



(10) 授权公告号 CN 111166878 B

(45) 授权公告日 2024.01.02

(21) 申请号 202010009708.9

C12N 5/0783 (2010.01)

(22) 申请日 2020.01.06

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 110205296 A, 2019.09.06

申请公布号 CN 111166878 A

CN 107523546 A, 2017.12.29

(43) 申请公布日 2020.05.19

WO 2019114751 A1, 2019.06.20

(73) 专利权人 上海鑫湾生物科技有限公司

US 2012082687 A1, 2012.04.05

地址 201506 上海市金山区天工路857号2幢419室

马秀兰等.NKT 细胞在 HIV 感染中的研究进展.中华中医药学会防治艾滋病分会2018年学术年会论文集.2018,第145-148页.

(72) 发明人 徐建青 张晓燕 丁相卿 廖启彬 王婧

Marek J Nowicki等.Association of cells with natural killer (NK) and NKT immunophenotype with incident cancers in HIV-infected women.AIDS Res Hum Retroviruses.2008,第24卷(第2期),第163-168页.

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司 11280

专利代理师 郭广迅

审查员 马璐

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书7页
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

靶向肿瘤抗原的抗体与iNKT细胞的组合的制备方法与应用

(57) 摘要

本发明提供了靶向肿瘤抗原的抗体和免疫细胞iNKT的组合在制备抗肿瘤的藥物中的用途。本发明还提供了所述组合的制备方法。本发明的组合采用iNKT细胞为效应细胞,联合靶向肿瘤抗原的抗体,实现了更高的肿瘤靶细胞杀伤活性,进一步提升了抗肿瘤的能力。

1. 一种靶向肿瘤抗原的抗体和iNKT细胞的组合在制备抗肿瘤药物中的用途,其中,所述肿瘤为AIDS并发的弥漫大B细胞淋巴瘤;

所述抗体包含如SEQ ID NO: 2所示的重链可变区和SEQ ID NO: 4所示的轻链可变区的靶向CD20的抗体;并且,所述靶向肿瘤抗原的抗体包含含A330L/I332E突变序列的Fc序列;

所述iNKT细胞为体外扩增的iNKT细胞,并且,所述iNKT细胞通过包括以下步骤的方法扩增:

a. 特异性扩增iNKT细胞;

使用 α -半乳糖苷神经酰胺扩增iNKT细胞,并以荷载 α -半乳糖苷神经酰胺的CD1d表达细胞刺激iNKT细胞增殖,同时加入细胞因子IL-2和IL-7辅助iNKT细胞生长;

b. 进一步进行iNKT细胞数量扩增与引导功能定向分化;

荷载 α -半乳糖苷神经酰胺的CD1d表达细胞刺激iNKT细胞增殖,同时加入IL-2、IL-7与IL-15,培养结束前1-2天,在培养体系中加入IL-12以引导iNKT细胞定向分化;

所述CD1d表达细胞选自树突状细胞。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述药物为注射剂。

靶向肿瘤抗原的抗体与iNKT细胞的组合的制备方法与用途

技术领域

[0001] 本发明涉及肿瘤的免疫治疗领域。具体地,本发明涉及靶向肿瘤抗原的抗体和iNKT细胞的组合的用途、使用靶向肿瘤抗原的抗体与iNKT细胞的组合进行肿瘤的免疫治疗的试剂盒以及它们的制备方法。

背景技术

[0002] 肿瘤免疫治疗能够靶向肿瘤诱导的免疫逃逸与免疫抑制性肿瘤微环境,通过激活体内的免疫细胞以增强机体抗肿瘤免疫应答,可特异性地清除肿瘤病灶、抑制肿瘤生长,并且能够打破免疫耐受。由于肿瘤免疫治疗副作用小、治疗效果明显,被称为继肿瘤手术、放疗和化疗之后的第四大肿瘤治疗技术。2013年12月,肿瘤免疫疗法被Science杂志评定位居全球十大科学研究突破之首。

[0003] 目前的肿瘤免疫疗法主要是增强抗肿瘤免疫反应。主要包括两类,一类是“被动”免疫疗法,利用免疫系统的效应细胞或分子直接攻击肿瘤细胞,包括抗体或其衍生物(如抗体-药物偶联物)靶向疗法,过继性免疫细胞疗法(如淋巴因子激活的杀伤细胞,自然杀伤细胞,自然杀伤T细胞,树突状细胞等),基因工程T细胞(如嵌合抗原受体CAR-T,T细胞受体TCR-T等)。另一类是“主动”免疫疗法,通过调控内源的免疫调节机制或免疫激活机制来增强免疫系统,例如利用I型干扰素,To11样受体激动剂和干扰素基因激动剂等增强抗原呈递细胞对抗原的摄取、加工和递呈能力;利用树突细胞疫苗和抗细胞毒性T淋巴细胞抗原-4(CTLA-4)单克隆抗体等以增强未分化幼稚T细胞的活化和扩增;通过离体刺激扩增肿瘤浸润T细胞(tumor infiltrating lymphocytes,TILs)后回输癌症患者来强化免疫应答的效应。

[0004] 免疫增强策略确实一定程度上控制了肿瘤生长,但抑制多种类型肿瘤的有效性有待提升。值得注意的是,免疫激活剂在增加机体对肿瘤的免疫应答的同时,也增加了超生理水平免疫应答的风险。例如CAR-T细胞荷载抗原结合的结构域和来自受体的细胞内共刺激结构域,对抗原的识别不受主要组织相容性复合物表达的限制,可更有效地攻击肿瘤细胞。但随之带来的是脱靶毒性以及急性细胞因子释放综合征等超生理水平的应答的结果。日益增多的临床试验证实,肿瘤的联合治疗策略,如免疫疗法与化学疗法、放射疗法、溶瘤病毒治疗、靶向疗法等的组合等,相比与单一治疗,在提高治疗有效性以及降低副作用方面有极大的优势。

[0005] 自然杀伤T细胞(Natural killer T cell,NKT)是肿瘤免疫治疗策略中重要的细胞类型。其中,I型NKT细胞即iNKT表达恒定的T细胞抗原受体(TCR),在 α -GalCer糖脂类抗原刺激活化后可分泌抗肿瘤相关细胞因子,提高自然杀伤细胞(NK)和细胞毒性T淋巴细胞(CTL)活性。iNKT细胞还可通过影响肿瘤微环境或在抗体依赖性细胞毒性(Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity,ADCC)中发挥重要的抗肿瘤及抗感染作用。在多种实体瘤或者恶性血液瘤临床试验中,给患者过继回输体外扩增的iNKT细胞显示了良好的治疗效果。NKT细胞免疫疗法肿瘤的有效性与安全性已被广泛认可。日本厚生劳动省已经批准

该方法在临床应用。此外,iNKT细胞治疗技术还可与其他的肿瘤治疗技术联合应用,例如外科手术、化学药物治疗、放射治疗等。目前iNKT细胞治疗肿瘤所面临的主要挑战是靶向性低,特别是对不表达CD1d分子的肿瘤细胞治疗效果非常有限。

[0006] 肿瘤治疗性单克隆抗体(Monoclonal Antibodies,mAbs)的作用靶点涵盖肿瘤细胞相关抗原(如CD19、CD20、CD22、Her2)、上皮与血管新生受体(如EGFR、VEGF、VEGFR2)、以及免疫检查点关键分子(如CTLA4、PD-1、PD-L1)等。可通过以下机制提升杀伤肿瘤细胞效果:(1)直接阻断或活化配体-受体信号转导活性,诱导细胞凋亡;(2)免疫细胞介导的肿瘤细胞杀伤,包括抗体依赖性细胞吞噬作用(Antibody-Dependent Cell Phagocytosis,ADCP)与ADCC、补体依赖性细胞毒性(Complement-Dependent Cytotoxicity,CDC);(3)基因工程修饰技术增加靶向肿瘤的精准性,如抗体单链可变片段(single-chain variable Fragment,scFv)基因修饰性T细胞;(4)免疫检查点关键分子的阻断抗体,可通过减少免疫耐受,从而增强T细胞对肿瘤细胞的杀伤效果。(5)靶向肿瘤脉管系统和基质的抗体,可拮抗血管受体或配体,诱导血管和基质细胞消融从而抑制肿瘤细胞的增殖。抗体具有作用靶点更为特异,副作用更少的优势。目前临床应用的抗体药物从早期的利妥昔单抗Rituximab(1997),曲妥珠单抗Trastuzumab(1998),到近年来研发成功的德瓦鲁单抗Durvalumab(2017),奥英妥珠单抗Inotuzumab ozogamicin(2017),Moxetumomab pasudotox(2018),Cemiplimab-rwlc(2018),累计有30余种,显示了令人充满希望的抗肿瘤效果,但大多数抗体单独使用依然难以实现对肿瘤细胞的长期有效的抑制和杀伤作用。

[0007] 艾滋病(AIDS)是由HIV病毒感染人体后导致免疫功能受损的疾病,患者发展到艾滋病后期容易并发各种危及生命的机会性感染和恶性肿瘤。由于此类患者伴有免疫缺陷,治疗方案的选择及剂量要非常谨慎。(赵鹏,赵华,涂波.艾滋病合并弥漫大B细胞淋巴瘤1例报道[J].解放军医学院学报,2016,37(10):1117-1118.)

[0008] 对于大多数肿瘤,例如CD20阳性的弥漫大B细胞淋巴瘤,单独使用其靶向抗体治疗,可以增加对肿瘤的治愈;但是由于艾滋病患者的免疫缺陷特质,这进一步增加了对患者体液免疫的抑制,从而造成机会性感染的发生,这对患者治疗是有危害的。因此,靶向抗体药物剂量需适量,而这会导致治疗效果的下降。

[0009] 如何解决抗体药物自身存在的免疫原性,如抗药抗体(anti-drug antibody,ADA)反应、长期使用肿瘤靶点的耐受性以及单一阻断信号转导通路的长效性问题,是肿瘤抗体药物无法回避的挑战。由于以上现有技术存在的缺陷,需要开发一种治疗效果佳、对患者副作用低的抗肿瘤药物和治疗方法。

发明内容

[0010] 因此,本发明的目的是提供一种靶向肿瘤抗原的抗体和iNKT细胞的组合在制备抗肿瘤药物中的用途,本发明还提供了使用靶向肿瘤抗原的抗体与效应细胞的组合进行肿瘤的免疫治疗的试剂盒以及它们的制备方法。所述肿瘤选自弥漫大B细胞淋巴瘤、肉瘤、胶质瘤、高级别胶质瘤、母细胞瘤、骨肉瘤、浆细胞瘤、组织细胞瘤、大肠癌、造血系统癌、睾丸癌、卵巢癌、鳞状细胞癌、腺癌、膀胱癌、脑癌、神经系统癌、头颈癌和头颈部鳞状细胞癌;

[0011] 优选地,所述肿瘤为AIDS并发的恶性肿瘤;所述AIDS并发的恶性肿瘤优选选自AIDS并发的弥漫大B细胞淋巴瘤、AIDS并发的卡波西肉瘤和AIDS并发的皮肤粘膜鳞癌;

- [0012] 优选地,所述肿瘤为AIDS并发的弥漫大B细胞淋巴瘤。
- [0013] 优选地,所述药物为注射剂、外用药物剂型或口服剂。
- [0014] 优选地,所述药物为片剂、胶囊剂、膜剂或颗粒剂。
- [0015] 优选地,所述药物为缓释剂或非缓释剂。优选地,其中,所述靶向肿瘤抗原的抗体包含Fc序列;更优选地,所述靶向肿瘤抗原的抗体包含含A330L/I332E突变序列的Fc序列。
- [0016] 一方面,所述靶向肿瘤抗原的抗体为靶向以下靶点的抗体:PD-L1、CD47、CD52、CTLA4、RANKL、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、GD2、EGFR、VEGF、VEGFR、PIGF、VEGFR2、PSMA、HER2、AXL、ROR2、PD-1、PDGF- α 、SLAMF7和/或CCR4;
- [0017] 优选地,所述靶向肿瘤抗原的抗体为靶向CD20的抗体;
- [0018] 优选地,所述抗体包含SEQ ID NO:2所示的重链和SEQ ID NO:4所示的轻链。
- [0019] 优选地,所述抗体重链的编码核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示,所述抗体轻链的编码核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示。
- [0020] 在一个具体的实施方案中,本发明人提供了包含SEQ ID NO:2所示的重链和SEQ ID NO:4所示的轻链的靶向CD20的抗体与iNKT细胞的组合。
- [0021] 本发明的发明人发现,治疗性单克隆抗体与iNKT细胞联合使用,不仅能够更好的使iNKT细胞导向肿瘤细胞,并且能够提升抗体的ADCC作用,对肿瘤有更好的控制作用;并且,对抗体组合使用增加免疫功能的iNKT细胞,还可能帮助患者修复免疫系统,减少机会性感染的发生,有利于病情的缓解。
- [0022] 另一方面,本发明提供了一种试剂盒,所述试剂盒包括:
- [0023] 靶向肿瘤抗原的抗体和iNKT细胞。
- [0024] 优选地,所述iNKT细胞的数量为 10^7 个至 10^{10} 个。根据本发明所述的试剂盒,其中所述靶向肿瘤抗原的抗体为靶向以下靶点的抗体:PD-L1、CD47、CD52、CTLA4、RANKL、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、CD147、GD2、EGFR、VEGF、PIGF、VEGFR、VEGFR2、PSMA、HER2、AXL、ROR2、PD-1、PDGF- α 、SLAMF7和/或CCR4;
- [0025] 优选地,所述靶向肿瘤抗原的抗体为靶向CD20的抗体;
- [0026] 优选地,所述抗体包含SEQ ID NO:2所示的重链和SEQ ID NO:4所示的轻链;
- [0027] 优选地,所述抗体重链的编码核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示,所述抗体轻链的编码核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示。
- [0028] 根据本发明所述的试剂盒,其中所述试剂盒包含靶向CD20的抗体和iNKT细胞;
- [0029] 其中,所述靶向CD20的抗体具有SEQ ID NO:2所示的重链和SEQ ID NO:4所示的轻链。
- [0030] 再一方面,本发明提供了所述组合或试剂盒在制备抗肿瘤药物中的用途。再一方面,本发明提供了所述组合或试剂盒的制备方法,所述方法包括以下步骤:
- [0031] 1) 制备靶向肿瘤抗原的抗体,和
- [0032] 2) 体外扩增iNKT细胞。
- [0033] 根据本发明所述的方法,其中,在步骤2)中,所述iNKT细胞通过包括以下步骤的方法扩增:
- [0034] a. 特异性扩增iNKT细胞;
- [0035] 优选地,使用 α -半乳糖苷神经酰胺(α -GalCer)扩增iNKT细胞,并以荷载 α -半乳糖

苷神经酰胺的CD1d表达细胞刺激iNKT细胞增殖,同时加入细胞因子IL-2和IL-7辅助iNKT细胞生长;

[0036] b. 进一步进行iNKT细胞数量扩增与引导功能定向分化;

[0037] 优选地,荷载 α -半乳糖苷神经酰胺的CD1d表达细胞刺激iNKT细胞增殖,同时加入IL-2、IL-7与IL-15,培养结束前1-2天,在培养体系中加入IL-12以引导iNKT细胞定向分化;

[0038] 优选地,所述CD1d表达细胞选自树突状细胞、表达CD1d的其他细胞和其他经人工修饰的DC细胞样抗原提呈细胞。

[0039] 另一方面,本发明提供了治疗肿瘤的方法,所述方法包括:将本发明的组合或试剂盒给予需要的对象;或者将根据本发明的方法制备的组合或试剂盒给予需要的对象;

[0040] 优选地,所述肿瘤选自弥漫大B细胞淋巴瘤、肉瘤、胶质瘤、高级别胶质瘤、母细胞瘤、骨肉瘤、浆细胞瘤、组织细胞瘤、大肠癌、造血系统癌、睾丸癌、卵巢癌、鳞状细胞癌、腺癌、膀胱癌、脑癌、神经系统癌、头颈癌、或头颈部鳞状细胞癌;

[0041] 优选地,所述肿瘤为AIDS并发的恶性肿瘤,所述AIDS并发的恶性肿瘤选自AIDS并发的弥漫大B细胞淋巴瘤、AIDS并发的卡波西肉瘤,或AIDS并发的皮肤粘膜鳞癌;

[0042] 优选地,所述肿瘤为AIDS并发的弥漫大B细胞淋巴瘤。

[0043] 本发明所述的靶向肿瘤抗原的抗体与所述iNKT细胞具有协同作用。在优选的实施方式中,将靶向肿瘤抗原的抗体和iNKT细胞同时或依次给予需要的对象;例如,先给予靶向肿瘤抗原的抗体再给予iNKT细胞,或者先给予iNKT细胞再给予靶向肿瘤抗原的抗体;更优选地,先给予iNKT细胞再给予靶向肿瘤抗原的抗体。优选地,所述靶向肿瘤抗原的抗体和iNKT细胞可以通过皮下注射、静脉注射、或肌肉注射的方式给药。其中所述靶向肿瘤抗原的抗体的给药剂量没有特别限制,一般根据实际情况如患者状况或者抗体种类而定。例如,在一个优选的实施方式中,靶向肿瘤细胞的特异性抗体的给予剂量可以是5mg-200mg/次;更优选地,所述靶向肿瘤细胞的特异性抗体的给予剂量是10mg/次。

[0044] 优选地,所述iNKT细胞的给予剂量为 10^7 个至 10^{10} 个细胞/次;更优选地,所述iNKT细胞的给予剂量为 $1.3 \sim 2.5 \times 10^9$ 个细胞/次。

[0045] 在一个优选的实施方式中,iNKT细胞的给予剂量可以是 1.3×10^9 个细胞/次至 2.5×10^9 个细胞/次。iNKT细胞的回输次数没有特别限制,一般根据实际情况如患者状况而定。

[0046] 根据本发明的一个示例性抗体为抗CD20抗体(11B8),其包含:SEQ ID NO:1所示的重链核苷酸序列,和与之对应SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列,以及SEQ ID NO:3所示的轻链核苷酸序列,和与之对应SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。

[0047] SEQ ID NO:1,即CD20抗体11B8的重链核苷酸序列

[0048] ATGGAATTAGGCCTCTCTTGGGTGTTCCCTCGTGGCTATTCTCAAGGGAGTGCAGTGCAGGTGCAGCTG
GTGCAGTCTGGAGGCGGGCTCGTGCATCCTGGCGGCTCCCTGAGACTGTCTTGCACCGGAAGCGGGTTCACCTTCTC
TTACCACGCTATGCACTGGGTGCGCCAGGCTCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGAGCATTATCGGAACCGGCGGGC
TGACATACTACGCTGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACAATTAGCCGCGACAACGTGAAGAACTCCCTGTACCTCCAG
ATGAACAGCCTCAGAGCCGAGGACATGGCTGTGTACTACTGCGCTAGAGACTACTACGGCGCCGGATCTTTCTACGA
CGGCCTGTACGGTATGGACGTGTGGGGCCAGGGCACAACAGTGACCGTGTCTAGC

[0049] SEQ ID NO:2,即CD20抗体11B8的重链氨基酸序列(其中下划线部分分别为CDR1、CDR2和CDR3)

[0050] MELGLSWVFLVAILKGVQCEVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCTGSGFTFSYHAMHWVRQAPGKGLEWVSI
IGTGGVTTYADSVKGRFTISRDNVKNLSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARDYYGAGSFYDGLYGM DVWGQGT TTVTVSS

[0051] SEQ ID NO:3,即CD20抗体11B8的轻链核苷酸序列

[0052] ATGGAGGCTCCCGCTCAGCTGCTGTTCTGCTCCTGCTGTGGCTGCCTGACACA ACTGGAGAGATCGTG
CTGACCCAGTCTCCCGCTACACTGTCTCTGAGCCCTGGCGAGCGGCCACCCTGTCTTGCAGGGCCTCTCAGTCCGT
TTCTTCTTACCTCGCTTGGTATCAGCAGAAGCCCGGACAGGCCCAAGACTCCTCATATATGACGCTTCTAACCGCG
CCACCGGCATCCCAGCTAGGTT CAGCGGTCCGGATCTGGAACCGACTTCACACTCACAATTTCTAGCCTCGAACCC
GAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGAGGTCCGACTGGCCACTCACATTCCGCGCGCGGACAAAGGTGGAGAT
TAAG

[0053] SEQ ID NO:4,即CD20抗体11B8的轻链氨基酸序列(其中下划线部分分别为CDR1、
CDR2和CDR3)

[0054] MEAPAQLLFLLLLWLPD TTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY
DASNRATGIPARFSGSGSGTDFLT ISSLPEPDAFVYYCQQRS DWPLTFGGGTKVEIK

[0055] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0056] 本发明的发明人发现,采用iNKT细胞为效应细胞,联合肿瘤抗原特异性高杀伤性
抗体进行治疗,具有更高的肿瘤靶细胞杀伤活性,进一步提升抗肿瘤的能力。具体地,发明
人发现,在肿瘤的治疗中,如果将免疫效应细胞iNKT与靶向肿瘤细胞的治疗性单克隆抗体
联合应用,可兼具iNKT细胞强大的CD1d靶向肿瘤杀伤作用与免疫调节作用,并通过肿瘤特
异性靶向抗体将iNKT细胞精准靶向肿瘤局部病灶的同时,利用抗体的ADCC作用以更加有效
提升肿瘤杀伤的特异性。对抗体组合使用增加免疫功能的iNKT细胞,还可能帮助患者修复
免疫系统,减少机会性感染的发生,有利于病情的缓解。相比于单一疗法,该种组合可能极
大地减少免疫细胞与抗体的用量与回输的频率,减轻肿瘤患者痛苦的同时降低治疗费用。

附图说明

[0057] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中:

[0058] 图1示出为患者使用常规治疗方法和根据本发明的治疗方法的流程图。其中患者
大致的治疗情况如下:

[0059] 患者于2018年6月发现腹部包块,无红肿疼痛并伴发热,穿刺病理显示为弥漫大B
细胞淋巴瘤,HIV病毒阳性;随后该患者进行抗HIV病毒的治疗、一线与二线化学药物治疗,
以及局部放射治疗。化疗与局部放疗减轻了肿瘤负荷,使肿瘤略有缩小,但停药后肿瘤反
弹。该患者于2018年12月18日进行iNKT细胞联合CD20抗体治疗,到2019年1月22日,该患者
共进行了3个疗程的免疫治疗。

[0060] 图2示出为患者腹部病灶MRI影像结果。图中显示该患者进行肿瘤局部放疗后,第
一疗程细胞回输前5天,肿瘤缩小,但是停药后肿瘤反弹。进行iNKT细胞联合CD20抗体三个
疗程后,肿瘤大小明显缩小且没有再反弹。

[0061] 图3为患者腹部病灶肿瘤的长径和短径图;

[0062] 图4为患者腹部病灶肿瘤的体积图。

具体实施方式

[0063] 下面结合具体临床试验对本发明作出详细说明。

[0064] CD20抗体由上海近岸生物科技有限公司的GMP (药品生产质量管理规范) 车间生产制备;

[0065] iNKT细胞取自患者自体的PBMC细胞,在体外扩增培养获得。并且,本患者自愿加入本研究,并签署知情同意书。

[0066] 实施例1本发明的组合的临床治疗过程、结果和结论

[0067] 1.临床治疗过程

[0068] 1.1患者的临床诊断

[0069] 患者发现腹部包块,无红肿疼痛,并伴发热;穿刺病理学确诊为:弥漫性大B细胞淋巴瘤以及人类免疫缺陷病毒(HIV)阳性(图1)。

[0070] 1.2患者的常规治疗方案

[0071] 患者病情确诊后,患者进行替诺福韦/恩曲他滨+多替拉韦治疗艾滋病(Acquired Immune Deficiency Syndrome,AIDS)。一个月后即2018年7月5日,进行R-EPOCH(美罗华、多柔比星、长春新碱和依托泊苷,其中多柔比星、长春新碱和依托泊苷三种化疗药一起打要连续打96小时不间断(一种化疗药一天一袋共四袋)最后才是长春新碱(未控制流速)口服强的松每天18片)化疗治疗弥漫性大B细胞淋巴瘤。由于治疗效果不佳,一个月后,更换为R-ICE(利妥昔单抗 $375\text{mg}/\text{m}^2$,静脉滴注,第1天;异环磷酰胺 $200\text{mg}/\text{m}^2$,静脉滴注,第2~6天;卡铂 $\text{AUC}=5$,静脉滴注,第2天;依托泊苷 $100\text{mg}/\text{m}^2$,静脉滴注,第2~4天。)化疗,肿瘤肿块略有缩小;可是由于R-ICE化疗,造成了骨髓抑制,以及巨细胞病毒性视网膜炎(CMVR)等症状,且肿块消退不明显。患者在R-ICE化疗进行一个月后,对肿瘤局部做放射治疗,此次放疗减轻了肿瘤负荷,肿瘤肿块略有缩小,但是放疗停止后肿瘤出现反弹(图1)。

[0072] 1.3使用本发明的iNKT细胞和CD20抗体组合的治疗方案

[0073] 放疗结束后一个月后,患者进行iNKT细胞联合CD20抗体治疗,第一个疗程在2018年12月18日进行(采用静脉注射形式回输),2018年12月21日再回输一次,回输iNKT细胞数目分别为 2×10^9 , 1.8×10^9 个,CD20抗体剂量均为10mg;3周后,进行第二个疗程,在2019年1月8日回输,2019

	第一周		第四周		第六周	
	第二天	第五天	第二天	第五天	第二天	第五天
[0074] 治疗日期	2018.12.18	2018.12.21	2019.01.08	2019.01.11	2019.01.22	2019.01.25
iNKT数目(个)	2×10^9	1.8×10^9	1.3×10^9	1.5×10^9	2×10^9	2.5×10^9
iNKT的纯度(%)	34.8	34.8	27.7	27.7	36.6	36.6
CD20抗体用量(mg)	10	10	10	10	10	10

[0075] 年1月11日再回输一次,回输iNKT细胞数目分别为 1.3×10^9 , 1.5×10^9 个,CD20抗体剂量仍为10mg;2周后,进行第三个疗程,于2019年1月22日回输,2019年1月25日再回输一次,回输iNKT细胞数目分别为 2×10^9 , 2.5×10^9 个,CD20抗体剂量同样为10mg(如表1所示)。

[0076] 表1本发明的组合的施加量

[0077] 1.4患者肿瘤的检测方法

[0078] 采用流式细胞术检测有效的iNKT细胞的比例;

[0079] 用腹部磁共振成像(MRI)的方法检测肿瘤的大小。

[0080] 2结果

[0081] 2.1肿瘤大小的变化

[0082] 该患者进行化疗结束后,肿瘤体积较大(长径为13厘米,短径为7.5厘米),且无明显缩小趋势,有骨髓抑制,CMVR等症状出现。骨髓抑制,CMVR等症状发生一个月后,进行肿瘤局部放射治疗,即在第一疗程细胞回输前5天,肿瘤有缩小趋势(长径为12厘米,短径为5.2厘米),但是停止放疗后肿瘤开始反弹(图2-4所示)。

[0083] 由于常规疗法无法控制肿瘤生长,患者开始进行iNKT细胞联合CD20抗体治疗。第一疗程细胞回输结束后7天,肿瘤开始缩小,肿瘤短径降低到7.4厘米;继续进行iNKT细胞联合CD20抗体治疗到第三个疗程,第三疗程结束后3天,肿瘤继续缩小,长径降低到9.1厘米,短径降低到4.5厘米,且肿瘤没有再反弹(图2-4所示)。与治疗前(2018.12.13)影像结果相比,患者肿瘤体积由最初的750立方厘米,缩小到150立方厘米(图2-4所示)。

[0084] 2.2进行iNKT细胞联合CD20抗体治后主要伴随反应及处理措施

[0085] 患者进行iNKT细胞联合CD20抗体治疗后,出现了寒颤发热症状。治疗后3小时左右开始出现,热峰达到40℃,物理降温及口服布洛芬退热,随后患者即可恢复正常。同时,iNKT细胞联合CD20抗体治疗后2天开始出现白细胞数量降低现象,根据症状采取升白细胞治疗即可恢复到正常白细胞水平。

[0086] 3结论

[0087] 该患者目前除iNKT细胞联合CD20抗体治疗外,未接受其他针对肿瘤的治疗手段,并于2019年3月15日接受第四疗程细胞回输。

[0088] 与治疗前(2018.12.13)影像结果相比,患者肿瘤最长径缩短25%,肿瘤体积缩小44%。第三疗程最后一次细胞回输后至今(共2个月)没有再发生反弹。

[0089] 目前临床上利妥昔单抗治疗CD20阳性的弥漫大B细胞淋巴瘤,抗体剂量对于体重60Kg、身高1.7米左右患者,剂量大约600mg左右。而本发明iNKT细胞与抗体组合物可以极大减少抗体用量,每次抗体用量只需要10mg,这可以大大减少机体的耐药性,起到更加突出的治疗效果。

[0090] 综合来看,本发明组合可显著减少HIV合并弥漫性大B细胞淋巴瘤患者的肿瘤荷载,能够有效控制肿瘤的反弹,且无明显副作用。采用iNKT细胞为效应细胞,联合肿瘤抗原特异性抗体进行治疗,具有更高的抑制肿瘤的作用,能够有效提升抗肿瘤的能力。

[0001]	序列表	
[0002]	<110>	上海鑫湾生物科技有限公司
[0003]	<120>	靶向肿瘤抗原的抗体与iNKT细胞的组合的制备方法与用途
[0004]	<130>	DIC19110105
[0005]	<160>	4
[0006]	<170>	SIP0SequenceListing 1.0
[0007]	<210>	1
[0008]	<211>	432
[0009]	<212>	DNA
[0010]	<213>	Artificial Sequence
[0011]	<400>	1
[0012]	atggaattag	gcctctcttg ggtgttctc gtggctattc tcaagggagt gcagtgcgag 60
[0013]	gtgcagctgg	tgcagtctgg aggcgggctc gtgcatcctg gcggctccct gagactgtct 120
[0014]	tgcaccggaa	gcggtttcac cttctcttac cacgctatgc actgggtgcg ccaggtcct 180
[0015]	ggcaagggac	tggagtgggt gagcattatc ggaaccggcg gcgtgacata ctacgtgac 240
[0016]	tctgtgaagg	gcagattcac aattagccgc gacaacgtga agaactccct gtacctccag 300
[0017]	atgaacagcc	tcagagccga ggacatggct gtgtactact gcgctagaga ctactacggc 360
[0018]	gccgatctt	tctacgacgg cctgtacggt atggacgtgt ggggccaggg cacaacagtg 420
[0019]	accgtgtcta	gc 432
[0020]	<210>	2
[0021]	<211>	144
[0022]	<212>	PRT
[0023]	<213>	Artificial Sequence
[0024]	<400>	2
[0025]	Met Glu Leu Gly	Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
[0026]	1	5 10 15
[0027]	Val Gln Cys Glu	Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His
[0028]	20	25 30
[0029]	Pro Gly Gly Ser	Leu Arg Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Phe Thr Phe
[0030]	35	40 45
[0031]	Ser Tyr His Ala	Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
[0032]	50	55 60
[0033]	Glu Trp Val Ser	Ile Ile Gly Thr Gly Gly Val Thr Tyr Tyr Ala Asp
[0034]	65	70 75 80
[0035]	Ser Val Lys Gly	Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Ser
[0036]	85	90 95
[0037]	Leu Tyr Leu Gln	Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr
[0038]	100	105 110

[0039]	Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Ala Gly Ser Phe Tyr Asp Gly Leu	
[0040]	115	120 125
[0041]	Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
[0042]	130	135 140
[0043]	<210>	3
[0044]	<211>	381
[0045]	<212>	DNA
[0046]	<213>	Artificial Sequence
[0047]	<400>	3
[0048]	atggaggctc cgcctcagct gctgttctctg ctcttgctgt ggctgcctga cacaactgga	60
[0049]	gagatcgtgc tgaccagtc tcccgctaca ctgtctctga gccctggcga gcgcgccacc	120
[0050]	ctgtcttgca gggcctctca gtccgtttct tcttacctcg cttggtatca gcagaagccc	180
[0051]	ggacaggccc caagactcct catatatgac gcttctaacc gcgccaccgg catcccagct	240
[0052]	aggttcagcg ggtccggatc tggaaccgac ttcacactca caatttctag cctcgaacct	300
[0053]	gaggacttcg cctgtacta ctgccagcag aggtccgact ggccactcac attcggcggc	360
[0054]	gggacaaagg tggagattaa g	381
[0055]	<210>	4
[0056]	<211>	127
[0057]	<212>	PRT
[0058]	<213>	Artificial Sequence
[0059]	<400>	4
[0060]	Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro	
[0061]	1	5 10 15
[0062]	Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser	
[0063]	20	25 30
[0064]	Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser	
[0065]	35	40 45
[0066]	Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro	
[0067]	50	55 60
[0068]	Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala	
[0069]	65	70 75 80
[0070]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	
[0071]	85	90 95
[0072]	Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser	
[0073]	100	105 110
[0074]	Asp Trp Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[0075]	115	120 125

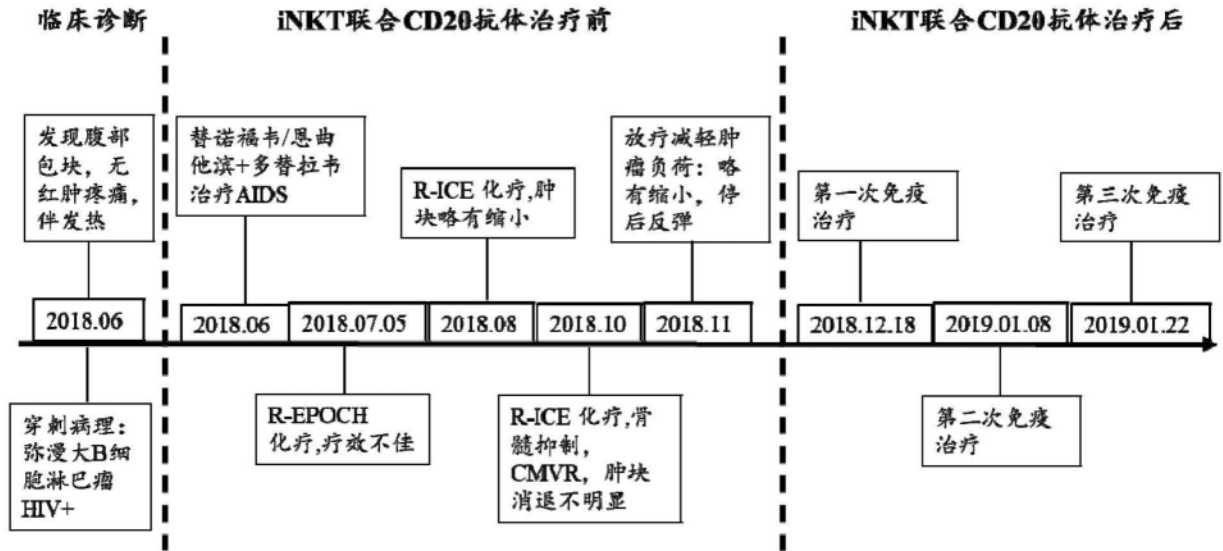
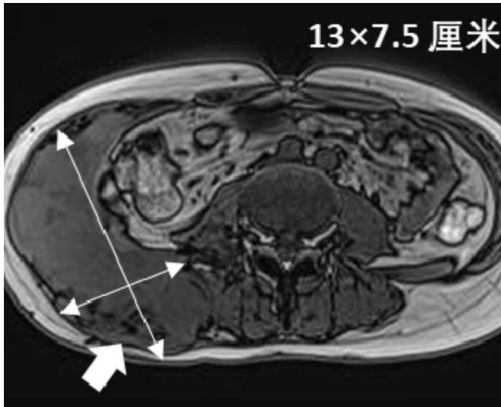
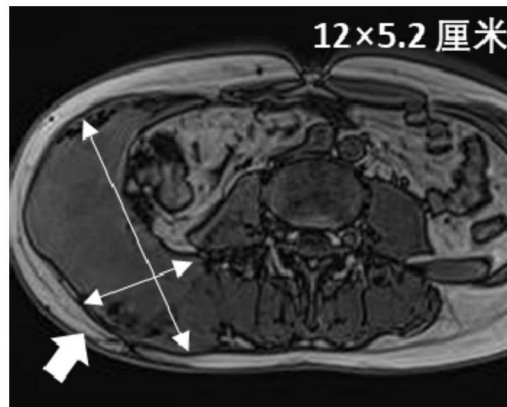


图1

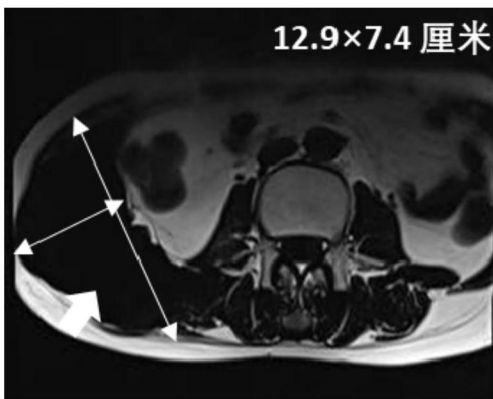
2018.10.30 腹部 MRI



2018.12.13 腹部 MRI



2018.12.29 腹部 MRI



2019.01.28 腹部 MRI

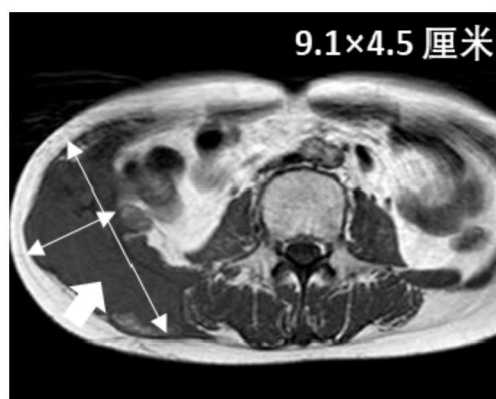


图2

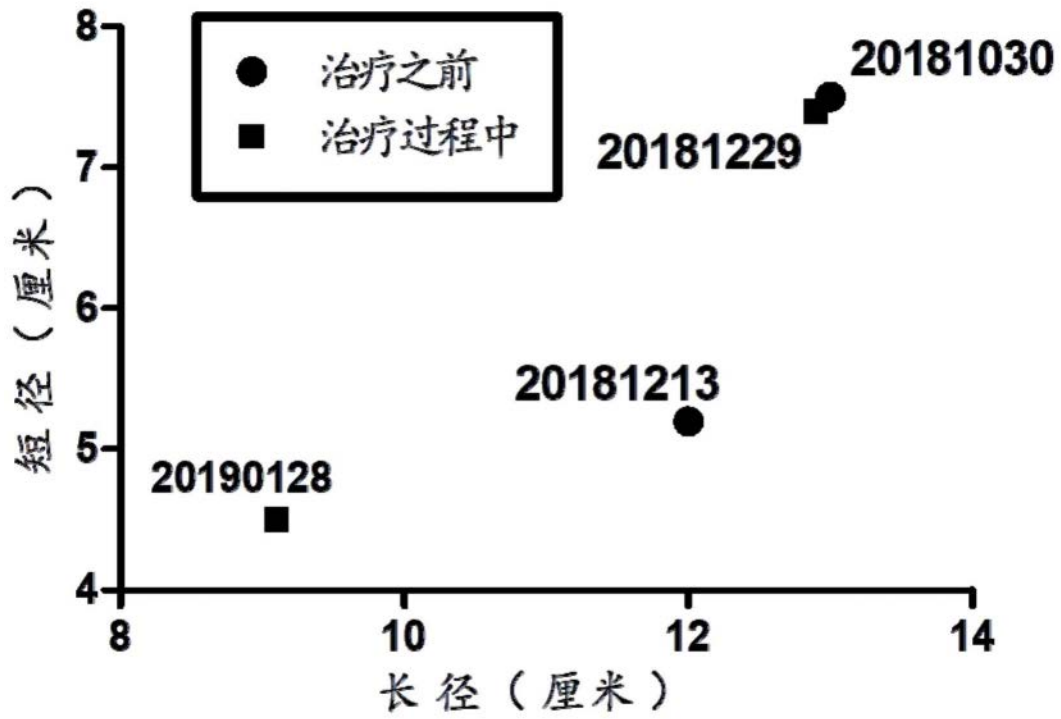


图3

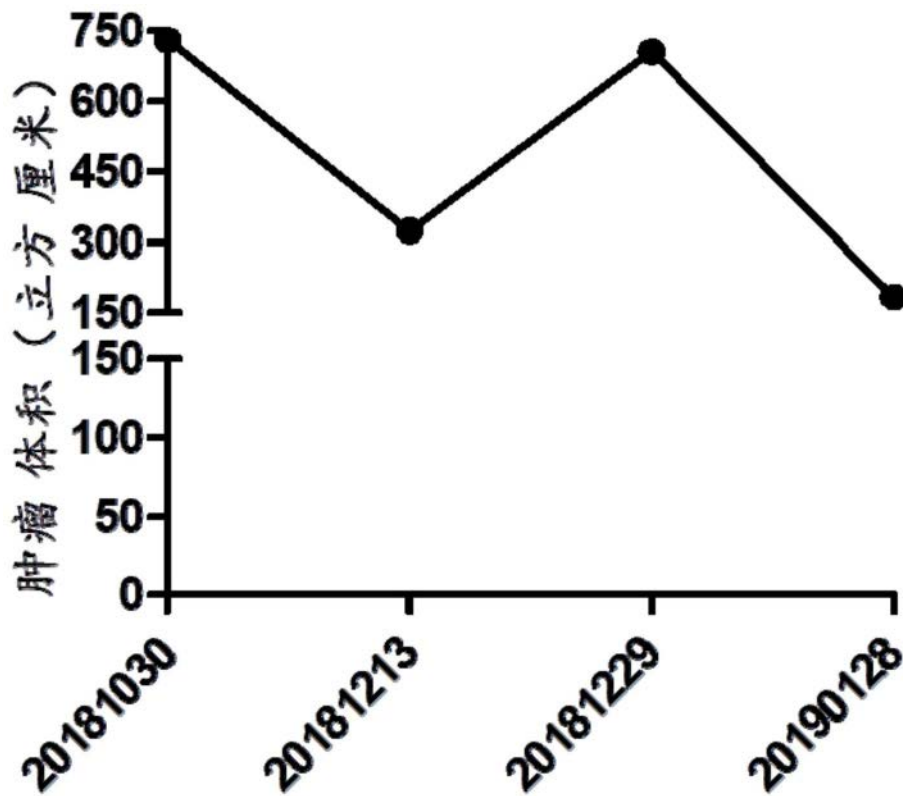


图4