



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 110582288 B

(45) 授权公告日 2024. 09. 20

(21) 申请号 201880028009.X

(22) 申请日 2018.02.28

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110582288 A

(43) 申请公布日 2019.12.17

(30) 优先权数据

62/464792 2017.02.28 US
62/480627 2017.04.03 US
62/554421 2017.09.05 US
62/620423 2018.01.22 US
62/620384 2018.01.22 US
62/620701 2018.01.23 US
62/634595 2018.02.23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.10.28

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/020095 2018.02.28

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/160622 EN 2018.09.07

(73) 专利权人 恩多塞特公司

地址 美国印第安那州

专利权人 普渡研究基金会

(72) 发明人 P.S.罗 H.储 Y.G.李 Y.J.卢
C.P.利蒙 L.W.惠勒二世

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

专利代理师 翟建伟 周齐宏

(51) Int.Cl.

C07K 14/725 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

(56) 对比文件

WO 2014100615 A1, 2014.06.26

WO 2016201300 A1, 2016.12.15

WO 2017177149 A2, 2017.10.12

审查员 冯小叶

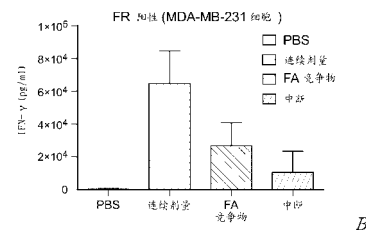
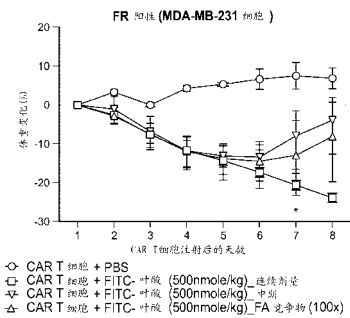
权利要求书1页 说明书142页
序列表4页 附图138页

(54) 发明名称

用于CAR T细胞疗法的组合物和方法

(57) 摘要

本发明涉及通过向患者施用包含CAR T细胞和通过接头与靶向部分连接的小分子的组合物治疗具有癌症的患者的方法。本发明也涉及用于此类方法中的组合物。



1. 用于治疗癌症的组合药物,其包含:

成分A:化合物或其药学上可接受的盐,所述化合物包含与异硫氰酸荧光素 (FITC) 连接的叶酸,即FITC-叶酸;

成分B:嵌合抗原受体T细胞 (CAR T细胞) 组合物,其包含CAR T细胞,所述CAR T细胞包含针对FITC的嵌合抗原受体 (CAR),和

成分C:抑制CAR T细胞活化的拯救剂,其选自叶酸、荧光素钠和甲酰四氢叶酸,其中向患有癌症的患者施用成分A、成分B和成分C,

其中所述癌症是表达叶酸受体的癌症;并且其中所述CAR T细胞包含SEQ ID NO:2所示的多肽。

2. 权利要求1的组合药物,其中所述CAR具有识别区且所述识别区是抗FITC抗体的单链片段可变 (scFv) 区,其中所述CAR具有共刺激结构域并且所述共刺激结构域为CD137 (4-1BB),并且其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3ζ链。

3. 权利要求1或2的组合药物,其中成分A不是抗体,并且不包含抗体片段。

4. 权利要求1或2的组合药物,其中施用抑制CAR T细胞活化的拯救剂并且所述拯救剂是阻断CAR T细胞结合成分A但不结合癌症的药剂。

5. 权利要求1或2的组合药物,其中成分C的拯救剂是荧光素钠。

6. 权利要求1或2的组合药物,其中在施用成分C之前,患者表现出细胞因子释放综合征 (CRS) 或细胞因子风暴的迹象。

7. 权利要求6的组合药物,其中确定患者的CRS等级,并且当CRS等级为1、2、3或4时,向患者施用成分C。

8. 权利要求6的组合药物,其中向患者施用成分A、成分B和成分C减少CRS或细胞因子风暴。

9. 权利要求1或2的组合药物,其中组合药物的施用导致患者肿瘤体积减少。

用于CAR T细胞疗法的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35 U.S.C. § 119(e) 要求2017年2月28日提交的美国临时申请号62/464,792、2017年4月3日提交的美国临时申请号62/480,627、2017年9月5日提交的美国临时申请号62/554,421、2018年1月23日提交的美国临时申请号62/620701、2018年1月22日提交的美国临时申请号62/620,384、2018年1月22日提交的美国临时申请号62/620,423和2018年2月23日提交的美国临时申请号62/634,595的优先权,所述美国临时申请通过引用以其整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及通过向所述患者施用包含CAR T细胞的组合物和向所述患者施用通过接头与靶向部分连接的小分子治疗具有癌症的患者的方法。本发明也涉及用于此类方法中的组合物。

[0004] 发明背景

[0005] 基于淋巴细胞(例如,T细胞)向患者中的过继转移的免疫疗法在癌症和其他疾病的治疗中是一种有价值的疗法。在基于淋巴细胞的过继转移的免疫疗法的开发中已经做出重要进展。在许多不同类型的免疫治疗剂中,所开发的最有前途的免疫治疗剂之一是表达嵌合抗原受体的T细胞(CAR T细胞)。所述嵌合抗原受体(CAR)是一种遗传工程改造的受体,其被设计成靶向特定抗原,例如,肿瘤抗原。该靶向可以导致对肿瘤的细胞毒性,例如,使得表达CAR的CAR T细胞可以经由特异性肿瘤抗原靶向和杀死肿瘤。

[0006] 第一代CAR由识别区域(例如,从抗体衍生出的单链片段可变(scFv)区域,其用于识别和结合由肿瘤表达的抗原)和活化信号传导结构域构成,例如,T细胞的CD3 ζ 链可以充当CAR中的T细胞活化信号。尽管CAR T细胞已经在体外显示积极结果,但它们在临床试验中在消除疾病(例如,癌症)中已经获得有限的成功。一个问题是不能在体内延长活化和扩增CAR T细胞群体。

[0007] 为了解决该问题,已经在第二代CAR中包括共刺激结构域(例如CD137、CD28或CD134)来实现体内T细胞的延长活化。共刺激结构域的添加增强含有CAR的T细胞的体内增殖和存活,且初步临床数据已经显示,此类构建体在疾病(诸如癌症)的治疗中是有前途的治疗剂。

[0008] 尽管已经在CAR T细胞疗法中做出改进,仍然有几个问题。首先,由于表达被CAR T细胞靶向的抗原(例如,肿瘤相关抗原)的正常细胞,‘脱靶’毒性可能发生。其次,在CAR T细胞对患病细胞(例如,癌细胞)的快速和失控消除诱导大群代谢紊乱(称为肿瘤裂解综合征;或细胞因子释放综合征(CRS),它们可能是对患者致命的)的情况下,可以发现失调的CAR T细胞活化。肿瘤裂解综合征和CRS可以由于施用的CAR T细胞(其不可容易地调节且失控地活化)而产生。因此,尽管CAR T细胞显示作为疾病(诸如癌症)的治疗中的工具的巨大希望,但需要额外的CAR T细胞疗法,其提供减小的脱靶毒性和CAR T细胞活化的更精确控制。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明人已经发现降低脱靶毒性和更精确地控制CAR T细胞活化的方法,提供了CAR T细胞疗法中的重要进展。在本文描述的各个实施方案中,将通过接头与靶向部分连接的小分子配体用作癌症和CAR T细胞之间的桥,其将CAR T细胞引导至癌症以改善所述癌症。在一个实施方案中,所述“小分子配体”可以是,例如,叶酸、DUPA、NK-1R配体、CAIX配体、 γ 谷氨酰基转肽酶的配体、NKG2D配体或CCK2R配体,其中的每一种是特异性结合癌细胞的小分子配体(即,这些配体的受体在癌症上相比于正常组织而言过表达)。

[0011] 在一个实施方案中,所述“小分子配体”连接至“靶向部分”,所述“靶向部分”结合由CAR T细胞表达的CAR。在各个实施方案中,所述“靶向部分”可以选自,例如,2,4-二硝基苯酚(DNP)、2,4,6-三硝基苯酚(TNP)、生物素、地高辛配基、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、NHS-荧光素、五氟苯基酯(PFP)、四氟苯基酯(TFP)、打结素、centyrin和DARPin。

[0012] 所述“靶向部分”结合由CAR T细胞表达的遗传工程改造的CAR的识别区域。因此,所述CAR的识别区域(例如,抗体的单链片段可变区(scFv)、Fab、Fv、Fc、(Fab')₂片段等)针对“靶向部分”。因此,通过接头与靶向部分连接的小分子配体充当癌症和CAR T细胞之间的桥,其将CAR T细胞引导至癌症以改善所述癌症。

[0013] 在一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,ii)向患者施用第一剂量的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞,且其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR,且iii)向患者施用第二剂量的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞,且其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR。

[0014] 在另一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,且ii)向患者施用包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述组合物中的CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR,且其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞和未转化的T细胞的混合物。

[0015] 在又一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,ii)向患者施用CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞,且其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR,且iii)向患者施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂。

[0016] 在另一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,且其中所述化合物或其药学上可接受的盐剂量为约10 nmol/kg患者体重至约2500 nmol/kg患者体重,且ii)向患者施用包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR,且其中所述CAR T细胞剂量为约100万个CAR T细胞至约1500万个CAR T细胞。

[0017] 在又一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者连续施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,ii)向患者施用包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞包含针对所

述靶向部分的CAR,且iii)结束所述化合物或其药学上可接受的盐的施用,以减少患者中的细胞因子释放综合征。

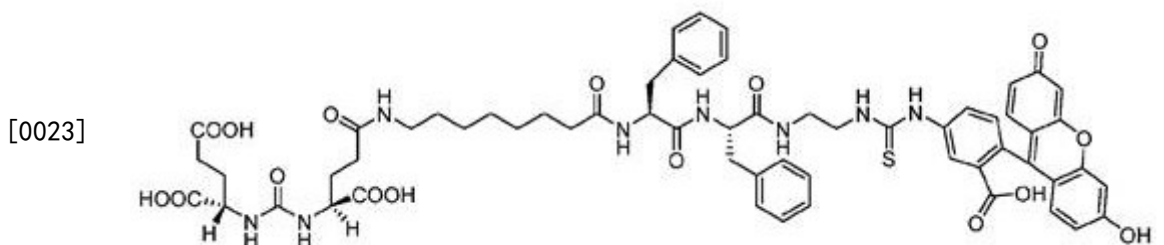
[0018] 在另一个说明性方面,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,其中向患者施用至少第一剂量和第二剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中第一剂量和第二剂量是不同的,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约2倍至约15000倍,且ii)向患者施用包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR。

[0019] 在另一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,且其中向患者每周一次施用所述化合物或其药学上可接受的盐,且ii)向患者施用包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR。

[0020] 在又一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者施用第一剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,ii)向患者施用至少第二剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐至多约50%,且iii)向患者施用一定剂量的包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR。

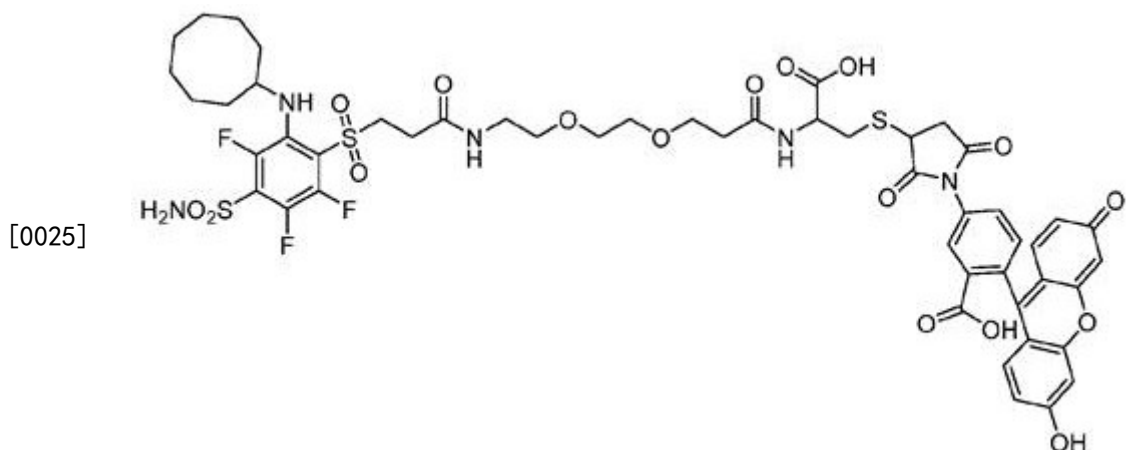
[0021] 在又一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者施用第一剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,且其中在施用包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物前至少约一小时向患者施用所述化合物或其药学上可接受的盐,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR,ii)然后向患者施用一定剂量的CAR T细胞组合物,且iii)然后向患者施用第二剂量的化合物或其药学上可接受的盐。

[0022] 在另一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,且ii)向患者施用CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞,且其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR,且其中所述小分子配体是PSMA配体且所述靶向部分是FITC。在该实施方案中,通过接头与靶向部分连接的小分子配体可以具有下式

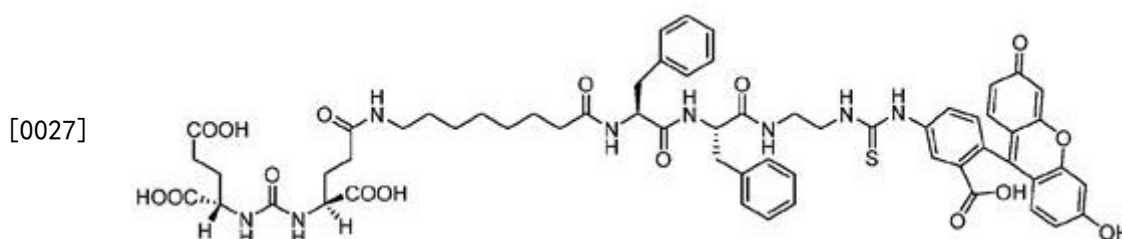


[0024] 在又一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,且ii)向患者施用CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞,且其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR,且其中所述小分子配体是CAIX配体且所述靶

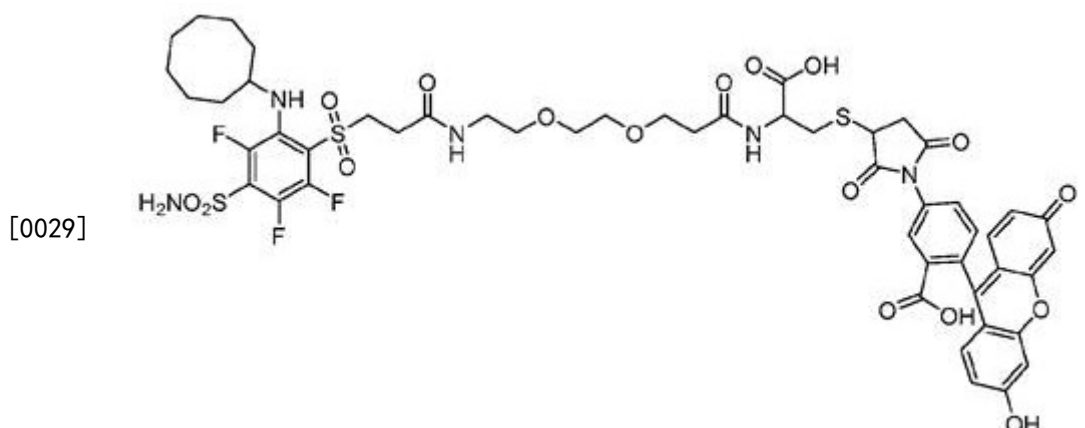
向部分是FITC。在该实施方案中,通过接头与靶向部分连接的小分子配体可以具有下式



[0026] 在又一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者施用第一化合物或其药学上可接受的盐,其中所述第一化合物或其药学上可接受的盐包含通过接头与FITC连接的PSMA配体,ii)向患者施用第二化合物或其药学上可接受的盐,其中所述第二化合物或其药学上可接受的盐包含通过接头与FITC连接的CAIX配体,且iii)向患者施用CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞,且其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR。在该实施方案中,所述第一化合物可以具有下式



[0028] 且所述第二化合物可以具有下式



[0030] 额外的实施方案还通过以下列举的条款进行描述。还考虑任何以下实施方案与在本专利申请的概述部分、说明性实施方案部分的详述、实施例部分或权利要求中描述的任何适用的实施方案的组合。

[0031] 1. 治疗癌症的方法,所述方法包括:

[0032] i) 向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与

靶向部分连接的小分子配体；

[0033] ii) 向所述患者施用第一剂量的包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR;且

[0034] iii) 向所述患者施用第二剂量的包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR。

[0035] 2. 条款1的方法,其中所述配体选自叶酸、DUPA、NK-1R配体、CAIX配体、 γ 谷氨酰基转肽酶的配体、NKG2D配体和CCK2R配体。

[0036] 3. 条款1或2中任一项的方法,其中所述配体是叶酸。

[0037] 4. 条款1或2中任一项的方法,其中所述配体是NK-1R配体。

[0038] 5. 条款1或2中任一项的方法,其中所述配体是DUPA。

[0039] 6. 条款1或2中任一项的方法,其中所述配体是CCK2R配体。

[0040] 7. 条款1或2中任一项的方法,其中所述配体是 γ 谷氨酰基转肽酶的配体。

[0041] 8. 条款1至7中任一项的方法,其中所述靶向部分选自2,4-二硝基苯酚(DNP)、2,4,6-三硝基苯酚(TNP)、生物素、地高辛配基、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、NHS-荧光素、五氟苯基酯、四氟苯基酯、打结素、centyrin和DARPin。

[0042] 9. 条款1至8中任一项的方法,其中所述靶向部分是FITC。

[0043] 10. 条款1至8中任一项的方法,其中所述靶向部分是DNP。

[0044] 11. 条款1至8中任一项的方法,其中所述靶向部分是TNP。

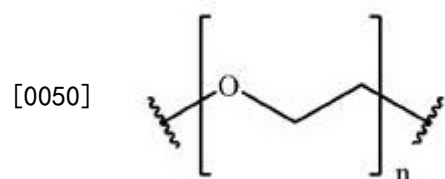
[0045] 12. 条款1至11中任一项的方法,其中所述接头包含聚乙二醇(PEG)、聚脯氨酸、亲水氨基酸、糖、非天然的肽聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、pluronic F-127或其组合。

[0046] 13. 条款1至12中任一项的方法,其中所述接头包含PEG。

[0047] 14. 条款1至13中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐具有下式

[0048] $B-L-T$,

[0049] 其中B代表小分子配体,L代表接头,且T代表靶向部分,且其中L包含具有下式的结构



[0051] 其中n是0至200的整数。

[0052] 15. 条款14的方法,其中n是0至150的整数。

[0053] 16. 条款14的方法,其中n是0至110的整数。

[0054] 17. 条款14的方法,其中n是0至20的整数。

[0055] 18. 条款14的方法,其中n是15至20的整数。

[0056] 19. 条款14的方法,其中n是15至110的整数。

[0057] 20. 条款1至9或12至19中任一项的方法,其中所述接头包含PEG,且所述靶向部分是FITC,或其药学上可接受的盐。

- [0058] 21. 条款1至20中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约10000 nmol/kg患者体重的剂量施用。
- [0059] 22. 条款1至21中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约5000 nmol/kg患者体重的剂量施用。
- [0060] 23. 条款1至22中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约1000 nmol/kg患者体重的剂量施用。
- [0061] 24. 条款1至23中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。
- [0062] 25. 条款1至24中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约200 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。
- [0063] 26. 条款1至25中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约250 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。
- [0064] 27. 条款1至26中任一项的方法,其中所述癌症选自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头癌、颈癌、皮肤黑色素瘤、眼内黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、子宫内膜癌、直肠癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、三重阴性的乳腺癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金氏病、食管癌、小肠癌、内分泌系统的癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、非小细胞肺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、骨肉瘤、尿道癌、前列腺癌、慢性白血病、急性白血病、急性髓细胞白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、髓性白血病、髓单核细胞白血病、毛细胞白血病、胸膜间皮瘤、膀胱癌、伯基特氏淋巴瘤、输尿管癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统 (CNS) 肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、脊椎肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤和胃食管连接部的腺癌。
- [0065] 28. 条款1至3或8至27中任一项的方法,其中所述癌症是表达叶酸受体的癌症。
- [0066] 29. 条款28的方法,其中所述癌症是子宫内膜癌。
- [0067] 30. 条款28的方法,其中所述癌症是非小细胞肺癌。
- [0068] 31. 条款28的方法,其中所述癌症是卵巢癌。
- [0069] 32. 条款28的方法,其中所述癌症是三重阴性的乳腺癌。
- [0070] 33. 条款1至32中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述识别区域是抗体的单链片段可变(scFv)区域。
- [0071] 34. 条款1至9或12至33中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述CAR的识别区域是抗-FITC抗体的单链片段可变(scFv)区域。
- [0072] 35. 条款1至34中任一项的方法,其中所述CAR具有共刺激结构域且所述共刺激结构域选自CD28、CD137 (4-1BB)、CD134 (OX40) 和CD278 (ICOS)。
- [0073] 36. 条款1至35中任一项的方法,其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链或Fc受体 γ 。
- [0074] 37. 条款1至9或12至36中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述识别区域是抗-FITC抗体的单链片段可变(scFv)区域,其中所述CAR具有共刺激结构域且所述共刺激结构域是CD137 (4-1BB),且其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链。
- [0075] 38. 条款1至37中任一项的方法,其中施用多个剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐和所述CAR T细胞组合物。

[0076] 39. 条款1至38中任一项的方法,其中在施用所述化合物或其药学上可接受的盐之前,或在施用所述CAR T细胞组合物之前,将所述患者成像。

[0077] 40. 条款1至39中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐不是抗体,且不包含抗体的片段。

[0078] 41. 条款1至40中任一项的方法,其中所述靶向部分不包含肽表位。

[0079] 42. 条款1至41中任一项的方法,其中不发生所述患者中导致脱靶毒性的细胞因子释放,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。

[0080] 43. 条款1至41中任一项的方法,其中在所述患者中不发生脱靶组织毒性,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。

[0081] 44. 条款1至41中任一项的方法,其中所述癌症包含肿瘤,其中肿瘤大小在所述患者中减小,且其中不发生脱靶毒性。

[0082] 45. 条款1至44中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:1的核酸。

[0083] 46. 条款1至45中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:2的多肽。

[0084] 47. 条款45的方法,其中所述核酸编码嵌合抗原受体。

[0085] 48. 条款1至47中任一项的方法,其中所述CAR包含人源化氨基酸序列。

[0086] 49. 条款1至47中任一项的方法,其中所述CAR由人源化氨基酸序列组成。

[0087] 50. 条款1至49中任一项的方法,其中第一剂量的CAR T细胞组合物包含选自以下的比率的CAR T细胞和未转化的T细胞的混合物:约1:5的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:4的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:3的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:2的CAR T细胞:未转化的T细胞,和约1:1的CAR T细胞:未转化的T细胞。

[0088] 51. 条款1至50中任一项的方法,其中第二剂量的CAR T细胞组合物包含选自以下的比率的CAR T细胞和未转化的T细胞的混合物:约1:5的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:4的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:3的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:2的CAR T细胞:未转化的T细胞,和约1:1的CAR T细胞:未转化的T细胞。

[0089] 52. 条款1至51中任一项的方法,其中第一剂量的CAR T细胞组合物包含以下比率的CAR T细胞和未转化的T细胞的混合物:约1:1至约1:5的CAR T细胞:未转化的T细胞。

[0090] 53. 条款1至52中任一项的方法,其中第二剂量的CAR T细胞组合物包含以下比率的CAR T细胞和未转化的T细胞的混合物:约1:1至1:5的CAR T细胞:未转化的T细胞。

[0091] 54. 条款1至53中任一项的方法,其中第一剂量的CAR T细胞组合物包含约1000万个CAR T细胞和约4000万个未转化的T细胞的混合物。

[0092] 55. 条款1至54中任一项的方法,其中第二剂量的CAR T细胞组合物包含约1000万个CAR T细胞和约4000万个未转化的T细胞的混合物。

[0093] 56. 治疗癌症的方法,所述方法包括:

[0094] i) 向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,且

[0095] ii) 向患者施用CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR,且其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细

胞和未转化的T细胞的混合物。

[0096] 57. 条款56的方法,其中所述配体选自叶酸、DUPA、NK-1R配体、CAIX配体、 γ 谷氨酰基转肽酶的配体、NKG2D配体和CCK2R配体。

[0097] 58. 条款56或57中任一项的方法,其中所述配体是叶酸。

[0098] 59. 条款56或57中任一项的方法,其中所述配体是NK-1R配体。

[0099] 60. 条款56或57中任一项的方法,其中所述配体是DUPA。

[0100] 61. 条款56或57中任一项的方法,其中所述配体是CCK2R配体。

[0101] 62. 条款56或57中任一项的方法,其中所述配体是 γ 谷氨酰基转肽酶的配体。

[0102] 63. 条款56至62中任一项的方法,其中所述靶向部分选自2,4-二硝基苯酚(DNP)、2,4,6-三硝基苯酚(TNP)、生物素、地高辛配基、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、NHS-荧光素、五氟苯基酯、四氟苯基酯、打结素、centyrin和DARPin。

[0103] 64. 条款56至63中任一项的方法,其中所述靶向部分是FITC。

[0104] 65. 条款56至63中任一项的方法,其中所述靶向部分是DNP。

[0105] 66. 条款56至63中任一项的方法,其中所述靶向部分是TNP。

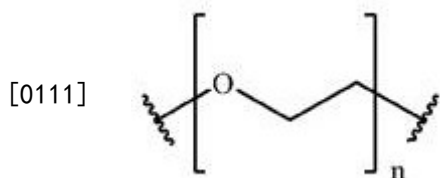
[0106] 67. 条款56至66中任一项的方法,其中所述接头包含聚乙二醇(PEG)、聚脯氨酸、亲水氨基酸、糖、非天然的肽聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、pluronic F-127或其组合。

[0107] 68. 条款56至67中任一项的方法,其中所述接头包含PEG。

[0108] 69. 条款56至68中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐具有下式

[0109] $B-L-T$,

[0110] 其中B代表小分子配体,L代表接头,且T代表靶向部分,且其中L包含具有下式的结构



[0112] 其中n是0至200的整数。

[0113] 70. 条款69的方法,其中n是0至150的整数。

[0114] 71. 条款69的方法,其中n是0至110的整数。

[0115] 72. 条款69的方法,其中n是0至20的整数。

[0116] 73. 条款69的方法,其中n是15至20的整数。

[0117] 74. 条款69的方法,其中n是15至110的整数。

[0118] 75. 条款56至64或67至74中任一项的方法,其中所述接头包含PEG,且所述靶向部分是FITC,或其药学上可接受的盐。

[0119] 76. 条款56至75中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约10000 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0120] 77. 条款56至76中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约5000 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0121] 78. 条款56至77中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约1000 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0122] 79. 条款56至78中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0123] 80. 条款56至79中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约200 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0124] 81. 条款56至80中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约250 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0125] 82. 条款56至81中任一项的方法,其中所述癌症选自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头癌、颈癌、皮肤黑色素瘤、眼内黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、子宫内膜癌、直肠癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、三重阴性的乳腺癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金氏病、食管癌、小肠癌、内分泌系统的癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、非小细胞肺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、骨肉瘤、尿道癌、前列腺癌、慢性白血病、急性白血病、急性髓细胞白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、髓性白血病、髓单核细胞白血病、毛细胞白血病、胸膜间皮瘤、膀胱癌、伯基特氏淋巴瘤、输尿管癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统 (CNS) 肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、脊椎肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤和胃食管连接部的腺癌。

[0126] 83. 条款56至58或63至82中任一项的方法,其中所述癌症是表达叶酸受体的癌症。

[0127] 84. 条款83的方法,其中所述癌症是子宫内膜癌。

[0128] 85. 条款83的方法,其中所述癌症是非小细胞肺癌。

[0129] 86. 条款83的方法,其中所述癌症是卵巢癌。

[0130] 87. 条款83的方法,其中所述癌症是三重阴性的乳腺癌。

[0131] 88. 条款56至87中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述识别区域是抗体的单链片段可变 (scFv) 区域。

[0132] 89. 条款56至64或67至88中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述CAR的识别区域是抗-FITC抗体的单链片段可变 (scFv) 区域。

[0133] 90. 条款56至89中任一项的方法,其中所述CAR具有共刺激结构域且所述共刺激结构域选自CD28、CD137 (4-1BB)、CD134 (OX40) 和CD278 (ICOS)。

[0134] 91. 条款56至90中任一项的方法,其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链或Fc受体 γ 。

[0135] 92. 条款56至64或67至91中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述识别区域是抗-FITC抗体的单链片段可变 (scFv) 区域,其中所述CAR具有共刺激结构域且所述共刺激结构域是CD137 (4-1BB),且其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链。

[0136] 93. 条款56至92中任一项的方法,其中施用多个剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[0137] 94. 条款56至93中任一项的方法,其中在施用所述化合物或其药学上可接受的盐之前,或在施用所述CAR T细胞组合物之前,将所述患者成像。

[0138] 95. 条款56至94中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐不是抗

体,且不包含抗体的片段。

[0139] 96. 条款56至95中任一项的方法,其中所述靶向部分不包含肽表位。

[0140] 97. 条款56至96中任一项的方法,其中不发生所述患者中导致脱靶毒性的细胞因子释放,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。

[0141] 98. 条款56至96中任一项的方法,其中在所述患者中不发生脱靶组织毒性,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。

[0142] 99. 条款56至96中任一项的方法,其中所述癌症包含肿瘤,其中肿瘤大小在所述患者中减小,且其中不发生脱靶毒性。

[0143] 100. 条款56至99中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:1的核酸。

[0144] 101. 条款56至100中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:2的多肽。

[0145] 102. 条款100的方法,其中所述核酸编码嵌合抗原受体。

[0146] 103. 条款56至102中任一项的方法,其中所述CAR包含人源化氨基酸序列。

[0147] 104. 条款56至102中任一项的方法,其中所述CAR由人源化氨基酸序列组成。

[0148] 105. 条款56至104中任一项的方法,其中CAR T细胞和未转化的T细胞的组合物呈选自以下的比率:约1:5的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:4的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:3的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:2的CAR T细胞:未转化的T细胞,和约1:1的CAR T细胞:未转化的T细胞。

[0149] 106. 条款56至105中任一项的方法,其中CAR T细胞和未转化的T细胞的组合物呈以下比率:约1:1至约1:5的CAR T细胞:未转化的T细胞。

[0150] 107. 条款56至106中任一项的方法,其中CAR T细胞和未转化的T细胞的组合物包含约1000万个CAR T细胞和约4000万个未转化的T细胞。

[0151] 108. 治疗癌症的方法,所述方法包括:

[0152] i) 向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体;

[0153] ii) 向患者施用CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞,且其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR;且

[0154] iii) 向患者施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂。

[0155] 109. 条款108的方法,其中步骤iii包括施用叶酸。

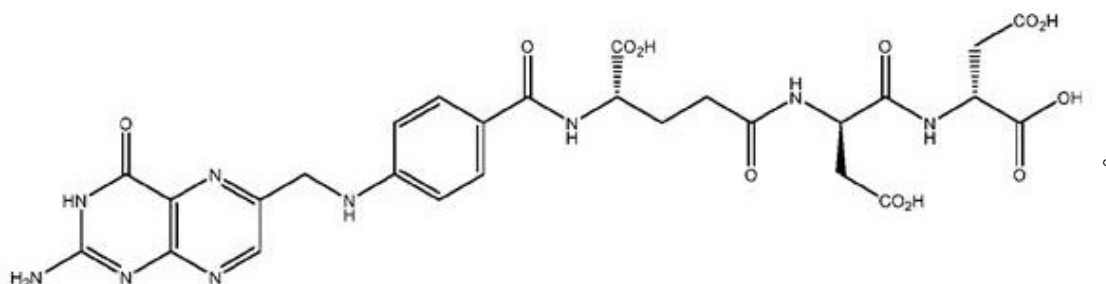
[0156] 110. 条款108或109中任一项的方法,其中步骤iii包括施用叶酸或甲酰四氢叶酸。

[0157] 111. 条款108的方法,其中步骤iii包括施用包含叶酸的缀合物。

[0158] 112. 条款111的方法,其中所述包含叶酸的缀合物包含与一个或多个氨基酸连接的叶酸。

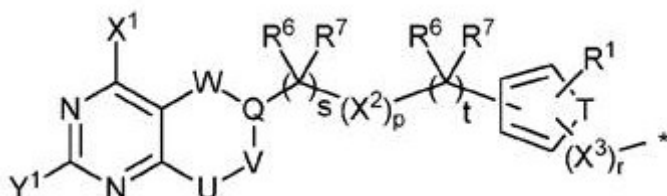
[0159] 113. 条款111的方法,其中所述包含叶酸的缀合物具有下式

[0160]



[0161] 114. 条款109至112中任一项的方法,其中所述叶酸具有下式

[0162]

[0163] 其中 X^1 和 Y^1 各自独立地选自卤素、 R^2 、 OR^2 、 SR^3 和 NR^4R^5 ;[0164] U、V和W代表各自独立地选自 $-(R^{6a})C=$ 、 $-N=$ 、 $-(R^{6a})C(R^{7a})-$ 和 $-N(R^{4a})-$ 的二价部分;Q选自C和CH;T选自S、O、N和 $-C=C-$;[0165] X^2 和 X^3 各自独立地选自氧、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} 亚烷基和 C_1-C_{12} 亚烷基氧基,其中Z是氧或硫;[0166] R^1 选自氢、卤素、 C_1-C_{12} 烷基和 C_1-C_{12} 烷氧基;[0167] R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^{4a} 、 R^{4b} 、 R^5 、 R^{5b} 、 R^{6b} 和 R^{7b} 各自独立地选自氢、卤素、 C_1-C_{12} 烷基、 C_1-C_{12} 烷氧基、 C_1-C_{12} 烷酰基、 C_1-C_{12} 烯基、 C_1-C_{12} 炔基、 $(C_1-C_{12}$ 烷氧基)羰基和 $(C_1-C_{12}$ 烷基氨基)羰基;[0168] R^6 和 R^7 各自独立地选自氢、卤素、 C_1-C_{12} 烷基和 C_1-C_{12} 烷氧基;或者, R^6 和 R^7 一起形成羰基基团;[0169] R^{6a} 和 R^{7a} 各自独立地选自氢、卤素、 C_1-C_{12} 烷基和 C_1-C_{12} 烷氧基;或者, R^{6a} 和 R^{7a} 一起形成羰基基团;

[0170] p、r、s和t各自独立地为0或1;且

[0171] 如果任何额外化学部分是叶酸的部分,则*代表至缀合物的剩余部分的任选共价键。

[0172] 115. 条款108至114中任一项的方法,其中所述靶向部分选自2,4-二硝基苯酚(DNP)、2,4,6-三硝基苯酚(TNP)、生物素、地高辛配基、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、NHS-荧光素、五氟苯基酯、四氟苯基酯、打结素、centyrin和DARPin。

[0173] 116. 条款108至115中任一项的方法,其中所述靶向部分是FITC。

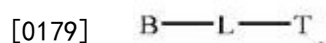
[0174] 117. 条款108至115中任一项的方法,其中所述靶向部分是DNP。

[0175] 118. 条款108至115中任一项的方法,其中所述靶向部分是TNP。

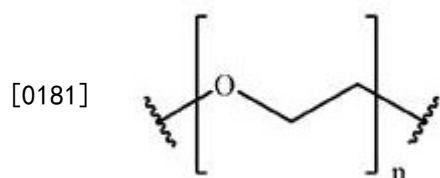
[0176] 119. 条款108至118中任一项的方法,其中所述接头包含聚乙二醇(PEG)、聚脯氨酸、亲水氨基酸、糖、非天然的肽聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、pluronic F-127或其组合。

[0177] 120. 条款108至119中任一项的方法,其中所述接头包含PEG。

[0178] 121. 条款108至120中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐具有下式



[0180] 其中B代表小分子配体,L代表接头,且T代表靶向部分,且其中L包含具有下式的结构



[0182] 其中n是0至200的整数。

[0183] 122. 条款121的方法,其中n是0至12的整数。

[0184] 123. 条款121的方法,其中n是0至150的整数。

[0185] 124. 条款121的方法,其中n是0至110的整数。

[0186] 125. 条款121的方法,其中n是0至20的整数。

[0187] 126. 条款121的方法,其中n是15至20的整数。

[0188] 127. 条款121的方法,其中n是15至110的整数。

[0189] 128. 条款108至116或119至127中任一项的方法,其中所述接头包含PEG,且所述靶向部分是FITC,或其药学上可接受的盐。

[0190] 129. 条款108至128中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约10000 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0191] 130. 条款108至129中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约5000 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0192] 131. 条款108至130中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约1000 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0193] 132. 条款108至131中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0194] 133. 条款108至132中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约200 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0195] 134. 条款108至133中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约250 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0196] 135. 条款108至134中任一项的方法,其中所述癌症选自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头癌、颈癌、皮肤黑色素瘤、眼内黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、子宫内膜癌、直肠癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、三重阴性的乳腺癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金氏病、食管癌、小肠癌、内分泌系统的癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、非小细胞肺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、骨肉瘤、尿道癌、前列腺癌、慢性白血病、急性白血病、急性髓细胞白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、髓性白血病、髓单核细胞白血病、毛细胞白血病、胸膜间皮瘤、膀胱癌、伯基特氏淋巴瘤、输尿管癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、脊椎肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤和胃食管连接部的腺癌。

- [0197] 136. 条款108至135中任一项的方法,其中通过接头与靶向部分连接的小分子配体的配体部分是叶酸,且所述癌症是表达叶酸受体的癌症。
- [0198] 137. 条款136的方法,其中所述癌症是子宫内膜癌。
- [0199] 138. 条款136的方法,其中所述癌症是非小细胞肺癌。
- [0200] 139. 条款136的方法,其中所述癌症是卵巢癌。
- [0201] 140. 条款136的方法,其中所述癌症是三重阴性的乳腺癌。
- [0202] 141. 条款108至140中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述识别区域是抗体的单链片段可变(scFv)区域。
- [0203] 142. 条款108至116或119至141中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述CAR的识别区域是抗-FITC抗体的单链片段可变(scFv)区域。
- [0204] 143. 条款108至142中任一项的方法,其中所述CAR具有共刺激结构域且所述共刺激结构域选自CD28、CD137 (4-1BB)、CD134 (OX40)和CD278 (ICOS)。
- [0205] 144. 条款108至143中任一项的方法,其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链或Fc受体 γ 。
- [0206] 145. 条款108至116或119至144中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述识别区域是抗-FITC抗体的单链片段可变(scFv)区域,其中所述CAR具有共刺激结构域且所述共刺激结构域是CD137 (4-1BB),且其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链。
- [0207] 146. 条款108至145中任一项的方法,其中施用多个剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐和/或所述CAR T细胞组合物。
- [0208] 147. 条款108至146中任一项的方法,其中在施用所述化合物或其药学上可接受的盐之前,或在施用所述CAR T细胞组合物之前,将所述患者成像。
- [0209] 148. 条款108至147中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐不是抗体,且不包含抗体的片段。
- [0210] 149. 条款108至148中任一项的方法,其中所述靶向部分不包含肽表位。
- [0211] 150. 条款108至149中任一项的方法,其中不发生在所述患者中导致脱靶毒性的细胞因子释放,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。
- [0212] 151. 条款108至149中任一项的方法,其中在所述患者中不发生脱靶组织毒性,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。
- [0213] 152. 条款108至149中任一项的方法,其中所述癌症包含肿瘤,其中肿瘤大小在所述患者中减小,且其中不发生脱靶毒性。
- [0214] 153. 条款108至152中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:1的核酸。
- [0215] 154. 条款108至153中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:2的多肽。
- [0216] 155. 条款153的方法,其中所述核酸编码嵌合抗原受体。
- [0217] 156. 条款108至155中任一项的方法,其中所述CAR包含人源化氨基酸序列。
- [0218] 157. 条款108至155中任一项的方法,其中所述CAR由人源化氨基酸序列组成。
- [0219] 158. 条款108至157中任一项的方法,其中所述CAR T细胞组合物包含选自以下的

比率的CAR T细胞和未转化的T细胞的混合物:约1:5的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:4的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:3的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:2的CAR T细胞:未转化的T细胞,和约1:1的CAR T细胞:未转化的T细胞。

[0220] 159. 条款108至158中任一项的方法,其中所述CAR T细胞组合物包含以下比率的CAR T细胞和未转化的T细胞的混合物:约1:1至约1:5的CAR T细胞:未转化的T细胞。

[0221] 160. 条款108至159中任一项的方法,其中所述CAR T细胞组合物包含含有约1000万个CAR T细胞和约4000万个未转化的T细胞的混合物。

[0222] 161. 条款108至160中任一项的方法,其中抑制CAR T细胞的活化的药剂选自淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶抑制剂、PI3激酶抑制剂、IL-2诱导型T细胞激酶的抑制剂、JAK抑制剂、BTK抑制剂、EC2319和阻断CAR T细胞与所述化合物或其药学上可接受的盐的结合、但不结合癌症的药剂。

[0223] 162. 条款161的方法,其中施用抑制CAR T细胞的活化的药剂,且所述药剂是淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶抑制剂。

[0224] 163. 条款162的方法,其中所述淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶抑制剂是达沙替尼。

[0225] 164. 条款161的方法,其中施用抑制CAR T细胞的活化的药剂,且所述药剂是PI3激酶抑制剂。

[0226] 165. 条款164的方法,其中所述PI3激酶抑制剂是GDC0980。

[0227] 166. 条款161的方法,其中施用抑制CAR T细胞的活化的药剂,且所述药剂是IL-2诱导型T细胞激酶抑制剂。

[0228] 167. 条款166的方法,其中所述IL-2诱导型T细胞激酶抑制剂是BMS-509744。

[0229] 168. 条款1至160中任一项的方法,其中所述CAR T细胞组合物通过注射入患者的血流来施用,且其中所述患者的血流中的CAR T细胞是到注射所述CAR T细胞组合物之后约4周患者的血流中的患者的总T细胞的至少10%。

[0230] 169. 条款1至160中任一项的方法,其中所述CAR T细胞组合物通过注射入患者的血流来施用,且其中所述患者的血流中的CAR T细胞是到注射所述CAR T细胞组合物之后约4周患者的血流中的患者的总T细胞的至少12%。

[0231] 170. 条款1至160中任一项的方法,其中所述CAR T细胞组合物通过注射入患者的血流来施用,且其中所述患者的血流中的CAR T细胞是到注射所述CAR T细胞组合物之后约4周患者的血流中的患者的总T细胞的至少15%。

[0232] 171. 条款1至160或168至170中任一项的方法,其中在所述CAR T细胞组合物中施用于所述患者的CAR T细胞包含约1百万至约1500万个CAR T细胞。

[0233] 172. 条款1至160或168至171中任一项的方法,其中在所述CAR T细胞组合物中施用于所述患者的CAR T细胞的剂量选自约100万、约200万、约300万、约400万、约500万、约600万、约700万、约800万、约900万、约1000万、约1100万、约1200万、约1250万、约1300万、约1400万和约1500万个CAR T细胞。

[0234] 173. 条款1至160或168至170中任一项的方法,其中在所述CAR T细胞组合物中施用于所述患者的CAR T细胞包含至少约200万个CAR T细胞。

[0235] 174. 条款1至160或168至170中任一项的方法,其中在所述CAR T细胞组合物中施

用于所述患者的CAR T细胞包含至少约500万个CAR T细胞。

[0236] 175. 条款1至160或168至170中任一项的方法,其中在所述CAR T细胞组合物中施用于所述患者的CAR T细胞包含至少约1000万个CAR T细胞。

[0237] 176. 条款1至175中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:3的核酸。

[0238] 177. 条款1至176中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:1的载体。

[0239] 178. 条款1至177中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:3的载体。

[0240] 179. 条款176的方法,其中所述核酸编码嵌合抗原受体。

[0241] 180. 条款108至160中任一项的方法,其中施用抑制CAR T细胞的活化的药剂且所述抑制CAR T细胞的活化的药剂是阻断CAR T细胞与所述化合物或其药学上可接受的盐结合、但不结合癌症的药剂。

[0242] 181. 条款180的方法,其中所述药剂是荧光素胺、FITC或荧光素钠。

[0243] 182. 条款180的方法,其中所述药剂是FITC。

[0244] 183. 治疗癌症的方法,所述方法包括:

[0245] i) 向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,且其中所述化合物或其药学上可接受的盐剂量为约10 nmol/kg患者体重至约2500 nmol/kg患者体重;且

[0246] ii) 向患者施用包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR,且其中所述CAR T细胞剂量为约100万个CAR T细胞至约1500万个CAR T细胞。

[0247] 184. 条款183的方法,其中所述配体选自叶酸、DUPA、NK-1R配体、CAIX配体、 γ 谷氨酰基转肽酶的配体、NKG2D配体和CCK2R配体。

[0248] 185. 条款183或184中任一项的方法,其中所述配体是叶酸。

[0249] 186. 条款183至185中任一项的方法,其中所述靶向部分选自2,4-二硝基苯酚(DNP)、2,4,6-三硝基苯酚(TNP)、生物素、地高辛配基、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、NHS-荧光素、五氟苯基酯、四氟苯基酯、打结素、centyrin和DARPin。

[0250] 187. 条款183至186中任一项的方法,其中所述靶向部分是FITC。

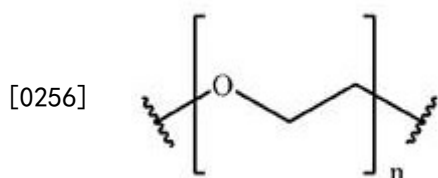
[0251] 188. 条款183至187中任一项的方法,其中所述接头包含聚乙二醇(PEG)、聚脯氨酸、亲水氨基酸、糖、非天然的肽聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、pluronic F-127或其组合。

[0252] 189. 条款183至188中任一项的方法,其中所述接头包含PEG。

[0253] 190. 条款183至189中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐具有下式

[0254]
$$B-L-T,$$

[0255] 其中B代表小分子配体,L代表接头,且T代表靶向部分,且其中L包含具有下式的结构



[0257] 其中n是0至200的整数。

[0258] 191. 条款183至190中任一项的方法,其中所述接头包含PEG,且所述靶向部分是FITC,或其药学上可接受的盐。

[0259] 192. 条款183至191中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约100 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0260] 193. 条款183至191中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约50 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0261] 194. 条款183至191中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约20 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0262] 195. 条款183至191中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0263] 196. 条款183至191中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约200 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0264] 197. 条款183至191中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约400 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0265] 198. 条款183至197中任一项的方法,其中所述CAR T细胞剂量为约100万个CAR T细胞至约1250万个CAR T细胞。

[0266] 199. 条款183至197中任一项的方法,其中所述CAR T细胞剂量为约100万个CAR T细胞至约700万个CAR T细胞。

[0267] 200. 条款183至197中任一项的方法,其中所述CAR T细胞剂量为约100万个CAR T细胞至约500万个CAR T细胞。

[0268] 201. 条款183至197中任一项的方法,其中所述CAR T细胞剂量为约200万个CAR T细胞至约500万个CAR T细胞。

[0269] 202. 条款183至201中任一项的方法,其中所述癌症选自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头癌、颈癌、皮肤黑色素瘤、眼内黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、子宫内膜癌、直肠癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、三重阴性的乳腺癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金氏病、食管癌、小肠癌、内分泌系统的癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、非小细胞肺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、骨肉瘤、尿道癌、前列腺癌、慢性白血病、急性白血病、急性髓细胞白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、髓性白血病、髓单核细胞白血病、毛细胞白血病、胸膜间皮瘤、膀胱癌、伯基特氏淋巴瘤、输尿管癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、脊椎肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤和胃食管连接部的腺癌。

[0270] 203. 条款183至202中任一项的方法,其中所述癌症是表达叶酸受体的癌症。

[0271] 204. 条款183至203中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述识别区域是抗-FITC抗体的单链片段可变(scFv)区域,其中所述CAR具有共刺激结构域且所述共刺激

结构域是CD137 (4-1BB),且其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链。

[0272] 205. 条款183至204中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐不是抗体,且不包含抗体的片段。

[0273] 206. 条款183至205中任一项的方法,其中所述靶向部分不包含肽表位。

[0274] 207. 条款183至206中任一项的方法,其中不发生所述患者中导致脱靶毒性的细胞因子释放,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。

[0275] 208. 条款183至206中任一项的方法,其中在所述患者中不发生脱靶组织毒性,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。

[0276] 209. 条款183至206中任一项的方法,其中所述癌症包含肿瘤,其中肿瘤大小在所述患者中减小,且其中不发生脱靶毒性。

[0277] 210. 条款183至209中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:1的核酸。

[0278] 211. 条款183至209中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:2的多肽。

[0279] 212. 条款183至211中任一项的方法,其中所述CAR包含人源化氨基酸序列。

[0280] 213. 条款183至212中任一项的方法,其中所述CAR由人源化氨基酸序列组成。

[0281] 214. 条款183至213中任一项的方法,其中所述CAR T细胞组合物进一步包含未转化的T细胞。

[0282] 215. 治疗癌症的方法,所述方法包括:

[0283] i) 向患者连续施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体;

[0284] ii) 向患者施用包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR;且

[0285] iii) 结束所述化合物或其药学上可接受的盐的连续施用,以抑制或预防患者中的细胞因子释放综合征。

[0286] 216. 条款215的方法,其中所述配体选自叶酸、DUPA、NK-1R配体、CAIX配体、 γ 谷氨酰基转肽酶的配体、NKG2D配体和CCK2R配体。

[0287] 217. 条款215或216中任一项的方法,其中所述配体是叶酸。

[0288] 218. 条款215至217中任一项的方法,其中所述靶向部分选自2,4-二硝基苯酚(DNP)、2,4,6-三硝基苯酚(TNP)、生物素、地高辛配基、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、NHS-荧光素、五氟苯基酯、四氟苯基酯、打结素、centyrin和DARPin。

[0289] 219. 条款215至218中任一项的方法,其中所述靶向部分是FITC。

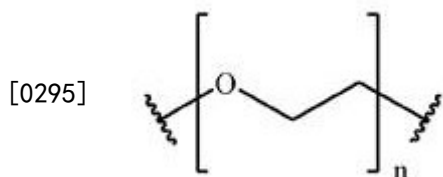
[0290] 220. 条款215至219中任一项的方法,其中所述接头包含聚乙二醇(PEG)、聚脯氨酸、亲水氨基酸、糖、非天然的肽聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、pluronic F-127或其组合。

[0291] 221. 条款215至220中任一项的方法,其中所述接头包含PEG。

[0292] 222. 条款215至221中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐具有下式

[0293] $B-L-T$,

[0294] 其中B代表小分子配体,L代表接头,且T代表靶向部分,且其中L包含具有下式的结构



[0296] 其中n是0至200的整数。

[0297] 223. 条款215至222中任一项的方法,其中所述接头包含PEG,且所述靶向部分是FITC,或其药学上可接受的盐。

[0298] 224. 条款215至223中任一项的方法,其中向患者连续施用所述化合物或其药学上可接受的盐至少一小时。

[0299] 225. 条款215至223中任一项的方法,其中向患者连续施用所述化合物或其药学上可接受的盐至少四小时。

[0300] 226. 条款215至223中任一项的方法,其中向患者连续施用所述化合物或其药学上可接受的盐至少六小时。

[0301] 227. 条款215至223中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的连续施用是每隔一天施用的方案。

[0302] 228. 条款215至223中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的连续施用是每周三次施用的方案。

[0303] 229. 条款215至223中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的连续施用是施用直至患者体重无法接受的减轻、发烧、血压下降或肺水肿发生。

[0304] 230. 条款215至229中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约200 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0305] 231. 条款215至229中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约400 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0306] 232. 条款215至231中任一项的方法,其中施用约200万至约500万个CAR T细胞。

[0307] 233. 条款215至232中任一项的方法,其中所述施用是通过静脉内施用。

[0308] 234. 条款215至233中任一项的方法,其中所述癌症选自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头癌、颈癌、皮肤黑色素瘤、眼内黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、子宫内膜癌、直肠癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、三重阴性的乳腺癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金氏病、食管癌、小肠癌、内分泌系统的癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、非小细胞肺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、骨肉瘤、尿道癌、前列腺癌、慢性白血病、急性白血病、急性髓细胞白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、髓性白血病、髓单核细胞白血病、毛细胞白血病、胸膜间皮瘤、膀胱癌、伯基特氏淋巴瘤、输尿管癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、脊椎肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤和胃食管连接部的腺癌。

[0309] 235. 条款215至234中任一项的方法,其中所述癌症是表达叶酸受体的癌症。

[0310] 236. 条款215至235中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述识别区域

是抗-FITC抗体的单链片段可变(scFv)区域,其中所述CAR具有共刺激结构域且所述共刺激结构域是CD137 (4-1BB),且其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链。

[0311] 237. 条款215至236中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐不是抗体,且不包含抗体的片段。

[0312] 238. 条款215至237中任一项的方法,其中所述靶向部分不包含肽表位。

[0313] 239. 条款215至238中任一项的方法,其中不发生所述患者中导致脱靶毒性的细胞因子释放,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。

[0314] 240. 条款215至238中任一项的方法,其中在所述患者中不发生脱靶组织毒性,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。

[0315] 241. 条款215至238中任一项的方法,其中所述癌症包含肿瘤,其中肿瘤大小在所述患者中减小,且其中不发生脱靶毒性。

[0316] 242. 条款215至241中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:1的核酸。

[0317] 243. 条款215至242中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:2的多肽。

[0318] 244. 条款215至243中任一项的方法,其中所述CAR包含人源化氨基酸序列。

[0319] 245. 条款215至243中任一项的方法,其中所述CAR由人源化氨基酸序列组成。

[0320] 246. 条款215至245中任一项的方法,其中所述CAR T细胞组合物进一步包含未转化的T细胞。

[0321] 247. 条款215至246中任一项的方法,其中所述CAR T细胞组合物进一步包含选自以下的比率的未转化的T细胞:约1:5的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:4的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:3的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:2的CAR T细胞:未转化的T细胞,和约1:1的CAR T细胞:未转化的T细胞。

[0322] 248. 条款215至247中任一项的方法,其中所述CAR T细胞组合物进一步包含以下比率的未转化的T细胞:约1:1至约1:5的CAR T细胞:未转化的T细胞。

[0323] 249. 条款215至248中任一项的方法,其中所述CAR T细胞组合物在约1000万个CAR T细胞和约4000万个未转化的T细胞的混合物中进一步包含未转化的T细胞。

[0324] 250. 条款215至249中任一项的方法,其中所述癌症是非小细胞肺癌。

[0325] 251. 条款215至249中任一项的方法,其中所述癌症是卵巢癌。

[0326] 252. 治疗癌症的方法,所述方法包括:

[0327] i) 向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,且其中向患者每周一次施用所述化合物或其药学上可接受的盐;且

[0328] ii) 向患者施用包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR。

[0329] 253. 条款252的方法,其中所述配体选自叶酸、DUPA、NK-1R配体、CAIX配体、 γ 谷氨酰基转肽酶的配体、NKG2D配体和CCK2R配体。

[0330] 254. 条款252或253中任一项的方法,其中所述配体是叶酸。

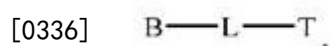
[0331] 255. 条款252至254中任一项的方法,其中所述靶向部分选自2,4-二硝基苯酚(DNP)、2,4,6-三硝基苯酚(TNP)、生物素、地高辛配基、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、NHS-荧光素、五氟苯基酯、四氟苯基酯、打结素、centyrin和DARPin。

[0332] 256. 条款252至255中任一项的方法,其中所述靶向部分是FITC。

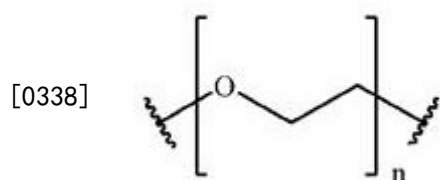
[0333] 257. 条款252至256中任一项的方法,其中所述接头包含聚乙二醇(PEG)、聚脯氨酸、亲水氨基酸、糖、非天然的肽聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、pluronic F-127或其组合。

[0334] 258. 条款252至257中任一项的方法,其中所述接头包含PEG。

[0335] 259. 条款252至258中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐具有下式



[0337] 其中B代表小分子配体,L代表接头,且T代表靶向部分,且其中L包含具有下式的结构



[0339] 其中n是0至200的整数。

[0340] 260. 条款252至259中任一项的方法,其中所述接头包含PEG,且所述靶向部分是FITC,或其药学上可接受的盐。

[0341] 261. 条款252至260中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约100 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0342] 262. 条款252至261中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约50 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0343] 263. 条款252至262中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约20 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0344] 264. 条款252至263中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0345] 265. 条款252至264中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约200 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0346] 266. 条款252至265中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约400 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0347] 267. 条款252至266中任一项的方法,其中所述CAR T细胞剂量为约100万个CAR T细胞至约1500万个CAR T细胞。

[0348] 268. 条款252至267中任一项的方法,其中所述CAR T细胞剂量为约100万个CAR T细胞至约700万个CAR T细胞。

[0349] 269. 条款252至268中任一项的方法,其中所述CAR T细胞剂量为约100万个CAR T细胞至约500万个CAR T细胞。

[0350] 270. 条款252至269中任一项的方法,其中所述CAR T细胞剂量为约200万个CAR T

细胞至约500万个CAR T细胞。

[0351] 271. 条款252至270中任一项的方法,其中所述癌症选自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头癌、颈癌、皮肤黑色素瘤、眼内黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、子宫内膜癌、直肠癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、三重阴性的乳腺癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金氏病、食管癌、小肠癌、内分泌系统的癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、非小细胞肺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、骨肉瘤、尿道癌、前列腺癌、慢性白血病、急性白血病、急性髓细胞白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、髓性白血病、髓单核细胞白血病、毛细胞白血病、胸膜间皮瘤、膀胱癌、伯基特氏淋巴瘤、输尿管癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、脊髓肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤和胃食管连接部的腺癌。

[0352] 272. 条款252至271中任一项的方法,其中所述癌症是表达叶酸受体的癌症。

[0353] 273. 条款252至272中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述识别区域是抗-FITC抗体的单链片段可变(scFv)区域,其中所述CAR具有共刺激结构域且所述共刺激结构域是CD137 (4-1BB),且其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链。

[0354] 274. 条款252至273中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐不是抗体,且不包含抗体的片段。

[0355] 275. 条款252至274中任一项的方法,其中所述靶向部分不包含肽表位。

[0356] 276. 条款252至275中任一项的方法,其中不发生在所述患者中导致脱靶毒性的细胞因子释放,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。

[0357] 277. 条款252至275中任一项的方法,其中在所述患者中不发生脱靶组织毒性,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。

[0358] 278. 条款252至275中任一项的方法,其中所述癌症包含肿瘤,其中肿瘤大小在所述患者中减小,且其中不发生脱靶毒性。

[0359] 279. 条款252至278中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:1的核酸。

[0360] 280. 条款252至278中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:2的多肽。

[0361] 281. 条款252至280中任一项的方法,其中所述CAR包含人源化氨基酸序列。

[0362] 282. 条款252至280中任一项的方法,其中所述CAR由人源化氨基酸序列组成。

[0363] 283. 条款252至282中任一项的方法,其中所述CAR T细胞组合物进一步包含未转化的T细胞。

[0364] 284. 治疗癌症的方法,所述方法包括:

[0365] i) 向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,其中向患者施用至少第一剂量和第二剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中第一剂量和第二剂量是不同的,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约2倍至约15000倍;且

[0366] ii) 向患者施用包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR。

[0367] 285. 条款284的方法,其中向患者施用至少第一剂量、第二剂量和第三剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中第一剂量、第二剂量和第三剂量是不同的,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约2倍至约750倍,且其中第三剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约800倍至约10000倍。

[0368] 286. 条款285的方法,其中向患者施用至少第一剂量、第二剂量、第三剂量和第四剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中第一剂量、第二剂量、第三剂量和第四剂量是不同的,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约2倍至约750倍,其中第三剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约800倍至约7500倍,且其中第四剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约8000倍至约15000倍。

[0369] 287. 条款286的方法,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约100倍,其中第三剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约1000倍,且其中第四剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约10000倍。

[0370] 288. 条款284至287中任一项的方法,其中所述配体选自叶酸、DUPA、NK-1R配体、CAIX配体、 γ 谷氨酰基转肽酶的配体、NKG2D配体和CCK2R配体。

[0371] 289. 条款284至288中任一项的方法,其中所述配体是叶酸。

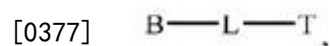
[0372] 290. 条款284至289中任一项的方法,其中所述靶向部分选自2,4-二硝基苯酚(DNP)、2,4,6-三硝基苯酚(TNP)、生物素、地高辛配基、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、NHS-荧光素、五氟苯基酯、四氟苯基酯、打结素、centyrin和DARPin。

[0373] 291. 条款284至290中任一项的方法,其中所述靶向部分是FITC。

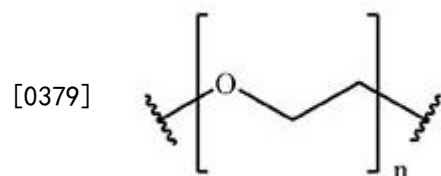
[0374] 292. 条款284至291中任一项的方法,其中所述接头包含聚乙二醇(PEG)、聚脯氨酸、亲水氨基酸、糖、非天然的肽聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、pluronic F-127或其组合。

[0375] 293. 条款284至292中任一项的方法,其中所述接头包含PEG。

[0376] 294. 条款284至293中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐具有下式



[0378] 其中B代表小分子配体,L代表接头,且T代表靶向部分,且其中L包含具有下式的结构



[0380] 其中n是0至200的整数。

[0381] 295. 条款284至294中任一项的方法,其中所述接头包含PEG,且所述靶向部分是

FITC,或其药学上可接受的盐。

[0382] 296. 条款284至295中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约100 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0383] 297. 条款284至296中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约50 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0384] 298. 条款284至297中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约20 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0385] 299. 条款284至298中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0386] 300. 条款284至299中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约200 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0387] 301. 条款284至300中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约400 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0388] 302. 条款284至301中任一项的方法,其中所述CAR T细胞剂量为约100万个CAR T细胞至约1500万个CAR T细胞。

[0389] 303. 条款284至302中任一项的方法,其中所述CAR T细胞剂量为约100万个CAR T细胞至约700万个CAR T细胞。

[0390] 304. 条款284至303中任一项的方法,其中所述CAR T细胞剂量为约100万个CAR T细胞至约500万个CAR T细胞。

[0391] 305. 条款284至304中任一项的方法,其中所述CAR T细胞剂量为约200万个CAR T细胞至约500万个CAR T细胞。

[0392] 306. 条款284至305中任一项的方法,其中所述癌症选自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头癌、颈癌、皮肤黑色素瘤、眼内黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、子宫内膜癌、直肠癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、三重阴性的乳腺癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金氏病、食管癌、小肠癌、内分泌系统的癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、非小细胞肺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、骨肉瘤、尿道癌、前列腺癌、慢性白血病、急性白血病、急性髓细胞白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、髓性白血病、髓单核细胞白血病、毛细胞白血病、胸膜间皮瘤、膀胱癌、伯基特氏淋巴瘤、输尿管癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、脊椎肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤和胃食管连接部的腺癌。

[0393] 307. 条款284至306中任一项的方法,其中所述癌症是表达叶酸受体的癌症。

[0394] 308. 条款284至307中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述识别区域是抗-FITC抗体的单链片段可变(scFv)区域,其中所述CAR具有共刺激结构域且所述共刺激结构域是CD137 (4-1BB),且其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链。

[0395] 309. 条款284至308中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐不是抗体,且不包含抗体的片段。

[0396] 310. 条款284至309中任一项的方法,其中所述靶向部分不包含肽表位。

[0397] 311. 条款284至310中任一项的方法,其中不发生所述患者中导致脱靶毒性的细胞因子释放,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。

[0398] 312. 条款284至310中任一项的方法,其中在所述患者中不发生脱靶组织毒性,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。

[0399] 313. 条款284至310中任一项的方法,其中所述癌症包含肿瘤,其中肿瘤大小在所述患者中减小,且其中不发生脱靶毒性。

[0400] 314. 条款284至313中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:1的核酸。

[0401] 315. 条款284至313中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:2的多肽。

[0402] 316. 条款284至315中任一项的方法,其中所述CAR包含人源化氨基酸序列。

[0403] 317. 条款284至315中任一项的方法,其中所述CAR由人源化氨基酸序列组成。

[0404] 318. 条款284至317中任一项的方法,其中所述CAR T细胞组合物进一步包含未转化的T细胞。

[0405] 319. 条款1至214或252至318中任一项的方法,其中向患者连续施用所述化合物或其药学上可接受的盐;且所述方法进一步包括结束所述化合物或其药学上可接受的盐的连续施用,以抑制或预防患者中的细胞因子释放综合征。

[0406] 320. 条款1至107或183至318中任一项的方法,其进一步包括向患者施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂。

[0407] 321. 条款1至182或215至318中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐剂量为约10 nmol/kg患者体重至约2500 nmol/kg患者体重,且所述CAR T细胞剂量为约100万个CAR T细胞至约1500万个CAR T细胞。

[0408] 322. 条款1至251或284至318中任一项的方法,其中向患者每周一次施用所述化合物或其药学上可接受的盐。

[0409] 323. 条款1至283中任一项的方法,其中向患者施用至少第一剂量和第二剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中第一剂量和第二剂量是不同的,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约2倍至约15000倍。

[0410] 324. 条款56至318中任一项的方法,其中所述CAR T细胞组合物以至少两个剂量施用。

[0411] 325. 治疗癌症的方法,所述方法包括:

[0412] i) 向患者施用第一剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体;

[0413] ii) 向患者施用至少第二剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐至多约50%;且

[0414] iii) 向患者施用一定剂量的包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR。

[0415] 326. 条款325的方法,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐至多约60%。

- [0416] 327. 条款325的方法,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐至多约70%。
- [0417] 328. 条款325的方法,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐至多约80%。
- [0418] 329. 条款325的方法,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐至多约90%。
- [0419] 330. 条款325的方法,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐至多约95%。
- [0420] 331. 条款325的方法,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐至多约96%。
- [0421] 332. 条款325的方法,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐至多约97%。
- [0422] 333. 条款325的方法,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐至多约98%。
- [0423] 334. 条款325的方法,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐至多约99%。
- [0424] 335. 条款325的方法,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐至多约99.5%。
- [0425] 336. 条款325至335中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量为约100 nmol/kg至约1000 nmol/kg患者体重。
- [0426] 337. 条款325至335中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量为约100 nmol/kg至约900 nmol/kg患者体重。
- [0427] 338. 条款325至335中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量为约100 nmol/kg至约800 nmol/kg患者体重。
- [0428] 339. 条款325至335中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量为约100 nmol/kg至约700 nmol/kg患者体重。
- [0429] 340. 条款325至335中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量为约100 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重。
- [0430] 341. 条款325至335中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量为约200 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重。
- [0431] 342. 条款325至335中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量为约400 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重。
- [0432] 343. 条款325至335中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量为约500 nmol/kg患者体重。
- [0433] 344. 条款336的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第二剂量为约0.5 nmol/kg至约500 nmol/kg患者体重。
- [0434] 345. 条款337的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第二剂量为约0.5 nmol/kg至约450 nmol/kg患者体重。
- [0435] 346. 条款338的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第二剂量为约

0.5nmol/kg至约400 nmol/kg患者体重。

[0436] 347. 条款339的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第二剂量为约0.5 nmol/kg至约350 nmol/kg患者体重。

[0437] 348. 条款340的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第二剂量为约0.5 nmol/kg至约300 nmol/kg患者体重。

[0438] 349. 条款341的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第二剂量为约1 nmol/kg至约300 nmol/kg患者体重。

[0439] 350. 条款342的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第二剂量为约2 nmol/kg至约300 nmol/kg患者体重。

[0440] 351. 条款343的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第二剂量为约2 nmol/kg至约250 nmol/kg患者体重。

[0441] 352. 条款336至343中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第二剂量为约5 nmol/kg至约40 nmol/kg患者体重。

[0442] 353. 条款336至343中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第二剂量为约40 nmol/kg至约150 nmol/kg患者体重。

[0443] 354. 条款325至353中任一项的方法,其进一步包括施用第三剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第三剂量与所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量相同。

[0444] 355. 条款354的方法,其进一步包括施用第四剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第四剂量与所述化合物或其药学上可接受的盐的第二剂量和所述化合物或其药学上可接受的盐的第三剂量相同。

[0445] 356. 条款325至355中任一项的方法,其中在第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐之后施用的一个或多个剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐相对于第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐维持癌症生长的抑制。

[0446] 357. 条款325至356中任一项的方法,其中所述CAR T细胞以约100万个CAR T细胞至约4000万个CAR T细胞的剂量施用。

[0447] 358. 条款325至357中任一项的方法,其中每周一次施用第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐之后施用的一个或多个剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[0448] 359. 条款325至357中任一项的方法,其中每周两次施用一个或多个剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[0449] 360. 条款325至359中任一项的方法,其中所述配体选自叶酸、DUPA、NK-1R配体、CAIX配体、 γ 谷氨酰基转肽酶的配体、NKG2D配体和CCK2R配体。

[0450] 361. 条款325至360中任一项的方法,其中所述配体是叶酸。

[0451] 362. 条款325至360中任一项的方法,其中所述配体是NK-1R配体。

[0452] 363. 条款325至360中任一项的方法,其中所述配体是DUPA。

[0453] 364. 条款325至360中任一项的方法,其中所述配体是CCK2R配体。

[0454] 365. 条款325至360中任一项的方法,其中所述配体是 γ 谷氨酰基转肽酶的配体。

[0455] 366. 条款325至365中任一项的方法,其中所述靶向部分选自2,4-二硝基苯酚(DNP)、2,4,6-三硝基苯酚(TNP)、生物素、地高辛配基、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、

NHS-荧光素、五氟苯基酯、四氟苯基酯、打结素、centyrin和DARPin。

[0456] 367. 条款325至366中任一项的方法,其中所述靶向部分是FITC。

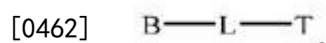
[0457] 368. 条款325至366中任一项的方法,其中所述靶向部分是DNP。

[0458] 369. 条款325至366中任一项的方法,其中所述靶向部分是TNP。

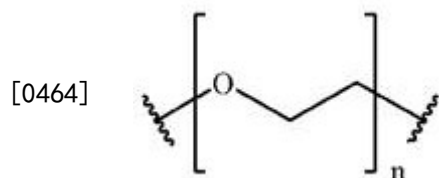
[0459] 370. 条款325至369中任一项的方法,其中所述接头包含聚乙二醇(PEG)、聚脯氨酸、亲水氨基酸、糖、非天然的肽聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、pluronic F-127或其组合。

[0460] 371. 条款325至370中任一项的方法,其中所述接头包含PEG。

[0461] 372. 条款325至371中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐具有下式



[0463] 其中B代表小分子配体,L代表接头,且T代表靶向部分,且其中L包含具有下式的结构



[0465] 其中n是0至200的整数。

[0466] 373. 条款372的方法,其中n是0至150的整数。

[0467] 374. 条款372的方法,其中n是0至110的整数。

[0468] 375. 条款372的方法,其中n是0至20的整数。

[0469] 376. 条款372的方法,其中n是15至20的整数。

[0470] 377. 条款372的方法,其中n是15至110的整数。

[0471] 378. 条款325至367或370至377中任一项的方法,其中所述接头包含PEG,且所述靶向部分是FITC,或其药学上可接受的盐。

[0472] 379. 条款325至378中任一项的方法,其中所述癌症选自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头癌、颈癌、皮肤黑色素瘤、眼内黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、子宫内膜癌、直肠癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、三重阴性的乳腺癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金氏病、食管癌、小肠癌、内分泌系统的癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、非小细胞肺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、骨肉瘤、尿道癌、前列腺癌、慢性白血病、急性白血病、急性髓细胞白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、髓性白血病、髓单核细胞白血病、毛细胞白血病、胸膜间皮瘤、膀胱癌、伯基特氏淋巴瘤、输尿管癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、脊椎肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤和胃食管连接部的腺癌。

[0473] 380. 条款325至361或366至379中任一项的方法,其中所述癌症是表达叶酸受体的癌症。

[0474] 381. 条款380的方法,其中所述癌症是子宫内膜癌。

[0475] 382. 条款380的方法,其中所述癌症是非小细胞肺癌。

[0476] 383. 条款380的方法,其中所述癌症是卵巢癌。

[0477] 384. 条款380的方法,其中所述癌症是三重阴性的乳腺癌。

- [0478] 385. 条款325至384中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述识别区域是抗体的单链片段可变(scFv)区域。
- [0479] 386. 条款325至367或370至385中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述CAR的识别区域是抗-FITC抗体的单链片段可变(scFv)区域。
- [0480] 387. 条款325至386中任一项的方法,其中所述CAR具有共刺激结构域且所述共刺激结构域选自CD28、CD137 (4-1BB)、CD134 (OX40)和CD278 (ICOS)。
- [0481] 388. 条款325至387中任一项的方法,其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链或Fc受体 γ 。
- [0482] 389. 条款325至367或370至388中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述识别区域是抗-FITC抗体的单链片段可变(scFv)区域,其中所述CAR具有共刺激结构域且所述共刺激结构域是CD137 (4-1BB),且其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链。
- [0483] 390. 条款325至389中任一项的方法,其中施用多个剂量的CAR T细胞组合物。
- [0484] 391. 条款325至390中任一项的方法,其中在施用所述化合物或其药学上可接受的盐之前,或在施用所述CAR T细胞组合物之前,将所述患者成像。
- [0485] 392. 条款325至391中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐不是抗体,且不包含抗体的片段。
- [0486] 393. 条款325至392中任一项的方法,其中所述靶向部分不包含肽表位。
- [0487] 394. 条款325至393中任一项的方法,其中不发生所述患者中导致脱靶毒性的细胞因子释放,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。
- [0488] 395. 条款325至393中任一项的方法,其中在所述患者中不发生脱靶组织毒性,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。
- [0489] 396. 条款325至393中任一项的方法,其中所述癌症包含肿瘤,其中肿瘤大小在所述患者中减小,且其中不发生脱靶毒性。
- [0490] 397. 条款325至398中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:1的核酸。
- [0491] 398. 条款325至397中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:2的多肽。
- [0492] 399. 条款397的方法,其中所述核酸编码嵌合抗原受体。
- [0493] 400. 条款325至399中任一项的方法,其中所述CAR包含人源化氨基酸序列。
- [0494] 401. 条款325至399中任一项的方法,其中所述CAR由人源化氨基酸序列组成。
- [0495] 402. 条款325至401中任一项的方法,其进一步包括向患者施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂的步骤。
- [0496] 403. 条款402的方法,其中向患者施用抑制CAR T细胞的活化的药剂,且所述药剂是阻断CAR T细胞与所述化合物或其药学上可接受的盐的结合、但不结合癌症的药剂。
- [0497] 404. 条款403的方法,其中所述药剂是荧光素胺、荧光素钠或荧光素。
- [0498] 405. 条款404的方法,其中所述药剂是荧光素钠。
- [0499] 406. 治疗癌症的方法,所述方法包括:
- [0500] i) 向患者施用第一剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含

通过接头与靶向部分连接的小分子配体,且其中在施用包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物前至少约一小时向患者施用所述化合物或其药学上可接受的盐,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR;

[0501] ii) 然后向患者施用一定剂量的CAR T细胞组合物;且

[0502] iii) 然后向患者施用第二剂量的化合物或其药学上可接受的盐。

[0503] 407. 条款406的方法,其中在施用所述CAR T细胞组合物前至少约两小时向患者施用第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[0504] 408. 条款406的方法,其中在施用所述CAR T细胞组合物前至少约四小时向患者施用第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[0505] 409. 条款406的方法,其中在施用所述CAR T细胞组合物前至少约八小时向患者施用第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[0506] 410. 条款406的方法,其中在施用所述CAR T细胞组合物前至少约十二小时向患者施用第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[0507] 411. 条款406的方法,其中在施用所述CAR T细胞组合物前至少约十六小时向患者施用第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[0508] 412. 条款406的方法,其中在施用所述CAR T细胞组合物前至少约二十小时向患者施用第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[0509] 413. 条款406的方法,其中在施用所述CAR T细胞组合物前至少约二十四小时向患者施用第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[0510] 414. 条款406至413中任一项的方法,其中到施用所述CAR T细胞组合物后至少约二十四小时向患者施用第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[0511] 415. 条款406至413中任一项的方法,其中到施用所述CAR T细胞组合物后至少约十六小时向患者施用第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[0512] 416. 条款406至413中任一项的方法,其中到施用所述CAR T细胞组合物后至少约十二小时向患者施用第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[0513] 417. 条款406至413中任一项的方法,其中到施用所述CAR T细胞组合物后至少约八小时向患者施用第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[0514] 418. 条款406至413中任一项的方法,其中到施用所述CAR T细胞组合物后至少约四小时向患者施用第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[0515] 419. 条款406至418中任一项的方法,其中不发生在所述患者中导致脱靶毒性的细胞因子释放,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。

[0516] 420. 条款406至418中任一项的方法,其中在所述患者中不发生脱靶组织毒性,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。

[0517] 421. 条款406至418中任一项的方法,其中所述癌症包含肿瘤,其中肿瘤大小在所述患者中减小,且其中不发生脱靶毒性。

[0518] 422. 条款406至418中任一项的方法,其中所述癌症包含肿瘤,且其中所述患者中的肿瘤大小的减小大于在施用所述CAR T细胞组合物前未用所述化合物或其药学上可接受的盐预先治疗的患者中。

[0519] 423. 条款406至422中任一项的方法,其中所述配体选自叶酸、DUPA、NK-1R配体、

CAIX配体、 γ 谷氨酰基转肽酶的配体、NKG2D配体和CCK2R配体。

[0520] 424. 条款406至423中任一项的方法,其中所述配体是叶酸。

[0521] 425. 条款406至423中任一项的方法,其中所述配体是NK-1R配体。

[0522] 426. 条款406至423中任一项的方法,其中所述配体是DUPA。

[0523] 427. 条款406至423中任一项的方法,其中所述配体是CCK2R配体。

[0524] 428. 条款406至423中任一项的方法,其中所述配体是 γ 谷氨酰基转肽酶的配体。

[0525] 429. 条款406至428中任一项的方法,其中所述靶向部分选自2,4-二硝基苯酚(DNP)、2,4,6-三硝基苯酚(TNP)、生物素、地高辛配基、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、NHS-荧光素、五氟苯基酯、四氟苯基酯、打结素、centyrin和DARPin。

[0526] 430. 条款406至429中任一项的方法,其中所述靶向部分是FITC。

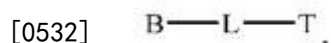
[0527] 431. 条款406至429中任一项的方法,其中所述靶向部分是DNP。

[0528] 432. 条款406至429中任一项的方法,其中所述靶向部分是TNP。

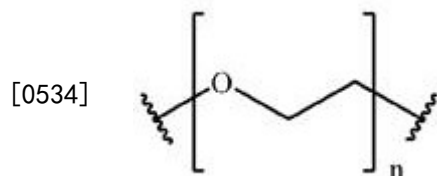
[0529] 433. 条款406至432中任一项的方法,其中所述接头包含聚乙二醇(PEG)、聚脯氨酸、亲水氨基酸、糖、非天然的肽聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、pluronic F-127或其组合。

[0530] 434. 条款406至433中任一项的方法,其中所述接头包含PEG。

[0531] 435. 条款406至434中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐具有下式



[0533] 其中B代表小分子配体,L代表接头,且T代表靶向部分,且其中L包含具有下式的结构



[0535] 其中n是0至200的整数。

[0536] 436. 条款435的方法,其中n是0至150的整数。

[0537] 437. 条款435的方法,其中n是0至110的整数。

[0538] 438. 条款435的方法,其中n是0至20的整数。

[0539] 439. 条款435的方法,其中n是15至20的整数。

[0540] 440. 条款435的方法,其中n是15至110的整数。

[0541] 441. 条款406至430或433至440中任一项的方法,其中所述接头包含PEG,且所述靶向部分是FITC,或其药学上可接受的盐。

[0542] 442. 条款406至441中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约10000 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0543] 443. 条款406至441中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约5000 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0544] 444. 条款406至441中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约1000 nmol/kg患者体重的剂量施用。

- [0545] 445. 条款406至441中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。
- [0546] 446. 条款406至441中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约200 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。
- [0547] 447. 条款406至441中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约250 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。
- [0548] 448. 条款406至447中任一项的方法,其中所述癌症选自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头癌、颈癌、皮肤黑色素瘤、眼内黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、子宫内膜癌、直肠癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、三重阴性的乳腺癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金氏病、食管癌、小肠癌、内分泌系统的癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、非小细胞肺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、骨肉瘤、尿道癌、前列腺癌、慢性白血病、急性白血病、急性髓细胞白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、髓性白血病、髓单核细胞白血病、毛细胞白血病、胸膜间皮瘤、膀胱癌、伯基特氏淋巴瘤、输尿管癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统 (CNS) 肿瘤、原发性 CNS 淋巴瘤、脊椎肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤和胃食管连接部的腺癌。
- [0549] 449. 条款406至424或429至448中任一项的方法,其中所述癌症是表达 β 的癌症。
- [0550] 450. 条款448的方法,其中所述癌症是子宫内膜癌。
- [0551] 451. 条款448的方法,其中所述癌症是非小细胞肺癌。
- [0552] 452. 条款448的方法,其中所述癌症是卵巢癌。
- [0553] 453. 条款448的方法,其中所述癌症是三重阴性的乳腺癌。
- [0554] 454. 条款406至453中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述识别区域是抗体的单链片段可变 (scFv) 区域。
- [0555] 455. 条款406至430或433至454中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述CAR的识别区域是抗-FITC抗体的单链片段可变 (scFv) 区域。
- [0556] 456. 条款406至455中任一项的方法,其中所述CAR具有共刺激结构域且所述共刺激结构域选自CD28、CD137 (4-1BB)、CD134 (OX40) 和CD278 (ICOS)。
- [0557] 457. 条款406至456中任一项的方法,其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链或Fc受体 γ 。
- [0558] 458. 条款406至430或433至457中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述识别区域是抗-FITC抗体的单链片段可变 (scFv) 区域,其中所述CAR具有共刺激结构域且所述共刺激结构域是CD137 (4-1BB), 且其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链。
- [0559] 459. 条款406至458中任一项的方法,其中施用多个剂量的CAR T细胞组合物。
- [0560] 460. 条款406至459中任一项的方法,其中在施用所述化合物或其药学上可接受的盐之前,将所述患者成像。
- [0561] 461. 条款406至460中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐不是抗体,且不包含抗体的片段。
- [0562] 462. 条款406至461中任一项的方法,其中所述靶向部分不包含肽表位。
- [0563] 463. 条款406至462中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:1的核酸。

- [0564] 464. 条款406至463中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:2的多肽。
- [0565] 465. 条款463的方法,其中所述核酸编码嵌合抗原受体。
- [0566] 466. 条款406至465中任一项的方法,其中所述CAR包含人源化氨基酸序列。
- [0567] 467. 条款406至465中任一项的方法,其中所述CAR由人源化氨基酸序列组成。
- [0568] 468. 条款108至182中任一项的方法,其中向所述患者施用多于一个剂量的叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂。
- [0569] 469. 条款108至182中任一项的方法,其中在所述化合物或其药学上可接受的盐之前和/或之后向所述患者施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂。
- [0570] 470. 条款108至182中任一项的方法,其中叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂的施用引起患者中的细胞因子水平的降低。
- [0571] 471. 条款470的方法,其中到向患者施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂后约3小时,发生细胞因子水平的降低。
- [0572] 472. 条款470的方法,其中到向患者施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂后约6小时,发生细胞因子水平的降低。
- [0573] 473. 条款470的方法,其中细胞因子水平的降低是降低至约未治疗患者中的细胞因子水平。
- [0574] 474. 条款108至182中任一项的方法,其中在施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂之前和之后施用所述化合物或其药学上可接受的盐。
- [0575] 475. 条款108至182中任一项的方法,其中在施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂之后,患者的血液中的CAR T细胞数增加,即使患者中的细胞因子水平降低。
- [0576] 476. 条款108至182中任一项的方法,其中在施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂之后,相对于未用拯救剂治疗的患者,CAR T细胞活化增强或维持,即使治疗的患者中的细胞因子水平降低。
- [0577] 477. 条款108至182中任一项的方法,其中所述癌症包含肿瘤,且当向患者施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂时,患者中的肿瘤大小不增加。
- [0578] 478. 条款477的方法,其中获得针对肿瘤的完全应答。
- [0579] 479. 条款108、115-160、168-182和468-478中任一项的方法,其中当CRS等级达到1、2、3或4时,向患者施用抑制CAR T细胞的活化的药剂。
- [0580] 480. 条款108、115-160、168-182和468-478中任一项的方法,其中当CRS等级达到3或4时,向患者施用抑制CAR T细胞的活化的药剂。

- [0581] 481. 条款108至182和468至480中任一项的方法,其中肺水肿减少。
- [0582] 482. 条款108、115-160、168-182和468-481中任一项的方法,其中抑制CAR T细胞的活化的药剂以约0.01至约300 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重的剂量施用。
- [0583] 483. 条款108、115-160、168-182和468-481中任一项的方法,其中抑制CAR T细胞的活化的药剂以约0.06至约100 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重的剂量施用。
- [0584] 484. 条款108、115-160、168-182和468-481中任一项的方法,其中抑制CAR T细胞的活化的药剂以约0.06至约90 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重的剂量施用。
- [0585] 485. 条款108、115-160、168-182和468-481中任一项的方法,其中抑制CAR T细胞的活化的药剂以约0.06至约80 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重的剂量施用。
- [0586] 486. 条款108、115-160、168-182和468-481中任一项的方法,其中抑制CAR T细胞的活化的药剂以约0.06至约70 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重的剂量施用。
- [0587] 487. 条款108、115-160、168-182和468-481中任一项的方法,其中抑制CAR T细胞的活化的药剂以约0.06至约60 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重的剂量施用。
- [0588] 488. 条款108、115-160、168-182和468-481中任一项的方法,其中抑制CAR T细胞的活化的药剂以约0.06至约50 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重的剂量施用。
- [0589] 489. 条款108、115-160、168-182和468-481中任一项的方法,其中抑制CAR T细胞的活化的药剂以约0.06至约40 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重的剂量施用。
- [0590] 490. 条款108、115-160、168-182和468-481中任一项的方法,其中抑制CAR T细胞的活化的药剂以约0.06至约30 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重的剂量施用。
- [0591] 491. 条款108、115-160、168-182和468-481中任一项的方法,其中抑制CAR T细胞的活化的药剂以约0.06至约20 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重的剂量施用。
- [0592] 492. 条款108、115-160、168-182和468-481中任一项的方法,其中抑制CAR T细胞的活化的药剂以约0.06至约10 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重的剂量施用。
- [0593] 493. 条款108、115-160、168-182和468-481中任一项的方法,其中抑制CAR T细胞的活化的药剂以约0.06至约8 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重的剂量施用。
- [0594] 494. 条款108、115-160、168-182和468-481中任一项的方法,其中抑制CAR T细胞的活化的药剂以约0.06至约6 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重的剂量施用。
- [0595] 495. 条款108、115-160、168-181和468-494中任一项的方法,其中向患者施用抑制CAR T细胞的活化的药剂,且所述药剂是荧光素钠。
- [0596] 496. 条款1至495中任一项的方法,其中减少或预防CRS,且所述方法导致患者中的肿瘤体积的减少。
- [0597] 497. 条款1至496中任一项的方法,其中减少或预防由于CRS导致的体重减轻。
- [0598] 498. 条款1-3、8-28、33-58、63-83、88-136、141-249、252-361、366-380、385-424、429-449和454至497中任一项的方法,其中所述癌症是急性髓细胞白血病。
- [0599] 499. 条款498的方法,其中所述癌症表达叶酸受体- β 。
- [0600] 500. 条款498或499的方法,其中所述CAR-T细胞具有中央记忆/效应记忆表型。
- [0601] 501. 条款1至500中任一项的方法,其中所述CAR T细胞的CD8:CD4比率为约1:1。
- [0602] 502. 条款215至251中任一项的方法,其进一步包括步骤iv):向所述患者再次施用所述化合物或其药学上可接受的盐。

[0603] 503. 条款474的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的后续施用引起CAR T细胞活化和患者中的细胞因子水平的增加。

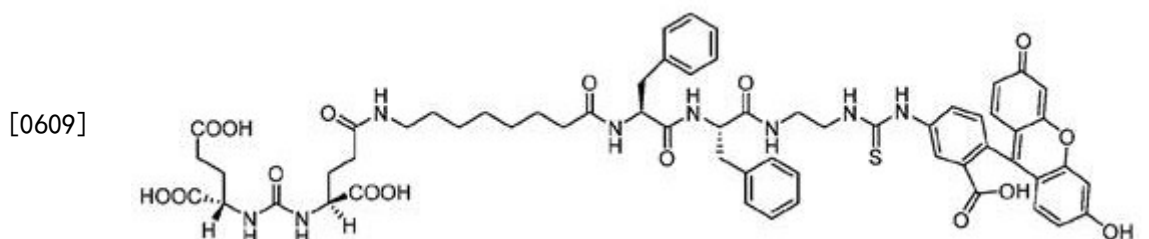
[0604] 504. 条款1至107、183至476至479至503中任一项的方法,其中所述癌症包含肿瘤,且其中获得针对肿瘤的完全应答。

[0605] 505. 治疗癌症的方法,所述方法包括:

[0606] i) 向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体;且

[0607] ii) 向患者施用CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞,且其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR;且其中所述小分子配体是PSMA配体且所述靶向部分是FITC。

[0608] 506. 条款505的方法,其中通过接头与靶向部分连接的小分子配体具有下式

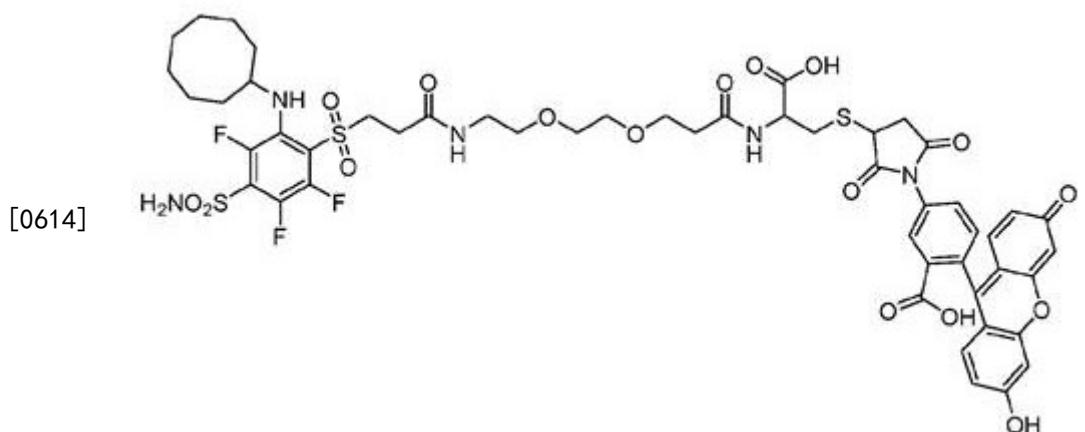


[0610] 507. 治疗癌症的方法,所述方法包括:

[0611] i) 向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体;且

[0612] ii) 向患者施用CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞,且其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR;且其中所述小分子配体是CAIX配体且所述靶向部分是FITC。

[0613] 508. 条款507的方法,其中通过接头与靶向部分连接的小分子配体具有下式



[0615] 509. 治疗癌症的方法,所述方法包括:

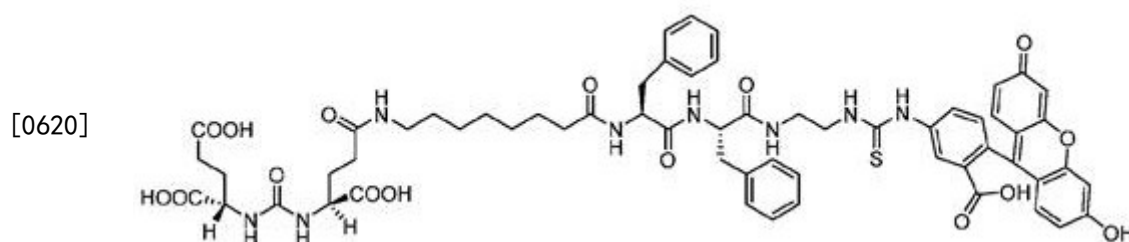
[0616] i) 向患者施用第一化合物或其药学上可接受的盐,其中所述第一化合物或其药学上可接受的盐包含通过接头与FITC连接的PSMA配体;

[0617] ii) 向患者施用第二化合物或其药学上可接受的盐,其中所述第二化合物或其药学上可接受的盐包含通过接头与FITC连接的CAIX配体;且

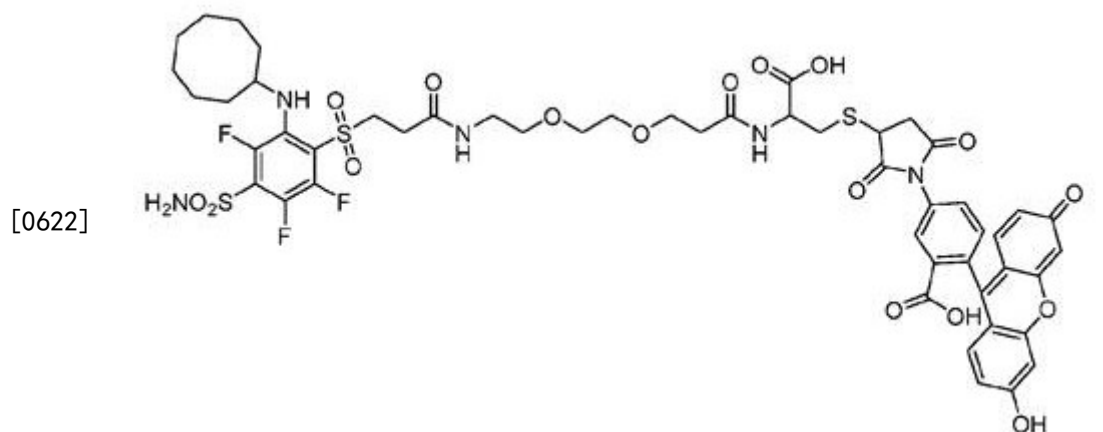
[0618] iii) 向患者施用CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞,

且其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR。

[0619] 510. 条款509的方法,其中所述第一化合物具有下式



[0621] 且所述第二化合物具有下式



[0623] 附图简述

[0624] 图1A-1B显示抗-FITC CAR T细胞介导的毒性。图1A显示不同治疗组小鼠的体重变化。图1B显示对于不同治疗组检测到的IFN- γ 的浓度。图1C显示不同治疗组中的小鼠的第一周存活率(%)。

[0625] 图2A-B显示抗-FITC CAR T细胞调节对肿瘤应答的影响。图2A显示用CAR T细胞和PBS或CAR T细胞和FITC-叶酸治疗的小鼠的肿瘤生长。图2B显示用于研究中的小鼠的肿瘤应答结果的概述。

[0626] 图3A-D显示FITC-叶酸浓度对肿瘤应答的影响。图3A显示在不同FITC-叶酸浓度下检测到的IFN- γ 的浓度。图3B显示在不同FITC-叶酸浓度存在的情况下CAR T细胞注射后的肿瘤生长。图3C显示小鼠的第一周存活率(%)。图3D显示用于研究中的小鼠的肿瘤应答结果的概述。

[0627] 图4A-B显示用抑制T细胞活化信号的介体的药剂抑制FITC CAR T细胞活化。图4A显示IFN- γ 浓度随药剂浓度的变化。图4B显示CD69表达随药剂浓度的变化。

[0628] 图5显示用于CAR T转导的构建体的总图。

[0629] 图6A-D显示在不同EC17剂量和CART细胞数量下的抗肿瘤效力和毒性。图6A显示随时间的肿瘤体积。图6B显示随时间的体重变化。图6C显示每个EC17剂量的最大体重减轻百分比。图6D显示对于每个EC17剂量显示sCRS(细胞因子释放综合征)的小鼠的百分比。(1) 无CAR-T + EC17 500 nmol/kg; (2) 1250万个CAR-T + EC17 10000 nmol/kg; (3) 1250万个CAR-T + EC17 1500 nmol/kg; (4) 1250万个CAR-T + EC17 500 nmol/kg; (5) 1000万个CAR-T + EC17 100 nmol/kg; (6) 1000万个CAR-T + EC17 20 nmol/kg。

[0630] 图7显示用EC0923拯救具有sCRS的小鼠,以及用或不用EC0923治疗的小鼠的观察

到的应答,以及从用或不用EC0923治疗的小鼠收获的器官。

[0631] 图8A-D显示不同CAR T剂量的抗肿瘤效力和毒性。图8A显示随时间的肿瘤体积。图8B显示随时间的体重变化。图8C显示每个CAR T剂量的最大体重减轻百分比。图8D显示每个CAR T剂量显示sCRS的小鼠的百分比。

[0632] 图9A-B显示对于不同EC 17剂量的抗肿瘤效力和体重变化。图9A显示随时间的肿瘤体积。图9B显示随时间的体重变化。

[0633] 图10A-C显示不同的CAR T细胞和未转化的T细胞混合物的抗肿瘤效力。图10A显示随时间的肿瘤体积;(●) 无CAR-T,(○) CAR-T,在第0天,(■) CAR-T,在第0天;未修饰的T,在第52天,(▼) CAR-T,在第0天、第46天和第52天。图10B显示随时间的体重变化;(●) 无CAR-T,(○) CAR-T,在第0天,(■) CAR-T,在第0天;未修饰的T,在第52天,(▼) CAR-T,在第0天、第46天和第52天。图10C显示对于不同的CAR T细胞和未转化的T细胞混合物,血液中的CAR T细胞的量和肿瘤体积。

[0634] 图11A-B显示500万个CAR T细胞和不同的EC17给药时间表的抗肿瘤效力和毒性。图11A显示随时间的肿瘤体积。图11B显示随时间的体重变化。

[0635] 图12显示通过使用竞争物来抑制CAR T细胞活化并通过终止桥的施用经由调节CAR T细胞活化来控制CAR T细胞介导的毒性。

[0636] 图13A-C显示FITC-叶酸剂量递增研究的结果。图13A显示在施用桥和CAR T细胞后,随时间的体重变化百分比。图13B显示在注射CAR T细胞和桥后,随时间的肿瘤体积变化。图13C显示在用桥和CAR T细胞治疗的第一周后的存活百分比。

[0637] 图14A-B显示FITC-配体桥分子对CAR T细胞增殖和细胞因子产生的影响。图14A显示将CAR T细胞引入小鼠后6天的CAR T细胞的数量。图14B显示在将CAR T细胞引入小鼠后6天的血清细胞因子IL-2、IFN- γ 和TNF- α 的浓度。

[0638] 图15显示在体外测定中作为FITC-叶酸浓度的函数的IFN- γ 的浓度。

[0639] 图16显示用EC0923或荧光素拯救(基于细胞因子产生的测量)具有细胞因子释放综合征的小鼠。

[0640] 图17显示CAR-T细胞活性(基于细胞因子产生的测量)取决于肿瘤的存在和EC17剂量水平。

[0641] 图18A-C显示CAR-T细胞在没有肿瘤的幼稚小鼠中不增殖。图18A显示每周三次用CAR-T细胞注射、但无EC17或有500 nmol/kg EC17的小鼠(无肿瘤)中的体重变化。图18B和C显示这些小鼠相比于具有HEK(叶酸受体阳性)肿瘤的小鼠中的CAR-T细胞数和脾脏大小。对于图18B和C,每组三个柱中的左手柱是未用EC17注射、但用CAR-T细胞注射的没有肿瘤的小鼠,中间柱是用CAR-T细胞和EC17注射的没有肿瘤的小鼠,并且右手柱是用CAR-T细胞和EC17注射的具有肿瘤的小鼠。在图18B中,N.D.是未测定,并且y-轴是图18的对数。

[0642] 图19A-B显示使用MDA-MB-231模型(高叶酸受体表达水平-图19A)或OV90肿瘤模型(低叶酸受体表达水平-图19B)注入小鼠的CAR-T细胞和EC17对肿瘤大小的影响。

[0643] 图20A-B显示使用MDA-MB-231模型注入小鼠的CAR-T细胞和各种剂量的EC17对肿瘤大小(图20A)和体重减轻(图20B)的影响。

[0644] 图21A和21B显示MDA-MB-231模型中的FITC-CAR-T抗肿瘤活性。

[0645] 图22A和22B显示OV-90模型中的FITC-CAR-T抗肿瘤活性。

- [0646] 图23A和23B显示KB模型中的FITC-CAR-T抗肿瘤活性。对于EC17组,2/3在第23天具有sCRS,且1/3在第37天具有sCRS。
- [0647] 图24A和24B显示HEK-FRa模型中的FITC-CAR-T抗肿瘤活性。
- [0648] 图25A和25B显示SKOV-3模型中的FITC-CAR-T抗肿瘤活性。
- [0649] 图26、小图C和E显示具有EC17预先涂抹的小鼠中的毒性研究。小图A和B显示治疗的方案。小图D显示EC17预先涂抹对肿瘤大小的影响。
- [0650] 图27、小图A显示治疗的方案。小图B显示毒性研究。小图C显示EC17预先涂抹对肿瘤毒性的影响。线1:无EC17。线2:EC17,给药前4小时。线3:EC17,给药前4小时,然后CART后24小时。线4:EC17,CAR-T后48小时。
- [0651] 图28、小图A-D显示血液中的CAR-T细胞数。没有拯救的小鼠中的CAR-T数量被认为是1。
- [0652] 图29、小图A-E显示三种拯救剂(叶酸、荧光素钠(NaFL)和甲酰四氢叶酸)的比较研究。
- [0653] 图30A和30B显示拯救测定。具有荧光素拯救的小鼠具有最少的体重减轻。除了荧光素拯救组中的2/9以外,具有拯救的所有小鼠均达到完全应答。线1无EC17。线2:无EC17,但有荧光素。线3:荧光素拯救。线4:甲酰四氢叶酸拯救。线5:叶酸拯救。线6:无拯救。
- [0654] 图31显示荧光素钠(60 $\mu\text{mol/kg}$)拯救研究方案。
- [0655] 图32A和32B显示NaFL拯救相关的器官重量变化。(1) CAR-T; (2) CAR-T + EC17; (3) CAR-T + EC17 + NaFL拯救。
- [0656] 图33、小图A-G显示NaFL拯救后7小时小鼠血液中的细胞因子产生。
- [0657] 图34、小图A-G显示(NaFL拯救后27小时)小鼠中的细胞因子产生。
- [0658] 图35、小图A-E显示(NaFL拯救后<7小时)小鼠血液中减少的细胞因子产生。
- [0659] 图36A和36B显示NaFL拯救对FITC CAR-T抗肿瘤活性和体重变化的影响。(1) 仅CAR-T; (2) CAR-T + EC17; (3) CAR-T + EC17 + NaFL。
- [0660] 图37A和37B显示拯救对细胞因子水平的影响。
- [0661] 图38A显示CAR-T施用时间表。图38B显示体重变化。
- [0662] 图39、小图A-D显示血液中的细胞因子产生是CAR-T剂量依赖性的。
- [0663] 图40A显示给药时间表,且图40B显示血液中的CAR-T数目是EC17剂量依赖性的(体内第3天)。
- [0664] 图41A显示给药时间表,且图41B显示血液中的CAR-T计数是EC17剂量依赖性的,尽管差异较小(体内第6天)。
- [0665] 图42显示在CAR-T和EC17注射后的小鼠体重变化。
- [0666] 图43A和43B显示在CAR-T细胞和EC17注射后小鼠中的CAR-T细胞计数和脾脏大小。(1) 具有肿瘤的小鼠:CAR-T 500万 + EC17 SIW; (2) 幼稚小鼠:CAR-T 800万,无EC17; (3) 幼稚小鼠:CAR-T 800万 + EC17 TIW; (4) 幼稚小鼠:CAR-T 500万,无EC17; (5) 幼稚小鼠:CAR-T 500万 + EC17 TIW。
- [0667] 图44显示在肿瘤存在和不存在的条件下,在EC17和CAR-T细胞注射后的细胞因子产生。
- [0668] 图45显示抗-FITC CAR T细胞疗法的通用性:各种衔接子与CAR T细胞的结合。(1)

没有染色的CAR T细胞；(2)用FITC-Alexa 647 + FITC-叶酸标记的CAR T细胞(竞争)；(3)用FITC-Alexa 647标记的CAR T细胞；(4)用FITC-Alexa 647 + FITC-DUPA标记的CAR T细胞(竞争)；(5)用FITX-Alexa 647 + FITC-CA9标记的CAR T细胞(竞争)。

[0669] 图46显示通用Car T细胞可以在添加抗原匹配的桥后体外消除表达正交抗原的各种癌细胞。

[0670] 图47显示桥的浓度和通用CAR T细胞的体外抗肿瘤活性之间的关系。

[0671] 图48显示通用CAR T细胞可以在添加抗原匹配的桥后体内消除表达正交抗原的各种癌细胞。

[0672] 图49显示通用CAR T细胞可以经由桥的混合物体内消除两种肿瘤。

[0673] 图50显示荧光素钠(0.06、0.6、6 $\mu\text{mol/kg}$)拯救研究方案。

[0674] 图51A显示抗肿瘤活性(6 $\mu\text{mol/kg}$ NaFL拯救)。图51B显示相应的体重变化。

[0675] 图52、小图A-E显示荧光素钠拯救后小鼠血液中的细胞因子水平。

[0676] 图53、小图A显示拯救方案。小图B和C显示拯救后血液中的FITC CAR T细胞的计数。

[0677] 图54显示拯救后小鼠血液中的循环CAR T细胞的表征。

[0678] 图55A显示拯救方案。小图B和C显示拯救后血液中的CAR T细胞的计数。(1) 对照[无NaFL]；(2) 0.06 $\mu\text{mol/kg}$ NaFL；(3) 0.6 $\mu\text{mol/kg}$ NaFL；(4) 6 $\mu\text{mol/kg}$ NaFL。

[0679] 图56显示在EC17治疗和未治疗的动物中的肿瘤负荷。

[0680] 图57概述所检查的所有组中的肿瘤块的估计数量和总肿瘤重量。

[0681] 图58A和58B显示循环肿瘤细胞的表征。

[0682] 图59A和59B显示循环肿瘤细胞的表征。

[0683] 图60A和60B显示在EC17注射后作为CAR T细胞的全血的百分比。

[0684] 图61A和61B显示在有或没有拯救的情况下输注EC17后血源性CAR T细胞的持久性以及输注EC17后的表型。

[0685] 图62A和62B显示,当注射EC17时,CAR T细胞位于转移性肿瘤病灶中,而不是邻近的健康组织中。

[0686] 图63显示抗-荧光素CAR T细胞和荧光素-叶酸桥的设计和表征。(A) 荧光素-叶酸(FITC-叶酸)的结构。(B) 显示抗-荧光素CAR的构建的图,其中SP = 信号肽,scFv = 具有KD=270 fM的识别荧光素的单链可变片段,TM = 跨膜结构域,4-1BB = 来自CD137的胞质活化结构域,且CD3 ζ =CD3 ζ 的胞质活化结构域。(C) 通过流式细胞术评估的CAR T细胞的转导效率。空心柱状图:未转导的T细胞;实心柱状图:用表达GFP和(B)中显示的CAR构建体的慢病毒转导的T细胞。(D) 证明FITC-叶酸结合抗-荧光素CAR T细胞。实心柱状图(灰色):无染色的抗-荧光素CAR T细胞;空心柱状图:用FITC-Alexa647 (10nM) 标记的抗-荧光素CAR T细胞;实心柱状图(黑色):在竞争性100倍过量FITC-叶酸(1 μM) 存在的情况下,用FITC-Alexa647 (10nM) 标记的抗-荧光素CAR T细胞。

[0687] 图64显示FITC-叶酸桥介导抗-荧光素CAR T细胞与表达叶酸受体的癌细胞(KB细胞)的接合的证明。(A) FR在KB细胞上表达的证明。灰色柱状图:没有染色的KB细胞;黑色柱状图:在过量(10 μM) 的作为竞争剂的游离叶酸存在的情况下,用100nM FITC-叶酸标记的KB细胞;空心柱状图:用100nMFITC-叶酸标记的KB细胞。(B) 添加正确的FITC-叶酸(100nM)、但

未添加错配的FITC-DUPA (100nM) 或未添加(PBS) 桥后,CAR T细胞对KB细胞的细胞毒性。(C) 在存在FITC-叶酸、FITC-DUPA或不存在桥的情况下,效应子:靶细胞比率对KB细胞的CAR T细胞裂解的影响。(D) 通过添加FITC-叶酸(100nM) 而不是FITC-DUPA(100nM) 诱导IFN γ 产生。(E) 通过FITC-叶酸而不是FITC-DUPA诱导抗-荧光素CAR T细胞的增殖。(F) 抗-荧光素CAR T细胞上的活化标志物(CD69) 的表达仅在添加正确的桥后发生。对于小图B、D、E和F,抗-荧光素CAR T细胞:KB细胞的比率为10:1。条形图代表平均值 $\pm$ s.d.n = 3。对于所有比较进行的单向ANOVA (****P<0.0001,**P<0.005,*P<0.01,ns (不显著))。

[0688] 图65显示在体内CRS对抗-荧光素CAR T细胞、叶酸受体阳性癌细胞(MDA-MB-231细胞) 和FITC-叶酸的存在的依赖性。(A) 在FITC-叶酸(第1天和第2天施用的500 nmol/kg) 存在或不存在的条件下,将抗-荧光素CAR T细胞(5×10^6) 输注入无肿瘤小鼠或荷瘤小鼠后4天测定的体重变化(%)。**通过单向ANOVA检验,P<0.01。(B) 在第1和2天施用PBS或500 nmol/kg FITC-叶酸后,CAR T细胞数对荷瘤小鼠中的第4天的体重变化(%) 的影响。** P<0.05,**** P<0.0001,通过单向ANOVA检验。(C) 在第4天,荷瘤小鼠中的CAR T细胞数对血浆IFN γ 浓度的影响。*** P<0.001,**** P<0.0001,ns(不显著),通过单向ANOVA检验.n = 5只小鼠/组。条形图代表平均值 $\pm$ s.e.m。

[0689] 图66显示通过间断桥施用来控制CRS强度。(A) 在不存在(PBS) 或存在FITC-叶酸(500nmol/kg,在第1天和第2天施用和在其后隔日施用) 的情况下,施用高剂量的抗-荧光素CAR T细胞(15×10^6) 后的作为CRS强度的量度的体重变化(%) 的分析。在间断给药方案中,遵循连续给药时间表,除了在第4天和第6天省略FITC-叶酸注射。(B) 使用部分A中所述的给药方案的在第6天的小鼠血浆中的IFN γ 水平的分析。(C) 如部分A中所述治疗的小鼠中的肿瘤体积的测量.n = 5只小鼠/组。数据代表平均值 $\pm$ s.e.m.**** P<0.0001,通过单向ANOVA检验。

[0690] 图67显示经由与游离叶酸或游离荧光素竞争而阻断桥对CAR T细胞介导的细胞毒性的影响。(A) 在不存在(PBS) 或存在FITC-叶酸(500nmol/kg,在第1天和第2天施用和在其后隔日施用) 的情况下,施用抗-荧光素CAR T细胞(15×10^6) 后的体重变化(%) 的测量。对于竞争研究,在第4天和第6天共同注射100倍过量的叶酸。**** P<0.0001。(B) 第6天以上治疗组的血浆中的IFN γ 水平的分析。** P<0.005。(C) 在相同治疗组中的肿瘤体积的测量.n = 5只小鼠/组。误差条代表平均值 $\pm$ s.e.m。(D) 在施用12倍过量的游离荧光素以抑制CRS后,CAR T细胞的血浆中的细胞因子水平的时间依赖性的分析。通过注射 10×10^6 个抗-荧光素CAR T细胞加上FITC-叶酸(500 nmol/kg,在第3天),在所有小鼠中诱导CRS。在第4天,为了抑制有效的CRS,注射6 μ mol/kg游离荧光素,并且在施用荧光素后3和6小时在血浆中测量所示的细胞因子.n = 3只小鼠/组。数据代表平均值 $\pm$ s.e.m.** P<0.01,*** P<0.001,**** P<0.0001,通过单向ANOVA检验。

[0691] 图68显示桥浓度对体外和体内抗-荧光素CAR T细胞细胞因子释放和抗肿瘤活性的调节的影响。(A) 在各种浓度的FITC-叶酸(0.001nM至100000nM) 存在的条件下,抗-荧光素CAR T细胞(5:1 = 效应子:肿瘤细胞比率) 对培养物中的MDA-MB-231细胞的裂解。(B) 来自部分A中描述的细胞的IFN γ 释放。(C) 在通过注射 15×10^6 个CAR T细胞开始疗法后6天,携带MDA-MB-231肿瘤的小鼠的血浆中的IFN γ 水平。在第1、2、8、10天和其后隔日用5、50、500或2500 nmol/kg FITC-叶酸治疗小鼠(省略第4和第6天的治疗以避免CRS)。(D) 在小组C的

治疗组中肿瘤生长的分析。 $n = 5$ 只小鼠/组。条形图代表平均值 $\pm$ s.e.m.**** $P < 0.0001$,通过单向ANOVA检验。

[0692] 图69显示通过逐渐递增桥剂量或降低桥给药频率来预防CRS。在用 15×10^6 个CAR T细胞加PBS或逐渐递增的FITC-叶酸剂量(在第1和第2天, 0.5 nmol/kg ;在第4天和第6天, 5 nmol/kg ;在第8天和第10天, 50 nmol/kg ;和从第12天起, 500 nmol/kg)或在隔日恒定剂量的 500 nmol/kg 治疗的携带MDA-MB-231肿瘤的小鼠中的体重变化(A)和肿瘤体积(B)的测量。**** $P < 0.0001$,通过单向ANOVA检验。在1) 1个剂量/周(在第1、8、15天等)、2) 2个剂量/周(第1、4、8、11、15天等)或3个剂量/周(第1、3、5、8、10、12、15等)的不同的给药频率的用 5×10^6 个CAR T细胞加上PBS或FITC-叶酸(500 nmol/kg)治疗的携带MDA-MB-231肿瘤的小鼠中的体重变化(C)和肿瘤体积(D)的测量。 $n = 5$ 只小鼠/组。所有数据代表平均值 $\pm$ s.e.m。

[0693] 图70、小图A显示剂量递增方案。小图B-C显示EC17剂量递增对CAR-T疗法的抗肿瘤活性和毒性(体重变化)的影响。

[0694] 图71、小图A显示用于测试肿瘤大小是否与在CAR-T/EC17疗法期间的体重变化和IL-6释放相关的方案。小图B-C分别显示体重变化和IL-6水平的结果。

[0695] 图72、小图A显示用于测试CAR-T/EC17疗法在骨肉瘤模型中是否有效的方案。小图B显示肿瘤大小结果。

[0696] 图73显示针对图72所述的测试的体重变化。

[0697] 图74、小图A-F显示HOS癌细胞表达FR- α 。

[0698] 图75显示用于测试是否响应于CAR-T/EC17疗法产生细胞因子以及NaFL是否拯救小鼠免于CRS的方案。

[0699] 图76、小图A-E显示NaFL拯救后7小时 60 umol/kg NaFL对小鼠细胞因子产生的降低。

[0700] 图77、小图A-c显示NaFL拯救后27小时 60 umol/kg NaFL对小鼠细胞因子产生的减少。

[0701] 图78显示用于测试通过各种浓度的NaFL响应于CAR-T/EC17疗法的小鼠细胞因子产生的减少的方案。

[0702] 图79显示通过NaFL拯救响应于CAR-T/EC17疗法的MCP-1的减少。

[0703] 图80显示通过NaFL拯救响应于CAR-T/EC17疗法的IL-6的减少。

[0704] 图81显示通过NaFL拯救响应于CAR-T/EC17疗法的IL-10的减少。

[0705] 图82、小图A显示用于测试响应于CAR-T/EC17疗法的MCP-1产生是否与CAR-T细胞数相关的方案。小图B显示响应于CAR-T/EC17疗法的MCP-1产生与CAR-T细胞数相关。

[0706] 定义

[0707] 如本文所用,“一个/种(a)”或“一个/种(an)”可以意指一个/种或多个/种。如本文所用,关于数值(包括、例如,整数、分数和百分比)的“约”通常是指本领域普通技术人员认为等同于列举的值(例如,具有相同的功能或结果)的数值范围(例如,列举的值 $\pm 5\%$ 至 10%)。

[0708] 如本文所用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”、“治疗(treated)”或“治疗(treatment)”是指治疗性治疗和预防性或防止性治疗。

[0709] 如本文所用,关于癌症的术语“改善(ameliorate)”、“改善(ameliorating)”、“改善(amelioration)”或“改善(ameliorated)”可以意指减轻癌症的症状,减小肿瘤的大小,完全地或部分地除去肿瘤(例如,完全或部分应答),造成稳定的疾病,阻止癌症的进展(例如,无进展存活),或被医师认为是癌症的治疗性、预防性或防止性治疗的对癌症的任意其他效应。

[0710] 如本文所用,术语“施用(administer)”、“施用(administering)”或“施用(administered)”意指将本文描述的化合物或其药学上可接受的盐或CAR T细胞组合物引入患者的所有方式,包括、但不限于,口服、静脉内、肌肉内、皮下和经皮。

[0711] 如本文所用,术语“脱靶毒性”意指对于治疗患者的医师而言不可接受的器官损伤或患者的重量的减小,或对患者的对于治疗患者的医师而言不可接受的任意其他效应,例如B细胞发育不全,发烧,血压下降或肺水肿。

[0712] 如本文所用,术语“转导”和“转染”等同地使用,且所述术语意指通过任何人工方法(包括病毒和非病毒方法)将核酸引入细胞中。

[0713] 说明性实施方案的详述

[0714] 在本文描述各个实施方案中,将通过接头与靶向部分连接的小分子配体用作癌症和CAR T细胞(即,表达嵌合抗原受体的T细胞)之间的桥。所述桥将所述CAR T细胞引导至所述癌症以改善所述癌症。在一个实施方案中,所述“小分子配体”可以是叶酸、CAIX配体、DUPA、NK-1R配体、 γ 谷氨酰基转肽酶的配体、NKG2D配体或CCK2R配体,其各自是特异性结合癌细胞类型的小分子配体(即,这些配体中的每一种的受体相对于正常组织在癌症上过表达)。

[0715] 与小分子配体连接的“靶向部分”结合由CAR T细胞表达的遗传工程改造的CAR的识别区域。因此,所述CAR的识别区域(例如,抗体的单链片段可变区(scFv)、Fab、Fv、Fc或(Fab')₂片段等)是指“靶向部分”。因此,通过接头与靶向部分连接的小分子配体充当癌症和CAR T细胞之间的桥,其将CAR T细胞引导至癌症以改善所述癌症。在各个实施方案中,所述癌症和所述CAR T细胞之间的桥可以是在实施例中所示的缀合物中的任一种。

[0716] 所述桥是小有机关分子,所以可以快速(例如,约20分钟或更少)实现从血流的清除。在一个方面,可以使CAR T细胞应答仅靶向表达所述“桥”的小分子配体部分的受体的那些癌细胞,由此降低对正常组织的脱靶毒性。另外,因为一种类型的CAR T细胞构建体可以用于使用不同的“桥”靶向多种癌症,所以该系统可以是“通用的”。示例性地,由CAR T细胞识别的靶向部分可以保持恒定,使得可以使用一种类型的CAR T细胞构建体,而可以改变结合癌症的小分子配体以允许靶向多种癌症。

[0717] 在下面的条款列表和权利要求和整个申请中所述的各个实施方案中,通过接头与靶向部分连接的小分子配体被称为“化合物”。

[0718] 下述列举的条款描述了几个实施方案。还考虑任何以下实施方案与在本专利申请的概述部分、本专利申请的说明性实施方案部分的详述、实施例部分或权利要求中描述的任何适用的实施方案的组合。

[0719] 1. 治疗癌症的方法,所述方法包括:

[0720] i) 向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体;

[0721] ii) 向所述患者施用第一剂量的包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR;且

[0722] iii) 向所述患者施用第二剂量的包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR。

[0723] 2. 条款1的方法,其中所述配体选自叶酸、DUPA、NK-1R配体、CAIX配体、 γ 谷氨酰基转肽酶的配体、NKG2D配体和CCK2R配体。

[0724] 3. 条款1或2中任一项的方法,其中所述配体是叶酸。

[0725] 4. 条款1或2中任一项的方法,其中所述配体是NK-1R配体。

[0726] 5. 条款1或2中任一项的方法,其中所述配体是DUPA。

[0727] 6. 条款1或2中任一项的方法,其中所述配体是CCK2R配体。

[0728] 7. 条款1或2中任一项的方法,其中所述配体是 γ 谷氨酰基转肽酶的配体。

[0729] 8. 条款1至7中任一项的方法,其中所述靶向部分选自2,4-二硝基苯酚(DNP)、2,4,6-三硝基苯酚(TNP)、生物素、地高辛配基、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、NHS-荧光素、五氟苯基酯、四氟苯基酯、打结素、centyrin和DARPin。

[0730] 9. 条款1至8中任一项的方法,其中所述靶向部分是FITC。

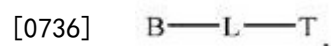
[0731] 10. 条款1至8中任一项的方法,其中所述靶向部分是DNP。

[0732] 11. 条款1至8中任一项的方法,其中所述靶向部分是TNP。

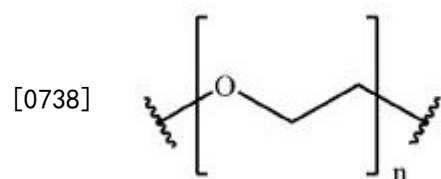
[0733] 12. 条款1至11中任一项的方法,其中所述接头包含聚乙二醇(PEG)、聚脯氨酸、亲水氨基酸、糖、非天然的肽聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、pluronic F-127或其组合。

[0734] 13. 条款1至12中任一项的方法,其中所述接头包含PEG。

[0735] 14. 条款1至13中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐具有下式



[0737] 其中B代表小分子配体,L代表接头,且T代表靶向部分,且其中L包含具有下式的结构



[0739] 其中n是0至200的整数。

[0740] 15. 条款14的方法,其中n是0至150的整数。

[0741] 16. 条款14的方法,其中n是0至110的整数。

[0742] 17. 条款14的方法,其中n是0至20的整数。

[0743] 18. 条款14的方法,其中n是15至20的整数。

[0744] 19. 条款14的方法,其中n是15至110的整数。

[0745] 20. 条款1至9或12至19中任一项的方法,其中所述接头包含PEG,且所述靶向部分是FITC,或其药学上可接受的盐。

[0746] 21. 条款1至20中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10

nmol/kg至约10000 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0747] 22. 条款1至21中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约5000 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0748] 23. 条款1至22中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约1000 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0749] 24. 条款1至23中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0750] 25. 条款1至24中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约200 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0751] 26. 条款1至25中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约250 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0752] 27. 条款1至26中任一项的方法,其中所述癌症选自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头癌、颈癌、皮肤黑色素瘤、眼内黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、子宫内膜癌、直肠癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、三重阴性的乳腺癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金氏病、食管癌、小肠癌、内分泌系统的癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、非小细胞肺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、骨肉瘤、尿道癌、前列腺癌、慢性白血病、急性白血病、急性髓细胞白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、髓性白血病、髓单核细胞白血病、毛细胞白血病、胸膜间皮瘤、膀胱癌、伯基特氏淋巴瘤、输尿管癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统 (CNS) 肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、脊椎肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤和胃食管连接部的腺癌。

[0753] 28. 条款1至3或8至27中任一项的方法,其中所述癌症是表达叶酸受体的癌症。

[0754] 29. 条款28的方法,其中所述癌症是子宫内膜癌。

[0755] 30. 条款28的方法,其中所述癌症是非小细胞肺癌。

[0756] 31. 条款28的方法,其中所述癌症是卵巢癌。

[0757] 32. 条款28的方法,其中所述癌症是三重阴性的乳腺癌。

[0758] 33. 条款1至32中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述识别区域是抗体的单链片段可变 (scFv) 区域。

[0759] 34. 条款1至9或12至33中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述CAR的识别区域是抗-FITC抗体的单链片段可变 (scFv) 区域。

[0760] 35. 条款1至34中任一项的方法,其中所述CAR具有共刺激结构域且所述共刺激结构域选自CD28、CD137 (4-1BB)、CD134 (OX40) 和CD278 (ICOS)。

[0761] 36. 条款1至35中任一项的方法,其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链或Fc受体 γ 。

[0762] 37. 条款1至9或12至36中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述识别区域是抗-FITC抗体的单链片段可变 (scFv) 区域,其中所述CAR具有共刺激结构域且所述共刺激结构域是CD137 (4-1BB),且其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链。

[0763] 38. 条款1至37中任一项的方法,其中施用多个剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐和所述CAR T细胞组合物。

[0764] 39. 条款1至38中任一项的方法,其中在施用所述化合物或其药学上可接受的盐

之前,或在施用所述CAR T细胞组合物之前,将所述患者成像。

[0765] 40. 条款1至39中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐不是抗体,且不包含抗体的片段。

[0766] 41. 条款1至40中任一项的方法,其中所述靶向部分不包含肽表位。

[0767] 42. 条款1至41中任一项的方法,其中不发生在所述患者中导致脱靶毒性的细胞因子释放,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。

[0768] 43. 条款1至41中任一项的方法,其中在所述患者中不发生脱靶组织毒性,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。

[0769] 44. 条款1至41中任一项的方法,其中所述癌症包含肿瘤,其中肿瘤大小在所述患者中减小,且其中不发生脱靶毒性。

[0770] 45. 条款1至44中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:1的核酸。

[0771] 46. 条款1至45中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:2的多肽。

[0772] 47. 条款45的方法,其中所述核酸编码嵌合抗原受体。

[0773] 48. 条款1至47中任一项的方法,其中所述CAR包含人源化氨基酸序列。

[0774] 49. 条款1至47中任一项的方法,其中所述CAR由人源化氨基酸序列组成。

[0775] 50. 条款1至49中任一项的方法,其中第一剂量的CAR T细胞组合物包含选自以下的比率的CAR T细胞和未转化的T细胞的混合物:约1:5的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:4的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:3的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:2的CAR T细胞:未转化的T细胞,和约1:1的CAR T细胞:未转化的T细胞。

[0776] 51. 条款1至50中任一项的方法,其中第二剂量的CAR T细胞组合物包含选自以下的比率的CAR T细胞和未转化的T细胞的混合物:约1:5的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:4的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:3的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:2的CAR T细胞:未转化的T细胞,和约1:1的CAR T细胞:未转化的T细胞。

[0777] 52. 条款1至51中任一项的方法,其中第一剂量的CAR T细胞组合物包含以下比率的CAR T细胞和未转化的T细胞的混合物:约1:1至约1:5的CAR T细胞:未转化的T细胞。

[0778] 53. 条款1至52中任一项的方法,其中第二剂量的CAR T细胞组合物包含以下比率的CAR T细胞和未转化的T细胞的混合物:约1:1至1:5的CAR T细胞:未转化的T细胞。

[0779] 54. 条款1至53中任一项的方法,其中第一剂量的CAR T细胞组合物包含约1000万个CAR T细胞和约4000万个未转化的T细胞的混合物。

[0780] 55. 条款1至54中任一项的方法,其中第二剂量的CAR T细胞组合物包含约1000万个CAR T细胞和约4000万个未转化的T细胞的混合物。

[0781] 56. 治疗癌症的方法,所述方法包括:

[0782] i) 向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,且

[0783] ii) 向患者施用CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR,且其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞和未转化的T细胞的混合物。

[0784] 57. 条款56的方法,其中所述配体选自叶酸、DUPA、NK-1R配体、CAIX配体、 γ 谷氨酰基转肽酶的配体、NKG2D配体和CCK2R配体。

[0785] 58. 条款56或57中任一项的方法,其中所述配体是叶酸。

[0786] 59. 条款56或57中任一项的方法,其中所述配体是NK-1R配体。

[0787] 60. 条款56或57中任一项的方法,其中所述配体是DUPA。

[0788] 61. 条款56或57中任一项的方法,其中所述配体是CCK2R配体。

[0789] 62. 条款56或57中任一项的方法,其中所述配体是 γ 谷氨酰基转肽酶的配体。

[0790] 63. 条款56至62中任一项的方法,其中所述靶向部分选自2,4-二硝基苯酚(DNP)、2,4,6-三硝基苯酚(TNP)、生物素、地高辛配基、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、NHS-荧光素、五氟苯基酯、四氟苯基酯、打结素、centyrin和DARPin。

[0791] 64. 条款56至63中任一项的方法,其中所述靶向部分是FITC。

[0792] 65. 条款56至63中任一项的方法,其中所述靶向部分是DNP。

[0793] 66. 条款56至63中任一项的方法,其中所述靶向部分是TNP。

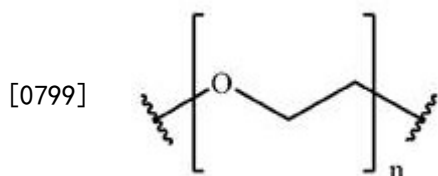
[0794] 67. 条款56至66中任一项的方法,其中所述接头包含聚乙二醇(PEG)、聚脯氨酸、亲水氨基酸、糖、非天然的肽聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、pluronic F-127或其组合。

[0795] 68. 条款56至67中任一项的方法,其中所述接头包含PEG。

[0796] 69. 条款56至68中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐具有下式

[0797]
$$B-L-T,$$

[0798] 其中B代表小分子配体,L代表接头,且T代表靶向部分,且其中L包含具有下式的结构



[0800] 其中n是0至200的整数。

[0801] 70. 条款69的方法,其中n是0至150的整数。

[0802] 71. 条款69的方法,其中n是0至110的整数。

[0803] 72. 条款69的方法,其中n是0至20的整数。

[0804] 73. 条款69的方法,其中n是15至20的整数。

[0805] 74. 条款69的方法,其中n是15至110的整数。

[0806] 75. 条款56至64或67至74中任一项的方法,其中所述接头包含PEG,且所述靶向部分是FITC,或其药学上可接受的盐。

[0807] 76. 条款56至75中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约10000 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0808] 77. 条款56至76中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约5000 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0809] 78. 条款56至77中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10

nmol/kg至约1000 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0810] 79. 条款56至78中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0811] 80. 条款56至79中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约200 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0812] 81. 条款56至80中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约250 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0813] 82. 条款56至81中任一项的方法,其中所述癌症选自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头癌、颈癌、皮肤黑色素瘤、眼内黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、子宫内膜癌、直肠癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、三重阴性的乳腺癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金氏病、食管癌、小肠癌、内分泌系统的癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、非小细胞肺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、骨肉瘤、尿道癌、前列腺癌、慢性白血病、急性白血病、急性髓细胞白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、髓性白血病、髓单核细胞白血病、毛细胞白血病、胸膜间皮瘤、膀胱癌、伯基特氏淋巴瘤、输尿管癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统 (CNS) 肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、脊髓肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤和胃食管连接部的腺癌。

[0814] 83. 条款56至58或63至82中任一项的方法,其中所述癌症是表达叶酸受体的癌症。

[0815] 84. 条款83的方法,其中所述癌症是子宫内膜癌。

[0816] 85. 条款83的方法,其中所述癌症是非小细胞肺癌。

[0817] 86. 条款83的方法,其中所述癌症是卵巢癌。

[0818] 87. 条款83的方法,其中所述癌症是三重阴性的乳腺癌。

[0819] 88. 条款56至87中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述识别区域是抗体的单链片段可变 (scFv) 区域。

[0820] 89. 条款56至64或67至88中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述CAR的识别区域是抗-FITC抗体的单链片段可变 (scFv) 区域。

[0821] 90. 条款56至89中任一项的方法,其中所述CAR具有共刺激结构域且所述共刺激结构域选自CD28、CD137 (4-1BB)、CD134 (OX40) 和CD278 (ICOS)。

[0822] 91. 条款56至90中任一项的方法,其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链或Fc受体 γ 。

[0823] 92. 条款56至64或67至91中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述识别区域是抗-FITC抗体的单链片段可变 (scFv) 区域,其中所述CAR具有共刺激结构域且所述共刺激结构域是CD137 (4-1BB),且其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链。

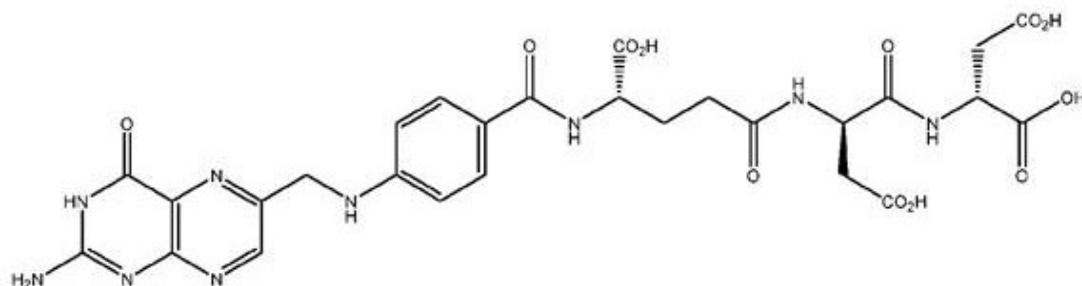
[0824] 93. 条款56至92中任一项的方法,其中施用多个剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[0825] 94. 条款56至93中任一项的方法,其中在施用所述化合物或其药学上可接受的盐之前,或在施用所述CAR T细胞组合物之前,将所述患者成像。

[0826] 95. 条款56至94中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐不是抗体,且不包含抗体的片段。

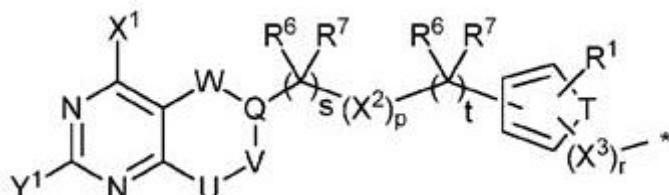
- [0827] 96. 条款56至95中任一项的方法,其中所述靶向部分不包含肽表位。
- [0828] 97. 条款56至96中任一项的方法,其中不发生在所述患者中导致脱靶毒性的细胞因子释放,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。
- [0829] 98. 条款56至96中任一项的方法,其中在所述患者中不发生脱靶组织毒性,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。
- [0830] 99. 条款56至96中任一项的方法,其中所述癌症包含肿瘤,其中肿瘤大小在所述患者中减小,且其中不发生脱靶毒性。
- [0831] 100. 条款56至99中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:1的核酸。
- [0832] 101. 条款56至100中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:2的多肽。
- [0833] 102. 条款100的方法,其中所述核酸编码嵌合抗原受体。
- [0834] 103. 条款56至102中任一项的方法,其中所述CAR包含人源化氨基酸序列。
- [0835] 104. 条款56至102中任一项的方法,其中所述CAR由人源化氨基酸序列组成。
- [0836] 105. 条款56至104中任一项的方法,其中CAR T细胞和未转化的T细胞的组合物呈选自以下的比率:约1:5的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:4的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:3的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:2的CAR T细胞:未转化的T细胞,和约1:1的CAR T细胞:未转化的T细胞。
- [0837] 106. 条款56至105中任一项的方法,其中CAR T细胞和未转化的T细胞的组合物呈以下比率:约1:1至约1:5的CAR T细胞:未转化的T细胞。
- [0838] 107. 条款56至106中任一项的方法,其中CAR T细胞和未转化的T细胞的组合物包含约1000万个CAR T细胞和约4000万个未转化的T细胞。
- [0839] 108. 治疗癌症的方法,所述方法包括:
- [0840] i) 向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体;
- [0841] ii) 向患者施用CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞,且其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR;且
- [0842] iii) 向患者施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂。
- [0843] 109. 条款108的方法,其中步骤iii包括施用叶酸。
- [0844] 110. 条款108或109中任一项的方法,其中步骤iii包括施用叶酸或甲酰四氢叶酸。
- [0845] 111. 条款108的方法,其中步骤iii包括施用包含叶酸的缀合物。
- [0846] 112. 条款111的方法,其中所述包含叶酸的缀合物包含与一个或多个氨基酸连接的叶酸。
- [0847] 113. 条款111的方法,其中所述包含叶酸的缀合物具有下式

[0848]



[0849] 114. 条款109至112中任一项的方法,其中所述叶酸具有下式

[0850]

[0851] 其中 X^1 和 Y^1 各自独立地选自卤素、 R^2 、 OR^2 、 SR^3 和 NR^4R^5 ;[0852] U、V和W代表各自独立地选自 $-(R^{6a})C=$ 、 $-N=$ 、 $-(R^{6a})C(R^{7a})-$ 和 $-N(R^{4a})-$ 的二价部分;Q选自C和CH;T选自S、O、N和 $-C=C-$;[0853] X^2 和 X^3 各自独立地选自氧、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} 亚烷基和 C_1-C_{12} 亚烷基氧基,其中Z是氧或硫;[0854] R^1 选自氢、卤素、 C_1-C_{12} 烷基和 C_1-C_{12} 烷氧基;[0855] R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^{4a} 、 R^{4b} 、 R^5 、 R^{5b} 、 R^{6b} 和 R^{7b} 各自独立地选自氢、卤素、 C_1-C_{12} 烷基、 C_1-C_{12} 烷氧基、 C_1-C_{12} 烷酰基、 C_1-C_{12} 烯基、 C_1-C_{12} 炔基、 $(C_1-C_{12}$ 烷氧基)羰基和 $(C_1-C_{12}$ 烷基氨基)羰基;[0856] R^6 和 R^7 各自独立地选自氢、卤素、 C_1-C_{12} 烷基和 C_1-C_{12} 烷氧基;或者, R^6 和 R^7 一起形成羰基基团;[0857] R^{6a} 和 R^{7a} 各自独立地选自氢、卤素、 C_1-C_{12} 烷基和 C_1-C_{12} 烷氧基;或者, R^{6a} 和 R^{7a} 一起形成羰基基团;

[0858] p、r、s和t各自独立地为0或1;且

[0859] 如果任何额外化学部分是叶酸的部分,则*代表至缀合物的剩余部分的任选共价键。

[0860] 115. 条款108至114中任一项的方法,其中所述靶向部分选自2,4-二硝基苯酚(DNP)、2,4,6-三硝基苯酚(TNP)、生物素、地高辛配基、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、NHS-荧光素、五氟苯基酯、四氟苯基酯、打结素、centyrin和DARPin。

[0861] 116. 条款108至115中任一项的方法,其中所述靶向部分是FITC。

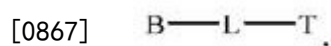
[0862] 117. 条款108至115中任一项的方法,其中所述靶向部分是DNP。

[0863] 118. 条款108至115中任一项的方法,其中所述靶向部分是TNP。

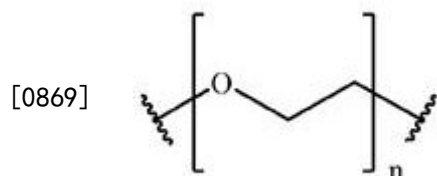
[0864] 119. 条款108至118中任一项的方法,其中所述接头包含聚乙二醇(PEG)、聚脯氨酸、亲水氨基酸、糖、非天然的肽聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、pluronic F-127或其组合。

[0865] 120. 条款108至119中任一项的方法,其中所述接头包含PEG。

[0866] 121. 条款108至120中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐具有下式



[0868] 其中B代表小分子配体,L代表接头,且T代表靶向部分,且其中L包含具有下式的结构



[0870] 其中n是0至200的整数。

[0871] 122. 条款121的方法,其中n是0至12的整数。

[0872] 123. 条款121的方法,其中n是0至150的整数。

[0873] 124. 条款121的方法,其中n是0至110的整数。

[0874] 125. 条款121的方法,其中n是0至20的整数。

[0875] 126. 条款121的方法,其中n是15至20的整数。

[0876] 127. 条款121的方法,其中n是15至110的整数。

[0877] 128. 条款108至116或119至127中任一项的方法,其中所述接头包含PEG,且所述靶向部分是FITC,或其药学上可接受的盐。

[0878] 129. 条款108至128中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约10000 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0879] 130. 条款108至129中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约5000 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0880] 131. 条款108至130中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约1000 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0881] 132. 条款108至131中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0882] 133. 条款108至132中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约200 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0883] 134. 条款108至133中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约250 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0884] 135. 条款108至134中任一项的方法,其中所述癌症选自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头癌、颈癌、皮肤黑色素瘤、眼内黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、子宫内膜癌、直肠癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、三重阴性的乳腺癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金氏病、食管癌、小肠癌、内分泌系统的癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、非小细胞肺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、骨肉瘤、尿道癌、前列腺癌、慢性白血病、急性白血病、急性髓细胞白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、髓性白血病、髓单核细胞白血病、毛细胞白血病、胸膜间皮瘤、膀胱癌、伯基特氏淋巴瘤、输尿管癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、脊椎肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤和胃食管连接部的腺癌。

- [0885] 136. 条款108至135中任一项的方法,其中通过接头与靶向部分连接的小分子配体的配体部分是叶酸,且所述癌症是表达叶酸受体的癌症。
- [0886] 137. 条款136的方法,其中所述癌症是子宫内膜癌。
- [0887] 138. 条款136的方法,其中所述癌症是非小细胞肺癌。
- [0888] 139. 条款136的方法,其中所述癌症是卵巢癌。
- [0889] 140. 条款136的方法,其中所述癌症是三重阴性的乳腺癌。
- [0890] 141. 条款108至140中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述识别区域是抗体的单链片段可变(scFv)区域。
- [0891] 142. 条款108至116或119至141中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述CAR的识别区域是抗-FITC抗体的单链片段可变(scFv)区域。
- [0892] 143. 条款108至142中任一项的方法,其中所述CAR具有共刺激结构域且所述共刺激结构域选自CD28、CD137 (4-1BB)、CD134 (OX40)和CD278 (ICOS)。
- [0893] 144. 条款108至143中任一项的方法,其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链或Fc受体 γ 。
- [0894] 145. 条款108至116或119至144中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述识别区域是抗-FITC抗体的单链片段可变(scFv)区域,其中所述CAR具有共刺激结构域且所述共刺激结构域是CD137 (4-1BB),且其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链。
- [0895] 146. 条款108至145中任一项的方法,其中施用多个剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐和/或所述CAR T细胞组合物。
- [0896] 147. 条款108至146中任一项的方法,其中在施用所述化合物或其药学上可接受的盐之前,或在施用所述CAR T细胞组合物之前,将所述患者成像。
- [0897] 148. 条款108至147中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐不是抗体,且不包含抗体的片段。
- [0898] 149. 条款108至148中任一项的方法,其中所述靶向部分不包含肽表位。
- [0899] 150. 条款108至149中任一项的方法,其中不发生在所述患者中导致脱靶毒性的细胞因子释放,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。
- [0900] 151. 条款108至149中任一项的方法,其中在所述患者中不发生脱靶组织毒性,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。
- [0901] 152. 条款108至149中任一项的方法,其中所述癌症包含肿瘤,其中肿瘤大小在所述患者中减小,且其中不发生脱靶毒性。
- [0902] 153. 条款108至152中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:1的核酸。
- [0903] 154. 条款108至153中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:2的多肽。
- [0904] 155. 条款153的方法,其中所述核酸编码嵌合抗原受体。
- [0905] 156. 条款108至155中任一项的方法,其中所述CAR包含人源化氨基酸序列。
- [0906] 157. 条款108至155中任一项的方法,其中所述CAR由人源化氨基酸序列组成。
- [0907] 158. 条款108至157中任一项的方法,其中所述CAR T细胞组合物包含选自以下的

比率的CAR T细胞和未转化的T细胞的混合物:约1:5的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:4的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:3的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:2的CAR T细胞:未转化的T细胞,和约1:1的CAR T细胞:未转化的T细胞。

[0908] 159. 条款108至158中任一项的方法,其中所述CAR T细胞组合物包含以下比率的CAR T细胞和未转化的T细胞的混合物:约1:1至约1:5的CAR T细胞:未转化的T细胞。

[0909] 160. 条款108至159中任一项的方法,其中所述CAR T细胞组合物包含含有约1000万个CAR T细胞和约4000万个未转化的T细胞的混合物。

[0910] 161. 条款108至160中任一项的方法,其中抑制CAR T细胞的活化的药剂选自淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶抑制剂、PI3激酶抑制剂、IL-2诱导型T细胞激酶的抑制剂、JAK抑制剂、BTK抑制剂、EC2319和阻断CAR T细胞与所述化合物或其药学上可接受的盐的结合、但不结合癌症的药剂。

[0911] 162. 条款161的方法,其中施用抑制CAR T细胞的活化的药剂,且所述药剂是淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶抑制剂。

[0912] 163. 条款162的方法,其中所述淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶抑制剂是达沙替尼。

[0913] 164. 条款161的方法,其中施用抑制CAR T细胞的活化的药剂,且所述药剂是PI3激酶抑制剂。

[0914] 165. 条款164的方法,其中所述PI3激酶抑制剂是GDC0980。

[0915] 166. 条款161的方法,其中施用抑制CAR T细胞的活化的药剂,且所述药剂是IL-2诱导型T细胞激酶抑制剂。

[0916] 167. 条款166的方法,其中所述IL-2诱导型T细胞激酶抑制剂是BMS-509744。

[0917] 168. 条款1至160中任一项的方法,其中所述CAR T细胞组合物通过注射入患者的血流来施用,且其中所述患者的血流中的CAR T细胞是到注射所述CAR T细胞组合物之后约4周患者的血流中的患者的总T细胞的至少10%。

[0918] 169. 条款1至160中任一项的方法,其中所述CAR T细胞组合物通过注射入患者的血流来施用,且其中所述患者的血流中的CAR T细胞是到注射所述CAR T细胞组合物之后约4周患者的血流中的患者的总T细胞的至少12%。

[0919] 170. 条款1至160中任一项的方法,其中所述CAR T细胞组合物通过注射入患者的血流来施用,且其中所述患者的血流中的CAR T细胞是到注射所述CAR T细胞组合物之后约4周患者的血流中的患者的总T细胞的至少15%。

[0920] 171. 条款1至160或168至170中任一项的方法,其中在所述CAR T细胞组合物中施用于所述患者的CAR T细胞包含约1百万至约1500万个CAR T细胞。

[0921] 172. 条款1至160或168至171中任一项的方法,其中在所述CAR T细胞组合物中施用于所述患者的CAR T细胞的剂量选自约100万、约200万、约300万、约400万、约500万、约600万、约700万、约800万、约900万、约1000万、约1100万、约1200万、约1250万、约1300万、约1400万和约1500万个CAR T细胞。

[0922] 173. 条款1至160或168至170中任一项的方法,其中在所述CAR T细胞组合物中施用于所述患者的CAR T细胞包含至少约200万个CAR T细胞。

[0923] 174. 条款1至160或168至170中任一项的方法,其中在所述CAR T细胞组合物中施

用于所述患者的CAR T细胞包含至少约500万个CAR T细胞。

[0924] 175. 条款1至160或168至170中任一项的方法,其中在所述CAR T细胞组合物中施用于所述患者的CAR T细胞包含至少约1000万个CAR T细胞。

[0925] 176. 条款1至175中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:3的核酸。

[0926] 177. 条款1至176中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:1的载体。

[0927] 178. 条款1至177中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:3的载体。

[0928] 179. 条款176的方法,其中所述核酸编码嵌合抗原受体。

[0929] 180. 条款108至160中任一项的方法,其中施用抑制CAR T细胞的活化的药剂且所述抑制CAR T细胞的活化的药剂是阻断CAR T细胞与所述化合物或其药学上可接受的盐结合、但不结合癌症的药剂。

[0930] 181. 条款180的方法,其中所述药剂是荧光素胺、FITC或荧光素钠。

[0931] 182. 条款180的方法,其中所述药剂是FITC。

[0932] 183. 治疗癌症的方法,所述方法包括:

[0933] i) 向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,且其中所述化合物或其药学上可接受的盐剂量为约10 nmol/kg患者体重至约2500 nmol/kg患者体重;且

[0934] ii) 向患者施用包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR,且其中所述CAR T细胞剂量为约100万个CAR T细胞至约1500万个CAR T细胞。

[0935] 184. 条款183的方法,其中所述配体选自叶酸、DUPA、NK-1R配体、CAIX配体、 γ 谷氨酰基转肽酶的配体、NKG2D配体和CCK2R配体。

[0936] 185. 条款183或184中任一项的方法,其中所述配体是叶酸。

[0937] 186. 条款183至185中任一项的方法,其中所述靶向部分选自2,4-二硝基苯酚(DNP)、2,4,6-三硝基苯酚(TNP)、生物素、地高辛配基、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、NHS-荧光素、五氟苯基酯、四氟苯基酯、打结素、centyrin和DARPin。

[0938] 187. 条款183至186中任一项的方法,其中所述靶向部分是FITC。

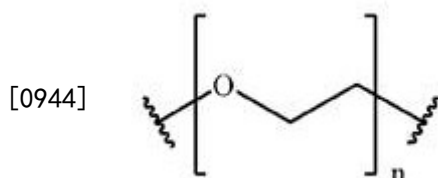
[0939] 188. 条款183至187中任一项的方法,其中所述接头包含聚乙二醇(PEG)、聚脯氨酸、亲水氨基酸、糖、非天然的肽聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、pluronic F-127或其组合。

[0940] 189. 条款183至188中任一项的方法,其中所述接头包含PEG。

[0941] 190. 条款183至189中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐具有下式

[0942]
$$B-L-T,$$

[0943] 其中B代表小分子配体,L代表接头,且T代表靶向部分,且其中L包含具有下式的结构



[0945] 其中n是0至200的整数。

[0946] 191. 条款183至190中任一项的方法,其中所述接头包含PEG,且所述靶向部分是FITC,或其药学上可接受的盐。

[0947] 192. 条款183至191中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约100 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0948] 193. 条款183至191中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约50 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0949] 194. 条款183至191中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约20 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0950] 195. 条款183至191中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0951] 196. 条款183至191中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约200 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0952] 197. 条款183至191中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约400 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0953] 198. 条款183至197中任一项的方法,其中所述CAR T细胞剂量为约100万个CAR T细胞至约1250万个CAR T细胞。

[0954] 199. 条款183至197中任一项的方法,其中所述CAR T细胞剂量为约100万个CAR T细胞至约700万个CAR T细胞。

[0955] 200. 条款183至197中任一项的方法,其中所述CAR T细胞剂量为约100万个CAR T细胞至约500万个CAR T细胞。

[0956] 201. 条款183至197中任一项的方法,其中所述CAR T细胞剂量为约200万个CAR T细胞至约500万个CAR T细胞。

[0957] 202. 条款183至201中任一项的方法,其中所述癌症选自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头癌、颈癌、皮肤黑色素瘤、眼内黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、子宫内膜癌、直肠癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、三重阴性的乳腺癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金氏病、食管癌、小肠癌、内分泌系统的癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、非小细胞肺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、骨肉瘤、尿道癌、前列腺癌、慢性白血病、急性白血病、急性髓细胞白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、髓性白血病、髓单核细胞白血病、毛细胞白血病、胸膜间皮瘤、膀胱癌、伯基特氏淋巴瘤、输尿管癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、脊椎肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤和胃食管连接部的腺癌。

[0958] 203. 条款183至202中任一项的方法,其中所述癌症是表达叶酸受体的癌症。

[0959] 204. 条款183至203中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述识别区域是抗-FITC抗体的单链片段可变(scFv)区域,其中所述CAR具有共刺激结构域且所述共刺激

结构域是CD137 (4-1BB),且其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链。

[0960] 205. 条款183至204中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐不是抗体,且不包含抗体的片段。

[0961] 206. 条款183至205中任一项的方法,其中所述靶向部分不包含肽表位。

[0962] 207. 条款183至206中任一项的方法,其中不发生所述患者中导致脱靶毒性的细胞因子释放,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。

[0963] 208. 条款183至206中任一项的方法,其中在所述患者中不发生脱靶组织毒性,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。

[0964] 209. 条款183至206中任一项的方法,其中所述癌症包含肿瘤,其中肿瘤大小在所述患者中减小,且其中不发生脱靶毒性。

[0965] 210. 条款183至209中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:1的核酸。

[0966] 211. 条款183至209中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:2的多肽。

[0967] 212. 条款183至211中任一项的方法,其中所述CAR包含人源化氨基酸序列。

[0968] 213. 条款183至212中任一项的方法,其中所述CAR由人源化氨基酸序列组成。

[0969] 214. 条款183至213中任一项的方法,其中所述CAR T细胞组合物进一步包含未转化的T细胞。

[0970] 215. 治疗癌症的方法,所述方法包括:

[0971] i) 向患者连续施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体;

[0972] ii) 向患者施用包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR;且

[0973] iii) 结束所述化合物或其药学上可接受的盐的连续施用,以抑制或预防患者中的细胞因子释放综合征。

[0974] 216. 条款215的方法,其中所述配体选自叶酸、DUPA、NK-1R配体、CAIX配体、 γ 谷氨酰基转肽酶的配体、NKG2D配体和CCK2R配体。

[0975] 217. 条款215或216中任一项的方法,其中所述配体是叶酸。

[0976] 218. 条款215至217中任一项的方法,其中所述靶向部分选自2,4-二硝基苯酚(DNP)、2,4,6-三硝基苯酚(TNP)、生物素、地高辛配基、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、NHS-荧光素、五氟苯基酯、四氟苯基酯、打结素、centyrin和DARPin。

[0977] 219. 条款215至218中任一项的方法,其中所述靶向部分是FITC。

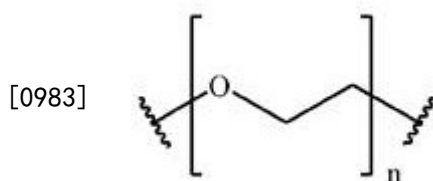
[0978] 220. 条款215至219中任一项的方法,其中所述接头包含聚乙二醇(PEG)、聚脯氨酸、亲水氨基酸、糖、非天然的肽聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、pluronic F-127或其组合。

[0979] 221. 条款215至220中任一项的方法,其中所述接头包含PEG。

[0980] 222. 条款215至221中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐具有下式

[0981] $B-L-T$,

[0982] 其中B代表小分子配体,L代表接头,且T代表靶向部分,且其中L包含具有下式的结构



[0984] 其中n是0至200的整数。

[0985] 223. 条款215至222中任一项的方法,其中所述接头包含PEG,且所述靶向部分是FITC,或其药学上可接受的盐。

[0986] 224. 条款215至223中任一项的方法,其中向患者连续施用所述化合物或其药学上可接受的盐至少一小时。

[0987] 225. 条款215至223中任一项的方法,其中向患者连续施用所述化合物或其药学上可接受的盐至少四小时。

[0988] 226. 条款215至223中任一项的方法,其中向患者连续施用所述化合物或其药学上可接受的盐至少六小时。

[0989] 227. 条款215至223中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的连续施用是每隔一天施用的方案。

[0990] 228. 条款215至223中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的连续施用是每周三次施用的方案。

[0991] 229. 条款215至223中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的连续施用是施用直至患者体重无法接受的减轻、发烧、血压下降或肺水肿发生。

[0992] 230. 条款215至229中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约200 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0993] 231. 条款215至229中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约400 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[0994] 232. 条款215至231中任一项的方法,其中施用约200万至约500万个CAR T细胞。

[0995] 233. 条款215至232中任一项的方法,其中所述施用是通过静脉内施用。

[0996] 234. 条款215至233中任一项的方法,其中所述癌症选自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头癌、颈癌、皮肤黑色素瘤、眼内黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、子宫内膜癌、直肠癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、三重阴性的乳腺癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金氏病、食管癌、小肠癌、内分泌系统的癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、非小细胞肺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、骨肉瘤、尿道癌、前列腺癌、慢性白血病、急性白血病、急性髓细胞白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、髓性白血病、髓单核细胞白血病、毛细胞白血病、胸膜间皮瘤、膀胱癌、伯基特氏淋巴瘤、输尿管癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、脊椎肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤和胃食管连接部的腺癌。

[0997] 235. 条款215至234中任一项的方法,其中所述癌症是表达叶酸受体的癌症。

[0998] 236. 条款215至235中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述识别区域

是抗-FITC抗体的单链片段可变(scFv)区域,其中所述CAR具有共刺激结构域且所述共刺激结构域是CD137 (4-1BB),且其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链。

[0999] 237. 条款215至236中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐不是抗体,且不包含抗体的片段。

[1000] 238. 条款215至237中任一项的方法,其中所述靶向部分不包含肽表位。

[1001] 239. 条款215至238中任一项的方法,其中不发生在所述患者中导致脱靶毒性的细胞因子释放,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。

[1002] 240. 条款215至238中任一项的方法,其中在所述患者中不发生脱靶组织毒性,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。

[1003] 241. 条款215至238中任一项的方法,其中所述癌症包含肿瘤,其中肿瘤大小在所述患者中减小,且其中不发生脱靶毒性。

[1004] 242. 条款215至241中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:1的核酸。

[1005] 243. 条款215至242中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:2的多肽。

[1006] 244. 条款215至243中任一项的方法,其中所述CAR包含人源化氨基酸序列。

[1007] 245. 条款215至243中任一项的方法,其中所述CAR由人源化氨基酸序列组成。

[1008] 246. 条款215至245中任一项的方法,其中所述CAR T细胞组合物进一步包含未转化的T细胞。

[1009] 247. 条款215至246中任一项的方法,其中所述CAR T细胞组合物进一步包含选自以下的比率的未转化的T细胞:约1:5的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:4的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:3的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:2的CAR T细胞:未转化的T细胞,和约1:1的CAR T细胞:未转化的T细胞。

[1010] 248. 条款215至247中任一项的方法,其中所述CAR T细胞组合物进一步包含以下比率的未转化的T细胞:约1:1至约1:5的CAR T细胞:未转化的T细胞。

[1011] 249. 条款215至248中任一项的方法,其中所述CAR T细胞组合物在约1000万个CAR T细胞和约4000万个未转化的T细胞的混合物中进一步包含未转化的T细胞。

[1012] 250. 条款215至249中任一项的方法,其中所述癌症是非小细胞肺癌。

[1013] 251. 条款215至249中任一项的方法,其中所述癌症是卵巢癌。

[1014] 252. 治疗癌症的方法,所述方法包括:

[1015] i) 向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,且其中向患者每周一次施用所述化合物或其药学上可接受的盐;且

[1016] ii) 向患者施用包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR。

[1017] 253. 条款252的方法,其中所述配体选自叶酸、DUPA、NK-1R配体、CAIX配体、 γ 谷氨酰基转肽酶的配体、NKG2D配体和CCK2R配体。

[1018] 254. 条款252或253中任一项的方法,其中所述配体是叶酸。

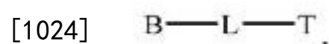
[1019] 255. 条款252至254中任一项的方法,其中所述靶向部分选自2,4-二硝基苯酚(DNP)、2,4,6-三硝基苯酚(TNP)、生物素、地高辛配基、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、NHS-荧光素、五氟苯基酯、四氟苯基酯、打结素、centyrin和DARPin。

[1020] 256. 条款252至255中任一项的方法,其中所述靶向部分是FITC。

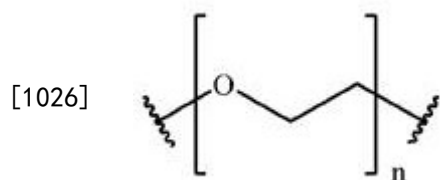
[1021] 257. 条款252至256中任一项的方法,其中所述接头包含聚乙二醇(PEG)、聚脯氨酸、亲水氨基酸、糖、非天然的肽聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、pluronic F-127或其组合。

[1022] 258. 条款252至257中任一项的方法,其中所述接头包含PEG。

[1023] 259. 条款252至258中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐具有下式



[1025] 其中B代表小分子配体,L代表接头,且T代表靶向部分,且其中L包含具有下式的结构



[1027] 其中n是0至200的整数。

[1028] 260. 条款252至259中任一项的方法,其中所述接头包含PEG,且所述靶向部分是FITC,或其药学上可接受的盐。

[1029] 261. 条款252至260中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约100 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[1030] 262. 条款252至261中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约50 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[1031] 263. 条款252至262中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约20 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[1032] 264. 条款252至263中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[1033] 265. 条款252至264中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约200 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[1034] 266. 条款252至265中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约400 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[1035] 267. 条款252至266中任一项的方法,其中所述CAR T细胞剂量为约100万个CAR T细胞至约1500万个CAR T细胞。

[1036] 268. 条款252至267中任一项的方法,其中所述CAR T细胞剂量为约100万个CAR T细胞至约700万个CAR T细胞。

[1037] 269. 条款252至268中任一项的方法,其中所述CAR T细胞剂量为约100万个CAR T细胞至约500万个CAR T细胞。

[1038] 270. 条款252至269中任一项的方法,其中所述CAR T细胞剂量为约200万个CAR T

细胞至约500万个CAR T细胞。

[1039] 271. 条款252至270中任一项的方法,其中所述癌症选自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头癌、颈癌、皮肤黑色素瘤、眼内黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、子宫内膜癌、直肠癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、三重阴性的乳腺癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金氏病、食管癌、小肠癌、内分泌系统的癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、非小细胞肺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、骨肉瘤、尿道癌、前列腺癌、慢性白血病、急性白血病、急性髓细胞白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、髓性白血病、髓单核细胞白血病、毛细胞白血病、胸膜间皮瘤、膀胱癌、伯基特氏淋巴瘤、输尿管癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、脊髓肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤和胃食管连接部的腺癌。

[1040] 272. 条款252至271中任一项的方法,其中所述癌症是表达叶酸受体的癌症。

[1041] 273. 条款252至272中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述识别区域是抗-FITC抗体的单链片段可变(scFv)区域,其中所述CAR具有共刺激结构域且所述共刺激结构域是CD137 (4-1BB),且其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链。

[1042] 274. 条款252至273中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐不是抗体,且不包含抗体的片段。

[1043] 275. 条款252至274中任一项的方法,其中所述靶向部分不包含肽表位。

[1044] 276. 条款252至275中任一项的方法,其中不发生在所述患者中导致脱靶毒性的细胞因子释放,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。

[1045] 277. 条款252至275中任一项的方法,其中在所述患者中不发生脱靶组织毒性,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。

[1046] 278. 条款252至275中任一项的方法,其中所述癌症包含肿瘤,其中肿瘤大小在所述患者中减小,且其中不发生脱靶毒性。

[1047] 279. 条款252至278中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:1的核酸。

[1048] 280. 条款252至278中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:2的多肽。

[1049] 281. 条款252至280中任一项的方法,其中所述CAR包含人源化氨基酸序列。

[1050] 282. 条款252至280中任一项的方法,其中所述CAR由人源化氨基酸序列组成。

[1051] 283. 条款252至282中任一项的方法,其中所述CAR T细胞组合物进一步包含未转化的T细胞。

[1052] 284. 治疗癌症的方法,所述方法包括:

[1053] i) 向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,其中向患者施用至少第一剂量和第二剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中第一剂量和第二剂量是不同的,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约2倍至约15000倍;且

[1054] ii) 向患者施用包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR。

[1055] 285. 条款284的方法,其中向患者施用至少第一剂量、第二剂量和第三剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中第一剂量、第二剂量和第三剂量是不同的,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约2倍至约750倍,且其中第三剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约800倍至约10000倍。

[1056] 286. 条款285的方法,其中向患者施用至少第一剂量、第二剂量、第三剂量和第四剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中第一剂量、第二剂量、第三剂量和第四剂量是不同的,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约2倍至约750倍,其中第三剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约800倍至约7500倍,且其中第四剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约8000倍至约15000倍。

[1057] 287. 条款286的方法,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约100倍,其中第三剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约1000倍,且其中第四剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约10000倍。

[1058] 288. 条款284至287中任一项的方法,其中所述配体选自叶酸、DUPA、NK-1R配体、CAIX配体、 γ 谷氨酰基转肽酶的配体、NKG2D配体和CCK2R配体。

[1059] 289. 条款284至288中任一项的方法,其中所述配体是叶酸。

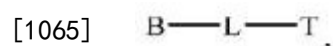
[1060] 290. 条款284至289中任一项的方法,其中所述靶向部分选自2,4-二硝基苯酚(DNP)、2,4,6-三硝基苯酚(TNP)、生物素、地高辛配基、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、NHS-荧光素、五氟苯基酯、四氟苯基酯、打结素、centyrin和DARPin。

[1061] 291. 条款284至290中任一项的方法,其中所述靶向部分是FITC。

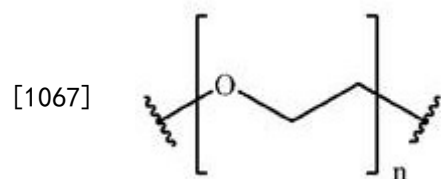
[1062] 292. 条款284至291中任一项的方法,其中所述接头包含聚乙二醇(PEG)、聚脯氨酸、亲水氨基酸、糖、非天然的肽聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、pluronic F-127或其组合。

[1063] 293. 条款284至292中任一项的方法,其中所述接头包含PEG。

[1064] 294. 条款284至293中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐具有下式



[1066] 其中B代表小分子配体,L代表接头,且T代表靶向部分,且其中L包含具有下式的结构



[1068] 其中n是0至200的整数。

[1069] 295. 条款284至294中任一项的方法,其中所述接头包含PEG,且所述靶向部分是

FITC,或其药学上可接受的盐。

[1070] 296. 条款284至295中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约100 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[1071] 297. 条款284至296中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约50 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[1072] 298. 条款284至297中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约20 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[1073] 299. 条款284至298中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[1074] 300. 条款284至299中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约200 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[1075] 301. 条款284至300中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约400 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[1076] 302. 条款284至301中任一项的方法,其中所述CAR T细胞剂量为约100万个CAR T细胞至约1500万个CAR T细胞。

[1077] 303. 条款284至302中任一项的方法,其中所述CAR T细胞剂量为约100万个CAR T细胞至约700万个CAR T细胞。

[1078] 304. 条款284至303中任一项的方法,其中所述CAR T细胞剂量为约100万个CAR T细胞至约500万个CAR T细胞。

[1079] 305. 条款284至304中任一项的方法,其中所述CAR T细胞剂量为约200万个CAR T细胞至约500万个CAR T细胞。

[1080] 306. 条款284至305中任一项的方法,其中所述癌症选自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头癌、颈癌、皮肤黑色素瘤、眼内黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、子宫内膜癌、直肠癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、三重阴性的乳腺癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金氏病、食管癌、小肠癌、内分泌系统的癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、非小细胞肺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、骨肉瘤、尿道癌、前列腺癌、慢性白血病、急性白血病、急性髓细胞白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、髓性白血病、髓单核细胞白血病、毛细胞白血病、胸膜间皮瘤、膀胱癌、伯基特氏淋巴瘤、输尿管癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、脊椎肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤和胃食管连接部的腺癌。

[1081] 307. 条款284至306中任一项的方法,其中所述癌症是表达叶酸受体的癌症。

[1082] 308. 条款284至307中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述识别区域是抗-FITC抗体的单链片段可变(scFv)区域,其中所述CAR具有共刺激结构域且所述共刺激结构域是CD137 (4-1BB),且其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链。

[1083] 309. 条款284至308中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐不是抗体,且不包含抗体的片段。

[1084] 310. 条款284至309中任一项的方法,其中所述靶向部分不包含肽表位。

[1085] 311. 条款284至310中任一项的方法,其中不发生所述患者中导致脱靶毒性的细胞因子释放,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。

[1086] 312. 条款284至310中任一项的方法,其中在所述患者中不发生脱靶组织毒性,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。

[1087] 313. 条款284至310中任一项的方法,其中所述癌症包含肿瘤,其中肿瘤大小在所述患者中减小,且其中不发生脱靶毒性。

[1088] 314. 条款284至313中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:1的核酸。

[1089] 315. 条款284至313中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:2的多肽。

[1090] 316. 条款284至315中任一项的方法,其中所述CAR包含人源化氨基酸序列。

[1091] 317. 条款284至315中任一项的方法,其中所述CAR由人源化氨基酸序列组成。

[1092] 318. 条款284至317中任一项的方法,其中所述CAR T细胞组合物进一步包含未转化的T细胞。

[1093] 319. 条款1至214或252至318中任一项的方法,其中向患者连续施用所述化合物或其药学上可接受的盐;且所述方法进一步包括结束所述化合物或其药学上可接受的盐的连续施用,以抑制或预防患者中的细胞因子释放综合征。

[1094] 320. 条款1至107或183至318中任一项的方法,其进一步包括向患者施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂。

[1095] 321. 条款1至182或215至318中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐剂量为约10 nmol/kg患者体重至约2500 nmol/kg患者体重,且所述CAR T细胞剂量为约100万个CAR T细胞至约1500万个CAR T细胞。

[1096] 322. 条款1至251或284至318中任一项的方法,其中向患者每周一次施用所述化合物或其药学上可接受的盐。

[1097] 323. 条款1至283中任一项的方法,其中向患者施用至少第一剂量和第二剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中第一剂量和第二剂量是不同的,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约2倍至约15000倍。

[1098] 324. 条款56至318中任一项的方法,其中所述CAR T细胞组合物以至少两个剂量施用。

[1099] 325. 治疗癌症的方法,所述方法包括:

[1100] i) 向患者施用第一剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体;

[1101] ii) 向患者施用至少第二剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐至多约50%;且

[1102] iii) 向患者施用一定剂量的包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR。

[1103] 326. 条款325的方法,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐至多约60%。

- [1104] 327. 条款325的方法,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐至多约70%。
- [1105] 328. 条款325的方法,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐至多约80%。
- [1106] 329. 条款325的方法,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐至多约90%。
- [1107] 330. 条款325的方法,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐至多约95%。
- [1108] 331. 条款325的方法,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐至多约96%。
- [1109] 332. 条款325的方法,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐至多约97%。
- [1110] 333. 条款325的方法,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐至多约98%。
- [1111] 334. 条款325的方法,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐至多约99%。
- [1112] 335. 条款325的方法,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐至多约99.5%。
- [1113] 336. 条款325至335中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量为约100 nmol/kg至约1000 nmol/kg患者体重。
- [1114] 337. 条款325至335中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量为约100 nmol/kg至约900 nmol/kg患者体重。
- [1115] 338. 条款325至335中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量为约100 nmol/kg至约800 nmol/kg患者体重。
- [1116] 339. 条款325至335中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量为约100 nmol/kg至约700 nmol/kg患者体重。
- [1117] 340. 条款325至335中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量为约100 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重。
- [1118] 341. 条款325至335中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量为约200 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重。
- [1119] 342. 条款325至335中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量为约400 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重。
- [1120] 343. 条款325至335中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量为约500 nmol/kg患者体重。
- [1121] 344. 条款336的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第二剂量为约0.5 nmol/kg至约500 nmol/kg患者体重。
- [1122] 345. 条款337的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第二剂量为约0.5 nmol/kg至约450 nmol/kg患者体重。
- [1123] 346. 条款338的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第二剂量为约

0.5 nmol/kg至约400 nmol/kg患者体重。

[1124] 347. 条款339的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第二剂量为约0.5 nmol/kg至约350 nmol/kg患者体重。

[1125] 348. 条款340的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第二剂量为约0.5 nmol/kg至约300 nmol/kg患者体重。

[1126] 349. 条款341的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第二剂量为约1 nmol/kg至约300 nmol/kg患者体重。

[1127] 350. 条款342的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第二剂量为约2 nmol/kg至约300 nmol/kg患者体重。

[1128] 351. 条款343的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第二剂量为约2 nmol/kg至约250 nmol/kg患者体重。

[1129] 352. 条款336至343中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第二剂量为约5 nmol/kg至约40 nmol/kg患者体重。

[1130] 353. 条款336至343中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第二剂量为约40 nmol/kg至约150 nmol/kg患者体重。

[1131] 354. 条款325至353中任一项的方法,其进一步包括施用第三剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第三剂量与所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量相同。

[1132] 355. 条款354的方法,其进一步包括施用第四剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第四剂量与所述化合物或其药学上可接受的盐的第二剂量和所述化合物或其药学上可接受的盐的第三剂量相同。

[1133] 356. 条款325至355中任一项的方法,其中在第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐之后施用的一个或多个剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐相对于第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐维持癌症生长的抑制。

[1134] 357. 条款325至356中任一项的方法,其中所述CAR T细胞以约100万个CAR T细胞至约4000万个CAR T细胞的剂量施用。

[1135] 358. 条款325至357中任一项的方法,其中每周一次施用第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐之后施用的一个或多个剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[1136] 359. 条款325至357中任一项的方法,其中每周两次施用一个或多个剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[1137] 360. 条款325至359中任一项的方法,其中所述配体选自叶酸、DUPA、NK-1R配体、CAIX配体、 γ 谷氨酰基转肽酶的配体、NKG2D配体和CCK2R配体。

[1138] 361. 条款325至360中任一项的方法,其中所述配体是叶酸。

[1139] 362. 条款325至360中任一项的方法,其中所述配体是NK-1R配体。

[1140] 363. 条款325至360中任一项的方法,其中所述配体是DUPA。

[1141] 364. 条款325至360中任一项的方法,其中所述配体是CCK2R配体。

[1142] 365. 条款325至360中任一项的方法,其中所述配体是 γ 谷氨酰基转肽酶的配体。

[1143] 366. 条款325至365中任一项的方法,其中所述靶向部分选自2,4-二硝基苯酚(DNP)、2,4,6-三硝基苯酚(TNP)、生物素、地高辛配基、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、

NHS-荧光素、五氟苯基酯、四氟苯基酯、打结素、centyrin和DARPin。

[1144] 367. 条款325至366中任一项的方法,其中所述靶向部分是FITC。

[1145] 368. 条款325至366中任一项的方法,其中所述靶向部分是DNP。

[1146] 369. 条款325至366中任一项的方法,其中所述靶向部分是TNP。

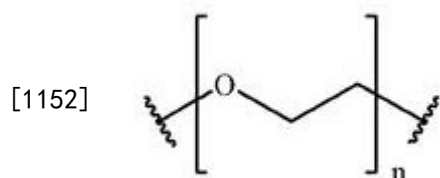
[1147] 370. 条款325至369中任一项的方法,其中所述接头包含聚乙二醇(PEG)、聚脯氨酸、亲水氨基酸、糖、非天然的肽聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、pluronic F-127或其组合。

[1148] 371. 条款325至370中任一项的方法,其中所述接头包含PEG。

[1149] 372. 条款325至371中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐具有下式

[1150]
$$B-L-T,$$

[1151] 其中B代表小分子配体,L代表接头,且T代表靶向部分,且其中L包含具有下式的结构



[1153] 其中n是0至200的整数。

[1154] 373. 条款372的方法,其中n是0至150的整数。

[1155] 374. 条款372的方法,其中n是0至110的整数。

[1156] 375. 条款372的方法,其中n是0至20的整数。

[1157] 376. 条款372的方法,其中n是15至20的整数。

[1158] 377. 条款372的方法,其中n是15至110的整数。

[1159] 378. 条款325至367或370至377中任一项的方法,其中所述接头包含PEG,且所述靶向部分是FITC,或其药学上可接受的盐。

[1160] 379. 条款325至378中任一项的方法,其中所述癌症选自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头癌、颈癌、皮肤黑色素瘤、眼内黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、子宫内膜癌、直肠癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、三重阴性的乳腺癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金氏病、食管癌、小肠癌、内分泌系统的癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、非小细胞肺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、骨肉瘤、尿道癌、前列腺癌、慢性白血病、急性白血病、急性髓细胞白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、髓性白血病、髓单核细胞白血病、毛细胞白血病、胸膜间皮瘤、膀胱癌、伯基特氏淋巴瘤、输尿管癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、脊髓肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤和胃食管连接部的腺癌。

[1161] 380. 条款325至361或366至379中任一项的方法,其中所述癌症是表达叶酸受体的癌症。

[1162] 381. 条款380的方法,其中所述癌症是子宫内膜癌。

[1163] 382. 条款380的方法,其中所述癌症是非小细胞肺癌。

[1164] 383. 条款380的方法,其中所述癌症是卵巢癌。

[1165] 384. 条款380的方法,其中所述癌症是三重阴性的乳腺癌。

- [1166] 385. 条款325至384中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述识别区域是抗体的单链片段可变(scFv)区域。
- [1167] 386. 条款325至367或370至385中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述CAR的识别区域是抗-FITC抗体的单链片段可变(scFv)区域。
- [1168] 387. 条款325至386中任一项的方法,其中所述CAR具有共刺激结构域且所述共刺激结构域选自CD28、CD137 (4-1BB)、CD134 (OX40)和CD278 (ICOS)。
- [1169] 388. 条款325至387中任一项的方法,其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链或Fc受体 γ 。
- [1170] 389. 条款325至367或370至388中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述识别区域是抗-FITC抗体的单链片段可变(scFv)区域,其中所述CAR具有共刺激结构域且所述共刺激结构域是CD137 (4-1BB),且其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链。
- [1171] 390. 条款325至389中任一项的方法,其中施用多个剂量的CAR T细胞组合物。
- [1172] 391. 条款325至390中任一项的方法,其中在施用所述化合物或其药学上可接受的盐之前,或在施用所述CAR T细胞组合物之前,将所述患者成像。
- [1173] 392. 条款325至391中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐不是抗体,且不包含抗体的片段。
- [1174] 393. 条款325至392中任一项的方法,其中所述靶向部分不包含肽表位。
- [1175] 394. 条款325至393中任一项的方法,其中不发生所述患者中导致脱靶毒性的细胞因子释放,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。
- [1176] 395. 条款325至393中任一项的方法,其中在所述患者中不发生脱靶组织毒性,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。
- [1177] 396. 条款325至393中任一项的方法,其中所述癌症包含肿瘤,其中肿瘤大小在所述患者中减小,且其中不发生脱靶毒性。
- [1178] 397. 条款325至398中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:1的核酸。
- [1179] 398. 条款325至397中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:2的多肽。
- [1180] 399. 条款397的方法,其中所述核酸编码嵌合抗原受体。
- [1181] 400. 条款325至399中任一项的方法,其中所述CAR包含人源化氨基酸序列。
- [1182] 401. 条款325至399中任一项的方法,其中所述CAR由人源化氨基酸序列组成。
- [1183] 402. 条款325至401中任一项的方法,其进一步包括向患者施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂的步骤。
- [1184] 403. 条款402的方法,其中向患者施用抑制CAR T细胞的活化的药剂,且所述药剂是阻断CAR T细胞与所述化合物或其药学上可接受的盐的结合、但不结合癌症的药剂。
- [1185] 404. 条款403的方法,其中所述药剂是荧光素胺、荧光素钠或荧光素。
- [1186] 405. 条款404的方法,其中所述药剂是荧光素钠。
- [1187] 406. 治疗癌症的方法,所述方法包括:
- [1188] i) 向患者施用第一剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含

通过接头与靶向部分连接的小分子配体,且其中在施用包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物前至少约一小时向患者施用所述化合物或其药学上可接受的盐,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR;

[1189] ii) 然后向患者施用一定剂量的CAR T细胞组合物;且

[1190] iii) 然后向患者施用第二剂量的化合物或其药学上可接受的盐。

[1191] 407. 条款406的方法,其中在施用所述CAR T细胞组合物前至少约两小时向患者施用第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[1192] 408. 条款406的方法,其中在施用所述CAR T细胞组合物前至少约四小时向患者施用第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[1193] 409. 条款406的方法,其中在施用所述CAR T细胞组合物前至少约八小时向患者施用第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[1194] 410. 条款406的方法,其中在施用所述CAR T细胞组合物前至少约十二小时向患者施用第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[1195] 411. 条款406的方法,其中在施用所述CAR T细胞组合物前至少约十六小时向患者施用第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[1196] 412. 条款406的方法,其中在施用所述CAR T细胞组合物前至少约二十小时向患者施用第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[1197] 413. 条款406的方法,其中在施用所述CAR T细胞组合物前至少约二十四小时向患者施用第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[1198] 414. 条款406至413中任一项的方法,其中到施用所述CAR T细胞组合物后至少约二十四小时向患者施用第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[1199] 415. 条款406至413中任一项的方法,其中到施用所述CAR T细胞组合物后至少约十六小时向患者施用第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[1200] 416. 条款406至413中任一项的方法,其中到施用所述CAR T细胞组合物后至少约十二小时向患者施用第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[1201] 417. 条款406至413中任一项的方法,其中到施用所述CAR T细胞组合物后至少约八小时向患者施用第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[1202] 418. 条款406至413中任一项的方法,其中到施用所述CAR T细胞组合物后至少约四小时向患者施用第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[1203] 419. 条款406至418中任一项的方法,其中不发生在所述患者中导致脱靶毒性的细胞因子释放,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。

[1204] 420. 条款406至418中任一项的方法,其中在所述患者中不发生脱靶组织毒性,且其中发生对所述癌症的CAR T细胞毒性。

[1205] 421. 条款406至418中任一项的方法,其中所述癌症包含肿瘤,其中肿瘤大小在所述患者中减小,且其中不发生脱靶毒性。

[1206] 422. 条款406至418中任一项的方法,其中所述癌症包含肿瘤,且其中所述患者中的肿瘤大小的减小大于在施用所述CAR T细胞组合物前未用所述化合物或其药学上可接受的盐预先治疗的患者中。

[1207] 423. 条款406至422中任一项的方法,其中所述配体选自叶酸、DUPA、NK-1R配体、

CAIX配体、 γ 谷氨酰基转肽酶的配体、NKG2D配体和CCK2R配体。

[1208] 424. 条款406至423中任一项的方法,其中所述配体是叶酸。

[1209] 425. 条款406至423中任一项的方法,其中所述配体是NK-1R配体。

[1210] 426. 条款406至423中任一项的方法,其中所述配体是DUPA。

[1211] 427. 条款406至423中任一项的方法,其中所述配体是CCK2R配体。

[1212] 428. 条款406至423中任一项的方法,其中所述配体是 γ 谷氨酰基转肽酶的配体。

[1213] 429. 条款406至428中任一项的方法,其中所述靶向部分选自2,4-二硝基苯酚(DNP)、2,4,6-三硝基苯酚(TNP)、生物素、地高辛配基、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、NHS-荧光素、五氟苯基酯、四氟苯基酯、打结素、centyrin和DARPin。

[1214] 430. 条款406至429中任一项的方法,其中所述靶向部分是FITC。

[1215] 431. 条款406至429中任一项的方法,其中所述靶向部分是DNP。

[1216] 432. 条款406至429中任一项的方法,其中所述靶向部分是TNP。

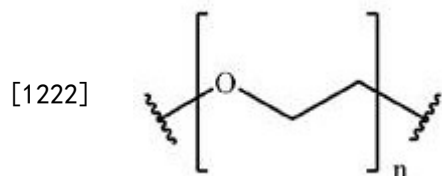
[1217] 433. 条款406至432中任一项的方法,其中所述接头包含聚乙二醇(PEG)、聚脯氨酸、亲水氨基酸、糖、非天然的肽聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、pluronic F-127或其组合。

[1218] 434. 条款406至433中任一项的方法,其中所述接头包含PEG。

[1219] 435. 条款406至434中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐具有下式

[1220]
$$B-L-T,$$

[1221] 其中B代表小分子配体,L代表接头,且T代表靶向部分,且其中L包含具有下式的结构



[1223] 其中n是0至200的整数。

[1224] 436. 条款435的方法,其中n是0至150的整数。

[1225] 437. 条款435的方法,其中n是0至110的整数。

[1226] 438. 条款435的方法,其中n是0至20的整数。

[1227] 439. 条款435的方法,其中n是15至20的整数。

[1228] 440. 条款435的方法,其中n是15至110的整数。

[1229] 441. 条款406至430或433至440中任一项的方法,其中所述接头包含PEG,且所述靶向部分是FITC,或其药学上可接受的盐。

[1230] 442. 条款406至441中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约10000 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[1231] 443. 条款406至441中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约5000 nmol/kg患者体重的剂量施用。

[1232] 444. 条款406至441中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约1000 nmol/kg患者体重的剂量施用。

- [1233] 445. 条款406至441中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约10 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。
- [1234] 446. 条款406至441中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约200 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。
- [1235] 447. 条款406至441中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以约250 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重的剂量施用。
- [1236] 448. 条款406至447中任一项的方法,其中所述癌症选自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头癌、颈癌、皮肤黑色素瘤、眼内黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、子宫内膜癌、直肠癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、三重阴性的乳腺癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金氏病、食管癌、小肠癌、内分泌系统的癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、非小细胞肺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、骨肉瘤、尿道癌、前列腺癌、慢性白血病、急性白血病、急性髓细胞白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、髓性白血病、髓单核细胞白血病、毛细胞白血病、胸膜间皮瘤、膀胱癌、伯基特氏淋巴瘤、输尿管癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统 (CNS) 肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、脊椎肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤和胃食管连接部的腺癌。
- [1237] 449. 条款406至424或429至448中任一项的方法,其中所述癌症是表达叶酸受体的癌症。
- [1238] 450. 条款448的方法,其中所述癌症是子宫内膜癌。
- [1239] 451. 条款448的方法,其中所述癌症是非小细胞肺癌。
- [1240] 452. 条款448的方法,其中所述癌症是卵巢癌。
- [1241] 453. 条款448的方法,其中所述癌症是三重阴性的乳腺癌。
- [1242] 454. 条款406至453中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述识别区域是抗体的单链片段可变 (scFv) 区域。
- [1243] 455. 条款406至430或433至454中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述CAR的识别区域是抗-FITC抗体的单链片段可变 (scFv) 区域。
- [1244] 456. 条款406至455中任一项的方法,其中所述CAR具有共刺激结构域且所述共刺激结构域选自CD28、CD137 (4-1BB)、CD134 (OX40) 和CD278 (ICOS)。
- [1245] 457. 条款406至456中任一项的方法,其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链或Fc受体 γ 。
- [1246] 458. 条款406至430或433至457中任一项的方法,其中所述CAR具有识别区域且所述识别区域是抗-FITC抗体的单链片段可变 (scFv) 区域,其中所述CAR具有共刺激结构域且所述共刺激结构域是CD137 (4-1BB),且其中所述CAR具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链。
- [1247] 459. 条款406至458中任一项的方法,其中施用多个剂量的CAR T细胞组合物。
- [1248] 460. 条款406至459中任一项的方法,其中在施用所述化合物或其药学上可接受的盐之前,将所述患者成像。
- [1249] 461. 条款406至460中任一项的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐不是抗体,且不包含抗体的片段。
- [1250] 462. 条款406至461中任一项的方法,其中所述靶向部分不包含肽表位。
- [1251] 463. 条款406至462中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:1

的核酸。

[1252] 464. 条款406至463中任一项的方法,其中所述CAR T细胞包含含有SEQ ID NO:2的多肽。

[1253] 465. 条款463的方法,其中所述核酸编码嵌合抗原受体。

[1254] 466. 条款406至465中任一项的方法,其中所述CAR包含人源化氨基酸序列。

[1255] 467. 条款406至465中任一项的方法,其中所述CAR由人源化氨基酸序列组成。

[1256] 468. 条款108至182中任一项的方法,其中向所述患者施用多于一个剂量的叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂。

[1257] 469. 条款108至182中任一项的方法,其中在所述化合物或其药学上可接受的盐之前和/或之后向所述患者施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂。

[1258] 470. 条款108至182中任一项的方法,其中叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂的施用引起患者中的细胞因子水平的降低。

[1259] 471. 条款470的方法,其中到向患者施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂后约3小时,发生细胞因子水平的降低。

[1260] 472. 条款470的方法,其中到向患者施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂后约6小时,发生细胞因子水平的降低。

[1261] 473. 条款470的方法,其中细胞因子水平的降低是降低至约未治疗患者中的细胞因子水平。

[1262] 474. 条款108至182中任一项的方法,其中在施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂之前和之后施用所述化合物或其药学上可接受的盐。

[1263] 475. 条款108至182中任一项的方法,其中在施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂之后,患者的血液中的CAR T细胞数增加,即使患者中的细胞因子水平降低。

[1264] 476. 条款108至182中任一项的方法,其中在施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂之后,相对于未用拯救剂治疗的患者,CAR T细胞活化增强或维持,即使治疗的患者中的细胞因子水平降低。

[1265] 477. 条款108至182中任一项的方法,其中所述癌症包含肿瘤,且当向患者施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂时,患者中的肿瘤大小不增加。

[1266] 478. 条款477的方法,其中获得针对肿瘤的完全应答。

[1267] 479. 条款108、115-160、168-182和468-478中任一项的方法,其中当CRS等级达到1、2、3或4时,向患者施用抑制CAR T细胞的活化的药剂。

[1268] 480. 条款108、115-160、168-182和468-478中任一项的方法,其中当CRS等级达到

3或4时,向患者施用抑制CAR T细胞的活化的药剂。

[1269] 481. 条款108至182和468至480中任一项的方法,其中肺水肿减少。

[1270] 482. 条款108、115-160、168-182和468-481中任一项的方法,其中抑制CAR T细胞的活化的药剂以约0.01至约300 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重的剂量施用。

[1271] 483. 条款108、115-160、168-182和468-481中任一项的方法,其中抑制CAR T细胞的活化的药剂以约0.06至约100 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重的剂量施用。

[1272] 484. 条款108、115-160、168-182和468-481中任一项的方法,其中抑制CAR T细胞的活化的药剂以约0.06至约90 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重的剂量施用。

[1273] 485. 条款108、115-160、168-182和468-481中任一项的方法,其中抑制CAR T细胞的活化的药剂以约0.06至约80 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重的剂量施用。

[1274] 486. 条款108、115-160、168-182和468-481中任一项的方法,其中抑制CAR T细胞的活化的药剂以约0.06至约70 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重的剂量施用。

[1275] 487. 条款108、115-160、168-182和468-481中任一项的方法,其中抑制CAR T细胞的活化的药剂以约0.06至约60 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重的剂量施用。

[1276] 488. 条款108、115-160、168-182和468-481中任一项的方法,其中抑制CAR T细胞的活化的药剂以约0.06至约50 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重的剂量施用。

[1277] 489. 条款108、115-160、168-182和468-481中任一项的方法,其中抑制CAR T细胞的活化的药剂以约0.06至约40 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重的剂量施用。

[1278] 490. 条款108、115-160、168-182和468-481中任一项的方法,其中抑制CAR T细胞的活化的药剂以约0.06至约30 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重的剂量施用。

[1279] 491. 条款108、115-160、168-182和468-481中任一项的方法,其中抑制CAR T细胞的活化的药剂以约0.06至约20 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重的剂量施用。

[1280] 492. 条款108、115-160、168-182和468-481中任一项的方法,其中抑制CAR T细胞的活化的药剂以约0.06至约10 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重的剂量施用。

[1281] 493. 条款108、115-160、168-182和468-481中任一项的方法,其中抑制CAR T细胞的活化的药剂以约0.06至约8 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重的剂量施用。

[1282] 494. 条款108、115-160、168-182和468-481中任一项的方法,其中抑制CAR T细胞的活化的药剂以约0.06至约6 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重的剂量施用。

[1283] 495. 条款108、115-160、168-181和468-494中任一项的方法,其中向患者施用抑制CAR T细胞的活化的药剂,且所述药剂是荧光素钠。

[1284] 496. 条款1至495中任一项的方法,其中减少或预防CRS,且所述方法导致患者中的肿瘤体积的减少。

[1285] 497. 条款1至496中任一项的方法,其中减少或预防由于CRS导致的体重减轻。

[1286] 498. 条款1-3、8-28、33-58、63-83、88-136、141-249、252-361、366-380、385-424、429-449和454至497中任一项的方法,其中所述癌症是急性髓细胞白血病。

[1287] 499. 条款498的方法,其中所述癌症表达叶酸受体- β 。

[1288] 500. 条款498或499的方法,其中所述CAR-T细胞具有中央记忆/效应记忆表型。

[1289] 501. 条款1至500中任一项的方法,其中所述CAR T细胞的CD8:CD4比率为约1:1。

[1290] 502. 条款215至251中任一项的方法,其进一步包括步骤iv):向所述患者再次施

用所述化合物或其药学上可接受的盐。

[1291] 503. 条款474的方法,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的后续施用引起CAR T细胞活化和患者中的细胞因子水平的增加。

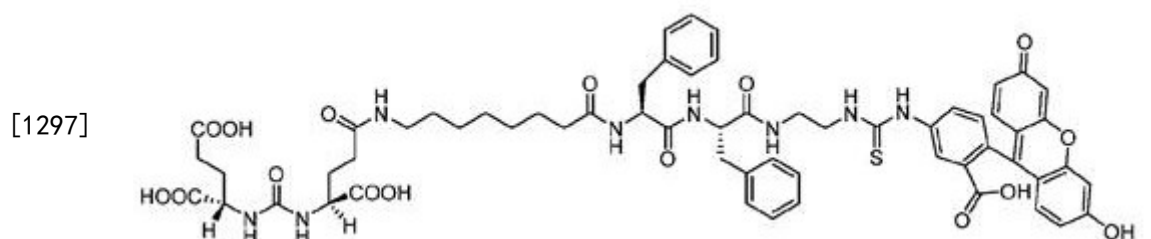
[1292] 504. 条款1至107、183至476至479至503中任一项的方法,其中所述癌症包含肿瘤,且其中获得针对肿瘤的完全应答。

[1293] 505. 治疗癌症的方法,所述方法包括:

[1294] i) 向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体;且

[1295] ii) 向患者施用CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞,且其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR;且其中所述小分子配体是PSMA配体且所述靶向部分是FITC。

[1296] 506. 条款505的方法,其中通过接头与靶向部分连接的小分子配体具有下式

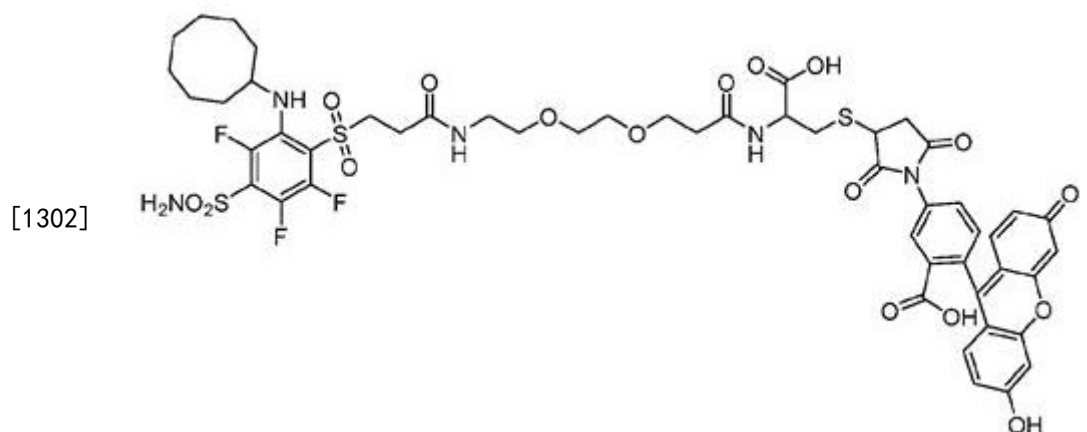


[1298] 507. 治疗癌症的方法,所述方法包括:

[1299] i) 向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体;且

[1300] ii) 向患者施用CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞,且其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR;且其中所述小分子配体是CAIX配体且所述靶向部分是FITC。

[1301] 508. 条款507的方法,其中通过接头与靶向部分连接的小分子配体具有下式



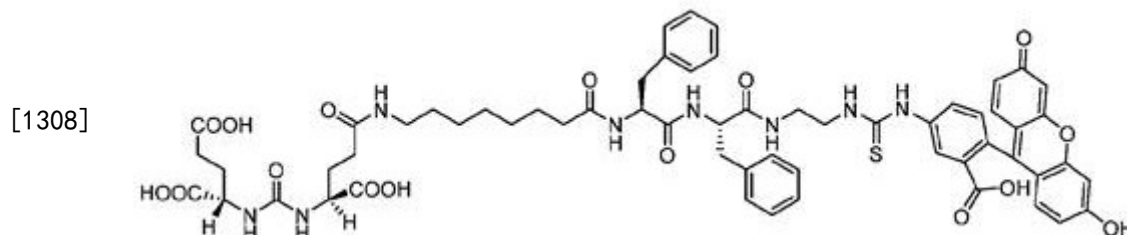
[1303] 509. 治疗癌症的方法,所述方法包括:

[1304] i) 向患者施用第一化合物或其药学上可接受的盐,其中所述第一化合物或其药学上可接受的盐包含通过接头与FITC连接的PSMA配体;

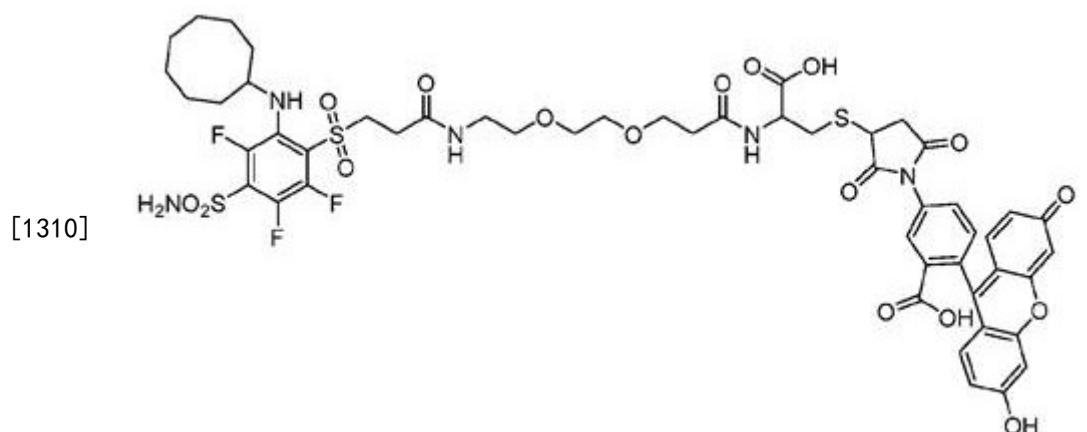
[1305] ii) 向患者施用第二化合物或其药学上可接受的盐,其中所述第二化合物或其药学上可接受的盐包含通过接头与FITC连接的CAIX配体;且

[1306] iii) 向患者施用CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞,且其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR。

[1307] 510. 条款509的方法,其中所述第一化合物具有下式



[1309] 且所述第二化合物具有下式



[1311] 因此,在一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,ii)向患者施用第一剂量的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞,且其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR,且iii)向患者施用第二剂量的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞,且其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR。

[1312] 在另一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,且ii)向患者施用包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述组合物中的CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR,且其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞和未转化的T细胞的混合物。

[1313] 在又一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,ii)向患者施用CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞,且其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR,且iii)向患者施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药物。

[1314] 在另一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,且其中所述化合物或其药学上可接受的盐剂量为约10 nmol/kg患者体重至约2500 nmol/kg患者体重,且ii)向患者施用包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞包

含针对所述靶向部分的CAR,且其中所述CAR T细胞剂量为约100万个CAR T细胞至约1500万个CAR T细胞。

[1315] 在又一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者连续施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,ii)向患者施用包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR,且iii)结束所述化合物或其药学上可接受的盐的连续施用,以抑制或预防患者中的细胞因子释放综合征。

[1316] 在另一个说明性方面,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,其中向患者施用至少第一剂量和第二剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中第一剂量和第二剂量是不同的,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约2倍至约15000倍,且ii)向患者施用包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR。

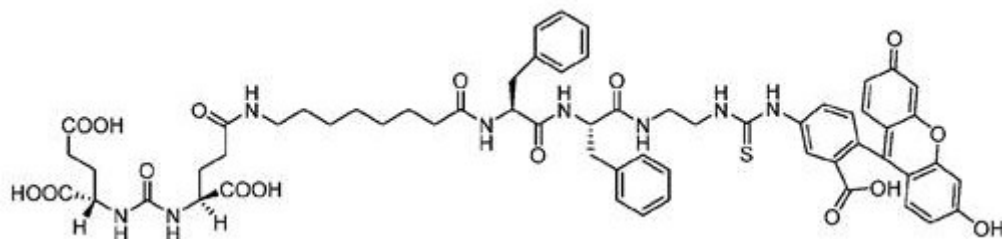
[1317] 在另一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,且其中向患者每周一次施用所述化合物或其药学上可接受的盐,且ii)向患者施用包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR。

[1318] 在又一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者施用第一剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,ii)向患者施用至少第二剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐至多约50%,且iii)向患者施用一定剂量的包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR。

[1319] 在又一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者施用第一剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,且其中在施用包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物前至少约一小时向患者施用所述化合物或其药学上可接受的盐,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR,ii)然后向患者施用一定剂量的CAR T细胞组合物,且iii)然后向患者施用第二剂量的化合物或其药学上可接受的盐。

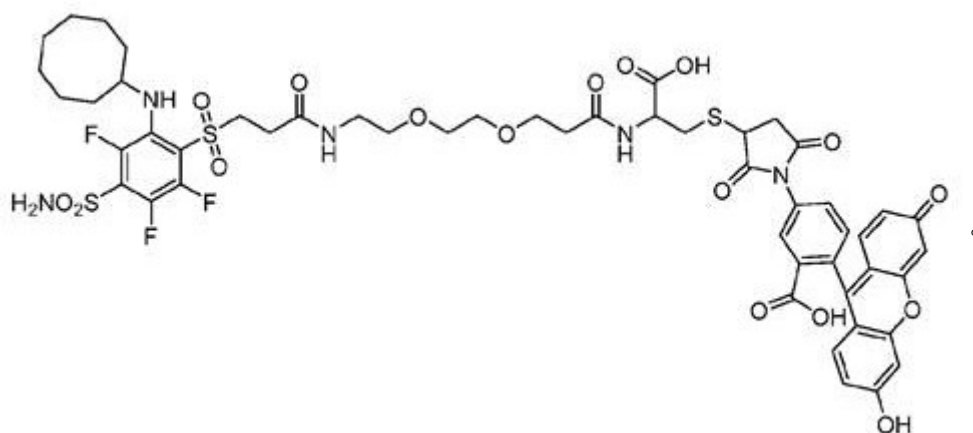
[1320] 在另一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,且ii)向患者施用CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞,且其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR,且其中所述小分子配体是PSMA配体且所述靶向部分是FITC。在该实施方案中,通过接头与靶向部分连接的小分子配体可以具有下式

[1321]



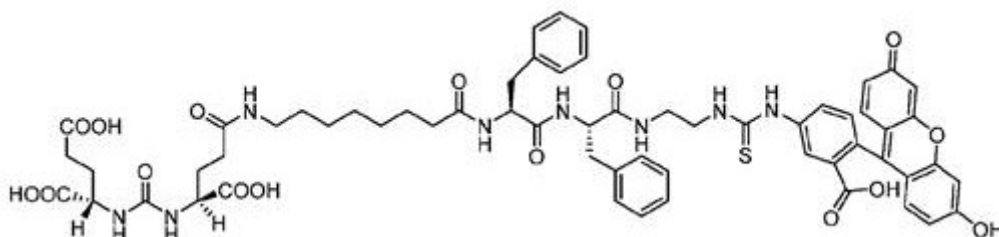
[1322] 在又一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,且ii)向患者施用CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞,且其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR,且其中所述小分子配体是CAIX配体且所述靶向部分是FITC。在该实施方案中,通过接头与靶向部分连接的小分子配体可以具有下式

[1323]



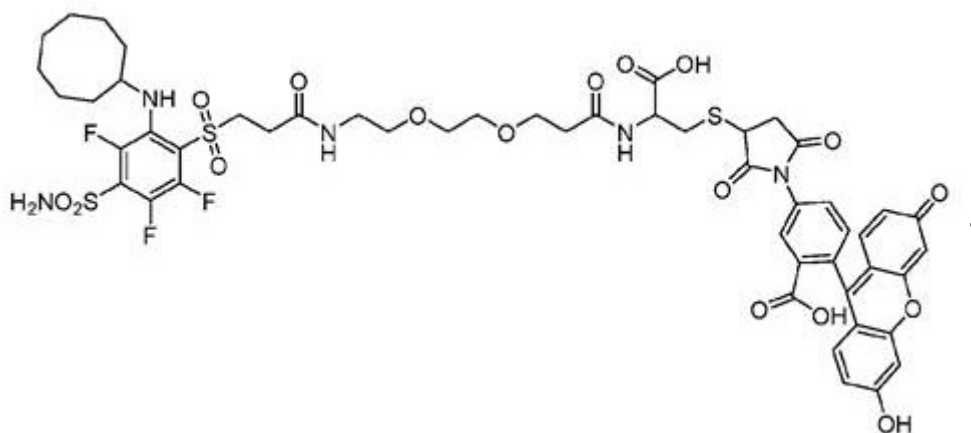
[1324] 在又一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者施用第一化合物或其药学上可接受的盐,其中所述第一化合物或其药学上可接受的盐包含通过接头与FITC连接的PSMA配体,ii)向患者施用第二化合物或其药学上可接受的盐,其中所述第二化合物或其药学上可接受的盐包含通过接头与FITC连接的CAIX配体,且iii)向患者施用CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞,且其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR。在该实施方案中,所述第一化合物可以具有下式

[1325]



[1326] 且所述第二化合物可以具有下式

[1327]



[1328] 因此,在前面的十二个段落和上面的条款列表中提供了各个实施方案,并且在该“说明性实施方案的详述”、概述部分、实施例和权利要求中描述的所有适用的实施方案都适用于这些实施方案。

[1329] 如本文所述,“患者”可以是人,或者,在兽医学应用的情况下,所述患者可以是实验动物、农业动物、家养动物或野生动物。在各个方面,所述患者可以是实验动物诸如啮齿动物(例如,小鼠、大鼠、仓鼠等)、兔、猴、黑猩猩,家养动物诸如狗、猫或兔,农业动物诸如牛、马、猪、绵羊、山羊,或被人工驯养的野生动物诸如熊、熊猫、狮子、老虎、豹、象、斑马、长颈鹿、大猩猩、海豚或鲸鱼。

[1330] 在各个实施方案中,待治疗的癌症可以选自癌、肉瘤、骨肉瘤、淋巴瘤、黑色素瘤、间皮瘤、鼻咽癌、白血病、腺癌或骨髓瘤。在其他实施方案中,所述癌症可以是肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头癌、颈癌、皮肤黑色素瘤、眼内黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、子宫内膜癌、直肠癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、三重阴性的乳腺癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金氏病、食管癌、小肠癌、内分泌系统的癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、非小细胞肺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、骨肉瘤、尿道癌、前列腺癌、慢性白血病、急性白血病(包括急性髓细胞白血病)、淋巴细胞性淋巴瘤、髓性白血病、髓单核细胞白血病、毛细胞白血病、胸膜间皮瘤、膀胱癌、伯基特氏淋巴瘤、输尿管癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、脊椎肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤和胃食管连接部的腺癌。

[1331] 在这些实施方案的一些方面,所述癌症是表达叶酸受体的癌症。在另一个实施方案中,所述癌症是表达叶酸受体 α 的癌症。在又一个实施方案中,所述癌症是表达叶酸受体 β 的癌症。在这些实施方案的一些方面,所述癌症是子宫内膜癌、非小细胞肺癌、卵巢癌或三重阴性的乳腺癌。在另一个实施方案中,所治疗的癌症是肿瘤。在另一个实施方案中,所述癌症是恶性的。在另一个实施方案中,所述癌症是急性髓细胞白血病。在又一个实施方案中,所述癌症是急性髓细胞白血病,且所述癌症表达叶酸受体- β 。在又一个实施方案中,所述癌症是急性髓细胞白血病,且所述CAR-T细胞具有中央记忆/效应记忆表型。在又一个实施方案中,所述CAR-T细胞的CD8:CD4比率为约1:1比率。在另一个实施方案中,所述CD8:CD4比率为约1.2:1比率、约1:1.2比率、约1.3:1比率、约1:1.3比率、约1.4:1比率、约1:1.4比率、约1.5:1比率或约1:1.5比率。在其中所述癌症是急性髓细胞白血病且使用拯救剂的还有其他实施方案中,所述CAR-T细胞可以在施用CAR-T细胞后、甚至在使用拯救剂来抑制或防止CRS后至少约40天、至少约45天、至少约50天、至少约55天、至少约60天、至少约70

天、至少约80天、至少约90天或至少约100天仍然存在于患者中。在其中所述癌症是急性髓细胞白血病或另一种癌症的另一个实施方案中,与肿瘤相关的CAR T细胞可以具有相对于与肿瘤不相关的CAR T细胞增加的CD25表达。

[1332] 在一个实施方案中,所述“小分子配体”可以是叶酸、DUPA (被PSMA-阳性的人前列腺癌细胞和其他癌细胞类型结合的配体)、NK-1R配体(例如在结肠癌和胰腺癌上发现的NK-1R配体的受体)、CAIX配体(例如在肾癌、卵巢癌、外阴癌和乳腺癌上发现CAIX配体的受体)、 γ 谷氨酰基转肽酶的配体(例如在卵巢癌、结肠癌、肝癌、星形细胞神经胶质瘤、黑色素瘤和白血病中过表达转肽酶)、NKG2D配体(在例如肺癌、结肠癌、肾癌、前列腺癌和T和B细胞淋巴瘤上发现NKG2D配体的受体)或CCK2R配体(在甲状腺癌、肺癌、胰腺癌、卵巢癌、脑癌、胃癌、胃肠间质瘤和结肠癌以及其他癌上发现CCK2R配体的受体),其中的每一种是特异性结合癌细胞类型的小分子配体(即,这些配体中的每一种的受体可以相比于正常组织在癌症上过表达)。

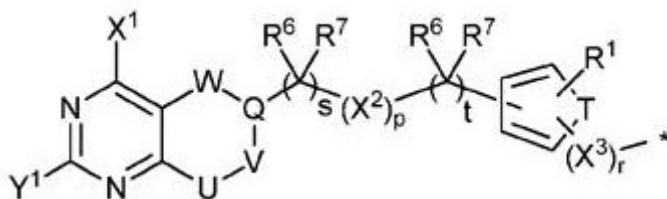
[1333] 在一个实施方案中,所述小分子配体可以具有小于约10,000道尔顿、小于约9000道尔顿、小于约8,000道尔顿、小于约7000道尔顿、小于约6000道尔顿、小于约5000道尔顿、小于约4500道尔顿、小于约4000道尔顿、小于约3500道尔顿、小于约3000道尔顿、小于约2500道尔顿、小于约2000道尔顿、小于约1500道尔顿、小于约1000道尔顿或小于约500道尔顿的质量。在另一个实施方案中,所述小分子配体可以具有约1至约10,000道尔顿、约1至约9000道尔顿、约1至约8,000道尔顿、约1至约7000道尔顿、约1至约6000道尔顿、约1至约5000道尔顿、约1至约4500道尔顿、约1至约4000道尔顿、约1至约3500道尔顿、约1至约3000道尔顿、约1至约2500道尔顿、约1至约2000道尔顿、约1至约1500道尔顿、约1至约1000道尔顿或约1至约500道尔顿的质量。

[1334] 在一个实施方案中,DUPA衍生物可以是与靶向部分连接的小分子配体的配体,且DUPA衍生物描述于WO 2015/057852(通过引用并入本文)中。

[1335] 在一个实施方案中,在“与接头连接的小分子配体”的上下文中的小分子配体是叶酸。在各个实施方案中,所述叶酸可以是叶酸、叶酸类似物或另一种结合叶酸受体的分子。在各个实施方案中,可以使用的叶酸的类似物包括亚叶酸(例如,甲酰四氢叶酸)、蝶酰谷氨酸(pteropolyglutamic acid)和结合叶酸受体的喋啶类诸如四氢喋呤类、二氢叶酸类、四氢叶酸类和它们的脱氮和二脱氮类似物。术语“脱氮”和“二脱氮”类似物是指本领域公认的类似物,其用碳原子取代天然存在的叶酸结构中的一个或两个氮原子。例如,所述脱氮类似物包括1-脱氮、3-脱氮、5-脱氮、8-脱氮和10-脱氮类似物。所述二脱氮类似物包括,例如,1,5-二脱氮、5,10-二脱氮、8,10-二脱氮和5,8-二脱氮类似物。前述叶酸类似物常规地被称为“叶酸”,其反映它们的结合叶酸受体的能力。其他结合叶酸受体的类似物包括氨基喋呤、甲氨喋呤(氨甲喋呤)、N10-甲基叶酸、2-去氨基-羟基叶酸、脱氮类似物诸如1-脱氮甲氨喋呤或3-脱氮甲氨喋呤和3',5'-二氯-4-氨基-4-脱氧-N10-甲基蝶酰谷氨酸(二氯甲氨喋呤)。

[1336] 在另一个实施方案中,在“与接头连接的小分子配体”的上下文中的小分子配体可以具有下式

[1337]



[1338] 其中 X^1 和 Y^1 各自独立地选自卤素、 R^2 、 OR^2 、 SR^3 和 NR^4R^5 ;

[1339] U、V和W代表各自独立地选自 $-(R^{6a})C=$ 、 $-N=$ 、 $-(R^{6a})C(R^{7a})-$ 和 $-N(R^{4a})-$ 的二价部分;Q选自C和CH;T选自S、O、N和 $-C=C-$;

[1340] X^2 和 X^3 各自独立地选自氧、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} 亚烷基和 C_1-C_{12} 亚烷基氧基,其中Z是氧或硫;

[1341] R^1 选自氢、卤素、 C_1-C_{12} 烷基和 C_1-C_{12} 烷氧基;

[1342] R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^{4a} 、 R^{4b} 、 R^5 、 R^{5b} 、 R^{6b} 和 R^{7b} 各自独立地选自氢、卤素、 C_1-C_{12} 烷基、 C_1-C_{12} 烷氧基、 C_1-C_{12} 烷基酰基、 C_1-C_{12} 烯基、 C_1-C_{12} 炔基、 $(C_1-C_{12}$ 烷氧基)羰基和 $(C_1-C_{12}$ 烷基氨基)羰基;

[1343] R^6 和 R^7 各自独立地选自氢、卤素、 C_1-C_{12} 烷基和 C_1-C_{12} 烷氧基;或者, R^6 和 R^7 一起形成羰基基团;

[1344] R^{6a} 和 R^{7a} 各自独立地选自氢、卤素、 C_1-C_{12} 烷基和 C_1-C_{12} 烷氧基;或者, R^{6a} 和 R^{7a} 一起形成羰基基团;

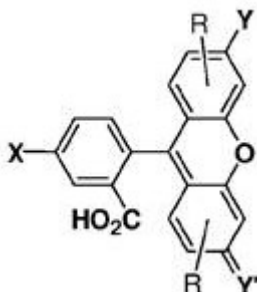
[1345] p、r、s和t各自独立地为0或1;且

[1346] 如果任何额外化学部分是叶酸的部分,则*代表至缀合物的剩余部分的任选共价键。

[1347] 在一个方面,结合由CAR T细胞表达的CAR的“靶向部分”可以选自,例如,2,4-二硝基苯酚(DNP)、2,4,6-三硝基苯酚(TNP)、生物素、地高辛配基、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、NHS-荧光素、五氟苯基酯、四氟苯基酯、打结素、centyrin、DARPin、亲和体、affilin、anticalin、atrimmer、avimer、双环肽、FN3支架、cys-结、fynomer、Kunitz结构域或Obody。靶向部分的身份仅受限于它应当被CAR识别和结合,优选地具有特异性,并且它具有相对低的分子量。在不同的方面,示例性的靶向部分是半抗原,包括小分子量有机分子。

[1348] 在一个说明性实施方案中,所述靶向部分可以具有下述说明性的结构:

[1349]



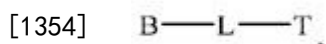
[1350] 其中X是氧、氮或硫,且其中X连接至接头L;Y是 OR^a 、 NR^a_2 或 $NR^a_3^+$;且Y'是 O 、 NR^a 或 $NR^a_2^+$;其中每个R在每种情况下独立地选自H、氟、磺酸、磺酸盐、及其盐等;且 R^a 是氢或烷基。

[1351] 在一个说明性方面,所述接头可以包含聚乙二醇(PEG)、聚脯氨酸、亲水氨基酸、

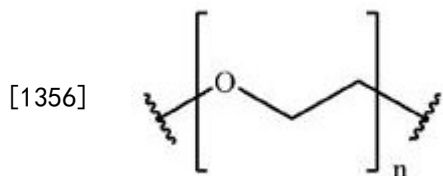
糖、非天然的肽聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、pluronic F-127或其组合。

[1352] 在另一个说明性方面,本文描述的化合物或其药学上可接受的盐中的接头可以包含直接连接(例如,FITC的异硫氰酸酯基团和小分子配体的游离胺基团之间的反应),或所述连接可以通过中间接头。在一个实施方案中,如果存在的话,中间接头可以是本领域已知的任何生物相容的接头,诸如二价接头。在一个说明性实施方案中,所述二价接头可以包含约1至约30个碳原子。在另一个说明性实施方案中,所述二价接头可以包含约2至约20个碳原子。在其他实施方案中,采用较低分子量二价接头(即,具有约30至约300道尔顿的近似分子量的那些)。在另一个实施方案中,合适的接头长度包括、但不限于具有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或40个或更多个原子的接头。

[1353] 在各个实施方案中,与靶向部分连接的小分子配体可以具有下式

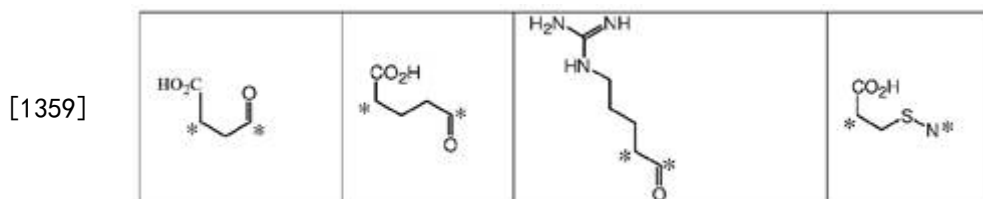


[1355] 其中B代表小分子配体,L代表接头,且T代表靶向部分,且其中L包含具有下式的结构

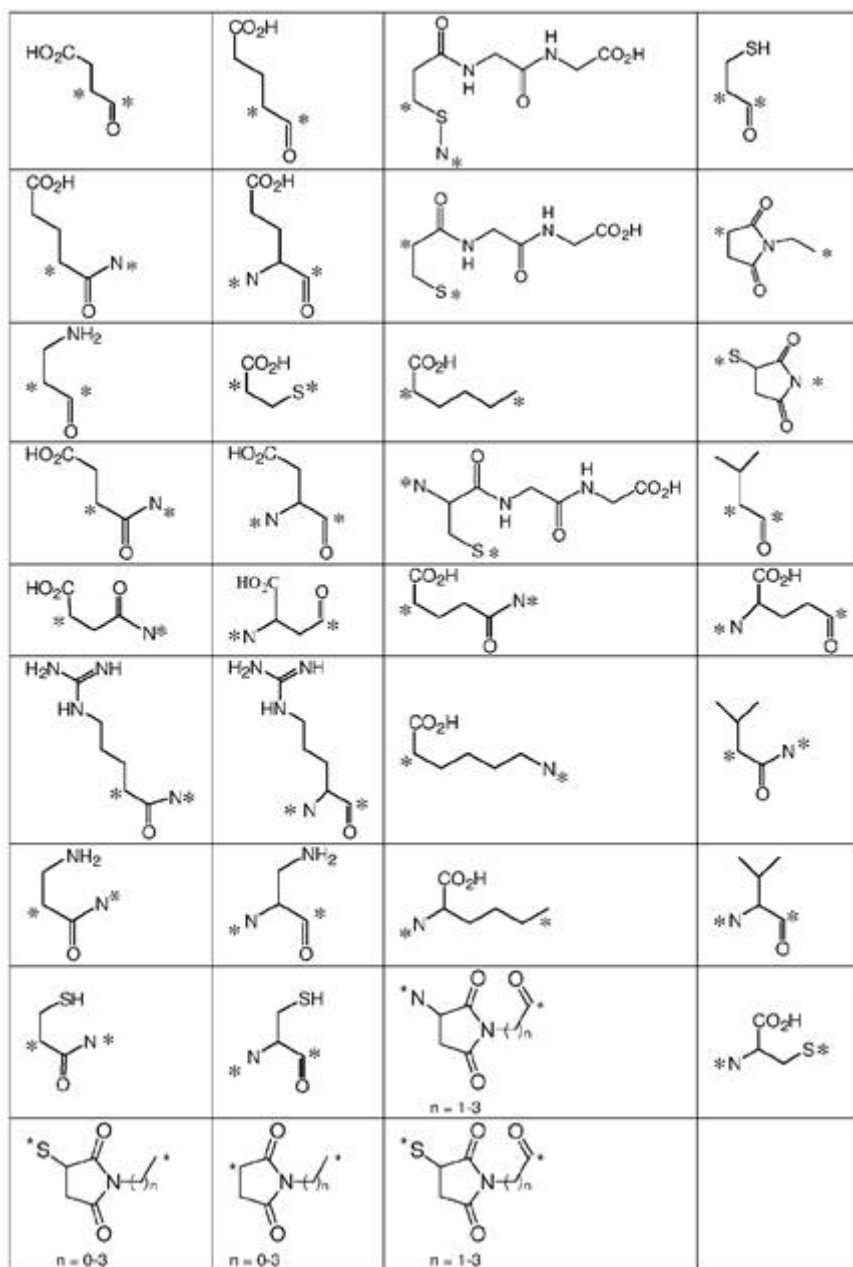


[1357] 其中n是0至200的整数。在另一个实施方案中,n可以是0至150、0至110、0至100、0至90、0至80、0至70、0至60、0至50、0至40、0至30、0至20、0至15、0至14、0至13、0至12、0至11、0至10、0至9、0至8、0至7、0至6、0至5、0至4、0至3、0至2、0至1、15至16、15至17、15至18、15至19、15至20、15至21、15至22、15至23、15至24、15至25、15至26、15至27、15至28、15至29、15至30、15至31、15至32、15至33、15至34、15至35、15至36、15至37、15至38、15至39、15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的整数,或n可以是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。

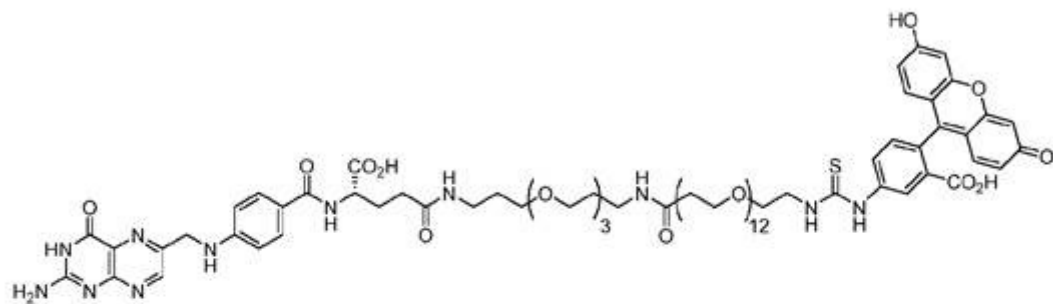
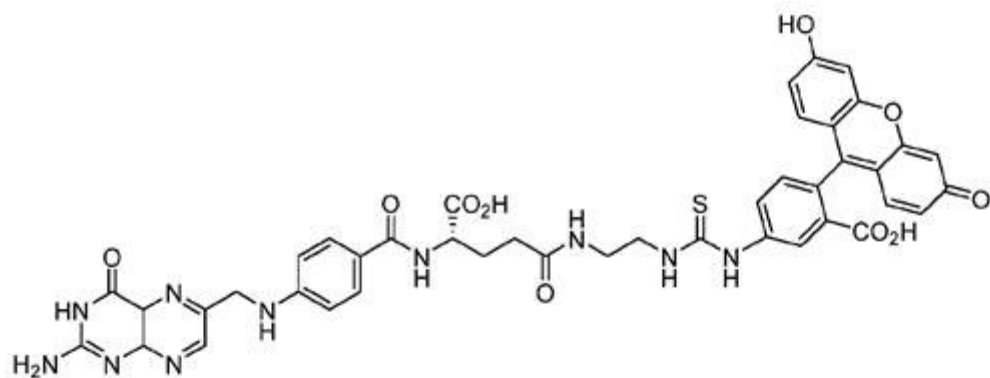
[1358] 在另一个实施方案中,所述接头可以是可包括一个或多个间隔物的二价接头。说明性的间隔物显示在下表中。描述了下述非限制性的、说明性的间隔物,其中* 指示与小分子配体或靶向部分或其他二价接头部分的连接点。



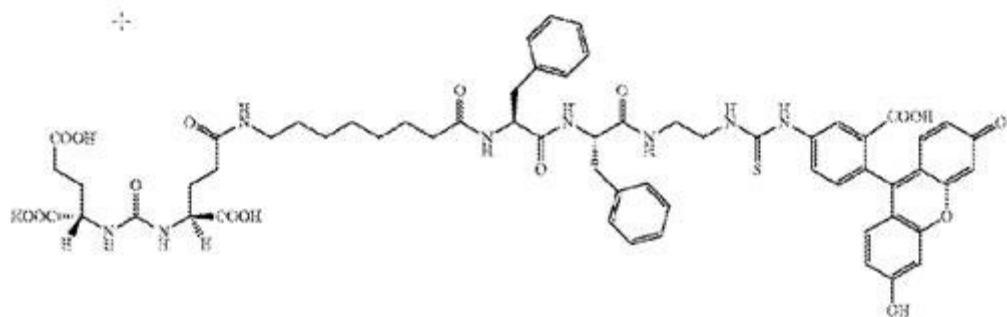
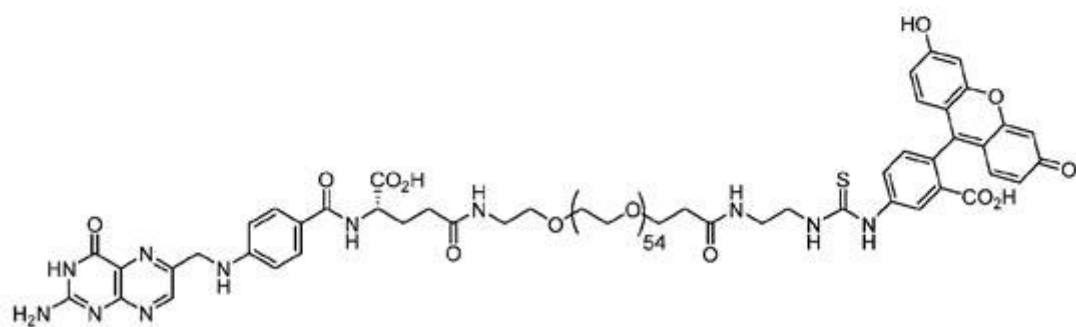
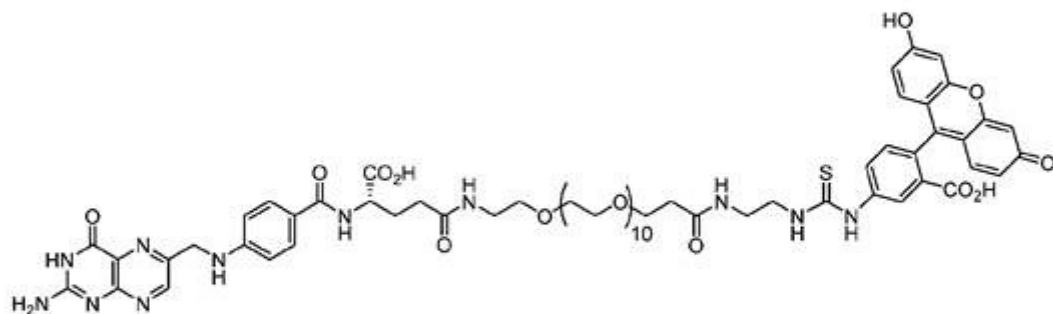
[1360]



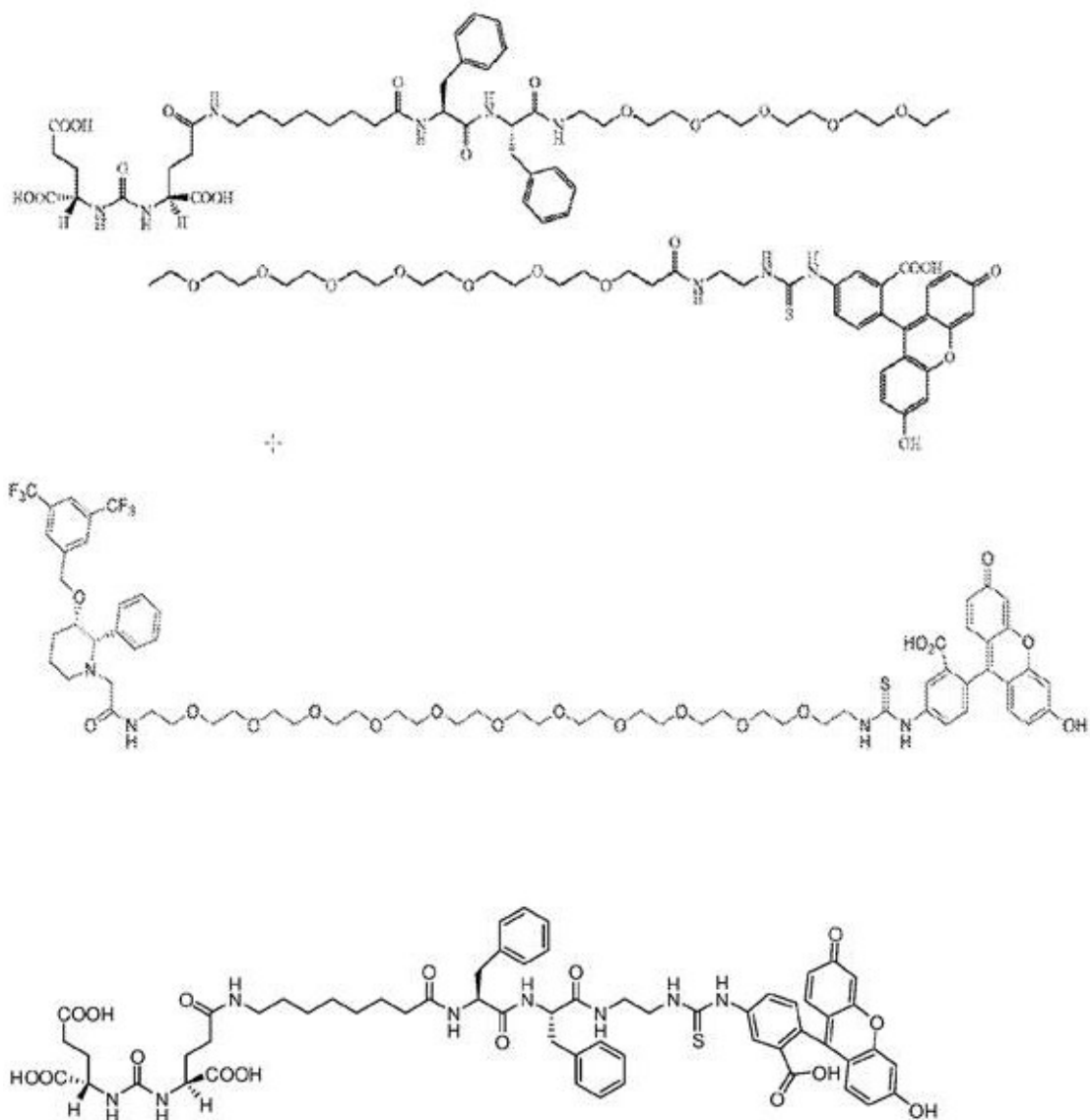
[1361] 在其他实施方案中,与靶向部分连接的小分子配体(桥)可以具有以下结构中的任一种。

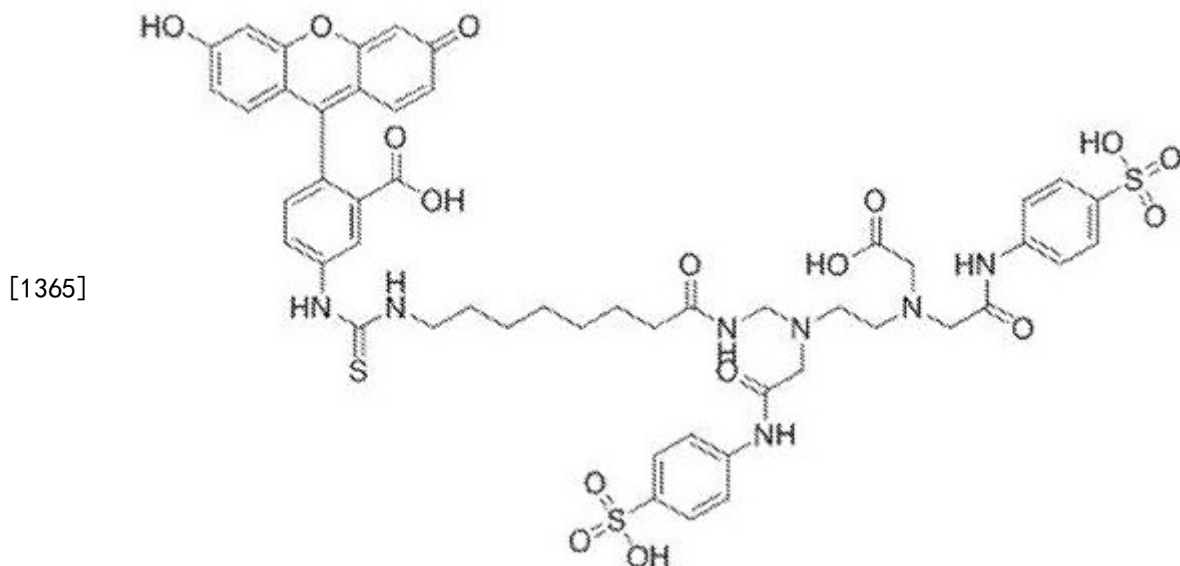


[1362]



[1363]





[1366] 在其他实施方案中,所述化合物或其药学上可接受的盐不是抗体,且不包含抗体的片段。在又一个实施方案中,所述靶向部分不包含肽表位。

[1367] 在一个说明性实施方案中,通过接头与靶向部分连接的小分子配体(桥)包含与所述小分子配体连接的异硫氰酸荧光素(FITC)。在一个方面,所述癌症可以过表达所述小分子配体的受体。在另一个方面,例如,可以转化细胞毒性T细胞或另一种类型的T细胞以表达包含抗-FITC scFv的CAR。在该方面,由于小分子配体与癌症的结合,所述CAR可以靶向用FITC分子装饰癌症的FITC。因此,可以避免对正常的非靶细胞的毒性。在该实施方案中,当表达抗-FITC CAR的T细胞结合FITC时,所述CAR T细胞被活化且所述癌症被改善。

[1368] 涵盖通过接头与靶向部分连接的小分子配体的“药学上可接受的盐”。如本文所用,术语“药学上可接受的盐”是指其抗衡离子可以用在药物中的盐。在各个实施方案中,此类盐包括,但不限于:1)酸加成盐,其可以通过母体化合物的游离碱与无机酸(诸如盐酸、氢溴酸、硝酸、磷酸、硫酸和高氯酸等)或与有机酸(诸如乙酸、草酸、(D)或(L)苹果酸、马来酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸或丙二酸等)的反应获得;或2)当存在于母体化合物中的酸性质子被金属离子(例如,碱金属离子、碱土金属离子或铝离子)替换或与有机碱(诸如乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、氨丁三醇、N-甲基葡萄糖胺等)配位时形成的盐。药学上可接受的盐是本领域技术人员众所周知的,且任何这种药学上可接受的盐与本文描述的实施方案关联地被涵盖。

[1369] 在各个实施方案中,从形成无毒盐的酸形成合适的酸加成盐。说明性实例包括乙酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、碳酸氢盐/碳酸盐、硫酸氢盐/硫酸盐、硼酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、乙二磺酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、葡萄糖酸盐、葡萄糖醛酸盐、六氟磷酸盐、羟苯酰苯酸盐、盐酸盐/氯化物、氢溴酸盐/溴化物、氢碘酸盐/碘化物、羟乙基磺酸盐、乳酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、甲基硫酸盐、萘酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、乳清酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、扑酸盐、磷酸盐/磷酸氢盐/磷酸二氢盐、蔗糖酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、甲苯磺酸盐和三氟乙酸盐。

[1370] 在各个实施方案中,从形成无毒盐的碱形成合适的碱盐。说明性实例包括精氨酸、苄星青霉素、钙、胆碱、二乙胺、二乙醇胺、甘氨酸、赖氨酸、镁、葡甲胺、乙醇胺(olamine)、钾、钠、氨丁三醇和锌的盐。也可以形成酸和碱的半盐,例如,半硫酸盐和半钙盐。

[1371] 在一个说明性方面,本文描述的化合物或其药学上可接受的盐可以含有一个或多个手性中心,或可以另外能够作为多种立体异构体存在。因此,各个实施方案可以包括纯的立体异构体以及立体异构体的混合物,诸如对映异构体、非对映异构体和对映异构地或非对映异构地富集的混合物。在一个方面,本文描述的化合物或其药学上可接受的盐可以能够作为几何异构体存在。因此,各个实施方案可以包括纯的几何异构体或几何异构体的混合物。

[1372] 在一些方面,本文描述的化合物或其药学上可接受的盐可以以未溶剂化形式以及溶剂化形式(包括水合形式)存在。一般而言,所述溶剂化形式与未溶剂化形式等效且被涵盖于本发明范围内。

[1373] 本文所述的方法也利用被工程改造成表达嵌合抗原受体(CAR)的T淋巴细胞(例如,细胞毒性T淋巴细胞),所述嵌合抗原受体识别和结合所述桥的靶向部分(例如,FITC、DNP或TNP)。在一个实施方案中,本文描述的CAR包含三个结构域,其包括:1)特异性地识别和结合靶向部分的识别区域(例如,抗体的单链片段可变(scFv)区域、Fab片段等),2)增强T淋巴细胞的增殖和存活的共刺激结构域,和3)生成T淋巴细胞活化信号的活化信号传导结构域。

[1374] 在各个方面,作为非限制性实例,可以使用结合叶酸、DUPA、CAIX配体、NK-1R配体、 γ 谷氨酰基转肽酶的配体、NKG2D配体或CCK2R配体的抗体的scFv区域。在说明性非限制性实施方案中,可以从以下物质制备scFv区域:(i)本领域已知的结合靶向部分的抗体,(ii)使用选择的靶向部分(诸如半抗原)新制备的抗体,和(iii)从此类抗体的scFv区域衍生出的序列变体,例如,与衍生它们的scFv区域的氨基酸序列具有至少约80%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或至少约99.5%序列同一性的scFv区域。

[1375] 在一个方面,所述共刺激结构域用于在CAR与靶向部分结合后增强细胞毒性T淋巴细胞的增殖和存活。合适的共刺激结构域包括,但不限于,CD28,CD137 (4-1BB),肿瘤坏死因子(TNF)受体家族的成员,CD134 (OX40),受体的TNFR-超家族的成员,CD27,CD30,CD150,DAP10,NKG2D和CD278 (ICOS),在活化的T细胞上表达的CD28-超家族共刺激性分子,或它们的组合。技术人员会理解,在不会不利地影响本发明的情况下可以使用这些共刺激结构域的序列变体,其中所述变体具有与在其上建模它们的结构域相同或类似的活性。在各个实施方案中,此类变体可以与衍生它们的结构域的氨基酸序列具有至少约80%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或至少约99.5%序列同一性。

[1376] 在一个说明性实施方案中,所述活化信号传导结构域用于在CAR与靶向部分结合后活化淋巴细胞(例如,细胞毒性T淋巴细胞)。在各个实施方案中,合适的活化信号传导结构域包括T细胞CD3 ζ 链、CD3 ζ 受体蛋白、mb1受体蛋白、B29受体蛋白和Fc受体 γ 。技术人员会理解,可以使用这些活化信号传导结构域的序列变体,其中所述变体具有与在其上建模它们的结构域相同或类似的活性。在各个实施方案中,所述变体与衍生它们的结构域的氨基酸序列具有至少约80%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或至少约99.5%序列同一性。

[1377] 在一个方面,使用基因工程改造技术制备编码CAR的构建体。此类技术详细地描述

在Sambrook等人, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 第3版, Cold SpringHarbor Laboratory Press, (2001) (通过引用并入本文), 和Green和Sambrook, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 第4版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2012) (通过引用并入本文)。

[1378] 作为实例, 可以制备编码融合蛋白的质粒或病毒表达载体 (例如, 慢病毒载体、逆转录病毒载体、睡美人 (sleeping beauty) 和piggyback (包括非病毒介导的CAR基因递送系统的转座子/转座酶系统)), 所述融合蛋白包含在框架内且在5' 至3' 方向连接的识别区域、一个或多个共刺激结构域和活化信号传导结构域。在其他实施方案中, 其他排列是可接受的, 且包括识别区域、活化信号传导结构域和一个或多个共刺激结构域。在一个实施方案中, 所述识别区域在融合蛋白中的布置通常将使得实现所述区域在细胞外部的展示。在一个实施方案中, 所述CAR可以包括额外的元件, 诸如确保融合蛋白向细胞表面的适当输出的信号肽 (例如, CD8 α 信号肽), 确保将融合蛋白维持为嵌膜蛋白 (例如, CD8 α 跨膜结构域、CD28跨膜结构域或CD3 ζ 跨膜结构域) 的跨膜结构域, 和给识别区域赋予柔性并允许与靶向部分的强烈结合的铰链结构域 (例如, CD8 α 铰链)。

[1379] 一种示例性CAR的简图显示在图5中, 其中将融合蛋白序列并入慢病毒表达载体中, 且其中“SP”是信号肽, 所述CAR是抗-FITC CAR, CD8 α 铰链和CD8 α 跨膜结构域存在, 所述共刺激结构域是4-1BB, 且所述活化信号传导结构域是CD3 ζ 。CAR插入物的示例性核酸序列作为SEQ ID NO:1和3提供, 且编码的氨基酸序列作为SEQ ID NO:2提供。在又一个实施方案中, SEQ ID NO:2可以包含人源化或人氨基酸序列或由人源化或人氨基酸序列组成。

[1380] 在一个实施方案中, 所述CAR具有识别区域且所述识别区域是抗-FITC抗体的单链片段可变 (scFv) 区域, 具有共刺激结构域且所述共刺激结构域是CD137 (4-1BB), 具有活化信号传导结构域且所述活化信号传导结构域是T细胞CD3 ζ 链。技术人员众所周知, 抗-FITC scFv和抗-荧光素scFv是等同的术语。

[1381] 在一个实施方案中, 通过用编码CAR构建体的表达载体转染T淋巴细胞群体, 可以将T淋巴细胞 (例如, 细胞毒性T淋巴细胞) 遗传工程改造成表达CAR构建体。用于制备转导的T淋巴细胞 (其表达选择的CAR构建体) 的群体的合适方法是技术人员众所周知的, 且描述在Sambrook等人, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 第3版, Cold SpringHarbor Laboratory Press, (2001) (通过引用并入本文) 和Green和Sambrook, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 第4版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2012) (通过引用并入本文)。

[1382] 在一些实施方案中, 提供了包含SEQ ID NO:1或3的核酸的CAR T细胞。在另一个实施方案中, 提供了包含SEQ ID NO:2的多肽的CAR T细胞。在另一个说明性方面, 提供了核酸 (例如, 分离的核酸), 其包含SEQ ID NO:1或3且编码嵌合抗原受体。在又一个实施方案中, 提供了包含SEQ ID NO:2的嵌合抗原受体多肽。在另一个实施方案中, 提供了包含SEQ ID NO:1或3的载体。在另一个方面, 提供了包含SEQ ID NO:1或3的慢病毒载体。在又一个实施方案中, SEQ ID NO:2可以包含人源化或人氨基酸序列或由人源化或人氨基酸序列组成。

[1383] 在这些实施方案中的每一个中, 涵盖与SEQ ID NO:1至3具有至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或至少约99.5%序列同一性的变体核酸序列或氨基酸序列。在另一个实施方案中, 所述核酸序列可以是与SEQ ID NO:1或2具有至

少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或至少约99.5%序列同一性的变体核酸序列,只要所述变体序列编码SEQ ID NO:2的多肽。在另一个实施方案中,所述核酸序列或氨基酸序列可以是沿着SEQ ID NO:2的200个核酸的段、沿着200个氨基酸的段与SEQ ID NO:1或3具有至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或至少约99.5%序列同一性的变体核酸或氨基酸序列。例如,在一个实施方案中,通过使用GAP程序(Genetics Computer Group, 软件;现在可由Accelrys在<http://www.accelrys.com>上得到),可以完成序列之间的同一性或相似性百分比的确定;并且使用例如ClustalW算法(VNTI软件, InforMax Inc.)可以完成比对。使用目标核酸或氨基酸序列可以检索序列数据库。数据库检索算法通常是基于BLAST软件(Altschul等人, 1990)。在一些实施方案中,可以沿着核酸或氨基酸序列的全长确定同一性百分比。

[1384] 也在本发明范围内的是,与由SEQ ID NO:1和3代表的核酸互补的核酸,和与由SEQ ID NO:1和3代表的核酸杂交的那些,或高严谨条件下与其补体杂交的那些。根据本发明,“高严谨条件”意指在5X SSPE和50%甲酰胺中在65℃杂交,和在0.5X SSPE中在65℃洗涤。用于高严谨性、低严谨性和中严谨杂交的条件描述在Sambrook等人, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001) (通过引用并入本文)和Green和Sambrook, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 4th Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2012) (通过引用并入本文)。在一些说明性方面,杂交沿着核酸的全长发生。

[1385] 在一个实施方案中,在本文所述的方法中使用的T淋巴细胞(例如,用于制备CAR T细胞的细胞毒性T淋巴细胞或未转化的T细胞)可以是自体细胞,尽管还可以使用异源细胞,诸如当所治疗的患者已经接受高剂量化学疗法或辐射治疗以破坏患者的免疫系统时。在一个实施方案中,可以使用同种异体细胞。

[1386] 在一个方面,所述T淋巴细胞可以通过本领域众所周知的方式获得自患者。例如,可以如下获得T淋巴细胞(例如,细胞毒性T细胞或未转化的T细胞):从患者收集外周血,对所述血液进行Ficoll密度梯度离心,且然后使用阴性T细胞分离试剂盒(诸如EasySep™ T细胞分离试剂盒)来从外周血分离T细胞群体。在一个说明性实施方案中,T淋巴细胞(例如,细胞毒性T细胞或未转化的T细胞)的群体不需要是纯的,且可能含有其他细胞诸如其他类型的T细胞(例如,在细胞毒性T细胞的情况下)、单核细胞、巨噬细胞、天然杀伤细胞和B细胞。在一个方面,所收集的群体可以包含至少约90%的选择的细胞类型,至少约91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的选择的细胞类型。

[1387] 在一个实施方案中,在获得T淋巴细胞(例如,用于制备CAR T细胞的细胞毒性T细胞)之后,在促进所述细胞的活化的条件下培养所述细胞。在该实施方案中,所述培养条件可以使得,可以将所述细胞施用于患者,无需担心对培养基的组分的反应性。例如,培养条件可以不包括牛血清产品,诸如牛血清白蛋白。在一个说明性方面,通过将已知的活化剂(诸如在细胞毒性T细胞的情况下,抗-CD3抗体)引入培养基中,可以实现活化。其他合适的活化剂包括抗-CD28抗体。在一个方面,可以将淋巴细胞群体在促进活化的条件下培养约1至约4天。在一个实施方案中,通过细胞大小、增殖速率或活化标志物(通过流式细胞术确定)可以确定适当的活化水平。

[1388] 在一个说明性实施方案中,已经在促进活化的条件下培养T淋巴细胞(例如,用于

制备CAR T细胞的细胞毒性T细胞)的群体之后,可以用编码CAR的表达载体转染所述细胞。上面描述了用于各个实施方案中的合适的载体和转染方法。在一个方面,在转染之后,可以立即将细胞施用于患者,或可以将细胞培养至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18天或更多天,或约5和约12天之间,约6和约13天之间,约7和约14天之间,或约8和约15天之间,例如,以允许所述细胞从转染恢复的时间。在一个方面,合适的培养条件可以类似于用于在有或没有用于促进活化的试剂的情况下培养所述细胞进行活化的条件。

[1389] 因此,如上所述,在一个说明性方面,本文描述的治疗方法可以进一步包括:1)获得自体或异源T淋巴细胞(例如,用于制备CAR T细胞的细胞毒性T细胞)的群体,2)在促进所述细胞的活化的条件下培养所述T淋巴细胞,和3)用编码CAR的表达载体转染所述淋巴细胞以形成CAR T细胞。

[1390] 在一个说明性实施方案中,当已经将所述细胞转染和活化时,可以制备包含CAR T细胞的组合物并与或不与未转化的T细胞一起施用于患者。在一个实施方案中,可以使用缺乏任何动物产品(诸如牛血清)的培养基以培养CAR T细胞和/或未转化的T细胞。在另一个实施方案中,可以使用这样的组织培养条件:其通常被技术人员使用以避免细菌、真菌和支原体的污染。在一个示例性实施方案中,在施用于患者之前,将所述细胞(例如,CAR T细胞和/或未转化的T细胞)沉淀、洗涤和重新悬浮于药学上可接受的载体或稀释剂中。包含表达CAR的T淋巴细胞(例如,细胞毒性T淋巴细胞)或未转化的T细胞的示例性组合物包括包含在无菌的290 mOsm盐水中、在可输注的冷冻介质(cryomedia)(含有Plasma-Lyte A、右旋糖、氯化钠注射、人血清白蛋白和DMSO)中、在含有2%人血清白蛋白的0.9%NaCl中或在任何其他无菌290 mOsm可输注物质中的细胞的组合物。或者,在另一个实施方案中,取决于培养基的身份,所述CAR T细胞或未转化的T细胞可以在培养基中作为组合物施用,或进行浓缩并重新悬浮在培养基中,然后施用。在各个实施方案中,经由任何合适的方式,诸如胃肠外施用,例如,真皮内、皮下、肌肉内、腹膜内、静脉内或鞘内,可以将CAR T细胞组合物与或不与未转化的T细胞施用于患者。

[1391] 在一个方面,在施用于患者的组合物中的CAR T细胞的总数和所述细胞的浓度将随许多因素而变化,所述因素包括所使用的T淋巴细胞(例如,细胞毒性T淋巴细胞)的类型、CAR的结合特异性、靶向部分和小分子配体的身份、癌症的身份、癌症在患者中的位置、用于将组合物施用于患者的方式和所治疗的患者的健康、年龄和重量。在各个实施方案中,包含转导的CAR T细胞的合适组合物包括具有约0.1 ml至约200 ml和约0.1 ml至约125ml的体积的那些。

[1392] 在各个实施方案中,向所述患者施用的转导的CAR T细胞可以包含约 1×10^5 至约 1×10^{15} 或 1×10^6 至约 1×10^{15} 个转导的CAR T细胞。在各个实施方案中,可以向所述患者施用约 1×10^5 至约 1×10^{10} 、约 1×10^6 至约 1×10^{10} 、约 1×10^6 至约 1×10^9 、约 1×10^6 至约 1×10^8 、约 1×10^6 至约 2×10^7 、约 1×10^6 至约 3×10^7 、约 1×10^6 至约 1.5×10^7 、约 1×10^6 至约 1×10^7 、约 1×10^6 至约 9×10^6 、约 1×10^6 至约 8×10^6 、约 1×10^6 至约 7×10^6 、约 1×10^6 至约 6×10^6 、约 1×10^6 至约 5×10^6 、约 1×10^6 至约 4×10^6 、约 1×10^6 至约 3×10^6 、约 1×10^6 至约 2×10^6 、约 2×10^6 至约 6×10^6 、约 2×10^6 至约 5×10^6 、约 3×10^6 至约 6×10^6 、约 4×10^6 至约 6×10^6 、约 4×10^6 至约 1×10^7 、约 1×10^6 至约 1×10^7 、约 1×10^6 至约 1.5×10^7 、约 1×10^6 至约 2×10^7 、约 0.2×10^6 至约 1×10^7 、约 0.2×10^6 至约 $1.5 \times$

10^7 、约 0.2×10^6 至约 2×10^7 或约 5×10^6 个CAR T细胞。在一个方面,在本文所述的任一实施方案中,可以向所述患者施用单个剂量或多个剂量的CAR T细胞。在该段落中描述的任何实施方案中,CAR T细胞剂量可以是每kg患者体重的CAR T细胞的数量。在本文所述的任一实施方案中,可以在所述化合物或其药学上可接受的盐之前施用CAR T细胞。如所理解,除非另有说明,否则本文所述的任一方法的步骤的名称i)、ii)和iii)等不表示顺序。

[1393] 在本文所述的各个实施方案中,未转化的T细胞也可以与CAR T细胞一起施用,并且可以本文针对CAR T细胞和未转化的T细胞所述的量施用。在一个方面,可以一次或多次施用CAR T细胞和未转化的T细胞的混合物,或者可以施用多个剂量的纯CAR T细胞以及CAR T细胞和未转化的T细胞的混合物的组合(例如,一个剂量的CAR T细胞,随后为一个或多个剂量的CAR T细胞和未转化的T细胞的混合物)。如技术人员从本文的公开内容清楚的是,如本文所述的CAR T细胞和未转化的T细胞的混合物意味着将CAR T细胞与未暴露于用于表达嵌合抗原受体的构建体的未转化的T细胞混合。

[1394] 在其他实施方案中,在所述CAR T细胞组合物中施用于所述患者的CAR T细胞的剂量选自约100万、约200万、约300万、约400万、约500万、约600万、约700万、约800万、约900万、约1000万、约1100万、约1200万、约1250万、约1300万、约1400万和约1500万个CAR T细胞。在这些实施方案中,CAR T细胞剂量可以是每kg患者体重的CAR T细胞的数量。

[1395] 在还有其他说明性实施方案中,所述CAR T细胞组合物通过注射入患者的血流来施用,且患者的血流中的CAR T细胞是到注射CAR T细胞组合物后约四周的患者血液中的患者的总T细胞的至少5%、至少7%、至少10%、至少11%、至少12%、至少13%、至少14%或至少15%,到注射CAR T细胞组合物后约3周的至少20%、25%、30%、35%、40%或50%,到注射CAR T细胞组合物后约2周的至少60%、65%、70%、75%或80%,或到注射CAR T细胞组合物后约1周的至少85%、90%或95%。

[1396] 在本文所述的实施方案中,CAR T细胞组合物可以包含不具有任何其他细胞类型的CAR T细胞,或者可以将未转化的T细胞与CAR T细胞组合施用于患者。对于其中施用多个剂量的CAR T细胞组合物的实施方案,任何剂量可以包含CAR T细胞或CAR T细胞和未转化的T细胞的混合物。在各个实施方案中,可以以本文针对CAR T细胞所述的量施用未转化的T细胞。

[1397] 在另一个实施方案中,任何剂量的CAR T细胞组合物可以包含选自以下的比率的CAR T细胞和未转化的T细胞的混合物:约1:5的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:4的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:3的CAR T细胞:未转化的T细胞,约1:2的CAR T细胞:未转化的T细胞,和约1:1的CAR T细胞:未转化的T细胞。

[1398] 在还有其他实施方案中,任何剂量的CAR T细胞组合物可以包含以下比率的CAR T细胞和未转化的T细胞的混合物:约1:1至约1:5的CAR T细胞:未转化的T细胞,或者所述CAR T细胞组合物可以包含约1000万个CAR T细胞和约4000万个未转化的T细胞、约1500万个CAR T细胞和约3500万个未转化的T细胞、约2000万个CAR T细胞和约3000万个未转化的T细胞或约2500万个CAR T细胞和约2500万个未转化的T细胞的混合物。

[1399] 使用本领域已知的任何合适方法,可以将本文描述的化合物或其药学上可接受的盐或CAR T细胞组合物施用于患者。如本文所述,术语“施用(administering)”或“施用(administered)”包括将所述化合物或其药学上可接受的盐或CAR T细胞组合物引入患者

中的所有方式,包括、但不限于,口服、静脉内、肌肉内、皮下、经皮等。在一个方面,可以在含有常规的无毒的药理学上可接受的载体、佐剂和媒介物的单位剂型和/或制剂中施用本文描述的化合物或其药理学上可接受的盐。

[1400] 在一个方面,可以将如本文所述的化合物或其药理学上可接受的盐或CAR T细胞组合物直接施用至血流中、肌肉中或内部器官中。在各个实施方案中,用于这种胃肠外施用的合适途径包括静脉内、动脉内、腹膜内、鞘内、硬膜外、脑室内、尿道内、胸骨内、颅内、肿瘤内、肌肉内和皮下递送。在一个实施方案中,用于胃肠外施用的方式包括针头(包括微针)注射器、无针注射器和输注技术。

[1401] 在一个说明性方面,胃肠外制剂通常是水溶液,其可以含有载体或赋形剂诸如盐、碳水化合物和缓冲剂(优选地在3-9的pH),但它们可以更合适地配制为无菌的非水性溶液或待与合适的媒介物(诸如无菌的、无热原的水或无菌的盐水)结合使用的干燥形式。在其他实施方案中,本文描述的任何液体制剂可以适合用于如本文所述的胃肠外施用。使用本领域技术人员众所周知的标准制药技术,可以容易地完成在无菌条件下的制备,对于胃肠外制剂通过冻干法来生产无菌的冻干的粉末。在一个实施方案中,通过使用适当的制剂技术,诸如增溶剂的掺入,可以增加在胃肠外制剂的制备中使用的化合物或其药理学上可接受的盐的溶解度。

[1402] 待施用于患者的化合物或其药理学上可接受的盐的量可以显著地变化,其取决于所治疗的癌症、化合物或其药理学上可接受的盐的施用途径和组织分布。待施用于患者的量可以基于体表面积、质量和医师评价。在各个实施方案中,待施用的量可以范围例如,约0.05 mg至约30 mg、约0.05 mg至约25.0 mg、约0.05 mg至约20.0 mg、约0.05 mg至约15.0 mg、约0.05 mg至约10.0 mg、约0.05 mg至约9.0 mg、约0.05 mg至约8.0 mg、约0.05 mg至约7.0 mg、约0.05 mg至约6.0 mg、约0.05 mg至约5.0 mg、约0.05 mg至约4.0 mg、约0.05 mg至约3.0 mg、约0.05 mg至约2.0 mg、约0.05 mg至约1.0 mg、约0.05 mg至约0.5 mg、约0.05 mg至约0.4 mg、约0.05 mg至约0.3 mg、约0.05 mg至约0.2 mg、约0.05 mg至约0.1 mg、约0.01 mg至约2 mg、约0.3 mg至约10 mg、约0.1 mg至约20 mg、或约0.8至约3 mg。本领域技术人员会容易地认识到,所述剂量可以基于上面指出的因素在上面提供的各种范围内变化,且可以根据医师的判断。

[1403] 在其他实施方案中,所述化合物或其药理学上可接受的盐的剂量可以范围例如约50 nmol/kg至约3000 nmol/kg患者体重,约50 nmol/kg至约2000 nmol/kg、约50 nmol/kg至约1000nmol/kg、约50 nmol/kg至约900 nmol/kg、约50 nmol/kg至约800nmol/kg、约50 nmol/kg至约700 nmol/kg、约50 nmol/kg至约600nmol/kg、约50 nmol/kg至约500 nmol/kg、约50 nmol/kg至约400nmol/kg、约50 nmol/kg至约300 nmol/kg、约50 nmol/kg至约200nmol/kg、约50 nmol/kg至约100 nmol/kg、约100 nmol/kg至约300 nmol/kg、约100nmol/kg至约500 nmol/kg、约100 nmol/kg至约1000 nmol/kg、约100 nmol/kg至约2000 nmol/kg患者体重。在其他实施方案中,所述剂量可以是约1nmol/kg、约5 nmol/kg、约10 nmol/kg、约20 nmol kg、约25nmol/kg、约30 nmol/kg、约40 nmol/kg、约50 nmol/kg、约60nmol/kg、约70 nmol/kg、约80 nmol/kg、约90 nmol/kg、约100nmol/kg、约150 nmol/kg、约200 nmol/kg、约250 nmol/kg、约300 nmol/kg、约350 nmol/kg、约400nmol/kg、约450 nmol/kg、约500 nmol/kg、约600 nmol/kg、约700 nmol/kg、约800 nmol/kg、约900nmol/kg、

约1000 nmol/kg、约2000 nmol/kg、约2500 nmol/kg或约3000 nmol/kg患者体重。在还有其
他实施方案中,所述剂量可以是约0.1 nmol/kg、约0.2 nmol/kg、约0.3nmol/kg、约0.4
nmol kg或约0.5 nmol/kg、约0.1 nmol/kg至约1000 nmol/kg、约0.1 nmol/kg至约
900nmol/kg、约0.1 nmol/kg至约850 nmol/kg、约0.1 nmol/kg至约800 nmol/kg、约0.1
nmol/kg至约700nmol/kg、约0.1 nmol/kg至约600 nmol/kg、约0.1 nmol/kg至约500 nmol/
kg、约0.1 nmol/kg至约400nmol/kg、约0.1 nmol/kg至约300 nmol/kg、约0.1 nmol/kg至约
200 nmol/kg、约0.1 nmol/kg至约100nmol/kg、约0.1 nmol/kg至约50 nmol/kg、约0.1
nmol/kg至约10 nmol/kg或约0.1nmol/kg至约1 nmol/kg患者体重。在其他实施方案中,所
述剂量可以是约0.3 nmol/kg至约1000 nmol/kg、约0.3 nmol/kg至约900nmol/kg、约0.3
nmol/kg至约850 nmol/kg、约0.3 nmol/kg至约800 nmol/kg、约0.3 nmol/kg至约700nmol/
kg、约0.3 nmol/kg至约600 nmol/kg、约0.3 nmol/kg至约500 nmol/kg、约0.3 nmol/kg至
约400nmol/kg、约0.3 nmol/kg至约300 nmol/kg、约0.3 nmol/kg至约200 nmol/kg、约0.3
nmol/kg至约100nmol/kg、约0.3 nmol/kg至约50 nmol/kg、约0.3 nmol/kg至约10 nmol/kg
或约0.3nmol/kg至约1 nmol/kg患者体重。在这些实施方案中,“kg”是患者体重的千克数。
在一个方面,可以向所述患者施用单个剂量或多个剂量的化合物或其药学上可接受的盐。

[1404] 在各个其他实施方案中,所述化合物或其药学上可接受的盐的剂量可以范围为例
如约10 nmol/kg至约10000 nmol/kg、约10 nmol/kg至约5000 nmol/kg、约10 nmol/kg至约
3000nmol/kg、约10 nmol/kg至约2500 nmol/kg、约10 nmol/kg至约2000nmol/kg、约10
nmol/kg至约1000 nmol/kg、约10 nmol/kg至约900nmol/kg、约10 nmol/kg至约800 nmol/
kg、约10 nmol/kg至约700nmol/kg、约10 nmol/kg至约600 nmol/kg、约10 nmol/kg至约
500nmol/kg、约10 nmol/kg至约400 nmol/kg、约10 nmol/kg至约300nmol/kg、约10 nmol/
kg至约200 nmol/kg、约10 nmol/kg至约150nmol/kg、约10 nmol/kg至约100 nmol/kg、约10
nmol/kg至约90nmol/kg、约10 nmol/kg至约80 nmol/kg、约10 nmol/kg至约70nmol/kg、约
10 nmol/kg至约60 nmol/kg、约10 nmol/kg至约50nmol/kg、约10 nmol/kg至约40 nmol/
kg、约10 nmol/kg至约30nmol/kg、约10 nmol/kg至约20 nmol/kg、约200 nmol/kg至约900
nmol/kg、约200nmol/kg至约800 nmol/kg、约200 nmol/kg至约700 nmol/kg、约200 nmol/
kg至约600 nmol/kg、约200nmol/kg至约500 nmol/kg、约250 nmol/kg至约600 nmol/kg、约
300 nmol/kg至约600 nmol/kg、约300nmol/kg至约500 nmol/kg或约400 nmol/kg至约600
nmol/kg患者体重。在各个其他实施方案中,所述化合物或其药学上可接受的盐的剂量可以
范围为例如约1nmol/kg至约10000 nmol/kg、约1 nmol/kg至约5000 nmol/kg、约1 nmol/kg
至约3000 nmol/kg、约1 nmol/kg至约2500 nmol/kg、约1 nmol/kg至约2000 nmol/kg、约1
nmol/kg至约1000 nmol/kg、约1 nmol/kg至约900 nmol/kg、约1 nmol/kg至约800 nmol/
kg、约1 nmol/kg至约700 nmol/kg、约1 nmol/kg至约600 nmol/kg、约1 nmol/kg至约500
nmol/kg、约1 nmol/kg至约400 nmol/kg、约1 nmol/kg至约300 nmol/kg、约1 nmol/kg至约
200 nmol/kg、约1 nmol/kg至约150 nmol/kg、约1 nmol/kg至约100 nmol/kg、约1 nmol/kg
至约90 nmol/kg、约1 nmol/kg至约80 nmol/kg、约1 nmol/kg至约70 nmol/kg、约1 nmol/
kg至约60 nmol/kg、约1 nmol/kg至约50 nmol/kg、约1 nmol/kg至约40 nmol/kg、约1
nmol/kg至约30 nmol/kg, or about 1 nmol/kg至约20 nmol/kg。在这些实施方案中,“kg”
是患者体重的千克数。在一个方面,可以向所述患者施用单个剂量或多个剂量的化合物或

其药学上可接受的盐。

[1405] 在另一个实施方案中,将约20 ug/kg患者体重至约3 mg/kg患者体重的化合物或其药学上可接受的盐施用于患者。在另一个方面,量可以是约0.2mg/kg患者体重至约0.4 mg/kg患者体重,或可以是约50 ug/kg患者体重。在一个方面,可以将单个剂量或多个剂量的化合物或其药学上可接受的盐施用于患者。

[1406] 在一个实施方案中,可以将与靶向部分连接的小分子配体在CAR T细胞组合物之前施用于患者。在另一个实施方案中,可以将与靶向部分连接的小分子配体与CAR T细胞组合物同时、但是在不同的制剂中或在相同的制剂中施用于患者。在又另一个实施方案中,可以将与靶向部分连接的小分子配体在CAR T细胞组合物之后施用于患者。

[1407] 在一个说明性方面,CAR T细胞和与靶向部分连接的小分子的施用之间的时机可以宽泛地变化,其取决于包括以下的因素:所使用的CAR T细胞的类型、CAR的结合特异性、靶向部分和小分子配体的身份、癌症的身份、癌症在患者中的位置、用于将CAR T细胞和与靶向部分连接的小分子配体施用于患者的方式、以及患者的健康、年龄和重量。在一个方面,可以在CAR T细胞之前或之后施用与靶向部分连接的小分子配体,诸如在约3、6、9、12、15、18、21、24、27、30、33、36、39、42、45、48或51小时内,或在约0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9、10或更多天内。

[1408] 在一个实施方案中,本领域已知的任何适用的给药时间表均可用于施用所述化合物或其药学上可接受的盐,或CAR T细胞组合物。例如,可以使用每天1次给药(又名qd)、每天2次给药(又名bid)、每天3次给药(又名tid)、每周2次给药(又名BIW)、每周3次给药(又名TIW)、每周1次给药等。在一个方面,对于所述化合物或其药学上可接受的盐和CAR T细胞组合物选择的给药时间表可以考虑所述化合物或其药学上可接受的盐的浓度以及所施用的CAR T细胞的数量以调节CAR T细胞组合物的细胞毒性和控制CRS。

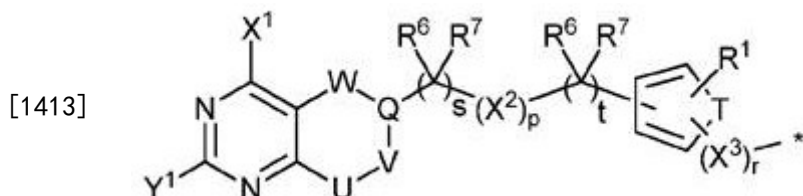
[1409] 在一个实施方案中,为了预防或抑制患者中的细胞因子释放综合征(CRS),提供了治疗癌症的方法,且所述方法包括i)向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,ii)向患者施用CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞,且其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR,且iii)向患者施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药物。

[1410] 在该方法实施方案中,向患者施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药物的步骤可用于预防或抑制患者中的CRS。在该实施方案中,叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药物中的任一种在本文中都可以称为“拯救剂”。在一个实施方案中,可以施用叶酸(盐)、诸如叶酸以预防或抑制患者中的CRS。在该实施方案中,所述叶酸抑制桥(即通过接头与靶向部分连接的小分子配体)与肿瘤上桥的受体的相互作用,抑制肿瘤裂解并预防或抑制患者中的CRS。

[1411] 在一个实施方案中,作为桥与肿瘤的结合的抑制剂施用的叶酸(盐)可以是例如叶酸、叶酸类似物或另一种结合叶酸受体的分子。在各个实施方案中,可以使用的叶酸的类似物包括亚叶酸、蝶酰谷氨酸(pteropolyglutamic acid)和结合叶酸受体的喋啶类诸如四氢喋呤类、二氢叶酸类、四氢叶酸类和它们的脱氮和二脱氮类似物。术语“脱氮”和“二脱氮”类

似物是指本领域公认的类似物,其用碳原子取代天然存在的叶酸结构中的一个或两个氮原子。例如,所述脱氮类似物包括1-脱氮、3-脱氮、5-脱氮、8-脱氮和10-脱氮类似物。所述二脱氮类似物包括,例如,1,5-二脱氮、5,10-二脱氮、8,10-二脱氮和5,8-二脱氮类似物。前述叶酸类似物常规地被称为“叶酸”,其反映它们的结合叶酸受体的能力。其他结合叶酸受体的类似物包括氨基蝶呤、甲氨蝶呤(氨甲蝶呤)、N10-甲基叶酸、2-去氨基-羟基叶酸、脱氮类似物诸如1-脱氮甲氨蝶呤或3-脱氮甲氨蝶呤和3',5'-二氯-4-氨基-4-脱氧-N10-甲基蝶酰谷氨酸(二氯甲氨蝶呤)。

[1412] 在另一个实施方案中,作为桥与肿瘤的结合的抑制剂施用的叶酸具有下式



[1414] 其中X¹和Y¹各自独立地选自卤素、R²、OR²、SR³和NR⁴R⁵;

[1415] U、V和W代表各自独立地选自-(R⁶ᵃ)C=、-N=、-(R⁶ᵃ)C(R⁷ᵃ)-和-N(R⁴ᵃ)-的二价部分;Q选自C和CH;T选自S、O、N和-C=C-;

[1416] X²和X³各自独立地选自氧、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亚烷基和C₁-C₁₂亚烷基氧基,其中Z是氧或硫;

[1417] R¹选自氢、卤素、C₁-C₁₂烷基和C₁-C₁₂烷氧基;

[1418] R²、R³、R⁴、R⁴ᵃ、R⁴ᵇ、R⁵、R⁵ᵇ、R⁶ᵇ和R⁷ᵇ各自独立地选自氢、卤素、C₁-C₁₂烷基、C₁-C₁₂烷氧基、C₁-C₁₂烷酰基、C₁-C₁₂烯基、C₁-C₁₂炔基、(C₁-C₁₂烷氧基)羰基和(C₁-C₁₂烷基氨基)羰基;

[1419] R⁶和R⁷各自独立地选自氢、卤素、C₁-C₁₂烷基和C₁-C₁₂烷氧基;或者,R⁶和R⁷一起形成羰基基团;

[1420] R⁶ᵃ和R⁷ᵃ各自独立地选自氢、卤素、C₁-C₁₂烷基和C₁-C₁₂烷氧基;或者,R⁶ᵃ和R⁷ᵃ一起形成羰基基团;

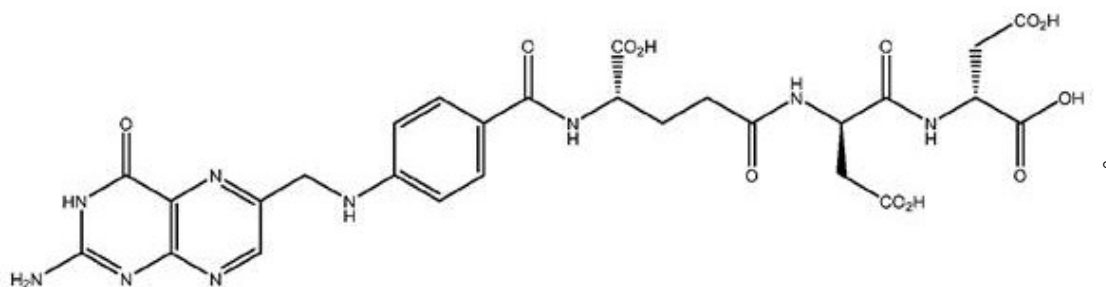
[1421] p、r、s和t各自独立地为0或1;且

[1422] 如果任何额外化学部分是叶酸的部分,则*代表至缀合物的剩余部分的任选共价键。

[1423] 在又一个实施方案中,可以施用包含叶酸的缀合物以预防或抑制患者中的细胞因子释放综合征(CRS)。CRS是本领域众所周知的术语,并且该综合征可以引起对患者的有害影响,包括但不限于体重减轻、高烧、肺水肿和危险的血压下降。

[1424] 在该实施方案中,包含叶酸的缀合物不包含靶向部分,且因此,所述缀合物抑制桥与肿瘤的相互作用以防止肿瘤裂解并降低患者中的CRS。在该实施方案中,包含叶酸的缀合物中的叶酸部分可以包含与化学部分连接的前述段落中描述的任何叶酸,所述化学部分不包含靶向部分。在一个方面,包含叶酸的缀合物可以包含与一个或多个氨基酸连接的叶酸,所述氨基酸不包含靶向部分。说明性地,所述包含叶酸的缀合物可以具有下式

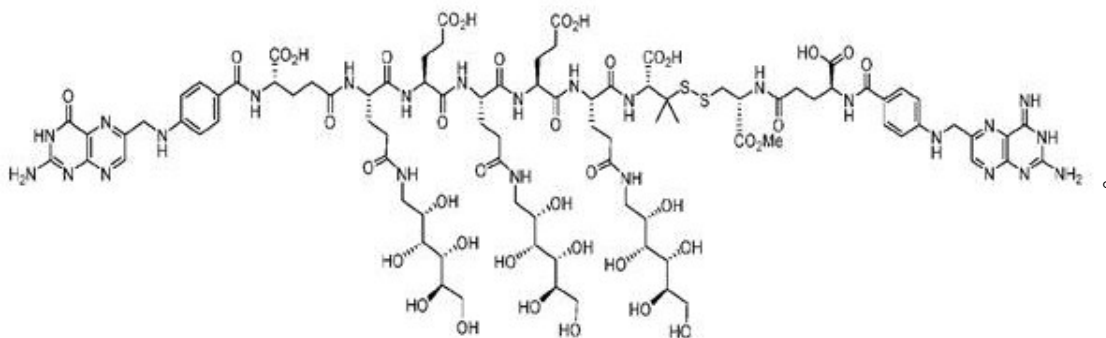
[1425]



[1426] 该化合物也可以被称为“EC923”。在这些实施方案中,叶酸或包含叶酸的缀合物可以以相对于桥(即,通过接头与靶向部分连接的小分子配体)摩尔过量,诸如叶酸或包含叶酸的缀合物相对于通过接头与靶向部分连接的小分子配体10倍过量、100倍过量、200倍过量、300倍过量、400倍过量、500倍过量、600倍过量、700倍过量、800倍过量、900倍过量、1000倍过量、10,000倍过量或10,000倍过量施用于患者。抑制桥与肿瘤的相互作用所需的相对于通过接头与靶向部分连接的小分子配体的量的叶酸的量可以由技术人员确定。

[1427] 在另一个实施方案中,可以将抑制CAR T细胞的活化的药剂施用于患者以抑制CAR T细胞活化和抑制或预防患者中的CRS。在一个方面,所述药剂可以选自淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶抑制剂(例如,达沙替尼)、PI3激酶抑制剂(例如,GDC0980)、Tocilizumab、IL-2诱导型T细胞激酶的抑制剂(例如,BMS-509744)、JAK抑制剂、BTK抑制剂、SIP激动剂(例如,Siponimod和Ozanimod)以及阻断CAR T细胞与桥的结合、但不结合癌症的药剂(例如,荧光素胺、FITC或荧光素钠)。技术人员理解,FITC(即,荧光素)可以在生理条件下或例如在生理pH下的缓冲液中呈盐(例如,荧光素钠)的形式或呈其非盐形式。因此,在一个实施方案中,当将荧光素施用于患者时,其可以在其盐形式(例如,荧光素钠)和其非盐形式之间的平衡中。在另一个实施方案中,抑制CAR T细胞的活化的拯救剂可以是下式的化合物

[1428]



[1429] 在各个实施方案中,可以以任何适当体积(包括例如,0.1 ml、0.2 ml、0.3ml、0.4 ml、0.5 ml、0.6 ml、0.7ml、0.8 ml、0.9 ml、1 ml、2 ml、3 ml、4 ml、5 ml、10 ml、100 ml或1000 ml)中的约0.001 nM至约100 mM、约0.01 nM至约100 mM、约1 nM至约100 mM、约10 nM至约100 mM、约50 nM至约100 mM或约100 nM至约100 mM 的浓度施用拯救剂。在其他实施方案中,所述拯救剂可以以如下剂量施用:约0.01至约300 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重、约0.06至约100 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重、约0.06至约90 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重、约0.06至约80 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重、约0.06至约70 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重、约0.06至约60 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重、约0.06至约50 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重、约0.06至约40 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重、约0.06至约30 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重、约

0.06至约20 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重、约0.06至约10 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重、约0.06至约8 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重或约0.06至约6 $\mu\text{mol/kg}$ 患者体重。

[1430] 在这些实施方案中,所述拯救剂可以以相对于化合物或其药学上可接受的盐(即,通过接头与靶向部分连接的小分子配体)摩尔过量,诸如拯救剂相对于通过接头与靶向部分连接的小分子配体约10倍过量、约20倍过量、约30倍过量、约40倍过量、约50倍过量、约60倍过量、约70倍过量、约80倍过量、约90倍过量、约100倍过量、约200倍过量、约300倍过量、约400倍过量、约500倍过量、约600倍过量、约700倍过量、约800倍过量、约900倍过量、约1000倍过量或约10,000倍过量施用于患者。抑制所述化合物或其药学上可接受的盐与肿瘤和/或CAR T细胞的相互作用所需的相对于通过接头与靶向部分连接的小分子配体的量的拯救剂的量可以由技术人员确定。

[1431] 在另一个实施方案中,向所述患者施用多于一个剂量的叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂。

[1432] 在本文所述的‘拯救剂’实施方案中,可以在所述化合物或其药学上可接受的盐之前和/或之后向所述患者施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂。在另一个方面,可以在施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂之前和之后施用所述化合物或其药学上可接受的盐。在该实施方案中,所述化合物或其药学上可接受的盐的后续施用可以引起CAR T细胞活化和患者中的细胞因子水平的增加。

[1433] 在另一个实施方案中,叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂的施用可以引起患者中的细胞因子水平的降低。在又另一个实施方案中,细胞因子水平的降低可以到向患者施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂后约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时或约8小时发生。在另一个实施方案中,细胞因子水平的降低是降低至约未治疗患者中的细胞因子水平。在另一个说明性实施方案中,在施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂之后,患者的血液中的CAR T细胞数可以增加,即使患者中的细胞因子水平降低。在另一个说明性方面,在施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂之后,相对于未用拯救剂治疗的患者,CAR T细胞活化可以增强或维持,即使治疗的患者中的细胞因子水平降低。在又另一个实施方案中,所述癌症包含肿瘤,且当向患者施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂时,患者中的肿瘤大小不增加。在该实施方案中,可以获得针对肿瘤的完全应答。

[1434] 在其他实施方案中,当CRS等级达到1、2、3或4时或当CRS等级达到3或4时,向患者施用抑制CAR T细胞的活化的药剂。在另一个方面,当施用拯救剂时,患者中的肺水肿减小。

[1435] 在本文所述的一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法,且所述方法包括i)向患者连续施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,ii)向患者施用包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR,且iii)结束所述化合物或其药学上可接受的盐的连续施用,以抑制或预防患者中的细胞因子释放综合征。

[1436] 根据该实施方案,术语“连续地”可以意指向患者施用所述化合物或其药学上可接受的盐例如至少一小时、至少四小时、至少六小时、至少八小时、至少十小时、至少十二小时或至少二十四小时,或者可以意指每天或每周一次、诸如每天一次、每天两次、每天三次、每天、每隔一天、每周一次、每周两次、每周三次施用的方案或者本领域技术人员认为连续施用的任何其他合适方案。在另一个方面,术语“连续地”可以意指该段落中描述的实施方案的任何组合。

[1437] 在该方法实施方案中,“结束化合物或其药学上可接受的盐的连续施用”以抑制或预防患者中的细胞因子释放综合征的步骤可以意指,例如,在施用连续时间段(诸如数小时或数天)后停止施用,或停止治疗方案(诸如上述的每天或每周方案)。在另一个实施方案中,“结束连续施用”的步骤可以意指,例如,施用,直至发生患者的体重的不可接受的减轻,或直至发生任何其他不可接受的副作用,诸如高烧、血压下降或肺水肿。在该实施方案中,“结束化合物或其药学上可接受的盐的连续施用”的步骤并不意指用所述化合物或其药学上可接受的盐的单一治疗,而没有随后用所述化合物或其药学上可接受的盐治疗。在该方法实施方案中,“抑制或预防”细胞因子释放综合征(CRS)意指消除CRS或减少或减轻CRS的症状。

[1438] 在涉及“结束化合物或其药学上可接受的盐的连续施用”的实施方案的一个实施方案中,所述方法可以进一步包括步骤iv):向所述患者再次施用所述化合物或其药学上可接受的盐。在一个实施方案中,所述化合物或其药学上可接受的盐可以例如每周一次施用并且可以省略一个剂量。在另一个实施方案中,所述化合物或其药学上可接受的盐可以隔天(即,每隔一天)施用,并且可以省略一个或多个(例如两个、三个、四个等)剂量。在另一个实施方案中,所述化合物或其药学上可接受的盐可以每周两次施用,并且可以省略一个或多个(例如两个、三个、四个等)剂量。在另一个实施方案中,所述化合物或其药学上可接受的盐可以在星期一、星期二和下一个星期一施用,且然后可以停止给药两周并重复该循环。在另一个实施方案中,可以使用上述任何方案实施方案,并且可以省略一个或多个(例如,两个、三个、四个等)剂量。在另一个实施方案中,可以使用这些实施方案的组合。在这些实施方案中,省略的剂量可以预防或降低患者中的CRS。

[1439] 在又一个说明性方面,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,其中向患者施用至少第一剂量和第二剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中第一剂量和第二剂量是不同的,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约2倍至约15000倍,且ii)向患者施用包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR。

[1440] 在该实施方案中,可以逐渐递增所述化合物或其药学上可接受的盐的剂量,以抑制或预防患者中的细胞因子释放综合征。例如,可以向患者施用至少第一剂量和第二剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中第一剂量和第二剂量是不同的,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约20倍至约15000倍、约2倍至约15000倍。在其他实施方案中,第二剂量或后续剂量的量可以是所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量的约2倍至约5倍、约2倍至约10倍、约2倍至约20倍、约2倍至约30倍、约2倍至约40倍、约2倍至约50倍、约2倍至约60倍、约2倍至约

70倍、约2倍至约80倍、约2倍至约90倍、约2倍至约100倍、约2倍至约15000倍、约2倍至约10000倍、约5倍至约9000倍、约5倍至约8000倍、约5倍至约7000倍、约5倍至约6000倍、约5倍至约5000倍、约5倍至约4000倍、约5倍至约3000倍、约5倍至约4000倍、约5倍至约3000倍、约5倍至约2000倍、约5倍至约1000倍、约5倍至约750倍、约2倍至约750倍、约5倍至约500倍、约5倍至约100倍、约800倍至约15000倍、约800倍至约10000倍、约800倍至约9000倍、约800倍至约8000倍、约800倍至约7000倍、约800倍至约6000倍、约800倍至约5000倍、约800倍至约4000倍、约800倍至约3000倍、约800倍至约2000倍、约800倍至约1000倍、约8000倍至约15000倍、约8000倍至约10000倍、约8000倍至约9000倍、约15000倍、约10000倍、约9000倍、约8000倍、约7000倍、约6000倍、约5000倍、约4000倍、约3000倍、约2000倍、约1000倍、约500倍、约400倍、约300倍、约200倍、约100倍、约90倍、约80倍、约70倍、约60倍、约50倍、约40倍、约30倍、约20倍、约10倍、约5倍或约2倍。

[1441] 在剂量递增方法的另一个说明性实施方案中,可以向患者施用至少第一剂量、第二剂量和第三剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中第一剂量、第二剂量和第三剂量是不同的,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约2倍至约750倍,且其中第三剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约800倍至约10000倍。

[1442] 在剂量递增方法的另一个方面,可以向患者施用至少第一剂量、第二剂量、第三剂量和第四剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中第一剂量、第二剂量、第三剂量和第四剂量是不同的,其中第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约2倍至约750倍,其中第三剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约800倍至约7500倍,且其中第四剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约8000倍至约15000倍。

[1443] 在又一个实施方案中,第二剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量可以是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约100倍,第三剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量可以是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约1000倍,且第四剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的量可以是第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐的约10000倍。在一个示例性实施方案中,所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量是0.05 nmol/kg,第二剂量是5 nmol/kg,第三剂量是50 nmol/kg,且第四剂量是500 nmol/kg。在本文所述的剂量递增实施方案中,第一、第二、第三、第四和任何后续剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐可以多次施用(例如,可以在施用后续递增剂量之前几次施用0.05 nmol/kg的第一剂量)。

[1444] 在本文所述的另一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者施用第一剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,ii)向患者施用至少第二剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中第二剂量的化合物或其药学上可接受的盐的量是第一剂量的化合物或其药学上可接受的盐至多约50%,且iii)向患者施用一定剂量的包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR。

[1445] 在该剂量递减实施方案的各个实施方案中,所述化合物或其药学上可接受的盐的

第二剂量的量可以是所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量至多约60%,所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量至多约70%,所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量至多约80%,所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量至多约90%,所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量至多约95%,所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量至多约96%,所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量至多约97%,所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量至多约98%,所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量至多约99%,或所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量至多约99.5%。

[1446] 在本文所述的剂量递减实施方案的各个实施方案中,所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量可以是约100 nmol/kg至约1000 nmol/kg患者体重、约100 nmol/kg至约900 nmol/kg患者体重、约100 nmol/kg至约800nmol/kg患者体重、约100 nmol/kg至约700 nmol/kg患者体重、约100 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重、约200 nmol/kg至约600nmol/kg患者体重、约400 nmol/kg至约600 nmol/kg患者体重或约500 nmol/kg患者体重。

[1447] 在本文所述的剂量递减实施方案的各个实施方案中,所述化合物或其药学上可接受的盐的第二剂量可以是约0.5 nmol/kg至约500 nmol/kg患者体重、约0.5 nmol/kg至约450 nmol/kg患者体重、约0.5 nmol/kg至约400nmol/kg患者体重、约0.5 nmol/kg至约350 nmol/kg患者体重、约0.5 nmol/kg至约300 nmol/kg患者体重、约1 nmole/kg至约300nmol/kg患者体重、约2 nmol/kg至约300 nmol/kg患者体重、约2 nmol/kg至约250nmol/kg患者体重、约5 nmol/kg至约40 nmol/kg患者体重或约40 nmol/kg至约150nmol/kg患者体重。

[1448] 在本文所述的剂量递减实施方案的额外实施方案中,所述方法可以进一步包括施用第三剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第三剂量与所述化合物或其药学上可接受的盐的第一剂量相同。在另一个实施方案中,所述方法可以进一步包括施用第四剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的第四剂量与所述化合物或其药学上可接受的盐的第二剂量和所述化合物或其药学上可接受的盐的第三剂量相同。在又一个实施方案中,在第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐之后施用的一个或多个剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐相对于第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐可以维持癌症生长的抑制。

[1449] 在本文所述的剂量递减实施方案的其他实施方案中,所述CAR T细胞可以以约100万个CAR T细胞至约4000万个CAR T细胞的剂量施用。在还有其他实施方案中,可以每周一次或两次施用在第一剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐之后施用的一个或多个剂量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

[1450] 在本文所述的剂量递减实施方案的还有其他实施方案中,所述方法可以进一步包括向患者施用叶酸、包含叶酸的缀合物(其中包含叶酸的缀合物不包含靶向部分)或抑制CAR T细胞的活化的药剂的步骤。在另一个实施方案中,向患者施用抑制CAR T细胞的活化的药剂,且所述药剂是阻断CAR T细胞与所述化合物或其药学上可接受的盐的结合、但不结合癌症的药剂,且所述药剂是荧光素胺、荧光素钠或荧光素。在又一个实施方案中,所述药剂是荧光素钠。

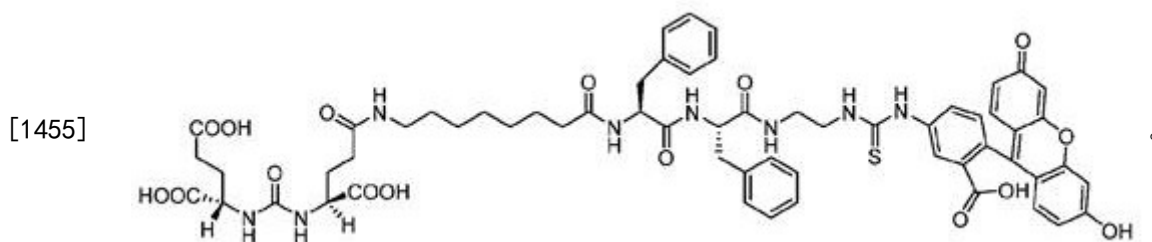
[1451] 在另一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者施用第一剂量的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小

分子配体,且其中在施用包含CAR T细胞的CAR T细胞组合物前至少约一小时向患者施用所述化合物或其药学上可接受的盐,其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR,ii)然后向患者施用一定剂量的CAR T细胞组合物,且iii)然后向患者施用第二剂量的化合物或其药学上可接受的盐。在该预先治疗实施方案的各个实施方案中,可以在施用CAR T细胞组合物前至少约两小时,在施用CAR T细胞组合物前至少约四小时,在施用CAR T细胞组合物前至少约八小时,在施用CAR T细胞组合物前至少约十二小时,在施用CAR T细胞组合物前至少约十六小时,在施用CAR T细胞组合物前至少约二十小时,或在施用CAR T细胞组合物前至少约二十四小时,向患者施用第一剂量的化合物或其药学上可接受的盐。

[1452] 在该预先治疗实施方案的各个实施方案中,可以到施用CAR T细胞组合物后至少约二十四小时,到施用CAR T细胞组合物后至少约二十小时,到施用CAR T细胞组合物后至少约十八小时,到施用CAR T细胞组合物后至少约十六小时,到施用CAR T细胞组合物后至少约十四小时,到施用CAR T细胞组合物后至少约十二小时,到施用CAR T细胞组合物后至少约十小时,到施用CAR T细胞组合物后至少约八小时,到施用CAR T细胞组合物后至少约六小时,到施用CAR T细胞组合物后至少约四小时,或到施用CAR T细胞组合物后至少约二小时,向患者施用第二剂量的化合物或其药学上可接受的盐。

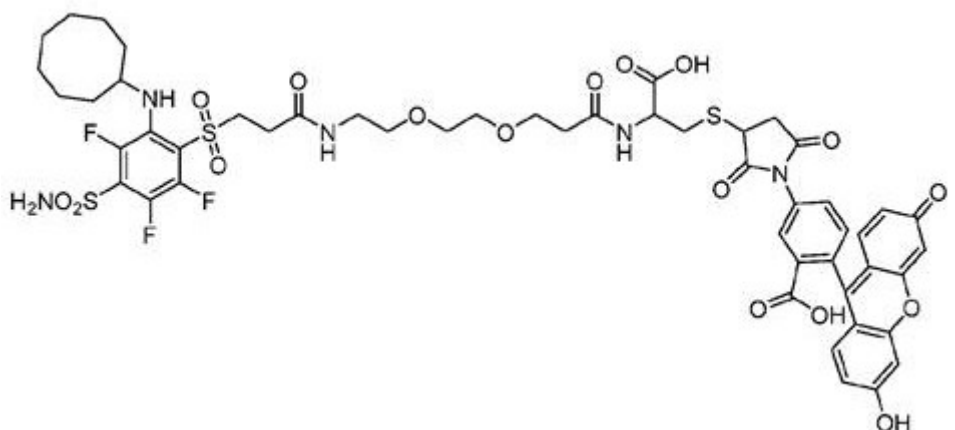
[1453] 在该预先治疗实施方案的各个额外实施方案中,不发生导致患者中的脱靶毒性的细胞因子释放,但发生对癌症的CAR T细胞毒性或在患者中未发生脱靶组织毒性,但发生对癌症的CAR T细胞毒性,或所述癌症包含肿瘤,并且患者中的肿瘤大小减小,但未发生脱靶毒性,或者患者中的肿瘤大小的减小大于在施用CAR T细胞组合物前未用化合物或其药学上可接受的盐预先治疗的患者中。如技术人员所理解,“靶标”可以是癌症(例如肿瘤)。

[1454] 在另一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,且ii)向患者施用CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞,且其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR,且其中所述小分子配体是PSMA配体且所述靶向部分是FITC。在该实施方案中,通过接头与靶向部分连接的小分子配体可以具有下式



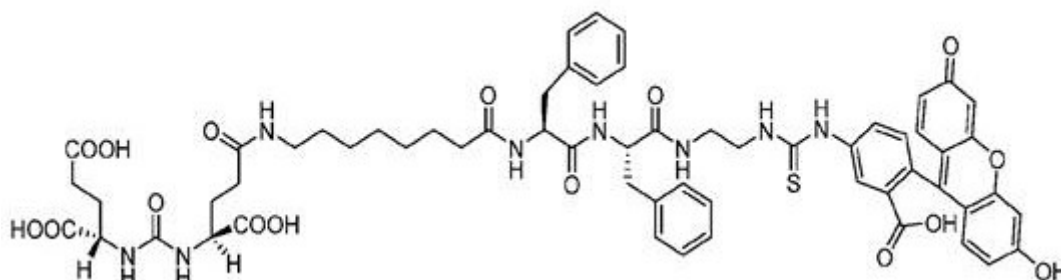
[1456] 在又一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者施用化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物包含通过接头与靶向部分连接的小分子配体,且ii)向患者施用CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞,且其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR,且其中所述小分子配体是CAIX配体且所述靶向部分是FITC。在该实施方案中,通过接头与靶向部分连接的小分子配体可以具有下式

[1457]



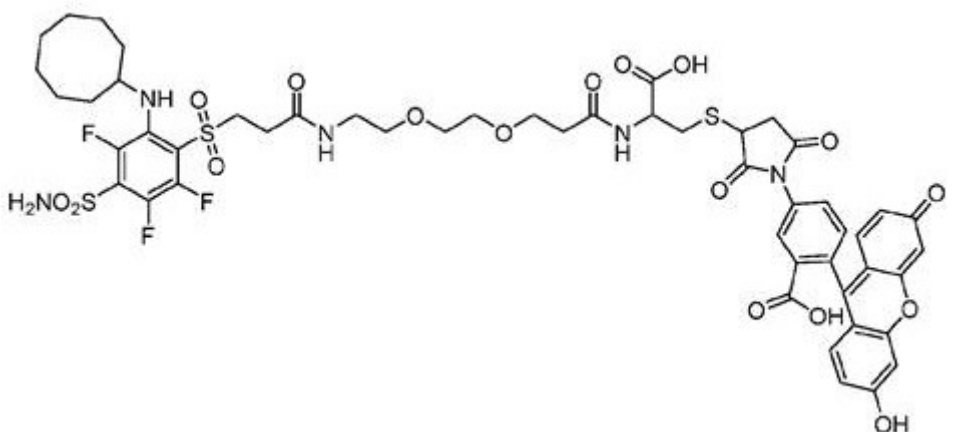
[1458] 在又一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。所述方法包括:i)向患者施用第一化合物或其药学上可接受的盐,其中所述第一化合物或其药学上可接受的盐包含通过接头与FITC连接的PSMA配体,ii)向患者施用第二化合物或其药学上可接受的盐,其中所述第二化合物或其药学上可接受的盐包含通过接头与FITC连接的CAIX配体,且iii)向患者施用CAR T细胞组合物,其中所述CAR T细胞组合物包含CAR T细胞,且其中所述CAR T细胞包含针对所述靶向部分的CAR。在该实施方案中,所述第一化合物可以具有下式

[1459]



[1460] 且所述第二化合物可以具有下式

[1461]



[1462] 在本文所述的方法的一个实施方案中,在将所述化合物或其药学上可接受的盐施用于患者之前,或在将所述CAR T细胞组合物施用于患者之前,将癌症成像。在一个说明性实施方案中,通过PET成像进行成像。在其他说明性实施方案中,通过MRI成像或SPECT/CT成像进行成像。所述成像方法可以是本领域已知的任何合适的成像方法。在一个实施方案中,所述成像方法可以涉及使用本文所述的小分子配体,但其与适合于本文所述的成像类型的成像剂连接。

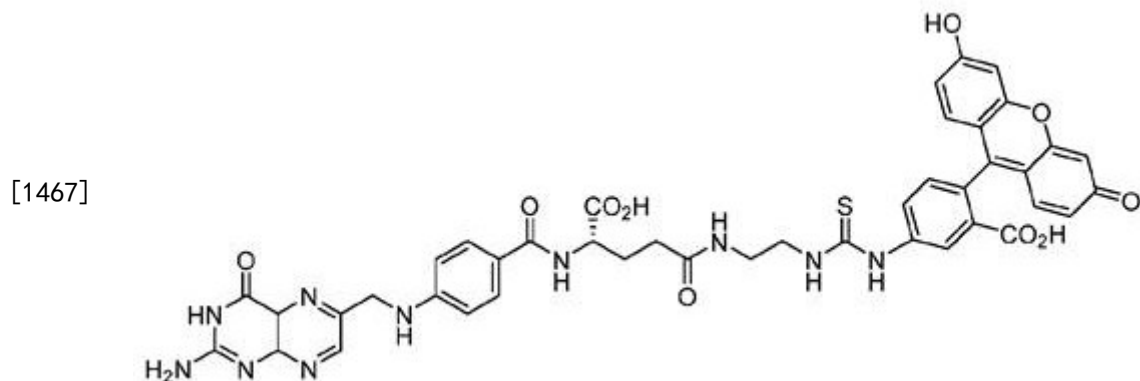
[1463] 在本文描述的任何实施方案中,即使对癌症的CAR T细胞毒性发生,在患者中导致脱靶毒性的细胞因子释放也不可能发生。在本文描述的任一实施方案中,即使对癌症的CAR T细胞毒性发生,脱靶组织毒性也不可能在患者中发生。在本文描述的任一实施方案中,所述癌症可以包含肿瘤,且患者中的肿瘤大小可以减小,即使脱靶毒性不会发生。在本文所述的任何实施方案中,可以减少或预防CRS,且所述方法可以导致患者中的肿瘤体积的减少。在本文所述的任一实施方案中,可以减少或预防由于CRS导致的体重减轻。在本文所述的任一实施方案中,所述癌症可以包含肿瘤,且可以获得针对肿瘤的完全应答。

[1464] 在本文所述的方法的另一个实施方案中,本文描述的任何方法可以单独使用,或者本文描述的任何方法可以与本文描述的任何其他一种或多种方法组合使用。

实施例

[1465] 实施例1

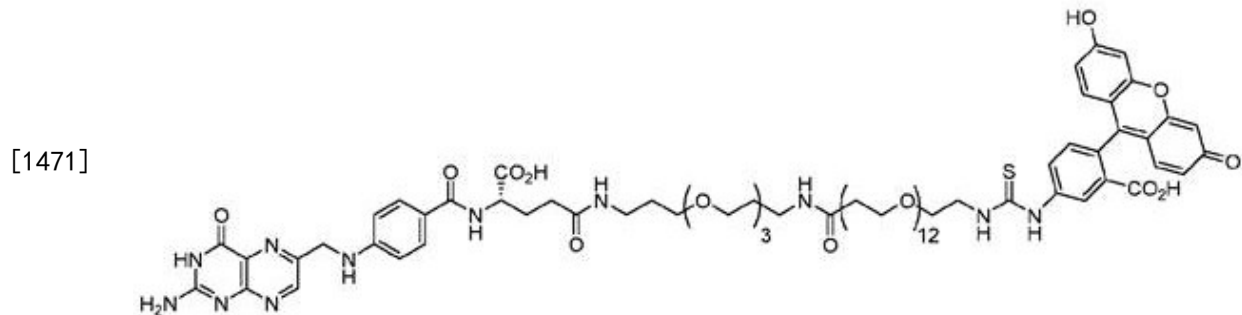
[1466] FITC-叶酸的合成



[1468] 在四甲基胍和二异丙胺存在的情况下在无水二甲基亚砜 (DMF) 中将叶酸- γ -乙二胺与异硫氰酸荧光素 (FITC) 异构体 I (Sigma-Aldrich) 偶联。将粗产物加载至 Xterra RP18 制备型 HPLC 柱 (Waters) 上并用梯度条件洗脱, 所述梯度条件开始于 99% 5 mM 磷酸钠 (流动相 A, pH 7.4) 和 1% 乙腈 (流动相 B) 并在 10 min 中达到 90% A 和 10% B, 流速为 20 mL/min。在这些条件下, FITC-叶酸主峰通常在 27-50 min 洗脱。通过具有 UV 检测器的分析型反相 HPLC 监测 FITC-叶酸级分的特性。将具有大于 98.0% 纯度 (LCMS) 的级分冻干以获得最终的 FITC-叶酸产物。如本领域已知, 具有这种结构的化合物也称为 EC17。

[1469] 实施例2

[1470] FITC-PEG12-叶酸的合成



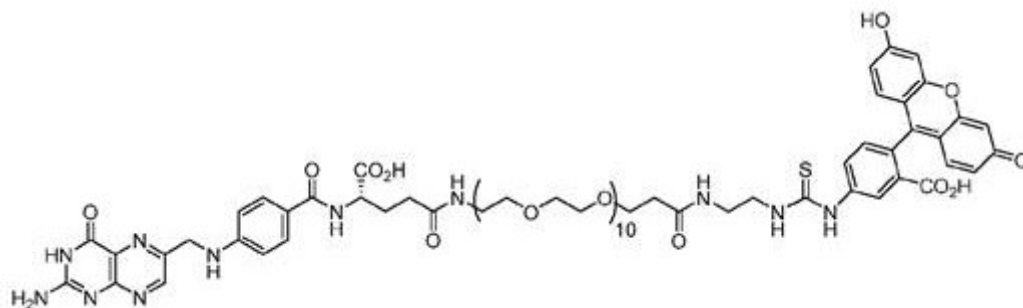
[1472] 将通用的聚乙二醇 (PEG) Nova Tag™ 树脂 (0.2 g) 加载进肽合成容器中, 并用异丙

醇 (*i*-PrOH) (3 x 10 mL) 和二甲基甲酰胺 (DMF, 3 x 10 mL) 洗涤。使用 DMF 中的 20% 哌啶 (3 x 10 mL) 实施 9-苄基甲氧基羰基 (Fmoc) 去保护。进行 Kaiser 测试以评价反应进程。然后向所述容器引入 Fmoc-L-谷氨酸 5-叔丁酯 (Fmoc-Glu-(O-*t*-Bu)-OH) (23.5 mg) 于 DMF 中的溶液、N,N-二异丙基乙胺 (*i*-Pr₂NEt) (4 当量) 和苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷子基磷六氟磷酸盐 (PyBOP) (2 当量)。使用 DMF 中的 20% 哌啶 (3 x 10 mL) 实施 Fmoc 去保护。然后向所述容器引入 N¹⁰-TFA-Pte-OH (22.5 mg)、DMF、*i*-Pr₂NEt (4 当量) 和 PyBOP (2 当量) 的溶液。用氩气鼓泡 2 h, 并将树脂用 DMF (3 x 3 mL) 和 *i*-PrOH (3 x 3 mL) 洗涤。使树脂在二氯甲烷 (DCM) 中膨胀之后, 加入 1M 羟基苯并三唑 (HOBT) 于 DCM/三氟乙烷 (TFE) (1:1) 中的溶液 (2 x 3 mL)。用氩气鼓泡 1 h, 将溶剂除去, 并将树脂用 DMF (3 x 3 mL) 和 *i*-PrOH (3 x 3 mL) 洗涤。使树脂在 DMF 中膨胀之后, 加入 Fmoc-NH-(PEG)₁₂-COOH (46.3 mg) 于 DMF 中的溶液、*i*-Pr₂NEt (4 当量) 和 PyBOP (2 当量)。用氩气鼓泡 2 h, 并将树脂用 DMF (3 x 3 mL) 和 *i*-PrOH (3 x 3 mL) 洗涤。使用 DMF 中的 20% 哌啶 (3 x 10 mL) 实施 Fmoc 去保护。进行 Kaiser 测试以评价反应进程。然后向所述容器引入 FITC (Life Technologies 21.4 mg) 于 DMF 中的溶液和 *i*-Pr₂NEt (4 当量), 然后用氩气鼓泡 2 h, 并将树脂用 DMF (3 x 3 mL) 和 *i*-PrOH (3 x 3 mL) 洗涤。然后向所述容器加入 DMF 中的 2% NH₂NH₂ (2 x 2 mL)。将最终的化合物使用 TFA:H₂O: 三异丙基硅烷 (TIS) (95:2.5:2.5) (切割溶液) 从所述树脂切割并在真空下浓缩。将浓缩的产物在 Et₂O 中沉淀并在真空下干燥。将粗产物使用制备型 RP-HPLC (流动相: A = 10 mM 乙酸铵 pH = 7, B = ACN; 方法: 在 30 min 中 0%B 至 30%B, 以 13 mL/min) 纯化。将纯的级分合并和冷冻干燥, 提供 FITC-PEG12-叶酸。

[1473] 实施例 3

[1474] FITC-PEG20-叶酸的合成

[1475]



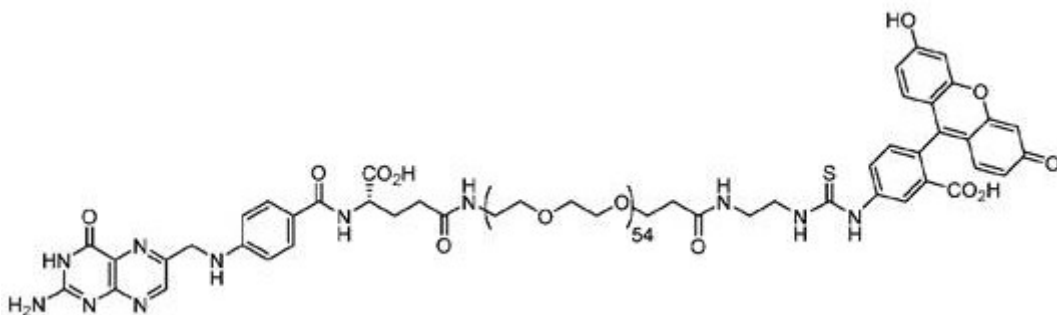
[1476] 将乙二胺、聚合物结合的 (200-400 目) - 树脂 (50 mg) 加载至肽合成容器中并用 DCM (3 mL) 膨胀, 随后用 DMF (3 mL) 膨胀。然后向所述容器引入 Fmoc-PEG₂₀-COOH 溶液 (131 mg, 1.0 当量) / DMF、*i*-Pr₂NEt (6.0 当量) 和 PyBOP (4.0 当量)。用氩气鼓泡 6 h, 将偶联溶液排空, 并将树脂用 DMF (3 x 10 mL) 和 *i*-PrOH (3 x 10 mL) 洗涤。进行 Kaiser 测试以评价反应进程。在每次氨基酸偶联之前, 使用 20% 哌啶 / DMF (3 x 10 mL) 实施 Fmoc 去保护。重复以上顺序以 Fmoc-Glu-OtBu (72 mg, 2.0 当量) 和 Tfa. 蝶酸 (41 mg, 1.2 当量) 偶联步骤完成反应。将树脂用 DMF 中的 2% 胍 3 x 10 mL (5 min) 洗涤以切割蝶酸上的三氟-乙酰基保护基, 并用 *i*-PrOH (3 x 10 mL) 洗涤, 随后用 DMF (3 x 10 mL) 洗涤。将树脂在氩气下干燥 30 min。使用切割溶液从树脂切割叶酸-肽。引入 10 mL 切割混合物, 并用氩气鼓泡 1.5 h。将切割混合物排入干净烧瓶中。将树脂用更多的切割混合物洗涤 3 次。将合并的混合物在减压下浓缩至更小的体积 (~ 5 mL) 并在乙醚中沉淀。

[1477] 将沉淀物通过离心进行收集,用乙醚洗涤(3次),并在高真空下干燥。将干燥的叶酸-PEG₂₀-EDA (1.0当量)在室温用DMSO和DIPEA中的FITC (50 mg, 1.5当量)处理。通过LCMS监测反应进程。8 h之后,耗尽起始材料,以得到产物。通过制备型HPLC (流动相A = 10mM乙酸铵, pH= 7;有机相B = 乙腈;方法: 在35分钟中0%B至30%B,以13 mL/min)纯化粗反应混合物,并以60%产率提供FITC-PEG20-叶酸。

[1478] 实施例4

[1479] FITC-PEG108-叶酸的合成

[1480]



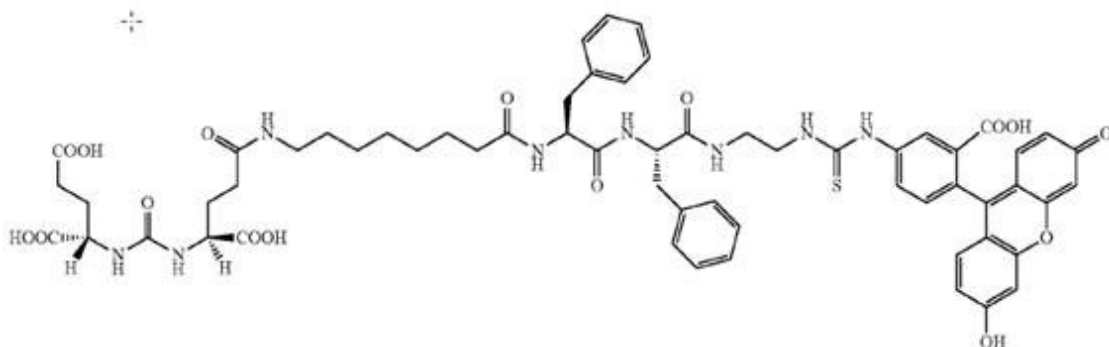
[1481] 将乙二胺、聚合物结合的(200-400目)-树脂(50 mg)加载于肽合成容器中并用DCM (3 mL)膨胀,随后用DMF (3 mL)膨胀。然后向所述容器引入DMF中的Fmoc-PEG₃₆-COOH溶液(161 mg、1.0当量)、*i*-Pr₂NEt (6.0当量)和PyBOP (4.0当量)。用氩气鼓泡6 h,将偶联溶液排空,并将树脂用DMF (3 x 10 mL)和*i*-PrOH (3 x 10 mL)洗涤。进行Kaiser测试以评价反应进程。在每次氨基酸偶联之前,使用DMF中的20%哌啶(3 x 10 mL)实施Fmoc去保护。重复以上顺序以2X Fmoc-PEG₃₆-COOH (161 mg、1.0当量)、Fmoc-Glu-OtBu (72 mg、2.0当量)和Tfa.蝶酸(41.0 mg、1.2当量)偶联步骤完成反应。最后,将树脂用DMF中的2%胍3 x 10mL (5 min)洗涤以切割蝶酸上的三氟-乙酰基保护基,并用*i*-PrOH (3 x 10mL)洗涤,随后用DMF (3 x 10mL)洗涤。将树脂在氩气下干燥30 min。使用切割溶液从树脂切割叶酸-肽。引入10 mL切割混合物,并用氩气鼓泡1.5 h。将切割混合物排入干净烧瓶中。将树脂用更多的切割溶液洗涤3次。将合并的混合物在减压下浓缩至更小的体积(~ 5mL)并在乙醚中沉淀。

[1482] 将沉淀物通过离心进行收集,用乙醚洗涤(3次),并在高真空下干燥。将干燥的叶酸-PEG₁₀₈-EDA (1.0当量)在室温用DMSO和DIPEA中的FITC (50 mg, 1.5当量)处理。通过LCMS监测反应进程。10 h之后,耗尽起始原料,以得到产物。通过制备型HPLC (流动相A = 10mM乙酸铵, pH= 7;有机相B = 乙腈;方法:在35分钟中0%B至30%B,以13 mL/min)纯化粗反应混合物,并以64%产率提供FITC-PEG108-叶酸。

[1483] 实施例5

[1484] FITC-DUPA的合成

[1485]

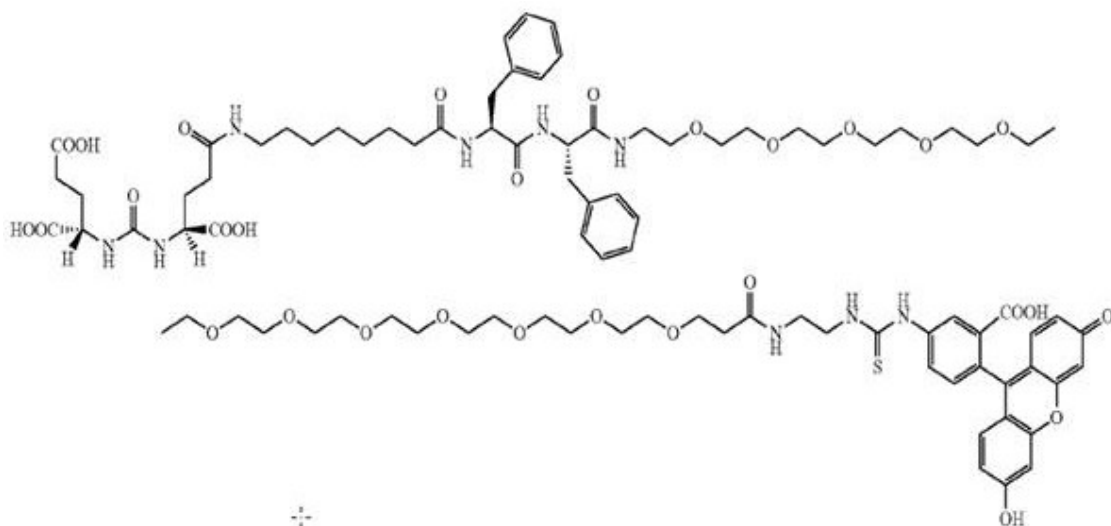


[1486] 如下通过固相方法合成DUPA-FITC。将通用的Nova TagTM树脂(50 mg, 0.53 mM)用DCM (3 mL)膨胀,随后用DMF(3 mL)膨胀。将20%哌啶于DMF中的溶液(3×3 mL)添加至树脂,并用氩气鼓泡5 min。将树脂用DMF(3×3 mL)和异丙醇(*i*-PrOH, 3×3 mL)洗涤。使树脂在DMF中膨胀之后,加入DUPA-(OtBu)-OH (1.5当量)、HATU(2.5当量)和*i*-Pr₂NEt (4.0当量)于DMF中的溶液。用氩气鼓泡2 h,并将树脂用DMF (3×3 mL)和*i*-PrOH (3×3 mL)洗涤。使树脂在DCM中膨胀之后,加入1 M HOBt于DCM/TFE (1:1)中的溶液(2×3 mL)。用氩气鼓泡1 h,将溶剂除去并将树脂用DMF (3×3 mL)和*i*-PrOH (3×3 mL)洗涤。使树脂在DMF中膨胀之后,加入Fmoc-Phe-OH (2.5当量)、HATU (2.5当量)和DIPEA (4.0当量)于DMF中的溶液。用氩气鼓泡2 h,并将树脂用DMF (3×3 mL)和*i*-PrOH (3×3 mL)洗涤。重复以上顺序另外2个偶联步骤,用于添加8-氨基辛酸和异硫氰酸荧光素或异硫氰酸罗丹明B。将最终的化合物使用切割溶液从所述树脂切割并在真空下浓缩。将浓缩的产物在乙醚中沉淀并在真空下干燥。将粗产物使用制备型RP-HPLC[λ= 488 nm;溶剂梯度:在25 min中1%B至80%B,80%B洗涤运行30 min;A = 10 mM NH₄OAc, pH = 7; B = 乙腈(ACN)]纯化。在真空下除去ACN,并将纯化的级分冷冻干燥以产生FITC-DUPA作为淡棕色-橙色固体。RP-HPLC: t_R = 8.0 min (A = 10 mM NH₄OAc, pH = 7.0; B = ACN, 溶剂梯度: 在10min中1% B至50% B, 80% B洗涤运行15 min)。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的(M + H)⁺计算值,1040.3712,实测值,1040.3702。UV/vis: λ_{max} = 491 nm。

[1487] 实施例6

[1488] FITC-PEG12-DUPA的合成

[1489]



[1490] 将1,2-二氨基乙烷三苯甲基-树脂(0.025 g)加载至肽合成容器中,并用*i*-PrOH (3 x 10 mL)洗涤,随后用DMF (3 x 10mL)洗涤。然后向所述容器引入Fmoc-NH-(PEG)₁₂-COOH (42.8 mg)于DMF中的溶液、*i*-Pr₂NEt (2.5当量)和PyBOP(2.5当量)。将所得的溶液用氩气鼓泡1 h,将偶联溶液排空,并将树脂用DMF (3 x 10 mL)和*i*-PrOH (3 x 10 mL)洗涤。进行Kaiser测试以评价反应进程。使用DMF中的20%哌啶(3 x 10 mL)实施Fmoc去保护。重复该程序以完成所有偶联步骤(在它们的相应偶联步骤的每一个上使用2 x 1.5当量的Fmoc-Phe-OH和1.5当量的8-氨基辛酸和1.2当量的DUPA)。DUPA偶联之后,将树脂用DMF (3 x 10 mL)和*i*-PrOH (3 x 10 mL)洗涤并在减压下干燥。在肽合成容器中使用切割溶液从所述树脂切割肽。将15 mL切割溶液加入肽合成容器,并将反应物在氩气下鼓泡15 min。将树脂用两份额外10 mL量的切割溶液各自处理5 min。将切割混合物浓缩至约5 mL并用乙醚沉淀。将沉淀物通过离心进行收集,用乙醚洗涤(3次),并在高真空下干燥,导致粗物质的回收。在室温向粗DUPA-(PEG)₁₂-EDA (10 mg)和FITC (5.6 mg)于二甲基亚砜(DMSO, 1 mL)中的搅拌溶液中加入*i*-Pr₂NEt (5当量)并在氩气下搅拌6 h。通过LCMS监测反应并通过制备型HPLC (流动相: A = 10 mM乙酸铵pH = 7, B = ACN;方法: 在30 min中0% B至50% B,以13 mL/min)纯化。将纯化的级分合并和冷冻干燥,提供FITC-PEG12-DUPA。

[1491] 实施例7

[1492] FITC-PEG11-NK1的合成

[1493]



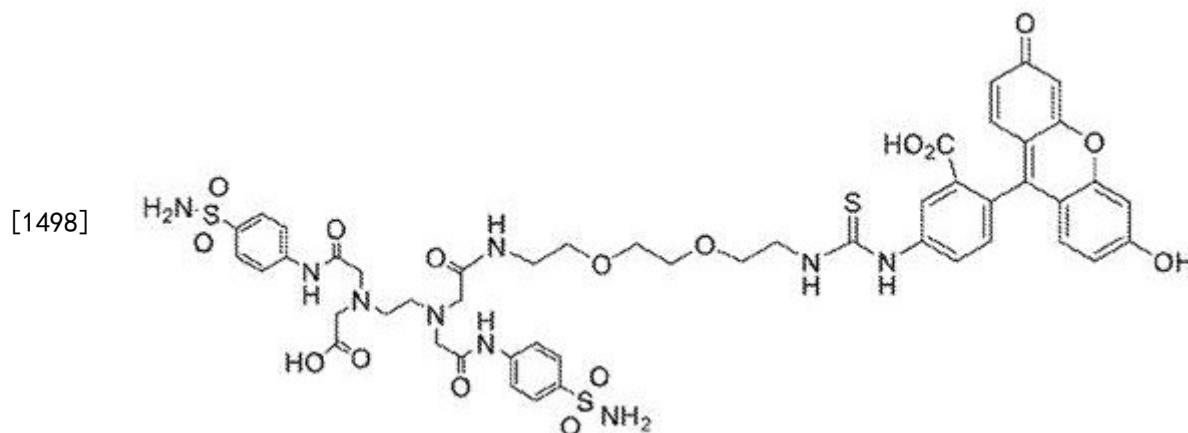
[1494] 在氩气下在室温向NK-1 (0.02 g, 0.0433 mmol, 1.0当量)、O-(2-氨基乙基)-O'-[2-(Boc-氨基)乙基]十乙二醇(BocNH-PEG₁₁-NH₂) (Sigma, 0.0336 g, 0.0521 mmol, 1.2当量)、苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷子基磷六氟磷酸盐(PyBOP) (0.027 g, 0.0521 mmol, 1.2当量)于无水CH₂Cl₂中的搅拌溶液中加入*N,N*-二异丙基乙胺(DIPEA) (0.076 mL,

0.4338 mmol, 10当量)。通过LCMS监测反应进程并通过制备型RP-HPLC (Waters, XBridge™ Prep C18, 5 μ m; 19 $\times$ 100 mm柱, 流动相A = 20 mM乙酸铵缓冲液, pH 7, B = 乙腈, 梯度在30 min中10–100% B, 13 mL/min, λ = 220 nm, 254 nm) 纯化。收集纯级分, 蒸发所有有机溶剂, 并将样品冻干48 h以提供NK1-PEG₁₁-NH₂Boc。产率: 40.13 mg (97%)。向无水DCM中的NK1-PEG₁₁-NH₂Boc (0.0165 g, 0.015 mmol) 中加入三氟乙酸(TFA, 20当量), 并将反应混合物在室温搅拌4 h。将过量TFA除去, 并将剩余的溶液用水稀释并使用CH₂Cl₂ (3 x 5 mL) 萃取。将合并的有机层用盐水洗涤, 干燥(Na₂SO₄) 并浓缩。将获得的残余物在真空下干燥并不经进一步纯化用于下一步。在室温在氩气下将NK1-PEG₁₁-NH₂ (0.008 g, 0.0081 mmol, 1.0当量)、异硫氰酸荧光素(FITC) (Sigma, 0.0037 g, 0.0097 mmol, 1.2当量) 于无水二甲基亚砜(DMSO, 0.3 mL) 中的搅拌溶液加入二异丙基乙基胺(0.0028 mL, 0.0162 mmol, 2.0当量) 中。通过LCMS监测反应进程并将产物通过制备型RP-HPLC (Waters, XBridge™ Prep C18, 5 μ m; 19 $\times$ 100 mm柱, 流动相A = 20 mM乙酸铵缓冲液, pH 7, B = 乙腈, 梯度在30 min中10–100% B, 13 mL/min, λ = 280 nm) 纯化。收集纯级分, 蒸发所有有机溶剂, 并将样品冻干48 h, 以8.54 mg (77%) 的产率提供FITC-PEG₁₁-NK1。

[1495] *注: 从碱性配体开始通过两步程序合成NK-1化合物, 所述碱性配体通过使用文献中的程序来制备(参考文献: DESIGN AND DEVELOPMENT OF NEUROKININ-1 RECEPTOR-BINDING AGENT DELIVERY CONJUGATES, 申请号: PCT/US2015/44229; 通过引用并入本文)。

[1496] 实施例8

[1497] FITC-PEG2-CA9的合成



[1499] 在50mL圆底烧瓶中使用Teflon磁力搅拌棒将CA9配体(53.6mg)溶解于DMF (2–3mL) 中。将环境空气使用真空除去并用氮气替换, 这在三个循环中完成。将圆底烧瓶保持在恒定氮气下。向烧瓶中加入28.9 mg N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC), 随后加入21.6mg 1-羟基苯并三唑水合物(HOBt) 和18.9 μ L Boc-PEG₂-NH₂ (Sigma Aldrich)。加入5.4 μ L三乙胺(TEA), 并将反应物搅拌过夜。将反应混合物使用HPLC纯化并用UHPLC-MS (831的目标m/z) 证实。使用高真空旋转蒸发除去乙腈并将产物冻干。将化合物与1:1 TFA:DCM混合30分钟。使用高真空旋转蒸发除去TFA/DCM, 随后在高真空下除去30分钟。然后将化合物溶解于DMF中并与5摩尔当量的*i*-Pr₂NEt, 16 mg异硫氰酸荧光素(Life Technologies) 合并并搅拌1 h。将反应混合物通过HPLC纯化并用UHPLC-MS (1120的目标m/z) 证实靶化合物。将样品冻干并在-20℃储存。

[1500] 实施例9**[1501] 可以通过停止FITC-配体施用或引入过量的竞争物小分子来控制抗-FITC CAR T细胞活化**

[1502] 将MDA-MB-231细胞皮下注射至NSG小鼠 (Jackson Laboratory) 的肩部以建立实体瘤异种移植。当肿瘤体积达到约50-100mm³时,将抗-FITC CAR T细胞 (15 x 10⁶个细胞) 静脉内引入荷瘤小鼠中。将20只NSG小鼠分为四个研究组 (每组中5只动物)。第一组用抗-FITC CAR T细胞治疗,其以磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 作为阴性对照。第二、第三和第四组每隔一天用抗-FITC CAR T细胞与FITC-叶酸 (500 nmol/kg) 治疗。一旦检测到显著的毒性 (例如严重的体重减轻), 这些组就用如下任一种治疗: 连续施用FITC-叶酸 (第二组); 停止FITC-叶酸施用,直至小鼠恢复 (第三组); 或100倍过量的EC0923 (即游离叶酸) 和FITC-叶酸的混合物,直至小鼠恢复 (第四组)。定期测量体重以监测毒性。另外,测量每个治疗组的干扰素 (IFN) - γ 的血液浓度,以监测抗-FITC CAR T活化的程度。最后,测量肿瘤体积以鉴定每个治疗组中的抗肿瘤效力。

[1503] 图1A显示每个治疗组中的体重变化。在第二剂量的FITC-叶酸 (第1天和第2天) 后,除了PBS治疗组以外,每个治疗组都显示由于抗-FITC CAR T细胞介导的毒性导致的体重减轻。由于在每组小鼠中都检测到毒性,如上所述将对各组的治疗分为: (1) 连续剂量的FITC-叶酸 (连续组); (2) 在第4天和第6天不连续的FITC-叶酸注射 (中断组); 和 (3) 在第4天和第6天的100倍过量的游离叶酸和FITC-叶酸的混合物 (竞争物组)。如图1A中所示,用不连续的FITC-叶酸注射或竞争物分子和FITC-叶酸的混合物的施用治疗的组从严重的抗-FITC CAR T细胞介导的毒性恢复 (即体重增加)。然而,在第4天和第6天用FITC-叶酸连续治疗的组保持体重下降,以达到昏睡状态 (即体重减轻>原始的20%)。如图1B中所示,在连续剂量组中检测到显著量的IFN- γ 。与连续剂量组不同,中断组和竞争物组两者中的IFN- γ 浓度均减少。这些结果表明,可以通过导致CAR T细胞介导的毒性的减轻的方法来控制抗-FITC CAR T细胞活化。图1C概述治疗第一周的每个治疗组中的小鼠的存活率 (%)。由于在连续剂量组中检测到由抗-FITC CAR T细胞引起的毒性,连续剂量组中仅40%的小鼠 (即5只小鼠中的2只) 能够在治疗后存活。然而,如图1C中所示,由于CAR T细胞活化的降低,中断组和竞争物组两者中的所有小鼠均在CAR T细胞介导的毒性后存活。

[1504] 尽管可以通过控制抗-FITC CAR T细胞活化来管控抗-FITC CAR T细胞介导的毒性,但确定抗-FITC CAR T细胞活化的调节是否引起肿瘤应答的任何降低。因此,每隔一天测量肿瘤体积。如图2A和2B中所示,用抗-FITC CAR T细胞与PBS治疗的对照组没有显示肿瘤应答,如所预期。有趣的是,中断 (100%完全应答) 和竞争物组 (75%完全应答) 显示与连续剂量组 (肿瘤生长延迟) 相比更有效的肿瘤应答。连续剂量组中缺乏完全应答可能是由于: (1) FITC-叶酸的给药太频率,引起两种靶受体 (即CAR T细胞和癌细胞中的叶酸受体) 的饱和,导致抗-FITC CAR T细胞活化的减少; (2) 由于经由连续注射的FITC-叶酸可重复接合癌细胞,抗-FITC CAR T细胞可能已变得高度活化。该过度活化可能已经引起抑制剂机制的显著诱导,作为阻止活化的反馈机制。总之,监测毒性 (实施例9) 和肿瘤应答表明,可以通过管控CAR T细胞介导的毒性 (例如,细胞因子风暴) 来实现抗-FITC CAR T细胞活化的控制,而不丧失CAR T细胞的抗肿瘤效力。

[1505] 实施例10

[1506] 抗-FITC CAR T细胞调节对肿瘤应答的影响

[1507] 设计以下五个实验组以鉴定抗-FITC CAR T细胞应答和FITC-配体的剂量之间的关系：(1) 抗-FITC CAR T细胞与PBS；(2) 抗-FITC CAR T细胞与FITC-叶酸 (5 nmol/kg)；(3) 抗-FITC CAR T细胞与FITC-叶酸 (50 nmol/kg)；(4) 抗-FITC CAR T细胞与FITC-叶酸 (500 nmol/kg)；(5) 抗-FITC CAR T细胞与FITC-叶酸 (2500 nmol/kg)。将MDA-MB-231细胞皮下注射至NSG小鼠 (Jackson Laboratory) 的肩部以建立实体瘤异种移植物。当肿瘤体积达到约 50-100mm³时,将抗-FITC CAR T细胞 (15 × 10⁶个细胞) 和不同剂量的FITC-叶酸静脉内引入小鼠中。

[1508] 为了监测用不同剂量的FITC-叶酸的抗-FITC CAR T细胞活化,通过基于珠粒的免疫测定法 (来自Biolegend的Legendplex试剂盒) 测量小鼠血液中的IFN- γ 浓度。还测量肿瘤体积。通过测量体重减轻来监测每个治疗组的一般毒性。

[1509] 图3A-D显示抗-FITC CAR T细胞活化取决于FITC-叶酸的浓度。每个治疗组中的INF- γ 浓度显示钟形剂量应答曲线 (图3A)。抗-FITC CAR T细胞活化与FITC-叶酸剂量的增加正相关。然而,如果FITC-叶酸的剂量 (2500nmol/kg) 高于500nmol/kg,则CAR T细胞活化开始降低。这可能由于以下事实:在较高剂量的FITC-配体下,CAR T细胞 (例如抗-FITC) 和癌细胞 (例如叶酸受体) 两者中的靶受体可能分别饱和。这可降低FITC-配体作为CAR T细胞和癌细胞之间的桥的功能性。如图3B中所示,用肿瘤应答也证实钟形剂量应答。通过增加FITC-叶酸的浓度 (从5 nmol/kg至500 nmol/kg) 来诱导CAR T细胞的抗肿瘤效力。与促炎性细胞因子的水平相似,CAR T细胞的抗肿瘤效力在较高浓度的FITC-叶酸 (2500 nmol/kg) 下也开始降低。如图3C中所示,在以500 nmol/kg治疗的组中观察到最大毒性 (即,小鼠的最低存活率),这也显示最高的抗肿瘤效力。而且,经由减少或增加FITC-叶酸剂量,CAR T细胞介导的毒性逐渐减轻。因此,由于抗-FITC CAR T细胞活化取决于FITC-配体剂量,可以通过改变FITC-配体剂量来实现CAR T细胞介导的毒性的管控。

[1510] 实施例11

[1511] 可以关闭抗-FITC CAR T细胞活化信号的药物的施用

[1512] 为了测试抗-FITC CAR T细胞活化是否可以通过抑制T细胞活化信号的介体的药剂来抑制,选择以下药剂: (1) 达沙替尼, FDA批准将其用于治疗成人CML (已知达沙替尼通过抑制LCK活化来抑制天然T细胞活化), (2) PI3K抑制剂 (GDC0980), 其正在2期临床试验中 (已知PI3K在T细胞的活化中起关键作用), (3) 诱导型T细胞激酶 (ITK, BMS-509744), 其也参与T细胞活化信号并且处于临床前阶段。为了研究每种药剂在抑制CAR T细胞活化中的效力,在几种浓度的每种药剂存在的条件下进行体外CAR T细胞功能研究 (例如促炎性细胞因子产生测定和经由表面活化标志物评估CAR T细胞活化的程度)。

[1513] CAR T细胞功能研究1:促炎性细胞因子 (例如IFN- γ) 产生测定

[1514] 使用来自Biolegend的人IFN- γ 检测ELISA试剂盒,进行ELISA测定以定量在每种试剂存在的情况下抗-FITC CAR T细胞的IFN- γ 产生水平。为了进行ELISA测定,从抗-FITC CAR T细胞、MDA-MB-231细胞、FITC-配体和每种药剂的共孵育获得每个样品。将MDA-MB-231细胞以10⁴个细胞/100 μ l培养基的密度预接种于96-孔板的每个孔中,并生长过夜。第二天,将CAR T细胞引入其中接种MDA-MB-231细胞的每个孔中。引入100nM FITC-叶酸以活化抗-FITC CAR T细胞。将0.01 nM至100 μ M的每种药剂添加至每个孔中,并将细胞培养24小

时。共孵育后,收获上清液并在1000 g和4℃下离心10分钟以除去细胞碎片。使用来自每个样品的澄清的上清液以直接通过ELISA检测IFN- γ 或储存在-80℃下。根据制造商的说明进行ELISA测定。

[1515] CAR T细胞功能研究2:CAR T细胞活化的程度的评估

[1516] 为了鉴定在每种试剂存在的情况下CAR T细胞活化的程度,将CAR T细胞的表面用抗-CD69抗体(CD69是T细胞活化表面标志物)染色。具体地,将CAR T细胞在FITC-叶酸(100 nM)和每种试剂(0.01 nM至100 μ M)存在的情况下与预接种的MDA-MB-231细胞共孵育24小时。共孵育后,收获CAR T细胞,并在冰上用抗-CD69抗体染色15分钟。将CAR T细胞用染色缓冲液(PBS中的2% FBS)洗涤2次。洗涤后,通过流式细胞术分析CAR T细胞。

[1517] 图4A-B显示,可以通过靶向T细胞活化信号的关键介体来调节抗-FITC CAR T细胞的活化。如图4A和4B中所示,达沙替尼和GDC0980显示抑制抗-FITC CAR T细胞活化中的效力。在每种试剂(>10nM)存在的情况下,IFN- γ 产生均被显著抑制,并且抗-FITC CAR T细胞仍经由FITC-叶酸靶向癌细胞(图4A)。还通过检查标准T细胞活化标志物CD69证实使用每种药剂抑制CAR T细胞活化。如图4B中所示,在浓度>10 nM的每种试剂存在的情况下,活化的CAR T细胞(CD69阳性细胞)减少。尽管PI3K抑制剂和达沙替尼在体外抑制CAR T细胞活化中显示相似的效力,但可优选达沙替尼。

[1518] 实施例12

[1519] T细胞制备

[1520] 通过使用Ficoll密度梯度离心(GE Healthcare Lifesciences)从健康供体的全血分离人外周血单核细胞(PBMC)。然后通过使用EasySep™人T细胞分离试剂盒(STEM CELL technologies)从PBMC分离T细胞。在具有40-100 IU/mL人IL-2 (Miltenyi Biotech)、2%人AB型血清和1%青霉素/链霉素硫酸盐的TexMACS培养基(Miltenyi Biotech Inc)中培养T细胞。将Dynabeads人T-活化剂CD3/CD28 (ThermoFisher Scientific)以1:1比率添加至T细胞中以活化T细胞。活化后12-24小时,在8 μ g/mL聚溴(Santa CruzBiotech)存在的情况下,将T细胞通过在22-32℃下以1,200gspinfection 90分钟用FITC-CAR慢病毒颗粒转导T细胞。在除去活化珠粒之前,将含有具有CAR修饰的那些(CAR-T)和不含CAR修饰的那些(未转化T)的T细胞混合物在活化珠粒存在的情况下培养6天。荧光活化细胞分选用于基于其GFP表达分选出CAR-T细胞(GFP阳性)和未转化的T细胞(GFP阴性)。将分选的T细胞培养7-15天,然后注射至小鼠中。当使用T细胞混合物时,在小鼠注射之前,将CAR-T细胞和未转化的T细胞以期望比率混合。图6-11中显示的数据以用这些程序制备的T细胞获得。

[1521] 实施例13

[1522] 编码CAR基因的慢病毒载体的产生

[1523] 使用重叠PCR方法来生成包含针对荧光素的scFv的CAR构建体。合成针对荧光素的scFv,即从抗-荧光素(4-4-20)抗体衍生出的4M5.3 (Kd = 270 fM, 762碱基对)。通过重叠PCR将如在图5中所示编码人CD8 α 信号肽(SP, 63bp)、铰链和跨膜区域(249bp)、4-1BB的胞质结构域(CD137, 141bp)和CD3 ζ 链(336bp)的序列与抗-荧光素scFV融合。将所得的CAR构建体(1551bp)插入EcoRI/NotI切割的慢病毒表达载体pCDH-EF1-MCS-(PGK-GFP)(图5, System Biosciences)中。通过DNA测序来证实慢病毒载体中的CAR构建体的序列。除非本文另有说明,否则用于生成实施例的数据的CAR构建体具有SEQ ID NO:1的核酸序列和SEQ ID NO:2

的氨基酸序列。

[1524] 一种示例性的CAR核酸编码序列可以包含：

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCG
CCAGGCCGGATGTCGTGATGACCCAGACCCCCCTCAGCCTCCAGTGTCCTCGG
TGACCAGGCTTCTATTAGTTGCAGATCCAGCCAGTCCCTCGTGCACTCTAACGGT
AATACCTACCTGAGATGGTATCTCCAGAAGCCCGGACAGAGCCCTAAGGTGCTG

[1525] ATCTACAAAGTCTCCAACCGGGTGTCTGGAGTCCCTGACCGCTTCTCAGGGAGCG
GTTCCGGCACC GACTTCACCCTGAAGATCAACCGGGTGGAGGCCGAAGACCTCG
GCGTCTATTTCTGCTCTCAGAGTACACATGTGCCCTGGACCTTCGGCGGAGGGAC
CAAGCTGGAGATCAAAAGCTCCGCAGACGATGCCAAGAAAGATGCCGCTAAGAA
AGACGATGCTAAGAAAGACGATGCAAAGAAAGACGGTGGCGTGAAGCTGGATG
AAACCGGAGGAGGTCTCGTCCAGCCAGGAGGAGCCATGAAGCTGAGTTGCGTGA
CCAGCGGATTCACCTTTGGGCACTACTGGATGAACTGGGTGCGACAGTCCCCAGA
GAAGGGGCTCGAATGGGTCGCTCAGTTCAGGAACAAACCCTACAATTATGAGAC
ATACTATTCAGACAGCGTGAAGGGCAGGTTTACTATCAGTA

GAGACGATTCCAAATCTAGCGTGTACCTGCAGATGAACAATCTCAGGGTCTGAAG
ATACAGGCATCTACTATTGCACAGGGGCATCCTATGGTATGGAGTATCTCGGTCA
GGGGACAAGCGTCACAGTCAGTTTCGTGCCGGTCTTCCTGCCAGCGAAGCCCACC
ACGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCC
CTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGACACG
AGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTT
[1526] GTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGCAACCACAGGAACCG
TTTCTCTGTTGTAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCA
TTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTC
CAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCA
GACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTA
GGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG
ATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACT
GCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGC
GCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCA
AGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA (SEQ ID
NO:1)

[1527] 在上面显示的示例性核酸序列 (SEQ ID NO:1) 中, 第一个ATG是起始密码子。一种示例性的CAR氨基酸序列可以包含：

[1528]

MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNT
YLRWYLQKPGQSPKVLIIYKVSNRVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVIYFC
SQSTHVPWTFGGGTKLEIKSSADDAKKDAKKDDAKKDDAKKDDGGVKLDETGGGL
VQPGGAMKLSCVTSGFTFGHYWMNWVRQSPEKGLEWVAQFRNKPYNYETIYSDS
VKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRVEDTGIYYCTGASYGMEYLGQGTSTVTSFVPVF
LPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAG
TCGVLLLSLVITLYCNHRNRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE
EEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG
KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD
ALHMQALPPR (SEQ ID NO:2)

[1529]

[1530] 一种示例性的插入物可以包含：

[1531]

GCCACCATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCC
ACGCCGCCAGGCCGGATGTCGTGATGACCCAGACCCCCCTCAGCCTCCCAGTGTC
CCTCGGTGACCAGGCTTCTATTAGTTGCAGATCCAGCCAGTCCCTCGTGCACTCT
AACGGTAATACCTACCTGAGATGGTATCTCCAGAAGCCCGGACAGAGCCCTAAG
GTGCTGATCTACAAAGTCTCCAACCGGGTGTCTGGAGTCCCTGACCGCTTCTCAG
GGAGCGGTTCCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAACCGGGTGGAGGCCGAAG
ACCTCGGCGTCTATTTCTGCTCTCAGAGTACACATGTGCCCTGGACCTTCGGCGG
AGGGACCAAGCTGGAGATCAAAAGCTCCGCAGACGATGCCAAGAAAGATGCCG
CTAAGAAAGACGATGCTAAGAAAGACGATGCAAAGAAAGACGGTGGCGTGAAG
CTGGATGAAACCGGAGGAGGTCTCGTCCAGCCAGGAGGAGCCATGAAGCTGAGT
TGCGTGACCAGCGGATTACCTTTGGGCACTACTGGATGAACTGGGTGCGACAGT
CCCCAGAGAAGGGGCTCGAATGGGTCGCTCAGTTCAGGAACAAACCCTACAATT
ATGAGACATACTATTCAGACAGCGTGAAGGGCAGGTTTACTATCAGTA
GAGACGATTCCAAATCTAGCGTGTACCTGCAGATGAACAATCTCAGGGTCTGAAG
ATACAGGCATCTACTATTGCACAGGGGCATCCTATGGTATGGAGTATCTCGGTCA
GGGGACAAGCGTCACAGTCAGTTTCGTGCCGGTCTTCCTGCCAGCGAAGCCCACC
ACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCC
CTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGACACG
AGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTT
GTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAACCACAGGAACCG
TTTCTCTGTTGTTAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCA
TTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTC
CAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCA
GACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTA
GGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG
ATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACT
GCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGC
GCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCA
AGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA (SEQ ID
NO:3)

[1532]

[1533] 在上述的示例性插入物 (SEQ ID NO:3) 中, 第一个GCCACC序列可以包含限制性酶切割位点, 随后为ATG起始密码子。编码的氨基酸序列可以包含:

MALPVTALLPLALLLHAARPDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNT
YLRWYLQKPGQSPKVLIIYKVSNRVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVYFC
SQSTHVPWTFGGGTKLEIKSSADDAKKDAKKDDAKKDDAKKDDGGVKLDETGGGL
VQPGGAMKLSCVTSGFTFGHYWMNWVRQSPEKGLEWVAQFRNKPYNYYETYYSDS
[1534] VKGRFTISRDDSKSSVYLQMNRLRVEDTGIIYCTGASYGMEYLGQGTSTVTSFVPVF
LPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAG
TCGVLLLSLVITLYCNHRNRFVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE
EEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGG
KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD
ALHMQALPPR (SEQ ID NO:2)

[1535] 实施例14

[1536] 用于人T细胞转导的含有CAR基因的慢病毒的产生

[1537] 为了制备含有抗-荧光素(即,抗-FITC)单链可变片段(scFv) CAR的慢病毒,用编码抗-荧光素scFv CAR的慢病毒载体和第2代慢病毒包装质粒混合物(Cellecta)或ViraPower慢病毒包装混合物(ThermoFisher)共转染HEK-293TN包装细胞系。在24和48小时的转染之后,将含有具有CAR基因的慢病毒的上清液收获,并将病毒颗粒通过标准聚乙二醇病毒浓缩方法(Clontech)浓缩用于将来的人T细胞转导。

[1538] 实施例15

[1539] 从人PBMC分离人T细胞

[1540] 通过Ficoll密度梯度离心(GE Healthcare Lifesciences)从人外周血单核细胞(PBMC)分离T细胞。洗掉剩余的Ficoll溶液之后,通过使用EasySep™人T细胞分离试剂盒(STEM CELL technologies)分离T细胞。将纯化的T细胞在人IL-2 (100 IU/mL, Miltenyi Biotech Inc)存在的情况下在含有1%青霉素和链霉素硫酸盐的TexMACSTM培养基(Miltenyi Biotech Inc)中培养。在多孔板中以 1×10^6 个细胞/mL的密度培养T细胞。将T细胞分开并每2-3天重新补料。

[1541] 实施例16

[1542] 人T细胞的转导

[1543] 将分离的T细胞在人IL-2 (100 IU/mL)存在的情况下用与抗-CD3/CD28抗体(LifeTechnologies)偶联的Dynabeads活化12-24小时,然后用编码抗-荧光素CAR基因的慢病毒转导。在72小时之后收获细胞,并通过使用流式细胞术测量GFP荧光细胞来鉴定转导的T细胞上的CAR的表达。

[1544] 实施例17

[1545] 在体内测试CAR T细胞的抗肿瘤效力

[1546] 免疫缺陷的NSG小鼠(Jackson Laboratory)用于鉴定CAR T细胞体内抗肿瘤活性的效力。将表达叶酸受体的MDA-MB-231癌细胞系皮下注射至NSG小鼠的背部中,以建立实体瘤异种移植物。当达到约 $100-300\text{mm}^3$ 的肿瘤体积时,在将期望数量的CAR T细胞(如附图说明中所示)施用于荷瘤小鼠中前4小时,引入期望浓度的EC17(如附图说明中所示)。在初始施用EC17和CAR T细胞后,还每周三次引入(i.v.)期望浓度的EC17(如附图说明中所示)。向

对照小鼠施用没有CAR修饰的T细胞。向其他对照小鼠施用CAR-T, 但用PBS代替EC17给药。通过肿瘤体积监测抗肿瘤效力。通过体重减轻、总体动物形态和行为监测该疗法的一般毒性。

[1547] 调节桥剂量可以减少细胞因子释放和毒性, 同时维持抗肿瘤作用。如图6A-D的说明中所示, 将T细胞或CAR T细胞与0、20 nmol/kg、100 nmol/kg、500 nmol/kg、1500 nmol/kg或10000 nmol/kg EC17一起施用于小鼠。经74天测量肿瘤体积(图6A)和体重变化(图6B)。每个EC17剂量的最大体重减轻百分比显示于图6C中。表现出严重细胞因子释放综合征的小鼠的数量和每组中总小鼠的数量显示于括号中。每个EC17剂量显示sCRS的小鼠的百分比显示于图6D中。与具有较高EC17剂量(500 nmol/kg)的群组中的小鼠相比, 具有20和100 nmol/kg EC17剂量的群组中的小鼠具有较低的sCRS百分比和较少的体重减轻, 而它们都达到完全治愈。用过饱和的桥EC17剂量(1500和10000 nmol/kg), 较少的小鼠显示sCRS, 但较少的小鼠达到治愈。

[1548] 降低CAR-T剂量或将CAR-T剂量分为2个剂量可以避免严重细胞因子释放综合征, 同时维持抗肿瘤效力。EC17剂量固定在500 nmol/kg。如图8A-D的说明中所示, 将不同的CAR T剂量引入小鼠中。经56天测量肿瘤体积(图8A)和体重(图8B)。表现出严重细胞因子释放综合征的小鼠的数量和每组中总小鼠的数量显示于括号中。每个CAR T剂量的最大体重减轻百分比显示于图8C中。每个CAR T剂量显示sCRS的小鼠的百分比显示于图8D中。

[1549] 调节CAR T细胞剂量和EC17剂量可以影响肿瘤大小。将T细胞或CAR T细胞与100 nmol/kg或500 nmol/kg的EC17一起施用于小鼠。如图9A-B的说明中所示, 对照或CAR T细胞与不同浓度的EC17一起施用。持续75天测量肿瘤体积(图9A)和体重(图9B)。表现出严重细胞因子释放综合征的小鼠的数量和每组中总小鼠的数量显示于括号中。用优化的EC17量和CAR T数量, 小鼠仅具有2%体重减轻, 同时达到完全治愈。

[1550] 第二剂量的T细胞中CAR T细胞的存在可以影响肿瘤大小。如图10A-C的说明中所示, 向小鼠不施用第二剂量的T细胞, 施用具有2000万未转化的T细胞的第二剂量, 或具有未转化的T细胞和CAR T细胞的混合物的第二剂量。随时间测量肿瘤体积(图10A)和体重(图10B)。对于没有用第二剂量的T细胞治疗的一只小鼠, 和各自对于具有2000万未转化的T细胞的第二剂量或具有未转化的T细胞和CAR T细胞的混合物的第二剂量的治疗组的两只小鼠, 注射CAR T细胞混合物后2周, 在50 μ l患者血液中的CAR T细胞/正常T细胞的测量量显示于图10C中。图10C还显示正常T细胞和CAR T细胞的测量量的相应流式细胞术图, 以及注射CAR T细胞混合物后4周的相应肿瘤体积。

[1551] 调节EC17剂量时间表可以降低毒性并且可以影响肿瘤大小。如图11A-B的说明中所示, 使用不同的给药时间表将CAR T细胞和EC17施用于小鼠。随时间测量肿瘤体积(图11A)和体重(图11B)。表现出严重细胞因子释放综合征的小鼠的数量和每组中总小鼠的数量显示于括号中。调节桥给药频率(从每周三次(TIW)至每周一次(SIW))可以降低毒性并且实现更好的抗肿瘤功效。

[1552] 实施例18

[1553] 在体内测试CAR T细胞治疗期间的EC0923的拯救能力

[1554] 将CAR T细胞引入荷瘤小鼠中, 并且还每周三次引入(i.v.) EC17。当观察到严重细胞因子释放综合征时, 将一个剂量的10 μ mol/kg的EC0923引入拯救小鼠。监测小鼠另外4天, 并且将一些安乐死以评估器官。治疗后6小时、1天和4天, 来自用或不用EC0923治疗的小

鼠的器官显示于图7中。4小时后,用一个剂量的EC0923的小鼠开始移动并寻找食物,并且其脾脏和肝脏为红色。6小时后,没有EC0923的对照小鼠没有移动,并且其脾脏和肝脏为苍白的。用EC0923治疗的小鼠在24小时内再次活跃并且预期其存活,并将其放回正常的EC17给药时间表。没有EC0923的对照小鼠在24小时内开始移动一些,但必须将其安乐死以防止动物受苦。用EC0923的小鼠在4天内看起来正常。将小鼠之一安乐死,并发现其具有正常颜色的脾脏和肝脏。拯救的小鼠的脾脏肿大,其表明尽管单个剂量的EC0923用于拯救,CAR-T也仍然增殖。其他剩余的用EC0923的小鼠每周三次给予常规EC17给药,并且其肿瘤在4周内消失。

[1555] 实施例19

[1556] 在体内控制CAR T细胞活化

[1557] 可以通过停止FITC-配体施用、引入过量的竞争物小分子(例如叶酸(FA))或这两种方法的组合来控制抗-FITC CAR T细胞活化。

[1558] 为了显示对CAR T细胞活化的控制,将人乳腺癌细胞系(例如,MDA-MB-231)皮下注射至NSG小鼠(Jackson Laboratory)的肩部,以建立实体瘤异种移植物。当肿瘤体积达到约50-100mm³时,将约15x10⁶个抗-FITC CAR T细胞静脉内引入具有肿瘤的小鼠中。设计了五个研究组,以测试是否可以经由暂时终止FITC-配体,通过施用竞争物小分子,或停止FITC-配体和/或施用FA竞争物两者的组合方法来控制抗-FITC CAR T细胞活化。第一组通过施用抗-FITC CAR T细胞治疗,其以磷酸盐缓冲盐水(PBS)作为阴性对照。在研究过程中每隔一天,将第二、第三、第四和第五组用与FITC-叶酸(500 nmol/kg)混合的抗-FITCCAR T细胞治疗。一旦检测到显著的毒性事件(例如,体重的严重减轻),则如下对于四组改变治疗方案:(1)组2用叶酸-FITC注射连续(连续);(2)组3接受联合治疗,包括终止FITC-叶酸和接受过量的游离叶酸(中断 + FA竞争物);(3)组4接受FITC-叶酸的终止,直至小鼠恢复(中断);和(4)组5接受含有相对于FITC-叶酸100倍过量的游离叶酸(即EC0923)的混合物,直至小鼠恢复(FITC-叶酸 + FA竞争物)。定期测量小鼠体重以测试毒性。

[1559] 结果。图12(0线附近的条= PBS对照;0线以下每组中的第一条=连续;0线以下每组中的第二条=中断 + FA竞争物;0线以下每组中的第三条=中断;0线以下每组中的第四条=FA竞争物)显示,可以通过经由停止FITC-叶酸注射、施用过量的竞争物分子或两者的组合控制抗-FITC CAR T活化来管控抗-FITC CAR T细胞介导的毒性。图12的图表和表格显示,可以通过经由停止FITC-配体(中断);施用过量的作为竞争物的游离叶酸与FITC-叶酸(500nmol/kg)(FITC-叶酸 + FA竞争物);或这两种方法的组合(中断+ FA竞争物)控制CAR T细胞活化来管控CAR T细胞介导的毒性(例如细胞因子风暴)。图12进一步显示用CAR T细胞+ FITC-叶酸治疗的组由于CAR T细胞的过度活化而表明体重减轻。当检测到严重的CAR T细胞介导的毒性(即>10%体重减轻)时,测试三种不同的方法(如上所提及),以发现是否可以降低CAR T细胞活化的程度并可以管控CAR T细胞介导的毒性。基于所述数据,三种方法能够控制CAR T细胞活化的程度,以减轻CAR T细胞介导的毒性。此外,与单独的每种方法相比,停止FITC-叶酸和施用过量的游离叶酸的组合显示在降低CAR T细胞介导的毒性中更好的效力。如所预期,当限制FITC-叶酸量时,CAR T细胞活化的程度降低。同时,过量的游离叶酸的施用可以通过干扰FITC-叶酸和叶酸受体之间的相互作用来与FITC-叶酸竞争。因此,包括终止FITC-叶酸和施用叶酸竞争物的组合治疗可以促进CAR T细胞介导的毒性的快速

降低。

[1560] 实施例20

[1561] FITC-叶酸体内剂量递增研究

[1562] 为了测试FITC-叶酸剂量的逐渐递增是否可以使CAR T细胞介导的毒性最小化,而不损害CAR T细胞的抗肿瘤效力,设计实验。首先将一个剂量的FITC-叶酸(0.05 nmol/kg)与抗-FITC CAR T细胞注射物(使用约 15×10^6 个细胞)一起引入携带MDA-MB-231(肿瘤体积约50-100mm³)的NSG小鼠中。向小鼠施用额外两个剂量的约0.05 nmol/kg FITC-叶酸。然后,将FITC-叶酸的剂量从5 nmol/kg(单个剂量)逐渐增加至50 nmol/kg(两个剂量)。在FITC-叶酸剂量逐渐增加后,用500 nmol/kg剂量的FITC-叶酸治疗小鼠。该浓度显示良好的肿瘤效力,但如果最初用500 nmol/kg剂量治疗小鼠,则也引起毒性。通过测量体重减轻来监测每个治疗组的一般毒性。测量肿瘤体积以监测抗-FITC CAR T细胞的抗肿瘤效力。

[1563] 图13显示,FITC-叶酸的逐渐剂量增加可以使抗-FITC CAR T细胞介导的毒性最小化,而不损害CAR T细胞的抗肿瘤效力。具体地,图13A和13C表明,与用500 nmol/kg FITC-叶酸连续治疗的组相比,使用逐渐治疗方案未检测到严重毒性(即,>10%重量减轻)。图13B显示,通过FITC-叶酸剂量的逐渐增加的CAR T细胞的逐渐活化不会负面影响CAR T细胞的抗肿瘤效力。因此,FITC-叶酸的逐渐增加剂量可用于使用FITC-叶酸桥治疗肿瘤,同时避免显著的严重毒性副作用。

[1564] 实施例21

[1565] 叶酸-FITC对CAR-T细胞数量和血清细胞因子的影响

[1566] 将三重阴性的人乳腺癌细胞系(即MDA-MB-231)皮下植入免疫缺陷(例如NSG)小鼠的肩部。当肿瘤体积达到约50-100mm³时,将抗-FITC CAR T细胞(10^7 个细胞)与FITC-叶酸(500 nmol/kg)或PBS静脉内引入。为了监测CAR T细胞增殖和促炎性细胞因子产生,在第6天收集小鼠血液。通过用抗-人CD3抗体(Biolegend)对全血样品染色并检测CD3阳性T细胞群上的GFP表达来评估CAR T细胞增殖。通过基于珠粒的免疫测定法(来自biolegend的Legendplex试剂盒)测量促炎性细胞因子产生。

[1567] 图14A显示,当将桥分子引入荷瘤小鼠中时,抗-FITC CAR T细胞仅显著增殖。然而,在抗原匹配的桥分子不存在的情况下,抗-FITC CAR T细胞没有显著增殖。此外,当用抗-FITC CAR T细胞和抗原匹配的桥分子两者治疗荷瘤小鼠时,显著产生促炎性细胞因子(例如IL-2、TNF- α 和IFN- γ)。图14A和14B一起显示,通过经由抗原匹配的桥分子叶酸-FITC靶向癌细胞,可以特异性增殖和活化抗-FITCCAR T细胞以产生促炎性细胞因子。

[1568] 实施例22

[1569] 体外干扰素 γ 测定

[1570] 为了研究桥剂量和抗-FITC CAR T细胞活化之间的关系,将叶酸受体阳性癌细胞系(MDA-MB-231)以 10^4 个细胞/100 μ l培养基的密度接种于96-孔板的每个孔中,并使细胞生长过夜。然后将抗-FITCCAR T细胞(5×10^4 个细胞)添加至含有癌细胞与各种浓度的叶酸-FITC(0.001 nM至100 μ M)的每个孔中,持续6-24小时。共孵育后,将含有抗-FITC CAR T细胞和癌细胞的板以350 x g离心10分钟以除去细胞和细胞碎片,并通过ELISA(来自Biolegend的人IFN- γ ELISA试剂盒)测定50 μ l上清液以检测抗-FITC CAR T细胞的IFN- γ 产生。

[1571] 为了评估桥剂量和抗-FITC CAR T细胞活化之间的关系,在各种浓度的FITC-叶酸

下将CAR T细胞与癌细胞体外共孵育后,测量抗-FITC CAR T细胞产生的IFN- γ 的水平,如上所述。如图15中所示,随着桥剂量增加,IFN- γ 产生的水平增加。然而,如果桥的剂量高于最佳剂量(即最高的IFN- γ 水平[10nM]),则当引入非常高剂量(例如10 μ M和100 μ M)的桥时,IFN- γ 产生降低并最终未检测到(即钟形桥剂量应答)。该体外结果可能是因为高剂量的桥可以在体外使癌细胞和CAR T细胞两者上的所有靶受体饱和。这些结果显示,可以通过操作桥的剂量来控制CAR T细胞介导的毒性。在图15中,X-轴上的“适配子剂量”是叶酸-FITC剂量。

[1572] 实施例23

[1573] CAR T细胞体内治疗期间竞争物的拯救能力

[1574] 将过量的CAR T细胞(各研究中的8至1千万个)引入携带MDA-MB-231肿瘤的小鼠中,并且还每周三次引入(i.v.) 500 nmol/kg EC17。当观察到严重细胞因子释放综合征时,静脉内引入一个剂量的EC0923(叶酸)或非栓系的荧光素(均为10 μ mol/kg)以拯救小鼠(图16)。用一个剂量的EC0923或荧光素的小鼠在4小时后开始移动并寻找食物,在24小时内再次活跃,并在4天内看起来正常。然后继续EC17施用。没有EC0923或荧光素的对照小鼠在4小时后没有移动,并且因病不得不安乐死。在施用竞争物后6小时收集血液样品,并测量细胞因子水平(参见图16)。四周后,用拯救治疗从小鼠清除肿瘤。针对细胞因子产生测试的所有小鼠都注射800万个CAR-T细胞。

[1575] 实施例24

[1576] CAR-T活性取决于桥剂量水平和肿瘤的存在两者

[1577] 将CAR-T细胞注射至幼稚小鼠(每只小鼠800万个)和携带MDA-MB-231肿瘤的小鼠(每只小鼠500万个)中。每周三次施用各种水平的EC17。CAR-T细胞注射后10天测量血液中的IFN- γ 。如图17中所示,细胞因子产生(CAR-T活性)取决于桥(EC17)剂量水平和肿瘤的存在两者。

[1578] 实施例25

[1579] CAR-T细胞在没有肿瘤的幼稚小鼠中不增殖

[1580] 将五百万个CAR-T细胞注射(i.v.)至没有肿瘤的幼稚小鼠中。每周三次施用500 nmol/kg EC17。监测小鼠5周,并且每周将一些安乐死以评估器官。对于任何小鼠,无论是否施用EC17,都没有观察到明显的体重减轻(毒性)(图18A)。CAR-T细胞在施用或未施用EC17的幼稚小鼠中均不增殖,如血液(图18B)和脾脏大小(图18C)中的CAR-T细胞数所示。

[1581] 实施例26

[1582] FITC-CAR-T在不同叶酸受体阳性肿瘤异种移植物模型中的EC17依赖性抗肿瘤活性

[1583] 免疫缺陷的NSG小鼠(Jackson Laboratory)用于显示用每周单个剂量的EC17的CAR T细胞抗肿瘤活性的效力。使用两种表达叶酸受体的癌细胞系以建立皮下实体瘤异种移植物:MDA-MB-231具有高叶酸受体表达,而OV90具有低叶酸受体表达。当达到约100-250 mm³的肿瘤体积时,将小鼠分为两组。向“EC17 500 nmol/kg”组(nmol/kg等同于本专利申请中对于桥使用的nmol/kg)中的小鼠注射500 nmol/kg体重的EC17,而未向“无EC17”组中的小鼠注射EC17。四小时后,向两组中的小鼠施用500万个抗-FITC CAR-T细胞。在初始施用EC17和CAR-T细胞后,每周一次仅向“EC17 500 nmol/kg”组中的小鼠注射(i.v.) 500

nmol/kg EC17。通过肿瘤体积监测抗肿瘤效力。

[1584] 图19A显示,抗-FITC CAR-T细胞本身在具有高叶酸受体表达的MDA-MB-231肿瘤模型中不具有抗肿瘤活性。只有用施用EC17(每周单个剂量),抗-FITC CAR-T细胞才消除MDA-MB-231肿瘤。因此,每周单个剂量的EC17足以活化抗-FITC CAR-T细胞并将其桥接至肿瘤细胞以消除肿瘤。图19B显示,抗-FITC CAR-T细胞在OV90异种移植物模型中也显示EC17依赖性抗肿瘤活性,所述OV90异种移植物模型在肿瘤细胞上具有低表达水平的叶酸受体。

[1585] 实施例27

[1586] 通过调节桥剂量水平维持CAR-T抗肿瘤活性

[1587] 免疫缺陷的NSG小鼠(Jackson Laboratory)用于研究在不同EC17剂量水平存在的情况下CAR-T细胞抗肿瘤活性及其毒性。MDA-MB-231肿瘤细胞用于建立皮下实体瘤异种移植物。当达到约100-150mm³的肿瘤体积时,在i.v.注射1000万个CAR-T细胞前4小时预注射各种浓度的EC17。然后,在最初的EC17和CAR-T细胞注射后,每周三次施用各种浓度的EC17。向阴性对照组注射500 nmol/kg EC17(提前4小时)和5000万个未修饰的T细胞。然后在初始注射后每周三次施用500 nmol/kg EC17。测量肿瘤大小和体重以监测抗肿瘤活性和毒性。如图20A中所示,用1000万个CAR-T细胞和500 nmol/kg、100nmol/kg或20 nmol/kg EC17治疗的小鼠中的肿瘤都被消除,但阴性对照组的肿瘤未被消除。当比较施用1000万个CAR-T细胞、但不同EC17剂量水平的小鼠中由于治疗导致的体重减轻时,发现施用500 nmol/kg EC17 TIW的组显示最强的毒性(体重减轻(图20B))。20 nmol/kg EC17 TIW在三个EC17剂量组中显示最低毒性(以体重减轻指示),但仍维持足够的抗肿瘤活性。通过调节EC17剂量水平,可以维持CAR-T抗肿瘤活性,同时可以减少所得的体重减轻(毒性)。在图20A和20B中,EC17也被称为“适配子”或“双特异性适配子”。

[1588] 实施例28

[1589] FITC-CAR-T/EC17疗法在各种FR+肿瘤模型中显示抗肿瘤活性

[1590] 为了测试FITC-CAR-T/EC17疗法在各种FR+肿瘤模型中是否具有抗肿瘤活性,向NSG小鼠皮下植入MDA-MB-231(三重阴性的乳腺癌细胞系)、OV90(人卵巢癌细胞系)、KB(人宫颈腺癌细胞系)、SKOV-3(人卵巢癌细胞系)或HEK293-FRa(用人FRa稳定转染的HEK293)。当肿瘤大小达到100-300 mm³时,通过尾静脉注射一个剂量的500 nmol/kg体重的EC17,随后在4小时后施用500万个FITC-CAR-T细胞。初始EC17/CAR-T施用(约第7天)后,每周一次给药500 nmol/kg EC17,每周三次监测小鼠的肿瘤大小和体重。EC17给药日在图中以绿色垂直虚线标记。如图21至25中所示,在EC17不存在的情况下,FITC-CAR-T治疗未显示任何抗肿瘤活性,而在各种FR+肿瘤异种移植物模型中,FITC-CAR-T/EC17疗法显示EC17依赖性抗肿瘤活性。该疗法实现在MDA-MB-231异种移植物小鼠中的100%治愈,在OV90小鼠中的50%治愈和50%稳定疾病,在所有KB异种移植物小鼠和SKOV3异种移植物小鼠中的稳定疾病,和在HEK293-FRa模型中的进行性疾病。在所有荷瘤小鼠中也观察到EC17剂量依赖性暂时性体重减轻,表明CAR-T的活化在这些小鼠中是EC17依赖性的。

[1591] MDA-MB-231模型中的FITC-CAR-T抗肿瘤活性显示于图21A和21B中。OV-90模型中的FITC-CAR-T抗肿瘤活性显示于图22A和22B中。KB模型中的FITC-CAR-T抗肿瘤活性显示于图23A和23B中。HEK-FRa模型中的FITC-CAR-T抗肿瘤活性显示于图24A和24B中。SKOV-3模型中的FITC-CAR-T抗肿瘤活性显示于图25A和25B中。

[1592] 实施例29

[1593] FITC-CAR-T相关的毒性(例如SCRS)可以通过用EC17预先涂抹肿瘤来降低

[1594] 为了评估用EC17预先涂抹肿瘤是否可以减少疗法相关的毒性(例如sCRS),向NSG小鼠植入MDA-MB-231。由于更大的肿瘤负荷与更严重的CRS相关,当肿瘤大小达到400-500 mm³时,开始治疗。将小鼠分为两组,并在CAR-T施用前的不同时间点用500 nmol/kg EC17预先给药(图26A和26B)。组#1在施用800万个CAR-T细胞前4小时预先给药,而组#2在施用800万个CAR-T细胞前24小时预先给药。然后在CAR-T施用后每周一次(在第1、8、15天等) i.v. 给药500 nmol/kg EC17(图26D和26E)。尽管两组中的小鼠显示相似的EC17依赖性体重减轻,但用EC17预先涂抹4小时的组中的小鼠比CAR-T施用前24小时用EC17涂抹的组中的小鼠显示更差的sCRS。如图26C中所示,在4小时预先涂抹组中,33%的小鼠在第2周内死亡(或由于sCRS而安乐死),33%在第3周内死亡,17%在第4周内死亡,并且仅17%经5周存活;在24小时预先涂抹组中,仅17%小鼠在第2周内死亡(或由于sCRS而安乐死),并且83%经5周存活。在这两组中发现抗肿瘤活性没有差异,并且所有存活的小鼠最终都变得没有肿瘤。因此,预先涂抹24小时的小鼠中的毒性小于用EC17预先涂抹4小时的小鼠中。

[1595] 实施例30

[1596] 用EC17预先涂抹肿瘤降低毒性(sCRS)

[1597] FITC-CAR-T相关的毒性(例如sCRS)可以通过组合EC17预先涂抹和CAR-T施用后EC17给药的延迟来降低。为了探索控制疗法相关的毒性的策略,评估EC17预先涂抹和EC17给药时间表优化的组合。将携带MDA-MB-231肿瘤(100-200 mm³)的小鼠分为三组。向组#1(无EC17预先涂抹)中的小鼠通过尾静脉施用800万个FITC-CAR-T细胞,且然后在CAR-T施用后每周给药500 nmol/kg EC17作为单个剂量(第2、9、16天等)。组#2中的小鼠(EC17,预先涂抹4小时)在施用800万个CAR-T细胞前4小时用500 nmol/kg EC17预先涂抹,且然后在CAR-T施用后每周给药500 nmol/kg EC17作为单个剂量。组#3中的小鼠(EC17,4小时预先涂抹+延迟的第二EC17剂量)在施用800万个CAR-T细胞前4小时也用500 nmol/kg EC17预先涂抹,但推迟500 nmol/kg的EC17的第二剂量,直至CAR-T施用后7天,且然后遵循EC17给药的每周单个剂量时间表。CAR-T施用后三天,通过视觉观察评估三组中的小鼠。如图27A中所示,组#1(未预先涂抹)中的小鼠显示最差的sCRS,组#2((EC17 4小时预先涂抹)中的小鼠显示sCRS,但没有比组#1中的那些严重。最重要的是,组#3(EC17 4小时预先涂抹+延迟的第二EC17剂量)中的小鼠未显示sCRS。如图27B中所示,用EC17 4小时预先涂抹和延迟的第二EC17剂量的组合治疗的组#3中的小鼠显示最小的体重减轻。EC17给药时间的变化不影响CAR-T抗肿瘤活性,并且所有三组中的小鼠都达到完全应答(图27C)。

[1598] 实施例31

[1599] 拯救后血液中的CAR-T数量增加

[1600] EC17/CAR-T疗法策略可通过用游离叶酸或游离荧光素置换桥来控制。为了评估FITC-CAR-T疗法策略是否可通过桥(例如EC17)剂量/置换来控制,向携带MDA-MB-231肿瘤(100-250 mm³)的NSG小鼠施用过量的FITC-CAR-T细胞(800万个),并且每周三次(在CAR-T施用后的第1、3、5天等)用500 nmol/kg EC17给药。那些小鼠在一周后显示sCRS,并且分为三组。向一组小鼠 i.v. 注射10 μmol/kg未缀合的叶酸(EC0923),向第二组 i.v. 注射10 μmol/kg荧光素胺用于“拯救”,而第三组未治疗作为对照组。然后将来自三组的小鼠在注射

EC0923或荧光素胺后的8、12、24和48小时安乐死,并分析其血液样品的CAR-T细胞数和细胞因子水平。血液中的CAR-T细胞用以APCeF780标记的抗-人CD45抗体(Biolegend)染色,并通过FACS计数。将CountBright™绝对计数珠粒(ThermoFisher Scientific)混合至样品中,并用作细胞计数的参考。如图28A-D中所示,用10 $\mu\text{mol/kg}$ EC0923(未缀合的叶酸)和10 $\mu\text{mol/kg}$ 荧光素胺(未缀合的荧光素)两者的治疗均引起血液循环中的CAR-T数量增加,表明当桥(EC17)被过量的未缀合的叶酸或荧光素置换时,一些CAR-T细胞从其靶肿瘤细胞解离并且返回至血液循环。早在EC0923/荧光素注射后6小时,发现拯救的小鼠的血液循环中CAR-T细胞计数的增加,表明小鼠对置换“拯救”迅速应答。此外,荧光素似乎比叶酸(EC0923)引起更多的CAR-T置换,这与以下先前描述的发现相关:与叶酸相比,用荧光素胺拯救更强烈地降低血液中的细胞因子产生。

[1601] 实施例32

[1602] 三种拯救试剂(叶酸、荧光素钠(NAFL)和甲酰四氢叶酸)的比较

[1603] 一个剂量的叶酸、荧光素钠或甲酰四氢叶酸可以通过置换CART和肿瘤细胞之间的桥EC17在sCRS下“拯救”小鼠。为了评估是否可以通过使用可以从FITC-CAR-T或FR+肿瘤细胞置换EC17的竞争物来拯救具有FITC-CAR-T疗法相关的sCRS的小鼠,向49只携带MDA-MB-231肿瘤(150-250 mm^3)的NSG小鼠用过量的FITC-CAR-T细胞(800万个)施用,然后将其中的36只在CAR-T施用后48小时用500 nmol/kg EC17给药,将其中的6只未用EC17给药并用作“无EC17”对照,并且其中的7只用260 $\mu\text{mol/kg}$ 荧光素钠给药(无EC17,但有荧光素)以测试其毒性。一天后,尽管在“无EC17”对照组和“无EC17、但有荧光素”中的小鼠是健康的,用EC17给药的小鼠开始显示sCRS,并且分为四组。每个组都用10 $\mu\text{mol/kg}$ 甲酰四氢叶酸或10 $\mu\text{mol/kg}$ 叶酸或260 $\mu\text{mol/kg}$ 荧光素钠或作为未拯救对照的无物i.v.注射。在拯救注射后10小时评估那些小鼠,并且发现其具有不同严重程度水平的sCRS。尽管所有三个拯救组都显示与未拯救的对照组相比从sCRS的更好恢复,但这些拯救组中的恢复水平是不同的。sCRS严重程度顺序为(从最差到最少):无拯救组>甲酰四氢叶酸拯救组>叶酸拯救组>荧光素钠拯救组>无EC17组。还监测小鼠体重变化作为毒性的指标。如图29A-E中所示,与其他两个拯救组相比,用荧光素拯救的小鼠具有最小的体重减轻。为了评估拯救注射是否影响FITC-CAR-T细胞的抗肿瘤活性,每周两次(第9、11、15、18、22、25天等)向这些小鼠给药500 nmol/kg EC17,并监测肿瘤大小。如图30A和图30B中所示,几乎所有小鼠都治愈,除了荧光素拯救组中的9只小鼠中的2只在CART注射后第36天仍留下微小肿瘤,表明单个剂量的拯救试剂对FITC-CAR-T的抗肿瘤活性影响很小。

[1604] 实施例33

[1605] 荧光素钠拯救

[1606] 显示荧光素钠作为EC17/CAR-T抗肿瘤疗法中缓解细胞因子释放综合征的拯救剂。

[1607] 材料:

[1608] 内部合成EC17(叶酸-FITC, m.w. 873)。荧光素钠(AK-FLUOR®, 荧光素注射物, USP)购自Purdue Pharmacy。

[1609] 体内方法:

[1610] 细胞系

[1611] MDA-MB-231是一种人三重阴性的乳腺癌(TNBC)细胞系,其表达高水平的人FR α 。

THP1-FRβ是稳定表达人FRβ的CD33⁺ CD123⁺人急性髓性白血病细胞系。使细胞分别在含有5-10%热失活的胎牛血清 (HIFCS) 的无叶酸RPMI1640培养基 (GIBCO BRL) (FFRPMI) 中生长, 并使用标准细胞培养技术维持在5% CO₂气氛下。

[1612] 小鼠

[1613] 雌性NSGTM (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ, 库存号005557) 小鼠购自The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), 并且当它们达到~4周龄时使用。在到达当天向小鼠喂食叶酸缺乏的饮食 (TestDiet, St. Louis, MO)。

[1614] 肿瘤植入

[1615] 通过将培养的细胞以2 x 10⁶皮下植入NSG小鼠中而生成MDA-MB-231肿瘤。

[1616] CAR-T细胞制备

[1617] 如前所述制备FITC-CAR-T细胞。体外培养12-20天后, 将它们冷冻并在-80℃下储存于冷冻试剂中, 所述冷冻试剂含有50%热失活的AB+人血清、40% T细胞培养基和10% DMSO。将冷冻的CAR-T细胞在37℃下快速解冻, 用PBS洗涤两次, 并用于动物注射。

[1618] 荷瘤小鼠的EC17/CAR-T疗法

[1619] 通常, 当小鼠肿瘤达到~200-250 mm³时开始EC17/CAR-T疗法, 并且在CAR-T施用后2天开始以500 nmol/kg的每周EC17剂量。所有EC17剂量都在一天结束时 (~3-4 PM) 给予, 以允许细胞因子释放综合征 (CRS) 发展过夜。当动物经历0-5分级量表上的等级3-4的严重CRS时, 在第一剂量的EC17后, 施用各种剂量 (0.06-60 μmol/kg) 的荧光素钠拯救 (图31)。收集荧光素钠拯救后各个时间点 (3-27小时) 的血浆样品用于多重细胞因子分析。

[1620] 通过流式细胞术的全血细胞分析

[1621] 用以3000g 4℃离心10分钟, 从预定体积的EDTA处理的全血中除去血浆, 并将所得细胞沉淀物与10倍体积的室温1X RBC裂解溶液 [由10X储备液制备; Biolegend, 目录号420301] 孵育5分钟, 以400g离心5分钟, 并将细胞沉淀物在10倍体积的冰冷磷酸盐缓冲盐水 pH=7.4 中洗涤, 并用40μm尼龙过滤器过滤, 且然后再次沉淀。然后将白细胞沉淀物重悬浮于流式细胞术染色溶液 [1%牛血清白蛋白, 50mg/mL人IgG (EquitechBio, 目录号SLH56-0001), 0.9%叠氮化钠, 在磷酸盐缓冲盐水 (pH=7.4) 中] 中, 所述流式细胞术染色溶液补充有抗-小鼠Fc γ III/II受体 (CD16/CD32) 阻断剂 [克隆2.4G2; BD Bioscience, 目录号553142, 以1:100 (v/v) 稀释] 和抗-人Fc阻断剂 [BD Biosciences, 目录号564220, 以1:50 (v/v) 稀释]。白细胞表面标志物染色通过在黑暗中的冰上持续20分钟添加向每个样品添加的以下荧光染料标记的单克隆抗体来进行: 抗-人CD45-APCeF780 [克隆HI30, eBioscience #47-0459-42, 以1:20 (v/v) 稀释], 抗-人CD137-BV650 [克隆4B4-1, BD Bioscience #564092, 以1:20 (v/v) 稀释], 抗-人CD8α-PECy7 [克隆RPA-T8, BD Bioscience, 目录号557746, 以1:20 (v/v) 稀释], 抗-人CD4-Percpe710 [克隆SK3, eBioscience目录号46-0047-42, 以1:20 (v/v) 稀释]。白细胞染色后, 将细胞用PBS洗涤, 并重悬浮于含有53,000个CountBrightTM珠粒 [Invitrogen目录号C36950] 的冷PBS中, 并转移至流式细胞仪收集管中。在Gallios流式细胞仪 (Beckman Coulter, Brea, CA) 上收集流式细胞术数据, 其中收集最少15,000个CountBrightTM珠粒事件, 以试图收集足够的白细胞事件以准确计数每个小鼠血液样品中输注的CAR T细胞。根据Invitrogen的说明, 计算每个血液样品中的CAR T细胞的浓度的测定。简而言之, 将CAR T细胞鉴定为人CD45⁺ GFP⁺事件, 并使用KaluzaTM流式细胞仪软件容易地

区分和计数。CountBright™珠粒用于鉴定CAR T细胞的抗体组中未利用的荧光染料均匀标记,并且容易与白细胞区分开,并计数珠粒事件。因为向每个样品管中添加53,000个CountBright™珠粒,我们计算53,000个总珠粒与每个样品收集的珠粒事件的比率,并将珠粒比率设置为等于每个样品中未知的CAR T细胞数除以收集的已知的CAR T细胞事件数。解决未知物给予我们从已知体积的每个血液样品分离的CAR T细胞的数量。然后,将每只输注小鼠的循环中CAR T细胞的数量在图表上表示为每50 μ L全血中CAR T细胞的总数。通过利用未配对、两尾、students t-检验确定统计学显著性,其中显著性设置为 $p < 0.05$,用于三组小鼠各自之间的比较。

[1622] 肿瘤和正常组织的单细胞悬浮液的制备

[1623] 收获实体瘤(100-1000 mm^3),称重,并切成小块,且然后转移至含有20 mL肿瘤消化混合物的50 mL管中。酶促肿瘤消化混合物由补充有抗生素的无血清和叶酸缺乏的RPMI1640培养基中的0.5 mg/mL胶原酶IV (Sigma-Aldrich,目录号C5138)、0.5mg/mL透明质酸酶(Sigma-Aldrich,目录号H3506)和0.1 mg/mL DNA酶I(Sigma-Aldrich,目录号DN25)组成。将肿瘤片段在37°C下在水平摇床上以300 rpm消化1小时。之后,将肿瘤消化物以400 x g离心5分钟,且肿瘤细胞沉淀物经历红血细胞裂解步骤,然后用冷磷酸盐缓冲盐水(PBS, pH 7.4)洗涤,且最后通过40 μ m尼龙细胞滤网过滤。

[1624] 数据和结果:

[1625] 如图31中所示,评估一次性60 $\mu\text{mol/kg}$ 的荧光素钠拯救对体内细胞因子产生和CAR-T抗肿瘤活性的影响。在第0天,将~1040万个FITC-CAR-T细胞静脉内施用于携带MDA-MB-231肿瘤的NSG小鼠中。CAR-T细胞输注后近似48小时,将小鼠分为3组。第一组(#1)不用EC17给药,并充当CAR-T细胞对照,第二组(#2)和第三组(#3)用单个剂量的EC17(500 nmol/kg)静脉内注射。在EC17剂量后17小时,接受EC17 (500 nmol/kg)的组#2和#3中的小鼠显示sCRS,而CAR-T细胞对照组#1中的小鼠未显示任何相关毒性。然后,组#2接受单次静脉内荧光素钠(60 $\mu\text{mol/kg}$),而组#3则未被拯救。荧光素钠拯救后七小时,用60 $\mu\text{mol/kg}$ 荧光素钠拯救的组#2中的小鼠恢复并评分为低3级sCRS,而组#3中的没有拯救的小鼠仍具有3级sCRS。将来自每组的三只卫星动物安乐死以收集血液和器官,用于细胞因子分析和器官毒性评估。经由心脏穿刺获得全血,并将其收集至含有EDTA的管中。荧光素钠拯救后二十七小时,组#2中的用60 $\mu\text{mol/kg}$ 荧光素钠拯救的小鼠恢复并且sCRS规模降低至2级,而组#3中的没有拯救的小鼠具有较差sCRS(3-4级)。此时,将来自每组的6只卫星小鼠安乐死用于血液收集和器官评估。如果期望,每周向剩余小鼠用500nmol/kg EC17的单个剂量给药,并且EC17给药日在图36中标记为垂直虚线,其在符号“EC17”之后出现。每周2-3次监测肿瘤体积和体重变化。

[1626] 如图36中所示,尽管仅CAR-T组中的肿瘤迅速生长,但用500 nmol/kg EC17 SIW给药的小鼠中的肿瘤保持缓慢生长约一周,且然后开始缩小并最终消失。尽管拯救组中的肿瘤多花费几天来开始缩小,但在拯救组和未拯救组之间没有发现肿瘤生长的显著差异。该发现表明,一个剂量的60 $\mu\text{mol/kg}$ 荧光素钠在体内不干扰CAR-T抗肿瘤活性。如图36B中所示,拯救组中的小鼠与未拯救组中的那些相比看起来具有较小的体重减轻,表明60 $\mu\text{mol/kg}$ 荧光素钠拯救可以减少CAR-T疗法相关的毒性(显示为更少的体重减轻)。

[1627] 还在荧光素钠拯救后7小时和27小时评估来自所有三组的器官,并比较它们的重

量,如图32中所示。如图32A中所示,拯救后7小时,与从仅CAR-T细胞组中的小鼠收集的肺,来自用CAR-T和EC17治疗的小鼠的肺肿胀和更重。如图32B中所示,拯救后27小时,来自拯救组的肺重量下降大于未拯救组中的肺重量下降。尽管在拯救组和未拯救组之间没有发现肝脏或肾脏的明显体重差异,但通过目测检查,拯救组中的器官看起来更健康(肝和肾褪色更少,且肺水肿更少)。对于图32,NaFL拯救后27小时,肺水肿得到改善。

[1628] 还测量CRS相关的细胞因子水平,以确定拯救是否使CAR-T细胞失活并减少细胞因子产生。通过遵循制造商的说明,使用基于FACS的多分析物流动测定试剂盒(BioLegend)和基于ELISA的细胞因子检测试剂盒(ThermoFisher Scientific)测量小鼠血浆样品中的人细胞因子水平。图33A-G显示拯救后7小时的细胞因子水平。对于图33,NaFL拯救后<7小时内,小鼠血液中的细胞因子产生减少。图34A-G显示拯救后27小时的细胞因子水平。对于图34,NaFL拯救后<7小时内,小鼠血液中的细胞因子产生减少。图35A-E显示细胞因子水平的变化。对于图35,血液中的细胞因子水平和小鼠总体状况(CRS评分)之间存在延迟。总之,用CAR-T细胞施用、但未用EC17施用的小鼠在其血液中具有非常低水平的细胞因子,而用EC17给药的小鼠在其血液中具有升高的细胞因子水平,包括IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-6、IL-10、GM-CSF和IL-3。更重要的是,用60 $\mu\text{mol/kg}$ 荧光素钠拯救的小鼠中的细胞因子水平比未拯救的小鼠中的那些低得多(拯救后7小时和27小时)。拯救后7小时,一些细胞因子(例如IL-2、TNF- α 、IL-3、GM-CSF和IL-6)的水平降低至正常范围,而其他细胞因子(例如IFN- γ)在拯救后27小时降低至接近正常范围。

[1629] 为了评估较低水平的荧光素钠是否还可以拯救sCRS下的小鼠,进行相同的拯救研究,除了荧光素钠以0.06、0.6和6 $\mu\text{mol/kg}$ 给药。如图50中所示,施用~830万个冷冻的CAR-T细胞,并以500 nmol/kg EC17剂量诱导sCRS。尽管没有拯救的小鼠显示sCRS的严重程度增加,但用荧光素钠拯救的小鼠显示sCRS严重程度的剂量依赖性降低(图50)。总之,用6 $\mu\text{mol/kg}$ 荧光素钠拯救的小鼠恢复最快,而用0.06 $\mu\text{mol/kg}$ 荧光素钠拯救的小鼠恢复最慢。

[1630] 如图51中所示,用一个剂量的6 $\mu\text{mol/kg}$ 荧光素钠的拯救不影响EC17/CAR-T细胞疗法的抗肿瘤活性(图51A,肿瘤生长曲线),但拯救减少EC17依赖性CAR-T毒性(较少的初始体重减轻)(图51B)。如图52中所示,小鼠血液中的细胞因子水平也取决于用于拯救的荧光素钠的浓度,并且中值有效剂量为约0.6 $\mu\text{mol/kg}$,其中关键细胞因子(例如IL-2、TNF- α 、IFN- γ 等)早在拯救后3小时开始应答。

[1631] 血液中的FITC CAR T细胞的计数

[1632] 实验时间线在图53A中表示。在第0天,从冷冻保存取出GFP + FITC-CAR T细胞[克隆4M5.3],解冻,且然后以1000万/小鼠[肿瘤~250mm³]静脉内输注至携带MDA-MB-231肿瘤的NSG小鼠中。输注后近似48小时,将小鼠分为三组,以测试荧光素钠对体内、特别是循环中的CAR T细胞的行为的影响。第一组充当无EC17/无荧光素对照(图53B-C)。第二组用单个剂量的EC17[500nmol/kg]静脉内注射以生成严重细胞因子释放综合征(sCRS)(图53B-C,红色)。第三组(图53B-C)接受EC17 [500nmol/kg]以生成sCRS,但也在近似18小时后接受单次静脉内荧光素钠[60 $\mu\text{mol/kg}$]以抑制CAR T细胞与叶酸受体阳性肿瘤细胞的相互作用。荧光素钠拯救后的二十七小时,将小鼠安乐死,并经由心脏穿刺获得全血,并将其收集至含有EDTA的管中,且然后根据方法部分中详述的方案制备血液白细胞用于分析。不与小鼠标志物交叉反应的对于人表面标志物特异性的单克隆抗体用于流式细胞术分析。针对抗-人

CD45的染色允许清楚鉴定在输注CAR T细胞的小鼠的血液中循环的人T细胞(图53B,y-轴,点图)。另外,用CAR慢病毒构建体成功地转导的输注的人T细胞通过绿色荧光显现,所述绿色荧光通过共表达也存在于CAR慢病毒构建体中的编码绿色荧光蛋白的cDNA实现(图53B,x-轴,点图)。因此,通过对人CD45+ GFP+双重阳性事件门控,我们能够可靠地区分和计数表达FITC-CAR的人T细胞的数目与未转导的人T细胞或小鼠白细胞的数目(图53B)。

[1633] 在向未接受CAR桥分子EC17的小鼠的对照组输注后四天,人CAR T细胞在小鼠循环中以高水平存在(图53B,左点图)。有趣的是,在接受一个剂量的EC17的小鼠组中,在循环中检测到非常少的CAR T细胞,这据推测是因为EC17已引导CAR T细胞定位至在肿瘤细胞的表面的抗原位点(图53B,中间点图)。我们在这种治疗条件下常规观察到的通过CAR T细胞的肿瘤缩小,导致产生升高水平的人炎性细胞因子(包括TNF α 和IFN γ),引起这些动物中的严重CRS。重要的是,当我们向这些患病的动物给药60 $\mu\text{mol/kg}$ 荧光素钠时,我们不仅减轻sCRS的症状,而且我们还观察到CAR T细胞重新出现在循环中(图53B,右点图)。因此,过量的荧光素可以介导从标记叶酸受体阳性肿瘤细胞的EC17 CAR桥分子释放CAR T细胞。从肿瘤细胞释放CAR T细胞后,驱动sCRS的炎性细胞因子的产生将停止,因此导致拯救荷瘤小鼠免于死亡。

[1634] 通过共刺激表面受体(包括4-1BB(CD137))的表达增加,显现通过T细胞受体或嵌合抗原受体的T细胞的活化。在T细胞受体或嵌合抗原受体的初始抗原活化后,4-1BB的这种增加表达将持续几天。不令人惊讶的是,在表征来自仅用CAR T细胞输注的小鼠血液的循环的CAR T细胞后,我们观察到在从不接受EC17的动物分离的输注的CAR T细胞中的少于2%的表面上几乎没有表面活化标志物4-1BB的表达(图54)。有趣的是,当我们测量从接受CAR T细胞输注加上EC17和荧光素钠治疗的动物的循环CAR T细胞的活化状态时,循环CAR T细胞表达大量的4-1BB,这与其最近在收获前两天在肿瘤内被EC17的活化一致(图54)。无法可靠地分析来自接受CAR T输注加上EC17治疗的第二组荷瘤小鼠的循环CAR T细胞的4-1BB表达,这是由于其循环中的数目非常低(图53A-C)。

[1635] 尽管60 $\mu\text{mol/kg}$ 的荧光素钠远低于人患者中建立的耐受剂量,但拯救用FITC CAR T细胞和EC17输注的患者免于sCRS的荧光素钠的最小有效剂量的知识将是有用的。如图50和图55A中所示,将输注CAR-T的动物用EC17给药以诱导sCRS,且然后在一天后分成四个不同的组。三组接受0.06、0.6和6 $\mu\text{mol/kg}$ 的低剂量的荧光素钠拯救。值得注意的是,该研究中使用的最高荧光素钠剂量比图31中给予小鼠的剂量低10倍。在荧光素钠拯救后3和24小时,将来自上述剂量组的动物安乐死,使得可以计数血液中的循环CAR-T细胞(图55B-C)。有趣的是,接受0.06-6 $\mu\text{mol/kg}$ 荧光素钠治疗的动物中的循环CAR T细胞的数量早在拯救后3小时增加(图55B)。这表明荧光素钠的注射可能将CAR T细胞从其在FR+肿瘤细胞上的靶标置换出。重要的是,在拯救后24小时,以荧光素钠剂量依赖性方式增加CAR T细胞渗入血液中(图55C)。图53-55中显示的这些观察表明,通过给予低剂量的荧光素钠,可以在经历严重CRS的动物中不同程度地改变FITC CAR-T细胞的行为和定位。

[1636] 实施例34

[1637] 先前的拯救并未影响EC17诱导的FITC-CAR-T重新活化

[1638] 为了评估拯救是否影响FITC-CAR-T功能,向12只携带MDA-MB-231肿瘤(150-250 mm³)的NSG小鼠施用过量的FITC-CAR-T细胞(800万)。然后在CAR-T施用后48小时,向9只小

鼠给予500 nmol/kg EC17,并且3只小鼠不给药EC17,并用作“仅CAR-T”对照。尽管“仅CAR-T”对照组中的小鼠是健康的,但用EC17给药的小鼠在一天后显示sCRS,并且分为三组。一组小鼠(CAR-T + EC17 + FA)用10 μ mol/kg叶酸i.v.注射,第二组小鼠(CAR-T + EC17 + NaFL)用260 μ mol/kg荧光素钠i.v.注射,而第三组(CAR-T + EC17)未被拯救。六天后,所有小鼠均用500 nmol/kg EC17进行再次加强,用于FITC-CAR-T重新活化,并在EC17再次加强后18小时收集其血液样品用于血液细胞因子分析。人细胞因子产生是CAR-T活化的指标。如图37A-B中所示,拯救的小鼠(“CAR-T + EC17 + FA”组和“CAR-T + EC17 + NaFL”组)中的人细胞因子(例如IFN γ , IL-2)的水平与无拯救的小鼠(“CAR-T + EC17”组)中的那些相似。数据表明,拯救并不影响EC17诱导的CAR-T重新活化。

[1639] 实施例35

[1640] 血液中的细胞因子产生和体重减轻是CAR-T剂量依赖性的

[1641] 为了评估小鼠血液中的细胞因子产生是否与小鼠中的CAR-T数量相关,将15只携带MDA-MB-231肿瘤(250-500 mm³)的NSG小鼠用500 nmol/kg体重的EC17给药,且然后分为三组。四小时后,每组分别用2、5或12.5百万个FITC-CAR-T细胞施用。然后将三组中的小鼠在CAR-T施用后24小时用第二剂量的500 nmol/kg EC17给药,并在48小时后收集其血液样品(施用时间表显示于图38A中)。如图38B中所示,用1250万个CAR-T细胞施用的小鼠显示最大的体重减轻,而用250万个CAR-T细胞施用的小鼠显示最小的体重减轻。细胞因子(例如人IL-2、人IFN γ 、人TNF α 和人IL-10)的产生与所施用的CAR-T细胞的数量相关(图39A-D)。随着小鼠中的CAR-T细胞的增加,细胞因子的产生增加,且体重减轻也增加。

[1642] 实施例36

[1643] 体内FITC-CAR-T细胞增殖是EC17剂量依赖性的

[1644] 为了评估桥剂量是否可以控制体内CAR-T增殖,将携带MDA-MB-231肿瘤(250-500 mm³)的NSG小鼠分为4组,并分别用0、5、50或500 nmol/kg体重的EC17给药(如图40A中所示)。四小时后,将四组用500万个在体外培养11天的FITC-CAR-T细胞施用,而用500nmol/kg EC17预先给药的一组小鼠未用CAR-T细胞给药,并被用作“无CAR-T对照”。两天后,将所有五组中的小鼠用各种水平的EC17给药,如图40B中所示。尽管“无CAR-T剂量”组中的小鼠几乎不显示CRS相关综合征,但用500万个CAR-T细胞给药的小鼠在CAR-T施用后3天显示EC17剂量依赖性的CRS。然后在第二EC17剂量后16小时收集血液样品,并分析血液循环中的CAR-T数量(图40B)。如图40B中所示,与用0 nmol/kg EC17给药的小鼠相比,用5 nmol/kg EC17给药的小鼠在其血液循环中具有更少的CAR-T细胞,这可能是由于EC17依赖的CAR-T细胞向肿瘤组织的转运,其将CAR-T细胞从血液循环移除。重要的是,用相同量的CAR-T细胞施用、但用50或500 nmol/kg EC17给药的小鼠在其血液循环中具有更多的CAR-T细胞。该发现的解释是,与用5nmol/kg EC17给药的小鼠中相比,用50或500 nmol/kg EC17给药的小鼠中的CAR-T细胞增殖更多,使得血液循环中的CAR-T计数更高。

[1645] 为了进一步证实FITC-CAR-T增殖是EC17剂量依赖性的,我们还评估当给予CAR-T更多的时间以安定并增殖时的CAR-T体内增殖。为此目的,我们检查六天前用CAR-T细胞施用并已给予四个剂量的EC17以加强CAR-T体内增殖的小鼠中的CAR-T细胞数。将携带MDA-MB-231肿瘤(250-500 mm³)的NSG小鼠分为4组,并分别用0、5、50或500 nmol/kg体重的EC17给药(如图41A中所示)。四小时后,将所有小鼠用500万个在体外培养18天的FITC-CAR-T细

胞施用。然后在CAR-T施用后第1、3、5天给药各种水平的EC17以加强CAR-T增殖。在最后一个EC17剂量后24小时收集小鼠血液样品,血液中的CAR-T细胞用抗-人CD45抗体染色并通过FACS计数。如图41B中所示,CAR-T计数在无EC17剂量的小鼠中最低,在用5 nmol/kg EC17剂量的小鼠中增加,在用50nmol/kg EC17给药的小鼠中达到最高,并且当EC17剂量为500 nmol/kg时开始下降,可能是由于EC17的过饱和以及随后的CAR-T细胞从肿瘤细胞的解离。总之,在两个不同的时间点观察到携带MDA-MB-231肿瘤的小鼠中的EC17剂量依赖性FITC-CAR-T增殖,表明EC17剂量水平的控制可以控制FITC-CAR-T体内增殖。

[1646] 实施例37

[1647] FITC-CAR-T在幼稚小鼠中不增殖和引起毒性

[1648] 测试幼稚小鼠和携带FR+肿瘤异种移植物的老鼠两者中的FITC-CAR-T增殖及相关毒性的评估。为了评估FITC-CAR-T体内增殖是否依赖于桥(例如EC17)和肿瘤抗原(例如叶酸受体)的共同存在,比较幼稚小鼠和携带FR+肿瘤异种移植物的老鼠(有或没有EC17)中的FITC-CAR-T体内增殖。将5-8百万个CAR-T细胞(如图42和43中所示)施用(i.v.)至没有肿瘤的幼稚小鼠和携带FR+肿瘤异种移植物(80-200mm³)的老鼠中。如果期望,在CAR-T施用前4小时和在CAR-T施用后每周3次给药500 nmol/kg EC17。监测小鼠的体重变化和血液循环中的CAR-T细胞计数;还每周将一些老鼠安乐死以评估器官。如图42中所示,无论是否给药EC17,没有肿瘤负荷的幼稚小鼠都没有显示任何明显的体重减轻(毒性)。另一方面,携带FR+MDA-MB-231肿瘤的老鼠显示EC17依赖性的体重减轻:每周三次用EC17给药的老鼠在前10天内具有体重减轻,而没有EC17剂量的老鼠没有体重减轻(图42)。还比较血液样品中的CAR-T细胞计数以评估CAR-T增殖。如图43A中所示,无论是否给药EC17,FITC-CAR-T在用5或8百万个FITC-CAR-T细胞给药的老鼠中不增殖。相反,当每周三次给予500 nmol/kg EC17时,用FR+ HEK-FRa异种移植物植入的老鼠中的FITC-CAR-T细胞具有快速增殖。由于脾脏大小的增大是CAR-T体内增殖的另一种指标,还测量脾脏大小,如图43B中所示。无论是否给药EC17,没有肿瘤负荷的幼稚小鼠都未显示很多脾脏肿大(无CAR-T增殖的指标)。另一方面,当携带FR+MDA-MB-231肿瘤的老鼠每周三次用500 nmol/kg EC17给药时,它们具有增大的脾脏。总之,甚至在EC17存在的情况下,FITC-CAR-T细胞也不在幼稚小鼠中增殖或引起毒性,但当还施用EC17时在携带FR+肿瘤的老鼠中迅速增殖。

[1649] 对于图42,使用MDA-MB-231 s.c.模型。对于图43A,使用HEK-FRa s.c.异种移植物模型。对于图43B,使用MDA-MB-231 s.c.模型。

[1650] 结果显示,FITC-CAR-T在没有肿瘤负荷的幼稚小鼠中不活跃。将CAR-T细胞i.v.注射至幼稚小鼠(每只老鼠800万个)和携带MDA-MB-231肿瘤的老鼠(每只老鼠500万个)中。当期望时,每周三次施用500 nmol/kg EC17(如附图标记中所示)。一周后,将小鼠血液样品收集于EDTA包被的管中,并在4℃下以3000g离心15分钟,且分离血浆并在-20℃下保存,直至分析。

[1651] 根据制造商的说明,使用LEGENDplex人细胞因子组试剂盒(BioLegend, San Diego, CA)测量细胞因子水平(包括IFN)。将血浆样品用测定缓冲液稀释,且然后与固定有针对分析的细胞因子的抗体的捕获珠粒混合。在室温下摇动孵育2小时后,添加针对分析的细胞因子的生物素化的检测抗体,并在室温摇动再孵育一小时。然后添加藻红蛋白(PE)标记的链霉抗生物素蛋白以与检测抗体上的生物素结合,并使用FACS以读取结合复合物(捕

获抗体-细胞因子-检测抗体)上的PE的信号。PE的强度与分析的细胞因子的水平成正比。同时测量一系列已知浓度的细胞因子溶液,并将其用作定量分析样品中的细胞因子水平的标准品。

[1652] 如图44中所示,细胞因子产生(CAR-T活性)取决于肿瘤的存在。甚至当将小鼠每周三次用500 nmol/kg EC17给药时,CAR-T细胞在幼稚小鼠中不活跃。

[1653] 实施例38

[1654] 桥分子的表征

[1655] 为了检查桥分子结合CAR T细胞上的抗-荧光素scFv的能力,开发竞争结合测定法。由于其荧光与表达GFP的CAR T细胞的荧光重叠,不能使用来自CAR T细胞结合的桥的荧光素信号的测量。为此目的,在室温下,在过量(1 μ M)竞争性配体(即FITC-叶酸、FITC-DUPA、FITC-CA9)不存在或存在的情况下,允许FITC-Alexa647 (10nM)结合抗-荧光素CAR T细胞1小时。孵育后,将抗-荧光素CAR T细胞用PBS洗涤3次,以除去未结合的FITC-Alexa647,并通过流式细胞术分析洗涤的细胞的Alexa647荧光。

[1656] 测试的所有桥分子(即FITC-叶酸、FITC-DUPA、FITC-CA9)都能够结合表达CAR的T细胞,如通过桥竞争性阻断FITC-Alexa 647与工程改造的T细胞的结合的能力确立(图45)。

[1657] 实施例39

[1658] 通用CAR T细胞可以在添加抗原匹配的桥后体外消除表达正交抗原的各种癌细胞

[1659] 将每种人癌细胞系以 10^4 个细胞/100 μ l培养基的密度接种至96孔板中,并生长过夜。在桥分子不存在或存在的情况下,将抗-荧光素CAR T细胞添加至每个孔中。共孵育6-24小时后,将板以350xg离心10分钟以除去碎片,并使用PierceTM LDH细胞毒性测定试剂盒(Thermo Fisher Scientific, MA)分析上清液的乳酸脱氢酶释放(细胞死亡分析),并使用人IFN γ ELISA试剂盒(Biolegend, CA)分析上清液的干扰素 γ (IFN γ)水平。

[1660] 为了评估抗-荧光素CAR T细胞的特异性和通用性,将抗-荧光素CAR T细胞分别与表达FR、PSMA、CA9或NK1R的HEK细胞在桥分子存在或不存在的条件下共孵育。如图46、小图A中所示,当存在抗原匹配的桥分子时,抗-荧光素CAR T细胞可以消除靶HEK细胞。用表达叶酸受体(KB、MDA-MB-231和OVCAR3)、PSMA(LNCaP和22RV1)或CA9(HT29、SK-RC-52、A549和SKOV3)的各种人癌细胞系进一步评估具有多种桥分子的抗-荧光素CAR T细胞的通用性(图46B)。裂解对于所测试的桥和表达桥肿瘤配体的受体的相应肿瘤是特异性的。

[1661] 实施例40

[1662] 桥分子的浓度和通用CAR T细胞的抗肿瘤活性之间的关系

[1663] 将每种人癌细胞系以 10^4 个细胞/100 μ l培养基的密度接种至96孔板中,并生长过夜。在桥分子不存在或存在的情况下,将抗-荧光素CAR T细胞添加至每个孔中。共孵育6-24小时后,将板以350xg离心10分钟以除去碎片,并使用PierceTM LDH细胞毒性测定试剂盒(Thermo Fisher Scientific, MA)分析上清液的乳酸脱氢酶释放(细胞死亡分析),并使用人IFN γ ELISA试剂盒(Biolegend, CA)分析上清液的干扰素 γ (IFN γ)水平。

[1664] 如图47中所示,所有桥分子都行为相似。随着桥的浓度增加,CAR T细胞抗肿瘤活性也增加。然而,如果添加更高浓度的桥分子,CAR T细胞抗肿瘤活性则降低(即,钟形剂量应答)。该结果是由于以下事实:当添加更高浓度的桥分子时,桥分子不能在CAR T细胞和癌细胞之间形成桥,因为较高浓度的桥分子可以分别使CAR T细胞和癌细胞上的两种受体饱

和。

[1665] 实施例41

[1666] 通用CAR T细胞可以在添加抗原匹配的桥分子后体内消除表达正交抗原的各种癌细胞

[1667] 通过使用慢病毒基因递送系统生成表达正交抗原的MDA-MB-231的多个克隆。将免疫缺陷的NSG小鼠 (Jackson Laboratory, ME) 用表达叶酸受体、PSMA或CA9的MDA-MB-231细胞中的每一种皮下植入,并且当肿瘤大小达到~100mm³时,用CAR T细胞静脉内注射,且然后用桥分子 (即FITC-叶酸、FITC-DUPA或FITC-CA9) 静脉内注射。每隔一天用卡尺测量肿瘤,并根据以下等式计算肿瘤体积:肿瘤体积= $\frac{1}{2}(L \times W^2)$,其中L是肿瘤的最长轴,且W是垂直于L的轴。

[1668] 为了评估每种桥是否可以诱导抗-荧光素CAR T细胞的抗肿瘤活性,生成表达叶酸受体、PSMA或CA9的MDA-MB-231的多个克隆。如图48中所示,当注射抗原匹配的桥时,抗-荧光素CAR T细胞可以消除表达正交抗原的肿瘤细胞。综上,这些数据表明,单一抗-荧光素CAR T细胞可以通过注射抗原匹配的与靶抗原的桥来消除多种肿瘤。

[1669] 实施例42

[1670] 通用CAR T细胞可以经由桥分子的混合物体内消除两种肿瘤 (两种分开的肿瘤模型)

[1671] 为了评估桥分子的混合物是否可以消除表达正交抗原的两种肿瘤,我们建立两种不同的肿瘤模型。作为第一种肿瘤模型,将PSMA+ MDA-MB-231和CA9+ MDA-MB-231各自植入NSG小鼠的两个不同位置 (即右侧腹:CA9+ MDA-MB-231,左侧腹:PSMA+MDA-MB-231)。对于第二种肿瘤模型,将PSMA+ MDA-MB-231和CA9+ MDA-MB-231以1:1比率预混合并植入一个位置。如图49的小图A和B中所示,当注射两种桥 (即FITC-PSMA和FITC-CA9的混合物) 时,可以实现表达PSMA或CA9的两种肿瘤细胞的完全消除。然而,如果仅输注所述桥之一 (即单独的FITC-DUPA或单独的FITC-CA9),则表达不匹配抗原 (即PSMA或CA9) 的肿瘤连续生长。综上,这些数据表明抗-荧光素CAR T细胞可以通过利用桥分子的混合物来克服肿瘤异质性。

[1672] 将PSMA+ MDA-MB-231和CA9+ MDA-MB-231植入NSG小鼠 (JacksonLaboratory, ME) 的两个不同位置 (即右侧腹:PSMA+ MDA-MB-231,左侧腹:CA9+ MDA-MB-231),或者预混合两种肿瘤细胞 (即50%的PSMA+ MDA-MB-231和50%的CA9+ MDA-MB-231) 后植入一个位置。当肿瘤大小达到~100mm³时,注射抗-荧光素CAR T细胞 (8×10^6) 加上FITC-DUPA、FITC-CA9或两者。每隔一天用卡尺测量肿瘤,并根据以下等式计算肿瘤体积:肿瘤体积= $\frac{1}{2}(L \times W^2)$,其中L是肿瘤的最长轴,且W是垂直于L的轴。结果显示于图49A和49B中。

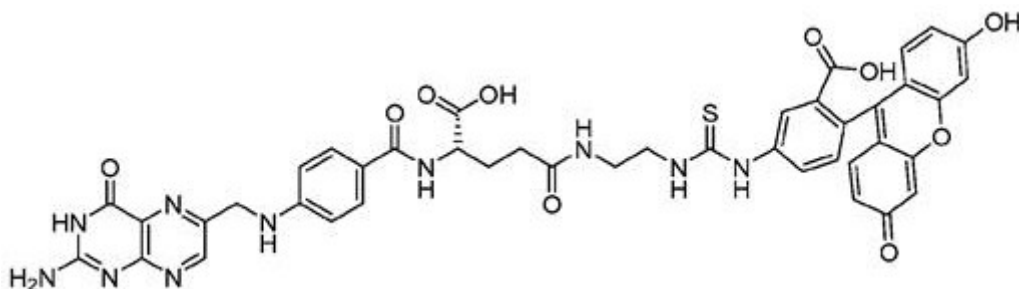
[1673] 桥分子的合成

[1674] FITC-叶酸

[1675] 在四甲基胍和二异丙胺存在的情况下在无水二甲基亚砜 (DMF) 中将叶酸- γ -乙二胺与异硫氰酸荧光素 (FITC) 异构体I (Sigma-Aldrich) 偶联。将粗产物加载至Xterra RP18制备型HPLC柱 (Waters) 上并用梯度条件洗脱,所述梯度条件开始于99% 5 mM磷酸钠 (流动相A, pH 7.4) 和1%乙腈 (流动相B) 并在10 min中达到90% A和10% B,流速为20 mL/min。在这些条件下,FITC-叶酸主峰通常在27-50 min洗脱。通过具有UV检测器的分析型反相HPLC监测FITC-叶酸级分的特性。将具有大于98.0%纯度 (LCMS) 的级分冻干以获得最终的FITC-

叶酸产物。

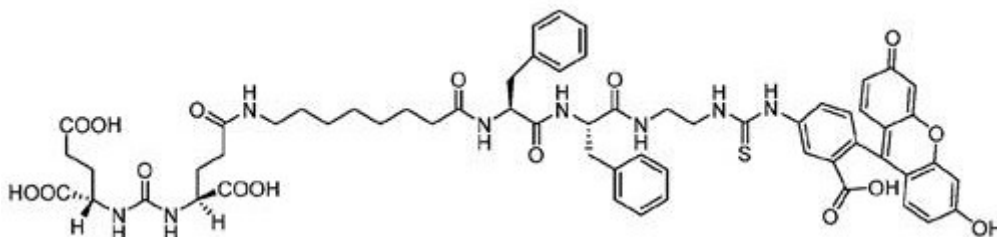
[1676]



[1677] FITC-DUPA

[1678] 如下通过固相方法合成DUPA-FITC。将通用的NovaTag树脂(50 mg, 0.53 mM)用二氯甲烷(DCM) (3 mL)膨胀,随后用二甲基甲酰胺(DMF, 3 mL)膨胀。将20%哌啶于DMF中的溶液(3×3 mL)添加至树脂,并用氩气鼓泡5 min。将树脂用DMF(3×3 mL)和异丙醇(*i*-PrOH, 3×3 mL)洗涤。使树脂在DMF中膨胀之后,加入DUPA-(OtBu)-OH (1.5当量)、HATU(2.5当量)和DIPEA(4.0当量)于DMF中的溶液。用氩气鼓泡2 h,并将树脂用DMF(3×3 mL)和*i*-PrOH(3×3 mL)洗涤。使树脂在DCM中膨胀之后,加入1 M HOBt于DCM/三氟乙烷(TFE) (1:1)中的溶液(2×3 mL)。用氩气鼓泡1 h,将溶剂除去并将树脂用DMF(3×3 mL)和*i*-PrOH(3×3 mL)洗涤。使树脂在DMF中膨胀之后,加入Fmoc-Phe-OH(2.5当量)、HATU(2.5当量)和DIPEA(4.0当量)于DMF中的溶液。用氩气鼓泡2 h,并将树脂用DMF(3×3 mL)和*i*-PrOH(3×3 mL)洗涤。重复以上顺序另外2个偶联步骤,用于添加8-氨基辛酸和异硫氰酸荧光素或异硫氰酸罗丹明B。将最终的化合物使用三氟乙酸(TFA):H₂O:三异丙基硅烷:混合物(95:2.5:2.5)从所述树脂切割并在真空下浓缩。将浓缩的产物在乙醚中沉淀并在真空下干燥。将粗产物使用制备型RP-HPLC [λ = 488 nm;溶剂梯度:在25min中1%B至80%B,80%B洗涤运行30 min;A = 10 mM NH₄OAc, pH = 7; B = 乙腈(ACN)]纯化。在真空下除去ACN,并将纯级分冷冻干燥以产生DUPA-FITC作为淡棕色-橙色固体。RP-HPLC: *t*_R = 8.0 min (A = 10 mM NH₄OAc, pH = 7.0; B = ACN, 溶剂梯度:在10min中1%B至50%B, 80%B洗涤运行15 min)。¹H NMR (DMSO-*d*₆/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的(*M* + *H*)⁺计算值,1040.3712,实测值,1040.3702。UV/vis: $\lambda_{\max}$ = 491 nm。

[1679]



[1680] FITC-CA9

[1681] 在50mL圆底烧瓶中,使用Teflon磁力搅拌棒将CA9配体(53.6mg,在实验室中合成)溶解于期望量的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)(2-3mL)中。使用真空除去环境空气并用氮气代替,这在三个循环中完成。然后将圆底保持在恒定氮气下。向烧瓶中添加28.9mg N-(3-二甲

DELIVERY CONJUGATES, 申请号:PCT/US2015/44229;以其整体通过引用并入本文)。

[1686] 实施例43

[1687] 用桥分子控制细胞因子风暴

[1688] 显示使用低分子量桥分子调节CAR T细胞介导的细胞因子释放综合征的强度。描述用于消除毒性和有时致命的细胞因子释放综合征、而同时改善CAR T细胞治疗效力的四种新型策略。

[1689] 细胞系和T细胞

[1690] 将叶酸受体阳性细胞系(例如KB和MDA-MB-231)在5% CO₂、37℃下在含有10%热失活的胎牛血清和1%青霉素-链霉素的无叶酸RPMI 1640(Gibco, Ireland)中维持。通过来自健康志愿者的新鲜人血液(IRB#:1702018875)的Ficoll密度梯度离心(GE Healthcare Lifesciences, USA)分离外周血单核细胞(PBMC)。使用EasySep™人T细胞分离试剂盒(STEM CELL technologies, Canada)从PBMC分离纯CD3⁺T细胞,且然后在人IL-2 (100IU/ml, Miltenyi Biotech Inc, CA)存在的情况下在含有1%青霉素和链霉素硫酸盐的TexMACS™培养基(Miltenyi Biotech Inc, CA)中进行培养。分裂T细胞,且每2-3天更换上述培养基。

[1691] 编码抗-荧光素CAR基因的慢病毒载体的生成

[1692] 使用重叠PCR方法来生成含有针对荧光素的单链可变片段(scFv)的CAR构建体。从人抗-荧光素抗体4M5.3 (Kd = 270 fM, 762bp)的亲和力优化序列合成scFv的编码序列(GeneScript, NJ) [21]。编码人CD8α信号肽(SP, 63bp)、CD8α的铰链和跨膜区(249bp)、4-1BB的胞质结构域(4-1137, 141bp)和CD3ζ链的胞质结构域(336bp)的序列(购自GeneScript)通过重叠PCR与抗-荧光素scFv融合。将所得CAR构建体(1551bp)插入EcoRI/NotI切割的慢病毒表达载体pCDH-EF1-MCS-(PGK-GFP)(System Biosciences, CA)中,并使用PureLink HiPure质粒midiprep试剂盒(Invitrogen, CA)进行扩增/纯化。通过DNA测序(Purdue Genomic Core Facility, IN)证实慢病毒载体中的CAR构建体的序列。

[1693] 慢病毒的产生和人T细胞转导

[1694] 为了制备含有抗-荧光素(scFv) CAR的慢病毒,将293TN包装细胞系用编码抗-荧光素scFv CAR的慢病毒载体和包装质粒的第二代混合物(Collecta, CA)共转染。24和48小时转染后,收获含有编码CAR基因的慢病毒的上清液,并使用标准聚乙二醇病毒浓缩方法(Clontech, CA)浓缩病毒颗粒。

[1695] 用表达CAR的慢病毒转导人T细胞

[1696] 在人IL-2 (100 IU/ml)存在的情况下,使用与抗-CD3/CD28抗体偶联的Dynabeads (Life Technologies, CA)活化分离的T细胞(参见上文)12-24小时,且然后用上述编码GFP和抗-荧光素CAR两者的慢病毒转导[50]。72小时转导后,通过流式细胞术分析T细胞的GFP荧光以测定转导效率。

[1697] 桥与CAR T和癌细胞受体的结合

[1698] 如前所述合成荧光素-叶酸(FITC-叶酸)和荧光素-PSMA (FITC-DUPA)。为了检查这些桥分子结合CAR T细胞上的抗-荧光素scFv的能力,必须开发一种竞争性结合测定法,因为无法使用来自CAR T细胞结合的桥的荧光素信号的测量,这是由于其荧光与表达GFP的CAR T细胞的荧光重叠。为此目的,在室温下,在过量(1μM)竞争性配体(即FITC-叶酸)不存

在或存在的情况下,允许FITC-Alexa647 (10nM)结合抗-荧光素CAR T细胞1小时。孵育后,将抗-荧光素CAR T细胞用PBS洗涤3次,以除去未结合的FITC-Alexa647,并通过流式细胞术分析洗涤的细胞的Alexa647荧光。为了分析FITC-叶酸与叶酸受体的结合,将FR阳性KB细胞与FITC-叶酸(100nM)在过量(10 μ M)游离叶酸(即作为竞争性配体)不存在或存在的情况下进行孵育。用PBS洗涤样品(3次)后,通过流式细胞术分析样品的荧光素-叶酸结合。

[1699] 抗-荧光素CAR T细胞的体外抗肿瘤活性的分析

[1700] 将FR阳性癌细胞系(例如KB或MDA-MB-231细胞)以10⁴个细胞/100 μ l培养基的密度接种至96孔板中并生长过夜。在桥分子不存在或存在的情况下,将抗-荧光素CAR T细胞添加至每个孔中。共孵育6-24小时后,将板以350xg离心10分钟以除去碎片,并使用PierceTMLDH细胞毒性测定试剂盒(Thermo Fisher Scientific, MA)分析上清液的乳酸脱氢酶释放(细胞死亡分析),并使用人IFN γ ELISA试剂盒(Biolegend, CA)分析上清液的干扰素 γ (IFN γ)水平,同时通过用抗-人CD69 APC(克隆:FN50, Biolegend, CA)染色评估沉淀物的CAR T细胞活化,或者通过在含有1%青霉素和链霉素硫酸盐的TexMACSTM培养基(Miltenyi Biotech Inc, CA)中培养5天并通过使用固有GFP荧光的流式细胞术定量并用抗-人CD3 APC抗体(克隆:HIT3a, Biolegend, CA)染色来检查CAR T细胞增殖。

[1701] 抗-荧光素CAR T细胞的体内抗肿瘤活性的分析

[1702] 免疫缺陷的NSG小鼠(Jackson Laboratory)用MDA-MB-231细胞皮下植入,并当肿瘤大小达到~100mm³时用CAR T细胞静脉内注射,且然后用荧光素-叶酸静脉内注射(如所示)。维持小鼠叶酸缺乏饮食(TD.95247, Envigo),以将小鼠中的叶酸的降低至人中发现的生理水平。每隔一天用卡尺测量肿瘤,并根据以下等式计算肿瘤体积:肿瘤体积= $\frac{1}{2}(L \times W^2)$,其中L是肿瘤的最长轴,且W是垂直于L的轴。还收集小鼠血液以使用LEGENDplex基于珠粒的免疫测定法(Biolegend, CA)测量细胞因子水平(例如IL-2、IL-6、IFN γ 和TNF α),并通过测量体重减轻来监测全身毒性。所有动物护理和使用均遵循美国国立卫生研究院(NIH)指南,并且所有实验方案均由普渡大学动物护理和使用委员会批准。

[1703] 统计学分析

[1704] GraphPad Prism版本7软件(Graphpad, CA)用于生成所有图形和统计学分析。除非另有说明,否则所有附图均报告平均值 $\pm$ s.e.m值。ANOVA用于多重比较。

[1705] 抗-荧光素CAR的构建和表征及其与荧光素-叶酸桥分子的相互作用

[1706] 图63A显示荧光素-叶酸桥(FITC-叶酸)的结构。在该结构的左侧是维生素叶酸,其被选择为代表性的肿瘤靶向配体,因为其受体(叶酸受体 α ,FR α)在~40%的人上皮肿瘤上过表达,但在正常组织中基本上不存在或不可及。在右侧是荧光素,其被选择为CAR接合的配体,因为在文献中已经描述了对于荧光素具有飞摩尔亲和力的人抗-荧光素抗体。图63B概述用于指导细胞毒性CAR T细胞以杀死癌细胞的CAR (SEQ ID NO:1和2)的构建。将来自上述抗体的抗-荧光素scFv融合至T细胞受体的CD3 ζ 链,所述T细胞受体的CD3 ζ 链先前已被工程改造为含有CD137(4-1BB)的胞内结构域。将该CAR构建体插入慢病毒载体[pCDH-EF1-MCS-(PGK-GFP)]允许以50-60%效率转导预活化的人T细胞,如染色为GFP(与CAR共转导的荧光标志物)阳性的T细胞的分数的分数所显示(图63C)。图63D进一步表明表达CAR的T细胞结合荧光素-叶酸,如通过荧光素-叶酸竞争性阻断FITC-Alexa 647与工程改造的T细胞结合的能力所建立。

[1707] 在生成抗-荧光素CAR T细胞的能力确立的情况下,通过评估荧光素-叶酸桥分子介导培养物中肿瘤细胞的CAR T细胞消除的能力来检查工程改造的T细胞的杀伤功效。如图64A中所示,发现荧光素-叶酸结合FR阳性KB细胞(宫颈癌细胞系),如由以下所表明:i)添加荧光素-叶酸后KB细胞荧光的偏移,以及ii)与过量游离叶酸竞争后该偏移的阻断。然后通过表明在桥存在的情况下KB细胞裂解、但在桥不存在的情况下KB细胞不裂解来显示CAR T细胞介导的KB细胞杀伤。因此,如图64B中所示,当存在CAR T细胞和荧光素-叶酸两者时观察到癌细胞的裂解,但当荧光素-叶酸(PBS)不存在时或当荧光素-DUPA(桥接至前列腺癌细胞、但不桥接至KB细胞的桥分子)时观察不到癌细胞的裂解。此外,抗-荧光素CAR T细胞能够以多种效应子:靶细胞比率根除KB细胞,但仅当荧光素-叶酸存在时才再次根除KB细胞(图64C)。IFN γ 的同时产生的分析提供了进一步证据证明,抗-荧光素CAR T细胞的杀肿瘤活性仅通过添加正确的荧光素-叶酸桥来触发(图64D),并且相关实验确定抗-荧光素CAR T细胞增殖和CAR T细胞活化两者还取决于正确桥的添加(图64,小图E和F)。综上所述,这些数据表明,抗-荧光素CAR T细胞功能性不可或缺地取决于正确的肿瘤特异性桥介导CAR T细胞与期望的癌细胞的接合的可用性。

[1708] 促进细胞因子释放综合征(CRS)的条件的鉴定

[1709] 为了探究是否可能采用桥给药的持续时间、浓度或频率的操作来控制CRS,首先必需鉴定其中容易可测量的CRS会可重复发生的条件。在探索许多人肿瘤异种移植模型后,发现用FR阳性MDA-MB-231细胞(人三重阴性的乳腺癌细胞系)植入的NSG小鼠在施用抗-荧光素CAR T细胞加上荧光素-叶酸后可靠地展现有效的CRS。因此,如图65A中所示,在注射 5×10^6 个CAR T细胞加上500 nmol/kg荧光素-叶酸的4天内,在荷瘤小鼠中观察到~8%的体重减轻;即,表明发生CRS。相反,在荧光素-叶酸不存在的情况下,注射CAR T细胞后,在类似的荷瘤小鼠中未观察到体重减轻;即与上述表明CAR T细胞活化需要桥的数据一致。显著地,无论是否存在桥,在用相同的抗-荧光素CAR T细胞治疗的无肿瘤小鼠中均未检测到体重减轻。这些后面的数据证实,甚至在CAR T细胞和荧光素-叶酸桥存在的情况下,CAR T细胞活化和随后的体重减轻不会发生,除非CAR T细胞可以接合具有暴露的荧光素的细胞(即荧光素修饰的MDA-MB-231细胞)。因为健康组织中的FR表达主要限于肾脏中的近端小管细胞的顶端表面(其中FR不可接近于免疫细胞),在无肿瘤的小鼠中预期很少或没有CAR T细胞活化。

[1710] 为了进一步确定CRS的强度取决于成功与癌细胞形成细胞毒性突触的CAR T细胞的数量,确定作为CAR T细胞数的函数的体重减轻和IFN γ 释放的依赖性。如图65B中所示,仅施用桥不促进体重减轻。类似地,在桥不存在的情况下注射 10×10^6 个CAR T细胞不会刺激体重降低;即证实全身细胞毒性需要癌细胞的接合。尽管注射 2×10^6 个CAR T细胞加上500 nmol/kg桥也不诱导明显的体重减轻,但输注 5×10^6 或 10×10^6 个CAR T细胞加上相同的桥剂量促进越来越大的体重减轻。IFN γ 释放的并发分析表明,这些体重递降可能由CRS产生,这也展现对CAR T细胞数和桥的存在的敏感依赖性。综上所述,这些数据表明,必须存在CAR T细胞和桥两者以诱导CAR T细胞活化和相关的CRS。

[1711] 快速终止先前存在的细胞因子释放综合征的策略

[1712] 在所有CAR T细胞治疗的ALL患者中的92%经历CRS的情况下,产生这样的问题,是否可能利用控制CAR T细胞与其癌细胞靶标的接合的能力在其完全活化后终止CRS。为了探

索该可能性,我们首先检查荧光素-叶酸施用的中断是否可能有助于停止CRS。如图66A中所示,用 15×10^6 个抗-荧光素CAR T细胞对携带MDA-MB-231肿瘤的小鼠进行单次治疗,随后隔日施用500 nmol/kg荧光素-叶酸,促进快速和连续的重量减轻,导致到疗法的第8天需要小鼠中的三只安乐死。相反,其中省略在第4天和第6天荧光素-叶酸的给药(但其此后接受连续隔日给药)的相同处理的小鼠仅显示适度的重量减轻,它们从中迅速恢复。通过在每只小鼠血浆中测量的IFN γ 水平的相关变化,表明这种重量减轻可能与同一小鼠中的细胞因子产生水平相关(图66B)。更重要的是,隔日给药的暂时中断不仅不能损害抗肿瘤活性,但反而实际上增强CAR T细胞功效。因此,如图66C中所示,尽管未治疗或连续治疗的小鼠展现肿瘤生长的快速增加,但暴露于中断的桥给药的小鼠表现出其肿瘤的完全缓解。这些数据表明,可以通过暂时终止桥给药来控制预先建立的CRS,而不破坏CAR T细胞的细胞毒性。

[1713] 认识到桥剂量的短暂中断可以导致CRS的降低,我们接下来想知道是否可能通过添加会与荧光素-叶酸竞争将CAR T细胞桥接至癌细胞的配体来促进CRS的更有效的递降。为此目的,我们如上所述起始CRS,并且在继续桥的常用隔日给药的同时,我们在第4天和第6天简单地施用100倍过量的游离叶酸以试图终止CRS。如图67A中所示,过量叶酸的注射迅速地防止用不间断桥给药观察到的连续重量减轻。而且,如图66中所示,与适配子给药的这种竞争不仅降低治疗小鼠中IFN γ 的水平(图67B),而且还增强CAR T细胞疗法的治疗功效(图67C)。这些数据表明,良性竞争配体(即维生素叶酸)的瞬时施用可以终止CRS而不显著损害肿瘤疗法。

[1714] 尽管每当CAR T细胞疗法利用荧光素-叶酸以介导CAR T和癌细胞之间的桥连时,叶酸可用于控制CRS,但还检查荧光素阻断CRS的能力似乎是谨慎的,因为其应证明可用于控制与任何荧光素连接的肿瘤特异性桥相关的CRS。因此,如上所述,在携带MDA-MB-231肿瘤的小鼠中诱导CRS,并且通过在CRS的第3天施用游离荧光素试图其终止。尽管竞争性荧光素的注射导致CRS的降低与治疗效力的增加,但其速度比用游离叶酸所见的快速得多。因此,如图67D中所示,在荧光素施用的3小时内,所有CRS相关的细胞因子均下降,在此短时间范围内,IL-2、TNF- α 和IL-6下降>50%。尽管IFN γ 在3小时时并未展现血浆浓度的下降,但其到荧光素注射后6小时确实表明递降,表明荧光素添加也抑制其产生。重要的是,到6小时时间点,IL-2、TNF- α 和IL-6的血浆浓度均降低至接近背景水平。

[1715] 预防CRS出现而不损害抗肿瘤活性的策略

[1716] 尽管高度升高和延长的CRS可以经常导致患者死亡,但将一定水平的CRS被视为是期望的,因为通常没有观察到没有展现CRS的证据的患者对CAR T细胞疗法应答。因此,出现如下问题,桥或CAR T细胞给药条件的优化是否可以导致CRS的最小化而不损失抗肿瘤活性。为了探索这种可能性,我们首先检查桥剂量对体外肿瘤细胞裂解和IFN γ 释放的影响。为此目的,将抗-荧光素CAR T细胞添加至MDA-MB-231细胞培养物中,随后用浓度范围为0.001至100,000 nM的荧光素-叶酸处理。如图68A和B中所示,低于0.01 nM的桥剂量对肿瘤细胞裂解几乎没有影响,而对IFN γ 产生只有最小影响。相反,有些更高浓度的荧光素-叶酸对两种参数行使有效影响,而仍更高剂量的桥促进细胞因子释放和MDA-MB-231细胞杀伤两者的降低。基于桥的机理,可以预料,过量的桥浓度应使CAR T细胞和癌细胞两者上的所有位点单价饱和,且由此二价阻断桥的细胞间桥连功能。

[1717] 为了评估体内相同的桥浓度依赖性,将MDA-MB-231细胞皮下植入NSG小鼠中,并且

通过监测肿瘤生长和细胞因子释放再次检查荧光素-叶酸剂量的作用。不幸的是,如先前在图66中所见,连续的隔日给药导致预期的毒性CRS,无论桥剂量如何,迫使我们在第4天和第6天省略桥施用。然而,甚至用该修改,桥浓度的影响的分析是可能的,揭示与体外观察到的相似的钟形依赖性;即,随着桥剂量增加,血浆IFN γ 最初增加,随后其血浆浓度降低(图66B)。重要的是,肿瘤细胞缩小也展现相似的钟形剂量应答,其中500 nmol/kg表现出完全的肿瘤根除,并且较低和较高的浓度均展现较低的功效(图66C)。这些观察证实,CAR T细胞和癌细胞之间的最大桥接仅在中间桥浓度下发生,其中存在足够的桥以使桥形成最大化,但未施用过量的桥以促进桥连功能的自体竞争。

[1718] 在现在确立利用桥剂量来控制CAR T细胞活化的能力的情况下,我们决定研究是否可能鉴定治疗活性桥给药方案,其可防止毒性CRS的出现而不损害抗肿瘤功效。基于当CAR T细胞被太陡然活化时CRS变得最严重的假设,我们选择测试两种较不侵袭性的桥给药方案,其可能更逐渐诱导CAR T细胞活化。对于第一方案,在每次连续施用适配子期间,荧光素-叶酸浓度从0.5 nmol/kg稳定增加至500 nmol/kg。如图69A中所示,桥浓度的这种缓慢递增仅引起短暂的重量减轻,所述重量减轻在4天内恢复而无任何干预。相反,在用 15×10^6 个CAR T细胞预先治疗的相同小鼠中连续给药500 nmol/kg引起剧烈和连续的重量减轻,其迫使小鼠最终安乐死。更重要的是,逐渐剂量递增方案导致荷瘤小鼠的完全治愈,而连续的毒性给药时间表几乎没有提供治疗益处(图69B)。这些数据强烈地表明,抗肿瘤活性可以与CRS脱偶联,且较慢的CAR T细胞活化实际上可以增强杀肿瘤活性,同时降低CRS。

[1719] 检查降低桥给药的频率的影响,以期望在CAR T细胞活化之间引入更长的间隔可能允许一定CAR T细胞松弛,且由此减少通常因长期抗原暴露产生的任何疲劳。如图69C中所示,每周三个剂量的桥引起显著的动物重量减轻,而每周两个剂量的桥引起较小的毒性,并且每周单次荧光素-叶酸注射未引起重量减轻。如许多先前的研究中可见,抗肿瘤活性随着CRS降低而增加;即,当每周仅施用一个剂量的桥时,得到完全治愈。

[1720] 实施例44

[1721] 使用AML模型的研究

[1722] 显示叶酸受体- β 阳性急性髓性白血病模型中的EC17/CAR-T疗法。

[1723] 材料:

[1724] 内部合成EC17(叶酸-FITC, m.w. 873)。荧光素钠(AK-FLUOR[®], 荧光素注射液, USP)购自Purdue Pharmacy。

[1725] 体内方法:

[1726] 细胞系

[1727] THP-1是一种源自具有急性单核细胞白血病(一种类型的急性髓性白血病(AML))的患者的人单核细胞细胞系。THP-1-FR β 是一种用人FR β 稳定转染的THP-1的GFP阳性亚克隆。使细胞在含有10%热失活的胎牛血清(HIFCS)和抗生素的无叶酸RPMI1640培养基(GIBCO BRL)(FFRPMI)中生长,并使用标准细胞培养技术维持在5% CO₂气氛下。

[1728] 小鼠

[1729] 雌性NSGTM(NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ, 库存号005557)小鼠购自The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME),并且当它们达到~4周龄时使用。在到达当天向小鼠喂食叶酸缺乏的饮食(TestDiet, St. Louis, MO)。

[1730] 肿瘤植入

[1731] 通过将培养的细胞以 5×10^6 /动物静脉内植入9只NSG小鼠中来生成THP-1-FR β 肿瘤。

[1732] 荷瘤小鼠的EC17/CAR-T疗法

[1733] 肿瘤植入后11天开始,将~830万个GFP+ 4M5.3 CAR-T细胞静脉内输注至每只小鼠中。将小鼠分为3组(n = 3): (1)单独的CAR-T细胞, (2)CAR-T细胞,每周剂量为500 nmol/kg的EC17,和(3)CAR-T细胞,每周剂量为500 nmol/kg的EC17加上荧光素钠拯救(当需要时)。在CAR-T细胞施用后两天给予第一EC17剂量。所有EC17剂量都在一天结束时(~3-4 PM)给予,以允许细胞因子释放综合征(CRS)发展过夜。在第一EC17剂量后的第二天早晨,组2和组3中的所有6只小鼠均显示CRS等级为~3的CRS的发作,然后仅对组3以6 μ mol/kg施用荧光素钠。在接下来的几天中,有或没有荧光素钠拯救的所有EC17给药的小鼠都完全康复。在组3中,没有给予额外的荧光素钠拯救用于额外的EC17给药。将小鼠称重并监测健康和疾病发展的体征。当动物展现严重的窘迫/垂死行为或出于比较目的时,将其安乐死。安乐死后,对所有小鼠进行针对存在肿瘤块的大体检查。将所有可见的肿瘤块切除,计数并称重。收集血液、肿瘤转移(mets)和正常邻近组织用于同日流式细胞术分析。

[1734] 通过流式细胞术的全血细胞分析

[1735] 用以3000 x g 4°C离心10分钟,从预定体积的EDTA处理的全血中除去血浆,并将所得细胞沉淀物与10倍体积的室温1X RBC裂解溶液(由10X储备液制备; Biolegend,目录号420301)孵育5分钟,以400 x g离心5分钟。将细胞沉淀物在10倍体积的冰冷磷酸盐缓冲盐水(PBS, pH = 7.4)中洗涤,并用40 μ m尼龙过滤器过滤,然后再次沉淀。然后将白细胞细胞沉淀物重悬浮于流式细胞术染色溶液(1%牛血清白蛋白,50 mg/mL人IgG (Equitech Bio,目录号SLH56-0001),0.9%叠氮化钠,在PBS(pH=7.4)中]中,所述流式细胞术染色溶液补充有抗-小鼠Fc γ III/II受体(CD16/CD32)阻断剂[克隆2.4G2; BD Bioscience,目录号553142,以1:100 (v/v)稀释]和抗-人Fc阻断剂[BD Biosciences,目录号564220,以1:50 (v/v)稀释]两者。表面标志物染色通过在黑暗中的冰上持续20分钟添加向每个样品添加的以下荧光染料标记的单克隆抗体进行:抗-人CD45-APCeF780(克隆HI30,eBioscience #47-0459-42,以1:20(v/v)稀释),抗-人CD3-BV650(克隆SK7,BD Bioscience,目录号563999,以1:20(v/v)稀释),抗-人CD137-BV650(克隆4B4-1,BD Bioscience #564092,以1:20(v/v)稀释),抗-人CD8 α -PECy7(克隆RPA-T8,BD Bioscience,目录号557746,以1:20(v/v)稀释),抗-人CD4-Percpe710(克隆SK3,eBioscience,目录号46-0047-42,以1:20(v/v)稀释),抗-人CD25-PE(克隆M-A251,BD Bioscience,目录号555432,以1:10(v/v)稀释),抗-人CD33-PE(克隆WM53,BD Bioscience,目录号555450,以1:5(v/v)稀释),抗-人CD123-AF647(克隆9F5,BD Bioscience,目录号563599,以1:20(v/v)稀释)。生物素化的抗-人叶酸受体- β (克隆m909)由普渡大学的Low实验室善意提供(*Arthritis Res Ther.* 2011;13(2):R59),并使用链霉抗生物素蛋白-eFluor660 (eBioscience,目录号50-4317,以1:1000 (v/v)稀释)进行检测。叶酸结合被解释为功能性叶酸受体的量度,并通过与内部合成的Alexa Fluor缀合的叶酸孵育来测定。白细胞染色后,将细胞用PBS洗涤并重悬浮于含有3 μ M碘化丙啶的冷PBS中。在Gallios流式细胞仪(BeckmanCoulter, Brea, CA)上收集流式细胞术数据,其中收集最少15,000个CountBright™磁珠事件,以试图收集足够的白细胞事件用于准确计数各

小鼠血液样品中的输注的CAR T细胞。根据Invitrogen的说明,计算每个血液样品中的CAR T细胞的浓度的测定。简而言之,将CAR T细胞鉴定为人CD45⁺ GFP⁺事件,并使用Kaluzatm流式细胞仪软件版本1.5容易地区分和计数。CountBrightTM珠粒用于鉴定CAR T细胞的抗体组中未利用的荧光染料均匀标记,并且容易与白细胞区分开,并计数珠粒事件。因为向每个样品管中添加53,000个CountBrightTM珠粒,我们计算53,000个总珠粒与每个样品收集的珠粒事件的比率,并将珠粒比率设置为等于每个样品中未知的CAR T细胞数除以收集的已知的CAR T细胞事件数。解决未知物给予我们从已知体积的每个血液样品分离的CAR T细胞的数量。然后,将每只输注的小鼠的循环中CAR T细胞的数量在图表上表示为每50μL分析的全血中CAR T细胞的总数。购买人外周血单核细胞并将其用于白细胞表面标志物的染色对照(人PBMC, Stem Cell Technologies, 目录号70025.22)。通过利用未配对、两尾、students氏t-检验确定统计学显著性,其中显著性设置为 $p < 0.05$,用于三组小鼠各自之间的比较。

[1736] 肿瘤和邻近健康组织的单细胞悬浮液的制备

[1737] 收获实体瘤和无肿瘤的邻近组织,称重,并切成小块,然后转移至含有20 mL肿瘤消化混合物的50 mL管中。酶促肿瘤消化混合物由补充有抗生素的无血清和叶酸缺乏的RPMI1640培养基中的0.5 mg/mL胶原酶IV (Sigma-Aldrich, 目录号C5138)、0.5mg/mL透明质酸酶(Sigma-Aldrich, 目录号H3506)和0.1 mg/mL DNA酶I(Sigma-Aldrich, 目录号DN25)组成。将肿瘤片段在37℃下在水平摇床上以300 rpm消化1小时。然后,将肿瘤消化物以400 x g离心5分钟,且将肿瘤细胞沉淀物与10倍体积的室温1X RBC裂解溶液[由10X储备液制备; Biolegend, 目录号420301]孵育5分钟,以400g离心5分钟,并将细胞沉淀物在10倍体积的冰冷磷酸盐缓冲盐水pH=7.4中洗涤,并用40μm尼龙过滤器过滤,然后再次沉淀。如前所述,通过流式细胞术分析肿瘤细胞。

[1738] 总肿瘤负荷的总体检查

[1739] 发现组1中的所有3只CAR-T细胞对照动物(#1、#2、#3)在肿瘤植入后第45天(PTI 45)(即CAR-T细胞施用后34天)都发胀。将两只对照动物安乐死,且第三只在临安乐死前死亡。将组2中的一只动物(#5)安乐死并充当组1的同日比较物。在肿瘤植入后第58天(PTI 58)(即,CAR-T施用后46天),将组2中剩余的两只动物(#4和#6)安乐死(前一天向#4用EC17预先给药)。还收集组3中的所有3只动物(#7、#9和#10)(在前一天向#7和#9用EC17预先给药)。如图56中所示,在仅CAR-T细胞对照组中发现各种大小(卵巢中大)和部位(除了肺)的转移性肿瘤块。在收集的同一天,在来自组2的EC17治疗的动物(#5)中仅鉴定微小的肿瘤结节。图57概述所检查的所有组中的肿瘤块的估计数量和总肿瘤重量。通常,与荧光素钠拯救无关,CAR-T细胞对照组1中的小鼠比两个EC17治疗组中的动物具有最明显的肿瘤块和更高的总肿瘤负荷。除了组3中的一只动物(#10)以外,在收集时,6只EC17治疗的小鼠(+/-一次性荧光素钠拯救)中的五只具有最小的肿瘤负荷。这些初步结果显示,EC17对照的CAR-T疗法针对这种AML肿瘤模型非常有效。

[1740] 循环肿瘤细胞的表征

[1741] 分析循环AML,并在所有患者中的近似90-95%中显示特征性表面标志物表达,CD33和CD123。为了在这种侵袭性AML模型中测试我们的FITC特异性4M5.3 CAR T细胞的抗白血病活性,我们利用以FRβ稳定转染并称为THP-1-FRβ的THP-1细胞。因此,我们测试我们的体外THP-1-FRβ细胞系,并表明这些细胞还表达CD33和CD123表面表达(图58A,左点图),表明

AML表型。未染色的THP-1-FR β 细胞和新鲜的人PBMC充当门控和阳性对照,使我们对我们的针对这些标志物的测定法充满信心(图58A,中点图和右点图)。当将THP-1-FR β 细胞静脉内注射至NSG小鼠中时,通过GFP荧光容易地将人白血病细胞与血液中的小鼠白细胞区分开,并观察到其保留AML标志物CD33和CD123的表面表达(图58B)。另外,我们通过用Alexa Fluor 647标记的叶酸进行阳性表面染色证实体内循环肿瘤细胞上稳定的FR β 表达(图59A)。THP-1-FR β 肿瘤细胞还在从肝脏和卵巢分离的实体肿瘤转移中继续表达FR β ,如通过使用抗-人FR β 抗体的流式细胞术染色所见(图59B)。

[1742] EC17引导的CAR T细胞的抗白血病活性

[1743] 为了确定是否可以引导CAR T细胞以降低CAR-T输注后第34天的携带THP-1-FR β 细胞的NSG小鼠的白血病负荷,我们比较从组1中的接受单独的CAR T细胞的已符合安乐死标准的动物的血液分离的GFP+肿瘤细胞与组2中的接受CAR T细胞加上EC17 (500 nmol/kg; SIW) 4周的动物的GFP+肿瘤细胞(图60)。显然,没有EC17治疗的对照动物中存在高白血病负荷,因为总白细胞的近似23%是GFP+白血病细胞(图60A和图60B,柱状图)。然而,在用CAR T细胞输注并用EC17给药的动物中,观察到显著的CAR T细胞活性,因为GFP+白血病细胞在血液中变得几乎检测不到(图60B)。而且,由于THP1-FR β 细胞在血液中仍检测不到,所以观察到的CAR T细胞的抗白血病活性在动物中持续长达CAR T细胞输注后47天(图60B)。

[1744] 输注后血源性CAR T细胞的持久性

[1745] 通过流式细胞术分析测量循环中的FITC-CAR T细胞的数量,以计数CAR T细胞输注后第34天和第47天(研究结束)从小鼠收集的全血样品中的GFP+ CD3+ CAR T事件(图61A)。我们的用4M5.3构建体转导的人CAR T细胞在不接受任何EC17的对照小鼠中持续长达输注后34天,表明携带THP-1-FR β 肿瘤的NSG小鼠能够维持人T细胞的活力。在每周接受EC17的输注CAR-T细胞的携带THP1-FR β 的小鼠中,CAR T细胞在血液中明显地持续长达输注后47天,其中数目范围为3800至300,000个CAR T细胞/100 μ L血液(图61A),与对照动物没有明显差异。有趣的是,从接受EC17的每周注射的小鼠分离的CAR T细胞表型主要是中枢记忆/效应记忆表型(图61B),而来自未接受EC17的小鼠的CAR T细胞仍具有效应T细胞表型(图61B)。具有记忆表型的CAR T细胞是T细胞疗法的期望特性,因为记忆T细胞能够进一步细胞分裂,以产生可用于杀死癌细胞的未来效应T细胞。

[1746] CAR T细胞位于转移性肿瘤病灶中,而不是邻近健康组织中

[1747] 尽管通常在患者的血液和骨髓中发现AML肿瘤细胞,但偶尔AML细胞可以在体内任何地方形成实体瘤。NSG小鼠中的THP-1-FR β 肿瘤模型类似于血液中具有肿瘤细胞的AML以及正常组织(诸如卵巢、肝脏、小肠、脑和胃)中的转移性实体瘤病灶的模型。由于EC17/CAR-T治疗显著降低总肿瘤负荷(图56和图57),所以我们想要评价在EC17治疗的动物中发现的残留肿瘤内的CAR T细胞的存在,并研究CAR T细胞对于肿瘤相对于同一动物中其相邻正常组织的偏好(图62)。在T细胞输注后第47天,将接受CAR-T细胞输注加上5次每周剂量的EC17 (500 nmol/kg)的两只动物安乐死。在几个正常器官(例如胃内壁、心脏、肝脏和十二指肠)中发现残留的肿瘤。对消化的样品使用流式细胞术,我们分析可见实体瘤转移中CAR T细胞的存在,并将CAR-T细胞浸润与其中发现肿瘤的相同动物的相邻健康组织的浸润进行比较。在一只动物(小鼠#4)中,CAR T细胞以更高的数量存在于用胃和心脏发现的肿瘤中(图62A),但不存在于健康的相邻组织中(图62A)。在另一只动物(小鼠#10)中也看到相似的数

据,其中在十二指肠内发现肿瘤,然而,肝肿瘤转移和健康肝组织之间的CAR T细胞数量差异并不大。

[1748] 为了测量肿瘤内CAR T细胞的任何活性,我们还对CAR T细胞的表面针对活性标志物CD25进行染色。有趣的是,我们在肿瘤中的CAR T细胞上看到较高水平的CD25,但在从相邻健康组织分离的CAR T细胞上没有看到(图62B)。综上(图62A和62B),这些数据表明CAR T细胞可以跟随白血病细胞进入健康组织,并在肿瘤形成的转移部位处攻击它们,并且在输注后47天仍然活跃。重要的是,小鼠#10在组3中,其在第一个剂量的EC17后接受sCRS的荧光素钠拯救。尽管向该动物给予荧光素钠,但CAR T细胞在血液和肿瘤两者中仍然持续,表明CAR T细胞功能性得以保留,并且这些CAR-T细胞可以被针对FR阳性肿瘤靶标的EC17重新活化。

[1749] 实施例45

[1750] EC17剂量递减循环可以降低毒性

[1751] 研究EC17剂量递减对CAR-T疗法的抗肿瘤活性和毒性(体重变化)的影响。将850万个冷冻的抗-FITC CAR-T细胞解冻,并i.v.注射至携带s.c. MDA-MB-231肿瘤(100-200mm³)的小鼠中。500 nmol/kg EC17在CAR-T注射后2天施用,并在小鼠中引起sCRS。那些小鼠用6 μ mol/kg NaFL成功拯救,且然后分为两组。第一组用500 nmol/kg EC17每周(SIW)给药,而第二组用两个EC17递增周期给药。每个周期持续2周(14天)。每个周期中的给药时间表包括在第1天的5 nmol/kg EC17,在第3天的50 nmol/kg EC17,在第5天的500 nmol/kg EC17。9天中断后,开始第二递增周期。递增组和SIW组两者的给药时间表显示于图70A中。每周2-3次监测肿瘤大小和体重。两组均显示对CAR-T疗法的相似应答(图70B),而递增组的体重减轻远小于EC17 SIW组的体重减轻(图70C)。数据表明,EC17剂量递减可以降低毒性,同时维持CAR-T细胞疗法的抗肿瘤活性。

[1752] 实施例46

[1753] CAR-T和EC17疗法相关的毒性与肿瘤大小相关

[1754] 为了探究CAR-T疗法相关的毒性是否取决于肿瘤负荷,将NSG小鼠用MDA-MB-231 s.c.注射。选择具有大小范围在150-900 mm³之间的不同肿瘤的十只小鼠用于该研究。对于CAR-T细胞,i.v.注射1050万个GFP+ FITC-CAR-T细胞,随后48小时后进行500 nmol/kg EC17施用(图71A)。在CAR-T注射前和EC17施用后18小时之间比较小鼠的体重。如图71B中所示,体重变化显示为肿瘤大小依赖性的。随着更高的肿瘤负荷,CAR-T和EC17治疗后,小鼠体重减轻更大。EC17施用后18小时,小鼠显示2级细胞因子释放综合征,并通过心脏穿刺收集其血液样品。立即分离血浆样品,并保存在-20℃,直至使用人细胞因子检测试剂盒(Biolegend)分析细胞因子水平。如图71C中所示,显示IL-6的产生是肿瘤大小依赖性的。随着更高的肿瘤负荷,CAR-T和EC17治疗后,产生更多的IL-6。当具有液体肿瘤的人患者用常规CAR-T疗法治疗时,IL-6被广泛报道为他们中的严重细胞因子释放综合征的预测生物标志物。这些数据表明,在CAR-T和EC17疗法中,携带实体瘤的小鼠中的CRS的严重程度也与肿瘤负荷相关。

[1755] 实施例47

[1756] 侵袭性骨肉瘤模型中的EC17受控的抗-FITC CAR T-细胞疗法的评估

[1757] 材料

[1758] 内部合成EC17 (叶酸-FITC, m.w. 873)。荧光素钠 (AK-FLUOR[®], 荧光素注射液, USP) 购自Purdue Pharmacy。

[1759] 体内方法

[1760] 细胞系

[1761] HOS-143b是一种购自ATCC的细胞系 (CRL-8303), 其源自具有骨肉瘤的13岁高加索女孩。HOS-FR α 是用FR α 稳定转染的HOS-143b的亚克隆。使细胞在含有5-10%热失活的胎牛血清 (HIFCS) 的无叶酸RPMI1640培养基 (GIBCO BRL) (FFRPMI) 中生长, 并使用标准细胞培养技术维持在5% CO₂气氛下。

[1762] 小鼠

[1763] 雌性NSGTM (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ, 库存号005557) 小鼠购自The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), 并且当它们达到~4周龄时使用。在到达当天向小鼠喂食叶酸缺乏的饮食 (TestDiet, St. Louis, MO)。

[1764] 肿瘤植入

[1765] 将HOS-FR α 细胞以5 x 10⁵/动物皮下植入6只动物中。

[1766] CAR-T细胞制备

[1767] 如前所述制备GFP+ 抗-FITC 4M5.3 scFv-CAR T细胞。体外培养12-20天后, 将它们冷冻并在-80℃下储存于冷冻试剂中, 所述冷冻试剂含有50%热失活的AB+人血清、40% T细胞培养基和10% DMSO。将冷冻的CAR-T细胞在37℃下快速解冻, 用PBS洗涤两次, 并用于动物注射。

[1768] 荷瘤小鼠中的EC17/CAR-T疗法

[1769] 如图72A中所示, 在肿瘤植入后6天, 所有动物静脉内接受1050万个CAR T-细胞 (第0天)。两天后, 将动物分为两组 (该研究为n = 3), 并且不接受EC17治疗, 或EC17以500 nmol/kg静脉内给药, 每周一次 (SIW), 持续4-5个剂量。EC17治疗组中的一只动物在第40天和第42天再接受50和100 nmol/kg的两个剂量的EC17。所有EC17剂量都在一天结束时 (~3-4 PM) 给予, 以允许细胞因子释放综合征 (CRS) 发展过夜。根据需要以0.6 μ mol/kg进行荧光素钠拯救。在第47天, 只有最后一只EC17给药的动物接受荧光素钠。

[1770] 通过流式细胞术的全血细胞分析

[1771] 用以3000g 4℃离心10分钟, 从预定体积的EDTA处理的全血中除去血浆, 并将所得细胞沉淀物与10倍体积的室温1X RBC裂解溶液 [由10X储备液制备; Biolegend, 目录号420301] 孵育5分钟, 以400g离心5分钟, 并将细胞沉淀物在10倍体积的冰冷磷酸盐缓冲盐水 pH=7.4 中洗涤, 并用40 μ m尼龙过滤器过滤, 且然后再次沉淀。然后将白细胞沉淀物重悬浮于流式细胞术染色溶液 [1%牛血清白蛋白, 50mg/mL人IgG (EquitechBio, 目录号SLH56-0001), 0.9%叠氮化钠, 在磷酸盐缓冲盐水 (pH=7.4) 中] 中, 所述流式细胞术染色溶液补充有抗-小鼠Fc γ III/II受体 (CD16/CD32) 阻断剂 [克隆2.4G2; BD Bioscience, 目录号553142, 以1:100 (v/v) 稀释] 和抗-人Fc阻断剂 [BD Biosciences, 目录号564220, 以1:50 (v/v) 稀释]。白细胞表面标志物染色通过在黑暗中的冰上持续20分钟添加向每个样品添加的以下荧光染料标记的单克隆抗体进行: 抗-人CD45-APCeF780 [克隆HI30, eBioscience #47-0459-42, 以1:20 (v/v) 稀释], 抗-人CD137-BV650 [克隆4B4-1, BD Bioscience #564092, 以1:20 (v/v) 稀释], 抗-人CD8 α -PECy7 [克隆RPA-T8, BD Bioscience, 目录号557746, 以1:

20 (v/v) 稀释], 抗-人CD4-Perce710 [克隆SK3, eBioscience目录号46-0047-42, 以1:20 (v/v) 稀释]。白细胞染色后, 将细胞用PBS洗涤, 并重悬浮于含有53,000个CountBright™珠粒[Invitrogen目录号C36950]的冷PBS中, 并转移至流式细胞仪收集管中。在Gallios流式细胞仪(Beckman Coulter, Brea, CA) 上收集流式细胞术数据, 其中收集最少15,000个CountBright™珠粒事件, 以试图收集足够的白细胞事件以准确计数每个小鼠血液样品中的输注的CAR T细胞。根据Invitrogen的说明, 计算每个血液样品中的CAR T细胞的浓度的测定。简而言之, 将CAR T细胞鉴定为人CD45+ GFP+事件, 并使用Kaluza™流式细胞仪软件容易地区分和计数。CountBright™珠粒用于鉴定CAR T细胞的抗体组中未利用的荧光染料均匀标记, 并且容易与白细胞区分开, 并计数珠粒事件。因为向每个样品管中添加53,000个CountBright™珠粒, 计数53,000个总珠粒与每个样品收集的珠粒事件的比率, 并将珠粒比率设置为等于每个样品中未知的CAR T细胞数除以收集的已知的CAR T细胞事件数。解决未知物提供从已知体积的每个血液样品分离的CAR T细胞的数量。然后, 将每只输注的小鼠的循环中CAR T细胞的数量在图表上表示为每50 μ L分析的全血中CAR T细胞的总数。

[1772] 肿瘤和健康组织的单细胞悬浮液的制备

[1773] 对于在第47天安乐死的动物, 收获血液、正常组织(肝脏、脾脏和骨髓) 和皮下肿瘤, 并切成小块, 然后转移至含有20 mL肿瘤消化混合物的50 mL管中。酶促肿瘤消化混合物由补充有抗生素的无血清和叶酸缺乏的RPMI1640培养基中的0.5 mg/mL胶原酶IV(Sigma-Aldrich, 目录号C5138)、0.5 mg/mL透明质酸酶(Sigma-Aldrich, 目录号H3506) 和0.1 mg/mL DNA酶I(Sigma-Aldrich, 目录号DN25) 组成。将肿瘤片段在37°C下在水平摇床上以300 rpm消化1小时。然后, 将肿瘤消化物以400 x g离心5分钟, 且将肿瘤细胞沉淀物与10倍体积的室温1X RBC裂解溶液[由10X储备液制备; Biolegend, 目录号420301]孵育5分钟, 以400g离心5分钟, 将细胞沉淀物在10倍体积的冰冷磷酸盐缓冲盐水pH=7.4中洗涤, 并用40 μ m尼龙过滤器过滤, 且然后再次沉淀。通过用抗-人FR α [克隆LK26, Biolegend目录号908304, 以1:20 (v/v) 稀释]染色来测量肿瘤细胞的FR α 的表达。如前所述, 通过流式细胞术分析肿瘤细胞。

[1774] 数据和结果

[1775] 研究方案显示于图72A中。EC17治疗组中的第一只携带HOS-FR α 肿瘤的动物接受500 nmol/kg的4个每周EC17剂量, 但由于神经系统问题在第28天被安乐死。相同组中的第二只动物接受500nmol/kg的5个每周EC17剂量, 但在第34天被发现死亡。相同组中的最后一只动物接受500 nmol/kg的5个每周EC17剂量, 加上分别在第40天和第42天接受50和100 nmol/kg的两个额外的EC17剂量。在第47天向该动物给予荧光素钠, 并在第53天安乐死。所有动物在CAR-T细胞施用后近似5周发展GVHD。

[1776] 对于每只个别动物绘制肿瘤体积(图72B) 和体重变化(图73)。实线代表仅接受CAR-T细胞的携带HOS-FR α 肿瘤的小鼠。虚线代表接受如上所述的CAR-T细胞和EC17治疗的携带HOS-FR α 肿瘤的小鼠。EC17给药日期被标记为垂直虚线。每周2-3次监测肿瘤体积和体重变化。尽管发现一只仅CAR-T组动物在第45天没有明显原因死亡, 但所有3只CAR-T-细胞对照动物的肿瘤一旦建立便迅速生长(图72B, 实线)。相反, 在第28天和第33天, 用500 nmol/kg的EC17 SIW给药的所有3只小鼠中的肿瘤开始缩小(图72B, 虚线)。尽管在EC17治疗组中的2只动物在第28天和第34天丢失, 但相同治疗组中的最后一只动物具有更长的延迟

的肿瘤生长,并对额外低剂量EC17治疗应答。这些动物中的体重变化(图73)表明一旦EC17治疗的动物中的肿瘤达到 $>200\text{ mm}^3$,CRS就严重。CRS连同严重的GVHD可能是这些动物中观察到的毒性和死亡率的原因。

[1777] 在第47天收获的最后一只动物中进行流式细胞术分析。如图74A-F中所示,HOS癌细胞被鉴定为抗-人FR α [克隆LK26]染色阳性。HOS-FR α 癌细胞在测试的正常组织中不能检测到,且仅在皮下实体瘤中可检测到。另外,这些数据证实EC17/CAR-T处理后FR α 在HOS-FR α 肿瘤细胞上的体内连续表面表达。

[1778] 实施例48

[1779] 荧光素钠 (NaFL) 拯救可以减少与严重细胞因子释放综合征的发展相关的宿主MCP-1、IL-6和IL-10的产生

[1780] 据报道,对于各种液体肿瘤,高水平的MCP-1、IL-6和IL-10可预测CAR-T细胞疗法后的细胞因子释放综合征(CRS)。这些细胞因子的产生不仅对于人CAR-T细胞发生,而且对于宿主免疫细胞(包括单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞)也发生。还已经报道这些细胞因子参与异常的巨噬细胞活化,并且在用CAR-T细胞治疗的患者中驱动CRS的发展。这些细胞因子(例如IL-6和MCP-1)的减少已证明有效管控CAR-T疗法中的CRS。尽管NSG小鼠是免疫缺陷的,但小鼠树突状细胞和巨噬细胞仍是部分功能性的。为了评估CAR-T/EC17疗法是否可以诱导NSG小鼠中的这些宿主细胞因子的产生,并且还为了研究NaFL拯救是否可以减少这些宿主小鼠细胞因子的产生,使用携带MDA-MB-231肿瘤的NSG小鼠。

[1781] 在研究的第一部分中(图75),用EC17和FITC-CAR-T细胞治疗小鼠。当小鼠开始显示sCRS时,注射一个剂量的 $60\text{ }\mu\text{mol/kg}$ NaFL用于拯救。然后在NaFL拯救后7小时和27小时收集小鼠血液样品。通过遵循制造商的说明,使用来自BioLegend的小鼠炎症组试剂盒(目录号740446)分析血液中的小鼠细胞因子水平。图76 A-E显示拯救后7小时的细胞因子水平。图77A-C显示拯救后27小时的细胞因子水平。总之,用CAR-T施用、但未用EC17施用的小鼠在其血液中具有非常低水平的小鼠细胞因子,而用EC17给药的小鼠在其血液中具有增加的小鼠细胞因子水平,包括MCP-1、IL-6、IL-10、IFN- β 和TNF- α 。更重要的是,用 $60\mu\text{mol/kg}$ 荧光素钠拯救的小鼠中的小鼠细胞因子水平比未拯救的小鼠中的那些低得多(在拯救后7小时和27小时)。

[1782] 在研究的第二部分中,测试一系列浓度的NaFL的拯救效率(图78)。如图79-81中所示,血液中的小鼠细胞因子水平也取决于用于拯救的荧光素钠的浓度,并且中值有效剂量对于测试的细胞因子(例如MCP-1、IL-6和IL-10)为约 $0.6\mu\text{mol/kg}$,并且小鼠早在拯救后3小时开始应答。

[1783] 总之,CAR-T/EC17疗法可以诱导升高的小鼠细胞因子产生,并且一个剂量的NaFL拯救可以减少这些CRS相关小鼠细胞因子的产生并改善小鼠的总体状况。

[1784] 实施例49

[1785] 小鼠中的小鼠MCP-1产生与CAR-T细胞数相关

[1786] 单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)是一种趋化因子分子,其对单核细胞/巨噬细胞具有趋化性。据报道,对于各种液体肿瘤(包括急性淋巴细胞白血病),高水平的MCP-1是CAR-T细胞疗法后的细胞因子释放综合征的预测生物标志物。尽管NSG小鼠是免疫缺陷的,但树突状细胞和巨噬细胞的功能是缺陷的,但并未完全消除。为了评估CAR-T/EC17疗法是否可以诱

导NSG小鼠中的小鼠MCP-1的产生,和为了研究小鼠MCP-1的产生是否与小鼠中的CAR-T数量相关,将携带MDA-MB-231肿瘤(250-500 mm³)的NSG小鼠分成三组,并施用500 nmol/kg体重的EC17和不同量的CAR-T细胞(分别为2、5或1250万),如图82A中所示。第二EC17注射后两天,收集小鼠血液样品,并使用来自BioLegend的小鼠炎症组试剂盒(目录号740446)分析血液中的小鼠MCP-1的产生。如图82B中所示,发现小鼠MCP-1与所施用的CAR-T细胞的数量相关。总之,随着CAR-T细胞的增加,小鼠MCP-1的产生也增加,其主要是由于活性人CAR-T细胞释放的高水平的人细胞因子。

[0001] 序列表

[0002] <110> ENDOCYTE, INC.

[0003] PURDUE RESEARCH FOUNDATION

[0004] <120> 用于CAR T细胞疗法的组合物和方法

[0005] <130> 20150-275471

[0006] <140> PCT/US2018/020095

[0007] <141> 2018-02-28

[0008] <150> 62/634,595

[0009] <151> 2018-02-23

[0010] <150> 62/620,701

[0011] <151> 2018-01-23

[0012] <150> 62/620,423

[0013] <151> 2018-01-22

[0014] <150> 62/620,384

[0015] <151> 2018-01-22

[0016] <150> 62/554,421

[0017] <151> 2017-09-05

[0018] <150> 62/480,627

[0019] <151> 2017-04-03

[0020] <150> 62/464,792

[0021] <151> 2017-02-28

[0022] <160> 3

[0023] <170> PatentIn version 3.5

[0024] <210> 1

[0025] <211> 1554

[0026] <212> DNA

[0027] <213> 人工序列

[0028] <220>

[0029] <223> 人工序列的描述:合成多核苷酸

[0030] <400> 1

[0031] atggccttac cagtgaccgc cttgtctcctg ccgctggcct tgetgtctcca cgccgccagg 60

[0032] ccggatgtcg tgatgaccca gacccccctc agcctcccag tgtccctcgg tgaccaggct 120

[0033] tctattagtt gcagatccag ccagtcctc gtgcactcta acggtataac ctacctgaga 180

[0034] tggatctctc agaagcccg acagagccct aaggtgtgta tctacaaagt ctccaaccgg 240

[0035] gtgtctggag tccctgaccg cttctcaggg agcggttccg gcaccgactt caccctgaag 300

[0036] atcaaccggg tggaggccga agacctcggc gtctatttct gctctcagag tacacatgtg 360

[0037] ccctggacct tcggcggagg gaccaagctg gagatcaaaa gctccgcaga cgatgccaag 420

[0038] aaagatgccg ctaagaaaga cgatgctaag aaagacgatg caaagaaaga cgggtggcgtg 480

[0039] aagctggatg aaaccggagg aggtctcgtc cagccaggag gagccatgaa gctgagttgc 540

[0040] gtgaccagcg gattcacctt tgggcactac tggatgaact gggtgcgaca gtccccagag 600

[0041] aaggggctcg aatgggtcgc tcagttcagg aacaaaccct acaattatga gacatactat 660

[0042]	tcagacagcg tgaagggcag gtttactatc agtagagacg attccaaatc tagcgtgtac	720
[0043]	ctgcagatga acaatctcag ggtcgaagat acaggcatct actattgcac aggggcatcc	780
[0044]	tatggtatgg agtatctcgg tcaggggaca agcgtcacag tcagtttcgt gccggtcttc	840
[0045]	ctgccagcga agcccaccac gacgccagcg ccgcgaccac caacaccggc gcccaccatc	900
[0046]	gcgtgcgagc ccctgtccct gcgcccagag gcgtgccggc cagcggcggg gggcgagtg	960
[0047]	cacacgaggg ggctggactt cgcctgtgat atctacatct gggcgccctt ggccgggact	1020
[0048]	tgtggggtec ttctcctgtc actggttata accctttact gcaaccacag gaaccgtttc	1080
[0049]	tctgttggtt aacggggcag aaagaaactc ctgtatatat tcaaacaacc atttatgaga	1140
[0050]	ccagtacaaa ctactcaaga ggaagatggc tgtagctgcc gatttccaga agaagaagaa	1200
[0051]	ggaggatgtg aactgagagt gaagttcagc aggagcgagc acgccccgc gtaccagcag	1260
[0052]	ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg	1320
[0053]	gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag	1380
[0054]	gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggcctacag tgagattggg	1440
[0055]	atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg cacgatggcc tttaccaggg tctcagtaca	1500
[0056]	gccaccaagg acacctacga cgcccttcac atgcaggccc tgccccctcg ctaa	1554
[0057]	<210> 2	
[0058]	<211> 517	
[0059]	<212> PRT	
[0060]	<213> 人工序列	
[0061]	<220>	
[0062]	<223> 人工序列的描述:合成多肽	
[0063]	<400> 2	
[0064]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu	
[0065]	1 5 10 15	
[0066]	His Ala Ala Arg Pro Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu	
[0067]	20 25 30	
[0068]	Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln	
[0069]	35 40 45	
[0070]	Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln	
[0071]	50 55 60	
[0072]	Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg	
[0073]	65 70 75 80	
[0074]	Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp	
[0075]	85 90 95	
[0076]	Phe Thr Leu Lys Ile Asn Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr	
[0077]	100 105 110	
[0078]	Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr	
[0079]	115 120 125	
[0080]	Lys Leu Glu Ile Lys Ser Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala	
[0081]	130 135 140	
[0082]	Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Gly Gly Val	
[0083]	145 150 155 160	

[0084]	Lys	Leu	Asp	Glu	Thr	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ala	Met
[0085]						165				170					175	
[0086]	Lys	Leu	Ser	Cys	Val	Thr	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Gly	His	Tyr	Trp	Met
[0087]						180				185					190	
[0088]	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Glu	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Gln
[0089]						195				200					205	
[0090]	Phe	Arg	Asn	Lys	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Glu	Thr	Tyr	Tyr	Ser	Asp	Ser	Val
[0091]						210				215					220	
[0092]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Ser	Ser	Val	Tyr
[0093]						225				230					235	
[0094]	Leu	Gln	Met	Asn	Asn	Leu	Arg	Val	Glu	Asp	Thr	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Cys
[0095]						245									250	
[0096]	Thr	Gly	Ala	Ser	Tyr	Gly	Met	Glu	Tyr	Leu	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val
[0097]						260									265	
[0098]	Thr	Val	Ser	Phe	Val	Pro	Val	Phe	Leu	Pro	Ala	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr
[0099]						275									280	
[0100]	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro
[0101]						290									295	
[0102]	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val
[0103]						305									310	
[0104]	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro
[0105]						325									330	
[0106]	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu
[0107]						340									345	
[0108]	Tyr	Cys	Asn	His	Arg	Asn	Arg	Phe	Ser	Val	Val	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys
[0109]						355									360	
[0110]	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr
[0111]						370									375	
[0112]	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu
[0113]						385									390	
[0114]	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro
[0115]						405									410	
[0116]	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly
[0117]						420									425	
[0118]	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro
[0119]						435									440	
[0120]	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr
[0121]						450									455	
[0122]	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly
[0123]						465									470	
[0124]	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln
[0125]						485									490	

[0126]	Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln	
[0127]	500	505 510
[0128]	Ala Leu Pro Pro Arg	
[0129]	515	
[0130]	<210> 3	
[0131]	<211> 1560	
[0132]	<212> DNA	
[0133]	<213> 人工序列	
[0134]	<220>	
[0135]	<223> 人工序列的描述:合成多核苷酸	
[0136]	<400> 3	
[0137]	gccaccatgg ccttaccagt gaccgccttg ctctgccgc tggccttgct gctccacgcc	60
[0138]	gccaggccgg atgtcgtgat gaccagacc cccctcagcc tcccagtgtc cctcggtgac	120
[0139]	caggcttcta ttagttgcag atccagccag tccctcgtgc actctaacgg taataacctac	180
[0140]	ctgagatggg atctccagaa gcccggacag agccctaagg tgctgatcta caaagtctcc	240
[0141]	aaccgggtgt ctggagtccc tgaccgttc tcagggagcg gttccggcac cgacttcacc	300
[0142]	ctgaagatca accgggtgga ggccgaagac ctcggcgtct atttctgctc tcagagtaca	360
[0143]	catgtgccct ggaccttcgg cggagggacc aagctggaga tcaaaagctc cgcagacgat	420
[0144]	gccaagaaag atgccgctaa gaaagacgat gctaagaaag acgatgcaa gaaagacggg	480
[0145]	ggcgtgaagc tggatgaaac cggaggaggt ctgtccagc caggaggagc catgaagctg	540
[0146]	agttgcgtga ccagcggatt cacctttggg cactactgga tgaactgggt gcgacagtcc	600
[0147]	ccagagaagg ggctcgaatg ggctcgtcag ttcaggaaca aacctacaa ttatgagaca	660
[0148]	tactattcag acagcgtgaa gggcaggttt actatcagta gagacgattc caaatctagc	720
[0149]	gtgtacctgc agatgaacaa tctcagggtc gaagatacag gcatctacta ttgcacaggg	780
[0150]	gcatcctatg gtatggagta tctcggtcag gggacaagcg tcacagtcag tttcgtgccg	840
[0151]	gtcttcctgc cagcgaagcc caccacgacg ccagcggcgc gaccaccaac accggcgccc	900
[0152]	accatcgcgt cgcagcccct gtccctgcgc ccagaggcgt gccggccagc ggcggggggc	960
[0153]	gcagtgcaca cgagggggct ggacttcgcc tgtgatattc acatctgggc gcccttgcc	1020
[0154]	gggacttggt gggtccttct cctgtcactg gttatcacc tttactgcaa ccacaggaac	1080
[0155]	cgtttctctg ttgttaaacg gggcagaaag aaactcctgt atatattcaa acaaccattt	1140
[0156]	atgagaccag taaaactac tcaagaggaa gatggctgta gctgccgatt tccagaagaa	1200
[0157]	gaagaaggag gatgtgaact gagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc cccgcgtac	1260
[0158]	cagcagggcc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat	1320
[0159]	gttttggaac agagacgtgg ccgggaccct gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac	1380
[0160]	cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagttag	1440
[0161]	attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc	1500
[0162]	agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc cttcacatgc aggcctgcc ccctcgctaa	1560

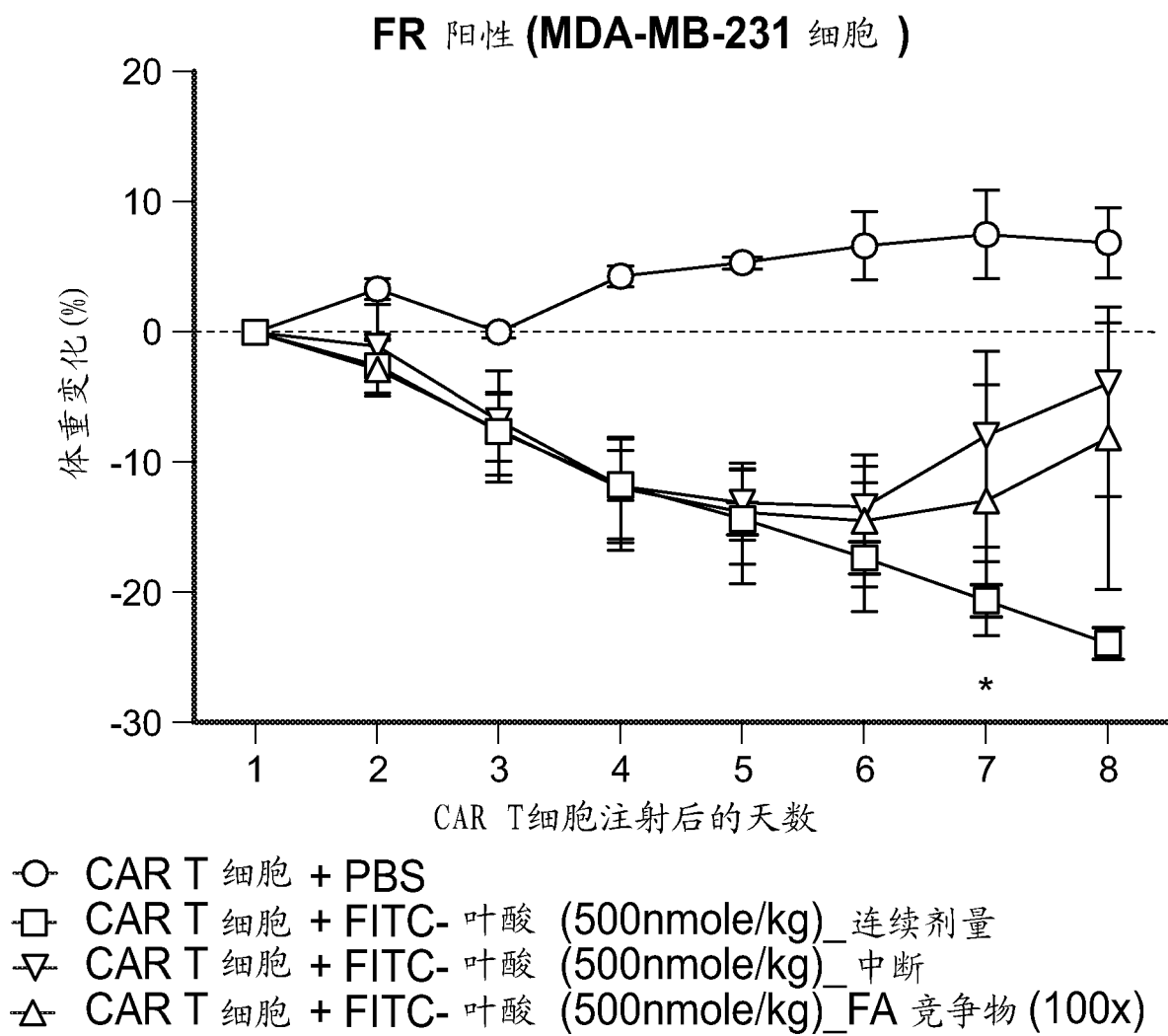


图 1A

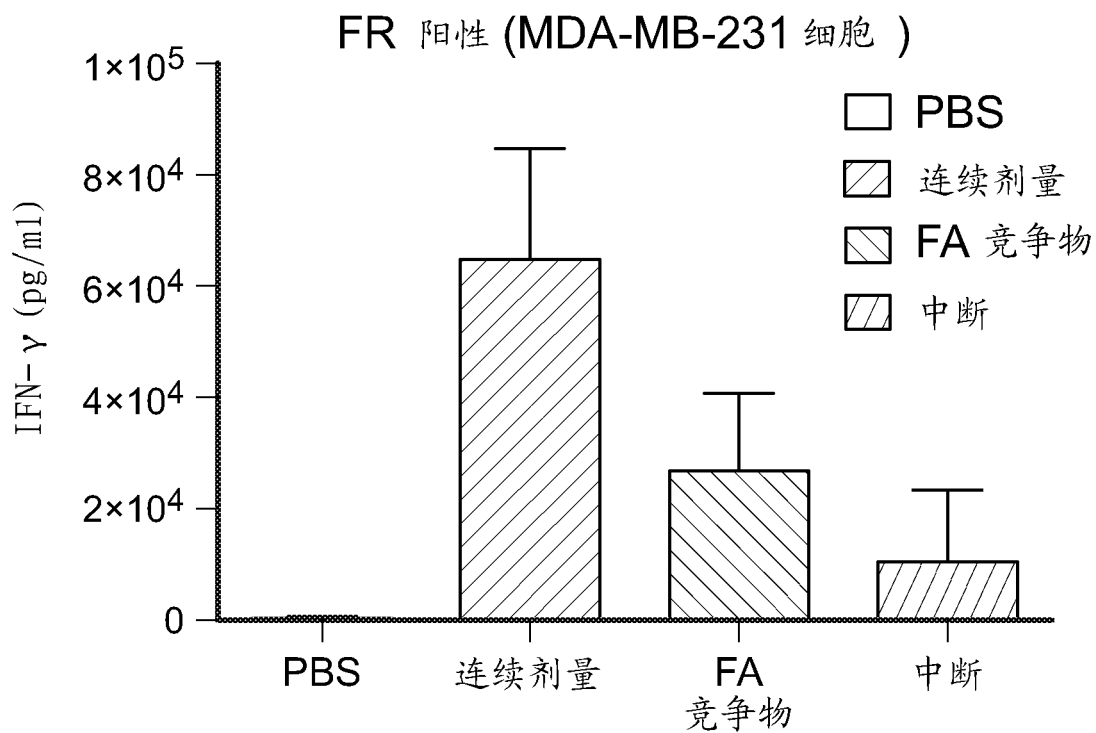


图 1B

治疗第一周时的存活百分比				
	PBS	FITC-FA (500nmole/kg)		
		连续	FA竞争物 (100x)	中断
%	100(5/5)	40 (2/5)	100 (5/5)	100 (5/5)

图 1C

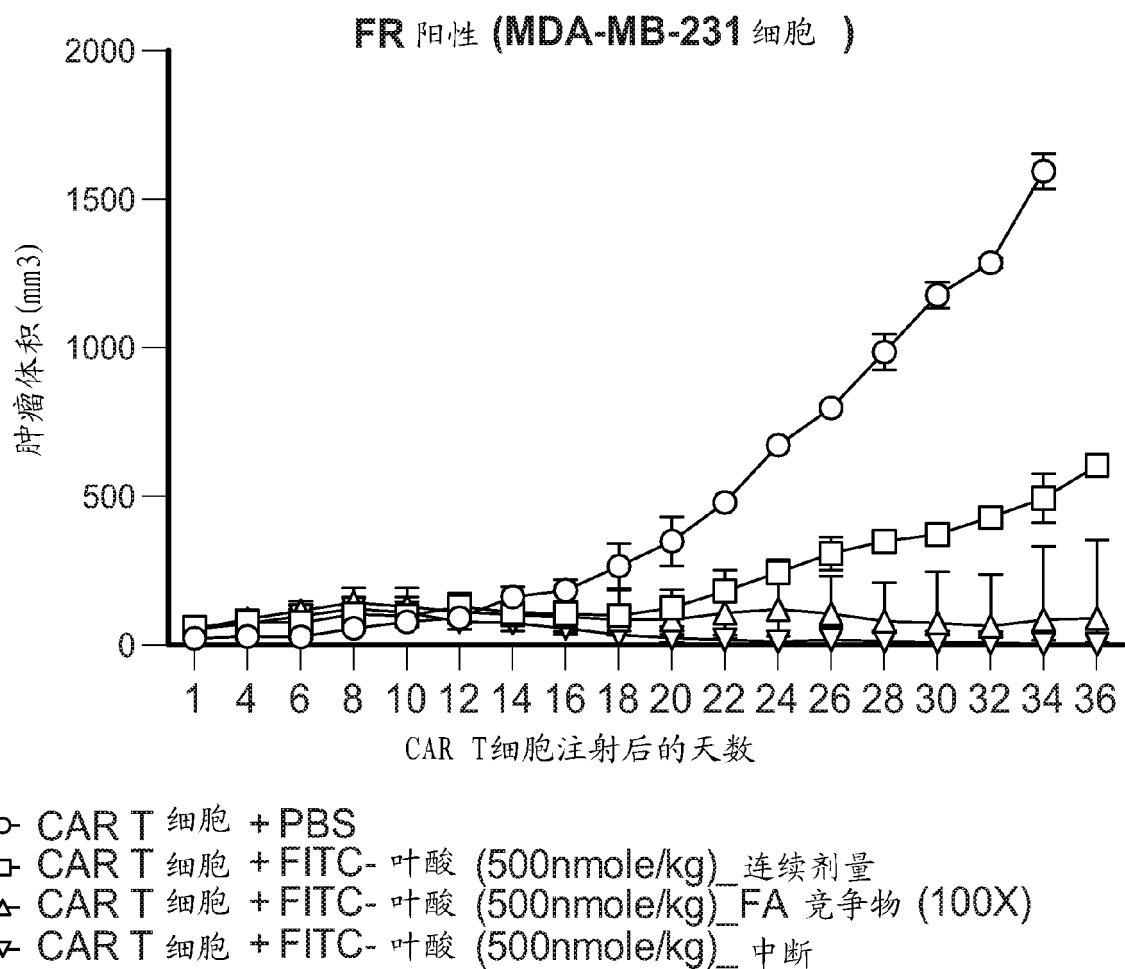


图 2A

肿瘤应答的最终结果				
%	PBS	中断	FA竞争物	连续剂量
完全应答	—	100 (5/5)	75 (3/4)	
稳定疾病	—	—	25 (1/4)	
部分应答	—	—	—	100 (2/2)
无应答	100 (5/5)	—	—	—

图 2B

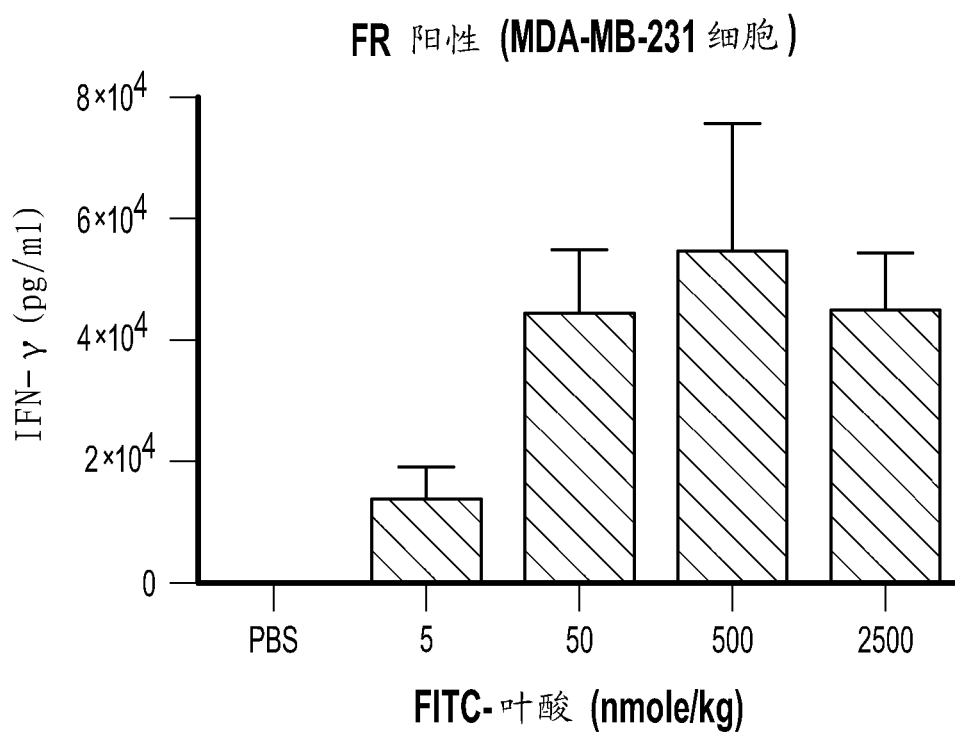


图 3A

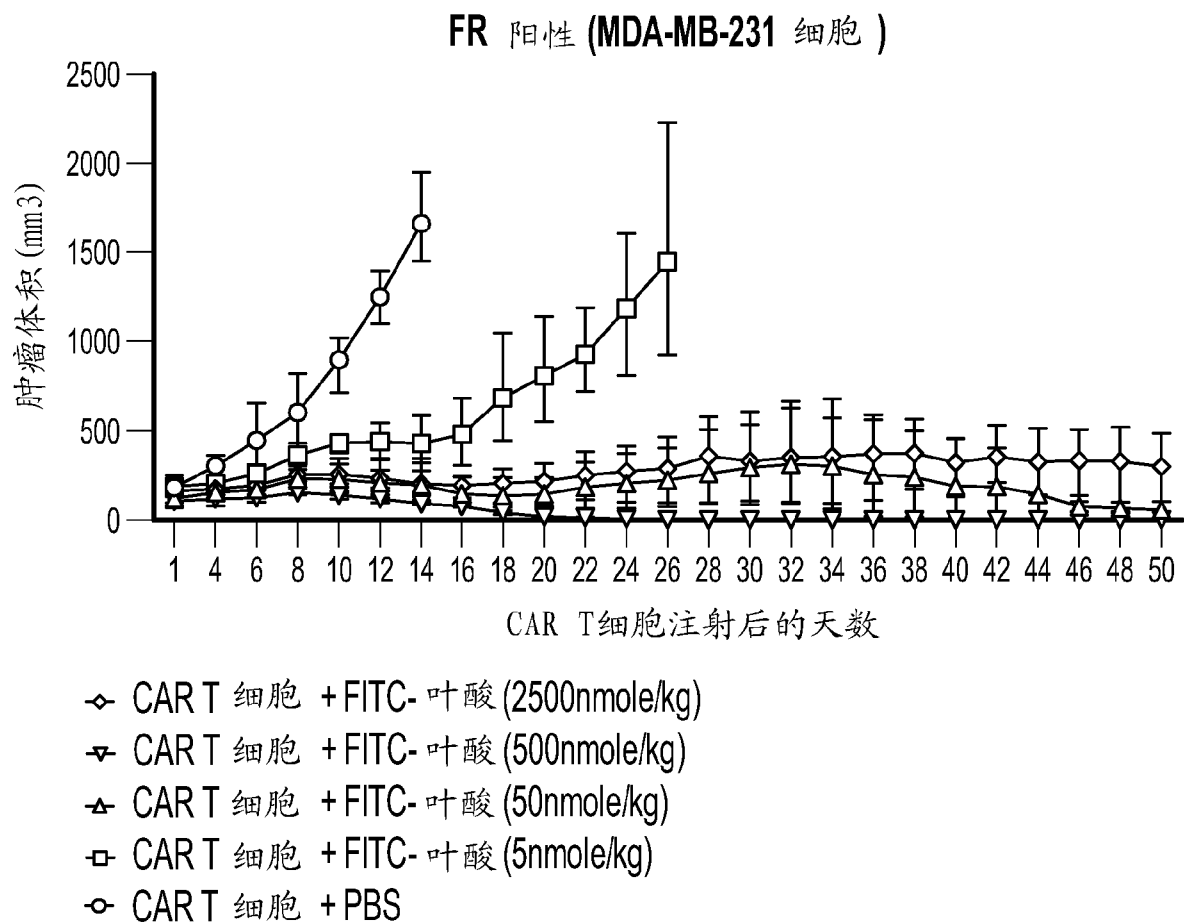


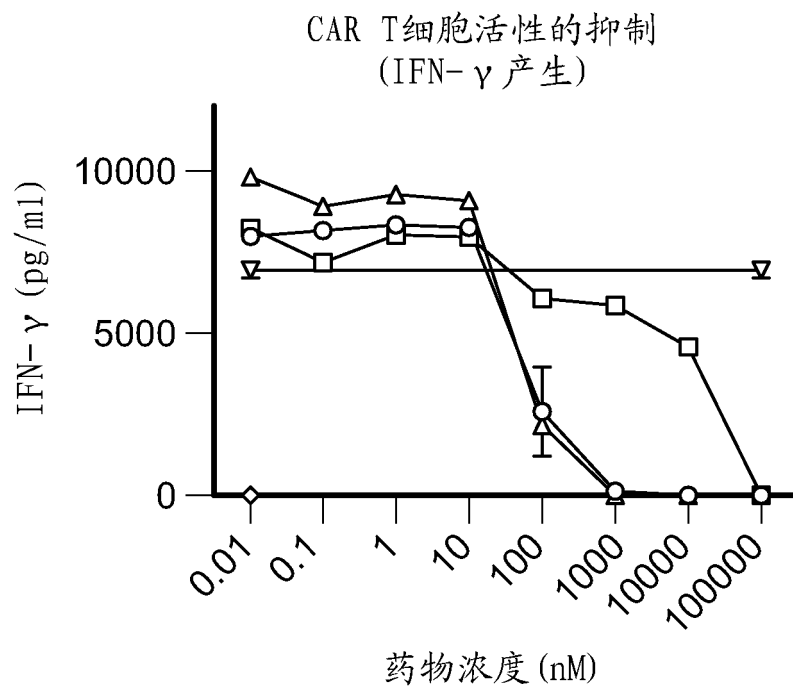
图 3B

治疗第一周时的存活百分比					
	PBS	FITC-FA (nmole/kg)			
		5	50	500	2500
%	100 (5/5)	100 (5/5)	60 (3/5)	40 (2/5)	80 (4/5)

图 3C

肿瘤应答的最终结果					
%	PBS	FITC-FA (nmole/kg)			
		5	50	500	2500
完全应答	0	0	33.3 (1/3)	100 (2/2)	0
稳定疾病	0	0	67.7 (2/3)	0	100 (4/5)
部分应答	0	100 (5/5)	0	0	0
无应答	100 (5/5)	0	0	0	0

图 3D



- ◇ PBS
- ▽ EC17 (100nM)
- △ EC17 (100nM) + Lcki (达沙替尼)
- EC17 (100nM) + ITKi (BMS-509744)
- EC17 (100nM) + PI3Ki (GDC0980)

图 4A

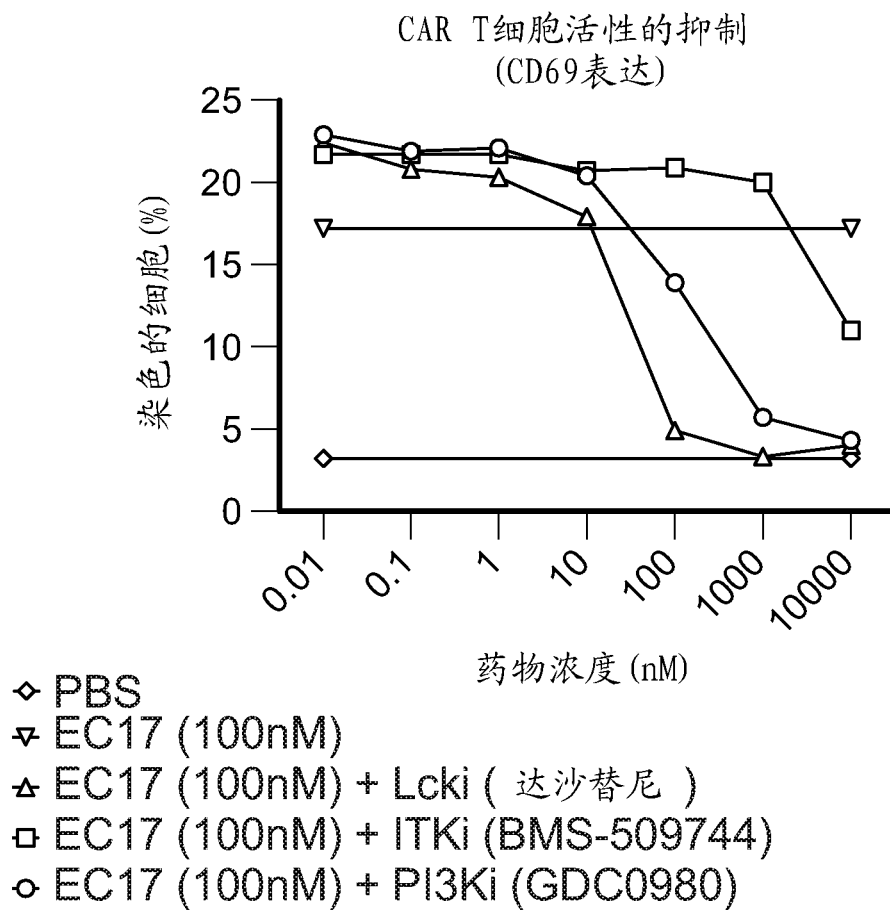


图 4B

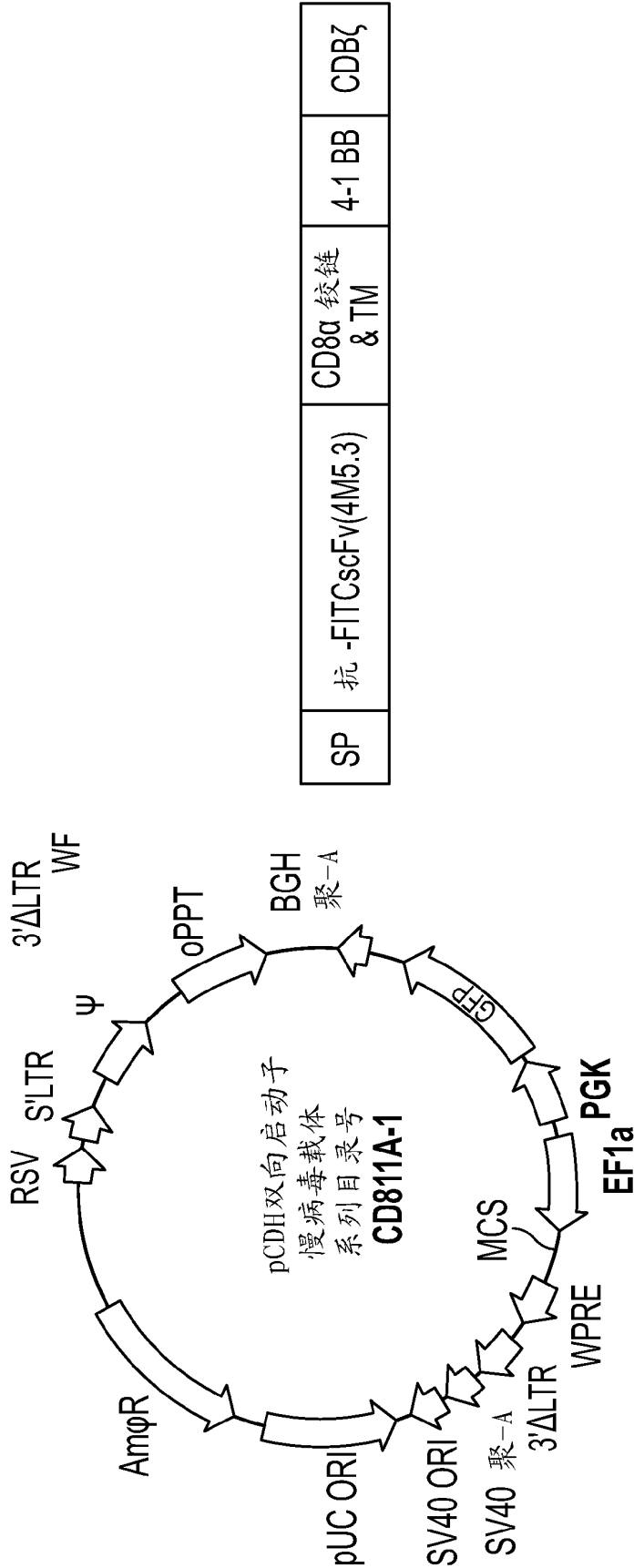


图 5

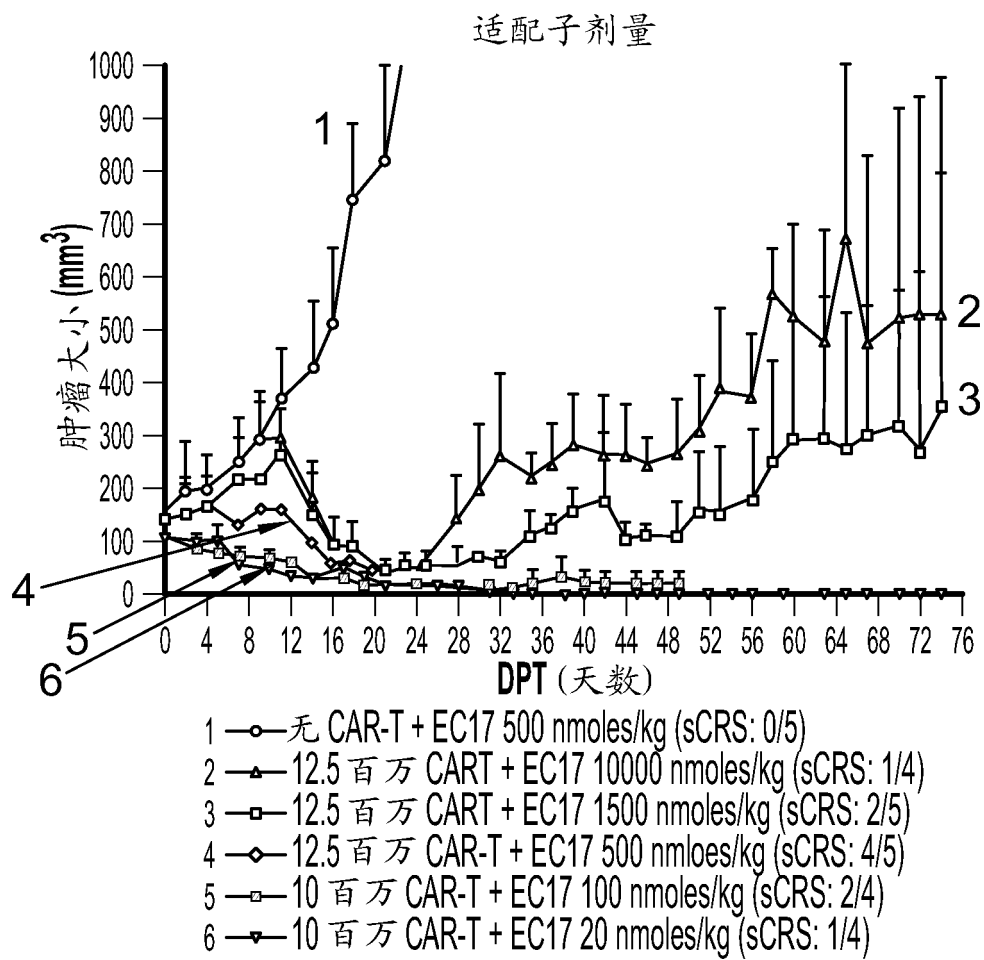


图 6A

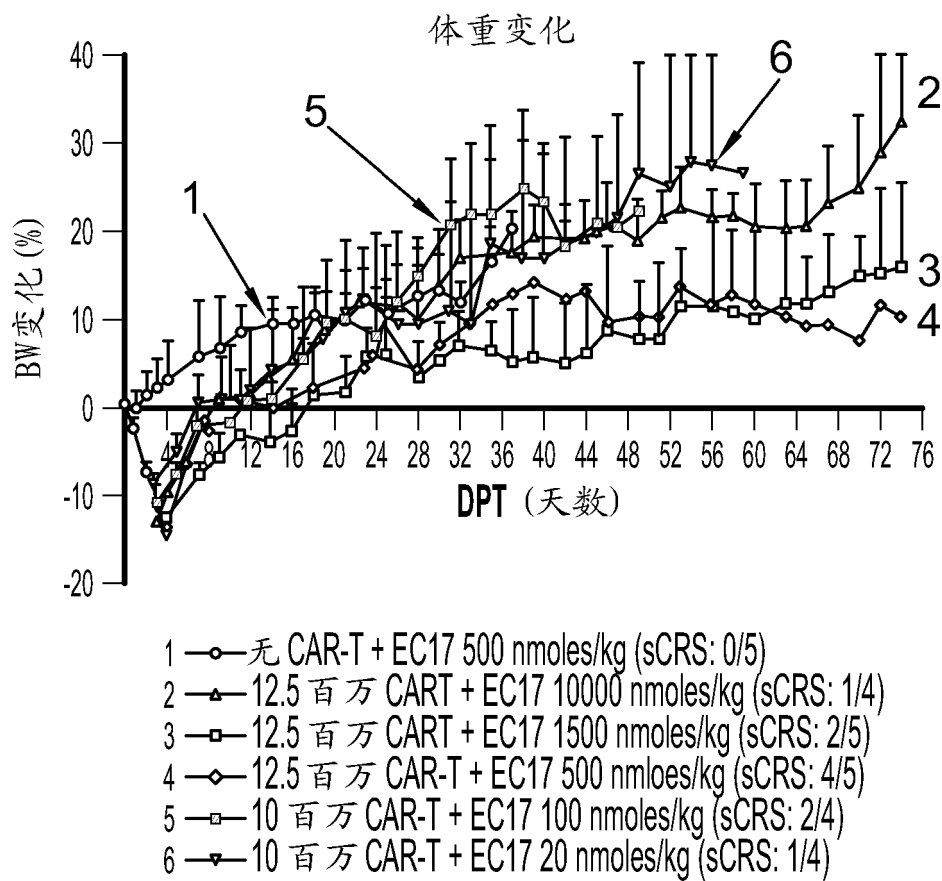


图 6B

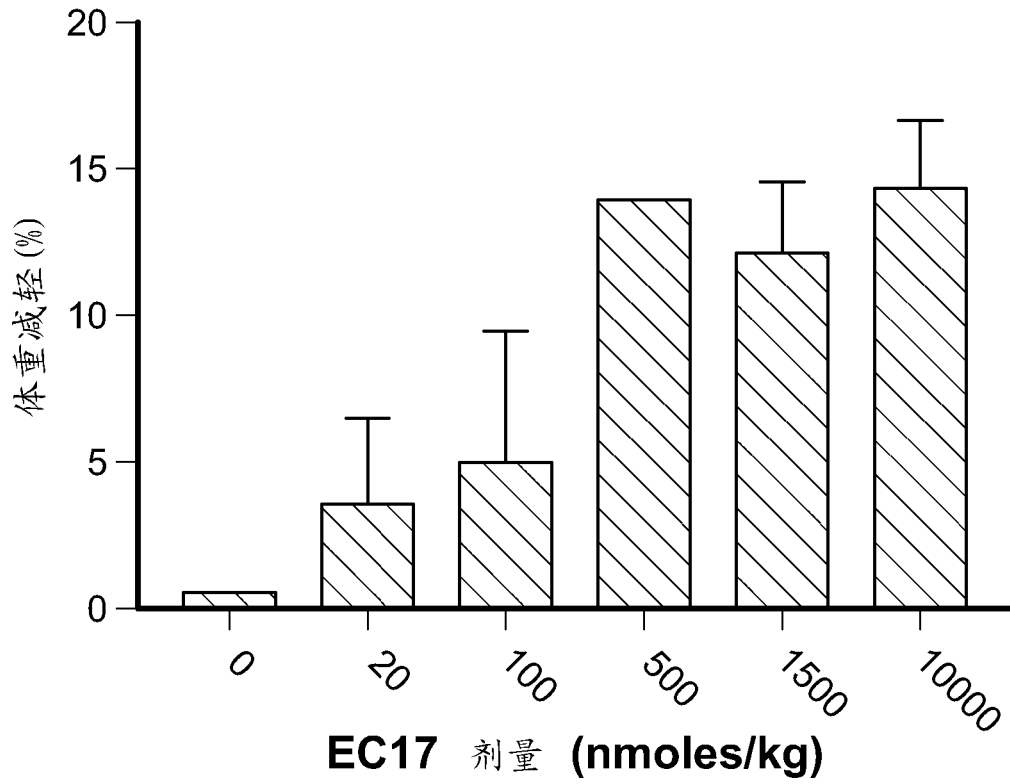


图 6C

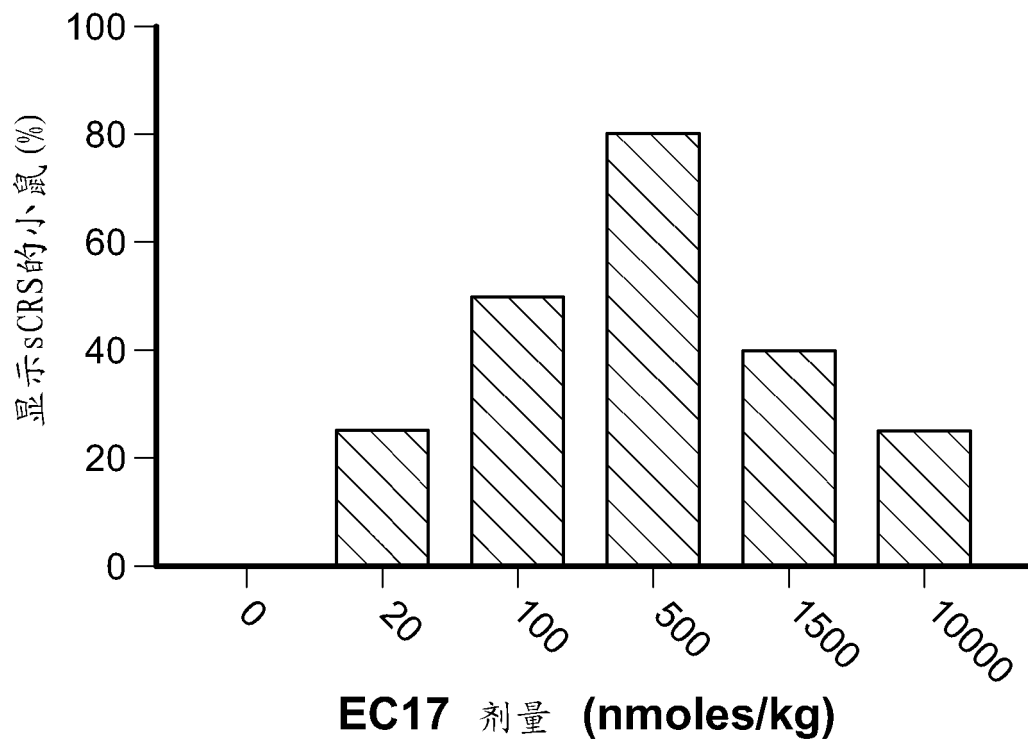


图 6D

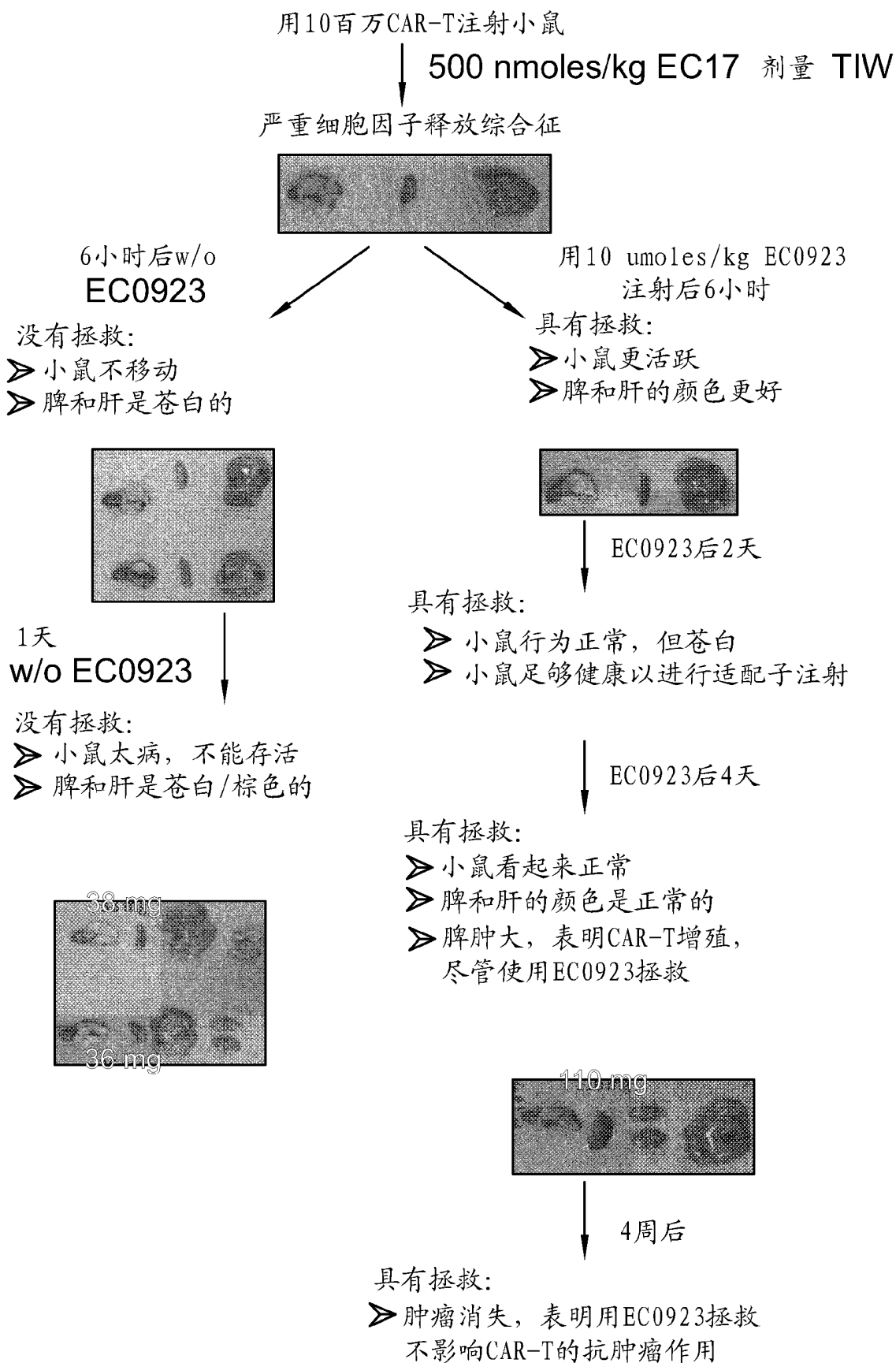


图 7

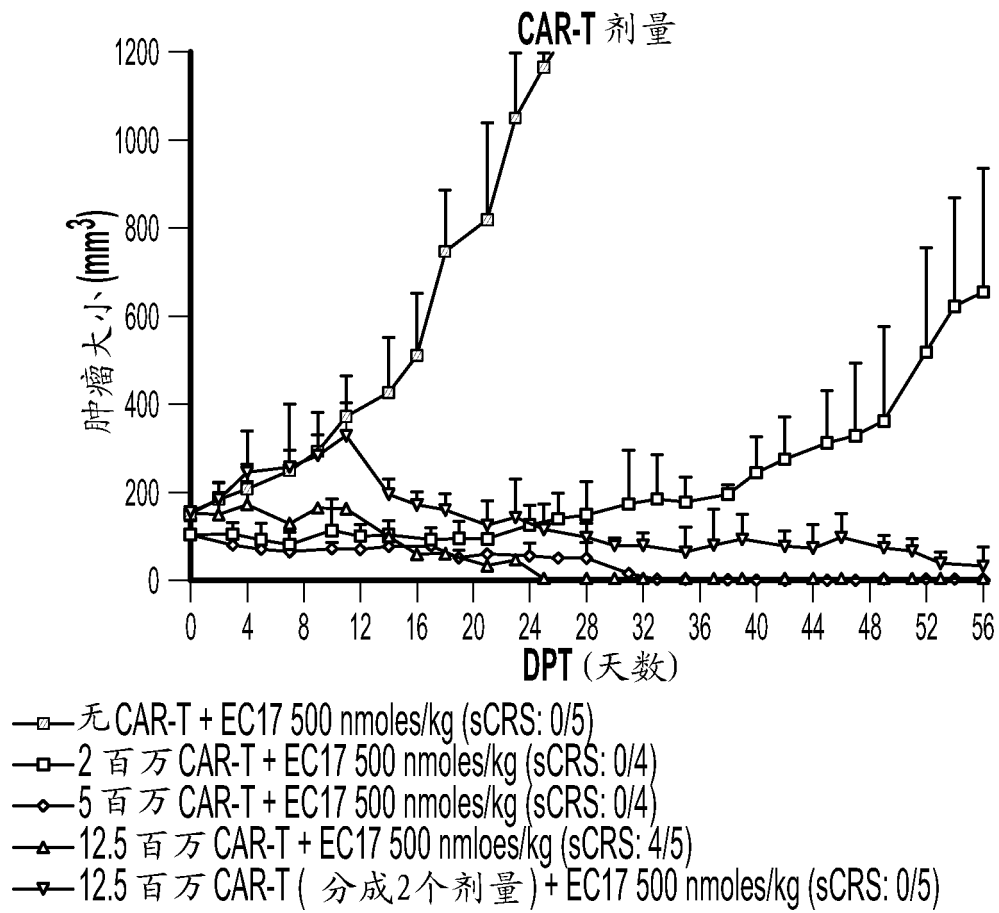


图 8A

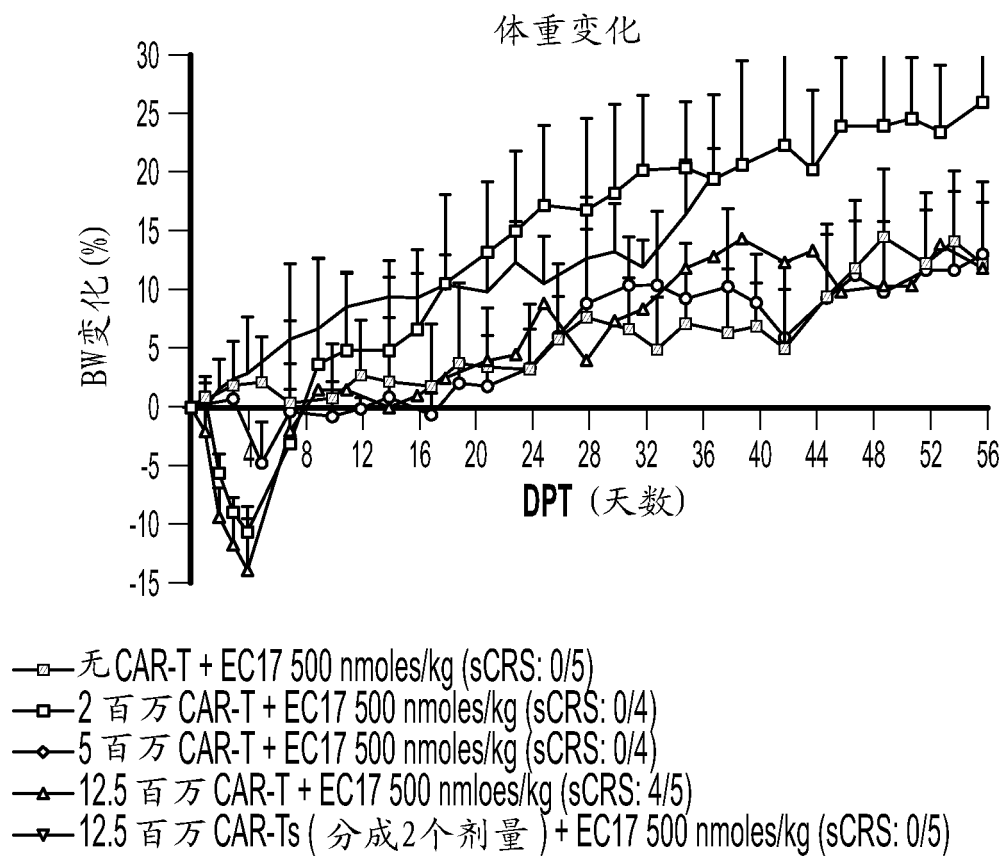


图 8B

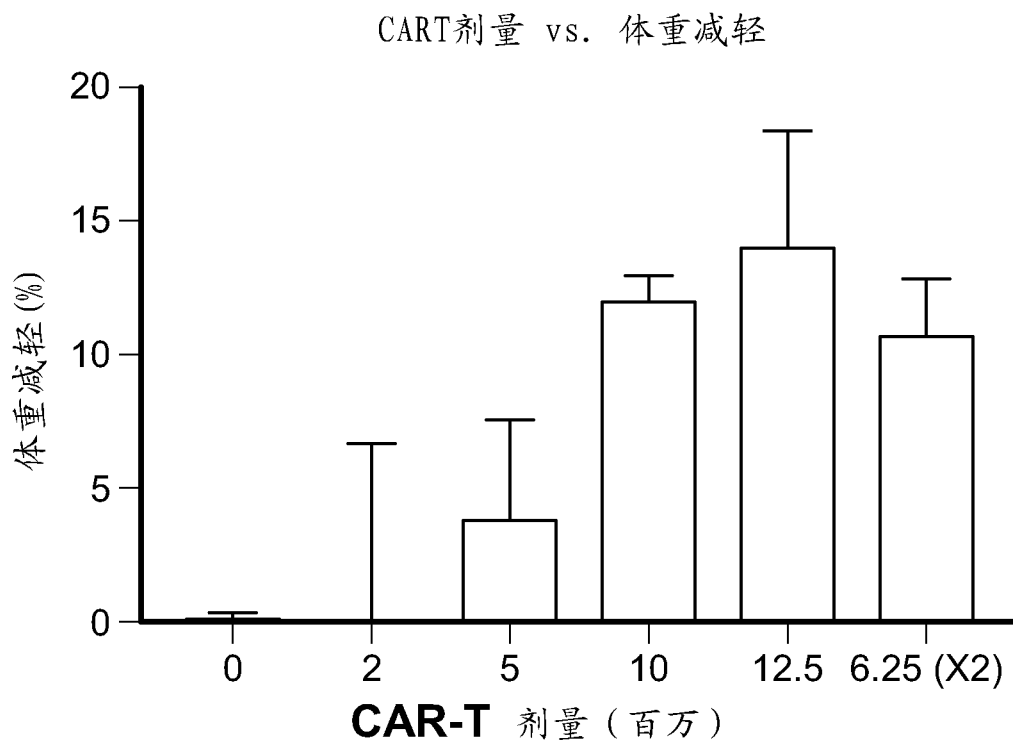


图 8C

CART剂量 vs. 严重细胞因子释放综合征

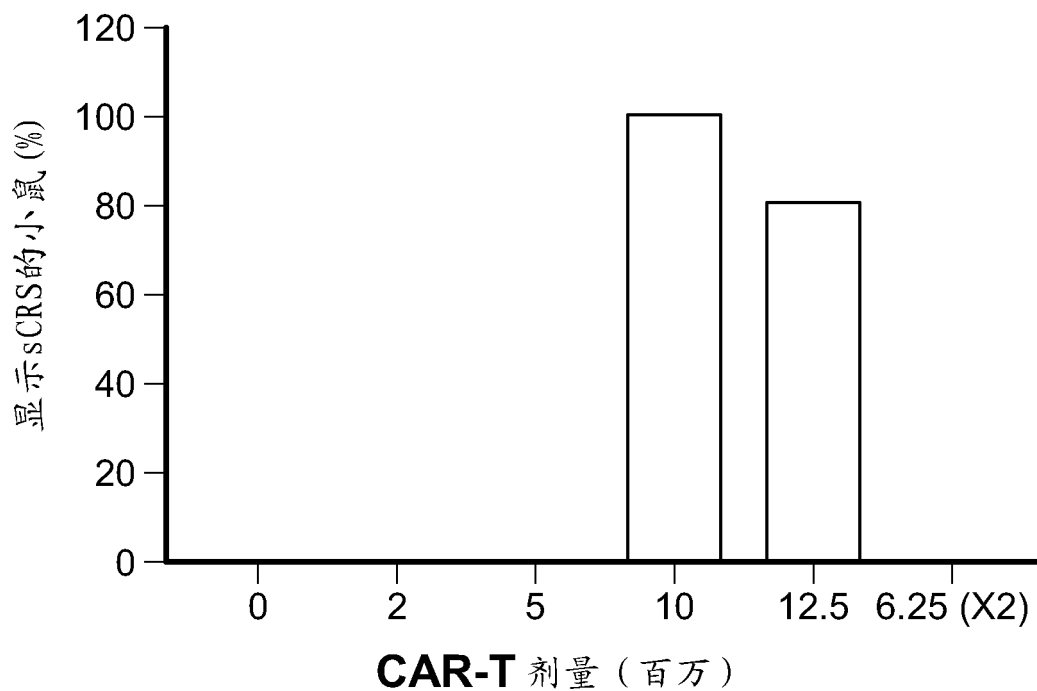


图 8D

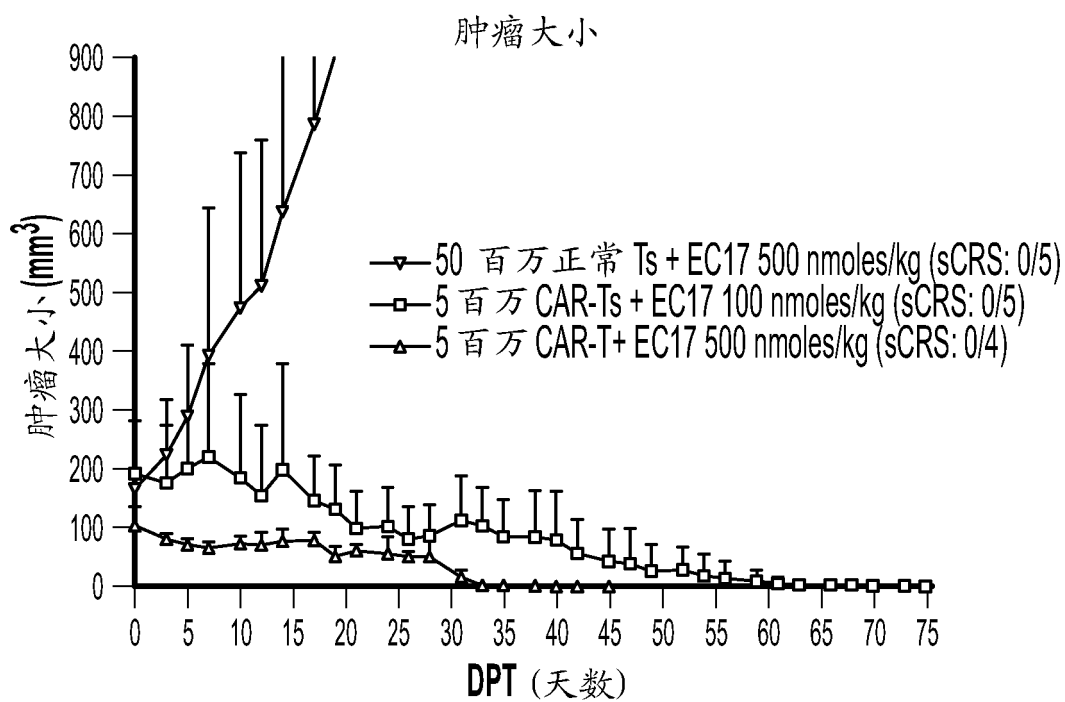


图 9A

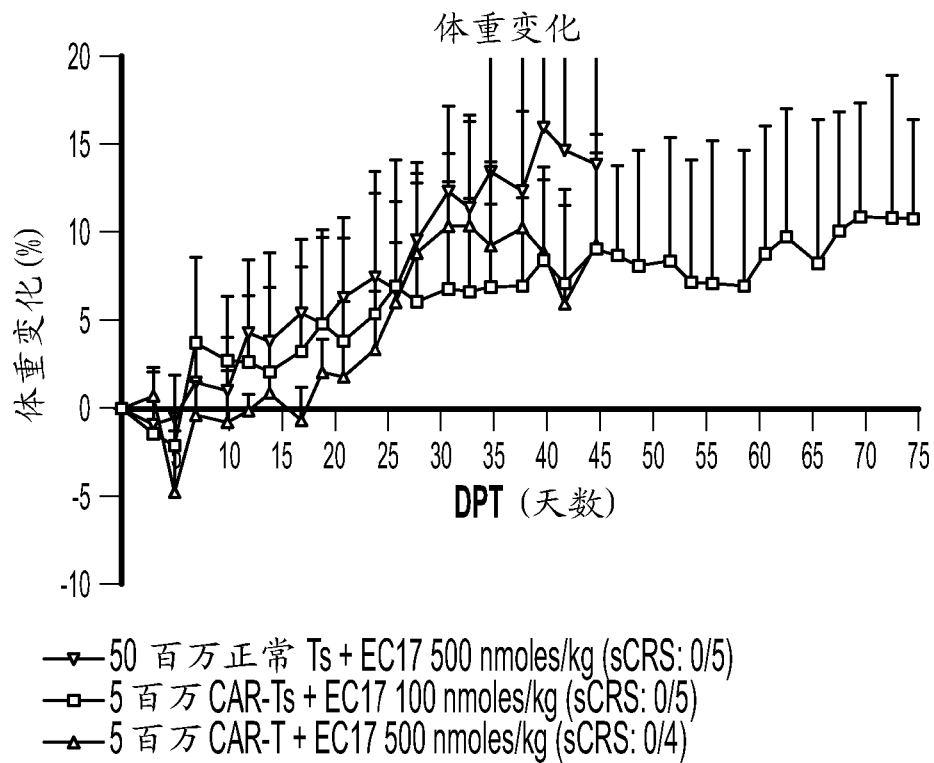


图 9B

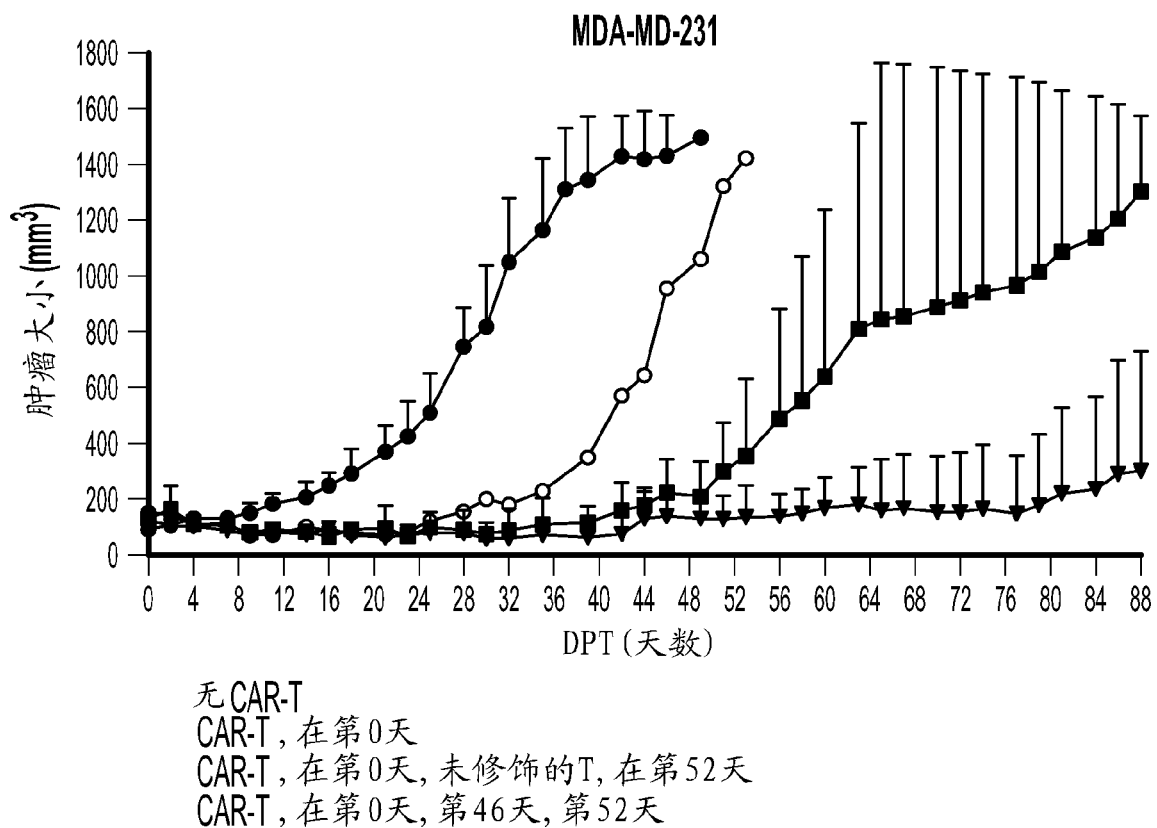


图 10A

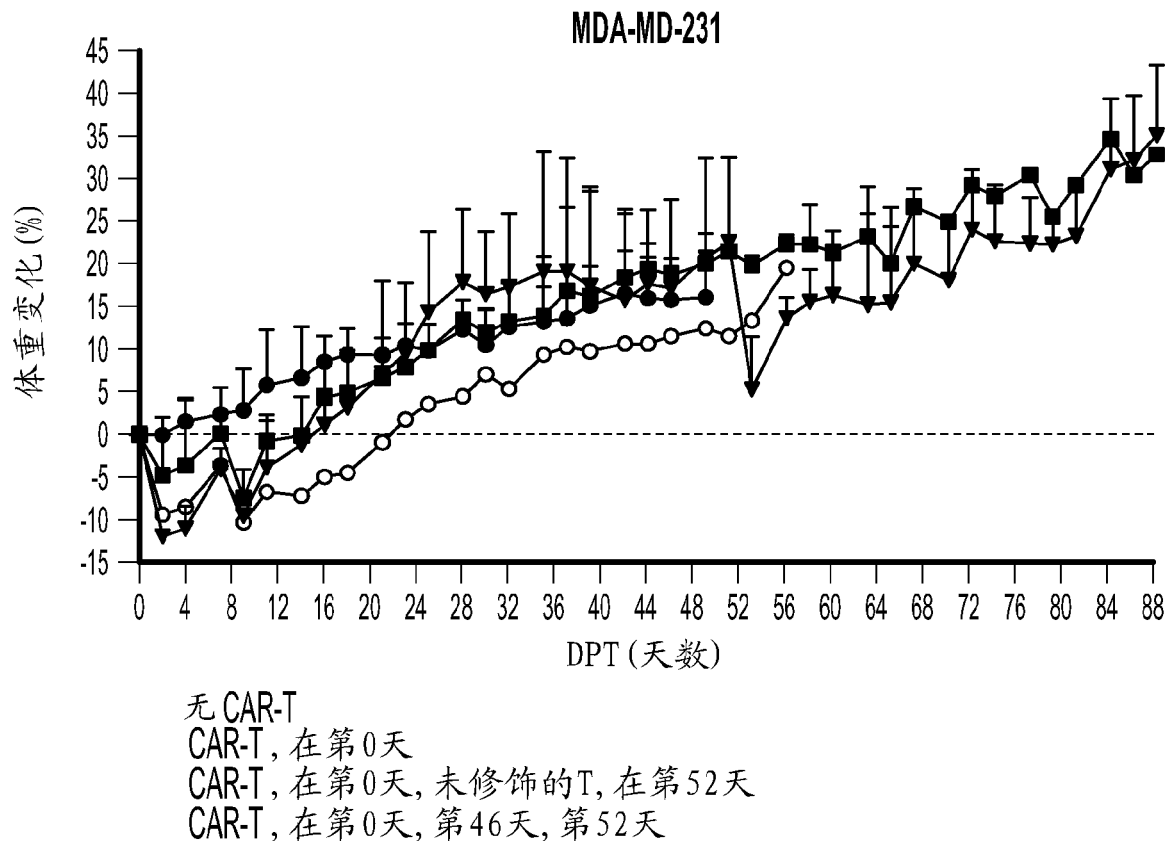


图 10B

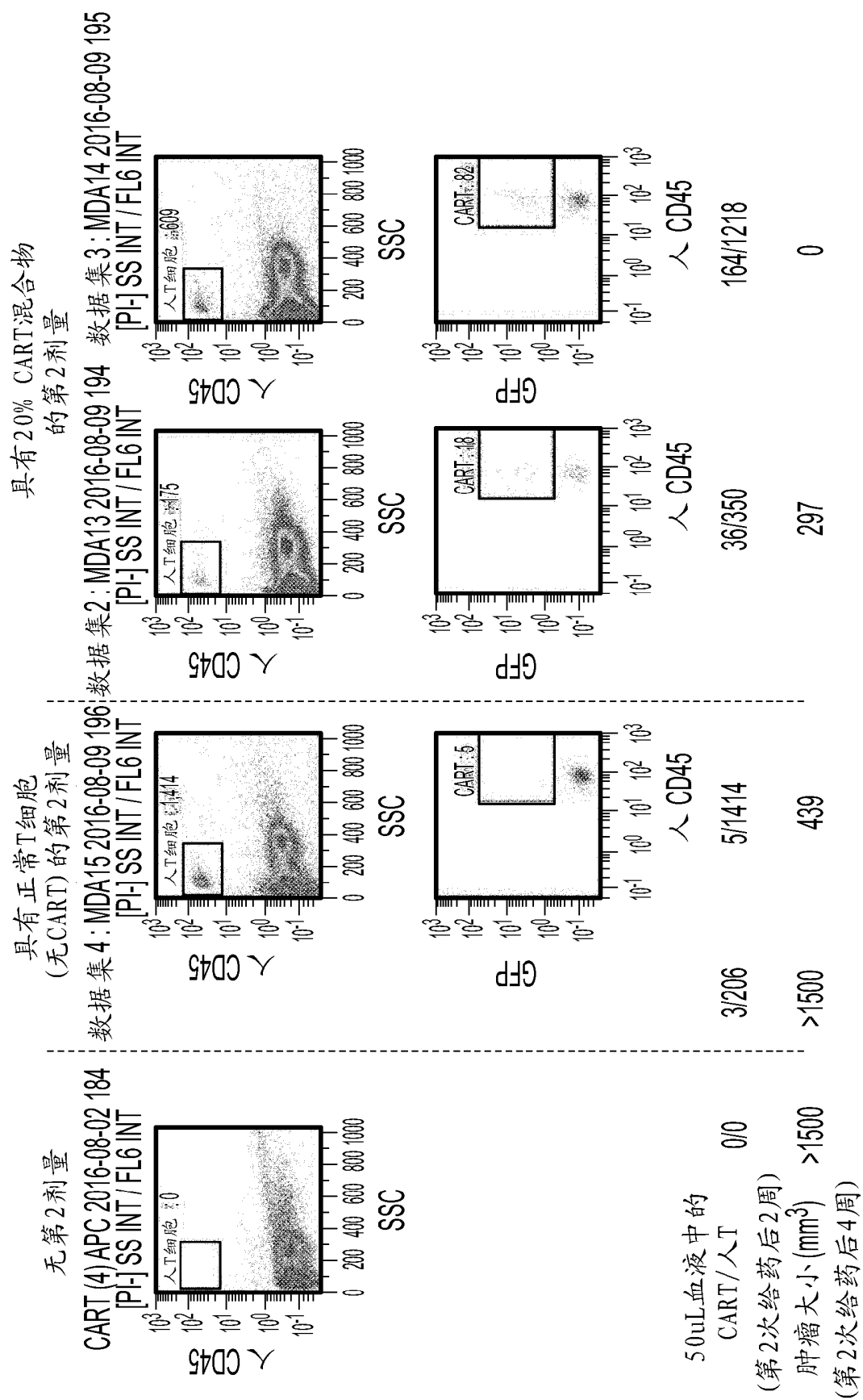


图 10C

EC17给药时间表: 肿瘤大小

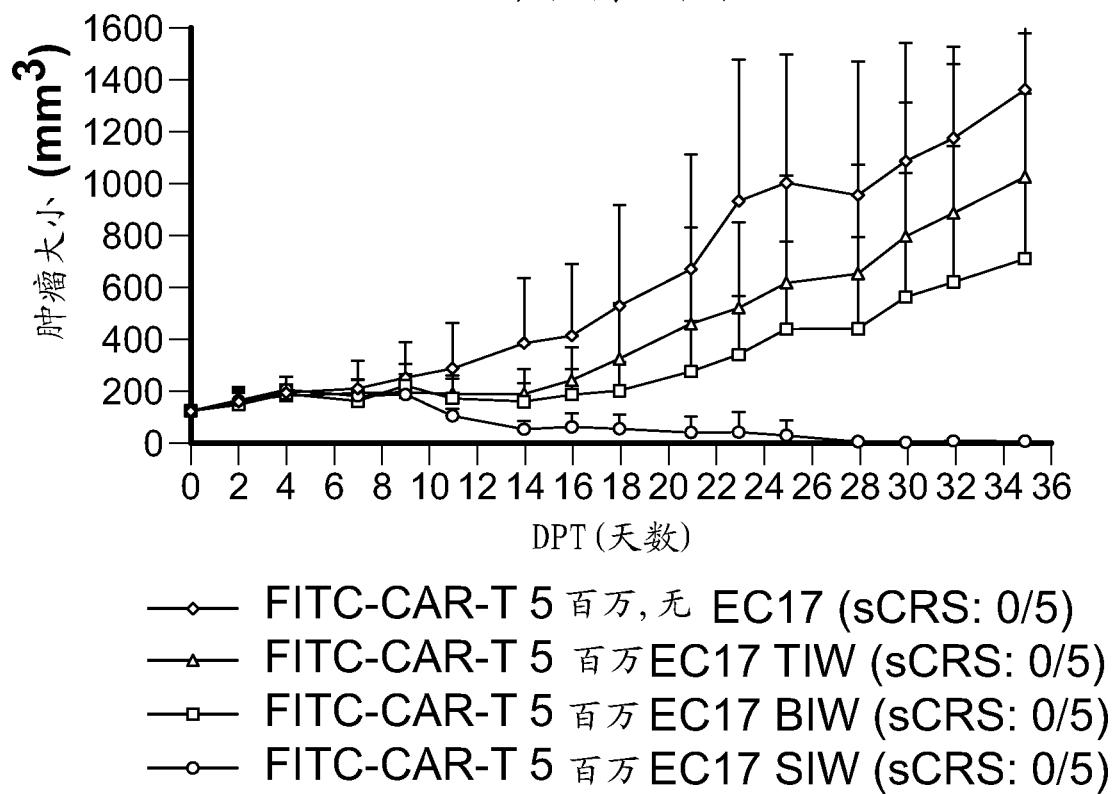


图 11A

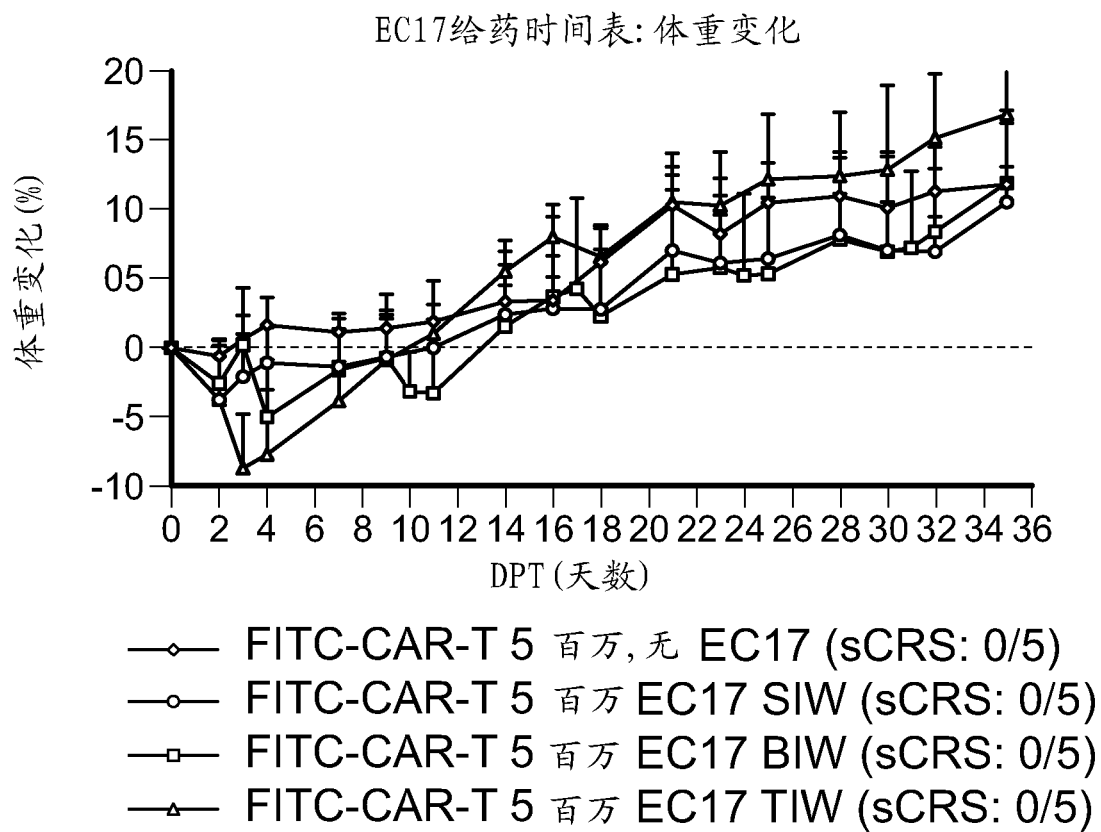
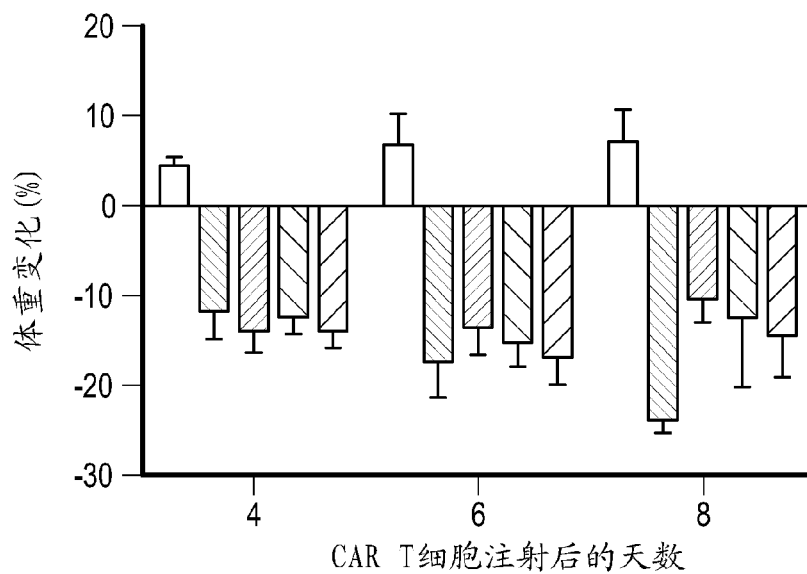


图 11B

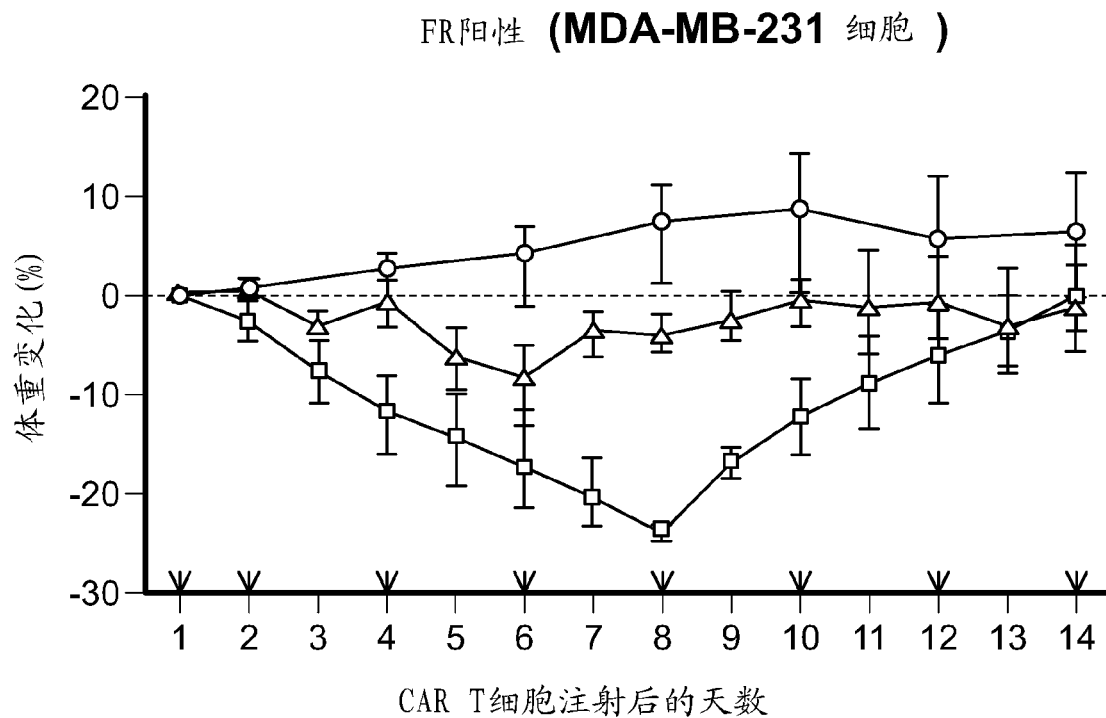
通过调节CAR T细胞活化控制毒性



- CAR T 细胞 + PBS
- ▨ CAR T 细胞 + FITC- 叶酸 (500nmole/kg)_ 连续剂量
- ▩ CAR T 细胞 + FITC- 叶酸 (500nmole/kg)_ 中断+FA竞争物
- ▧ CAR T 细胞 + FITC- 叶酸 (500nmole/kg)_ 中断
- ▦ CAR T 细胞 + FITC- 叶酸 (500nmole/kg)_ FA竞争物

治疗第一周时的存活百分比					
	PBS	FITC-FA (500nmole/kg)			
		连续	FA 竞争物 (100x)	中断	中断 +FA竞争物 (100x)
%	100(5/5)	40(2/5)	100(3/3)	100(3/3)	100(5/5)

图 12



- CAR T 细胞 + PBS
- △— CAR T 细胞 + FITC- 叶酸 _ 剂量递增
- CAR T 细胞 + FITC- 叶酸 (500nmole/kg)_ 连续剂量

* 注

1. 在剂量递增组中注射EC17
 - 第1天和第2天 : EC17 (0.5nmole/kg)
 - 第4天 : EC17 (5nmole/kg)
 - 第6天和第8天 : EC17 (50nmole/kg)
 - 第10天、第12天和第14天 : EC17 (500nmole/kg)
2. 在连续组中注射EC17
 - 从第1天每隔一天
3. CAR T细胞: 15×10^6 CART细胞, 在第1天

图 13A

FR阳性 (MDA-MB-231 细胞)

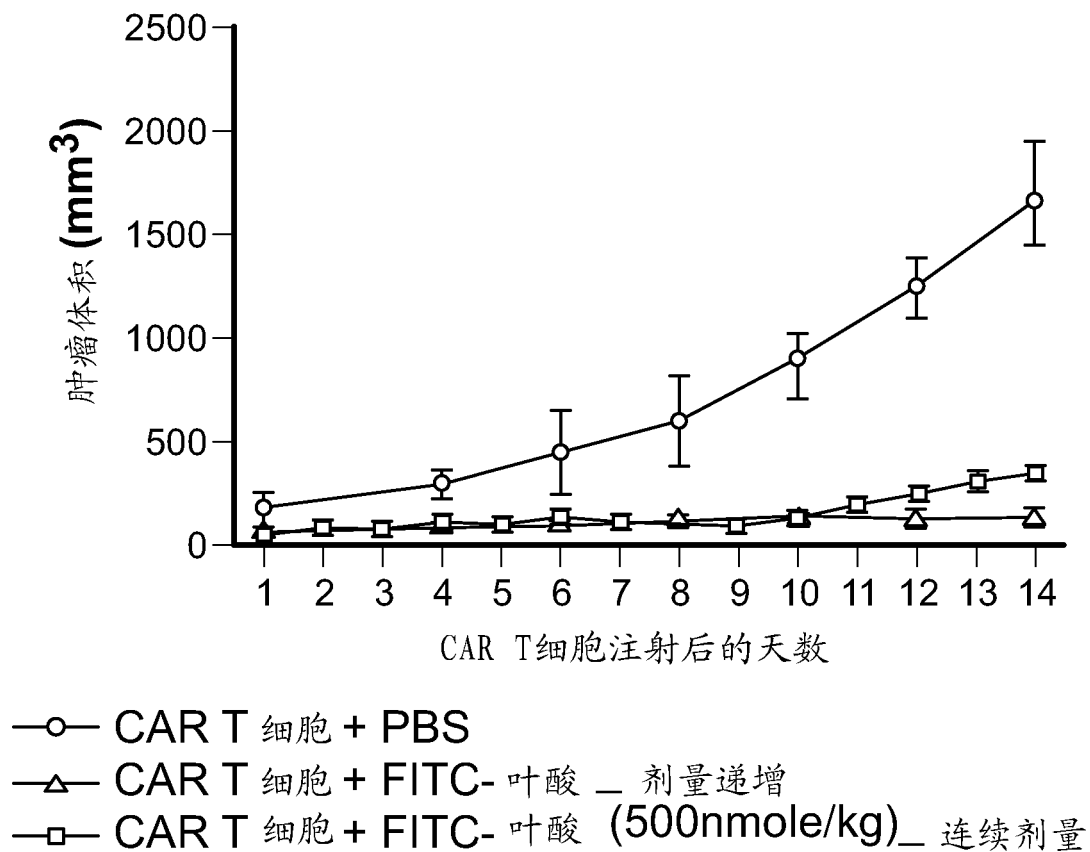


图 13B

治疗第一周时的存活百分比			
	PBS	连续	剂量递增
%	100	40 (2/5)	100 (4/4)

* 注：剂量递增组中的1只小鼠在注射CAR T细胞期间死亡

图 13C

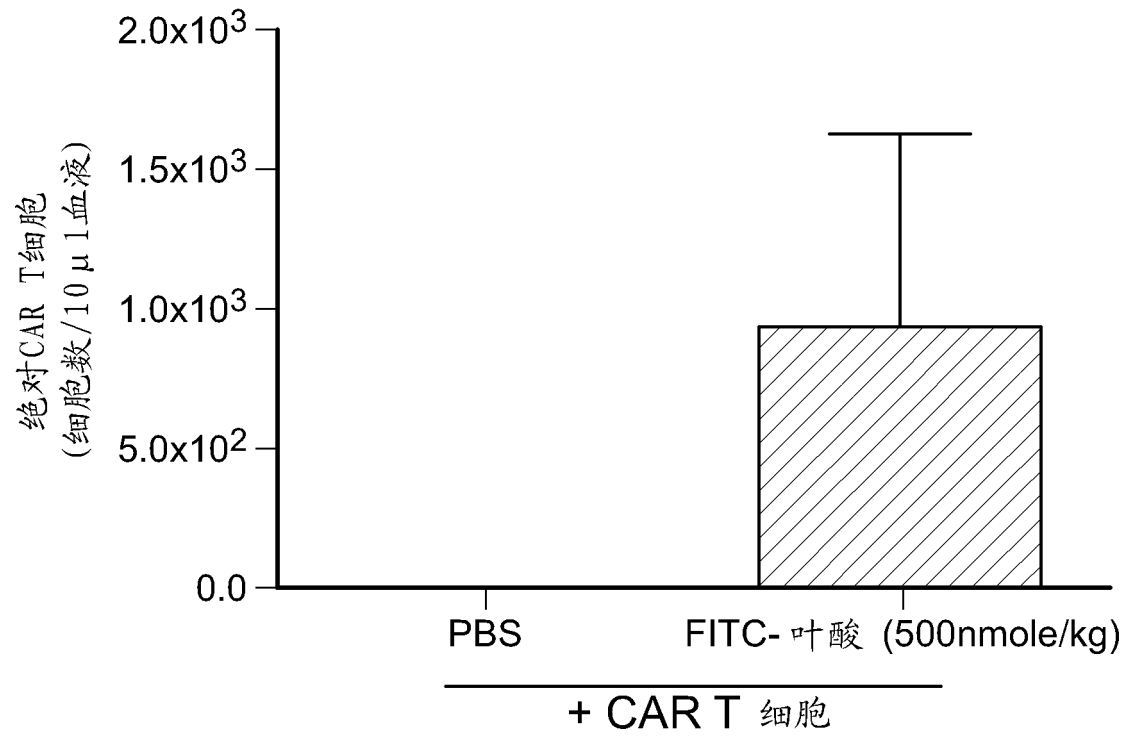


图 14A

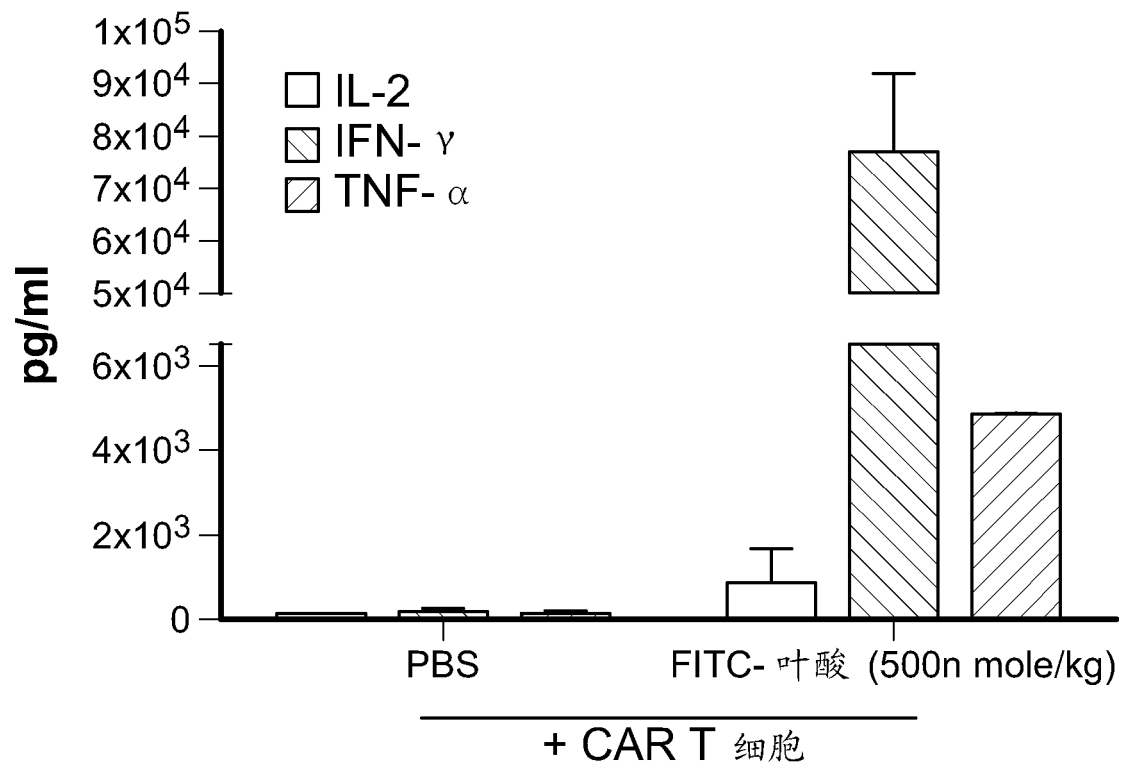


图 14B

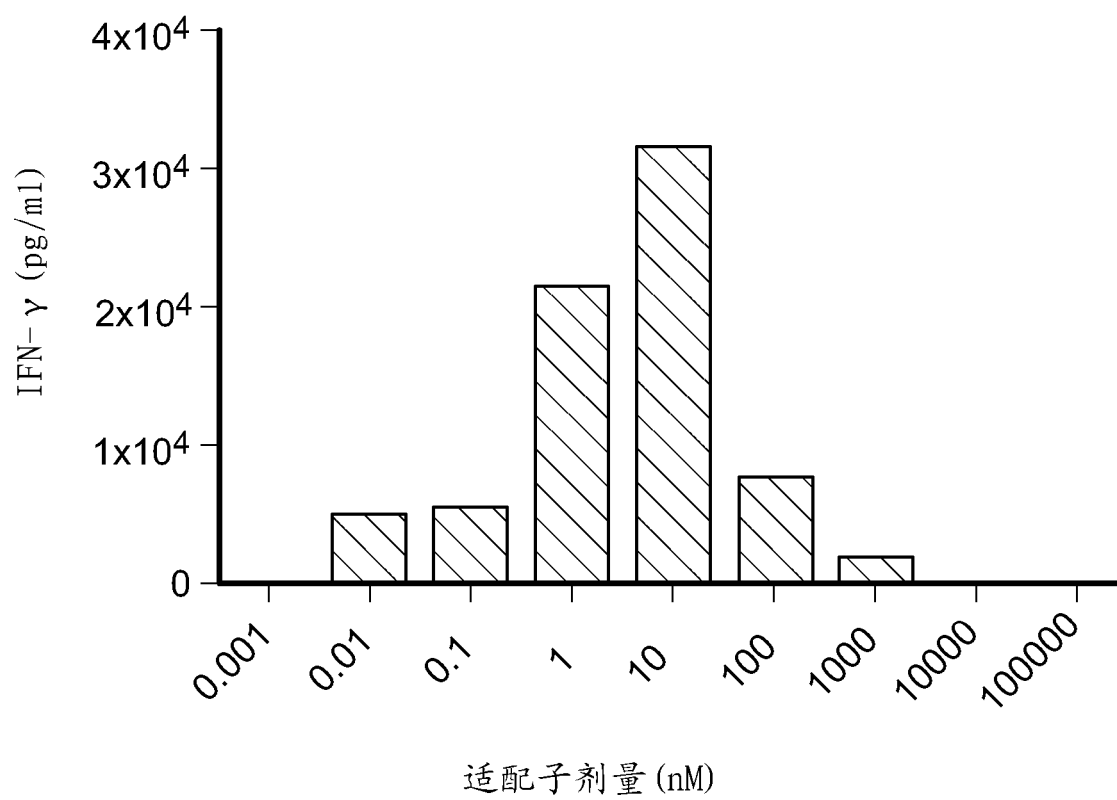


图 15

细胞因子产生

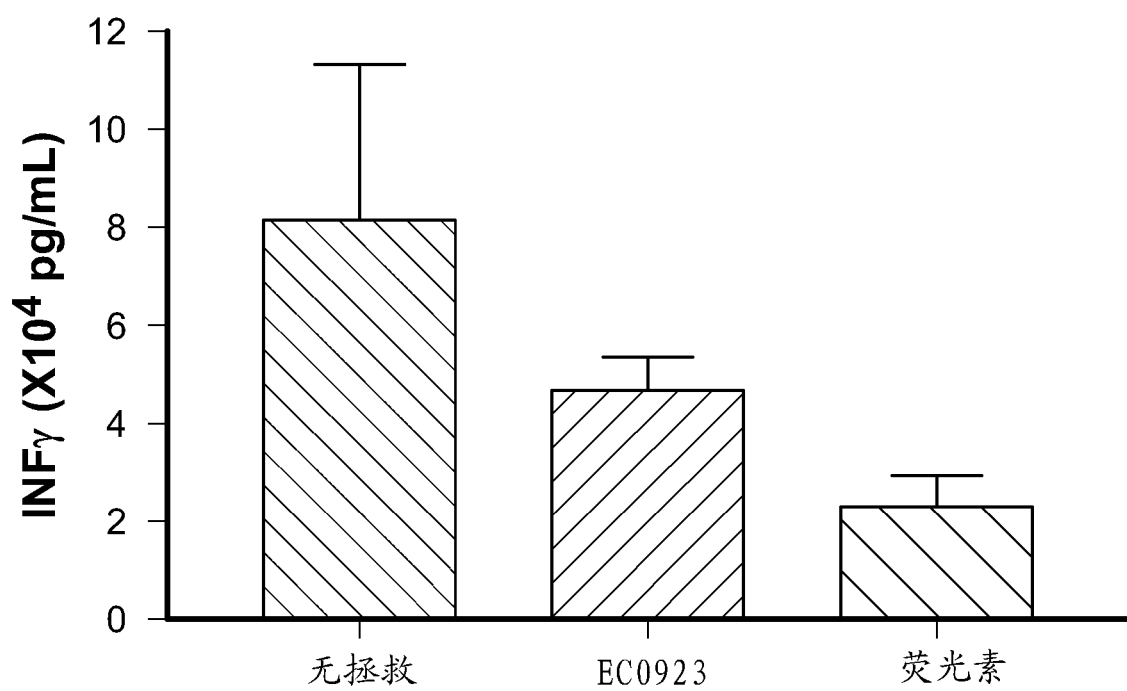


图 16

细胞因子产生

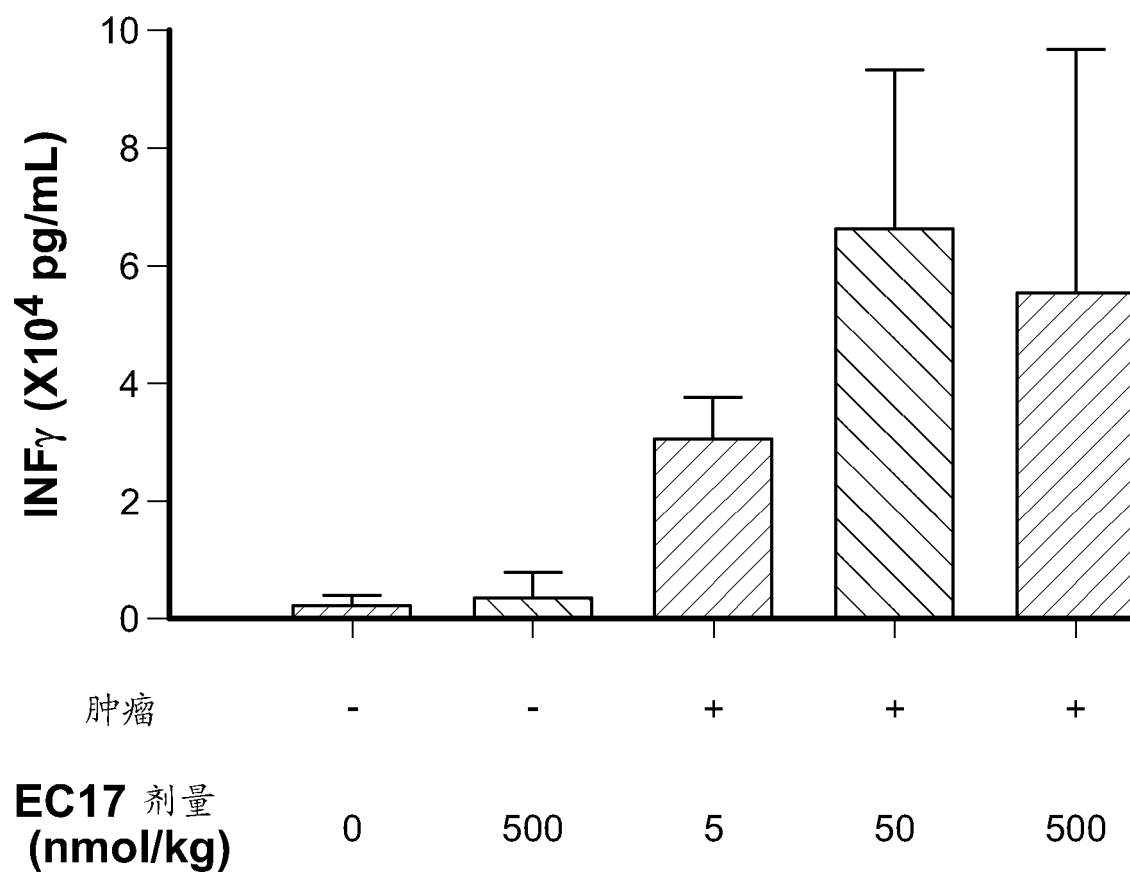


图 17

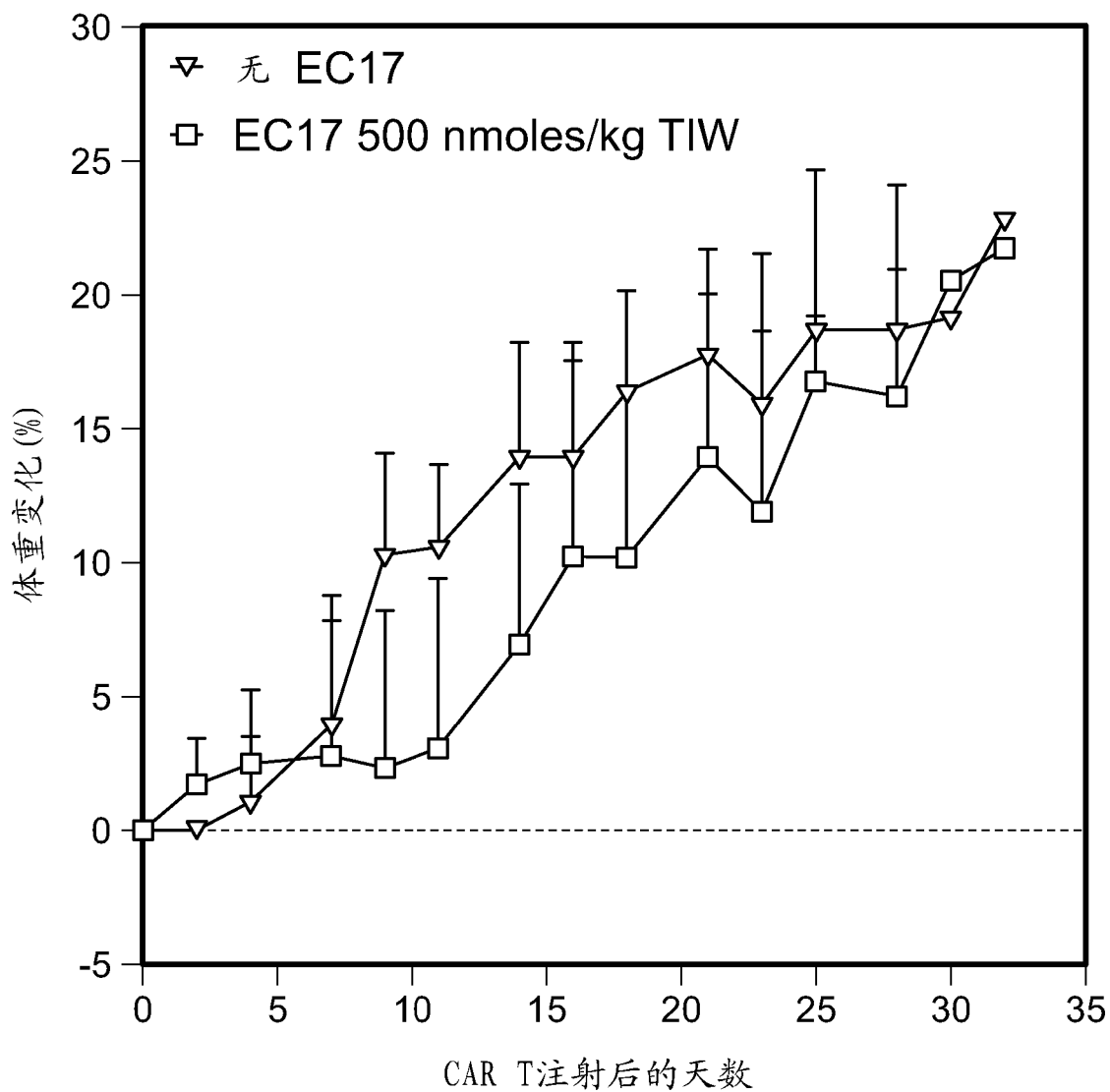
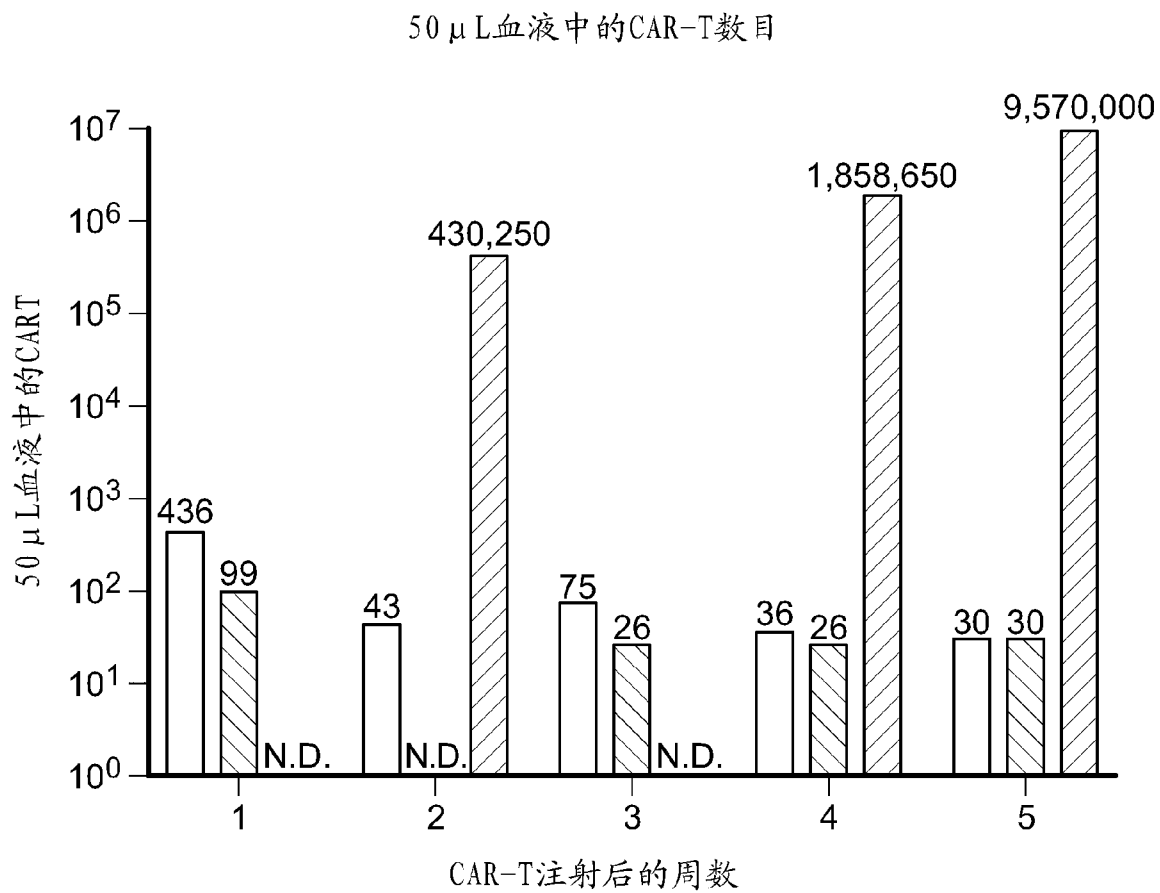
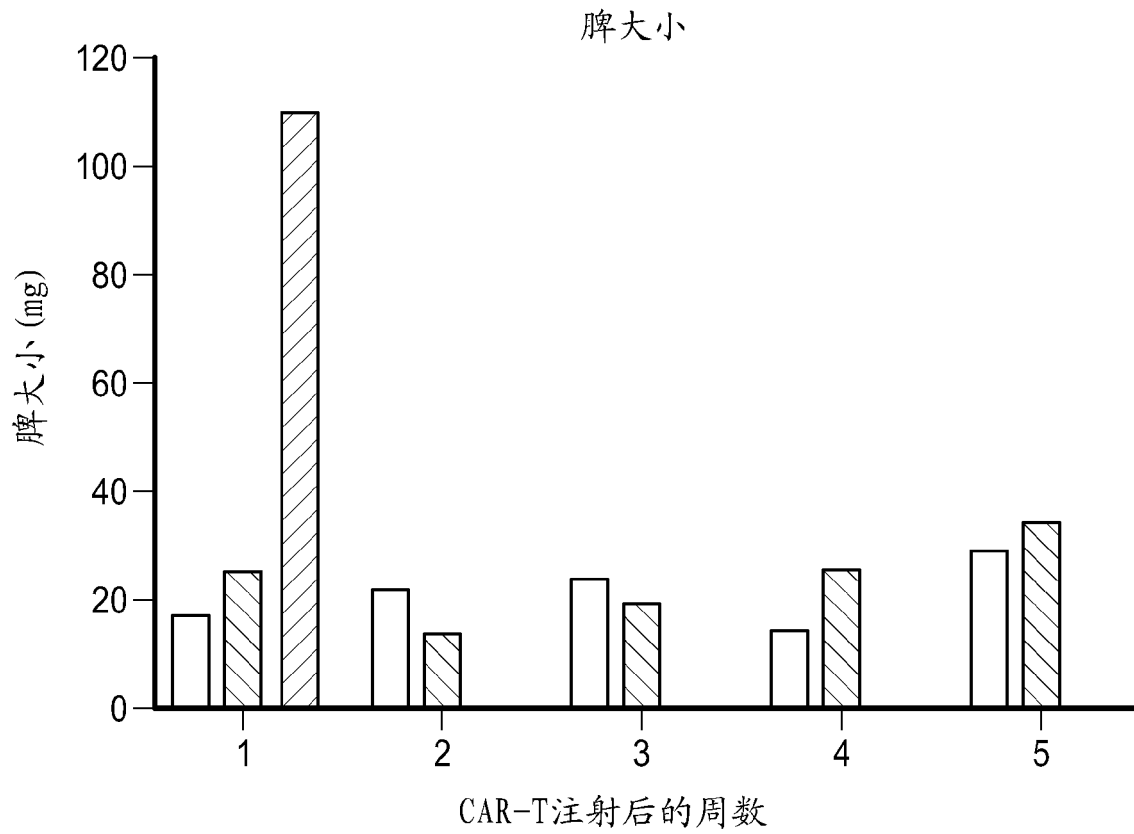


图 18A



- ☐ 幼稚小鼠: 5百万CAR-T, 无EC17
- ☒ 幼稚小鼠: 5百万CAR-T+EC17
- ☒ 携带HEK-FRa肿瘤的小鼠: 5百万CAR-T+EC17 SIW

图 18B



- ☐ 幼稚小鼠: 5百万CAR-Ts, 无EC17
- ☒ 幼稚小鼠: 5百万CAR-Ts+EC17 TIW
- ☒ 携带MDA-MB-231肿瘤的小鼠: 5百万CAR-Ts+EC17 TIW

图 18C

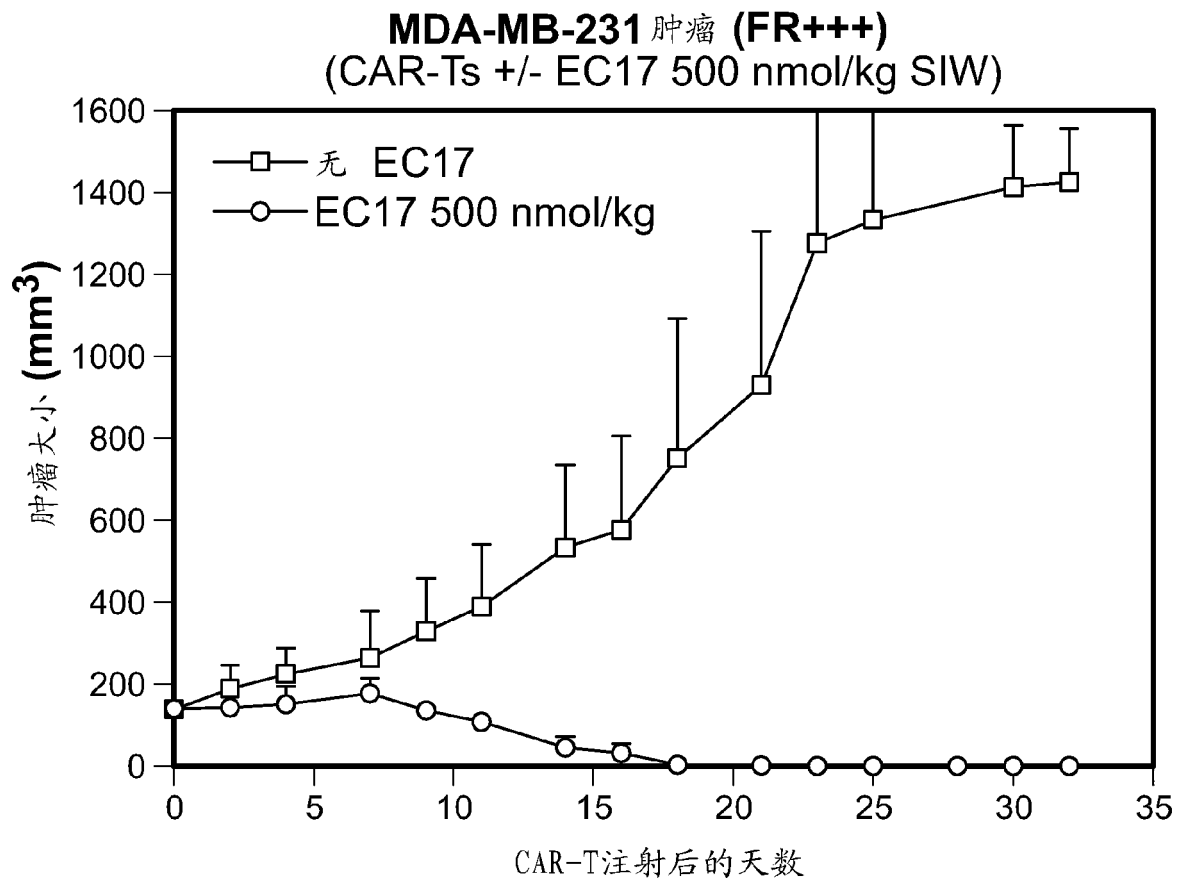


图 19A

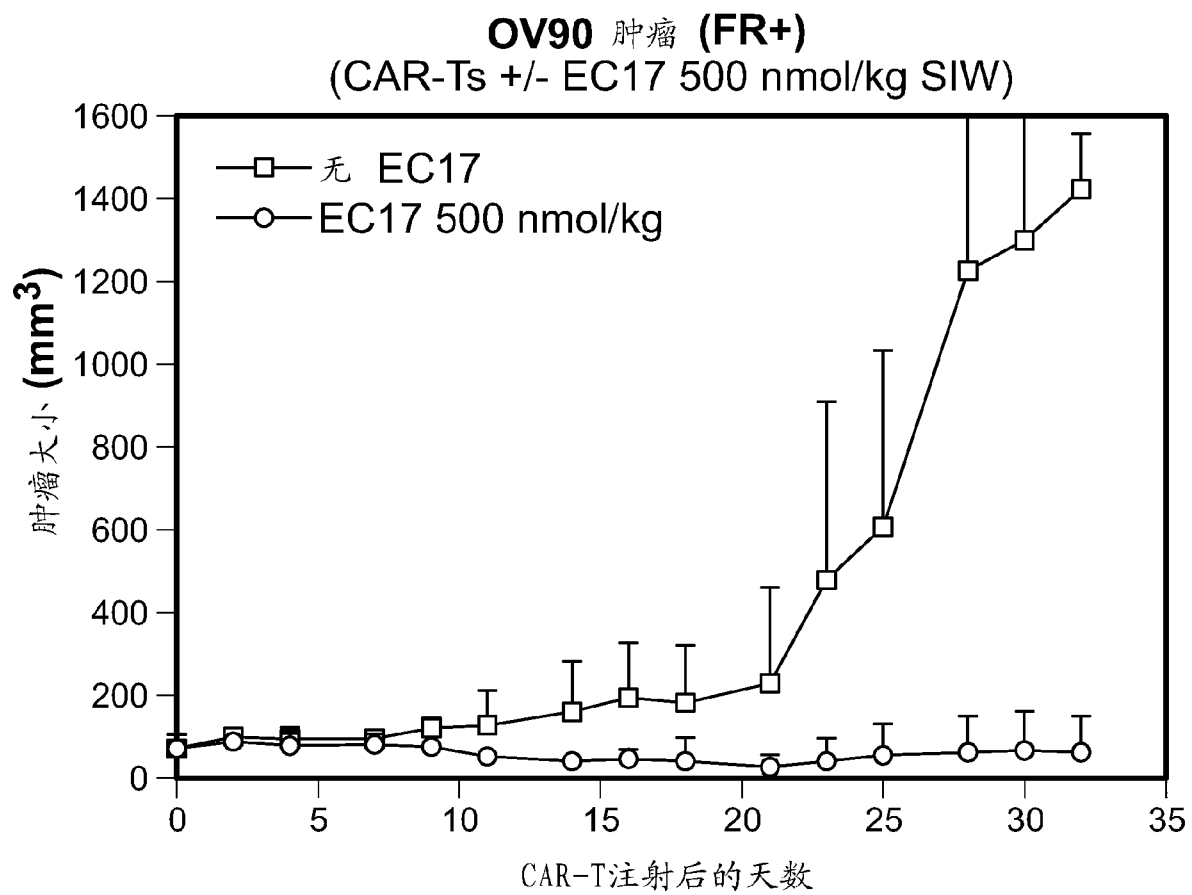


图 19B

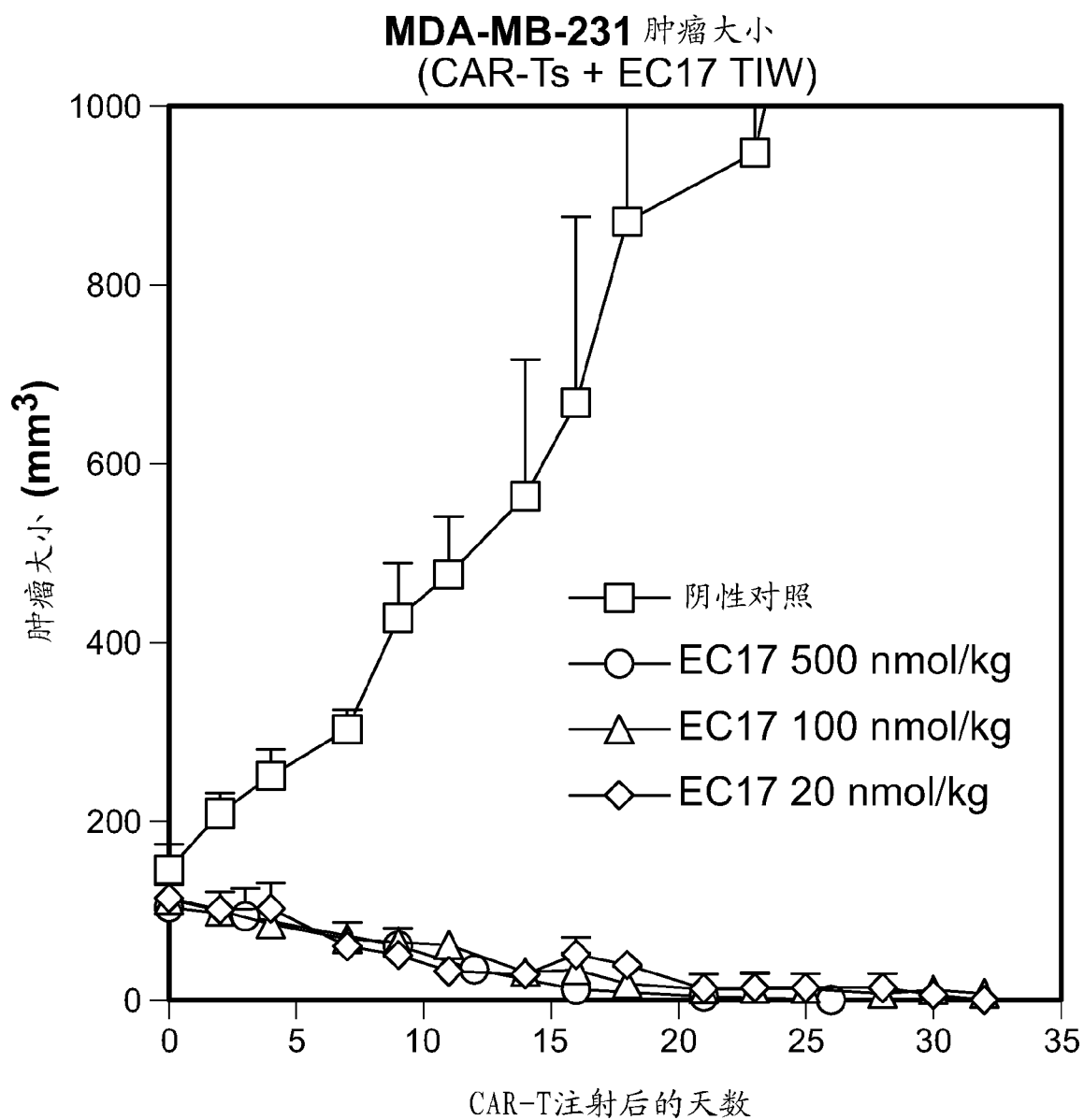


图 20A

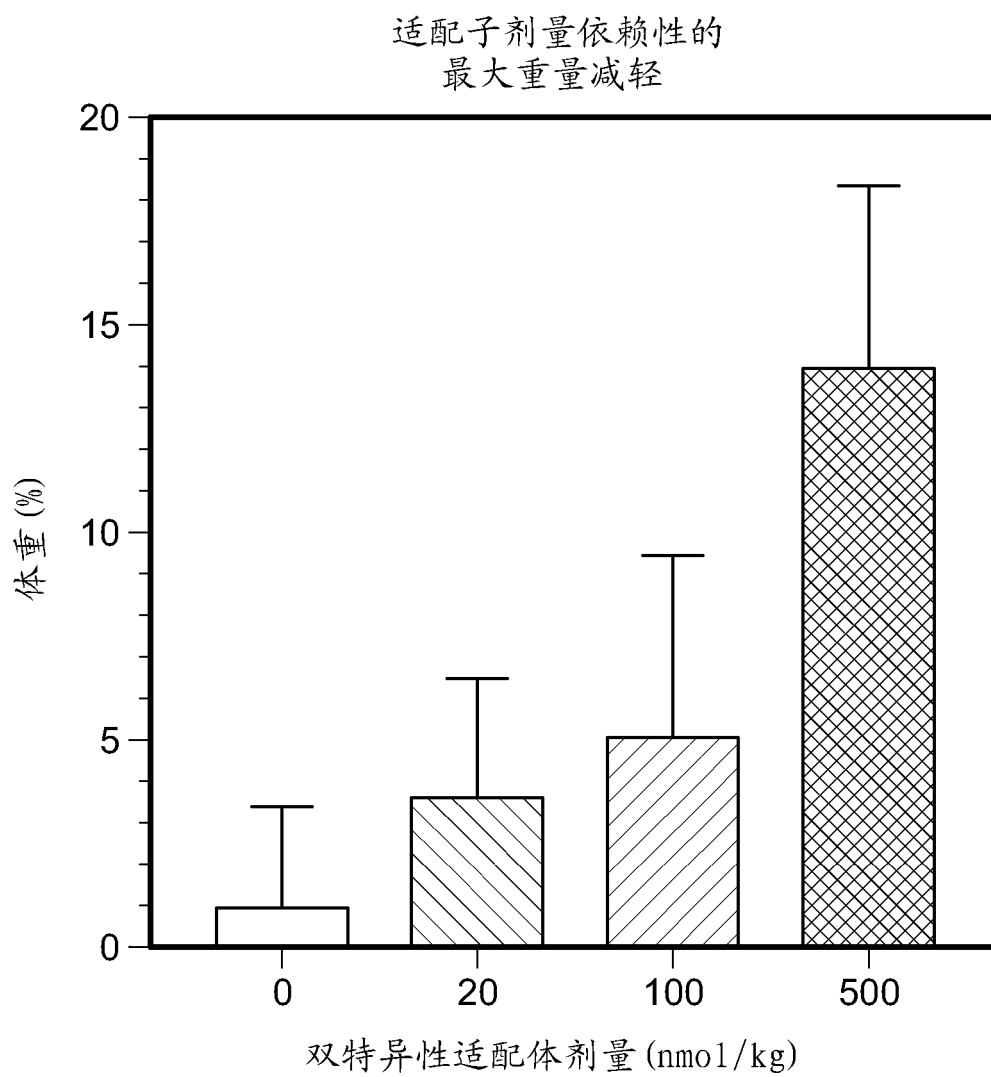


图 20B

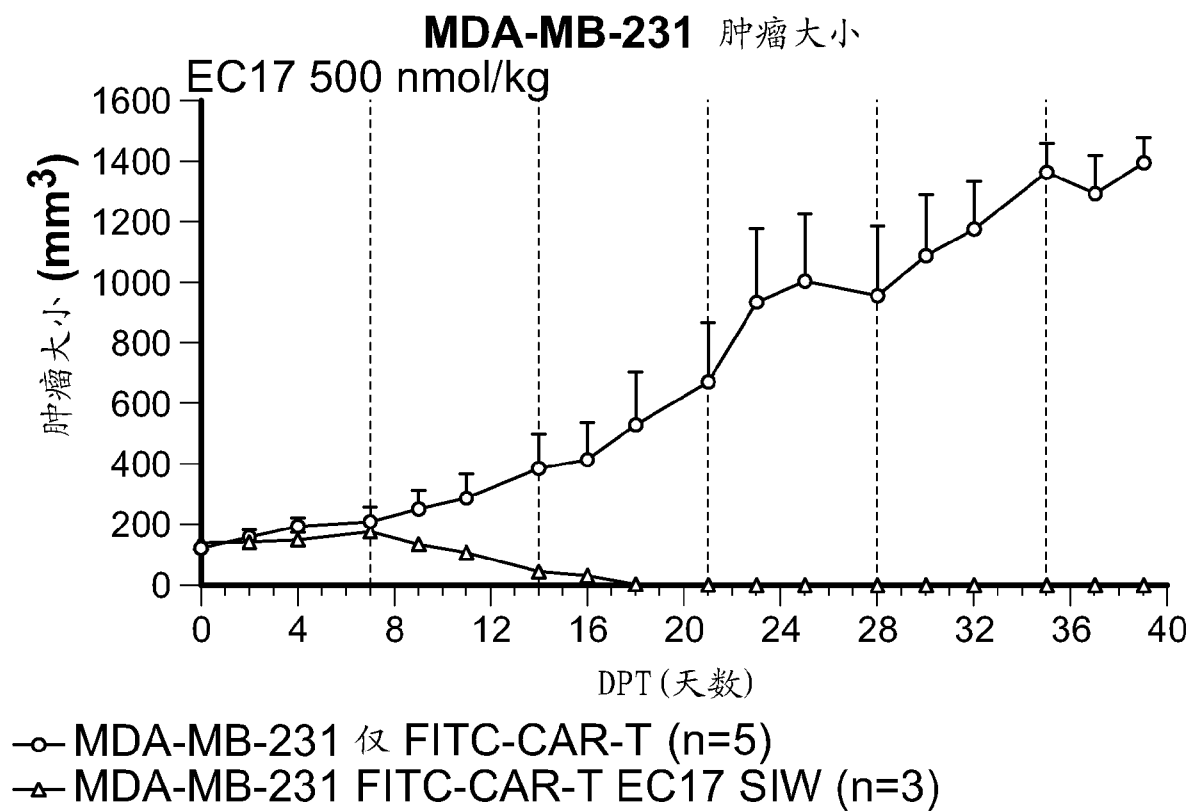


图 21A

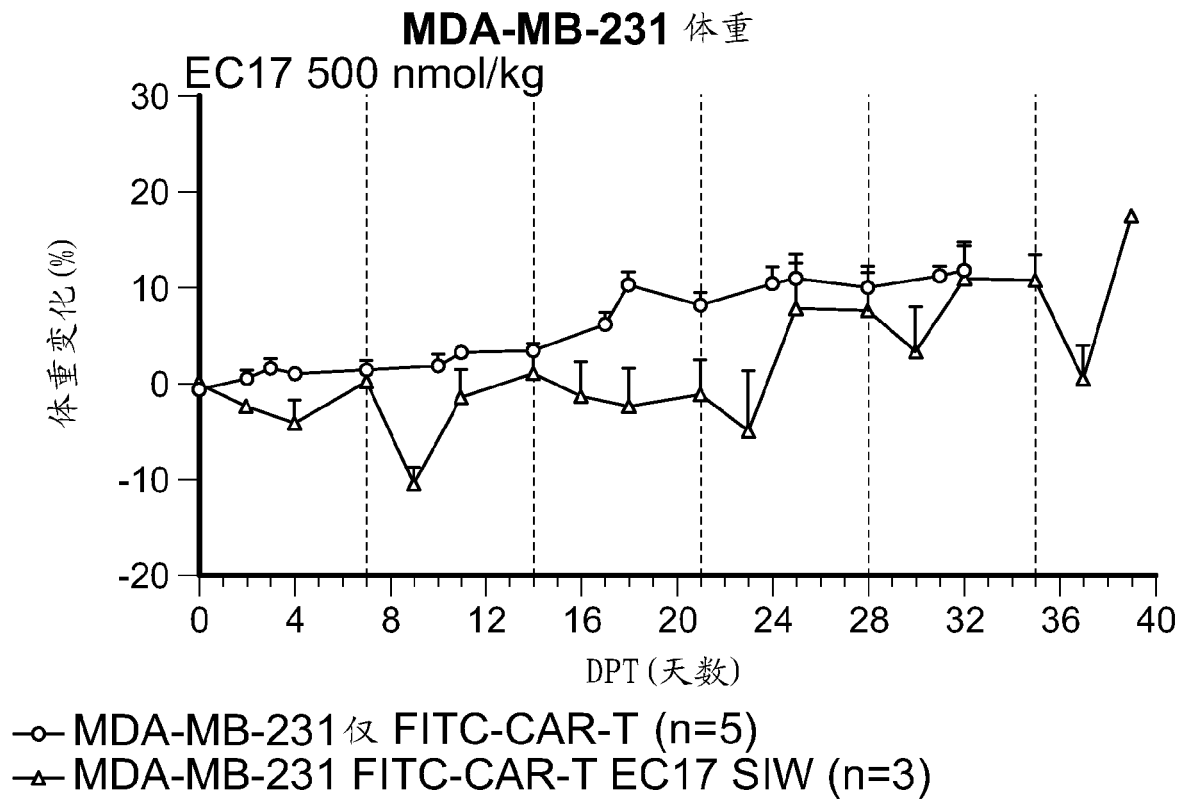


图 21B

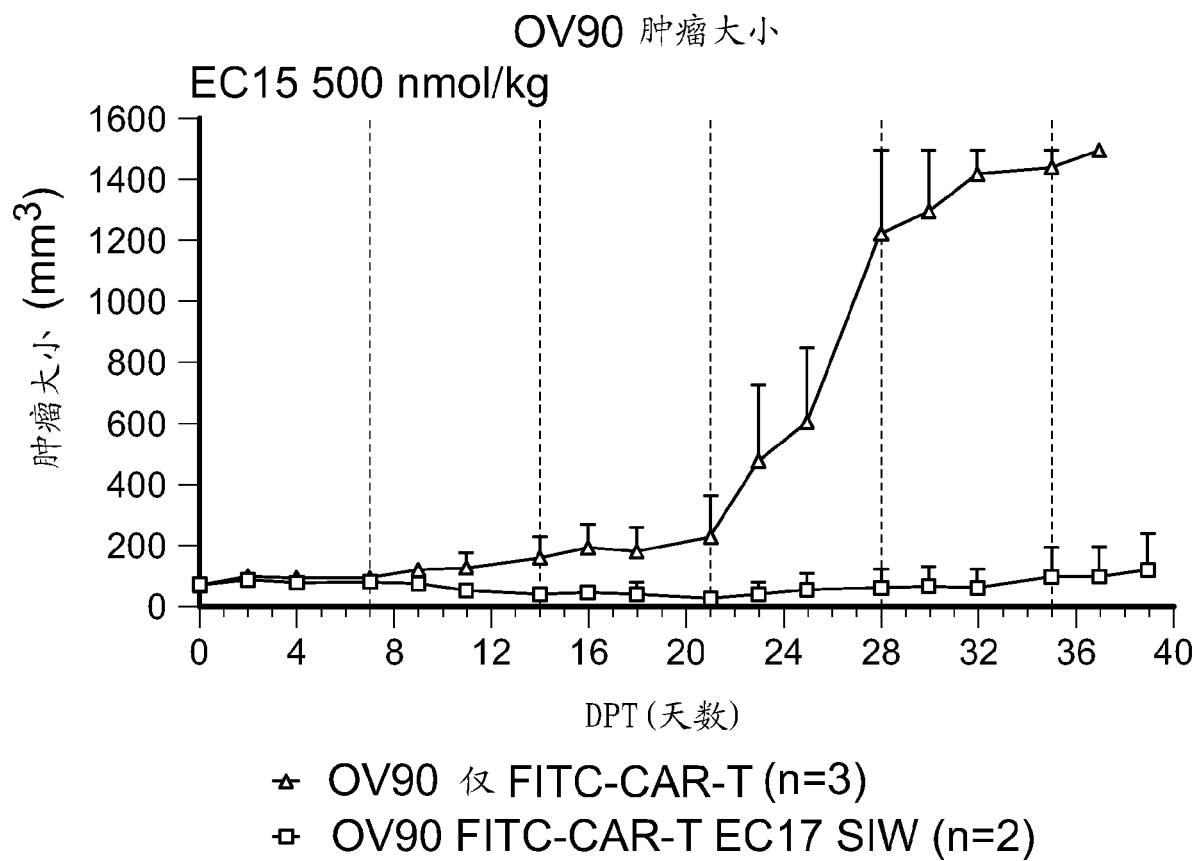


图 22A

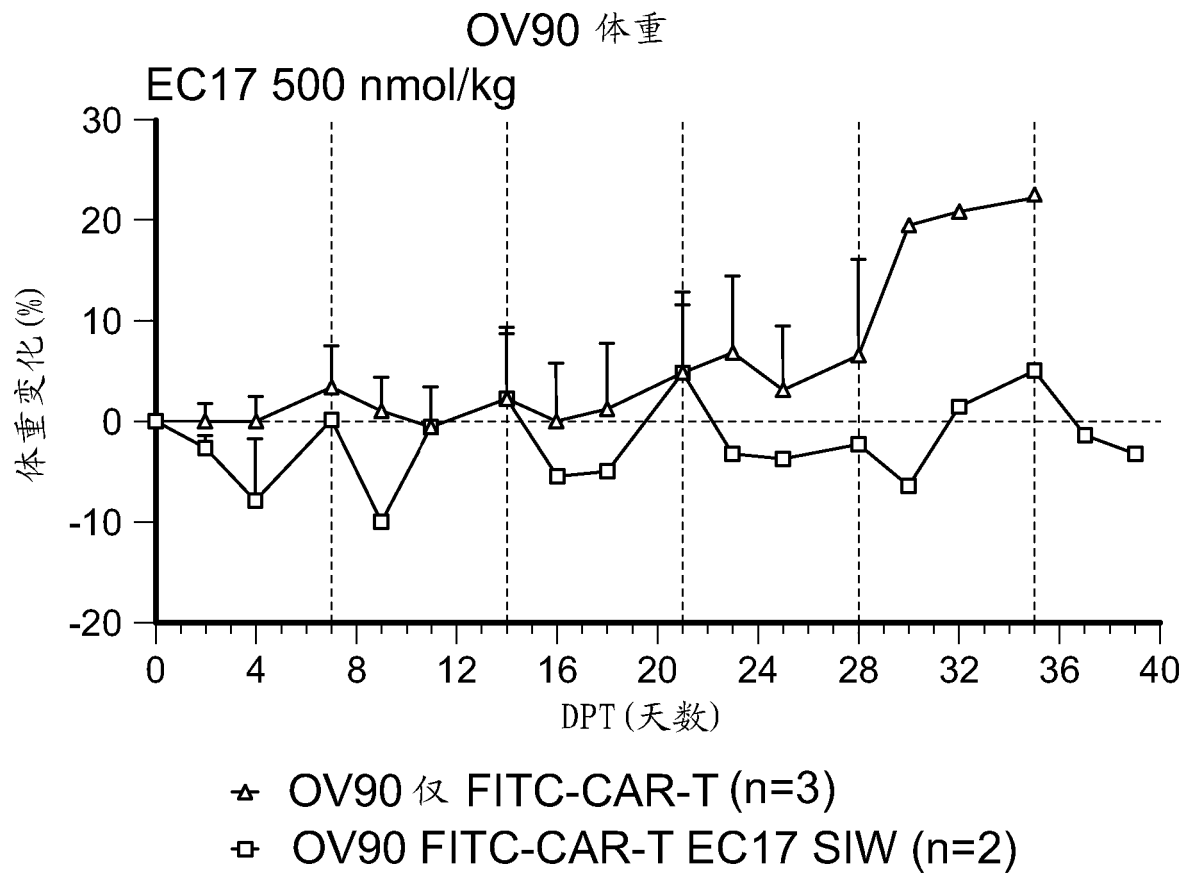
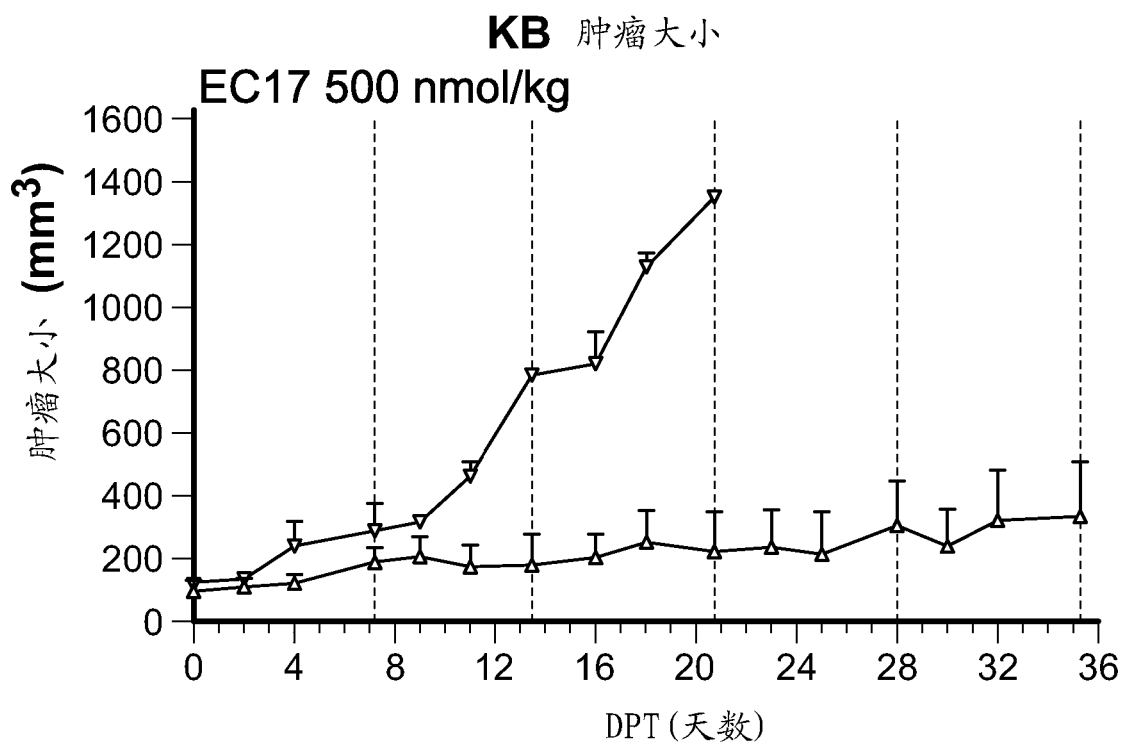


图 22B



▽ KB 仅 FITC-CAR-T (n=2)

△ KB FITC-CAR-T EC17 SIW (n=3)

图 23A

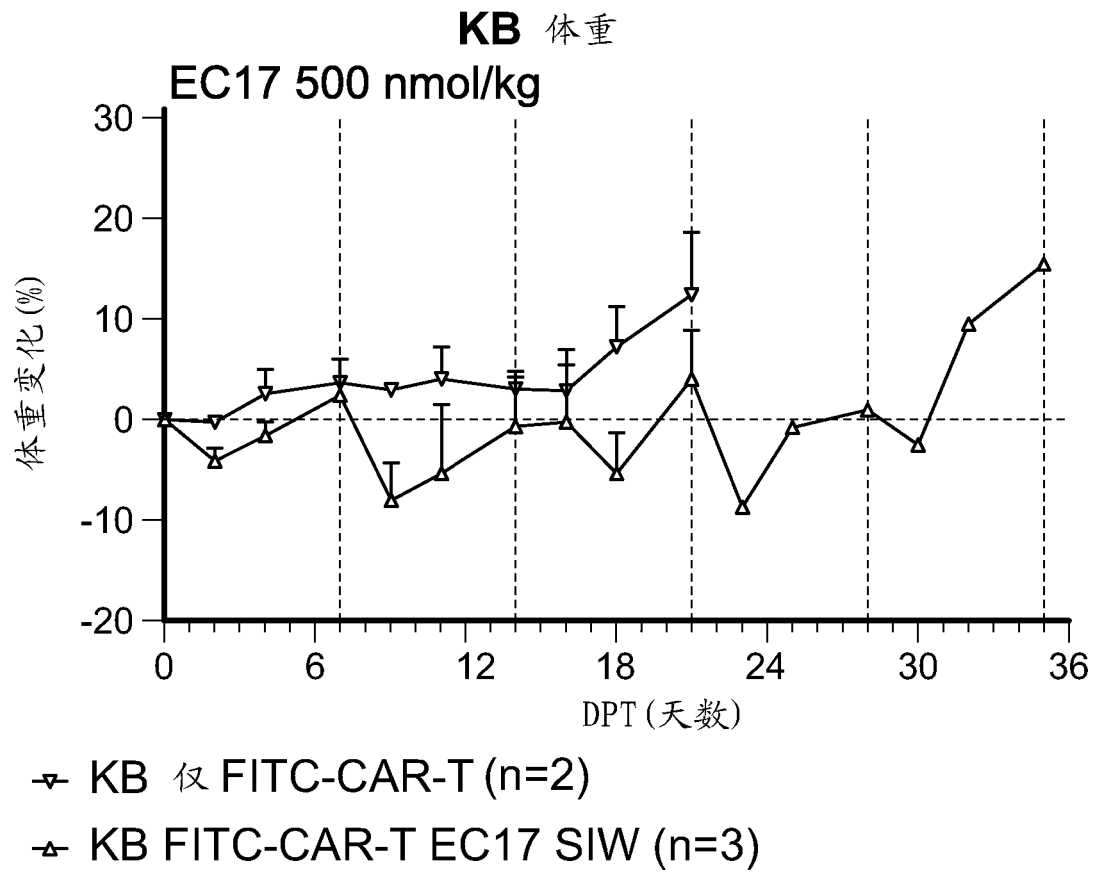


图 23B

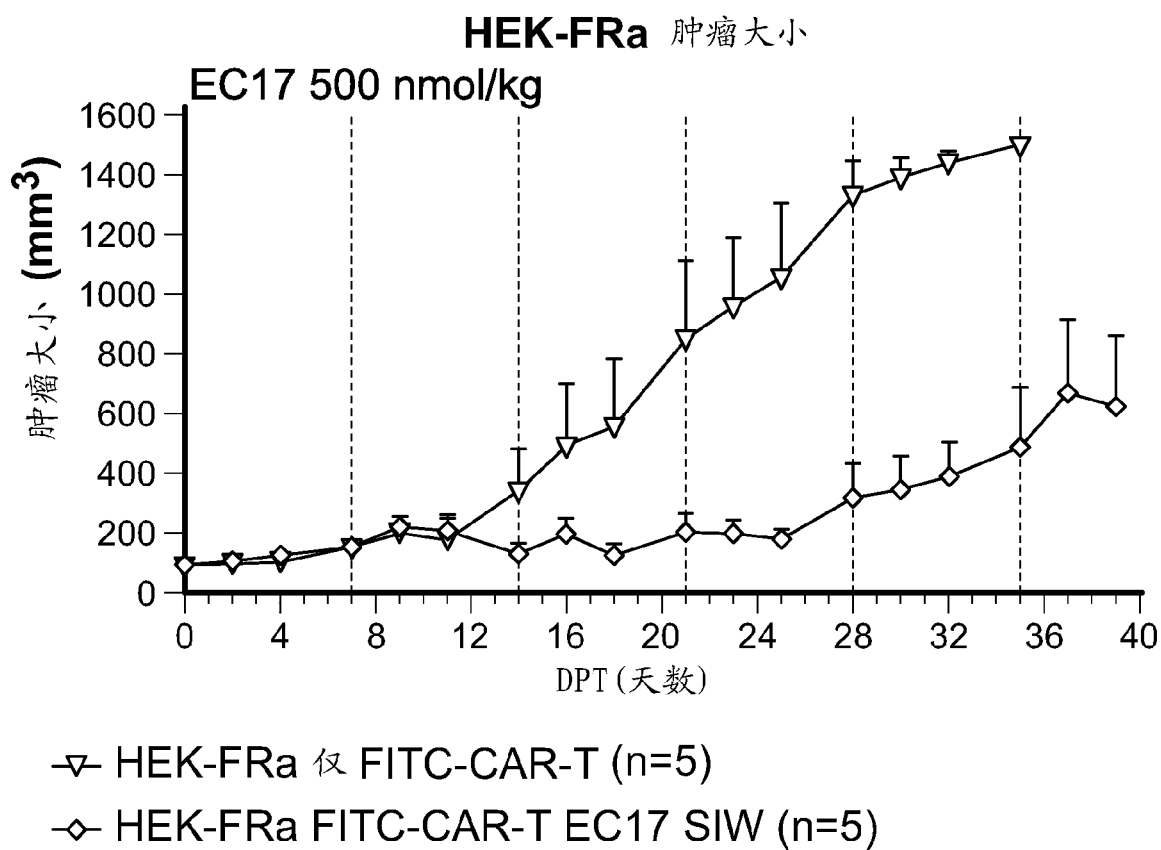


图 24A

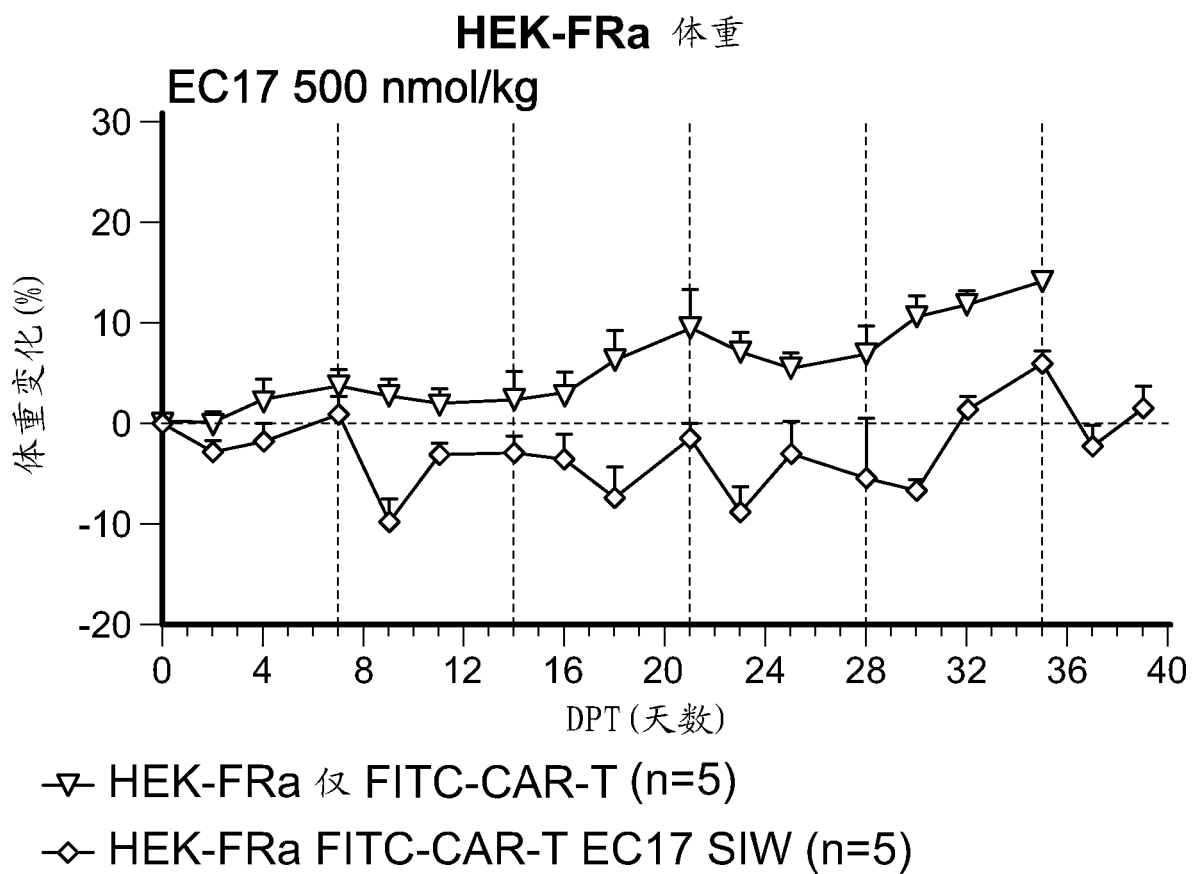


图 24B

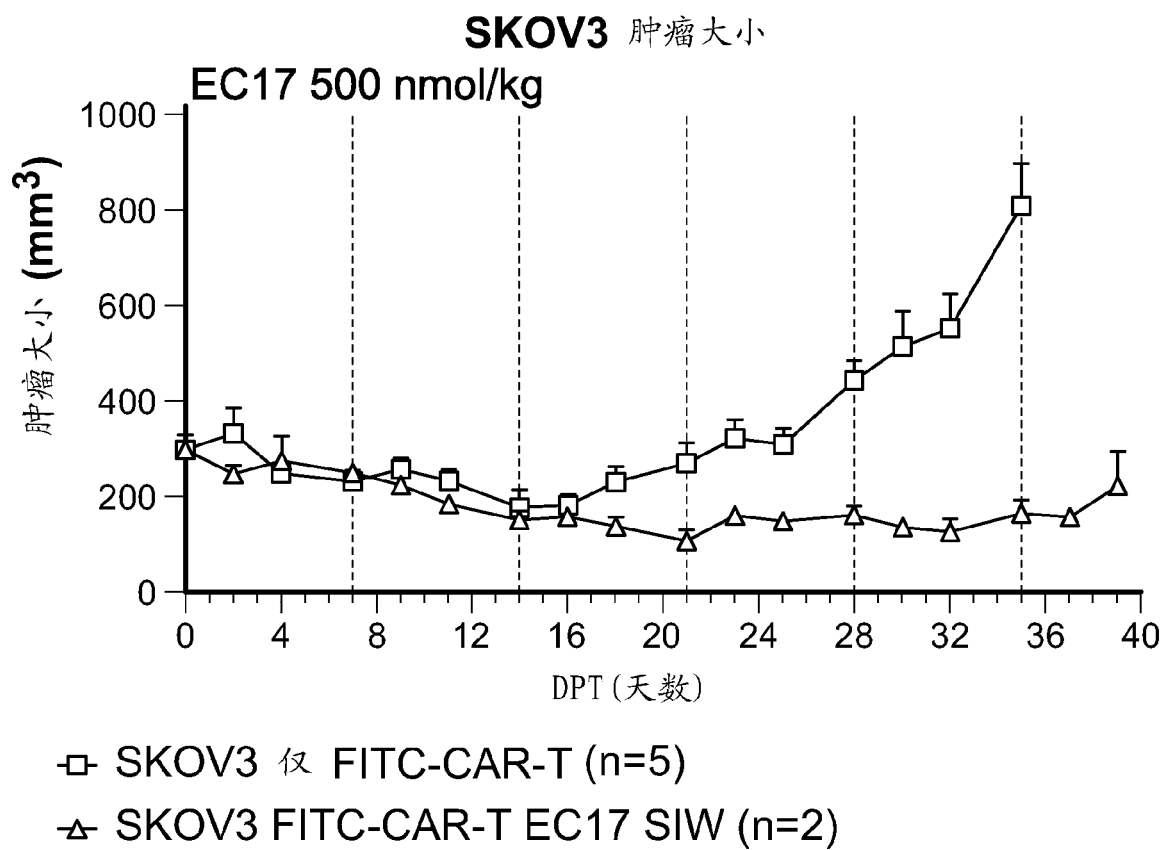


图 25A

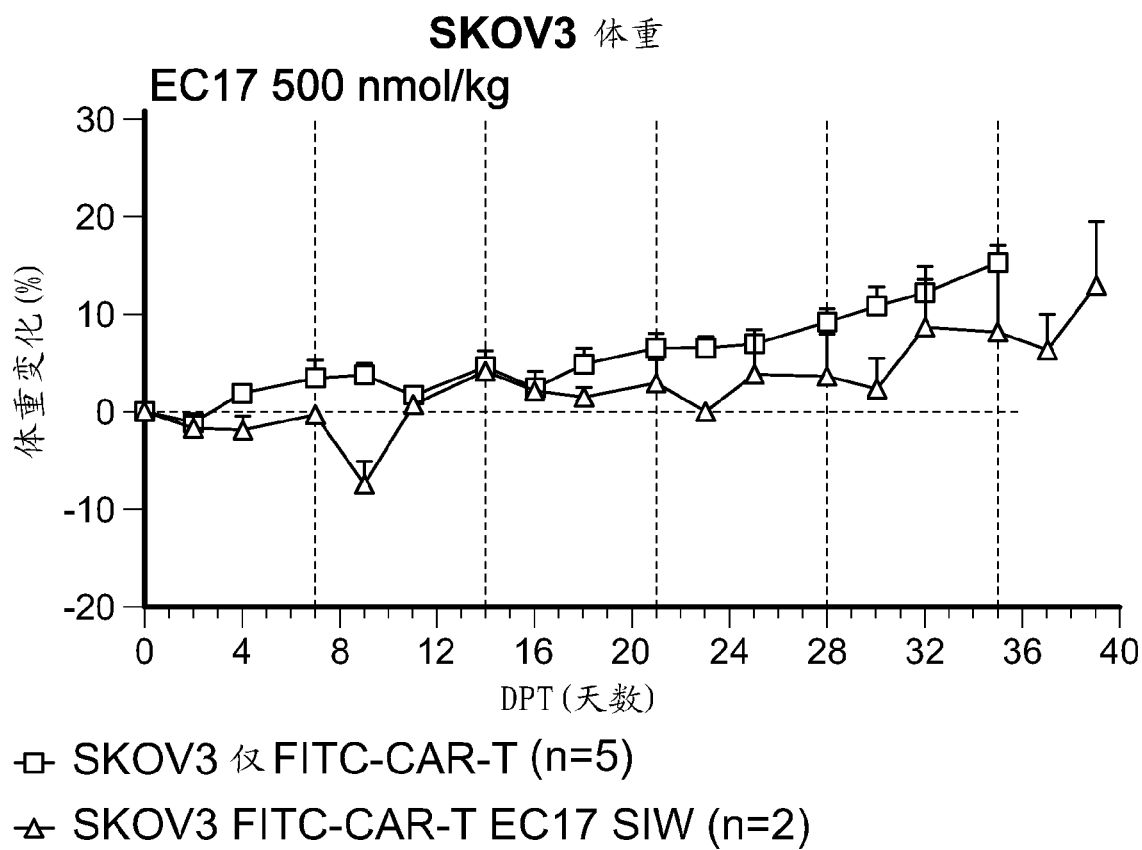


图 25B

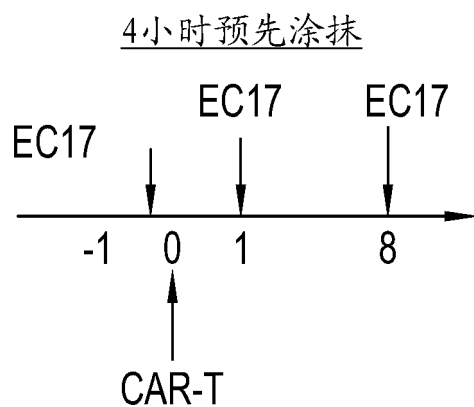


图 26A

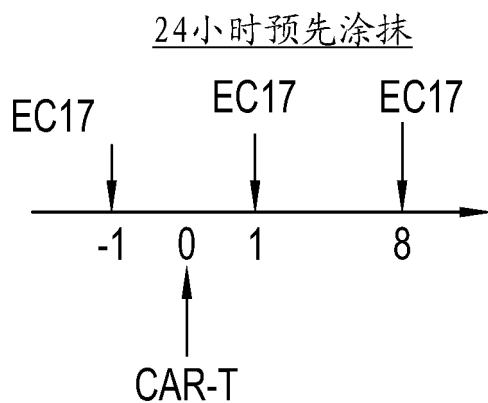


图 26B

	小鼠由于sCRS死亡			小鼠存活
	第2周	第3周	第4周	>5周
4小时预先涂抹	33%	33%	17%	17%
24小时预先涂抹	17%	0	0	83%

图 26C

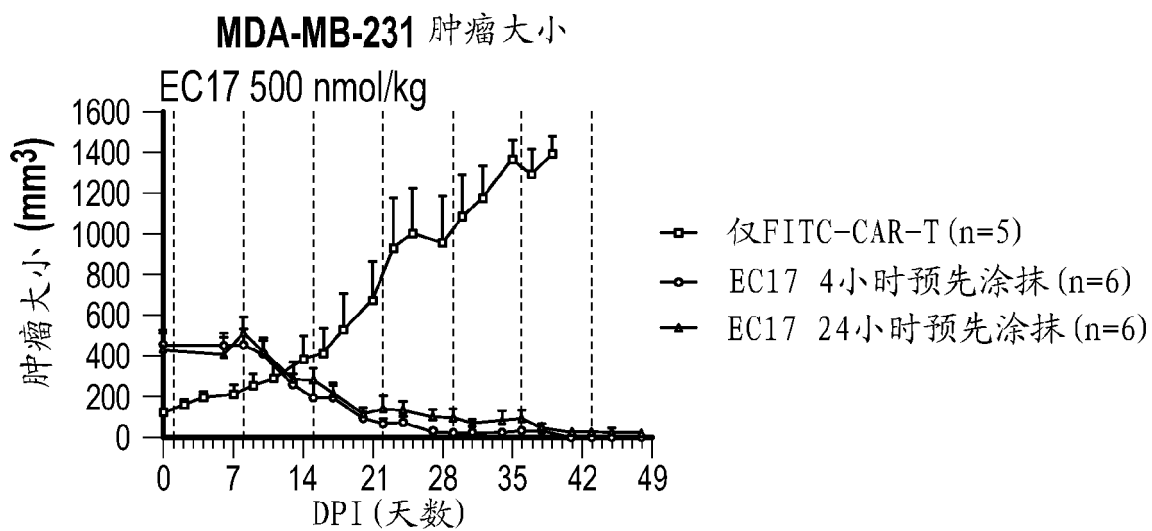


图 26D

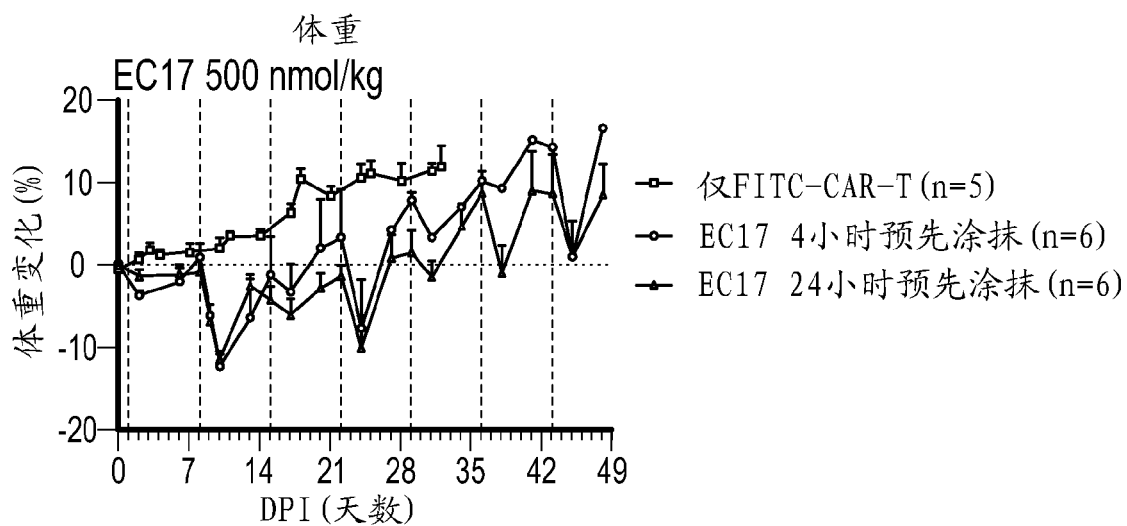


图 26E

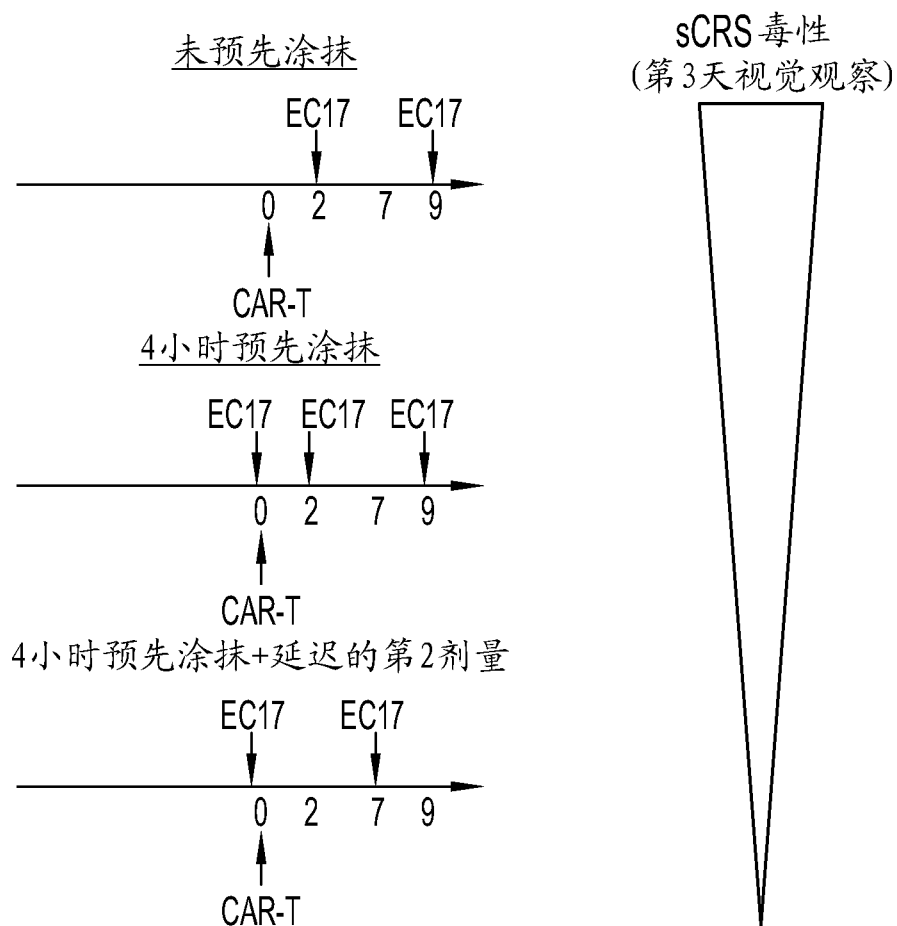


图 27A

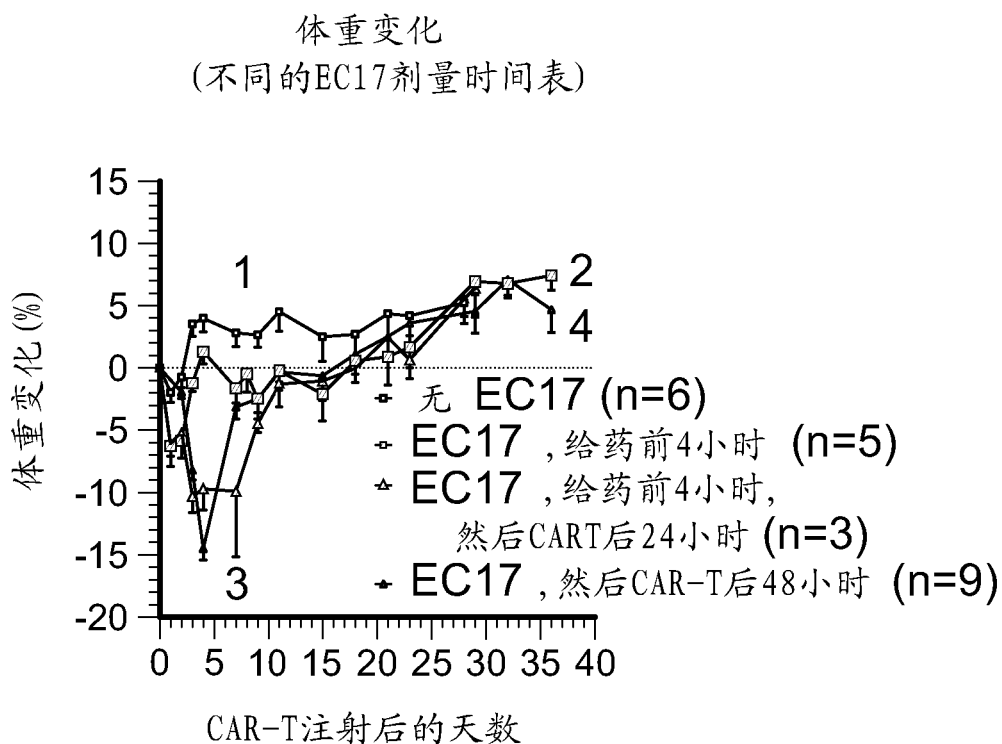


图 27B

MDA-MB-231 肿瘤大小
(不同的EC17剂量时间表)

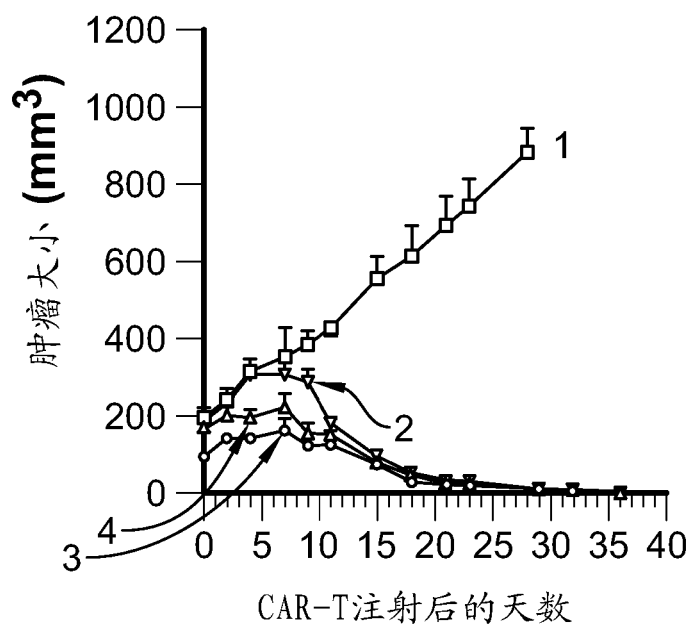


图 27C

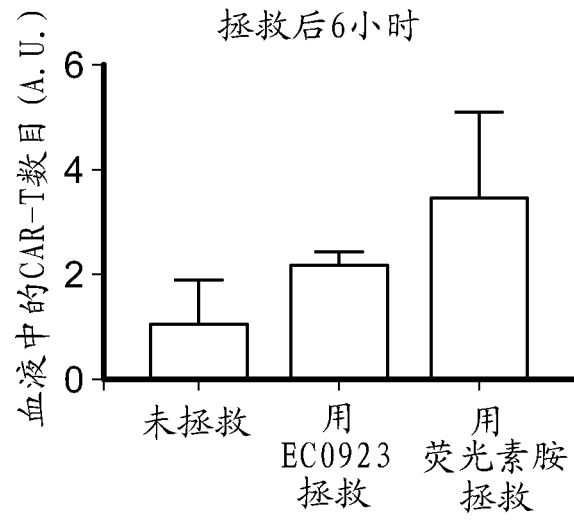


图 28A

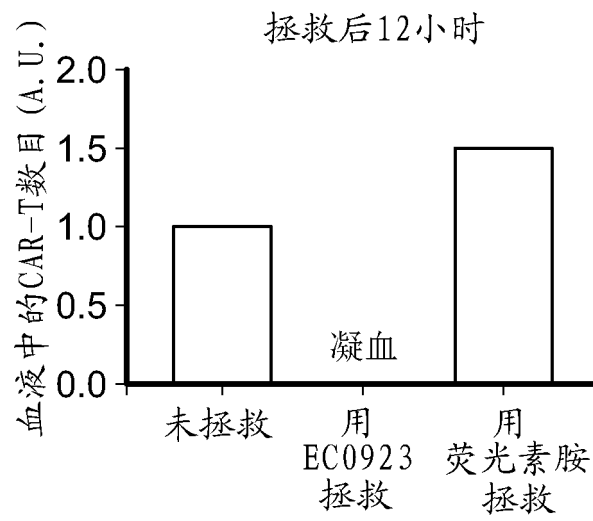


图 28B

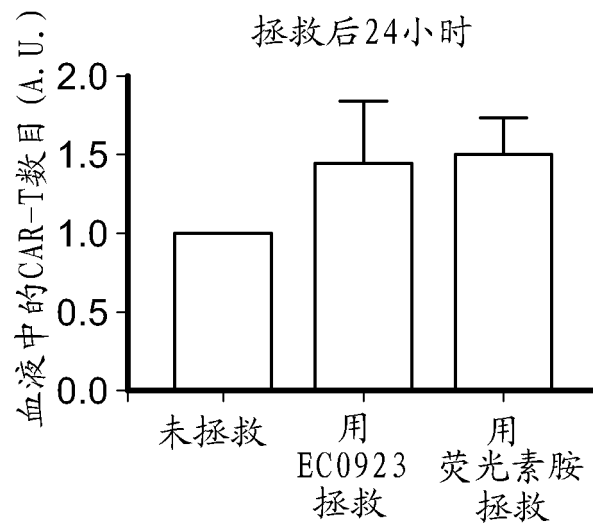


图 28C

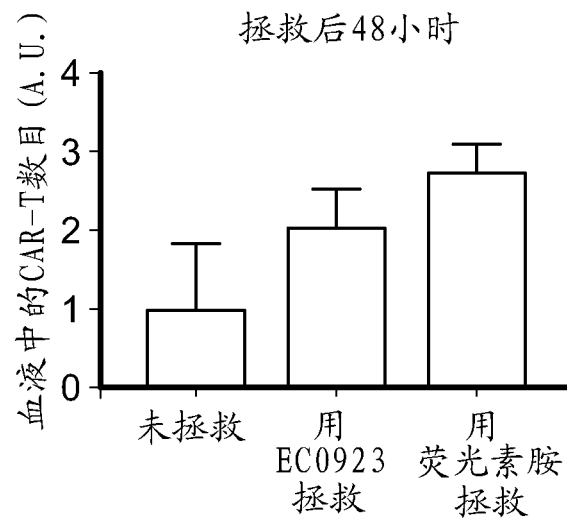
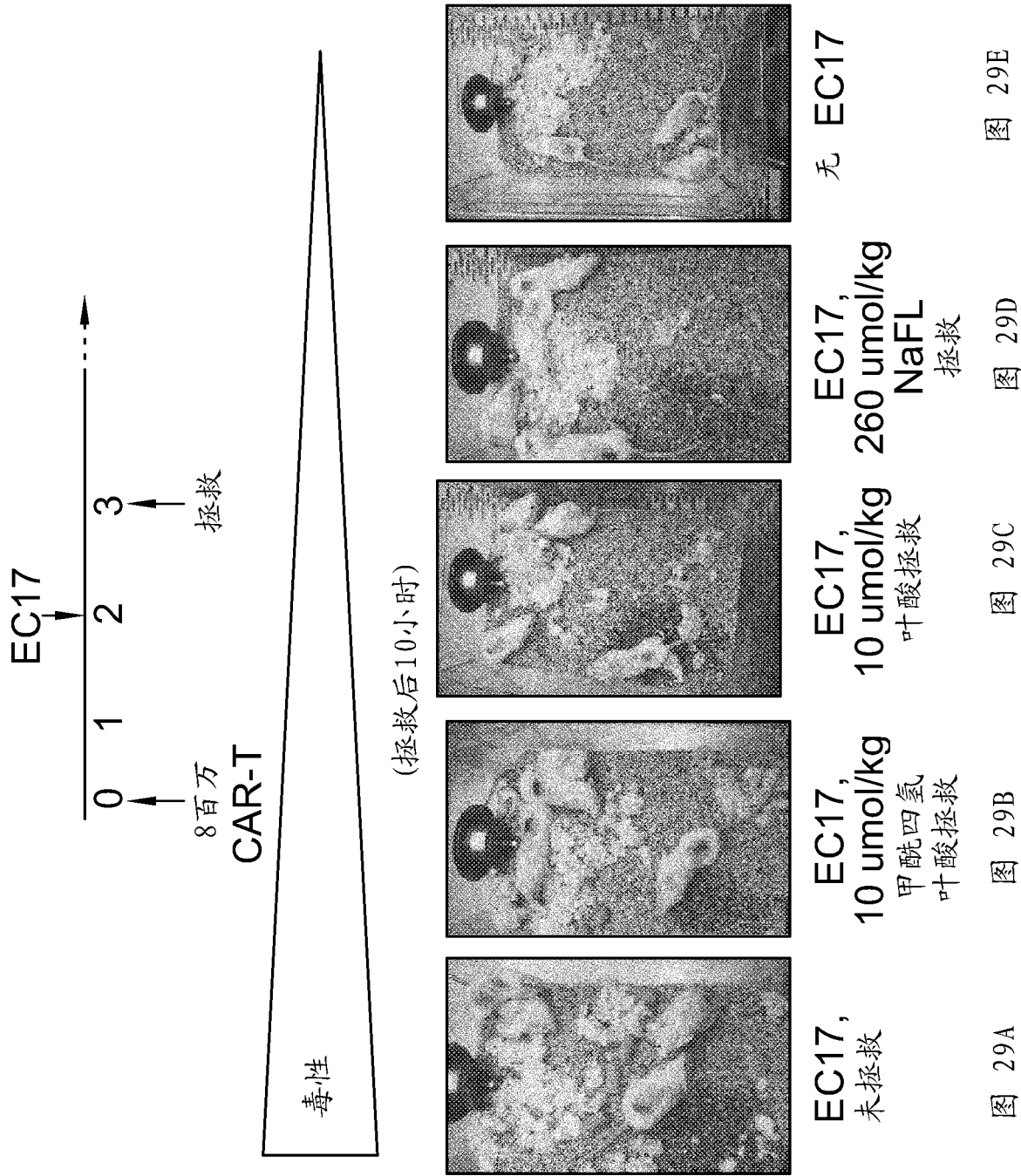


图 28D



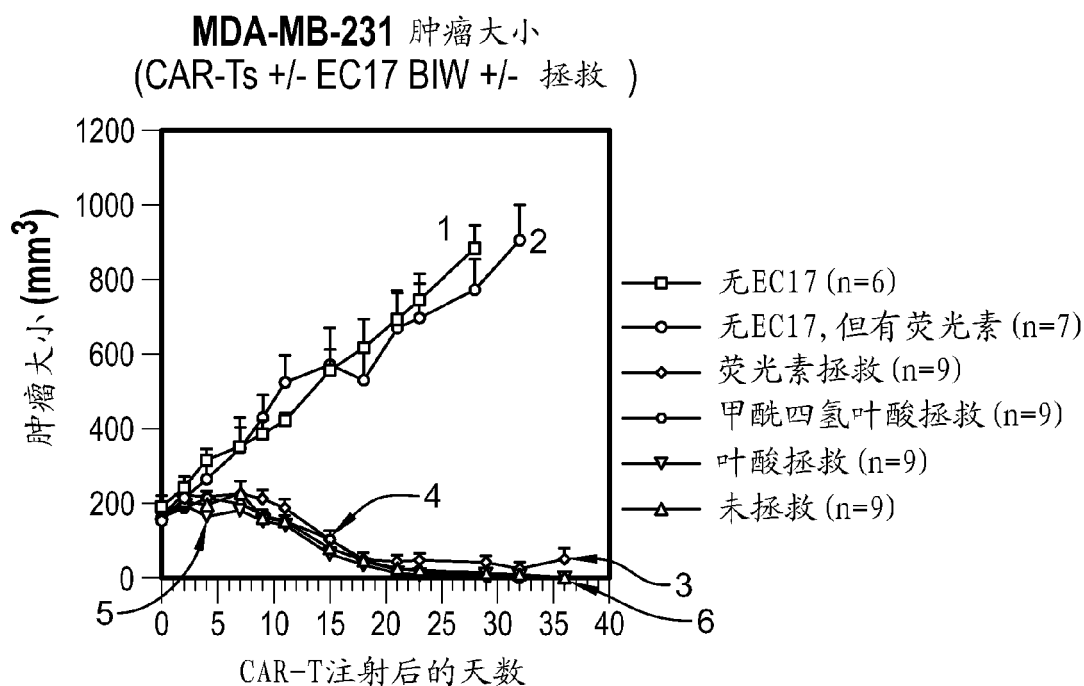


图 30A

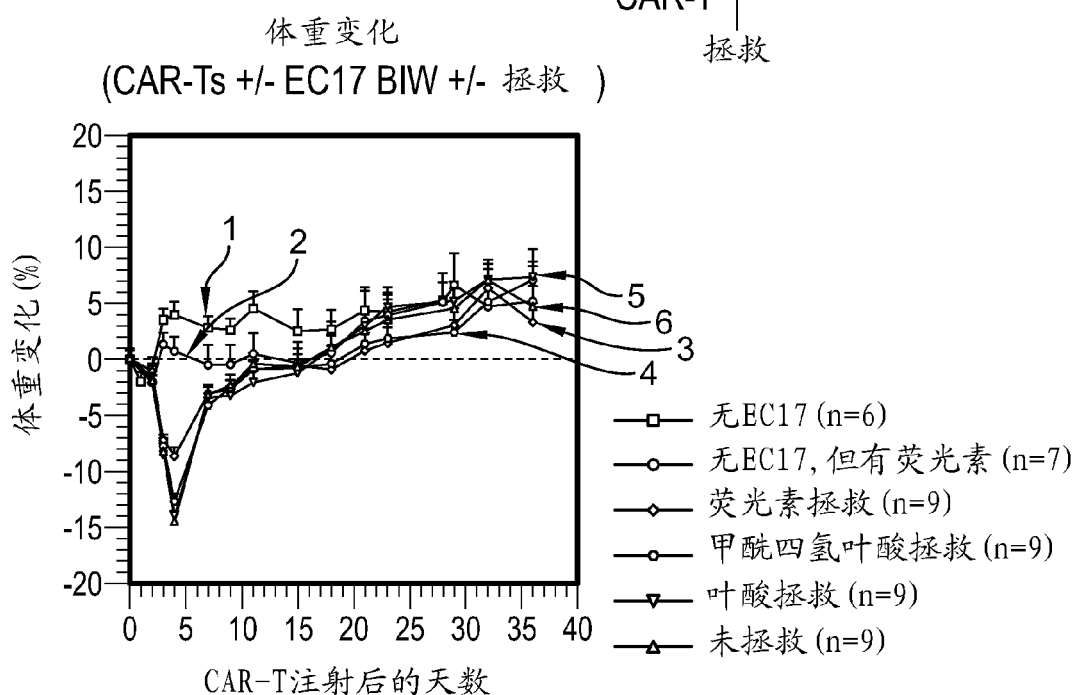
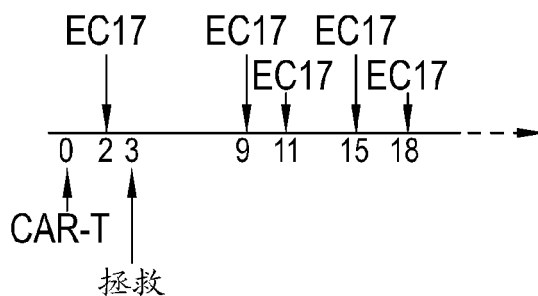
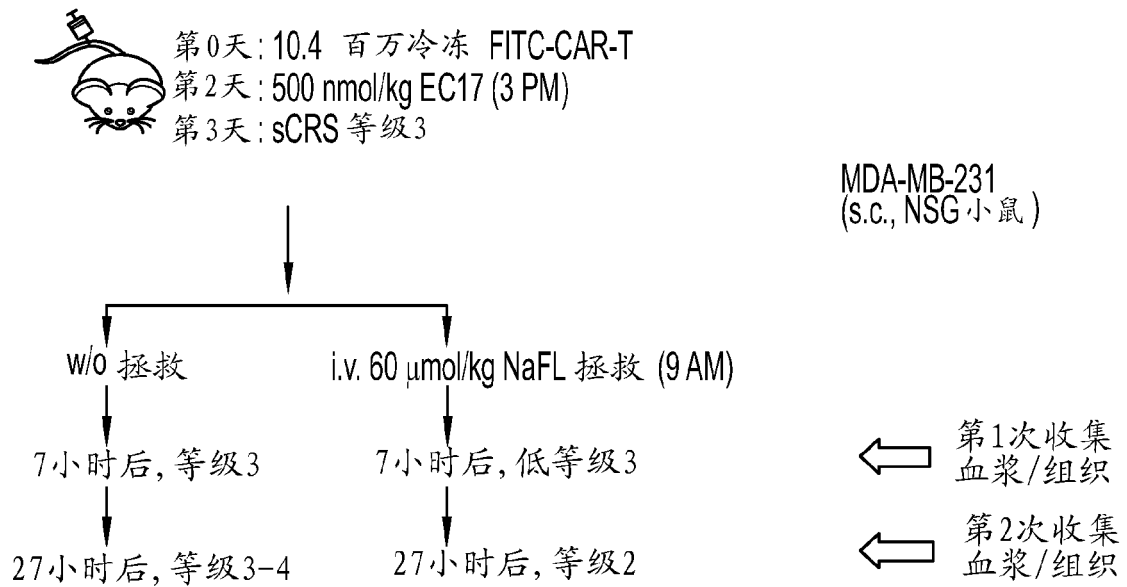


图 30B



CRS 分级量表

0	1	2	3	4	5
正常	~pilo	pilo	pilo, 谄媚的	垂死的	死亡
	~谄媚的	谄媚的	皱褶的, 瘦的	皱褶的, 苍白	
	仍然活跃	不太活跃	不活跃, 除非	昏睡的	
			受刺激的		

图 31

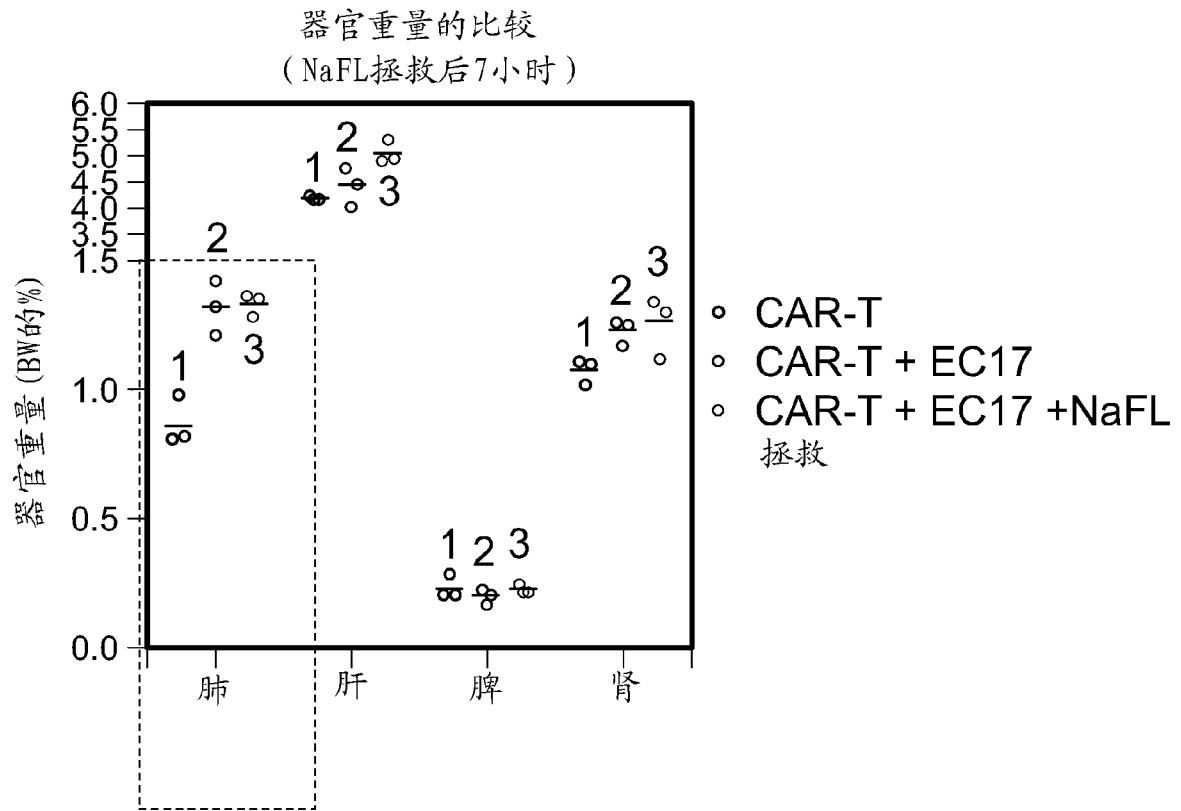


图 32A

器官重量的比较
(NaFL拯救后27小时)

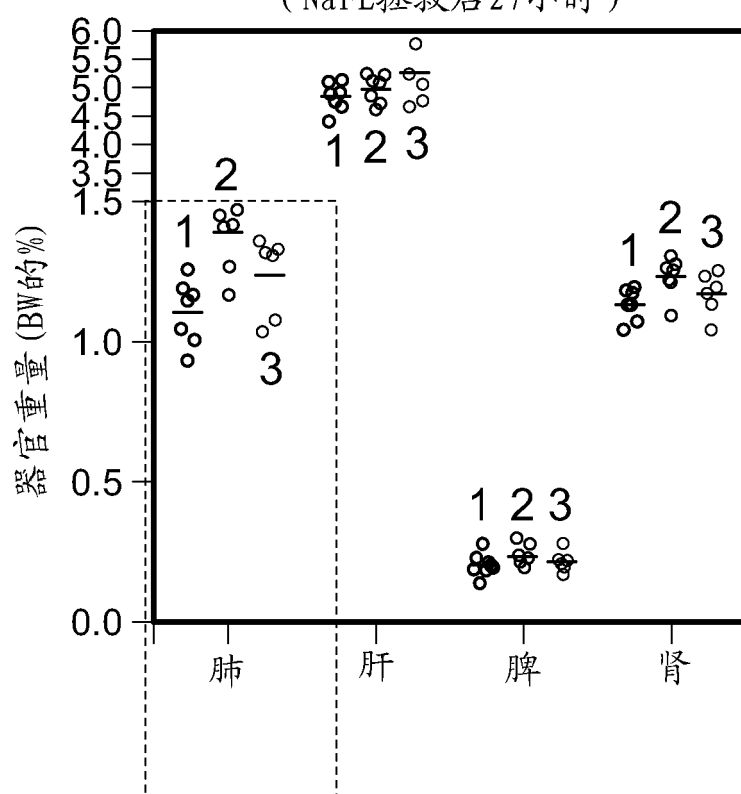


图 32B

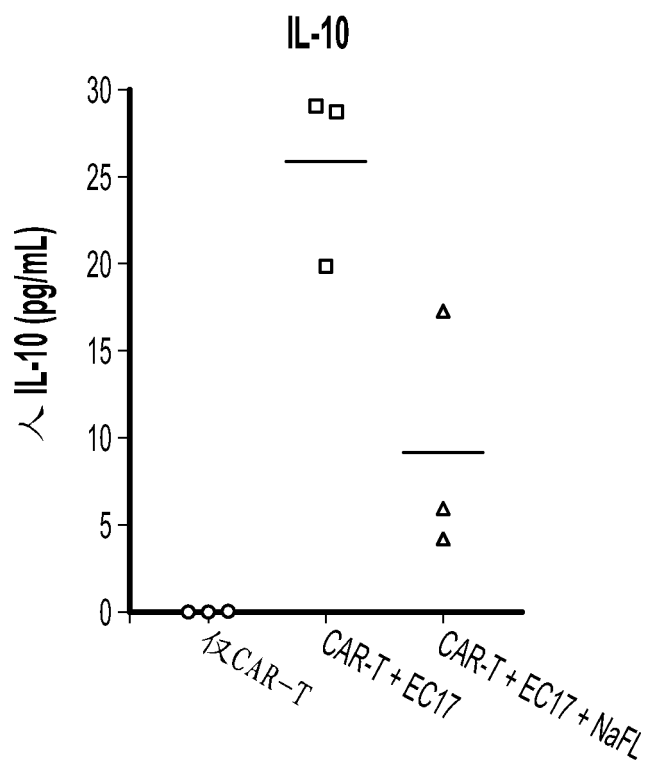


图 33C

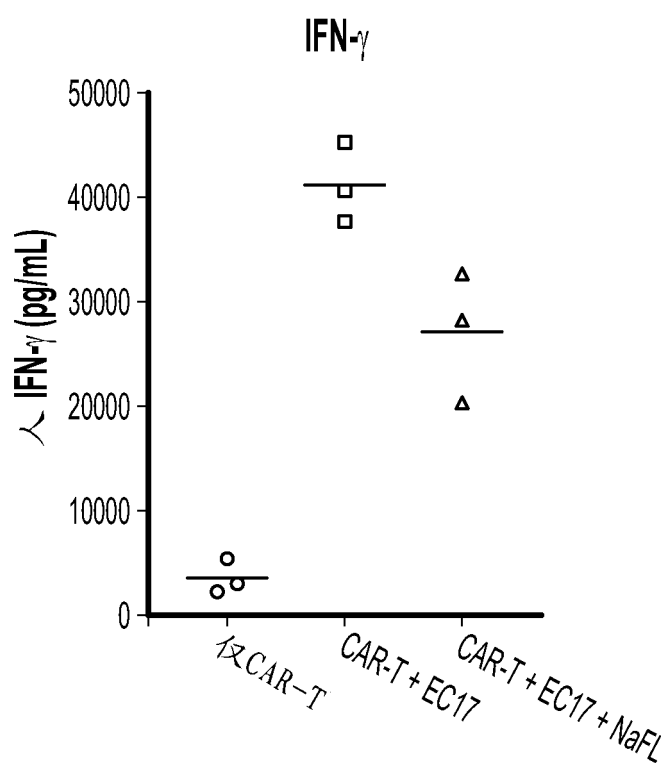


图 33D

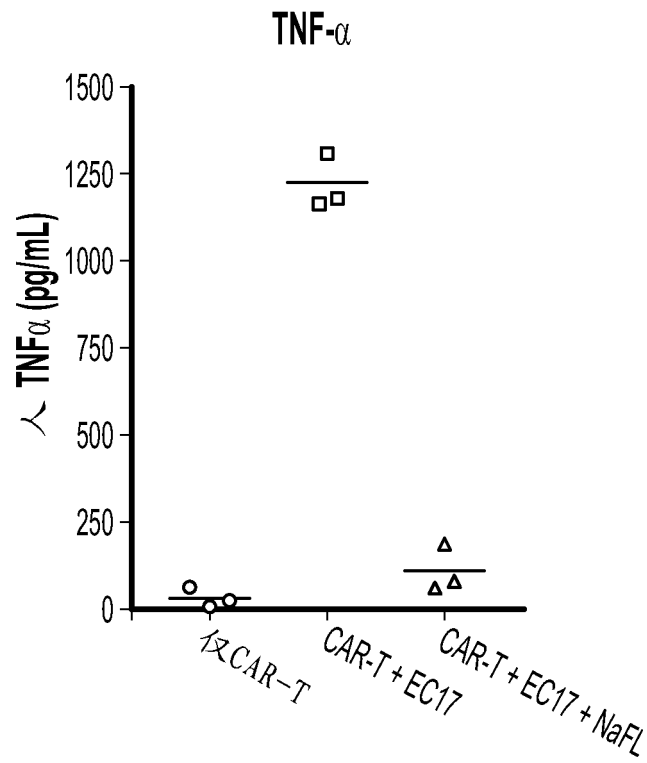


图 33E

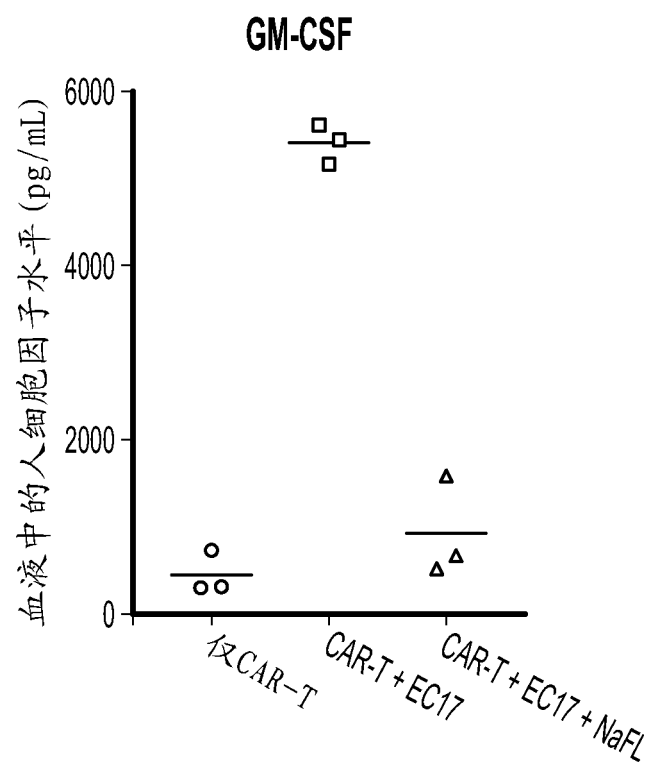


图 33F

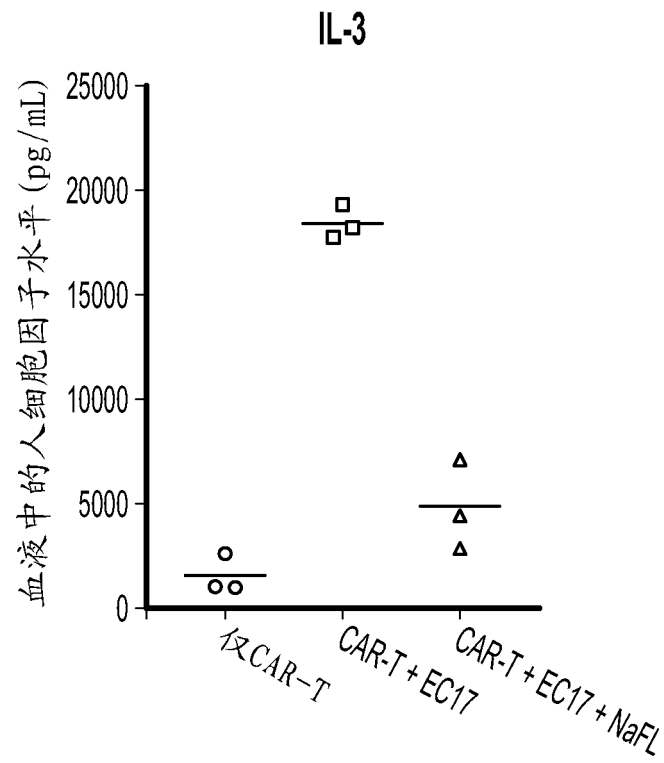


图 33G

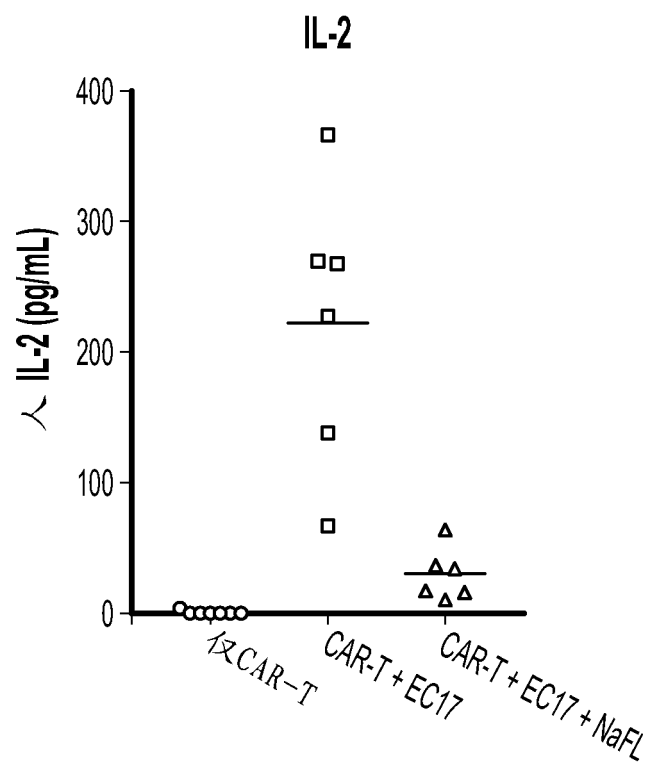


图 34A

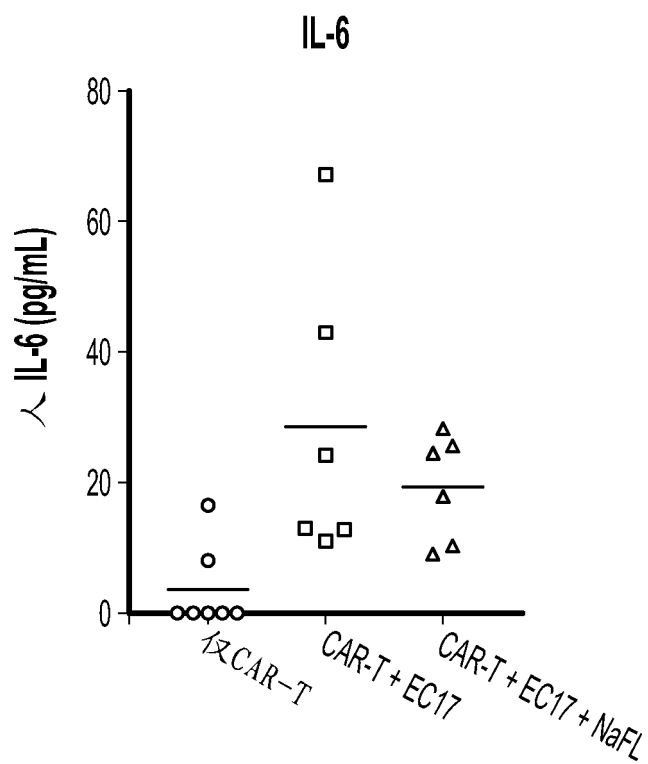


图 34B

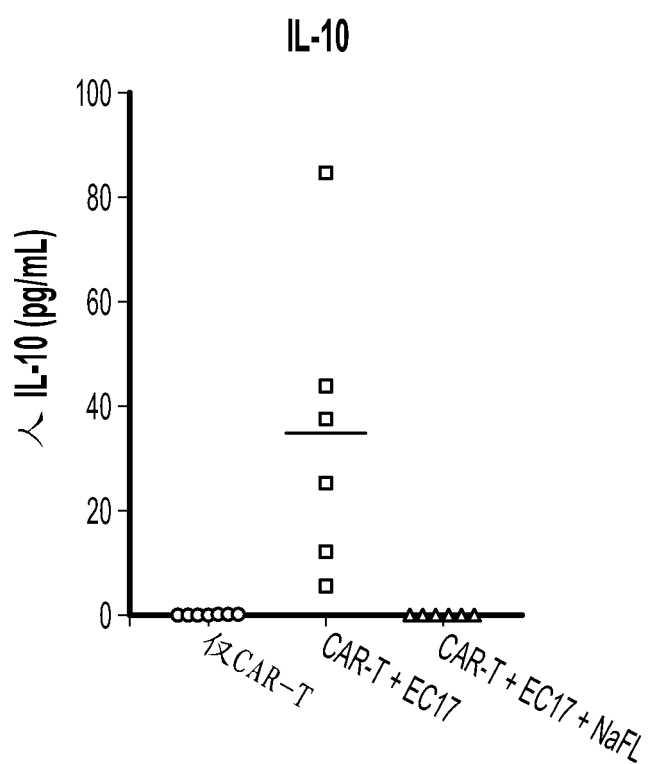


图 34C

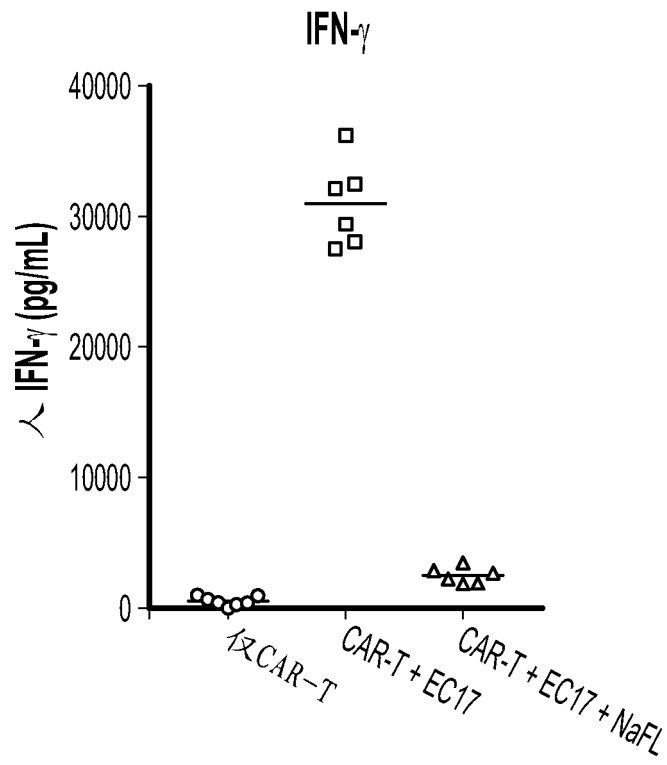


图 34D

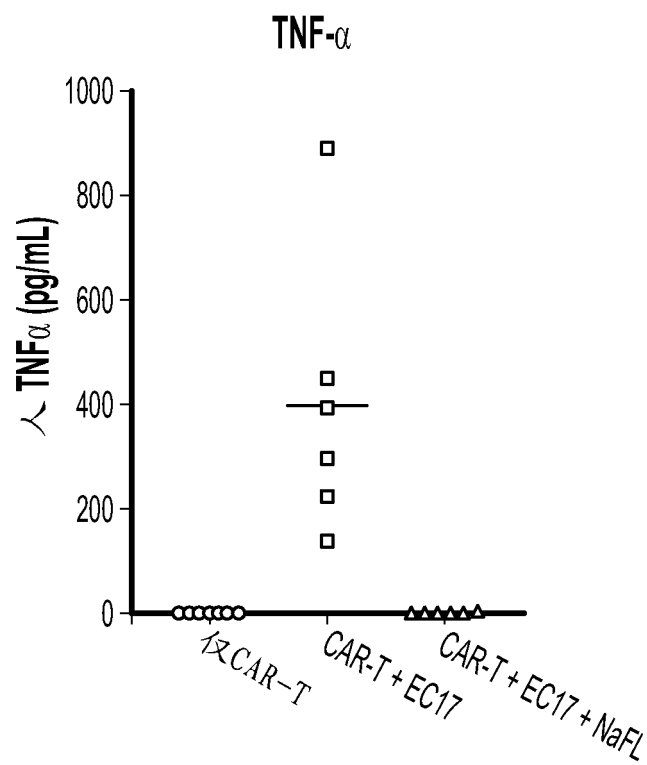


图 34E

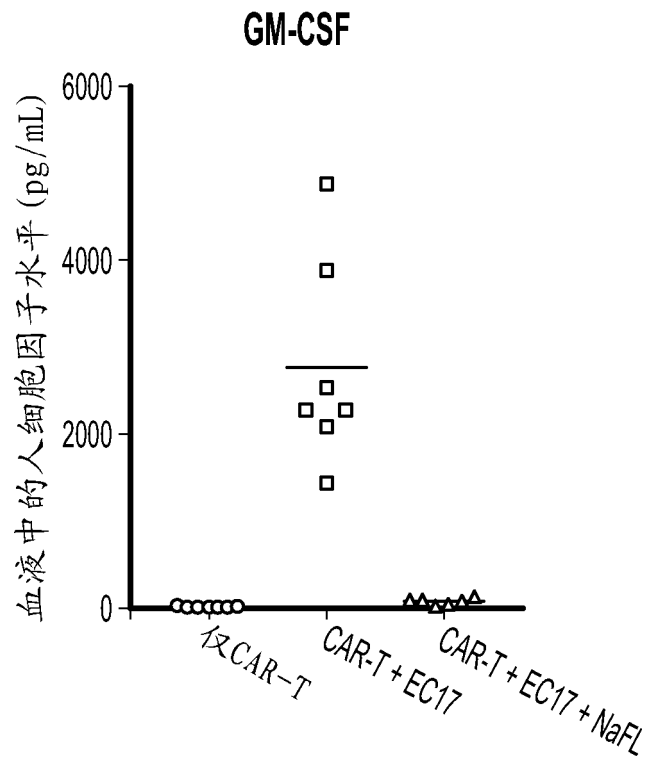


图 34F

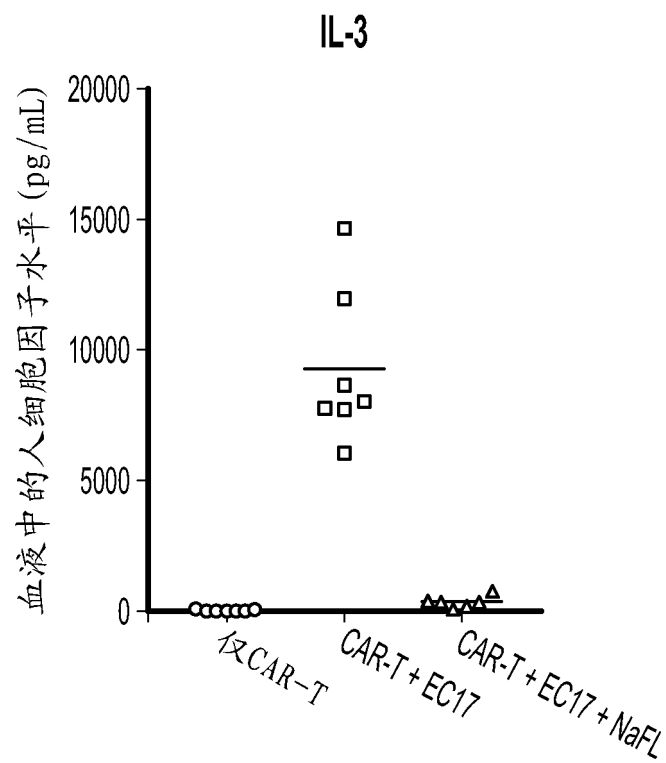


图 34G

IL-2

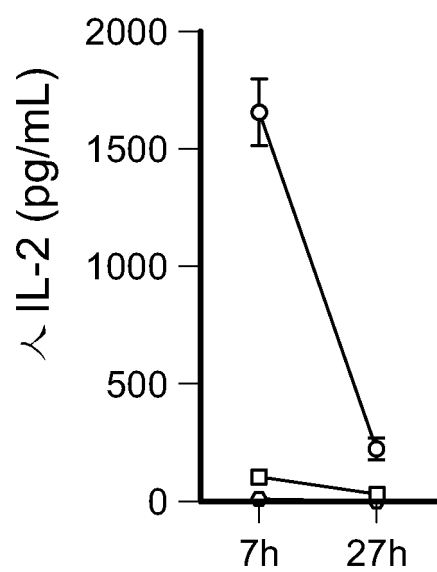


图 35A

IL-6

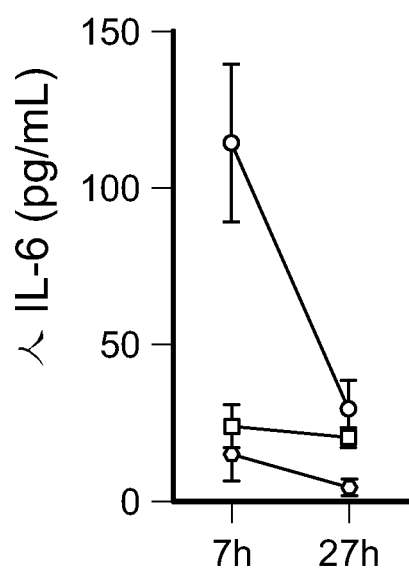


图 35B

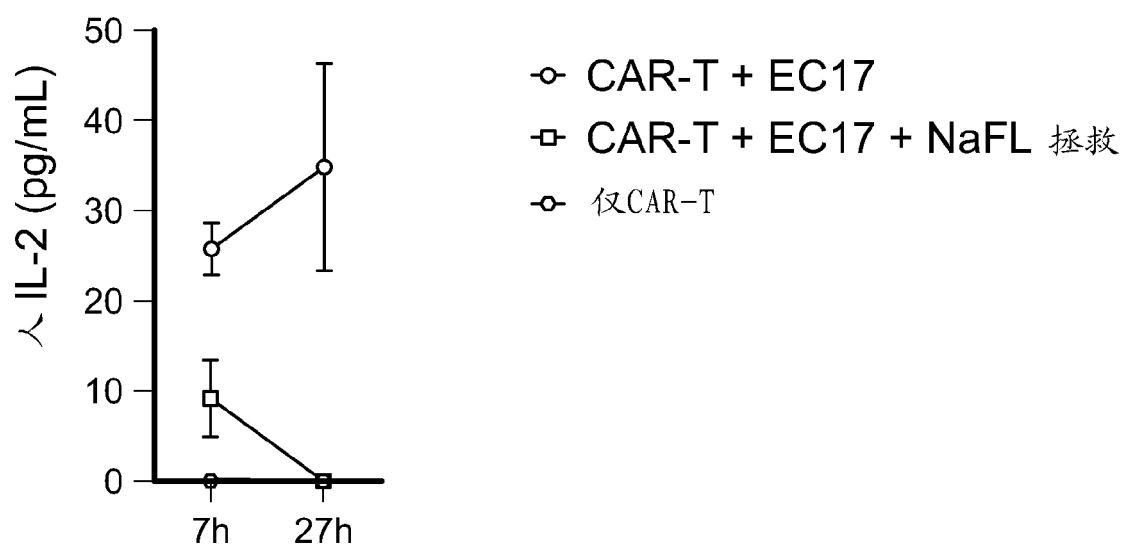
IL-10

图 35C

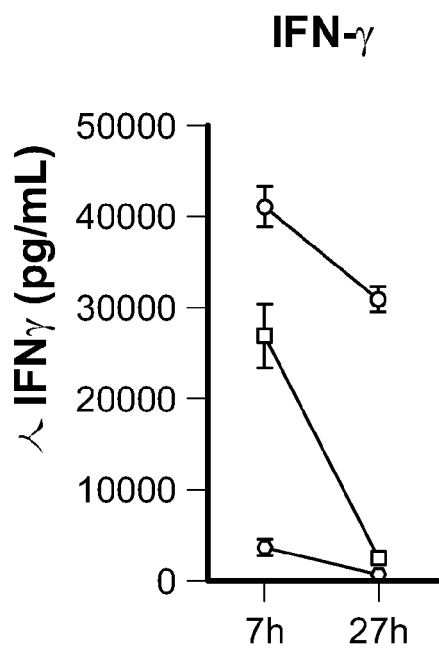


图 35D

- CAR-T + EC17
- CAR-T + EC17 + NaFL 拯救
- 仅CAR-T

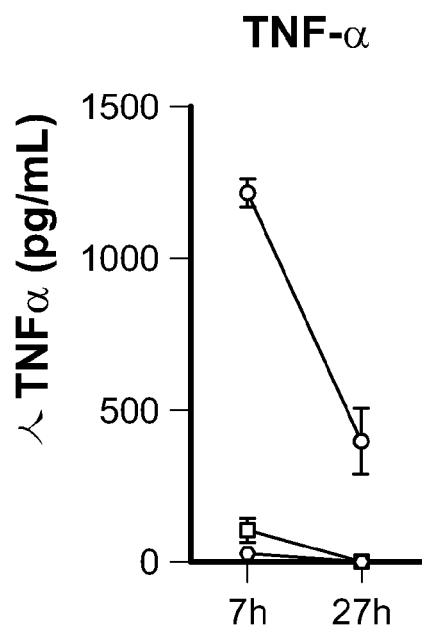


图 35E

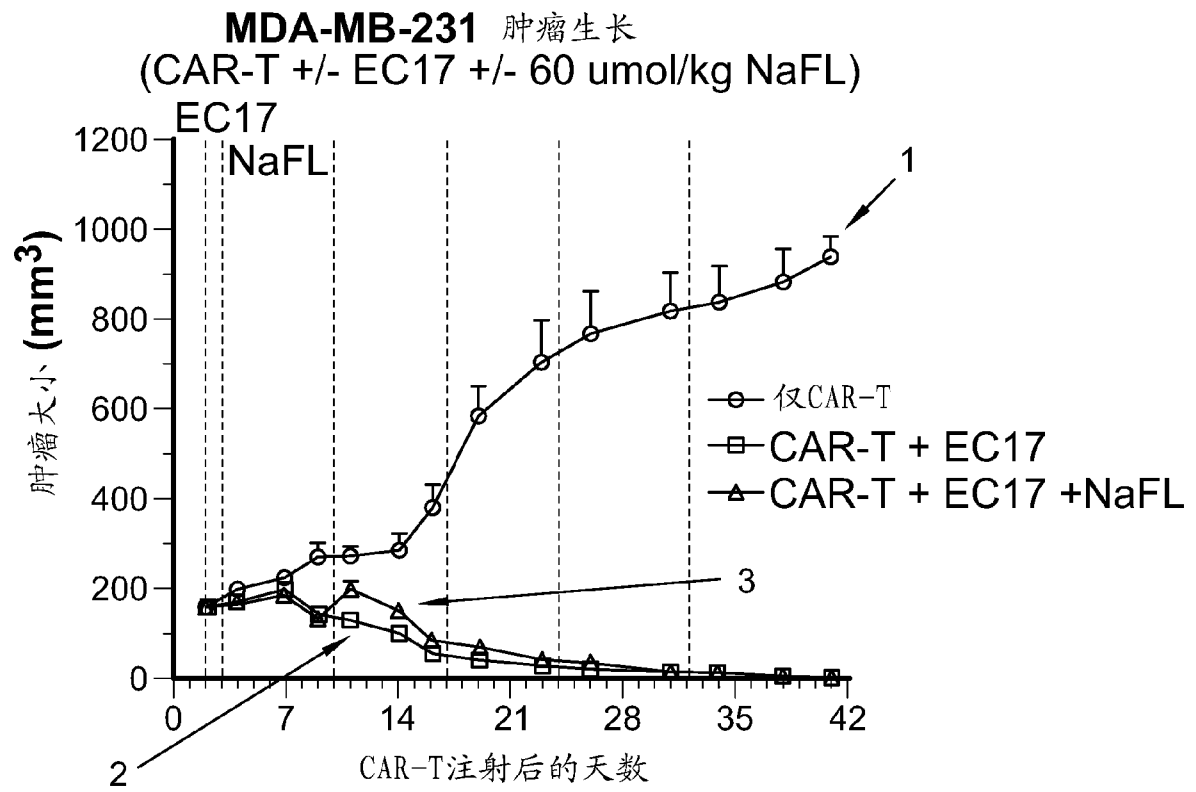


图 36A

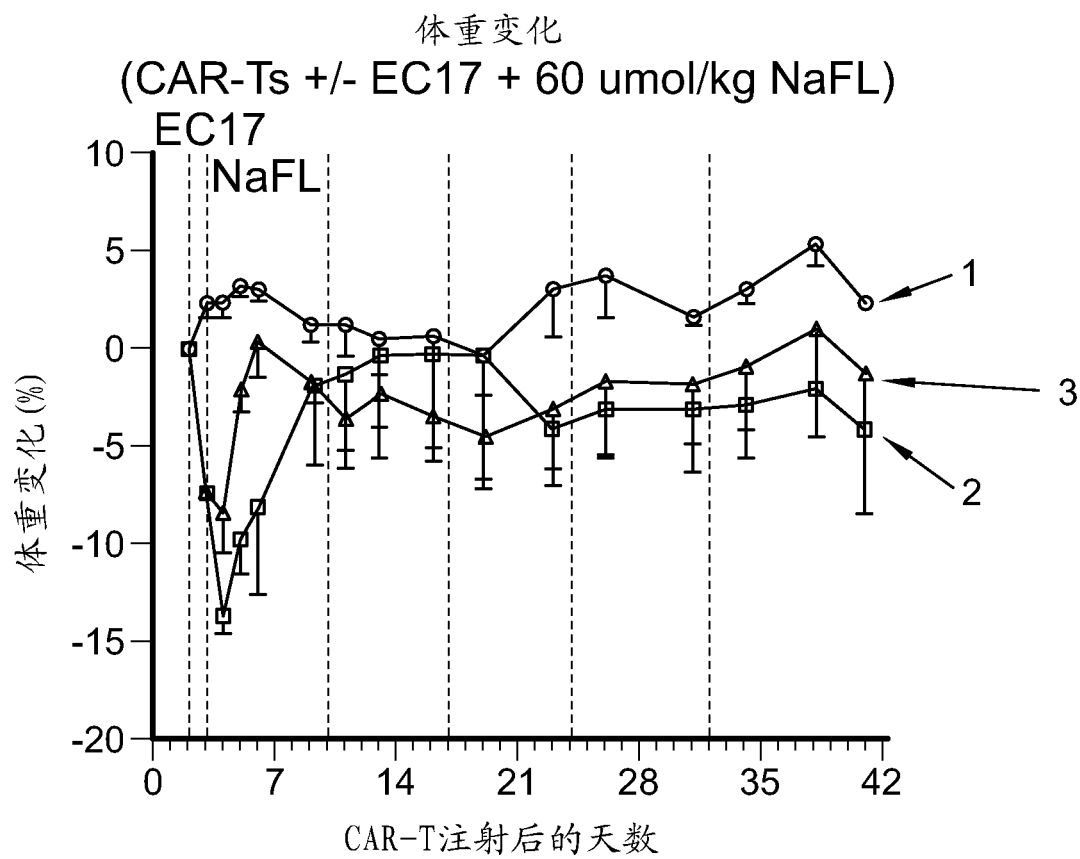


图 36B

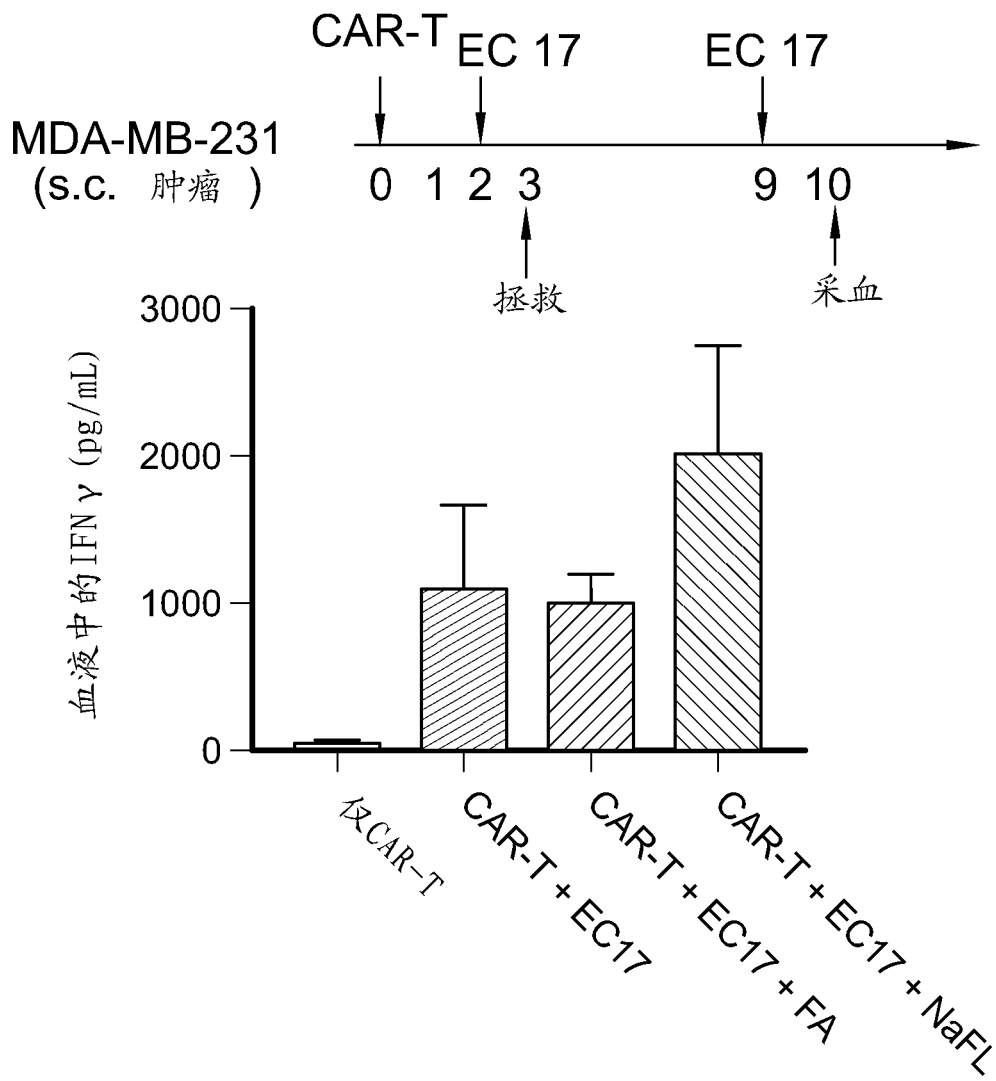


图 37A

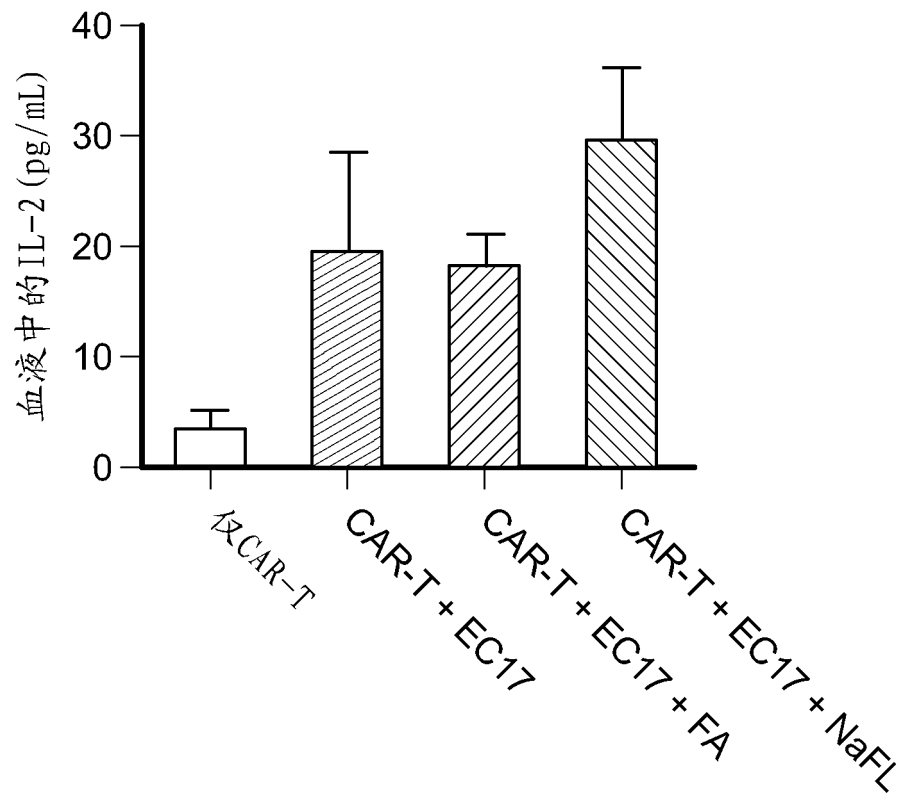


图 37B

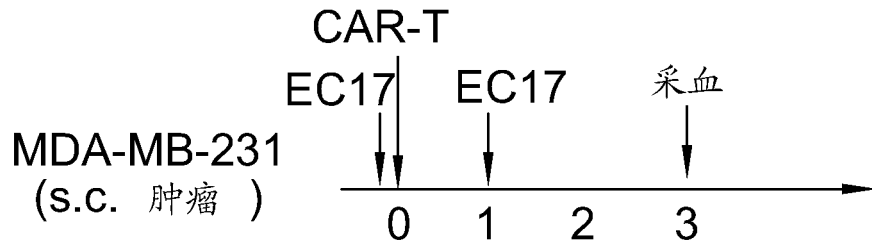


图 38A

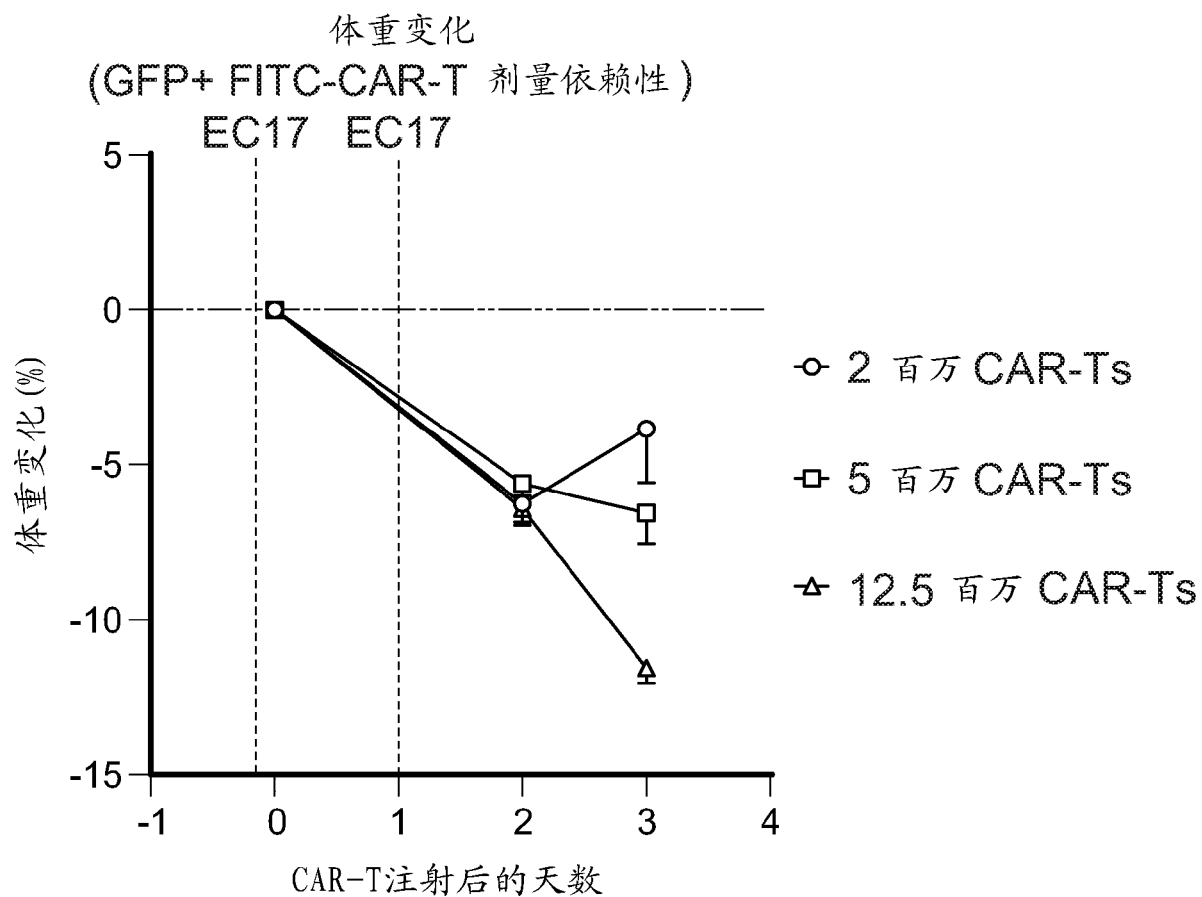


图 38B

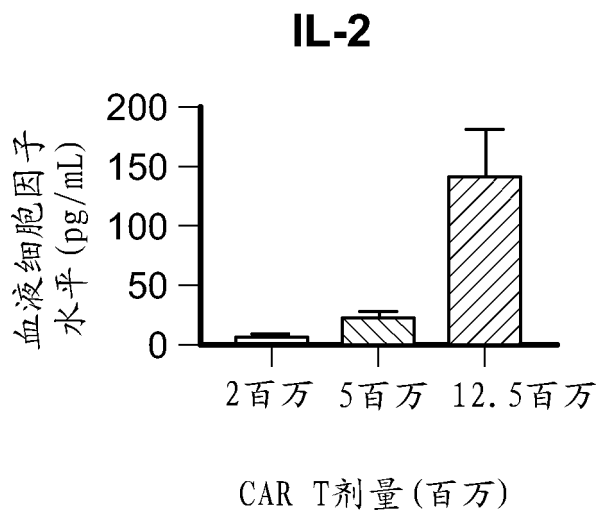


图 39A

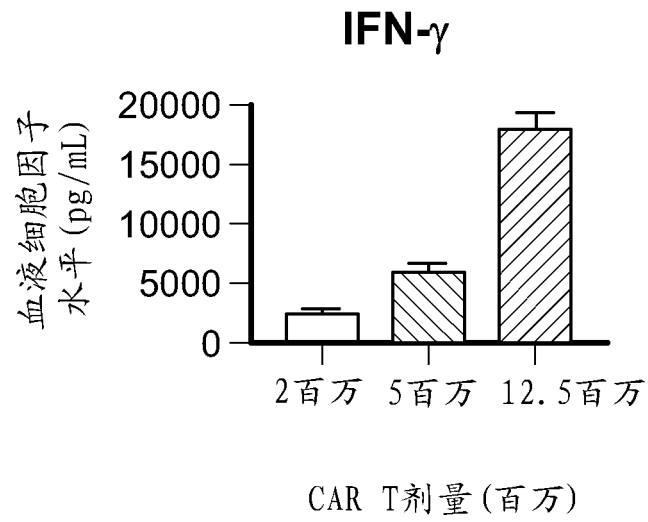


图 39B

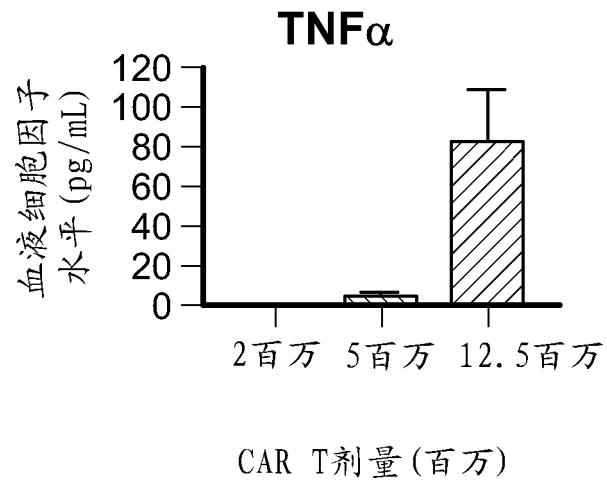


图 39C

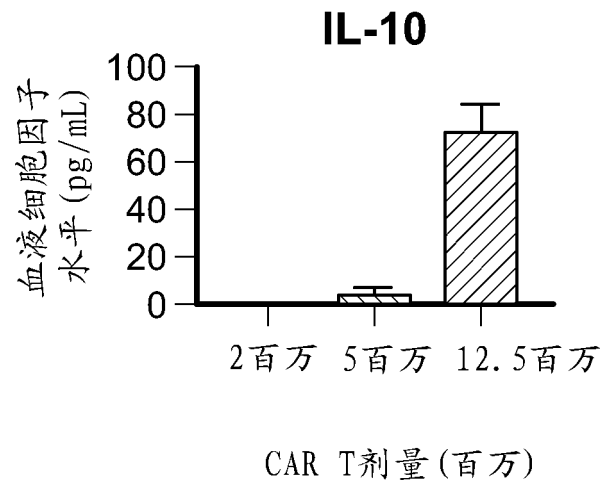


图 39D

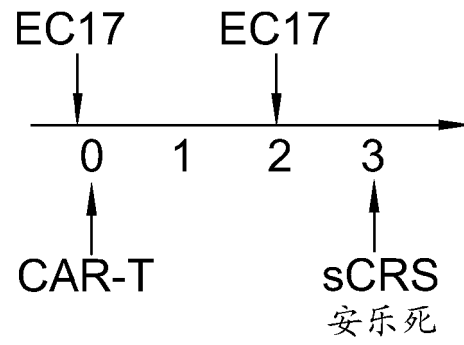


图 40A

小鼠血液中的EC17剂量依赖性的CAR-T计数

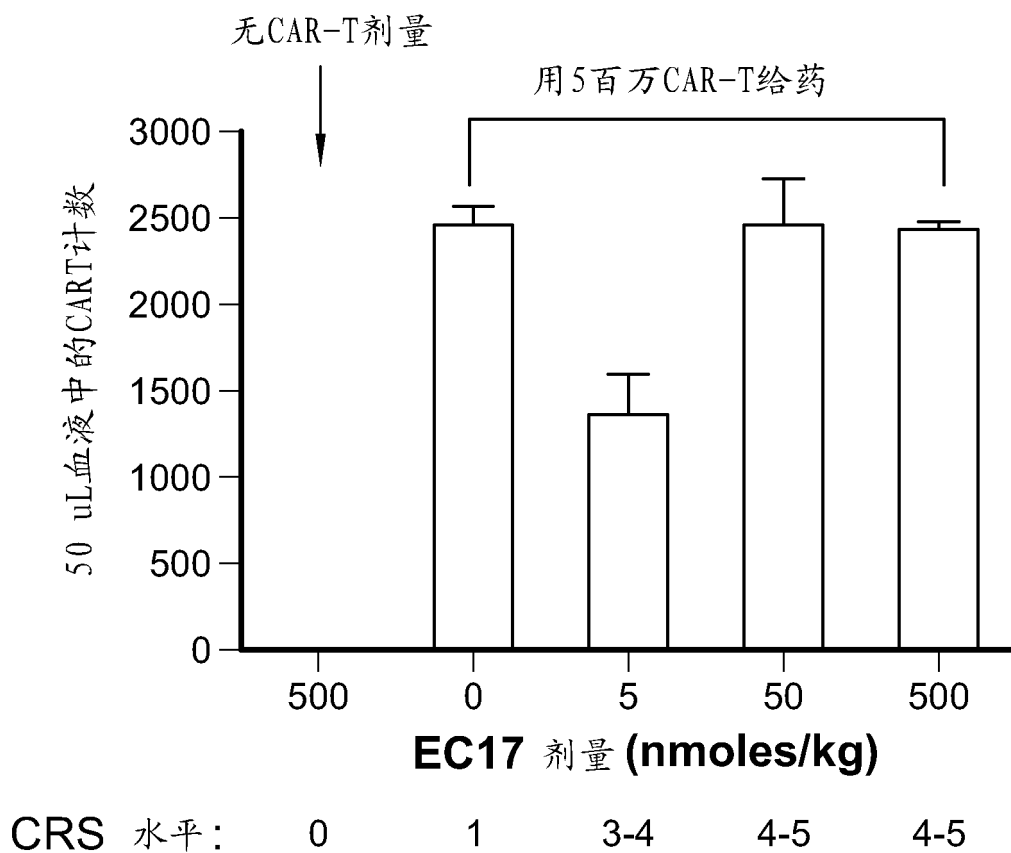


图 40B

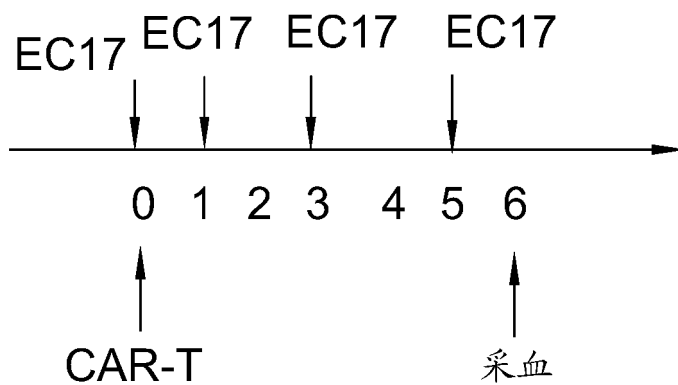
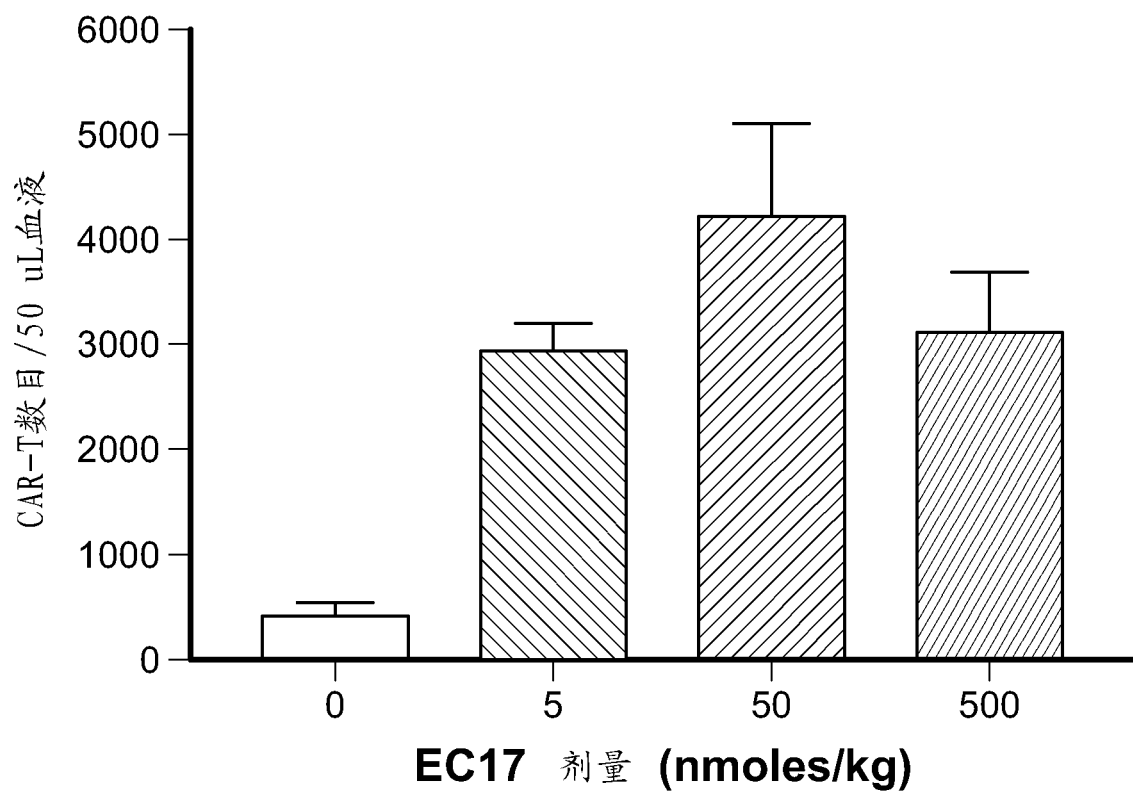


图 41A



*MDA-MB-231 s.c. 模型

图 41B

- 幼稚小鼠: CAR-T 5百万, 无EC17
- 幼稚小鼠: CAR-T 5百万+EC17 TIW
- 具有肿瘤的小鼠: CAR-T 5百万, 无EC17
- ◇— 具有肿瘤的小鼠: CAR-T 5百万+EC17 TIW

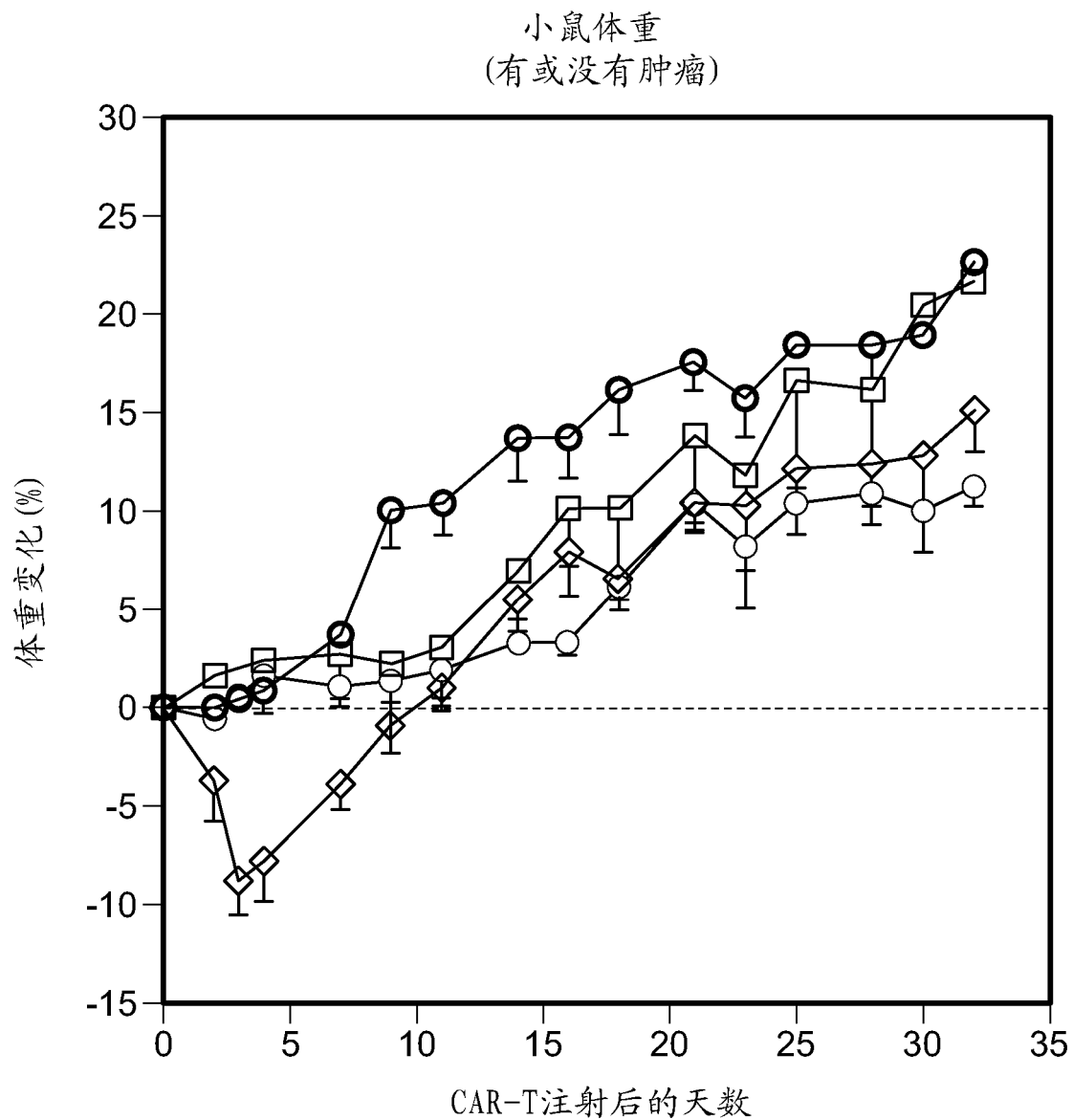


图 42

血液中的CART计数

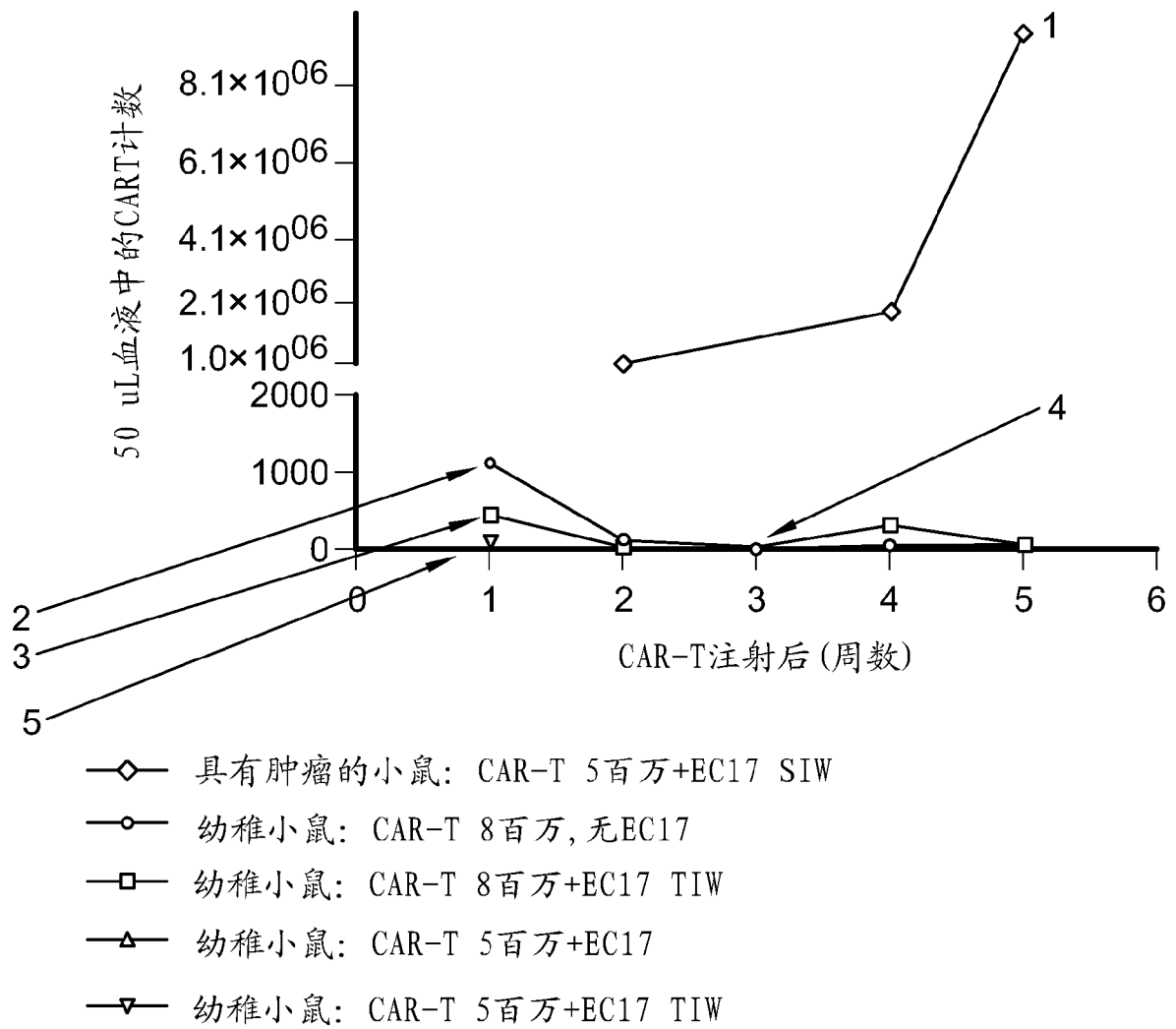
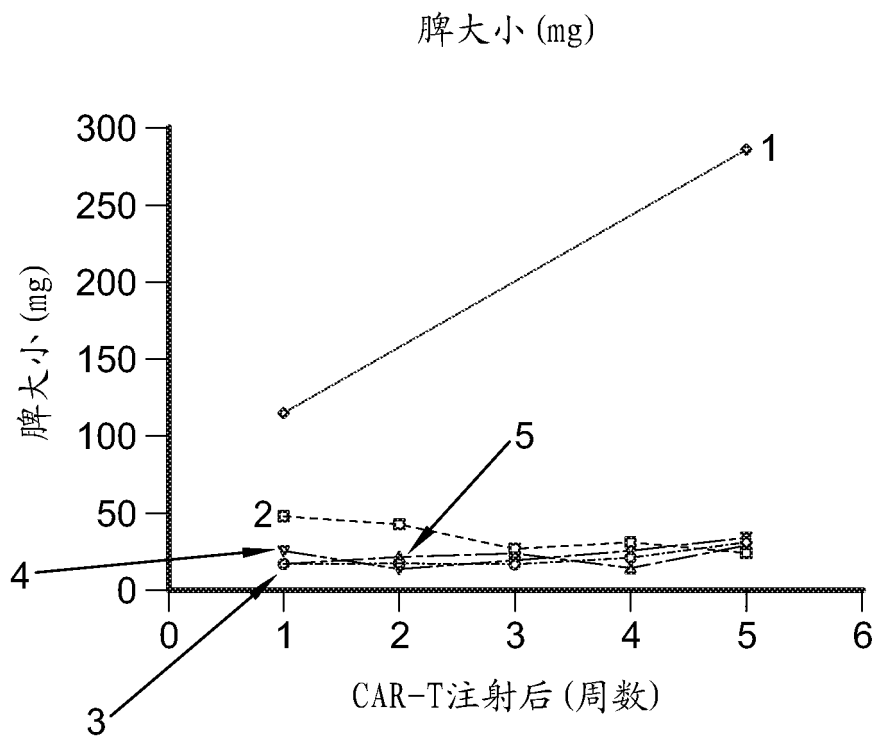


图 43A



- ◇— 具有肿瘤的小鼠: CAR-T 5百万+EC17 TIW
- 幼稚小鼠: CAR-T 8百万+EC17 TIW
- ◇--- 幼稚小鼠: CAR-T 8百万, 无EC17
- ▽— 幼稚小鼠: CAR-T 5百万+EC17 TIW
- ▲--- 幼稚小鼠: CAR-T 5百万, 无EC17

图 43B

细胞因子水平：CAR-T注射后1周

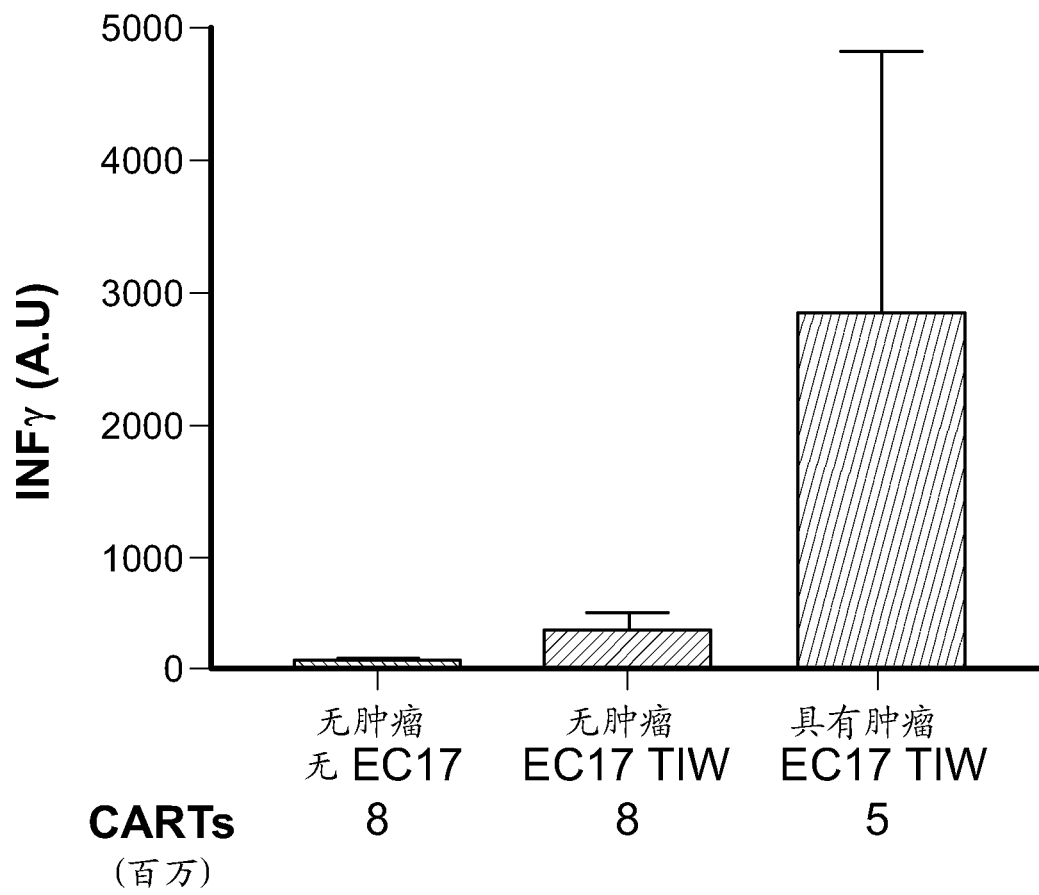


图 44

抗-FITC CAR T细胞疗法的通用性: 各种适配子与CAR T细胞的结合

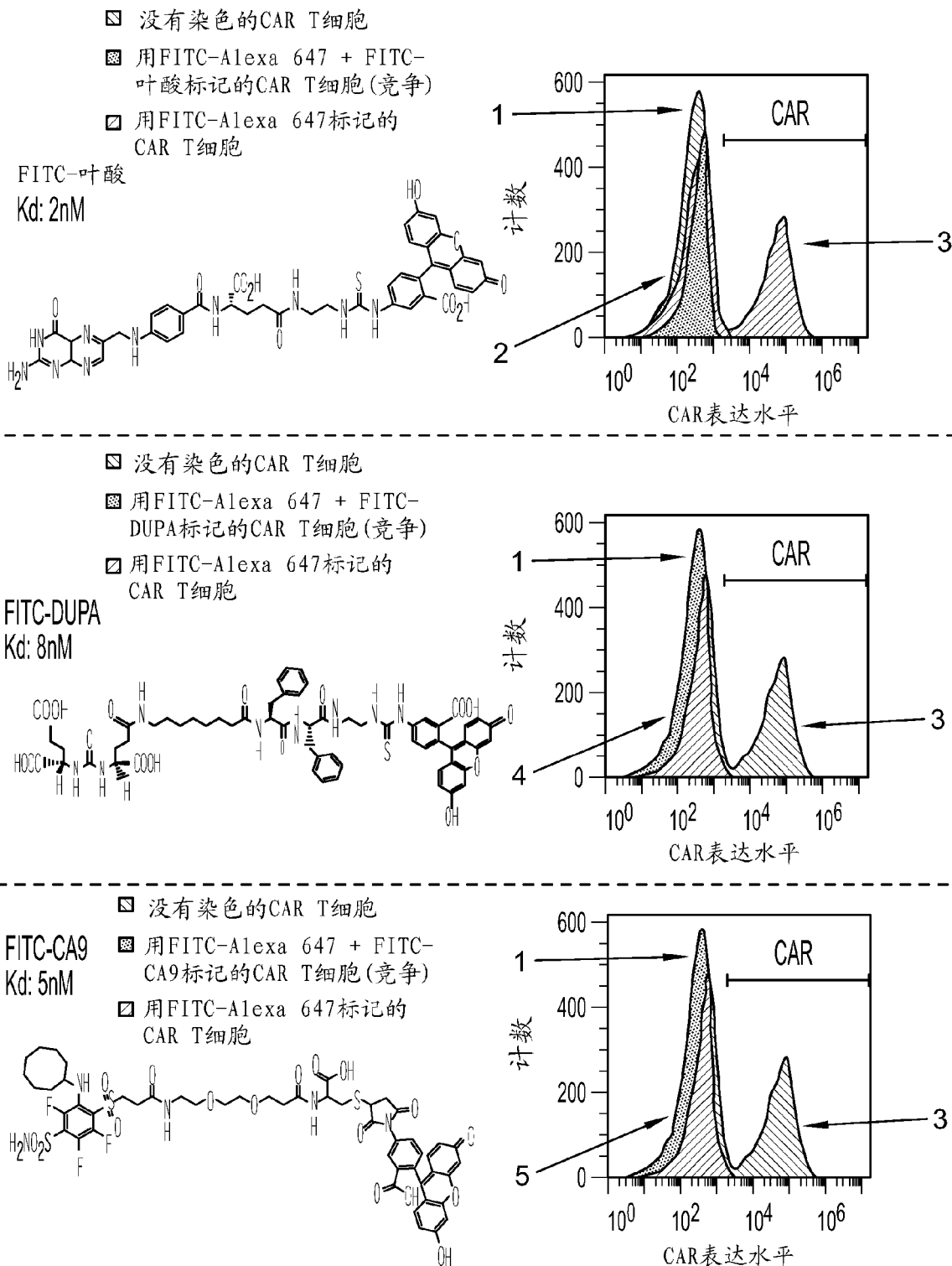


图 45

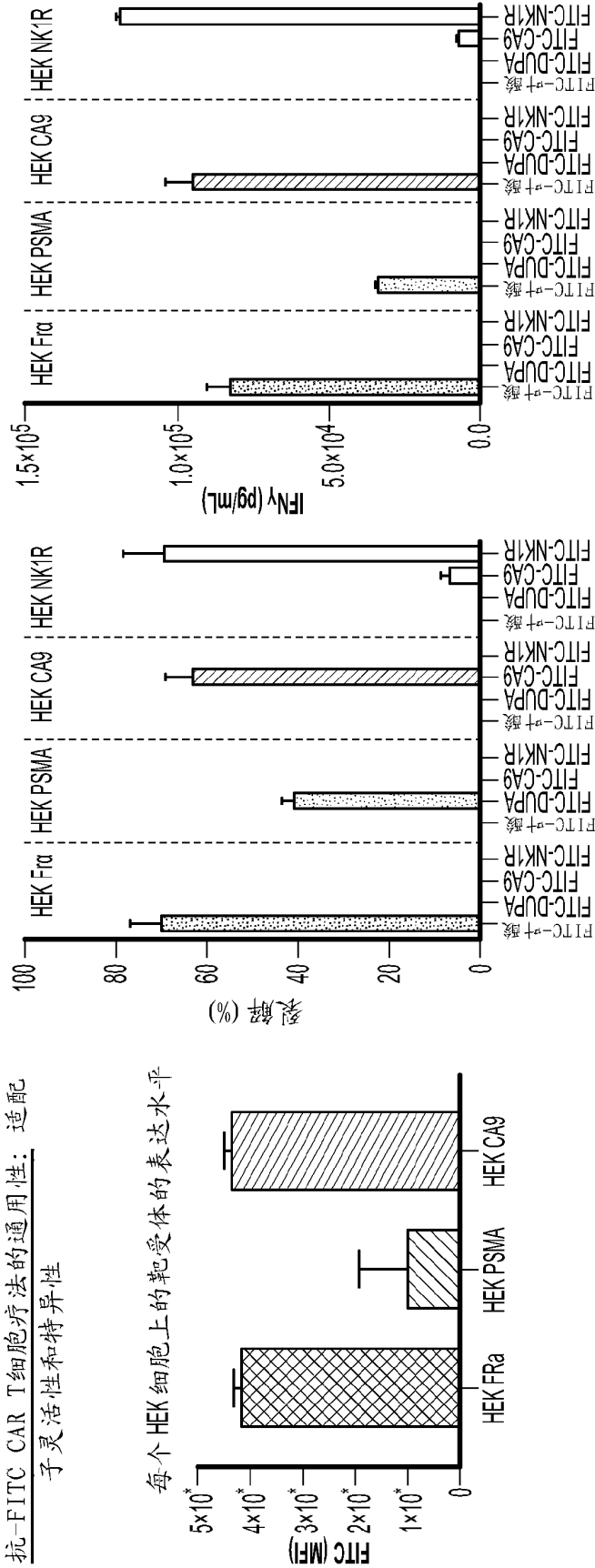


图 46A

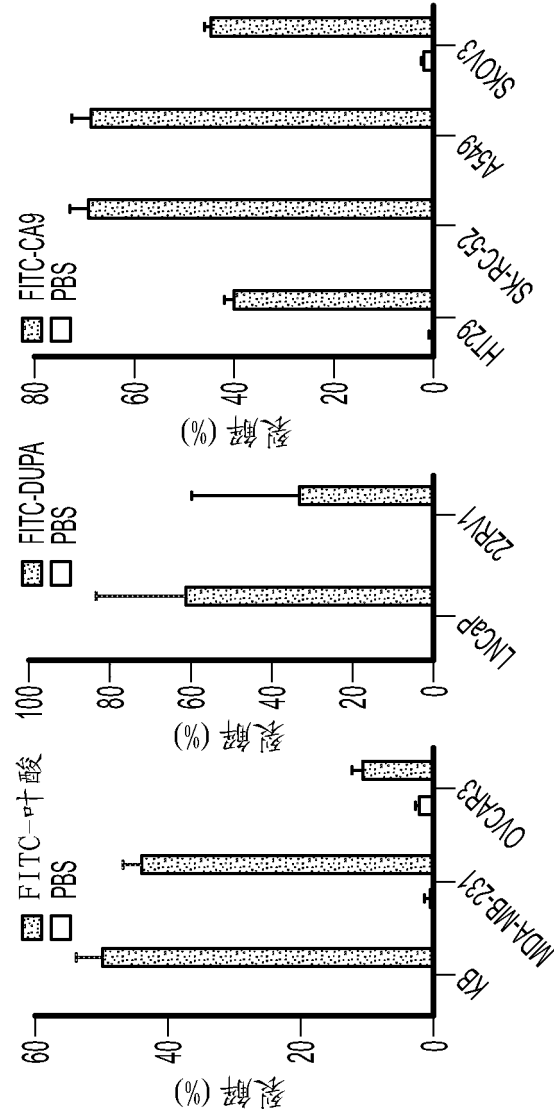


图 46B

抗-FITC CAR T细胞疗法的通用性：所有适配子表现类似

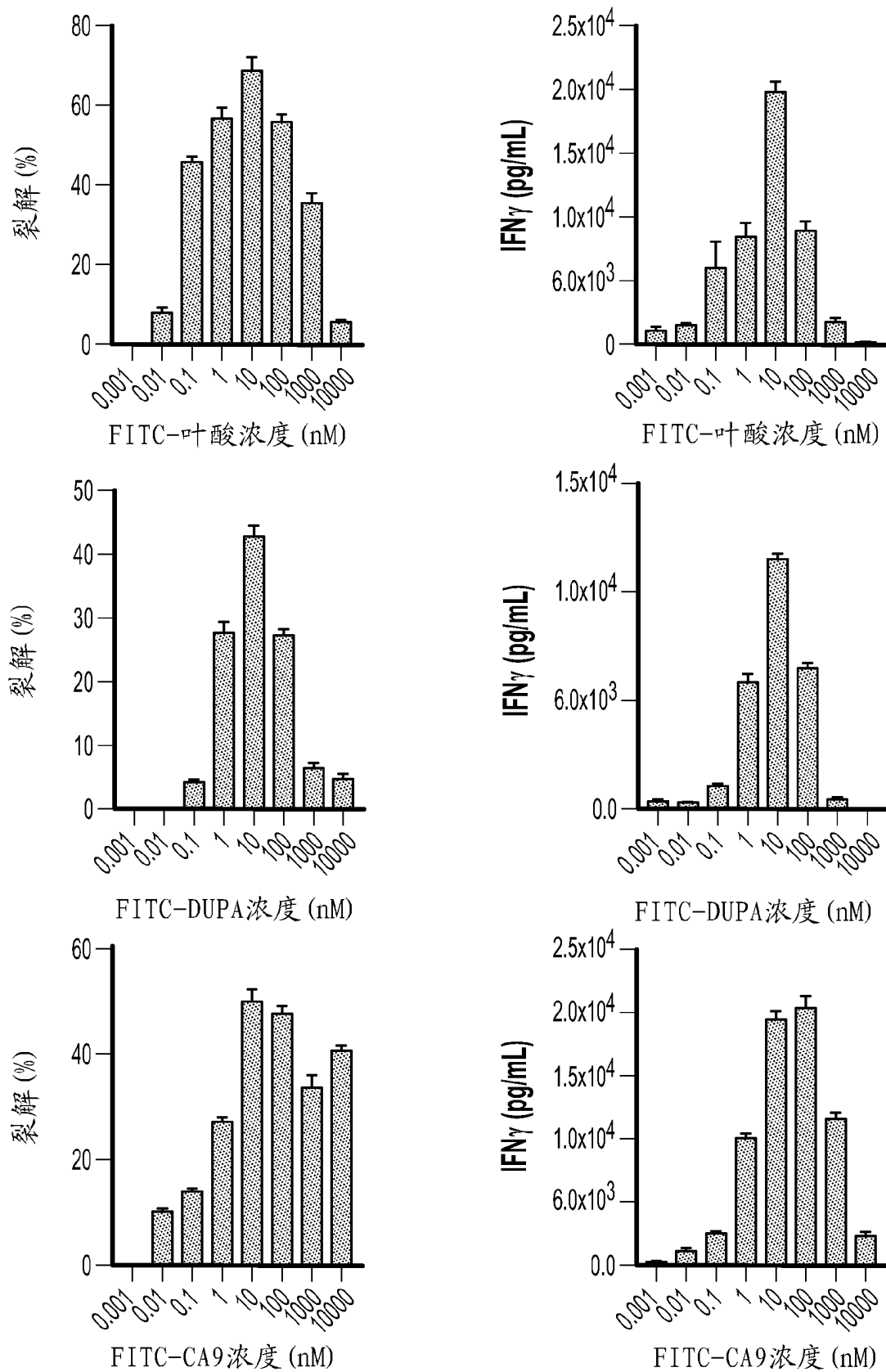


图 47

抗-FITC CAR T细胞疗法的通用性：所有适配子都可以在体内消除肿瘤

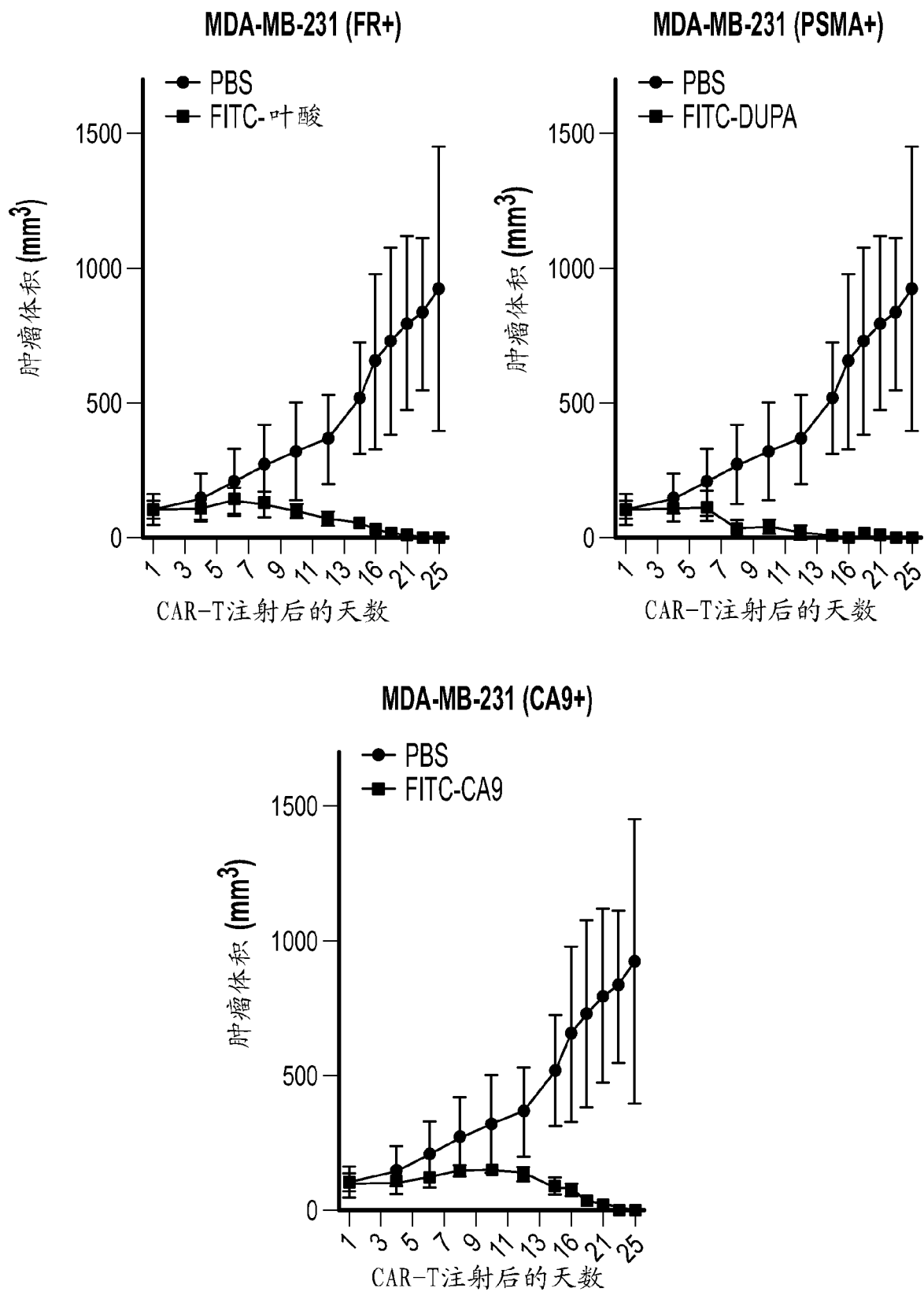


图 48

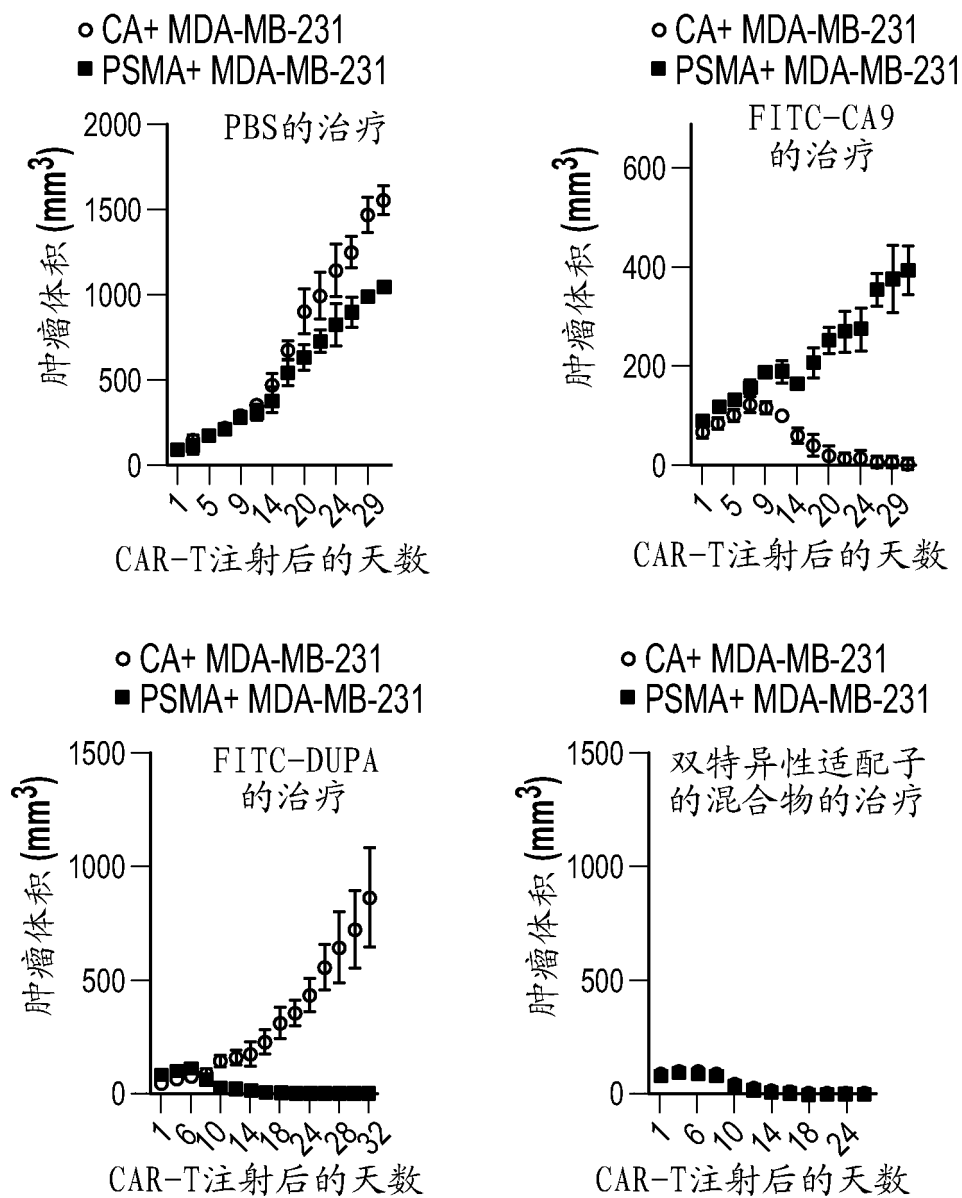


图 49A

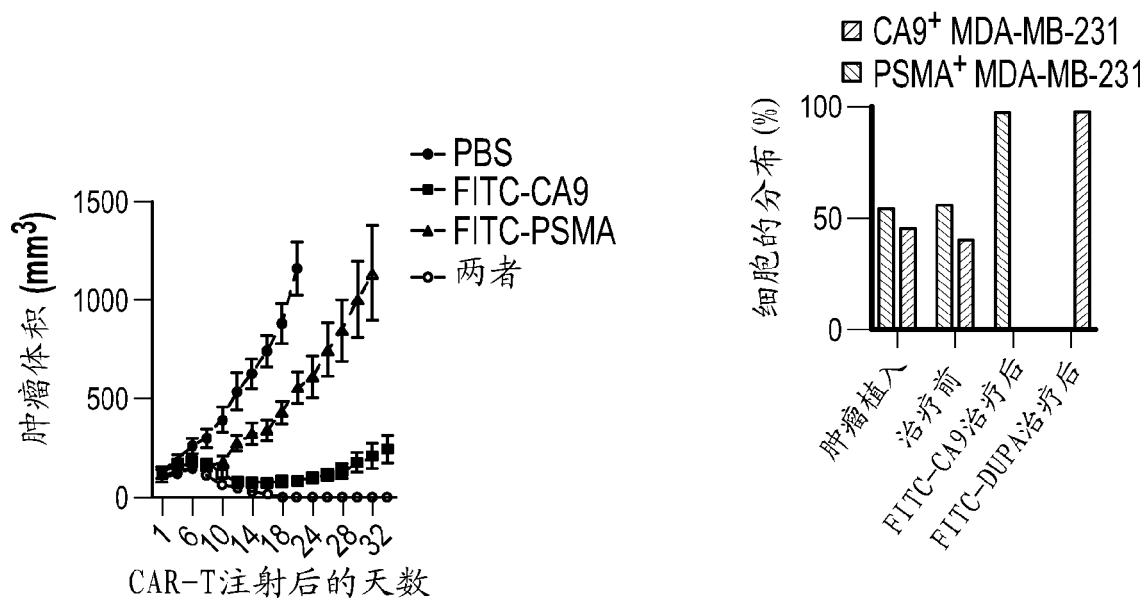


图 49B

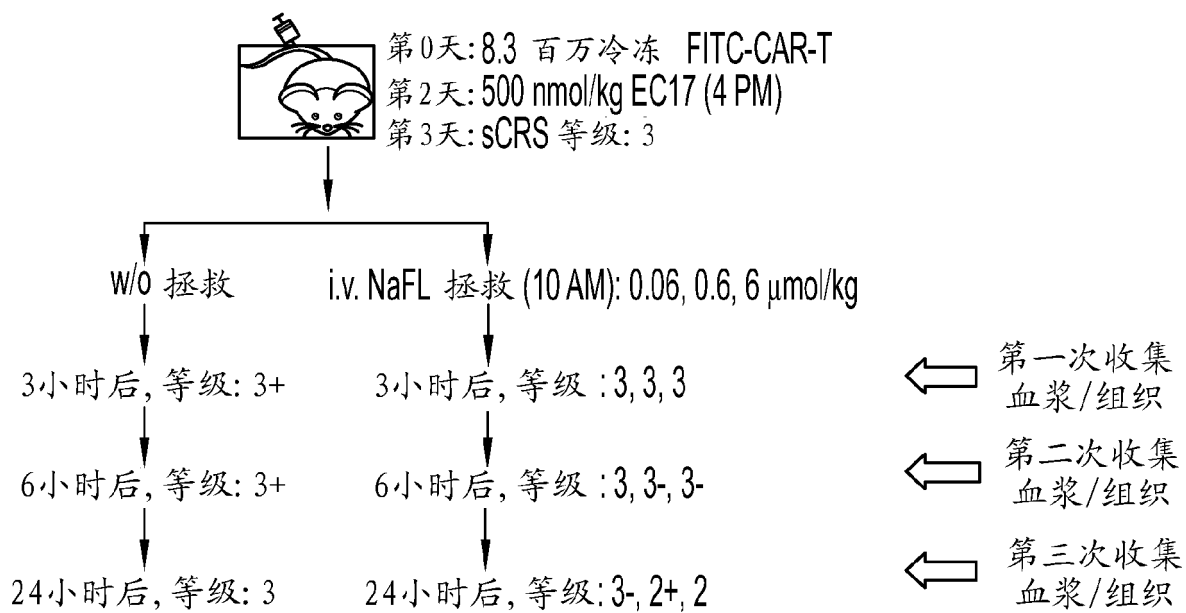


图 50

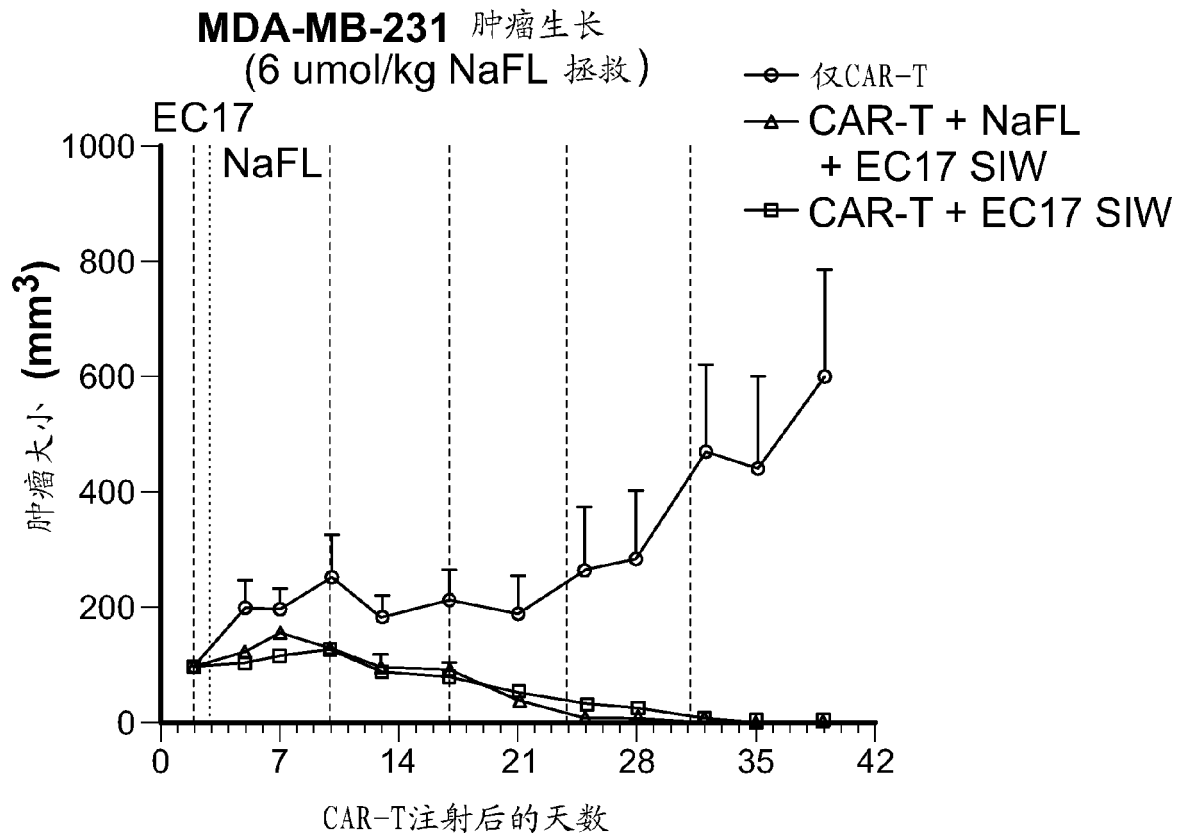


图 51A

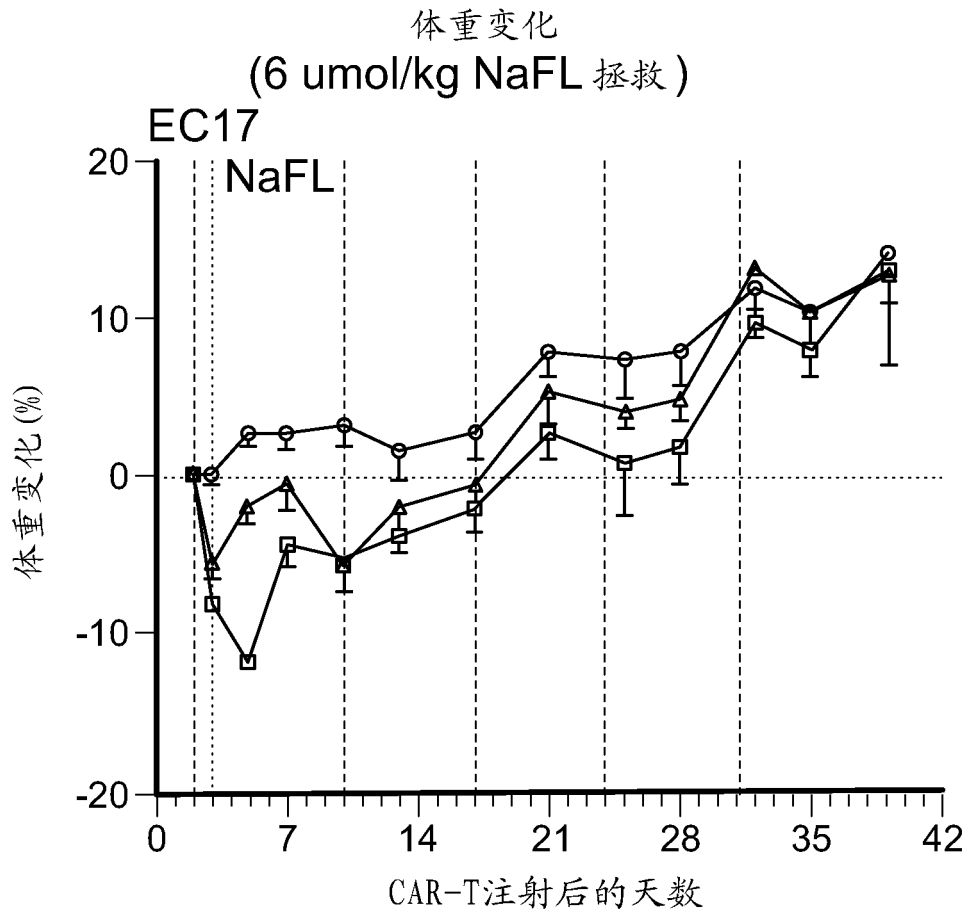


图 51B

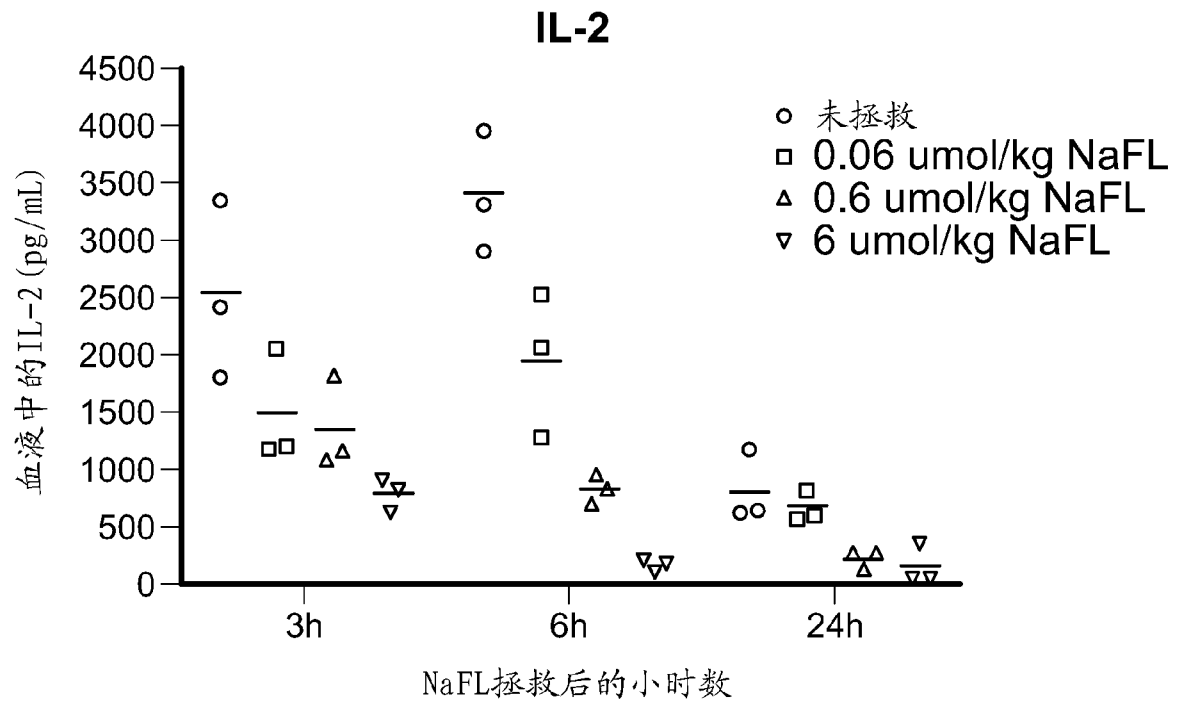


图 52A

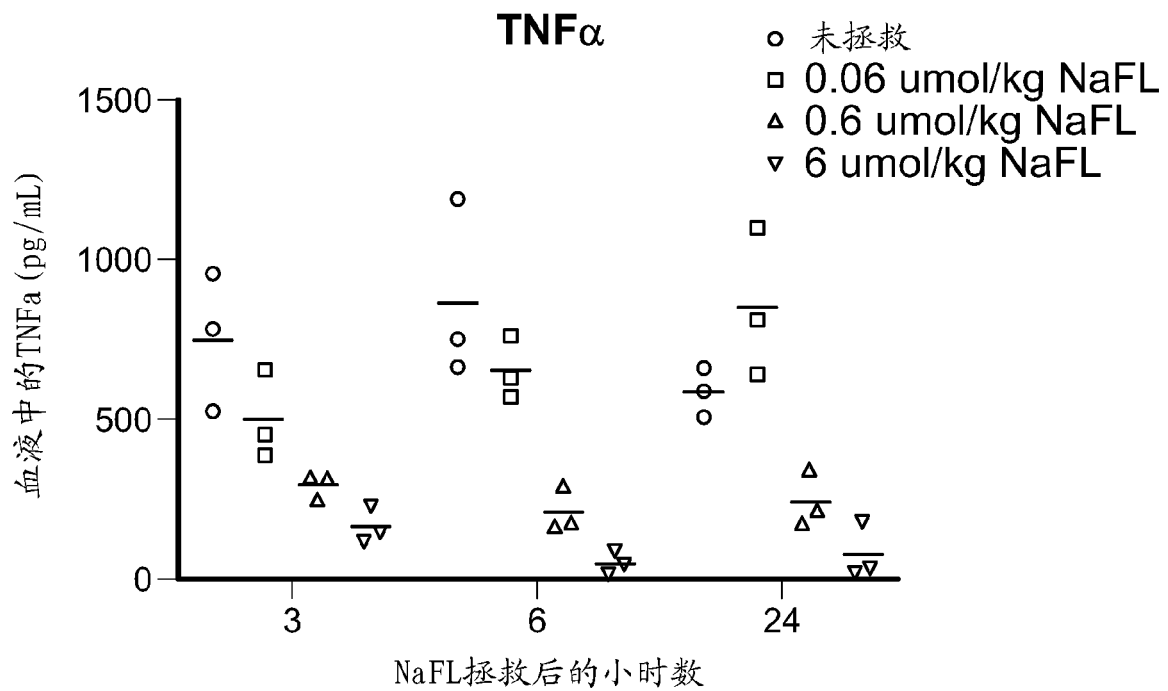


图 52B

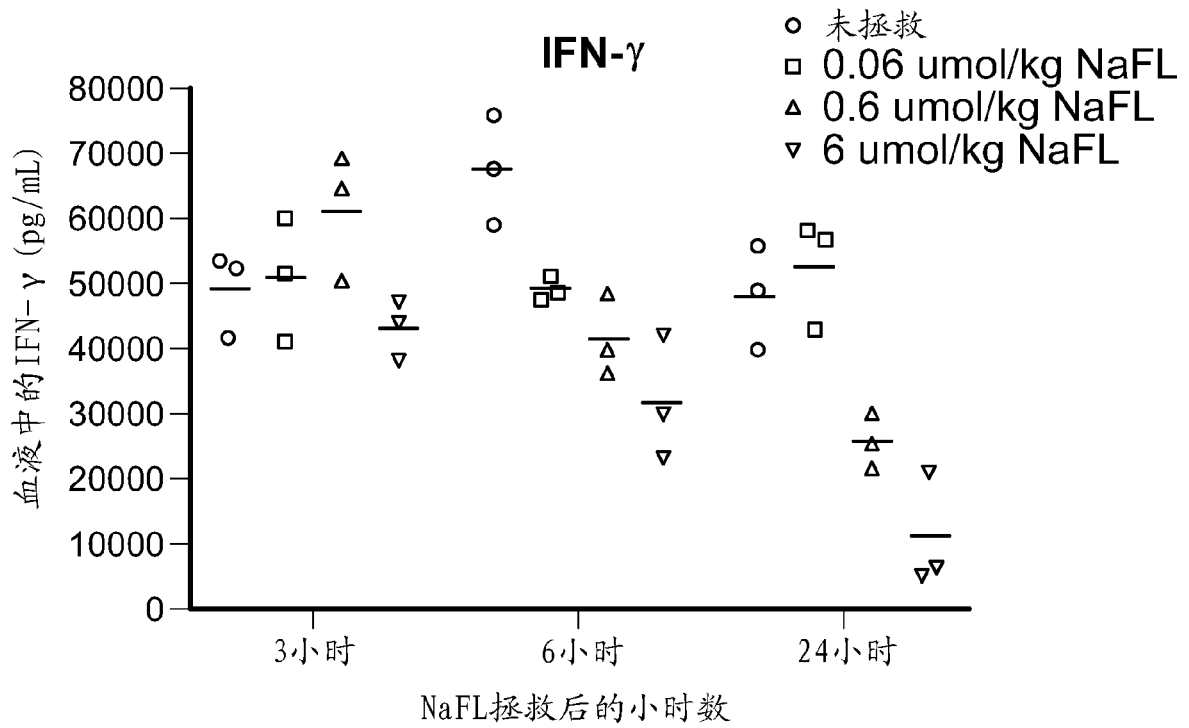


图 52C

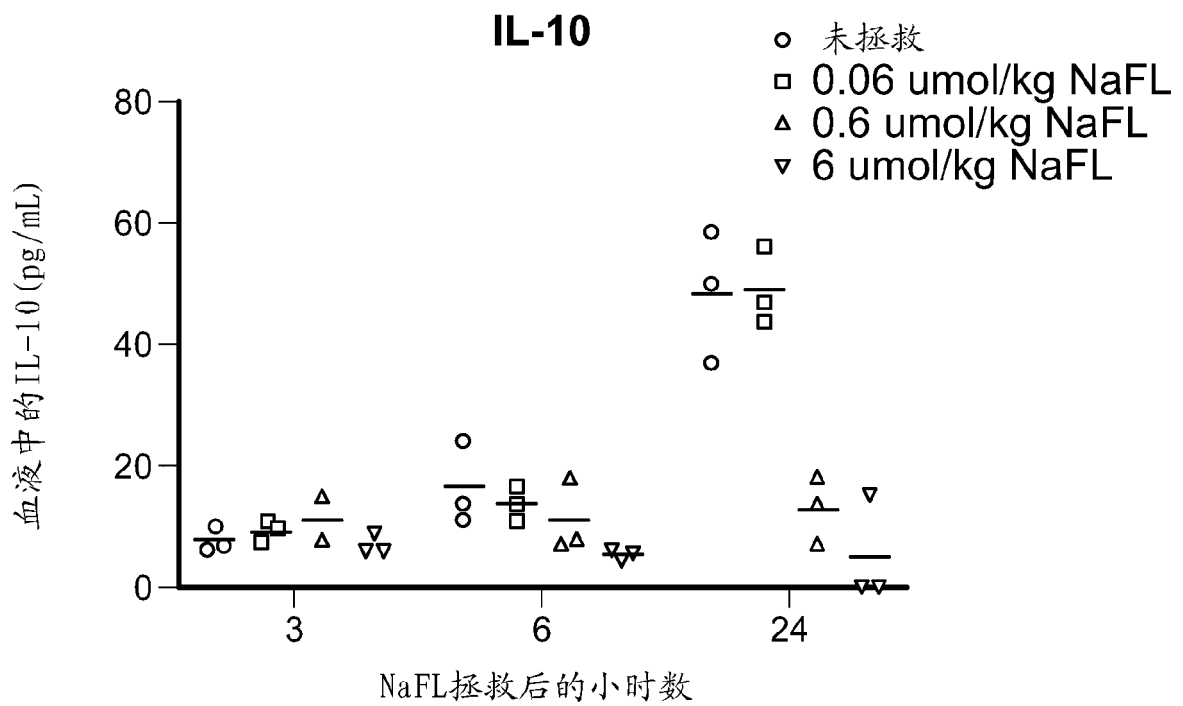


图 52D

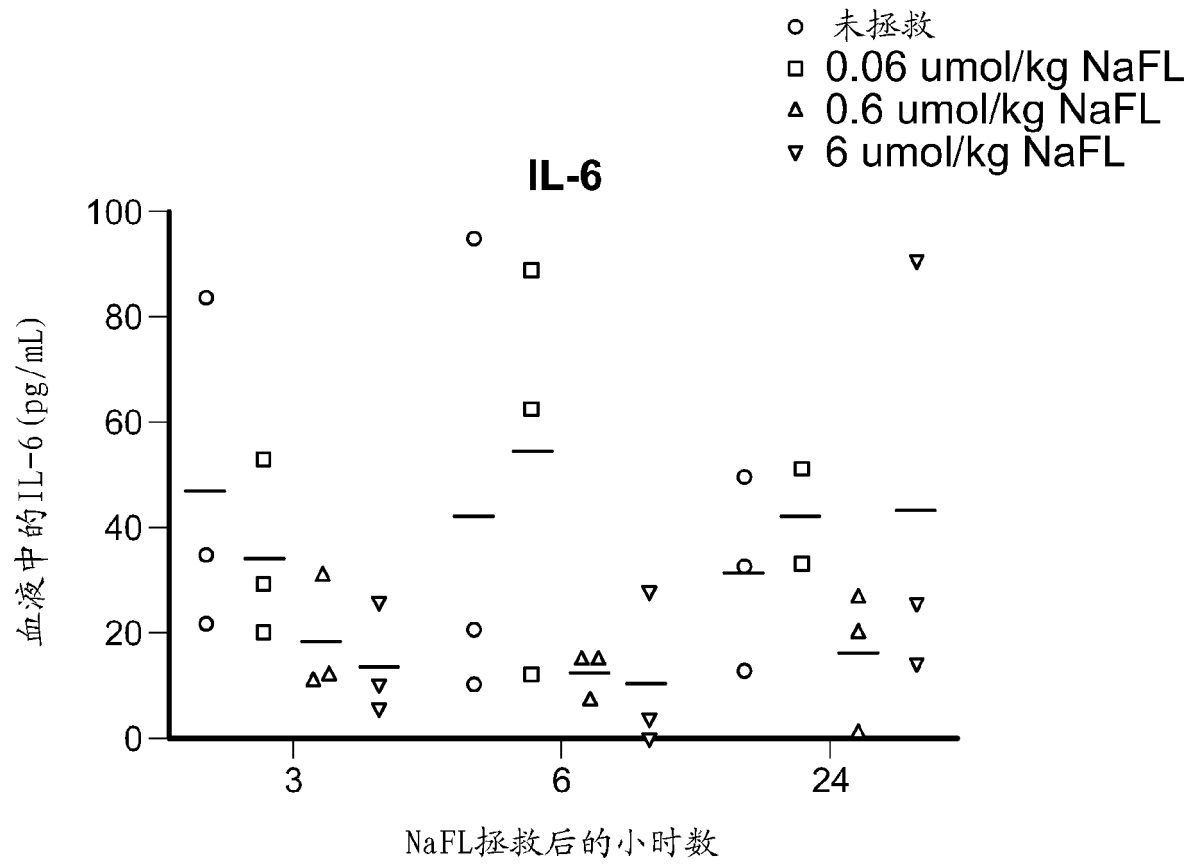


图 52E

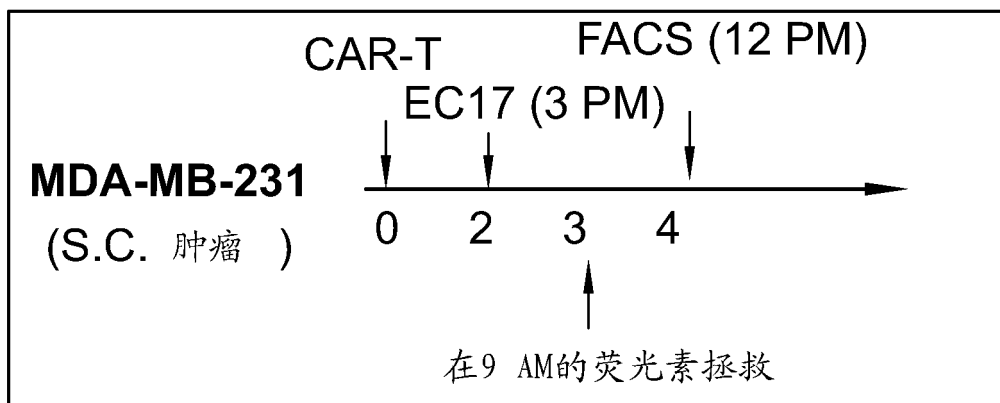


图 53A

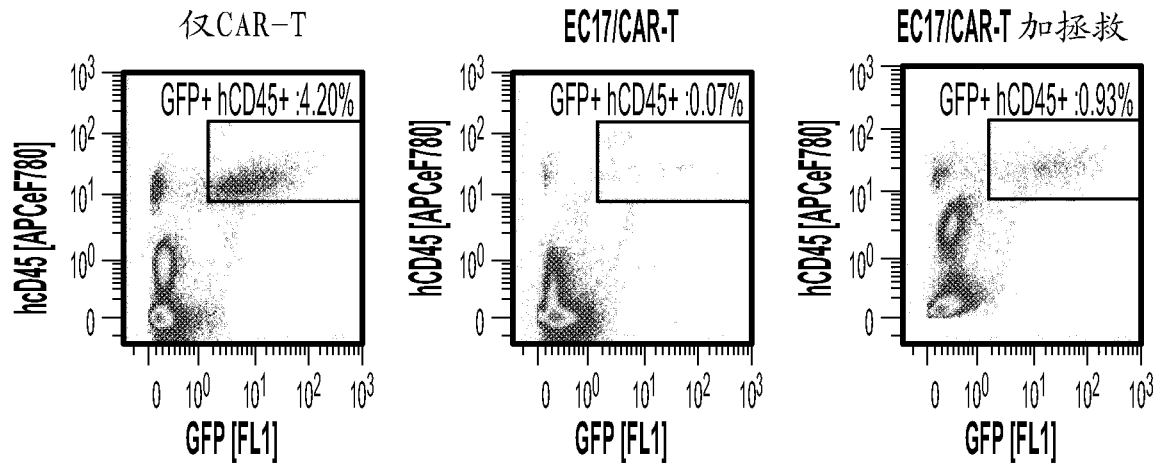


图 53B

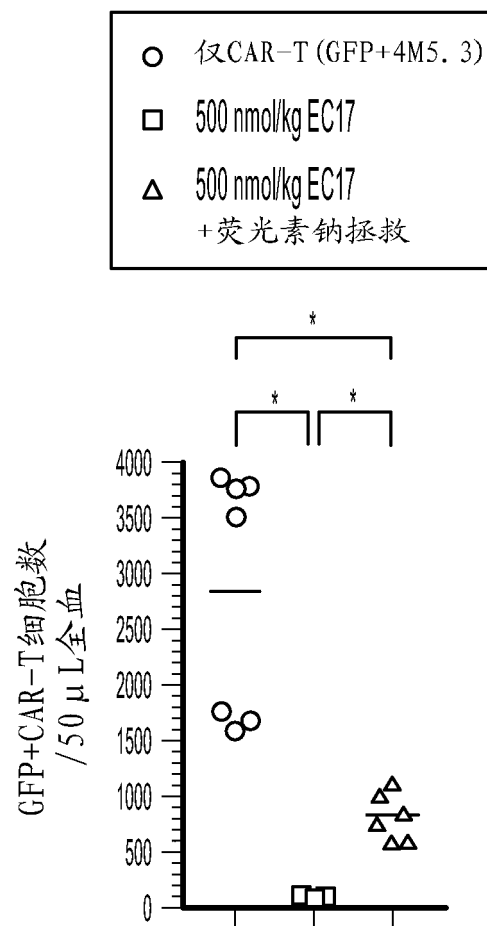


图 53C

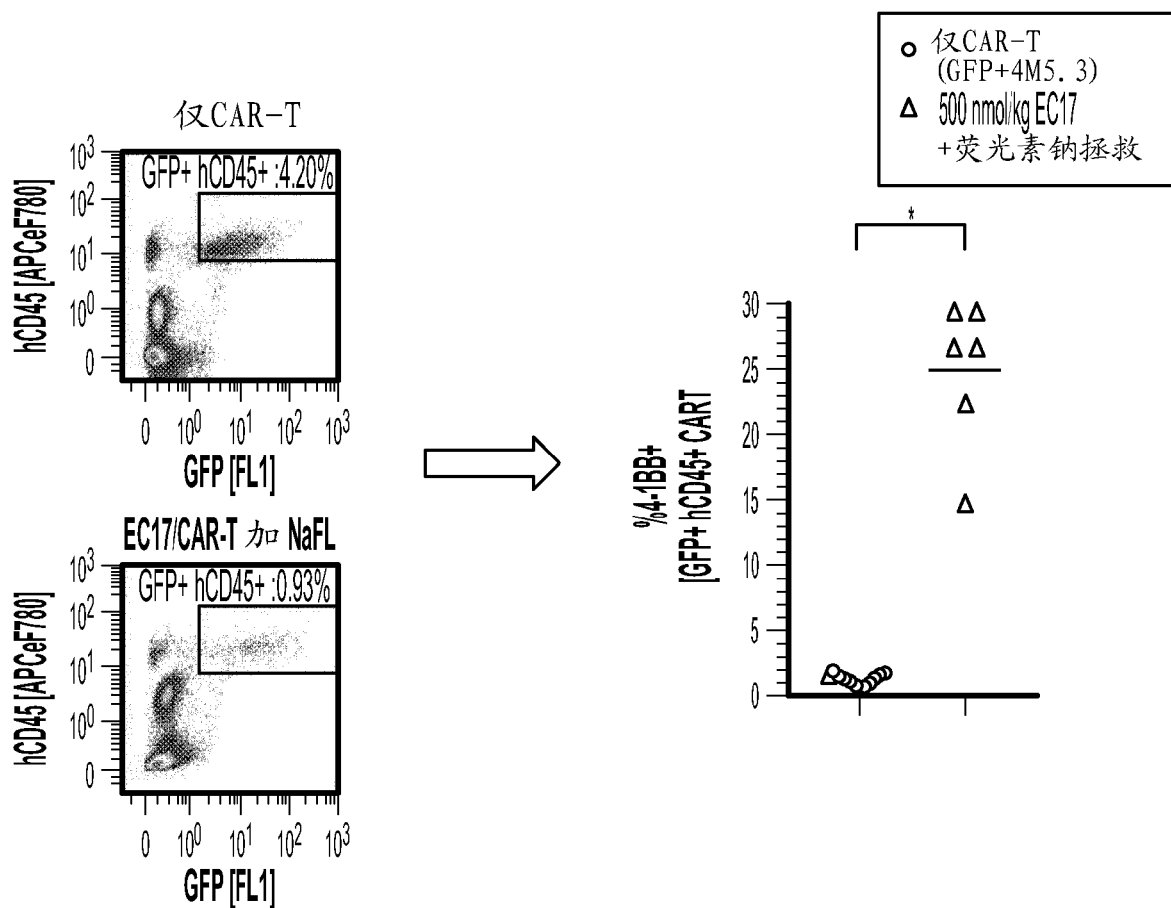


图 54

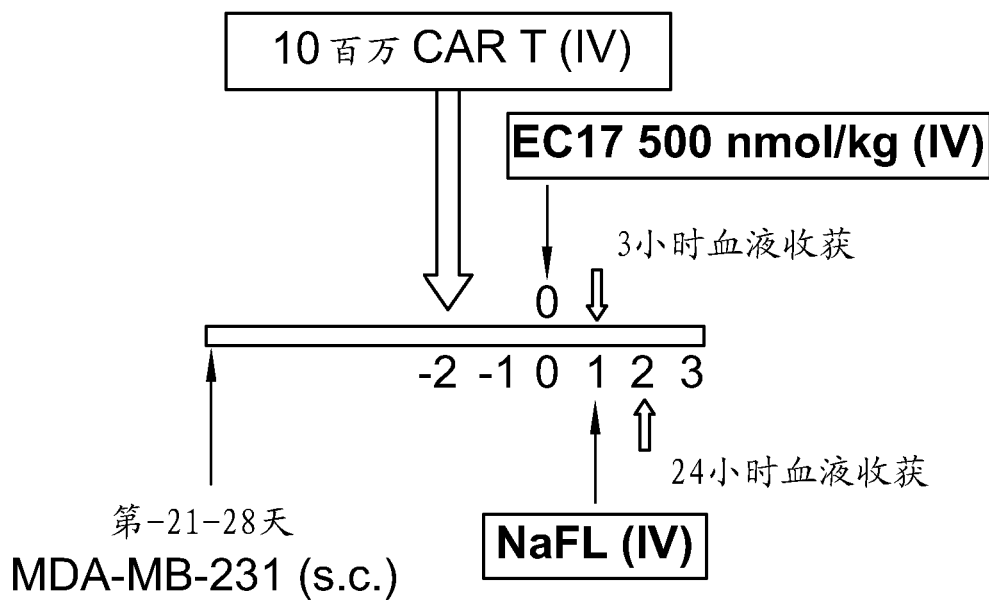


图 55A

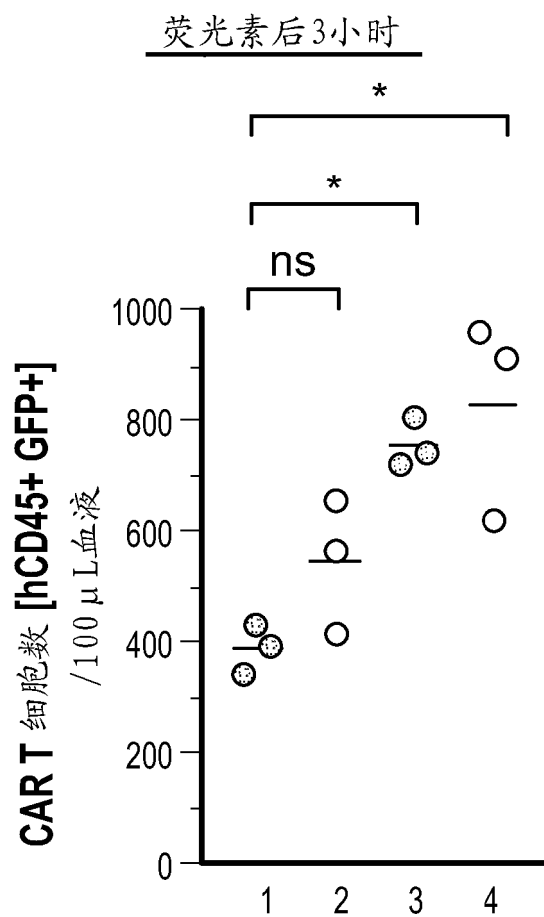


图 55B

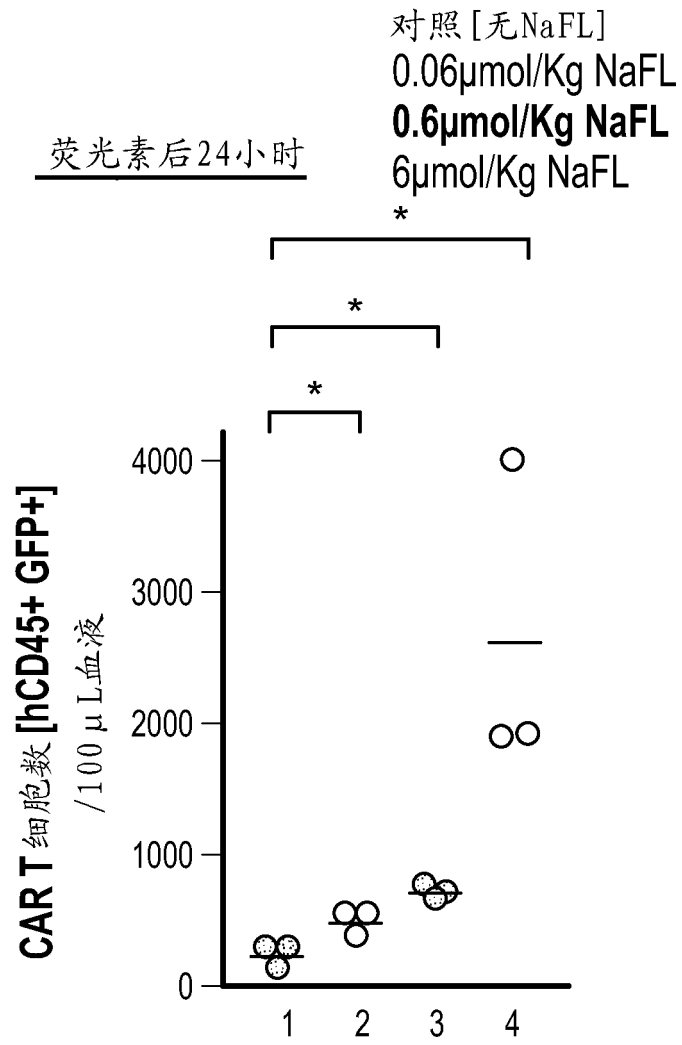


图 55C

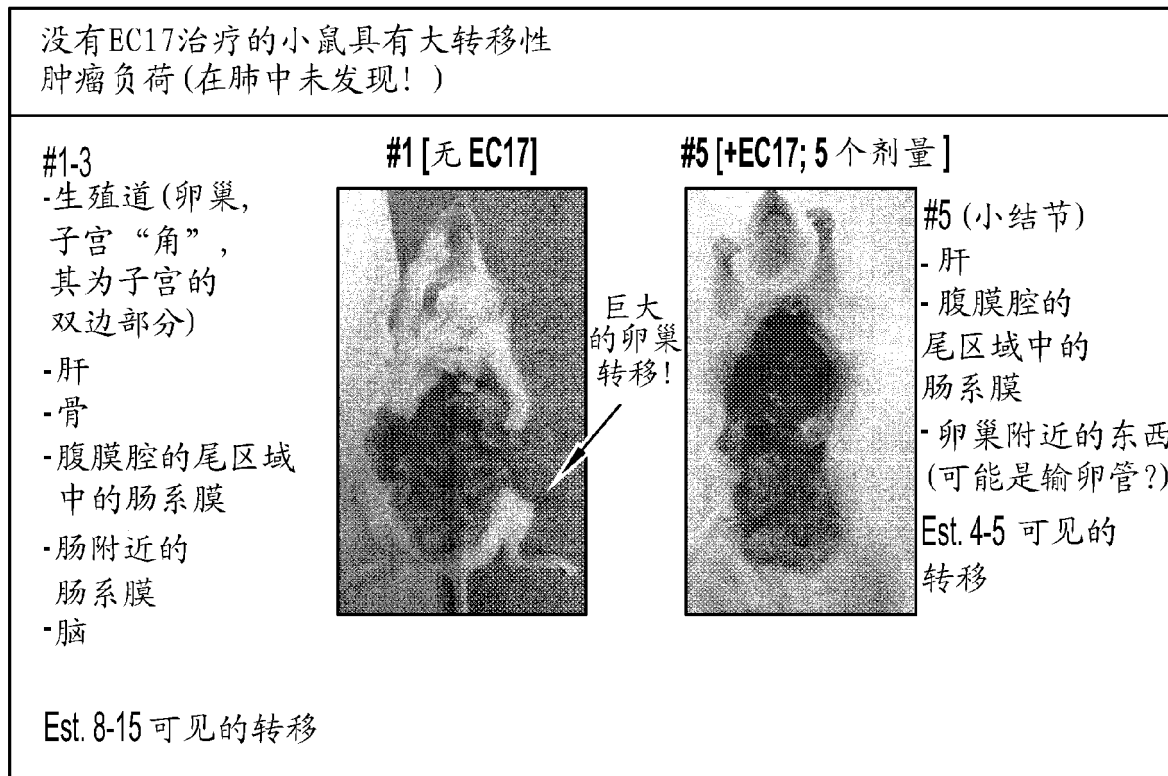
*A**B*

图 56

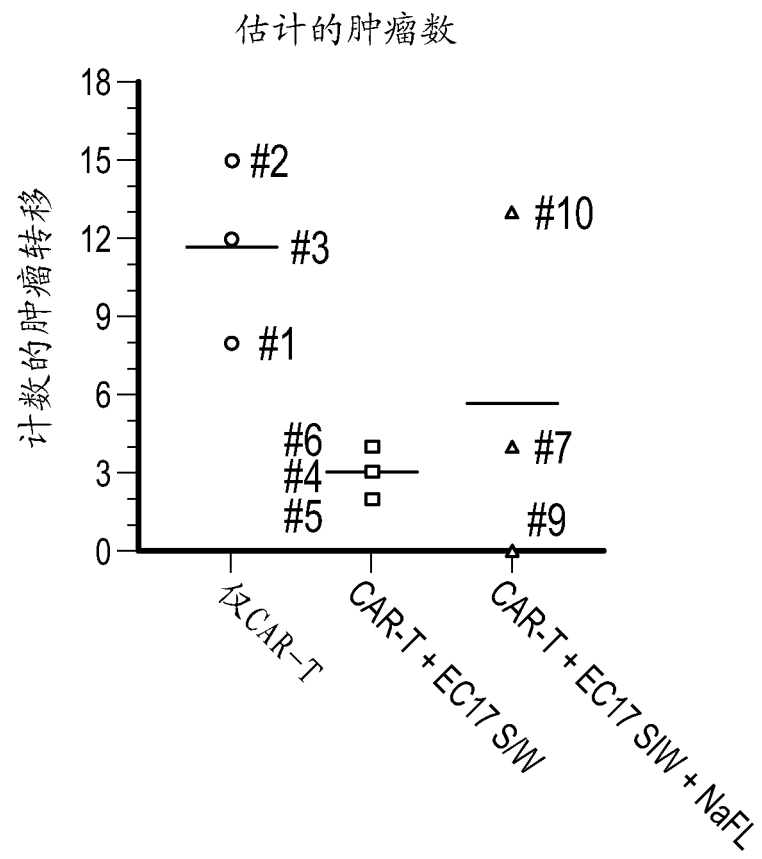


图 57A

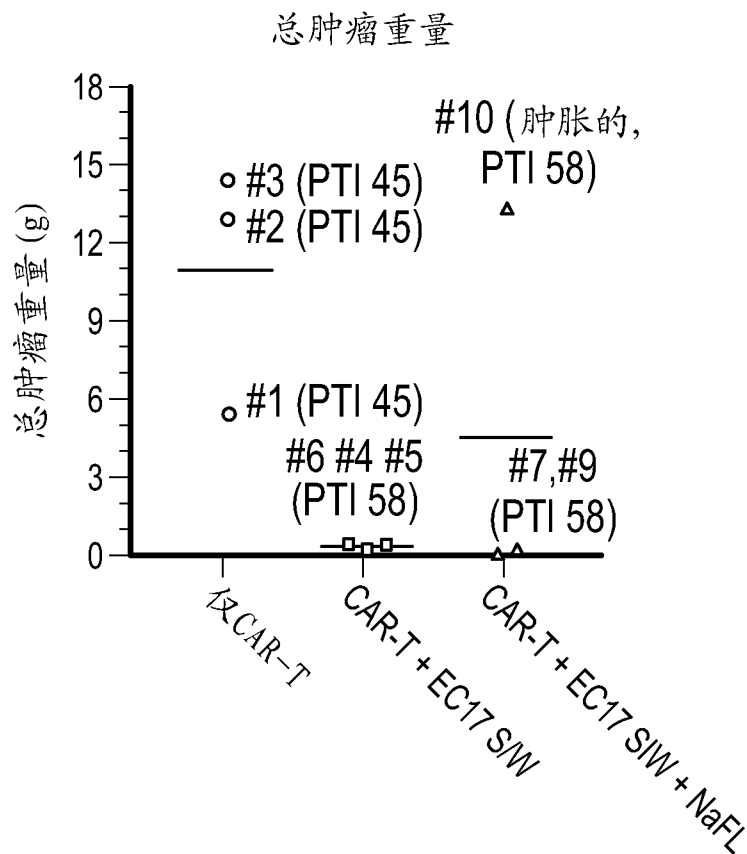


图 57B

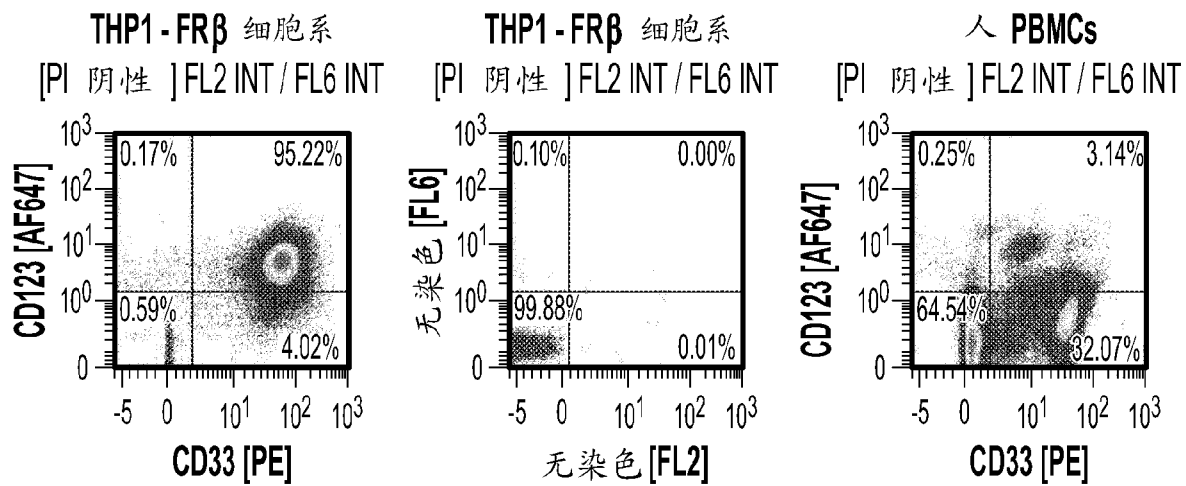


图 58A

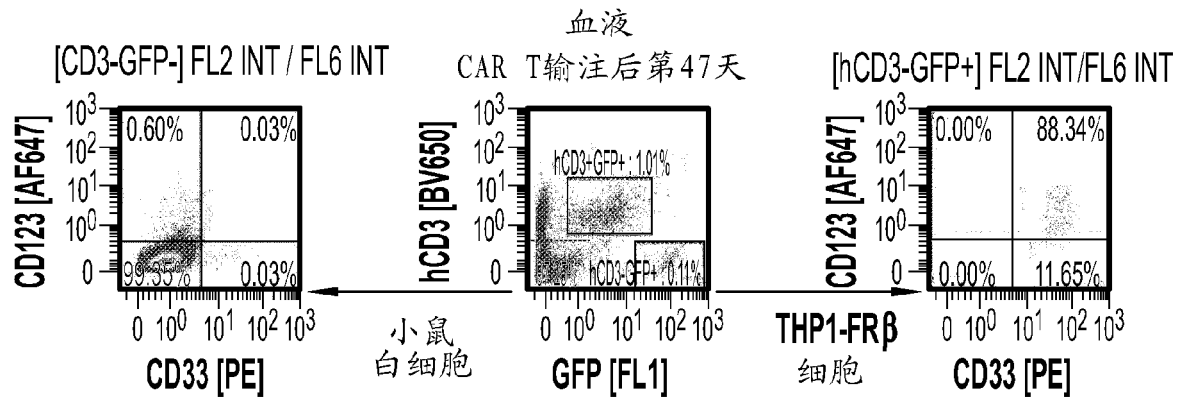


图 58B

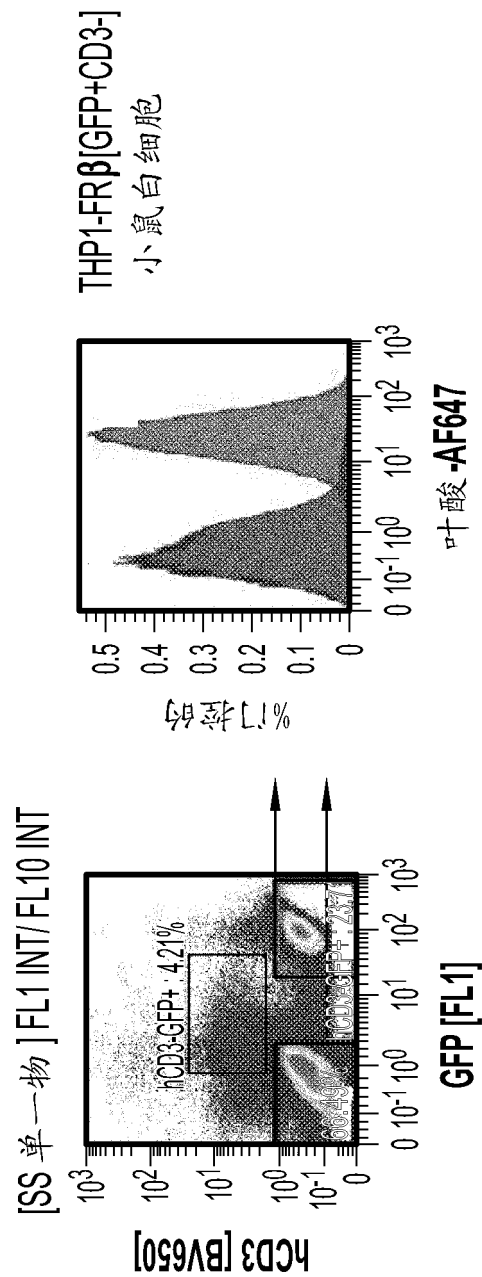


图 59A

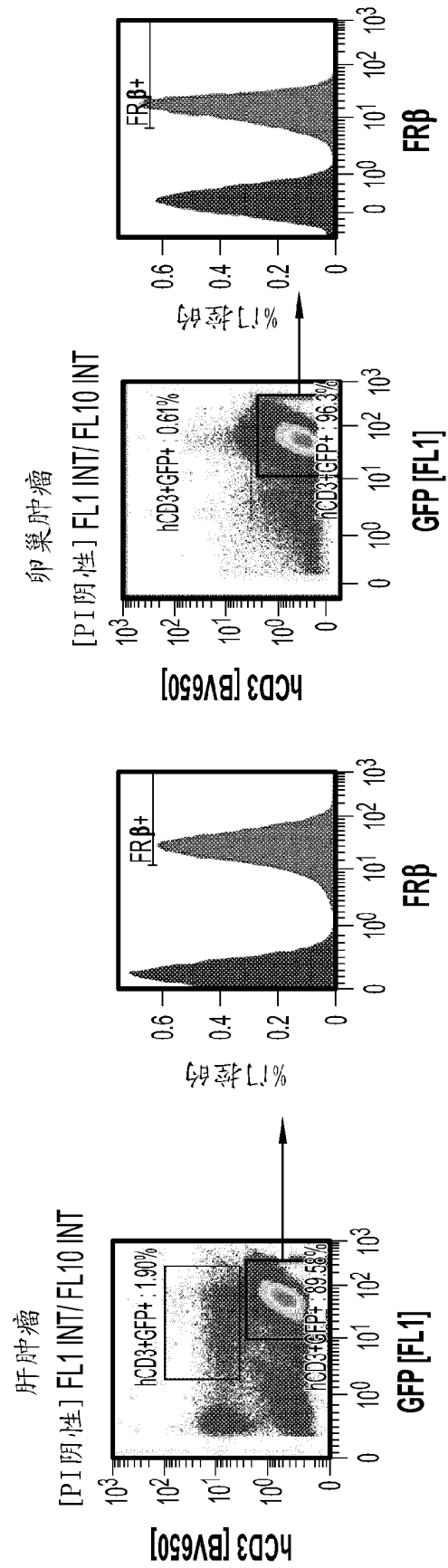


图 59B

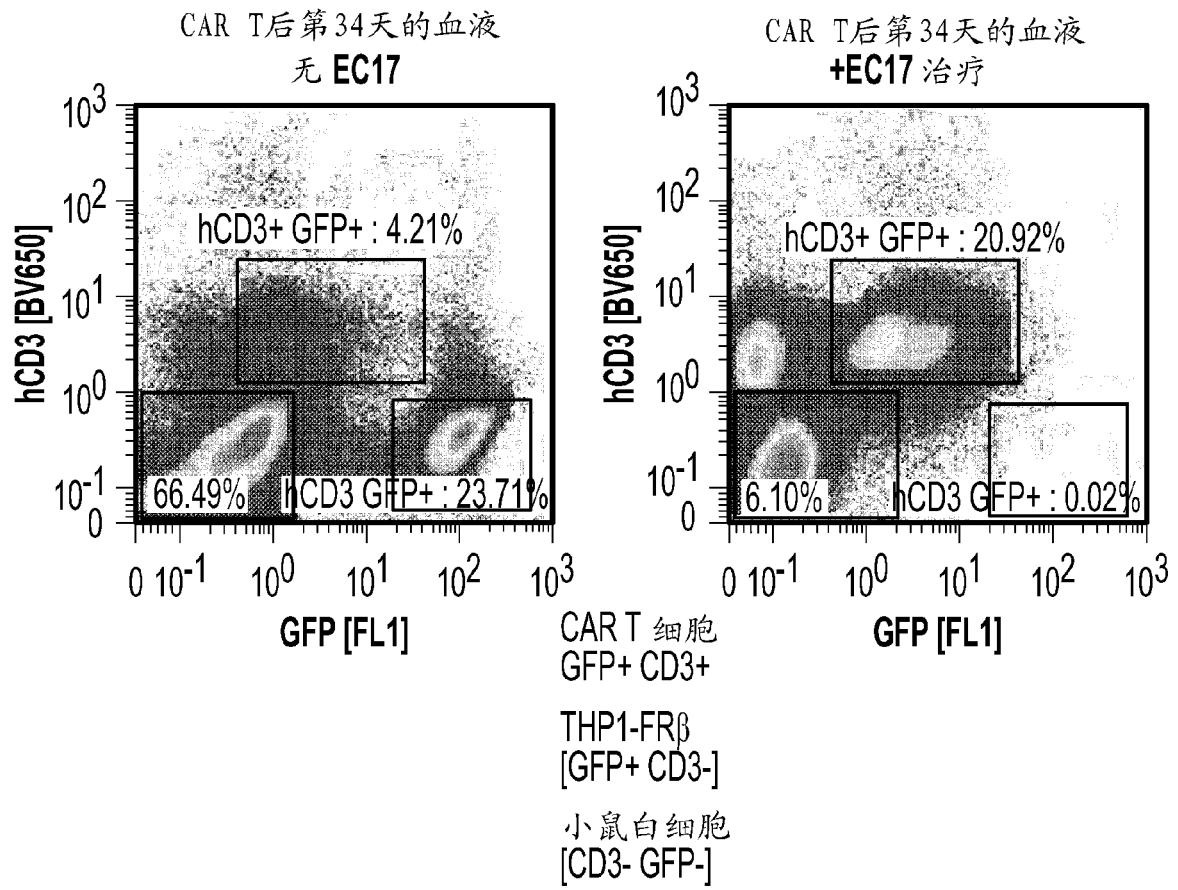


图 60A

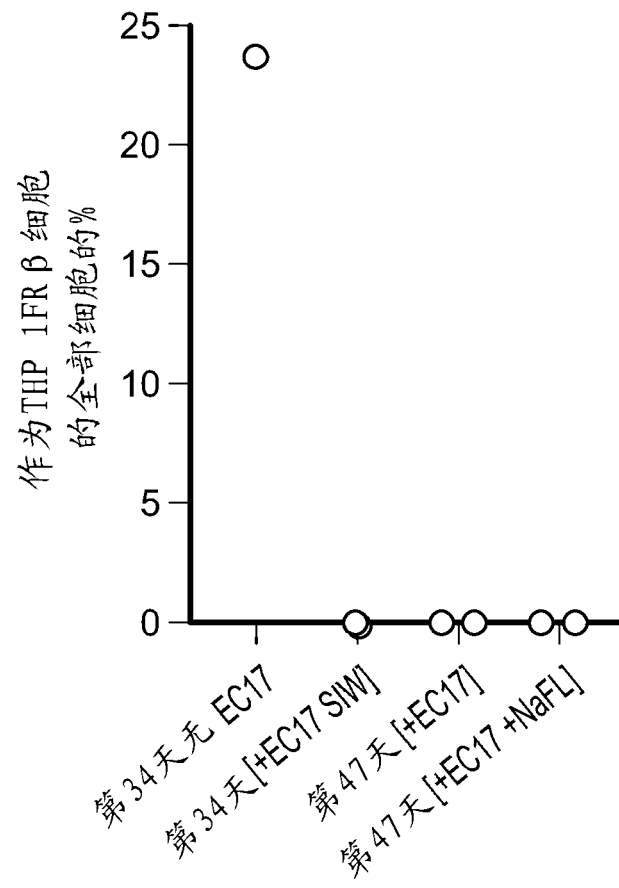


图 60B

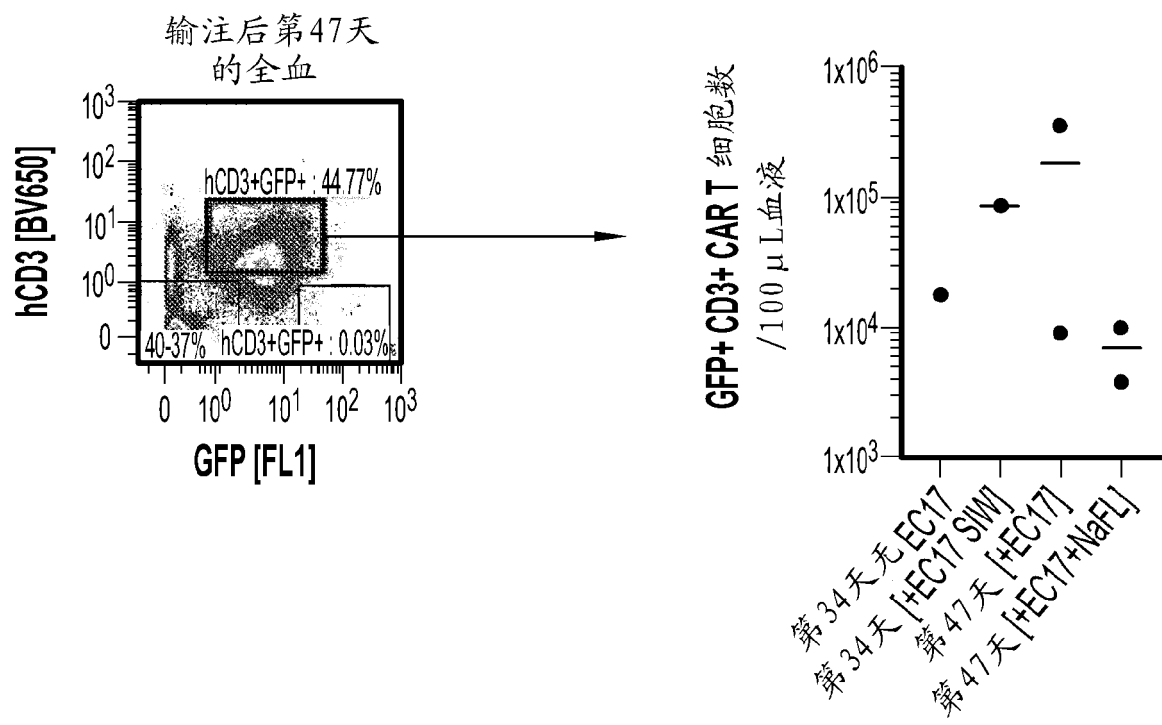


图 61A

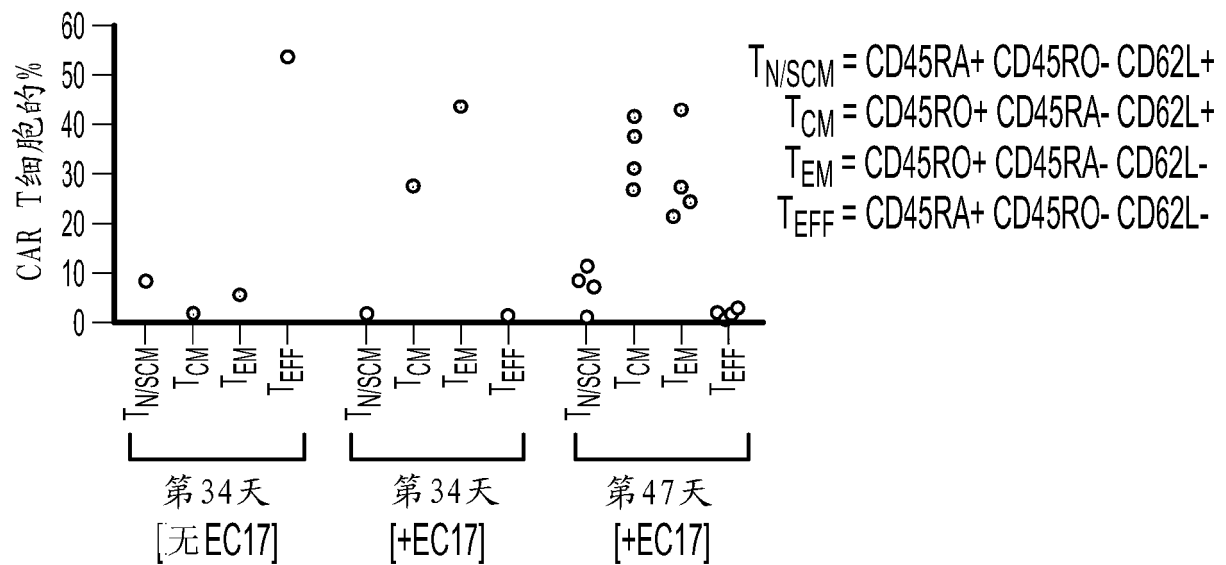


图 61B

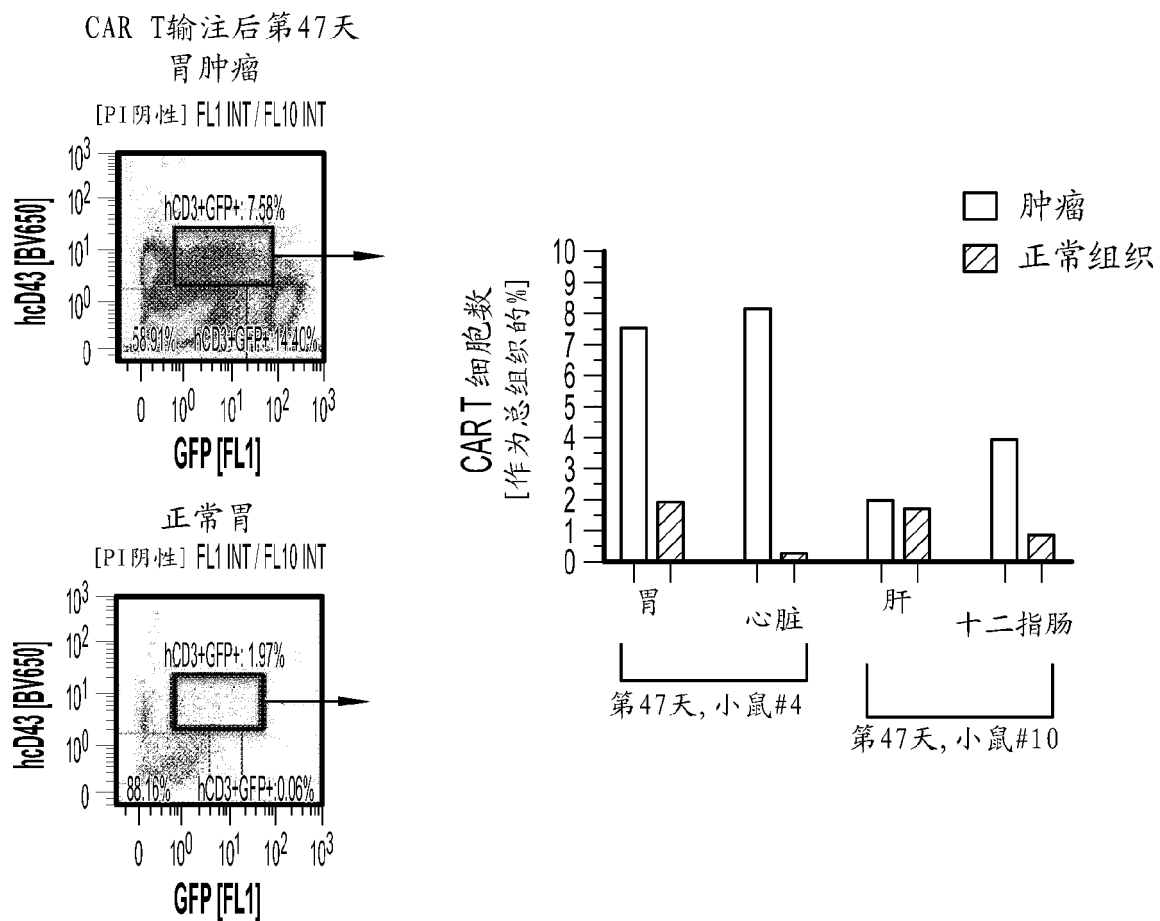


图 62A

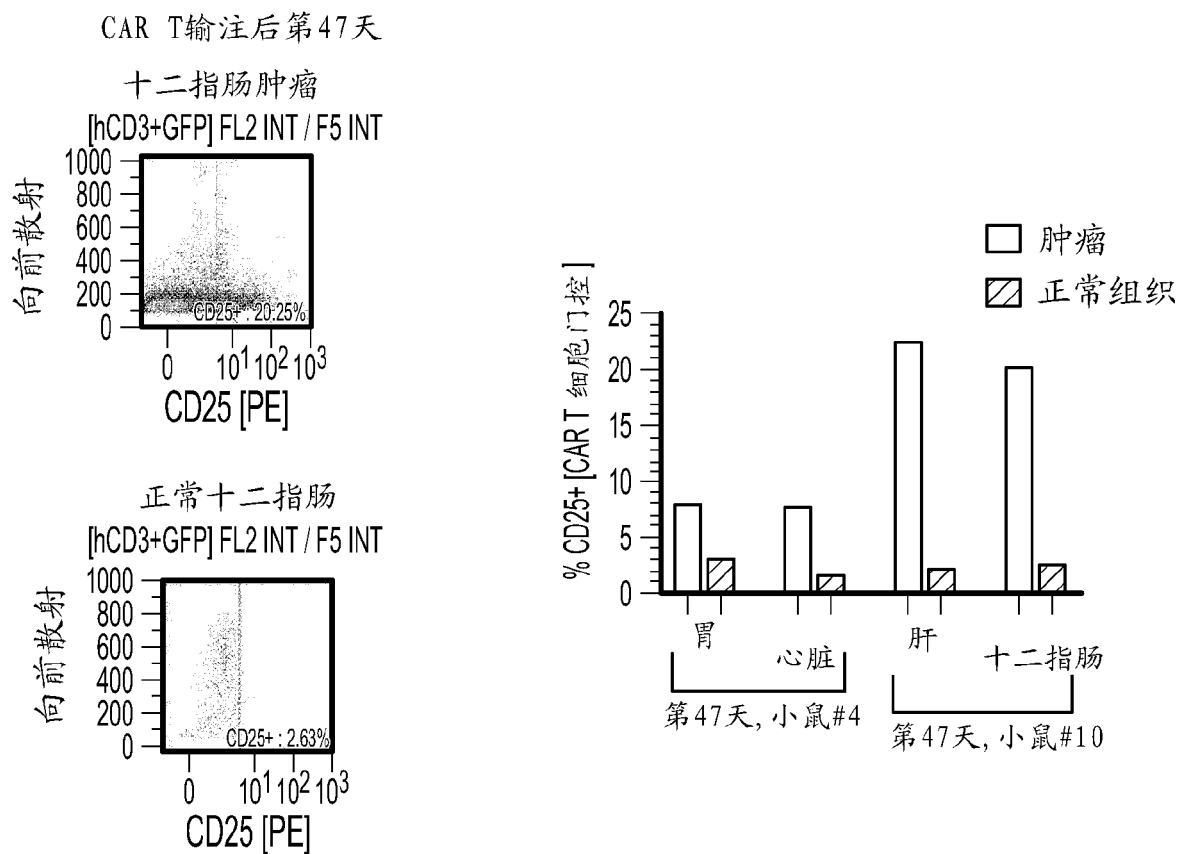


图 62B

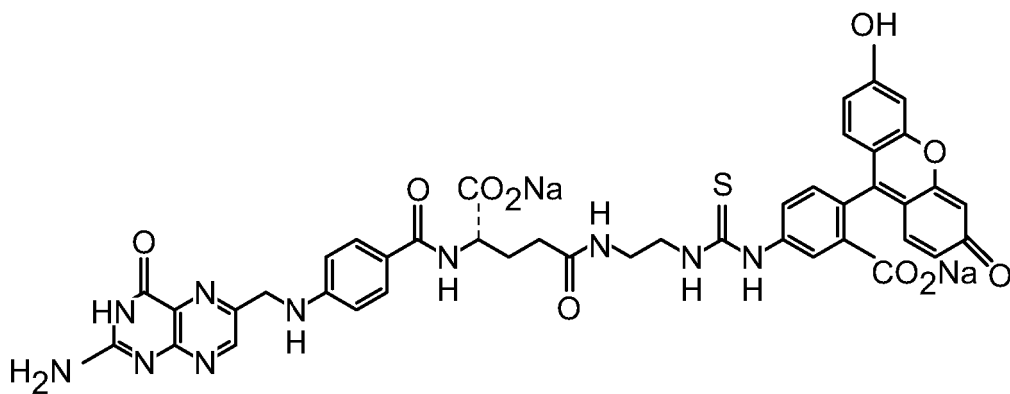


图 63A

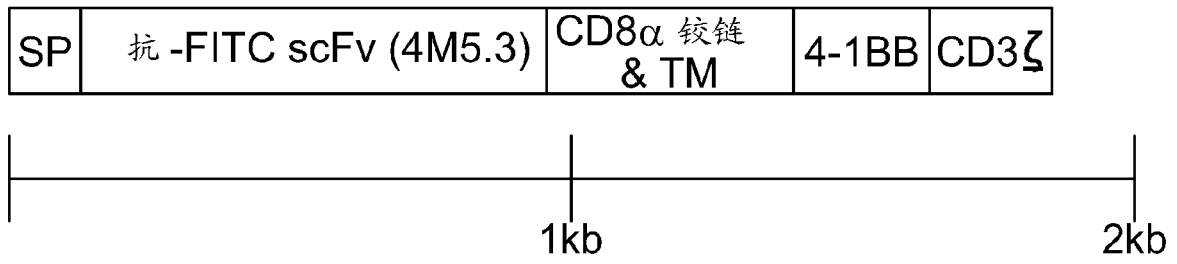


图 63B

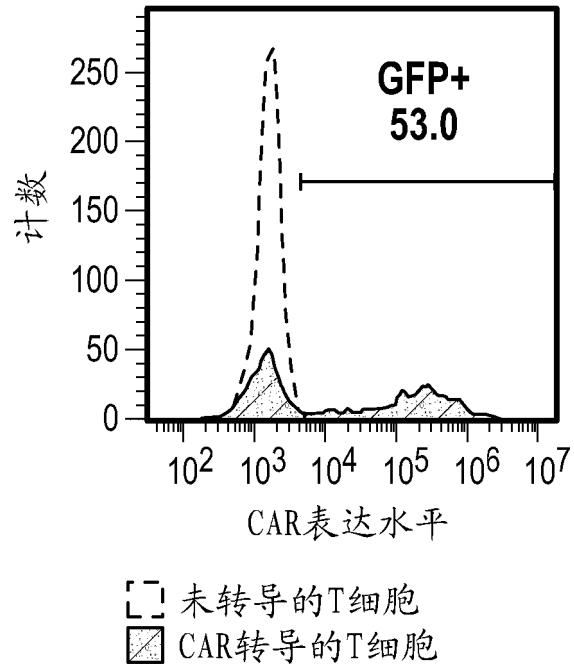


图 63C

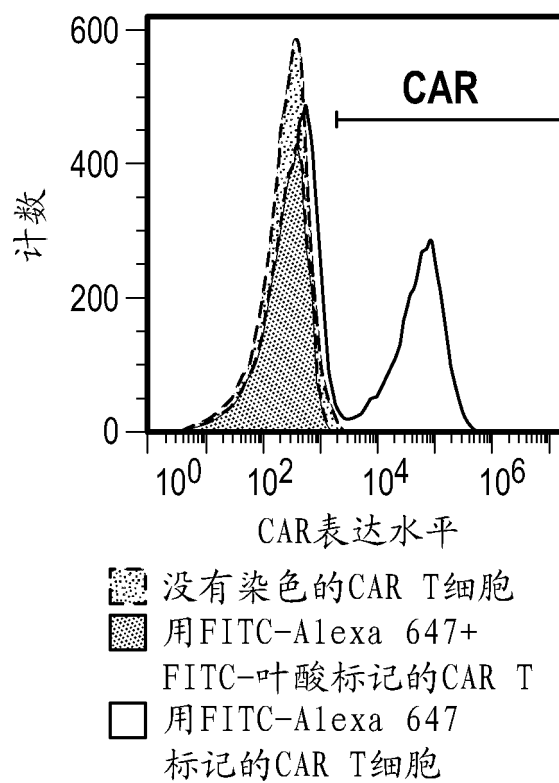
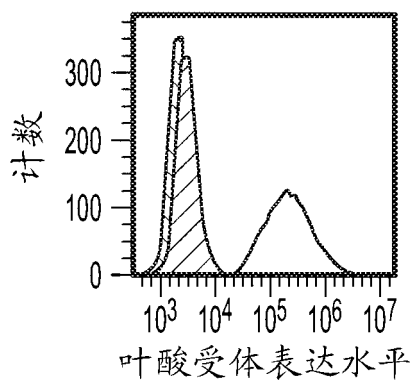


图 63D



- 没有染色的KB细胞
- 用FITC-叶酸+游离叶酸标记的KB细胞(竞争)
- 用FITC-叶酸标记的KB细胞

图 64A

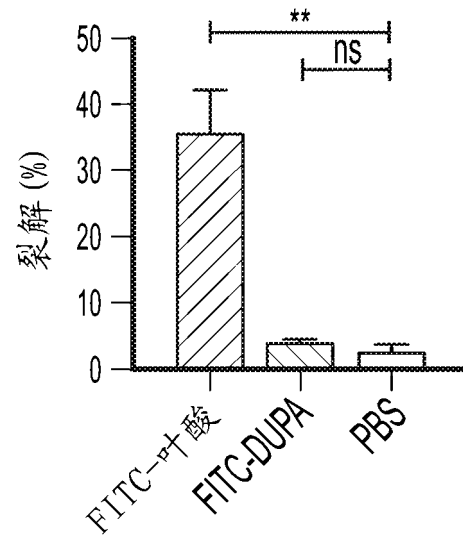


图 64B

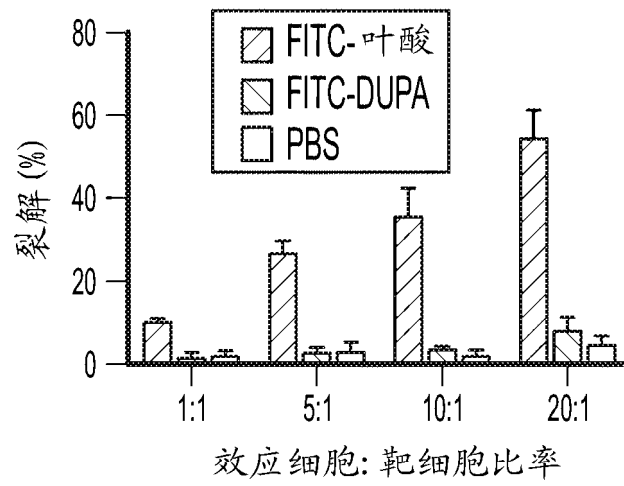


图 64C

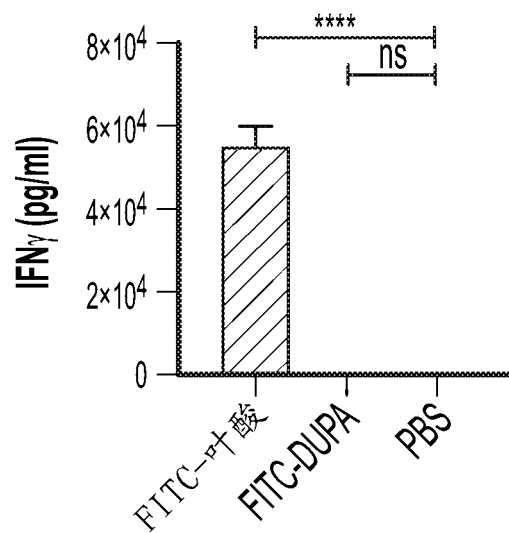


图 64D

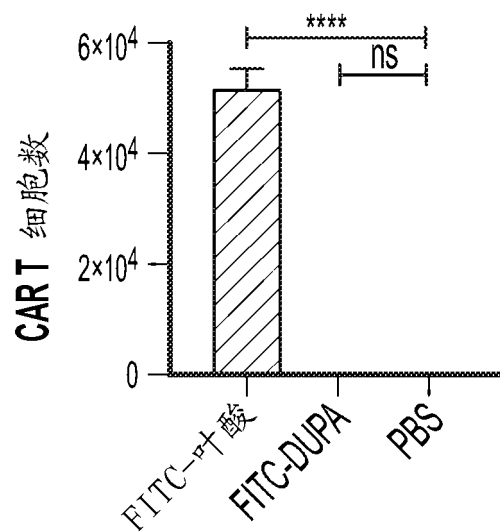


图 64E

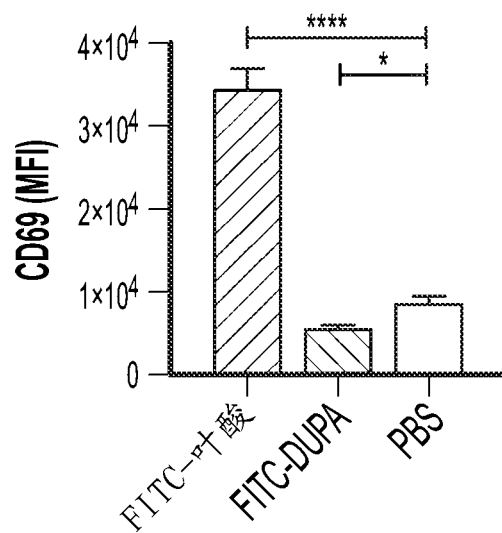


图 64F

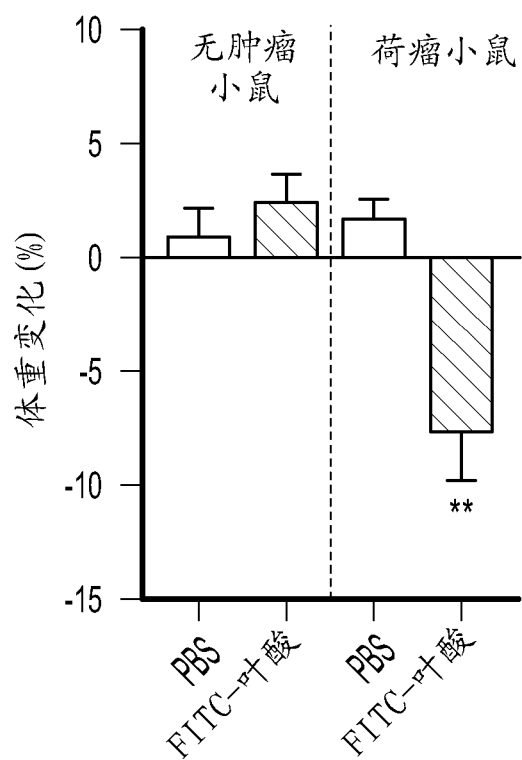


图 65A

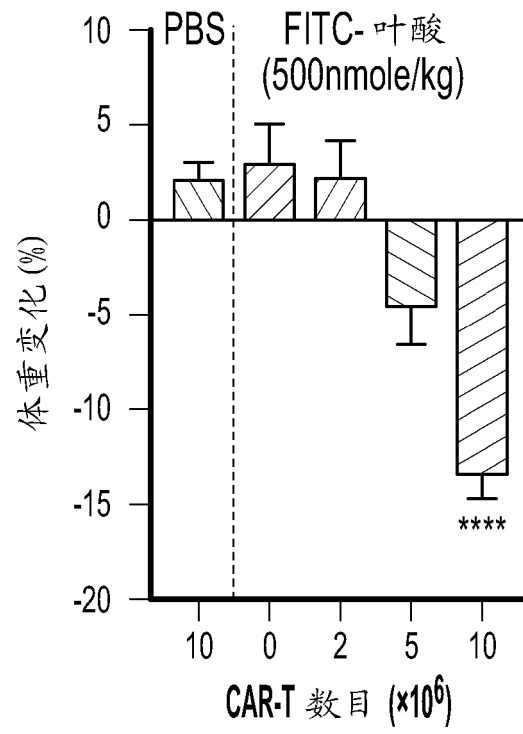


图 65B

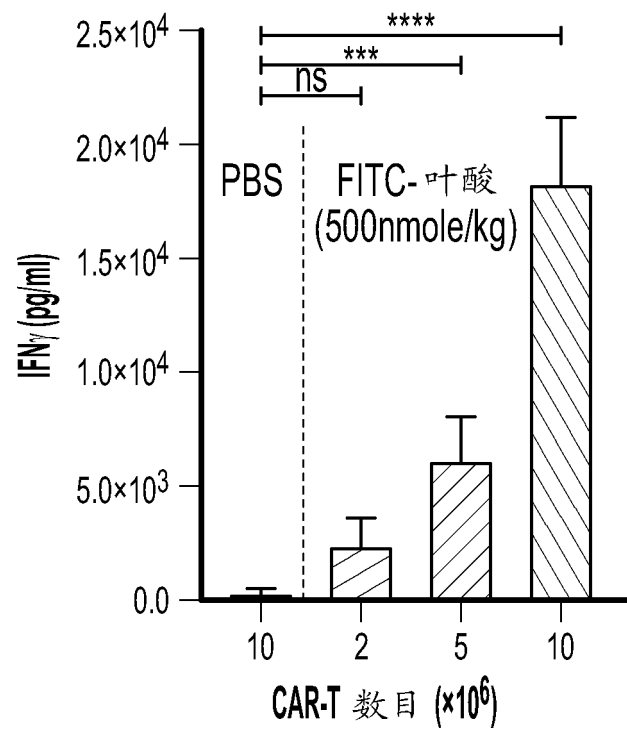


图 65C

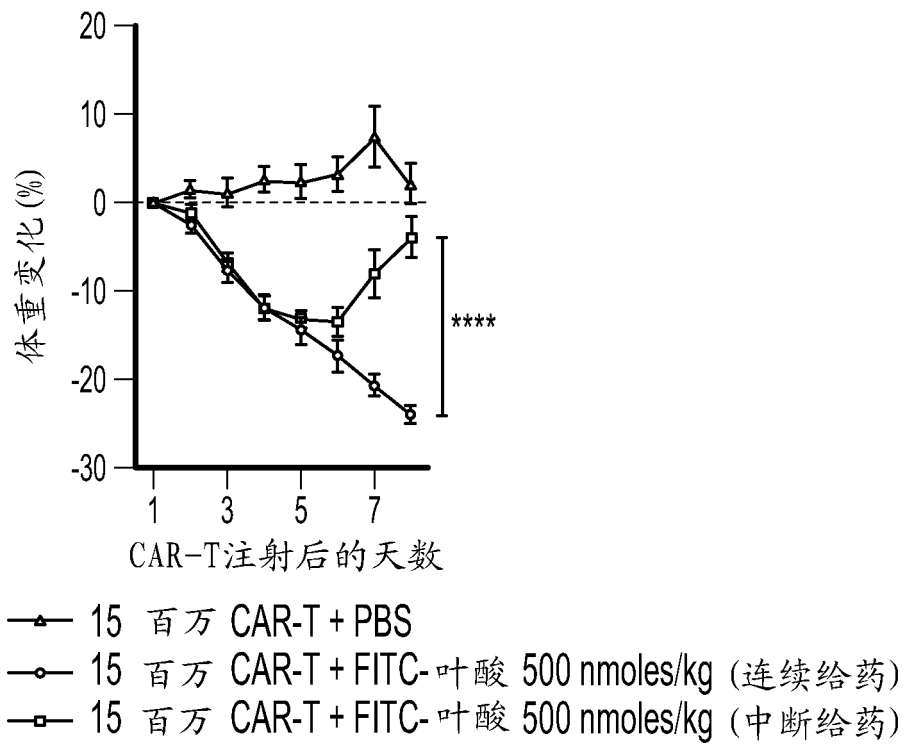


图 66A

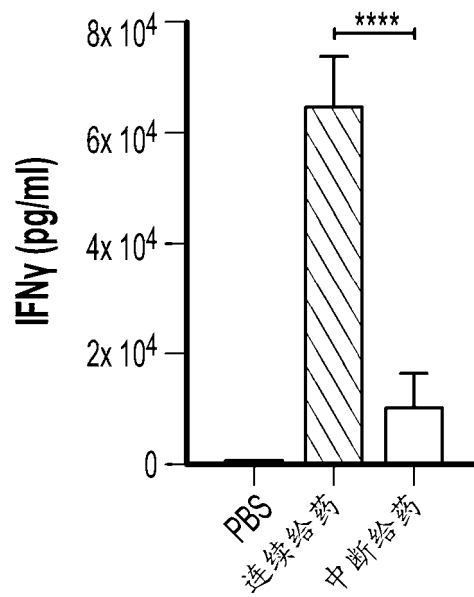


图 66B

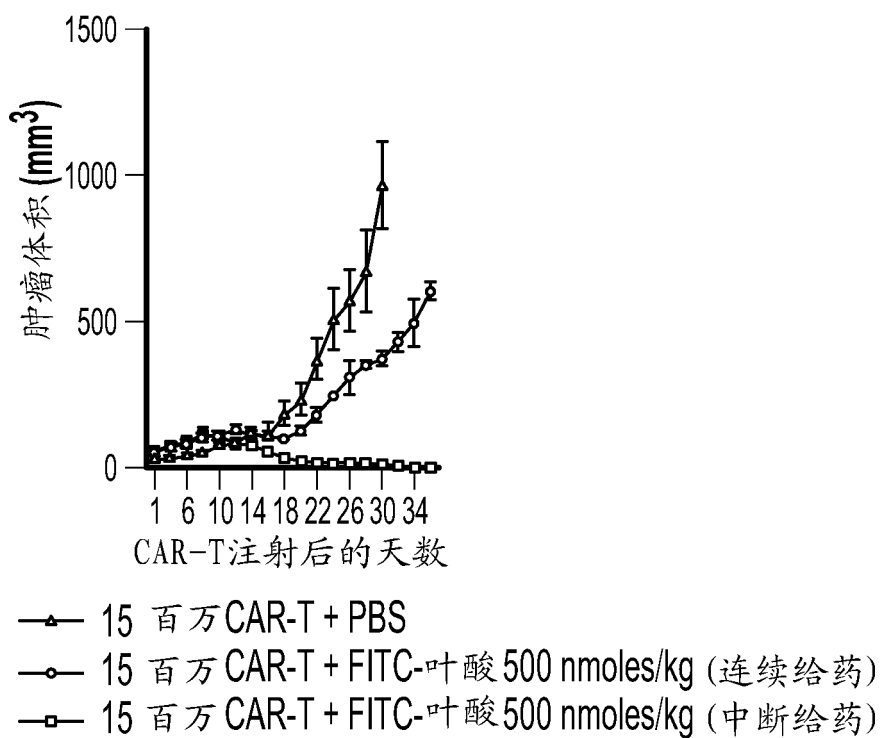


图 66C

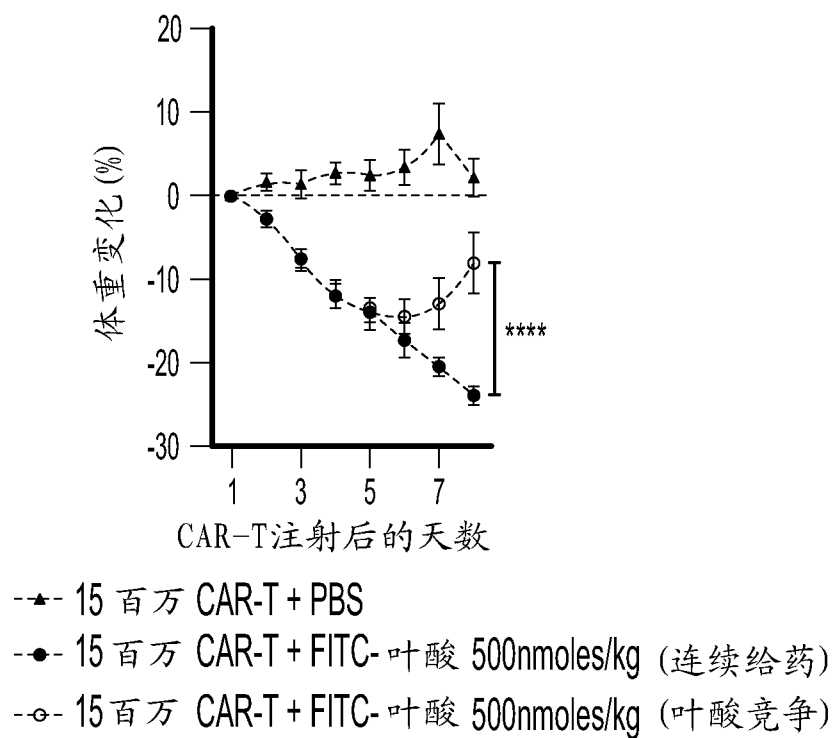


图 67A

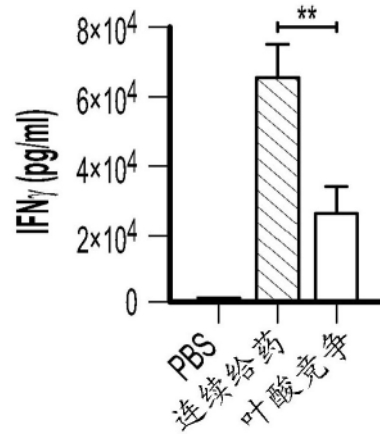
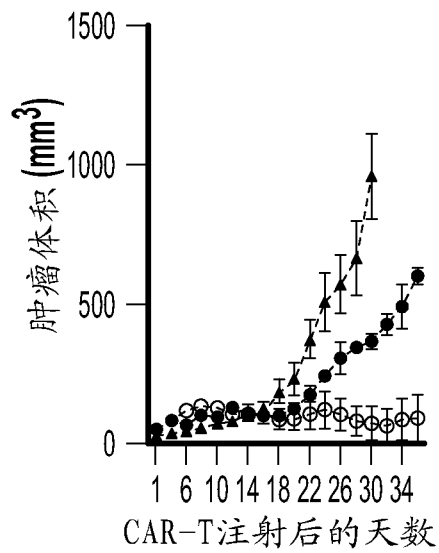


图 67B



- ▲-- 15 百万 CAR-T + PBS
- 15 百万 CAR-T + FITC- 叶酸 500nmol/kg (连续给药)
- 15 百万 CAR-T + FITC- 叶酸 500nmol/kg (叶酸竞争)

图 67C

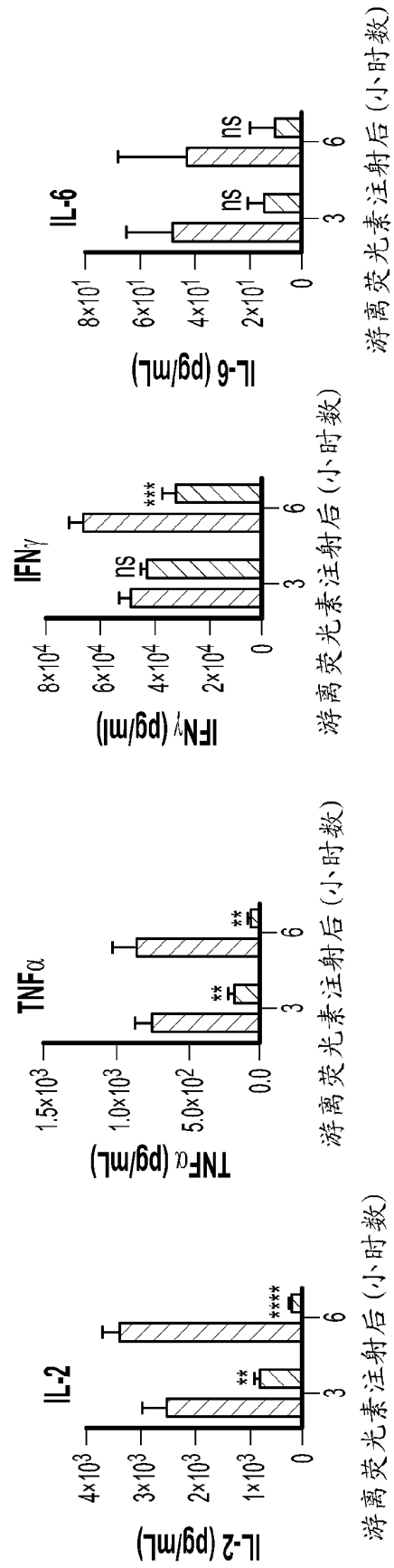


图 67D

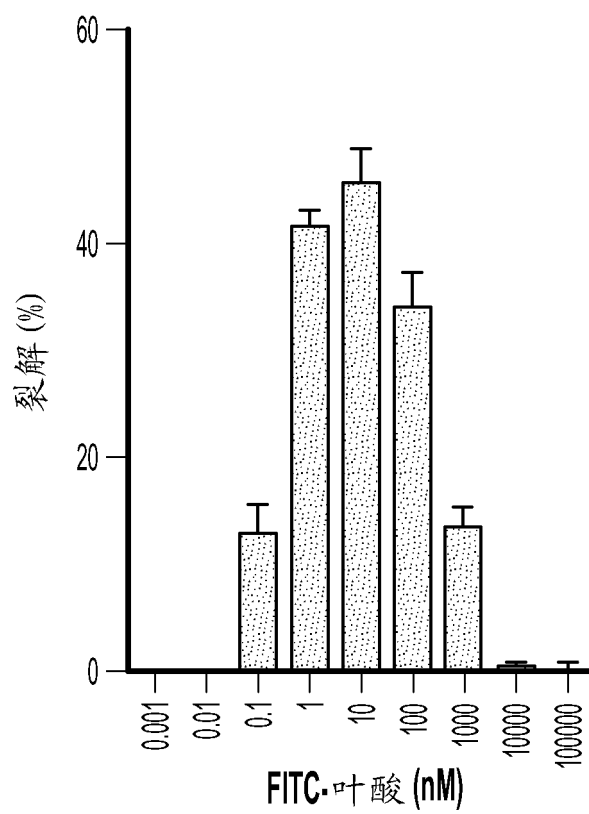


图 68A

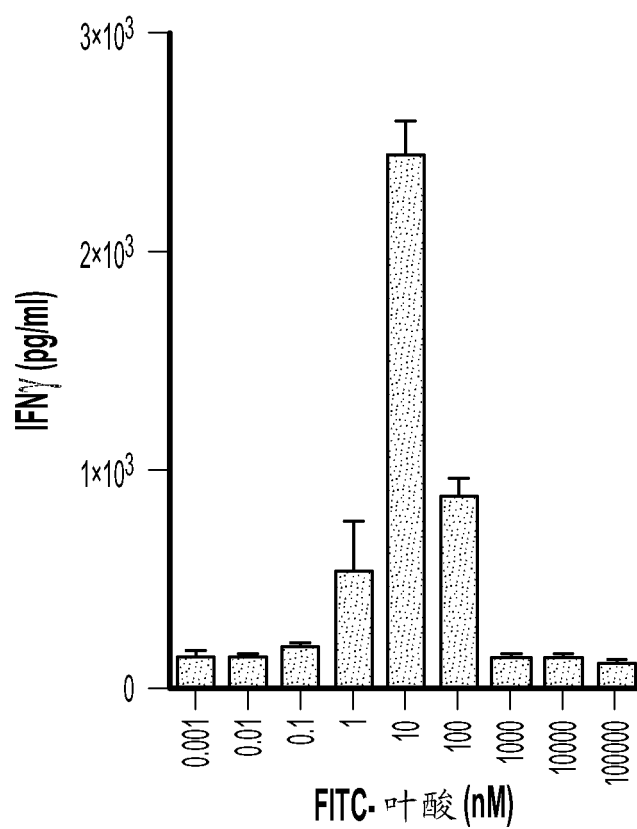


图 68B

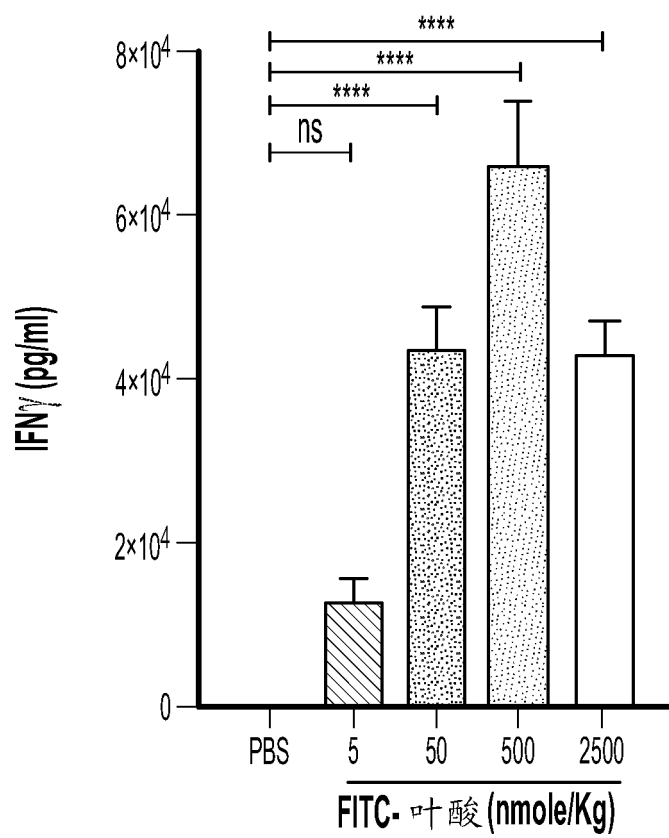


图 68C

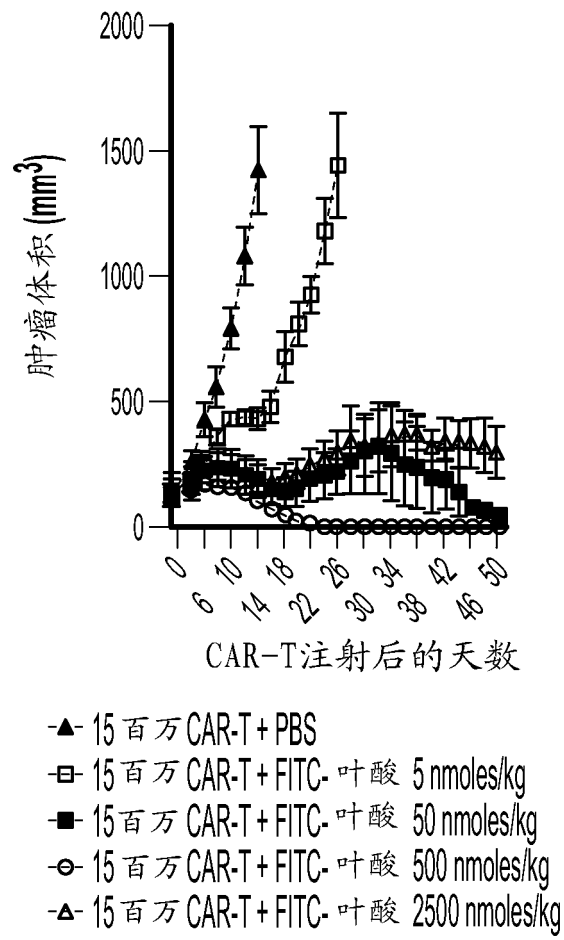


图 68D

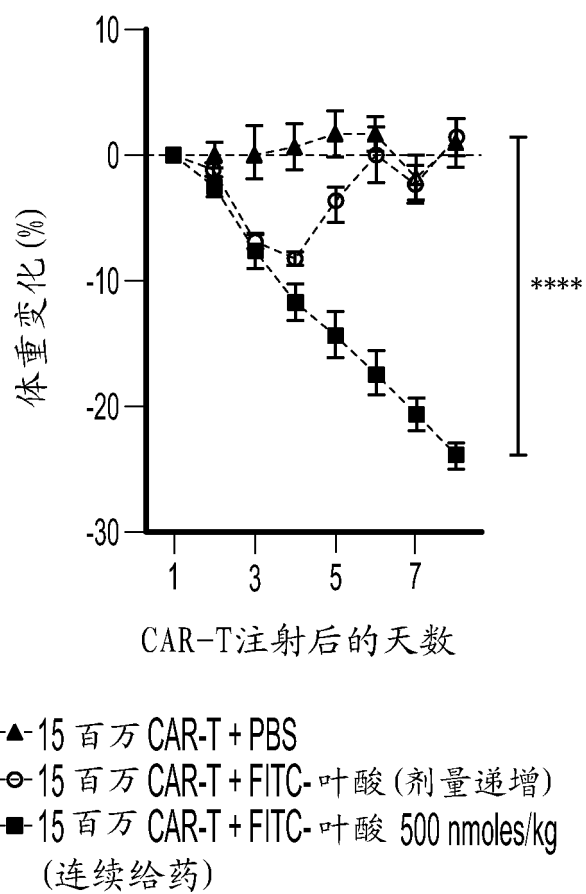


图 69A

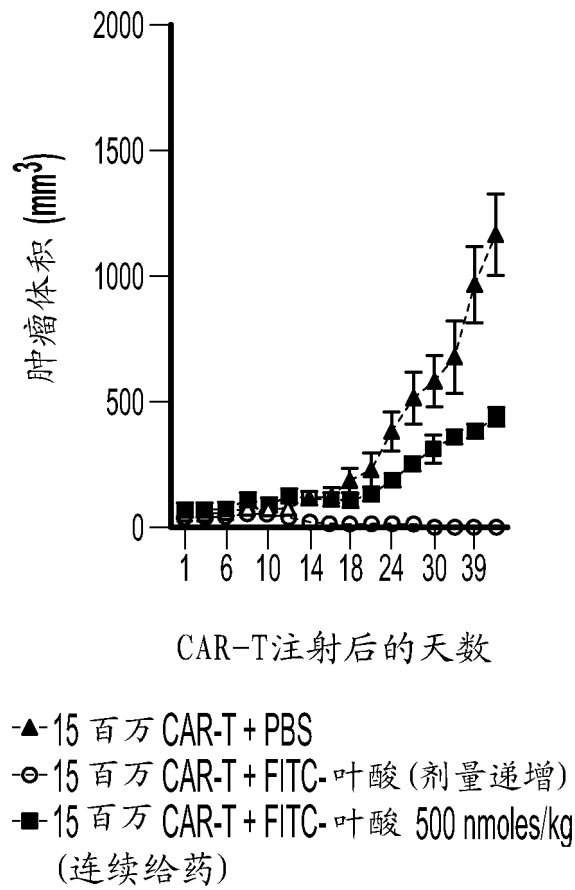


图 69B

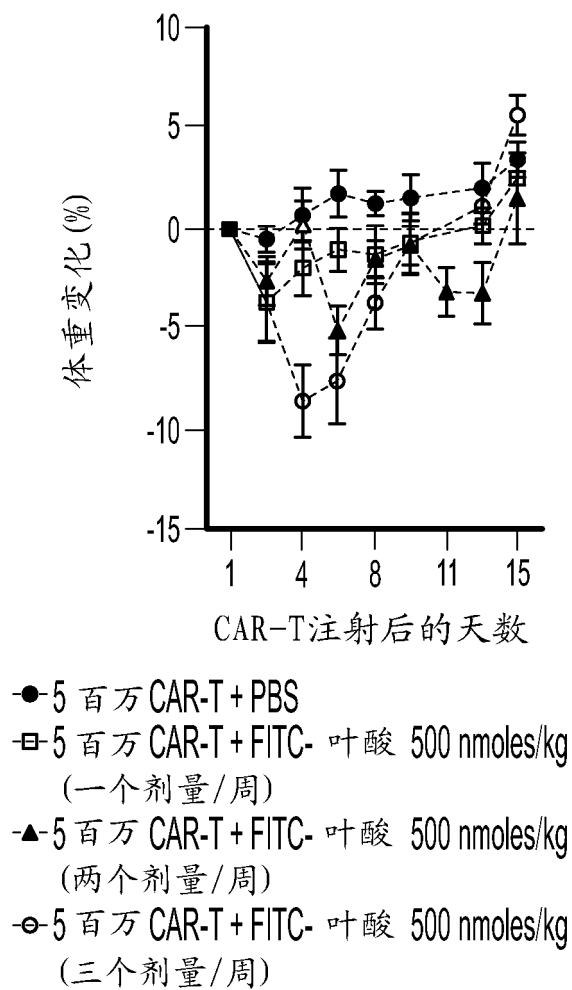


图 69C

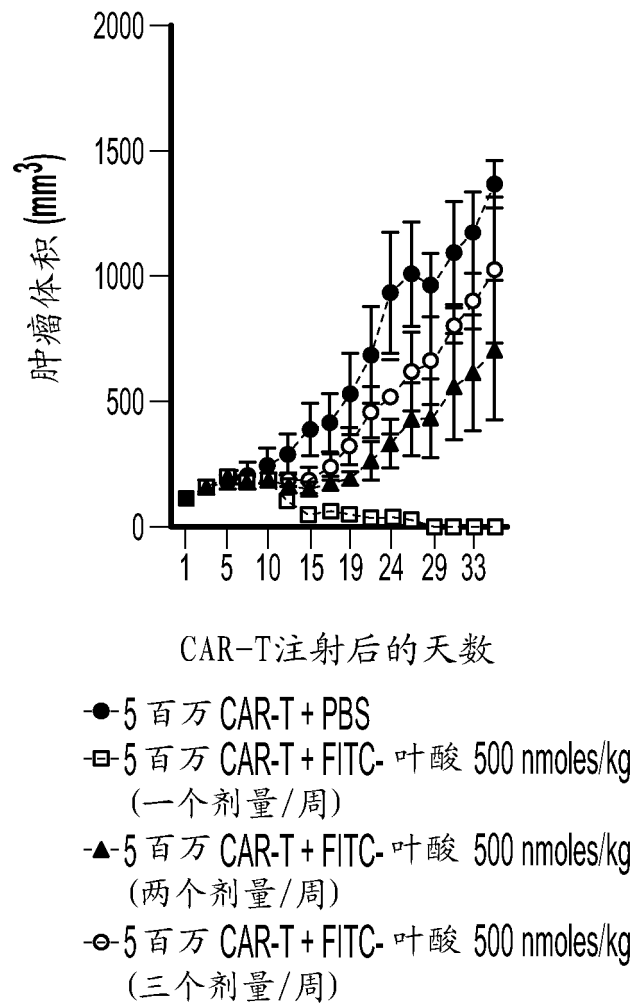
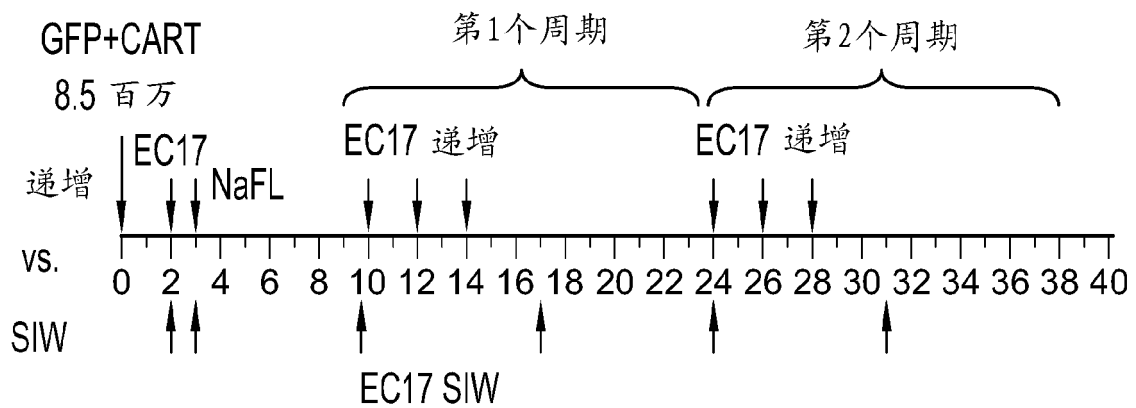


图 69D



第2天: 500 nmol/kg EC17;
 第10天, 第24天: 5 nmol/kg EC17;
 第12天, 第26天: 50 nmol/kg EC17;
 第14天, 第28天: 500 nmol/kg EC17;

图 70A

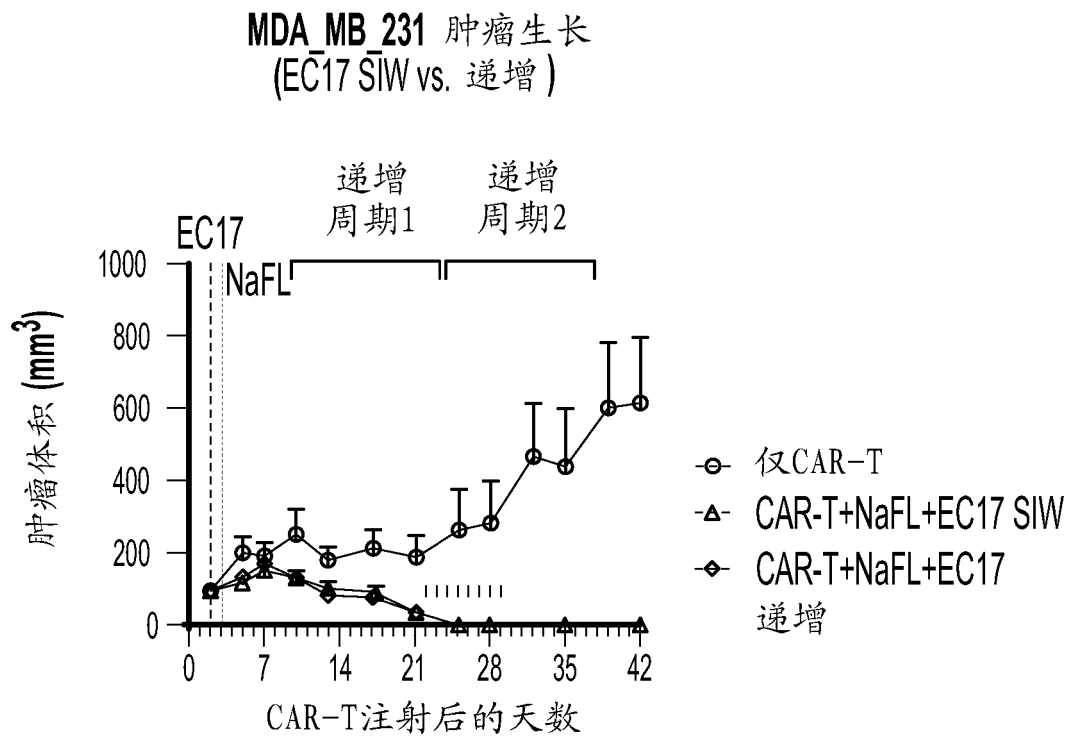


图 70B

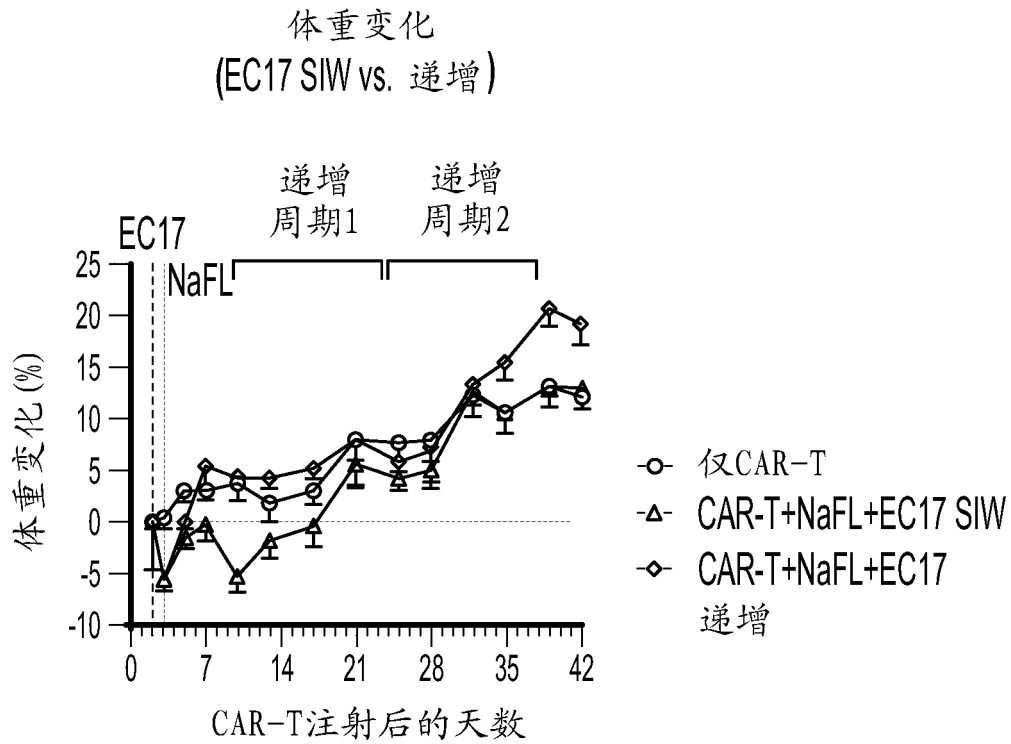


图 70C

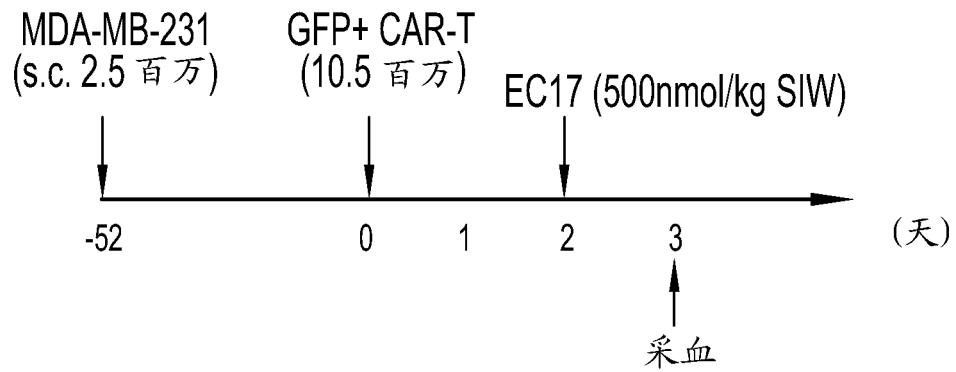


图 71A

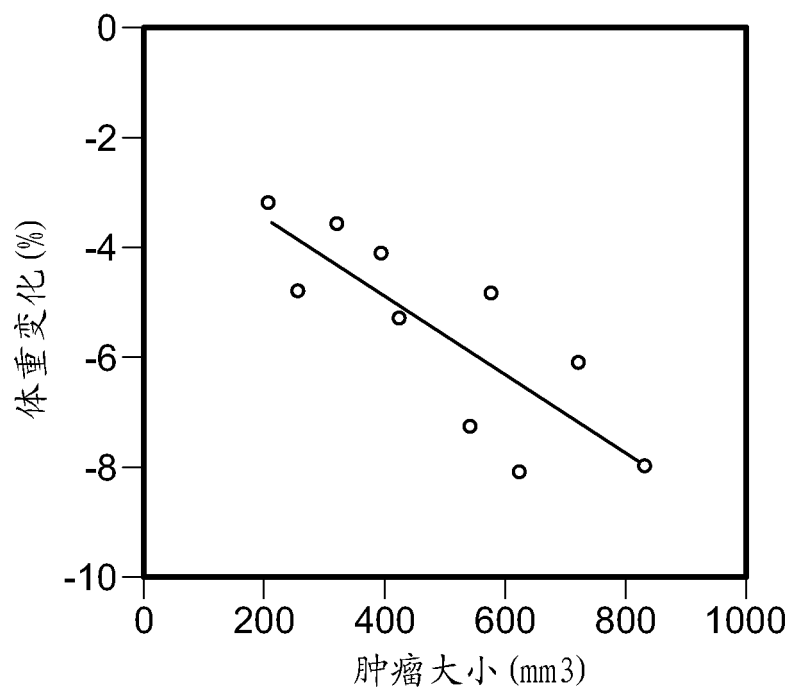


图 71B

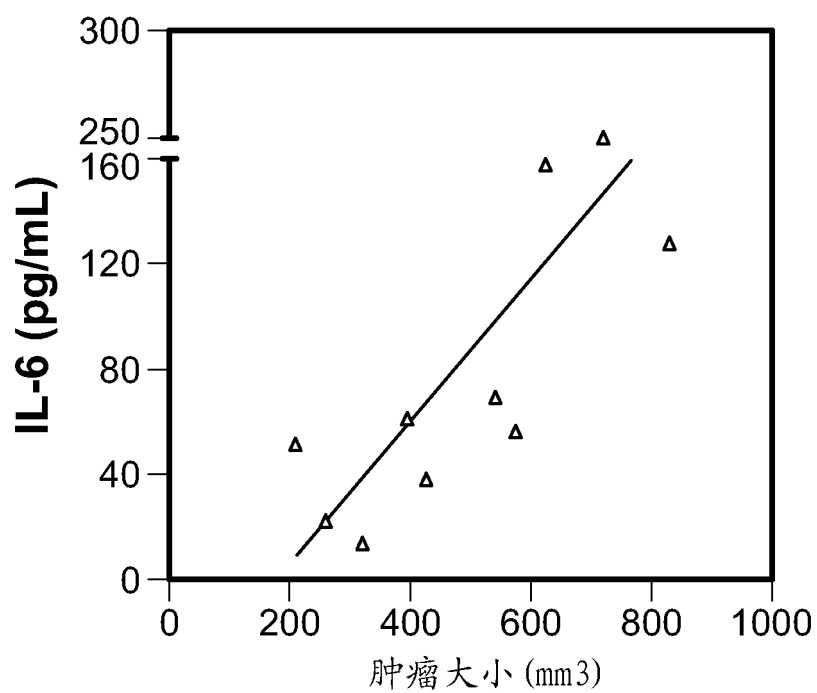


图 71C

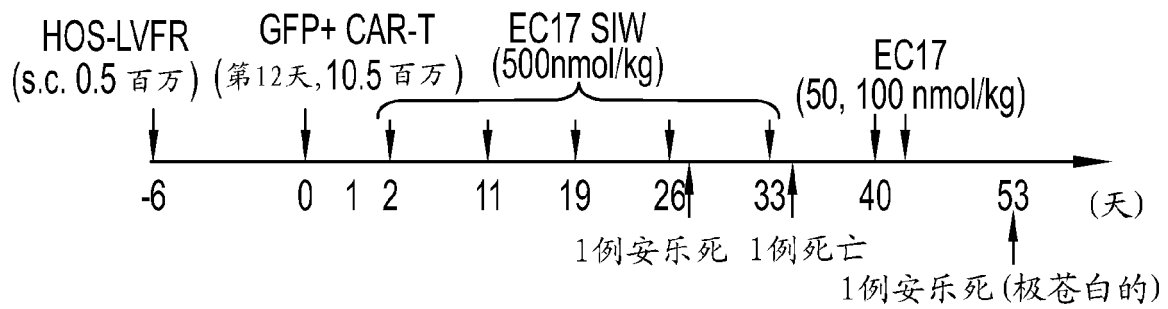


图 72A

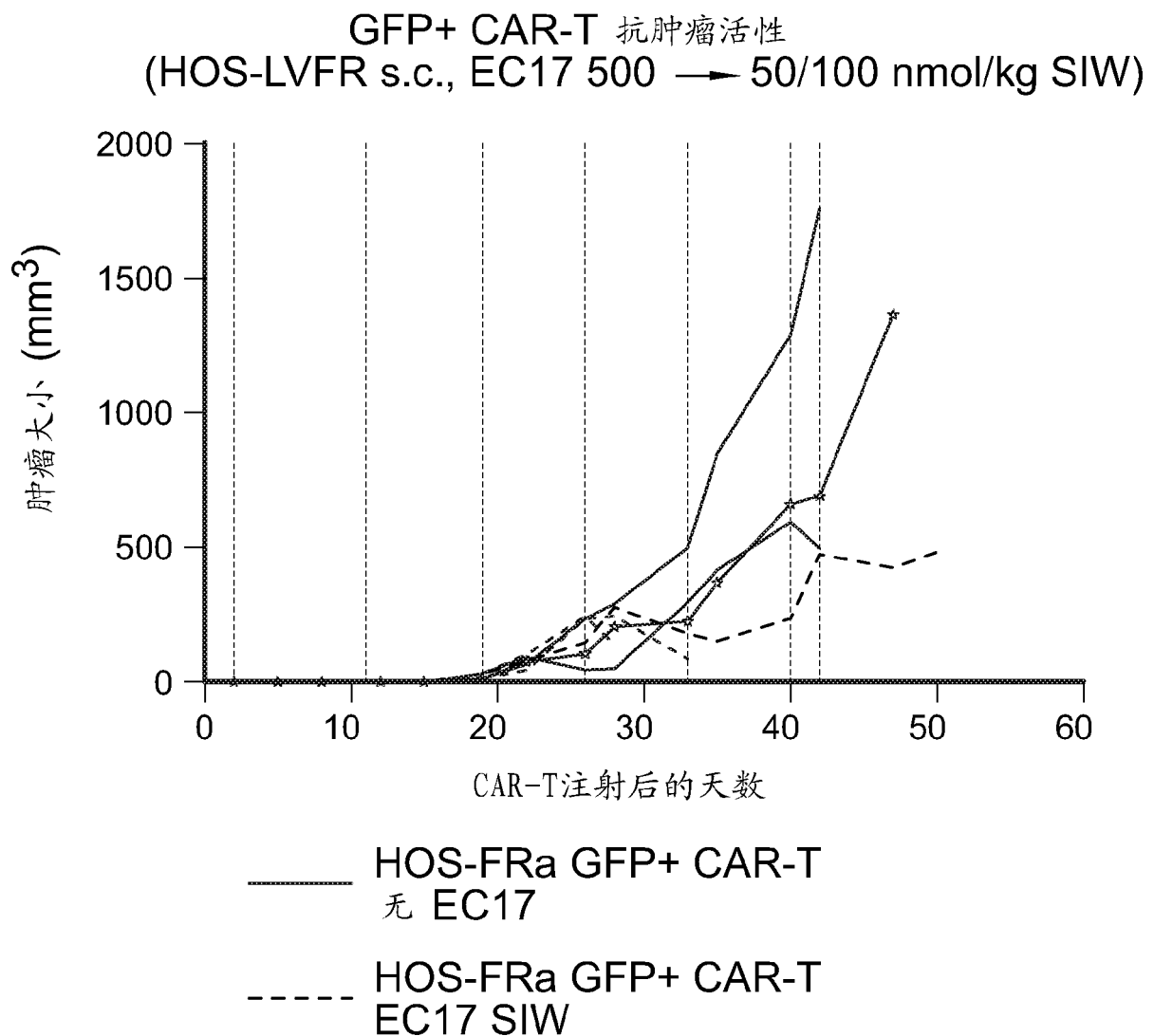


图 72B

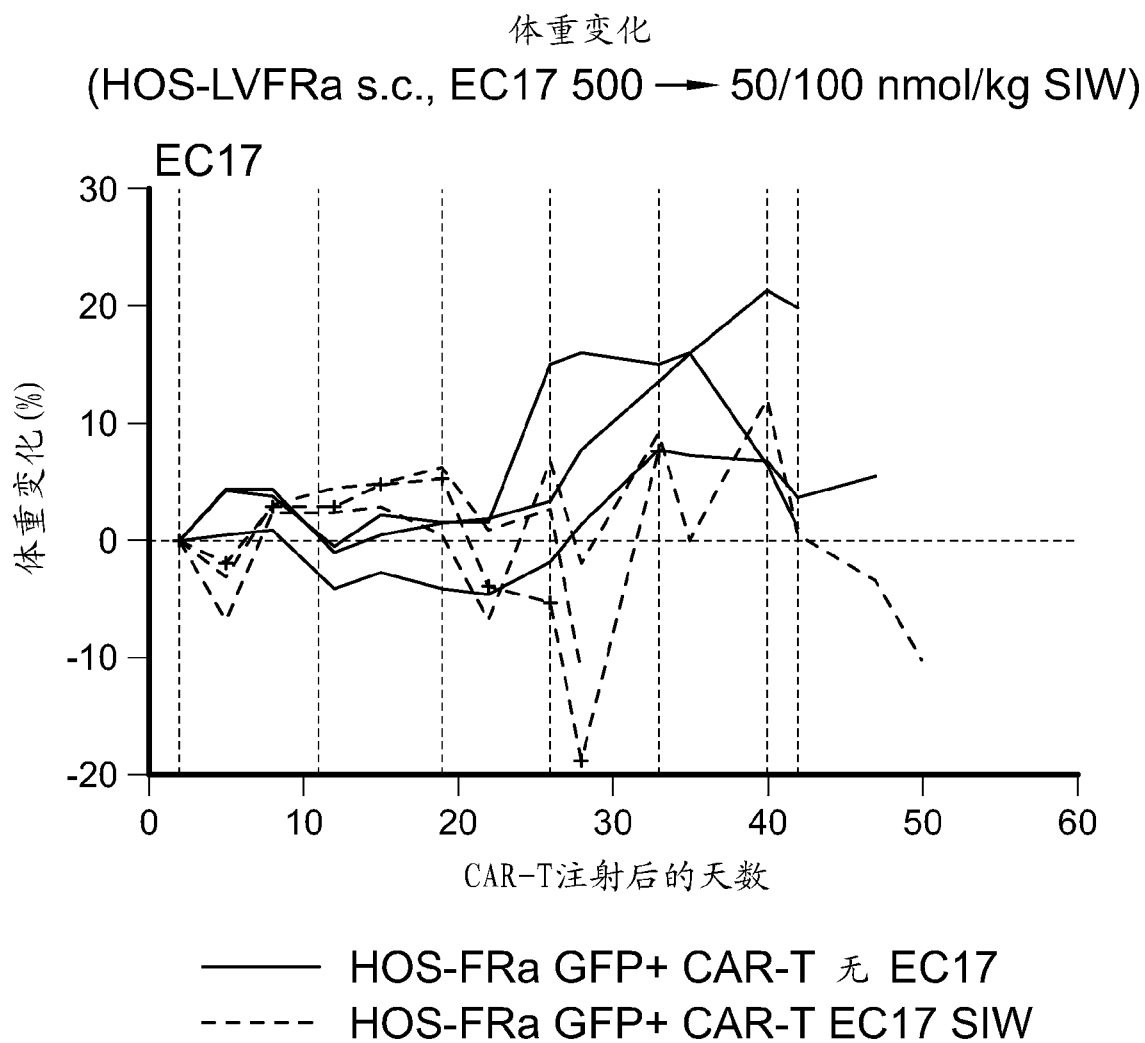


图 73

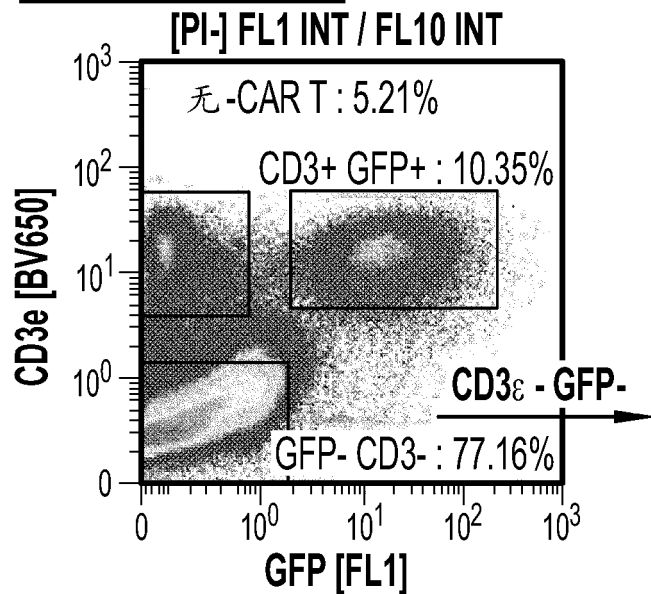
HOS143bLVFRa 肿瘤

图 74A

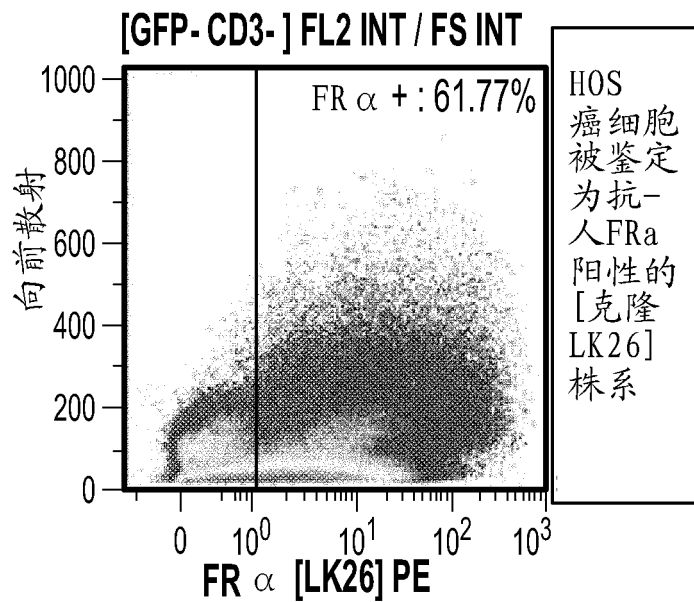


图 74B

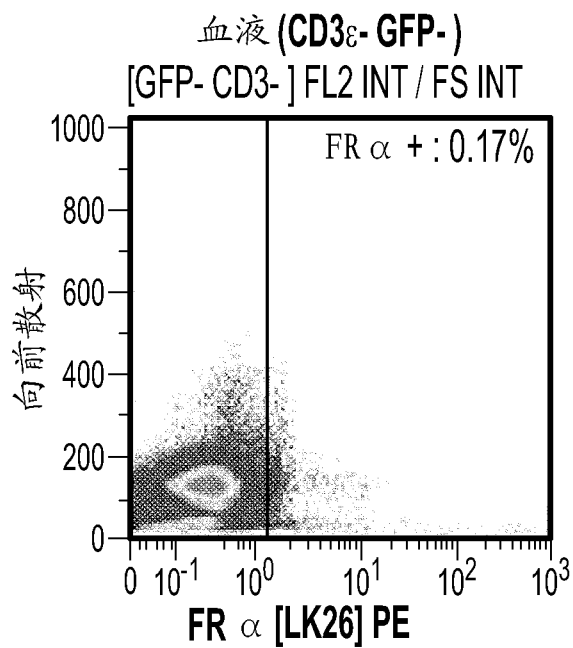


图 74C

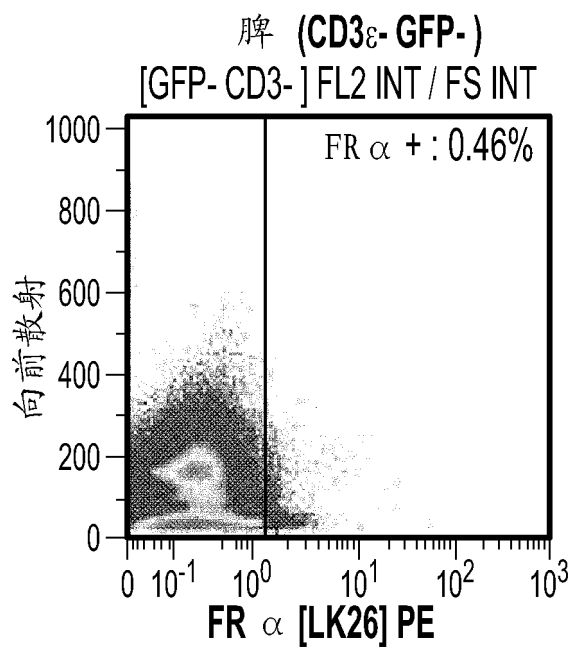


图 74D

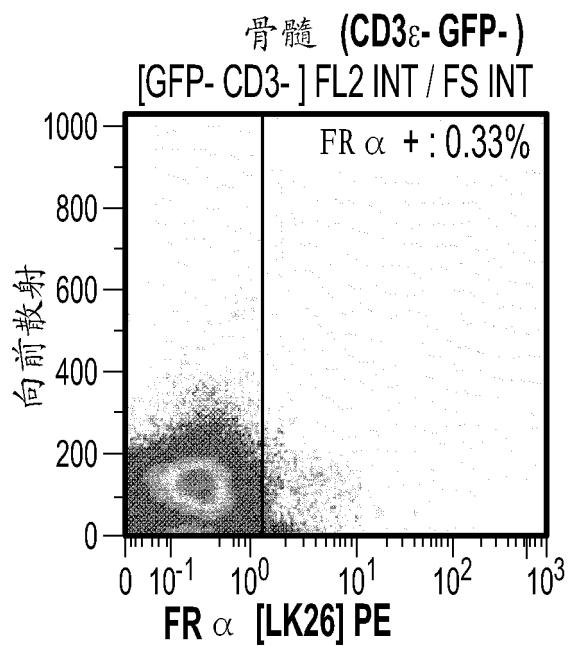


图 74E

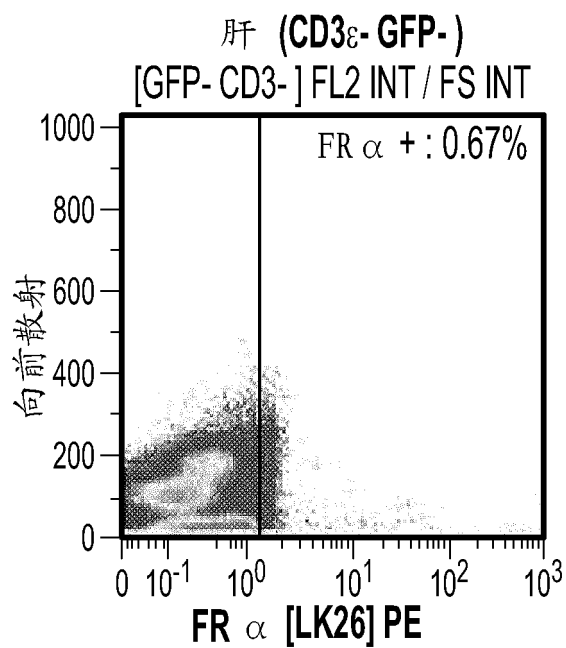


图 74F

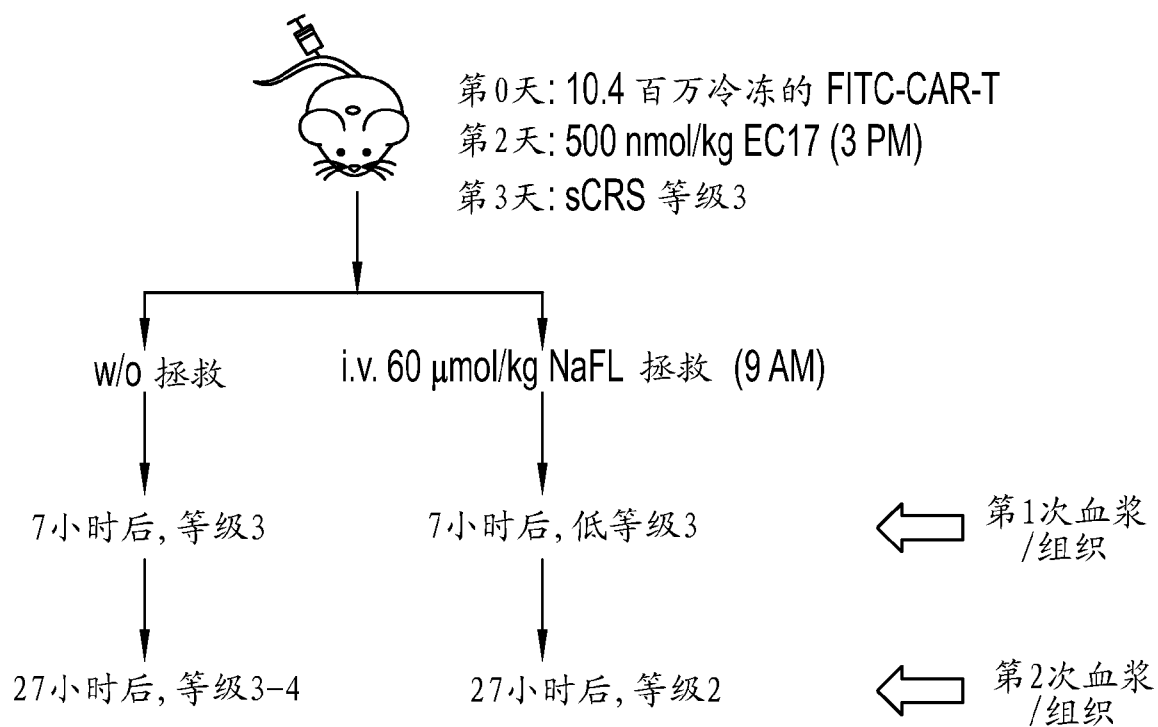


图 75

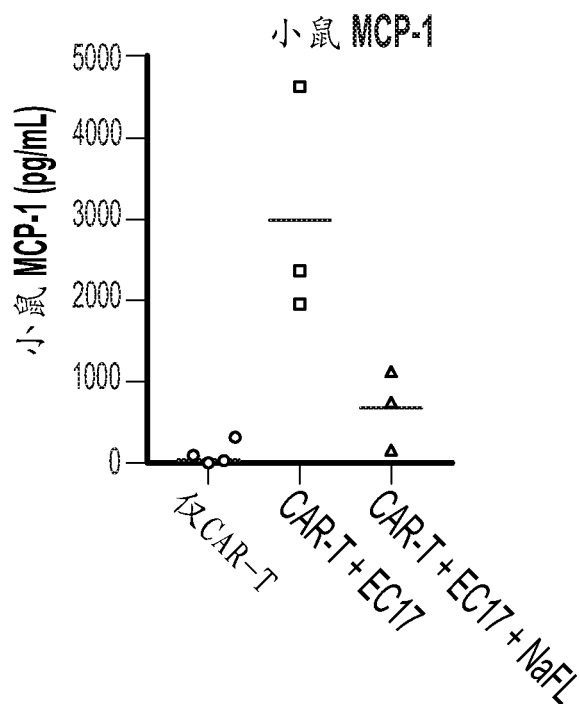


图 76A

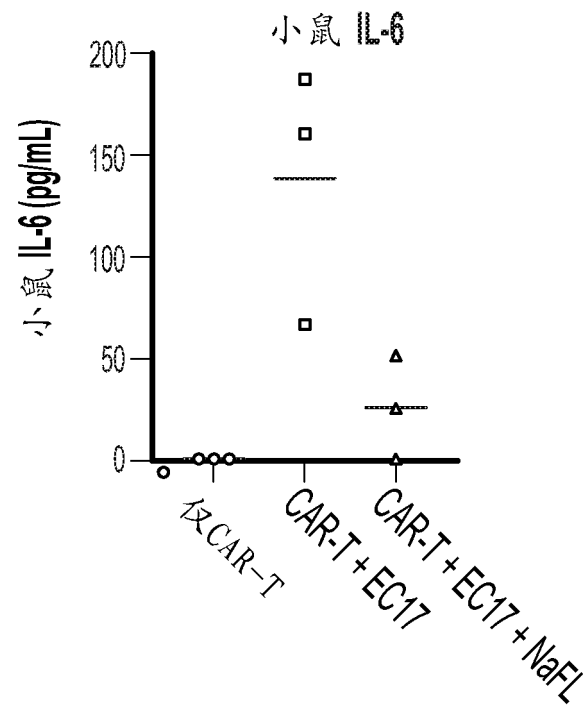


图 76B

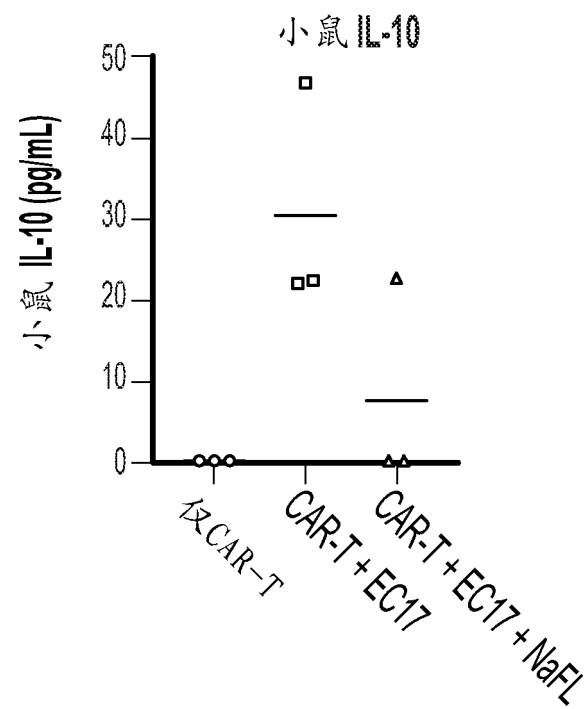


图 76C

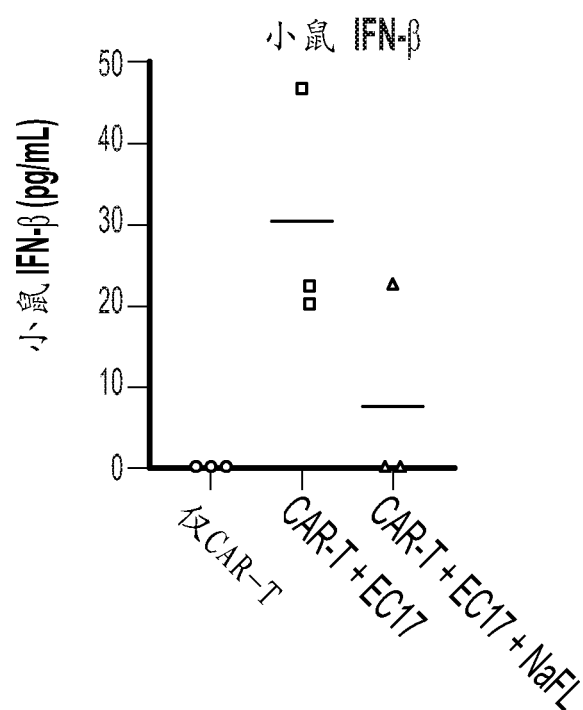


图 76D

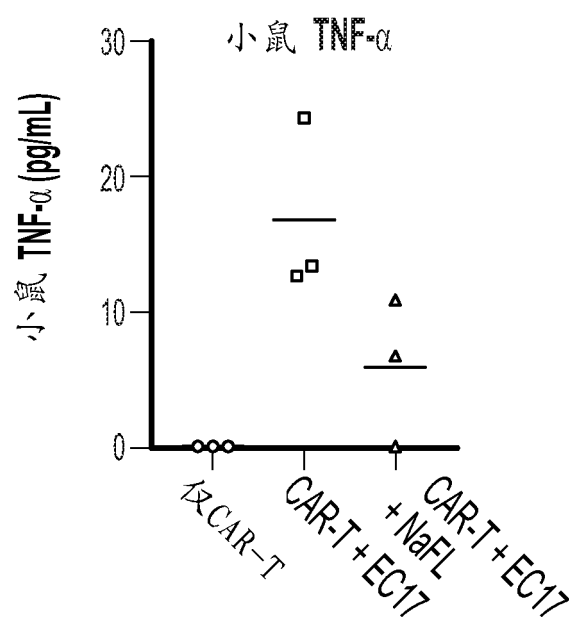


图 76E

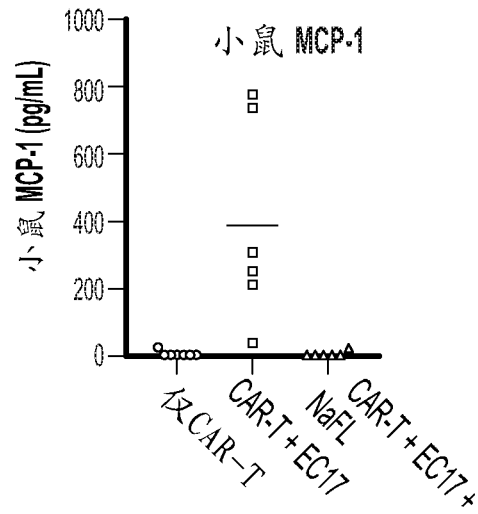


图 77A

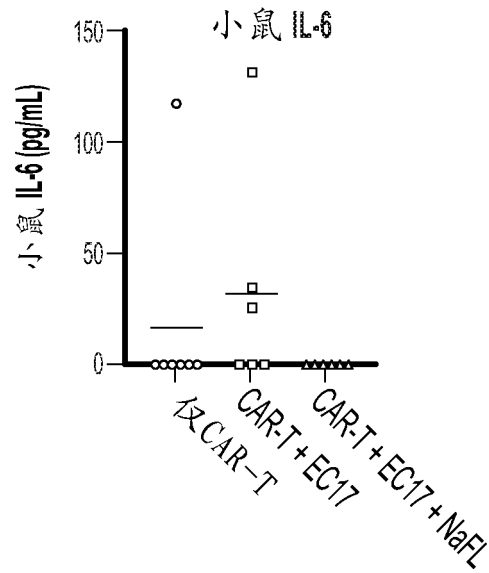


图 77B

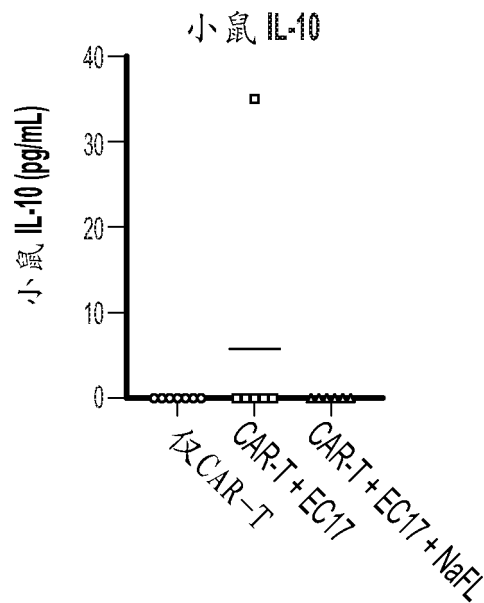


图 77C

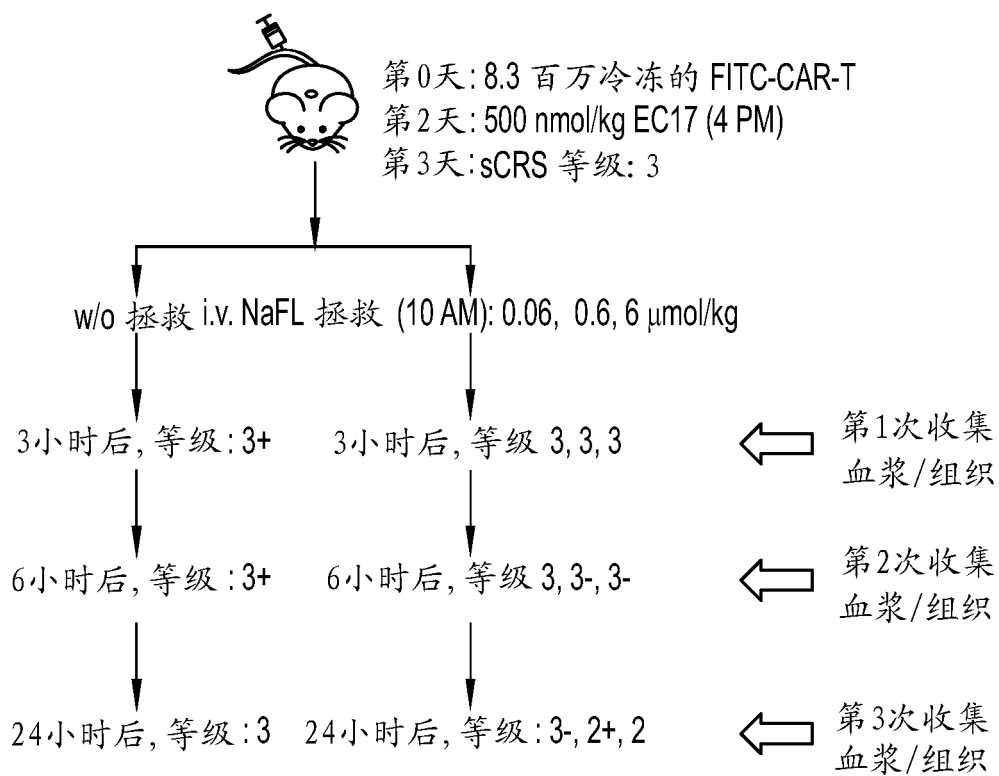


图 78

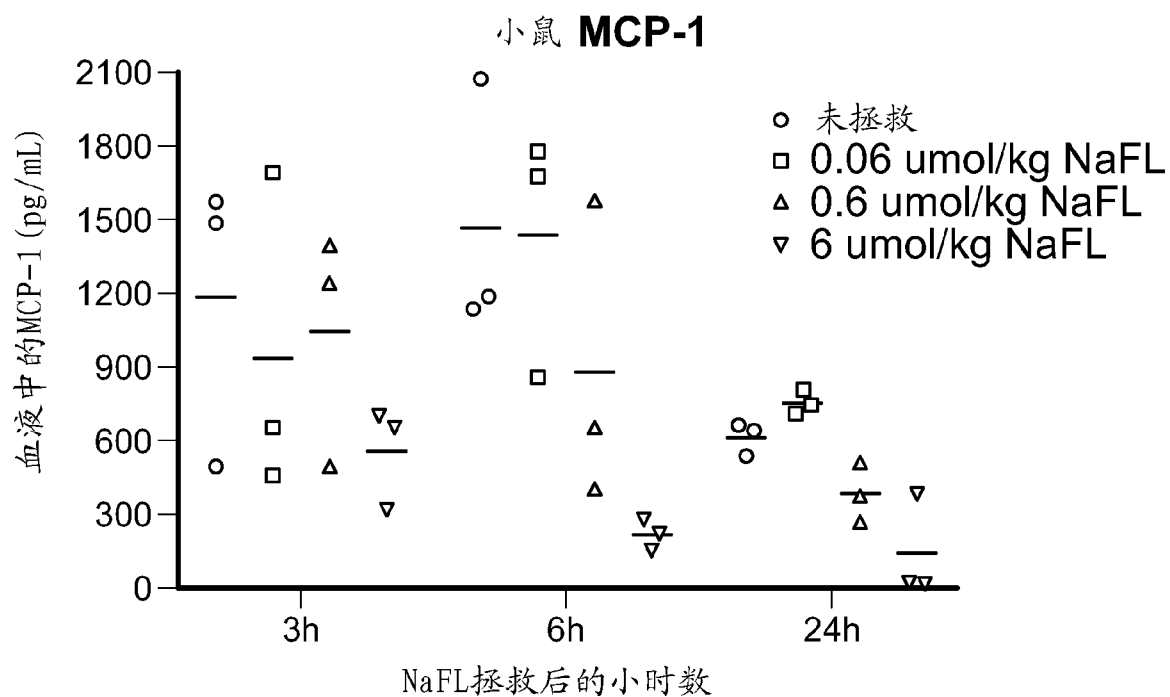


图 79

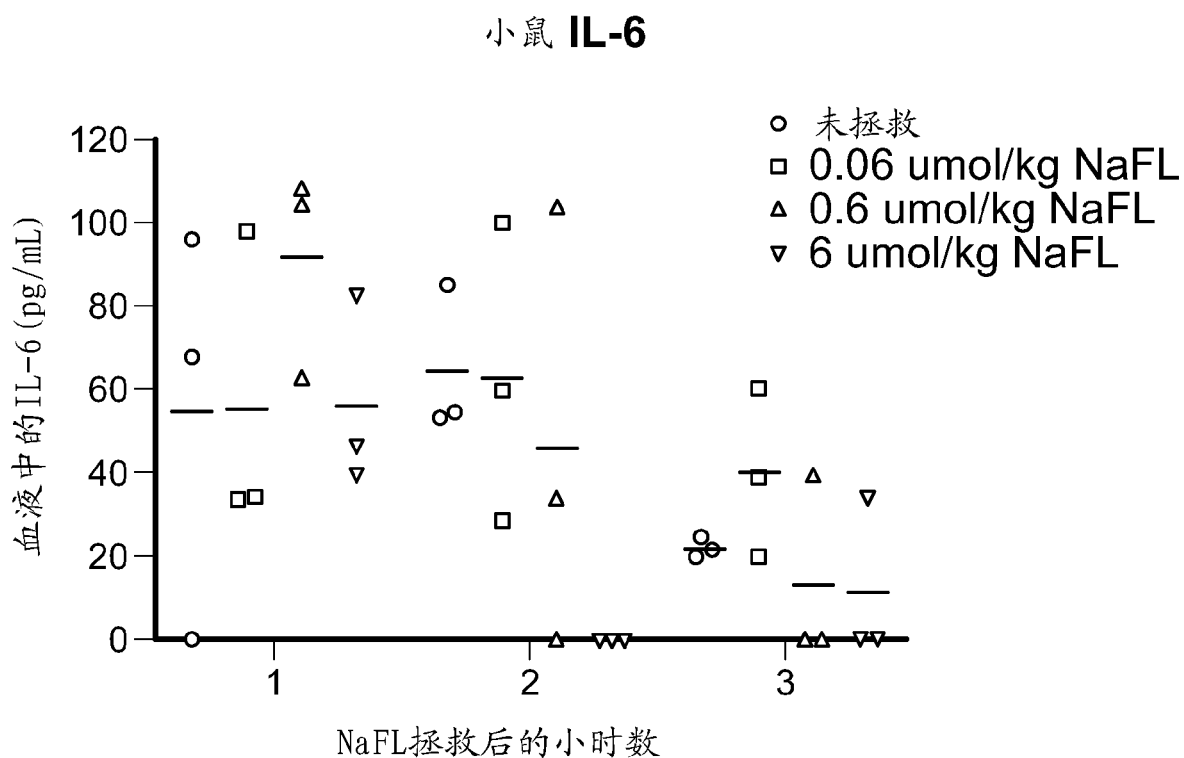


图 80

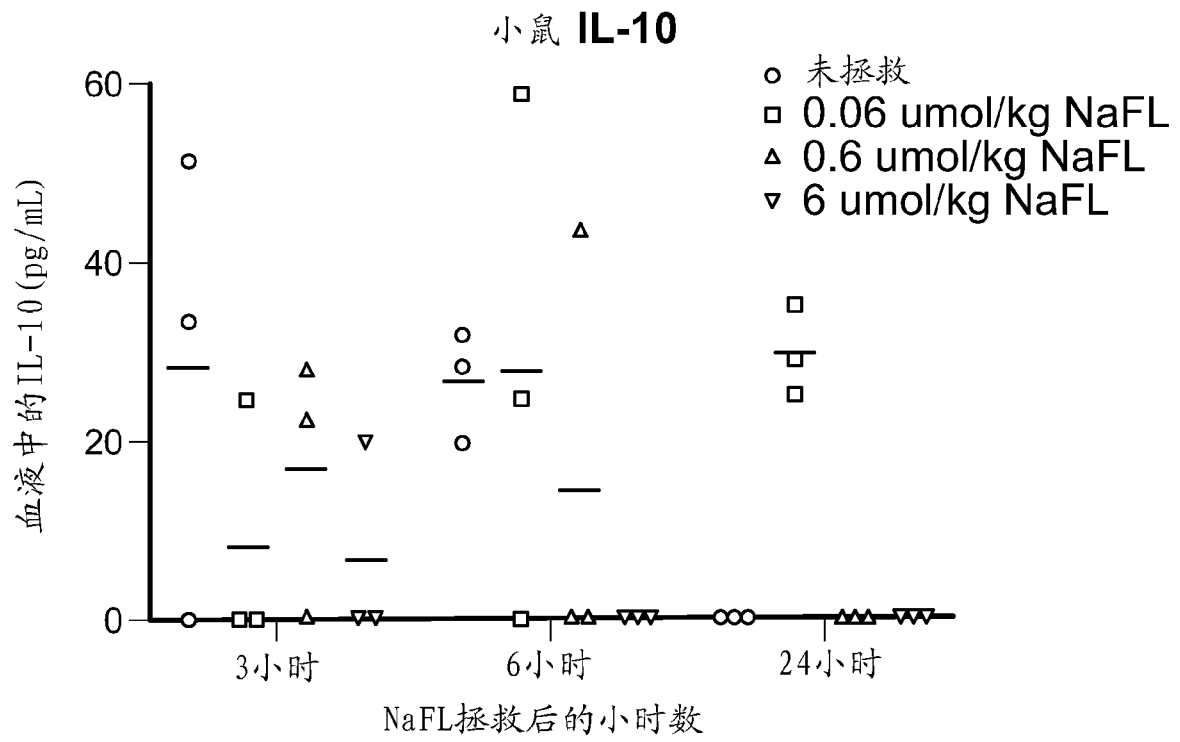


图 81

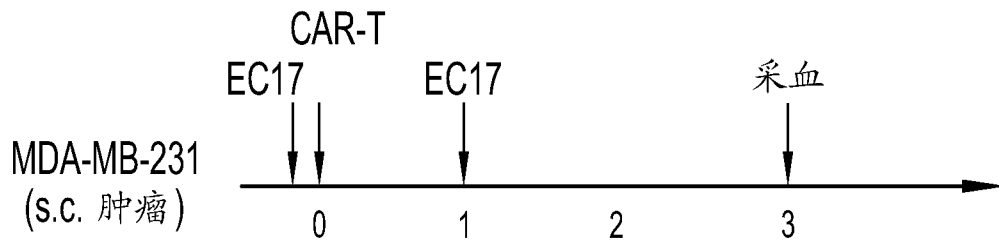


图 82A

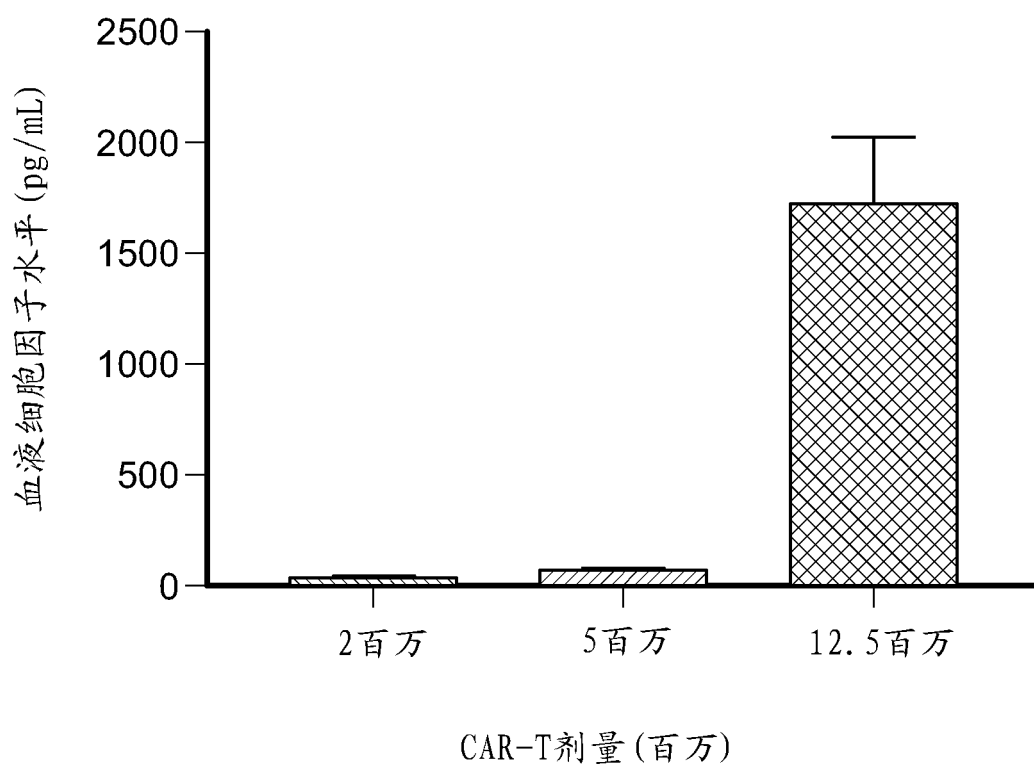
小鼠 **MCP-1**

图 82B