



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116413420 A

(43) 申请公布日 2023. 07. 11

(21) 申请号 202211533672.X

G01N 33/68 (2006.01)

(22) 申请日 2016.09.14

C12N 5/0784 (2010.01)

(30) 优先权数据

62/219,058 2015.09.15 US

(62) 分案原申请数据

201680066721.X 2016.09.14

(71) 申请人 西北生物治疗药物公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 M·L·博希

(74) 专利代理机构 北京华睿卓成知识产权代理

事务所(普通合伙) 11436

专利代理师 程淼 唐莉

(51) Int. Cl.

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

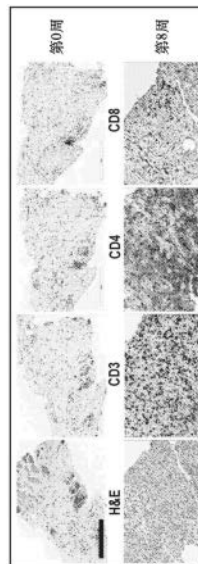
权利要求书3页 说明书25页 附图6页

(54) 发明名称

涉及用于患有晚期癌症的受试者的经活化树突状细胞组合物和免疫治疗处理的方法

(57) 摘要

本公开提供了部分成熟且经活化树突状细胞,其产生与改善的临床结果、显著增加的存活时间和显著增加的至肿瘤或癌症复发所需时间相关的的细胞因子/趋化因子,例如,IL-6、IL-8、IL-12和/或TNFα中的一个或任何组合、和/或全部的水平。这些细胞因子的确定的阈值量可用于(i)经活化树突状细胞的免疫治疗效力试验,(ii)选择应答患者,(iii)拒绝非应答患者,以及(iv)筛选也可诱导产生阈值量的细胞因子/趋化因子的树突状细胞活化或成熟剂。



1. 用于确定经活化且未完全成熟的人树突状细胞组合物的免疫治疗效力的体外方法，所述方法包括以下步骤：

i) 制备经活化的树突状细胞，所述树突状细胞通过保留摄取和加工抗原的能力而被测定为是未完全成熟的；

ii) 确定经活化且未完全成熟的人树突状细胞的IL-6、IL-8和IL-12p40的相对量；

iii) 将IL-6、IL-8和IL-12p40的确定量与阈值量比较，其中所述确定量是步骤ii)中确定的相对量；以及

iv) 如果IL-6、IL-8和IL-12p40中的一个或其任意组合低于阈值，则确定所述经活化且未完全成熟的人树突状细胞组合物为低免疫治疗效力；或者，如果IL-6、IL-8和IL-12p40中的一个或其任意组合高于阈值，则确定所述经活化且未完全成熟的人树突状细胞组合物为高免疫治疗效力；

所述方法不是疾病治疗方法。

2. 用于选择树突状细胞成熟剂的体外方法，所述树突状细胞成熟剂用于产生具有增强的免疫治疗效力的经活化且未完全成熟的人树突状细胞，所述方法包括以下步骤：

i) 使未成熟树突状细胞与试验树突状细胞成熟剂接触一段时间，所述时间足以诱导未成熟的树突状细胞成熟但不允许所述树突状细胞完全成熟，通过所述树突状细胞摄取和加工抗原的能力测定，由此制备经活化且未完全成熟的人树突状细胞；

ii) 确定IL-6、IL-8和IL-12p40的组的相对量；

iii) 将IL-6、IL-8和IL-12p40的组的确定量与阈值量比较，其中所述确定量是步骤ii)中确定的相对量；以及

iv) 如果IL-6、IL-8和IL-12p40中的一个或其任意组合、和/或全部低于阈值，则确定所述经活化且未完全成熟的人树突状细胞组合物为低免疫治疗效力，或者，如果IL-6、IL-8和IL-12p40中的一个或其任意组合、和/或全部高于阈值，则确定所述经活化且未完全成熟的人树突状细胞组合物为高免疫治疗效力，并选择诱导体外产生高于所述阈值的经活化且未完全成熟的人树突状细胞的树突状细胞成熟剂；

所述方法不是疾病治疗方法。

3. 如权利要求1或2所述的体外方法，其中所述经活化且未完全成熟的人树突状细胞产生阈值量为50至200ng/1百万个细胞/24小时的IL-6；500至2000ng/1百万个细胞/24小时的IL-8；和/或至少75至100ng/1百万个细胞/24小时的IL-12p40亚基。

4. 如权利要求3所述的体外方法，其中所述经活化且未完全成熟的人树突状细胞产生阈值量为75至150ng/1百万个细胞/24小时的IL-6；750至1500ng/1百万个细胞/24小时的IL-8；和/或至少100ng/1百万个细胞/24小时的IL-12p40。

5. 如权利要求4所述的体外方法，其中所述经活化且未完全成熟的人树突状细胞产生阈值量为约100ng/1百万个细胞/24小时的IL-6，和1000ng/1百万个细胞/24小时的IL-8，和/或至少约100ng/1百万个细胞/24小时的IL-12p40。

6. 如权利要求1或2所述的体外方法，其中所述经活化且未完全成熟的人树突状细胞通过以下步骤制备：

i) 从外周血分离包含人PBMC的细胞群；

ii) 使所述包含人PBMC的细胞群富集人单核树突状细胞前体；

iii) 用补充有有效量的树突状细胞分化剂的组织培养基培养富集了人单核树突状细胞前体的细胞群一段时间,所述时间足以使所述人单核树突状细胞前体分化成未成熟人树突状细胞;

iv) 用有效量的树突状细胞成熟剂培养富集了未成熟人树突状细胞的细胞群16小时,以活化所述未成熟人树突状细胞,但不使其完全成熟,通过所述人树突状细胞摄取和加工抗原的效率测定;以及

v) 分离并洗涤经活化且未完全成熟的人树突状细胞。

7. 如权利要求1或2所述的体外方法,其中所述经活化且未完全成熟的人树突状细胞通过以下步骤制备:

i) 分离富集了且包含人单核树突状细胞前体的细胞群;

ii) 用补充有有效量的树突状细胞分化剂的组织培养基培养富集了人单核树突状细胞前体的细胞群一段时间,所述时间足以使所述人单核树突状细胞前体分化成未成熟人树突状细胞;

iii) 用有效量的树突状细胞成熟剂培养富集了未成熟人树突状细胞的细胞群16小时,以活化和诱导所述未成熟人树突状细胞的成熟;以及

iv) 分离并洗涤经活化且未完全成熟的人树突状细胞。

8. 如权利要求6或7所述的体外方法,其中所述人单核树突状细胞前体从皮肤、脾、骨髓、胸腺、淋巴结、脐带血或外周血获得。

9. 如权利要求6或7所述的体外方法,其中所述人单核树突状细胞前体细胞是未经活化的单核树突状细胞前体。

10. 如权利要求6或7所述的体外方法,其中所述人单核树突状细胞前体从待处理个体受试者获得。

11. 如权利要求6或7所述的体外方法,其中所述人单核树突状细胞前体从与待处理个体受试者HLA匹配的健康个体受试者获得。

12. 如权利要求6或7所述的体外方法,其中所述树突状细胞分化剂是无任何其它细胞因子的GM-CSF,或者与IL-4、IL-7、IL-13或IL-15联合的GM-CSF。

13. 如上述权利要求任一项所述的体外方法,其中所述树突状细胞成熟剂是灭活BCG、IFN γ 、LPS、TNF α 、咪唑并喹啉化合物、合成的双链多聚核糖核苷酸、To11样受体激动剂、已知会诱导树突状细胞成熟的含有未甲基化的CpG基序的核酸序列,或其任何组合。

14. 如权利要求13所述的体外方法,其中所述灭活BCG包括完整的BCG、BCG的细胞壁组分、BCG衍生的脂阿拉伯糖甘露聚糖或BCG成分。

15. 如权利要求14所述的体外方法,其中所述灭活BCG是经热灭活的BCG、经福尔马林处理的BCG,或经热灭活且福尔马林处理的BCG。

16. 如权利要求13所述的体外方法,其中BCG的有效量为每毫升组织培养基 10^5 至 10^7 cfu, IFN γ 的有效量为每毫升组织培养基100至1000单位。

17. 如权利要求13所述的体外方法,其中所述咪唑并喹啉化合物是咪唑并喹啉-4-胺化合物。

18. 如权利要求17所述的体外方法,其中所述咪唑并喹啉-4-胺化合物是4-氨基-2-乙氧基甲基- α , α -二甲基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-5乙醇或1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑并[4,5-

c] 喹啉-4-胺, 或上述化合物的衍生物。

19. 如权利要求13所述的体外方法, 其中所述合成的双链多聚核糖核苷酸是聚[I]: 聚[C(12)U]。

涉及用于患有晚期癌症的受试者的经活化树突状细胞组合物和免疫治疗处理的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是申请号为201680066721.X、发明名称为“涉及用于患有晚期癌症的受试者的经活化树突状细胞组合物和免疫治疗处理的方法”的分案申请,在此通过引用将其全文并入本文。

[0003] 本申请主张2015年9月15日提交的序列号为62/219,058的美国临时专利申请的优先权,在此通过引用将其全文并入本文。

背景技术

[0004] 患有不可切除的、局部晚期的或转移性实体瘤的患者具有不良预后,几乎没有治疗选项,尤其是在标准疗法失败之后。Amato, *Semin. Oncol.* 27:177-186, 2000; Bramwell等, *Cochrane Database Syst. Rev.* 3: Cd003293, 2003; Kleijer等, *Ann. Oncol.* 25:1260-1270, 2014)。近期在免疫癌症治疗中有几个有希望的进展(Ito等, *Biomed. Res. Int.* 2015: 605478, 2015; West, *JAMA Oncol.* 1:115, 2015);但是,为了激发针对癌症的有效免疫应答,首先必须致敏免疫系统以攻击癌细胞。(Melero等, *Nat. Rev. Cancer* 15:457-472, 2015)。具体地,肿瘤特异性抗原必须通过抗原呈递细胞呈递至初始T细胞,其继而诱导T细胞分化成经活化细胞毒性T细胞(CTL)。(Ito等, *Biomed. Res. Int.* 2015:605478, 2015; MacKeon等, *Front. Immunol.* 6:243, 2015)。

[0005] 树突状细胞(Dendritic cells, DCs)通过抗原性化合物的摄取和随后呈递至免疫系统来专门启动适应性免疫应答。DC刺激B细胞和T细胞,并生成共刺激分子诸如细胞因子来驱动CTL增殖。(Banchereau等, *Nature* 392:245-252, 1998)。鉴于DC诱导广泛免疫应答的能力,基于DC的免疫疗法研究在近些年迅速增长。基于DC的癌症疫苗临床试验已显示出不同程度的前景,有几个产品目前处于后期临床试验中。(Anguille等, *Pharmacol. Rev.* 67: 731-753, 2015)。血液中发现的各种DC以其有效的抗原交叉呈递和其有效迁移至引流淋巴结的能力而为人所知。但是,DC构成外周血单个核细胞的不足1%,这意味着没有足够的细胞材料来生成用于启动和维持肿瘤特异性免疫的组合物。(MacKeon, *Front. Immunol.* 6: 243, 2015; Anguille等, *Pharmacol. Rev.* 67:731-753, 2015)。结果,离体生成衍生自通过例如白细胞分离术(leukapheresis)为待处理受试者收集的单核细胞的DC;但是,采用其它DC类型的策略目前正在研究当中。在生成DC后,通常用抗原触发细胞并回输进患者。抗原的选择和来源,(例如,纯化的肿瘤特异性或肿瘤相关抗原)。

[0006] 在临床前研究中,经活化DC(aDC; DCVax®-Direct)在瘤内注射后在清除来自小鼠的肿瘤方面显示出优于未成熟DC。

[0007] 树突状细胞(DC)是免疫系统中专门呈递抗原的细胞,其被认为能够活化初始和记忆T细胞。越来越多的树突状细胞被离体制备以用于免疫治疗,特别是癌症的免疫治疗。制备具有最佳免疫刺激性质的树突状细胞需要理解和利用这些细胞的生物学以用于离体培养。已经描述了多种各自具有不同优点的用于培养这些细胞的方案。

[0008] 树突状细胞的活化启动将表型类似于皮肤朗格汉斯 (Langerhans) 细胞的未成熟 DC 转化为成熟的可迁移到淋巴结的抗原呈递细胞的过程。这个过程导致了未成熟树突状细胞特征性的强大抗原摄取能力逐步和渐进性丧失, 以及共刺激细胞表面分子和各种细胞因子的表达的上调。多种刺激可启动 DC 的成熟。这个过程是复杂的, 并且, 取决于所使用的树突状细胞成熟剂, 树突状细胞、尤其是单核树突状细胞 (monocytic dendritic cell) 至少在体外完全成熟可能需要长达 48 小时才能完成。成熟的另一个后果是细胞的体内迁移性质改变。例如, 诱导未成熟树突状细胞成熟则诱导了几种趋化因子受体, 包括 CCR7, 其将细胞引导到引流淋巴结的 T 细胞区域, 在这里, 在 I 类和 II 类 MHC 分子存在的情况下, 成熟的 DC 针对呈递于 DC 表面上的抗原活化 T 细胞。术语“活化/激活 (activation)”和“成熟/成熟化 (maturation)”以及“经活化的/经激活的 (activated)”和“成熟的 (mature)”描述了诱导和完成从未成熟 DC (部分特征为摄取抗原的能力) 到成熟 DC (部分特征为有效刺激新生 T 细胞应答的能力) 的过程。这些术语在本领域中通常可互换使用。

[0009] 已知的成熟方案基于认为 DC 在暴露于抗原期间或之后遇到的体内环境。这种方法的早期实例是使用单核细胞条件培养基 (MCM) 作为细胞培养基。在体外培养单核细胞以产生 MCM, 并将其用作成熟因子的来源。(参见例如 US 2002/0160430, 通过引用并入本文。) 据报道, (促) 炎性细胞因子白细胞介素 1β (IL- 1β)、白细胞介素 6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子 α (TNF α) 是 MCM 中负责成熟的主要成分。其它的树突状细胞成熟剂例如包括与细胞因子诸如肿瘤坏死因子 α (TNF α)、白细胞介素 (IL) - 1β 、IL-6 和前列腺素 E₂ (PGE₂) 相混合的 Toll 样受体激动剂。

[0010] 因此, DC 的成熟可通过许多不同因子触发或启动, 这些因子通过许多信号转导途径发挥作用。于是, 没有单一的成熟途径或结果, 但实际上存在通用的成熟 DC 阶段, 每个阶段都有其自己独特的功能特征。从概念上讲, 这是有道理的, 因为免疫系统必须应答的对身体的各种威胁是多方面的, 需要不同的攻击策略。例如, 尽管细菌感染最好是通过辅助有特异性抗体的活化巨噬细胞来清除, 但病毒感染最好是通过有效杀死病毒感染细胞的细胞毒性 T 细胞来攻击。杀死癌细胞通常涉及细胞毒性 T 细胞、自然杀伤细胞和抗体的组合。

[0011] 因此可设计 DC 的体外成熟以诱导免疫系统偏好一种类型的免疫应答超过另一种, 即, 使得免疫应答极化。DC 的定向成熟 (directional maturation) 描述了这样的概念, 即成熟过程的结果指示了成熟 DC 处理产生的接踵而至的免疫应答的类型。在其最简单的形式中, 定向成熟导致 DC 群体产生细胞因子, 这些细胞因子引导了极化为 Th1 型或 Th2 型免疫应答的 T 细胞应答。干扰素 γ 、干扰素 α 和聚肌胞苷酸 (polyisoinic: polycytidylic acid) 已被用于补充树突状细胞成熟剂, 以便产生分泌 IL-12 的成熟 1 型极化 DC。成熟 DC 褶皱 (crease) 诱发自然杀伤细胞和 CTL 活化的 T 辅助细胞 1 (T_H1) 型谱。(Maillard 等, Cancer Res. 64:5934-5937, 2004; Trinchieri, Blood 84:4008-4027, 1994)。CTL 活化触发促炎状态, 刺激这些细胞直接杀死肿瘤细胞。(Coulie 等, Nat. Rev. Cancer 14:135-146, 2014)。

[0012] DC 表达多达 9 种不同的 Toll 样受体 (TLR1 至 TLR9), 其中每一种都可以用于触发成熟。毫不意外地的, 细菌产物与 TLR2 和 TLR4 的相互作用导致 DC 的定向成熟, 导致对于处理细菌感染最为适宜的极化应答。相反, 通过 TLR7 或 TLR9 触发的成熟似乎导致更多的抗病毒类型应答。作为另一个实例, 在大多数成熟方案中加入干扰素 γ (IFN- γ) 导致成熟 DC 产生白细胞介素 12, 这指示了 Th1 型免疫应答。相反, 包含前列腺素 E₂ 具有相反的效果。

[0013] 完全成熟的树突状细胞与未成熟的DC有定性和定量上的不同。一旦完全成熟,DC表达更高水平的MHC I类和II类抗原,以及更高水平的T细胞共刺激分子,例如CD80和CD86。这些改变增加了树突状细胞活化T细胞的能力,因为它们增加了细胞表面上的抗原密度,以及增加了通过T细胞上的共刺激分子对应物(例如CD28等)的T细胞激活信号的幅度。另外,成熟DC产生大量细胞因子,它们刺激和极化T细胞应答。这些细胞因子包括与Th1型免疫应答有关的白细胞介素12和与Th2型免疫应答有关的白细胞介素10和白细胞介素4。

[0014] 通常用于离体产生DC的方法包括:从受试者获得富集了DC前体细胞的细胞群,然后在体外将DC前体细胞分化成完全成熟的DC,再将完全成熟的DC回输至受试者。通常在该过程中,成熟中的DC与抗原接触以摄取并随着DC成熟而加工抗原。有些人认为DC必须终末分化,否则它们会去分化回单核细胞/巨噬细胞,并失去它们大部分免疫增强能力。从单核细胞产生的DC的离体成熟已经用本领域熟知的方法和试剂成功完成。

[0015] 树突状细胞(DC)被认为是癌症主动免疫疗法的载体选项。动物实验已证实了基于DC的免疫疗法在保护小鼠免于肿瘤形成和消除已存在的肿瘤中的潜力。这些成功已至少部分地重现于小规模的人类临床试验中。从小规模的安全性或概念证明试验向可证明其活性或功效的大型试验的转变已被上文所描述的DC制备的繁琐性质所阻碍。因而,尽管这些产品具有巨大的潜在治疗价值,但很少有公司对开发基于DC的癌症疫苗感兴趣。

[0016] 除了成熟,施用方法也对结果有明显影响。施用途径必须允许DC到达淋巴结,以使得它们可诱导T细胞分化。先前已研究了几种方法,包括静脉内、皮内和结内注射(intranodal injection)。(Anguille等,Pharmacol.Rev.67:731-753,2015)。DC的瘤内(IT)注射是基于DC的免疫疗法的特殊形式。注射后,初始(naïve)DC在体内例如从凋亡或垂死(坏死)的肿瘤细胞和肿瘤环境摄取和加工抗原,并在迁移到淋巴结后将抗原呈递给T细胞。事实上,发现这种处理在动物模型中的功效与肿瘤中凋亡程度相关(Candido等,Cancer Res.61:228-236,2001),这表明这种方式与在注射DC之前用化学治疗剂或辐射处理肿瘤完全相容。此外,几个小组已证实,这样的联合疗法对于已存在的肿瘤是特别有效的(Nikitina等,Int.J.Cancer 94:825-833,2001;Tanaka等,Int.J.Cancer 101:265-269,2002;Tong等,Cancer Res.61:7530-7535,2001)。

[0017] 由于体内肿瘤细胞是抗原的来源,所以肿瘤内注射不需要肿瘤抗原的选择和制造,即使它们目前用于大多数基于体外DC的治疗方法中。肿瘤抗原的选择通常是由公司取得专利权地位(proprietary position)的需求所驱动,并且迄今为止鉴定的少数肿瘤抗原仍有待证明能提供显著的临床益处。另外,使用这样的肿瘤抗原经常产生单价免疫原性成分或疫苗,如果肿瘤细胞下调免疫中使用的抗原的表达,则其会丧失效力。此外,在良好生产规范(GMP)要求的条件下生产肿瘤抗原的要求增加了传统的基于DC的免疫方法的额外成本。

[0018] DC的IT注射使树突状细胞进入免疫抑制性肿瘤环境。已知肿瘤产生使DC失活的或具有使T细胞应答朝不太有效的Th2型免疫应答倾斜的能力的细胞因子。几个小组已使用DC的遗传修饰来试图克服这些抑制效应,特别是通过细胞因子白细胞介素12的产生(IL-12; Nishioka等,Cancer Res.59:4035-4041,1999;Melero等,Gene Therapy 6:1779-1784,1999)或CD40配体的表达(Kikuchi等,Blood 96:91-99,2000)。这些小组描述的令人鼓舞的结果进一步证明了IT注射DC作为治疗方法的可行性。

[0019] Triozzi等(Cancer 89:2647-2654,2000)描述了在患有转移性黑素瘤或乳腺癌的患者中IT注射DC。他们在4例黑素瘤患者和2例乳腺癌患者中获得肿瘤消退。对消退病变的活检显示浸润的T细胞,表明DC确实激活了针对肿瘤细胞的免疫应答。总体而言,这些数据表明,IT注射DC对人类是可行的,并且可提供显著的临床益处。然而,观察到注射的DC上MHC II类抗原和B7-2(CD86)共刺激分子的显著下调。预计这些关键分子的下调将降低DC的免疫刺激潜力。

[0020] 在WO 2004/053072(通过引用并入本文)中已经公开了克服这种下调的一种方法,其中发现可以通过在施用之前让DC部分成熟来避免下调。在该方法中,首先在体外诱导树突状细胞前体(红细胞溶解后的骨髓细胞或单核树突状细胞前体)分化成未成熟的树突状细胞,接着通过用树突状细胞成熟剂培养这些细胞来诱导未成熟的树突状细胞开始成熟,该树突状细胞成熟剂例如为BCG和IFN γ 、脂多糖(LPS)、肿瘤坏死因子 α (TNF α)、咪唑并喹啉化合物、合成的双链多聚核糖核苷酸、Toll样受体(TLR)激动剂、已知会诱导DC成熟的含有未甲基化CpG基序的核酸序列、细胞因子组合(例如与白细胞介素1 β (IL-1 β)、白细胞介素6(IL-6)和前列腺素E₂(PGE₂)组合的肿瘤坏死因子 α (TNF α)),或其任何组合。使未成熟的树突状细胞继续成熟一段时间,该时间短于先前已经确定的用于未成熟的树突状细胞完全成熟所需的时间。如果允许树突状细胞在体外完全成熟,那么细胞在施用给患者后将不能摄取和加工抗原。本文描述的方法证实,应该让树突状细胞成熟一段时间到足以活化,以使得在分离部分成熟的树突状细胞并配制成用于向需要免疫刺激的患者或个体施用之前产生如本文所述显著水平的IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 。

[0021] 出人意料地,已确定产生某些量或阈值量的IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 的经活化树突状细胞具有与改善的临床结果(如通过诸如增加的存活时间和/或增加的至癌症复发所需时间的特征所衡量的)相关联的免疫治疗效力水平。由此,产生高于阈值量的IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 的经活化树突状细胞提供了用于向受试者施用的改进的组合物,并且该组合物显示出增强的产生积极临床结果的能力。

[0022] 发明概述

[0023] 提供本概述是为了以简化的形式介绍将在下文详细描述中进一步描述的一些精选概念。该发明概述无意确定所要求保护的的主题的关键特征,也无意帮助确定所要求保护的的主题的范围。

[0024] 附图简要说明

[0025] 结合附图参考以下的详细描述,本发明的前述方面和许多伴随的优点将变得更容易理解。

[0026] 图1A至1C描述了经活化DC处理后的T细胞浸润。免疫化学染色显示肿瘤浸润淋巴细胞,包括CD3⁺经活化T细胞。免疫组织化学染色显示在27个活检患者的15中肿瘤浸润淋巴细胞,包括CD3⁺经活化T细胞、CD4⁺辅助细胞和CD8⁺杀伤细胞,从基线增加。代表性图像来自经6百万个经活化DC/注射处理的透明细胞肉瘤。在活检时已注射两次。放大倍数为20 \times ,比例尺表示200 μ m。图1B和图1C描述了经活化T细胞的细胞因子产生。采用RNAscope(黑点)探测组织切片的图1B IFN γ 和图1C显示TNF α 表达,并采用免疫组织化学为CD3表达共染色(浅色点)。黑色箭头表示表达它们各自细胞因子的CD3⁺经活化T细胞。白色箭头表示产生细胞因子的CD3⁻细胞,很可能是巨噬细胞。代表性图像来自经6百万个经活化DC/注射处理的透

明细胞肉瘤。在活检时已注射两次。放大倍数为 $20\times$ ，比例尺表示 $100\mu\text{m}$ 。

[0027] 图2A至图2F描述了经活化DC的特征。图2A显示IL-8产生($\text{ng}/10^6\text{DC}/\text{天}$)和总体存活之间的相关性。IL-8产生和存活的Kaplan-Meyer曲线。虚线表示注射有产生 $<985\text{ng}/10^6\text{DC}/\text{天}$ (中值IL-8浓度)的aDC的患者中存活;实线表示注射有 $\geq 985\text{ng}/10^6\text{DC}/\text{天}$ 的细胞的那些。图2B显示IL-12p40产生($\text{ng}/10^6\text{DC}/\text{天}$)和总体存活之间的相关性。IL-12p40产生和存活的Kaplan-Meyer曲线。虚线表示注射有产生 $<330\text{ng}/10^6\text{DC}/\text{天}$ (中值IL-12p40浓度)的经活化DC的患者中存活;实线表示注射有 $\geq 330\text{ng}/10^6\text{DC}/\text{天}$ 的细胞的那些。图2C显示在第8周具有稳定疾病(SD)的患者数量和存活。在第8周具有SD的患者的Kaplan-Meyer曲线与第8周具有进展疾病(PD)的患者的Kaplan-Meyer曲线比较。虚线表示在第8周具有SD的患者的存活;实线代表在第8周具有SD的那些患者。总体存活在两组间显著不同($p=0.04$)。图2D显示经活化DC的 $\text{TNF}\alpha$ 产生和第8周的疾病状态。在第8周具有SD的患者的数量以黑条显示,具有PD的患者的数量以白条显示。 $\text{TNF}\alpha$ 水平 $>130\text{ng}/10^6\text{DC}/\text{天}$ 的患者中没有在第8周具有PD的患者。在多变量分析中, $\text{TNF}\alpha$ 产生与存活相关($p=0.016$)。对于图2A至图2D, $n=39$ 。患者存活和细胞表面标志物表达水平之间的关联。图2E测量对MHC-II的染色,图2F显示对CD86的染色(两图中 $n=25$)。图2E实线表示具有当对MHC-II染色时具有 $>12,000$ 均值荧光强度(MFI)的细胞的患者;虚线表示具有 $6,200-12,000$ MFI细胞的患者;点线代表具有 $<6,200$ MFI细胞的患者。图2F实线表示具有当对CD86染色时具有 $>3,400$ 均值荧光强度(MFI)的细胞的患者;虚线表示具有 $2,000-3,400$ MFI细胞的患者;点线代表具有 $<2,000$ MFI细胞的患者。将Log-rank分析用于图2A至图2C和图2E至图2F。将卡方分析用于图2D。

[0028] 图3显示了经活化树突状细胞的表型。所显示的为各种树突状细胞活化标志物的代表性流式细胞术柱状图。暗灰色柱状图来自白细胞分离术期间收集的单核细胞群。浅灰色柱状图来自经活化DC。

[0029] 发明详述

[0030] 本公开提供了用于确定经活化树突状细胞组合物(activated dendritic cell composition)的免疫治疗效力(immunotherapeutic potency)的方法,该方法包括以下步骤:(i)制备经活化树突状细胞;(ii)确定IL-6、IL-8、IL-12和/或 $\text{TNF}\alpha$ 的相对量;(iii)将IL-6、IL-8、IL-12和/或 $\text{TNF}\alpha$ 的确定量与阈值量比较;以及(iv)如果IL-6、IL-8、IL-12和/或 $\text{TNF}\alpha$ 中的一个或任何组合、和/或全部低于阈值,则确定该经活化树突状细胞组合物为低免疫治疗效力,或者,如果IL-6、IL-8、IL-12和 $\text{TNF}\alpha$ 中的一个或任何组合、和/或全部高于阈值,则确定该经活化树突状细胞组合物为高免疫治疗效力。

[0031] 还提供了用于增强经活化DC群(activated DC population)的免疫治疗效力的方法,该方法包括以下步骤:(i)制备经活化树突状细胞群体;(ii)确定IL-6、IL-8、IL-12和/或 $\text{TNF}\alpha$ 的相对量;(iii)将IL-6、IL-8、IL-12和/或 $\text{TNF}\alpha$ 的确定量与阈值量比较;(iv)确定IL-6、IL-8、IL-12和 $\text{TNF}\alpha$ 中的一个或任何组合、和/或全部是否低于阈值;以及(v)添加足够量的可诱导该经活化DC产生IL-6、IL-8、IL-12和/或 $\text{TNF}\alpha$ 中的一个或任何组合、和/或全部的试剂将IL-6、IL-8、IL-12和/或 $\text{TNF}\alpha$ 的量提高到高于阈值量,以便形成具有增强的免疫治疗效力的经活化DC群体。

[0032] 此外,本公开提供了用于通过确定衍生自该患者的经活化树突状细胞组合物的免疫治疗效力来选择将对经活化树突状细胞的施用作出应答的患者的方法,该方法包括以下

步骤：(i) 制备经活化树突状细胞；(ii) 确定IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 的相对量；(iii) 将IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 的确定量与阈值量比较；以及(iv) 如果IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 中的一个或任何组合、和/或全部低于阈值，则确定该经活化树突状细胞组合物为低免疫治疗效力，或者，如果IL-6、IL-8、IL-12和TNF α 中的一个或任何组合、和/或全部高于阈值，则确定该经活化树突状细胞组合物为高免疫治疗效力并将高于阈值的那些患者选择为将作出应答的患者。

[0033] 另外，本公开提供了用于通过确定衍生自该患者的经活化树突状细胞组合物的免疫治疗效力来选择将对经活化树突状细胞的施用不作出应答的患者的方法，该方法包括以下步骤：(i) 制备经活化树突状细胞；(ii) 确定IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 的相对量；(iii) 将IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 的确定量与阈值量比较；以及(iv) 如果IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 中的一个或任何组合、和/或全部低于阈值，则确定该经活化树突状细胞组合物为低免疫治疗效力，或者，如果IL-6、IL-8、IL-12和TNF α 中的一个或任何组合或、和/或全部高于阈值，则确定该经活化树突状细胞组合物为高免疫治疗效力，并将低于阈值的那些患者选择为将不作出应答的患者。

[0034] 本公开还提供了用于选择用于产生具有增强的免疫治疗效力的经活化树突状细胞的树突状细胞成熟剂的方法，该方法包括以下步骤：(i) 通过让未成熟树突状细胞与测试树突状细胞成熟剂接触来制备经活化树突状细胞；(ii) 确定IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 的相对量；(iii) 将IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 的确定量与阈值量比较；以及(iv) 如果IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 中的一个或任何组合、和或全部低于阈值，则确定该经活化树突状细胞组合物为低免疫治疗效力，或者，如果IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 中的一个或任何组合、和/或全部高于阈值，则确定该经活化树突状细胞组合物为高免疫治疗效力，并选择诱导产生高于阈值的经活化树突状细胞的树突状细胞成熟剂。一旦确定了树突状细胞成熟剂，就可将其用于诱导产生部分成熟且经活化树突状细胞，如本文所描述。

[0035] 在上述方法中的任何一个的典型实施方案中，该经活化树突状细胞产生阈值量为约50至约200ng/1百万个细胞/24小时的IL-6；约500至约2000ng/1百万个细胞/24小时的IL-8；至少约30至约70ng/1百万个细胞/24小时的TNF α ；至少约75至约100ng/1百万个细胞/24小时的IL-12p40亚基；以及1至3ng/1百万个细胞/24小时的生物学活性IL-12p70。该经活化树突状细胞也可产生约75至约150ng/1百万个细胞/24小时的IL-6；约750至约1500ng/1百万个细胞/24小时的IL-8；至少约100ng/1百万个细胞/24小时的IL-12p40；至少约1至3ng/1百万个细胞/24小时的IL-12p70；以及至少约30至70ng/1百万个细胞/24小时的TNF α ，或约100ng/1百万个细胞/24小时的IL-6，和1000ng/1百万个细胞/24小时的IL-8，至少约100ng/1百万个细胞/24小时的IL-12p40；至少约2ng/1百万个细胞/24小时的IL-12p70；以及至少约30ng的TNF α 。

[0036] 用在以上实施方案任一个中的经活化树突状细胞可通过以下步骤制备：(i) 从外周血分离包含人PBMC的细胞群；ii) 使该包含人PBMC的细胞群富集人单核树突状细胞前体；iii) 用补充有有效量的树突状细胞分化剂的组织培养基培养该富集人单核树突状细胞前体的细胞群足够长的时间，以使该人单核树突状细胞前体分化成未成熟人树突状细胞；iv) 用有效量的树突状细胞成熟剂培养该富集未成熟人树突状细胞的细胞群以活化该未成熟人树突状细胞；以及v) 分离并洗涤经活化人树突状细胞。

[0037] 在另一实施方案中,该经活化树突状细胞通过以下步骤制备:(i)分离包含人单核树突状细胞前体的细胞群;ii)用补充有有效量的树突状细胞分化剂的组织培养基培养富集人单核树突状细胞前体的细胞群足够长的时间,以使该人单核树突状细胞前体分化成未成熟人树突状细胞;iii)用有效量的树突状细胞成熟剂培养该富集未成熟人树突状细胞的细胞群以活化该未成熟人树突状细胞;以及iv)分离并洗涤经活化人树突状细胞。该树突状细胞分化剂可以是无任何其它细胞因子的GM-CSF,或者与IL-4、IL-7、IL-13或IL-15联合的GM-CSF。

[0038] 单核树突状细胞前体可从皮肤、脾、骨髓、胸腺、淋巴结、脐带血或外周血获得。在某些实施方案中,该单核树突状细胞前体细胞是未经活化的单核树突状细胞前体。此外,该单核树突状细胞前体可从待处理的个体受试者获得,或者如果该个体不具有足够数量的反应性单核树突状细胞前体,则该单核树突状细胞前体可从与待处理的该个体受试者HLA匹配的健康个体受试者获得。

[0039] 可用在这些方法中用于产生部分成熟的经活化树突状细胞的树突状细胞成熟剂可以是灭活卡介苗(BCG)、与干扰素 γ (IFN γ)联合的BCG、脂多糖(LPS)、肿瘤坏死因子 α (TNF α)、咪唑并喹啉化合物、合成的双链多聚核糖核苷酸、Toll样受体(TLR)激动剂、已知会诱导树突状细胞成熟的含有未甲基化的CpG基序的核酸序列,或其任何组合。灭活的BCG可包含完整的BCG、BCG的细胞壁组分(constituent)、BCG衍生的脂阿拉伯糖甘露聚糖(lipoarabidomannans)或BCG成分(component),该BCG可以是采用热灭活、福尔马林处理或它们的组合处理的灭活BCG。典型地,BCG的有效量为每毫升组织培养基约 10^5 至 10^7 cfu,IFN γ 的有效量为每毫升组织培养基约100至约1,000单位。另外,该咪唑并喹啉化合物可以是咪唑并喹啉-4-胺化合物,并典型地是4-氨基-2-乙氧基甲基- α , α -二甲基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-5乙醇或1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-4-胺,或其衍生物。通常,该合成的双链多聚核糖核苷酸是聚[I]:聚[C(12)U]。

[0040] 实施方案描述

[0041] 树突状细胞是在各种淋巴和非淋巴组织中发现的抗原呈递细胞的多样化群体。(参见Liu,Cell 106:259-262,2001;Steinman,Ann.Rev.Immunol.9:271-296,1991)。树突状细胞包括脾的淋巴树突状细胞、表皮的朗格汉斯细胞和血液循环中的隐蔽细胞(veiled cell)。总体而言,树突状细胞根据其形态、高水平表面MHC-II类表达以及缺乏在T细胞、B细胞、单核细胞和自然杀伤细胞上表达的某些其它表面标志物而被分类为一组。具体地,来源于单核细胞的树突状细胞(也称为单核树突状细胞)通常表达CD11c、CD80、CD86,并且是HLA-DR+,但也是CD14-。

[0042] 相比之下,单核树突状细胞前体(通常是单核细胞)通常是CD14+。单核树突状细胞前体可从它们所驻留的任何组织获得,特别是淋巴组织,例如脾、骨髓、淋巴结和胸腺。单核树突状细胞前体也可以从循环系统中分离。

[0043] 外周血是容易获得单核树突状细胞前体的来源。脐带血是单核树突状细胞前体的另一来源。单核树突状细胞前体可从可引发免疫应答的多种生物体中分离。这些生物体包括动物,例如包括人和非人类动物,如灵长类、哺乳动物(包括狗、猫、小鼠和大鼠),鸟类(包括鸡),以及它们的转基因物种。

[0044] 在某些实施方案中,该单核树突状细胞前体和/或未成熟树突状细胞可从健康受

试者或从需要免疫刺激的受试者中获得,例如癌症患者或者对其而言细胞免疫刺激可以是有益的或期望的其他受试者,(即患有细菌或病毒感染或增生状况等的受试者)。树突状细胞前体和/或未成熟树突状细胞也可从HLA匹配的健康个体获得,用于部分激活并施用于需要免疫刺激的HLA匹配的受试者。在分离自受试者的树突状细胞前体和/或未成熟树突状细胞不形成经活化树突状细胞组合物(产生适当水平的免疫刺激效力因子)的特定实施方案中,可使用来自HLA匹配的正常供体的树突状前体细胞或未成熟树突状细胞。

[0045] 树突状细胞前体和未成熟树突状细胞

[0046] 从各种来源(包括血液和骨髓)分离富集了树突状细胞前体(例如未经活化树突状细胞前体)和未成熟树突状细胞的细胞群的方法是本领域已知的。例如,树突状细胞前体和未成熟树突状细胞可通过以下方式分离:通过收集肝素化血液,通过血液成分单采(apheresis)或者白细胞分离术,通过制备血沉棕黄层(buffy coat)、花结(rosetting)、离心、密度梯度离心(例如使用Ficoll®(FICOLL-PAQUE®)、PERCOLL®(涂有不可透析的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)的胶态二氧化硅颗粒(直径15-30nm)、蔗糖等)、细胞差异裂解、过滤等。在某些实施方案中,可例如通过从受试者收集血液、去纤维化以去除血小板并裂解红细胞来制备白细胞群体。树突状细胞前体和未成熟树突状细胞可任选地通过例如经PERCOLL®梯度、抗体淘选(antibody panning)等富集单核树突状细胞前体。

[0047] 树突状细胞前体和未成熟树突状细胞任选地可在封闭的无菌系统中制备。用在本文时,术语“封闭的无菌系统”或“封闭系统”是指其中暴露于非无菌的、外界的或循环的空气或其他非无菌条件被降低至最少或消除的系统。用于分离树突状细胞前体和未成熟树突状细胞的封闭系统通常不包括敞口试管(open top tube)中的密度梯度离心、细胞的敞口转移、组织培养板或非密封烧瓶中细胞的培养等。在典型的实施方案中,该封闭系统允许树突状细胞前体和未成熟树突状细胞从初始收集容器无菌转移至可密封组织培养容器,而不暴露于非无菌空气。

[0048] 另一种经报道的分离树突状细胞前体的方法是使用商业处理的塑料基质(例如,珠子或磁珠)来选择性去除粘附的单核细胞和其它“非树状细胞前体”。(参见,例如,美国专利No.5,994,126和5,851,756)。弃去粘附的单核细胞和非树突状细胞前体,而保留非粘附细胞进行离体培养和成熟。在另一种方法中,将血液成分单采细胞培养在塑料培养袋中,向其中加入塑料(即聚苯乙烯或苯乙烯)微载体珠以增加袋的表面积。

[0049] 将细胞培养足够的时间以使某些细胞粘附到珠子上,并从袋中清洗掉非粘附细胞。(Maffei等,Transfusion 40:1419-1420,2000;WO 02/44338,通过引用并入本文)。在某些其他实施方案中,单核细胞的树突状细胞前体通过粘附于单核细胞结合基质(substrate)而分离,如W003/010292中所公开的,其公开内容通过引用并入本文。例如,可以让(例如,通过白细胞分离术分离的)白细胞群体与单核细胞的树突状细胞前体粘附基质接触。当该白细胞群体与基质接触时,该白细胞群体中的单核细胞的树突状细胞前体优先粘附至该基质。其它白细胞(包括其它潜在的树突状细胞前体)表现出对基质降低的结合亲和力,由此允许单核细胞的树突状细胞前体优先富集在该基质的表面上。

[0050] 适合的基质包括例如具有大的表面积体积比的那些。基质可例如是颗粒或纤维基质。适合的颗粒基质包括例如玻璃颗粒、塑料颗粒、玻璃涂覆的塑料颗粒、玻璃涂覆的聚苯乙烯颗粒和其它适用于蛋白吸收的珠子。适用于本发明方法的纤维基质包括微毛细管和微

绒毛膜等。颗粒或纤维基质典型地允许粘附的单核细胞的树突状细胞前体被洗脱而基本上不降低粘附细胞的生存力(viability)。颗粒或纤维基质可以是基本上无孔的,以便于从基质上洗脱单核树突状细胞前体或树突状细胞。“基本上无孔的”基质指存在于该基质中的至少大部分孔小于细胞,以让细胞陷入基质中最少化。

[0051] 可任选地通过添加结合培养基来增强单核树突状细胞前体对基质的粘附。适合的结合培养基包括,例如,单独地或以任何组合地补充了例如细胞因子(例如粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)或GM-CSF联合白细胞介素4(IL-4)、白细胞介素15(IL-15)或白细胞介素13(IL-13))、血浆、血清(例如人血清,如自体或同种异体血清)、纯化的蛋白质如血清白蛋白、二价阳离子(如钙离子和/或镁离子),以及其它帮助单核树突状细胞前体特异性粘附于基质或者防止非单核树突状细胞前体粘附于基质的分子的单核树突状细胞前体培养基(例如 AIM-V[®]、RPMI 1640、DMEM、XVIVO 15[®]等)。在某些实施方案中,血浆或血清可被加热灭活。热灭活的血浆对于白细胞可以是自体的或异源的。

[0052] 在单核树突状细胞前体粘附到基质上之后,将未粘附的白细胞与单核树突状细胞前体/基质复合物分离。可使用任何适合的手段将未粘附的细胞与该复合物分离。例如,可让未粘附的白细胞和该复合物的混合物沉降,并将未粘附的白细胞和培养基倒出或排出。或者,可将混合物离心,由沉淀的复合物中倒出或排出含有未粘附的白细胞的上清液。

[0053] 在另一种方法中,未经活化的单核树突状细胞前体可从富集了白细胞的细胞群中分离,该细胞群是通过使用切向流过滤装置制备,如2003年6月19日提交的国际专利申请公开No.WO 2004/000444、现美国专利No.7,695,627中所描述的,两者都通过引用并入本文。可用于分离富集了单核树突状细胞前体的细胞群的切向流过滤装置可包括具有错流室(cross-flow chamber)、滤液室和置于其间的过滤器的去除器单元(remover unit)。过滤器在一侧即滞留物(retentate)表面与错流室流体连通,在另一侧即滤液(filtrate)表面与滤液室流体连通。错流室具有适于将包含白细胞的血液成分样品引入错流室并且平行于过滤器的滞留物表面的入口。错流室中还设有出口,该出口居中设置在与过滤器的滞留物表面相对的该室的一部分中。适用于切向流过滤装置的过滤器通常具有约1至约10微米的平均孔径。过滤器可具有约3至约7微米的平均孔径。还可包括将预定输入速率的样品提供进入错流室入口的装置以及用于控制滤液穿过过滤器并进入滤液室的过滤速率的装置。过滤速率控制装置将过滤速率限制为小于过滤器的无对抗过滤速率(unopposed filtration rate)。包含血液成分的样品可由来源设备例如白细胞分离术设备提供或由包含从白细胞分离术设备收集的样品的容器提供。

[0054] 可离体(ex vivo)或体外(in vitro)培养单核树突状细胞前体和富集了该前体的细胞群,以进行分化和部分成熟和/或增殖。用在本文时,分离的未成熟树突状细胞、树突状细胞前体和其它细胞指通过人工介入而存在于其天然环境之外的细胞,因此并非天然产物。分离的细胞可以以纯化形式、以半纯化形式或在非天然环境中存在。简而言之,体外和/或离体树突状细胞分化通常涉及在一种或多种树突状细胞分化剂存在下培养单核树突状细胞前体或具有树突状细胞前体的细胞群。适合的分化剂可包括例如细胞生长因子(例如细胞因子如(GM-CSF)或GM-CSF与白细胞介素4(IL-4)、白细胞介素13(IL-13)、白细胞介素15(IL-15)或白细胞介素7(IL-7)的组合)。在某些实施方案中,该单核树突状细胞前体分化形成单核细胞衍生的未成熟的树突状细胞。

[0055] 可在合适的体外培养条件下培养和分化树突状细胞前体。适合的树突状细胞组织培养基包括但不限于 AIM-V®、RPMI 1640、DMEM、X-VIVO 15®等。组织培养基可补充有血清、血浆、氨基酸、维生素、细胞因子如GM-CSF和/或IL-4、IL-7、IL-13、IL-15、二价阳离子等,以促进细胞的分化。在某些实施方案中,该树突状细胞前体可在无血清培养基中培养。培养条件可任选地排除任何动物衍生产品。与树突状细胞培养基一起使用的典型的细胞因子组合包含每一种约500单位/ml的GM-CSF和IL-4、IL-7、IL-15或IL-13。在使用未经活化的树突状细胞前体的典型实施方案中,典型的树突状细胞组织培养基可补充有GM-CSF而无任何其它细胞因子。当单独使用GM-CSF时,组织培养基通常还补充有高浓度的人或动物蛋白以防止未经活化的单核树突状细胞前体粘附到组织培养基质从而激活树突状细胞前体的成熟。通常该人或动物蛋白以大于1%的浓度加入,并且通常以10%或更少的浓度使用。该人或动物蛋白可以是白蛋白,如人血清白蛋白、血清、血浆、明胶、聚氨基酸等。

[0056] 当分化形成未成熟的树突状细胞时,树突状细胞前体在表型上类似于皮肤朗格汉斯细胞。未成熟的树突状细胞通常是CD14⁻和CD11c⁺,表达低水平的CD86和CD83,并且能够通过特化内吞捕获可溶性抗原。

[0057] 树突状细胞成熟剂可包括例如但不限于BCG,LPS,TNF α ,TNF α 、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6和前列腺素E₂(PGE₂)的组合,咪唑并喹啉化合物例如咪唑并喹啉-4-胺化合物,如4-氨基-2-乙氧基甲基- α , α -二甲基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-乙醇(命名为R848)或1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-4-胺以及它们的衍生物(参见例如W02000/47719,通过引用将其全文并入本文),合成的双链多聚核糖核苷酸如聚[I]:聚[C(12)U]等,Toll样受体(TLR)激动剂如TLR-3、TLR-4、TLR-7和/或TLR-9,已知会诱导DC成熟的含有未甲基化的CpG基序的核酸序列等,或它们的任何组合。此外,干扰素 γ 可与上文树突状细胞成熟剂的一种或更多种组合,以将该未成熟的树突状细胞的成熟偏向可诱导Th1型应答的表型。在灭活之前,BCG的有效量通常在相当于每毫升组织培养基约10⁵-10⁷cfu的范围内。IFN γ 的有效量通常在每毫升组织培养基约100至约1000U的范围内。

[0058] 卡介苗(BCG)是牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)的无毒菌株。如本文所使用的,BCG指完整的BCG以及细胞壁组分、BCG衍生的脂阿拉伯糖甘露聚糖和其它BCG成分。BCG可任选是灭活的,例如经热灭活的BCG、经福尔马林处理的BCG,或者通过热与其它灭活方法的组合灭活,等等。有效量的咪唑并喹啉化合物,例如咪唑并喹啉-4-胺化合物,例如4-氨基-2-乙氧基甲基- α , α -二甲基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-乙醇(命名为R848),可以是约1至约50 μ g/ml培养基,更通常使用5至约10 μ g/ml培养基。该咪唑并喹啉化合物可单独使用或者可与例如BCG和/或IFN γ ,或者另外的TLR激动剂组合。

[0059] 通常让未成熟的DC与有效量的树突状细胞成熟剂如BCG和IFN γ 接触一段时间,该段时间足以诱导成熟和活化,但不让该树突状细胞完全成熟。当使用BCG和IFN γ 成熟树突状细胞时,通常需要至少24小时的温育时间完全成熟,并且取决于使用的树突状细胞成熟剂,完全成熟通常需要约48至约72小时的温育时间。在某些实施方案中,取决于所用的树突状细胞成熟剂,该时间段可以是约5小时至约19小时,或更长。在使用BCG和IFN γ 的更典型实施方案中,树突状细胞的部分成熟且最佳活化的时间段可以是约8至约19小时或更长。未成熟的树突状细胞可在合适的成熟培养条件下培养、部分成熟和活化。适合的组织培养基包括但不限于 AIM-V®、RPMI 1640、DMEM、X-VIVO 15®等。该组织培养基可补充有氨基酸;维

生素;细胞因子如单独GM-CSF(参见例如美国专利No.8,389,278,其全文通过引用并入本文)或GM-CSF与IL-4、IL-7、IL-13或IL-15的组合;二价阳离子等,以促进诱导细胞成熟。典型的细胞因子可以是单独的GM-CSF连同高浓度的人或动物蛋白,或者当组合使用时,GM-CSF以约500单位/ml至约1000单位/ml使用,并使用100ng/ml的IL-4、IL-13或IL-15。

[0060] 未成熟的树突状细胞的部分成熟和活化可通过本领域已知的用于树突状细胞的方法来监测。细胞表面标志物可在本领域熟悉的测定法中检测,例如流式细胞术、免疫组织化学等。还可监测细胞的细胞因子产生(例如,通过ELISA,另一种免疫测定或通过使用寡核苷酸阵列)。在树突状细胞成熟剂(例如但不限于BCG和 $\text{INF } \gamma$)的存在下,根据本说明书进行培养并部分成熟且经最佳活化的DC中,可以通过本领域公知的方法测量到与未成熟树突状细胞相比而言增高水平的磷酸化的JAK2(janus活化激酶2(activated kinase2)),以指示成熟的开始。细胞表面标志物和细胞因子表达的诱导以及信号分子例如jak2的磷酸化也已知为指示物,其标志着一旦树突状细胞被施用给个体,树突状细胞经调理(conditioned)而适于在体内呈递抗原和诱导免疫应答。

[0061] 让未成熟的树突状细胞处于成熟条件中仅一段时间,该段时间为启动未成熟的树突状细胞的成熟以及让树突状细胞部分成熟和活化所需。典型地,已经发现,与有效量的BCG和有效量的 $\text{INF } \gamma$ 一起温育约5、或8、或10至19个小时的时间,可使树突状细胞部分成熟和活化,以用作当与药学上可接受的载体组合时的组合物施用于受试者。完全成熟的DC丧失摄取抗原和展示共刺激细胞表面分子和各种细胞因子的上调表达的能力。具体而言,成熟DC比未成熟的树突状细胞表达更高水平的MHC I类和II类抗原,并且成熟树突状细胞一般被鉴定为 CD80^+ 、 CD83^+ 、 CD86^+ 和 CD14^- 。更高的MHC表达导致DC表面上的抗原密度增加,而共刺激分子CD80和CD86的上调通过共刺激分子的对应物例如T细胞上的CD28而增强T细胞激活信号。如本公开中使用的部分成熟且经活化树突状细胞通常包含那些一旦暴露于树突状细胞成熟剂则表现出与未成熟的树突状细胞相比而言上调的细胞表面上共刺激分子表达的树突状细胞。这些共刺激分子包括但不限于CD80、CD86和/或CD54。这些细胞能表达或者不可以表达CD83,但是细胞确实保持有效摄取和加工抗原的能力。此外,部分和最佳成熟的树突状细胞可产生 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6、IL-8、IL-10和/或IL-12的一种或任何组合、和/或全部,而它们通常不在未成熟的树突状细胞中以明显量产生。

[0062] 产生IL-6、IL-8、IL-12和/或 $\text{TNF-}\alpha$ 的一种或任何组合、和/或全部的经活化树突状细胞现在已与改善的临床结果相关联。改善的临床结果可例如通过与未处理个体或经标准的许可处理方案处理的个体相比增加的存活时间和/或增加的至肿瘤复发所需时间来衡量。在本描述中,已发现,产生约50至约200ng/1百万个细胞/24小时的IL-6、约500至约2000ng/1百万个细胞/24小时的IL-8、至少约30至约70ng/1百万个细胞/24小时的 $\text{TNF}\alpha$,和/或至少约75至约100ng/1百万个细胞/24小时的IL-12_{p40}亚基和1至3ng/1百万个细胞/24小时的生物学活性IL-12_{p70}的经活化树突状细胞具有与改善的临床结果相关联的免疫性效力。这些细胞因子/趋化因子还可在约75至约150ng/1百万个细胞/24小时的范围并优选约100ng/1百万个细胞/24小时的IL-6;约750至约1500ng/1百万个细胞/24小时并优选约1000ng/1百万个细胞/24小时的IL-8;至少约100ng/1百万个细胞/小时的IL-12_{p40}并优选至少约100ng/1百万个细胞/24小时的IL-12_{p70},并产生与改善的临床结果相关联的免疫性效力。如之前所公开的,改善的临床结果特征在于,与未经处理的或经采用目前设立的标准

护理处理的患有相同癌症或肿瘤个体相比,显著增加的存活时间或显著增加的至肿瘤或癌症复发所需时间。

[0063] 完全成熟的树突状细胞对于本发明不是优选的,因为一旦它们完全成熟,细胞就不再有效地摄取和加工抗原。另外,现有方法中使用的未成熟树突状细胞并非所期望的,因为通常在肿瘤内或在肿瘤周围的组织中发现的免疫抑制环境包括已知会阻止未成熟的树突状细胞对抗原进行加工的相当浓度的细胞因子。在本公开中,未成熟树突状细胞的部分成熟和最佳活化下调了细胞表面上的细胞因子受体,使得它们对瘤内空间或周围组织中存在的细胞因子的任何免疫抑制作用较不敏感或响应,并提供可有效摄取和加工瘤内空间或周围组织内存在的抗原的细胞。这些树突状细胞摄取和加工来自瘤内空间或周围组织内发现的凋亡和垂死的肿瘤细胞的大量肿瘤抗原。一旦施用的部分成熟和经最佳活化的树突状细胞在瘤内空间内已成熟(如通过例如趋化因子受体CCR7的表达而测定的),这些树突状细胞迁移到淋巴结,现在在这里呈递抗原的树突状细胞将接触T细胞,以上调对树突状细胞呈递的任何肿瘤抗原的免疫应答。

[0064] 根据说明书的又一个方面,本公开的各种DC可与药学上可接受的载体进行组合或不进行组合,作为单核树突状细胞前体、成熟前的未成熟树突状细胞,或者在部分成熟后,通过例如冷冻来保存。可使用的冷冻保存剂包括但不限于二甲基亚砷(DMSO)、甘油、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇、白蛋白、葡聚糖、蔗糖、乙二醇、i-赤藓糖醇(i-erythritol)、D-核糖醇、D-甘露糖醇、D-山梨糖醇、肌醇、D-乳糖、氯化胆碱、氨基酸、甲醇、乙酰胺、单乙酸甘油酯和无机盐。受控的缓慢冷却速度可能是至关重要的。不同的冷冻保护剂和不同的细胞类型通常具有不同的最佳冷却速率。

[0065] 水转变成冰的融溶(fusion)阶段的热量通常应该是最小的。冷却过程可通过使用例如可编程冷冻设备或甲醇浴过程来进行。可编程冷冻装置使得能够确定最佳冷却速率并有利于标准可重复冷却。可编程控制速率冷冻机,如Cryomed[®]或Planar[®]允许将冷冻方案调整为所需的冷却速率曲线。

[0066] 在彻底冷冻后,可以将具有或不具有药学上可接受的载体的单核前体细胞、未成熟的DC或部分成熟的DC迅速转移到长期低温存储容器中。在典型的实施方案中,样品可低温保存在液氮(-196℃)或其蒸气(-165℃)中。对造血干细胞(特别是来自于骨髓或外周血)的操作、冷冻保存和长期保存的考虑(consideration)和程序大部分适用于本发明的细胞。这样的讨论可在例如以下参考文献中找到,通过引用将它们并入本文:Taylor等,Cryobiology 27:269-78(1990);Gorin,Clinics in Hematology 15:19-48(1986);Bone-Marrow Conservation,Culture and Transplantation,Proceedings of a Panel,Moscow,Jul.2226,1968,International Atomic Energy Agency,Vienna,pp.107-186。

[0067] 优选地,将冷冻细胞快速解冻(例如,在保持在37℃-41℃的水浴中)并在解冻后立即降温。可能需要处理细胞以便防止细胞在解冻时结块。为防止结块,可使用各种方法,包括但不限于冷冻之前和/或之后加入Dnase(Spitzer等,Cancer 45:3075-85(1980))、低分子量葡聚糖和柠檬酸盐、羟乙基淀粉(Stiff等,Cryobiology 20:17-24(1983))等。如果冷冻保存剂对人体有毒,则应在治疗性使用解冻的部分成熟DC之前除去。去除冷冻保护剂的一种方式是将稀释到不显著的浓度。一旦冷冻的单核树突状细胞前体、未成熟的树突状细胞和/或部分成熟的DC已解冻并回收,它们就可用于进一步的方法中,或者继续产生部分成熟

的经活化树突状细胞,或者产生配制的药物产品。该配制的部分成熟和经最佳活化的树突状细胞可如本文关于未冷冻的部分成熟和经最佳活化的DC所述的那样施用。

[0068] 确定部分成熟且经活化树突状细胞的免疫治疗效力

[0069] 可通过本领域公知的方法测量各种炎性细胞因子和趋化因子的量。在本文情况下,经活化树突状细胞产生的IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 中的一种或组合、和/或全部的量可与改善的临床结果相关联。改善的临床结果可例如通过与未处理个体或经标准的许可处理方案处理的个体相比显著增加的存活时间和/或显著增加的至肿瘤复发所需时间来衡量。出乎意料地,已发现,产生约50至约200ng/1百万个细胞/24小时的IL-6、约500至约2000ng/1百万个细胞/24小时的IL-8、至少约30至约70ng/1百万个细胞/24小时的TNF α 、和/或至少约75至约100ng/1百万个细胞/24小时的IL-12p40亚基和1至3ng/1百万个细胞/24小时的生物学活性IL-12p70的经活化树突状细胞具有与改善的临床结果相关联的免疫性效力。这些细胞因子/趋化因子还可在约75至约150ng/1百万个细胞/24小时的范围并优选约100ng/1百万个细胞/24小时的IL-6;约750至约1500ng/1百万个细胞/24小时并优选约1000ng/1百万个细胞/24小时的IL-8;至少约100ng/1百万个细胞/小时的IL-12p40并优选至少约100ng/1百万个细胞/24小时的L-12p70。

[0070] 这些经活化树突状细胞可用于免疫治疗效力试验,以确定经活化树突状细胞组合物当施用回个体时是否将很可能产生改善的临床结果。另外,该免疫治疗效力试验可用于选择很可能发生显著免疫应答的患者,拒用(reject)当施用回个体时预期将不会产生显著免疫应答的树突状细胞组合物批次;或者可用于筛选可产生期望水平的IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 中的一个或任何组合、和/或全部的树突状细胞活化剂。在从个体分离的外周血不产生能够产生期望水平的IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 中的一个或任何组合、和/或全部的经活化树突状细胞时,该患者可能需要用分离自HLA匹配的正常供体的经活化树突状细胞处理。

[0071] 用于确定经活化树突状细胞组合物的免疫治疗效力的方法可包括以下步骤:i)采用上文描述方法的任一种制备经活化树突状细胞;ii)采用本领域公知的任何方法确定IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 的相对量;iii)将IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 中的一个或任何组合、和/或全部确定量与阈值量比较;iv)如果IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 中的一个或任何组合、和/或全部低于阈值,则确定该经活化树突状细胞组合物为低免疫治疗效力,或者,如果IL-6、IL-8、IL-12和TNF α 中的一个或任何组合、和/或全部高于阈值,则确定该经活化树突状细胞组合物为高免疫治疗效力。用于IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 的阈值量在上文列出了。如果该经活化树突状细胞表现出高免疫治疗效力,则可将这些经活化树突状细胞配制为和药学上可接受的载体一起施用。

[0072] 在另一实施方案中,提供了增加经活化DC群体的免疫治疗效力的方法。该方法包括以下步骤:i)制备经活化树突状细胞群体;ii)采用本领域公知的方法确定IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 的相对量;iii)将IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 中的一个或任何组合、和/或全部确定量与阈值量比较;iv)确定IL-6、IL-8、IL-12和TNF α 中的一个或任何组合、和/或全部是否低于阈值;v)添加足够量的可诱导该经活化DC产生IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 中的一个或任何组合、和/或全部的试剂将IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 的量提高到高于阈值量,以便形成具有增强的免疫治疗效力的经活化DC群体。

[0073] 部分成熟的树突状细胞的体内施用

[0074] 提供了用于向患有例如癌症或肿瘤的受试者施用部分成熟且经活化树突状细胞、或经富集并含有这些细胞的细胞群体的方法和组合物。在某些实施方案中,通过获得树突状细胞前体或未成熟树突状细胞,在树突状细胞成熟剂如BCG和IFN γ 或如上列出的任何其它树突状细胞成熟剂存在下使这些细胞分化并部分成熟,来进行这些方法。这些部分成熟且经活化树突状细胞可在冷冻状态提供给医疗人员。在施用前,该冷冻细胞快速解冻、冷却,并使用本领域技术人员熟知的方法和组合物用生理上可接受的载体、赋形剂、缓冲剂和/或稀释剂来配制。这些部分成熟且经活化树突状细胞可直接施用于需要免疫刺激的受试者。通常,将约 10^2 至约 10^{10} 个细胞悬浮于药学上可接受的载体如磷酸盐缓冲盐水中。将细胞直接注射到肿瘤中或者注射到与肿瘤或肿瘤床接近、邻近的区域中,或与肿瘤或肿瘤床接触的循环血管或淋巴中,以确保细胞能够接近癌症或肿瘤抗原。

[0075] 例如,但并非限制,细胞可直接施用进肿瘤,施用进手术移除或切除肿瘤之后的肿瘤床,施用进瘤周间隙,施用进与肿瘤直接接触的引流淋巴结,施用进引向肿瘤或肿瘤受累器官或为它们提供营养的血管或淋巴管,例如门静脉或肺静脉或动脉等。本发明的部分和最佳成熟的树突状细胞的施用可与肿瘤的另一处理,例如化学疗法或放射疗法同时进行或在其之后进行。此外,本发明的部分成熟的树突状细胞可与另一种药剂共同施用,该药剂用作树突状细胞成熟和/或对肿瘤或肿瘤附近或邻近区域内的抗原进行加工的佐剂。此外,还可将树突状细胞配制或复合成缓释基质以植入肿瘤或肿瘤床内或周围的区域,以使得细胞缓慢释放到肿瘤或肿瘤床中以接触肿瘤抗原。

[0076] 本公开中使用的肿瘤包括实体瘤,例如但非限制,肉瘤;胰腺肿瘤;结直肠肿瘤;黑色素瘤;肺肿瘤;乳腺肿瘤;卵巢肿瘤;头或颈部肿瘤;胃肿瘤;前列腺肿瘤;食管肿瘤;子宫颈或阴道肿瘤;脑肿瘤,例如成胶质细胞瘤、星形细胞瘤、脑膜瘤或成神经管细胞瘤;等等。其它的实体瘤也使用本文所公开的组合物或方法来进行处理。

[0077] 本公开的部分成熟且经活化树突状细胞可通过适合于制剂和施用模式的任何方式施用。例如,这些细胞可与药学上可接受的载体组合,并用注射器、导管、套管等施用。如上所述,细胞可配制在缓释基质中。当以这种方式施用时,可通过适合所用基质的方式施用制剂。适用于本发明的其它施用方法和模式对于本领域技术人员来说是公知的。

[0078] 本发明的组合物自身可用于个体的处理。另外,这些组合物可与任何其它方法联合使用来处理癌症或肿瘤。例如,本发明的方法可与肿瘤的手术切除、化学治疗(细胞毒性药物、细胞凋亡剂、抗体等)、放射疗法、冷冻疗法、近距离放射疗法、免疫疗法(施用抗原特异性成熟的经活化树突状细胞、NK细胞、对癌细胞或肿瘤抗原具有特异性的抗体等)等。这些方法中的任何一种和所有也可以任何组合形式使用。联合处理可以是同时的或依序的,并且可按处理医师确定的任何顺序施用。

[0079] 在另一个实施方案中,树突状细胞和受体受试者具有相同的MHC (HLA) 单体型(haplotype)。确定受试者的HLA单体型的方法是本领域已知的。在相关的实施方案中,部分成熟的树突状细胞与受体受试者是同种异体的(allogeneic)。同种异体细胞通常匹配至少一个MHC等位基因(例如,共有至少一个但不是全部MHC等位基因)。在一个较不典型的实施方案中,树突状细胞和受体受试者彼此都是同种异体的,但都具有至少一个共同的MHC等位基因。

[0080] 抗肿瘤免疫应答可通过任何一种或更多种公知的方法来测量。例如,可通过肿瘤尺寸的减小、肿瘤细胞死亡或肿瘤细胞坏死的诱导、肿瘤细胞增殖的减少、或者通过肿瘤抗原特异性T细胞(TIL)的浸润等等来测量抗肿瘤应答。

[0081] 本发明特别涉及以下方案:

[0082] 方案1.用于确定经活化树突状细胞组合物的免疫治疗效力的方法,所述方法包括以下步骤:

[0083] i) 制备经活化树突状细胞;

[0084] ii) 确定白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素8(IL-8)、白细胞介素12(IL-12)和/或肿瘤坏死因子 α (TNF α)的相对量;

[0085] iii) 将IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 的确定量与阈值量比较;以及

[0086] iv) 如果IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 中的一个或任何组合、和/或全部低于阈值,则确定所述经活化树突状细胞组合物为低免疫治疗效力;或者,如果IL-6、IL-8、IL-12和TNF α 中的一个或任何组合、和/或全部高于阈值,则确定所述经活化树突状细胞组合物为高免疫治疗效力。

[0087] 方案2.用于增强经活化DC群的免疫治疗效力的方法,所述方法包括以下步骤:

[0088] i) 制备经活化树突状细胞群;

[0089] ii) 确定IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 的相对量;

[0090] iii) 将IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 的确定量与阈值量比较;

[0091] iv) 确定IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 中的一个或任何组合、和/或全部是否低于阈值;以及

[0092] v) 添加足够量的可诱导所述经活化DC产生IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 中的一个或任何组合、和/或全部的试剂将IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 中的一个或任何组合、和/或全部的量提高到高于所述阈值量,以便形成具有增强的免疫治疗效力的经活化DC群。

[0093] 方案3.用于通过确定衍生自患者的经活化树突状细胞组合物的免疫治疗效力来选择将对经活化树突状细胞的施用作出应答的患者,所述方法包括以下步骤:

[0094] i) 制备经活化树突状细胞;

[0095] ii) 确定IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 的相对量;

[0096] iii) 将IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 的确定量与阈值量比较;以及

[0097] iv) 如果IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 中的一个或任何组合、和/或全部低于阈值,则确定所述经活化树突状细胞组合物为低免疫治疗效力,或者,如果IL-6、IL-8、IL-12和TNF α 中的一个或任何组合、和/或全部高于阈值,则确定所述经活化树突状细胞组合物为高免疫治疗效力并将高于所述阈值的那些患者选择为将作出应答的患者。

[0098] 方案4.用于通过确定衍生自患者的经活化树突状细胞组合物的免疫治疗效力来选择将对经活化树突状细胞的施用不作出应答的患者,所述方法包括以下步骤:

[0099] i) 制备经活化树突状细胞;

[0100] ii) 确定IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 的相对量;

[0101] iii) 将IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 的确定量与阈值量比较;以及

[0102] iv) 如果IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 中的一个或任何组合、和/或全部低于阈值,则确定所述经活化树突状细胞组合物为低免疫治疗效力,或者,如果IL-6、IL-8、IL-12和

TNF α 中的一个或任何组合、和/或全部高于阈值,则确定所述经活化树突状细胞组合物为高免疫治疗效力并将低于所述阈值的那些患者选择为将不作出应答的患者。

[0103] 方案5.用于选择用于产生具有增强的免疫治疗效力的经活化树突状细胞的树突状细胞成熟剂的方法,所述方法包括以下步骤:

[0104] i) 通过让未成熟树突状细胞与试验树突状细胞成熟剂接触制备经活化树突状细胞;

[0105] ii) 确定IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 的相对量;

[0106] iii) 将IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 的确定量与阈值量比较;以及

[0107] iv) 如果IL-6、IL-8、IL-12和/或TNF α 中的一个或任何组合、和/或全部低于阈值,则确定所述经活化树突状细胞组合物为低免疫治疗效力,或者,如果IL-6、IL-8、IL-12和TNF α 中的一个或任何组合、和/或全部高于阈值,则确定所述经活化树突状细胞组合物为高免疫治疗效力,并选择诱导产生高于所述阈值的经活化树突状细胞的树突状细胞成熟剂。

[0108] 方案6.如方案1至5中任一项所述的方法,其中所述经活化树突状细胞产生约50至约200ng/1百万个细胞/24小时的IL-6;约500至约2000ng/1百万个细胞/24小时的IL-8;至少约30至约70ng/1百万个细胞/24小时的TNF α ;至少约75至约100ng/1百万个细胞/24小时的IL-12p40亚基;以及约1至3ng/1百万个细胞/24小时的生物学活性IL-12p70。

[0109] 方案7.如方案6所述的方法,其中所述经活化树突状细胞产生约75至约150ng/1百万个细胞/24小时的IL-6;约750至约1500ng/1百万个细胞/24小时的IL-8;至少约100ng/1百万个细胞/24小时的IL-12p40;至少约1至3ng/1百万个细胞/24小时的IL-12p70;以及至少约30至70ng/1百万个细胞/24小时的TNF α 。

[0110] 方案8.如方案7所述的方法,其中所述经活化树突状细胞产生约100ng/1百万个细胞/24小时的IL-6,1000ng/1百万个细胞/24小时的IL-8,至少约100ng/1百万个细胞/24小时的IL-12p40;至少约2ng/1百万个细胞/24小时的IL-12p70;以及至少约30ng的TNF α 。

[0111] 方案9.如方案1-5中任一项所述的方法,其中所述经活化树突状细胞通过以下步骤制备:

[0112] i) 从外周血分离包含人外周血单个核细胞(PBMC)的细胞群;

[0113] ii) 使所述包含人PBMC的细胞群富集人单核树突状细胞前体;

[0114] iii) 用补充有有效量的树突状细胞分化剂的组织培养基培养富集了人单核树突状细胞前体的细胞群足够长的时间,以使所述人单核树突状细胞前体分化成未成熟人树突状细胞;

[0115] iv) 用有效量的树突状细胞成熟剂培养富集了未成熟人树突状细胞的细胞群以活化所述未成熟人树突状细胞;以及

[0116] v) 分离并洗涤经活化人树突状细胞。

[0117] 方案10.如方案1-5中任一项所述的方法,其中所述经活化树突状细胞通过以下步骤制备:

[0118] i) 分离包含人单核树突状细胞前体的细胞群;

[0119] ii) 用补充有有效量的树突状细胞分化剂的组织培养基培养富集了人单核树突状细胞前体的细胞群足够长的时间,以使所述人单核树突状细胞前体分化成未成熟人树突状细胞;

[0120] iii) 用有效量的树突状细胞成熟剂培养富集了未成熟人树突状细胞的细胞群以活化所述未成熟人树突状细胞;以及

[0121] iv) 分离并洗涤经活化人树突状细胞。

[0122] 方案11. 如方案10所述的方法, 其中所述单核树突状细胞前体从皮肤、脾、骨髓、胸腺、淋巴结、脐带血或外周血获得。

[0123] 方案12. 如方案9至11中任一项所述的方法, 其中所述单核树突状细胞前体细胞是未经活化的单核树突状细胞前体。

[0124] 方案13. 如方案9至12中任一项所述的方法, 其中所述单核树突状细胞前体从待处理个体受试者获得。

[0125] 方案14. 如方案9至12中任一项所述的方法, 其中所述单核树突状细胞前体从与待处理个体受试者HLA匹配的健康个体受试者获得。

[0126] 方案15. 如方案9和10中任一项所述的方法, 其中所述树突状细胞分化剂是无任何其它细胞因子的GM-CSF, 或者与IL-4、IL-7、IL-13或IL-15联合的GM-CSF。

[0127] 方案16. 如方案9和10中任一项所述的方法, 其中所述树突状细胞成熟剂是灭活卡介苗(BCG)、干扰素 γ (IFN γ)、脂多糖(LPS)、肿瘤坏死因子 α (TNF α)、咪唑并喹啉化合物、合成的双链多聚核糖核苷酸、Toll样受体(TLR)激动剂、已知会诱导树突状细胞成熟的含有未甲基化的CpG基序的核酸序列, 或其任何组合。

[0128] 方案17. 如方案16所述的方法, 其中所述灭活BCG包括完整的BCG、BCG的细胞壁组分、BCG衍生的脂阿拉伯糖甘露聚糖或BCG成分。

[0129] 方案18. 如方案17所述的方法, 其中所述灭活BCG是经热灭活的BCG、经福尔马林处理的BCG, 或经热灭活且福尔马林处理的BCG。

[0130] 方案19. 如方案16至18中任一项所述的方法, 其中BCG的有效量为每毫升组织培养基约 10^5 至 10^7 cfu, IFN γ 的有效量为每毫升组织培养基约100至约1,000单位。

[0131] 方案20. 如方案16所述的方法, 其中所述咪唑并喹啉化合物是咪唑并喹啉-4-胺化合物。

[0132] 方案21. 如方案20所述的方法, 其中所述咪唑并喹啉-4-胺化合物是4-氨基-2-乙氧基甲基- α, α -二甲基-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-1-5乙醇或1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-4-胺, 或其衍生物。

[0133] 方案22. 如方案16所述的方法, 其中所述合成的双链多聚核糖核苷酸是聚[I]:聚[C(12)U]。

实施例

[0134] 提供以下实施例仅仅是为了说明本说明书的各个方面, 而不应被解释为以任何方式限制本文公开的方法和组合物。虽然已经说明和描述了该方法和/或方法的优选实施方案, 但应理解的是, 在不脱离本说明书的精神和范围的情况下, 可以在其中进行各种改变。

[0135] 在本实施例中, 在各种实体肿瘤中以剂量递增研究试验了经活化树突状细胞。

[0136] 方法

[0137] 40个受试者参加了本剂量递增研究以试验在实体瘤中肿瘤内注射经活化DC(aDC) (包括经最佳活化的树突状细胞)的安全性和可行性。在12周的筛选内经历了至少一次抗肿

瘤处理方案的患有局部晚期或转移性疾病的18至75岁受试者入选本研究。其它入选标准包括东部肿瘤协作组 (ECOG) 表现状态为0或1,至少有一个直径大于1 cm的可注射肿瘤块并位于远离主要血管结构或不适于肿胀的区域(例如,上呼吸道肿瘤),产生足够数量的单核细胞来制造全剂量疗程,预期寿命大于6个月,以及具有足够的骨髓和肾功能。具有自身免疫疾病或器官移植史的受试者排除在本研究外。其它的排除标准包括具有HIV-1、2或HTLV-I或II阳性状态;在首次注射前4周内严重骨髓抑制或骨髓毒性化疗;在2年内接受癌症免疫疗法;具有未处理的脑转移;需要不间断的甾类或抗凝治疗;或者具有急性或未控制的感染。受试者的特征总结在表1中。

[0138] 表1. 所处理患者的基线特征

特征, n=39	总计
年龄中值 (范围)	53 (30 - 73)
性别, n (%)	
男性	18 (46.2)
女性	21 (53.8)
疾病类型, n (%)	
胰腺腺癌	5 (12.8)
肉瘤	9 (23.1)
结直肠的	7 (17.9)
[0139] 神经内分泌的	4 (10.3)
黑素瘤	6 (15.4)
肺	3 (7.7)
乳腺	2 (5.1)
卵巢	1 (2.6)
膀胱	1 (2.6)
胆管癌	1 (2.6)
先前治疗的次数, n (%)	
≤ 2	20 (51.3)
3 - 5	12 (30.8)
≥ 6	7 (17.9)

[0140] 研究设计

[0141] 这是对经活化DC的安全性和有效性的评价。研究的剂量递增部分采用“3+3”设计。在本项研究中包括了三个剂量水平。每次注射2百万个、6百万个和1千5百万个经活化DC。

[0142] 每个受试者经历白细胞分离术以收集单核细胞,所述DC前体细胞。按下文描述制备经活化DC (aDC; 商品名 DCVax[®]-Direct)。首次aDC注射发生在白细胞分离术后的大概第3周,随后的注射在首次注射后的1、2、8、16、和32周施用。所有的注射都采用影像导引(或者超声波,或者计算机断层扫描(CT))施用,以将导引针置于肿瘤内部,然后细针将产品直接递送至肿瘤组织。对于每次免疫,将3至4个针道 (needle passes) 用于将细胞施用进肿瘤边缘内,增强aDC暴露于死亡和垂死肿瘤细胞,同时避免将单个团块递送至肿瘤块的坏死中心。注射后,观察受试者2小时,每30分钟获取生命体征(心率、体温和血压)。

[0143] 剂量限制性毒性 (DLT) 和最大耐受剂量 (MTD)

[0144] DLT定义为以下的任一个: ≥3级注射部位反应,出现自身免疫疾病的临床体征和

症状, ≥ 2 级过敏反应, 持续3天或更多天或需要药物介入的 ≥ 2 级免疫反应, ≥ 3 级国立癌症研究院通用毒性标准(NCI CTC)v.4毒性, 或与恶性肿瘤进展无关的4级或威胁生命事件。最大耐受剂量(MTD)定义为不超过三分之一的受试者经历剂量限制性毒性(DLT)的最高剂量水平。

[0145] 有效性评价

[0146] 根据实体肿瘤的疗效评估标准1.1版(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors v.1.1(Eisenhauer等, Eur. J. Cancer 4:228-247, 2009))或免疫应答相关标准(immune response related criteria(Hoos等, J. Nat'l. Cancer Inst. 102:1388-1397, 2010)), 通过计算机断层扫描(CT)或磁共振(MR)成像研究来评价处理有效性。简言之, 进展性疾病(PD)定义为靶病变直径总和相对于研究期间观察到的最小总和 $\geq 20\%$, 并且绝对总和必须 $\geq 5\text{mm}$ 。稳定疾病(SD)定义为, 不具有足够的肿瘤收缩以符合部分应答($\geq 30\%$ 靶病变直径减小), 同时也不具有足够的肿瘤生长以符合PD。

[0147] 经活化DC的制备

[0148] 采用切向流过滤从白细胞分离术产物纯化单核细胞。将细胞置于Teflon组织培养袋(Saint-Gobain, Malvern, PA)中并在粒细胞巨噬细胞击落刺激因子(GM-CSF加2%人血清白蛋白)存在下分化5天成未成熟DC。将细胞培养5天, 然后添加已杀灭BCG分枝杆菌和IFN γ , 以诱导DC活化约10至19小时的时间。活化后, 将经活化树突状细胞重悬浮在小体积的RPMI-1640、40%人血清白蛋白和10%DMSO中, 并将细胞以单个剂量等份冷冻保存。在细胞上进行流式细胞术, 寻找树突状细胞活化标志物(图3)。

[0149] 细胞因子水平确定

[0150] 按照制造商说明, 将定制的用于TNF α 、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10和IL-12p40的多重磁珠组(Luminex Corp., Austin, TX)和用于IL-12p70的单重组(Invitrogen, Carlsbad, CA)用来来自DCVax-Direct产物培养物的澄清上清液中确定细胞因子浓度。数据报告为每百万活DC归一化的重复确定值的平均值。

[0151] 肿瘤活检评价

[0152] 采用标准方法将活检肿瘤福尔马林固定和石蜡包埋(FFPE)。由QualTek Molecular Laboratories(Santa Barbara, CA)进行所有的免疫组织化学。

[0153] 按照制造商建议的程序, 采用RNAscope测定法, 用探针Hs-IFN γ 和Hs-TNF Δ (分别为cat#310501和310421, Advanced Cell Diagnostics(ACD), USA)、阳性对照探针PPIB(cat#313901)、以及RNAscope 2.0HD试剂盒(Brown)(cat#310035, ACD, USA)进行FFPE样本中IFN γ 和TNF α 转录物的原位检测。为了证实IFN γ 和TNF α RNAscope特异性, 在T细胞刺激之前和之后试验了来自三个健康供体的PBMC。为了刺激T细胞, 采用Ficoll-Paque(Sigma-Aldrich)分离PBMC, 重悬浮在补加有10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中, 并用50ng/mL豆蔻酸佛波醇乙酸酯(PMA)和1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 离子霉素(ionomycin)(Sigma-Aldrich)在37 $^{\circ}\text{C}$ 和5%CO₂处理5小时。将细胞固定在Histogel[®]中10%中性缓冲福尔马林(NBF)中, 处理, 并包埋进FFPE块中。然后采用RNAscope试验切片(5 μm), 如上文所述。经刺激的T细胞与未处理细胞相比, 显示出IFN γ 和TNF α 的强烈增加。用Aperio ScanScope XT数字载玻片扫描仪获取染色载玻片的数字图像。

[0154] 统计分析

[0155] 进行统计分析以确定细胞因子水平是否与结果相关。此外,还评估了基线特征或处理因素是否能预测细胞因子水平或结果。基于两个变量测量应答。作为二分类测量的第8周时SD和存活时间。不为试验多重性(testing multiplicity)进行调整。0.05的p值被认为是统计学显著的。

[0156] 首先,为细胞因子水平生成描述性测量值,包括效力测量值之间的相关性。其次,使用非参数ANOVA(Wilcoxon)方法评估基线特征或处理因素与细胞因子水平之间的关联。审查了对所有成对的细胞因子水平的测量值的散点图。将比例风险模型用来将生存时间作为单个细胞因子水平的函数进行拟合,并使用向后回归法(backward regression)来确定特殊测量值是否在联合模型中更具预测性。将逻辑斯谛模型用来将第8周时SD作为单个细胞因子水平的函数进行拟合,并使用向后回归法(backward regression)来确定特殊测量值是否在联合模型中更具预测性。以适合于测量值和终点的方式,将比例风险模型、逻辑斯谛模型、趋势检验、或似然比 χ^2 检验用于评价基线特征和处理因素与存活和第8周时SD之间的关联。对于基于细胞因子水平的Kaplan-Meier生存曲线图,每种细胞因子均使用中值作为两组之间的临界值。

[0157] 基于散点图的分析 and 审查,一组观察结果似乎是潜在的异常值或可能是一组独特受试者(在结果中进一步描述)。除去这些受试者记录后重复分析。采用SAS 9.3版本(SAS Institute Inc.,Cary,NC)完成分析。

[0158] 结果

[0159] 受试者

[0160] 总计40个受试者参加了本项研究。其中,一个受试者由于aDC的不正确配制而被认为是无法评价的。受试者人口统计数据 and 临床特征显示在表1中。中值受试者年龄为53岁(30至73岁范围)。本研究包括21个女性(53.8%)。在本研究中包括了大量的肿瘤类型,最常见的为肉瘤(n=8)、结直肠癌(n=7)和黑素瘤(n=6)。受试者具有三个病变的中值(范围=1至5个病变)。先前处理的中值数量为2(平均值=3;范围=1至9)。所有操作都是在门诊的基础上,在影像引导(计算机断层扫描或超声)下完成的,由介入放射科医师进行清醒镇静协助。在2百万个aDC剂量,16个受试者施用中值为四次注射(范围=1至6次注射)。在6百万个aDC剂量,20个受试者施用中值为三次注射(范围=2至6次注射)。在1千5百万个aDC剂量,三个受试者施用中值为四次注射(范围=3至4次注射)。每个受试者仅注射一个肿瘤。

[0161] 在影像引导下,将每次注射aDC以2百万个、6百万个或1千5百万个活的、经活化、自体DC的剂量瘤内施用。在每次注射探访时(第0、7、14天,然后第8、16和32周),注射单个病变部位。为了治病用于瘤内注射的aDC,它们经暴露于BCG和IFN γ 而活化。收集来自经活化DC的上清液,测量细胞因子产生。针对肿瘤坏死和浸润淋巴细胞,对肿瘤活检进行评估。通过标准成像操作监测肿瘤尺寸,收集血液用于免疫监测。

[0162] 安全性和存活

[0163] 影像引导下的瘤内注射通常具有很好的耐受性和可行性。总体上,在16个受试者以2百万个、20个受试者以6百万个,以及3个受试者以1千5百万个的剂量水平进行i.t.注射。在剂量递增期间未观察到剂量限制性毒性(DLT),因此,未确定最大耐受剂量(MTD)。最大的试验剂量(1千5百万个aDC)被很好地耐受。与研究处理相关的不良事件报告在表2中。

[0164] 表2. 处理相关的不良事件。

		经活化树突状细胞 (aDCs/注射)						
		2 百万个, n = 16		6 百万个, n = 20		1 千 5 百万个, n = 3		总计, n (%) ^b
不良事件 ^a		G1-G2	G3-G4	G1-G2	G3-G4	G1-G2	G3-G4	
	发热	15	0	14	0	2	0	31 (79.5)
	寒战	10	0	5	0	1	0	16 (41.0)
	疲劳	8	0	2	2	0	0	12 (30.8)
	注射部位疼痛或不适	8	0	3	0	0	0	11 (28.2)
	盗汗	5	0	5	0	0	0	10 (25.6)
	食欲降低	6	0	2	0	1	0	9 (23.1)
	肌痛	4	0	3	0	0	0	7 (17.9)
	头痛	3	0	1	0	0	0	4 (10.3)
	恶心	3	0	0	0	1	0	4 (10.3)
	呕吐	3	0	0	0	1	0	4 (10.3)
	贫血	1	0	0	1	0	0	2 (5.1)
	流感样病态	1	0	1	0	0	0	2 (5.1)
	疼痛	0	0	2	0	0	0	2 (5.1)
[0165]	消瘦	0	0	1	0	1	0	2 (5.1)
	腹部疼痛	0	0	1	0	0	0	1 (2.6)
	背痛	0	0	1	0	0	0	1 (2.6)
	胸痛	0	0	1	0	0	0	1 (2.6)
	脱水	1	0	0	0	0	0	1 (2.6)
	眼干	1	0	0	0	0	0	1 (2.6)
	口干	1	0	0	0	0	0	1 (2.6)
	呼吸困难	0	0	1	0	0	0	1 (2.6)
	面部水肿	0	0	1	0	0	0	1 (2.6)
	肾积水	1	0	0	0	0	0	1 (2.6)
	低钾血症	0	0	0	1	0	0	1 (2.6)
	低镁血症	1	0	0	0	0	0	1 (2.6)
	失眠	1	0	0	0	0	0	1 (2.6)
	肌肉骨骼不适	1	0	0	0	0	0	1 (2.6)
	外周性水肿	1	0	0	0	0	0	1 (2.6)
	皮肤敏化	0	0	1	0	0	0	1 (2.6)
	全身炎症反应综合征	0	0	0	1	0	0	1 (2.6)
	心动过速	0	0	1	0	0	0	1 (2.6)

[0166] 缩写:aDC,经活化树突状细胞;G,级别(根据国立癌症研究院用于不良事件的通用术语标准版本4)。

[0167] ^a当于多日在不同级别观察到不良事件,列出了所观察到的最高级别。

[0168] ^b总患者百分比,N=39。

[0169] 在32个受试者中观察到处理相关不良事件(82.1%),但这些基本上都是1级或2级,并且大部分在研究期结束前已解决。最常见的不良事件为发热(n=31,79.5%)、寒战(n=16,41.0%)、疲劳(n=12,23.1%)、注射部位疼痛或不适(n=11,28.2%)、盗汗(n=10,25.6%)、食欲降低(n=9,23.1%)和肌痛(n=7,17.9%)。

[0170] 有四个3级(10.3%)和一个4级(2.6%)处理相关不良事件,全部在每次注射6百万个aDC的剂量。

[0171] 组织学

[0172] 从28个受试者收集系列活检数据。总计取得104个活检样本。在14个活检受试者中观察到新的或增加的坏死(57%)。在14个活检受试者中观察到新的或增加数量的间质淋巴细胞(50.0%)；在15个活检受试者中观察到新的或增加数量的浸润淋巴细胞(54%)；以及在8个活检受试者中观察到浸润和间质淋巴细胞(29%)。在第3周和第8周收集活检样本，瘤周或瘤内T细胞通常在处理开始后的第8周检测到。因此，免疫应答在该时间框架内在某个地方启动。在一些受试者中，在首次注射后的第2或第3周检测到T细胞聚集。这些T细胞可能代表了经活化DC注射后局限于肿瘤的预先存在的抗肿瘤免疫应答。

[0173] 在25个评价的肿瘤活检中19个观察到从无到有的或显著增强的PD-L1表达。在对淋巴细胞和PD-L1二者染色的活检样本中，在具有新的或增加的浸润T细胞的12个受试者中的9个，以及在具有新的或增加的间质T细胞的12个受试者中的11个观察到新的或增加的PD-L1表达。在具有新的或增加的PD-L1表达的总计19个受试者中，14个具有瘤周或浸润淋巴细胞。

[0174] 当观察到浸润T细胞时，它们主要为CD4⁺和CD8⁺细胞的混合物；但是，有少数情况仅检测到CD4⁺或CD8⁺ T细胞。在一些情形下，在活检切片中T细胞构成了总细胞的30%以上(还参见图1A)。

[0175] 为了评估肿瘤相关和肿瘤浸润T细胞功能性，在所选的组织上进行IFN γ 和TNF α 表达的RNAscope分析。试验样品中大多数T细胞对两种细胞因子都是阳性的(图1B和1C)，提示完全功能性的T细胞被募集到肿瘤。也检测到表达TNF α 的组织巨噬细胞。

[0176] 细胞因子水平、存活和稳定疾病(SD)

[0177] 在注射进受试者之前评价aDC的细胞因子水平。因为每个批次的aDC都是衍生自受试者自己的单核细胞，所以在细胞因子水平方面观察到大幅度的受试者间可变性。因此，在第8周评价了细胞因子水平之间的内部相关性和细胞因子与基线特征、处理因素、存活、和SD之间的相关性。

[0178] 在统计分析期间，三个受试者具有这样的经活化DC，它们具有高水平IL-8和IL-6，但低TNF α 水平。这些受试者一直作为统计异常值出现。第一个异常值受试者为51岁的男性黑色素瘤受试者，来自6百万个aDC处理组。他具有5个病变(lesion)，并先前经历了一轮处理。他接受了三次注射，在第8周具有SD，大概在首次注射9个月后死亡。第二个异常值受试者为6百万个aDC处理组中的59岁女性乳腺癌受试者。她具有3个病灶，并先前经历了八轮处理。她接受了三次注射，大概在首次注射1个月后死亡。第三个异常值受试者为1千5百万个aDC处理组中的52岁男性肺癌受试者。他具有3个病灶，并先前经历了五轮处理。他接受了三次注射，在第8周具有PD(进展疾病)，大概在首次注射3.5个月后死亡。所有三个受试者都有沉重的疾病负担和极差的预后。这三个受试者不具有将他们与其余的研究受试者分开的其它已知的突出特点。对来自这些受试者之一的aDC的探索性分析提示，纯化的单核细胞可能未能完全转变为aDC。在随后的分析中，排除了异常值受试者数据。

[0179] 细胞因子水平之间的内部相关性

[0180] 为了评估活化的质量和aDC产生的细胞因子的效果，确定了TNF α 、IL-6、IL-8、IL-10、IL12p40，和IL-12p70的水平。所评价的各种细胞因子之间具有高水平的内部相关性。在单变量分析中这些值与结果(稳定疾病(SD)或存活)相关联。另行地将向后回归模型用来评估测量值的相对预测强度，并基于联合模型，从所有因素开始鉴定变量组合。将相关的细胞

因子分为以下三组。第一组包括IL-6、IL-12p40和较低程度的TNF α 。IL-6和IL-12p40的皮尔逊r值为0.64 ($p=0.004$)。IL-6和TNF α 的r值为0.88 ($p<0.001$)。IL-8和IL-12p40的r值为0.641 ($p<0.001$)。第二组为IL-10和IL-8。IL-18和IL-10的r值为0.63 ($p<0.001$)。第三组为IL-12p40和IL-12p70,其具有0.55的r值 ($p<0.001$)。应该指出的是,用于生成aDC的短活化时间对于检测IL-12p70产生的完全补充(full complement)不是最佳的。

[0181] 细胞因子水平与基线特征和处理因素的相关性

[0182] 接下来,采用回归分析确定了细胞因子水平与基线特征和处理因素,包括适应症(indications)、病变数量、先前的处理、剂量、注射数量、年龄、总的或最大肿瘤直径(SLD)、以及筛查时的决定淋巴细胞计数(ALC)之间的关联。SLD与IL-8 ($R^2=0.20$; $p=0.006$)、IL-12p40 ($R^2=0.14$; $p=0.026$) 和IL-12p70 ($R^2=0.11$; $p=0.051$) 水平负相关,与IL-10水平正相关 ($R^2=0.023$)。ALC与IL-12p40正相关 ($R^2=0.26$; $p=0.002$)。SLD或ALC各自都不与存活相关。

[0183] 细胞因子水平和存活的相关性

[0184] 将细胞因子水平单个地在比例风险模型中拟合,以确定它们是否能预测存活。单变量分析表明,IL-6 ($p=0.048$)、IL-8 ($p=0.014$) 和IL-12p40 ($p=0.016$) 与存活相关。具体地,IL-8水平高于985ng/10⁶个细胞/天和IL-12p40水平高于330/10⁶个细胞/天显示出显著更高的总体存活(分别地, $p=0.0022$ 和 $p=0.0077$;图2A和2B)。

[0185] 进行探索性分析以评价分离的细胞因子对的联合模型并评估潜在的因素相互作用。IL-8和IL-12p40的组合与潜在的显著交叉项(interaction term)相关 ($p=0.020$)。该联合交叉模型表明,具有高值的IL-8和IL-12p40受试者可能总体上应答更佳。该结果提示,DC效力测量值和临床结果之间可能有更复杂的关系。

[0186] 细胞因子水平和第8周时稳定疾病之间的关联

[0187] Kaplan-Meyer分析显示,存活与第8周SD显著相关 ($p=0.004$,图2C);因此,确定是否有细胞因子标志物与SD相关。将细胞因子水平单个地拟合进逻辑斯谛模型,以确定它们是否能预测第8周SD。单变量分析揭示了第8周SD与TNF α 之间的正相关 ($p=0.015$,图2D),并且在多变量向后回归模型中证实了这种关联。

[0188] DC质量的其它测量

[0189] 针对表面标志物表达,分析了来自25个受试者的经注射的aDC。存活与MHC I类抗原(用于趋势(trend)的log-rank $p=0.07$)和CD86共刺激分子(用于趋势(trend)的log-rank $p=0.1$)的表达水平(平均荧光强度,分为三分位)之间的弱相关性为这样的假设增添了更多的支持:当瘤内递送时DC质量为受试者结果的主要驱动者(图2E和图2F)。

[0190] 在经产生高水平TNF的aDC处理的更多受试者中观察到疾病的稳定性 ($p<0.01$)。存活很可能与高产生水平的TNF α 、IL-6和IL-8相关。

[0191] 在本研究中,试验了经活化自体树突状细胞(aDC)的安全性和有效性。将aDC瘤内注射,作为对患有不可切除的、局部晚期的或转移性实体瘤的受试者的处理。在第0、1、2、8、16和32周用2百万、6百万、1千5百万个aDC/注射处理受试者,或者直至没有更多的自体aDC可施用。没有观察到DLT,因此,没有MTD。这个观察结果与其中没有鉴定出DLT或MTD的其它DC疫苗研究是一致的(Butterfield,Front.Immunol.4:454,2013,Draube等,PLoS One 6:e18801,2011)。鉴于DC疫苗使用自体细胞,毒性有限并不出人意料。之前还注意到,DC疫苗

剂量仅由在白细胞分离术期间可提取和转变来用于处理的细胞数量所限制,其称为最大可行剂量(Anguille等,Pharmacol.Rev.67:731-753,2015)。

[0192] 本文施用的最大剂量为1千5百万个aDC/注射,这个剂量被很好地耐受;这个大剂量可能不是产生有效T细胞应答所必需的。对肾和前列腺癌DC疫苗试验的一个大元分析(meta analysis)鉴定了剂量和结果之间的正相关性(Draube等,PLoS One 6:e18801,2011)。但是,几个其它的研究已显示,用相对少的DC,较少的细胞可实现等效的免疫应答,只要该DC有效到达引流淋巴(Tel等,Cancer Res.73:1063-1075,2013;Aarntzen等,Clin.Cancer Res.19:1525-1533,2013;Verdijk等,Expert Opin.Biol.Ther.87:865-874,2008),Celli等,Blood 120:3945-3948,2012)。本研究中用aDC处理,观察到相对较少的低级别的处理相关不良事件。这些不良事件主要与免疫系统的活化相关,例如发热。这些结果,连同缺乏MTD,表明aDC为实体瘤的安全处理。

[0193] 至于aDC的有效性,经注射肿瘤的活检显示了增加的坏死和淋巴细胞浸润,包括CD4⁺辅助细胞和CD8⁺杀伤细胞。在个别情况下,观察到患者活检中T细胞的快速和延迟浸润以及广泛坏死的免疫反应性。这些观察结果领先于肿瘤尺寸的可证实的减小(数据未示出)。研究已显示,在几种实体瘤中,肿瘤中T细胞的某些类型(例如间质淋巴细胞和CTL)增加的浸润和聚集与改善的结果紧密相关(Tosolini等,Cancer Res.71:1263-1271,2011;Smyth等,Adv.Immunol.90:1-50,2006;Clemente等,Cancer 77:1303-1310,1996)。此外,在所试验的25个肿瘤中的19个上调了PD-L1,并且这种上调很可能反映了对免疫活化的肿瘤应答,特别是因为试验为T细胞阳性的肿瘤活检更可能具有增加的PD-L1表达。PD-L1为淋巴细胞浸润期间诱发的共抑制分子,其下调T细胞活性以控制过度免疫反应,而肿瘤将其用于逃避免疫应答(Ito等,Biomed.Res.Int.2015:605478,2015,Anguille等,Pharmacol.Rev.67:731-753,2015)。鉴于上述PD-L1数据来自活检肿瘤,则PD-L1表达的出现可以用作成功抗肿瘤免疫应答诱导的标志物,而不是对免疫应答下调的指示。总之,这些结果提供了aDC在实体瘤中刺激有效T细胞应答的证明。

[0194] 关于DC处理有效,其也应改善患者结果。本文假设,存活机制与如通过aDC分泌的细胞因子衡量的DC效力有关。因此,在将aDC注射进肿瘤之前评估aDC的细胞因子水平。观察到IL-12p40与存活显著相关。IL-12p40为异二聚体IL-12复合体(也称为IL-12p70)的一个亚基。已知IL-12刺激自然杀伤细胞和成熟T细胞。还已知其帮助T_H2细胞转变为T_H1细胞,而后者具有抗肿瘤活性(DeI Vecchio等,Clin.Cancer Res.12:4677-4685,2007)。因此,产生IL-12p40的aDC对于有效DC疫苗是理想的。此外,IL-8分泌与存活相关。具体地,高的IL-8分泌显示显著更高的总体存活。IL-8主要被认为是与肿瘤负相关。IL-8促进血管生成,细胞增殖、以及细胞存活;但是,其也促进免疫细胞浸润肿瘤微环境(Waugh和Wilson,Clin.Cancer Res.14:6735-6741,2008)。在BCG免疫治疗的情况下,IL-8与抗肿瘤免疫应答的出现相关(de Boer等,Urol.Res.25:31-34,1997)。看起来有可能是产生IL-8的aDC的局部应用刺激免疫细胞浸润肿瘤。此外,回归模型显示这二者的组合与存活正相关。该观察结果表明,IL-8和IL-12p40的组合(以及可能的其它细胞因子),而不是个别细胞因子,可以是改善存活的关键。目前,不清楚显示出与存活相关的分泌的细胞因子具有直接的功能意义,还是它们起了对总体DC效力的灵敏测量的作用。所观察到的患者基线水平与通过细胞因子产生测量的DC效力之间的相关性提示,诸如SLD和ALC的因素可以让患者倾向于更大受益于基于DC的治

疗,尽管该 R^2 值提示这些基线参数仅解释了多至25%的细胞因子水平变化。这种可能性值得在用更均一患者群体进行的随后研究中进一步关注,并且将会是未来研究的主题。

[0195] 对经aDC处理的患者的另外的存活分析显示,第8周SD与存活显著相关。这些数据表明,如果肿瘤可通过aDC稳定化,则无进展存活的几率显著增加。因此,研究了哪些细胞因子与第8周SD相关。对细胞因子水平的分析显示,TNF α 与第8周SD正相关。TNF α 为被充分表征的细胞因子,广泛地与免疫应答的上调相关,包括DC成熟以及T细胞致敏、增殖和募集(Calzascia等,J.Clin.Invest.117:3833-3845,2007;van Horssen等,Oncologist 11:397-408,2006)。人类研究已显示,TNF α 的分离肢体灌注可用于处理局部晚期的软组织肉瘤(Eggermont等,Lancet Oncol.4:429-437,2006)。此外,TNF α 已显示对小鼠中抗肿瘤免疫应答是重要的(Calzascia等,J.Clin.Invest.117:3833-3845,2007)。本文观察到的与TNF α 之间的正相关与这些结果相符。在IL-6、IL-8和IL-12p40之间也观察到显著的内部相关性;但是,该表观意义(apparent significance)可能是IL-8和IL-12p40之间内部相关性的结果,而不是生物学上相关的结果。或者,其可能是总体DC效力的反映,如上文讨论的。这种假设得到存活与aDC表面上MHC-II和CD86(重要的DC成熟标志物)的表达之间的相关性趋势的支持(Steinman和Banchemereau,Nature 449:419-426,2007)。

[0196] 本文已显示,经活化DC(aDC)为实体瘤患者安全的、可行的处理选项。已鉴定了特异的细胞因子,当它们的一个或多个被aDC分泌时,导致疾病的稳定,获得延长的生存时间。鉴于以上数据,清楚的是,aDC为有希望的处理,以延长患有不可切除、局部晚期或转移性实体瘤的患者的存活,在多种实体瘤中无显著毒性,并且可引起局部和全身免疫应答。诸如疾病的稳定和存活的临床结果与诸如体外细胞因子产生的DC效力测量值显著相关。

[0197] 基于本文的结果,已发现:(i)瘤内(i.t.)注射经活化树突状细胞是安全的并且耐受性良好;(ii)经活化DC i.t.注射后的临床结果与如通过细胞因子产生测量的DC效力相关;(iii)单个细胞因子显示与临床结果参数不同的相关性,提示DC功能与可能的治疗益处之间的复杂相关性。

[0198] 虽然已经说明和描述了阐释性实施方案,但应理解的是,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以在其中进行各种改变。

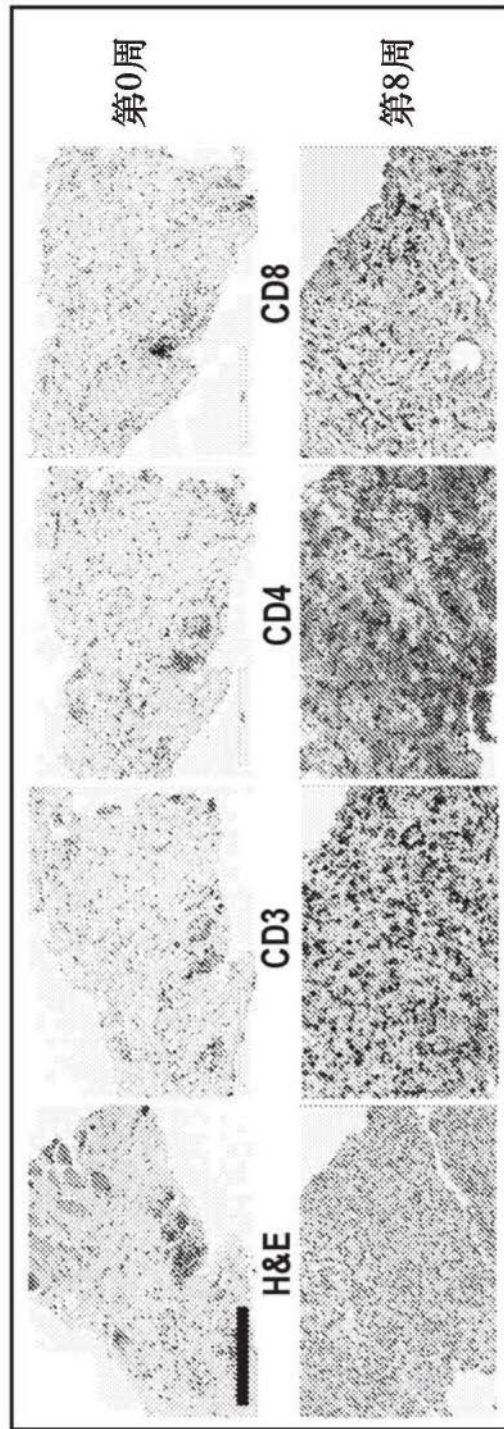


图1A

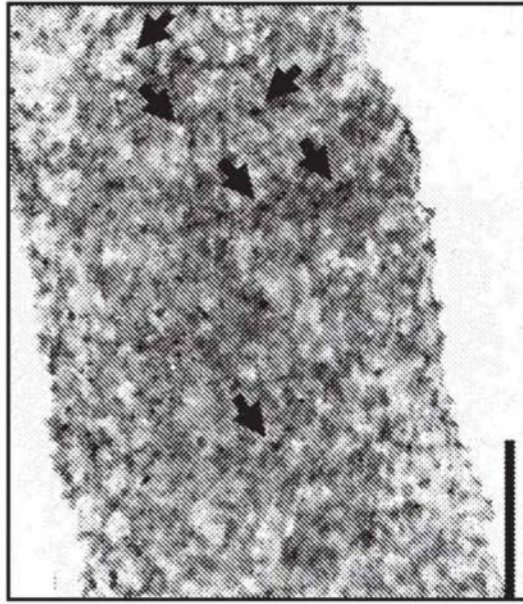


图1B

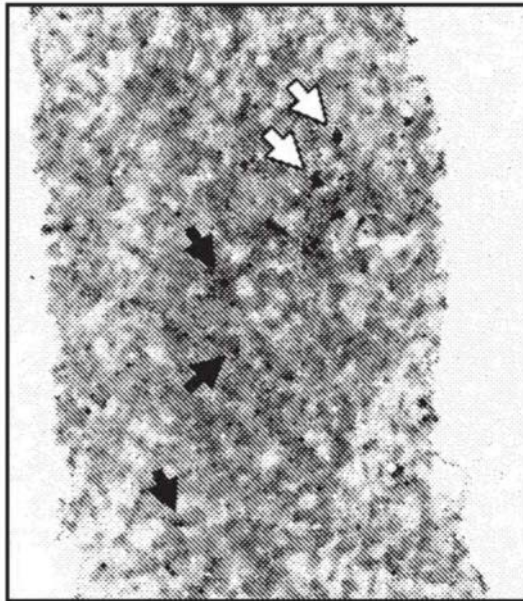


图1C

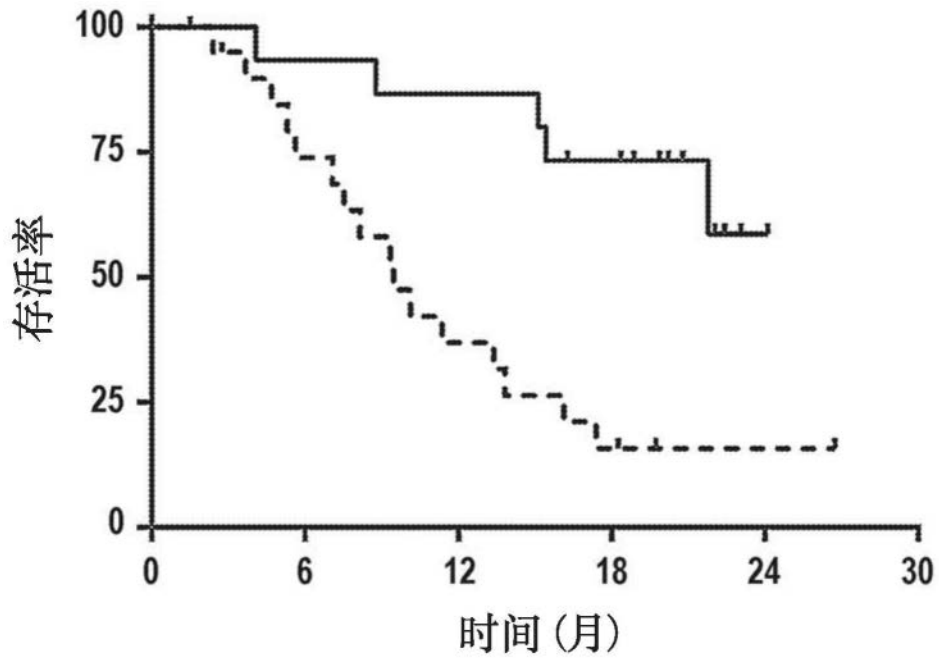


图2A

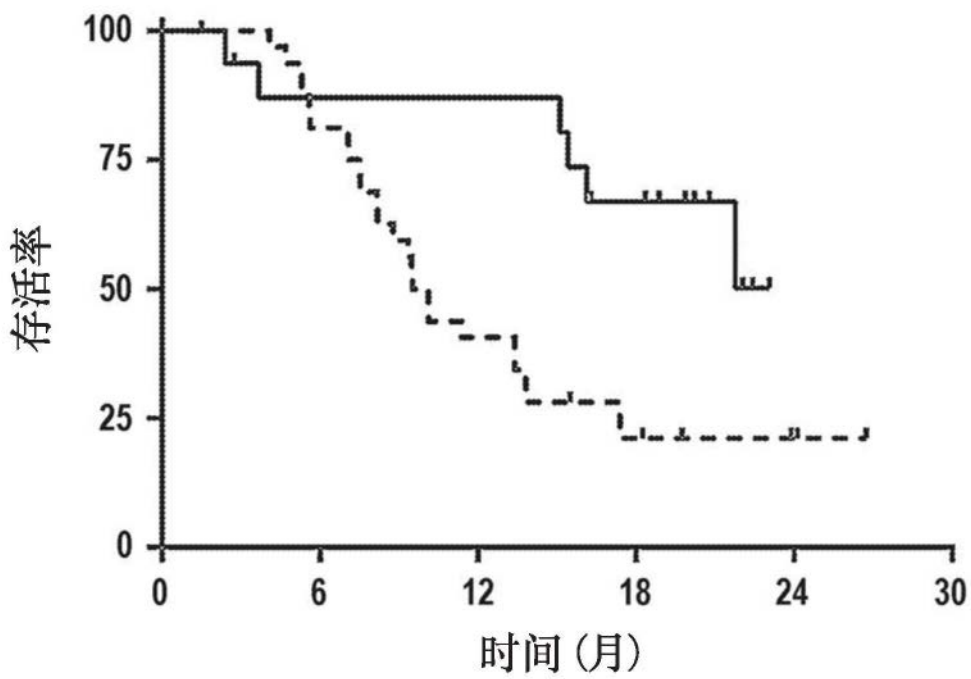


图2B

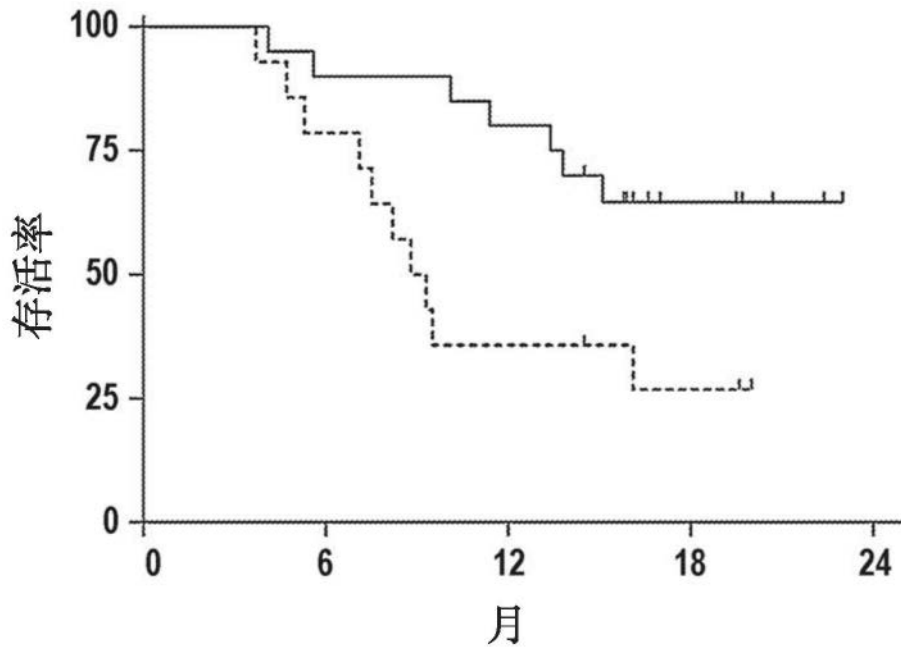


图2C

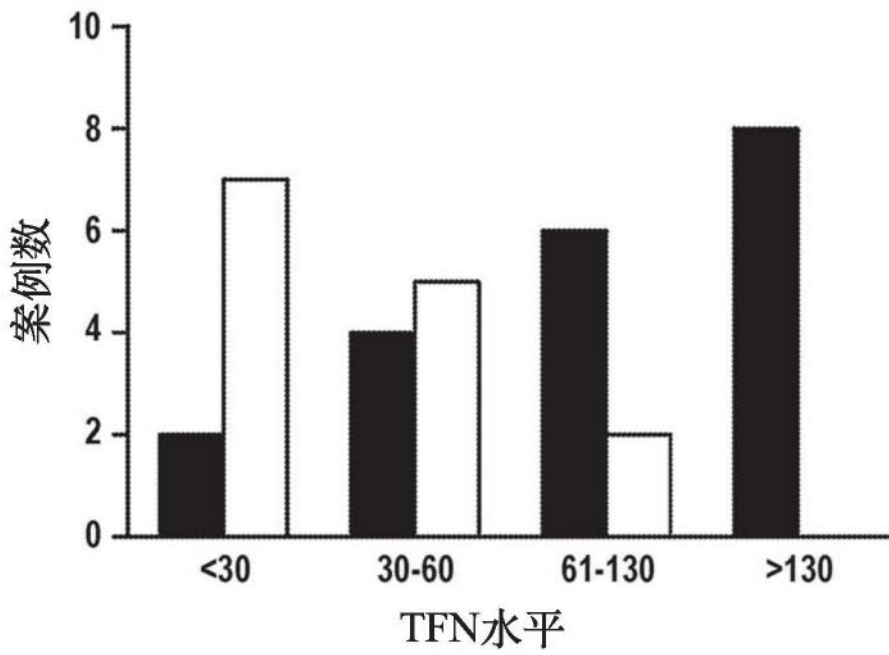


图2D

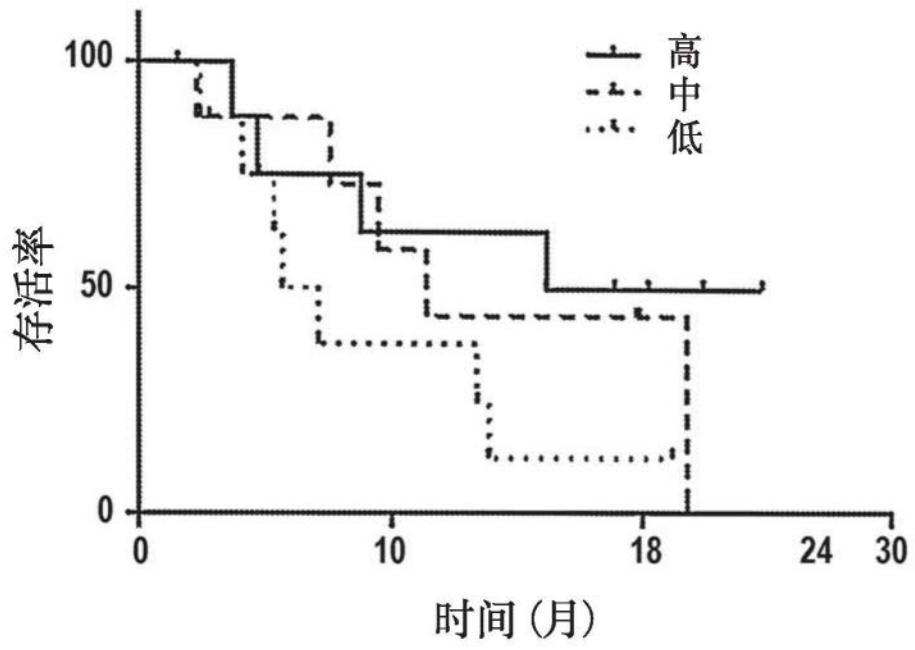


图2E

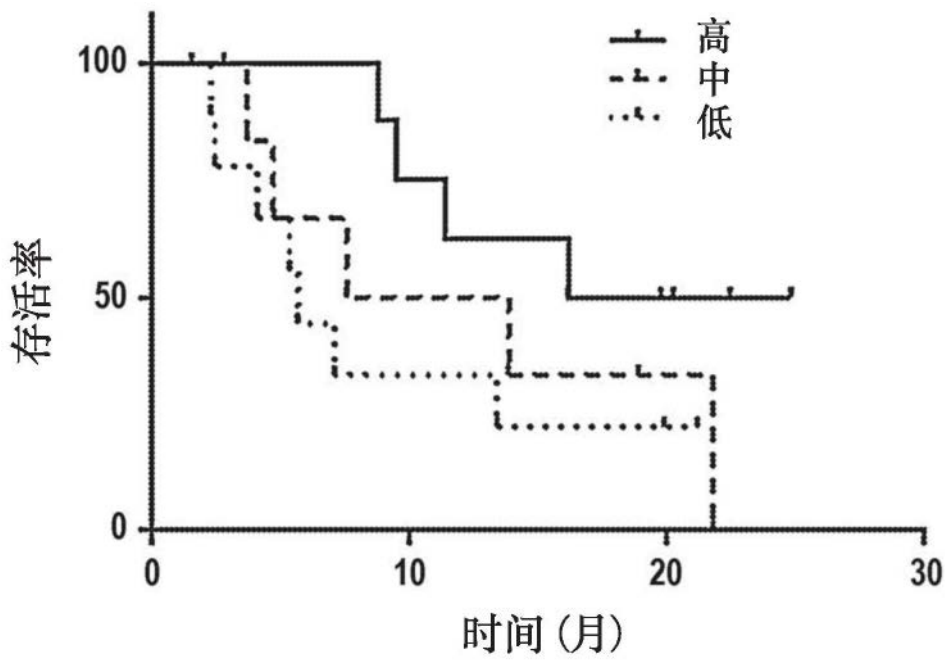


图2F

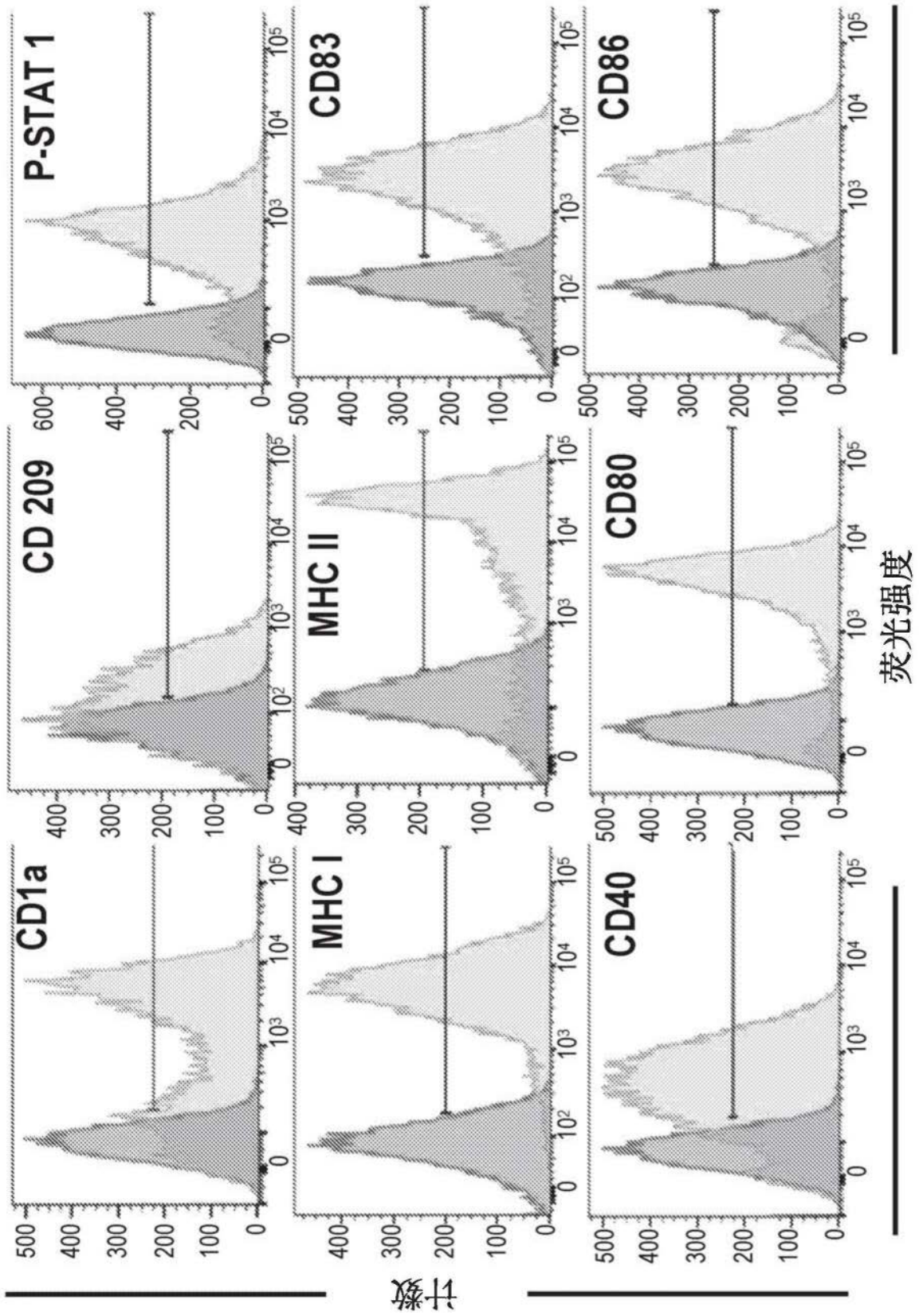


图3