(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114761027 A
(43)申请公布日 2022.07.15

(21)申请号 202080081556.1

(22)申请日 2020.09.23

(30)优先权数据
62/905124 2019.09.24 US
62/954323 2019.12.27 US
62/961596 2020.01.15 US
62/978254 2020.02.18 US
63/032462 2020.05.29 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.05.24

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/052335 2020.09.23

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/061870 EN 2021.04.01

(71)申请人 纽力克斯治疗公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 A·T·桑德斯 J·高斯灵 S·A·韦兰 M·洛策

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 李志强 彭昶

(51)Int.Cl.
*A61K 35/17*(2006.01)
*A61K 31/4196*(2006.01)
*A61K 31/454*(2006.01)
*A61K 31/506*(2006.01)
*A61K 31/5375*(2006.01)
*A61K 38/20*(2006.01)
*A61P 35/00*(2006.01)

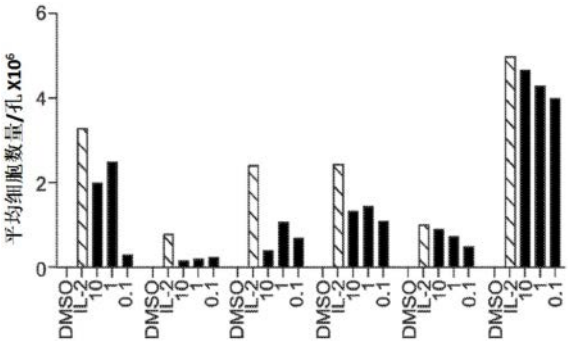
权利要求书3页 说明书50页 附图32页

(54)发明名称

用于免疫细胞扩增的Cbl抑制剂和组合物

(57)摘要

本发明公开了使用新型Cbl抑制剂增强免疫细胞扩增以增加基于细胞的免疫治疗剂功效的方法和组合物。本发明还提供了基于细胞的免疫疗法方法和组合物。




CN 114761027 A

1.生成经扩增的免疫细胞的方法,所述方法包含以下步骤:

a.在存在Cbl抑制剂的培养物中,在第一扩增中生成大量经扩增的免疫细胞的条件下,体外扩增免疫细胞。

2.根据权利要求1所述的方法,其包含所述第一扩增步骤并且不存在进一步的扩增步骤。

3.根据权利要求1所述的方法,其包含所述第一扩增步骤a以及一个或多个进一步的扩增。

4.根据权利要求3所述的方法,其中所述第一扩增持续8-12天。

5.根据权利要求3所述的方法,其中所述第二扩增持续8-12天并且不存在进一步的扩增。

6.根据前述权利要求任一项所述的方法,其中每3-5天将所述Cbl抑制剂添加至所述培养物。

7.根据前述权利要求任一项所述的方法,其中所述Cbl抑制剂在所述第一扩增的第0天、第4天和第7天或大约在所述第一扩增的第0天、第4天和第7天添加至所述培养物。

8.根据前述权利要求任一项所述的方法,其中所述Cbl抑制剂在所述第二扩增步骤的第0天和第5天或大约在所述第二扩增步骤的第0天和第5天添加至所述培养物。

9.根据前述权利要求任一项所述的方法,其中所述培养物包含IL-2。

10.根据前述权利要求任一项所述的方法,其中IL-2在第0天添加至所述第一扩增和在第0天与第5天添加至所述第二扩增。

11.根据前述权利要求任一项所述的方法,其中所述培养物不包含与所述免疫细胞的表面受体结合的成分。

12.根据前述权利要求任一项所述的方法,其中所述培养物不包含抗CD3抗体或OKT3。

13.根据前述权利要求任一项所述的方法,其中所述培养物不包含添加的饲养细胞。

14.根据前述权利要求任一项所述的方法,其中所述培养物不包含添加的经辐照外周血单核细胞。

15.根据前述权利要求任一项所述的方法,其中所述培养物不包含添加的4-IBB激动剂。

16.根据前述权利要求任一项所述的方法,其中所述免疫细胞收获自供体。

17.根据前述权利要求任一项所述的方法,其中所述免疫细胞来自肿瘤或肿瘤碎片。

18.根据前述权利要求任一项所述的方法,其中所述免疫细胞是T细胞。

19.根据前述权利要求任一项所述的方法,其中所述免疫细胞是肿瘤浸润淋巴细胞。

20.根据前述权利要求任一项所述的方法,其生成至少$10^6$、$10^7$、$10^8$、$10^9$、$10^{10}$、或$10^{11}$个经扩增的免疫细胞。

21.根据前述权利要求任一项所述的方法,其中所述经扩增的免疫细胞无需进一步扩增便能够用于治疗。

22.根据前述权利要求任一项所述的方法,其中所述经扩增的免疫细胞分泌促炎细胞因子。

23.根据前述权利要求任一项所述的方法,其中所述经分泌的促炎细胞因子是IL-2。

24.根据前述权利要求任一项所述的方法,其中所述经分泌的促炎细胞因子是IFNγ。

25.根据前述权利要求任一项所述的方法，其中所述第一扩增的时长为0-4天、0-7天、0-11天、0-14天、或0-30天。

26.根据前述权利要求任一项所述的方法，其中所述第二扩增的时长为0-4天、0-7天、0-11天、0-14天、或0-30天。

27.根据前述权利要求任一项所述的方法，其中所有扩增的时长加起来为0-4天、0-7天、0-11天、0-14天、或0-30天。

28.根据前述权利要求任一项所述的方法，其中所述免疫细胞在包含透气性快速扩增细胞培养膜的培养器皿中进行体外扩增。

29.根据前述权利要求任一项所述的方法，其中所述免疫细胞在G-Rex$^{TM}$器皿中进行体外扩增。

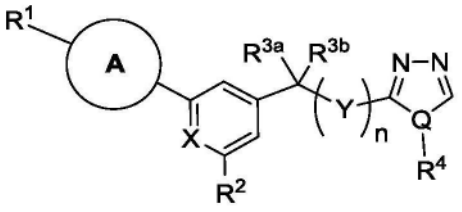
30.根据前述权利要求任一项所述的方法，其中所述Cbl-b抑制剂的浓度为0.5-50μM。

31.根据前述权利要求任一项所述的方法，其中所述Cbl抑制剂抑制酶的活性，所述酶选自由cCbl、Cbl-b和Cbl-c组成的组。

32.根据前述权利要求任一项所述的方法，其中所述Cbl抑制剂抑制Cbl-b的活性。

33.根据前述权利要求任一项所述的方法，其中所述Cbl抑制剂是小分子、肽、抗体、或核酸。

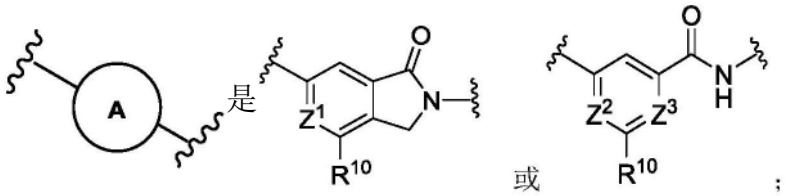
34.根据权利要求24所述的方法，其中所述Cbl抑制剂是式(A)所示化合物：




式（A）

或其互变异构体，或前述任一种的药学上可接受的盐，其中：

$R^1$是H、$C_1$-$C_6$烷基、$C_3$-$C_6$环烷基、3至6个原子组成的杂环基、$C_1$-$C_6$烷基-($C_3$-$C_6$环烷基)、$C_1$-$C_6$烷基-(3至6个原子组成的杂环基)；




；

$Z^1$是CH或N；

$Z^2$是CH或N；

$Z^3$是CH或N；

X是CH或N；

$R^2$是H、卤素、$C_3$-$C_6$环烷基、-NH-(3至6个原子组成的杂环基)、-NH-($C_1$-$C_6$烷基)、-NH-($C_3$-$C_6$环烷基)、-O-(3至6个原子组成的杂环基)、-O-($C_1$-$C_6$烷基)、或-O-($C_3$-$C_6$环烷基)；

$R^{3a}$是H、卤素、或$C_1$-$C_6$烷基；

$R^{3b}$是H、卤素、$C_1$-$C_6$烷基、或$C_3$-$C_6$环烷基；或者，$R^{3a}$和$R^{3b}$同与之连接的所述碳原子一起形成4至8个原子组成的杂环基或$C_3$-$C_6$环烷基，其中所述杂环基或环烷基分别任选地被1-3个$R^{12}$基团取代；

或$R^{3b}$和$R^{11a}$同与之连接的所述碳原子一起形成$C_3$-$C_6$环烷基，所述$C_3$-$C_6$环烷基任选地被$C_1$-$C_6$烷基取代；

n是0或1；

Y是C($R^{11a}$)($R^{11b}$)或S，条件是：如果$R^{3a}$和$R^{3b}$中的一者或两者为卤素，则Y是C($R^{11a}$)($R^{11b}$)；

Q是CH或N；

$R^4$是H、$C_1$-$C_6$烷基、$C_1$-$C_6$卤代烷基、或$C_3$-$C_6$环烷基；

$R^{10}$是H、$C_1$-$C_6$烷基、$C_1$-$C_6$卤代烷基、或$C_3$-$C_6$环烷基；

$R^{11a}$和$R^{11b}$分别独立地为H、卤素、$C_1$-$C_6$烷基、或$C_1$-$C_6$卤代烷基；或者，$R^{11a}$和$R^{11b}$同与之连接的所述碳原子一起形成$C_3$-$C_6$环烷基；或$R^{3b}$和$R^{11a}$同与之连接的所述碳原子一起形成$C_3$-$C_6$环烷基，所述$C_3$-$C_6$环烷基任选地被$C_1$-$C_6$烷基取代；和

各$R^{12}$分别独立地为$C_1$-$C_6$烷基、卤素、羟基、-O($C_1$-$C_6$烷基)、-CN、$C_1$-$C_6$烷基-CN、$C_1$-$C_6$烷基-OH、或$C_1$-$C_6$卤代烷基；其中两个偕$R^{12}$基团可以同与之连接的所述碳原子一起形成螺$C_3$-$C_4$环烷基。

35.根据权利要求24所述的方法，其中所述Cbl抑制剂是选自由化合物101-129、及其药学上可接受的盐和溶剂化物组成的组的小分子。

36.根据权利要求24所述的方法，其中所述Cbl抑制剂是肽。

37.根据权利要求24所述的方法，其中所述Cbl抑制剂是抗体。

38.根据权利要求24所述的方法，其中所述核酸是siRNA。

39.组合物，其包含通过前述权利要求任一项所述的方法生成的经扩增的免疫细胞。

40.治疗有需要的患者的T细胞功能障碍的方法，所述方法包含向所述患者施用有效量的权利要求29所述的组合物。

41.治疗有需要的患者的癌症的方法，所述方法包含向所述患者施用有效量的权利要求29所述的组合物。

42.根据权利要求31或32所述的方法，其进一步包含以有效增强所述治疗的量向所述患者施用Cbl抑制剂、或其盐或药学上可接受的组合物。

# 用于免疫细胞扩增的Cbl抑制剂和组合物

交叉引用

[0001] 本申请要求并享有于2019年9月24日提交的美国临时申请号62/905,124、于2019年12月27日提交的美国临时申请号62/954,323、于2020年1月15日提交的美国临时申请号62/961,596、于2020年2月18日提交的美国临时申请号62/978,254、以及于2020年5月29日提交的美国临时申请号63/032,462的权益,其各自内容均在此以全文形式并入本发明。

## 发明领域

[0002] 本发明提供了涉及在基于细胞的免疫疗法中使用Cbl抑制剂的方法。本发明的方法和组合物例如可用于制备免疫细胞组合物及其用于治疗T细胞功能障碍和癌症的用途。

发明背景

[0003] Cbl(Casitas B-系淋巴瘤)蛋白是涉及细胞信号传导、蛋白质泛素化及蛋白质底物降解的泛素连接酶家族的一部分。此家族的成员包括环型(RING-type)E3连接酶cCbl、Cbl-b和Cbl-c。Cbl-b由于其作为免疫活化的负调节剂的功能而在免疫系统中发挥重要作用。Cbl-b在人CD4+和CD8+T细胞中高度表达,其表达受CD28和CTLA-4以及其他共刺激性和抑制性信号的严格调控。参见Lutz-Nicoladoni et al.,Frontiers in Oncology,5(58):1-14(2015)。

[0004] Cbl-b在T细胞活化的负调控中起重要作用。T细胞通常需要两个活化信号,第一个由T细胞受体与MHC分子呈递的肽相互作用而提供,第二个由抗原呈递细胞上的共刺激分子提供。Cbl-b在NK细胞的活化及效应功能中起重要作用。在B细胞中,Cbl-b被募集到聚集的B细胞抗原受体(BCR),并且是内吞BCR进入晚期核内体所必需的。参见Veselits et al.,PLOS One,9(3):e89792(2014)。Cbl-b在骨髓细胞中的活性尚未完全表征,但包括在TLR信号传导的负反馈回路中的作用,并通过脂肪酸调节巨噬细胞活化。

[0005] 研究发现,缺乏Cbl-b的T细胞显示出较低的抗原识别受体和共刺激分子(例如CD28)活化阈值。譬如,在T细胞活化和增殖过程中,T细胞中Cbl-b的缺失解除了对CD28共刺激的需求。参见Bachmaier,K.et al.,Nature,403(6766):211-216(2000)。此类Cbl-b$^{-/-}$T细胞在很大程度上抵抗T细胞失能,这是一种耐受机制,其中T细胞功能失活且T细胞增殖严重受损。参见Jeon et al.,Immunity,21(2):167-177(2004)和Schwartz et al.,Annu Rev Immunol.,21:305-34(2003)。支持这一主张的证据包括在cbl-b敲除小鼠中Cbl-b的缺失导致T细胞耐受性诱导受损及自身免疫加剧的事实。参见Jeon et al.,Immunity,21(2):167-177(2004)。重要的是,小鼠中Cbl-b的缺失亦使得主要依赖于细胞毒性T细胞的强大抗肿瘤应答。一项研究表明,Cbl-b$^{-/-}$CD8+T细胞对T调节性细胞介导的抑制具有抗性,并表现出增强的活化及肿瘤浸润。原生Cbl-b$^{-/-}$CD8+T细胞的治疗性转移足以介导对已建立肿瘤的排斥。参见Loeser et al.,J.Exp.Med.,204(4):879-891(2007)。最近的研究表明,Cbl-b在NK细胞活化中亦起作用。Cbl-b的遗传缺失或其E3连接酶活性的靶向失活使得NK细胞在小鼠模型中自发排斥转移性肿瘤。参见Paolino et al.,Nature,507(7493):508-512。

[0006] 过继细胞疗法(ACT)用于治疗其他难治性癌症,包括转移性黑素瘤、神经胶质瘤和

肾癌。在ACT中，从患者自身的血液或肿瘤组织中收获NK细胞或T细胞，然后在实验室中大量生长，然后将经扩增的细胞转移回患者体内，以增强患者的免疫系统对癌症的应答。在某些版本的ACT中，使用遗传工程对T细胞或NK细胞进行修饰，使其能够靶向患者的癌细胞并更有效地杀死癌细胞。过继细胞疗法的类型包括自然杀伤(NK)细胞疗法、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)疗法、工程T细胞受体疗法(TCR)及嵌合抗原受体T细胞(CAR T)疗法。

[0007] 顾名思义，NK细胞疗法使用NK细胞，其是先天免疫系统的一部分，是抵御感染和疾病(包括癌细胞)的第一道防线。NK细胞是基于细胞的免疫疗法的一种有吸引力的工具，因为其具有区分健康细胞和病毒感染细胞或自然转化细胞的先天能力。NK细胞疗法包括过继性自体或同种异体细胞疗法，其中NK细胞用于支持造血干细胞移植。所述这些细胞获自治疗前的患者，获自相关供体，或者是部分HLA匹配的同种异体NK细胞。过继性转移细胞疗法亦采用来自供体、患者、脐带血、经分化的诱导多能干细胞、或造血干细胞的NK细胞。

[0008] TIL疗法涉及分离和扩增来自患者的肿瘤组织的TIL。浸润免疫细胞可起到控制肿瘤生长和进展的作用，但矛盾的是，其亦可帮助创造一个免疫抑制环境，使肿瘤可在其中茁壮成长。参见Schreiber,Science;331(6024):1565-70(2011)。肿瘤免疫逃避的一个重要机制是免疫检查点调节剂如CTLA-4和PD-L1在肿瘤细胞和浸润免疫细胞两者上的表达。通过阻断这些信号传导通路，免疫检查点抑制剂可重新激活宿主免疫系统以识别并控制肿瘤；这是目前几种疗法的作用机制。参见，Pardoll,Nat.Rev.Cancer,12(4):252-64(2012)，和Salgado et al.,Adv.Anat.Pathol.,24(5):235-251,and 24(6):311-335(2017))。

[0009] LN-145疗法已被FDA授予突破性疗法认证，是一种TIL疗法，用于治疗复发性、转移性或持续性宫颈癌患者。在一项LN-145疗法II期临床研究中，通过手术从患者体内分离出肿瘤组织，然后将其送往GMP设施，在此设施中TIL被分离并进行扩增，为期3周。输注前一周，给予患者预处理治疗，包含在第-8天和第-7天施用环磷酰胺IV，在第-6天至第-2天施用氟达拉滨IV，在第-1天施用派姆单抗(pembrolizumab)(一种人源化抗PD-1抗体)。然后患者接受所述自体扩增的TIL，然后在第+1至第+4天接受阿地白介素IV。此后，在无疾病进展或不可接受毒性的情况下，患者每21天接受一个周期的派姆单抗(pembrolizumab)治疗，持续12个月。

[0010] TCR疗法涉及T细胞的遗传工程以表达亲和性增强的肿瘤特异性T细胞受体(TCR)基因，从而杀死癌细胞。简言之，通过单采术收集自体T细胞并在体外进行转化，例如，使用慢病毒载体，以表达识别特定肿瘤抗原的T细胞。经转化的细胞在输注入患者体内之前在体外进行扩增。进行再输注前7天，患者接受低剂量环磷酰胺和低剂量氟达拉滨以清除淋巴细胞。输注经扩增的TCR-T细胞后(一次输注或分阶段输注)，皮下施用IL-2(250,000IU/两次/天)，持续14天。此种疗法是有效的，但如果抗原也在健康组织中表达，则会引起副作用。

[0011] 嵌合抗原受体疗法(CAR T)使用患者的T细胞，这些细胞经过收获及遗传工程改造以表达嵌合T细胞受体，此受体由抗原结合结构域组成，其通常是单链可变片段及来自受体(例如，CD19、CD28或CD137)的额外细胞内共刺激结构域。基于CAR T的细胞疗法的一个优点是，即使在MHC上表达的经识别抗原不存在的情况下，CAR T细胞亦可与癌细胞结合(与基于TIL和TCR的细胞疗法相比)。基于CAR T的细胞疗法已被FDA批准用于治疗复发性癌症。例如，KYMRIAH®(tisagenlecleucel)已获FDA批准，用于治疗儿童和年轻人的复发性/难治性B细胞急性淋巴细胞白血病(B细胞ALL)。使用慢病毒载体去除及转导患者T细胞以表达

CAR,所述CAR具有鼠类抗CD19单链抗体片段(scFv)和包含T细胞信号传导(CD3-δ)及共刺激(4-1BB)结构域的细胞内部分。Axicabtagene ciloleucel(YESCARTA®)是FDA批准的基于CAR T的细胞疗法,用于治疗在接受至少两种先前治疗方案后癌症仍已进展的成人大B细胞淋巴瘤。通过白细胞单采术从患者体内取出T细胞,在体外进行转导以表达具有鼠类单链可变片段(scFv)的CAR,所述片段具有对CD19的特异性,所述CD19与源自CD3-δ和CD28基因的两个信号域相连。

[0012] 当前,基于CAR T的细胞疗法存在许多限制。对于因T细胞太少而无法捐献的患者,这可能并非一种有效的治疗方法。与表达靶抗原的正常细胞的交叉反应亦可能存在问题。此外,大约30-50%的大B细胞淋巴瘤患者使用CD19 CAR T细胞在一个月内达到缓解,但最终复发。参见Shah and Fry,Nat.Rev.Clin.Oncol.16:372-385(2019)。最后,基于CAR T的细胞疗法对实体瘤的疗效不佳。

[0013] CAR-NK细胞疗法包括选择性扩增来自患者脐带血、健康供体、干细胞或NK衍生细胞系的NK起始材料。NK细胞通过耗尽CD3+T细胞以及阳性选择CD56+细胞而在细胞群中富集,然后在存在饲养细胞和细胞因子(包括IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-12和IL-18)的情况下进行选择性扩增。接下来,在IL-2存在下进行最终扩增之前,对其进行遗传工程改造,譬如,使用慢病毒载体、逆转录病毒载体或逆转录病毒、转座子或CRISPR。细胞再次耗尽CD3+T细胞并配制用于输注入患者体内或冷冻保存以备将来输注之用。参见,Trager,Cell and Gene Therapy Insights,5(5):585-600(2011)。最近一项同种异体CAR-NK细胞的1期和2期试验表明,11名患者中有7名患者的淋巴瘤或慢性淋巴细胞白血病完全缓解。参见Liu et al.,2020,N.Engl.J.Med.382:545-553。

[0014] 尽管有上述基于细胞的免疫疗法的前景,但由于无法收集或制造免疫细胞,许多患者不能从其中受益,尤其是来自接受强化治疗的受试者,其免疫细胞计数低,在基线时存在缺陷。即使对于可制造足够数量的免疫细胞的患者,其临床结果亦可通过改善流出的免疫细胞的植入或增加其应答的持久性来改善。因此,需要更有效的免疫细胞疗法。

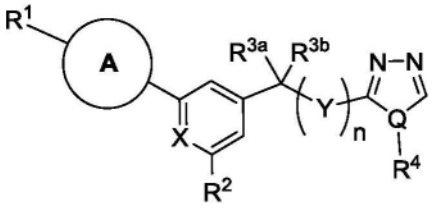
## 发明摘要

[0015] 在一些方面,本发明提供了使用Cbl抑制剂增强细胞疗法的方法和组合物。在某些实施方案,所述Cbl抑制剂在收获之前增强体内免疫细胞的扩增。在某些实施方案,所述Cbl抑制剂增强离体免疫细胞的初始扩增。在某些实施方案,所述Cbl抑制剂增强离体免疫细胞的快速扩增。在某些实施方案,所述Cbl抑制剂增强离体免疫细胞的初始扩增并消除所述免疫细胞第二次快速扩增的需要。在某些实施方案,所述Cbl抑制剂可在不存在共刺激的情况下活化免疫细胞。在某些实施方案,所述Cbl抑制剂增加了对有需要的患者接受免疫细胞输注的益处。所述方法可用于例如治疗T细胞功能障碍和癌症。虽然不打算受操作理论的束缚,但所述这些方法部分基于以下发现:Cbl抑制剂可丰富记忆性细胞的免疫细胞群,从而提高体内和体外免疫细胞应答的持久性。

[0016] 一方面,本发明提供了用Cbl抑制剂增强体内免疫细胞扩增的方法。另一方面,本发明提供了用Cbl抑制剂增强免疫细胞离体扩增的方法。另一方面,本发明提供了通过本发明提供的方法所增强的免疫细胞。另一方面,本发明提供了包含所述免疫细胞的组合物。另一方面,本发明提供了包含施用所述免疫细胞或组合物的治疗方法。另一方面,本发明提供

了通过联合施用Cbl抑制剂来增强免疫细胞或组合物施用的方法。在又一方面，将所述这些方面中的任一个或所有方面进行组合。

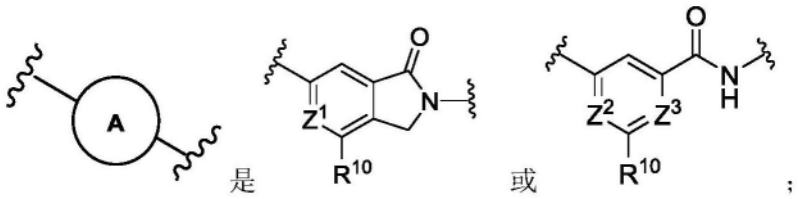
[0017] 有用的Cbl抑制剂包括抑制cCbl、Cbl-b和/或Cbl-c酶活性的化合物。所述Cbl抑制剂可以是小分子类、肽类、抗体类、或核酸类。在某些实施方案，所述Cbl抑制剂是式(A)所示化合物：




式(A)

或其互变异构体，或前述任一种的药学上可接受的盐，其中：

$R^1$是H、$C_1$-$C_6$烷基、$C_3$-$C_6$环烷基、3至6个原子组成的杂环基、$C_1$-$C_6$烷基-($C_3$-$C_6$环烷基)、$C_1$-$C_6$烷基-(3至6个原子组成的杂环基)；




；

$Z^1$是CH或N；

$Z^2$是CH或N；

$Z^3$是CH或N；

X是CH或N；

$R^2$是H、卤素、$C_3$-$C_6$环烷基、-NH-(3至6个原子组成的杂环基)、-NH-($C_1$-$C_6$烷基)、-NH-($C_3$-$C_6$环烷基)、-O-(3至6个原子组成的杂环基)、-O-($C_1$-$C_6$烷基)、或-O-($C_3$-$C_6$环烷基)；

$R^{3a}$是H、卤素、或$C_1$-$C_6$烷基；

$R^{3b}$是H、卤素、$C_1$-$C_6$烷基、或$C_3$-$C_6$环烷基；或者，$R^{3a}$和$R^{3b}$同与之连接的所述碳原子一起形成4至8个原子组成的杂环基或$C_3$-$C_6$环烷基，其中所述杂环基或环烷基分别任选地被1-3个$R^{12}$基团取代；

或$R^{3b}$和$R^{11a}$同与之连接的所述碳原子一起形成$C_3$-$C_6$环烷基，所述$C_3$-$C_6$环烷基任选地被$C_1$-$C_6$烷基取代；

n是0或1；

Y是C($R^{11a}$)($R^{11b}$)或S，可选条件是：如果$R^{3a}$和$R^{3b}$中的一者或两者为卤素，则Y是C($R^{11a}$)($R^{11b}$)；

Q是CH或N；

$R^4$是H、$C_1$-$C_6$烷基、$C_1$-$C_6$卤代烷基、或$C_3$-$C_6$环烷基；

$R^{10}$是H、$C_1$-$C_6$烷基、$C_1$-$C_6$卤代烷基、或$C_3$-$C_6$环烷基；

$R^{11a}$和$R^{11b}$分别独立地为H、卤素、$C_1$-$C_6$烷基、或$C_1$-$C_6$卤代烷基；或者，$R^{11a}$和$R^{11b}$同与之连接的所述碳原子一起形成$C_3$-$C_6$环烷基；或$R^{3b}$和$R^{11a}$同与之连接的所述碳原子一起形成$C_3$-$C_6$环烷基，所述$C_3$-$C_6$环烷基任选地被$C_1$-$C_6$烷基取代；和

各$R^{12}$分别独立地为$C_1$-$C_6$烷基、卤素、羟基、-O($C_1$-$C_6$烷基)、-CN、$C_1$-$C_6$烷基-CN、$C_1$-

$C_6$烷基-OH、或$C_1$-$C_6$卤代烷基;其中两个偕$R^{12}$基团可以同与之连接的所述碳原子一起形成螺$C_3$-$C_4$环烷基。

[0018] 在某些实施方案,所述Cbl抑制剂选自本发明所述的化合物101-129。在一些实施方案,所述Cbl抑制剂是抗体。在一些实施方案,所述Cbl抑制剂是肽。在一些实施方案,所述Cbl抑制剂是siRNA。

[0019] 一方面,本发明提供了用于治疗有需要的患者的病症的扩增方法、组合物和细胞疗法方法。在某些实施方案,所述方法包含在适于促进供体中免疫细胞活化或扩增的条件下向所述供体施用Cbl抑制剂。在某些实施方案,所述方法进一步包含从所述供体收获循环免疫细胞。在某些实施方案,所述方法进一步包含从所述供体的肿瘤或其一部分收获免疫细胞。在某些实施方案,所述方法进一步包含对所述经收获的免疫细胞进行遗传修饰。在某些实施方案,所述方法进一步包含在一个或两个步骤中离体扩增来自所述供体的免疫细胞。在某些实施方案,第一步是扩增步骤。在某些实施方案,第二步是快速扩增步骤。

在一些实施方案,一个或多个扩增步骤是在一种或多种Cbl抑制剂存在下进行。在某些实施方案,所述方法进一步包含向有需要的患者施用所述免疫细胞。在一些实施方案,所述施用与一种或多种Cbl抑制剂联合使用。

[0020] 另一方面,本发明提供了用于治疗有需要的患者的病症的扩增方法、组合物和细胞疗法方法。

在某些实施方案,所述方法包含从供体收获肿瘤或其一部分。在某些实施方案,所述方法包含在适于促进供体中免疫细胞活化或扩增的条件下向所述供体施用Cbl抑制剂。在某些实施方案,所述经收获的细胞经遗传修饰。在某些实施方案,所述方法进一步包含在一个或两个步骤中离体扩增来自所述肿瘤的免疫细胞。在其他实施方案,所述方法包含第二扩增步骤,例如,快速扩增步骤。在某些实施方案,所述方法进一步包含向有需要的患者施用所述免疫细胞。

[0021] 另一方面,本发明提供了用于治疗有需要的患者的病症的扩增方法、组合物和细胞疗法方法。在某些实施方案,所述方法包含从供体的肿瘤或其一部分收获免疫细胞。在某些实施方案,所述经收获的细胞经遗传修饰。在某些实施方案,所述方法进一步包含在一个或两个步骤中离体扩增来自所述肿瘤的免疫细胞。在某些实施方案,第一步是在存在Cbl抑制剂情况下的扩增步骤。在某些实施方案,在存在Cbl抑制剂情况下的第一步产生足够数量的有效免疫细胞,从而无需第二个快速扩增步骤。在其他实施方案,所述方法包含第二扩增步骤,例如,快速扩增步骤。在某些实施方案,所述方法进一步包含向有需要的患者施用所述免疫细胞。

[0022] 另一方面,本发明提供了用于治疗有需要的患者的病症的扩增方法、组合物和细胞疗法方法。

在某些实施方案,所述方法包含从供体的肿瘤或其一部分收获免疫细胞。在某些实施方案,所述经收获的免疫细胞经遗传修饰。在某些实施方案,所述方法进一步包含在一个或两个步骤中离体扩增来自所述肿瘤的免疫细胞。在某些实施方案,第一步是扩增步骤。在某些实施方案,所述方法包含在Cbl抑制剂存在下的第二扩增步骤,例如,快速扩增步骤。在某些实施方案,所述方法进一步包含向有需要的患者施用所述免疫细胞。

[0023] 另一方面,本发明提供了用于治疗有需要的患者的病症的扩增方法、组合物和细

胞疗法方法。在某些实施方案，所述方法包含从供体的肿瘤或其一部分收获免疫细胞。在某些实施方案，所述经收获的免疫细胞经遗传修饰。在某些实施方案，所述方法进一步包含在一个或两个步骤中离体扩增来自所述肿瘤的免疫细胞。在某些实施方案，第一步是扩增步骤。在其他实施方案，所述方法包含第二扩增步骤，例如，快速扩增步骤。在某些实施方案，所述方法进一步包含向有需要的患者施用所述免疫细胞，同时联合施用足量的Cbl抑制剂，例如，以提高所述免疫细胞的效力。在某些实施方案，所述Cbl抑制剂增强所述免疫细胞的持久性。在某些实施方案，所述Cbl抑制剂增强所述免疫细胞的植入。

[0024] 在某些方面，将上述任一方法进行组合。在某些实施方案，所述方法包含在收获之前向供体施用Cbl抑制剂，以及向有此需要的患者施用经扩增的免疫细胞与Cbl抑制剂的组合。在某些实施方案，所述方法包含在收获之前向供体施用Cbl抑制剂并在Cbl抑制剂存在下进行第一次扩增。在某些实施方案，所述方法包含在收获之前向供体施用Cbl抑制剂，并且不进行第二次快速扩增。在某些实施方案，所述方法包含在收获之前向供体施用Cbl抑制剂，在Cbl抑制剂存在下进行第一次扩增，不进行第二次快速扩增，和/或向有需要的患者施用经扩增的免疫细胞与Cbl抑制剂的组合。在某些实施方案，所述方法包含在存在Cbl抑制剂的情况下进行第一次扩增，以及向有需要的患者施用经扩增的免疫细胞与Cbl抑制剂的组合。在某些实施方案，所述方法包含在收获之前向供体施用Cbl抑制剂，在Cbl抑制剂存在的情况下进行第一次扩增，并且不进行第二次快速扩增。在某些实施方案，所述方法包含在收获之前向供体施用Cbl抑制剂，在存在Cbl抑制剂的情况下进行第一次扩增，以及向有需要的患者施用经扩增的免疫细胞与Cbl抑制剂的组合。在某些实施方案，所述方法包含在收获之前向供体施用Cbl抑制剂，不进行第二次快速扩增，以及向有需要的患者施用经扩增的免疫细胞与Cbl抑制剂的组合。在某些实施方案，所述方法包含在存在Cbl抑制剂的情况下进行第一次扩增，不进行第二次快速扩增，以及向有需要的患者施用经扩增的免疫细胞与Cbl抑制剂的组合。

[0025] 一方面，本发明提供了用于治疗有需要的患者的病症的扩增方法、组合物和细胞疗法方法。在某些实施方案，所述方法包含在适于促进供体中免疫细胞活化或扩增的条件下向所述供体施用Cbl抑制剂。在某些实施方案，所述方法进一步包含从所述供体收获循环免疫细胞。在某些实施方案，所述方法进一步包含任选地对所述经收获的免疫细胞进行遗传修饰。在某些实施方案，所述方法进一步包含离体扩增来自所述供体的免疫细胞。在某些实施方案，所述方法进一步包含向有需要的患者施用所述免疫细胞。

[0026] 另一方面，本发明提供了用于治疗有需要的患者的病症的扩增方法、组合物和细胞疗法方法。在某些实施方案，所述方法包含从所述供体收获循环免疫细胞。在某些实施方案，所述方法进一步包含任选地对所述经收获的免疫细胞进行遗传修饰。在某些实施方案，所述方法进一步包含离体扩增免疫细胞。在某些实施方案，所述扩增步骤是在存在Cbl抑制剂的情况下进行。在某些实施方案，所述方法进一步包含向有需要的患者施用所述经扩增的免疫细胞。

[0027] 另一方面，本发明提供了用于治疗有需要的患者的病症的扩增方法、组合物和细胞疗法方法。在某些实施方案，所述方法包含从供体收获循环免疫细胞。在某些实施方案，所述方法进一步包含任选地对所述经收获的免疫细胞进行遗传修饰。在某些实施方案，所述方法进一步包含离体扩增免疫细胞。在某些实施方案，所述方法进一步包含向有需要的

患者施用所述免疫细胞，同时联合施用足量的Cbl抑制剂，以提高所述免疫细胞的效力。在某些实施方案，所述Cbl抑制剂增强所述免疫细胞的持久性。在某些实施方案，所述Cbl抑制剂增强所述免疫细胞的植入。

[0028] 在某些方面，将上述任一方法进行组合。在某些实施方案，所述方法包含在收获循环免疫细胞之前向供体施用Cbl抑制剂，任选地对所述经收获的免疫细胞进行遗传修饰，在Cbl抑制剂存在下进行扩增，和/或向有需要的患者施用经扩增的免疫细胞与Cbl抑制剂的组合。

[0029] 所述免疫细胞可以是技术人员认为有用的任何免疫细胞。所述免疫细胞可从肿瘤或从血液或血浆中的循环细胞分离得到。在某些实施方案，所述免疫细胞选自肿瘤浸润淋巴细胞、T细胞、CAR-T细胞、TCR T细胞、自然杀伤细胞、和NK-CAR细胞。在某些实施方案，所述免疫细胞是针对特定肿瘤抗原的存在而经选择的患者的T细胞。在某些实施方案，所述免疫细胞经工程改造并经选择以使存在例如T细胞受体或嵌合抗原受体。所述这些方法可用于本领域从业人员认为合适的任何目的。在某些实施方案，所述这些方法可用于增强有需要的患者的细胞植入。在某些实施方案，所述这些方法可用于治疗有需要的患者的免疫细胞功能障碍。在某些实施方案，所述这些方法可用于治疗有需要的患者的T细胞功能障碍。在某些实施方案，所述这些方法可用于治疗有需要的患者的癌症。在某些实施方案，通过本发明所述方法制得的细胞可用于治疗实体瘤。在某些实施方案，通过本发明所述方法制得的细胞可用于治疗复发性或难治性癌症。在某些实施方案，通过本发明所述方法制得的细胞可与化学疗法组合使用以治疗癌症或T细胞功能障碍。

[0030] 另一方面，本发明提供了体外扩增免疫细胞的方法。在某些实施方案，所述方法包含在Cbl抑制剂存在下，在产生比不存在Cbl抑制剂时更多的记忆性免疫细胞的条件下，体外扩增免疫细胞，和任选地在存在Cbl抑制剂的情况下任选地使所述经扩增的细胞进行第二轮扩增。在一些实施方案，所述免疫细胞是T细胞，和比不存在Cbl抑制剂时产生更多的$T_{SCM}$和/或$T_{CM}$。在一些实施方案，与不存在Cbl抑制剂的情况相比，产生更多的$T_{CM}$。在某些实施方案，所述经扩增的免疫细胞不进行第二轮扩增。在某些其他实施方案，所述经扩增的免疫细胞任选地在存在Cbl抑制剂的情况下进行第二轮扩增。

[0031] 另一方面，本发明提供了组合物，所述组合物包含通过本发明所述的任一方法制得的细胞。本发明所述方法的组合物可用于，例如治疗癌症和/或免疫细胞功能障碍。在某些实施方案，通过本发明所述方法制得的细胞可用于治疗实体瘤。在某些实施方案，通过本发明所述方法制得的细胞可用于治疗复发性或难治性癌症。在某些实施方案，通过本发明所述方法制得的细胞可与化学疗法组合使用以治疗癌症或免疫细胞功能障碍。

附图简要说明

[0032] 图1A和图1B提供了使用源自人卵巢和结肠肿瘤碎片的细胞的TIL研究结果，表明在不存在和存在IL-2的情况下Cbl抑制剂对体外细胞生长的影响。图1A示出了在单独存在10μM、1μM和0.1μM Cbl抑制剂的情况下培养28天后的每孔细胞数量。图1B示出了在10μM、1μM和0.1μM Cbl抑制剂和6000IU IL-2存在下培养孵育28天后来自相同来源材料的细胞数量。

[0033] 图2A和图2B提供了在IL-2不存在(图2A)和存在(图2B)的情况下在0.1μM、1.0μM和10μM Cbl抑制剂存在下扩增11天后对TIL进行流式细胞术研究的结果。

[0034] 图3A和图3B示出了在0.1μM、1.0μM和10μM Cbl抑制剂存在下，在不存在和存在IL-2的情况下扩增11天后CD4+/IFNγ(图3A)和CD8+/IFNγ(图3B)TIL的水平。

[0035] 图4A-4D示出了来自不同患者的肿瘤所生长的淋巴细胞百分比(%)。源自卵巢肿瘤的TIL在DMSO(对照)、IL-2、和单独存在10μM、1μM和0.1μM Cbl抑制剂、以及10μM、1μM或0.1μM Cbl抑制剂与IL-2组合存在下生长。图4A、4B和4D是来源于3个不同患者的卵巢肿瘤的TIL细胞。图4C示出了来源于结肠肿瘤组织的TIL细胞的结果。

[0036] 图5A和图5B提供了在IL-2、Cbl抑制剂、及其组合存在下培养的来自结肠肿瘤来源(图5A)TIL和卵巢肿瘤来源(图5B)TIL的结果。

[0037] 图6提供了用于确定TIL培养的最佳起始材料的研究结果。在一项使用肿瘤碎片与来自结肠肿瘤的肿瘤细胞悬浮液的对比研究中，从肿瘤碎片生长11天的培养物显示出比使用肿瘤细胞悬浮液作为TIL培养起始材料的培养物高约10倍的扩增。

[0038] 图7提供了在培养源自人结肠肿瘤的TIL后显示中枢记忆性表型(CD45RO+)的CD4+和CD8+细胞百分比(%)的第11天和第28天结果。

[0039] 图8提供了使用具有透气硅底部的透气性烧瓶用于来自2个不同卵巢肿瘤样本的细胞扩增的第7天结果，其中将在第0天或第3天添加IL-2或Cbl抑制剂的情况进行了比较。“A”是在第0天单独添加IL-2。“B”是在第0天添加IL-2及1μM Cbl抑制剂。“C”是在第0天添加IL-2并在第3天添加1μM Cbl抑制剂。“D”是在第3天添加IL-2并在第3天添加Cbl抑制剂。“E”是在第0天添加Cbl抑制剂。

[0040] 图9提供的结果表明，用Cbl抑制剂扩增的OT-1细胞是能够排斥在一侧皮下植入E.G7-OVA细胞的小鼠中已形成的肿瘤的有效效应物。

[0041] 图10提供的结果表明，用Cbl抑制剂扩增的OT-1细胞在总CD8+T细胞和CD45+细胞中表现出更高的频率，并在血液中体内持久存在。转移后4天或9天，评估血液中的OT-1细胞。当分析获自脾的OT-1细胞时得到了类似的数据。

[0042] 图11A和图11B提供了在施用用Cbl抑制剂、IL-2、Cbl抑制剂+IL-2、及对照扩增的CD8+OT-1细胞后随时间变化的肿瘤体积。

[0043] 图12A和图12B提供了在施用用Cbl抑制剂、IL-2、Cbl抑制剂+IL-2、及对照扩增的抗CD3刺激的OT-1细胞后随时间变化的肿瘤体积(图12A)和条件性存活率(图12B)。

[0044] 图13A(转移后第4天)和图13B(转移后第22天)提供了使用和不使用Cbl抑制剂扩增的OT-1细胞在总CD45+细胞中的频率及在血液中的体内持久性。

[0045] 图14A-14C示出了Cbl抑制剂对OT-1细胞生长的影响。图14A提供的结果显示，用Cbl抑制剂扩增的OT-1细胞在肿瘤中的总CD45+细胞中表现出更高的频率。图14B和图14C提供的结果显示，用Cbl抑制剂扩增的OT-1细胞降低了肿瘤中耗竭标志物PD1和TIM3(图14B)以及PD1、TIM3和LAG3(图14C)的表达。

[0046] 图15提供了在使用和不使用Cbl抑制剂扩增的经收获的OT-1细胞中，响应肽再刺激的总CD45+细胞的频率。

[0047] 图16A-16C示出了Cbl抑制剂对OT-1细胞生长的影响。图16A和图16B提供了使用和不使用Cbl抑制剂扩增的肽再刺激的OT-1细胞的多功能性(IFN-γ和TNF-α双阳性细胞)。图16C提供了使用和不使用Cbl抑制剂扩增的多功能(IFN-γ和TNF-α双阳性)OT-1细胞中的耗竭标志物(PD1和TIM3)频率。

[0048] 图17A和图17B提供了收获自脾细胞的肽再刺激的OT-1细胞中的IFN-γ和IL2生成。图17A提供了再刺激后的IFN-γ生成。图17B提供了再刺激后的IFN-γ和IL-2生成。

[0049] 图18提供了用IL-2及化合物103连同和不连同口服化合物116扩增的OT-1细胞的抗肿瘤功效。

[0050] 图19提供了用OT-1细胞处理的小鼠的存活率,所述OT-1细胞用IL-2及化合物103连同和不连同口服化合物116进行扩增。

[0051] 图20A(转移后第5天)和图20B(转移后第20天)提供了用IL-2和化合物103连同和不连同口服化合物116扩增的OT-1细胞在总CD45+细胞中的频率以及体内持久性。

[0052] 图21表明用Cbl抑制剂进行体外扩增的肿瘤抗原特异性T细胞(OT-1细胞)变成了能够保护小鼠在以后的时间点免受肿瘤再次攻击的有效记忆性细胞。

[0053] 图22A提供的结果表明,在初始OT-1T细胞转移后149天,用单独的IL-2、单独的Cbl抑制剂、以及IL-2与Cbl抑制剂的组合扩增的OT-1细胞的体内持久性。

[0054] 图22B提供的结果表明,由Cbl抑制剂扩增的OT-1细胞的数量在肿瘤再次攻击后在血液中增加更快。

[0055] 图23A和图23B提供的结果表明,与在24孔形式中单独使用IL-2相比,在离体TIL扩增期间添加Cbl抑制剂与IL-2可减少CD4+T细胞并增加CD8+细胞。图23A提供了显示记忆性表型CD4+T细胞(CD3+CD8-)百分比的FACS数据。图23B提供了CD45RO+中的CD8+T细胞(CD3+CD8+)。FACS结果表示为平均值±SEM。使用双尾Wilcoxon符号秩检验来计算统计显著性(*,$p<0.05$)。

[0056] 图24提供的结果表明,与24孔形式中单独使用IL-2相比,在离体TIL扩增期间添加Cbl抑制剂可增加CD8+中枢记忆性T细胞。

[0057] 图25A和图25B提供的结果表明,与GREX10形式中单独使用IL-2相比,Cbl抑制剂在离体TIL扩增期间可增加CD8+细胞。图25A提供了表明CD45RO+中记忆性表型CD8+T细胞(CD3+CD8+)百分比的FACS数据。图25B提供了在14天的离体培养后从患者的癌组织获得的CD8+TIL总数。FACS结果表示为平均值±SEM。使用双尾Wilcoxon符号秩检验来计算统计显著性(*,$p<0.05$)。

[0058] 图26提供的结果表明,与GREX10形式中单独使用IL-2相比,Cbl抑制剂在离体TIL扩增期间可增加CD8+中枢记忆性T细胞。使用双尾Wilcoxon符号秩检验来计算统计显著性(*,$p<0.05$)。

[0059] 图27A和图27B提供的结果表明,在GREX10中扩增的pre-REP TIL(在进行快速扩增方案前的TIL)与通过响应于非特异性刺激的CD107a动员所确定的情况呈函数关系。通过流式细胞术评估源自结肠、肺、卵巢和乳腺(n=10)的CD8+TIL(图27A)和CD4+(图27B)在分泌抑制剂和抗CD107a存在下响应于抗CD3/抗CD28刺激6小时的CD107a+表达。FACS结果表示为平均值±SEM。使用双尾Wilcoxon符号秩检验来计算统计显著性(*,$p<0.05$)。

[0060] 图28A和图28B提供的结果表明,在GREX10中扩增的pre-REP TIL与通过响应于非特异性刺激的颗粒酶+分泌以及颗粒酶B+CD107a+动员所确定的情况呈函数关系。通过流式细胞术评估源自结肠、肺、卵巢和乳腺(n=10)的CD8+TIL在存在分泌抑制剂的情况下响应于抗CD3/抗CD28刺激6小时的单独颗粒酶B+(图28A)以及颗粒酶B+CD107a(图28B)表达。FACS结果表示为平均值±SEM。使用双尾Wilcoxon符号秩检验来计算统计显著性(*,p<

0.05)。

[0061] 图29提供的结果表明,pre-REP扩增的TIL与响应于高剂量(6000IU/ml)IL-2或高剂量IL-2+1uM Cbl抑制剂的细胞因子分泌所确定的情况呈函数关系。使用Luminex评估源自结肠、肺、卵巢和乳腺(n=10)的TIL扩增14天期间所分泌的细胞因子。FACS结果表示为平均值±SEM。使用双尾Wilcoxon符号秩检验来计算统计显著性(*,p<0.05)。

[0062] 图30A和图30B提供的结果表明,与单独的IL-2相比,使用高剂量IL-2(6000IU/ml)与1μM Cbl抑制剂的组合扩增的TIL响应于非特异性刺激,分泌增加的T细胞趋化因子MIP1A(图30A)和MIP1B(图30B)。FACS结果表示为平均值±SEM。使用双尾Wilcoxon符号秩检验来计算统计显著性(*,p<0.05)。

[0063] 图31提供的结果表明,用高剂量IL-2(6000IU/ml)和1μM化合物103扩增的TIL响应于非特异性刺激,分泌T细胞生长因子细胞因子。FACS结果表示为平均值±SEM。使用双尾Wilcoxon符号秩检验来计算统计显著性(*,p<0.05)。

[0064] 图32A-32C提供的结果表明,Cbl抑制剂增加了治疗组之间共享的独特CDR3的百分比。所述这些组别分别是高剂量IL-2(图32A)、高剂量IL-2与化合物103组合(图32B)、以及单独的化合物103(图32C)。

[0065] 图33提供的结果表明,Cbl抑制剂化合物103在多个温度(4℃-37℃)下,在11天的时间段内是稳定的。

[0066] 图34提供了表明Cbl抑制剂在TIL培养物中稳定性的结果。

发明详述

定义

[0067] 当提及本发明提供的化合物和方法时,除非另有说明,否则以下术语具有下列含义。除非另有定义,本发明使用的所有技术用语及科学术语均具有本发明所属技术领域中具有通常知识者所通常了解的意义。若本发明中某一术语有多种定义,除非另有说明,否则以本节中的定义为准。在本发明中描述或指涉的技术和程序通常为所属技术领域中具有通常知识者所广为理解且经常使用常规方法采用,诸如,例如广为使用的Green&Sambrook,Molecular Cloning:A Laboratory Manual 4th ed.(2012),Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY;Ausubel et al.,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons;和Rosenberg et al.,J.Natl.Cancer Inst.,86(15):1159-1166(1994)中所述的分子克隆方法。当适当时,涉及使用自商业途径获得的试剂盒及试剂的方法通常根据厂商定义的方案和条件/参数进行,除非另有说明。

[0068] 本发明使用的单数形式“一个/种/项”和“所述”包括复数指涉物,除非上下文另外清楚说明。

[0069] 术语“约/大约”表示且涵盖所示值以及此值以上及以下的范围。在某些实施方案,术语“约/大约”表示指定数值±10%、±5%或±1%。在某些实施方案,术语“约/大约”表示指定数值±此数值的一个标准偏差。对于对数刻度,术语“约/大约”表示指定数值±0.1或±0.2对数(log)单位。

[0070] 本发明使用的术语“异常细胞增殖”包括增生或癌细胞增殖。癌细胞可来源于血液学癌症或非血液学癌症,例如本发明所述的那些。

[0071] 本发明使用的体内“活化”或“激活”是指提供一组合适的体内条件,特别是在接受

基于细胞的免疫疗法的个体中，以在收获前使所述免疫细胞与有效量的Cbl抑制剂接触以调节所述个体的免疫细胞群的活性。在一些实施方案，所述免疫细胞是T细胞、B细胞或自然杀伤(NK)细胞。所述免疫细胞可以是循环T细胞。所述免疫细胞可以是肿瘤浸润淋巴细胞。在一些任何此类实施方案中，所述免疫细胞是T细胞，和调节T细胞活性包含增加的T细胞活化、增加的T细胞增殖、减少的T细胞耗竭及降低的T细胞耐受性中的一种或多种。在进一步的实施方案，增加的T细胞活化包含增加细胞因子的生成，所述细胞因子例如选自由以下组成的组的一种或多种：IL-2、IFN-γ和TNFα。在又一进一步的实施方案中，增加的T细胞活化包含增加一种或多种T细胞活化标志物(例如，CD25、CD69和CD45RO中的一种或多种)的细胞表面表达。在一些任何此类实施方案中，T细胞已与或与单独的抗CD3抗体或抗CD3抗体与抗CD28抗体的组合接触。在一些任何此类实施方案中，所述免疫细胞是NK细胞，和调节NK细胞活性包含增加NK细胞活化。在进一步的实施方案，增加的NK细胞活化包含增加细胞因子例如IFN-γ的生成。在一些任何此类实施方案中，所述免疫细胞是B细胞，和调节B细胞活性包含增加B细胞活化(例如，CD69等的增加)。在一些任何此类实施方案中，所述免疫细胞是人免疫细胞。

[0072] 关于本发明化合物(例如，Cbl抑制剂)或细胞群体的“施用”或“给药”及其变体(在一些实施方案，“施用”化合物或细胞群体)是指引入所述化合物或所述化合物的前药、或用所述化合物(例如，Cbl抑制剂)处理的细胞群至动物系统中以激活细胞或用于治疗。当本发明化合物或其前药与一种或多种其他活性剂(在一些实施方案，例如，细胞群的输注、手术、放射、及化学疗法等)组合提供时，“施用”或“给药”及其变体均应理解为包括同时和依序引入所述化合物及其他药剂或元素。

[0073] 本发明使用的术语“Cbl”是指选自包含cCbl、Cbl-b和Cbl-c的组的Cbl蛋白。所述术语还包括这些蛋白质的天然存在变体，包括剪接变体或等位基因变体。所述术语还包括这些蛋白质的非天然存在变体，例如重组Cbl蛋白或其截短变体，其通常保留天然存在的Cbl或天然存在的Cbl变体的结合能力(例如，与E2酶结合的能力)。

[0074] 本发明使用的术语“Cbl抑制剂”是指与Cbl结合并抑制Cbl蛋白的活性或功能的化合物。在一些实施方案，Cbl抑制剂是抑制Cbl-b活性的化合物。在其他实施方案，Cbl抑制剂是能够在不存在共刺激的情况下活化T细胞的化合物。

[0075] 在体内、离体或体外使细胞“接触”是指将群体中的一个或多个细胞暴露于特定化合物、分子或试剂。可与细胞接触的化合物包括细胞因子类、抗体类、有丝分裂原类、重组配体类和凝集素类。

[0076] 本发明使用的“供体”是哺乳动物。就用于本发明方法中的免疫细胞来源而言，“哺乳动物”包括人类；非人灵长类动物；家畜和农场动物类；和动物园动物、运动动物或赏玩动物类，如犬、马、兔、牛、猪、仓鼠、沙鼠、小鼠、雪貂、大鼠、猫等。在一些实施方案，所述供体是人。“血缘供体”或“相关供体”是接受治疗的个体的近亲。“在世的非血缘供体”是指与接受治疗的个体无近亲血缘关系的个体。

[0077] “药物增强的过继细胞疗法”是指过继性细胞疗法，其包含使用一种或多种Cbl抑制剂来增加用于过继细胞疗法的待收获细胞的数量，缩短细胞体外选择和扩增所需的时长，增加输注入有需要的患者体内的过继细胞疗法所生成的细胞的数量和持久性，和/或增加过继细胞疗法在有需要的患者中的功效。

[0078] “药物增强的嵌合抗原受体疗法”是指嵌合抗原疗法，其包含使用一种或多种Cbl抑制剂来增加用于过继细胞疗法的待收获细胞的数量，缩短经遗传修饰的细胞体外选择和扩增所需的时长，增加输注入有需要的患者体内的经遗传修饰细胞的数量和持久性，和/或增加嵌合抗原受体疗法在有需要的患者中的功效。

[0079] “药物增强的TIL疗法”是指肿瘤浸润淋巴细胞疗法，其包含使用一种或多种Cbl抑制剂来增加收获自肿瘤碎片的细胞数量，缩短TIL体外选择和扩增所需的时长，增加输注入有需要的患者体内的将要生成的TIL的数量和持久性，和/或增加TIL疗法在有需要的患者中的功效。

[0080] 本发明公开的药剂的“有效量”是足以实现特定目的的量。“有效量”可根据所述目的以经验和常规方式确定。药剂的“有效量”或“足够量”是足以产生所需生物学效应(例如，有益结果，包括有益的临床结果)的量。在一些实施方案，术语“有效量”是指可有效“治疗”个体(例如，诸如人的哺乳动物)的疾病或病症的药剂的量。

[0081] “富集的”细胞群是指已被纯化、分选或暴露于条件(例如，在特定化合物或分子存在下体外培养)一段时间的一组细胞，所述这些条件可促进具有特定表型或功能活性的细胞的存活或增殖。在一些实施方案，富集的细胞群将具有比在正常组织环境中发现的更高浓度或比例的特定细胞类型。

[0082] 本发明使用的术语“造血细胞”包括造血干细胞和造血祖细胞。

[0083] “免疫细胞”是指造血细胞、多能干细胞、髓系祖细胞、淋巴系祖细胞、肿瘤浸润淋巴细胞、T细胞、B细胞、和/或NK细胞。

[0084] 本发明使用的术语“抑制生长”(例如，指涉细胞，诸如肿瘤细胞)旨在包括当同已用Cbl抑制剂处理的细胞接触时细胞生长(例如，肿瘤细胞生长)的任何可测定的减少。在某些实施方案，将细胞生长与未同细胞接触或未同已用Cbl抑制剂处理的细胞接触的相同细胞的生长进行比较。在一些实施方案，生长可被抑制至少约10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、99％、或100％。细胞生长的减少可通过多种机制发生，包括但不限于蛋白质内化、细胞凋亡、坏死和/或效应子功能介导的活性。

[0085] 本发明使用的术语“预防剂”和“预防药物/药剂”是指可用于预防病况、疾病、或病症或其一种或多种症状的任何药物/药剂。在某些实施方案，术语“预防剂”包括本发明提供的化合物。在某些其他实施方案，术语“预防剂”并非指本发明提供的化合物。在某些实施方案，预防剂可以是已知可用于或已经用于或正在用于预防或阻止与癌症或免疫介导的疾病相关的病况、疾病、或病症的发作、发展、进展和/或严重程度的药物/药剂，或已知可用于或已经用于或正在用于预防或阻止副作用发作或降低副作用严重程度(例如，恶心、呕吐)的药物/药剂。

[0086] 本发明使用的短语“预防有效量”是指足以导致预防或减少与病况、疾病、或病症相关的一种或多种症状的发展、复发或发作的治疗/疗法(例如，预防剂)的量，或减少或预防副作用、或增强或改善另一种治疗/疗法(例如，另一种预防剂)的预防效果的量。

[0087] “选择”、“选择性富集”或“选择性扩增”是指从个体收获的免疫细胞的离体培养，或来自供体或细胞系的免疫细胞或干细胞的体外培养，在促进所述免疫细胞增殖的条件下，富集特定类型的免疫细胞，例如，CD8+T细胞，或特定表型的T细胞，例如($CD45RO^+/CD95^+$)记忆性T细胞。

[0088] 本发明使用的术语“受试者”、“个体”和“患者”可互换使用。术语“受试者”是指动物，诸如包括非灵长类动物(例如，牛、猪、马、猫、犬、大鼠和小鼠)和灵长类动物(例如，猴如食蟹猴、黑猩猩和人)的哺乳动物，在某些实施方案是人。在某些实施方案，所述受试者是农场动物(例如，马、牛、猪等)或宠物(例如，犬或猫)。在某些实施方案，所述受试者是人。

[0089] 本发明使用的术语“T细胞功能障碍”是指对抗原刺激的免疫应答性降低的状态。术语“T细胞功能障碍”包括T细胞耗竭和/或T细胞失能的共同要素，其中可能发生抗原识别，但随后的免疫应答对控制肿瘤生长无效。术语“T细胞功能障碍”还包括对抗原识别难治或无应答，譬如，将抗原识别转化为下游T细胞效应器功能(例如增殖、细胞因子生成和/或靶细胞杀伤)的能力受损。

[0090] 术语“T细胞失能(T-cell anergy)”是指由于通过T细胞受体传递的信号不完整或不足导致对抗原刺激无应答的状态。“T细胞失能”亦可在不存在共刺激的情况下在用抗原刺激时产生，导致细胞对抗原的后续活化变得难治，即使在共刺激的情况下亦是如此。

[0091] 术语“T细胞耗竭”是指由于癌症期间可能发生的持续TCR信号传导而引起的T细胞功能障碍状态。其与失能的区别在于，其并非由不完整或有缺陷的信号传导所致，而是由持续的信号传导所致。其定义是效应器功能差、抑制性受体的持续表达、以及不同于功能效应T细胞或记忆性T细胞的转录状态。

[0092] 术语“T细胞持久性”是指移植或输注的T细胞作为储库持续存在并在输注后继续增殖一段时间的能力，使得所述T细胞持续进行免疫监视以促进根除当前和潜在的未来恶性肿瘤。其中一些T细胞处于活化状态。持久性亦指移植细胞在输注后存活或持续存在的能力。T细胞应答或细胞植入的持久性可与疾病缓解有关。

[0093] “T细胞功能障碍性病症”是特征在于T细胞对抗原刺激的应答性降低的疾病或病症。降低的应答性可导致对肿瘤的无效控制。在一些实施方案，术语“T细胞功能障碍性病症”包括癌症，例如血液学癌症或非血液学癌症。在一些实施方案，“T细胞功能障碍性病症”是其中T细胞失能或具有降低的分泌细胞因子、增殖和/或执行细胞溶解活性的能力的疾病。

[0094] “增强/提高T细胞功能”是指诱导、引起或刺激T细胞具有持续或扩增的生物学功能，或重新活化或重活化耗竭或失活的T细胞。增强或提高的T细胞功能的实例包括与用Cbl-b抑制剂治疗前的T细胞状态相比，T细胞活化增加(例如细胞因子生成增加、T细胞活化标志物表达增加等)、T细胞增殖增加、T细胞耗竭减少、和/或T细胞耐受性降低。测定T细胞功能增强或提高的方法均是本领域已知的。

[0095] 本发明使用的术语“治疗有效量”或“有效量”是指当向受试者施用时可有效治疗疾病或病症的蛋白质或组合物的量。在一些实施方案，治疗有效量或有效量是指当施用于受试者时可有效预防或改善疾病或疾病进展或导致症状改善的组合物的量。术语“治疗剂”可以指Cbl抑制剂、经修饰的免疫细胞群、或其组合或组合物。

[0096] 在某些实施方案，“治疗”或“处理”任何疾病或病症是指改善存在于受试者的疾病或病症。在另一实施方案，“治疗”或“处理”包括改善至少一种物理参数，此参数可能无法被所述受试者感知。在又一实施方案，“治疗”或“处理”包括调节所述疾病或病症，不论是物理学上(例如，稳定可感知的症状)或生理学上(例如，稳定生理参数)或两者兼具。在另一实施方案，“治疗”或“处理”包括推迟或预防所述疾病或病症发作。

[0097] 在另一实施方案，术语“治疗”或“处理”疾病是指执行一个方案，所述方案可包括向个体(人或其他受试者)施用一种或多种治疗剂，以努力在所述个体中获得有益或期望的结果，包括临床结果。有益或期望的临床结果包括，但不限于，减轻或改善一种或多种症状、减轻疾病程度、稳定(即，不恶化)疾病状态、防止疾病传播、延迟或减缓疾病进展、改善或缓解疾病状态、以及缓解(部分或全部)。“治疗”还可指与未接受治疗的个体的预期存活期相比延长了存活期。此外，“治疗”和“处理”可通过施用一剂一种或多种治疗剂而发生，或可在施用一系列剂量的一种或多种治疗剂时发生。“治疗”或“处理”不需要完全缓解体征或症状，也不需要治愈。“治疗”亦可指临床干预，例如向个体施用一种或多种治疗剂，旨在改变被治疗个体或细胞的自然病程(即，改变在无临床干预的情况下将发生的个体或细胞的进程)。

[0098] 本发明使用的“烷基”是指饱和的直链(即，未支链化)或支链的一价烃链或其组合。特定的烷基基团是具有指定碳原子数的那些，例如，具有1至20个碳原子(“$C_1$-$C_{20}$烷基”)、具有1至10个碳原子(“$C_1$-$C_{10}$”烷基)、具有1至8个碳原子(“$C_1$-$C_8$烷基”)、具有1至6个碳原子(“$C_1$-$C_6$烷基”)、具有2至6个碳原子(“$C_2$-$C_6$烷基”)、或具有1至4个碳原子(“$C_1$-$C_4$烷基”)的烷基基团。烷基基团的实例包括但不限于，诸如甲基，乙基，正丙基，异丙基，正丁基，叔丁基，异丁基，仲丁基，例如正戊基、正己基、正庚基、正辛基的同系物类及异构体类，及其类似基团。

[0099] “氨基”是指基团-$NH_2$。

[0100] 本发明使用的“芳基”是指具有单环(例如，苯基)或多个稠环(例如，萘基或蒽基)的芳族碳环基团，其中所述稠环中一个或多个环可能并非芳族。特定的芳基基团是具有6至14个环(即，环)碳原子(“$C_6$-$C_{14}$芳基”)的那些。具有多于一个环的芳基基团(其中至少一个环是非芳族的)，可在芳族环位置或非芳族环位置处连接至母体结构。在一个变体中，具有多于一个环的芳基基团(其中至少一个环是非芳族的)是在芳族环位置处连接至母体结构。芳基的实例包括但不限于，诸如苯基、萘基、1-萘基、2-萘基、1,2,3,4-四氢萘-6-基等基团。

[0101] 本发明使用的“亚芳基”是指与芳基相同的残基，但具有二价。特定的亚芳基基团是具有6至14个环碳原子(“$C_6$-$C_{14}$亚芳基”)的那些。亚芳基的实例包括但不限于，诸如亚苯基，邻亚苯基(即，1,2-亚苯基)，间亚苯基(即，1,3-亚苯基)，对亚苯基(即，1,4-亚苯基)，亚萘基，1,2-亚萘基，1,3-亚萘基，1,4-亚萘基，2,7-亚萘基，2,6-亚萘基等基团。

[0102] “碳环基”或“碳环”是指所有环成员均为碳原子的一价环状基团，例如环己基、苯基、1,2-二氢萘基等。

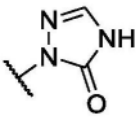
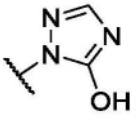
[0103] 本发明使用的“环烷基”是指非芳族、饱和或不饱和的环状一价烃结构。特定的环烷基基团是具有指定数目的环(即，环)碳原子的那些，例如，具有3至12个环碳原子(“$C_3$-$C_{12}$环烷基”)的环烷基基团。特定的环烷基是具有3至8个环碳原子(“$C_3$-$C_8$环烷基”)或具有3至6个环碳原子(“$C_3$-$C_6$环烷基”)的环状烃。环烷基可由一个环(例如环己基)或多个环(例如金刚烷基)组成，但不包括芳基基团。包含多于一个环的环烷基可以是稠合、螺环或桥接的、或其组合。环烷基基团的实例包括但不限于，环丙基，环丁基，环戊基，环己基，1-环己烯基，3-环己烯基，环庚基，降莰基，及其类似基团。

[0104] 本发明使用的“亚环烷基”是指与环烷基相同的残基，但具有二价。特定的亚环烷基基团是具有3至12个环碳原子(“$C_3$-$C_{12}$亚环烷基”)、具有3至8个环碳原子(“$C_3$-$C_8$亚环烷

基”)或具有3至6个环碳原子(“$C_3$-$C_6$亚环烷基”)的那些。亚环烷基的实例包括但不限于,亚环丙基,亚环丁基,亚环戊基,亚环己基,1,2-亚环己烯基,1,3-亚环己烯基,1,4-亚环己烯基,亚环庚基,亚降莰基,及其类似基团。

[0105] “卤基”或“卤素”是指原子序数为9至85的第17族元素。卤素基团包括氟、氯、溴和碘。

[0106] “卤代烷基”、“卤代亚烷基”、“卤代芳基”、“卤代亚芳基”、“卤代杂芳基”及类似术语是指被至少一个卤素基团取代的基团部分。当卤代烷基基团部分或其他卤素取代的基团部分被一个以上的卤素取代时,可通过使用对应于所连接的卤素基团部分的数目的前缀来表示。例如,二卤代芳基、二卤代烷基、三卤代芳基、三卤代烷基等,是指被2个(“二”)或3个(“三”)卤素基团取代的芳基和烷基,其可以是但不一定是相同的卤素;因此,譬如,卤代芳基基团4-氯-3-氟苯基属于二卤代芳基的范畴。卤代烷基基团的子集,其中烷基基团的每个氢(H)被卤素基团替代,则称为“全卤代烷基”。特定的全卤代烷基基团是三氟烷基(-$CF_3$)。同理,“全卤代烷氧基”是指烷氧基基团,其中卤素取代构成烷氧基的烷基基团部分的烃中的每个氢(H)。全卤代烷氧基基团的实例是三氟甲氧基(-$OCF_3$)。“卤代烷基”包括单卤代烷基、二卤代烷基、三卤代烷基、全卤代烷基、和烷基基团上可能的任何其他数目的卤代取代基;同理,对于其他基团,如卤代亚烷基、卤代芳基、卤代亚芳基、卤代杂芳基等亦是如此。

[0107] 本发明使用的“杂芳基”是指具有1至14个环碳原子和至少一个环杂原子(包括但不限于,诸如氮(N)、氧(O)和硫(S)的杂原子)的不饱和芳族环状基团。杂芳基基团可具有单环(例如,吡啶基或咪唑基)或多个稠环(例如,吲哚啉基、吲哚基或喹啉基),其中至少一个稠环是芳族的。特定的杂芳基基团是具有1至12个环碳原子和1至6个独立地选自由氮、氧和硫组成的组的环杂原子的5至14个原子组成的环(“5至14个原子组成的杂芳基”);具有1至8个环碳原子和1至4个独立地选自由氮、氧和硫组成的组的环杂原子的5至10个原子组成的环(“5至10个原子组成的杂芳基”);或具有1至5个环碳原子和1至4个独立地选自由氮、氧和硫组成的组的环杂原子的5、6或7个原子组成的环(“5至7个原子组成的杂芳基”)。在一个变体中,杂芳基包括具有1至6个环碳原子和1至4个独立地选自由氮、氧和硫组成的组的环杂原子的单环芳族5、6或7个原子组成的环。在另一变体中,杂芳基包括具有1至12个环碳原子和1至6个独立地选自由氮、氧和硫组成的组的环杂原子的多环芳族环。具有多于一个环的杂芳基基团,其中至少一个环是非芳族的,可在芳族环位置处或非芳族环位置处连接至母体结构。杂芳基的实例包括但不限于,诸如吡啶基、苯并咪唑基、苯并三唑基、苯并[b]噻吩基、喹啉基、吲哚基、苯并噻唑基等基团。“杂芳基”亦包括诸如  (2,4-二氢-3H-1,2,4-三唑-3-酮-2-基)的基团部分,其具有互变异构结构  (1H-1,2,4-三唑-5-醇-1-基)。

[0108] 本发明使用的“亚杂芳基”是指与杂芳基相同的残基,但具有二价。特定的亚杂芳基基团是具有1至12个环碳原子和1至6个独立地选自由氮、氧和硫组成的组的环杂原子的5至14个原子组成的环(“5至14个原子组成的亚杂芳基”);具有1至8个环碳原子和1至4个独

立地选自由氮、氧和硫组成的组的环杂原子的5至10个原子组成的环(“5至10个原子组成的亚杂芳基”);或具有1至5个环碳原子和1至4个独立地选自由氮、氧和硫组成的组的环杂原子的5、6或7个原子组成的环(“5至7个原子组成的亚杂芳基”)。亚杂芳基的实例包括但不限于,诸如亚吡啶基、亚苯并咪唑基、亚苯并三唑基、亚苯并[b]噻吩基、亚喹啉基、亚吲哚基、亚苯并噻唑基等基团。

[0109] 本发明使用的“杂环基”和“杂环基团”俱是指具有指定原子数和杂原子数的非芳族、饱和或部分不饱和环状基团,或者如果未指定原子数或杂原子数,则具有至少3个环原子,1至14个环碳原子和至少一个环杂原子,包括但不限于诸如N、O和S的杂原子。杂环基团可具有单个环(例如,四氢噻吩基、噁唑烷基)或多个稠环(例如,十氢喹啉基、八氢苯并[d]噁唑基)。多个稠环包括但不限于,双环、三环和四环,以及桥环或螺环体系。杂环基团的实例包括但不限于,吖丙啶基、氮杂环丁烷基、吡咯烷基、哌啶基、环氧乙烷基、氧杂环丁烷基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、噁唑烷基、哌嗪基、吗啉基、二噁烷基、3,6-二氢-2H-吡喃基、2,3-二氢-1H-咪唑基、及其类似基团。

[0110] “氧代”是指基团=O,即与碳或其他化学元素双键键合的氧原子。

[0111] 除非另有说明,否则“任选取代”是指基团未被取代或被一个或多个(例如,1、2、3、4或5个)为所述基团列出的取代基取代,其中所述取代基可以相同或不同。在一个实施方案,任选取代的基团是未取代的。在一个实施方案,任选取代的基团具有一个取代基。在另一实施方案,任选取代的基团具有两个取代基。在另一实施方案,任选取代的基团具有三个取代基。在另一实施方案,任选取代的基团具有四个取代基。在一些实施方案,任选取代的基团具有1至2、1至3、1至4、或1至5个取代基。当存在多个取代基时,除非另有说明,否则每个取代基均是独立选择的。譬如,基团-N($C_1$-$C_4$烷基)($C_1$-$C_4$烷基)上的每个($C_1$-$C_4$烷基)取代基均可以相互独立地选择,从而生成诸如-N($CH_3$)($CH_2CH_3$)的基团,等等。

[0112] 本发明使用的“小分子”是指分子量为2,000道尔顿或更小的化合物。

[0113] 除了本发明公开内容外,术语“取代的”在用于修饰特定基团或原子团时,还可表示所述特定基团或原子团的一个或多个氢原子(H)各自彼此独立地被如本发明所定义的相同或不同取代基取代。在一些实施方案,被取代的基团具有1、2、3或4个取代基,1、2或3个取代基,1或2个取代基,或1个取代基。

[0114] 除非另有说明,否则取代基可连接至指定基团或原子团上任何化学上可能的位置。因此,-$C_1$-$C_8$烷基-OH包括,例如,-$CH_2CH_2OH$、-$CH(OH)$-$CH_3$和-$CH_2C(OH)(CH_3)_2$。

[0115] 除非通式中指明了元素的特定同位素,否则本发明内容包括本发明所公开化合物的所有同位素体,诸如,例如化合物的氘代衍生物(其中H可以是$^2H$,即氘(D))。氘代化合物可在药代动力学(ADME)特性方面提供有利变化。同位素体可在结构中的任何或所有位置处具有同位素置换,或者可在结构中的任何或所有位置处具有以天然丰度存在的原子。

[0116] 本发明使用的“辅料”包括在所采用的剂量和浓度下对暴露于其中的细胞或哺乳动物无毒的药学上可接受的赋形剂、载体、媒剂或稳定剂。通常生理学上可接受的辅料是pH缓冲水溶液。

[0117] 术语“药物制剂”和“药物组合物”是指其形式能够使活性成分的生物活性发挥作用的制剂,并且不包含对将要施用所述制剂或组合物的个体具有不可接受的毒性的附加组分。此类制剂或组合物可以是无菌的。

[0118] 提及药物组合物中描述的化合物、或主张药物组合物权利要求中描述的化合物，是指药物组合物中记载的由通式描述的化合物，不包括药物组合物的其他要素，即，不含载体、辅料等。

[0119] 本发明旨在包括本发明所述化合物的所有盐类，以及所述化合物的此类盐的使用方法。在一个实施方案，所述化合物的盐包含药学上可接受的盐。药学上可接受的盐是可作为药品或药物施用于人和/或动物并且在施用时保留游离化合物(中性化合物或非盐化合物)的至少一些生物活性的那些盐。所需的碱性化合物的盐可通过本领域技术人员已知的方法通过用酸处理所述化合物来制备得到。无机酸的实例包括但不限于，盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸和磷酸。有机酸的实例包括但不限于，甲酸、乙酸、丙酸、乙醇酸、丙酮酸、草酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、磺酸、和水杨酸。亦可制备碱性化合物与氨基酸的盐类，例如天冬氨酸盐和谷氨酸盐。所需的酸性化合物的盐可通过本领域技术人员已知的方法通过用碱处理所述化合物来制备得到。酸化合物的无机盐的实例包括但不限于，碱金属和碱土金属盐类，例如钠盐、钾盐、镁盐和钙盐；铵盐；以及铝盐。酸化合物的有机盐的实例包括但不限于，普鲁卡因、二苄胺、N-乙基哌啶、N,N'-二苄基乙二胺、和三乙胺的盐类。亦可制备酸性化合物与氨基酸的盐类，例如赖氨酸盐。对于药学上可接受的盐的列表，参见，例如，P.H.Stahl and C.G.Wermuth(eds.)“Handbook of Pharmaceutical Salts,Properties,Selection and Use”

Wiley-VCH,2011(ISBN:978-3-90639-051-2)。以下文献中亦公开了数种药学上可接受的盐：Berge,J.Pharm.Sci.66:1(1977)。

概览

[0120] 本发明提供了使用Cbl抑制剂进行细胞疗法的方法和组合物。所述细胞可以是本领域从业人员认为有用的任何免疫细胞。在某些实施方案，所述细胞是肿瘤浸润淋巴细胞、T细胞、NK细胞、CAR-T细胞、TCR-T细胞或NK-CAR细胞。在一些实施方案，Cbl抑制剂用于活化T细胞以实现如本发明所述的期望结果。在一些实施方案，Cbl抑制剂用于在不存在共刺激的情况下活化T细胞以实现如本发明所述的期望结果。

[0121] 除非另有说明，否则进行细胞疗法的方法是众所周知的，并且本发明提供的步骤可利用本领域从业人员已知的标准技术。通常，所述方法包含任何或所有下列步骤。如下文详细描述的，一种或多种Cbl抑制剂可增强一个或多个所述这些步骤。

[0122] 在第一步中，从供体收获细胞。收获可通过标准技术进行。在某些实施方案，循环免疫细胞，例如血细胞，是收获自供体。在某些实施方案，一种或多种肿瘤或肿瘤组织获自供体并被碎片化，然后从所述肿瘤碎片分离和收获免疫细胞。在第二步中，所述经收获的免疫细胞通过一个或两个步骤进行扩增。通常，由于获得的细胞数量相对较多，因此通常一步扩增经收获的循环免疫细胞。相比之下，收获自肿瘤的免疫细胞通常需要分两步进行扩增，因为与得自血液的免疫细胞数量相比，通常得自肿瘤碎片的免疫细胞数量较少。在任一情况下，所述经收获的免疫细胞在扩增之前可任选地进行遗传修饰。在任一情况下，第一次扩增可进行3-28天，优选3-14天。第一次扩增会使得免疫细胞数量增加数倍。

[0123] 一些方法包含任选的第二扩增。在第二次扩增中，可补充细胞培养基以增强免疫细胞生长，而非在没有此种补充的情况下获得。第二次扩增可进行3-14天，优选7-14天。重要的是，在某些有利的实施方案中，由于早期步骤中Cbl抑制剂的作用，收获自肿瘤的免疫

细胞无需第二次扩增。因此，在某些实施方案，不存在第二扩增步骤。扩增后(无论是一步还是两步)，将经扩增的免疫细胞进行回收。可将所述免疫细胞储存。在进一步的步骤中，通过标准技术，譬如输注，将所述回收的免疫细胞施用于患者。如下文详细描述，一种或多种Cbl抑制剂可在收获之前增强宿主中免疫细胞的生长、扩增、及发育，可增强任一扩增步骤，可增强免疫细胞的施用以进行治疗，和/或可增强施用后的免疫细胞以增强其植入。实施方案于以下段落中进行简要描述并于以下章节中进行更详细描述。

[0124] Cbl抑制剂可用于所述方法的一个或多个步骤。在某些实施方案，Cbl抑制剂在一个步骤中使用。在某些实施方案，Cbl抑制剂在多于一个步骤中使用。在某些实施方案，Cbl抑制剂在两个步骤中使用。在某些实施方案，Cbl抑制剂在三个步骤中使用。在某些实施方案，Cbl抑制剂增强供体体内免疫细胞的扩增。在某些实施方案，Cbl抑制剂增强免疫细胞离体的第一次扩增。在某些实施方案，Cbl抑制剂增强免疫细胞离体的第二次或快速扩增。在某些实施方案，Cbl抑制剂增强了患者所施用免疫细胞的施用后植入。在某些实施方案，施用于患者的Cbl抑制剂提高了所施用免疫细胞在需要此种免疫细胞疗法的患者中的益处。

[0125] 在某些实施方案，所述方法包含向个体施用Cbl抑制剂。所述个体可以是免疫细胞的供体。所述供体可以是自体供体，亦可以是需要治疗的患者。所述供体也可以是为同种异体疗法提供细胞的个体。在某些实施方案，在收获免疫细胞之前将Cbl抑制剂施用于供体。在某些实施方案，所述Cbl抑制剂增加可收获自供体的免疫细胞的总数。在某些实施方案，所述Cbl抑制剂增加供体中活化细胞的水平。在某些实施方案，所述Cbl抑制剂增加具有特定活性的细胞，例如，对特定肿瘤或癌症类型具有细胞毒性或与特定肿瘤或癌症类型结合。在某些实施方案，所述Cbl抑制剂增加肿瘤浸润淋巴细胞的水平。在某些实施方案，所述Cbl抑制剂增加循环T细胞的水平。

[0126] 在某些实施方案，Cbl抑制剂增强免疫细胞的扩增。可根据标准技术收获免疫细胞。在某些实施方案，所述细胞样品是循环血细胞或包含免疫细胞的血浆。在某些实施方案，所述细胞样品是包含免疫细胞的肿瘤组织。在某些实施方案，所述经收获的免疫细胞在一种或多种Cbl抑制剂的存在下离体培养。在一些实施方案，在存在Cbl抑制剂的情况下培养使得收获自肿瘤碎片的免疫细胞的产量增加。在某些实施方案，在存在Cbl抑制剂的情况下培养产生更高的繁殖率。在某些实施方案，在存在Cbl抑制剂的情况下培养产生更高百分比的增殖细胞，其表现出活化免疫细胞的表型。譬如，当在存在Cbl抑制剂的情况下培养时，来自许多不同肿瘤来源(即，黑素瘤、乳腺癌、卵巢肿瘤或结肠肿瘤)中的一种所培养的细胞，在某些实施方案中表现出某些类型的基于细胞的免疫疗法所需的表型表达增加。在某些实施方案，在存在Cbl抑制剂的情况下培养免疫细胞可产生更高水平的具有记忆性表型(例如，CD45RO+/CD95+)的细胞，此举促进与更高缓解率相关的更持久的免疫应答。在Cbl抑制剂存在下选择性扩增的免疫细胞与在IL-2、另一种细胞因子、或其组合(例如，IL-2与IL-7和IL-15的组合)存在下培养的免疫细胞相比，可表现出不同的表型，从而在输注入有需要的患者体内后提供更有效的免疫细胞植入。在某些实施方案，在存在Cbl抑制剂的情况下扩增消除了免疫细胞第二次、快速扩增的需要。在某些实施方案，Cbl抑制剂增强所述第二次、快速扩增步骤。在某些实施方案，任一扩增步骤中的Cbl抑制剂是化合物103。

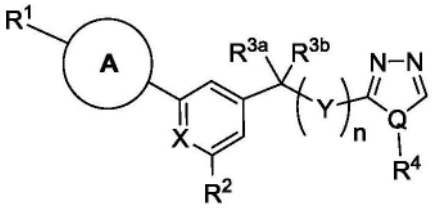
[0127] 在某些实施方案，Cbl抑制剂增强免疫细胞对有此需要的接受者或患者的施用。在某些实施方案，将Cbl抑制剂与经扩增的免疫细胞联合施用于有需要的个体。在某些实施方

案，所述施用促进免疫细胞的植入和/或生长速率。在某些实施方案，Cbl抑制剂的施用增强了免疫应答的持久性。在某些实施方案，Cbl抑制剂的施用使得疾病进展率显著降低和/或缓解率更高。在某些实施方案，本发明提供了对有需要的个体进行细胞免疫疗法的方法，所述方法包含：向所述个体施用有效量的Cbl抑制剂以增强所述细胞免疫疗法；和向所述个体施用有效量的经扩增的免疫细胞以进行细胞免疫疗法。所述Cbl抑制剂可在本领域从业人员认为合适的任何时间进行施用。在某些实施方案，所述Cbl抑制剂在收获前、收获后、输注前、输注后、或其任何组合进行施用。在特定实施方案，所述Cbl抑制剂在输注后的第1天进行施用并在本领域从业人员认为合适的天数内持续施用。在某些实施方案，所述Cbl抑制剂在输注后每天进行施用，持续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10天、或持续最多15、20、25、30、或35天。在某些实施方案，所述Cbl抑制剂经口服、静脉内、皮下、或瘤内施用于所述个体。在某些实施方案，施用于患者的Cbl抑制剂是口服递送的化合物116。在某些实施方案，所述这些方法可与本发明所述的任何免疫细胞扩增实施方案进行组合。在某些实施方案，扩增步骤包含使用如本发明所述的化合物103，和施用步骤包含如本发明所述口服使用化合物116。

Cbl抑制剂

[0128] Cbl抑制剂包括抑制Cbl酶的小分子类、肽类、核酸类、或抗体类。Cbl酶包括cCbl、Cbl-b和Cbl-c。可用于本发明治疗方法和组合物的Cbl抑制剂包括但不限于，用于基于细胞的免疫疗法的化合物及药物组合物。Cbl抑制剂可用于调节免疫系统的体内治疗方法，例如增加T细胞、NK细胞、循环T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞和B细胞的活化，以增加所输注的经离体扩增免疫细胞的植入，或增加对所述输注的经离体扩增免疫细胞应答的持久性。此外，Cbl抑制剂可用于帮助在体外或离体扩增此类免疫细胞，以增加其生长和增殖或以调节所得经扩增免疫细胞的表型。

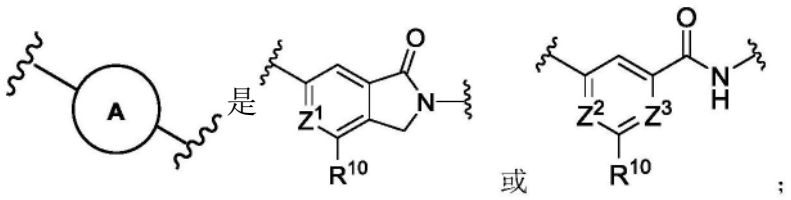
[0129] 在某些实施方案，所述Cbl抑制剂是式(A)所示化合物：




式(A)

或其互变异构体，或前述任一种的药学上可接受的盐，其中：

$R^1$是H、$C_1$-$C_6$烷基、$C_3$-$C_6$环烷基、3至6个原子组成的杂环基、$C_1$-$C_6$烷基-($C_3$-$C_6$环烷基)、$C_1$-$C_6$烷基-(3至6个原子组成的杂环基)；




；

$Z^1$是CH或N；

$Z^2$是CH或N；

$Z^3$是CH或N；

X是CH或N；

$R^2$是H、卤素、$C_3$-$C_6$环烷基、-NH-(3至6个原子组成的杂环基)、-NH-($C_1$-$C_6$烷基)、-NH-($C_3$-$C_6$环烷基)、-O-(3至6个原子组成的杂环基)、-O-($C_1$-$C_6$烷基)、或-O-($C_3$-$C_6$环烷基)；

$R^{3a}$是H、卤素、或$C_1$-$C_6$烷基；

$R^{3b}$是H、卤素、$C_1$-$C_6$烷基、或$C_3$-$C_6$环烷基；或者，$R^{3a}$和$R^{3b}$同与之连接的所述碳原子一起形成4至8个原子组成的杂环基或$C_3$-$C_6$环烷基，其中所述杂环基或环烷基分别任选地被1-3个$R^{12}$基团取代；

或$R^{3b}$和$R^{11a}$同与之连接的所述碳原子一起形成$C_3$-$C_6$环烷基，所述$C_3$-$C_6$环烷基任选地被$C_1$-$C_6$烷基取代；

n是0或1；

Y是C($R^{11a}$)($R^{11b}$)或S，可选条件是：如果$R^{3a}$和$R^{3b}$中的一者或两者为卤素，则Y是C($R^{11a}$)($R^{11b}$)；

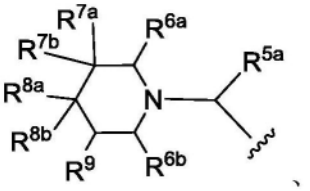
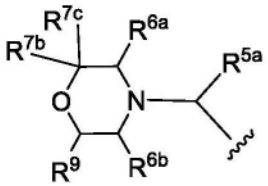
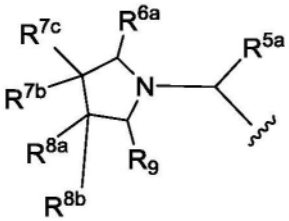
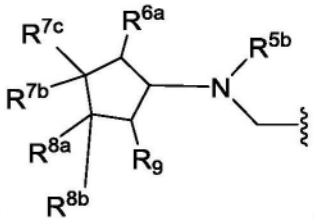
Q是CH或N；

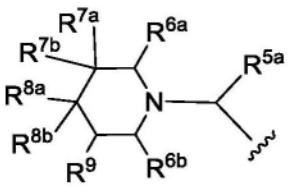
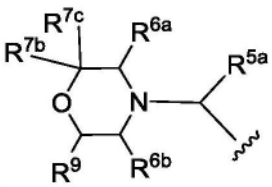
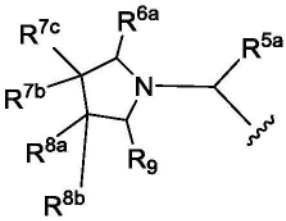
$R^4$是H、$C_1$-$C_6$烷基、$C_1$-$C_6$卤代烷基、或$C_3$-$C_6$环烷基；

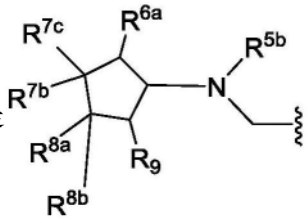
$R^{10}$是H、$C_1$-$C_6$烷基、$C_1$-$C_6$卤代烷基、或$C_3$-$C_6$环烷基；

$R^{11a}$和$R^{11b}$分别独立地为H、卤素、$C_1$-$C_6$烷基、或$C_1$-$C_6$卤代烷基；或者，$R^{11a}$和$R^{11b}$同与之连接的所述碳原子一起形成$C_3$-$C_6$环烷基；或$R^{3b}$和$R^{11a}$同与之连接的所述碳原子一起形成$C_3$-$C_6$环烷基，所述$C_3$-$C_6$环烷基任选地被$C_1$-$C_6$烷基取代；和

各$R^{12}$分别独立地为$C_1$-$C_6$烷基、卤素、羟基、-O($C_1$-$C_6$烷基)、-CN、$C_1$-$C_6$烷基-CN、$C_1$-$C_6$烷基-OH、或$C_1$-$C_6$卤代烷基；其中两个偕$R^{12}$基团可以同与之连接的所述碳原子一起形成螺$C_3$-$C_4$环烷基。

[0130] 在某些实施方案，$R^1$是H、$C_1$-$C_6$烷基、$C_3$-$C_6$环烷基、  、  、  、或  。

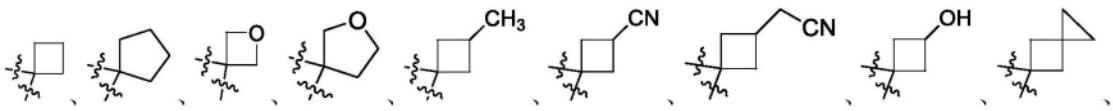
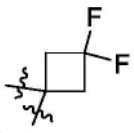
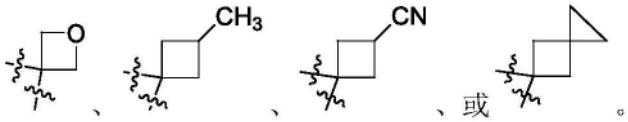
[0131] 在一些实施方案，$R^1$是  。在一些实施方案，$R^1$是  。在一些实施方案，$R^1$是  。

[0132] 在一些实施方案，$R^1$是  。

[0133] 在式(A)的一些实施方案中，X是CH。在一些实施方案，X是N。

[0134] 在式(A)的一些实施方案中，$R^2$是H。在一些实施方案，$R^2$是-NH-($C_1$-$C_6$烷基)。

[0135] 在一些实施方案，$R^2$是-O-($C_1$-$C_6$烷基)。

[0136] 在式(A)的一些实施方案中，$R^{3a}$和$R^{3b}$同与之连接的所述碳原子一起形成  、  或  。

[0137] 在式(A)的一些实施方案中，$R^{3b}$是$C_3$-$C_6$环烷基。在一些实施方案，$R^{3b}$是环丁基。在一些实施方案，$R^{3a}$是H。

[0138] 在式(A)的一些实施方案中，$R^{3b}$和$R^{11a}$同与之连接的所述碳原子一起形成$C_3$-$C_6$环烷基，所述$C_3$-$C_6$环烷基任选地被$C_1$-$C_6$烷基取代。

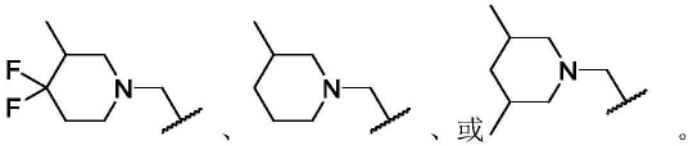
[0139] 在式(A)的一些实施方案中，n是0。在一些实施方案，n是1。

[0140] 在式(A)的一些实施方案中，Y是C($R^{11a}$)($R^{11b}$)。在一些实施方案，$R^{11a}$和$R^{11b}$分别独立地为H、F、$CH_2F$、$CHF_2$、或$CF_3$。在一些实施方案，Y是$CH_2$。

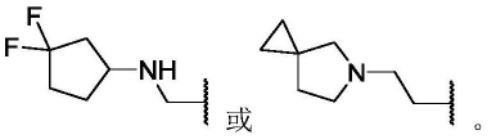
[0141] 在式(A)的一些实施方案中，Q是CH。在一些实施方案，Q是N。

[0142] 在式(A)的一些实施方案中，$R^4$是H。在一些实施方案，$R^4$是$CH_3$。

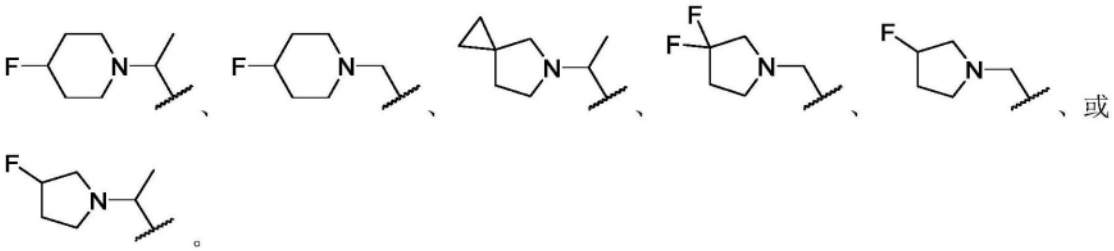
[0143] 在式(A)的一些实施方案中，$R^{5a}$是H。

[0144] 在式(A)的一些实施方案中，$R^1$是  。

[0145] 在式(A)的一些实施方案中，$R^{5b}$是H。

[0146] 在式(A)的一些实施方案中，$R^1$是  。

[0147] 在式(A)的一些实施方案中，$R^1$是


、或


。

[0148] 在式(A)的一些实施方案中，$R^1$是甲基。在式(A)的一些实施方案中，$R^1$是三氟甲基。

[0149] 在式(A)的一些实施方案中，$Z^1$是CH。在一些实施方案，$Z^1$是N。在一些实施方案，$Z^2$是CH。在一些实施方案，$Z^2$是N。在一些实施方案，$Z^3$是CH。在一些实施方案，$Z^3$是N。

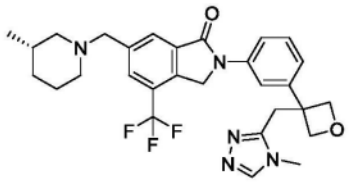
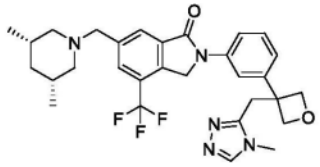
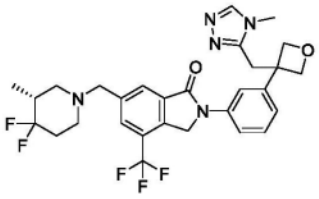
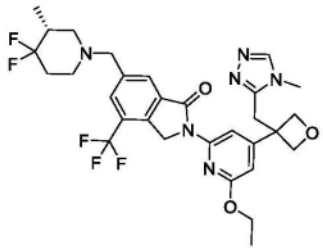
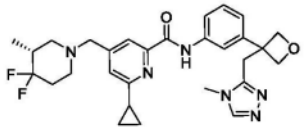
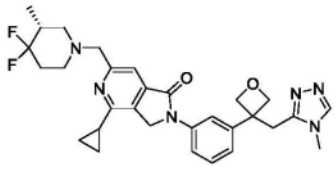
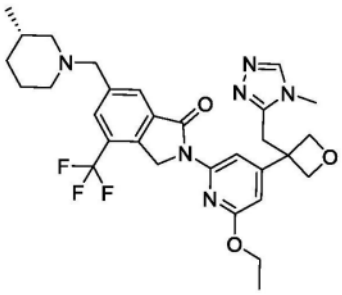
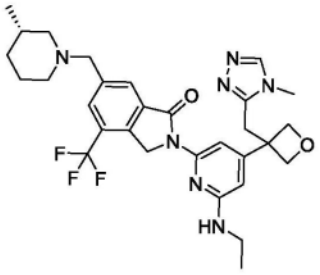
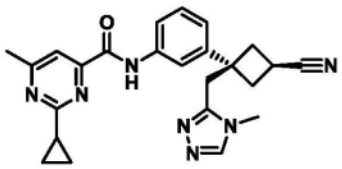
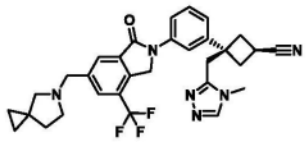
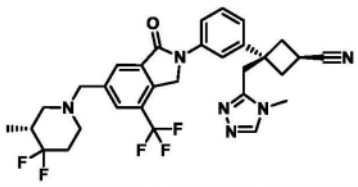
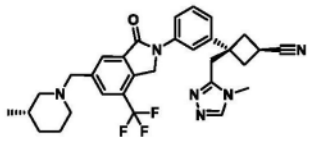
[0150] 在式(A)的一些实施方案中，$R^{10}$是H。在一些实施方案，$R^{10}$是$CH_3$。在一些实施方案，$R^{10}$是$CF_3$。在一些实施方案，$R^{10}$是环丙基。在一些实施方案，$R^{10}$是环丙基，和$R^1$是甲基。

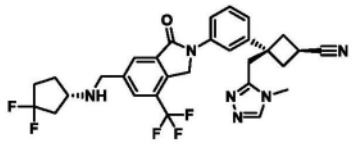
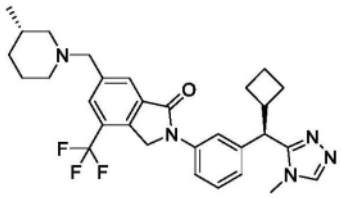
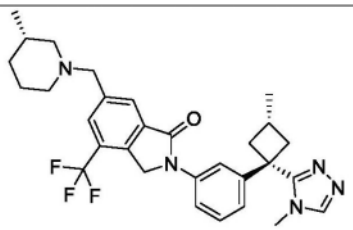
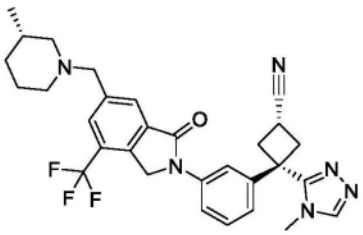
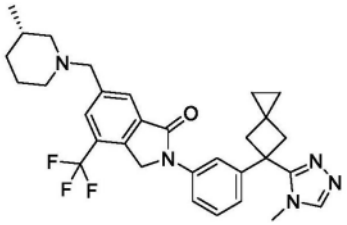
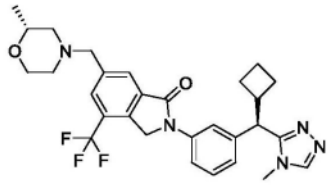
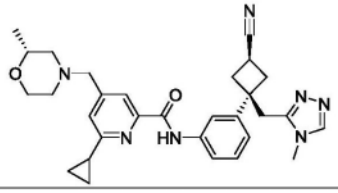
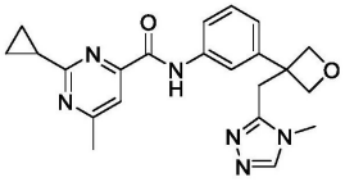
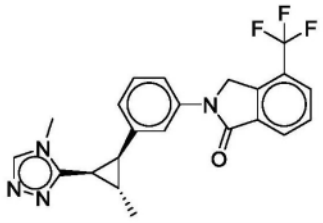
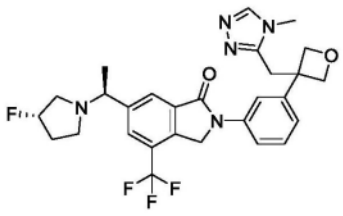
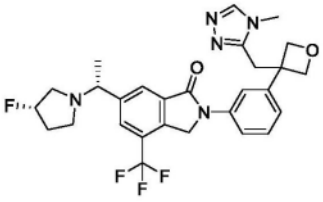
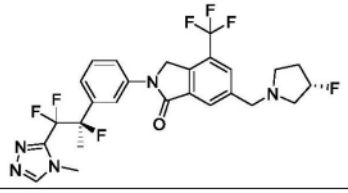
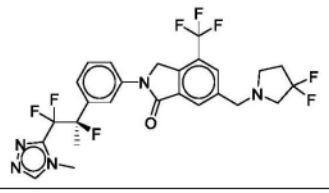
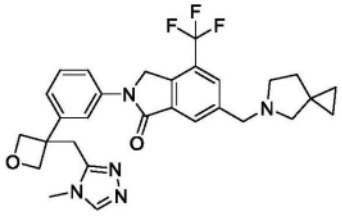
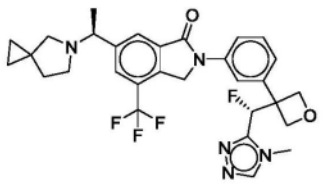
[0151] 在式(A)的一些实施方案中，$R^{3a}$和$R^{3b}$同与之连接的所述碳原子一起形成$C_3$-$C_6$环烷基，所述$C_3$-$C_6$环烷基任选地被1个$R^{12}$基团取代。在一些实施方案，$R^{3a}$和$R^{3b}$同与之连接的所述碳原子一起形成$C_3$-$C_6$环烷基，所述$C_3$-$C_6$环烷基被$C_1$-$C_6$烷基、-CN、或$C_1$-$C_6$烷基-CN取代。

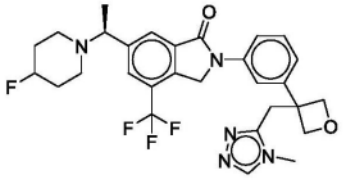
[0152] 在一些实施方案，$R^{3a}$和$R^{3b}$同与之连接的所述碳原子一起形成$C_3$-$C_6$环烷基，所述$C_3$-$C_6$环烷基任选地被CN或$CH_3$取代。

[0153] 在某些实施方案，所述Cbl抑制剂是表1所示化合物。所述这些化合物根据国际申请号PCT/US2020/027492或PCT/US2020/033274或美国临时申请号62/888,845或62/888,870制备得到，其各自通过引用其全文并入本发明。

表1

| 化合物编号 | 结构式 | 化合物编号 | 结构式 |
|---|---|---|---|
| 101 |  | 102 |  |
| 103 |  | 104 |  |
| 105 |  | 106 |  |
| 107 |  | 108 |  |
| 109 |  | 110 |  |
| 111 |  | 112 |  |

| 化合物编号 | 结构式 | 化合物编号 | 结构式 |
|---|---|---|---|
| 113 |  | 114 | |
| 115 |  | 116 |  |
| 117 |  | 118 |  |
| 119 |  | 120 |  |
| 121 |  | 122 |  |
| 123 |  | 124 |  |
| 125 |  | 126 |  |
| 127 |  | 128 |  |

| 化合物编号 | 结构式 | 化合物编号 | 结构式 |
|---|---|---|---|
| 129 |  | | |

[0154] 在一些实施方案,提供用于本发明所述组合物和方法的化合物是选自表1中化合物编号为101-129的化合物,或其互变异构体,或前述任一种的药学上可接受的盐。

[0155] 在一些实施方案,WO 2019/148005中公开的一种或多种小分子Cbl抑制剂均可用于本发明所述方法,此专利申请通过引用其全文并入。

[0156] 本发明内容还包括任何或所有立体化学形式,包括本发明所述化合物的任何对映异构体或非对映异构体形式,以及顺式/反式或E/Z异构体。除非在化学结构或名称中明确指出立体化学,否则所述结构或名称旨在包含所描述化合物的所有可能的立体异构体。此外,在描述特定立体化学形式的情况下,应理解所有其他立体化学形式,以及所公开化合物的一般非立体有择形式及任何比例的混合物,包括所公开化合物的两种或更多种立体化学形式以任何比例的混合物,使得包括化合物的外消旋、非外消旋、对映体富集和缩放的混合物,亦均被描述并包含在本发明中。还预期包含所公开化合物的组合物,例如基本上纯的化合物(包括其特定立体化学形式)的组合物。包含任何比例的所公开化合物的混合物的组合物亦包含在本发明内容中,包括包含所公开化合物的两种或更多种立体化学形式的任何比例的混合物的组合物,使得化合物的外消旋、非外消旋、对映体富集和缩放的混合物均包含在本发明中。如果对分子的一个或多个部分明确指出立体化学,而不对分子的另一个或多个部分明确指出立体化学,则所述结构旨在涵盖立体化学未明确指出的一个或多个部分的所有可能的立体异构体。本发明包括本发明所述化合物的任何及所有互变异构体形式。

[0157] 本发明包括本发明所述化合物的所有盐类,以及所述化合物的此类盐的使用方法。在一个实施方案,所述化合物的盐包含药学上可接受的盐。药学上可接受的盐是可作为药品或药物施用于人和/或动物并且在施用时保留游离化合物(中性化合物或非盐化合物)的至少一些生物活性的那些盐。所需的碱性化合物的盐可通过本领域技术人员已知的方法通过用酸处理所述化合物来制备得到。无机酸的实例包括但不限于,盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸和磷酸。有机酸的实例包括但不限于,甲酸、乙酸、丙酸、乙醇酸、丙酮酸、草酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、磺酸、和水杨酸。亦可制备碱性化合物与氨基酸的盐类,例如天冬氨酸盐和谷氨酸盐。所需的酸性化合物的盐可通过本领域技术人员已知的方法通过用碱处理所述化合物来制备得到。酸化合物的无机盐的实例包括但不限于,碱金属和碱土金属盐类,例如钠盐、钾盐、镁盐和钙盐;铵盐;以及铝盐。酸化合物的有机盐的实例包括但不限于,普鲁卡因、二苄胺、N-乙基哌啶、N,N'-二苄基乙二胺、和三乙胺的盐类。亦可制备酸性化合物与氨基酸的盐类,例如赖氨酸盐。对于药学上可接受的盐的列表,参见,例如,P.H.Stahl and C.G.Wermuth(eds.)"Handbook of Pharmaceutical Salts,Properties,Selection and Use"Wiley-VCH,2011(ISBN:978-3-90639-051-2)。以下文献中亦公开了数种药学上可接受的盐:Berge,J.Pharm.Sci.66:1(1977)。

[0158] 在一些实施方案,所述Cbl抑制剂如WO 2019/148005中所公开的那样制备得到,此

专利申请通过引用其全文并入。在一些实施方案，所述Cbl抑制剂可从包括但不限于Progenra公司的来源商购得到。

[0159] 在一些实施方案，化合物101-129中的任一种，或其两种或更多种的组合，均可用于本发明所述的组合物和/或方法。在其他实施方案，如WO 2019/148005中公开的一种或多种Cbl抑制剂化合物在本发明方法中可用作抑制剂，此专利申请通过引用其全文并入。

[0160] 在各种实施方案中，并且如本发明进一步所描述，如在WO 2019/148005的生物学实施例1中所述Cbl抑制的体外测定试验中所测定，本发明提供的Cbl抑制剂化合物(以及包含本发明所述化合物的组合物，以及使用所述化合物或组合物的方法)具有小于1nM、介于1nM和100nM之间、介于100nM-300nM之间、介于301nM-1000nM之间、介于1,001nM-3,000nM之间、介于3,001nM-10,000nM之间、或大于10,000nM的$IC_{50}$值。在特定实施方案，如在WO 2019/148005的生物学实施例1中所述Cbl抑制的体外测定试验中所测定，所述Cbl抑制剂具有介于约0.1nM和10nM之间的$IC_{50}$。在进一步的实施方案，并且如本发明进一步所描述，如在WO 2019/148005的生物学实施例1中所述Cbl抑制的体外测定试验中所测定，本发明提供的化合物(以及包含本发明所述化合物的组合物，以及使用所述化合物或组合物的方法)具有小于100nM的$IC_{50}$值。在进一步的实施方案，并且如本发明进一步所描述，如在WO2019/148005的生物学实施例1中所述Cbl抑制的体外测定试验中所测定，本发明提供的化合物(以及包含本发明所述化合物的组合物，以及使用所述化合物或组合物的方法)具有介于100nM-300nM之间的$IC_{50}$值。在进一步的实施方案，并且如本发明进一步所描述，如在WO 2019/148005的生物学实施例1中所述Cbl抑制的体外测定试验中所测定，本发明提供的化合物(以及包含本发明所述化合物的组合物，以及使用所述化合物或组合物的方法)具有介于301nM-1000nM之间的$IC_{50}$值。在进一步的实施方案，并且如本发明进一步所描述，如在WO 2019/148005的生物学实施例1中所述Cbl抑制的体外测定试验中所测定，本发明提供的化合物(以及包含本发明所述化合物的组合物，以及使用所述化合物或组合物的方法)具有介于1,001nM-3,000nM之间的$IC_{50}$值。在进一步的实施方案，并且如本发明进一步所描述，如在WO 2019/148005的生物学实施例1中所述Cbl抑制的体外测定试验中所测定，本发明提供的化合物(以及包含本发明所述化合物的组合物，以及使用所述化合物或组合物的方法)具有介于3,001nM-10,000nM之间的$IC_{50}$值。在进一步的实施方案，并且如本发明进一步所描述，如在WO 2019/148005的生物学实施例1中所述Cbl抑制的体外测定试验中所测定，本发明提供的化合物(以及包含本发明所述化合物的组合物，以及使用所述化合物或组合物的方法)具有大于10,000nM的$IC_{50}$值。

[0161] 在一些实施方案，所述Cbl抑制剂是合成的或天然存在的肽。在一些实施方案，所述肽是融合蛋白。所述肽可以是，例如，酪氨酸(608)-磷酸化胰岛素受体底物-1(IRS-1)(Cblin)的DGpYMP肽模拟物，或融合肽，例如，包含细胞递送部分和casitas b-系淋巴瘤-b(Cbl)结合肽，其中所述Cbl结合肽具有序列$N/DX_1PYX_2P$，其中X、$X_1$和$X_2$均选自任何氨基酸，N/D是天冬酰胺(N)或天冬氨酸(D)，和pY是与Cbl的酪氨酸激酶结合(TKB)结构域结合的磷酸酪氨酸，在一些实施方案，所述Cbl结合肽是脾酪氨酸激酶(Syk)的肽片段。

[0162] 在一些实施方案，所述Cbl抑制剂是抗体，例如选择性结合Cbl表位从而使其失活的抗体。单克隆及多克隆抗Cbl抗体均可用于本发明方法和组合物。

[0163] 在一些实施方案，所述Cbl抑制剂是核酸，例如，靶向Cbl蛋白(例如Cbl)的siRNA。

参见，例如US10,421,945。如US10,421,945、US9,186,373、或US8,809,288中所述的siRNA组合物亦可用于本发明所述方法。

[0164] 在某些实施方案，本发明的Cbl抑制剂是通过口服、静脉内、皮下、瘤内、或通过体内肺部给药施用于接受基于自体细胞的免疫疗法的个体，或通过口服、静脉内、皮下、或通过肺部给药施用于提供免疫细胞的供体，以进行基于同种异体细胞的免疫疗法。

收获细胞

[0165] 在本发明所述的细胞疗法方法中，细胞收获自供体。所述细胞可以是本领域技术人员认为合适的任何细胞。所述收获可根据标准技术进行。在某些实施方案，免疫细胞收获自供体。在某些实施方案，所述免疫细胞是循环免疫细胞并通过单采术进行收获。在某些实施方案，循环细胞通过白细胞单采术进行收获。在某些实施方案，免疫细胞从得自供体的肿瘤进行收获。在某些实施方案，所述肿瘤通过活检或手术切除实体瘤组织而从供体获得。在一些实施方案，肿瘤组织从个体中取出并进行破碎或进行酶消化以破坏细胞外基质和/或进行机械破坏并在培养之前制备肿瘤细胞悬浮液，所述免疫细胞将从此悬浮液中分离。初始细胞群可以是源自外周血、脐带血、肿瘤或肿瘤活检、淋巴、皮肤、肿瘤浸润淋巴细胞或源自干细胞前体和诱导多能干细胞的异质细胞群。与其他细胞类型相比，培养条件有利于免疫细胞生长，从而使所得细胞群富含所需的免疫细胞。

[0166] 对于本发明所述的方法，无论供体是否用Cbl抑制剂预处理，均可使用相同的取出及扩增步骤。

[0167] 在一些实施方案，通过白细胞单采术收集$10^6$至$10^{10}$个细胞以用于选择及扩增。在一些实施方案，通过白细胞单采术收集$10^8$至$10^{10}$个细胞以用于选择及扩增。在一些实施方案，收集$10^9$至$10^{10}$个细胞以用于选择及扩增。

[0168] 在某些实施方案，肿瘤碎片，例如介于1$mm^3$和2$cm^3$之间，从患者中分离出来以用于TIL的分离及扩增。在一些实施方案，所收集的肿瘤碎片是在0.5$mm^3$和1$cm^3$之间。在一些实施方案，肿瘤碎片是在1$mm^3$和8$mm^3$之间。在一些实施方案，所收集的肿瘤碎片是在1$mm^3$和5$mm^3$之间。在一些实施方案，所收集的肿瘤碎片是在1$mm^3$和3$mm^3$之间。

[0169] 在某些实施方案，一种或多种Cbl抑制剂增强所述收获步骤。在某些实施方案，一种或多种Cbl抑制剂在收获之前在体内活化免疫细胞。在此类实施方案中，将一种或多种Cbl抑制剂以足以增强用于收获的所需细胞的量施用于供体。在某些实施方案，在收获之前向个体施用一种或多种Cbl抑制剂。在某些实施方案，所述Cbl抑制剂增强体内活化。在某些实施方案，所述Cbl抑制剂增强体内分化。在某些实施方案，所述Cbl抑制剂增强体内刺激。在某些实施方案，所述Cbl抑制剂增强细胞的体内启动。在一些个案中，所述Cbl抑制剂的施用可刺激免疫细胞增殖，所述这些免疫细胞特异性识别患者所患的癌症或肿瘤。

[0170] 所述Cbl抑制剂的剂量可以是本领域技术人员认为合适的任何剂量。在某些实施方案，所述剂量可有效增强所需细胞用于收获。在某些实施方案，所述Cbl抑制剂的剂量是在0.001-5000mg之间、0.01-2500mg、0.1-2000mg、1-1500mg、1-1000mg、1-750mg、1-500mg、1-400mg、1-300mg、1-250mg、1-200mg、1-100mg、1-10mg、0.1-10mg、0.1-5mg、或0.1-1mg。在某些实施方案，所述剂量是在1-5000mg之间、1-2500mg、1-2000mg、1-1500mg、1-1000mg、1-750mg、1-500mg、1-400mg、1-300mg、1-250mg、1-200mg、1-100mg、1-10mg、0.1-10mg、0.1-5mg、或0.1-1mg。

[0171] 所述剂量按照技术人员认为合适的时间表施用一段时间。在某些实施方案，所述剂量足以增强所期望收获的细胞。在一些实施方案，用Cbl抑制剂治疗的时间段，即体内活化时间段，是从约1分钟至约1小时，约5分钟至约1小时，约10分钟至约1小时，约15分钟至约1小时，约20分钟至约1小时，约30分钟至约1小时，约45分钟至约1小时，约1小时至约2小时，约1小时至约4小时，约1小时至约6小时，约1小时至约8小时，约1小时至约12小时，约1小时至约24小时，约2小时至约24小时，约6小时至约7小时，约6小时至约24小时，约8小时至约24小时，约10小时至约24小时，约15小时至约24小时，约20小时至约24小时，约12小时至约48小时，约24小时至约48小时，或约36小时至约48小时。在一些实施方案，所述体内活化时间段为约1分钟，约5分钟，约10分钟，约15分钟，约20分钟，约30分钟，约40分钟，约50分钟，约1小时，约2小时，约3小时，约4小时，约5小时，约6小时，约7小时，约8小时，约9小时，约10小时，约12小时，约14小时，约16小时，约18小时，约20小时，约22小时，或约24小时。在一些实施方案，所述体内活化时间段为约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天或约7天，1至2天，1至3天，1至4天，1至5天，1至6天，1至7天，1至10天，1至14天，1至21天，1至28天或1至45天，1至60天，2至3天，2至4天，2至5天，2至6天，2至7天，2至10天，2至14天，2至21天，2至28天或2至45天，2至60天，4至5天，4至6天，4至7天，4至10天，4至14天，4至21天，4至28天，4至45天，4至60天，7至10天，7至14天，7至21天，7至28天，7至45天或7至60天。在一些实施方案，所述体内扩增阶段的时长为0-4天，0-7天，0-11天，0-14天，或0-30天。

[0172] 在一些实施方案，所述Cbl抑制剂与选自由IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、或粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(G-MCSF)、或其组合组成的组的药剂进行组合施用。在一些实施方案，所述Cbl抑制剂与IL-2组合施用。在一些实施方案，所述Cbl抑制剂与IL-4组合施用。在一些实施方案，所述Cbl抑制剂与IL-7组合施用。在一些实施方案，所述Cbl抑制剂与IL-15组合施用。在一些实施方案，所述Cbl抑制剂与IL-7和IL-15组合施用。在一些实施方案，所述Cbl抑制剂与IL-12组合施用。在一些实施方案，所述Cbl抑制剂与IL-21组合施用。在一些实施方案，所述Cbl抑制剂与G-MCSF组合施用。

[0173] 在一些实施方案，在活化之前和之后和/或在收获之前测定供体免疫细胞群的生物活性。可通过本领域已知的方法测定免疫细胞。评估的参数包括活化前后的细胞总数或细胞活性。譬如，可在体内(例如，通过成像)或离体(例如，通过ELISA或流式细胞术)测定经修饰的免疫细胞或其他免疫细胞与抗原的特异性结合。在一些实施方案，免疫细胞破坏靶细胞的能力可使用本领域已知的任何合适的方法来测定，诸如，在例如Kochenderfer et al.,J.Immunotherapy,32(7):689-702(2009)和Herman et al.J.Immunological Methods,285(1):25-40(2004)中描述的细胞毒性测定试验。在一些实施方案，免疫细胞的生物活性亦可通过测定某些细胞因子如IL-2和IFNγ的表达和/或分泌来测定。在一些实施方案，在开始治疗之前评估肿瘤的初始尺寸和/或数量。

[0174] 在一些实施方案，所述免疫细胞源自细胞系。在一些实施方案，所述免疫细胞在扩增前进行遗传工程改造。在一些实施方案，所述免疫细胞源自选自T细胞系、B细胞系和NK细胞系的细胞系。在一些实施方案，待选择性扩增的免疫细胞或包含待选择性扩增和任选地待遗传工程改造的免疫细胞的细胞群均源自细胞系(例如，T细胞系、B细胞系、NK细胞系等)。在一些实施方案，所述免疫细胞获自异种来源，例如获自小鼠、大鼠、非人灵长类动物、或猪。在一些实施方案，细胞系在收获之前暴露于Cbl抑制剂以用于基于细胞的免疫疗法。

[0175] 在某些实施方案，将所述经收获的细胞于冷冻保存培养基中进行配制并置于低温储存单元中，例如液氮冷冻机(-195℃)或超低温冷冻机(-65℃、-80℃或-120℃)，长期储存至少1个月、2个月、3个月、4个月、6个月、1年、2年、3年、或至少5年。所述冷冻保存培养基可包含甘油、DMSO(二甲亚砜)、NaCl、葡萄糖、硫酸葡聚糖、和/或羟乙基淀粉(HES)、以及培养基或生理缓冲剂以维持pH值为6.0至6.5、6.5至7.0、6.5至7.5、7.0至7.5、7.5至8.0、或8.0至8.5。可将冷冻细胞解冻并进行多轮刺激和/或扩增。在一些实施方案，将冷冻保存的细胞解冻并进行遗传修饰以表达重组T细胞受体或嵌合T细胞受体。

[0176] 在一些实施方案，经解冻的细胞通过本发明所述方法进行扩增。T细胞可进一步冷冻保存以在冷冻培养基中以每mL约至少$10^1$、$10^2$、$10^3$、$10^4$、$10^5$、$10^6$、$10^7$、$10^8$、$10^9$、或至少约$10^{10}$个细胞的量产生至少约1、5、10、100、150、200、或500个小瓶的细胞库。冷冻保存的细胞库可保留其功能，并且可解冻并进行进一步刺激和扩增。

[0177] 在一些案例中，可在合适的封闭器皿如细胞培养袋和/或生物反应器中刺激和扩增经解冻的细胞，以产生大量细胞作为同种异体细胞产物。

[0178] 在某些实施方案，冷冻保存的T细胞在低温储存条件下维持其生物学功能至少约6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、15个月、18个月、20个月、24个月、30个月、36个月、40个月、50个月、或至少约60个月。

[0179] 在某些实施方案，所述经收获的细胞群在选择性条件下进行分离或培养，其中某些类型的免疫细胞在离体或体外扩增所述细胞群之前进行富集。在一些实施方案，所述选择性条件针对特定T细胞群富集细胞群。在其他实施方案，所述选择性条件富集细胞群以获得所需T细胞成熟水平、表型或特异性的优势。

经遗传修饰的细胞

[0180] 在某些实施方案，经收获的免疫细胞例如在扩增之前进行遗传工程改造。在一些实施方案，所述免疫细胞是T细胞，和所述T细胞经遗传修饰以表达嵌合抗原受体T细胞(CAR T细胞)或重组T细胞受体(TCR)。可通过本领域建立的方法对T细胞进行遗传修饰以表达CAR或TCR受体，从而识别癌症或恶性肿瘤相关抗原。参见，例如，Brenner et al.,Current Opinion in Immunology,22(2):251-257(2010);Rosenberg et al.,Nature Reviews Cancer,8(4):299-308(2008))。可对T细胞进行遗传修饰以表达嵌合抗原受体(CAR)，其是由抗原识别基团部分和T细胞活化结构域组成的融合蛋白。参见，例如，Eshhar et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90(2):720-724(1993)，和Sadelain et al., Curr.Opin.Immunol.,21(2):215-223(2009))。在一些实施方案，所述免疫细胞是NK细胞，和所述NK细胞经遗传修饰以表达嵌合抗原受体(NK CAR细胞)或重组T细胞受体(TCR)。

免疫细胞的扩增

[0181] 在某些实施方案，本发明所述的免疫细胞通过本领域技术人员认为合适的任何方法在培养物中进行扩增。标准技术对此非常有用。在一些实施方案，免疫细胞的离体或体外扩增是在一个或多个包含透气性膜的培养器皿中进行。在其他实施方案，免疫细胞的离体或体外扩增使用G-Rex™细胞培养器皿进行。

循环免疫细胞

[0182] 在某些实施方案，来自血液的免疫细胞在一轮扩增中进行扩增。在一些实施方案，所述免疫细胞使用包含透气性膜的培养器皿进行扩增。在某些实施方案，所述免疫细胞通

过使用G-Rex™细胞培养器皿采用单次扩增进行扩增。有利的是，在一些实施方案，在存在Cbl抑制剂的情况下扩增可产生足够数量和/或活性的免疫细胞。

[0183] 在一些实施方案，从患者收集循环免疫细胞并进行离体扩增以使细胞数量增加至介于约$10^9$和约$2\times10^{11}$个细胞之间，然后将所得细胞输注入患者体内。在某些实施方案，所述Cbl抑制剂相对于其不存在时的扩增增加了细胞数量。在某些实施方案，所述Cbl抑制剂相对于其不存在时的扩增改善了细胞的一种或多种表型。在某些实施方案，所述Cbl抑制剂相对于其不存在时的扩增减少了扩增时间。在某些实施方案，扩增在10天或更少天数后完成。在某些实施方案，所述免疫细胞在与Cbl抑制剂一起培养时相对于在其不存在时的扩增完成至少一次额外的加倍。

[0184] 在某些实施方案，来自血液的免疫细胞在一轮扩增中进行扩增。在一些实施方案，所述免疫细胞使用包含透气性膜的培养器皿进行扩增。在某些实施方案，所述免疫细胞通过使用G-Rex™细胞培养器皿采用单次扩增进行扩增。有利的是，在一些实施方案，在存在Cbl抑制剂的情况下扩增可产生足够数量和/或活性的免疫细胞。

肿瘤免疫细胞

[0185] 在一些实施方案，从患者收集肿瘤免疫细胞并进行离体扩增两次，其中一次用于所需免疫细胞的选择性扩增，然后进行第二次扩增以将细胞数量进一步增加至介于约$10^9$和约$2\times10^{11}$个细胞之间(“双重扩增”)，然后将所得细胞输注入患者体内。在其他实施方案，从患者收集免疫细胞，并且在将所得细胞输注入患者体内之前仅离体扩增一次至细胞数在约$10^9$和约2x $10^{11}$个细胞之间(“单次扩增”)。在其他实施方案，单次扩增在G-Rex™细胞培养器皿中发生。在一些实施方案，双重扩增在单个细胞培养器皿中发生。在其他实施方案，双重扩增在同一G-Rex™细胞培养器皿中发生。

扩增培养

[0186] 在某些方法中，在一种或多种药剂或化合物存在下，对经历扩增的细胞进行培养以促进增殖，包括在输注入有需要的个体之前富集具有特别需要的成熟水平的细胞。有用的化合物包括促炎细胞因子类，例如IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、或其组合。在一些实施方案，所述细胞因子是IL-2。在一些实施方案，所述细胞因子是IL-4。在一些实施方案，所述细胞因子是IL-7。在一些实施方案，所述细胞因子是IL-12。在一些实施方案，所述细胞因子是IL-15。在一些实施方案，所述细胞因子是IL-7和IL-15的组合。在一些实施方案，所述细胞因子是IL-21。在一些实施方案，所述细胞因子是IL-2、IL-7和IL-15的组合。

[0187] 各细胞因子可分别以介于0和25000IU/ml之间、或介于0和10,000IU/ml之间、或介于0和5000IU/ml之间、或介于0-2500IU/ml之间、或介于0-1000IU/ml之间、或介于0-500IU/ml之间，或介于0-100IU/ml之间的浓度使用。扩增期间所使用的细胞因子可任选地在培养期间补充，以替补细胞在培养期间所使用的量。

[0188] 在某些方法中，向经历扩增的细胞提供额外的IL-2，以补充细胞在培养期间所使用的量。在一些实施方案，IL-2在单次扩增期间进行补充。在其他实施方案，IL-2在双重扩增期间进行补充，但仅在选择性扩增阶段补充。在其他实施方案，IL-2在双重扩增期间进行补充，但仅在第二次扩增阶段期间补充。在其他实施方案，IL-2在选择性扩增阶段和第二次扩增阶段两者期间的双重扩增期间进行补充。在其他实施方案，每2、3、4、5、6、7、8、9、10或11天，将IL-2添加至培养物(无论是在单次扩增、选择性扩增、第二次扩增、或选择性扩增和

第二次扩增两者期间)。在其他实施方案,IL-2在扩增期间(无论是在单次扩增、选择性扩增、第二次扩增、或选择性扩增和第二次扩增两者期间)仅补充一次、两次或三次。

[0189] 在某些方法中,向经历扩增的细胞提供额外的IL-7和IL-15,以补充细胞在培养期间所使用的量。在一些实施方案,IL-7和IL-15均在单次扩增期间补充。在其他实施方案,IL-7和IL-15均在双重扩增期间补充,但仅在选择性扩增阶段补充。在其他实施方案,IL-7和IL-15均在双重扩增期间补充,但仅在第二次扩增阶段期间补充。在其他实施方案,IL-7和IL-15均在选择性扩增阶段和第二次扩增阶段两者期间的双重扩增期间补充。在其他实施方案,每2、3、4、5、6、7、8、9、10或11天,将IL-7和IL-15添加至培养物(无论是在单次扩增、选择性扩增、第二次扩增、或选择性扩增和第二次扩增两者期间)。在其他实施方案,IL-7和IL-15均在扩增期间(无论是在单次扩增、选择性扩增、第二次扩增、或选择性扩增和第二次扩增两者期间)仅补充一次、两次或三次。

[0190] 在某些方法中,所述细胞在免疫刺激剂存在下进行培养。在一些实施方案,所述免疫刺激剂是结合免疫细胞表面受体的化合物。所述表面受体可以是本领域技术人员认可的任何此类表面受体。在一些实施方案,所述免疫刺激剂是与T细胞受体结合的化合物。在一些实施方案,所述免疫刺激剂是结合CD3的化合物。在一些实施方案,所述免疫刺激剂是抗CD3抗体。在一些实施方案,所述免疫刺激剂是结合CD28的化合物。在一些实施方案,所述免疫刺激剂是抗CD28抗体。在一些实施方案,所述免疫刺激剂是抗CD3抗体与抗CD28抗体的组合。在其他实施方案,将所述免疫刺激剂固定在表面上。在其他实施方案,将所述免疫刺激剂固定在磁珠上。

[0191] 在某些方法中,细胞在饲养细胞存在下进行培养。所述饲养细胞通常经处理,因此其本身不会增殖,而是有助于免疫细胞的增殖或活化,作为刺激剂或有益剂或此两者的来源。在一些实施方案,对所述饲养细胞进行辐照。通常,饲养细胞用于扩增收获自肿瘤的免疫细胞,并且通常在双重扩增的第二次扩增阶段进行添加。在一些实施方案,所述饲养细胞是经辐照的外周血单核细胞。在某些实施方案,所述饲养细胞在第二次扩增期间进行添加,和所述饲养细胞是经辐照的外周血单核细胞。

[0192] 在某些方法中,所述细胞在饲养细胞和免疫刺激剂两者存在下进行培养。通常,饲养细胞和免疫刺激剂的组合用于扩增收获自肿瘤的免疫细胞,并且通常在双重扩增的第二次扩增阶段期间进行添加。在一些实施方案,所述饲养细胞是经辐照的外周血单核细胞,和所述免疫刺激剂是抗CD3抗体。

[0193] 在某些实施方案,一个或多个扩增步骤用Cbl抑制剂增强。有利的是,所述Cbl抑制剂可减少扩增步骤的时间,并且在需要多次扩增的情况下,消除额外的一个或多个扩增步骤。在某些实施方案,所述Cbl抑制剂可减少或消除对额外免疫刺激剂的需要。在某些实施方案,所述Cbl抑制剂消除了对饲养细胞的需要。在某些实施方案,所述Cbl抑制剂消除了对免疫刺激剂以及对饲养细胞的需要。在某些实施方案,扩增步骤均在不存在经辐照的外周血单核细胞的情况下进行。在某些实施方案,扩增步骤均在不存在抗CD3抗体的情况下进行。在某些实施方案,扩增步骤均在不存在OKT3的情况下进行。在某些实施方案,扩增步骤均在不存在4-IBB激动剂(例如,4-BBL)的情况下进行。在某些实施方案,扩增步骤均在不存在经辐照的外周血单核细胞、不存在抗CD3抗体、以及不存在4-IBB激动剂的情况下进行。在某些实施方案,扩增步骤均在存在如本发明所述的Cbl抑制剂和IL-2,在不存在经辐照的外

周血单核细胞、不存在抗CD3抗体(例如,OKT3)、以及不存在4-IBB激动剂(例如,4-BBL)的情况下进行。在某些实施方案,扩增步骤均在存在如本发明所述的Cbl抑制剂、IL-2、OKT3和经辐照的外周血单核细胞,以及在不存在4-IBB激动剂(例如,4-BBL)的情况下进行。

[0194] 在某些实施方案,所述方法包含在存在Cbl抑制剂的情况下进行扩增。在某些实施方案,所述方法包含在存在Cbl抑制剂且不存在额外免疫刺激剂的情况下进行扩增。在某些实施方案,所述方法包含在存在Cbl抑制剂且不添加饲养细胞的情况下进行扩增。在某些实施方案,所述方法包含在存在Cbl抑制剂且不进行第二扩增步骤的情况下进行扩增。在某些实施方案,所述方法包含在存在Cbl抑制剂、而不添加免疫刺激剂且不进行第二扩增步骤的情况下进行扩增。在某些实施方案,所述方法包含在存在Cbl抑制剂、而不添加饲养细胞且不进行第二扩增步骤的情况下进行扩增。

[0195] 在某些实施方案,免疫细胞在Cbl抑制剂存在下进行离体或体外培养,所述Cbl抑制剂的浓度是在1pM至约100mM之间,约0.001pM至约100μM,约0.01pM至约50μM,约0.001nM至约50μM,约100nM至约10μM,约0.01μM至约25μM,约0.1μM至约15μM,约1μM至约10μM,约0.1pM至约100nM,约1pM至约10nM,约1pM至约1nM。在一些实施方案,添加至包含免疫细胞的组合物(例如,细胞培养基)中的Cbl抑制剂的浓度为约1μM、约2μM、约3μM、约4μM、或约5μM。在一些实施方案,添加至包含免疫细胞的组合物(例如,细胞培养基)中的Cbl抑制剂的浓度为约1μM。在一些实施方案,添加至包含免疫细胞的组合物(例如,细胞培养基)中的Cbl抑制剂的浓度是在约0.1μM至约1μM之间。在一些实施方案,添加至包含免疫细胞的组合物(例如,细胞培养基)中的Cbl抑制剂的浓度为约1μM。

[0196] 在某些方法中,向在存在Cbl抑制剂的情况下经历扩增的细胞提供额外的Cbl抑制剂,以补充细胞在培养期间所使用的量。在一些实施方案,所述Cbl抑制剂在单次扩增期间进行补充。在其他实施方案,所述Cbl抑制剂在双重扩增期间进行补充,但仅在选择性扩增阶段期间补充。在其他实施方案,所述Cbl抑制剂在扩增期间进行补充,但仅在第二次扩增阶段期间补充。在其他实施方案,所述Cbl抑制剂在选择性扩增阶段和第二次扩增阶段两者期间的扩增期间进行补充。在其他实施方案,每2、3、4、5、6、7、8、9、10或11天,将所述Cbl抑制剂添加至培养物(无论是在单次扩增、选择性扩增、第二次扩增、或选择性扩增和第二次扩增两者期间)。在其他实施方案,所述Cbl抑制剂在扩增期间(无论是在单次扩增、选择性扩增、第二次扩增、或选择性扩增和第二次扩增两者期间)仅补充一次、两次或三次。

[0197] 在某些方法中,所述细胞在离体扩增期间进行培养,而不添加饲养细胞以及不添加抗CD3和/或不添加抗CD28抗体,并且每2或3天将Cbl抑制剂或IL-2添加至培养物。在一些实施方案,所述细胞使用单次扩增进行培养,而不添加经辐照的外周血单核细胞以及不添加抗CD3抗体,并且其中每2或3天将Cbl抑制剂和IL-2添加至培养物。在其他实施方案,在第二次扩增阶段期间,所述细胞使用双重扩增进行培养,而不添加经辐照的外周血单核细胞以及不添加抗CD3抗体,并且其中在选择性扩增阶段和第二次扩增阶段期间,每2或3天将Cbl抑制剂和IL-2添加至培养物。

[0198] 在某些实施方案,免疫细胞使用本发明所述的方法进行扩增约1天至约48天,约7天至约28天,约7天至约24天,约11天至约24天,1天至约28天,约2天至约24天,约3天至约20天,约4天至约17天,约5天至约15天,约5天至约14天,约5天至约12天,约6天至约14天,约6天至约12天,或约8天至约14天的时间段。

[0199] 在一些实施方案,所述扩增是单次扩增并持续约7天至约28天的时间段。在其他实施方案,所述扩增是单次扩增并持续约11天至约28天的时间段。在其他实施方案,所述扩增是单次扩增并持续约10天至约24天的时间段。在其他实施方案,所述扩增是单次扩增并持续约7天至约14天的时间段。在其他实施方案,所述扩增是单次扩增并持续约10天。在其他实施方案,所述扩增是单次扩增并持续约11天。

[0200] 在一些实施方案,所述扩增是双重扩增,其中所述选择性扩增是从约3天至约7天,约3天至8天,约3天至10天,约3天至12天,约3天至14天,3天至18天,3天至22天,约4天至约7天,约4天至8天,约4天至10天,约4天至12天,约4天至14天,约4天至18天,约4天至约22天,约5天至8天,约5天至10天,约5天至约18天,约5天至约21天,约5天至约28天,约6天至8天,约6天至10天,约6天至12天,约6天至14天,约6天至约18天,约6天至约21天,约6天至约28天,约7天至8天,约7天至10天,约7天至12天,约7天至14天,约7天至约18天,约7天至约21天,约8天至10天,约8天至12天,约8天至14天,约8天至约18天,约8天至约21天,或约8天至约28天。在其他实施方案,所述扩增是双重扩增,其中所述第二次扩增是从约3天至约15天,约4天至14天,约5天至13天,约6天至12天,约7天至11天,约6天至约18天,约6天至约21天,约6天至约28天,约7天至8天,约7天至10天,约7天至12天,约7天至14天,约7天至约18天,约7天至约21天,约8天至10天,约8天至12天,约8天至14天,约8天至约18天,约8天至约21天,或约8天至约28天。

[0201] 在一些实施方案,离体扩增的总时间段为约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约10天、约11天、约12天、约14天、约18天、约22天或约28天。在其他实施方案,离体扩增的总时间段是介于10天和14天之间。在其他实施方案,离体扩增的总时间段是介于14天和22天之间。在优选实施方案,细胞在输注入癌症患者或有需要的患者之前进行扩增少于14天。在更优选的实施方案,细胞在输注入癌症患者或有需要的患者之前进行扩增少于11天。

经扩增免疫细胞的表型

[0202] 通常,所述输注群体(输注入患者体内的免疫细胞)的所需表型包括与更好的患者治疗结果相关的特征。因此,在某些实施方案,所需表型将是相同的,而与细胞的起始群体无关(例如,是否直接使用所述经扩增的免疫细胞或所述经扩增的免疫细胞是否进行进一步筛选以获得所需特性)。

[0203] 在某些方法中,针对所需特性筛选所述经扩增的免疫细胞,并选择所述经扩增细胞的亚群用于输注入患者体内。在此种情况下,起始群体是所述经扩增的免疫细胞,而输注群体是选择用于输注的所述经扩增细胞的子集。在一些实施方案,所述输注群体富含表现出肿瘤识别活性的免疫细胞。在其他实施方案,所述输注群体富含表达工程化T细胞受体的免疫细胞。在其他实施方案,所述输注群体富含表达工程化嵌合抗原受体的免疫细胞。

[0204] 在某些实施方案,在存在Cbl抑制剂的情况下扩增的免疫细胞已经富集具有所需特性的细胞。因此,在某些实施方案,在存在Cbl抑制剂的情况下扩增的免疫细胞无需进一步的选择步骤来鉴定用于患者输注的所需亚群。

[0205] 在一些实施方案,筛选所述经扩增的免疫细胞产生IL-2和/或IFNγ的能力,并选择富含生成IL-2或IFNγ的细胞的细胞亚群。在其他实施方案,使用成熟阶段特异性标志物,针对T细胞表型筛选所述免疫细胞,并选择富含所需成熟阶段的细胞亚群。譬如,理想特

性可以是表达一种或多种以下标志物的免疫细胞:CD8+、CD45RA+、CD45RA-、CD45RO+、CD45RO-、CD95+、CD95-、CCR7+、CD62L+、CD62L-、CCR7-、CD56+、IL-2Rβ+、和IL-2Rβ-。在其他实施方案,针对具有记忆性表型的T细胞筛选所述免疫细胞,并选择富含记忆性T细胞的细胞亚群。在其他实施方案,针对$T_{CM}$或$T_{SCM}$细胞筛选所述免疫细胞,并选择富含$T_{CM}$或$T_{SCM}$细胞的细胞亚群。区分$T_{CM}$或$T_{SCM}$的方法,例如,由Schmueck-Henneresse et al.,J.Immunol.,194(11):5559-5567(2015)和Berger et al.,J.Clin.Invest.,118(1):294-305(2008)所述。

[0206] 在一些实施方案,所述输注群体包含比起始群体更大百分比和/或更多数量的TIL。在其他实施方案,所述输注群体包含比起始群体更大百分比和/或更多数量的T细胞。在其他实施方案,所述输注群体包含比起始群体更大百分比和/或更多数量的$T_{CM}$或$T_{SCM}$细胞。在其他实施方案,所述输注群体包含比起始群体更大百分比和/或更多数量的$T_{EM}$细胞。在其他实施方案,所述输注群体包含比起始群体更低百分比和/或更少数量的原生(naïve)T细胞。

[0207] 在本发明所述的一些实施方案中,所述输注群体包含在约10%和约20%之间的记忆性T细胞。在其他实施方案,所述输注群体包含在约5%和约40%之间的记忆性T细胞。在其他实施方案,所述输注群体包含在约10%和约30%之间的记忆性T细胞。在一些实施方案,所述记忆性T细胞是$T_{CM}$或$T_{SCM}$。在一些实施方案,所述记忆性T细胞是$CD45RO^{+}$细胞。

[0208] 在某些实施方案,所述这些方法提供了富集CD8+细胞的经扩增TIL。在某些实施方案,所述这些方法提供了CD4+细胞数量减少的经扩增TIL。在某些实施方案,所述方法提供了富集CD8+中枢记忆性细胞的经扩增TIL。在某些实施方案,所述这些方法提供了已增加CD107a分泌的经扩增TIL。在某些实施方案,所述这些方法提供了已增加颗粒酶(例如,颗粒酶B)分泌的经扩增TIL。在某些实施方案,所述这些方法提供了已增加一种或多种细胞因子分泌的经扩增TIL。在某些实施方案,所述细胞因子选自IFN-γ、TNF-α、GMCSF、MIP1α、MIP1βb、IP10、IL-2、IL-8、IL-7、IL-21、IL-23、及其组合。如本发明所用,富集或增加或减少是相对于在不存在Cbl抑制剂的情况下收获或扩增的类似TIL。在某些实施方案,所述富集、增加或减少分别为10%、20%、30%、40%、50%、100%、200%、或更多。量可通过标准技术,例如本发明实施例中描述的那些,进行测定。

[0209] 在一些实施方案,将所述输注群体在冷冻保存培养基中进行配制,并置于低温储存单元中,例如液氮冷冻机(-195℃)或超低温冷冻机(-65℃、-80℃、或-120℃),可长期储存至少1个月、2个月、3个月、4个月、6个月、1年、2年、3年、或至少5年。所述冷冻保存培养基可包含甘油、DMSO(二甲亚砜)、NaCl、葡萄糖、硫酸葡聚糖、和/或羟乙基淀粉(HES)、以及培养基或生理缓冲剂以维持pH值为6.0至6.5、6.5至7.0、6.5至7.5、7.0至7.5、7.5至8.0、或8.0至8.5。可将冷冻细胞解冻并进行额外刺激和/或扩增。冷冻保存的T细胞在低温储存条件下可维持其生物学功能至少约6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、15个月、18个月、20个月、24个月、30个月、36个月、40个月、50个月、或至少约60个月。在一些方面,制剂中不使用防腐剂。冷冻保存的T细胞可解冻并作为同种异体现成细胞产品施用于(例如,输注入)多个患者。

治疗方法

[0210] 在本发明提供的细胞疗法方法中,将经扩增的细胞施用于有需要的患者。在某些实施方案,患者与供体相同。在某些实施方案,患者与供体并非同一个体。在某些实施方案,

供体是异种的，而患者是人。在一些实施方案，根据本发明所述的方法向患者施用自体细胞。在一些实施方案，根据本发明所述的方法向患者施用同种异体细胞。

[0211] 本发明公开了基于细胞的免疫疗法的方法。基于细胞的免疫疗法方法包括，过继细胞疗法、基于肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的疗法、嵌合T细胞受体(CAR)T细胞疗法、工程化T细胞受体(TCR)疗法、自然杀伤细胞(NK)疗法、或自然杀伤嵌合抗原受体疗法(NK CAR)。在一些实施方案，可在多于一个疗程中向个体施用所述输注群体。

[0212] 在某些实施方案，所述方法包含向需要治疗的个体施用组合物，所述组合物包含有效量的如本发明提供的离体或体外生成的免疫细胞。所述输注群体的治疗有效剂量的范围可在约100万至约2000亿个细胞，例如100万至约500亿个细胞(例如，约500万个细胞、约2500万个细胞、约5亿个细胞、约10亿个细胞、约50亿个细胞、约200亿个细胞、约300亿个细胞、约400亿个细胞、或由上述任意两个值定义的范围)，例如约1000万至约1000亿个细胞(例如，约2000万个细胞、约3000万个细胞、约4000万个细胞、约6000万个细胞、约7000万个细胞、约8000万个细胞、约9000万个细胞、约100亿个细胞、约250亿个细胞、约500亿个细胞、约750亿个细胞、约900亿个细胞、或由上述任意两个值定义的范围)，和在一些案例中，约1亿个细胞至约500亿个细胞(例如，约1.2亿个细胞、约2.5亿个细胞、约3.5亿个细胞、约4.5亿个细胞、约6.5亿个细胞、约8亿个细胞、约9亿个细胞、约30亿个细胞、约300亿个细胞、约450亿个细胞)，或所述这些范围之间的任意值。在一些实施方案，所述方法包含每kg体重施用$2\times10^6$至$2\times10^8$个活免疫细胞。

[0213] 可使用标准施用技术、制剂和/或装置，将所述输注群体及其组合物施用于有需要的个体。本发明提供了用于组合物的储存及给药的制剂和施用装置，例如注射器和小瓶。包含免疫细胞的制剂或药物组合物包括用于静脉内、腹腔内、皮下、肌肉内、或肺部给药的那些。在一些实施方案，所述免疫细胞经肠胃外进行施用。本发明使用的术语“肠胃外”包括静脉内、肌肉内、皮下、直肠、阴道和腹腔内给药。在一些实施方案，所述细胞群通过静脉内、腹腔内或皮下注射，采用外周全身递送施用于受试者。所述经修饰的免疫细胞的组合物可作为无菌液体制剂提供，例如等渗水溶液、悬浮液、乳液、分散体、或黏性组合物，在某些方面可缓冲至选定的pH值。黏性组合物可在适当的黏度范围内配制，以提供与特定组织的更长接触时间。液体或黏性组合物可包含载体，所述载体可以是溶剂或分散介质，其包含例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如，甘油、丙二醇、液体聚乙二醇)、及其适当混合物。无菌可注射溶液可通过将免疫细胞掺入溶剂，例如与合适的载体、稀释剂或辅料例如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等混合来制备。

[0214] 在一些实施方案，所述输注群体与一种或多种附加治疗剂或与另一种治疗干预联合施用，即同时或以任何顺序依次施用。

[0215] 在一些实施方案，所述个体在施用免疫细胞的输注群体之前接受准备方案。例如，在接受输注群体之前，所述个体可能经历以下一项或多项：免疫抑制、免疫耗竭、淋巴细胞清除、或干细胞冲洗。

[0216] 可用于免疫抑制的药剂包括但不限于环孢菌素(cyclosporine)、他克莫司(tacrolimus)、利纳西普(rilonacept)、卡那单抗(canakinumab)、布罗达单抗(brodalumab)、阿那白滞素(anakinra)、瑞替珠单抗(reslizumab)、优特克单抗(ustekinumab)、美泊利单抗(mepolizumab)、托珠单抗(tocilizumab)、度普利尤单抗

(dupilumab)、伊珠单抗(ixekizumab)、苏金单抗(secukinumab)、古塞库单抗(guselkumab)、替拉珠单抗(tildrakizumab)、贝那利珠单抗(benralizumab)、萨瑞鲁单抗(sarilumab)、巴利昔单抗(basiliximab)、瑞莎珠单抗(risankizumab)、塞妥昔单抗(siltuximab)、达利珠单抗(daclizumab)、泊马度胺(pomalidomide)、甲氨蝶呤(methotrexate)、奥马珠单抗(omalizumab)、硫唑嘌呤(azathioprine)、来那度胺(lenalidomide)、沙利度胺(thalidomide)、阿法西普(alefacept)、西罗莫司(sirolimus)、依法珠单抗(efalizumab)、霉酚酸(mycophenolic acid)、霉酚酸酯(mycophenolate mofetil)、贝利单抗(belimumab)、那他珠单抗(natalizumab)、芬戈莫德(fingolimod)、来氟米特(leflunomide)、富马酸二甲酯(dimethyl fumarate)、依维莫司(everolimus)、阿巴西普(abatacept)、特立氟胺(teriflunomide)、维多珠单抗(vedolizumab)、依维莫司(everolimus)、依帕伐单抗(emapalumab)、辛波莫德(siponimod)、贝拉西普(belatacept)、巴瑞替尼(baricitinib)、莫罗莫那-CD3(muromonab-cd3)、依库珠单抗(eculizumab)、瑞丽珠单抗(ravulizumab)、依维莫司(everolimus)、依那西普(etanercept)、英夫利昔单抗(infliximab)、戈利木单抗(golimumab)、赛妥珠单抗(certolizumab)、或阿达木单抗(adalimumab)。

[0217] 可用于免疫耗竭的药剂包括但不限于环磷酰胺(Cytoxan)、氟达拉滨(fludarabine)、苯达莫司汀(bendamustine)、顺铂(cisplatin)、依托泊苷(etoposide)、紫杉醇(paclitaxel)、和吉西他滨(gemcitabine)。

[0218] 可用于淋巴细胞清除的药剂包括但不限于:依托度酸(etodolac)。

[0219] 可用于干细胞动员或冲洗的药剂包括但不限于G-CSF、培非格司亭(pegfilgrastim)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、和普乐沙福(Mozobil,Genzyme)。

[0220] 在一些实施方案,将Cbl抑制剂与所述这些药剂之一联合施用作为补充的输注前治疗。

[0221] 在本发明的一些实施方案中,个体在治疗前经历免疫抑制、免疫耗竭、淋巴细胞清除、或干细胞冲洗,持续0-60天、0-30天、0-15天、0-14天、0-13天、0-12天、0-11天、0-10天、0-9天、0-8天、0-7天、0-6天、0-5天、0-4天、0-3天、0-2天、或0-1天,然后输注细胞。

[0222] 在一些实施方案,患者通过使用环磷酰胺和氟达拉滨的组合进行免疫耗竭来调节。环磷酰胺和氟达拉滨可根据标准技术进行施用。在某些实施方案,环磷酰胺的施用剂量是在约200mg/$m^2$/天和约2000mg/$m^2$/天之间(例如,200mg/$m^2$/天、300mg/$m^2$/天、或500mg/$m^2$/天)。在某些实施方案,环磷酰胺的剂量为约300mg/$m^2$/天。在某些实施方案,氟达拉滨的施用剂量是在约20mg/$m^2$/天和约900mg/$m^2$/天之间(例如,20mg/$m^2$/天、25mg/$m^2$/天、30mg/$m^2$/天、或60mg/$m^2$/天)。在某些实施方案,氟达拉滨的剂量为约25mg/$m^2$/天。在某些实施方案,环磷酰胺的施用剂量是在约200mg/$m^2$/天和约2000mg/$m^2$/天之间(例如,200mg/$m^2$/天、300mg/$m^2$/天、或500mg/$m^2$/天),和氟达拉滨的施用剂量是在约20mg/$m^2$/天和约900mg/$m^2$/天之间(例如,20mg/$m^2$/天、25mg/$m^2$/天、30mg/$m^2$/天、或60mg/$m^2$/天)。在某些实施方案,环磷酰胺的施用剂量为约500mg/$m^2$/天,和氟达拉滨的施用剂量为约30mg/$m^2$/天。在示例性实施方案中,环磷酰胺的剂量为500mg/$m^2$/天,持续3天,和氟达拉滨的剂量为30mg/$m^2$/天,持续3天。相对于第0天的T细胞输注,可在第-6至第-4天(有+/-1天的窗口,即在第-7至第-5天给药)安排淋巴细胞清除的给药。相对于第0天的T细胞输注,可在第-5至第-3天(有+/-1天的窗口,即

在第-4至第-2天给药)安排淋巴细胞清除的给药。

[0223] 在一些实施方案,向患者施用细胞因子和细胞疗法。在某些实施方案,所述细胞因子是IL-2。IL-2根据标准技术进行施用。在某些实施方案,IL-2以100,000IU/kg至1,000,000IL/kg的剂量进行施用。在某些实施方案,IL-2的剂量为400,000IU/kg至800,000IU/kg。在某些实施方案,IL-2的剂量为约600,000IU/kg。相对于第0天的T细胞输注,可在第1至第3天(有+/-1天的窗口,即在第2至第4天给药)安排细胞因子的给药。在某些实施方案,细胞因子每8小时施用一次,在给药方案中总共6剂。在某些实施方案,IL-2在第1至第3天每8小时施用一次,共6剂。

[0224] 在一些实施方案,个体可在多于一个疗程中输注所述经修饰的细胞。

[0225] 在本发明的一些实施方案中,将基于细胞的免疫疗法与另一种抗癌疗法联合施用。

Cbl抑制剂的联合疗法

[0226] 在某些实施方案,细胞疗法与一种或多种Cbl抑制剂联合施用。例如,在本发明的一些治疗方案中,将经修饰的免疫细胞和Cbl抑制剂两者施用于有需要的受试者,其中所述Cbl抑制剂是本发明所述的化合物、或其药学上可接受的盐或溶剂化物。

[0227] 在一些实施方案,WO 2019/148005中公开的一种或多种小分子Cbl抑制剂可用于本发明所述的治疗方法,此专利申请通过引用其全文并入。在某些实施方案,所述Cbl抑制剂如式(A)所示。在某些实施方案,所述Cbl抑制剂选自化合物101-129。在某些实施方案,所述Cbl抑制剂是化合物116。在某些实施方案,使用Cbl抑制剂的组合。在某些实施方案,所述Cbl抑制剂是抗体。在某些实施方案,所述Cbl抑制剂是肽。在某些实施方案,所述Cbl抑制剂是siRNA。

[0228] 在某些实施方案,将Cbl抑制剂施用于接受治疗性细胞的患者以支持所述细胞的植入。

[0229] 在这些实施方案的一些中,所述待移植的细胞被组织成组织或器官。在这些实施方案中,施用一种或多种Cbl抑制剂以支持移植的骨髓、皮肤、角膜、肌腱、骨组织、血管、或心脏瓣膜的植入。在一些实施方案,施用Cbl抑制剂以支持一种或多种移植器官的植入,所述移植器官选自包含心脏、肺、肾、肝和胰腺在内的可移植器官的组。在其他实施方案,将Cbl抑制剂施用于接受免疫细胞的患者以支持所述免疫细胞的植入。

[0230] 对于接受治疗性细胞以支持所述治疗性细胞植入的个体而言,所用Cbl抑制剂的日剂量是在1-5000mg之间、1-2500mg、1-2000mg、1-1500mg、1-1000mg、1-750mg、1-500mg、1-400mg、1-300mg、1-250mg、1-200mg、1-100mg、1-10mg、0.1-10mg、0.1-5mg、或0.1-1mg。

[0231] 在免疫细胞输注后1至2天、1至3天、1至4天、1至5天、1至6天、1至7天、1至10天、1至14天、1至21天、1至28天、1至45天、1至60天、2至3天、2至4天、2至5天、2至6天、2至7天、2至10天、2至14天、2至21天、2至28天、2至45天、2至60天、4至5天、4至6天、4至7天、4至10天、4至14天、4至21天、4至28天、4至45天、4至60天、7至10天、7至14天、7至21天、7至28天、7至45天、或7至60天,可向接受治疗性细胞的患者施用Cbl抑制剂以支持所述细胞的植入。

[0232] 用于支持通过输注而接受的治疗性细胞植入的有效量的Cbl抑制剂在施用于有需要的患者时,使得所述患者体内的Cbl抑制剂浓度为0-0.5μM之间、0-1μM、0-5μM之间、0-10μM之间、0-25μM之间、0-50μM之间、0-100μM之间、或0-1000μM之间。

[0233] 在某些实施方案，除了Cbl抑制剂之外，亦在输注治疗性细胞后，向患者施用选自包含IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、及其组合的组的一种或多种药剂或化合物，以促进所述经输注的治疗性细胞的植入。在某些实施方案，所述附加药剂是IL-2。在某些实施方案，所述附加药剂是IL-7。在某些实施方案，所述附加药剂是IL-15。在某些实施方案，所述附加药剂是IL-21。在某些实施方案，所述附加药剂是IL-7和IL-15的组合。在某些实施方案，所述一种或多种药剂包括环磷酰胺和氟达拉滨。

[0234] 在某些实施方案，所述Cbl抑制剂的施用可减少或甚至消除对施用所述一种或多种附加药剂的任一或所有的需要。在某些实施方案，与无Cbl抑制剂的治疗相比，环磷酰胺以降低的剂量施用。在某些实施方案，与无Cbl抑制剂的治疗相比，氟达拉滨以降低的剂量施用。在某些实施方案，与无Cbl抑制剂的治疗相比，IL-2以降低的剂量施用。在某些实施方案，不施用IL-2。在某些实施方案，环磷酰胺的施用剂量为约500mg/$m^2$/天，氟达拉滨的施用剂量为约25mg/$m^2$/天。在示例性实施方案中，环磷酰胺的剂量为500mg/$m^2$/天，持续3天，和氟达拉滨的剂量为25mg/$m^2$/天，持续3天。相对于第0天的T细胞输注，可在第-5至第-3天(有+/-1天的窗口，即在第-4至第-2天给药)安排淋巴细胞清除的给药。在某些实施方案，环磷酰胺的施用剂量为约500mg/$m^2$/天，氟达拉滨的施用剂量为约25mg/$m^2$/天，并且不施用IL-2。

T细胞功能障碍

[0235] 在某些实施方案，可将有效量的Cbl抑制剂施用于有需要的患者以治疗T细胞功能障碍。

[0236] 针对患有T细胞功能障碍的个体，所用Cbl抑制剂的日剂量是在1-5000mg之间、1-2500mg、1-2000mg、1-1500mg、1-1000mg、1-750mg、1-500mg、1-400mg、1-300mg、1-250mg、1-200mg、1-100mg、1-10mg、0.1-10mg、0.1-5mg、或0.1-1mg。

[0237] 用于治疗T细胞功能障碍的有效量的Cbl抑制剂在施用于有需要的患者后，将使得所述患者体内的Cbl抑制剂浓度为0.0001-0.5μM之间、0.001-1μM之间、0.001-5μM之间、0.01-10μM之间、0.1-25μM之间、0.1-50μM之间、0.01-100μM之间、0.1-1000μM之间。

[0238] 患有T细胞功能障碍的患者可用Cbl抑制剂治疗1至2天、1至3天、1至4天、1至5天、1至6天、1至7天、1至10天、1至14天、1至21天、1至28天或1至45天、1至60天、2至3天、2至4天、2至5天、2至6天、2至7天、2至10天、2至14天、2至21天、2至28天或2至45天、2至60天、4至5天、4至6天、4至7天、4至10天、4至14天、4至21天、4至28天、4至45天、4至60天、7至10天、7至14天、7至21天、7至28天、7至45天或7至60天。

用Cbl抑制剂进行输注后治疗

[0239] 在某些实施方案，所述Cbl抑制剂在免疫细胞输注后施用于个体。免疫细胞的输注与Cbl抑制剂的施用之间的时长，或反之亦然，可为约1分钟至约1小时、约5分钟至约1小时、约10分钟至约1小时、约15分钟至约1小时、约20分钟至约1小时、约30分钟至约1小时、约45分钟至约1小时、约1小时至约2小时、约1小时至约4小时、约1小时至约6小时、约1小时至约8小时、约1小时至约12小时、约1小时至约24小时、约2小时至约24小时、约6小时至约7小时、约6小时至约24小时、约8小时至约24小时、约10小时至约24小时、约15小时至约24小时、约20小时至约24小时、约12小时至约48小时、约24小时至约48小时、或约36小时至约48小时。

[0240] 在一些实施方案，所述Cbl抑制剂作为输注后的支持疗法进行施用。在一些实施方案，此时间段可为约1天至约7天、约2天至约7天、约3天至约7天、约4天至约7天、约5天至约7

天、6天至约7天、1天至约2周、或1周至约3周、1周至约4周、1周至约6周、1周至约9周、1周至约12周、1周至约24周、1周至约48周、1周至约52周、1周至约60周、1周至约100周。

[0241] 因此，在一些实施方案，所述治疗方案包含过继细胞疗法和化学疗法。本发明所述治疗方案的一些实施方案包含药物增强的过继细胞疗法(DE-ACT)、药物增强的肿瘤浸润淋巴细胞(DE-TIL)疗法、药物增强的嵌合抗原受体疗法(DE-CART)、或药物增强的NK-CAR细胞疗法。

[0242] 在将所述输注群体施用于个体之后，可通过本领域已知的方法测定个体输注后免疫细胞的生物活性。评估的参数包括经修饰的免疫细胞或其他免疫细胞在体内(例如，通过成像)或离体(例如，通过ELISA或流式细胞术)与抗原的特异性结合。在一些实施方案，经修饰的免疫细胞破坏靶细胞的能力可使用本领域已知的任何合适的方法来测定，诸如，在例如Kochenderfer et al.,J.Immunotherapy,32(7):689-702(2009)和Herman et al.J.Immunological Methods,285(1):25-40(2004)中描述的细胞毒性测定试验。在一些实施方案，个体输注后免疫细胞的生物活性亦可通过测定某些细胞因子如IL-2和IFNγ的表达和/或分泌来测定。在一些案例中，输注后免疫细胞的生物活性是通过评估临床结果(例如，肿瘤尺寸或肿瘤数量的减少)来测定。

治疗病症

[0243] 本发明方法和组合物可用于治疗本领域技术人员认为合适的任何病症。在某些实施方案，所述病症是癌症。在某些实施方案，所述病症是肿瘤。在某些实施方案，所述病症是血液学癌症。

[0244] 在本发明方法的一些实施方案中，所述癌症是血液学癌症，例如淋巴瘤、白血病、或骨髓瘤。本发明所涵盖的血液学癌症包括但不限于一种或多种白血病，例如B细胞急性淋巴细胞白血病(“BALL”)、T细胞急性淋巴细胞白血病(“TALL”)、急性淋巴细胞白血病(ALL)；一种或多种慢性白血病，包括但不限于慢性粒细胞白血病(CML)和慢性淋巴细胞白血病(CLL)；其他血液学癌症或血液学病症，包括但不限于B细胞幼淋巴细胞白血病、母细胞性浆细胞样树突状细胞肿瘤、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、毛细胞白血病、小细胞滤泡性淋巴瘤或大细胞滤泡性淋巴瘤、恶性淋巴增生性疾病、MALT淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常和骨髓增生异常综合征、非霍奇金淋巴瘤、浆母细胞性淋巴瘤、浆细胞样树突状细胞肿瘤、华氏巨球蛋白血症(Waldenstrom macroglobulinemia)、和“白血病前期”，其均是由髓系血细胞的无效生成(或发育异常)联合起来的多种血液学病症的集合。

[0245] 在本发明方法的一些实施方案中，所述癌症是非血液学癌症，例如肉瘤、癌(carcinoma)、或黑素瘤。本发明所涵盖的非血液学癌症包括但不限于，神经母细胞瘤、肾细胞癌、结肠癌、结直肠癌、乳腺癌、上皮鳞状细胞癌、黑素瘤、胃癌、脑癌、肺癌(例如，NSCLC)、胰腺癌、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、前列腺癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、肾上腺癌、及头颈癌。在某些实施方案，所述癌症是黑素瘤。在某些实施方案，所述癌症是宫颈癌。在某些实施方案，所述癌症是卵巢癌。在某些实施方案，所述癌症是头颈部鳞状细胞癌。在某些实施方案，所述癌症是非小细胞肺癌。

[0246] 在一些实施方案，所述癌症在多于一种全身性疗法后复发或难治。

剂型

[0247] 在一些实施方案,将本发明的Cbl抑制剂配制成丸剂、胶囊剂、片剂、糖浆剂、安瓿、锭剂、散剂以供个体口服给药。在一些实施方案,将所述Cbl抑制剂配制用于输注或注射。在一些实施方案,将所述Cbl抑制剂配制用于体外或离体细胞培养。

[0248] 在本发明的一些实施方案中,本发明提供的Cbl抑制剂是药物组合物或单一单位剂型。本发明提供的药物组合物和单一单位剂型包含预防有效量或治疗有效量的一种或多种Cbl抑制剂。在提供免疫细胞之前经历体内活化的个体中,与未经处理的参比样品相比,Cbl抑制剂的量是足以调节体内免疫细胞活性的量。所述Cbl抑制剂可每日施用1次(1x)、2次(2x)或3次(3x),或每日施用4次(4x)或5次(5x)。

[0249] 在某些实施方案,针对采用基于细胞的免疫疗法的个体,所用Cbl抑制剂的日剂量为1-5000mg之间、1-2500mg、1-2000mg、1-1500mg、1-1000mg、1-750mg、1-500mg、1-400mg、1-300mg、1-250mg、1-200mg、1-100mg、1-10mg、0.1-10mg、0.1-5mg、或0.1-1mg。

[0250] 在某些实施方案,有效量的Cbl抑制剂在施用于个体后使得在体内活化阶段期间受影响的组织或肿瘤或邻近或周围区域内的所述抑制剂浓度为0-0.5μM之间、0-1μM之间、0-5μM之间、0-10μM之间、0-25μM之间、0-50μM之间、0-100μM之间、或0-1000μM之间。

[0251] 通过本发明提供的方法所生成的细胞可根据标准技术进行配制和施用。简言之,药物组合物可包含如本发明所述的细胞群,以及一种或多种药学上或生理学上可接受的载体、稀释剂或辅料。此类组合物可包含缓冲剂类,例如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;碳水化合物类,例如葡萄糖、甘露糖、蔗糖、葡聚糖、或甘露醇;蛋白质类;多肽类或氨基酸类,例如甘氨酸;抗氧化剂类;螯合剂类,例如EDTA或谷胱甘肽;佐剂类(例如,氢氧化铝);及防腐剂类。在某些实施方案,将细胞组合物配制用于静脉内施用。本发明的药物组合物可以适合待治疗(或预防)疾病的方式进行施用。施用的量和频率将根据患者的病情、患者疾病的类型及严重程度等因素确定,适当的剂量可通过临床试验确定。

## 实施例

实施例1:评估用于离体扩增来自肿瘤组织的人肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的Cbl抑制剂

[0252] 人卵巢和结肠肿瘤的样本得自Cooperative Human Tissue Network(CHTN,c/o Vanderbilt University Medical Center,Nashville,TN)。仔细解剖实体瘤标本,使其无周围脂肪及坏死区域。在无菌条件下,使用手术刀和手术刀架将肿瘤切成8mm$^3$(2x2x2mm$^3$)的碎片。

[0253] 对于肿瘤细胞系的生成,将多个碎片浸入1mg/ml Worthington 4型胶原酶、10μg/ml庆大霉素和3000U/ml DNAse的无血清RPMI 1640培养基混合物中。肿瘤碎片最初使用Miltenyi Genermacs octo解离器进行处理,并于37℃、温和搅拌下孵育30分钟。将单细胞浆液通过无菌网以去除未消化的组织碎片。清洗所得细胞浆液并重悬于培养基中。将细胞悬浮液于具有100%Ficoll、75%Ficoll和25%培养基的两步梯度上分层。以2000rpm离心20分钟后,收集界面层。在含有20%胎牛血清(FBS)的RPMI培养基的T75组织培养瓶(VWR)中,以大约1x10$^6$个肿瘤细胞的比例将上层富含肿瘤细胞的部分进行铺板。

[0254] 对于TIL的生成,将单个8mm$^3$肿瘤碎片添加至含有2mL RPMI培养基的24孔板的每个孔中,所述培养基含有25mM HEPES、10%热灭活人AB血清、100U/mL青霉素、100μg/ml链霉

素、2mM L-谷氨酰胺、10μg/ml庆大霉素和0.25μg/ml两性霉素B(Fungizone)(完全培养基;CM),连同6000IU/mL IL-2(其中存在或不存在0.1-10μM Cbl抑制剂),或连同单独的0.1-10μM Cbl抑制剂。将板置于具有5%$CO_2$的37℃加湿培养箱中。培养开始后,半数培养基每两天更换一次。随着孔汇合,将内容物剧烈混合,分成两个子孔,用含6000IU/mL IL-2(其中存在或不存在0.1-10μM Cbl抑制剂),或含单独的0.1-10μM Cbl抑制剂的RPMI培养基填充至每孔2mL。随后,半数培养基每周更换三次,将培养物拆分以维持$1\times10^6$个细胞/mL的细胞密度。在第17天和第28天,收集TIL并计数,并在第28天经流式细胞术通过测定谱系(CD4、CD8)、分化及其他T细胞标志物的表达进行免疫表型分析,所述T细胞标志物包括ICOS、CD45RA、CD45RO、CD95、CCR7、CD62L、CD3ε、CD8α、CD14、CD19、CD20、CD11c、TCF1、PD-1、TIM3、LAG3、CD27、CD28、CD127、PD-1、CD122、CD132、KLRG-1、HLA、HLA-DR、CD33、CD61、Cd235、TCRγ、TCRδ、CD38、CD69、CD11a、CD58、CD99、CD103、CCR4、CCR5、CCR6、CCR9、CCR10、CXCR3、CXCR4、CLA、CD161、IL-18Ra、c-Kit、和CD130。包括Mitotracker、Mitoprobe和2-NBDG在内的线粒体标志物亦可用于评估细胞的分化和/或活化。初始TIL生成步骤可从28天缩短至约7-11天之间,但结果相似。

[0255] 附图及表2-7中的数据均是化合物103的数据。图1示出了每孔的平均细胞数和肿瘤样品之间TIL扩增变异性的量级。出于此缘由,总细胞数在表2中示出为单独使用IL-2条件的百分比。图1A示出了单独使用IL-2或单独使用Cbl抑制剂的平均细胞数。图1B示出了单独使用IL-2或使用IL-2与0.1μM、1μM或10μM Cbl抑制剂组合的平均细胞数。图4A-4D分别示出了单独使用IL-2、使用0.1μM、1μM或10μM Cbl抑制剂、或使用IL-2与0.1μM、1μM或10μM Cbl抑制剂组合的卵巢TIL和结肠TIL的细胞平均数。图5A示出了单独使用IL-2、使用0.5μM Cbl抑制剂、或使用IL-2与0.50μM Cbl抑制剂组合的结肠TIL的细胞平均数。图5B示出了单独使用IL-2、使用0.3μM、0.5μM或10μM Cbl抑制剂、或使用IL-2与0.3μM、0.5μM或10μM Cbl抑制剂组合的结肠TIL的细胞平均数。图6示出了单独使用IL-2、使用0.5μM Cbl抑制剂、或使用IL-2与0.50μM Cbl抑制剂组合的来自肿瘤碎片或来自肿瘤悬浮液的结肠TIL的细胞平均数。值得注意的是,即使在不含IL-2的情况下、在存在Cbl抑制剂的情况下培养TIL,亦会使得TIL显著扩增。这是令人惊讶的,因为在不存在Cbl抑制剂和IL-2两者的情况下培养的肿瘤样品未产生任何活细胞。此外,与仅在IL-2或Cbl抑制剂存在下培养TIL相比,在IL-2和Cbl抑制剂两者存在的情况下培养TIL可使得来自四个肿瘤样品中的两个(TIL1和TIL4)产生显著更多的TIL。因此,Cbl抑制剂在不存在IL-2的情况下可支持细胞活力,并增强IL-2在某些肿瘤样品中的作用。

表2.人肿瘤样品中TIL的扩增

| 条件^ | TIL1 %<br>(卵巢) | TIL2 %<br>(卵巢) | TIL3 %<br>(卵巢) | TIL4 %<br>(结肠) | TIL5 %<br>(卵巢) | TIL6 %<br>(卵巢) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 单独的 IL-2 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 0.1 μM Cbl 抑制剂 | 90 | 30 | 30 | 45 | 50 | 93 |
| 1.0 μM Cbl 抑制剂 | 75 | 26 | 43 | 58 | 70 | 87 |
| 10 μM Cbl 抑制剂 | 60 | 22 | 16 | 54 | 90 | 80 |
| IL-2 + 0.1 μM Cbl 抑制剂 | 300 | 49 | 103 | 113 | 20 | 280 |
| IL-2 + 1.0 μM Cbl 抑制剂 | 450 | 86 | 114 | 197 | 10 | 260 |
| IL-2 + 10 μM Cbl 抑制剂 | 450 | 49 | 110 | 170 | 20 | 240 |

^第17天相对于单独的IL-2的总细胞数百分比。

[0256] 快速扩增方案

[0257] 快速扩增方案(REP)使用OKT3(抗CD3)抗体(Thermo Fisher Scientific)和IL-2，在经辐照、同种异体饲养细胞(Astarte Biologics)存在下，饲养细胞与响应TIL细胞的比率为200:1。将PBMC、OKT3抗体(30ng/mL)、完全培养基(“CM”)、AIM V培养基(GIBCO/BRL)和TIL效应细胞合并、混合并分装至75cm$^2$组织培养瓶中。烧瓶在5％$CO_2$中于37℃下直立培养。在第2天添加IL-2(6000IU/mL)和/或Cbl抑制剂(0.1μM、1μM、10μM)。在第5天，通过抽吸移除培养上清液，并将培养基用含有6000IU/mL IL-2和/或Cbl抑制剂的1:1CM/AIM V混合物替换。在第6天及此后的每一天，测定细胞浓度，并将细胞拆分至另外的烧瓶，并根据需要添加含有6000CU/mL IL-2/Cbl抑制剂的培养基，以维持细胞密度在1×10$^6$个细胞/mL左右。REP开始后约14天，收获细胞并冷冻保存，以备后续实验分析。

[0258] 仅在pre-REP(快速扩增方案之前)方案期间扩增的TIL在REP方案中进行进一步扩增:TIL1、TIL3、TIL4&TIL6。REP期间，TIL扩增的幅度因肿瘤样本而异。出于此缘由，在REP扩增方案期间，总细胞数在表3中示出为单独使用IL-2条件的百分比。

表3.人肿瘤样品中TIL的扩增(REP)

| 条件^ | TIL1 %<br>(卵巢) | TIL3 %<br>(卵巢) | TIL4 %<br>(结肠) | TIL6%<br>(卵巢) |
|---|---|---|---|---|
| 单独的 IL-2 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 0.1 μM Cbl 抑制剂 | 40 | 127 | 80 | 51 |
| 1.0 μM Cbl 抑制剂 | 42 | 150 | 80 | 63 |
| 10 μM Cbl 抑制剂 | 32 | 107 | 107 | 49 |
| IL-2 + 0.1 μM Cbl 抑制剂 | 50 | 193 | 167 | 206 |
| IL-2 + 1.0 μM Cbl 抑制剂 | 52 | 207 | 194 | 180 |
| IL-2 + 10 μM Cbl 抑制剂 | 49 | 197 | 240 | 168 |

^第42天相对于单独的IL-2的总细胞数百分比(Pre-REP和REP)。

[0259] T淋巴细胞是根据发育模型(Restifo,Blood,124:476-477,2014)基于谱系和分化标志物表达进行定义，如表4所示。有趣的是，在Cbl抑制剂存在下进行离体扩增的人TIL具有$T_{CM}$(CD45RO+、CD95+、CCR7+、CD62L+)或$T_{EM}$(CD45RO+、CD95+、CCR7-、CD62L-)表型，如表5所示。此外，发现Cbl抑制剂可选择性扩增来自恶性卵巢肿瘤样品的CD8+T淋巴细胞，如图7所示。这是值得注意的，因为当TIL与单独的IL-2一同离体培养时，生成了基本相同数量的CD4+和CD8+T淋巴细胞。单核细胞(CD14+)、B细胞(CD20+)和NK细胞(CD56+)占细胞总数的<

10％。

表4.T淋巴细胞的标志物表达

| 类型 | CD45RA/RO | CD95 | CCR7 | CD62L |
|---|---|---|---|---|
| $T_N$(原生) | RA+ | - | + | + |
| $T_{SCM}$(干细胞记忆性) | RA+ | + | + | + |
| $T_{CM}$(中枢记忆性) | RO+ | + | + | + |
| $T_{EM}$(效应记忆性) | RO+ | + | - | - |
| $T_{EFF}$(效应) | RA+ | + | - | - |

表5.TIL1群体中的中枢记忆性T细胞和效应记忆性T细胞^

| 条件 | CD8 | | CD4 | |
|---|---|---|---|---|
| | $T_{CM}$ CD62L+ CCR7+ | $T_{EM}$ CD62L- CCR7- | $T_{CM}$ CD62L+ CCR7+ | $T_{EM}$ CD62L- CCR7- |
| DMSO | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 单独的 IL-2 | 4.2 | 48.7 | 1.8 | 48.9 |
| 0.1 μM Cbl 抑制剂 | 19.5 | 37.2 | 2.8 | 67.2 |
| 1.0 μM Cbl 抑制剂 | 20.2 | 15.6 | 8.0 | 24.2 |

| 条件 | CD8 | | CD4 | |
|---|---|---|---|---|
| | $T_{CM}$ CD62L+ CCR7+ | $T_{EM}$ CD62L- CCR7- | $T_{CM}$ CD62L+ CCR7+ | $T_{EM}$ CD62L- CCR7- |
| 10 μM Cbl 抑制剂 | 29.7 | 13.2 | 15.8 | 66.7 |
| IL-2 + 0.1 μM Cbl 抑制剂 | 20.3 | 35.5 | 12.1 | 49.3 |
| IL-2 + 1.0 μM Cbl 抑制剂 | 16.5 | 43.3 | 15.2 | 57.3 |
| IL-2 + 10 μM Cbl 抑制剂 | 20.5 | 35.4 | 0 | 55.8 |

^第28天的总TIL细胞数百分比

^经遗传工程改造以表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞可类似地进行扩增。简言之，从患者的全血、血沉棕黄层或白细胞中分离出T细胞，并如上所述进行扩增。慢病毒转导将CAR引入T细胞。通过测定记忆性、效应、耗竭和干性(例如，CD95、TCF7、CD62L、CCR7、CD45RO和CD45RA、TOX、PD-1、TIM3、LAG3)以及转导效率的流式细胞术分析来评估T细胞所生成的细胞总数及其表型。所得CAR T细胞经扩增并评估其在通过CAR的特定抗原或通用T细胞活化方法(例如，抗CD3/CD28)重新活化后生成细胞因子(例如，IFNγ)的能力。

实施例2:评估用于扩增来自外周血单核细胞的抗原特异性人T细胞的Cbl抑制剂

[0260] 在Cbl抑制剂存在的情况下，对来自外周血单核细胞的T细胞的离体扩增进行评估。

[0261] CMV pp65(495-503)反应性T细胞通过解冻CMV血清阳性供体(Conversant)进行扩增，并将$2x10^6$个细胞/ml重悬于补充有1％GlutaMax(Gibco)、1％非必需氨基酸(NEAA)、青霉素/链霉素(Gibco)、10％热灭活人AB血清(Corning)、1μg/ml CMV pp65(495-503)(Anaspec)、2ng/mL IL-2(R&D)、和/或Cbl抑制剂(0.1μM、1μM、10μM)的RPMI培养基(Gibco)中。PBMC与IL-2和/或Cbl抑制剂一同培养8天，并在第3天和第5天进行补充。在第8天，收获细胞，并在完全RPMI培养基中以200万/ml的低剂量IL-2(100U/ml)和/或Cbl抑制剂重新接

种2天。在第11天，收集细胞并计数，并在第11天经流式细胞术通过测定谱系(CD4、CD8)和分化(包括CD45RA、CD45RO、CD95、CCR7、CD62L、TCF1、PD-1、TIM3、LAG3)标志物的表达进行免疫表型分析。

[0262] 样品之间的扩增幅度不同。值得注意的是，即使在不含IL-2的情况下、在存在Cbl抑制剂的情况下培养T细胞亦会使得T细胞大量扩增。

表6.来自人外周单核细胞的T细胞扩增

| 条件^ | 供体 1 % | 供体 2 % | 供体 3 % |
|---|---|---|---|
| 单独的 IL-2 | 100 | 100 | 100 |
| 0.1 μM Cbl 抑制剂 | 12 | 70 | 175 |
| 1.0 μM Cbl 抑制剂 | 12 | 95 | 75 |
| 10 μM Cbl 抑制剂 | 44 | 45 | 38 |
| IL-2 + 0.1 μM Cbl 抑制剂 | 614 | 2059 | 3622 |
| IL-2 + 1.0 μM Cbl 抑制剂 | 1007 | 170 | 2145 |
| IL-2 + 10 μM Cbl 抑制剂 | 898 | 2161 | 1151 |

^第11天相对于单独的IL-2的总细胞数百分比。

[0263] T淋巴细胞是根据发育模型(Restifo,Blood,124:476-477,2014)基于谱系和分化标志物表达进行定义，如表4所示。有趣的是，在Cbl抑制剂存在下进行离体扩增的人T细胞具有$T_{SCM}$(CD45RA+、CD95+、CCR7+、CD62L+)、$T_{CM}$(CD45RO+、CD95+、CCR7+、CD62L+)、或$T_{EM}$(CD45RO+、CD95+、CCR7-、CD62L-)表型，如表7所示。此外，发现Cbl抑制剂可选择性扩增来自供体PBMC的CD8+T淋巴细胞，如图2A和图2B所示。图2A示出了在IL-2存在的情况下，以及在0.1μM Cbl抑制剂、1μM Cbl抑制剂和10μM Cbl抑制剂在不存在(图2A)及存在(图2B)IL-2的情况下，来自PBMC样品的T细胞的选择性扩增。在IL-2与0.1或0.5μM Cbl抑制剂组合存在的情况下所培养的细胞显示出培养物中CD8+细胞的百分比最高。此外，仅在1μM Cbl抑制剂中培养的细胞比仅在IL-2中培养的细胞显示出更高的CD8+细胞百分比。

表7.供体PBMC中的中枢记忆性T细胞和效应记忆性T细胞

| 条件 | CD8 | | | CD4 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $Ts_{CM}$ | $T_{CM}$ | $T_{EM}$ | $Ts_{CM}$ | $T_{CM}$ | $T_{EM}$ |
| DMSO | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 单独的 IL-2 | 39.9 | 25.4 | 11 | 16.9 | 43.2 | 24.9 |
| 0.1 μM Cbl 抑制剂 | 17.1 | 50.7 | 14.2 | 12 | 53.1 | 23.9 |
| 1.0 μM Cbl 抑制剂 | 7.29 | 61.1 | 12.9 | 7.27 | 55.3 | 19.3 |
| 10 μM Cbl 抑制剂 | 10.8 | 34.2 | 9.23 | 1.37 | 47.3 | 23.3 |
| IL-2 + 0.1 μM Cbl 抑制剂 | 4.2 | 47.8 | 18.3 | 8.53 | 13.9 | 29.7 |
| IL-2 + 1.0 μM Cbl 抑制剂 | 0.23 | 37.8 | 41.4 | 1.98 | 16.8 | 28.4 |
| IL-2 + 10 μM Cbl 抑制剂 | 9.36 | 49 | 10.6 | 2.69 | 24.3 | 25.8 |

第11天的总细胞数百分比。

[0264] T细胞活性通过分析细胞因子分泌来确定。为了研究这些经扩增的T细胞是否能够响应细胞外刺激，用25ng/mL佛波醇肉豆蔻乙酸酯(PMA)和0.5μM离子霉素刺激T细胞。刺激90分钟后，以1:50加入莫能菌素(monensin)(GolgiStop,BD Biosciences)。6小时后，对细胞进行CD4+、CD8+、CD45RA+、CD95+、CCR7+、CD62L+的表面表达染色，随后进行固定、透化及细胞内细胞因子IFN-γ染色。6小时后，我们观察到积累的细胞内IFN-γ明显增加，而IFN-γ是当T细胞用IL-2和Cbl抑制剂扩增时抗肿瘤应答的重要效应物。我们发现大约50％的CD4/8+T细胞在经IL-2扩增的T细胞中对IFN-γ表达呈阳性，超过85％的经IL-2和Cbl抑制剂扩增的CD4/8+T细胞能够产生IFN-γ。图3A显示，在存在Cbl抑制剂和IL-2的情况下所培养的T细胞的CD4/CD8+及IFNγ+细胞水平高于仅存在IL-2或仅存在Cbl抑制剂的情况下所培养的T细胞的CD4/CD8+及IFNγ+细胞水平。CD4/8+及IFNγ+细胞的表达表明，经IL-2和Cbl抑制剂扩增的T细胞具有引发抗肿瘤应答的功能潜力。

实施例3：使用透气性烧瓶评估用于离体扩增来自肿瘤组织的人肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的Cbl抑制剂

[0265] 图6提供了确定TIL培养的最佳起始材料的研究结果。在一项使用肿瘤碎片与来自结肠肿瘤的肿瘤细胞悬浮液的对比研究中，从肿瘤碎片生长11天的培养物显示出比使用肿瘤细胞悬浮液作为TIL培养起始材料的培养物高约10倍的扩增。

[0266] 在具有40mL容量和10$cm^2$透气性硅底部(GREX6M;Wilson Wolf Manufacturing，MN)的透气性烧瓶中开始培养，每个烧瓶在第0天(D0)或第3天(D3)，在单独或联合添加有IL-2和/或1μM Cbl抑制剂的40mL培养基中，装载5个肿瘤碎片。将G-REX孔在37℃、5％$CO_2$的腐殖化培养箱中孵育7至28天。

[0267] 图8提供了使用具有透气性硅底部的透气性烧瓶用于来自2个不同卵巢肿瘤样品的细胞扩增的第7天结果，其中针对在第0天或第3天添加IL-2或Cbl抑制剂进行了比较。“A”是在第0天添加单独的IL-2。“B”是在第0天添加IL-2和1μM Cbl抑制剂。“C”是在第0天添加IL-2并在第3天添加1μM Cbl抑制剂。“D”是在第3天添加IL-2并在第3天添加Cbl抑制剂。“E”是在第0天添加Cbl抑制剂。

实施例4：评估Cbl抑制剂对体内转移的抗原特异性T细胞的离体扩增的影响以确定肿瘤模型的功效和作用机制

[0268] 与使用单独的IL-2的标准培养条件相比，在存在Cbl抑制剂的情况下离体培养肿瘤特异性T细胞可获得优异的抗肿瘤效果。在本实施例中，其证明了即使是T细胞在离体3天短时间暴露于化合物103(其无论是单独使用还是与IL-2联合)，在将细胞转移至荷瘤动物中后，与对照组相比，均能获得一个多月的持久抗肿瘤表型。

[0269] 来自转基因小鼠的抗原特异性T细胞可用作用Cbl抑制剂离体扩增CAR T或TIL的模型。市售的OT-1转基因动物具有CD8 T细胞，当MHC I分子呈递时，所述CD8 T细胞可识别OVA肽aa 257-264。通过阴性选择(StemCell Technologies目录号19853EasySep™小鼠CD8+T细胞分离试剂盒)从脾细胞的单细胞悬液中分离出OT-1小鼠的CD8+T细胞。然后将细胞以0.5x $10^6$/mL的浓度重悬于完全培养基(RPMI1640、10％热灭活FBS、1X青霉素/链霉素、1X谷氨酰胺和β-巯基乙醇)中。六孔组织培养板(Falcon)用2ug/mL抗小鼠CD3(Bio Xcell目录号BE0001-1-R100mg InVivoMAb抗小鼠CD3ε克隆：145-2C11)在37℃下包被>3小时，并在添加

细胞之前用PBS(MediaTech)清洗。对于离体扩增,在IL-2(300IU)(R&D Systems)、Cbl抑制剂(1μM)、或IL-2与Cbl抑制剂的组合存在下,对1.5x $10^6$个细胞/孔进行培养。已显示Cbl抑制剂与小鼠CBLB相互作用并表现出类似的增强增殖和增强细胞因子分泌的特征。在OT-1T细胞活化及扩增3天后,收集细胞并计数,并经流式细胞术通过测定分化及其他T细胞标志物的表达进行免疫表型分析,所述T细胞标志物包括:CD3、CD4、CD8、CD45、CD25、颗粒酶B、CD107a、CD127、PD-1、TIM3、LAG3、KLRG-1、ICOS、TCF1、Ki67、T-bet和FOXP3。发现在扩增期间响应于包含CBL抑制剂的效应器功能增加的趋势如所测定的增强的颗粒酶和T-bet。

[0270] 在体内转移之前去除死细胞(Miltenyi Biotec目录号130-090-101),以监测其在表达OVA抗原的EG.7淋巴瘤模型中的转运和功能。每只小鼠大约有500万个细胞被转移至平均肿瘤负荷为约70$mm^3$的小鼠身上。在OT-1细胞的体内转移后,随着时间的推移监测抗肿瘤应答,并在不同时间点评估免疫应答的质量和数量。在转移后4天和9天对其进行分析时,来自血液和脾脏的OT-1细胞在总CD8+T细胞和CD45+细胞中表现出更高的频率和体内持久性。此外,用Cbl抑制剂扩增的OT-1细胞显示出更高百分比的表达干标志物$TCF1^+$、$PD\text{-}1^+$和$TIM\text{-}3^-$的细胞。

[0271] 图9提供的结果表明,用Cbl抑制剂扩增的OT-1细胞是有效效应物,其能够排斥皮下植入E.G7-OVA细胞的小鼠中所建立的肿瘤。

[0272] 图10提供的结果表明,用Cbl抑制剂扩增的OT-1细胞在总CD8+T细胞和CD45+细胞中表现出更高的频率以及在血液中的更好体内持久性。转移后4天或9天,对血液中的OT-1细胞进行评估。当分析获自脾脏的OT-1细胞时,得到了类似的数据。

实施例5:经Cbl抑制剂扩增的肿瘤抗原特异性T细胞的评价

[0273] 本实施例评估了在存在Cbl-b抑制剂的情况下扩增的细胞的治疗效果。

[0274] 简言之,在板结合CD3存在下,连同1)Cbl抑制剂,1μM、2)IL-2,300IU、和3)Cbl抑制剂和IL-2的组合,将表达对卵清蛋白(OT-1)特异的转基因T细胞受体的肿瘤抗原特异性CD8+T细胞在体外扩增3天。经扩增的OT-1细胞通过FACS分析进行表征,并转移至E.G7-OVA小鼠中,这些小鼠带有表达卵清蛋白(OVA)的肿瘤。在体内转移经扩增的OT-1细胞后,随着时间的推移监测抗肿瘤应答,并在不同时间点评估免疫应答的质量和数量。分析包括对血液、肿瘤和脾脏样本的FACS分析。分析还包括用OVA I类肽重新刺激脾细胞以评估抗原特异性效应T细胞的多功能性。

[0275] 在第0天,将E.G7-OVA细胞植入每只小鼠。在第5天,将大约5x $10^6$个经体外扩增的OT-1细胞注射到每只小鼠的尾部。在第9天,通过FACS分析血液。在第14天,通过FACS分析血液、肿瘤和脾脏样品。在第27天,通过FACS分析血液。在植入后约50天,大约每5天测定一次肿瘤体积。

[0276] 如图11A和图11B所示,用化合物103扩增的$CD8^+$OT-1细胞至少与用IL-2扩增的$CD8^+$OT-1细胞一样有效。用化合物103与IL-2的组合进行的扩增在植入后至少20天亦显示出相似的效力。

[0277] 在图12所示的第二项研究中,仅用CD3扩增的对照细胞表现出最小的抗肿瘤活性。与经IL-2扩增的细胞相比,用化合物103扩增的细胞显示出增加的效力,如更显著的肿瘤生长抑制(图A)及长期存活率(图B)所示。此外,与IL-2相比,经细胞化合物103+IL-2扩增的细胞显示出增加的效力,如更显著的肿瘤生长抑制(图A)及长期存活率(图B)所示。

[0278] 图12中示出的实验表明，与经IL-2扩增的细胞相比，用化合物103扩增的OT-1细胞显示出增加的效力，如更显著的肿瘤生长抑制(图12A)及改善的长期存活率(图12B)所示。重要的是，与单独的单一药剂、IL-2或化合物103相比，用化合物103+IL-2细胞扩增的OT-1细胞显示出增加的效力，如更显著的肿瘤生长抑制(图12A)及更优异的长期存活率(图12B)所示。

实施例6：与用IL-2扩增的相同细胞相比，经Cbl抑制剂扩增的肿瘤抗原特异性T细胞表现出更优异的特性

[0279] OT-1细胞根据前述实施例进行扩增并施用于E.G7-OVA小鼠，这些小鼠带有表达卵清蛋白(OVA)的肿瘤。对细胞的体内特性进行评估。

[0280] 转移后4天和22天，评估血液中经扩增的OT-1细胞。如图13A(第4天)和图13B(第22天)所示，与单独用IL-2扩增的细胞相比，经Cbl抑制剂扩增的细胞在总CD45+细胞中表现出更高的频率并且持续时间更长，且比单独用抗CD3扩增的细胞亦持续时间更长。用Cbl抑制剂与IL-2的组合扩增的细胞在总CD45+细胞中表现出更高的频率和更高的持久性。

[0281] 转移后4天，评估肿瘤中经扩增的OT-1细胞。如图14A所示，与单独用IL-2扩增的细胞和单独用抗CD3扩增的细胞相比，经Cbl抑制剂扩增的细胞表现出浸润肿瘤的能力增加，如总CD45+细胞中的更高频率所示。用Cbl抑制剂与IL-2的组合扩增的细胞可更好地浸润肿瘤，如总CD45+细胞中的最高频率所示。此外，与单独用IL-2扩增的OT-1细胞相比，用Cbl抑制剂或Cbl抑制剂+IL-2扩增的OT-1细胞均显示出耗竭标志物PD1和TIM3(图14B)以及PD1、TIM3和LAG3(图14C)的表达水平较低。

[0282] 在转移后11天，评估来自脾细胞的经扩增OT-1细胞。用OVA I类肽重新刺激经收获的脾细胞72小时。如图15所示，与仅用IL-2扩增的细胞相比，经Cbl抑制剂扩增的细胞显示出响应肽再刺激而增殖的优异内在能力。用Cbl抑制剂与IL-2的组合扩增的细胞显示出更强的内在增殖能力，以响应肽的再刺激。

[0283] 在转移后11天，评估来自脾细胞的经扩增OT-1细胞。用OVA I类肽重新刺激经收获的脾细胞4小时。如图16A和图16B所示，与仅用IL-2扩增的细胞相比，经Cbl抑制剂扩增的细胞在肽再刺激的OT-1细胞中显示出与其相当的多功能性(IFN-γ和TNF-α双阳性细胞)。如图16C所示，与仅用IL-2扩增的细胞相比，经Cbl抑制剂扩增的细胞在多功能(IFN-γ和TNF-α双阳性)细胞中表现出耗竭标志物(PD1和TIM3)的表达水平较低。

[0284] 在转移后11天，评估来自脾细胞的经扩增OT-1细胞。用OVA I类肽重新刺激经收获的脾细胞24小时。在肽再刺激24小时后测定IL-2的生成。如图17A所示，扩增条件不影响IFN-γ的生成。如图17B所示，经Cbl抑制剂扩增的细胞在再刺激后表现出增加的IL-2生成。当在Cbl抑制剂存在下体外扩增细胞时，总IL-2和双重IFN-g/IL-2生成细胞两者均增加。

实施例7：口服Cbl抑制剂治疗增强经扩增的OT-1细胞的抗肿瘤功效

细胞转移后，大约每5天测定一次肿瘤体积。如图18所示，口服施用化合物116增强了用化合物103+IL-2扩增的OT-1细胞的抗肿瘤功效。如图19所示，与未接受化合物116口服治疗的小鼠相比，口服施用化合物116提高了用化合物103+IL-2扩增的OT-1细胞所治疗的小鼠的存活率。

[0285] 转移后5天和20天，评估小鼠血液中的OT-1细胞。如图20A和图20B所示，化合物116诱导用Cbl抑制剂+IL-2扩增的OT-1细胞的频率增加。化合物116还诱导用Cbl抑制剂+IL-2

扩增的OT-1细胞的持久性更长。

实施例8:经扩增的OT-1细胞的长期抗肿瘤功效

[0286] 为了确定OT-1细胞是否能够长期保护肿瘤,上述实验的长期幸存者(图12)在经体外扩增的OT-1细胞最初过继转移后149天,再次用致死剂量的E.G7-OVA肿瘤细胞攻击。在移植有表达卵清蛋白抗原的E.G7-OVA肿瘤细胞的部位处再次攻击诱导OT-1细胞扩增,从而有效控制肿瘤生长(图21)。图21所示结果表明,排斥肿瘤的小鼠在初始OT-1T细胞转移后149天对肿瘤再次攻击具有抗性(图21)。

[0287] 为了评估回忆应答的效力,在肿瘤再次攻击前第0天(初始过继转移后149天)以及再次攻击后5天、12天、20天和27天,评估血液中OT-1细胞的数量。如图22A所示,在初始过继转移后149天,在体外用Cbl抑制剂或Cbl抑制剂+IL-2的组合扩增的OT-1细胞均在血液中以更高数量存在,表明在体内具有优异的持续存在能力。

[0288] 为了评估用Cbl抑制剂(单独使用或与IL-2组合使用)扩增的记忆性OT-1细胞的回忆应答,在肿瘤再次攻击后5天、12天、20天和27天评估血液中OT-1细胞的数量。如图22B所示,与仅用IL-2扩增的OT-1细胞相比,用Cbl抑制剂或Cbl抑制剂+IL-2的组合体外扩增的OT-1细胞均能够产生明显更快的回忆应答,如在第5天时每毫升血液中的OT-1细胞数量更高所证明(图22B)。

实施例9:用Cbl抑制剂扩增的细胞表型

[0289] 对在Cbl抑制剂存在下培养的细胞进行广泛表征。

[0290] 初步研究涉及卵巢和CRC肿瘤组织(平均约0.5-0.8g)的TIL扩增。这些组织被分成多个碎片(尺寸为约2$mm^3$),每个24孔板添加一个碎片。在快速扩增之前(pre-REP),将这些碎片于6000IU IL-2或6000IU IL-2+1μM化合物103中培养28天。然后通过处理将所述这些孔合并,并通过流式细胞术评估总细胞数。在TIL扩增后,对细胞的表型进行表征。其中以CD45RO+和CD4+以及CD8+居多。在图23A中,CD4的百分比(%)降低。在图24B中,细胞中CD8相应增加。与单独的IL-2相比,两者均用IL-2+化合物103扩增。这表明Cbl抑制剂可选择性扩增多种肿瘤中的CD8 T细胞。

[0291] 通过流式细胞术分析直接来源于新鲜卵巢癌和结肠癌组织(新鲜,n=8)的TIL,所述这些组织是在28天的癌症组织碎片离体培养后获得。图24提供了FACS数据,分别示出了CD8+CD45RO+中的中枢记忆性(CD45RO+CCR7+)和效应记忆性(CD45RO+CCR7-)表型的百分比。FACS结果表示为平均值±SEM。使用双尾Wilcoxon符号秩检验计算统计显著性(*,$p<0.05$)。通过评估T细胞分化表型标志物、以及CCR7和CD45RO,进一步表征CD8 T细胞。与单独的IL-2相比,在用IL-2+化合物103扩增的TIL中观察到中枢记忆性T细胞(CCR7+CD45RO+细胞)显著增加(图24)。这表明分化程度较低的持久性T细胞的扩增。

[0292] 通过流式细胞术分析直接来源于新鲜卵巢癌、结肠癌和乳腺癌组织(新鲜,n=7)的TIL,所述这些组织是在14天的癌症组织碎片离体培养后获得。将肿瘤破碎并将5个碎片添加至GREX 10烧瓶中,所述烧瓶含有50ml体积的IL-2或IL-2+化合物103,持续14天,每5天补给细胞。着眼于CD8 T细胞,观察到用IL-2+化合物103扩增的CD8 T细胞增加,以及CD8 T的百分比(%)(图25A)和总数(图25B)均增加。

[0293] 通过流式细胞术分析直接来源于新鲜卵巢癌、结肠癌和乳腺癌组织(新鲜,n=7)的TIL,所述这些组织是在14天的癌症组织碎片离体培养后获得。图26提供了FACS数据,分

别示出了CD8+

CD45RO+中的中枢记忆性(CD45RO+CD8+)和效应记忆性(CD45RO+CD8-)表型的百分比。FACS结果表示为平均值±SEM。这表明中枢记忆性细胞显著增加,以黑色突出显示。

[0294] 为了研究经扩增的TIL是否能够响应细胞外刺激,在存在分泌抑制剂和抗CD107a的情况下,用抗CD3/CD28刺激TIL,持续6小时。6小时后,观察到CD107a的表面表达明显增加,这与T细胞的脱粒和细胞毒活性有关。刺激后,平均40%的用IL2扩增的$CD8^+$TIL对CD107A表达呈阳性,超过60%的用IL2+化合物103扩增的$CD8^+$TIL能够生成CD107a(图27A)。刺激后,平均50%的用IL2扩增的$CD4^+$TIL对CD107A表达呈阳性,超过60%的用IL2+化合物103扩增的$CD4^+$TIL能够生成CD107a(图27B)。

[0295] 在细胞毒性的背景下,评估了颗粒酶B(Grb),一种分泌以介导细胞凋亡的蛋白酶。在刺激后,与单独使用IL-2相比,在用IL-2+化合物103扩增的TIL中生成的Grb显著增加(图28A)。亦评估了CD107A+GRB+细胞,并在刺激后再次观察到用IL-2+化合物103扩增的细胞显著增加(图28B)。由此,我们得出结论,Cbl抑制剂似乎可扩增TIL并可能增加细胞毒性。

[0296] 还评估了在GREX中14天扩增期间所分泌的细胞因子和趋化因子。在用IL-2+化合物103扩增的烧瓶中,IFN-γ显著增加,并观察到GMCSF、MIP1α、MIP1β和IP10亦呈增加趋势(图29)。

[0297] 添加Cbl抑制剂后,观察结果包括细胞数量增加、潜在质量更好、更持久的中枢记忆性T细胞(就其功能而言可能更有效,如细胞因子分泌所证明)、以及颗粒酶B和脱粒标志物CD107A的表达增加。这些支持为患有实体瘤适应症的患者提供一种新的临床方法。

[0298] 为了评估经处理细胞中的趋化因子分泌,将在GREX10中扩增的1x $10^5$个TIL与来自多种肿瘤适应症(n=10)的高剂量IL-2+/-1μM化合物103一同培养24小时,+/-抗-3/CD28一同培养24小时。通过Luminex评估上清液。用IL-2和化合物103扩增的TIL显示刺激后MIP1α(图30A)和MIP1β(图30B)的分泌显著增加。

[0299] 为了评估经处理细胞中的细胞因子分泌,将在GREX10中扩增的1x $10^5$个TIL与来自多种肿瘤适应症(n=10)的高剂量IL-2+/-1μM化合物103一同培养24小时,+/-抗-3/CD28一同培养24小时。用IL-2和化合物103扩增的TIL显示刺激后IL-2、IL-5、IL-7、IL-21、IL-23、TNF-α和IFN-γ的分泌显著增加(图31)。

[0300] 为了评估CDR3多样性,用高剂量IL-2(图32A)、高剂量IL-2与化合物103(图32B)、或单独的化合物103(图32C)扩增代表性乳腺TIL。TIL在GREX10中培养14天。分离用IL-2+/-化合物103扩增的TIL的总RNA,并通过iRepertoire(Huntsville,AL,USA)进行RT-PCR和测序。原始数据由iRepertoire使用IRmap程序及改进的Smith-Waterman算法进行分析。使用CDR3algerbra软件,评估采用指定处理方法的样本之间共享CDR3的计算结果。数据通过CDR3的频率进行过滤,以便仅显示原始数据中具有预设频率的共享CDR3序列。所有CDR3频率均缩放至1000万次读取,以说明样本之间读取深度的差异。对数据进行归一化,因此无论读取计数如何,每个uCDR3-VDJ组合均视为数量为1,然后分析V使用情况及J使用情况。独特的CDR3在化合物103组中均增加。

实施例10:用Cbl抑制剂扩增的细胞表型

[0301] 为了评估化合物的稳定性,在第1天,将1μM化合物103或DMSO添加至含有10%人血清的完全RMPI中,并在4℃、22℃或37℃下储存11天。通过质谱法在每个指定的时间点和储

存温度下评估化合物103的浓度。化合物103在RPMI培养基中可稳定至少11天(图33)。

[0302] 为了评估化合物在培养中的稳定性,在1μM化合物103(其在14天内每4天依次添加)存在下培养TIL,然后在PBS中清洗两次(W1:Wash 1(清洗1),W2:Wash 2(清洗2))。测定化合物103在初始培养基中、在两次连续清洗后的重悬缓冲液(W1&W2)中、以及在细胞沉淀裂解物(最终产物)中的量(图34)。化合物103的残留量低于所述产物的药理作用水平(PEL)。

实施例11:扩增方案

[0303] 在第-1天,收获肿瘤组织并进行破碎。在第0天,细胞在含有10%血清以及化合物103与IL-2(6000IU)的RPMI培养基中扩增。在第4天,加入化合物103。在第7天,再次加入化合物103。在第11天,收获细胞。在第11天,用经收获的细胞与化合物103、IL-2(3000IU)和任选的OKT3及任选的经辐照的外周血单核细胞开始快速扩增。在第16天,加入化合物103和IL-2(3000IU)。在第22天,收获经扩增的细胞并准备输注。在第24天,将细胞施用于患者。

[0304] 本说明书中引用的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本发明,如同每个单独的出版物或专利申请均被具体地和单独地指出通过引用并入。尽管已根据各种实施方案描述了所要求保护的主题,但本领域技术人员将理解,在不背离本发明精神的情况下可进行各种修改/修饰、替换、省略和改变/变化。因此,本主题的范围旨在仅由以下权利要求书的范围限制,包括其等同物。

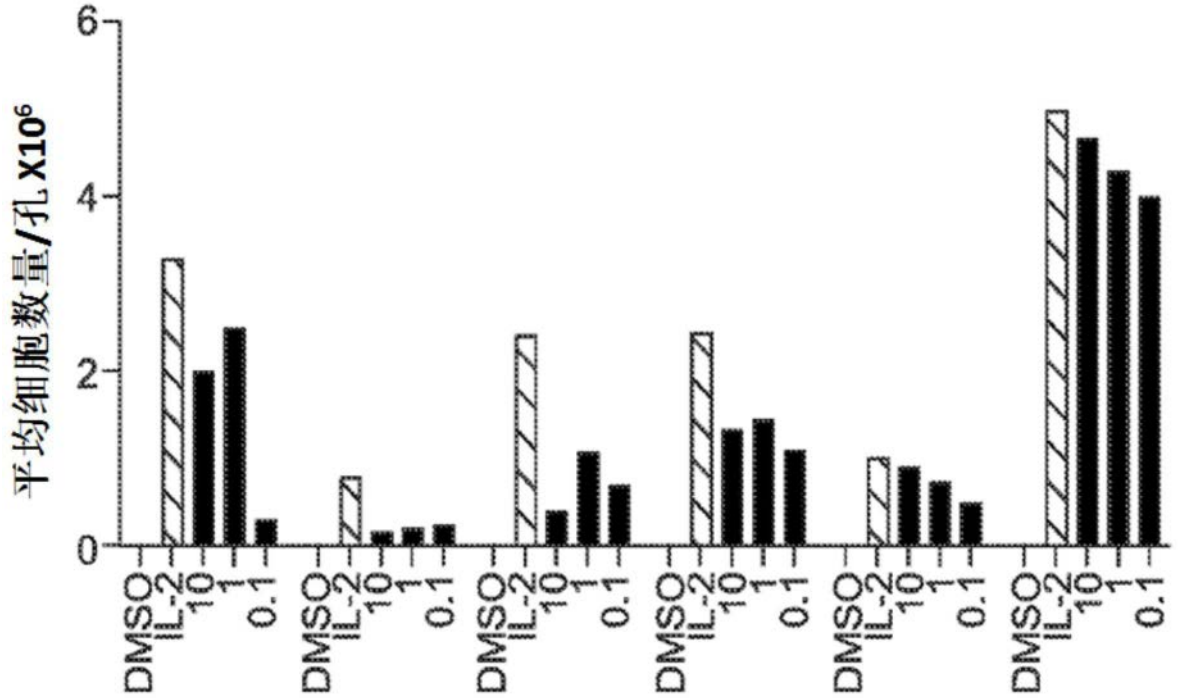

平均细胞数量/孔 X10⁶
6
4
2
0
DMSO
IL-2
10
1
0.1

图1A

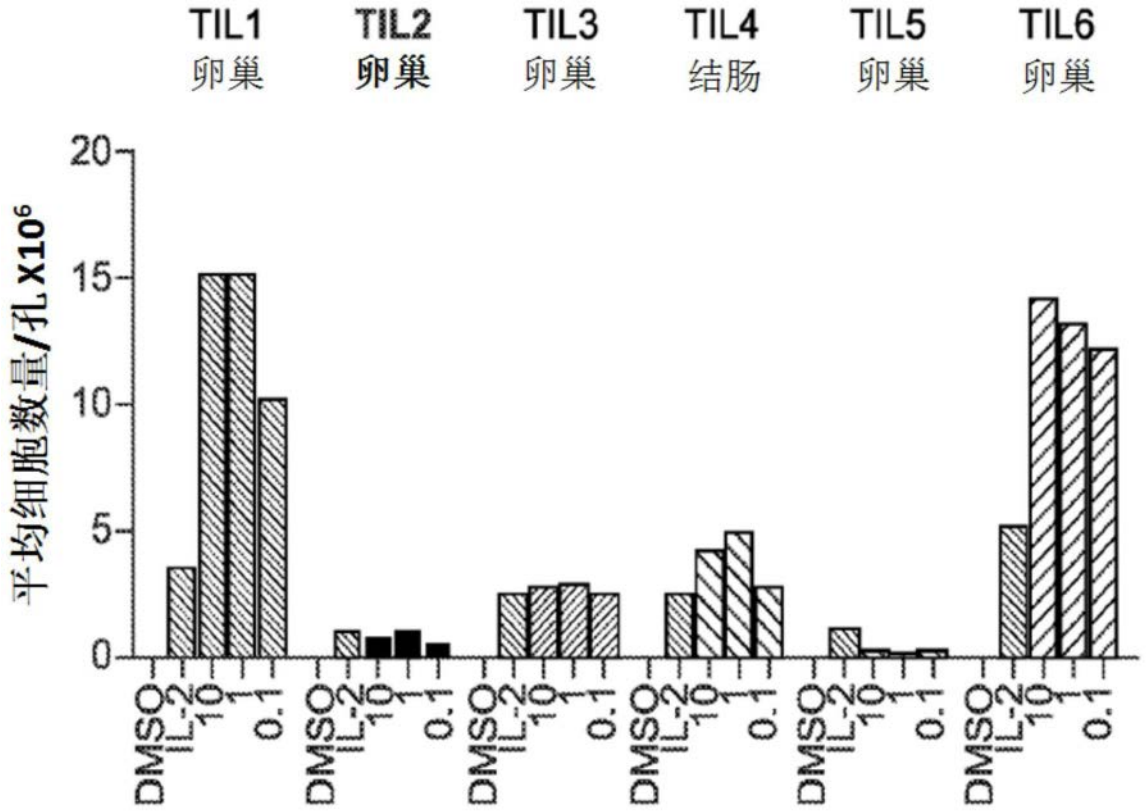

TIL1
卵巢
TIL2
卵巢
TIL3
卵巢
TIL4
结肠
TIL5
卵巢
TIL6
卵巢
平均细胞数量/孔 X10⁶
20
15
10
5
0
DMSO
IL-2
10
1
0.1

图1B

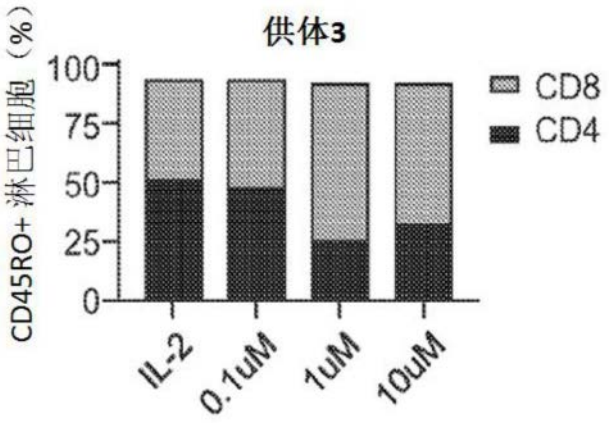

供体3
CD45RO+ 淋巴细胞（%）
100
75
50
25
0
CD8
CD4
IL-2
0.1uM
1uM
10uM

图2A

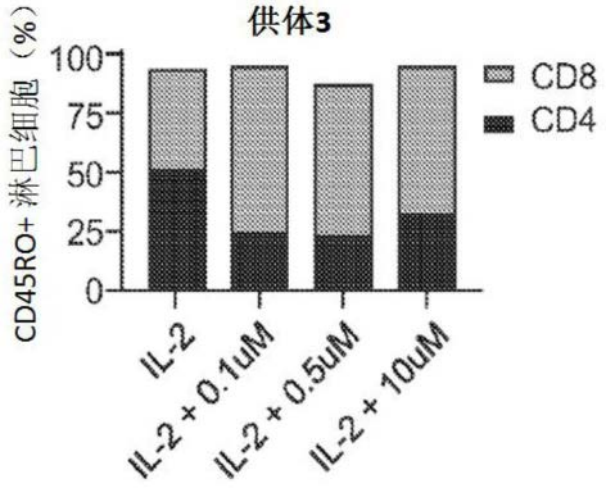

供体3
CD45RO+ 淋巴细胞（%）
100
75
50
25
0
CD8
CD4
IL-2
IL-2 + 0.1uM
IL-2 + 0.5uM
IL-2 + 10uM

图2B

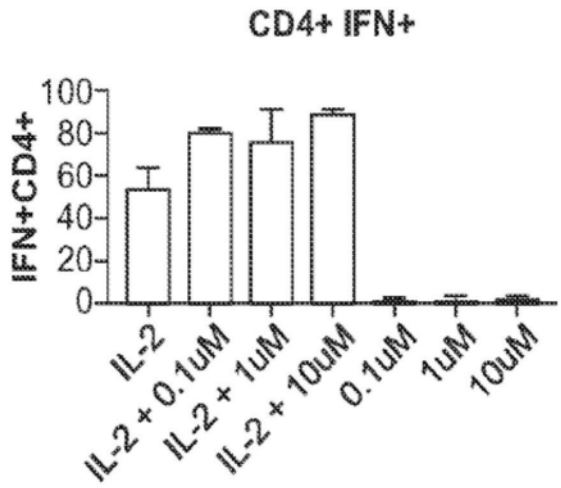

CD4+ IFN+
IFN+CD4+
100
80
60
40
20
0
IL-2
IL-2 + 0.1uM
IL-2 + 1uM
IL-2 + 10uM
0.1uM
1uM
10uM

图3A

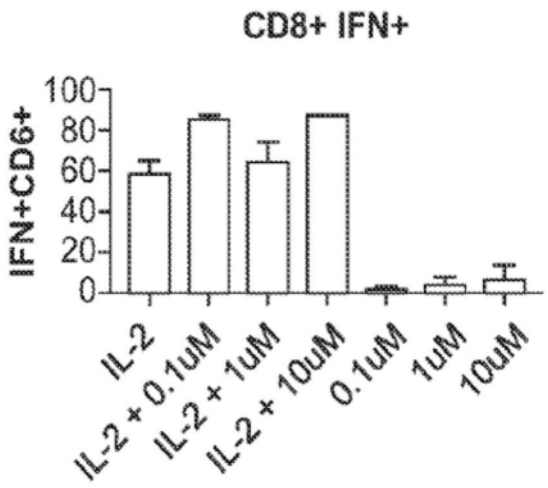

CD8+ IFN+
IFN+CD6+
100
80
60
40
20
0
IL-2
IL-2 + 0.1uM
IL-2 + 1uM
IL-2 + 10uM
0.1uM
1uM
10uM

图3B

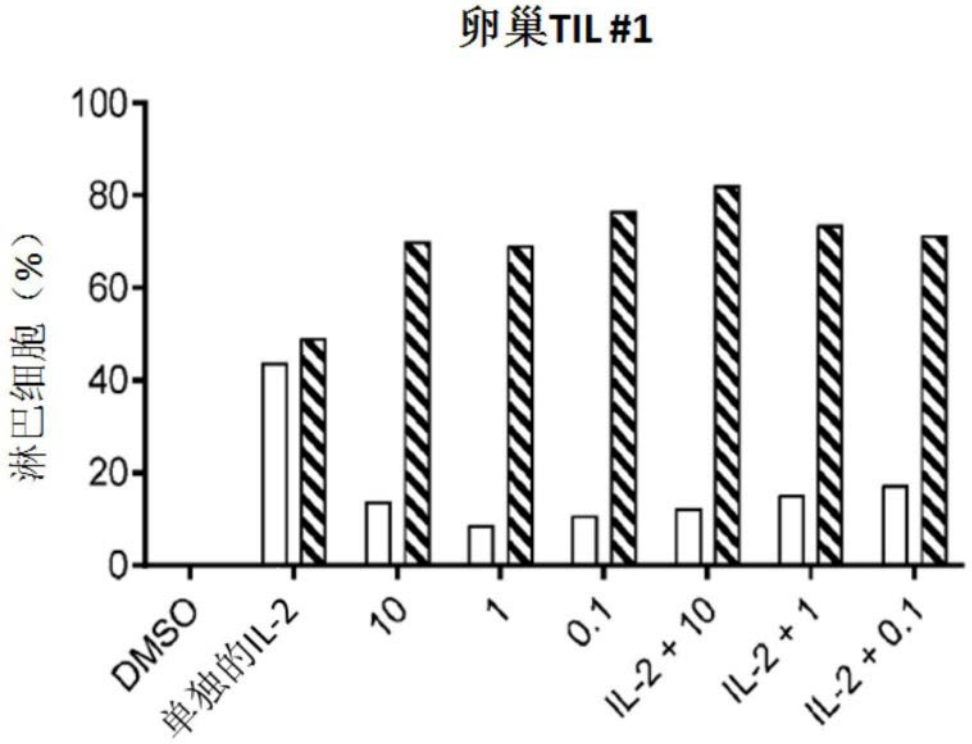

卵巢TIL #1
淋巴细胞（%）
100
80
60
40
20
0
DMSO
单独的IL-2
10
1
0.1
IL-2 + 10
IL-2 + 1
IL-2 + 0.1

图4A

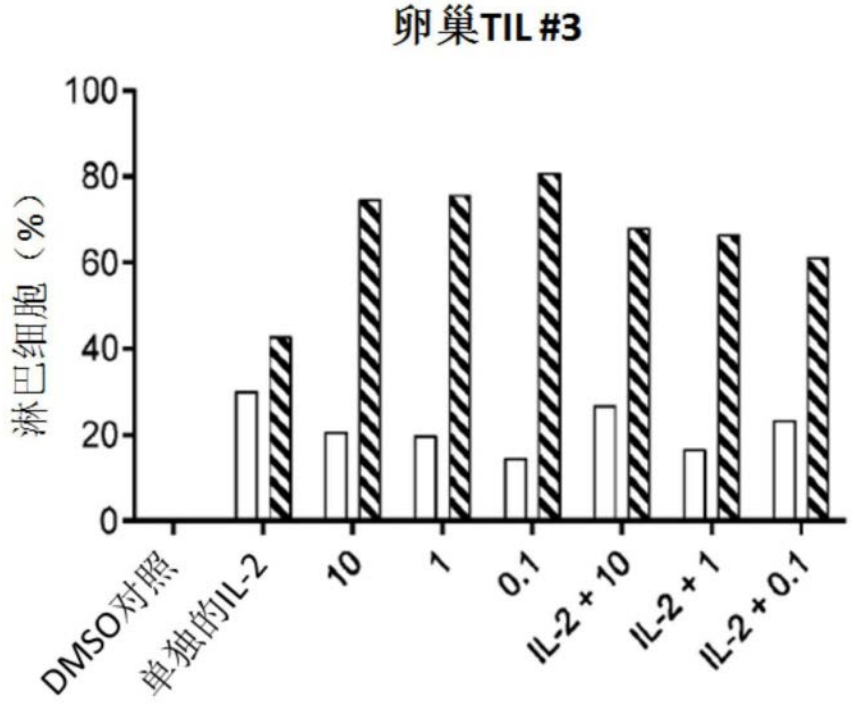

卵巢TIL #3
淋巴细胞（%）
100
80
60
40
20
0
DMSO对照
单独的IL-2
10
1
0.1
IL-2 + 10
IL-2 + 1
IL-2 + 0.1

图4B

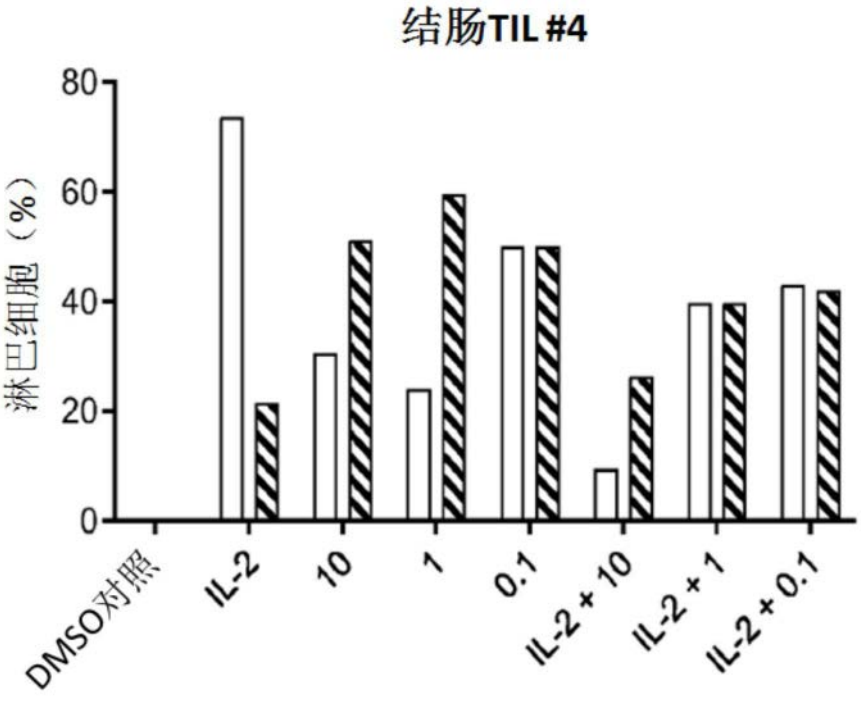

结肠TIL #4
淋巴细胞（%）
80
60
40
20
0
DMSO对照
IL-2
10
1
0.1
IL-2 + 10
IL-2 + 1
IL-2 + 0.1

图4C

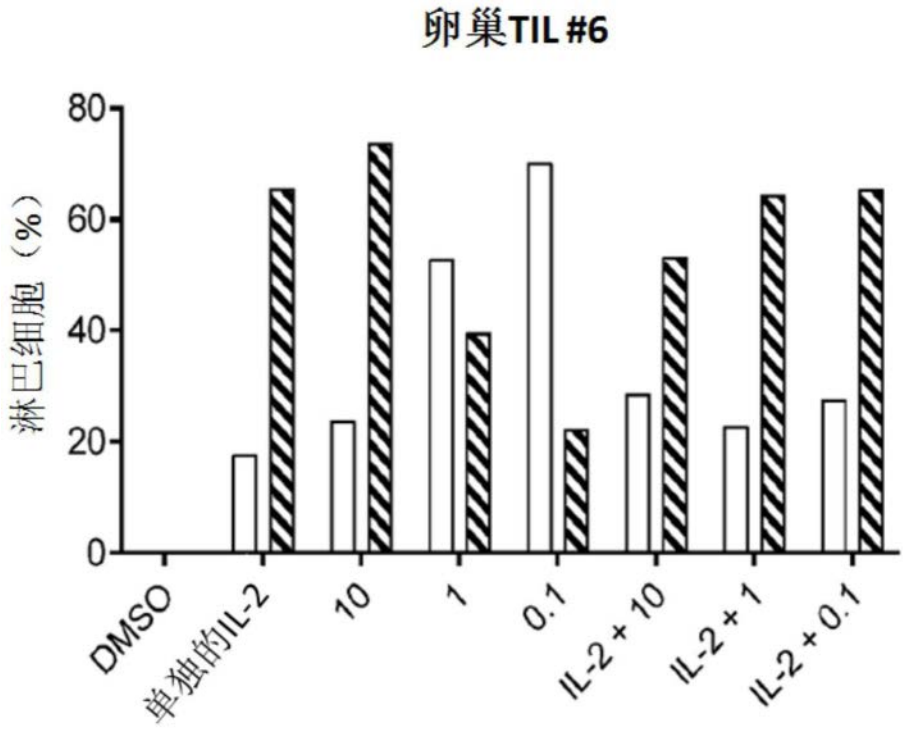

卵巢TIL #6
淋巴细胞（%）
80
60
40
20
0
DMSO
单独的IL-2
10
1
0.1
IL-2 + 10
IL-2 + 1
IL-2 + 0.1

图4D

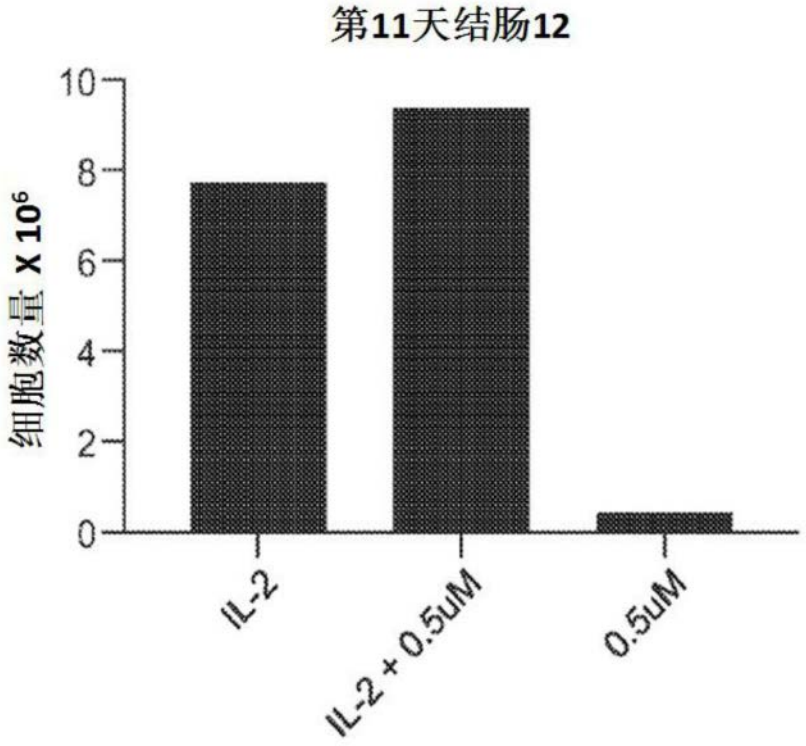

第11天结肠12
细胞数量 X 10⁶
10
8
6
4
2
0
IL-2
IL-2 + 0.5uM
0.5uM

图5A

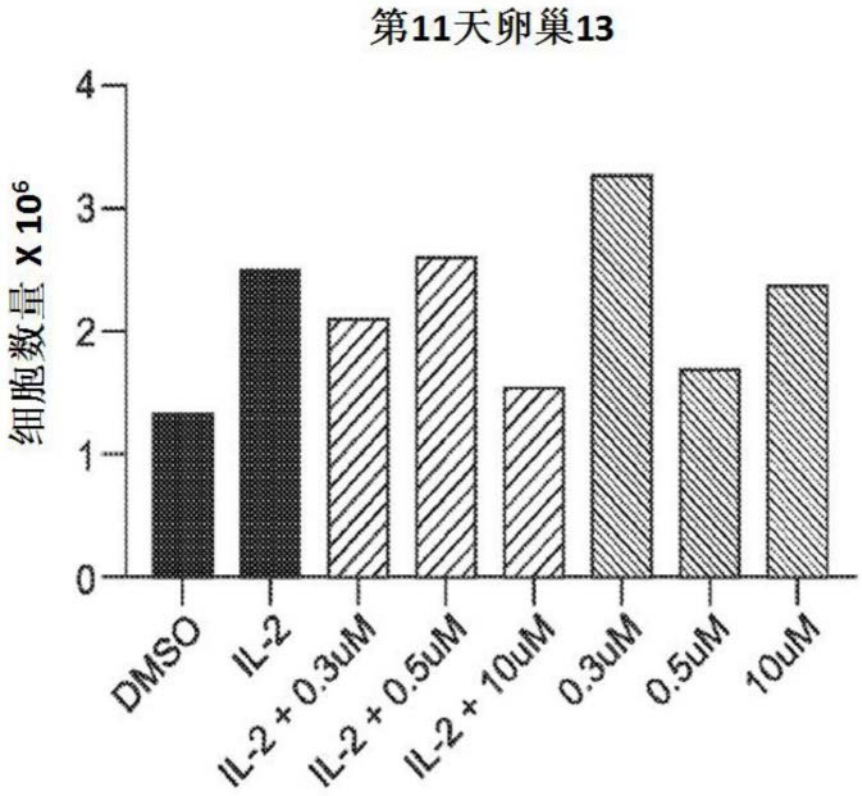

第11天卵巢13
细胞数量 X 10⁶
4
3
2
1
0
DMSO
IL-2
IL-2 + 0.3uM
IL-2 + 0.5uM
IL-2 + 10uM
0.3uM
0.5uM
10uM

图5B

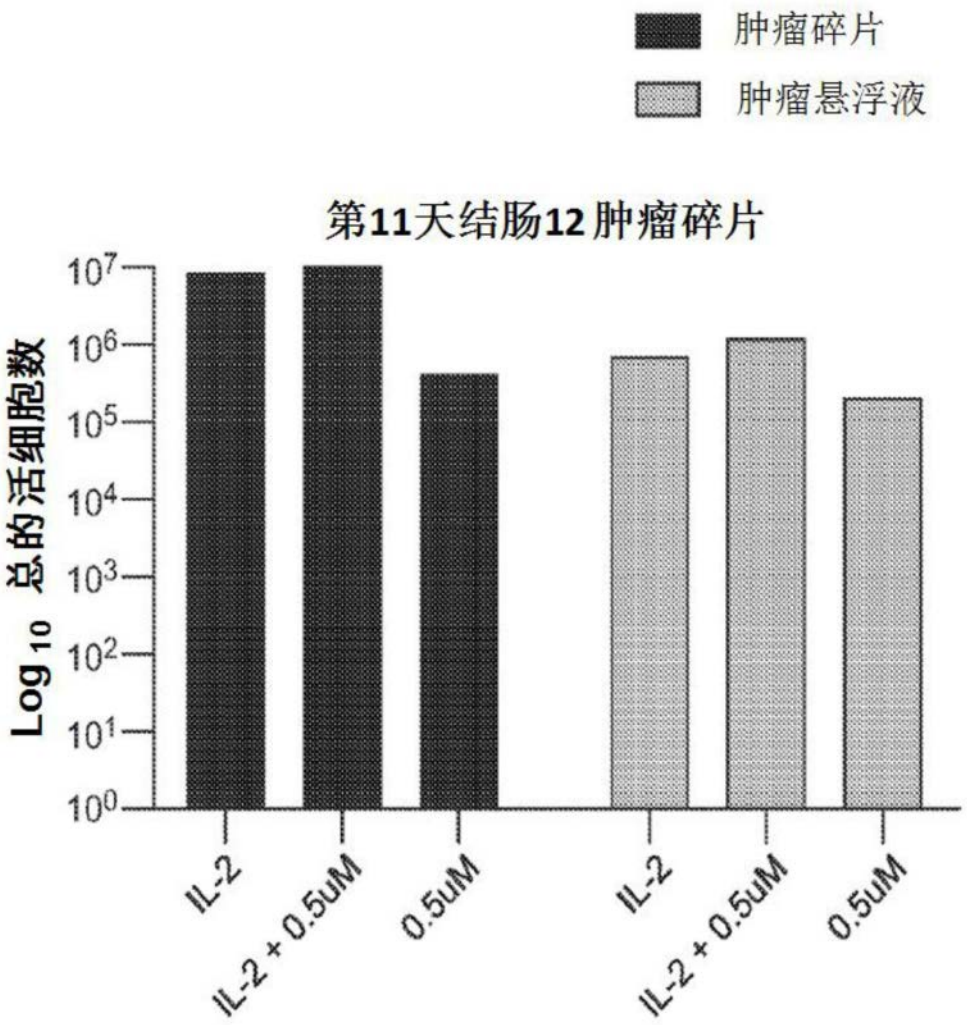

肿瘤碎片
肿瘤悬浮液
第11天结肠12肿瘤碎片
Log10 总的活细胞数
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
IL-2
IL-2 + 0.5uM
0.5uM
IL-2
IL-2 + 0.5uM
0.5uM

图6

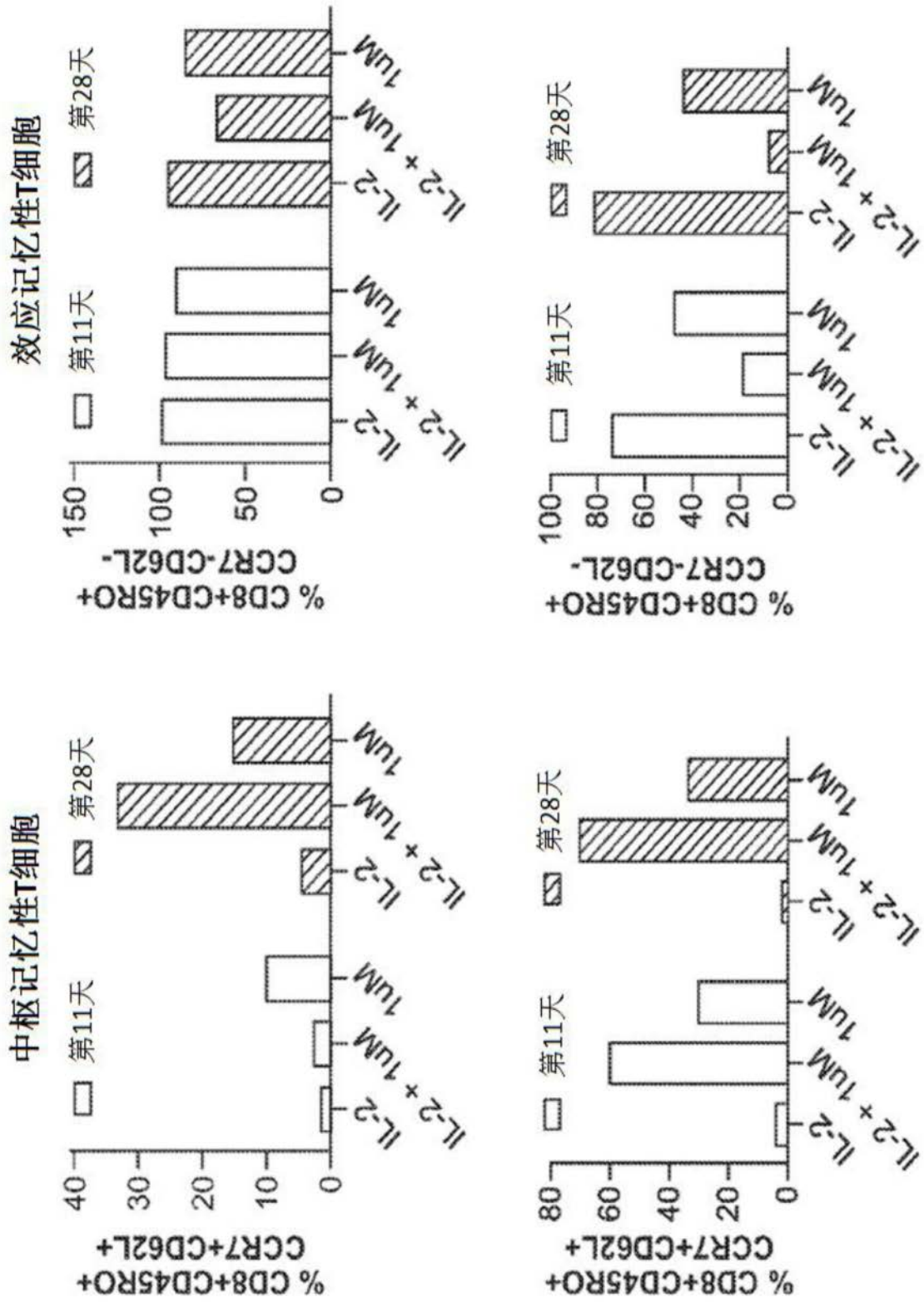

效应记忆性T细胞
% CD8+CD45RO+ CCR7-CD62L-
150
100
50
0
第11天
第28天
IL-2
IL-2 × 1uM
1uM
% CD8+CD45RO+ CCR7-CD62L-
100
80
60
40
20
0
第11天
第28天
IL-2
IL-2 × 1uM
1uM
中枢记忆性T细胞
% CD8+CD45RO+ CCR7+CD62L+
40
30
20
10
0
第11天
第28天
IL-2
IL-2 × 1uM
1uM
% CD8+CD45RO+ CCR7+CD62L+
80
60
40
20
0
第11天
第28天
IL-2
IL-2 × 1uM
1uM

图7

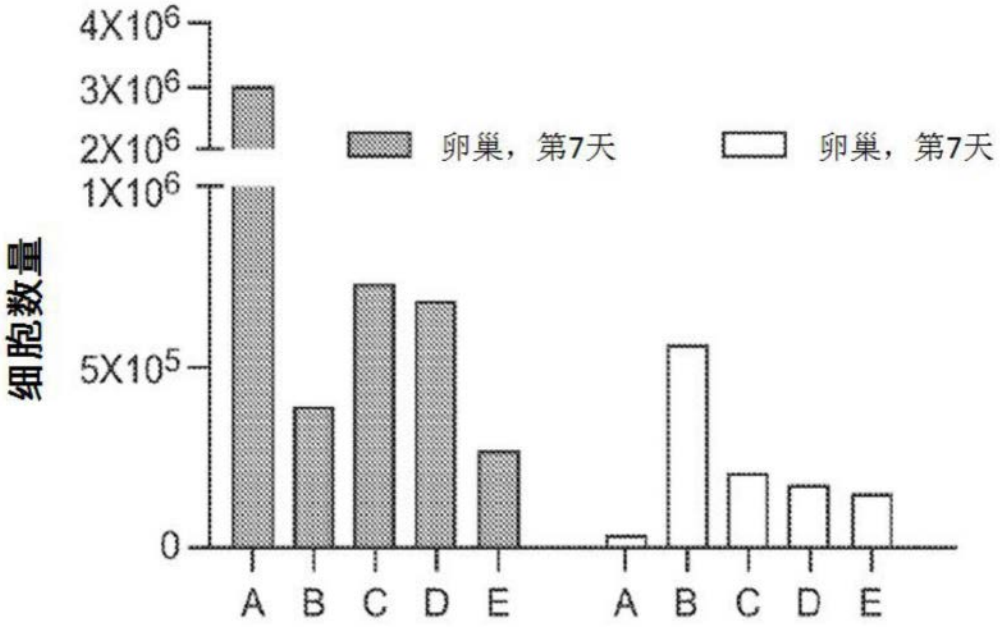

4X10^6
3X10^6
2X10^6
1X10^6
5X10^5
0
细胞数量
卵巢，第7天
卵巢，第7天
A B C D E
A B C D E

图8

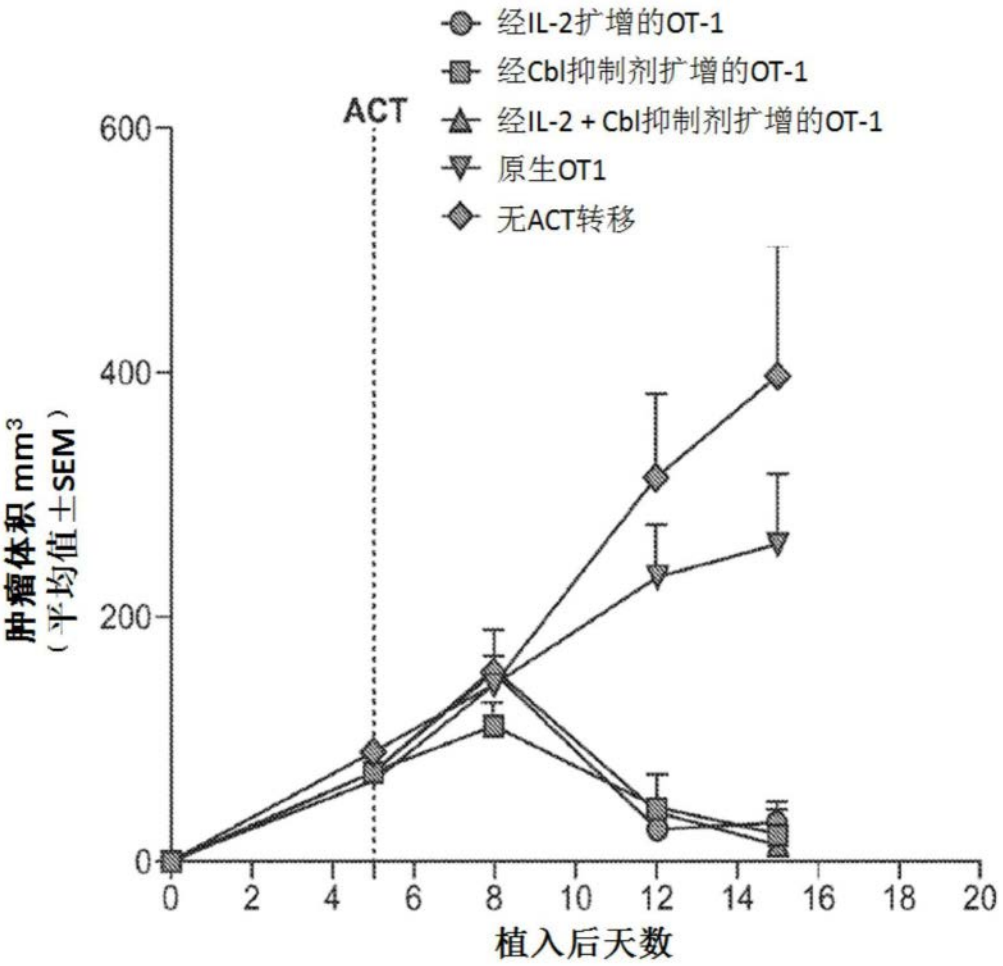

经IL-2扩增的OT-1
经Cbl抑制剂扩增的OT-1
经IL-2 + Cbl抑制剂扩增的OT-1
原生OT1
无ACT转移
ACT
600
400
200
0
肿瘤体积 mm3
（平均值±SEM）
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
植入后天数

图9

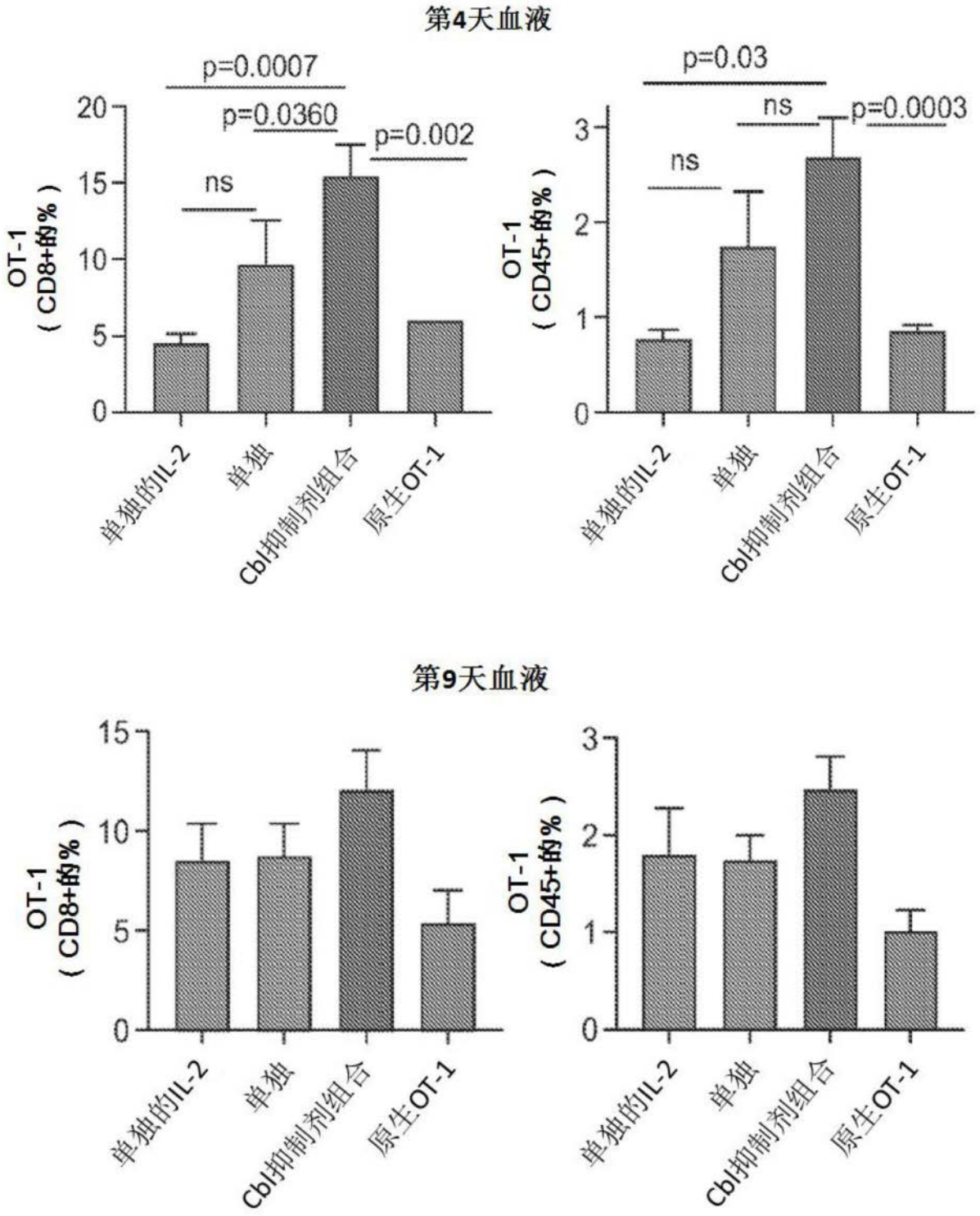

第4天血液
p=0.0007
p=0.0360
p=0.002
ns
OT-1
( CD8+的% )
20
15
10
5
0
单独的IL-2
单独
Cbl抑制剂组合
原生OT-1
p=0.03
ns
p=0.0003
ns
OT-1
( CD45+的% )
3
2
1
0
单独的IL-2
单独
Cbl抑制剂组合
原生OT-1
第9天血液
OT-1
( CD8+的% )
15
10
5
0
单独的IL-2
单独
Cbl抑制剂组合
原生OT-1
OT-1
( CD45+的% )
3
2
1
0
单独的IL-2
单独
Cbl抑制剂组合
原生OT-1

图10

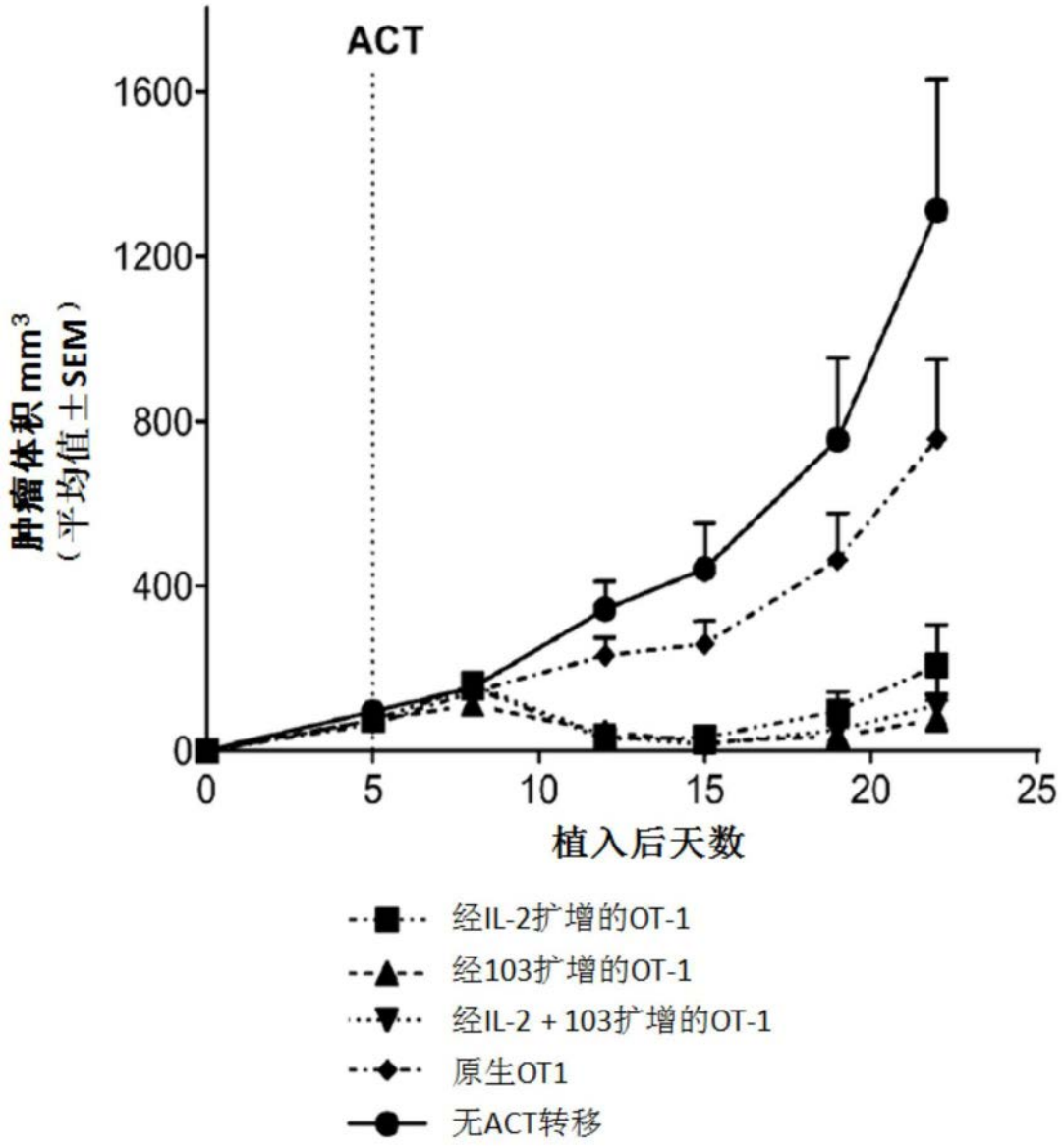

ACT
1600
1200
800
400
0
肿瘤体积 mm³
（平均值±SEM）
0
5
10
15
20
25
植入后天数
经IL-2扩增的OT-1
经103扩增的OT-1
经IL-2 + 103扩增的OT-1
原生OT1
无ACT转移

图11A

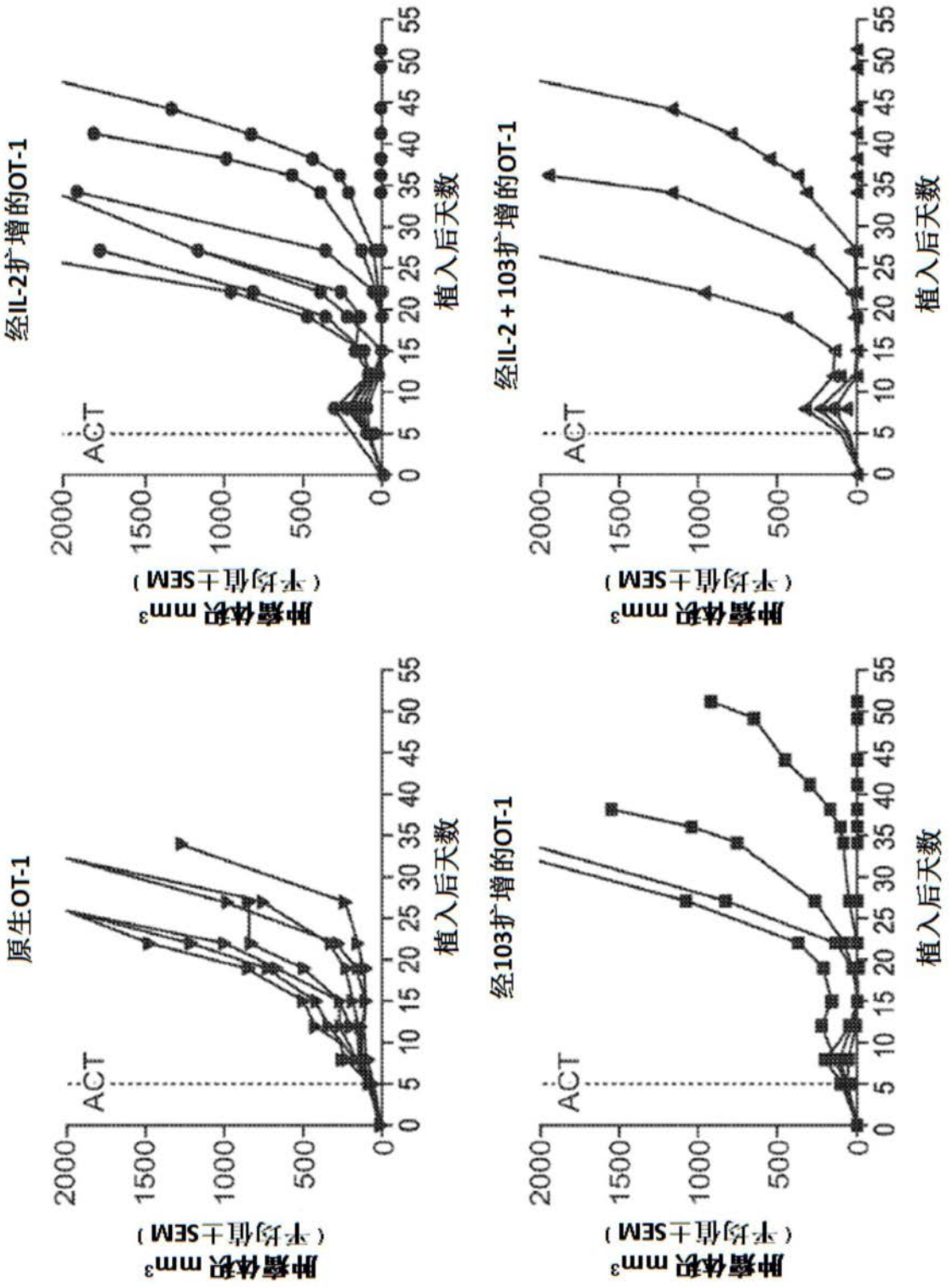

经IL-2扩增的OT-1
经IL-2 + 103扩增的OT-1
原生OT-1
经103扩增的OT-1
肿瘤体积 mm3
（平均值±SEM）
植入后天数
ACT
0
500
1000
1500
2000
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55

图11B

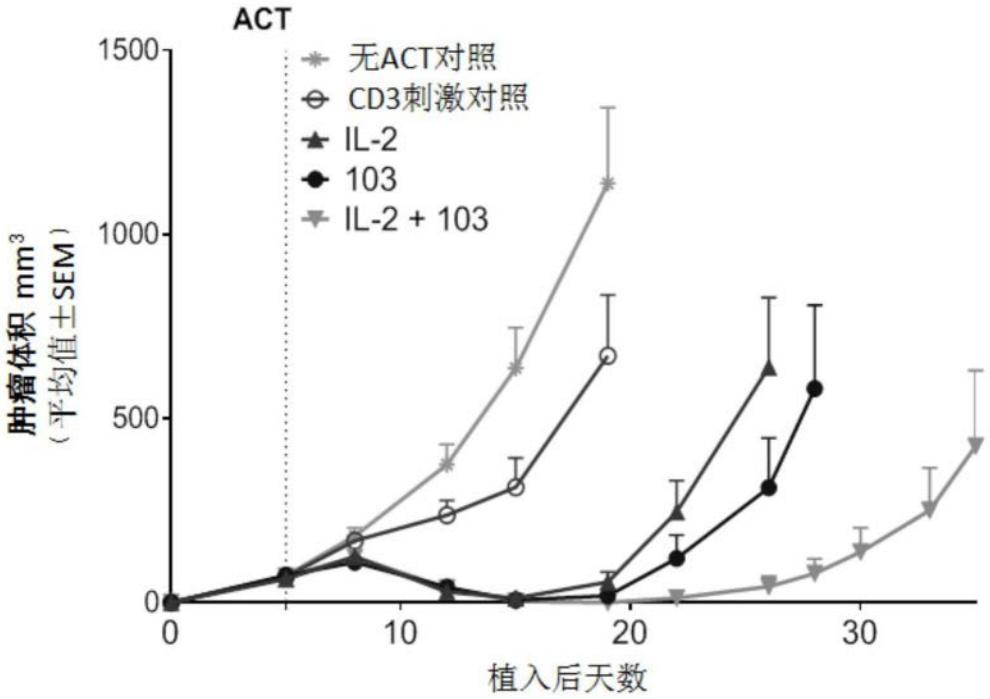

ACT
无ACT对照
CD3刺激对照
IL-2
103
IL-2 + 103
肿瘤体积 mm³
（平均值±SEM）
1500
1000
500
0
0
10
20
30
植入后天数

图12A

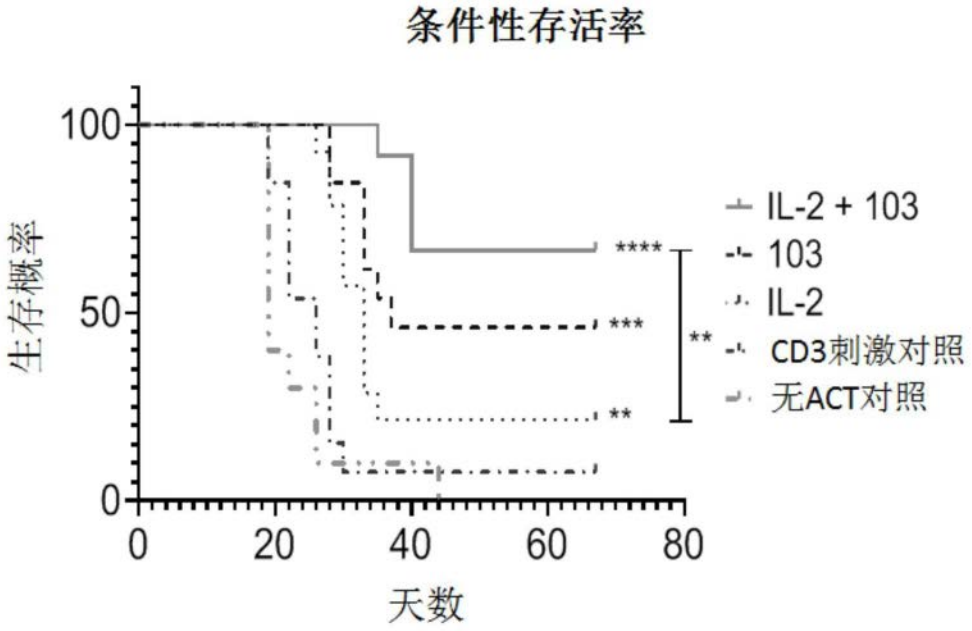

条件性存活率
生存概率
100
50
0
0
20
40
60
80
天数
IL-2 + 103
103
IL-2
CD3刺激对照
无ACT对照
****
***
**
**

图12B

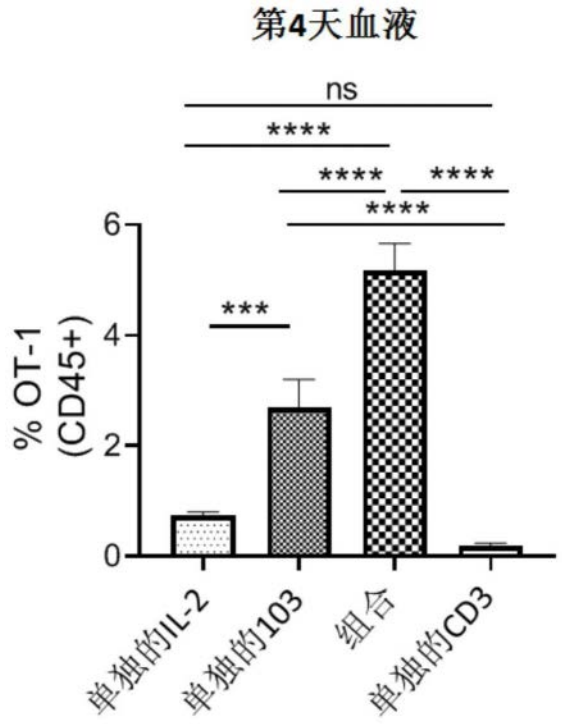

第4天血液
ns
****
****
****
****
***
% OT-1 (CD45+)
6
4
2
0
单独的IL-2
单独的103
组合
单独的CD3

图13A

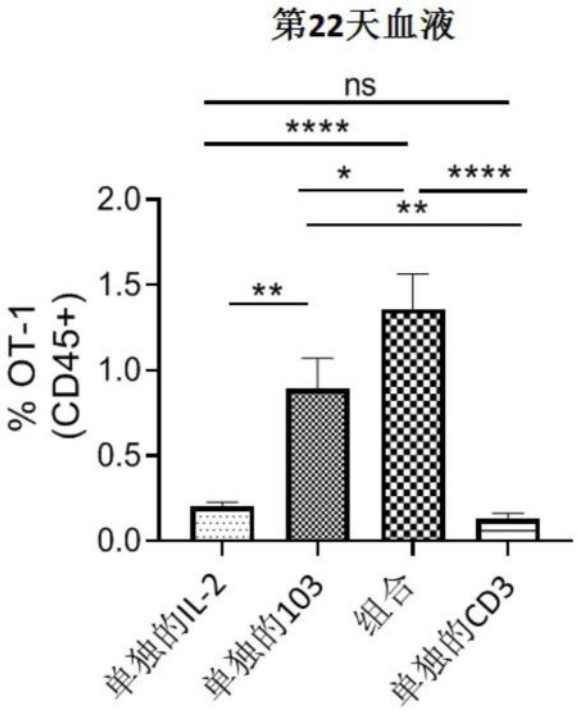

第22天血液
ns
****
*
****
**
**
% OT-1 (CD45+)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
单独的IL-2
单独的103
组合
单独的CD3

图13B

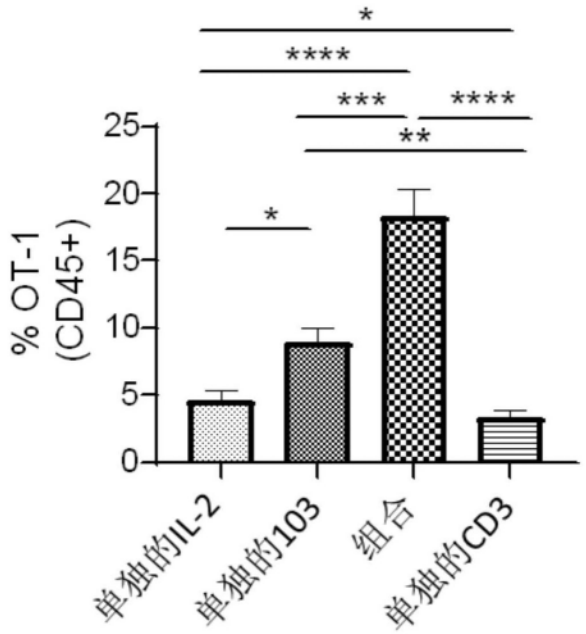

*
****
***
****
**
*
% OT-1
(CD45+)
25
20
15
10
5
0
单独的IL-2
单独的103
组合
单独的CD3

图14A

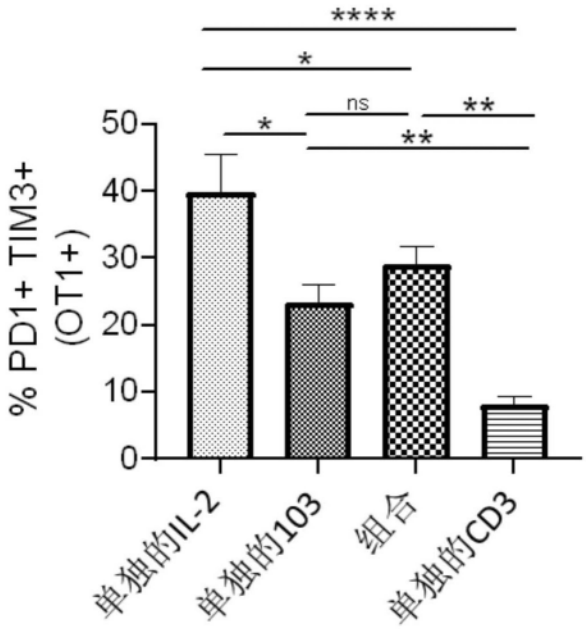

****
*
ns
**
*
**
% PD1+ TIM3+
(OT1+)
50
40
30
20
10
0
单独的IL-2
单独的103
组合
单独的CD3

图14B

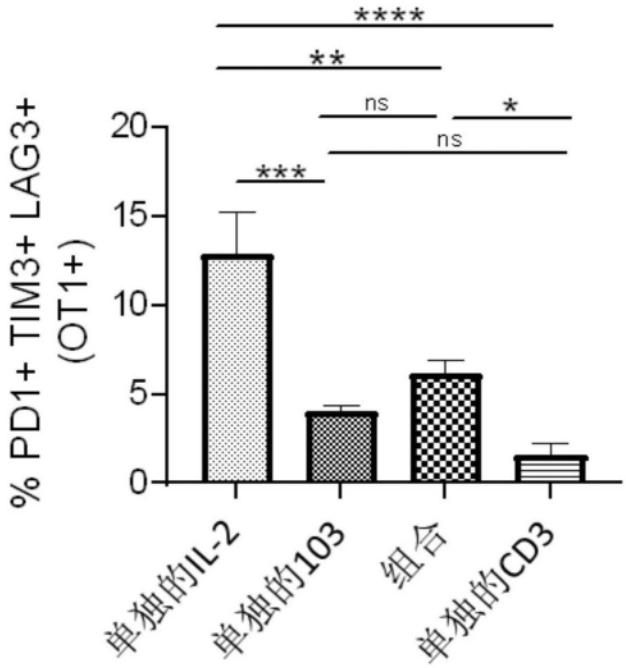

****
**
ns
*
ns
***
% PD1+ TIM3+ LAG3+
(OT1+)
20
15
10
5
0
单独的IL-2
单独的103
组合
单独的CD3

图14C

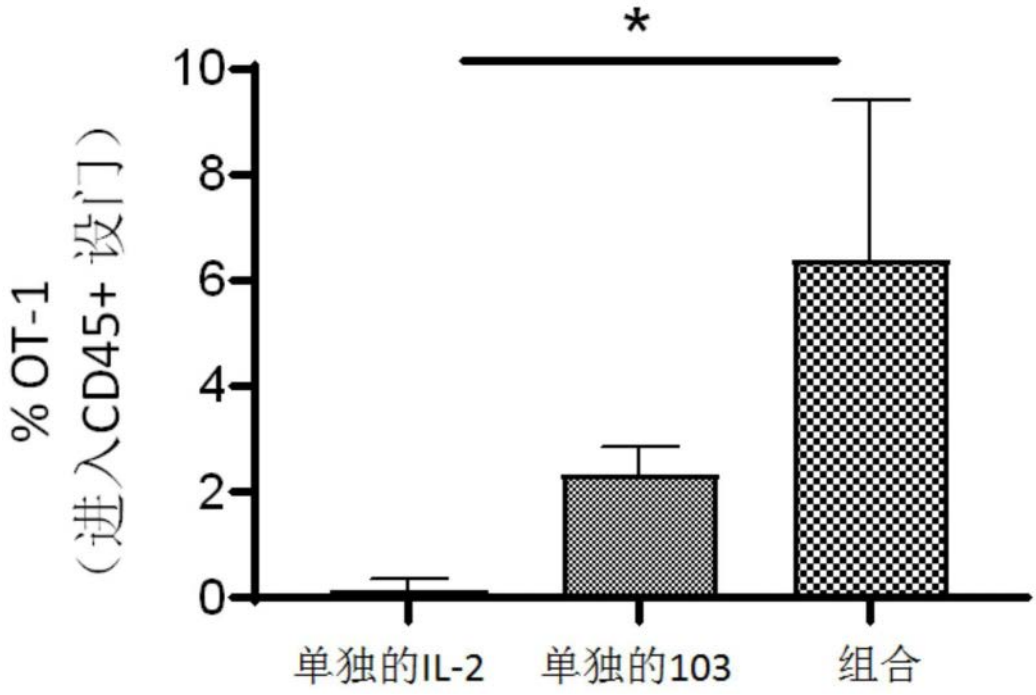

*
% OT-1
（进入CD45+设门）
10
8
6
4
2
0
单独的IL-2
单独的103
组合

图15

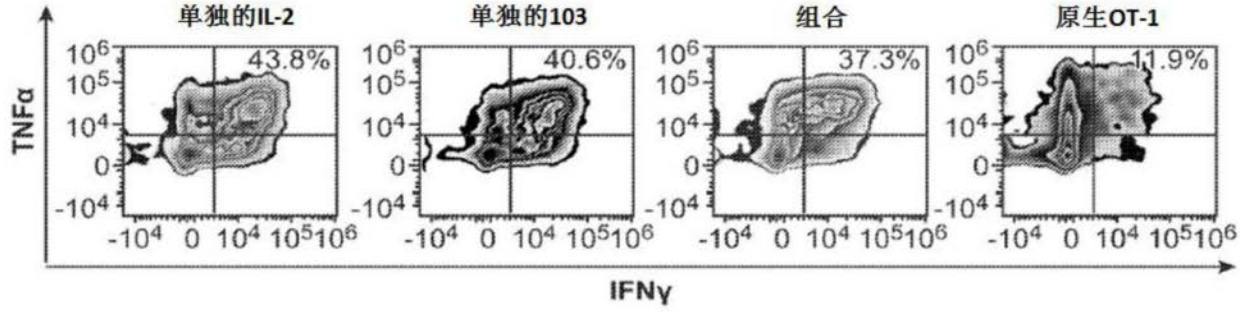



图16A

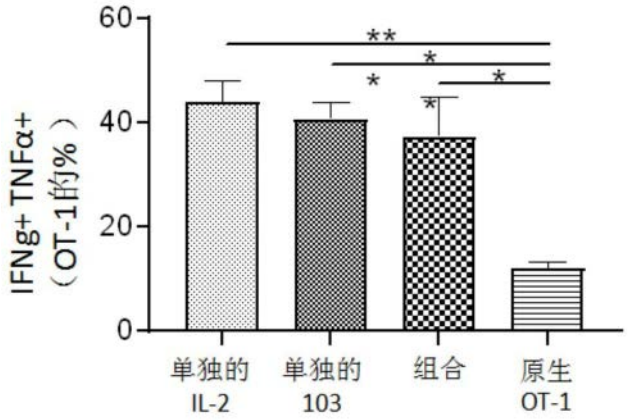



图16B

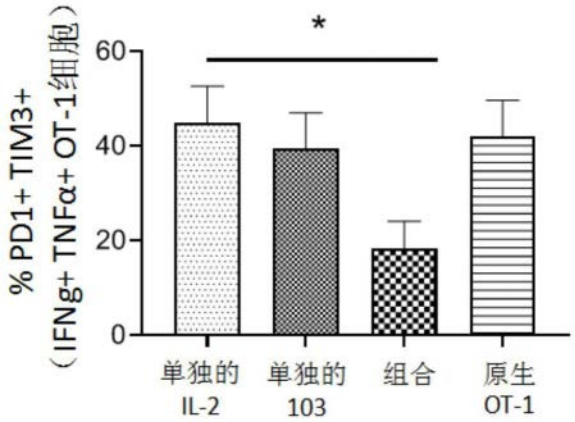



图16C

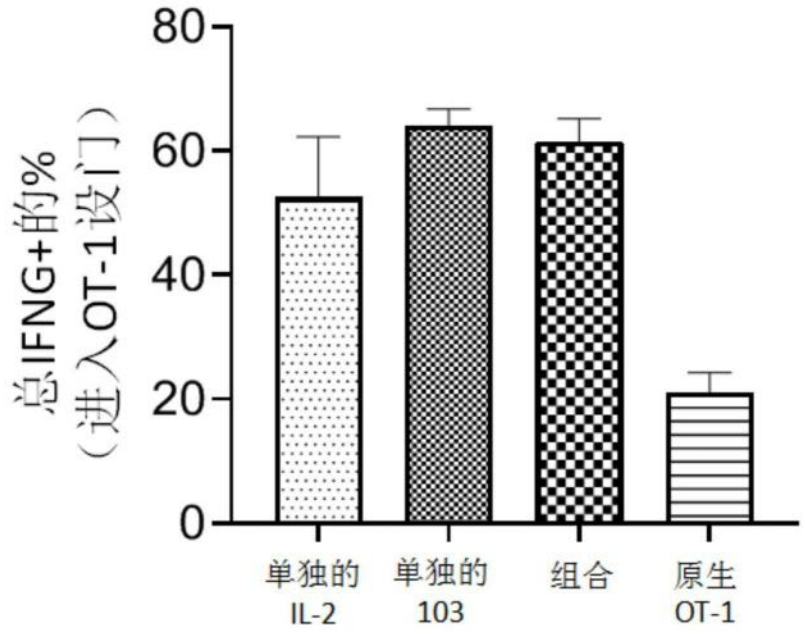

总IFNG+的%
（进入OT-1设门）
80
60
40
20
0
单独的
IL-2
单独的
103
组合
原生
OT-1

图17A

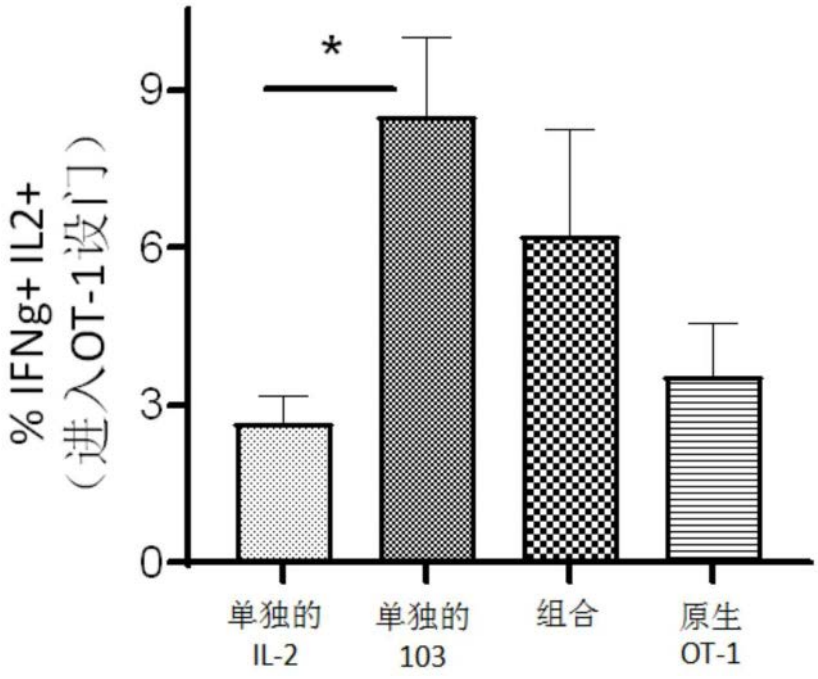

% IFNg+ IL2+
（进入OT-1设门）
*
9
6
3
0
单独的
IL-2
单独的
103
组合
原生
OT-1

图17B

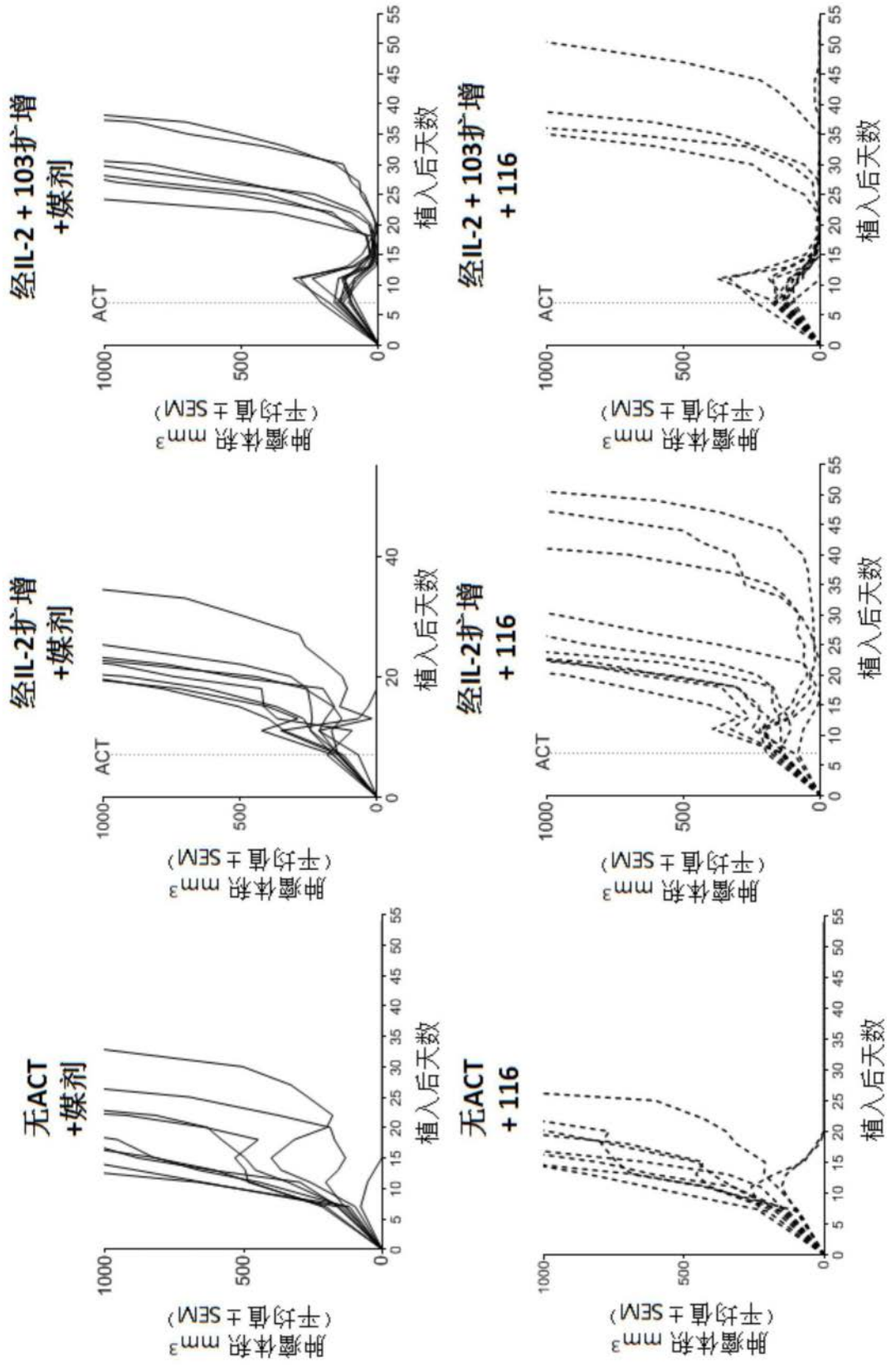

经IL-2 + 103扩增
+煤剂
经IL-2 + 103扩增
+ 116
经IL-2扩增
+煤剂
经IL-2扩增
+ 116
无ACT
+煤剂
无ACT
+ 116
ACT
异源体积 mm³
（平均值 ± SEM）
植入后天数

图18

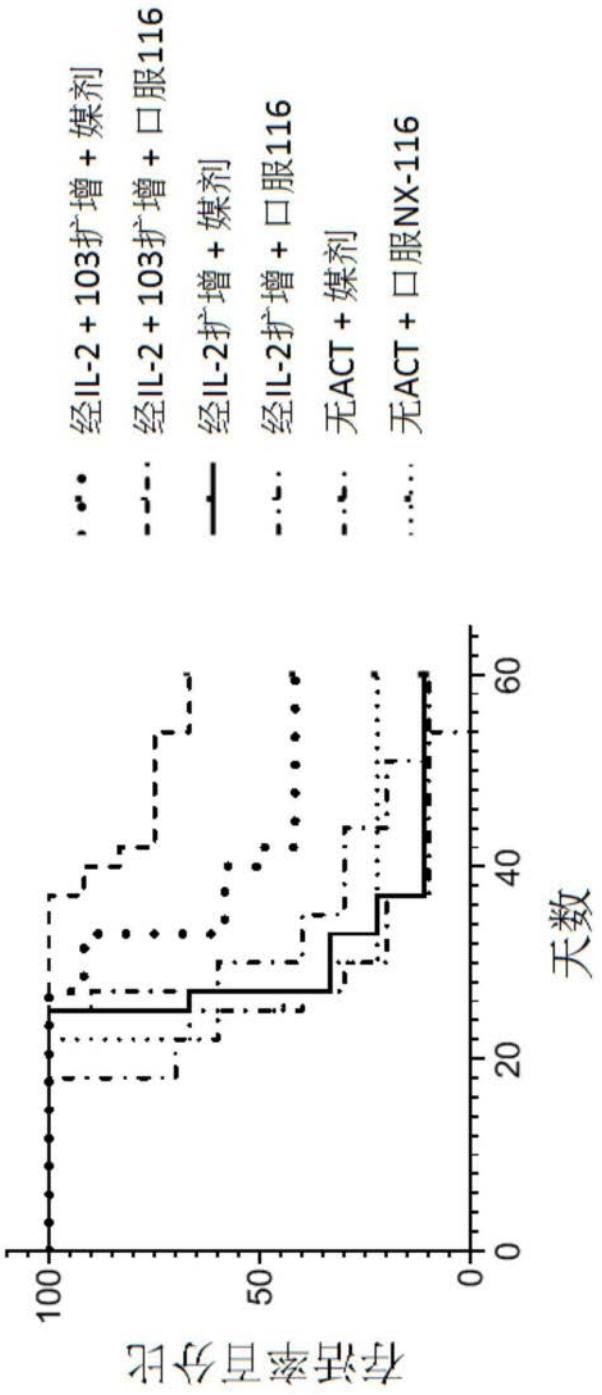

经IL-2 + 103扩增 + 媒剂
经IL-2 + 103扩增 + 口服116
经IL-2扩增 + 媒剂
经IL-2扩增 + 口服116
无ACT + 媒剂
无ACT + 口服NX-116
存活率百分比
100
50
0
0
20
40
60
天数

图19

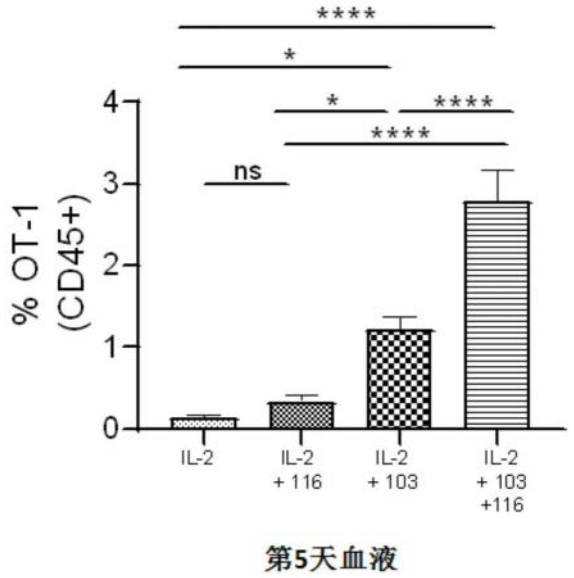

****
*
*
****
****
ns
% OT-1
(CD45+)
4
3
2
1
0
IL-2
IL-2
+ 116
IL-2
+ 103
IL-2
+ 103
+116
第5天血液

图20A

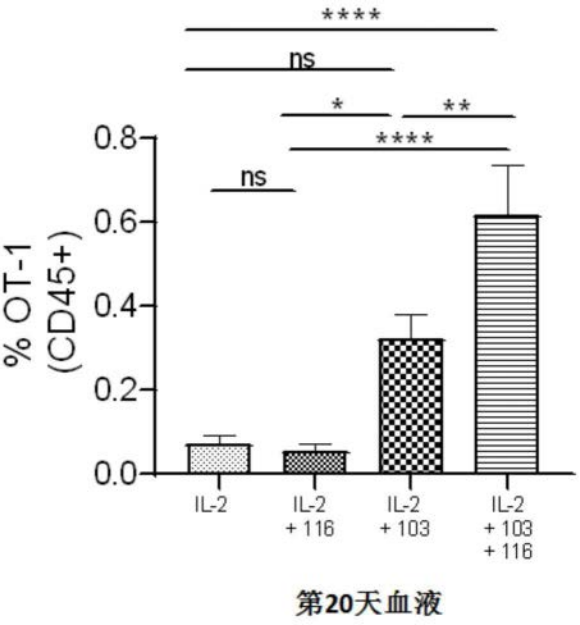

****
ns
*
**
****
ns
% OT-1
(CD45+)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
IL-2
IL-2
+ 116
IL-2
+ 103
IL-2
+ 103
+ 116
第20天血液

图20B

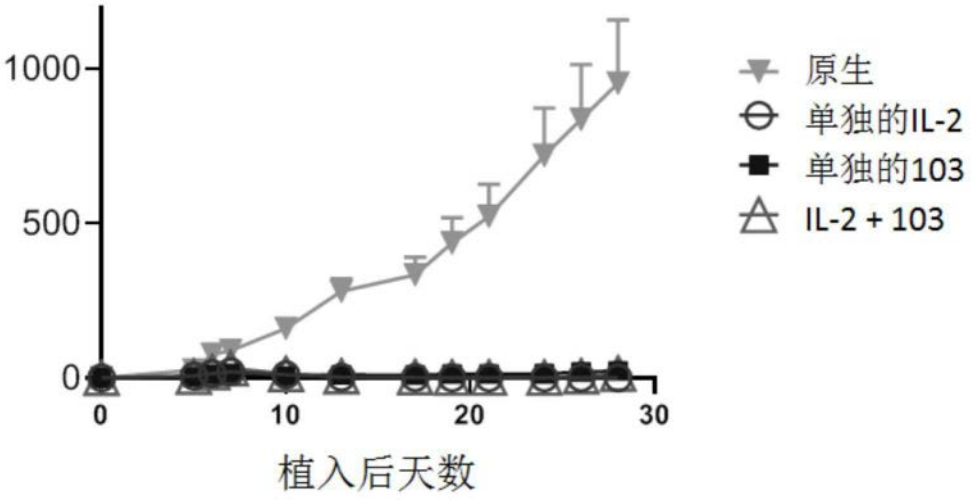

1000
500
0
0
10
20
30
植入后天数
原生
单独的IL-2
单独的103
IL-2 + 103

图21

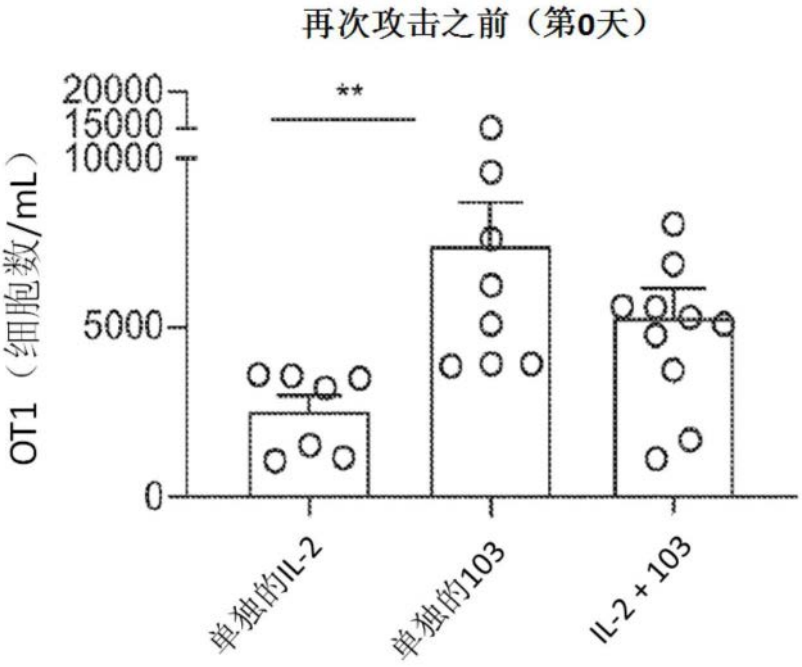

再次攻击之前（第0天）
**
20000
15000
10000
5000
0
OT1（细胞数/mL）
单独的IL-2
单独的103
IL-2 + 103

图22A

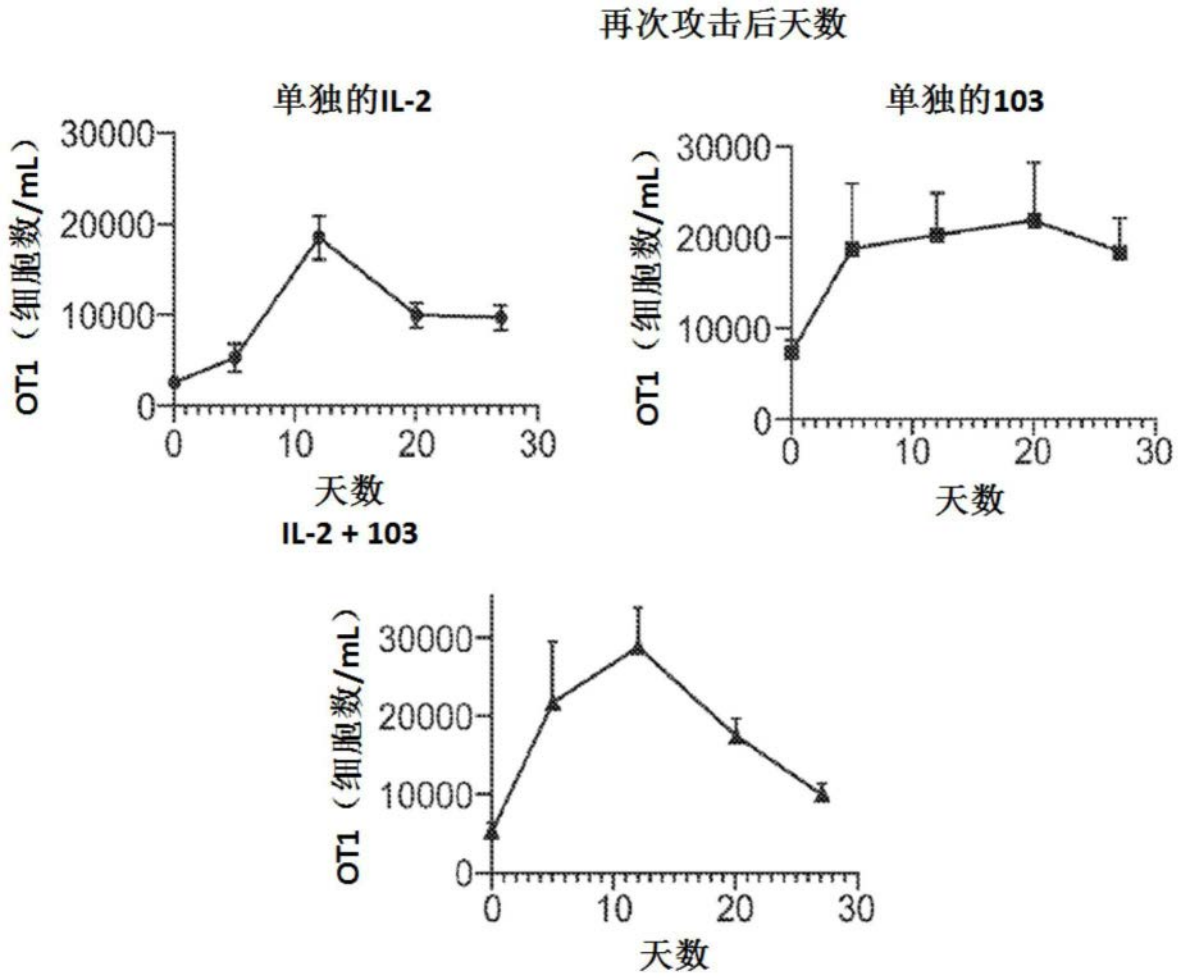

再次攻击后天数
单独的IL-2
单独的103
IL-2 + 103
OT1（细胞数/mL）
天数
30000
20000
10000
0
0
10
20
30

图22B

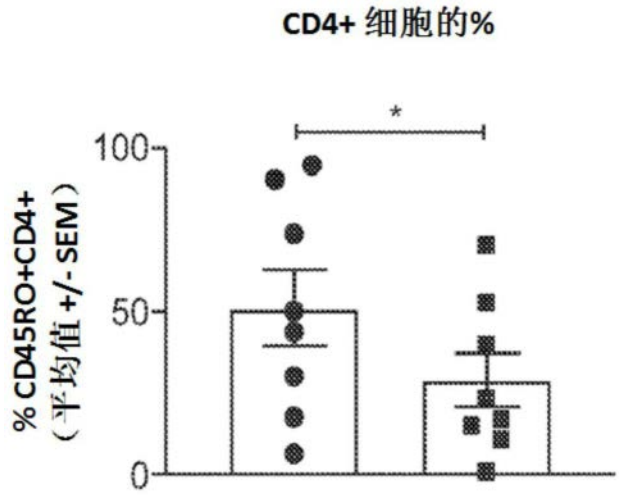

CD4+ 细胞的%
% CD45RO+CD4+
（平均值 +/- SEM）
*
100
50
0

图23A

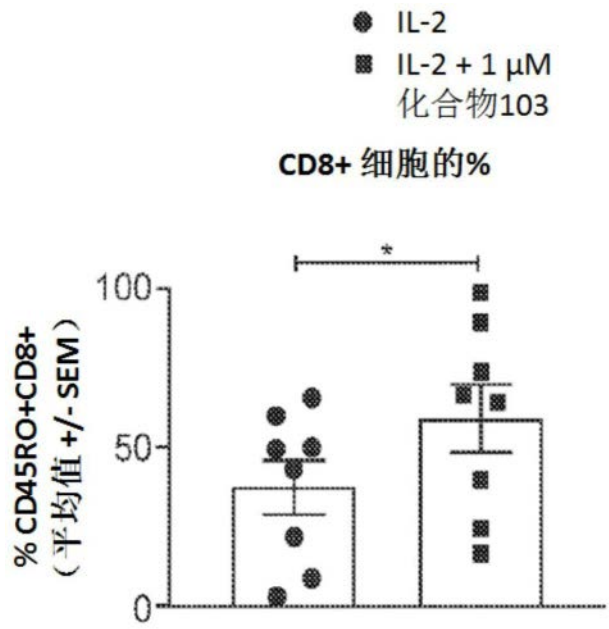

IL-2
IL-2 + 1 μM
化合物103
CD8+ 细胞的%
% CD45RO+CD8+
（平均值 +/- SEM）
100
50
0
*

图23B

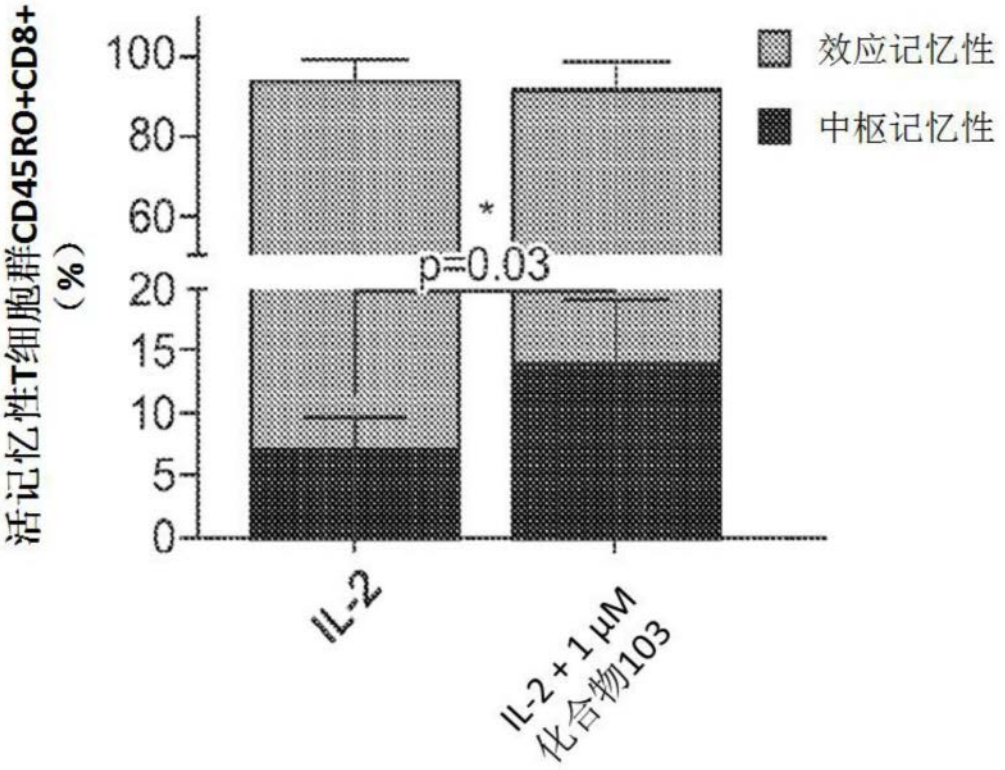

活记忆性T细胞群CD45RO+CD8+
（%）
100
80
60
20
15
10
5
0
*
p=0.03
效应记忆性
中枢记忆性
IL-2
IL-2 + 1 μM
化合物103

图24

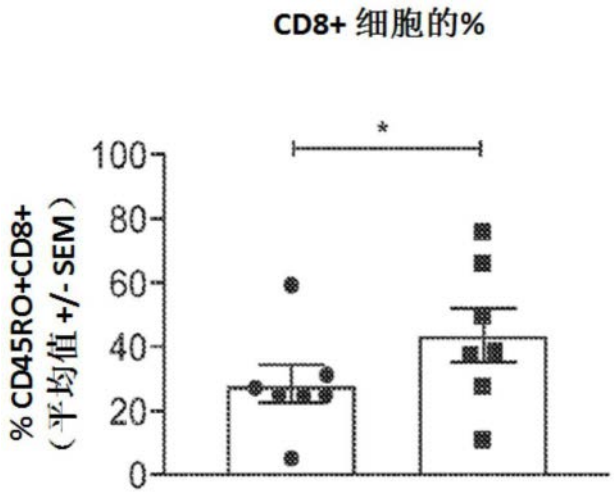

CD8+ 细胞的%
*
100
80
60
40
20
0
% CD45RO+CD8+
（平均值 +/- SEM）

图25A

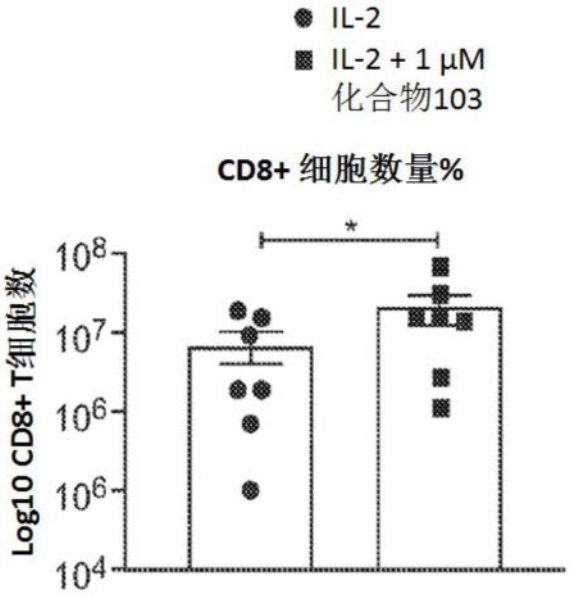

IL-2
IL-2 + 1 μM
化合物103
CD8+ 细胞数量%
*
$10^8$
$10^7$
$10^6$
$10^6$
$10^4$
Log10 CD8+ T细胞数

图25B

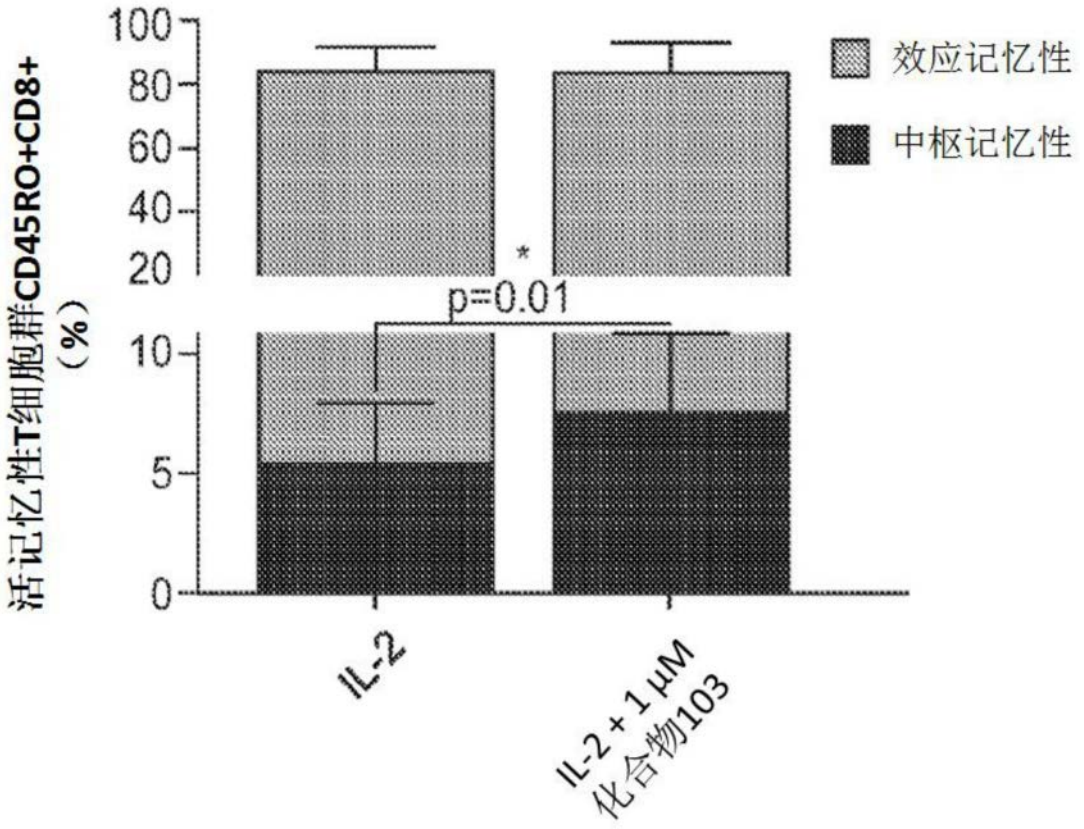

活记忆性T细胞群CD45RO+CD8+（%）
100
80
60
40
20
10
5
0
*
p=0.01
效应记忆性
中枢记忆性
IL-2
IL-2 + 1 μM 化合物103

图26

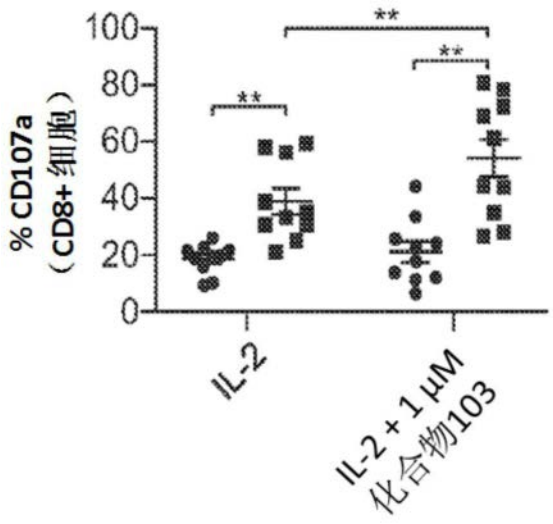

% CD107a（CD8+ 细胞）
100
80
60
40
20
0
**
**
**
IL-2
IL-2 + 1 μM 化合物103

图27A

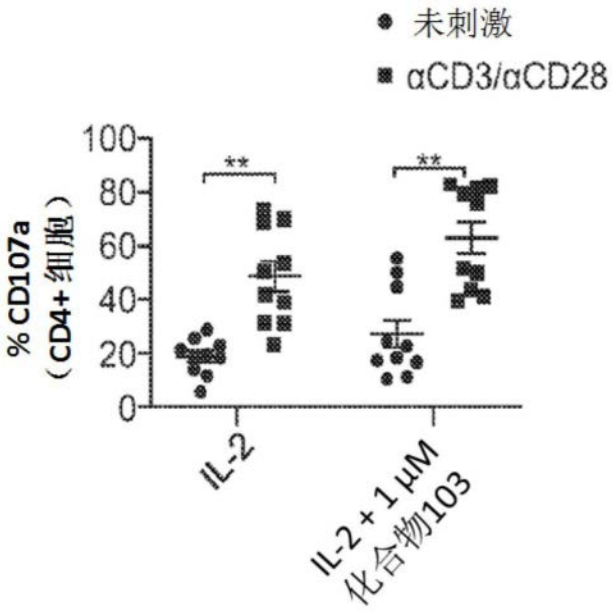

未刺激
αCD3/αCD28
% CD107a
（CD4+细胞）
100
80
60
40
20
0
**
**
IL-2
IL-2 + 1 μM
化合物103

图27B

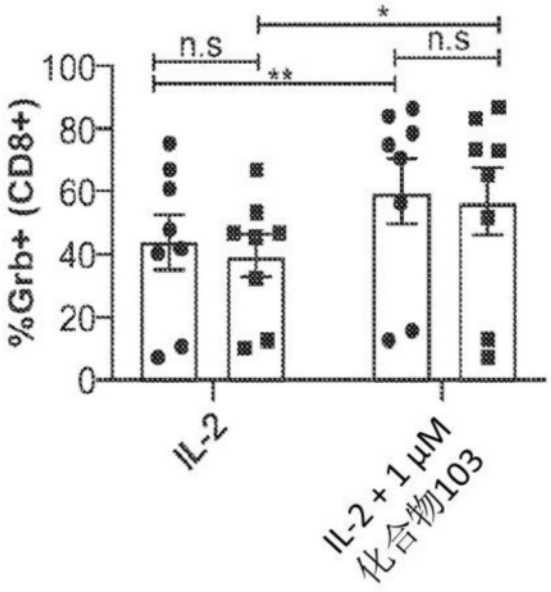

%Grb+ (CD8+)
100
80
60
40
20
0
n.s
**
*
n.s
IL-2
IL-2 + 1 μM
化合物103

图28A

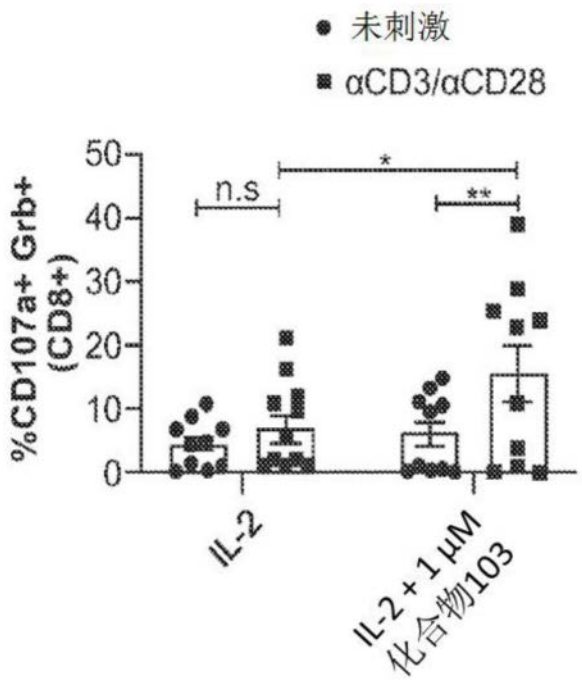

未刺激
αCD3/αCD28
%CD107a+ Grb+ (CD8+)
50
40
30
20
10
0
n.s
*
**
IL-2
IL-2 + 1 μM 化合物103

图28B

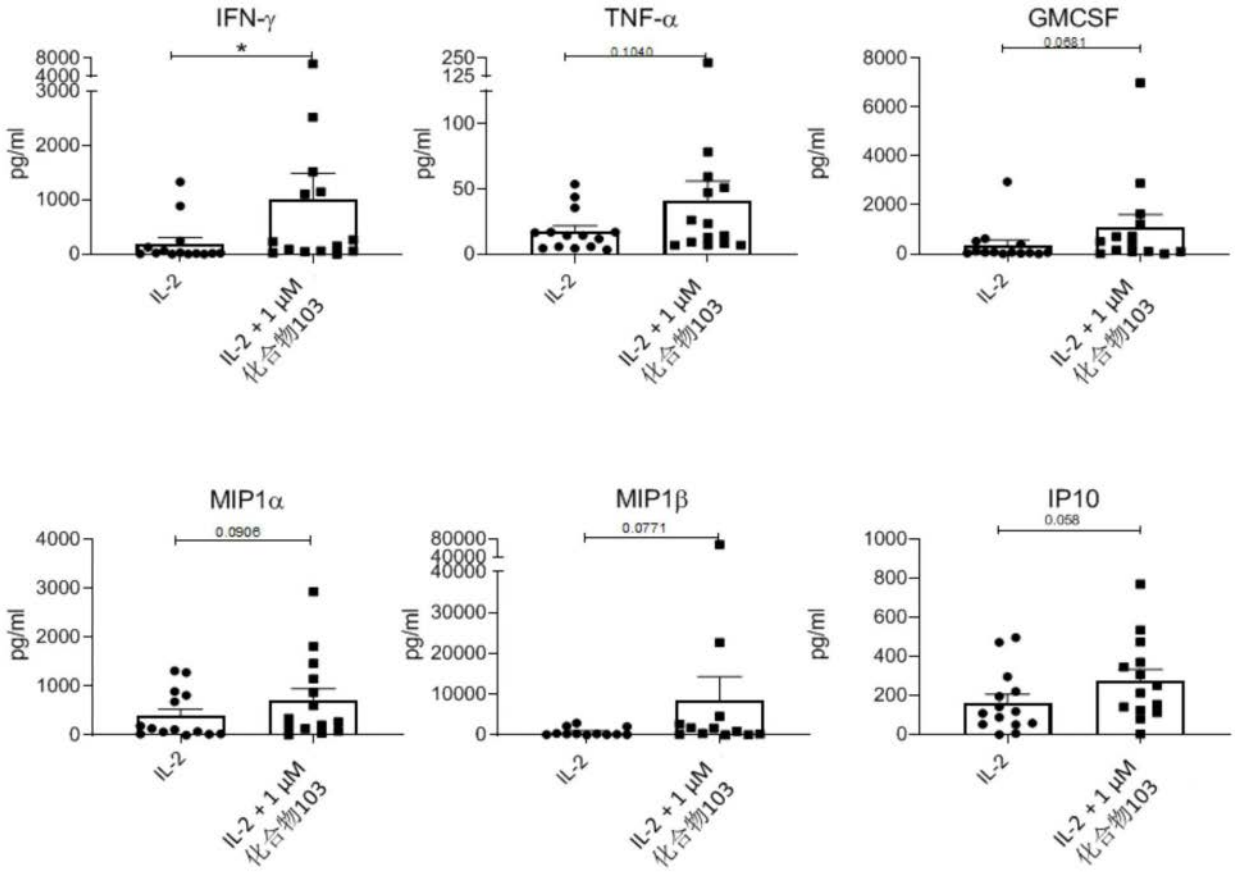

IFN-γ
TNF-α
GMCSF
MIP1α
MIP1β
IP10
pg/ml
IL-2
IL-2 + 1 μM 化合物103
0.1040
0.0681
0.0906
0.0771
0.058

图29

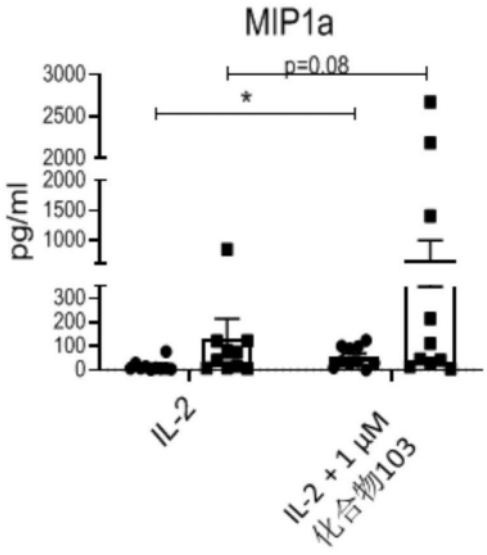

MIP1a
p=0.08
*
3000
2500
2000
2000
1500
1000
300
200
100
0
pg/ml
IL-2
IL-2 + 1 μM
化合物103

图30A

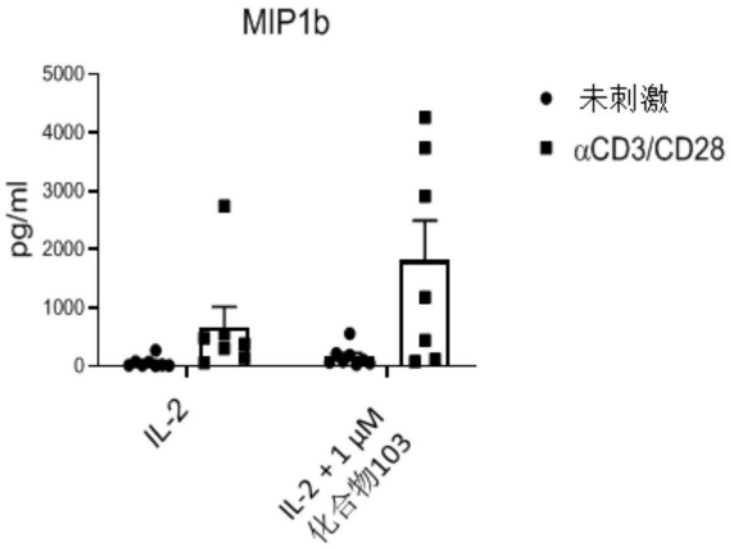

MIP1b
5000
4000
3000
2000
1000
0
pg/ml
未刺激
αCD3/CD28
IL-2
IL-2 + 1 μM
化合物103

图30B

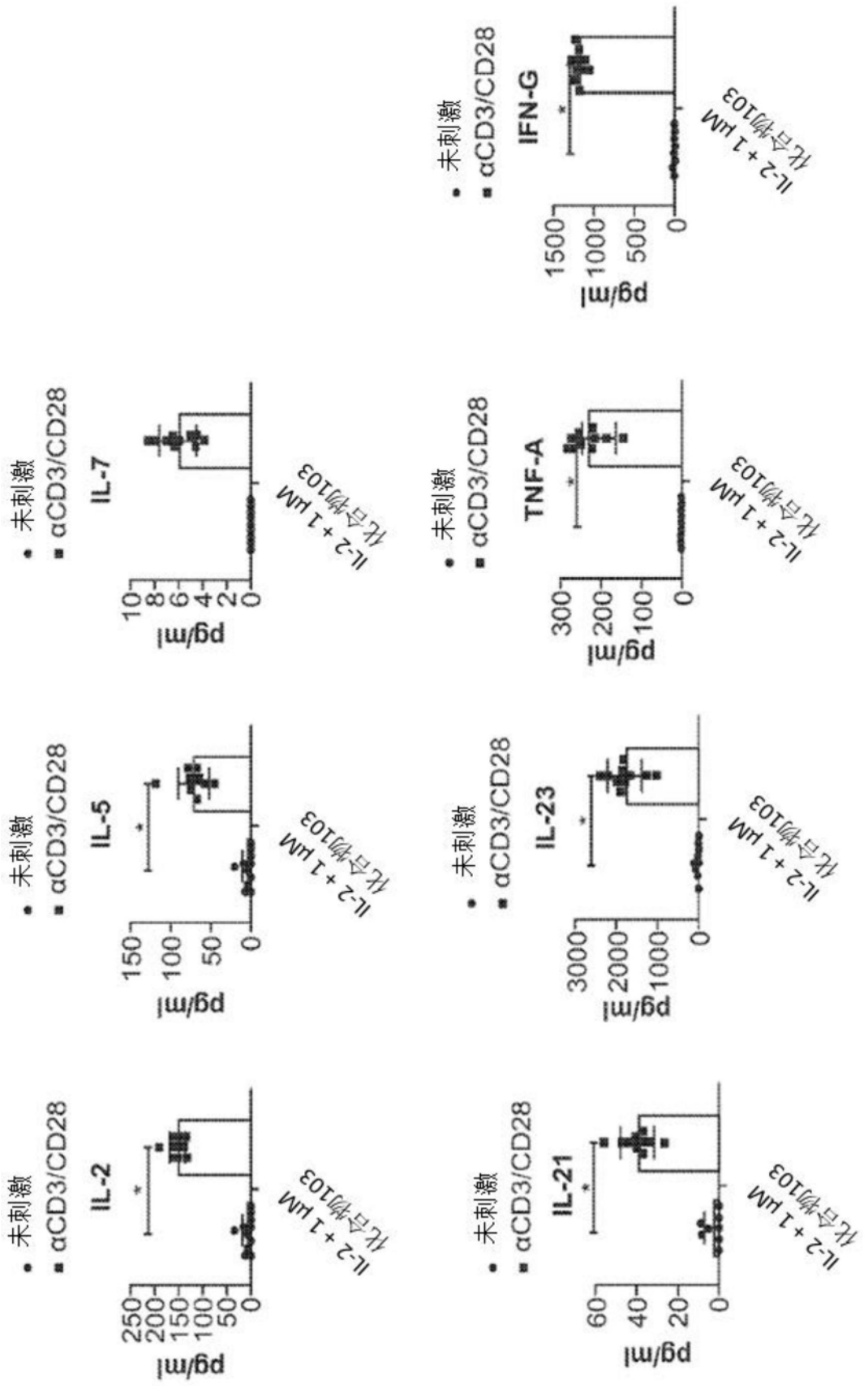

未刺激
αCD3/CD28
IL-2
IL-5
IL-7
IL-21
IL-23
TNF-A
IFN-G
pg/ml
IL-2 + 1 μM
化合物103

图31

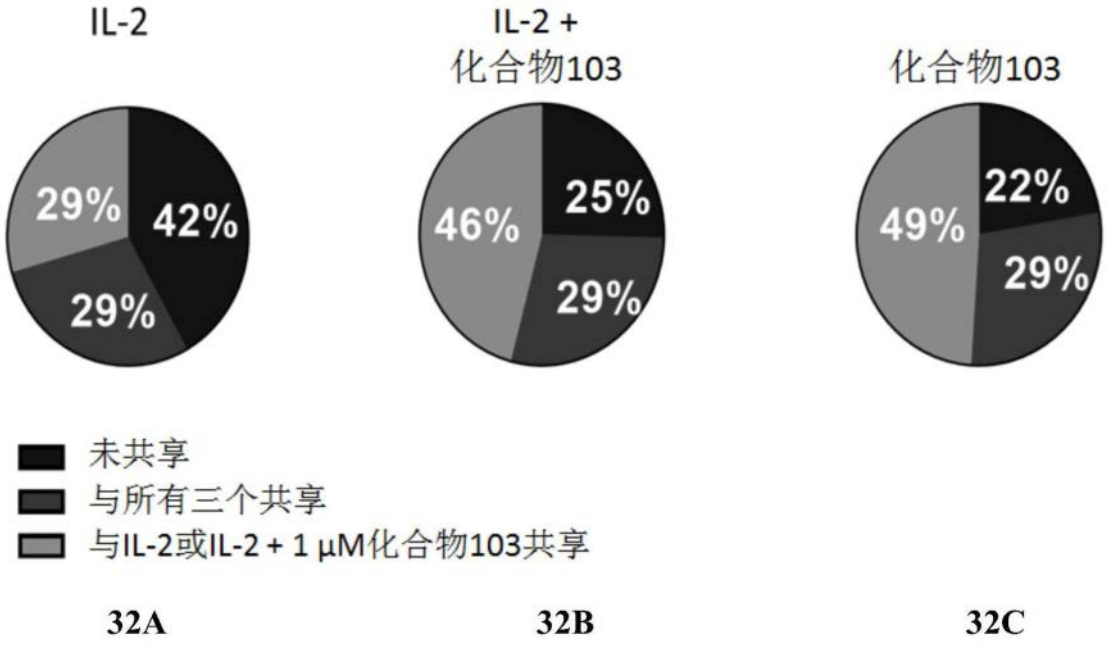

IL-2
IL-2 +
化合物103
化合物103
29%
42%
29%
46%
25%
29%
49%
22%
29%
未共享
与所有三个共享
与IL-2或IL-2 + 1 μM化合物103共享
32A
32B
32C

图32

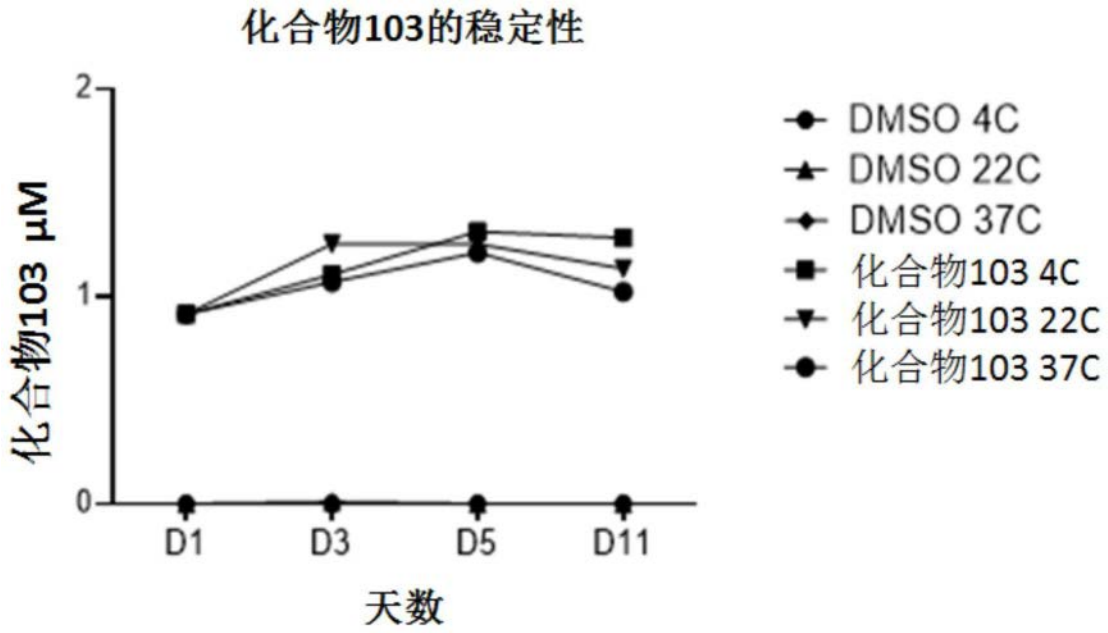

化合物103的稳定性
化合物103 μM
2
1
0
D1
D3
D5
D11
天数
DMSO 4C
DMSO 22C
DMSO 37C
化合物103 4C
化合物103 22C
化合物103 37C

图33

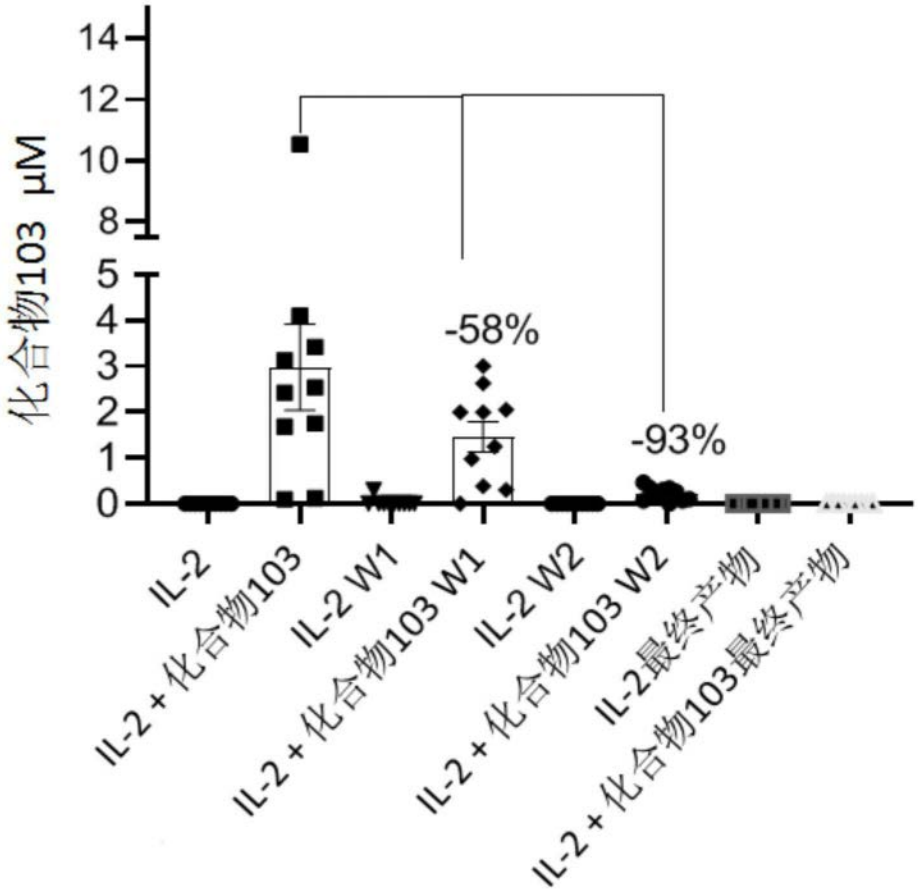

化合物103 μM
14
12
10
8
5
4
3
2
1
0
-58%
-93%
IL-2
IL-2 + 化合物103
IL-2 W1
IL-2 + 化合物103 W1
IL-2 W2
IL-2 + 化合物103 W2
IL-2最终产物
IL-2 + 化合物103最终产物

图34