



(21) 申請案號：108108566

(22) 申請日：中華民國 108 (2019) 年 03 月 14 日

(51) Int. Cl. :

*A61P37/04 (2006.01)**A61K9/00 (2006.01)**A61K9/51 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)**A61K31/555 (2006.01)**A61K31/711 (2006.01)**A61K31/713 (2006.01)**A61K38/00 (2006.01)**A61K45/06 (2006.01)**A61K31/215 (2006.01)**A61K31/282 (2006.01)**A61K31/337 (2006.01)*

(30) 優先權：2018/03/15

美國

62/643,618

(71) 申請人：美商艾陶莎基因有限公司 (美國) ATOSSA GENETICS INC. (US)

美國

(72) 發明人：貴 史提芬 C QUAY, STEVEN C. (US)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：50 項 圖式數：0 共 100 頁

(54) 名稱

誘發免疫反應之原位方法

(57) 摘要

本發明係關於用於誘發患有乳癌之個體中免疫反應之管內方法及組合物。該等經管內投與之組合物包括一或多種生物活性劑，能夠誘發抗原呈遞細胞之原位成熟及成熟抗原呈遞細胞遷移至淋巴結。該等管內方法及組合物誘發效應免疫細胞之活化，且增加腫瘤細胞死亡。

The present disclosure relates to intraductal methods and compositions for inducing immune response in subjects having breast cancer. The intraductally administered compositions comprise one or more bioactive agents capable of inducing in situ maturation of antigen presenting cells and migration of mature antigen presenting cells to lymph nodes. The intraductal methods and compositions induce the activation of effector immune cells, and augment tumor cell death.

【發明說明書】

【中文發明名稱】

誘發免疫反應之原位方法

【英文發明名稱】

IN SITU METHODS OF INDUCING IMMUNE RESPONSE

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 先天免疫細胞(例如樹突狀細胞(DC)、巨噬球及天然殺手(NK)細胞)藉由識別「非自我」腫瘤相關抗原(TAA)而涉及癌症免疫監視。該等細胞引發針對TAA之適應性免疫細胞(例如T細胞及B細胞)。此使得產生直接及間接抗癌效應功能，產生抗TAA抗體，殺死癌細胞，且隨後產生能夠排斥擁有相應TAA之腫瘤細胞之免疫性。因此，藉由針對TAA之先天性免疫細胞引發適應性免疫細胞係完全依賴於先天性免疫細胞之抗原呈遞及抗原感應能力之關鍵里程碑。抗原呈遞細胞(APC)適當呈遞「非自我」TAA以引發以及活化適應性免疫細胞之能力係激活強力抗癌免疫性之絕對前提。APC包含樹突狀細胞(DC)、巨噬球及B淋巴球(B細胞)，其中DC係「專職性」APC。

【0002】 為幫助環境感應且實施快速先天性免疫性相關功能，DC擁有各種細胞表面受體及細胞內受體，例如各種清除或吞噬受體(如CD91、整聯蛋白、CD36)、表面模式識別受體(PRR)、類鐸受體(TLR)及細胞內PRR樣NOD樣受體(NLR)。基於DC之PRR幫助檢測(及後續DC刺激)危險信號，如病原體相關分子模式(PAMP)或損害相關分子模式(DAMP)。

【0003】 DC亦具有抗原處理機構。通常，細胞內抗原係由主要組織相容性複合物(MHC)種類I呈遞系統呈現，而細胞外抗原(經由吞噬作用或胞飲作用捕獲)優先經處理用於MHC種類II呈遞。然而，DC能夠「交叉呈遞」抗原。亦即，在DC中，細胞外抗原亦可進入MHC種類I呈遞系統，而細胞內抗原片段亦可發現於MHC種類II分子上(藉由自體吞噬調介)。

【0004】 一般而言，DC以兩種主要狀態存在，亦即穩態不成熟樹突狀細胞(iDC)及完全成熟之DC，該分類係部分地基於發生於表型層面及功能層面上之變化。在DC上調表面共刺激分子(例如CD54、CD80、CD83、CD86及ICOS-L以及MHC種類II分子及CD40)時，達成表型成熟。在功能層面上刺激之DC會分泌細胞介素，其中發炎性或免疫刺激性細胞介素(例如IL-12、IL-6、IL-1 β)及免疫抑制性細胞介素(例如IL-10、TGF- β)之間之平衡取決於存在「自我」抗原或異常「非自我」或「外來」抗原(例如TAA)或病原體之環境背景。

【0005】 在正常健康條件下，DC以不成熟狀態或穩態(iDC)存在且藉由阻止適應性免疫細胞攻擊擁有「自我」抗原之宿主細胞來維持免疫耐受性。iDC展現連續吞噬(胞吞)活性且將「自我」抗原連續呈遞至經極化以促進耐受性或免疫抑制而非朝向效應狀態進行極化之T細胞。該等iDC通常組成型表現低含量之CD40 (Ma等人，*Semin Immunol.* 2009 Oct；21(5): 265-272)。

【0006】 該免疫耐受性係經由免疫檢查點路徑與由DC所提供共刺激信號之完全缺乏的混合來有效誘發及維持，例如諸如OX-40L、細胞毒性T淋巴球相關抗原4 (CTLA4)及程式性細胞死亡蛋白1 (PD1)等配體至T

細胞之基於DC之呈遞導致T細胞無反應性或免疫抑制性T細胞或調控性T細胞(Treg)之分化。

【0007】 另一方面，在DC遇到擁有PAMP之腫瘤抗原、病原體或實體時(部分地經由PRR檢測)，其具有吞噬清除功能，降解「非自我」實體源蛋白以產生加載於MHC種類I及II分子上之適宜抗原性肽，上調共刺激分子，且變成成熟DC，其中假設抗原呈遞功能轉移至淋巴結以用於抗原呈遞至T細胞及B細胞。

【0008】 活化且成熟之DC由此同時提供三組T細胞刺激信號(適當抗原-MHC複合物(信號1，藉由T細胞經由T細胞受體/TCR-CD3之複合物檢測)；表型成熟配體，亦即共刺激分子(信號2，藉由諸如CD28、CD40L等T細胞受體檢測)；及誘導免疫刺激及效應T細胞表型之適宜細胞介素或因子(信號3，藉由各別細胞介素同族受體檢測)，幫助活化相互作用之T細胞中之效應特徵，由此將其極化以用於抗原特異性消除「非自我」實體。DC亦可使用其他功能性免疫刺激因子來誘導效應功能。DC之此成熟及活化對於初始T細胞之活化及分化及免疫反應之生成至關重要。

【0009】 在腫瘤微環境(TME)中，癌細胞積極抑制穩態DC (亦稱為腫瘤浸潤性DC或腫瘤浸潤性樹突狀細胞，「TIDC」)且使其保持於有利於腫瘤之不成熟狀態。TIDC狀態之特徵通常在於：(1)完全不存在或存在可忽略量之經充分處理之癌症抗原(信號1生成受損)，(2)不存在或具有微量表型成熟配體或共刺激分子(消融信號2)，及/或(3)完全不存在或存在較少功能刺激物/免疫刺激細胞介素(如IL-12p70) (消融信號3)。

【0010】 在癌細胞所採用之免疫逃避策略中，一種策略係下調或損失抗原(信號1)。另一策略係低表現共刺激分子(信號2)。較低癌細胞相關

抗原含量或低共刺激分子表現會產生不穩定DC-T細胞相互作用及受損之T細胞免疫性。除抗原及共刺激分子下調外，癌細胞亦經由分泌免疫抑制因子(如IL-10、VEGF、TGF- β 及PGE₂)來直接誘發不成熟TIDC狀態，由此進一步危害穩定DC-T細胞相互作用(信號4)。

【0011】 在過去幾年，基於DC之疫苗日益應用於癌症患者之臨床治療中。然而，大部分抗癌療法(包含基於樹突狀細胞之疫苗)往往誘發非免疫原性或極低免疫原性癌細胞死亡，從而不容許足夠DC刺激且使DC保持於不成熟狀態。舉例而言，某些化學治療劑(如順鉑(cisplatin))或某些抗腫瘤疫苗製備方法(如冷凍解凍)可實際上引起亞最佳DC活化，由此產生一定之缺乏共刺激信號(例如CD40、CD86)或適宜免疫刺激細胞介素(例如IL-12p70)之「過渡」狀態，其可稱為「半成熟」DC。因此，半成熟DC展現小於成功/最佳T細胞活化所需之全部三個信號之信號且由此展現關於T細胞之不穩定界面，從而產生抗癌免疫性之主動消融及純系T細胞無反應性。具有表型成熟差異之半成熟DC能夠分泌幾種細胞介素(如IL-10、IL-6、IL-1 β)及腫瘤壞死因子(TNF) (信號4)中之一或多者。總而言之，iDC及半成熟DC往往促進T細胞無反應性或T細胞耗竭、針對癌細胞之致耐受性及甚至主動促腫瘤生成活性。

【0012】 儘管已藉由全身性遞送成熟劑(如脂多醣)及細胞介素(例如GM-CSF)中在活體內DC成熟方面進行少數嘗試 Smedt等人，j. Exp. Med. 9，第184卷，1413-1424, 1996；Bobanga等人，Vaccines (Basel). 2013 Dec；1(4): 444-462)，但已多次嘗試使用各種涉及分離個體之血液及DC之活體外及離體方法來生成完全成熟之DC (美國專利第5,851,756號、第5,994,126號及第5,475,483號、美國專利第5,866,115號、美國專利

第6,228,640號、U.S. 6,251,665、美國專利第6,121,044號、U.S. 8,932,575、U.S. 7,972,847及U.S. 8691570)。已使用藉由將癌症抗原活體外或離體加載於自體DC上製得之該等基於樹突狀細胞之疫苗來實施關於治療乳癌之研究(Park等人，Cancer Res Treat. 2011 Mar；43(1): 56-66；Maillard等人，Cancer Research 64, 5934-5937, 2004)。基於DC之疫苗之該等活體外或離體製劑面臨與大量生產、有效保存、儲放壽命及配送相關之後勤及監管難題。(Kalinski等人，Immunol Res. 2011 Aug；50(0): 235-247)。另外，交叉呈遞抗原之能力中不同DC子組、DC發育及成熟階段之間有所不同，且受DC活化及成熟之條件影響。儘管通常認為早期DC成熟階段對於抗原攝取及其交叉呈遞而言係最佳的，但腫瘤細胞交叉呈遞之有效性可受用於DC成熟之因子選擇顯著影響。(同上)。

【0013】 另外，該等抗癌療法通常係經血管內或經皮下遞送。然而，投與途徑可影響療法之有效性(Bouvier等人，Front Immunol. 2011；2:71)。本發明提供動員個體之內源性免疫細胞(例如DC)進行抗原呈遞且誘發抵抗乳癌之免疫反應之新穎原位方法，該等方法無需收集個體之血液及分離APC，且消除了與離體DC馴化、活體外大量生產、保存、儲放壽命以及基於抗原呈遞細胞及樹突狀細胞之疫苗之配送相關之難題。本發明將腫瘤駐留iDC及半成熟DC有利地活化及分化至完全成熟，從而容許將腫瘤抗原有效呈遞至T細胞、NK細胞及B細胞，且誘發免疫反應及抗腫瘤免疫性。

【發明內容】

【0014】 提供此發明內容從而以簡化形式引入下文在實施方式中進一步闡述之概念選擇。此發明內容並不意欲鑑別所主張標的物之關鍵特

徵，且亦並不意欲用作對確定所主張標的物之範圍的輔助。

【0015】 本文提供誘發個體中之免疫反應之方法，其包括向個體之乳管經管內投與有效量之包括一或多種生物活性劑之組合物，其中該組合物原位誘發抗原呈遞細胞在乳房中之成熟。在一些實施例中，包括於組合物中之一或多種生物活性劑係選自由以下組成之群之1型極化劑：TLR激動劑(例如TLR3激動劑(例如聚(I:C)、聚腺苷-聚尿苷酸(聚AU)、安普利近(Ampligen) (聚I:聚C (12)U；Hemispherx Biopharma)及經聚-L-離胺酸及羧甲基纖維素穩定之聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚ICLC, Hiltonol®))；TLR4激動劑(例如吡喃葡萄糖基類脂A (G100)、GSK1795091、單磷醯脂質A (MPL)及基於MPL之激動劑(例如葡萄胺糖苷磷酸胺基烷基酯(AGP))、脂多醣(LPS)及類鴉片(例如美沙酮(methadone)、嗎啡-3-葡萄糖醛酸苷))；TLR7-及TLR8激動劑，例如咪唑并喹啉(咪喹莫特(Imiquimod) (3M)及瑞喹莫德(Resiquimod) (R848；3M))；TLR9激動劑，例如(CpG-ODN，例如PF-3512676及諸如此類)、DAMP (例如高遷移率族蛋白B1 (HMGB1))、細胞介素(例如TNF α 、IFN γ 、I型IFN(例如IFN α 或IFN β)、IL-1 β 、IL-2、IL-12)、趨化介素(例如IL-1 β 、CCL2或CCR7配體(例如CCL19、CCL21))及生長因子、mi-RNA (例如miR-155)、共刺激分子激動劑(例如CD-40激動劑(例如抗CD40抗體，例如RO7009789、APX005M、CP-870,893、ABBV-927)、OX-40激動劑(例如抗OX-40抗體MOXR0916、PF-04518600、MEDI0562、MEDI6469及MEDI6383)、環糊精(例如2-羥丙基- β -環糊精)及其組合。

【0016】 在一些實施例中，抗原呈遞細胞係樹突狀細胞。

【0017】 在一態樣中，本發明提供，包括一或多種本文所揭示之生

物活性劑之組合物在個體中誘發抗原呈遞細胞遷移至淋巴結。在一些實施例中，免疫反應包括活化效應T細胞、效應NK細胞、效應B細胞或其組合。在某些實施例中，免疫反應包括抗腫瘤T細胞效應反應、NK細胞效應反應或B細胞抗腫瘤效應反應或其組合。

【0018】 在一些實施例中，效應T細胞包括細胞毒性CD8+ T細胞、CD4+ Th1細胞、記憶性T細胞、T濾泡輔助性(*Tfh*)細胞或其組合。在其他實施例中，免疫反應包括減小免疫抑制。在至少一實施例中，個體之腫瘤大小得以減小。

【0019】 在一態樣中，本發明提供，該等組合物進一步包括有效量之能夠誘發自來(*inbound*)抗原呈遞細胞募集至個體之乳管或乳房組織之生物活性劑，該生物活性劑係選自由以下組成之群：細胞介素及趨化介素(例如IL-1 β 、MCP-1、RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、IL-8、C1q、CCL1 (CCR1配體)、CCL2 (CCR2配體)、CCL5 (CCR5配體)、CCL20 (CCR6配體)、CXCL3 (CXCR3配體)、CXCL4 (CXCR4配體)及CXCL1 (CXCR1配體))、DAMP (例如HMGB1)及TLR激動劑(如TLR3激動劑(例如聚(I:C)、聚腺苷-聚尿苷酸(聚AU)、安普利近(聚I:聚C (12)U；Hemispherx Biopharma)及經聚-L-離胺酸及羧甲基纖維素穩定之聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚ICLC，Hiltonol®))、TLR4激動劑(例如吡喃葡萄糖基類脂A (G100)、GSK1795091、單磷醯脂質A (MPL)及基於MPL之激動劑(例如葡萄胺糖苷磷酸胺基烷基酯(AGP))、脂多醣(LPS)及類鴉片(例如美沙酮、嗎啡-3-葡萄糖醛酸苷))、TLR7/8激動劑(例如咪唑并喹啉(咪喹莫特(3M)及瑞喹莫德(R848；3M)))、TLR9激動劑(例如CpG-ODN，例如PF-3512676及諸如此類))。

【0020】 在某些實施例中，1型極化劑或能夠誘發募集自來抗原呈遞細胞之生物活性劑或二者係TLR3激動劑、TLR4激動劑、TLR7激動劑、TLR8激動劑或TLR9激動劑。

【0021】 在另一態樣中，本發明提供，該等組合物進一步包括有效量之能夠將M2-極化巨噬球樣DC (「M2-DC」)再極化成1型極化DC (「DC1」)之再極化劑，該再極化劑係選自由以下組成之群：芬維A胺 (fenretinide) (4-羥基(苯基)視黃醯胺，4-HPR)；IL-12；IFN γ 、miR127、miR155及miR223、奈米氧化鐵(ferumoxytol)；以下各項之抑制劑：CSF-1、CSF-1R、IL-10、IL-10R、TGF β 、精胺酸酶1 (Arg1)、M2巨噬球清除劑受體(例如A、B、MARCO)、組織蛋白去乙醯酶 (HDACi)、DICER、IRF4/STAT4/STAT6信號傳導路徑；IL-4、IL-13、IL-17、PPAR γ 、KLF4、KLF6、miRNA-146家族成員(例如miRNA-146a)、let7家族成員(例如let-7c)、miRNA-9、miRNA-21、miRNA-47、miRNA-187、CCR-CC12軸信號傳導、CCL2/MCP-1、胎盤生長因子 (PlGF) (HRG)及C/EBP β (PI3K γ 缺失)、AMPK α 1 (二甲雙胍 (metformin))、p50-p50 NF κ B、NADPH氧化酶(NOX) (NOX 1及NOX 2) (例如GKT137831)、Rbpj、Notch信號傳導路徑；CD40及CD40L、IRF1、IRF5、STAT1 (例如IFN γ 、瓦第美贊(vadimezan) (DMXAA))及STAT3之活化劑/激動劑、核因子 κ B活化劑、TLR3、TLR4、TLR7、TLR8及TLR9之類鐸受體(TLR)激動劑(例如咪喹莫特)、合成未甲基化胞嘧啶-鳥嘌呤(CpG)寡去氧核苷酸(CpG-ODN)、(聚I:C)、C792、來非莫德 (lefitolimod) (MGN1703)、SD-101 (Dynavax)、SD-101 (Dynavax)、IMO-2125 (Idera)；p65-p50 NF κ B、MyD88、miR127、miR155及

miR223；或其組合。

【0022】 在另一態樣中，本發明提供，該等組合物進一步包括有效量之能夠減小或防止抗原呈遞細胞發生DC至巨噬球移位之阻斷劑，其中阻斷劑係選自由以下組成之群：CSF-1抑制劑、CSF-1R抑制劑、MCP-1抑制劑、IL-4抑制劑(例如帕考珠單抗(pascalizumab)、皮特克拉(pitakinra)及杜匹魯單抗(dupilumab))、IL-10抑制劑、IL-13抑制劑(例如安蘆珠單抗(anrukinzumab)、來金珠單抗(lebrikizunab)及曲洛青單抗(tralokinumab))、IL-4/IL-13雙重抑制劑(例如杜普麗單抗(duplimab))、類前列腺素抑制劑(例如PGE3抑制劑)、STAT3抑制劑(例如索拉菲尼(sorafenib)、舒尼替尼(sunitinib)、WP1066及白藜蘆醇(resveratrol))及STAT6抑制劑(例如芬維A胺(4-HPR)、來氟米特(leflunomid)、TMX264及AS1217499)或其組合。

【0023】 在再一態樣中，該等方法包括向個體投與有效量之選自由以下組成之群之其他治療劑：抗激素(例如抗雌激素或抗雌激素受體，例如他莫昔芬(tamoxifen)、順式他莫昔芬、因多昔芬(endoxifen)、去甲基他莫昔芬(desmethyiltamoxifen)、拉索昔芬(lasofloxifene)、雷洛昔芬(raloxifene)、苯并噻吩、巴多昔芬(bazedofloxifene)、阿佐昔芬(arzoxifene)、米潑昔芬(miproxifene)、左美洛昔芬(levormeloxifene)、屈洛昔芬(droloxifene)、氯米芬(clomifene)、艾多昔芬(idoxifene)、托瑞米芬(toremifene)、EM652及ERA-923、氟維司群(fulvestrant)、ARN-810或CH498、阿那曲唑(anastrozole)、依西美坦(exemestane)及來曲唑(letrozole))、類固醇、蔥環、甲狀腺激素代替藥物、細胞毒性劑(例如烷基化劑(例如替莫唑胺(temozolomide)及環磷醯胺(cyclophosphamide))、

蔥環(例如多柔比星(doxorubicin)、聚乙二醇化脂質體多柔比星、表柔比星(epirubicin)、伊達比星(idarubicin)及諸如此類)、蔥二酮(例如米托蔥醌(mitoxantrone))、鉑藥物(例如順鉑、卡鉑(carboplatin)、奧沙利鉑(oxaliplatin)、奧馬鉑(ormaplatin)、恩洛鉑(enloplatin)及諸如此類)、紫杉烷(taxane) (例如太平洋紫杉醇(paclitaxel)))、抗有絲分裂藥、博來黴素(bleomycin)、硼替佐米(bortezomib)、帕土匹龍(patupilone)、鈣網織蛋白(calreticulin)、廣譜細胞死亡劑(例如棉子酚(glossypol)、茶酚(例如表沒食子兒茶素-3-沒食子酸酯)、7-溴靛玉紅-3'-脞(7BIO) -、致癌RAS、大環內酯、小檗鹼(Berberine) (衍生自植物之異喹啉生物鹼)、UMI-77、雷公藤內酯(triptolide)及舍利克爾(selinexor))、細胞外核苷酸酶之廣譜抑制劑(例如ARL67156、替莫唑胺、環磷醯胺、馬磷醯胺(mafosfamide)、多柔比星、表柔比星、伊達比星、米托蔥醌、奧沙利鉑、太平洋紫杉醇、博來黴素、硼替佐米、溶瘤病毒、帕土匹龍)、酪胺酸磷酸化抑制劑(Tyrphostin) AG 490 (傑納斯(Janus)活化激酶2/信號轉導劑及轉錄活化劑-3 (JAK2/STAT3)抑制劑)、DNA低甲基化劑(例如阿紮胞苷(azacitidine)或地西他濱(decitabine))、胸苷酸靶向藥(例如多西他賽(docetaxel)、吉西他濱(gemcitabine))、曲妥珠單抗(trastuzumab)、阿多-曲妥珠單抗艾坦辛(ado-trastuzumab emtansine)、帕妥珠單抗(pertuzumab)、阿貝西利(abemaciclib)、帕博西尼(palbociclib)、抗IL-10抑制劑、抗TGF- β 抑制劑、檢查點抑制劑(如PD-1抑制劑，例如抗PD-1抗體(例如尼沃魯單抗(Nivolumab))；PD-1L抑制劑，例如抗PD-1L (例如阿替珠單抗(atezolizumab) (MPDL3280)、阿維魯單抗(Avelumab) (MSB0010718C)、德瓦魯單抗(Durvalumab)、MDX-1105)；CTLA-4抑

制劑，例如抗CTLA4抗體(例如伊匹單抗(Ipilimumab))；LAG-3抑制劑，例如抗LAG-3抗體(例如IMP321、BMS-986016及GSK2831781)；OX-40激動劑，例如MOXR0916、PF-04518600、MEDI0562、MEDI6469及MEDI6383；TIM抑制劑及IDO抑制劑)、CCR4抑制劑、FoxP3抑制劑、細胞療法(例如嵌合抗原受體/T細胞(CAR-T)療法及其他過繼性細胞療法)或其組合。

【0024】 其他治療劑可位於單獨組合物中。在一些實施例中，其他治療劑包括於任一包括一或多種生物活性劑、能夠誘發APC募集之生物活性劑、再極化劑或阻斷劑或其任一組合之組合物中。

【0025】 在某些實施例中，向個體經管內投與有效量之包括TLR9激動劑及OX-40激動劑之組合物。在一些實施例中，TLR9激動劑係介於0.01 $\mu\text{g/mL}$ 至20 mg/mL 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 至15 mg/mL 、1 $\mu\text{g/mL}$ 至10 mg/mL 、10 $\mu\text{g/mL}$ 至5 mg/mL 、50 $\mu\text{g/mL}$ 至1 mg/mL (每單位劑量)之間之CPG-ODN，且OX-40激動劑抗體介於0.01 mg/mL 至50 mg/mL 、0.1 mg/mL 至40 mg/mL 、0.5 mg/mL 至30 mg/mL 及1 mg/mL 至25 mg/mL (每單位劑量)之間。

【0026】 在某些實施例中，向個體經管內投與有效量之包括TLR3激動劑及IFN α 之組合物。在一些實施例中，TLR3激動劑係介於0.01 $\mu\text{g/mL}$ 至50 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 至40 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 至25 $\mu\text{g/mL}$ 及1 $\mu\text{g/mL}$ 至20 $\mu\text{g/mL}$ 之間之聚(I:C)，且IFN α 介於1 $\mu\text{g/mL}$ 至300 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 至250 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 至200 $\mu\text{g/mL}$ 及50 $\mu\text{g/mL}$ 至150 $\mu\text{g/mL}$ (每單位劑量)之間。

【0027】 在某些實施例中，向個體投與有效量之包括 α DC混合劑

TNF α 、IL-1 β 、IFN γ 、IFN α -2b及聚(I:C)之組合物。在一些實施例中，TNF α 介於0.05 $\mu\text{g/mL}$ 至150 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 至100 $\mu\text{g/mL}$ 及0.5 $\mu\text{g/mL}$ 至50 $\mu\text{g/mL}$ (每單位劑量)之間；IL-1 β 介於0.01 $\mu\text{g/mL}$ 至20 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 至15 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 至10 $\mu\text{g/mL}$ 及1 $\mu\text{g/mL}$ 至10 $\mu\text{g/mL}$ (每單位劑量)之間；IFN γ 介於1 $\mu\text{g/mL}$ 至100 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 至80 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 至75 $\mu\text{g/mL}$ 及50 $\mu\text{g/mL}$ 至75 $\mu\text{g/mL}$ 之間；IFN α 介於1 $\mu\text{g/mL}$ 至300 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 至250 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 至200 $\mu\text{g/mL}$ 及50 $\mu\text{g/mL}$ 至150 $\mu\text{g/mL}$ (每單位劑量)之間；且聚(I:C)介於0.01 $\mu\text{g/mL}$ 至50 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 至40 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 至25 $\mu\text{g/mL}$ 及1 $\mu\text{g/mL}$ 至20 $\mu\text{g/mL}$ (每單位劑量)之間。

【0028】 在另一態樣中，本發明提供誘發個體中之抗原呈遞細胞之遷移之方法，其包括向個體之乳管經管內投與有效量之包括一或多種生物活性劑之組合物，其中該組合物中所包括之至少一種生物活性劑能夠在個體中誘發抗原呈遞細胞遷移至淋巴結。

【0029】 在一些實施例中，一或多種生物活性劑係選自由以下組成之群之1型極化劑：TLR激動劑(例如TLR3激動劑(例如聚(I:C)、聚腺苷-聚尿苷酸(聚AU)、安普利近(聚I:聚C (12)U；Hemispherx Biopharma)及經聚-L-離胺酸及羧甲基纖維素穩定之聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚ICLC，Hiltonol®))；TLR4激動劑(例如吡喃葡萄糖基類脂A (G100)、GSK1795091、單磷醯脂質A (MPL)及基於MPL之激動劑(例如葡萄胺糖苷磷酸胺基烷基酯(AGP))、脂多醣(LPS)及類鴉片(例如美沙酮、嗎啡-3-葡萄糖醛酸苷))；TLR7激動劑及TLR8激動劑(例如咪唑并喹啉(咪喹莫特(3M)及瑞喹莫德(R848；3M)))；TLR9激動劑(例如CpG-ODN，例如PF-

3512676及諸如此類)、DAMP (例如HMGB1)、細胞介素(例如TNF α 、IFN γ 、類型I IFN (例如IFN α 或IFN β)、IL-1 β 、IL-2、IL-12p70)、趨化介素(例如IL-1 β 、MIP-3 β 、CCL2、CCL19、CCL21或任何CCR7配體)及生長因子、mi-RNA (例如miR-155)、共刺激分子激動劑(例如CD-40激動劑(例如抗CD40抗體，例如RO7009789、APX005M、CP-870,893、ABBV-927)、OX-40激動劑(例如抗OX-40抗體，MOXR0916、PF-04518600、MEDI0562、MEDI6469及MEDI6383)、環糊精(例如2-羥丙基- β -環糊精)及其組合。

【0030】 在某些實施例中，至少一種能夠在個體中誘發抗原呈遞細胞遷移至淋巴結之生物活性劑係IL-1 β 、MIP-3 β 、CCL2、CCR7配體(例如CCL19及CCL21)、LMP1、LMP1-CD40、LMP1-OX40激動劑、CD40L、MMP9、DAMP (例如HMGB1)或其組合。在某些實施例中，抗原呈遞細胞係樹突狀細胞。

【0031】 在一些實施例中，抗原呈遞細胞遷移至淋巴結可活化細胞毒性CD8⁺ T細胞、CD4⁺ Th1細胞、記憶性T細胞、記憶性B細胞、Thf細胞、NK細胞或其任一組合。在一些實施例中，本文所揭示之方法及組合物誘發個體中之抗腫瘤免疫反應。抗腫瘤免疫反應包括活化細胞毒性CD8⁺ T細胞、CD4⁺ Th1細胞、NK細胞、B細胞或其組合所達成之乳房腫瘤浸潤。在一些實施例中，個體之乳房腫瘤之大小有所減小。

【0032】 在另一態樣中，本發明提供誘發或增大個體中乳房腫瘤細胞之免疫細胞死亡之方法，其包括向個體投與有效量之細胞毒性劑，且經管內投與有效量之包括一或多種生物活性劑之組合物。在一些實施例中，細胞毒性劑係選自由以下組成之群：替莫唑胺、環磷醯胺(包含低劑量或

節拍式環磷醯胺)、馬磷醯胺、多柔比星、表柔比星、伊達比星、米托蒽醌、奧沙利鉑、太平洋紫杉醇、博來黴素、硼替佐米、溶瘤病毒、帕土匹龍、酪胺酸磷酸化抑制劑AG 490 (JAK2/STAT3抑制劑)或其組合。

【0033】 在某些實施例中，一或多種生物活性劑係選自由以下組成之群之1型極化劑：TLR激動劑(例如TLR3激動劑(例如聚(I:C)、聚腺苷-聚尿苷酸(聚AU)、安普利近(聚I:聚C (12)U；Hemispherx Biopharma)及經聚-L-離胺酸及羧甲基纖維素穩定之聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚ICLC，Hiltonol®))；TLR4激動劑(例如吡喃葡萄糖基類脂A (G100)、GSK1795091、單磷醯脂質A (MPL)及基於MPL之激動劑(例如葡萄糖糖苷磷酸胺基烷基酯(AGP))、脂多醣(LPS)及類鴉片(例如美沙酮、嗎啡-3-葡萄糖醛酸苷))；TLR7激動劑及TLR8激動劑(例如咪唑并喹啉(咪喹莫特(3M)及瑞喹莫德(R848；3M)))；TLR9激動劑(例如CpG-ODN，例如PF-3512676及諸如此類)、細胞介素(例如TNF α 、IFN γ 、類型I IFN (例如IFN α 或IFN β)、IL-1 β 、IL-2、IL-12)、趨化介素(例如IL-1 β 、CCL2、CCL19、CCL21或任何CCR7配體)及生長因子、mi-RNA (例如miR-155)、共刺激分子激動劑(例如CD-40激動劑(例如抗CD40抗體，例如RO7009789、APX005M、CP-870,893、ABBV-927)、OX-40激動劑(例如抗OX-40抗體，MOXR0916、PF-04518600、MEDI0562、MEDI6469及MEDI6383)、環糊精(例如2-羥丙基- β -環糊精)及其組合。

【0034】 在某些情況下，可期望向乳管及乳房組織新募集初始APC(「自來APC」)以有效地呈現腫瘤抗原。在某些實施例中，該等方法進一步包括向個體之乳管或乳房組織經管內投與有效量之能夠誘發募集自來抗原呈遞細胞之生物活性劑，該生物活性劑係選自由以下組成之群：細胞介

素及趨化介素(例如IL-1 β 、MCP-1、RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、IL-8、C1Q、CCL1 (CCR1配體)、CCL2 (CCR2配體)、CCL5 (CCR5配體)、CCL20 (CCR6配體)、CXCL3 (CXCR3配體)、CXCL4 (CXCR4配體)及CXCL1 (CXCR1配體))、DAMP (例如HMGB1)及TLR激動劑(如TLR3激動劑(例如聚(I:C)、聚腺苷-聚尿苷酸(聚AU)、安普利近(聚I:聚C (12)U；Hemispherx Biopharma)及經聚-L-離胺酸及羧甲基纖維素穩定之聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚ICLC，Hiltonol®))、TLR4激動劑(例如吡喃葡萄糖基類脂A (G100)、GSK1795091、單磷醯脂質A (MPL)及基於MPL之激動劑(例如葡萄糖胺糖苷磷酸胺基烷基酯(AGP))、脂多醣(LPS)及類鴉片(例如美沙酮、嗎啡-3-葡萄糖醛酸苷))、TLR7激動劑及TLR8激動劑(例如咪唑并喹啉(咪喹莫特(3M)及瑞喹莫德(R848；3M)))、TLR9激動劑(例如CpG-ODN，例如PF-3512676、(聚I:C)、C792、來非莫德(MGN1703)、SD-101 (Dynavax)、IMO-2125 (Idera)及諸如此類)或其組合。

【0035】 在某些實施例中，細胞毒性劑包括奧沙利鉑，且包括一或多種生物活性劑之組合物包括：(i) TLR3激動劑聚(I:C)及IFN α ；(ii) TLR9激動劑(CpG-ODN)及OX-40激動劑抗體；或(iii) TNF α 、IL-1 β 、IFN γ 、IFN α -2b及聚(I:C)。在一些實施例中，經靜脈內或經管內向個體投與細胞毒性劑。本發明提供，在經管內投與細胞毒性劑及包括一或多種生物活性劑之組合物後，個體之腫瘤大小有所減小。

【0036】 在一態樣中，本發明提供，以單一劑量或多個劑量來經管內投與組合物。可每天一次、一天多次(兩次、三次、四次及諸如此類)、隔天、每2天、每3天、每5天、每7天、每14天、每15天、每3週、每28天、每月一次、每季一次、每6個月一次及一年一次來投與組合物。

【0037】 在一些實施例中，該等組合物進一步包括選自由以下組成之群之成像劑、染料或對比劑：釷螯合物、超順磁氧化鐵奈米顆粒 (SPION)、¹⁹F全氟碳奈米顆粒及其他磁性報告基因(例如基於金屬蛋白之MRI探針)。

【0038】 在一些實施例中，經管內投與本文所揭示之組合物包括醫藥上可接受之載劑。

【0039】 在某些實施例中，將組合物調配為脂質體、奈米顆粒、微顆粒、微球體、奈米膠囊、奈米球、脂質顆粒、囊泡或微胞。在一些實施例中，一或多種生物活性劑包括(囊封)於脂質體、微顆粒、微球體、奈米膠囊、奈米顆粒、奈米球、脂質顆粒、囊泡或微胞中。在其他實施例中，一或多種生物活性劑包括於脂質體、微顆粒、微球體、奈米膠囊、奈米顆粒、奈米球、脂質顆粒、囊泡或微胞上。在至少一實施例中，奈米顆粒係脂質奈米顆粒。

【0040】 在一些實施例中，奈米顆粒進一步經細胞靶向劑塗覆。在一些實施例中，細胞靶向劑係選自由以下組成之群：DEC-205、Clec9A (DNDR-1)、DC-SIGN、C1q、BDCA1、BDCA2、BDCA3及BDCA4。

【0041】 在一態樣中，本發明提供包括本文所揭示之組合物、一或多個容器、包裝材料、標記或包裝插頁及視情況裝置之製品。在一些實施例中，裝置係針及注射器、套管、導管、微型導管、滲透幫浦或囊封裝置。

【0042】 在一些實施例中，製品進一步包括選自由以下組成之群之其他治療劑：檢查點抑制劑、抗激素(例如抗雌激素或抗雌激素受體，例如他莫昔芬、順式他莫昔芬、因多昔芬、去甲基他莫昔芬、拉索昔芬、雷

洛昔芬、苯并噻吩、巴多昔芬、阿佐昔芬、米潑昔芬、左美洛昔芬、屈洛昔芬、氯米芬、艾多昔芬、托瑞米芬、EM652及ERA-923、氟維司群、ARN-810或CH498、阿那曲唑、依西美坦及來曲唑)、類固醇、蔥環、甲狀腺激素代替藥物、細胞毒性劑(例如烷基化劑(例如替莫唑胺及環磷醯胺)、蔥環(例如多柔比星、聚乙二醇化脂質體多柔比星、表柔比星、伊達比星及諸如此類)、蔥二酮(例如米托蔥醌)、鉑藥物(例如順鉑、卡鉑、奧沙利鉑、奧馬鉑、恩洛鉑及諸如此類)、紫杉烷(例如太平洋紫杉醇))、抗有絲分裂藥、博來黴素、硼替佐米、帕土匹龍、鈣網織蛋白、廣譜細胞死亡劑(例如棉子酚、茶酚(例如表沒食子兒茶素-3-沒食子酸酯)、7-溴靛玉紅-3'-肟(7BIO) -、致癌RAS、大環內酯、小蘗鹼(衍生自植物之異喹啉生物鹼)、UMI-77、雷公藤內酯及舍利克爾)、細胞外核苷酸酶之廣譜抑制劑(例如ARL67156、替莫唑胺、環磷醯胺、馬磷醯胺、多柔比星、表柔比星、伊達比星、米托蔥醌、奧沙利鉑、太平洋紫杉醇、博來黴素、硼替佐米、溶瘤病毒、帕土匹龍)、酪胺酸磷酸化抑制劑AG 490 (JAK2/STAT3抑制劑)、DNA低甲基化劑(例如阿紮胞昔或地西他濱)、胸苷酸靶向藥物(例如多西他賽、吉西他濱)、曲妥珠單抗、阿多-曲妥珠單抗艾坦辛、帕妥珠單抗、阿貝西利、帕博西尼、抗IL-10抑制劑、抗TGF- β 抑制劑、檢查點抑制劑(例如抗PD-1抗體、抗PD-1L抗體、抗PD-L2抗體、抗CTLA-4抗體、抗LAG-3抗體、抗TIM-3抗體及諸如此類)、抗CCR4抑制劑、抗FoxP3抑制劑、細胞療法(例如嵌合抗原受體/T細胞(CAR-T)療法及其他過繼性細胞療法)或其組合。

【實施方式】

【0043】

相關申請案之交叉參考

本申請案主張2018年3月15日提出申請之臨時申請案第62/643618號之權益，該申請案之全部內容以引用方式明確併入本文中。

【0044】 本發明提供誘發患有乳癌之個體中之免疫反應之新穎方法，其係藉由向有需要之個體之乳管經管內投與包括一或多種生物活性劑之組合物來達成。生物活性劑原位動員個體之內源性免疫細胞抵抗乳癌。與當前方法(其中個體中之免疫細胞動員需要投與活體外或離體成熟抗原呈遞細胞或離體製備之表現嵌合抗原及共刺激抗原之CAR-T細胞之基於DC的疫苗)相比，本發明提供將個體乳房中之不成熟及/或半成熟DC同時原位局部暴露於一或多種經管內遞送之生物活性劑及個體特異性腫瘤抗原，此使得強烈增強了成熟APC (例如DC)產生IL-12p70、呈遞抗原及誘發Th1-主導反應(Vieira等人，J Immunol, 164: 4507-12, 2000；Maillard等人，Cancer Research, 64, 5934-5937, 2004)且更具體而言誘發個體之癌症特異性CTL反應的後續能力。

【0045】 如本文中所使用，術語「管內」及「經管內」係指如下治療方法：其中經由乳頭中之管孔口將本文所揭示之組合物遞送至個體之至少一個乳管中且到達乳房之內部深處。熟習此項技術者應瞭解，如本文所揭示之管內方法包括經由個體乳房中之乳管之天然孔口來遞送本文所揭示之組合物。本發明之有利態樣在於，管內遞送通常非侵襲性或最小侵襲性實現，不涉及個體之皮膚或組織或細胞層之故意破壞，且經由個體乳頭中靠近受影響乳房組織之個體自有天然乳管開口(管孔口)來遞送組合物。

【0046】 在一態樣中，管內投與係指將本發明組合物施加至乳頭，藉此經由乳頭中之管孔口將組合物遞送至至少一個乳管。乳頭及乳管孔口

尤其適於將本文所揭示之組合物(例如包括一或多種生物活性劑、再極化劑、極化阻斷劑、細胞毒性劑或治療劑或其組合者)接收至乳管中。在另一態樣中，管內投與係指經由乳頭中之管孔口將組合物經管內直接遞送至乳管之官腔中。

【0047】 乳房病症(例如乳癌)通常源於個體之乳管(Wellings SR. Pathol. Res. Prac. 1980 ; 166:515-535 ; Love及Barsky. Cancer. 2004 , 第101卷(9):1947-1957)。因此，高度期望靠近乳管(breast milk duct、breast duct)內之受影響部位局部遞送使用本文所揭示之組合物(作為非限制性實例，包括一或多種生物活性劑之組合物)之療法。經管內投與該等組合物可提供局部、有效、易投與療法，此可藉由減小全身性暴露於本文所揭示之組合物來消除全身性治療之副效應。此具有減小脫靶(on-target-off-tumor)效應之可能性/風險之額外益處。藉由管內投與局部遞送至乳管將減小組合物之傳輸時間，且使APC (例如DC、M1-巨噬球及B細胞)較迅速地暴露於組合物及相鄰腫瘤細胞，由此改良細胞毒性活性及效能，同時亦減小由較短傳輸所致之藥物鈍化及/或降解之可能。

【0048】 本文所揭示管內方法之特定優點在於，APC在暴露於個體特異性腫瘤抗原及經管內遞送之一或多種生物活性劑時可原位活化及成熟，且同時載有抗原之成熟APC遷移至引流淋巴結(及(若存在)異位及三級淋巴結)以用於抗原呈遞至效應免疫細胞(例如T細胞、NK細胞及B細胞)。經管內投與本文所揭示之組合物可在個體中誘發增加之抗原呈遞及免疫反應。在各個態樣中，本發明提供，向有需要之個體之乳管經管內投與本文所揭示之組合物會產生下列表現中之任一者或多者：活化腫瘤特異性效應免疫細胞(例如T細胞(例如細胞毒性CD8+ T細胞及輔助性T細胞

(CD4+ Th1細胞)、NK細胞、B細胞)且遷移或動員至個體之乳管或乳房組織，增加T細胞(例如CD4+ T-輔助細胞、細胞毒性CD8+ T細胞、*Tfh*細胞)及NK細胞之效應功能(例如增加腫瘤細胞死亡、增加記憶性T細胞及B細胞之形成)，減少Treg，降低免疫抑制，及血管抑制反應。

【0049】 適於誘發患有乳癌之個體中之免疫反應之生物活性劑包含(但不限於)形成活化T細胞之免疫刺激性APC(「DC1」)之類型I極化劑，例如TLR激動劑(例如TLR3激動劑(例如聚(I:C)、聚腺苷-聚尿苷酸(聚AU)、安普利近(聚I:聚C (12)U；Hemispherx Biopharma)及經聚-L-離胺酸及羧甲基纖維素穩定之聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚ICLC，Hiltonol®))；TLR4激動劑(例如吡喃葡萄糖基類脂A (G100)、GSK1795091、單磷醯脂質A (MPL)及基於MPL之激動劑(例如葡萄胺糖苷磷酸胺基烷基酯(AGP))、脂多醣(LPS)及類鴉片(例如美沙酮、嗎啡-3-葡萄糖醛酸苷))；TLR7激動劑及TLR8激動劑(例如咪唑并喹啉(咪喹莫特(3M)及瑞喹莫德(R848；3M)))；TLR9激動劑(例如CpG-ODN，例如PF-3512676及諸如此類)；DAMP(例如HMGB1)、細胞介素(例如TNF α 、IFN γ 、類型I IFN(例如IFN α 或IFN β)、IL-1 β 、IL-2、IL-12)、趨化介素及生長因子、mi-RNA、共刺激分子激動劑(例如CD28激動劑、CD-40激動劑(例如抗CD40抗體，例如RO7009789、APX005M、CP-870,893、ABBV-927)、OX-40激動劑(例如抗OX-40抗體MOXR0916、PF-04518600、MEDI0562、MEDI6469及MEDI6383)、2-羥丙基- β -環糊精及諸如此類。

【0050】 在某些實施例中，該組合物包括類型I IFN(例如IFN α 或IFN β)及TLR3激動劑。在至少一實施例中，該組合物包括IFN α -2b及TLR3激動劑(例如聚肌苷-聚胞苷(聚I:C))。在另一實施例中，該組合物包

括TNF α 、IL-1 β 及IFN γ 作為生物活性劑。

【0051】 在某些實施例中，包括一或多種類型1極化劑之組合物進一步包括IFN α 及/或聚(I:C)。

【0052】 在某些實施例中，該組合物包括之含有IL-1、TNF- α 、IFN- α 、IFN- γ 及聚(I:C)之類型1極化劑混合劑(「 α DC混合劑」或「 α -類型1極化劑」)。在至少一實施例中， α DC混合劑包括TNF α /IL-1 β /IFN γ /IFN α -2b/聚I:C。 α -類型1極化劑或 α DC混合劑誘發DC完成成熟以形成類型1極化DC(「DC1」)，該等極化DC可活化效應細胞(例如細胞毒性T-淋巴球(CD8+ T細胞；「CTL」)及CD4+ Th1輔助性T細胞(「CD4+ Th1細胞」))，對二級淋巴樣器官趨化介素具有反應性，且產生高介白素-12p70 (IL-12p70)-產生能力。 α DC混合劑誘發DC成熟以形成對CD40-配體(CD40L)信號傳導極具反應性之DC1(基於藉由成熟DC1達成之增強之IL-12p70產生)。CD4+ T輔助性-1細胞(CD4+ Th1細胞)及CD8+ T細胞表現CD40L且DC1上之與CD40之此相互作用似乎對於增加及維持活體內Th1-偏向免疫性較為重要。

【0053】 在一些實施例中，該等組合物包括TLR9配體(例如CpG-ODN及CD134 (OX-40)激動劑，例如激動性抗OX-40抗體(例如MOXR0916、PF-04518600、MEDI0562、MEDI6469及MEDI6383)或OX-40L誘發劑)作為生物活性劑。OX-40係提供持久免疫反應及生成免疫T細胞記憶所需之共刺激信號之共刺激分子。OX40信號最終使得增強T細胞活化，延長T細胞存活，生成記憶反應，防止T細胞耐受性，且減小調控T細胞之免疫抑制性活性(Croft等人，Immunol Rev. 2009年5月；229(1): 173-191；Sagiv-Barfi等人，Science Translational Medicine 31

Jan 2018:第10卷，第426期，eaaan4488)。

【0054】在至少一實施例中，該等組合物包括TLR9配體CpG-ODN、IL-12 (例如IL-12p70)及OX-40激動劑。

【0055】CpG-ODN可為種類A、B及/或C (Krieg等人，J Clin Invest. 2007年5月1日；117(5): 1184-1194)。種類A (類型D) CpG ODN (CpG-A ODN)可含有中心回文未甲基化磷酸二酯(PO) CpG序列及EC₅₀為1.5 μM之經PS修飾之3'聚G尾部。種類A CpG-ODN刺激APC (例如pDC)且誘發IFN-α產生。實例性種類A CpG-ODN包含ODN 2216 (5'-ggGGGACGA:TCGTCggggggg-3' (20聚體))。種類B CpG-ODN可含有完整未甲基化核酸酶抗性硫代磷酸酯(PS)主鏈以及一或多個EC₅₀為0.4 μM之CpG二核苷酸(例如ODN 7909 (CpG2006；5'-tcgtcgttttgcgttttgcgtt-3' (24聚體)))。種類B CpG-ODN強烈活化B細胞，但微弱刺激pDC中之IFN-α分泌。C類CpG-ODN可含有完整未甲基化核酸酶抗性硫代磷酸酯(PS)主鏈及回文模體(CpG-ODN)，該模體能夠以0.8 μM之EC₅₀動員APC (例如pDC以及B細胞)。該等TLR9 CpG-ODN能夠自pDC及B細胞刺激誘發IFNα產生且誘發IFNα調介之T細胞活化。實例性C類CpG-ODN包含(但不限於) M362 (5'-tcgtcgtcgttc:gaacgacgttgat-3' (25聚體))或CpG 2395 (5'-tcgtcgttttcggcgc:gcgccg-3' (22聚體))。

【0056】在一些實施例中，TLR激動劑可為來自dSLIM家族之寡核苷酸，例如MGN 1703 (Witting等人，Critical Reviews in Oncology/Hematology.第94卷，第1期，2015年4月，第31-44頁)。

【0057】在其他實施例中，經管內遞送之組合物包括一或多種生物活性劑(例如IFN-α及單磷醯脂質A (MPL))。

【0058】 本文所揭示之生物活性劑將個體之不成熟及半成熟APC原位誘發至完全成熟。因此，在一態樣中，本發明有利地提供，在與經管內投與之本文所揭示包括一或多種生物活性劑之組合物及個體乳房腫瘤中之腫瘤抗原接觸時，本文所揭示之方法及組合物將個體之自有不成熟及/或半成熟APC原位誘發至完全成熟以形成載有抗原之免疫刺激性APC (DC1)。

【0059】 在一些實施例中，所動員免疫細胞係APC。

【0060】 在一些實施例中，APC係乳房組織駐留駐留APC或乳房腫瘤相關APC或二者。出於本發明目的，APC可為業內已知之任一APC，例如DC、巨噬球(例如M1-極化巨噬球)及B細胞。在一些實施例中，APC係DC或其祖細胞。DC可為任一不成熟或穩態DC (iDC)。DC可為骨髓源、脾源或單核球源DC。在一些實施例中，APC係乳房組織駐留DC或腫瘤相關DC (例如TIDC)。DC子組在業內已知且可藉由各種標記物及方法鑑別(Collins等人，*Immunology*. 2013 Sep; 140(1): 22-30; Worah等人，2016, *Cell Reports* 16, 2953-2966)。DC包含(但不限於)骨髓樣或習用DC (mDC; 例如BDCA-3+ (CD141+) DC、BDCA1+ (CD1c+) DC)、漿細胞樣DC (pDC; 例如BDCA-2+ DC)、CD14+ DC、朗格漢斯細胞(langerhans cell, LC)及諸如此類。腫瘤相關DC之實例包含(但不限於)TIDC，例如腫瘤相關mDC、腫瘤相關單核球源DC、腫瘤相關pDC、腫瘤相關iDC或腫瘤相關半成熟DC。熟習此項技術者將理解，DC命名已有所擴展且將繼續擴展，且本發明包含所鑑別之所有DC。

【0061】 研究已展示，腫瘤中之APC具有功能缺陷且造成較差抗腫瘤免疫反應(Palucka等人，*Cancer J*. 2013 ; 19(6))。腫瘤濫用骨髓可塑

性來再引導自T細胞刺激性DC子組(DC1)至免疫抑制性DC子組(調控DC)之DC分化，此可干擾抗腫瘤免疫性(Gabrilovich等人，Nat Rev Immunol (2012) 12:253-68；Janco等人，J Immunol. 2015 Apr 1；194(7): 2985-2991)。研究亦已展示，腫瘤細胞亦可經由分泌免疫抑制因子(如iNOS、IL-6、IL-10、VEGF、TGF- β 及前列腺素-E2 (PGE2))來直接誘發不成熟TIDC狀態，由此進一步危害穩定DC-T細胞相互作用。舉例而言，腫瘤源抑制因子(例如精胺酸酶、PGE2及IL-10)已鑑別為原發性人類腫瘤培養物中負責抑制皮膚DC以及單核球源DC之發育及活化之因子(Sombroek等人，J Immunol (2002) 168:4333-43)。

【0062】 另外，IL-10具有免疫抑制性，其中能夠誘發「DC至巨噬球」移位(亦即將完全發育之DC轉化成具有功能M2特性以及不成熟CD14⁺BDCA3⁺DC-SIGN⁺CD16⁺表型及巨噬球樣形態之不成熟巨噬球樣細胞)、釋放免疫抑制性IL-10 (高)與免疫刺激性IL-12p70 (低)之受擾平衡、T細胞抑制性分子B7-H1/PDL-1之高表現程度以及同種異體Th細胞及CD8⁺ (細胞毒性) T細胞之較低引發效率，從而以低親合力結合表位/MHC複合物(De Gruijl等人，J Immunol (2006) 176:7232-42；Fortsch D等人，J Immunol 2000, 165:978 -987；Gerlini G等人，Am J Pathol (2004) 165:1853-63；van de Ven等人，Front. Immunol.，2013年11月25日)。該等不成熟及半成熟TIDC由此顯現M2-巨噬球樣極化狀態(「M2-巨噬球樣DC」或「M2-DC」)以及較類似於腫瘤相關M2-極化巨噬球之免疫抑制性功能，從而產生低T細胞活化(例如減小之細胞毒性CD8⁺ T細胞效應功能)及減小之腫瘤細胞死亡。

【0063】 TIDC (例如M2-DC)往往展現抗原呈遞能力功能障礙、經

抑制吞噬及胞吞活性、異常運動性及各種其他不成熟特性。另外，腫瘤細胞以使免疫抑制性調控DC (例如CCR6 DC及小鼠CD11b+CD11c+MHC-II+CD24+CD64lowF4/80low DC之人類等效物)募集至腫瘤之方式來改變TME (Kenkel等人，Cancer Res. 2017 Aug 1;77(15):4158-4170)。

【0064】 不期望受限於任一理論或機制，在一態樣中，本發明提供用於將腫瘤相關M2-DC及調控DC轉變成免疫刺激性DC (DC1)之管內方法及組合物。

【0065】 在一些實施例中，如本文所揭示之包括一或多種生物活性劑之組合物包括再極化劑。適宜再極化劑可包含(但不限於)芬維A胺(4-羥基(苯基)視黃醯胺，4-HPR)；IL-12；IFN γ 、miR127、miR155及miR223、奈米氧化鐵；以下各項之抑制劑：CSF-1、CSF-1R、IL-10、IL-10R、TGF β 、精胺酸酶1 (Arg1)、M2巨噬球清除劑受體(例如A、B、MARCO)；組織蛋白去乙醯酶(HDACi)、DICER、IRF4/STAT4/STAT6信號傳導路徑；IL-4、IL-13、IL-17、PPAR γ 、KLF4、KLF6；miRNA-146家族成員(例如miRNA-146a)、let7家族成員(例如let-7c)、miRNA-9、miRNA-21、miRNA-47、miRNA-187；CCR-CC12軸信號傳導；CCL2/MCP-1合成；胎盤生長因子(PlGF) (HRG)及C/EBP β (PI3K γ 缺失)；AMPK α 1 (二甲雙胍)、p50-p50 NF κ B、NADPH氧化酶(NOX) (NOX 1及NOX 2)、Rbpj、Notch信號傳導路徑；CD40及CD40L之活化劑；IRF1、IRF5、STAT1 (例如IFN γ 、瓦第美贊(DMXAA))及STAT3；核因子 κ B活化劑、TLR3、TLR4及TLR9之類鐸受體(TLR)激動劑(例如咪喹莫特)、合成未甲基化胞嘧啶-鳥嘌呤(CpG)寡去氧核苷酸(CpG-ODN)、(聚I:C)、C792、來非莫德(MGN1703)、SD-101 (Dynavax)、SD-101

(Dynavax)、IMO-2125 (Idera)；p65-p50 NF κ B、MyD88、miR127、miR155及miR223；或其組合。熟習此項技術者將理解，一或多種生物活性劑亦可用作再極化劑。

【0066】 在另一態樣中，本發明提供，本文所揭示之管內方法及組合物可減小或防止DC至巨噬球移位(「M2-移位」)。在一些實施例中，如本文所揭示之包括一或多種生物活性劑之組合物包括阻斷劑。用於防止或減小DC至巨噬球M2-移位之適宜阻斷劑包含(但不限於) CSF-1抑制劑、CSF-1R抑制劑、MCP-1抑制劑、IL-4抑制劑(例如帕考珠單抗、皮特克拉及杜匹魯單抗)、IL-10抑制劑、IL-13抑制劑(例如安蘆珠單抗、來金珠單抗及曲洛青單抗)、IL-4/IL-13雙重抑制劑(例如杜普麗單抗)、類前列腺素抑制劑(例如PGE3抑制劑)、STAT3抑制劑(例如索拉菲尼、舒尼替尼、WP1066及白藜蘆醇)及STAT6抑制劑(例如芬維A胺(4-HPR)、來氟米特、TMX264及AS1217499)或其組合。

【0067】 可藉由將一或多種本文所揭示之生物活性劑以及再極化劑或阻斷劑或二者經管內共遞送至有需要之個體之乳管中來使M2-DC再極化至DC1或減小或防止M2-轉變。一或多種生物活性劑及再極化劑及/或阻斷劑可包括於單一組合物或分開組合物中。該等分開組合物可以任一順序共遞送至個體之乳管。舉例而言，可在經管內遞送本文所揭示之包括一或多種生物活性劑之組合物之後1 m至30 m內、30 m至6小時內、6小時至12小時內及24小時內遞送包括再極化劑或阻斷劑或二者之組合物。作為另一實例，可組合每一分開組合物以遞送至個體。

【0068】 熟習此項技術者將認識到，本文所揭示之管內方法及組合物可增加免疫刺激性DC1相對於免疫抑制性調控DC或M2-DC之比率。

【0069】 在某些情況下，可期望向乳管及乳房組織新募集初始APC (「自來APC」)以有效地呈現腫瘤抗原。該等自來APC可為周邊APC，例如循環APC、骨髓源APC、脾源APC及諸如此類。因此，本發明提供，在一些實施例中，APC係在經管內投與包括一或多種能夠將APC募集或誘發遷移至個體乳管之生物活性劑之組合物後新近或重新募集至個體之乳管或乳房組織的自來APC。該等新募集APC暴露於個體特異性腫瘤抗原且經誘發以在乳管及/或乳房組織中原位分化成載有抗原之完全成熟APC以用於有效抗原呈遞及免疫反應生成。該等管內方法容許最佳抗原攝取及靠近受影響部位之原位腫瘤抗原交叉呈遞。另外，本文所揭示之原位方法消除了收集個體血液並分離APC、選擇非個體特異性腫瘤抗原之需要及與APC之大量產生、保存、儲放壽命及分佈相關之難題。

【0070】 在一些實施例中，APC係自來DC。自來DC子組之實例包含循環初始mDC (例如BDCA-1+ (CD1c+)、BDCA-3+ (CD141+)及BDCA-4+ DC)、pDC (例如BDCA-2+ DC)及其祖細胞。該等自來APC變得原位暴露於個體特異性腫瘤抗原且藉由吞噬作用、胞飲作用及諸如此類吸收腫瘤抗原。可防止新募集之自來APC發生M2-轉變或變為如上文所闡述之調控DC。

【0071】 適於新募集自來APC之生物活性劑之非限制性實例包含IL-1 β 、MCP-1、RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、IL-8或其任一組合。在至少一實施例中，該組合物包括MIP3 α 、MIP1 α 及RANTES。在另一實施例中，該組合物包括HMGB1、TLR激動劑(如TLR3激動劑(例如聚(I:C)、聚腺苷-聚尿苷酸(聚AU)、安普利近(聚I:聚C (12)U；Hemispherx Biopharma)及經聚-L-離胺酸及羧甲基纖維素穩定之聚肌苷酸-聚胞苷酸

(聚ICLC，Hiltonol®)、TLR4激動劑(例如吡喃葡萄糖基類脂A (G100)、GSK1795091、單磷醯脂質A (MPL)及基於MPL之激動劑(例如葡萄糖胺糖苷磷酸胺基烷基酯(AGP))、脂多醣(LPS)及類鴉片(例如美沙酮、嗎啡-3-葡萄糖醛酸苷))、TLR7/8激動劑(例如咪唑并喹啉(咪喹莫特(3M)及瑞喹莫德(R848；3M)))、TLR9激動劑(例如CpG-ODN，例如PF-3512676及諸如此類)))、用於誘發循環iDC及周邊組織iDC趨化至乳管及乳房組織之生物活性劑。HMGB1係DAMP，亦即藉由頻死或壞死細胞釋放或藉由活化巨噬球分泌之用作人類單核球源iDC之化學吸引劑之「危險信號」。用於募集iDC之生物活性劑亦包含C1q、CCL1 (CCR1配體)、CCL2 (CCR2配體)、CCL5 (CCR5配體)、CCL20 (CCR6配體)、CXCL3 (CXCR3配體)、CXCL4 (CXCR4配體)及CXCL1 (CXCR1配體)。CXCL3能夠結合至pDC上之CXCR3，但不能結合不表現CXCR3之MoDC或血液DC (Villablanca等人，Histol Histopathol (2008) 23: 897-910)。

【0072】 熟習此項技術者將理解，募集自來APC之生物活性劑亦可能能夠誘發APC至完全成熟。在一些實施例中，自來APC在到達個體乳管後可進一步暴露於特異性誘發APC至完全成熟之本文所揭示之組合物。

【0073】 誘發至完全成熟之APC同時提供三組T細胞刺激信號(適當抗原-MHC複合物(信號1，藉由T細胞經由T細胞受體/TCR-CD3複合物檢測)；表型成熟配體，亦即共刺激分子(信號2，藉由諸如CD28、CD40L、OX-40 (CD134、TNFRSF4)等T細胞受體檢測)；及誘導免疫刺激及效應T細胞表型之適宜細胞介素或因子，例如IL-12p70、IL-18、IL-23 (信號3，藉由各別細胞介素同族受體(如IL-12受體)檢測)，幫助活化T細胞相互作用中之效應特徵，由此將其極化以用於腫瘤細胞之個體腫瘤抗原特異性

消除。DC亦可使用其他功能免疫刺激性因子以經由B細胞及NK細胞誘導效應功能。

【0074】 在一些實施例中，成熟DC係CCR7⁺ DC、CD80⁺ DC、CD86⁺ DC、CD40⁺ DC、OX-40⁺ DC或其任一組合。在其他實施例中，成熟DC展現表型標記物CD11c⁺HLA-DR⁺、CD11c⁺MHCII^高或CD11b⁺CD11c⁺CD86^高MHC-II^高。

【0075】 自經管內投與本文所揭示組合物之個體獲得之DC1可釋放極少免疫抑制性細胞介素(例如IL-10、TGF- β 、IL-4及IL-13)。在(例如)在活體外藉由ELISA測試時，DC1可釋放發炎性細胞介素(例如IL-18及/或IL-23及/或IL-27)。在一些實施例中，經活化成熟DC釋放IL-12p70。在其他實施例中，經活化成熟DC釋放IFN α 。

【0076】 可藉由測定以下各項來量測至免疫刺激性APC (例如DC1)之成熟及/或再極化：(i)一或多種成熟標記物(例如CD40、CD80、CD83、CD86、OX-40及CCR7或其組合)之增加，及(ii)細胞介素(信號3)之釋放之增加，例如來自自個體所獲得試樣之IL-6、IL-12p70、IL-18、IL-23、IL-27、TNF α 或其組合之含量增加。個體試樣可為任一試樣，舉例而言，試樣可為血液、血清、血漿、組織、乳頭抽吸液、管灌洗液、淋巴液及諸如此類。可使用業內已知之任一方法(例如藉由ELISA、ELISPOT及諸如此類)來測定組織試樣中之APC-相關細胞介素IL-6、IL-8、IL-12p-70及TNF α 之含量。在至少一實施例中，所量測細胞介素係IL-12p70。

【0077】 腫瘤微環境可負面地影響內源性APC (例如DC)遷移至淋巴結(N. Seyfizadeh等人，Critical Reviews in Oncology/Hematology 107

(2016) 100-110)。在一態樣中，本發明有利地提供，本文所揭示之管內方法及組合物誘發載有抗原之成熟免疫刺激性APC (例如DC1)自乳房組織或乳癌遷移至引流淋巴結(及(若存在)異位淋巴結及三級淋巴結)用於T細胞、NK細胞及B細胞之抗原呈遞及引發。因此，在一些實施例中，在經管內投與本文所揭示之組合物時，增加DC遷移至二級淋巴器官(例如引流淋巴結)、異位及/或三級淋巴結。在一些實施例中，自乳房組織遷移至引流淋巴結之APC係CCR7⁺ DC、CD80⁺ APC、CD86⁺ APC、CD40⁺ APLC、OX-40L⁺ APC中之任一者或其任何組合。APC之遷移可根據淋巴結趨化介素梯度。適於誘發活化APC遷移至淋巴結之趨化介素可為IL-1 β 、MIP-3 β 、CCL2、CCR7配體，例如CCL19、CCL21、CD40L、肽聚醣、MMP9、DAMP (例如HMGB1)，或其組合。

【0078】 在一些實施例中，誘發活化APC遷移至淋巴結之組合物包括IL-1 β 、IL-6、MIP-3 β 作為生物活性劑之混合物(cocktail)。

【0079】 在其他實施例中，誘發活化APC遷移至淋巴結之組合物包括TLR激動劑(例如CpG-ODN及衣喏莫德(iquimod))、趨化介素(例如CCL2、CCL19、CCL21或其他CCR7配體)。在另外其他實施例中，誘發活化APC遷移至淋巴結之組合物包括CpG-ODN及肽聚醣作為生物活性劑。在另外其他實施例中，誘發活化APC遷移至淋巴結之組合物包括CpG-ODN及基質金屬蛋白酶(例如MMP9)作為生物活性劑。在一些實施例中，CpG-ODN可融合至其他分子，例如艾伯斯坦-巴爾病毒(Epstein Barr virus) LMP1蛋白或肽、CD40蛋白質或肽、OX-40肽及諸如此類。

【0080】 在一些實施例中，本文所揭示之方法及組合物藉由使用RNA疫苗原位轉染APC (乳房組織及腫瘤駐留APC以及藉由本文所揭示之

方法誘發至完全成熟之新募集自來APC)以表現包括天然艾伯斯坦-巴爾病毒LMP1蛋白或肽序列之蛋白質來誘發APC之遷移。該等LMP1蛋白可為融合蛋白，例如LMP1與結合抗腫瘤效應T細胞之共刺激分子之融合蛋白(例如LMP1-CD40融合蛋白、LMP1-OX-40L融合蛋白)。在一些實施例中，RNA疫苗包含報告基因RNA(例如編碼螢光蛋白、例如綠色或黃色螢光蛋白者)。

【0081】 可在活體內使用正電子發射斷層攝影術(PET)及單光子發射電腦化斷層攝影術(SPECT)與電腦化斷層攝影術(CT)之組合、使用螢光(例如綠色螢光及黃色螢光蛋白)之光學成像技術、生物發光、磁共振成像(MRI)、細胞MRI及諸如此類來監測APC遷移。

【0082】 在一態樣中，本發明提供，本文所揭示之管內方法及組合物誘發增加之APC至效應免疫細胞(例如T細胞、B細胞及NK細胞)之抗原呈遞。在一些實施例中，可藉由新募集初始APC且再極化乳房組織駐留APC及腫瘤組織駐留APC來增加抗原呈遞。

【0083】 在其他實施例中，可藉由預治療具有細胞毒性劑誘發之腫瘤細胞死亡之個體來增大藉由自來APC、乳房組織駐留APC及腫瘤相關APC進行之抗原呈遞。增加之腫瘤細胞死亡可藉由(例如)以下任一細胞死亡方式達成：細胞凋亡(半胱天冬酶(caspase)依賴性)、壞死性凋亡(藉由TNF受體在化學抑制半胱天冬酶後引發，亦即半胱天冬酶獨立性)、壞死及免疫細胞死亡(「ICD」)。細胞凋亡、壞死性凋亡及壞死性細胞死亡方式已闡述於以下文獻中：Belizario等人，*Mediators Inflamm.* 2015；2015: 128076；Vanden Berge等人，*Mol Cell Oncol.* 2015 Oct-Dec；2(4): e975093)。

【0084】化學治療藥物通常藉由誘發可伴有自體吞噬或(在後期)細胞壞死之細胞凋亡來殺死腫瘤細胞。ICD中之免疫原性取決於頻死細胞暴露或若干能夠活化免疫系統之不同組分(例如巨噬球、NK細胞及DC)之分子之釋放(Cirone M等人，*Oncoimmunology*. 2012 Oct 1；1(7):1218-1219；Bezu等人，*Front Immunol* 2015；6: 187)。

【0085】增加之細胞死亡生成較高量之有助於APC抗原呈遞之腫瘤相關抗原及分子。頻死腫瘤細胞可發射一系列決定特定骨髓樣免疫效應物之募集及活化之危險信號(例如DAMP)，由此觸發一線先天性反應(Krysko等人，*Nat Rev Cancer*. 2012 Dec；12(12):860-75)。該等DAMP包含代謝變化(ATP排出至細胞外空間)、細胞表面變化(例如漿膜上之鈣網織蛋白暴露)及細胞外周微環境變化(例如染色質結合蛋白HMGB1之核及細胞外流，其最終引發抗癌免疫反應)(Bezu等人，*Front Immunol*. 2015；6: 187)。該等DAMP將抗原呈遞細胞(APC)募集至活性ICD之位點且刺激死細胞相關抗原之攝取、處理及呈遞，從而最終引發適應性免疫反應。此一免疫反應涉及免疫效應物(包含DC，例如產生介白素-1 β 之單核球源樹突狀細胞(DC)、產生介白素-17之 γ/δ T細胞及產生干擾素- γ (IFN- γ)之習用CD8⁺ α/β T細胞)之複雜分級(Ma Y等人，*J. Exp. Med.* 2011)。自頻死細胞釋放之內源性危險信號可結合類鐸受體(TLR)以誘發該先天性免疫反應。舉例而言，存在於DC表面上之TLR3、TLR4及TLR9識別自頻死腫瘤細胞釋放之其內源性配體HMGB1 (Tian等人，*Nature Immunology*，第8卷，第487-496頁(2007))，且此會引發對於感知ICD而言必不可少之MyD88 (骨髓樣分化一級反應基因)依賴性信號傳導路徑。由HMGB1誘導之TLR4/MyD88路徑抑制吞噬體與溶酶體之間之融合，由

此促進腫瘤抗原處理及抗原呈遞，此係誘發再刺激或動員針對癌細胞之細胞免疫反應所需。

【0086】 可經由任一遞送途徑來遞送細胞毒性劑，包含經口、非經腸、靜脈內、腹膜內、皮下、肌內及諸如此類。在一些實施例中，可經靜脈內或經管內投與細胞毒性劑。經管內投與細胞毒性劑係在經管內投與本文所揭示之組合物之後。在其他實施例中，可在使用包括一或多種生物活性劑之組合物治療期間或之後向個體投用本文所揭示之細胞毒性劑。本文所揭示之細胞毒性劑及組合物可在一或多個週期中投與。暴露於本文所揭示之該等組合物可有利地使腫瘤細胞對隨後遞送之細胞毒性劑敏感。使用本文所揭示之細胞毒性劑及組合物進行治療會增加APC抗原呈遞及免疫反應。經管內投與之細胞毒性劑可減少由細胞毒性劑之較低全身性暴露所致之任何旁觀者效應。

【0087】 細胞毒性劑可單獨遞送，或與一或多種誘發IFN產生、HMGB1釋放且活化DC上之TLR3、TLR4、TLR7、TLR8及TLR9路徑中之任一者或多者之其他生物活性劑組合遞送。可使用之TLR9激動劑之實例包含(但不限於)抗TLR-9激動劑抗體及抗體片段(例如ScFv)、合成DNA及含有CpG模體之寡核苷酸(CpG ODN) (例如TTAGGG多聚體、來非莫德(MGN1703)、SD-101 (Dynavax)及IMO-2125 (Idera))及諸如此類。

【0088】 適於增加腫瘤細胞死亡之細胞毒性劑可包含(但不限於)烷基化劑(例如替莫唑胺及環磷醯胺)、蔥環(例如多柔比星、表柔比星、伊達比星及諸如此類)、蔥二酮(例如米托蔥醯)、鉑藥物(例如順鉑、卡鉑、奧沙利鉑、奧馬鉑、恩洛鉑及諸如此類)、紫杉烷(例如太平洋紫杉醇)、抗有絲分裂藥、博來黴素、硼替佐米、帕土匹龍、鈣網織蛋白、廣譜細胞

死亡劑(例如棉子酚、茶酚(例如表沒食子兒茶素-3-沒食子酸酯)、7-溴靛玉紅-3'-脞(7BIO) -、致癌RAS、大環內酯、小蘗鹼(衍生自植物之異喹啉生物鹼)、UMI-77、雷公藤內酯及舍利克爾)、細胞外核苷酸酶之廣譜抑制劑(例如ARL67156)或其組合。

【0089】 可用於誘發免疫細胞死亡之細胞毒性劑包含(但不限於)替莫唑胺、環磷醯胺(包含低劑量或節拍式環磷醯胺(例如以50 mg/d之劑量)、馬磷醯胺、多柔比星、表柔比星、伊達比星、米托蒽醌、奧沙利鉑、太平洋紫杉醇、博來黴素、硼替佐米、溶瘤病毒、帕土匹龍、酪胺酸磷酸化抑制劑AG 490 (傑納斯活化激酶2/信號轉導劑及轉錄活化劑-3 (JAK2/STAT3)抑制劑)或其組合。

【0090】 可藉由業內已知之方法(例如細胞凋亡分析，例如藉由TUNNEL技術)在組織生檢上來量測細胞死亡。可藉由乳房X線攝影術、CT-掃描及MRI來測定腫瘤大小之降低。

【0091】 在一態樣中，本發明提供，本文所揭示之管內方法及組合物進一步包括佐劑。適宜佐劑可為礦物質鹽、乳液及脂質體(例如PLGA脂質體)、皂苷、熱休克蛋白(例如HSP70、VSSP、BCG及DETOX)。

【0092】 在一態樣中，本發明提供，本文所揭示之方法及組合物誘發個體中之免疫反應。免疫反應可為以下中之任一者或多者：抗體及免疫細胞調介之反應(例如T細胞效應功能(例如經由活化CD4+輔助性-1 T細胞及細胞毒性CD8+ T細胞，T細胞調介之細胞毒性)、B細胞效應功能(例如腫瘤抗原靶向抗體形成)、NK細胞效應功能、記憶性T細胞及B細胞之形成、Treg減少)、免疫抑制(例如經由抑制檢查點路徑分子(例如CTLA4、PD-1、PD1-L1、TIM、LAG3)或活化OX-40/OX-40L路徑)減小、血管抑

制反應(抑制新生血管形成)及誘發或增大腫瘤細胞死亡(Park等人，Cancer Res Treat. 2011 Mar；43(1): 56-66)。

【0093】 因此，本文所揭示之方法將解決抗原不適當或不充分呈遞及/或遷移至二級淋巴樣器官(例如淋巴結)及(若存在)異位及三級淋巴結以用於抗原呈遞至T細胞及B細胞之問題。自來APC (例如防止發生M2-轉變或變成M2-DC之新募集iDC、乳房組織駐留DC及腫瘤相關DC)將能夠處理腫瘤抗原且變得活化，並更有效地呈遞腫瘤抗原。因此，暴露於經管內投與之本文所揭示之組合物亦將使腫瘤細胞對使用細胞毒性劑之後續治療敏感。

【0094】 在一態樣中，本發明提供，本文所揭示之組合物及方法動員效應免疫細胞。在一些實施例中，所動員免疫細胞係效應細胞，例如T細胞、B細胞及NK細胞。在經管內遞送本文所揭示之組合物後，藉由遷移至引流淋巴結、異位淋巴結及三級淋巴結以用於抗原呈遞之載有抗原之成熟APC來動員腫瘤抗原特異性T細胞、B細胞及NK細胞。

【0095】 在另一態樣中，本發明提供在經管內投與包括一或多種能夠誘發或增大T細胞遷移之生物活性劑之組合物時誘發或增大滲透抗腫瘤T細胞遷移至個體之乳管或乳房組織的方法及組合物。該T細胞遷移可沿自來淋巴系統及/或在血液中。不期望受限於任一理論或機制，在一些實施例中，包括該一或多種生物活性劑之組合物包含(但不限於) CCL17、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL27、CXCL1及CX3CL1或其任一組合。在至少一實施例中，在包括一或多種生物活性劑之組合物中，至少一種生物活性劑誘發T細胞遷移。該等T細胞可浸潤乳房腫瘤且有助於腫瘤殺死。

【0096】 在另一態樣中，本發明提供在經管內投與包括一或多種能夠誘發或增大NK細胞遷移之生物活性劑之組合物時誘發或增大NK細胞遷移至個體之乳管或乳房組織的方法及組合物。在一些實施例中，包括該一或多種生物活性劑之組合物包含(但不限於) IL-12、IL-15、IL-18、低劑量IL-2或其組合。在一些實施例中，包括一或多種生物活性劑之組合物進一步包括miR-30c-1、miR-27a、miR-548q、miR362-5p、miR628-5p及miR152或其任一組合。包含該miRNA有助於NK細胞介導之細胞毒性。

【0097】 藉由活化抗腫瘤效應免疫細胞浸潤腫瘤組織與乳癌中之陽性結果相關。

【0098】 在一態樣中，本發明提供，本文所揭示之包括一或多種生物活性劑之組合物經調配用於以如中表1中所闡述之單位劑量進行管內遞送。

表1. 管內組合物中之一或多種生物活性劑之單位劑量之實例性實施例

編號	生物活性劑	單位劑量之實例性實施例
1	TNF α	0.01 μ g/mL至200 μ g/mL
2	IL-1 β	0.01 μ g/mL至20 μ g/mL
3	IFN γ	1 μ g/mL至100 μ g/mL
4	IFN α	1 μ g/mL至300 μ g/mL
5	聚(I:C)	1 μ g/mL至50 μ g/mL
6	CpG-ODNs	0.01 μ g/mL至20 mg/mL
7	OX-40激動劑	0.01 mg/mL至50 mg/mL

【0099】 管內組合物中之TNF α 之單位劑量可介於0.05 μ g/mL至150 μ g/mL、0.1 μ g/mL至100 μ g/mL及0.5 μ g/mL至50 μ g/mL之間。在一些實施例中，該等組合物以0.1 μ g/mL、0.5 μ g/mL、1 μ g/mL、5 μ g/mL、10 μ g/mL、20 μ g/mL、25 μ g/mL、50 μ g/mL、100 μ g/mL、150 μ g/mL及

200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之單位劑量包括 $\text{TNF}\alpha$ 。

【0100】 管內組合物中之 $\text{IL-1}\beta$ 之單位劑量可介於0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之間。在一些實施例中，該等組合物以0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之單位劑量包括 $\text{IL-1}\beta$ 。

【0101】 管內組合物中之 $\text{IFN}\gamma$ 之單位劑量可介於1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之間。在一些實施例中，本文所揭示之組合物以1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之單位劑量包括 $\text{IFN}\gamma$ 。

【0102】 管內組合物中之 $\text{IFN}\alpha$ 之單位劑量可介於1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之間。在一些實施例中，本文所揭示之組合物以1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之單位劑量包括 $\text{IFN}\alpha$ 。

【0103】 管內組合物中之 TLR3 激動劑(例如聚(I:C))之單位劑量可介於0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之間。在一些實施例中，該等組合物以0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之單位劑量包括聚(I:C)。

【0104】 管內組合物中之 TLR9 激動劑(例如 CpG-ODN)之單位劑量

可介於0.01 µg/mL至20 mg/mL、0.1 µg/mL至15 mg/mL、1 µg/mL至10 mg/mL、10 µg/mL至5 mg/mL、50 µg/mL至1 mg/mL之間。在一些實施例中，該等組合物以0.01 µg/mL、0.1 µg/mL、0.5 µg/mL、1 µg/mL、5 µg/mL、10 µg/mL、20 µg/mL、25 µg/mL、50 µg/mL、100 µg/mL、200 µg/mL、300 µg/mL、400 µg/mL、0.5 mg/mL、1 mg/mL、2 mg/mL、4 mg/mL、6 mg/mL、8 mg/mL、10 mg/mL、15 mg/mL及20 mg/mL之單位劑量包括CpG-ODN。

【0105】 管內組合物中之OX-40激動劑(例如抗OX-40抗體)之單位劑量可介於0.01 mg/mL至50 mg/mL、0.1 mg/mL至40 mg/mL、0.5 mg/mL至30 mg/mL及1 mg/mL至25 mg/mL之間。在一些實施例中，該等組合物以0.01 mg/mL、0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.5 mg/mL、1 mg/mL、2 mg/mL、4 mg/mL、6 mg/mL、8 mg/mL、10 mg/mL、15 mg/mL、20 mg/mL、25 mg/mL、30 mg/mL、35 mg/mL、40 mg/mL、45 mg/mL及50 mg/mL之單位劑量包括OX-40激動劑。

【0106】 在另一態樣中，本發明提供，包括一或多種生物活性劑之組合物進一步包括其他治療劑。該等其他治療劑可為任一可用於治療乳房病症之藥劑。

【0107】 實例性其他治療劑包含(但不限於)檢查點抑制劑、旨在減少乳癌個體中之雌激素之抗激素(例如抗雌激素或抗雌激素受體，例如他莫昔芬、順式他莫昔芬、因多昔芬、去甲基他莫昔芬、拉索昔芬、雷洛昔芬、苯并噻吩、巴多昔芬、阿佐昔芬、米潑昔芬、左美洛昔芬、屈洛昔芬、氯米芬、艾多昔芬、托瑞米芬、EM652及ERA-923、氟維司群、ARN-810或CH498、阿那曲唑、依西美坦及來曲唑)、類固醇、蔥環、甲

狀腺激素代替藥物、細胞毒性劑(例如烷基化劑(例如替莫唑胺及環磷醯胺)、蔥環(例如多柔比星、聚乙二醇化脂質體多柔比星、表柔比星、伊達比星及諸如此類)、蔥二酮(例如米托蔥醌)、鉑藥物(例如順鉑、卡鉑、奧沙利鉑、奧馬鉑、恩洛鉑及諸如此類)、紫杉烷(例如太平洋紫杉醇))、抗有絲分裂藥、博來黴素、硼替佐米、帕土匹龍、鈣網織蛋白、廣譜細胞死亡劑(例如棉子酚、茶酚(例如表沒食子兒茶素-3-沒食子酸酯)、7-溴靛玉紅-3'-肟(7BIO) -、致癌RAS、大環內酯、小蘗鹼(衍生自植物之異喹啉生物鹼)、UMI-77、雷公藤內酯及舍利克爾)、細胞外核苷酸酶之廣譜抑制劑(例如ARL67156、替莫唑胺、環磷醯胺、馬磷醯胺、多柔比星、表柔比星、伊達比星、米托蔥醌、奧沙利鉑、太平洋紫杉醇、博來黴素、硼替佐米、溶瘤病毒、帕土匹龍)、酪胺酸磷酸化抑制劑AG 490 (傑納斯活化激酶2/信號轉導劑及轉錄活化劑-3 (JAK2/STAT3)抑制劑)、DNA低甲基化劑(例如阿紮胞苷或地西他濱)、胸苷酸靶向藥物(例如多西他賽、吉西他濱)、曲妥珠單抗、阿多-曲妥珠單抗艾坦辛、帕妥珠單抗、阿貝西利、帕博西尼、抗IL-10抑制劑、抗TGF- β 抑制劑、檢查點抑制劑(例如抗PD-1抗體、抗PD-1L抗體、抗PD-L2抗體、抗CTLA-4抗體、抗LAG-3抗體、抗TIM-3抗體及諸如此類)、抗CCR4抗體、抗FoxP3抑制劑、細胞療法(例如嵌合抗原受體/T細胞(CAR-T)療法及其他過繼性細胞療法)或其組合。

【0108】 腫瘤浸潤調控性T細胞(T-reg ; CD4+/CD25+/Foxp3+ T細胞)與乳癌中之最壞結果有關(Shou等人, BMC Cancer. 2016 ; 16(1): 687)。研究展示, 雌激素藉由擴增T-reg腔室來促進免疫耐受性(Prieto及Rosenstein. Immunology. 2006年5月 ; 118(1):58-65 ; Polanczyk等人, International Immunology, 第19卷, 第3期, pp.337-343)。本發明有利

地提供用於減少乳癌個體中之T-reg之管內方法及組合物。因此，在一些實施例中，其他治療劑係一或多種旨在減少乳癌個體中之雌激素之抗激素(例如抗雌激素或抗雌激素受體)，且係選自由以下組成之群：他莫昔芬、順式他莫昔芬、因多昔芬、去甲基他莫昔芬、拉索昔芬、雷洛昔芬、苯并噻吩、巴多昔芬、阿佐昔芬、米潑昔芬、左美洛昔芬、屈洛昔芬、氯米芬、艾多昔芬、托瑞米芬、EM652及ERA-923、氟維司群、ARN-810或CH498、阿那曲唑、依西美坦及來曲唑。

【0109】 在一些實施例中，其他治療劑係一或多種檢查點抑制劑且包含選自由以下組成之群之檢查點抑制劑：抗PD-1 (例如尼沃魯單抗)、抗PD-1L (例如阿替珠單抗(MPDL3280)、阿維魯單抗(MSB0010718C)、德瓦魯單抗、MDX-1105)、抗CTLA4 (例如伊匹單抗)、抗LAG-3 (例如IMP321、BMS-986016及GSK2831781)、OX-40激動劑、TIM抑制劑、IDO抑制劑或其組合。

【0110】 本發明提供，用於實踐本發明之一或多種生物活性劑、再極化劑、DC至巨噬球阻斷劑及其他治療劑可為(藉由非限制性實例方式)小分子抑制劑、小分子活化劑、基因、DNA、多核苷酸、寡核苷酸(ODN)、適配體、樹枝狀聚合物、拷貝DNA (cDNA)、裸RNA、信使RNA (mRNA)、微RNA (miRNA)、反義RNA (ASR)、沉默RNA (siRNA)、長非編碼RNA (lncRNA)、蛋白質、多肽、肽、擬肽、誘餌序列、DNA疫苗、RNA疫苗、自擴增mRNA複製子、抗體(人類、人類化、嵌合、單株、多株、單特異性、雙特異性及諸如此類)及抗體片段、醣、多醣、基因療法(例如CRISPR/Cas9-調介之基因編輯)及諸如此類。熟習此項技術者應理解，在本發明(包含申請專利範圍)提及抗體時，申請者意

欲使抗體範圍包含可用於實踐本發明之抗體片段。

【0111】 用於實踐本發明之蛋白質、多肽及肽可分離自天然來源，係合成的，或係以重組方式生成之多肽。肽及蛋白質可在活體外或活體內以重組方式來表現。可使用業內已知之任一方法來製備及分離用於實踐本發明之蛋白質、肽及多肽。亦可使用業內熟知之化學方法來合成(整體或部分)用於實踐本發明之蛋白質、多肽及肽。例如參見Caruthers (1980) *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* 215-223 ; Horn (1980) *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* 225-232 ; Banga, A. K, *Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems* (1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, Pa。舉例而言，可使用各種固相技術實施肽合成(例如參見Roberge (1995) *Science* 269:202 ; Merrifield (1997) *Methods Enzymol.* 289:3-13)且可(例如)使用ABI 431A肽合成器(Perkin Elmer)根據由製造商提供之說明書來達成自動化合成。

【0112】 生物活性劑、再極化劑及DC至巨噬球移位阻斷劑之序列(例如蛋白質、多肽、基因、DNA、核苷酸序列)可視需要自公開及市售來源測定或在業內自(例如) NCBI基因庫及序列查看器知曉。

【0113】 蛋白質、肽及多肽可偶聯至其他部分(例如聚乙二醇(PEG))。舉例而言，IFN α 可經聚乙二醇化或與天門冬醯胺-甘胺酸-精胺酸偶聯。

【0114】 可以各種形式來遞送多核苷酸。在一些實施例中，可使用裸多核苷酸，其呈線性形式，或插入質體(例如表現質體)中。在其他實施例中，可使用活載體，例如病毒或細菌載體。可存在一或多個有助於DNA轉錄成RNA及/或RNA轉譯成多肽之調控序列。在一些情況下，例如

在作為信使RNA (mRNA)分子之多核苷酸之情形下，無需與轉錄過程相關之調控序列(例如啟動子)，且可在不存在啟動子下實現蛋白質表現。熟習此項技術者可視需要包含適宜調控序列。

【0115】 在一些實施例中，多核苷酸存在於表現盒中，其中其可操作地連接至允許多核苷酸表現於投與本發明組合物之個體中之調控序列。表現盒之選擇取決於投與組合物之個體以及表現多肽之期望特徵。

【0116】 通常，表現盒包含：啟動子，其在個體中發揮作用且可為組成型或可誘發型；核糖體結合位點；視需要之起始密碼子(ATG)；編碼所關注多肽之多核苷酸；終止密碼子；及視情況3'末端區域(轉譯及/或轉錄終止子)。可包含其他序列，例如編碼信號肽之區域。編碼所關注多肽之多核苷酸可與表現盒中之其他調控序列中之任一者同源或異源。擬表現序列與所關注多肽(例如信號肽編碼區域)一起通常位於毗鄰編碼擬表現蛋白質之多核苷酸處且置於適當閱讀框中。將由編碼擬表現之蛋白質之多核苷酸單獨或與任一其他擬表現序列(例如信號肽)一起構成之開放閱讀框置於啟動子的控制下，從而在投與組合物之個體中發生轉錄及轉譯。

【0117】 在另一態樣中，本發明提供，本文所揭示之組合物可進一步包括醫藥上可接受之載劑。

【0118】 擬選擇載劑可部分地取決於經管內投與之特定生物活性劑。該等載劑闡述於(例如) Remington's Pharmaceutical Sciences，第16版，Osol, A.編輯(1980)中。醫藥上可接受之載劑在所用劑量及濃度下通常對接受者無毒，且包含(但不限於)：緩衝劑，例如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包含抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(例如十八烷基二甲基苄基氯化銨；氯化六甲雙銨；苯紮氯銨、苄索氯銨；苯酚、丁醇

或苯甲醇；對羥基苯甲酸烷基酯，例如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間-甲酚)；低分子量(小於約10個殘基)多肽；蛋白質，例如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水聚合物，例如聚乙烷基吡咯啉酮；胺基酸，例如甘胺酸、麩胺醯胺、天門冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、二醣及其他碳水化合物，包含葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，例如EDTA；糖，例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；成鹽相對離子，例如鈉；金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合物)；及/或非離子表面活性劑，例如聚乙二醇(PEG)。

【0119】 適宜防腐劑可包含(例如)對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸丙酯、苯甲酸鈉及苯紮氯銨。在一些態樣中，使用兩種或更多種防腐劑之混合物。防腐劑或其混合物通常以佔總組合物約0.0001重量%至約2重量%之量存在。

【0120】 在一些態樣中，緩衝劑包含於組合物中。適宜緩衝劑包含(例如)檸檬酸、檸檬酸鈉、磷酸、磷酸鉀及各種其他酸及鹽。在一些態樣中，使用兩種或更多種緩衝劑之混合物。緩衝劑或其混合物通常以佔總組合物約0.001重量%至約4重量%之量存在。已知製備可投與醫藥組合物之方法。實例性方法更詳細地闡述於(例如) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins；第21版(2005年5月1日)中。

【0121】 調配物可包含水性、酒精性或水醇性溶液。

【0122】 在一些實施例中，組合物之載劑可包括疏水性物質(例如液體疏水性物質)之連續相。連續相可為基本上純之疏水性物質或疏水性物質之混合物。另外，載劑可為水於疏水性物質中之乳液或水於疏水性物質

混合物中之乳液，條件係疏水性物質構成連續相。

【0123】 可用於如本文所闡述之組合物中之疏水性物質係醫藥上可接受者。載劑較佳係液體，但某些在大氣溫度下非液體之疏水性物質可(例如)藉由升溫發生液化，且亦可用於本發明中。在一實施例中，疏水性載劑可為磷酸鹽緩衝鹽水。

【0124】 油或油包水型乳液係用於本發明中之尤其適宜之載劑。油應在醫藥上可接受。適宜油包含(例如)礦物油(尤其輕或低黏度礦物油，例如Drakeol® 6VR)、植物油(例如大豆油)、堅果油(例如花生油)或其混合物。在一實施例中，油係於礦物油溶液中之二縮甘露醇油酸酯且以Montanide® ISA 51形式購得。亦可使用動物脂肪及人工疏水性聚合材料，尤其係在大氣溫度下係液體或可相對容易地液化者。

【0125】 在組合物闡述為係無水脂質體懸浮液(「無水」)之本文實施例中，該等「無水」組合物之疏水性載劑可仍含有少量水，條件係水存在於載劑之非連續相中。舉例而言，組合物之個別組分可具有可未由諸如凍乾或蒸發等製程完全去除之結合水且某些疏水性載劑可含有少量溶於其中之水。通常，基於組合物之載劑組分之總重量，闡述為「無水」之本發明組合物含有(例如)小於約10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%之水(以重量/重量計)。

【0126】 在另一態樣中，本發明提供，將本文所揭示之組合物調配為脂質體、微顆粒、微球體、奈米膠囊、奈米顆粒、奈米球、脂質顆粒、囊泡及微胞。因此，在一些實施例中，一或多種生物活性劑、再極化劑、阻斷劑、其他治療劑或其任一組合包括於(囊封)脂質體、微顆粒、微球體、奈米膠囊、奈米顆粒、奈米球、脂質顆粒、囊泡及微胞中。在其他實

施例中，一或多種生物活性劑、再極化劑、阻斷劑、其他治療劑或其任一組合包括於脂質體、微顆粒、微球體、奈米膠囊、奈米顆粒、奈米球、脂質顆粒、囊泡及微胞之表面上。在再其他實施例中，一或多種生物活性劑、再極化劑、阻斷劑、其他治療劑或其任一組合可包括於脂質體、微顆粒、微球體、奈米膠囊、奈米顆粒、奈米球、脂質顆粒、囊泡及微胞中及位於其表面上。

【0127】 製備脂質體、奈米顆粒、微顆粒、微球體、奈米膠囊、奈米球、脂質顆粒、囊泡及微胞之方法在業內已眾所周知。

【0128】 脂質體係含有包埋水性體積之完全閉合性脂質膜。脂質體可為單室囊泡(擁有單一雙層膜)或特徵在於多膜雙層(每一雙層可或可不與下一雙層由水層隔開)之多室囊泡。如本文及申請專利範圍中所使用，術語「脂質體」意欲涵蓋如上文所闡述之所有該等囊泡結構，包含(但不限於)在業內闡述為「類脂質體」、「傳遞體」及「病毒體」者。脂質體顆粒之兩親性結構使得能夠囊封親水性及疏水性醫藥藥物。

【0129】 脂質體之一般論述可參見：Akbarzadeh等人，Nanoscale Research Letters 2013, 8:102；Gregoriadis G. Immunol. Today, 11:89-97, 1990；及Frezard, F., Braz. J. Med. Bio. Res., 32:181-189, 1999。可使用製備脂質體之任一適宜方法來實踐本發明，或可自商業來源獲得脂質體。通常藉由使與水溶液形成脂質雙層(例如磷脂及膽固醇)之脂質體組分發生水合來製備脂質體，該水溶液可為純水或一或多種組分溶於水中之溶液(例如磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)、無磷酸鹽鹽水或任一其他生理上相容之水溶液)。

【0130】 可(例如)藉由使用天然脂質、合成脂質、鞘脂、醚脂質、

固醇、心磷脂、陽離子脂質及經聚(乙二醇)及其他聚合物修飾之脂質來獲得脂質體組合物。合成脂質可包含下列脂肪酸組分：月桂醯基、肉豆蔻醯基、棕櫚醯基、硬脂醯基、花生醯基、油醯基、亞油醯基、瓢兒菜基或該等脂肪酸之組合。尤其適於製備脂質體之脂質包含(但不限於)磷脂、二油醯基磷脂醯膽鹼(DOPC)、二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)、三油酸甘油酯、二棕櫚醯基磷脂醯甘油(DPPG)、氫化大豆磷脂醯膽鹼(HSPC)、二硬脂醯基磷脂醯甘油(DSPG)、二油醯基磷脂醯膽鹼(DOPG)、膽固醇、三辛酸甘油酯、三油酸甘油酯、N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸-乙醇胺鈉鹽(MPEG-DSPE)、卵磷脂、腦磷脂、鞘磷脂、雞蛋磷脂醯膽鹼(EPC)、六水合琥珀酸二鈉(DSH)、(1,2-雙(油醯基氧基)-3-(三甲基銨基)丙烷)(DOTAP)、1-[2-(油醯基氧基)乙基]-2-油基-3-(2-羥乙基)氯化咪唑鎊(DOTIM)、二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼(DMPC)及二肉豆蔻醯基磷脂醯甘油(DMPG)。

【0131】 陽離子合成脂質(例如DOTAP及DOTIM)可用於製備對腫瘤血管系統及乳管具有親和力之陽離子脂質體。在一些實施例中，使用陽離子合成脂質來製備脂質體、奈米顆粒、微顆粒、微球體、奈米膠囊、奈米球、脂質顆粒、囊泡、微胞。

【0132】 儘管可在本發明中使用任何脂質體(包含自古細菌脂質製得之脂質體)，但在至少一實施例中，在脂質體調配物中使用磷脂及未酯化膽固醇。使用膽固醇來穩定脂質體且任一穩定脂質體之其他化合物可代替膽固醇。熟習此項技術者已知其他脂質體穩定化合物。舉例而言，飽和磷脂產生具有較高轉變溫度(指示增加之穩定性)之脂質體。

【0133】 較佳地用於製備脂質體之磷脂係具有至少一個選自由以下

組成之群之頭基者：磷酸甘油、磷酸乙醇胺、磷酸絲胺酸、磷酸膽鹼及磷酸肌醇。在一些實施例中，脂質體包括含有94-100%磷脂醯膽鹼之脂質。該等脂質可以卵磷脂Phospholipon® 90 G形式購得。在未酯化膽固醇亦用於脂質體調配物中時，膽固醇係以等效於約10重量%磷脂之量來使用。若使用除膽固醇外之化合物來穩定脂質體，則熟習此項技術者可易於確定組合物中之所需量。

【0134】 在其他實施例中，可將脂質體組分或脂質體組分混合物(例如磷脂(例如Phospholipon® 90G)、二油醯基磷脂醯膽鹼(DOPC)、三油酸甘油酯、二棕櫚醯基磷脂醯甘油(DPPG)、氫化大豆磷脂醯膽鹼(HSPC)、二硬脂醯基磷脂醯甘油(DSPG)、二油醯基磷脂醯膽鹼(DOPG)、膽固醇、三辛酸甘油酯、三油酸甘油酯、N-(羧基-甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸-乙醇胺鈉鹽(MPEG-DSPE)、卵磷脂、腦磷脂、鞘磷脂、雞蛋磷脂醯膽鹼(EPC)、六水合琥珀酸二鈉(DSH)、二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼(DMPC)、二肉豆蔻醯基磷脂醯甘油(DMPG))溶於有機溶劑(例如氯仿及甲醇之混合物)，隨後過濾(例如PTFE 0.2 μm過濾器)並乾燥(例如藉由旋轉蒸發)以去除溶劑。

【0135】 可藉由(例如)將脂質混合物注射至水溶液中或超音波處理脂質混合物及水溶液來實現所得脂質混合物之水合。在形成脂質體期間，脂質體組分環繞水溶液體積形成單一雙層(單室)或多個雙層(多室)，該水溶液與脂質體組分發生水合。

【0136】 在其他實施例中，可組合脂質體與包括連續疏水相之載劑。

【0137】 若載劑僅由疏水性物質或疏水性物質混合物構成(例如使用

100%礦物油載劑)，則可簡單混合脂質體與疏水性物質，或若存在多種疏水性物質，則與其中之任一者或組合進行混合。若包括疏水性物質之連續相之載劑代之以含有不連續水相，則載劑通常呈水相於疏水相中之乳液形式(例如油包水型乳液)。該等組合物可含有乳化劑來穩定乳液且促進脂質體之均勻分佈。即使使用無水載劑，乳化劑亦可用於促進脂質體在載劑中之均勻分佈之目的。典型乳化劑包含二縮甘露醇油酸鹽(Arlacel™ A)、卵磷脂(例如S100卵磷脂)、磷脂、Tween™ 80及Spans™ 20、80、83及85。在一些實施例中，疏水性物質對乳化劑之體積比率(v/v)在約5:1至約15:1之範圍內。在至少一實施例中，該比率約為10:1。

【0138】 可將脂質體添加至最終乳液中，或其可在乳化之前存在於水相或疏水相中。在一些實施例中，可然後(例如)藉由冷凍乾燥或凍乾來將脂質體去水。

【0139】 可在調配製程之各個不同階段引入一或多種生物活性劑。可將一類以上生物活性劑(及/或再極化劑或阻斷劑)納入組合物中(例如抗體及小分子抑制劑或siRNA及mRNA、多肽及RNA疫苗等)。

【0140】 在一些實施例中，一或多種生物活性劑(及/或再極化劑或阻斷劑)存在於用於水合用以形成脂質體之脂質雙層之組分(例如磷脂及膽固醇)之水溶液中。在此情形下，一或多種生物活性劑(及/或再極化劑或阻斷劑)將囊封於脂質體中且存在於其水性內部。若並不洗滌或乾燥所得脂質體以便存在殘餘水溶液(其最終與包括疏水性物質之連續相之載劑混合)，則其他極化劑或阻斷劑可存在於最終產物中之脂質體外部。

【0141】 在一相關技術中，在與水溶液水合之前，可將一或多種生物活性劑(及/或再極化劑或阻斷劑)與用於形成脂質體之脂質雙層之組分混

合。亦可將一或多種生物活性劑添加至預形成脂質體中，在該情形下，可將一或多種生物活性劑主動加載至脂質體中(亦即囊封)或加載於脂質體之表面上(例如結合)或抗原可保留於脂質體外部。在該等實施例中，在添加一或多種生物活性劑之前，預形成脂質體可為空脂質體(例如不含囊封之一或多種生物活性劑及/或再極化劑或阻斷劑)或預形成脂質體可含有一或多種納入脂質體中或與其締合之生物活性劑。該等步驟可發生於與包括疏水性物質之連續相之載劑混合之前。

【0142】 在一替代方式中，在組合包括疏水性物質之連續相之載劑與脂質體之前、期間或之後，可代之以混合一或多種生物活性劑(及/或再極化劑或阻斷劑)與載劑。若載劑係乳液，則可在乳化之前混合一或多種生物活性劑(及/或再極化劑或阻斷劑)與水相或疏水相中之任一者或兩者。或者，可在乳化之後混合一或多種生物活性劑(及/或再極化劑或阻斷劑)與載劑。在一些實施例中，一或多種生物活性劑(及/或再極化劑或阻斷劑)可存在於脂質體內亦及包括疏水性物質之連續相之載劑中。

【0143】 若包括一或多種生物活性劑之組合物進一步包括其他治療劑，則可如上文所闡述來組合其他治療劑。

【0144】 可向該等組合物中添加穩定劑(例如糖，例如蔗糖)、抗氧化劑(例如 α -生育酚)或防腐劑(其維持生物活性或改良化學穩定性以延長一或多種生物活性劑之儲放壽命)。其他賦形劑可包含鹽，例如氯化鈉(NaCl)及氯化鈣、去水磷酸二鈉、磷酸二氫鉀。

【0145】 在一實施例中，為調配本發明組合物，在一或多種生物活性劑(例如 α DC混合劑、TLR3激動劑聚(I:C)及IFN α 以及TLR9激動劑CpG-ODNS及OX-40激動劑)存在下視情況於磷酸鹽緩衝液中對S100卵磷脂及

膽固醇(例如10:1 w:w)之均質混合物實施水合以形成具有囊封之一或多種生物活性劑之脂質體。可然後視情況經由人工微型擠出機擠出脂質體製劑，且視情況與其他治療劑或成像劑混合。可然後凍乾此懸浮液且重構於包括疏水性物質之連續相之載劑中以形成無水脂質體懸浮液。

【0146】 在一些實施例中，可藉由對至少一種選自由以下組成之群之脂質組分與一或多種生物活性劑之均質混合物(例如10:1 w:w)實施水合以形成經再極化劑、阻斷劑或二者囊封的脂質體來調配組合物：三油酸甘油酯、二棕櫚醯基磷脂醯甘油(DPPG)、氫化大豆磷脂醯膽鹼(HSPC)、二硬脂醯基磷脂醯甘油(DSPG)、二油醯基磷脂醯膽鹼(DOPG)、膽固醇、三辛酸甘油酯、三油酸甘油酯、N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸-乙醇胺鈉鹽(MPEG-DSPE)、卵磷脂(0.01 mg/ml至0.2 mg/ml)、腦磷脂(0.005 mg/ml至0.05 mg/ml)、鞘磷脂、雞蛋磷脂醯膽鹼(EPC)、六水合琥珀酸二鈉(DSH)、二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼(DMPC)、二肉豆蔻醯基磷脂醯甘油(DMPG)。

【0147】 在其他實施例中，可藉由在一或多種生物活性劑存在下視情況於磷酸鹽緩衝液中對至少兩種選自由以下組成之群之脂質組分(例如10:1 w:w)之均質混合物實施水合以形成經一或多種生物活性劑囊封的脂質體來調配組合物：三油酸甘油酯、二棕櫚醯基磷脂醯甘油(DPPG)、氫化大豆磷脂醯膽鹼(HSPC)、二硬脂醯基磷脂醯甘油(DSPG)、二油醯基磷脂醯膽鹼(DOPG)、膽固醇、三辛酸甘油酯、三油酸甘油酯、N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸-乙醇胺鈉鹽(MPEG-DSPE)、卵磷脂(0.01 mg/ml至0.2 mg/ml)、腦磷脂(0.005 mg/ml至0.05 mg/ml)、鞘磷脂、雞蛋磷脂醯膽鹼(EPC)、六水合琥珀酸二鈉(DSH)、二

肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼(DMPC)、二肉豆蔻醯基磷脂醯甘油(DMPG)。

【0148】 在一些實施例中，可藉由在一或多種生物活性劑存在下視情況於磷酸鹽緩衝液中對二油醯基-磷脂醯膽鹼(DOPC)及膽固醇(例如 10:1 w:w)之均質混合物實施水合以形成經一或多種生物活性劑囊封之脂質體來調配組合物。

【0149】 在一態樣中，本發明提供，將包括一或多種生物活性劑(及/或再極化劑或阻斷劑)之組合物調配為奈米顆粒。在一些實施例中，舉例而言，奈米顆粒可為脂質奈米顆粒(例如經修飾脂質體)。奈米級經修飾脂質體已展示具有關於遞送DNA、反義寡核苷酸、siRNA、蛋白質及化學治療劑之極佳藥物動力學特徵。因此，在一些實施例中，一或多種生物活性劑(及/或再極化劑或阻斷劑)包括於脂質奈米顆粒中。在其他實施例中，將一或多種生物活性劑加載於奈米顆粒(例如脂質顆粒，例如經脂質塗覆之奈米顆粒，如**實例1**中所展示)或脂質體之表面上。

【0150】 其他適宜奈米顆粒包含聚合奈米顆粒(例如使用生物可降解合成聚合物(例如聚交酯-聚乙醇酸交酯共聚物、聚丙烯酸酯及聚己內酯)或天然聚合物(例如白蛋白、明膠、海藻酸鹽、膠原及幾丁聚醣)製得)、聚合微胞、水凝膠奈米顆粒、樹枝狀聚合物、貴金屬奈米顆粒(例如金奈米顆粒)及諸如此類。

【0151】 在一些實施例中，該組合物包括平均(average或mean)直徑不大於約1000奈米(nm) (例如不大於約900、800、700、600、500、400、300、200及100 nm中之任一者)之奈米顆粒。在一些實施例中，奈米顆粒之平均直徑不大於約200 nm。在一些實施例中，奈米顆粒之平均直徑不大於約150 nm。在一些實施例中，奈米顆粒之平均直徑不大於約

100 nm。在一些實施例中，奈米顆粒之平均直徑為約20 nm至約400 nm。在一些實施例中，奈米顆粒之平均直徑為約40 nm至約200 nm。在一些實施例中，奈米顆粒可無菌過濾。

【0152】 在一些實施例中，可藉由改變pH、溫度、放射頻率或磁場來觸發自奈米顆粒-及脂質體反應性聚合物或水凝膠釋放一或多種生物活性劑。

【0153】 在一態樣中，本發明提供，脂質體、微顆粒、微球體、奈米膠囊、奈米顆粒、奈米球、脂質顆粒、囊泡及微胞經調配用於靶特异性藥物遞送。藉由使奈米顆粒及脂質體與一或多種靶向APC (例如DC、M1-巨噬球及B細胞)之細胞靶向劑偶聯來實現該靶特异性。適用於本發明目的之細胞靶向劑可為任一APC特异性細胞表面分子。在期望將M2-DC再極化成免疫原性DC1之情形下，細胞靶向劑可為任一M2-DC-選擇性細胞表面分子。本發明提供，使用一或多種M2-DC-選擇性細胞表面分子塗覆奈米顆粒及脂質體。熟習此項技術者將認識到，M2-DC-選擇性細胞表面分子可排他性地存在於M2-DC上-但亦可存在於其他DC上。然而，適宜M2-DC-選擇性細胞表面分子係排他性地表現於M2-DC上或在M2-DC上之表現程度高於非M2-DC者。適用於本發明目的之M2-DC-選擇性細胞表面分子包含(但不限於) C1q蛋白質。適用於本發明之其他細胞靶向劑包含(但不限於) APC上之細胞表面分子，例如DEC-205、Clec9A (DNGR-1)、DC-SIGN、BDCA1、BDCA2、BDCA3及BDCA4。

【0154】 本文所闡述之奈米顆粒可存在於乾燥調配物(例如凍乾組合物)中或懸浮於生物相容介質中。適宜生物相容介質包含(但不限於)水、緩衝水性介質、鹽水、緩衝鹽水、胺基酸之視情況緩衝溶液、蛋白質之視

情況緩衝溶液、糖之視情況緩衝溶液、維他命之視情況緩衝溶液、合成聚合物之視情況緩衝溶液、含脂質乳液及諸如此類。

【0155】 可藉由業內已知之任一方法來製備奈米顆粒(參見Pal等人, *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 01 (06); 2011: 228-234; Hu Y等人, *Nanoparticles. Nano Letters.* 2007; 7:3056-3064; Hu YH等人, *Biomacromolecules.* 2009; 10:756-765; Lynn DM, Langer R. *Journal of the American Chemical Society.* 2000; 122:10761-10768)。

【0156】 可藉由任一已知適宜方式來添加一或多種生物活性劑、極化劑、阻斷劑及其他治療劑。藉由非限制性實例方式, 可將DNA序列(線性或呈質體及盒形式)添加至脂質體、微顆粒、微球體、奈米膠囊、奈米顆粒、奈米球、脂質顆粒、囊泡及微胞中, 如藉由Goncalves等人、Su等人所闡述。

【0157】 本發明提供, 脂質體、微顆粒、微球體、奈米膠囊、奈米顆粒、奈米球、脂質顆粒、囊泡及微胞之脂質對核酸比率(LNR)介於30:1至2.5:1之間。在一些實施例中, 脂質體、微顆粒、微球體、奈米膠囊、奈米顆粒、奈米球、脂質顆粒、囊泡及微胞之LNR介於25:1至5:1之間。在至少一實施例中, 脂質體、微顆粒、微球體、奈米膠囊、奈米顆粒、奈米球、脂質顆粒、囊泡及微胞之LNR介於20:1至10:1之間。

【0158】 本發明提供, 脂質體、微顆粒、微球體、奈米膠囊、奈米顆粒、奈米球、脂質顆粒、囊泡及微胞之脂質對蛋白質比率(LPR)介於30:1至1:1之間。在一些實施例中, 脂質體、微顆粒、微球體、奈米膠囊、奈米顆粒、奈米球、脂質顆粒、囊泡及微胞之LNR介於25:1至5:1之間。在至少一實施例中, 脂質體、微顆粒、微球體、奈米膠囊、奈米顆

粒、奈米球、脂質顆粒、囊泡及微胞之LNR介於20:1至10:1之間。

【0159】 本發明提供，本發明之脂質體、微顆粒、微球體、奈米膠囊、奈米顆粒、奈米球、脂質顆粒、囊泡及微胞之小分子藥物對脂質(D/L)比率通常為至少0.05、0.1、0.2、0.35、0.5或至少0.65 mg藥物/mg脂質。就莫耳比率而言，本發明之D/L比率為至少約0.02至約5、至少0.1至約2及約0.15至約1.5莫耳藥物/莫耳脂質。

【0160】 在一態樣中，本發明提供，包括一或多種生物活性劑之組合物進一步包括成像劑、染料或對比劑。適宜成像劑可為釷螯合物、超順磁氧化鐵奈米顆粒(SPION)、¹⁹F全氟碳奈米顆粒及其他磁性報告基因(例如基於金屬蛋白之MRI探針)。添加本文所揭示之成像劑、染料及對比劑會提供額外優點，亦即追蹤本文所揭示組合物之管內遞送及藉由其他機制吞噬、胞飲或吸收該等組合物之APC之遷移。

【0161】 在一些實施例中，將組合物調配為儲積調配物、延長釋放調配物、受控釋放調配物。

【0162】 本文所揭示之組合物適於經管內投與個體之乳管。

【0163】 在一態樣中，本發明提供，可藉由業內已知之任一方法將本文所揭示之組合物經管內遞送至個體之一或多個乳管。該等方法包含(但不限於)使用注射器/針(Krause等人，J. Vis. Exp. 2013；(80): 50692)、微型針(例如固體-、藥物塗覆-、空心-及可溶微型針)、套管、微型套管、導管、微型導管及探針進行注射。

【0164】 適於經皮投與藥物之微型針可用於實踐本發明(Kim等人，Adv Drug Deliv Rev. 2012 Nov；64(14): 1547-1568，其全部內容併入本文中)。

【0165】 作為一非限制性實例，在一些實施例中，可將本文所揭示之組合物經管內投與個體之乳管中，包括使含於裝置治療室內之本文所揭示之組合物與乳頭接觸並對組合物施加正壓，從而迫使組合物因正壓而經由乳管孔口進入乳房乳管中。較佳地，迫使組合物進入一或多種乳管。在其他實施例中，迫使組合物進入2至5個乳管、4至8個乳管或7至11個乳管中。

【0166】 舉例而言，美國專利6,413,228揭示能夠收集管流體且向管輸注洗滌流體之管接入裝置。此一裝置可經適當改進或構形以用於本發明目的，亦即經管內遞送本發明組合物。

【0167】 作為管內投與之替代方法，可將小幫浦安置於乳管中或可到達乳管之乳頭表面處以用於將組合物緩慢連續投與管區，舉例而言，可將幫浦安置於輸乳竇中以用於在其中投與組合物及使得組合物擴散至乳管之其餘部分，或可將幫浦安置於可到達乳管之乳頭表面上。安置於乳頭表面處之幫浦可成型為例如如圖釘(或具有頂部或圖釘部分之套管形部分)並擱置於乳頭表面上，其中一部分延伸至需要治療或具有需要治療之風險之乳管中。幫浦機構可包括(例如) Duros™滲透(微)幫浦(Viadur) (由 Johnson & Johnson所收購之Alza Corp製得)、IntelliDrug、Alzet® (Durect Corp.)、Ivomec SR®濃注等(Herrlich等人，Advanced Drug Delivery Reviews. 2012，第1617 - 1626頁)。

【0168】 亦可基本上如美國專利第5,531,736號、美國專利第5,279,608號、美國專利第5,562,654號、美國專利第5,827,538號、美國專利第5,798,119號、美國專利第5,795,591號、美國專利第4,552,561號或美國專利第5,492,534號中所闡述之幫浦來組裝或構形滲透幫浦，且適當改

良大小及體積以用於投與乳管中，例如用於置於乳管(例如輸乳竇)中或用於置於乳頭表面上。尖端(其接入乳管)可能能夠旋轉以容納乳頭表面上之各個位置之乳管。單一圖釘頭(tack-head)幫浦可具有一或多個尖端置於圖釘頭下方以接入一或多個特定乳管，舉例而言，其中需要接入乳房中兩個或更多個乳管。如此構形且載有本文所揭示用於管內投與之適當調配組合物之幫浦可投與所述組合物，但亦可含有且投與本文所揭示之組合物以外用於適當治療目的之藥劑以用於治療乳管中之初癌或癌症病狀。幫浦可設想構形以投與位於乳房中具有一些大小及體積變化之所有乳管。

【0169】 在另一態樣中，可使用離子電滲來輔助本文所揭示組合物之管內遞送，離子電滲涉及向乳房施加電流以幫助細胞遷移至乳管中及/或乳管內。

【0170】 通常設計本文所揭示組合物之投藥時間及大小以減小毒性結果風險或最小化毒性結果及/或改良效能，例如提供個體較迅速及增加暴露(例如隨時間)於組合物。投與之量及頻率取決於諸如患者病狀、年齡、體重、腫瘤大小及階段、表面積及個體疾病之嚴重程度等因素，但可由主治醫師來確定適當劑量。

【0171】 最佳劑量及投藥方案可由熟習醫學技術者輕易藉由監測患者之疾病體徵且由此調節治療來確定。可以該等劑量投與組合物多次。因此，該等方法可涉及在一定時間段內之單一劑量或多個劑量，或例如藉由輸注連續劑量。在一些實施例中，劑量可為單一單位劑量。在其他實施例中，單一劑量可為分割單位劑量。如本文中所使用，術語「分割單位劑量」係指單位劑量經分割，因而在一天期間(包含一天以上)投與一次以上。用於本發明目的之分割單位劑量視為單一(亦即一個)單位劑量。分割

劑量之實例性方法包含在第一天投與25%之劑量且在次日投與剩餘劑量。在另一實施例中，單位劑量可分成2個，各50%在連續2天遞送。在又一實施例中，分割單位劑量可在2隔天給予。在另一實施例中，單位劑量可分成3個在連續3天等量投與。

【0172】 在一態樣中，本發明提供，以 1×10^4 至 1×10^8 個脂質體、微顆粒、微球體、奈米膠囊、奈米顆粒、奈米球、脂質顆粒或囊泡/每單位劑量之濃度來經管內投與包括脂質體、微顆粒、微球體、奈米膠囊、奈米顆粒、奈米球、脂質顆粒及囊泡之中之任一者之組合物。

【0173】 在一態樣中，本發明提供，向個體投用本文所揭示之組合物，其中以如表2中所提供之劑量範圍來經管內投與一或多種生物活性劑。

表2.實例性生物活性劑量範圍。

編號	生物活性劑	實例性劑量範圍
1	TNF α	0.01 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$
2	IL-1 β	0.2 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至20 $\mu\text{g}/\text{m}^2$
3	IFN γ	1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$
4	IFN α -2b	1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至300 $\mu\text{g}/\text{m}^2$
5	聚(I:C)	0.1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至50 $\mu\text{g}/\text{m}^2$
6	TLR9激動劑CpG-ODN	0.01 mg/m^2 至40 mg/m^2
7	OX-40激動劑	0.01 mg/m^2 至500 mg/m^2

【0174】 在一些實施例中，本發明提供，向個體經管內投與包括單位劑量介於0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之間之TNF α 之組合物。在一些實施例中，該等組合物包括以0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之

單位劑量投與之TNF α 。

【0175】 在一些實施例中，本發明提供，向個體經管內投與包括單位劑量介於0.01 $\mu\text{g/mL}$ 至20 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 至15 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 至10 $\mu\text{g/mL}$ 及1 $\mu\text{g/mL}$ 至10 $\mu\text{g/mL}$ (每單位劑量)之間之IL-1 β 之組合物。在一些實施例中，該等組合物以0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 及20 $\mu\text{g/mL}$ 之單位劑量包括IL-1 β 。

【0176】 在一些實施例中，本發明提供，向個體經管內投與包括單位劑量介於1 $\mu\text{g/mL}$ 至100 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 至80 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 至75 $\mu\text{g/mL}$ 及50 $\mu\text{g/mL}$ 至75 $\mu\text{g/mL}$ 之間之IFN γ 之組合物。在一些實施例中，本文所揭示之組合物以1 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、15 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、75 $\mu\text{g/mL}$ 及100 $\mu\text{g/mL}$ 之單位劑量包括IFN γ 。

【0177】 在一些實施例中，本發明提供，向個體經管內投與包括單位劑量介於1 $\mu\text{g/mL}$ 至300 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 至250 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 至200 $\mu\text{g/mL}$ 及50 $\mu\text{g/mL}$ 至150 $\mu\text{g/mL}$ 之間之IFN α 之組合物。在一些實施例中，本文所揭示之組合物以1 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、15 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、75 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、125 $\mu\text{g/mL}$ 、150 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、250 $\mu\text{g/mL}$ 及300 $\mu\text{g/mL}$ 之單位劑量包括IFN α 。

【0178】 在一些實施例中，本發明提供，向個體經管內投與包括單位劑量介於0.01 $\mu\text{g/mL}$ 至50 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 至40 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 至25 $\mu\text{g/mL}$ 及1 $\mu\text{g/mL}$ 至20 $\mu\text{g/mL}$ 之間之TLR3激動劑(例如聚(I:C))之組合物。在一些實施例中，該等組合物以0.01 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 、30

$\mu\text{g/mL}$ 、 $35 \mu\text{g/mL}$ 、 $40 \mu\text{g/mL}$ 、 $45 \mu\text{g/mL}$ 及 $50 \mu\text{g/mL}$ 之單位劑量包括聚(I:C)。

【0179】 在一些實施例中，本發明提供，向個體經管內投與包括單位劑量介於 $0.01 \mu\text{g/mL}$ 至 20 mg/mL 、 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 至 15 mg/mL 、 $1 \mu\text{g/mL}$ 至 10 mg/mL 、 $10 \mu\text{g/mL}$ 至 5 mg/mL 、 $50 \mu\text{g/mL}$ 至 1 mg/mL 之間之TLR9激動劑(例如CpG-ODN)之組合物。在一些實施例中，該等組合物以 $0.01 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 、 $1 \mu\text{g/mL}$ 、 $5 \mu\text{g/mL}$ 、 $10 \mu\text{g/mL}$ 、 $20 \mu\text{g/mL}$ 、 $25 \mu\text{g/mL}$ 、 $50 \mu\text{g/mL}$ 、 $100 \mu\text{g/mL}$ 、 $200 \mu\text{g/mL}$ 、 $300 \mu\text{g/mL}$ 、 $400 \mu\text{g/mL}$ 、 0.5 mg/mL 、 1 mg/mL 、 2 mg/mL 、 4 mg/mL 、 6 mg/mL 、 8 mg/mL 、 10 mg/mL 、 15 mg/mL 及 20 mg/mL 之單位劑量包括CpG-ODN。

【0180】 在一些實施例中，本發明提供，向個體經管內投與有效量之包括單位劑量介於 0.01 mg/mL 至 50 mg/mL 、 0.1 mg/mL 至 40 mg/mL 、 0.5 mg/mL 至 30 mg/mL 及 1 mg/mL 至 25 mg/mL 之間之OX-40激動劑(例如抗OX-40抗體)之組合物。在一些實施例中，該等組合物以 0.01 mg/mL 、 0.05 mg/mL 、 0.1 mg/mL 、 0.5 mg/mL 、 1 mg/mL 、 2 mg/mL 、 4 mg/mL 、 6 mg/mL 、 8 mg/mL 、 10 mg/mL 、 15 mg/mL 、 20 mg/mL 、 25 mg/mL 、 30 mg/mL 、 35 mg/mL 、 40 mg/mL 、 45 mg/mL 及 50 mg/mL 之單位劑量包括OX-40激動劑。

【0181】 在一些實施例中，本發明提供，向個體經管內投與有效量之包括 αDC 混合劑($\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 $\text{IFN}\gamma$ 、 $\text{IFN}\alpha$ 及聚(I:C))之組合物。在一些實施例中，本發明提供，向個體經管內投與包括 αDC 混合劑之組合物，其中組合物之單位劑量包括： $\text{TNF}\alpha$ ，其介於 $0.05 \mu\text{g/mL}$ 至 $150 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 至 $100 \mu\text{g/mL}$ 及 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 至 $50 \mu\text{g/mL}$ 之間； $\text{IL-1}\beta$ ，

其介於0.01 $\mu\text{g/mL}$ 至20 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 至15 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 至10 $\mu\text{g/mL}$ 及1 $\mu\text{g/mL}$ 至10 $\mu\text{g/mL}$ 之間； $\text{IFN}\gamma$ ，其介於1 $\mu\text{g/mL}$ 至100 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 至80 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 至75 $\mu\text{g/mL}$ 及50 $\mu\text{g/mL}$ 至75 $\mu\text{g/mL}$ 之間；1 $\mu\text{g/mL}$ 至300 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 至250 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 至200 $\mu\text{g/mL}$ 及50 $\mu\text{g/mL}$ 至150 $\mu\text{g/mL}$ ；及聚(I:C)，其介於0.01 $\mu\text{g/mL}$ 至50 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 至40 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 至25 $\mu\text{g/mL}$ 及1 $\mu\text{g/mL}$ 至20 $\mu\text{g/mL}$ 之間。

【0182】 在一些實施例中，本發明提供，向個體經管內投與包括TLR9激動劑CpG-ODN及OX-40激動劑抗體之組合物，其中組合物之單位劑量包括介於0.01 $\mu\text{g/mL}$ 至20 mg/mL 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 至15 mg/mL 、1 $\mu\text{g/mL}$ 至10 mg/mL 、10 $\mu\text{g/mL}$ 至5 mg/mL 、50 $\mu\text{g/mL}$ 至1 mg/mL 之間之CPG-ODN及介於0.01 mg/mL 至50 mg/mL 、0.1 mg/mL 至40 mg/mL 、0.5 mg/mL 至30 mg/mL 及1 mg/mL 至25 mg/mL 之間之OX-40激動劑抗體。

【0183】 在一些實施例中，本發明提供，向個體經管內投與包括TLR3激動劑聚(I:C)及 $\text{IFN}\alpha$ 之組合物，其中組合物之單位劑量包括介於0.01 $\mu\text{g/mL}$ 至50 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 至40 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 至25 $\mu\text{g/mL}$ 及1 $\mu\text{g/mL}$ 至20 $\mu\text{g/mL}$ 之間之聚(I:C)及介於1 $\mu\text{g/mL}$ 至300 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 至250 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 至200 $\mu\text{g/mL}$ 及50 $\mu\text{g/mL}$ 至150 $\mu\text{g/mL}$ 之間之 $\text{IFN}\alpha$ 。

【0184】 本文所揭示之方法涉及將一或多個連續劑量之組合物投與可能已接受第一劑量之個體的乳管中，及/或投與第一及一或多個後續劑量。以特定量且根據特定時刻時間表及參數來投與各劑量。

【0185】 在另一態樣中，經管內投與第一劑量且藉由任一適宜方式

(包含經管內；藉由注射及藉由輸注，例如靜脈內或皮下注射、眼內注射、眼周注射、視網膜下注射、玻璃體內注射、經中隔注射、鞏膜下注射、脈絡膜內注射、前房注射、結膜下注射、結膜下注射、特農囊下注射(sub-Tenon's injection)、眼球後注射、眼球周注射或球周鞏膜後遞送)投與任一後續劑量。在一些實施例中，其係藉由非經腸、肺內及鼻內及(若期望局部治療)病灶內投與來投與。非經腸輸注包含肌內、靜脈內、動脈內、腹膜內、胸腔內、顱內或皮下投與。

【0186】 在一些實施例中，該等方法通常涉及經管內投與第一劑量之本文所揭示之組合物，由此減小疾病負荷。可隨後相對於第一劑量在特定時間窗期間投與後續劑量之組合物或向正接受第一劑量之個體投與後續劑量。在一些實施例中，第一劑量相對較低。設計所投與組合物之量及組合物劑量之時刻以改良一或多種結果，例如APC (乳房組織駐留、腫瘤組織駐留或自來APC)成熟，增加載有抗原之完全成熟APC至引流淋巴結(及(若存在)異位及/或三級淋巴結)之遷移，活化T細胞、B細胞及/或NK細胞之效應細胞功能中之任一者，增加T細胞、B細胞及/或NK細胞中之任一者之乳房腫瘤浸潤，減少T-reg，減小免疫抑制，減小腫瘤大小且增加促發炎性細胞介素、趨化介素，再極化M2-DC，減小或防止M2-轉變，募集細胞毒性T-淋巴球，及其他免疫反應。

【0187】 在一些實施例中，本文揭示涉及相對於第一/初始劑量以增加之數量及由此較高劑量來投與後續組合物劑量之方法。

【0188】 在投藥方案涉及多個劑量之情形下，可每天一次、一天多次(兩次、三次、四次及諸如此類)、隔天、每2天、每3天、每5天、每7天、每14天、每15天、每3週、每28天、每月一次、每季一次、每6個月

一次及一年一次來投與每一劑量。

【0189】 在一些態樣中，自開始初始(第一)劑量至開始下一劑量來量測初始劑量後之劑量時刻。在其他實施例中，自完成初始(第一)劑量時來量測初始劑量後之劑量時刻。

【0190】 本發明涵蓋，初始劑量可為分割單位劑量，隨後投與第二劑量。在一些實施例中，第二或後續劑量可為分割單位劑量。藉由非限制性實例方式，可經三天投與分割單位劑量且在第二天投與第二單位劑量或其可在一年後投與。初始劑量意欲對需要此一劑量之個體產生任何限制，此意味著該個體在此之前從未接受一定劑量之細胞療法，或甚至該個體在此之前未接受一定劑量之表現相同重組受體或靶向相同抗原之相同細胞。

【0191】 通常，可以 1×10^4 至 1×10^8 個脂質體、微顆粒、微球體、奈米膠囊、奈米顆粒、奈米球、脂質顆粒或囊泡中之任一者/每單位劑量來經管內投與如本文所闡述之組合物。

【0192】

組合療法

本發明涵蓋，本文所揭示之管內方法進一步包括組合療法。在一態樣中，管內方法進一步包括向個體投與一或多種其他治療劑或療法。可藉由業內已知之任一適宜方式(包含(但不限於)經管內、經局部、經口、經鼻、非經腸、藉由注射或輸注、經皮下等)向個體投與其他治療劑。其他治療劑可包括於本文所揭示之組合物中或可獨立調配。治療劑及/或療法之投與順序可為任一投與順序。舉例而言，可共投與本文所揭示之組合物與其他治療劑，或可首先投與其他治療劑或可在投與本發明組合物之後投與其他治療劑。

【0193】 其他治療劑可為任一可用於本發明目的者。

【0194】 實例性其他治療劑包含(但不限於)檢查點抑制劑、旨在減少乳癌個體中之雌激素之抗激素(例如抗雌激素或抗雌激素受體，例如他莫昔芬、順式他莫昔芬、因多昔芬、去甲基他莫昔芬、拉索昔芬、雷洛昔芬、苯并噻吩、巴多昔芬、阿佐昔芬、米潑昔芬、左美洛昔芬、屈洛昔芬、氯米芬、艾多昔芬、托瑞米芬、EM652及ERA-923、氟維司群、ARN-810或CH498、阿那曲唑、依西美坦及來曲唑)、類固醇、蔥環、甲狀腺激素代替藥物、細胞毒性劑(例如烷基化劑(例如替莫唑胺及環磷醯胺)、蔥環(例如多柔比星、聚乙二醇化脂質體多柔比星、表柔比星、伊達比星及諸如此類)、蔥二酮(例如米托蔥醌)、鉑藥物(例如順鉑、卡鉑、奧沙利鉑、奧馬鉑、恩洛鉑及諸如此類)、紫杉烷(例如太平洋紫杉醇))、抗有絲分裂藥、博來黴素、硼替佐米、帕土匹龍、鈣網織蛋白、廣譜細胞死亡劑(例如棉子酚、茶酚(例如表沒食子兒茶素-3-沒食子酸酯)、7-溴靛玉紅-3'-肟(7BIO) -、致癌RAS、大環內酯、小蘗鹼(衍生自植物之異喹啉生物鹼)、UMI-77、雷公藤內酯及舍利克爾)、細胞外核苷酸酶之廣譜抑制劑(例如ARL67156、替莫唑胺、環磷醯胺、馬磷醯胺、多柔比星、表柔比星、伊達比星、米托蔥醌、奧沙利鉑、太平洋紫杉醇、博來黴素、硼替佐米、溶瘤病毒、帕土匹龍)、酪胺酸磷酸化抑制劑AG 490 (JAK2/STAT3抑制劑)、DNA低甲基化劑(例如阿紮胞昔或地西他濱)、胸苷酸靶向藥物(例如多西他賽、吉西他濱)、曲妥珠單抗、阿多-曲妥珠單抗艾坦辛、帕妥珠單抗、阿貝西利、帕博西尼、抗IL-10抑制劑、抗TGF- β 抑制劑、檢查點抑制劑(例如抗PD-1抗體、抗PD-1L抗體、抗PD-L2抗體、抗CTLA-4抑制劑、抗LAG-3抗體、抗TIM-3抗體及諸如此類)、抗CCR4抗體、抗

FoxP3抑制劑、細胞療法(例如嵌合抗原受體/T細胞(CAR-T)療法及其他過繼性細胞療法)或其組合。

【0195】 其他療法可包含手術、輻射、化學療法、針刺、過繼性細胞療法等。本文所揭示之方法可用作主要療法、新輔助療法(例如在手術(例如乳房切除術或病灶切除術)或化學療法之前)或輔助療法(僅出於闡釋性目的，在化學療法或使用過繼性細胞療法之其他方法治療之後)。

【0196】

製品

本文亦提供用於投與本文所揭示用於過繼性細胞療法之細胞及組合物及用於儲存及投與該等細胞及組合物之製品(例如套組及裝置)。

【0197】 製品包含本文所揭示之組合物、一或多個容器、包裝材料及標記或包裝插頁(通常包含用於向個體投與細胞之說明書)。

【0198】 容器含有一或多個單位劑量之擬投與組合物。在一些實施例中，製品包括一或多個容器，每一容器含有單一單位劑量之組合物。單位劑量可為擬以第一劑量投與個體之脂質體、微顆粒、微球體、奈米膠囊、奈米顆粒、奈米球、脂質顆粒及囊泡中之任一者之量或數量，或為擬以第一或後續劑量投與之奈米顆粒、脂質體及諸如此類之數量之兩倍(或更高)。其可為結合投與方法投與個體之奈米顆粒、脂質體及諸如此類之最低劑量或最低可能劑量。

【0199】 在一些實施例中，每一容器個別地包括含有相同或實質上相同數量之脂質體、微顆粒、微球體、奈米膠囊、奈米顆粒、奈米球、脂質顆粒及囊泡中之任一者之組合物之單位劑量。因此，在一些實施例中，每一容器包括相同或大致或實質上相同數量之脂質體、微顆粒、微球體、

奈米膠囊、奈米顆粒、奈米球、脂質顆粒及囊泡中之任一者。在一些實施例中，單位劑量包含 1×10^4 個或更多脂質體、微顆粒、微球體、奈米膠囊、奈米顆粒、奈米球、脂質顆粒及囊泡中之任一者。在一些實施例中，單位劑量包含 1×10^4 至 1×10^8 個脂質體、微顆粒、微球體、奈米膠囊、奈米顆粒、奈米球、脂質顆粒及囊泡中之任一者。

【0200】 在一些實施例中，製品進一步包含其他治療劑，例如檢查點抑制劑、旨在減少乳癌個體中之雌激素之抗激素(例如抗雌激素或抗雌激素受體，例如他莫昔芬、順式他莫昔芬、因多昔芬、去甲基他莫昔芬、拉索昔芬、雷洛昔芬、苯并噻吩、巴多昔芬、阿佐昔芬、米潑昔芬、左美洛昔芬、屈洛昔芬、氯米芬、艾多昔芬、托瑞米芬、EM652及ERA-923、氟維司群、ARN-810或CH498、阿那曲唑、依西美坦及來曲唑)、類固醇、蔥環、甲狀腺激素代替藥物、胸苷酸靶向藥物(例如多西他賽、吉西他濱、太平洋紫杉醇或卡鉑及聚乙二醇化脂質體多柔比星)、細胞毒性劑(例如烷基化劑(例如替莫唑胺及環磷醯胺)、蔥環(例如多柔比星、聚乙二醇化脂質體多柔比星、表柔比星、伊達比星及諸如此類)、蔥二酮(例如米托蔥醌)、鉑藥物(例如順鉑、卡鉑、奧沙利鉑、奧馬鉑、恩洛鉑及諸如此類)、紫杉烷(例如太平洋紫杉醇))、抗有絲分裂藥、博來黴素、硼替佐米、帕土匹龍、鈣網織蛋白、廣譜細胞死亡劑(例如棉子酚、茶酚(例如表沒食子兒茶素-3-沒食子酸酯)、7-溴靛玉紅-3'-肟(7BIO) -、致癌RAS、大環內酯、小蘗鹼(衍生自植物之異喹啉生物鹼)、UMI-77、雷公藤內酯及舍利克爾)、細胞外核苷酸酶之廣譜抑制劑(例如ARL67156、替莫唑胺、環磷醯胺、馬磷醯胺、多柔比星、表柔比星、伊達比星、米托蔥醌、奧沙利鉑、太平洋紫杉醇、博來黴素、硼替佐米、溶瘤病毒、帕土匹

龍)、酪胺酸磷酸化抑制劑AG 490 (傑納斯活化激酶2/信號轉導劑及轉錄活化劑-3 (JAK2/STAT3)抑制劑)、DNA低甲基化劑(例如阿紮胞苷或地西他濱)、胸苷酸靶向藥物(例如多西他賽、吉西他濱)、曲妥珠單抗、阿多-曲妥珠單抗艾坦辛、帕妥珠單抗、阿貝西利、帕博西尼、抗IL-10抑制劑、抗TGF- β 抑制劑、曲妥珠單抗、阿多-曲妥珠單抗艾坦辛、帕妥珠單抗、阿貝西利、帕博西尼、細胞療法(例如嵌合抗原受體/T細胞(CAR-T)療法及其他過繼性細胞療法)。抗激素可選自由以下組成之群：他莫昔芬、順式他莫昔芬、因多昔芬、去甲基他莫昔芬、拉索昔芬、雷洛昔芬、苯并噻吩、巴多昔芬、阿佐昔芬、米潑昔芬、左美洛昔芬、屈洛昔芬、氯米芬、艾多昔芬、托瑞米芬、EM652。抗檢查點抑制劑可選自由以下組成之群：抗PD-1、抗PD-1L、抗PD-L2、抗CTLA-4、抗LAG-3、抗TIM-3、抗OX40及諸如此類。

【0201】 在一些實施例中，製品進一步包含選自由釷螯合物、超順磁氧化鐵奈米顆粒(SPION)、¹⁹F全氟碳奈米顆粒組成之群之成像劑、染料或對比劑。

【0202】 舉例而言，適宜容器包含(但不限於)瓶、小瓶、注射器及撓性袋(例如輸注袋)。容器可自諸如玻璃或塑膠等多種材料形成。在一些實施例中，容器具有一或多個孔(例如無菌出入孔)，該等孔(例如)用於使管道或套管連結至一或多個管以(例如)用於經乳頭遞送及/或用於連結以用於轉移往返其他容器(例如細胞培養及/或儲存袋或其他容器)之目的。

【0203】 製品可進一步包含包裝具有一或多段鑑別資訊及/或使用說明書之插頁或標記。在一些實施例中，資訊或說明書指示，可或應使用該等內容物來治療乳房病症及/或提供其說明書。標記或包裝插頁可指示，

製品內容物擬用於治療乳房病症。在一些實施例中，標記或包裝插頁提供治療個體(例如患有乳房病症之個體)之說明書，該治療係經由涉及(例如)根據所提供方法之任一實施例經管內投與第一及一或多個後續劑量之細胞之方法來進行。在一些實施例中，說明書指定以第一劑量投與一個單位劑量(例如製品中之單一個體容器之內容物)，隨後在指定時間點或在指定時間窗內及/或在個體中檢測到一或多種因素或結果之存在或不存在或量或程度之後投與一或多個後續劑量。

【0204】 如本文中所使用，除非上下文另外指示，否則術語「一(a、an)」及「該(the)」包含複數個指示物。

【0205】 如本文中所使用，術語「約」在提及諸如量、時間長度及諸如此類等可量測值時意欲涵蓋自指定值 $\pm 20\%$ 或在一些情況下為 $\pm 10\%$ 或在一些情況下為 $\pm 5\%$ 、在一些情況下為 $\pm 1\%$ 及在一些情況下為 $\pm 0.1\%$ 的變化，只要該等變化適於實施所揭示之方法即可。

【0206】 如本文中所使用，術語「活化」係指已足夠刺激以誘發可檢測細胞增殖之細胞狀態。活化亦可與所誘發細胞介素產生及可檢測效應功能有關。術語「活化T細胞」尤其係指發生細胞分裂之T細胞。

【0207】 如本文中所使用，術語「輔助療法」係指跟隨主要療法且投與處於復發風險下之個體之療法。該等個體具有乳房病症歷史且已使用另一模式療法進行治療。在乳癌情形下，全身性輔助療法通常始於主要療法之後不久以延遲復發、延長存活或治癒個體。如本文中所使用，「主要療法」係指在首次診斷個體之乳房病症後之一線治療。非限制性實例性主要療法可涉及手術、寬範圍之化學療法及放射療法。

【0208】 如本文中所使用，術語「抗體」係指特異性結合抗原之免

疫球蛋白分子。抗體可為多株或單株、多鏈或單鏈或完整免疫球蛋白，且可源自天然來源或重組來源。抗體(例如IgG)通常係免疫球蛋白分子之四聚體。

【0209】 如本文中所使用，術語「抗體片段」係指完整抗體之至少一部分或其重組變體，且係指足以使抗體片段識別並特異性結合至靶(例如抗原)之抗原結合結構域(例如完整抗體之抗原決定可變區)。抗體片段之實例包含(但不限於) Fab、Fab'、F(ab')₂及Fv片段、scFv、直鏈抗體、單一結構域抗體(例如sdAb (VL或VH))、駱駝科VHH結構域及自抗體片段形成之多特異性抗體。術語「scFv」係指包括至少一個包括輕鏈可變區之抗體片段及至少一個包括重鏈可變區之抗體片段之融合蛋白，其中輕鏈及重鏈可變區經由短撓性多肽連接體以鄰接方式連接，且能夠表現為單鏈多肽，且其中scFv保留衍生出其之完整抗體之特異性。除非予以指定，否則如本文中所使用，scFv可(例如)針對多肽之N末端及C末端具有呈任一順序之VL及VH可變區，scFv可包括VL-連接體-VH或可包括VH-連接體-VL。

【0210】 如本文中所使用，術語「個體(subject)」、「患者」及「個體(individual)」可在本文中互換使用且係指哺乳動物(例如人類)。哺乳動物亦包含寵物動物(例如狗、貓)、實驗室動物(例如大鼠、小鼠)及農場動物(例如牛及馬)。除非另外指定，否則哺乳動物可為任一性別(gender或sex)。

【0211】 如本文中所使用，「投與途徑」或「遞送途徑」係指將組合物遞送至個體之路徑，通常係指之投與組合物之位置(例如口服、靜脈內及諸如此類)或作用靶所處位置(例如局部、經腸、非經腸及諸如此

類)。「投與途徑」或「遞送途徑」在本發明中可互換使用。

【0212】

實例

實例1

經脂質塗覆之CpG-ODN及CpG-ODN+OX-40激動劑抗體奈米顆粒之合成

【0213】 經脂質塗覆之奈米顆粒之製備。如闡述Su等人(Molecular Pharmaceutics 8, 第3期(2011年6月): 774-787)來合成具有poly-1核心之經脂質塗覆之奈米顆粒。簡言之,經由以下兩種不同製程來合成具有poly-1核心之經脂質塗覆之奈米顆粒:雙乳液/溶劑蒸發方式或溶劑擴散/奈米沈澱策略。對於雙乳液合成而言,將30 mg poly-1 (或PLGA,對於pH不敏感性對照顆粒)及2 mg磷脂DOPC、DOPC及DSPE-PEG (以7:2:1莫耳比率)共溶於1 ml二氯甲烷(DCM)中。然後在使用探針尖端超音波器(Misonix XL2000, Farmingdale, NY)在7 W下進行1 min超音波處理步驟期間向冰上混合物中添加200 µl磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)以形成第一乳液。然後將一級乳液分散於6 ml經蒸餾、去離子無核酸酶水中且在12 W下超音波處理5 min,然後在25°C下置於振盪器上18 h以蒸發有機溶劑。對於奈米沈澱合成而言,將相同量之DOPC、DOTAP及聚合物共溶於4 ml乙醇中並逐滴添加至40 ml經蒸餾、去離子無核酸酶水中,隨後輕微攪拌5 h以蒸發乙醇。經由後插入製程將DSPE引入脂質塗層中:將1 mM DSPE脂質添加至於經蒸餾、去離子無核酸酶水中之0.5 mg/ml顆粒中且將懸浮液在25°C下攪拌16 h。收集顆粒並經由離心洗滌一次,再懸浮於新鮮水中並儲存於4°C下直至使用。藉由類似製程來製備無脂質PVA穩定化顆粒,只是

將僅含聚合物之有機乳液或溶液分散於2% w/vol PVA水溶液中。

【0214】 在真空烘箱中乾燥每一顆粒批次之一部分以藉由量測乾燥質量來測定顆粒濃度(mg/ml)。使用動態光散射(DLS)及 ζ 電勢量測且使用ZetaPALS動態光散射檢測器(Brookhaven Instruments)來測定粒度及表面電荷。為估計納入脂質之百分比及存在於脂質表面塗層中之脂質之所得mol%，藉由以下方式來製備脂質包膜顆粒：如上文所闡述使用1 mol% DOPE-玫瑰紅(作為示蹤劑添加以用於量測納入顆粒中之總脂質量)實施奈米沈澱，然後插入經羧基螢光黃標記之DSPE-脂質(DSPE-CF)。然後藉由使用2% triton X-100處理15 min自顆粒表面脂質剝除且量測上清液之玫瑰紅及螢光黃信號以量化脂質納入量。

【0215】 為藉由低溫電子顯微術(cryoEM)探究經脂質塗覆之奈米顆粒之表面結構，藉由將顆粒懸浮液(3 μ L)印漬於1.2/1.3 μ m多孔碳塗覆銅柵格(Electron Microscopy Sciences)並在液體乙烷中使用Leica快速冷凍機器立即冷凍試樣來將顆粒包埋於冰中。將試樣轉移至低溫支架上並使用JEOL 2200FS透射電子顯微鏡在185 μ A發射電流及40 000 \times 放大率下成像。

【0216】 CpG-ODN載量。 然後將可自Invivogen, USA.獲得之CpG-ODN (1.5 mL, 200 μ g/mL, pH = 5.7)塗覆於奈米顆粒上。沈積1至3層。在組裝之後，藉由離心(15000 rpm, 25 min)收集上清液。藉由UV-Vis廣譜術來表徵上清液中之CpG量。使用262 nm及278 nm下之吸光度來表徵CpG。藉由與所添加原始材料相比扣除上清液中之CpG量來計算加載於顆粒上之CpG量。

【0217】 OX-40激動劑抗體載量。 對於亦加載OX-激動劑抗體之

CpG-ODN奈米顆粒而言，使用將沈積於奈米顆粒之表面上之OX-40激動劑抗體(2 mL, 200 mg/mL)來塗覆奈米顆粒。沈積1至3層。藉由與所添加原始材料相比扣除上清液中之抗體量來測定抗體量。

【0218】

實例2

α -類型1極化奈米顆粒之合成

根據由Kocbek等人，J. Control. Release, 120, 18-26 (2007)所闡述之方法來製備囊封 α -類型1極化生物活性劑(α DC混合劑)之奈米顆粒。臨床等級聚(I:C)可以雷他莫德(Rintatolimod)或Ampligen®形式購自Hemispherx Pharmaceuticals。

【0219】簡言之，將400 μ L α DC混合劑(TNF α (500 μ g/mL)、IL-1 β (2.5 μ g)、IFN γ (1250 μ g/mL)、PEG-IFN α -2b (1250 μ g/mL)及聚I:C) (100 μ g/mL))添加至含有200 mg聚(乳酸-共-乙醇酸) (PLGA, Sigma-Aldrich)之乙酸乙酯中。然後在20,000 rpm下攪拌混合物(Homogeniser, IKA)且同時超音波處理(超音波浴：500 W, 30 kHz, BRANSON)。在乳化3 min之後，將8 mL聚乙烯醇水溶液(PVA, 5%)添加至水/油乳液中以形成水/油/水雙乳液且將此乳液攪拌5 min。為固化奈米顆粒，藉由使用200 mL 0.1% PVA水溶液在500 rpm下將雙乳液攪拌2 h來蒸發有機溶劑。為完全去除乙酸乙酯，使用旋轉蒸發儀在40°C下將奈米顆粒分散液濃縮至大約一半體積。將所得奈米顆粒在3,000 rpm下離心20 min，並使用磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)洗滌兩次。使用粒度分析儀(ELS-Z, Otsuka)量測顆粒之平均大小。

【0220】對於一些批次而言，使用此實例中所闡述之方法來個別地

製備包括生物活性劑IFN α -2b、聚(I:C)、TNF α 、IL-1 β 、IFN γ 、PEG-IFN α 及聚I:C之奈米顆粒。組合包括個體生物活性劑之奈米顆粒以產生生物活性劑之混合劑。

【0221】當在含有0.1% SDS及0.1 N NaOH之裂解緩衝液中裂解奈米顆粒之後，測定生物活性劑之濃度。在260° nm下測定TNF α 、IL-1 β 、IFN γ 、PEG-IFN α -2b及聚I:C之量。

【0222】

實例3

生物活性劑TLR9激動劑CpG-ODN及OX-40激動劑之管內投與

治療方案。一級研究目標係評估經管內投與TLR9激動劑CpG-ODN及OX-40激動劑(例如MOXR0916) (統稱為「藥物」)與安慰劑相比之安全性及耐受性。二級研究目標係評估(i)免疫細胞動員、個體中之抗原呈遞，及(ii)初步效能(藉由評價治療後之整體反應率及無進展存活)。

【0223】使八十八(88)個患有乳癌之個體隨機化接受使用安慰劑或藥物之治療。所有個體皆在第1 - 2天接受輻射療法。在第2、9、16及23天，向個體經管內投與(如下文所闡述)安慰劑(小組1；n=8)或1 mg (小組2；n=20)、5 mg (小組3；n=20)及10 mg (小組4；n=20)及20 mg (小組5；n=20) TLR9激動劑CpG-ODN。在第3、10、30、60、90、120及160天，向小組2、3、4及5中之個體經管內投與安慰劑(n=5)或10 mg/mL (n=5)、100 mg/mL (n=5)及200 mgs/mL (n=5)抗OX-40抗體，且使小組1中之個體接受安慰劑。

【0224】TLR9激動劑係臨床等級C類CpG-ODN **M362** (5'-tcgtcgtcgttc:gaacgacgttgat-3' (25聚體))或CpG-ODN **2395** (5'-

tcgtcgttttcgggcgc:gcgccg-3' (22聚體))。OX-40抗體係模擬能夠活化T細胞之OX-40配體之激動劑。

【0225】 乳頭準備。在個體已脫衣之後，臨床醫師清潔擬研究乳房上之乳頭。此包含使用輕度粒狀凝膠或軟膏將乳頭擦拭乾淨以鬆弛及去除任何死亡皮膚細胞及累積油狀物。此係在醫院中通常用於醫學程序之前之清潔劑。然後，將一些麻木乳霜施加至乳頭上。

【0226】 乳頭麻醉。使用極小針將與0.1-0.2 mL藍色染料混合之1 mL利多卡因(Lidocaine)注射至乳頭基部。

【0227】 乳管鑑別。在染料注射之後且在導管佈置之前，將小撓性線插入開口中約½英吋以進一步鑑別及擴張乳管開口。在鑑別乳管後，立即將小片打結縫合材料插入管中將其標誌。在至少3個乳管開口且最多5個乳管開口上進行此步驟。若臨床醫師不能找到至少3個乳管開口，則個體將不能繼續研究且退出。由新招募個體代替該等個體。

【0228】 導管佈置、CpG-ODN及抗OX-40抗體之滴注及X射線檢驗。在標誌所有乳頭乳管開口後，臨床醫師立即經由管孔口插入導管且置於由此標誌之每一所標誌乳管中。在導管處於適當位置後，臨床醫師可視情況向乳管中緩慢(經30秒)滴注小於1 mL不透射線染料以允許乳管成像。

【0229】 在染料滴注之後且端視所鑑別乳管數，在第2、9、16及23天，將最多2 mL (通常介於0.5 mL至2 mL之間)包括C類CpG-ODN TLR9激動劑之第一組合物經管內緩慢(經1分鐘)遞送至個體之每一乳管中。在第3、10、30、60、90、120及160天，將包括具有潛在免疫刺激性活性之OX-40激動劑抗體之第二組合物經管內投與個體之每一乳管中。OX-40抗體模擬OX-40配體來活化T細胞。僅治療含有癌症之乳房。端視擬治療之

乳管數，將組合物以最高10 mL之體積分批或分組經管內投與乳管中。

【0230】 基於所鑑別之受影響乳管或小葉之數量，嘗試在乳管之間均勻分佈劑量。

【0231】 導管通常保留於每一乳管中大約1-5分鐘。在程序期間，詢問個體以使用視覺模擬量表評價其疼痛。在已滴注染料及奈米顆粒之後，獲取影像以證實經修飾細胞在乳管中之適當輸注。在受影響乳管數高於2個乳管時，管內療法程序可成組進行。自第一組乳管(例如2個毗鄰乳管)去除導管，且各自使用小片打結縫合材料標誌該等乳管。此時，使用疼痛評價之疼痛量表來評價個體之疼痛。

【0232】 隨後，將新導管插入剩餘經標誌乳管中。在下半乳頭乳管已插管且輸注染料及細胞之後，使用螢光鏡獲取另一影像以記載乳管。再次詢問個體以評價其疼痛。去除導管且使用小片打結縫合材料個別地標誌乳管。將安息香軟膏及澄清塑膠敷料(生物閉塞)置於乳頭上以將標記物保持於適當位置直至手術。總程序消耗0.5至1.5小時。獲取程序照片。

【0233】 若在評價疼痛期間個體報告不會在輸注組合物之後10分鐘內消退之3或4級乳房疼痛，則中斷該個體之研究相關程序。根據方案實施如本文所闡述之抽血及隨訪評價以及病理學評價。在此情形下，更換研究組中之個體以用於統計學目的。

【0234】 若在初始X射線檢驗時發現穿孔，則立即評價副效應。若個體未報告任何不良效應，則將剩餘乳管插管並投與奈米顆粒。根據方案實施如下文所闡述之研究相關抽血及評價以及病理學評價。

【0235】 在研究投藥之第2天，在投用安慰劑或藥物之前，在投藥之前及在下列時間點：劑量投與後1、2、4、8及12小時檢查生命體徵(收

縮/舒張血壓、脈衝、溫度、呼吸速率)及熱潮紅發生。獲得投藥前及投與第一劑量後4小時之12-導程ECG。在劑量投與之前 10 ± 1 分鐘收集用於生物標記物及藥物動力學(PK)分析之血樣以確立基線。

【0236】 在第9、16、23、30、60、90、120、160天及研究結束時，檢查生命體徵(收縮/舒張血壓、脈衝、溫度、呼吸速率)及熱潮紅發生。亦在劑量投與之前60分鐘內實施ECG分析、血液學分析、血清化學分析、凝血分析及尿分析且在投與研究藥物之前 10 ± 1 分鐘收集用於PK分析之血樣。

【0237】 在治療前及在治療時或治療之後獲取腫瘤生檢。亦在治療前、在治療期間及在治療之後獲取腫瘤引流淋巴結之連續生檢。使用RECIST v1.1評價腫瘤反應。使用組織生檢來免疫表現型分型存在於組織中之免疫細胞及細胞介素。

【0238】 在整個研究期中藉由臨床評價、個體報告及主動隨訪來測定每一劑量組之安全特徵及耐受性。記錄所有不良事件(不論嚴重程度如何)並予以評估。

【0239】 APC成熟及免疫反應。藉由量測以下各項來測定個體中之APC (例如pDC)成熟及免疫反應：諸如IL-12p70、IFN α 及IL6等細胞介素之釋放，APC上之成熟標記物(例如CCR7表現)及APC上之共刺激分子(例如OX-40L、CD40)之增加，及使得活化效應免疫細胞(例如T細胞、B細胞及NK細胞)之增加之抗原呈遞。使用Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA)及SPSS v18.0 (SPSS, Chicago, IL)實施統計學分析。測定CD11c+HLA-DR+ DC及CD123+HLA-DR+ DC (pDC)之存在且計算其比率。使用配對t-測試分析來自免疫細胞及細胞介素釋放之數據。使用雙尾

t-測試測試來自不同組之免疫細胞變化之數據。使用皮爾森相關係數 (Pearson's correlation coefficient) 分析免疫細胞變化。P值<0.05可視為統計學顯著。

【0240】 活體外分析-細胞介素釋放。量測個體之血清細胞介素含量以測定個體中免疫細胞之刺激變化。在經管內遞送第一組合物CpG-ODN之前第2天及在經管內投與組合物CpG-ODN之後4小時、8小時、12小時、24小時、36小時、48小時及72小時使用市售ELISA套組(例如人類發炎性細胞介素多分析物ELISArray套組MEH-004A, 來自Qiagen, Germantown, MD)分析IL6、IL8、MIP-1 α 、MIP1 β 、IL10、IL12p70、IL17A、IFN α 、IFN γ 、TNF α 、IL-23、IL-27及GM-CSF之血清細胞介素含量。使用市售IL-13分泌ELISA分析(例如來自Miltenyi Biotec及Thermo Fischer者或來自R&D Biosystems之人類IL-13 Luminex性能分析)測定IL-13分泌變化。在稀釋至分析之線性範圍內之試樣中量測細胞介素分泌。促發炎性細胞介素及趨化介素(如IL12p70、IL-23、IL-27、IFN α 及IL6)之含量之時間依賴性增加指示個體中之APC (例如pDC)的活化及成熟。

【0241】

免疫細胞之動員。

APC. 載有抗原之成熟APC (例如DC、M1-巨噬球及B細胞)預計以高於對照之含量存在於藥物治療個體之乳房組織中且預計遷移至引流淋巴結以用於抗原呈遞至效應細胞。因此，藥物治療個體之引流淋巴結中之所檢測成熟APC之含量預計高於高於安慰劑個體。藉由免疫組織化學(IHC)或流式細胞術(根據製造商說明書，例如Bio-Rad、AbCam)來測試腫瘤生檢試樣中之成熟APC之存在。利用APC成熟標記物使用(例如)趨化引導及遷

移速度調控分子CCR7、CD40、CD83、CD86、OX-40L、CD209及其他分子之經FITC或PE標記之抗體(可自Bio-RAD、Invitrogen、Biolegend、R&D Systems、AbCam及BD Biosciences獲得)將腫瘤生檢試樣免疫表現型分型或染色。

【0242】 使用連續淋巴結生檢來測定APC遷移。可藉由免疫組織化學或流式細胞術在生檢組織上檢測表現CCR7、CD40、CD83及OX-40L之DC。自生檢淋巴結試樣製備單細胞懸浮液(SSC)。使用改良之Neubauer血球計數器及台盼藍染色來量測細胞計數及存活率。使用APC成熟標記物(例如CCR7、CD40、CD83、CD86、OX-40L之經FITC或PE標記之抗體，可自Bio-RAD、Invitrogen、Biolegend、R&D Systems、AbCam及BD Biosciences獲得))將試樣免疫表現型分型或染色。

【0243】 T細胞。 引流淋巴結駐留T細胞預計藉由由載有抗原之成熟APC所達成之腫瘤抗原呈遞及細胞介素信號傳導來活化。藉由量測個體淋巴結中之CD4⁺ Th1細胞、CD8⁺細胞毒性T細胞、T_{fh}細胞之含量來測定引流淋巴結中之T細胞活化。自生檢淋巴結試樣製備單細胞懸浮液(SSC)。使用改良之Neubauer血球計數器及台盼藍染色來量測細胞計數及存活率。使用CD3、CD4、CD8、CD56、CD19、CD-28、CD69、CD40L、OX-40、CD134及CD137之經PE或FITC標記之抗體(Invitrogen)將試樣免疫表現型分型或染色，並使用1%低聚甲醛固定，然後在LSR II流式細胞儀(BD Biosciences, San Jose, Ca)上分析且使用WinList (Verity Software House, Topsham, ME)處理數據。

【0244】 使用腫瘤生檢組織藉由IHC或流式細胞術藉由使用如上文所闡述CD4⁺ Th1細胞及CD8⁺ CTL之T細胞標記物進行免疫表現型分型或

染色來測定乳房腫瘤組織藉由活化T細胞之浸潤。

【0245】 B細胞、漿細胞、漿母細胞。使用腫瘤生檢組織測定乳房腫瘤組織藉由活化B細胞之浸潤且藉由IHC或流式細胞術如上文所闡述藉由B細胞標記物之經PE或FITC標記之抗體(基於Freiburg分類)、CD19別藻藍蛋白-Cy7、CD20-PE、IgD FITC、IgM PE-Cy5、CD38 PE-Cy7、Igκ別藻藍蛋白、Igλ PE、IgG PE-Cy5、CD27 PE、CD21別藻藍蛋白、CD40 FITC、CD86 PE-Cy5、早期活化標記物CD69 FITC (Becton Dickinson)及IgA FITC (Miltenyi Biotec)進行免疫表現型分型或染色來將個體之末梢血單核細胞(PBMC)針對B細胞進行免疫表現型分型。

【0246】 藥物治療個體之乳房腫瘤組織預計具有較大B細胞浸潤及較高數量之表現活化及記憶性B細胞標記物之漿細胞及漿母細胞，例如增加之C80+B細胞、CD86+B細胞、CD40L-活化B細胞及/或CD20+B細胞(記憶細胞)。浸潤B細胞之存在與患有乳癌之個體中之陽性結果相關(Tsou等人，Cancer Research. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0431；Mehmoud等人，Breast Cancer Res Treat 2012;132:545-53)。

【0247】 NK細胞。引流淋巴結駐留NK細胞預計由載有抗原之成熟APC活化且形成免疫突觸，其中藥物治療個體中之活化T細胞之數量高於安慰劑治療個體。大部分淋巴結駐留NK細胞可視為CD56brightCD16dim/- NK細胞(Sta Maria等人，Magn Reson Insights. 2014；7: 15-2)。在藥物治療個體中，活化NK細胞預計以高於安慰劑治療個體之數量浸潤乳房腫瘤組織。使用腫瘤生檢組織來測定乳房腫瘤組織藉由活化NK細胞之浸潤且藉由IHC或流式細胞術藉由成熟標記物(例如CD27、CD56、CD57、CD62L、CD94以及NKG2D、CD16)之經PE或

FITC標記之抗體進行免疫表現型分型或染色來將個體之末梢血細胞針對NK細胞進行免疫表現型分型。

【0248】 藥物治療個體之乳房腫瘤預計具有較高數量之一或多個子組之浸潤細胞毒性NK細胞，例如CD57+、CD27^{high}及CD56^{dim}CD16⁺ NK細胞。

【0249】 在此研究中，分析個體之周邊血樣之CD56^{dim}CD16⁺ (細胞溶解)、CD56^{bright}CD16⁻ (不成熟)及CD56⁻CD16⁺、CD56^{bright}CD16⁺及CD56^{dim}CD16⁻ (不成熟) NK細胞子組之含量，如由Mamessier等人(J Immunol, 2013年3月1日, 190 (5) 2424-2436)所闡述。簡言之，使用NK細胞StemSep系統(StemCell Technology)根據製造商說明書自個體之末梢血單核細胞(PBMC)陰性分離NK細胞。經分選細胞之純度及存活率確立為>94%。將NK細胞在補充有IL-2 (1000 U/ml; 普留淨(Proleukin); Chiron)及PHA (1/1000; Life Technologies)之RPMI 1640/10% FCS中在用作飼養細胞之經輻照PBMC上培育15 d。在第6及10天，將三分之一之培養基更換為補充有IL-2之新鮮RPMI 1640/10% FCS。

【0250】 將自個體之乳房組織、末梢血及骨髓分離之200 μ L新鮮全血或 1×10^6 個細胞與一起適當經PE或FITC標記之抗體在振動臺上培育30 min。使用OptiLyse B (Beckman Coulter)裂解RBC。在BD FACSCanto (BD Biosciences)上分析試樣。在分析試樣之前及之後，使用光倍增器管七色設置珠粒(BD Biosciences)隨時間標準化來自FACSCanto之螢光強度以防止與外部或固有因素相關之螢光強度變化。選通策略包括基於正向散射面積/正向散射高度參數來消除雙重峰，然後消除死細胞(7-胺基更生徽

素(aminoactinomycin) D+)，然後選擇CD45+CD3-CD33-HLA-DR-CD56+/-細胞。

【0251】與自安慰劑治療個體獲得之PBMC相比，自藥物治療個體獲得之PBMC預計具有較高含量之細胞毒性NK細胞(例如CD56dimCD16+細胞毒性NK細胞、較高數量之CD57+ NK細胞及/或CD27high NK細胞)。儘管末梢血及脾中之約90%之NK細胞係CD56dim CD16+ NK細胞，但研究已展示，自末梢血募集不成熟CD56brightCD16-及CD56dimCD16-子組之NK細胞且在乳房腫瘤中有所增加，從而表明不成熟NK細胞優先募集至乳房腫瘤(Mamessier等人)。本發明方法預計可活化淋巴結駐留NK細胞，將自體細胞毒性NK細胞自淋巴結及末梢血動員至乳房腫瘤組織，且消除癌症患者中之觀察到嚴重副效應之較差臨床結果(包含血管洩漏及與使用細胞介素離體活化及擴增自體NK細胞有關之邏輯問題)。

【0252】

實例4

APC至引流淋巴結之活體內遷移

可在HBCx22及HBCx34患者源異種移植物(PDX)小鼠模型中量測APC (例如DC、M1-巨噬球及B細胞)至引流淋巴結之活體內遷移。

【0253】HBCx22及HBCx34 PDX模型係自未治療早期LBC所確立，如先前所闡述(Cottu等人，Breast Cancer Res Treat 2012;133:595-606)。兩種腫瘤模型皆對內分泌療法(ET)具有反應。在患者腫瘤及衍生異種移植物上確立管腔B狀態，且基於低PR/高Ki67表現進行評價。為自該等異種移植物確立抗激素性模型，在6至8個月期間使用不同ET (包含他莫

昔芬)治療具腫瘤小鼠。在腫瘤逃逸時，將抗性腫瘤再植入瑞士裸小鼠中進行三個連續傳代並使用出現抗性之療法治療。在腫瘤已成功地發生該三個傳代且展現藉由對照組與治療組之間之類似腫瘤生長模式定義之抗性表型時，將確立抗性異種移植物。

【0254】 在該等小鼠中藉由使用針及注射器向小鼠乳管經管內注射經FITC標記之CpG-ODN 2395 Vaccigrade™或ODN 2395-FITC ((5'-tcgtcgttttcgggcg:gcgccg-3')及OX-40激動劑抗體(可自Bio-Cell獲得之InvivoMab純系OX-86)來量測APC至引流淋巴結之活體內遷移。在24小時之後，解剖腋下淋巴結(腋窩淋巴結)且藉由免疫組織化學或流式細胞術量測APC，如**實例4**中所闡述。來自ODN治療小鼠之淋巴結與來自對照小鼠之淋巴結相比預計展示較高含量之完全成熟APC (例如CCR7+、CD40+ CDOX40L+、CD80+、CD86+及其他成熟APC中之一或多者)。

【0255】

實例5

α -類型1極化生物活性劑之管內投與

治療方案。一級研究目標係評估在患有乳癌之個體中經管內投與 **α -類型1極化生物活性劑**之「 α DC混合劑」(TNF α /IL-1 β /IFN γ /IFN α -2b/聚I:C)與ICD化學療法之組合的安全性及耐受性。

【0256】 募集80名患有乳癌之女性進行研究且使其隨機經管內接受安慰劑或包括 **α DC混合劑**(「藥物」)之組合物。二級研究目標係評估(i)免疫細胞動員、個體中之抗原呈遞，及(ii)初步效能(藉由評價治療後之整體反應率及無進展存活)。

【0257】 使患有乳癌之個體隨機接受使用安慰劑或藥物之治療。所

有個體皆在第1天接受使用ICD誘發性細胞毒性劑奧沙利鉑(85 mg/m²，靜脈內)之化學療法且經2小時輸注。

【0258】 在第1天，在使用細胞毒性劑進行此預治療後，使個體以表3中之劑量接受安慰劑或藥物。

表3. aDC混合劑單位劑量

劑量編號	TNF α : IL- β : IFN γ : IFN α -2b : 聚(I:C)
1	1 μ g/mL : 1 ng/mL : 100 U/mL : 300 U/mL : 2 μ g/mL
2	5 μ g/mL : 5 ng/mL : 500 U/mL : 1500 U/mL : 10 μ g/mL
3	10 μ g/mL : 10 ng/mL : 1000 U/mL : 3000 U/mL : 20 μ g/mL
4	20 μ g/mL : 20 ng/mL : 2000 U/mL : 6000 U/mL : 40 μ g/mL

【0259】 在第8天，使個體如所闡述再次接受安慰劑或藥物，但並不使用奧沙利鉑進行預治療。如上文所闡述，經管內投與安慰劑及藥物。每2週重複此投藥方案且重複至少4次。在研究期結束時，再監測個體6至18個月。

【0260】 在研究投藥之第1天，在投用安慰劑或藥物之前，在投藥之前及在下列時間點：劑量投與後1、2、4、8及12小時檢查生命體徵(收縮/舒張血壓、脈衝、溫度、呼吸速率)。獲得投藥前及投與第一劑量後4小時之12-導程ECG。在劑量投與之前10 \pm 1分鐘收集用於生物標記物及藥物動力學(PK)分析之血樣以確立基線。

【0261】 自第8天開始，在研究期期間之每一投藥日(在投藥之前)定期檢查生命體徵(收縮/舒張血壓、脈衝、溫度、呼吸速率)。亦在劑量投與之前60分鐘內實施ECG分析、血液學分析、血清化學分析、凝血分析及尿分析且在投與研究藥物之前10 \pm 1分鐘收集用於PK分析之血樣。

【0262】 在整個研究期中藉由臨床評價、個體報告及主動隨訪來測

定每一劑量組之安全特徵及耐受性。記錄所有不良事件(不論嚴重程度如何)並予以評估。

【0263】 如**實例4**中所闡述來測定APC (例如DC)之成熟及免疫細胞(例如T細胞、B細胞及NK細胞)之動員。如**實例5**中所闡述來測定APC至淋巴結之遷移。藉由乳房X線攝影術、CT-掃描及/或MRI測定個體之腫瘤大小。

【0264】

實例6

APC至引流淋巴結之活體內遷移

在靜止DC中，TLR3及TLR9位於早期胞內體及其他細胞內腔室中，但在使用配體刺激時遷移至LAMP1+胞內體。TLR3結合至TLR3配體(例如雙鏈RNA，例如聚I:C (例如林塔米德(rintatalomid)))且TLR9結合至未甲基化CpG DNA。可在C57/B16小鼠中藉由使用針及注射器向小鼠乳管經管內遞送(例如藉由注射) TLR3配體(可自Invivogen獲得之聚I:C HMW螢光黃)或TLR9配體CpG-ODN (可自Invivogen獲得之5'-tcgtcgttttcggcgc:gcgccg-3' (22聚體)及CCR7配體、CCL19及CCL21 (可自R&D biosystems獲得)來量測APC (例如DC)至引流淋巴結之活體內遷移。CCR7配體經EGFP或FITC標記以追蹤活體內APC遷移。在24小時之後，解剖腋下淋巴結(腋窩淋巴結)且藉由免疫組織化學或流式細胞術量測CCR7+ APC。

【0265】

實例7

APC至引流淋巴結之活體內遷移

如上文所闡述，可在HBCx22及HBCx34患者源異種移植植物(PDX)小鼠模型中量測APC (例如DC)至引流淋巴結之活體內遷移。使用針及注射器向PDX小鼠之一或多個乳管經管內注射TLR9激動劑經FITC標記之CpG-ODN 2395 Vaccigrade™或ODN 2395-FITC ((5'-tcgtcgttttcgggcgc:gcgccg-3')及OX-40激動劑抗體(可自Bio-Cell獲得之InvivoMab純系OX-86)。在24小時之後，解剖腋下淋巴結(腋窩淋巴結)且量測CCR7+ APC。

【0266】 出於闡釋及說明之目的，已呈現本發明之上述論述。上文並不意欲將本發明限定於本文中所揭示之一或多種形式。儘管本發明之說明已包含對一或多個實施例及某些變化形式及改變之說明，但在理解本發明之後，其他變化形式及修改在本發明範圍內，例如可在熟習此項技術者之技術及知識範圍內。意欲獲得包含所允許範圍之替代實施例之權利，包含所主張者之替代、可互換及/或等效結構、功能、範圍或步驟，不論該等替代、可互換及/或等效結構、功能、範圍或步驟是否揭示於本文中，且並不意欲公開地專用於任何可取得專利之標的物。

【0267】 本文所提及之所有公開案、專利及專利申請案之全部內容皆以引用方式併入本文中，其併入程度如同具體地及個別地指示將每一個別公開案、專利或專利申請案之全部內容以引用方式併入一般。

【0268】 儘管闡釋且闡述了闡釋性實施例，但應瞭解，可在其中作出各種改變，此並不背離本發明之精神及範圍。



202010536

【發明摘要】

【中文發明名稱】

誘發免疫反應之原位方法

【英文發明名稱】

IN SITU METHODS OF INDUCING IMMUNE RESPONSE

【中文】

本發明係關於用於誘發患有乳癌之個體中免疫反應之管內方法及組合物。該等經管內投與之組合物包括一或多種生物活性劑，能夠誘發抗原呈遞細胞之原位成熟及成熟抗原呈遞細胞遷移至淋巴結。該等管內方法及組合物誘發效應免疫細胞之活化，且增加腫瘤細胞死亡。

【英文】

The present disclosure relates to intraductal methods and compositions for inducing immune response in subjects having breast cancer. The intraductally administered compositions comprise one or more bioactive agents capable of inducing *in situ* maturation of antigen presenting cells and migration of mature antigen presenting cells to lymph nodes. The intraductal methods and compositions induce the activation of effector immune cells, and augment tumor cell death.

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種包括一或多種生物活性劑之組合物之用途，其用以製造用於誘發個體中免疫反應之藥劑，其中該藥劑擬經管內投與至該個體之乳管，且其中該藥劑誘發抗原呈遞細胞之原位成熟。

【第2項】

如請求項1之用途，其中包括於該組合物中之該一或多種生物活性劑係選自由以下組成之群之1型極化劑：TLR激動劑(例如TLR3激動劑(例如聚(I:C)、聚腺苷-聚尿苷酸(聚AU)、安普利近(Ampligen) (聚I:聚C (12)U)及經聚-L-離胺酸及羧甲基纖維素穩定之聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚ICLC))；TLR4激動劑(例如吡喃葡萄糖基類脂A (G100)、GSK1795091、單磷醯脂質A (MPL)及基於MPL之激動劑(例如葡萄胺糖苷磷酸胺基烷基酯(AGP)、脂多醣(LPS)及類鴉片(例如美沙酮(methadone)、嗎啡-3-葡萄糖醛酸苷))；TLR7-及TLR8激動劑，例如咪唑并喹啉(咪喹莫特(Imiquimod)及瑞喹莫德(Resiquimod) (R848))；TLR9激動劑(例如CpG-ODN，例如PF-3512676及諸如此類)、DAMP (例如HMGB1)、細胞介素(例如TNF α 、IFN γ 、I型IFN (例如IFN α 或IFN β)、IL-1 β 、IL-2、IL-12)、趨化介素(例如IL-1 β 、CCL2或CCR7配體(例如CCL19、CCL21))，及生長因子，mi-RNA (例如miR-155)，共刺激分子激動劑(例如CD-40激動劑(例如抗CD40抗體，例如RO7009789、APX005M、CP-870,893、ABBV-927)、OX-40激動劑(例如抗OX-40抗體MOXR0916、PF-04518600、MEDI0562、MEDI6469及MEDI6383)、環糊精(例如2-羥丙基- β -環糊精)，及其組合。

【第3項】

如請求項1或2之用途，其中該抗原呈遞細胞係樹突狀細胞。

【第4項】

如請求項1或2之用途，其中該組合物在該個體中誘發該抗原呈遞細胞遷移至淋巴結。

【第5項】

如請求項1或2之用途，其中該免疫反應包括效應T細胞、效應NK細胞、效應B細胞或其組合之活化。

【第6項】

如請求項1或2之用途，其中該免疫反應包括抗腫瘤T細胞效應反應、NK細胞效應反應，或B細胞抗腫瘤效應反應，或其組合。

【第7項】

如請求項5之用途，其中該等效應T細胞包括細胞毒性CD8⁺ T細胞、CD4⁺ Th1細胞、記憶性T細胞、T_{fh}細胞，或其組合。

【第8項】

如請求項1或2之用途，其中該免疫反應包括減小免疫抑制。

【第9項】

如請求項1或2之用途，其中該個體之腫瘤大小減小。

【第10項】

如請求項1或2之用途，其中該組合物進一步包括有效量之能夠誘發自來(inbound)抗原呈遞細胞募集至該個體之乳管或乳房組織之生物活性劑，該生物活性劑係選自由以下組成之群：細胞介素及趨化介素(例如IL-1 β 、MCP-1、RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、IL-8、C1q、CCL1 (CCR1

配體)、CCL2 (CCR2配體)、CCL5 (CCR5配體)、CCL20 (CCR6配體)、CXCL3 (CXCR3配體)、CXCL4 (CXCR4配體)及CXCL1 (CXCR1配體)、DAMP (例如HMGB1), 及TLR激動劑(如TLR3激動劑(例如聚(I:C)、聚腺苷-聚尿苷酸(聚AU)、安普利近(聚I:聚C (12)U), 及經聚-L-離胺酸及羧甲基纖維素穩定之聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚ICLC); TLR4激動劑, 例如吡喃葡萄糖基類脂A (G100)、GSK1795091、單磷醯脂質A (MPL)及基於MPL之激動劑, 例如葡萄糖胺糖苷磷酸胺基烷基酯(AGP)、脂多醣(LPS)及類鴉片(例如美沙酮、嗎啡-3-葡萄糖醛酸苷); TLR7激動劑及TLR8激動劑, 例如咪唑并喹啉(咪喹莫特及瑞喹莫德(R848)); TLR9激動劑, 例如(CpG-ODN, 例如PF-3512676, 及諸如此類)。

【第11項】

如請求項2或10之用途, 其中該1型極化劑或能夠誘發自來抗原呈遞細胞之募集之生物活性劑或二者係TLR3激動劑、TLR4激動劑、TLR7激動劑、TLR8激動劑或TLR9激動劑。

【第12項】

如請求項1或2之用途, 其中該組合物進一步包括有效量之能夠將M2-DC再極化成1型極化DC (DC1)之再極化劑, 該再極化劑係選自由以下組成之群: 芬維A胺(fenretinide) (4-羥基(苯基)視黃醯胺(retinamide), 4-HPR); IL-12; IFN γ 、miR127、miR155及miR223、奈米氧化鐵(ferumoxytol); 以下之抑制劑: CSF-1、CSF-1R、IL-10、IL-10R、TGF β 、精胺酸酶1 (Arg1)、M2巨噬球清除劑受體(例如A、B、MARCO)、組織蛋白去乙醯酶(HDACi)、DICER、IRF4/STAT4/STAT6信號傳導路徑; IL-4、IL-13、IL-17、PPAR γ 、KLF4、KLF6、miRNA-146

家族成員(例如miRNA-146a)、let7家族成員(例如let-7c)、miRNA-9、miRNA-21、miRNA-47、miRNA-187、CCR-CC12軸信號傳導、CCL2/MCP-1、胎盤生長因子(PIGF) (HRG)及C/EBP β (PI3K γ 缺失)、AMPK α 1 (二甲雙胍(metformin))、p50-p50 NF κ B、NADPH氧化酶(NOX) (NOX 1及NOX 2) (例如GKT137831)、Rbpj、Notch信號傳導路徑；CD40及CD40L、IRF1、IRF5、STAT1 (例如IFN γ 、瓦第美贊(vadimezan) (DMXAA))及STAT3之活化劑/激動劑、核因子 κ B活化劑、TLR3、TLR4、TLR7、TLR8及TLR9之類鐸受體(TLR)激動劑(例如咪喹莫特)、合成之未甲基化胞嘧啶-鳥嘌呤(CpG)寡去氧核苷酸(CpG-ODN)、(聚I:C)、C792、來非莫德(lefitolimod) (MGN1703)、SD-101 (Dynavax)、SD-101、IMO-2125；p65-p50 NF κ B、MyD88、miR127、miR155及miR223；或其組合。

【第13項】

如請求項1或2之用途，其中該組合物進一步包括有效量之能夠減小或防止DC至巨噬球移位之阻斷劑，其中該阻斷劑係選自由以下組成之群：CSF-1抑制劑、CSF-1R抑制劑、MCP-1抑制劑、IL-4抑制劑(例如帕考珠單抗(pascalizumab)、皮特克拉(pitakinra)及杜匹魯單抗(dupilumab))、IL-10抑制劑、IL-13抑制劑(例如安蘆珠單抗(anrukizumab)、來金珠單抗(lebrikizunab)及曲洛青單抗(tralokinumab))、IL-4/IL-13雙重抑制劑(例如杜普麗單抗(duplimab))、類前列腺素抑制劑(例如PGE3抑制劑)、STAT3抑制劑(例如索拉菲尼(sorafenib)、舒尼替尼(sunitinib)、WP1066及白藜蘆醇(resveratrol))及STAT6抑制劑(例如芬維A胺(4-HPR)、來氟米特(leflunomid)、TMX264

及AS1217499)，或其組合。

【第14項】

如請求項1或2之用途，其中該藥劑係與選自由以下組成之群之其他治療劑一起投與：抗激素(例如抗雌激素或抗雌激素受體，例如他莫昔芬(tamoxifen)、順式他莫昔芬、因多昔芬(endoxifen)、去甲基他莫昔芬(desmethyltamoxifen)、拉索昔芬(lasofloxifene)、雷洛昔芬(raloxifene)、苯并噻吩、巴多昔芬(bazedofloxifene)、阿佐昔芬(arzoxifene)、米潑昔芬(miproxifene)、左美洛昔芬(levormeloxifene)、屈洛昔芬(droloxifene)、氯米芬(clomifene)、艾多昔芬(idoxifene)、托瑞米芬(toremifene)、EM652及ERA-923、氟維司群(fulvestrant)、ARN-810或CH498、阿那曲唑(anastrozole)、依西美坦(exemestane)及來曲唑(letrozole)、類固醇、蔥環、甲狀腺激素代替藥物、細胞毒性劑(例如烷基化劑(例如替莫唑胺(temozolomide)及環磷醯胺(cyclophosphamide))、蔥環(例如多柔比星(doxorubicin)、聚乙二醇化脂質體多柔比星、表柔比星(epirubicin)、伊達比星(idarubicin)及諸如此類)、蔥二酮(例如米托蔥醯(mitoxantrone))、鉑藥物(例如順鉑、卡鉑(carboplatin)、奧沙利鉑(oxaliplatin)、奧馬鉑(ormaplatin)、恩洛鉑(enloplatin)及諸如此類)、紫杉烷(taxane) (例如太平洋紫杉醇(paclitaxel)))、抗有絲分裂藥、博來黴素(bleomycin)、硼替佐米(bortezomib)、帕土匹龍(patupilone)、鈣網織蛋白(calreticulin)、廣譜細胞死亡劑(例如棉子酚(glossypol)、茶酚(例如表沒食子兒茶素-3-沒食子酸酯)、7-溴 靛 玉 紅-3'-脲(7BIO)、致癌RAS、大環內酯、小蘗鹼(Berberine) (衍生自植物之異喹啉生物鹼)、UMI-77、雷公藤內酯(triptolide)及舍利克爾(selinexor))、細胞外核苷酸酶之廣譜抑制劑，例如

ARL67156、替莫唑胺、環磷醯胺、馬磷醯胺(mafosfamide)、多柔比星、表柔比星、伊達比星、米托蒽醌、奧沙利鉑、太平洋紫杉醇、博來黴素、硼替佐米、溶瘤病毒、帕土匹龍、酪胺酸磷酸化抑制劑(Tyrphostin) AG 490 (傑納斯(Janus)活化激酶2/信號轉導劑及轉錄活化劑-3 (JAK2/STAT3) 抑制劑)、DNA低甲基化劑(例如阿紫胞苷(azacitidine)或地西他濱(decitabine))、胸苷酸(thymidylate)靶向藥(例如多西他賽(docetaxel)、吉西他濱(gemcitabine))、曲妥珠單抗(trastuzumab)、阿多-曲妥珠單抗艾坦辛(ado-trastuzumab emtansine)、帕妥珠單抗(pertuzumab)、阿貝西利(abemaciclib)、帕博西尼(palbociclib)、抗IL-10抑制劑、抗TGF- β 抑制劑、檢查點抑制劑(如PD-1抑制劑，例如抗PD-1抗體(例如尼沃魯單抗(Nivolumab))；PD-1L抑制劑，例如抗PD-1L (例如阿替珠單抗(atezolizumab) (MPDL3280)、阿維魯單抗(Avelumab) (MSB0010718C)、德瓦魯單抗(Durvalumab)、MDX-1105)；CTLA-4抑制劑，例如抗CTLA4抗體(例如伊匹單抗(Ipilimumab))；LAG-3抑制劑，例如抗LAG-3抗體(例如IMP321、BMS-986016及GSK2831781)；OX-40激動劑，例如MOXR0916、PF-04518600、MEDI0562、MEDI6469及MEDI6383；TIM抑制劑、IDO抑制劑)、CCR4抑制劑、FoxP3抑制劑、細胞療法(例如嵌合抗原受體/T細胞(CAR-T)療法及其他過繼性細胞療法(adoptive cell therapies))，或其組合。

【第15項】

如請求項14之用途，其中該其他治療劑包括於如請求項1至13之任一組合物中。

【第16項】

如請求項14之用途，其中該細胞毒性劑誘發腫瘤細胞死亡。

【第17項】

如請求項1或2之用途，其中該組合物包括TLR9激動劑及OX-40激動劑。

【第18項】

如請求項17之用途，其中該TLR9激動劑係CPG-ODN，每單位劑量範圍由0.01 $\mu\text{g/mL}$ 至20 mg/mL 、由0.1 $\mu\text{g/mL}$ 至15 mg/mL 、由1 $\mu\text{g/mL}$ 至10 mg/mL 、由10 $\mu\text{g/mL}$ 至5 mg/mL 或由50 $\mu\text{g/mL}$ 至1 mg/mL ，且該OX-40激動劑抗體為每單位劑量範圍由0.01 mg/mL 至50 mg/mL 、由0.1 mg/mL 至40 mg/mL 、由0.5 mg/mL 至30 mg/mL 或由1 mg/mL 至25 mg/mL 。

【第19項】

如請求項1或2之用途，其中該組合物包括TLR3激動劑及 $\text{IFN}\alpha$ 。

【第20項】

如請求項19之用途，其中該TLR3激動劑係聚(I:C)，每單位劑量範圍由0.01 $\mu\text{g/mL}$ 至50 $\mu\text{g/mL}$ 、由0.1 $\mu\text{g/mL}$ 至40 $\mu\text{g/mL}$ 、由0.5 $\mu\text{g/mL}$ 至25 $\mu\text{g/mL}$ 或由1 $\mu\text{g/mL}$ 至20 $\mu\text{g/mL}$ ，且該 $\text{IFN}\alpha$ 為每單位劑量範圍由1 $\mu\text{g/mL}$ 至300 $\mu\text{g/mL}$ 、由10 $\mu\text{g/mL}$ 至250 $\mu\text{g/mL}$ 、由25 $\mu\text{g/mL}$ 至200 $\mu\text{g/mL}$ 或由50 $\mu\text{g/mL}$ 至150 $\mu\text{g/mL}$ 。

【第21項】

如請求項1或2之用途，其中該組合物包括 $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 $\text{IFN}\gamma$ 、 $\text{IFN}\alpha\text{-2b}$ 及聚(I:C)。

【第22項】

如請求項21之用途，其中該TNF α 為每單位劑量範圍由0.05 $\mu\text{g/mL}$ 至150 $\mu\text{g/mL}$ 、由0.1 $\mu\text{g/mL}$ 至100 $\mu\text{g/mL}$ 或由0.5 $\mu\text{g/mL}$ 至50 $\mu\text{g/mL}$ ；IL-1 β 為每單位劑量範圍由0.01 $\mu\text{g/mL}$ 至20 $\mu\text{g/mL}$ 、由0.1 $\mu\text{g/mL}$ 至15 $\mu\text{g/mL}$ 、由0.5 $\mu\text{g/mL}$ 至10 $\mu\text{g/mL}$ 或由1 $\mu\text{g/mL}$ 至10 $\mu\text{g/mL}$ ；IFN γ 為每單位劑量範圍由1 $\mu\text{g/mL}$ 至100 $\mu\text{g/mL}$ 、由10 $\mu\text{g/mL}$ 至80 $\mu\text{g/mL}$ 、由25 $\mu\text{g/mL}$ 至75 $\mu\text{g/mL}$ 或由50 $\mu\text{g/mL}$ 至75 $\mu\text{g/mL}$ ；IFN α 為每單位劑量範圍由1 $\mu\text{g/mL}$ 至300 $\mu\text{g/mL}$ 、由10 $\mu\text{g/mL}$ 至250 $\mu\text{g/mL}$ 、由25 $\mu\text{g/mL}$ 至200 $\mu\text{g/mL}$ 或由50 $\mu\text{g/mL}$ 至150 $\mu\text{g/mL}$ ；且聚(I:C)為每單位劑量範圍由0.01 $\mu\text{g/mL}$ 至50 $\mu\text{g/mL}$ 、由0.1 $\mu\text{g/mL}$ 至40 $\mu\text{g/mL}$ 、由0.5 $\mu\text{g/mL}$ 至25 $\mu\text{g/mL}$ 或由1 $\mu\text{g/mL}$ 至20 $\mu\text{g/mL}$ 。

【第23項】

一種包括一或多種生物活性劑之組合物之用途，其用以製造用於誘發個體中抗原呈遞細胞遷移之藥劑，其中該藥劑係經管內投與該個體之乳管，且其中包括於該組合物中之至少一種生物活性劑能夠在該個體中誘發抗原呈遞細胞遷移至淋巴結。

【第24項】

如請求項23之用途，其中該一或多種生物活性劑係選自由以下組成之群之1型極化劑：TLR激動劑(例如TLR3激動劑(例如聚(I:C)、聚腺苷-聚尿苷酸(聚AU)、安普利近(聚I:聚C (12)U)，及經聚-L-離胺酸及羧甲基纖維素穩定之聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚ICLC)；TLR4激動劑(例如吡喃葡萄糖基類脂A (G100)、GSK1795091、單磷醯脂質A (MPL)及基於MPL之激動劑(例如葡萄胺糖苷磷酸胺基烷基酯(AGP))、脂多醣(LPS)及類鴉片(例如美沙酮、嗎啡-3-葡萄糖醛酸苷))；TLR7激動劑及TLR8激動劑，例如咪

唑并喹啉(咪喹莫特及瑞喹莫德(R848)；TLR9激動劑，例如(CpG-ODN，例如PF-3512676及諸如此類)、DAMP (例如HMBG1)、細胞介素(例如TNF α 、IFN γ 、I型IFN(例如IFN α 或IFN β)、IL-1 β 、IL-2、IL-12p70)、DAMP (例如HMBG1)、趨化介素(例如IL-1 β 、MIP-3 β 、CCL2、CCL19、CCL21或任何CCR7配體)，及生長因子、mi-RNA (例如miR-155)、共刺激分子激動劑(例如CD-40激動劑(例如抗CD40抗體，例如RO7009789、APX005M、CP-870,893、ABBV-927)、OX-40激動劑(例如抗OX-40抗體MOXR0916、PF-04518600、MEDI0562、MEDI6469及MEDI6383)、環糊精(例如2-羥丙基- β -環糊精)，及其組合。

【第25項】

如請求項23或24之用途，其中該至少一種能夠在該個體中誘發抗原呈遞細胞遷移至淋巴結之生物活性劑係IL-1 β 、MIP-3 β 、CCL2、CCR7配體(例如CCL19及CCL21)、LMP1、LMP1-CD40、LMP1-OX40激動劑、CD40L、MMP9、DAMP (例如HMBG1)，或其組合。

【第26項】

如請求項23或24之用途，其中該抗原呈遞細胞係樹突狀細胞。

【第27項】

如請求項23或24之用途，其中該等抗原呈遞細胞遷移至該淋巴結活化細胞毒性CD8⁺ T細胞、CD4⁺ Th1細胞、記憶性T細胞、記憶性B細胞、Th_f細胞、NK細胞、B細胞，或其任何組合。

【第28項】

如請求項23或24之用途，其中該藥劑在該個體中誘發抗腫瘤免疫反應。

【第29項】

如請求項28之用途，其中抗腫瘤免疫反應包括乳房腫瘤由經活化細胞毒性CD8+ T細胞、CD4+ Th1細胞、NK細胞、B細胞或其組合浸潤。

【第30項】

如請求項23或24之用途，其中該個體之乳房腫瘤之大小減小。

【第31項】

一種細胞毒性劑之用途，其用以製造用於誘發或增加個體之乳房腫瘤細胞中免疫細胞死亡之藥劑，其中經管內投與包括一或多種生物活性劑之組合物與該藥劑。

【第32項】

如請求項31之用途，其中該細胞毒性劑係選自由以下組成之群：替莫唑胺、環磷醯胺(包含低劑量或節拍式(metronomic)環磷醯胺)、馬磷醯胺、多柔比星、表柔比星、伊達比星、米托蒽醌、奧沙利鉑、太平洋紫杉醇、博來黴素、硼替佐米、溶瘤病毒、帕土匹龍、酪胺酸磷酸化抑制劑AG 490 (JAK2/STAT3抑制劑)，或其組合。

【第33項】

如請求項32之用途，其中該一或多種生物活性劑係選自由以下組成之群之1型極化劑：TLR激動劑(例如TLR3激動劑(例如聚(I:C)、聚腺苷-聚尿苷酸(聚AU)、安普利近(聚I:聚C (12)U)及經聚-L-離胺酸及羧甲基纖維素穩定之聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚ICLC)；TLR4激動劑(例如吡喃葡萄糖基類脂A (G100)、GSK1795091、單磷醯脂質A (MPL)及基於MPL之激動劑(例如葡萄胺糖苷磷酸胺基烷基酯(AGP))、脂多醣(LPS)及類鴉片(例如美沙酮、嗎啡-3-葡萄糖醛酸苷))；TLR7激動劑及TLR8激動劑，例如咪唑

并喹啉(咪喹莫特及瑞喹莫德(R848))；TLR9激動劑，例如(CpG-ODN，例如PF-3512676，及諸如此類)、DAMP (例如HMGB1)、細胞介素(例如TNF α 、IFN γ 、I型IFN(例如IFN α 或IFN β)、IL-1 β 、IL-2、IL-12)、趨化介素(例如IL-1 β 、CCL2、CCL19、CCL21或任何CCR7配體)，及生長因子、mi-RNA (例如miR-155)、共刺激分子激動劑(例如CD-40激動劑(例如抗CD40抗體，例如RO7009789、APX005M、CP-870,893、ABBV-927)、OX-40激動劑(例如抗OX-40抗體MOXR0916、PF-04518600、MEDI0562、MEDI6469及MEDI6383)、環糊精(例如2-羥丙基- β -環糊精)，及其組合。

【第34項】

如請求項31至33中任一項之用途，其中該方法進一步包括向該個體之乳管或乳房組織經管內投與有效量之能夠誘發募集自來抗原呈遞細胞之生物活性劑，該生物活性劑係選自由以下組成之群：細胞介素及趨化介素(例如IL-1 β 、MCP-1、RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、IL-8、C1Q、CCL1 (CCR1配體)、CCL2 (CCR2配體)、CCL5 (CCR5配體)、CCL20 (CCR6配體)、CXCL3 (CXCR3配體)、CXCL4 (CXCR4配體)及CXCL1 (CXCR1配體))、DAMP (例如HMGB1)，及TLR激動劑(如TLR3激動劑(例如聚(I:C)、聚腺苷-聚尿苷酸(聚AU)、安普利近(Ampligen)(聚I:聚C (12)U)及經聚-L-離胺酸及羧甲基纖維素穩定之聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚ICLC)；TLR4激動劑(例如吡喃葡萄糖基類脂A (G100)、GSK1795091、單磷醯脂質A (MPL)及基於MPL之激動劑(例如葡萄胺糖苷磷酸胺基烷基酯 (AGP))、脂多醣(LPS)及類鴉片(例如美沙酮、嗎啡-3-葡萄糖醛酸苷))；TLR7激動劑及TLR8激動劑，例如咪唑并喹啉(咪喹莫特及瑞喹莫德

(R848)；TLR9激動劑(例如CpG-ODN，例如PF-3512676、(聚I:C)、C792、來非莫德(MGN1703)、SD-101、IMO-2125及諸如此類)，或其組合。

【第35項】

如請求項31至33中任一項之用途，其中該細胞毒性劑包括奧沙利鉑，且其中該包括一或多種生物活性劑之組合物包括：(i) TLR3激動劑聚(I:C)及IFN α ；(ii) TLR9激動劑(CpG-ODN)及OX-40激動劑抗體；或(iii) TNF α 、IL-1 β 、IFN γ 、IFN α -2b及聚(I:C)。

【第36項】

如請求項31至33中任一項之用途，其中經靜脈內或經管內將細胞毒性劑投與該個體。

【第37項】

如請求項31至33中任一項之用途，其中該個體之腫瘤大小減小。

【第38項】

如請求項1、2、23、24及31至33中任一項之用途，其中以單一劑量或多個劑量經管內投與該組合物。

【第39項】

如請求項1、2、23、24及31至33中任一項之用途，其中每天一次、一天多次(兩次、三次、四次及諸如此類)、隔天、每2天、每3天、每5天、每7天、每14天、每15天、每3週、每28天、每月一次、每季一次、每6個月一次及一年一次投與該組合物。

【第40項】

如請求項1、2、23、24及31至33中任一項之用途，其中該組合物進一步包括選自由以下組成之群之成像劑、染料或對比劑：釷螯合物、超順

磁氧化鐵奈米顆粒(SPION)、¹⁹F全氟碳奈米顆粒，及其他磁性報告基因(例如基於金屬蛋白之MRI探針)。

【第41項】

如請求項1、2、23、24及31至33中任一項之用途，其中該組合物進一步包括醫藥上可接受之載劑。

【第42項】

如請求項1、2、23、24及31至33中任一項之用途，其中將該組合物調配為脂質體、奈米顆粒、微顆粒、微球體、奈米膠囊、奈米球、脂質顆粒、囊泡或微胞。

【第43項】

如請求項1、2、23、24及31至33中任一項之用途，其中該一或多種生物活性劑包括於脂質體、微顆粒、微球體、奈米膠囊、奈米顆粒、奈米球、脂質顆粒、囊泡或微胞中。

【第44項】

如請求項1、2、23、24及31至33中任一項之用途，其中該一或多種生物活性劑包括於脂質體、微顆粒、微球體、奈米膠囊、奈米顆粒、奈米球、脂質顆粒、囊泡或微胞上。

【第45項】

如請求項42之用途，其中該奈米顆粒係脂質奈米顆粒。

【第46項】

如請求項42之用途，其中該奈米顆粒進一步經細胞靶向劑塗覆。

【第47項】

如請求項46之用途，其中該細胞靶向劑係選自由以下組成之群：

DEC-205、Clec9A (DNDR-1)、DC-SIGN、C1q、BDCA1、BDCA2、BDCA3及BDCA4。

【第48項】

一種製品，其包括如請求項1至47中任一項之組合物、一或多個容器、包裝材料、標記或包裝插頁，及視情況裝置。

【第49項】

如請求項48之製品，其中該裝置係針及注射器、套管、導管、微型導管、滲透幫浦，或囊封裝置。

【第50項】

如請求項48或49之製品，其進一步包括選自由以下組成之群之其他治療劑：檢查點抑制劑、抗激素(例如抗雌激素或抗雌激素受體，例如他莫昔芬、順式他莫昔芬、因多昔芬、去甲基他莫昔芬、拉索昔芬、雷洛昔芬、苯并噻吩、巴多昔芬、阿佐昔芬、米潑昔芬、左美洛昔芬、屈洛昔芬、氯米芬、艾多昔芬、托瑞米芬、EM652及ERA-923、氟維司群、ARN-810或CH498、阿那曲唑、依西美坦及來曲唑)、類固醇、蔥環、甲狀腺激素代替藥物、細胞毒性劑，例如烷基化劑(例如替莫唑胺及環磷醯胺)、蔥環(例如多柔比星、聚乙二醇化脂質體多柔比星、表柔比星、伊達比星及諸如此類)、蔥二酮(例如米托蔥醯)、鉑藥物(例如順鉑、卡鉑、奧沙利鉑、奧馬鉑、恩洛鉑及諸如此類)、紫杉烷(例如太平洋紫杉醇)、抗有絲分裂藥、博來黴素、硼替佐米、帕土匹龍、鈣網織蛋白、廣譜細胞死亡劑(例如棉子酚、茶酚(例如表沒食子兒茶素-3-沒食子酸酯)、7-溴靛玉紅-3'-肟(7BIO)、致癌RAS、大環內酯、小蘗鹼(衍生自植物之異喹啉生物鹼)、UMI-77、雷公藤內酯及舍利克爾)、細胞外核苷酸酶之廣譜抑制

劑，例如ARL67156、替莫唑胺、環磷醯胺、馬磷醯胺、多柔比星、表柔比星、伊達比星、米托蒽醌、奧沙利鉑、太平洋紫杉醇、博來黴素、硼替佐米、溶瘤病毒、帕土匹龍、酪胺酸磷酸化抑制劑AG 490 (JAK2/STAT3抑制劑)、DNA低甲基化劑(例如阿紮胞苷或地西他濱)、胸苷酸靶向藥物(例如多西他賽、吉西他濱)、曲妥珠單抗、阿多-曲妥珠單抗艾坦辛、帕妥珠單抗、阿貝西利、帕博西尼、抗IL-10抑制劑、抗TGF- β 抑制劑、檢查點抑制劑(例如抗PD-1抗體、抗PD-1L抗體、抗PD-L2抗體、抗CTLA-4抗體、抗LAG-3抗體、抗TIM-3抗體及諸如此類)、抗CCR4抑制劑、抗FoxP3抑制劑、細胞療法(例如嵌合抗原受體/T細胞(CAR-T)療法，及其他過繼性細胞療法)，或其組合。