



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202000229 A

(43)公開日：中華民國 109 (2020) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：108106131

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 02 月 22 日

(51)Int. Cl.：

*A61K39/00 (2006.01)**C07K16/44 (2006.01)**C07K14/705 (2006.01)**C12N15/86 (2006.01)*

(30)優先權：2018/02/23

美國

62/634,573

2018/04/11

美國

62/656,265

2018/08/29

美國

62/724,345

2018/09/26

美國

62/736,730

(71)申請人：美商安德賽特公司 (美國) ENDOCYTE, INC. (US)

美國

美國普度研究基金會 (美國) PURDUE RESEARCH FOUNDATION (US)

美國

西雅圖兒童醫院以西雅圖兒童研究機構名義經營 (美國) SEATTLE CHILDREN'S HOSPITAL (DBA SEATTLE CHILDREN'S RESEARCH INSTITUTE) (US)

美國

(72)發明人：梅斯曼 理查 MESSMANN, RICHARD (US)；利蒙 克里斯多夫 P LEAMON, CHRISTOPHER P. (US)；朱 海燕 CHU, HAIYAN (US)；陸 英娟 LU, YINGJUAN J. (US)；羅 菲利浦 S LOW, PHILIP S. (US)；簡森 麥可 C JENSEN, MICHAEL C. (US)；馬太 詹姆斯 MATTHAEI, JAMES (US)；皮托 納文 羅伯特 查理斯 PINTO, NAVIN ROBERT CHARLES (US)；帕克 裘莉 羅傑利 PARK, JULIE RUGGIERI (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：45 項 圖式數：14 共 160 頁

(54)名稱

CAR T細胞療法之順序方法

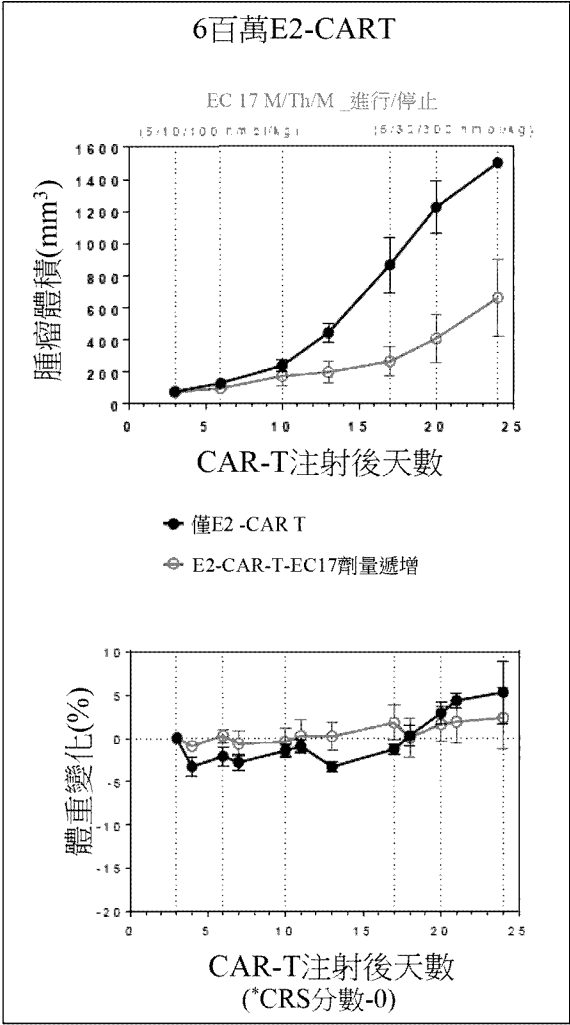
(57)摘要

本發明係關於治療癌症患者之方法，其藉由向該患者投與包含 CAR T 細胞之組合物且向該患者投與藉由連接子連接於靶向部分之小分子。本發明亦關於用於此類方法之組合物。

The present disclosure relates to methods of treating a patient with a cancer by administering to the patient a composition comprising CAR T cells and administering to the patient a small molecule linked to a targeting moiety by a linker. The disclosure also relates to compositions for use in such methods.

指定代表圖：

骨肉瘤：HOS-FR α



【圖4】

【發明說明書】

【中文發明名稱】

CAR T細胞療法之順序方法

【英文發明名稱】

SEQUENCING METHOD FOR CAR T CELL THERAPY

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種治療癌症患者之方法，其藉由向該患者投與包含CAR T細胞之組合物且向該患者投與藉由連接子連接於靶向部分之小分子。本發明亦關於一種用於此類方法之組合物。

【先前技術】

【0002】 基於淋巴球(例如，T細胞)之授受性轉移至患者中之免疫療法係一種有用的治療癌症及其他疾病之療法。基於淋巴球之授受性轉移之免疫療法的發展已取得重大進步。在許多不同類型之免疫治療劑中，所研發的最有前景之免疫治療劑之一為表現嵌合抗原受體的T細胞(CAR T細胞)。嵌合抗原受體(CAR)係一種經設計以靶向特定抗原，例如腫瘤抗原之基因工程化受體。此靶向可引起針對腫瘤之細胞毒性，例如使得表現CAR之CAR T細胞可經由特定腫瘤抗原靶向及殺死腫瘤。

【0003】 第一代CAR由識別區及活化信號傳導結構域構成，識別區例如衍生自用於識別之抗體且與由腫瘤表現之抗原結合的單鏈片段可變(scFv)區，活化信號傳導結構域例如可在CAR中充當T細胞活化信號之T細胞CD3 ζ 鏈。雖然CAR T細胞已在活體外顯示陽性結果，但其在臨床試驗中消除疾病(例如癌症)之成果有限。一個問題為無法在活體內延長活化並擴大CAR T細胞群體。

【0004】為了解決此問題，共刺激結構域(例如，CD137、CD28或CD134)已包括於第二代CAR中，以達成在活體內延長T細胞之活化。共刺激結構域之添加增強含CAR之T細胞的活體內增殖及存活，且初始臨床資料已顯示此類構築體為有前景的治療諸如癌症之疾病之治療劑。

【0005】雖然CAR T細胞療法已得到改善，但仍有若干問題。首先，「脫靶」毒性可由於表現藉由CAR T細胞靶向之抗原(例如，腫瘤相關抗原)的正常細胞而出現。其次，可發現不受調控的CAR T細胞活化，其中藉由CAR T細胞對患病細胞(例如，癌細胞)進行之快速且不受控制的消除誘導一系列代謝紊亂，稱為腫瘤溶解症候群或細胞介素釋放症候群(CRS)，其對患者可為致命的。腫瘤溶解症候群及CRS可由於投與不容易調控且不受控制地活化之CAR T細胞而引起。因此，雖然CAR T細胞顯示出作為治療諸如癌症之疾病之工具的極大前景，但仍需要提供減少脫靶毒性及對CAR T細胞活化之更精確控制之額外CAR T細胞治療方法。

【發明內容】

【0006】在本文所描述之各種實施例中，藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體用作癌症與CAR T細胞之間的橋樑，引導CAR T細胞至癌症以改善癌症。在一個實施例中，「小分子配位體」可為例如葉酸、DUPA、NK-1R配位體、CAIX配位體、 γ 羧胺醯基轉肽酶之配位體、NKG2D配位體或CCK2R配位體，其中各者為特異性結合於癌細胞之小分子配位體(亦即，與正常組織相比，此等配位體之受體在癌症上過度表現)。

【0007】在一個實施例中，「小分子配位體」連接於與由CAR T細胞表現之CAR結合的「靶向部分」。在各種實施例中，「靶向部分」可選自

例如2,4-二硝基苯酚(DNP)、2,4,6-三硝基苯酚(TNP)、生物素、地高辛(digoxigenin)、螢光素、異硫氰酸螢光素(FITC)、NHS-螢光素、五氟苯基酯(PFP)、四氟苯基酯(TFP)、打結素(knottin)、賽丁素(centyrin)及DARPin。

【0008】「靶向部分」結合於由CAR T細胞表現之基因工程化之CAR的識別區。因此，CAR (例如，抗體、Fab、Fv、Fc、(Fab')₂片段及其類似者之單鏈片段可變區(scFv))之識別區經引導至「靶向部分」。因此，藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體充當癌症與CAR T細胞之間的橋樑，引導CAR T細胞至癌症以改善癌症。

【0009】在一個實施例中，提供一種治療癌症之方法。該方法包含 i)向患者投與至少一種劑量之包含CAR T細胞之CAR T細胞組合物，其中CAR T細胞包含引導至靶向部分之CAR；ii)向患者投與化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中該化合物包含由連接子連接於靶向部分之小分子配位體，且其中該化合物或其醫藥學上可接受之鹽係以至少第一劑量遞增順序及第二劑量遞增順序投與。

【0010】在另一實施例中，提供一種治療癌症之方法。該方法包含 i)向患者投與至少一種劑量之包含CAR T細胞之CAR T細胞組合物，其中CAR T細胞包含引導至靶向部分之CAR；ii)向患者投與化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中該化合物包含藉由連接子連接於靶向部分的小分子配位體，且其中該化合物或其醫藥學上可接受之鹽係以第一劑量遞增順序投與，其中若在第一劑量遞增順序中出現嚴重CRS，則使用較低劑量遞增順序投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中較低劑量遞增順序中之化合物或其醫藥學上可接受之鹽的第一劑量低於以第一劑量遞增順序投與

之化合物或其醫藥學上可接受之鹽的第一劑量。在一個實施例中，在較低劑量遞增順序中，化合物或其醫藥學上可接受之鹽可在分開的三天以全劑量之化合物或其醫藥學上可接受之鹽的約0.5%、約5%及約50%投與。

【0011】 額外實施例亦由以下列舉之條款描述。亦涵蓋與本專利申請案之概述部分、例示性實施例之詳細描述部分、實例部分或申請專利範圍中所述的任何適用實施例組合的以下實施例中之任一者。

【0012】 1. 一種治療癌症之方法，該方法包含

i)向患者投與至少一種劑量之包含CAR T細胞之CAR T細胞組合物，其中該等CAR T細胞包含引導至靶向部分之CAR；

ii)向該患者投與化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中該化合物包含藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體，且其中該化合物或其醫藥學上可接受之鹽係以至少第一劑量遞增順序及第二劑量遞增順序投與。

【0013】 2. 如條款1之方法，其中該化合物或其醫藥學上可接受之鹽係以至少第一劑量遞增順序、第二劑量遞增順序及第三劑量遞增順序投與。

【0014】 3. 如條款1之方法，其中該化合物或其醫藥學上可接受之鹽係以至少第一劑量遞增順序、第二劑量遞增順序、第三劑量遞增順序及第四劑量遞增順序投與。

【0015】 4. 如條款1之方法，其中該化合物或其醫藥學上可接受之鹽係以至少第一劑量遞增順序、第二劑量遞增順序、第三劑量遞增順序、第四劑量遞增順序及第五劑量遞增順序投與。

【0016】 5. 如條款1之方法，其中該化合物或其醫藥學上可接受之鹽係以至少第一劑量遞增順序、第二劑量遞增順序、第三劑量遞增順序、

第四劑量遞增順序、第五劑量遞增順序及第六劑量遞增順序投與。

【0017】 6. 如條款1至5中任一項之方法，其中向該患者投與第一劑量之該等CAR T細胞及第二劑量之該等CAR T細胞。

【0018】 7. 如條款6之方法，其中該等CAR T細胞之該第一劑量為監測該患者對該等CAR T細胞之耐受性的測試劑量。

【0019】 8. 如條款6之方法，其中該等CAR T細胞之該第二劑量包含比該第一劑量之該等CAR T細胞更高劑量之該等CAR T細胞。

【0020】 9. 如條款6至8中任一項之方法，其中該等CAR T細胞之該第一劑量包含約 0.5×10^5 個該等CAR T細胞/公斤患者體重至約 1.5×10^6 個該等CAR T細胞/公斤患者體重。

【0021】 10. 如條款6至9中任一項之方法，其中該等CAR T細胞之該第二劑量包含約 0.8×10^6 個該等CAR T細胞/公斤患者體重至約 2×10^7 個該等CAR T細胞/公斤患者體重。

【0022】 11. 如條款1至10中任一項之方法，其中該第一劑量遞增順序之後為期間不投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽的時間段。

【0023】 12. 如條款1至11中任一項之方法，其中該第二劑量遞增順序之後為期間不投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽的時間段。

【0024】 13. 如條款2至12中任一項之方法，其中該第三劑量遞增順序之後為期間不投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽的時間段。

【0025】 14. 如條款3至13中任一項之方法，其中該第四劑量遞增順序之後為期間不投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽的時間段。

【0026】 15. 如條款4至14中任一項之方法，其中該第五劑量遞增順序之後為期間不投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽的時間段。

【0027】 16.如條款5至15中任一項之方法，其中該第六劑量遞增順序之後為期間不投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽的時間段。

【0028】 17.如條款11至16中任一項之方法，其中該時間段為約7天。

【0029】 18.如條款1至17中任一項之方法，其中該第一劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約10%及約100%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0030】 19.如條款1至18中任一項之方法，其中該第二劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約30%及約300%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0031】 20.如條款2至19中任一項之方法，其中該第三劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約50%及約500%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0032】 21.如條款3至20中任一項之方法，其中該第四劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約10%及約100%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0033】 22.如條款4至21中任一項之方法，其中該第五劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約30%及約300%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0034】 23.如條款5至22中任一項之方法，其中該第六劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約50%及約500%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0035】 24.如條款18至23中任一項之方法，其中該全劑量之該化

合物或其醫藥學上可接受之鹽為約10 µg/kg至約50 µg/kg的該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0036】 25.如條款18至24中任一項之方法，其中該全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽為約20 µg/kg至約40 µg/kg的該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0037】 26.如條款18至25中任一項之方法，其中該全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽為約25 µg/kg至約35 µg/kg的該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0038】 27.如條款18至26中任一項之方法，其中該全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽為約30 µg/kg的該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0039】 28.如條款6至27中任一項之方法，其中在第1週期間向該患者投與該第一劑量之該等CAR T細胞及該第二劑量之該等CAR T細胞。

【0040】 29.如條款6至28中任一項之方法，其中在第1週的星期一及星期四向該患者投與該第一劑量之該等CAR T細胞及該第二劑量之該等CAR T細胞。

【0041】 30.如條款1至29中任一項之方法，其中用於該化合物或其醫藥學上可接受之鹽的該第一劑量遞增順序出現在第2週及第3週期間。

【0042】 31.如條款1至30中任一項之方法，其中用於該化合物或其醫藥學上可接受之鹽的該第二劑量遞增順序出現在第4週及第5週期間。

【0043】 32.如條款2至31中任一項之方法，其中用於該化合物或其醫藥學上可接受之鹽的該第三劑量遞增順序出現在第6週及第7週期間。

【0044】 33.如條款30之方法，其中在分開的三天投與該化合物或該

其醫藥學上可接受之鹽，且該分開的三天為第2週的星期一及星期四及第3週的星期一。

【0045】 34.如條款31之方法，其中在分開的三天投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽，且該分開的三天為第4週的星期一及星期四及第5週的星期一。

【0046】 35.如條款32之方法，其中在分開的三天投與該化合物或該其醫藥學上可接受之鹽，且該分開的三天為第6週的星期一及星期四及第7週的星期一。

【0047】 36.如條款1至35中任一項之方法，其中在向該患者投與該CAR T細胞組合物之前去除該患者體內的淋巴球。

【0048】 37.如條款1至36中任一項之方法，其進一步包含向該患者投與血小板，向該患者投與紅血球濃厚液，向該患者投與冷沈澱物，向該患者投與靜脈內免疫球蛋白及/或向該患者提供抗菌劑療法。

【0049】 38.如條款1至37中任一項之方法，其中若在該第一劑量遞增順序期間在患者體內未觀測到CRS或神經毒性，則該方法前進至該第二劑量遞增順序。

【0050】 39.如條款2至38中任一項之方法，其中若在該第二劑量遞增順序期間在該患者體內未觀測到CRS或神經毒性，則該方法前進至該第三劑量遞增順序。

【0051】 40.如條款3至39中任一項之方法，其中若在該第三劑量遞增順序期間在該患者體內未觀測到CRS或神經毒性，則該方法前進至該第四劑量遞增順序。

【0052】 41.如條款4至40中任一項之方法，其中若在該第四劑量遞

增順序期間在該患者體內未觀測到CRS或神經毒性，則該方法前進至該第五劑量遞增順序。

【0053】 42.如條款5至41中任一項之方法，其中若在該第五劑量遞增順序期間在該患者體內未觀測到CRS或神經毒性，則該方法前進至該第六劑量遞增順序。

【0054】 43.如條款1至42中任一項之方法，其中若在該等劑量遞增順序中之任一者期間在該患者體內觀測到發熱而無低血壓且在該患者體內未觀測到神經毒性，則在致使該發熱而無低血壓之該劑量遞增順序含量下向該患者投與所有後續劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0055】 44.如條款1至43中任一項之方法，其中若在任何劑量遞增順序下在該患者體內出現嚴重CRS或神經毒性，則在低於在該患者體內造成該嚴重CRS或神經毒性之該劑量遞增順序水準之該劑量遞增順序水準下向該患者投與所有後續劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0056】 45.一種治療癌症之方法，該方法包含

i)向患者投與至少一種劑量之包含CAR T細胞之CAR T細胞組合物，其中該等CAR T細胞包含引導至靶向部分之CAR；

ii)向該患者投與化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中該化合物包含藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體，且其中該化合物或其醫藥學上可接受之鹽以第一劑量遞增順序投與，其中若在該第一劑量遞增順序中出現嚴重CRS，則使用較低劑量遞增順序投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中該較低劑量遞增順序中之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽的該第一劑量低於以該第一劑量遞增順序投與之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽的該第一劑量。

【0057】 46.如條款45之方法，其中在該較低劑量遞增順序中，該化合物或其醫藥學上可接受之鹽在分開的三天以全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽的約0.5%、約5%及約50%投與。

【0058】 47.如條款46之方法，其中該化合物或其醫藥學上可接受之鹽之該全劑量為約10 µg/kg至約50 µg/kg之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0059】 48.如條款46至47中任一項之方法，其中該全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽為約25 µg/kg至約35 µg/kg之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0060】 49.如條款46至48中任一項之方法，其中該全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽為約30 µg/kg之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0061】 50.如條款1至49中任一項之方法，其中該配位體選自由以下組成之群：葉酸、DUPA、NK-1R配位體、CAIX配位體、γ羰胺醯基轉肽酶配位體、NKG2D配位體及CCK2R配位體。

【0062】 51.如條款1至50中任一項之方法，其中該配位體為葉酸。

【0063】 52.如條款1至50中任一項之方法，其中該配位體為NK-1R配位體。

【0064】 53.如條款1至50中任一項之方法，其中該配位體為DUPA。

【0065】 54.如條款1至50中任一項之方法，其中該配位體為CCK2R配位體。

【0066】 55.如條款1至50中任一項之方法，其中該配位體為γ羰胺醯

基轉肽酶配位體。

【0067】 56.如條款1至55中任一項之方法，其中該靶向部分選自由以下組成之群：2,4-二硝基苯酚(DNP)、2,4,6-三硝基苯酚(TNP)、生物素、地高辛、螢光素、異硫氰酸螢光素(FITC)、NHS-螢光素、五氟苯基酯、四氟苯基酯、打結素、賽丁素及DARPin。

【0068】 57. 如條款1至56中任一項之方法，其中該靶向部分為FITC。

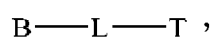
【0069】 58.如條款1至56中任一項之方法，其中該靶向部分為DNP。

【0070】 59.如條款1至56中任一項之方法，其中該靶向部分為TNP。

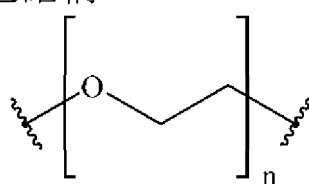
【0071】 60.如條款1至59中任一項之方法，其中該連接子包含聚乙二醇(PEG)、聚脯胺酸、親水性胺基酸、糖、非天然肽聚糖、聚乙烯吡咯啶酮、普洛尼克(pluronic) F-127或其組合。

【0072】 61.如條款1至60中任一項之方法，其中該連接子包含PEG。

【0073】 62.如條款1至61中任一項之方法，其中該化合物或其醫藥學上可接受之鹽具有下式：



其中B表示該小分子配位體，L表示該連接子，且T表示該靶向部分，且其中L包含具有下式之結構：



其中n為0至200之整數。

【0074】 63.如條款62之方法，其中n為0至150之整數。

【0075】 64.如條款62之方法，其中n為0至110之整數。

【0076】 65.如條款62之方法，其中n為0至20之整數。

【0077】 66.如條款62之方法，其中n為15至20之整數。

【0078】 67.如條款62之方法，其中n為15至110之整數。

【0079】 68.如條款1至67中任一項之方法，其中該癌症選自由以下組成之群：肺癌、骨癌、胰臟癌、皮膚癌、頭部癌、頸部癌、皮膚黑色素瘤、眼內黑色素瘤、子宮癌、卵巢癌、子宮內膜癌(endometrial cancer)、直腸癌、胃癌、結腸癌、乳癌、三陰性乳癌、輸卵管癌、子宮內膜癌(carcinoma of the endometrium)、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、霍奇金氏病(Hodgkin's Disease)、食道癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、非小細胞肺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、骨肉瘤(包括小兒或非小兒骨肉瘤)、尿道癌、前列腺癌、慢性白血病、急性白血病、急性骨髓細胞性白血病、淋巴球性淋巴瘤、骨髓白血病、骨髓單核球性白血病、毛細胞白血病、肋板間皮瘤、膀胱癌、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、尿管癌、腎臟癌、腎細胞癌、腎盂癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、原發性CNS淋巴瘤、脊軸腫瘤、腦幹神經膠質瘤、垂體腺瘤、及胃食道接合點腺癌。

【0080】 69.如條款1至51或56至68中任一項之方法，其中該癌症為表現葉酸受體之癌症。

【0081】 70.如條項1至69中任一項之方法，其中該癌症為骨肉瘤。

【0082】 71.如條款1至70中任一項之方法，其中該CAR具有識別區

且該識別區為抗體之單鏈片段可變(scFv)區。

【0083】 72.如條款1至57或60至71中任一項之方法，其中該CAR具有識別區且該CAR之該識別區為抗FITC抗體之單鏈片段可變(scFv)區。

【0084】 73.如條款1至72中任一項之方法，其中該CAR具有共刺激結構域且該共刺激結構域選自由以下組成之群：CD28、CD137 (4-1BB)、CD134 (OX40)及CD278 (ICOS)。

【0085】 74.如條款1至73中任一項之方法，其中該CAR具有活化信號傳導結構域且該活化信號傳導結構域為T細胞CD3 ζ 鏈或Fc受體 γ 。

【0086】 75.如條款1至57或60至74中任一項之方法，其中該CAR具有識別區且該識別區為抗FITC抗體之單鏈片段可變(scFv)區，其中該CAR具有共刺激結構域且該共刺激結構域為CD137 (4-1BB)，且其中該CAR具有活化信號傳導結構域且該活化信號傳導結構域為T細胞CD3 ζ 鏈。

【0087】 76.如條款1至75中任一項之方法，其中在投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽之前，或在投與該CAR T細胞組合物之前，該患者經成像。

【0088】 77.如條款1至76中任一項之方法，其中該化合物或其醫藥學上可接受之鹽不為抗體且不包含抗體之片段。

【0089】 78.如條款1至77中任一項之方法，其中該靶向部分不包含肽抗原決定基。

【0090】 79.如條款1至78中任一項之方法，其中產生脫靶毒性之細胞介素釋放不會在該患者體內發生，且其中該癌症之CAR T細胞毒性出現。

【0091】 80.如條款1至78中任一項之方法，其中脫靶組織毒性不會在該患者體內出現，且其中該癌症之CAR T細胞毒性出現。

【0092】 81.如條款1至78中任一項之方法，其中該癌症包含腫瘤，其中腫瘤大小在該患者體內減小，且其中脫靶毒性不會出現。

【0093】 82.如條款1至81中任一項之方法，其中該等CAR T細胞包含含有SEQ ID NO:1之核酸。

【0094】 83.如條款1至82中任一項之方法，其中該等CAR T細胞包含含有SEQ ID NO:2之多肽。

【0095】 84.如條款82之方法，其中該核酸編碼嵌合抗原受體。

【0096】 85.如條款1至81中任一項之方法，其中該等CAR T細胞包含含有SEQ ID NO:4之核酸。

【0097】 86.如條款1至81或85中任一項之方法，其中該等CAR T細胞包含含有SEQ ID NO:5之多肽。

【0098】 87.如條款85之方法，其中該核酸編碼嵌合抗原受體。

【0099】 88.如條款1至87中任一項之方法，其中該CAR包含人類化胺基酸序列。

【0100】 89. 如條款1至87中任一項之方法，其中該CAR由人類化胺基酸序列組成。

【0101】 90.如條款1至89中任一項之方法，其進一步包含向該患者投與葉酸；包含葉酸之結合物，其中包含葉酸之該結合物不包含靶向部分；或抑制該等CAR T細胞活化之藥劑。

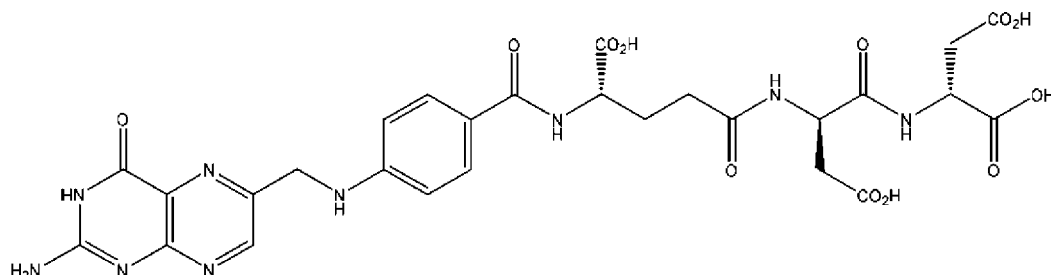
【0102】 91.如條款90之方法，其中投與葉酸。

【0103】 92.如條款90之方法，其中投與葉酸或甲醯四氫葉酸。

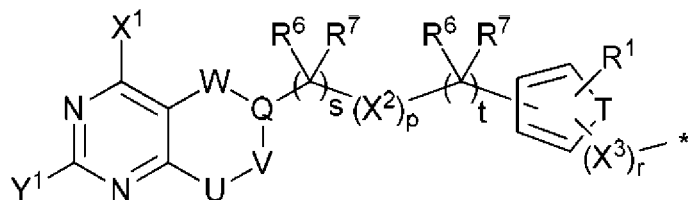
【0104】 93.如條款90之方法，其中投與包含葉酸之該結合物。

【0105】 94.如條款93之方法，其中包含葉酸之該結合物包含連接於一或多個胺基酸之葉酸。

【0106】 95.如條款93之方法，其中包含葉酸之該結合物具有下式：



【0107】 96.如條款91之方法，其中該葉酸具有下式：



其中 X^1 及 Y^1 各自獨立地選自由以下組成之群：鹵基、 R^2 、 OR^2 、 SR^3 及 NR^4R^5 ；

U、V及W表示各自獨立地選自由以下組成之群的二價部分： $-(R^{6a})C=$ 、 $-N=$ 、 $-(R^{6a})C(R^{7a})-$ 及 $-N(R^{4a})-$ ；Q選自由以下組成之群：C及CH；T選自由以下組成之群：S、O、N及 $-C=C-$ ；

X^2 及 X^3 各自獨立地選自由以下組成之群：氧、硫、 $-C(Z)-$ 、 $-C(Z)O-$ 、 $-OC(Z)-$ 、 $-N(R^{4b})-$ 、 $-C(Z)N(R^{4b})-$ 、 $-N(R^{4b})C(Z)-$ 、 $-OC(Z)N(R^{4b})-$ 、 $-N(R^{4b})C(Z)O-$ 、 $-N(R^{4b})C(Z)N(R^{5b})-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-N(R^{4a})S(O)_2-$ 、 $-C(R^{6b})(R^{7b})-$ 、 $-N(C\equiv CH)-$ 、 $-N(CH_2C\equiv CH)-$ 、 C_1-C_{12} 伸烷基及 C_1-C_{12} 伸烷氧基，其中Z為氧或硫；

R^1 選自由以下組成之群：氫、鹵基、 C_1-C_{12} 烷基及 C_1-C_{12} 烷氧基；

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^{4a} 、 R^{4b} 、 R^5 、 R^{5b} 、 R^{6b} 及 R^{7b} 各自獨立地選自由以下

組成之群：氫、鹵基、 C_1 - C_{12} 烷基、 C_1 - C_{12} 烷氧基、 C_1 - C_{12} 烷酯基、 C_1 - C_{12} 烯基、 C_1 - C_{12} 炔基、(C_1 - C_{12} 烷氧基)羰基及(C_1 - C_{12} 烷基)羰基；

R^6 及 R^7 各自獨立地選自由以下組成之群：氫、鹵基、 C_1 - C_{12} 烷基及 C_1 - C_{12} 烷氧基；或 R^6 及 R^7 一起形成羰基；

R^{6a} 及 R^{7a} 各自獨立地選自由以下組成之群：氫、鹵基、 C_1 - C_{12} 烷基及 C_1 - C_{12} 烷氧基；或 R^{6a} 與 R^{7a} 一起形成羰基；

p、r、s及t各自獨立地為0或1；且

若任何其他化學部分為該葉酸之部分，則*表示與該結合物之其餘部分的視情況存在之共價鍵。

【0108】 97. 如條款90之方法，其中抑制該等CAR T細胞活化之該藥劑選自由以下組成之群：淋巴球特異性蛋白質酪胺酸激酶抑制劑、PI3激酶抑制劑、IL-2誘導性T細胞激酶抑制劑、JAK抑制劑、BTK抑制劑、EC2319及阻斷CAR T細胞與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽結合但不與該癌症結合之藥劑。

【0109】 98. 如條款90之方法，其中投與抑制該等CAR T細胞活化之該藥劑且該藥劑為淋巴球特異性蛋白質酪胺酸激酶抑制劑。

【0110】 99. 如條款98之方法，其中該淋巴球特異性蛋白質酪胺酸激酶抑制劑為達沙替尼(Dasatinib)。

【0111】 100. 如條款90之方法，其中投與抑制該等CAR T細胞活化之該藥劑且該藥劑為PI3激酶抑制劑。

【0112】 101. 如條款100之方法，其中該PI3激酶抑制劑為GDC0980。

【0113】 102. 如條款90之方法，其中投與抑制該等CAR T細胞活

化之該藥劑且該藥劑為IL-2誘導性T細胞激酶抑制劑。

【0114】 103. 如條款102之方法，其中該IL-2誘導性T細胞激酶抑制劑為BMS-509744。

【0115】 104. 如條款90之方法，其中抑制該等CAR T細胞之活化之該藥劑經投與，且為阻斷CAR T細胞與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽結合但不與該癌症結合之藥劑。

【0116】 105. 如條款104之方法，其中該藥劑為螢光素胺、FITC或鈉螢光素。

【0117】 106. 如條款105之方法，其中該藥劑為鈉螢光素。

【0118】 107. 如條款90至106中任一項之方法，其中投與該葉酸、包含葉酸之該結合物或抑制該等CAR T細胞活化之該藥劑使得該患者體內之細胞介素含量降低，其中包含葉酸之該結合物不包含靶向部分。

【0119】 108. 如條款107之方法，其中該細胞介素含量降低為降低至約未經治療之患者體內之細胞介素含量。

【0120】 109. 如條款90至108中任一項之方法，其中該癌症包含腫瘤且在向該患者投與該葉酸、包含葉酸之該結合物或抑制該等CAR T細胞活化之該藥劑時該患者體內之腫瘤大小未增大，其中包含葉酸之該結合物不包含靶向部分。

【0121】 110. 如條款104至106中任一項之方法，當該CRS級別達到1、2、3或4時，向該患者投與抑制該等CAR T細胞活化之該藥劑。

【0122】 111. 如條款110之方法，其中當該CRS級別達到3或4時，向該患者投與抑制該等CAR T細胞活化之該藥劑。

【0123】 112. 如條款104至106中任一項之方法，其中以約0.01至

約300微莫耳/公斤該患者體重之劑量投與抑制該等CAR T細胞活化之該藥劑。

【0124】 113. 如條款1至112中任一項之方法，其中在該患者體內減輕或預防CRS且該方法引起該患者體內之腫瘤體積減小。

【0125】 114. 如條款1至113中任一項之方法，其中減輕或預防由CRS所致之體重減輕。

【0126】 115. 如條款90至114中任一項之方法，其進一步包含向該患者再投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0127】 116. 如條款115之方法，其中該化合物或其醫藥學上可接受之鹽之該後續投與致使CAR T細胞活化及該患者體內之細胞介素含量增大。

【0128】 117. 如條款1至116中任一項之方法，其中在該化合物或其醫藥學上可接受之鹽前投與該CAR T細胞組合物。

【0129】 118. 如條款1至117中任一項之方法，其中該等CAR T細胞為自體性的。

【0130】 119. 如條款2至17中任一項之方法，其中該第一劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約2%及約20%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中該第二劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約6%及約60%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽，且其中該第三劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約10%及約100%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0131】 120. 如條款2至17中任一項之方法，其中該第一劑量遞

增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約10%及約100%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽，且其中該第二劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約20%及約200%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0132】 121. 如條款2至17中任一項之方法，其中該第一劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約10%及約100%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽，且其中該第二劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約10%及約100%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0133】 122. 如條款2至17中任一項之方法，其中該第一劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約20%及約200%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽，且其中該第二劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約20%及約200%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0134】 123. 如條款119至122中任一項之方法，其中該化合物或其醫藥學上可接受之鹽之該全劑量為約500奈莫耳/公斤。

【圖式簡單說明】

【0135】 圖1展示根據所主張之方法之例示性給藥方案的圖示。在此例示性方案中，在於第2週開始投與藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體(例如，EC17)之前，E2 CAR T細胞(表現SEQ ID NO:4之CAR T細胞)投與出現在第1週的星期一及星期四。

【0136】 在第2週，在星期一及星期四投與藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體(例如，EC17)，且接著在第3週的星期一使用劑量遞增

順序(亦即，順序1)。在第3週的星期二至星期日不投與藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體(例如，EC17)。第2週至第3週稱為「第1週期」。

【0137】 在第4週，在星期一及星期四投與藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體(例如，EC17)，且接著在第5週的星期一使用劑量遞增順序(亦即，順序2)。在第5週的星期二至星期日不投與藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體(例如，EC17)。第4週至第5週稱為「第2週期」。

【0138】 在第6週，在星期一及星期四投與藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體(例如，EC17)，且接著在第7週的星期一使用劑量遞增順序(亦即，順序3)。在第7週的星期二至星期日不投與藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體(例如，EC17)。第6週至第7週稱為「第3週期」。第2週至第7週稱為「療程1」。

【0139】 在順序1期間，在第2週的星期一及星期四投與藉由連接子(例如，EC17)連接於靶向部分之小分子配位體，且接著在第3週的星期一至藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體(例如，EC17)的劑量投與，該等劑量分別為1%、10%及100%之全劑量(例如，31 $\mu\text{g}/\text{kg}$)之連接於靶向部分的小分子配位體(例如，EC17)。

【0140】 在順序2期間，在第4週的星期一及星期四投與藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體(例如，EC17)，且接著在第5週的星期一至藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體(例如，EC17)的劑量投與，該等劑量分別為1%、30%及300%之全劑量(例如，31 $\mu\text{g}/\text{kg}$)之連接於靶向部分的小分子配位體(例如，EC17)。

【0141】 在順序3期間，在第6週的星期一及星期四投與藉由連接子(例如，EC17)連接於靶向部分之小分子配位體，且接著在第7週的星期一以藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體(例如，EC17)的劑量投與，該等劑量分別為1%、50%及500%之全劑量(例如，31 $\mu\text{g/kg}$)之連接於靶向部分的小分子配位體(例如，EC17)。接著重複療程1，呈現臨床益處及可耐受毒性。

【0142】 圖2展示用於CAR T轉導之構築體之總圖。

【0143】 圖3概略地展示E2構築體相對於4M5.3構築體且展示E2構築體之映像。

【0144】 圖4 (上部圖)為展示在用E2 Car-T細胞僅(●)及E2 Car-T細胞+ EC-17 (○)治療時HOS-FR α 腫瘤之腫瘤體積的圖表。圖4 (下部圖)為展示在用E2 Car-T細胞僅(●)及E2 Car-T細胞+ EC-17 (○)治療時攜帶HOS-FR α 腫瘤之小鼠之體重變化的圖表。

【0145】 圖5為展示在Car-T (●)；不用EC-17 (■)；用EC-17 SIW 500 nmol/kg (▲)；用EC-17 TIW (5、50、500 nmol/kg進行/停止)；用(◆) EC-17劑量遞增(M/Th/M進行/停止)治療時攜帶THP-1-FR β AML之小鼠之體重變化的圖表。

【0146】 圖6 (左側圖)為展示肝臟轉移性腫瘤負荷之圖表。圖6 (右側圖)為展示無肝臟轉移性腫瘤負荷之圖表。

【0147】 圖7為展示以對數標度在第39天每100 μL 血液循環THP1-FR β 細胞之計數值的圖表。

【0148】 圖8為展示在不同EC-17給藥方案下自實體肝臟腫瘤(y軸)分離之總E2 CAR T細胞之百分比的圖表。對於各給藥方案，最左側條形為

PD1+ LAG3+ TIM3+，左側第二個條形為PD1+ LAG3+ TIM3-，中間條形為PD1+ LAG3- TIM3+；右側第二個條形為PD1+ LAG3- TIM3-；最右側條形為PD1- LAG3- TIM3-。

【0149】圖9展示完全人類CAR構築體，其包括抗FITC scFv (選殖系E2)、全長IgG4間隔基(Fc衍生之鉸鏈-CH2(L235D, N297Q)-CH3)、CD28tm跨膜結構域、4-1BB/CD3 ζ 細胞質活化結構域及表皮生長因子受體之非功能性截斷細胞表面多肽(EGFRt)。底部：藉由流式細胞測量術對EGFRt分選的(左側餅圖圖表)CAR-T細胞製備及未分選「臨床傳真(clinical facsimile)」(右側餅圖圖表)執行之CD4/CD8 T細胞表型之實例。顏色鍵如所展示。

【0150】圖10，A圖：在37°C下在2小時培育之後由FR+標靶細胞吸收之³H-EC17的Kd值(自每細胞所結合之分子數目計算)。B圖：在室溫下在2小時培育之後由E2-CAR-T細胞(~24% EGFRt+，~95:5 CD8/CD4比率)吸收之³H-EC17的Kd值(自總的細胞相關之放射活性DPM計算)。

【0151】圖11展示藉由³H-FA類結合分析量測之腫瘤細胞上的功能性FR含量(100 nM，1小時，在37°C下)。

【0152】圖12展示相較於無腫瘤小鼠之腫瘤中之EC17劑量研究結果及CRS評估。A圖：展示在無或有預先建立的MDA-MB-231異種移植的情況下CAR-T細胞(約1千萬「臨床傳真」)加上EC17在NSG小鼠中給藥之3種不同方式的劑量排程之示意圖。無腫瘤小鼠接受EC17 SIW 500 nmol/kg (在第2天及第10天2次劑量)。攜帶腫瘤之小鼠接受EC17如下：EC17 SIW 500 nmol/kg (在第2、10、17、24及31天5次劑量)、EC17 M/Th/M_Escalation-1 (在星期一/星期四/星期一，隨後中斷1週，亦即在

第2、6、10、17、20、24及31天 重複5/50/500 nmol/kg)或EC17 M/Th/M_Escalation-2 (在星期一/星期四/星期一，隨後中斷1週，亦即在第2、6、10、17、20、24及31天 重複5/100/1000 nmol/kg)。B圖：以log2標度在將CAR-T細胞注射於攜帶腫瘤與無腫瘤小鼠中之後的第11及12天(亦即，在所有經治療同期組群中進行先前EC17給藥之後約20及42小時)在小鼠血漿中偵測到的人類IFN γ 之全身性含量。C圖：藉由流式細胞測量術識別為人類CD3 ϵ ⁺ EGFRt⁺現象且每100 μ L全血所計數之小鼠血液中的循環CAR-T細胞。D圖：接受僅CAR-T細胞或CAR-T細胞加上EC17的以3種不同方式給藥之攜帶腫瘤之小鼠之體重及腫瘤體積變化的量測結果(虛線指示各EC17劑量)。n = 5隻小鼠/組。所有資料均表示平均值 $\pm$ s.e.m。* $p < 0.05$ ，藉由單向ANOVA測試。

【0153】 圖13展示活體內安全性及抗白血病活性之EC17劑量遞增。A圖：展示經靜脈內THP1-FR β 異種移植之1天齡NSG小鼠中EC17加上未分選EGFRt CAR-T細胞(約6百萬，第0天)之劑量排程的示意圖。在CAR-T細胞注射之後初始3天，EC17以3種不同方式給藥：EC17 SIW 500 nmol/kg (在第3、10、17、24、31及38天5次劑量)、EC17 TIW 5/50/500 nmol/kg (在星期一/星期三/星期五，隨後中斷9天，亦即在第3/5/7、17/19/21及31/33/35天重複3次5/50/500 nmol/kg)或在星期一/星期四/星期一之EC17 M/Th/M_劑量遞增(3個遞增週期，第1週期為5/10/100 nmol/kg，第2週期為5/30/300 nmol/kg，且第3週期為5/50/500 nmol/kg，亦即在第3/6/10、17/20/24及31/34/38天)。B圖：體重變化之量測結果(n = 5)。C圖：作為以對數標度在第31天每100 μ L小鼠全血發現之人類CD3 ϵ ⁺ EGFRt⁺現象的循環CAR-T細胞。D圖：左側條形圖：在研究結束

時(第39天)所量測之所有同期組群中每100 μ L全血之循環腫瘤細胞(GFP+)；中間條形圖：表示肝臟轉移性負擔之THP1-FR β 浸潤之肝臟重量；右側條形圖：所有無肝臟巨大轉移之總腫瘤重量。E圖：在輸注前CAR-T細胞產物(三陰性)及自肝臟轉移分離之腫瘤浸潤CAR-T細胞上對T細胞耗竭標記PD1、LAG3、TIM3進行之流式細胞分析。完全耗竭性T細胞之主要特徵為共表現多個抑制性受體標記(亦即三陽性)。

【0154】圖14展示小兒骨肉瘤之侵蝕性模型中之抗腫瘤活性及CRS挽救。A圖：展示皮下HOS-FR α 異種移植(n = 5)之3天齡NSG小鼠中CAR-T細胞(約6百萬，第0天)加上EC17之劑量排程的示意圖。在CAR-T細胞注射之後初始3天(在腫瘤植入之後6天)，3個週期為：在第1週期中以5/10/100 nmol/kg在星期一/星期四/星期一進行EC17 M/Th/M「患者內」劑量遞增，在第2週期中5/30/300 nmol/kg，及在第3週期中5/50/500 nmol/kg，亦即在第3/6/10、17/20/24及31/34/38天。B圖：腫瘤體積及體重變化之量測結果。由於腫瘤進展，在第23-31天將僅接受CAR-T細胞(無EC17)的五隻小鼠安樂死，且在第33天(2隻小鼠)及第47天(3隻小鼠)分別將五隻經EC17治療之小鼠安樂死。C圖：以對數標度標繪之每100 μ L全血的CAR-T細胞(人類CD3 ϵ + EGFRt+) (左側)及在安樂死時之腫瘤浸潤性CAR-T細胞(右側)之流式細胞分析。

【實施方式】

定義

【0155】如本文所用，「一種(a或an)」可意謂一或多種。如本文所用，參考數值，包括(例如)整數、分數及百分比，「約」通常係指一般熟習此項技術者將考慮等於所列舉值(例如，具有相同功能或結果)之一系列

數值(例如， $\pm 5\%$ 至 10% 之所列舉值)。

【0156】如本文所用，術語「治療 (treat/treating/treated/treatment)」係指治療性治療及防治性或預防性治療兩者。

【0157】如本文所用，參考癌症，術語「改善 (ameliorate/ameliorating/amelioration/ameliorated)」可意謂減輕癌症之該，減小腫瘤的大小，完全地或部分地移除腫瘤(例如，完全或部分反應)，產生穩定的疾病，阻止癌症之進展(例如，無進展存活期)或將由醫師考慮為癌症之治療性、防治性或預防性治療之對於癌症的任何其他作用。

【0158】如本文所用，術語「投與 (administer/administering/administered)」意謂所有將化合物或其醫藥學上可接受之鹽或本文所述之CAR T細胞組合物引入患者之方式，包括(但不限於)經口、靜脈內、肌肉內、皮下及經皮。

【0159】如本文所用，術語「脫靶毒性」意謂治療患者之醫師不可接受之器官破壞或患者體重降低，或治療患者之醫師不可接受之對患者的任何其他作用，例如B細胞發育不全、發熱、血壓下降或肺水腫。

【0160】如本文所用，術語「轉導」及「轉染」同等地使用且該等術語意謂藉由任何人工方法，包括病毒及非病毒方法將核酸引入細胞中。

【0161】如本文所用，術語「劑量遞增順序」意謂隨時間投與增大劑量之化合物或其醫藥學上可接受之鹽。如本文所用，參考「第一劑量遞增順序」結合「第二劑量遞增順序」、「第三劑量遞增順序」、「第四劑量遞增順序」、「第五劑量遞增順序」及「第六劑量遞增順序」等等使用意謂出

現多個劑量遞增順序，且對於每一單獨劑量遞增順序，在第一劑量遞增順序後，後續劑量遞增順序中之化合物或其醫藥學上可接受之鹽之第一劑量低於先前劑量遞增順序中之化合物或其醫藥學上可接受之鹽之上次劑量(參見例如附圖簡要說明中之圖1及圖1之解釋)。

【0162】

說明性實施例之詳細描述

【0163】 在本文所描述的各种實施例中，藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體用作癌症與CAR T細胞(亦即，表現嵌合抗原受體之T細胞)之間的橋。該橋將CAR T細胞引導至癌症以改善癌症。在一個實施例中，「小分子配位體」可為葉酸、CAIX配位體、DUPA、NK-1R配位體、 γ 羧胺醯基轉肽酶之配位體、NKG2D配位體或CCK2R配位體，其中各者為特異性結合於癌細胞類型之小分子配位體(亦即，與正常組織相比，此等配位體各者之受體在癌症上過度表現)。

【0164】 連接於小分子配位體之「靶向部分」結合於由CAR T細胞表現之基因工程改造之CAR的識別區。因此，CAR之識別區(例如，抗體之單鏈片段可變區、Fab、Fv、Fc或(Fab')₂片段及類似者)經引導至「靶向部分」。因此，藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體充當癌症與CAR T細胞之間的橋，將CAR T細胞引導至癌症以改善癌症。在各種實施例中癌症與CAR T細胞之間的橋可為實例中展示的可應用結合物中之任一者。

【0165】 該橋為較小有機分子因此可迅速地實現自血流清除(例如，約20分鐘或更少)。在一個態樣中，CAR T細胞反應可僅僅靶向表現「橋」之小分子配位體部分之受體的彼等癌細胞，藉此減小對正常組織之

脫靶毒性。另外，此系統可為「通用」的，因為一類CAR T細胞構築體可使用不同「橋」用於靶向各種癌症。說明性地，由CAR T細胞識別之靶向部分可保持恆定使得可使用一類CAR T細胞構築體，同時可改變結合於癌症之小分子配位體以允許靶向多種癌症。

【0166】 在一個實施例中，提供一種治療癌症之方法。該方法包含 i)向患者投與至少一種劑量之包含CAR T細胞之CAR T細胞組合物，其中CAR T細胞包含引導至靶向部分之CAR；ii)向患者投與化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中該化合物包含由連接子連接於靶向部分之小分子配位體，且其中在至少第一劑量遞增順序及第二劑量遞增順序下投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0167】 在另一實施例中，提供一種治療癌症之方法。該方法包含 i)向患者投與至少一種劑量之包含CAR T細胞之CAR T細胞組合物，其中CAR T細胞包含引導至靶向部分之CAR；ii)向患者投與化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中該化合物包含藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體且其中在第一劑量遞增順序下投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中若在第一劑量遞增順序下出現嚴重CRS，則使用更低劑量遞增順序投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中更低劑量遞增順序下之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽之第一劑量低於第一劑量遞增順序下投與之化合物或其醫藥學上可接受之鹽之第一劑量。在另一實施例中，在更低劑量遞增順序下，可以約0.5%、約5%及約50%之完整劑量之化合物或其醫藥學上可接受之鹽投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽三個單獨日。

【0168】 在以下條款清單及申請專利範圍及整個申請案中描述之各種實施例中，藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體稱為「化合

物」。

【0169】 若干實施例由以下列舉之條款描述。亦涵蓋任一以下實施例以及在本專利申請案之概述部分、本專利申請案之例示性實施例之具體描述部分、實例部分或申請專利範圍中描述的任何適用實施例。

【0170】 1. 一種治療癌症之方法，該方法包含

i)向患者投與至少一種劑量之包含CAR T細胞之CAR T細胞組合物，其中該等CAR T細胞包含引導至靶向部分之CAR；

ii)向該患者投與化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中該化合物包含藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體且其中在至少第一劑量遞增順序及第二劑量遞增順序下投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0171】 2. 如條款1之方法，其中在至少第一劑量遞增順序、第二劑量遞增順序及第三劑量遞增順序下投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0172】 3. 如條款1之方法，其中在至少第一劑量遞增順序、第二劑量遞增順序、第三劑量遞增順序及第四劑量遞增順序下投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0173】 4. 如條款1之方法，其中在至少第一劑量遞增順序、第二劑量遞增順序、第三劑量遞增順序、第四劑量遞增順序及第五劑量遞增順序下投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0174】 5. 如條款1之方法，其中在至少第一劑量遞增順序、第二劑量遞增順序、第三劑量遞增順序、第四劑量遞增順序、第五劑量遞增順序及第六劑量遞增順序下投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0175】 6. 如條款1至5中任一項之方法，其中向該患者投與第一劑

量之該等CAR T細胞及第二劑量之該等CAR T細胞。

【0176】 7. 如條款6之方法，其中該等CAR T細胞之該第一劑量為監視該患者對該等CAR T細胞之耐受性之測試劑量。

【0177】 8. 如條款6之方法，其中該等CAR T細胞之該第二劑量包含比該第一劑量之該等CAR T細胞更高劑量之該等CAR T細胞。

【0178】 9. 如條款6至8中任一項之方法，其中該等CAR T細胞之該第一劑量包含約 0.5×10^5 個該等CAR T細胞/公斤患者體重至約 1.5×10^6 個該等CAR T細胞/公斤患者體重。

【0179】 10. 如條款6至9中任一項之方法，其中該等CAR T細胞之該第二劑量包含約 0.8×10^6 個該等CAR T細胞/公斤患者體重至約 2×10^7 個該等CAR T細胞/公斤患者體重。

【0180】 11. 如條款1至10中任一項之方法，其中該第一劑量遞增順序之後為期間不投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽之時間段。

【0181】 12. 如條款1至11中任一項之方法，其中該第二劑量遞增順序之後為期間不投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽之時間段。

【0182】 13. 如條款2至12中任一項之方法，其中該第三劑量遞增順序之後為期間不投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽之時間段。

【0183】 14. 如條款3至13中任一項之方法，其中該第四劑量遞增順序之後為期間不投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽之時間段。

【0184】 15. 如條款4至14中任一項之方法，其中該第五劑量遞增順序之後為期間不投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽之時間段。

【0185】 16. 如條款5至15中任一項之方法，其中該第六劑量遞增順序之後為期間不投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽之時間段。

【0186】 17.如條款11至16中任一項之方法，其中該時間段為約7天。

【0187】 18.如條款1至17中任一項之方法，其中該第一劑量遞增順序包含向該患者投與約1%、約10%及約100%之完整劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽三個單獨日。

【0188】 19.如條款1至18中任一項之方法，其中該第二劑量遞增順序包含向該患者投與約1%、約30%及約300%之完整劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽三個單獨日。

【0189】 20.如條款2至19中任一項之方法，其中該第三劑量遞增順序包含向該患者投與約1%、約50%及約500%之完整劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽三個單獨日。

【0190】 21.如條款3至20中任一項之方法，其中該第四劑量遞增順序包含向該患者投與約1%、約10%及約100%之完整劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽三個單獨日。

【0191】 22.如條款4至21中任一項之方法，其中該第五劑量遞增順序包含向該患者投與約1%、約30%及約300%完整劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽三個單獨日。

【0192】 23.如條款5至22中任一項之方法，其中該第六劑量遞增順序包含向該患者投與約1%、約50%及約500%之完整劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽三個單獨日。

【0193】 24.如條款18至23中任一項之方法，其中該完整劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽為約10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至約50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0194】 25.如條款18至24中任一項之方法，其中該完整劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽為約20 $\mu\text{g/kg}$ 至約40 $\mu\text{g/kg}$ 之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0195】 26.如條款18至25中任一項之方法，其中該完整劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽為約25 $\mu\text{g/kg}$ 至約35 $\mu\text{g/kg}$ 之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0196】 27.如條款18至26中任一項之方法，其中該完整劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽為約30 $\mu\text{g/kg}$ 之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0197】 28.如條款6至27中任一項之方法，其中在第1週期間向該患者投與該第一劑量之該等CAR T細胞及該第二劑量之該等CAR T細胞。

【0198】 29.如條款6至28中任一項之方法，其中在第1週的星期一及星期四向該患者投與該第一劑量之該等CAR T細胞及該第二劑量之該等CAR T細胞。

【0199】 30.如條款1至29中任一項之方法，其中用於該化合物或其醫藥學上可接受之鹽之該第一劑量遞增順序出現在第2週及第3週期間。

【0200】 31.如條款1至30中任一項之方法，其中用於該化合物或其醫藥學上可接受之鹽之該第二劑量遞增順序出現在第4週及第5週期間。

【0201】 32.如條款2至31中任一項之方法，其中用於該化合物或其醫藥學上可接受之鹽之該第三劑量遞增順序出現在第6週及第7週期間。

【0202】 33.如條款30之方法，其中在三個單獨日投與該化合物或該其醫藥學上可接受之鹽且該三個單獨日為第2週之星期一及星期四及第3週之星期一。

【0203】 34.如條款31之方法，其中在三個單獨日投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽且該三個單獨日為第4週之星期一及星期四及第5週之星期一。

【0204】 35.如條款32之方法，其中在三個單獨日投與該化合物或該其醫藥學上可接受之鹽且該三個單獨日為第6週之星期一及星期四及第7週之星期一。

【0205】 36.如條款1至35中任一項之方法，其中在向該患者投與該等CAR T細胞組合物前,該患者體內缺失淋巴球。

【0206】 37.如條款1至36中任一項之方法，其進一步包含向該患者投與血小板，向該患者投與紅血球濃厚液，向該患者投與冷沈澱物，向該患者投與靜脈內免疫球蛋白及/或向該患者提供抗菌劑療法。

【0207】 38.如條款1至37中任一項之方法，其中若在該第一劑量遞增順序期間在該患者體內未觀測到CRS或神經毒性，則該方法提前到該第二劑量遞增順序。

【0208】 39.如條款2至38中任一項之方法，其中若在該第二劑量遞增順序期間在該患者體內未觀測到CRS或神經毒性，則該方法提前到該第三劑量遞增順序。

【0209】 40.如條款3至39中任一項之方法，其中若在該第三劑量遞增順序期間在該患者體內未觀測到CRS或神經毒性，則該方法提前到該第四劑量遞增順序。

【0210】 41.如條款4至40中任一項之方法，其中若在該第四劑量遞增順序期間在該患者體內未觀測到CRS或神經毒性，則該方法提前到該第五劑量遞增順序。

【0211】 42.如條款5至41中任一項之方法，其中若在該第五劑量遞增順序期間在該患者體內未觀測到CRS或神經毒性，則該方法提前到該第六劑量遞增順序。

【0212】 43.如條款1至42中任一項之方法，其中若在該等劑量遞增順序中之任一者期間在該患者體內觀測到發熱而無低血壓且在該患者體內未觀測到神經毒性，則在致使該發熱而無低血壓之該劑量遞增順序水準下向該患者投與所有後續劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0213】 44.如條款1至43中任一項之方法，其中若在任何劑量遞增順序下在該患者體內出現嚴重CRS或神經毒性，則在低於在該患者體內造成該嚴重CRS或神經毒性之該劑量遞增順序水準之該劑量遞增順序水準下向該患者投與所有後續劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0214】 45.一種治療癌症之方法，該方法包含

【0215】 i)向患者投與至少一種劑量之包含CAR T細胞之CAR T細胞組合物，其中該等CAR T細胞包含引導至靶向部分之CAR；

【0216】 ii)向該患者投與化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中該化合物包含藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體且其中在第一劑量遞增順序下投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中若在該第一劑量遞增順序下出現嚴重CRS，則使用更低劑量遞增順序投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中該更低劑量遞增順序下之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽之該第一劑量低於該第一劑量遞增順序下投與之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽之該第一劑量。

【0217】 46.如條款45之方法，其中在該更低劑量遞增順序下，在三個單獨日以約0.5%、約5%及約50%之完整劑量之化合物或其醫藥學上可

接受之鹽投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0218】 47.如條款46之方法，其中該化合物或其醫藥學上可接受之鹽之該完整劑量為約10 $\mu\text{g/kg}$ 至約50 $\mu\text{g/kg}$ 之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0219】 48.如條款46至47中任一項之方法，其中該完整劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽為約25 $\mu\text{g/kg}$ 至約35 $\mu\text{g/kg}$ 之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0220】 49.如條款46至48中任一項之方法，其中該完整劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽為約30 $\mu\text{g/kg}$ 之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0221】 50.如條款1至49中任一項之方法，其中該配位體選自由以下組成之群：葉酸、DUPA、NK-1R配位體、CAIX配位體、 γ 羧胺醯基轉肽酶配位體、NKG2D配位體及CCK2R配位體。

【0222】 51.如條款1至50中任一項之方法，其中該配位體為葉酸。

【0223】 52.如條款1至50中任一項之方法，其中該配位體為NK-1R配位體。

【0224】 53.如條款1至50中任一項之方法，其中該配位體為DUPA。

【0225】 54.如條款1至50中任一項之方法，其中該配位體為CCK2R配位體。

【0226】 55.如條款1至50中任一項之方法，其中該配位體為 γ 羧胺醯基轉肽酶配位體。

【0227】 56.如條款1至55中任一項之方法，其中該靶向部分選自由

以下組成之群：2,4-二硝基苯酚(DNP)、2,4,6-三硝基苯酚(TNP)、生物素、地高辛(digoxigenin)、螢光素、異硫氰酸螢光素(FITC)、NHS-螢光素、五氟苯基酯、四氟苯基酯、打結素、賽丁素(centyrin)及DARPin。

【0228】 57.如條款1至56中任一項之方法，其中該靶向部分為FITC。

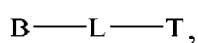
【0229】 58.如條款1至56中任一項之方法，其中該靶向部分為DNP。

【0230】 59.如條款1至56中任一項之方法，其中該靶向部分為TNP。

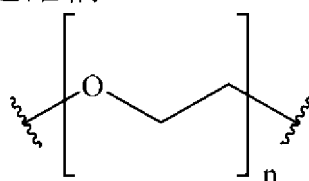
【0231】 60.如條款1至59中任一項之方法，其中該連接子包含聚乙二醇(PEG)、聚脯胺酸、親水性胺基酸、糖、非天然肽聚糖、聚乙烯吡咯啶酮、普洛尼克(pluronic) F-127或其組合。

【0232】 61.如條款1至60中任一項之方法，其中該連接子包含PEG。

【0233】 62.如條款1至61中任一項之方法，其中該化合物或其醫藥學上可接受之鹽具有下式：



其中B表示該小分子配位體，L表示該連接子，且T表示該靶向部分，且其中L包含具有下式之結構：



其中n為0至200之整數。

【0234】 63.如條款62之方法，其中n為0至150之整數。

【0235】 64.如條款62之方法，其中n為0至110之整數。

【0236】 65.如條款62之方法，其中n為0至20之整數。

【0237】 66.如條款62之方法，其中n為15至20之整數。

【0238】 67.如條款62之方法，其中n為15至110之整數。

【0239】 68.如條款1至67中任一項之方法，其中該癌症選自由以下組成之群：肺癌、骨癌、胰臟癌、皮膚癌、頭癌、頸癌、皮膚黑素瘤、眼內黑素瘤子宮癌、卵巢癌、子宮內膜癌、直腸癌、胃癌、結腸癌、乳癌、三陰性乳癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、霍奇金氏病(Hodgkin's Disease)、食道癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、非小細胞肺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、骨肉瘤(包括小兒或非小兒骨肉瘤)、尿道癌、前列腺癌、慢性白血病、急性白血病、急性骨髓細胞性白血病、淋巴球性淋巴瘤、骨髓白血病、骨髓單核細胞性白血病、毛細胞白血病、胸膜間皮瘤、膀胱癌、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、尿管癌、腎臟癌、腎細胞癌瘤、腎盂癌瘤、中樞神經系統(central nervous system, CNS)腫瘤、原發CNS淋巴瘤、脊髓軸腫瘤、腦幹神經膠質瘤、垂體腺瘤及胃食道結合部之腺癌。

【0240】 69.如條款1至51或56至68中任一項之方法，其中該癌症為表現葉酸受體之癌症。

【0241】 70.如條款1至69中任一項之方法，其中該癌症為骨肉瘤。

【0242】 71.如條款1至70中任一項之方法，其中該CAR具有識別區且該識別區為抗體之單鏈片段可變(scFv)區。

【0243】 72.如條款1至57或60至71中任一項之方法，其中該CAR具有識別區且該CAR之該識別區為抗FITC抗體之單鏈片段可變(scFv)區。

【0244】 73.如條款1至72中任一項之方法，其中該CAR具有共刺激結構域且該共刺激結構域選自由以下組成之群：CD28、CD137 (4-1BB)、CD134 (OX40)及CD278 (ICOS)。

【0245】 74.如條款1至73中任一項之方法，其中該CAR具有活化信號傳導結構域且該活化信號傳導結構域為T細胞CD3 ζ 鏈或Fc受體 γ 。

【0246】 75.如條款1至57或60至74中任一項之方法，其中該CAR具有識別區且該識別區為抗FITC抗體之單鏈片段可變(scFv)區，其中該CAR具有共刺激結構域且該共刺激結構域為CD137(4-1BB)，且其中該CAR具有活化信號傳導結構域且該活化信號傳導結構域為T細胞CD3 ζ 鏈。

【0247】 76.如條款1至75中任一項之方法，其中在投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽之前，或在投與該等CAR T細胞組合物之前，該患者經成像。

【0248】 77.如條款1至76中任一項之方法，其中該化合物或其醫藥學上可接受之鹽不為抗體且不包含抗體之片段。

【0249】 78.如條款1至77中任一項之方法，其中該靶向部分不包含肽抗原決定基。

【0250】 79.如條款1至78中任一項之方法，其中不會出現在該患者體內產生脫靶毒性之細胞介素釋放，且其中出現針對該癌症之CAR T細胞毒性。

【0251】 80.如條款1至78中任一項之方法，其中在該患者體內不會出現脫靶組織毒性且其中出現針對該癌症之CAR T細胞毒性。

【0252】 81.如條款1至78中任一項之方法，其中該癌症包含腫瘤，

其中腫瘤大小在該患者體內減小，且其中不會出現脫靶毒性。

【0253】 82.如條款1至81中任一項之方法，其中該等CAR T細胞包含含有SEQ ID NO: 1之核酸。

【0254】 83.如條款1至82中任一項之方法，其中該等CAR T細胞包含含有SEQ ID NO: 2之多肽。

【0255】 84.如條款82之方法，其中該核酸編碼嵌合抗原受體。

【0256】 85.如條款1至81中任一項之方法，其中該等CAR T細胞包含含有SEQ ID NO: 4之核酸。

【0257】 86.如條款1至81或85中任一項之方法，其中該等CAR T細胞包含含有SEQ ID NO: 5之多肽。

【0258】 87.如條款85之方法，其中該核酸編碼嵌合抗原受體。

【0259】 88.如條款1至87中任一項之方法，其中該CAR包含人類化胺基酸序列。

【0260】 89.如條款1至87中任一項之方法，其中該CAR由人類化胺基酸序列組成。

【0261】 90.如條款1至89中任一項之方法，其進一步包含向該患者投與葉酸包含葉酸之結合物，或抑制該等CAR T細胞活化之藥劑，其中包含葉酸之該結合物不包含靶向部分。

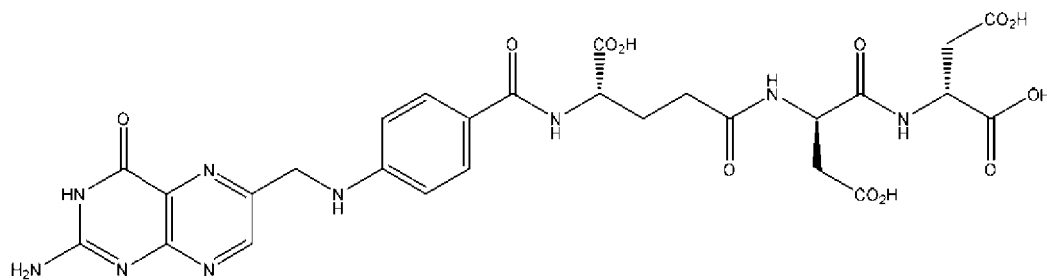
【0262】 91.如條款90之方法，其中投與葉酸。

【0263】 92.如條款90之方法，其中投與葉酸或甲醯四氫葉酸。

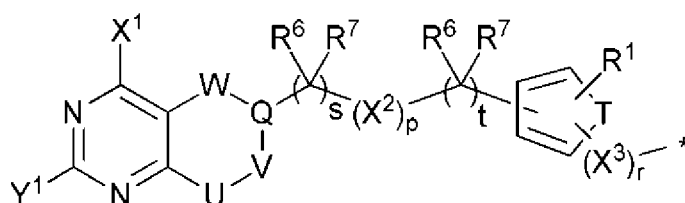
【0264】 93.如條款90之方法，其中投與包含葉酸之該結合物。

【0265】 94.如條款93之方法，其中包含葉酸之該結合物包含連接於一或多個胺基酸之葉酸。

【0266】 95.如條款93之方法，其中包含葉酸之該結合物具有下式：



【0267】 96.如條款91之方法，其中該葉酸具有下式：



其中 X^1 及 Y^1 各自獨立地選自由以下組成之群：鹵基、 R^2 、 OR^2 、 SR^3 及 NR^4R^5 ；

U、V及W表示各獨立地選自由以下組成之群之二價部分： $-(R^{6a})C=$ 、 $-N=$ 、 $-(R^{6a})C(R^{7a})-$ 及 $-N(R^{4a})-$ ，Q選自由以下組成之群：C及CH；T選自由以下組成之群：S、O、N及 $-C=C-$ ；

X^2 及 X^3 各自獨立地選自由以下組成之群：氧、硫、 $-C(Z)-$ 、 $-C(Z)O-$ 、 $-OC(Z)-$ 、 $-N(R^{4b})-$ 、 $-C(Z)N(R^{4b})-$ 、 $-N(R^{4b})C(Z)-$ 、 $-OC(Z)N(R^{4b})-$ 、 $-N(R^{4b})C(Z)O-$ 、 $-N(R^{4b})C(Z)N(R^{5b})-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-N(R^{4a})S(O)_2-$ 、 $-C(R^{6b})(R^{7b})-$ 、 $-N(C\equiv CH)-$ 、 $-N(CH_2C\equiv CH)-$ 、 C_1-C_{12} 伸烷基及 C_1-C_{12} 伸烷氧基，其中Z為氧或硫；

R^1 選自由以下組成之群：氫、鹵基、 C_1-C_{12} 烷基及 C_1-C_{12} 烷氧基；

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^{4a} 、 R^{4b} 、 R^5 、 R^{5b} 、 R^{6b} 及 R^{7b} 各自獨立地選自由以下組成之群：氫、鹵基、 C_1-C_{12} 烷基、 C_1-C_{12} 烷氧基、 C_1-C_{12} 烷醯基、 C_1-C_{12} 烯基、 C_1-C_{12} 炔基、 $(C_1-C_{12}$ 烷氧基)羰基及 $(C_1-C_{12}$ 烷胺基)羰基；

R^6 及 R^7 各自獨立地選自由以下組成之群：氫、鹵基、 C_1-C_{12} 烷基及

C₁-C₁₂烷氧基；或R⁶及R⁷一起形成羰基；

R^{6a}及R^{7a}各自獨立地選自由以下組成之群：氫、鹵基、C₁-C₁₂烷基及C₁-C₁₂烷氧基；或R^{6a}及R^{7a}一起形成羰基；

p、r、s及t各自獨立地為0或1；以及

若任何其他化學部分為該葉酸之一部分，則*表示與該結合物之其餘部分的視情況存在之共價鍵。

【0268】 97. 如條款90之方法，其中抑制該等CAR T細胞活化之該藥劑選自由以下組成之群：淋巴球特異性蛋白質酪胺酸激酶抑制劑、PI3激酶抑制劑、IL-2誘導性T細胞激酶抑制劑、JAK抑制劑、BTK抑制劑、EC2319及阻斷CAR T細胞與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽結合但不結合該癌症之藥劑。

【0269】 98. 如條款90之方法，其中投與抑制該等CAR T細胞活化之該藥劑且該藥劑為淋巴球特異性蛋白質酪胺酸激酶抑制劑。

【0270】 99. 如條款98之方法，其中該淋巴球特異性蛋白質酪胺酸激酶抑制劑為達沙替尼(Dasatinib)。

【0271】 100. 如條款90之方法，其中投與抑制該等CAR T細胞活化之該藥劑且該藥劑為PI3激酶抑制劑。

【0272】 101. 如條款100之方法，其中該PI3激酶抑制劑為GDC0980。

【0273】 102. 如條款90之方法，其中投與抑制該等CAR T細胞活化之該藥劑且該藥劑為IL-2誘導性T細胞激酶抑制劑。

【0274】 103. 如條款102之方法，其中該IL-2誘導性T細胞激酶抑制劑為BMS-509744。

【0275】 104. 如條款90之方法，其中投與抑制該等CAR T細胞活化之該藥劑且為阻斷CAR T細胞與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽結合但不結合於該癌症之藥劑。

【0276】 105. 如條款104之方法，其中該藥劑為螢光素胺、FITC或鈉螢光素。

【0277】 106. 如條款105之方法，其中該藥劑為鈉螢光素。

【0278】 107. 如條款90至106中任一項之方法，其中投與該葉酸、包含葉酸之結合物或抑制該等CAR T細胞活化之藥劑引起該患者體內之細胞介素含量降低，其中包含葉酸之該結合物不包含靶向部分。

【0279】 108. 如條款107中任一項之方法，該細胞介素含量降低為降低至約未經治療之患者體內之細胞介素含量。

【0280】 109. 如條款90至108中任一項之方法，其中該癌症包含腫瘤且在向該患者投與該葉酸、包含葉酸之該結合物或抑制該等CAR T細胞活化之該藥劑時該患者體內之腫瘤大小未增大，其中包含葉酸之該結合物不包含靶向部分。

【0281】 110. 如條款104至106中任一項之方法，當該CRS級別達到1、2、3或4時向該患者投與抑制該等CAR T細胞活化之該藥劑。

【0282】 111. 如條款110之方法，其中當該CRS級別達到3或4時向該患者投與抑制該等CAR T細胞活化之該藥劑。

【0283】 112. 如條款104至106中任一項之方法，其中以約0.01至約300微莫耳/公斤該患者體重之劑量投與抑制該等CAR T細胞活化之該藥劑。

【0284】 113. 如條款1至112中任一項之方法，其中CRS在該患者

體內降低或經預防且該方法使得該患者體內之腫瘤體積減小。

【0285】 114. 如條款1至113中任一項之方法，其中因CRS所致之體重減輕降低或經預防。

【0286】 115. 如條款90至114中任一項之方法，其進一步包含向該患者再投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0287】 116. 如條款115之方法，其中該化合物或其醫藥學上可接受之鹽之該後續投與致使CAR T細胞活化及該患者體內之細胞介素含量增大。

【0288】 117. 如條款1至116中任一項之方法，其中在該化合物或其醫藥學上可接受之鹽前投與該CAR T細胞組合物。

【0289】 118. 如條款1至117中任一項之方法，其中該等CAR T細胞為自體性的。

【0290】 119. 如條款2至17中任一項之方法，其中該第一劑量遞增順序包含在三個單獨日向該患者投與約1%、約2%及約20%之完整劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中該第二劑量遞增順序包含在三個單獨日向該患者投與約1%、約6%及約60%之完整劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽，且其中該第三劑量遞增順序包含在三個單獨日向該患者投與約1%、約10%及約100%之完整劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0291】 120. 如條款2至17中任一項之方法，其中該第一劑量遞增順序包含在三個單獨日向該患者投與約1%、約10%及約100%之完整劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽，且其中該第二劑量遞增順序包含在三個單獨日向該患者投與約1%、約20%及約200%之完整劑量之該化合

物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0292】 121. 如條款2至17中任一項之方法，其中該第一劑量遞增順序包含在三個單獨日向該患者投與約1%、約10%及約100%之完整劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽，且其中該第二劑量遞增順序包含在三個單獨日向該患者投與約1%、約10%及約100%之完整劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0293】 122. 如條款2至17中任一項之方法，其中該第一劑量遞增順序包含在三個單獨日向該患者投與約1%、約20%及約200%之完整劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽，且其中該第二劑量遞增順序包含在三個單獨日向該患者投與約1%、約20%及約200%之完整劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【0294】 123. 如條款119至122中任一項之方法，其中該化合物或其醫藥學上可接受之鹽之該完整劑量為約500奈莫耳/公斤。

【0295】 因此，前述段落及以上條款清單中提供各種實施例，且此「說明性實施例之詳細描述」、概述部分、實例及申請專利範圍中描述之所有適用實施例均適用於此等實施例。

【0296】 如本文所述，「患者」可為人類，或在獸醫學應用之情況下，患者可為實驗室動物、農畜、家畜或野生動物。在各個態樣中，患者可為實驗室動物，諸如啮齒動物(例如小鼠、大鼠、倉鼠等)、兔、猴、黑猩猩、家畜(諸如犬、貓或兔)、農畜(諸如牛、馬、豬、綿羊、山羊)或籠養野生動物，諸如熊、熊貓、獅子、虎、豹、大象、斑馬、長頸鹿、大猩猩、海豚或鯨。

【0297】 在各種實施例中，待治療之癌症可選自癌瘤、肉瘤、骨肉

瘤、淋巴瘤、黑色素瘤、間皮瘤、鼻咽癌、白血病、腺癌或骨髓瘤。在其他實施例中，癌症可為肺癌、骨癌、胰腺癌、皮膚癌、頭癌、頸癌、皮膚黑素瘤、眼內黑素瘤、子宮癌、卵巢癌、子宮內膜癌、直腸癌、胃癌、結腸癌、乳癌、三陰性乳癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、霍奇金氏病、食道癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、非小細胞肺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、骨肉瘤(包括小兒或非小兒骨肉瘤)、尿道癌、前列腺癌、慢性白血病、急性白血病(包括急性骨髓細胞性白血病)、淋巴球性淋巴瘤、骨髓白血病、骨髓單核細胞性白血病、毛細胞白血病、胸膜間皮瘤、膀胱癌、伯基特氏淋巴瘤、輸尿管癌、腎癌、腎細胞癌、腎盂癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、原發性CNS淋巴瘤、脊軸腫瘤、腦幹神經膠質瘤、垂體腺瘤及胃食道結合部之腺癌。

【0298】在此等實施例之一些態樣中，癌症為表現葉酸受體之癌症。在另一實施例中，癌症為表現葉酸受體 α 之癌症。在另一實施例中，癌症為表現葉酸受體 β 之癌症。在此等實施例之一些態樣中，癌症為子宮內膜癌、非小細胞肺癌、卵巢癌、骨肉瘤(包括小兒或非小兒骨肉瘤)或三陰性乳癌。在另一實施例中，所治療之癌症為腫瘤。在另一實施例中，癌症為惡性的。在另一實施例中，癌症為骨肉瘤，包括小兒或非小兒骨肉瘤。

【0299】在一個實施例中，「小分子配位體」可為葉酸、DUPA (由PSMA陽性人類前列腺癌細胞及其他癌細胞類型結合之配位體)、NK-1R配位體(例如在結腸及胰臟之癌症上發現NK-1R配位體之受體)、CAIX配位體(例如在腎癌、卵巢癌、外陰癌及乳癌上發現CAIX配位體之受體)、 γ 羧基轉氨酶之配位體(該轉氨酶例如在卵巢癌、結腸癌、肝癌、星形

膠質細胞瘤、黑色素瘤及白血病中過度表現)、NKG2D配位體(例如在肺癌、結腸癌、腎癌、前列腺癌上及在T細胞及B細胞淋巴瘤上發現NKG2D配位體之受體)或CCK2R配位體(尤其在甲狀腺、肺、胰臟、卵巢、腦、胃、胃腸道基質及結腸之癌症上發現CCK2R配位體之受體)，其中各者為特異性地結合於癌細胞類型之小分子配位體(亦即與正常組織相比，此等配位體各者之受體可在癌症上過度表現)。

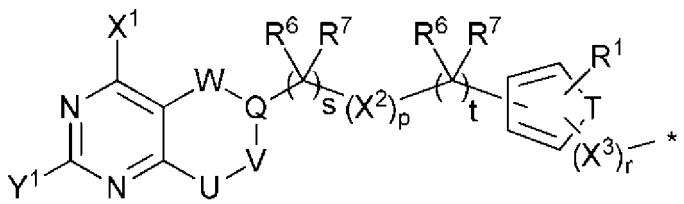
【0300】 在一個實施例中，小分子配位體可具有低於約10,000道爾頓、低於約9000道爾頓、低於約8,000道爾頓、低於約7000道爾頓、低於約6000道爾頓、低於約5000道爾頓、低於約4500道爾頓、低於約4000道爾頓、低於約3500道爾頓、低於約3000道爾頓、低於約2500道爾頓、低於約2000道爾頓、低於約1500道爾頓、低於約1000道爾頓或低於約500道爾頓之質量。在另一實施例中，小分子配位體可具有約1至約10,000道爾頓、約1至約9000道爾頓、約1至約8,000道爾頓、約1至約7000道爾頓、約1至約6000道爾頓、約1至約5000道爾頓、約1至約4500道爾頓、約1至約4000道爾頓、約1至約3500道爾頓、約1至約3000道爾頓、約1至約2500道爾頓、約1至約2000道爾頓、約1至約1500道爾頓、約1至約1000道爾頓或約1至約500道爾頓之質量。

【0301】 在一個實施例中，DUPA衍生物可為連接於靶向部分之小分子配位體的配位體，且DUPA衍生物描述於以引用的方式併入本文中之WO 2015/057852中。

【0302】 在一個實施例中，在「連接於連接子之小分子配位體」之情況下小分子配位體為葉酸。在各種實施例中，葉酸可為葉酸、葉酸類似物或另一葉酸受體結合分子。在各種實施例中，可使用之葉酸之類似物包

括亞葉酸(例如甲醯四氫葉酸)、喋醯聚麩胺酸及葉酸受體結合喋啶，諸如四氫喋呤、二氫葉酸、四氫葉酸及其脫氮及二脫氮類似物。術語「脫氮」及「二脫氮」類似物係指有碳原子取代天然存在之葉酸結構中之一或兩個氮原子的此項技術所知之類似物。舉例而言，脫氮類似物包括1-脫氮、3-脫氮、5-脫氮、8-脫氮及10-脫氮類似物。二脫氮類似物包括例如1,5-二脫氮、5,10-二脫氮、8,10-二脫氮及5,8-二脫氮類似物。上述葉酸類似物一般稱為「葉酸」，此反映其結合於葉酸受體之能力。其他葉酸受體結合類似物包括胺基喋呤、胺甲喋呤(甲胺喋呤)、N10-甲基葉酸、2-脫胺基-羥基葉酸、脫氮類似物(諸如1-脫氮胺甲喋呤或3-脫氮胺甲喋呤)及3',5'-二氯-4-胺基-4-去氧-N10-甲基喋醯聚麩胺酸(二氯甲胺喋呤)。

【0303】 在另一實施例中，在「連接於連接子之小分子配位體」之情況下小分子配位體可具有下式：



其中X¹及Y¹各自獨立地選自由以下組成之群：鹵基、R²、OR²、SR³及NR⁴R⁵；

U、V及W表示各獨立地選自由以下組成之群之二價部分：-(R⁶ᵃ)C=、-N=、-(R⁶ᵃ)C(R⁷ᵃ)-及-N(R⁴ᵃ)-，Q選自由以下組成之群：C及CH；T選自由以下組成之群：S、O、N及-C=C-；

X²及X³各自獨立地選自由以下組成之群：氧、硫、-C(Z)-、-C(Z)O-、-OC(Z)-、-N(R⁴ᵇ)-、-C(Z)N(R⁴ᵇ)-、-N(R⁴ᵇ)C(Z)-、-OC(Z)N(R⁴ᵇ)-、-N(R⁴ᵇ)C(Z)O-、-N(R⁴ᵇ)C(Z)N(R⁵ᵇ)-、-S(O)-、-S(O)₂-、-N(R⁴ᵃ)S(O)₂-、-C(R⁶ᵇ)(R⁷ᵇ)-、-N(C≡CH)-、-N(CH₂C≡CH)-、C₁-C₁₂伸烷基及C₁-C₁₂伸

烷氧基，其中Z為氧或硫；

R^1 選自由以下組成之群：氫、鹵基、 C_1 - C_{12} 烷基及 C_1 - C_{12} 烷氧基；

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^{4a} 、 R^{4b} 、 R^5 、 R^{5b} 、 R^{6b} 及 R^{7b} 各自獨立地選自由以下組成之群：氫、鹵基、 C_1 - C_{12} 烷基、 C_1 - C_{12} 烷氧基、 C_1 - C_{12} 烷醯基、 C_1 - C_{12} 烯基、 C_1 - C_{12} 炔基、(C_1 - C_{12} 烷氧基)羰基及(C_1 - C_{12} 烷基)羰基；

R^6 及 R^7 各自獨立地選自由以下組成之群：氫、鹵基、 C_1 - C_{12} 烷基及 C_1 - C_{12} 烷氧基；或 R^6 及 R^7 一起形成羰基；

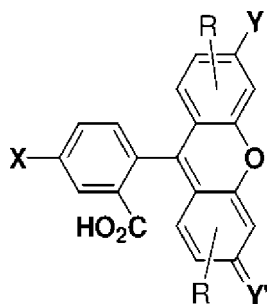
R^{6a} 及 R^{7a} 各自獨立地選自由以下組成之群：氫、鹵基、 C_1 - C_{12} 烷基及 C_1 - C_{12} 烷氧基；或 R^{6a} 及 R^{7a} 一起形成羰基；

p、r、s及t各自獨立地為0或1；以及

若任何其他化學部分為該葉酸之一部分，則*表示與該結合物之其餘部分的視情況存在之共價鍵。

【0304】 在一個態樣中，結合於由CAR T細胞表現之CAR的「靶向部分」可選自例如2,4-二硝基苯酚(DNP)、2,4,6-三硝基苯酚(TNP)、生物素、地高辛、螢光素、異硫氰酸螢光素(FITC)、NHS-螢光素、五氟苯基酯(PFP)、四氟苯基酯(TFP)、打結素、賽丁素、DARPin、親和抗體、阿菲林、抗運輸蛋白、艾三聚體(atrimer)、高親和性多聚體、雙環肽、FN3骨架、cys-結、福諾體(fynomer)、孔尼茲域(Kunitz domain)或Obody。靶向部分之屬性僅限於其應經CAR識別且與CAR結合(較佳地特異性結合)且其具有相對較低分子量。在各個態樣中，例示性靶向部分為半抗原，包括小分子量有機分子。

【0305】 在一個說明性實施例中，靶向部分可具有以下說明性結構：



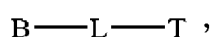
其中X為氧、氮或硫，且其中X附接至連接子L；Y為 OR^a 、 NR^{a_2} 或 NR^{a_3+} ；且Y'為O、 NR^a 或 NR^{a_2+} ；其中在各情況下各R獨立地選自H、氟、磺酸、磺酸酯及其鹽及其類似物；且 R^a 為氫或烷基。

【0306】 在一個說明性態樣中，連接子可包含聚乙二醇(PEG)、聚脯胺酸、親水性胺基酸、糖、非天然肽聚糖、聚乙烯吡咯啉酮、普洛尼克 F-127或其組合。

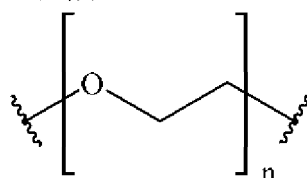
【0307】 在另一說明性態樣中，本文所述之化合物或其醫藥學上可接受之鹽中的連接子可包含直接連接(例如FITC之異硫氰酸酯基與小分子配位體之游離胺基之間的反應)或連接可經由中間連接子。在一個實施例中，若存在，則中間連接子可為此項技術中已知之任何生物相容性連接子，諸如二價連接子。在一個說明性實施例中，二價連接子可包含約1至約30個碳原子。在另一說明性實施例中，二價連接子可包含約2至約20個碳原子。在其他實施例中，採用低分子量二價連接子(亦即，近似分子量為約30至約300道爾頓之彼等連接子)。在另一實施例中，適合之連接子長度包括(但不限於)具有2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個、32個、33個、34個、35個、36個、37個、38個、39個或40個或更多個原子之連接子。

【0308】 在各種實施例中，連接於靶向部分之小分子配位體可具有

下式：



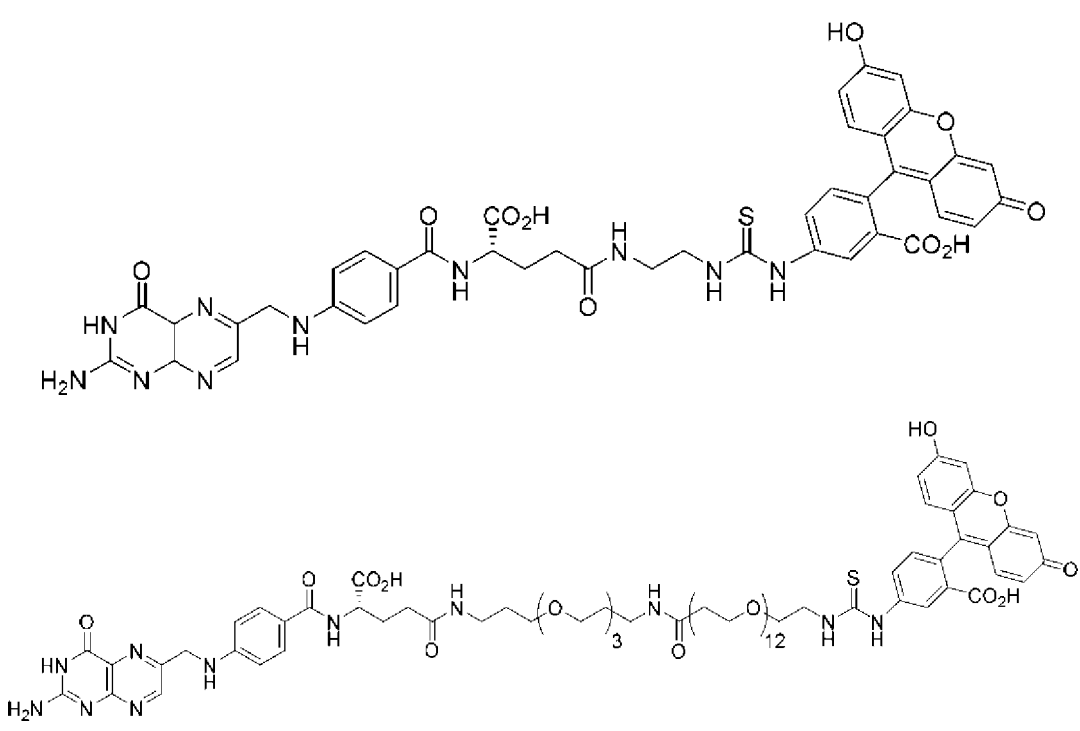
其中B表示該小分子配位體，L表示該連接子，且T表示該靶向部分，且其中L包含具有下式之結構：

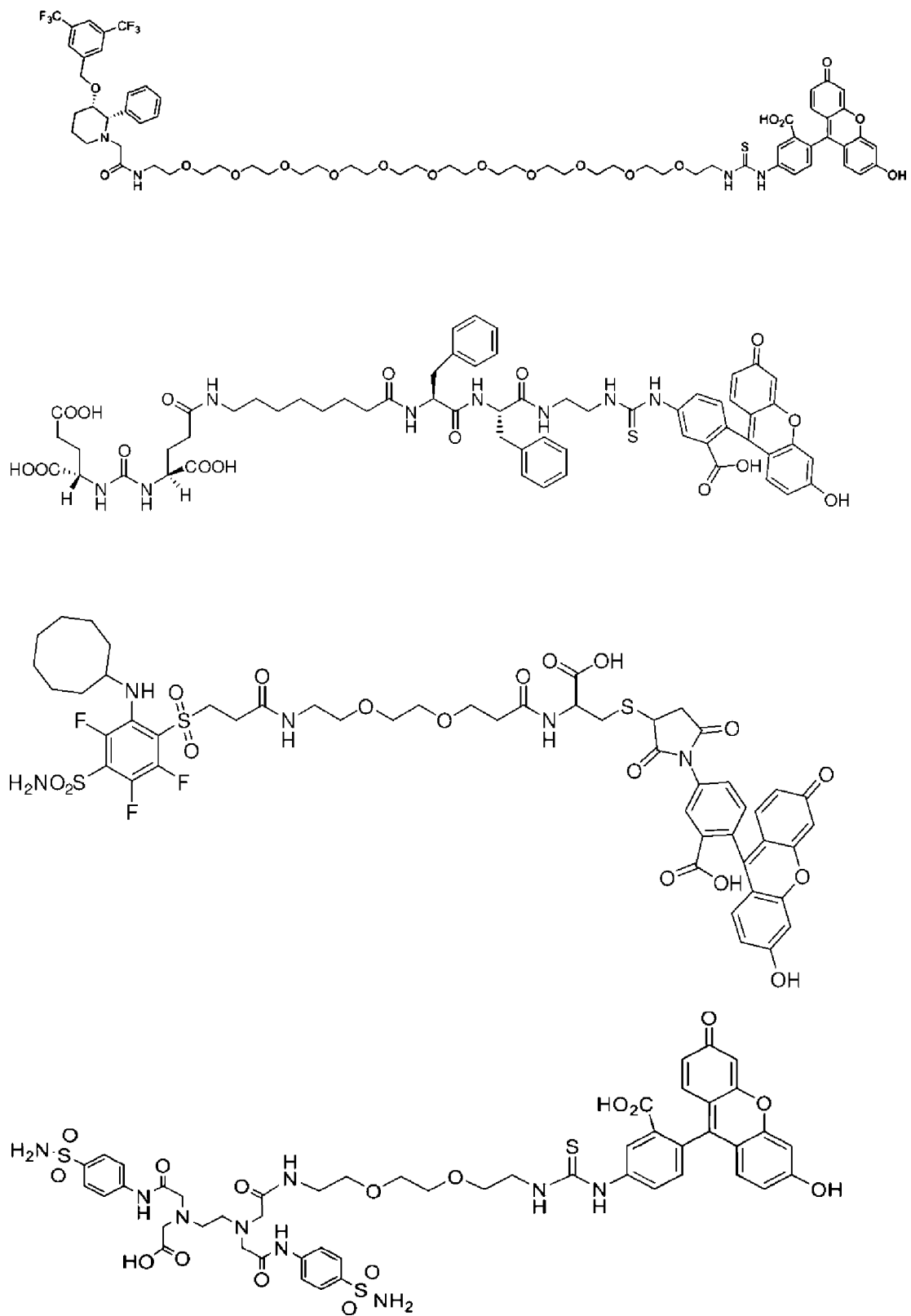


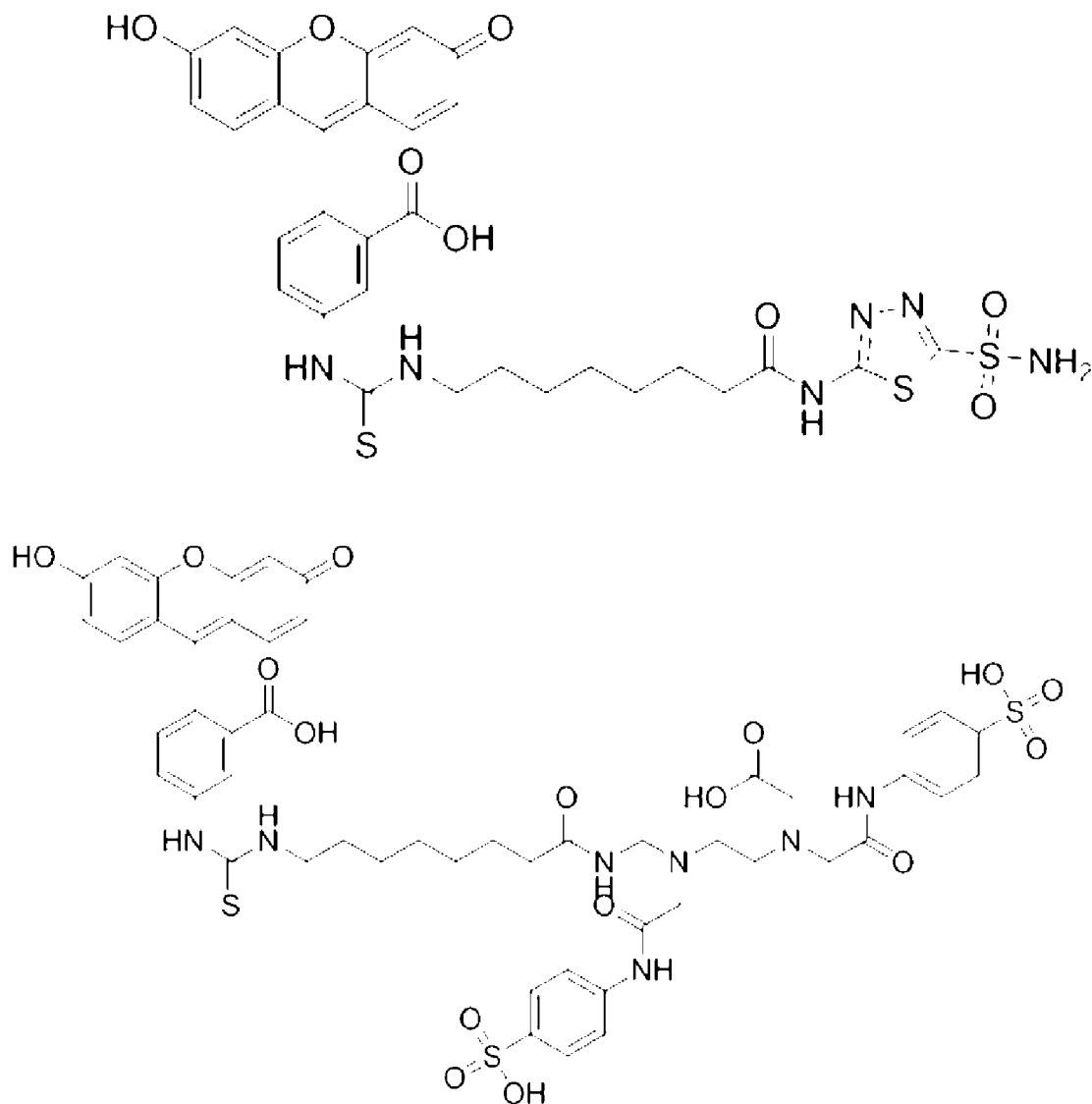
其中n為0至200之整數。在另一實施例中，n可為0至150、0至110、0至100、0至90、0至80、0至70、0至60、0至50、0至40、0至30、0至20、0至15、0至14、0至13、0至12、0至11、0至10、0至9、0至8、0至7、0至6、0至5、0至4、0至3、0至2、0至1、15至16、15至17、15至18、15至19、15至20、15至21、15至22、15至23、15至24、15至25、15至26、15至27、15至28、15至29、15至30、15至31、15至32、15至33、15至34、15至35、15至36、15至37、15至38、15至39、15至40、15至50、15至60、15至70、15至80、15至90、15至100、15至110、15至120、15至130、15至140、15至150之整數，或n可為1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、50、60、70、80、90、100、108、110、120、130、140或150。

【0309】在另一實施例中，連接子可為可包括一或多個間隔基之二價連接子。說明性間隔基顯示於下表中。描述以下非限制性例示性間隔基，其中*指示與小分子配位體或靶向部分或其他二價連接子部分之連接點。

【0310】 在其他實施例中，連接於靶向部分(橋)之小分子配位體可具有任一以下結構。







【0311】 在其他實施例中，化合物或其醫藥學上可接受之鹽並非抗體，且不包含抗體片段。在另一實施例中，靶向部分不包含肽抗原決定基。

【0312】 在一個說明性實施例中，藉由連接子(橋)連接於靶向部分之小分子配位體包含連接於小分子配位體之異硫氰酸螢光素(FITC)。在一個態樣中，癌症可過度表現小分子配位體之受體。在另一態樣中，例如細胞毒性T細胞或另一類型T細胞可轉型以表現包含抗FITC scFv之CAR。在此態樣中，作為小分子配位體與癌症結合之結果，CAR可靶向以FITC分子裝飾癌症之FITC。因此，可避免或降低對正常之非標靶細胞之毒性。

在此實施例中，當抗FITC表現CAR之T細胞結合FITC時CAR T細胞活化且改善癌症。

【0313】 涵蓋藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體的「醫藥學上可接受之鹽」。如本文所用，術語「醫藥學上可接受之鹽」係指相對離子可用於藥物中之彼等鹽。在各種實施例中，此類鹽包括(但不限於)：1)酸加成鹽，其可由母體化合物之游離鹼與無機酸之反應形成，該等無機酸為諸如鹽酸、氫溴酸、硝酸、磷酸、硫酸及過氯酸及其類似物；或由母體化合物之游離鹼與有機酸之反應形成，該等有機酸為諸如乙酸、乙二酸、(D)或(L)蘋果酸、順丁烯二酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、對甲苯磺酸、水楊酸、酒石酸、檸檬酸、丁二酸或丙二酸及其類似物；或(2)當母體化合物中存在之酸性質子經金屬離子(例如鹼金屬離子、鹼土金屬離子或鋁離子)置換時所形成之鹽；或當母體化合物中存在之酸性質子與有機鹼配位而形成的鹽，該有機鹼為諸如乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、三羥甲基胺基甲烷、N-甲基還原葡萄糖胺及其類似物。醫藥學上可接受之鹽為熟習此項技術者所熟知，且結合本文所述之實施例涵蓋任何此類醫藥學上可接受之鹽。

【0314】 在各種實施例中，合適酸加成鹽由形成無毒鹽之酸形成。說明性實例包括乙酸鹽、天冬胺酸鹽、苯甲酸鹽、苯磺酸鹽、碳酸氫鹽/碳酸鹽、硫酸氫鹽/硫酸鹽、硼酸鹽、樟腦磺酸鹽、檸檬酸鹽、乙二磺酸鹽、乙磺酸鹽、甲酸鹽、反丁烯二酸鹽、葡庚糖酸鹽、葡萄糖酸鹽、葡萄糖醛酸鹽、六氟磷酸鹽、海苯酸鹽、鹽酸鹽/氯化物、氫溴酸鹽/溴化物、氫碘酸鹽/碘化物、羥乙磺酸鹽、乳酸鹽、蘋果酸鹽、順丁烯二酸鹽、丙二酸鹽、甲磺酸鹽、甲硫酸鹽、萘二甲酸鹽、2-萘磺酸鹽、菸酸鹽、硝酸

鹽、乳清酸鹽、草酸鹽、棕櫚酸鹽、雙羥萘酸鹽、磷酸鹽/磷酸氫鹽/磷酸二氫鹽、葡萄糖二酸鹽、硬脂酸鹽、丁二酸鹽、酒石酸鹽、甲苯磺酸鹽及三氟乙酸鹽。

【0315】 在各種實施例中，適合之鹼鹽由形成無毒鹽之鹼形成。說明性實例包括精胺酸、苜蓿青黴素、鈣、膽鹼、二乙胺、二乙醇胺、甘胺酸、離胺酸、鎂、葡甲胺、乙醇胺、鉀、鈉、緩血酸胺及鋅之鹽。亦可形成酸及鹼之半鹽，例如半硫酸鹽及半鈣鹽。

【0316】 在一個例示性態樣中，本文所述之化合物或其醫藥鹽可含有一或多個對掌性中心，或可另外能夠呈多個立體異構體存在。因此，各種實施例可包括純立體異構體以及立體異構體之混合物，諸如對映異構體、非對映異構體及對映異構性或非對映異構性增濃混合物。在一個態樣中，本文所述之化合物或其醫藥學上可接受之鹽能夠呈幾何異構體存在。因此，各種實施例可包括純幾何異構體或幾何異構體之混合物。

【0317】 在一些態樣中，本文所述之化合物或其醫藥學上可接受之鹽可呈未溶劑化形式以及溶劑化形式，包括水合形式存在。一般而言，溶劑化形式等同於未溶劑化形式且涵蓋於本發明之範疇內。

【0318】 本文所述之方法亦利用T淋巴球(例如細胞毒性T淋巴球)，其經工程改造以表現識別且結合於橋之靶向部分(例如FITC、DNP或TNP)之嵌合抗原受體(CAR)。在一個實施例中，本文中描述之CAR包含三個域，包括1)識別區(例如，抗體之單鏈片段可變(scFv)區、Fab片段及其類似物)，其識別且特異性結合於靶向部分，2)共刺激結構域，其增強T淋巴球之增殖及存活，3)活化信號傳導結構域，其產生T淋巴球活化信號。

【0319】 在一個態樣中，可使用結合以下之抗體之scFv區：2,4-二

硝基苯酚(DNP)、2,4,6-三硝基苯酚(TNP)、生物素、地高辛、螢光素、異硫氰酸螢光素(FITC)、NHS-螢光素、五氟苯基酯(PFP)、四氟苯基酯(TFP)、打結素、賽丁素、DARPin、親和抗體、阿菲林、抗運載蛋白、艾三聚體(atrimer)、高親和性多聚體、雙環肽、FN3骨架、cys-結、福諾體(fynomer)、孔尼茲域(Kunitz domain)或Obody。在說明性非限制性實施例中，scFv區可以下由製備：(i)結合靶向部分之此項技術中已知之抗體，(ii)使用選定靶向部分(諸如半抗原)新製備之抗體及(iii)源自此類抗體之scFv區之順序變體，例如scFv區域具有與其源自之scFv區域之胺基酸序列至少約80%、至少約90%、至少約91%、至少約92%、至少約93%、至少約94%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或至少約99.5%序列一致性。

【0320】 在一個態樣中，共刺激結構域用以在CAR結合於靶向部分後增強細胞毒性T淋巴球之增殖及存活。合適共刺激結構域包括(但不限於) CD28、CD137 (4-1BB)、腫瘤壞死因子(TNF)受體家族之成員、CD134 (OX40)、TNFR受體超家族之成員、CD27、CD30、CD150、DAP10、NKG2D及CD278 (ICOS)、在活化T細胞上表現之CD28超家族共刺激分子或其組合。熟習此項技術者應瞭解可在不會不利地影響本發明的情況下使用此等共刺激結構域之順序變體，其中該等變體具有與其模擬之域相同或類似的活性。在各種實施例中，此類變體可與其源自之域之胺基酸序列具有至少約80%、至少約90%、至少約91%、至少約92%、至少約93%、至少約94%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或至少約99.5%序列一致性。

【0321】 在說明性實施例中，活化信號傳導結構域用以在CAR結合

於靶向部分後活化T淋巴球(例如細胞毒性T淋巴球)。在各種實施例中，適合之活化信號傳導結構域包括T細胞CD3 ζ 鏈、CD3 δ 受體蛋白、mb1受體蛋白、B29受體蛋白及Fc受體 γ 。熟習此項技術者應瞭解可使用此等活化信號傳導結構域之順序變體，其中變體具有與其模擬之域相同或類似活性。在各種實施例中，變異體與其源自之域之胺基酸序列具有至少約80%、至少約90%、至少約91%、至少約92%、至少約93%、至少約94%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或至少約99.5%序列一致性。

【0322】 在一個態樣中，使用基因工程改造技術製備編碼CAR之構築體。此類技術詳細描述於以引用之方式併入本文中之Sambrook等人，「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」，第3版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001)及以引用之方式併入本文中之Green and Sambrook，「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」，第4版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2012)中。

【0323】 作為實例，可製備質體或病毒表現載體(例如，慢病毒載體、逆轉錄病毒載體、sleeping beauty及piggyback(包括非病毒介導的CAR基因傳遞系統之轉位子/轉位酶系統))，其編碼包含識別區、一或多個共刺激結構域及活化信號傳導結構域之融合蛋白，框內且在5'至3'方向上連結。在其他實施例中，其他配置為可接受的，且包括識別區、活化信號傳導結構域及一或多個共刺激結構域。在一個實施例中，融合蛋白中之識別區之置放將通常為此使得實現在CAR T細胞之外部呈現該區域。在一個實施例中，CAR可包括其他元件，諸如確保融合蛋白適當輸出至細胞表面之信號肽(例如CD8 α 信號肽)；確保融合蛋白作為整合膜蛋白維持之跨

膜結構域(例如CD8 α 跨膜結構域、CD28跨膜結構域或CD3 ζ 跨膜結構域)及賦予識別區可撓性且允許強烈結合於靶向部分之鉸鏈域(例如CD8 α 鉸鏈)。

【0324】 例示性CAR之圖式展示於圖2及3中。對於圖2，可將融合蛋白序列併入至慢病毒表現載體中，其中「SP」為信號肽，CAR為抗FITC CAR，存在CD8 α 鉸鏈及CD8 α 跨膜結構域，共刺激結構域為4-1BB且活化信號傳導結構域為CD3 ζ 。CAR插入之例示性核酸序列提供為SEQ ID NO: 1及3且經編碼胺基酸序列提供為SEQ ID NO: 2。在又一實施例中，SEQ ID NO: 2可包含人類化或人類胺基酸序列或由人類化或人類胺基酸序列組成。

【0325】 對於圖3，展示例示性CAR構築體之圖式，其中經表現CAR包含E2抗螢光素抗體片段，其中可將融合蛋白序列併入至表現載體中且其中CAR包含E2抗螢光素抗體片段、IgG4鉸鏈域、CD28跨膜結構域，且其中共刺激結構域為CD137 (4-1BB)，且活化信號傳導結構域為CD3 ζ 。CAR可包含額外適合域。此CAR插入之例示性核酸序列提供為SEQ ID NO: 4且例示性經編碼胺基酸序列提供為SEQ ID NO: 5。如本文所用，「SEQ ID NO: 4」意謂開始於帶下劃線之「agc」密碼子處且終止於帶下劃線之「ggc」密碼子的序列。更長序列之此部分編碼插入至T細胞薄膜中之CAR。較長序列之其他部分包括不為經插入至膜中且充當嵌合抗原受體之CAR之部分的信號肽、EGFRt域等之編碼序列。如本文中所使用，「SEQ ID NO: 5」意謂開始於帶下劃線之「S」處且終止於帶下劃線之「G」的序列。較長序列之此部分為經插入至T細胞薄膜中之CAR的胺基酸序列。較長序列之其他部分包括不為經插入至膜中且充當嵌合抗原受

體之CAR之部分的信號肽、EGFRt域等之胺基酸序列。在又一實施例中，SEQ ID NO: 5可包含人類化或人類胺基酸序列或由人類化或人類胺基酸序列組成。SEQ ID NO :4及5如上文所描述且顯示如下。較長核酸序列中之開始及終止密碼子為帶下劃線的且較長序列為可用於轉導用於如本文所描述之方法之T細胞的例示性序列。

SEQ ID NO:4 (E2抗螢光素抗體片段CAR核酸序列(插入))

atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacacccagcattcctcctgatcccaagcgtgctgacacagcctagctcc
gtgtctgccgcccctggccagaaagtgaccatcagctgtagcggcagcaccagcaacatcggaacaactacgtgctcctggtatcag
cagcaccggcgaaggccccaagctgatgatctacgacgtgtccaagcggccagcggcgtgcccgatagattttccggcagcaa
gagcggcaacagcggcagcctggatacagcggcctgcagctgaggacgaggccgactactattgcccgcctgggacgatagc
ctgagcgaagtctgtttggcaccggcaccgaagctgacagtgtggggcggaggcggaggatctggcggcggagggaagtggcggga
gggggatctcaggtgcagctgggtggaaagcggcggcaacctgggtcagcctggcgggatctctgagactgagctgtgccgccagcg
gttccacctggcagcttcagcatgagctgggtgcgccaggtcctgggggaggactggaatgggtggcaggactgagcggcaga
agcagcctgaccactacgccgatagcgtgaaggggcgggttaccatcagccgggacaacgccaagaacagcgtgtacctgcaga
tgaacagcctgccccgtggaagataccgccgtgtactactgcgccagacggctctacgacagcagcggctactggggccacttctaca
gctacatggacgtgtggggccagggcaccctcgtgacagtgtctgagagcaagtacggaccgcccctgcccccttgccttgcctccc
gagttcgacggcggaccagcgtgttctgttcccccaagcccaaggacacctgatgatcagccggacccccgaggtgacctg
cgtggtggtggacgtgagccaggaagatcccagggtccagttcaatlggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagacca
agcccagagaggaaacagttccagagcacctaccgggtggtgtctgtgtgaccgtgctgcaccaggactgggtgaacggcgaagaa
tacaagtgcagggtgtccaacaaggcctgcccagcagcatcgaagaccatcagcaaggccaaggggcagcctcgcgagccc
caggtgtacacctgctcctcccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgcctgggtgaagggttctaccccagc
gacatcgccgtggagtgggagagcaacggccagcctgagaacaactacaagaccacctcccgtgctggacagcgacggcagc
ttcttctgtacagccggctgacctgggacaagagccggtggcaggaaaggcaacgtcttttagctgcagcgtgatgcagaggccctg
cacaaccactacaccagaagagcctgagcctgtccctggggcaagatgttctgggtgctlggtggtggtgggcggggtgctggcctgc
tacagcctgctggtgacagtggccttcatcatcttttgggtgaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaccatttatga
gaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttcagaagaagaaggaggatgtgaactgcccgtggaag
ttcagcagaagcggcagccttgcctaccagcagggccagaatcagctgtacaacgagctgaacctgggcagaagggaagagt
acgacgtcctggataagcggagagggccgggaccctgagatgggcggcaagcctcggcgggaagaacccccagggaaggcctgtata
acgaactgcagaaagacaagatggccgagggcctacagcgagatcgccatgaagggcgagcggaggcggggcgaaggccacga
cggcctgtatcagggcctgtccaccgccaccaagatactacgacgccctgcacatgcaggccctgcccccaaggctcgagggc
ggcggagagggcagaggaagtcttctaacatcgcggtgacgtggaggagaatcccggccctaggatgcttctcctggtgacaagcctt
ctgctctgtgagttaccacacccagcatttctcctgatccacgcgaagtgtgtaacggaataggtattggtgaatttaaagactcactt
ccataaatgctacgaatattaaacacttcaaaaactgcacctccatcagtgccgatctccacatcctccgggtggcatttaggggtgact
ccttcacatactcctccttggatccacaggaactggatattctgaaaaccgtaaaaggaaatcacagggttttctgattcaggcttg
gcctgaaaacaggacggacctccatgcctttgagaacctagaaatcatacggcaggaccaagcaacatggtcagttttcttcttga
gtcgtcagcctgaacataacatccttgggattacgtccctcaaggagataagtgtgagatgtgataatttcaggaaacaaaattgt
gctatgcaaatacaataaactggaaaaaactgtttgggacctccggtcagaaaacaaaattataagcaacagaggtgaaaacagctg
caaggccacagggcaggtctgccatgcttctgtcctcccgagggtgctggggccggagcccagggactgcgtctcttgcggga
atgtcagccgaggcaggaatgcgtggacaagtgcaccttctggagggtgagccaagggaatttggagaactctgagtgcatac
agtgccaccagagtgctgcctcaggccatgaacatcactgcacaggacggggaccagacaactgtatccagtggtgccactac
attgacggccccactgcgtcaagacctgcccggcaggagtcagggagaaaacaacacctggtctggaagtacgcagacgccg
gccatgtgtgccacctgtgccatccaaactgcacctacggatgcactggggcaggcttgaaggctgtccaacgaatgggcctaagat
cccgtccatcgccactgggatggtggggccctccttctgctggtggtggccctggggatggcctcttcattgta

【0326】 SEQ ID NO:5 (E2抗螢光素抗體片段CAR胺基酸序列(插

入))

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPSVLTQPSSVSAAPGQKVTISC
SGSTSNIGNNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSKRPSGVPDRFS
GSKSGNSASLDISGLQSEDEADYYCAAWDDSLSEFLFGTGTK
LTVLGGGGGGSGGGGGSGGGGSSQVQLVESGGNLVQPGGSLRLS
CAASGFTFGSFSMSWVRQAPGGGLEWVAGLSARSSLTHYAD
SVKGRFTISRDNANKNSVYLQMNSLRVEDTAVYYCARRSYDS
SGYWGHFYSYMDVWGQGTTLVTVSESKYGPPCPPCPAPEFDG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SLGKMFWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLY
IFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSAD
APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKP
RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL
YQGLSTATKDTYDALHMQALPPRLEGGGEGRGSLLTCGDVE
ENPGPRMLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDS
LSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQE
LDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQH
QFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINW
KKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPE
PRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPE
CLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGE
NNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKI
PSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM

【0327】另一例示性CAR構築體為概略地展示於圖3中之4M5.3CAR。如本文中所使用，「SEQ ID NO:6」意謂以下所示之開始於帶下劃線之「gac」密碼子處且終止於帶下劃線之「ggc」密碼子的序列。較長序列之此部分編碼例示性4M5.3 CAR。CAR經插入至T細胞膜中。較長序列之其他部分包括不為經插入至膜中且充當嵌合抗原受體之CAR之部分的信號肽、EGFRt域等之編碼序列。如本文中所使用，「SEQ ID NO:7」意謂開始於帶下劃線之「D」處且終止於帶下劃線之「G」的序列。較長序列之此部分為經插入至T細胞膜中之CAR的胺基酸序列。較長序列之其他部分包括不為經插入至膜中且充當嵌合抗原受體之CAR之部分的信號肽、EGFRt域等之胺基酸序列。在又另一實施例中，SEQ ID NO:7

可包含人源化或人類胺基酸序列或由人源化或人類胺基酸序列構成。SEQ ID NO:6及SEQ ID NO:7如上文所描述且其在下文展示。較長核酸序列中之起始密碼子及終止密碼子帶下劃線，且較長序列為可用於轉導T細胞以製備4M5.3 CAR之例示性序列。

SEQ ID NO:7 [4M5.3-CAR胺基酸序列(插入序列)]
MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDVVMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTY
LRWYLQKPGQSPKVLIIYKVSNRVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDLG VYFCS
QSTHVPWTFGGGT KLEIKSSADDAKKDAAKKDDAKKDDAKKDGGVKLDETGGGL
VQPGGAMKLSCVTS GFTFGHYWMNWVRQSPEKGLEWVAQFRNKPYNYETYYSDS
VKGRFTISRDDSKSSVYLQMN NLRVEDTGIYYCTGASYGMEYLGQGTSVTVSESKY
GPPCPPCPAPEFDGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKMF
WVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC
RFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPE
MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK
DTYDALHMQALPPRLEGGGEGRGSLT CGDVEENPGPRMLLLVTSLLLCELPHPAFL
LIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCT SISGDLHILPVAFRGDSFHTHPPLDPQE
LDILKTVKEITGFL LIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGR TKQHGQFSLAVVSLNITSLGL
RSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHA
LCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQ
AMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLC
HPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLFM

SEQ ID NO:6 [4M5.3-CAR核苷酸序列(插入序列)]

ATG(起始)cttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagcattcctcctgatccagacgttgtaatgac
ccagaccctctgtctctcccgtgaagcttggcgaccaggcgagcatctcttctcgttctccagtccttggtccattcaaacggcaa
tacttacttgcggtggtacttgcagaagccccgtcaatccccaaaagtgtgatatacaaggttagcaatcgggtcagtggaagtgccccg
accgcttcagcgggaagcggatccgggactgacttactctgaagatcaaccgggtagaagctgaagacctgggggtgtacttctgctc
tcagtcaacacacgtgccatggaccttggaggtggcaccaagctggaaatcaaatcatcagcggacgatccaaaaagacgcgg
ccaagaaggacgatccaagaaggatgatgctaaaaaggatggcgaggatcaaatggacgagacaggcgggggactggtgcagc
ccggcggtgccatgaaactgtcttgtgaccagcggctttacctcgggcattattggatgaactgggtgcgacagtctccagagaaa
gggctcgagtgggtggccagtttcgaaataaacgtacaattatgagacctactattcagattctgtgaaagggcgcttactatttcac
gcgacgacagcaaaagtccgtctaccttcagatgaacaaccttagagtggaggataccggaatactactgcacgggtgccagttat
ggcatggagtacttggggcaggggacatctgtgaccgtttctgagagcaagtacggaccgccctgcccccttgccctgccccgag
ttcgacggcggaaccagcgtgttctgttccccccaaagcccaaggacacctgatgatcagccggacccccgaggtgacctgcgt
gggtgggtggacgtgagccagggaagatccccgaggtccagttcaattggtagctggacggcggtggaagtgcacaacgccaagaccaag
cccagagagggaacagttccagagcacctaccgggtggtgtctgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaagaata
caagtgaaggtgtccaacaaggccctgccagcagcatcgaaaagaccatcagcaaggccaaggccagcctcgcgagcccca
ggtgtacacctgcctccctcccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgcctgtgaagggcttctaccccagcga
categccgtggagtgggagagcaacggccagcctgagaacaactacaagaccacctctccctgctggacagcgacggcagcttc
ttctgtacagccggctgaccgtggacaagagccggtggcagggaaggaacgctttagctgcagcgtgatgcagaggccctgca
caaccactacaccgaagagcctgagcctgtccctgggcaagatgttctgggtgctggtggtggtggcggggtgctggcctgcta
cagcctgctggtgacagtggccttcatcatcttttgggtgaaacggggcagaaaagaaactcctgtatatattcaacaaccattatgaga
ccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtgagctgccgatttcagaagaagaagaggaggtgtgaactcggggtgaagttc
agcagaagcggcgacgccctgcctaccagcaggggccagaatcagctgtacaacagctgaacctgggcagaagggaagagtac
gacgtcctggataagcggagagggcgggacctgagatggcgggcaagcctcgcggaagaacccccaggaaggcctgtataac
gaactgcagaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggcatgaagggcgagcggagggcggggcaagggccacgacg
gcctgtatcagggcctgtccaccgccaccaaggatacctacgacgccctgcacatgcaggccctgcccccaaggctcgagggcgg
cggagaggcgagaggaagtcttcaacatcggtgacgtggaggagaatcccggccctaggtgcttctcctggtgacaagcctct
gctctgtgagttaccacaccagcattcctcctgatccacgcaaagtgtgtaacggaataggtattggtgaatttaaagactcactctcc
ataaatgctacgaatattaacacttcaaaaactgcacctccatcagtggcgatctccacatcctgccggtggcatttaggggtgactcct
tcacacatactcctccttggatccacaggaactggatattctgaaaaccgtaaaggaaatcacagggtttttgctgattcaggcttggcc
tgaaaacaggacggacctccatgccttgagaacctagaaatcatacgcggcaggaccaagcaacatggtcagtttctcttcagtcg
tcagcctgaacataacatccttgggattacgtccctcaaggagataagtgtgagatgtgataatttcaggaaacaaaatttgtgcta
tgcaatacaataaactggaaaaaactgtttgggacctccggtcagaaaacaaaattataagcaacagaggtgaaaacagctgcaag
gccacaggccaggtctgccatgccttgtgctccccgagggtgcttggggcccgaggccagggactgcgtctcttgcgggaatgt
cagccgaggcgagggaatgcgtggacaagtgaaccttctggagggtgagccaagggagtgttggaagaactctgagtgcatacagt
gccaccagagtgctcctcagccatgaacatcacctgcacaggacggggaccagacaactgtatccagtgtcccactacattg
acggccccactgctcaagacctgccggcaggagtcattgggagaaaacaacacctggtctggaagtacgcagacgccggcc
atgtgtgccacctgtccatccaaactgcacctacggatgcactgggccaggtcttgaaagctgtccaacgaatgggcctaagatccc
gtccatgccactgggatggtggggccctcctcttctgctgctggtggtggccctggggatcgccctcttcagTGA (終止密碼子)

【0328】 在一個實施例中，CAR具有識別區且該識別區為抗FITC抗體之單鏈片段可變(scFv)區，具有共刺激結構域且該共刺激結構域為CD137(4-1BB)，且具有活化信號傳導結構域且該活化信號傳導結構域為T細胞CD3ζ鏈。熟習此項技術者熟知抗FITC scFv與抗螢光素scFv為同等術語。

【0329】 在一個實施例中，T淋巴球(例如細胞毒性T淋巴球)可藉由用編碼CAR構築體之表現載體轉染T淋巴球群體而經基因工程改造以表現

CAR構築體。適用於製備表現所選CAR構築體之T淋巴球之經轉導群體的方法為熟習此項技術者所熟知，且描述於Sambrook等人，「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」，第3版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001) (以引用之方式併入本文中)及Green及Sambrook, 「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」，第4版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2012) (以引用的方式併入本文中)中。

【0330】在一個實施例中，提供包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6之核酸的CAR T細胞。在另一實施例中，提供包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7之多肽的CAR T細胞。在另一說明性態樣中，提供包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6且編碼嵌合抗原受體之核酸(例如經分離核酸)。在又另一實施例中，提供包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7之嵌合抗原受體多肽。在另一實施例中，提供包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6之載體。在另一態樣中，提供包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6之慢病毒載體。在又另一實施例中，SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7可包含人源化或人類胺基酸序列或由人源化或人類胺基酸序列構成。

【0331】在此等實施例中之每一者中，涵蓋與SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:7具有至少約80%、至少約90%、至少約95%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或至少約99.5%序列一致性之變體核酸序列或胺基酸序列。在另一實施例中，核酸序列可為與SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6具有至少約80%、至少約90%、至少約

95%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或至少約99.5%序列一致性之變體核酸序列，只要該變體序列編碼SEQ ID NO:2 (針對SEQ ID NO:1及SEQ ID NO:3)、SEQ ID NO:5 (針對SEQ ID NO: 4)或SEQ ID NO:7 (針對SEQ ID NO:6)之多肽即可。在另一實施例中，核酸序列或胺基酸序列可為與沿一段200個核酸之SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6或與沿一段200個胺基酸之SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7具有至少約80%、至少約90%、至少約95%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或至少約99.5%序列一致性之變體核酸或胺基酸序列。在一個實施例中，可例如藉由使用GAP程式(Genetics Computer Group，軟體；目前可在<http://www.accelrys.com>上經由Accelrys獲得)來實現對序列之間的一致性或類似性百分比之測定，且可使用(例如) ClustalW演算法(VNTI軟體，InforMax公司)來實現對準。可使用所關注之核酸或胺基酸序列來搜索序列資料庫。資料庫搜索演算法典型地基於BLAST軟體(Altschul等人,1990)。在一些實施例中，可沿核酸或胺基酸序列之全長來測定一致性百分比。

【0332】 與由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6表示之核酸互補之核酸及混雜至由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6表示之核酸的彼等核酸或在高度嚴格條件下混雜至其互補序列之彼等核酸亦在本發明之範疇內。根據本發明，「高度嚴格條件」意謂在65℃下於5X SSPE及50%甲醯胺中混雜，且在65℃下於0.5X SSPE中洗滌。用於高度嚴格、低嚴格及中等嚴格混雜之條件描述於Sambrook等人，「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」，第3版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001) (以引用

之方式併入本文中)及Green及Sambrook, 「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」, 第4版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2012) (以引用之方式併入本文中)。在一些說明性態樣中, 混雜沿核酸之全長發生。

【0333】 在一個實施例中, 儘管用於本文中所描述方法中之T淋巴球(例如用以製備CAR T細胞之細胞毒性T淋巴球)可為自體細胞, 但亦可使用異源細胞, 諸如當經治療之患者已接受高劑量化療或放射治療而破壞患者之免疫系統時。在一個實施例中, 可使用同種異體細胞。

【0334】 在一個態樣中, T淋巴球可藉由此項技術中熟知之方式自患者獲得。舉例而言, T細胞(例如細胞毒性T細胞)可藉由以下操作而獲得: 收集來自患者之外周血液, 對血液進行菲科爾(Ficoll)密度梯度離心, 且隨後使用陰性T細胞分離套組(諸如EasySep™T細胞分離套組)以自外周血液分離T細胞群體。在一個說明性實施例中, T淋巴球(例如細胞毒性T細胞)群體不必為純淨的, 且可含有其他細胞, 諸如其他類型之T細胞(在例如細胞毒性T細胞之情況下)、單核球、巨噬細胞、自然殺手細胞及B細胞。在一個態樣中, 所收集之群體可包含至少約90%之所選細胞類型、至少約91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之所選細胞類型。

【0335】 在一個實施例中, 在獲得T淋巴球(例如用以製備CAR T細胞之細胞毒性T細胞)之後, 在促進細胞活化之條件下培養該等細胞。在此實施例中, 培養條件可使得細胞可投與患者, 而不涉及針對培養基之組分的反應性。舉例而言, 培養條件可不包括牛血清產物, 諸如牛血清白蛋白。在一個說明性態樣中, 活化可藉由在細胞毒性T細胞之情況下將諸如

抗CD3抗體之已知活化劑引入至培養基中來達成。其他合適之活化劑包括抗CD28抗體。在一個態樣中，可在促進活化之條件下將淋巴球群體培養約1天至約4天。在一個實施例中，適當活化水平可藉由利用流動式細胞量測術測定之細胞大小、增殖速率或活化標記物來測定。

【0336】 在一個說明性實施例中，在已於促進活化之條件下培養T淋巴球(例如用以製備CAR T細胞之細胞毒性T淋巴球)群體之後，該等細胞可經編碼CAR之表現載體轉染。上文描述用於各種實施例中之合適的載體及轉染方法。在一個態樣中，在轉染之後，可立即向患者投與該等細胞，或可將細胞培養至少約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、14天、15天、16天、17天、18天或更多天，或在約5天與約12天之間、在約6天與約13天之間、在約7天與約14天之間或在約8天與約15天之間，例如以為細胞自轉染中恢復留出時間。在一個態樣中，合適之培養條件可類似於在具有或不具有用以促進活化之試劑下培養細胞以活化的條件。

【0337】 因此，如上文所描述，在一個說明性態樣中，本文中所描述之治療方法可進一步包含1)獲得自體或異源T淋巴球(例如用以製備CAR T細胞之細胞毒性T淋巴球)之群體，2)在促進細胞活化之條件下培養T淋巴球，以及3)用編碼CAR之表現載體轉染淋巴球以形成CAR T細胞。

【0338】 在一個實施例中，可使用缺少任何動物產物(諸如牛血清)之培養基來培養CAR T細胞。在另一實施例中，可使用熟習此項技術者典型地用以避免受細菌、真菌及支原菌污染之組織培養條件。在一例示性實施例中，在投與患者之前，將細胞(例如CAR T細胞)沈澱，洗滌，且再懸浮於醫藥學上可接受之載劑或稀釋劑中。包含CAR表現T淋巴球(例如細

胞毒性T淋巴球)之例示性組合物包括在無菌290 mOsm生理鹽水中、在不溶性冷凍介質(含有Plasma-Lyte A、右旋糖、氯化鈉注射劑、人類血清白蛋白及DMSO)中、在具有2%人類血清白蛋白之0.9% NaCl中或在任何其他無菌290 mOsm不溶性物質中包含該等細胞之組合物。可替代地，在另一實施例中，視培養基之屬性而定，CAR T細胞可作為組合物投入培養基中，或在投與之前經濃縮且再懸浮於培養基中。在各種實施例中，可經由任何合適之手段來向患者投與CAR T細胞組合物，諸如非經腸投與，例如皮內、皮下、肌內、腹膜內、經靜脈內或鞘內。

【0339】 在一個態樣中，CAR T細胞之總數目及向患者投與之組合物中之細胞的濃度將視包括以下各者之數個因素而變化：正在使用之T淋巴球(例如細胞毒性T淋巴球)之類型、CAR之結合特異性、靶向部分及小分子配位體之屬性、癌症之屬性、患者體內之癌症的部位、用以向患者投與組合物之手段以及正經治療之患者的健康、年齡、體重。在各種實施例中，包含經轉導CAR T細胞之合適的組合物包括具有約0.1 ml至約200 ml與約0.1 ml至約125 ml之體積的彼等。

【0340】 在各種實施例中，向患者投與之經轉導CAR T細胞可包含約 1×10^5 至約 1×10^{15} 或 1×10^6 至約 1×10^{15} 之經轉導CAR T細胞。在各種實施例中，可向患者投與約 1×10^5 至約 1×10^{10} 、約 1×10^6 至約 1×10^{10} 、約 1×10^6 至約 1×10^9 、約 1×10^6 至約 1×10^8 、約 1×10^6 至約 2×10^7 、約 1×10^6 至約 3×10^7 、約 1×10^6 至約 1.5×10^7 、約 1×10^6 至約 1×10^7 、約 1×10^6 至約 9×10^6 、約 1×10^6 至約 8×10^6 、約 1×10^6 至約 7×10^6 、約 1×10^6 至約 6×10^6 、約 1×10^6 至約 5×10^6 、約 1×10^6 至約 4×10^6 、約 1×10^6 至約 3×10^6 、約 1×10^6 至約 2×10^6 、約 2×10^6 至約 6×10^6 、約 2×10^6 至約 5×10^6 、約 3×10^6 至約 6×10^6 、約 4×10^6 至

約 6×10^6 、約 4×10^6 至約 1×10^7 、約 1×10^6 至約 1×10^7 、約 1×10^6 至約 1.5×10^7 、約 1×10^6 至約 2×10^7 、約 0.2×10^6 至約 1×10^7 、約 0.2×10^6 至約 1.5×10^7 、約 0.2×10^6 至約 2×10^7 、約 0.2×10^6 至約 3×10^7 、約 0.2×10^6 至約 4×10^7 、約 0.2×10^6 至約 5×10^7 、約 0.2×10^5 至約 1.5×10^6 、約 0.5×10^5 至約 1.5×10^6 、約 0.2×10^5 至約 1.4×10^6 、約 0.2×10^5 至約 1.3×10^6 、約 0.5×10^5 至約 1.3×10^6 、約 0.8×10^6 至約 2×10^7 、約 0.8×10^6 至約 1.5×10^7 、約 0.9×10^6 至約 1.2×10^7 、或約 0.5×10^6 、 1×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 1.5×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 或 5×10^7 之CAR T細胞。此等量可針對每kg患者體重。

【0341】在其他實施例中，CAR T細胞組合物中向患者投與之CAR T細胞之劑量係選自由以下組成之群：約100萬、約200萬、約300萬、約400萬、約500萬、約600萬、約700萬、約800萬、約900萬、約1000萬、約1100萬、約1200萬、約1250萬、約1300萬、約1400萬及約1500萬之該等CAR T細胞。此等量可針對每kg患者體重。

【0342】在此段落中所描述之實施例中之任一者中，CAR T細胞劑量可為每kg患者體重之CAR T細胞的數目。在一個態樣中，在本文中所描述之任何實施例中，可向患者投與單次劑量或多次劑量之CAR T細胞。在一個說明性實施例中，可向患者投與第一劑量之CAR T細胞及第二劑量之CAR T細胞。在一個態樣中，CAR T細胞之第一劑量可為用以監測患者對CAR T細胞之耐受性的測試劑量，且CAR T細胞之第二劑量可包含高於CAR T細胞之第一劑量之CAR T細胞的劑量。在一個實施例中，CAR T細胞之第一劑量可包含約 0.5×10^5 之CAR T細胞至約 1.5×10^6 之CAR T細胞。在另一實施例中，CAR T細胞之第二劑量可包含約 0.8×10^6 之CAR T細胞

至約 2×10^7 之CAR T細胞。在此等實施例中，包括CAR T細胞之第一劑量及第二劑量，可投與本文中所描述之CAR T細胞的任何劑量。

【0343】在本文中所描述之任何實施例中，CAR T細胞可在化合物或其醫藥學上可接受之鹽之前或之後投與。如將理解，除非另外陳述，否則針對本文所述之任何方法之步驟的名稱i)、ii)及iii)等不指示次序。

【0344】化合物或其醫藥學上可接受之鹽或本文中所描述之CAR T細胞組合物可使用此項技術中已知的任何合適之方法投與患者。如本文中所描述，術語術語「投與(administering)」或「投與(administered)」包括向患者引入化合物或其醫藥學上可接受之鹽或CAR T細胞組合物之所有手段，包括(但不限於)經口、靜脈內、肌內、皮下、經皮及其類似手段。在一個態樣中，本文中所描述之化合物或其醫藥學上可接受之鹽可以單位劑型及/或含有習知無毒性醫藥學上可接受之載劑、佐劑及媒劑的調配物來投與。

【0345】在一個態樣中，如本文中所描述之化合物或其醫藥學上可接受之鹽或CAR T細胞組合物可直接投與至血流中、至肌肉中或至內部器官中。在各種實施例中，適用於此類非經腸投與之途徑包括靜脈內、動脈內、腹膜內、鞘內、硬膜外、腦室內、尿道內、胸骨內、顱內、瘤內、肌內及皮下遞送。在一個實施例中，用於非經腸投與之手段包括針(包括微針)注射器、無針注射器及輸注技術。

【0346】在一個說明性態樣中，非經腸調配物典型地為可含有諸如鹽、碳水化合物及緩衝劑(較佳地在3至9之pH值下)之載劑或賦形劑的水溶液，但其可能更適合經調配為無菌非水性溶液，或調配為乾燥形式以結合諸如無菌、無熱原質水或無菌生理鹽水之合適媒劑來使用。在其他實施例

中，本文中所描述之液體調配物中之任一者可經調適以用於如本文中所描述之非經腸投與。可易於使用熟習此項技術者所熟知之標準醫藥技術在無菌條件下製備，藉由凍乾來產生用於非經腸調配物之無菌凍乾粉末。在一個實施例中，用於製備非經腸調配物之化合物或其醫藥學上可接受之鹽的溶解度可藉由使用諸如併入溶解度增強劑之適當調配技術來增加。

【0347】 在一個實施例中，待投與患者之化合物或其醫藥學上可接受之鹽的量可視正經治療之癌症、化合物或其醫藥學上可接受之鹽之投與途徑及組織分佈而顯著變化。在一個態樣中，待投與患者之量可基於體表面積、質量及醫師評估。

【0348】 在各種實施例中，可按以下各者來投與化合物或其醫藥學上可接受之鹽：1)至少第一劑量遞增順序及第二劑量遞增順序，2)至少第一劑量遞增順序、第二劑量遞增順序及第三劑量遞增順序，3)至少第一劑量遞增順序、第二劑量遞增順序、第三劑量遞增順序及第四劑量遞增順序，4)至少第一劑量遞增順序、第二劑量遞增順序、第三劑量遞增順序、第四劑量遞增順序及第五劑量遞增順序，5)至少第一劑量遞增順序、第二劑量遞增順序、第三劑量遞增順序、第四劑量遞增順序、第五劑量遞增順序及第六劑量遞增順序，或可包括6)一或多個額外劑量遞增順序。

【0349】 在各種實施例中，對於第一、第二、第三、第四、第五或第六等劑量遞增順序，待投與患者之化合物或其醫藥學上可接受之鹽的量可為約0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至約2000 $\mu\text{g/kg}$ 、0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至約1500 $\mu\text{g/kg}$ 、0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至約1000 $\mu\text{g/kg}$ 、0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至約500 $\mu\text{g/kg}$ 、約0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至約100 $\mu\text{g/kg}$ 、約0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至約80 $\mu\text{g/kg}$ 、約0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至約70 $\mu\text{g/kg}$ 、約0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至約50 $\mu\text{g/kg}$ 、約0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至約40 $\mu\text{g/kg}$ 、約0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至約30 $\mu\text{g/kg}$ 。

$\mu\text{g/kg}$ 、約0.3 $\mu\text{g/kg}$ 至約500 $\mu\text{g/kg}$ 、約0.3 $\mu\text{g/kg}$ 至約400 $\mu\text{g/kg}$ 、約0.3 $\mu\text{g/kg}$ 至約300 $\mu\text{g/kg}$ 、約0.3 $\mu\text{g/kg}$ 至約200 $\mu\text{g/kg}$ 、約0.3 $\mu\text{g/kg}$ 至約100 $\mu\text{g/kg}$ 、約0.3 $\mu\text{g/kg}$ 至約90 $\mu\text{g/kg}$ 、約0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至約400 $\mu\text{g/kg}$ 、約0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至約350 $\mu\text{g/kg}$ 、約0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至約300 $\mu\text{g/kg}$ 、約0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至約250 $\mu\text{g/kg}$ 、約0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至約200 $\mu\text{g/kg}$ 、約0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至約150 $\mu\text{g/kg}$ 或約0.3 $\mu\text{g/kg}$ 至約150 $\mu\text{g/kg}$ 或5 $\mu\text{g/kg}$ 至約2000 $\mu\text{g/kg}$ 、5 $\mu\text{g/kg}$ 至約1500 $\mu\text{g/kg}$ 、5 $\mu\text{g/kg}$ 至約1000 $\mu\text{g/kg}$ 、5 $\mu\text{g/kg}$ 至約500 $\mu\text{g/kg}$ 、約5 $\mu\text{g/kg}$ 至約100 $\mu\text{g/kg}$ 、約5 $\mu\text{g/kg}$ 至約80 $\mu\text{g/kg}$ 、約5 $\mu\text{g/kg}$ 至約70 $\mu\text{g/kg}$ 、約5 $\mu\text{g/kg}$ 至約50 $\mu\text{g/kg}$ 、約5 $\mu\text{g/kg}$ 至約40 $\mu\text{g/kg}$ 或約5 $\mu\text{g/kg}$ 至約30 $\mu\text{g/kg}$ 。在另一實施例中，對於第一劑量遞增順序及第四劑量遞增順序，待投與患者之化合物或其醫藥學上可接受之鹽的量可為約0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至約100 $\mu\text{g/kg}$ 、約0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至約80 $\mu\text{g/kg}$ 、約0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至約70 $\mu\text{g/kg}$ 、約0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至約50 $\mu\text{g/kg}$ 、約0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至約40 $\mu\text{g/kg}$ 、約0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至約30 $\mu\text{g/kg}$ 或約0.3 $\mu\text{g/kg}$ 至約30 $\mu\text{g/kg}$ 、約5 $\mu\text{g/kg}$ 至約100 $\mu\text{g/kg}$ 、約5 $\mu\text{g/kg}$ 至約80 $\mu\text{g/kg}$ 、約5 $\mu\text{g/kg}$ 至約70 $\mu\text{g/kg}$ 、約5 $\mu\text{g/kg}$ 至約50 $\mu\text{g/kg}$ 、約5 $\mu\text{g/kg}$ 至約40 $\mu\text{g/kg}$ 、約5 $\mu\text{g/kg}$ 至約30 $\mu\text{g/kg}$ 或約5 $\mu\text{g/kg}$ 至約2000 $\mu\text{g/kg}$ 或約5 $\mu\text{g/kg}$ 至約1500 $\mu\text{g/kg}$ 或約5 $\mu\text{g/kg}$ 至約1000 $\mu\text{g/kg}$ 或約5 $\mu\text{g/kg}$ 至約500 $\mu\text{g/kg}$ 。在另一實施例中，對於第二劑量遞增順序及第五劑量遞增順序，待投與患者之化合物或其醫藥學上可接受之鹽的量可為約0.3 $\mu\text{g/kg}$ 至約500 $\mu\text{g/kg}$ 、約0.3 $\mu\text{g/kg}$ 至約400 $\mu\text{g/kg}$ 、約0.3 $\mu\text{g/kg}$ 至約300 $\mu\text{g/kg}$ 、約0.3 $\mu\text{g/kg}$ 至約200 $\mu\text{g/kg}$ 、約0.3 $\mu\text{g/kg}$ 至約100 $\mu\text{g/kg}$ 或約0.3 $\mu\text{g/kg}$ 至約90 $\mu\text{g/kg}$ 或約5 $\mu\text{g/kg}$ 至約100 $\mu\text{g/kg}$ 、約5 $\mu\text{g/kg}$ 至約80 $\mu\text{g/kg}$ 、約5 $\mu\text{g/kg}$ 至約70 $\mu\text{g/kg}$ 、約5 $\mu\text{g/kg}$ 至約50 $\mu\text{g/kg}$ 、約5 $\mu\text{g/kg}$ 至約40 $\mu\text{g/kg}$ 、

約5 µg/kg至約30 µg/kg或約5 µg/kg至約2000 µg/kg或約5 µg/kg至約1500 µg/kg或約5 µg/kg至約1000 µg/kg或約5 µg/kg至約500 µg/kg。在又另一實施例中，對於第三劑量遞增順序及第六劑量遞增順序，待投與患者之化合物或其醫藥學上可接受之鹽的量可為0.1 µg/kg至約400 µg/kg、約0.1 µg/kg至約350 µg/kg、約0.1 µg/kg至約300 µg/kg、約0.1 µg/kg至約250 µg/kg、約0.1 µg/kg至約200 µg/kg、約0.1 µg/kg至約150 µg/kg或約0.3 µg/kg至約150 µg/kg或約5 µg/kg至約100 µg/kg、約5 µg/kg至約80 µg/kg、約5 µg/kg至約70 µg/kg、約5 µg/kg至約50 µg/kg、約5 µg/kg至約40 µg/kg、約5 µg/kg至約30 µg/kg或約5 µg/kg至約2000 µg/kg或約5 µg/kg至約1500 µg/kg或約5 µg/kg至約1000 µg/kg或約5 µg/kg至約500 µg/kg。在此等實施例中，「kg」為患者體重之公斤數。

【0350】 在此等實施例中之任一者中，化合物或其醫藥學上可接受之鹽之量的範圍可為基於化合物或其醫藥學上可接受之鹽之「完整劑量」的計算百分比之範圍，其中化合物或其醫藥學上可接受之鹽之「完整劑量」可為約30 µg/kg，且其中百分比為化合物或其醫藥學上可接受之鹽之「完整劑量」的約百分之1至約百分之100 (見圖1中之順序1)、約百分之1至約百分之300 (見圖1中之順序2)及約百分之1至約百分之500 (見圖1中之順序3)。在其他實施例中，以劑量遞增順序投與之化合物或其醫藥學上可接受之鹽的「完整劑量」之百分比可為約百分之1、約百分之2、約百分之3、約百分之4、約百分之5、約百分之6、約百分之7、約百分之8、約百分之9、約百分之10、約百分之20、約百分之30、約百分之40、約百分之50、約百分之60、約百分之70、約百分之80、約百分之90、約百分之100、約百分之200、約百分之300、約百分之400或約百分之500，且投與

量可分別為約0.3 $\mu\text{g/kg}$ 、約3 $\mu\text{g/kg}$ 、約9 $\mu\text{g/kg}$ 、約15 $\mu\text{g/kg}$ 、約30 $\mu\text{g/kg}$ 、約90 $\mu\text{g/kg}$ 或約150 $\mu\text{g/kg}$ ，或百分比可為約百分之17、約百分之333、約百分之1666或約百分之3333，且投與量可分別為約5 $\mu\text{g/kg}$ 、約100 $\mu\text{g/kg}$ 、約500 $\mu\text{g/kg}$ 或約1000 $\mu\text{g/kg}$ 。在此等實施例中，「kg」為患者體重之公斤數。

【0351】 在另一實施例中，以劑量遞增順序投與之化合物或其醫藥學上可接受之鹽的「完整劑量」之百分比可為：對第一劑量遞增順序約百分之1、約百分之2及約百分之20，對第二劑量遞增順序約百分之1、約百分之6及約百分之60，且對第三劑量遞增順序約百分之1、約百分之10及約百分之100，且化合物或其醫藥學上可接受之鹽之「完整劑量」可為500奈莫耳/公斤。在此實施例中，「kg」為患者體重之公斤數。在此實施例中，化合物或其醫藥學上可接受之鹽可在各劑量遞增循環之間在星期一、星期四及隔約6天之星期一投與。

【0352】 在另一實施例中，以劑量遞增順序投與之化合物或其醫藥學上可接受之鹽的「完整劑量」之百分比可為：對第一劑量遞增順序約百分之1、約百分之10及約百分之100，且對第二劑量遞增順序約百分之1、約百分之20及約百分之200，且化合物或其醫藥學上可接受之鹽之「完整劑量」可為500奈莫耳/公斤。在此實施例中，「kg」為患者體重之公斤數。在此實施例中，化合物或其醫藥學上可接受之鹽可在各劑量遞增循環之間在星期一、星期四及隔約6天之星期一投與。

【0353】 在另一實施例中，以劑量遞增順序投與之化合物或其醫藥學上可接受之鹽的「完整劑量」之百分比可為：對第一劑量遞增順序約百分之1、約百分之10及約百分之100，且對第二劑量遞增順序約百分之1、

約百分之10及約百分之100，且化合物或其醫藥學上可接受之鹽之「完整劑量」可為500奈莫耳/公斤。在此實施例中，「kg」為患者體重之公斤數。在此實施例中，化合物或其醫藥學上可接受之鹽可在各劑量遞增循環之間在星期一、星期四及隔約6天之星期一投與。在另一實施例中，化合物或其醫藥學上可接受之鹽可在各劑量遞增循環之間在星期一、星期四及隔約9天之星期一投與。在其他實施例中，劑量遞增可重複一次、兩次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次或十次或任何適當次數。

【0354】 在又另一實施例中，以劑量遞增順序投與之化合物或其醫藥學上可接受之鹽的「完整劑量」之百分比可為：對第一劑量遞增順序約百分之1、約百分之20及約百分之200，且對第二劑量遞增順序約百分之1、約百分之20及約百分之200，且化合物或其醫藥學上可接受之鹽之「完整劑量」可為500奈莫耳/公斤。在此實施例中，「kg」為患者體重之公斤數。在此實施例中，化合物或其醫藥學上可接受之鹽可在各劑量遞增循環之間在星期一、星期四及隔約6天之星期一投與。在其他實施例中，劑量遞增可重複一次、兩次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次或十次或任何適當次數。

【0355】 在另一實施例中，以第一劑量遞增順序或第四劑量遞增順序投與之化合物或其醫藥學上可接受之鹽的「完整劑量」之百分比可為以遞增量之化合物或其醫藥學上可接受之鹽之「完整劑量」(約10 µg/kg至約50 µg/kg、約20 µg/kg至約40 µg/kg、約25 µg/kg至約35 µg/kg或約30 µg/kg)的約百分之1、約百分之10及約百分之100，且所投與化合物或其醫藥學上可接受之鹽的量可分別為約0.3 µg/kg、約3 µg/kg及約30 µg/kg。在又另一實施例中，以第二劑量遞增順序或第五劑量遞增順序投與之化合

物或其醫藥學上可接受之鹽的「完整劑量」之百分比可為以遞增量之化合物或其醫藥學上可接受之鹽之「完整劑量」(約10 µg/kg至約50 µg/kg、約20 µg/kg至約40 µg/kg、約25 µg/kg至約35 µg/kg或約30 µg/kg)的約百分之1、約百分之30及約百分之300，且所投與化合物或其醫藥學上可接受之鹽的量可分別為約0.3 µg/kg、約9 µg/kg及約90 µg/kg。在再另一實施例中，以第三劑量遞增順序或第六劑量遞增順序投與之化合物或其醫藥學上可接受之鹽的「完整劑量」之百分比可為以遞增量之化合物或其醫藥學上可接受之鹽之「完整劑量」(約10 µg/kg至約50 µg/kg、約20 µg/kg至約40 µg/kg、約25 µg/kg至約35 µg/kg或約30 µg/kg)的約百分之1、約百分之50及約百分之500，且所投與化合物或其醫藥學上可接受之鹽的量可分別為約0.3 µg/kg、約15 µg/kg及約150 µg/kg。在此等實施例中，「kg」為患者體重之公斤數。

【0356】 在各種實施例中，待投與患者之量可例如在約0.05 mg至約30 mg、約0.05 mg至約25.0 mg、約0.05 mg至約20.0 mg、約0.05 mg至約15.0 mg、約0.05 mg至約10.0 mg、約0.05 mg至約9.0 mg、約0.05 mg至約8.0 mg、約0.05 mg至約7.0 mg、約0.05 mg至約6.0 mg、約0.05 mg至約5.0 mg、約0.05 mg至約4.0 mg、約0.05 mg至約3.0 mg、約0.05 mg至約2.0 mg、約0.05 mg至約1.0 mg、約0.05 mg至約0.5 mg、約0.05 mg至約0.4 mg、約0.05 mg至約0.3 mg、約0.05 mg至約0.2 mg、約0.05 mg至約0.1 mg、約0.01 mg至約2 mg、約0.3 mg至約10 mg、約0.1 mg至約20 mg或約0.8至約3 mg之範圍內。

【0357】 在其他實施例中，化合物或其醫藥學上可接受之鹽之劑量可在例如約50奈莫耳/公斤患者體重至約3000奈莫耳/公斤患者體重、約50

奈莫耳/公斤患者體重至約2000奈莫耳/公斤患者體重、約50奈莫耳/公斤患者體重至約1000奈莫耳/公斤患者體重、約50奈莫耳/公斤患者體重至約900奈莫耳/公斤患者體重、約50奈莫耳/公斤患者體重至約800奈莫耳/公斤患者體重、約50奈莫耳/公斤患者體重至約700奈莫耳/公斤患者體重、約50奈莫耳/公斤患者體重至約600奈莫耳/公斤患者體重、約50奈莫耳/公斤患者體重至約500奈莫耳/公斤患者體重、約50奈莫耳/公斤患者體重至約400奈莫耳/公斤患者體重、約50奈莫耳/公斤患者體重至約300奈莫耳/公斤患者體重、約50奈莫耳/公斤患者體重至約200奈莫耳/公斤患者體重、約50奈莫耳/公斤患者體重至約100奈莫耳/公斤患者體重、約100奈莫耳/公斤患者體重至約300奈莫耳/公斤患者體重、約100奈莫耳/公斤患者體重至約500奈莫耳/公斤患者體重、約100奈莫耳/公斤患者體重至約1000奈莫耳/公斤患者體重、約100奈莫耳/公斤患者體重至約2000奈莫耳/公斤患者體重之範圍內。在其他實施例中，該劑量可為約1奈莫耳/公斤患者體重、約5奈莫耳/公斤患者體重、約10奈莫耳/公斤患者體重、約20奈莫耳/公斤患者體重、約25奈莫耳/公斤患者體重、約30奈莫耳/公斤患者體重、約40奈莫耳/公斤患者體重、約50奈莫耳/公斤患者體重、約60奈莫耳/公斤患者體重、約70奈莫耳/公斤患者體重、約80奈莫耳/公斤患者體重、約90奈莫耳/公斤患者體重、約100奈莫耳/公斤患者體重、約150奈莫耳/公斤患者體重、約200奈莫耳/公斤患者體重、約250奈莫耳/公斤患者體重、約300奈莫耳/公斤患者體重、約350奈莫耳/公斤患者體重、約400奈莫耳/公斤患者體重、約450奈莫耳/公斤患者體重、約500奈莫耳/公斤患者體重、約600奈莫耳/公斤患者體重、約700奈莫耳/公斤患者體重、約800奈莫耳/公斤患者體重、約900奈莫耳/公斤患者體重、約1000奈莫耳/公斤患

者體重、約2000奈莫耳/公斤患者體重、約2500奈莫耳/公斤患者體重或約3000奈莫耳/公斤患者體重。在又其他實施例中，該劑量可為約0.1奈莫耳/公斤患者體重、約0.2奈莫耳/公斤患者體重、約0.3奈莫耳/公斤患者體重、約0.4奈莫耳/公斤患者體重或約0.5奈莫耳/公斤患者體重、約0.1奈莫耳/公斤患者體重至約1000奈莫耳/公斤患者體重、約0.1奈莫耳/公斤患者體重至約900奈莫耳/公斤患者體重、約0.1奈莫耳/公斤患者體重至約850奈莫耳/公斤患者體重、約0.1奈莫耳/公斤患者體重至約800奈莫耳/公斤患者體重、約0.1奈莫耳/公斤患者體重至約700奈莫耳/公斤患者體重、約0.1奈莫耳/公斤患者體重至約600奈莫耳/公斤患者體重、約0.1奈莫耳/公斤患者體重至約500奈莫耳/公斤患者體重、約0.1奈莫耳/公斤患者體重至約400奈莫耳/公斤患者體重、約0.1奈莫耳/公斤患者體重至約300奈莫耳/公斤患者體重、約0.1奈莫耳/公斤患者體重至約200奈莫耳/公斤患者體重、約0.1奈莫耳/公斤患者體重至約100奈莫耳/公斤患者體重、約0.1奈莫耳/公斤患者體重至約50奈莫耳/公斤患者體重、約0.1奈莫耳/公斤患者體重至約10奈莫耳/公斤患者體重或約0.1奈莫耳/公斤患者體重至約1奈莫耳/公斤患者體重。在其他實施例中，該劑量可為約0.3奈莫耳/公斤患者體重至約1000奈莫耳/公斤患者體重、約0.3奈莫耳/公斤患者體重至約900奈莫耳/公斤患者體重、約0.3奈莫耳/公斤患者體重至約850奈莫耳/公斤患者體重、約0.3奈莫耳/公斤患者體重至約800奈莫耳/公斤患者體重、約0.3奈莫耳/公斤患者體重至約700奈莫耳/公斤患者體重、約0.3奈莫耳/公斤患者體重至約600奈莫耳/公斤患者體重、約0.3奈莫耳/公斤患者體重至約500奈莫耳/公斤患者體重、約0.3奈莫耳/公斤患者體重至約400奈莫耳/公斤患者體重、約0.3奈莫耳/公斤患者體重至約300奈莫耳/公斤患者體重、約0.3奈莫耳/公斤患者體重至約200奈莫耳/公斤患者體重、約0.3奈莫耳/公斤患者體重至約100奈莫耳/公斤患者體重、約0.3奈莫耳/公斤患者體重至約50奈莫耳/公斤患者體重、約0.3奈莫耳/公斤患者體重至約10奈莫耳/公斤患者體重或約0.3奈莫耳/公斤患者體重至約1奈莫耳/公斤患者體重。

耳/公斤患者體重至約200奈莫耳/公斤患者體重、約0.3奈莫耳/公斤患者體重至約100奈莫耳/公斤患者體重、約0.3奈莫耳/公斤患者體重至約50奈莫耳/公斤患者體重、約0.3奈莫耳/公斤患者體重至約10奈莫耳/公斤患者體重或約0.3奈莫耳/公斤患者體重至約1奈莫耳/公斤患者體重。在此等實施例中，「kg」為患者體重之公斤數。

【0358】在另一實施例中，在CAR T細胞之投與(例如以本文中所描述的量中之任一者)之後執行使用化合物(例如其中各劑量遞增步驟為50 nmol/kg且隨後500 nmol/kg)或其醫藥學上可接受之鹽的第一劑量遞增步驟及第二劑量遞增步驟。在此實施例中，在例如第一週及第二週中之第一劑量遞增步驟及第二劑量遞增步驟之後，相對於第二週中所投與之最末劑量，化合物或其醫藥學上可接受之鹽之含量可在第三週保持恆定(例如在500 nmol/kg處保持恆定)。在本文中所描述之任何實施例中，相對於前一週中所投與之最末劑量，化合物或其醫藥學上可接受之鹽之含量可在後一週保持恆定。

【0359】在各種其他實施例中，化合物或其醫藥學上可接受之鹽之劑量可介於例如約10奈莫耳/公斤患者體重至約10000奈莫耳/公斤患者體重、約10奈莫耳/公斤患者體重至約5000奈莫耳/公斤患者體重、約10奈莫耳/公斤患者體重至約3000奈莫耳/公斤患者體重、約10奈莫耳/公斤患者體重至約2500奈莫耳/公斤患者體重、約10奈莫耳/公斤患者體重至約2000奈莫耳/公斤患者體重、約10奈莫耳/公斤患者體重至約1000奈莫耳/公斤患者體重、約10奈莫耳/公斤患者體重至約900奈莫耳/公斤患者體重、約10奈莫耳/公斤患者體重至約800奈莫耳/公斤患者體重、約10奈莫耳/公斤患者體重至約700奈莫耳/公斤患者體重、約10奈莫耳/公斤患者體重至約

600奈莫耳/公斤患者體重、約10奈莫耳/公斤患者體重至約500奈莫耳/公斤患者體重、約10奈莫耳/公斤患者體重至約400奈莫耳/公斤患者體重、約10奈莫耳/公斤患者體重至約300奈莫耳/公斤患者體重、約10奈莫耳/公斤患者體重至約200奈莫耳/公斤患者體重、約10奈莫耳/公斤患者體重至約150奈莫耳/公斤患者體重、約10奈莫耳/公斤患者體重至約100奈莫耳/公斤患者體重、約10奈莫耳/公斤患者體重至約90奈莫耳/公斤患者體重、約10奈莫耳/公斤患者體重至約80奈莫耳/公斤患者體重、約10奈莫耳/公斤患者體重至約70奈莫耳/公斤患者體重、約10奈莫耳/公斤患者體重至約60奈莫耳/公斤患者體重、約10奈莫耳/公斤患者體重至約50奈莫耳/公斤患者體重、約10奈莫耳/公斤患者體重至約40奈莫耳/公斤患者體重、約10奈莫耳/公斤患者體重至約30奈莫耳/公斤患者體重、約10奈莫耳/公斤患者體重至約20奈莫耳/公斤患者體重、約200奈莫耳/公斤患者體重至約900奈莫耳/公斤患者體重、約200奈莫耳/公斤患者體重至約800奈莫耳/公斤患者體重、約200奈莫耳/公斤患者體重至約700奈莫耳/公斤患者體重、約200奈莫耳/公斤患者體重至約600奈莫耳/公斤患者體重、約200奈莫耳/公斤患者體重至約500奈莫耳/公斤患者體重、約250奈莫耳/公斤患者體重至約600奈莫耳/公斤患者體重、約300奈莫耳/公斤患者體重至約600奈莫耳/公斤患者體重、約300奈莫耳/公斤患者體重至約500奈莫耳/公斤患者體重或約400奈莫耳/公斤患者體重至約600奈莫耳/公斤患者體重之範圍內。在此等實施例中，「kg」為患者體重之公斤數。

【0360】 在上文所描述之劑量實施例中之所有中，在任何步驟處以劑量遞增順序投與之化合物或其醫藥學上可接受之鹽的「完整劑量」之百分比可為化合物或其醫藥學上可接受之鹽之「完整劑量」的約百分之1、

約百分之2、約百分之3、約百分之4、約百分之5、約百分之6、約百分之7、約百分之8、約百分之9、約百分之10、約百分之20、約百分之30、約百分之40、約百分之50、約百分之60、約百分之70、約百分之80、約百分之90、約百分之100、約百分之200、約百分之300、約百分之400或約百分之500。化合物或其醫藥學上可接受之鹽之「完整劑量」可為作為以劑量遞增順序投與之劑量描述於前述段落中之化合物或其醫藥學上可接受之鹽的劑量中之任一者。

【0361】在各種其他實施例中，化合物或其醫藥學上可接受之鹽之劑量可介於例如約1奈莫耳/公斤至約10000奈莫耳/公斤、約1奈莫耳/公斤至約5000奈莫耳/公斤、約1奈莫耳/公斤至約3000奈莫耳/公斤、約1奈莫耳/公斤至約2500奈莫耳/公斤、約1奈莫耳/公斤至約2000奈莫耳/公斤、約1奈莫耳/公斤至約1000奈莫耳/公斤、約1奈莫耳/公斤至約900奈莫耳/公斤、約1奈莫耳/公斤至約800奈莫耳/公斤、約1奈莫耳/公斤至約700奈莫耳/公斤、約1奈莫耳/公斤至約600奈莫耳/公斤、約1奈莫耳/公斤至約500奈莫耳/公斤、約1奈莫耳/公斤至約400奈莫耳/公斤、約1奈莫耳/公斤至約300奈莫耳/公斤、約1奈莫耳/公斤至約200奈莫耳/公斤、約1奈莫耳/公斤至約150奈莫耳/公斤、約1奈莫耳/公斤至約100奈莫耳/公斤、約1奈莫耳/公斤至約90奈莫耳/公斤、約1奈莫耳/公斤至約80奈莫耳/公斤、約1奈莫耳/公斤至約70奈莫耳/公斤、約1奈莫耳/公斤至約60奈莫耳/公斤、約1奈莫耳/公斤至約50奈莫耳/公斤、約1奈莫耳/公斤至約40奈莫耳/公斤、約1奈莫耳/公斤至約30奈莫耳/公斤或約1奈莫耳/公斤至約20奈莫耳/公斤之範圍內。

【0362】在另一實施例中，可向患者投與約20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 患者體重至約3

mg/kg患者體重之化合物或其醫藥學上可接受之鹽。在另一態樣中，量可為約0.2 mg/kg患者體重至約0.4 mg/kg患者體重。

【0363】 在上述劑量實施例中之任一者中，可向患者投與化合物或其醫藥學上可接受之鹽的單次劑量或多次劑量。

【0364】 在一個實施例中，連接於靶向部分之小分子配位體可在CAR T細胞組合物之前投與患者。在另一實施例中，連接於靶向部分之小分子配位體可與CAR T細胞組合物同時但在不同調配物中或在相同調配物中投與患者。在又另一實施例中，連接於靶向部分之小分子配位體可在CAR T細胞組合物之後投與患者。

【0365】 在一個說明性態樣中，投與CAR T細胞與連接於靶向部分之小分子之間的時間安排可廣泛地視包括以下各者之因素而變化：所使用CAR T細胞之類型、CAR之結合特異性、靶向部分及小分子配位體之屬性、癌症之屬性、癌症在患者體內之部位、用以向患者投與CAR T細胞及連接於靶向部分之小分子配位體的手段以及患者之健康、年齡及體重。在一個態樣中，連接於靶向部分之小分子配位體可在CAR T細胞之前或之後諸如約3小時、6小時、9小時、12小時、15小時、18小時、21小時、24小時、27小時、30小時、33小時、36小時、39小時、42小時、45小時、48小時或51小時內或約0.5天、1天、1.5天、2天、2.5天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或更多天內投與。

【0366】 在一個實施例中，此項技術中已知之任何適用給藥時程可用於化合物或其醫藥學上可接受之鹽或CAR T細胞組合物之投與。在一個態樣中，為化合物或其醫藥學上可接受之鹽及CAR T細胞組合物選擇之給藥時程可考慮化合物或其醫藥學上可接受之鹽之濃度，及所投與CAR T細

胞之數目，以調節CAR T細胞組合物之細胞毒性及控制CRS。

【0367】 在一個例示性實施例中，第一劑量遞增順序、第二劑量遞增順序、第三劑量遞增順序、第四劑量遞增順序、第五劑量遞增順序、第六劑量遞增順序或任何額外劑量遞增順序可隨後為其間不投與化合物或其醫藥學上可接受之鹽的一段時間。在各種說明性實施例中，不投與化合物或其醫藥學上可接受之鹽的該時間段可為1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天。在另一實施例中，不投與化合物或其醫藥學上可接受之鹽的該時間段可為6天、7天或8天。在又另一實施例中，不投與化合物或其醫藥學上可接受之鹽的該時間段可為7天。

【0368】 在一個態樣中，在第1週期間向患者投與CAR T細胞之第一劑量及CAR T細胞之第二劑量，例如在星期一及星期四投與。在此實施例中，化合物或其醫藥學上可接受之鹽的第一劑量遞增順序可隨後在第2週及第3週期間進行。舉例而言，化合物或其醫藥學上可接受之鹽可在三個單獨日投與，且三個單獨日可為第2週之星期一及星期四以及第3週之星期一(見圖1中之順序1)。在此實施例中，化合物或其醫藥學上可接受之鹽的第二劑量遞增順序可隨後在第4週及第5週期間進行(見圖1中之順序2)。舉例而言，化合物或其醫藥學上可接受之鹽可在三個單獨日投與，且三個單獨日可為第4週之星期一及星期四以及第5週之星期一。在此實施例中，化合物或其醫藥學上可接受之鹽的第三劑量遞增順序可隨後在第6週及第7週期間進行(見圖1中之順序3)。舉例而言，化合物或其醫藥學上可接受之鹽可在三個單獨日投與，且三個單獨日可為第6週之星期一及星期四以及第7週之星期一。在其他實施例中，後續劑量遞增順序可遵循類似順序，或在順序3於「療程2」時結束之後，順序3可重複約7天，且不進行使用化

物或其醫藥學上可接受之鹽的額外治療直至「療程3」開始為止(「療程2」之時長基於圖1中針對「療程1」所示之時間長度)。在一個實施例中，患者可接受四個治療療程。

【0369】 在另一說明性實施例中，提供癌症之治療方法。該方法包含i)向患者投與至少一次劑量之包含CAR T細胞之CAR T細胞組合物，其中CAR T細胞包含引導至靶向部位之CAR；ii)向患者投與化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中該化合物包含藉由連接子連接於靶向部位之小分子配位體且其中以第一劑量遞增順序投與化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中若在第一劑量遞增順序下出現嚴重CRS，則使用較低劑量遞增順序來投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中較低劑量遞增順序中之化合物或其醫藥學上可接受之鹽的第一劑量低於以第一劑量遞增順序投與之化合物或其醫藥學上可接受之鹽的第一劑量。在此實施例中，在較低劑量遞增順序下，在三個單獨日以化合物或其醫藥學上可接受之鹽之完整劑量的約百分之0.5、約百分之5及約百分之50來投與化合物或其醫藥學上可接受之鹽。在此實施例中，化合物或其醫藥學上可接受之鹽之完整劑量可為約10 µg/kg至約50 µg/kg、約20 µg/kg至約40 µg/kg、約25 µg/kg至約35 µg/kg或約30 µg/kg。在此等實施例中，「kg」為患者體重之公斤數。

【0370】 在各種相關實施例中，在使用例如賽托克森(cytosan)、氟達拉賓(fludarabine)及/或依託泊苷(etoposide)向患者投與CAR T細胞組合物之前，淋巴球在患者體內可耗盡，且方法可進一步包含包括但不限於以下各者之額外步驟；向患者投與血小板、向患者投與紅血球濃厚液、向患者投與冷沈澱物、向患者投與靜脈內免疫球蛋白、使用鈣補充劑、酸檸檬酸鹽右旋糖及/或肝素治療及/或為患者提供抗菌劑治療。在一個實施例

中，淋巴耗盡發生在CAR T細胞投與之前至少約24小時。

【0371】 在另一態樣中，方法可包含CRS監測步驟。在一個說明性態樣中，若在第一劑量遞增順序期間於患者體內未觀測到CRS或神經毒性，則該方法可前進至第二劑量遞增順序。若在第二劑量遞增順序期間於患者體內未觀測到CRS或神經毒性，則該方法可前進至第三劑量遞增順序。若在第三劑量遞增順序期間於患者體內未觀測到CRS或神經毒性，則該方法可前進至第四劑量遞增順序。若在第四劑量遞增順序期間於患者體內未觀測到CRS或神經毒性，則該方法可前進至第五劑量遞增順序。若在第五劑量遞增順序期間於患者體內未觀測到CRS或神經毒性，則該方法可前進至第六劑量遞增順序，以此類推。

【0372】 在另一說明性實施例中，若在劑量遞增順序中之任一者期間於患者體內觀測到發熱而無低血壓(亦即非重大CRS)且於患者體內未觀測到神經毒性，則可按導致發熱而無低血壓之劑量遞增順序水準向患者投與化合物或其醫藥學上可接受之鹽的所有後續劑量。在另一態樣中，若在任何劑量遞增順序下於患者體內出現CRS (亦即重大CRS)或神經毒性，則可按低於導致患者體內之重大CRS或神經毒性之劑量遞增順序水準的劑量遞增順序水準來向患者投與化合物或其醫藥學上可接受之鹽的所有後續劑量。

【0373】 在一個態樣中，除≤在治療開始之後持續少於48小時之4級發熱、≤在治療開始之後持續少於24小時之3級發冷、≤在治療開始之後持續少於24小時之3級咳嗽、≤在治療開始之後持續少於7天之3級轉胺酶、≤在治療開始之後持續少於48小時之3級低血壓、≤在治療開始之後持續少於48小時之3級CRS、≤與可藉由苯海拉明(Benadryl)及/或腎上腺素分辨

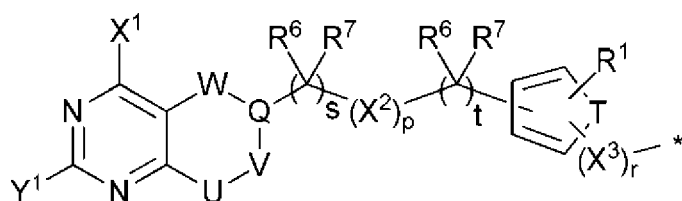
之DMSO相關的3級全身性過敏反應或≤藉由經口或IV麻醉劑治療控制之3級疼痛以外，或另外在CAR T細胞輸注之後約3週出現之包括≤持續多達5天之3級發冷、≤持續多達2週之3級轉胺酶、≤持續多達2週之3級CRS、≤4級淋巴球減少症、≤4級白細胞減少症或≤藉由經口或IV麻醉劑治療控制之持續多達2週之3級疼痛的毒性以外，重大CRS可包括需要使用西妥昔單抗之任何毒性、任何≥3級自身免疫毒性、任何≥3級之可歸因於CAR T細胞投與或化合物或其醫藥學上可接受之鹽之投與且在治療開始之後28天內出現的毒性。

在一個實施例中，為防止或抑制患者體內之CRS，方法可進一步包含向患者投與葉酸、包含葉酸之結合物或抑制CAR T細胞活化之藥物，其中包含葉酸之結合物不包含靶向部分。在此實施例中，任一葉酸、包含葉酸之結合物或抑制CAR T細胞活化之藥物在本文中可稱為「救援藥劑」，其中包含葉酸之結合物不包含靶向部分。在一個實施例中，可投與諸如葉酸之葉酸以預防或抑制患者體內之CRS。在此實施例中，葉酸抑制橋樑(亦即藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體)與腫瘤上橋樑之受體的相互作用，從而抑制腫瘤溶解及防止或抑制患者體內之CRS。

【0374】 在一個實施例中，作為橋樑結合於腫瘤之抑制劑投與的葉酸可為例如葉酸、葉酸類似物或另一葉酸受體結合分子。在各種實施例中，可使用之葉酸之類似物包括亞葉酸、喋醯聚麩胺酸及葉酸受體結合喋啶，諸如四氫喋呤、二氫葉酸、四氫葉酸及其脫氮及二脫氮類似物。術語「脫氮」及「二脫氮」類似物係指碳原子經天然存在之葉酸結構中的一個或兩個氮原子取代之本領域公認的類似物。舉例而言，脫氮類似物包括1-脫氮、3-脫氮、5-脫氮、8-脫氮及10-脫氮類似物。二脫氮類似物包括例

如1,5-二脫氫、5,10-二脫氫、8,10-二脫氫及5,8-二脫氫類似物。前述葉酸類似物習知地稱為「葉酸」，此反映其與葉酸受體結合之能力。其他葉酸受體結合類似物包括胺基喋呤、胺甲喋呤(甲胺喋呤)、N10-甲基葉酸、2-脫胺基-羥基葉酸、脫氫類似物(諸如1-脫氫胺甲喋呤或3-脫氫胺甲喋呤)及3',5'-二氯-4-胺基-4-脫氧-N10-甲基喋醯麩胺酸(二氯甲胺喋呤)。

【0375】 在另一實施例中，作為橋樑結合至腫瘤之抑制劑投與的葉酸具有式



其中X¹及Y¹各自獨立地選自由以下組成之群：鹵基、R²、OR²、SR³及NR⁴R⁵；

U、V及W表示各自獨立地選自由以下組成之群的二價部分：-(R⁶ᵃ)C=、-N=、-(R⁶ᵃ)C(R⁷ᵃ)-及-N(R⁴ᵃ)-；Q選自由以下組成之群：C及CH；T選自由以下組成之群：S、O、N及-C=C-；

X²及X³各自獨立地選自由以下組成之群：氧、硫、-C(Z)-、-C(Z)O-、-OC(Z)-、-N(R⁴ᵇ)-、-C(Z)N(R⁴ᵇ)-、-N(R⁴ᵇ)C(Z)-、-OC(Z)N(R⁴ᵇ)-、-N(R⁴ᵇ)C(Z)O-、-N(R⁴ᵇ)C(Z)N(R⁵ᵇ)-、-S(O)-、-S(O)₂-、-N(R⁴ᵃ)S(O)₂-、-C(R⁶ᵇ)(R⁷ᵇ)-、-N(C≡CH)-、-N(CH₂C≡CH)-、C₁-C₁₂伸烷基及C₁-C₁₂伸烷氧基，其中Z為氧或硫；

R¹選自由以下組成之群：氫、鹵基、C₁-C₁₂烷基及C₁-C₁₂烷氧基；

R²、R³、R⁴、R⁴ᵃ、R⁴ᵇ、R⁵、R⁵ᵇ、R⁶ᵇ及R⁷ᵇ各自獨立地選自由以下組成之群：氫、鹵基、C₁-C₁₂烷基、C₁-C₁₂烷氧基、C₁-C₁₂烷醯基、C₁-

C₁₂烯基、C₁-C₁₂炔基、(C₁-C₁₂烷氧基)羰基及(C₁-C₁₂烷胺基)羰基；

R⁶及R⁷各自獨立地選自由以下組成之群：氫、鹵基、C₁-C₁₂烷基及C₁-C₁₂烷氧基；或R⁶及R⁷一起形成羰基；

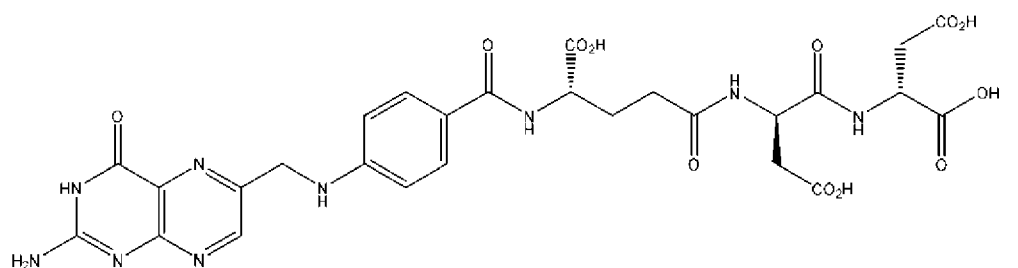
R^{6a}及R^{7a}各自獨立地選自由以下組成之群：氫、鹵基、C₁-C₁₂烷基及C₁-C₁₂烷氧基；或R^{6a}與R^{7a}一起形成羰基；

p、r、s及t各自獨立地為0或1；且

若任何其他化學部分為該葉酸之部分，則*表示與該結合物之其餘部分的視情況存在之共價鍵。

【0376】 在又另一實施例中，可投與包含葉酸之結合物以預防或抑制患者體內之細胞介素釋放症候群(CRS)。CRS可對患者產生有害影響，包括但不限於體重減輕、高熱、肺水腫及血壓危險地下降。

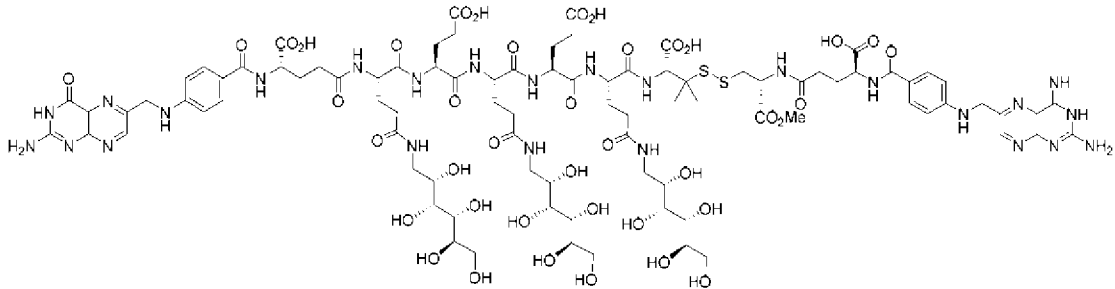
【0377】 在此實施例中，包含葉酸之結合物不包含靶向部分，且因此，結合物抑制橋樑與腫瘤之相互作用以預防腫瘤溶解及減少患者體內之CRS。在此實施例中，包含葉酸之結合物中之葉酸部分可包含連接於不包含靶向部分之化學部分的前述段落中所描述之任一葉酸。在一個態樣中，包含葉酸之結合物可包含連接於不包含靶向部分之一或多個胺基酸的葉酸。說明性地，包含葉酸之結合物可具有式



【0378】 此化合物亦可稱為「EC923」。在此等實施例中，可向患者投與葉酸或包含葉酸之結合物，相對於橋樑(亦即藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體)莫耳過量，諸如葉酸或包含葉酸之結合物相對於藉

由連接子連接於靶向部分之小分子配位體過量10倍、過量100倍、過量200倍、過量300倍、過量400倍、過量500倍、過量600倍、過量700倍、過量800倍、過量900倍、過量1000倍或過量10,000倍。相對於藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體的量，抑制橋樑與腫瘤之相互作用所需要的葉酸或包含葉酸之結合物的量可藉由熟習此項技術者來確定。

【0379】 在另一實施例中，可向患者投與抑制CAR T細胞活化之藥劑來抑制CAR T細胞活化及抑制或預防患者體內之CRS。在一個態樣中，藥劑可選自由以下組成之群：淋巴球特異性蛋白質酪胺酸激酶抑制劑(例如達沙替尼(Dasatinib)、PI3激酶抑制劑(例如GDC0980)、托西路單抗(Tocilizumab)、IL-2誘導性T細胞激酶之抑制劑(例如BMS-509744)、JAK抑制劑、BTK抑制劑、SIP促效劑(例如西普尼莫德(Siponimod)及奧紫尼莫(Ozanimod))及阻斷CAR T細胞結合至橋樑但不結合癌症之藥劑(例如螢光素胺、FITC或螢光素鈉)。熟習此項技術者應瞭解，在生理條件下或例如在緩衝液中在生理pH下，FITC (亦即螢光素)可呈鹽(例如螢光素鈉)形式或呈其非鹽形式。因此，在一個實施例中，在將螢光素投與患者時，其可處於其鹽形式(例如螢光素鈉)與其非鹽形式之間的平衡中。在另一實施例中，抑制CAR T細胞活化之救援藥劑可為下式化合物：



【0380】此化合物亦可稱為「EC2319」。

【0381】 在各種實施例中，救援藥劑可以約0.001 nM至約100 mM、約0.01 nM至約100 mM、約1 nM至約100 mM、約10 nM至約100

mM、約50 nM至約100 mM或約100 nM至約100 mM之濃度呈包括(例如) 0.1 ml、0.2 ml、0.3 ml、0.4 ml、0.5 ml、0.6 ml、0.7 ml、0.8 ml、0.9 ml、1 ml、2 ml、3 ml、4 ml、5 ml、10 ml、100 ml或1000 ml之任何適當體積投與。在其他實施例中，救援藥劑可以約0.01至約300微莫耳/公斤患者體重、約0.06至約100微莫耳/公斤患者體重、約0.06至約90微莫耳/公斤患者體重、約0.06至約80微莫耳/公斤患者體重、約0.06至約70微莫耳/公斤患者體重、約0.06至約60微莫耳/公斤患者體重、約0.06至約50微莫耳/公斤患者體重、約0.06至約40微莫耳/公斤患者體重、約0.06至約30微莫耳/公斤患者體重、約0.06至約20微莫耳/公斤患者體重、約0.06至約10微莫耳/公斤患者體重、約0.06至約8微莫耳/公斤患者體重或約0.06至約6微莫耳/公斤患者體重之劑量投與。

【0382】 在此等實施例中，可向患者投與救援藥劑，相對於化合物或其醫藥學上可接受之鹽(亦即藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體)莫耳過量，諸如救援藥劑相對於藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體約10倍過量、約20倍過量、約30倍過量、約40倍過量、約50倍過量、約60倍過量、約70倍過量、約80倍過量、約90倍過量、約100倍過量、約200倍過量、約300倍過量、約400倍過量、約500倍過量、約600倍過量、約700倍過量、約800倍過量、約900倍過量、約1000倍過量或約10,000倍過量。相對於藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體的量，抑制化合物或其醫藥學上可接受之鹽與腫瘤及/或CAR T細胞的相互作用所需要之救援藥劑的量可藉由熟習此項技術者來確定。

【0383】 在另一實施例中，可向患者投與超過一次劑量之葉酸、包含葉酸之結合物或抑制CAR T細胞活化之藥劑，其中包含葉酸之結合物不

包含靶向部分。

【0384】 在本文中所描述之「救援藥劑」實施例中，葉酸、包含葉酸之結合物或抑制CAR T細胞活化之藥劑可在化合物或其醫藥學上可接受之鹽之前及/或之後投與患者，其中包含葉酸之結合物不包含靶向部分。在另一態樣中，可在投與葉酸、包含葉酸之結合物或抑制CAR T細胞活化之藥劑之前及之後投與化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中包含葉酸之結合物不包含靶向部分。在此實施例中，化合物或其醫藥學上可接受之鹽之後一投與可導致患者體內之CAR T細胞活化及細胞介素含量增加。

【0385】 在另一實施例中，投與葉酸、包含葉酸之結合物或抑制CAR T細胞活化之藥劑可引起患者中細胞介素含量降低，其中包含葉酸之該結合物不包含靶向部分。在另一實施例中，細胞介素含量降低為降低至約未經治療之患者中之細胞介素含量。在其他實施例中，當CRS級別達到1、2、3或4時或當CRS級別達到3或4時向患者投與抑制CAR T細胞活化之藥劑。

【0386】 在本文中描述之葉酸為藉由連接子連接於靶向部分之配位體的實施例中之任一者中，在用本文中所描述的方法治療之前可為患者規定葉酸缺失型飲食，或患者可在飲食中投與葉酸。在患者經投與葉酸之實施例中，劑量可例如介於約50 nmol/kg患者體重至約3000 nmol/kg患者體重、約50 nmol/kg患者體重至約2000 nmol/kg患者體重、約50 nmol/kg患者體重至約1000 nmol/kg患者體重、約50 nmol/kg患者體重至約900 nmol/kg患者體重、約50 nmol/kg患者體重至約800 nmol/kg患者體重、約50 nmol/kg患者體重至約700 nmol/kg患者體重、約50 nmol/kg患者體重至約600 nmol/kg患者體重、約50 nmol/kg患者體重至約500 nmol/kg患者

體重、約50 nmol/kg患者體重至約400 nmol/kg患者體重、約50 nmol/kg患者體重至約300 nmol/kg患者體重、約50 nmol/kg患者體重至約200 nmol/kg患者體重、約50 nmol/kg患者體重至約100 nmol/kg患者體重、約100 nmol/kg患者體重至約300 nmol/kg患者體重、約100 nmol/kg患者體重至約500 nmol/kg患者體重、約100 nmol/kg患者體重至約1000 nmol/kg患者體重、約100 nmol/kg患者體重至約2000 nmol/kg患者體重之範圍。在其他實施例中，劑量可為約100 nmol/kg、約150 nmol/kg、約200 nmol/kg、約250 nmol/kg、約300 nmol/kg、約350 nmol/kg、約400 nmol/kg、約450 nmol/kg、約500 nmol/kg、約600 nmol/kg、約700 nmol/kg、約800 nmol/kg、約900 nmol/kg、約1000 nmol/kg、約2000 nmol/kg或約3000 nmol/kg患者體重。在此等實施例中，「kg」為患者體重之公斤數。在一個態樣中，可例如每日、每週、兩週一次、一週三次或使用葉酸之投與的任何適合之方案投與葉酸。

【0387】在本文中所描述之各種實施例中，CAR T細胞可在CAR T細胞投與後長至約10天、長至約15天、長至約20天、長至約25天、長至約30天、長至約35天、長至約40天、長至約45天、長至約50天、長至約55天、長至約60天、長至約65天、長至約70天、長至約75天或長至約80天保持循環CAR T細胞之數量增加。

【0388】在本文中所描述之各種實施例中，化合物或其醫藥學上可接受之鹽的半最大有效濃度(EC₅₀)可為約1 pM至約2 nM、約1 pM至約5 nM、約1 pM至約10 nM、約1 pM至約20 nM、約1 pM至約30 nM、約1 pM至約40 nM、約1 pM至約50 nM、約1 pM至約60 nM、約1 pM至約70 nM、約1 pM至約80 nM、約1 pM至約90 nM、約1 pM至約100 nM、約1

pM至約200 nM、約1 pM至約300 nM、約1 pM至約400 nM、約1 pM至約500 nM、約1 pM至約600 nM、約1 pM至約700 nM、約1 pM至約800 nM、約1 pM至約900 nM、約1 pM至約1 nM、約1 pM至約900 pM、約1 pM至約800 pM、約1 pM至約700 pM、約1 pM至約600 pM、約1 pM至約500 pM、約1 pM至約400 pM、約1 pM至約300 pM、約1 pM至約200 pM、約1 pM至約100 pM、約1 pM至約90 pM、約1 pM至約80 pM、約1 pM至約70 pM、約1 pM至約60 pM、約1 pM至約50 pM、約1 pM至約40 pM、約1 pM至約30 pM、約1 pM至約20 pM、約1 pM至約10 pM或約1 pM至約5 pM。

【0389】 在本文中所描述的各種實施例中，化合物或其醫藥學上可接受之鹽與CAR T細胞之結合的K_d可為約1 nM至約100 nM、約1 nM至約200 nM、約1 nM至約300 nM、約1 nM至約400 nM、約1 nM至約500 nM、約1 nM至約600 nM、約1 nM至約700 nM、約1 nM至約800 nM、約1 nM至約900 nM、約100 nM至約500 nM、約100 nM至約400 nM、約100 nM至約300 nM、約100 nM至約200 nM、約100 nM至約150 nM或約130 nM。

【0390】 在本文中所描述之各種實施例中，可使用經EGFRt分選或未分選之CAR T細胞。在另一實施例中，可使用具有低分化特徵之「臨床傳真」批量之CAR T細胞。在另一實施例中，可使用「研究批量」之CAR T細胞。「臨床傳真」批量(約39% EGFRt+)可包含呈約66% T_{SCM}及約32% T_{CM}之CD4⁺亞組及呈約95% T_{SCM}及約3% T_{CM}的CD8亞組。研究批量(約23% EGFRt+)可包含呈約32% T_{SCM}、約53% T_{CM}、約11% T_{EM}及約3.7% T_{EFF}之CD4亞組及呈約44% T_{SCM}、約0.28% T_{CM}、約3.4% T_{EM}及約

52% T_{EFF}的CD8亞組。

【0391】 在本文中所描述之各種說明性實施例中，可首先在CAR T細胞之前或之後約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9或約10天或在CAR T細胞之前或之後的任一適當天時向患者投與化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

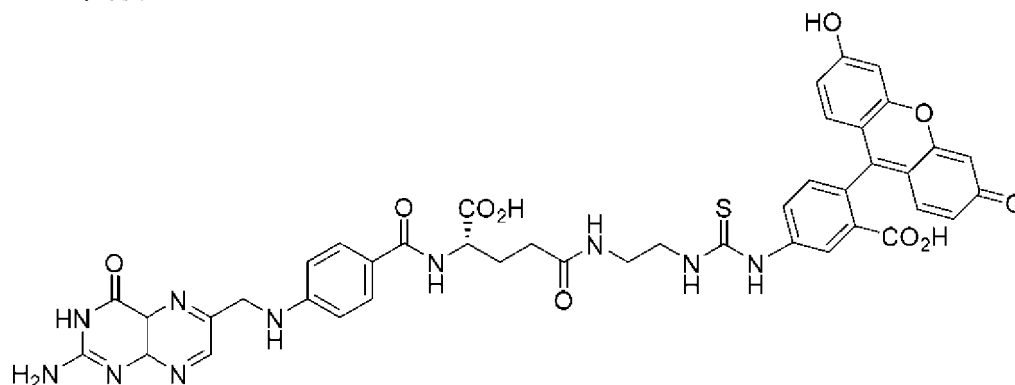
【0392】 在本文中所描述之方法之一個實施例中，在向患者投與化合物或其醫藥學上可接受之鹽之前或在向患者投與CAR T細胞組合物之前使癌症成像。在一個說明性實施例中，成像藉由PET成像進行。在其他說明性實施例中，成像藉由MRI成像或SPECT/CT成像進行。成像方法可為此項技術中已知之任何適合之成像方法。在一個實施例中，成像方法可涉及本文中所描述之但連接於適用於本文中所描述之成像類型之成像劑以判定患者之葉酸受體表現是否為陽性的小分子配位體之用途。在另一實施例中，可出於此目的使用免疫組織化學分析。

【0393】 在本文中所描述之實施例中之任一者中，即使出現針對癌症之CAR T細胞毒性，在患者中亦可能不會出現產生脫靶毒性的細胞介素釋放。在本文中所描述之任何實施例中，即使出現針對癌症之CAR T細胞毒性，在患者中亦可能不會出現脫靶組織毒性。在本文中所描述之任何實施例中，癌症可包含腫瘤，且即使未出現脫靶毒性，患者中腫瘤大小亦可減小。在本文中所描述之實施例中之任一者中，可減少或預防CRS且方法可引起患者中腫瘤體積減小。在本文中所描述之任何實施例中，可減小或預防歸因於CRS及CAR T細胞耗竭之體重減輕。在本文中所描述之任何實施例中，癌症可包含腫瘤且可獲得腫瘤之完全反應。

【0394】

實例1

合成FITC-葉酸

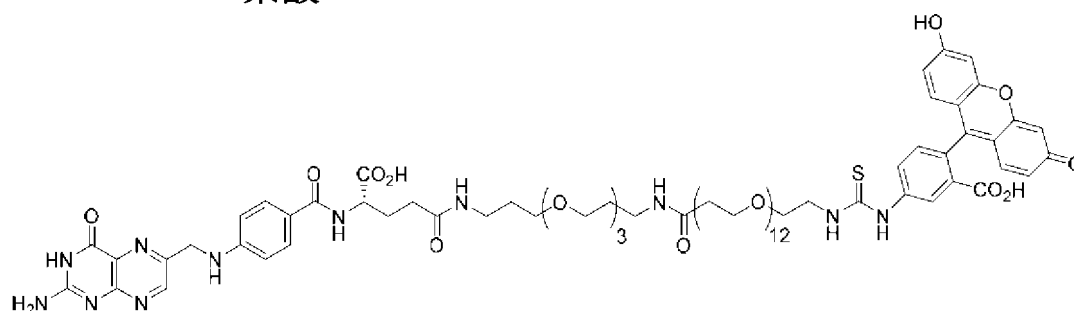


在無水二甲亞砜(DMF)中，在四甲基胍及二異丙胺存在之情況下，使葉酸- γ -乙二胺與螢光異硫氰酸鹽(FITC)異構體I (Sigma-Aldrich)偶合。將粗產物載入於Xterra RP18製備型HPLC管柱(Waters)上且用以99% 5 mM磷酸鈉(移動相A，pH 7.4)及1%乙腈(移動相B)開始且在20 mL/min之流動速率下在10 min內達至90% A及10% B之梯度條件溶離。在此等條件下，FITC-葉酸主峰通常在27-50 min溶離。FITC-葉酸溶離份之品質藉由分析型逆相HPLC與UV偵測器監測。將純度超過98.0% (LCMS)之溶離份凍乾以獲得最終FITC-葉酸產物。如此項技術中已知，具有此結構之化合物亦稱為EC17。

【0395】

實例2

合成FITC-PEG12-葉酸



將Universal聚乙二醇(PEG) Nova Tag™樹脂(0.2 g)裝入肽合成容器

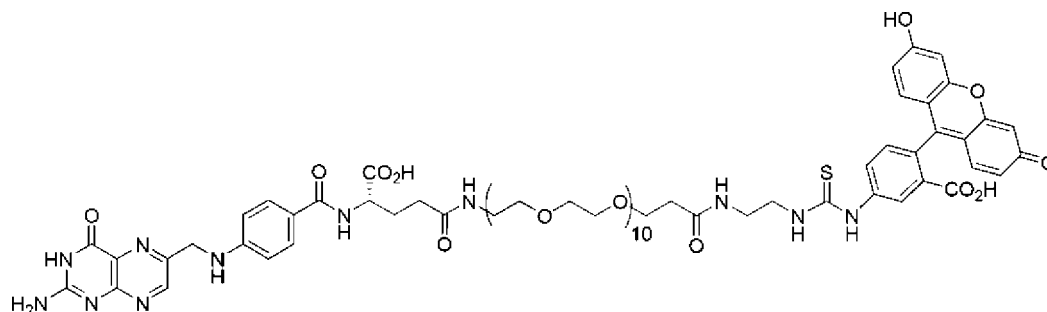
第 95 頁(發明說明書)

中且用異丙醇(*i*-PrOH) (3×10 mL)及二甲基甲醯胺(DMF, 3×10 mL)洗滌。9-使用含20%哌啶之DMF (3×10 mL)實施茚基甲氧基羰基(Fmoc)去除保護基。進行Kaiser測試以評估反應進展。隨後向容器引入Fmoc-L-麩胺酸5-第三丁酯(Fmoc-Glu-(O-*t*-Bu)-OH) (23.5 mg)於DMF、*N,N*-二異丙基乙胺(*i*-Pr₂NEt) (4當量)及六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯啶基鎂(PyBOP) (2當量)中之溶液。使用含20%哌啶之DMF (3×10 mL)實施Fmoc去除保護基。隨後向容器引入N¹⁰-TFA-Pte-OH (22.5 mg)、DMF、*i*-Pr₂NEt (4當量)及PyBOP (2當量)之溶液。氬氣軋泡2 h，且用DMF (3×3 mL)及*i*-PrOH (3×3 mL)洗滌樹脂。樹脂在二氯甲烷(DCM)中溶脹之後，添加1M羥基苯并三唑(HOBT)於DCM/三氟乙烷(TFE) (1:1) (2×3 mL)中之溶液。氬氣軋泡1 h，移除溶劑，且用DMF (3×3 mL)及*i*-PrOH (3×3 mL)洗滌樹脂。樹脂在DMF中溶脹之後，添加Fmoc-NH-(PEG)₁₂-COOH (46.3 mg)於DMF、*i*-Pr₂NEt (4當量)及PyBOP (2當量)中之溶液。氬氣軋泡2 h，且用DMF (3×3 mL)及*i*-PrOH (3×3 mL)洗滌樹脂。使用含20%哌啶之DMF (3×10 mL)實施Fmoc去除保護基。進行Kaiser測試以評估反應進展。隨後向容器引入FITC (Life Technologies 21.4 mg)於DMF及*i*-Pr₂NEt (4當量)中之溶液，隨後氬氣軋泡2 h，且用DMF (3×3 mL)及*i*-PrOH (3×3 mL)洗滌樹脂。隨後向容器添加含2% NH₂NH₂之DMF (2×2 mL)。使用TFA:H₂O:三異丙基矽烷(TIS) (95:2.5:2.5) (裂解溶液)自樹脂裂解最終化合物且在真空下濃縮。經濃縮之產物在Et₂O中沈澱，且在真空下乾燥。使用製備型RP-HPLC (移動相：A = 10 mM乙酸銨 pH = 7，B = ACN；方法：在13 mL/min下在30分鐘內0% B至30% B)純化粗產物。將純溶離份彙集且凍乾，得到FITC-PEG12-葉酸。

【0396】

實例3

合成FITC-PEG20-葉酸



將乙二胺、聚合物結合(200-400目)樹脂(50 mg)裝入肽合成容器中且用DCM (3 mL)、隨後DMF (3 mL)溶脹。隨後向容器引入含Fmoc-PEG₂₀-COOH溶液(131 mg, 1.0當量)之DMF、*i*-Pr₂NEt (6.0當量)及PyBOP (4.0當量)。氬氣軋泡6 h, 排出偶合溶液, 且用DMF (3 × 10 mL)及*i*-PrOH (3 × 10 mL)洗滌樹脂。進行Kaiser測試以評估反應進展。在各胺基酸偶合之前, 使用含20%哌啶之DMF (3 × 10 mL)實施Fmoc去除保護基。重複以上順序, 以完成具有Fmoc-Glu-OtBu (72 mg, 2.0當量)及Tfa.喋酸(41 mg, 1.2當量)偶合步驟之反應。將樹脂用含2%胍之DMF 3 × 10 mL (5 min)洗滌以裂解喋酸上之三氟-乙醯基保護基, 且先後用*i*-PrOH (3 × 10 mL)及DMF (3 × 10 mL)洗滌。樹脂在氬氣下乾燥30 min。使用裂解溶液使葉酸-肽自樹脂裂解。引入10 mL裂解混合物且氬氣軋泡1.5 h。裂解混合物排出至乾淨燒瓶中。將樹脂用更多裂解混合物洗滌3次。將合併之混合物減壓濃縮成較小體積(約5 mL)且在乙醚中沈澱。

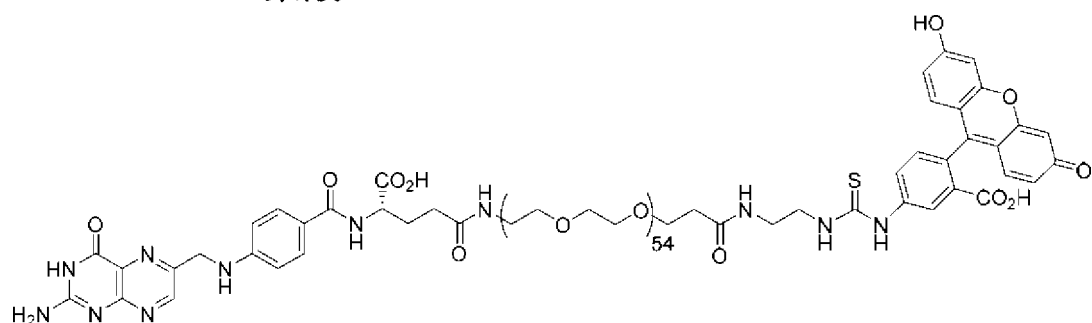
【0397】 沈澱物藉由離心收集, 用乙醚洗滌(3次)且在高真空下乾燥。在室溫下將經乾燥之葉酸-PEG₂₀-EDA (1.0當量)用含FITC (50 mg, 1.5當量)之DMSO及DIPEA處理。藉由LCMS監測反應之進展。在8 h之

後，起始物質耗盡，得到產物。藉由製備型HPLC (移動相A = 10 mM乙酸銨，pH = 7；有機相B = 乙腈；方法：在13 mL/min下，35分鐘內0% B至30% B)純化粗反應混合物且得到FITC-PEG20-葉酸，產率60%。

【0398】

實例4

合成FITC-PEG108-葉酸



將乙二胺、聚合物結合(200-400目)樹脂(50 mg)裝於肽合成容器中且用DCM (3 mL)、隨後DMF (3 mL)溶脹。隨後向容器引入含Fmoc-PEG₃₆-COOH溶液(161 mg，1.0當量)之DMF、*i*-Pr₂NEt (6.0當量)及PyBOP (4.0當量)。氬氣軋泡6 h，排出偶合溶液，且用DMF (3 × 10 mL)及*i*-PrOH (3 × 10 mL)洗滌樹脂。進行Kaiser測試以評估反應進展。在各胺基酸偶合之前，使用含20%哌啶之DMF (3 × 10 mL)實施Fmoc去除保護基。重複以上順序，以完成具有2X Fmoc-PEG₃₆-COOH (161 mg，1.0當量)、Fmoc-Glu-OtBu (72 mg，2.0當量)及Tfa.喋酸(41.0 mg，1.2當量)偶合步驟之反應。結束時，將樹脂用含2%胍之DMF 3 × 10 mL (5 min)洗滌以裂解喋酸上之三氟-乙醯基保護基，且先後用*i*-PrOH (3 × 10 mL)及DMF (3 × 10 mL)洗滌。樹脂在氬氣下乾燥30 min。使用裂解溶液使葉酸-肽自樹脂裂解。引入10 mL裂解混合物且氬氣軋泡1.5 h。裂解混合物排出至乾淨燒瓶中。將樹脂用更多裂解溶液洗滌3次。將合併之混合物減壓濃縮成較小體

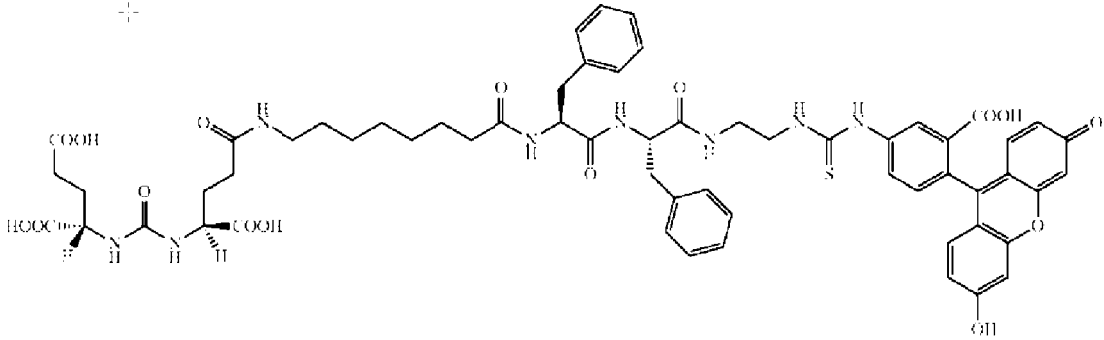
積(約5 mL)且在乙醚中沈澱。

【0399】 沈澱物藉由離心收集，用乙醚洗滌(3次)且在高真空下乾燥。在室溫下將經乾燥之葉酸-PEG₁₀₈-EDA (1.0當量)用含FITC (50 mg，1.5當量)之DMSO及DIPEA處理。藉由LCMS監測反應進展。在10 h之後，起始物質耗盡，得到產物。藉由製備型HPLC (移動相A = 10 mM乙酸銨，pH = 7；有機相B = 乙腈；方法：在13 mL/min下，35分鐘內0% B至30% B)純化粗反應混合物且得到FITC-PEG108-葉酸，產率64%。

【0400】

實例5

合成FITC-DUPA



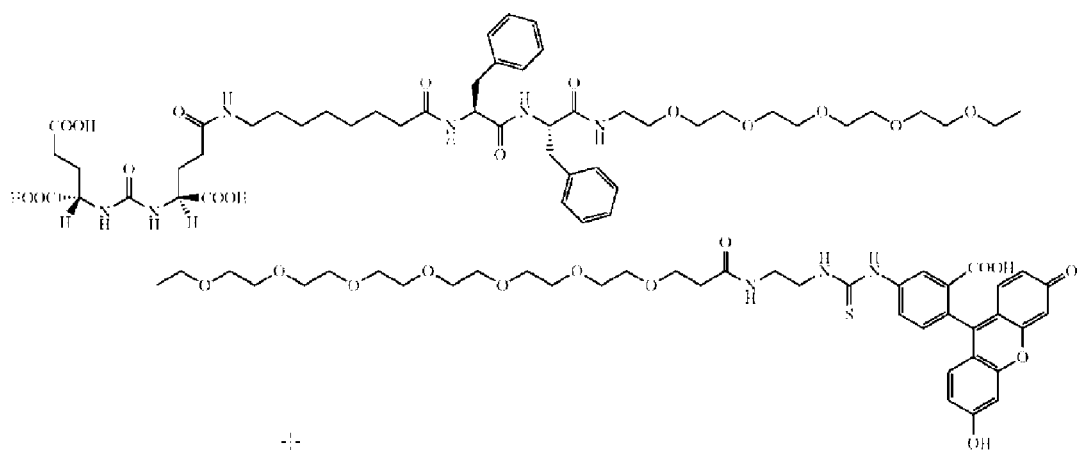
藉由如下固相方法合成DUPA-FITC。Universal Nova TagTM樹脂(50 mg，0.53 mM)用DCM (3 mL)、隨後DMF (3 mL)溶脹。將20%哌啶於DMF (3 × 3 mL)中之溶液添加至樹脂，且氬氣軋泡5 min。用DMF (3 × 3 mL)及異丙醇 (*i*-PrOH，3 × 3 mL)洗滌樹脂。樹脂在DMF中溶脹之後，添加DUPA-(OtBu)-OH (1.5當量)、HATU (2.5當量)及*i*-Pr₂NEt (4.0當量)於DMF中之溶液。氬氣軋泡2 h，且用DMF (3 × 3 mL)及*i*-PrOH (3 × 3 mL)洗滌樹脂。樹脂在DCM中溶脹之後，添加1 M HOBt於DCM/TFE (1:1) (2 × 3 mL)中之溶液。氬氣軋泡1 h，移除溶劑且用DMF (3 × 3 mL)及*i*-PrOH (3 × 3 mL)洗滌樹脂。樹脂在DMF中溶脹之後，添加Fmoc-

Phe-OH (2.5當量)、HATU (2.5當量)及DIPEA (4.0當量)於DMF中之溶液。氬氣軋泡2 h，且用DMF (3 × 3 mL)及*i*-PrOH (3 × 3 mL)洗滌樹脂。重複以上順序進行另外2個偶合步驟，以添加8-胺基辛酸及螢光異硫氰酸鹽或若丹明B異硫氰酸鹽。使用裂解溶液使最終化合物自樹脂裂解且在真空下濃縮。濃縮產物在乙醚中沈澱，且在真空下乾燥。使用製備型RP-HPLC [λ = 488 nm；溶劑梯度：25分鐘內1% B至80% B，80% B洗滌30分鐘操作；A = 10 mM NH₄OAc，pH = 7；B = 乙腈(ACN)]純化粗產物。在真空下移除ACN，且凍乾經純化溶離份，以產生呈淡褐色-橙色固體狀之FITC-DUPA。RP-HPLC：tR = 8.0 min (A = 10 mM NH₄OAc，pH = 7.0；B = ACN，溶劑梯度：10分鐘內1% B至50% B，80% B洗滌15分鐘操作)。¹H NMR (DMSO-d₆/D₂O): δ 0.98-1.27 (ms, 9H); 1.45 (b, 3H); 1.68-1.85 (ms, 11H); 2.03 (m, 8H); 2.6-3.44 (ms, 12H); 3.82 (b, 2H); 4.35 (m, 1H); 6.53 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 6.61 (dd, J = 5.3, 3.5 Hz, 2H); 6.64 (s, 2H); 7.05 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.19 (m, 5H); 7.76 (d, J = 8.0 Hz, 1H); 8.38 (s, 1H)。HRMS (ESI) (m/z)：C₅₁H₅₉N₇O₁₅S之(M + H)⁺計算值，1040.3712，實驗值，1040.3702。UV/vis： λ 最大值= 491 nm。

【0401】

實例6

合成FITC-PEG12-DUPA

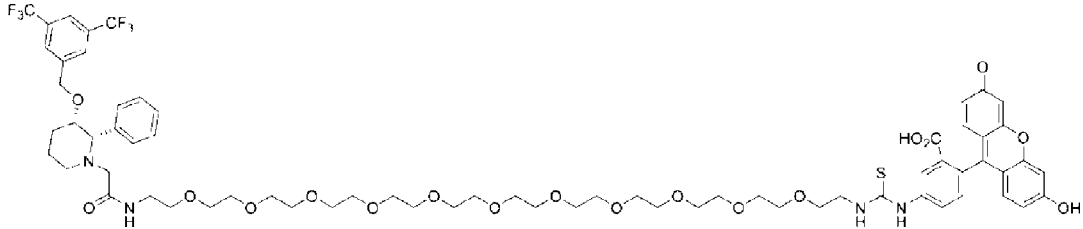


將1,2-二胺基乙烷三苯甲基-樹脂(0.025 g)裝入至肽合成容器且先後用*i*-PrOH (3 × 10 mL)及DMF (3 × 10 mL)洗滌。隨後向容器引入Fmoc-NH-(PEG)₁₂-COOH (42.8 mg)於DMF、*i*-Pr₂NEt (2.5當量)及PyBOP (2.5當量)之溶液。將所得溶液用Ar軋泡1 h，排出偶合溶液，且用DMF (3 × 10 mL)及*i*-PrOH (3 × 10 mL)洗滌樹脂。進行Kaiser測試以評估反應進展。使用含20%哌啶之DMF (3 × 10 mL)實施Fmoc去除保護基。重複此程序以完成所有偶合步驟(2 × 1.5當量Fmoc-Phe-OH及1.5當量8-胺基辛酸及1.2當量DUPA用於其對應偶合步驟中之每一者)。DUPA偶合之後，將樹脂用DMF (3 × 10 mL)及*i*-PrOH (3 × 10 mL)洗滌且在減壓下乾燥。在肽合成容器中，使用裂解溶液，使肽自樹脂裂解。將15 mL裂解溶液添加至肽合成容器中，且在Ar下軋泡反應15 min。將樹脂用兩個額外10 mL量之裂解溶液處理，各5 min。將裂解混合物濃縮至約5 mL且用乙醚沈澱。沈澱物藉由離心收集，用乙醚洗滌(3次)，且在高真空下乾燥，回收粗物質。在室溫下向粗制DUPA-(PEG)₁₂-EDA (10 mg)及FITC (5.6 mg)於二甲亞砜(DMSO，1 mL)中之攪拌溶液中添加*i*-Pr₂NEt (5當量)且在氬氣下攪拌6 h。反應藉由LCMS監測且藉由製備型HPLC (移動相：A = 10 mM乙酸銨pH = 7，B = ACN；方法：在13 mL/min下30分鐘內0% B至50% B)純化。將經純化溶離份彙集且凍乾，得到FITC-PEG12-DUPA。

【0402】

實例7

合成FITC-PEG11-NK1



在室溫下在氬氣下向NK-1 (0.02 g, 0.0433 mmol, 1.0當量)、*O*-(2-胺基乙基)-*O'*-[2-(Boc-胺基)乙基]癸乙二醇(BocNH-PEG₁₁-NH₂) (Sigma, 0.0336 g, 0.0521 mmol, 1.2當量)、六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯啶基磷(PyBOP) (0.027 g, 0.0521 mmol, 1.2當量)於無水CH₂Cl₂中之攪拌溶液中添加*N,N*-二異丙基乙胺(DIPEA) (0.076 mL, 0.4338 mmol, 10當量)。反應進展藉由LCMS監測且藉由製備型RP-HPLC (Waters, XBridge™ Prep C18, 5 μm; 19 × 100 mm管柱, 移動相A = 20 mM乙酸銨緩衝液, pH 7, B = 乙腈, 梯度30分鐘內10-100% B, 13 mL/min, λ = 220 nm, 254 nm)純化。收集純溶離份, 蒸發所有有機溶劑, 且樣品凍乾48小時, 得到NK1-PEG₁₁-NHBoc。產率: 40.13 mg (97%)。向於無水DCM中之NK1-PEG₁₁-NHBoc (0.0165 g, 0.015 mmol)添加三氟乙酸(TFA, 20當量), 且在室溫下攪拌反應混合物4 h。移除過量TFA, 且將剩餘溶液用水稀釋且使用CH₂Cl₂ (3 × 5 mL)萃取。經合併之有機層用鹽水洗滌、經(Na₂SO₄)乾燥且濃縮。所得殘餘物在真空下乾燥且未經進一步純化即用於下一步驟。在室溫下在氬氣下將NK1-PEG₁₁-NH₂ (0.008 g, 0.0081 mmol, 1.0當量)、螢光異硫氰酸鹽(FITC) (Sigma, 0.0037 g, 0.0097 mmol, 1.2當量)於無水二甲亞砜(DMSO, 0.3 mL)中之

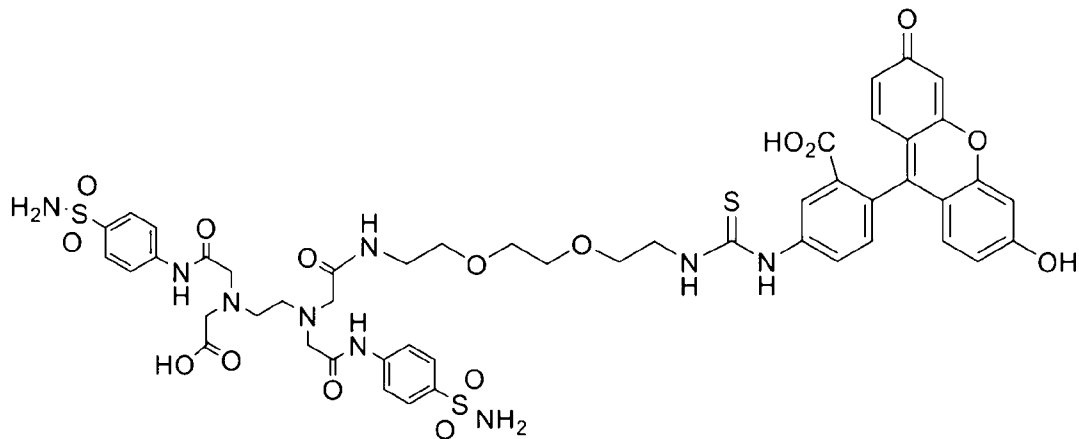
攪拌溶液添加至二異丙基乙胺(0.0028 mL, 0.0162 mmol, 2.0當量)。反應進展藉由LCMS監測且產物藉由製備型RP-HPLC (Waters, XBridgeTM Prep C18, 5 μ m; 19 $\times$ 100 mm管柱, 移動相A = 20 mM乙酸銨緩衝液, pH 7, B = 乙腈, 梯度30分鐘內10-100% B, 13 mL/min, λ = 280 nm)純化。收集純溶離份, 蒸發所有有機溶劑, 且樣品凍乾48 h, 得到FITC-PEG11-NK1, 產率為8.54 mg (77%)。

【0403】 *注意：藉由自鹼基配位體開始之二步驟程序合成NK-1化合物，該鹼基配位體藉由使用文獻中之程序製備。(參考：DESIGN AND DEVELOPMENT OF NEUROKININ-1 RECEPTOR-BINDING AGENT DELIVERY CONJUGATES，申請案號：PCT/US2015/44229；以引用之方式併入本文中。)

【0404】

實例8

合成FITC-PEG2-CA9



在50 mL圓底燒瓶中，使用鐵氟龍磁性攪拌棒，使CA9配位體(53.6 mg)溶解於DMF (2-3 mL)中。使用真空移除環境空氣且用氮氣置換，此循環三次。圓底燒瓶保持在恆定氮氣下。向燒瓶添加28.9 mg N-(3-二甲基胺基丙基)-N'-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)，隨後添加21.6 mg 1-羥基

苯并三唑水合物(HOBt)及18.9 μL Boc-PEG₂-NH₂ (Sigma Aldrich)。添加5.4 μL 三乙胺(TEA)且反應攪拌隔夜。反應混合物使用HPLC純化且用UHPLC-MS (目標m/z為831)確認。使用高真空旋轉蒸發移除乙腈且凍乾產物。將化合物與1:1 TFA:DCM混合30分鐘。使用高真空旋轉蒸發移除TFA/DCM，隨後高真空30分鐘。隨後使化合物溶解於DMF中且與5莫耳當量之*i*-Pr₂NEt、16 mg螢光異硫氰酸鹽(Life Technologies)合併，且攪拌1小時。藉由HPLC純化反應混合物且用UHPLC-MS (目標m/z為1120)確認目標化合物。樣品凍乾且儲存於-20°C下。

【0405】

實例9

T細胞製備

藉由使用Ficoll密度梯度離心(GE Healthcare Lifesciences)，自健康供體之全血分離人類外周血液單核細胞(PBMC)。隨後藉由使用EasySep™人類T細胞分離套組(STEM CELL technologies)自PBMC分離T細胞。將T細胞在具有40-100 IU/mL人類IL-2 (Miltenyi Biotech)、2%人類AB型血清及1%青黴素/鏈黴素硫酸鹽之TexMACS培養基(Miltenyi Biotech Inc)中培養。將Dynabeads人類T-活化劑CD3/CD28 (ThermoFisher Scientific)以1:1比率添加至T細胞以活化T細胞。活化後12-24小時，在8 $\mu\text{g/mL}$ 聚凝胺(Santa Cruz Biotech)存在之情況下，藉由在22-32°C下在1,200 g下離心感染90分鐘，將T細胞用FITC-CAR慢病毒粒子轉導。在移除活化珠粒之前，將含有具有CAR修飾之T細胞(CAR-T)及不具有CAR修飾之T細胞(未轉型T)的T細胞混合物在活化珠粒存在之情況下培養6天。螢光活化之細胞分選術用於基於GFP表現分選出CAR-T細

胞(GFP陽性)及未轉型T細胞(GFP陰性)。在注射至小鼠中之前將經分選之T細胞培養7-15天。當使用T細胞混合物時，在小鼠注射之前將CAR-T細胞與未轉型T細胞以所需比率混合。

【0406】

實例10

編碼CAR基因之慢病毒載體之產生

重疊PCR方法用於產生包含抗螢光素之scFv的CAR構築體。合成衍生自抗螢光素(4-4-20)抗體之抗螢光素之scFV，4M5.3 (Kd = 270 fM，762bp)。如圖2中所展示，藉由重疊PCR使編碼人類CD8 α 訊息肽(SP，63bp)、鉸鏈及跨膜區(249bp)、4-1BB (CD137，141bp)及CD3 ζ 鏈(336bp)之細胞質域的序列與抗螢光素scFV稠合。將所得CAR構築體(1551bp)插入至EcoRI/NotI裂解慢病毒表現載體pCDH-EF1-MCS-(PGK-GFP) (圖2，System Biosciences)中。慢病毒載體中CAR構築體之序列藉由DNA測序來確認。

【0407】 一種例示性CAR核酸編碼序列可包含：

```
ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCG
CCAGGCCGGATGTCGTGATGACCCAGACCCCCCTCAGCCTCCCAGTGTCCTCGG
TGACCAGGCTTCTATTAGTTGCAGATCCAGCCAGTCCCTCGTGCACTCTAACGGT
AATACCTACCTGAGATGGTATCTCCAGAAGCCCGGACAGAGCCCTAAGGTGCTG
ATCTACAAAGTCTCCAACCGGGTGTCTGGAGTCCCTGACCGCTTCTCAGGGAGCG
```

GTTCCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAACCGGGTGGAGGCCGAAGACCTCG
GCGTCTATTTCTGCTCTCAGAGTACACATGTGCCCTGGACCTTCGGCGGAGGGAC
CAAGCTGGAGATCAAAAGCTCCGCAGACGATGCCAAGAAAGATGCCGCTAAGA
AAGACGATGCTAAGAAAGACGATGCAAAGAAAGACGGTGGCGTGAAGCTGGAT
GAAACCGGAGGAGGTCTCGTCCAGCCAGGAGGAGCCATGAAGCTGAGTTGCGTG
ACCAGCGGATTCACCTTTGGGCACTACTGGATGAACTGGGTGCGACAGTCCCCA
GAGAAGGGGCTCGAATGGGTCGCTCAGTTCAGGAACAAACCCTACAATTATGAG
ACATACTATTCAGACAGCGTGAAGGGCAGGTTTACTATCAGTA
GAGACGATTCCAAATCTAGCGTGTACCTGCAGATGAACAATCTCAGGGTCTGAAG
ATACAGGCATCTACTATTGCACAGGGGCATCCTATGGTATGGAGTATCTCGGTCA
GGGGACAAGCGTCACAGTCAGTTTCGTGCCGGTCTTCCTGCCAGCGAAGCCCACC
ACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCC
CTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACG
AGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTT
GTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGCAACCACAGGAACCG
TTTCTCTGTTGTTAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCA
TTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTC
CAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCA
GACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTA
GGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGA
GATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAC
TGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAG
CGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACC
AAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA (SEQ ID
NO:1) 。

【0408】 在上文所展示之例示性核酸序列(SEQ ID NO:1)中，第一
ATG為起始密碼子。一種例示性CAR胺基酸序列可包含：

MALPVTALLLPLALLHAARPDVVMQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNT
YLRWYLQKPGQSPKVLIIYKVSNRVSGVPDRFSGSGSTDFTLKINRVEAEDLG VYFC
SQSTHVPWTFGGGTKLEIKSSADDAKKDAKKDDAKKDDAKKDDGGVKLDETGGGL

VQPGGAMKLSCVTSGFTFGHYWMNWVRQSPEKGLEWVAQFRNKPYN YETYYSDS
VKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLRVEDTGIYYCTGASYGMEYLGQGTSVTVSFVPVF
LPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAG
TCGVLLLSLVITLYCNHRNRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE
EEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG
KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD
ALHMQALPPR (SEQ ID NO:2)

【0409】 一種例示性插入序列可包含：

GCCACCATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCC
ACGCCGCCAGGCCGGATGTCGTGATGACCCAGACCCCCCTCAGCCTCCCAGTGTC
CCTCGGTGACCAGGCTTCTATTAGTTGCAGATCCAGCCAGTCCCTCGTGCCTCT
AACGGTAATACCTACCTGAGATGGTATCTCCAGAAGCCCGGACAGAGCCCTAAG
GTGCTGATCTACAAAGTCTCCAACCGGGTGTCTGGAGTCCCTGACCGCTTCTCAG
GGAGCGGTTCCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAACCGGGTGGAGGCCGAAG
ACCTCGGCGTCTATTTCTGCTCTCAGAGTACACATGTGCCCTGGACCTTCGGCGG
AGGGACCAAGCTGGAGATCAAAAGCTCCGCAGACGATGCCAAGAAAGATGCCG
CTAAGAAAGACGATGCTAAGAAAGACGATGCAAAGAAAGACGGTGGCGTGAAG
CTGGATGAAACCGGAGGAGGTCTCGTCCAGCCAGGAGGAGCCATGAAGCTGAGT
TGCCTGACCAGCGGATTCACCTTTGGGCACTACTGGATGAACTGGGTGCGACAGT
CCCCAGAGAAGGGGCTCGAATGGGTGCTCAGTTCAGGAACAAACCCTACAATT
ATGAGACATACTATTTCAGACAGCGTGAAGGGCAGGTTTACTATCAGTA
GAGACGATTCCAAATCTAGCGTGTACCTGCAGATGAACAATCTCAGGGTCTGAAG
ATACAGGCATCTACTATTGCACAGGGGCATCCTATGGTATGGAGTATCTCGGTCA
GGGGACAAGCGTCACAGTCAGTTTCGTGCCGGTCTTCCTGCCAGCGAAGCCCACC
ACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCC
CTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACG
AGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTT
GTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAACCACAGGAACCG
TTTCTCTGTTGTTAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCA
TTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTC

CAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCA
GACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTA
GGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGA
GATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAC
TGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAG
CGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACC
AAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA (SEQ ID
NO:3)

【0410】 在上文所描述的例示性插入序列(SEQ ID NO:3)中，第一GCCACC序列可包含限制酶裂解位點，隨後為ATG起始密碼子。經編碼之胺基酸序列可包含：

MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNT
YLRWYLQKPGQSPKVLIIYKVSNRVSGVPDRFSGSGSTDFTLKINRVEAEDLG VYFC
SQSTHVPWTFGGGTKLEIKSSADDAKKDAKKDDAKKDDAKKDDGGVKLDETGGGL
VQPGGAMKLSCVTSGFTFGHYWMNWVRQSPEKGLEWVAQFRNKPYN YETYYSDS
VKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRVEDTGIYYCTGASYGMEYLGQGT SVTVSFVPVF
LPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAG
TCGVLLLSLVITLYCNHRNRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE
EEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGG
KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD
ALHMQALPPR (SEQ ID NO:2)

【0411】

實例11

用於人類T細胞轉導之含有CAR基因之慢病毒的產生

為製備含有抗螢光素(亦即，抗FITC)單鏈片段可變(scFv) CAR之慢病毒，將HEK-293TN包裝細胞株與編碼抗螢光素scFv CAR之慢病毒載體及第2代慢病毒包裝質體混合物(Collecta)或ViraPower Lentivrial包裝混合物(ThermoFisher)共轉染。轉染24及48小時之後，收穫含有具有CAR基因之慢病毒的上清液且藉由標準聚乙二醇病毒濃縮法(Clontech)濃縮病毒粒子，以供將來用人類T細胞轉導。

【0412】

實例12

自人類PBMC分離人類T細胞

藉由Ficoll密度梯度離心(GE Healthcare Lifesciences)自人類外周血液單核細胞(PBMC)分離T細胞。在洗去剩餘Ficoll溶液後，藉由使用EasySep™人類T細胞分離套組(STEM CELL technologies)分離T細胞。將經純化之T細胞在具有1%青黴素及鏈黴素硫酸鹽之TexMACSTM培養基(Miltenyi Biotech Inc)中在人類IL-2 (100 IU/mL，Miltenyi Biotech Inc)存在之情況下培養。T細胞以 1×10^6 個細胞/毫升之密度在多孔盤中培養。將T細胞分開且每2-3天再次饋入。

【0413】

實例13

人類T細胞之轉導

在人類IL-2 (100 IU/mL)存在之情況下將經分離之T細胞用與抗CD3/CD28抗體(Life Technologies)偶合的Dynabeads活化12-24小時，隨後用編碼抗螢光素CAR基因之慢病毒轉導。72小時後收穫細胞且藉由使用流動式細胞量測術量測GFP螢光細胞來鑑別轉導T細胞上CAR之表現。

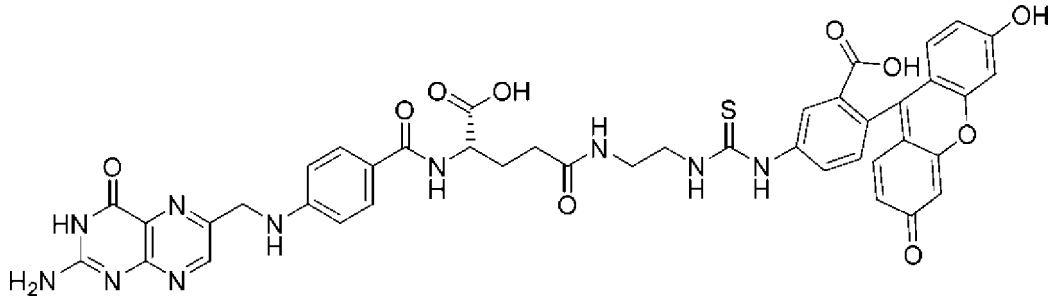
【0414】

實例14

合成FITC-葉酸

在無水二甲亞砜(DMF)中，在四甲基胍及二異丙胺存在之情況下，使葉酸- γ -乙二胺與螢光異硫氰酸鹽(FITC)異構體I (Sigma-Aldrich)偶合。將粗產物載入於Xterra RP18製備型HPLC管柱(Waters)上且用以99% 5

mM磷酸鈉(移動相A，pH 7.4)及1%乙腈(移動相B)開始且在20 mL/min之流動速率下在10 min內達至90% A及10% B的梯度條件溶離。在此等條件下，FITC-葉酸主峰通常在27-50 min溶離。FITC-葉酸溶離份之品質藉由分析型逆相HPLC與UV偵測器監測。將純度超過98.0% (LCMS)之溶離份凍乾以獲得最終FITC-葉酸產物。



【0415】

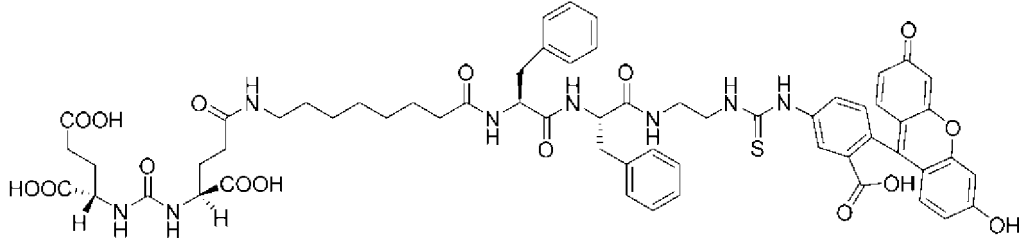
實例15

合成FITC-DUPA

藉由如下固相方法合成DUPA-FITC。Universal NovaTag樹脂(50 mg，0.53 mM)用二氯甲烷(DCM) (3 mL)、隨後二甲基甲醯胺(DMF，3 mL)溶脹。將20%哌啶於DMF (3 × 3 mL)中之溶液添加至樹脂，且氬氣軋泡5 min。用DMF (3 × 3 mL)及異丙醇 (*i*-PrOH，3 × 3 mL)洗滌樹脂。樹脂在DMF中溶脹之後，添加DUPA-(OtBu)-OH (1.5當量)、HATU (2.5當量)及DIPEA (4.0當量)於DMF中之溶液。氬氣軋泡2 h，且用DMF (3 × 3 mL)及*i*-PrOH (3 × 3 mL)洗滌樹脂。樹脂在DCM中溶脹之後，添加1 M HOBT於DCM/三氟乙烷(TFE) (1:1) (2 × 3 mL)中之溶液。氬氣軋泡1 h，移除溶劑且用DMF (3 × 3 mL)及*i*-PrOH (3 × 3 mL)洗滌樹脂。樹脂在DMF中溶脹之後，添加Fmoc-Phe-OH (2.5當量)、HATU (2.5當量)及DIPEA (4.0當量)於DMF中之溶液。氬氣軋泡2 h，且用DMF (3 × 3 mL)及*i*-PrOH (3 × 3 mL)洗滌樹脂。重複以上順序進行另外2個偶合步驟，以

第 110 頁(發明說明書)

添加8-胺基辛酸及螢光異硫氰酸鹽或若丹明B異硫氰酸鹽。使用三氟乙酸(TFA):H₂O:三異丙基矽烷混合物(95:2.5:2.5)自樹脂裂解最終化合物且在真空下濃縮。濃縮產物在乙醚中沈澱，且在真空下乾燥。使用製備型RP-HPLC [λ = 488 nm；溶劑梯度：25分鐘內1% B至80% B，80% B洗滌30分鐘操作；A = 10 mM NH₄OAc，pH = 7；B = 乙腈(ACN)]純化粗產物。在真空下移除ACN，且凍乾純溶離份，以產生呈淡褐色-橙色固體狀之DUPA-FITC。RP-HPLC：tR = 8.0 min (A = 10 mM NH₄OAc，pH = 7.0；B = ACN，溶劑梯度：10分鐘內1% B至50% B，80% B洗滌15分鐘操作)。¹H NMR (DMSO-d₆/D₂O): δ 0.98-1.27 (ms, 9H); 1.45 (b, 3H); 1.68-1.85 (ms, 11H); 2.03 (m, 8H); 2.6-3.44 (ms, 12H); 3.82 (b, 2H); 4.35 (m, 1H); 6.53 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 6.61 (dd, J = 5.3, 3.5 Hz, 2H); 6.64 (s, 2H); 7.05 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.19 (m, 5H); 7.76 (d, J = 8.0 Hz, 1H); 8.38 (s, 1H)。HRMS (ESI) (m/z)：C₅₁H₅₉N₇O₁₅S之(M + H)⁺計算值，1040.3712，實驗值，1040.3702。UV/vis： λ 最大值= 491 nm。



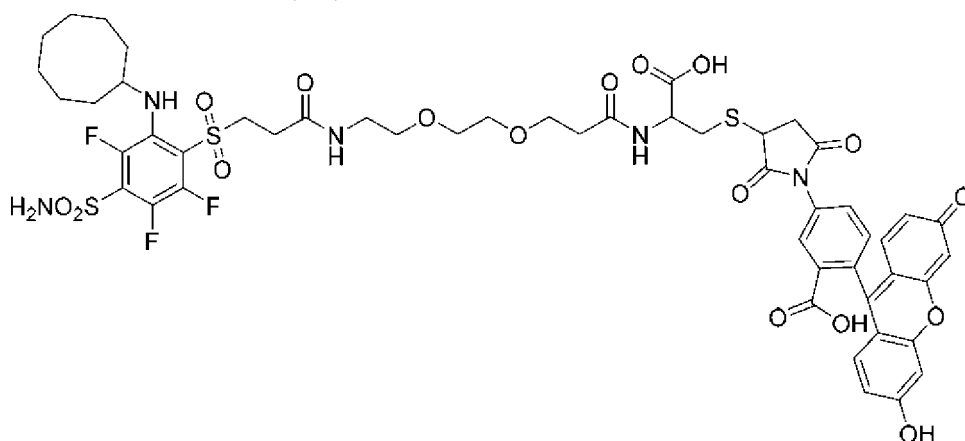
【0416】

實例16

合成FITC-CA9

在50 mL圓底燒瓶中，使用鐵氟龍磁性攪拌棒使CA9配位體(53.6 mg，實驗室中合成)溶解於所要量之N,N-二甲基甲醯胺(DMF) (2-3 mL)中。使用真空移除環境空氣且用氮氣置換，此循環三次。隨後將圓底燒瓶

保持在恆定氮氣下。向燒瓶先後添加28.9 mg N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)及21.6 mg 1-羥基苯并三唑水合物(HOBT)及18.9 μ L Boc-PEG2-NH₂ (購自Sigma Aldrich)。最後添加5.4 μ L三乙胺(TEA)且使反應攪拌隔夜。反應混合物使用HPLC純化且用UHPLC-MS (目標m/z為831)確認。使用高真空旋轉蒸發移除乙腈且置於凍乾器上48小時。用1:1 TFA:DCM進行Boc去除保護基，歷時30分鐘。使用高真空旋轉蒸發移除TFA/DCM，隨後高真空30分鐘。隨後使化合物溶解於DMF中且與5莫耳當量之N,N-二異丙基乙胺(DIPEA)合併。將16 mg螢光異硫氰酸鹽(購自Life Technologies)添加至溶液且攪拌1小時。藉由HPLC純化反應混合物且用UHPLC-MS證實目標化合物(標靶m/z為1120)。將樣品置於凍乾器上48小時且將化合物儲存於-20°C下。



【0417】

實例17

合成FITC-NK1R

在室溫下在氮氣下向NK-1 (0.02 g, 0.0433 mmol, 1.0當量)、O-(2-胺基乙基)-O'-[2-(Boc-胺基)乙基]癸乙二醇(BocNH-PEG₁₁-NH₂) (Sigma, 0.0336 g, 0.0521 mmol, 1.2當量)、六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯啶基鎂(PYBOP) (0.027 g, 0.0521 mmol, 1.2當量)於無水

CH₂Cl₂中之攪拌溶液中添加N,N-二異丙基乙胺(DIPEA) (0.076 mL, 0.4338 mmol, 10當量)。反應進展藉由LCMS監測且藉由製備型RP-HPLC (Waters, XBridge™ Prep C18, 5 μm; 19 × 100 mm管柱, 移動相A = 20 mM乙酸銨緩衝液, pH 7, B = 乙腈, 梯度30分鐘內10-100% B, 13 mL/min, λ = 220 nm, 254 nm)純化。收集純溶離份, 蒸發所有有機溶劑, 且樣品凍乾48小時, 得到NK1-PEG11-NHBoc。產率: 40.13 mg (97%)。向於乾燥CH₂Cl₂中之NK1-PEG11-NHBoc (0.0165 g, 0.015 mmol)添加三氟乙酸(TFA, 20當量), 且反應混合物在室溫下攪拌4 h。移除過量TFA, 用水稀釋, 且使用CH₂Cl₂ (3 × 5 mL)萃取。經合併之有機層用鹽水洗滌、經(Na₂SO₄)乾燥且濃縮。所得殘餘物在真空下乾燥且未經進一步純化即用於下一步驟。在室溫下在氬氣下將NK1-PEG₁₁-NH₂ (0.008 g, 0.0081 mmol, 1.0當量)、螢光異硫氰酸鹽(FITC) (Sigma, 0.0037 g, 0.0097 mmol, 1.2當量)於無水二甲亞砜(DMSO, 0.3 mL)中之攪拌溶液添加二異丙基乙胺(0.0028 mL, 0.0162 mmol, 2.0當量)。反應進展藉由LCMS監測且藉由製備型RP-HPLC (Waters, XBridge™ Prep C18, 5 μm; 19 × 100 mm管柱, 移動相A = 20 mM乙酸銨緩衝液, pH 7, B = 乙腈, 梯度30分鐘內10-100% B, 13 mL/min, λ = 280 nm)純化。收集純溶離份, 蒸發所有有機溶劑, 且樣品凍乾48小時, 得到NK1-PEG11-FITC (5)。產率: 8.54 mg (77%)。

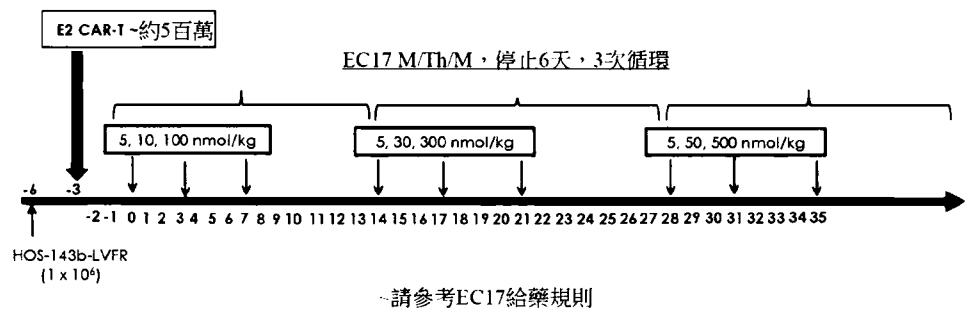
【0418】藉由自鹼基配位體開始之二步驟程序合成NK-1化合物, 該鹼基配位體藉由使用文獻程序製備。(參考: DESIGN AND DEVELOPMENT OF NEUROKININ-1 RECEPTOR-BINDING AGENT DELIVERY CONJUGATES, 申請案號: PCT/US2015/44229, 以全文引

用之方式併入本文中)。

【0419】

實例18

HOS-FR- α 及AML研究概要



【0420】

將根據以下規則投與連續遞增劑量之EC17：

- 若無CRS或神經毒性，則按規劃通過EC 17劑量遞增推進。
- 若CRS級別 < 2，則以在相同循環中引起不嚴重CRS之序列含量投與所有後續EC17劑量。
- 若CRS級別 > 2，則在循環中取消其他EC17劑量，且在下文引起sCRS之下一最高序列處開始所有後續循環。

【0421】

A. 腫瘤植入

HOS-FR α (亦即HOS-143b-LV-FR α)為用人類FR α 穩定轉染之HOS-143B(ATCC CRL-8303)次純系。HOS-143B最初衍生自患有骨肉瘤之13歲的高加索人女性。腫瘤細胞在5% CO₂潮濕大氣中在37℃下在具有5% FBS之葉酸缺失型RPMI 1640中生長。針對活體內研究，以1 × 10⁶個細胞/隻動物皮下接種腫瘤細胞。

【0422】

B. CAR-T細胞投與

經EGFRt分選的抗FITC E2 scFv-CAR T細胞在T細胞冷凍培養基中冷凍。在到達時，即刻將冷凍CAR-T細胞之小瓶儲存於-80℃下。CAR-T細胞在37℃下快速解凍，用PBS洗滌兩次，且以6百萬有活性的EGFRt+E2CAR-T細胞(CD4/CD8為約1:1)/隻動物用於動物注射。在輸液之日取出較小等分試樣以用於E2-CAR T細胞表型之流動式細胞量測分析。

【0423】

C. 製備投予藥物溶液

EC17投予溶液在投予開始時藉由以下製備：稱取適當量之各化合物，在PBS中重組，pH 7.4，通過0.22 μm PVDF針筒過濾器無菌過濾藥物溶液，且在-20℃下冷凍等分試樣用於每日投予。

【0424】

D. 化合物投與

至一天結束(3-4 PM)，給出所有EC17劑量，以允許隔夜顯現可能的CRS (細胞介素釋放症候群)。在第二天早晨，根據CRS定級系統(參見下文)對動物評分。

【0425】

E. 評估

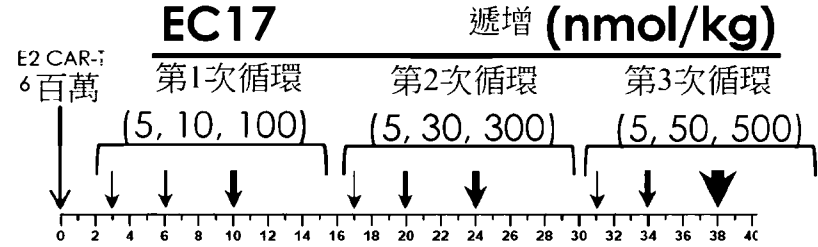
CRS定級系統

CRS定級量表					
0	1	2	3	4	
正常	近乎多毛 近乎多脂 仍有活性	多毛 多脂 活性降低	多毛、多脂 腫塊隆起、消瘦 除非受到刺激， 否則無活性	瀕死 腫塊隆起、蒼白 昏睡	死亡

【0426】 **腫瘤生長、體重及總評定：**腫瘤大小監測2-3次/週且體重量測2-3次/週。在緊接在任何EC17劑量之後的數天，每日進行體重量測且注意力集中於總體動物形態及行為。

【0427】 **安樂死：**當小鼠之重量降低 $\geq 20\%$ 時，當腫瘤達至 $\geq 1500\text{ mm}^3$ 時，進行安樂死。若小鼠在短時間內(例如，歸因於重度頭部傾斜)損失大量重量，或當其按照CRS定級系統接近瀕死狀態時，則亦進行安樂死。

【0428】 *EC17 宿主內劑量遞增治療(3次循環)*



抗腫瘤活性(N = 5)

【0429】 如圖4中所見：

群組1 (僅E2-CAR T細胞)展示在無EC17治療之情況下HOS-FR α 強力生長。

【0430】 群組2(EC17 5/100/1000 nmol/kg，M/Th/M)通過此研究展示在無體重減輕或CRS之情況下的顯著腫瘤消退。

【0431】 減慢EC17劑量遞增(M/Th/M)方案為安全的。在HOS-FR α 帶有腫瘤之小鼠中未觀測到體重減輕或細胞介素釋放症候群(CRS)之症狀。

【0432】 此E2-CAR T細胞研究的一種目標為使用在CAR-T輸液之後3天開始的多個給藥方案測試EC17/E2 CAR-T細胞活性及相關毒性(例如sCRS)。三個不同EC17給藥方案包括(a)以500 nmol/Kg每週一次

(SIW)，(b)以5、50及500 nmol/kg在星期一/星期三/星期五時以9天之間隔「TIW類」，及(c)以5、100及1000 nmol/kg在星期一/星期四/星期一7天的間隔「TIW類」。

【0433】實驗組(C =循環)：

群組	組	T細胞§	C1 Wk1 (EC17)	C2 Wk1 (EC17)	C3 Wk1 1 (EC 17)	N (療效)	N (衛星)
1	僅腫瘤	N/A	N/A	N/A	N/A	5	N/A
2	僅CAR-T	6百萬 CAR-T	N/A	N/A	N/A	5	0/ 3/0/3/0/ 3/ 3
3	EC17 SIW	6百萬 CAR-T	500 mnol/kg	500 mnol/kg	500 mnol/kg	N/A	3/ 3/ 0/ 3/ 0/ 3/ 3
4*	EC17 TTW (進行/停止)	6百萬 CAR-T	5 nmol/kg 50 nmol/kg 500 mnol/kg	5 nmol/kg 50 nmol/kg 500 mnol/kg	5 nmol/kg 50 nmol/kg 500 mnol/kg	N/A	0/ 0/ 0/ 3/ 3/ 0/ 3
5*	EC17「TIW」M/Th/M	6百萬 CAR-T	5 nmol/kg 10 nmol/kg 100 mnol/kg	5 nmol/kg 30 nmol/kg 300 nmol/kg	5 nmol/kg 50 nmol/kg 500 nmol/kg	5	0/ 3/ 3/ 3/ 0/ 3/ 3

*第4-5組：各循環的第2週跳過投予。

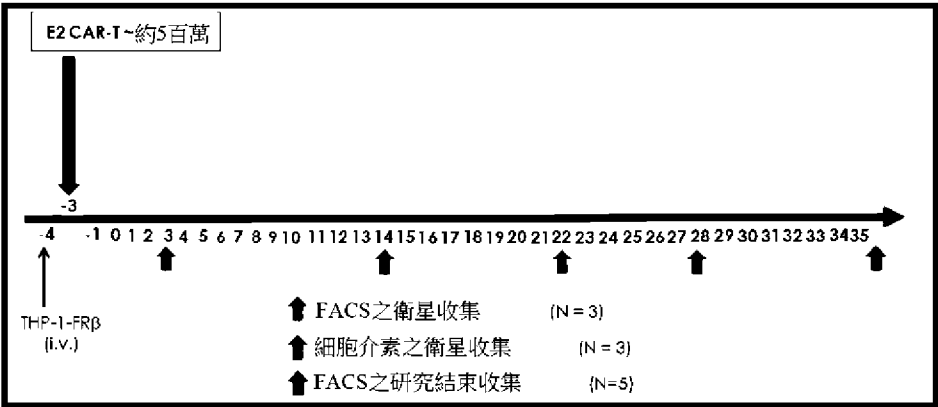
【0434】

研究概要

第1組(未治療)：僅用於療效比較。

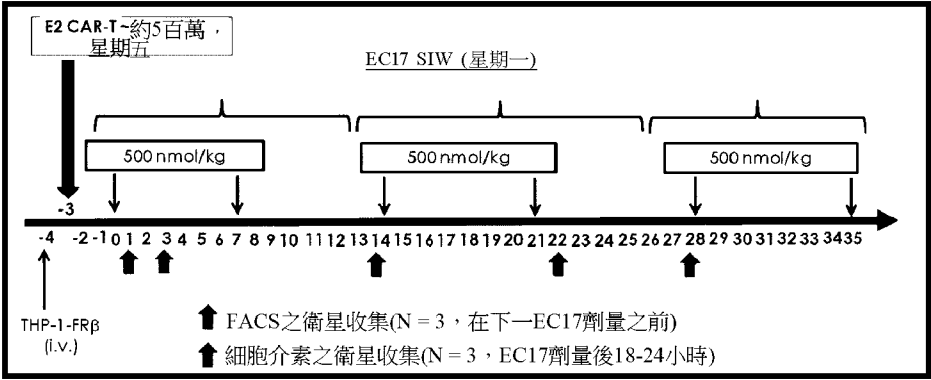
【0435】

第2組(僅CAR-T)：



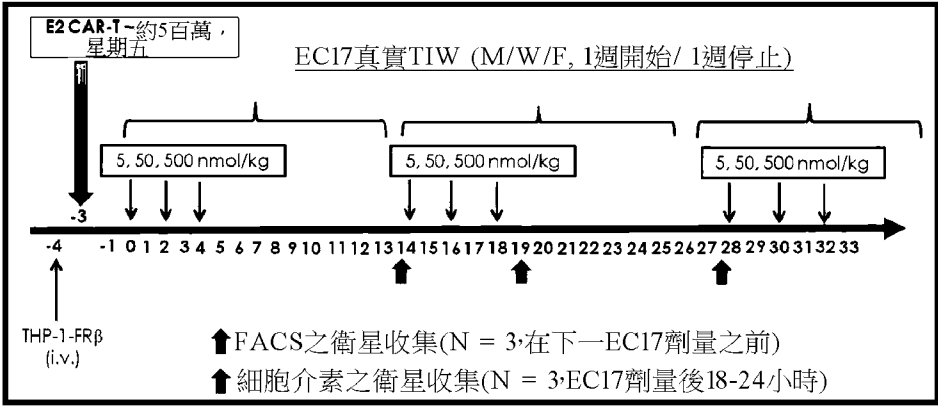
【0436】

第3組(EC17 SIW)：



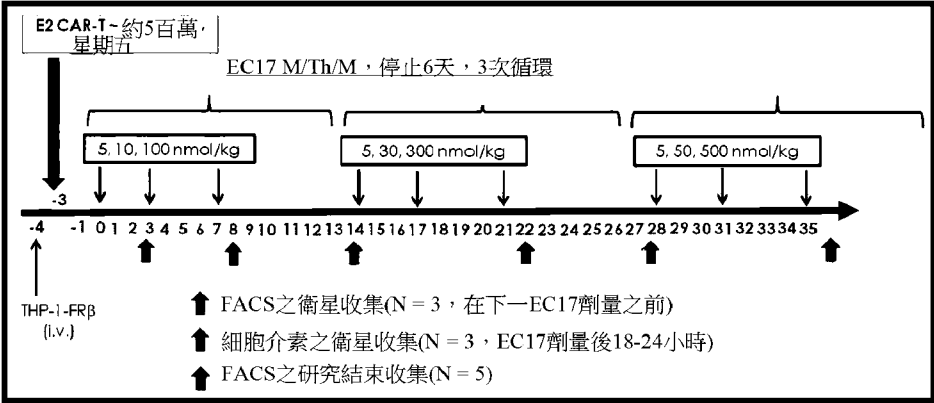
【0437】

第4組(EC17真實TIW)：



【0438】

第5組-EC17低劑量「TIW」(M/Th/M，停止6天)具有/療效：



【0439】

A. 腫瘤植入

THP-1-FRβ AML腫瘤細胞在5% CO₂潮濕大氣中在37℃下在具有5-10% FBS之葉酸缺失型RPMI 1640中生長。以5 × 10⁶個細胞/隻動物靜脈

內注射無血清葉酸缺失型RPMI1640培養基中之THP-1-FRβ腫瘤細胞。

【0440】

B. CAR-T細胞投與

將抗FITC E2 scFv-CAR T細胞冷凍於T細胞冷凍培養基中。在到達時，即刻將冷凍CAR-T細胞之小瓶儲存於-80℃下。CAR-T細胞在37℃下快速解凍，用CAR-T細胞培養基洗滌兩次，且以6百萬個有活性的EGFRt+ E2 CAR-T細胞(CD4/CD8在約1:1)/隻動物用於動物注射。在輸液之日取出較小等分試樣以用於E2-CAR T細胞表型之流動式細胞量測分析。

【0441】

C. 製備投予藥物溶液

EC17及雙-EDA-FITC投予溶液在投予開始時藉由以下製備：稱取適當量之各化合物，在PBS中重組，pH 7.4，通過0.22 μm PVDF針筒過濾器無菌過濾藥物溶液，且在-20℃下冷凍等分試樣用於每日投予。

【0442】

D. 化合物投與

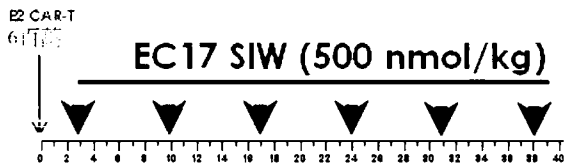
至一天結束(3-4 PM)，給出所有EC17劑量，以允許隔夜顯現可能的CRS (細胞介素釋放症候群)。在第二天早晨時，根據CRS定級系統(參見下文)對動物評分。

【0443】

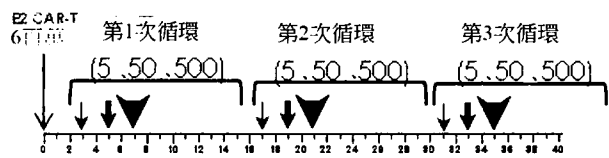
EC17劑量計劃表：

群組1-2：未給予EC17劑量

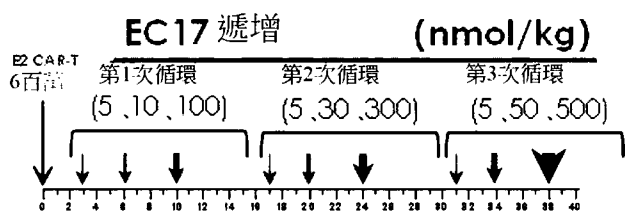
群組3：



群組4：



群組5：



【0444】

監測/療效：

需要在EC17劑量之後數天進行每日體重量測。注意力集中於總體動物形態及行為。若小鼠在短時間內損失大量重量，或當小鼠按照CRS定級系統或神經毒性接近瀕死狀態時，則進行安樂死。

【0445】

CRS定級系統

CRS定級量表					
0	1	2	3	4	
正常	~多毛 ~多脂 仍有活性	多毛 多脂 活性降低	多毛、多脂 腫塊隆起、消瘦 除非受到刺激，否則無活性	瀕死 腫塊隆起、蒼白 昏睡	死亡

【0446】 腫瘤生長、體重及總體評定：體重量測2-3次/週。在緊接在任何EC17劑量之後的數天，每日進行體重量測且注意力集中於總體動物形態及行為。

【0447】

流動式細胞量測分析

全血細胞分析：自預定體積之全部經EDTA處理血液移除血漿，且用RBC溶解溶液溶解RBC。白細胞集結粒隨後再懸浮於流動式細胞測量術染色溶液(1%牛血清白蛋白，50 mg/mL人類IgG (Equitech Bio，cat#SLH56-0001)、0.9%疊氮化鈉於磷酸鹽緩衝鹽水中，pH = 7.4)中，且白細胞表面標記染色使用以下抗體進行：抗人類CD45 (純系HI30，eBioscience號47-0459-42，呈1:20(v/v)稀釋)，抗人類CD137 (純系4B4-1，BD Bioscience號564092，呈1:20(v/v)稀釋)，抗人類CD8α [純系RPA-T8，BD Bioscience，目錄號557746，呈1:20(v/v)稀釋]，抗人類CD4 [純系SK3，eBioscience目錄號46-0047-42，呈1:20(v/v)稀釋]，抗人類EGFR[R&D系統，純系Hu1，目錄號#FAB9577B，呈1:10(v/v)]，抗人類PD1 [BD Biosciences，純系EH12.1，目錄號562511，呈1:20(v/v)]，抗人類LAG3 [BD Biosciences，純系T47-530，目錄號565616，呈1:20(v/v)]，抗人類TIM3 [BD Biosciences，純系7D3，目錄號565558，呈1:20(v/v)]，抗人類CD3ε [BD Biosciences，純系SK7，目錄號557832，呈1:20(v/v)]。白細胞染色後，將細胞用PBS洗滌且再懸浮於含有53,000個CountBright™珠粒[Invitrogen目錄號C36950]之低溫PBS中且轉移至流動式細胞量測術之收集管。在Gallios流式細胞儀(Beckman Coulter，Brea，CA)上收集流動式細胞測量術資料。根據Invitrogen說明書計算各血液樣品中CAR T細胞之濃度之判定。CAR T細胞鑑別為人類CD3ε + EGFRt+事件且容易使用Kaluza™流動式細胞測量術軟體區分及計數。隨後各輸注小鼠之循環中的CAR T細胞數目以每50 μL分析之全血

的CAR T細胞總數目表示在圖上。統計顯著性藉由利用未配對之雙尾學生t測試來判定，其中顯著性設定為 $p < 0.05$ 。

【0448】 腫瘤及組織分析：收穫實體腫瘤(100-1000 mm³)，稱重，且切碎成小碎片，隨後轉移至含有20 mL腫瘤消化混合物之50 mL管中。酶促腫瘤消化混合物由補充有抗生素之無血清及葉酸缺失型RPMI1640培養基中0.5 mg/mL IV型膠原蛋白酶(Sigma-Aldrich，目錄號C5138)、0.5 mg/mL玻尿酸酶(Sigma-Aldrich，目錄號H3506)及0.1 mg/mL DNase I (Sigma-Aldrich，目錄號DN25)組成。在水平震盪器上腫瘤片段在37°C下在300 rpm下消化一小時。隨後，腫瘤消化物在400 × g下離心5分鐘，且腫瘤細胞集結粒進行紅血球溶解步驟，隨後用低溫磷酸鹽緩衝鹽水(PBS，pH 7.4)洗滌且最後經40 μm耐綸細胞過濾器過濾。

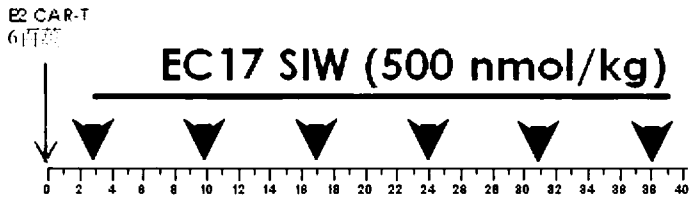
【0449】

結果及結論

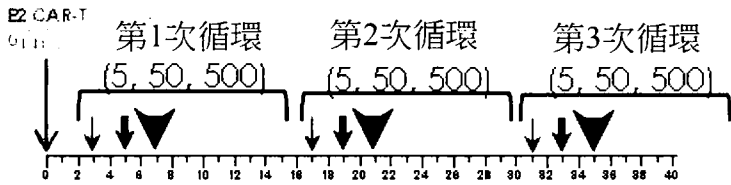
A. *EC17投與之三個不同劑量計劃表展示不同體重減輕模式及不同CRS含量*

如圖5中所見，群組1 (未治療)及群組2(僅CAR-T)不展示諸多體重減輕且無CRS。群組3 (EC17 SIW)展示在各EC17劑量之後EC17劑量依賴型體重減輕且貫穿研究展示級別1-2之CRS。群組5 (EC17劑量遞增)展示在前兩次循環期間較少體重減輕，但在第二次EC17劑量循環結束之後開始展示與群組2類似的體重減輕。群組4 (EC17 TIW進行/停止)展示三個治療組中最輕微的體重減輕。群組4或5兩者都不展示任何大於1之CRS。

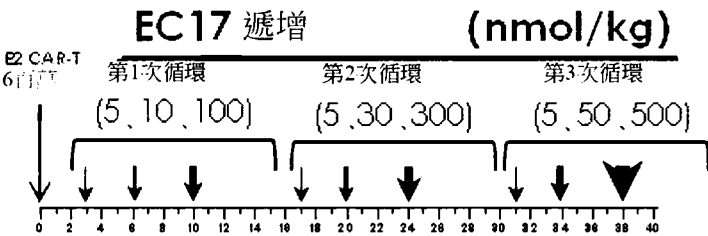
群組3



群組4



群組5



【0450】

EC17投與之三個不同劑量計劃表展示不同抗腫瘤活性。

如圖6中所見，所有群組中在第39天評定肝及非肝腫瘤負荷。群組2 (僅CAR-T)與群組1 (未治療)比較不展示任何差異。群組4展示三個不同EC17劑量計劃表中最佳的抗腫瘤活性。

【0451】

循環AML細胞株THP1-FRβ之消除

在使用CD19特異性抗ALL療法之研究中，已報告CAR T細胞在血液中之擴增及暫留與循環CD19+ ALL細胞的消除從而引起對療法之完全反應相關。在此實驗中，吾等在吾等之小鼠AML模型中進行類似分析，以藉由回應於CAR T接附分子EC17的不同給藥方案尋找吾等經GFP標記之人類AML細胞株THP1-FRβ的消失判定吾等受接附子控制之E2 CAR T細

胞的抗腫瘤活性。圖7顯示循環THP1-FRβ細胞，其中y軸展示在對數標度上每100 μL全血之GFP+細胞總數目。不同條柱表示不同治療群組。展現了，較高AML細胞負荷存在於將AML細胞輸入至既不接受CAR T細胞亦不接受EC17之小鼠中後40天的循環中。血液中AML細胞之不減少見於接受AML細胞及E2 CAR T細胞兩者之輸入但無EC17治療的小鼠中。此藉由具有同種異體THP1細胞之人類T細胞的可能同種異體反應性展現可忽略的抗腫瘤活性。有趣地，看見以不同給藥方案用E2 CAR T細胞加EC17輸注之所有三個群組小鼠中的循環THP1細胞負荷之顯著減少，由此展現在三個不同接附子給藥方案下的CAR T療法之有效性。

【0452】

E2-CAR-T耗盡表型

在慢性抗原刺激下，例如在慢性病毒感染或癌症之情形下，T細胞在其不再能夠增殖、分泌發炎性細胞介素或殺死抗原呈現標靶細胞時經歷耗盡製程，CAR T細胞在CAR之慢性刺激下藉由持續存在之scFv刺激抗原亦具有耗盡的可能性。因為吾等之E2CAR T細胞僅對鍵結至FR+腫瘤細胞之表面的吾等之橋接分子EC17之存在起反應，所以吾等具有藉由停止用EC17治療且從而除去表面結合抗原的存在來預防E2 CAR T細胞之慢性抗原刺激的能力。藉由表面抗原之不存在表徵的其餘階段預防E2CAR T細胞之慢性抗原曝露且預防可產生之所得耗盡。

【0453】 為確認吾等之EC17給藥方案不引起E2 CAR T細胞耗竭，對來自THP1-FRβ肝癌轉移及在經耗盡T細胞上特異性表現之表面標記物的單細胞製劑進行流動式細胞測量術分析。隨著T細胞接近耗盡，表面抑制受體PD1、LAG3及TIM3之共表現增加。圖8展示柱狀圖，其中y軸說明

自實體肝腫瘤分離之總E2 CAR T細胞的百分比，其表現由不同條柱表示的三種表面標記物之各種組合。值得注意的為，同時表現所有三種標記物之經完全耗盡T細胞由各組中之左側條柱表示。左側組展示將E2 CAR T細胞預輸注至自三個不同EC17治療群組分離之肝腫瘤CAR T細胞。抑制性受體表現在輸注前CAR T細胞產物中幾乎為零，此係由於T細胞中之大部分對於所有三種表面標記物為陰性。重要的為，所有三個經EC17治療群組E2 CAR T細胞具有經耗盡之三陽性細胞，且有趣的為，群組4 (EC17 TIW)表達最少數目之雙及三陽性事件且進一步由相當大量的三陰性CAR T細胞組成。此等資料表明在此小鼠實驗中所採用的所有三個EC17給藥方案可適用於臨床，此係由於存在顯著抗腫瘤活性且存在極少CAR T耗盡之誘導。

【0454】 實例19至25-參見圖9至14。

【0455】

實例19

細胞株及試劑

除非另外指出，否則所有FR+及FR-陰性癌細胞株保持在補充有10%熱滅活胎牛血清之RPMI-1640培養基(Gibco BRL)，該培養基不含2.4 μ M葉酸(FA) (FFRPMI)或含該葉酸 (RPMI)。將KB (具有HeLa標記物之FR α -表現人類子宮頸癌)及CHO- β (經人類FR β 轉染之中國倉鼠卵巢細胞)分別用作FR α 及FR β 的來源以用於放射性配位體結合分析。MDA-MB-231表示人類TNBC (三陰性乳癌)細胞株之FR α 次純系。對於AML研究而言，提供FR β 陽性(THP1-FR β)及FR-陰性(THP1-FG12)細胞株之綠色螢光蛋白(GFP)-表現同基因對。兩者皆自作為研究兒童AML之最初衍生自患有急

性單核細胞性白血病的1歲男嬰之常用細胞模型的THP-1 (ATCC, TIB-202)形成。對於骨肉瘤研究而言，藉由用編碼人類FR α 之FOLR1基因慢病毒轉導FR陰性HOS-143b (ATCC, CRL8303)來形成HOS-FR α 。HOS-143b最初自13歲高加索女性之原發腫瘤形成且在NSG小鼠中高度致瘤。用慢病毒螢火蟲螢光素酶轉導FR+ HOS-FR α^{fluc} 及FR-陰性HOS-143b $^{\text{fluc}}$ 之GFP表現生物發光對。

【0456】 LEGENDplex™人類細胞介素面板購自BioLegend (San Diego, CA)。基於乳酸脫氫酶(LDH) CytoTox 96®非放射性細胞毒性分析套組購自Promega (Madison, WI)。用於多色流動式細胞測量術之可商購的抗人類抗體為：來自Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA)之CD45RA (純系HI100)、CD45RO (純系UCHL1)、CD4 (純系SK3)及CD69 (純系FN50)；來自BD Bioscience (San Jose, CA)之CD3 ϵ (純系SK7)、CD8 α (純系RPA-T8)、CD137/4-1BB (純系4B4-1)、CD25 (純系M-A251)、PD1 (純系EH12.1)、LAG3 (純系T47-530)及TIM3 (純系7D3)；來自R&D系統(Minneapolis, MN)的生物素化抗人類EGFR (西妥昔單抗(Cetuximab), 純系Hu1)；及來自BioLegend (San Diego, CA)之FR α (純系LK26)。經螢光團結合之抗生物素亦購自BioLegend。經APC結合之抗FITC小鼠IgG2a/卡帕(kappa)抗體(純系NAWESLEE)、CountBright™珠粒(Invitrogen)、Annexin V染色緩衝液及經AlexaFluor-647結合的Annexin V購自Thermo Fisher Scientific。對於腫瘤組織之酶促消化而言，IV型膠原蛋白酶、玻尿酸酶及DNase I皆購自Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)。

【0457】 EC17或葉酸-FITC [FA-(γ)-乙二胺-FITC]在Endocyte處合

成。³H-EC17購自Moravek biochemicals (Brea, CA), 呈約0.952 Ci/mmol之放射性比度, 或在Endocyte處藉由使FITC與藉由ViTrax (Placentia, CA)製得的³H-FA-(γ)-乙二胺結合來製備, 呈約1.2 Ci/mmol之放射性比度。³H-FA亦購自ViTrax, 呈59 Ci/mmol之放射性比度。對於CRS急救而言, 鈉螢光素給藥溶液自購自Purdue Pharmacy (NDC 17478-250-25)之AK-FLUOR[®] 25% (螢光素注射, USP)稀釋。

【0458】

實例20

人類化CAR構築體及經CAR改性的T細胞

先前研究使用含有CD8 α 及4-1BB/CD3 ζ 信號傳遞域之鉸鏈及跨膜序列(亦即, FITC-4M5.3-scFv-CD8 α 鉸鏈-CD8 α tm-4-1BB/CD3 ζ)之GFP+第二代抗FITC scFv (純系4M5.3) CAR。對於轉譯成第一次人體測試而言, 研發第二代完全人類FITC特異性(純系E2) CAR構築體(本文中稱為E2)(圖9, 頂部圖)。經CAR改性的T細胞展示於圖9, 底部餅狀圖中。

【0459】本文中所描述的構築體為包括以下之FITC特異性CAR構築體：(1)完全人類抗FITC scFv (純系E2, Kd = 0.75 nM), (2)耦合至CD28-跨膜結構域之IgG4鉸鏈-CH2間隔基(L235D、N297Q)-CH3, (3)第二代4-1BB/CD3 ζ -胞內域, 及(4)細胞表面人類EGFRt標記(圖9, 頂部圖) (SEQ ID NO:4及5分別為核酸及胺基酸序列)。為產生經CAR改性的T細胞, 在與CAR編碼之epHIV7慢病毒載體共轉染的293T細胞中產生慢病毒。供體CD4⁺及CD8⁺ T細胞藉由免疫磁性選擇純化且單獨地或以約50:50比率轉導。一般而言, 實施僅一個CD3/CD28珠粒活化回合, 隨後為一或兩個快速活體外擴增回合。針對臨床前評價, 使用若干批量之經EGFRt分選的

CD4、CD8及未分選之CD4/CD8 CAR-T細胞。在冷凍保存之前及解凍之後分析所有CAR-T細胞製劑以藉由流動式細胞測量術判定EGFRt表現及CD4/CD8比率。使用表面標記物之組合，在輸液當天時CD4⁺及CD8⁺ CAR-T細胞亞組之分化狀態經分析且定義為T_N，CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD62L⁺ CD95⁻天然T細胞；T_{SCM}，CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD62L⁺ CD95⁺幹細胞記憶T細胞；T_{CM}，CD45RA⁻ CD45RO⁺ CD62L⁺ CD95⁺中樞記憶T細胞；T_{EM}，CD45RA⁻ CD45RO⁺ CD62L⁻ CD95⁺效應記憶細胞；及T_{EFF}，CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD62L⁻ CD95⁺效應T細胞。針對下文所描述的臨床前測試，研究包括兩個批量之經EGFRt分選的純CD4及CD8亞組(在以約1:1比率混合之後)及若干批量之包括具有低分化特徵的「臨床傳真」製劑之未分選的約1:1 EGFRt⁺ CD4/CD8混雜物。

【0460】在所合成及評價之一系列不同CAR構築體中，選擇完全人類抗FITC scFv (FITC-E2) CAR用於臨床前研發(圖9)。此第二代完全人類CAR由抗FITC scFv (純系E2)、CH2區域(L235D及N297Q)中具有雙突變以減少與FcγR、CD28跨膜結構域及藉由T2A核糖體跳躍序列附接至細胞表面EGFRt標記之4-1BB/CD3ζ信號傳導結構域結合的IgG4-Fc間隔基/鉸鏈組成(亦即，FITC-E2-scFv-IgG4鉸鏈-CD28tm-4-1BB/CD3ζ-T2A-EGFRt)。針對臨床前研究，經EGFRt分選的及未分選之E2 CAR-T細胞兩者皆以約1:1 CD4/CD8比率製備，且在各活體內實驗之CAR T細胞輸注(第0天)時常規地藉由流動式細胞測量術進行T細胞亞型表型。A 經EGFRt分選的CAR-T細胞之典型表現模式包括呈大致42% T_{SCM}、10% T_{CM}、12% T_{EM}及34%T_{EFF}之兩種CD4及CD8亞組(圖9，左側上的餅圖)。僅將經EGFRt分選的CAR-T細胞用於共培養及藥物動力學研究。針對腫瘤療法，

使用具有MDA-MB-231之低分化特徵(圖9，右側上之餅圖)的「臨床傳真」批量，且研究批量用於THP1-FR β 及HOS-FR α 研究。「臨床傳真」批量(約39% EGFRt+)包括呈約66% T_{SCM}及約32% T_{CM}之CD4+亞組及呈約95% T_{SCM}及約3% T_{CM}的CD8亞組。研究批量(約23% EGFRt+)更經分化且包括呈約32% T_{SCM}、約53% T_{CM}、約11% T_{EM}及約3.7% T_{EFF}之CD4亞組及呈約44% T_{SCM}、約0.28% T_{CM}、約3.4% T_{EM}及約52% T_{EFF}的CD8亞組。

【0461】

實例21

EC17 CAM的雙特異性親和力

在基於細胞之放射性配位體結合分析中使用³H-EC17評定EC17 CAM (CAM在本申請案中等效於「橋接子」或「化合物」之雙特異性親和力。針對與FR+標靶之結合，將KB及CHO- β 細胞在24孔組織培養盤中預接種隔夜且與0.1、0.5、1、5、10、20及40 nM於FFRPMI中之³H-EC17在37°C下一起培育2 h。隨後，將細胞用磷酸鹽緩衝鹽水(PBS，pH 7.4)沖洗且用1%十二烷基硫酸鈉溶解。全細胞溶胞物針對放射性等級及細胞蛋白質含量藉由標準Pierce BCA蛋白質分析來定量。計算每個細胞結合之³H-EC17分子之數目以分別判定FR α (KB)及FR β (CHO- β)的解離常數(K_d) (圖10)。

【0462】已在臨床中出於免疫療法及光學成像之目的測試EC17。為直接地定量³H-EC17之雙特異性結合親和力，合成其且對分別表示FR α +及FR β +標靶細胞的KB及CHO- β 細胞株及對表示效應細胞之未分選EGFRt CAR-T細胞實施放射性配位體結合分析。當結合至EC17之標靶時，其展

現對於分別具有1.7 nM及0.8 nM之低Kd值的FR α 及FR β 兩者類似的親和力(圖10，A圖)。在結合至未分選E2-CAR-T細胞(約24% EGFR^{t+}，約95:5 CD8/CD4比率)時，估計Kd值在約130 nM (圖10，B圖)。

【0463】

實例22

腫瘤模型

根據NIH指導原則且遵循由Purdue University Animal Use and Care Committee審批通過之方案進行所有動物護理及使用。雌性4至5週齡之NOD/SCID γ (NSGTM)小鼠(物料編號：005557)購自Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME)。除非專門指示，否則所有動物在到達時及在研究中保持FA缺失型飲食(TestDiet, St. Louis, MO)。為確定皮下異種移植，分別將MDA-MB-231及HOS-FR α 以 2.5×10^6 及 1×10^6 個細胞/隻動物植入於右側腹區域中。針對靜脈內異種移植，以 5×10^6 個細胞/隻動物接種THP1-FR β 細胞。皮下腫瘤用測徑規量測每週2-3次且使用橢圓形公式(長度 $\times$ 寬度²)/2來計算。按照研究設計或在以下情況時進行安樂死：(i)動物之體重已減輕 $\geq 20\%$ 或接近瀕死狀態，(ii)皮下腫瘤之大小達至 $\geq 1500 \text{ mm}^3$ ，或(iii)動物顯示出腫脹之腹部及非常痛苦之症兆(亦即，THP1-FR β)。靜脈內給予所有動物劑量(CAR-T細胞、EC17、螢光素鈉)。

【0464】

實例23

腫瘤療法

在治療背景下，可在CAR-T細胞注射前或後給與EC17 CAM。如本文所述，在CAR T細胞2-3.5天後投與第一劑量之EC17以留出帶有腫瘤之

小鼠體內之人類T細胞之觀測週期。兩個批次之未分類E2-CAR T細胞(23%或39%EGFRt+，1:1 CD4/CD8)用於活體內研究。在用於各實驗之輸液日(第0天)，將冷凍CAR T細胞在37°C下快速解凍，用達爾伯克(Dulbecco's)1×PBS (pH 7.4)洗滌2×並以所需EGFRt+E2-CAR-T細胞劑量注射至尾部靜脈中。此外，藉由流式細胞量測術分析較小等分試樣之CAR T細胞之CAR T細胞之CD4與CD8比率及分化狀態。在EC17給藥之第一天，根據帶有腫瘤動物之腫瘤大小或靜脈內移植後相同天數(亦即，THP1-FRβ)將其隨機分配為多組。

對於MDA-MB-231研究，小鼠接受較高劑量(約10百萬)之具有較低分化特徵之「臨床傳真」之E2-CAR T細胞(約39%EGFRt+) (圖9)。兩天後，在平均腫瘤大小為約 $293 \pm 39 \text{ mm}^3$ 下開始3種不同的EC17治療方案(圖12)。一週一次(SIW)以500 nmol/kg在星期一或週期之間以遞增劑量：5、50或100及500或1000 nmol/kg (亦即，5/50/500或5/100/1000)在星期一、星期四及6天後之星期一給與EC17給藥。對照小鼠維持不治療之(接受CAR T細胞但無EC17)。用於比較，一組不含腫瘤同胎仔畜亦以500 nmol/kg接受相同數目之無EC17之CAR T細胞或具有EC17之CAR T細胞SIW。

用於AML研究(圖13)，小鼠在接受較低劑量之約6百萬E2-CAR T細胞(約23% EGFRt+)之前一天經靜脈內注入THP1-FRβ腫瘤細胞。在CAR-T細胞輸注後約3.5天，以3種不同方式給藥EC17，包括i)以500 nmol/kg SIW，ii)週期之間以5/50/500 nmol/kg在星期一/星期三/9天後之星期五三次(TIW進行/停止)，及iii)以遞增劑量之第1週期5/10/100 nmol/kg、第2週期5/30/300 nmol/kg及第3週期之5/50/500 nmol/kg，週期之間所有在星期一/星期四/6天後之星期一(M/Th/M_進行/停止)。在第31天，採集衛星

動物用於將小鼠血液中識別之CAR陽性T細胞量化為人類CD3 ϵ +EGFRt+事件且經計算為每100 μ L全血之絕對數目。在安樂死之後或在第38天研究結束時，藉由利用流式細胞量測術量測血液中之GFP+腫瘤細胞且收集體內發現之肝重量(具有轉移性病變)及非肝巨轉移酶之總重量來評估帶有THP1-FR β 腫瘤之小鼠體內的總腫瘤負載。將肝癌轉移之腫瘤片段酶消化至單細胞懸浮液中且使用抗人類PD1、LAG3及TIM3(純系EH12.1、T47-530及7D3，分別地)分析活細胞群之CAR-T細胞耗竭狀態。

對於骨肉瘤研究(圖14)，兩組小鼠在接受用於THP1-FR β 研究(圖13)之約6百萬之相同CAR-T細胞製劑前3天經皮下移植HOS-FR α 腫瘤細胞。在CAR-T細胞輸注後約3.5天，一組小鼠經給與至多3個週期之EC17：第1週期以5/10/100 nmol/kg，第2週期以5/30/300 nmol/kg及第3週期以5/50/500 nmol/kg，全部遵循星期一/星期四/星期一方案，週期之間具有6天間隔。在研究結束時，計數每100 μ L小鼠血液循環CD3 ϵ +EGFRt+CAR T細胞。亦採集HOS-FR α 腫瘤(+/-EC17治療)並消化用於腫瘤浸潤性CAR T細胞之流式細胞測量分析。

【0465】

針對攻擊性骨肉瘤模型之劑量遞增試驗

為了吾等既定目的，HOS-FR α 為具有功能性FR水準之約 5.82 ± 1.45 pmol/mg蛋白質之較低FR-表現但最具攻擊性腫瘤模型。平行於上文所描述之THP1-FR β 研究，具有3天大之HOS-FR α 腫瘤之兩組小鼠經以相同劑量(約6百萬)給與相同E2-CAR T細胞。一組經相同加速EC17給藥遞增方案治療：第1週期以5/10/100 nmol/kg，第2週期以5/30/300 nmol/kg及第3週期以5/50/500 nmol/kg，在星期一/星期四/星期一排程繼之以6天間斷

(圖14，A圖)。由於HOS-FR α 腫瘤在無EC17治療的情況下強力地生長，因此在此CAR-T細胞劑量下之加速EC17給藥遞增為安全的(無CRS或體重減輕)且在前兩個治療週期內引起腫瘤生長的明顯延遲(圖14，B圖)。在協議授權之僅因腫瘤大小($\geq 1500 \text{ mm}^3$)所致之安樂死之後，對全血執行之流動式細胞測量術分析展示EC17依賴性CAR-T細胞擴大至第47天但在第33天時更高(圖14，C圖，左邊長條圖)。第33天之活體外腫瘤分析指示經EC17治療之動物體內的較低但明顯瘤內CD3 ϵ +EGFRt+CAR-T細胞群體，其累積至約1%總存活消化腫瘤衍生細胞(圖14，C圖，右邊長條圖)。隨著較大HOS-FR α 腫瘤停止對第3週期之治療作出回應(圖14，B圖)，在第47天時瘤內CAR T細胞亦減弱(圖14，C圖)。值得注意地，在疾病進程後藉由 ^3H -FA放射性配位體分析分析之HOS-FR α 腫瘤在存在及不存在EC17治療下展示類似FR α 含量。因此，似乎NSG小鼠體內之HOS-FR α 腫瘤快速地增長CAR T細胞之腫瘤浸潤性能力且可如活體外共培養研究表明因T細胞耗竭所致而具有減小的溶胞活性。

【0466】

含腫瘤及無腫瘤小鼠體內之EC17給藥發現研究

如實驗性佈局之示意圖所展示在MDA-MB-231腫瘤負載小鼠中進行初始EC17給藥發現研究(圖12，A圖)。在第0天，不具有或具有MDA-MB-231腫瘤(約 $211 \pm 65 \text{ mm}^3$)之NSG小鼠經移植約10百萬「臨床傳真」批次之E2-CAR T細胞(約39% EGFRt+, 51:49 CD4/CD8)。此批次CAR T細胞由大部分T_{SCM}及T_{CM}表現型組成(參見圖9)。在CAR-T細胞注射後兩天，一組帶有腫瘤小鼠保持未治療同時三組經不同EC17方案治療，包括以500 nmol/kg每週單次注射(SIW)，或給與如5/50/500(遞增-1)或

5/100/1000 nmol/kg(遞增-2)之遞增EC17給藥含量，在星期一/星期四/星期一排程伴隨1週無藥物間隔。為了比較，兩個無腫瘤組未經治療或經EC17以500 nmol/kg SIW治療。

使用衛星動物在第11天及第12天(在先前EC17劑量之後約20及42小時)來量測在所有群組中人類T細胞衍生之IFN γ 於小鼠血液中之含量。與僅接受CAR T細胞之腫瘤攜帶小鼠相比，所有經EC17治療之腫瘤群組具有高約30 $\times$ (第11天)及約10 $\times$ (第12天)之小鼠血漿中之IFN γ 產生，且此細胞介素之含量稍後自20小時至42小時自然地降低(圖12，B圖)。根據IFN γ 釋放，EC17亦觸發經鑑別為小鼠血液中之人類CD3 ϵ +EGFRt+事件的CAR-T細胞增殖，且細胞在腫瘤攜帶動物中存留多達54天(最末量測) (圖12，C圖)。在無腫瘤群組中，未藉由流式細胞量測術偵測到CAR-T細胞增殖，但在第11天及第12天於接受相同數目之CAR T細胞加EC17的動物中偵測到低含量之IFN γ (圖12，B至C圖)。此外，未在以500 nmol/kg接受兩週劑量之EC17的無腫瘤小鼠中觀測到CRS症狀(超出0級0至5個刻度)或體重減輕。

在藉由獨立於該療法之持續EC17投藥的腫瘤攜帶群組中觀測到中度至重度CRS症狀(2至3級)及顯著體重減輕(圖12，D圖)。在500 nmol/kg下之EC17 SIW導致CRS及體重減輕之最早開始，而侵略性EC17遞增-2療法(多達1000 nmol/kg)導致持久性體重減輕，其中動物恢復出現在EC17投藥停止之後(圖12，D圖，頂部列)。值得注意地，移植物抗宿主病(GVHD)之症狀包括紅色皮膚瘙癢及無毛髮且在CAR-T細胞移植之後約1個月時變得明顯。儘管僅接受CAR T細胞之動物展示出非特異性CAR-T細胞/腫瘤同種異體反應性之體徵，但僅經EC17治療之群組產生100%治

癒(圖12，D圖，底部列)。因此，在FR+腫瘤存在下之EC17投與為驅動 i) CAR-T細胞活化，ii) 細胞激素產生，及iii) 活體內CAR-T細胞增殖及存留之關鍵。然而，在特定條件下，藉由高CAR-T細胞劑量與等於或大於500 nmol/kg之EC17劑量組合而觸發嚴重CRS (≥ 3 級)。

【0467】

抗白血病活性之EC17 CAM投藥對照

經靜脈內植入之GFP表現THP1-FR β 腫瘤細胞在NSG小鼠體內產生多發性疾病，其中腫瘤細胞處於循環中且肝癌/非肝癌在整個體內轉移。THP1-FR β 腫瘤細胞亦可定位於小鼠卵巢，該卵巢在腫瘤進展之初期期間出現發炎。因此，研究群組中之各動物中的總腫瘤攜帶係藉由對血液中之循環GFP+腫瘤細胞、肝重量及肉眼可見之全包含性非肝巨轉移酶進行定量來評估。儘管THP1-FR β 於試管內表現低水平之FR，但THP1-FR β 腫瘤癌轉移經發現在約8.9 pmol/mg $\pm$ 2.8 pmol/mg膜蛋白下表現高於預期之功能性FR含量。因此，以約6百萬/動物向THP1-FR β 腫瘤攜帶小鼠移植研究批次之EGFR^t-未篩選之E2-CAR T細胞(約23%EGFR^t+, 1:1 CD4:CD8)且隨後用3種不同EC17投藥療法來治療(圖13)。在CAR-T細胞注射之後開始3天，EC17投藥療法在SIW持續處於500 nmol/kg時開始，以5/50/500 nmol/kg在星期一/星期三/星期五進行一週三次(TIW)，隨後中斷9天，或藉由加速劑量遞增療法在第1循環中以5/10/100 nmol/kg、在第2循環中以5/30/300 nmol及在第3循環中以5/50/500 nmol kg在星期一/星期四/星期一(M/Th/M)進行，隨後中斷6天(圖13，A圖)。在接受EC17 SIW治療之動物體內觀測到循環2及循環3中的一些體重減輕及1至2級CRS，而接受EC17 TIW之動物體重減輕最少，僅為0至1級CRS(圖13，B圖)。在接受3

次循環之EC17 M/Th/M劑量遞增的動物當中，在300 nmol/kg之EC17的最末劑量之後的第2循環中觀測到0至1級CRS及極輕微體重減輕。在第31天使用衛星動物，對血液中之CAR T細胞進行計數，且資料展現出在所有經治療群組中之EC17依賴型CAR-T細胞增殖及存留(圖13，C圖)。與僅接受腫瘤細胞或腫瘤細胞加CAR T細胞而無EC17之對照動物相比，經3個「內部患者」遞增格式中之任一者投藥之EC17有效地降低血液中之循環THP1-FR β 腫瘤細胞，且展示出針對肝腫瘤癌轉移之類似活性(圖13，D圖，左側及中間條形圖)。僅發現微量之針對僅接受CAR T細胞之小鼠體內的THP1-FR β 肝癌轉移之同種異體反應性。以10倍劑量遞增(進行/停止)之EC17 SIW及TIW成功地控制非肝巨轉移酶，以每循環緩慢步調之EC17 M/Th/M劑量遞增(圖13，A圖)未能控制非肝巨轉移酶(圖13，D圖，最右側圖)。在研究結束(亦即CAR-T細胞注射後39天)時，自肝THP1-FR β 腫瘤癌轉移分離之CAR T細胞似乎具有最少之雙重及參重陽性T細胞抑制受體、PD1、LAG3及TIM3之表現(圖13，E圖)。總體而言，未在任何經EC17治療之群組中觀測到嚴重CRS (亦即等級 ≥ 3)。然而，較大侵略性EC17 TIW劑量遞增(進行/停止)排程傾向於為用於降低此等小鼠體內之總THP1-FR β 腫瘤攜帶之最佳療法。

【0468】

實例24

功能性FR評估

此等功能性FR評估適用於本文中所描述之實例。除經FR α (HOS-FR α)及FR β (THP1-FR β)轉染之兒童癌細胞系之外，亦包括具有不同組織結構及FR表現水平(圖11)之癌細胞系。如藉由放射性配位體結合分析(在

37°C 下，100 nM ^3H -FA，1 h)所估計，在此等細胞系上總體可獲得之FR的分級次序為： 9×10^4 (OV90，低-FR表現卵巢癌細胞系)、 1.9×10^5 (THP1-FR β)、 2.4×10^5 (HOS-FR α^{fLuc})、 7×10^5 (HOS-FR α)、 2.1×10^6 (MDA-MB-231)及 4.8×10^6 (KB) FA分子/細胞。亦將HOS-143b(fLuc)及THP1-FG12母細胞系包括為FR-陰性對照。因此，對共培養FR+癌細胞系之功能性FR表現的一般分級為：KB>MDA-MB-231>HOS-FR α >HOS-FR α^{fLuc} >THP1-FR β (AML)>OV90。

【0469】

實例25

統計

使用電腦程式GraphPad Prism (GraphPad Software公司., San Diego, CA)來執行統計分析。使用司圖頓t測試或單向ANOVA對資料進行分析。若適用，使用適當多個比較事後測試在治療組內對資料作進一步分析。在所有測試中將 $*=p < 0.05$ 視為統計學上顯著。

202000229

【發明摘要】

【中文發明名稱】

CAR T細胞療法之順序方法

【英文發明名稱】

SEQUENCING METHOD FOR CAR T CELL THERAPY

【中文】

本發明係關於治療癌症患者之方法，其藉由向該患者投與包含CAR T細胞之組合物且向該患者投與藉由連接子連接於靶向部分之小分子。本發明亦關於用於此類方法之組合物。

【英文】

The present disclosure relates to methods of treating a patient with a cancer by administering to the patient a composition comprising CAR T cells and administering to the patient a small molecule linked to a targeting moiety by a linker. The disclosure also relates to compositions for use in such methods.

【指定代表圖】

圖4

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種治療癌症之方法，該方法包含

- i)向患者投與至少一種劑量之包含CAR T細胞之CAR T細胞組合物，其中該等CAR T細胞包含引導至靶向部分之CAR；
- ii)向該患者投與化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中該化合物包含藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體，且其中該化合物或其醫藥學上可接受之鹽係以至少第一劑量遞增順序及第二劑量遞增順序投與。

【第2項】

如請求項1之方法，其中該化合物或其醫藥學上可接受之鹽係以至少第一劑量遞增順序、第二劑量遞增順序及第三劑量遞增順序投與。

【第3項】

如請求項1之方法，其中該化合物或其醫藥學上可接受之鹽係以至少第一劑量遞增順序、第二劑量遞增順序、第三劑量遞增順序及第四劑量遞增順序投與。

【第4項】

如請求項1之方法，其中該化合物或其醫藥學上可接受之鹽係以至少第一劑量遞增順序、第二劑量遞增順序、第三劑量遞增順序、第四劑量遞增順序及第五劑量遞增順序投與。

【第5項】

如請求項1之方法，其中該化合物或其醫藥學上可接受之鹽係以至少第一劑量遞增順序、第二劑量遞增順序、第三劑量遞增順序、第四劑量遞增順序、第五劑量遞增順序及第六劑量遞增順序投與。

【第6項】

如請求項1至5中任一項之方法，其中向該患者投與第一劑量之該等CAR T細胞及第二劑量之該等CAR T細胞。

【第7項】

如請求項6之方法，其中該等CAR T細胞之該第一劑量為監測該患者對該等CAR T細胞之耐受性的測試劑量。

【第8項】

如請求項6之方法，其中該等CAR T細胞之該第二劑量包含比該第一劑量之該等CAR T細胞更高劑量之該等CAR T細胞。

【第9項】

如請求項1至8中任一項之方法，其中該第一劑量遞增順序之後為期間不投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽的時間段。

【第10項】

如請求項1至9中任一項之方法，其中該第二劑量遞增順序之後為期間不投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽的時間段。

【第11項】

如請求項2至10中任一項之方法，其中該第三劑量遞增順序之後為期間不投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽的時間段。

【第12項】

如請求項3至11中任一項之方法，其中該第四劑量遞增順序之後為期間不投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽的時間段。

【第13項】

如請求項4至12中任一項之方法，其中該第五劑量遞增順序之後為期

間不投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽的時間段。

【第14項】

如請求項5至13中任一項之方法，其中該第六劑量遞增順序之後為期間不投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽的時間段。

【第15項】

如請求項9至14中任一項之方法，其中該時間段為約7天。

【第16項】

如請求項1至15中任一項之方法，其中該第一劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約10%及約100%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【第17項】

如請求項1至16中任一項之方法，其中該第二劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約30%及約300%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【第18項】

如請求項2至17中任一項之方法，其中該第三劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約50%及約500%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【第19項】

如請求項3至18中任一項之方法，其中該第四劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約10%及約100%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【第20項】

如請求項4至19中任一項之方法，其中該第五劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約30%及約300%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【第21項】

如請求項5至20中任一項之方法，其中該第六劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約50%及約500%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【第22項】

如請求項16至21中任一項之方法，其中該全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽為約10 $\mu\text{g/kg}$ 至約50 $\mu\text{g/kg}$ 的該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【第23項】

如請求項16至22中任一項之方法，其中該全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽為約20 $\mu\text{g/kg}$ 至約40 $\mu\text{g/kg}$ 的該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【第24項】

如請求項16至23中任一項之方法，其中該全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽為約25 $\mu\text{g/kg}$ 至約35 $\mu\text{g/kg}$ 之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【第25項】

如請求項16至24中任一項之方法，其中該全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽為約30 $\mu\text{g/kg}$ 的該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【第26項】

如請求項1至25中任一項之方法，其中若在該第一劑量遞增順序期間在患者體內未觀測到CRS或神經毒性，則該方法前進至該第二劑量遞增順序。

【第27項】

如請求項2至26中任一項之方法，其中若在該第二劑量遞增順序期間在該患者體內未觀測到CRS或神經毒性，則該方法前進至該第三劑量遞增順序。

【第28項】

如請求項3至27中任一項之方法，其中若在該第三劑量遞增順序期間在該患者體內未觀測到CRS或神經毒性，則該方法前進至該第四劑量遞增順序。

【第29項】

如請求項4至28中任一項之方法，其中若在該第四劑量遞增順序期間在患者體內未觀測到CRS或神經毒性，則該方法前進至該第五劑量遞增順序。

【第30項】

如請求項5至29中任一項之方法，其中若在該第五劑量遞增順序期間在患者體內未觀測到CRS或神經毒性，則該方法前進至該第六劑量遞增順序。

【第31項】

如請求項1至30中任一項之方法，其中若在該等劑量遞增序列中之任一者期間在該患者體內觀測到發熱而無低血壓且在該患者體內未觀測到神經毒性，則在致使該發熱而無低血壓之該劑量遞增序列含量下向該患者投

與所有後續劑量的該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【第32項】

如請求項1至30中任一項之方法，其中若在任何劑量遞增順序下在該患者體內出現嚴重CRS或神經毒性，則在低於在該患者體內造成該嚴重CRS或神經毒性之該劑量遞增順序水準之該劑量遞增順序水準下向該患者投與所有後續劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【第33項】

一種治療癌症之方法，該方法包含

i)向患者投與至少一種劑量之包含CAR T細胞之CAR T細胞組合物，其中該等CAR T細胞包含引導至靶向部分之CAR；

ii)向該患者投與化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中該化合物包含藉由連接子連接於靶向部分之小分子配位體，且其中該化合物或其醫藥學上可接受之鹽以第一劑量遞增順序投與，其中若在該第一劑量遞增順序中出現嚴重CRS，則使用較低劑量遞增順序投與該化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中該較低劑量遞增順序中之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽的該第一劑量低於以該第一劑量遞增順序投與之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽的該第一劑量。

【第34項】

如請求項33之方法，其中在該較低劑量遞增順序中，該化合物或其醫藥學上可接受之鹽在分開的三天以全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽的約0.5%、約5%及約50%投與。

【第35項】

如請求項34之方法，其中該化合物或其醫藥學上可接受之鹽之該全

劑量為約10 $\mu\text{g/kg}$ 至約50 $\mu\text{g/kg}$ 之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【第36項】

如請求項34至35中任一項之方法，其中該全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽為約25 $\mu\text{g/kg}$ 至約35 $\mu\text{g/kg}$ 之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【第37項】

如請求項34至36中任一項之方法，其中該全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽為約30 $\mu\text{g/kg}$ 的該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【第38項】

如請求項1至37中任一項之方法，其中該等CAR T細胞包含含有SEQ ID NO:4之核酸。

【第39項】

如請求項1至38中任一項之方法，其中該等CAR T細胞包含含有SEQ ID NO:5之多肽。

【第40項】

如請求項38之方法，其中該核酸編碼嵌合抗原受體。

【第41項】

如請求項2至15中任一項之方法，其中該第一劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約2%及約20%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其中該第二劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約6%及約60%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽，且其中該第三劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約10%及約100%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【第42項】

如請求項2至15中任一項之方法，其中該第一劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約10%及約100%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽，且其中該第二劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約20%及約200%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

【第43項】

如請求項2至15中任一項之方法，其中該第一劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約10%及約100%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽，且其中該第二劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約10%及約100%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

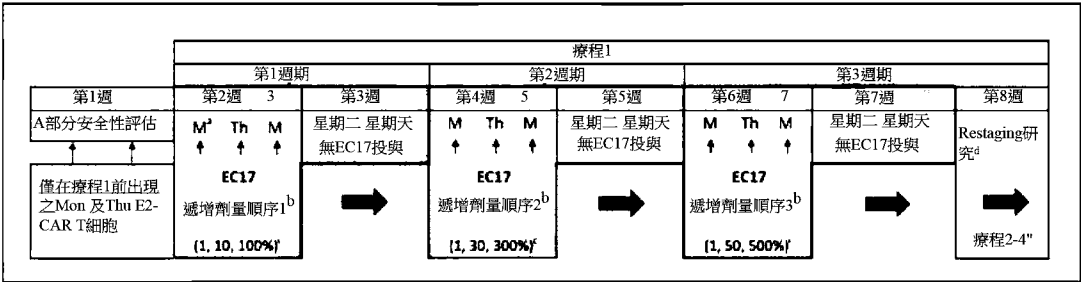
【第44項】

如請求項2至15中任一項之方法，其中該第一劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約20%及約200%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽，且其中該第二劑量遞增順序包含在分開的三天向該患者投與約1%、約20%及約200%的全劑量之該化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

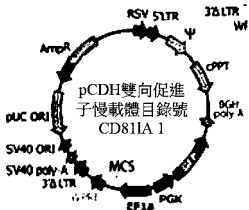
【第45項】

如請求項41至44中任一項之方法，其中該化合物或其醫藥學上可接受之鹽之該全劑量為約500奈莫耳/公斤。

【發明圖式】



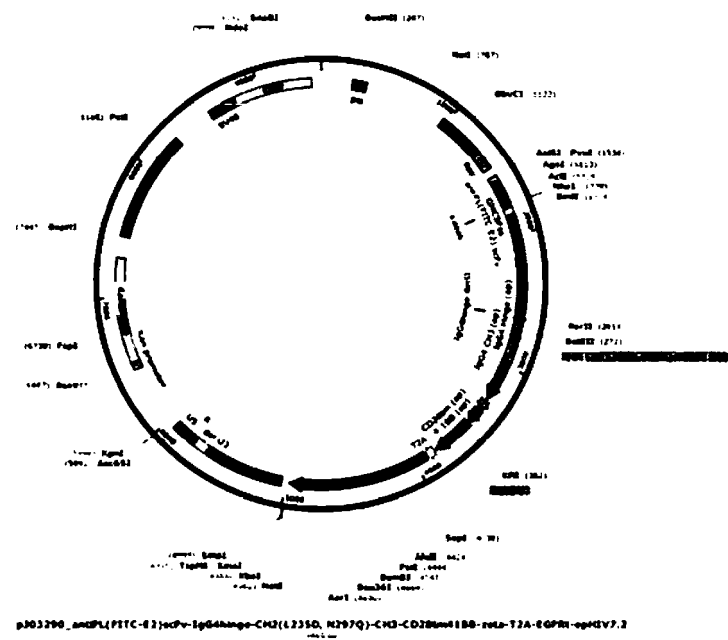
【圖1】



SP	抗FITC scFv (4M5.3)	CDBa鉸鏈& TM	4-1BB	CD3ζ
----	--------------------	------------	-------	------

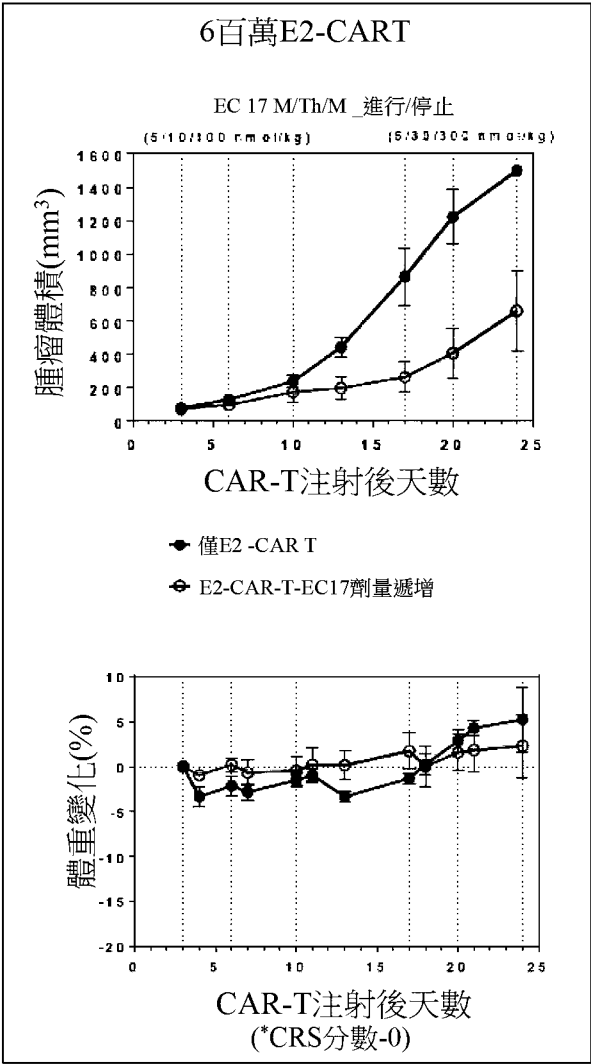
【圖2】

- 1. pJ03290：抗FL(FITC-E2)scFv - IgG4鉸鏈(CH2(L235D, N297Q)-CH3)-CD28 TM-4-1BB-CD3z-T2A-EGFRt
- 2. pJ03340：抗FL(4M53)scFv - IgG4鉸鏈(CH2(L235D, N297Q)-CH3)-CD28 TM-4-1BB-CD3z-T2A-EGFRt

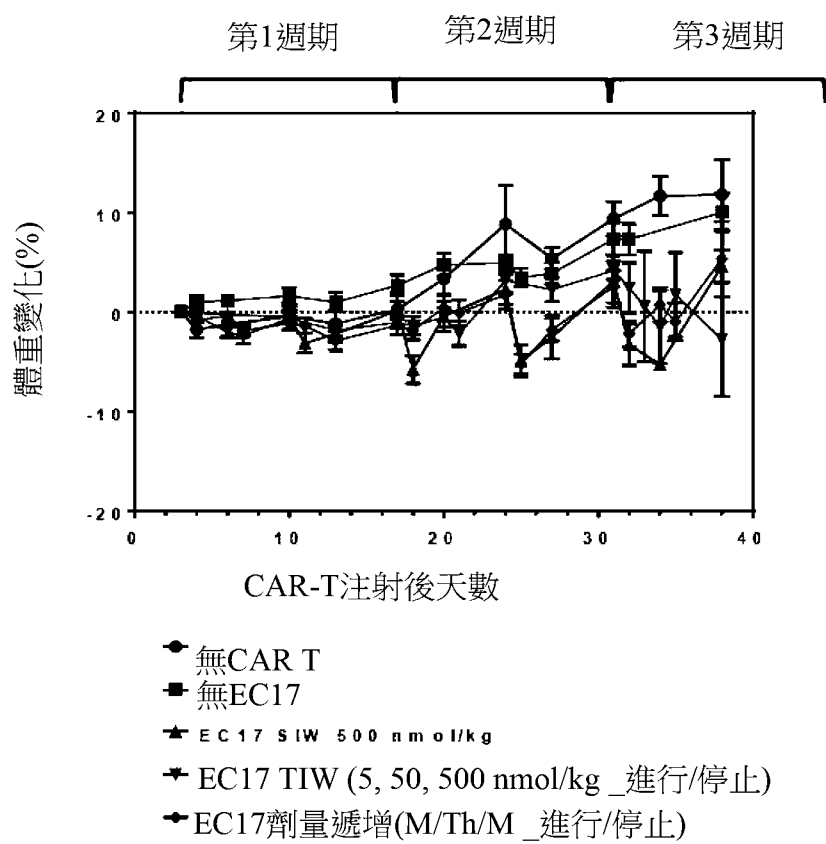


【圖3】

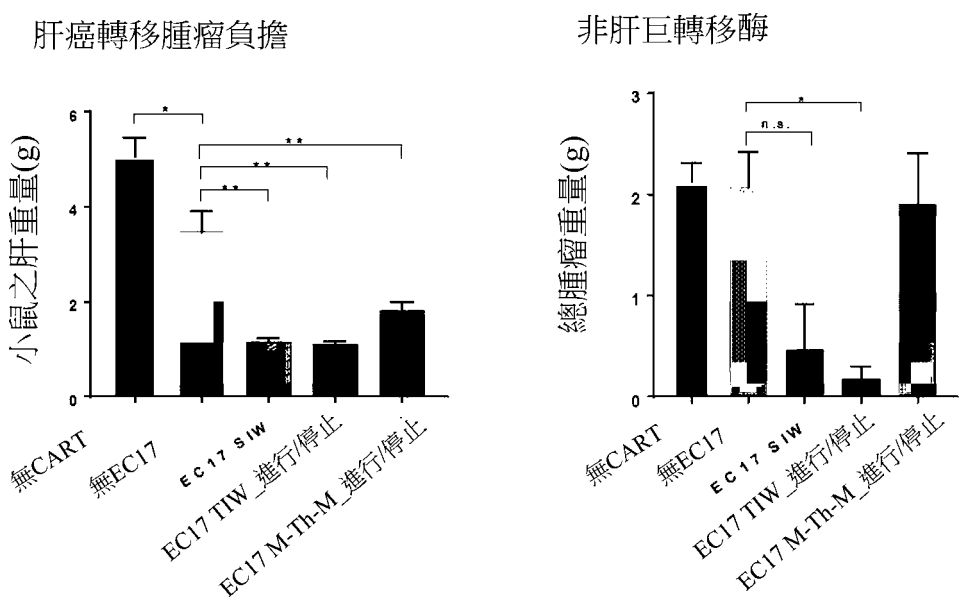
骨肉瘤：HOS-FR α



【圖4】

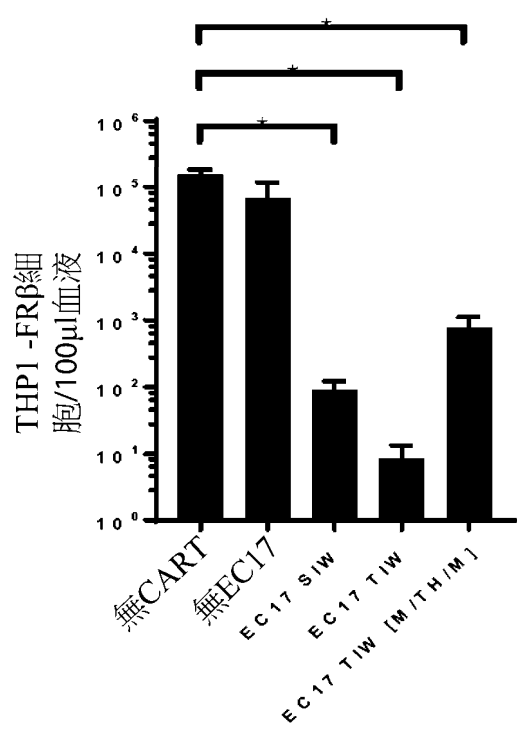


【圖5】



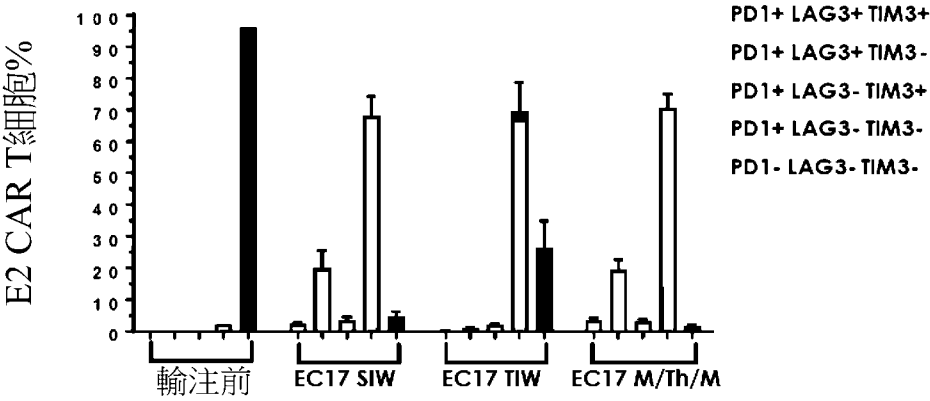
【圖6】

血液中之腫瘤細胞(第39天)

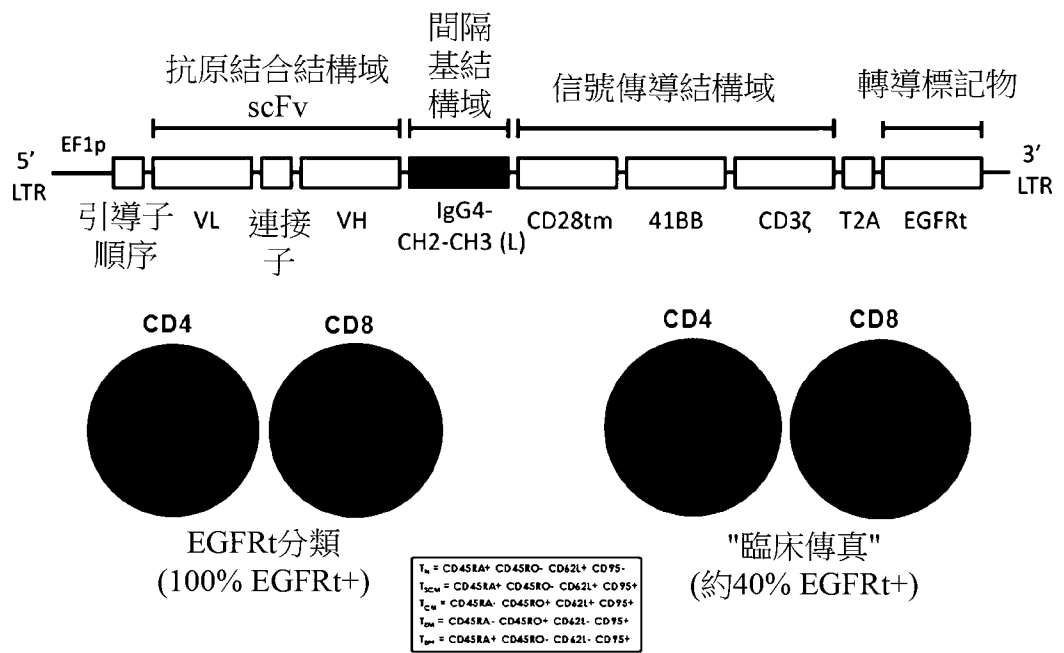


【圖7】

CAR-T耗竭表現型(肝腫瘤滿足)

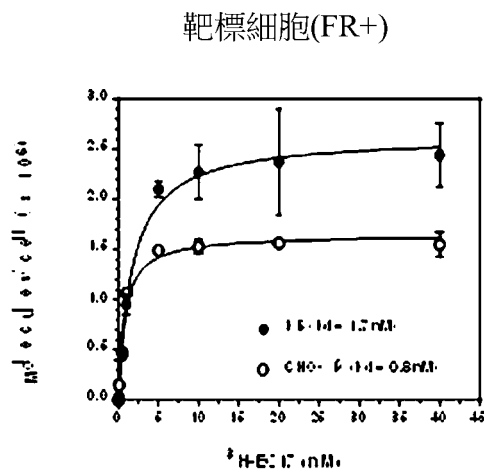


【圖8】

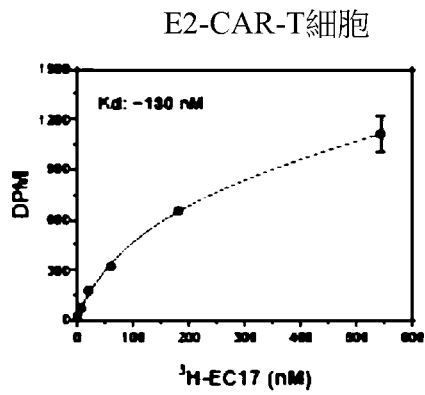


【圖9】

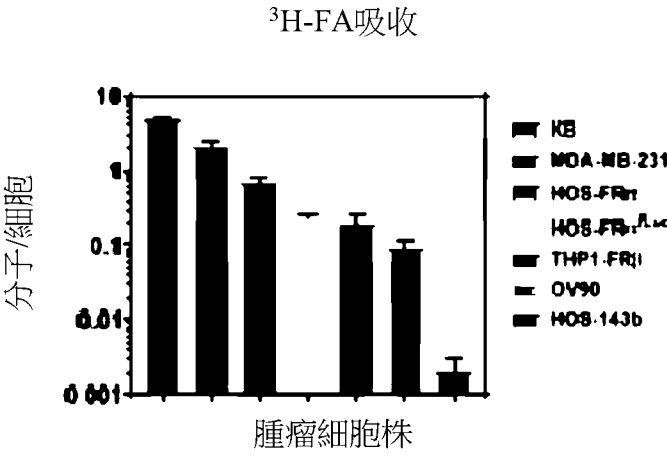
A



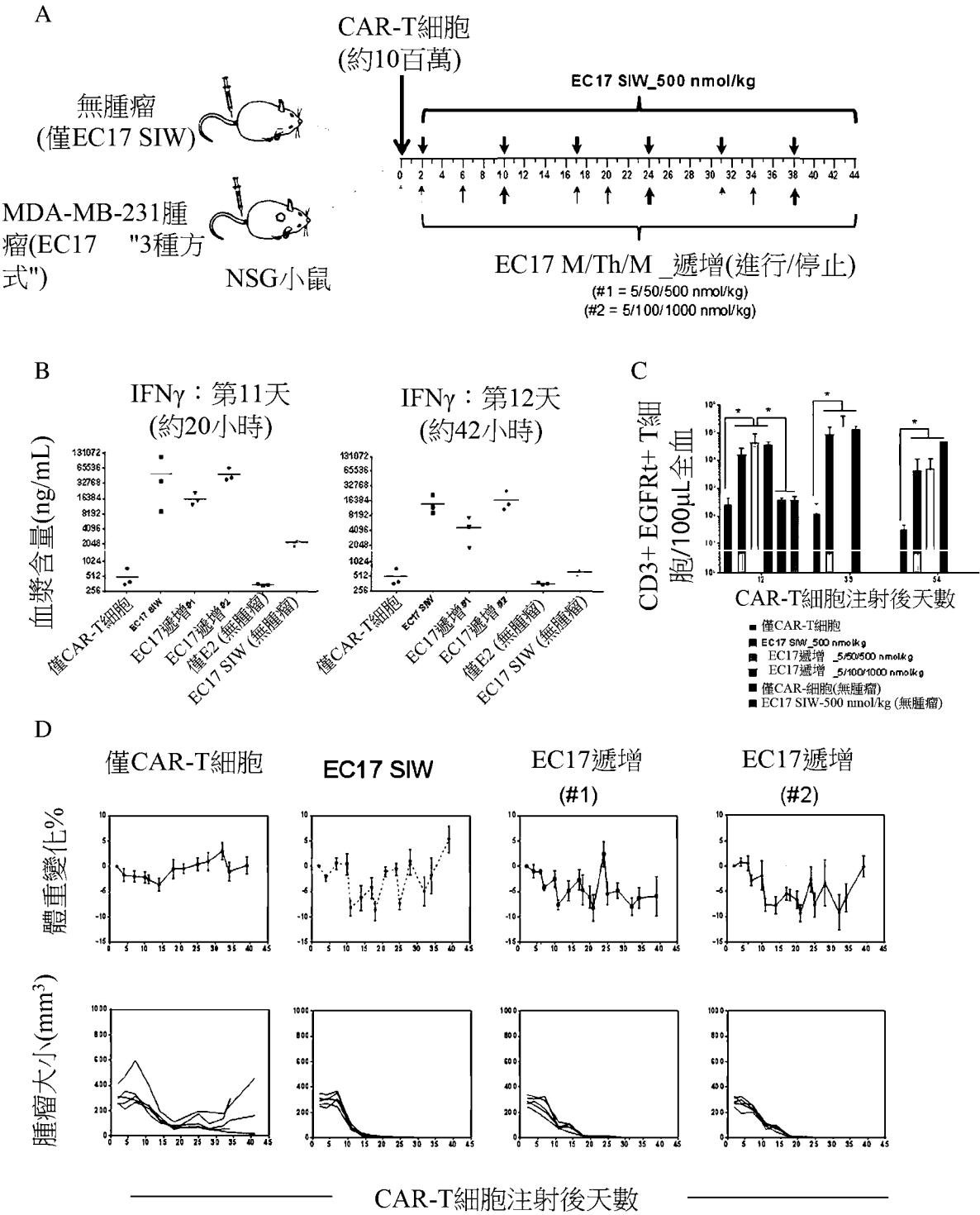
B



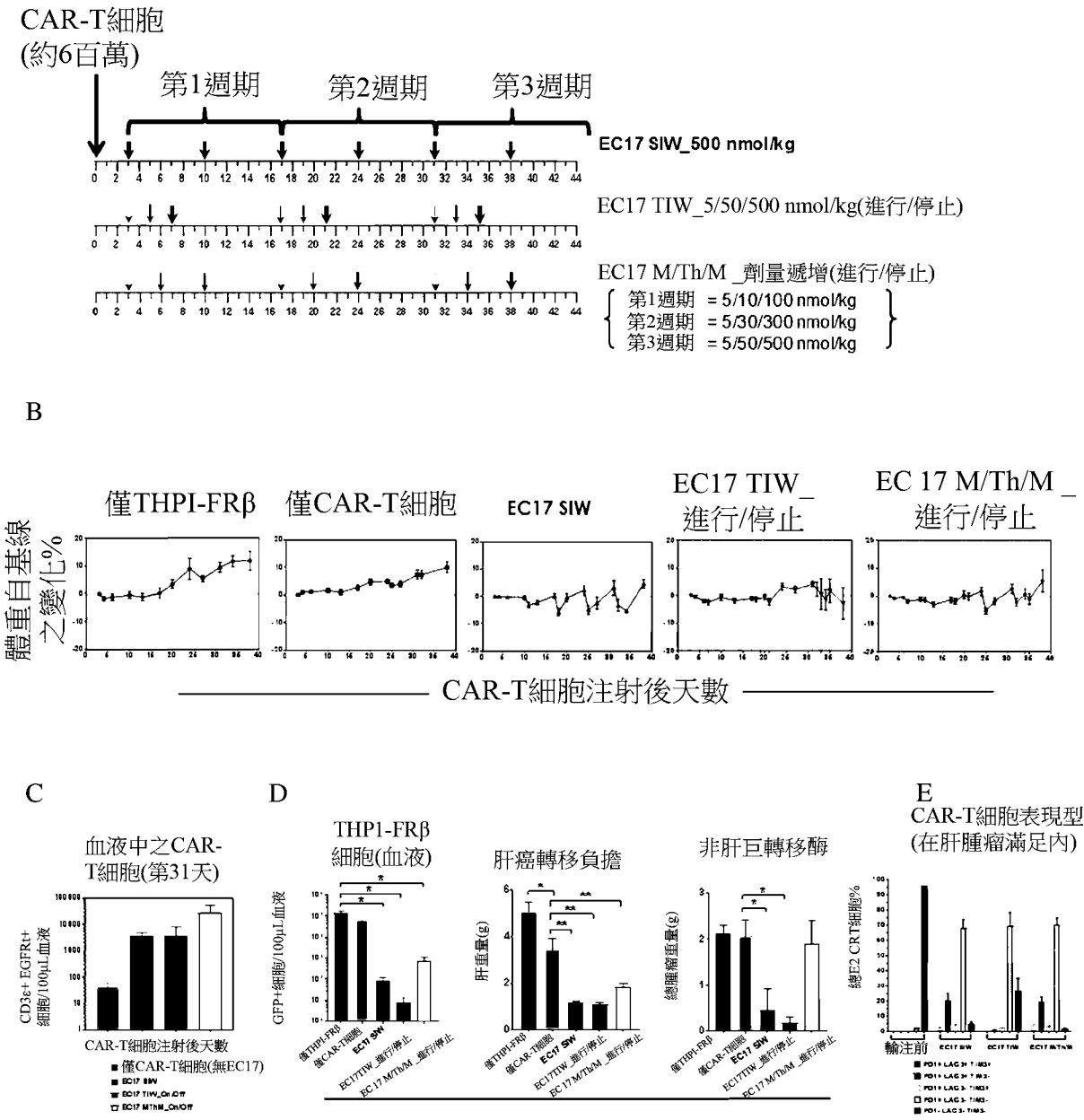
【圖10】



【圖11】

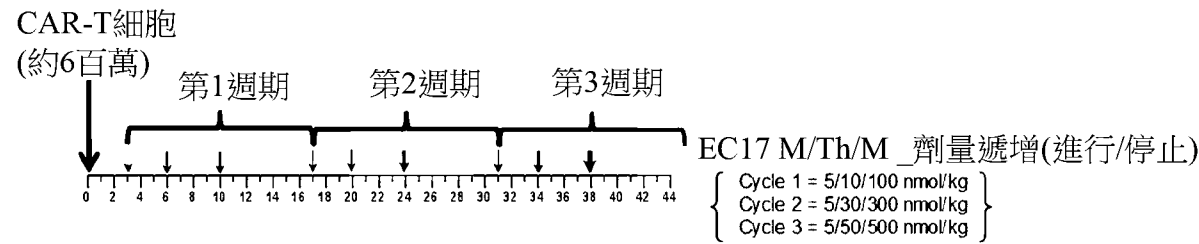


【圖12】

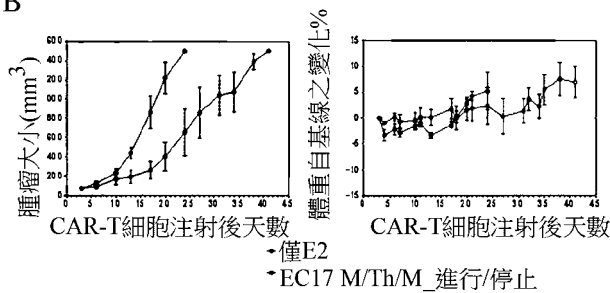


【圖13】

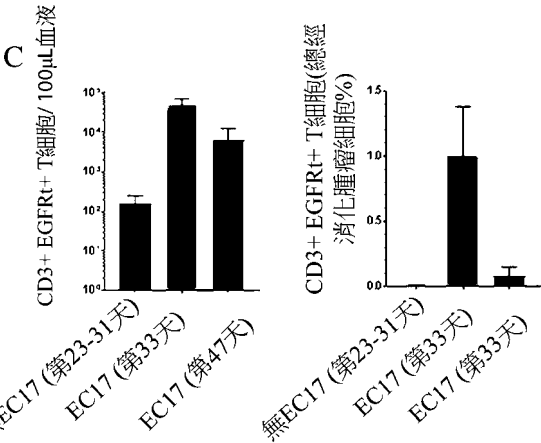
A



B



C



【圖14】