(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116763943 A
(43)申请公布日 2023.09.19

(21)申请号 202310525133.X

(22)申请日 2019.07.21

(30)优先权数据
62/715,666 2018.08.07 US

(62)分案原申请数据
201980052586.7 2019.07.21

(71)申请人 普渡研究基金会
地址 美国印第安纳州

(72)发明人 菲利普·斯图尔特·罗吾 张泊宁 约翰·V·拿破仑

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 张福誉 刘振佳

(51)Int.Cl.
A61K 49/00(2006.01)
A61K 31/4745(2006.01)
A61K 31/4545(2006.01)
A61K 31/4535(2006.01)
A61K 31/352(2006.01)
A61K 31/7076(2006.01)
A61K 47/55(2017.01)
A61K 47/62(2017.01)
A61K 47/68(2017.01)
A61P 35/00(2006.01)

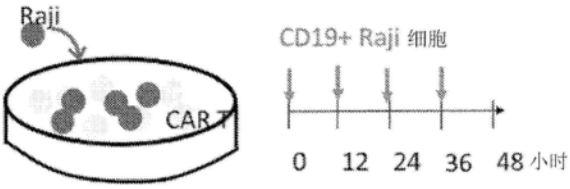
权利要求书3页 说明书30页 附图6页

(54)发明名称

使CAR T细胞恢复活力

(57)摘要

本申请涉及使CAR T细胞恢复活力。本文中提供了与靶向配体缀合的药物载荷,其被专门设计成递送至耗竭的CAR T细胞以使这些CAR T细胞恢复活力。被靶向的CAR T细胞以融合受体进行修饰,所述融合受体可与所述靶向配体结合并且使所缀合的药物载荷内化,以执行其对耗竭的CAR T细胞的调节功能。



CN 116763943 A

1.使耗竭的经典CAR T细胞恢复活力的系统,其包含至少两种组分:

第一组分是包含与载荷药物共价连接的靶向配体的缀合物,其中所述靶向配体选自荧光素和FK506,并且其中所述载荷药物选自TLR7激动剂、STING激动剂、SHP1/2的抑制剂、TC-PTP的抑制剂、DGKa的抑制剂或TGFp的抑制剂;并且

第二组分是与膜锚定模块连接的靶向配体结合模块,其中所述第二组分的所述靶向配体结合模块以高亲和力识别所述第一组分中的所述靶向配体以形成复合物,所述载荷药物阻断所述耗竭的经典CAR T的抑制性信号传导,或者通过抗原非依赖性途径重新激活所述CAR T,并且其中所述膜锚定模块介导该双组分复合物内化到所述耗竭的CAR T细胞中。

2.根据权利要求1所述的系统,其中所述第二组分的靶向配体结合模块包含抗FITC抗体片段、抗荧光素抗体片段或FKBP。

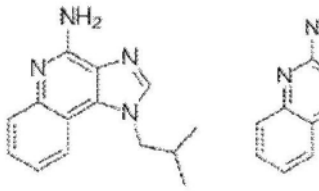
3.根据权利要求1所述的系统,其中所述膜锚定模块是叶酸受体。

4.根据权利要求1所述的系统,其中所述第一组分包含在所述靶向配体与所述载荷药物之间的可释放的接头。

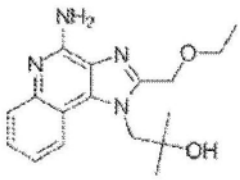
5.根据权利要求1所述的系统,其中所述第一组分包含在所述靶向配体与所述载荷药物之间的不可释放的接头。

6.根据权利要求1所述的系统,其中所述靶向配体与所述配体结合模块之间的结合亲和力在亚纳摩范围内。

7.根据权利要求1所述的系统,其中所述TLR7激动剂具有以下结构:

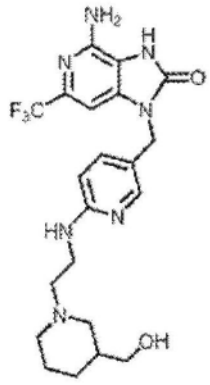


咪喹莫特



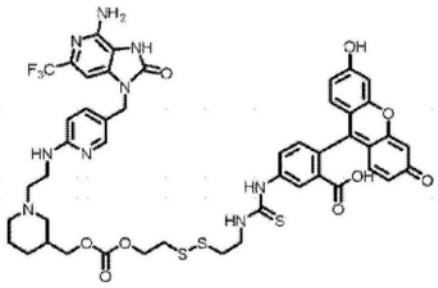
雷西莫特

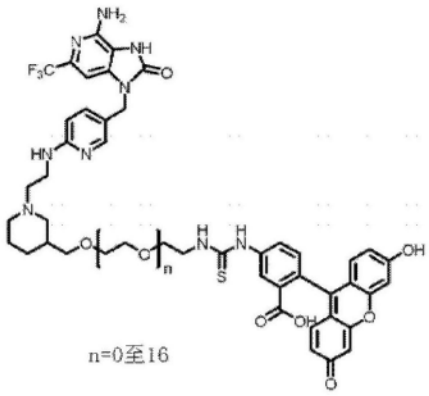
或



JTLR7。

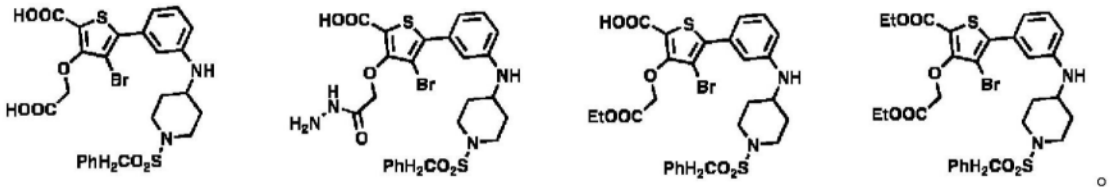
8.根据权利要求1所述的系统,其中所述第一组分是以下之一:



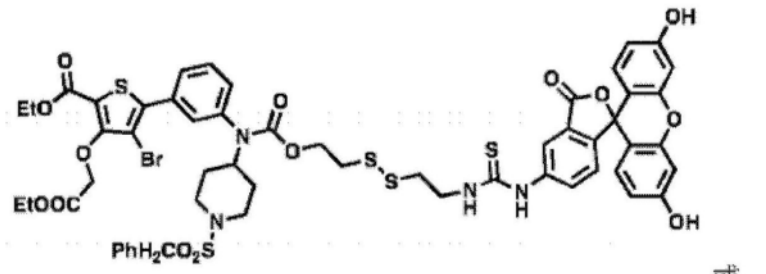


。

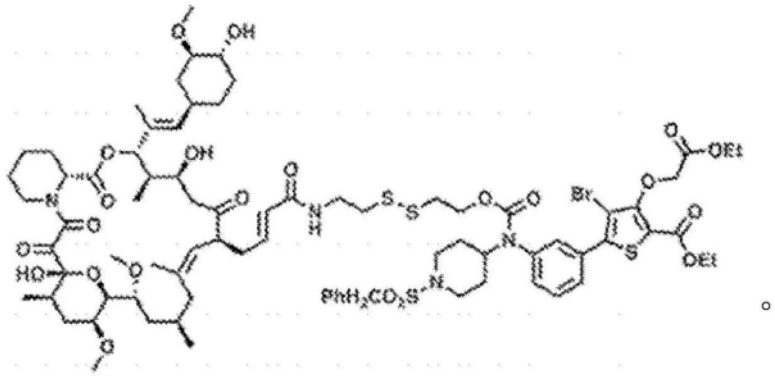
9.根据权利要求1所述的系统,其中所述第一组分包含选自以下TC-PTP磷酸酶抑制剂的载荷药物:



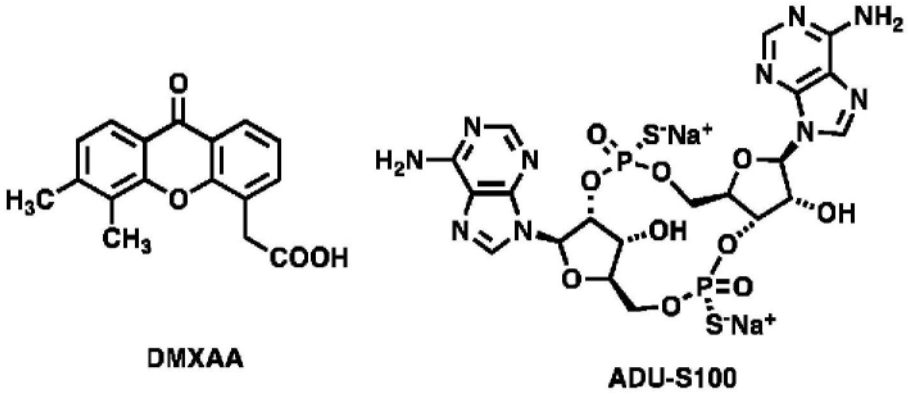
10.根据权利要求9所述的系统,其中所述磷酸酶抑制剂与荧光素或FK506(他克莫司)连接以形成以下结构:



或

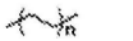


11.根据权利要求1所述的系统,其中所述第一组分中的所述载荷药物包含以下结构之一的STING激动剂;



DMXAA ADU-S100

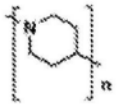
12.根据权利要求1所述的系统,其中所述第一组分包含在所述靶向配体与所述载荷药物之间的间隔基,所述间隔基选自以下结构:

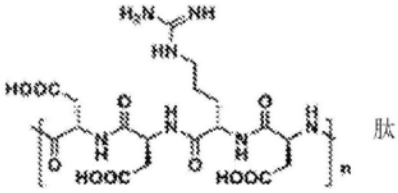

烷基

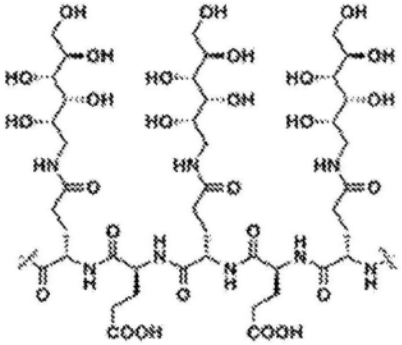

聚乙二醇（PEG）


聚脯氨酸


寡聚-(4-哌啶羧酸)


寡聚哌啶


肽


糖-肽

。

使CAR T细胞恢复活力

[0001] 本申请是申请日为2019年7月21日、申请号为“201980052586.7”、发明名称为“使CAR T细胞恢复活力”的中国专利申请的分案申请，原申请是国际申请PCT/US2019/042726的中国国家阶段申请。

技术领域

[0002] 本公开内容提供了使癌抗原耗竭的嵌合抗原受体T(chimeric antigen receptor T，CAR T)细胞恢复活力(rejuvenate)的系统。具体地，所述系统在经典CAR构建体(construct)中包含融合受体，其中所述融合受体提供了配体结合模块(ligand binding module)，其识别高亲和力配体-载荷药物缀合物(ligand-payload drug conjugate)以递送药物载荷，所述药物载荷被设计成阻断耗竭的CAR T中的抑制性信号传导或通过抗原非依赖性途径重新激活CAR T。

背景技术

[0003] 在过去的二十年中，嵌合抗原受体(CAR)T细胞治疗领域取得了巨大进步。CAR构建体由四个部分组成：(1)针对肿瘤特异性抗原的胞外结合部分，(2)铰链结构域，(3)跨膜结构域，以及(4)多种激活结构域(例如，CD28、4-1BB和CD3ζ链)的组合。在针对CD1 9阳性B细胞白血病的CAR T治疗中取得了最令人印象深刻的成功，其中在多项临床试验中已达到超过80％的完全缓解率。

[0004] 相比之下，迄今为止已证明通过CAR T治疗实体瘤更具挑战性。在临床前研究中，在免疫缺陷小鼠中使用同基因小鼠模型或异种移植肿瘤模型已经取得了巨大的成功。然而，涉及实体瘤(例如，乳腺癌、卵巢癌或肺癌)的临床试验均没有显示出与对照相比的改善。通常来说，其具有与其他过继细胞治疗所面临的相同局限性，包括(1)肿瘤穿透性差；(2)低氧压；(3)免疫抑制性肿瘤微环境，其包括肿瘤相关的巨噬细胞、成纤维细胞和抑制性细胞因子[1]。CAR T细胞与肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)一样，可以通过这种抑制性微环境再培养(re-educated)并转变为“功能低下”状态，其特征在于共抑制分子(即，PD-1、Tim-3、LAG-3等)的过表达、降低的INFγ分泌和杀伤能力。来自卵巢癌患者样品的数据显示，大多数PD-1^{+}CD8^{+}T细胞缺乏CD 127的表达，已知CD 127对于T细胞中的效应子-记忆的转变是重要的。LAG-3的过表达也与TCR特异性CD8^{+}TIL的效应子功能负相关。此外，PD-1^{+}LAG-3^{+}双阳性T细胞表现出较低的INFγ产生[2]。类似地，NY-ESO-1TCR特异人T细胞在小鼠实体瘤模型中功能低下，表明由于微环境和通过持续暴露于抗原对T细胞的持续激活二者造成的共抑制分子的高表达和低效的抗肿瘤效果[3]。因此，为了更好的实体瘤治疗，非常期望逆转抑制性微环境，更重要的是，使耗竭的CAR T细胞恢复活力。

发明内容

[0005] 本公开内容提供了使耗竭的经典CAR T细胞恢复活力的系统。所述系统包含至少两种组分：第一组分是包含与药物载荷共价连接的靶向配体的缀合物；并且第二组分是与

膜锚定模块(membrane-anchoring module)连接的靶向配体结合模块。第二组分的靶向配体结合模块以高亲和力识别第一组分中的靶向配体以形成复合物,并且载荷药物阻断耗竭的CAR T的抑制性信号传导,或者通过抗原非依赖性途径重新激活所述CAR T。膜锚定模块介导该双组分复合物内化到耗竭的CAR T细胞中。

[0006] 在一些优选的实施方案中,前述第一组分的靶向配体是叶酸(folate)、FITC或FK506。

[0007] 在一些优选的实施方案中,前述第二组分的靶向配体结合模块包含叶酸受体、抗FITC抗体片段或FKBP。

[0008] 在一些优选的实施方案中,前述膜锚定模块是叶酸受体。

[0009] 在一些优选的实施方案中,前述第一组分包含在靶向配体与载荷药物之间的可释放的接头(linker)。

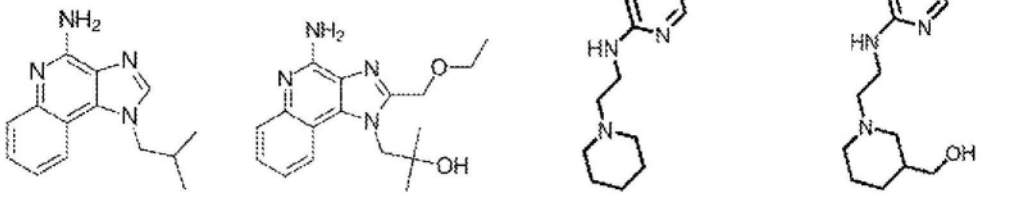
[0010] 在一些优选的实施方案中,前述第一组分包含在靶向配体与载荷药物之间的不可释放的接头。

[0011] 在一些优选的实施方案中,前述靶向配体与靶向配体结合模块之间的结合亲和力在亚纳摩范围(sub-nanomolar range)内。

[0012] 在一些优选的实施方案中,前述药物载荷是Toll样受体7(Toll Like Receptor 7,TLR7)激动剂或干扰素基因刺激物(Simulator of interferon genes,STING)激动剂。

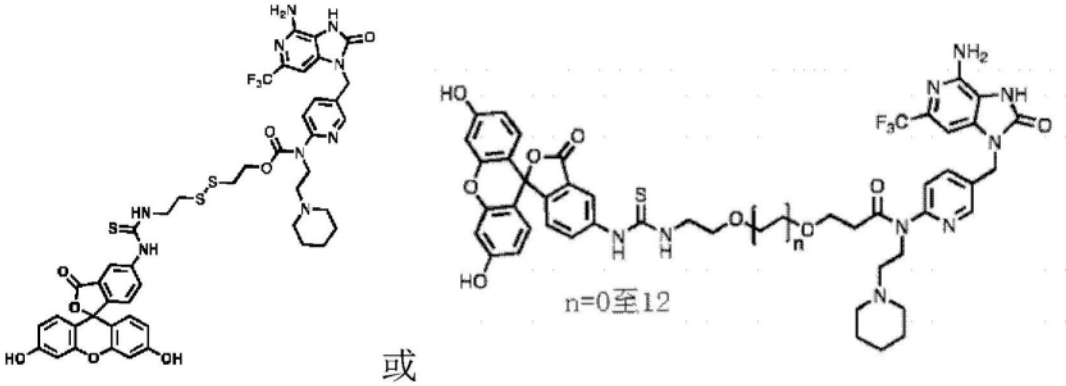
[0013] 在一些优选的实施方案中,前述药物载荷是以下蛋白质的抑制剂:SHP1/2、TC-PTP或DGKα、TGFβ。

[0014] 在一些优选的实施方案中,前述TLR7激动剂具有以下结构:

[0015] 

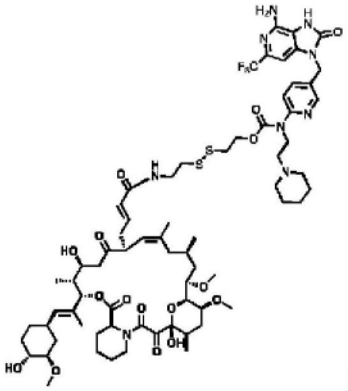
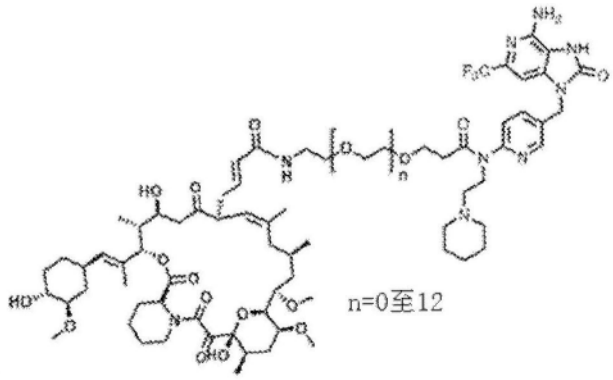
咪喹莫特 雷西莫特 TLR7 激动剂 JTLR7 。

[0016] 在一些优选的实施方案中,前述第一组分是具有以下结构的荧光素-TLR7激动剂:

[0017] 

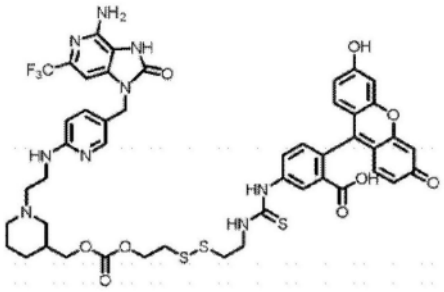
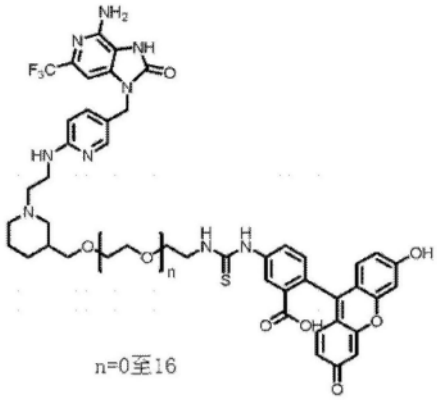
或 。

[0018] 在一些优选的实施方案中，前述第一组分是具有以下结构的FK506-TLR7激动剂：

[0019]  或 

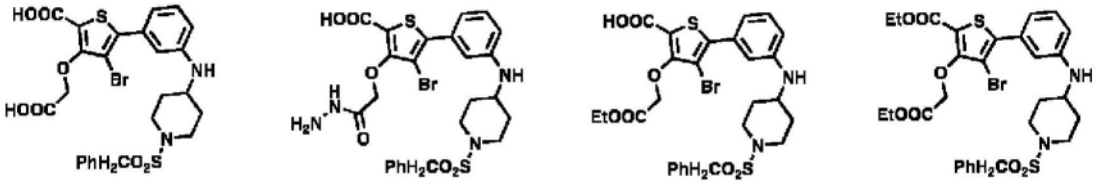
。

[0020] 在一些优选的实施方式中，前述第一组分是以下之一：

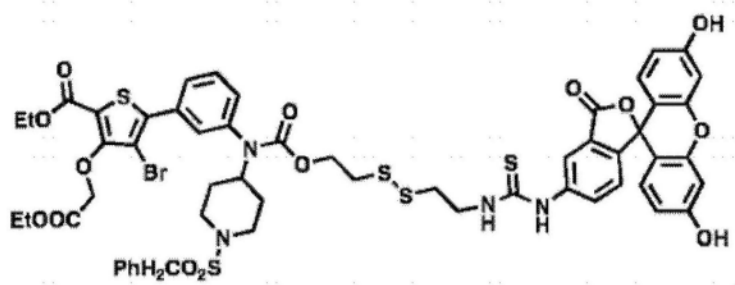
[0021]  

。

[0022] 在一些优选的实施方案中，前述第一组分包含选自以下TC-PTP磷酸酶抑制剂的载荷药物：

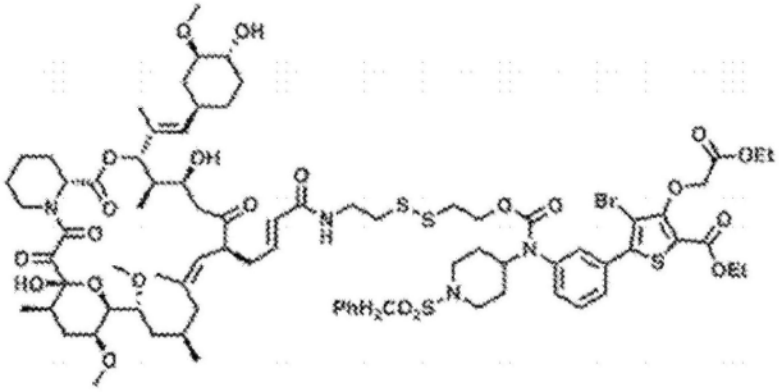
[0023] 
。

[0024] 在一些优选的实施方案中，前述磷酸酶抑制剂与荧光素或FK506(他克莫司)连接以形成以下结构：



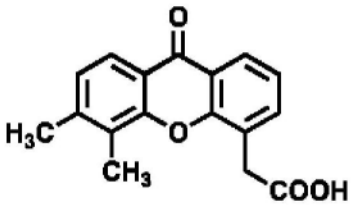
或

[0025]

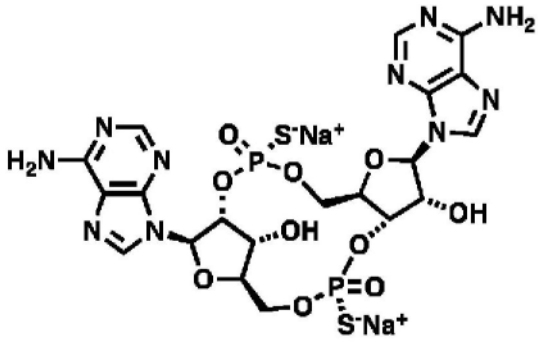


[0026] 在一些优选的实施方案中，前述第一组分中的载荷药物包含以下结构之一的STING激动剂：

[0027]



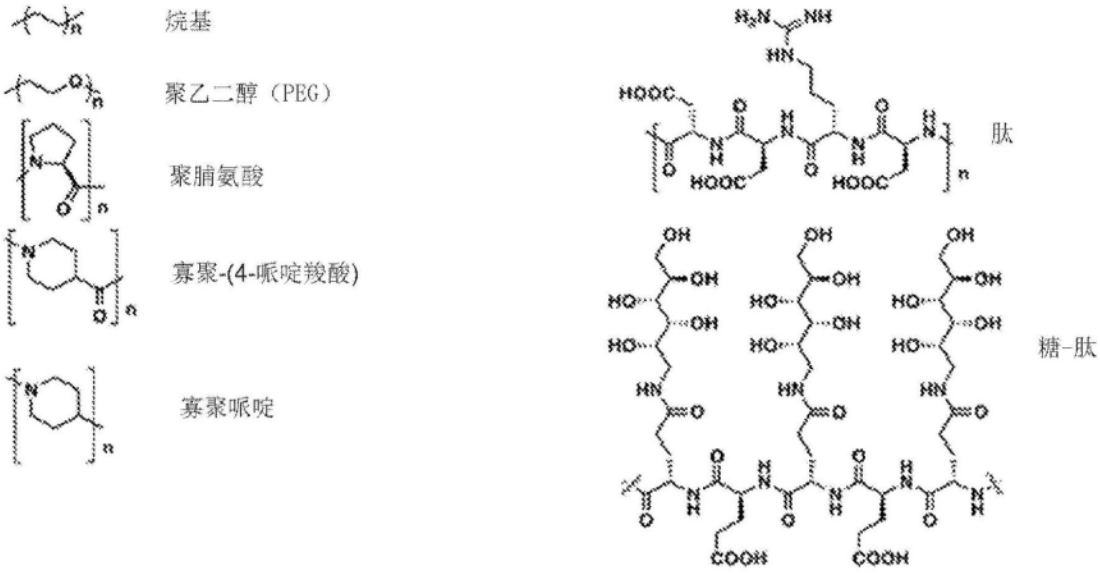
DMXAA



ADU-S100

[0028] 在一些优选的实施方案中，前述第一组分在靶向配体与载荷药物之间包含间隔基(spacer)，所述间隔基选自以下结构：

[0029]



。

[0030] 本公开内容还提供了使耗竭的CAR T细胞恢复活力的方法。所述方法包括以下步骤：

[0031] a.向耗竭的CAR T细胞提供包含缀合物的第一组分，其中所述缀合物包含通过可释放或不可释放的接头与药物载荷共价连接的靶向配体；

[0032] b.向所述耗竭的CAR T细胞提供包含与耗竭的CAR构建体连接的融合受体的第二组分，其中所述融合受体包含靶向配体结合模块和膜锚定模块；

[0033] c.使第二组分的靶向配体结合模块与第一组分中的靶向配体结合以形成复合物；

[0034] d.使膜锚定模块介导复合物向耗竭的CAR T细胞的内化；

[0035] e.使载荷药物阻断耗竭的CAR T的抑制性信号传导或通过抗原非依赖性途径重新激活所述CAR T。

[0036] 在一些优选的实施方案中，前述方法携带在耗竭的CAR T的内体中执行其功能的载荷药物，并且靶向配体与载荷药物通过不可释放的接头连接。

[0037] 在一些优选的实施方案中，前述方法携带作为耗竭的CAR T的胞质溶胶中的游离药物执行其功能的载荷药物，并且靶向配体与载荷药物通过可释放的接头连接。

[0038] 在一些优选的实施方案中，前述方法中第一组分的靶向配体是叶酸、FITC或FK506。

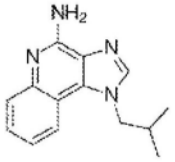
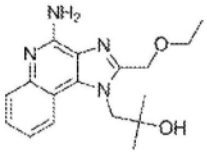
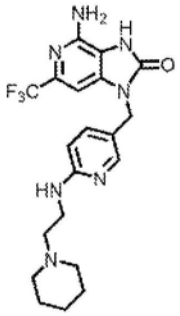
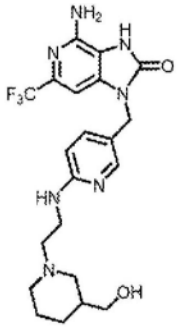
[0039] 在一些优选的实施方案中，前述方法中第二组分的靶向配体结合模块是抗FITC、叶酸受体或FKBP。

[0040] 在一些优选的实施方案中，前述方法中第二组分的靶向配体结合模块是叶酸受体α(FRa)。

[0041] 在一些优选的实施方案中，前述方法中第一组分的药物载荷是Toll样受体7(TLR7)激动剂或干扰素基因刺激物(STING)激动剂。

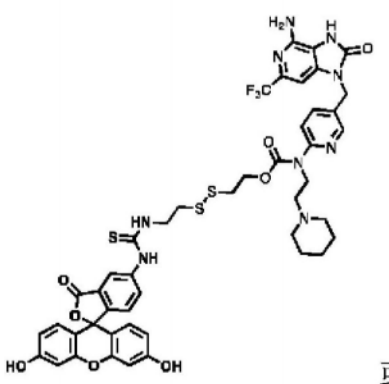
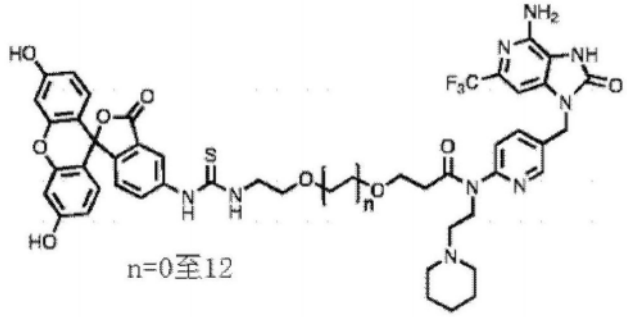
[0042] 在一些优选的实施方案中，前述方法中第一组分的药物载荷是以下蛋白质的抑制剂：SHP1/2、TC-PTP或DGKα、TGFβ。

[0043] 在一些优选的实施方案中，前述方法中TLR7激动剂具有以下结构：

[0044] 




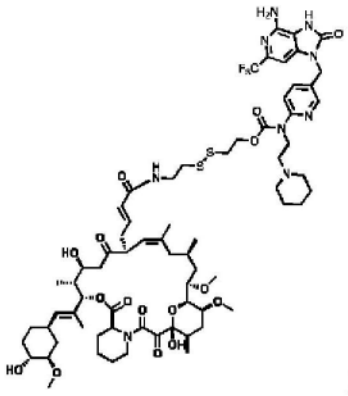
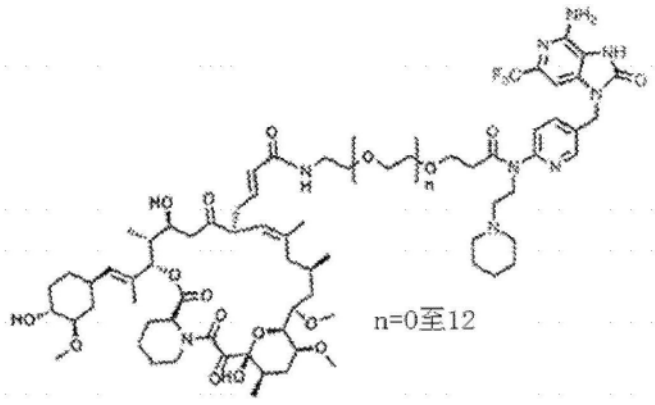
咪喹莫特 雷西莫特 TLR7 激动剂 JTLR7 。

[0045] 在一些优选的实施方案中,前述方法中第一组分是具有以下结构的荧光素-TLR7激动剂:

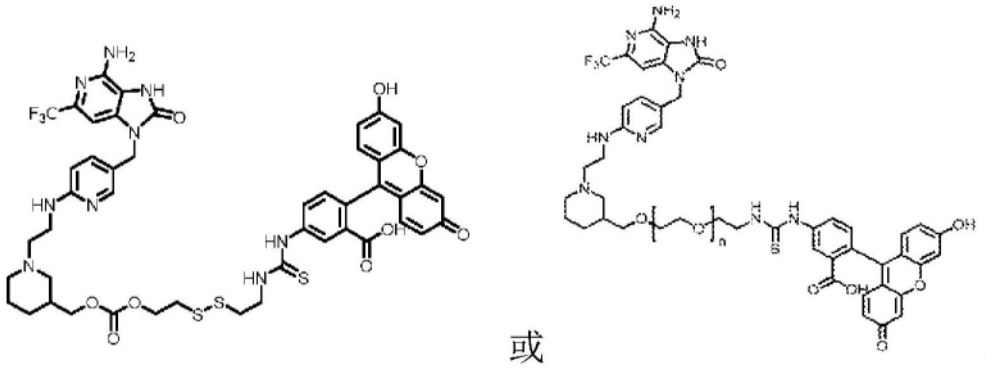
[0046] 
或


。

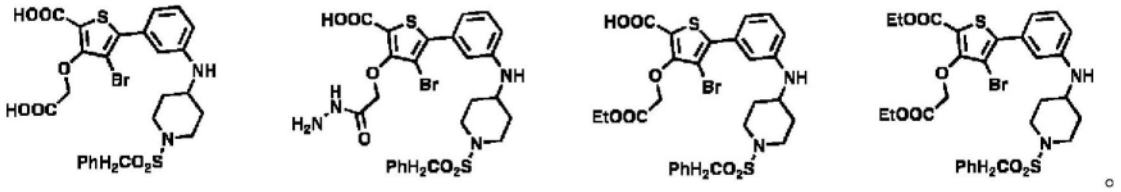
[0047] 在一些优选的实施方案中,前述方法中第一组分是具有以下结构的FK506-TLR7激动剂:

[0048] 
或


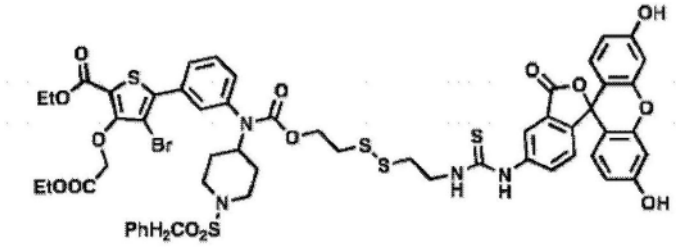
[0049] 在一些优选的实施方案中,前述方法中第一组分是:

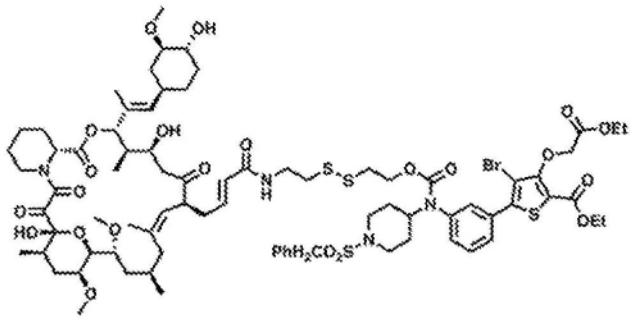
[0050] 
或

[0051] 在一些优选的实施方案中,前述方法中第一组分包含选自以下TC-PTP磷酸酶抑制剂的载荷药物:

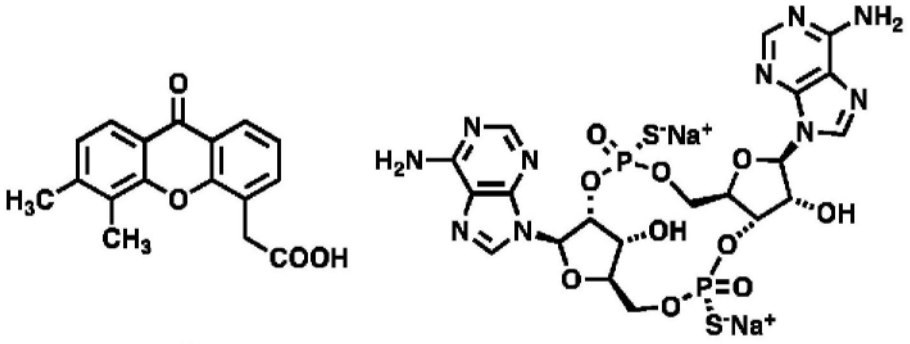
[0052] 

[0053] 在一些优选的实施方案中,前述方法中第一组分包含磷酸酶抑制剂,其与荧光素或FK506(他克莫司)连接以形成以下结构:

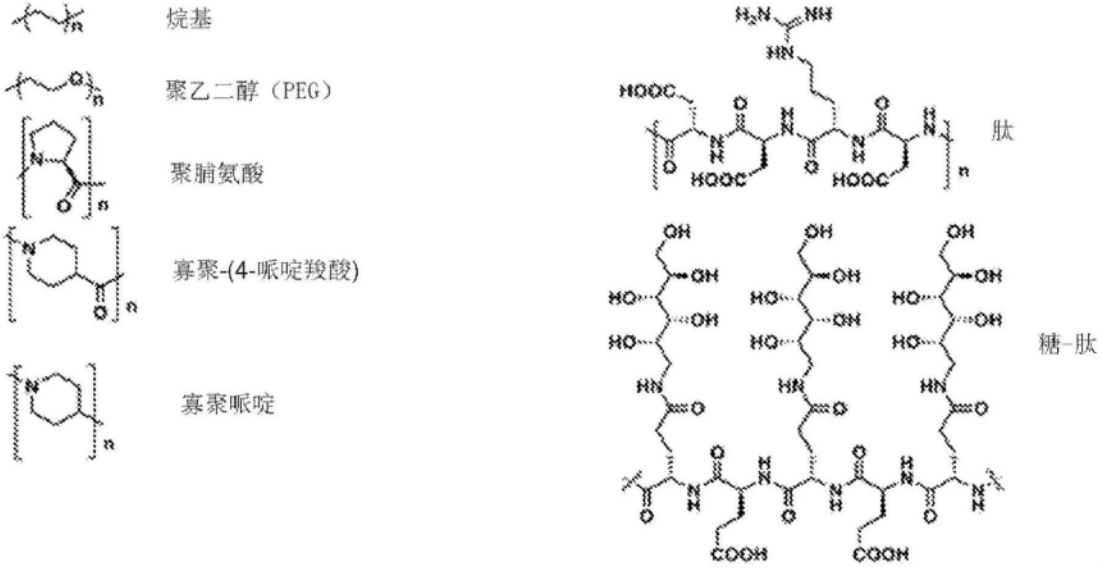
[0054] 
或

[0055] 

[0056] 在一些优选的实施方案中,前述方法中第一组分包含以下结构的STING激动剂的载荷药物:

[0057] 

[0058] 在一些优选的实施方案中,前述方法中的第一组分包含在靶向配体与载荷药物之间的间隔基,所述间隔基选自以下结构:

[0059] 

[0060] 参考以下附图、相关说明和权利要求书,将更好地理解本发明的这些和其他特征、方面和优点。

附图说明

[0061] 图1.1a,耗竭模型的图示说明。1b,在体外新鲜Raji细胞刺激3次之后抗CD19 CAR T细胞变得耗竭,如通过降低的杀伤作用显示的。

[0062] 图2.秘密通道(secret passageway)的图示说明。FKBP或抗FITC与FRa连接作为融合受体,其不断内化并且将FK506或FITC连接的载荷递送到细胞中。

[0063] 图3.FK506和FITC与相应融合受体的结合亲和力。FK506-罗丹明对FKBP-FR融合受体显示Kd=3.39nM,而FITC-AF647对抗FITC-FR显示Kd=8.03nM。

[0064] 图4.4a,TLR7激动剂的结构。4b,TLR7激动剂对耗竭的抗CD19 CAR T细胞的恢复活力作用,表现为提高的杀伤作用、INFr水平和降低的共抑制分子水平。

[0065] 图5.TLR7激动剂的化学结构。

[0066] 图6.用于诱导CAR T细胞耗竭的体外模型。(A)将$CD19^+$Raji与抗CD19 CAR T细胞以1:1的比例共培养,每12小时添加新鲜的Raji细胞。(B)随着刺激次数(添加Raji细胞的次数)增加,CAR T细胞的裂解作用逐渐降低。$CD19^-$K562细胞用作对照。(C)CD4和CD8阳性CAR

T细胞中stim1和stim3的共抑制分子PD-1、LAG3和Tim3的表达水平变化。

[0067] 图7.TLR7激动剂和PTP1b抑制剂使耗竭的CAR T细胞恢复活力的作用的评价。(A)TLR7激动剂和PTP1b抑制剂的化学结构。(B至C)将耗竭的CAR T细胞与不同浓度的TLR7激动剂和PTP1b抑制剂一起孵育,通过裂解作用和INFγ(B)以及孵育之后PD-1LAG-3和Tim3的表达水平(C)进行监测。*表示p值<0.05,**<0.01,ns=不显著。

[0068] 图8.TLR7激动剂用于不可释放的配体靶向递送的潜在衍生位点的评价。(A)TLR7激动剂类似物的化学结构。(B)将耗竭的CAR T细胞与不同浓度的TLR7类似物一起孵育,测量裂解作用并且与未处理组进行比较。

[0069] 图9.使用FITC作为靶向配体的TLR7激动剂的可释放和不可释放靶向递送的设计和评价。(A)FITC-TLR7激动剂的化学结构的图示。(B)将耗竭的CAR T细胞与不同浓度的可释放的FITC-TLR7和不可释放的FITC-JTLR7激动剂一起孵育,测量裂解作用并且与未处理组进行比较。*表示p值<0.05,**<0.01,ns=不显著。(C)左侧,与FITC scFv(灰色)结合的FITC(绿色)的晶体结构(PDB:1X9Q,左侧),FITC到FTIC scFV边缘之间的距离测量为约18Å。右侧,类似地,显示了与TLR7(灰色)结合的R-848(红色)的晶体结构(PDB:5GMF),R-848到TLR7边缘之间的距离为约24Å。(D)图示出了用于不可释放的FITC-TLR7激动剂的两种可能的工作机制,“到达(Reaching)”或“跳跃(Jumping)”模式。

[0070] 图10.可用于靶向配体-载荷缀合物设计的可变刚性和疏水性的化学接头。

具体实施方式

[0071] 尽管在本文的附图和说明中详细示出和描述了本公开内容的概念,但是附图及其说明中的结果在特征上应被认为是示例性的而不是限制性的;应当理解,仅示出和描述了示例性实施方案,并且希望保护落入本公开内容精神内的所有改变和修改。

[0072] 除非另有定义,否则科学和技术术语具有与本公开内容所属领域的普通技术人员的通常理解相同的含义。

[0073] 嵌合抗原受体(CAR)T细胞治疗最近在治疗多种类型的造血癌症中获得了实质性的成功。同时,人们还应该认识到,一些淋巴瘤和大多数实体瘤病例在CAR T细胞治疗的情况下仍然具有非常低的响应率或高的复发率。这主要是由于以下三种原因之一或组合:1.在CAR T细胞的选择压力下出现了抗原阴性癌细胞集落,如在用抗CD 19CAR T细胞治疗的CD 19阴性ALL复发的情况中看到的;2.由于异常的肿瘤脉管系统、密集的基质屏障和抑制性微环境,实体瘤中CAR T细胞的初始归巢和增殖受阻;3.持续肿瘤抗原暴露之后,CAR T细胞逐渐耗竭并且裂解作用降低。假设对于给定的实体瘤患者不存在抗原丢失(通过活检采样验证),则CAR T细胞治疗潜在失败的原因很可能是由后两种原因引起的。因此,为了提高CAR T细胞在实体瘤中的效力,非常期望用于CAR T细胞的体内评价和恢复活力的实用方法。

[0074] 在这里,我们描述了CAR T细胞中私有通道融合受体的新设计,作为实现这两个目标的通用平台。该FITC-FR融合受体由两部分构成,位于N端的作为配体结合结构域的针对FITC的scFv,以及位于C端的作为GPI锚定和内化结构域的FRα。当在CAR T细胞上独立表达时,FITC-FR融合受体可以被FITC-免疫激动剂特异性靶向,以克服抑制性肿瘤微环境中CAR T细胞的耗竭状态。这些免疫激动剂通常会引起强烈的自身免疫副作用,并且现在可以以

FITC靶向形式全身给药并安全地递送至FITC-FR阳性CAR T细胞。在过去的几十年中，该领域在细胞类型、递送方法和合适的疾病模型方面取得了巨大的进步。就细胞类型而言，目前的细胞治疗可大致分为嵌合抗原受体(CAR)、用于肿瘤模型的细胞和基于干细胞的再生医学。

[0075] CAR T也称为嵌合T细胞受体、嵌合免疫受体或人工T细胞受体，其能够使免疫效应细胞(通常为T细胞或NK细胞)识别具有相应抗原的靶细胞并发挥其细胞毒活性。CAR-T技术的出现和发展为某些类型的癌症带来了希望，这继而使CAR-T成为生物医学研究和临床研究两个领域的超级明星。在美国申请No.15/296,666(其内容通过引用完整并入)中公开了一些传统的和改进的CAR T细胞设计。在‘666申请中，通过提供表达CAR的细胞毒性淋巴细胞来产生CAR系统，所述CAR靶向不被所治疗的对象的细胞产生或表达的部分。因此，该CAR系统允许将细胞毒性淋巴细胞集中靶向至靶细胞，例如癌细胞。被靶向的部分是还包含肿瘤细胞受体的配体的小缀合分子(SCM)的一部分。与表达CAR的细胞毒性淋巴细胞一起施用SCM导致将细胞毒性淋巴细胞应答仅靶向表达与SCM结合的肿瘤受体的那些细胞。

[0076] 尽管CAR T细胞治疗在研究和临床应用领域二者都取得了飞速的发展，但是存在着伴随CAR T治疗的担忧。一种致命的副作用是因肿瘤细胞的快速裂解产生细胞因子风暴，以及其杀伤带有CAR的正常细胞。为了克服这些副作用，在PCT/US2018/018557(其内容通过引用完整并入)中开发了将具有特定药物载荷的CAR T细胞靶向递送至靶肿瘤细胞以控制这样的副作用的方法。简单地说，工程化蛋白与高亲和力靶向配体偶联，其中该靶向配体携带至少一种药物载荷，所述药物载荷待通过工程化蛋白被CAR T细胞内化以调节移植的细胞的治疗效果。

[0077] CAR T治疗的另一个局限性是其在癌抗原的反复刺激之后变得耗竭的趋势。证明了T细胞的耗竭表型的可逆性，因为从实体瘤组织分离的T细胞如果在重新刺激之前保持远离抗原(“静止”)过夜，则表现出较高INFγ分泌和杀伤作用[4]。然而，如果可以使用药物以更临床相关的方式实现恢复活力，则将更具吸引力:阻断抑制性信号传导或通过其他途径激活T细胞。在临床上，靶向检查点抑制剂(即PD-1、CTLA-4等)的抗体在实体瘤中已显示出一定的成功，然而，经常发现需要组合的两种或更多种靶标[56]。此外，抗体治疗在实体瘤中具有差的穿透性。因此，较少看到关于实体瘤中CAR T与检查点抑制剂抗体的联合治疗的报道。抑制介导TCR失活的磷酸酶(例如SHP1/2[7]和TC-PTP[8])是阻断抑制途径的另一种方法。这些磷酸酶的敲除实验和小分子抑制剂二者均显示出降低TCR阈值和提高T细胞活性的强效作用，但它们均未用于CAR T治疗。DGKα是TCR信号传导的另一种生理抑制剂并且其在耗竭的TIL中过表达。DGKα将DAG分解代谢为PA，从而降低DAG水平，其导致Ras和MARK ERK信号传导减弱。DGKα抑制剂恢复脱粒并提高TIL和CAR T的杀伤作用[39]。使T细胞恢复活力的另一种方法是通过抗原非依赖性途径激活它。已知某些病原体模式识别(PPR)受体(包括Toll样受体(TLR))确实在包括T细胞在内的非髓样细胞群上表达，并且可以以类似的方式激活。研究还表明，TLR2[10]、4[11]和7/8[1213]激动剂可以激活CD8 T细胞并且提高INFγ分泌。然而，由于TLR激动剂的全身给药的强烈副作用[14]，这些激动剂均未用于CAR T治疗中以重新激活T细胞或改变免疫抑制性微环境。TLR激动剂对肿瘤细胞本身的争议性作用也阻碍了这一过程[15]。干扰素基因刺激物(STING)是在外周淋巴组织中的造血细胞(包括T细胞、髓样细胞和单核细胞)中广泛表达的胞质溶胶DNA传感器(CDS)。STING激动剂已被用作许多免疫治疗的免疫刺激

剂,并且在CAR T治疗中也可能具有显著的作用。然而,尽管前述抑制剂和激动剂可能对CAR T细胞具有显著的恢复活力作用,但由于其高度强效的促炎功能,如果全身给药,则很可能可引起严重的副作用。因此,非常期望将潜在载荷靶向递送至CAR T细胞。

[0078] 为了解决特异性递送问题,我们设计了秘密通道平台,其可以在T细胞中与CAR构建体一起表达,使得某些载荷可以全身给药并且仅在CAR T细胞内特异性积累,而不接触其他细胞。该系统由通过T2A自剪切序列连接的融合受体和经典CAR构建体组成。融合受体包含两部分:(1)配体结合模块,其可以识别高亲和力配体-载荷缀合物;(2)膜结合受体模块,其可以介导受体/缀合物复合物内化到细胞中。针对部分1选择了两个蛋白质/配体对:FKBP/FK506以及针对FITC的scFv(4M5.3)/FITC,这是因为以下原因:(1)在天然细胞膜上不存在FKBP或4M5.3确保了将载荷特异性递送至融合受体阳性CAR T细胞,从而降低了对其他细胞的副作用;(2)蛋白质/配体对之间的亚纳摩结合亲和力促进了靶细胞内足够的载荷积累。对于部分2中的膜结合受体,选择了叶酸受体α(FRa),因为其具有固有内化特性而与叶酸的结合无关[16]。我们还设计了靶标-载荷连接系统,其中根据靶标,载荷可通过不可释放的接头或二硫键可释放接头与靶向配体连接。更具体地,由于TLR7位于内体中,所以秘密通道递送的TLR7激动剂在通过受体介导的内化进入内体后就可以尽快发挥其功能。因此,在这种情况下,不需要可释放的接头。而对于位于胞质溶胶而不是内体中的其他靶标,例如SHP1/2、TC-PTP、DGK、TGFβ和STING,从靶标-载荷缀合物中释放游离药物对于从内体逃逸是必要的。总之,这个秘密通道系统提供了用于将多种载荷特异性体内递送至耗竭的CAR T细胞的通用平台。

[0079] 通过以下实验实施例将更好地理解本发明的这些和其他特征、方面和优点。

[0080] 方法:

[0081] 抗CD19 CAR T细胞的耗竭和药物处理:

[0082] 将抗CD19 CAR T细胞与Raji以1:1的比例在6孔板中共培养,同时每12小时向相同孔添加新鲜Raji细胞。通过流式细胞术计数来定量杀伤作用和共抑制标志物。对于药物处理,在用Raji细胞刺激4轮之后,将耗竭的抗CD19 CAR T与不同浓度的药物一起再孵育12小时,然后类似地进行定量。

[0083] 靶向配体结合测定

[0084] 将融合受体阳性细胞与不同浓度不同的某些配体-染料分子在4度下一起孵育30分钟。孵育之后,将细胞用PBS清洗两次,然后进行流式细胞术。MFI或位移百分比用于结合曲线和Kd的计算。

[0085] 材料

[0086] 细胞系和人T细胞

[0087] 含有10%热灭活的胎牛血清和1%青霉素-链霉素的DMEM(Gibco)用于培养MDAMB-231和MDA-MB-231 $CD19^+$细胞。通过Ficoll密度梯度离心(GE Healthcare Lifesciences,#17-5442-02)从获自健康志愿者的人全血中分离外周血单核细胞(PBMC)。使用EasySep™人T细胞分离试剂盒(STEM CELL technologies,#17951)从PBMC中富集纯CD3+T细胞。

[0088] 用于耗竭的CAR T细胞的体外恢复活力的潜在载荷的评价

[0089] 将抗CD19 CAR T细胞与$CD19^+$Raji细胞以1:1的比例在12孔板中以每孔2×10^6个CAR T和2×10^6个Raji细胞的密度共培养,每12小时添加新的Raji细胞,添加三次,然后测

试Raji细胞群、裂解作用和共抑制受体以确认CAR T细胞的耗竭。流式细胞术和基于萤光素酶的测定二者用于定量裂解作用。为了测试潜在载荷的恢复活力效力，然后将这种细胞混合物转移到96孔板，每孔约2×10^5个细胞，并且添加不同浓度的药物。12小时之后，再次测试Raji细胞群、裂解作用和共抑制受体并且与PBS处理组进行比较。

[0090] 实施例

[0091] 实施例1.体外抗CD19 CAR T细胞的耗竭

[0092] 在该实施例中，我们说明了耗竭的CAR T细胞的模型。简单地说，图1a示出了如方法部分中所述将Raji细胞(一种B淋巴瘤细胞)与FMC63 CAR T细胞(一种抗CD19 CAR T细胞)共培养，并且连续三天每12小时向共培养物添加新鲜Raji细胞。图1b示出了这些CAR T细胞在体外通过新鲜Raji细胞刺激3次之后变得耗竭，如通过降低的杀伤作用指示的。共培养的K562细胞用作阴性对照。

[0093] 实施例2.秘密通道的设计

[0094] 在该实施例中，我们表明将载荷药物递送至靶细胞类型的秘密通道的图示说明。FKBP或抗FITC与FRa连接作为融合受体，其能够结合与特定药物载荷连接的靶向配体FK506或FITC。由于FRa的性质，其不断内化并且将FK506或FITC连接的载荷递送到CAR T细胞中。因此，在该实施例中，当CAR T通过CAR与其靶细胞结合时，CAR T表面上的抗CD 19分子结合癌细胞的CD-19，CAR T内部的递送的载荷药物可以执行其功能，即基于载荷功能来调节CAR T活性。例如，一些载荷药物可以在必要时被引导对PD-1、CTLA4或LAG3 T细胞功能调节分子发挥作用以使CAR T恢复活力。

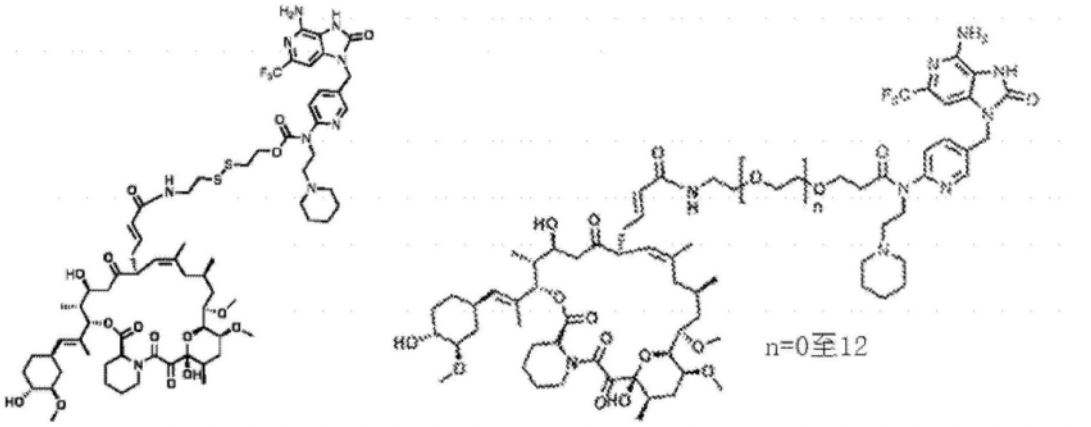
[0095] 实施例3.通过TLR7激动剂逆转耗竭的抗CD19 CAR T细胞

[0096] 在该实施例中，我们表明靶向配体FK506或FITC成功地结合其各自的融合受体(通过G_4S连接至叶酸受体的FKBP或FITC-AF647)。在该实施例中，载荷药物是成像剂罗丹明，以显示载荷在融合受体转染的Jurkat细胞中的分布。FK506和FITC的结合亲和力通过竞争性结合来计算，并且FK506-罗丹明对FKBP-FR融合受体显示Kd＝3.39nM，而FITC-AF647对抗FITC-FR显示Kd＝8.03nM。

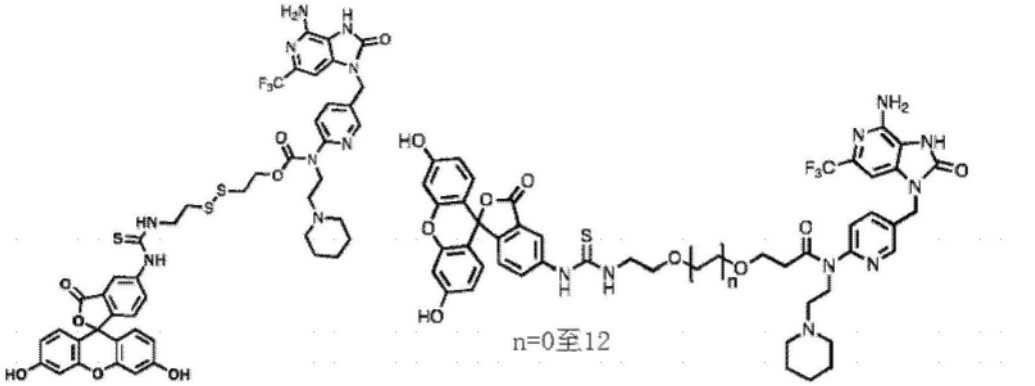
[0097] 实施例4.潜在的可释放和不可释放的FK506-TLR7激动剂和FITC-TLR7激动剂的设计

[0098] 在该实施例中，我们提供了具有以下结构的与Toll样受体7激动剂缀合的靶向配体FK506以处理耗竭的CAR T细胞。当TLR7激动剂载荷药物靶向耗竭的CAR T细胞时，观察到增强的杀伤作用剂量依赖性模式。因此，CAR T活性的指示因子IFNγ表达水平相对于载荷药物浓度以剂量依赖性方式升高；并且T细胞效应抑制分子Tim 3的表达水平呈反剂量依赖性方式，即Tim 3的表达随载荷药物浓度的增加而降低。

[0099] FK506-TLR7激动剂缀合物应具有以下给出的结构之一：

[0100] 

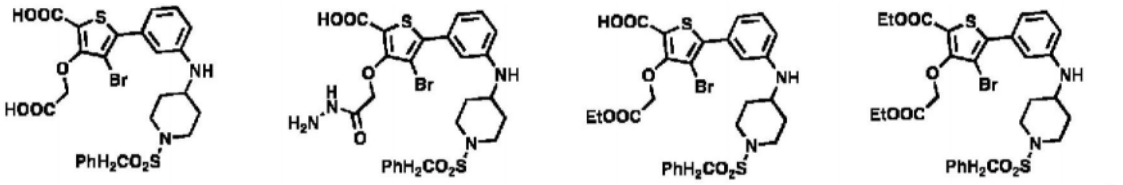
[0101] 类似地,荧光素-TLR7激动剂缀合物应具有以下给出的结构之一,并且如果功能性CAR T具有抗FITC融合受体,则使耗竭的CAR T恢复活力:

[0102] 

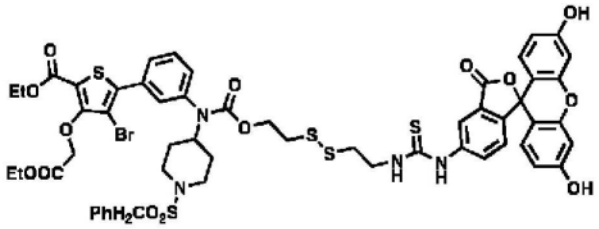
[0103] 实施例5.用于使耗竭的CAR T细胞恢复活力的其他潜在载荷的设计

[0104] 在该实施例中,我们提供了可以以较低的纳摩范围效价逆转CAR T耗竭的其他潜在载荷的结构列表。

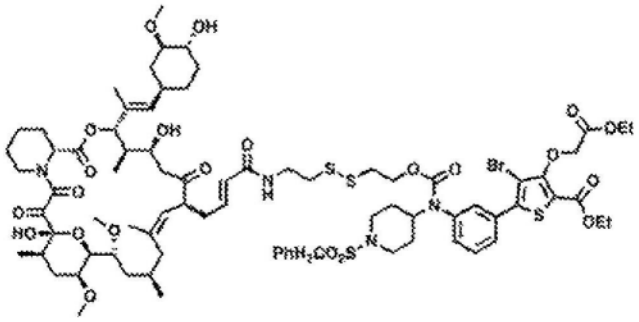
[0105] 1)TC-PTP磷酸酶抑制剂应具有以下结构:

[0106] 

[0107] 上述磷酸酶抑制剂可以通过以下方式与荧光素或FK506(他克莫司)连接:

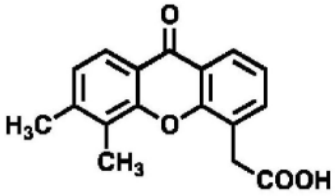


[0108]

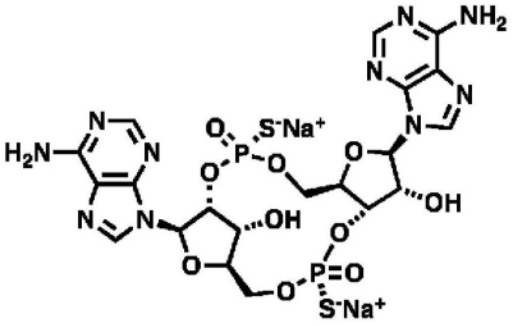


[0109] 2)STING激动剂应具有以下结构：

[0110]



DMXAA

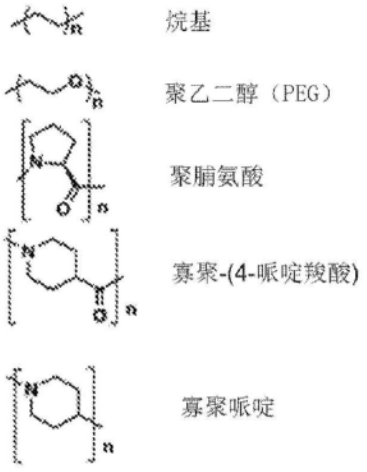


ADU-S100

[0111] 实施例6.靶向配体与潜在载荷之间的间隔基的设计

[0112] 以下是可用于连接靶向配体和任何潜在载荷的间隔基的列表：

[0113]



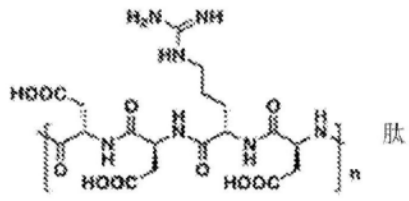
烷基

聚乙二醇（PEG）

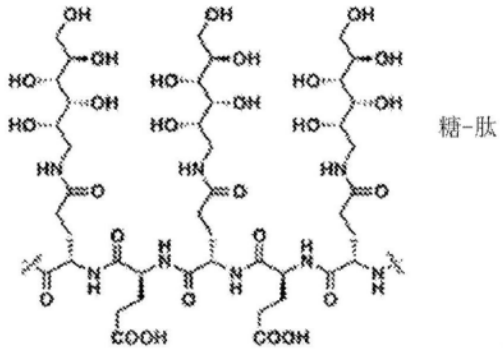
聚脯氨酸

寡聚-(4-哌啶羧酸)

寡聚哌啶



肽



糖-肽

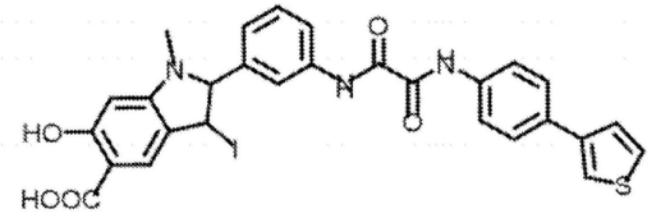
[0114] 实施例7.磷酸酶抑制剂和TLR7激动剂使耗竭的CAR T细胞恢复活力的能力的评价

[0115] CAR T细胞治疗在实体瘤中的一个主要局限性是其在用癌抗原重复刺激之后变得

耗竭的趋势。然而，这种现象并非CAR T细胞特有的，在慢性病毒感染[4]和肿瘤浸润淋巴细胞[5]二者中均有描述。T细胞的耗竭表型的可逆性已在研究中得到证实，其中从实体瘤组织分离的T细胞如果在重新刺激之前保持远离抗原(“静止”)过夜，则表现出较高INFγ分泌和杀伤作用[57]。然而，如果可以使用市售治疗剂以临床上更相关的方式实现恢复活力，则将更具吸引力:阻断抑制性信号传导或通过其他途径激活T细胞。靶向检查点抑制剂(即PD-1、CTLA-4等)的抗体在临床的实体瘤中已显示出一些成功[151]，然而，经常发现需要组合的两种或更多种靶标。此外，抗体治疗在实体瘤中还具有差的穿透性，并且这可能导致针对实体瘤中CAR T细胞与检查点阻断(ICB)的联合治疗的报道较少。

[0116] 抑制介导TCR失活的磷酸酶(例如SHP1/2和TC-PTP)是阻断递补CAR T信号传导(tonic CAR T signaling)的潜在途径。SHP1/2磷酸酶负责介导来自PD-1和其他耗竭标志物的信号。数据表明，SHP1/2磷酸酶抑制剂或沉默可以提高T细胞和CAR T细胞的活性[6-9]。已知TC-PTP是T细胞活性信号传导的重要参与者。具有T细胞特异性TC-PTP缺陷的小鼠由于提高的抗原驱动的T细胞活化而具有提高的对炎症和自身免疫的易感性。TC-PTP使TCR下游的Src家族激酶失活，从而导致TCR激活的阈值[11]。尽管这些磷酸酶的敲除实验和小分子抑制剂二者均显示出降低TCR阈值和提高T细胞活性的强效作用，但它们均未用于CAR T治疗。代表性的SHP1/2抑制剂具有以下结构：

[0117]



SHP1/2 抑制剂

[0118] 使T细胞恢复活力的另一种方法是通过抗原非依赖性先天免疫受体的参与来增强其活性。已知某些病原体模式识别(PPR)受体(包括Toll样受体(TLR))确实在包括T细胞在内的非髓样细胞群上表达，并且可以以类似的方式激活。研究还表明，TLR7/8激动剂和TCR信号传导的共刺激可以激活CD8 T细胞并且提高INFγ分泌[13]。然而，由于TLR激动剂的全身给药的强烈副作用，这些激动剂均未用于CAR T治疗中以重新激活T细胞或改变免疫抑制性微环境。TLR激动剂对肿瘤细胞的争议性作用也阻碍了TLR激动剂用于癌症免疫治疗的使用。因此，非常期望将潜在的载荷靶向递送至CAR T细胞。在文献中发现了一种强效的TLR7激动剂(图7A)，其比FDA批准的咪喹莫特强约40倍。

[0119] 为了建立如图6所示的体外筛选模型，将抗CD19 CAR T细胞暴露于4轮CD19阳性Raji细胞的添加，并且变得耗竭，如通过体外共培养模型中逐渐降低的裂解活性以及提高的共抑制标志物标记的。值得注意的是，培养基对于引入CAR T耗竭是重要的，并且在整个过程中都需要保持相同，而无需新的补充或更换。这表明由癌细胞和/或CAR T细胞释放到培养基中的可溶性组分(最可能是免疫抑制性细胞因子和调节剂(腺苷等))在此过程中发挥关键作用。这也表明由这种体外模型产生的CAR T细胞的耗竭处于相当柔韧而不是不可逆的状态。

[0120] 与未处理组相比，用选择的TLR7激动剂和PTP1b(与TC-PTP[26]高度同源)抑制剂[27]处理已经耗竭的CAR T细胞显示能够重新激活它们(图7)。然而，在除Tim3外的共抑制标志物

的表达水平中未见明显变化。如图7C所示，PTP1b抑制剂一般性地没有表现出与TLR7激动剂一样强的再活化作用。不受任何理论的束缚，该结果可能是由于目前的体外筛选模型所致，其中研究的是耗竭的“逆转”而不是“阻止”，并且在耗竭状态下磷酸酶已经“沉默”，因此其抑制将几乎没有效果。用于未来研究的经修改的筛选模型将通过在所有培养开始时添加药物并保持其余设置不变来测试磷酸酶抑制剂和其他药物的效果，重点是耗竭的“阻止”。以这种方式，可以看到磷酸酶的抑制是否可以降低CAR T的递补信号传导，同时仍保持功能性杀伤作用。在下面的研究中，我们将主要关注TLR7激动剂。

[0121] 由于TLR7是存在于内体中的4个TLR家族成员之一，因此推测TLR7激动剂与我们的秘密通道靶向配体之间的不可释放的接头将保留其TLR7激动剂功能[28]。为此，制备了多种TLR7激动剂类似物并进行了测试，以找到合适的用于连接的衍生位点。如图8所示，在哌啶环上具有CH_2OH延伸的TLR7激动剂与母体药物相比具有甚至更高的活性。因此，该衍生位点将用于不可释放的缀合物。还已经合成了二硫键连接的自牺牲形式(self-immolative form)。为了理解该TLR7激动剂到达其自身靶标所需的距离，为不可释放的FITC-TLR7制备了FITC与TLR7激动剂之间的三种不同长度的接头(PEG3、6、16)。如图9C所示，所有不可释放的形式都有一定作用，而PEG_6化合物显示出最佳的剂量依赖性响应。这些结果表明，TLR7激动剂可以通过在与FITC-FR结合时伸出或在TLR与FITC-FR之间跳跃而与TLR7对接，在这种情况下，两者之间的接头长度不是关键因素(图9D至E)。由于不可释放的FITC-TLR7被捕获在内体内部，并且每个内体的体积比胞质溶胶小得多，因此内体内的TLR7可以更快更迅速达到其功能浓度，导致较小的IC_{50}。

[0122] 实施例8.用于逆转/阻止CAR T细胞耗竭的其他潜在载荷

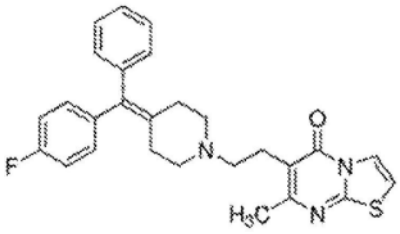
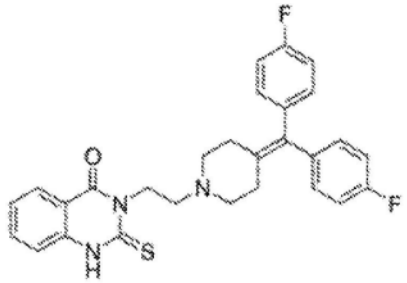
[0123] 除TLR7激动剂外，还有如下所述多种其他潜在的载荷可以逆转/阻止CAR T细胞的耗竭。一些靶标目前可能尚无具有适合我们靶向药物递送方法的IC_{50}的激动剂或抑制剂，但仍值得注意，可以通过其他抑制机制进行探索，例如CRISPR或靶向微RNA(microRNA)递送方法。

[0124] • STING激动剂

[0125] IFN基因刺激物(STING)是参与胞质溶胶DNA传感和随后IFN-β产生的主要衔接子之一。STING与sdDNA弱缔合，但是与通过cGMP-AMP合酶(sGAS)合成的内源环状二核苷酸GMP-AMP(cGAMP)强烈结合。其主要在巨噬细胞、T细胞、多种DC、内皮细胞以及选择的成纤维细胞和上皮细胞中表达。STING的研究主要集中于其在巨噬细胞和树突状细胞中的功能，并且最近一些小组注意到STING激活在T细胞中的直接作用[40]。STING激动剂可能对T细胞具有类似的促炎作用。ADU-S100是临床上探索的许多STING激动剂之一。

[0126] • DGK-α抑制剂

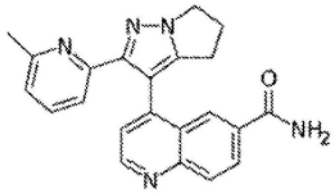
[0127] 二酰基甘油激酶-α(DGK-α)将TCR信号传导中的第二信使二酰基甘油(DAG)与IP3一起转换为磷脂酸(PA)。DGK在CD8TIL中比在CD8-NIL中更高表达，并且其抑制促进了ERK磷酸化和裂解脱粒[41]。其还恢复了从体内分离的CAR TIL的裂解功能[5]。一些DGK抑制剂结构如下：

[0128]  

DGK I 抑制剂 DGK II 抑制剂。

[0129] • TGFβRI(ALK5)抑制剂

[0130] TGFβ以其在许多免疫细胞(例如T细胞、B细胞和巨噬细胞)中的免疫抑制功能而闻名。T细胞中I型TGFβ受体(TGFβRI,也称为ALK5)的阻断逆转了肿瘤的免疫抑制环境[42]。在临床中利用测试的加尼斯替(galunisertib)(一水合LY2157299)和EW-7197探索了小分子抑制剂[4344]。TGFβ抑制剂的结构如下:

[0131] 

TGFβ 抑制剂 (LY2157299)。

[0132] • EZH2抑制剂

[0133] Zeste同源物增强子2(EZH2)是组蛋白H3K27甲基转移酶,其具有与Treg功能的强相关性。EZH2的遗传或药理破坏驱动肿瘤浸润Treg的促炎功能的获得[45]。由于慢性病毒感染中耗竭的CTL还以独特的表观遗传学变化为特征[174],因此EZH2抑制剂可能能够逆转这种耗竭状态。已经开发了EZH2抑制剂的多种小分子,包括CPI1205、EPZ6438和GSK126。

[0134] 因此,FITC-FR融合受体和相应的FITC靶向免疫激动剂载荷为监测和控制CAR T细胞在实体瘤中的归巢和持久性提供了通用平台。由于FITC-FR融合受体独立于CAR构建体表达,因此该方法可容易引入到CAR T细胞中以用于任何抗原。靶向配体-载荷缀合物的模块化设计还使其更易于切换和修饰。这种方法结合了细胞治疗和基于小分子的靶向药物递送的优势,并且可能需要对工程化细胞和相应的配体二者进行额外的表征。

[0135] CAR T细胞在实体瘤中的成功最可能还需要靶向微环境中其他参与者的多种方法的组合,例如通过PI3K激酶抑制剂破坏胞外基质,将抗炎M2巨噬细胞重编程为促炎M1表型,以及癌细胞上降低的MHC分子水平的上调。因此,将在临床前和临床上进行越来越多的联合治疗研究。然而,与此同时,不能忽略对CAR T细胞本身的仔细检查和控制,并且在临床上应该首先使用简单而稳健的系统(如FITC-FR融合受体)进行优化,然后再将其应用于人。

[0136] 本申请还涉及以下技术方案:

[0137] 1.使耗竭的经典CAR T细胞恢复活力的系统,其包含至少两种组分:第一组分是包含与载荷药物共价连接的靶向配体的缀合物;并且第二组分是与膜锚定模块连接的靶向配体结合模块,其中所述第二组分的所述靶向配体结合模块以高亲和力识别所述第一组分中的所述靶向配体以形成复合物,所述载荷药物阻断所述耗竭的经典CAR T的抑制性信号传导,或者通过抗原非依赖性途径重新激活所述CAR T,并且其中所述膜锚定模块介导该双组

分复合物内化到所述耗竭的CAR T细胞中。

[0138] 2.根据技术方案1所述的系统，其中所述第一组分的所述靶向配体是叶酸、FITC或FK506。

[0139] 3.根据技术方案1所述的系统，其中所述第二组分的所述靶向配体结合模块包含抗FITC抗体片段或FKBP或叶酸受体。

[0140] 4.根据技术方案1所述的系统，其中所述膜锚定模块是叶酸受体。

[0141] 5.根据技术方案1所述的系统，其中所述第一组分包含在所述靶向配体与所述载荷药物之间的可释放的接头。

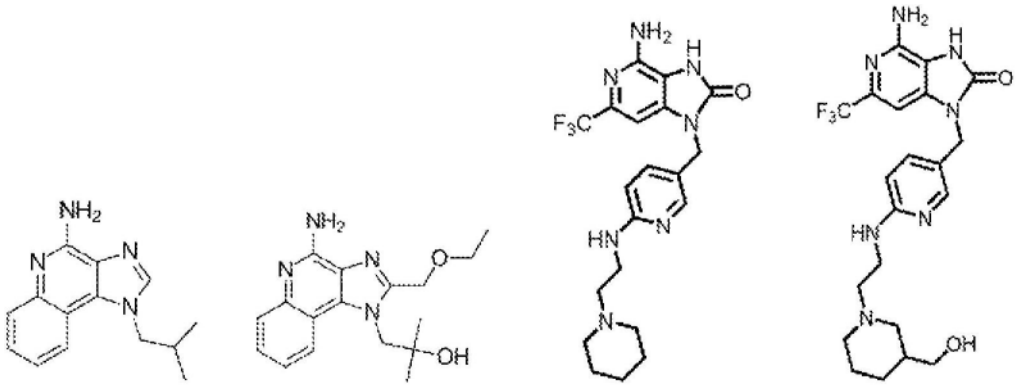
[0142] 6.根据技术方案1所述的系统，其中所述第一组分包含在所述靶向配体与所述载荷药物之间的不可释放的接头。

[0143] 7.根据技术方案1所述的系统，其中所述靶向配体与所述配体结合模块之间的结合亲和力在亚纳摩范围内。

[0144] 8.根据技术方案1所述的系统，其中所述药物载荷是Toll样受体7(TLR7)激动剂或干扰素基因刺激物(STING)激动剂。

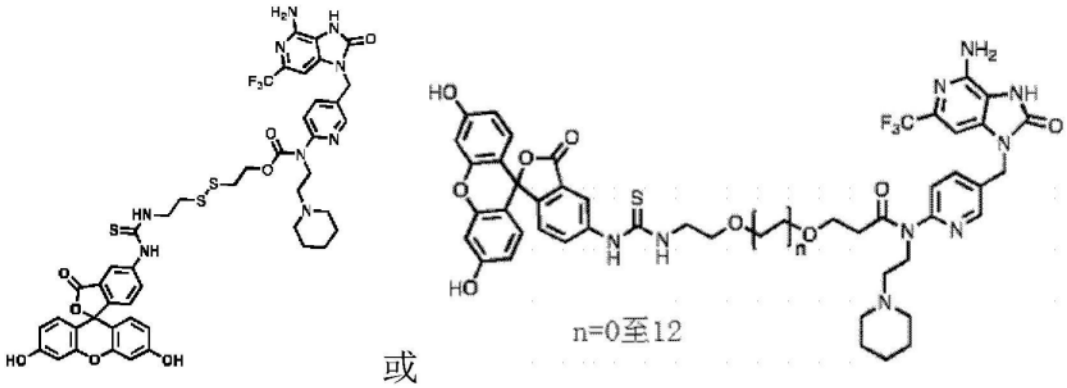
[0145] 9.根据技术方案1所述的系统，其中所述药物载荷是以下蛋白质的抑制剂：SHP1/2、TC-PTP或DGKα、TGFβ。

[0146] 10.根据技术方案8所述的系统，其中所述TLR7激动剂具有以下结构：

[0147] 

咪喹莫特 雷西莫特 TLR7 激动剂 JTLR7 。

[0148] 11.根据技术方案1所述的系统，其中所述第一组分是具有以下结构的荧光素-TLR7激动剂：

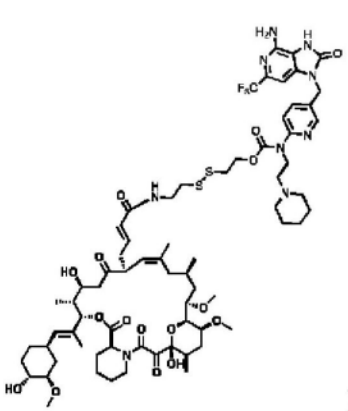
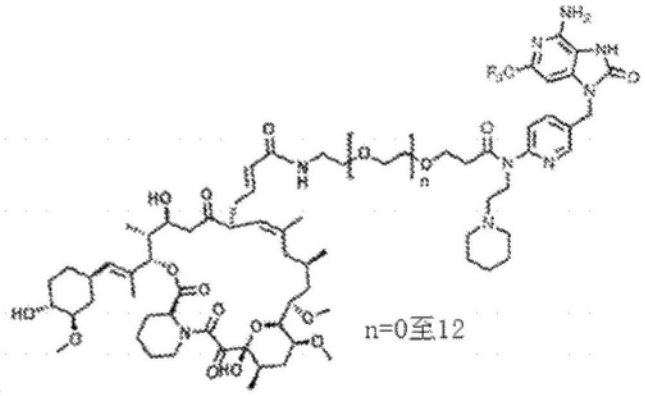
[0149] 

或

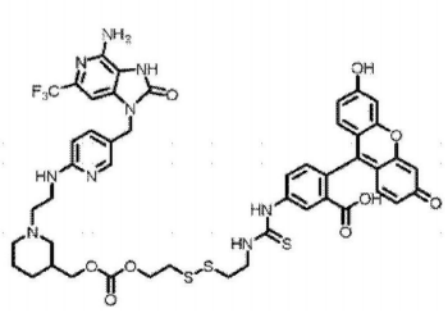
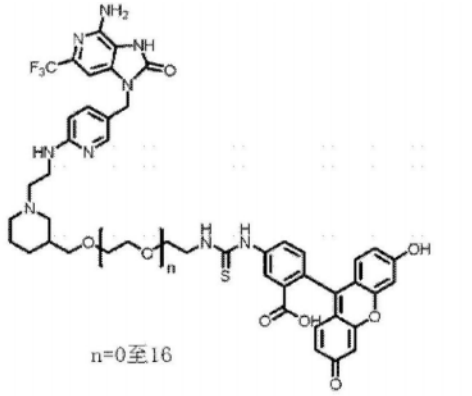
n=0至12

。

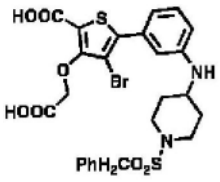
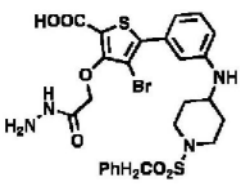
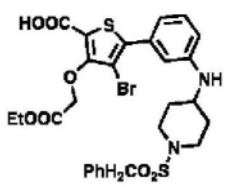
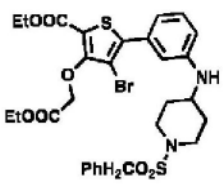
[0150] 12.根据技术方案1所述的系统，其中所述第一组分是具有以下结构的FK506-TLR7激动剂：

[0151]  或 

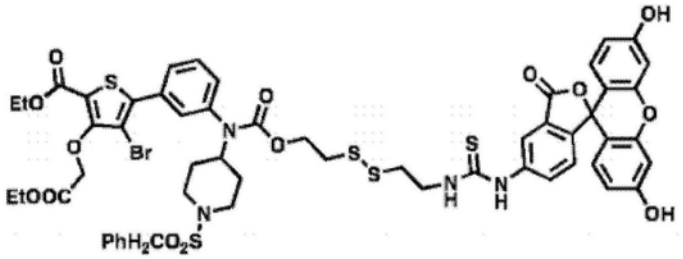
[0152] 13.根据技术方案1所述的系统,其中所述第一组分是以下之一:

[0153]  

[0154] 14.根据技术方案1所述的系统,其中所述第一组分包含选自以下TC-PTP磷酸酶抑制剂的载荷药物:

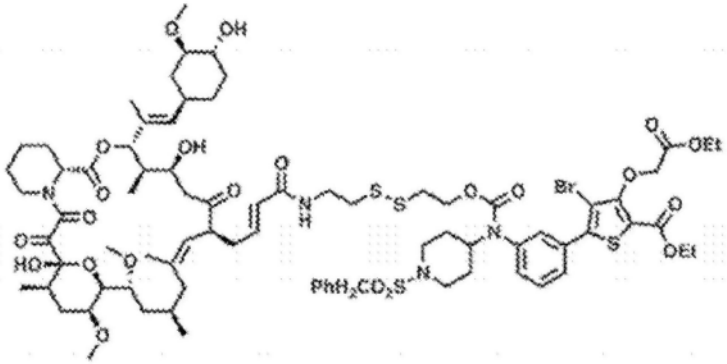
[0155]    

[0156] 15.根据技术方案14所述的系统,其中所述磷酸酶抑制剂与荧光素或FK506(他克莫司)连接以形成以下结构:



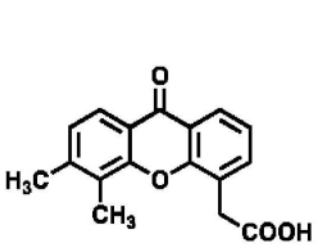
或

[0157]

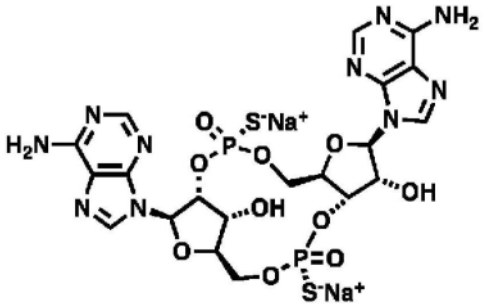


[0158] 16.根据技术方案1所述的系统,其中所述第一组分中的所述载荷药物包含以下结构之一的STING激动剂;

[0159]



DMXAA

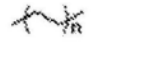


ADU-S100

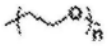
。

[0160] 17.根据技术方案1所述的系统,其中所述第一组分包含在所述靶向配体与所述载荷药物之间的间隔基,所述间隔基选自以下结构:

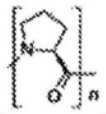
[0161]



烷基



聚乙二醇(PEG)



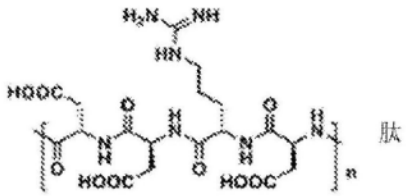
聚脯氨酸



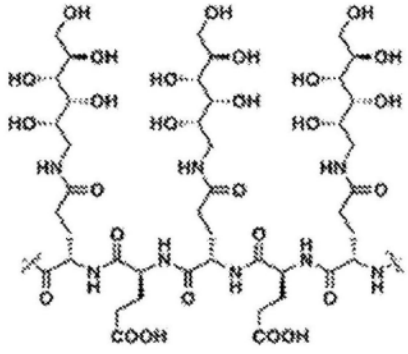
寡聚-(4-哌啶羧酸)



寡聚哌啶



肽



糖-肽

。

[0162] 18.使耗竭的CAR T细胞恢复活力的方法,其包括:

[0163] a.向所述耗竭的CAR T细胞提供包含缀合物的第一组分,其中所述缀合物包含通过可释放或不可释放的接头与药物载荷共价连接的靶向配体;

[0164] b.向所述耗竭的CAR T细胞提供包含与耗竭的CAR构建体连接的融合受体的第二组分,其中所述融合受体包含靶向配体结合模块和膜结合受体模块;

[0165] c.使所述第二组分的所述靶向配体结合模块与所述第一组分中的所述靶向配体结合以形成复合物;

[0166] d.使该膜结合CAR模块介导所述复合物向所述耗竭的CAR T细胞的内化;

[0167] e.使所述载荷药物阻断所述耗竭的CAR T的抑制性信号传导或通过抗原非依赖性途径重新激活所述CAR T。

[0168] 19.根据技术方案18所述的方法,其中所述载荷药物在所述耗竭的CAR T的内体中执行其功能,并且所述靶向配体与所述载荷药物通过不可释放的接头连接。

[0169] 20.根据技术方案18所述的方法,其中所述载荷药物作为所述耗竭的CAR T的胞质溶胶中的游离药物执行其功能,并且所述靶向配体与所述载荷药物通过可释放的接头连接。

[0170] 21.根据技术方案18所述的方法,其中所述第一组分的所述靶向配体是叶酸、FITC或FK506。

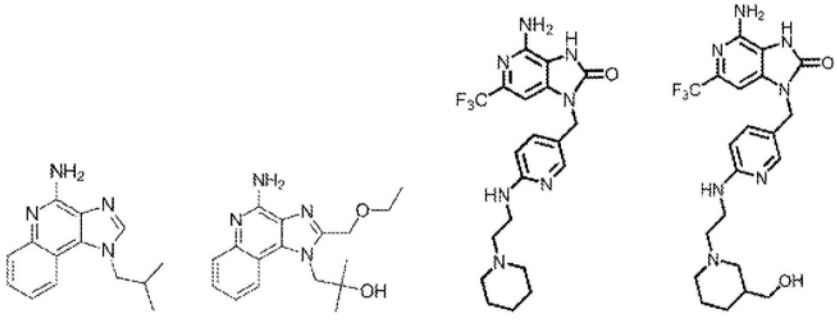
[0171] 22.根据技术方案18所述的方法,其中所述第二组分的所述靶向配体结合模块是抗FITC、叶酸受体或FKBP。

[0172] 23.根据技术方案18所述的方法,其中所述配体结合模块是叶酸受体α(FRa)。

[0173] 24.根据技术方案18所述的方法,其中所述药物载荷是Toll样受体7(TLR7)激动剂或干扰素基因刺激物(STING)激动剂。

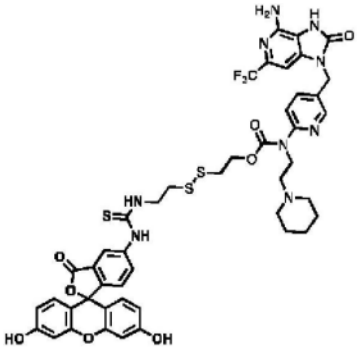
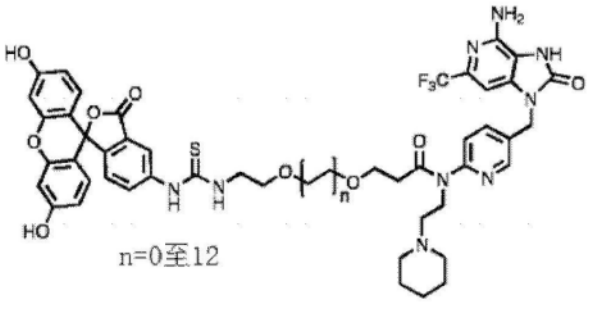
[0174] 25.根据技术方案18所述的方法,其中所述药物载荷是以下蛋白质的抑制剂:SHP1/2、TC-PTP或DGKα、TGFβ。

[0175] 26.根据技术方案18所述的方法,其中所述TLR7激动剂具有以下结构:

[0176] 

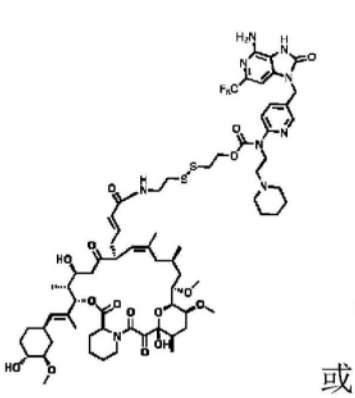
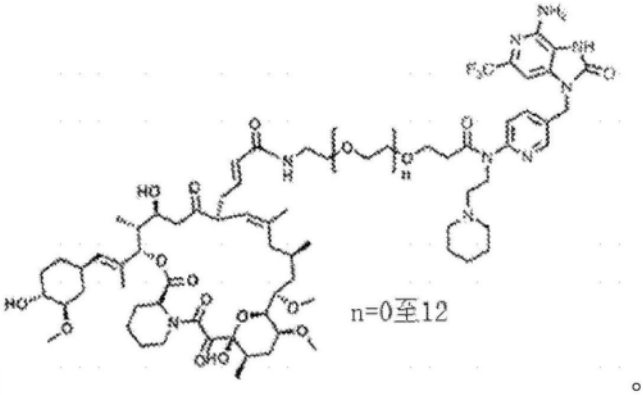
咪喹莫特 雷西莫特 TLR7 激动剂 JTLR7 。

[0177] 27.根据技术方案18所述的方法,其中所述第一组分是具有以下结构的荧光素-TLR7激动剂:

[0178]  或 

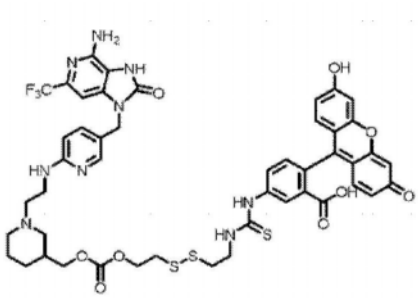
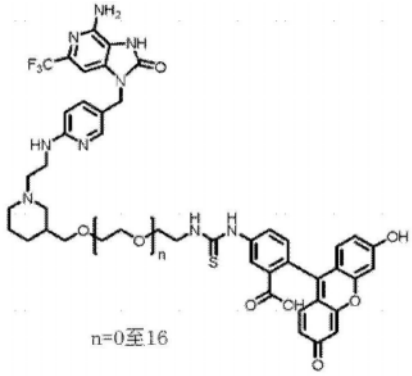
。

[0179] 28.根据技术方案18所述的方法,其中所述第一组分是具有以下结构的FK506-TLR7激动剂:

[0180]  或 

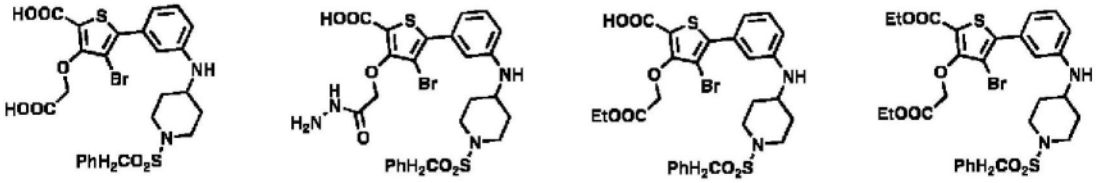
。

[0181] 29.根据技术方案18所述的方法,其中所述第一组分是以下之一:

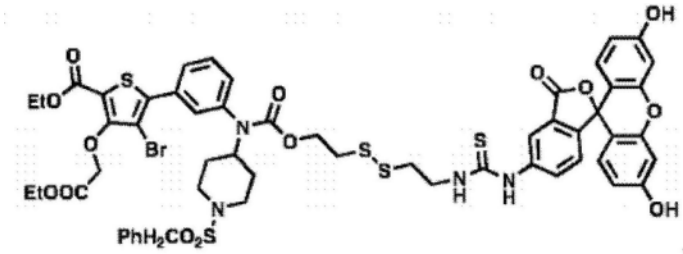
[0182]  

。

[0183] 30.根据技术方案18所述的方法,其中所述第一组分包含选自以下TC-PTP磷酸酶抑制剂的载荷药物:

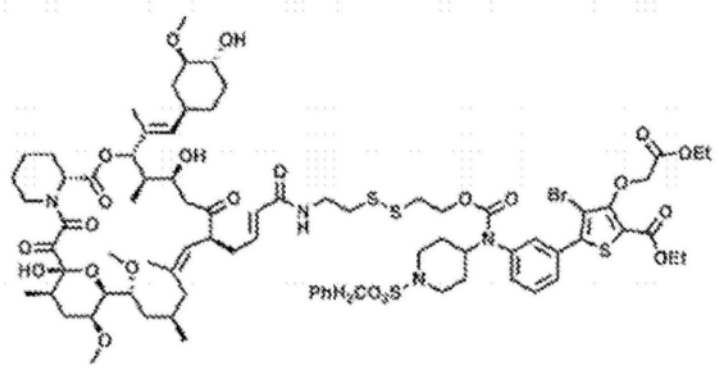
[0184] 
。

[0185] 31.根据技术方案30所述的方法,其中所述磷酸酶抑制剂与荧光素或FK506(他克莫司)连接以形成以下结构:



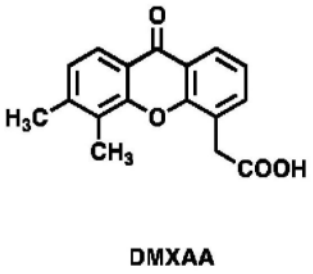
或

[0186]

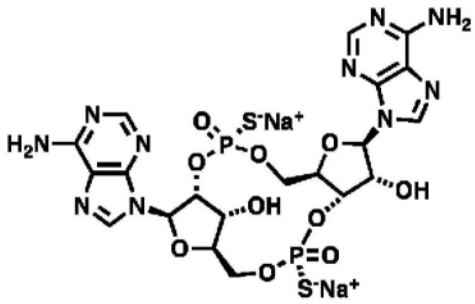


[0187] 32.根据技术方案18所述的方法,其中所述第一组分中的所述载荷药物包含以下结构的STING激动剂:

[0188]



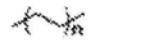
DMXAA



ADU-S100

[0189] 33.根据技术方案18所述的方法,其中所述第一组分包含在所述靶向配体与所述载荷药物之间的间隔基,所述间隔基选自以下结构:

[0190]



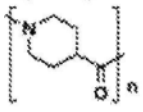
烷基



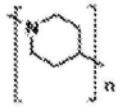
聚乙二醇(PEG)



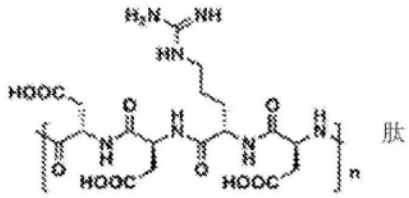
聚脯氨酸



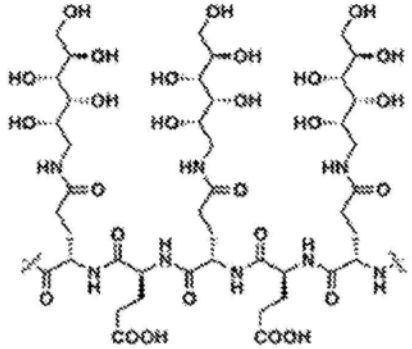
寡聚-(4-哌啶羧酸)



寡聚哌啶



肽



糖-肽

[0191] 参考文献:

[0192] 1.Park,J.H.;Riviere,I.;Gonen,M.;Wang,X.;Senechal,B.;Curran,K.J,;Sauter,C.;Wang,Y.;Santomasso,B.;Mead,E.;Roshal,M.;Maslak,P.;Davila,M.;Brentjens,R.J.;Sadelain,M.,Long-Tcrm Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia.The New England journal of medicine 2018,378(5),449-459.

[0193] 2.Jiang,Y.;Li.Y.;ZhuB.,T-cell exhaustion in the tumor microenvironment.Cell Death Dis 2015,6,e1792.

[0194] 3.Matsuzaki,J.;Gnjatic,S.;Mhawech-Fauceglia,P.;Beck,A.;Miller,A.;Tsuji,T.;Eppolito,C.;Qian,F.;Lele,S.;Shrikant,P.;Old,L.J.;Odunsi,K.,Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8+T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2010,107(17),7875-80.

[0195] 4.Moon,E,K.;Ranganathan,R.;Eruslanov,E,;Kim,S,;Newick,K.;O′Brien,S.;Lo,A.;Liu,X,;Zhao,Y.;Albelda,S.M.;Blockadc of Programmed Death 1 Augments the Ability of Human T Cells Engineered to Target NY-ESO-1 to Control Tumor Growth after Adoptive Transfer.Clinical cancer research:an official journal of the American Association for Cancer Research 2016,22(2),436-47.

[0196] 5.Moon,E.K.;Wang,L.C.;Dolfi,D.V.;Wilson,C.B.;Ranganathan,R.;Sun,J.;Kapoor,V.;Scholler,J.;Pure,E,;Milone,M,C.;June,C.H.;Riley,J.L.;Wherry,E,J.;Albelda,S.M.,Multifactorial T-cell hypofunction that is reversible car limit the efficacy of chimeric antigen receptor-transduced human T cells in solid tumors.Clinical cancer research:an official journal of the American Association for Cancer Research 2014,20(16),4262-73.

[0197] 6.Chae,Y.K.;Arya,A.;lams,W.;Cruz,M.R.;Chandra,S.;Choi,J.;Giles,F.,Current landscape an future of dual anti-CTLA4 and PD-1/PD-L1 blockade immunotherapy in cancer;lessons learned from clinical trial8 with melanoma and non-small cell lung cancer(NSCLC).J Immunother Cancer 2018,6(1),39.

[0198] 7.Ott,P.A.;Hodi,F.S.;Kaufman,H.L.;Wigginton,J.M.;Wolchok,J.D.,Combination immunotherapy:a road map.J Immunother Cancer 2017,5,16.

[0199] 8.Watson,H.A.;Dolton,G.;Ohme,J.;Ladell,K.;Vigar,M.;Wehnkel,S.;Hindley,J.;Mohammed,R.N.;Miners,K.;Luckwell,R.A.;Price,D.A.;Matthews,R.J.;Ager,A.,Purity of transferred CD8(+)T cells is crucial for safety and efficacy of combinatorial tumor immunotherapy in the absence of SHP-1.Immunology and cell biokogy 2016,94(8),802-8.

[0200] 9.Wiede,F.;Shields,B.J.;Chew,S.H.;Kypar;ssoudis,K.;van Vliet,C.;Galic,S.;Tremblay,M.L.;Russell,S.M.;Godfrey,D.L;Tiganis,T.,T cell protein tyrosine phosphatase attenuates T cell signaling to maintain tolerancc in mice.The Journal of clinical investigation 2011,121(12),4758-74.

[0201] 10.Prinz,P.U.;Mendler,A.N.;Masouris,I.;Durner,L.;Obeerneder,R.;

Noessner,E.,High DGK-alpha and disabled MAPK pathways cause dysfunction of human tumor-infiltrating CD8+T cells that is reversible by pharmacologic intervention.Journal of immunology 2012,188(12),5990-6000.

[0202] 11.Chua,B.Y.;Olson,M.R.;Bedoui,S.;Sekiya,T.;Wong,C.Y;Turner,S.J.;Jackson.D.C.,The usc of a TLR2 agonist-based adjuvant for enhancing effector and memory CD8 T-cell responses.Immunology and cell biology 2014,92(4),377-83.

[0203] 12.Rhee,E.G.;Kelley,R.P.;Agarwal,I;Lynch,D.M.;La Porrte,A.;Simmons,N.L.;Clark,S.L.;Barouch,D.H.,TLR4 ligands augment antigen-specific CD8+T lymphocyte responses elicited by a viral vaccine vector.Journal of virology 2010,84(19),10413-9.

[0204] 13.Wiedemann,G.M.;Jacobi,S.J.;Chaloupka,M.;Krachan,A.;Hamm,S.;Strobl,S.;Baumgartner,R.;Rothenfusser,S.;Duewell,P.;Endres,S.;Kobold,S.,A novel TLR7 agonist reverses NK cell anergy and cures RMA-S lymphoma-bearing mice.Oncoimmunology 2016,5(7),e1189051.

[0205] 14.Cheadle,E.J.;Lipowska-Bhalla,G.;Dovedi,S.J.;Fagnano,E.;Klein,C.;Honeychurch,J.;Illidge,T.M.,A TLR7 agonist enhances the antitumor efficacy of obinutuzumab in murine lymphoma models via NK cells and CD4 T cells.Leukemia 2017,31(10),2278.

[0206] 15.Hengge,U.R.;Ruzicka,T.,Topical immunomodulation in dermatology:potential of toll-like receptor agonists.Dermatol Surg 2004,30(8),1101-12.

[0207] 16.Kaczanowska,S.;Joseph,A.M.;Davila,E.,TLRagonists:our best frenemy in cancer immunotherapy.Journl of leukocyte biology 2013,93(6),847-63.

[0208] 17.Bandara,N.A.;Hansen,M.J.;Low,P.S.,Effect of receptor occupancy on folate receptor internalization.Molecular pharmaceutics 2014,11(3),1007-13.

[0209] 18.Kniess,T.;Laube,M.;Wust,F.;Pietzsch,J.,Technetium-99m based small molecule radiopharmaceuticals and radiotracers targeting inflammation and infection.Dalton tramsactions 2017,46(42),14435-14451.

[0210] 19.Kularatne,S.A.;Zhou,Z.;Yans,J.;Post,C.B.;Low,P.S.,Design,synthesis,and preclinical evaluation of prostate-speeific membrane antigen targeted(99m)Tc-radioimaging agents.Molecular pAarmaceutics 2009,6(3),790-800.

[0211] 20.Henne,W.A.;Rothenbuhler,R.;Ayala-Lopez,W.;Xia,W.;Varghese,B.;Low,P.S.,Imaging sites of infection using a 99mTc-labeled folate conjugate targeted to folate recePtor positive macrophages.Molecular pharmaceutics 2012,9(5),1435-40.

[0212] 21.Kahan,S.M.;Wherry,E.J.;Zajac,A.J.,T cell exhaustion during persistent viral infections.Virology 2015,479-480,180-93.

[0213] 22.Stefanova,I.;Hemmer,B.;Vergelli,M.;Martin,R.;Biddison,W.E.;

Germain,R.N.,TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-1 negative feedback pathways.Nature immunology 2003,4(3),248-54.

[0214] 23.Lorenz,U.,SHP-1 and SHP-2 in T eells:two phosphatases functioning at many levels.Immunological reviews 2009,228(1),342-59.

[0215] 24.Watson,H.A.;Wehenkel,S.;Matthews,J.;Ager,A.,SHP-1:the next checkpoint target for cancer immunotherapy?Biochemical Society transactions 2016,44(2),356-62.

[0216] 25.Hebeisen,M.;Baitsch,L.;Presotto,D.;Baumgaertner,P.;Romero,P.;Michielin,O.;Speiser,D.E;Rufer,N.,SHP-1 phosphatase activity counteracts increased T cell receptor affinity.The Journal of clinical investigation 2013,123(3),1044-56.

[0217] 26.Wiede,F.;Shields,B.J.;Chew.S.H.;Kyparissoudis,K.;van Vliet,C.;Galic,S.;Tremblay,M.L.;Russell,S.M.;Godfrey,D.I.;Tiganis,T.,T cell protein tyrosine phosphatase attenuates T ccll signaling to maintain tolerance in mice.The Journal of clinical investigation 2011,121(12),4758-74.

[0218] 27.Pike,K.A.;Hatzihristidis,T.;Bussieres-Marmen,S.;Robert,F.;Desai,N.;Miranda-Saavedra,D.;Pelletier,J.;Tremblay,M.L.,TC-PTP regulates the IL-7 transcriptional response during murine early T cell development.Scientific reports 2017,7(1),13275.

[0219] 28.Wiedemann,G.M.;Jacobi,S.J.;Chaloupka,M.;Kracha:n,A.;Hamm,S.;Strobl,S.;Baumgartner,R.;Rothenfusser,S.;Duewell,P.;Endres,S.;Kobold,S.,A novel TLR7 agonist rgverses NK cell anergyand cures RMA-S lymphoma-bearing mice.Oncoimmunology 2016,5(7),e1189051.

[0220] 29.Caron,G.;Duluc,D.;Fremaux,I.;Jeannin,P.;David,C.;Gascan,H.;Delneste,Y.,Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8:flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+T cells.Journal of immnunology 2005,175(3),1551-7.

[0221] 30.Wille-Reece,U.;Flynn,B.J.;Lore,K.;Koup,R.A.;Miles,A.P.;Saul,A.;Kedl,R.M.;Mattapallil,J.J.;Weiss,W.R.;Roederer,M.;Seder,R.A.,Toll-like receptor agonists influence the magnitude and quality of memory T cell responses after prime-boost immunization in nonhuman primates.The Journal of experimental medicine 2006,203(5),1249-58.

[0222] 31.Zarember,K.A.;Godowski,P.J.,Tissue expression of human Toll-like receptors and ifferential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes,their products,and cytokines.Journal of immnunology 2002,168(2),554-61.

[0223] 32.Hornung,V.;Rothen fusser,S.;Britsch,S.;Krug,A.;Jahrsdorfer,B.;Giese,T.;Endres,S.;Hartmann,G.,Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and

sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides。Journal of immunology 2002,168(9),4531-7.

[0224] 33.Strominger,N.L.;Brady,R.;Gullikson,G.;Carpeater,D,o.,Imiquimod-elicited emesis is med iated by the area postrema,but not by direct neuronal activation.Brain Res Bull 2001,55(3),445-51.

[0225] 34.Harrison,L.I.;Astry,C.;Kumar,S.;Yunis,C.,Pharmacokinetics of 852A, an imidazoquinoline Toll-like receptor 7-specific agonist,following intravenous,subcutaneous,and oral administrations in humans.Journal of clinical pharmacology 2007,47(8),962-9.

[0226] 35.Dudek,A.Z.;Yunis,C.;Harrison,L.I.;Kumar,S.;Hawkinson,R.;Cooley,S.;Vasilakos,J.P.;Gorski,K.S.;Miller,J.S.,First in human phase I trial or 852A,a novel systemic toll-like receptor 7 agonist,to activate innate immune responses in patients with advanced cancer.Clinical cancer research;an official journal of the American Association forcancer Research 2007,13(23),7119-25.

[0227] 36.Dummer,R.;Hauschild,A.;Becker,J.C.;Grob,J.J.;Schadendorf,D.;Tebbs,V.;Skalsky,J.;Kaehlcr,K,C.;Moosbauer,S.;Clark,R.;Meng,T.C.;Urosevic,M.,An exploratory study of systemic administration of the toll-like receptor-7 agonist 852A in patient8 with refractory metastatic melanoma.Clinical cancer researrch:an offiial journal of the American Association for Cancer Research 2008,14(3),856-64.

[0228] 37.perkins,H.;Khodai,T.;Mechiche,H.;Colman,P.;Burden,F.;Laxton,C.;Horscroft,N.;Corey,T.;Rodrigues,D.;Rawal,j.;Heyen,J.;Fidock,M.;Westby,M.;Bright,H.,Therapy with TLR7 agonists induces lymphopcnia:correlating pharmacology to mechanism in a mouse model.J Clin Imununol 2012,32(5),1082-92.

[0229] 38.Hasham,M.G.;Baxan,N.;Stuekey,D.J.;Branca,J.;Perkins,B.;Dent,O.;Duffy,T.;Hameed,T.S.;Stella,S.E.;Bellahcene,M.;Schneider,M.D.;Harding,S.E.;Rosenthal,N.;Sattler,S.,Systemic autoimmunity induced by the TLR7/8 agonist Resiquimod causes myocarditis and dilated cardiomyopathy in a new mouse model of autoimmune heart disease.Dis Model Mech 2017,10(3),259-270.

[0230] 39.Katie,J.;David,N.,Thediscovery of a novel prototype small molecule TLR7 agonist for the treatment of hepatitis C virus infection.MedChemComm 2011,2(3),185-189.

[0231] 40.Jones,P.;Pryde,D.C.;Tran,T.D.;Adam,F.M.;Bish,G.;Calo,F.;Ciaramella,G.;Dixon,R.;Duckworth,J.;Fox,D.N.;Hay,D.A.;Hitchin,J.;Horscroft,N.;Howard,M.;Laxton,C.;Parkinson,T.;Parsons.G.;Proctor,K.;Smith,M.C.;Smith,N.;Thomas,A.,Discovery of a highly potent series of TLR7 agonists.Bioorganic& medicinal chemistry letters 2011,21(19),5939-43.

[0232] 41.Hemmi,H.;Kaisho,T.;Takeuchi,O.;Sato.S.;Sanjo,H.;Hoshino,K.;Horiuchi,T.;Tomizawa,H.;Takeda,K.;Akira,S.,Smallanti-vral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway.Nature inununology 2002,3(2),196-200.

[0233] 42.Iversen,L.F.;Moller,K.B.;Pedersen,A.K.;Peters,G.H.;Petersen,A.S.;Andersen,H.S.;Branner,S.;Mortensen,S.B.;Moller,N.P.,Structure determination of T cell protein-tyrosine phosphatase.The Journal of biological chemistry 2002,277(22),19982-90.

[0234] 43.Wilson,D.P.;Wan,Z.K.;Xu,W.X.;Kirincieh,S.J.;Follows,B.C.;Joseph-McCarthy,D.;Foreman,K.;Moretto,A.;Wu,J.;Zhu,M.;Binrun、E.;Zhang,Y.L.;Tam,M.;Erbe,D.V.;Tobin,J.;Xu,X.;Leung,L.;Shilling,A.;Tam,S.Y.;Mansour,T.S.;Lee,J.,Structure-based optimization of protein tyrosine phosphatase 1B inibitors:from the active site to the second phosphotyrosine binding site.Journal of medicinal chemistry 2007,50(19),4681-98.

[0235] 44.Ignacio,B.J.; Albin,T.J.;Esser-Kahn,A.P.;Verdoes,M.,Toll-like Receptor Agonist Conjugation:A Chemical Perspective.Bioconjugate chemistry 2018,29(3),587-603.

[0236] 45.Parente-Pereira,A.C.;Burnet,J.;Ellison,D.;Foster,J.;Dayies,D.M.;van der Stegen,S.;Burbridge,S.;Chiapero-Stanke,L.;Wilkie,S.;Mather,S.;Maher,J.,Trafficking of CAR-engineered human T cells following regional or systemic adoptive transfer in SCID beige mice.J Clin Immunol 2011,31(4),710-8.

[0237] 46.Dobrenkov,K.;Olszewska,M.;Likar,Y.;Shenker,L.;Gunset,G.;Cai,S.;Pillarsetty,N.;Hricak,H.;Sadelain,M.;Ponomarev,V.,Monitoring the efficacy of adoptively transferred prostate cancer-targeted human T lymphocytes with PET and bioluminescence imaging.Journal of nuclear medicine;official publication,Society of Nuclear Medicine 2008,49(7),1162-70.

[0238] 47.Emami-Shahri,N.;Foster,J.;Kashani,R.;Gazinska,P.;Cook,C.;Sosabowski,J.;Maher,J.;Papa,S.,Clinically compliant spatial and temporal imaging of chimeric antigen receptor T-cells.Nature conununications 2018,9(1),1081.

[0239] 48.Bruno,R.;Giannasio,P.;Ronga,G.;Baudin,F.;Travagli,J.P.;Russo,D.;Filetti,S.;Schlumberger,M.,Sodiumiodide symporter expression and radioiodine distribution in extrathyroidal tissues.J Endocrinol Invest 2004,27(11),1010-4.

[0240] 49.Vedvyas,Y.;Shevlin,E.;Zaman,M.;Min,I.M.;Amor-Coarasa,A.;Park,S.;Park,S.;Kwon,K.W.;Smith,T.;Luo,Y.;Kim,D.;Kim,Y.;Law,B.;Ting,R.;Babich,J.;Jin,M.M,Longitudinal PET imaging demonstrates biphasic CAR T cell responses in surviyors.JCI insight 2016,1(19),e90064.

[0241] 50,Zhang,H.;Moroz,M,A,;Serganova,L;Ku,T.;Huang,R.;Vider,J.;Maecke,

H.R.;Larson,S,M.;Blasberg,R.;Smith-Jones,P,M.,Imaging expression of the human somatostatin receptor subtype-2 reporter gene w ith 68Ga-DOTATOC.Journal of nuclear medicine:official publication,Society of Nuclear Medicine 2011,52(1),123-31.

[0242] 51.Bhattacharyya,S.;Dixit,M.,Metallic radionuclides in the development of diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals.Dalton transactions 2011,40(23),6112-28.

[0243] 52.Khan,O.;Giles,J.R.;McDonald,S.;Manne,S.;Ngiow,S.F.;Patel,K.P.;Werner,M.T.;Huang,A.C.;Alexander,K.A.;Wu,J.E.;Attanasio,J.;Yan,P.;George,S.M.;Bengsch,B.;Staupc,R.P.;Donahue,G.;Xu,W.;Amaravadi,R.K.;Xu,X.;Karakousis,G.C.;Mitchell,T.C.;Schuchter,L.M.;Kaye,J.;Berger,S.L.;Wherry,E.J.,TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8(+)T cell exhaustion.Nature 2019.

[0244] 53.Alfei,F.;Kanev,K.;Hofmann,M.;Wu,M.;Ghoneim,H.E.;Roelli,P.;Utzschneider,D.T.;von Hoesslin,M.;Cullen,l.G.;Fan,Y.;Eisenberg.V.;Wohlleber,D.;Steiger,K.;Merkler,D.;Delorenzi,M.;Knolle,P.A.;Cohen,C.J.;Thimme,R.;Youngblood,B.;Zehn,D.,TOX reinforces the phenotype and longevity of exhausted T cells in chronic viral infection.Nature 2019.

[0245] 54.Kavqai,T.;Akira,S.,Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors.Trends in molecular mledicine 2007,13(11),460-9.

[0246] 55.Chen,J.;Lopez-Moyado,I.F.;Seo,H.;Lio,C.J.;Hempleman,L,J,;Sekiya,T.;Yoshimura,A,;Scott-Browne,J.P.;Rao,A.,NR4A transcription factors limit CAR T cell function in solid tumours.Nature 2019,567(7749),530-534.

[0247] 56.Larkin,B.;Ilyukha,V.;Sorokin,M.;Buzdin,A.;Vannier,E.;Poltorak,A.,Cutting Edge:Activation of STING in T Cells Induces Type I IFN Responses and Cell Death.Journal of immunology 2017,199(2),397-402.

[0248] 57.Prinz,P.U.;Mendler,A.N.;Masouris,I;Durner,L.;Oberneder,R.;Noessner,E;,High DGK-alpha and disabled MAPK pathways cause dysfunction of human tumor-infiltrating CD8+T cells that is reversible by pharmacologic intervention.Journal of immunology 2012,188(12),5990-6000.

[0249] 58.Gorelik,L;Flavell,R.A.,Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-βsignaling in T cells.Nature medicine 2001,7(10).1118.

[0250] 59.Herbertz,S;Sawyer,J.S.;Stauber,A.J.;Gueorauieva,I.;Driscoll,K.E.;Estrem,S.T.;Cleverly,A.L.;Desaiah,D.;Guba,S.C.;Benhadji,K.A.;Slapak,C.A.;Lahn,M.M.,Clinical development of galunisertib(LY2157299 monohydrate),a smallmolecule inhibitor of trarsforming growth factor-beta signaling pathway.Drug design,development and therapy 2015,9,4479-99.

[0251] 60.Jin,C.H.;Krishnaiah,M.;Sreenu,D.;Subrahmanyam,V.B.;Rao,K.S.;Lee,

H.J.;Park,S.J.;Park,H.J.;Lee,K.;Shecn,Y.Y.;Kim,D.K..Discovery of N-((4-([1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-6-yl)-5-(6-methylpyridin-2-yl)-1H-imidazol-2-yl)methyl)-2-fluoroaniline(EW-7197):ahighly potent,selective,and orally bioavailable inhibitor of TGF-beta type Ireceptor kinase as cancer immunotherapeutic/atifibrotic agent.Journal of medicinal chemistry 2014,57(10),4213-38.

[0252] 61.Wang,D.;Quiros,J.;Mahuron,K.;Pai,C.C.;Ranzani,V.;Young,A.;Silveria,S.;Harwin,T.;Abnousian,A.;Pagani,M;Rosenblum,M,D.;Van Gool,F.;Fong,L.;Bluestone,J.A.;DuPage,M.,TargetingEZH2 Reprograms Intratumoral Regulatory T Cells to Enhance Cancer Immunity.Cell reports 2018,23(11),3262-3274。

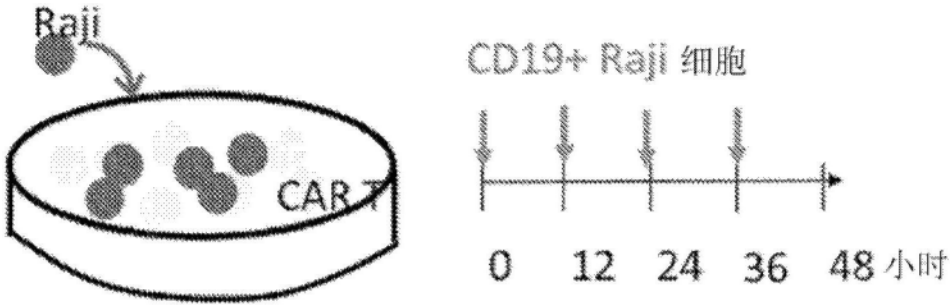

Raji
CAR T
CD19+ Raji 细胞
0 12 24 36 48 小时

图1a

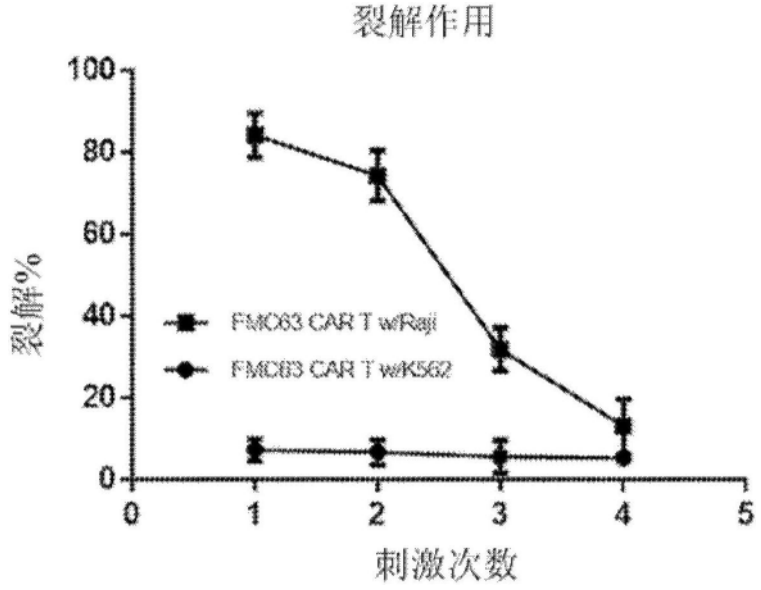

裂解作用
裂解%
100
80
60
40
20
0
FMC63 CAR T w/Raji
FMC63 CAR T w/K562
0 1 2 3 4 5
刺激次数

图1b

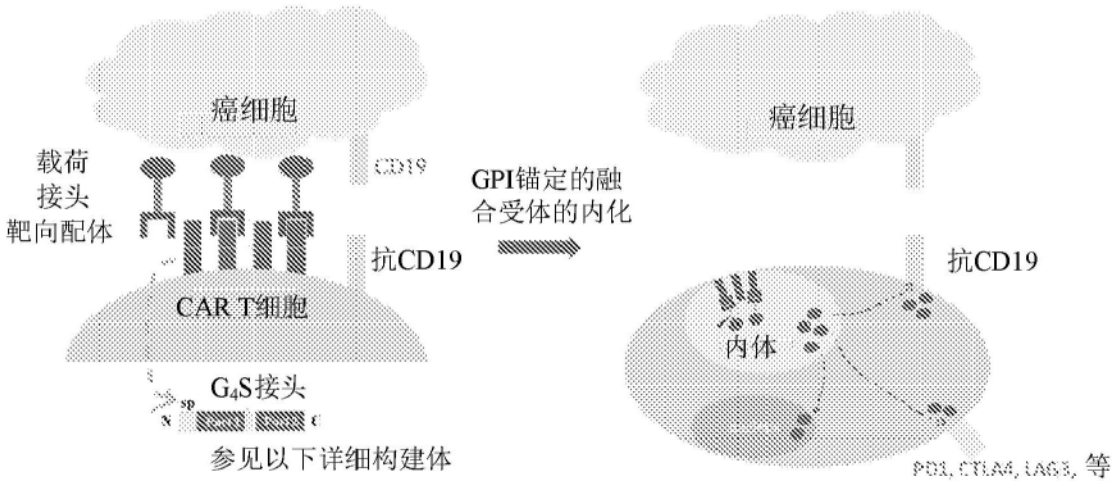

癌细胞
载荷
接头
靶向配体
CD19
抗CD19
CAR T细胞
G4S接头
参见以下详细构建体
GPI锚定的融
合受体的内化
癌细胞
抗CD19
内体
PD1, CTLA4, LAG3, 等

图2

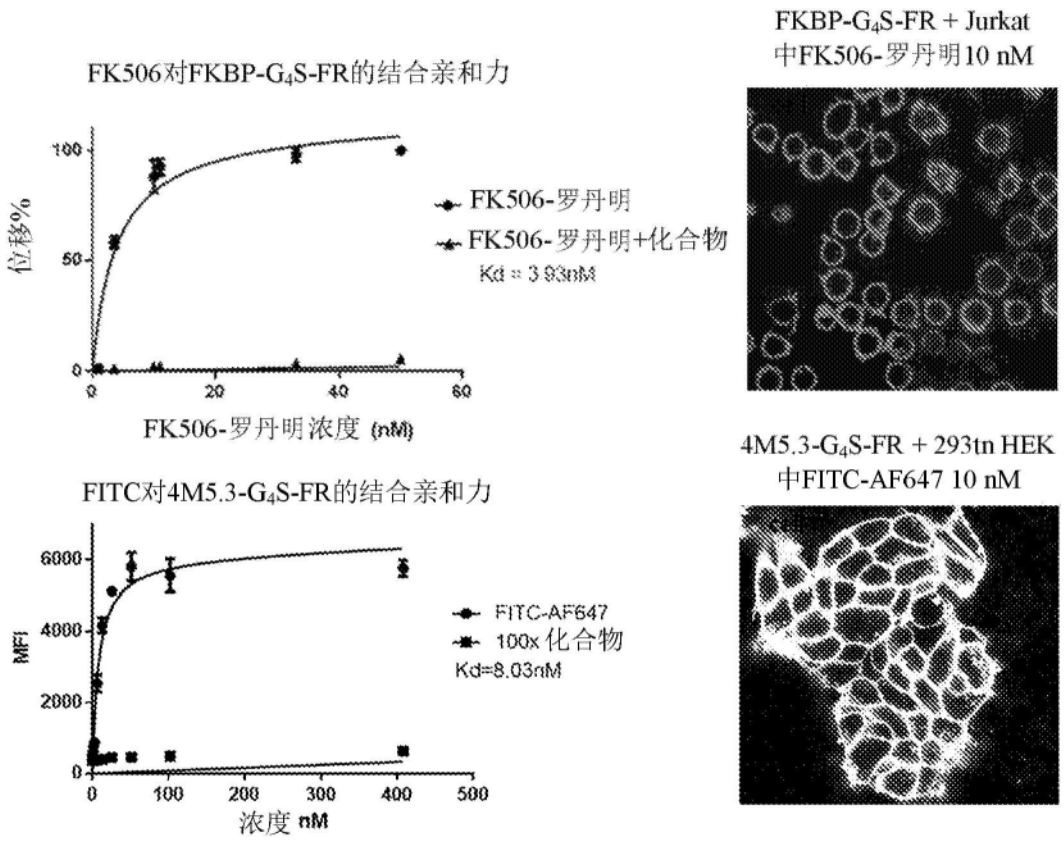
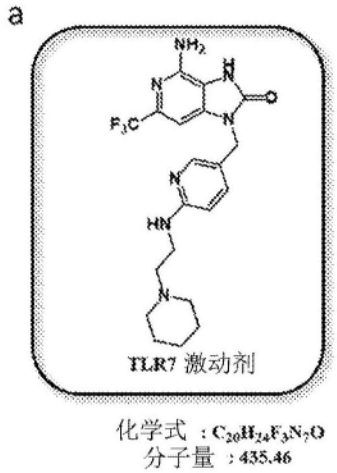

FK506对FKBP-G4S-FR的结合亲和力
位移%
100
50
0
0
20
40
60
FK506-罗丹明浓度 (nM)
FK506-罗丹明
FK506-罗丹明+化合物
Kd = 3.93nM
FKBP-G4S-FR + Jurkat
中FK506-罗丹明10 nM
FITC对4M5.3-G4S-FR的结合亲和力
MFI
6000
4000
2000
0
0
100
200
300
400
500
浓度 nM
FITC-AF647
100x 化合物
Kd=8.03nM
4M5.3-G4S-FR + 293tn HEK
中FITC-AF647 10 nM

图3


a
TLR7 激动剂
化学式 ：$C_{20}H_{24}F_3N_7O$
分子量 ：435.46

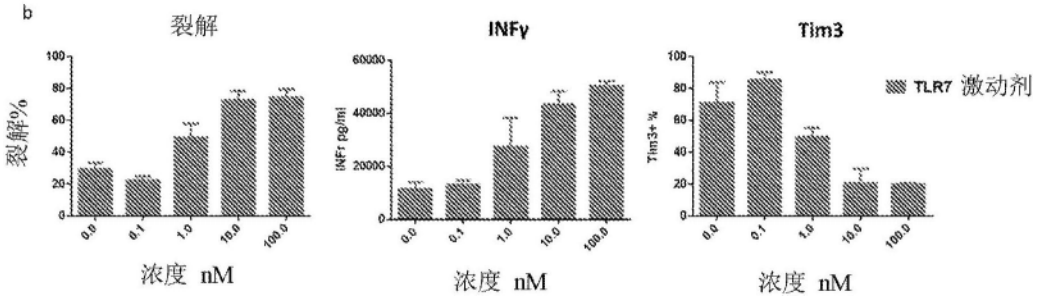

b
裂解
裂解%
浓度 nM
INFγ
INFγ pg/ml
浓度 nM
Tim3
Tim3+ %
浓度 nM
TLR7 激动剂

图4

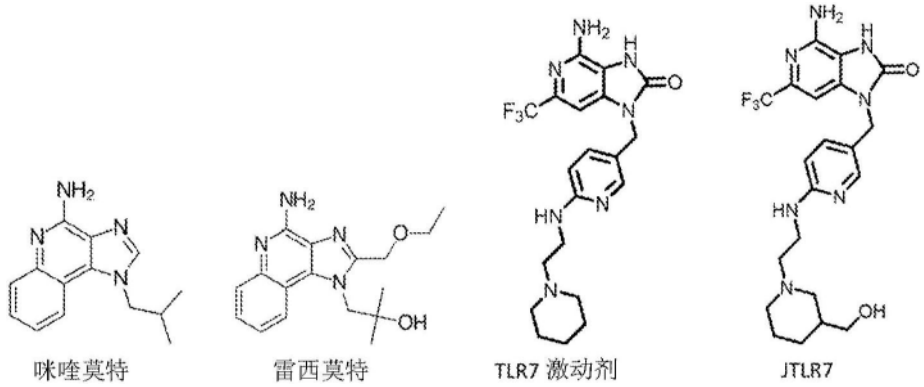

咪喹莫特
雷西莫特
TLR7 激动剂
JTLR7

图5

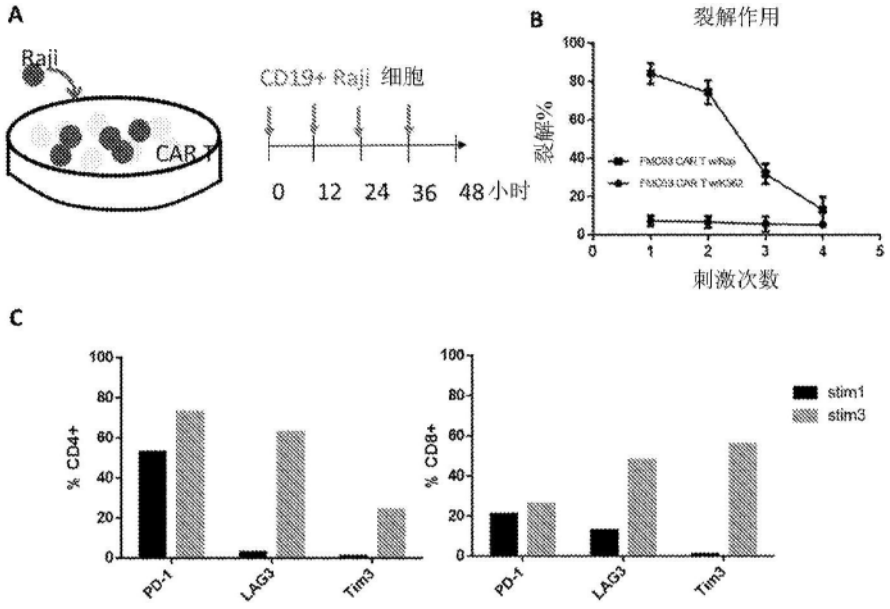

A
Raji
CAR T
CD19+ Raji 细胞
0 12 24 36 48 小时
B
裂解作用
裂解%
刺激次数
C
% CD4+
% CD8+
stim1
stim3
PD-1
LAG3
Tim3

图6

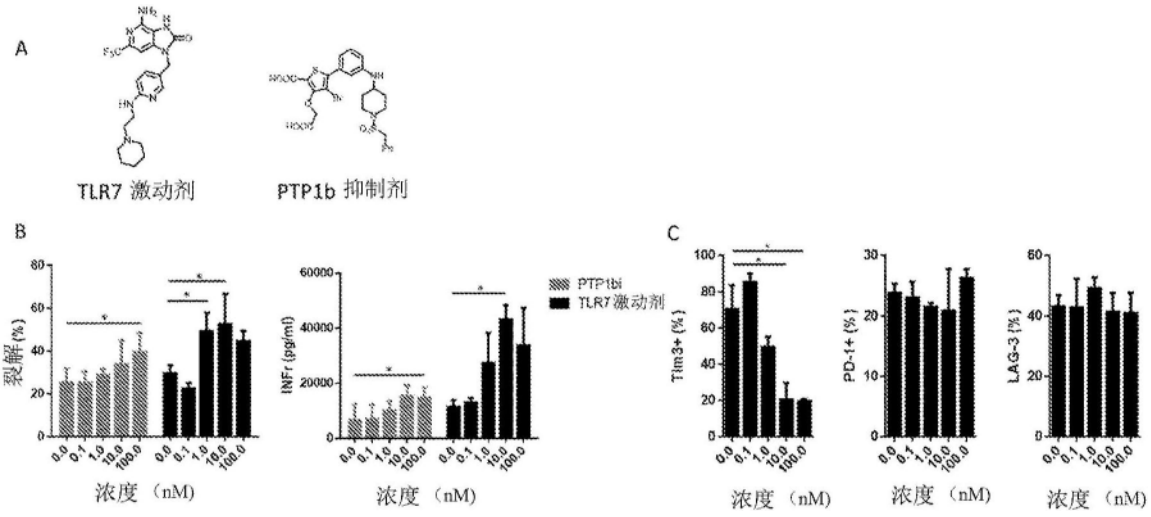

A
TLR7 激动剂
PTP1b 抑制剂
B
裂解(%)
INFr (pg/ml)
PTP1bi
TLR7激动剂
浓度 (nM)
C
Tim3+ (%)
PD-1+ (%)
LAG-3 (%)
浓度 (nM)

图7

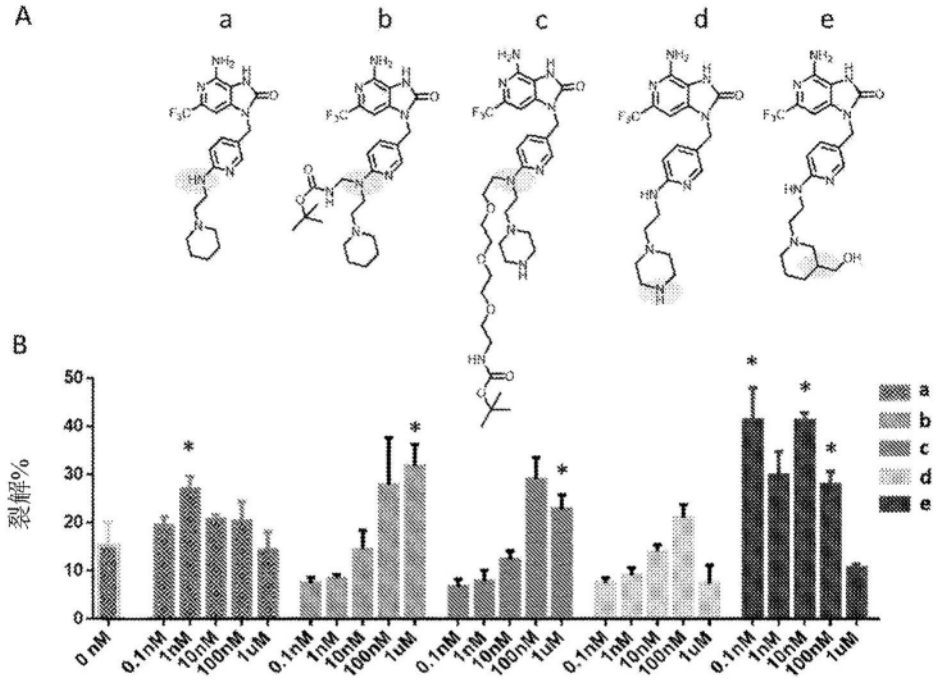

A
a
b
c
d
e
B
裂解%
50
40
30
20
10
0
a
b
c
d
e
0 nM
0.1nM
1nM
10nM
100nM
1uM

图8

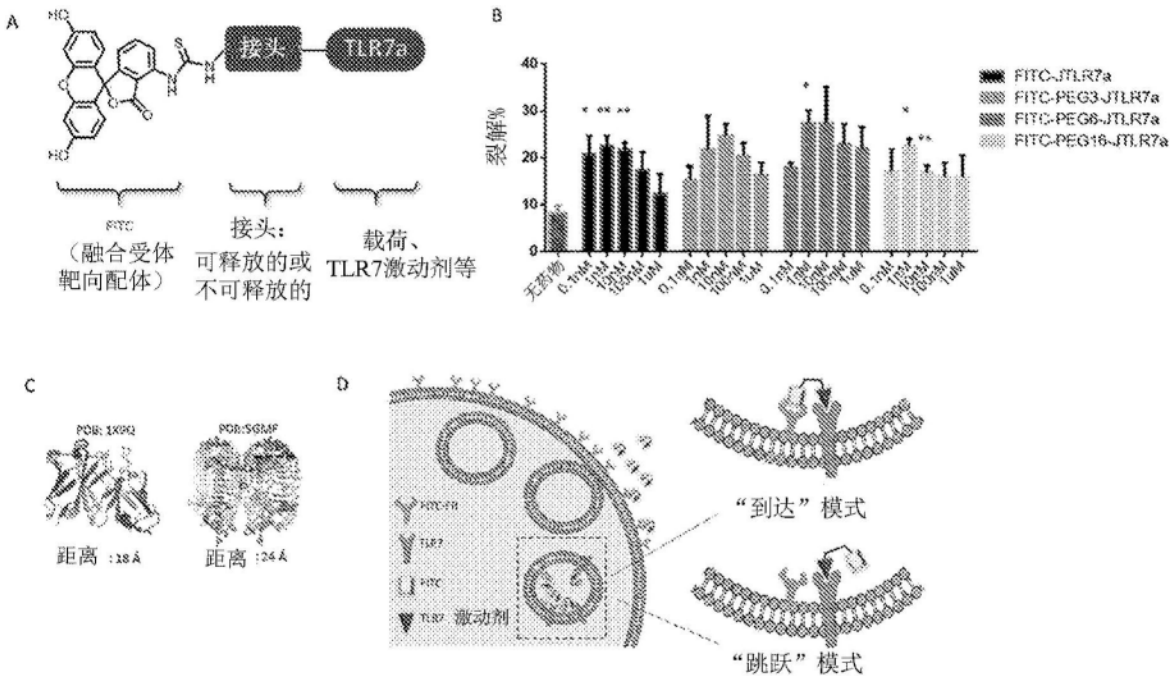

A
接头
TLR7a
FITC
（融合受体靶向配体）
接头：可释放的或不可释放的
载荷、TLR7激动剂等
B
裂解%
FITC-JTLR7a
FITC-PEG3-JTLR7a
FITC-PEG6-JTLR7a
FITC-PEG16-JTLR7a
C
PDB: 1XPQ
PDB:5GMF
距离 :18 Å
距离 :24 Å
D
激动剂
“到达”模式
“跳跃”模式

图9

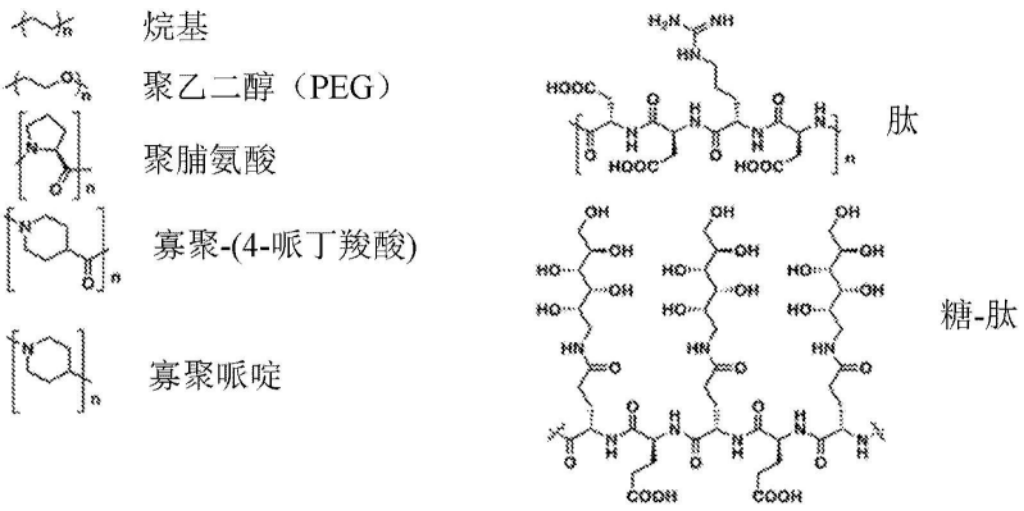


图10