疗前基线和活检样品显示凝固性坏死的证据。

[0021] 此处描述涉及“治疗组合物”、“药剂”和“药物”。这些术语可以互换使用，并且是指可以对患者给药的组合物。

[0022] 该治疗组合物一般包括外源性抗原。该外源性抗原可以是任何非自身性抗原，例如同种异体抗原。该外源性抗原必须以这样的方式提供，通过该方式该抗原可被专职抗原提呈细胞吞噬并被提呈给免疫系统从而被处理和提呈给T细胞。该抗原可以是活细胞的天然部分，也可以是利用分子生物学技术改变的或生物工程改造的。该抗原可以是可溶性的或者被固定表面上，活的有机体或细胞的完整部分，或减毒(attenuated)生物体的一部分。

[0023] 多种细胞因子也可以被包含在治疗组合物中。术语细胞因子被用作不同群体可溶性蛋白和多肽的通用名称，这些蛋白和多肽通常以纳摩到皮摩浓度在正常或病理条件下作为调节因子调控单个细胞和组织的功能活动。这些蛋白也直接介导细胞间相互作用并调节发生在细胞外微环境中的进程。I型细胞因子参与炎症应答，II型细胞因子参与体液免疫应答。I型细胞因子包括，例如，IL-2、IL-12、IL-15、IFN-γ、TNF-α、TNF-β、GM-CSF和C-C趋化因子。细胞因子成分可以是天然的或重组的细胞因子，或者可以是设计为与细胞因子的受体相互作用的生物工程分子(bioengineered molecular)。该细胞因子可以直接包含在治疗组合物中。可选地，该治疗组合物可以包含活细胞或其他可以产生和分泌细胞因子的成分。在一些示例性的实施例中，该治疗组合物包括产生和分泌细胞因子、处于激活状态的T细胞，从而作为该治疗组合物中细胞因子的来源。

[0024] 该治疗组合物还包括引起非成熟树突细胞成熟化的因子。树突细胞免疫调节能力依赖于树突细胞的成熟化。抗原摄取和加工树突细胞后多种因子可诱导成熟化，包括：整个细菌或细菌产生的抗原(如脂多糖，LPS)；炎症细胞因子，如IFN-γ、TNF-α、IL-1、GM-CSF、选择性细胞表面受体(如CD40)的配体(ligation)和病毒性产物(如双链RNA)。在他们从非成熟细胞转变为成熟细胞的过程中，树突细胞经历了一系列表型和功能的变化。树突细胞的成熟化过程大体上涉及主要组织相容性复合体(MHC)分子从细胞胞内腔室到树突细胞表面的重新分布，下调抗原的内在化，在表面共刺激分子表达的增加，形态变化(如树突的形成)，细胞骨架的重构，趋化因子、细胞因子和蛋白酶的分泌，以及粘附分子和趋化因子受体的表面表达。在一些优选的实施例中，CD40L是被包括在作为表示树突细胞成熟的一个因子。

[0025] 在另一些实施例中，引致树突细胞成熟化的物质通过Toll样受体(TLRs)提供信号。Toll样受体表达在主要参与先天免疫的巨噬细胞和树突细胞上。目前，已经鉴定了Toll样受体的多种配体，例如TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6和TLR9。这些配体大部分来源于病原体，而不是在宿主中被发现，这暗示Toll样受体对检测入侵的微生物至关重要。由Toll样受体识别病原体，通过诱导促炎性因子产生和共刺激分子上调的方式，引发先天免疫力的快速激活。被激活的先天免疫力随后导致有效的适应性免疫力。实例包括包含脂蛋白和肽聚

糖的TLR2配体，和分别识别双链RNA、脂多糖、细菌鞭毛蛋白、咪喹莫特(imiquimod)和细菌DNA的TLR-3、-4、-5、-7和-9配体。导致树突细胞成熟化的这些以及其他因子都在本方法的范畴中。

[0026] 本发明所述的组合物一般包括以上描述的三类主要组分。这些组分，外源性抗原、Th1细胞因子和树突细胞成熟化分子可以是组合在一起共同构成组合物。可选地，部分或所有这些组分可以由活细胞产生，可以在配制之前，也可以在配制之后，因此可以作为细胞因子和/或效应分子的来源。

[0027] 在一个示例性的实施例中，该治疗组合物包括表达于T细胞上的同种异体抗原。该T细胞优选为CD4+T细胞，更优选为Th1细胞。该Th1细胞可以是由来源于正常血液供体的初始CD4+前体细胞经体外分化、扩增和激活而来。优选地，在给药缀合于微米珠或纳米珠上的抗-CD3和抗-CD28单克隆抗体时，该细胞是处于激活状态的。这些珠子可以是生物可降解的。这些细胞可以产生大量炎症细胞因子，例如IFN-γ、TNF-α和GM-CSF，还可以在细胞表面表达效应分子，例如CD40L，其用于促进产生Th1免疫力。

[0028] 该治疗组合物包括被激活的同种异体Th1细胞。这些被激活的Th1细胞可以为强效炎性药剂。这些被激活的同种异体Th1细胞和用于制备它们的方法被详细描述于美国专利7,435,592、7,678,572、7,402,431和7,592,431中，通过参照将其并入本文。该被激活的同种异体Th1细胞是有意图针对患者错配的。

[0029] 肿瘤内给药优选的治疗组合物可以为I型抗肿瘤免疫力的产生提供强效辅助作用，同时下调肿瘤免疫逃逸机制。该组合物的辅助作用是基于该细胞3个主要的特征：(1)产生大量I型细胞因子的能力；(2)CD40L的表面表达；和(3)该细胞同种异体性质。外源性抗原，例如异种、同种异体或病毒抗原，也可以提供强效辅助作用。

[0030] 该组合物中的同种异体Th1细胞优选地产生大量I型细胞因子：IFN-γ、TNF-α和GM-CSF。γ干扰素为对促进I型抗肿瘤免疫力必不可少的一个关键I型细胞因子。γ干扰素可以通过直接抑制肿瘤细胞生长或诱导T细胞介导的抗肿瘤应答而介导抗肿瘤作用。γ干扰素的分泌可以独立地促进NK细胞应答，还可以增强IL-12激活的NK细胞应答。

[0031] 肿瘤坏死因子-α的重要性可以通过单独输注这种细胞因子已足够治愈某些已经建立的动物肿瘤的证据而被证明。肿瘤坏死因子-α是I型细胞因子和配体家族中的一部分，可以通过诱导凋亡有效地破坏癌症细胞。γ干扰素和肿瘤坏死因子-α不仅对抗肿瘤效应细胞具有辅助作用，也可以直接诱导肿瘤凋亡。

[0032] GM-CSF的产生也可以提供强大的辅助作用。GM-CSF可以诱导人PBMC、T淋巴细胞和APC产生I型细胞因子。GM-CSF可以下调II型细胞因子的表达并可以促进单核细胞分化为树突细胞，同时优先扩增树突细胞1(IL-12产生的树突细胞)和激活NK活性。

[0033] 将药剂与未成熟树突细胞混合可以引起树突细胞成熟，并产生IL-12。IL-12被称为I型免疫应答的原发性启动因子，并作为NK和Th1细胞产生IFN-γ的上游正调节因子。IL-12可以激活细胞毒性T细胞，引起CD4+淋巴细胞分化成Th1表型，并在平衡I型和II型免疫应答中倾向于I型。IL-12在促进I型免疫活性方面具有强效辅助作用。

[0034] 一种包含被激活的同种异体的Th1细胞的药剂可以来源于前体细胞，该前体细胞从正常或筛选过的血液供体纯化而来。细胞应以无菌、低内毒素的剂型提供，该剂型被制成适于皮下瘤内注射或者静脉输注。该细胞还可以制成适于腹腔、胸腔、结内、囊内或硬膜外

的输注。优选地供体被测试为HIV1、HIV2、HTLV1、HTLV2、HBV、HCV和RPR(梅毒)为阴性，并且优选地细胞被测试为支原体、EBV和CMV阴性。在优选的实施例中，被激活的同种异体细胞为与患者HLA不匹配的。

[0035] 本发明的方法一般包括，以驱使患者的免疫系统做出应答并引起肿瘤液化的方式，给药本发明的组合物。本文所述方法的第一步一般旨在增加癌症患者中Th1免疫细胞的循环数量，将平衡从Th2环境转移到Th1环境。第二步可以引起抗肿瘤特异性Th1免疫力，第三步可以激活先天和适应性免疫应答的组分并产生持续的Th1细胞因子环境从而下调肿瘤免疫逃逸。

[0036] 个体的免疫系统可以通过细胞因子的平衡而被评估，该细胞因子是应答疾病生物体而被产生的，可以是Th1应答或Th2应答。这种日益流行的分类方法被称为Th1/Th2平衡。白介素和干扰素被称为“细胞因子”，他们可以被分为由Th1型细胞分泌的细胞因子和由Th2型细胞分泌的细胞因子。Th1细胞促进细胞介导的免疫，而Th2细胞诱导体液免疫。细胞免疫(Th1)引导自然杀伤细胞(NK)、T-细胞和巨噬细胞在感染部位攻击异常细胞和微生物。体液免疫(Th2)导致产生用于中和外源性入侵物的抗体。在一般情况下，CD4+T细胞的Th2极化已在大多数人类和动物癌症研究中被证明是与癌症进程相关的，而Th1极化与肿瘤消退和抗肿瘤免疫力相关。Th1细胞产生IL-2和IFN-γ并介导I型免疫力，而Th2细胞产生IL-4、IL-5和IL-10并介导II型免疫力。Th1和Th2免疫应答是反向调节的，因而增强I型应答会下调II型应答，增强II型应答会下调I型应答。

[0037] 这里所述的方法包括对患者进行预致敏，通过给药包含外源性抗原的组合物以在患者中建立针对该外源性抗原的Th1免疫力。该方法进一步包括消融全部或者部分肿瘤，导致至少若干肿瘤坏死。多种方法可以用于在患者中产生肿瘤坏死，例如冷冻消融法、射频消融法、化学疗法、栓塞法和电穿孔法。该方法也涉及在邻近肿瘤坏死的部位建立炎症微环境，即肿瘤病变部位。此外，该方法包括激活患者的适应性和先天免疫细胞，从而维持长期Th1环境。在优选实施例中，该方法的重要组成包括，使用含有以上所述的产生Th1细胞因子的被激活的同种异体免疫细胞的药物或组合物。

[0038] 由于大多数人类癌症患者可以呈现极化Th2免疫力，这种治疗方法第一部分的目的是提高癌症患者中循环Th1细胞的数量。癌症患者中循环Th1细胞的数量可以通过利用包含外源性抗原的治疗组合物给患者预致敏或接种疫苗而建立。该治疗组合物还可以包括可以使患者在Th1环境中遇到外源性抗原的Th1细胞因子。在一个示例性的实施例中，利用皮下注射的被激活的同种异体Th1细胞，对患者进行预致敏。在优选的实施例中，皮下注射为按周规划每周1次，持续3周。然而，皮下注射也可以每隔两天或数年给药。该注射方案应该旨在增强循环中Th1记忆细胞的足迹。表达于外源性细胞上的同种异体抗原可以刺激强效免疫排斥应答。此外，组合物中存在Th1细胞因子或同种异体细胞表达的Th1细胞因子可以提供炎症辅助环境，这种环境对于将针对同种异体抗原的免疫应答引导向Th1记忆免疫力是必要的。这可以建立循环中Th1记忆细胞的增强池(increased pool)，所述Th1记忆细胞针对包含在同种异体Th1细胞中的同种异体抗原是特异性的。多次给药可以作为加强注射，增加对于同种异体抗原特异性的循环记忆Th1细胞的数量。一般地，低剂量的1×10^6～2×10^7个细胞为每次注射的优选剂量，每次注射优选间隔3～7天。为了进一步增加循环中Th1记忆细胞的效价，可以静脉给药一定剂量的被激活的同种异体细胞。在优选实施例中，皮下

给药1～2×10^7个细胞，一周1～3次，持续2～3周，然后静脉输注3～10×10^7个细胞。本方法的下一步是训练免疫系统识别肿瘤。

[0039] 为了训练由肿瘤构成的威胁的免疫系统、产生可以引起肿瘤液化的抗肿瘤特异性免疫力，利用了原位疫苗的方法。这种策略可以通过给药治疗组合物和肿瘤消融方法的结合而施行，优选地治疗组合物包含同种异体细胞。本文所述方法中，肿瘤抗原的来源是通过消融选定肿瘤病变而原位产生的。任何至少部分通过坏死引起肿瘤死亡的消融方法都可以被应用。通过凋亡引起肿瘤死亡的方法也可以被应用，然而，这些方法不如坏死诱导的方法有效。肿瘤消融可以包括化学疗法、射频疗法、冷冻消融法、射频消融法、电穿孔法、酒精消融法、生物疗法、抗血管生成疗法、其他消融法或可以用于肿瘤消融的这些方法的组合。肿瘤细胞减少的化疗方法也可以被应用。

[0040] 图像引导下经皮穿刺(透过皮肤)的冷冻消融或酒精消融(最好用于可触及病变的消融)的微创技术可以被应用。适合消融的肿瘤病变可以位于，例如肝脏、皮肤、头颈部、淋巴结、胰腺、骨、肾上腺、膀胱、胃肠道或肾脏，并将位于必要时使用CT或超声波图像的指导，可以安全经皮进入的那些器官内的位置。

[0041] 消融过程导致大量肿瘤碎片释放进入肿瘤微环境，作为患者特异性肿瘤抗原的来源。正常地，机体内细胞通过自然过程死亡被称为凋亡，作为细胞更替(turnover)的持续副产物。免疫系统被编程为对凋亡细胞没有应答从而避免自身免疫。然而，作为消融结果的坏死性细胞死亡可以募集免疫细胞到肿瘤部位或细胞内部，从而对应答免疫细胞提供“吃我”的信号。但是，被激活的Th1细胞的强效辅助作用可以克服凋亡细胞死亡不刺激免疫应答的正常作用。出于这个原因，引起肿瘤细胞死亡的任何方法都可以被用于与优选的被激活的同种异体Th1细胞组合物结合。

[0042] 通过被称为专职抗原提呈细胞(APC)或树突细胞(DC)的特化细胞网络，抗原被提呈给免疫系统。DC负责通过提呈抗原给初始T细胞诱导真对病原体或肿瘤的免疫力，导致T细胞分化为针对该抗原特异性的效应T细胞和记忆性T细胞。效应T细胞，主要是CD8+细胞溶性T细胞(CTL)，能破坏表达抗原的细胞。记忆性T细胞提供免疫保护，防止复发或再感染。树突细胞(DC)分化成强效专职抗原提呈细胞(APC)是由分子刺激触发的，该刺激分子是作为组织干扰和局部炎症应答的结果而释放的。

[0043] 加工被包含在吞噬材料中的肿瘤抗原的树突细胞(DC)，在炎症危险信号的存在下(即在Th1条件下)可以被以这样的方式程序性成熟，通过该方式可以促进Th1免疫力的产生，其中该Th1免疫力是针对所吞噬抗原特异性的。通过将由消融或化疗方法引起的病理或天然肿瘤死亡与肿瘤内给药治疗组合物进行结合，可以建立用于Th1肿瘤特异性免疫力的条件，其中，优选地治疗组合物包含产生炎症危险信号的被激活的同种异体Th1细胞。在体内炎症危险信号存在下暴露肿瘤抗原的组合被称为原位疫苗法。

[0044] 本发明还包括开发芯片或者晶片，其中，在这些芯片或者晶片上嵌入治疗组合物的重要组分：(a)外源性抗原；(b)能够引致树突细胞成熟化的分子；和(c)炎症因子。例如，嵌入了同种异体抗原和CD40L的晶片，被植入了嵌入的或外源性细胞因子如GM-CSF和/或IFN-γ，也落入本发明的保护范围内。

[0045] 吞噬肿瘤抗原的未成熟树突细胞可以在炎症信号的存在下加工肿瘤抗原，从而成熟、分化和迁移到引流区淋巴结，在那里树突细胞将免疫T细胞引导为Th1免疫力，包括能够

特异性寻找出和破坏肿瘤的细胞溶性T细胞(CTL),而无论肿瘤位于体内何处。为了使这个过程正确地发生,摄取肿瘤抗原的未成熟树突细胞必须在高度炎症环境中加工该抗原。对驱动树突细胞成熟化从而引导Th1免疫力是必不可少的炎症环境的类型不是自然发生,也不是作为仅消融过程的结果而发生,因此需要辅助。

[0046] 为了给驱动正确的树突细胞成熟化提供辅助,治疗组合物优选地包括本文所述被激活的Th1细胞,其可以被给药到所消融肿瘤病变的坏死中心,优选地在消融过程后的1小时内。当注射附着CD3/CD28单克隆抗体包被的微珠时,同种异体免疫细胞可以被激活。这些免疫细胞产生大量炎症因子,并且表达表面分子(例如:CD40L),已知这些分子引起树突细胞成熟化并促进产生Th1抗肿瘤免疫力。进一步,由于因先前皮下预致敏注射,患者将对同种异体抗原免疫,肿瘤内给药可以引发强效Th1细胞记忆应答以排斥这些同种异体细胞。所有这些因素作为辅助,促进树突细胞成熟化以引导得到抗肿瘤特异性的Th1免疫力。肿瘤内注射的时间可以为增强治疗效果而被改变。如果在树突细胞进入所消融的肿瘤病变的同时给药细胞,则被激活的记忆同种异体Th1细胞的辅助作用是最佳的。由于已知树突细胞进入损伤组织的波(wave)发生在消融事件后大约3天,因而优选在消融过程后3天同种异体细胞被给药。可以在消融时所进行的肿瘤内注射之外,进行该注射,也可以将该注射替代在消融时所进行的肿瘤内注射。

[0047] 由于已知肿瘤能够逃避Th1免疫应答,本方法一个附加的步骤旨在使这些肿瘤免疫逃逸机制失效。高度炎症环境可以具有抑制肿瘤免疫逃逸和破坏对肿瘤抗原耐受性的作用,其与炎症可以破坏对自身组织抗原耐受性并促进自身免疫的方式非常相似。为了建立和维持这个炎症环境,可以给患者静脉输注包含本文所述被激活的同种异体Th1细胞的药剂。可选地,这种药剂可以被动脉内给药。优选地,该被激活的同种异体Th1细胞可以与被用于初始预致敏患者的同种异体细胞来自于相同的供体。

[0048] 输注该药剂引起高度炎症环境,因为患者的预致敏免疫系统被激活以排斥这些细胞。此外,排斥该同种异体细胞具有激活宿主先天免疫系统成分(例如NK细胞和巨噬细胞)的继发性作用,从而启动系统性肿瘤液化和消除以及抑制肿瘤逃避该免疫攻击能力所必需的级联免疫事件。这种排斥应答可以建立与在同种异体移植设置中所建立的GVHD环境相似的免疫环境。然而,根据本发明所述的方法该同种异体细胞的排斥是没有毒性的。

[0049] 本文描述的方法包括给患者提供树突细胞成熟化分子CD40L(CD154)。该CD40L可以与组成型表达于宿主造血祖细胞、上皮和内皮细胞、所有专职抗原提呈细胞(APC)、树突细胞(DC)、被激活的单核细胞、被激活的淋巴B细胞、卵泡树突细胞和自然杀伤(NK)细胞上的CD40相互反应。CD40L是Th1应答的最强诱导剂之一,CD40L的刺激终止Treg细胞的抑制作用。CD40L还激活先天NK细胞,并且是树突细胞的最强效活化剂之一。树突细胞CD40-CD40L的激活导致共刺激分子的成熟化和上调,并导致大量IL-12的产生,其具有强效的抗肿瘤和Th1转向特性。CD40L也显示通过抑制肿瘤生长和诱导广泛的肿瘤死亡而具有直接抗肿瘤作用。CD40L的激活还可以增强CTL介导的肿瘤裂解。该CD40L可以独立地对患者给药或者作为治疗组合物的一部分给药。该CD40L可以由治疗组合物被提供给患者,该治疗组合物包括被激活的同种异体Th1细胞,因为CD40L是通过被激活的同种异体Th1细胞而被上调的,其中Th1细胞是通过组合物中存在的抗-CD3/抗-CD28抗体交联而被激活的。

[0050] 由组合物中同种异体Th1细胞产生的Th1细胞因子,与这些细胞上表达的CD40L也

可以激活循环的同种特异性Th1细胞，从而上调它们CD40L的表达，其中所述同种特异性Th1细胞产生于本发明所述方法中的预致敏步骤和其他宿主免疫细胞。通过维持宿主被激活的细胞CD40L的表达，在组合物被排斥后提供持续的CD40L信号。持续的宿主CD40L表达提供了持续的炎症环境并且实现了在介导抗肿瘤效果的方法的第二原位疫苗阶段中形成肿瘤特异性CTL，其中，所述炎症环境对于肿瘤免疫逃逸的下调是必要的。

[0051] 实施例

[0052] 患者

[0053] 至少一轮化疗难以治愈的晚期转移性癌症患者(IV期)适合参加本研究。使用完整的病史，身体检查，全血细胞计数，临床化学和胸部、腹部、骨盆计算机断层扫描(CT)评估每个病人的临床阶段。一些有骨转移癌病史的患者还进行了CT/PET扫描。所有患者的临床分期是根据修订后的美国联合委员会(AJC)系统而确定的。

[0054] 进一步的资格要求如下：书面的自愿知情同意书，年龄≥18岁，至少一处位于被评估认定为经皮冷冻消融安全的转移性病变的可测量疾病，东部肿瘤协作组(ECOG)功能状态≤2；期望寿命≥2个月；和充足的血液、肾和肝功能：总胆红素<1.5mg/dL，谷草转氨酶/谷丙转氨酶≤2.5ULN，肌酸酐≤1.5mg/dL，碱性磷酸酶≤2.5ULN(涉及肝脏时≤5倍正常值)，粒细胞绝对计数≥1,200/mm^3，血小板计数≥75,000/mm^3，PT/INR≤1.5，同时血红蛋白≥9g/dL.患者累积(accrual)3周没有使用贝伐单抗(冷冻消融前6周)，并且累积(accrual)2周没有进行化疗。

[0055] 排除标准为任何预先存在的医疗条件，该医疗条件将会损害接受计划治疗的能力；预先同种异体骨髓/干细胞或实体器官移；研究药物治疗的第一天计算，30天内长期使用(超过2周)大于生理剂量的皮质类固醇制剂(等效剂量大于5mg/天的强的松)；伴随活跃的自身免疫性疾病(例如风湿性关节炎、多发性硬化症、自身免疫性甲状腺疾病和葡萄膜炎)；预先实验性癌症疫苗治疗(例如树突细胞治疗，热休克疫苗)；免疫抑制治疗，包括环孢素、抗胸腺细胞球蛋白或进入研究3个月内他克莫司；输血反应病史；进行性细菌或病毒感染；心脏疾病症状性质或心脏射血分数小于45％；症状性肺部疾病或FEV1、FVC和DLCO≤50％的预测；HIV阳性或AIDS(被认定为HBV和/或HCV阳性)病史。大多数病人在累积时间内没有足够的热量和体液摄入，并没有因为这个原因被排除。

[0056] 对42例患者进行了评价。平均年龄为60.2岁(范围50～89岁)，40％的男性和60％为女性。对患者进行平均2.7批(line)预先化疗的深入预治疗，其中每批平均进行7次(course)化疗。45％患者接受预先放疗，90％患者接受预先手术切除肿瘤病变。患者有沉重肿瘤负担，平均每个患者有22处转移性病变。最常见的指征是乳腺癌(42％)，其次是大肠癌(19％)，还包括卵巢癌，肉瘤，鳞状细胞癌，肺癌，膀胱/输尿管癌，胰脏癌，黑色素瘤和食道癌转移癌。

[0057] 皮下注射

[0058] 皮下注射药物被给药的剂量为1×10^7～4×10^7个细胞，该药物包含同种异体Th1细胞，该细胞缀合CD3/CD28包被的微珠。该细胞悬浮于包含PlasmaLyteA，密度为每毫升1×10^7个细胞、1％人源血清白蛋白的配方缓冲液中。1～4个1mL注射剂在同一时间被给药于不同的位置(上臂、大腿和腹部)。皮下注射给药的频率高达每2天或低至每9天，但优选地每周一次注射、最少注射3周。

[0059] 肿瘤内注射

[0060] 肿瘤内注射药物发生在消融后肿瘤的坏死中心，注射应在消融的一小时内但可以在消融的一周内。优选的药物中1×10^7～6×10^7个细胞被肿瘤内注射而给药。如果存在多个肿瘤，则只有一个肿瘤被消融。在某些情况下重复该消融过程。

[0061] 静脉内、腔内、胸膜内、静脉内(Intravenou)、硬膜外输注：

[0062] 药物经静脉内、腹腔内、胸膜内、静脉内(Intravenou)输注给药，剂量范围为1×10^7～1×10^9个细胞，其中1×10^8个细胞为常用剂量。腹膜腔中输注药物可以用于治疗转移癌和恶性腹水。类似地，腔内输注可以治疗恶性胸腔积液，硬膜外输注可以治疗恶性脑脊髓空间。根据需要这些输注可以反复进行直到肿瘤被彻底根除。

[0063] 该规程的第一步骤被称为“预致敏”步骤。该预致敏步骤由3次或更多次将剂量为1×10^7～4×10^7个细胞的所述药物经皮下注射给药组成，不少于2天间隔，并优选地不多于8天间隔。观察患者至少30分钟注射后的任何不良反应。

[0064] 本方法的第二步被称为“原位接种疫苗”步骤。该步骤在致敏步骤完成后的2-8天内进行。该过程涉及消融选定肿瘤病变，随后在1小时内肿瘤内注射1×10^7～6×10^7个细胞剂量的药物。可选地，恶性腹水癌患者适合腹腔输注，结合不结合冷冻消融均可；可触及病变的患者适合酒精消融，结合不结合冷冻消融均可。腹膜转移癌患者优选地腹腔内注射1×10^8～1×10^9个细胞剂量的药物。

[0065] 用于冷冻消融的方法是使用CryoCare-28经皮探针系统(Endocare,CA,USA)。这个系统采用Joule-Thomson效应，从而在一个密闭系统中冷却超低温探头。依照气体系数和喷嘴的尺寸，不同的气体分子在接近喷嘴的区域产生不同的热交换事件。氩气用于冷却(-187℃)，氦被用于加热(67℃)。

[0066] 必要时，预计的目标肿瘤病变在CT图像引导下被确定和定位。建立无菌区域并且对预计探针插入部位局部麻醉给药。指导探针被经皮下插入，并经CT验证位于目标肿瘤病变范围内。进行一个或两个冻融循环。根据目标肿瘤的大小，使用2～5毫米单探头。冷冻时间约为15～20分钟，这取决于“冰球”的形成，CT上可见。在第二次冷冻步骤(使用时)开始前，融化通过在等同于冷冻的时间内输入氦气而实现。该过程只需要肿瘤病变样本的消融，并且不需要在无肿瘤边缘内完全的肿瘤消融。

[0067] 消融的病变可以在冷却循环后，注射优选的药物前，冷却大约10分钟到1个小时。

[0068] 本方法最后一步骤的免疫刺激步骤在冷冻消融的当天到冷冻消融过程8天内进行。该步骤由一次或多次将剂量为1×10^7～1×10^8个细胞的药物经静脉内输注组成，不少于2天间隔给药。大多数患者每月接受静脉输注作为加强注射。

[0069] 应答：

[0070] 经本发明所述方法治疗的患者在从最后一次治疗约30天后通过CT进行评估。无静脉造影CT中，肿瘤通常为中间密度。肿瘤、血管、肌肉和淋巴结可能都具有相同的密度。碘造影剂经静脉注射(IV)给药后，肿瘤得到不同程度提高：富含血管的副神经节瘤得到强烈加强(enhanced intensely)；然而富含更多细胞的鳞状细胞癌可能没有得到强烈加强，或很少加强，或根本没有加强。癌源或预先内出血在CT上为黑暗(低密度)。由于缺乏血液供应，造影给药后坏死性癌源不加强。

[0071] 成功的治疗中，30天后CT扫描结果显示所有肿瘤病变的肿胀(规模增大)与基线相

比变成低密度(黑暗)。CT中较大肿瘤的外观呈现异质性的点缀的低密度斑点,而不是均匀的低密度囊肿或进展性、具有中央坏死区域和能生存的晚期边缘(advancing rims)的肿瘤。低密度异质性外观表明肿瘤已经被液态化。

[0072] 结果:

[0073] 图1显示了89岁(yo)转移性大肠癌患者的冠状视图(coronal view),该患者在2009年6月被提出在肝脏有转移性疾病,并且用数批FOLFOX和FOLFIRI化疗方案以及FOLFIRI与贝伐珠单抗(avastin)的方案进行治疗。该患者在2010年6月成为晚期患者,成为化疗方法难以治愈,并且2010年9月在肝脏中呈现11处转移性病变。该患者接受了本文所述3周每周一次剂量为1×10^{7}皮下药物注射,一周后接受了其中一处肝脏转移肿瘤冷冻消融过程和第21天肿瘤内输注优选药物,并且在第28天静脉输注1×10^{9}个细胞,

[0074] 图1显示了在肝脏转移性病变的一个选取切片的基线外观。60天后肿瘤变大,并且密度变低,与液态化反应相一致。90天后肿瘤保持较大的规模,但可能由于水分重吸收失去了低密度特征。在第95天患者被给药加强静脉输注,在第120天拍摄另一个CT图像。图像显示再次高密度并且规模变大。为了表明这是事实上的液态化而不是进展性肿瘤,进行肿瘤组织切片检查并由病理专家评估。如图2所示,组织切片显示大面积凝固性坏死和与免疫介导的肿瘤液态化相一致的纤维化。

[0075] 尽管已经参考优选实施例,对本发明进行了描述,但本领域技术人员应该认可可以根据本发明的描述进行改变和丰富,而不会离开本发明的范围。

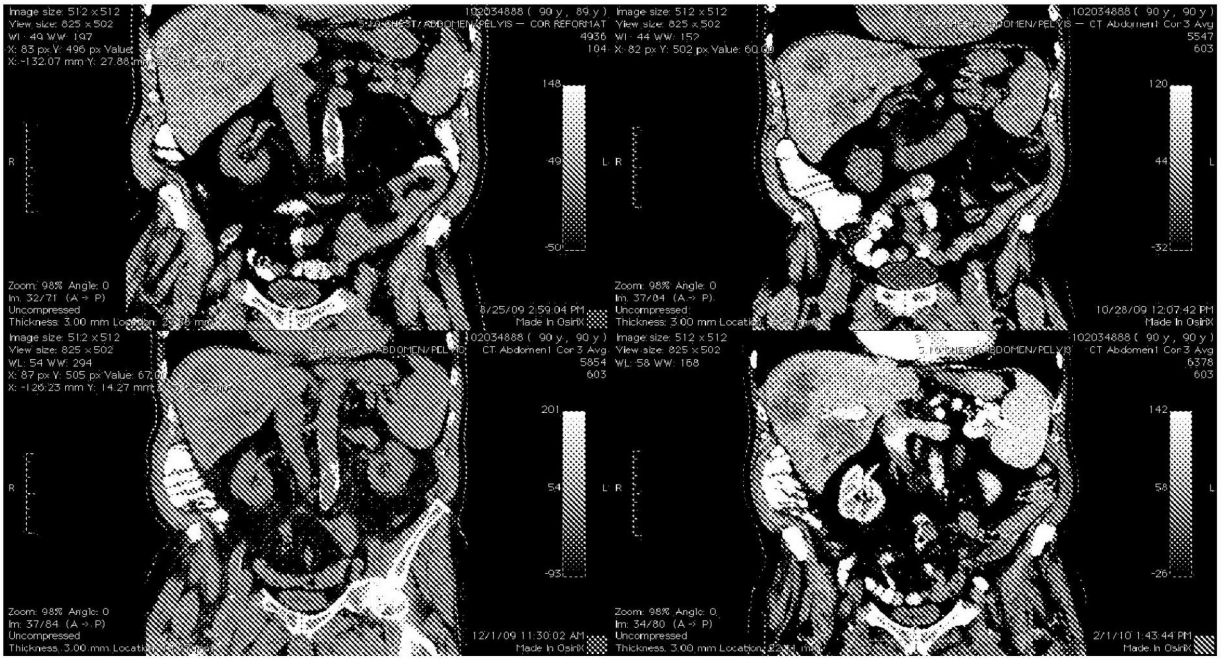


图1

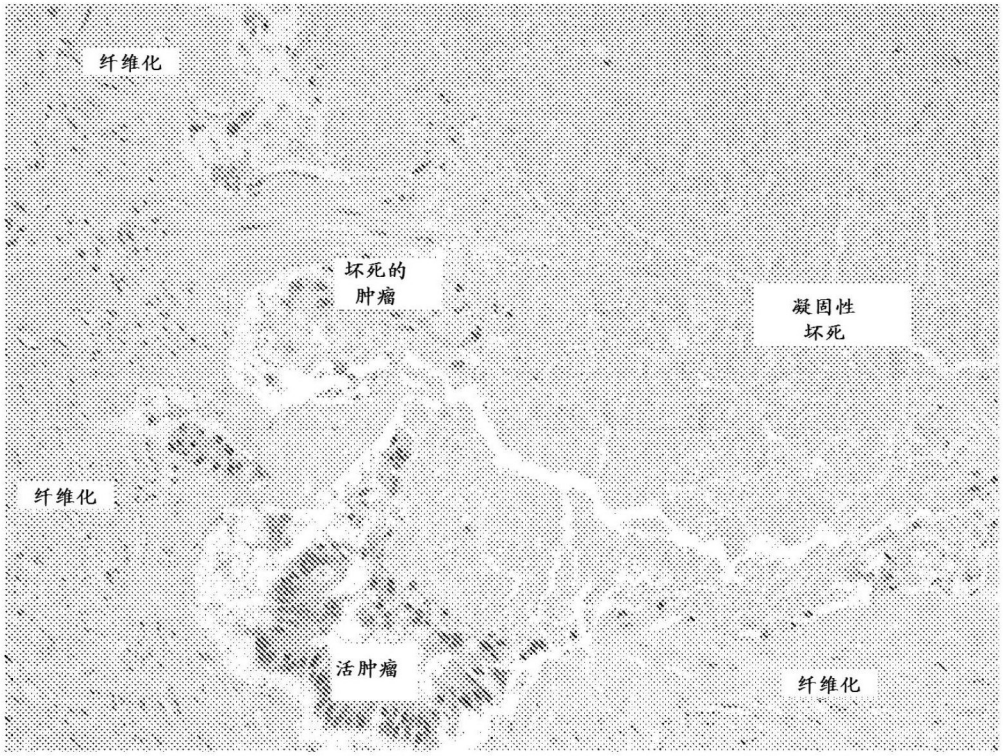


图2

Abstract

This invention relates to compositions and methods for immunotherapy of cancer. Specifically, a method of cancer immunotherapy is described which results in the systemic liquidation of both solid and metastatic tumors whereever they reside in the body. The compositions include activated allogeneic Th1 cells that when administered appropriately lead to liquidation of tumors. The method includes administering priming doses of the therapeutic composition, ablation of a selected tumor lesion along with intratumoral injection of the composition and then infusion of the therapeutic composition. These steps enable the systemic liquidation of tumors secondary to immune cell infiltration and leads to immune-mediated tumor eradication.

