(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114929265 A
(43)申请公布日 2022.08.19

(21)申请号 202080086575.3
(22)申请日 2020.12.11
(30)优先权数据
62/946,934 2019.12.11 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.06.13
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/064412 2020.12.11
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/119376 EN 2021.06.17
(71)申请人 NE1股份有限公司
地址 美国纽约州
申请人 以秘书处，卫生和人类服务部，国立卫生研究院为代表的美利坚合众国
捷克布杰约维采南波希米亚大学
(72)发明人 Z·庄 R·麦迪纳 王合瑞 J·赞卡 K·潘凯克 W·霍
(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
专利代理师 陈扬扬 钱文宇
(51)Int.Cl.
A61K 39/00(2006.01)
A61K 35/13(2006.01)
A61K 31/702(2006.01)
A61K 31/25(2006.01)
A61K 31/201(2006.01)
A61K 31/7115(2006.01)
A61K 31/407(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)

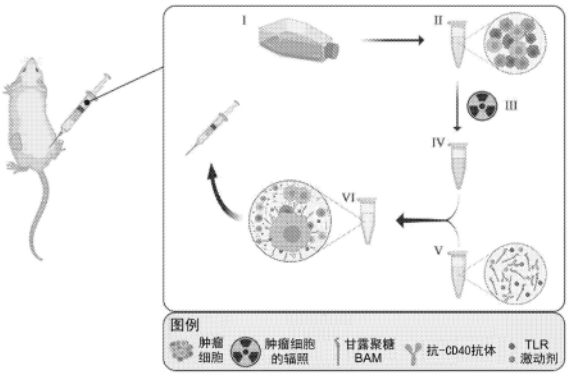
权利要求书3页 说明书48页 附图33页

(54)发明名称

个性化肿瘤疫苗及其用于癌症免疫疗法的用途

(57)摘要

本文公开了包含减弱的癌细胞的个性化肿瘤疫苗和使用所述个性化肿瘤疫苗治疗癌症的方法。



CN 114929265 A

1.一种个性化肿瘤疫苗,其包括:

(a)吞噬刺激剂,

(b)免疫刺激佐剂,和

(c)减弱的癌细胞,

其中所述个性化肿瘤疫苗,当给予有需要的个体时,有效激活免疫反应。

2.如权利要求1所述的个性化肿瘤疫苗,其中所述减弱的癌细胞获取自所述个体的肿瘤。

3.如权利要求2所述的个性化肿瘤疫苗,其中所述肿瘤是实体瘤。

4.如权利要求2所述的个性化肿瘤疫苗,其中所述肿瘤是液体瘤。

5.如权利要求1-4中任一项所述的个性化肿瘤疫苗,其中所述减弱的癌细胞是通过以下制备的:

(a)从所述个体的肿瘤部位的活检收获癌细胞,

(b)培养所述收获的癌细胞至治疗相关量,以及

(c)辐照所述培养的癌细胞。

6.如权利要求1-5中任一项所述的个性化肿瘤疫苗,其中所述减弱的癌细胞以约1.0×10^{3}至约1.0×10^{7}的量存在。

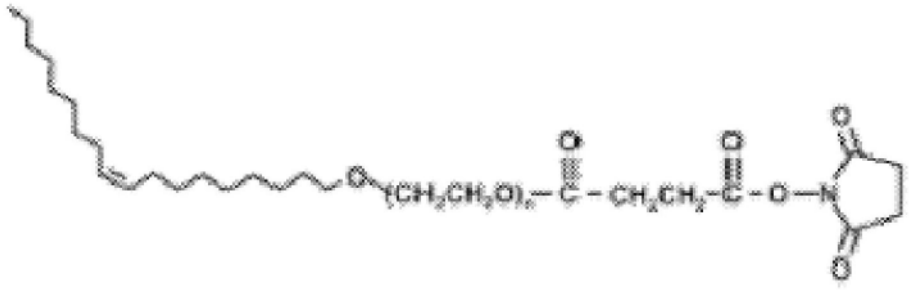
7.如权利要求1-6中任一项所述的个性化肿瘤疫苗,其中所述吞噬刺激剂包括甘露聚糖。

8.如权利要求7所述的个性化肿瘤疫苗,其中所述甘露聚糖以约2mg/剂至约200mg/剂的量存在。

9.如权利要求1-8中任一项所述的个性化肿瘤疫苗,其中所述吞噬刺激剂偶联至细胞膜生物相容性锚(BAM)。

10.如权利要求9所述的个性化肿瘤疫苗,其中所述BAM以约0.2mg/剂至约20mg/剂的量存在。

11.如权利要求9或10所述的个性化肿瘤疫苗,其中所述BAM包括式I:



其中n是PEG链中环氧乙烷(EO)单元重复数。

12.如权利要求1-11中任一项所述的个性化肿瘤疫苗,其中所述免疫刺激佐剂包括Toll样受体(TLR)激动剂。

13.如权利要求12所述的个性化肿瘤疫苗,其中所述TLR激动剂包括R-848、多聚(I:C)、脂磷壁酸(LTA)或其组合。

14.如权利要求13所述的个性化肿瘤疫苗,其中所述TLR激动剂包括R-848。

15.如权利要求14所述的个性化肿瘤疫苗,其中所述R-848以约0.05mg/剂至约5mg/剂

的量存在。

16.如权利要求13所述的个性化肿瘤疫苗,其中所述TLR激动剂包括多聚(I:C)。

17.如权利要求16所述的个性化肿瘤疫苗,其中所述多聚(I:C)以约0.05mg/剂至约5mg/剂的量存在。

18.如权利要求13所述的个性化肿瘤疫苗,其中所述TLR激动剂包括脂磷壁酸(LTA)。

19.如权利要求18所述的个性化肿瘤疫苗,其中所述LTA以约0.05mg/剂至约5mg/剂的量存在。

20.如权利要求1-19中任一项所述的个性化肿瘤疫苗,其中所述免疫刺激佐剂包括抗-CD40抗体。

21.如权利要求20所述的个性化肿瘤疫苗,其中所述抗-CD40抗体以约0.04mg/剂至约4mg/剂的量存在。

22.如权利要求1所述的个性化肿瘤疫苗,其中所述免疫反应包括对所述减弱的癌细胞特异性的适应性免疫反应。

23.一种个性化肿瘤疫苗,其包括:

(a)甘露聚糖,其中所述甘露聚糖偶联至BAM,

(b)R-848、多聚(I:C)和LTA,

(c)抗-CD40抗体,以及

(d)辐照的癌细胞,

其中所述个性化肿瘤疫苗,当给予有需要的个体时,有效激活免疫反应。

24.一种治疗癌症的方法,包括给予有需要的个体有效量的药物组合物,其中所述药物组合物包括:

(a)吞噬刺激剂,

(b)免疫刺激佐剂,和

(c)减弱的癌细胞。

25.如权利要求24所述的方法,其中所述减弱的癌细胞获取自所述个体的肿瘤。

26.如权利要求25所述的方法,其中所述肿瘤是实体瘤。

27.如权利要求25所述的方法,其中所述肿瘤是液体瘤。

28.如权利要求24-27中任一项所述的方法,其中所述减弱的癌细胞是通过以下制备的

(a)从所述个体的肿瘤部位的活检收获癌细胞,

(b)培养所述收获的癌细胞至治疗相关量,以及

(c)辐照所述培养的癌细胞。

29.如权利要求24-28中任一项所述的方法,其中所述减弱的癌细胞以约1.0×10^{3}至约1.0×10^{7}的量存在。

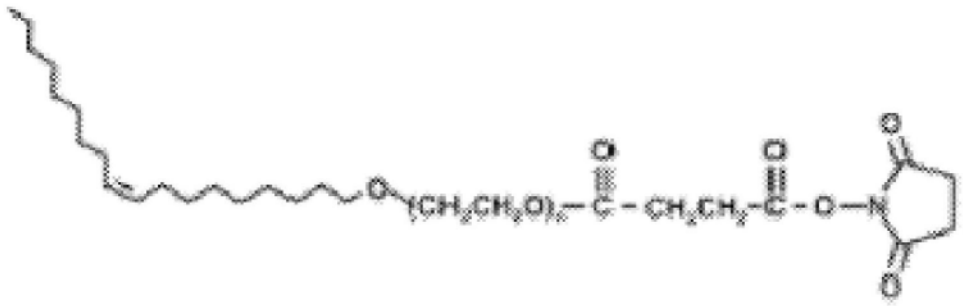
30.如权利要求24-29中任一项所述的方法,其中所述吞噬刺激剂包括甘露聚糖。

31.如权利要求30所述的方法,其中所述甘露聚糖以约2mg/剂至约200mg/剂的量存在。

32.如权利要求24-31中任一项所述的方法,其中所述吞噬刺激剂偶联至细胞膜生物相容性锚(BAM)。

33.如权利要求32所述的方法,其中所述BAM以约0.2mg/剂至约20mg/剂的量存在。

34.如权利要求32或33所述的方法,其中所述BAM包括式I:



其中n是PEG链中环氧乙烷(EO)单元重复数。

35.如权利要求24-34中任一项所述的方法,其中所述免疫刺激佐剂包括Toll样受体(TLR)激动剂。

36.如权利要求35所述的方法,其中所述TLR激动剂包括R-848、多聚(I:C)、脂磷壁酸(LTA)或其组合。

37.如权利要求36所述的方法,其中所述TLR激动剂包括R-848。

38.如权利要求37所述的方法,其中所述R-848以约0.05mg/剂至约5mg/剂的量存在。

39.如权利要求36所述的方法,其中所述TLR激动剂包括多聚(I:C)。

40.如权利要求39所述的方法,其中所述多聚(I:C)以约0.05mg/剂至约5mg/剂的量存在。

41.如权利要求36所述的方法,其中所述TLR激动剂包括脂磷壁酸(LTA)。

42.如权利要求41所述的方法,其中所述LTA以约0.05mg/剂至约5mg/剂的量存在。

43.如权利要求24-42中任一项所述的方法,其中所述免疫刺激佐剂包括抗-CD40抗体。

44.如权利要求43所述的方法,其中所述抗-CD40抗体以约0.04mg/剂至约4mg/剂的量存在。

45.如权利要求24-44中任一项所述的方法,其中所述个性化肿瘤疫苗是皮下给予。

46.如权利要求24所述的方法,其中所述个性化肿瘤疫苗可以激活对所述减弱的癌细胞特异性的免疫反应。

47.如权利要求46所述的方法,其中所述免疫反应包括适应性免疫反应。

个性化肿瘤疫苗及其用于癌症免疫疗法的用途

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年12月11日提交的美国临时申请第62/946,934号的权益,其通过引用全文纳入本文。

[0003] 联邦资助研究和开发

[0004] 本发明是在美国国立卫生研究院、国家癌症研究院和Eunice Kennedy Shriver国家儿童健康和人类发展研究院的项目号ZIA BC 011773下,由政府资助完成的。政府对本发明享有某些权利。

发明领域

[0005] 本发明总体涉及一种用于癌症免疫疗法的个性化肿瘤疫苗的制备和用途。

[0006] 发明背景

[0007] 免疫检查点抑制剂(ICI),例如抗-PD1/PD-L1和抗-CTLA-4,极大地改善了多种晚期癌症的转归,包括黑色素瘤和非小细胞肺癌(参见Nat Rev Cancer.2018;18(3):139-147.doi:10.1038/nrc.2017.117)。然而,已经很清楚的是,只有部分患者对ICI实现持久缓解。对ICI的客观缓解率最有力的预测指标是肿瘤突变负荷(参见N Engl J Med.2017;377(25):2500-2501.doi:10.1056/NEJMc1713444)。然而,许多肿瘤(包括成胶质细胞瘤)不太可能对单药ICI疗法缓解,大概是由于缺乏激活适应性免疫反应必要的新抗原(neoantigen)。这些肿瘤经常被发现为低T细胞浸润的“免疫冷”。高T细胞浸润的“免疫热”肿瘤表明存在激活的抗肿瘤免疫反应,预示着对ICI的有利反应。因此,将免疫原性表型由“冷”转化为“热”是实现成功的免疫治疗的重要步骤。因此,迫切需要鉴定能够将“免疫冷”肿瘤转化为“免疫热”肿瘤的新治疗或免疫治疗剂。

[0008] 另一方面,通常有希望的免疫治疗剂只有当施用或注射到肿瘤内(原位)时才会显示出强抗肿瘤反应。由于依赖解剖学上可及肿瘤,原位注射策略严重限制了免疫治疗剂的潜在应用,因为原发肿瘤在临床环境中通常是通过手术减缩体积的或可能位于解剖学上不易及的位置。

[0009] 癌症免疫治疗领域仍处于起步阶段,正在探索更多的免疫治疗药物及其临床转归。另一方面,多种形式的实体瘤,特别是来自神经系统的实体瘤,需要不囿于原位要求的递送策略。

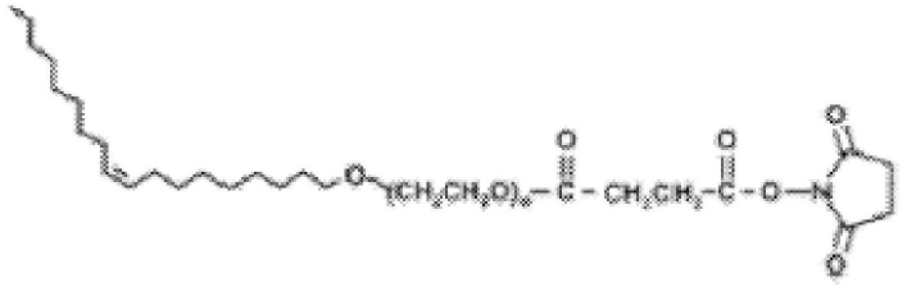
[0010] 发明概述

[0011] 在一些实施方式中,本文公开了个性化肿瘤疫苗。一方面,一种个性化肿瘤疫苗包括:(a)吞噬刺激剂,(b)免疫刺激佐剂,和(c)减弱的癌细胞,其中所述个性化肿瘤疫苗,当给予有需要的个体时,有效激活免疫反应。

[0012] 在一些实施方式中,减弱的癌细胞获取自个体的肿瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤是实体瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤是液体瘤。

[0013] 在一些实施方式中,减弱的癌细胞是通过(a)从所述个体的肿瘤部位活检收获癌细胞,(b)培养收获的癌细胞至治疗相关量,以及(c)辐照培养的癌细胞制备的。

[0014] 在一些实施方式中,其中所述减弱的癌细胞以约1.0×10^3至约1.0×10^7的量存在。在一些实施方式中,吞噬刺激剂包括甘露聚糖。在一些实施方式中,甘露聚糖以约2mg/剂至约200mg/剂的量存在。在一些实施方式中,吞噬刺激剂偶联至细胞膜生物相容性锚(BAM)。在一些实施方式中,BAM以约0.2mg/剂至约20mg/剂的量存在。在一些实施方式中,BAM包括式I:

[0015] 

[0016] 其中n是PEG链中环氧乙烷(EO)单元重复数。

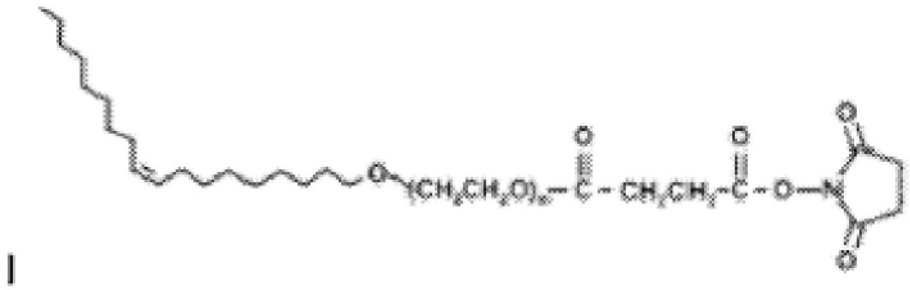
[0017] 在一些实施方式中,免疫刺激佐剂是Toll样受体(TLR)激动剂。在一些实施方式中,TLR激动剂包括R-848、多聚(I:C)、脂磷壁酸(LTA)或其组合。在一些实施方式中,TLR激动剂包括R-848。在一些实施方式中,R-848以约0.05mg/剂至约5mg/剂的量存在。在一些实施方式中,TLR激动剂包括多聚(I:C)。在一些实施方式中,多聚(I:C)以约0.05mg/剂至约5mg/剂的量存在。在一些实施方式中,TLR激动剂包括脂磷壁酸(LTA)。在一些实施方式中,LTA以约0.05mg/剂至约5mg/剂的量存在。在一些实施方式中,免疫刺激佐剂包括抗CD40抗体。在一些实施方式中,抗CD40抗体以约0.04mg/剂至约4mg/剂的量存在。在一些实施方式中,免疫反应包括对所述减弱的癌细胞特异性的适应性免疫反应。

[0018] 在一些实施方式中,本文公开了个性化肿瘤疫苗。一方面,一种个性化肿瘤疫苗包括:(a)甘露聚糖,其中甘露聚糖偶联至BAM,(b)R-848,多聚(I:C),和LTA,(c)抗-CD40抗体,和(d)辐照的癌细胞,其中所述个性化肿瘤疫苗,当给予有需要的个体时,有效激活免疫反应。

[0019] 在一些实施方式中,本文公开了治疗癌症的方法。一方面,一种治疗癌症的方法包括给予有需要的个体有效量的药物组合物,其中药物组合物包括:(a)吞噬刺激剂,(b)免疫刺激佐剂,和(c)减弱的癌细胞。

[0020] 在一些实施方式中,减弱的癌细胞获取自个体的肿瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤是实体瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤是液体瘤。在一些实施方式中,减弱的癌细胞是通过(a)从所述个体的肿瘤部位活检收获癌细胞,(b)培养收获的癌细胞至治疗相关量,以及(c)辐照培养的癌细胞制备的。

[0021] 在一些实施方式中,其中所述减弱的癌细胞以约1.0×10^3至约1.0×10^7的量存在。在一些实施方式中,吞噬刺激剂包括甘露聚糖。在一些实施方式中,甘露聚糖以约2mg/剂至约200mg/剂的量存在。在一些实施方式中,吞噬刺激剂偶联至细胞膜生物相容性锚(BAM)。在一些实施方式中,BAM以约0.2mg/剂至约20mg/剂的量存在。在一些实施方式中,BAM包括式I:

[0022] 

[0023] 其中n是PEG链中环氧乙烷(EO)单元重复数。

[0024] 在一些实施方式中,免疫刺激佐剂是Toll样受体(TLR)激动剂。在一些实施方式中,TLR激动剂包括R-848、多聚(I:C)、脂磷壁酸(LTA)或其组合。在一些实施方式中,TLR激动剂包括R-848。在一些实施方式中,R-848以约0.05mg/剂至约5mg/剂的量存在。在一些实施方式中,TLR激动剂包括多聚(I:C)。在一些实施方式中,多聚(I:C)以约0.05mg/剂至约5mg/剂的量存在。在一些实施方式中,TLR激动剂包括脂磷壁酸(LTA)。在一些实施方式中,LTA以约0.05mg/剂至约5mg/剂的量存在。在一些实施方式中,免疫刺激佐剂包括抗CD40抗体。在一些实施方式中,抗CD40抗体以约0.04mg/剂至约4mg/剂的量存在。在一些实施方式中,个性化肿瘤疫苗皮下给予。在一些实施方式中,个性化肿瘤疫苗激活对所述减弱的癌细胞特异性的适应性免疫反应。在一些实施方式中,免疫反应包括适应性免疫反应。

[0025] 附图简要说明

[0026] 所附权利要求书中具体说明了本发明的新特征。可参考以下详述更好地理解本发明的特征和优点,这些详述阐述了利用本发明原理的说明性实施方式和附图(本文中"图."或"附图."),其中:

[0027] 图1A-B显示了皮下原发肿瘤和转移性远端肿瘤的小鼠模型。图1A描述了皮下原发和转移性远端肿瘤的CT26荷瘤小鼠模型的卡通示意图。从背侧观察小鼠。分别在右胁腹的101号和右胁腹的102号建立有代表性的原发肿瘤和转移性远端肿瘤。图1B是注射生理盐水10天后CT26荷瘤小鼠的代表性图片。

[0028] 图2A-H显示,在有代表性的原发肿瘤处原位注射MBTA诱导强力的、全身性的对象特异性适应性免疫反应。图2A描述了MBTA免疫疗法的示意图时间线。图2B显示了MBTA免疫疗法的示意图时间线。图2C显示了MBTA免疫疗法开始10天后CT26荷瘤小鼠的代表性图片。代表性的原发肿瘤和转移性肿瘤的位置由箭头显示。从背侧观察小鼠。图2D描述了原发性肿瘤原位注射生理盐水(n=7,左图)和MBTA(n=7,右图)的CT26荷瘤小鼠的原发性肿瘤体积(mm^3)和时间的关系线图。与注射生理盐水的对照组小鼠相比,大多数原位注射MBTA的小鼠的原发肿瘤没有生长。图2E描述了原发性肿瘤原位注射生理盐水(n=7,左图)和MBTA(n=7,右图)的小鼠的转移性远端肿瘤体积(mm^3)和时间的关系线图。与对照组小鼠相比,大多数原位注射MBTA的小鼠的转移性远端肿瘤没有生长。图2F描述了在原发肿瘤处原位注射的CT26荷瘤小鼠的累积生存曲线。到20天时,所有接受生理盐水对照的小鼠(n=7)都死亡,而所有接受MBTA治疗的小鼠(n=7)都存活。MBTA治疗的小鼠中至少有25%在治疗后100天内存活。通过对数秩(Mantel-Cox)检验,***p=0.0002。图2G描述了确认CT26荷瘤小鼠脾脏中$CD4^+$(左图)或$CD8^+$T细胞耗竭(中图)的二维流式细胞仪图。无T细胞耗竭的对照图显示在右图中。靶耗竭耗竭了约90%的$CD4^+$或$CD8^+$细胞。图2H描述了原位注射生理盐水(n=9,上左

图)、无T细胞耗竭的MBTA(n＝9,上右图)、MBTA加$CD4^+$细胞耗竭(n＝5,下左图)和MBTA加$CD8^+$细胞耗竭(n＝5,下右图)的具有原发性肿瘤的CT26荷瘤小鼠的原发性肿瘤体积(mm^3)和时间的关系线图。与注射生理盐水的对照组小鼠相比,大多数原位注射MBTA的小鼠的原发肿瘤没有生长。与对照组小鼠相比,大多数原位注射MBTA的小鼠的原发肿瘤--无论非T细胞、$CD4^+$细胞或$CD8^+$细胞被耗竭--都没有生长。图2I描述了原位注射生理盐水(n＝9,上左图)、MBTA(n＝9,上右图)、MBTA加$CD4^+$细胞耗竭(n＝5,下左图)和MBTA加$CD8^+$细胞耗竭(n＝5,下右图)的具有原发性肿瘤的CT26荷瘤小鼠的转移性远端肿瘤体积(mm^3)和时间的关系线图。原位注射MBTA和非T细胞或$CD4^+$细胞耗竭的小鼠转移性远端肿瘤的生长速度比注射生理盐水或注射MBTA加$CD8^+$细胞耗竭的小鼠慢。图2J描述了在原发肿瘤处原位注射的CT26荷瘤小鼠的累积生存曲线。到30天时,所有接受生理盐水对照的小鼠(n＝7)、带有$CD4^+$或$CD8^+$细胞耗竭的注射MBTA的小鼠都死亡,而所有接受MBTA治疗的小鼠(n＝7)都存活。无T细胞耗竭的MBTA治疗的小鼠中至少有10％在治疗后100天内存活。通过对数秩(Mantel-Cox)检验ns＝不显著,***p＝0.0002。

[0029] 图3A-I显示,MBTA刺激先天性免疫系统以引起对原发和远端CT26肿瘤的对象特异性排斥。图3A描述了MBTA免疫疗法和肿瘤免疫表型实验(I.P.)的示意时间线。图3B描述了显示在总体活肿瘤解离细胞中$CD45^+$细胞的百分比的点图。I.P.第10天和I.P.第16天的分析证明,MBTA治疗的小鼠在原发肿瘤内的免疫细胞显著高于生理盐水处理的对照小鼠。通过曼-惠特尼U检验,**p＜0.01。数据显示为个体数据点(点)与中位数(线)。图3C描述了显示在从CT26荷瘤小鼠的原发肿瘤中解离的总体活肿瘤细胞中$CD45^+$细胞的百分比的点图。I.P.第10天和I.P.第16天的分析证明,MBTA治疗的小鼠在转移性远端肿瘤内的免疫细胞显著高于生理盐水处理的对照小鼠。**通过曼-惠特尼U检验,p＜0.01。数据显示为个体数据点(点)与中位数(线)。图3D描述了显示在从CT26荷瘤小鼠的原发肿瘤中解离的总体活肿瘤细胞中先天免疫细胞的百分比的点图。显示了在原发肿瘤中发现的先天免疫细胞对应于I.P.第10天和I.P.第16天的分析。通过曼-惠特尼U检验,*p＜0.05,**p＜0.01。数据显示为个体数据点(点)与中位数(线)。图3E描述了显示在从CT26荷瘤小鼠的转移性远端肿瘤中解离的总体活肿瘤细胞中MHC II+单核细胞的百分比的点图。I.P.第10天和I.P.第16天的分析证明,在原发肿瘤内MBTA治疗的小鼠比生理盐水处理的对照小鼠具有更多MHC II+单核细胞。通过曼-惠特尼U检验,**p＜0.01。数据显示为个体数据点(点)与中位数(线)。图3F描述了显示在从CT26荷瘤小鼠的转移性远端肿瘤中解离的总体活肿瘤细胞中先天免疫细胞的百分比的点图。I.P.第16天的分析证明,MBTA治疗的小鼠在转移性远端肿瘤内的具有比生理盐水处理的对照小鼠更多的树突状细胞、单核细胞和中性粒细胞。通过曼-惠特尼U检验,*p＜0.05,**p＜0.01。数据显示为个体数据点(点)与中位数(线)。图3G描述了显示在从CT26荷瘤小鼠的转移性远端肿瘤中解离的总体活肿瘤细胞中MHC II+单核细胞的百分比的点图。I.P.第10天和I.P.第16天的分析证明,在转移性远端肿瘤内MBTA治疗的小鼠(粉色)比生理盐水处理的对照小鼠(黑色)具有更多MHC II+单核细胞。通过曼-惠特尼U检验,**p＜0.01。数据显示为个体数据点(点)与中位数(线)。图3H描述了显示在从CT26荷瘤小鼠的原发肿瘤中解离的总体活肿瘤细胞中替代性的激活的巨噬细胞的百分比的点图。I.P.第10天和I.P.第16天的分析证明,MBTA治疗的小鼠(粉色)在原发肿瘤内的替代性的激活的巨噬细胞显著低于生理盐水处理的对照小鼠(黑色)。通过曼-惠特尼U检验,**p＜0.01。数据显

示为个体数据点(点)与中位数(线)。图3I描述了显示在从CT26荷瘤小鼠的转移性远端肿瘤中解离的总体活肿瘤细胞中替代性的激活的巨噬细胞的百分比的点图。I.P.第10天和I.P.第16天的分析证明,MBTA治疗的小鼠在远端肿瘤内的替代性的激活的巨噬细胞低于生理盐水处理的对照小鼠。通过曼-惠特尼U检验,**p＜0.01。数据显示为个体数据点(点)与中位数(线)。

[0030] 图4A-F显示,MBTA刺激适应性免疫系统以引起对原发和远端CT26肿瘤的对象特异性排斥。图4A描述了显示在从CT26荷瘤小鼠的原发肿瘤中解离的总体活肿瘤细胞中适应性免疫细胞的百分比的点图。I.P.第10天和I.P.第16天的分析证明,在第16天,MBTA治疗的小鼠在原发肿瘤内的$CD8^+$T细胞和B细胞显著高于生理盐水处理的对照小鼠。通过曼-惠特尼U检验,*p＜0.05,**p＜0.01。数据显示为个体数据点(点)与中位数(线)。图4B描述了显示在从CT26荷瘤小鼠的原发肿瘤中解离的总体活肿瘤细胞中适应性免疫细胞的百分比的点图。I.P.第10天和I.P.第16天的分析证明,在I.P.第16天,MBTA治疗的小鼠在原发肿瘤内的$CD8^+$T细胞和B细胞显著高于生理盐水处理的对照小鼠。在I.P.第10天,MBTA治疗的小鼠的远端肿瘤中的$CD8^+$T细胞也比对照小鼠多,而$CD4^+$T细胞则少。通过曼-惠特尼U检验,*p＜0.05,**p＜0.01。数据显示为个体数据点(点)与中位数(线)。图4C描述了分别显示了IFNγ或TNFα阳性的$CD4^+$或$CD8^+$T细胞占总$CD4^+$或$CD8^+$T细胞的百分比的点图。对应第10天和16天的分析的收获的左胁腹$CD4^+$和$CD8^+$T细胞用PMA/离子霉素离体刺激5小时,并用流式细胞仪测定细胞内IFNγ和TNFα。与生理盐水处理的小鼠相比,MBTA治疗的小鼠在I.P.第16天具有显著更多的TNFα$CD8^+$T细胞,在I.P.第10天有更多的IFNγ $CD8^+$T细胞。通过曼-惠特尼U检验,*p＜0.05,**p＜0.01。数据显示为个体数据点(点)与中位数(线)。图4D描述了显示在CT26荷瘤小鼠的远端肿瘤中,颗粒酶B+$CD8^+$T占总$CD8^+$T细胞的百分比的点图。MBTA治疗的小鼠在I.P.第10天和第16天的颗粒酶B+$CD8^+$T细胞显著多于生理盐水处理的小鼠。图4E描述了显示在从CT26荷瘤小鼠的全血中提取的AH-1-特异性$CD8^+$T-细胞的百分比的点图。MBTA治疗的小鼠血液中AH-1特异性(AH-1/H-$2L^d$-四聚体反应性)$CD8^+$T细胞显著多于生理盐水处理的小鼠。数据显示为个体点与中位数。通过曼-惠特尼U检验,*p＜0.05。图4F描述了显示在从CT26荷瘤小鼠的转移性远端肿瘤中提取的AH-1-特异性$CD8^+$T-细胞的百分比的点图。四只小鼠在生理盐水处理组,五只小鼠在MBTA治疗组。MBTA治疗的小鼠远端肿瘤中的AH-1特异性(AH-1/H-$2L^d$-四聚体反应性)$CD8^+$T细胞多于生理盐水处理的小鼠。数据显示为个体点与中位数。通过曼-惠特尼U检验,p＝0.06。

[0031] 图5A-F显示,rCT26-MBTA疫苗产生了强对象特异性抗肿瘤免疫反应,导致改善了CT26荷瘤小鼠的肿瘤生长控制和生存。图5A描述了rCT26-MBTA疫苗的开发过程的卡通示意图。图5B描述了条形图,显示了辐照后凋亡的CT26细胞的百分比。CT26细胞用50Gy辐照。辐照后3天,＞20％的受辐照CT26细胞处于早期凋亡阶段(PI-/膜联蛋白V+)。辐照后10天,＞70％的受辐照CT26细胞已进入晚期凋亡阶段(PI-/膜联蛋白V+)。数据显示为平均值±SEM。图5C描述了rCT26-MBTA疫苗接种的示意时间线。

[0032] 图5D描述了注射生理盐水(左)、rCT26疫苗(中)或rCT26疫苗和MBTA组合(右)的CT26荷瘤小鼠的肿瘤生长曲线。rCT26和MBTA组合疫苗接种的小鼠的肿瘤生长速度显著慢于盐水处理或rCT26疫苗接种的小鼠的肿瘤。图5E描述了图5D中小鼠的累积生存曲线。到第30天,所有生理盐水处理和rCT26疫苗接种的小鼠死亡,而rCT26和MBTA组合疫苗接种的小

鼠只有25％死亡。至少有10％在疫苗接种后100天内存活。通过对数秩(Mantel-Cox)检验和Tukey-Kramer事后检验:生理盐水比rCT26-MBTA治疗(**p＝0.0071);rCT26比rCT26-MBTA治疗(**p＝0.0034);生理盐水比rCT26治疗(p＝0.9846)。图5F描述了显示在从生理盐水处理、rCT26疫苗接种和rCT26-MBTA疫苗接种的CT26荷瘤小鼠的全血中提取的AH-1-特异性$CD8^+$T-细胞的百分比的点图。rCT26-MBTA治疗的小鼠血液中AH-1特异性(AH-1/H-$2L^d$-四聚体反应性)$CD8^+$T细胞显著多于生理盐水或rCT26处理的小鼠。数据显示为个体点与中位数。通过Kruskal-Wallis检验,**p＜0.01。图5G描述了显示在从生理盐水处理、rCT26疫苗接种和rCT26-MBTA疫苗接种的CT26荷瘤小鼠的肿瘤中提取的AH-1-特异性$CD8^+$T-细胞的百分比的点图。rCT26-MBTA治疗的小鼠血液中AH-1特异性(AH-1/H-$2L^d$-四聚体反应性)$CD8^+$T细胞显著多于生理盐水或rCT26处理的小鼠。数据显示为个体点与中位数。通过Kruskal-Wallis检验,*p＜0.05。图5H显示了经盐水和原位MBTA处理的小鼠的平均体重(g)的线图。与预处理的水平相比,原位MBTA治疗的小鼠在治疗开始后3天的平均体重显著急性下降。体重减轻在治疗后7天得到恢复。通过曼-惠特尼U检验,p＝0.004。图5I显示了经盐水和rCT26-MBTA处理的小鼠的平均体重(g)的线图。rCT26-MBTA治疗的小鼠在平均体重上与生理盐水处理的小鼠没有表现出显著的差异。

[0033] 图6A-D显示MBTA治疗诱导了针对CT26细胞的对象特异性免疫记忆。图6A显示了原始小鼠(n＝4,左)和CT26癌治愈的小鼠(n＝4,右)在受到CT26肿瘤细胞攻击时的肿瘤生长曲线。后者的小鼠没有显示出CT26肿瘤的任何显著增长。图6B显示了图6A中小鼠的累积生存曲线。到肿瘤接种后35天,所有的原始小鼠死亡,而所有先前治愈CT26癌的小鼠在肿瘤接种后100天存活。通过对数秩(Mantel-Cox)检验,**p＝0.0069。图6C显示了颅内再攻击的小鼠的代表性生物发光图像。治愈了CT26结肠癌的小鼠也用1×10^4个CT26-Luc细胞在右额叶(1mm前囟喙(rostral of the bregma),中线右侧2mm,距颅骨表面2mm深处)进行了颅内再攻击。MBTA-预处理(左,n＝4)和原始的(右,n＝4)。图6D显示了颅内再攻击小鼠随时间推移的累积生存曲线。到肿瘤接种后35天,所有的原始小鼠死亡,而所有先前治愈CT26癌的小鼠在肿瘤接种后100天存活。原始小鼠比MBTA预处理小鼠:通过对数秩(Mantel-Cox)检验,**p＝0.0100。

[0034] 发明详述

[0035] 虽然本文显示和描述了本发明的优选实施方式,但本领域技术人员显然了解这些实施方式仅以举例方式提供。本领域技术人员在不背离本发明的情况下可以作出多种改变、变化和替代。应理解,本文所述的本发明实施方式的各种替代形式可用于实施本发明。所附权利要求书确定了本发明范围,这些权利要求范围内的方法和结构以及其等同物均为本发明所涵盖。

[0036] 定义

[0037] 术语“细胞”和“细胞群”可互换使用,指一个或多个哺乳动物细胞。术语包括细胞或细胞群的子代。本领域技术人员应理解“细胞”包括单细胞的子代,由于天然的、意外的或有意突变和/或改变,子代和其原始亲本细胞之间有变异。

[0038] 本文所用的“癌细胞”是指表现出肿瘤细胞表型的细胞,其特征可以是一个或多个,例如,异常的细胞生长、异常的细胞增殖、丧失密度依赖性生长抑制、锚定独立的生长潜力、在免疫受损的非人动物模型中促进肿瘤生长和/或发展的能力,和/或任何适当的细胞

转化指标。“癌细胞”在此可与“肿瘤细胞”互换使用，并包括实体瘤和液体瘤的癌细胞。

[0039] 本文所用的“免疫治疗”是指通过调节免疫反应来治疗疾病(例如癌症)。在本发明的上下文中，免疫疗法是指通过给予在对象中引起抗肿瘤免疫反应的个性化肿瘤疫苗在对象中提供抗癌免疫反应。

[0040] “有效量”是指足以产生有益或所需临床结果的量。可在一次或多次给药中给予有效量。出于本申请的目的，有效量的试剂抗体是指足以诊断、缓解、减轻、稳定、逆转、减缓或推迟疾病状态发展的量。

[0041] “TLR”是指任何物种来源的toll样受体，例如人和啮齿动物。

[0042] 其TLR的例子包括TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10和TLR11。

[0043] “TLR激动剂”是指作为至少一种TLR的激动剂的分子。

[0044] 本文的“CD40激动剂”是指作为CD40激动剂信号作用的分子，例如CD40激动性抗体(例如，抗-CD40单克隆抗体)。它也可以指CD40L多肽、片段或其偶联物。通常，结合CD40的配体可以作为CD40激动剂。另外，根据本发明的CD40激动剂可以包括结合CD40的适配体。

[0045] 如本文所用术语“病原体相关分子模式”或“PAMP”是指微生物的引导靶向的宿主细胞的任何成分，以区分“自我”和“非自我”(例如感染的病原体)，并促进与先天免疫有关的信号。

[0046] 本文所用的术语“损伤/危险相关分子模式”或“DAMP”，是指来自受损或垂死细胞的任何分子，其激活先天免疫系统，以靶向未受损的细胞中的受损细胞。

[0047] 本文所用术语“实体瘤”或“实体癌”是指通常不包含囊肿或液体区域的肿瘤。实体瘤可以包括脑和其他中枢神经系统瘤(包括但不限于脑膜、大脑、脊髓、颅神经和中枢神经系统其他部位的肿瘤，如成胶质细胞瘤或成神经管细胞瘤)；头和/或颈部肿瘤；乳腺肿瘤；循环系统肿瘤(包括但不限于心脏、纵膈和胸膜以及其他胸腔内器官、血管肿瘤和肿瘤相关的血管组织)；排泄系统肿瘤(包括但不限于肾脏、肾盂、输尿管、膀胱、其他和未指定的泌尿器官肿瘤)；胃肠道肿瘤(包括但不限于食道、胃、小肠、结肠直肠、直肠乙状结肠、直肠、肛门和肛管的肿瘤，涉及肝脏和肝内胆管、胆囊、胆道的其他和未指定部位、胰腺、其他和消化器官的肿瘤)；口腔肿瘤(包括但不限于唇、舌、牙龈、口底、腭和口腔的其他部位、腮腺和唾液腺的其他部位、扁桃体、口咽、鼻咽、梨状窝、下咽以及唇、口腔和咽的其他部位的肿瘤)；生殖系统肿瘤(包括但不限于外阴、阴道、子宫颈、子宫体、子宫、卵巢和其他与女性生殖器官相关的部位、胎盘、阴茎、前列腺、睾丸和其他与男性生殖器官相关的部位的肿瘤)；呼吸道肿瘤(包括但不限于鼻腔和中耳、副鼻窦、喉、气管、支气管和肺部的肿瘤，例如小细胞肺癌或非小细胞肺癌)；骨骼系统肿瘤(包括但不限于四肢骨和关节软骨、骨关节软骨和其他部位的肿瘤)；皮肤肿瘤(包括但不限于皮肤恶性黑色素瘤、非黑色素瘤皮肤癌、皮肤基底细胞癌、皮肤鳞状细胞癌、间皮瘤、卡波西氏肉瘤)；以及涉及其他组织的肿瘤，包括外周神经和自主神经系统、结缔组织和软组织、腹膜后和腹膜、眼睛和附件、甲状腺、肾上腺和其他内分泌腺及相关结构、继发性和未指定的淋巴结恶性肿瘤、呼吸和消化系统的继发性恶性肿瘤以及其他部位的继发性恶性肿瘤。

[0048] 如本文所用的术语“液体癌”或“液体瘤”是指存在于体液(如血液、淋巴和骨髓)中的癌细胞。液体癌包括白血病、骨髓瘤、骨髓增生异常综合征(MDS)和液体淋巴瘤。液体淋巴

瘤包括含有囊肿或液体区域的淋巴瘤。本文所用的液体癌不包括实体瘤，如肉瘤和上皮癌或不含囊肿或液体区域的实体淋巴瘤。

[0049] 如本文所用术语“减弱的”细胞是指存活但复制缺陷的细胞。减弱的细胞可以是活的，但不能完成其细胞周期。减弱的细胞可以具有有限的复制、表达蛋白质和通过某些生命周期阶段进行发育的能力，例如，减弱的细胞可以停滞在特定生命周期阶段，不能在该阶段之后进行发育。

[0050] 如本文所用术语“减弱的癌细胞”是指减弱的、致癌性降低的癌细胞。减弱的癌细胞可以是不能引起或产生肿瘤的。减弱的癌细胞可以是不能转移或增加患肿瘤对象的肿瘤负荷的。减弱的癌细胞可以在其DNA中包含损伤。可以通过多种方法获得减弱的癌细胞，例如，通过物理和化学处理。可以通过辐照处理获得减弱的癌细胞。

[0051] 如本文所用的术语“个性化肿瘤疫苗”是指能引导针对对象的肿瘤的对象特异性免疫反应的肿瘤疫苗。这种反应可以是对来自特定对象的肿瘤的特定类型具有特异性的。本文所用的个性化肿瘤疫苗包括减弱的癌细胞。个性化肿瘤疫苗可以引起对对象的肿瘤或肿瘤细胞的适应性免疫反应。

[0052] 个性化肿瘤疫苗制剂和组合物

[0053] 本发明介绍的免疫治疗策略，充分利用吞噬刺激剂和免疫刺激佐剂的使用，以引导针对对象特异性癌或癌细胞的免疫反应。此处描述的具有免疫治疗潜力的个性化肿瘤疫苗，作为整个减弱癌细胞疫苗的一部分，产生了能够防止或控制肿瘤生长，并诱导原发性或转移性肿瘤的对象特异性亚群的肿瘤消退的强适应性免疫反应。个性化肿瘤疫苗被用来训练免疫系统，以发现并摧毁、攻击、杀死或抑制对象特异性癌细胞。

[0054] 在一些情况下，个性化肿瘤疫苗可以引导对象的免疫系统靶向对象特异性癌细胞。在一些情况下，个性化肿瘤疫苗可以引导对象的免疫系统从其他非同一对象的癌细胞中辨别对象特异性癌细胞。在一些情况下，个性化肿瘤疫苗可以引导对象的免疫系统从其他对象的癌细胞中辨别对象特异性癌细胞。这种疫苗可以使用对对象特异性癌细胞特异的一种或多种吞噬刺激剂。一种或多种吞噬刺激剂可以允许免疫系统从其他对象的癌细胞、其他肿瘤的癌细胞或非癌细胞中辨别对象特异性癌细胞。即使不存在癌症，当免疫系统被呈递了对象特异性癌特异性的一种或多种吞噬刺激剂时，该免疫系统会被激活以靶向具有相同对象特异性的癌细胞。免疫系统的这种激活会创建长效对象特异性免疫记忆。当免疫系统在未来遇到具有相同或相似对象特异性的癌症时，它会立即激活针对该癌细胞的对象特异性免疫反应。

[0055] 个性化肿瘤疫苗可以是预防性的或防止性的疫苗。个性化肿瘤疫苗可以是治疗性的或治疗的疫苗。在一些实施方式中，个性化肿瘤疫苗可在对象被诊断为患癌之前被给予有需要的对象。在一些实施方式中，个性化肿瘤疫苗可在对象被诊断为患癌之后被给予有需要的对象。

[0056] 个性化肿瘤疫苗可以包括吞噬刺激剂或其和其中的衍生物；免疫刺激佐剂或其和其中的衍生物；减弱的癌细胞、细胞群或其和其中的衍生物。

[0057] 在一些情况下，个性化肿瘤疫苗可以包括吞噬刺激剂或其和其中的衍生物；免疫刺激佐剂或其和其中的衍生物；和约1.0×10^{3}至约1.0×10^{7}个减弱的癌细胞。在一些情况下，个性化肿瘤疫苗可以包括甘露聚糖；免疫刺激佐剂或其和其中的衍生物；减弱的癌细

胞、细胞群或其和其中的衍生物。在一些情况下，个性化肿瘤疫苗可以包括约2mg/剂至约200mg/剂甘露聚糖；免疫刺激佐剂或其和其中的衍生物；减弱的癌细胞、细胞群或其和其中的衍生物。在一些情况下，个性化肿瘤疫苗可以包括偶联至细胞膜生物相容性锚(BAM)的吞噬刺激剂或其和其中的衍生物；免疫刺激佐剂或其和其中的衍生物；减弱的癌细胞、细胞群或其和其中的衍生物。在一些情况下，个性化肿瘤疫苗可以包括偶联至BAM的甘露聚糖，免疫刺激佐剂或其和其中的衍生物；减弱的癌细胞、细胞群或其和其中的衍生物。在一些情况下，个性化肿瘤疫苗可以包括偶联至约0.2mg/剂至约20mg/剂的BAM的甘露聚糖；免疫刺激佐剂或其和其中的衍生物；减弱的癌细胞、细胞群或其和其中的衍生物。在一些情况下，个性化肿瘤疫苗可以包括偶联至BAM的甘露聚糖，其包括本文所述式I及其衍生物；免疫刺激佐剂或其和其中的衍生物；减弱的癌细胞、细胞群或其和其中的衍生物。

[0058] 在一些情况下，个性化肿瘤疫苗可以包括吞噬刺激剂或其和其中的衍生物；Toll样受体(TLR)激动剂；减弱的癌细胞、细胞群或其和其中的衍生物。在一些情况下，个性化肿瘤疫苗可以包括吞噬刺激剂或其和其中的衍生物；R-848、多聚(I:C)、脂磷壁酸(LTA)或其组合；减弱的癌细胞、细胞群或其和其中的衍生物。在一些情况下，个性化肿瘤疫苗可以包括吞噬刺激剂或其和其中的衍生物；约0.05mg/剂至约5mg/剂的R-848、多聚(I:C)、脂磷壁酸(LTA)或其组合；减弱的癌细胞、细胞群或其和其中的衍生物。在一些情况下，个性化肿瘤疫苗可以包括吞噬刺激剂或其和其中的衍生物；R-848、约0.05mg/剂至约5mg/剂的多聚(I:C)、脂磷壁酸(LTA)或其组合；减弱的癌细胞、细胞群或其和其中的衍生物。在一些情况下，个性化肿瘤疫苗可以包括吞噬刺激剂或其和其中的衍生物；R-848、多聚(I:C)、约0.05mg/剂至约5mg/剂的脂磷壁酸(LTA)或其组合；减弱的癌细胞、细胞群或其和其中的衍生物。

[0059] 在一些情况下，个性化肿瘤疫苗可以包括吞噬刺激剂或其和其中的衍生物；抗-CD40抗体；减弱的癌细胞、细胞群或其和其中的衍生物。在一些情况下，个性化肿瘤疫苗可以包括本文的吞噬刺激剂或其衍生物；约0.04mg/剂至约4mg/剂的抗-CD40抗体；减弱的癌细胞、细胞群或其和其中的衍生物。

[0060] 在一些情况下，个性化肿瘤疫苗可以包括附接至BAM的甘露聚糖、R-848、多聚(I:C)、LTA、抗-CD40抗体及辐照癌细胞。在一些情况下，个性化肿瘤疫苗可以包括附接至约0.05mg/剂至约5mg/剂的BAM的约0.05mg/剂至约5mg/剂的甘露聚糖、约0.05mg/剂至约5mg/剂的R-848、约0.05mg/剂至约5mg/剂的多聚(I:C)、约0.05mg/剂至约5mg/剂的LTA、约0.04mg/剂至约4mg/剂的抗-CD40抗体，和约1.0×10^{3}至约1.0×10^{7}个辐照的癌细胞。

[0061] 吞噬刺激剂

[0062] 本文所述的及其个性化肿瘤疫苗可包括一种吞噬刺激剂。在一些情况下，吞噬刺激剂可包括核酸、氨基酸、核苷酸、碳水化合物、脂质、小分子、离子、化合物、其和其中任何衍生物、或其和其中任何组合。在一些实施方式中，吞噬刺激剂可以不由癌细胞表达。在一些情况下，吞噬刺激剂相对于癌细胞可以是外源性的。在一些情况下，吞噬刺激剂相对于癌细胞可以是特异性的。在一些情况下，吞噬刺激剂相对于癌细胞可以不是特异性的。

[0063] 在一些情况下，吞噬刺激剂可以被连接至减弱的癌细胞。在一些情况下，吞噬刺激剂可以被附接至减弱的癌细胞。在一些情况下，吞噬刺激剂可以包括本文所述的或其PAMP或DAMP。

[0064] 先天免疫反应，包括吞噬作用，依赖于对病原体相关分子模式(PAMP)的识别，其为

一组病原体上进化保守的结构。PAMP可以包括分泌分子、胞外分子或胞内分子。PAMP可以激活模式识别受体，例如Toll-样受体(TLR)，以触发针对病原体的抗微生物和促炎反应。这种反应包括差异基因表达、趋化因子、细胞因子产生和/或吞噬作用。在一些情况下，先天免疫反应刺激剂的另一种类型，包括在正常细胞中没有发现的危险相关分子模式(DAMP)、分子模式、结构或与应力、受伤、感染或转化细胞有关的实体。吞噬刺激剂可包括PAMP或DAMP分子，其，当被免疫系统识别时，触发针对该吞噬刺激剂或连接至该吞噬刺激剂的任何分子或细胞的吞噬作用反应。

[0065] 吞噬刺激剂可以起源于病毒、革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌、原生动物、原生生物、线虫、植物细胞、动物细胞、其和其中任何衍生物，或其和其中任何组合。吞噬刺激剂也可以在体外合成，例如但不限于有机合成。吞噬刺激剂可以是胞内的、胞外的、溶酶体的、内体的、核的、胞质的、线粒体的、ER结合的、高尔基体结合的、膜相关的或整合膜成分。在一些情况下，吞噬刺激剂也可以包括三酰基脂肽、二酰基脂肽、脂磷壁酸、脂蛋白、肽聚糖、脂阿拉伯甘露聚糖、孔蛋白、包膜糖蛋白、GPI粘蛋白、磷脂甘露聚糖、酵母聚糖、β-聚糖双链(ds)RNA、双链DNA、单链(ss)RNA、单链DNA、脂多糖、阿拉伯半乳聚糖、糖肌醇磷脂、热休克蛋白(HSP)、鞭毛蛋白、CpG DNA、甲基化DNA、5′-三磷酸RNA、二氨基庚二酸、三酰基脂肽、胞壁酰二肽(MDP)、表面糖蛋白(GP)、膜成分、脂磷壁酸(LTA)、磷酰胆碱(PC)、PE、PI、分枝菌酸、三磷酸腺苷(ATP)、二磷酸腺苷(ADP)、单磷酸腺苷(AMP)、鸟苷三磷酸(GTP)、尿苷三磷酸(UTP)、胸苷三磷酸(TTP)、胞苷三磷酸(CTP)、GDP、UDP、TDP、CDP、GMP、UMP、CMP、尿酸、磷脂酰肌醇甘露糖苷(PIM)、内毒素、壁磷壁酸(WTA)、LTA、N-甲硫氨酸、碳水化合物、葡聚糖、壳聚糖、血球凝集素(hamagglutinin)、F-蛋白、酚溶调控蛋白、疟原虫色素、其和其中任何衍生物、或其和其中任何组合。dsDNA可以是长或短的。CpG DNA可以包括甲基化的或未甲基化的CpG DNA。阿拉伯半乳聚糖可以包括D-阿拉伯糖或D-半乳糖。吞噬刺激剂可以包括葡聚糖或甘露聚糖。如本文所述，吞噬刺激剂可以包括甘露聚糖或其衍生物。

[0066] 甘露聚糖

[0067] 甘露聚糖通常在酵母细胞壁上发现。它可以包括一系列由α(1-6)连接连接的甘露糖单元。甘露聚糖也可以具有α(1-2)和α(1-3)支化连接。

[0068] 在甘露聚糖结合凝集素(MBL)通路中，检测到甘露聚糖导致细胞裂解或吞噬作用。甘露聚糖也可以在植物、藻类、真菌或细菌中找到。它们是由激活的核苷酸糖(例如GDP-甘露糖、GDP-葡萄糖和UDP-半乳糖)合成的。

[0069] 定位于高尔基体的糖基转移酶利用激活的核苷酸糖通过促进甘露糖单体之间的连接来合成聚合物。

[0070] 甘露聚糖可以包括糖蛋白的多糖部分。甘露聚糖可以包括连接的甘露糖残基或分子的直链、支链或直链和支链聚合物。在一些情况下，甘露聚糖可以具有β(1-4)连接。

[0071] 甘露聚糖可以是胞质的或胞外的。甘露聚糖的分子量可以是666.6g/mol。在一些实施方式中，甘露聚糖可以具有14个氢键供体和21个受体。在其他情况下，甘露聚糖可以具有10个可旋转键。在一些情况下，甘露聚糖的单同位素质量可以是666.221858g/mol。在其他情况下，甘露聚糖的拓扑极性表面积可以是348 Å²。在一些情况下，甘露聚糖可以具有45个重原子和0形式电荷。在一些实施方式中，甘露聚糖可以是(2S,3S,4S,5S,6R)-2-[(2R,3S,4R,5R,6S)-6-[(2R,3S,4R,5S,6S)-4,5-二羟基-2-(羟基甲基)-6-[(2R,3R,4R,5S,6R)-

4,5,6-三羟基-2-(羟基甲基)氧杂环己烷-3-基]氧基氧杂环己烷-3-基]氧基-4,5-二羟基-2-(羟基甲基)氧杂环己烷-3-基]氧基-6-(羟基甲基)氧杂环己烷-3,4,5-三醇。在一些情况下,甘露聚糖可以是$C_{24}H_{42}O_{21}$。

[0072] 甘露聚糖可以包括具有α(1-2)和α(1-3)连接的侧链的α(1-6)连接的甘露糖单元的骨架。侧链长度可以是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多糖单元。在一些实施方式中,侧链可以包含甘露聚糖-寡糖(MOS)。甘露糖可以是D-甘露糖或L-甘露糖。甘露糖分子式可以是$C_6H_{12}O_6$。在一些实施方式中,甘露糖的分子量可以是180.16g/mol。在其他情况下,甘露糖可以包括D-甘露-六吡喃糖。甘露糖也可以是(3S,4S,5S,6R)-6-(羟基甲基)氧杂环己烷-2,3,4,5-四醇。甘露糖可以包括两个不同大小的环,六元吡喃糖形式和五元呋喃糖形式。在一些情况下,环在异头位置可以具有α或β构型。

[0073] 甘露聚糖可以通过酵母合成。生产甘露聚糖的酵母可以包括霍尔斯特汉逊酵母(Hansenula holstii)、瘦果红酵母(Rhodotorula acheniorum)、赭色掷孢酵母(Sporobolomyces salmonicolor)、酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)、白色念珠菌(Candida albicans)、庞贝裂殖酵母(Schizosaccharomyces pombe)、季也蒙迈耶氏酵母(Meyerozyma guilliermondii)、啤酒干酵母(Brewers dried yeast)或假丝酵母(Candida utilis)。甘露聚糖可以通过植物合成。生产甘露聚糖的植物可以包括柿树科(Ebenaceae family)、拟南芥(Arabidopsis thaliana)、豆科(the Leguminoseae family)、刺云实(Caesalpinia spinosa Kuntze)、番荔枝科(the Annonaceae family)、魔芋(Amorphophallus konjac)、角豆(Ceratonia siliqua)、旋花科(the Convolvulaceae family)、瓜尔豆(Cyamopsis tetragonoloba)、马钱科(the Loganiaceae family)、决明(Senna tora)、葫芦巴(Trigonella foenum-graecum L.)、棕榈科(the Palmae family)、欧洲云杉(Picea abies)、南欧紫荆(Cercis siliquastrum)或皱叶烟草(Nicotiana plumbaginifolia)。其他生产甘露聚糖的生物体可以包括脐形紫菜(Porphyra umbilicalis)、地中海伞藻(Acetabularia acetabulum)、轮藻(Charophyceae)、树状指孢酶(Dactylium dendroide)、假杯点衣属栅枝垫柳(Pseudocyphellaria clathrata)、易变假单胞菌(Pseudomonas mutabilis)、丁香假单胞菌长角豆致病变种(Pseudomonas syringae pv.Ciccaronei)、迟缓爱德华氏菌(Edwardsiella tarda)、铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)或热红短芽孢杆菌(Brevibacillus thermoruber)。

[0074] 膜的生物相容性锚(BAM)

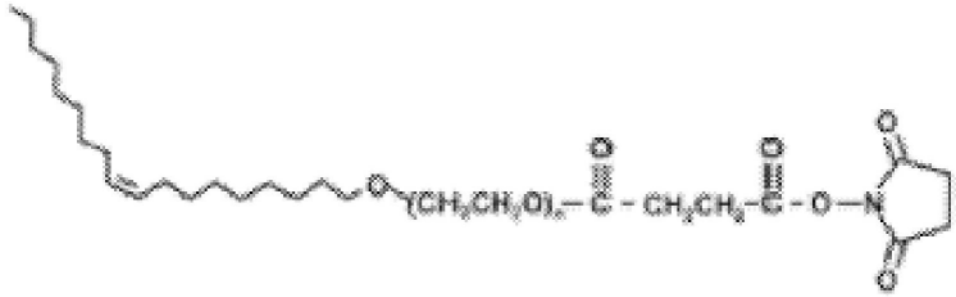
[0075] 吞噬刺激剂可以包括接头,其通过接头将吞噬刺激剂连接至减弱的癌细胞。接头可以包括化学连接、物理连接、缔合、附接、连接、接合、放置、融合、相互作用、连接、化学键合、物理键合、交联、联合、偶联、钳合、系连或其和其中任何衍生物、或其和其中任何组合。接头可以包括化学或物理接头。化学接头可以包括膜接头。膜接头可以包括肉豆蔻酸酯、棕榈酸酯、法呢基、香叶基香叶基、油酸酯、类异戊二烯、脂肪酸、二酰基甘油、长链酰基基团、长链异戊二烯基基团、胆固醇、硬脂基、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰肌醇(PI)、糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚、螯合剂脂质锚、多肽、其和其中衍生物、或其和其中的组合。螯合剂脂质锚可以包括氮三乙酸双四癸胺(NTA-DTDA)。

[0076] 接头也可以包括膜的生物相容性锚(BAM)。BAM可以包括脂质锚。脂质锚可以包括任何本文所述的及其脂质锚。BAM可以包括脂质锚和聚乙二醇(PEG)链。BAM可被用于将化学

品、分子、多肽、核酸、脂质、碳水化合物、本文所述的和其任何部分、其和其中的任何衍生物、其和其中的任何组合连接至细胞。

[0077] 在一些情况下，BAM可以包括NHS反应性酯基团。在其他情况下，PEG链可以是亲水性的。在一些实施方式中，BAM可以包括琥珀酰化多聚(乙二醇)油基醚，在PEG链的羟基末端处。在其他情况下，BAM可以包括N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)，在PEG末端琥珀酰处。在一些情况下，包含NHS末端的BAM可以结合大多数蛋白质。在一些情况下，BAM可以包括油基-O-多聚(乙二醇)-琥珀酰-N-羟基-琥珀酰亚胺酯。在一些情况下，BAM可以包括式I(油基-O-$(CH_2CH_2)_n$CO-CH_2CH_2-COO-NHS)：

[0078] 式I：

[0079] 

[0080] 其中n可以包括PEG部分中环氧乙烷(EO)单元重复数。

[0081] 在一些实施方式中，n可以是1-500，在一些情况下，PEG部分中EO单元重复的数量可以是0至9、1至10、2至11、3至12、4至13、5至14、6至15、7至16、8至17、9至18、10至19、11至20、12至21、13至22、14至23、15至24、16至25、17至26、18至27、19至28、20至29、21至30、22至31、23至32、24至33、25至34、26至35、27至36、28至37、29至38、30至39、31至40、32至41、33至42、34至43、35至44、36至45、37至46、38至47、39至48、40至49、41至50、42至51、43至52、44至53、45至54、46至55、47至56、48至57、49至58、50至59、51至60、52至61、53至62、54至63、55至64、56至65、57至66、58至67、59至68、60至69、61至70、62至71、63至72、64至73、65至74、66至75、67至76、68至77、69至78、70至79、71至80、72至81、73至82、74至83、75至84、76至85、77至86、78至87、79至88、80至89、81至90、82至91、83至92、84至93、85至94、86至95、87至96、88至97、89至98、90至99、91至100、92至101、93至102、94至103、95至104、96至105、97至106、98至107、99至108、100至109、101至110、102至111、103至112、104至113、105至114、106至115、107至116、108至117、109至118、110至119、111至120、112至121、113至122、114至123、115至124、116至125、117至126、118至127、119至128、120至129、121至130、122至131、123至132、124至133、125至134、126至135、127至136、128至137、129至138、130至139、131至140、132至141、133至142、134至143、135至144、136至145、137至146、138至147、139至148、140至149、141至150、142至151、143至152、144至153、145至154、146至155、147至156、148至157、149至158、150至159、151至160、152至161、153至162、154至163、155至164、156至165、157至166、158至167、159至168、160至169、161至170、162至171、163至172、164至173、165至174、166至175、167至176、168至177、169至178、170至179、171至180、172至181、173至182、174至183、175至184、176至185、177至186、178至187、179至188、180至189、181至190、182至191、183至192、184至193、185至194、186至195、187至196、188至197、189至198、190至199、191至200、192至201、193至202、194至203、195至204、196至205、197至206、198至207、199至208、200至

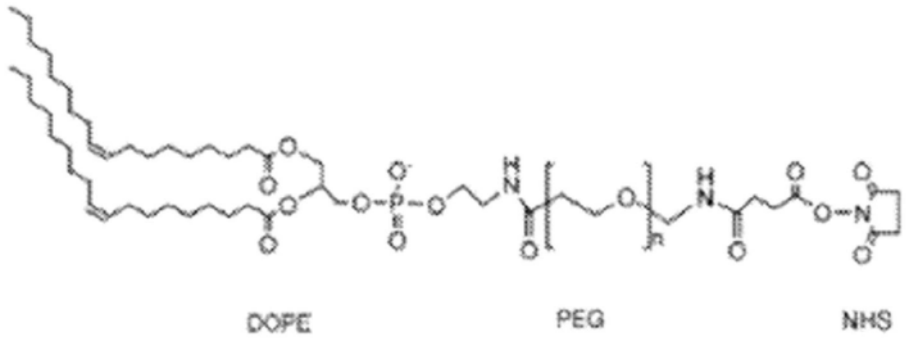
209、201至210、202至211、203至212、204至213、205至214、206至215、207至216、208至217、209至218、210至219、211至220、212至221、213至222、214至223、215至224、216至225、217至226、218至227、219至228、220至229、221至230、222至231、223至232、224至233、225至234、226至235、227至236、228至237、229至238、230至239、231至240、232至241、233至242、234至243、235至244、236至245、237至246、238至247、239至248、240至249、241至250、242至251、243至252、244至253、245至254、246至255、247至256、248至257、249至258、250至259、251至260、252至261、253至262、254至263、255至264、256至265、257至266、258至267、259至268、260至269、261至270、262至271、263至272、264至273、265至274、266至275、267至276、268至277、269至278、270至279、271至280、272至281、273至282、274至283、275至284、276至285、277至286、278至287、279至288、280至289、281至290、282至291、283至292、284至293、285至294、286至295、287至296、288至297、289至298、290至299、291至300、292至301、293至302、294至303、295至304、296至305、297至306、298至307、299至308、300至309、301至310、302至311、303至312、304至313、305至314、306至315、307至316、308至317、309至318、310至319、311至320、312至321、313至322、314至323、315至324、316至325、317至326、318至327、319至328、320至329、321至330、322至331、323至332、324至333、325至334、326至335、327至336、328至337、329至338、330至339、331至340、332至341、333至342、334至343、335至344、336至345、337至346、338至347、339至348、340至349、341至350、342至351、343至352、344至353、345至354、346至355、347至356、348至357、349至358、350至359、351至360、352至361、353至362、354至363、355至364、356至365、357至366、358至367、359至368、360至369、361至370、362至371、363至372、364至373、365至374、366至375、367至376、368至377、369至378、370至379、371至380、372至381、373至382、374至383、375至384、376至385、377至386、378至387、379至388、380至389、381至390、382至391、383至392、384至393、385至394、386至395、387至396、388至397、389至398、390至399、391至400、392至401、393至402、394至403、395至404、396至405、397至406、398至407、399至408、400至409、401至410、402至411、403至412、404至413、405至414、406至415、407至416、408至417、409至418、410至419、411至420、412至421、413至422、414至423、415至424、416至425、417至426、418至427、419至428、420至429、421至430、422至431、423至432、424至433、425至434、426至435、427至436、428至437、429至438、430至439、431至440、432至441、433至442、434至443、435至444、436至445、437至446、438至447、439至448、440至449、441至450、442至451、443至452、444至453、445至454、446至455、447至456、448至457、449至458、450至459、451至460、452至461、453至462、454至463、455至464、456至465、457至466、458至467、459至468、460至469、461至470、462至471、463至472、464至473、465至474、466至475、467至476、468至477、469至478、470至479、471至480、472至481、473至482、474至483、475至484、476至485、477至486、478至487、479至488、480至489、481至490、482至491、483至492、484至493、485至494、486至495、487至496、488至497、489至498、490至499或491至500。在一些实施方式中，PEG部分中EO单元重复的数量可以是40。在一些实施方式中，PEG部分中EO单元重复的数量可以是80。在一些实施方式中，PEG部分中EO单元重复的数量可以是90。在一些实施方式中，PEG部分中EO单元重复的数量可以是110。

[0082] BAM可以包括单脂质锚。BAM可以包括超过一个脂质锚。在一些情况下，BAM可以包括两个脂质锚。在一些实施方式中，BAM可以包括0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、

15、16、17、18、19或20个脂质锚。在一些情况下，脂质锚可以包括肉豆蔻酸酯、棕榈酸酯、法呢基、香叶基香叶基、油酸酯、类异戊二烯、脂肪酸、二酰基甘油、长链酰基基团、长链异戊二烯基基团、胆固醇、硬脂基、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰肌醇(PI)、糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚、螯合剂脂质锚、多肽、其和其中的衍生物、或其和其中的组合。螯合剂脂质锚可以包括双四癸胺氮三乙酸(NTA-DTDA)。在一些实施方式中，脂质锚可以包括甲氧基-多聚(乙二醇)-琥珀酰-N-羟基-琥珀酰亚胺酯。在一些情况下，脂质锚可以包括油基链。在其他情况下，脂质锚可以包括二油基磷脂酰乙醇胺(DOPE)。DOPE-PEG Bam可以是在PEG的羟基末端处被聚乙二醇化和琥珀酰化且在PEG末端琥珀酰化处用N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)修饰。

[0083] 在一些情况下，BAM可以包括式II。

[0084] 式II：

[0085] 

[0086] 其中n可以包括PEG部分中环氧乙烷(EO)单元重复数。

[0087] 在一些实施方式中，BAM在水性溶液中的浓度可以是100M、10M、1M、$1x10^{-1}$M、$1x10^{-2}$M、$1x10^{-3}$M、$1x10^{-4}$M、$1x10^{-5}$M、$1x10^{-6}$M、$1x10^{-7}$M、$1x10^{-8}$M、$1x10^{-9}$M、$1x10^{-10}$M、$1x10^{-11}$M、$1x10^{-12}$M、$1x10^{-13}$M、$1x10^{-14}$M、$1x10^{-15}$M、$1x10^{-16}$M、$1x10^{-17}$M、$1x10^{-18}$M、$1x10^{-19}$M、$1x10^{-20}$M、$1x10^{-21}$M、$1x10^{-22}$M、$1x10^{-23}$M、$1x10^{-24}$M、$1x10^{-25}$M、$1x10^{-26}$M、$1x10^{-27}$M、$1x10^{-28}$M、$1x10^{-29}$M或$1x10^{-30}$M。在其他情况下，BAM在水性溶液中的浓度可以是$9.9x10^{-31}$M至$1x10^{-29}$M、$9.9x10^{-30}$M至$1x10^{-28}$M、$9.9x10^{-29}$M至$1x10^{-27}$M、$9.9x10^{-28}$M至$1x10^{-26}$M、$9.9x10^{-27}$M至$1x10^{-25}$M、$9.9x10^{-26}$M至$1x10^{-24}$M、$9.9x10^{-25}$M至$1x10^{-23}$M、$9.9x10^{-24}$M至$1x10^{-22}$M、$9.9x10^{-23}$M至$1x10^{-21}$M、$9.9x10^{-22}$M至$1x10^{-20}$M、$9.9x10^{-21}$M至$1x10^{-19}$M、$9.9x10^{-20}$M至$1x10^{-18}$M、$9.9x10^{-19}$M至$1x10^{-17}$M、$9.9x10^{-18}$M至$1x10^{-16}$M、$9.9x10^{-17}$M至$1x10^{-15}$M、$9.9x10^{-16}$M至$1x10^{-14}$M、$9.9x10^{-15}$M至$1x10^{-13}$M、$9.9x10^{-14}$M至$1x10^{-12}$M、$9.9x10^{-13}$M至$1x10^{-11}$M、$9.9x10^{-12}$M至$1x10^{-10}$M、$9.9x10^{-11}$M至$1x10^{-9}$M、$9.9x10^{-10}$M至$1x10^{-8}$M、$9.9x10^{-9}$M至$1x10^{-7}$M、$9.9x10^{-8}$M至$1x10^{-6}$M、$9.9x10^{-7}$M至$1x10^{-5}$M、$9.9x10^{-6}$M至$1x10^{-4}$M、$9.9x10^{-5}$M至$1x10^{-3}$M、$9.9x10^{-4}$M至$1x10^{-2}$M、$9.9x10^{-3}$M至$1x10^{-1}$M、$9.9x10^{-2}$M至$1x10^{0}$M、$9.9x10^{-1}$M至$1x10^{1}$M或$9.9x10^{0}$M至$1x10^{2}$M。

[0088] BAM可被偶联至生物素、荧光素、多肽、化学品、小分子、核酸、药物化合物、多糖、其和其中任何衍生物、或其和其中任何组合。多糖可以包括通过糖苷键结合在一起的单糖或寡糖单元。在一些情况下，BAM可以被偶联至甘露聚糖。这可以通过将BAM的NHS基团与另一个分子的伯胺在pH 7-9反应实现以形成酰胺键。在甘露聚糖偶联至BAM的情况下，通过还原性胺化制备胺化甘露聚糖。在乙酸铵(300mg/ml)的环境中的甘露聚糖溶液通过0.2M氰基硼氢化钠在pH 7.5和50℃下还原五天。溶液使用MWCO 3500透析管(赛瓦(Serva)，德国海德堡)用PBS在4℃进一步透析过夜。在pH 7.3进行甘露聚糖的氨基基团上的BAM结合，根据

Kato等,2004。在室温1小时期间,BAM的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)基团与甘露聚糖的氨基基团反应。如上所述透析之后获得的溶液在-20℃冷冻储存直到使用。

[0089] 个性化肿瘤疫苗可以包括$1x10^{0}$M、$2x10^{0}$M、$3x10^{0}$M、$4x10^{0}$M、$5x10^{0}$M、$6x10^{0}$M、$7x10^{0}$M、$8x10^{0}$M、$9x10^{0}$M、$1x10^{-1}$M、$2x10^{-1}$M、$3x10^{-1}$M、$4x10^{-1}$M、$5x10^{-1}$M、$6x10^{-1}$M、$7x10^{-1}$M、$8x10^{-1}$M、$9x10^{-1}$M、$1x10^{-2}$M、$2x10^{-2}$M、$3x10^{-2}$M、$4x10^{-2}$M、$5x10^{-2}$M、$6x10^{-2}$M、$7x10^{-2}$M、$8x10^{-2}$M、$9x10^{-2}$M、$1x10^{-3}$M、$2x10^{-3}$M、$3x10^{-3}$M、$4x10^{-3}$M、$5x10^{-3}$M、$6x10^{-3}$M、$7x10^{-3}$M、$8x10^{-3}$M、$9x10^{-3}$M、$1x10^{-4}$M、$2x10^{-4}$M、$3x10^{-4}$M、$4x10^{-4}$M、$5x10^{-4}$M、$6x10^{-4}$M、$7x10^{-4}$M、$8x10^{-4}$M、$9x10^{-4}$M、$1x10^{-5}$M、$2x10^{-5}$M、$3x10^{-5}$M、$4x10^{-5}$M、$5x10^{-5}$M、$6x10^{-5}$M、$7x10^{-5}$M、$8x10^{-5}$M、$9x10^{-5}$M、$1x10^{-6}$M、$2x10^{-6}$M、$3x10^{-6}$M、$4x10^{-6}$M、$5x10^{-6}$M、$6x10^{-6}$M、$7x10^{-6}$M、$8x10^{-6}$M或$9x10^{-6}$M的甘露聚糖-BAM。在一些情况下,个性化肿瘤疫苗可以包括$5x10^{0}$M至$1x10^{1}$M、$1x10^{0}$M至$5x10^{0}$M、$5x10^{-1}$M至$1x10^{0}$M、$1x10^{-1}$M至$5x10^{-1}$M、$5x10^{-2}$M至$1x10^{-1}$M、$1x10^{-2}$M至$5x10^{-2}$M、$5x10^{-3}$M至$1x10^{-2}$M、$1x10^{-3}$M至$5x10^{-3}$M、$5x10^{-4}$M至$1x10^{-3}$M、$1x10^{-4}$M至$5x10^{-4}$M、$5x10^{-5}$M至$1x10^{-4}$M、$1x10^{-5}$M至$5x10^{-5}$M、$5x10^{-6}$M至$1x10^{-5}$M、$1x10^{-6}$M至$5x10^{-6}$M或$5x10^{-7}$M至$1x10^{-7}$M的甘露聚糖-BAM。个性化肿瘤疫苗也可以包括约0.2mM的甘露聚糖-BAM。个性化肿瘤疫苗也可以包括约0.95mg的甘露聚糖。个性化肿瘤疫苗也可以包括约0.098mg的BAM。个性化肿瘤疫苗可以包括约23.1mg/天的甘露聚糖。个性化肿瘤疫苗也可以包括约2.38mg/天的甘露聚糖。

[0090] 免疫刺激佐剂

[0091] 当与连接至减弱的癌细胞的吞噬刺激剂组合使用时,免疫刺激佐剂可以包括作用以加速、延长或增强吞噬刺激剂-特异性免疫反应的物质。在一些情况下,免疫刺激佐剂也可以增强、激活、引发、刺激或增加针对连接至减弱的癌细胞的吞噬刺激剂的免疫反应。

[0092] 个性化肿瘤疫苗可以包括一种免疫刺激佐剂。个性化肿瘤疫苗可以包括多于一种免疫刺激佐剂。个性化肿瘤疫苗可以包括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、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或多于100种免疫刺激佐剂。个性化肿瘤疫苗可以包括1至10、5至15、10至20、15至25、20至30、25至35、30至40、35至45、40至50、45至55、50至60、55至65、60至70、65至75、70至80、75至85、80至90、85至95、90至100种免疫刺激佐剂。在一些情况下,个性化肿瘤疫苗可以包括2种免疫刺激佐剂。在一些情况下,个性化肿瘤疫苗可以包括3种免疫刺激佐剂。在一些情况下,个性化肿瘤疫苗可以包括4种免疫刺激佐剂。

[0093] 因为免疫刺激佐剂可以通过模拟吞噬刺激剂接合免疫系统,吞噬刺激剂和免疫刺激佐剂可以通过免疫系统中受体的重叠集激活或信号转导。在一些情况下,免疫刺激佐剂可以包括PAMP或DAMP。在其他情况下,免疫刺激佐剂可以包括有机或无机免疫刺激佐剂。在一些情况下,免疫刺激佐剂可以通过TLR激动剂激活Toll样受体(TLR)。在其他情况下,免疫刺激佐剂可以通过抗-CD40抗体激活CD40受体。

[0094] 免疫刺激佐剂可以包括任何PAMP、DAMP、TLR激动剂、CD40激动剂、其和其中任何衍生物、或其和其中任何组合。在一些情况下,免疫刺激佐剂也可以包括编码PAMP、DAMP、TLR激动剂、CD40激动剂、其和其中任何衍生物、或其和其中任何组合的任何核酸。在一些实施方式中,免疫刺激佐剂也可以包括编码增加、刺激、激活或引发任何PAMP、DAMP、TLR激动剂、

CD40激动剂、其和其中任何衍生物、或其和其中任何组合的产生的蛋白质的任何核酸。在一些情况下，免疫刺激佐剂可以包括LTA、多聚(I:C)、R-848、抗-CD40抗体、其和其中任何衍生物、其和其中任何组合。

[0095] Toll样受体(TLR)

[0096] 先天免疫反应通路包括识别PAMP或DAMP的细胞成分。这种细胞成分可以包括Toll通路和胞质通路。先天免疫的细胞成分可以包括抗原呈递树突状细胞(DC)、吞噬型巨噬细胞和粒细胞、细胞毒性自然杀伤(NK)细胞和γ-δT淋巴细胞。这些细胞都使用Toll通路和胞质通路以识别PAMP或DAMP以触发免疫反应通路，其包括但不限于补体激活、吞噬作用、自噬和细胞因子产生分泌。

[0097] 在PAMP识别和免疫通路激活中，Toll通路使用一类受体，TLR。一旦PAMP激活，TLR招募衔接子蛋白以传播炎症反应中的PAMP/抗原诱导的信号转导通路。TLR是I型整合膜受体，各自具有N-末端配体识别结构域、单跨膜螺旋和C-末端胞质信号转导结构域。

[0098] TLR可以包括TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TLR11、TLR12、TLR13、其和其中任何衍生物、其和其中任何组合。在一些实施方式中，TLR可以在树突状细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞、T细胞、B细胞、上皮细胞、内皮细胞或成纤维细胞上表达。

[0099] TLR可以被本文所述的及其PAMP或DMAP激活。TLR也可以被本文所述的及其小分子激活。一些配体和其TLR列于表1。

[0100] 表1:TLR的配体列表

[0101]

TLR	配体	类别
TLR1	三酰基脂肽	PAMP
TLR2	糖脂	PAMP
TLR2	脂磷壁酸	PAMP
TLR2	HSP70	DAMP
TLR2	酵母聚糖	PAMP
TLR2	β-葡聚糖	PAMP
TLR3	dsRNA	PAMP
TLR3	多聚(I:C)	PAMP
TLR4	脂多糖	PAMP
TLR4	HSP	PAMP/DAMP
TLR4	硫酸乙酰肝素	DAMP
TLR4	纤维蛋白原	DAMP
TLR4	透明质酸片段	DAMP
TLR4	镍	化学品/药物
TLR4	阿片类药物	化学品/药物
TLR5	鞭毛蛋白	PAMP
TLR5	抑制蛋白(刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*))	PAMP
TLR6	二酰基脂肽	PAMP
TLR7	咪唑并喹啉	化学品/药物
TLR7	洛索立宾(鸟苷类似物)	化学品/药物
TLR7	溴匹立明	化学品/药物
TLR7	雷西莫特(R-848)	化学品/药物
TLR7	ssRNA	PAMP
TLR8	ssRNA	PAMP
TLR8	dsRNA	PAMP
TLR9	未甲基化的CpG DNA	PAMP
TLR10	三酰基脂肽	PAMP
TLR11	抑制蛋白(刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*))	PAMP
TLR12	抑制蛋白(刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*))	PAMP
TLR13	细菌核糖体RNA序列“CGGAAAGACC”	PAMP

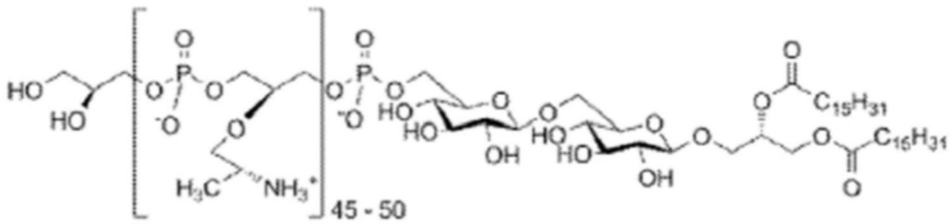
[0102] 在一些实施方式中,TLR配体可以包括β-防御素2、纤连蛋白、HMGB1、HSP22、HSP70、HSP72、内质蛋白、α-晶状体蛋白A链、人心肌肌球蛋白、抵抗素、S100蛋白、表面活性剂蛋白A、生腱蛋白-C、双糖链蛋白聚糖、CD138、透明质酸寡糖、透明质酸打碎片段、mRNA、小干扰RNA(siRNA)、氧化的PAPC(OxPAPC)、尿酸单钠盐结晶等。在一些情况下,TLR激动剂可以包括活的、死的细菌、真菌、原生生物、原生动物、线虫、植物细胞或动物细胞或其片段。在其他实

施方式中，TLR激动剂可以包括病毒或灭活病毒。在一些情况下，TLR激动剂还可以包括OX40、OX40配体、4-1-BB、4-1BB配体、CD27、CD30、CD30配体、HVEM、TROY、RELT、TNF-α、TNF-β、CD70、RANK配体、LT-α、LT-β、GITR配体和LIGHT、MALP-2、IRM化合物、其和其中的衍生物、其和其中的组合和其他本领域已知的TLR激动剂。

[0103] 在一些情况下，TLR配体可以是合成配体。合成配体可以包括Pam3Cys、CFA、MALP-2、Pam2Cys、FSL-1、Hib-OMPC、多聚I:C、多聚腺苷-多聚尿苷酸(多聚A:U)、AGP、单磷酰基脂A(MPLA)、RC-529、MDF2β、鞭毛蛋白、鸟苷类似物、咪唑并喹啉(imidazaquinoline)或洛索立宾(loxoribine)。咪唑并醌醇(Imidazoquinole)可以包括咪喹莫特、Aldara、R-848、ss多聚U、3M-012、CpG-寡核苷酸或雷西莫特、用多聚-L-赖氨酸和羧甲基纤维素(多聚-ICLC)稳定化的多聚肌苷-多聚胞苷酸、HLA-A2限制性肽、唾液酸-Tn(STn)、钥孔戚血蓝素(KLH)、其和其中的衍生物，或其和其中的组合。

[0104] 脂磷壁酸(LTA)

[0105] 个性化肿瘤疫苗可以包括LTA。脂磷壁酸(LTA)是表面相关粘附分子。LTA是革兰氏阳性菌的细胞壁的主要成分。LTA可由细菌分泌。LTA可以以冻干粉末形式维持。不同的革兰氏阳性细菌物种可以具有不同的LTA结构。LTA通过二酰基甘油被锚定至细胞膜。LTA也可以包括核糖醇或磷酸甘油(plycerol phosphate)。LTA可以诱导免疫系统中的促炎细胞因子反应。LTA的示例性化学结构示于式III。

[0106] 

式III

[0107] LTA是TLR激动剂：LTA可以结合至TLR-2以诱导NF-KB TNFα表达。LTA可以诱导补体系统以诱导被动免疫杀伤现象。LTA还可以诱导从中性粒细胞和巨噬细胞中释放活性氧和氮物质、酸水解酶、阳离子蛋白酶或细胞毒性细胞因子。LTA还可以激活清道夫受体。在一些实施方式中，LTA可以连接至肿瘤或癌细胞，且肿瘤或癌细胞膜的片段可以支持清道夫受体介导的癌抗原被树突状细胞识别。在一些情况下，LTA可以是PAMP。在其他情况下，LTA可以用作免疫刺激佐剂。

[0108] LTA可以包括来自任何革兰氏阳性菌的LTA。LTA可以包括来自枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)、海氏肠球菌(Enterococcus hirae)、金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)或酿脓链球菌(Streptococcus pyogenes)的LTA。

[0109] 个性化肿瘤疫苗可以包括$1x10^{0}$g/剂、$2x10^{0}$g/剂、$3x10^{0}$g/剂、$4x10^{0}$g/剂、$5x10^{0}$g/剂、$6x10^{0}$g/剂、$7x10^{0}$g/剂、$8x10^{0}$g/剂、$9x10^{0}$g/剂、$1x10^{-1}$g/剂、$2x10^{-1}$g/剂、$3x10^{-1}$g/剂、$4x10^{-1}$g/剂、$5x10^{-1}$g/剂、$6x10^{-1}$g/剂、$7x10^{-1}$g/剂、$8x10^{-1}$g/剂、$9x10^{-1}$g/剂、$1x10^{-2}$g/剂、$2x10^{-2}$g/剂、$3x10^{-2}$g/剂、$4x10^{-2}$g/剂、$5x10^{-2}$g/剂、$6x10^{-2}$g/剂、$7x10^{-2}$g/剂、$8x10^{-2}$g/剂、$9x10^{-2}$g/剂、$1x10^{-3}$g/剂、$2x10^{-3}$g/剂、$3x10^{-3}$g/剂、$4x10^{-3}$g/剂、$5x10^{-3}$g/剂、$6x10^{-3}$g/剂、$7x10^{-3}$g/剂、$8x10^{-3}$g/剂、$9x10^{-3}$g/剂、$1x10^{-4}$g/剂、$2x10^{-4}$g/剂、$3x10^{-4}$g/剂、$4x10^{-4}$g/剂、$5x10^{-4}$g/剂、$6x10^{-4}$g/剂、$7x10^{-4}$g/剂、$8x10^{-4}$g/剂、$9x10^{-4}$g/剂、$1x10^{-5}$g/剂、$2x10^{-5}$g/剂、$3x10^{-5}$g/剂、$4x10^{-5}$g/剂、$5x10^{-5}$g/剂、$6x10^{-5}$g/剂、$7x10^{-5}$g/剂、$8x10^{-5}$g/剂、$9x10^{-5}$g/剂、$1x10^{-6}$g/剂、$2x10^{-6}$g/剂、3x10

$^{-6}$g/剂、4x10^{-6}g/剂、5x10^{-6}g/剂、6x10^{-6}g/剂、7x10^{-6}g/剂、8x10^{-6}g/剂或9x10^{-6}g/剂的LTA。在一些情况下，个性化肿瘤疫苗可以包括5x10^{0}g/剂至1x10^{1}g/剂、1x10^{0}g/剂至5x10^{0}g/剂、5x10^{-1}g/剂至1x10^{0}g/剂、1x10^{-1}g/剂至5x10^{-1}g/剂、5x10^{-2}g/剂至1x10^{-1}g/剂、1x10^{-2}g/剂至5x10^{-2}g/剂、5x10^{-3}g/剂至1x10^{-2}g/剂、1x10^{-3}g/剂至5x10^{-3}g/剂、5x10^{-4}g/剂至1x10^{-3}g/剂、1x10^{-4}g/剂至5x10^{-4}g/剂、5x10^{-5}g/剂至1x10^{-4}g/剂、1x10^{-5}g/剂至5x10^{-5}g/剂、5x10^{-6}g/剂至1x10^{-5}g/剂、1x10^{-6}g/剂至5x10^{-6}g/剂、5x10^{-7}g/剂至1x10^{-7}g/剂的LTA。个性化肿瘤疫苗也可以包括约0.05至5mg/剂的LTA。个性化肿瘤疫苗也可以包括约0.05mg/剂的LTA。个性化肿瘤疫苗也可以包括约5mg/剂的LTA。个性化肿瘤疫苗也可以包括约0.024mg/剂的LTA。个性化肿瘤疫苗也可以包括约0.584mg/剂的LTA。

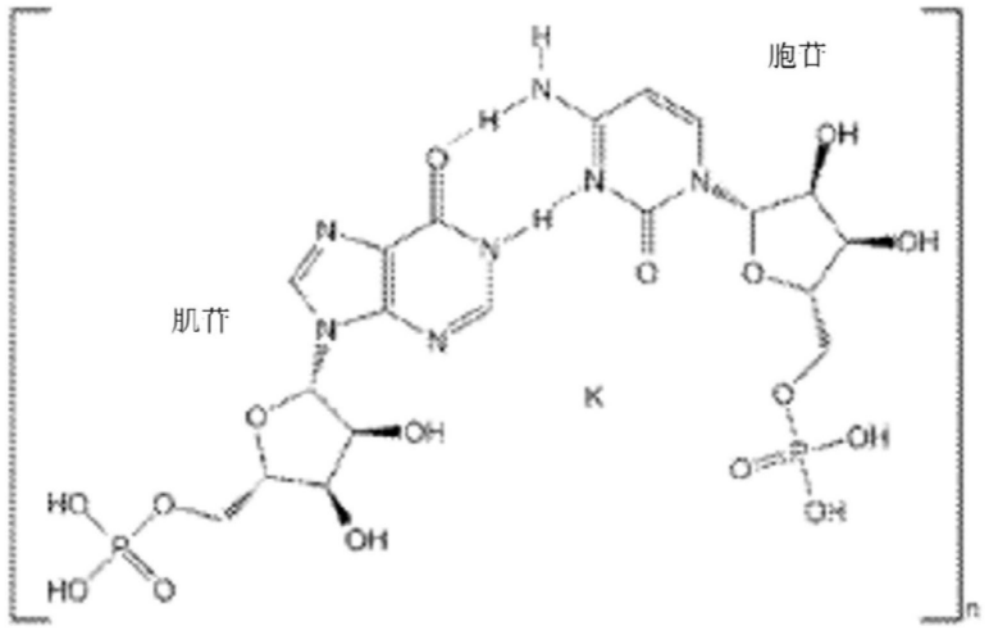
[0110] 多聚肌苷:多聚胞苷酸(多聚(I:C))

[0111] 个性化肿瘤疫苗可以包括多聚(I:C)。多聚(I:C)可以激活TLR3，其在B-细胞、巨噬细胞和树突状细胞的细胞膜上表达。由于其与病毒中发现的dsRNA的结构相似性，多聚(I:C)是TLR激动剂。多聚(I:C)及其衍生物可以用作TLR3的激动剂或激活剂。这种激活可以进一步激活转录因子干扰素调控因子3(IRF3)并产生I型IFN-β。多聚(I:C)也可以产生稳定的成熟树突状细胞。在一些情况中，多聚(I:C)可以是PAMP。在其他情况中，多聚(I:C)可以是免疫刺激佐剂。

[0112] 多聚(I:C)的衍生物可以包括多聚-L-赖氨酸和羧甲基纤维素(多聚ICLC)或多聚I:C$_{12}$U。多聚(I:C)的衍生物还可以包括癌症或免疫生物学或治疗领域普通技术人员已知的任何化学品。

[0113] 多聚(I:C)的示例性化学结构示于式IV。

[0114] 式IV

[0115] 

多聚(I:C)的纲要式结构

[0116] 多聚(I:C)可以包括错配的双链核酸。多聚(I:C)中的核酸链可以包括RNA。多聚(I:C)可以包括肌苷酸(inosinic acid)和胞苷酸(cytidylic acid)的聚合物。

[0117] 多聚(I:C)可以作为钠盐或钾盐被维持或给予对象。多聚(I:C)也可以以冻干粉末

形式维持。

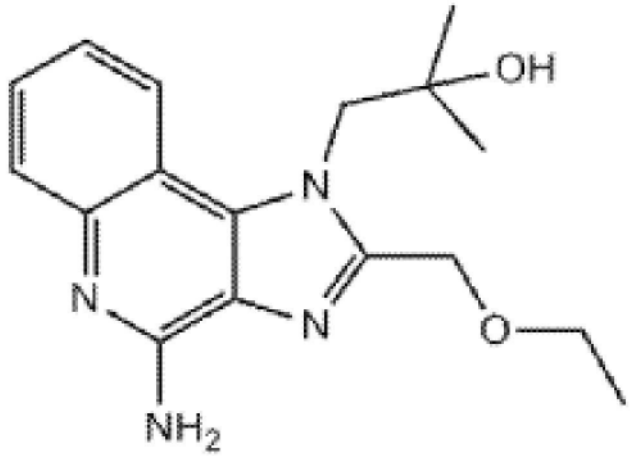
[0118] 个性化肿瘤疫苗可以包括$1x10^0$g/剂、$2x10^0$g/剂、$3x10^0$g/剂、$4x10^0$g/剂、$5x10^0$g/剂、$6x10^0$g/剂、$7x10^0$g/剂、$8x10^0$g/剂、$9x10^0$g/剂、$1x10^{-1}$g/剂、$2x10^{-1}$g/剂、$3x10^{-1}$g/剂、$4x10^{-1}$g/剂、$5x10^{-1}$g/剂、$6x10^{-1}$g/剂、$7x10^{-1}$g/剂、$8x10^{-1}$g/剂、$9x10^{-1}$g/剂、$1x10^{-2}$g/剂、$2x10^{-2}$g/剂、$3x10^{-2}$g/剂、$4x10^{-2}$g/剂、$5x10^{-2}$g/剂、$6x10^{-2}$g/剂、$7x10^{-2}$g/剂、$8x10^{-2}$g/剂、$9x10^{-2}$g/剂、$1x10^{-3}$g/剂、$2x10^{-3}$g/剂、$3x10^{-3}$g/剂、$4x10^{-3}$g/剂、$5x10^{-3}$g/剂、$6x10^{-3}$g/剂、$7x10^{-3}$g/剂、$8x10^{-3}$g/剂、$9x10^{-3}$g/剂、$1x10^{-4}$g/剂、$2x10^{-4}$g/剂、$3x10^{-4}$g/剂、$4x10^{-4}$g/剂、$5x10^{-4}$g/剂、$6x10^{-4}$g/剂、$7x10^{-4}$g/剂、$8x10^{-4}$g/剂、$9x10^{-4}$g/剂、$1x10^{-5}$g/剂、$2x10^{-5}$g/剂、$3x10^{-5}$g/剂、$4x10^{-5}$g/剂、$5x10^{-5}$g/剂、$6x10^{-5}$g/剂、$7x10^{-5}$g/剂、$8x10^{-5}$g/剂、$9x10^{-5}$g/剂、$1x10^{-6}$g/剂、$2x10^{-6}$g/剂、$3x10^{-6}$g/剂、$4x10^{-6}$g/剂、$5x10^{-6}$g/剂、$6x10^{-6}$g/剂、$7x10^{-6}$g/剂、$8x10^{-6}$g/剂或$9x10^{-6}$g/剂的多聚(I:C)。在一些情况下,个性化肿瘤疫苗可以包括$5x10^0$g至$1x10^1$g/剂、$1x10^0$g/剂至$5x10^0$g/剂、$5x10^{-1}$g/剂至$1x10^0$g/剂、$1x10^{-1}$g/剂至$5x10^{-1}$g/剂、$5x10^{-2}$g/剂至$1x10^{-1}$g/剂、$1x10^{-2}$g/剂至$5x10^{-2}$g/剂、$5x10^{-3}$g/剂至$1x10^{-2}$g/剂、$1x10^{-3}$g/剂至$5x10^{-3}$g/剂、$5x10^{-4}$g/剂至$1x10^{-3}$g/剂、$1x10^{-4}$g/剂至$5x10^{-4}$g/剂、$5x10^{-5}$g/剂至$1x10^{-4}$g/剂、$1x10^{-5}$g/剂至$5x10^{-5}$g/剂、$5x10^{-6}$g/剂至$1x10^{-5}$g/剂、$1x10^{-6}$g/剂至$5x10^{-6}$g/剂、$5x10^{-7}$g/剂至$1x10^{-7}$g/剂的多聚(I:C)。个性化肿瘤疫苗也可以包括约0.05至5mg/剂的多聚(I:C)。个性化肿瘤疫苗也可以包括约0.05mg/剂的多聚(I:C)。个性化肿瘤疫苗也可以包括约5mg/剂的多聚(I:C)。个性化肿瘤疫苗也可以包括约0.024mg/剂的多聚(I:C)。个性化肿瘤疫苗也可以包括约0.584mg/剂的多聚(I:C)。

[0119] 雷西莫特(R-848)

[0120] 个性化肿瘤疫苗可以包括雷西莫特(Resiquimod)(R-848)。R-848是咪唑并喹啉胺(imidazoquinolinamine)TLR激动剂。R-848可以具有抗肿瘤或抗病毒活性。在一些情况中,R-848可以是PAMP。在其他情况下,R-848可以用作免疫刺激佐剂。R-848可以激活TLR7/8。由R-848激活TLR7/8可以导致细胞因子的产生,特别是干扰素-α(INF-α),并增强T-辅助1(Th1)免疫反应。R-848也可以刺激树突状细胞的成熟。R-848也可以激活巨噬细胞和B-细胞。

[0121] R-848是咪喹莫特(imiquimod)的类似物。R-848的示例性结构在式V中列出。

[0122] 式V:

[0123] 

[0124] R-848也可以包括$C_{17}H_{22}N_4O_2$。R-848的分子量可以是314.4g/mol。它可以包括2个氢键供体和5个氢键受体。R-848也可以包括5个可旋转键。R-848可以包括314.174276g/mol的

单同位素质量。

[0125] 个性化肿瘤疫苗可以包括1x10^{0}g/剂、2x10^{0}g/剂、3x10^{0}g/剂、4x10^{0}g/剂、5x10^{0}g/剂、6x10^{0}g/剂、7x10^{0}g/剂、8x10^{0}g/剂、9x10^{0}g/剂、1x10^{-1}g/剂、2x10^{-1}g/剂、3x10^{-1}g/剂、4x10^{-1}g/剂、5x10^{-1}g/剂、6x10^{-1}g/剂、7x10^{-1}g/剂、8x10^{-1}g/剂、9x10^{-1}g/剂、1x10^{-2}g/剂、2x10^{-2}g/剂、3x10^{-2}g/剂、4x10^{-2}g/剂、5x10^{-2}g/剂、6x10^{-2}g/剂、7x10^{-2}g/剂、8x10^{-2}g/剂、9x10^{-2}g/剂、1x10^{-3}g/剂、2x10^{-3}g/剂、3x10^{-3}g/剂、4x10^{-3}g/剂、5x10^{-3}g/剂、6x10^{-3}g/剂、7x10^{-3}g/剂、8x10^{-3}g/剂、9x10^{-3}g/剂、1x10^{-4}g/剂、2x10^{-4}g/剂、3x10^{-4}g/剂、4x10^{-4}g/剂、5x10^{-4}g/剂、6x10^{-4}g/剂、7x10^{-4}g/剂、8x10^{-4}g/剂、9x10^{-4}g/剂、1x10^{-5}g/剂、2x10^{-5}g/剂、3x10^{-5}g/剂、4x10^{-5}g/剂、5x10^{-5}g/剂、6x10^{-5}g/剂、7x10^{-5}g/剂、8x10^{-5}g/剂、9x10^{-5}g/剂、1x10^{-6}g/剂、2x10^{-6}g/剂、3x10^{-6}g/剂、4x10^{-6}g/剂、5x10^{-6}g/剂、6x10^{-6}g/剂、7x10^{-6}g/剂、8x10^{-6}g/剂或9x10^{-6}g/剂的R-848。在一些情况下，个性化肿瘤疫苗可以包括5x10^{0}g至1x10^{1}g/剂、1x10^{0}g/剂至5x10^{0}g/剂、5x10^{-1}g/剂至1x10^{0}g/剂、1x10^{-1}g/剂至5x10^{-1}g/剂、5x10^{-2}g/剂至1x10^{-1}g/剂、1x10^{-2}g/剂至5x10^{-2}g/剂、5x10^{-3}g/剂至1x10^{-2}g/剂、1x10^{-3}g/剂至5x10^{-3}g/剂、5x10^{-4}g/剂至1x10^{-3}g/剂、1x10^{-4}g/剂至5x10^{-4}g/剂、5x10^{-5}g/剂至1x10^{-4}g/剂、1x10^{-5}g/剂至5x10^{-5}g/剂、5x10^{-6}g/剂至1x10^{-5}g/剂、1x10^{-6}g/剂至5x10^{-6}g/剂、5x10^{-7}g/剂至1x10^{-7}g/剂的R-848。个性化肿瘤疫苗可以包括约0.05至5mg/剂的R-848。个性化肿瘤疫苗可以包括约0.05mg/剂的R-848。个性化肿瘤疫苗也可以包括约5mg/剂的R-848。个性化肿瘤疫苗也可以包括约0.024mg/剂的R-848。个性化肿瘤疫苗也可以包括约0.584mg/剂的R-848。

[0126] 抗-CD40单克隆抗体(mAb)CD40是表面蛋白质受体，属于肿瘤坏死因子(TNF)受体家族。CD40的激活可以诱导树突状细胞许可(licensing)、T-细胞激活、细胞因子产生、肿瘤的巨噬细胞浸润和其他抗肿瘤反应。CD40激动剂可以被用于激活CD40并诱导抗肿瘤免疫反应。

[0127] CD40激动剂可以包括抗-CD40单克隆抗体(mAb)。在一些情况下，个性化肿瘤疫苗可以包括1x10^{0}g/剂、2x10^{0}g/剂、3x10^{0}g/剂、4x10^{0}g/剂、5x10^{0}g/剂、6x10^{0}g/剂、7x10^{0}g/剂、8x10^{0}g/剂、9x10^{0}g/剂、1x10^{-1}g/剂、2x10^{-1}g/剂、3x10^{-1}g/剂、4x10^{-1}g/剂、5x10^{-1}g/剂、6x10^{-1}g/剂、7x10^{-1}g/剂、8x10^{-1}g/剂、9x10^{-1}g/剂、1x10^{-2}g/剂、2x10^{-2}g/剂、3x10^{-2}g/剂、4x10^{-2}g/剂、5x10^{-2}g/剂、6x10^{-2}g/剂、7x10^{-2}g/剂、8x10^{-2}g/剂、9x10^{-2}g/剂、1x10^{-3}g/剂、2x10^{-3}g/剂、3x10^{-3}g/剂、4x10^{-3}g/剂、5x10^{-3}g/剂、6x10^{-3}g/剂、7x10^{-3}g/剂、8x10^{-3}g/剂、9x10^{-3}g/剂、1x10^{-4}g/剂、2x10^{-4}g/剂、3x10^{-4}g/剂、4x10^{-4}g/剂、5x10^{-4}g/剂、6x10^{-4}g/剂、7x10^{-4}g/剂、8x10^{-4}g/剂、9x10^{-4}g/剂、1x10^{-5}g/剂、2x10^{-5}g/剂、3x10^{-5}g/剂、4x10^{-5}g/剂、5x10^{-5}g/剂、6x10^{-5}g/剂、7x10^{-5}g/剂、8x10^{-5}g/剂、9x10^{-5}g/剂、1x10^{-6}g/剂、2x10^{-6}g/剂、3x10^{-6}g/剂、4x10^{-6}g/剂、5x10^{-6}g/剂、6x10^{-6}g/剂、7x10^{-6}g/剂、8x10^{-6}g/剂或9x10^{-6}g的抗-CD40mAb。在一些情况下，个性化肿瘤疫苗可以包括5x10^{0}g/剂至1x10^{1}g/剂、1x10^{0}g/剂至5x10^{0}g/剂、5x10^{-1}g/剂至1x10^{0}g/剂、1x10^{-1}g/剂至5x10^{-1}g/剂、5x10^{-2}g/剂至1x10^{-1}g/剂、1x10^{-2}g/剂至5x10^{-2}g/剂、5x10^{-3}g/剂至1x10^{-2}g/剂、1x10^{-3}g/剂至5x10^{-3}g/剂、5x10^{-4}g/剂至1x10^{-3}g/剂、1x10^{-4}g/剂至5x10^{-4}g/剂、5x10^{-5}g/剂至1x10^{-4}g/剂、1x10^{-5}g/剂至5x10^{-5}g/剂、5x10^{-6}g/剂至1x10^{-5}g/剂、1x10^{-6}g/剂至5x10^{-6}g/剂、5x10^{-7}g/剂至1x10^{-7}g/剂的抗-CD40mAb。个性化肿瘤疫苗可以包括约0.04mg/剂至约4mg/剂的抗-CD40mAb。个性化肿瘤疫苗可以包括约0.04mg/剂的抗-CD40mAb。个性化肿瘤疫苗可以包括约4mg/剂的抗-CD40mAb。个性化肿瘤疫苗可以包括约0.02mg/剂的抗-

CD40mAb。个性化肿瘤疫苗可以包括约0.467mg/剂的抗-CD40mAb。在一些情况下，个性化肿瘤疫苗还可以替换、取代或组合本文所述的及其抗-CD40mAb与CD40激动剂。在一些情况下，CD40激动剂还可以包括三聚体CD40配体(CD40L)、CD40L的异位表达、其和其中任何衍生物、或其和其中的任何组合。在一些情况下，抗-CD40抗体可以包括ABBV-927、ADC-1013、塞鲁单抗(Selicrelumab)、APX005M、ChiLob7/4、ADC-1013、SEA-CD40、CDX1140、CP-870893、达赛特珠单抗(dacetuzmab)、其和其中任何衍生物、或其和其中的任何组合。CD40激动剂还可以包括CD40L、GM.CD40L、MEDI5083(NCT03089645)、HERACD40L、双因子(duokine)、其和其中任何衍生物、或其和其中任何组合。

[0128] 抗体可以包括IgA、IgD、IgE、IgG、IgM、其和其中任何衍生物、或其和其中任何组合。在一些实施方式中，抗-CD40抗体可以包括鼠、人、嵌合的或人源化的抗体。在其他情况下，抗-CD40抗体可以包括多克隆或单克隆抗体。在一些情况下，抗体可以包括鸡、山羊、豚鼠、仓鼠、马、小鼠、大鼠、绵羊、猴、黑猩猩、人、骆驼、鲨鱼、兔子、羊驼、美洲驼的抗体或其任何组合。在一些情况下，抗-CD40抗体可以包括完整抗体或抗体片段。在一些情况下，抗-CD40抗体可以包括IgA1、IgA2、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、其和其中任何衍生物、或其和其中任何组合。在一些实施方式中，抗-CD40抗体可以包括双特异性抗体、单克隆抗体、单链可变片段(scFv)、单链抗原结合片段(scFab)、双可变结构域Ig(DVD-Ig)、scFv-IgG融合体、scFv-Fc(恒定区)、重链抗体(HcAb)、新抗原受体抗体(IgNAR)、结构域抗体(dAb)、单-dAb(sdAb)、双抗体、内抗体、曲马单抗(trioMab)、F(ab)2双特异性抗体、F(ab)3三特异性抗体、BiTE抗体、DART抗体、四价串联双抗体(tand antibody)、迷你抗体、双-scFv、三抗体、四抗体、骆驼Ig、鲨鱼Ig、其和其中的片段、其和其中的的衍生物、或其和其中的任何组合。

[0129] 在一些实施方式中，CD40和TLR的激活可以独立地激活不同的免疫反应通路。在一些情况下，CD40和TLR的激活可以激活重叠的免疫反应通路。在一些实施方式中，CD40和TLR的激活可以在激活免疫反应通路上具有叠加效应。在其他情况下，CD40和TLR的激活可以在激活免疫反应通路上具有协同效应。在一些实施方式中，CD40和TLR的激活可以在抗肿瘤反应上具有叠加效应或协同效应。在一些情况下，抗肿瘤反应可以包括抑制、逆转、停止、减少、约束、抑制或禁止肿瘤或肿瘤细胞的生长、转移、分化、迁移、分裂或分泌。

[0130] 有机和无机的佐剂

[0131] 在一些情况下，免疫刺激佐剂可以包括有机分子免疫刺激佐剂。在一些情况下，免疫刺激佐剂可以包括无机分子免疫刺激佐剂。

[0132] 有机免疫刺激佐剂可以包括灭活的库博克鲁斯分支杆菌(Mycobacterium tuberculosis)、角鲨烯、皂苷、单磷酰基脂A(MPL)、其和其中的任何衍生物、或其和其中的任何组合。在一些情况下，有机免疫刺激佐剂可以包括阿拉莫林(algammulin)；海藻葡聚糖(algal glucan)；β-葡聚糖；霍乱毒素B亚基；CRL1005：ABA嵌段聚合物具有平均值为x＝8和y＝205；γ胰岛素：直链(非支链的)B-D(2-＞1)多聚果糖呋喃基-α-D-葡萄糖；Gerbu佐剂：N-乙酰基葡萄糖胺-(β1-4)-N-乙酰基胞壁酰-L-丙氨酰基-D-谷氨酰胺(GMDP)；二甲基二十八烷铵氯(DDA)；锌L-脯氨酸盐复合物(Zn-Pro-8)；咪喹莫特(1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-4-胺；ImmTher™：N-乙酰基葡糖胺基-N-乙酰基胞壁酰-L-Ala-D-异Glu-L-Ala-二棕榈酸甘油酯；Murametide：(2R)-2-[[(2S)-2-[2-[(2S,3R,4R,5S,6R)-3-乙酰氨基-2,5-二羟基-6-(羟基甲基)氧杂环己烷-4-基]氧基丙酰基氨基]丙酰基]氨基]-5-氨基-

5-氧代戊酸甲酯;QS-21;S-28463:4-氨基-a,a-二甲基-iH-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-乙醇;Salvopeptide:VQGEESNDK^HCl(IL-1β 163-171肽);苏氨酰-MDP(Termurtide™):N-乙酰基胞壁酰-L-苏氨酰-D-异谷氨酰胺;白细胞介素(IL)-18;IL-1β;IL-2;IL-12;IL-15;IL-4;IL10;γ干扰素;NFκd3调节信号蛋白;DNA寡核苷酸例如包含C-或G-的寡核苷酸,其和其中任何衍生物,或其和其中的任何组合。在一些情况下,有机免疫刺激佐剂也可以包括编码免疫调节淋巴因子(例如IL-18、IL-1β、IL-2、IL-12、IL-15、IL-4、IL10、γ干扰素、NFκB调节信号蛋白、其和其中任何衍生物、或其和其中的任何组合)的核酸序列。在一些情况下,有机免疫刺激佐剂可以包括海藻糖-6,6′-二霉菌酸酯(TDM)、胞壁酰二肽(MDP);AF或SPT(角鲨烷的乳剂(5%);Tween 80(0.2%);AVRIDINE™(丙二胺);BAY R1005™((N-(2-脱氧-2-L-亮氨酰氨基-b-D-吡喃糖葡萄糖基)-N-十八烷基-十二烷酰-酰胺水醋酸);CALCITRIOL™(1-α,25-二羟基-维生素D3);霍乱全毒素;霍乱-毒素-A1-蛋白-A-D-片段融合蛋白;霍乱毒素的亚-基B;CRL 1005(嵌段共聚物P1205);含细胞因子脂质体;DDA(二甲基双十八烷基溴化铵);DHEA(脱氢表雄酮);DMPC(二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱);DMPG(二肉豆蔻酰磷脂酰甘油);DOC/明矾复合物(去氧胆酸钠盐);弗氏完全佐剂;弗氏不完全佐剂;γ菊糖(inulin);Gerbu佐剂(混合物:i)N-乙酰葡萄糖胺基-(P1-4)-N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰基-D-谷氨酰胺(GMDP)、ii)二甲基双十八烷基氯化铵(DDA)、iii)锌-L-脯氨酸盐复合物(ZnPro-8);GM-CSF);GMDP(N-乙酰葡萄糖胺基-(b1-4)-N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰基-D-异谷氨酰胺);ImmTher™(N-乙酰葡萄糖胺基-N-乙酰胞壁酰-L-Ala-D-异Glu-L-Ala-二棕榈酸甘油酯);DRV(由脱水-再脱水囊泡制备的免疫脂质体);ISCOMS™;ISCOPREP 7.0.3.™;脂质体;LOXORIBINE™(7-烯丙基-8-氧代鸟苷);LT口服佐剂(大肠杆菌不稳定肠毒素-原毒素);MF59™;(角鲨烯-水乳剂);MONTANIDE ISA 51™(纯化的不完全弗氏佐剂);MONTANIDE ISA 720™(可代谢的油佐剂);MPL™(3-Q-脱酰基(desacyl)-4′-单磷脂A);MTP-PE和MTP-PE脂质体((N-乙酰基-L-丙氨酰基-D-异谷氨酰胺酰-L-丙氨酸-2-(1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-(羟基磷酰基氧基))-乙氨酰、单钠盐);MURAMETIDE™(Nac-Mur-L-Ala-D-Gln-OCH3);MURAPALMITINE™和D-MURAPALMITINE™(Nac-Mur-L-Thr-D-异Gln-sn-二棕榈酰甘油);NAGO(神经氨酸酶-半乳糖氧化酶);NISV(非离子表面活性剂囊泡);PLEURAN™(β-葡聚糖);PLGA、PGA或PLA(乳酸和乙醇酸的均聚物和共聚物;微球/纳米球);PLURONIC L121™;PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯);PODDS™(类蛋白微球);氨基甲酸聚乙二醇酯衍生物;多聚-rA:多聚-rU(多聚腺苷酸-多聚尿苷酸复合物);聚山梨醇酯80(Tween 80);螺旋形蛋白质(阿凡提急性脂质制品公司(Avanti Polar Lipids,Inc.),阿拉巴马州阿拉巴斯特);STIMULON™(QS-21);植物皂甙(Quil-A)(植物皂甙皂角苷);S-28463(4-氨基-otec-二甲基-2-乙氧基甲基-IH-咪唑并[4,5c]喹啉-1-乙醇);SAF-1™(“Syntex佐剂配方”);仙台蛋白脂质体和含仙台的脂质基质;Span-85(脱水山梨糖醇);Specol(Marcol 52、Span 85和Tween 85的乳剂);角鲨烯或**Robane®**(2,6,10,15,19,23-六甲基二十四烷和2,6,10,15,19,23-六甲基-2,6,10,14,18,22-二十四烷己烷);硬脂基酪氨酸(十八烷基酪氨酸盐酸盐);**Theramid®**(N-乙酰基葡萄糖胺基-N-乙酰基胞壁酰-L-Ala-D-异Glu-L-Ala-二棕榈酰氧基丙酰胺);苏氨酰基-MDP(Termurtide™或[thr1]-MDP;N-乙酰基胞壁酰-L-苏氨酰基-D-异谷氨酰胺);Ty颗粒(Ty-VLP或病毒样颗粒);Walter-Reed脂质体(含有吸附在氢氧化铝上的脂质A的脂质体);脂肽,包括Pam3Cys;共聚物,包括Optivax(CRL1005)、L121、Poloaxmer4010);脂质体,包括隐形

的、螺旋形的，包括BIORAL；植物衍生的佐剂，包括QS21、植物皂甙、Iscomatrix；番茄素；PLG；PMM；菊粉(Inulin)；微生物衍生的佐剂，包括罗莫肽、DETOX™、MPL、CWS、甘露糖、CpG核酸序列、CPG7909、人TLR 1-10的配体、鼠TLR 1-13的配体、ISS-1018、IC31、咪唑并喹啉、林托莫德(Rintatolimod)、Ribi529、IMOxine、IRIV、VLP、霍乱毒素、热-不稳定毒素、Pam3Cys、鞭毛蛋白、GPI锚、LNFPIII/Lewis X、抗微生物肽、UC-1V150、RSV融合蛋白、cdiGMP；或CGRP神经肽。有机免疫刺激佐剂还可以包括阳离子或聚阳离子化合物。在一些情况下，阳离子或聚阳离子化合物可以包括阳离子或聚阳离子肽或蛋白质，包括鱼精蛋白、核仁素、精胺(spermin)或亚精胺，或其他阳离子肽或蛋白质，例如多聚-L-赖氨酸(PLL)、多聚-精氨酸、碱性多肽、细胞穿透肽(CPP)，包括结合HIV的肽、Tat、HIV-1Tat(HIV)、Tat-衍生肽、穿透肽、VP22衍生的或类似肽、HSV VP22(单纯疱疹病毒)、MAP、KALA或蛋白质转导结构域(PTD、PpT620、富含脯氨酸的肽、富含精氨酸的肽、富含赖氨酸的肽、一种或多种MPG-肽、Pep-1，L-寡聚物、一种或多种降血钙素肽、触角足突变衍生的肽(特别是来自果蝇触角足突变(Drosophilaantennapedia)的)、pAntp、pIsl、FGF、乳铁蛋白、转运蛋白、抗菌肽-2、Bac715-24、SynB、SynB(1)、pVEC、hCT-衍生肽、SAP、鱼精蛋白(protamine)、精胺、亚精胺(spermidine)或组蛋白。在其他情况下，阳离子或聚阳离子化合物可以包括阳离子多糖。在一些情况下，阳离子多糖可以包括壳聚糖；聚凝胺；阳离子聚合物，其包括聚乙烯亚胺(PEI)；阳离子脂质，其包括DOTMA：1,2-双-O-十八烯基-3-三甲基铵丙烷(氯盐)；DMRIE；双-C14-脒；DOTIM；SAINT；DC-Chol；BGTC；CTAP：DOPC；DODAP；DOPE：二油酰磷脂酰乙醇-胺；DOSPA；DODAB；DOIC；DMEPC；DOGS：双十八烷基酰胺甘氨酰精胺(Dioctadecylamidoglicylspermin)；DIMRI：双肉豆蔻-氧丙基二甲基羟乙基溴化铵；DOTAP：二油酰氧基-3-(三甲基氨)丙烷；DC-6-14：O,O-二十四酰(ditetradecanoyl)-N-(-三甲基铵基乙酰基)二乙醇氯化胺；CLIP1：rac-[(2,3-双十八烷基氧丙基)(2-羟乙基)]-二甲基氯化铵；CLIP6：rac-[2(2,3-双十六烷基氧丙基-氧基甲基氧基)乙基]三甲基溴化铵；CLIPS：rac-[2(2,3-双十六烷基氧丙基-氧基琥珀酰氧基)乙基]-三甲基铵；阳离子脂质体(oligofectamine)；或阳离子或聚阳离子聚合物，其包含修饰的多聚氨基酸，其包括氨基酸-聚合物或逆聚酰胺；修饰的聚乙二醇，其包括PVP(多聚(N-乙基-4-乙烯基溴化吡啶鎓))；修饰的丙烯酸酯，其包括pDMAEMA(多聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯))；修饰的酰胺基，其包括pAMAM(多聚(酰胺基))；修饰的多聚β酰胺酯(PBAE)，其包括二胺端修饰的1,4二丙烯酸丁二醇酯-共-5-氨基-1-戊醇聚合物；树状聚合物，其包括多聚丙胺树状聚合物或pAMAM基的树状聚合物；一种或多种聚亚胺(s)，其包括PEI：聚乙烯亚胺(poly(ethyleneimine))、聚丙烯亚胺(poly(propyleneimine))、聚丙烯胺(polyallylamine)；基于糖骨架的聚合物，其包括基于环糊精的聚合物、基于葡聚糖的聚合物、壳聚糖；基于硅烷骨架的聚合物，其包括PMOXA-PDMS共聚物；嵌段聚合物，其包括一种或多种阳离子嵌段物的组合(例如选择如上所述阳离子聚合物)和一种或多种亲水性-或疏水性嵌段物(例如聚乙二醇)的组合。在一些情况下，有机免疫刺激佐剂可以包括乳液佐剂。在一些情况下，乳液佐剂可以包括角鲨烯；DL-a-生育酚(维生素E)；来自明尼苏达沙门氏菌(Salmonella minnesota bactrerium)或皂树(Quillaja saponaria tree)的脂质；ASO1B；ASO1E；AS03；AS04；CFA；SAF；IFA；MF59；Provax；TiterMax；蒙塔尼(Montanide)；或Vaxfectin。在一些情况下，有机免疫刺激佐剂可以包括其中和其任何有机刺激佐剂的衍生物或组合；本文所述的和其任何有机佐剂的微球

和微颗粒，或本文所述的和其任何有机佐剂的纳米球或纳米颗粒。

[0133] 在一些情况下，免疫刺激佐剂可以包括无机分子免疫刺激佐剂。无机免疫刺激佐剂可以包括金属，例如铈、锌、铁、铝和钙的盐。在一些情况下，无机免疫刺激佐剂可以包括含铝化合物(明矾)。明矾可以包括具有式$KAl(SO_4)_2\cdot 12H_2O$，$(NH_4^+)(Al(SO_4)_2)\cdot 12H_2O$的材料、其和其中任何衍生物或其和其中任何组合。明矾可以包括偏氢氧化铝(AlO(OH))或羟基磷酸铝($Al(OH)_x(PO_4)_y$)。在一些情况下，含铝化合物还可以包括Imject™明矾。Imject™明矾可以包含晶体氢氧化镁和氢氧化铝。明矾还可以包括Alhydrogel®、Adju-Phos®、ADJUMER™(聚磷氰)(polyphosphazene)、磷酸铝凝胶、磷酸钙凝胶、CAP™(磷酸钙纳米颗粒)、铵矾、磷酸盐缓冲盐水、Rehydragel™、其和其中任何衍生物或其和其中的任何组合。

[0134] 减弱的癌细胞

[0135] 在一些情况下，个性化肿瘤疫苗可以包括减弱的癌细胞群或组。减弱的癌细胞可以包括正在经历或已经经历处理的癌细胞或癌细胞群或组。在一些情况下，减弱的癌细胞可以是哺乳动物细胞。在一些情况下，减弱的癌细胞可以是非哺乳动物细胞。在一些情况下，减弱的癌细胞可以包括小鼠细胞。在一些情况下，减弱的癌细胞可以是人细胞。在一些情况下，减弱的癌细胞可以是活细胞。在一些实施方式中，减弱的癌细胞可以包括在正常或健康细胞中不会发现的衰老的、应激的、损伤的、感染的或转化的细胞。在一些情况下，减弱的癌细胞可以包括肿瘤或癌细胞。在一些情况下，减弱的癌细胞可以包括过度生长的细胞。在一些情况下，减弱的癌细胞可以包括过度分裂的细胞。在一些情况下，减弱的癌细胞可以包括过度分化的细胞。在一些情况下，减弱的癌细胞可以包括干细胞。在一些情况下，减弱的癌细胞可以包括癌症干细胞。在一些情况下，减弱的癌细胞可以包括非分裂细胞。在一些情况下，减弱的癌细胞可以包括有丝分裂细胞。在一些情况下，减弱的癌细胞可以包括减数分裂细胞。在一些情况下，减弱的癌细胞可以包括生长停滞的细胞。在一些情况下，减弱的癌细胞可以包括复制停滞的细胞。在一些情况下，减弱的癌细胞可以包括分裂停滞的细胞。在一些情况下，减弱的癌细胞可以包括有丝分裂停滞的细胞。在一些情况下，减弱的癌细胞可以包括分化停滞的细胞。在一些情况下，减弱的癌细胞可以包括减数分裂停滞的细胞。在一些实施方式中，减弱的癌细胞可以包括猴、黑猩猩、大鼠、兔子、猪、豚鼠、马、骆驼、羊驼、美洲驼、狗、猫、牛的细胞。

[0136] 在一些情况下，减弱的癌细胞可以包括原发肿瘤或癌细胞。在一些情况下，减弱的癌细胞可以包括培养的癌细胞。在一些情况下，减弱的癌细胞可以包括从个体提取的和提取之后在体外培养的肿瘤或癌细胞。在一些情况下，提取可以包括从个体的组织活检收获肿瘤或癌细胞。在一些情况下，提取可以包括从个体的肿瘤或癌的部位的活检收获肿瘤或癌细胞。在一些情况下，提取可以包括从个体的循环肿瘤或癌细胞的活检收获肿瘤或癌细胞。在一些情况下，活检可以包括骨活检、骨髓活检、乳腺活检、胃肠道活检、肺活检、肝活检、前列腺活检、神经系统活检、泌尿生殖器活检、淋巴结活检、肌肉活检、皮肤活检、血液活检、体液活检、心脏活检、子宫内膜活检、开放性活检、前哨淋巴结活检、其和其中的任何衍生物、或其和其中的任何组合。在一些情况下，活检可以包括细针抽吸活检、芯针活检、真空辅助活检、切除式活检、削去式活检、打孔式活检、内窥镜活检、腹腔镜活检、骨髓抽吸活检、液体活检、其和其中的任何衍生物、或其和其中的任何组合。在其他情况下，活检可以包括切口活检或切除活检。

[0137] 在一些情况下，减弱的癌细胞可以包括从个体提取的和提取之后无需任何体外培养的肿瘤或癌细胞。在一些情况下，个性化肿瘤疫苗可以包括本文所述的及其任何细胞类型。

[0138] 个性化肿瘤疫苗可以包括$1x10^0$至$1x10^1$个减弱的癌细胞、$5x10^0$至$5x10^1$个减弱的癌细胞、$1x10^1$至$1x10^2$个减弱的癌细胞、$5x10^1$至$5x10^2$个减弱的癌细胞、$1x10^2$至$1x10^3$个减弱的癌细胞、$5x10^2$至$5x10^3$个减弱的癌细胞、$1x10^3$至$1x10^4$个减弱的癌细胞、$5x10^3$至$5x10^4$个减弱的癌细胞、$1x10^4$至$1x10^5$个减弱的癌细胞、$5x10^4$至$5x10^5$个减弱的癌细胞、$1x10^5$至$1x10^6$个减弱的癌细胞、$5x10^5$至$5x10^6$个减弱的癌细胞、$1x10^6$至$1x10^7$个减弱的癌细胞、$5x10^6$至$5x10^7$个减弱的癌细胞、$1x10^7$至$1x10^8$个减弱的癌细胞、$5x10^7$至$5x10^8$个减弱的癌细胞、$1x10^8$至$1x10^9$个减弱的癌细胞、$5x10^8$至$5x10^9$个减弱的癌细胞、$1x10^9$至$1x10^{10}$个减弱的癌细胞、$5x10^9$至$5x10^{10}$个减弱的癌细胞、$1x10^{10}$至$1x10^{11}$个减弱的癌细胞、$5x10^{10}$至$5x10^{11}$个减弱的癌细胞、$1x10^{11}$至$1x10^{12}$个减弱的癌细胞、$5x10^{11}$至$5x10^{12}$个减弱的癌细胞、$1x10^{12}$至$1x10^{13}$个减弱的癌细胞、$5x10^{12}$至$5x10^{13}$个减弱的癌细胞、$1x10^{13}$至$1x10^{14}$个减弱的癌细胞、$5x10^{13}$至$5x10^{14}$个减弱的癌细胞、$1x10^{14}$至$1x10^{15}$个减弱的癌细胞、$5x10^{14}$至$5x10^{15}$个减弱的癌细胞、$1x10^{15}$至$1x10^{16}$个减弱的癌细胞、$5x10^{15}$至$5x10^{16}$个减弱的癌细胞、$1x10^{16}$至$1x10^{17}$个减弱的癌细胞、$5x10^{16}$至$5x10^{17}$个减弱的癌细胞、$1x10^{17}$至$1x10^{18}$个减弱的癌细胞、$5x10^{17}$至$5x10^{18}$个减弱的癌细胞、$1x10^{18}$至$1x10^{19}$个减弱的癌细胞、$5x10^{18}$至$5x10^{19}$个减弱的癌细胞、$1x10^{19}$至$1x10^{20}$个减弱的癌细胞或$5x10^{19}$至$5x10^{20}$个减弱的癌细胞。在一些实施方式中，个性化肿瘤疫苗可以包括$1x10^5$、$2x10^5$、$3x10^5$、$4x10^5$、$5x10^5$、$6x10^5$、$7x10^5$、$8x10^5$、$9x10^5$、$1x10^6$、$2x10^6$、$3x10^6$、$4x10^6$、$5x10^6$、$6x10^6$、$7x10^6$、$8x10^6$、$9x10^6$或$1x10^7$个减弱的癌细胞。个性化肿瘤疫苗可以包括$1x10^6$个减弱的癌细胞。

[0139] 减弱的癌细胞的治疗相关量可以包括$1x10^0$至$1x10^1$个减弱的癌细胞、$5x10^0$至$5x10^1$个减弱的癌细胞、$1x10^1$至$1x10^2$个减弱的癌细胞、$5x10^1$至$5x10^2$个减弱的癌细胞、$1x10^2$至$1x10^3$个减弱的癌细胞、$5x10^2$至$5x10^3$个减弱的癌细胞、$1x10^3$至$1x10^4$个减弱的癌细胞、$5x10^3$至$5x10^4$个减弱的癌细胞、$1x10^4$至$1x10^5$个减弱的癌细胞、$5x10^4$至$5x10^5$个减弱的癌细胞、$1x10^5$至$1x10^6$个减弱的癌细胞、$5x10^5$至$5x10^6$个减弱的癌细胞、$1x10^6$至$1x10^7$个减弱的癌细胞、$5x10^6$至$5x10^7$个减弱的癌细胞、$1x10^7$至$1x10^8$个减弱的癌细胞、$5x10^7$至$5x10^8$个减弱的癌细胞、$1x10^8$至$1x10^9$个减弱的癌细胞、$5x10^8$至$5x10^9$个减弱的癌细胞、$1x10^9$至$1x10^{10}$个减弱的癌细胞、$5x10^9$至$5x10^{10}$个减弱的癌细胞、$1x10^{10}$至$1x10^{11}$个减弱的癌细胞、$5x10^{10}$至$5x10^{11}$个减弱的癌细胞、$1x10^{11}$至$1x10^{12}$个减弱的癌细胞、$5x10^{11}$至$5x10^{12}$个减弱的癌细胞、$1x10^{12}$至$1x10^{13}$个减弱的癌细胞、$5x10^{12}$至$5x10^{13}$个减弱的癌细胞、$1x10^{13}$至$1x10^{14}$个减弱的癌细胞、$5x10^{13}$至$5x10^{14}$个减弱的癌细胞、$1x10^{14}$至$1x10^{15}$个减弱的癌细胞、$5x10^{14}$至$5x10^{15}$个减弱的癌细胞、$1x10^{15}$至$1x10^{16}$个减弱的癌细胞、$5x10^{15}$至$5x10^{16}$个减弱的癌细胞、$1x10^{16}$至$1x10^{17}$个减弱的癌细胞、$5x10^{16}$至$5x10^{17}$个减弱的癌细胞、$1x10^{17}$至$1x10^{18}$个减弱的癌细胞、$5x10^{17}$至$5x10^{18}$个减弱的癌细胞、$1x10^{18}$至$1x10^{19}$个减弱的癌细胞、$5x10^{18}$至$5x10^{19}$个减弱的癌细胞、$1x10^{19}$至$1x10^{20}$个减弱的癌细胞或$5x10^{19}$至$5x10^{20}$个减弱的癌细胞。在一些实施方式中，减弱的癌细胞的治疗相关量可以包括$1x10^5$、$2x10^5$、$3x10^5$、$4x10^5$、$5x10^5$、$6x10^5$、$7x10^5$、$8x10^5$、$9x10^5$、$1x10^6$、$2x10^6$、$3x10^6$、$4x10^6$、$5x10^6$、$6x10^6$、$7x10^6$、$8x10^6$、$9x10^6$或$1x10^7$个减弱的癌细胞。减弱的癌细胞的治疗相关量可以包括$1x10^6$个减弱的癌细胞。

[0140] 在一些情况下，获得减弱的癌细胞的处理可以包括物理或化学的癌细胞处理。处理可以是压迫、阻滞、生长抑制或损伤癌细胞。处理可以改变癌细胞的化学或物理组成。处理可以增加或减少癌细胞的组分、分子、化学品或其和其中的任何衍生物。在一些情况下，处理可以损害癌细胞的DNA。处理可以压迫、阻滞、生长抑制或损伤0％、1％、5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或100％的细胞群或组。处理可以压迫、阻滞、生长抑制或损伤1至5％、2至6％、3至7％、4至8％、5至9％、6至10％、7至11％、8至12％、9至13％、10至14％、11至15％、12至16％、13至17％、14至18％、15至19％、16至20％、17至21％、18至22％、19至23％、20至24％、21至25％、22至26％、23至27％、24至28％、25至29％、26至30％、27至31％、28至32％、29至33％、30至34％、31至35％、32至36％、33至37％、34至38％、35至39％、36至40％、37至41％、38至42％、39至43％、40至44％、41至45％、42至46％、43至47％、44至48％、45至49％、46至50％、47至51％、48至52％、49至53％、50至54％、51至55％、52至56％、53至57％、54至58％、55至59％、56至60％、57至61％、58至62％、59至63％、60至64％、61至65％、62至66％、63至67％、64至68％、65至69％、66至70％、67至71％、68至72％、69至73％、70至74％、71至75％、72至76％、73至77％、74至78％、75至79％、76至80％、77至81％、78至82％、79至83％、80至84％、81至85％、82至86％、83至87％、84至88％、85至89％、86至90％、87至91％、88至92％、89至93％、90至94％、91至95％、92至96％、93至97％、94至98％、95至99％或96至100％的癌细胞群或组。

[0141] 在一些情况下，个性化肿瘤疫苗可以包括给予癌细胞或癌细胞群处理。处理可以包括辐照处理。在一些情况下，辐照处理可以包括使用无线电波、微波、红外(IR)、可见光、紫外(UV)、X-射线和γ射线。γ射线辐照处理可以包括1Gy、10Gy、20Gy、30Gy、40Gy、50Gy、60Gy、70Gy、80Gy、90Gy、100Gy、110Gy、120Gy、130Gy、140Gy、150Gy、160Gy、170Gy、180Gy、190Gy、200Gy、210Gy、220Gy、230Cy、240Gy、250Gy、260Gy、270Gy、280Gy、290Gy、300Gy、310Gy、320Gy、330Gy、340Gy、350Gy、360Gy、370Gy、380Gy、390Gy、400Gy、410Gy、420Gy、430Gy、440Gy、450Gy、460Gy、470Gy、480Gy、490Gy或500Gy的γ辐射。γ射线辐照可以包括1至25Gy、2至26Gy、3至27Gy、4至28Gy、5至29Gy、6至30Gy、7至31Gy、8至32Gy、9至33Gy、10至34Gy、11至35Gy、12至36Gy、13至37Gy、14至38Gy、15至39Gy、16至40Gy、17至41Gy、18至42Gy、19至43Gy、20至44Gy、21至45Gy、22至46Gy、23至47Gy、24至48Gy、25至49Gy、26至50Gy、27至51Gy、28至52Gy、29至53Gy、30至54Gy、31至55Gy、32至56Gy、33至57Gy、34至58Gy、35至59Gy、36至60Gy、37至61Gy、38至62Gy、39至63Gy、40至64Gy、41至65Gy、42至66Gy、43至67Gy、44至68Gy、45至69Gy、46至70Gy、47至71Gy、48至72Gy、49至73Gy、50至74Gy、51至75Gy、52至76Gy、53至77Gy、54至78Gy、55至79Gy、56至80Gy、57至81Gy、58至82Gy、59至83Gy、60至84Gy、61至85Gy、62至86Gy、63至87Gy、64至88Gy、65至89Gy、66至90Gy、67至91Gy、68至92Gy、69至93Gy、70至94Gy、71至95Gy、72至96Gy、73至97Gy、74至98Gy、75至99Gy、76至100Gy、77至101Gy、78至102Gy、79至103Gy、80至104Gy、81至105Gy、82至106Gy、83至107Gy、84至108Gy、85至109Gy、86至110Gy、87至111Gy、88至112Gy、89至113Gy、90至114Gy、91至115Gy、92至116Gy、93至117Gy、94至118Gy、95至119Gy、96至120Gy、97至121Gy、98至122Gy、99至123Gy、100至124Gy、101至125Gy、102至126Gy、103至127Gy、104至128Gy、105至129Gy、106至130Gy、107至131Gy、108至132Gy、109至133Gy、110至134Gy、111至135Gy、112至136Gy、113至137Gy、114至

138Gy、115至139Gy、116至140Gy、117至141Gy、118至142Gy、119至143Gy、120至144Gy、121至145Gy、122至146Gy、123至147Gy、124至148Gy、125至149Gy、126至150Gy的γ辐射。γ射线辐照可以包括50Gy的γ辐射。处理或γ射线辐照处理可以包括48小时、46小时、44小时、42小时、40小时、38小时、36小时、34小时、32小时、30小时、28小时、26小时、24小时、22小时、20小时、18小时、16小时、14小时、12小时、10小时、8小时、6小时、4小时、3小时、2小时或1小时、55分钟、55分钟、50分钟、45分钟、40分钟、35分钟、30分钟、25分钟、20分钟、15分钟、10分钟、5分钟、1分钟或小于1分钟。癌细胞可以经历一种处理。癌细胞可以经历2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种处理。

[0142] 在一些情况下，个性化肿瘤疫苗可以包括$1x10^0$至$1x10^1$个γ射线辐照的癌细胞、$5x10^0$至$5x10^1$个γ射线辐照的癌细胞、$1x10^1$至$1x10^2$个γ射线辐照的癌细胞、$5x10^1$至$5x10^2$个γ射线辐照的癌细胞、$1x10^2$至$1x10^3$个γ射线辐照的癌细胞、$5x10^2$至$5x10^3$个γ射线辐照的癌细胞、$1x10^3$至$1x10^4$个γ射线辐照的癌细胞、$5x10^3$至$5x10^4$个γ射线辐照的癌细胞、$1x10^4$至$1x10^5$个γ射线辐照的癌细胞、$5x10^4$至$5x10^5$个γ射线辐照的癌细胞、$1x10^5$至$1x10^6$个γ射线辐照的癌细胞、$5x10^5$至$5x10^6$个γ射线辐照的癌细胞、$1x10^6$至$1x10^7$个γ射线辐照的癌细胞、$5x10^6$至$5x10^7$个γ射线辐照的癌细胞、$1x10^7$至$1x10^8$个γ射线辐照的癌细胞、$5x10^7$至$5x10^8$个γ射线辐照的癌细胞、$1x10^8$至$1x10^9$个γ射线辐照的癌细胞、$5x10^8$至$5x10^9$个γ射线辐照的癌细胞、$1x10^9$至$1x10^{10}$个γ射线辐照的癌细胞、$5x10^9$至$5x10^{10}$个γ射线辐照的癌细胞、$1x10^{10}$至$1x10^{11}$个γ射线辐照的癌细胞、$5x10^10$至$5x10^{11}$个γ射线辐照的癌细胞、$1x10^{11}$至$1x10^{12}$个γ射线辐照的癌细胞、$5x10^{11}$至$5x10^{12}$个γ射线辐照的癌细胞、$1x10^{12}$至$1x10^{13}$个γ射线辐照的癌细胞、$5x10^{12}$至$5x10^{13}$个γ射线辐照的癌细胞、$1x10^{13}$至$1x10^{14}$个γ射线辐照的癌细胞、$5x10^{13}$至$5x10^{14}$个γ射线辐照的癌细胞、$1x10^{14}$至$1x10^{15}$个γ射线辐照的癌细胞、$5x10^{14}$至$5x10^{15}$个γ射线辐照的癌细胞、$1x10^{15}$至$1x10^{16}$个γ射线辐照的癌细胞、$5x10^{15}$至$5x10^{16}$个γ射线辐照的癌细胞、$1x10^{16}$至$1x10^{17}$个γ射线辐照的癌细胞、$5x10^{16}$至$5x10^{17}$个γ射线辐照的癌细胞、$1x10^{17}$至$1x10^{18}$个γ射线辐照的癌细胞、$5x10^{17}$至$5x10^{18}$个γ射线辐照的癌细胞、$1x10^{18}$至$1x10^{19}$个γ射线辐照的癌细胞、$5x10^{18}$至$5x10^{19}$个γ射线辐照的癌细胞、$1x10^{19}$至$1x10^{20}$个γ射线辐照的癌细胞或$5x10^{19}$至$5x10^{20}$个γ射线辐照γ射线辐照的癌细胞。在一些实施方式中，个性化肿瘤疫苗可以包括$1x10^5$、$2x10^5$、$3x10^5$、$4x10^5$、$5x10^5$、$6x10^5$、$7x10^5$、$8x10^5$、$9x10^5$、$1x10^6$、$2x10^6$、$3x10^6$、$4x10^6$、$5x10^6$、$6x10^6$、$7x10^6$、$8x10^6$、$9x10^6$或$1x10^7$个γ射线辐照的癌细胞。个性化肿瘤疫苗可以包括$1x10^6$个γ射线辐照的癌细胞。个性化肿瘤疫苗可以包括$2x10^6$个γ射线辐照的癌细胞。个性化肿瘤疫苗可以包括$2.5x10^6$个γ射线辐照的癌细胞。个性化肿瘤疫苗可以包括$5x10^6$个γ射线辐照的癌细胞。个性化肿瘤疫苗可以包括$5.5x10^6$个γ射线辐照的癌细胞。

[0143] 在一些情况下，获得减弱的癌细胞的处理还可以包括化学处理。化学处理可以包括活性氧物质(ROS)(例如，超氧化物、羟基自由基和过氧化氢)、脱氨基剂(例如，亚硝酸，其可通过将胞嘧啶转化为尿嘧啶而引起转换型突变)、多环芳烃(PAH)、烷化剂(例如，乙基亚硝基脲、亚硝胺、芥子气和氯乙烯)、芳族胺和酰胺(例如，2-乙酰氨基芴)、来自植物的生物碱、溴和一些在其化学结构中包含溴的化合物、叠氮化钠、补骨脂素、苯、溴乙锭、原黄素、柔红霉素和一些金属(砷、镉、铬、镍、铁、钴)。

[0144] 治疗患癌的个体的方法

[0145] 本文描述了用有效量的对象特异性的药物组合物治疗患癌或肿瘤的个体的方法。在一些情况下,对象特异性药物组合物可以是预防性的或防止性的组合物。对象特异性药物组合物可以是治疗性或治疗药物组合物。在一些实施方式中,对象特异性药物组合物可以在对象被诊断为患癌之前给予有需要的对象。在一些实施方式中,对象特异性药物组合物可以在对象被诊断为患癌之后给予有需要的对象。

[0146] 在一些情况下,对象特异性药物组合物可以包括吞噬刺激剂或其和其中的衍生物;免疫刺激佐剂或其和其中的衍生物;以及减弱的癌细胞或其和其中的衍生物。

[0147] 在一些情况下,对象特异性药物组合物可以包括吞噬刺激剂或其和其中的衍生物;免疫刺激佐剂或其和其中的衍生物;和约1.0×10^{3}至约1.0×10^{7}个减弱的癌细胞。在一些情况下,对象特异性药物组合物可以包括甘露聚糖;免疫刺激佐剂或其和其中的衍生物;减弱的癌细胞、细胞群或其和其中的衍生物。在一些情况下,对象特异性药物组合物可以包括约2mg/剂至约200mg/剂甘露聚糖;免疫刺激佐剂或其和其中的衍生物;减弱的癌细胞、细胞群或其和其中的衍生物。在一些情况下,对象特异性药物组合物可以包括偶联至细胞膜生物相容性锚(BAM)的吞噬刺激剂或其和其中的衍生物;免疫刺激佐剂或其和其中的衍生物;减弱的癌细胞、细胞群或其和其中的衍生物。在一些情况下,对象特异性药物组合物可以包括偶联至BAM的甘露聚糖,免疫刺激佐剂或其和其中的衍生物;减弱的癌细胞、细胞群或其和其中的衍生物。在一些情况下,对象特异性药物组合物可以包括偶联至约0.2mg/剂至约20mg/剂的BAM的甘露聚糖;免疫刺激佐剂或其和其中的衍生物;减弱的癌细胞、细胞群或其和其中的衍生物。在一些情况下,对象特异性药物组合物可以包括偶联至BAM的甘露聚糖,其包括本文所述式I及其衍生物;免疫刺激佐剂或其和其中的衍生物;减弱的癌细胞、细胞群或其和其中的衍生物。

[0148] 在一些情况下,对象特异性药物组合物可以包括吞噬刺激剂或其和其中的衍生物;Toll样受体(TLR)激动剂;减弱的癌细胞、细胞群或其和其中的衍生物。在一些情况下,对象特异性药物组合物可以包括吞噬刺激剂或其和其中的衍生物;R-848、多聚(I:C)、脂磷壁酸(LTA)或其组合;和减弱的癌细胞、细胞群或其和其中的衍生物。在一些情况下,对象特异性药物组合物可以包括吞噬刺激剂或其和其中的衍生物;约0.05mg/剂至约5mg/剂的R-848、多聚(I:C)、脂磷壁酸(LTA)或其组合;和减弱的癌细胞、细胞群或其和其中的衍生物。在一些情况下,对象特异性药物组合物可以包括吞噬刺激剂或其和其中的衍生物;R-848、约0.05mg/剂至约5mg/剂的多聚(I:C)、脂磷壁酸(LTA)或其组合;和减弱的癌细胞、细胞群或其和其中的衍生物。在一些情况下,对象特异性药物组合物可以包括吞噬刺激剂或其和其中的衍生物;R-848、多聚(I:C)、约0.05mg/剂至约5mg/剂的脂磷壁酸(LTA)、或其组合;和减弱的癌细胞、细胞群或其和其中的衍生物。

[0149] 在一些情况下,对象特异性药物组合物可以包括吞噬刺激剂或其和其中的衍生物;抗-CD40抗体;减弱的癌细胞、细胞群或其和其中的衍生物。在一些情况下,对象特异性药物组合物可以包括吞噬刺激剂或其和其中衍生物;约0.04mg/剂至约4mg/剂的抗-CD40抗体;减弱的癌细胞、细胞群或其和其中的衍生物。

[0150] 在一些情况下,对象特异性药物组合物可以包括附接至BAM的甘露聚糖、R-848、多聚(I:C)、LTA、抗-CD40抗体及辐照的癌细胞。在一些情况下,对象特异性药物组合物可以包括附接至约0.05mg/剂至约5mg/剂的BAM的约0.05mg/剂至约5mg/剂的甘露聚糖、约0.05mg/

剂至约5mg/剂的R-848、约0.05mg/剂至约5mg/剂的多聚(I:C)、约0.05mg/剂至约5mg/剂的LTA、约0.04mg/剂至约4mg/剂的抗-CD40抗体，和约1.0×10^{3}个至约1.0×10^{7}个辐照的癌细胞。

[0151] 本文描述了用有效量的本文所述的及其个性化癌治疗有需要的个体的方法。

[0152] 制作个性化肿瘤疫苗或药物组合物的方法

[0153] 个性化肿瘤疫苗或药物组合物可以包括同时混合辐照的从对象的肿瘤提取的细胞群和吞噬刺激剂与免疫刺激佐剂。在其他情况下，个性化肿瘤疫苗或药物组合物可以包括依次混合辐照的从对象的肿瘤提取的细胞群和吞噬刺激剂与免疫刺激佐剂。个性化肿瘤疫苗或药物组合物可以包括混合辐照的从对象的肿瘤提取的细胞或细胞群和甘露聚糖-BAM、R-848、抗-CD40 mAb、多聚(I:C)和LTA以形成个性化肿瘤疫苗。

[0154] 赋形剂

[0155] 个性化肿瘤疫苗或药物组合物可以包括赋形剂。在一些情况下，赋形剂可以包括防腐剂、佐剂、稀释剂或稳定剂。在一些情况下，赋形剂可以防止污染。在一些情况下，赋形剂可以在储存期间稳定化疫苗效力。在一些情况下，赋形剂可以包括谷氨酸一钠、蔗糖、D-甘露糖、D-果糖、右旋糖、人血清白蛋白、磷酸钾、聚维酮C、无水乳糖、微晶、纤维素、波拉克林钾、硬脂酸镁、邻苯二甲醋酸纤维素、醇、丙酮、蓖麻油、氢氧化铝、氯化钠、苄索氯铵、甲醛、甘油、天冬酰胺、柠檬酸、硫酸镁、柠檬酸铵铁、碳酸钠、必需氨基酸、L-苯丙氨酸、非必需氨基酸、L-精氨酸盐酸盐、D-海藻糖二水合物、D-山梨糖醇、氨丁三醇、硫柳汞(thimerosal)、明胶、脲、等渗氯化钠、戊二醛、2-苯氧乙醇、聚山梨醇酯80(Tween 80)、硫酸新霉素、多粘菌素B、2-苯氧基乙醇、新霉素、多粘菌素B硫酸盐、牛血清白蛋白、酵母蛋白、硫酸链霉素、硫氰酸铵、明矾、含铝化合物、宿主细胞DAN核酸酶、大米蛋白、无定形硫酸羟基磷酸铝、MRC-5细胞蛋白、福尔马林、生理盐水、Tween20、氨基糖苷类抗生素、硼酸钠、二水合磷酸氢二钠、二水合磷酸二氢钠、酵母DNA、硫代磷酸酯连接寡聚氧基核苷酸、十二水合二元碱(dibasic dodecahydrate)、脱水单碱(monobasic dehydrate)、磷酸盐缓冲液、L-组氨酸、氯化钙盐、脱氧胆酸钠(sodium taurodeozycholate)、卵清蛋白、β-丙内酯(propriolactone)、硫柳汞氢化可的松、角鲨烯、脱水山梨糖醇三油酸酯、柠檬酸一水合物、卡那霉素、钡、氢化可的松、卵蛋白、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、TRITON X-100、α-生育酚琥珀酸氢、硫酸庆大霉素、麦芽糊精17、麦芽糊精4、精氨酸、麦芽糖、组氨酸、庚葡糖酸钙、麦芽糊精13、肝素、棉子糖、myo-肌醇、蔗糖、山梨糖醇、阿糖醇、果糖、葡糖酸钾、侧金盏花醇、木糖醇、硫代硫酸钠、天冬酰胺(asparigine)、2-羟丙基--环糊精、TRIS、柠檬酸钠、卫矛醇、甘油、其和其中任何衍生物、其和其中的任何组合。

[0156] 在一些情况下，个性化癌症疫苗或药物组合物的赋形剂可以包括无定形糖。在一些情况下，无定形糖可以包括填充剂和蛋白质稳定剂。在一些情况下，无定形糖可以包括玻璃形成糖。在一些实施方式中，无定形糖可以包括蔗糖、棉子糖、海藻糖、水苏糖、乳糖、麦芽糖、其和其中任何衍生物或组合。糖可以包括有效体积增加或有效蛋白质稳定化的量。基于重量百分比单位，糖可以按重量以约1-10％、5-15％、10-20％、15-25％、20-30％、25-35％、30-40％、35-45％、40-50％、45-55％、50-60％、55-65％、60-70％、65-75％、70-80％、75-85％、80-90％、85-95％或90-100％存在。

[0157] 在一些情况下，个性化癌症疫苗或药物组合物的赋形剂可以包括增稠剂。增稠剂

可以包括聚合物材料。聚合物材料可以包括羟乙基纤维素(HEC)、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羟丙基纤维素(HPC)、甲基纤维素(MC)、羟乙基甲基纤维素(HEMC)、或乙基羟基乙基纤维素(EHEC)和其他纤维素衍生物。

[0158] 在一些实施方式中，与没有任何赋形剂的抗原、吞噬刺激剂或细胞或细胞群的干燥固体制剂相比，赋形剂可以增加干燥固体制剂中抗原、吞噬刺激剂、或细胞或细胞群的稳定性。在一些情况下，个性化肿瘤疫苗中可以使用至少一种赋形剂。在一些情况下，多种赋形剂可以提供比任何赋形剂单独使用更强的效果，在一些情况下，提供比多种赋形剂对抗原、吞噬刺激剂、或细胞或细胞群的稳定性的叠加效果更大的效果。

[0159] 以重量计或以体积计，一种或多种赋形剂可以以约个性化肿瘤疫苗总量的0％、5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或100％存在于组合物中。在一些情况下，以重量计或以体积计，一种或多种赋形剂可以以个性化肿瘤疫苗总量的0-10％、5-15％、10-20％、15-25％、20-30％、25-35％、30-40％、35-45％、40-50％、45-55％、50-60％、55-65％、60-70％、65-75％、70-80％、75-85％、80-90％、85-95％或90-100％存在于组合物中。

[0160] 个性化肿瘤疫苗或药物组合物可以包括稀释剂。稀释剂可以包括本文所述的及其水、PBS缓冲液、氯化钠、MenCWY、DTaP-IPV、碳酸钙、黄原胶、佐剂，和其和其中的衍生物，或其和其中的任何组合。

[0161] 个性化肿瘤疫苗或药物组合物的给予

[0162] 在一些情况下，个性化肿瘤疫苗可以包括将疫苗包装进组合物或制剂中用于递送或给予对象。在一些情况下，本文提供的组合物或药物组合物的给予是指用于能够将疫苗或药物组合物递送至生物作用的所需位点的方法。递送可以包括直接施用于身体的受影响组织或区域。递送可以包括颅内注射。递送可以包括实质注射、鞘内注射、心室内注射或脑池内注射。本文提供的组合物可以通过任何方法给予。给药方法可以是吸入、动脉内注射、脑室内注射、脑池内注射、肌肉注射、眶下注射、实质内注射、腹膜内注射、脊柱内注射、鞘内注射、静脉注射、脑室内注射、立体定向注射、皮下注射，或其任何组合。给药可以包括肠外给药(包括静脉内、皮下、鞘内、腹膜内、肌肉内、血管内或输注)、口服给药、吸入给药、十二指肠内给药、直肠给药。递送可以包括局部给予(如洗剂、膏药、软膏)到表面的外表面，如皮肤。在一些情况下，给药方式为实质注射、鞘内注射、心室内注射、鼻腔内注射、脑池内注射、静脉内注射或鼻内注射或其任何组合。在一些情况下，对象可以在没有监督的情况下给予组合物。在一些情况下，对象可以在医疗专业人员(例如，医生、护士、医生助理、护理人员、临终关怀人员等)的监督下给予该组合物。医疗专业人员可以给予该组合物。在一些情况下，美容专业人员可以给予该组合物。

[0163] 治疗本文所述的患癌个体的方法可以包括给予患癌或怀疑患癌的个体个性化的肿瘤疫苗或药物组合物。治疗本文所述的患癌个体的方法也可以包括给予未患癌或未怀疑患癌的个体个性化的肿瘤疫苗或药物组合物。在一些实施方式中，癌症包括棘皮瘤(Acanthoma)、腺泡细胞瘤(Acinic cell carcinoma)、听觉神经瘤(Acoustic neuroma)、肢端黑色素瘤(Acral lentiginous melanoma)、肢端汗腺瘤(Acrospiroma)、急性嗜酸粒细胞白血病(Acute eosinophilic leukemia)、急性淋巴母细胞性白血病(Acute lymphoblastic leukemia)、急性巨核细胞白血病(Acute megakaryoblastic leukemia)、

急性单核细胞性白血病(Acute monocytic leukemia)、成熟期急性髓系白血病(Acute myeloblastic leukemia withmaturation)、急性髓系树突状细胞白血病(Acute myeloid dendritic cell leukemia)、急性髓系白血病、急性早幼粒细胞白血病(Acute promyelocytic leukemia)、釉质瘤(Adamantinoma、腺癌、腺样囊性癌(Adenoid cystic carcinoma)、腺瘤、腺瘤性牙源性瘤(Adenomatoid odontogenic tumor)、肾上腺皮质癌(Adrenocortical carcinoma)、成人T细胞白血病、侵袭性NK细胞白血病、艾滋病相关癌症、艾滋病相关淋巴瘤、肺泡状软组织肉瘤(Alveolar soft part sarcoma)、成釉细胞纤维瘤(Ameloblastic fibroma)、肛门癌、间变性大细胞淋巴瘤(Anaplastic large cell lymphoma)、未分化甲状腺癌(Anaplastic thyroid cancer)、血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤(Angioimmunoblastic T-cell lymphoma)、血管肌脂瘤(Angiomyolipoma、血管肉瘤(Angiosarcoma)、阑尾癌(Appendix cancer)、星形细胞瘤(Astrocytoma)、非典型畸胎样横纹肌样肿瘤(Atypical teratoid rhabdoid tumor)、基底细胞癌、基底样癌、B细胞白血病、B细胞淋巴瘤、贝里尼导管癌(Bellini duct carcinoma)、胆道癌(Biliary tract cancer)、膀胱癌、胚细胞瘤(Blastoma)、骨癌、骨肿瘤、脑干胶质瘤、脑肿瘤、乳腺癌、布伦纳瘤(Brenner tumor)、支气管肿瘤、细支气管肺泡癌(Bronchioloalveolar carcinoma)、褐色瘤(Brown tumor)、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、原发灶不明的癌症(Cancer of Unknown Primary Site)、类癌(Carcinoid Tumor)、上皮癌(carcinoma)、原位癌、阴茎癌、原发部位不明的上皮癌、癌肉瘤、卡斯尔曼病(Castleman's Disease)、中枢神经系统胚胎瘤(Central Nervous System Embryonal Tumor)、小脑星形细胞瘤(Cerebellar Astrocytoma)、大脑星形细胞瘤(Cerebral Astrocytoma)、宫颈癌、胆管上皮癌(Cholangiocarcinoma)、软骨瘤(Chondroma)、内生软骨肉瘤(Chondrosarcoma)、脊索瘤(Chordoma)、恶性合体细胞癌Choriocarcinoma)、脉络丛乳头状瘤(Choroid plexus papilloma)、慢性淋巴细胞白血病、慢性单核细胞白血病、慢性骨髓性白血病(Chronic myelogenous leukemia)、慢性骨髓增生性疾病(Chronic Myeloproliferative Disorder)、慢性中性粒细胞白血病(Chronic neutrophilic leukemia)、透明细胞瘤、结肠癌、大肠癌(Colorectal cancer)、颅咽管瘤(Craniopharyngioma)、皮肤T细胞淋巴瘤(Cutaneous T-cell lymphoma)、恶性萎缩性丘疹病(Degos disease、隆凸性皮肤纤维肉瘤(Dermatofibrosarcoma protuberans)、皮样囊肿(Dermoid cyst)、纤维性小圆细胞瘤(Desmoplastic small round cell tumor)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(Diffuse large B cell lymphoma)、育不良性神经上皮肿瘤(Dysembryoplastic neuroepithelial tumor)、胚胎性癌(Embryonal carcinoma)、内皮窦瘤(Endodermal sinus tumor)、子宫内膜癌(Endometrial cancer)、子宫内膜癌(Endometrial Uterine Cancer)、子宫内膜样肿瘤(Endometrioid tumor)、肠病相关T细胞淋巴瘤(Enteropathy-associated T-cell lymphoma)、成脑室管膜细胞瘤(Ependymoblastoma)、室管膜瘤(Ependymoma)、上皮样肉瘤(Epithelioid sarcoma)、成红细胞恶性增生(Erythroleukemia、食道癌、嗅神经母细胞瘤(Esthesioneuroblastoma)、尤文氏肿瘤(Ewing Family of Tumor)、尤文氏肉瘤(Ewing Family Sarcoma)、尤文氏肉瘤(Ewing's sarcoma)、颅外生殖细胞肿瘤(Extracranial Germ Cell Tumor)、性腺外生殖细胞肿瘤(Extragonadal Germ Cell Tumor)、肝外胆管癌(Extrahepatic Bile Duct Cancer)、乳腺外帕哲病(Extramammary Paget's disease)、输

卵管癌(Fallopian tube cancer)、胎内胎(Fetus in fetu)、纤维瘤(Fibroma)、纤维肉瘤(Fibrosarcoma)、滤泡性淋巴瘤(Follicular lymphoma)、滤泡性甲状腺癌(Follicular thyroid cancer)、胆囊癌(Gallbladder Cancer)、胆囊癌(Gallbladder cancer)、神经节胶质瘤(Ganglioglioma)、神经节细胞瘤(Ganglioneuroma)、胃癌、胃淋巴瘤、胃肠道癌(Gastrointestinal cancer)、胃肠道类癌肿瘤(Gastrointestinal Carcinoid Tumor)、胃肠道间质瘤(Gastrointestinal Stromal Tumor)、胃肠间质瘤(Gastrointestinal stromal tumor)、生殖细胞瘤(Germ cell tumor)、胚胎瘤(Germinoma)、妊娠性绒毛膜癌(Gestational choriocarcinoma)、妊娠滋养细胞瘤(Gestational Trophoblastic Tumor)、骨巨细胞瘤(Giant cell tumor of bone)、多形性成胶质细胞瘤(Glioblastoma multiforme)、神经胶质瘤(Glioma)、大脑胶质瘤(Gliomatosis cerebri)、血管球瘤(Glomus tumor)、胰高血糖素瘤Glucagonoma)、性腺母细胞瘤(Gonadoblastoma)、颗粒细胞瘤(Granulosa cell tumor)、毛细胞白血病(Hairy Cell Leukemia)、毛细胞白血病(Hairy Cell Leukemia)、头颈部癌、头颈部癌、心脏癌、成血管细胞瘤(Hemangioblastoma、血管外皮细胞瘤(Hemangiopericytoma)、血管肉瘤(Hemangiosarcoma)、血液恶性肿瘤(Hematological malignancy)、肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma)、肝脾T细胞淋巴瘤(Hepatosplenic T-cell lymphoma)、遗传性乳腺癌-卵巢癌综合征(Hereditary breast-ovarian cancer syndrome)、霍奇金淋巴瘤(Hodgkin Lymphoma)、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)、下咽癌(Hypopharyngeal Cancer)、下丘脑胶质瘤(Hypothalamic Glioma)、炎症性乳腺癌、眼内黑色素瘤、胰岛细胞癌、胰岛细胞瘤、青少年单核细胞白血病(Juvenile myelomonocytic leukemia)、卡波西肉瘤(Kaposi Sarcoma)、卡波西氏肉瘤(Kaposi Sarcoma)、肾癌、肝门胆管癌(Klatskin tumor)、卵巢库肯勃瘤(Kmkenberg tumor)、喉癌(Laryngeal Cancer)、喉癌(Laryngeal Cancer)、恶性黑色素瘤(Lentigo maligna melanoma)、白血病、唇和口腔癌、脂肪肉瘤(Liposarcoma)、肺癌、黄体瘤(Luteoma)、淋巴管瘤(Lymphangioma)、淋巴管肉瘤(Lymphangiosarcoma)、淋巴上皮瘤Lymphoepithelioma)、淋巴性白血病、淋巴瘤、巨球蛋白血症、恶性纤维组织细胞瘤(Malignant Fibrous Histiocytoma)、恶性纤维组织细胞瘤(Malignant fibrous histiocytoma)、骨恶性纤维组织细胞瘤、恶性胶质瘤、恶性间皮瘤、恶性外周神经鞘瘤(Malignant peripheral nerve sheath tumor)、恶性横纹肌样瘤(Malignant rhabdoid tumor)、恶性蝾螈瘤(Malignant triton tumor)、MALT淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(Mantle cell lymphoma)、肥大细胞白血病(Mast cell leukemia)、纵隔生殖细胞肿瘤(Mediastinal germ cell tumor)、纵隔肿瘤(Mediastinal tumor)、甲状腺髓样癌(Medullary thyroid cancer)、成神经管细胞瘤(Medulloblastoma)、眼泡髓上皮瘤(Medulloepithelioma)、黑色素瘤、脑膜瘤(Meningioma)、默克细胞癌(Merkel Cell Carcinoma)、间皮瘤(Mesothelioma)、转移性鳞颈癌伴隐匿原发灶(Metastatic Squamous Neck Cancer with Occult Primary)、转移性尿路上皮癌(Metastatic urothelial carcinoma)、混合苗勒氏管肿瘤(Mixed Mullerian tumor)、单核细胞白血病Monocytic leukemia)、口腔癌(Mouth Cancer)、粘液性瘤(Mucinous tumor)、多发性内分泌瘤综合征(Multiple Endocrine Neoplasia Syndrome)、多发性骨髓瘤、蕈样霉菌病(Mycosis Fungoides)、骨髓增生异常综合征(Myelodysplastic Syndrome)、骨髓性白血病、髓样肉瘤(Myeloid sarcoma)、骨髓增

生性疾病(Myeloproliferative Disease)、黏液瘤(Myxoma)、鼻腔癌(Nasal Cavity Cancer)、鼻咽癌(Nasopharyngeal Cancer)、鼻咽癌(Nasopharyngeal carcinoma)、赘瘤(Neoplasm)、神经鞘瘤(Neurinoma)、成神经细胞瘤、神经纤维瘤、神经瘤(Neuroma)、结节性黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、非黑色素瘤皮肤癌、非小细胞肺癌、眼部肿瘤Ocular oncology、少突星形细胞瘤Oligoastrocytoma、少突胶质细胞瘤Oligodendroglioma、嗜酸细胞瘤(Oncocytoma)、视神经鞘脑膜瘤(Optic nerve sheath meningioma)、口腔癌、口咽癌(Oropharyngeal Cancer)、骨肉瘤(Osteosarcoma)、卵巢癌、卵巢上皮癌(Ovarian Epithelial Cancer)、卵巢生殖细胞瘤(Ovarian Germ Cell Tumo)、卵巢低恶性潜能瘤(Ovarian Low Malignant Potential Tumor)、乳腺派杰病(Paget's disease ofthe breast)、肺上沟癌(Pancoast tumor)、胰腺癌(Pancreatic cancer)、乳突甲状腺癌(Papillary thyroid cancer)、乳头状瘤病(Papillomatosis)、副神经节瘤(Paraganglioma)、鼻窦癌(Paranasal Sinus Cancer)、甲状旁腺癌(Parathyroid Cancer)、阴茎癌(Penile Cancer)、子宫颈血管周上皮样细胞瘤(Perivascular epithelioid cell tumor)、咽癌(Pharyngeal Cancer)、嗜铬细胞瘤(Pheochromocytoma)、松果体实质中分化肿瘤(Pineal Parenchymal Tumor of Intermediate Differentiation)、成松果体细胞瘤(Pineoblastoma)、垂体细胞瘤Pituicytoma)、垂体腺瘤(Pituitary adenoma)、垂体瘤(Pituitary tumor)、浆细胞肿瘤(Plasma Cell Neoplasm)、胸膜肺母细胞瘤(Pleuropulmonary blastoma)、多胚胎瘤(Polyembryoma)、前体T淋巴芽细胞淋巴瘤(Precursor T-lymphoblastic lymphoma)、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性渗出淋巴瘤(Primary effusion lymphoma)、原发性肝细胞癌、原发性肝癌、原发性腹膜癌(Primary peritoneal cancer)、原始性神经外胚肿瘤(Primitive neuroectodermal tumor)、前列腺癌、假黏液瘤(Pseudomyxoma peritonei)、直肠癌(Rectal Cancer)、肾细胞癌(Renal cell carcinoma)、涉及15号染色体上NUT基因的呼吸道癌(Respiratory Tract Carcinoma Involving the NUT Gene on Chromosome 15)、成视网膜细胞瘤(Retinoblastoma)、横纹肌瘤(Rhabdomyoma)、横纹肌肉瘤(Rhabdomyosarcoma)、Richter氏转化(Richter's transformation)、骶尾部畸胎瘤(Sacrococcygeal teratoma)、唾液腺癌、肉瘤、施万瘤病(Schwannomatosis)、皮脂腺癌(Sebaceous gland carcinoma)、继发性肿瘤、精原细胞瘤(Seminoma)、浆液性肿瘤(Serous tumor)、支持间质细胞肿瘤(Sertoli-Leydig cell tumor)、性索-间质瘤(Sex cord-stromal tumor)、塞扎里综合征(Sezary Syndrome)、印戒细胞癌(Signet ring cell carcinoma)、皮肤癌、小蓝圆细胞瘤(Small blue round cell tumor)、小细胞癌、小细胞肺癌、小细胞淋巴瘤、小肠癌、软组织肉瘤、生长抑制素瘤(Somatostatinoma)、煤烟疣(Soot wart)、脊髓肿瘤(Spinal Cord Tumor)、脊椎肿瘤(Spinal tumor)、脾边缘区淋巴瘤(Splenic marginal zone lymphoma)、鳞状细胞癌、胃癌、浅表扩散性黑色素瘤(Superficial spreading melanoma)、幕上原始神经外胚层肿瘤(Supratentorial Primitive Neuroectodermal Tumor)、表层上皮-间质肿瘤(Surface epithelial-stromal tumor)、滑膜肉瘤(Synovial sarcoma)、T细胞急性成淋巴细胞白血病(T-cell acute lymphoblastic leukemia)、T细胞大颗粒淋巴细胞白血病(T-cell large granular lymphocyte leukemia)、T细胞白血病、T细胞淋巴瘤、T细胞原淋巴细胞白血病、畸胎瘤

(Teratoma)、卵泡膜细胞瘤(Thecoma)、晚期淋巴癌(Terminal lymphatic cancer)、睾丸癌(Testicular cancer)、卵泡膜细胞瘤(Thecoma)、喉癌、胸腺上皮癌、胸腺瘤(Thymoma)、甲状腺癌、肾盂输尿管移行细胞癌(Transitional Cell Cancer of Renal Pelvis and Ureter)、移行细胞癌(Transitional cell carcinoma)、脐尿管癌(Urachal cancer)、尿道癌(Urethral cancer)、泌尿生殖系统肿瘤(Urogenital neoplasm)、子宫肉瘤(Uterine sarcoma)、葡萄膜黑色素瘤(Uveal melanoma)、阴道癌、弗纳-莫里森综合征(Verner Morrison syndrome)、疣状癌(Verrucous carcinoma)、视路胶质瘤(Visual Pathway Glioma)、外阴癌(Vulvar Cancer)、瓦尔登斯特罗姆氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)、沃辛氏瘤(Warthin's tumor)或威尔姆氏瘤(Wilms' tumor)。

[0164] 个性化肿瘤疫苗或药物组合物的给予或施用可以进行治疗持续时间,其连续或不连续地,至少约至少约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、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100天。治疗持续时间可以是约1至约30天、约2至约30天、约3至约30天、约4至约30天、约5至约30天、约6至约30天、约7至约30天、约8至约30天、约9至约30天、约10至约30天、约11至约30天、约12至约30天、约13至约30天、约14至约30天、约15至约30天、约16至约30天、约17至约30天、约18至约30天、约19至约30天、约20至约30天、约21至约30天、约22至约30天、约23至约30天、约24至约30天、约25至约30天、约26至约30天、约27至约30天、约28至约30天或约29至约30天。

[0165] 本文所述的组合物的给予或施用可以进行治疗持续时间为至少约1周、至少约1个月、至少约1年、至少约2年、至少约3年、至少约4年、至少约5年、至少约6年、至少约7年、至少约8年、至少约9年、至少约10年、至少约15年、至少约20年或更多。在对象的寿命期间可以重复进行给予,例如在对象的寿命期间一月一次或一年一次。

[0166] 在对象的生命的大部分期间可以重复进行给予,例如一月一次或一年一次持续至少约1年、5年、10年、15年、20年、25年、30年或更多。

[0167] 在一些情况下,本文提供的任何个性化肿瘤疫苗或药物组合物,包括药物组合物的给予可以是治疗有效量,例如以减少疾病或病状的症状和/或减少疾病或病状。在一些情况下,治疗有效量可以是足以实现所需效果的量。在治疗或预防应用的内容中,治疗有效量将取决于个体对象的组织病状的类型和严重程度以及个体的特征,例如总体健康状况、年龄、性别、体重和对药物组合物的耐受性。在免疫原性组合物的内容中,在一些实施方式中,治疗有效量是足以导致针对病原的保护性反应的量。在其他实施方式中,免疫原性组合物的有效量是足以导致针对抗原的抗体产生的量。在一些实施方式中,有效量是赋予有需要的对象被动免疫所需要的量。对于免疫原性组合物,在一些实施方式中,有效量将取决于预期用途、特定抗原化合物的免疫原性程度和对象的免疫系统的健康/反应性,以及上述因素。

[0168] 给药

[0169] 本文所述的个性化肿瘤疫苗或药物组合物的给予或施用可以一天进行至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24次。在一些情况下,本

文所述的个性化肿瘤疫苗或药物组合物的给予或施用可以一周进行至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21次。在一些情况下，本文所述的个性化肿瘤疫苗或药物组合物的给予或施用可以一个月进行至少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、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89或90次。

[0170] 本发明的个性化肿瘤疫苗或药物组合物可以作为单剂或分剂给予/施用。在一些情况下，本文所述的个性化肿瘤疫苗或药物组合物可以在第一个时间点和第二个时间点给予。在一些情况下，可以如下给予个性化肿瘤疫苗或药物组合物：第一次给予在另一次给予之前相差1小时、2小时、4小时、8小时、12小时、16小时、20小时、1天、2天、4天、7天、2周、4周、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、1年或更多。

[0171] 个性化肿瘤疫苗或药物组合物的有效量可以减少肿瘤的大小。个性化肿瘤疫苗或药物组合物可以以给予个性化肿瘤疫苗或药物组合物之前的肿瘤的大小的0％、5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或100％减小肿瘤的大小。在一些情况下，有效量的个性化肿瘤疫苗或药物组合物可以以给予个性化肿瘤疫苗或药物组合物之前的肿瘤的大小的1-10％、5-15％、10-20％、15-25％、20-30％、25-35％、30-40％、35-45％、40-50％、45-55％、50-60％、55-65％、60-70％、65-75％、70-80％、75-85％、80-90％、85-95％或90-100％减小肿瘤的大小。

[0172] 个性化肿瘤疫苗或药物组合物的有效量可以减少癌细胞的数量。个性化肿瘤疫苗或药物组合物可以以给予个性化肿瘤疫苗或药物组合物之前的癌细胞数的0％、5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或100％减少癌细胞数。在一些情况下，有效量的个性化肿瘤疫苗或药物组合物可以以给予个性化肿瘤疫苗或药物组合物之前的癌细胞数的1-10％、5-15％、10-20％、15-25％、20-30％、25-35％、30-40％、35-45％、40-50％、45-55％、50-60％、55-65％、60-70％、65-75％、70-80％、75-85％、80-90％、85-95％或90-100％减少癌细胞数。

[0173] 有效量的个性化肿瘤疫苗或药物组合物可以延长被给予个性化肿瘤疫苗或药物组合物的对象的寿命。在一些情况下，有效量的个性化肿瘤疫苗或药物组合物可以将被给予个性化肿瘤疫苗或药物组合物的对象的寿命延长1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、11年、12年、13年、14年、15年、16年、17年、18年、19年、20年、21年、22年、23年、24年、25年、26年、27年、28年、29年、30年、31年、32年、33年、34年、35年、36年、37年、38年、39年、40年、41年、42年、43年、44年、45年、46年、47年、48年、49年、50年或超过50年。在一些情况下，有效量的个性化肿瘤疫苗或药物组合物可以将被给予个性化肿瘤疫苗或药物组合物的对象的寿命延长1天至1个月、25天至6个月、5个月至12个月、10个月至2年、1年至5年、4年至10年、9年至15年、14年至20年、19年至25年、24年至30年、29年至35年、34年至40年、39年至45年或44年至50年的时间量。

[0174] 有效量的个性化肿瘤疫苗或药物组合物可以延迟被给予个性化肿瘤疫苗或药物组合物的对象的癌症的发生。在一些情况下,有效量的个性化肿瘤疫苗或药物组合物可以将被给予个性化肿瘤疫苗或药物组合物的对象的癌症发生延迟1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、11年、12年、13年、14年、15年、16年、17年、18年、19年、20年、21年、22年、23年、24年、25年、26年、27年、28年、29年、30年、31年、32年、33年、34年、35年、36年、37年、38年、39年、40年、41年、42年、43年、44年、45年、46年、47年、48年、49年、50年或超过50年。在一些情况下,有效量的个性化肿瘤疫苗或药物组合物可以将被给予个性化肿瘤疫苗或药物组合物的对象的癌症发生延迟1天至1个月、25天至6个月、5个月至12个月、10个月至2年、1年至5年、4年至10年、9年至15年、14年至20年、19年至25年、24年至30年、29年至35年、34年至40年、39年至45年或44年至50年的时间量。

实施例

[0175] 提供这些实施例仅用于说明目的,而不是限制本文所提供的权利要求的范围。

[0176] 实施例1:皮下原发和转移性远端肿瘤的小鼠模型。

[0177] 本文提供了创建小鼠模型以研究皮下原发和转移性远端肿瘤的方法。

[0178] 细胞系

[0179] CT26结肠癌细胞获取自ATCC。肿瘤细胞被培养在包含10%(体积/体积)FBS(吉布可公司(Gibco))、100Uml^{-1}青霉素、100μgml^{-1}链霉素(吉布可公司)的完全培养基(RPMI 1640,吉布可公司)中。使用PCR扩增,使用的所有细胞系都显示为支原体污染阴性。

[0180] CT26荷瘤小鼠模型

[0181] 为了建立研究原发和转移性远端肿瘤的小鼠模型,肿瘤细胞被分别注射到右胁腹和左胁腹,以形成原发肿瘤和远端转移性肿瘤。

[0182] 维持小鼠,实验的进行得到了NCI动物使用和护理委员会的批准。雌性BALB/c(6-8-周龄)购自查尔斯河实验室(Charles River Laboratory)。悬浮于100-200μL PBS中的5.5x10^{5}个和2.5x10^{5}个CT26细胞分别皮下注射至101和102,在右胁腹或左胁腹,如图IA所示。使用卡尺每周测量两次肿瘤体积并根据下式计算:体积(mm^3)=L×W2/2,其中L是肿瘤的长,W是肿瘤的宽(以毫米)。图1B是注射生理盐水10天后CT26荷瘤小鼠的代表性图片。

[0183] 统计学

[0184] 动物研究的样本大小可根据经验确定。预先建立的作为随机化纳入标准的起始肿瘤大小由试点实验确定。在结果测量过程中,对组别分配不设盲的调查员手动进行随机化。所有动物研究的生存终点是根据以下标准定义的:(1)肿瘤体积超过2000mm^3,(2)肿瘤直径超过2cm,(3)肿瘤上方有严重的不愈合的皮肤坏死。

[0185] 使用GraphPad Prism软件分析肿瘤生长情况,并使用Mann-Whitney检验和Kruskal-Wallis与Dunn的多重比较检验来检验治疗组之间平均肿瘤体积的统计学差异。P值<0.05被认为是统计学显著的。对于生存分析,生成了Kaplan-Meier曲线。采用对数秩检验(Mantel-Cox)计算P值。

[0186] 实施例2:在原发肿瘤原位注射MBTA通过T细胞依赖性对象特异性免疫反应抑制远端肿瘤生长

[0187] 本文提供了使用MBTA以治疗原发和远端肿瘤生长的方法。

[0188] MBTA免疫治疗策略

[0189] 图2A显示了MBTA治疗的通用策略:为了增强甘露聚糖-BAM对先天免疫细胞的诱导作用-例如树突状细胞、巨噬细胞、单核细胞和中性粒细胞-三种TLR配体(脂磷壁酸(LTA)、多聚肌苷-多聚胞苷酸(多聚(I:C))、雷西莫特(R-848))和免疫刺激抗-CD40-mAb(重组小鼠CD40融合蛋白,生物X细胞,目录号:BE0016-2,克隆号:FGK4.5/FGK45)作为佐剂纳入。LTA枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)激活TLR2介导的炎症通路,已知增加TNFα分泌。多聚(I:C),病毒dsRNA的合成类似物,激活TLR3介导在先证实激活APC的信号转导、调节肿瘤相关的巨噬细胞表型以变得越来越具有免疫支持性,并诱导肿瘤细胞凋亡。R-848,咪唑并喹啉胺和病毒ssRNA的合成类似物,激活TLR7/8通路,导致诱导Th1细胞介导的免疫。在一些情况下,抗-CD40-mAb被引入以模拟天然配体以在T细胞上激活CD40受体,一种肿瘤坏死因子受体。

[0190] 通过个性化肿瘤疫苗利用树突状细胞(DC)诱导抗肿瘤反应。DC在诱导T细胞增殖方面比B细胞更有效100倍。DC是最强力的抗原呈递细胞,可引发幼稚T细胞成为抗原特异性细胞毒性$CD4^+$或$CD8^+$T淋巴细胞。DC可以呈递主要组织相容性复合体(MHC)II类分子上的外源性抗原或MHC I类分子上的内源性抗原。在一些情况下,DC也可以呈递MHC分子上的外源性抗原,其为产生细胞毒性T淋巴细胞的必要条件。DC还可以诱导辅助T细胞(Th)1、Th2或Th17极化反应。

[0191] DC需要经历一个成熟的过程以引发幼稚T细胞。未成熟的DC可以通过PAMP、炎性细胞因子和TLR激动剂;胸腺基质淋巴细胞生成素;TLR激动剂和CD40激动剂;或Wnt-B-黏附素组合来诱导其进行成熟。例如,本文所述的个性化肿瘤疫苗中,可以通过LTA、多聚(I:C)、R-848和抗-CD40mAb组合使DC成熟。

[0192] DC代表了先天免疫和适应性免疫反应之间的连接。DC作为先天免疫反应细胞,可以吞没或吞噬病原体,例如缔合甘露聚糖-BAM的减弱的癌细胞。然后它们迁移到淋巴结以激活适应性免疫细胞T细胞。在那里,DC消化并利用其细胞膜表面的MHC分子在其细胞表面表达被吞噬的减弱的癌细胞的抗原。然后,癌症抗原的呈递激活了T细胞的分化和增殖,激活了免疫记忆,即使病原体被消除后也会长期存在。当免疫系统遇到类似或相同的病原体时,T细胞和B细胞的强大免疫反应被触发,即适应性免疫反应。因此,DC代表了先天免疫和适应性免疫反应之间的物理连接。

[0193] 药物合成

[0194] 甘露聚糖连接至BAM(甘露聚糖-BAM)促进甘露聚糖通过BAM的疏水油基基团锚定至肿瘤细胞膜上。随后,BAM通过招募MASP1和MASP2蛋白激活补体成分(如C2、C3和C4),利用先天免疫细胞上的模式识别受体识别甘露聚糖,导致先天免疫细胞吞噬(opsonphagocytosis)肿瘤细胞。

[0195] 杀死肿瘤细胞后,抗CD40-mAb与CD40受体的连接激活了抗原呈递细胞,将肿瘤抗原呈递给淋巴结中的幼稚T细胞。然后,幼稚T细胞分化为辅助性$CD4^+$和细胞毒性$CD8^+$T细胞,以获得持久的适应性免疫反应。

[0196] 甘露聚糖和多聚(I:C)获取自西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich)(密苏里州圣路易斯)。LTA获取自西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich)(密苏里州圣路易斯)和英韦沃基公司(InvivoGen)(加利福尼亚州圣迭戈)。R-848获取自Tocris生物科学公司(Tocris Bioscience)(明尼苏达州明尼阿波利斯)。在一些情况下,抗-小鼠CD40(克隆:FGK4.5/GFK45)获取自生物X细胞公司(BioXCell}(新罕布什尔州莱巴嫩)。细胞膜生物相容性锚(BAM)获取自NOF美国公司(NOF America Corporation)(纽约州白原市)。

[0197] 甘露聚糖-BAM合成按照先前报道的进行(Janotová等PLoS One 2014,9,e85222。通过还原性胺化制备胺化甘露聚糖,如先前的报道(Torosantucci等J.Exp.Med.2005,202,597)。在乙酸铵(300mg mL^{-1})的环境中的甘露聚糖溶液通过0.2m氰基硼氢化钠在pH 7.5和50℃下还原五天。溶液使用MWCO 3500透析管(赛瓦(Serva),德国海德堡)用PBS在4℃进一步透析过夜。在pH 7.3进行甘露聚糖的氨基基团上的BAM结合,根据Kato等(Biotechnol.Prog.2004,20,897)。BAM的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)基团与甘露聚糖的氨基基团在室温下反应1小时。透析之后获得的溶液在-20℃冷冻储存直到使用。

[0198] 原位MBTA注射

[0199] 对于原位MBTA注射,瘤内注射50μL的治疗性混合物,其由每mL的0.2mM甘露聚糖-BAM的PBS溶液中0.5mg R-848(HCl形式)、0.5mg多聚(I:C)、0.5mg LTA和0.4mg抗-CD40组成。

[0200] 原发和远端肿瘤的MBTA治疗

[0201] 使用实施例1的小鼠模型检查MBTA治疗的有效性。

[0202] 如图2B所示,10天后,左胁腹荷瘤的小鼠(平均左胁腹肿瘤体积-31.3mm^3)被随机分为两个治疗组:正常生理盐水(对照组)和在右胁腹瘤内原位注射MBTA。每天给予治疗,持续3天,然后每周重复治疗,持续共4周。每周评估两次肿瘤生长,直到生存结束点。实验进行了两次。这些小鼠的代表性图片显示在图2C。

[0203] 如图2D和2E所示,治疗开始4天后,右胁腹和左胁腹的肿瘤体积在原位注射MBTA的小鼠与生理盐水处理的小鼠之间显示出统计学上的显著差异(原位注射MBTA与生理盐水处理的小鼠的肿瘤体积中位数±SEM:右胁腹治疗肿瘤-74.4±8.8比150.2±28.1mm^3.p=0.0041;左胁腹远端肿瘤-39.7±5.3比111.0±11.5mm^3,p=0.0006)。

[0204] 如图2F所示,原位注射MBTA的小鼠比生理盐水处理的小鼠的生存期显著改善(原位MBTA与生理盐水处理小鼠的中位生存期±SEM:67±11.7天比18±1.2天,通过对数秩检验,p=0.0002)。2/7(28.6%)MBTA治疗的小鼠在研究期间实现完全缓解(CR)。因此,原位注射MBTA到原发肿瘤中抑制了远端肿瘤的生长。

[0205] 为了确定观察到的抗肿瘤效果是否是由T细胞介导的,在治疗前和治疗过程中都给予了抗体,以耗竭CT26荷瘤小鼠的$CD4^+$或$CD8^+$T细胞。$CD8^+$和$CD4^+$耗竭组的小鼠分别注射了250μg的CD8-耗竭抗体(克隆53-6.7;生物X细胞)和CD4-耗竭抗体(克隆GK1.5;生物X细胞)。注射时间为-2天、-1天和治疗起始当天(第-2天、第-1天、第0天),此后每周注射。治疗起始16天后,通过流式细胞仪确认T细胞耗竭,如图2G所示。$CD4^+$和$CD8^+$T细胞耗竭的小鼠接受相同的原位MBTA治疗计划,如图2B所示。图2H和2I显示,治疗后十天,原发肿瘤和远端肿瘤都出现了统计学显著的肿瘤体积差异(p=0.0019和0.0057),对应于非T细胞耗竭的原位MBTA治疗小鼠、$CD4^+$耗竭的原位MBTA治疗小鼠、$CD8^+$耗竭的原位MBTA治疗小鼠和生理盐水处

理的小鼠(肿瘤体积中位数±SEM:$CD4^+$耗竭比非T细胞耗竭的原位MBTA治疗小鼠-199.6±71.3比136.9±19.8mm^3,Bonferroni调整p＞0.05)。

[0206] CD8+耗竭的原位MBTA处理小鼠和生理盐水处理对照小鼠的原发肿瘤体积都明显大于非T细胞耗竭的原位MBTA处理小鼠(肿瘤体积中值±SEM:CD8+耗竭与非T细胞耗竭的原位MBTA处理小鼠-222.4±31.9与136.9±19.8mm^3。Bonferroni调整后的p＝0.0420;生理盐水处理与非T细胞耗竭的原位MBTA处理的小鼠相比,595.4±133.6比136.9±19.8mm^3。Bonferroni调整后的p＝0.0111)。因此,$CD8^+$T细胞显著影响原发肿瘤的肿瘤生长控制。

[0207] 在$CD4^+$或$CD8^+$耗竭的原位MBTA治疗的小鼠与生理盐水处理的对照小鼠之间没有发现远端肿瘤体积的显著差异(中位肿瘤体积±SEM:$CD4^+$耗竭的原位MBTA治疗相比于生理盐水处理的小鼠-448.7±291.1与607.4±121.1mm^3。Bonferroni调整后的p＞0.05;$CD8^+$耗竭的原位MBTA治疗相比于生理盐水处理的小鼠-582.5±75.6比607.4±121.1mm^3。Bonferroni调整的p＞0.05),如图2I所示。非T细胞耗竭的原位MBTA治疗的小鼠的远端肿瘤显著小于生理盐水处理的对照小鼠(中位肿瘤体积±SEM:非T细胞耗竭的原位MBTA治疗相比于生理盐水处理的小鼠-158.7±72.5比607.4±121.1mm^3,Bonferroni调整后p＝0.0074)。左胁腹肿瘤生长数据表明,$CD4^+$和$CD8^+$T细胞显著影响了转移性远端肿瘤的肿瘤生长控制。此外,上述4个治疗组之间的生存也有显著差异(对数秩检验p＝0.0003)。在$CD4^+$或$CD8^+$耗竭的原位MBTA治疗的小鼠与生理盐水处理的对照小鼠对比都证明了生存期无显著差异(中位生存期±SEM:$CD4^+$耗竭的原位MBTA治疗相比于生理盐水处理的小鼠21±3.2与17±0.9天,Tukey-Kramer调整后的p＞0.05;$CD8^+$耗竭的原位MBTA相比于生理盐水处理的小鼠-17±0.6比17±0.9天,Tukey-Kramer调整的p＞0.05),如图2J所示。非T细胞耗竭的原位MBTA治疗的小鼠的生存期相比于生理盐水处理的对照小鼠显著改进(中位生存期±SEM:非T细胞耗竭的原位MBTA治疗小鼠相比于生理盐水处理的小鼠-28±2.4比17±0.9,Tukey-Kramer调整后p＝0.0002)。因此,MBTA对远端肿瘤的治疗效力取决于T细胞。

[0208] 与图2F中原位注射MBTA的小鼠的中位生存期相比,非T细胞耗竭的原位注射MBTA治疗组的小鼠的中位生存时间减少(图2F中原位注射MBTA的小鼠与非T细胞耗竭的原位注射MBTA的小鼠的中位生存期±SEM:图2J中67±11.7比28±2.4天)。生存时间的差异可归因于每个实验的实验设计:图2F中的动物在左胁腹皮下接种2.5×10^5个CT26肿瘤细胞,以建立远端(代表性的转移)的肿瘤,而本实验中的动物则接种5.0×10^5个CT26肿瘤细胞。在治疗开始时,本节中的动物与图2F中的动物相比,已经形成了显著更大的左胁腹远端肿瘤,因而大大加快了达到研究终点。然而,尽管上述用于建立左胁腹肿瘤的CT26细胞数量存在差异,但两个实验都独立地证实,与对照组相比,用MBTA对原发肿瘤进行原位治疗,显著减少了转移性远端肿瘤的生长,并改善了MBTA治疗小鼠的中位生存期。

[0209] 实施例3:用流式细胞仪对肿瘤进行免疫分型(I.P.)

[0210] 本文提供了肿瘤流式细胞仪的I.P.方法。

[0211] 按实施例1的方法在左右胁腹建立CT26肿瘤。在治疗开始的10天和16天后完成两组独立的I.P.实验。每个I.P.实验由对照组(n＝5)和MBTA治疗的小鼠(n＝5)组成。小鼠被处死,左右胁腹肿瘤均被切除,并在使用肿瘤解离试剂盒(美天旎生物技术公司)存在酶解的情况下使用GentleMACS解离器(美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotech)进行机械破碎。

[0212] 表2中列出了用于流式细胞术染色的抗体。

[0213] 表2:用于流式细胞术分析的抗体

[0214]

抗体 实验	靶标	荧色物	克隆	来源
先天免疫细胞分析	CD45.2	APC/ 花青7	104	白乐津(BioLegend), 美国，目录号 109824
先天免疫细胞分析	CD11c	APC	HL3	BD生物科学公司, 美国，目录号 550261
先天免疫细胞分析	I-A/I-E (MHC II)	亮紫 711TM	M5/114.15.2	白乐津, 美国，目录号 107643
先天免疫细胞分析	CD11b	PE	M1/70	白乐津, 美国，目录号 101208
先天免疫细胞分析	Ly-6G	PE/Cy7	1A8	白乐津, 美国，目录号 127618
先天免疫细胞分析	Ly-6C	BV421	AL-21	BD生物科学公司, 美国，目录号

[0215]

				562727
先天免疫细胞分析	CD206 (MMR)	FITC	C068C2	白乐津，美国，目录号 141704
先天免疫细胞分析	活/死	碘化丙啶	n/a	白乐津，美国，目录号 421301
适应性免疫细胞分析	CD45.2	PE	104	白乐津，美国，目录号 109808
适应性免疫细胞分析	TCR β 链	PE/Cy7	H57-597	白乐津，美国，目录号 109222
适应性免疫细胞分析	CD4	APC/ 花青7	GK1.5	白乐津，美国，目录号 100414
适应性免疫细胞分析	CD8a	亮紫 711TM	53-6.7	白乐津，美国，目录号 100759
适应性免疫细胞分析	CD19	APC	1D3/CD19	白乐津，美国，目录号 152409
适应性免疫细胞分析	活/死	碘化丙啶	n/a	白乐津，美国，目录号 421301
细胞因子分析	CD45	亮紫 785TM	30-F11	白乐津，美国，目录号 103149
细胞因子分析	CD4	Alexa Fluor® 647	RM4-5	白乐津，美国，目录号 100530
细胞因子分析	CD8a	BUV737	53-6.7	BD生物科学公司，

[0216]

				美国，目录号 564297
细胞因子分析	IFNγ	亮紫 605TM	XMG1.2	白乐津，美国，目录号 505839
细胞因子分析	Granzyme B	FITC	QA16A02	白乐津，美国，目录号 372206
细胞因子分析	TNFα	亮紫 510TM	MP6-XT22	白乐津，美国，目录号 506339
细胞因子分析	活/死可固定的近-IR	活/死可固定的近-IR	n/a	赛默飞世尔，美国，目录号 L10119
四聚物分析	CD45	亮紫 785TM	30-F11	白乐津，美国，目录号 103149
四聚物分析	CD4	Alexa Fluor® 647	RM4-5	白乐津，美国，目录号 100530
四聚物分析	CD8a	BUV737	53-6.7	BD生物科学公司，美国，目录号 564297
四聚物分析	H-2L(d) MuLV gp70 env AH1423-431 (SPSYVYHQF) 四聚体	PE	n/a	埃默里大学的NIH四聚体核设施
四聚物分析	活/死	DAPI	n/a	BD生物科学公司，美国，目录号 564907

[0217] 对肿瘤进行I.P.分析时采用了门控策略。特定的免疫细胞群定义如下：树突状细胞(CD45.2+CD11c+MHCII+)；巨噬细胞(CD45.2+CD11c-CD11b+Ly6G-Ly6C-/低)；单核细胞(CD45.2+CD11c-CD11b+Ly6G-Ly6C高)；MHC II类+单核细胞(CD45.2+CD11c-CD11b+Ly6G-Ly6C高MHCII+)；中性粒细胞(CD45.2+CD11c-CD11b+Ly6G+)；CD4+T-细胞(CD45.2+TCRβ+CD4+CD8-)；CD8+T-细胞(CD45.2+TCRβ+CD4-CD8+)；B细胞(CD45.2+TCRβ-CD19+)。胞内细胞因子染色和流式细胞术-含有T细胞的悬浮液在PBS中用可固定的活/死染色剂(英杰公司)染色，然后在FACS缓冲液(PBS中含有0.5％BSA和0.1％叠氮化钠)中进行表面抗体染色。对于胞内染色，在进行染色之前，首先用含有PMA/离子霉素和蛋白转运抑制剂的细胞刺激混合物(电

子生物科学公司(eBioscience))刺激细胞5小时。接下来,在固定和透化(电子生物科学公司)后对细胞进行表面分子染色,然后用细胞因子抗体进行染色。染色细胞通过流式细胞仪(LSRII;BD生物科学公司(BD Bioscience))进行分析。使用FlowJo软件(树星公司(TreeStar))进行数据分析。

[0218] 实施例4:经MBTA处理后增强针对CT26肿瘤的对象特异性先天免疫

[0219] 本文提供了使用MBTA治疗以用先天免疫治疗CT26肿瘤的方法。

[0220] 根据实施例3对肿瘤进行免疫分型(I.P.),进一步评估实施例1中皮下肿瘤模型的肿瘤微环境的免疫概况。在MBTA治疗开始后的10天和16天,收获右胁腹和左胁腹的肿瘤。

[0221] 为了阐明免疫细胞群的时间变化,在两个不同的时间点完成I.P.分析,如图3A所示。第一个时间点是在第一次治疗后10天,原位注射MBTA后6小时内进行的。为了深入了解治疗后即刻免疫细胞群的急性变化,第10天被选为与第二组治疗的最后一次注射一致。第二个时间点是在6天后的第16天进行的,以评估免疫细胞组合物的中期变化。

[0222] 如图3B和3C所示,与生理盐水处理的对照组小鼠相比,原位注射MBTA到原发肿瘤中,显著增加了免疫细胞(CD45+细胞)对MBTA治疗小鼠的原发肿瘤和转移性远端肿瘤的浸润。图3D显示,与对照组相比,MBTA治疗的小鼠有显著的树突状(CD45.2+CD11c+MHCII+)和中性粒细胞(CD45.2+CD11c-CD11b+Ly6G+)炎症反应。六天后,右胁腹肿瘤的结果I.P.(第16天)分析显示,中性粒细胞显著减少,APC增加,包括DC和MHC II类阳性单核细胞(CD45.2+CD11c-CD11b+Ly6G-Ly6C高MHC II+),如图3D和3E中所示。对远端未治疗的左胁腹肿瘤的先天免疫细胞群的评估显示,与对照组相比,MBTA治疗的小鼠肿瘤中,在I.P.(第10天)时,中性粒细胞免疫反应增加,随后在I.P.(第16天)时,APC(DC和MHC II类阳性单核细胞)显著增加,如图3F和3G中所示。这些结果表明,MBTA治疗促进中性粒细胞和APC进入肿瘤,从而促进肿瘤细胞的吞噬和处理,以进一步发展对象特异性适应性免疫反应。尽管图3D和图3F显示,巨噬细胞(CD45.2+CD11c-CD11b+Ly6GLy6C-/低)的总体数量没有显著变化,但对CD206阳性的替代性活化巨噬细胞(AAM)群--也称为M2-巨噬细胞(CD45.2+CD11c-CD11b+Ly6GLy6C-/低CD206+)的评估,如图3H所示,表明原发性(MBTA治疗的)肿瘤的AAM群体在I.P.的第10和16天都明显减少。图3I显示,MBTA治疗的小鼠远端肿瘤中的AAM群在I.P.第10天显著减少。TLR激动剂和抗CD40-mAb被证明可使肿瘤相关巨噬细胞(TAM)的极化向M1样表型倾斜。

[0223] 实施例5:经MBTA治疗后增强针对CT26肿瘤的对象特异性适应性免疫反应

[0224] 本文提供了使用MBTA治疗以用适应性免疫反应治疗CT26肿瘤的方法。

[0225] 结果I.P.第10天和第16天,如实施例4所述,还显示与对照组相比,MBTA治疗的小鼠的原发和远端肿瘤中的适应性免疫细胞总体增加,如图4A和4B所示。图4A显示,在I.P.第16天,MBTA治疗小鼠的原发肿瘤中,CD8+T细胞(CD45.2+TCRβ+CD4-CD8+)和B细胞(CD45.2+TCRβ-CD19+)群统计学上增加。I.P.(第10天)和I.P.(第16天)分析显示,与对照组相比,MBTA治疗小鼠的肿瘤中CD8+T细胞和B细胞群显著增加,如图4B所示。这些结果表明,在原发肿瘤处原位注射MBTA可以增强对于远端、未接受治疗的肿瘤的适应性免疫细胞的总量,强调了MBTA在调控代表性转移病灶处的T细胞炎症反应的治疗潜力。

[0226] 从远端肿瘤中提取$CD4^+$(CD45.2+TCRβ+CD4+CD8-)和$CD8^+$T细胞群,并在体外用PMA/离子霉素刺激以评估IFNγ、TNFα和颗粒酶B的细胞内表达。如图4C所示,在I.P.(第10天)和(第16天)收获的MBTA治疗小鼠的T细胞比对照组产生更多的IFNγ和TNFα。值得注意的是,

CD8+T细胞在I.P.(第10天)证实IFNγ的显著增加和在I.P.(第10天)和(第16天)之间的六天间隔期间证实TNFα的显著增加。图4D还显示了颗粒酶B阳性CD8+T细胞群的增加,尽管没有统计学显著性。因此,MBTA治疗显著增加了远端肿瘤内CD8+T细胞的数量和激活,表明它们在MBTA诱导的肿瘤生长抑制中起主要作用。装载AH-1的H-2Ld四聚体被用来评估MBTA疗法是否产生了更多的针对CT26免疫优势表位,$gp70_{423-431}$(AH-1)的$CD8^+$T细胞(CTL)(Huang,等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.1996,93,9730.)。在治疗开始后11天,收集原位MBTA治疗的小鼠和对照小鼠的外周血样品和远端肿瘤进行分析。如图4E所示,原位MBTA治疗的小鼠全血中AH-1/H-2Ld-特异性CD8+T细胞的百分比显著高于对照组(通过Mann-Whitney U检验,p=0.02)。如图4F所示,原位MBTA治疗的小鼠在远端肿瘤内的AH-1/H-2Ld-特异性CD8+T细胞相对于对照组也有所增加(通过Mann-Whitney U测试,p=0.06)。因此,在MBTA治疗开始的11天内,原位注射MBTA增加了血液中和转移性远端肿瘤中循环的AH-1特异性CD8+T细胞克隆。

[0227] 综上所述,原位注射MBTA导致代表性原发和转移性肿瘤的免疫表型发生显著变化。在原发肿瘤处,MBTA治疗产生了先天炎症反应,起始特征在于强烈的中性粒细胞和DC优势,随后APC群(MHC II+单核细胞和DC)显著增加。在转移性远端肿瘤处,MBTA治疗通过增加浸润肿瘤的CD8+T细胞和B细胞的总体供应来加强适应性免疫反应。相对于对照组,提取远端肿瘤的T细胞不仅数量较高,而且证实更高的IFNγ和TNFα细胞因子的表达,验证了其增强的杀肿瘤活性。总之,我们发现原位MBTA治疗引起了代表性转移性肿瘤的肿瘤排斥。

[0228] 实施例6:rCT26-MBTA疫苗在CT26负荷的小鼠中产生有力的对象特异性抗肿瘤免疫反应

[0229] 本文提供了使用rCT26-MBTA疫苗产生有力的抗肿瘤免疫反应的方法。

[0230] rCT26-MBTA疫苗的产生

[0231] 如图5A所示,CT26细胞在体外扩增,随后等分至每个疫苗剂量1×10^6百万个细胞。使用$a^{137}Cs$ MARK I型辐照器(JL谢泼德和合伙人(JL Shepherd&Associates),加利福尼亚州圣费尔南多)对CT26细胞进行50Gy的亚致死辐照,以诱导肿瘤细胞凋亡并防止肿瘤细胞在疫苗位点植入。如图5B所示,在用作rCT26-MBTA疫苗的组分时,CT26肿瘤细胞最初被辐照以诱导肿瘤细胞凋亡并防止肿瘤生长。

[0232] 对于rCT26-MBTA疫苗,在rCT26-MBTA治疗的小鼠的右胁腹皮下注射100μL的下述治疗性混合物:a)1×10^6个辐照的CT26细胞悬浮在50μL PBS中,b)50μL的治疗性混合物,其每mL由0.5mg R-848(HCl形式)、0.5mg多聚(I:C)、0.5mg LTA和0.4mg抗-CD40,PBS中的0.2mM甘露聚糖-BAM组成。然后将疫苗剂量(a)与(b)(50μL,每只小鼠的剂量)脉冲(孵育)1小时,促进甘露聚糖-BAM体外整合到肿瘤细胞膜上,形成治疗性混合物。然后根据规定的治疗时间表,将其皮下注射到接受治疗的动物的右胁腹。接受rCT26疫苗的小鼠被注射了悬浮在100μL PBS中的1×10^6个辐照的肿瘤细胞(每个小鼠的剂量)。

[0233] 使用rCT26-MBTA疫苗产生强力的免疫反应

[0234] rCT26-MBTA疫苗接种的小鼠可以产生针对CT26-特异性抗原的CD8+T-细胞反应。

[0235] 如图5C所示,使用实施例1中描述的方法,在雌性BALB/c小鼠在左胁腹皮下接种CT26细胞。11天后,小鼠被随机分为三个处理组:普通生理盐水(对照;n=7)、辐照的CT26细胞(rCT26;n=7)或用MBTA疫苗脉冲的rCT26(rCT26-MBTA;n=8)。治疗是在右胁腹皮下注

射,每周连续三次,持续四周(12个剂量)。实验进行了两次。

[0236] 治疗6天后,Kruskal-Wallis检验显示,与生理盐水处理的对照组、rCT26和rCT26-MBTA治疗的小鼠相对应的肿瘤体积存在统计学上的显著差异(p=0.0108),如图5D所示。

[0237] 事后分析显示,在治疗6天和15天后,rCT26-MBTA疫苗接种的小鼠与rCT26或生理盐水接种的小鼠相比,表现出显著较小的中位肿瘤体积(第6天:rCT26-MBTA比rCT26接种的小鼠的中位肿瘤体积±SEM-47.7±19.0比247.1±37.3mm^3。Bonferroni调整的p=0.0279;第15天:rCT26-MBTA比生理盐水接种小鼠的中位肿瘤体积-67.6±137.7比971.2±320.3mm^3。Bonferroni调整后的p=0.0420)。在rCT26和生理盐水处理的小鼠之间没有观察到肿瘤体积的显著差异(Bonferroni调整的P>0.05)。与生理盐水或rCT26疫苗接种小鼠相比,rCT26-MBTA疫苗治疗组小鼠的生存期也有显著提高(rCT26-MBTA比生理盐水治疗小鼠的中位生存期±SEM:44±9.2比20±1.9天,Tukey-Kramer调整的p=0.0071;rCT26-MBTA比rCT26疫苗接种小鼠的中位生存期:44±9.2天比20±2.1天,Tukey-Kramer调整的p=0.0034),如图5E所示,此外还有改进的肿瘤生长控制。相较之下,相比生理盐水处理的小鼠,rCT26疫苗治疗组的小鼠并未改善生存期(rCT26比生理盐水处理的小鼠的中位生存期±SEM:20±2.1天比20±1.9天,Tukey-Kramer调整的p>0.05).1/8,或12.5%的rCT26-MBTA疫苗接种的小鼠在研究期间达到CR,如图5E中所示。因此,总计12次rCT26-MBTA疫苗接种的治疗可以成功地产生强大的抗肿瘤免疫反应。我们还评估了在外周血和远端、未治疗的肿瘤内发现的AH-1/H-2Ld特异性CD8+T细胞的数量。外周血样品在治疗开始10天后和接受总计两次疫苗接种后收集。在治疗开始后22天和接受总计四次疫苗接种后收获肿瘤,这与初始抗原刺激后T细胞激活的已知时间线一致(Pennock等Adv.Physiol.Educat.2013,37,273)。如图5F所示,经rCT26-MBTA疫苗治疗的小鼠全血中AH-1/H-2Ld-特异性CD8+T细胞显著多于对照小鼠(经Kruskal-Wallis检验,p=0.0018)。为了检查肿瘤中AH-1/H-2Ld-特异性CD8+T细胞的存在,分离出肿瘤浸润淋巴细胞并通过流式细胞仪进行分析。如图5G所示,rCT26-MBTA疫苗接种小鼠的肿瘤内AH-1/H-2Ld-特异性CD8+T细胞同样显著多于对照组(经Kruskal-Wallis检验,p=0.0169)。与生理盐水处理的小鼠相比,rCT26接种疫苗治疗的小鼠在全血和肿瘤内也具有更多的AH-1/H-2Ld特异性CD8+T细胞,尽管没有统计学显著性(通过Kruskal-Wallis检验,分别为p=0.1642和0.6469)。AH-1-MHC四聚体结果表明,与对照组小鼠相比,在rCT26-MBTA疫苗接种小鼠的全血和肿瘤内发现了显著更多的AH-1特异性CD8+T细胞克隆,强调了其产生针对CT26特异性抗原的CD8+T细胞反应的潜力。

[0238] MBTA治疗总体上耐受性良好:如图5H所示,原位MBTA治疗的小鼠在治疗开始后3天的平均体重与预处理水平相比证明有显著的急性下降。体重减轻在治疗开始后7天得到恢复。如图5I所示,用rCT26-MBTA疫苗治疗的小鼠的体重没有显著变化。在我们的研究中,原位MBTA或rCT26-MBTA疫苗接种的小鼠都没有意外死亡。

[0239] 实施例7:MBTA治疗诱导针对CT26细胞的对象特异性免疫记忆

[0240] 本文提供了使用MBTA治疗诱导针对CT26肿瘤的免疫记忆的方法。

[0241] MBTA治疗可以产生持久和强大的免疫记忆,以防止外围和颅内的亲本肿瘤复发。

[0242] 在实施例1的方法中建立的CT26肿瘤达到完全缓解(CR)的所有小鼠(n=4),在其治疗最后一天过去至少50天后进行攻击。将达到CT26肿瘤CR的小鼠(n=4)和原始的雌性BALB/c小鼠用悬浮在100μL PBS中的4.5×10^5个CT26细胞接种到左胁腹,与起始治疗的部

位相对。图6A和6B显示，所有CR小鼠没有显示出肿瘤生长的证据，而所有对照小鼠都发展了肿瘤并达到了相应的终点，证实了针对CT26肿瘤抗原的有效免疫记忆的诱导。

[0243] 由MBTA治疗产生的免疫记忆还延伸到了外周循环之外，并与中枢神经系统(CNS)内的CT26肿瘤接合。

[0244] 具有稳定荧光素酶表达的CT26-Luc细胞被用来促进监测颅内肿瘤的生长。在CR(n＝4)和原始的雌性BALB/c小鼠的额叶接种CT26-Luc细胞。根据Toda等(Cancer Gene Ther.2002,9,356)先前报告，含有5ug mL^{-1}DNA酶I的2μL HBSS中的1.0×10^{4}个CT26-Luc细胞，在前囟喙(rostral of the bregma)1mm入口位点、中线(midline)右侧2mm、右额叶(right frontal lobe)中颅骨表面(skull surface)2mm深处使用Hamilton注射器(汉密尔顿公司(Hamilton Company))，进行立体注射。手术麻醉是通过汽化的异氟烷获得的。

[0245] 如图6C和6D所示，先前治疗的小鼠都没有证明颅内肿瘤形成的证据，而所有的对照小鼠都发展了颅内肿瘤并达到了相应的终点。综上所述，再攻击实验显示，MBTA治疗的小鼠发展针对CT26细胞的免疫记忆，这种记忆不仅持久，而且足够强大，以防止外周和颅内的亲本肿瘤复发。

[0246] 实施例8：基于体表面积的人体等效剂量(HED)计算

[0247] 本文提供了基于体表面积计算MBTA组分的HED的方法。

[0248] 细节参见：Nair AB,Jacob S.《动物和人之间剂量转换的简单实践指南》(A simple practice guide for dose conversion between animals and human.)J Basic Clin Pharma 2016;7:27-31

[0249] 计算HED的式如下所示：

[0250] $$\text{HED（mg/kg）=动物剂量（mg/kg）}\times\frac{\text{动物 } Km}{\text{人 } Km}$$

[0251] 小鼠Km＝3

[0252] 人Km＝37

[0253] 使用该式，甘露聚糖、BAM、多聚I:C、LTA、R-848和抗-CD40抗体的最大推荐起始剂量示于表3。

[0254] 表3：最大推荐起始剂量(MRSD)，基于体表面积

[0255]

组分	每只小鼠(~20g)净药量(mg)	动物 NOAEL (mg/kg)	HED (mg/kg)	HED/ 安全性系数 (10) (mg/kg)	最大推荐起始剂量 (MRSD, 假定60 kg 成人)(mg/天)
甘露聚糖	0.95	47.5	3.85135135	0.385135135	23.10810811
BAM	0.098	4.9	0.3972973	0.03972973	2.383783784
多聚I:C	0.024	1.2	0.0972973	0.00972973	0.583783784
LTA	0.024	1.2	0.0972973	0.00972973	0.583783784
R-848	0.024	1.2	0.0972973	0.00972973	0.583783784
抗-CD40	0.02	1	0.0778378	0.00778378	0.4670269

[0256] 本说明书中引用的所有出版物和专利在此通过引用而纳入，就像每个单独的出版物或专利被具体和单独指出通过引用而纳入一样并通过引用而纳入，以公开和描述与引用的出版物有关的方法和/或材料。任何出版物的引用针对提交日之前的公开而不应解释为承认本发明不具有通过在先发明先于这些出版物的权利。此外，所提供的出版日期可能与实际公开日期不同，这可能需要单独确认。如果通过引用而纳入本文的文件中规定的术语定义与本文明确定义的术语定义相冲突，则以本文规定的定义为准。

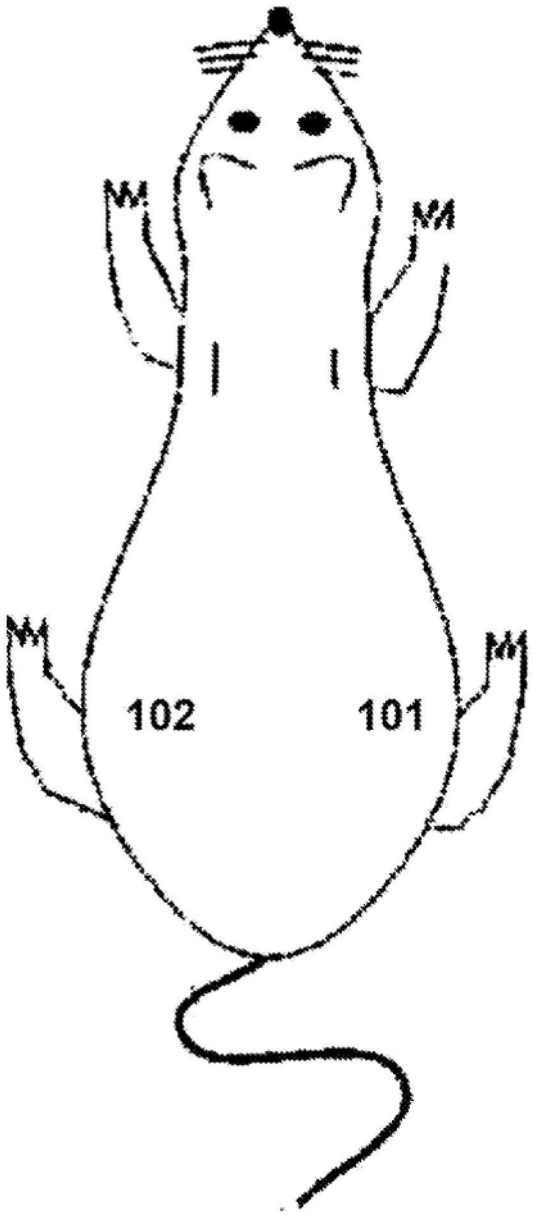


图1A

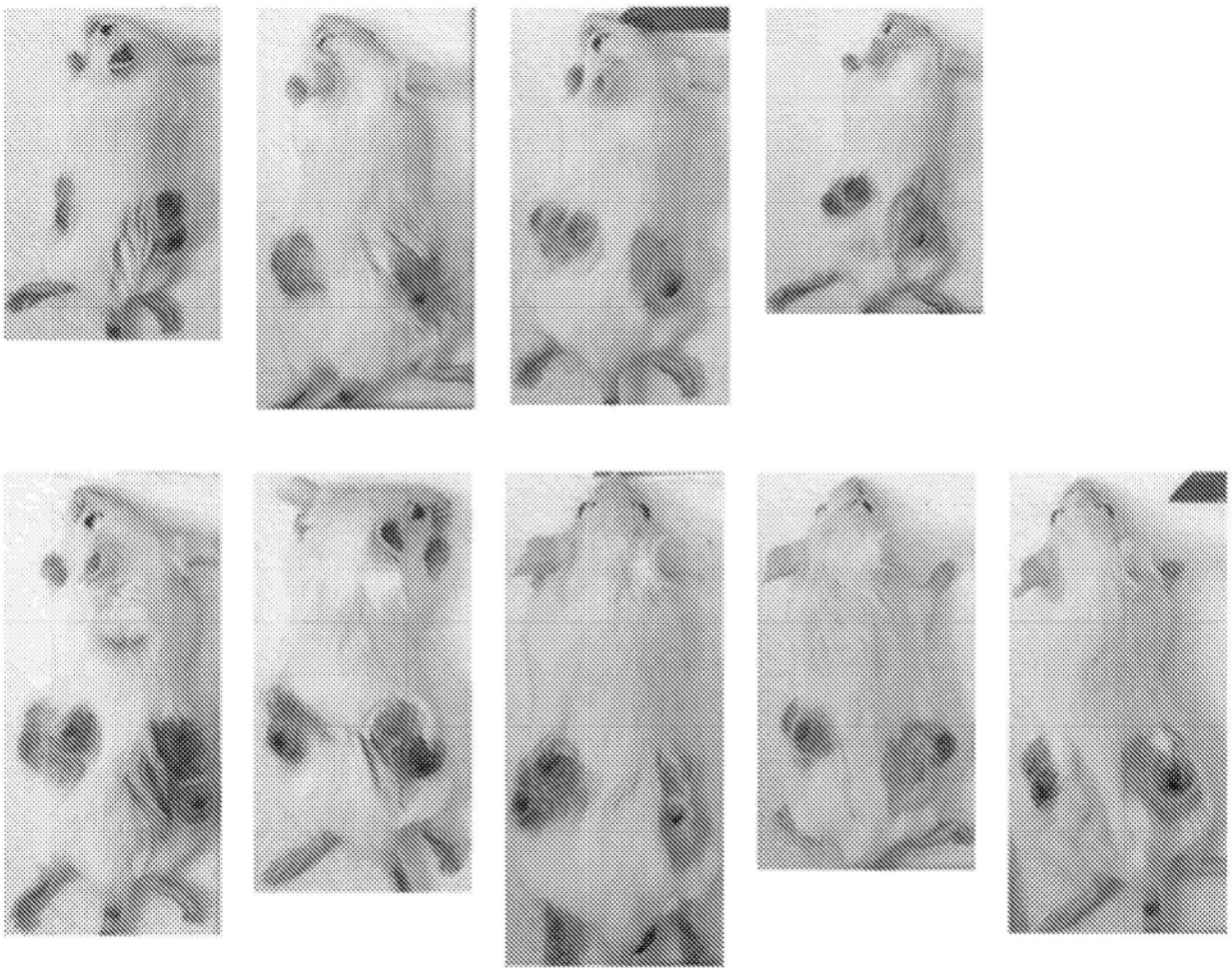


图1B

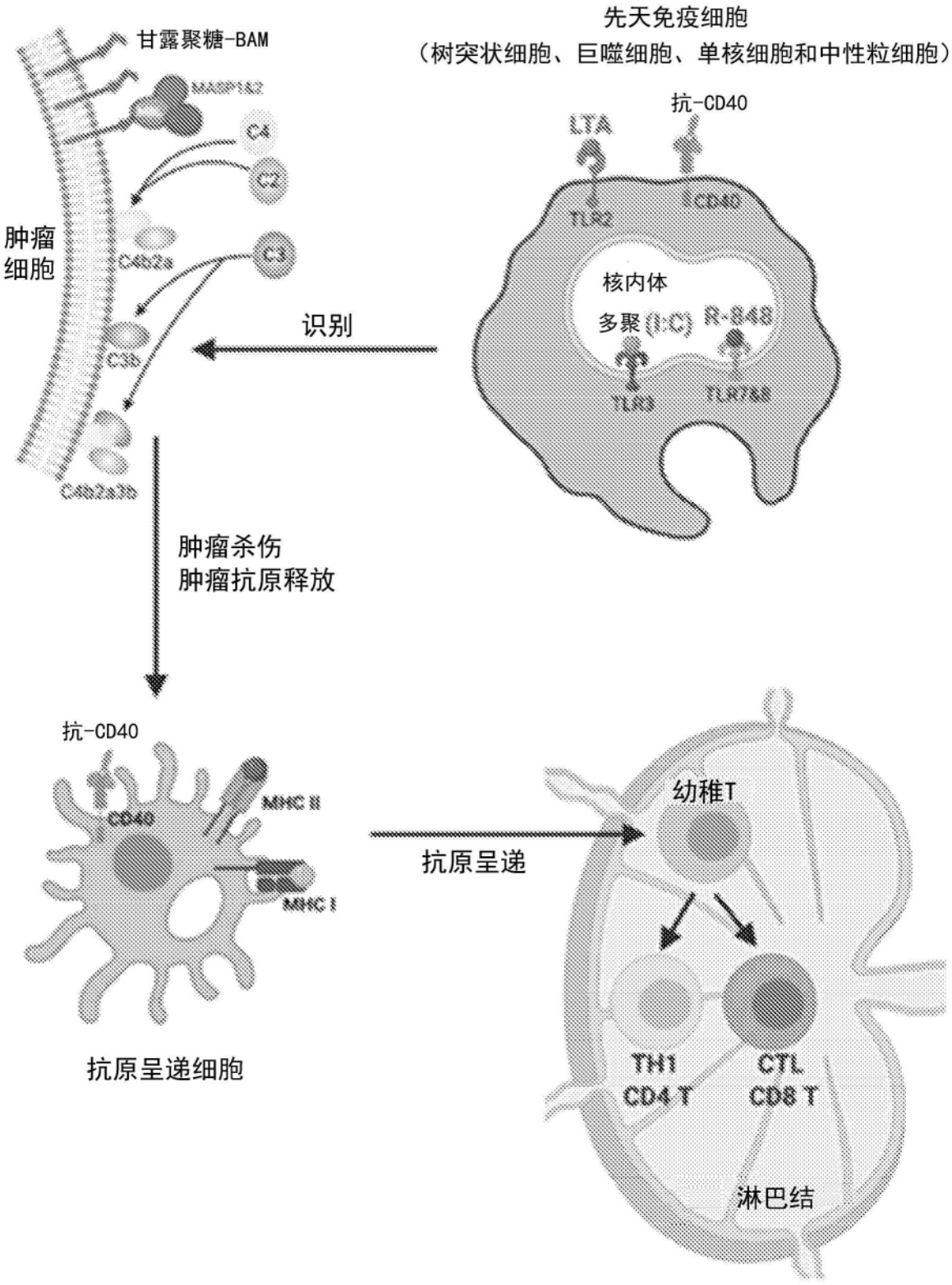

先天免疫细胞
（树突状细胞、巨噬细胞、单核细胞和中性粒细胞）
甘露聚糖-BAM
MASP1&2
C4
C2
C4b2a
C3
C5
C4b2a3b
肿瘤
细胞
识别
抗-CD40
LTA
TLR2
CD40
核内体
多聚(I:C)
R-848
TLR3
TLR7&8
肿瘤杀伤
肿瘤抗原释放
抗-CD40
CD40
MHC II
MHC I
抗原呈递细胞
抗原呈递
幼稚T
TH1
CD4 T
CTL
CD8 T
淋巴结

图2A

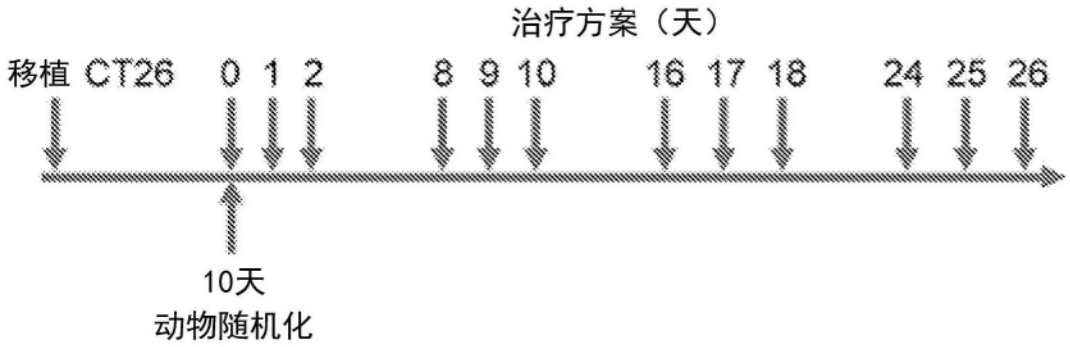

治疗方案（天）
移植 CT26
0 1 2
8 9 10
16 17 18
24 25 26
10天
动物随机化

图2B

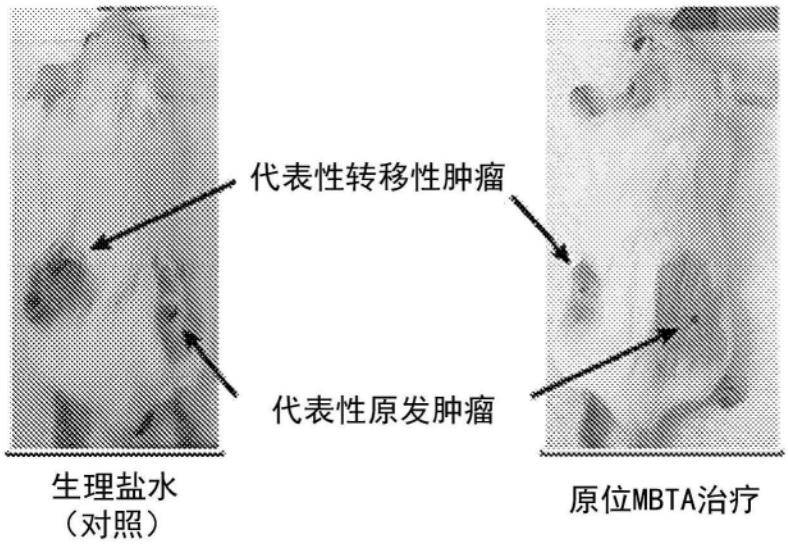

代表性转移性肿瘤
代表性原发肿瘤
生理盐水
（对照）
原位MBTA治疗

图2C

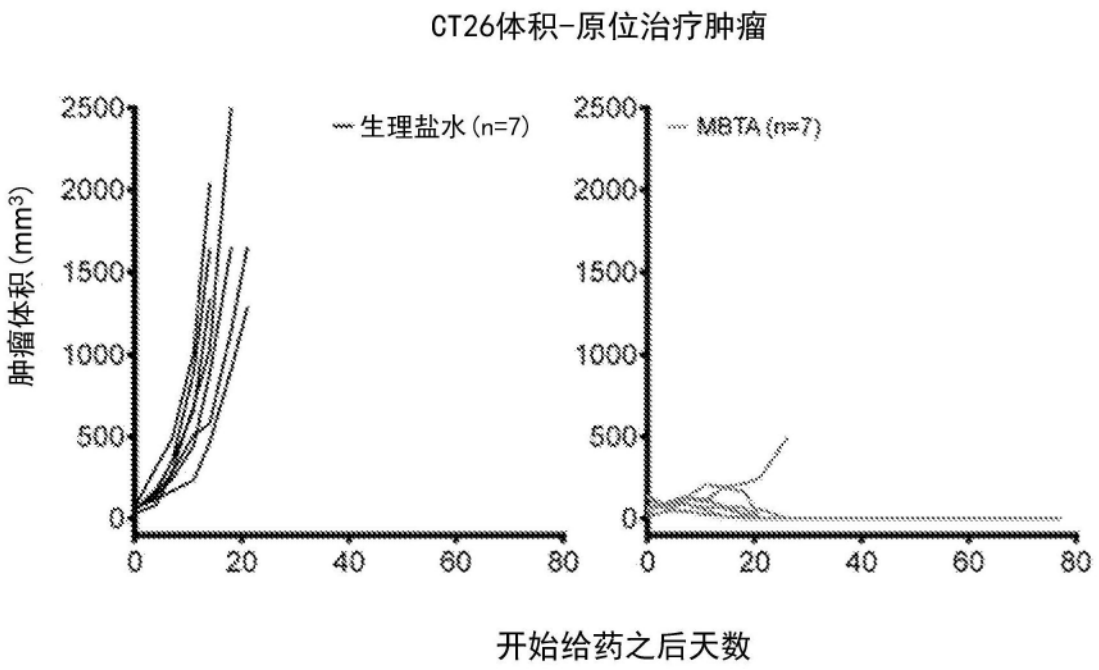

CT26体积-原位治疗肿瘤
生理盐水(n=7)
MBTA(n=7)
肿瘤体积(mm³)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
20
40
60
80
开始给药之后天数

图2D

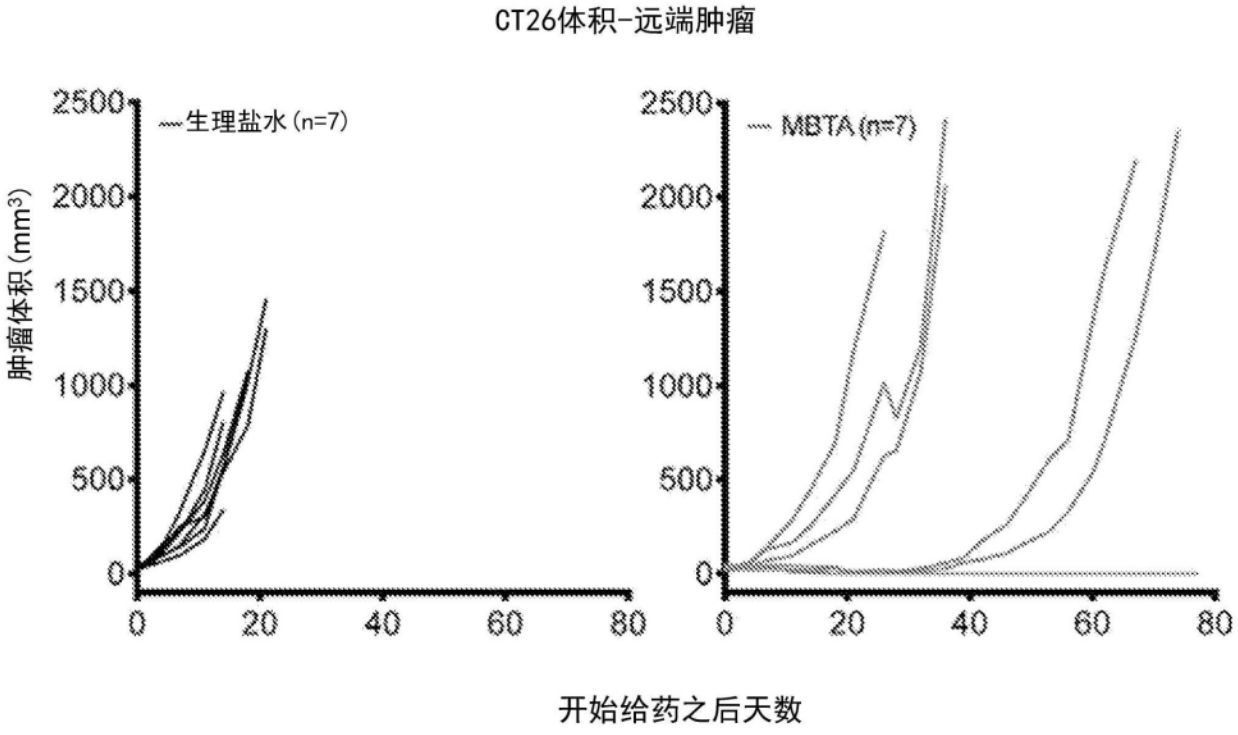

CT26体积-远端肿瘤
生理盐水(n=7)
MBTA(n=7)
肿瘤体积(mm³)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
20
40
60
80
开始给药之后天数

图2E

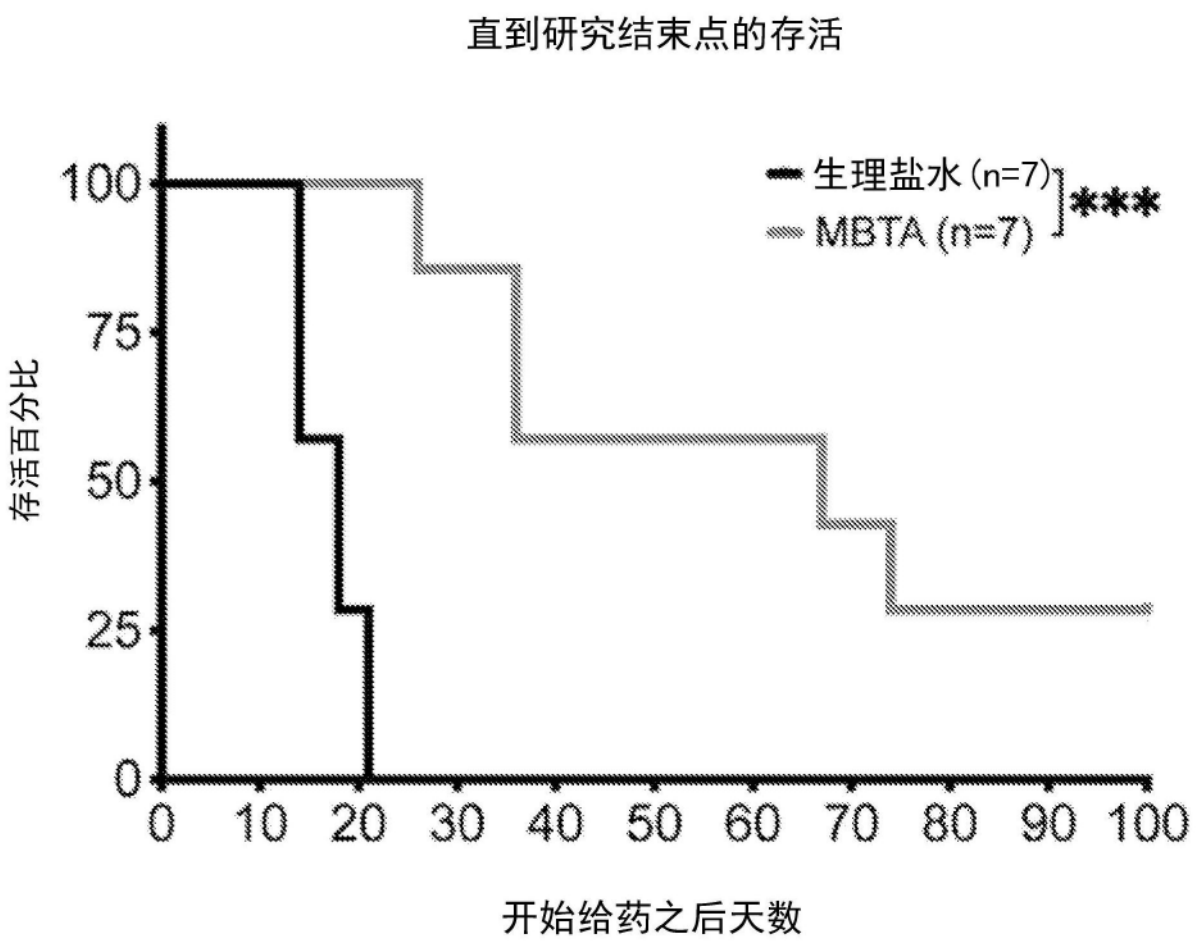

直到研究结束点的存活
生理盐水 (n=7)
MBTA (n=7)
***
存活百分比
100
75
50
25
0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
开始给药之后天数

图2F

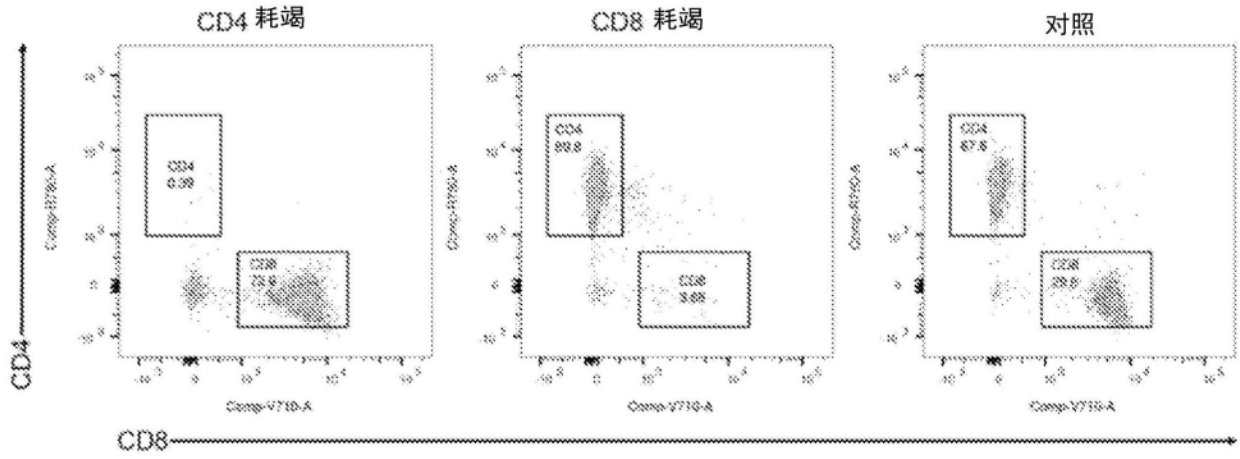

CD4 耗竭
CD8 耗竭
对照
CD4
CD8

图2G

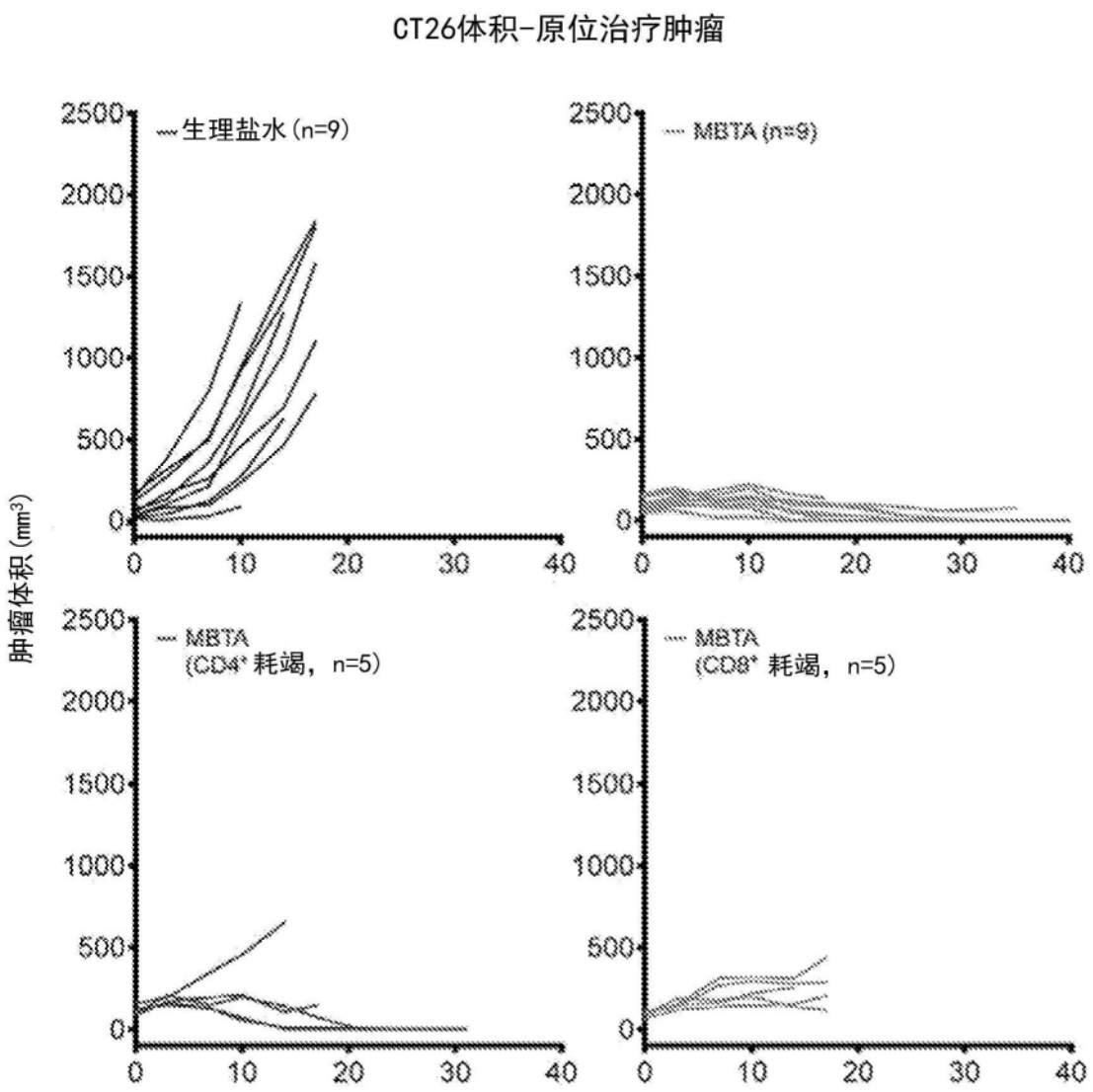

CT26体积-原位治疗肿瘤
肿瘤体积 (mm³)
生理盐水 (n=9)
MBTA (n=9)
MBTA (CD4⁺ 耗竭，n=5)
MBTA (CD8⁺ 耗竭，n=5)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40

图2H

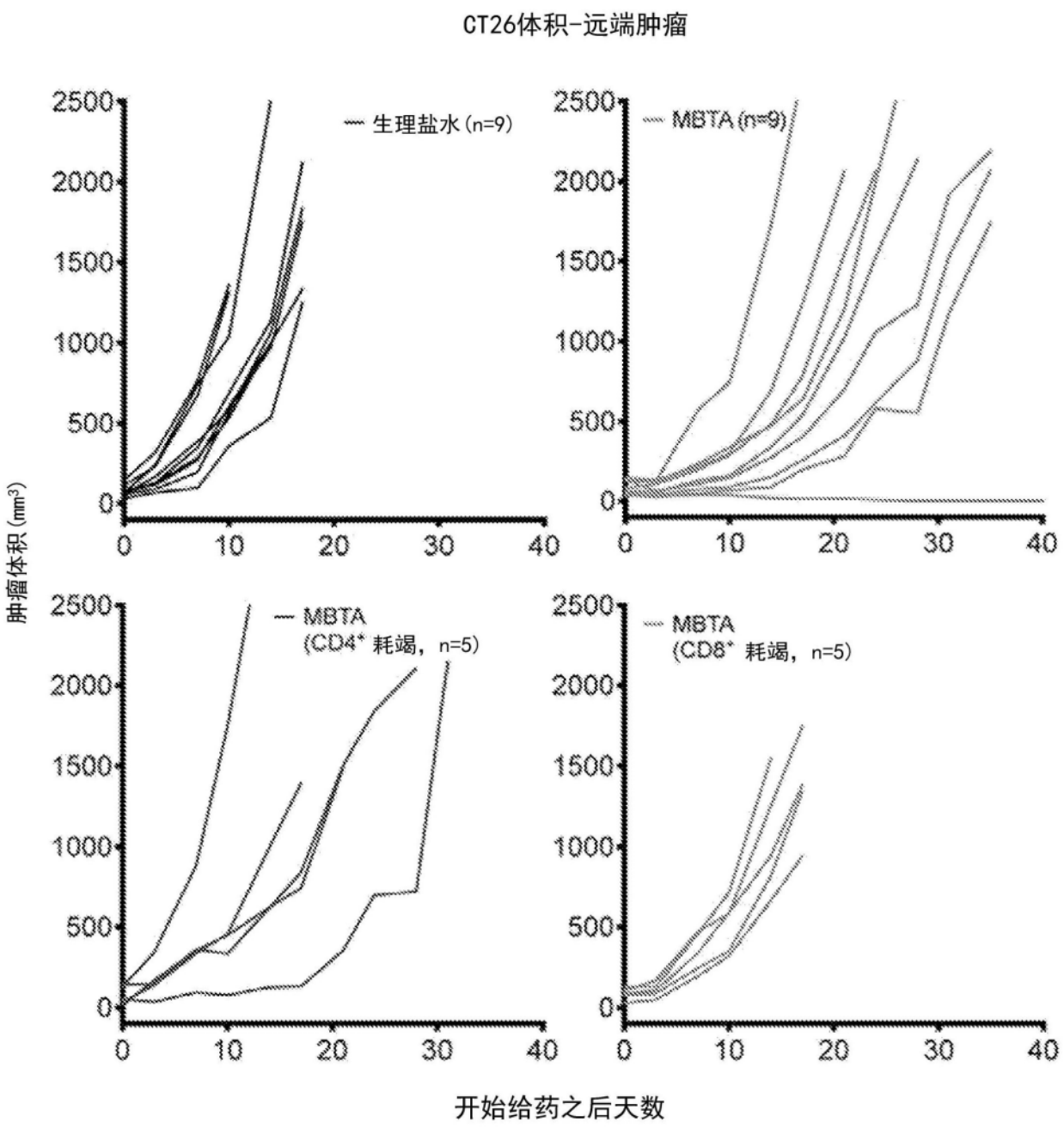

CT26体积-远端肿瘤
肿瘤体积 (mm³)
— 生理盐水 (n=9)
— MBTA (n=9)
— MBTA (CD4⁺ 耗竭，n=5)
— MBTA (CD8⁺ 耗竭，n=5)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
开始给药之后天数

图2I

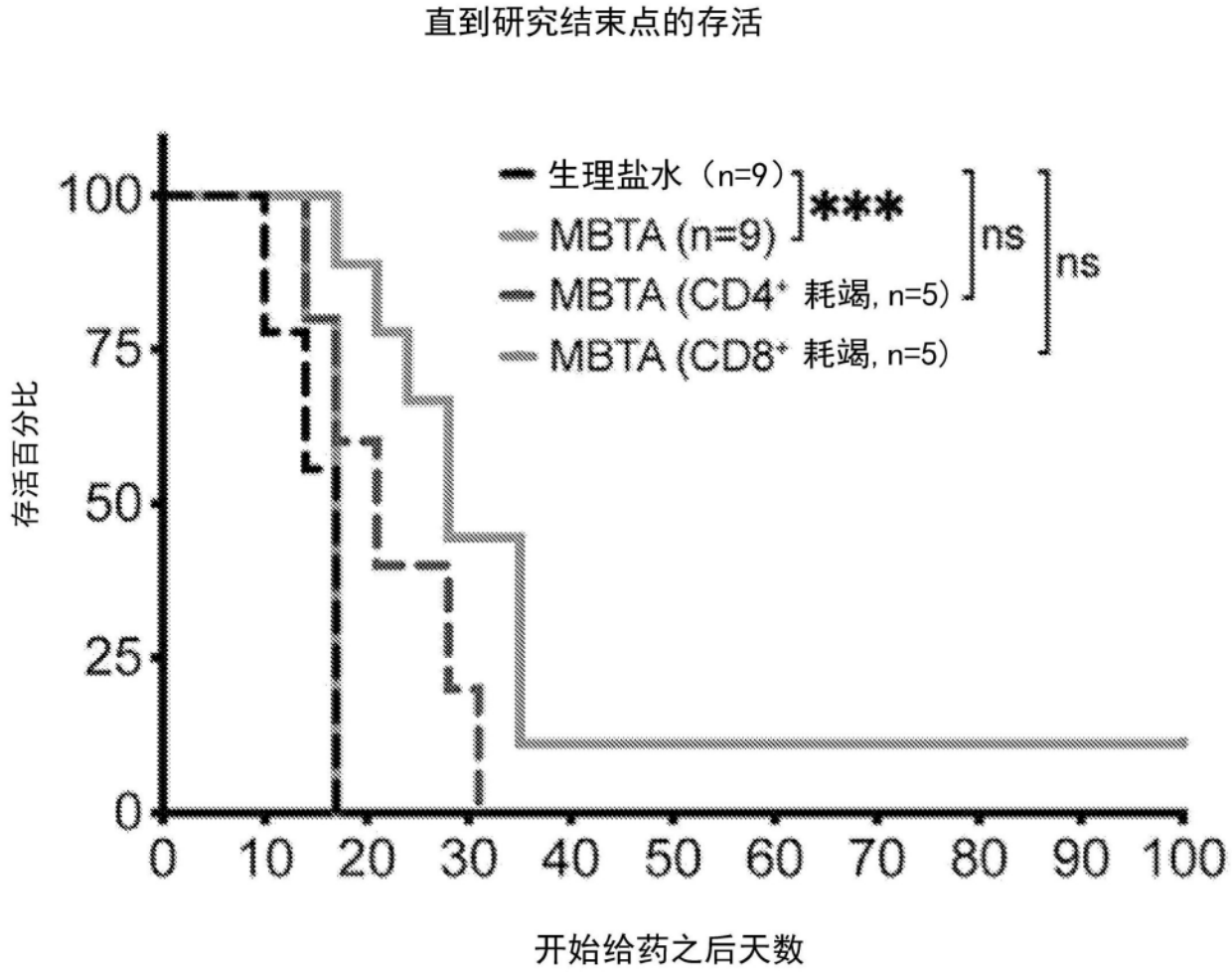

直到研究结束点的存活
生理盐水（n=9）
MBTA (n=9)
MBTA (CD4+ 耗竭, n=5)
MBTA (CD8+ 耗竭, n=5)
***
ns
ns
存活百分比
100
75
50
25
0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
开始给药之后天数

图2J

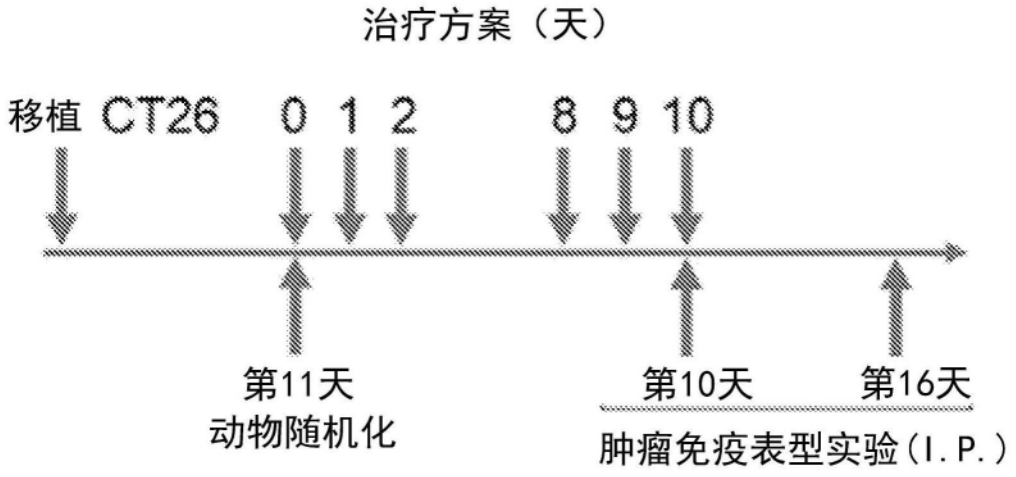

治疗方案（天）
移植 CT26
0 1 2
8 9 10
第11天
动物随机化
第10天
第16天
肿瘤免疫表型实验(I.P.)

图3A

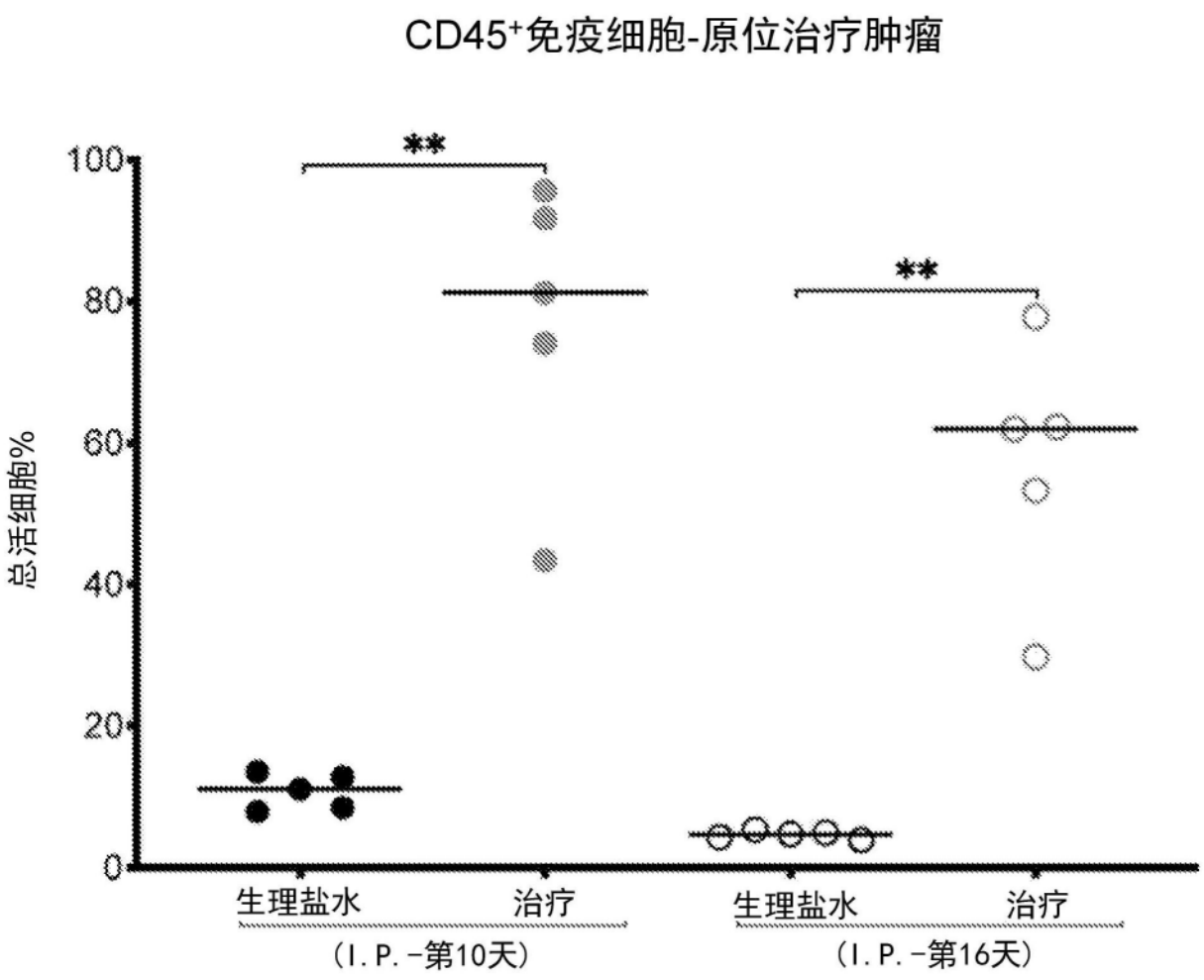

CD45+免疫细胞-原位治疗肿瘤
总活细胞%
100
80
60
40
20
0
**
**
生理盐水
治疗
生理盐水
治疗
(I.P.-第10天)
(I.P.-第16天)

图3B

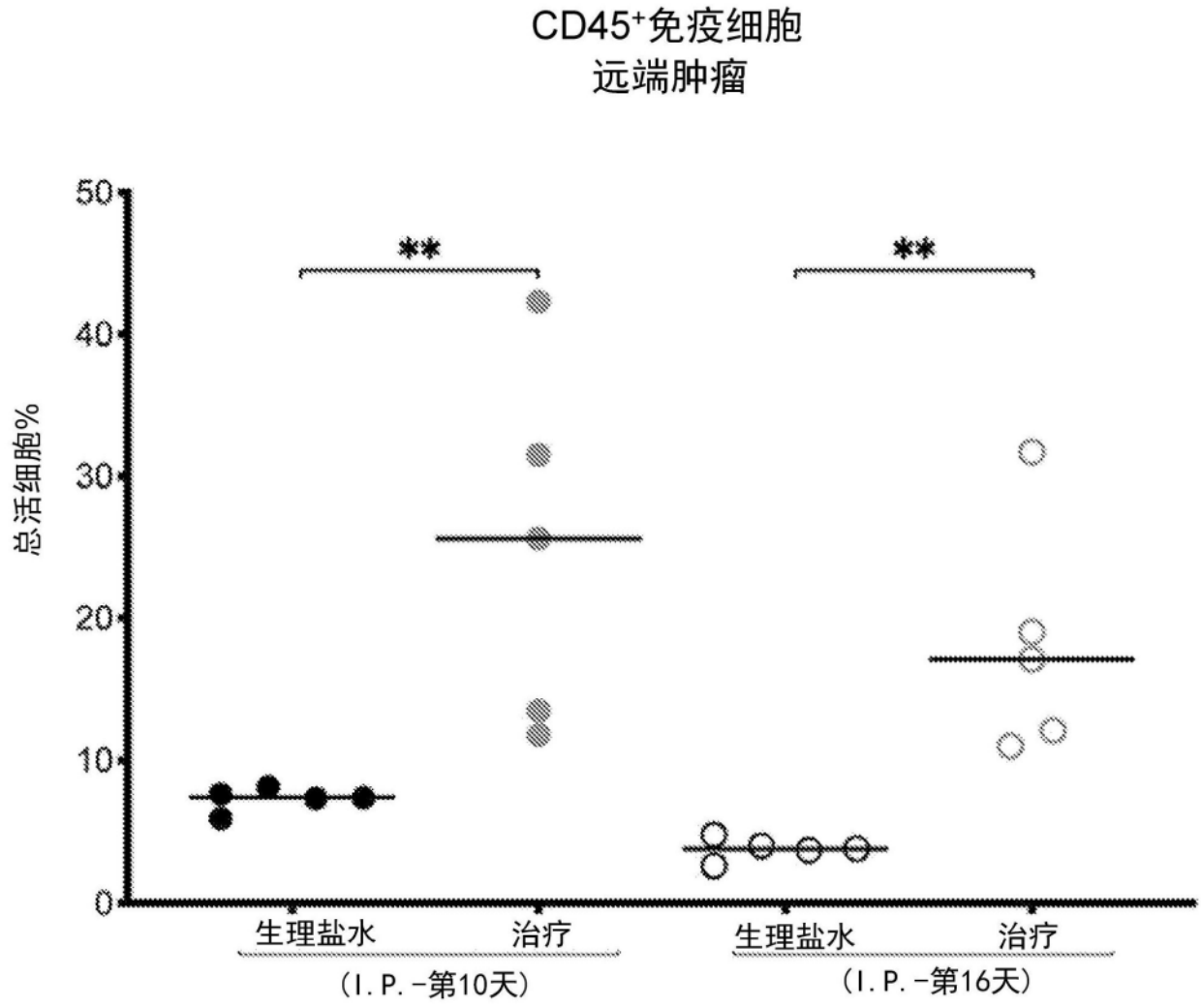

CD45+免疫细胞
远端肿瘤
总活细胞%
50
40
30
20
10
0
**
**
生理盐水
治疗
生理盐水
治疗
(I.P.-第10天)
(I.P.-第16天)

图3C

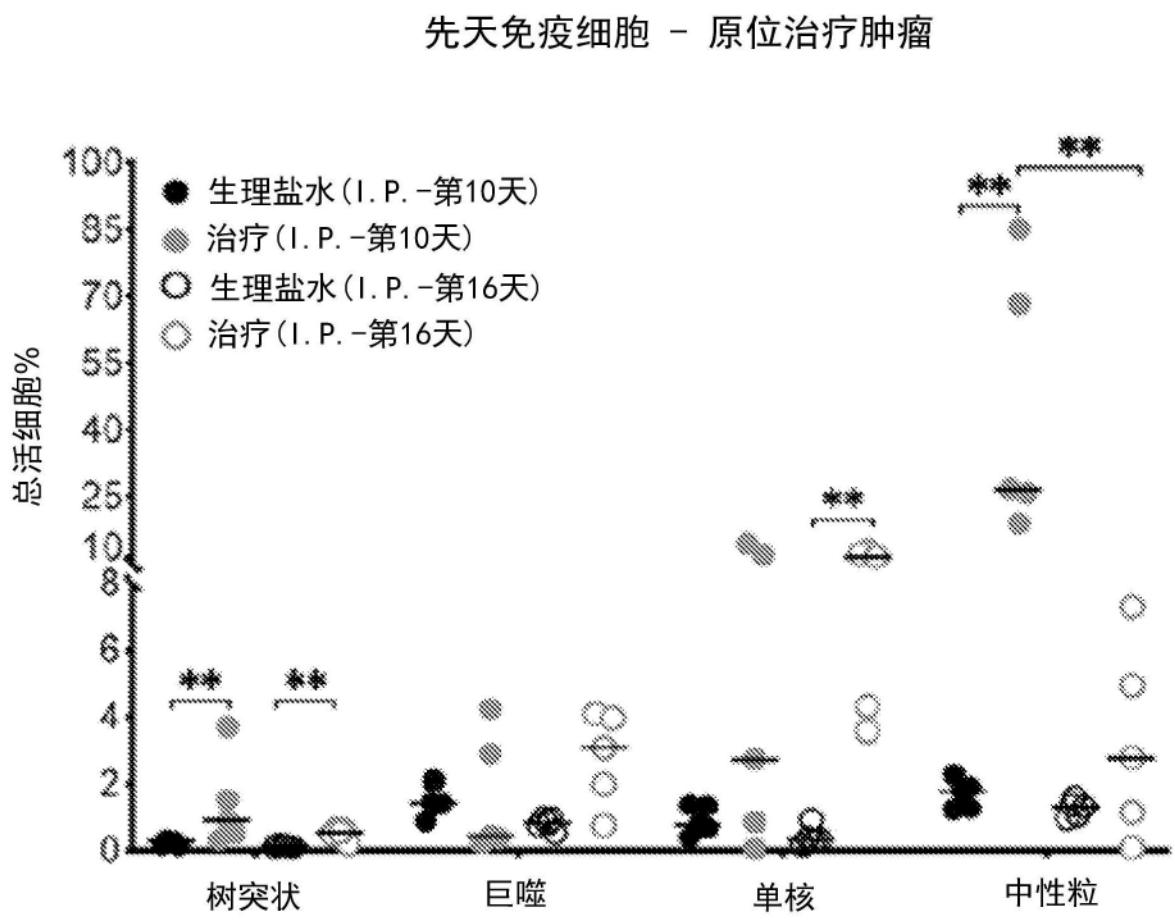

先天免疫细胞 - 原位治疗肿瘤
总活细胞%
100
85
70
55
40
25
10
8
6
4
2
0
生理盐水(I.P.-第10天)
治疗(I.P.-第10天)
生理盐水(I.P.-第16天)
治疗(I.P.-第16天)
**
**
**
**
**
树突状
巨噬
单核
中性粒

图3D

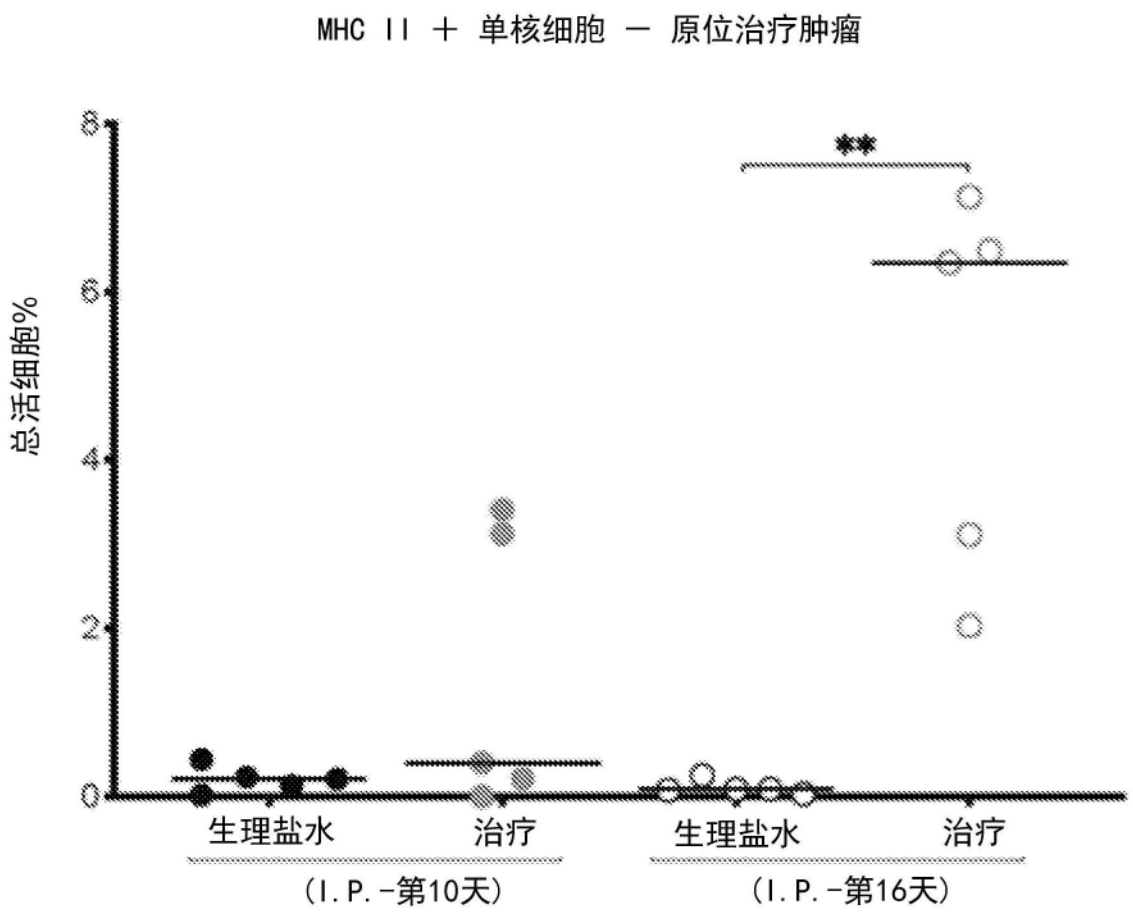


图3E

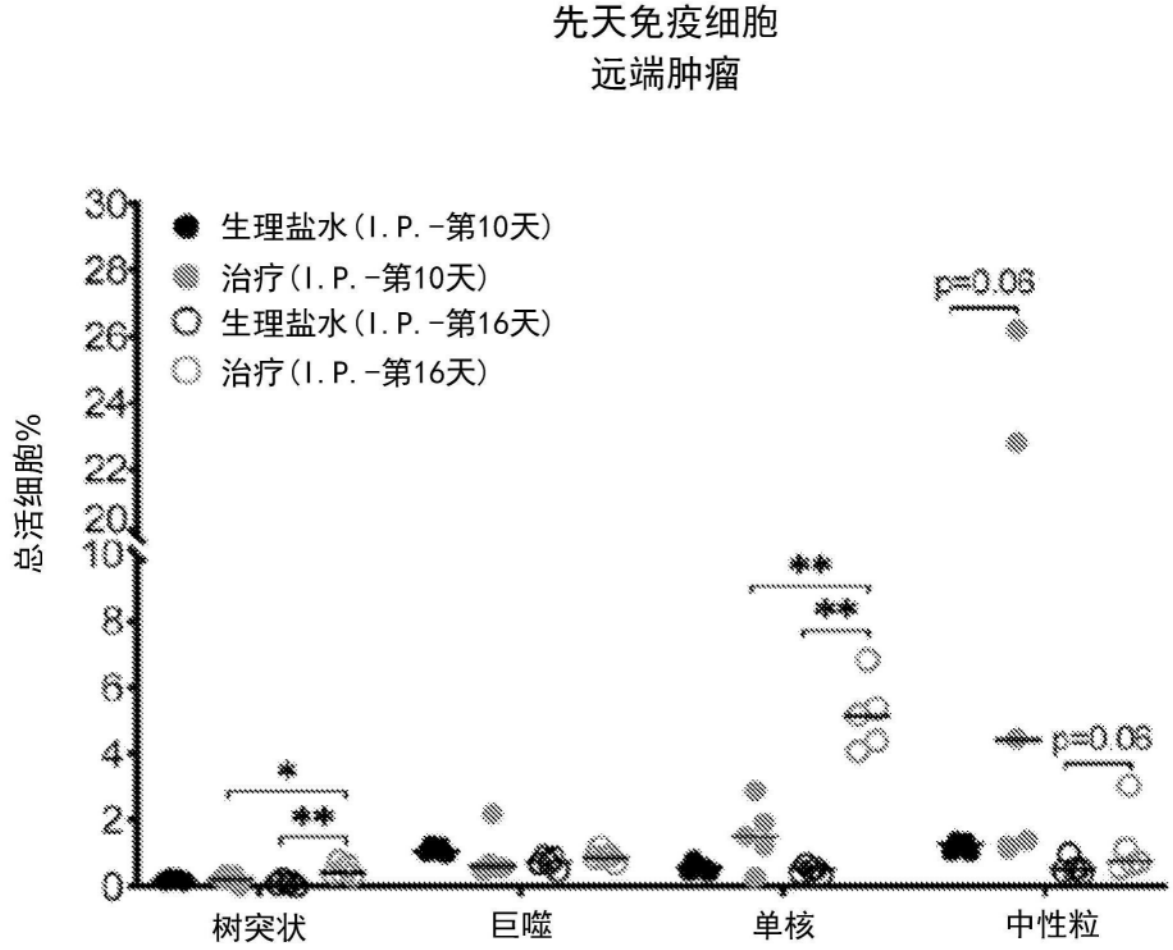

先天免疫细胞
远端肿瘤
总活细胞%
生理盐水(I.P.-第10天)
治疗(I.P.-第10天)
生理盐水(I.P.-第16天)
治疗(I.P.-第16天)
p=0.06
p=0.06
树突状
巨噬
单核
中性粒

图3F

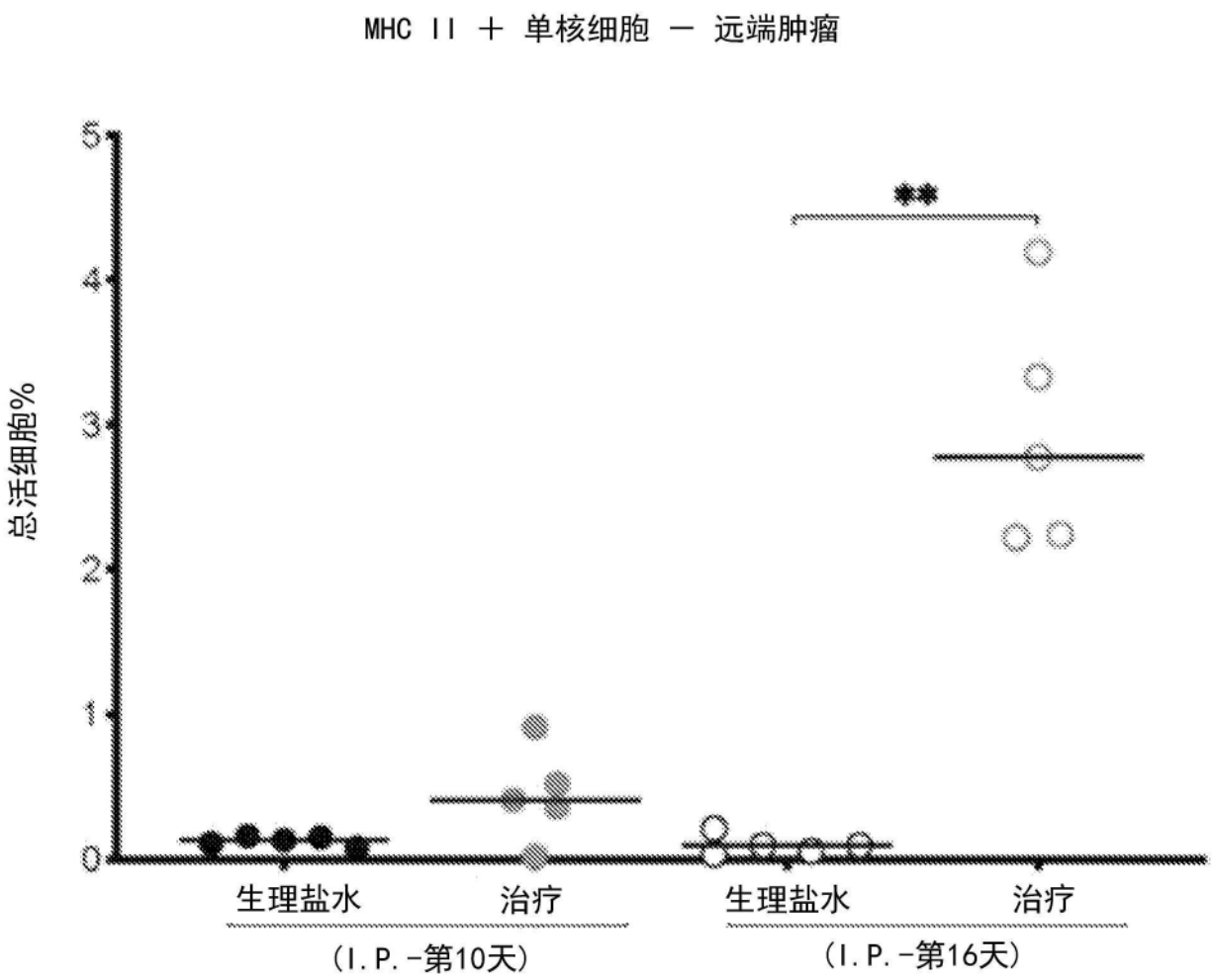


图3G

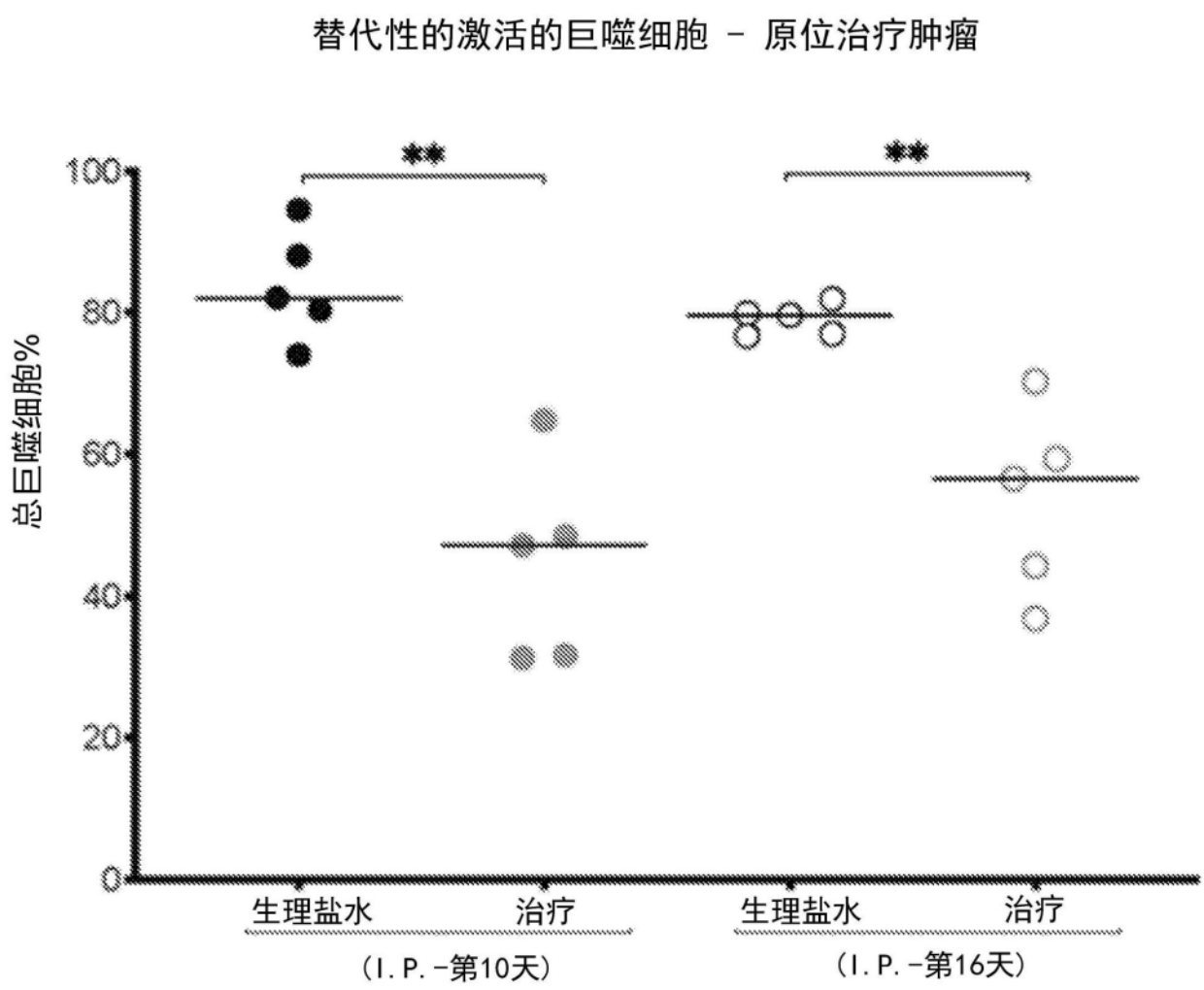

替代性的激活的巨噬细胞 - 原位治疗肿瘤
总巨噬细胞%
100
80
60
40
20
0
**
**
生理盐水
治疗
生理盐水
治疗
(I.P.-第10天)
(I.P.-第16天)

图3H

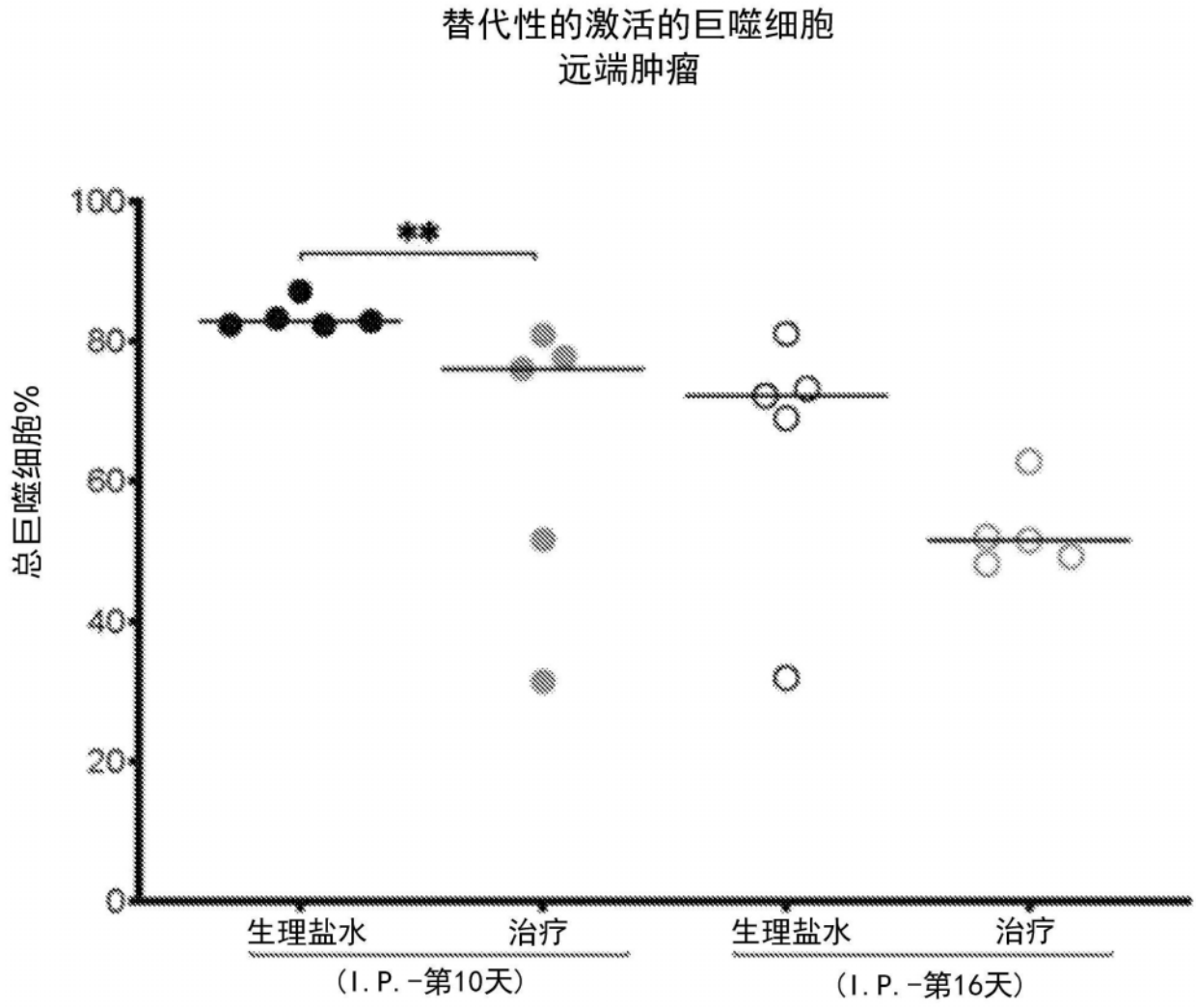

替代性的激活的巨噬细胞
远端肿瘤
总巨噬细胞%
100
80
60
40
20
0
**
生理盐水
治疗
生理盐水
治疗
(I.P.-第10天)
(I.P.-第16天)

图3I

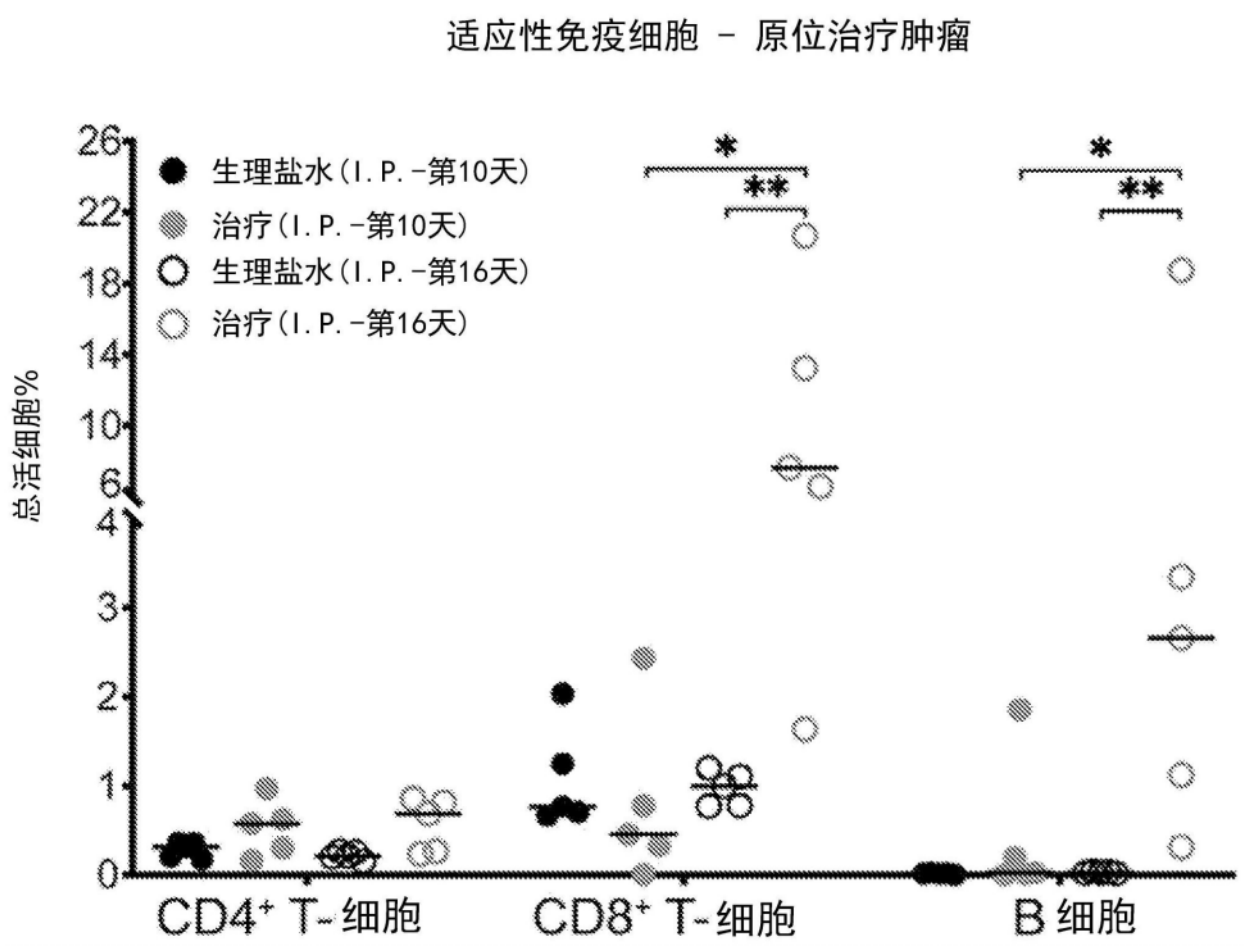

适应性免疫细胞 - 原位治疗肿瘤
生理盐水(I.P.-第10天)
治疗(I.P.-第10天)
生理盐水(I.P.-第16天)
治疗(I.P.-第16天)
总活细胞%
26
22
18
14
10
6
4
3
2
1
0
*
**
*
**
CD4+ T-细胞
CD8+ T-细胞
B 细胞

图4A

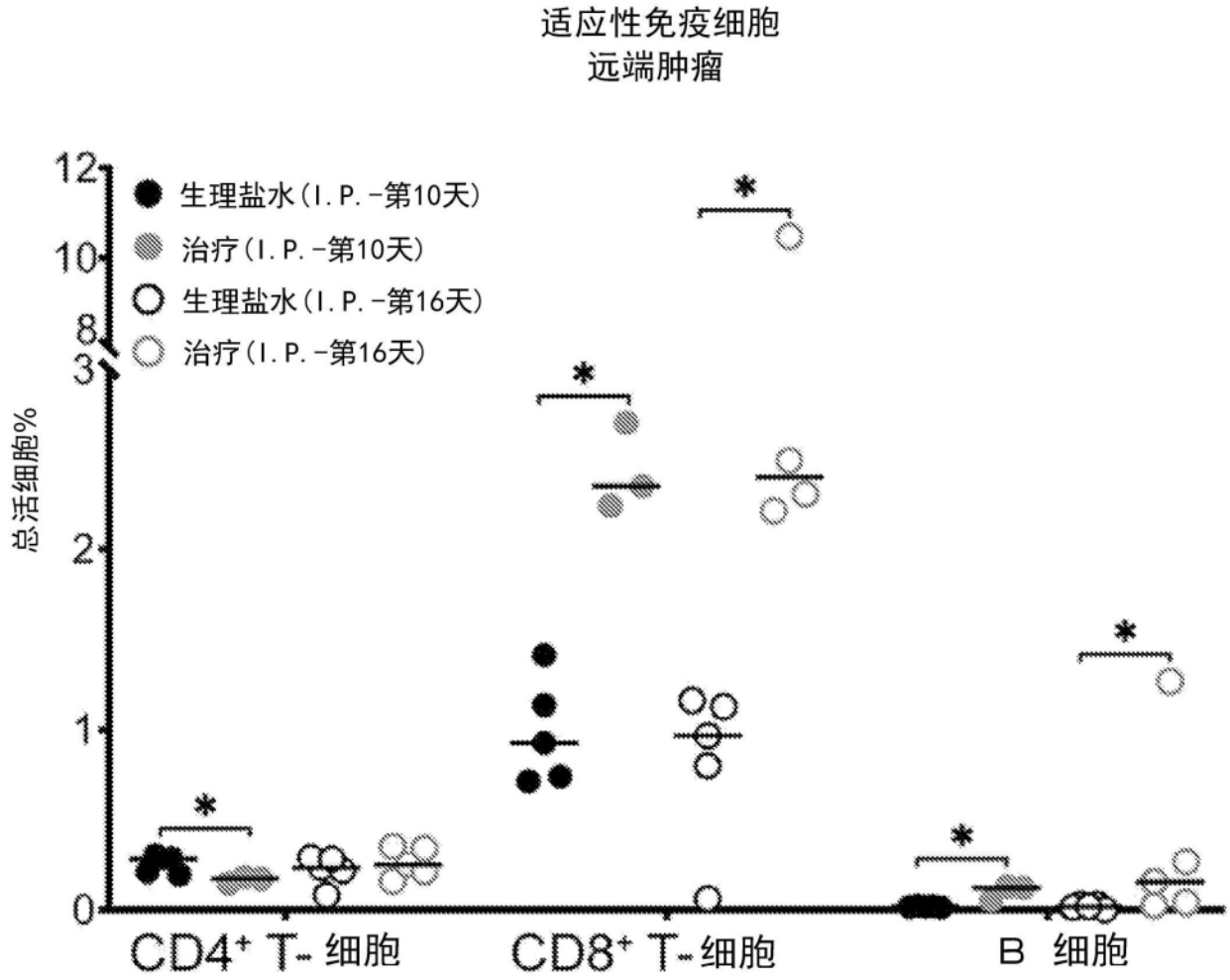

适应性免疫细胞
远端肿瘤
生理盐水(I.P.-第10天)
治疗(I.P.-第10天)
生理盐水(I.P.-第16天)
治疗(I.P.-第16天)
总活细胞%
12
10
8
3
2
1
0
*
CD4+ T-细胞
CD8+ T-细胞
B 细胞

图4B

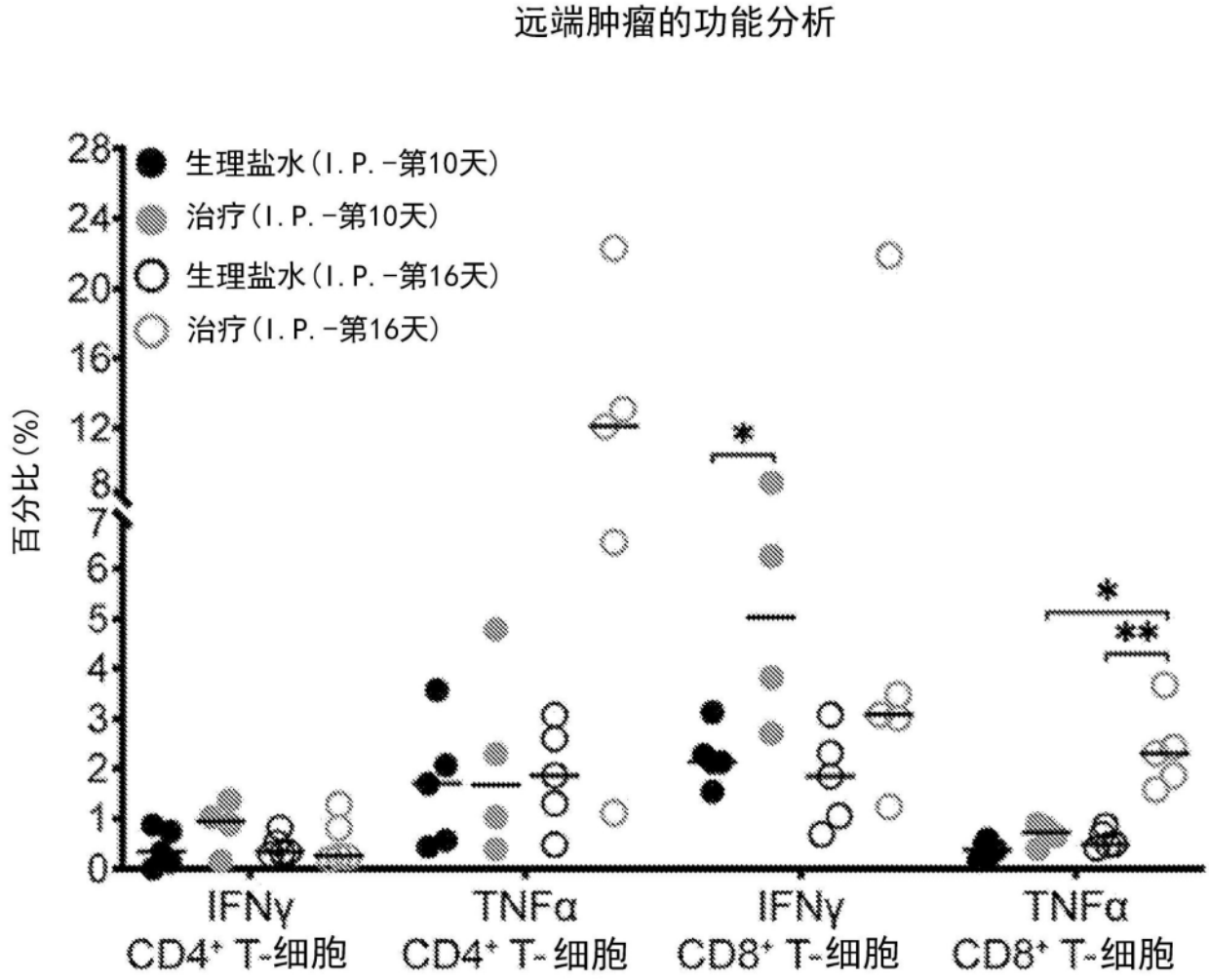

远端肿瘤的功能分析
生理盐水(I.P.-第10天)
治疗(I.P.-第10天)
生理盐水(I.P.-第16天)
治疗(I.P.-第16天)
百分比(%)
28
24
20
16
12
8
7
6
5
4
3
2
1
0
*
*
**
IFNγ CD4+ T-细胞
TNFα CD4+ T-细胞
IFNγ CD8+ T-细胞
TNFα CD8+ T-细胞

图4C

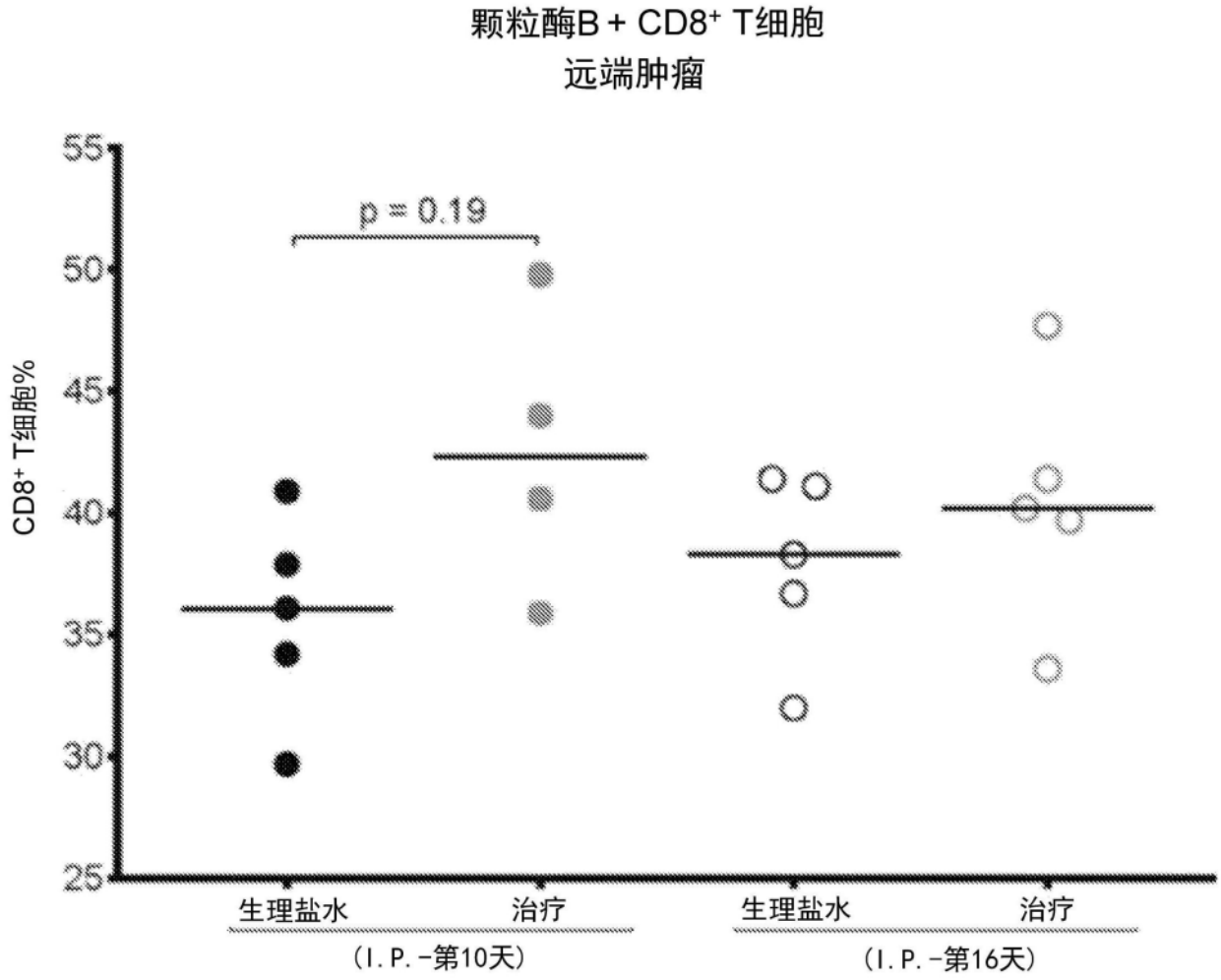

颗粒酶B + CD8+ T细胞
远端肿瘤
CD8+ T细胞%
55
50
45
40
35
30
25
p = 0.19
生理盐水
治疗
生理盐水
治疗
(I.P.-第10天)
(I.P.-第16天)

图4D

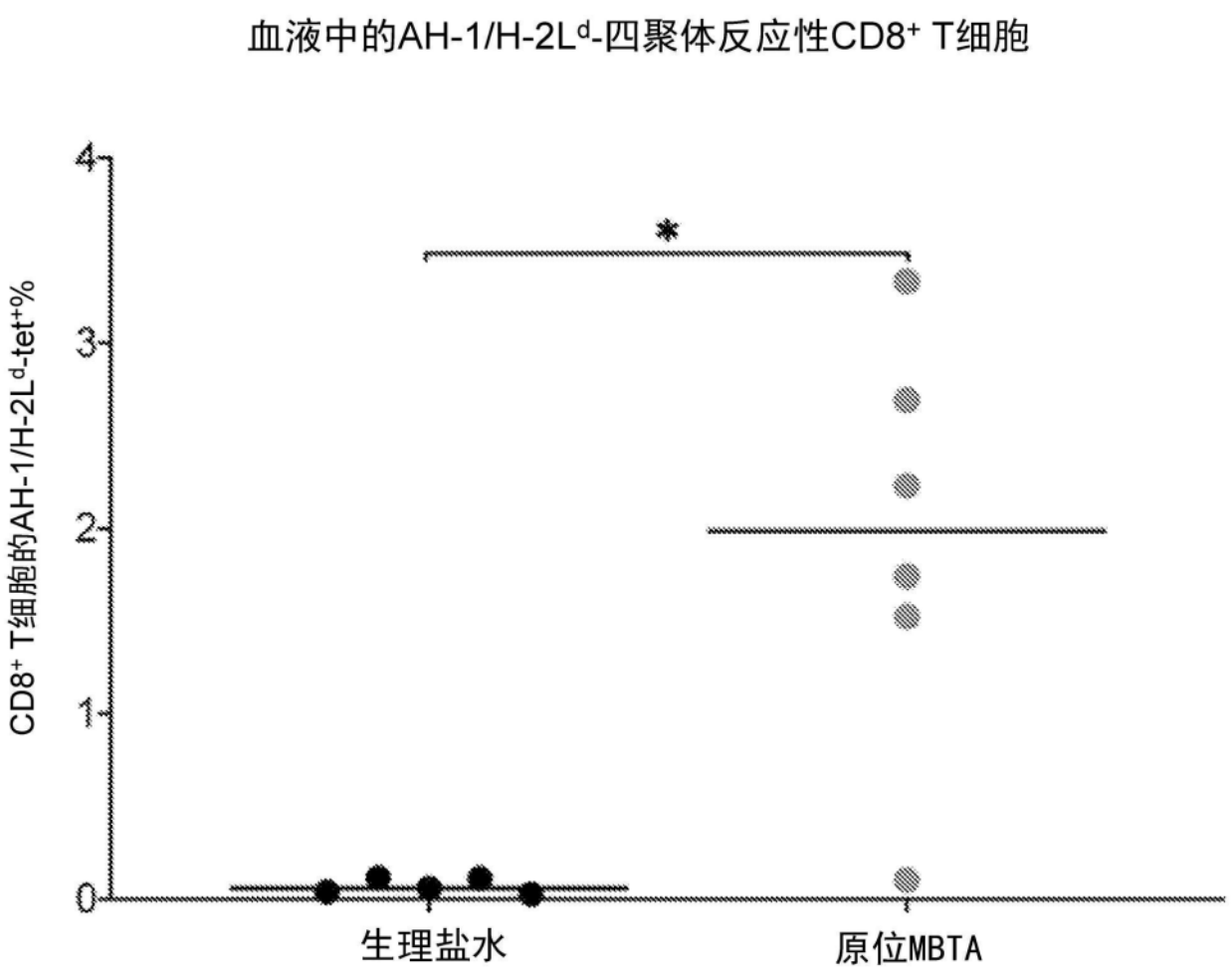

血液中的AH-1/H-2Ld-四聚体反应性CD8+ T细胞
CD8+ T细胞的AH-1/H-2Ld-tet+%
4
3
2
1
0
*
生理盐水
原位MBTA

图4E

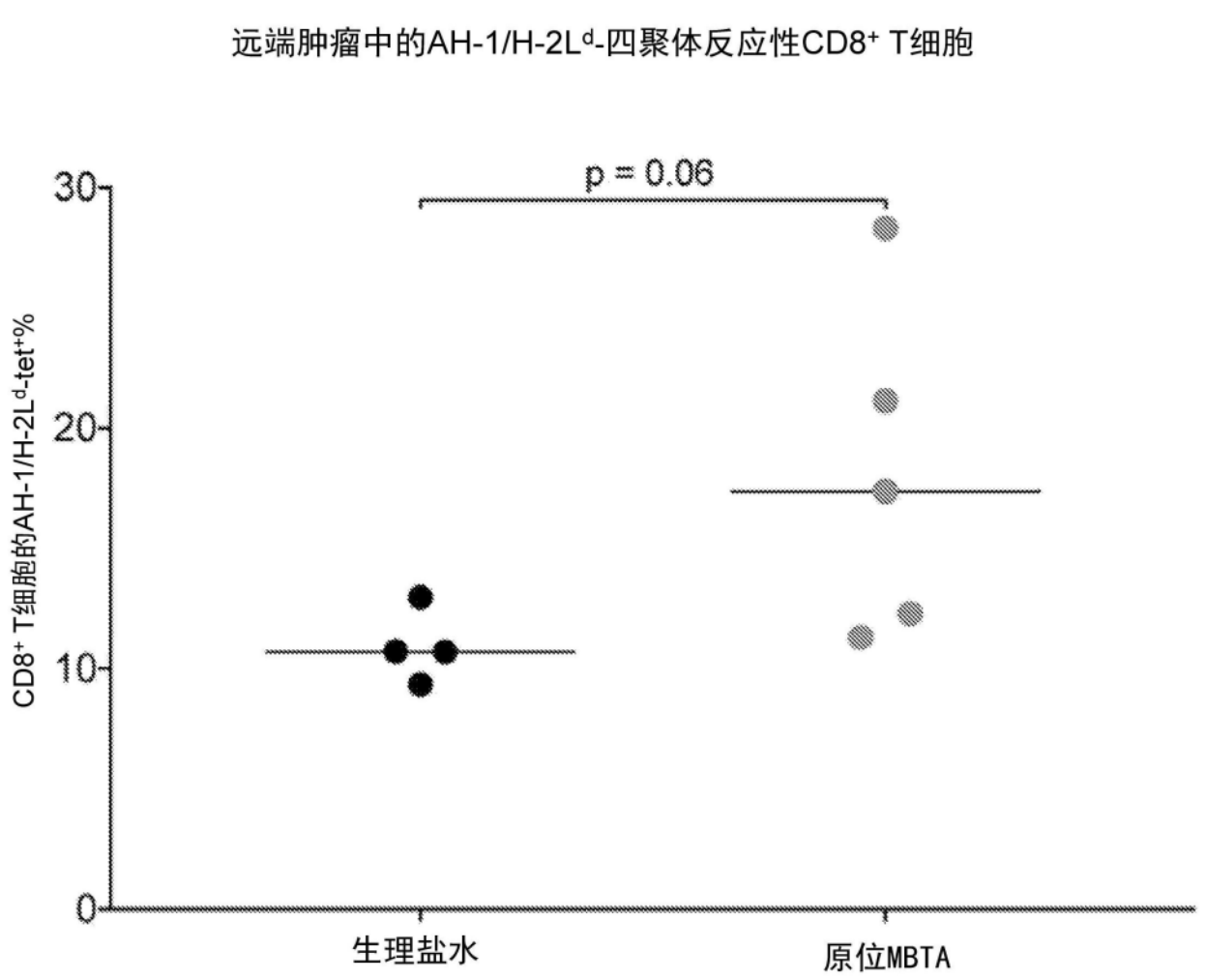

远端肿瘤中的AH-1/H-2Ld-四聚体反应性CD8+ T细胞
p = 0.06
CD8+ T细胞的AH-1/H-2Ld-tet+%
30
20
10
0
生理盐水
原位MBTA

图4F

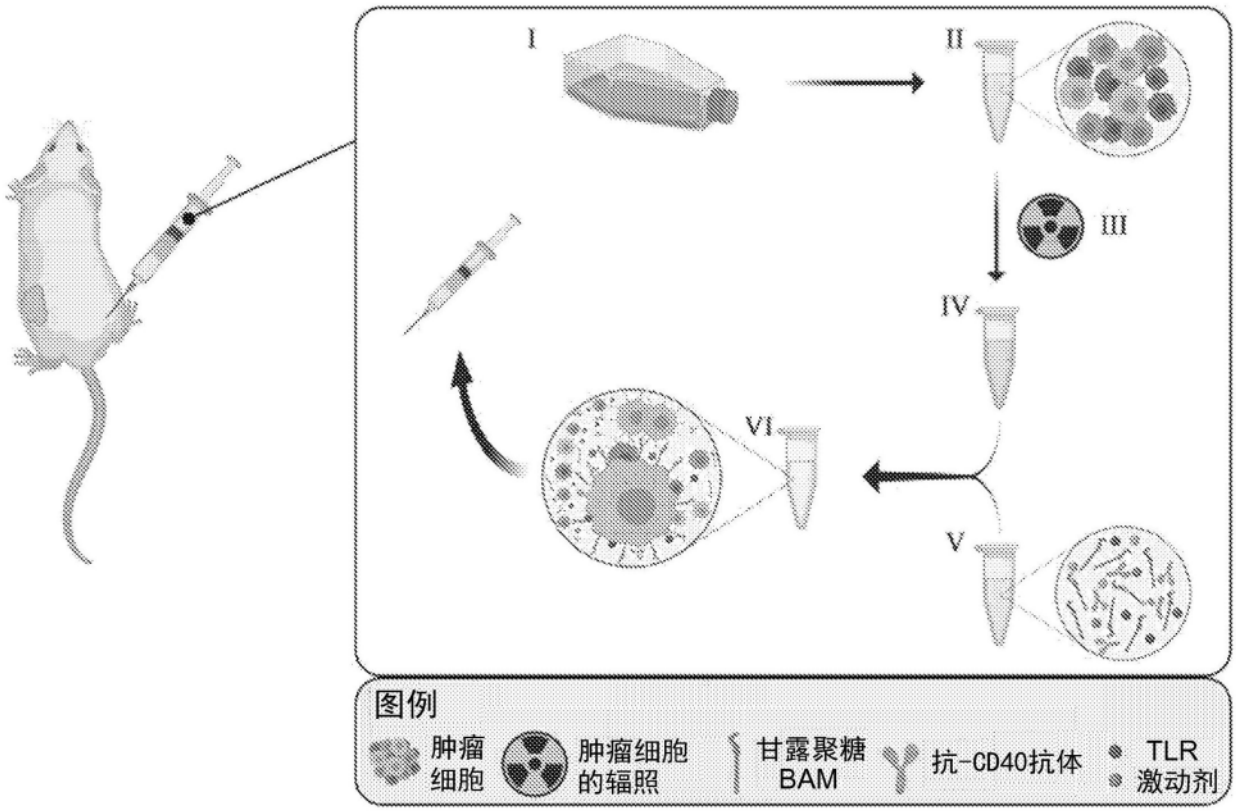


图5A

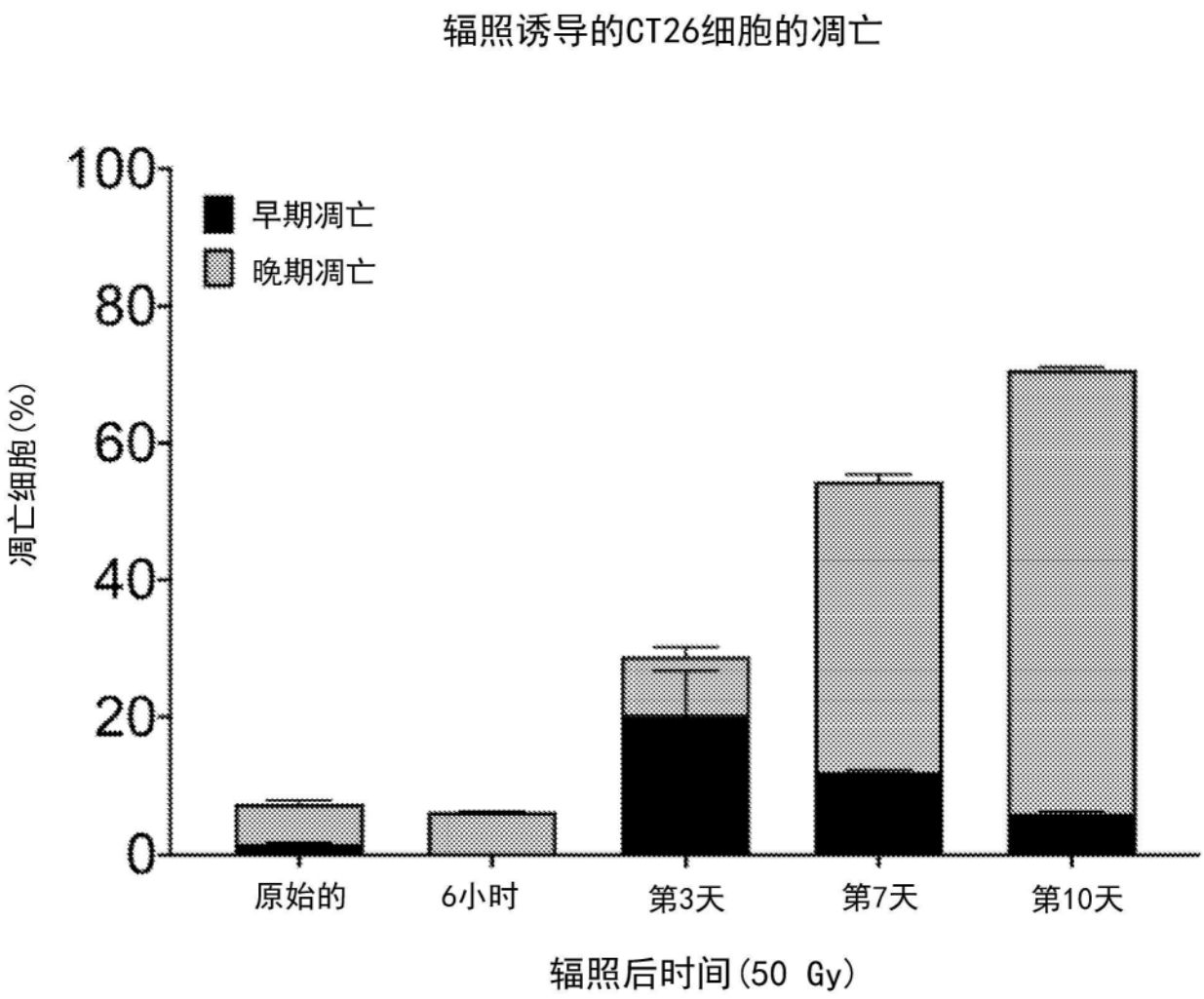

辐照诱导的CT26细胞的凋亡
100
80
60
40
20
0
凋亡细胞(%)
早期凋亡
晚期凋亡
原始的
6小时
第3天
第7天
第10天
辐照后时间(50 Gy)

图5B

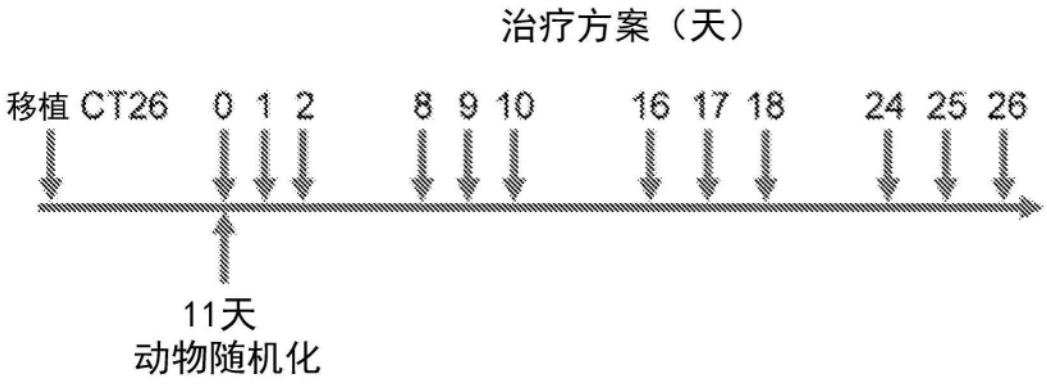

治疗方案（天）
移植 CT26
0 1 2
8 9 10
16 17 18
24 25 26
11天
动物随机化

图5C

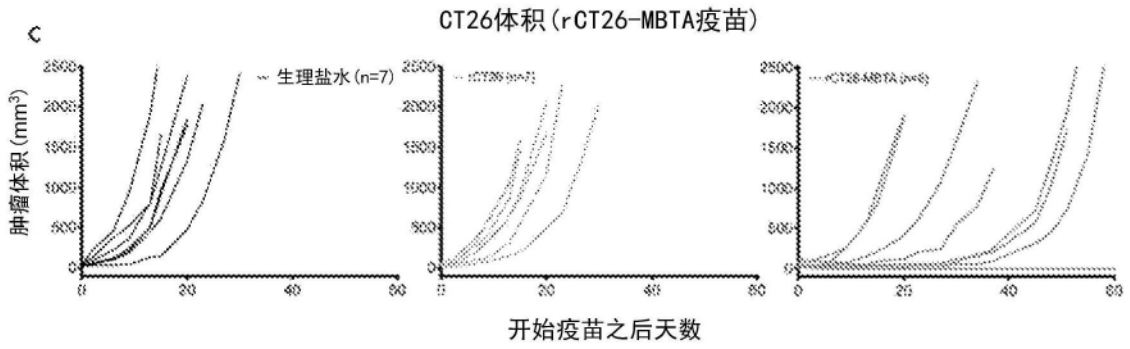

CT26体积(rCT26-MBTA疫苗)
C
肿瘤体积(mm³)
生理盐水(n=7)
开始疫苗之后天数

图5D

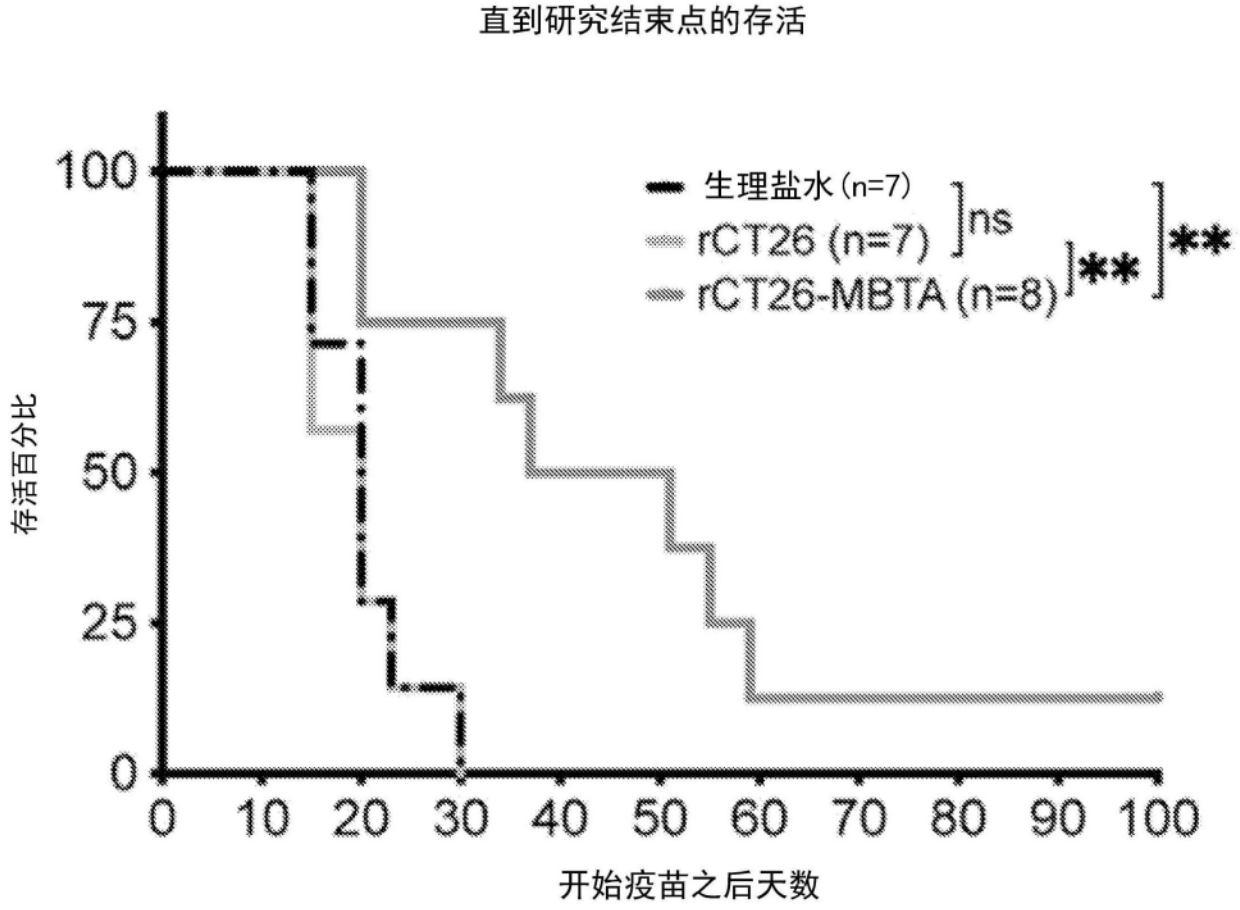

直到研究结束点的存活
生理盐水(n=7)
rCT26 (n=7)
rCT26-MBTA (n=8)
ns
**
**
存活百分比
开始疫苗之后天数

图5E

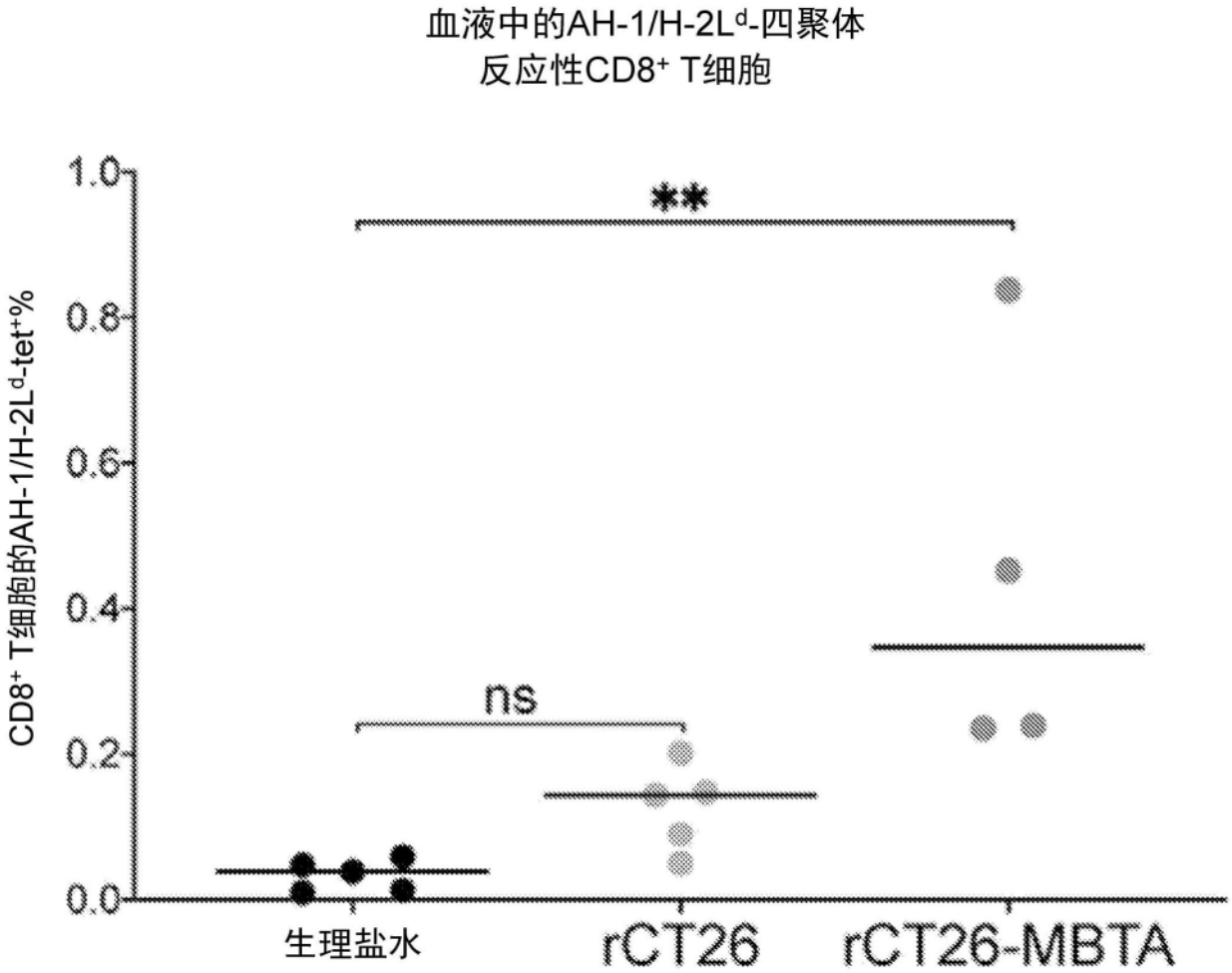

血液中的AH-1/H-2Ld-四聚体
反应性CD8+ T细胞
CD8+ T细胞的AH-1/H-2Ld-tet+%
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
**
ns
生理盐水
rCT26
rCT26-MBTA

图5F

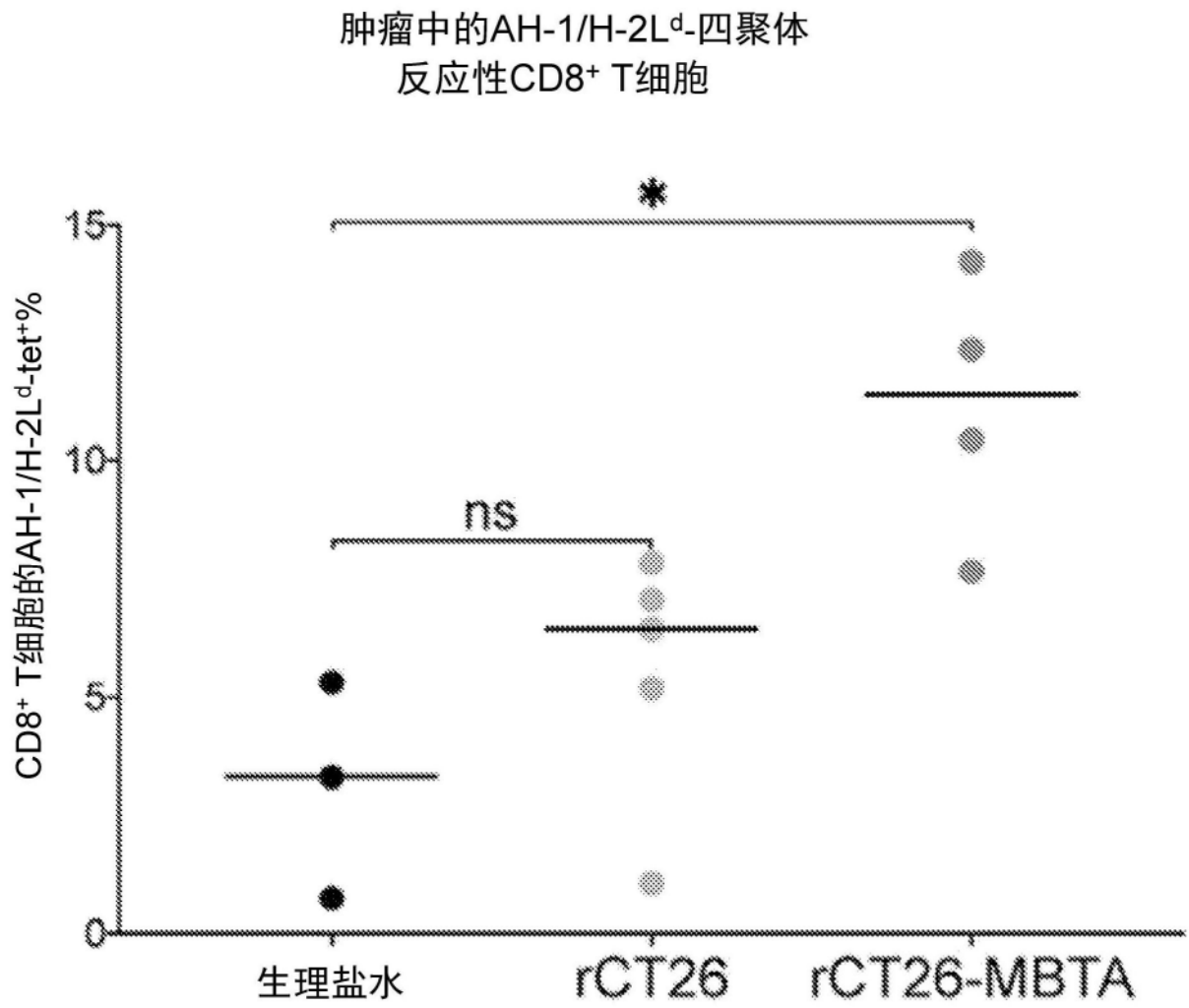

肿瘤中的AH-1/H-2Ld-四聚体
反应性CD8+ T细胞
CD8+ T细胞的AH-1/H-2Ld-tet+%
15
10
5
0
*
ns
生理盐水
rCT26
rCT26-MBTA

图5G

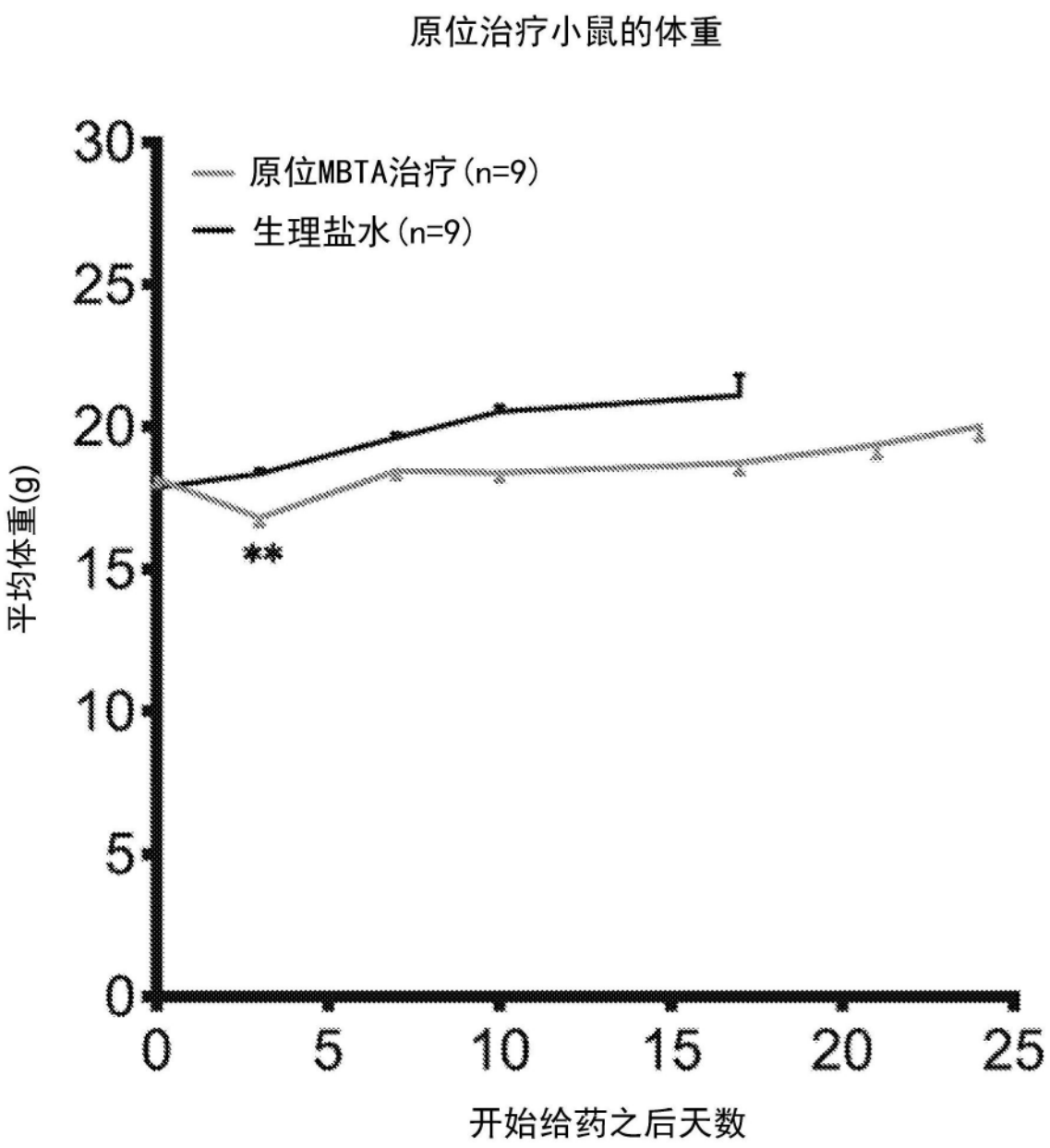

原位治疗小鼠的体重
原位MBTA治疗(n=9)
生理盐水(n=9)
平均体重(g)
开始给药之后天数
**
0
5
10
15
20
25
30

图5H

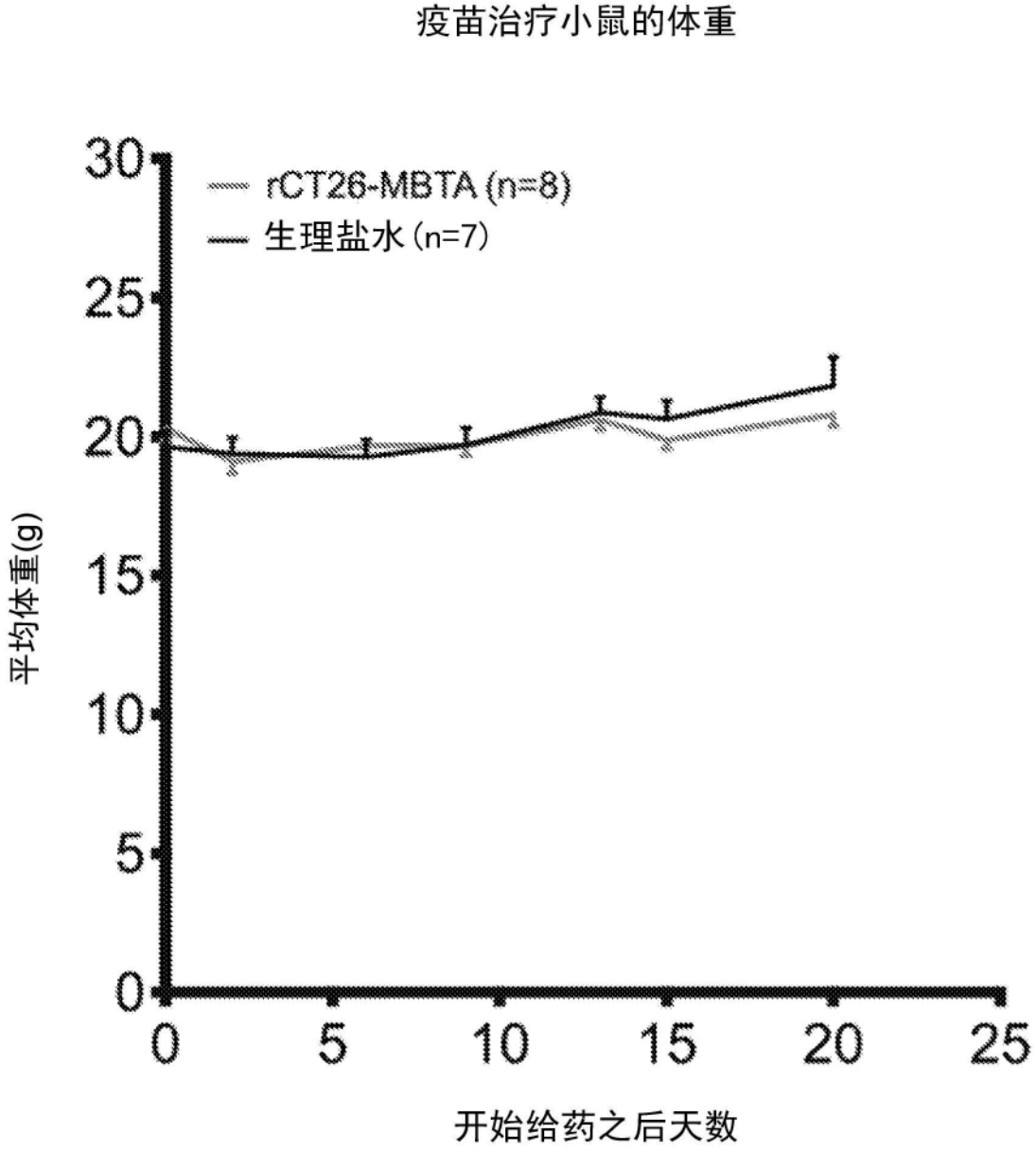

疫苗治疗小鼠的体重
rCT26-MBTA (n=8)
生理盐水 (n=7)
平均体重(g)
30
25
20
15
10
5
0
0
5
10
15
20
25
开始给药之后天数

图5I

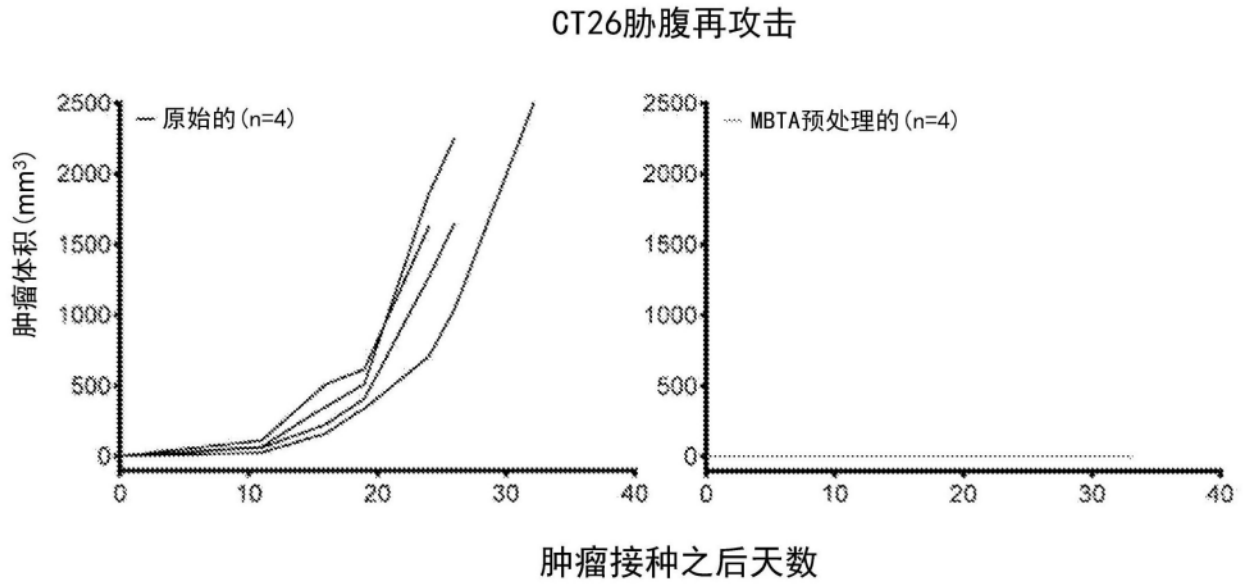

CT26胁腹再攻击
原始的(n=4)
MBTA预处理的(n=4)
肿瘤体积(mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
肿瘤接种之后天数

图6A

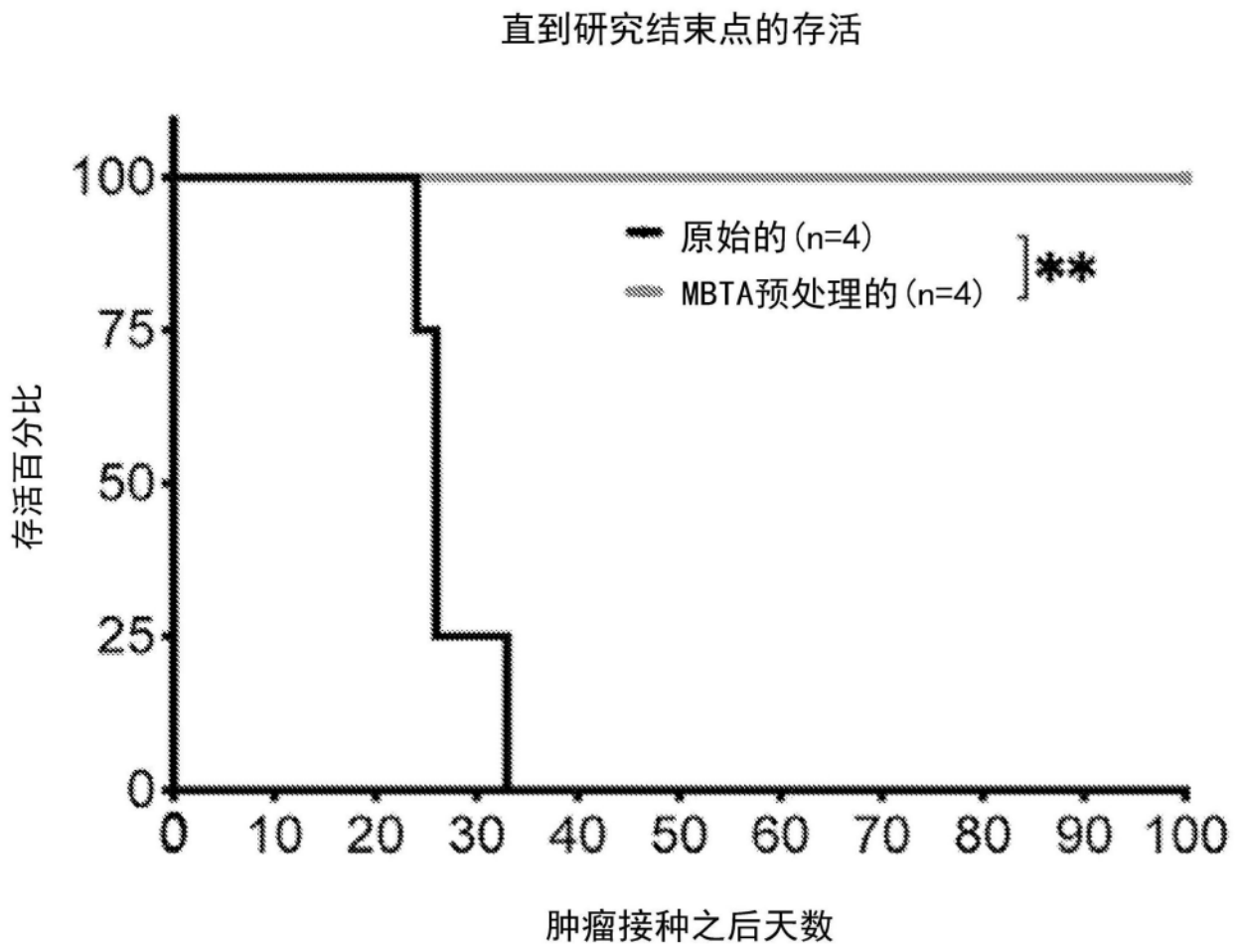

直到研究结束点的存活
原始的(n=4)
MBTA预处理的(n=4)
**
存活百分比
100
75
50
25
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
肿瘤接种之后天数

图6B

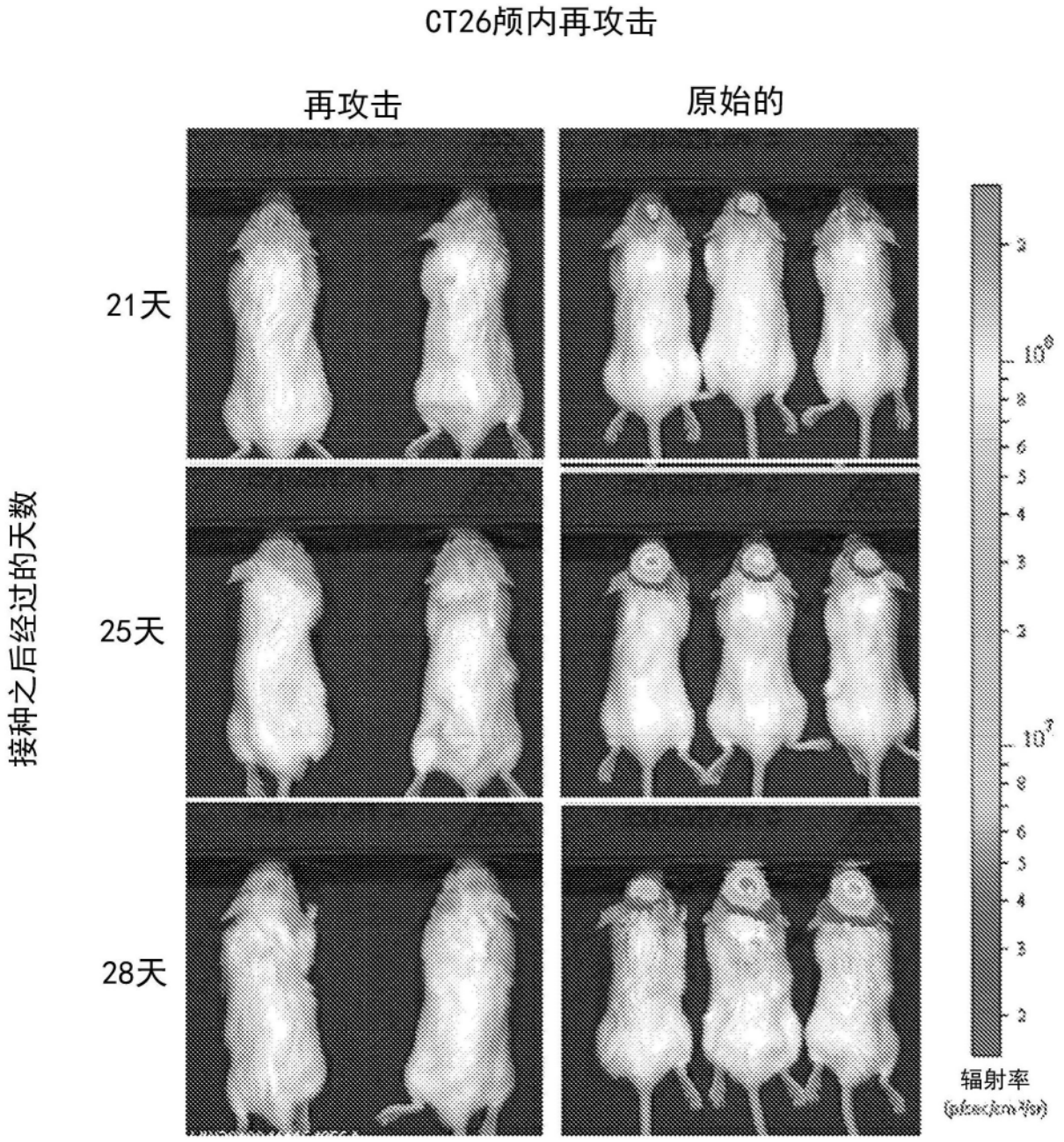


图6C

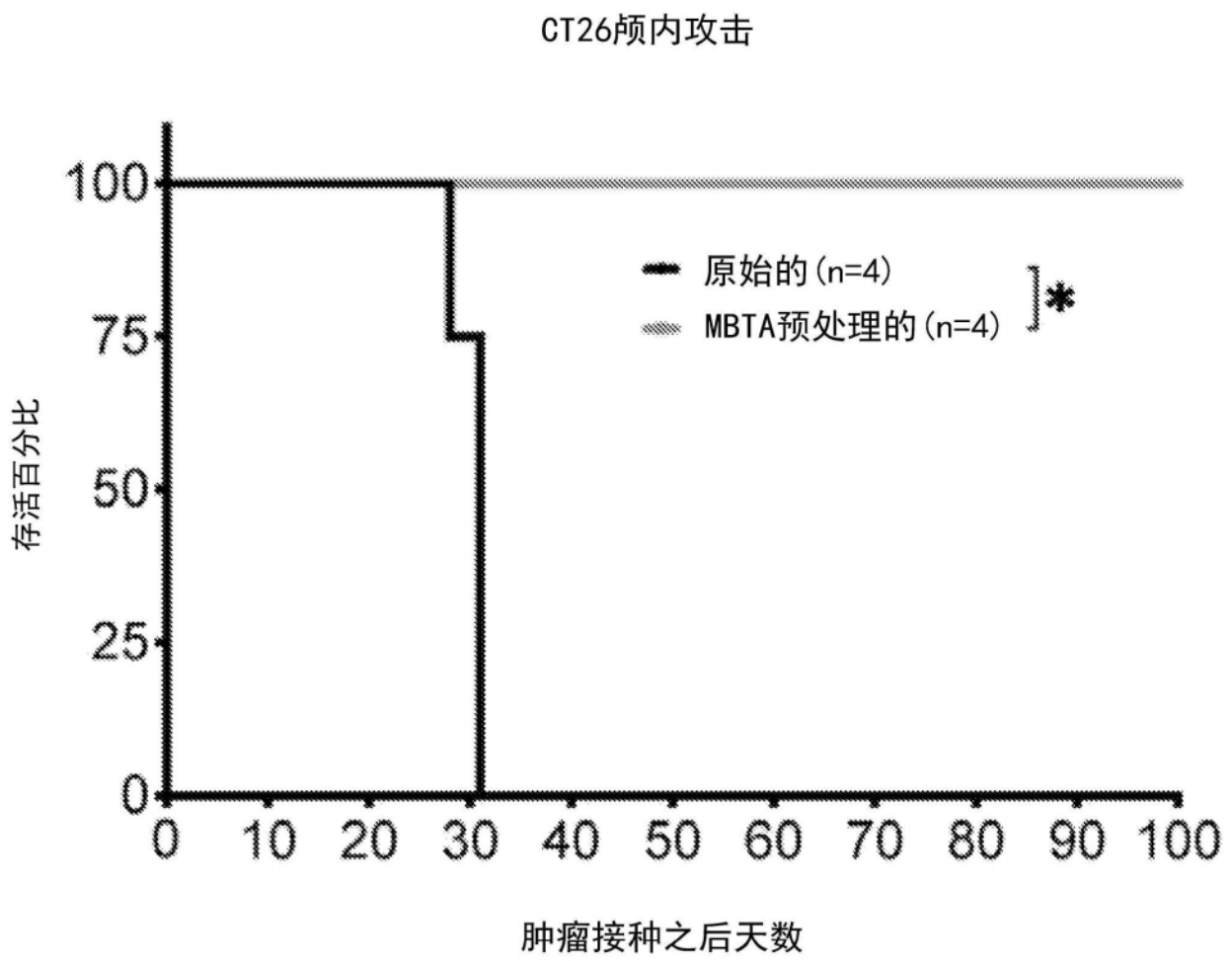

CT26颅内攻击
100
75
50
25
0
存活百分比
原始的(n=4)
MBTA预处理的(n=4)
*
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
肿瘤接种之后天数

图6D