



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112074280 A

(43) 申请公布日 2020.12.11

(21) 申请号 201980021186.X

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22) 申请日 2019.03.22

代理人 初明明 李唐

(30) 优先权数据

62/646649 2018.03.22 US

(51) Int.Cl.

A61K 35/28 (2015.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.09.22

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/55 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/023543 2019.03.22

G12N 5/10 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/183455 EN 2019.09.26

(71) 申请人 温德弥尔治疗公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 K·A·努南 I·博雷洛

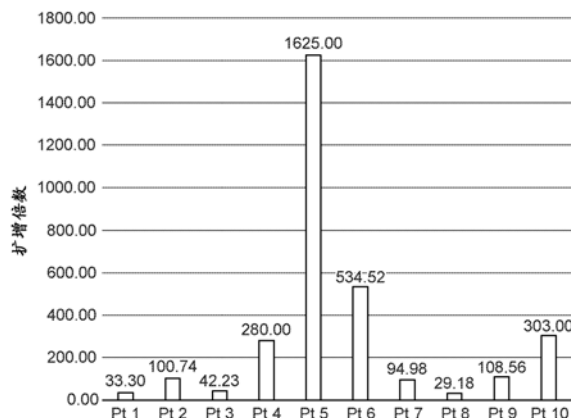
权利要求书2页 说明书11页 附图8页

(54) 发明名称

前列腺癌特异性骨髓浸润淋巴细胞及其用途

(57) 摘要

本公开内容提供了包含前列腺癌特异性骨髓浸润淋巴细胞的化合物及其制备和使用方法。



1. 一种用骨髓浸润淋巴细胞治疗患有前列腺癌的受试者的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 在低氧环境中,使得自所述患有前列腺癌的受试者的骨髓样品与抗CD3抗体和抗CD28抗体一起培养,以产生低氧激活的骨髓浸润淋巴细胞;

(b) 在常氧环境中培养所述低氧激活的骨髓浸润淋巴细胞,以产生治疗性的激活的骨髓浸润淋巴细胞;和

(c) 将所述治疗性的激活的骨髓浸润淋巴细胞施用于所述患有前列腺癌的受试者。

2. 权利要求1的方法,其中所述低氧环境具有约0%至约5%氧的氧含量。

3. 权利要求1的方法,其中在IL-2的存在下培养所述淋巴细胞。

4. 权利要求1的方法,其中在常氧环境中培养所述低氧激活的骨髓浸润淋巴细胞在IL-2的存在下执行。

5. 权利要求1的方法,其中所述骨髓样品在低氧环境中培养约24小时。

6. 权利要求1的方法,其中所述骨髓样品在低氧环境中培养约2天。

7. 权利要求1的方法,其中所述骨髓样品在低氧环境中培养约3天。

8. 权利要求1的方法,其中所述骨髓样品在低氧环境中培养约2至约5天。

9. 权利要求1的方法,其中所述低氧环境为约1%至约2%的氧。

10. 权利要求1的方法,其中所述低氧激活的骨髓浸润淋巴细胞在常氧环境中培养约2至约12天。

11. 权利要求1的方法,其中所述低氧激活的骨髓浸润淋巴细胞在常氧环境中培养约6天。

12. 权利要求1的方法,其中所述低氧激活的骨髓浸润淋巴细胞在常氧环境中培养约9天。

13. 权利要求1的方法,其进一步包括在步骤(a)之前,从患有癌症的受试者中取出骨髓样品的步骤。

14. 权利要求1的方法,其中所述抗CD3抗体和抗CD28抗体在珠上结合。

15. 权利要求1的方法,其中所述前列腺癌是腺泡状腺癌、导管腺癌、去势抵抗性、移行细胞癌、鳞状细胞癌或小细胞前列腺癌中的一种或多种。

16. 一种用治疗性的激活的骨髓浸润淋巴细胞治疗患有前列腺癌的受试者的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 在约1%至约2%氧的低氧环境中,使得自所述患有前列腺癌的受试者的骨髓样品与抗CD3/抗CD28珠一起培养约2至约5天,以产生低氧激活的骨髓浸润淋巴细胞;

(b) 在约21%氧的常氧环境中,在IL-2的存在下,培养所述低氧激活的骨髓浸润淋巴细胞约2至约12天,以产生治疗性的激活的骨髓浸润淋巴细胞;和

(c) 将所述治疗性的激活的骨髓浸润淋巴细胞施用于所述患有前列腺癌的受试者。

17. 一种治疗受试者中的前列腺癌的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含前列腺癌特异性骨髓浸润淋巴细胞的药物组合物。

18. 权利要求17的方法,其中所述前列腺癌特异性骨髓浸润淋巴细胞得自患有前列腺癌的受试者。

19. 权利要求17的方法,其中所述前列腺癌特异性骨髓浸润淋巴细胞对于待治疗的受

试者是自体的。

20. 权利要求17的方法,其中所述前列腺癌特异性骨髓浸润淋巴细胞对于待治疗的受试者是同种异体的。

21. 权利要求17的方法,其中所述骨髓浸润淋巴细胞是低氧激活的。

22. 权利要求17的方法,其中所述骨髓浸润淋巴细胞是低氧激活的和常氧激活的。

23. 权利要求17的方法,其中所述药物组合物通过肠胃外施用、腹膜内或肌内施用来施用。

24. 权利要求17的方法,其中所述药物组合物直接施用到所述受试者的前列腺内。

25. 权利要求1的方法,其中施用于所述受试者的约75%至约100%的骨髓浸润淋巴细胞表达CD3。

26. 权利要求1的方法,其中施用于所述受试者的约80%至约100%的骨髓浸润淋巴细胞表达CD3。

27. 权利要求1的方法,其中施用于所述受试者的约85%至约100%的骨髓浸润淋巴细胞表达CD3。

28. 权利要求1的方法,其中施用于所述受试者的约90%至约100%的骨髓浸润淋巴细胞表达CD3。

29. 权利要求1的方法,其中施用于所述受试者的组合物或MIL中存在的 $CD4^+ : CD8^+$ T细胞的比率为约2:1。

30. 一种组合物,其包含从前列腺癌患者中分离的低氧激活的骨髓浸润淋巴细胞群体,其中约75%至约100%的所述低氧激活的骨髓浸润淋巴细胞群体表达CD3。

31. 权利要求30的组合物,其中约80%至约100%的所述低氧激活的骨髓浸润淋巴细胞群体表达CD3。

32. 权利要求30的组合物,其中约85%至约100%的所述低氧激活的骨髓浸润淋巴细胞群体表达CD3。

33. 权利要求30的组合物,其中约90%至约100%的所述低氧激活的骨髓浸润淋巴细胞群体表达CD3。

34. 权利要求30的组合物,其中所述组合物中存在的 $CD4^+ : CD8^+$ T细胞的比率为约2:1。

35. 权利要求30的组合物,其中所述细胞群体可通过以下步骤从骨髓样品获得,所述骨髓样品得自患有前列腺癌的受试者:

(a) 在约1%至约3%氧的低氧环境中,使骨髓样品与抗CD3抗体和抗CD28抗体一起培养,以产生激活的骨髓浸润淋巴细胞;和

(b) 在常氧环境中,在IL-2的存在下,培养所述激活的骨髓浸润淋巴细胞,以产生所述组合物。

36. 权利要求30的组合物,其中所述MIL是前列腺癌特异性的。

前列腺癌特异性骨髓浸润淋巴细胞及其用途

[0001] 本申请根据35 U.S.C. §119(e)要求于2018年3月22日提交的美国临时专利申请62/646,649的优先权,所述美国临时专利申请在此整体引入作为参考。

[0002] 一般领域

本公开总体上涉及对于治疗前列腺癌特异性的骨髓浸润淋巴细胞(MIL)及其使用方法。

[0003] 背景

前列腺癌是最常被诊断的癌症之一,并且是与癌症相关的死亡的主要原因,并且新疗法保持临床优先。转移性前列腺癌可能对自体细胞免疫疗法敏感。Sipuleucel-T,一种用于mPCa患者的自体细胞疗法,增加了III期研究中的总存活率。针对PSMA和PSCA的嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法目前在前列腺癌中进行开发。尽管有希望,但这些疗法的总体功效和可行性仍是未知的。

[0004] 骨髓浸润淋巴细胞(MIL)是激活且扩增骨髓T细胞的产物。骨髓是免疫系统中的特化小生境,其富含抗原经历的中央记忆T细胞。MIL已显示在多发性骨髓瘤患者中赋予免疫学上可测量的临床益处(参见美国专利号9,687,510)。骨髓微环境也已显示在患有实体瘤(例如乳腺癌、胰腺癌和卵巢癌)的患者中具有肿瘤抗原特异性T细胞。因此,需要的是用于在癌症疗法中使用的前列腺癌特异性MIL。

[0005] 概述

本文公开了用骨髓浸润淋巴细胞治疗患有前列腺癌的受试者的方法,该方法包括以下步骤:(a)在低氧环境中,使得自患有前列腺癌的受试者的骨髓样品与抗CD3抗体和抗CD28抗体一起培养,以产生低氧激活的骨髓浸润淋巴细胞;(b)在常氧环境中培养低氧激活的骨髓浸润淋巴细胞,以产生治疗性的激活的骨髓浸润淋巴细胞;并且(c)将治疗性的激活的骨髓浸润淋巴细胞施用于患有前列腺癌的受试者。

[0006] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中所述低氧环境具有约0%至约5%氧的氧含量。

[0007] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中在IL-2的存在下培养淋巴细胞。

[0008] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中在常氧环境中培养低氧激活的骨髓浸润淋巴细胞在IL-2的存在下执行。

[0009] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中所述骨髓样品在低氧环境中培养约24小时。

[0010] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中所述骨髓样品在低氧环境中培养约2天。

[0011] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中所述骨髓样品在低氧环境中培养约3天。

[0012] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中所述骨髓样品在低氧环境中培养约2至约5天。

[0013] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中所述低氧环境为约1%至约2%的氧。

[0014] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中所述低氧激活的骨髓浸润淋巴细胞在常氧环境中培养约2至约12天。

[0015] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中所述低氧激活的骨髓浸润淋巴细胞在常氧环境中培养约6天。

[0016] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中所述低氧激活的骨髓浸润淋巴细胞在常氧环境中培养约9天。

[0017] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其进一步包括在步骤(a)之前,从患有癌症的受试者中取出骨髓样品的步骤。

[0018] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中所述抗CD3抗体和所述抗CD28抗体在珠上结合。

[0019] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中所述前列腺癌是腺泡状腺癌、导管腺癌、去势抵抗性、移行细胞癌、鳞状细胞癌或小细胞前列腺癌中的一种或多种。

[0020] 本文还公开了用治疗性的激活的骨髓浸润淋巴细胞治疗患有前列腺癌的受试者的方法,该方法包括以下步骤:(a)在约1%至约2%氧的低氧环境中,使得自患有前列腺癌的受试者的骨髓样品与抗CD3/抗CD28珠一起培养约2至约5天,以产生低氧激活的骨髓浸润淋巴细胞;(b)在约21%氧的常氧环境中,在IL-2的存在下,培养低氧激活的骨髓浸润淋巴细胞约2至约12天,以产生治疗性的激活的骨髓浸润淋巴细胞;并且(c)将治疗性的激活的骨髓浸润淋巴细胞施用于患有前列腺癌的受试者。

[0021] 本文还公开了治疗受试者中的前列腺癌的方法,该方法包括向受试者施用包含前列腺癌特异性骨髓浸润淋巴细胞的药物组合物。

[0022] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中所述前列腺癌特异性骨髓浸润淋巴细胞得自患有前列腺癌的受试者。

[0023] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中所述前列腺癌特异性骨髓浸润淋巴细胞对于待治疗的受试者是自体的。

[0024] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中所述前列腺癌特异性骨髓浸润淋巴细胞对于待治疗的受试者是同种异体的。

[0025] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中所述骨髓浸润淋巴细胞是低氧激活的。

[0026] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中所述骨髓浸润淋巴细胞是低氧激活的和常氧激活的。

[0027] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中所述药物组合物通过肠胃外施用、腹膜内或肌内施用来施用。

[0028] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中所述药物组合物直接施用到受试者的前列腺内。

[0029] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中施用于受试者的约75%至约100%的骨髓浸润淋巴细胞表达CD3。

[0030] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中施用于受试者的约80%至约

100%的骨髓浸润淋巴细胞表达CD3。

[0031] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中施用于受试者的约85%至约100%的骨髓浸润淋巴细胞表达CD3。

[0032] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中施用于受试者的约90%至约100%的骨髓浸润淋巴细胞表达CD3。

[0033] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中施用于受试者的组合物或MIL中存在的CD4⁺:CD8⁺ T细胞的比率为约2:1。

[0034] 还公开了组合物,其包含从前列腺癌患者中分离的低氧激活的骨髓浸润淋巴细胞群体,其中约75%至约100%的低氧激活的骨髓浸润淋巴细胞群体表达CD3。

[0035] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中约80%至约100%的低氧激活的骨髓浸润淋巴细胞群体表达CD3。

[0036] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中约85%至约100%的低氧激活的骨髓浸润淋巴细胞群体表达CD3。

[0037] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中约90%至约100%的低氧激活的骨髓浸润淋巴细胞群体表达CD3。

[0038] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中所述组合物中存在的CD4⁺:CD8⁺ T细胞的比率为约2:1。

[0039] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中所述细胞群体可通过以下步骤从骨髓样品获得,所述骨髓样品得自患有前列腺癌的受试者:(a)在约1%至约3%氧的低氧环境中,使骨髓样品与抗CD3抗体和抗CD28抗体一起培养,以产生激活的骨髓浸润淋巴细胞;并且(b)在常氧环境中,在IL-2的存在下,培养激活的骨髓浸润淋巴细胞,以产生组合物。

[0040] 本文还公开了如上所述的方法的一个实施方案,其中所述MIL是前列腺癌特异性的。

[0041] 附图简述

图1是显示了来自转移性前列腺癌患者骨髓的MIL的成功扩增的图。显示了对于每个患者的骨髓样本,表示为收获的细胞数/起始细胞数目的扩增倍数。

[0042] 图2显示了在扩增之前和之后,在10个转移性前列腺癌患者骨髓样本的每个中,对于每种T细胞标记物阳性染色的细胞百分比的图。

[0043] 图3显示了肿瘤特异性T细胞的定量。自体抗原呈递细胞(APC)用来自前列腺癌细胞系的裂解产物进行脉冲,并且与CFSE标记的MIL或PBL一起共培养。

[0044] 图4显示了对于单个患者,在扩增的MIL和PBL中定量肿瘤特异性T细胞的代表性结果。

[0045] 图5显示了对于每种扩增的MIL,针对肿瘤细胞裂解产物组合各自测量的产生IFN γ 的CFSE-1 α CD3⁺ T细胞的百分比。

[0046] 图6显示了对于每种扩增的PBL,针对肿瘤细胞裂解产物组合各自测量的产生IFN γ 的CFSE-1 α CD3⁺ T细胞的百分比。

[0047] 示例性实施方案的详述

如本文使用的,且除非另有说明,否则术语“约”预期意指它修饰的值的 \pm 5%。因此,约

100意指95至105。另外,术语“约”修饰一系列术语中的一个术语,例如“约1、2、3、4或5”,应理解术语“约”修饰列表的每个成员,使得“约1、2、3、4或5”可以理解为意指“约1、约2、约3、约4或约5”。对于由术语“至少”或其它量化修饰语(例如但不限于“小于”、“大于”等等)修饰的列表也是如此。

[0048] 如本文和所附权利要求中使用的,单数形式“a”、“an”和“the”包括复数指示物,除非上下文另有明确说明。

[0049] 如本文使用的,术语“包含(comprising)”(以及任何形式的包含,例如“包含(comprise)”、“包含(comprises)”和“包含(comprised)”、“具有(having)”(以及任何形式的具有,例如,“具有(have)”和“具有(has)”、“包括(including)”(以及任何形式的包括,例如“包括(includes)”和“包括(include)”、或“含有(containing)”(以及任何形式的含有,例如“含有(contains)”和“含有(contain)”)是包括性的或开放性的,并且不排除另外的未叙述的要素或方法步骤。叙述术语“包含”的任何组合物或方法也应理解为还将此类组合物描述为包括所叙述的组分或要素、由其组成或基本上由其组成。

[0050] 如本文使用的,术语“治疗(treat)”、“治疗(treated)”或“治疗(treating)”意指两种治疗性处理,其中目的是减慢(减轻)不需要的生理状况、病症或疾病,或者获得有益或所需的临床结果。为了本文描述的实施方案的目的,有益或所需的临床结果包括但不限于症状的减轻;状况、病症或疾病程度的缩小;状况、病症或疾病的稳定(即,不恶化)状态;状况、病症或疾病进展的发作延迟或减慢;可检测或不可检测的状况、病症或疾病状态的改善,或缓解(部分或全部);患者不一定能分辨的至少一个可测量的身体参数的改善;或者状况、病症或疾病的增强或改善。因此,“癌症的治疗”或“治疗癌症”意指减轻或改善与癌症或本文所述的任何其它状况有关的任何主要现象或继发病状的活动。在一些实施方案中,待治疗的癌症是本文所述的癌症之一。

[0051] 如本文使用的,术语“受试者”可以与术语“患者”互换使用。受试者可以是哺乳动物,例如犬、猫、猴、马、牛等等。在一些实施方案中,受试者是人。在一些实施方案中,受试者已被诊断有前列腺癌。在一些实施方案中,受试者被认为患有前列腺癌。在一些实施方案中,该受试者被怀疑患有前列腺癌。

[0052] 如本文使用的,当术语“表达”涉及细胞表面受体,例如但不限于CD3、CD4和CD8时,它也可以被称为细胞对于该标记物是阳性的。例如,表达CD3的细胞也可以被称为CD3阳性的(CD3⁺)。

[0053] 如本文使用的,术语“癌症”定义为特征在于异常细胞的快速且不受控制的生长的疾病。癌细胞可以局部扩散,或者通过血流和淋巴系统扩散到身体的其它部分。如本文使用的,术语“前列腺癌”定义为源自前列腺的癌症,或者在前列腺上或前列腺内的癌症。在一些实施方案中,前列腺癌是腺泡状腺癌、导管腺癌、去势抵抗性、移行细胞癌、鳞状细胞癌或小细胞前列腺癌中的一种或多种。

[0054] “有效量”或“治疗有效量”在本文可互换使用,并且指有效达到特定生物学结果的如本文所述的化合物、制剂、材料或组合物的量。此类结果可以包括但不限于如通过本领域合适的任何手段确定的病毒感染的抑制。

[0055] 如本文使用的,“骨髓浸润淋巴细胞”或“MIL”是免疫细胞的亚群,并且例如在美国专利号9,687,510中描述,所述美国专利在此整体引入作为参考。MIL与外周淋巴细胞(PBL)

明显不同。例如，MIL比PBL更容易扩增，上调激活标记物至更大的程度，维持更多的偏向V β 储库，运输至骨髓，且最重要的是，具有明显更大的肿瘤特异性。在一些实施方案中，MIL可以例如通过使其与抗CD3/抗CD-28珠一起在低氧条件下温育而激活，如本文所述。在一些实施方案中，在低氧条件下生长MIL也在美国专利号9,687,510和国际申请号W02016/037054中描述，二者均整体引入本文作为参考。

[0056] 与在非实体瘤类型的癌症(例如多发性骨髓瘤)中使用MIL的先前方法相比，使用MIL治疗实体瘤癌症需要不同且独特的模式。已知许多肿瘤通过肿瘤细胞和其它细胞上的PD-L1上调来利用PD-1/PD-L1途径，以逃避T细胞介导的肿瘤特异性免疫。抑制PD-1和PD-L1之间的相互作用降低这种免疫抑制信号，允许肿瘤特异性细胞毒性T细胞接近且杀死肿瘤细胞。

[0057] MILTM与其它两种形式的过继性细胞疗法不同。表1比较了MILTM与嵌合抗原受体(CAR)-T和遗传改造的T细胞受体(eTCR)细胞疗法的主要特征。最关键的是，CAR-T和eTCR细胞疗法的功效取决于同源抗原在肿瘤细胞上的接合；该抗原通过肿瘤的选择性编辑或缺失致使CAR-T或eTCR疗法无效。相比之下，MILTM的多克隆识别将使生成抗原逃逸丧失肿瘤变体作为疾病复发机制的风险降到最低。

表 1: MILTM与 CAR-T 和 eTCR 细胞的比较

特征	CAR-T/eTCR	MIL TM
细胞源	外周血	骨髓
抗原特异性	单克隆的(有限的)	多克隆的
遗传修饰	需要	不需要
HLA局限的	否(CAR-T); 是(eTCR)	否

缩写: MILTM = 骨髓浸润淋巴细胞; CAR-T = 嵌合抗原受体; eTCR = 改造的 T 细胞受体; HLA = 人白细胞抗原

[0058] 在一些实施方案中，制备MIL的方法可以包括从来自受试者的骨髓、淋巴细胞和/或骨髓浸润淋巴细胞中取出细胞；在低氧环境中温育细胞，从而产生激活的MIL。在一些实施方案中，受试者患有前列腺癌。如本文所述，细胞也可以在抗CD3/抗CD28抗体和细胞因子的存在下被激活。

[0059] 收集的骨髓可以进行冷冻或立即用于例如产生肿瘤特异性MIL。如果骨髓被冷冻，则它优选在温育之前被融化。可以通过本领域普通技术人员已知的方法处理骨髓，以纯化MIL。MIL可以例如用珠例如抗CD4/CD28珠进行激活。溶液中珠与细胞的比率可以不同；在一些实施方案中，该比率为3:1。类似地，MIL可以在一种或多种抗体、抗原和/或细胞因子的存在下，例如在不存在抗CD3/CD28珠的情况下进行扩增。例如，可以确定收集的骨髓的细胞计数，以调整待加入MIL中的珠、抗体、抗原和/或细胞因子的量。在一些实施方案中，使用专门设计为收集细胞的珠来捕获MIL。

[0060] 收集的MIL可以在低氧环境中生长第一时间段。低氧环境可以包括小于约7%的氧，例如小于约7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的氧。例如，低氧环境可以包括约0%的氧至约7%的氧、0%的氧至约6%的氧，例如约0%的氧至约5%的氧、约0%的氧至约4%的氧、约0%的氧至约3%的氧、约0%的氧至约2%的氧、约0%的氧至约1%的氧。在一些实施方案中，低氧环境包括约1%至约5%的氧。在一些实施方案中，低氧环境为约1%至约2%的氧。在一些实施方案中，低氧环境为约0.5%至约1.5%的氧。在一些实施方案中，低氧环境为约0.5%至约2%的氧。低氧环境可以包括约7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或约0%的氧，以及其在这些量之间的任何分数。

[0061] 在低氧环境中温育MIL可以包括例如在组织培养基中温育MIL至少约1小时,例如至少约12小时、18小时、24小时、30小时、36小时、42小时、48小时、60小时、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或甚至至少约14天。温育可以包括使MIL温育约1小时至约30天,例如约1天至约20天、约1天至约14天、或约1天至约12天。在一些实施方案中,在低氧环境中温育MIL包括在低氧环境中温育MIL约2天至约5天。该方法可以包括在低氧环境中温育MIL约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天。在一些实施方案中,该方法包括在低氧环境中温育MIL约3天。在一些实施方案中,该方法包括在低氧环境中温育MIL约2天至约4天。在一些实施方案中,该方法包括在低氧环境中温育MIL约3天至约4天。

[0062] 在一些实施方案中,低氧激活的MIL然后在常氧环境中培养,以产生治疗上激活的骨髓浸润淋巴细胞。在一些实施方案中,常氧环境可以包括至少约7%的氧。在一些实施方案中,常氧环境可以包括约,例如约8%的氧至约30%的氧、10%的氧至约30%的氧、约15%的氧至约25%的氧、约18%的氧至约24%的氧、约19%的氧至约23%的氧、或约20%的氧至约22%的氧。在一些实施方案中,常氧环境包括约21%的氧。

[0063] 在一些实施方案中,在IL-2或其它细胞因子的存在下培养MIL。在一些实施方案中,在IL-2的存在下,在常氧条件下培养MIL。在一些实施方案中,其它细胞因子可以是IL-7、IL-15、IL-9、IL-21或其任何组合。在一些实施方案中,可以在包含一种或多种细胞因子,例如IL-2、IL-7和/或IL-15或其任何合适组合的细胞培养基中培养MIL。每种细胞因子的合适浓度或细胞因子总浓度的说明性实例包括但不限于约25 IU/mL、约50 IU/mL、约75 IU/mL、约100 IU/mL、约125 IU/mL、约150 IU/mL、约175 IU/mL、约200 IU/mL、约250 IU/mL、约300 IU/mL、约350 IU/mL、约400 IU/mL、约450 IU/mL、或约500 IU/mL或其任何中间量的细胞因子。在一些实施方案中,IL-2、IL-1和/或IL-15或其任何组合各自或总共以约100 IU/mL培养细胞。在一些实施方案中,细胞培养基包含各自或总共约250 IU/mL的IL-2、IL-1和/或IL-15或其任何组合。

[0064] 在常氧环境中温育MIL可以包括使MIL温育至少约1小时,例如至少约12小时、18小时、24小时、30小时、36小时、42小时、48小时、60小时、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或甚至至少约14天。温育可以包括使MIL温育约1小时至约30天,例如约1天至约20天、约1天至约14天、约1天至约12天、或约2天至约12天。

[0065] 在一些实施方案中,通过从受试者中提取骨髓样品,并且如本文所述培养/温育细胞,来获得MIL。在一些实施方案中,将骨髓样品离心以去除红细胞。在一些实施方案中,骨髓样品不经受单采血液成分术。在一些实施方案中,骨髓样品不包含外周血淋巴细胞(“PBL”),或骨髓样品基本上不含PBL。这些方法选择与已被称为TIL的细胞不同的细胞。因此,MIL不是TIL。TIL可以通过本领域技术人员已知的方法进行选择,并且可以用本文所述的核酸分子转染或感染,使得TIL可以表达本文所述的嵌合跨膜蛋白。在一些实施方案中,与MIL的总数相比,骨髓样品包含小于10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%的PBL。在一些实施方案中,样品不含PBL。

[0066] 在一些实施方案中,还通过与针对CD3和CD28的抗体一起培养来激活细胞。这可以例如通过使细胞与商购可得或可以由本领域技术人员制备的抗CD3/抗CD28珠一起温育来执行。然后将细胞在板、瓶或袋中铺板。低氧条件可以通过用95%氮和5% CO₂气体混合

物冲洗低氧室或细胞培养袋3分钟来实现。这可以导致容器中例如1-2%或更少的O₂气体。此类珠和刺激方法的实例可以在例如美国专利号6,352,694、6,534,055、6,692,964、6,797,514、6,867,041、6,905,874中找到,所述专利各自整体引入作为参考。珠的替代物是改造的细胞,例如K562细胞,其可以用于刺激MIL。此类方法可以在例如美国专利号8,637,307和7,638,325中找到,所述专利各自整体引入作为参考。还可以使用其它方法刺激细胞,所述方法例如在美国专利号8,383,099中描述的那些方法,所述专利整体引入作为参考。

[0067] 在一些实施方案中,将激活的MIL和/或治疗性的激活的MIL施用于患有或怀疑患有前列腺癌的受试者。在一些实施方案中,低氧激活的MIL和/或治疗性的激活的MIL由来自患有或怀疑患有前列腺癌的受试者的骨髓样品产生,然后施用于同一受试者以治疗前列腺癌。在一些实施方案中,MIL对于受试者是同种异体的。

[0068] 在一些实施方案中,MIL可以在药物制剂或药物组合物中施用。包含前列腺癌特异性MIL的药物组合物可以进一步包含缓冲剂,例如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等等;碳水化合物,例如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或右旋糖酐、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸,例如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂,例如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如氢氧化铝);和防腐剂。组合物可以配制用于肠胃外施用,例如,血管内(静脉内或动脉内)、腹膜内或肌内施用。在一些实施方案中,MIL和/或组合物通过肠胃外施用,例如血管内(静脉内或动脉内)、腹膜内或肌内施用来施用。组合物也可以直接施用到前列腺内。在一些实施方案中,组合物经静脉内施用。

[0069] 在一些实施方案中,无论组合物是溶液、悬浮液还是其它类似形式,它们都可以包括下述中的一种或多种:DMSO,无菌稀释剂例如注射用水,盐水溶液,优选生理盐水,林格氏溶液,等渗氯化钠,不挥发性油,例如可以充当溶剂或悬浮介质的合成甘油单酯或甘油二酯,聚乙二醇,丙三醇,丙二醇或其它溶剂;抗菌剂,例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,例如乙二胺四乙酸;缓冲剂,例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐,以及用于调整张力的试剂,例如氯化钠或右旋糖。

[0070] 在一些实施方案中,受试者可以用连同或不连同氟达拉滨的环磷酰胺预条件化。在US 9,855,298中提供了一个此类实例,所述专利在此引入作为参考。另一个非限制性实例是施用氟达拉滨(每天静脉内30 mg/m²,共4天)和环磷酰胺(从氟达拉滨的第一个剂量开始,每天静脉内500 mg/m²,共2天)。在施用后,MIL可以在氟达拉滨完成后2至14天施用。在一些实施方案中,环磷酰胺以约500至约600 mg/m²的剂量施用2-3天。

[0071] 在一些实施方案中,施用的药物组合物包含如本文提供的前列腺癌特异性MIL。本文还提供了此类MIL的组合物。在一些实施方案中,前列腺癌特异性MIL是低氧激活的。在一些实施方案中,前列腺癌特异性MIL是低氧激活/常氧激活的MIL。前列腺癌特异性MIL是可以特异性靶向受试者中的前列腺癌的MIL。

[0072] 在一些实施方案中,组合物包含CD3阳性的前列腺癌特异性MIL群体。在一些实施方案中,至少约或至少40%的MIL是CD3阳性的。在一些实施方案中,约或至少45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%或89% MIL是CD3阳性的。在一些实施方案中,至少或约80%的MIL是CD3阳性的。在一些实施方案中,约40%至约100%的MIL是CD3阳性的。在一些实施方案中,约45%至约100%、约50%至约100%、约55%至约100%、约60%至约100%、约65%至约100%、约70%至约100%、约75%至约100%、约80%至约100%、约85%至约100%、约86%至约100%、约87%至约100%、约88%至约100%、或约90%至约100%的MIL是CD3阳性的(表达CD3)。

[0073] 在一些实施方案中,组合物包含不表达CD3的MIL群体,或例如相对于来自表达CD3的MIL群体的MIL表达水平,表达低水平的CD3的MIL群体。

[0074] 在一些实施方案中,组合物包含表达干扰素 γ (“IFN γ ”)的MIL群体,即其中表达IFN γ 的MIL群体中的每个细胞是表达IFN γ 的骨髓浸润淋巴细胞,例如,如通过流式细胞术检测的。例如,组合物中至少约2%的细胞可以是表达IFN γ 的MIL,或者至少约2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%或甚至至少约18%的MIL表达IFN γ 。在一些实施方案中,约2%至约100%的MIL表达IFN γ ,例如约2%至约100%、约3%至约100%、约4%至约100%、约5%至约100%、约6%至约100%、约7%至约100%、约8%至约100%、约9%至约100%、约10%至约100%、约11%至约100%、约12%至约100%、约13%至约100%、约14%至约100%、约15%至约100%、约16%至约100%、约17%至约100%、或甚至约18%至约100%的MIL。在一些实施方案中,组合物包含不表达IFN γ 的MIL群体,例如如通过流式细胞术检测的,或表达低水平的IFN γ 的MIL群体,即相对于来自表达IFN γ 的MIL群体的MIL表达水平。

[0075] 在一些实施方案中,组合物包含表达CXCR4的MIL群体。例如,至少约98%的MIL表达CXCR4,例如至少约98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99.0%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、或甚至至少约99.7%的MIL。在一些实施方案中,约98%至约100%可以是表达CXCR4的MIL,例如组合物中至少约98.1%至约100%、约98.2%至约100%、约98.3%至约100%、约98.4%至约100%、约98.5%至约100%、约98.6%至约100%、约98.7%至约100%、约98.8%至约100%、约98.9%至约100%、约99.0%至约100%、约99.1%至约100%、约99.2%至约100%、约99.3%至约100%、约99.4%至约100%、约99.5%至约100%、约99.6%至约100%、或甚至约99.7%至约100%的MIL。在一些实施方案中,组合物包含不表达CXCR4的MIL群体,例如如通过流式细胞术检测的,或表达低水平的CXCR4的MIL群体,即相对于来自表达CXCR4的MIL群体的MIL表达水平。

[0076] 表达CD4的MIL群体可以包含表达4-1BB的多个MIL。例如,组合物中至少约21%的细胞可以是来自表达4-1BB的多个MIL的MIL,例如组合物中至少约22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%或甚至至少约43%的细胞。在一些实施方案中,组合物中约21%至约100%的细胞可以是来自表达4-1BB的多个MIL的MIL,例如组合物中约22%至约100%、约23%至约100%、约24%至约100%、约25%至约100%、约26%至约100%、约27%至约100%、约28%至约100%、约29%至约100%、约30%至约100%、约31%至约100%、约32%至约100%、约33%至约100%、约34%至约100%、约35%至约100%、约36%至约100%、约37%至约100%、约38%至约100%、约39%至约100%、约40%至约100%、约41%至约100%、约42%至约100%、或甚至约43%至约100%的细胞。

[0077] 组合物可以包含表达CD8的MIL群体。表达CD8的MIL群体可以包含表达CXCR4的多个MIL。

[0078] 表达CD8的MIL群体可以包含表达4-1BB的多个MIL。例如,组合物中至少约21%的细胞可以是来自表达4-1BB的多个MIL的MIL,例如组合物中至少约8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%或甚至至少约21%的细胞。在一些实施方案中,组合物中约2%至约100%的细胞可以是来自表达4-1BB的多个MIL的MIL,例如组合物中约8%至约100%、约9%至约100%、约10%至约100%、约11%至约100%、约12%至约100%、约13%至约100%、约14%至约100%、约15%至约100%、约16%至约100%、约17%至约100%、约18%至约100%、约19%至约100%、约

20%至约100%、或甚至约21%至约100%的细胞。

[0079] 在一些实施方案中,组合物包含表达4-1BB的MIL群体。例如,组合物中至少约21%的细胞可以是来自表达4-1BB的MIL群体的MIL,例如组合物中至少约22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%或甚至至少约43%的细胞。在一些实施方案中,组合物中约21%至100%的细胞可以是来自表达4-1BB的MIL群体的MIL,例如组合物中约22%至约100%、约23%至约100%、约24%至约100%、约25%至约100%、约26%至约100%、约27%至约100%、约28%至约100%、约29%至约100%、约30%至约100%、约31%至约100%、约32%至约100%、约33%至约100%、约34%至约100%、约35%至约100%、约36%至约100%、约37%至约100%、约38%至约100%、约39%至约100%、约40%至约100%、约41%至约100%、约42%至约100%、或甚至约43%至约100%的细胞。在一些实施方案中,组合物包含不表达4-1BB的MIL群体,例如如通过流式细胞术检测的,或表达低水平的4-1BB的MIL群体,即相对于来自表达4-1BB的MIL群体的MIL表达水平。

[0080] 在一些实施方案中,组合物包含表达CD4的MIL。

[0081] 在一些实施方案中,组合物包含表达CD8的MIL。

[0082] 在一些实施方案中,组合物包含表达CD4的MIL。在一些实施方案中,组合物包含表达CD8的MIL。在一些实施方案中,组合物中存在的CD4⁺:CD8⁺ MIL的比率为约2:1。

[0083] 组合物可以包含表达CD8的MIL群体。表达CD8的MIL群体可以包含表达CXCR4的多个MIL。

[0084] 在一些实施方案中,组合物包含表达CD4的MIL群体。表达CD4的MIL群体可以包含表达CXCR4的多个MIL。

[0085] MIL可以表达单独或彼此组合的如本文所述的不同因子或表面受体。因此,例如,MIL可以是CD3⁺、CD4⁺和CD8⁺的。此类细胞也可以表达IFN γ 。对于本文提供的各种因子或受体,细胞也可以是阳性或阴性的。

[0086] 在一些实施方案中,提供了用于预防或治疗受试者中的前列腺癌的方法。在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用本文所述的组合物之一,例如但不限于如本文提供的前列腺特异性MIL。在一些实施方案中,组合物如本文提供的施用。在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的任何一种组合物。在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用治疗有效量的前列腺癌特异性MIL。在一些实施方案中,MIL是激活的。在一些实施方案中,如本文描述和本文提及的,MIL是低氧激活的。在一些实施方案中,如本文描述和本文提及的,MIL在低氧条件下随后在常氧条件下培养。在一些实施方案中,从得自患有前列腺癌的受试者的骨髓样品获得或提取MIL。在一些实施方案中,MIL对于待治疗的受试者是同种异体的。在一些实施方案中,该方法包括在约1%至约3%氧的低氧环境中,使来自受试者的骨髓样品与抗CD3抗体和抗CD28抗体一起培养,以产生激活的骨髓浸润淋巴细胞;并且(b)在常氧环境中,在IL-2的存在下,培养激活的骨髓浸润淋巴细胞,以产生组合物。然后将组合物施用于患有前列腺癌的受试者。

[0087] 下述实施例说明而不是限制本文所述的组合物和方法。本领域技术人员已知的其它合适的修改和适应在下述实施方案的范围内。

实施例

[0088] 实施例1:从患有前列腺癌的受试者产生MIL

从未用激素治疗和去势抵抗性前列腺癌的患者(n=10)中收集骨髓样品,具有不同量的骨髓累及。对于患者子集(n=4),在骨髓抽吸时还收集了匹配的外周血。

[0089] 使用先前描述的方法(参见美国专利9,687,510和10,172,887,所述两个专利均引入作为参考),分别从患者的骨髓和血液样品中激活且扩增MIL和外周血淋巴细胞(PBL)两者。从分离自十个mPCa患者的骨髓中成功扩增MIL,具有315.1(范围:29.1-1625)的平均扩增倍数。显示了对于每个患者的骨髓样本的扩增倍数(收获的细胞数/起始细胞数目)。参见图1。

[0090] 实施例2:T细胞表型标记物的表征

T细胞表型标记物CD3、CD4和CD8在扩增前和扩增后通过流式细胞术(FACS)进行表征。在扩增之前(前)和扩增之后(后),对于十个转移性前列腺癌患者骨髓样本中的每一个,显示了对于每种T细胞标记物阳性染色的细胞百分比。在扩增前,骨髓T细胞组成为21.5%(7.8-38.0)CD3⁺、14.1%(7.5-26.2)CD4⁺和6.1%(2.3-11.8)CD8⁺。在激活和扩增后,MIL平均为91.5%(88.6-95.1)CD3⁺,具有~2.5:1比率的CD4⁺:CD8⁺ T细胞[分别为66.4%(37.2-88.0)相对于25.7%(11.9-56.3)]。参见图2。

[0091] 实施例3:扩增的MIL和PBL中的肿瘤特异性T细胞的定量

使用先前描述的功能测定,在扩增的MIL和PBL中定量肿瘤特异性T细胞。(Noonan KA, Huff CA, Davis J, *et al. Sci Transl Med.* 2015;7(288):288ra78)。简言之,按照制造商的建议,如实施例1中所述获得的MIL和PBL用羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE; Invitrogen)进行标记,在37°C下温育10分钟,并且洗涤。自体抗原呈递细胞(APC)用来自前列腺癌细胞系的裂解产物进行脉冲,并且与CFSE标记的MIL或PBL一起共培养。用骨髓瘤细胞系裂解产物或仅培养基脉冲的APC用作阴性对照。在5天后,通过用抗CD3和IFN- γ (eBioscience)染色细胞,并且通过用流式细胞术分析它们来确定肿瘤特异性。数据在Gallios流式细胞仪(Beckman Coulter)上进行收集,并且用Kaluzza软件(Beckman Coulter)进行分析。肿瘤特异性T细胞定义为产生IFN γ 的CFSE低、CD3⁺群体。参见图3。

[0092] 图4显示了对于单个患者的代表性结果。对于从患者8扩增的匹配的MIL和PBL显示了在用自体骨髓APC刺激后,产生IFN γ 的CFSE-1 \circ CD3⁺、CD8⁺和CD4⁺ T细胞的百分比,所述自体骨髓APC不用细胞裂解产物(仅培养基)进行脉冲、用作为阴性对照的多发性骨髓瘤裂解产物进行脉冲、或用测试的前列腺癌细胞系裂解产物的四种不同组合中的两种进行脉冲。

[0093] 图5显示了对于每种扩增的MIL,针对肿瘤细胞裂解产物组合各自测量的产生IFN γ 的CFSE-1 \circ CD3⁺ T细胞的百分比。在所有扩增的MIL(n=9)中都检测到前列腺肿瘤特异性T细胞。平均起来,扩增的MIL中11.1%(1.25-44)的总T细胞储库是肿瘤特异性的。

[0094] 图6显示了对于每种扩增的PBL,针对肿瘤细胞裂解产物组合各自测量的产生IFN γ 的CFSE-1 \circ CD3⁺ T细胞的百分比。相比之下,从四个患者中扩增并激活的匹配的PBL证实没有可测量的肿瘤特异性T细胞。

[0095] 实施例4:MIL对前列腺癌患者的施用

在MIL施用之前,患者从第-5天到第-3天接受用环磷酰胺(300 mg/m²/天)和氟达拉滨

(30 mg/m²/天)的非骨髓清除性淋巴细胞排除。淋巴细胞排除已显示增加过继性T细胞疗法的总体疗效。根据需要,2-巯基乙烷磺酸钠(MESNA)可以用于使膀胱内的任何出血降到最低。

[0096] 患者也可以接受在第1天时(在MIL™施用后大约24小时)以及再次每3周施用的帕博利珠单抗(200 mg)。

[0097] 患者可以仅施用MIL™。这些受试者在MIL™施用后密切跟踪7天,用于安全性观察。

[0098] MIL™经由中央导管进行施用,所述中央导管可以是外周插入的中央导管(PICC)线或中央线。在施用激活的MIL™之前,受试者用5%右旋糖的水溶液和50%生理盐水(D5W½NS),以大约200 mL/小时的速率补水至少一小时。在第0天(+1天)时施用之前,MIL™在床边在37°C(±2°C)水浴中融化大约90秒(±30秒)/袋。每个袋从气相液氮装运箱中取出,一次一个,置于水浴中并揉动直到存在一些小冰块。每袋MIL™以大约10 mL/分钟的速率输注,并且在施用下一袋MIL™之前用盐水冲洗。

[0099] 在MIL™输注后,患者用D5W½NS以大约200 mL/小时的速率补水2小时。对于每个袋记录施用信息,包括但不限于融化的日期和时间、施用时间和输注时间。剂量修改是不适用的,因为整个MIL™产品将在至少一天,第0天(+1天)施用。

[0100] 通过使用已知测定测量前列腺特异性抗原(“PSA”)来评估患者中的肿瘤负荷。

[0101] MIL是存在的并且从测试的所有前列腺癌骨髓样品中扩增。来自所有患者的MIL都含有功能活性的肿瘤特异性T细胞。相比之下,相应的PBL未能显示任何可检测的肿瘤特异性免疫识别。因此,对于前列腺癌患者,用MIL的过继性T细胞疗法是令人惊讶且可行的新型治疗方法,这不预计使用过继性T细胞疗法可实现,直到本文提供的实施方案。来自前列腺特异性MIL的结果是令人惊讶和出乎意料的。

[0102] 本描述不限于所述的特定过程、组合物或方法,因为这些可以变化。描述中使用的术语仅出于描述特定形式或实施方案的目的,并不预期限制本文所述的实施方案的范围。除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语都具有与本领域普通技术人员通常理解相同的含义。在一些情况下,为了清楚和/或便于参考,本文定义了具有通常理解的含义的术语,并且在本文中包括此类定义不应必然解释为表示与本领域一般理解的显著差异。然而,在冲突的情况下,以专利说明书(包括定义)为准。

[0103] 根据前文,应了解,本公开内容的各种实施方案已在本文中进行描述用于说明性目的,并且在不脱离本公开内容的范围和精神的情况下可以进行各种修改。因此,本文公开的各种实施方案不预期是限制性的。本文引用的所有参考文献都在此整体引入作为参考。

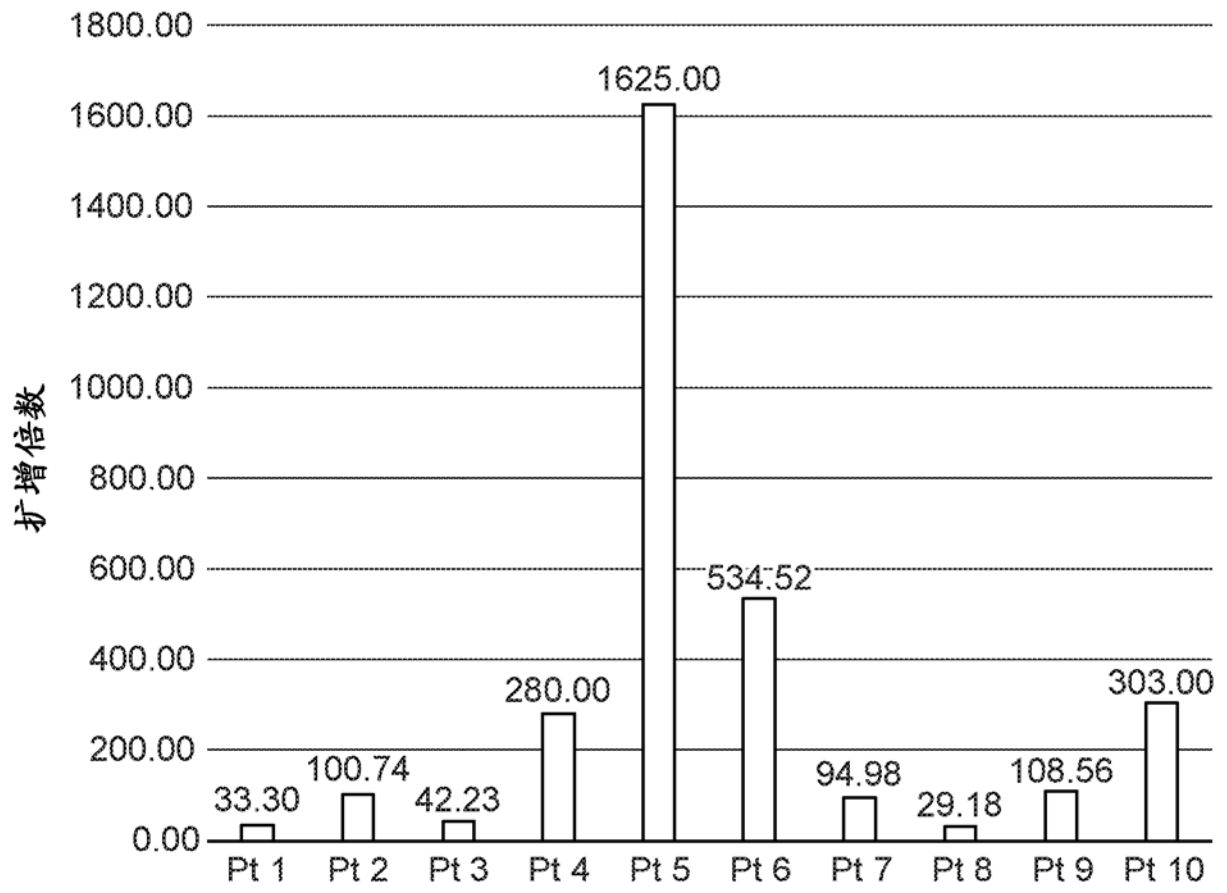


图 1

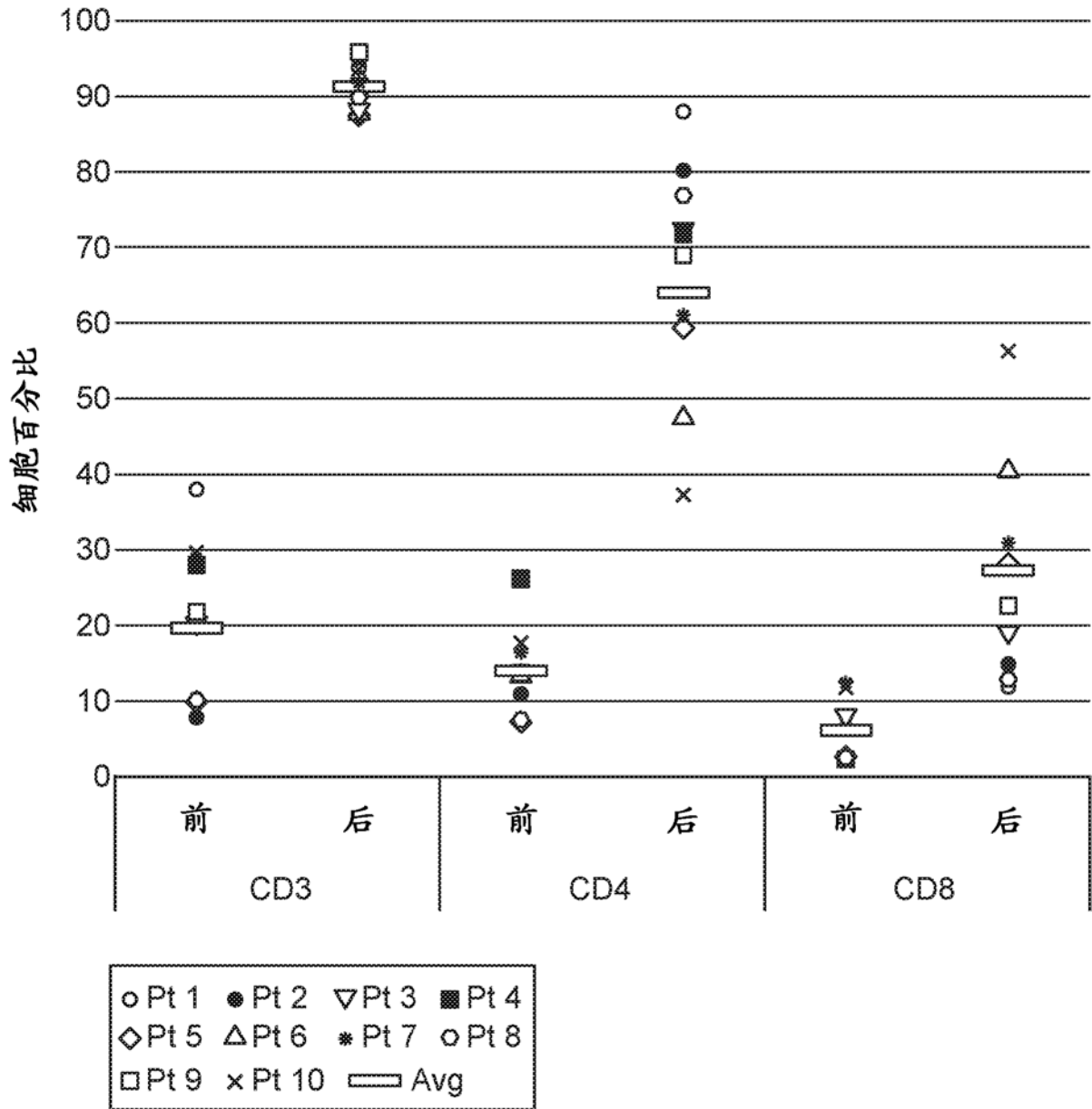


图 2

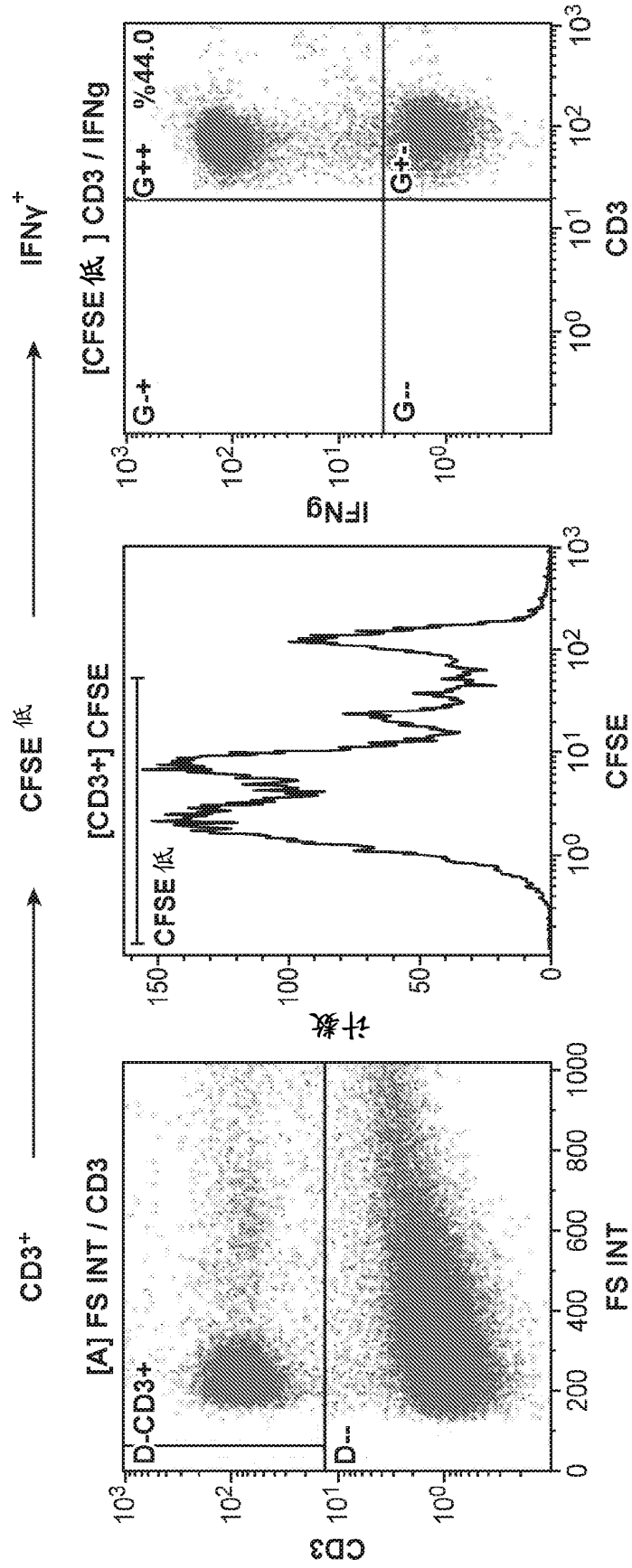


图 3

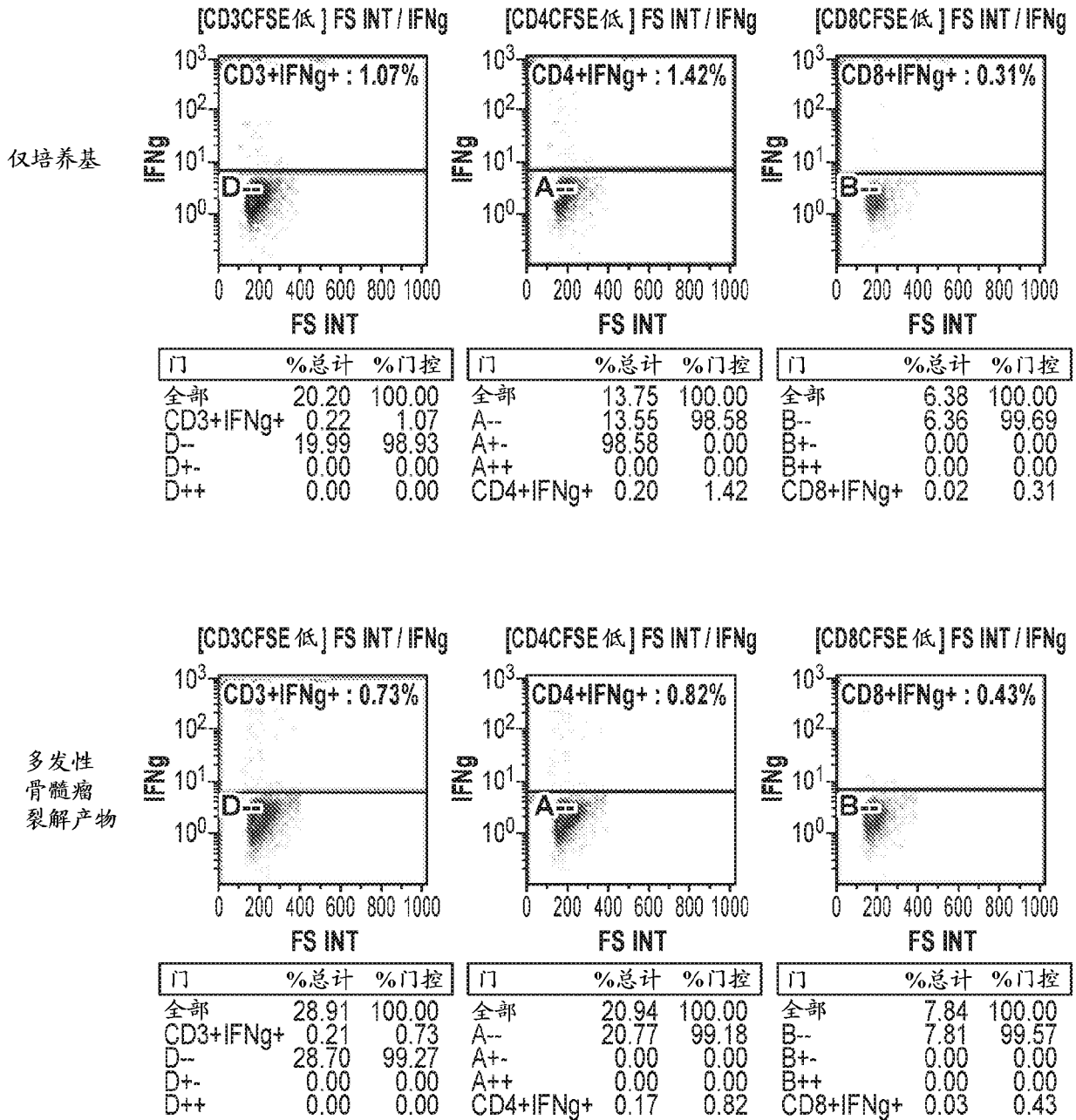


图 4

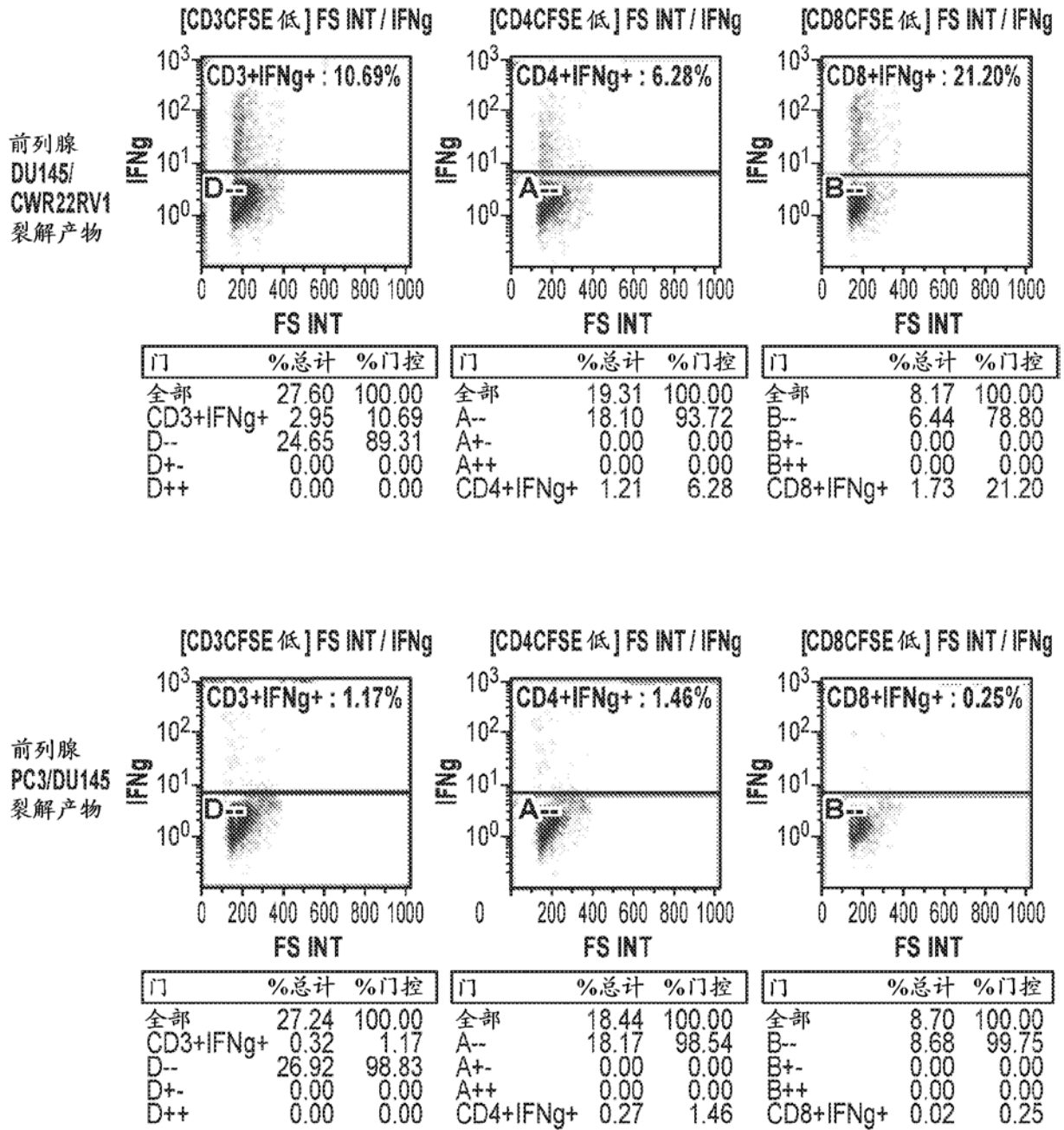


图 4 (续1)

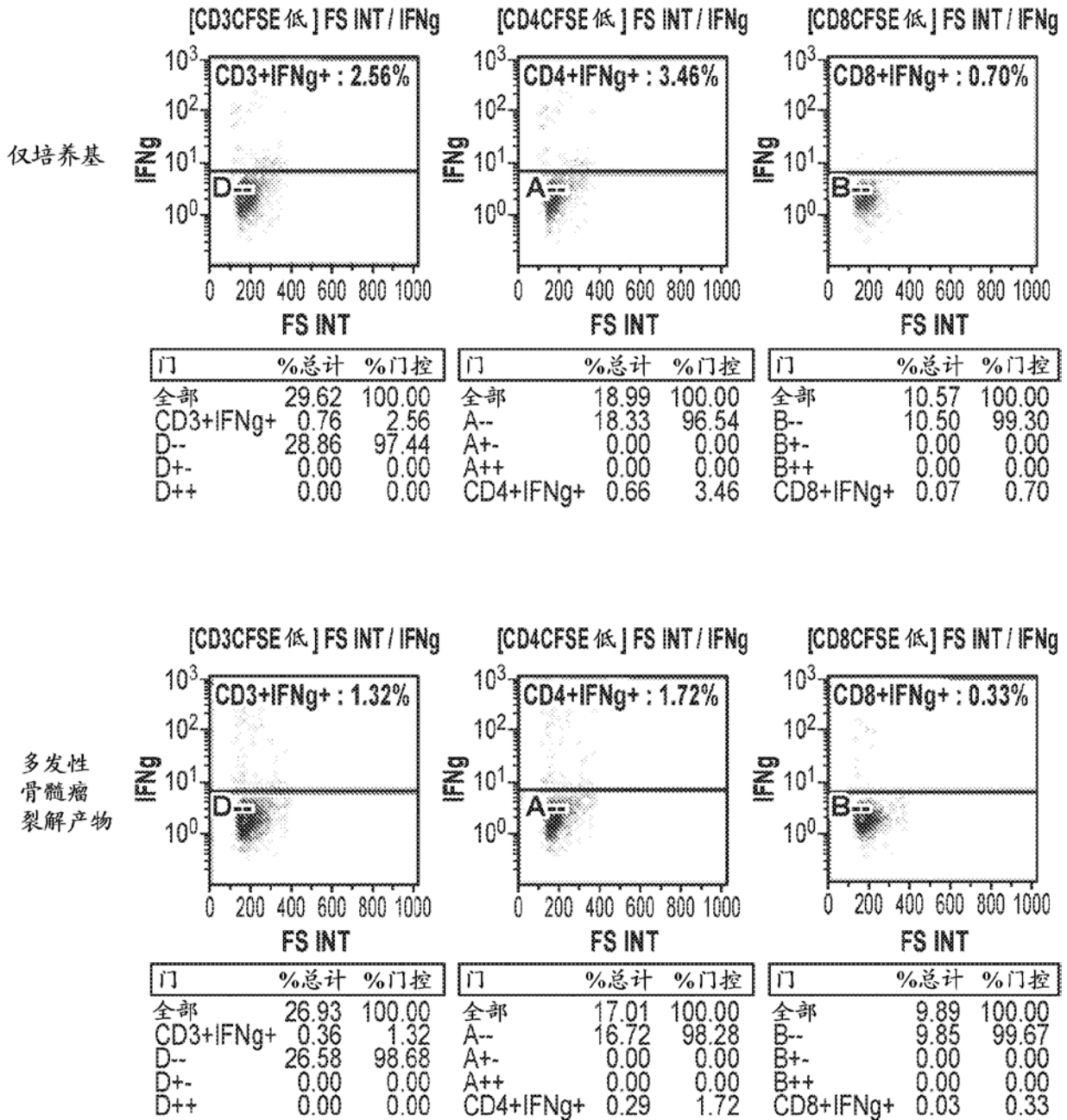


图 4 (续2)

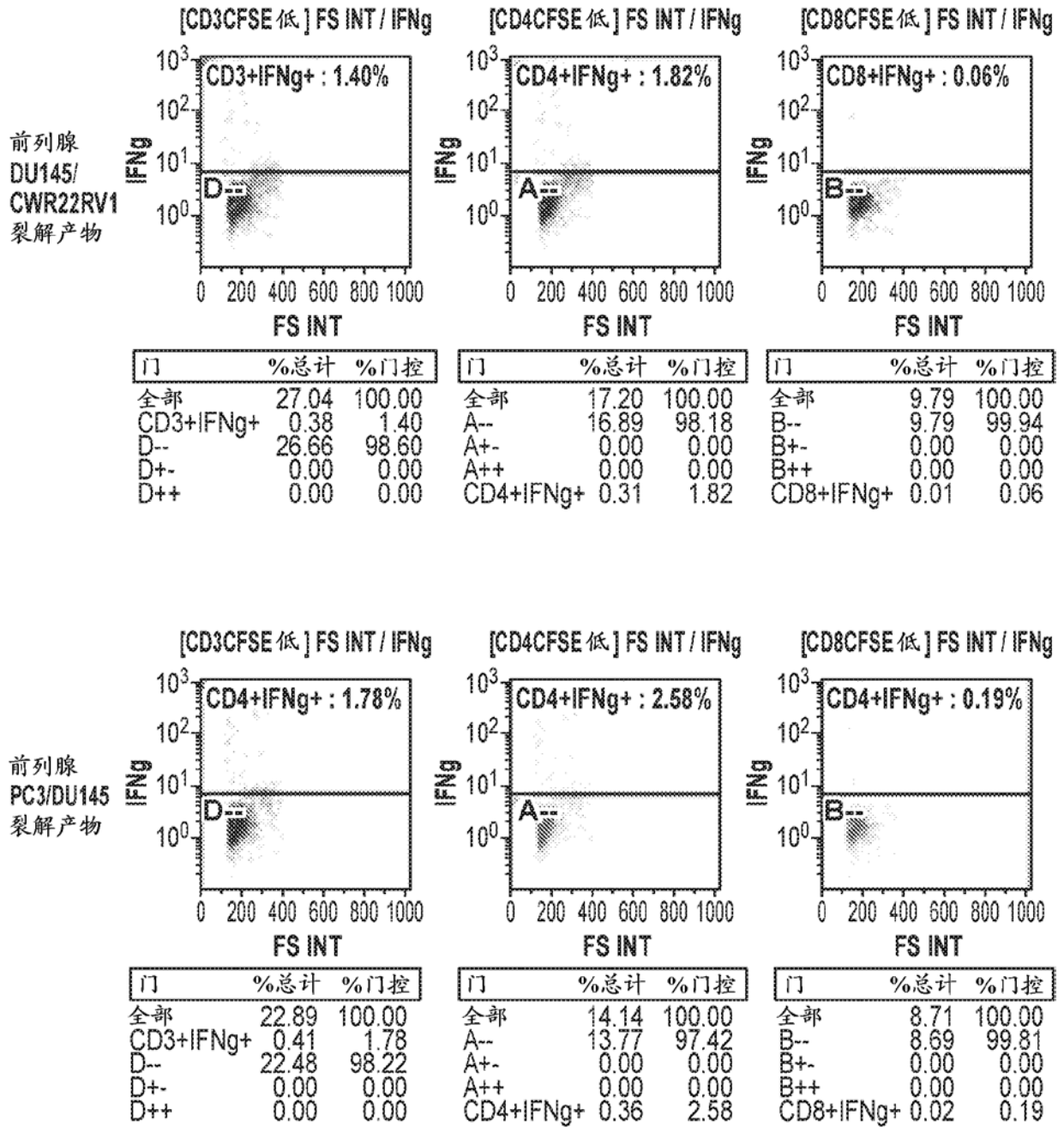


图 4 (续3)

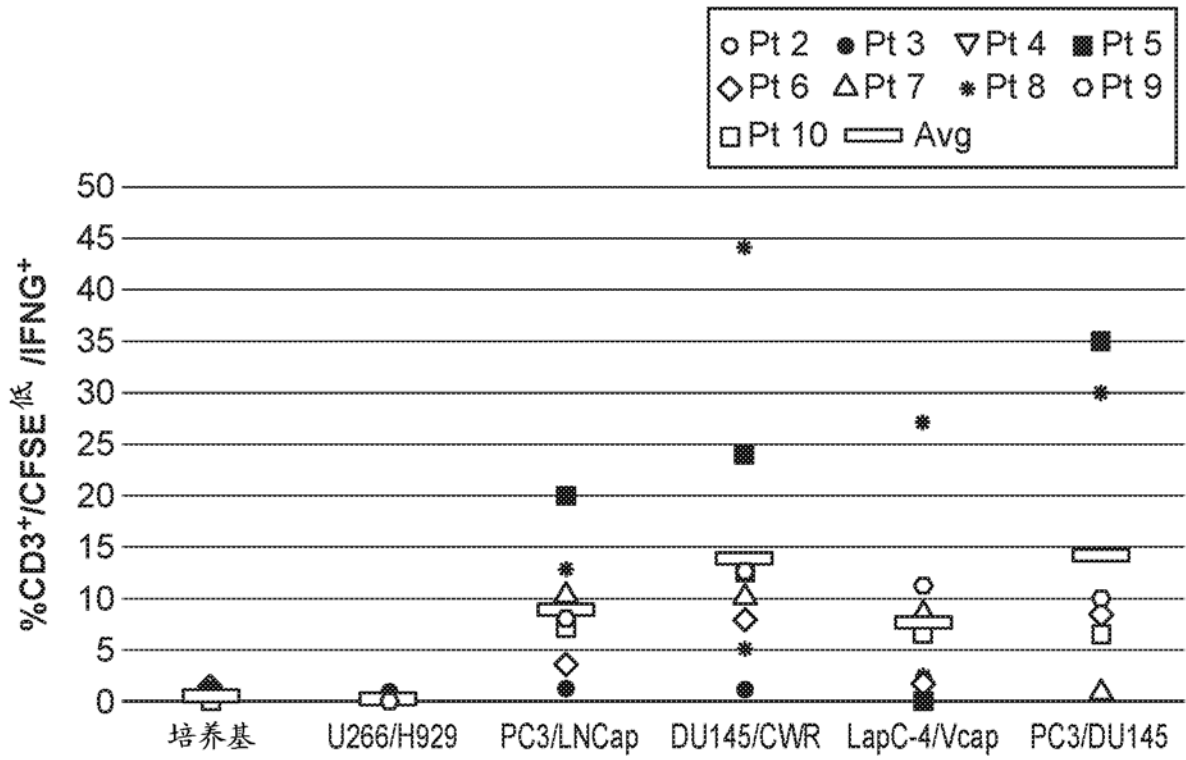


图 5

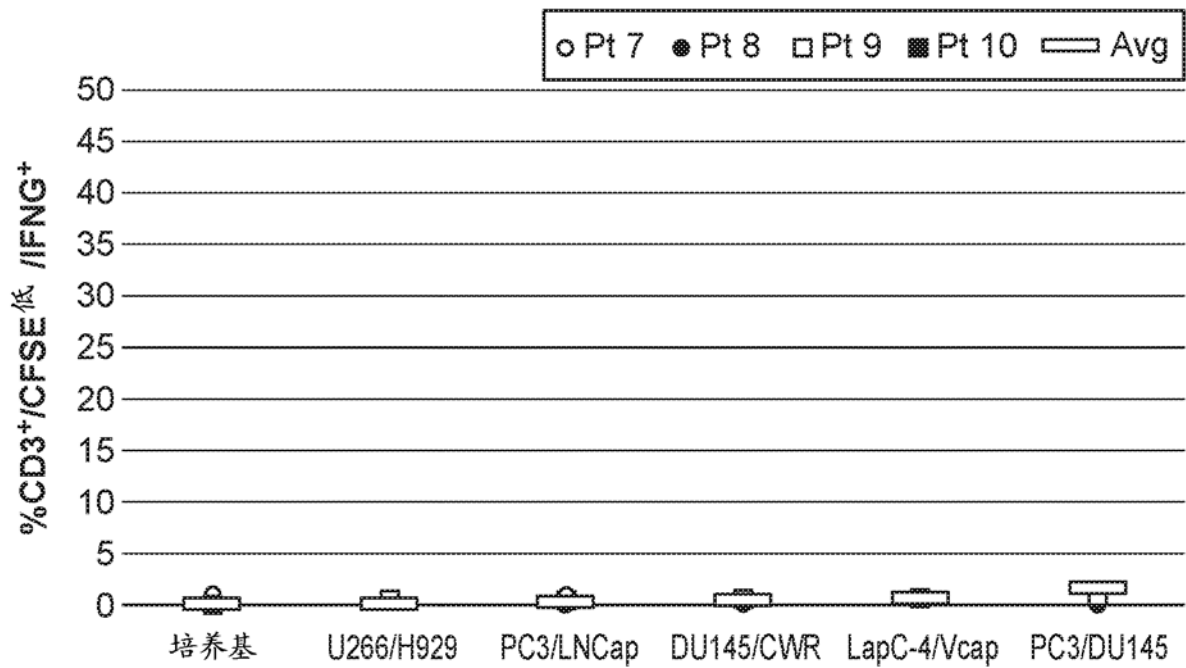


图 6