



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I843836 B

(45) 公告日：中華民國 113 (2024) 年 06 月 01 日

(21) 申請案號：109110903

(22) 申請日：中華民國 109 (2020) 年 03 月 30 日

(51) Int. Cl. : C12N5/078 (2010.01)

G01N33/574 (2006.01)

A61K49/00 (2006.01)

(30) 優先權：2019/03/29 美國

62/826,677

(71) 申請人：臺北醫學大學 (中華民國) TAIPEI MEDICAL UNIVERSITY (TW)

臺北市信義區吳興街 250 號

(72) 發明人：陳建中 CHEN, CHIEN CHUNG (TW)；趙子豪 CHEW, CHEE HO (MY)；黃俚婷 HUANG, WAN TING (TW)；曹芸 TSAO, YUN (TW)

(74) 代理人：陳長文

(56) 參考文獻：

CN 109504659A

US 2011/0264235A1

期刊 Aref et al., "3D microfluidic ex vivo culture of organotypic tumor spheroids to model immune checkpoint blockade", Lab on a Chip, Vol. 18, Royal Society of Chemistry, 2018, Pages 3129-3143.

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：17 項 圖式數：7 共 32 頁

(54) 名稱

孔洞中空纖維膜及使用其篩選免疫檢查點抑制劑之方法

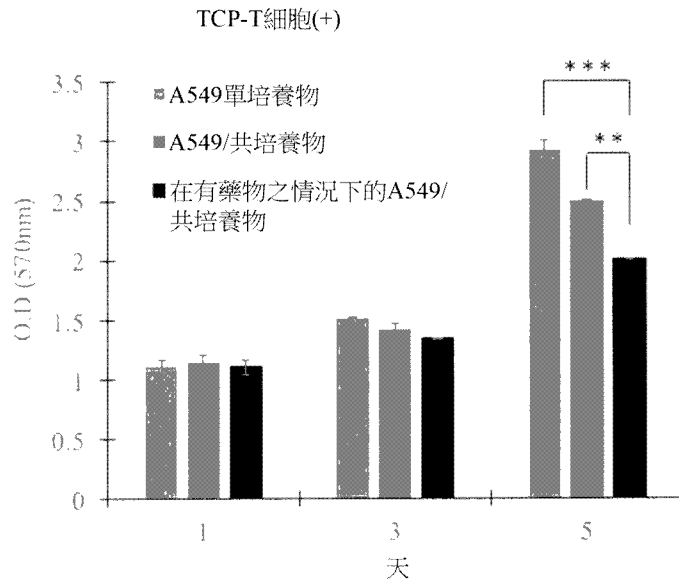
(57) 摘要

本發明提供一種孔洞中空纖維膜及使用該膜篩選免疫檢查點抑制劑之方法。該膜可在具有免疫系統且使用低成本常見小鼠之動物模型中使用。宿主免疫系統不能攻擊該膜內之癌細胞且動物研究證明膜系統可在動物內進行。

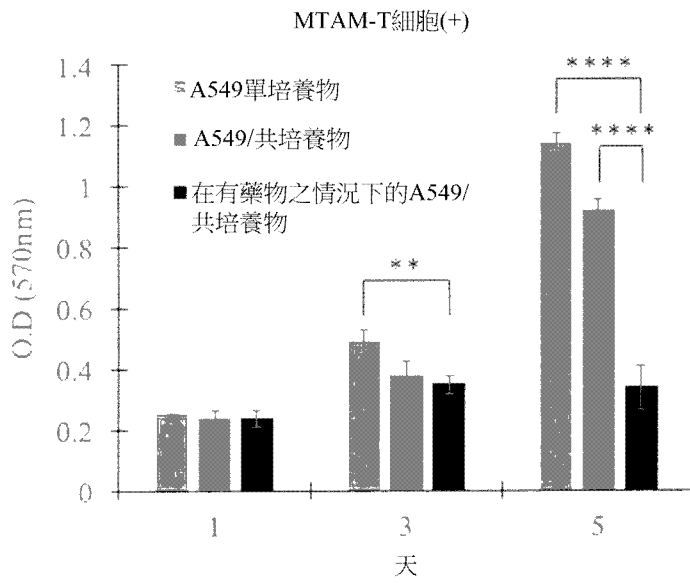
The present invention provides a porous hollow fiber membrane and methods of using the membrane to select an immune checkpoint inhibitor. The membrane can be used in animal models with an immune system and using low-cost common mouse. The host immune system is unable to attack the cancer cells within the membrane and animal study proves that the membrane system can be performed within animals.

指定代表圖：

(G)



(H)



【圖1】(續)



I843836

【發明摘要】

【中文發明名稱】

孔洞中空纖維膜及使用其篩選免疫檢查點抑制劑之方法

【英文發明名稱】

A POROUS HOLLOW FIBER MEMBRANE AND METHODS OF USING IT TO SELECT AN IMMUNE CHECKPOINT INHIBITOR

【中文】

本發明提供一種孔洞中空纖維膜及使用該膜篩選免疫檢查點抑制劑之方法。該膜可在具有免疫系統且使用低成本常見小鼠之動物模型中使用。宿主免疫系統不能攻擊該膜內之癌細胞且動物研究證明膜系統可在動物內進行。

【英文】

The present invention provides a porous hollow fiber membrane and methods of using the membrane to select an immune checkpoint inhibitor. The membrane can be used in animal models with an immune system and using low-cost common mouse. The host immune system is unable to attack the cancer cells within the membrane and animal study proves that the membrane system can be performed within animals.

【指定代表圖】

圖1(H)

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

孔洞中空纖維膜及使用其篩選免疫檢查點抑制劑之方法

【英文發明名稱】

A POROUS HOLLOW FIBER MEMBRANE AND METHODS OF USING IT TO SELECT AN IMMUNE CHECKPOINT INHIBITOR

【技術領域】

【0001】 本發明係關於免疫檢查點抑制劑之有效性之評估。詳言之，本發明係關於使用電紡纖維管鑑別有效免疫檢查點抑制劑。

【先前技術】

【0002】 癌症免疫療法為一個快速發展的領域，其已取得令人印象深刻且有前景之突破。免疫療法之基礎為免疫系統之操作及/或調節，包括先天性免疫反應及應變性免疫反應兩者。在正常條件下，免疫檢查點需要維持活化信號與抑制信號之間的平衡且在免疫系統對外來物或病原劑作出反應時確保形成有效免疫反應同時防護避免自體免疫之發生或對組織造成損害。重要的免疫檢查點受體為表現於T細胞上且高度表現於調節性T細胞(Treg)上之CTLA-4。認為CTLA-4充當抑制性分子或免疫反應「制動」且主要調節T細胞活化之幅度。另一重要免疫檢查點受體為PD-1，其在活化之後表現於T細胞上、高度表現於Treg上且表現於包括B細胞及自然殺手(NK)細胞之其他活化細胞上。與CTLA-4類似，認為PD-1充當抑制性分子及針對免疫反應之「制動」。

【0003】 調節癌症免疫性之藥劑之首次臨床成功已證實作為新穎路徑之癌症免疫療法在癌症患者中獲得持久且長效之臨床反應。獲得用於治

療轉移性黑素瘤之銷售批准之第一此類藥劑伊匹單抗(ipilimumab) (Yervoy, BMS)為阻斷CTLA4受體(免疫檢查點蛋白)的抗體。在研發下之其他免疫檢查點抑制劑為阻斷PD-1受體與其配位體PD-L1及PD-L2之間的相互作用的抗體。靶向PD-1路徑之若干抗體目前處於用於治療黑素瘤、腎細胞癌、非小細胞肺癌、彌漫性大B細胞淋巴瘤及其他腫瘤之臨床研發中。然而，利用免疫檢查點阻斷之治療具有較低反應率。

【0004】 免疫療法評估面對來自藥物研發之最早階段的許多挑戰。已研發出許多活體外分析來篩選及評估免疫細胞介導之殺滅的功效。然而，在活體外分析結果與臨床結果之間存在極大差距。此外，研發多種活體內動物模型以評估免疫檢查點抑制劑之有效性。然而，其通常花費長時間，需要特定小鼠(諸如免疫缺乏動物及人類化小鼠)及多個實驗室小鼠來完成活體內分析。儘管US 5,676,924提供一種測定癌症療法之有效性的方法，其藉由將腫瘤細胞密封於半透膜中空纖維之片段中，將經密封之纖維片段植入於哺乳動物中，用癌症療法治療該哺乳動物及評估癌症療法對中空纖維片段中之細胞的作用。但US 5,676,924中所揭示之方法不適用於評估免疫反應中之化合物。

【0005】 因此，由於難以預測免疫檢查點抑制劑之治療有效性，因此非常需要鑑別適用於診斷及治療目的之免疫檢查點抑制劑。

【發明內容】

【0006】 本發明提供一種活體內篩選免疫檢查點抑制劑之方法，其包含(a)將黏附腫瘤細胞及懸浮免疫細胞活體外共培養於微管陣列膜(MTAM)之內腔內，其中該MTAM包含一或多層靜電紡中空纖維集合體，其具有高度對齊且緊密填充之奈米尺寸之電紡中空纖維；(b)將該MTAM

移植至非人類動物中；及(c)向該非人類動物投與免疫檢查點抑制劑；(d)分離該黏附腫瘤細胞與該懸浮免疫細胞；及(e)測定該黏附腫瘤細胞之細胞存活率或該懸浮免疫細胞之活性，或測定該黏附腫瘤或懸浮免疫細胞中之免疫檢查點蛋白表現；其中若該黏附腫瘤細胞之細胞存活率顯著低於對照組之黏附腫瘤細胞之存活率或該懸浮免疫細胞之活性顯著高於對照組之懸浮免疫細胞之活性；或若該黏附腫瘤或懸浮免疫細胞中之免疫檢查點蛋白表現相對於對照組改變，則該免疫檢查點抑制劑具有抗腫瘤作用。

【0007】 在一個實施例中，該等纖維具有自其內表面延伸之奈米級毛髮狀結構。在一些實施例中，毛髮狀結構之長度介於100 nm至1 μm範圍內或毛髮狀結構之縱橫比至多15:1。在另一個實施例中，毛髮狀結構之表面覆蓋率為約10%至約80%。

【0008】 在某些實施例中，該等黏附腫瘤細胞或該等懸浮免疫細胞以約 1×10^4 個細胞/ μl 至 1×10^7 個細胞/ μl 之濃度接種。黏附腫瘤細胞之某些實施例包含以下的細胞：肝細胞癌、結腸直腸癌、神經膠母細胞瘤、胃癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、胰臟癌、腎細胞癌、良性前列腺增生、前列腺癌、卵巢癌、黑素瘤、乳癌、慢性淋巴球性白血病(CLL)、梅克爾細胞癌(Merkel cell carcinoma)、小細胞肺癌(SCLC)、非霍奇金淋巴瘤(Non-Hodgkin lymphoma)、急性骨髓白血病(AML)、膽囊癌及膽管癌、膀胱癌及子宮癌。懸浮免疫細胞之某些實施例包含外周血液單核細胞(PBMC)、淋巴細胞、T淋巴細胞、T細胞、T輔助細胞、單核球、自然殺手(NK)細胞、巨噬細胞及粒細胞。

【0009】 非人類動物之某些實施例包含嚙齒動物(諸如鼠類)、兔、狗、豬及猴。

【0010】 在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑包含結合於免疫檢查點蛋白之抗體(例如單株抗體、嵌合抗體、人類化抗體及人類抗體)、工程化結合蛋白、可溶受體、適體、肽或小分子。

【0011】 在一個實施例中，步驟(a)之活體外共培養花費約1至約2天。在一個實施例中，在步驟(b)之移植約1至約3天之後進行步驟(c)中之免疫檢查點抑制劑之投與。在一個實施例中，在步驟(c)之投與約8至約15天之後測定腫瘤細胞之細胞存活率或免疫細胞之活性或免疫檢查點蛋白表現。

【0012】 本發明進一步提供一種活體外篩選免疫檢查點抑制劑之方法，其包含(a)將黏附腫瘤細胞及懸浮免疫細胞活體外共培養於MTAM之纖維之內腔內；(b)向該MTAM添加免疫檢查點抑制劑；(c)分離該黏附腫瘤細胞與該懸浮免疫細胞且測定該黏附腫瘤細胞之細胞存活率或該懸浮免疫細胞之活性，或測定該黏附腫瘤或懸浮免疫細胞中之免疫檢查點蛋白表現；其中若該黏附腫瘤細胞之細胞存活率顯著低於對照組之黏附腫瘤細胞之細胞存活率或該懸浮免疫細胞之活性顯著高於對照組之活性；或若該黏附腫瘤或懸浮免疫細胞中之免疫檢查點蛋白表現相對於對照組改變，則該免疫檢查點抑制劑具有抗腫瘤作用。

【圖式簡單說明】

【0013】 圖1(A)至(H)展示細胞之細胞存活率。在TCP(A)及膜腔(B)中培養之A549細胞視培養天數而增加，且抗PD-1藥物之添加不影響細胞存活率($p>0.05$)。在TCP(C)及膜腔(D)中培養之PBMC細胞之細胞存活率視培養天數而降低，且抗PD-1藥物之添加不影響細胞存活率。將A549細胞及不活化T細胞在TCP中共培養(E)且其生長類似於對照組之生長。在膜

中共培養之A549細胞及不活化T細胞展現類似結果(F)。將A549細胞及活化T細胞在TCP中共培養(G)且其生長類似於對照組(一種細胞類型)之生長。與對照組相比，共培養之細胞存活率在第五天降低約14%(未添加抗PD-1藥物)及約31%(添加抗PD-1藥物)。在膜中共培養之A549細胞及活化T細胞(H)展現細胞存活率分別降低約19%(未添加抗PD-1藥物)及約70%(添加抗PD-1藥物)。

【0014】圖2展示裸小鼠及常見小鼠之膜中之細胞存活率視時間而增加且不存在顯著差異。

【0015】圖3展示裸小鼠及常見小鼠之膜中之干擾素 γ 含量極低。

【0016】圖4展示裸小鼠及常見小鼠中之血管數目視時間而增加。

【0017】圖5展示在第七天，常見小鼠中之血管數目與裸小鼠相比增加約38%。

【0018】圖6(A)及(B)展示將黏附腫瘤細胞(A549)保持在膜之纖維之內壁上(A)且分離懸浮液細胞(PBMC)(B)。

【0019】圖7(A)至(D)展示癌細胞與經抗PD1抗體處理之初始活化PBMC共培養。

【實施方式】

【0020】除非另外指明，否則當描述本發明(包括其各種態樣及實施例)時，以下術語具有以下含義。

【0021】術語「一(a/an)」係指一個或多於一個(亦即，至少一個)冠詞之語法賓語。藉助於實例，「一要素」意謂一個要素或多於一個要素。

【0022】術語「微管陣列膜」(縮寫為「MTAM」)係指包含電紡纖維集合體之薄膜或膜，該電紡纖維集合體具有高度對齊且緊密封裝之奈米

尺寸之中空纖維。

【0023】 如本文中所使用，術語「抗體」係指衍生自與抗原特異性結合之免疫球蛋白分子的蛋白質或多肽序列。抗體可為多株或單株、多鏈或單鏈或完整的免疫球蛋白且可衍生自天然來源或重組來源。抗體可為免疫球蛋白分子之四聚體。

【0024】 術語「抗癌作用」係指可藉由各種手段顯現之生物作用，包括但不限於例如腫瘤體積之減小、癌細胞數目之減少、癌轉移數目之減少、預期壽命之增加、癌細胞增殖之減少、癌細胞存活之減少或與癌病況相關之各種生理學症狀之改善。「抗癌作用」亦可藉由肽、聚核苷酸、細胞及抗體阻止首次癌症之出現的能力表明。術語「抗腫瘤作用」係指可藉由各種手段顯現之生物作用，包括但不限於例如腫瘤體積之減小、腫瘤細胞數目之減少、腫瘤細胞增殖之減少或腫瘤細胞存活之減少。

【0025】 術語「有效量」或「治療有效量」在本文中可互換使用，且係指有效達成特定生物結果之如本文中所描述之化合物、調配物、材料或組合物之量。

【0026】 「免疫反應」係指免疫系統之細胞(例如，T淋巴細胞、B淋巴細胞、自然殺手(NK)細胞、巨噬細胞、嗜酸性球、肥大細胞、樹突狀細胞及嗜中性球)及由此等細胞中之任一者或肝臟產生之可溶性巨分子(包括抗體、細胞激素及補體)的作用，其引起自脊椎動物體內選擇性靶向、結合於、損害、破壞及/或消除侵入病原體、受病原體感染之細胞或組織、癌細胞或其他異常細胞或在自體免疫或病理性炎症之情況下，普通人類細胞或組織。

【0027】 術語「免疫檢查點蛋白」在此項技術中已知。在此術語之

已知含義內，熟習此項技術者應清楚，在「免疫檢查點蛋白」之層面上，免疫系統向其組分提供抑制信號以便平衡免疫反應。已知免疫檢查點蛋白可包含CTLA-4、PD1及其配位體PD-L1及PD-L2以及另外的LAG-3、BTLA、B7H3、B7H4、TIM3、MR。涉及LAG3、BTLA、B7H3、B7H4、TIM3及MR之路徑在此項技術中經識別以構成與CTLA-4及PD-1依賴性路徑類似之免疫檢查點路徑(參見例如Pardoll, 2012. Nature Rev Cancer 12:252-264；Mellman等人, 2011. Nature 480:480-489)。

【0028】 術語「癌症」係指廣泛群體之各種疾病，其特徵為異常細胞在體內不受控生長。不受調控之細胞分裂及生長導致形成侵入鄰近組織且亦可經由淋巴系統或血流轉移至身體之遠端部分的惡性腫瘤。「癌」或「癌組織」可包括腫瘤。

【0029】 如本文中所使用，「給藥時間間隔」意指向個體投與本文中所揭示之調配物的多種劑量之間流逝之時間量。因此，給藥時間間隔可指示為範圍。

【0030】 如本文中所用，術語「給藥頻率」係指在既定時間內投與本文中揭示之調配物之劑量的頻率。給藥頻率可指示為每既定時間之給藥之次數，例如，一週一次或兩週一次。

【0031】 術語「生物材料」係指任何天然或人造材料，其整體或部分由執行、加強或代替天然功能的活性物質(諸如灌注有細胞或細胞提取物之聚合物支架)構成或衍生自該活性物質。

【0032】 術語「細胞株」係指可在培養物中維持及生長之特定類型之細胞。細胞株通常均質且具有良好特徵，且可長期儲存(例如，低溫保藏)。某些細胞株可具有有限壽命，而其他細胞株可無限分裂。

【0033】術語「活體內」係指在生物體體內，諸如在人類臨床試驗或治療中之動物中進行或發生之實驗方法或過程。

【0034】如本文中所使用，術語「電紡」係指使用流體動力學與帶電表面之間的相互作用自溶液產生稱為電紡纖維之奈米尺寸之纖維的技術。一般而言，電紡纖維之形成涉及將溶液提供至與電壓源電連通之體內之孔，其中電力有助於形成沈積於可接地表面上或以其他方式在低於主體之電壓下之精細纖維。在電紡中，將由一或多個針、槽或其他孔提供之聚合溶液或熔融物相對於收集柵格充電至高電壓。電力克服表面張力且使得聚合溶液或熔體之細流朝向接地或帶相反電荷之收集柵格移動。

【0035】如本文中所使用，術語「聚合物」係指且一般包括但不限於均聚物、共聚物(諸如嵌段、接枝、無規及交替共聚物、三元共聚物等)及其摻合物及變體。較佳地，其可包括但不限於聚乳酸交酯、聚乳酸、聚烯烴、聚丙烯腈、聚胺基甲酸酯、聚碳酸酯、聚己內酯、聚乙烯醇(PVA)、纖維素、聚葡萄糖耐綸(例如，耐綸6、耐綸406、耐綸6-6等)、聚苯乙烯、蛋白質及其類似物或其組合。除非另外特定限制，否則術語「聚合物」意欲包括材料之所有可能的幾何組態。此等組態包括但不限於等規、間規及無規對稱。用於各聚合物之適合溶劑可選自熟習此項技術者已知之溶劑，包括但不限於硫酸、甲酸、氯仿、四氫呋喃、二甲基甲醯胺、水、丙酮及其組合。

【0036】如本文中所使用，術語「奈米尺寸纖維」或「奈米纖維」係指平均直徑不超過約1500奈米(nm)之極小直徑纖維。奈米纖維通常理解為具有約10至約1500 nm、更具體言之，約10至約1000 nm、更具體言之，約20至約500 nm、且更具體言之，約20至約400 nm的纖維直徑範圍。

其他例示性範圍包括約50至約500 nm、約100至500 nm或約40至約200 nm。在存在微粒且非均質分佈於奈米纖維上的例子中，奈米纖維的平均直徑可使用已知技術(例如，與電子顯微法聯用之影像分析工具)來量測，但不包括相對於纖維之無粒子部分由額外粒子之存在顯著放大的纖維的部分。

【0037】 如本文中所使用，術語「定向纖維」指示特定結構或陣列中之大體上所有纖維彼此平行排列在縱向方向(「單向定向」)或在界定明確之三維網絡(「三維定向」)中。換言之，纖維並非相對於彼此任意在空間上排列。在大多數情況下，本文中所描述之纖維在相對於支撐基板表面之大體垂直方向上生長，且(若存在)存在個別纖維股線之極小分支。

【0038】 如本文中所使用，術語「單層材料」或「單層之材料」係指由厚度可變化之單層構成的材料。

【0039】 如本文中所使用，術語「複數個層」或「多層材料」係指單層之材料之「堆疊」。

【0040】 本發明提供一種活體內篩選免疫檢查點抑制劑之方法，其包含(a)將黏附腫瘤細胞及懸浮免疫細胞活體外共培養於微管陣列膜(MTAM)之內腔內，其中MTAM包含電紡中空纖維集合體，其具有高度對齊且緊密封裝之奈米尺寸之電紡中空纖維；(b)將該MTAM移植至非人類動物中；及(c)向該非人類動物投與免疫檢查點抑制劑；(d)分離該黏附腫瘤細胞與該懸浮免疫細胞；及(e)測定該黏附腫瘤細胞之細胞存活率或該懸浮免疫細胞之活性，或測定該黏附腫瘤或懸浮免疫細胞中之免疫檢查點蛋白表現；其中若該黏附腫瘤細胞之細胞存活率顯著低於對照組之黏附腫瘤細胞之細胞存活率或該懸浮免疫細胞之活性顯著高於對照組之懸浮免疫

細胞之活性；或若該黏附腫瘤或懸浮免疫細胞中之免疫檢查點蛋白表現相對於對照組改變，則該免疫檢查點抑制劑具有抗腫瘤作用。

【0041】 在一些實施例中，該等黏附腫瘤細胞或該等懸浮免疫細胞以約 1×10^4 個細胞/ μl 至 1×10^7 個細胞/ μl 之濃度接種。在一些實施例中，該等黏附腫瘤細胞或該等懸浮免疫細胞以 1×10^4 個細胞/ μl 至約 1×10^6 個細胞/ μl 、約 1×10^4 個細胞/ μl 至約 1×10^5 個細胞/ μl 、約 1×10^5 個細胞/ μl 至約 1×10^7 個細胞/ μl 、約 1×10^5 個細胞/ μl 至約 1×10^6 個細胞/ μl 、約 2×10^4 個細胞/ μl 至約 2×10^7 個細胞/ μl 、約 2×10^4 個細胞/ μl 至約 2×10^6 個細胞/ μl 、約 2×10^4 個細胞/ μl 至約 2×10^5 個細胞/ μl 、約 2×10^5 個細胞/ μl 至約 2×10^7 個細胞/ μl 或約 2×10^5 個細胞/ μl 至約 2×10^6 個細胞/ μl 之濃度接種。

【0042】 在一些實施例中，該等黏附腫瘤細胞包括但不限於以下的細胞：肝細胞癌、結腸直腸癌、神經膠母細胞瘤、胃癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、胰臟癌、腎細胞癌、良性前列腺增生、前列腺癌、卵巢癌、黑素瘤、乳癌、慢性淋巴球性白血病(CLL)、梅克爾細胞癌(Merkel cell carcinoma)、小細胞肺癌(SCLC)、非霍奇金淋巴瘤(Non-Hodgkin lymphoma)、急性骨髓白血病(AML)、膽囊癌及膽管癌、膀胱癌或子宮癌。

【0043】 在一些實施例中，該等懸浮免疫細胞包括但不限於外周血液單核細胞(PBMC)、淋巴細胞、T淋巴細胞(諸如CD8-陽性T淋巴細胞)、T細胞(諸如CD4-陽性T細胞、CD8-陽性T細胞、CD4-陽性輔助T細胞、CD4-陽性-輔助-T細胞及CD8-陽性細胞毒性T細胞)、T輔助細胞、單核球、自然殺手(NK)細胞、巨噬細胞或粒細胞(諸如嗜中性球、嗜鹼性球及

嗜酸性球)。

【0044】 將包含黏附腫瘤細胞及懸浮免疫細胞之膜移植至非人類動物中。使用本發明之方法，任何類型之動物可用於活體內篩選免疫檢查點抑制劑。例如，常見實驗室大鼠或小鼠可用於本發明方法中以篩選臨床前分析中之免疫檢查點抑制劑，且不需要免疫缺乏動物或人類化小鼠。

【0045】 在一些實施例中，非人類動物為嚙齒動物(諸如鼠類)、兔、狗、豬或猴。在一些實施例中，非人類動物為鼠類，諸如大鼠及小鼠。

【0046】 將所關注之免疫檢查點抑制劑投與非人類動物用於篩選。在一個實施例中，免疫檢查點抑制劑在步驟(b)之移植24小時之後投與。

【0047】 在本發明中，免疫檢查點抑制劑為抑制免疫檢查點蛋白功能之任何化合物。抑制包括降低功能及完全阻斷。詳言之，免疫檢查點蛋白係人類免疫檢查點蛋白。因此，免疫檢查點抑制劑較佳為人類免疫檢查點蛋白之抑制劑。

【0048】 在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑包括但不限於結合於免疫檢查點蛋白之抗體(例如，單株抗體、嵌合抗體、人類化抗體及人類抗體)、工程化結合蛋白、可溶受體、適體、肽或小分子。

【0049】 在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑包含抑制性受體之拮抗劑。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑抑制PD1路徑或CTLA4路徑。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑結合於PD1、PD-L1或PD-L2。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑結合於CTLA4。

【0050】 較佳免疫檢查點蛋白抑制劑為特異性識別免疫檢查點蛋白之化合物或抗體。已知許多CTLA-4、PD1、PDL-1、PD-L2、LAG-3、

BTLA、B7H3、B7H4、TIM3及MR抑制劑且類似於此等已知免疫檢查點蛋白抑制劑，將來可研發替代性免疫檢查點抑制劑。例如，伊匹單抗為當前以名稱Yervoy(Bristol-Myers Squibb)銷售之全人類CTLA-4阻斷抗體。第二CTLA-4抑制劑為曲美木單抗(tremelimumab)。PD-1抑制劑之實例包括但不限於阻斷人類PD-1之人類化抗體，諸如拉立珠單抗(lambrolizumab)或皮立珠單抗(pidilizumab)，以及諸如尼沃單抗(nivolumab)之全人類抗體。其他PD-1抑制劑可包括可溶PD-1配位體之呈現，包括但不限於亦稱為B7-DC-Ig或AMP-244的PD-L2 Fc融合蛋白及當前所研究及/或研發用於療法中之其他PD-1抑制劑。另外，免疫檢查點抑制劑可包括但不限於阻斷PD-L1之人類化或全人類抗體(諸如MEDI-4736及MIH1)及當前所研究之其他PD-L1抑制劑。根據本發明，免疫檢查點抑制劑較佳選自CTLA-4、PD-1或PD-L1抑制劑。此等免疫檢查點蛋白之已知抑制劑可原樣使用或可使用類似物，尤其抗體之嵌合、人類化或人類形式。

【0051】 分離腫瘤細胞及免疫細胞。孔洞中空纖維之孔徑阻止細胞進入及離開纖維。由於腫瘤細胞之黏附特性及免疫細胞之懸浮特性，腫瘤細胞可容易與免疫細胞分離。

【0052】 為篩選免疫檢查點抑制劑，測定腫瘤細胞之細胞存活率或免疫細胞之活性。當腫瘤細胞之細胞存活率顯著低於對照組之細胞存活率或免疫細胞之活性顯著高於對照組之活性時，免疫檢查點抑制劑測定為具有抗腫瘤作用。

【0053】 在一個實施例中，步驟(a)之活體外共培養花費約1至約2天。特定言之，步驟(a)之活體外共培養花費約1天。

【0054】 在一個實施例中，在步驟(b)之移植約1至約3天之後進行步驟(c)中之免疫檢查點抑制劑之投與。在另一實施例中，在步驟(b)移植約2天之後進行步驟(c)中之免疫檢查點抑制劑之投與。

【0055】 在一個實施例中，在步驟(c)之投與約8至約15天之後測定腫瘤細胞之細胞存活率或免疫細胞之活性或免疫檢查點蛋白表現。在另一實施例中，在步驟(c)約8天之後測定腫瘤細胞之細胞存活率或免疫細胞之活性或免疫檢查點蛋白表現。

【0056】 因此，步驟(b)至步驟(d)之總時間花費約9天至18天。在另一實施例中，步驟(b)至步驟(d)之總時間花費約10天。

【0057】 根據此項技術中已知之方法測定腫瘤細胞之細胞存活率或免疫細胞之活性。例如，細胞存活率可藉由MTT分析測定。

【0058】 在一個實施例中，MTAM包含揭示於US 2011264235中之一或多層高度對齊且緊密封裝之電紡纖維集合體。特定言之，MTAM包含高度對齊且緊密封裝之電紡中空纖維集合體，其中至少五種電紡纖維封裝在一起以形成單層，且電紡中空纖維之定向相對於集合體之縱軸不大於 $\pm 5^\circ$ ，其中電紡中空纖維經連接以使得電紡中空纖維經對齊且緊密封裝以形成單層，且其中電紡中空纖維之對齊在定向上不超過 $\pm 5^\circ$ 。在一些實施例中，纖維集合體由選自由以下組成之群的聚合物構成：環氧乙烷、聚氧化乙烯、乙二醇、聚乙二醇、聚(乳酸) (PLA)、聚(乙醇酸) (PGA)、聚(環氧乙烷) (PEO)、耐綸、聚酯、聚醯胺、聚(胺基酸)、聚醯亞胺、聚醚、聚酮、聚胺基甲酸酯、聚己內酯、聚丙烯腈、芳族聚醯胺、共軛聚合物、聚(2-甲氧基、5乙基(2'己氧基)對伸苯基伸乙炔基) (MEH-PPV)、聚伸苯基伸乙炔基、聚伸芳基-伸乙炔基、聚伸噻吩基-伸乙炔基、聚吡咯-伸乙

烯基、聚伸雜芳基-伸乙烯基、聚苯胺、聚苯、聚伸芳、聚噻吩、聚吡咯、聚伸雜芳、聚伸苯基-伸乙炔、聚伸芳基-伸乙炔、聚噻吩并-伸乙炔、聚伸雜芳基-伸乙炔及其混合物。在一些實施例中，各纖維之平均壁厚度為約1至約5 μm 。在一些實施例中，至少20種纖維封裝在一起以形成單層。在另一實施例中，至少50個纖維封裝在一起以形成單層。在一些實施例中，各纖維之L/d大於約100。在一些實施例中，各纖維之L/d大於約1,000。在一些實施例中，各纖維之L/d為約20至約10,000。在一些實施例中，各纖維之平均壁厚度為約1至約3 μm 。

【0059】 在一個實施例中，電紡中空纖維集合體及MTAM之纖維具有自纖維之內表面延伸之毛髮狀的結構。毛髮狀結構自纖維之內表面生長。毛髮狀結構之表面覆蓋率比率為約10%至約80%、約10%至約70%、約10%至約60%、約10%至約50%、約10%至約40%、約10%至約30%、約20%至約80%、約20%至約70%、約20%至約60%、約20%至約50%、約30%至約80%、約30%至約70%、約30%至約60%、約40%至約80%、約40%至約70%、約50%至約80%，或約60%至約80%。表面覆蓋率比率可基於TEM影像來估計。纖維中之毛髮狀結構提供較大表面積且容易地可縮放，從而使得較少纖維用於各種應用中且因此可降低成本。例如，「毛髮」之縱橫比至多20:1。毛髮狀結構之縱橫比的實施例包括但不限於至多15:1、至多10:1、至少1:1、至少3:1、或至少5:1、1:1至20:1。

【0060】 MTAM-毛髮狀之纖維係使用包含以約7:約2至約9:約1之比率溶解於溶劑中之約5 wt%至約40 wt%聚合溶液之聚合核溶液；及包含以約7:約2至約9:約1之比率溶解於溶劑中之約5 wt%至約40 wt%聚合溶液之聚合殼溶液在二流體同軸電紡過程中製備。在一個實施例中，溶劑為二氯

甲烷:二甲基甲醯(DCM:DMF)之共溶劑。在另一實施例中，流速為3至10 mL(核溶液)及2至12 mL(殼溶液)及/或收集速度為約80至約120 rpm之鼓收集器用於本發明之方法中。

【0061】 用作核溶液或殼溶液之聚合物之實施例包括但不限於環氧乙烷、聚氧化乙烯(PEO)、乙二醇、聚乙二醇(PEG)、聚(乳酸) (PLA)、聚(乙醇酸) (PGA)、聚(環氧乙烷) (PEO)、耐綸、聚酯、聚醯胺、聚(醯胺酸)、聚醯亞胺、聚醚、聚酮、聚胺基甲酸酯、聚己內酯、聚丙烯腈、芳族聚醯胺、共軛聚合物，諸如電致發光聚合物、聚(2-甲氧基、5-乙基(2'-己氧基)對伸苯基伸乙烯基) (MEH-PPV)、聚伸苯基伸乙烯基、聚伸芳基-伸乙烯基、聚伸噻吩基-伸乙烯基、聚吡咯-伸乙烯基、聚伸雜芳基-伸乙烯基、聚苯胺、聚苯、聚伸芳、聚噻吩、聚噻吩、聚吡咯、聚伸雜芳、聚伸苯基-伸乙炔、聚伸芳基-伸乙炔、聚噻吩并-伸乙炔、聚伸雜芳基-伸乙炔及其混合物。在一些實施例中，聚合物為生物可降解及/或生物可吸收聚合物，諸如聚乙交酯(PGA)及其無規共聚物聚(乙交酯-共-丙交酯) (PGA-共-PLA)、包括甲基丙烯酸乙酯之聚甲基丙烯酸癸烷酯及水凝膠，諸如聚乙烯吡咯啉酮、聚丙烯醯胺、膠原蛋白、明膠、褐藻酸、甲殼素、聚葡萄糖胺糖、纖維蛋白、玻尿酸、聚葡萄糖及聚胺基酸或其混合物。在另一實施例中，該溶液為PLA、PEO及PEG之混合物。

【0062】 纖維表面上之「孔隙」具有約5 nm至約1 μm 範圍內之尺寸。在一些實施例中，孔徑範圍介於約20 nm至約500 nm、約20 nm至約400 nm、約20 nm至約300 nm、約20 nm至約200 nm、約20 nm至約100 nm、約20 nm至約80 nm、約20 nm至約70 nm或約20 nm至約60 nm。表面上之孔隙之密度範圍介於約0.1%至約30%。在一些實施例中，密度為約

0.1%至約25%、約0.1%至約20%、約0.1%至約15%、約0.1%至約10%、約0.1%至約5%、約0.1%至約15%、約1%至約30%、約1%至約25%、約1%至約20%、約1%至約15%、約1%至約10%、約1%至約5%、約5%至約30%、約5%至約25%、約5%至約20%、約5%至約15%、約5%至約10%、約10%至約30%、約15%至約25%、或約15%至約20%。

【0063】 在一個實施例中，纖維為中空的且在內表面上具有孔。在一個實施例中，纖維為中空的且在內表面及外表面兩者上均具有孔。在纖維之(一或多個)表面上具有孔隙，纖維集合體被認為具有「海綿狀」外觀。

【0064】 在另一實施例中，MTAM包括至少兩層纖維集合體。MTAM具有如下結構：其中纖維集合體之層經交替排列，稱為交替層。本文中所示之術語「交替地」或「交替層」意謂纖維之層緊密堆疊且不沿層之z方向完全對齊。例如，在經由z方向觀察時，在雙層膜中之纖維層可具有「A-B」組態。對於三層膜，纖維之層在經由z方向觀測時可具有「A-B-A」或「A-B-C」組態。本文中所使用之術語「垂直」或「垂直層」意謂纖維之層緊密堆疊且沿層之z方向完全對齊。此等MTMA均表示為「MTMA-*al*」，但可添加其他內容足以清楚地指定MTMA之組態及層數目。例如，交替排列有兩個層之MTMA可表示為「MTMA-*dl-al*」。另外，MTMA-交替層可展現以下特徵或益處：面積之消耗減至最少、較大填充密度、可能存在之額外管可減小系統內壓力等。

【0065】 另一方面，MTAM具有如下結構：其中纖維集合體之層經垂直排列，稱為垂直層。亦即，MTMA具有沿z方向(垂直於膜平面之方向)上對齊之多個纖維層。例如，沿z方向上對齊之具有兩個纖維層之

MTMA由「MTMA-*dl*」表示；沿z方向上對齊之具有三個纖維層之MTMA由「MTMA-*tl*」表示；等。亦可提供具有較多纖維層之MTMA。MTMA-垂直層可展現以下特徵或益處：較大填充密度、增強型機械特性、歸因於串主鏈之簡易操作等。

【0066】 沿z方向上對齊之具有多個纖維層的MTAM，在流速大於10 mL/h且電壓為約8 kV至約11 kV下同時維持紡絲頭高度為約1-3 cm，係使用包含約15重量%至約25重量%聚合溶液的殼溶液藉由殼-流體同軸電紡過程來製備。在一個實施例中，聚合溶液為溶解於THF與DMAC之共溶劑中之PSF/PVP。製備具有多層結構之MTAM-*dl-al*包含在殼-流體同軸電紡過程中，在流速大於10 mL/h且電壓為約8 kV至約11 kV下使用包含約15重量%至約25重量%聚合溶液之殼溶液。在一個實施例中，聚合溶液為溶解於THF與DMAC之共溶劑中之PSF/PVP。

【0067】 MTAM可封閉於裝袋中。裝袋為MTAM提供保護且使得能夠容易操作MTAM。

【0068】 在另一態樣中，本發明亦提供一種活體外篩選免疫檢查點抑制劑之方法，其包含(a)將黏附腫瘤細胞及懸浮免疫細胞活體外共培養於本發明之孔洞中空纖維膜之內腔內；(b)向該膜添加免疫檢查點抑制劑；(c)分離該黏附腫瘤細胞與該懸浮免疫細胞且測定該黏附腫瘤細胞之細胞存活率或該懸浮免疫細胞之活性，或測定該黏附腫瘤或懸浮免疫細胞中之免疫檢查點蛋白表現；其中若該黏附腫瘤細胞之細胞存活率顯著低於對照組之黏附腫瘤細胞之細胞存活率或該懸浮免疫細胞之活性顯著高於對照組之懸浮免疫細胞之活性；或若該黏附腫瘤或懸浮免疫細胞中之免疫檢查點蛋白表現相對於對照組改變，則該免疫檢查點抑制劑具有抗腫瘤作

用。

【0069】 在一個實施例中，步驟(a)之活體外共培養花費約1至約2天。特定言之，步驟(a)之活體外共培養花費約1天。

【0070】 在一個實施例中，在步驟(a)之移植約1至約3天之後進行步驟(b)中之免疫檢查點抑制劑之添加。在另一實施例中，在步驟(a)之移植約2天之後進行步驟(b)中之免疫檢查點抑制劑之投與。

【0071】 在一個實施例中，在步驟(b)之投與約8至約15天之後測定腫瘤細胞之細胞存活率或免疫細胞之活性或免疫檢查點蛋白表現。在另一實施例中，在步驟(b)約8天之後測定腫瘤細胞之細胞存活率或免疫細胞之活性或免疫檢查點蛋白表現。

【0072】 因此，步驟(b)至步驟(c)之總時間花費約9天至18天。在另一實施例中，步驟(b)至步驟(c)之總時間花費約10天。

【0073】 在活體外方法中，免疫檢查點抑制劑、MTAM、黏附腫瘤細胞、懸浮免疫細胞、細胞存活率分析及投與等之實施例描述於本文中。

【0074】 本發明之方法可改良評估抗癌藥物之精確性且建立快速、可靠且低成本的抗癌藥物篩選平台。本發明之方法為用於篩選免疫檢查點抑制劑之可行動物模型且提供諸如快速、低成本及高度謹慎之優點。

【0075】 以下實例藉助於說明呈現且不意欲限制本文中所揭示之主題之範疇。

實例

實例1 使用MTAM之活體外研究

【0076】 將A549細胞(1×10^5 個細胞/5 μ l)及PBMC (2×10^5 個細胞/5 μ l)單獨及呈組合形式分別在如US 2011264235中所揭示之組織培養盤

(TCP)及MTAM之纖維之內腔中培養。每天將抗PD-1藥物添加至組織培養盤及膜中。如圖1(A)及(B)中所示，在TCP及膜內腔中培養之A549細胞之細胞存活率視培養天數而增加，且抗PD-1藥物之添加不影響細胞存活率($p>0.05$)。如圖1(C)及(D)中所示，在TCP及膜內腔中培養之PBMC細胞之細胞存活率視培養天數而降低，且抗PD-1藥物之添加不影響細胞存活率($p>0.05$)。

【0077】圖1(E)及(F)展示將A549細胞及不活化T細胞在TCP中共培養且其生長類似於對照組之生長。與包含一種細胞類型的培養物相比，共培養之細胞存活率在第五天降低8%(未添加抗PD-1藥物)及12%(添加抗PD-1藥物)。抗PD-1藥物之添加不具有顯著差異。在膜中共培養之A549細胞及不活化T細胞展現類似結果。

【0078】圖1(G)及(H)展示將A549細胞與活化T細胞在TCP中共培養且其生長類似於對照組(一種細胞類型)之生長。與對照組相比，共培養之細胞存活率在第五天降低約14%(未添加抗PD-1藥物)及約31%(添加抗PD-1藥物)。抗PD-1之添加展現顯著差異。在膜中共培養之A549細胞及活化T細胞展現細胞存活率分別降低約19%(未添加抗PD-1藥物)及約70%(添加抗PD-1藥物)。

【0079】MTAM-毛髮狀亦用於如上所述之活體外研究中。發現在MTAM中共培養之A549細胞及活化T細胞展現降低之細胞存活率。

實例2 在動物模型中之篩選

【0080】如US 2011264235中所揭示，將 1×10^6 個腫瘤細胞(A549細胞)移植至MTAM之內腔中。在24小時之後，將膜植入裸小鼠(缺乏T細胞)及具有完全免疫之常見小鼠(BALA/c小鼠)中。量測血管生成、細胞存活

率及干擾素 γ 含量。如圖2中所示，裸小鼠及常見小鼠之膜中之細胞存活率視時間而增加且不存在顯著差異。裸小鼠及常見小鼠之膜中之干擾素 γ 含量極低(參見圖3)。圖4及圖5展示裸小鼠及常見小鼠中之血管數目視時間而增加且常見小鼠中之血管數目在第七天比裸小鼠中之血管數目增加約38%。

實例3 使用MTAM之活體內動物研究

【0081】 如US 2011264235中所揭示將A549細胞(1×10^5 個細胞/5 μ l)及PBMC(2×10^5 個細胞/5 μ l)移植至MTAM之纖維之內腔中且密封膜之兩端以避免細胞自纖維離開。膜在具有RPMI-1640培養基之培養皿中培養。在24小時之後，使腫瘤細胞黏附至纖維內壁。

【0082】 將BALA/c小鼠(7週齡)用於動物研究中。將以上所得膜移植至小鼠之背部中。在24小時之後，每隔一天向小鼠投與抗PD-1藥物(200 μ g/小鼠)持續15天。在6、9、12及15天自小鼠採集膜以觀測血管生成。將膜置於MTT (0.5% ; Sigma, USA)溶液(1,000 μ l PBS + 200 μ l MTT)中。在30分鐘之後，採集膜且在670 g下離心10分鐘以分離及收集PBMC。在離心之後，採集懸浮液樣品且將其置於載片中。藉由螢光染色載片及膜，隨後藉由螢光顯微鏡觀測。如圖6(A)及(B)中所示，將黏附腫瘤細胞(A549)保持在膜纖維之內壁上且分離懸浮液細胞(PBMC)。隨後，將膜放入500 μ l DMSO溶液中；在24小時之後，將各膜之100 μ l溶液樣品放入96孔盤中且藉由ELISA讀取器量測吸收度(570 nm)。

【0083】 圖7(A)至(D)展示癌細胞與經抗PD1抗體處理之初始活化PBMC共培養。

【0084】 MTAM-毛髮狀亦用於如上文所提及之活體內動物研究中。已發現MTAM-毛髮狀在篩選抗腫瘤藥物方面呈現良好效應。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種活體外篩選免疫檢查點抑制劑之方法，其包含(a)將黏附腫瘤細胞及懸浮免疫細胞活體外共培養於微管陣列膜(MTAM)之內腔內，其中該MTAM包含具有高度對齊且緊密封裝之奈米尺寸之中空纖維的電紡纖維集合體；(b)向該MTAM添加免疫檢查點抑制劑；(c)分離該黏附腫瘤細胞與該懸浮免疫細胞且測定該黏附腫瘤細胞之細胞存活率或該懸浮免疫細胞之活性，或測定該黏附腫瘤細胞或該懸浮免疫細胞中之免疫檢查點蛋白表現；其中若該黏附腫瘤細胞之細胞存活率顯著低於對照組之黏附腫瘤細胞存活率或該懸浮免疫細胞之活性顯著高於對照組之懸浮免疫細胞之活性；或若該黏附腫瘤細胞或該懸浮免疫細胞中之免疫檢查點蛋白表現相對於對照組改變，則該免疫檢查點抑制劑具有抗腫瘤作用。

【請求項2】

如請求項1之方法，其中該黏附腫瘤細胞或該懸浮免疫細胞以約 1×10^4 個細胞/ μl 至 1×10^7 個細胞/ μl 之濃度接種。

【請求項3】

如請求項1之方法，其中該黏附腫瘤細胞為以下的細胞：肝細胞癌、結腸直腸癌、神經膠母細胞瘤、胃癌、食道癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、胰臟癌、腎細胞癌、良性前列腺增生、前列腺癌、卵巢癌、黑素瘤、乳癌、慢性淋巴球性白血病(CLL)、梅克爾細胞癌(Merkel cell carcinoma)、小細胞肺癌(SCLC)、非霍奇金淋巴瘤(Non-Hodgkin lymphoma)、急性骨髓白血病(AML)、膽囊癌及膽管癌、膀胱癌或子宮癌。

【請求項4】

如請求項1之方法，其中該懸浮免疫細胞包括外周血液單核細胞(PBMC)；淋巴細胞；單核球；巨噬細胞或粒細胞。

【請求項5】

如請求項4之方法，其中該懸浮免疫細胞包括T細胞或自然殺手(NK)細胞。

【請求項6】

如請求項5之方法，其中該懸浮免疫細胞包括T輔助細胞。

【請求項7】

如請求項5之方法，其中該懸浮免疫細胞包括CD4-陽性T細胞、CD8-陽性T細胞、CD4-陽性輔助T細胞、CD4-陽性-輔助-T細胞或CD8-陽性細胞毒性T細胞。

【請求項8】

如請求項1之方法，其中該免疫檢查點抑制劑抑制PD-1路徑或CTLA4路徑。

【請求項9】

如請求項8之方法，其中該免疫檢查點抑制劑為結合於免疫檢查點蛋白之抗體、工程化結合蛋白、可溶受體、適體、肽或小分子。

【請求項10】

如請求項1之方法，其中該免疫檢查點抑制劑結合於PD-1、PD-L1、PD-L2或CTLA4。

【請求項11】

如請求項1之方法，其中步驟(a)之該活體外共培養花費約1至約2天。

【請求項12】

如請求項1之方法，其中步驟(a)之該活體外共培養花費約1天。

【請求項13】

如請求項1之方法，其中該MTAM包含一或多層之該電紡中空纖維集合體，其中至少五種電紡中空纖維封裝在一起以形成單層之該電紡中空纖維集合體，且該等電紡中空纖維之定向相對於該電紡中空纖維集合體之縱軸不大於 $\pm 5^\circ$ ，其中該等電紡中空纖維經連接以使得該等電紡中空纖維經對齊且緊密封裝以形成該單層，且其中該等電紡中空纖維之對齊在定向上不超過 $\pm 5^\circ$ 。

【請求項14】

如請求項1之方法，其中該MTAM具有一或多層該電紡中空纖維集合體，其中該等電紡中空纖維具有自其內表面延伸之奈米級毛髮狀結構。

【請求項15】

如請求項1之方法，其中該MTAM包含至少兩層之該電紡中空纖維集合體。

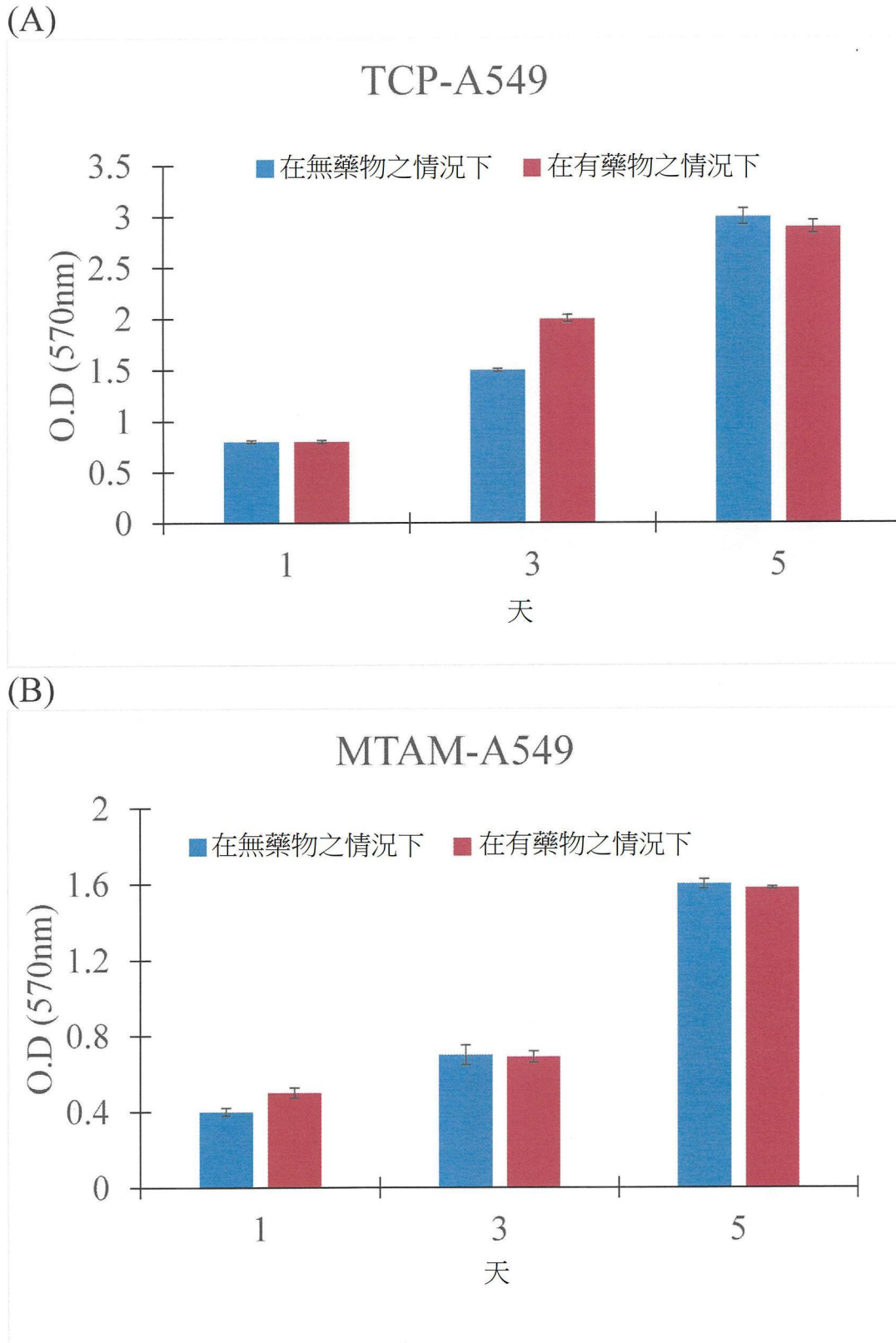
【請求項16】

如請求項15之方法，其中該電紡中空纖維集合體之該等層包含經交替或垂直排列的結構。

【請求項17】

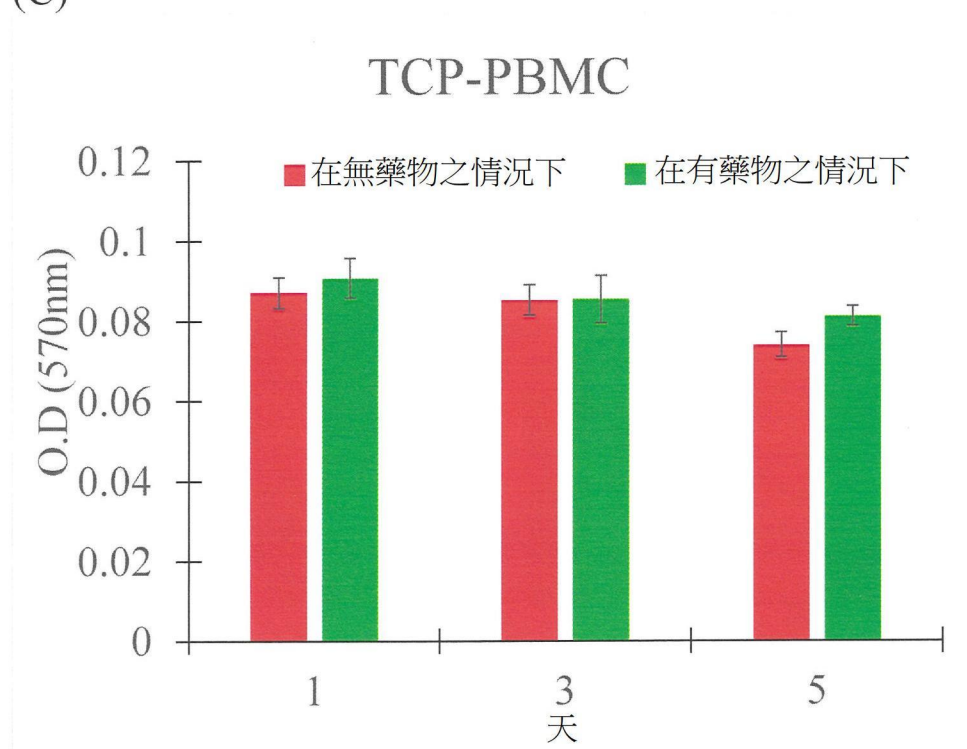
如請求項1之方法，其中該MTAM封閉於裝袋中。

【發明圖式】

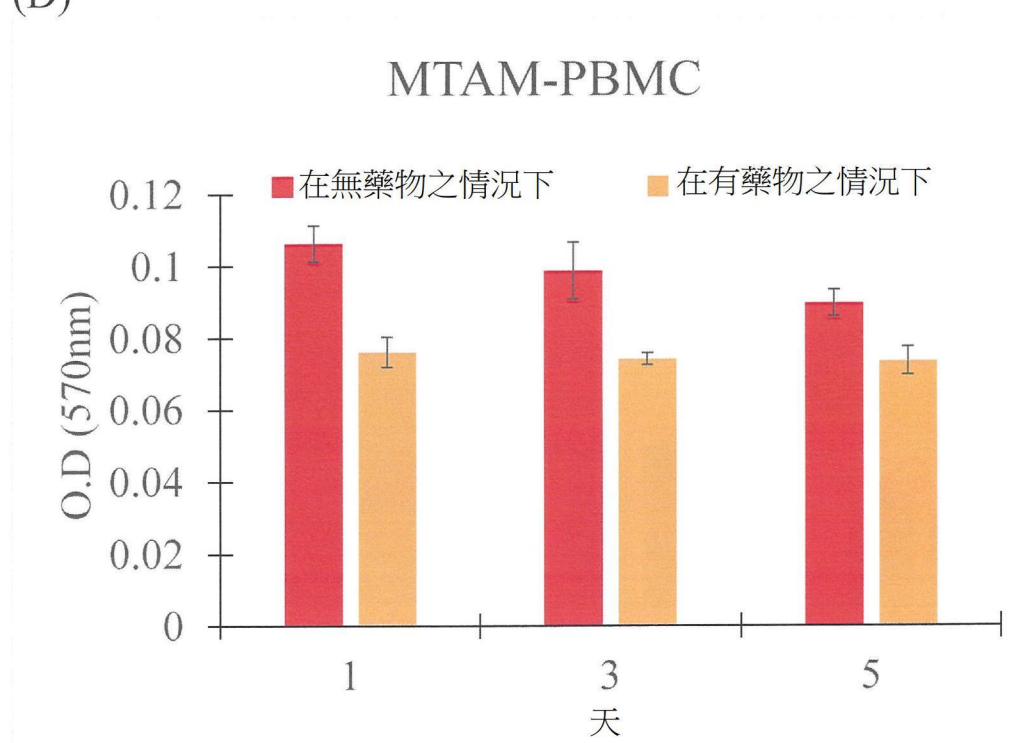


【圖1】

(C)

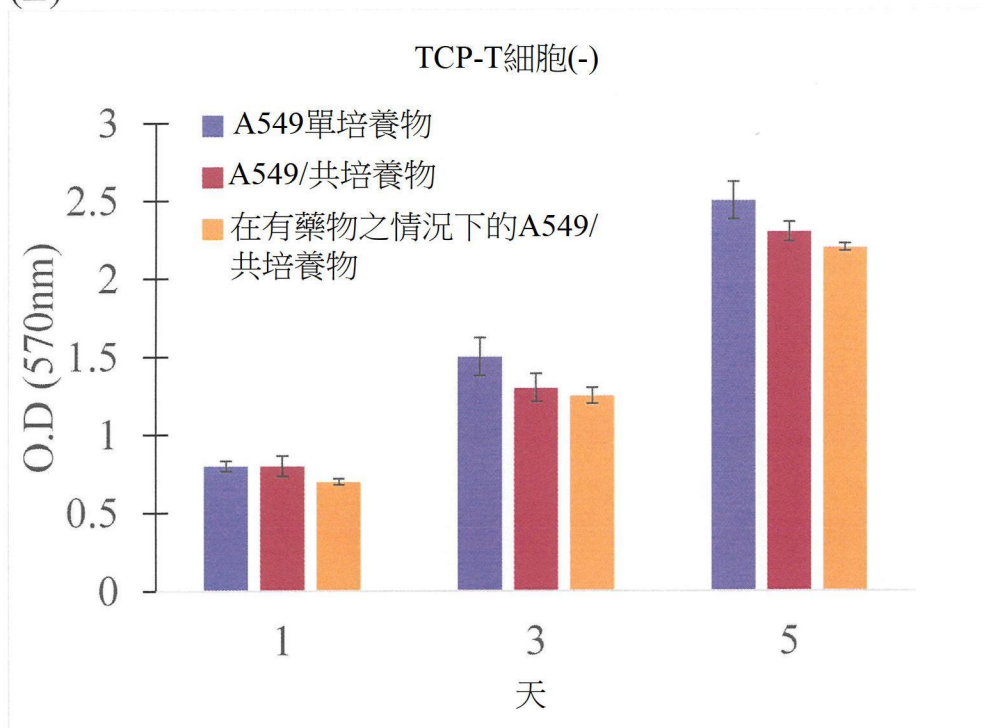


(D)

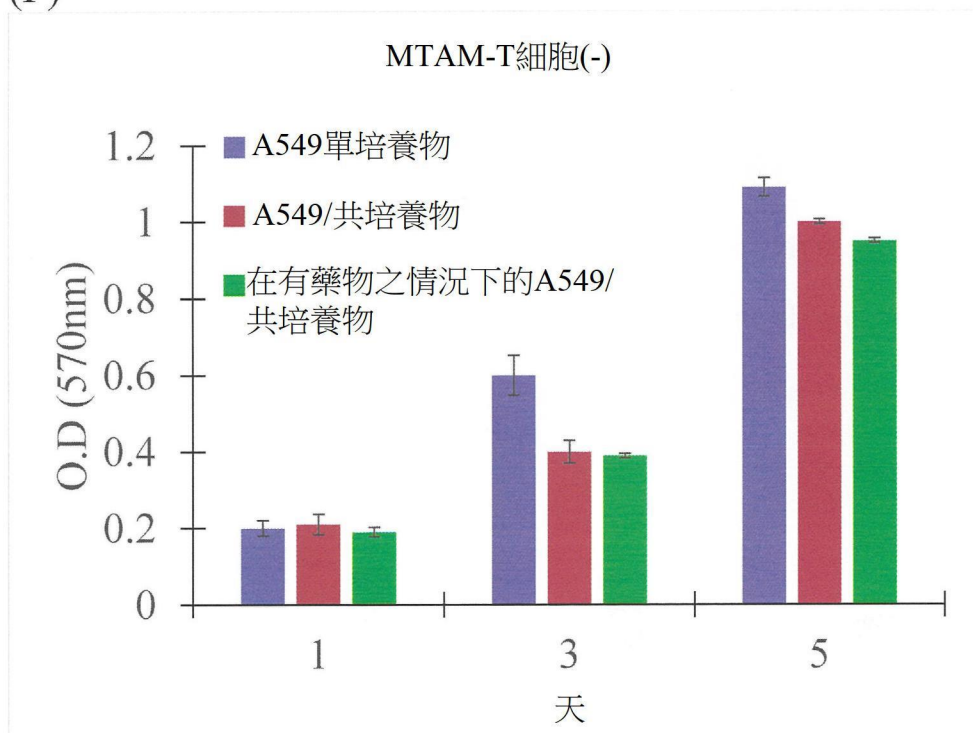


【圖1】(續)

(E)

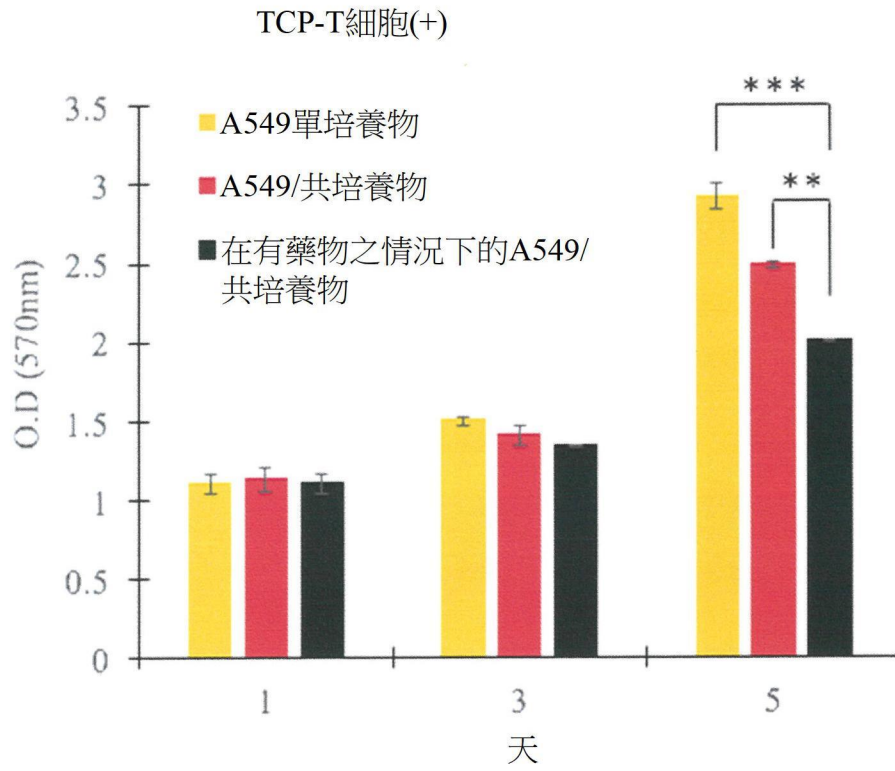


(F)

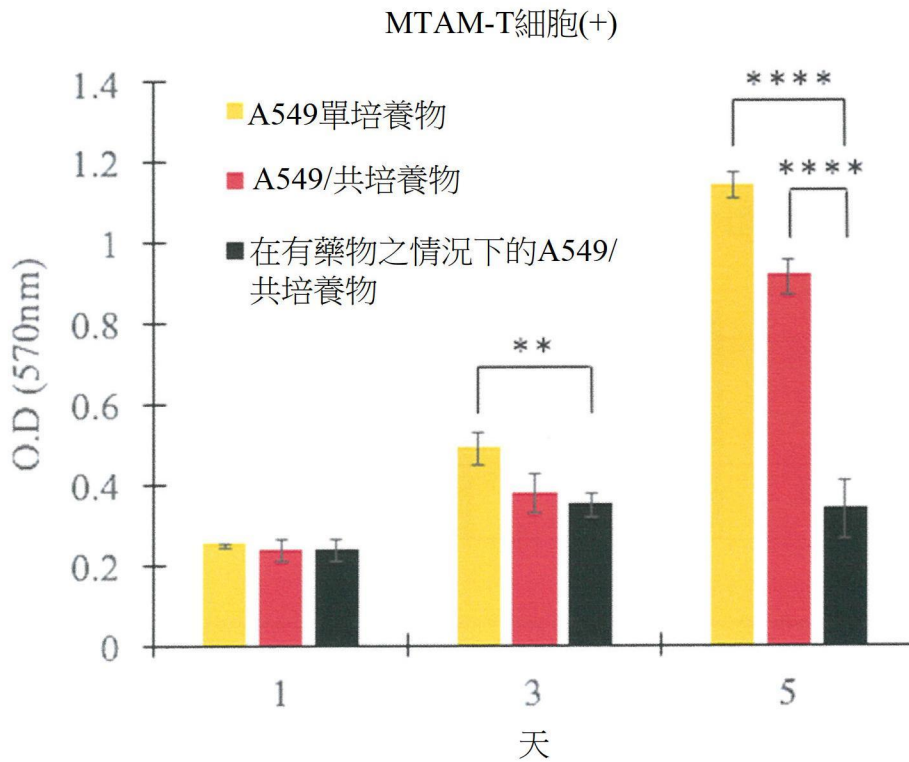


【圖1】(續)

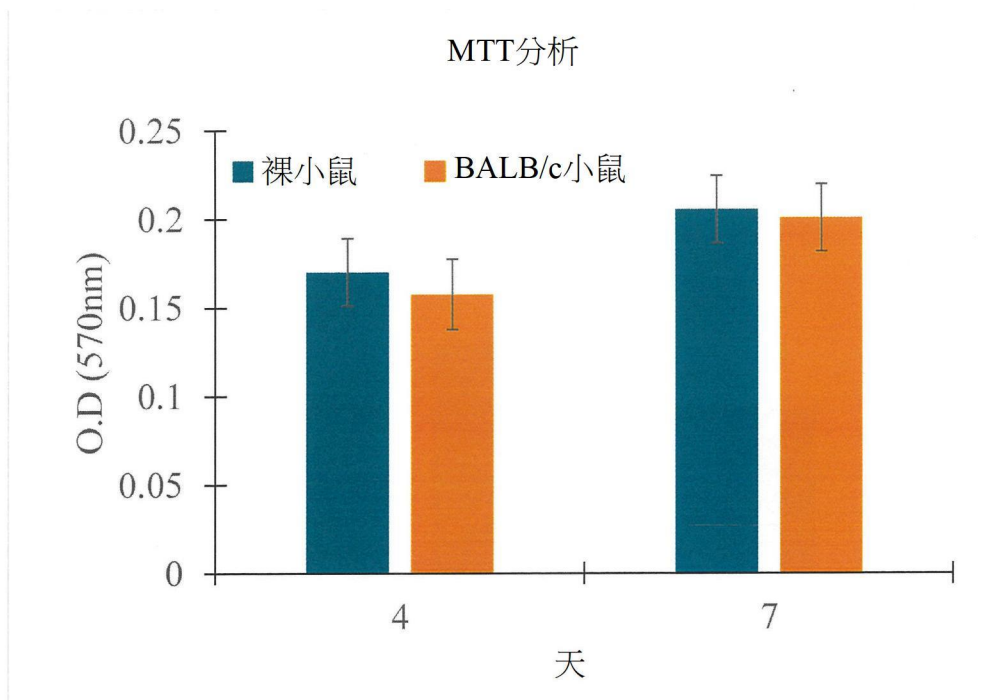
(G)



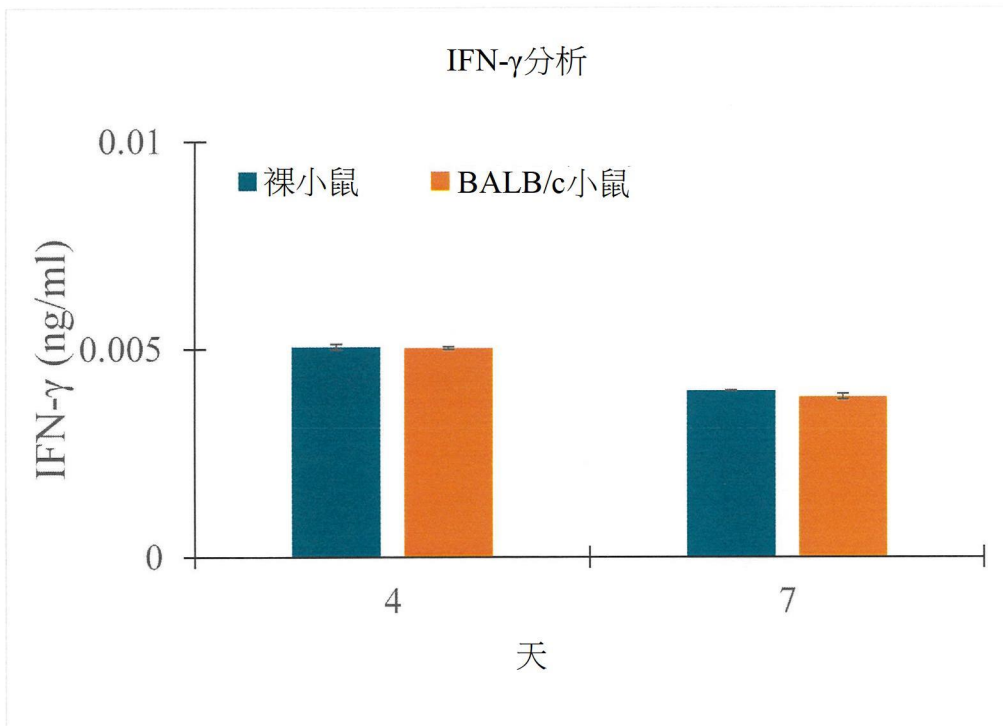
(H)



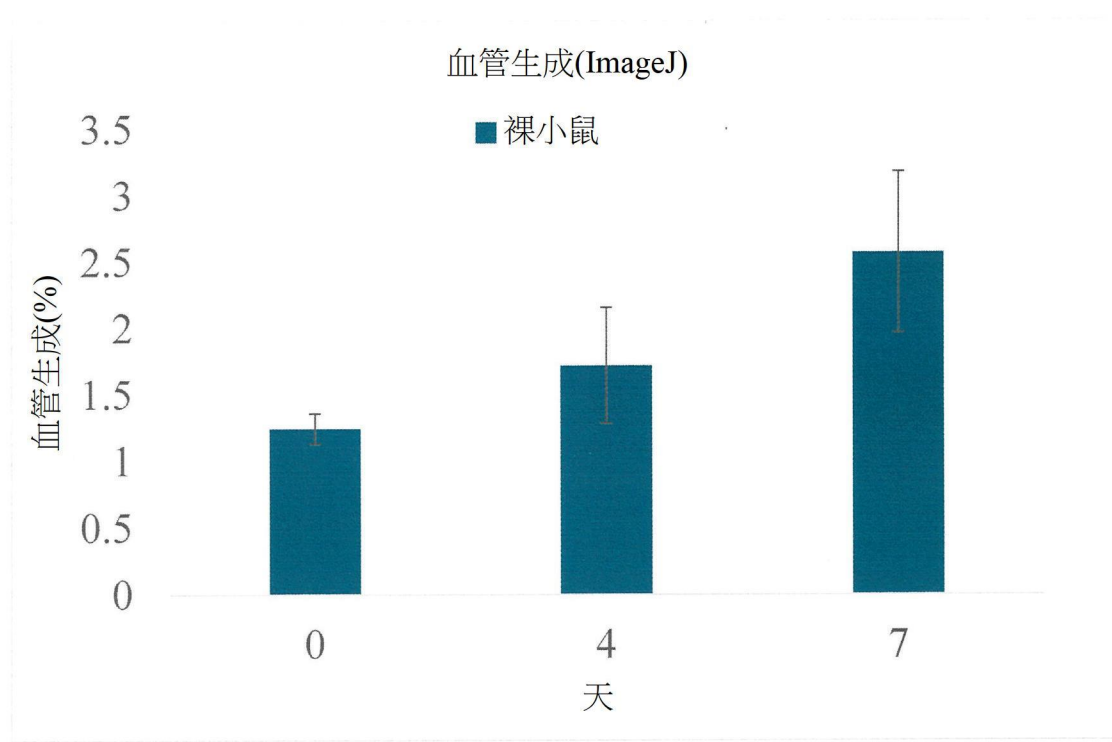
【圖1】(續)



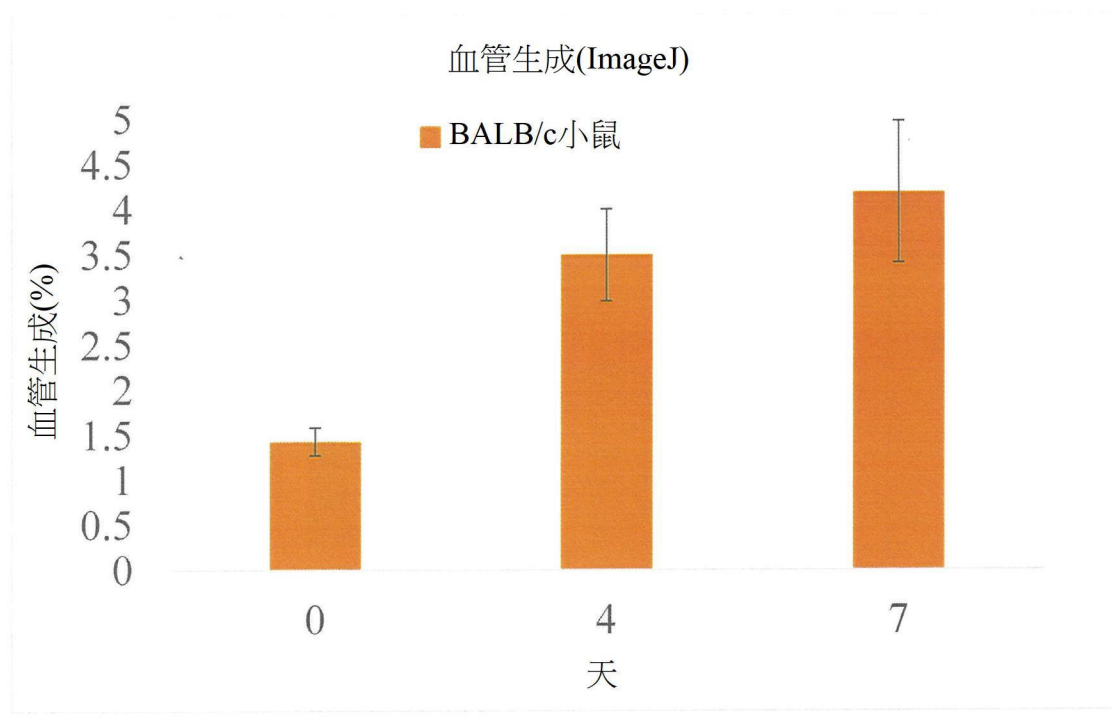
【圖2】



【圖3】

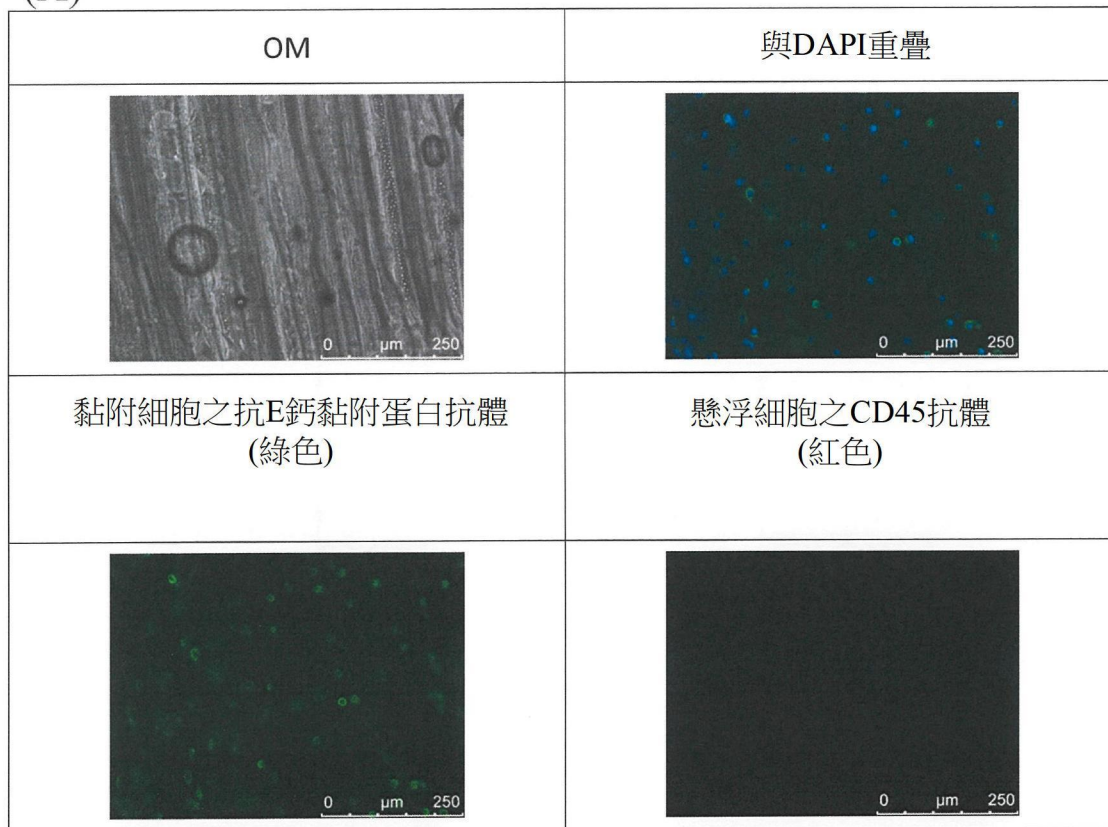


【圖4】

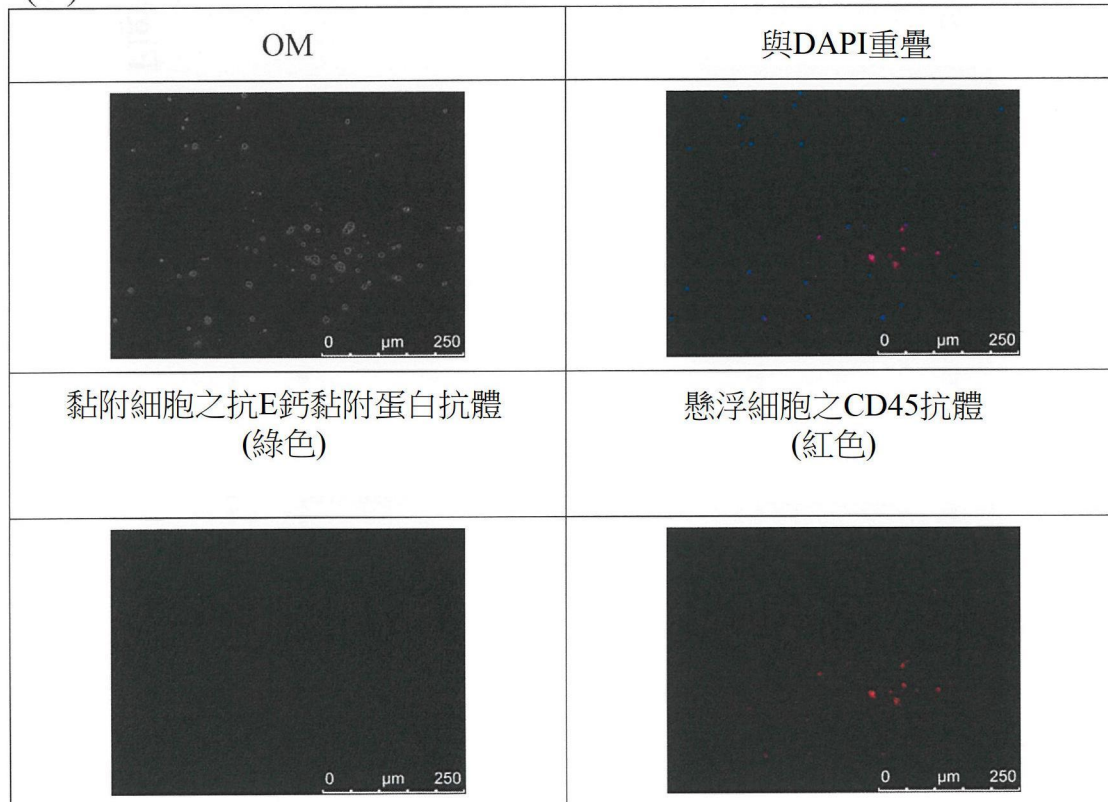


【圖5】

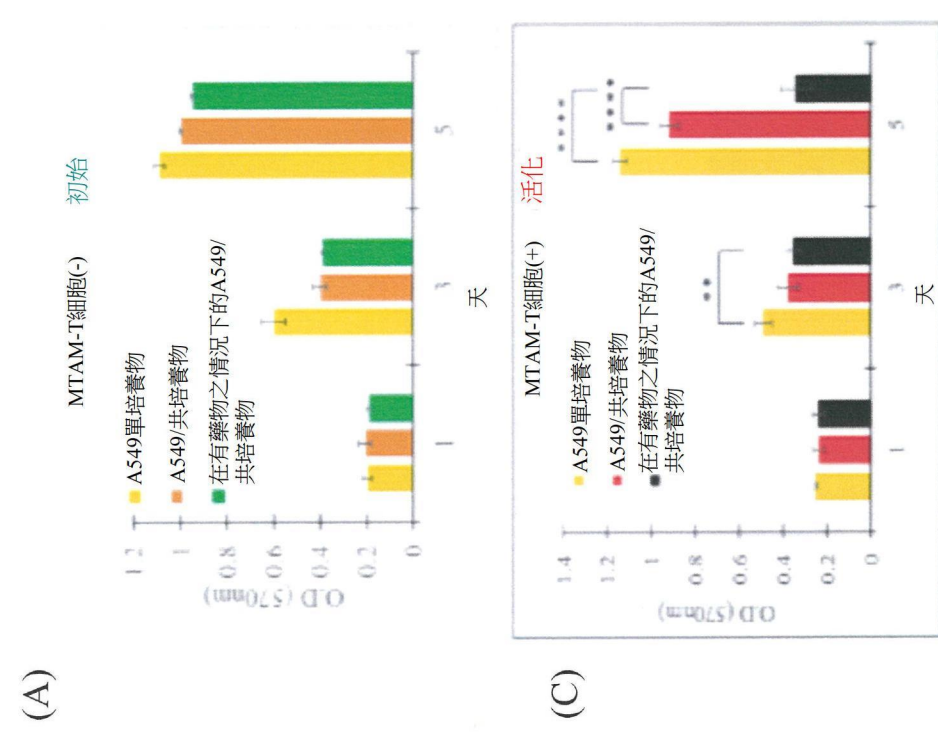
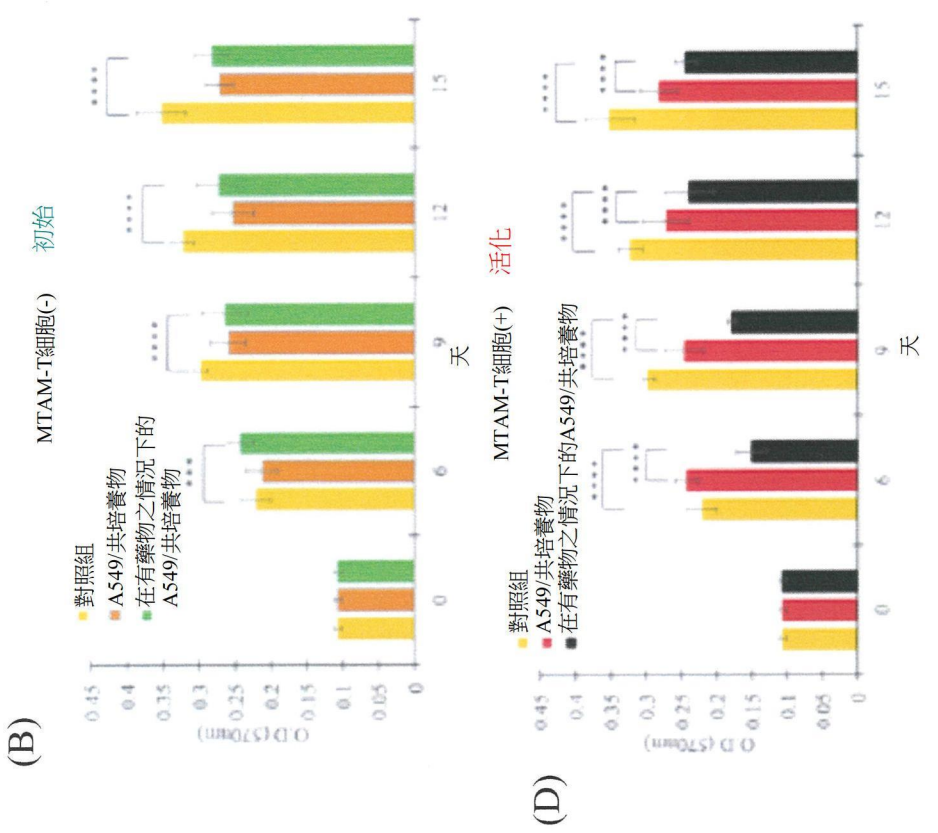
(A)



(B)



【圖6】



【圖7】