



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111246879 A

(43)申请公布日 2020.06.05

(21)申请号 201880068497.7

(22)申请日 2018.10.25

(30)优先权数据

62/576,774 2017.10.25 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.04.21

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/057494 2018.10.25

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/084259 EN 2019.05.02

(71)申请人 北卡罗来纳州大学

地址 美国北卡罗来纳州

(72)发明人 顾臻 叶彦奇

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

代理人 刘慧 金海霞

(51)Int.Cl.

A61K 39/35(2006.01)

A61K 38/19(2006.01)

A61K 39/39(2006.01)

A61K 9/00(2006.01)

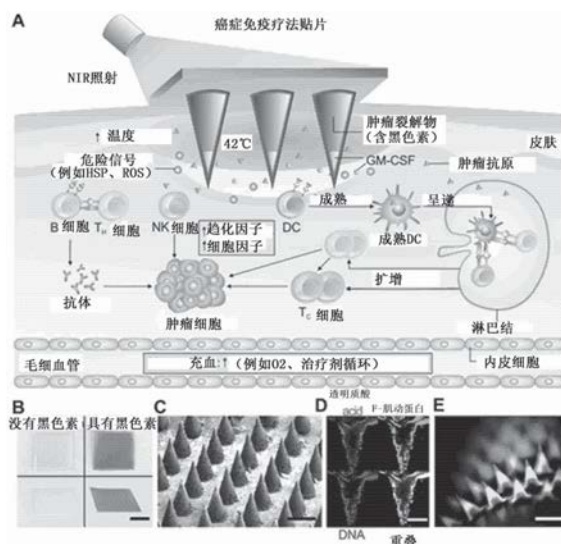
权利要求书3页 说明书25页 附图30页

(54)发明名称

用于癌症光免疫疗法的皮肤施药器

(57)摘要

本公开的实施方案大体上涉及用于治疗癌症的光免疫疗法。更特别地,本公开提供了光响应皮肤施药器,所述光响应皮肤施药器使用透皮微针阵列向受试者施用免疫原性组合物和光敏性生物色素来治疗和/或预防癌症。本公开的光响应皮肤施药器提供了以比常规手段更安全且侵入性更小的方式靶向癌性肿瘤的能力。



1. 一种用于光免疫疗法的光响应皮肤施药器,所述皮肤施药器包含:
包含多个微针的透皮微针阵列,每个微针包含基座部分和尖端部分;
包含至少一种肿瘤抗原的免疫原性组合物;以及
光敏性生物色素。
2. 根据权利要求1所述的皮肤施药器,其中使用聚合物基质将所述免疫原性组合物和所述生物色素封装在所述微针阵列内,所述聚合物基质包含以下的至少一种:糖胺聚糖、多硫酸化的糖胺聚糖、葡糖聚糖、多硫酸化的葡糖聚糖、葡糖胺聚糖、粘多糖、羧甲基纤维素(CMC)、(丙交酯-乙交酯)共聚物(PLGA)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚乙烯醇(PVA)、聚丙烯酸(PAA)、聚L-乳酸(PLA)、麦芽糖、壳聚糖、海藻酸盐,及其衍生物和组合。
3. 根据权利要求1所述的皮肤施药器,其中所述聚合物基质包含透明质酸。
4. 根据权利要求1所述的皮肤施药器,其中所述至少一种肿瘤抗原来源于灭活的肿瘤裂解物或新抗原。
5. 根据权利要求1所述的皮肤施药器,其中所述至少一种肿瘤抗原来源于黑色素瘤、白血病、乳癌、肺癌、膀胱癌、脑癌、子宫颈癌、卵巢癌、结肠直肠癌,以及任何相关癌症。
6. 根据权利要求1所述的皮肤施药器,其中所述至少一种肿瘤抗原来源于B16F10黑色素瘤、BRAF^{v600E}黑色素瘤或4T1乳房肿瘤。
7. 根据权利要求1所述的皮肤施药器,其中所述至少一种肿瘤抗原包含来自受试者的免疫原性表位。
8. 根据权利要求1所述的皮肤施药器,其中所述光敏性生物色素是黑色素、类胡萝卜素、叶黄素、胆红素,或其组合中的至少一种。
9. 根据权利要求1所述的皮肤施药器,其中所述免疫原性组合物还包含免疫刺激剂。
10. 根据权利要求9所述的皮肤施药器,其中所述免疫刺激剂包含以下的至少一种:粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、CpG核苷酸、白介素(IL)-7、IL-15及其组合,并且其中所述免疫刺激剂能够刺激免疫细胞。
11. 根据权利要求9所述的皮肤施药器,其中所述免疫刺激剂包含至少一种免疫检查点抑制剂。
12. 根据权利要求1所述的皮肤施药器,其中所述免疫原性组合物和所述光敏性生物色素被封装在所述多个微针的基座部分内,并且其中所述免疫刺激剂被封装在所述多个微针的尖端部分内,所述尖端部分位于所述基座部分的远端。
13. 根据权利要求12所述的皮肤施药器,其中通过使甲基丙烯酸化的透明质酸交联将所述免疫刺激剂封装在所述多个微针的尖端部分内。
14. 根据权利要求1所述的皮肤施药器,所述皮肤施药器还包含用于将光能递送至所述施药器刺激受试者的免疫应答的构件。
15. 根据权利要求14所述的皮肤施药器,其中所述光能包含近红外(NIR)光。
16. 一种治疗罹患肿瘤的受试者的方法,所述方法包括:
使所述受试者的皮肤区域与根据权利要求1所述的光响应皮肤施药器接触,以及将光能递送至所述皮肤施药器;
其中所述的将光能递送至所述皮肤施药器刺激所述受试者的针对所述肿瘤的免疫应答。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述的将光能递送至所述皮肤施药器包括递送近红外(NIR)光、UV光或波长为约10nm至约1000nm的光。

18. 根据权利要求16所述的方法,其中所述的将光能递送至所述皮肤施药器包括递送NIR光历时约5分钟至约20分钟。

19. 根据权利要求16所述的方法,其中所述的将光能递送至所述皮肤施药器包括每天递送NIR光至少一次,持续约一天至约连续七天。

20. 根据权利要求16所述的方法,其中所述至少一种肿瘤抗原来源于灭活的肿瘤裂解物或新抗原。

21. 根据权利要求16所述的方法,其中所述至少一种肿瘤抗原来源于黑色素瘤、白血病、乳癌、肺癌、膀胱癌、脑癌、子宫颈癌、卵巢癌、结肠直肠癌,以及任何相关癌症。

22. 根据权利要求16所述的方法,其中所述光敏性生物色素包含黑色素,并且其中将NIR光递送至所述皮肤施药器刺激所述黑色素产生高热微环境。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述高热微环境的温度为约35℃至约45℃。

24. 根据权利要求16所述的方法,其中所述免疫原性组合物还包含免疫刺激剂。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述免疫刺激剂包含以下的至少一种:粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、CpG核苷酸、白介素(IL)-7、IL-15及其组合,并且其中所述免疫刺激剂能够刺激免疫细胞。

26. 根据权利要求24所述的方法,其中所述免疫刺激剂包含至少一种免疫检查点抑制剂。

27. 一种预防受试者的肿瘤形成的方法,所述方法包括:

使所述受试者的皮肤区域与根据权利要求1所述的光响应皮肤施药器接触,以及将光能递送至所述皮肤施药器;

其中所述的将光能递送至所述皮肤施药器刺激所述受试者的针对所述肿瘤的免疫应答。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中所述的将光能递送至所述皮肤施药器包括递送近红外(NIR)光、UV光或波长为约10nm至约1000nm的光。

29. 根据权利要求27所述的方法,其中所述的将光能递送至所述皮肤施药器包括递送NIR光历时约5分钟至约20分钟。

30. 根据权利要求27所述的方法,其中所述的将光能递送至所述皮肤施药器包括每天递送NIR光至少一次,持续约一天至约连续七天。

31. 根据权利要求27所述的方法,其中所述至少一种肿瘤抗原来源于灭活的肿瘤裂解物或新抗原。

32. 根据权利要求27所述的方法,其中所述至少一种肿瘤抗原来源于黑色素瘤、白血病、乳癌、肺癌、膀胱癌、脑癌、子宫颈癌、卵巢癌、结肠直肠癌,以及任何相关癌症。

33. 根据权利要求27所述的方法,其中所述光敏性生物色素包含黑色素,并且其中将NIR光递送至所述皮肤施药器刺激所述黑色素产生高热微环境。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中所述高热微环境的温度为约35℃至约45℃。

35. 根据权利要求27所述的方法,其中所述免疫原性组合物还包含免疫刺激剂。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中所述免疫刺激剂包含以下的至少一种:粒细胞-

巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、CpG核苷酸、白介素 (IL) -7、IL-15及其组合,并且其中所述免疫刺激剂能够刺激免疫细胞。

37. 根据权利要求36所述的方法,其中所述免疫刺激剂包含至少一种免疫检查点抑制剂。

用于癌症光免疫疗法的皮肤施药器

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年10月25日提交的美国临时申请号62/576,774的权益,该案以全文引用的方式并入本文中。

[0003] 政府基金

[0004] 本发明是在美国国立卫生研究院(the National Institutes of Health;NIH)授予的授权号TR001111的政府支持下完成的。政府对本发明享有某些权利。

技术领域

[0005] 本公开的实施方案大体上涉及用于治疗癌症的光免疫疗法。更特别地,本公开提供了一种光响应皮肤施药器,所述光响应皮肤施药器使用透皮微针(MN)阵列向受试者施用免疫原性组合物和光敏性生物色素来治疗和/或预防癌症。

背景技术

[0006] 与免疫疗法相关的新兴技术在癌症治疗中具有广阔的前景。可以使用微米或纳米配制品或工程化的免疫细胞来递送多种免疫调节剂。也已经开发了支架,诸如水凝胶,来产生原位募集并活化免疫细胞的免疫原性微环境。而且,掺入抗体或治疗剂中的T细胞工程化促进了免疫靶向和治疗。其中,基于树突状细胞(DC)的疫苗接种可以有效地捕获抗原以改进免疫应答的有效性,并且是癌症疗法的有力工具。但是,DC的工程化通常涉及复杂且昂贵的离体操作。另外,离体操作的DC的有限淋巴结归巢能力至少部分造成了有限的抗癌功效。用完整肿瘤抗原疫苗接种提供了肿瘤相关抗原的广泛来源,与狭义肿瘤抗原相比,完整肿瘤抗原引起显著增强的免疫应答。另外,呈递广泛的免疫原性表位不仅加强了DC抗原吸收和加工介导的免疫性,而且还直接活化了CD4+T辅助淋巴细胞和CD8+细胞毒性T淋巴细胞(CTL)。

发明内容

[0007] 本公开的实施方案大体上涉及用于治疗癌症的光免疫疗法。更特别地,本公开提供了一种光响应皮肤施药器,所述光响应皮肤施药器使用透皮微针阵列向受试者施用免疫原性组合物和光敏性生物色素来治疗和/或预防癌症。

[0008] 本公开的实施方案包括用于光免疫疗法的光响应皮肤施药器。根据这些实施方案,皮肤施药器包括:包含多个微针的透皮微针阵列,其中每个微针具有基座部分和尖端部分;包括至少一种肿瘤抗原的免疫原性组合物;以及光敏性生物色素。

[0009] 在一些实施方案中,使用聚合物基质,诸如基于透明质酸的基质,将免疫原性组合物和生物色素封装在微针阵列内。免疫原性组合物可以包括至少一种来源于灭活的肿瘤裂解物肿瘤抗原(诸如来源于黑色素瘤的肿瘤抗原),或合成抗原诸如新抗原,并且光敏性生物色素可以包括黑色素。在一些实施方案中,免疫原性组合物还可以包括能够刺激免疫细胞的免疫刺激剂。

[0010] 本公开的实施方案包括治疗罹患肿瘤的受试者和/或预防受试者的肿瘤形成的方法。根据这些实施方案,所述方法包括使受试者的皮肤区域与上述光响应皮肤施药器接触,并将光能递送至皮肤施药器,其中光能的递送转化为刺激受试者的针对肿瘤的免疫应答的局部热。在一些实施方案中,将光能递送至皮肤施药器包含递送近红外(NIR)光、UV光或波长为约10nm至约1000nm的光。将光递送至皮肤施药器可以刺激光敏性生物色素,诸如黑色素,以产生高热微环境来刺激免疫应答以治疗肿瘤和/或预防肿瘤形成。

附图说明

[0011] 图1A-1B包括用于黑色素介导的癌症免疫疗法的基于MN的透皮施药器的代表性示意图和图像。(A) 基于MN的透皮疫苗接种的示意性说明。 T_H 细胞:T辅助细胞, T_C 细胞:细胞毒性T细胞。(B) 没有(w/o)黑色素和具有(w/)黑色素的代表性MN施药器的照片(比例尺:4mm)。(C) MN施药器的扫描电子显微图像(比例尺:400 μ m)。(D) 代表性MN的荧光截面图像。用Alexa Fluor 488-鬼笔环肽(绿色)显现细胞中的肌动蛋白丝,用Hoechst(蓝色)将细胞DNA片段染色,并且用罗丹明(rhodamine)(红色)将透明质酸聚合物基质染色(比例尺:200 μ m)。(E) 含有Alexa Fluor 488-鬼笔环肽标记的肿瘤裂解物和罗丹明标记的透明质酸的代表性MN阵列施药器的荧光成像(比例尺:400 μ m)。

[0012] 图2A-2G表征了光响应透皮MN。(A) 在1.0W/cm²的连续808nm NIR照射下,具有或没有肿瘤裂解物的MN的表面温度实时变化,所述变化通过红外热感照相机表征(比例尺:1mm)。(B) 在1.0W/cm²连续NIR照射下,代表性MN的定量表面温度变化(n=3)。(C) 随着激光功率通量的增加,代表性MN阵列施药器的定量温度变化(n=3)。(D) 肿瘤裂解物蛋白从MN阵列施药器的体外总释放(n=3)。(E) 响应于载有肿瘤裂解物和GM-CSF或LPS的MN并暴露于NIR照射不同时间的DC的体外活化(n=3)。(F) 用(i) 空白MN、(ii) 10分钟NIR、(iii) MN和(iv) MN和10分钟NIR处理后DC的活/死测定。(G) 处理后DC活力的定量。数据点表示平均值 $\pm$ 标准偏差(SD)(n=3)。误差线指示SD。通过史都登t检验(Student t-test)计算统计学显著性(NS.P>0.05;*P<0.05)。

[0013] 图3A-3G证明了MN施药器赋予保护性先天和适应性免疫。(A) MN癌症免疫疗法的示意性说明。(B) 插入后MN的表征。(i) 用一个MN施药器透皮处理的小鼠背部皮肤的照片(红线内的区域),以及(ii) Cy5.5标记的MN阵列施药器随时间变化的荧光信号。(C) 通过红外热感照相机测量的将MN插入皮肤后单个动物的表面温度变化。(D) B16F10疫苗肿瘤模型的示意图。(E) 肿瘤攻击后经处理小鼠的平均肿瘤体积。(F) 经处理和对照小鼠的卡普兰-迈耶存活曲线(Kaplan-Meier survival curve)。数据点表示平均值 $\pm$ SD(n=8)。误差线指示SD。通过史都登t检验和对数秩检验计算统计学显著性(*P<0.05;**P<0.01;***P<0.001)。(G) 不同实验组中和肿瘤攻击后的不同时间点时B16F10黑色素瘤的体内生物发光成像。每个处理组显示了三只代表性小鼠。在肿瘤细胞接种后10天后测量E、F和G中的肿瘤生长。

[0014] 图4A-4D证明了在NIR增强和MN介导的癌症免疫疗法后的免疫细胞募集。(A) 通过流式细胞术评定的处理后三天渗透到皮肤中的DC(CD11c⁺, PIR-A/B⁺)的代表性定量分析。将指示的样品用空白MN(空白)处理、用疫苗MN处理(MN)、用载有肿瘤裂解物但没有GM-CSF并用NIR处理的MN处理(NIR)、用疫苗MN处理并用NIR处理(MN+NIR)。(B) 通过流式细胞术评定的透皮癌症免疫疗法后皮肤中NK细胞(CD49b⁺)的代表性定量分析。(C) CD11c⁺DC的免疫

荧光染色和定量分析(比例尺:100 μ m),和(D)CD49b+NK细胞的免疫荧光染色和定量分析(比例尺:100 μ m)。通过史都登t检验计算统计学显著性(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)。星号指示MN+NIR组与所有其他处理组之间的显著差异。数据点表示平均值 $\pm$ SD($n=3$)。误差线指示SD。

[0015] 图5A-5G证明了MN介导的癌症免疫治疗后的免疫学应答。(A)通过流式细胞术分析的经处理肿瘤中T细胞(以CD3+T细胞门控)的代表性定量分析。(B)通过流式细胞术分析的引流淋巴结中活化DC(CD86+, CD80+)的代表性定量分析。数据点表示平均值 $\pm$ SD($n=8$)。(C)显示CD4+T细胞和CD8+T细胞浸润的肿瘤的免疫荧光染色(比例尺:100 μ m)。(D)在第10天收集的血清中IgG1亚型的定量。数据点表示平均值 $\pm$ SD($n=8$)。(E)在体外脾细胞对B16F10细胞的细胞毒性反应。数据点表示平均值 $\pm$ SD($n=6$)。(F)局部皮肤中HSP70的免疫荧光染色(绿色),其中用Alexa Fluor 660-鬼笔环肽显现肌动蛋白丝(红色),并且用Hoechst将细胞核染色(蓝色)(比例尺:100 μ m)。(G)第3天来自提取的施药器的细胞因子的体内局部检测。通过史都登t检验计算统计学显著性(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)。数据点表示平均值 $\pm$ SD($n=8$)。误差线指示SD。

[0016] 图6A-6K证明了局部癌症免疫疗法处理对远端B16F10肿瘤的抗肿瘤作用。(A)B16F10肿瘤模型的示意图。(B)MN施用之前和之后小鼠的照片。红色箭头指示两侧已形成的肿瘤。红线指示MN注射部位。(C)不同实验组的肿瘤重量($n=3$)。(D)在不同实验组中处理后的肿瘤浸润性CD8+T细胞($n=6$)。C、D中的星号指示空白MN与其他组之间的统计学显著差异。(E)通过(D)中的标记指示的从经处理小鼠提取的肿瘤的图像。(F)经处理B16F10黑色素瘤在处理后的不同时间点的体内生物发光成像。每个处理组显示了一只代表性小鼠。(G)经处理小鼠的平均肿瘤体积。(H)经处理小鼠的体重($n=6$)。(I)用载有BP裂解物和黑色素的MN和空白MN处理的小鼠中的平均B16F10肿瘤体积($n=8$)。(J)在第80天用B16F10细胞或BP细胞再攻击的疫苗接种小鼠的平均肿瘤体积。(K)再攻击的小鼠的卡普兰-迈耶存活曲线。数据点表示平均值 $\pm$ SD($n=8$)。误差线指示SD。通过史都登t检验和对数秩检验计算统计显著性(NS. $P > 0.05$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)。

[0017] 图7A-7D证明了局部癌症免疫疗法处理在各种肿瘤模型中的抗肿瘤作用。(A)BP肿瘤细胞攻击后,疫苗接种的C57BL/6J小鼠的平均肿瘤生长和卡普兰-迈耶存活率。将小鼠用空白MN(空白)、载有BP肿瘤裂解物和黑色素的MN(MN)或负载的MN与NIR照射的组合(MN+NIR)预处理。(B)4T1肿瘤细胞攻击后,疫苗接种的BALB/cJ小鼠的平均肿瘤生长和卡普兰-迈耶存活率。将小鼠用空白MN(空白)、载有4T1肿瘤裂解物和黑色素的MN(MN)或负载的MN与NIR照射的组合(MN+NIR)预处理。(C)具有形成的BP肿瘤的C57BL/6J小鼠的平均肿瘤生长和卡普兰-迈耶存活率。将小鼠用空白MN(空白)、载有BP肿瘤裂解物和黑色素的MN(MN)或负载的MN与NIR照射的组合(MN+NIR)处理。(D)具有形成的4T1肿瘤的BALB/cJ小鼠的平均肿瘤生长和卡普兰-迈耶存活率。将小鼠用空白MN(空白)、载有4T1肿瘤裂解物和黑色素的MN(MN)或负载的MN与NIR照射的组合(MN+NIR)处理。数据点表示平均值 $\pm$ SD($n=8$)。误差线指示SD。通过史都登t检验和对数秩检验计算统计学显著性(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)。

[0018] 图8证明了基于MN的透皮施药器的机械特性。数据点显示一个代表性的MN。重复实验三次,并且获得类似的结果。

[0019] 图9A-9B包括表征肿瘤裂解物溶液和合成黑色素的数据。(A)B16F10全肿瘤裂解物溶液、合成黑色素和PBS的吸收光谱。(B)用或未用1.0W/cm² NIR照射10min处理的黑色素的

傅里叶变换红外光谱学(Fourier transform infrared spectroscopy)。

[0020] 图10A-10B证明了通过重复的NIR照射产生的MN阵列施药器的加热行为。(A) 粉色区域指示NIR光打开,白色区域指示NIR光关闭。(B) 当暴露于 $1.0\text{W}/\text{cm}^2$ NIR光或未暴露于NIR光时,MN施药器的表面温度变化。数据点表示平均值 $\pm$ SD ($n=3$)。误差线指示SD。

[0021] 图11A-11B证明了具有各种肿瘤裂解物负荷的MN阵列施药器在NIR照射时的表面温度。使MN阵列施药器暴露于 $1.0\text{W}/\text{cm}^2$ NIR光。(A) 具有不同浓度的提取肿瘤裂解物蛋白质的MN阵列施药器的表面温度变化。数据点表示平均值 $\pm$ SD ($n=3$)。误差线指示SD。(B) 具有不同厚度的MN底座的MN阵列施药器的表面温度变化。使用了具有不同底座厚度的MN阵列施药器:(1) $169\mu\text{m}$ 、(2) $175\mu\text{m}$ 、(3) $179\mu\text{m}$ 、(4) $181\mu\text{m}$ 和(5) $202\mu\text{m}$ 。

[0022] 图12A-12D证明了GM-CSF和肿瘤裂解物蛋白的体外释放曲线。(A) 来自MN阵列施药器的GM-CSF的体外总释放和(B) 生物活性随时间变化的曲线。每天NIR处理MN阵列施药器10分钟的情况下缓冲溶液中GM-CSF (C) 和肿瘤裂解物蛋白 (D) 随时间的总释放。数据点表示平均值 $\pm$ SD ($n=3$)。误差线指示SD。通过史都登t检验计算统计学显著性 (NS, $P>0.05$)。

[0023] 图13包括在第1、2和3天评定的MN阵列施药器插入小鼠皮肤后的代表性扫描电子显微镜图像(比例尺: $400\mu\text{m}$)。

[0024] 图14A-14B评价了体外活化后的DC功能。(A) 通过活/死测定测量的DC活力。(B) 细胞上清液中细胞因子白介素12 (IL-12) 的浓度。用载有肿瘤裂解物或脂多糖 (LPS) 和GM-CSF的MN处理DC,并使其暴露于不同时间段的NIR照射。数据点表示平均值 $\pm$ SD ($n=3$)。误差线指示SD。通过史都登t检验计算统计学显著性 ($*P<0.05$)。

[0025] 图15是空白MN的细胞毒性研究。将MN阵列施药器再溶解,并添加到B16F10细胞中孵育24hr。误差线指示SD ($n=6$)。通过史都登t检验计算统计学显著性 (NS, $P>0.05$)。

[0026] 图16A-16B表征了MN插入后的皮肤。显示MN渗透到小鼠皮肤中的(A) 锥虫蓝和(B) H&E染色图像(比例尺: $200\mu\text{m}$)。用黑色短划线指示发生MN插入的区域。

[0027] 图17A-17C证明了载有黑色素的MN在体内赋予了保护性免疫。(A) 通过红外热感照相机测量的在MN插入皮肤并进行NIR ($1.0\text{W}/\text{cm}^2$) 照射后,单个动物的实时表面温度变化。(B) 经处理和对照小鼠的平均肿瘤体积。(C) 经处理和对照小鼠的卡普兰-迈耶存活曲线。数据点表示平均值 $\pm$ SD ($n=6$)。误差线指示SD。通过史都登t检验和对数秩检验计算统计学显著性 ($*P<0.05$; $**P<0.01$)。

[0028] 图18A-18B证明了对照和经处理小鼠中的肿瘤生长。肿瘤接种和指示处理后小鼠的平均(A) 和(B) 单个B16F10肿瘤生长曲线。肿瘤细胞接种后10天绘制肿瘤生长曲线。数据点表示平均值 $\pm$ SD ($n=8$)。误差线指示SD。通过史都登t检验和对数秩检验计算统计学显著性 ($*P<0.05$; $**P<0.01$; $***P<0.001$)。

[0029] 图19包括定量对照和经处理小鼠中B16F10生物发光肿瘤信号的数据。误差线指示SD ($n=3$)。通过史都登t检验计算统计学显著性 (NS, $P>0.05$; $*P<0.05$; $**P<0.01$)。

[0030] 图20包括对照和经处理小鼠中的肿瘤重量的数据。数据点表示平均值 $\pm$ SD ($n=8$)。误差线指示SD。通过史都登t检验计算统计学显著性 ($**P<0.01$)。

[0031] 图21A-21B包括肿瘤切片的组织学和细胞凋亡分析。(A) 肿瘤切片中黑色素含量的H&E染色和定量分析。(B) 在每种指示的处理后从小鼠收集的肿瘤的原位TUNEL阳性细胞核的荧光图像和定量分析。将肿瘤切片用荧光素-dUTP (绿色) 染色以用于细胞凋亡分析,并且

用DAPI染色以用于细胞核分析(蓝色)(比例尺:100 μ m)。数据点表示平均值 $\pm$ SD (n=3)。误差线指示SD。通过史都登t检验和对数秩检验计算统计学显著性(*P<0.05;**P<0.01;***P<0.001)。

[0032] 图22包括接受透皮癌症免疫疗法的小鼠的肿瘤生长的数据。在CD8 T细胞耗竭(CD8)、CD4 T细胞耗竭(CD4)、自然杀伤(NK)细胞耗竭(NK)和B细胞耗竭(B)的条件下,在肿瘤接种并且疫苗MN处理和NIR照射后小鼠中的平均肿瘤体积。对照是用空白MN(空白)和进行NIR照射的疫苗MN(MN+NIR)处理的幼稚小鼠。数据点表示平均值 $\pm$ SD (n=8)。误差线指示SD。通过史都登t检验计算统计学显著性(NS.P>0.05;*P<0.05;**P<0.01;***P<0.001)。

[0033] 图23A-23C包括小鼠的局部微循环血液灌注的测量值。在不同条件的处理后立即使用激光多普勒流量测定(Laser Doppler flowmetry)收集数据。将小鼠用以下处理:(A)空白MN,(B)疫苗MN和(C)疫苗MN和NIR照射。重复实验三次,并将定量分析概括在表2中。

[0034] 图24A-24B证明了透皮癌症免疫疗法后的免疫学应答。通过流式细胞术分析的来自经处理小鼠的肿瘤的CD8+T细胞中四聚体GP100染色的(A)代表性图和(B)定量分析。数据点表示平均值 $\pm$ SD (n=3)。误差线指示SD。通过史都登t检验计算统计学显著性(*P<0.05)。

[0035] 图25包括血清中IgG1亚型的定量。在用空白、MN或MN+NIR处理后第15天收集血清。数据点表示平均值 $\pm$ SD (n=8)。误差线指示SD。通过史都登t检验计算统计显著性(*P<0.05;**P<0.01)。

[0036] 图26A-26B证明了通过流式细胞术在肿瘤切片中的活性氧物质(ROS)检测。(A)从不同实验组收集的肿瘤中的归一化的平均ROS信号强度。(B)定量平均ROS信号强度(n=6)。误差线指示SD。通过史都登t检验计算统计学显著性(*P<0.05)。

[0037] 图27A-27B证明了透皮癌症免疫疗法后的HSP90表达。(A)在指示的处理后收集的皮肤中HSP90的免疫荧光染色(绿色)。肌动蛋白丝通过鬼笔环肽(红色)显现,并且细胞核用Hoechst(蓝色)染色(比例尺:100 μ m)。(B)免疫荧光染色图像中HSP 90信号强度的定量分析。数据点表示平均值 $\pm$ SD (n=3)。误差线指示SD。通过史都登t检验计算统计学显著性(*P<0.05)。

[0038] 图28包括透皮癌症免疫疗法后的细胞因子动力学。在指示的时间点在B16F10肿瘤模型中提取的施药器和周围组织中测量细胞因子浓度。数据点表示平均值 $\pm$ SD (n=3)。误差线指示SD。通过史都登t检验计算统计显著性(*P<0.05;**P<0.01)。

[0039] 图29A-29B包括透皮癌症免疫疗法后的组织学分析。(A)从组合处理后的小鼠和具有肺转移的对照小鼠以及健康小鼠收集的器官的H&E染色。深蓝色箭头指示肺中的转移性肿瘤。(B)收集的肺的图片(比例尺:100 μ m),和来自接受不同处理的小鼠的肺结节的定量。数据点表示平均值 $\pm$ SD (n=3)。误差线指示SD。通过史都登t检验计算统计学显著性(***P<0.001)。

[0040] 图30A-30B证明了透皮癌症免疫疗法对不同肿瘤模型的抗肿瘤作用。接受指示处理的小鼠的(A)平均和(B)单个B16F10和BP肿瘤生长曲线。数据点表示平均值 $\pm$ SD (n=8)。误差线指示SD。通过史都登t检验计算统计学显著性(***P<0.001)。

[0041] 图31证明了载有黑色素的MN的表面温度变化。插入小鼠皮肤和1.0W/cm² NIR照射后,通过红外热感照相机实时测量图像。MN载有黑色素瘤BP裂解物或乳癌4T1裂解物和黑色素。

[0042] 图32A-32D证明了透皮癌症免疫疗法的抗肿瘤作用。(A) BP肿瘤细胞攻击后,疫苗接种的C57BL/6J小鼠的肿瘤生长。将小鼠用空白MN(空白)、载有BP肿瘤裂解物和黑色素的MN(MN)或负载的MN与NIR照射的组合(MN+NIR)预处理。(B)用空白MN(空白)、载有BP肿瘤裂解物和黑色素的MN(MN)或负载的MN与NIR照射的组合(MN+NIR)治疗性处理前,具有形成的BP肿瘤的C57BL/6J小鼠的肿瘤生长。(C) 4T1肿瘤细胞攻击后,疫苗接种的BALB/cJ小鼠的肿瘤生长。将小鼠用空白MN(空白)、载有4T1肿瘤裂解物和黑色素的MN(MN)或负载的MN与NIR照射的组合(MN+NIR)预处理。(D)用空白MN(空白)、载有4T1肿瘤裂解物和黑色素的MN(MN)或负载的MN与NIR照射的组合(MN+NIR)治疗性处理前,具有形成的4T1肿瘤的BALB/cJ小鼠的肿瘤生长。数据点表示平均值 $\pm$ SD($n=8$)。通过史都登t检验和对数秩检验计算统计学显著性(* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$)。星号指示MN+NIR组与所有其他处理组之间的统计学上显著差异。

[0043] 图33A-33B证明了透皮癌症免疫疗法后的HSP70表达。(A) 分别在BP和4T1肿瘤模型中,局部皮肤中HSP70的免疫荧光染色(绿色),其中用鬼笔环肽显现肌动蛋白丝(红色),并且用Hoechst将细胞核染色(蓝色)(比例尺:100 μ m)。(B)局部皮肤样品中HSP70的定量强度。数据点表示平均值 $\pm$ SD($n=3$)。误差线指示SD。通过史都登t检验计算统计学显著性(* $P<0.05$; ** $P<0.01$)。

[0044] 图34A-34B包括DC活化的代表性定量分析。在(A)BP和(B)4T1肿瘤模型中,在引流淋巴结中收集活化的DC(CD86+, CD80+)。数据点表示平均值 $\pm$ SD($n=3$)。误差线指示SD。通过史都登t检验计算统计学显著性(* $P<0.05$)。

[0045] 图35A-35B包括在不同肿瘤模型中透皮癌免疫治疗后的细胞因子动力学。在(A)BP和(B)4T1肿瘤模型中,在提取的施药器和周围组织中测量细胞因子浓度。数据点表示平均值 $\pm$ SD($n=3$)。误差线指示SD。通过史都登t检验计算统计学显著性(* $P<0.05$)。

[0046] 图36A-36D包括在对照和经处理小鼠中经皮癌症免疫治疗后的小鼠的平均重量。(A)BP肿瘤细胞攻击后,疫苗接种的C57BL/6J小鼠的平均重量。(B)治疗性处理前,具有形成的BP肿瘤的C57BL/6J小鼠的平均重量。(C)4T1肿瘤细胞攻击后,疫苗接种的BALB/cJ小鼠的平均重量。(D)治疗性处理前,具有形成的4T1肿瘤的BALB/cJ小鼠的平均重量。数据点表示平均值 $\pm$ SD($n=8$)。

[0047] 图37包括在(A)具有BP肿瘤的C57BL/6J小鼠和(B)具有4T1肿瘤的BALB/cJ小鼠中进行透皮癌症免疫疗法之后,在疫苗接种后收集的器官的代表性H&E染色(比例尺:100 μ m)。

[0048] 发明详述

[0049] 除非另外定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解相同的含义。如有冲突,以本文件,包括定义为准。优选的方法和材料如下所述,但与本文所述类似或等效的方法和材料可以用于本发明的实践或测试。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献以全文引用的方式并入。本文公开的材料、方法和实施例仅是说明性的,并且不欲具有限制性。

[0050] 本文所用的术语“包含”、“包括”、“具有”、“可以”、“含有”及其变化形式旨在是开放式的过渡性短语、术语或词语,其不排除其他行为或结构的可能性。除非上下文另外明确指示,否则不带具体数量的形式包括复数指称。无论是否明确阐述,本公开还涵盖“包含”本文提出的实施方案或要素、“由其组成”和“基本上由其组成”的其他实施方案。

[0051] 与数量结合使用的修饰语“约”包括所述值,并且具有上下文所指示的含义(例如,其至少包括与特定数量的测量相关的误差程度)。修饰语“约”还应被认为是公开了由两个端点的绝对值限定的范围。例如,表述“约2至约4”也公开了范围“2至4”。术语“约”可以指加或减指定数值的10%。例如,“约10%”可以指示9%至11%的范围,并且“约1”可以指0.9-1.1。从上下文可以明显看出“约”的其他含义,诸如四舍五入,因此例如“约1”还可以指0.5至1.4。

[0052] 除非本文另外指示或与上下文明显矛盾,否则在描述本发明的上下文中(尤其是在以下权利要求书的上下文中),术语“一个”、“该”和“至少一个”以及类似指称的使用应被视为覆盖单数和复数指称两者。除非本文另外指示或与上下文明显矛盾,否则后接一个或多个项的清单的术语“至少一个”(例如,“A和B中的至少一个”)应被视为是指选自所列项中的一个项(A或B)或所列项中的两个或更多个的任何组合(A和B)。除非另外说明,否则术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”应被视为是开放式术语(即,是指“包括但不限于”)。除非本文中另外指示,否则本文中数值范围的叙述仅旨在用作单独提及属于该范围内的每个单独值的简写方法,并且每个单独值都被并入本说明书中,就好像它在本文中被单独叙述一样。除非本文中另外指示或与上下文明显矛盾,否则本文中所述的所有方法均可以以任何合适的顺序进行。除非另外要求,否则本文中提供的任何和所有实施例或示例性语言(例如,“诸如”)的使用仅旨在更好地说明本发明,并且不对本发明的范围构成限制。本说明书中的任何语言都不应被视为是指示任何未要求保护的要素对于实践本发明是必要的。

[0053] 术语“施用”是指口服、局部、静脉内、皮下、经皮、透皮、肌肉内、关节内、肠胃外、小动脉内、皮内、心室内、颅内、腹膜内、病灶内、鼻内、经直肠、经阴道、通过吸入或通过植入型药盒施用。可以使用透皮微针阵列贴片进行施用。术语“肠胃外”包括皮下、静脉内、肌肉内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、肝内、病灶内和颅内注射或输注技术。“生物相容”通常指通常对接受者无毒并且不会对受试者造成任何明显副作用的物质及其任何代谢物或降解产物。

[0054] 术语“载体”或“药学上可接受的载体”是指可用于制备药物或治疗组合物的通常是安全且无毒的载体或赋形剂,并且包括兽医和/或人药物或治疗用途可接受的载体。如本文所用,术语“载体”或“药学上可接受的载体”可以包括磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳液(诸如油/水或水/油乳液)和/或各种类型的润湿剂。如本文所用,术语“载体”涵盖任何赋形剂、稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、稳定剂、增溶剂、脂质、稳定剂或本领域中熟知用于药物配制品中并且如下文进一步描述的其他物质。

[0055] 如本文所用,术语“药学上可接受”可以指不会在生物学上或其他方面不期望的组分。例如,可以将该组分掺入本发明的药物配制品中并如本文所述施用于受试者,而不会引起任何明显的不期望生物学作用或以有害的方式与含有该组分的配制品的任何其他成分相互作用。当术语“药学上可接受”用于指赋形剂时,通常意味着该组分已满足毒理学和制备测试的所要求标准,或包括在美国食品和药物管理局(U.S. Food and Drug Administration)编写的《非活性成分指南(Inactive Ingredient Guide)》中。

[0056] 术语“免疫检查点抑制剂”或“免疫治疗剂”是指完全或部分减少、抑制、干扰或调节一种或多种检查点蛋白的分子。检查点蛋白调节免疫细胞活化或功能。已知许多检查点蛋白,诸如CTLA-4及其配体CD80和CD86;以及PD1及其配体PDL1和PDL2(参见例如,Pardoli,

Nature Reviews Cancer 12:252-264,2012)。这些蛋白质负责免疫细胞应答的共刺激性或抑制性相互作用。免疫检查点蛋白调节并维持自身耐受性以及生理免疫应答的持续时间和范围。免疫检查点抑制剂包括抗体或来源于抗体。

[0057] 如本文所用,术语“聚合物”是指相对高分子量的天然或合成的有机化合物,其结构可以由重复的小单元即单体(例如,聚乙烯、橡胶、纤维素)表示,所述小单元可以连接形成更大的聚合物基质。合成的聚合物典型地通过单体的加成或缩合聚合形成。如本文所用,术语“共聚物”是指由两种或更多种不同的重复单元(单体残基)形成的聚合物。举例来说并且不限制地,共聚物可以是交替共聚物、无规共聚物、嵌段共聚物或接枝共聚物。还设想,在某些方面,嵌段共聚物的各种嵌段区段本身可以包含共聚物。

[0058] 如本文所用,“预防”(及其任何衍生物)是指阻止、停止和/或抑制肿瘤的生长或进展,包括阻止、停止和/或抑制代谢过程或进展和随后的转移。

[0059] 如本文所用的“受试者”和“患者”可互换地指任何脊椎动物,包括但不限于哺乳动物(例如,牛、猪、骆驼、美洲驼、马、山羊、兔、绵羊、仓鼠、豚鼠、猫、狗、大鼠和小鼠,非人类灵长类动物(例如,猴诸如食蟹猴或恒河猴、黑猩猩等)和人)。在一些实施方案中,受试者可以是人或非人。受试者或患者可能正在接受其他形式的治疗。

[0060] 如本文所用,治疗剂的“治疗有效量”是指有效实现期望的治疗结果的量,并且治疗剂的“预防有效量”是指有效预防非所要的生理学疾患的量。给定治疗剂的治疗有效量和预防有效量典型地会根据如下因素而变化,诸如所治疗病症或疾病的类型和严重性以及受试者的年龄、性别和体重。术语“治疗有效量”还可以指有效促进期望治疗效果的治疗剂的量或治疗剂的递送速率(例如,随时间变化的量)。精确的期望治疗效果将根据以下变化:待治疗的疾患、受试者的耐受性、待施用的药物和/或药物配制品(例如,治疗剂(药物)的效力、药物在配制品中的浓度等)以及本领域普通技术人员理解的多种其他因素。

[0061] 如本文所用,“治疗”是指如下治疗方法,其中目的是减慢(减轻)不期望的生理学疾患、病症或疾病,或获得有益或期望的临床结果。在本公开的一些方面,有益或期望的临床结果包括但不限于减轻症状;降低疾患、病症或疾病的程度;稳定(即,不恶化)疾患、病症或疾病的状态;延迟疾患、病症或疾病的发作或减慢其进展;改善疾患、病症或疾病状态;以及可检测抑或不可检测地缓和(无论是部分还是全部)或改进或改善疾患、病症或疾病。治疗还包括与未接受治疗的情况下的预期存活期相比延长存活期。

[0062] “变体”在涉及肽或多肽时是指氨基酸序列因氨基酸的插入、缺失或保守取代而不同,但保留至少一种生物学活性。变体还可以指氨基酸序列与具有至少一种生物学活性的参考蛋白质的氨基酸序列基本上一致的蛋白质。氨基酸的保守取代,即将氨基酸用类似特性(例如,亲水性、带电区域的程度和分布)的不同氨基酸置换,在本领域中被认为典型地涉及微小的变化。如本领域中所理解,这些微小的变化可以部分通过考虑氨基酸的亲水指数来鉴别。氨基酸的亲水指数是基于对其疏水性和电荷的考虑。本领域中已知具有类似亲水指数的氨基酸可以被取代并且仍保留蛋白质功能。在一方面,亲水指数为 ± 2 的氨基酸被取代。氨基酸的亲水性还可以用于显示会产生保留生物学功能的蛋白质的取代。在肽的情形下考虑氨基酸的亲水性使得可以计算该肽的最大局部平均亲水性。可以用亲水性值在彼此 ± 2 内的氨基酸进行取代。氨基酸的疏水性指数和亲水性值两者均受该氨基酸的特定侧链影响。与该观察结果一致,与生物学功能相容的氨基酸取代应理解为取决于氨基酸的相对

类似性,并且特别是那些氨基酸的侧链的相对类似性,如疏水性、亲水性、电荷、大小和其他特性所显示。

[0063] 本文使用“载体”来描述可以输送已与其连接的另一种核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,其是指环状双链DNA环,可以将其他DNA区段接合在该环状双链DNA环中。另一种类型的载体是病毒载体,其中可以将其他DNA区段接合到病毒基因组中。某些载体可以在引入其的宿主细胞(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体)中自主复制。其他载体(例如,非游离型哺乳动物载体)可以在引入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中,从而与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导与其可操作性连接的基因的表达。此类载体在本文中称为“重组表达载体”(或简称为“表达载体”)。通常,用于重组DNA技术中的表达载体经常为质粒的形式。“质粒”和“载体”可以互换使用,因为质粒是最常用的载体形式。但是,可以使用具有等效功能的其他形式的表达载体,诸如病毒载体(例如,复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺病毒相关病毒)。在此方面,载体的RNA形式(包括RNA病毒载体)也可以用于本公开的上下文中。

[0064] 在详细解释本公开的任何实施方案之前,应理解,本公开的应用不限于在以下描述中阐述或在附图中说明的构造细节和组分的布置。本公开能够具有其他实施方案并且能够以各种方式实践或实施。

[0065] 通过考虑详细说明和附图,本发明的其他方面将变得显而易见。

[0066] 本公开的实施方案大体上涉及用于治疗癌症的光免疫疗法。更特别地,本公开提供了一种光响应皮肤施药器,所述光响应皮肤施药器使用透皮微针阵列向受试者施用免疫原性组合物和光敏性生物色素来治疗和/或预防癌症。

[0067] 黑色素能够将吸收的阳光能量中的99.9%转化为热,从而降低了皮肤癌的风险。本公开的实施方案包括通过透皮微针阵列施药器(也称为“施药贴片”或“贴片”)进行的黑色素介导的癌症免疫疗法策略。根据这些实施方案,例如,可以将含有黑色素的B16F10全肿瘤裂解物负载到聚合物微针中,所述聚合物微针允许在插入皮肤中后持续释放裂解物。与光能诸如近红外光照射组合,施药器中的黑色素介导热的产生,这进而促进了树突状细胞吸收肿瘤抗原,并产生增强的抗肿瘤治疗和疫苗接种。在不受任何特定理论的束缚下,时空光响应免疫疗法增加了极化T细胞的浸润和局部细胞因子的释放。例如,这些免疫学作用提高了肿瘤攻击后小鼠的存活率,并引起了针对已形成的原发性肿瘤和远端肿瘤的抗肿瘤作用。总而言之,黑色素产生局部热,通过透皮疫苗提高了T细胞活性并促进了抗肿瘤免疫应答。

[0068] 基于本公开,本领域技术人员将认识到,本公开的光响应MN施药器中使用的免疫原性组合物可以用于治疗和预防/抑制癌性肿瘤形成两者。通常,癌症疫苗属于被称为生物应答调节剂的一类物质。生物应答调节剂通过刺激或恢复免疫系统抵抗感染和疾病的能力起作用。有两大类型的癌症疫苗:预防(或预防性)疫苗,其旨在预防癌症在健康人中发展;和治疗(或治疗性)疫苗,其旨在通过增强身体对癌症的天然免疫应答来治疗现有癌症。治疗疫苗是免疫疗法的一种形式。本文描述了预防(例如预防性治疗)和治疗(例如,诊断后的治疗)疫苗功能。

[0069] 本公开的光响应皮肤施药器可以包括包含全肿瘤裂解物的免疫原性组合物,该全肿瘤裂解物通过透皮递送肿瘤裂解物与光响应生物色素诸如黑色素的组合直接靶向抗原

呈递细胞 (APC) (图1A)。此免疫原性组合物涉及无活性肿瘤裂解物的封装,该无活性肿瘤裂解物由插入皮肤中的皮内微针 (MN) 阵列施药器逐渐释放。肿瘤裂解物可以是全肿瘤裂解物或部分肿瘤裂解物,并且在一些情况下可以是灭活的全肿瘤裂解物或部分肿瘤裂解物 (例如,热灭活的)。MN促进DC吸收和呈递抗原,进而通过真皮中淋巴管的广泛网络促进免疫活化。同时,可以作为或不作为肿瘤裂解物中的天然生物色素存在的黑色素的存在使得可以通过可远程控制的近红外 (NIR) 光发射来局部释放热。局部热可以引起吸引免疫细胞的炎性细胞因子的释放;免疫原性底物诸如细胞外热休克蛋白 (HSP)、活性氧物质 (ROS)、抗原佐剂和一些其他危险信号的产生可以激活免疫系统。间质组织的局部温度的温和升高也可能使血流和淋巴液流增加,从而促进APC和T细胞的迁移,因此引发肿瘤抗原特异性免疫应答。增加的血流还可以允许其他细胞亚群,诸如自然杀伤 (NK) 细胞的募集。在一些实施方案中,光响应皮肤施药器的施用可以在B16F10黑色素瘤模型中产生加强的先天性和适应性免疫应答,并提供肿瘤消退。此外,NIR增强的透皮疫苗接种延迟了远端肿瘤的生长,并改进了长期存活率,为在临床研究中采用该策略奠定了坚实的基础。

[0070] 根据这些实施方案,本公开已经证明将B16F10全肿瘤裂解物与免疫刺激剂 (例如,粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)) 整合到透皮MN施药器中可以维持免疫原性组合物的递送并且靶向表皮中的免疫细胞群。黑色素的掺入通过募集DC和其他免疫细胞来促进近红外 (NIR) 辐射后的局部免疫活化。与其他光敏剂相比,黑色素是一种具有高生物相容性和宽吸收光谱的天然色素。黑色素介导的有效光热转导使皮肤温度迅速升高至约42°C。

[0071] 本文所述的免疫原性组合物的实施方案可以用作治疗方案的一部分来治疗和/或预防受试者的肿瘤形成。根据这些实施方案,用光响应皮肤施药器治疗受试者可以提高存活率并在87%的C57BL/6J疫苗接种小鼠中引起肿瘤排斥。在用B16F10肿瘤细胞再攻击的小鼠中进一步证明了完全的肿瘤保护。NIR处理后,局部微循环血流灌注升高与局部DC和NK细胞的迁移有关。B细胞、NK细胞和T细胞的耗尽减弱了疫苗接种小鼠中的治疗效果,突显了免疫控制在肿瘤发展中的相关性。另外,危险信号和促炎性细胞因子的产生会触发免疫活化,包括HSP70和HSP90表达升高以及周围组织中的ROS水平提高。此作用还与IFN- γ 、TNF- α 和IL-6的局部富集相关。

[0072] 本公开的实施方案证明,光照射的MN施药贴片中含有全肿瘤裂解物和黑色素的光响应皮肤施药器产生了模仿高热的微环境,该微环境有效地在疫苗接种部位募集并活化免疫细胞。因此,黑色素介导的施药器预防了预防模型中的肿瘤植入,并在具有肿瘤的小鼠中引起持续的肿瘤消退。另外,光敏性生物色素的使用可以扩展至除黑色素外的天然以及合成的其他生物色素,诸如类胡萝卜素、叶黄素、胆红素和/或这些生物色素的组合和衍生物。另外,本文所述的方法还适用于深部组织的光声成像、生物学标记,并且可以用于以光/热应答方式靶向多种疾病。

[0073] 本公开的实施方案包括用于光免疫疗法的光响应皮肤施药器。皮肤施药器包括包含多个微针 (或MN) 的透皮微针阵列,每个微针包含基座部分和尖端部分。微针应具有机械强度以在插入生物屏障时、在保持在原处长达数天时以及在取出时保持完整。在一些实施方案中,微针必须保持完整至少足够久以使微针发挥其预期目的 (例如,递送免疫原性组合物)。微针可以具有直轴或锥形轴。在一个实施方案中,微针的直径在微针的基座端最大,并且逐渐变细成在基座远端呈点状。微针还可以制造成具有包括直 (非锥形) 部分和锥形部分

两者的轴。针也可能根本不具有锥形端,即,其可以简单地是具有钝头或平头的圆柱体。微针垂直于基底或与基底呈一定角度定向。在一个实施方案中,微针垂直于基底定向,使得每单位基底面积可以提供较大密度的微针。微针阵列可以包括微针取向、高度或其他参数的混合物。微针可以形成为轴在垂直方向上具有圆形的截面,或者所述截面可以是非圆形的。例如,微针的截面可以是多边形(例如,星形、正方形、三角形)、椭圆形或其他形状。截面尺寸可以为约 $1\mu\text{m}$ 至约 $1000\mu\text{m}$,使得基座可以为约 $100\mu\text{m}$ 至约 $500\mu\text{m}$,并且尖端可以为约 $1\mu\text{m}$ 至约 $20\mu\text{m}$ 。在一个实施方案中,微针的基座可以为大约 $300\mu\text{m}$,并且尖端大约为 $5\mu\text{m}$ 。微针的长度典型地为约 $10\mu\text{m}$ 至约 1mm ,包括约 $400\mu\text{m}$ 至 1mm 。在一个实施方案中,微针的长度(或高度)为约 $800\mu\text{m}$ 。针对特定应用选择长度,包括插入和未插入部分两者。微针阵列可以包括微针的混合物,这些微针具有例如各种长度、外径、内径、截面形状以及微针之间的间隔。在一个实施方案中,将微针以 15×15 的阵列排列,其中尖端与尖端的间隔为 $600\mu\text{m}$ 。

[0074] 本公开的实施方案还包括包含至少一种肿瘤抗原的免疫原性组合物。肿瘤抗原可以包括与受试者的癌性肿瘤的发作或发展相关的合成或天然存在的任何抗原或新抗原。肿瘤抗原上的抗原表位可以是已知的或尚未鉴别的。本公开的免疫原性组合物中的肿瘤抗原可以是合成的肿瘤抗原,诸如新抗原,或来源于任何癌症的肿瘤裂解物(或其任何抗原组分),该癌症尤其诸如但不限于实体肿瘤,例如黑色素瘤、肺癌(包括肺腺癌、基底细胞癌、鳞状细胞癌、大细胞癌、支气管肺泡癌、支气管癌、非小细胞癌、小细胞癌、间皮瘤);乳癌(包括导管癌、小叶癌、炎性乳癌、透明细胞癌、粘液癌、浆膜腔性乳癌);结肠直肠癌(结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌);肛门癌;胰癌(包括胰腺癌、胰岛细胞癌、神经内分泌肿瘤);前列腺癌;前列腺腺癌;卵巢癌(卵巢上皮癌或表面上皮基质肿瘤,包括浆液性肿瘤、子宫内膜样肿瘤和粘液性囊腺癌、性索基质肿瘤);肝和胆管癌(包括肝细胞癌、胆管癌、血管瘤);食道癌(包括食道腺癌和鳞状细胞癌);口腔和口咽鳞状细胞癌;唾液腺腺样囊性癌;膀胱癌;膀胱癌;子宫癌(包括子宫内膜腺癌、眼癌、子宫乳头状浆液性癌、子宫透明细胞癌、子宫肉瘤、平滑肌肉瘤、混合苗勒氏肿瘤(mixed mullerian tumor));胶质瘤、胶质母细胞瘤、髓母细胞瘤和其他脑肿瘤;肾癌(包括肾细胞癌、透明细胞癌、威尔姆氏肿瘤(Wilm's tumor));头颈癌(包括鳞状细胞癌);胃癌(胃癌、胃腺癌、胃肠基质肿瘤);睾丸癌;生殖细胞肿瘤;神经内分泌肿瘤;子宫颈癌;胃肠道、乳房和其他器官的类癌;印戒细胞癌;间充质肿瘤包括肉瘤、纤维肉瘤、血管瘤、血管瘤病、血管周细胞瘤、假血管瘤性基质增生、肌纤维母细胞瘤、纤维瘤、炎性肌纤维母细胞肿瘤、脂肪瘤、血管脂肪瘤、颗粒细胞肿瘤、神经纤维瘤、许旺氏细胞瘤(schwannoma)、血管肉瘤、脂肪肉瘤、横纹肌肉瘤、骨肉瘤、平滑肌瘤、平滑肌肉瘤、皮肤癌包括黑色素瘤、子宫颈癌、视网膜母细胞瘤、头颈癌、胰癌、脑癌、甲状腺癌、睾丸癌、肾癌、膀胱癌、软组织癌、肾上腺癌、尿道癌、阴茎癌、粘液肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤、脊索瘤、恶性纤维组织细胞瘤、淋巴管肉瘤、间皮瘤、鳞状细胞癌;表皮样癌、恶性皮肤附件肿瘤、腺癌、肝细胞瘤、肝细胞癌、肾细胞癌、肾上腺样瘤、胆管癌、移行细胞癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎细胞瘤、间变性胶质瘤;多形性胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、髓母细胞瘤、恶性脑膜瘤、恶性神经鞘瘤、神经纤维肉瘤、甲状旁腺癌、甲状腺髓样癌、支气管类癌、嗜铬细胞瘤、胰岛细胞癌、恶性类癌、恶性副神经节瘤、黑色素瘤、默克尔细胞瘤(Merkel cell neoplasm)、叶状囊肉瘤、唾液癌、胸腺癌和阴道癌。在黑色素瘤的情况下,肿瘤抗原可以来源于B16F10黑色素瘤或BRAFv600E黑色素瘤。在其他情况下,肿瘤抗原可以来源于4T1乳房肿瘤。

[0075] 本公开的实施方案还可以包括包含光敏性生物色素的免疫原性组合物。色素是具有特定颜色的化学品。生物色素在受试者身体的日常操作中起着至关重要的作用。例如，黑色素是皮肤中的一种黄色到黑色的色素，该色素通过吸收光能并将其作为热散发来帮助保护皮肤免受太阳损伤。黑色素是大多数有机体中发现的一组天然色素的广义术语。黑色素通过氨基酸酪氨酸的氧化和随后的聚合而产生。黑色素色素是在称为黑色素细胞的一组特殊细胞中产生的。存在三种基本类型的黑色素：真黑色素、类黑色素和神经黑色素。最常见的类型是真黑色素，其中存在两种类型-褐色真黑色素和黑色真黑色素。类黑色素是一种半胱氨酸，其含有苯并噻嗪单元的红色聚合物，主要负责红色毛发，以及其他染色。神经黑色素发现于脑中，但其功能仍不清楚。在人皮肤中，黑色素生成通过曝露于UV辐射引发，从而导致皮肤变黑。黑色素是有效的光吸收剂；该色素能够消散所吸收UV辐射的超过99.9%。由于此特性，黑色素被认为保护皮肤细胞免受UVB辐射损伤，从而降低了癌症的风险，并且人们认为，曝露于UV辐射与提高的恶性黑色素瘤（黑色素细胞的癌症）风险相关。

[0076] 如本领域普通技术人员基于本公开会认识到的，其他生物色素也可以与黑色素组合的方式或作为黑色素的替代与本公开的免疫原性组合物一起使用。这些生物色素包括但不限于基于血红素/卟啉的色素，诸如叶绿素、胆红素、血蓝蛋白、血红蛋白、肌红蛋白；发光色素，诸如荧光素；类胡萝卜素；血色素，诸如藻类色素、类胡萝卜素及其衍生物的混合物；胡萝卜素，诸如 α 和 β -胡萝卜素、番茄红素、视紫红质；叶黄素，诸如角黄素、玉米黄质、叶黄素；蛋白质色素，诸如植物色素、藻胆蛋白；多烯烯酸酯；尿色素和类黄酮。在一些实施方案中，光敏性生物色素是黑色素、类胡萝卜素、叶黄素、胆红素或其组合中的至少一种。光敏性生物色素也可以是合成的、天然的或其组合。

[0077] 可以包括在免疫原性组合物中的生物色素的量或浓度可以根据多种因素而变化，包括但不限于所治疗肿瘤的性质、受试者的特征等。在一些情况下，生物色素的量可以为约0.01重量%至约10重量%。在一些情况下，生物色素的量可以为约0.1重量%至约10重量%。在一些情况下，生物色素的量可以为约1重量%至约10重量%。在一些情况下，生物色素的量可以为约5.0重量%至约10重量%。在一些情况下，生物色素的量可以为约0.1重量%至约5重量%。在一些情况下，生物色素的量可以为约0.1重量%至约2.5重量%。还可以制备生物色素的储备溶液并随后稀释，然后添加到免疫原性组合物中。在一些情况下，生物色素储备溶液可以为约200mg/mL、约150mg/mL、约100mg/mL、约75mg/mL或约50mg/mL。这些储备溶液可以以约1:1000、1:500、1:250、1:100、1:10的比率和本领域普通技术人员基于本公开确定的任何其他比率稀释。

[0078] 本公开的实施方案还可以包括包含免疫刺激剂的免疫原性组合物。免疫刺激剂是刺激免疫系统的物质。特定的免疫刺激剂诸如疫苗刺激对特定抗原类型的免疫应答。非特异性免疫刺激剂没有抗原特异性，并且被广泛用于慢性感染、免疫缺陷、自身免疫和肿瘤疾病中。在一些免疫原性组合物中，佐剂可以被认为是免疫刺激剂，其具有将抗原呈递给免疫系统从而引起放大的且抗原特异性的免疫应答的重要任务。在一些实施方案中，免疫刺激剂包括粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）、CpG核苷酸、白介素（IL）-7、IL-15及其组合。根据这些实施方案，免疫刺激剂可以刺激各种免疫细胞，包括NK细胞、T细胞、B细胞、树突状细胞、巨噬细胞等。

[0079] 在一些实施方案中，免疫刺激剂可以包括免疫检查点抑制剂。有多种已知抑制免

疫检查点蛋白的免疫治疗剂(免疫检查点抑制剂)。已知的免疫检查点蛋白包括CTLA-4、PD1及其配体PD-L1和PD-L2,以及另外的LAG-3、BTLA、B7H3、B7H4、TIM3、KIR。在本领域中认为涉及LAGS、BTLA、B7H3、B7H4、TIM3和KIR的路径构成了类似于CTLA-4和PD-1依赖性路径的免疫检查点路径(参见,例如Pardoll, 2012. Nature Rev Cancer 12:252-264)。免疫检查点抑制剂是抑制免疫检查点蛋白功能的任何化合物。抑制包括降低功能和/或完全阻断。在一个实施方案中,免疫检查点蛋白是人免疫检查点蛋白。因此,免疫检查点蛋白抑制剂可以是人免疫检查点蛋白的抑制剂。本领域中对免疫检查点蛋白进行了描述(参见例如, Pardoll, 2012. Nature Rev. Cancer 12:252-264)。免疫检查点蛋白抑制剂可以包括特异性识别免疫检查点蛋白的抗体。已知许多PD1、PDL-1、PD-L2、CTLA-4、LAG-3、BTLA、B7H3、B7H4、4-1BB (CD137)、TEVI3和KIR抑制剂,并且与这些已知的免疫检查点蛋白抑制剂类似,可以使用本文公开的装置和方法施用替代的免疫检查点抑制剂。PD-1抑制剂的实例包括但不限于阻断人PD-1的人源化抗体,诸如派姆单抗(pembrolizumab, 以前的 lambrolizumab)或毕迪丽珠单抗(pidilizumab),以及全人抗体,诸如纳武单抗(nivolumab) (先前称为MDX-1 106或BMS-936558)。伊匹木单抗是一种全人CTLA-4封闭抗体,目前以Yervoy (百时美施贵宝公司(Bristol-Myers Squibb))的名称出售。第二种CTLA-4抑制剂是替西木单抗(tremelimumab)。在一个实施方案中,免疫治疗剂是纳武单抗。另外,免疫检查点抑制剂可以包括但不限于阻断PD-L1的人源化或全人抗体,诸如MED 1-4736、MPDL328 0A和MIH1,以及其他PD-L1抑制剂。PD-L1的其他抗体包括阿特殊单抗(atezolizumab)和德瓦鲁单抗(durvalumab)。

[0080] 本公开的实施方案还可以包括使用聚合物基质封装在微针阵列内的免疫原性组合物和生物色素。在一些实施方案中,聚合物基质包括以下的至少一种:糖胺聚糖、多硫酸化的糖胺聚糖、葡糖聚糖、多硫酸化的葡糖聚糖、葡糖胺聚糖、粘多糖、羧甲基纤维素(CMC)、(丙交酯-乙交酯)共聚物(PLGA)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚乙烯醇(PVA)、聚丙烯酸(PAA)、聚L-乳酸(PLA)、麦芽糖、壳聚糖、海藻酸盐及其衍生物和组合。在一些实施方案中,聚合物基质包括透明质酸。根据这些实施方案,可以将免疫原性组合物和光敏性生物色素封装在多个微针的基座部分内,而将免疫刺激剂封装在多个微针的尖端部分内,该尖端部分位于基座部分的远端(图1)。在一些实施方案中,通过使甲基丙烯酸化的透明质酸交联将免疫刺激剂封装在多个微针的尖端部分内。

[0081] 作为本文公开的MN皮肤施药器的一部分,免疫原性组合物还可以包括载体或药理学上可接受的载体,该载体可以包括但不限于磷酸盐缓冲盐溶液、水、乳液(诸如油/水或水/油乳液)和/或各种类型的润湿剂和/或表面活性剂;任何赋形剂;稀释剂;填充剂;盐;缓冲液;稳定剂;增溶剂;脂质;稳定剂;或本领域中熟知用于药物配制品并且如本文所述的其他物质。

[0082] 本公开的实施方案还包括用于将光能递送至光响应MN皮肤施药器刺激受试者的免疫应答的构件。使用黑色素作为生物色素允许以各种时间和曝露方案使用近红外(NIR)光能,以提高MN施药器周围微环境的温度(高热),如本文所述,诸如从约35°C到约45°C,或从约38°C到约42°C。此温度提高可以充当免疫刺激因素,并且可以将各种免疫细胞募集到施药器的部位,以促进受试者的癌症的治疗和/或预防。

[0083] 在一些实施方案中,治疗和/或预防癌症的方法包括将NIR光、UV光或波长为约

10nm至约1000nm的光递送至皮肤施药器。在一些情况下,将约100nm至约1000nm的光递送至皮肤施药器。在一些情况下,将约200nm至约1000nm的光递送至皮肤施药器。在一些情况下,将约300nm至约1000nm的光递送至皮肤施药器。在一些情况下,将约400nm至约1000nm的光递送至皮肤施药器。在一些情况下,将约500nm至约1000nm的光递送至皮肤施药器。在一些情况下,将约800nm至约900nm的光递送至皮肤施药器。在一些情况下,将约808nm的NIR光递送至皮肤施药器。尽管特定的治疗方案将基于例如受试者的需求、肿瘤的类型等而变化,但是将光能递送至皮肤施药器可以包括递送NIR光约5分钟至约20分钟。在一些实施方案中,将光能递送至皮肤施药器包括每天递送NIR光至少一次,持续约一天至约连续五天。在其他实施方案中,治疗和/或预防癌症的方法包括每天递送光能多次,持续约一天至约连续五天。

具体实施方式

[0084] 实施例

[0085] 以下实施例用于举例说明所公开的方法。基于本公开的启示,本领域技术人员将认识到,可以在不进行过度实验的情况下对所公开方法的这些实施例和其他实施例进行改变。

[0086] 实施例1:用于光免疫疗法的光响应皮肤施药器的制备和表征:首先,研究了是否可以将肿瘤裂解物负载到透皮MN施药器上和以持续的方式从透皮MN施药器释放。在微模具中制造MN施药器以形成封装全肿瘤裂解物(含黑色素)和免疫刺激剂粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的透明质酸基MN。分别从轴向和横向透视图显示具有和不具有肿瘤裂解物的施药器(图1B)。将 15×15 MN阵列组装在 $9 \times 9 \text{ mm}^2$ 的施药贴片上,其中中心与中心的间隔为 $600 \mu\text{m}$ 。MN的详细尺寸通过扫描电子显微术显现(图1C)。每个MN具有圆锥形结构,其中基座直径为 $300 \mu\text{m}$,高度为 $800 \mu\text{m}$,并且尖锐的尖端逐渐变细成 $5 \mu\text{m}$ 的曲率半径。负载肿瘤裂解物后,MN比空白的透明质酸MN明显更黑,因为施药贴片中存在黑色素。每个施药贴片的黑色素的量为约 $50 \mu\text{g}$,这在单次施用的安全剂量范围内。用封装了肿瘤裂解物的经罗丹明标记的透明质酸构建代表性MN,其中肌动蛋白丝和DNA分别用鬼笔环肽和Hoechst染色(图1D)。阵列的荧光视图还显示了肿瘤裂解物的均匀负载和MN的对准(图1E)。在应变测试中,MN在0.39N下失效,同时被压缩到其高度的四分之一(图8),证明了用于可能的皮肤插入而不会屈曲的足够强度。

[0087] 接着,评价了NIR激光照射对黑色素诱导的热产生的作用。使用红外热感照相机实时记录MN的温度变化(图2A)。与透明的透明质酸MN相比,由于黑色素诱导的光热转导,载有肿瘤裂解物的MN的表面温度在一分钟内急剧提高(图2B)。如黑色素的吸收光谱所证明,肿瘤裂解物中含有的黑色素可以吸收808nm的NIR照射(图9A)。肿瘤裂解物中黑色素含量的吸收系数也与合成黑色素的吸收系数相当(图9A和表1)。尽管温度提高,但在治疗期间,MN的形态保持不变并且黑色素的光热特性保持稳定(图9B)。当重复进行NIR光曝露时,也可以维持MN施药器的加热行为(图10)。此外,施药器的表面温度的稳态取决于裂解物浓度和NIR光强度,而MN底座厚度的影响最小(图11和图2C)。可以容易地控制施药器的表面温度在高温(42°C)下,以使肿瘤抗原和其他生物分子的潜在热诱导变性最小化。

[0088] 表1:从具有肿瘤的小鼠切除的肿瘤中的黑色素含量。

	肿瘤模型	B16F10	BP	4T1
[0089]	黑色素含量 (微克/ 毫克肿瘤)	2.10 ± 0.20	0.00 ± 0.01	0.0 ± 0.01

[0090] 实施例2:响应MN疫苗的DC的体外活化:通过在紫外线照射下交联甲基丙烯酸化的透明质酸来将用作DC募集和活化的有效细胞因子的GM-CSF以物理方式封装在MN尖端中。发现在48小时内从MN释放了60%的生物活性GM-CSF(图12A-12B),而在五天内观察到肿瘤裂解物蛋白的持续释放(图2D)。NIR处理的引入未改变GM-CSF和肿瘤裂解物的释放曲线(图12C-12D)。疫苗MN的扫描电子显微术图像显示,尖端随着时间逐渐分解(图13)。

[0091] 为了评价MN中的GM-CSF是否提供可以有效促进DC成熟的信号提示,将骨髓来源的DC暴露于MN悬浮液。用载有肿瘤裂解物和GM-CSF的MN处理并进行10分钟的NIR激光照射后,成熟的DC(CD80+CD86+)的百分比从 $36.7 \pm 2.3\%$ 大幅增加到 $48.9 \pm 3.1\%$ (图2E)。还测量了改变NIR激光照射时间对DC活化的影响。与处理5或15分钟的样品相比,十分钟的NIR照射可以实现最佳的DC活化(图2E)。只有20分钟的NIR暴露稍微损害DC的活力和功能(图14)。MN悬浮液或10分钟NIR照射的所有其他实验条件下的DC都表现出高的活力(图2F-2G和图15)。

[0092] 实施例3:NIR后MN介导的免疫的体内功效:为了表征基于MN的免疫的体内功效,用载有含1.5mg提取蛋白的B16F10全肿瘤裂解物的光响应MN施药器透皮处理C57BL/6J小鼠。在NIR照射和随后的肿瘤攻击之后,测量免疫应答的大小和持续时间(图3A)。将MN施药器施加在小鼠近尾部背侧区域的皮肤上大约10分钟,并且使用Skin Affix外科粘合剂进一步粘贴。用锥虫蓝、苏木精和曙红(H&E)染色指示MN在已切开的皮肤中成功渗透(图16)。将透皮施药器在皮肤中保留至少五天(图3B)。然后每天将局部NIR照射递送到MN区域10分钟,持续5天(MN+NIR)。将对照小鼠用不进行NIR照射的MN施药器(MN)、进行NIR照射的仅载有黑色素的MN施药器(黑色素)或进行NIR照射的仅含有透明质酸的MN(空白)处理。

[0093] 使用红外热感照相机实时记录疫苗MN插入后局部皮肤表面中的温度变化。NIR照射后的光热转导引起在用疫苗MN处理的小鼠中观察到局部加热作用(图3C)。施药器中的黑色素在30秒内介导了温度在 38°C 至 42°C 之间的透皮加热。在用载有合成黑色素的MN处理的小鼠中类似地观察到了局部处理部位的轻度高热(图17A)。相比之下,用空白MN和NIR处理的小鼠以及植入了负载的MN但未进行NIR处理的小鼠显示有限的皮肤表面温度变化,该皮肤表面温度在 $33-36^{\circ}\text{C}$ 的正常范围内(图3C)。

[0094] 在预防性小鼠模型中,在疫苗接种后10天向小鼠植入B16F10黑色素瘤细胞(图3D)。用空白MN处理的所有小鼠在接种肿瘤细胞后15天内均具有明显的肿瘤生长,并且需要在第25天安乐死。载有黑色素并用NIR照射处理的MN稍微改进了小鼠的存活率,因为一些小鼠存活至第25天(图17B-17C)。类似地,载有肿瘤裂解物和黑色素但未进行NIR照射的MN在直到第30天在13%的小鼠中引起了肿瘤保护(图3E-3F)。与之形成鲜明对比的是,接受组合形式(载有肿瘤裂解物和GM-CSF的MN并进行NIR照射)的小鼠显示长期存活期,其中在87%的处理小鼠中,肿瘤被完全排斥(图3E-3F和图18)。具有B16F10黑色素瘤的小鼠的生物发光成像证实了对肿瘤生长的显著抑制(图3G和图19)。这通过肿瘤重量的测量(图20)和组织学分析(图21A)进一步证明。

[0095] 还评定了通过基于组合的免疫组合物的治疗观察到的抗肿瘤作用对免疫细胞的需求。白喉毒素受体 (DTR) 小鼠中CD11c+DC的耗竭足以消除MN免疫组合物的抗肿瘤作用(图3E-3F)。T细胞和B细胞缺陷型Rag1^{-/-}小鼠中的数据显示在用组合疫苗接种治疗期间肿瘤生长遏制显著丧失(图18)。还研究了组合MN疫苗接种前CD8⁺和CD4⁺T细胞的选择性耗竭。与空白对照相比,消除CD8⁺T淋巴细胞显示没有显著的肿瘤消退(图22)。当将抗CD4抗体给予小鼠时,与对照相比,肿瘤尺寸减小了($P < 0.01$),这表明CD4⁺T细胞对抗肿瘤应答的益处小于CD8⁺T细胞(图22)。B细胞和NK细胞的耗竭也对免疫应答具有有害影响,但不降低针对肿瘤攻击的疫苗接种作用(图22)。这些结果在一起显示,MN疫苗接种与CD11c+DC和其他免疫细胞诸如T细胞、B细胞和NK细胞相关。

[0096] MN中GM-CSF的负载在DC (CD11c⁺,活化型配对Ig样受体 (PIR) -A/B⁺) 的局部募集中起重要作用(图4A-4C)。组合疫苗接种后三天,与用空白MN处理的小鼠相比,在皮肤切片中观察到累计DC增加5.9倍。NIR进一步加强了载有GM-CSF的MN募集DC的效果(图4C)。还观察到NK细胞的局域化(localization)增加(图4B-4D)。另外,在NIR和MN处理后观察到的局部微循环血液灌注升高可有助于增强免疫细胞的迁移(表2和图23)。肿瘤接种后第15天,通过流式细胞术分析处理后T细胞的肿瘤浸润。与对照小鼠相比,接受组合疫苗接种的小鼠中观察到CD8⁺T细胞大约增加了9.8倍,而仅用MN的组显示增加了5.8倍(图5A)。此外,用H-2Db gp100四聚体染色在经处理小鼠的肿瘤中鉴别到B16F10特异性CD8⁺T细胞。发现与缺乏免疫的对照小鼠相比,在MN处理的小鼠中四聚体阳性CD8⁺T细胞的百分比更大。与对照小鼠相比,组合处理或仅用MN处理的小鼠在局部皮肤中分别表现出活化的DC (CD80⁺, CD86⁺) 增加了1.5和1.3倍(图5B)。免疫荧光染色和原位细胞凋亡证实了用流式细胞术获得的结果(图5C和图21B)。局部免疫活化与全身免疫应答相关。与用空白对照处理的小鼠相比,在经免疫小鼠的血清中测量到IgG滴度增加了8倍(图5D)。与对照组相比,NIR处理直到第15天时都可以进一步提高IgG滴度,并延长免疫应答(图25)。脾细胞的体外分析显示,在接受组合疫苗接种的小鼠中,对B16F10肿瘤裂解物的T细胞应答的频率高10倍(图5E)。

[0097] 表2:使用激光多普勒流量测定获得的接受不同处理的小鼠的总局部微循环血液灌注测量值。

	灌注单元 (PU)	平均值	S.D.	Min	Max	面积
[0098]	空白	76.4	23.0	40.3	150.8	1111.7
	MN	80.5	27.4	45.5	150.2	1196.7
	MN + NIR	96.3	35.2	49.5	228.0	1420.6

[0099] 为了检查光热转导诱导危险信号和促炎性细胞因子的产生,我们首先通过流式细胞术测量了经MN处理的周围组织中ROS的局部水平。与未处理组相比,来自接受组合治疗的小鼠的样品显示ROS水平增加了大约4倍,而与MN对照相比,在NIR照射后观察到ROS增加了1.5倍(图26)。与引起危险信号一致,组合疫苗接种引起HSP 70和HSP 90的表达(图5F和图

27)。来自局部组织和抗原分子的危险信号促进促炎性细胞因子的产生。与此作用一致,我们发现与MN对照相比,用组合疫苗接种处理的小鼠中干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白介素6 (IL-6) 局部增加(图5G和图28)。

[0100] 实施例4:光响应MN施药器在远端肿瘤中的功效:还分析了局部疫苗接种是否赋予针对NIR和MN处理部位远端的继发性肿瘤的保护(图6A)。仅对具有双侧肿瘤的B16F10小鼠的左侧肿瘤进行局部NIR照射和MN处理。未向右侧肿瘤注射并且将右侧肿瘤遮光(图6B)。我们观察到,在组合疫苗接种的小鼠的两侧,肿瘤的尺寸和生物发光信号均显著降低(图6C-6G)。同时,局部淋巴结中活化的DC的显著增加(图5B)和体外脾细胞对B16F10细胞的细胞毒性反应增强(图5E)均指示,可以通过透皮免疫疗法实现全身性抗肿瘤作用。此作用伴随有CD8+T细胞浸润相较于对照的5倍增加,这与免疫细胞对抗肿瘤功效的作用一致(图6D)。在进行组合处理的小鼠的肺中未观察到远端转移(图29)。体重测量值指示,处理的小鼠的重量增加在正常范围内(图6H)。当用不同黑色素瘤细胞类型的肿瘤裂解物(BRAFV600EPTEN-/-Duke-克隆6细胞系(BP))对小鼠进行疫苗接种时,观察到B16F10肿瘤生长的最小变化(图6I),从而指示了免疫记忆的特异性。类似地,当用B16F10细胞或BP细胞再次攻击疫苗接种的小鼠时,仅在用B16F10攻击的小鼠中观察到肿瘤保护(图6J-6K和图30)。

[0101] 实施例5:光响应MN施药器在其他肿瘤模型中的功效:为了证明建议的疫苗接种的效力不限于黑色素生成上调的B16黑色素瘤模型,使用了C57BL/6J小鼠中的BRAFV600E突变的BP黑色素瘤和BALB/cJ小鼠中的三阴性乳腺癌4T1癌瘤。载有合成黑色素(具有与分光光度法定量的相同数量的色素;表1)和肿瘤裂解物的MN的研究显示了类似的高热作用,并通过组合疫苗接种显著增强了免疫应答(图31)。还实现了肿瘤消退和长期存活。重要地,用组合方法进行疫苗接种分别使75%和87%的小鼠对BP和4T1植入具有抗性(图7A-7B和图32)。在具有肿瘤的小鼠中,MN和NIR处理在分别植入了BP和4T1细胞的小鼠中的87%和37%中诱导了完全缓和(图7C-7D和图32)。对局部HSP70表达的分析显示,与仅MN相比,在组合疫苗接种后,BP模型中增加了2.5倍,并且4T1模型中增加了4倍(图33)。组合处理还诱导了促炎性细胞因子的产生,从而使得DC活化增强(图34和图35)。处理具有良好的耐受性,并且不会引起重量减轻或远端转移的临床病征(图36和图37)。

[0102] 材料和方法

[0103] 研究设计:本公开评定了黑色素介导的透皮施药贴片对基于癌症疫苗的免疫疗法的作用。将含有黑色素的B16F10全肿瘤裂解物整合到微针施药贴片中,以使得可控制释放癌症疫苗。对施药贴片进行NIR光照射后,评价了对增强免疫应答的局部加热作用。小鼠受试者购自美国杰克逊实验室(Jackson Laboratories (USA)),称重并随机分为不同的实验组。每个图例中都包括了采样和重复实验的数量。

[0104] MN的制备和表征:使用硅酮模具制备所有MN,其中圆锥形孔阵列通过激光烧蚀加工(布鲁艾克技术有限公司(Blueacre Technology Ltd.))。每个MN都有300 μ m x 300 μ m的圆形基座,该基座逐渐变细到800 μ m的高度,尖端半径为约5 μ m。MN以15 $\times$ 15的阵列排列,其中中心与中心的间隔为600 μ m。将GM-CSF溶液(0.1mg/mL,最终体积为10 μ L)通过移液直接放置每个硅酮微模具表面,随后施加真空(600mmHg)条件5min,以使溶液流入孔腔中。之后,将0.2mL4.0wt%甲基丙烯酸化的透明质酸溶液与N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(2.0wt%)和光引发剂(Irgacure 2959;0.05wt%)的混合物通过移液直接放置每个硅酮微模具表面,随

后施加真空(600mmHg)条件5min。将GM-CSF层通过紫外线照射(波长:365nm) 10sec交联,并在2cm×2cm的微模具基板周围施加一片4cm×9cm的银胶带。将含3mL的在4.0wt%混合甲基丙烯酸化的透明质酸溶液中的均质化B16F10肿瘤裂解物(含有1.5mg提取的肿瘤裂解物蛋白)添加至制备的微模具储器中。将透明质酸溶液用于不同浓度的肿瘤蛋白,范围为约0.25mg/mL、约0.5mg/mL至约1.0mg/mL。在MN制造之前,通过使用T-PER提取试剂和布拉德福德(Bradford)测定测量肿瘤裂解物上清液中提取的蛋白质含量来定量蛋白质浓度。对于载有BP或4T1肿瘤裂解物的MN,将50μg黑色素溶解在含肿瘤裂解物的4.0wt%混合甲基丙烯酸化的透明质酸溶液(含有1.5mg提取的肿瘤裂解物蛋白,最终体积为3.0mL)中来制造MN基质。对于没有肿瘤裂解物的空白MN,使用不含肿瘤裂解物的混合甲基丙烯酸化的透明质酸。对于载有黑色素的MN,将50μg黑色素溶解在4.0wt%混合甲基丙烯酸化的透明质酸溶液中来制造MN基质。通过将黑色素溶解在1.0M氢氧化钠中并加热至99℃后维持10min来制备100mg/mL黑色素储备溶液。将最终配制品在真空干燥器中在25℃下干燥过夜。干燥完成后,将针阵列与硅酮模具小心分开,并通过紫外线照射交联。将针基座裁剪成正方形。用鬼笔环肽标记的肿瘤裂解物和罗丹明B或Cy5.5标记的透明质酸制造荧光MN。在FEI Verios 460L场发射扫描电子显微镜上表征MN的形态,该扫描电子显微镜在分析仪器设施上用金/钨进行溅射镀膜后,在20kV下操作。通过使用赛默科技(Thermo Scientific)HN 525NX低温保持器切割5μm的薄片获得MN的横截面,并用Alexa Fluor 488或660-鬼笔环肽和Hoechst染色。MN的荧光图像通过奥林巴斯(Olympus) IX70多参数荧光显微镜拍摄。

[0105] MN的NIR反应性特性:为了评价响应于NIR光照射的光响应MN施药器的特性,用808nm NIR激光照射样品。二极管红外激光模块(光学工程有限公司(Opto Engine LLC), MDL-N-808)已获得北卡罗来纳州立大学(North Carolina State University;NC State)环境健康与安全中心(Environmental Health and Safety Center)的激光安全主管的批准。将MN施药器放置在一张白纸上,其中针尖朝下。使用具有支撑杆和夹具的板架将激光线固定就位。将施药器与点光之间的距离固定为10cm,并且点尺寸为约1cm²。将二极管红外激光模块的输出能量调整在1.0W内,并产生1.0瓦特/平方厘米(在808nm下)(W/cm²)的每单位面积的强度($E = I/d^2$)。根据需要连续或间歇地照射NIR光。记录MN施涂器底座的表面温度变化,并使用热成像仪(FLIR E4)和非接触式红外测温枪(Leegoal)将最高温度实时控制在42℃以下。对于间歇照射,使MN反复曝露于1.0W/cm²激光,并且局部温度达到大约42℃持续1min。随后,关闭激光1min。重复该循环四次以评定MN阵列施药器在重复的NIR照射下的应答行为。对于连续照射,测试了具有不同参数的样品。在载有不同蛋白质浓度的肿瘤裂解物的MN或具有透明质酸的空白MN上测试了黑色素含量对光应答行为的影响。记录了在1.0W/cm²的连续NIR照射下代表性MN的定量表面温度变化。在一个单独的实验中,控制了激光功率通量。在连续NIR曝露2min期间,记录了MN表面的最大温度并绘图。通过1.0W/cm²的连续NIR照射在MN上测试了MN底座厚度对光应答行为的影响。使用数显指示器(三丰公司(Mitutoyo Corp.) ID-C112E系列543)测得MN施药器的厚度平均值为181μm,并且标准偏差为12.5μm。使用了具有不同底座厚度的MN施药器样品:169μm、175μm、179μm、181μm和202μm。

[0106] 体外DC活化:通过用含有10%胎牛生长血清的完全RPMI 1640培养基冲洗股骨和胫骨来收集骨髓。在红细胞裂解(裂解物溶液,Cwbiootech)后,将1×10⁶个骨髓细胞接种在具有3.0mL培养基的六孔培养皿中,所述培养基含有含有20ng/mL GM-CSF和50μMβ巯基乙醇

(美国加利福尼亚州赫拉克勒斯的伯乐公司(Biorad, Hercules, CA, USA))。在第3天,再将4.0mL具有GM-CSF的相同培养基添加到培养板中。在第6天,收集一半的培养上清液并离心。将细胞再悬浮在RPMI培养基中,并添加回原先的培养板中。在第7天,收集非粘附细胞并将其用作骨髓来源的DC以供进一步研究使用。在具有5ng/mL GM-CSF的伊格尔阿尔法改良最小必需培养基(MEM,西格玛公司(Sigma))中培养另一种鼠DC细胞系JAWS II细胞。不刺激DC或用100 μ g/mL空白MN或载有肿瘤裂解物的MN释放培养基或100ng/mL脂多糖(LPS)刺激DC 12hr。刺激后,分别使细胞以10cm的距离暴露于1.0W/cm² NIR照射0、5、10、15、20min。细胞孵育4hr后,收集上清液并通过IL-12p70小鼠ELISA试剂盒(赛默飞公司(Thermo Fisher), MC0121)测量。洗涤细胞并用活死测定(赛默飞公司(Thermo Fisher), L3224)、CD80+和CD86+成熟标记物特异性抗体染色,随后通过共聚焦显微镜和流式细胞仪分析。将骨髓来源的DC细胞和JAWS II细胞系两者用于表征DC活化。活/死测定成像数据获自JAWS II细胞系。

[0107] 小鼠和体内肿瘤模型:雌性C57BL/6J小鼠、BALB/cJ小鼠、CD11c-白喉毒素受体(DTR)转基因小鼠(B6.FVB-Tg(Itgax-DTR/EGFP) 57Lan/J; 储料编号004509)、Rag1-/-敲除小鼠(B6.129S7-Rag1tm1Mom/J; 储料编号002216)购自杰克逊实验室(Jackson Lab)。将小鼠称重并随机分至不同的组中。在第0天,用载有肿瘤裂解物和GM-CSF的MN、载有合成黑色素而没有肿瘤裂解物的空白MN或仅含有透明质酸的空白MN(空白)处理健康小鼠。将MN施药器施加到近尾部背侧区域的皮肤中大约10min,并且使用Skin Affix外科粘合剂(麦朗工业公司(Medline Industries, Inc.))进一步固定。注射MN后,免疫后连续五天每天在局部MN区域上进行NIR照射10min(MN+NIR)。808nm下的二极管红外激光模块(光学工程有限公司, MDL-N-808)已获得NC State环境健康与安全中心(Environmental Health and Safety Center)的激光安全主管的批准。将对照组中的小鼠用不进行NIR照射的疫苗MN(MN)、进行NIR照射的载有合成黑色素且没有肿瘤裂解物的空白MN(黑色素)或进行NIR照射的仅含有透明质酸的空白MN(空白)处理。记录局部皮肤的表面温度变化,并使用热成像仪(FLIR E4)和非接触式红外测温枪(Leegoal)实时控制在42℃以下。在第10天,将25 μ L PBS中的1 $\times$ 10⁶个B16F10肿瘤细胞皮下移植到C57BL/6J小鼠、CD11c-DTR转基因小鼠和Rag1-/-敲除小鼠的侧腹中。第一次肿瘤接种后80天,用25 μ L PBS中的1 $\times$ 10⁶个B16F10肿瘤细胞再次攻击无肿瘤的小鼠。为进行耗竭抗体研究,在小鼠模型中使特定的T细胞、B细胞和NK细胞群耗竭。对小鼠腹膜内给予溶解在200 μ L PBS中的200 μ g从小鼠胸腺或脾纯化的抗体溶液。从肿瘤接种前一周开始,每周两次施用针对CD4(Biolegend, LEAF 100435)和CD8(Biolegend, LEAF 100735)、CD19(Biolegend, LEAF 152402)和NK-1.1(Biolegend, LEAF 108712)的抗体持续三周。通过脾悬浮液的流式细胞术确认耗竭。对于另一种黑色素瘤模型,将25 μ L PBS中的1 $\times$ 10⁶个BP肿瘤细胞皮下移植到C57BL/6J小鼠的侧腹中。对于癌肿瘤模型,将25 μ L PBS中的1 $\times$ 10⁶个肿瘤细胞皮下移植到BALB/cJ小鼠的侧腹中。为获得实验转移模型,通过尾静脉将1 $\times$ 10⁵个肿瘤细胞静脉内输注到小鼠中。在另一组实验中,在第0天将肿瘤细胞皮下移植到小鼠的侧腹中。在第3天,当肿瘤体积达到约50mm³时,称重具有肿瘤的小鼠并随机分到四个组中。之后,向小鼠肿瘤周围施用载有肿瘤裂解物和GM-CSF的无菌MN(MN)或仅含有透明质酸的空白MN(空白)。之后,在从第3天到第7天的接下来的五天期间,将NIR光照射到MN施药器上10min。通过数字卡尺测量肿瘤生长或通过荧光素酶标记的细胞的生物发光信号监测。肿瘤体积(mm³)计算为1/2 $\times$ 长径 $\times$ (短径)²。

[0108] 为了评定潜在毒性,每天监测小鼠的重量减轻。按照标准程序(NC State兽医学院的组织学实验室),对从小鼠收集的器官进行H&E染色。切除肺并计数肉眼可见的转移。将切除的原发性肿瘤保存在-20℃下以进行免疫荧光染色或固定在4%多聚甲醛中以进行后续分析。

[0109] DC亚群、T细胞和细胞因子的鉴别:使用的抗体购自赛默飞科技公司(Thermo Fisher Scientific)和Biolegend公司。将包括CD3(赛默飞科技公司(Thermo Fisher Scientific),A18644)、CD4(赛默飞科技公司(Thermo Fisher Scientific),A18667)、CD8(赛默飞科技公司(Thermo Fisher Scientific),A18609)、CD11c(Biolegend,117309)、CD49b(Biolegend,108909)、CD80(Biolegend,104707)、CD86(Biolegend,105007)、PIR-A/B(gp91,Biolegend,144103)、四聚体(MBL国际公司(MBL International),H-2Db gp100 EGSRNQDWL-P)和荧光CellROX™深红色试剂(Biolegend,C10422)在内的染色抗体用于FACS并且按照制造商的说明进行分析。收获器官(皮肤、肿瘤、淋巴结、脾),并使用剪刀或手术刀切成2-4mm的块。在细胞染色缓冲液(BioLegend,420201)中制备单细胞悬浮液。将预定最佳浓度的CellROX试剂添加到细胞中,并在黑暗在冰上孵育20-30min来检测ROS。将相关的四聚体PE在室温下在黑暗中染色30min,然后再用适当结合的荧光抗体染色。在Calibur FACS仪器(BD)上分析染色的细胞,并使用flowJo软件分析。为了确定MN疫苗部位处不同细胞因子的浓度,切除施药器和相邻组织并用组织蛋白提取试剂(皮尔斯公司(Pierce))消化。根据制造商的说明,用BioLegend的基于LEGENDplex™珠粒的免疫测定分析提取的施药器中的细胞因子浓度。

[0110] 统计分析:使用GraphPad Prism(6.0)评价统计分析。用配对的史都登t检验和ANOVA进行统计分析。用对数秩检验计算卡普兰-迈耶曲线的P值。P值小于或等于0.05被认为是显著的。

[0111] 研究批准:所有小鼠研究均按照北卡罗来纳州立大学和北卡罗来纳大学教堂山分校(University of North Carolina at Chapel Hill)的机构动物护理和使用委员会批准的动物规程进行。

[0112] 细胞培养:小鼠黑色素瘤细胞系B16F10和小鼠乳癌细胞系4T1购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)。B16F10-luc和BRAFV600EPTEN-/- (BP)(由杜克大学(Duke)Brent A.Hanks博士的实验室产生)细胞获自北卡罗来纳大学教堂山分校的Leaf Huang博士。将B16F10细胞维持在补充有10%胎牛血清(加利福尼亚州卡尔斯巴德市的英杰公司(Invitrogen,Carlsbad,CA))、100U/mL青霉素(英杰公司(Invitrogen))和100U/mL链霉素(英杰公司(Invitrogen))的杜尔贝科改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium,DMEM,Gibco,英杰公司(Invitrogen))中。将4T1和BP细胞维持在补充有10%胎牛血清(加利福尼亚州卡尔斯巴德市的英杰公司(Invitrogen,Carlsbad,CA))、100U/mL青霉素(英杰公司(Invitrogen))和100U/mL链霉素(英杰公司(Invitrogen))的罗斯维公园纪念所(Roswell Park Memorial Institute;RPMI)1640培养基(Gibco,英杰公司(Invitrogen))中。在孵育箱(赛默科技公司(Thermo Scientific))中,在37℃下,在5%CO₂的氛围下和90%相对湿度下培养细胞,并在大约每3天80%汇合时使用0.25wt%胰蛋白酶以1:3的分流比进行亚培养。

[0113] 肿瘤裂解物的蛋白质和黑色素定量:从具有B16F10黑色素瘤的小鼠收集原发性肿

瘤。为了定量肿瘤裂解物蛋白,将3mL T-PER组织蛋白提取试剂添加到1.5g肿瘤组织中,并使用超声进行均质化。在冰上孵育2hr后,将裂解液在 $10,000\times g$ 下在4℃下离心20min以使组织碎片沉淀,并使用Coomassie Plus™(布拉德福德法)测定试剂盒测定所得上清液的蛋白质浓度。为了定量黑色素,将均质化的肿瘤组织再悬浮于1M氢氧化钠中,并加热至99℃后维持10min。通过测量475nm下的吸光度并根据标准曲线计算来确定黑色素浓度。为了制备微针(MN),将3mL磷酸盐缓冲盐水(PBS)培养基缓冲液添加到1.5g肿瘤组织中,并通过超声均质化。

[0114] 机械强度测试:如下用应力-应变规测定微针的机械强度,在MTS30G拉伸试验机上将不锈钢板压向MN。MN的尖端与板之间的初始规格为2.00mm,负荷单元容量为10.00N。将板接近MN的速度设定为0.1mm/s。MN的破坏力记录为针头开始屈曲的力。

[0115] 皮肤渗透测试:为了评价MN的皮肤渗透能力,将它们插入小鼠皮肤10min。对小鼠实施安乐死,并用锥虫蓝对皮肤样品染色10min,然后通过光学显微法(徕卡(Leica)EZ4 D立体显微镜)成像。在单独的实验中,将皮肤样本用苏木精和曙红(H&E)(NC State兽医学院的组织学实验室)染色。

[0116] 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)释放曲线。根据制造商的规程通过ELISA(eBioscience小鼠GM-CSF ELISA试剂盒)检测从MN释放的GM-CSF的量。通过将MN的尖端浸入37℃下适度震荡的PBS培养基缓冲液中监测GM-CSF从MN的释放。每天对MN进行近红外(NIR)照射10min,持续3天。在预定的时间点,收集100μL培养基以进行分析,并且再添加100μL新鲜培养基。用酶标仪(Infinite M200 PRO,帝肯公司(Tecan))在450nm下测定GM-CSF的吸收强度。同时还通过布拉德福德测定分析了肿瘤裂解物蛋白的浓度。通过体外生物活性测定来评定生物活性GM-CSF的百分比,并通过将GM-CSF生物活性的量对ELISA检测到的GM-CSF蛋白的量进行归一化来计算。生物活性测定使用从C57BL/6J小鼠(雌性,6-8周龄;杰克逊实验室(Jackson Laboratories))分离的骨髓来源的树突状细胞(DC)。向每个细胞培养孔中添加10v/v%的AlamarBlue试剂,并在37℃下孵育4hr后,在490nm的吸光度下读取培养板。将所有标准品和样品对空白对照归一化,并相对于标准曲线确定实验样品的生物活性。

[0117] 细胞毒性研究:使用B16F10细胞对具有各种溶解浓度的空白MN配制品进行了细胞毒性研究。将细胞以每孔 5×10^3 个细胞的密度接种到96孔板中,并在100μL具有10%FBS、1×青霉素-链霉素(Pen-Strep)、1×L-谷氨酰胺和2.5μLB巯基乙醇/500mL培养基的DMEM(25mM葡萄糖)中培养。然后将板在37℃下在5%CO₂中孵育12hr,以达到70-80%汇合,然后添加与MN溶液一起孵育的释放培养基的连续稀释液。与样品一起孵育24hr后,将细胞用PBS溶液洗涤,并与100μL新鲜的无FBS的DMEM和20μL新鲜制备的溴化3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎓溶液(MTT溶液,5.0mg/mL)一起孵育。将培养板在黑暗中在37℃下再孵育4hr。之后,小心地去除溶液,并添加100μL二甲亚砜。在10min内使用酶标仪(Infinite M200 Pro,美国纽约州摩利斯维尔市的帝肯公司(Tecan, Morrisville, NC, USA))在590nm下和630nm的参考波长下读取板的吸光度。

[0118] 体内生物发光和成像:用Xenogen IVIS光谱成像系统(Xenogen IVIS Spectrum Imaging System)收集生物发光图像。向动物腹膜内注射(10微克/克体重)含D-荧光素(皮尔斯公司(Pierce))的杜尔贝科磷酸盐缓冲盐水(Dulbecco's phosphate-buffered saline; DPBS)(15mg/mL)10min后,使用Living Image软件(Xenogen)获得数据。

[0119] 共聚焦显微术:切割局部皮肤和肿瘤,并在4℃下固定在4%多聚甲醛中,然后包埋在OCT化合物(樱花(Sakura)Finetek)中,并在干冰上的异戊烷浴中速冻。将冷冻样品切片(厚度为5μm),安装在显微镜载玻片上,并保存在-20℃下。为了通过免疫荧光对CD3(赛默飞科技公司(Thermo Fisher Scientific),A18644)、CD4(赛默飞科技公司(Thermo Fisher Scientific),A18667)、CD8(赛默飞科技公司(Thermo Fisher Scientific),目录号A18609)、CD11c(Biolegend,117309)、CD49b(Biolegend,108909)、热休克蛋白70(HSP70)(艾博抗公司(Abcam),ab2787)和HSP90(艾博抗公司(Abcam),ab1429)染色,将载玻片洗涤两次,使用0.1%Triton X100溶液透化30min,随后使用1%牛血清白蛋白(BSA)溶液封闭1小时。封闭后,施加1/200稀释的一级单克隆抗体,在4℃下过夜,随后洗涤并与1/400稀释的二级抗体一起孵育。将二级抗体添加到一些样品中,这些二级抗体包括山羊抗大鼠IgG二级抗体(赛默飞(Thermo Fisher)A18866)、兔抗大鼠IgG(H+L)二级抗体(赛默飞科技公司(Thermo Fisher Scientific),A18920)。将载玻片洗涤三次,施加Hoechst 33342或4',6-二脒基-2-苯基吡啶二盐酸盐(DAPI)以将细胞核染色并盖上盖玻片。对于末端脱氧核苷酸基转移酶dUTP缺口末端标记(TUNEL)细胞凋亡染色,根据制造商的规程,通过原位细胞死亡检测试剂盒(In Situ Cell Death Detection Kit,罗氏应用科学部(Roche Applied Science))对固定的肿瘤切片进行染色。使用Hoechst 33342进行细胞核染色。使用奥林巴斯(Olympus)IX70多参数荧光显微镜和共聚焦显微镜(蔡司公司(Zeiss))将对样品成像。使用ImageJ软件处理图像。

[0120] 肿瘤浸润细胞和淋巴样组织细胞的分离:通过在RPMI中用40μm尼龙细胞过滤器(康宁公司(Corning))研磨肿瘤来分离B16F10肿瘤细胞样品。用剪刀将BP和4T1肿瘤样品切碎,然后与胰蛋白酶/EDTA(0.25%/0.1%)一起孵育20min。通过重复移液将肿瘤细胞均质化,并通过在RPMI中用40μm细胞过滤器过滤,产生单细胞悬浮液。用完全RPMI洗涤细胞悬浮液一次。如所述,从小鼠皮肤中分离出淋巴样组织细胞到单细胞悬浮液中。在测试之前,将所有样品再悬浮在荧光活化的细胞分选(FACS)缓冲液(PBS/0.5%白蛋白)中。

[0121] 细胞毒性T淋巴细胞活性:在体外用肿瘤裂解物刺激从小鼠收获的脾细胞。用过量的PBS通过过滤器洗涤细胞3次,然后与B16F10靶细胞一起在96孔培养板中以500:1的有效靶细胞比进行培养。24hr后,收集上清液以用非放射性细胞毒性测定(赛默科技公司(Thermo Scientific))检测乳酸脱氢酶(LDH)渗漏水平,这指示有效细胞对靶细胞的特异性裂解水平。根据特异性裂解% = ((实验LDH释放-有效的细胞LDH释放)/(最大LDH释放-自发LDH释放)) × 100%计算特异性裂解百分比。

[0122] 应理解,前述详细描述和实施例仅是说明性的,并且不应被视为对本发明范围的限制,本发明的范围仅由权利要求书及其等效物来限定。

[0123] 对所公开的实施方案的各种改变和修改对于本领域技术人员将是显而易见的。在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以进行此类变化和修改,包括但不限于与本发明的化学结构、取代基、衍生物、中间物、合成、组合物、配制品或使用有关的变化和修改。

[0124] 出于完整性的原因,本发明的各种方面在以下编号的条目以及权利要求书中有所阐述:

[0125] 条目1.一种用于光免疫疗法的光响应皮肤施药器,所述皮肤施药器包含:包含多个微针的透皮微针阵列,每个微针包含基座部分和尖端部分;包含至少一种肿瘤抗原的免

疫原性组合物;以及光敏性生物色素。

[0126] 条目2.根据条目1所述的皮肤施药器,其中使用聚合物基质将所述免疫原性组合物和所述生物色素封装在所述微针阵列内,所述聚合物基质包含以下的至少一种:糖胺聚糖、多硫酸化的糖胺聚糖、葡糖聚糖、多硫酸化的葡糖聚糖、葡糖胺聚糖、粘多糖、羧甲基纤维素(CMC)、(丙交酯-乙交酯)共聚物(PLGA)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚乙烯醇(PVA)、聚丙烯酸(PAA)、聚L-乳酸(PLA)、麦芽糖、壳聚糖、海藻酸盐及其衍生物和组合。

[0127] 条目3.根据条目1或2所述的皮肤施药器,其中所述聚合物基质包含透明质酸。

[0128] 条目4.根据条目1至3所述的皮肤施药器,其中所述至少一种肿瘤抗原来源于灭活的肿瘤裂解物或新抗原。

[0129] 条目5.根据条目1至4所述的皮肤施药器,其中所述至少一种肿瘤抗原来源于黑色素瘤、白血病、乳癌、肺癌、膀胱癌、脑癌、子宫颈癌、卵巢癌、结肠直肠癌,以及任何相关癌症。

[0130] 条目6.根据条目1至4所述的皮肤施药器,其中所述至少一种肿瘤抗原来源于B16F10黑色素瘤、BRAF^{v600E}黑色素瘤或4T1乳房肿瘤。

[0131] 条目7.根据条目1至5所述的皮肤施药器,其中所述至少一种肿瘤抗原包含来自受试者的免疫原性表位。

[0132] 条目8.根据条目1至7所述的皮肤施药器,其中所述光敏性生物色素是以下的至少一种:黑色素、类胡萝卜素、叶黄素、胆红素,或其组合。

[0133] 条目9.根据条目1至8所述的皮肤施药器,其中所述免疫原性组合物还包含免疫刺激剂。

[0134] 条目10.根据条目9所述的皮肤施药器,其中所述免疫刺激剂包含以下的至少一种:粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、CpG核苷酸、白介素(IL)-7、IL-15及其组合,并且其中所述免疫刺激剂能够刺激免疫细胞。

[0135] 条目11.根据条目9所述的皮肤施药器,其中所述免疫刺激剂包含至少一种免疫检查点抑制剂。

[0136] 条目12.根据条目1至11所述的皮肤施药器,其中所述免疫原性组合物和所述光敏性生物色素被封装在所述多个微针的基座部分内,并且其中所述免疫刺激剂被封装在所述多个微针的尖端部分内,所述尖端部分位于所述基座部分的远端。

[0137] 条目13.根据条目12所述的皮肤施药器,其中通过使甲基丙烯酸化的透明质酸交联将所述免疫刺激剂封装在所述多个微针的尖端部分内。

[0138] 条目14.根据条目1至13所述的皮肤施药器,所述皮肤施药器还包含用于将光能递送至所述施药器刺激受试者的免疫应答的构件。

[0139] 条目15.根据条目14所述的皮肤施药器,其中所述光能包含近红外(NIR)光。

[0140] 条目16.一种治疗罹患肿瘤的受试者的方法,所述方法包括使所述受试者的皮肤区域与根据条目1所述的光响应皮肤施药器接触,以及将光能递送至所述皮肤施药器;其中所述光能转化为热并且进一步刺激所述受试者的针对所述肿瘤的免疫应答。

[0141] 条目17.根据条目16所述的方法,其中将光能递送至所述皮肤施药器包括递送近红外(NIR)光、UV光或波长为约10nm至约1000nm的光。

[0142] 条目18.根据条目16或17所述的方法,其中将光能递送至所述皮肤施药器包括递

送NIR光历时约5分钟至约20分钟。

[0143] 条目19.根据条目16或18所述的方法,其中将光能递送至所述皮肤施药器包括每天递送NIR光至少一次,持续约一天至约连续七天。

[0144] 条目20.根据条目16至19所述的方法,其中所述至少一种肿瘤抗原来源于灭活的肿瘤裂解物或新抗原。

[0145] 条目21.根据条目16至19所述的方法,其中所述至少一种肿瘤抗原来源于黑色素瘤、白血病、乳癌、肺癌、膀胱癌、脑癌、子宫颈癌、卵巢癌、结肠直肠癌,以及任何相关癌症。

[0146] 条目22.根据条目16至21所述的方法,其中所述光敏性生物色素包含黑色素,并且其中将NIR光递送至所述皮肤施药器刺激所述黑色素产生高热微环境。

[0147] 条目23.根据条目22所述的方法,其中所述高热微环境的温度为约35℃至约45℃。

[0148] 条目24.根据条目16至23所述的方法,其中所述免疫原性组合物还包含免疫刺激剂。

[0149] 条目25.根据条目24所述的方法,其中所述免疫刺激剂包含以下的至少一种:粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、CpG核苷酸、白介素(IL)-7、IL-15及其组合,并且其中所述免疫刺激剂能够刺激免疫细胞。

[0150] 条目26.根据条目24所述的方法,其中所述免疫刺激剂包含至少一种免疫检查点抑制剂。

[0151] 条目27.一种抑制受试者的肿瘤形成的方法,所述方法包括使所述受试者的皮肤区域与根据条目1所述的光响应皮肤施药器接触,以及将光能递送至所述皮肤施药器;其中将光能递送至所述皮肤施药器刺激所述受试者的针对所述肿瘤的免疫应答。

[0152] 条目28.根据条目27所述的方法,其中将光能递送至所述皮肤施药器包括递送近红外(NIR)光、UV光或波长为约10nm至约1000nm的光。

[0153] 条目29.根据条目27或28所述的方法,其中将光能递送至所述皮肤施药器包括递送NIR光历时约5分钟至约20分钟。

[0154] 条目30.根据条目27或29所述的方法,其中将光能递送至所述皮肤施药器包括每天递送NIR光至少一次,持续约一天至约连续七天。

[0155] 条目31.根据条目27至30所述的方法,其中所述至少一种肿瘤抗原来源于灭活的肿瘤裂解物或新抗原。

[0156] 条目32.根据条目27至31所述的方法,其中所述至少一种肿瘤抗原来源于黑色素瘤、白血病、乳癌、肺癌、膀胱癌、脑癌、子宫颈癌、卵巢癌、结肠直肠癌以及任何相关癌症。

[0157] 条目33.根据条目27至32所述的方法,其中所述光敏性生物色素包含黑色素,并且其中将NIR光递送至所述皮肤施药器刺激所述黑色素产生高热微环境。

[0158] 条目34.根据条目33所述的方法,其中所述高热微环境的温度为约35℃至约45℃。

[0159] 条目35.根据条目27至34所述的方法,其中所述免疫原性组合物还包含免疫刺激剂。

[0160] 条目36.根据条目35所述的方法,其中所述免疫刺激剂包含以下的至少一种:粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、CpG核苷酸、白介素(IL)-7、IL-15及其组合,并且其中所述免疫刺激剂能够刺激免疫细胞。

[0161] 条目37.根据条目36所述的方法,其中所述免疫刺激剂包含至少一种免疫检查点

抑制剂。

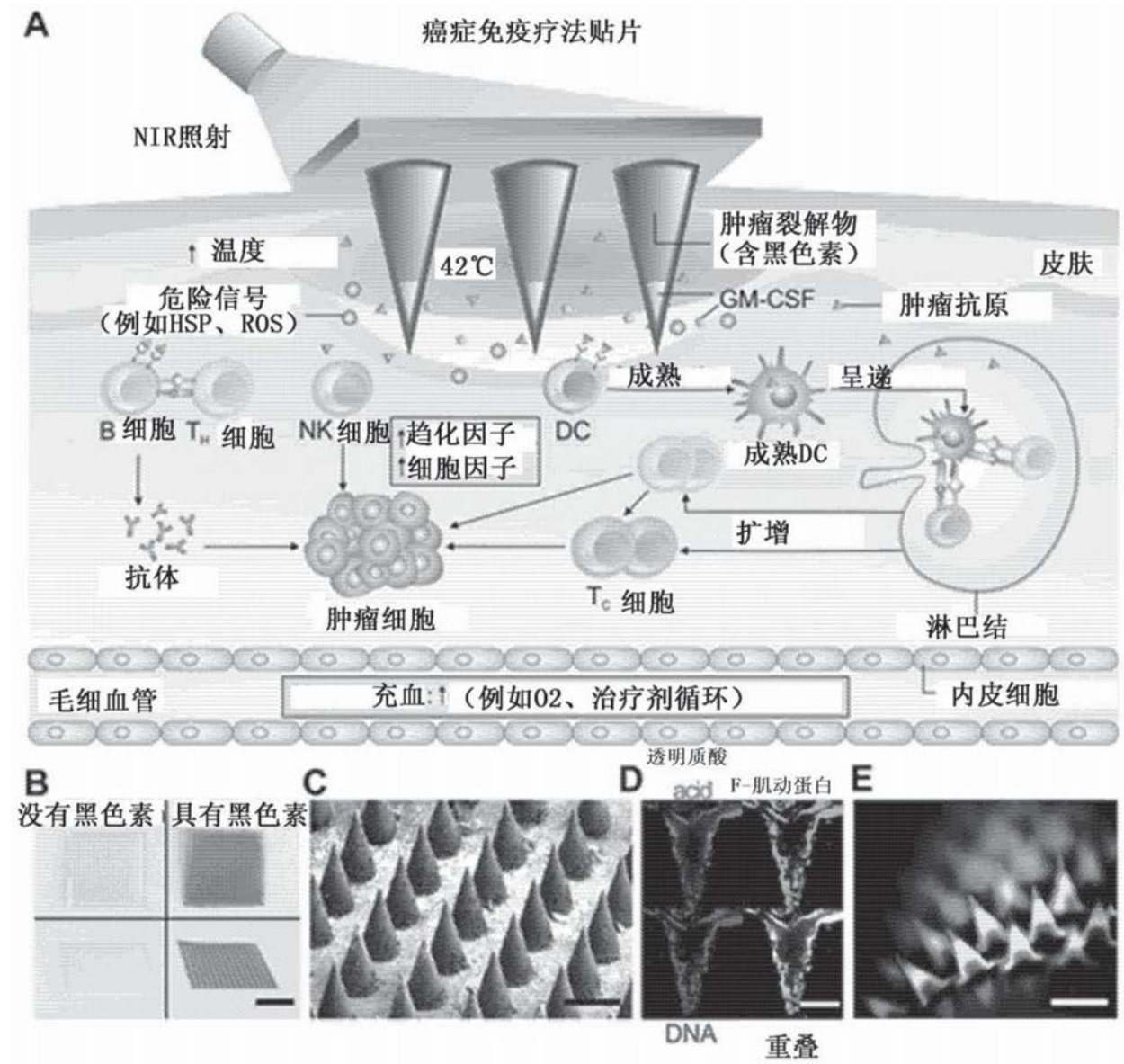


图1A-1E

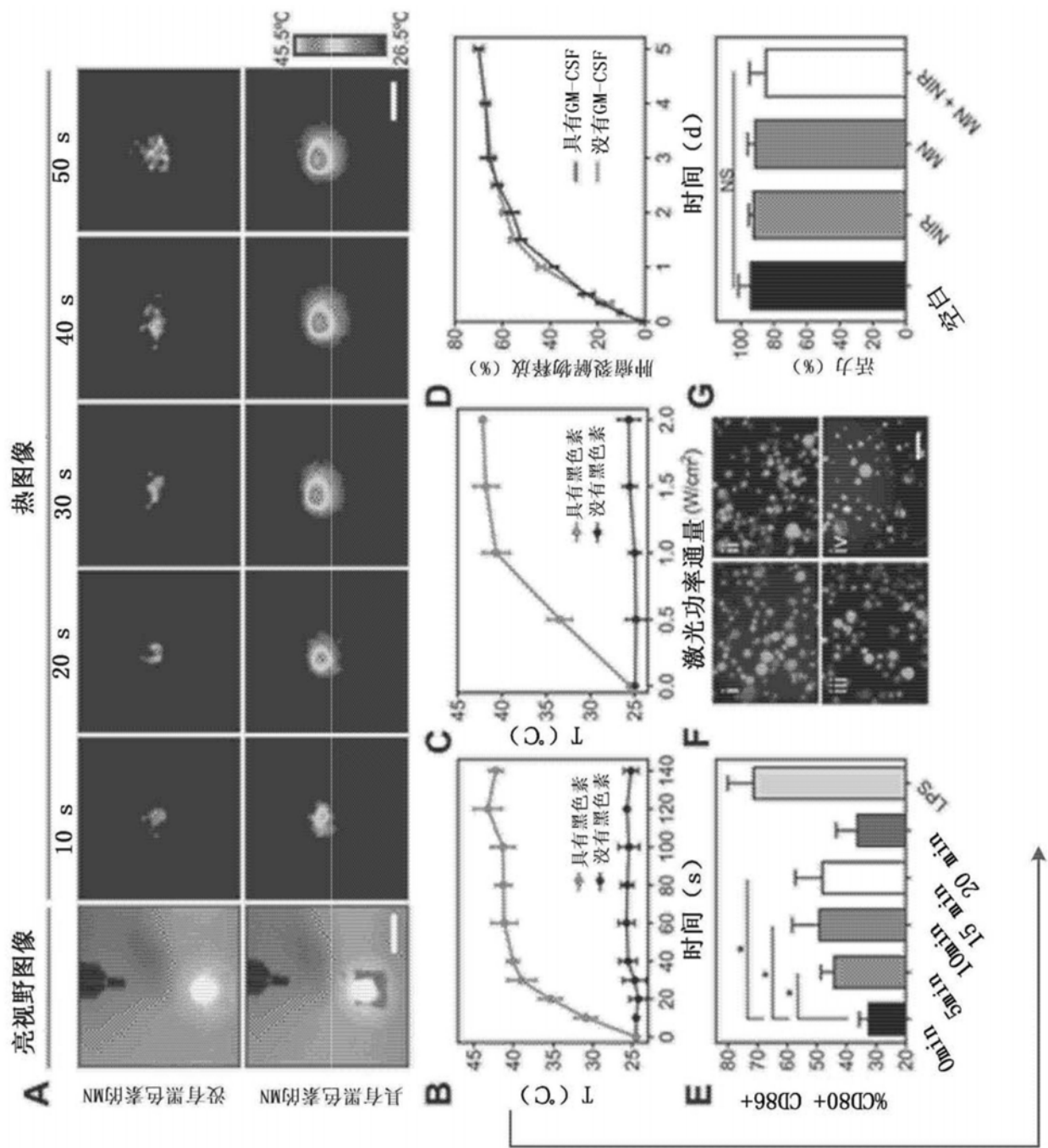


图2A-2G

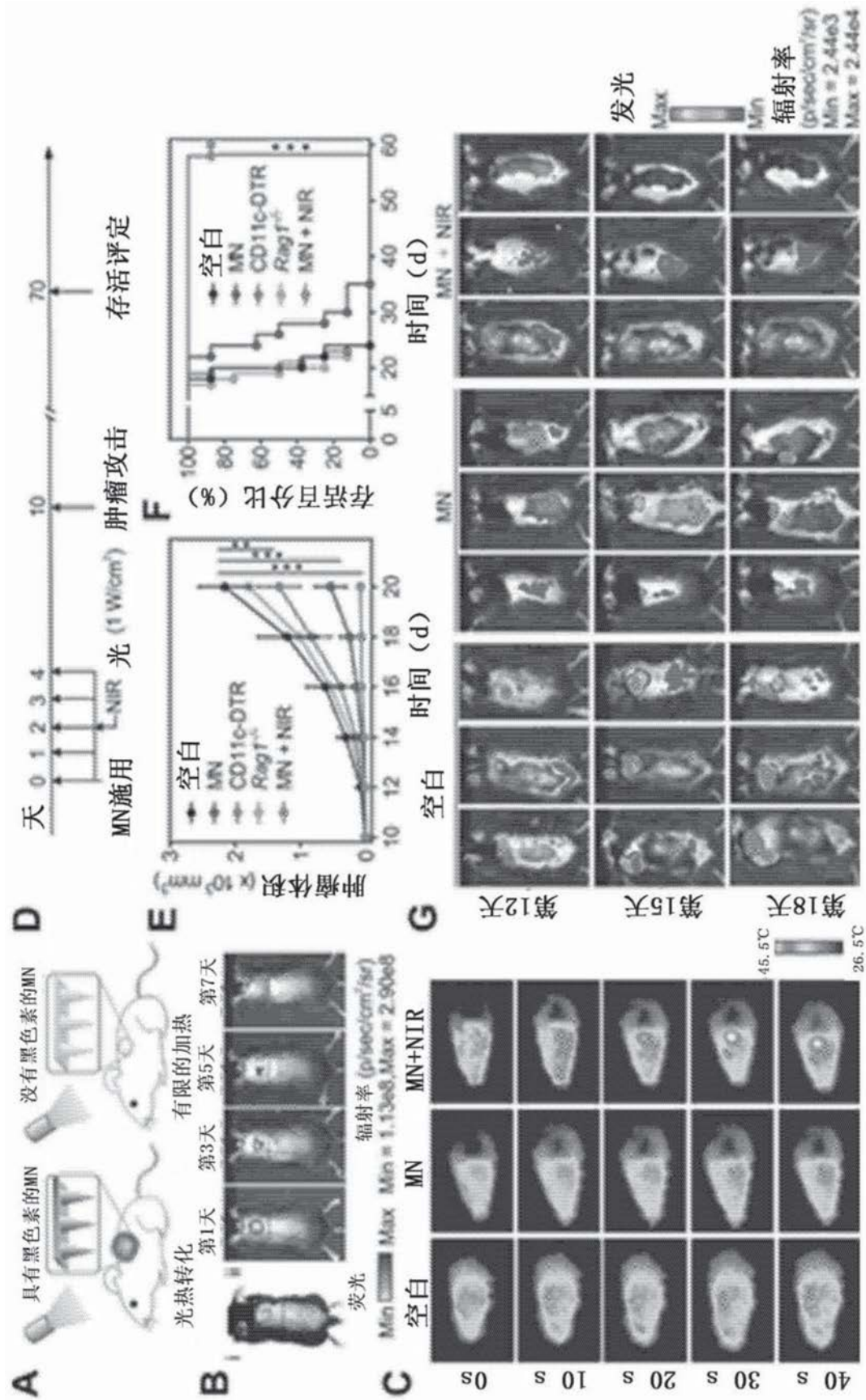


图3A-3G

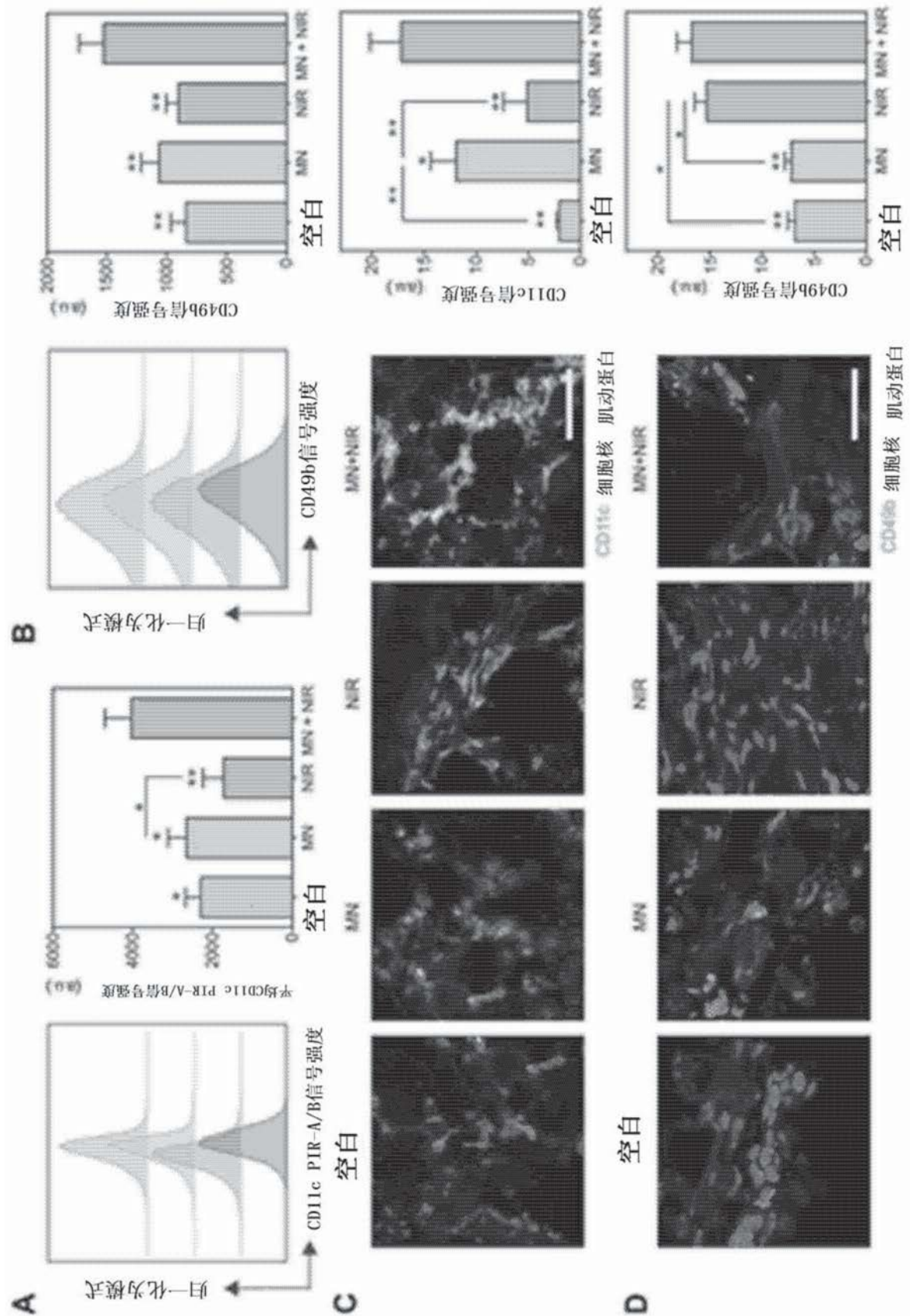


图4A-4D

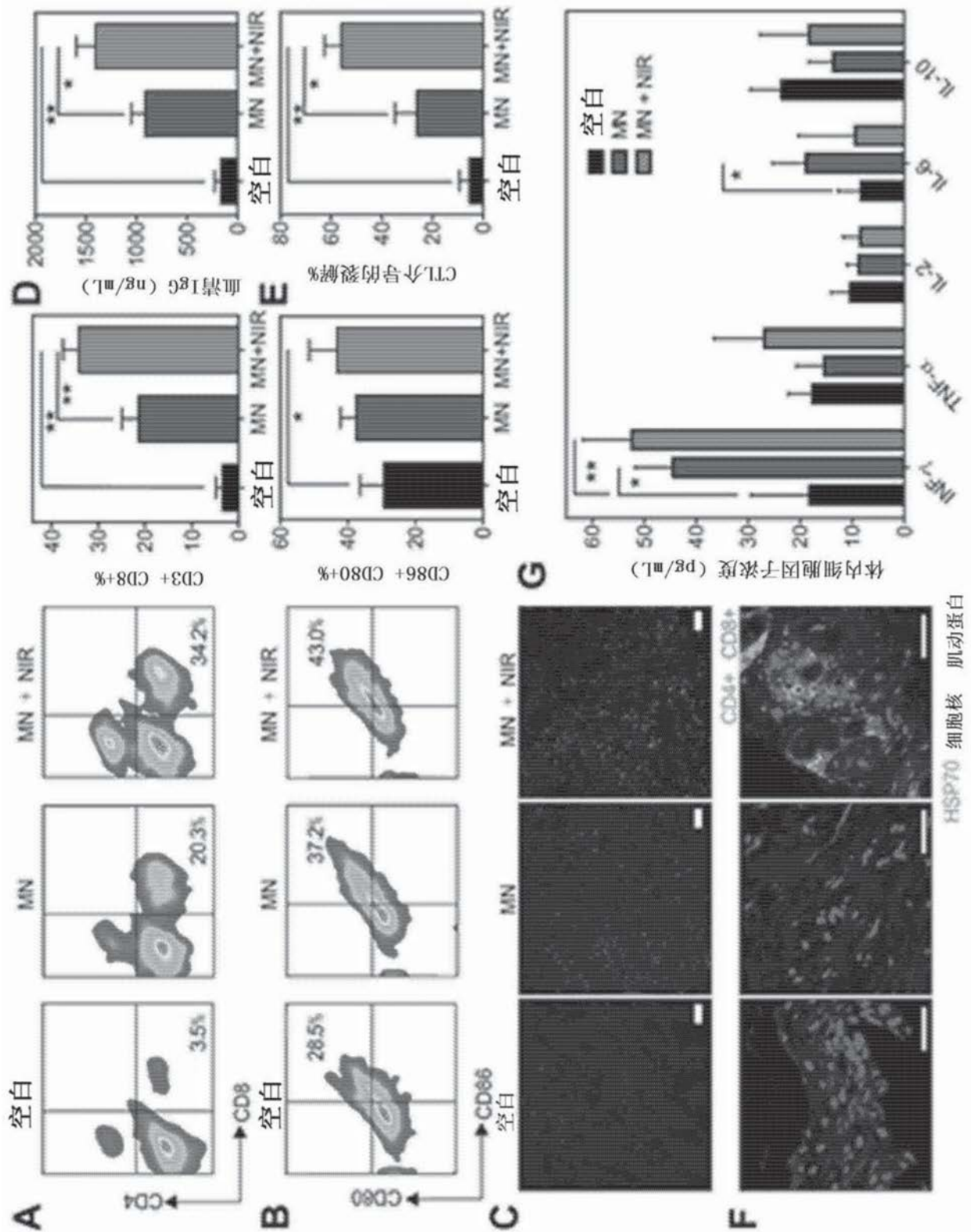


图5A-5G

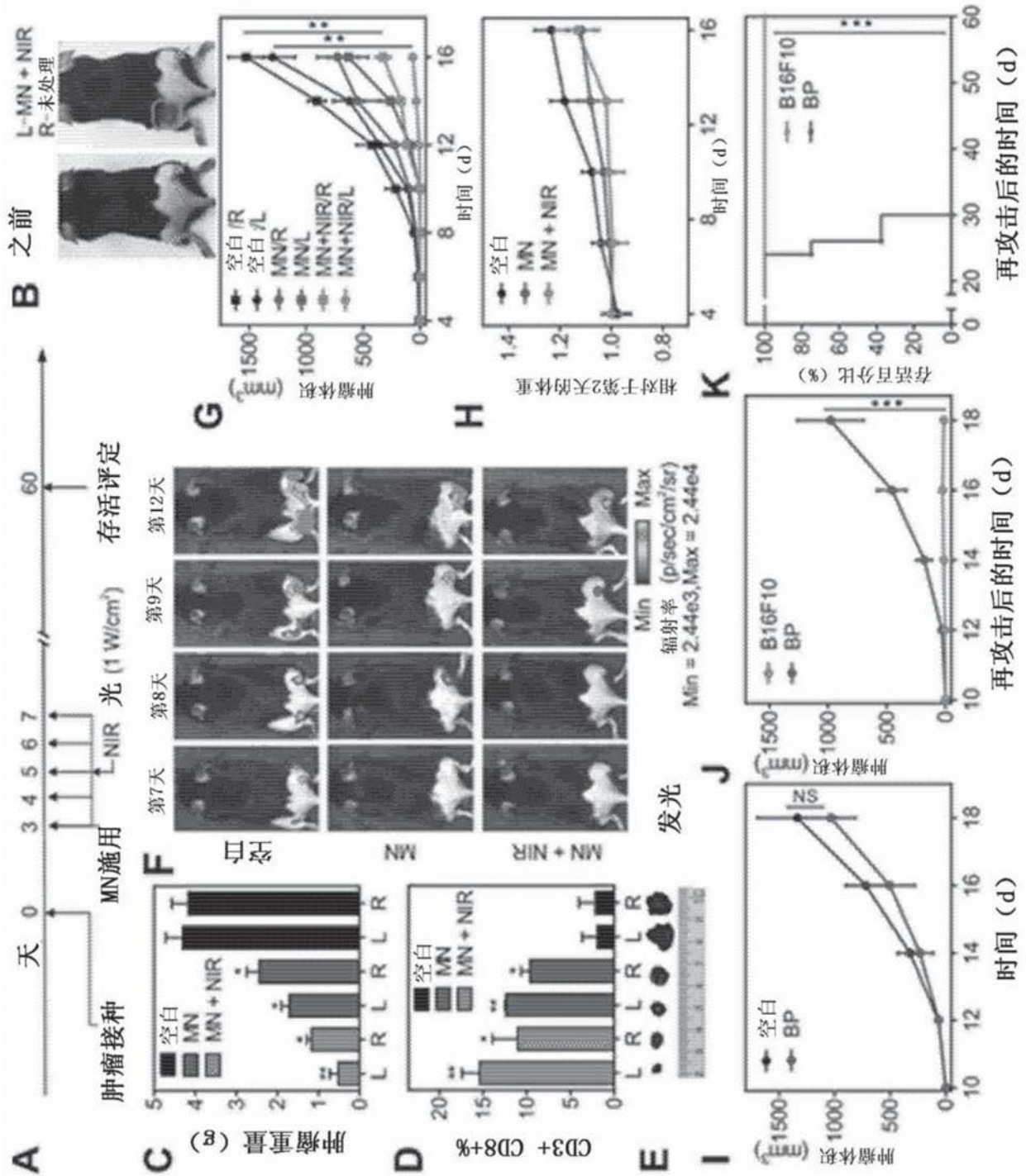


图6A-6K

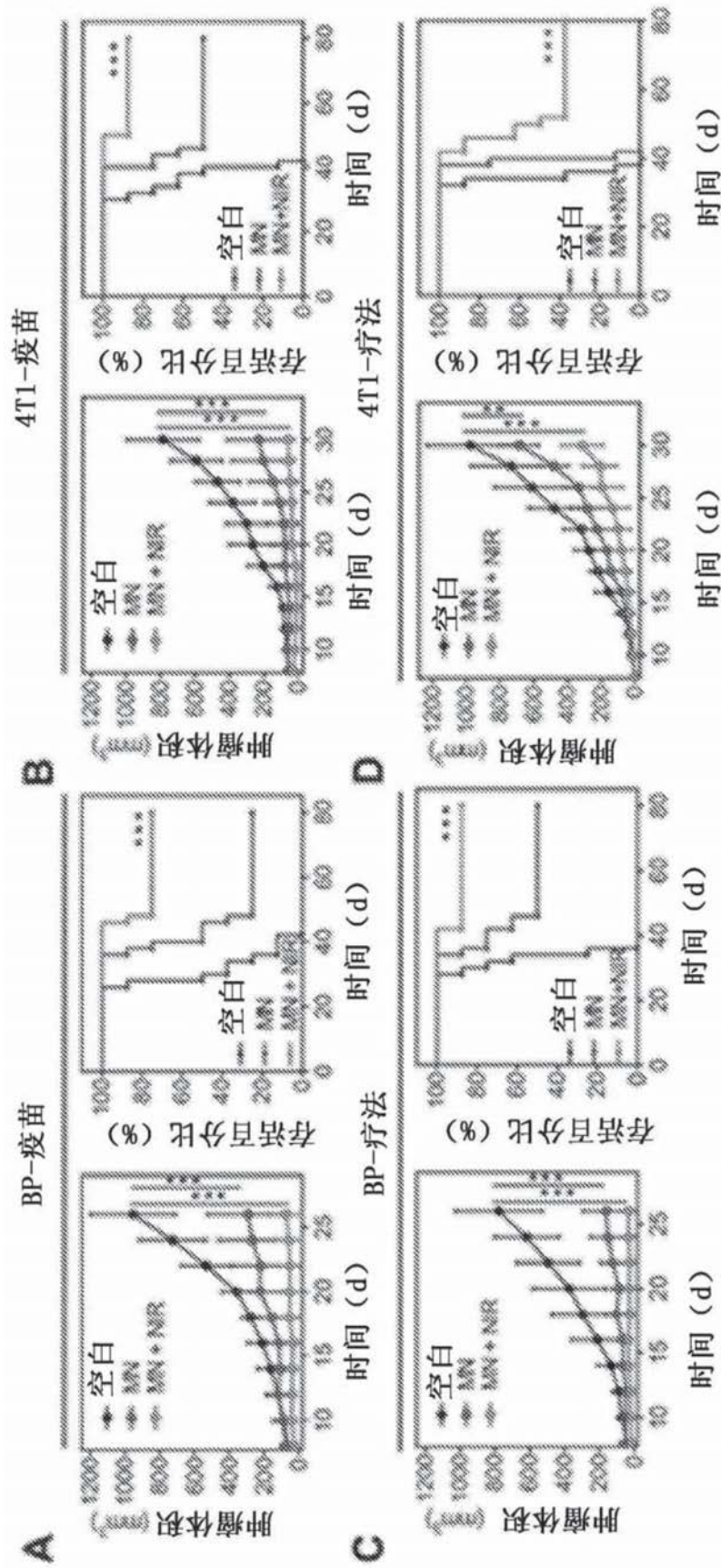


图7A-7D

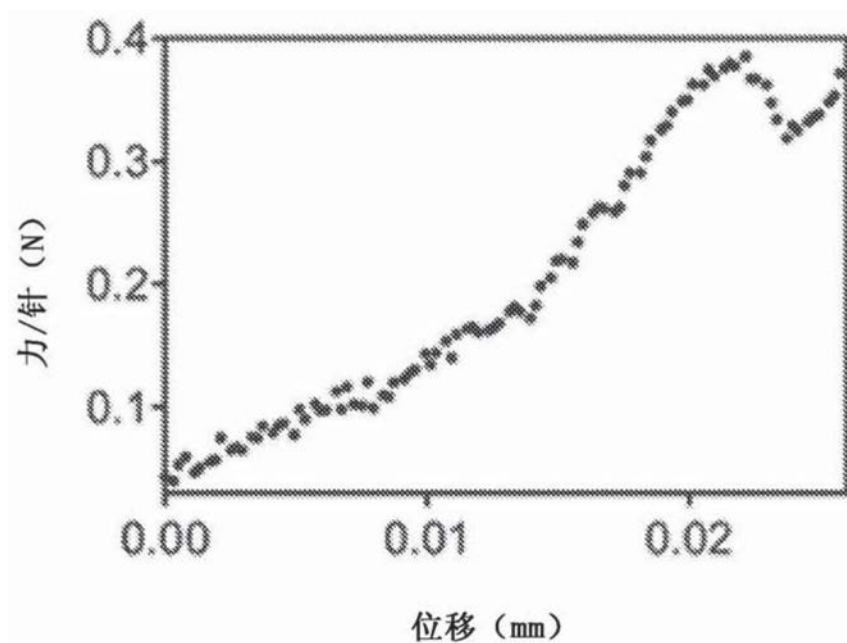


图8

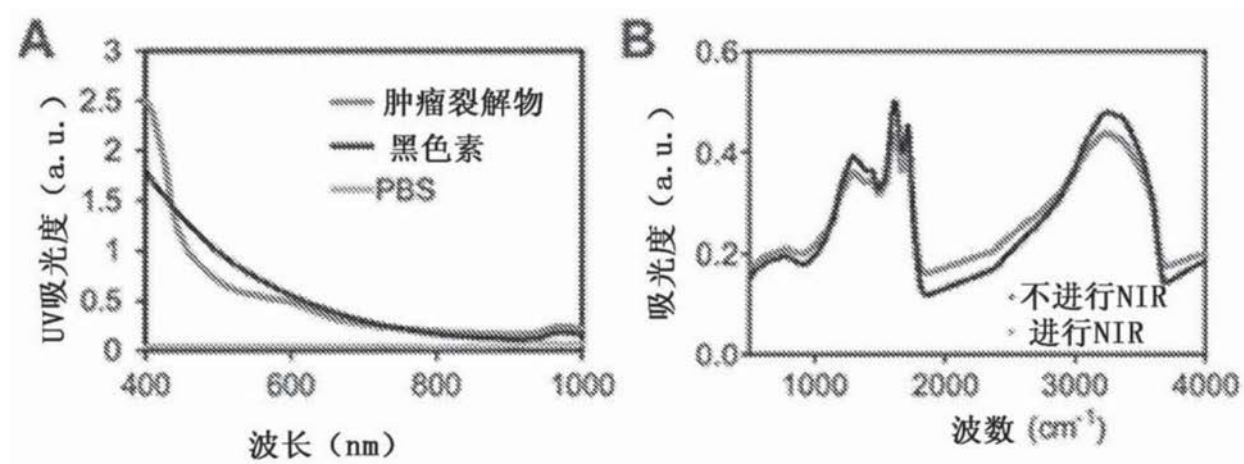


图9A-9B

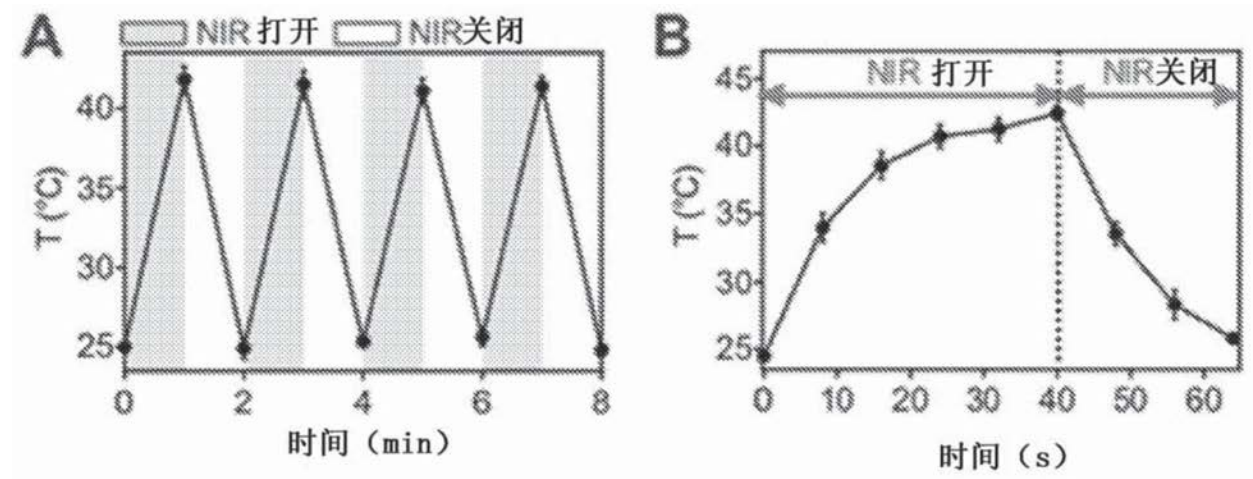


图10A-10B

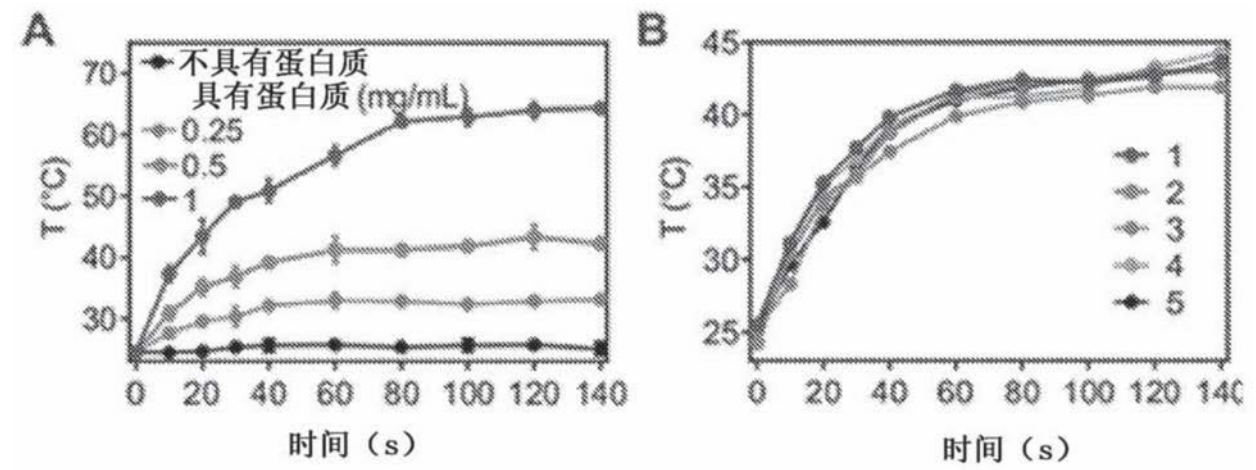


图11A-11B

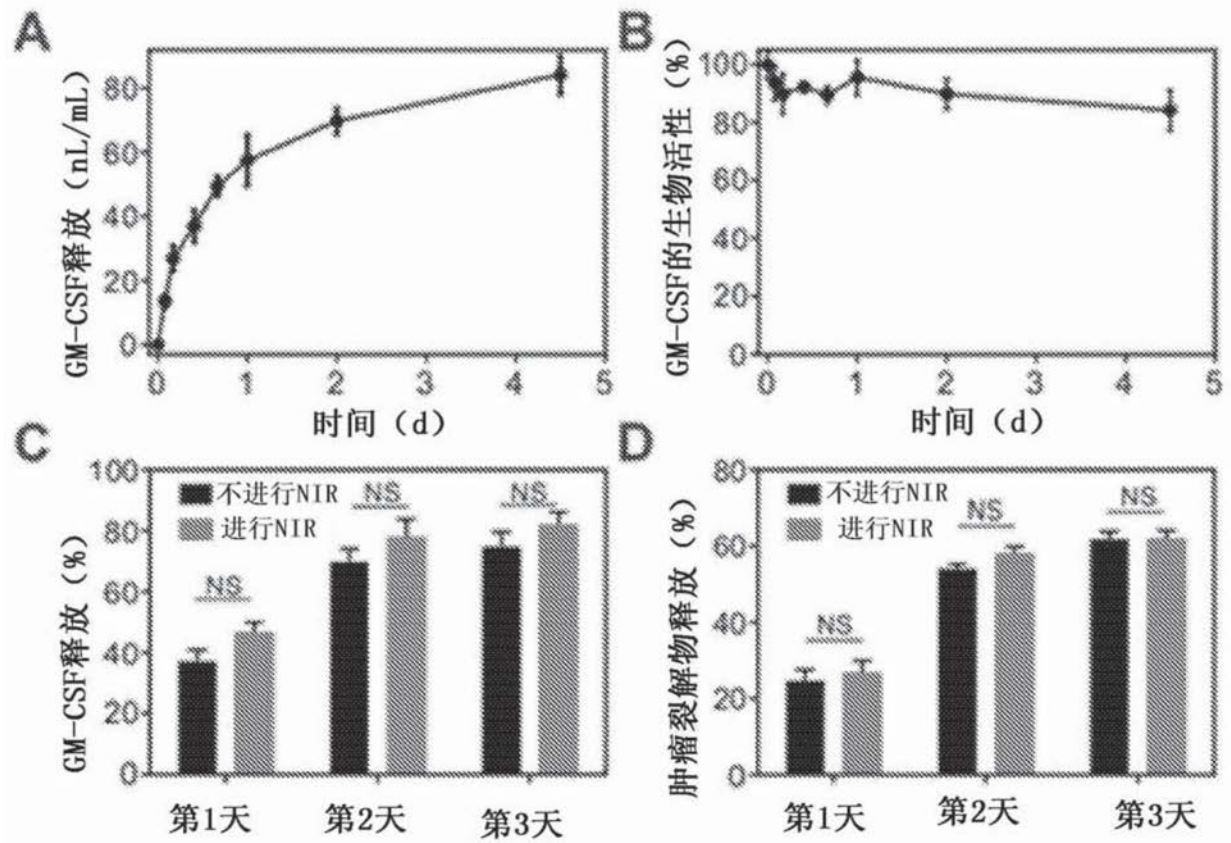


图12A-12D

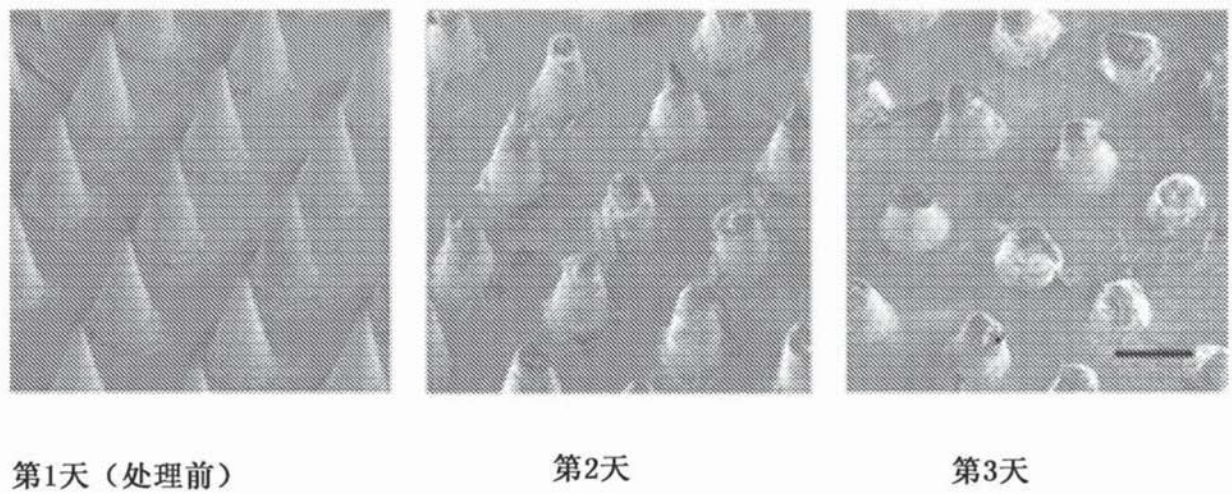


图13

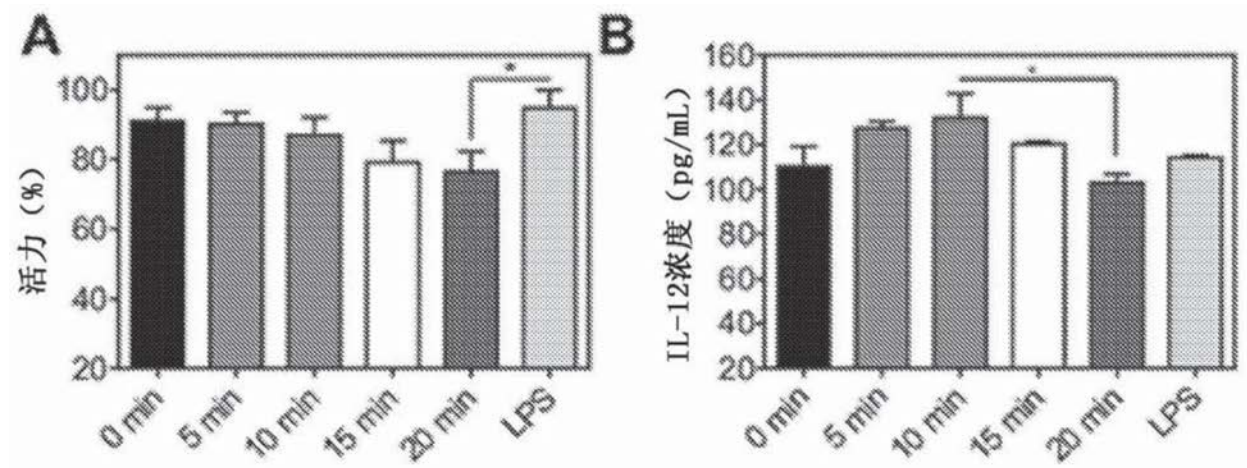


图14A-14B

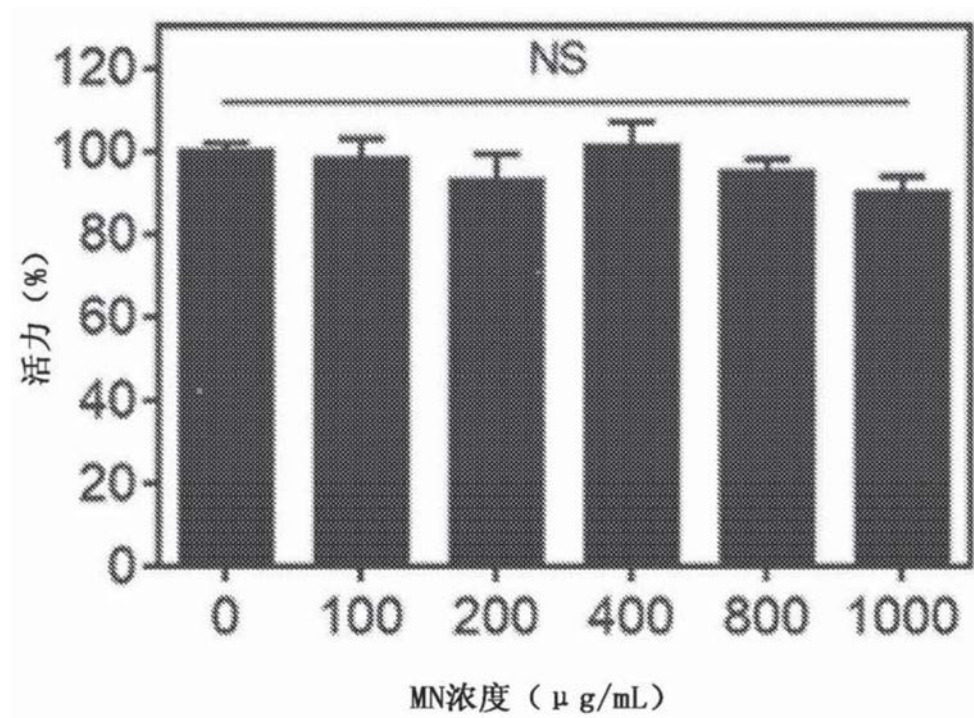


图15

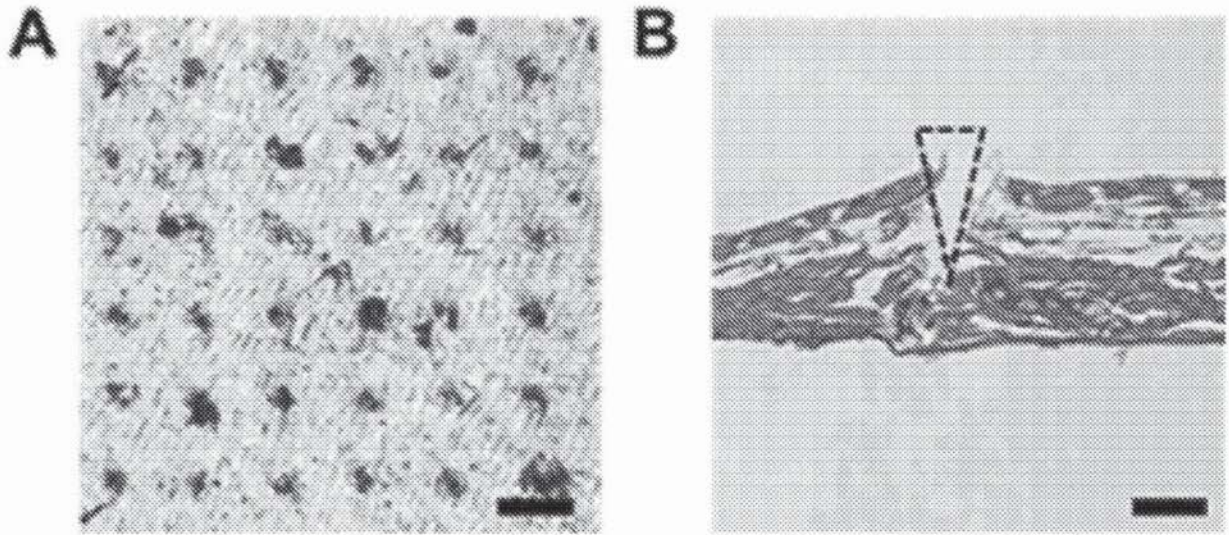


图16A-16B

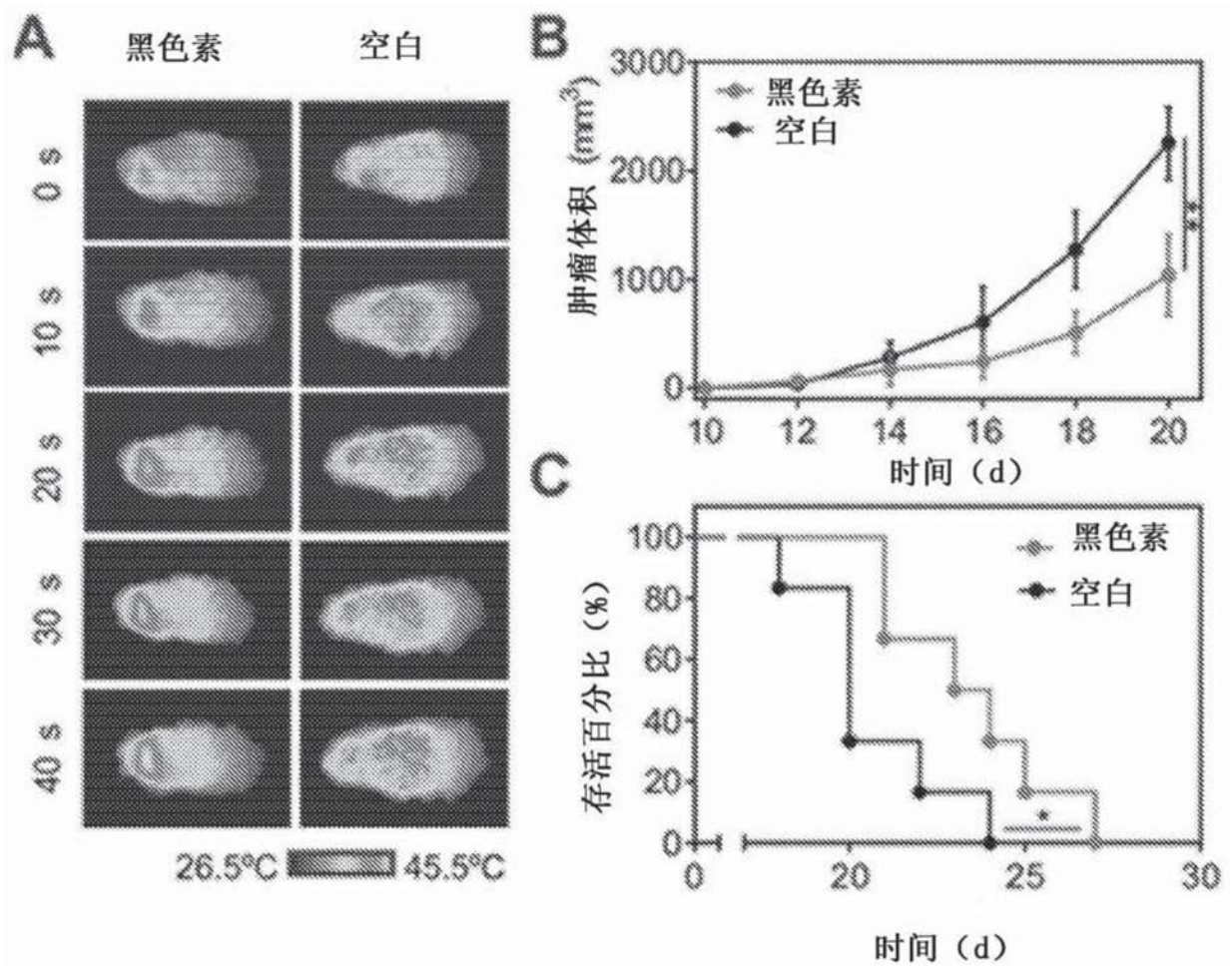


图17A-17C

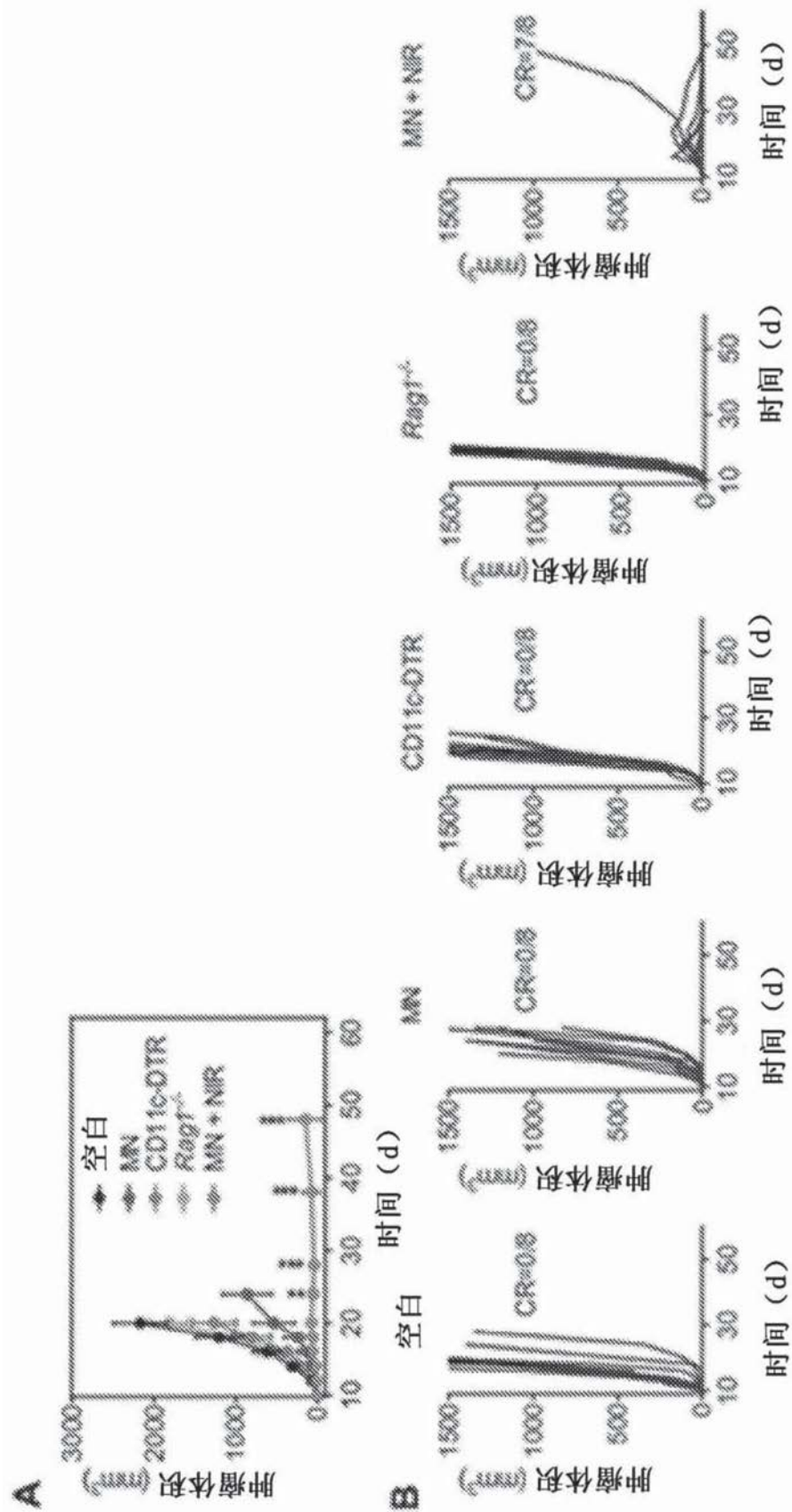


图18A-18B

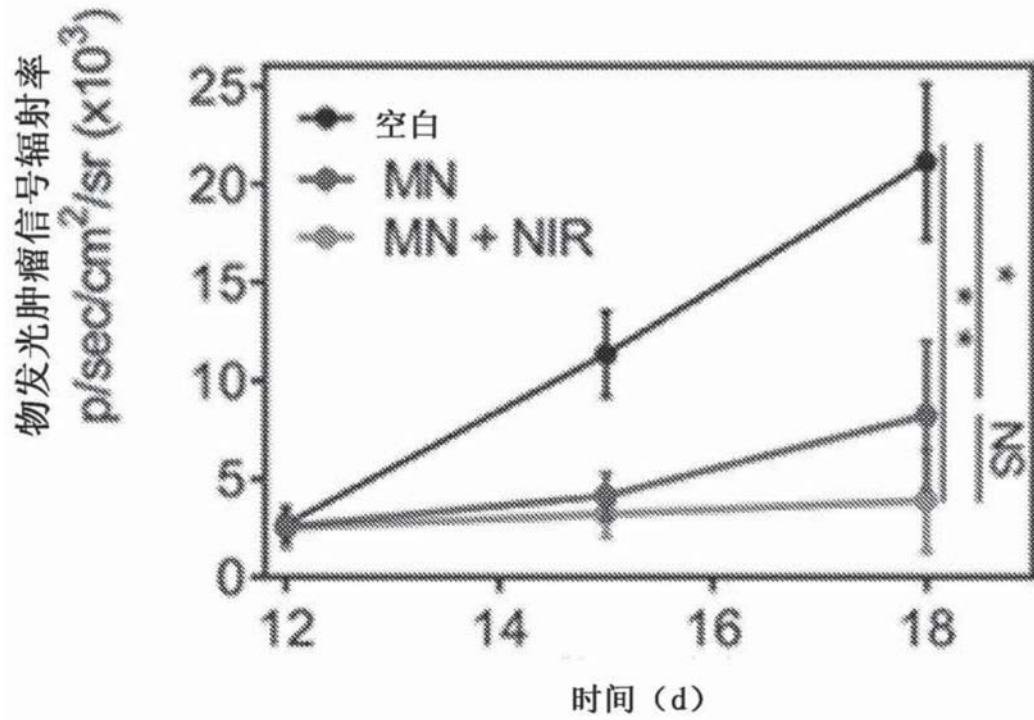


图19

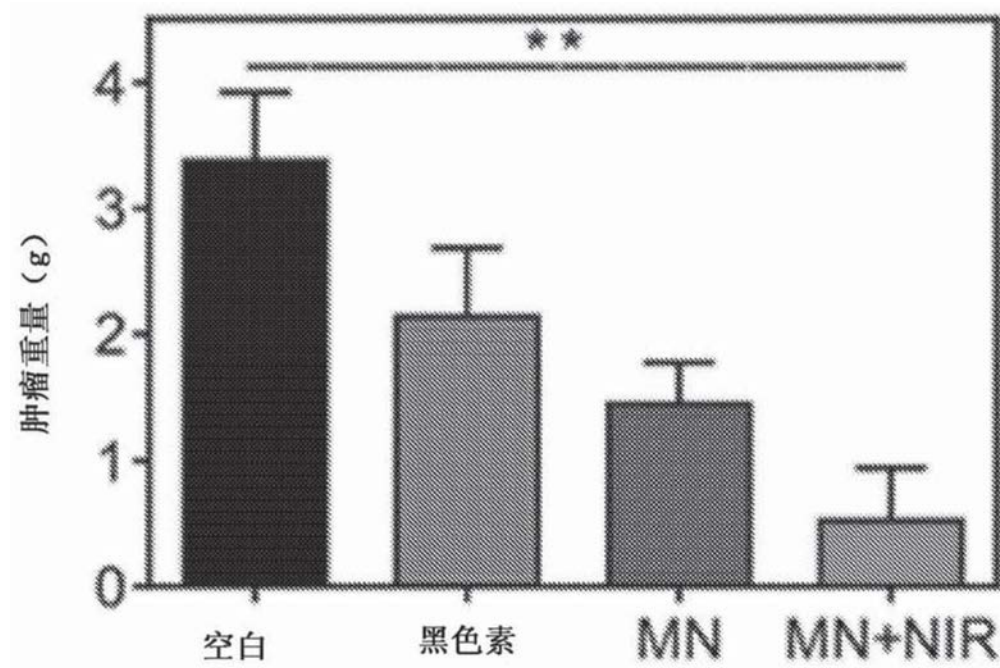


图20

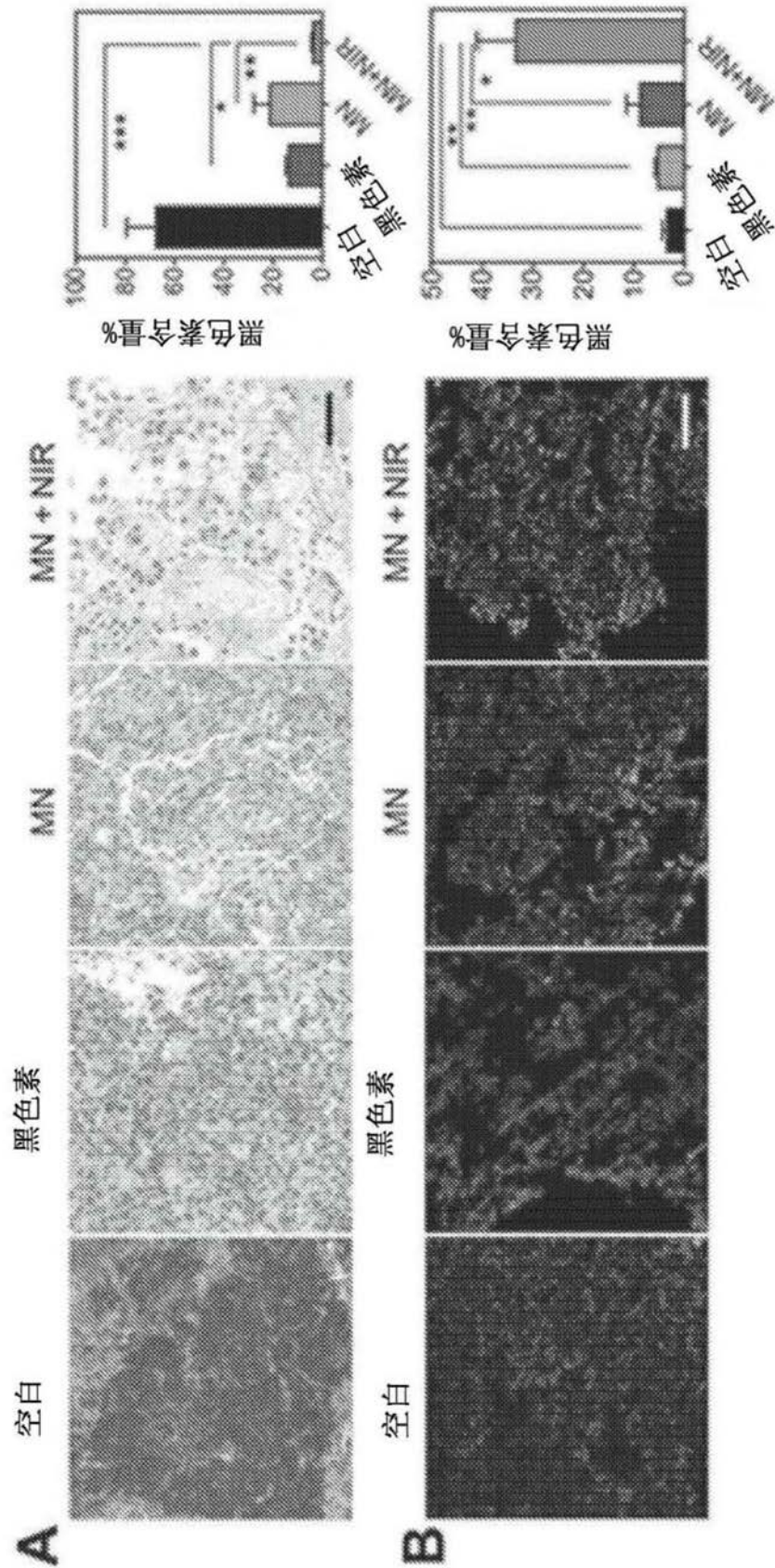


图21A-21B

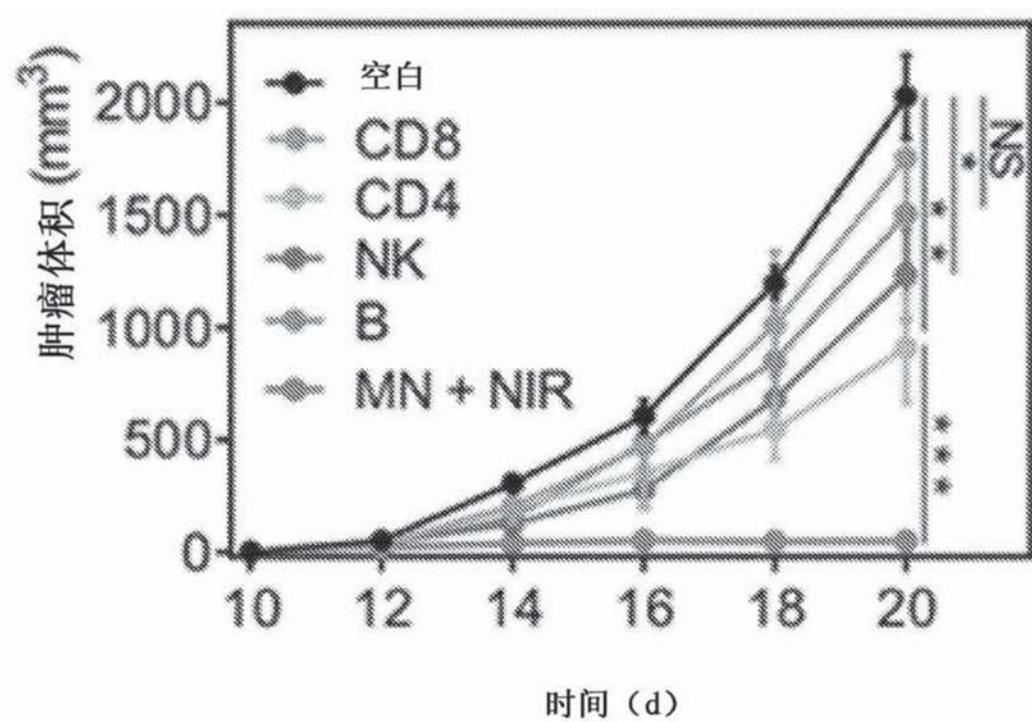


图22

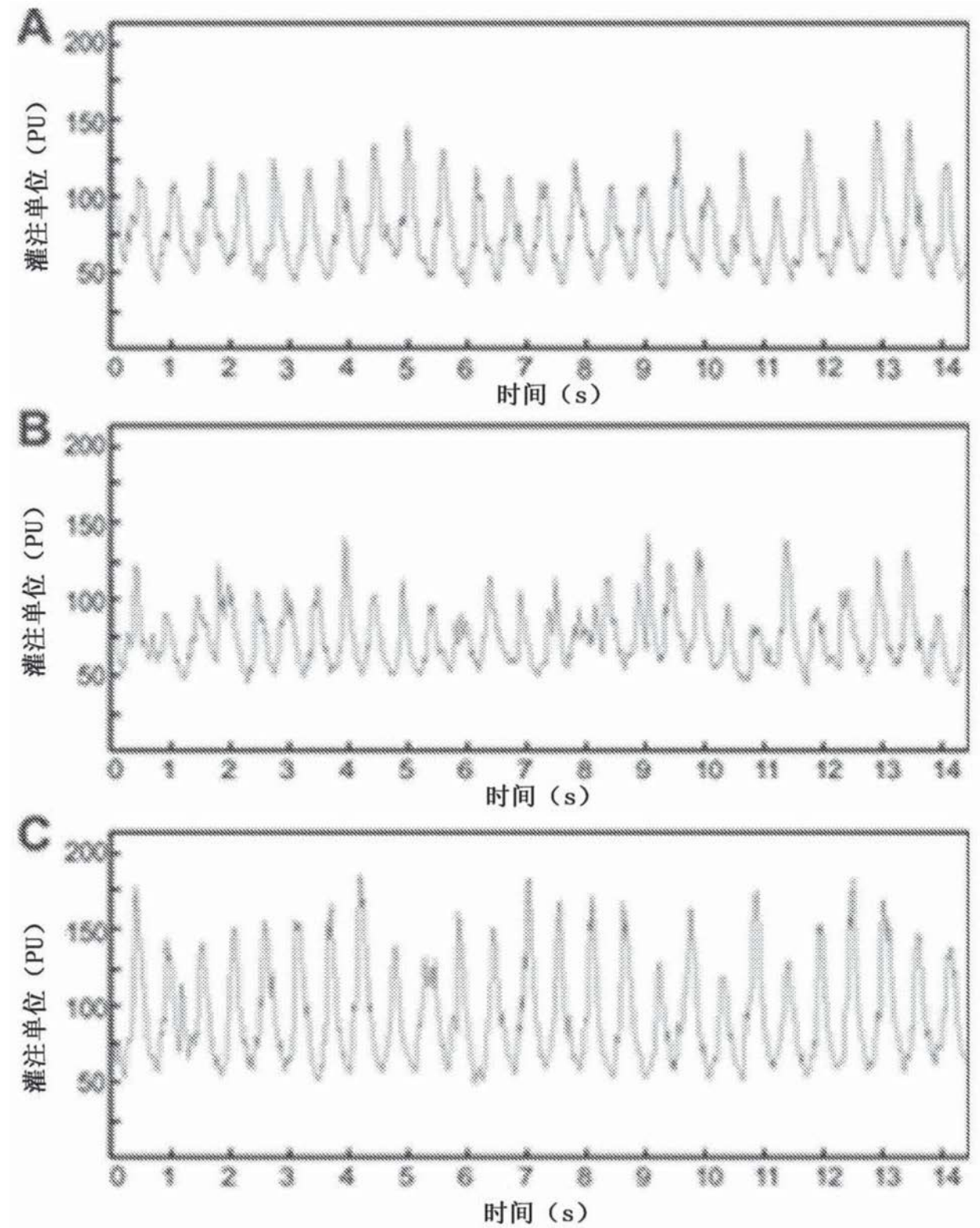


图23A-23C

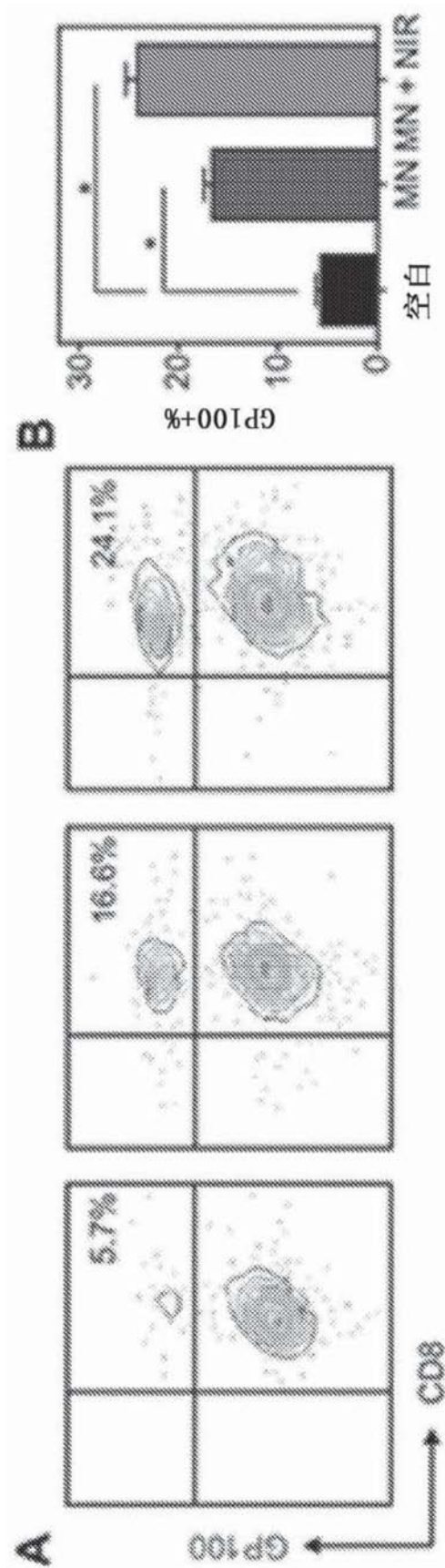


图24A-24B

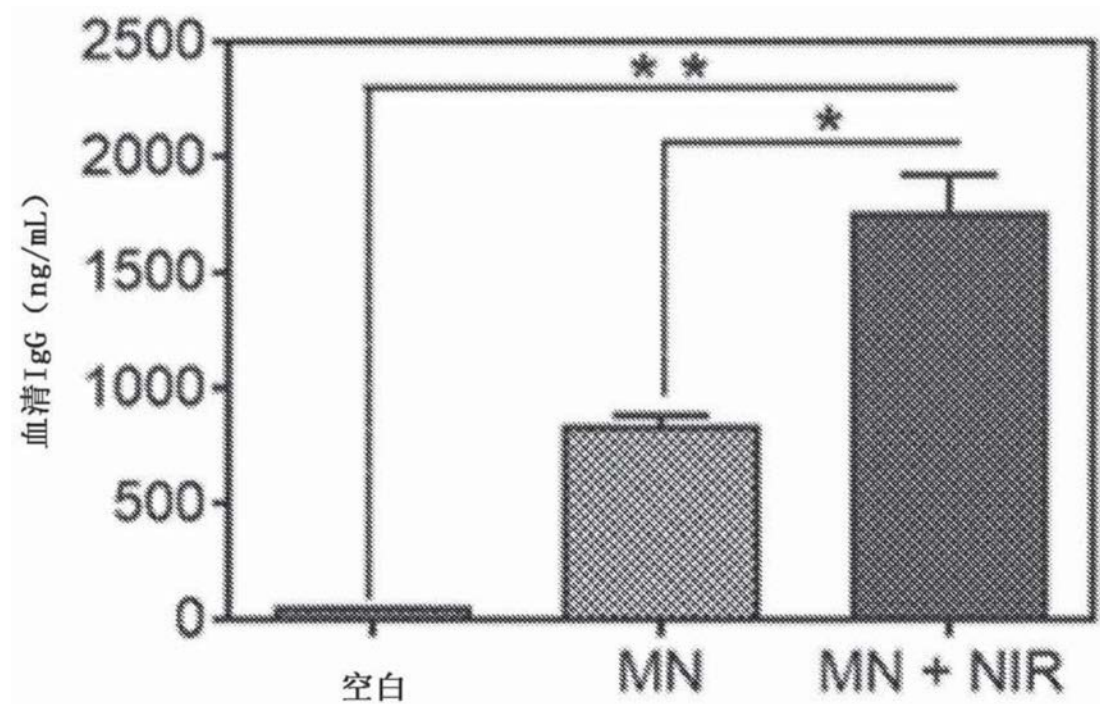


图25

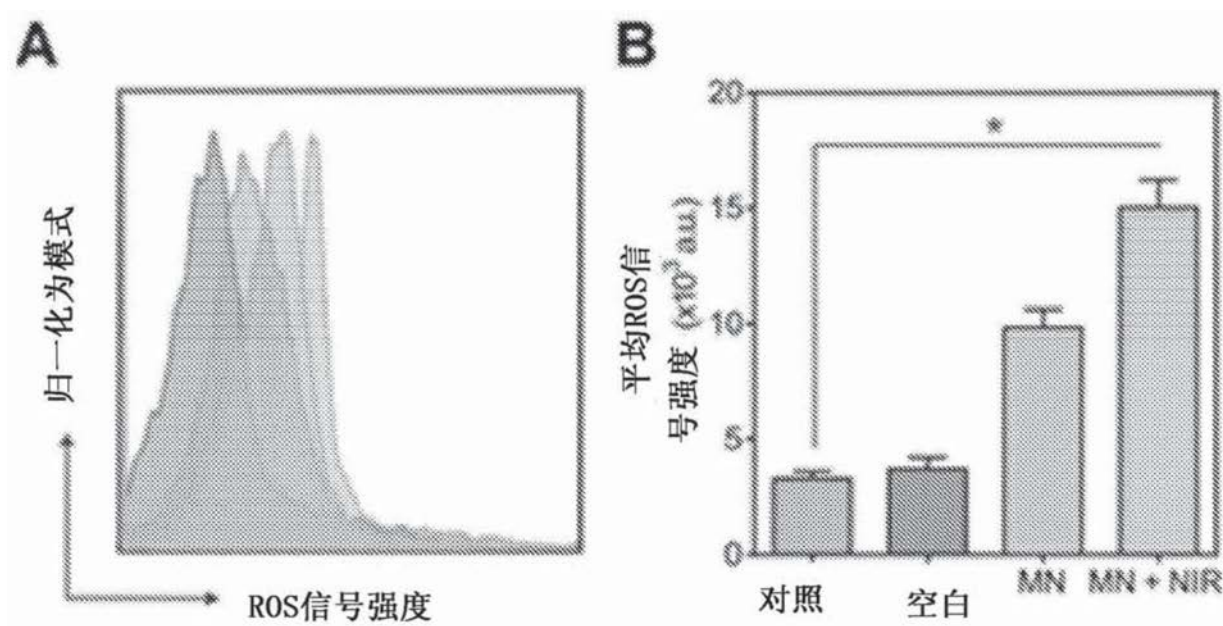


图26A-26B

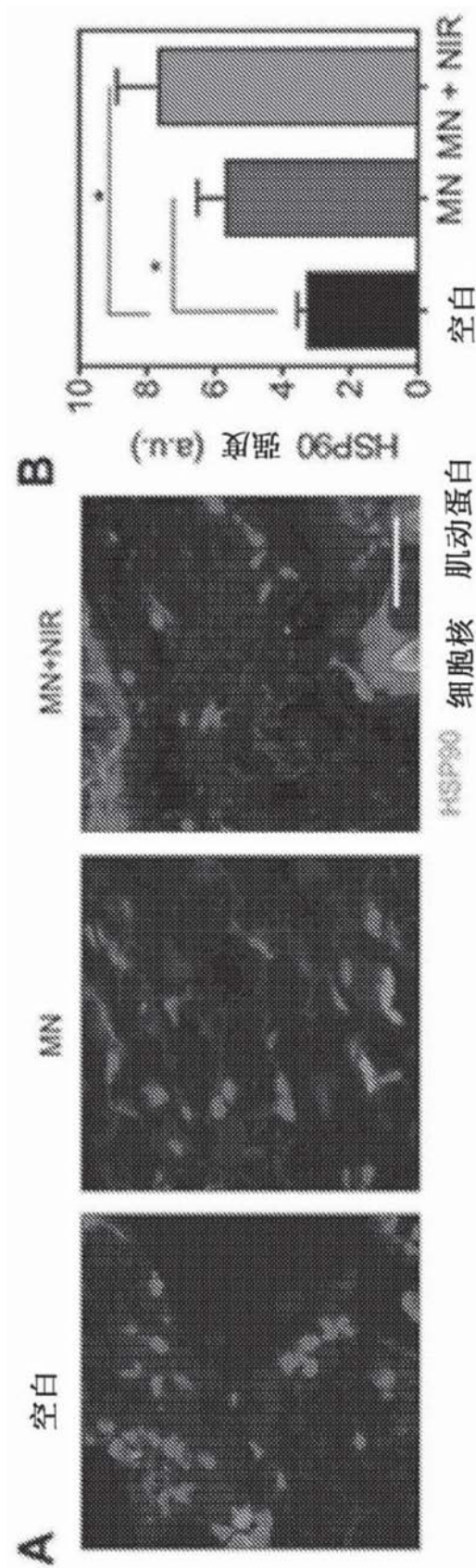


图27A-27B

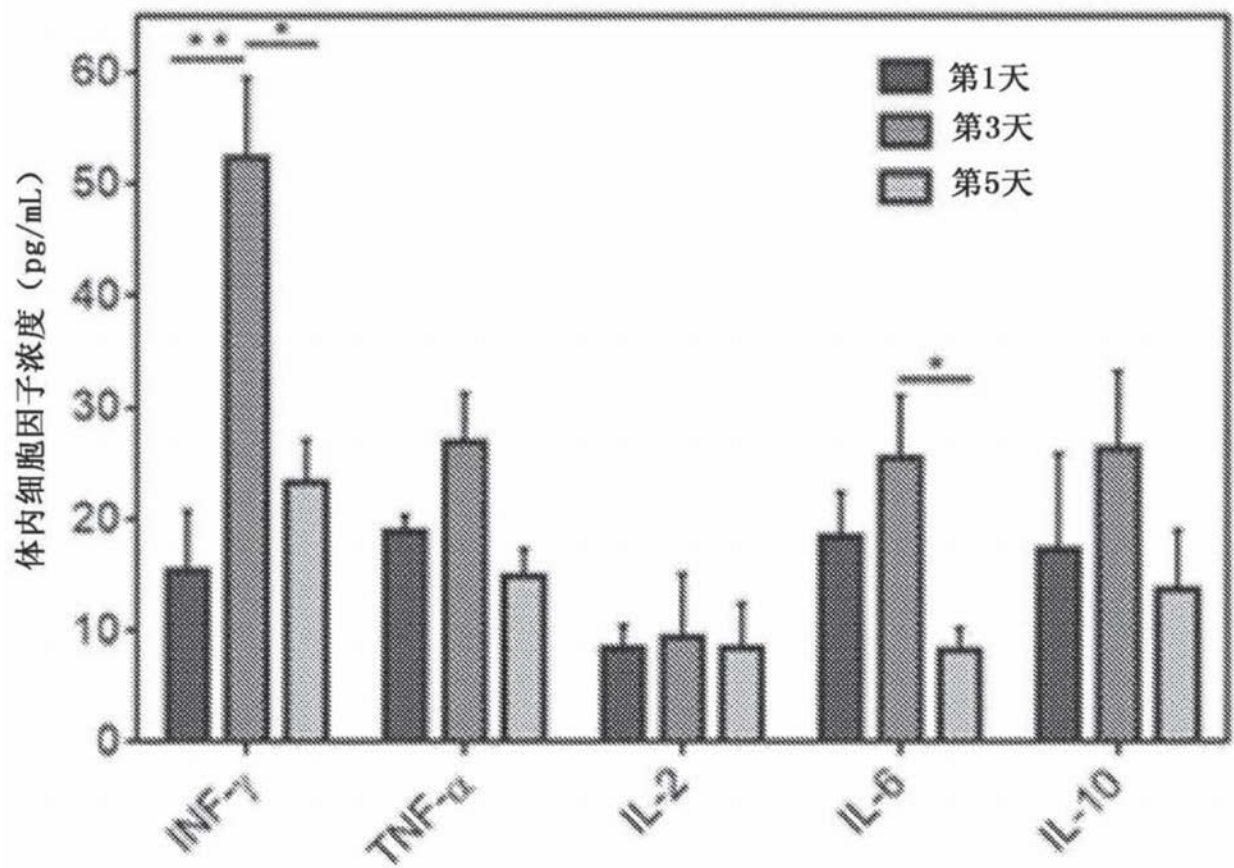


图28

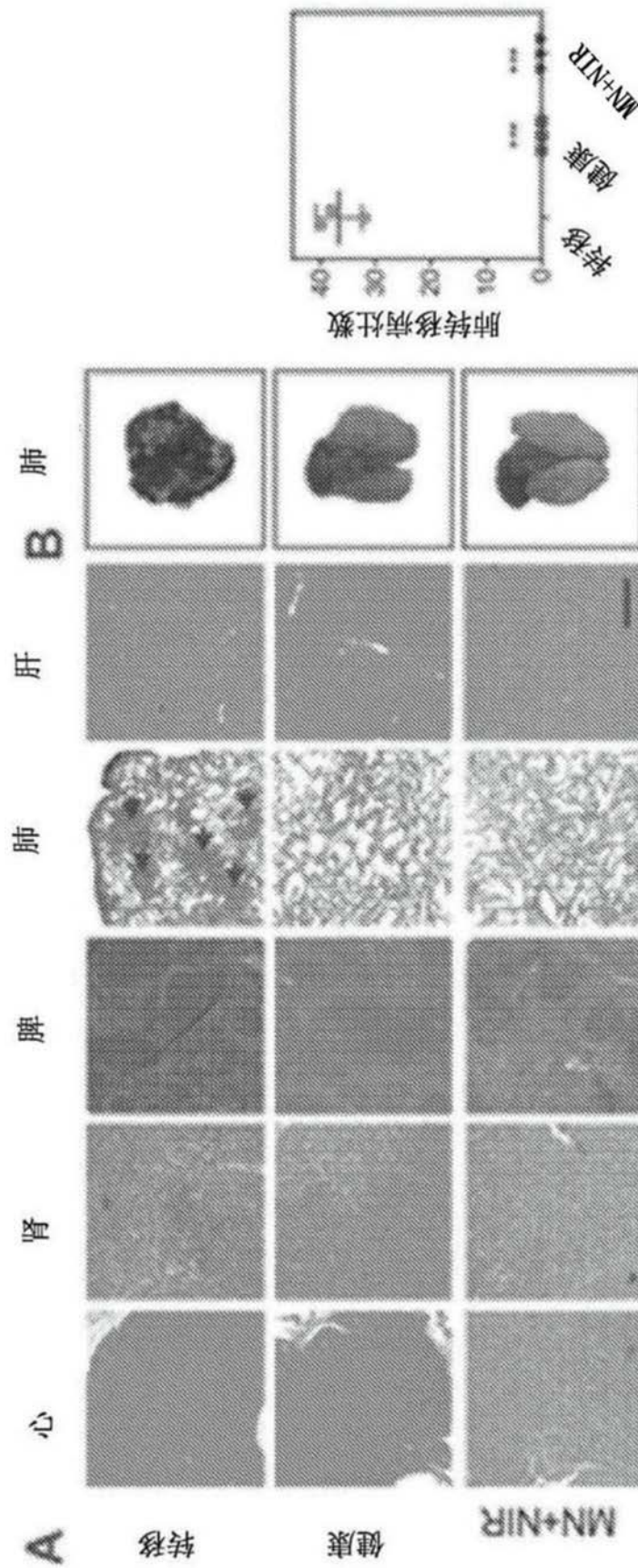


图29A-29B

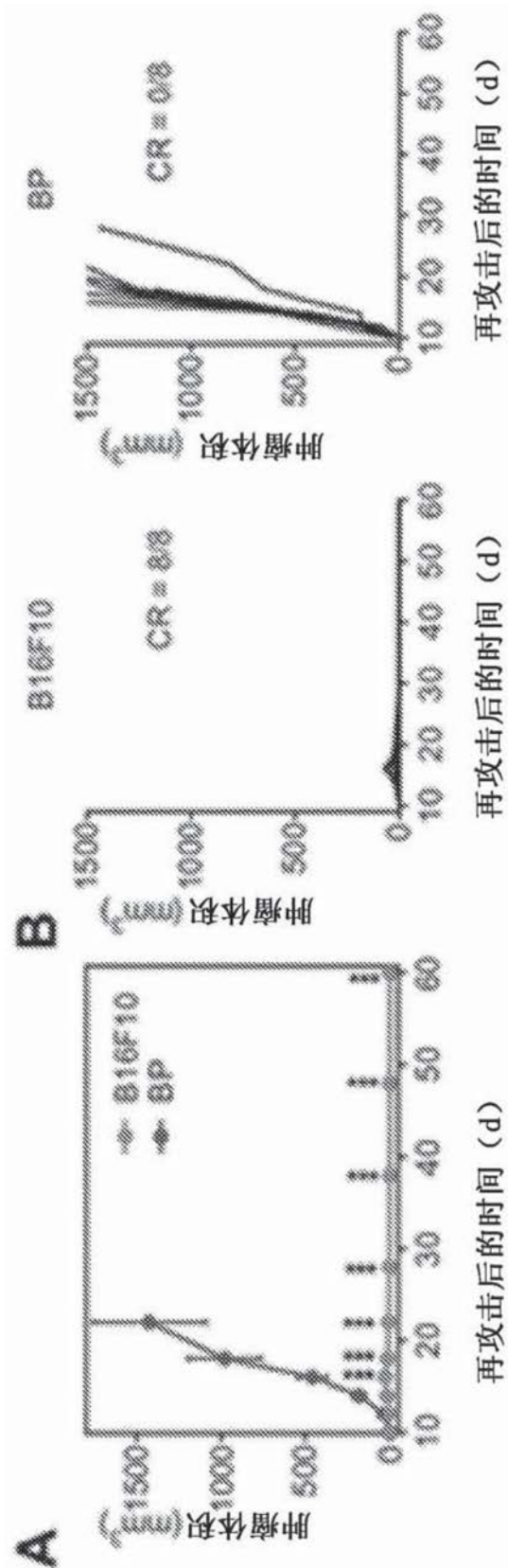


图30A-30B

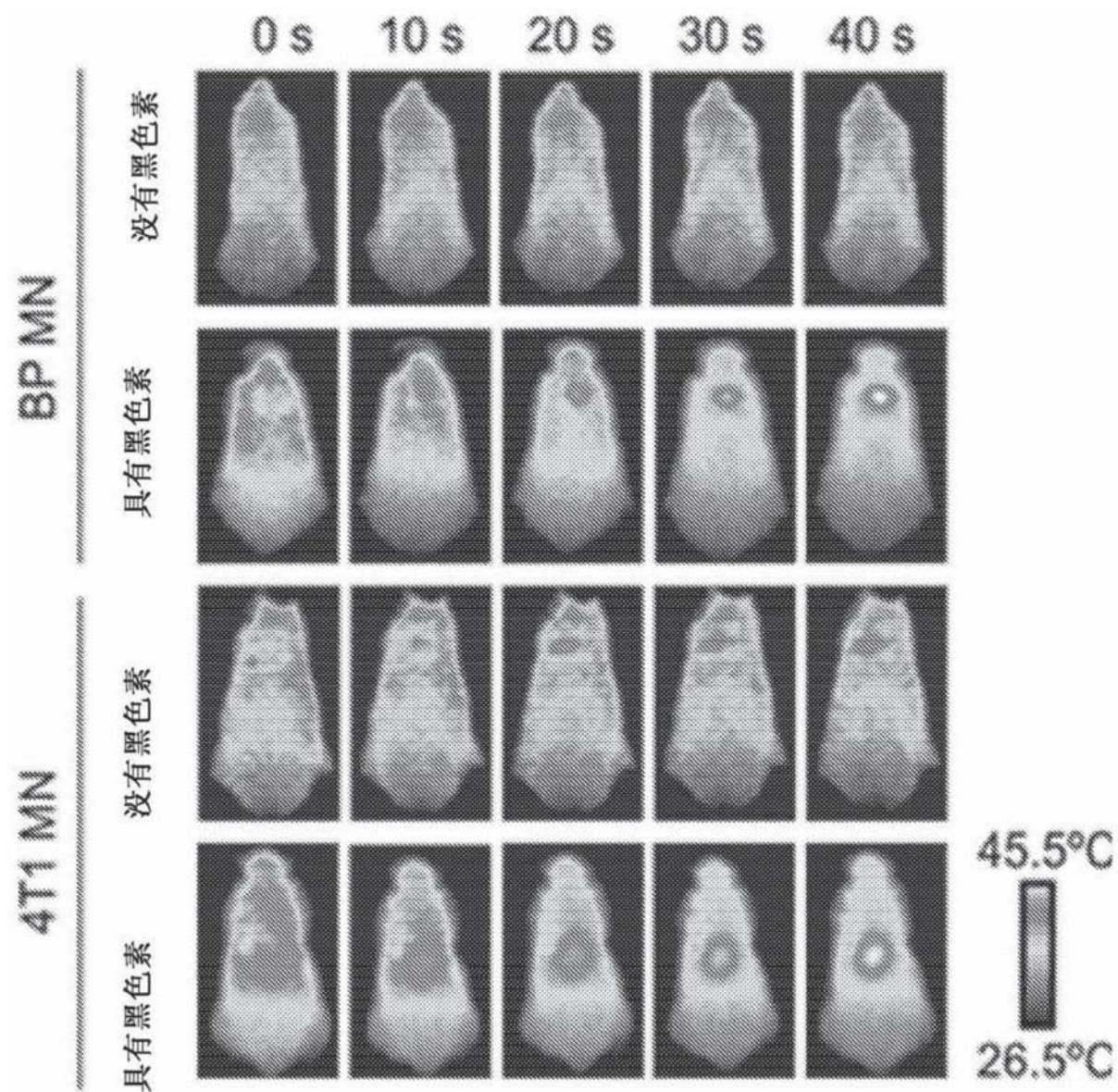


图31

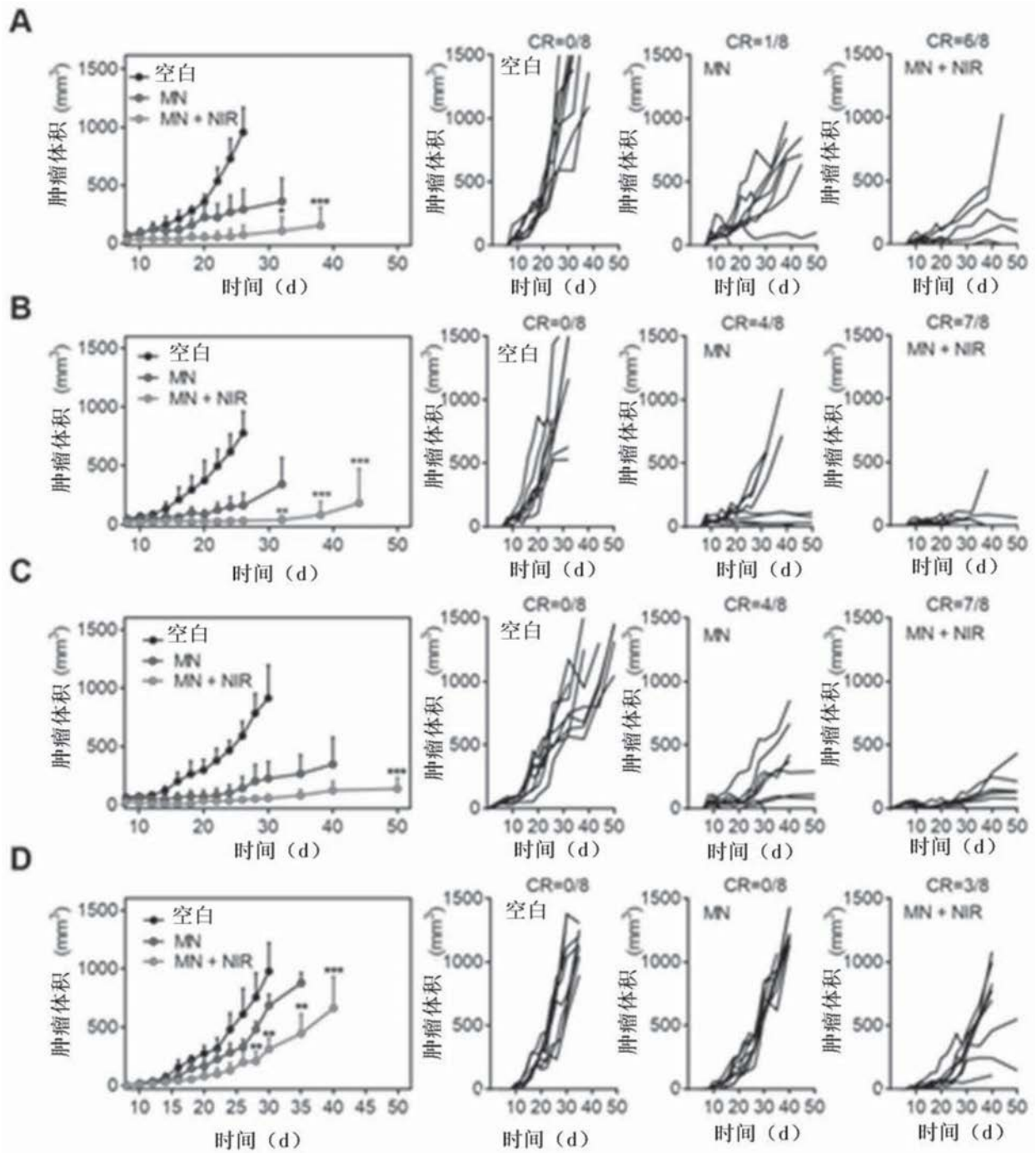


图32A-32D

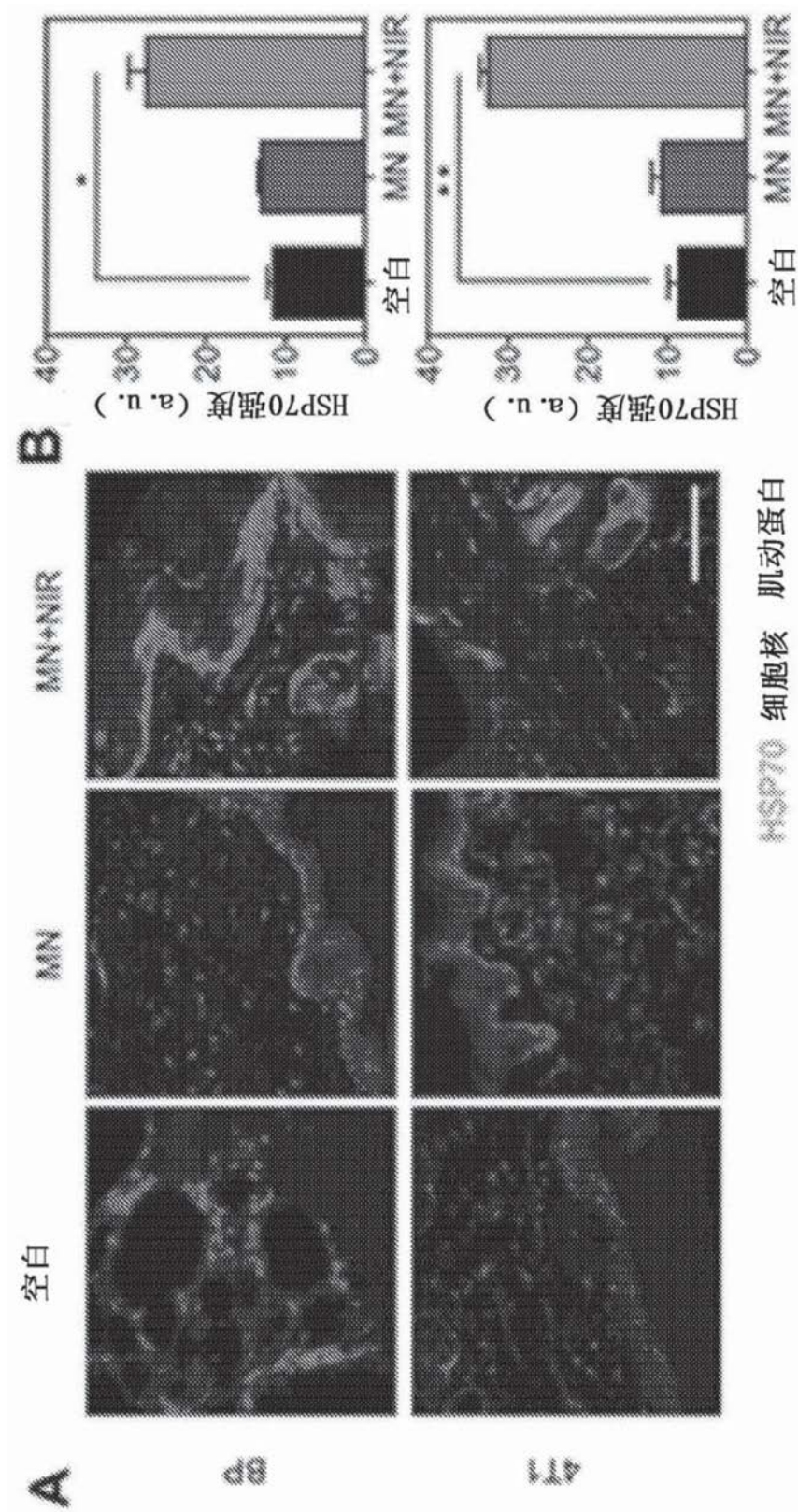


图33A-33B

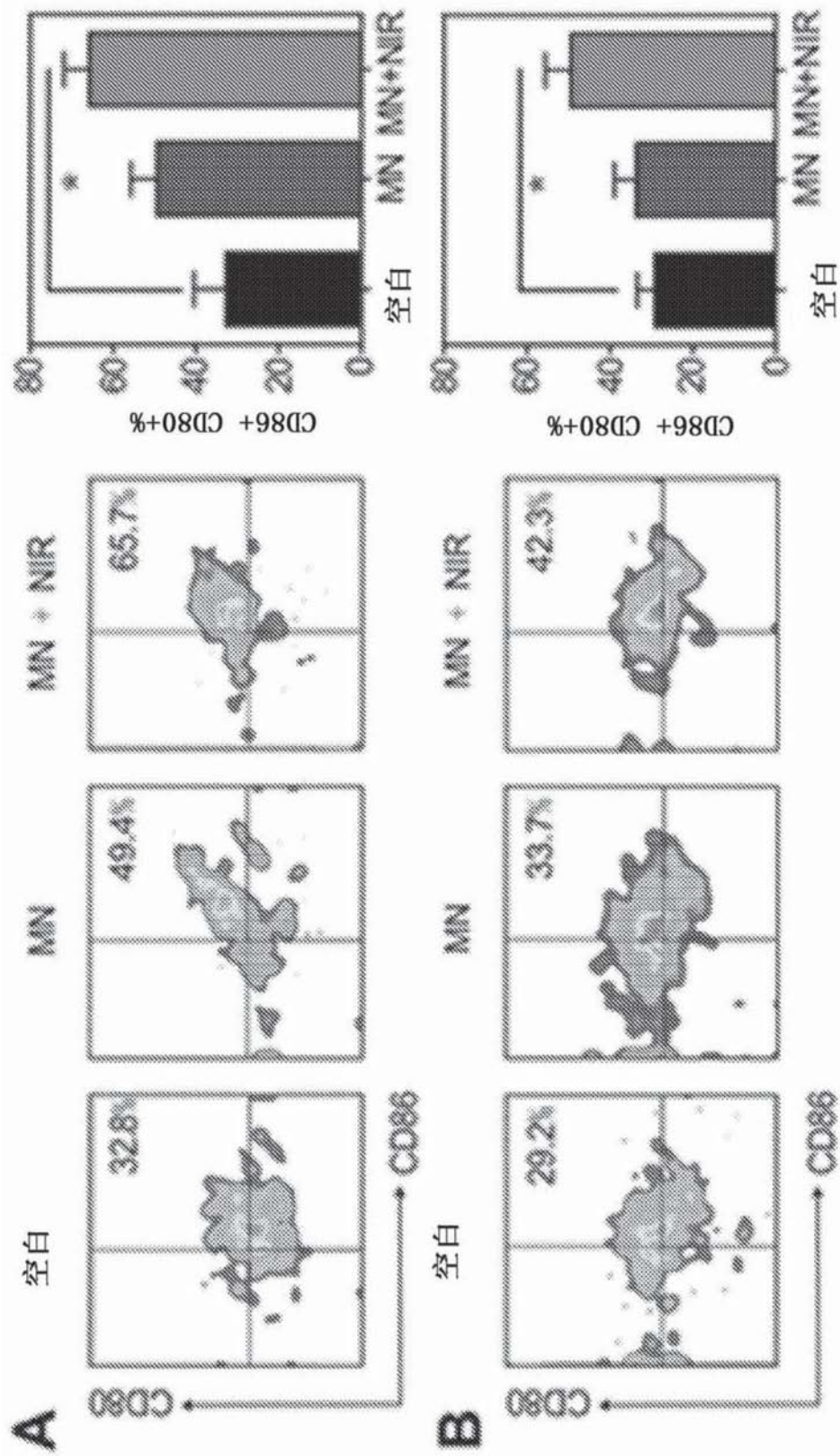


图34A-34B

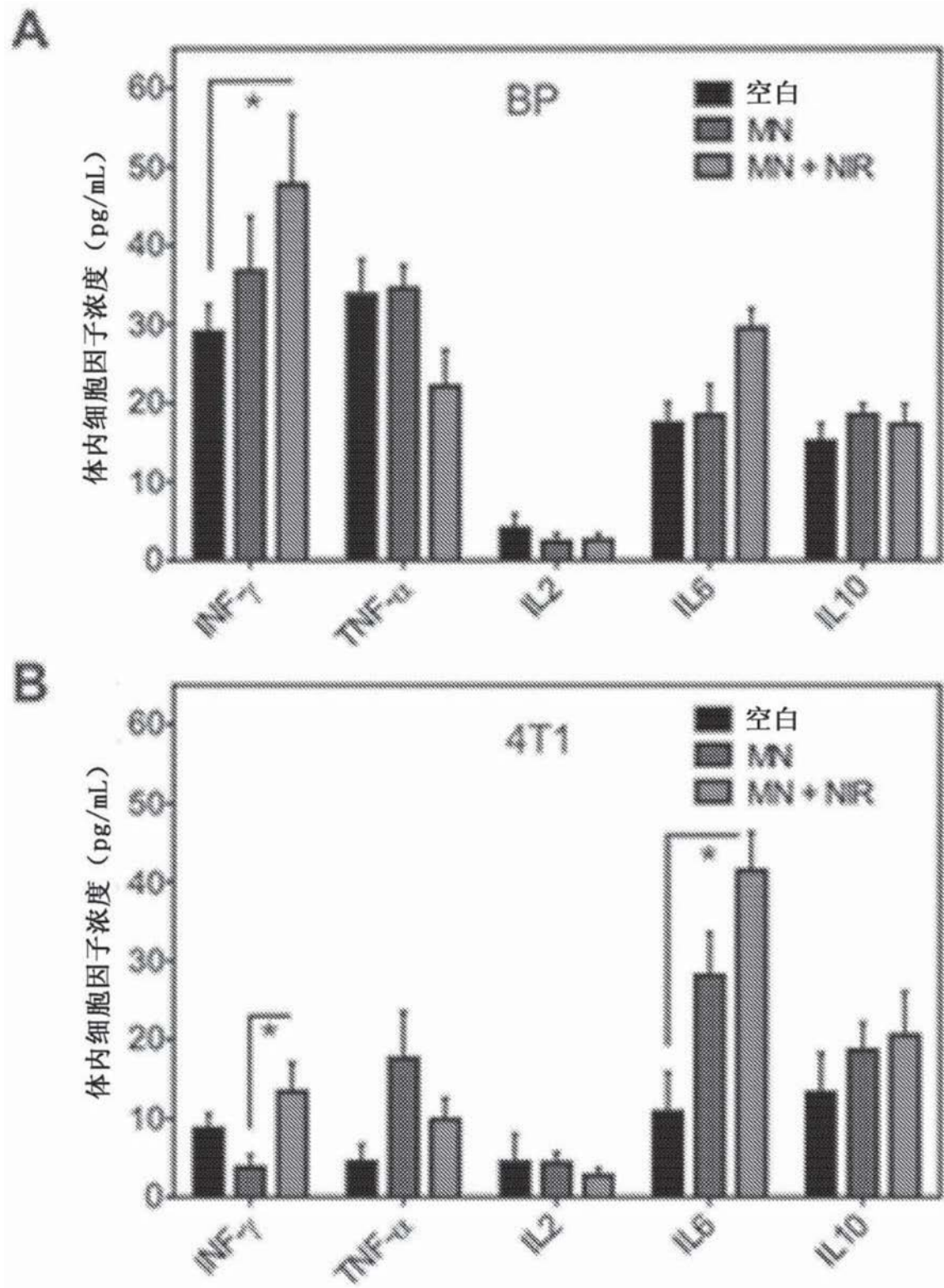


图35A-35B

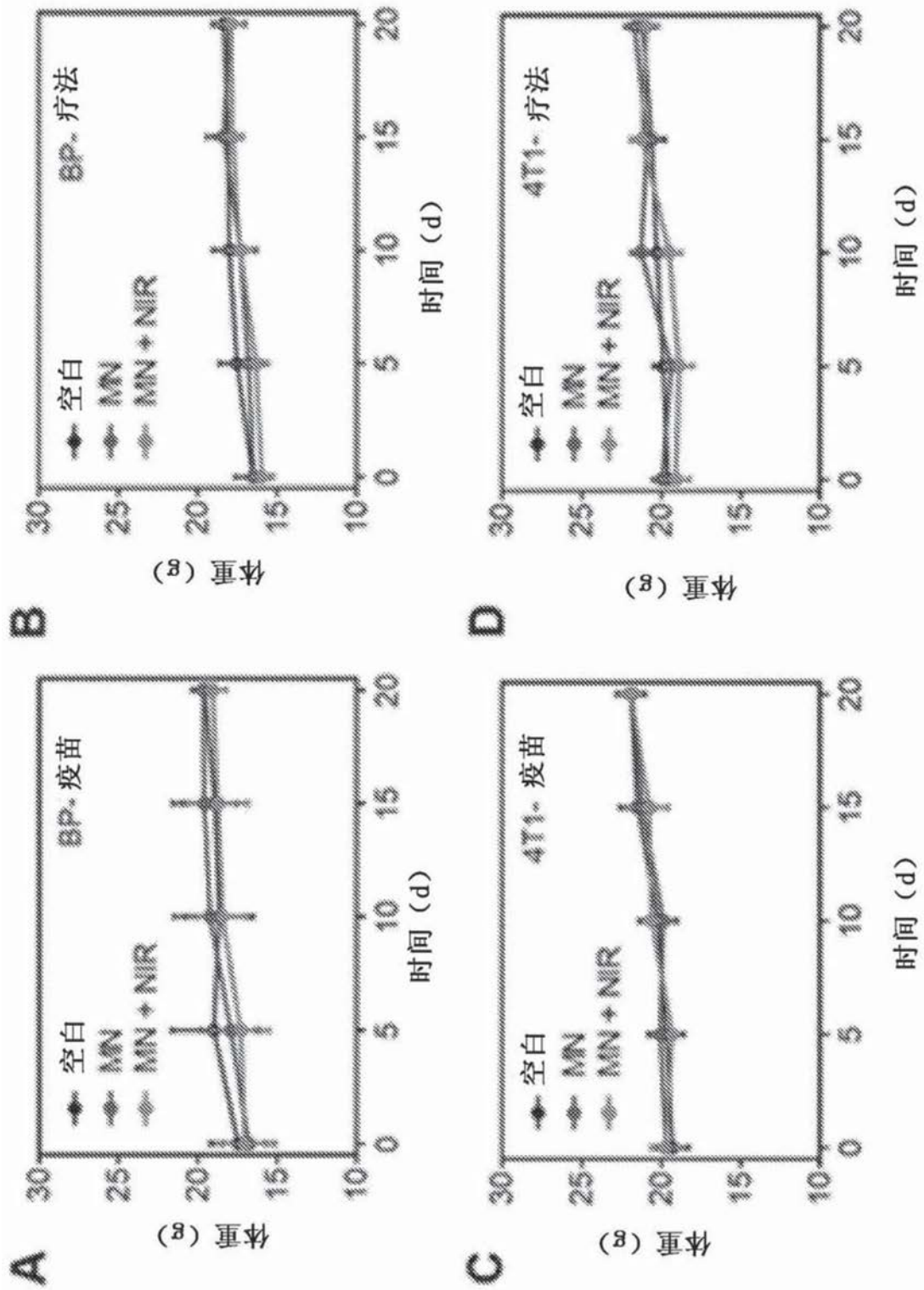


图36A-36D

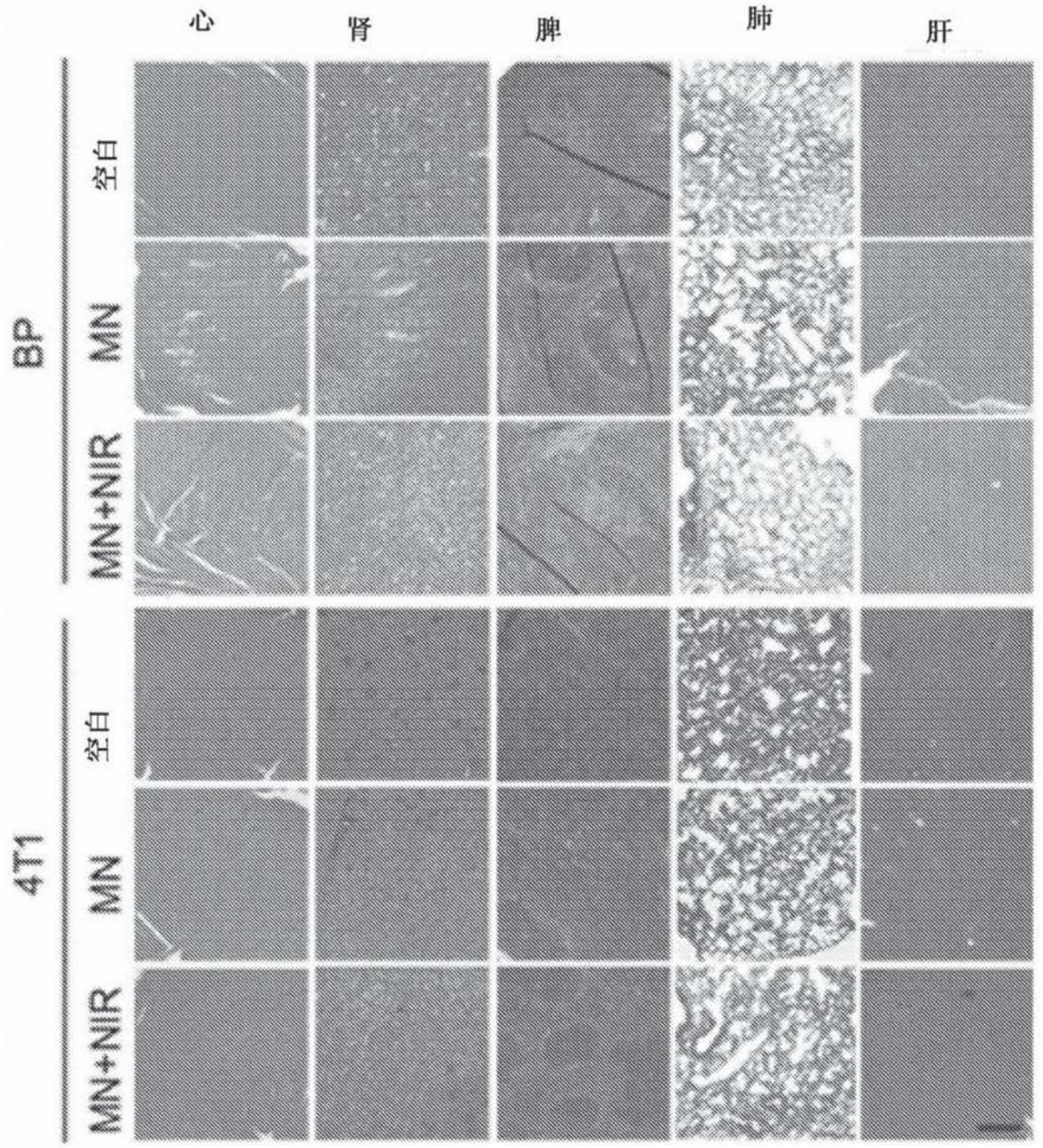


图37