



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111148533 A

(43)申请公布日 2020.05.12

(21)申请号 201880061030.X

(22)申请日 2018.09.19

(30)优先权数据

62/560,588 2017.09.19 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.03.19

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/051764 2018.09.19

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/060425 EN 2019.03.28

(71)申请人 麻省理工学院

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 D·J·伊尔文 马乐园

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 袁元

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

A61K 47/54(2006.01)

A61K 47/64(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

权利要求书5页 说明书59页 附图26页

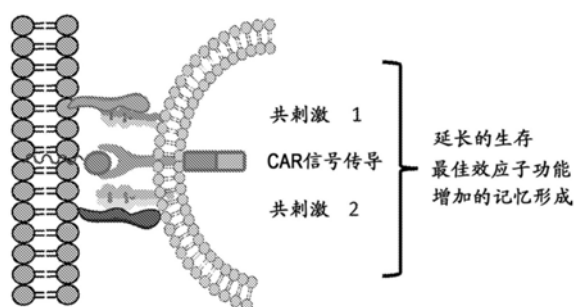
(54)发明名称

用于嵌合抗原受体T细胞疗法的组合物及其用途

(57)摘要

本公开描述了两亲性配体缀合物,其包含嵌合抗原受体(CAR)配体、脂质(二酰基脂质)、接头(亲水性聚合物、亲水性氨基酸、多糖),要求保护了组合物和使用所述结构的方法,例如,以刺激CAR表达细胞的增殖。

淋巴结中APC的最佳刺激



1. 一种两亲性配体缀合物,其包含:
嵌合抗原受体 (CAR) 配体;和
可操作地连接至所述CAR配体的脂质。
2. 根据权利要求1所述的两亲性配体缀合物,其中所述脂质在生理条件下插入细胞膜中,在生理条件下结合白蛋白,或两者。
3. 根据权利要求1或权利要求2所述的两亲性配体缀合物,其中所述脂质是二酰基脂质。
4. 根据权利要求3所述的两亲性配体缀合物,其中所述二酰基脂质包含酰基链,所述酰基链包含12-30个烃单元,14-25个烃单元,16-20个烃单元,或12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个烃单元。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的两亲性配体缀合物,其中所述CAR配体通过接头可操作地连接至所述脂质。
6. 根据权利要求5所述的两亲性配体缀合物,其中所述接头选自亲水性聚合物、一串亲水性氨基酸、多糖或其组合。
7. 根据权利要求5所述的两亲性配体缀合物,其中所述接头包含“N”个连续的聚乙二醇单元,其中N在25-50之间。
8. 一种两亲性配体缀合物,其包含通过接头可操作地连接至二酰基脂质的CAR配体,其中所述二酰基脂质包含包含12-30个烃单元的酰基链,并且其中所述接头包含“N”个连续的聚乙二醇单元,其中N在25-50之间。
9. 根据权利要求1-8中任一项所述的两亲性配体缀合物,其中所述CAR配体是标签。
10. 根据权利要求9所述的两亲性配体缀合物,其中所述标签选自异硫氰酸荧光素 (FITC)、链霉抗生物素蛋白、生物素、二硝基苯酚、多甲藻素叶绿素蛋白复合物、绿色荧光蛋白、枣红蛋白 (PE)、辣根过氧化物酶、棕榈酰化、亚硝基化、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶和麦芽糖结合蛋白。
11. 根据权利要求1-8中任一项所述的两亲性配体缀合物,其中所述CAR配体是肿瘤相关抗原或其片段。
12. 一种两亲性配体缀合物,其包含通过聚乙二醇部分可操作地连接至异硫氰酸荧光素 (FITC) 的脂质。
13. 根据权利要求8-12中任一项所述的两亲性配体缀合物,其中所述脂质是1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 (DSPE) 并且其中所述聚乙二醇部分是PEG-2000。
14. 根据权利要求1-13中任一项所述的两亲性配体缀合物,其中所述CAR配体结合至CAR,并且其中所述CAR包含共刺激结构域。
15. 根据权利要求14所述的两亲性配体缀合物,其中所述CAR包含双特异性结合结构域。
16. 根据权利要求15所述的两亲性配体缀合物,其中所述双特异性结合结构域包含标签结合结构域和肿瘤相关抗原结合结构域或包含第一肿瘤相关抗原结合结构域和第二肿瘤相关抗原结合结构域。
17. 根据权利要求16所述的两亲性配体缀合物,其中所述双特异性结合结构域包含标签结合结构域和肿瘤相关抗原结合结构域,并且其中所述CAR配体是标签。

18. 根据权利要求15所述的两亲性配体缀合物, 其中所述双特异性结合结构域包含第一肿瘤相关抗原结合结构域和第二肿瘤相关抗原结合结构域, 并且其中所述CAR配体是第一或第二肿瘤相关抗原或其片段。

19. 根据权利要求14所述的两亲性配体缀合物, 其中所述CAR包含标签结合结构域, 并且其中所述CAR配体是标签。

20. 根据权利要求14所述的两亲性配体缀合物, 其中所述CAR包含肿瘤相关抗原结合结构域, 并且其中所述CAR配体是肿瘤相关抗原或其片段。

21. 一种组合物, 其包含权利要求1-19中任一项所述的两亲性配体缀合物, 和药学上可接受的载体。

22. 一种免疫原性组合物, 其包含权利要求21所述的组合物和佐剂。

23. 根据权利要求22所述的免疫原性组合物, 其中所述佐剂是两亲性寡核苷酸缀合物, 其包含与脂质缀合的免疫刺激性寡核苷酸, 具有或不具有接头, 并且任选地是极性化合物。

24. 根据权利要求23所述的免疫原性组合物, 其中所述免疫刺激性寡核苷酸结合模式识别受体。

25. 根据权利要求24所述的免疫原性组合物, 其中所述免疫刺激性寡核苷酸包含CpG。

26. 根据权利要求23所述的免疫原性组合物, 其中所述免疫刺激性寡核苷酸是针对toll样受体的配体。

27. 根据权利要求23-26中任一项所述的免疫原性组合物, 其中所述接头是寡核苷酸接头。

28. 根据权利要求27所述的免疫原性组合物, 其中所述寡核苷酸接头包含“N”个连续的鸟嘌呤, 其中N在0-2之间。

29. 根据权利要求23-28中任一项所述的免疫原性组合物, 其中所述脂质是二酰基脂质。

30. 根据权利要求29所述的免疫原性组合物, 其中所述二酰基脂质包含包含12-30个烃单元的酰基链。

31. 根据权利要求22所述的免疫原性组合物, 其中所述佐剂是环状双GMP (CDG)。

32. 一种在受试者中激活CAR-T细胞、扩增CAR-T细胞或增加CAR-T细胞增殖的方法, 其包括向所述受试者施用权利要求1-20中任一项所述的两亲性配体缀合物, 权利要求21所述的组合物, 或权利要求23-31中任一项所述的免疫原性组合物。

33. 根据权利要求32所述的方法, 其中所述CAR (-) T细胞的增殖在所述受试者中不增加。

34. 一种在有需要的受试者中降低或减少肿瘤大小或抑制肿瘤生长的方法, 其包括向所述受试者施用权利要求1-20中任一项所述的两亲性配体缀合物, 权利要求21所述的组合物, 或权利要求23-31中任一项所述的免疫原性组合物, 其中所述受试者正在接受或已接受CAR-T细胞疗法。

35. 一种在具有癌症的受试者中诱导抗肿瘤应答的方法, 其包括向所述受试者施用权利要求1-20中任一项所述的两亲性配体缀合物, 权利要求21所述的组合物, 或权利要求23-31中任一项所述的免疫原性组合物, 其中所述受试者正在接受或已接受CAR-T细胞疗法。

36. 一种在受试者中刺激针对表达抗原的靶细胞群或靶组织的免疫应答的方法, 所述

方法包括向所述受试者施用靶向所述抗原的CAR-T细胞,和权利要求1-20中任一项所述的两亲性配体缀合物,权利要求21所述的组合物,或权利要求23-31中任一项所述的免疫原性组合物。

37. 根据权利要求36所述的方法,其中所述免疫应答是T细胞介导的免疫应答或抗肿瘤免疫应答。

38. 根据权利要求36或权利要求37所述的方法,其中所述靶细胞群或靶组织是肿瘤细胞或肿瘤组织。

39. 一种治疗患有与抗原的表达或表达升高相关的疾病、病症或病情的受试者的方法,其包括向所述受试者施用靶向所述抗原的CAR-T细胞,和权利要求1-20中任一项所述的两亲性配体缀合物,权利要求21所述的组合物,或权利要求23-31中任一项所述的免疫原性组合物。

40. 根据权利要求32-34中任一项所述的方法,其中在接受CAR T细胞之前,所述受试者被施用所述两亲性配体缀合物、所述组合物或所述免疫原性组合物。

41. 根据权利要求32-34中任一项所述的方法,其中在接受CAR-T细胞后,所述受试者被施用所述两亲性配体缀合物、所述组合物或所述免疫原性组合物。

42. 根据权利要求32-34中任一项所述的方法,其中所述两亲性配体缀合物、所述组合物或所述免疫原性组合物,和CAR-T细胞是同时施用的。

43. 根据权利要求32-42中任一项所述的方法,其中所述两亲性配体缀合物被运输至淋巴结。

44. 根据权利要求32-42中任一项所述的方法,其中所述两亲性配体缀合物被运输至腹股沟淋巴结和辅助淋巴结。

45. 根据权利要求32-44中任一项所述的方法,其中所述两亲性配体缀合物在运输至淋巴结时被插入抗原呈递细胞的膜中。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中所述抗原呈递细胞是髓巨噬细胞、CD8+树突细胞和/或CD11b+树突细胞。

47. 根据权利要求32-46中任一项所述的方法,其中所述CAR配体在淋巴结中保留至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少8天、至少9天、至少10天、至少11天、至少12天、至少13天、至少14天、至少15天、至少16天、至少17天、至少18天、至少19天、至少20天、至少21天、至少22天、至少23天、至少24天或至少25天。

48. 根据权利要求32-47中任一项所述的方法,其中所述CAR配体是标签,其中所述CAR包含标签结合结构域,并且其中所述方法还包括施用标记蛋白的制剂,并且其中所述标签结合结构域结合所述标记蛋白。

49. 根据权利要求48所述的方法,其中所述标记蛋白的蛋白是抗体或其抗原结合片段。

50. 根据权利要求48或权利要求49所述的方法,其中所述标签结合结构域是抗体或其抗原结合片段。

51. 根据权利要求48-50中任一项所述的方法,其中在施用所述CAR-T细胞和两亲性配体缀合物、组合物或免疫原性组合物之前,将所述标记蛋白的制剂施用于所述受试者。

52. 根据权利要求48-50中任一项所述的方法,其中在施用所述CAR-T细胞和两亲性配体缀合物、组合物或免疫原性组合物同时,将所述标记蛋白的制剂施用于所述受试者。

53. 根据权利要求48-50中任一项所述的方法,其中在施用所述CAR-T细胞和两亲性配体缀合物、组合物或免疫原性组合物之后,将所述标记蛋白的制剂施用于所述受试者。

54. 根据权利要求51-53中任一项所述的方法,其中所述CAR-T细胞在施用所述两亲性配体缀合物、组合物或免疫原性组合物之前施用。

55. 根据权利要求51-53中任一项所述的方法,其中所述CAR-T细胞在施用所述两亲性配体缀合物、组合物或免疫原性组合物之后施用。

56. 根据权利要求51-53中任一项所述的方法,其中所述CAR-T细胞在施用所述两亲性配体缀合物、组合物或免疫原性组合物的同时施用。

57. 根据权利要求32-34和49-56中任一项所述的方法,其中所述受试者患有癌症。

58. 根据权利要求32-57中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

59. 一种试剂盒,其包含容器,所述容器包含组合物,所述组合物包含权利要求1-20中任一项所述的两亲性配体缀合物,任选的药学上可接受的载体,以及包装说明书,其包括在接受CAR-T细胞疗法的个体中用于治疗癌症或延缓癌症发展的所述组合物的施用说明。

60. 一种试剂盒,其包含药物,所述药物包含组合物,所述组合物包含权利要求1-20中任一项所述的两亲性配体缀合物,任选的药学上可接受的载体,以及包装说明书,其包括在接受CAR-T细胞疗法的个体中用于治疗癌症或延缓癌症发展的所述药物单独或与包含佐剂和任选的药学上可接受的载体的组合物组合的施用说明。

61. 一种试剂盒,其包含容器,所述容器包含组合物,所述组合物包含权利要求1-20中任一项所述的两亲性配体缀合物,任选的药学上可接受的载体,以及包装说明书,其包括在接受CAR-T细胞疗法的个体中用于激活CAR-T细胞、扩增CAR-T细胞或增加CAR-T细胞增殖的组合物疫苗的施用说明。

62. 一种试剂盒,其包含药物,所述药物包含组合物,所述组合物包含权利要求1-20中任一项所述的两亲性配体缀合物,任选的药学上可接受的载体,以及包装说明书,其包括在接受CAR-T细胞疗法的个体中用于激活CAR-T细胞、扩增CAR-T细胞或增加CAR-T细胞增殖的所述药物单独或与包含佐剂和任选的药学上可接受的载体的组合物组合的施用说明。

63. 根据权利要求59或权利要求61所述的试剂盒,其进一步包含佐剂和用于在接受CAR-T细胞疗法的个体中用于治疗癌症或延缓癌症发展的佐剂的施用说明。

64. 根据权利要求60、62和63中任一项所述的试剂盒,其中所述佐剂是两亲性寡核苷酸缀合物,其包含与脂质缀合的免疫刺激性寡核苷酸,具有或不具有接头,并且任选地是极性化合物。

65. 权利要求1-20中任一项所述的两亲性配体缀合物、权利要求21所述的组合物、或权利要求23-31中任一项所述的免疫原性组合物在接受CAR-T细胞疗法的个体中用于激活CAR-T细胞、扩增CAR-T细胞或增加CAR-T细胞增殖的用途。

66. 权利要求1-20中任一项所述的两亲性配体缀合物、权利要求21所述的组合物、或权利要求23-31中任一项所述的免疫原性组合物在个体中用于治疗癌症或延缓癌症发展的用途。

67. 权利要求1-20中任一项所述的两亲性配体缀合物、权利要求21所述的组合物、或权利要求23-31中任一项所述的免疫原性组合物在制备用于在个体中治疗癌症或延缓癌症发展的药物中的用途。

68. 根据权利要求32-58中任一项所述的方法,其包括在非肿瘤引流淋巴结不经肠道地、在肿瘤引流淋巴结不经肠道地,或瘤内地施用所述两亲性配体缀合物、所述组合物或所述免疫原性组合物。

69. 根据权利要求36所述的方法,其中所述靶细胞群或靶组织是被病毒感染的细胞群或组织。

70. 根据权利要求69所述的方法,其中所述病毒是人免疫缺陷病毒(HIV)。

71. 根据权利要求69或权利要求70所述的方法,其中所述免疫应答是T细胞介导的免疫应答。

72. 根据权利要求39所述的方法,其中所述抗原是病毒抗原或癌抗原。

73. 一种试剂盒,其包含药物,所述药物包含组合物,所述组合物包含权利要求1-20中任一项所述的两亲性配体缀合物,任选的药学上可接受的载体,以及包装说明书,其包括在接受CAR-T细胞疗法的个体中用于治疗病毒感染或延缓病毒感染发展的所述组合物的施用说明。

74. 根据权利要求73所述的试剂盒,其进一步包含标记蛋白的制剂和用于施用所述标记蛋白的制剂的说明,其中所述CAR包含结合所述标记蛋白的标签结合结构域。

75. 根据权利要求73或权利要求74所述的试剂盒,其进一步包含佐剂和用于在接受CAR-T细胞疗法的个体中用于治疗病毒感染或延缓病毒感染发展的佐剂的施用说明。

76. 根据权利要求75所述的试剂盒,其中所述佐剂是两亲性寡核苷酸缀合物,其包含与脂质缀合的免疫刺激性寡核苷酸,具有或不具有接头,并且任选地是极性化合物。

用于嵌合抗原受体T细胞疗法的组合物及其用途

[0001] 相关信息段落

[0002] 本申请要求于2017年9月19日提交的美国临时申请62/560,588的优先权日期的权益,其内容通过引用全文并入本文。

背景技术

[0003] 使用免疫疗法的癌症临床治疗正在取得重大进展。迄今为止开发的最有效的治疗方法之一是用嵌合抗原受体T细胞(CAR T细胞或CAR-T)进行过继细胞疗法。CAR-T是用通过将抗原结合结构域融合到来自T细胞受体复合物的CD3信号传导链和来自多种公知在T细胞激活期间提供支持信号的共受体之一的共刺激结构域而形成的合成抗原受体转导的来自患者的自体淋巴细胞。CAR-T细胞在血液系统恶性肿瘤中已显示出惊人的完全应答,并且FDA最近批准了CAR-T疗法用于B细胞白血病的治疗。

[0004] 然而,目前CAR-T细胞被简单地输注到患者中,并且没有接受额外刺激,除了通过体内遭遇肿瘤细胞,其缺乏通常被提供到T细胞以促进其全部效应子功能的关键信号传导提示中的许多。此外,CAR-T细胞无法在某些患者中持续发挥功能,并且在实体瘤中通常显示出不良应答。因此,存在对改善CAR-T细胞疗法的试剂的需要。

发明内容

[0005] 本公开至少部分基于以下发现:嵌合抗原受体(CAR)配体通过使用两亲性缀合物有效地递送至淋巴结,所述两亲性缀合物结合人血清白蛋白并分配到驻留抗原呈递细胞(APC)的膜中,从而在细胞表面上共同展示CAR-T细胞配体以及天然细胞因子/受体共刺激信号。不受理论的束缚,据信两亲性缀合物的这些双重性质(即淋巴结靶向和膜插入)组合在一起以使用于CAR-T细胞的加强疫苗(booster vaccine)成为可能,其在体内有效地扩增CAR-T细胞,增加其功能,并增强抗肿瘤活性。

[0006] 已经证明包含标签或肿瘤相关抗原的两亲性配体缀合物激活表达包含标签或肿瘤相关抗原结合结构域或两者的CAR的T细胞和诱导其增殖。值得注意的是,这样的两亲性配体缀合物在体内保留了该活性,因此允许在施用于受试者后CAR-T细胞的扩增和激活。此外,本公开的两亲性配体缀合物的施用也导致CAR-T向肿瘤中的浸润显著增加,并且尽管有检查点抑制剂PD1和TIM3的表面表达,但浸润肿瘤的CAR-T细胞对肿瘤细胞仍表现出增强的反应性。用本公开的两亲性配体缀合物与CAR-T细胞疗法一起治疗显著地延缓了肿瘤生长并延长了生存。

[0007] 本公开还至少部分基于以下发现:本文所述的两亲性配体缀合物克服了实体瘤中显示的CAR-T细胞的不良应答。如本文所证明的,与对照和单独CAR-T细胞相比,当与两亲性配体缀合物组合施用时,表达肿瘤相关抗原的CAR-T细胞的施用能够延缓实体瘤的肿瘤生长并增加荷瘤小鼠的生存。

[0008] 此外,本公开至少部分基于以下发现:CAR-T细胞疗法与本公开的两亲性配体缀合物组合的增强的功效在淋巴充足(lymphoreplete)条件下保持。当前CAR-T细胞疗法需要淋

巴清除 (lymphodepletion), 这与严重的毒性有关。如本文所示, CAR-T 细胞疗法与本公开的两亲性配体缀合物组合导致了淋巴充足荷瘤小鼠的延缓的肿瘤生长和增加的存活。该延缓的肿瘤生长和增加的存活与接受相同治疗方案的淋巴清除小鼠相当。不希望被理论束缚, 这些结果表明本公开的两亲性配体缀合物的施用可以消除对在 CAR-T 细胞疗法之前淋巴清除的需要, 从而减轻受试者中的毒性。

[0009] 因此, 一方面, 本公开提供了一种两亲性配体缀合物, 其包含嵌合抗原受体 (CAR) 配体和可操作地连接至 CAR 配体的脂质。在一些方面, 脂质在生理条件下插入细胞膜中。在一些方面, 脂质在生理条件下结合白蛋白。在一些方面, 脂质在生理条件下插入细胞中并在生理条件下结合白蛋白。在一些方面, 两亲性配体缀合物包含脂质, 其运输至淋巴结并插入驻留抗原呈递细胞 (APC) 的膜中, 从而在细胞表面共同展示 CAR-T 细胞配体以及天然细胞因子/受体共刺激信号。

[0010] 在任何前述或相关方面, 本公开的两亲性配体缀合物包含二酰基脂质。在一些方面, 二酰基脂质包含包含 12-30 个烃单元的酰基链。在一些方面, 二酰基脂质包含包含 14-25 个烃单元的酰基链。在一些方面, 二酰基脂质包含包含 16-20 个烃单元的酰基链。在一些方面, 二酰基脂质包含包含 12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个烃单元。在一些方面, 二酰基脂质包含包含 18 个烃单元的酰基链。

[0011] 在任何前述或相关方面, 两亲性配体缀合物包含通过接头可操作地连接至脂质的 CAR 配体。在一些方面, 接头选自亲水性聚合物、一串亲水性氨基酸、多糖或其组合。在一些方面, 接头包含 "N" 个连续的聚乙二醇单元, 其中 N 在 25-50 之间。

[0012] 在其他方面, 本公开提供了一种两亲性配体缀合物, 其包含通过接头可操作地连接至二酰基脂质的 CAR 配体, 其中所述二酰基脂质包含包含 12-30 个烃单元的酰基链, 并且其中所述接头包含 "N" 个连续的聚乙二醇单元, 其中 N 在 25-50 之间。

[0013] 在任何前述或相关方面, 本公开的两亲性配体缀合物包含作为标签的 CAR 配体。在一些方面, 标签选自异硫氰酸荧光素 (FITC)、链霉抗生物素蛋白、生物素、二硝基苯酚、多甲藻素 (peridinin) 叶绿素蛋白复合物、绿色荧光蛋白、枣红蛋白 (PE)、辣根过氧化物酶、棕榈酰化、亚硝基化、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶和麦芽糖结合蛋白。

[0014] 在其他方面, 两亲性配体缀合物包含 CAR 配体, 其是肿瘤相关抗原或其片段。示例性肿瘤抗原包括 CD19、CD20、CD22、 κ 轻链、CD30、CD33、CD123、CD38、ROR1、ErbB3/4、EGFRvIII、癌胚抗原、EGP2、EGP40、间皮素、TAG72、PSMA、NKG2D 配体、B7-H6、IL-13 受体 $\alpha 2$ 、MUC1、MUC16、CA9、GD2、GD3、HMW-MAA、CD171、Lewis Y、G250/CALX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSC1、叶酸受体- α 、CD44v7/8、8H9、NCAM、VEGF 受体、5T4、胎儿 AchR、NKG2D 配体、CD44v6、TEM1 和/或 TEM8 中的一种或多种。

[0015] 在其他方面, 本公开提供了一种两亲性配体缀合物, 其包含通过聚乙二醇部分可操作地连接至异硫氰酸荧光素 (FITC) 的脂质。在其他方面, 本公开提供了一种两亲性配体缀合物, 其包含通过聚乙二醇部分可操作地连接至肿瘤相关抗原 (例如 CD19、CD20、CD22、HER2、EGFRvII) 的片段的脂质。在一些方面, 脂质是 1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 (DSPE) 并且聚乙二醇部分是 PEG-2000。

[0016] 在任何前述或相关方面, 本公开的两亲性配体缀合物包含脂质, 其中脂质是 1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 (DSPE)。在一些方面, 本公开的两亲性配体缀合物包含

通过PEG-2000连接至CAR配体的1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE)。

[0017] 在另一个方面,本公开提供了一种两亲性配体缀合物,其包含通过聚乙二醇部分可操作地连接至异硫氰酸荧光素(FITC)的1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE)。在其他方面,本公开提供了一种两亲性配体缀合物,其包含通过聚乙二醇部分可操作地连接至肿瘤相关抗原(例如CD19、CD20、CD22、HER2、EGFRvII)的片段的1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE)。

[0018] 在其他方面,本公开提供了一种两亲性配体缀合物,其包含通过PEG-2000可操作地连接至异硫氰酸荧光素(FITC)的1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE)。在其他方面,本公开提供了一种两亲性配体缀合物,其包含通过PEG-2000可操作地连接至肿瘤相关抗原(例如CD19、CD20、CD22、HER2、EGFRvII)的片段的1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE)。

[0019] 在任何前述或相关方面,本公开的两亲性配体缀合物包含结合至CAR的CAR配体,其中CAR包含共刺激结构域。

[0020] 在任何前述或相关方面,本公开的两亲性配体缀合物包含结合至CAR的CAR配体,其中CAR包含双特异性结合结构域。在一些方面,双特异性结合结构域包含标签结合结构域和肿瘤相关抗原结合结构域(例如CD19、CD20、CD22、HER2、EGFRvII)。在一些方面,双特异性结合结构域包含第一肿瘤相关抗原结合结构域(例如CD19、CD20、CD22、HER2、EGFRvII)和第二肿瘤相关抗原结合结构域(例如CD19、CD20、CD22、HER2、EGFRvII)。在一些方面,双特异性结合结构域包含标签结合结构域和肿瘤相关抗原结合结构域,其中CAR配体是标签。在一些方面,双特异性结合结构域包含第一肿瘤相关抗原结合结构域和第二肿瘤相关抗原结合结构域,并且其中CAR配体包含第一或第二肿瘤相关抗原或其片段。

[0021] 在任何前述或相关方面,本公开的两亲性配体缀合物包含包含标签的CAR配体,并且CAR包含标签结合结构域。在其他方面,CAR配体是肿瘤相关抗原或其片段,并且CAR包含肿瘤相关抗原结合结构域。

[0022] 在另一方面,本公开提供了一种两亲性配体缀合物,其包含可操作地连接至标签的二酰基脂质,其中标签结合至包含标签结合结构域的CAR。在另一方面,本公开提供了一种两亲性配体缀合物,其包含通过聚乙二醇部分可操作地连接至标签的二酰基脂质,其中标签结合至包含标签结合结构域的CAR。

[0023] 在另一方面,本公开提供了一种两亲性配体缀合物,其包含可操作地连接至标签的二酰基脂质,其中标签结合至包含标签结合结构域和肿瘤相关抗原结合结构域的CAR。在另一方面,本公开提供了一种两亲性配体缀合物,其包含通过聚乙二醇部分可操作地连接至标签的二酰基脂质,其中标签结合至包含标签结合结构域和肿瘤相关抗原结合结构域的CAR。

[0024] 在另一方面,本公开提供了一种两亲性配体缀合物,其包含可操作地连接至肿瘤相关抗原或其片段的二酰基脂质,其中肿瘤相关抗原结合至包含肿瘤相关抗原结合结构域(例如CD19、CD20、CD22、HER2、EGFRvII)的CAR。在另一方面,本公开提供了一种两亲性配体缀合物,其包含通过聚乙二醇部分可操作地连接至肿瘤相关抗原或其片段的二酰基脂质,其中肿瘤相关抗原或其片段结合至包含肿瘤相关抗原结合结构域的CAR。在一些方面,CAR包含第一肿瘤相关抗原结合结构域和第二肿瘤相关抗原结合结构域,其中两亲性配体缀合

物包含第一或第二肿瘤相关抗原。

[0025] 在其他方面,本公开提供了一种组合物,其包含如本文所述的两亲性配体缀合物和药学上可接受的载体。

[0026] 在另一方面,本公开提供了一种免疫原性组合物,其包含如本文所述的组合物和佐剂。

[0027] 在一些方面,免疫原型组合物包含佐剂,其中佐剂是两亲性寡核苷酸缀合物,其包含与脂质缀合的免疫刺激性寡核苷酸,具有或不具有接头,并且任选地是极性化合物。在一些方面,免疫刺激性寡核苷酸结合模式识别受体。在一些方面,免疫刺激性寡核苷酸包含 CpG。在一些方面,免疫刺激性寡核苷酸是针对 toll 样受体的配体。

[0028] 在任何前述或相关方面,两亲性寡核苷酸缀合物包含接头,其中接头是寡核苷酸接头。在一些方面,寡核苷酸接头包含“N”个连续的鸟嘌呤,其中N在0-2之间。在一些方面,两亲性寡核苷酸缀合物的脂质是二酰基脂质。在一些方面,二酰基脂质包含包含12-30个烃单元的酰基链。在一些方面,二酰基脂质包含包含14-25个烃单元的酰基链。在一些方面,二酰基脂质包含包含16-20个烃单元的酰基链。在一些方面,二酰基脂质包含包含12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个烃单元。在一些方面,二酰基脂质包含包含18个烃单元的酰基链。

[0029] 在其他方面,免疫原性组合物包含佐剂,其中所述是环状双GMP (CDG)。

[0030] 在另一方面,本公开提供了一种在受试者中激活CAR-T细胞、扩增CAR-T细胞或增加CAR-T细胞增殖的方法,其包括向受试者施用本文所述的两亲性配体缀合物、组合物或免疫原性组合物。在一些方面,CAR(-) T细胞的增殖在受试者中不增加。在一些方面,CAR包含标签结合结构域并且两亲性配体缀合物的CAR配体是标签。在一些方面,CAR包含肿瘤相关抗原结合结构域并且两亲性配体缀合物的CAR配体是肿瘤相关抗原或其片段。在一些方面,CAR包含标签结合结构域和肿瘤相关抗原结合结构域,并且两亲性配体缀合物的CAR配体是标签。在一些方面,CAR包含第一肿瘤相关抗原结合结构域和第二肿瘤相关抗原结合结构域,并且两亲性配体缀合物的CAR配体是第一或第二肿瘤相关抗原或其片段。

[0031] 在其他方面,本文提供了一种在有需要的受试者中降低或减少肿瘤大小或抑制肿瘤生长的方法,其包括向受试者施用本文所述的两亲性配体缀合物、组合物或免疫原性组合物,其中受试者正在接受或已接受CAR-T细胞疗法。在一些方面,CAR包含标签结合结构域并且两亲性配体缀合物的CAR配体是标签。在一些方面,CAR包含肿瘤相关抗原结合结构域并且两亲性配体缀合物的CAR配体是肿瘤相关抗原或其片段。在一些方面,CAR包含标签结合结构域和肿瘤相关抗原结合结构域,并且两亲性配体缀合物的CAR配体是标签。在一些方面,CAR包含第一肿瘤相关抗原结合结构域和第二肿瘤相关抗原结合结构域,并且两亲性配体缀合物的CAR配体是第一或第二肿瘤相关抗原或其片段。

[0032] 在其他方面,本公开提供了一种在具有癌症的受试者中诱导抗肿瘤应答的方法,其包括向受试者施用本文所述的两亲性配体缀合物、组合物或免疫原性组合物,其中受试者正在接受或已接受CAR-T细胞疗法。在一些方面,CAR包含标签结合结构域并且两亲性配体缀合物的CAR配体是标签。在一些方面,CAR包含肿瘤相关抗原结合结构域并且两亲性配体缀合物的CAR配体是肿瘤相关抗原或其片段。在一些方面,CAR包含标签结合结构域和肿瘤相关抗原结合结构域,并且两亲性配体缀合物的CAR配体是标签。在一些方面,CAR包含第

一肿瘤相关抗原结合结构域和第二肿瘤相关抗原结合结构域,并且两亲性配体缀合物的CAR配体是第一或第二肿瘤相关抗原或其片段。

[0033] 在另一方面,本公开提供了一种在受试者中刺激针对表达抗原的靶细胞群或靶组织的免疫应答的方法,所述方法包括向受试者施用靶向所述抗原的CAR-T细胞,和本文所述的两亲性配体缀合物、组合物或免疫原性组合物。在一些方面,免疫应答是T细胞介导的免疫应答或抗肿瘤免疫应答。在一些方面,靶细胞群或靶组织是肿瘤细胞或肿瘤组织。在一些方面,CAR包含标签结合结构域并且两亲性配体缀合物的CAR配体是标签。在一些方面,CAR包含肿瘤相关抗原结合结构域并且两亲性配体缀合物的CAR配体是肿瘤相关抗原或其片段。在一些方面,CAR包含标签结合结构域和肿瘤相关抗原结合结构域,并且两亲性配体缀合物的CAR配体是标签。在一些方面,CAR包含第一肿瘤相关抗原结合结构域和第二肿瘤相关抗原结合结构域,并且两亲性配体缀合物的CAR配体是第一或第二肿瘤相关抗原或其片段。

[0034] 在另一方面,本公开提供了一种在受试者中刺激针对表达抗原的靶细胞群或靶组织的免疫应答的方法,所述方法包括向受试者施用靶向所述抗原的CAR-T细胞,和本文所述的两亲性配体缀合物、组合物或免疫原性组合物,其中靶细胞群或靶组织是被病毒感染的细胞群或组织。在一些方面,病毒是人免疫缺陷病毒(HIV)。在一些方面,免疫应答是T细胞介导的免疫应答。在一些方面,CAR包含标签结合结构域并且两亲性配体缀合物的CAR配体是标签。

[0035] 在其他方面,本公开提供了一种治疗患有与抗原的表达或表达升高相关的疾病、病症或病情的受试者的方法,其包括向受试者施用靶向所述抗原的CAR-T细胞,和本文所述的两亲性配体缀合物、组合物或免疫原性组合物。在一些方面,抗原是病毒抗原或癌抗原。在一些方面,CAR包含标签结合结构域并且两亲性配体缀合物的CAR配体是标签。在一些方面,CAR包含肿瘤相关抗原结合结构域并且两亲性配体缀合物的CAR配体是肿瘤相关抗原或其片段。在一些方面,CAR包含标签结合结构域和肿瘤相关抗原结合结构域,并且两亲性配体缀合物的CAR配体是标签。

[0036] 在任何前述或相关方面,所述方法包括在接受CAR-T细胞之前向受试者施用两亲性配体缀合物、组合物或免疫原性组合物。在其他方面,所述方法包括在接受CAR-T细胞之后向受试者施用两亲性配体缀合物、组合物或免疫原性组合物。在另一方面,所述方法包括在施用CAR-T细胞的同时向受试者同时施用两亲性配体缀合物、组合物或免疫原性组合物。

[0037] 在任何前述或相关方面,本公开的两亲性配体缀合物被运输至淋巴结。在一些方面,两亲性配体缀合物被运输至腹股沟淋巴结和辅助淋巴结。在一些方面,两亲性配体缀合物被插入抗原呈递细胞的膜中。在一些方面,抗原呈递细胞是髓巨噬细胞、CD8+树突细胞和/或CD11b+树突细胞。

[0038] 在任何前述或相关方面,CAR配体在淋巴结中保留至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少8天、至少9天、至少10天、至少11天、至少12天、至少13天、至少14天、至少15天、至少16天、至少17天、至少18天、至少19天、至少20天、至少21天、至少22天、至少23天、至少24天或至少25天。

[0039] 在任何前述或相关方面,其中CAR配体是标签并且CAR包含标签结合结构域,所述方法还包括施用标记蛋白的制剂,和其中标签结合结构域结合标记蛋白。在一些方面,标记

蛋白的蛋白质是抗体或其抗原结合片段。在一些方面,标签结合结构域是抗体或其抗原结合片段。在一些方面,在施用CAR-T细胞和两亲性配体缀合物、组合物或免疫原性组合物之前,将标记蛋白的制剂施用于受试者。在其他方面,在施用CAR-T细胞和两亲性配体缀合物、组合物或免疫原性组合物的同时,将标记蛋白的制剂施用于受试者。在其他方面,在施用CAR-T细胞和两亲性配体缀合物、组合物或免疫原性组合物之后,将标记蛋白的制剂施用于受试者。

[0040] 在任何前述方面,CAR-T细胞在施用两亲性配体缀合物、组合物或免疫原性组合物之前施用。在其他方面,CAR-T细胞在施用两亲性配体缀合物、组合物或免疫原性组合物之后施用。在其他方面,CAR-T细胞在施用两亲性配体缀合物、组合物或免疫原性组合物的同时施用。

[0041] 在任何前述方面,将本文所述的两亲性配体缀合物、组合物或免疫原性组合物在非肿瘤引流淋巴结不经肠道地、在肿瘤引流淋巴结不经肠道地,或瘤内地施用。

[0042] 在任何前述方面,受试者患有癌症。在任何前述方面,受试者是人。

[0043] 在另一方面,本文提供了一种试剂盒,其包含容器,所述容器包含组合物,所述组合物包含本文所述的两亲性配体缀合物,和任选的药学上可接受的载体,以及包装说明书,其包括在接受CAR-T细胞疗法的个体中用于治疗癌症或延缓癌症发展的组合物的施用说明。在一些方面,CAR包含标签结合结构域并且两亲性配体缀合物的CAR配体是标签。在一些方面,CAR包含肿瘤相关抗原结合结构域并且两亲性配体缀合物的CAR配体是肿瘤相关抗原或其片段。在一些方面,CAR包含标签结合结构域和肿瘤相关抗原结合结构域,并且两亲性配体缀合物的CAR配体是标签。在一些方面,CAR包含第一肿瘤相关抗原结合结构域和第二肿瘤相关抗原结合结构域,并且两亲性配体缀合物的CAR配体是第一或第二肿瘤相关抗原或其片段。

[0044] 在其他方面,本公开提供了一种试剂盒,其包含药物,所述药物包含组合物,所述组合物包含本文所述的两亲性配体缀合物,任选的药学上可接受的载体,以及包装说明书,其包括在接受CAR-T细胞疗法的个体中用于激活CAR-T细胞、扩增CAR-T细胞或增加CAR-T细胞增殖的药物单独或与包含佐剂和任选的药学上可接受的载体的组合物组合的施用说明。在一些方面,CAR包含标签结合结构域并且两亲性配体缀合物的CAR配体是标签。在一些方面,CAR包含肿瘤相关抗原结合结构域并且两亲性配体缀合物的CAR配体是肿瘤相关抗原或其片段。在一些方面,CAR包含标签结合结构域和肿瘤相关抗原结合结构域,并且两亲性配体缀合物的CAR配体是标签。在一些方面,CAR包含第一肿瘤相关抗原结合结构域和第二肿瘤相关抗原结合结构域,并且两亲性配体缀合物的CAR配体是第一或第二肿瘤相关抗原或其片段。

[0045] 在其他方面,本公开提供了一种试剂盒,其包含容器,所述容器包含组合物,所述组合物包含本文所述的两亲性配体缀合物,和任选的药学上可接受的载体,以及包装说明书,其包括在接受CAR-T细胞疗法的个体中用于激活CAR-T细胞、扩增CAR-T细胞或增加CAR-T细胞增殖的组合物疫苗的施用说明。在一些方面,CAR包含标签结合结构域并且两亲性配体缀合物的CAR配体是标签。在一些方面,CAR包含肿瘤相关抗原结合结构域并且两亲性配体缀合物的CAR配体是肿瘤相关抗原或其片段。在一些方面,CAR包含标签结合结构域和肿瘤相关抗原结合结构域,并且两亲性配体缀合物的CAR配体是标签。在一些方面,CAR包含第

一肿瘤相关抗原结合结构域和第二肿瘤相关抗原结合结构域,并且两亲性配体缀合物的CAR配体是第一或第二肿瘤相关抗原或其片段。

[0046] 在一些方面,本公开提供了一种试剂盒,其包含药物,所述药物包含组合物,所述组合物包含本文所述的两亲性配体缀合物,任选的药学上可接受的载体,以及包装说明书,其包括在接受CAR-T细胞疗法的个体中用于激活CAR-T细胞、扩增CAR-T细胞或增加CAR-T细胞增殖的药物单独或与包含佐剂和任选的药学上可接受的载体的组合物组合的施用说明。在一些方面,CAR包含标签结合结构域并且两亲性配体缀合物的CAR配体是标签。在一些方面,CAR包含肿瘤相关抗原结合结构域并且两亲性配体缀合物的CAR配体是肿瘤相关抗原或其片段。在一些方面,CAR包含标签结合结构域和肿瘤相关抗原结合结构域,并且两亲性配体缀合物的CAR配体是标签。在一些方面,CAR包含第一肿瘤相关抗原结合结构域和第二肿瘤相关抗原结合结构域,并且两亲性配体缀合物的CAR配体是第一或第二肿瘤相关抗原或其片段。

[0047] 在任何前述方面,试剂盒包含佐剂和用于在接受CAR-T细胞疗法的个体中用于治疗癌症或延缓癌症发展的佐剂的施用说明。在一些方面,佐剂是包含本文所述的免疫刺激性寡核苷酸的两亲性寡核苷酸缀合物。

[0048] 在另一方面,本公开提供了本文所述的两亲性配体缀合物、组合物或免疫原性组合物在接受CAR-T细胞疗法的个体中用于激活CAR-T细胞、扩增CAR-T细胞或增加CAR-T细胞增殖的用途。

[0049] 在其他方面,本公开提供了本文所述的两亲性配体缀合物、组合物或免疫原性组合物在个体中用于治疗癌症或延缓癌症发展的用途。

[0050] 在另一方面,本公开提供了本文所述的两亲性配体缀合物、组合物或免疫原性组合物在制备用于在个体中治疗癌症或延缓癌症发展的药物中的用途。

[0051] 在其他方面,本公开提供了一种试剂盒,其包含药物,所述药物包含组合物,所述组合物包含本文所述的两亲性配体缀合物,和任选的药学上可接受的载体,以及包装说明书,其包括在接受CAR-T细胞疗法的个体中用于治疗病毒感染或延缓病毒感染发展的组合物的施用说明。在一些方面,试剂盒包含标记蛋白的制剂和用于施用标记蛋白的制剂的说明,其中所述CAR包含结合标记蛋白的标签结合结构域。在一些方面,试剂盒包含佐剂和用于在接受CAR-T细胞疗法的个体中用于治疗病毒感染或延缓病毒感染发展的佐剂的施用说明。在一些方面,佐剂是本文所述的两亲性寡核苷酸缀合物。

附图说明

[0052] 图1A提供了包含通过PEG-2000接头与小分子(顶部)、短线性肽(中间)或蛋白质结构域(底部)缀合的脂质尾部(例如DSPE)的两亲性配体缀合物的示意图。

[0053] 图1B提供了说明用包含嵌合抗原受体(CAR)配体的两亲性配体缀合物装饰的抗原呈递细胞与CAR-T细胞之间的相互作用的示意图。

[0054] 图2A提供了跨膜抗FITC CAR的结构域结构和方向的示意图。

[0055] 图2B提供了流式细胞数据的图,其描述了逆转录病毒转导至原代小鼠T细胞后抗FITC CAR表面表达的程度。

[0056] 图2C提供了描述了抗FITC CAR-T细胞在与用各种浓度的DSPE-PEG-FITC装饰的

K562细胞相互作用后产生的IFN γ 的定量的图。*** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

[0057] 图2D提供了描述在与FITC-CAR-T细胞共培养6小时后,DSPE-PEG-FITC包被的DC2.4细胞的细胞死亡百分比,效应物与靶标(E:T)比为10:1。*** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

[0058] 图3A提供了描述在以指定的各种剂量用DSPE-PEG-FITC或单独FITC接种疫苗的随后几天后,从小鼠中去除的淋巴结中的DSPE-PEG-FITC保留程度(通过辐射效率测定)的图。

[0059] 图3B提供了描述皮下注射后24小时引流腹股沟淋巴结中的不同淋巴样群体的DSPE-PEG-FITC摄取的图。

[0060] 图3C提供了流式细胞数据的图,其描述了皮下注射后三种不同APC对各种剂量的DSP-PEG-FITC的摄取。

[0061] 图4提供了描述在由PBS、c-di-GMP (CDG)、DSPE-PEG-FITC或DSPE-PEG-FITC+CDG初免(prime)的腹股沟淋巴结中FITC CAR-T细胞的增殖指数的图。疫苗接种后一天评估单独的PBS和CDG的效果。

[0062] 图5提供了描述在淋巴结细胞群中的抗原呈递细胞表面上的DSPE-PEG-FITC展示的图,有或没有CDG。在DSPE-PEG-FITC疫苗接种+/-CDG后24小时和3天收集淋巴结。*** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

[0063] 图6提供了描述在有或没有CDG的DSPE-PEG-FITC摄取CD11c+细胞上的各种共刺激分子的平均荧光强度(MFI)的图。*** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

[0064] 图7提供了描述实验时间轴的示意图(上图)和显示在淋巴清除CD45.2小鼠中进行了两轮DSPE-PEG-FITC疫苗接种的CD45.1FITC CAR-T细胞的百分比(下图)。*** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

[0065] 图8提供了描述实验时间轴的示意图(上图)和显示在淋巴充足CD45.2小鼠中进行了两轮DSPE-PEG-FITC疫苗接种的CD45.1FITC CAR-T细胞的百分比(下图)。*** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

[0066] 图9提供了显示针对反复DSPE-PEG-FITC疫苗接种的抗体应答随时间的图。*** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

[0067] 图10A提供了显示缀合至DSPE-PEG的EGFRvIII肽的示意图。

[0068] 图10B显示了用DSPE-PEG-EGFRvIII免疫后,在鼠T细胞上的EGFRvIII CAR的表面表达。

[0069] 图10C显示了通过细胞痕量紫跟踪确定的,在DSPE-PEG-EGFRvIII疫苗接种后48小时,淋巴结中EGFRvIII CAR T细胞的增殖。

[0070] 图11A提供了描述EGFRvIII CAR-T细胞或对照T细胞在与有或没有细胞表面上表达的EGFRvIII的CT-2A胶质瘤细胞相互作用后产生的IFN γ 的定量的图。*** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

[0071] 图11B提供了描述在与EGFRvIII CAR-T细胞或对照T细胞共培养后携带野生型EGFR或EGFRvIII的CT-2A胶质瘤细胞的死亡百分比的图。*** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ 。

[0072] 图12提供了描述接受DSPE-PEG-EGFRvIII("VAX")或对照疫苗接种的小鼠中EGFRvIII CAR T细胞的百分比的图。

[0073] 图13提供了显示循环CAR T或非CAR T细胞(n=5)在体外响应于有或没有DSPE-

PEG-EGFRvIII的EGFRvIII表达靶细胞(“VAX”)的细胞因子(IFN γ 和TNF α)分泌的图。

[0074] 图14提供了描述实验时间轴的示意图(上图)和显示EGFRvIII CAR-T细胞的肿瘤浸润的图,如通过在植入表达EGFRvIII的CT-2A细胞并施用DSPE-PEG-EGFRvIII(“PepVIII Vax”)的小鼠中的CAR-T细胞数每毫克肿瘤测量的。

[0075] 图15提供了显示肿瘤浸润CAR-T细胞响应于PBS或DSPE-PEG-EGFRvIII(“VAX”)的细胞因子(IFN γ 和TNF α)分泌的图。

[0076] 图16提供了描述颗粒酶B的表达水平(左图)和通过肿瘤浸润CAR-T细胞响应于PBS或DSPE-PEG-EGFRvIII(“PepVIII Vax”)的Ki67确定的增殖(右图)的图。

[0077] 图17提供了描述在有或没有DSPE-PEG-EGFRvIII(“VAX”)的肿瘤浸润EGFRvIII CAR T细胞上的PD-1和TIM3的表达的图。

[0078] 图18A提供了显示在淋巴清除条件下用EGFRvIII CAR-T+/-DSPE-PEG-EGFRvIII疫苗接种(“VAX”)治疗的携带CT-2A肿瘤的小鼠中的肿瘤体积的图。***p<0.0001,**p<0.01,*p<0.05。

[0079] 图18B提供了图18A的携带CT-2A肿瘤的小鼠的Kaplan-Meier生存图。

[0080] 图19提供了靶向FITC和黑色素瘤相关抗原TRP1两者的FITC抗原双特异性CAR设计的示意图。

[0081] 图20提供了描述T细胞表面上的FITC-TRP1 CAR表达的图。

[0082] 图21提供了描述与DSPE-PEG-FITC包被的K562细胞或B16F10细胞共培养时FITC-TRP1双特异性CAR T的IFN γ 分泌的图。单特异性FITC CAR T细胞和TRP1 CAR T细胞被作为对照包括。***p<0.0001,**p<0.01,*p<0.05。

[0083] 图22提供了描述当与FITC-TRP1双特异性CAR-T或单特异性TRP1 CAR T细胞体外共培养时,表达TRP1的靶细胞的细胞死亡百分比的图。以10:1的效应物与靶标(E:T)比率建立共培养6小时。

[0084] 图23提供了描述通过细胞痕量紫跟踪测量的,在DSPE-PEG-FITC疫苗接种48小时在淋巴结中的FITC-TRP1 CAR-T增殖的图。

[0085] 图24A和24B显示了单独用FITC-TRP1双特异性CAR-T疗法治疗,或用CAR-T加上DSPE-PEG-FITC疫苗接种(“VAX”)与淋巴清除预调理治疗的B16F10荷瘤小鼠的肿瘤生长(图24A)和动物存活(图24B)。

[0086] 图25提供了描述接受PBS或DSPE-PEG-FITC疫苗接种(“VAX”)的小鼠的外周血中FITC-TRP1双特异性CAR-T的数量的图。

[0087] 图26提供了描述接受PBS或DSPE-PEG-FITC疫苗接种的小鼠中FITC/TRP1-CAR T细胞向B16F10肿瘤中的浸润的图。

[0088] 图27A和27B显示了单独用FITC-TRP1双特异性CAR-T疗法治疗,或用CAR-T加上DSPE-PEG-FITC疫苗接种(“VAX”)治疗的淋巴充足B16F10荷瘤小鼠的肿瘤生长(图27A)和动物存活(图27B)。

具体实施方式

[0089] 总览

[0090] 各种疾病的特征在于患者中发生进行性免疫抑制。恶性肿瘤患者中免疫应答受损

的存在已被特别记录。癌症患者和荷瘤小鼠表现出多种免疫功能改变,例如延迟型超敏反应的降低、裂解功能的降低和淋巴细胞的增殖应答。增强癌症患者的免疫功能可对肿瘤控制有益处。

[0091] 嵌合抗原受体(CAR) T细胞疗法已经成功治疗血液系统恶性肿瘤。然而CAR-T细胞无法在某些患者中功能性地持续,并且在实体瘤中通常显示出不良应答。当前用于CAR-T疗法的方案依赖于大量CAR-T细胞的输注,其可消失或迅速失去对肿瘤的功能活性。在临床前动物模型中,已知通过疫苗接种体内扩增T细胞是增强T细胞疗法功效的最有效策略之一,但是传统疫苗无法通过其嵌合抗原受体增强CAR-T。

[0092] 基于本公开,使用包含嵌合抗原受体的配体和脂质的两亲性配体缀合物实现了CAR-T激活和增殖的增强。本公开的两亲性配体缀合物通过刺激体内转移的CAR-T细胞提供了针对当前朝向产生治疗性CAR-T细胞的方法的若干缺点的解决方案,其可降低持久性治疗应答所需的输注CAR-T细胞的量,并可减轻对患者淋巴清除的需要。

[0093] 定义

[0094] 除非另有说明,否则权利要求和说明书中使用的术语定义如下。

[0095] 必须注意的是,如在说明书和所附权利要求中使用的单数形式“一个”、“一个”和“该”包括复数指示物,除非上下文另外明确指出。

[0096] 如在本文中所使用的,“约”将被普通技术人员理解并将在一定程度上根据其使用的上下文而变化。如果在给定使用上下文的情况下存在对普通技术人员而言不清除的术语使用,则“约”表示特定值的正负10%。

[0097] 如在本文中所使用的,术语“佐剂”指具有特定免疫原或抗原的化合物,其将增强或改变或修饰所得的免疫应答。免疫应答的修饰包括强化或拓宽抗体和细胞免疫应答中任一或两者的特异性。免疫应答的修饰还可以意味着减少或抑制某些抗原特异性免疫应答。在某些实施方式中,佐剂是环状二核苷酸。在一些实施方式中,佐剂是如本文所述的免疫刺激性寡核苷酸。在一些实施方式中,在两亲性配体缀合物或包含缀合物的组合物的施用之前、同时或之后施用佐剂。在一些实施方式中,佐剂以与两亲性配体缀合物相同的组成供体制配。

[0098] “氨基酸”指天然存在和合成的氨基酸,以及以与天然存在的氨基酸相似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些,以及后来被修饰的氨基酸,例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的化合物,即与氢、羧基、氨基和R基团键合的 α 碳,例如高丝氨酸、正亮氨酸、蛋氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。这种类似物具有修饰的R基团(例如正亮氨酸)或修饰的肽主链,但保留了与天然存在氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构但与天然存在氨基酸相似的方式起作用的化合物。

[0099] 氨基酸在本文中可以用它们众所周知的三个字母符号或IUPAC-IUB生化命名委员会推荐的一个字母符号来表示。同样,核苷酸可指用它们普遍接受的单字母代码表示。

[0100] “氨基酸取代”指用第二个不同的“取代”氨基酸残基取代预定氨基酸序列(起始多肽的氨基酸序列)中的至少一个现有氨基酸残基。“氨基酸插入”指将至少一个另外的氨基酸掺入预定的氨基酸序列中。虽然插入通常由一个或两个氨基酸残基的插入组成,但是目

前可以进行更大的“肽插入”，例如约三个至约五个或甚至多达约十个、十五个、或二十个氨基酸残基的插入。插入的残基可以是如上所述的天然存在或非天然存在的。“氨基酸缺失”指从预定氨基酸序列中去除至少一个氨基酸残基。

[0101] 如在本文中所使用的，“两亲性”或“两亲性的”指包含亲水性头部基团和疏水性尾部从而形成两亲性缀合物的缀合物。在一些实施方式中，两亲性缀合物包含嵌合抗原受体 (CAR) 配体和一个或多个疏水性脂质尾部，在本文中称为“两亲性配体缀合物”。在一些实施方式中，两亲性缀合物还包含聚合物 (例如聚乙二醇)，其中聚合物缀合至一个或多个脂质或CAR配体。

[0102] 术语“改善”指在疾病状态例如癌症的治疗中任何治疗有益的结果，包括预防、减轻其严重性或进展、缓解或治愈。

[0103] 如在本文中所使用的，术语“抗原制剂”或“抗原组合物”或“免疫原性组合物”指当施用于脊椎动物，尤其是哺乳动物时，将诱导免疫应答的制剂。

[0104] 术语“抗原呈递细胞”或“APC”是在其表面展示与MHC复合的外源抗原的细胞。T细胞使用T细胞受体 (TCR) 识别该复合物。APC的实例包括但不限于树突细胞 (DC)、外周血单核细胞 (PBMC)、单核细胞 (例如THP-1)、B淋巴细胞 (例如C1R.A2、1518B-LCL) 和单核细胞来源的树突细胞 (DC)。一些APC通过吞噬作用或受体介导的内吞作用内在化抗原。

[0105] 如在本文中所使用的，术语“双特异性”或“双功能抗体”指具有两个不同重链/轻链对和两个不同结合位点的人工合成抗体或其片段。双特异性抗体可以通过多种方法产生，其包括杂交瘤的融合或Fab'片段的连接。参见例如Songsivilai&Lachmann, (1990) Clin.Exp.Immunol.79:315-321;Kostelny等, (1992) J.Immunol.148:1547-1553。

[0106] 如在本文中所使用的，术语“嵌合抗原受体 (CAR)”指人工跨膜蛋白受体，其包含 (i) 能够结合至少一种预定的CAR配体或抗原的细胞外结构域，或预定的CAR配体和抗原；(ii) 细胞内区域，其包含一个或多个衍生自信号转导蛋白的细胞质结构域，所述信号转导蛋白不同于从其衍生细胞外结构域的多肽；和 (iii) 跨膜结构域。“嵌合抗原受体 (CAR) 有时称为“嵌合受体”，“T体”或“嵌合免疫受体 (CIR)”。

[0107] 与“CAR抗原”可互换使用的短语“CAR配体”指可特异性地结合至CAR (例如CAR的细胞外结构域) 的天然或合成的分子 (例如小分子、蛋白质、肽、脂质、碳水化合物、核酸) 或其部分或其片段。在一些实施方式中，CAR配体是肿瘤相关抗原或其片段。在一些实施方式中，CAR配体是标签。基于细胞疗法中所使用的CAR，本领域技术人员可以确定用于两亲性配体缀合物的合适的CAR配体。

[0108] “细胞内信号传导结构域”指已知能起传递信号功能的任何寡肽或多肽结构域，其引起细胞中生物过程的激活或抑制，例如免疫细胞例如T细胞或NK细胞的激活。实例包括ILR链、CD28和/或CD3ζ。

[0109] 如在本文中所使用的，“癌抗原”指 (i) 肿瘤特异性抗原，(ii) 肿瘤相关抗原，(iii) 表达肿瘤特异性抗原的细胞，(iv) 表达肿瘤相关抗原的细胞，(v) 肿瘤上的胚胎抗原，(vi) 自体肿瘤细胞，(vii) 肿瘤特异性膜抗原，(viii) 肿瘤相关膜抗原，(ix) 生长因子受体，(x) 生长因子配体，和 (xi) 与癌症相关的任何其他类型的抗原或抗原呈递细胞或材料。

[0110] 如在本文中所使用的，“CG寡脱氧核苷酸 (CG ODN)”，也称为“CpG ODN”，是短的单链合成DNA分子，其包含胞嘧啶核苷酸 (C) 和鸟嘌呤核苷酸 (G)。在某些实施方式中，免疫刺

激性寡核苷酸是CG ODN。

[0111] 如在本文中所使用的,术语“共刺激配体”包括抗原呈递细胞(例如APC、树突细胞、B细胞等)上的分子,其特异性地结合T细胞上的同源共刺激分子,从而提供信号,该信号除了例如由TCR/CD3复合物与载有肽的MHC分子结合提供的主要信号外,它还介导T细胞应答,其包括但不限于增殖、激活、分化等。共刺激配体可包括但不限于CD7、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、诱导性共刺激配体(ICOS-L)、细胞间粘附分子(rCAM)、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、淋巴毒素 β 受体、TR6、ILT3、ILT4、HVEM、结合Toll配体受体的激动剂或抗体和特异性结合B7-H3的配体。共刺激配体还包括特别地与存在在T细胞上的共刺激分子结合的抗体,例如但不限于CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、和特异性结合CD83的配体。

[0112] “共刺激分子”指T细胞上的同源结合伴侣,其余共刺激配体特异性地结合,从而介导T细胞的共刺激应答,例如但不限于增殖。共刺激分子包括但不限于MHC I类分子、BTLA和Toll配体受体。

[0113] 如在本文中所使用的,“共刺激信号”指与主要信号例如TCR/CD3连接结合而导致T细胞增殖和/或关键分子上调或下调的信号。

[0114] “衍生自”指定多肽或蛋白质的多肽或氨基酸序列指多肽的来源。优选地,衍生自特定序列的多肽或氨基酸序列具有与该序列或其部分基本上相同的氨基酸序列,其中该部分由至少10-20个氨基酸,优选地至少20-30个氨基酸,更优先地至少30-50个氨基酸组成,或本领域的普通技术人员可以确定其起源于序列。

[0115] 相对于起始多肽,衍生自另一种肽的多肽可具有一个或多个突变,例如一个或多个氨基酸残基已被另一个氨基酸残基取代或具有一个或多个氨基酸残基插入或缺失。

[0116] 多肽可包含非天然存在的氨基酸序列。这样的变体必须与起始分子具有小于100%序列同一性或相似性。在优选的实施方式中,变体将具有与起始多肽的氨基酸序列约75%至小于100%氨基酸序列同一性或相似性的氨基酸序列,更优选约80%至小于100%,更优选约85%至小于100%,更优选约90%至小于100%,(例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)和最优约95%至小于100%,即在变体分子的长度上。

[0117] 在一个实施方式中,起始多肽序列和从其衍生的序列之间存在一种氨基酸差异。相对于该序列的同一性或相似性在本文中定义为在比对序列并在必要时引入缺口以达到最大序列同一性百分比后,候选序列中与起始氨基酸残基相同(即相同残基)的氨基酸残基的百分比。

[0118] 如在本文中所使用的,术语抗原“交叉呈递”指通过APC上的MHC I类和II类分子将外源蛋白抗原呈递给T细胞。

[0119] 如在本文中所使用的,术语“细胞毒性T淋巴细胞(CTL)应答”指由细胞毒性T细胞诱导的免疫应答。CTL应答主要由CD8⁺T细胞介导。

[0120] 如在本文中所使用的,术语“有效剂量”或“有效剂量”定义为足以达到或部分达到所需效果的量。术语“治疗有效剂量”定义为足以治愈或至少部分遏制已患有该疾病的患者的疾病及其并发症的量。该用途的有销量将取决于待治疗疾病的严重程度以及患者自身免疫系统的一般状态。

[0121] 如在本文中所使用的,术语“效应细胞”或“效应免疫细胞”指参与免疫应答例如促进免疫效应应答的细胞。在一些实施方式中,免疫效应细胞特异性地识别抗原。免疫效应细胞的实例包括但不限于自然杀伤(NK)细胞、B细胞、单核细胞、巨噬细胞、T细胞(例如细胞毒性T淋巴细胞(CTL))。在一些实施方式中,效应细胞是T细胞。

[0122] 如在本文中所使用的,术语“免疫效应子功能”或“免疫效应子应答”指促进对靶标的免疫应答的免疫效应细胞的功能或应答。

[0123] 如在本文中所使用的,术语“血液癌症”包括淋巴瘤、暴雪并、骨髓瘤或淋巴恶性肿瘤以及脾脏和淋巴结癌。示例性淋巴瘤包括B细胞淋巴瘤(B细胞血液癌症)和T细胞淋巴瘤。B细胞淋巴瘤包括霍奇金淋巴瘤和大部分非霍奇金淋巴瘤。B细胞淋巴瘤的非限制性实例包括弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、黏膜相关淋巴组织淋巴瘤、小细胞淋巴细胞性淋巴瘤(与慢性淋巴细胞性白血病重叠)、套细胞淋巴瘤(MCL)、伯基特淋巴瘤、纵隔大B细胞淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症、结节边缘区B细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、淋巴瘤肉芽肿。T细胞淋巴瘤的非限制性实例包括结外T细胞淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤和血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤。血液恶性肿瘤还包括白血病,例如但不限于继发性白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性骨髓性白血病、慢性粒细胞性白血病和急性淋巴细胞白血病。血液恶性肿瘤还包括骨髓瘤,例如但不限于多发性骨髓瘤和冒烟型骨髓瘤。术语血液恶性肿瘤包括其他血液学和/或B细胞或T细胞相关癌症。

[0124] 如在本文中所使用的,“免疫细胞”是造血起源的细胞并在免疫应答中起作用。免疫细胞包括淋巴细胞(例如B细胞和T细胞)、自然杀伤细胞和髓样细胞(例如单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、嗜碱粒细胞和粒细胞)。

[0125] 如在本文中所使用的,“免疫刺激性寡核苷酸”是可以刺激(例如诱导或增强)免疫应答的寡核苷酸。

[0126] 术语“诱导免疫应答”和“增强免疫应答”可互换使用,并且指对特定抗原的免疫应答(即被动或适应性)的刺激。关于诱导CDC或ADCC所用的术语“诱导”指特定的直接细胞杀伤机制的刺激。

[0127] 如在本文中所使用的,“需要预防”、“需要治疗”或“需要其”的受试者指由合适的医生(例如就人类而言,医生、护士或执业护士;就非人哺乳动物而言,兽医)判断的受试者,将合理地受益于给定的治疗(例如用包含两亲性配体缀合物的组合物治疗)。

[0128] 术语“体内”指在活生物体中发生的过程。

[0129] 如在本文中所使用的,术语“连接”、“可操作地连接”、“融合”或“融合”可互换使用。这些术语指通过包括化学缀合或重组DNA技术的合适方式将两个或更多元件或组分或结构域连接在一起。化学缀合方法(例如使用异双功能交联剂)以及重组DNA技术方法是本领域已知的。

[0130] 术语“脂质”指可溶于非极性溶剂且不溶于水的生物分子。脂质通常被描述为疏水性或两亲性分子,其允许它们能够在水性环境中形成例如泡囊或膜的结构。脂质包括脂肪酸、甘油酯、甘油磷脂、鞘脂、固醇脂质(包括胆固醇)、烯醇脂、糖脂和聚酮化合物。在一些实施方式中,适用于本公开的两亲性配体缀合物的脂质在生理条件下结合人血清白蛋白。在一些实施方式中,适用于本公开的两亲性配体缀合物的脂质在生理条件下插入细胞膜中。

在一些实施方式中,脂质在生理条件下结合白蛋白并插入细胞膜中。在一些实施方式中,脂质是二酰基脂质。在一些实施方式中,二酰基脂质包含多于12个碳。在一些实施方式中,二酰基脂质包含至少12个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个或至少18个碳。

[0131] 如在本文中所使用的,术语“哺乳动物”或“受试者”或“患者”包括人类和非人类,并且包括但不限于人类、非人类灵长类、犬科动物、猫科动物、鼠、牛、马类和猪。

[0132] “核酸”指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。除非特别限定,术语涵盖含有天然核苷酸的已知类似物的核酸,其具有与参考核酸相似的结合特性并且以与天然存在核苷酸类似的方式被代谢。除非另有说明,特定的核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如简并密码子替换)和互补序列以及明确指出的序列。具体而言,简并密码子替换可通过产生序列来实现,其中一个或多个选择的(或全部)密码子的第三位置被混合的碱基和/或脱氧肌苷残基取代(Batzner等,Nucleic Acid Res.19:5081,1991; Ohtsuka等,J.Biol.Chem.260:2605-2608,1985);和Cassol等,1992;Rossolini等,Mol.Cell.Probes 8:91-98,1994)。对于精氨酸和亮氨酸,在第二碱基处的修饰也可以是保守的。术语核酸可与基因、cDNA和基因编码的mRNA互换使用。

[0133] 本发明的多核苷酸可以由任何多核糖核苷酸或多脱氧核糖核苷酸组成,其可以是未修饰的RNA或DNA或修饰的RNA或DNA。例如,多核苷酸可以由单链和双链DNA组成,DNA是单链和双链区域、单链和双链RNA的混合物,并且RNA是单链和双链区域的混合物,包含抗原是单链或更通畅是双链或单链和双链区域的混合物的DNA和RNA的杂合分子。另外,多核苷酸可以由包含RNA或DNA或RNA和DNA的三链区域组成。多核苷酸还可以包含一个或多个修饰的碱基或处于其他原因修饰的DNA或RNA主链。“修饰的”碱基包括例如三苯甲基化碱基和不常见碱基例如肌苷。可以对DNA和RNA进行多种修饰;因此,“多核苷酸”包括化学、酶或代谢修饰的形式。

[0134] 在一些实施方式中,本发明的肽由核苷酸序列编码。本发明的核苷酸序列可用于许多应用,包括:克隆、基因疗法、蛋白表达和纯化、突变导入、有需要的宿主的DNA疫苗接种、例如被动免疫的抗体生产、PCR、引物和探针生成等。

[0135] 如在本文中所使用的,“肠胃外施用”、“非肠道施用”和其他语法上等价的短语指除肠内和局部施用外的给药方式,通常通过注射,并且包括但不限于静脉内、鼻内、眼内、肌肉内、动脉内、囊内的、囊内的、眶内的、心脏内的、皮内的、腹膜内的、经气管壁的、皮下的、表皮下的、关节内的、被膜下的、蛛网膜下的、脊柱内的、硬膜外、大脑内的、颅内的、颈内动脉和胸骨内注射和输注。

[0136] 如在本文中通常所使用的,“药学上可接受的”指那些化合物、材料、组合物和/或剂型,其在合理的医学判断范围内,适用于与人和动物的组织、器官和/或体液接触,而没有过度毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症与合理的受益/风险比相称。

[0137] 如在本文中所使用的,术语“生理条件”指受试者的体内条件。在一些实施方式中,生理条件指中性pH(例如pH6-8之间)。

[0138] “多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于氨基酸聚合物,其中一个或多个氨基酸残基是相应的天然存在氨基酸的人工化学模拟物,以及天然存在氨基酸聚合物和非天然存在氨基酸聚合物。

[0139] 如在本文中所使用的,“小分子”是具有小于约500道尔顿分子量的分子。

[0140] 如在本文中所使用的,术语“受试者”包括人类或非人类动物。例如,本发明的方法和组合物可以用于治疗患有癌症或感染的受试者。术语“非人类动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,例如非人类灵长类动物、绵阳、狗、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

[0141] 术语“有效量”或“足以……的量”指足以产生所需效果的量,例如足以减小肿瘤直径的量。

[0142] 术语“T细胞”指白细胞的一种,其通过细胞表面存在T细胞受体可以将其与其他白细胞区分开。T细胞有几个子集,包括但不限于T辅助细胞(即 T_H 细胞或 $CD4^+$ T细胞)和亚型,其包括 T_H1 、 T_H2 、 T_H3 、 T_H17 、 T_H9 和TFH细胞、细胞毒性T细胞(即TC细胞、 $CD8^+$ T细胞、细胞毒性T淋巴细胞、T杀伤细胞、杀伤性T细胞)、记忆T细胞和亚型,其包括中央记忆T细胞(T_{CM} 细胞)、效应记忆T细胞(T_{EM} 和 T_{EMRA} 细胞)和常驻记忆T细胞(T_{RM} 细胞),调节性T细胞(即 T_{reg} 细胞或抑制性T细胞)和亚型,其包括 $CD4^+FOXP3^+T_{reg}$ 细胞、 $CD4^+FOXP3^-T_{reg}$ 细胞、Tr1细胞、 T_H3 细胞、和 $T_{reg}17$ 细胞、自然杀伤性T细胞(即NKT细胞)、粘膜相关不变T细胞(MAIT)和 $\gamma\delta$ T细胞($\gamma\delta$ T细胞),其包括 $V\gamma 9/V\delta 2$ T细胞。前述或未提及的T细胞中的任何一个或多个可以是用于本发明的使用方法的靶细胞类型。

[0143] 如在本文中所使用的,术语“T细胞激活”或“T细胞的激活”指成熟的T细胞在其表明表达抗原特异性T细胞受体、识别其同源抗原和通过进入细胞周期、分析细胞因子或裂解酶、启动或胜任执行基于细胞的效应子功能来做出反应的细胞过程。T细胞激活需要至少两个信号以完成完全激活。第一次发生在抗原主要组织相容性复合物(MHC)与T细胞抗原特异性受体(TCR)的结合之后,并且第二次是通过随后通刺激分子(例如CD29)的结合。这些信号被传递至细胞核,并导致T细胞的克隆扩增,细胞表面激活标记物的上调,分化为效应细胞,诱导细胞毒性或细胞因子分泌,诱导细胞凋亡,或其组合。

[0144] 如在本文中所使用的,术语“T细胞介导的应答”指由T细胞介导的任何应答,其包括但不限于效应T细胞(例如 $CD8^+$ 细胞)和辅助T细胞(例如 $CD4^+$ 细胞)。T细胞介导的应答包括例如T细胞细胞毒性和增殖。

[0145] 术语“T细胞细胞毒性”包括由 $CD8^+$ T细胞介导的任何免疫应答。示例性免疫应答包括细胞因子产生, $CD8^+$ T细胞增殖,颗粒酶或穿孔素的产生和传染剂的清除。

[0146] “治疗性抗体”是抗体、抗体的片段、或衍生自抗体的构建体,并且可以结合靶细胞上的细胞表面抗原以引起治疗效果。这样的抗体可以是嵌合、人源化或完全人源的抗体。用于产生这样的抗体的方法是本领域已知的。这样的抗体包括抗体、小抗体和双抗体的单链Fc片段。本领域已知可用于癌症治疗的任何治疗性抗体可与本文所述的组合物一起用于联合治疗。治疗性抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体。在优选的实施方式中,治疗性抗体靶向癌症抗原。在一些实施方式中,治疗性抗体包含标签结合结构域,其被包含标签的两亲性配体缀合物识别。

[0147] 如在本文中所使用的,“治疗性蛋白”指可以作为药物施用于受试者的任何多肽、蛋白质、蛋白质变体、融合蛋白和/或其片段。

[0148] 术语“治疗有效量”是有效改善疾病症状的量。治疗有效量可以是“预防有效量”,因为预防可以视为治疗。

[0149] 如在本文中所使用的术语“治疗”、“治疗”和“治疗”指本文所述的治疗或预防措

施。”治疗”方法采用向需要这种治疗的受试者施用本公开的两亲性配体缀合物,例如接受CAR T细胞治疗的受试者。在一些实施方式中,将两亲性配体缀合物施用于需要增强针对特定抗原的免疫应答的受试者或最终可能患有这种疾病的受试者,以预防、治愈、延迟、降低疾病或复发疾病的一种或多种症状或其严重性,或为了延长受试者的生存期,使其超过在没有这种治疗的情况下所预期的寿命。

[0150] 如在本文中所使用的,“疫苗”指包含如本文所述的两亲性配体缀合物与佐剂组合的制剂,其形式为能够施用于脊椎动物并诱导保护性免疫应答,足以诱导免疫以预防和/或改善感染或疾病和/或减少感染或疾病的至少一种症状和/或增强另一剂量的合成纳米颗粒的功效。通常,疫苗包含常规的盐水或缓冲水溶液介质,其中将本文所述的组合物悬浮或溶解其中。以这种形式,本文所述的组合物用于预防、改善或以其他方式治疗感染或疾病。导入宿主后,疫苗引起免疫应答,其包括但不限于抗体和/或免疫因子的产生和/或细胞毒性T细胞、抗原呈递细胞、辅助T细胞、树突细胞和/或其他细胞应答的激活。

[0151] 嵌合抗原受体

[0152] 在一些方面,本公开提供了用于与嵌合抗原受体(CAR)效应细胞联合进行的组合物和方法。

[0153] 嵌合抗原受体(CAR)是基因工程的人工跨膜受体,其赋予免疫效应细胞(例如T细胞、自然杀伤细胞或其他免疫细胞)配体任意特异性并且其导致其识别和结合配体后激活效应细胞。通常这些受体用于将单克隆抗体的抗原特异性赋予T细胞。

[0154] 在一些实施方式中,CAR包含三个结构域:1)胞外结构域,其通常包含信号肽、配体或抗原识别区(例如scFv)和柔性间隔基;2)跨膜(TM)结构域;3)胞内结构域(也称为“激活结构域”),其通常包含一个或多个细胞内信号传导结构域。CAR的胞外结构域位于细胞外部,并暴露于细胞外空间,因此它易于与其关联配体相互作用。TM结构域允许CAR锚定在效应细胞的细胞膜中。第三个胞内结构域(也称为“激活结构域”)有助于在与CAR与其特异性配体结合后效应细胞激活。在一些实施方式中,效应细胞激活包括细胞因子的诱导和趋化因子的产生,以及细胞的溶细胞活性的激活。在一些实施方式中,CAR重定向细胞毒性至肿瘤细胞。

[0155] 在一些实施方式中,CAR包含与特异性靶配体或抗原结合的配体或抗原特异性识别结构域(也称为结合结构域)。在一些实施方式中,结合结构域是单链抗体可变片段(scFv)、即系锁配体或共受体的胞外结构域,融合至跨膜结构域,其又连接至信号传导结构域。在一些实施方式中,信号传导结构域衍生自CD3 β 或FcR γ 。在一些实施方式中,CAR包含衍生自例如CD28、CD137(也称为4-1BB)、CD134(也称为OX40)和CD278(也称为ICOS)的蛋白质的一个或多个共刺激结构域。

[0156] CAR的抗原结合结构域与其靶抗原在靶细胞表面上的结合导致CAR的聚集并将激活刺激传递至含CAR的细胞。在一些实施方式中,CAR的主要特征是其重定向免疫效应细胞特异性的能力,从而触发增殖、细胞因子产生、吞噬作用或分子的产生,所述分子可以利用主要组织相容性(MHC)独立的方式介导表达靶抗原细胞的细胞凋亡,从而利用单克隆抗体、可溶性配体或细胞特异性共受体的细胞特异性靶向能力。尽管已显示工程改造的,包含来自CD3 ζ 或FcR的信号传导结构域的基于scFv的CAR能够为T细胞激活和效应物功能递送有效的信号,但是在没有伴随共刺激信号存在下,它们不足以引发促进T细胞存活和扩增的信

号。新一代的CAR,其包含结合结构域、铰链、跨膜和衍生自CD3 ζ 或FcR的信号传导结构域以及一个或多个共刺激信号结构域(例如衍生自CD28、CD137、CD134和CD278的胞内共刺激结构域)已显示在动物模型和癌症患者中更有效地指导抗肿瘤活性以及增强表达CAR的T细胞体外细胞因子分泌、裂解活性、存活和增殖(Milone等,Molecular Therapy,2009;17:1453-1464;Zhong等,Molecular Therapy,2010;18:413-420;Carpenito等,PNAS,2009;106:3360-3365)。

[0157] 在一些实施方式中,表达嵌合抗原受体的效应细胞(例如CAR-T细胞)是衍生自患有疾病或病症的患者并通常在体外修饰以表达至少一个对配体具有特异性的CAR的细胞。细胞执行至少一种效应子功能(例如细胞因子的诱导),其通过配体与CAR特异性结合被刺激或诱导并且其对于相同患者的疾病或病症的治疗有用。效应细胞是T细胞(例如细胞毒性T细胞或辅助T细胞)。本领域技术人员将理解,其他细胞类型(例如自然杀伤细胞或干细胞)可表达CAR,并且嵌合抗原受体效应细胞可包含除T细胞以外的效应细胞。在一些实施方式中,效应细胞是T细胞(例如细胞毒性T细胞),当与靶或靶细胞(例如癌细胞)接触或接近时,其在靶细胞上发挥其效应物功能(例如细胞毒性T细胞相应)(参见例如Chang and Chen (2017) Trends Mol Med 23 (5):430-450)。

[0158] T细胞长时间暴露于它们的同源抗原可导致效应子功能衰竭,从而使感染或转化的细胞得以持久存在。最近开发的使用诱导免疫检查点阻断试剂以刺激或复原宿主效应子功能的策略已成功治疗多种癌症。新兴证据表明T细胞衰竭也可代表表达嵌合抗原受体的T细胞(CAR-T细胞)维持长寿抗肿瘤活性的重大障碍。在一些实施方式中,CAR转导之前患者采集的T细胞的分化状态以及患者在重新引入CAR-T细胞之前所经历的调理方案(例如添加或排除烷基化剂、氟达拉滨、全身辐照)可以深刻地影响CAR-T细胞的持久性和细胞毒性潜力。(通过抗CD3/CD28或刺激细胞)刺激和(通过细胞因子,例如IL-2)扩增T细胞群的体外培养条件也可以改变CAR-T细胞的分化状态和效应子功能(Ghoneim等,(2016) Trends in Molecular Medicine 22 (12):1000-1011)。

[0159] 本公开解决了用于产生治疗性CAR-T细胞的当前方法的若干弱点。治疗性CAR-T细胞制备的现有方法通常需要体外进行大量细胞培养以获得足够数量的修饰的细胞用于过继细胞转移,在此期间,T细胞的自然特性或分化状态可能已经改变并且T细胞功能可能已经妥协。此外,当患者急需治疗以预防疾病进展时,产生足够数量的CAR-T细胞所需的时间可能与治疗患者的机会不符,其导致治疗失败和患者死亡。本公开提供的组合物和方法绕过了这一障碍,并通过刺激体内CAR-T细胞激活和增殖提供一种可取和更生理相关的治疗方法。此外,目前CAR-T细胞疗法方案需要先进行淋巴清除,其削弱了病人的健康并破坏可以改善CAR-T疗效的营养环境。在一些方面,本公开提供了刺激过继转移CAR-T细胞的方法,使得它们仍可以在没有淋巴清除时在体内植入、主动增殖和扩增。

[0160] 目前的CAR-T细胞疗法仅依靠工程化共刺激信号以保持CAR-T效应子功能。其他共刺激信号和天然刺激环境的缺乏可能导致T细胞成熟不完全并增加T细胞衰竭。在一个方面,本公开提供了招募T细胞至淋巴结、免疫细胞的省里相关激活环境和佐剂共同施用以激活APC的方法和组合物,其提供了用于最佳CAR-T细胞激活的整套基本共刺激信号。

[0161] 在一些实施方式中,特别是对于ALL和/或NHL的治疗,合适的CAR靶向CD19或CD20。非限制性实例包括CAR,其包含以下结构:(i)抗CD19 scFv、CD8 H/TM结构域、4-1BB CS结构

域和CD3 TCR信号传导结构域；(ii) 抗CD19 scFv、CD28铰链和跨膜结构域、CD28共刺激结构域和CD3 TCR信号传导结构域；和(iii) 抗CD20 scFv、IgG铰链和跨膜结构域、CD28/4-1BB共刺激结构域和CD3 TCR信号传导结构域。在一些实施方式中，适用于与本文公开的组合物和方法组合的CAR效应细胞靶向CD19或CD20，其包括但不限于KymriahTM (tisagenlecleucel; Novartis; 先前为CTL019) 和YescartaTM (axicabtagene ciloleucel; Kite Pharma)。

[0162] 重靶向CAR T细胞

[0163] 在一些实施方式中，修饰效应细胞(例如T细胞)以表达与免疫球蛋白上的通用免疫受体、标签、开关或Fc区结合的CAR适用于本文所述的组合物和方法。

[0164] 在一些实施方式中，修饰效应细胞(例如T细胞)以表达通用免疫受体或UnivIR。一种类型的UnivIR是生物素结合免疫受体(BBIR) (参见例如美国专利公开US20140234348A1，通过引用整体并入本文)。与通用嵌合受体和/或表达通用嵌合受体的效应细胞相关的方法和组合物的其他实例描述于国际专利申请W02016123122A1、W02017143094A1、W02013074916A1、美国专利申请US20160348073A1，其所有均用引用整体并入本文。

[0165] 在一些实施方式中，修饰效应细胞(例如T细胞)以表达通用、模块化的、抗标签的嵌合抗原受体(UniCAR)。该系统允许针对多种抗原的UniCAR植入免疫细胞重新靶向(参见例如通过引用整体并入本文的美国专利公开US20170240612A1；通过引用整体并入本文的Cartellieri等, (2016) Blood Cancer Journal 6, e458)。

[0166] 在一些实施方式中，修饰效应细胞(例如T细胞)以表达可切换的嵌合抗原受体和嵌合抗原受体效应细胞(CAR-ES)开关。在该系统中，CAR-ES开关具有一个由CAR-EC上的嵌合抗原受体结合的第一区域和一个与靶细胞上细胞表面分子结合的第二区域，从而刺激来自CAR-EC的免疫应答，其对结合的靶细胞有细胞毒性。在一些实施方式中，CAR-EC是T细胞，其中CAR-EC开关可以充当CAR-EC活性的“分子开关”。活性可以通过减少或停止开关的管理来“关闭”。这些CAR-EC开关可与本公开的CAR-EC以及现有的CAR T细胞一起使用，用于疾病或病症的治疗，例如癌症，其中靶细胞是恶性细胞。这种治疗在本文中可称为可切换的免疫疗法(美国专利公开US9624276B2，其通过引用整体并入本文)。

[0167] 在一些实施方式中，修饰效应细胞(例如T细胞)以表达结合人免疫球蛋白的Fc部分的受体(例如CD16V-BB- ζ) (Kudo等, (2014) Cancer Res 74 (1):93-103，其通过引用整体并入本文)。

[0168] 在一些实施方式中，修饰效应细胞(例如T细胞)以表达结合肽新表位(PNE)的通用免疫受体(例如可切换的CAR, sCAR)。在一些实施方式中，肽新表位(PNE)已经被引入靶向抗原的抗体(抗体开关)内限定的不同位置。因此，sCAR-T细胞特异性仅针对PNE重定向，不会发生在人蛋白质组中，因此允许sCAR-T细胞和抗体开关之间的正交相互作用。以此方式，sCAR-T细胞严格地依赖于抗体开关的存在以被完全激活，因此排除了在没有抗体开关的情况下内源组织或抗原的CAR T细胞脱靶识别。可切换的CAR的其他实例由美国专利申请US20160272718A1提供，其通过引用整体并入本文。

[0169] 如在本文中所使用的，术语“标签”涵盖如上所述的免疫球蛋白的通用免疫受体、标签、开关或Fc区域。在一些实施方式中，修饰效应细胞以表达包含标签结合结构域的CAR。在一些实施方式中，CAR结合异硫氰酸荧光素(FITC)、链霉抗生物素蛋白、生物素、二硝基苯酚、多甲藻素叶绿素蛋白复合物、绿色荧光蛋白、枣红蛋白(PE)、辣根过氧化物酶、棕榈酰

化、亚硝基化、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶或麦芽糖结合蛋白。

[0170] 抗TAG嵌合抗原受体(AT-CAR)

[0171] CAR T细胞的一般临床应用存在一些局限性。例如,由于不存在所有癌症类型都普遍表达的单一肿瘤抗原,因此需要对CAR中的每个scFv针对所需肿瘤抗原的特异性工程改造。此外,由CAR靶向的肿瘤抗原可响应于导致肿瘤逃逸的治疗而被下调或突变。

[0172] 作为替代方案,已经开发了通用的抗标签嵌合抗原受体(AT-CAR)和CAR-T细胞。例如,人T细胞已被工程化以表达抗异硫氰酸荧光素(FITC)CAR(称为抗FITC-CAR)。该平台利用了抗FITC scFv(在细胞表面)和FITC之间的高亲和力相互作用以及FITC分子(或其他标签)与任何抗癌单克隆抗体例如西妥昔单抗(抗EGFR)、雷妥昔单抗(抗CD20)和赫赛汀(抗Her2)结合能力的优势。

[0173] 因此,在一些实施方式中,修饰效应细胞(例如T细胞)以表达通用抗标签嵌合抗原受体(AT-CAR),如至少在WO 2012082841和US20160129109A1所述,其通过引用整体并入本文。在这种AT-CAR系统中,T细胞识别并结合标记蛋白质,例如抗体。例如,在一些实施方式中,AT-CAR T细胞识别标签标记的抗体,例如FITC标记的抗体。在一些实施方式中,将抗肿瘤抗原抗体缀合至标签(例如FITC),并在AT-CAR疗法之前、同时或之后施用。抗肿瘤抗原抗体是本领域技术人员已知的。

[0174] 如所指出的,标签结合结构域的结合特异性取决于用于结合靶细胞的蛋白质缀合的标签的同一性。例如,在本公开的一些方面,标签是FITC,标签结合结构域是抗FITC scFv。或者,在本公开的一些方面,标签是生物素或PE(藻红蛋白)并且标签结合结构域是抗生物素scFv或抗PE scFv。

[0175] 在一些实施方式中,标记蛋白的每个制剂的蛋白质是相同的或不同的,并且蛋白质是抗体或其抗原结合片段。在一些方面,抗体或其抗原结合片段是西妥昔单抗(抗EGFR)、尼莫托珠单抗(抗EGFR)、帕尼单抗(抗EGFR)、雷妥昔单抗(抗CD20)、奥马珠单抗(抗CD20)、托西莫单抗(抗CD20)、曲妥珠单抗(抗Her2)、吉妥珠单抗(抗CD33)、阿仑单抗(抗CD52)和贝伐单抗(抗VEGF)。

[0176] 因此,在一些实施方式中,标记蛋白包括FITC缀合的抗体、生物素缀合的抗体、PE缀合的抗体、组氨酸缀合的抗体和链霉抗生物素蛋白缀合的抗体,其中抗体结合至由靶细胞表达的TAA或TSA。例如,标记蛋白包括但不限于FITC缀合的西妥昔单抗、FITC缀合的雷妥昔单抗、FITC缀合的赫赛汀、生物素缀合的西妥昔单抗、生物素缀合的雷妥昔单抗、生物素缀合的赫赛汀、PE缀合的西妥昔单抗、PE缀合的雷妥昔单抗、PE缀合的赫赛汀、组氨酸缀合的西妥昔单抗、组氨酸缀合的雷妥昔单抗、组氨酸缀合的赫赛汀、链霉抗生物素蛋白缀合的西妥昔单抗、链霉抗生物素蛋白缀合的雷妥昔单抗、和链霉抗生物素蛋白缀合的赫赛汀。

[0177] 在一些实施方式中,表达AT-CAR的T细胞的每个群体的AT-CAR是相同的或不同的,并且AT-CAR包含标签结合结构域、跨膜结构与和激活结构域。在一些实施方式中,标签结合结构域是抗体或其抗原结合片段。在一些方面,标签结合结构域特异性地结合FITC、生物素、PE、组氨酸或链霉抗生物素蛋白。在一些实施方式中,标签结合结构域是抗原结合片段并且抗原结合片段是单链可变片段(scFv),例如特异性结合FITC、生物素、PE、组氨酸或链霉抗生物素蛋白的scFv。在一些实施方式中,跨膜结构与是人CD8 α 链的铰链和跨膜区域。在一些实施方式中,激活结构域包含CD28的细胞质区域、CD137(41BB)的细胞质区域、OX40、

HVEM、CD3 ζ 和FcR ϵ 中的一个或多个。

[0178] 在一些实施方式中,标记蛋白的每个制剂的标签是相同的或不同的,并且标签选自异硫氰酸荧光素(FITC)、链霉抗生物素蛋白、生物素、二硝基苯酚、多甲藻素叶绿素蛋白复合物、绿色荧光蛋白、枣红蛋白(PE)、辣根过氧化物酶、棕榈酰化、亚硝基化、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶和麦芽糖结合蛋白。

[0179] 可以使用例如化学缀合和化学交联剂的技术将标签缀合至蛋白质。或者,可以制备将标记蛋白质作为融合蛋白的多核苷酸载体。然后将细胞系工程化以表达标记蛋白质,并且标记蛋白质可以从培养基中分离、纯化并用于本文公开的方法中。

[0180] 在一些实施方式中,在施用表达AT-CAR的T细胞之前、同时或之后,将标记蛋白质施用于受试者。在一些实施方式中,本公开提供了一种治疗受试者的癌症的方法,其包括:
(a) 将标记蛋白的制剂施用于需要治疗的受试者,其中标记蛋白结合受试者中的癌细胞;和
(b) 将治疗有效的表达抗标签嵌合抗原受体(AT-CAR)的T细胞施用于受试者,其中表达AT-CAR的T细胞结合标记蛋白并诱导癌细胞死亡,从而治疗受试者的癌症。

[0181] 串联CAR(TanCAR)效应细胞

[0182] 已经观察到使用CAR方法进行癌症治疗时,肿瘤异质性和免疫编辑可导致从CAR治疗逃脱(Grupp等,New Eng.J.Med(2013)368:1509-1518)。作为一种替代方法,已经开发出双特异性CAR,也称为串联CAR或TanCAR,以尝试同时靶向多种癌症特异性标记。在TanCAR中,细胞外结构域包含串联的两个抗原结合特异性,通过接头连接。因此两个结合特异性(scFv)都连接至单个跨膜部分:一个scFv与膜并列,另一个位于远侧位置。示例性TanCAR,Grada等(Mol Ther Nucleic Acids(2013)2,e105)描述了TanCAR,其包括CD19特异性scFv,然后是Gly-Ser接头和HER2特异性scFv。HER2-scFv位于近膜位置,和CD19-scFv位于远端位置。TanCAR被证明诱导针对两种肿瘤限制性抗原均有不同的T细胞反应性。

[0183] 因此,本公开的一些方面涉及介导T细胞的双特异性激活和靶向的串联嵌合抗原受体。尽管本公开涉及CAR的双特异性,在一些方面,CAR能够靶向三种、四种或更多种肿瘤抗原。使用CAR T细胞靶向多种抗原可增强T细胞激活和/或通过抗原丢失抵消肿瘤逃逸。TanCAR还可以靶向杜仲表达的抗原,使用具有广泛特异性的相同细胞产物靶向多种肿瘤,和/或提供更好的毒性研究进展和不太强烈的信号传导CAR,由于多种特异性达到相同的结果。

[0184] 在一些实施方式中,本公开提供了诱导两个靶向结构域的TanCAR。在一些实施方式中,本公开提供了诱导三个或更多个靶向结构域的多特异性TanCAR。在另一个实施方式中,本公开提供了在细胞表面的第一CAR和第二CAR,每个CAR包含抗原结合结构域,其中第一CAR的抗原结合结构域结合至第一肿瘤抗原(例如CD19、CD20、CD22、HER2)和第二CAR的抗原结合结构域结合至另一个(不同的)肿瘤抗原。在US20160303230A1和US20170340705A1中描述了TanCAR,其通过引用并入本文。

[0185] 在一些实施方式中,本公开的TanCAR靶向两个或更多个肿瘤抗原。示例性肿瘤抗原包括CD19、CD20、CD22、 κ 轻链、CD30、CD33、CD123、CD38、ROR1、ErbB3/4、EGFr vIII、癌胚抗原、EGP2、EGP40、间皮素、TAG72、PSMA、NKG2D配体、B7-H6、IL-13受体 α 2、MUC1、MUC16、CA9、GD2、GD3、HMW-MAA、CD171、Lewis Y、G250/CALX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2 NY-ESO-1、PSC1、叶酸受体- α 、CD44v7/8、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AchR、NKG2D配体、CD44v6、TEM1和/或

TEM8中的一种或多种。

[0186] 在一些实施方式中,本公开提供了靶向CD19和另一个肿瘤抗原的双特异性TanCAR。在一些实施方式中,本公开提供了靶向CD22和另一个肿瘤抗原的双特异性TanCAR。在一些实施方式中,本公开提供了靶向HER2和另一个肿瘤抗原的双特异性TanCAR。在一些实施方式中,本公开提供了靶向IL13R- α 2和另一个肿瘤抗原的双特异性TanCAR。在一些实施方式中,本公开提供了靶向VEGF-A和另一个肿瘤抗原的双特异性TanCAR。在一些实施方式中,本公开提供了靶向Tem8和另一个肿瘤抗原的双特异性TanCAR。在一些实施方式中,本公开提供了靶向FAP和另一个肿瘤抗原的双特异性TanCAR。在一些实施方式中,本公开提供了靶向EphA2和另一个肿瘤抗原的双特异性TanCAR。在一些实施方式中,本公开提供了一种双特异性TanCAR,其靶向一种或多种、两种或多种、三种或多种、或四种或多种以下肿瘤抗原:CD19、CD22、HER2、IL13R- α 2、VEGF-A、Tem8、FAP或EphA及其任何组合。在一些实施方式中,本公开提供了靶向HER2和IL13R- α 2的双特异性TanCAR。在一些实施方式中,本公开提供了靶向CD19和CD22的双特异性TanCAR。

[0187] 产生嵌合抗原受体和CAR效应细胞的方法

[0188] 在一些实施方式中,受试者的效应细胞(例如T细胞)用嵌合抗原受体遗传修饰(Sadelain等,Cancer Discov.3:388-398,2013)。例如,提供了效应细胞(例如T细胞),并且将编码嵌合抗原受体的重组核酸引入患者来源的效应细胞(例如T细胞)以产生CAR细胞。在一些实施方式中,不是来源受试者的效应细胞(例如T细胞)用嵌合抗原受体遗传修饰。例如,在一些实施方式中,效应细胞(例如T细胞)是已被工程化用作“现成的”过继细胞疗法的同种异基因细胞,例如通用嵌合抗原受体T细胞(UCART),由Collectis开发。UCART是同种异基因CAR T细胞,其已被工程化以用于治疗最多的特定癌症类型的患者。Collectis正在开发的UCART的非限制性实例包括靶向以下肿瘤抗原的那些:CD19、CD123、CD22、CS1和CD38。

[0189] 可以使用本领域已知的多种不同方法将本公开的任何核酸或表达载体引入至效应细胞(例如T细胞)。用于将核酸引入效应细胞(例如T细胞)的方法的非限制性实例包括:脂质转染、转染(磷酸钙转染、使用高支化有机化合物转染、使用阳离子聚合物转染、树枝行分子转染、光学转染、基于粒子转染(例如纳米颗粒转染)、或使用脂质体转染(例如阳离子脂质体))、显微镜下注射、电穿孔、细胞挤压、声穿孔、原生质体融合、不完美、流体动力输送、基因枪、磁转染、病毒转染和核转染。此外,本领域已知的CRISPR/Cas9基因组编辑技术可用于将CAR核酸引入至效应细胞(例如T细胞)和/或将其他遗传修饰(例如如下所述)引入至效应细胞(例如T细胞)以增强CAR细胞活性(将CRISPR/Cas9技术与CAR T细胞结合使用,参见例如美国9,890,393;美国9,855,297;美国2017/0175128;美国2016/0184362;美国2016/0272999;WO 2015/161276;WO 2014/191128;CN 106755088;CN 106591363;CN 106480097;CN 106399375;CN 104894068)。

[0190] 本文提供了可用于产生本文所述的任何细胞或组合物的方法,其中每个细胞可表达CAR(例如本文所述的任何CAR)。

[0191] 嵌合抗原受体(CAR)包括抗原结合结构域,跨膜结构域和细胞质信号传导结构域,其包括当抗原结合结构域结合至抗原时足以刺激T细胞的CD3 β 序列的细胞质序列,和任选地一种或多种(例如两个、三个或四个)共刺激蛋白的细胞质序列(例如B7-H3、BTLA、CD2、CD7、CD27、CD8、CD30、CD40、CD40L、CD80、CD160、CD244、ICOS、LAG3、LFA-1、LIGHT、NKG2C、4-

1BB、OX40、PD-1、PD-L1、TIM3和特异性结合至CD83的配体中的一种或多种的细胞质序列),其当抗原结合结构域结合至抗原时,提供了对T细胞的共刺激。在一些实施方式中,CAR还可以包含接头。CAR的非限制性方面和特征描述如下。CAR和CAR细胞的其他方面,其包括示例性抗原结合结构域、接头、跨膜结构域和细胞质信号传导结构域,描述于例如Kakarla等,Cancer J.20:151-155,2014;Srivastava等,Trends Immunol.36:494-502,2015;Nishio等,Oncoimmunology 4(2):e988098,2015;Ghorashian等,Br.J.Haematol.169:463-478,2015;Levine,Cancer Gene Ther.22:79-84,2015;Jensen等,Curr.Opin.Immunol.33:9-15,2015;Singh等,Cancer Gene Ther.22:95-100,2015;Li等,Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 22:1753-1756,2014;Gill等,Immunol.Rev.263:68-89,2015;Magee等,Discov.Med.18:265-271,2014;Gargett等,Front.Pharmacol.5:235,2014;Yuan等,Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 22:1137-1141,2014;Pedgram等,Cancer J.20:127-133,2014;Eshhar等,Cancer J.20:123-126,2014;Ramos等,Cancer J.20:112-118,2014;Maus等,Blood 123:2625-2635,2014;Jena等,Curr.Hematol.Malig.Rep.9:50-56,2014;Maher等,Curr.Gene Ther.14:35-43,2014;Riches等,Discov.Med.16:295-302,2013;Cheadle等,Immunol.Rev.257:83-90,2014;Davila等,Int.J.Hematol.99:361-371,2014;Xu等,Cancer Lett.343:172-178,2014;Kochenderfer等,Nat.Rev.Clin.Oncol.10:267-276,2013;Hosing等,Curr.Hematol.Malig.Rep.8:60-70,2013;Hombach等,Curr.Mol.Med.13:1079-1088,2013;Xu等,Leuk.Lymphoma 54:255-260,2013;Gilham等,Trends Mol.Med.18:377-384,2012;Lipowska-Bhalla等,Cancer Immunol.Immunother.61:953-962,2012;Chmielewski等,Cancer Immunol.Immunother.61:1269-1277,2013;Jena等,Blood 116:1035-1044,2010;Dotti等,Immunology Reviews 257(1):107-126,2013;Dai等,Journal of the National Cancer Institute 108(7):djv439,2016;Wang and Riviere,Molecular Therapy-Oncolytics 3:16015,2016;美国专利申请公开号2018/0057609;2018/0037625;2017/0362295;2017/0137783;2016/0152723;2016/0206656;2016/0199412;2016/0208018;2015/0232880;2015/0225480;2015/0224143;2015/0224142;2015/0190428;2015/0196599;2015/0152181;2015/0140023;2015/0118202;2015/0110760;2015/0099299;2015/0093822;2015/0093401;2015/0051266;2015/0050729;2015/0024482;2015/0023937;2015/0017141;2015/0017136;2015/0017120;2014/0370045;2014/0370017;2014/0369977;2014/0349402;2014/0328812;2014/0322275;2014/0322216;2014/0322212;2014/0322183;2014/0314795;2014/0308259;2014/0301993;2014/0296492;2014/0294784;2014/0286973;2014/0274909;2014/0274801;2014/0271635;2014/0271582;2014/0271581;2014/0271579;2014/0255363;2014/0242701;2014/0242049;2014/0227272;2014/0219975;2014/0170114;2014/0134720;2014/0134142;2014/0120622;2014/0120136;2014/0106449;2014/0106449;2014/0099340;2014/0086828;2014/0065629;2014/0050708;2014/0024809;2013/0344039;2013/0323214;2013/0315884;2013/0309258;2013/0288368;2013/0287752;2013/0287748;2013/0280221;2013/0280220;2013/0266551;2013/0216528;2013/0202622;2013/0071414;2012/0321667;2012/0302466;2012/0301448;2012/0301447;2012/0060230;2011/0213288;2011/0158957;

2011/0104128;2011/0038836;2007/0036773和2004/0043401。CAR和CAR细胞的其他方面，其包括示例性抗原结合结构域、接头、跨膜结构域和细胞质信号传导结构域，描述于WO 2016/168595;WO 12/079000;2015/0141347;2015/0031624;2015/0030597;2014/0378389;2014/0219978;2014/0206620;2014/0037628;2013/0274203;2013/0225668;2013/0116167;2012/0230962;2012/0213783;2012/0093842;2012/0071420;2012/0015888;2011/0268754;2010/0297093;2010/0158881;2010/0034834;2010/0015113;2009/0304657;2004/0043401;2014/0322253;2015/0118208;2015/0038684;2014/0024601;2012/0148552;2011/0223129;2009/0257994;2008/0160607;2008/0003683;2013/0121960;2011/0052554和2010/0178276。

[0192] A. 抗原结合结构域

[0193] 嵌合抗原受体 (CAR) 中包含的抗原结合结构域可以特异性地结合至抗原 (例如肿瘤相关抗原 (TAA) 或在非癌细胞上表达的抗原) 或通用受体 (例如标签)。抗原结合结构域的非限制性实例包括：单克隆抗体 (例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgE和IgD) (例如完全人类或嵌合 (例如人源化) 抗体)、抗体的抗原结合片段 (例如Fab、Fab'、或F(ab')₂片段) (例如完全人类或嵌合 (例如人源化) 抗体的片段)、双抗体、三抗体、四抗体、微抗体、scFv、scFv-Fc、(scFv)₂、scFab、bis-scFv、hc-IgG、BiTE、单结构域抗体 (例如V-NAR结构域或VhH结构域)、IgNAR和多特异性 (例如双特异性抗体) 抗体。制备这些抗原结合结构域的方法是本领域已知的。

[0194] 在一些实施方式中，抗原结合结构域包括能够特异性地结合至靶抗原的抗体的至少一个 (例如一个、两个、三个、四个、五个或六个) CDR (例如来自免疫球蛋白轻链可变区的单个CDR的任何一个，或来自免疫球蛋白重链可变区的三个CDR中的任何一个)，例如免疫球蛋白分子 (例如轻链或重链免疫球蛋白分子) 和免疫球蛋白分子的免疫活性 (抗原结合) 片段。

[0195] 在一些实施方式中，抗原结合结构域是单链抗体 (例如V-NAR结构域或VhH结构域，或本文所述的任何单链抗体)。在一些实施方式中，抗原结合结构域是完整抗体分子 (例如人、人源化或嵌合抗体) 或多聚抗体 (例如双特异性抗体)。

[0196] 在一些实施方式中，抗原结合结构域包括抗体片段和多特异性 (例如双特异性) 抗体或抗体片段。抗体和其抗原结合片段的实例包括但不限于：单链Fv (scFv)、Fab片段、F(ab')₂、二硫键链接的Fv (sdFv)、Fv和包含VL或VH结构域的片段。

[0197] 本文提供的其他抗原结合结构域是多克隆、单克隆、多特异性 (多聚体，例如双特异性)、人抗体、嵌合抗体 (例如人-小鼠嵌合体)、单链抗体、细胞内抗体 (例如胞内抗体) 和其抗原结合片段。抗体或其抗原结合片段可以是任何类型 (例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别 (例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2) 或亚型。在一些实施方式中，抗原结合结构域是IgG1抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中，抗原结合结构域是IgG4抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中，抗原结合结构域是包含重链和轻链的免疫球蛋白。

[0198] 抗原结合结构域的其他实例是IgG的抗原结合片段 (例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的抗原结合片段) (例如人或人源化IgG的抗原结合片段，例如人或人源化IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)、IgA的抗原结合片段 (例如IgA1或IgA2的抗原结合片段) (例如人或人源化IgA的抗原结合片段，例如人或人源化IgA1或IgA2)、IgD的抗原结合片段 (例如人或人源化IgD的抗

原结合片段)、IgE的抗原结合片段(例如人或人源化IgE的抗原结合片段)、或IgM的抗原结合片段(例如人或人源化IgM的抗原结合片段)。

[0199] 在一个特定的实施方式中,抗原结合结构域可以以约或小于 1×10^{-7} M(例如约或小于 1×10^{-8} M、约或小于 5×10^{-9} M、约或小于 2×10^{-9} M、或约或小于 1×10^{-9} M)的亲和力(K_D)在例如盐水或磷酸盐缓冲盐水中结合至特定抗原(例如肿瘤相关抗原)。

[0200] 如本领域技术人员可以理解的,包含在CAR中的抗原结合结构域的选择取决于定义需要其的受试者中靶向的细胞(例如癌细胞或肿瘤)表面的配体的类型和数量,和/或取决于存在于两亲性配体缀合物的配体。例如,在一些实施方式中,选择抗原结合结构域以识别配体,其充当癌细胞上的细胞表面标记物,或是肿瘤相关抗原(例如CD19、CD30、Her2/neu、EGFR或BCMA)或肿瘤特异性抗原(TSA)。在一些实施方式中,抗原结合结构域识别两亲性配体缀合物上的配体。

[0201] 在一些实施方式中,CAR效应细胞(例如CAR T细胞)包含结合至肿瘤抗原(例如包含肿瘤抗原结合结构域)的CAR分子。在一些实施方式中,CAR分子包含识别实体瘤(例如乳腺癌、结肠癌等)的肿瘤抗体的抗原结合结构域。在一些实施方式中,CAR分子是如上所述的串联CAR分子,其包含至少两个抗原结合结构域。在一些实施方式中,CAR分子包含识别血液恶性肿瘤(例如白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性粒细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、慢性白血病、慢性髓细胞性(粒细胞性)白血病、慢性淋巴细胞白血病、套细胞淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、伯基特淋巴瘤和边缘区B细胞淋巴瘤、真性红细胞增多、淋巴肉芽肿病、非霍奇金病、多发性骨髓瘤等)的肿瘤抗原的抗原结合结构域。

[0202] 在一些实施方式中,肿瘤抗原是肿瘤特异性抗原(TSA)。TSA对肿瘤细胞是唯一的,并不发生在体内其他细胞上。在一些实施方式中,肿瘤抗原是肿瘤相关抗原(TAA)。TAA对肿瘤细胞不是唯一的,而是在不能诱导针对抗原的免疫耐受状态的情况下在正常细胞上表达。抗原在肿瘤上的表达抗原发生使免疫系统能够对抗原有应答的条件下。在一些实施方式中,当免疫系统不成熟且不能应答时,TAA在胎儿发育期间表达在正常细胞上,或通常在正常细胞上以极低的水平存在,但在肿瘤细胞上以高得多的水平表达。

[0203] 在某些实施方式中,通过对患者肿瘤细胞测序并鉴定仅在肿瘤中发现的突变蛋白来确定肿瘤相关抗原。这些抗原也称为“新抗原”。一旦鉴定出新抗原,就可以产生针对其的治疗性抗体并用于本文所述的方法中。

[0204] 在一些实施方式中,肿瘤抗原是上皮癌抗原(例如乳腺、胃肠道、肺)、前列腺特异性癌抗原(PSA)或前列腺特异性膜抗原(PSMA)、膀胱癌抗原、肺(例如小细胞肺)癌抗原、结肠癌抗原、卵巢癌抗原、脑癌抗原、胃癌抗原、肾细胞癌抗原、胰腺癌抗原、肝癌抗原、食管癌抗原、头和颈部癌抗原或结直肠癌抗原。在某些实施方式中,肿瘤抗原是淋巴瘤抗原(例如非霍奇金淋巴瘤或霍奇金淋巴瘤)、B细胞淋巴瘤癌抗原、白血病抗原、骨髓瘤(例如多发性骨髓瘤或浆细胞性骨髓瘤)抗原、急性淋巴细胞白血病抗原、慢性粒细胞白血病抗原或急性髓性白血病抗原。

[0205] 抗原被CAR效应细胞(例如CAR T细胞)靶向的肿瘤抗原(例如肿瘤相关抗原(TAA)和肿瘤特异性抗原(TSA)包括但不限于1GH-IGK、43-9F、5T4、791Tgp72、亲环蛋白C相关蛋白、甲胎蛋白(AFP)、 α -肌动蛋白4、A3、A33抗体特异的抗原、ART-4、B7、Ba 733、BAGE、BCR-ABL、 β -连环蛋白、 β -HCG、BrE3抗原、BCA225、BTAA、CA125、CA 15-3\CA 27.29\BCAA、CA195、

CA242、CA-50、CAM43、CAMEL、CAP-1、碳酸酐酶IX、c-Met、CA19-9、CA72-4、CAM 17.1、CASP-8/m、CCCL19、CCCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD68、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD79b、CD80、CD83、CD95、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK4、CDK4m、CDKN2A、C0-029、CTLA4、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1a、结肠特异性抗原p (CSAp)、CEA (CEACAM5)、CEACAM6、c-Met、DAM、E2A-PRL、EGFR、EGFRvIII、EGP-1 (TROP-2)、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、成纤维细胞生长因子 (FGF)、FGF-5、F1t-1、F1t-3、叶酸受体、G250抗原、Ga733VEpCAM、GAGE、gp100、GR0-β、H4-RET、HLA-DR、HM1.24、人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 和其亚单位、HER2/neu、HMGB-1、缺氧诱导因子 (HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、HTgp-175、Ia、IGF-1R、IFN-γ、IFN-α、IFN-β、IFN-λ、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-25、胰岛素样生长因子1 (IGF-1)、KC4抗原、KSA、KS-1抗原、KS1-4、LAGE-1a、Le-Y、LDR/FUT、M344、MA-50、巨噬细胞迁移抑制因子 (MIF)、MAGE、MAGE-1、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、MART-1、MART-2、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MG7-Ag、MOV18、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、MYL-RAR、NB/70K、Nm23H1、NuMA、NCA66、NCA95、NCA90、NY-ESO-1、p15、p16、p185erbB2、p180erbB3、PAM4抗原、胰腺粘蛋白、PD1受体 (PD-1)、PD-1受体配体1 (PD-L1)、PD-1受体配体2 (PD-L2)、PI5、胎盘生长因子、p53、PLAGL2、Pme117前列腺酸磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、P1GF、ILGF、ILGF-1R、IL-6、IL-25、RCAS1、RS5、RAGE、RANTES、Ras、T101、SAGE、S100、生存素、生存素2B、SDDCAG16、TA-90\Mac2结合蛋白、TAAL6、TAC、TAG-72、TLP、肌腱蛋白、TRAIL受体、TRP-1、TRP-2、TSP-180、TNF-α、Tn抗原、Thomson-Friedenreich抗原、肿瘤坏死抗原、酪氨酸酶、VEGFR、ED-B纤维连接蛋白、WT-1、17-1A抗原、补体因子C3、C3a、C3b、C5a、C5 (参见例如Sensi等, Clin Cancer Res 2006,12:5023-32; Parmiani等, J Immunol 2007,178:1975-79; Novellino等 Cancer Immunol Immunother 2005,54:187-207)。

[0206] 在一些实施方式中, 肿瘤抗原是原子与人慢性疾病或癌症 (例如宫颈癌) 相关的病毒的病毒抗原。例如, 在一些实施方式中, 病毒抗原衍生自爱泼斯坦-巴尔病毒 (EBV)、HPV抗原E6和/或E7、丙型肝炎病毒 (HCV)、甲型肝炎病毒 (HBV) 或巨细胞病毒 (CMV)。

[0207] 示例性的癌症或肿瘤和与此类肿瘤相关的特异性肿瘤抗原 (但不仅限于此) 包括急性淋巴细胞白血病 (etv6、aml1、亲环蛋白b)、B细胞淋巴瘤 (Ig遗传型)、神经胶细胞瘤 (钙粘蛋白、α连环蛋白、β连环蛋白、γ连环蛋白、p120ctn)、膀胱癌 (p21ras)、胆道癌 (p21ras)、乳腺癌 (MUC家族、HER2/neu、c-erbB-2)、宫颈癌 (p53、p21ras)、结肠癌 (p21ras、HER2/neu、c-erbB-2、MUC家族)、大肠癌 (大肠相关抗原 (CRC) -C017-1A/GA733、APC)、绒毛膜癌 (CEA)、上皮细胞癌 (亲环蛋白b)、胃癌 (HER2/neu、c-erbB-2、ga733糖蛋白)、肝细胞癌 (甲胎蛋白)、霍奇金淋巴瘤 (Imp-1、EBNA-1)、肺癌 (CEA、MAGE-3、NY-ESO-1)、淋巴细胞源性白血病 (亲环蛋白b)、黑色素瘤 (p5蛋白、gp75、癌胚抗原、GM2和GD2神经节苷脂、Melan-A/MART-1、cdc27、MAGE-3、p21ras、gp100)、粘液瘤 (MUC家族、p21ras)、非小细胞肺癌 (HER2/neu、c-erbB-2)、鼻咽癌 (Imp-1、EBNA-1)、卵巢癌 (MUC家族、HER2/neu、c-erbB-2)、前列腺癌 (前列腺特异性抗原 (PSA) 和气抗原表位 PSA-1、PSA-2 和 PSA-3、PSMA、HER2/neu、c-erbB-2、ga733糖蛋白)、肾癌 (HER2/neu、c-erbB-2)、宫颈和食道鳞状细胞癌、睾丸癌 (NY-ESO-1)、和T细胞白血病

基酸、约20个氨基酸、约18个氨基酸、约16个氨基酸、约14个氨基酸、或约12个氨基酸；约12个氨基酸至约500个氨基酸，约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约100个氨基酸、约90个氨基酸、约80个氨基酸、约70个氨基酸、约60个氨基酸、约50个氨基酸、约40个氨基酸、约35个氨基酸、约30个氨基酸、约25个氨基酸、约20个氨基酸、约18个氨基酸、约16个氨基酸、或约14个氨基酸；约14个氨基酸至约500个氨基酸，约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约100个氨基酸、约90个氨基酸、约80个氨基酸、约70个氨基酸、约60个氨基酸、约50个氨基酸、约40个氨基酸、约35个氨基酸、约30个氨基酸、约25个氨基酸、约20个氨基酸、约18个氨基酸、或约16个氨基酸；约16个氨基酸至约500个氨基酸，约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约100个氨基酸、约90个氨基酸、约80个氨基酸、约70个氨基酸、约60个氨基酸、约50个氨基酸、约40个氨基酸、约35个氨基酸、约30个氨基酸、约25个氨基酸、约20个氨基酸、或约18个氨基酸；约18个氨基酸至约500个氨基酸，约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约100个氨基酸、约90个氨基酸、约80个氨基酸、约70个氨基酸、约60个氨基酸、约50个氨基酸、约40个氨基酸、约35个氨基酸、约30个氨基酸、约25个氨基酸、或约20个氨基酸；约20个氨基酸至约500个氨基酸，约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约100个氨基酸、约90个氨基酸、约80个氨基酸、约70个氨基酸、约60个氨基酸、约50个氨基酸、约40个氨基酸、约35个氨基酸、约30个氨基酸、或约25个氨基酸；约25个氨基酸至约500个氨基酸，约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约100个氨基酸、约90个氨基酸、约80个氨基酸、约70个氨基酸、约60个氨基酸、约50个氨基酸、约40个氨基酸、约35个氨基酸、或约30个氨基酸；约30个氨基酸至约500个氨基酸，约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约100个氨基酸、约90个氨基酸、约80个氨基酸、约70个氨基酸、约60个氨基酸、约50个氨基酸、或约40个氨基酸；约40个氨基酸至约500个氨基酸，约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约100个氨基酸、约90个氨基酸、约80个氨基酸、约70个氨基酸、约60个氨基酸、或约50个氨基酸；约50个氨基酸至约500个氨基酸，约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约100个氨基酸、约90个氨基酸、约80个氨基酸、约70个氨基酸、或约60个氨基酸；约60个氨基酸至约500个氨基酸，约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约100个氨基酸、约90个氨基酸、约80个氨基酸、或约70个氨基酸；约70个氨基酸至约500个氨基酸，约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约100个氨基酸、约90个氨基酸、约80个氨基酸、或约60个氨基酸；约80个氨基酸至约500个氨基酸，约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、约100个氨基酸、或约90个氨基酸；约90个氨基酸至约500个氨基酸，约400个氨基酸、约300个氨基酸、约200个氨基酸、或约100个氨基酸；约100个氨基酸至约500个氨基酸，约400个氨基酸、约300个氨基酸、或约200个氨基酸；约200个氨基酸至约500个氨基酸，约400个氨基酸，或约300个氨基酸；约300个氨基酸至约500个氨基酸或约400个氨基酸；或约400个氨基酸至约500个氨基酸。

[0213] 接头的另外实例和方面在本文引用的参考文献中描述，因此全文并入本文。

[0214] C.跨膜结构域

[0215] 在一些实施方式中,本文所述的CAR也包括跨膜结构域。在一些实施方式中,跨膜结构域与细胞质结构域中的序列天然相关。在一些实施方式中,跨膜结构域可以被一个或多个(例如两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个)氨基酸取代基修饰以避免该结构域与其他跨膜结构域的结合(例如相同或不同的表面膜蛋白的跨膜结构域),以尽量减少与受体复合物其他成员的相互作用。

[0216] 在一些实施方式中,跨膜结构域可以衍生自天然来源。在一些实施方式中,跨膜结构域可以衍生自任何膜结合或跨膜蛋白。可用于本文的跨膜结构域的非限制性实例可以衍生自(例如至少包含以下的跨膜序列或部分跨膜序列):T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD33、CD37、CD64、CD80、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD86、CD134、CD137或CD154。

[0217] 在一些实施方式中,跨膜结构域可以是合成的。例如,在一些实施方式中,如果跨膜结构域来自合成来源,则跨膜结构域可以包括(例如主要包括)疏水性残基(例如亮氨酸和缬氨酸)。在一些实施方式中,合成的跨膜结构域将在合成跨膜结构域的末端包括至少一个(例如至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、或至少六个)丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三元组。在一些实施方式中,CAR的跨膜结构域可以包括CD8铰链结构域。

[0218] 跨膜结构域的其他具体实例在本文引用的参考文献中描述。

[0219] D. 胞质结构域

[0220] 本文还提供了包含例如胞质信号传导结构域的CAR分子,所述胞质信号传导结构域包括当抗原结合结构域与抗原结合时足以刺激T细胞的CD3 ζ 的胞质序列,和任选地一种或多种共刺激蛋白的胞质序列(例如CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40L、CD40、PD-1、PD-L1、ICOS、LFA-1、CD2、CD7、CD160、LIGHT、BTLA、TIM3、CD244、CD80、LAG3、NKG2C、B7-H3、特异性结合至CD83的配体、和本文所述或本领域已知的任何ITAM序列中一个或多个的胞质序列),其提供T细胞的共刺激。CAR免疫效应细胞的刺激可以导致CAR免疫效应细胞的一种或多种抗癌活性的激活。例如,在一些实施方式中,CAR免疫效应细胞的刺激可以导致CAR免疫效应细胞的溶细胞活性或辅助活性增加,其包括细胞因子的分泌。在一些实施方式中,共刺激蛋白的整个胞内信号传导结构域包括在胞质信号传导结构域中。在一些实施方式中,胞质信号传导结构域包括共刺激蛋白的胞内信号传导结构域的截短部分(例如胞内信号传导结构域的截短部分,其可在CAR免疫效应细胞中转导效应子功能信号)。可以包括胞质信号传导结构域中的胞内信号传导结构域的非限制性实例包括T细胞受体(TCR)和在抗原受体参与后共同启动信号转导的共同受体,以及包括至少一个(例如一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个)取代基的这些序列的任何变体,并且具有相同或大约相同的功能能力。

[0221] 在一些实施方式中,胞质信号传导结构域包括两类不同的胞质信号传导序列:信号传导序列和一种或多种共刺激蛋白的胞质序列,所述信号传导序列通过TCR(主要胞质信号传导序列)(例如CD3 ζ 胞质信号传导序列)启动抗原依赖性激活,所述共刺激蛋白以抗原依赖性方式发挥作用,以提供次级或共刺激信号(次级胞质信号传导序列)。

[0222] 在其他实施方式中,设计CAR的胞质结构域以包括CD3 ζ 信号传导结构域本身或与在CAR的情况下有用的其他任何所期望的胞质信号传导序列组合。在一些实例中,CAR的胞质结构域可以包括CD3 ζ 链部分和共刺激胞质信号传导序列。共刺激胞质信号传导序列指CAR的部分,其包括共刺激蛋白(例如CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、

ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3和特异性结合CD83的配体)的胞质信号传导序列。

[0223] 在一些实施方式中,CAR的胞质信号传导结构域内的胞质信号传导序列以随机顺序定位。在一些实施方式中,CAR的胞质信号传导结构域内的胞质信号传导序列以特定顺序彼此连接。在一些实施方式中,接头(例如本文所述的任何接头)可用于形成不同胞质信号传导序列之前的连接。

[0224] 在一些实施方式中,设计胞质信号传导结构域以包括CD3 ζ 信号传导序列和共刺激蛋白CD28的胞质信号传导序列。在一些实施方式中,设计胞质信号传导结构域以包括CD3 ζ 信号传导序列和共刺激蛋白4-1BB的胞质信号传导序列。在一些实施方式中,设计胞质信号传导结构域以包括CD3 ζ 信号传导序列和共刺激蛋白CD28和4-1BB的胞质信号传导序列。在一些实施方式中,胞质信号传导结构域不包括4-1BB的胞质信号传导序列。

[0225] CAR T细胞的其他修饰

[0226] 在另一个实施方式中,CAR效应细胞(例如CAR T细胞)的治疗功效通过甲基胞嘧啶双加氧酶基因(例如Tet1、Tet2、Tet3)的破坏而增强,如PCT公开WO 2017/049166中所述,其导致5-羟甲基胞嘧啶的总水平降低与增殖增强、效应细胞因子产生和脱颗粒的调节相关,并从而增加CAR效应细胞(例如CAR T细胞)增殖和/或功能。因此,可以工程化效应细胞(例如T细胞)以表达CAR,并且其中所述笑一个细胞(例如T细胞)中的Tet1、Tet2和/或Tet3的表达和/或功能已经被减少或消除。

[0227] 在另一个实施方式中,CAR效应细胞(例如CAR T细胞)的治疗功效通过使用组成性表达CAR(称为非条件CAR)并有条件地表达另一种可用于治疗癌症的药物的效应细胞(例如T细胞)来增强,如在PCT公开WO 2016/126608和美国专利2018/0044424中所述。在这样的实施方式中,有条件地表达的药物在效应细胞(例如T细胞)激活时表达,例如非条件CAR与其靶标的结合。在一个实施方式中,有条件地表达的药物是CAR(本文称为条件CAR)。在另一个实施方式中,有条件地表达的药物抑制免疫应答的检查点抑制剂。在另一个实施方式中,有条件地表达的药物改善或增强了CAR的功效,并可以包括细胞因子。

[0228] 在另一个实施方式中,CAR T细胞的治疗功效通过用能够或改变(例如下调)内源基因表达的核酸修饰CAR T细胞来增强,所述内源基因选自TCR α 链、TCR β 链、 β -2微球蛋白、HLA分子、CTLA-4、PD1和FAS,如在PCT公开WO 2016/069282和美国专利2017/0335331中所述。

[0229] 在另一个实施方式中,CAR T细胞的治疗功效通过在T细胞中共表达CAR和一种或多种T细胞启动("ETP")增强子来增强,如在PCT公开2015/112626和美国专利2016/0340406中所述。向CAR T细胞中添加ETP组分可增强"专业"抗原呈递细胞(APC)功能。在一个实施方式中,CAR和一个或多个EPT在T细胞中瞬时共表达。因此,工程化的T细胞是安全的(考虑到CAR/ETP表达的瞬时性质),并通过APC功能诱导延长的免疫力。

[0230] 在另一个实施方式中,CAR T细胞的治疗功效通过在T细胞中共表达CAR和包含结合(或二聚)结构域的抑制膜蛋白(IMP)来增强,如在PCT公开2016/055551和美国专利2017/0292118中所述。使CAR核IMP都对可溶性化合物具有反应性,特别是通过包含在CAR中的第二结合结构域,从而通过二聚化或配体识别允许IMP携带的抑制性信号传导结构域和CAR携带的信号转到结构域共同定位,其具有降低CAR激活的效果。抑制性信号传导结构域优选地

是程序性死亡1 (PD-1), 其减弱T细胞受体 (TCP) 介导的IL-2产生和T细胞增殖的激活。

[0231] 在另一个实施方式中, 使用系统来增强CAR T细胞的治疗功效, 所述系统通过添加小分子获得含有抗原结合解耦股与的CAR胞外部分构象的受控变化, 如在PCR公开WO 2017/032777中所述。该集成系统在开/关状态之间切换抗原和抗原结合结构域之间的相互作用。通过能够控制CAR的胞外部分的构象, 抗原直接调节CAR T细胞的下游功能, 例如细胞毒性。因此, CAR的特征在于其包含: a) 至少一个胞外域, 其包含: i) 胞外抗原结合结构域; 和ii) 包含至少第一多聚配体结合结构域和第二多聚配体结合结构域的开关结构域, 其能够结合预定的多价配体以形成包含所述第二结合结构域和它们能够结合的多价配体的多聚体; b) 至少一个跨膜结构域; 和c) 至少一个包含信号转导结构域和任选地共刺激结构域的内域; 其中开关结构域位于细胞外抗原结合结构域和跨膜结构域之间。

[0232] 两亲性缀合

[0233] A. 总览

[0234] 已经开发了一种两亲性疫苗技术, 其涉及将佐剂或抗原 (例如肽) 连接至亲脂性聚合物尾上, 其促进疫苗在淋巴结中的定位 (Liu等 (2014) Nature 507:519-522)。这样的两亲性抗原 (例如两性肽) 也能够插入细胞膜中 (参见例如Liu等 (2011) Angewandte Chemie-Intl.Ed. 50:7052-7055)。因此, 本公开提供了一种两亲性缀合物, 其包含用于刺激、扩展、激活CAR效应细胞 (例如CAR T细胞) 的CAR配体。

[0235] 在一些实施方式中, 本公开的两亲性缀合物与表达嵌合抗原受体 (CAR) 的细胞疗法 (例如CAR-T细胞疗法) 一起使用。在一些实施方式中, 本公开的两亲性缀合物刺激针对特定靶标 (例如肿瘤相关抗原) 的特异性免疫应答。在一些实施方式中, 本公开的两亲性缀合物在体内刺激CAR表达细胞 (例如CAR-T细胞) 的增殖。在一些实施方式中, 本公开的两亲性缀合物包含CAR配体, 在本文中称为两亲性配体缀合物。在一些实施方式中, 两亲性缀合物包含免疫刺激性寡核苷酸, 并且在本文中称为两亲性寡核苷酸缀合物。

[0236] 如图1A所示, 公开了多种两亲性配体缀合物结构, 其中亲脂性部分或“脂质尾部” (例如DSPE) 通过接头 (例如PEG-2000) 连接 (例如共价地连接) 至CAR配体。该设计的模块化允许各种配体连接至脂质, 所述配体包括但不限于小分子 (例如FITC)、短肽 (例如提供对CAR特异性的表位的线性肽)、或模块蛋白结构域 (例如可提供CAR特异的构象表位的折叠多肽或多肽片段) (例如共价地), 产生具有定制特异性的两亲性配体缀合物。

[0237] 不受理论的束缚, 据信本公开的两亲性配体缀合物主要被递送至淋巴结, 其中脂质尾部被插入抗原呈递细胞 (APC) 的膜中, 导致CAR配体修饰APC (图1B)。嵌入的CAR配体用作在CAR表达细胞 (例如CAR T细胞) 的表面表达的CAR的特异性靶标 (其在本公开的两亲性配体缀合物之前、之后或同时施用), 其导致将CAR表达细胞招募到CAR配体修饰的APC。CAR与嵌入的CAR配体的相互作用通过CAR提供了刺激信号, 而APC还呈现其他自然发生的共刺激信号, 从而导致最佳的表达CAR细胞激活、延长的生存期和有效记忆形成。

[0238] B. 脂质缀合物

[0239] 在某些实施方式中, 如本文中通过引用并入本文的US2013/0295129中所述的脂质缀合物 (例如两亲性缀合物) 用于本公开的方法。在一些实施方式中, 脂质缀合物包含插入细胞膜中的疏水性尾部。在一些实施方式中, 脂质缀合物包含结合白蛋白以有效地靶向缀合物至体内淋巴结的脂质。在一些实施方式中, 脂质缀合物包含包含疏水性尾部的白蛋白

结合脂质,其中亲水性尾部插入细胞膜中,并且其中缀合物有效地靶向体内淋巴结。在一些实施方式中,脂质缀合物结合至内源性白蛋白,其由于抗原呈递细胞对白蛋白的过滤而将它们靶向淋巴管和引流淋巴结,在其中它们积聚。在一些实施方式中,脂质缀合物包括抗原肽或分子佐剂,并从而诱导或增强有效免疫应答。在一些实施方式中,脂质缀合物包括CAR配体,并且从而诱导或增强CAR表达细胞(例如CAR效应细胞,例如CAR-T细胞)的扩增、增殖和/或激活。包含CAR配体的脂质缀合物被称为上文定义的“两亲性配体缀合物”。

[0240] 在一些实施方式中,有效地靶向淋巴结的脂质缀合物称为“淋巴结靶向缀合物”。在一些实施方式中,淋巴结靶向缀合物包含高度亲脂性的白蛋白结合结构域(例如结合白蛋白的脂质),和货物(cargo),例如CAR配体或分子佐剂。在一些实施方式中,淋巴结靶向缀合物包括三个结构域:高度亲脂性的白蛋白结合结构域(例如结合白蛋白的脂质)、货物例如CAR配体或分子佐剂、和极性嵌段,其促进缀合物的溶解性并减小脂质插入细胞质膜的能力。因此,在某些实施方式中,缀合物的通用结构是L-P-C,其中“L”是结合白蛋白的脂质,“P”是极性嵌段,和“C”是货物例如CAR配体或分子佐剂。在一些实施方式中,货物本身也可以用作极性嵌段,并且不需要单独的极性嵌段。因此,在某些实施方式中,缀合物仅有两个结构域:结合白蛋白的脂质和货物。

[0241] 在一些实施方式中,缀合物的货物是CAR配体,从而产生两亲性配体缀合物。在一些实施方式中,两亲性配体缀合物与佐剂一起使用或配制,其中佐剂是包含分子佐剂例如免疫刺激性寡核苷酸或肽抗原作为货物的两亲性配体。

[0242] (i) 脂质

[0243] 在一些实施方式中,两亲性缀合物的脂质组分包含疏水性尾部。在一些实施方式中,疏水性尾部插入细胞膜中。在一些实施方式中,脂质是线性的、分支的或环状的。在一些实施方式中,脂质的长度大于12个碳原子。在一些实施方式中,脂质的长度是13个碳原子。在一些实施方式中,脂质的长度是14个碳原子。在一些实施方式中,脂质的长度是15个碳原子。在一些实施方式中,脂质的长度是16个碳原子。在一些实施方式中,脂质的长度是17个碳原子。在一些实施方式中,脂质的长度是18个碳原子。在一些实施方式中,脂质的长度是19个碳原子。在一些实施方式中,脂质的长度是20个碳原子。在一些实施方式中,脂质的长度是21个碳原子。在一些实施方式中,脂质的长度是22个碳原子。在一些实施方式中,脂质的长度是23个碳原子。在一些实施方式中,脂质的长度是24个碳原子。在一些实施方式中,脂质的长度是25个碳原子。在一些实施方式中,脂质的长度是26个碳原子。在一些实施方式中,脂质的长度是27个碳原子。在一些实施方式中,脂质的长度是28个碳原子。在一些实施方式中,脂质的长度是29个碳原子。在一些实施方式中,脂质的长度是30个碳原子。在一些实施方式中,脂质的长度至少17至18个碳原子,但是如果其显示出良好的白蛋白结合和对淋巴结的充分靶向,则可以更短。

[0244] 淋巴结靶向缀合物包括两亲性配体缀合物和两亲性寡核苷酸缀合物,其可以从通过淋巴的递送部位运输至淋巴结。在某些实施方式中,活性部分取决于缀合物与受试者血液中白蛋白结合的能力。因此,淋巴结靶向缀合物通常包括可以在生理条件下结合白蛋白的脂质。适用于靶向淋巴结的脂质可以基于脂质或包括脂质的脂质缀合物结合至白蛋白的能力来选择。用于测试脂质或脂质缀合物结合至白蛋白的合适方法是本领域已知的。

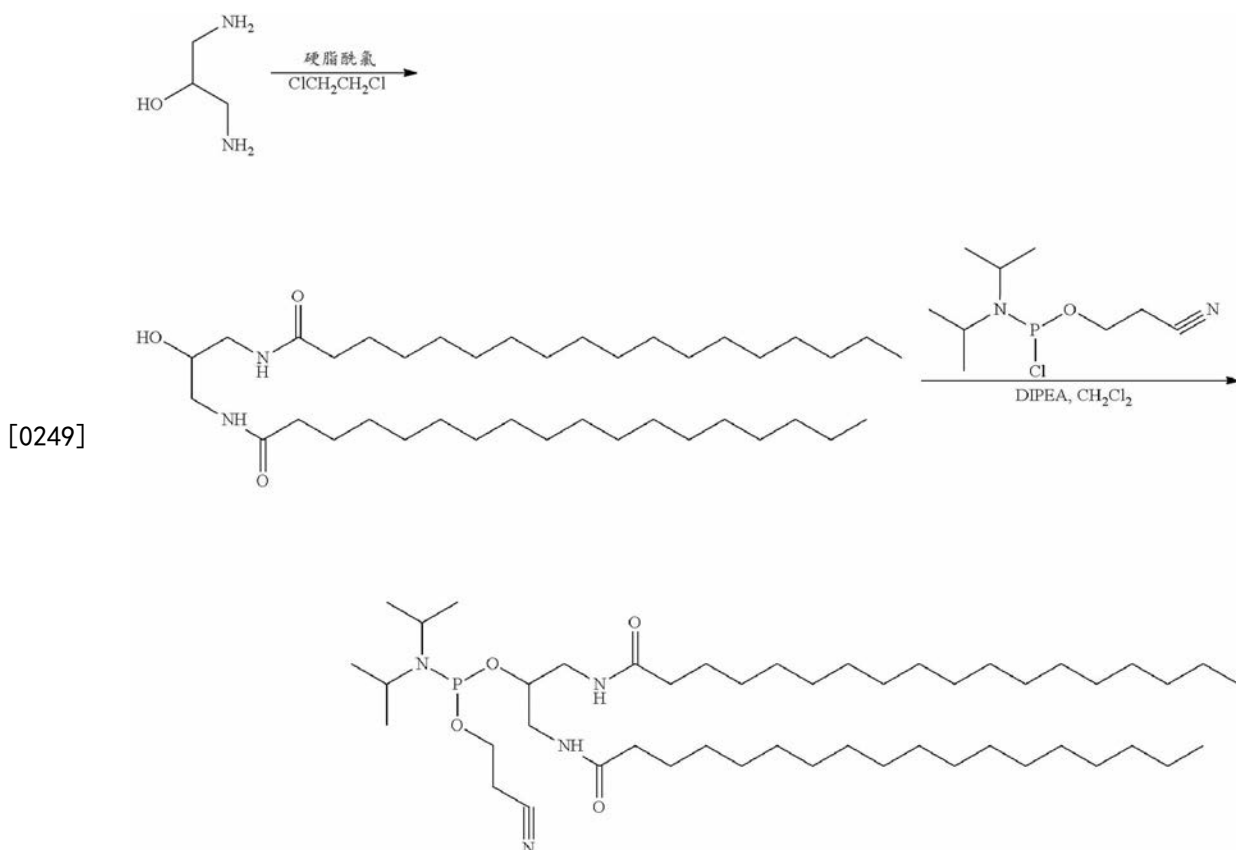
[0245] 例如,在某些实施方式中,允许多种脂质缀合物在水溶液中自发地形成胶束。将胶

束与白蛋白或含白蛋白的溶液(例如胎牛血清(FBS))一起孵育。可以例如通过ELISA、尺寸排阻色谱法或其他方法分析样品以确定结合是否发生。如果存在白蛋白或含白蛋白的溶液(例如胎牛血清(FBS)),胶束解离并且脂质缀合物如上所述结合至白蛋白,则脂质缀合物可以选择为淋巴结靶向缀合物。

[0246] 用于靶向淋巴结的脂质缀合物中的优选脂质的实例包括但不限于具有8-30个碳原子的脂肪族尾部的脂肪酸,其包括但不限于线性不饱和和饱和脂肪酸、支链饱和和不饱和脂肪酸,和脂肪酸衍生物,例如脂肪酸酯、脂肪酸酰胺、和脂肪酸硫酯、二酰基脂质、胆固醇、胆固醇衍生物、和类固醇酸例如胆汁酸、脂质A或其组合。在一些实施方式中,脂质是饱和的。在一些实施方式中,脂质包含至少一个包含8-30、12-30、15-25或16-20个碳原子的脂质尾部。

[0247] 在某些实施方式中,脂质是二酰基脂质或两尾脂质。在一些实施方式中,二酰基脂质中的尾部包含约8个至30个碳原子并且可以是饱和的、不饱和的或其组合。在一些实施方式中,二酰基脂质是饱和的。在一些实施方式中,二酰基脂质是饱和的并且每个尾部包含约8个至约30个碳原子。在一些实施方式中,二酰基脂质是饱和的并且每个尾部包含12个碳原子。在一些实施方式中,二酰基脂质是饱和的并且每个尾部包含13个碳原子。在一些实施方式中,二酰基脂质是饱和的并且每个尾部包含14个碳原子。在一些实施方式中,二酰基脂质是饱和的并且每个尾部包含15个碳原子。在一些实施方式中,二酰基脂质是饱和的并且每个尾部包含16个碳原子。在一些实施方式中,二酰基脂质是饱和的并且每个尾部包含17个碳原子。在一些实施方式中,二酰基脂质是饱和的并且每个尾部包含18个碳原子。在一些实施方式中,二酰基脂质是饱和的并且每个尾部包含19个碳原子。在一些实施方式中,二酰基脂质是饱和的并且每个尾部包含20个碳原子。在一些实施方式中,二酰基脂质是饱和的并且每个尾部包含21个碳原子。在一些实施方式中,二酰基脂质是饱和的并且每个尾部包含22个碳原子。在一些实施方式中,二酰基脂质是饱和的并且每个尾部包含23个碳原子。在一些实施方式中,二酰基脂质是饱和的并且每个尾部包含24个碳原子。在一些实施方式中,二酰基脂质是饱和的并且每个尾部包含25个碳原子。在一些实施方式中,二酰基脂质是饱和的并且每个尾部包含26个碳原子。在一些实施方式中,二酰基脂质是饱和的并且每个尾部包含27个碳原子。在一些实施方式中,二酰基脂质是饱和的并且每个尾部包含28个碳原子。在一些实施方式中,二酰基脂质是饱和的并且每个尾部包含29个碳原子。在一些实施方式中,二酰基脂质是饱和的并且每个尾部包含30个碳原子。尾部可通过酯键连接、酰胺键连接、硫酯键连接或其组合与头基团缀合。在一个特定的实施方式中,二酰基脂质是磷酸盐脂质、糖脂、鞘脂或其组合。

[0248] 在一些实施方式中,脂质是1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE)。在一些实施方式中,二酰基脂质是如在US 9,107,904中所述合成的,其通过引用整体并入本文。在一些实施方式中,如下提供合成二酰基脂质:



[0250] 优选地,靶向淋巴的缀合物包括长度为8个或更多个碳单位的脂质。据信增加脂质单位的数量可以减少脂质插入细胞质膜中,其使脂质缀合物保持自由结合白蛋白和运输至淋巴结。

[0251] 例如,在一些实施方式中,脂质可以是由两个C18烃尾部组成的二酰基脂质。在某些实施方式中,用于制备靶向淋巴结的脂质缀合物的脂质不是单链烃(例如C18)。

[0252] (ii) 分子佐剂

[0253] 在某些实施方式中,两亲性寡核苷酸缀合物与两亲性缀合物一起使用。寡核苷酸缀合物通常包含免疫刺激性寡核苷酸。

[0254] 在某些实施方式中,免疫刺激性寡核苷酸可以用作模式识别受体 (PRR) 的配体。PRR的实例包括Toll样家族信号分子,其在先天免疫应答中起作用并且还影响后来的和更多的抗原特异性适应性免疫应答。因此,寡核苷酸可以用作Toll样家族信号分子的配体,例如Toll样受体9 (TLR9)。

[0255] 例如,可以通过TLR9在人的浆细胞样树突细胞和B细胞上检测未甲基化的CpG位点(Zaida等,Infection and Immunity,76 (5):2123-2129,(2008))。因此,寡核苷酸的序列可以包括一个或多个未甲基化的胞嘧啶-鸟嘌呤(CG或CpG,可互换使用)而核苷酸基序。“p”指DNA的磷酸二酯主链,如以下更详细所讨论,一些包含CG的寡核苷酸可以具有修饰的主链,例如硫代磷酸(PS)主链。

[0256] 在某些实施方式中,免疫刺激性寡核苷酸可以包含多于一个CG二核苷酸,其被连续地排列或被居中核苷酸分隔。CpG基序可以在寡核苷酸序列的内部。许多核苷酸序列以CG二核苷酸的数量和位置以及CG二聚体侧翼的精确碱基序列刺激TLR9。

[0257] 通常,CG ODN根据其序列、二级结构、和对人外周血单核细胞(PBMC)的影响进行分

类。这五个类别是A类(D型)、B类(K型)、C类、P类和S类(Vollmer, J&Krieg, A M, Advanced drug delivery reviews 61(3):195-204(2009),其通过引用并入本文)。CG ODN可以刺激I型干扰素(例如IFN α)的产生并诱导树突细胞(DC)成熟。一些类别的ODN通过间接细胞因子信号传导也是自然杀伤(NK)细胞的强激活剂。一些类别是人B细胞和单核成熟的强刺激剂(Weiner, G L, PNAS USA 94(20):10833-7(1997); Dalpke, A H, Immunology 106(1):102-12(2002); Hartmann, G, J of Immun. 164(3):1617-2(2000),其每个都通过引用并入本文)。

[0258] 根据一些实施方式,亲脂性CpG寡核苷酸缀合物可用于增强对抗原的免疫应答。亲脂性-CpG寡核苷酸由以下表述,其中“L”是亲脂性化合物,例如二酰基脂质,“Gn”是鸟嘌呤重复接头和“n”代表1、2、3、4或5。

[0259] 5'-L-GnTCCATGACGTTCTGACGTT-3'

[0260] 其他PRR Toll样受体包括TLR3和TLR7,其可分别识别双链RNA、单链和短双链RNA,和维甲酸诱导基因I(RIG-I)样受体、即RIG-I和黑色素瘤分化相关基因5(MDA5),其最广为人知的是胞质中的RNA感应受体。因此,在某些实施方式中,寡核苷酸包含TLR3、TLR7或RIG-I样受体或其组合的功能配体。

[0261] 免疫刺激性寡核苷酸的实例,以及制备方法是本领域已知的,参见例如Bodera, P. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov. 5(1):87-93(2011),其通过引用并入本文。

[0262] 在某些实施方式中,寡核苷酸货物包括两个或更多个免疫刺激性序列。

[0263] 寡核苷酸的长度可以在2-100个核苷酸碱基之间,其包括例如5个核苷酸碱基长度、10个核苷酸碱基长度、15个核苷酸碱基长度、20个核苷酸碱基长度、25个核苷酸碱基长度、30个核苷酸碱基长度、35个核苷酸碱基长度、40个核苷酸碱基长度、45个核苷酸碱基长度、50个核苷酸碱基长度、60个核苷酸碱基长度、70个核苷酸碱基长度、80个核苷酸碱基长度、90个核苷酸碱基长度、95个核苷酸碱基长度、98个核苷酸碱基长度、100个核苷酸碱基长度或更多。

[0264] 寡核苷酸的3'末端或5'末端可以缀合至极性嵌段或脂质。在某些实施方式中,寡核苷酸的5'末端连接至极性嵌段或脂质。

[0265] 寡核苷酸可以是DNA或RNA核苷酸,其通常包括杂环碱基(核苷酸碱基)、与杂环碱基连接的糖部分、和磷酸酯部分,其酯化糖部分的羟基官能团。主要天然存在的核苷酸包括尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶、腺嘌呤和鸟嘌呤作为杂环碱基,以及通过磷酸二酯键连接的核糖或脱氧核糖。在某些实施方式中,寡核苷酸由核苷酸类似物组成,其相对于DNA或RNA配对物,已经被化学修饰以改善对靶受体的稳定性、半衰期或特异性或亲和力。化学修饰包括核苷酸碱基、糖部分、核苷酸键或其组合的化学修饰。如在本文中所使用的,“修饰的核苷酸”或“化学修饰的核苷酸”定义了具有对杂环碱基、糖部分或磷酸酯部分组成中的一个或多个化学修饰的核苷酸。在某些实施方式中,与相同核苷酸序列的DNA或RNA寡核苷酸相比,修饰的核苷酸的电荷减少。例如,寡核苷酸可以具有低的负电荷,不带电或正电荷。

[0266] 通常,核苷类似物支持能够通过Watson-Crick碱基配对与标准多核苷酸碱基氢键键合的碱基,其中类似物主链以允许寡核苷酸类似物分子与标准多核苷酸中的碱基之间以序列特异性方式进行氢键键合的方式提供碱基。在某些实施方式中,类似物具有基本不带电的含磷主链。

[0267] (iii) 嵌合抗原受体配体

[0268] 在一些实施方式中,两亲性配体缀合物的CAR配体是抗原蛋白或多肽,例如肿瘤相关抗原或其部分。在一些实施方式中,CAR配体是小分子、肽或蛋白质结构域或其片段。在一些实施方式中,配体结合至CAR表达细胞上的CAR。因此,本文所述的方法和组合物利用与CAR表达细胞(例如CAR-T细胞)互补的两亲性配体缀合物。在一些实施方式中,CAR配体结合至上文所述的任何一种CAR。

[0269] 在一些实施方式中,肽是2-100个氨基酸,其包括例如5个氨基酸、10个氨基酸、15个氨基酸、20个氨基酸、25个氨基酸、30个氨基酸、35个氨基酸、40个氨基酸、45个氨基酸、或50个氨基酸。在一些实施方式中,肽大于50个氨基酸。在一些实施方式中,肽大于100个氨基酸。

[0270] 在一些实施方式中,蛋白质/肽是线性的、分支的或环状的。在一些实施方式中,肽包括D氨基酸、L氨基酸或其组合。在一些实施方式中,肽或蛋白质在肽或蛋白质的N-末端或C-末端缀合至极性嵌段或脂质。

[0271] 在一些实施方式中,蛋白质或多肽可以是可诱导或增加免疫系统以产生对蛋白质或肽的抗体和T细胞应答的任何蛋白质或肽。癌抗原是通常优先由癌细胞(即,其在癌细胞中的表达水平高于在非癌细胞上的表达),并且在某些情况下仅由癌细胞表达的抗原。癌抗原可以在癌细胞内或在癌细胞表面上表达。癌抗原可以是,但不限于,CD19、TRP-1、TRP-2、MART-1/Melan-A、gp100、腺苷脱氨酶结合蛋白(ADAbp)、FAP、亲环蛋白b、大肠相关抗原(CRC)—C017-1A/GA733、癌胚抗原(CEA)、CAP-1、CAP-2、etv6、AML1、前列腺特异性抗原(PSA)、PSA-1、PSA-2、PSA-3、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、T细胞抗原/CD3 ζ 链和CD20。癌抗原可选自由MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2(MAGE-B2)、MAGE-Xp3(MAGE-B3)、MAGE-Xp4(MAGE-B4)、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-C5、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、GAGE-9、BAGE、RAGE、LAGE-1、NAG、GnT-V、MUM-1、CDK4、酪氨酸酶、p53、MUC家族、HER2/neu、p21ras、RCAS1、甲胎蛋白、钙粘蛋白、 α -连环蛋白、 β -连环蛋白、 γ -连环蛋白、p120ctn、gp100Pmel117、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、腺瘤性息肉病大肠杆菌蛋白(APC)、富铁蛋白、连接蛋白37、Ig表位、p15、gp75、GM2神经节苷脂、GD2神经节苷脂、人类乳头瘤病毒蛋白、Smad家族的肿瘤抗原、lmp-1、P1A、EBV编码的核抗原(EBNA)-1、脑糖原磷酸化酶、SSX-1、SSX-2(HOM-MEL-40)、SSX-1、SSX-4、SSX-5、SCP-1和CT-7、CD20或c-erbB-2。

[0272] 在一些实施方式中,本公开的方法和组合物与用于静脉内输注的KymriahTM(tisagenlecleucel;Novartis)悬浮液(以前的CTL019)组合使用。例如,在一个实施方式中,本公开的组合物包含两亲性配体缀合物,其中CAR配体是CD19或其抗原部分。可以将这种组合物与CD19特异性CAR-T细胞(例如CD19特异性CAR-T细胞群),例如KymriahTM(tisagenlecleucel;Novartis)一起施用于受试者,用于治疗癌症,例如B细胞急性淋巴细胞白血病(ALL)。

[0273] 合适的抗原是本领域已知的,并且可以从商业政府和科学来源获得。在某些实施方式中,抗原是完整的灭活或辐射的肿瘤细胞。抗原可以是源自肿瘤的纯化的或部分纯化的多肽。抗原可以通过在异源表达系统中表达编码多肽抗原的DNA来产生的重组多肽。抗原可以是编码全部或部分抗原蛋白的DNA。DNA可以是载体DNA的形式,例如质粒DNA。

[0274] 在某些实施方式中,抗原可以作为单一抗原提供或可以组合提供。抗原也可以多肽或核酸的复杂混合物形式提供。

[0275] 在一些实施方式中,两亲性配体缀合物的CAR配体是标签,其结合至包含标签结合结构域的CAR,如上所述。在一些实施方式中,标签是异硫氰酸荧光素 (FITC)、链霉抗生物素蛋白、生物素、二硝基苯酚、多甲藻素叶绿素蛋白复合物、绿色荧光蛋白、枣红蛋白 (PE)、辣根过氧化物酶、棕榈酰化、亚硝基化、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶或麦芽糖结合蛋白。

[0276] 在一些实施方式中,CAR包含肿瘤抗原结合结构域,并且CAR配体是肿瘤抗原或其片段。在一些实施方式中,CAR包含标签结合结构域(例如AT-CAR),并且CAR配体是标签。在一些实施方式中,CAR是串联CAR,并且CAR配体结合至串联CAR上的至少一个抗原结合结构域。在一些实施方式中,CAR是双特异性的,并且包含肿瘤抗原结合结构域和标签结合结构域,并且CAR配体是标签。在一些实施方式中,CAR是双特异性的,并且包含肿瘤抗原结合结构域和标签结合结构域,并且CAR配体是肿瘤抗原或其片段。在一些实施方式中,CAR包含第一第一肿瘤相关抗原结合结构域和第二肿瘤相关抗原结合结构域,并且CAR配体是第一或第二肿瘤相关抗原。

[0277] (iv) 极性嵌段/接头

[0278] 为了将缀合物有效地运输至淋巴结,缀合物应保持可溶。因此,在一些实施方式中,极性嵌段接头是包括在货物和脂质之间以增加缀合物的溶解度。极性嵌段降低或阻止脂质插入细胞质膜的能力,例如邻近注射部位的组织中的细胞。极性嵌段也可以降低或阻止货物的能力,例如含有PS主链的合成寡核苷酸在给药部位与细胞外基质蛋白质非特异性结合。在一些实施方式中,极性嵌段增加缀合物的溶解度而不阻止其与白蛋白结合的能力。据信这种特征的组合物允许缀合物结合至存在于血清或间质液中的白蛋白上,并保持循环直到白蛋白被运输到或保留在淋巴结中。在一些实施方式中,货物用作极性嵌段,并且一次不要单独的极性嵌段。

[0279] 极性嵌段的长度和组合物可以根据所选择的脂质和货物进行调节。例如,对于寡核苷酸缀合物,寡核苷酸本身可以是足够极性的以确保缀合物的溶解度,例如长度为10个、15个、20个或更多个核苷酸的寡核苷酸。因此,在某些实施方式中,不需要另外的剂型嵌段接头。但是,根据氨基酸序列,一些脂化肽可能基本不溶。在这些情况下,可能需要包括模拟极性寡核苷酸作用的极性嵌段。

[0280] 在一些实施方式中,极性嵌段用作适用于本公开的方法中的任何脂质缀合物的一部分,例如,两亲性寡核苷酸缀合物和两亲性配体缀合物,其减少白蛋白上的细胞膜插入/优先分配。在一些实施方式中,合适的极性嵌段包括但不限于例如以上讨论的寡核苷酸、亲水性聚合物,其包括但不限于聚乙二醇(MW:500Da至20,000Da)、聚丙烯酰胺(MW:500Da至20,000Da)、聚丙烯酸;一串亲水性氨基酸,例如丝氨酸、酸氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸或其组合多糖,其包括但不限于葡聚糖(MW:1,000Da至2,000,000Da),或其组合。

[0281] 在一些实施方式中,极性嵌段,无论是单独的组分或货物本身,基于极性嵌段的分子量向整个脂质缀合物提供溶解度。例如,在一些实施方式中,具有2,000Da分子量的极性嵌段足以使脂质缀合物可溶用于白蛋白结合。在一些实施方式中,极性嵌段具有约300至约20,000Da的分子量。在一些实施方式中,极性嵌段具有约1,000至约15,000Da的分子量。在

一些实施方式中,极性嵌段具有约1,500至约10,000Da的分子量。在一些实施方式中,极性嵌段具有约2,000至约5,000Da的分子量。在一些实施方式中,极性嵌段具有约1,000至约2,500Da的分子量。在一些实施方式中,极性嵌段具有约1,000至约3,000Da的分子量。在一些实施方式中,极性嵌段具有约1,000至约3,500Da的分子量。在一些实施方式中,极性嵌段具有约1,000至约4,000Da的分子量。在一些实施方式中,极性嵌段具有约1,000至约5,000Da的分子量。在一些实施方式中,极性嵌段具有约5,000至约10,000Da的分子量。在一些实施方式中,极性嵌段具有约15,000至约20,000Da的分子量。

[0282] 在一些实施方式中,疏水性脂质和接头/货物共价连接。在一些实施方式中,共价键是不可裂解的键或可裂解的键。在一些实施方式中,不可裂解的键包括酰胺键或磷酸键,和可裂解的键包括二硫键、酸可裂解的键、酯键、酸酐键、可生物降解的键或酶可裂解的键。

[0283] a. 乙二醇接头

[0284] 在某些实施方式中,极性嵌段是一个或多个乙二醇(EG)单元,优选地两个或多个EG单元(例如聚乙二醇(PEG))。例如,在某些实施方式中,脂质缀合物包括货物(例如CAR配体或分子佐剂)和通过聚乙二醇(PEG)分子或其衍生物或其类似物连接的两亲性脂质。

[0285] 在某些实施方式中,适用于本公开的方法的脂质缀合物包含连接至PEG的CAR配体,其反过来连接至疏水性脂质或脂质-Gn-ON缀合物,共价地或通过与寡聚物杂交的蛋白质-寡核苷酸缀合物的形成连接。EG单元的精确数目取决于脂质和货物,但是,通常极性嵌段可具有约1至约100、约20至约80、约30至约70、或约40和约60个EG单元。在某些实施方式中,极性嵌段具有约45至约55个EG单元。例如,在某些实施方式中,极性嵌段具有48个EG单元。

[0286] 在一些实施方式中,PEG分子具有约300-20,000道尔顿的分子量。在一些实施方式中,PEG分子具有约1,000道尔顿的分子量。在一些实施方式中,PEG分子具有约1,500道尔顿的分子量。在一些实施方式中,PEG分子具有约2,000道尔顿的分子量。在一些实施方式中,PEG分子具有约2,500道尔顿的分子量。在一些实施方式中,PEG分子具有约3,000道尔顿的分子量。在一些实施方式中,PEG分子具有约3,500道尔顿的分子量。在一些实施方式中,PEG分子具有约4,000道尔顿的分子量。在一些实施方式中,PEG分子具有约5,000道尔顿的分子量。在一些实施方式中,PEG分子具有约6,000道尔顿的分子量。在一些实施方式中,PEG分子具有约7,000道尔顿的分子量。在一些实施方式中,PEG分子具有约8,000道尔顿的分子量。在一些实施方式中,PEG分子具有约9,000道尔顿的分子量。在一些实施方式中,PEG分子具有约10,000道尔顿的分子量。在一些实施方式中,PEG分子具有约11,000道尔顿的分子量。在一些实施方式中,PEG分子具有约12,000道尔顿的分子量。在一些实施方式中,PEG分子具有约13,000道尔顿的分子量。在一些实施方式中,PEG分子具有约14,000道尔顿的分子量。在一些实施方式中,PEG分子具有约15,000道尔顿的分子量。在一些实施方式中,PEG分子具有约16,000道尔顿的分子量。在一些实施方式中,PEG分子具有约17,000道尔顿的分子量。在一些实施方式中,PEG分子具有约18,000道尔顿的分子量。在一些实施方式中,PEG分子具有约19,000道尔顿的分子量。在一些实施方式中,PEG分子具有约20,000道尔顿的分子量。

[0287] b. 寡核苷酸接头

[0288] 如上所述,在某些实施方式中,极性嵌段是寡核苷酸。极性嵌段接头可以具有任何序列,例如核苷酸序列可以是随机序列,或针对其分子或生化特性特别地选择的序列(例

如高极性)。在某些实施方式中,极性嵌段接头包括一个或多个系列的连续腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)、尿嘧啶(U)或其类似物。在某些实施方式中,极性嵌段接头由一些列连续的腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)、尿嘧啶(U)或其类似物组成。

[0289] 在某些实施方式中,接头是一个或多个鸟嘌呤,例如在1-10个鸟嘌呤之间。已经发现在血清蛋白存在下,改变货物例如CpG寡核苷酸和脂质尾部之间的鸟嘌呤数目控制了胶束稳定性。因此,可以基于缀合物对血清蛋白例如白蛋白的所需亲和力来选择接头中鸟嘌呤的数量。当货物是CpG免疫刺激性寡核苷酸并且脂质尾部是二酰基脂质时,鸟嘌呤的数量影响在血清存在下水溶液中形成的胶束解离的能力:20%的不稳定胶束(lipo-G₀T₁₀-CG)完好无损,而其余80%的胶束被破坏并与FBS组分结合。在鸟嘌呤的存在下,完整胶束的百分比从36%(lipo-G₂T₈-CG)增加至73%(lipo-G₄T₆-CG),并最终达到90%(lipo-G₆T₄-CG)。鸟嘌呤的数量增加到八个(lipo-G₈T₂-CG)和十个(lipo-G₁₀T₀-CG)不会进一步提高胶束稳定性。

[0290] 因此,在某些实施方式中,适用于本公开的方法的靶向淋巴结缀合物中的接头可以包括0、1或2个鸟嘌呤。如下更详细讨论的,包括3个或更多个连续鸟嘌呤的接头可用于形成具有适用于本公开方法的性质的胶束稳定缀合物。

[0291] C. 免疫原性组合物

[0292] 适用于本公开的方法的脂质缀合物可用于免疫原性组合物或用作疫苗中的组分。通常,本文公开的免疫原性组合物包括佐剂、抗原或其组合。佐剂和抗原的组合可以称为疫苗。当组合施用于受试者时,佐剂和抗原可以在分开的药物组合物中施用,或它们可以在相同的药物组着无中一起施用。当组合施用,佐剂可以是脂质缀合物,抗原可以是脂质缀合物,或者佐剂和抗原可以都是脂质缀合物。

[0293] 在一些实施方式中,适用于本公开的方法的免疫原性组合物包括单独或与佐剂组合施用的两亲性配体缀合物。在一些实施方式中,佐剂是但不限于明矾(例如氢氧化铝、磷酸铝);从*Q. saponaria*树的树皮中纯化的皂苷,例如QS21(通过HPLC分级洗脱在第21个峰中洗脱的糖脂;Antigenics, Inc., Worcester, Mass.);聚(双(羧基苯氧基)膦脂)(PCPP聚合物;Virus Research Institute, USA)、Flt3配体、利什曼原虫延伸因子(纯化的利什曼原虫蛋白;Corixa Corporation, Seattle, Wash.)、ISCOMS(免疫刺激复合物,其包含混合的皂苷、脂质并形成病毒大小的颗粒,并带有可容纳抗原的孔;CSL, Melbourne, Australia)、Pam3Cys、SB-AS4 (SmithKline Beecham佐剂系统#4,其包含明矾和MPL;SBB, Belgium)、形成胶束的非离子嵌段共聚物例如CRL 1005(这些包含疏水性聚氧丙烯的线性链,侧接聚氧乙烯的链,Vaxcel, Inc., Norcross, Ga.),和Montanide IMS(例如IMS 1312,水性纳米颗粒与可溶性免疫刺激剂的结合,Seppic)。

[0294] 在一些实施方式中,佐剂是TLR配体,例如如上讨论的那些。在一些实施方式中,通过TLR3起作用的佐剂包括但不限于双链RNA。在一些实施方式中,通过TLR4起作用的佐剂包括但不限于脂多糖的衍生物,例如单磷酸脂质A (MPLA;Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Mont) 和嘧啶二肽 (MDP;Ribi) 和苏氨酸基-嘧啶二肽 (t-MDP;Ribi);OM-174(与脂质A有关的葡萄糖胺二糖;OM Pharma SA, OM Pharma SA, Switzerland)。在一些实施方式中,通过TLR5起作用的佐剂包括但不限于鞭毛蛋白。在一些实施方式中,通过TLR7和/或

TLR8起作用的佐剂包括单链RNA、寡核糖核苷酸(ORN)、合成的低分子量化合物例如咪唑啉胺(例如咪唑莫特(R-837),雷西莫德(R-848))。在一些实施方式中,通过TLR9起作用的佐剂包括病毒或细菌来源的DNA,或合成的寡脱氧核苷酸(ODN),例如CpG ODN。在一些实施方式中,另一类佐剂是含有硫代磷酸酯的分子,例如硫代磷酸核苷酸类似物和含有硫代磷酸酯主链的核酸。

[0295] 在一些实施方式中,佐剂选自油乳剂(例如Freund's佐剂);皂甙制剂;病毒体和病毒样颗粒;细菌和微生物衍生物;免疫刺激性寡核苷酸;ADP-核糖基化毒素和解毒衍生物;明矾;BCG;含矿物质的成分(例如矿物盐,例如铝盐和钙盐、氢氧化物、磷酸盐、硫酸盐等);生物粘合剂和/或粘膜粘合剂;微粒;脂质体;聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯制剂;聚磷腈;鼠酰胺基肽;咪唑并喹诺酮化合物;和表面活性物质(例如溶血卵磷脂、普朗尼克多元醇、聚阴离子、肽、油乳剂、匙孔血蓝蛋白和二硝基苯酚)。

[0296] 在一些实施方式中,佐剂选自免疫调节剂,例如细胞因子、白介素(例如IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7等)、干扰素(例如 γ 干扰素)、巨噬细胞集落刺激因子和肿瘤坏死因子。

[0297] 在一些实施方式中,佐剂是包含免疫刺激性寡核苷酸的两亲性寡核苷酸缀合物,如上所述。

[0298] 在一些实施方式中,佐剂是STING(干扰素基因的刺激物)激动剂。免疫细胞中的STING信号传导通路是先天免疫应答的中枢介体,并且当受到刺激时,诱导各种干扰素、细胞因子和T细胞招募因子的表达,从而放大并增强免疫活性。近期研究已经表明STING激动剂是有效的佐剂并且可有效地引发免疫应答,例如描述于Dubensky,T.,等, *Therapeutic Advances in Vaccines*, Vol.1(4):131-143(2013);和Hanson,M.,等, *The Journal of Clinical Investigation*, Vol.125(6):2532-2546(2015),其通过引用并入本文。

[0299] 在一些实施方式中,STING激动剂是环状二核苷酸。在某些实施方式中,环状二核苷酸包括但不限于cdAMP、cdGMP、cdIMP、c-AMP-GMP、c-AMP-IMP和c-GMP-IMP及其类似物,包括但不限于硫代磷酸酯类似物。在一些实施方式中,用于本公开的合适的环状二核苷酸描述于例如美国专利7,709,458和7,592,326;W02007/054279;US 2014/0205653;和Yan等 *Bioorg.Med.Chem Lett.*18:5631(2008),每个都通过引用并入本文。

[0300] 在某些实施方式中,STING激动剂是化学合成的。在某些实施方式中,STING激动剂是天然存在的环状二核苷酸的类似物。适用于本公开的STING激动剂,包括环状二核苷酸的类似物,提供于美国专利7,709,458和7,592,326;和US 2014/0205653。

[0301] 制备多肽的方法

[0302] 在一些实施方式中,使用重组DNA技术在转化的宿主细胞中制备本文所述用于两亲性缀合物(例如肿瘤相关抗原)的多肽。为此,制备了编码该肽的重组DNA分子。制备这种DNA分子的方法是本领域众所周知的。例如,抗原使用合适的限制酶从DNA上切除编码肽的序列。或者,抗原使用化学合成技术,例如磷酸胺法合成DNA分子。同样,抗原使用这些技术的组合。

[0303] 制备多肽的方法还包括能够在合适的宿主中表达肽的载体。载体包含编码与适当的表达控制序列有效地连接的肽的DNA分子。在将DNA分子插入载体之前或之后,影响这种有效连接的方法是众所周知的。表达控制序列包括启动子、激活子、增强子、操纵子、核糖体

核酸酶结构域、起始信号、终止信号、帽信号、聚腺苷酸化信号和参与转录或翻译控制的其他信号。

[0304] 其上具有DNA分子的所得载体用于转化合适的宿主。可以使用本领域公知的方法进行该转化。

[0305] 大量可用的和众所周知的宿主细胞中的任何一种都适用于本公开的方法。特定宿主的选择取决于本领域公认的许多因素。这些包括例如与所选表达载体的相容性、由DNA分子编码的肽的毒性、转化率、肽的回收容易性、表达特性、生物安全性和成本。在理解并非所有宿主对于特定DNA序列的表达可能都同样有效的前提下,必须在这些因素之间取得平衡。在这些通用准则中,有用的微生物宿主包括细菌(例如大肠杆菌)、酵母(例如酿酒酵母)和其他真菌、昆虫、织物、培养的哺乳动物(例如人)的细胞、或本领域已知的其他宿主。

[0306] 接着,培养并纯化转化的宿主。可以在常规发酵条件下培养宿主细胞以便表达所需化合物。这样的发酵条件是本领域众所周知的。最后,通过本领域众所周知的方法从培养物中纯化肽。

[0307] 化合物也可以通过合成方法制备。例如,可以使用固相合成技术。合适的技术是本领域众所周知的,并且包括描述于Merrifield(1973),Chem.Polypeptides,pp.335-61(Katsoyannis and Panayotis eds.);Merrifield(1963),J.Am.Chem.Soc.85:2149;Davis等(1985),Biochem.Intl.10:394-414;Stewart和Young(1969),Solid Phase Peptide Synthesis;美国专利3,941,763;Finn等(1976),The Proteins(3rd ed.)2:105-253;和Erickson等(1976),The Proteins(3rd ed.)2:257-527的那些。固相合成是制备单个肽的优选技术,因为它是制备小肽的最具成本效益的方法。可以通过众所周知的有机化学技术合成含有衍生化肽或含有非肽基团的化合物。

[0308] 分子表达/合成的其他方法是本领域普通技术人员通常已知的。

[0309] 上述核酸分子可以包含在载体中,其能够指导其表达在例如已被载体转导的细胞中表达。因此,除了多肽突变体之外,某些实施方式中还包括含有编码突变体的核酸分子的表达载体和用这些载体转染的细胞。

[0310] 适合使用的载体包括用于细菌的基于T7的载体(参见例如Rosenberg等,Gene 56:125,1987),用于哺乳动物细胞的pMSXND表达载体(Lee和Nathans,J.Biol.Chem.263:3521,1988),和用于昆虫细菌的杆状病毒来源的载体(例如Clontech,Palo Alto,Calif.的表达载体pBacPAKS)。可以将这样的载体中编码目的多肽的核酸插入物可操作地连接至启动子,该启动子例如基于寻求表达的细胞类型来选择。例如,可以用于细菌中的T7启动子,可以用于昆虫细胞的多面体蛋白启动子,和可用于哺乳动物细胞的巨细胞病毒或金属硫蛋白启动子。同样,在高级真核生物的情况下,阻止特异型和细胞类型特异性启动子是广泛可用的。这些启动子因其指导核酸分子在体内给定组织或细胞类型中表达的能力而得名。技术人员非常了解可用于指导核算表达的许多启动子和其他调节元件。

[0311] 除了有助于插入的核酸分子转录的序列之外,载体可以包含复制起点和其他编码选择标记的基因。例如,新霉素抗性(neo^r)基因将G418抗性赋予表达它的细胞,并且因此允许转染细胞的表型选择。本领域技术人员可以容易地确定给定的调节元件或选择标记是否适合用于特定的实验环境。

[0312] 适用的病毒载体包括例如逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒载体、疱疹病毒、猿猴

病毒40 (SV40) 和牛乳头瘤病毒载体 (参见例如Gluzman (Ed.), *Eukaryotic Viral Vectors*, CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)。

[0313] 包含并表达编码多肽突变体的核酸分子的原核或真核细胞也适用。细胞是转染的细胞,即,已经通过重组DNA技术将核酸分子例如编码突变多肽的核酸分子引入细胞中。这种细胞的后代也被认为适用于本公开的方法。

[0314] 表达系统的精确组分并不重要。例如,多肽突变体可以在原核宿主(例如大肠杆菌)中或在真核宿主(例如昆虫细胞(例如Sf21细胞))或哺乳动物细胞(例如COS细胞、NIH 3T3细胞或HeLa细胞)。这些细胞可从许多来源获得,包括American Type Culture Collection (Manassas, Va.)。在选择一种表达系统时,仅重要的是组分之间相互兼容。技术人员或普通人员能够做出这样的决定。此外,如果在选择表达系统时需要指导,技术人员可以咨询Ausubel等(*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, New York, N.Y., 1993)和Pouwels等(*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, 1985 Suppl. 1987)。

[0315] 表达的多肽可以使用常规生化程序从表达系统中纯化,并且可以用于与如本文所述的脂质缀合。

[0316] 药物组合物和给药方式

[0317] 在一些实施方式中,两亲性配体缀合物和CAR表达细胞(例如CAR T细胞)一起(同时或顺序)施用。在一些实施方式中,两亲性配体缀合物和佐剂(例如两亲性寡核苷酸缀合物)一起(同时或顺序)施用。在一些实施方式中,两亲性配体缀合物、佐剂(例如两亲性寡核苷酸缀合物)和CAR表达细胞(例如CAR T细胞)一起(同时或顺序)施用。在一些实施方式中,两亲性配体缀合物和CAR表达细胞(例如CAR T细胞)分开施用。在一些实施方式中,两亲性配体缀合物和佐剂(例如两亲性寡核苷酸缀合物)分开施用。在一些实施方式中,两亲性配体缀合物、佐剂(例如两亲性寡核苷酸缀合物)和CAR表达细胞(例如CAR T细胞)分开施用。

[0318] 在一些实施方式中,本公开提供了药物组合物,其包含两亲性配体缀合物和药学上可接受的稀释剂、载体、增溶剂、乳化剂、防腐剂和/或佐剂。在一些实施方式中,佐剂是两亲性寡核苷酸缀合物。在一些实施方式中,佐剂是STING激动剂(例如CDG)。在一些实施方式中,佐剂被配制成单独的药物组合物。

[0319] 在一些实施方式中,可接受的制剂材料优选地是在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒。在某些实施方式中,制剂材料用于皮下注射和/或静脉注射。在一些实施方式中,药物组合物包含用于修饰、维持或保持组合物的例如pH、渗透度、粘度、澄清度、颜色、等渗性、气味、无菌性、稳定性、溶解或释放速率、吸附或渗透的制剂材料。在一些实施方式中,合适的制剂材料包括但不限于氨基酸(例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、精氨酸或赖氨酸);抗菌素;抗氧化剂(例如抗坏血酸、亚硫酸钠或亚硫酸氢钠);缓冲液(例如硼酸盐、碳酸氢盐、Tris-HCl、柠檬酸盐、磷酸盐或其他有机酸);填充剂(例如甘露醇或甘氨酸);螯合剂(例如乙二胺四乙酸(EDTA));络合剂(例如咖啡因、聚乙烯吡咯烷酮、 β -环糊精或羟丙基- β -环糊精);填料;单糖;二糖;和其他碳水化合物(例如葡萄糖、甘露糖或糊精);蛋白质(例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白);着色、调味和稀释剂;乳化剂;亲水性聚合物(例如聚乙烯吡咯烷酮);低分子量多肽;成盐离子(例如钠);防腐剂(例如苯扎氯铵、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、双氯苯双胍己烷、山梨酸或过氧化氢);溶

剂(例如甘油、丙二醇或聚乙二醇);糖醇(例如甘露醇或山梨糖醇);悬浮剂;表面活性剂或湿润剂(例如普朗尼克、PEG、脱水山梨糖醇酯、聚山梨酯如聚山梨酯20、聚山梨酯80、triton、氨丁三醇、卵磷脂、胆固醇、替罗沙星);稳定性增强剂(例如蔗糖或山梨糖醇);张力增强剂(例如碱金属卤化物,优选氯化钠或氯化钾、甘露醇山梨醇);运载工具;稀释剂;赋形剂和/或药物佐剂。(Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A.R.Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1995)。在某些实施方式中,制剂包含PBS; 20mM NaOAc, pH 5.2, 50mM NaCl; 和/或10mM NaOAc, pH 5.2, 9%蔗糖。在一些实施方式中,最佳药物组合物由本领域技术人员根据例如预期的给药途径、递送形式和所需剂量确定。参见例如上文的《Remington's Pharmaceutical Sciences》。在一些实施方式中,这种组合物可影响两亲性缀合物的物理状态、稳定性、体内释放速率和体内清除速率。

[0320] 在一些实施方式中,药物组合物中的主要工具或载体本质上可以是水性或非水性的。例如,在一些实施方式中,合适的工具或载体是注射用水、生理盐水溶液或人工脑脊液,可能补充了肠胃外给药组合物中常见的其他物质。在一些实施方式中,盐水包括等渗磷酸盐缓冲盐水。在某些实施方式中,中性缓冲盐水或与血清白蛋白混合的盐水是进一步的示例性载体。在一些实施方式中,药物组合物包含约pH 7.0-8.5的Tris缓冲液,或约pH 4.0-5.5的乙酸盐缓冲液,其可以进一步包括山梨糖醇或其合适的替代物。在一些实施方式中,包含两亲性缀合物的组合物可以通过将具有所需纯度的所选组合物与冻干并或水溶液形式的任选制剂试剂(Remington's Pharmaceutical Sciences上述)混合来制备用于储存。此外,在一些实施方式中,包含两亲性缀合物的组合物可以使用合适的赋形剂例如蔗糖来配制成冻干物。

[0321] 在一些实施方式中,可以选择药物组合物用于肠胃外递送。在一些实施方式中,可以选择组合物用于吸入或通过消化道例如口服递送。这种药学上可接受的组合物的制备在本领域技术人员的能力范围内。

[0322] 在一些实施方式中,制剂组分以给药部位可接受的浓度存在。在一些实施方式中,使用缓冲液以维持组合物在生理pH或稍低的pH,通常在约5至8个pH范围内。

[0323] 在一些实施方式中,当考虑肠胃外给药时,治疗组合物可以是药学上可接受的载体中的无热原的、包含两亲性缀合物的肠胃外可接受的水溶性的形式。在一些实施方式中,肠胃外注射的载体是无菌蒸馏水,其中两亲性缀合物被配制成适当保存的无菌等渗溶液。在一些实施方式中,制备可以包括用试剂配制所需分子,例如可注射的微球、可生物降解的颗粒、高分子化合物(例如聚乳酸或聚乙醇酸)、珠或脂质体,其可以提供产品的受控释放或持续释放,然后通过长效注射进行递送。在一些实施方式中,还可以使用透明质酸,并且可以具有促进循环中持续时间的作用。在一些实施方式中,可植入药物递送装备可用于引入所需分子。

[0324] 在一些实施方式中,可以配制药组合物用于吸入。在一些实施方式中,可以配制两亲性缀合物用于吸入的干粉。在一些实施方式中,可以将包含两亲性缀合物的吸入溶液与推进剂一起配制以用于气雾剂递送。在一些实施方式中,溶液可以被雾化。肺部给药进一步描述于PCT申请PCT/US94/001875,其中描述了化学修饰蛋白质的肺部递送。

[0325] 在一些实施方式中,预期制剂可以口服给药。在一些实施方式中,以这种方式给药的两亲性缀合物可以与或不与通常用于复合固体剂型例如片剂和胶囊剂的那些载体一起

配制。在一些实施方式中,可以设计胶囊以在生物利用度最大化并且全身前降解最小化时在胃肠道中的点释放制剂的活性部分。在一些实施方式中,可以包括至少一种另外的试剂以促进两亲性缀合物的吸收。在某些实施方式中,也可以使用稀释剂、调味剂、低熔点蜡、植物油、润滑剂、助悬剂、片剂崩解剂和粘合剂。

[0326] 在一些实施方式中,药物组合物可以包含有效量的两亲性缀合物与适用于片剂制造的无毒赋形剂的混合物。在一些实施方式中,通过将片剂溶解于无菌水或另一种合适的载体中,可以将溶液制成单位剂量形式。在一些实施方式中,合适的赋形剂包括但不限于惰性稀释剂例如碳酸钙、碳酸钠或碳酸氢钠、乳糖或磷酸钙;或结合剂,例如淀粉、明胶或阿拉伯胶;或润滑剂例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉。

[0327] 其他药物组合物对本领域技术人员将是显而易见的,其包括在持续或可控递送制剂中包括两亲性缀合物的制剂。在一些实施方式中,用于制备多种其他持续或可控递送方式的技术,例如脂质体载体、可生物降解的微粒或多孔珠和储库注射剂,也是本领域技术人员已知的。参见例如PCT申请PCT/US93/00829,其描述了用于药物组合物递送的多孔聚合物微粒的控制释放。在一些实施方式中,缓释制剂可包括截面形状形式的半透性聚合物基质,例如薄膜或微胶囊。缓释基质可以包括聚酯、水凝胶、聚丙交酯(美国专利3,773,919和EP 058,481)、L-谷氨酸和 γ -L-谷氨酸的共聚物(Sidman等,Biopolymers,22:547-556 (1983))、聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯)(Langer等,J.Biomed.Mater.Res.,15:167-277 (1981)和Langer,Chem.Tech.,12:98-105 (1982))、乙烯醋酸乙烯酯(Langer等,同上)或聚-D(-)-3-羟基丁酸(EP 133,988)。在一些实施方式中,缓释组合物还可包括脂质体,其可通过本领域已知的几种方法的任何一种来制备。参见例如Eppstein等Proc.Natl.Acad.Sci.USA,82:3688-3692 (1985);EP 036,676;EP 088,046和EP 143,949。

[0328] 在一些实施方式中,用于体内给药的药物组合物是无菌的。在一些实施方式中,无菌是通过无菌滤膜过滤来实现的。在某些实施方式中,组合物是冻干的时,在冻干和重构之前或之后施用这种方法进行灭菌。在一些实施方式中,肠胃外施用的组合物以冻干形式或溶液形式储存。在一些实施方式中,肠胃外组合物被置于具有无菌进出口的容器中,例如具有皮下注射针可刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶。

[0329] 在一些实施方式中,一旦配制了药物组合物,就将其以溶液、悬浮液、凝胶、乳剂、固体或脱水或冻干粉末储存在无菌小瓶中。在一些实施方式中,这样的制剂以现用现配形式或以在给药前重构的形式(例如冻干)储存。

[0330] 在一些实施方式中,提供了用于产生单剂量给药单位的试剂盒。在一些实施方式中,试剂盒可以包含干燥蛋白质的第一容器和具有水性制剂的第二容器。在一些实施方式中,包括了包含单腔室和多腔室预填充注射器的试剂盒(例如液体注射器和溶血注射器)。

[0331] 在一些实施方式中,包含两亲性缀合物的药物组合物的有效量将取决于例如治疗背景和目的。本领域的技术人员经理解,根据某些实施方式,用于治疗的合适剂量水平将因此部分地取决于所递送的分子,使用两亲性缀合物的指示、给药途径、和患者的身材(体重、体表或器官大小)和/或病情(年龄和总体健康)。在一些实施方式中,临床医生可以滴定剂量并改变给药途径以获得最佳治疗效果。

[0332] 在一些实施方式中,在所用制剂中,给药频率将考虑到两亲性缀合物的药代动力学参数。在一些实施方式中,临床医生将施用组合物直至达到所需效果的剂量。在一些实施

方式中,组合物因此可以随着时间推移以单剂量、或以两剂或更多剂量(其可以包含或不包含相同量的所需分子)、或通过植入装置或导管的连续输注的形式给药。本领域普通技术人员常规地进一步精炼合适的剂量,并且在她们常规执行的任务范围内。在一些实施方式中,可以通过使用适当剂量反应数据来确定合适的剂量。

[0333] 在一些实施方式中,药物组合物的给药途径与已知方法一致,例如口服、通过静脉内、腹膜内、脑内(实质内)、脑室内、肌内、皮下、眼内、动脉内、门内或病变内途径注射;通过持续释放系统或通过植入装置。在某些实施方式中,可以通过推注或连续地通过输注或通过植入装置来施用组合物。在某些实施方式中,可以通过不同途径施用联合疗法的各个元件。

[0334] 在一些实施方式中,可以通过植入所需分子已被吸收或封装的膜、海绵或另一种合适的材料来局部地施用组合物。在一些实施方式中,施用植入装置时,该装置可以被植入任何合适的组织或器官中,并且所期望的分子的递送可以通过输注、定时释放的推注或连续施用。在一些实施方式中,可以期望以离体方式使用包含两亲性缀合物的药物组合物。在这种情况下,将已从患者体内取出的细胞、组织和/或器官暴露于包含两亲性缀合物的药物组合物中,然后将细胞、组织和/或器官随后植入回患者体内。

[0335] 在一些实施方式中,两亲性缀合物可以通过使用本文所述的那些方法植入已遗传工程改造的表达和分泌欧丽娜无的某些细胞来递送。在一些实施方式中,这种细胞可以是动物或人细胞,并且可以是自体的、异源的或异种的。在一些实施方式中,细胞可以被永生。在一些实施方式中,为了减少免疫应答的机会,将细胞包封以避免周围组织的浸润。在一些实施方式中,包封材料通常是生物相容的、半透性的聚合物外壳或膜,其允许蛋白质产物的释放但阻止患者的免疫系统或周围组织的其他有害因素破坏的细胞。

[0336] 使用方法

[0337] 在一些实施方式中,本公开提供了在受试者体内扩增或激活CAR效应细胞(例如CAR-T细胞)的方法,其包括施用包含本文所述的两亲性配体缀合物的组合物。

[0338] 在一些实施方式中,本公开提供了在受试者体内刺激CAR效应细胞(例如CAR-T细胞)增殖的方法,其包括施用包含本文所述的两亲性配体缀合物的组合物。

[0339] 确定细胞扩增、激活和增殖的方法是本领域技术人员已知的。例如,可以通过分离细胞和通过流式细胞仪分析来确定特定位置(例如淋巴结、血液、肿瘤)的细胞数量。在一些实施方式中,将细胞用合适的标记物,例如激活标志(例如CD80、CD86、41BBL、ICOSL或OX40L)和/或增殖标志(例如Ki67)染色。在一些实施方式中,通过将染料(例如结晶紫)引入细胞中并测量染料随时间的稀释度来测量细胞数量,其中稀释度指示细胞增殖。

[0340] 在一些实施方式中,本公开提供了用于治疗患有与抗原的康达或表达升高相关的疾病、病症或病情的受试者的方法,其包括向受试者施用靶向所述抗原的CAR效应细胞(例如CAR-T细胞)和两亲性配体缀合物。

[0341] 在一些实施方式中,在接受两亲性配体缀合物之前,向受试者施用CAR效应细胞(CAR-T细胞)。在一些实施方式中,在接受两亲性配体缀合物之后,向受试者施用CAR效应细胞(CAR-T细胞)。在一些实施方式中,向受试者依次或同时施用CAR效应细胞(CAR-T细胞)和两亲性配体缀合物。

[0342] 在一些实施方式中,其中CAR包含标签结合结构域,本文公开的方法进一步包括施

用标记蛋白的制剂,其中标签结合结构域结合标记蛋白。在一些实施方式中,标记蛋白的蛋白质是抗体或抗原结合片段。在一些实施方式中,标签结合结构域是抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,在施用CAR效应细胞(例如CAR T细胞)和两亲性配体缀合物之前,将标记蛋白的制剂施用于受试者。在一些实施方式中,将标记蛋白的制剂与CAR效应细胞(例如CAR T细胞)和两亲性配体缀合物同时(同时或依次)施用于受试者。在一些实施方式中,在施用CAR效应细胞(例如CAR T细胞)和两亲性配体缀合物之后,将标记蛋白的制剂施用于受试者。

[0343] 癌症和癌症免疫疗法

[0344] 在一些实施方式中,本文所述的两亲性配体缀合物可用于治疗与异常细胞凋亡和分化过程(例如细胞增殖性疾病(例如过度增殖性疾病)或细胞分化性疾病,例如癌症)相关的病症。适用于本发明的方法治疗的癌症的非限制性实例在下文描述。

[0345] 细胞增殖性和/或分化性疾病的实例包括癌症(例如癌、肉瘤、转移性疾病或造血肿瘤疾病,例如白血病)。转移性肿瘤可源自多种原发性肿瘤类型,其包括但不限于前列腺癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌和肝癌。因此,本文所用的包含两亲性配体缀合物的组合物可以施用于患有癌症的患者。

[0346] 如在本文中所使用的,我们可以使用术语“癌症”(或“癌性”)、“过度增殖”、“和”肿瘤性”来指具有自主生长能力的细胞(即以快速增殖的细胞为特征的异常状态或状况)。过度增殖和肿瘤性疾病状态可以分类为病理性(即表征或构成疾病状态),或它们可以分类为非病理性(即偏离正常但与疾病状态无关)。术语旨在包括所有类型的癌性生长或致癌过程、转移性组织或恶性转化的细胞、组织、或器官,而与组织病理学类型或侵入性阶段无关。“病理性过度增殖”细胞发证在以恶性肿瘤生长为特征的疾病状态中。非病理性过度增殖细胞的实例包括与伤口修复相关的细胞的增殖。

[0347] 术语“癌症”或“肿瘤”用于指各种器官系统的恶性肿瘤,包括影响肺、乳腺、甲状腺、淋巴管和淋巴组织、胃肠道和泌尿生殖道的那些,以及通常被认为包括恶性肿瘤例如大多数结肠癌、肾细胞癌、前列腺癌和/或睾丸肿瘤、肺肺小细胞癌、小肠癌和食道癌的腺癌。

[0348] 术语“癌”是本领域公认的,并且是指上皮或内分泌组织的恶性肿瘤,其包括呼吸系统癌、胃肠道系统癌、泌尿生殖系统癌、睾丸癌、乳腺癌、前列腺癌、内分泌系统癌和黑色素瘤。两亲性配体缀合物可用于治疗患有、怀疑患有、或可能具有高风险发展为包括肾癌或黑色素瘤或任何病毒疾病的任何类型癌症的患者。示例性癌包括由子宫颈、肺、前列腺、乳腺、头和脖子、结肠和卵巢的组织形成的那些。术语还包括癌肉瘤,其包括由癌组织和肉瘤组织组成的恶性肿瘤。“腺癌”指源自腺组织或其中肿瘤细胞形成可识别的腺结构的癌。

[0349] 增殖性疾病的其他实例包括造血肿瘤疾病。如在本文中所使用的,术语“造血肿瘤疾病”包括涉及造血起源的增殖/肿瘤细胞的疾病,例如源自髓样、淋巴或幼红细胞系谱系或其前体细胞的疾病。优选地,该疾病源自分化差的急性白血病(例如成红细胞白血病和急性巨核细胞白血病)。其他示例性骨髓疾病包括但不限于急性早幼粒细胞白血病(APML)、急性骨髓性白血病(AML)和慢性粒细胞性白血病(CML)(综述于Vaickus, L. (1991) Crit.Rev.in Oncol./Hematol.11:267-97);淋巴恶性肿瘤包括但不限于急性淋巴细胞白血病(ALL),其包括B谱系ALL和T谱系ALL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、前淋巴细胞性白血病(PLL)、毛细胞白血病(HLL)和Waldenstrom氏巨球蛋白血症(WM)。恶性淋巴瘤的其他形式

包括但不限于非霍奇金淋巴瘤及其变体、外周T细胞淋巴瘤、成人T细胞白血病/淋巴瘤(ATL)、皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)、大颗粒淋巴细胞白血病(LGF)、霍奇金氏病和里德斯特恩伯格病。

[0350] 本领域技术人员将认识到,足以减少肿瘤生长和大小的两亲性缀合物的量或治疗有销量不仅会因为所选择的特定化合物或组合物而异,而且还取决于给药途径、所治疗疾病的性质以及患者的年龄和状态,并最终将由患者的医师或药剂师决定。在本方法中使用的化合物给出的时间长度会因人而异。

[0351] 在一些实施方式中,本公开提供了在需要其的受试者中降低或减小肿瘤大小或抑制肿瘤生长的方法,其包括向受试者施用本文所述的两亲性配体缀合物,其中受试者正在接受或已接受CAR效应细胞疗法(例如CAR-T细胞疗法)。在一些实施方式中,本公开提供了在患有癌症的受试者中诱导抗肿瘤应答的方法,其包括向受试者施用本文所述的两亲性配体缀合物,其中受试者正在接受或已接受CAR效应细胞疗法(例如CAR-T细胞疗法)。

[0352] 在一些实施方式中,本公开提供了在受试者中刺激针对表达抗原的靶细胞群体或靶组织的免疫应答的方法,其包括施用靶向所述抗原的效应CAR细胞(例如CAR-T细胞)和两亲性配体缀合物。在一些实施方式中,免疫应答是T细胞介导的免疫应答。在一些实施方式中,免疫应答是抗肿瘤免疫应答。在一些实施方式中,靶细胞群或靶组织是肿瘤细胞或肿瘤组织。

[0353] 本领域技术人员将认识到,本文提及的治疗扩展到所指出的癌症和症状的预防以及治疗。

[0354] 感染性疾病

[0355] 在一些实施方式中,本文公开的两亲性配体缀合物可用于治疗急性或慢性感染性疾病。因为病毒感染主要是由T细胞清除的,所以在更快速或更彻底地清除感染性病毒剂对动物或人类受试者有益的情况下,T细胞活性的增加在治疗上是有用的。最近,已经研究了CAR-T细胞疗法在治疗例如人免疫缺陷病毒(HIV)病毒感染中的有用性,描述于PCT申请WO 2015/077789;Hale等,(2017)Engineering HIV-Resistant, Anti-HIV Chimeric Antigen Receptor T Cells.Molecular Therapy, Vol.25(3):570-579;Liu等,(2016).ABSTRACT.Journal of Virology,90(21),9712-9724;Liu等,(2015).ABSTRACT.Journal of Virology,89(13),6685-6694;Sahu等,(2013).Virology,446(1-2),268-275。

[0356] 因此,在一些实施方式中,将两亲性配体缀合物施用于局部或系全身性病毒感染的治疗,其包括但不限于免疫缺陷(例如HIV)、乳头瘤(例如HPV)、疱疹(例如HSV)、脑炎、流感(例如人流感病毒A)和普通感冒(例如人鼻病毒)病毒感染。在一些实施方式中,包括两亲性配体缀合物的药物制剂被局部施用以治疗皮肤疾病,例如疱疹皮损或带状疱疹或生殖器疣。在一些实施方式中,将两亲性配体缀合物施用以治疗全身性病毒疾病,其包括但不限于AIDS、流感、普通感冒或脑炎。

[0357] 在一些实施方式中,本公开提供了在患有病毒感染的受试者体内增加CAR效应细胞(例如CAR-T细胞)的增殖的方法,其包括施用包含两亲性配体缀合物的组合物,其中CAR包含病毒肽结合结构域(例如HIV Env结合结构域),并且其中两亲性配体缀合物包含病毒肽(例如HIV Env)。

[0358] 在一些实施方式中,本公开提供了在患有病毒感染的受试者体内扩增CAR效应细

胞(例如CAR-T细胞)的方法,其包括施用包含两亲性配体缀合物的组合物,其中CAR包含病毒肽结合结构域(例如HIV Env结合结构域),并且其中两亲性配体缀合物包含病毒肽(例如HIV Env)。

[0359] 在一些实施方式中,本公开提供了在需要其的受试者中减少病毒感染的方法,其包括向受试者施用本文所述的两亲性配体缀合物,其中受试者正在接受或已接受CAR效应细胞疗法(例如CAR-T细胞疗法)。在一些实施方式中,本公开提供了在患有癌症的受试者中诱导抗病毒应答的方法,其包括向受试者施用本文所述的两亲性配体缀合物,其中受试者正在接受或已接受CAR效应细胞疗法(例如CAR-T细胞疗法)。

[0360] 本领域技术人员将认识到,本文提及的治疗扩展到所指出的感染和症状的预防以及治疗。

[0361] 试剂盒

[0362] 本文提供的试剂盒包含至少本文所述的两亲性配体缀合物和使用说明。在一些实施方式中,试剂盒在合适的容器中包含两亲性配体缀合物、一个或多个对照、和本领域众所周知的各种缓冲液、试剂、酶和其他标准成分。在一些实施方式中,试剂盒进一步包含佐剂(例如两亲性寡核苷酸缀合物或STING激动剂(例如CDG))。因此,在一些实施方式中,两亲性配体缀合物和佐剂在同一小瓶中。在一些实施方式中,两亲性配体缀合物和佐剂在不同的小瓶中。

[0363] 在一些实施方式中,容器是至少一个小瓶、孔、试管、烧瓶、瓶、注射器或其他容器装置,两亲性配体缀合物置于其中,并且在某些情况下适当地等分。当提供了其他组分时,试剂盒可包含其他抗原放置该化合物的容器。试剂盒还可包括用于容纳两亲性配体缀合物的装置,以及密封封闭的任何其他试剂容器,以用于商业销售。这种容器可包括将期望的小瓶保留在其中的注射或吹塑塑料容器。容器和/或试剂盒可以包括带有使用说明和/或警告的标签。

[0364] 在一些实施方式中,本公开提供了一种试剂盒,其包含容器,所述容器包含组合物,所述组合物包含本文所述的两亲性配体缀合物,任选的药学上可接受的载体,以及包装说明书,其包括在接受CAR-T细胞疗法的个体中用于治疗癌症或延缓癌症发展的组合物的施用说明。在一些实施方式中,试剂盒进一步包含佐剂的施用说明,该佐剂用于在接受CAR-T细胞疗法的个体中治疗癌症或延缓癌症发展。在一些实施方式中,佐剂是本文所述的两亲性寡核苷酸缀合物。在一些实施方式中,佐剂是STING激动剂。在一些实施方式中,佐剂的CDG。

[0365] 在一些实施方式中,本公开提供了一种试剂盒,其包含包含药物,所述药物包含组合物,所述组合物包含本文所述的两亲性配体缀合物,任选的药学上可接受的载体,以及包装说明书,其包括在接受CAR-T细胞疗法的个体中用于激活CAR-T细胞、扩增CAR-T细胞或增加CAR-T细胞增殖的药物单独或与包含佐剂和任选的药学上可接受的载体的组合物组合的施用说明。

[0366] 在一些实施方式中,本公开提供了一种试剂盒,其包含容器,所述容器包含组合物,所述组合物包含本文所述的两亲性配体缀合物,和任选的药学上可接受的载体,以及包装说明书,其包括在接受CAR-T细胞疗法的个体中用于扩增CAR-T细胞的组合物疫苗的施用说明。在一些实施方式中,试剂盒进一步包含佐剂和用于在接受CAR-T细胞疗法的个体中扩

增CAR-T细胞的施用说明。在一些实施方式中,佐剂是本文所述的两亲性寡核苷酸缀合物。在一些实施方式中,佐剂是STING激动剂。在一些实施方式中,佐剂的CDG。

[0367] 在一些实施方式中,本公开提供了一种试剂盒,其包含药物,所述药物包含组合物,所述组合物包含本文所述的两亲性配体缀合物,任选的药学上可接受的载体,以及包装说明书,其包括在接受CAR-T细胞疗法的个体中用于扩增CAR-T细胞药物单独或与包含佐剂和任选的药学上可接受的载体的组合物组合的施用说明。在一些实施方式中,佐剂是本文所述的两亲性寡核苷酸缀合物。在一些实施方式中,佐剂是STING激动剂。在一些实施方式中,佐剂的CDG。

[0368] 在一些实施方式中,本公开提供了一种试剂盒,其包含容器,所述容器包含组合物,所述组合物包含本文所述的两亲性配体缀合物、任选的药物上可接受的载体,以及包装说明书,其包括在接受CAR-T细胞疗法的个体中用于增加CAR-T细胞增殖的组合物施用说明。在一些方面,试剂盒进一步包含佐剂和用于在接受CAR-T细胞疗法的个体中增加CAR-T细胞增殖的佐剂的施用说明。在一些实施方式中,佐剂是本文所述的两亲性寡核苷酸缀合物。在一些实施方式中,佐剂是STING激动剂。在一些实施方式中,佐剂的CDG。

[0369] 在一些实施方式中,本公开提供了一种试剂盒,其包含药物,所述药物包含组合物,所述组合物包含本文所述的两亲性配体缀合物、任选的药学上可接受的载体、以及包装说明书,其包括在在接受CAR-T细胞疗法的个体中药物单独地或与用于增加CAR-T细胞增殖的包含佐剂和任选的药学上可接受的载体的组合物组合的施用说明。在一些实施方式中,佐剂是本文所述的两亲性寡核苷酸缀合物。在一些实施方式中,佐剂是STING激动剂。在一些实施方式中,佐剂的CDG。

[0370] 在一些实施方式中,本文所述的任何试剂盒进一步包含CAR-T细胞,其包含与存在于两亲性配体缀合物中的CAR配体结合的CAR。

[0371] 本公开的其他实施方式

[0372] 在本节中,术语“实施方式”缩写为“E”,后接序号。例如,E1等同于实施方式1。

[0373] E1.一种在受试者体内扩增嵌合抗原受体(CAR) T细胞或增加CAR T细胞增殖的方法,其包括以足以在受试者体内扩增CAR T细胞的量施用组合物,其中组合物包含包含脂质、CAR配体和任选地接头的两亲性配体缀合物。

[0374] E2.根据实施方式1的方法,其中所述两亲性配体缀合物在生理条件下结合白蛋白。

[0375] E3.根据实施方式2的方法,其中CAR(-) T细胞的增殖在受试者中没有增加。

[0376] E4.一种在需要其的受试者中降低或减小肿瘤大小或抑制肿瘤生长的方法,其包括向受试者施用组合物,其中受试者正在接受或已接受嵌合抗原受体(CAR) T细胞疗法,并且其中所述组合物包含包含脂质、CAR配体和任选地接头的两亲性配体缀合物。

[0377] E5.一种在患有癌症的受试者中诱导抗肿瘤应答的方法,其包括向受试者施用组合物,其中受试者正在接受或已接受嵌合抗原受体(CAR) T细胞疗法,并且其中所述组合物包含包含脂质、CAR配体和任选地接头的两亲性配体缀合物。

[0378] E6.一种在受试者中刺激针对表达抗原的靶细胞群或靶组织的免疫应答的方法,所述方法包括向受试者施用靶向所述抗原的嵌合抗原受体(CAR) T细胞和组合物,其中所述组合物包含包含脂质、CAR配体和任选地接头的两亲性配体缀合物。

[0379] E7.根据实施方式6的方法,其中所述免疫应答是T细胞介导的免疫应答或抗肿瘤免疫应答。

[0380] E8.根据实施方式6或7的方法,其中所述靶细胞群或靶组织是肿瘤细胞或肿瘤组织。

[0381] E9.一种治疗患有与抗原表达或升高表达相关的疾病、病症或病状的受试者的方法,其包括向受试者施用靶向所述抗原的嵌合抗原受体(CAR) T细胞和组合物,其中所述组合物包含包含脂质、CAR配体和任选地接头的两亲性配体缀合物。

[0382] E10.根据实施方式1-3中任一项的方法,其中在接受CAR T细胞之前,受试者被施用组合物。

[0383] E11.根据实施方式1-3中任一项的方法,其中在接受CAR T细胞之后,受试者被施用组合物。

[0384] E12.根据实施方式1-3中任一项的方法,其中所述组合物和CAR T细胞被同时施用。

[0385] E13.根据前述实施方式中任一项的方法,其中CAR T细胞包含一个共刺激结构域。

[0386] E14.根据实施方式13的方法,其中所述一个共刺激结构域是CD28或4-1BB。

[0387] E15.根据实施方式1-14中任一项的方法,其中所述两亲性配体缀合物被运输至淋巴结。

[0388] E16.根据实施方式1-14中任一项的方法,其中所述两亲性配体缀合物被运输至腹股沟淋巴结和辅助淋巴结。

[0389] E17.根据实施方式1-16中任一项的方法,其中所述两亲性配体缀合物在运输至淋巴结时被插入抗原呈递细胞的膜中。

[0390] E18.根据实施方式17的方法,其中所述抗原呈递细胞是髓巨噬细胞、CD8+树突细胞和/或CD11b+树突细胞。

[0391] E19.根据实施方式1-18中任一项的方法,其中所述CAR配体在淋巴结中保留至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少8天、至少9天、至少10天、至少11天、至少12天、至少13天、至少14天、至少15天、至少16天、至少17天、至少18天、至少19天、至少20天、至少21天、至少22天、至少23天、至少24天或至少25天。

[0392] E20.根据实施方式1-19中任一项的方法,其中组合物还包含佐剂。

[0393] E21.根据实施方式20的方法,其中所述佐剂是两亲性寡核苷酸缀合物,其包含与脂质缀合的免疫刺激性寡核苷酸,具有或不具有接头,并且任选地是极性化合物。

[0394] E22.根据实施方式21的方法,其中所述免疫刺激性寡核苷酸结合模式识别受体。

[0395] E23.根据实施方式22的方法,其中所述免疫刺激性寡核苷酸包含CpG。

[0396] E24.根据实施方式21的方法,其中所述免疫刺激性寡核苷酸是针对toll样受体的配体。

[0397] E25.根据实施方式1-20中任一项的方法,其中所述接头选自亲水性聚合物、一串亲水性氨基酸、多糖或其组合。

[0398] E26.根据实施方式1-20中任一项的方法,其中所述接头包含“N”个连续的聚乙二醇单元,其中N在25-50之间。

[0399] E27.根据实施方式1-26中任一项的方法,其中所述脂质是二酰基脂质。

- [0400] E28.根据实施方式21-24中任一项的方法,其中所述接头是寡核苷酸接头。
- [0401] E29.根据实施方式28的方法,其中所述寡核苷酸接头包含“N”个连续的鸟嘌呤,其中N在0-2之间。
- [0402] E30.根据实施方式21-24和28-29中任一项的方法,其中所述脂质是二酰基脂质。
- [0403] E31.根据实施方式1-30中任一项的方法,其中CAR配体是肿瘤相关抗原,并且其中所述CAR包含肿瘤相关抗原结合结构域。
- [0404] E32.根据实施方式1-30中任一项的方法,其中所述CAR配体是标签,并且其中所述CAR包含标签结合结构域。
- [0405] E33.根据实施方式32的方法,其中所述标签选自异硫氰酸荧光素(FITC)、链霉抗生物素蛋白、生物素、二硝基苯酚、多甲藻素叶绿素蛋白复合物、绿色荧光蛋白、枣红蛋白(PE)、辣根过氧化物酶、棕榈酰化、亚硝基化、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶和麦芽糖结合蛋白。
- [0406] E34.根据实施方式32或33的方法,其进一步包含施用标记蛋白的制剂,其中所述标签结合结构域结合标记蛋白。
- [0407] E35.根据实施方式34的方法,其中所述标记蛋白的蛋白是抗体或其抗原结合片段。
- [0408] E36.根据实施方式34或35的方法,其中所述标签结合结构域是抗体或其抗原结合片段。
- [0409] E37.根据实施方式34-36中任一项的方法,其中在施用CAR T细胞和包含两亲性配体缀合物的组合物之前,将所述标记蛋白的制剂施用于受试者。
- [0410] E38.根据实施方式34-36中任一项的方法,其中在施用CAR T细胞和包含两亲性配体缀合物的组合物同时,将所述标记蛋白的制剂施用于受试者。
- [0411] E39.根据实施方式34-36中任一项的方法,其中在施用CAR T细胞和包含两亲性配体缀合物的组合物之后,将所述标记蛋白的制剂施用于受试者。
- [0412] E40.根据实施方式37-39中任一项的方法,其中在施用包含两亲性配体缀合物的组合物之前,施用CAR T细胞。
- [0413] E41.根据实施方式37-39中任一项的方法,其中在施用包含两亲性配体缀合物的组合物之后,施用CAR T细胞。
- [0414] E42.根据实施方式37-39中任一项的方法,其中在施用包含两亲性配体缀合物的组合物同时,施用CAR T细胞。
- [0415] E43.根据实施方式1-3和6-42中任一项的方法,其中所述受试者患有癌症。
- [0416] E44.根据实施方式1-43中任一项的方法,其中所述受试者是人。
- [0417] E45.一种包含两亲性配体缀合物的组合物,其中两亲性配体缀合物包含嵌合抗原受体(CAR)配体、脂质和任选的接头、和药学上可接受的载体。
- [0418] E46.根据实施方式45的组合物,其中所述接头选自亲水性聚合物、一串亲水性氨基酸、多糖或其组合。
- [0419] E47.根据实施方式45的组合物,其中所述接头包含“N”个连续的聚乙二醇单元,其中N在25-50之间。
- [0420] E48.根据实施方式45-47中任一项的组合物,其中所述脂质是二酰基脂质。

- [0421] E49. 根据实施方式45-48中任一项的组合物,其中所述CAR配体是标签。
- [0422] E50. 根据实施方式49的组合物,其中所述标签选自异硫氰酸荧光素 (FITC)、链霉抗生物素蛋白、生物素、二硝基苯酚、多甲藻素叶绿素蛋白复合物、绿色荧光蛋白、枣红蛋白 (PE)、辣根过氧化物酶、棕榈酰化、亚硝基化、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶和麦芽糖结合蛋白。
- [0423] E51. 一种免疫原性组合物,其包含实施方式45-50中任一项所述的组合物和佐剂。
- [0424] E52. 根据实施方式51的免疫原性组合物,其中所述佐剂是两亲性寡核苷酸缀合物,其包含与脂质缀合的免疫刺激性寡核苷酸,具有或不具有接头,并且任选地是极性化合物。
- [0425] E53. 根据实施方式52的免疫原性组合物,其中所述免疫刺激性寡核苷酸结合模式识别受体。
- [0426] E54. 根据实施方式53的免疫原性组合物,其中所述免疫刺激性寡核苷酸包含CpG。
- [0427] E55. 根据实施方式52的免疫原性组合物,其中所述免疫刺激性寡核苷酸是针对toll样受体的配体。
- [0428] E56. 根据实施方式52-55中任一项的免疫原性组合物,其中所述脂质是二酰基脂质。
- [0429] E57. 根据实施方式52-56中任一项的免疫原性组合物,其中所述接头是寡核苷酸接头。
- [0430] E58. 根据实施方式57的免疫原性组合物,其中所述寡核苷酸接头包含“N”个连续的鸟嘌呤,其中N在0-2之间。
- [0431] E59. 一种试剂盒,其包含容器,所述容器包含组合物,所述组合物包含两亲性配体缀合物、任选的药学上可接受的载体,以及包装说明书,其包括在接受CAR T细胞疗法的个体中用于治疗癌症或延缓癌症发展的组合物的施用说明,其中所述两亲性配体缀合物包含脂质、CAR配体和任选的接头。
- [0432] E60. 根据实施方式59的试剂盒,其进一步包含佐剂和在接受嵌合抗体受体 (CAR) T细胞疗法的个体中用于治疗癌症或延缓癌症发展的佐剂的施用说明。
- [0433] E61. 根据实施方式60的试剂盒,其中所述佐剂是两亲性寡核苷酸缀合物,其包含与脂质缀合的免疫刺激性寡核苷酸,具有或不具有接头,并且任选地是极性化合物。
- [0434] E62. 一种试剂盒,其包含药物,所述药物包含组合物,所述组合物包含两亲性配体缀合物、任选的药学上可接受的载体、以及胞质说明书,其包括在接受嵌合抗原受体 (CAR) T细胞疗法的个体中用于治疗或延缓癌症进展的药物单独或与包含佐剂和任选的药学上可接受的载体的组合物组合的施用说明,其中所述两亲性配体缀合物包含脂质、CAR配体和任选的接头。
- [0435] E63. 一种试剂盒,其包含容器,所述容器包含组合物,所述组合物包含两亲性配体缀合物、任选的药学上可接受的载体、以及包装说明书,其包括在接受CAR T细胞疗法的个体中用于扩增CAR T细胞的组合物疫苗的施用说明,其中所述两亲性配体缀合物包含脂质、CAR配体和任选的接头。
- [0436] E64. 根据实施方式63的试剂盒,其进一步包含佐剂和在接受接受嵌合抗体受体 (CAR) T细胞疗法的个体中用于扩增CAR T细胞的佐剂的施用说明。

[0437] E65. 根据实施方式64的试剂盒,其中所述佐剂是两亲性寡核苷酸缀合物,其包含与脂质缀合的免疫刺激性寡核苷酸,具有或不具有接头,并且任选地是极性化合物。

[0438] E66. 一种试剂盒,其包含药物,所述药物包含组合物,所述组合物包含两亲性配体缀合物、任选的药学上可接受的载体、以及胞质说明书,其包括在接受CAR T细胞疗法的个体中用于扩增CAR T细胞的药物单独或与包含佐剂和任选的药学上可接受的载体的组合物组合的施用说明,其中所述两亲性配体缀合物包含脂质、CAR配体和任选的接头。

[0439] E67. 一种试剂盒,其包含容器,所述容器包含组合物,所述组合物包含两亲性配体缀合物、任选的药学上可接受的载体、以及包装说明书,其包括在接受CAR T细胞疗法的个体中用于增加CAR T细胞增殖的组合物施用说明,其中所述两亲性配体缀合物包含脂质、CAR配体和任选的接头。

[0440] E68. 根据实施方式67的试剂盒,其进一步包含佐剂和在接受接受嵌合抗体受体(CAR) T细胞疗法的个体中用于增加CAR T细胞增殖的佐剂的施用说明。

[0441] E69. 根据实施方式66或68的试剂盒,其中佐剂是两亲性寡核苷酸缀合物,其包含与脂质缀合的免疫刺激性寡核苷酸,具有或不具有接头,并且任选地是极性化合物。

[0442] E70. 一种试剂盒,其包含药物,所述药物包含组合物,所述组合物包含两亲性配体缀合物、任选的药学上可接受的载体、以及包装说明书,其包括在接受CAR T细胞疗法的个体中用于增加CAR T细胞增殖的药物单独或与包含佐剂和任选的药学上可接受的载体的组合物组合的施用说明,其中所述两亲性配体缀合物包含脂质、CAR配体和任选的接头。

[0443] E71. 根据实施方式45-50中任一项的组合物、实施方式51-58中任一项的免疫原性组合物,或实施方式59-70中任一项的试剂盒,用于在受试者体内扩增CAR T细胞的用途。

[0444] E72. 根据实施方式45-50中任一项的组合物、实施方式51-58中任一项的免疫原性组合物,或实施方式59-70中任一项的试剂盒,用于增加在受试者体内增加CAR T细胞的增殖的用途。

[0445] E73. 根据实施方式45-50中任一项的组合物、实施方式51-58中任一项的免疫原性组合物,或实施方式59-70中任一项的试剂盒,用于在个体中治疗癌症或延缓癌症发展的用途。

[0446] E74. 根据实施方式45-50中任一项的组合物在制备用于在个体中治疗癌症或延缓癌症发展的药物中的用途,其中所述药物包含所述组合物,和任选的药学上可接受的载体。

[0447] E75. 一种包含两亲性配体缀合物的组合物,其中所述两亲性配体缀合物包含通过聚乙二醇部分缀合至异硫氰酸荧光素(FITC)的脂质。

[0448] E76. 实施方式75的组合物,其中所述脂质是1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE)并且其中所述聚乙二醇部分是PEG-2000。

[0449] E77. 一种包含两亲性配体缀合物和佐剂的免疫原性组合物,其中所述两亲性配体缀合物包含脂质、CAR配体和任选的接头,并且其中所述佐剂是两亲性寡核苷酸缀合物,其包含与脂质缀合的免疫刺激性寡核苷酸,具有或不具有接头,并且任选地是极性化合物。

[0450] E78. 一种包含两亲性配体缀合物和佐剂的免疫原性组合物,其中所述两亲性配体缀合物包含脂质、CAR配体和任选的接头,其中所述CAR配体是标签,并且其中所述佐剂是两亲性寡核苷酸缀合物,其包含与脂质缀合的免疫刺激性寡核苷酸,具有或不具有接头,并且任选地是极性化合物。

- [0451] E79.根据实施方式4-44中任一项的方法,其中所述两亲性配体缀合物在生理条件下结合白蛋白。
- [0452] E80.根据实施方式21-24和27-44中任一项的方法,其中所述两亲性寡核苷酸缀合物在生理条件下结合白蛋白。
- [0453] E81.根据实施方式1-44中任一项的方法,其中所述方法包括在非肿瘤引流淋巴结不经肠道地、在肿瘤引流淋巴结不经肠道地,或瘤内地施用包含两亲性配体缀合物的组合物。
- [0454] E82.根据实施方式6的方法,其中所述靶细胞群或靶组织是被病毒感染的细胞群或组织。
- [0455] E83.根据实施方式82的方法,其中所述病毒是人免疫缺陷病毒(HIV)。
- [0456] E84.根据实施方式82或83的方法,其中所述免疫应答是T细胞介导的免疫应答。
- [0457] E85.根据实施方式9的方法,其中所述抗原是病毒抗原或癌抗原。
- [0458] E86.一种试剂盒,其包含容器,所述容器包含组合物,所述组合物包含两亲性配体缀合物、任选的药学上可接受的载体,以及包装说明书,其包括在接受CAR T细胞疗法的个体中用于治疗病毒感染或延缓病毒感染发展的组合物的施用说明,其中所述两亲性配体包含脂质、CAR配体和任选的接头。
- [0459] E87.根据实施方式86的试剂盒,其进一步包含佐剂和用于在接受CAR T细胞疗法的个体中治疗病毒感染或延缓病毒感染发展的佐剂的施用说明。
- [0460] E88.根据实施方式87的试剂盒,其中所述佐剂是两亲性寡核苷酸缀合物,其包含与脂质缀合的免疫刺激性寡核苷酸,具有或不具有接头,并且任选地是极性化合物。
- [0461] E89.根据实施方式59-70和86-88中任一项的试剂盒,其中所述两亲性配体缀合物包含选自亲水性聚合物、一串亲水性氨基酸、多糖或其组合的接头。
- [0462] E90.根据实施方式59-70和86-88中任一项的试剂盒,其中所述两亲性配体缀合物包含接头,其包含"N"个连续的聚乙二醇单元,其中N在25-50之间。
- [0463] E91.根据实施方式59-70和86-90中任一项的试剂盒,其中所述脂质是二酰基脂质。
- [0464] E92.根据实施方式61、65、69或88中任一项的试剂盒,其中所述两亲性寡核苷酸缀合物包含寡核苷酸接头。
- [0465] E93.根据实施方式92的试剂盒,其中所述寡核苷酸接头包含"N"个连续的鸟嘌呤,其中N在0-2之间。
- [0466] E94.根据实施方式59-70和86-93中任一项的试剂盒,其中所述CAR配体是肿瘤相关抗原,并且其中所述CAR包含肿瘤相关抗原结合结构域。
- [0467] E95.根据实施方式59-70和86-93中任一项的试剂盒,其中所述CAR配体是标签,并且其中所述CAR包含标签结合结构域。
- [0468] E96.根据实施方式95的试剂盒,其中所述标签选自异硫氰酸荧光素(FITC)、链霉抗生物素蛋白、生物素、二硝基苯酚、多甲藻素叶绿素蛋白复合物、绿色荧光蛋白、枣红蛋白(PE)、辣根过氧化物酶、棕榈酰化、亚硝基化、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶和麦芽糖结合蛋白。
- [0469] E97.根据实施方式95或96的试剂盒,其中所述试剂盒进一步包含标记蛋白的制剂

和标记蛋白的制剂的施用说明,其中所述标签结合结构域结合标记蛋白。

[0470] E98.根据实施方式97的试剂盒,其中所述标记蛋白的蛋白是抗体或其抗原结合片段。

[0471] E99.根据实施方式77或88的免疫原性组合物,其中所述两亲性配体缀合物包含选自亲水性聚合物、一串亲水性氨基酸、多糖或其组合的接头。

[0472] E100.根据实施方式77或78的免疫原性组合物,其中所述两亲性配体缀合物包含接头,其包含“N”个连续的聚乙二醇单元,其中N在25-50之间。

[0473] E101.根据实施方式77、78、99或100的免疫原性组合物,其中所述脂质是二酰基脂质。

[0474] E102.根据实施方式77或99-101的免疫原性组合物,其中所述CAR配体是肿瘤相关抗原或病毒抗原。

[0475] E103.根据实施方式77、78或99-102的免疫原性组合物,其中所述两亲性寡核苷酸缀合物包含寡核苷酸接头。

[0476] E104.根据实施方式103的免疫原性组合物,其中所述寡核苷酸接头包含“N”个连续的鸟嘌呤,其中N在0-2之间。

[0477] E105.根据实施方式78、99-101和103-104中任一项的免疫原性组合物,其中所述标签选自异硫氰酸荧光素 (FITC)、链霉抗生物素蛋白、生物素、二硝基苯酚、多甲藻素叶绿素蛋白复合物、绿色荧光蛋白、枣红蛋白 (PE)、辣根过氧化物酶、棕榈酰化、亚硝基化、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶和麦芽糖结合蛋白。

[0478] 通过以下实施例进一步举例说明本公开,其不应解释为进一步的限制。在本申请中引用的所有附图和所有参考文献,专利和公开的专利申请的内容通过引用明确地并入本文。

[0479] 实施例

[0480] 以下是用于实施本文所述的方法的特定实施方式的实施例。实施例仅出于说明目的提供,而非旨在以任何方式限制本发明的范围。已经尽力确保所用数字(例如,数量,温度等)的准确性,但是,一些实验误差和偏差当然应当是允许的。

[0481] 实施例1:DSPE-PEG-FITC和DSPE-PEG-肽/蛋白质配体的产生

[0482] 由于CAR-T细胞在一些患者群体中的持久性差,并且CAR-T疗法未能在实体瘤中诱导最佳应答,因此假设通过经由CAR本身的刺激可以实现更有效的CAR-T细胞扩增和增强的功能。为实现这一点,利用了结合白蛋白的磷脂聚合物,如前所述(Liu,H.,Moynihan,K.D.,Zheng,Y.,Szeto,G.L.,Li,A.V.,Huang,B.,Irvine,D.J.(2014).Structure-based programming of lymph-node targeting in molecular vaccines.Nature,507(7493),519-522.)。具体地,如图1A所示,用于CAR的小分子、肽或蛋白质配体连接至聚合物-脂质尾部以形成两亲性疫苗。

[0483] 最初,使用可重靶向的CAR,其中嵌合抗原受体识别小分子荧光素 (FITC),其通过FITC缀合的抗肿瘤抗体靶向肿瘤(Ma,J.S.,Kim,J.Y.,Kazane,S.A.,Choi,S.H.,Yun,H.Y.,Kim,M.S.,Cao,Y.(2016).Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells.Proc Natl Acad Sci U S A,113(4),E450-458)。关联配体是FITC-聚乙二醇 (PEG)-DSPE (“DSPE-PEG-FITC”)。图1B提供了显示用相应两亲性疫苗

包被的抗原呈递细胞对CAR T细胞的刺激的示意图。

[0484] 为了产生DSPE-PEG-FITC疫苗,将PE(磷酸乙醇胺)脂质(例如DSPE)溶解在500 μ L CHCl₃和500 μ L DMF中,加入3当量的三乙胺和1.2当量的荧光素-PEG2000-NHS (Creative PEG Works Inc.)并将反应混合物搅拌过夜。两亲性荧光素PEG两亲物通过使用C4柱的反相HPLC(BioBasic-4,200mm x 4.6mm,Thermo Scientific)纯化,100mM三乙胺-醋酸缓冲液(TEAA,pH 7.5)-甲醇(0-30min,10-100%)作为洗脱剂。将最终产物溶解在H₂O中并用UV-Vis光谱法(荧光素,490nm,pH 9,消光系数70,000M⁻¹cm⁻¹)定量和通过MALDI-TOF质谱法表征。为了产生DSPE-PEG-肽/蛋白质配体,将N端半胱氨酸修饰的肽或蛋白质配体溶解在DMF中并与2当量的马来酰亚胺-PEG₂₀₀₀-DSPE(Laysan Bio, Inc.)混合,并将混合物在25℃下搅拌24小时。通过HPLC分析判断生物缀合物基本上完成。肽两亲物通过MALDI-TOF质谱法表征。然后将肽缀合物在10x ddH₂O中稀释并冻干成粉末,重新溶解在H₂O中并在-80℃下保存。

[0485] 实施例2:DSPE-PEG-FITC包被的细胞对于抗FITC CAR-T的体外激活

[0486] 为了确定两亲性配体缀合物对嵌合抗原受体(CAR)T细胞的作用,在与提供两亲性配体缀合物的抗原呈递细胞(APC)共培养后,对CAR-T细胞的体外刺激进行了评估。具体地,通过以下产生表达抗FITC CAR的模型CAR-T细胞:逆转录病毒转导包含框内融合到Myc表位标签编码区和融合到包含CD8跨膜结构域、CD28信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域的CAR编码区的抗FITC(荧光素)scFV(4m5.3)编码区的DNA载体到原代小鼠T细胞中。Myc标记的抗FITC CAR的结构域结构和方向在图2A中描绘。原代小鼠T细胞中Myc标记的抗FITC CAR的表面表达是通过将转导的细胞与荧光标记抗Myc抗体一起孵育并通过流式细胞术定量荧光细胞而定量(图2B)。

[0487] 接着,测试模型靶细胞K562细胞的两亲性配体缀合物的有效膜插入,该两亲性配体缀合物包含通过PEG-2000接头共价地连接至FITC的亲脂性部分(即DSPE)。在低剂量(即25nM)的DSPE-PEG-FITC下,渐增的血清浓度几乎完全消除了表面插入。但是,在高剂量(500nM)下,DSPE-PEG-FITC保留了高水平的细胞表面装饰(数据未显示)。

[0488] 为了模拟淋巴结中的抗原呈递细胞,用浓度渐增的DSPE-PEG-FITC装饰树突细胞(DC2.4),然后与抗FITC CAR T细胞共培养0小时、48小时和96小时。通过CAR T细胞的IFN- γ 分泌监测FITC装饰的DC2.4细胞刺激抗FITC CAR T细胞的能力。尽管大多数FITC分子似乎在24小时内被内化,但在0和48小时观察到CAR-T细胞对IFN γ 的强烈诱导,然后在96小时下降(数据未显示),并且观察到剂量依赖性激活(图2C)。进一步地,当将FITC装饰的DC2.4细胞与FITC-CAR-T细胞在效应子与靶标(E:T)比率10:1下共培养6小时时,当FITC-CAR-T细胞与DSPE-PEG-FITC一起施用,DC2.4细胞被杀死(图2D)。此外,如先前报道的(Ma等,2016),在FITC缀合的抗CD19抗体而非对照抗体存在下,将FITC-CAR T细胞与CD19+靶细胞共培养,产生有效的CAR-T激活,如通过IFN γ 分泌确定的(数据未显示)。总的来说,这些结果表明两亲性配体缀合物能够激活CAR-T细胞。

[0489] 实施例3:DSPE-PEG-FITC运输至淋巴结(LN),通过APC进行的保留和摄取

[0490] 基于实施例2的结果,接下来确定两亲性配体缀合物DSPE-PEG-FITC是否可以包被淋巴结(LN)中的抗原呈递细胞以体内初免FITC-CAR-T细胞。为了评估DSPE-PEG-FITC运输至淋巴结和通过APC进行的保留和摄取,C57BL/6小鼠接受了不同剂量的DSPE-PEG-FITC。具体而言,在将2nmol、5nmol或10nmol剂量的DSPE-PEG-FITC施用于小鼠尾静脉后24小时,收

获腹股沟LN、辅助LN和髂LN。游离FITC用作对照。处死小鼠并在不同时间点移除LN用于IVIS成像(激发465nm,发射520nm)以监测FITC信号的LN保留。最有效的引流的是到腹股沟LN中,然后是辅助LN(数据未显示)。在高剂量下,还观察到DSPE-PEG-FITC引流到髂LN中。

[0491] 尽管在4天后在最低剂量(2nmol)下FITC信号几乎消失,但在高剂量(10nmol)的DSPE-PEG-FITC下该信号保留超过21天(图3A)。游离FITC信号在24小时内消失(图3A)。LN细胞的流式细胞术分析揭示了CD8⁺和CD11b⁺树突细胞(DC)以及巨噬细胞中DSPE-PEG-FITC的大量摄取,但在T细胞或B细胞中积累很少(图3B和3C)。LN的共聚焦成像显示DSPE-PEG-FITC最初在1天后聚集在小泡间区域中,但随时间分配到T细胞区域中的CD11c⁺DC上,并且从这些LN分选的FITC⁺CD11c⁺细胞用抗FITC抗体明亮地染色(数据未显示)。

[0492] 总的来说,这些结果表明两亲性配体缀合物在淋巴结中的抗原呈递细胞上表达。

[0493] 实施例4:LN中保留的DSPE-PEG-FITC稳健地刺激CAR T细胞增殖

[0494] 为了评估在淋巴结抗原呈递细胞上积聚的DSPE-PEG-FITC是否导致CAR T细胞初免以及这种刺激作用持续多久,在第1天,将PBS、c-di-GMP(25ug)、DSPE-PEG-FITC(10nmol)或DSPE-PEG-FITC(10nmol)+c-di-GMP(25ug)施用于野生型C57Bl/6小鼠。在各个时间点之后,如图7A中的时间线所示,通过尾静脉注射将 2×10^6 个CTV标记的CAR-T细胞转移到每个小鼠中。将CAR-T细胞滴定为1:1比率的CAR⁺和CAR⁻细胞的混合物。在另外48小时后,处死小鼠并移除LN用于FACS分析。如图7B中的代表性结果所证实,在疫苗接种后长达7天,在过继转移后48小时在淋巴结中有效地刺激FITC-CAR-T,并且强效T细胞促进佐剂环状-di-GMP(CDG,STING激动剂)的共施用显著地延长DSPE-PEG-FITC刺激长达14天(图7B)。在接受PBS或单独佐剂的对照小鼠中观察到CAR-T细胞的很小的增殖。这些结果表明两亲性配体缀合物体内诱导CAR-T细胞增殖的能力。

[0495] 进一步地,CDG共施用显著地增加了DSPE-PEG-FITC在多种APC细胞表面上的持续时间和可及性,包括巨噬细胞和CD11c⁺CD11b⁺DC(图5)。此外,相对于单独的DSPE-PEG-FITC,CDG共施用增加了多种共刺激分子的表达水平,即CD80、CD86、41BBL、ICOSL和OX40L(图6)。表达在疫苗接种后24小时和3天测量。

[0496] 实施例5:DSPE-PEG-FITC对长期CAR-T细胞扩增的影响

[0497] 为了追踪DSPE-PEG-FITC对CAR-T细胞的长期体内扩增的影响,使用了CD45.1/CD45.2同类系移植模型。具体来说,淋巴清除的CD45.2受体小鼠在第0天接种了各种剂量的CD45.1供体FITC CAR-T细胞(0.25×10^6 ; 0.05×10^6 ; 0.01×10^6)。24小时后,小鼠接受PBS或疫苗接种含或不含25ug CDG的10nmol DSPE-PEG-FITC。图7提供了实验的时间轴。通过在疫苗接种后第7天和第14天收集的外周血的FACS分析来确定循环CAR-T细胞的百分比。CAR T细胞定义为CD3⁺CD8⁺/Myc标签⁺群体。

[0498] 在采用单独或与CDG组合的DSPE-PEG-FITC的疫苗接种后,观察到惊人的纵向CD45.1 CAR-T扩增。具体来说,在第一次疫苗接种后7天, 0.25×10^6 组占外周CD8⁺T细胞的>70%, 0.05×10^6 组占外周CD8⁺T细胞的>50%,这比用 10×10^6 离体扩增的CAR-T细胞转移的小鼠显著更多(图7)。采用第二次启动, 0.01×10^6 组到第14天也达到50%。

[0499] 进一步地,在淋巴充足小鼠中评估了DSPE-PEG-FITC的功效。淋巴清除疗法增强了过继细胞疗法的功效,但与严重毒性有关。考虑到DSPE-PEG-FITC在淋巴清除环境中有力的CAR-T加强,接下来考虑的是DSPE-PEG-FITC是否可以在淋巴充足小鼠中扩增CAR-T细胞到

相当高的水平。具体来说,将多个剂量的CD45.1 FITC CAR-T细胞转移到淋巴充足的CD45.2受体小鼠中,随后进行上述的相同疫苗接种方案和后续分析,如图8所示。结果也显示在图8中,其表明接受 10×10^6 CAR-T的对照小鼠仅具有约5%的循环CD8+T细胞群,而接受 0.25×10^6 CAR-T加上DSPE-PEG-FITC的小鼠到14天达到约10%,并且 1×10^6 CART-T组到14天达到约20%。一个担忧是反复的疫苗接种可能在与DSPE-PEG缀合时引发对抗FITC的抗体,从而阻断其对淋巴结中的CAR的刺激。然而,当FITC缀合至DSPE-PEG或载体蛋白OVA(图9)时,未观察到抗体应答,因为DSPE-PEG未提供T细胞帮助的来源。

[0500] 总的来说,这些结果表明DSPE-PEG-FITC疫苗与佐剂(即CDG)组合在体内充当有效的CAR-T加强疫苗。

[0501] 实施例6:具有肿瘤特异性抗原的两亲性疫苗的功效

[0502] 接着,评估是否可以将上述实施例所述的相同的加强疫苗概念用于真实的抗肿瘤特异性CAR。具体来说,利用鼠EGFRvIII特异性CAR 139scFv,其识别源自EGFRvIII的短线性表位(Sampson, et al. (2014). EGFRvIII mCAR-modified T-cell therapy cures mice with established intracerebral glioma and generates host immunity against tumor-antigen loss. Clin Cancer Res, 20 (4), 972-984)。用该CAR转导鼠T细胞,并通过以下方法合成两亲性EGFRvIII肽疫苗分子:将溶解在二甲基甲酰胺(DMSO)中的c端半胱氨酸修饰的EGFRvIII肽与2.5当量的1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[马来酰亚胺(聚乙二醇)-2000](DSPE-PEG2k)和1当量的三(2-羧乙基)膦盐酸盐和催化量的三乙胺混合。将混合物在室温下搅拌24小时,然后通过HPLC纯化并溶于H₂O。DSPE-PEG-EGFRvIII两亲性疫苗的示意图显示在图10A中,图10B显示抗EGFRvIII CAR在T细胞上的表达。

[0503] 与DSPE-PEG-FITC相似,DSPE-PEG-EGFRvIII在体外插入细胞膜中,并且DSPE-PEG-EGFRvIII包被的细胞刺激EGFRvIII-CAR-T细胞(数据未显示)。进一步地,在静脉注射 2×10^6 细胞痕量紫(CTV)标记的EGFRvIII-CAR-T细胞后,用10ug DSPE-PEG-EGFRvIII和佐剂(25ug环状二GMP)免疫的小鼠在48小时后在体内引流腹股沟淋巴结中触发了广泛的CAR-T细胞增殖(图10C)。为了测试疫苗加强的治疗影响,将鼠CT-2A胶质瘤细胞用EGFRvIII转导并与EGFRvIII-CAR-T细胞共培养。在表达EGFRvIII的CT-2A胶质瘤细胞存在下,CAR-T细胞分泌IFN γ (图11A)。进一步地,将表达野生型EGFR或EGFRvIII的CT-2A胶质瘤细胞与EGFRvIII-CAR-T以1:10比率体外共培养6小时,导致EGFRvIII-CAR-T细胞有效杀死表达EGFRvIII但不杀死表达野生型EGFR的CT-2A胶质瘤细胞(图11B)。

[0504] 为了进一步研究DSPE-PEG-EGFRvIII两亲性疫苗的功效,使用了体内模型。具体来说,野生型CD45.2 C57Bl/6小鼠被植入 4×10^6 个表达EGFRvIII的CT-2A细胞。在第7天,携带CT-2A-mEGFRvIII肿瘤的小鼠接受了亚致死性辐照,并随后输注了从CD45.1小鼠产生的不同剂量的EGFRvIII CAR-T细胞,随后接受或不接受10ug的DSPE-PEG-EGFRvIII加上25ug的CDG。在接受 10×10^6 CAR-T细胞的组中,循环CAR-T细胞约占外周血CD8+T细胞的约40% (图12)。接受较低细胞数的小鼠具有最少的循环CAR-T细胞,但是在接受DSPE-PEG-EGFRvIII加上CDG的组中实现了显著的EGFRvIIICAR-T扩增(图12)。

[0505] 为了评估两亲性配体缀合物对EGFRvIII CAR T功能的影响,细胞内细胞因子染色(ICS)通过使用接种疫苗后7天收集的外周血进行。在 1×10^6 golgip1ug的存在下,将外周血单核细胞(PBMC)与表达EGFRvIII的CT-2A细胞以1:1的比率在96孔板中混合6小时。然后对细

胞进行表面染色、固定和透化,然后进一步用抗IFN γ 和抗TNF α 抗体染色,以评估响应于靶细胞的疫苗增强或未增强的EGFRvIII CAR T细胞的细胞因子产生。DSPE-PEG-EGFRvIII增强的EGFRvIII CAR-T细胞具有显著增强的功能,其中大部分循环CAR-T响应靶肿瘤细胞(图13)。此外,在接种疫苗后第7天,在DSPE-PEG-EGFRvIII+CDG加强组中观察到CAR-T向肿瘤中的浸润显著增加,如通过FACS分析CAR-T细胞数每毫克肿瘤来确定的(图14)。另外,在疫苗接种后第7天,肿瘤浸润CAR-T细胞对肿瘤细胞表现出增强的反应性。具体来说,图15显示了相对于PBS,在DSPE-PEG-EGFRvIII+CDG存在下,肿瘤浸润CAR-T细胞产生的细胞因子分泌的水平增加,而图16显示了肿瘤浸润CAR-T细胞中细胞毒性的指示物颗粒酶B的水平增加,并且增殖的指示物Ki67也增加。有趣的是,尽管有PD1和TIM3的表面表达,但仍发生了这种增强的反应性(图17)。接受CAR-T和DSPE-PEG-EGFRvIII+CDG两者的动物具有显著延缓的肿瘤生长(图18A)和延长的生存(图18B)。值得注意的是,类似于DSPE-PEG-FITC疫苗接种的小鼠,在四轮每周疫苗接种后,未引发针对EGFRvIII的抗体应答,并且在每次疫苗接种后仅观察到轻微的体重减轻,其表明毒性处于可控的水平(数据未显示)。

[0506] 实施例7:用DSPE-PEG-FITC疫苗接种的双特异性CAR T细胞的设计和功效

[0507] 将替代肽配体用于CAR T细胞是有效的,但一些CAR识别三维结构表位(De Oliveira, et al. (2013). A CD19/Fc fusion protein for detection of anti-CD19 chimeric antigen receptors. J Transl Med, 11, 23. doi:10.1186/1479-5876-11-23),因此可能难以或不可能鉴定出简单的替代配体。为了消除这种限制并提供增强任何CAR的方法,无论其结合结构域性质或其特异性如何,设计了基于串联scFv的双特异性CAR。具体来说,抗FITC scFV 4m5.3紧跟着N末端信号肽通过(G4S)₄肽接头附加至肿瘤靶向CAR的N末端胞外结构域(图19)。为了评估这种方法的可行性,利用了靶向FITC和黑色素瘤相关抗原TRP1两者的双特异性鼠CAR,其在原代小鼠T细胞中表达良好。图20显示了双特异性CAR在T细胞上的表达。为了确认这种双特异性CAR的反应特异性,将FITC/TRP1-CAR T细胞与DSPE-PEG-FITC包被的靶细胞或表达TRP1的B16F10细胞以10:1效应子:靶标比率体外共培养6小时, FITC/TRP1-CAR T如IFN γ 分泌所示对两种抗原特异性地和有效地响应(图21)。进一步地, FITC/TRP1-CAR T细胞与单特异性TRP1-CAR T细胞等效地杀死TRP1⁺靶细胞,如通过以10:1的效应子与靶标(E:T)比率共培养细胞6小时来确定的(图22)。在体内,DSPE-PEG-FITC疫苗接种稳健地刺激FITC/TRP1双特异性CAR-T增殖,如通过在疫苗接种后48小时的细胞痕量紫运输来确定的(图23)。

[0508] 为了评估用DSPE-PEG-FITC加上CDG的双特异性CAR-T的治疗潜力,将野生型C57Bl/6小鼠植入 5×10^5 B16F10肿瘤细胞。5天后,荷瘤动物接受了500cGy辐射的淋巴清除处理,然后第二天静脉注射 10×10^6 FITC/TRP1 CAR-T细胞。与对照T细胞相比,单独的CAR-T细胞对肿瘤生长有轻微影响,而接受CAR-T和疫苗(10nmol DSPE-PEG-FITC+25ug CDG)的小鼠表现出显著延缓的肿瘤生长(图24A)和显著延长的生存(图24B)。这与增加的循环CAR-T细胞水平(图25)和增强的肿瘤浸润(图26)一致。在接受疫苗接种的动物组中体重减轻也得到了控制(数据未显示)。

[0509] 被有效CAR-T扩增和采用DSPE-PEG-FITC+CDG增强的功能增强所激励,评估了CAR-T加上DSPE-PEG-FITC+CDG在无淋巴清除预调理的荷瘤小鼠中的治疗效果。为了促进体内追踪,按照类似的疫苗接种方案,将CD45.1 FITC/TRP1 CAR-T细胞转移到具有B16F10黑色素

瘤的CD45.2受体小鼠中。接受单独CAR-T的小鼠具有与接受对照T细胞的小鼠几乎不可区别的肿瘤生长,而CAR-T和DSPE-PEG-FITC+CDG疫苗接种两者的组合治疗显著地延缓了肿瘤生长并提高了动物存活(图27A和27B),对动物体重影响很小(数据未显示)。

[0510] 尽管DSPE-PEG-FITC优先运输到淋巴结中并在其中积累,并引入到淋巴结中的驻留APC中,少量百分比的两亲物可泄露到外周血中并插入旁观者细胞中,使它们成为新的CAR-T靶标。为了分析由从淋巴引流逃逸的两亲物的引起的这种无意的毒性,将DSPE-PEG-FITC静脉注射到具有严重缺陷淋巴的NSG小鼠中以刺激FITC CAR-T细胞。尽管如此,有着FITC CAR-T增殖的可忽略的刺激(数据未显示)。

[0511] 总的来说,这些结果表明通过使用两亲性疫苗,CAR-T细胞疗法在实体瘤中有效。

[0512] 等同方式

[0513] 本领域技术人员将认识到或能够确定,使用不超过常规实验,本文所述的具体实施方式的许多等同方式。这样的等同方式旨在由所附权利要求所覆盖。

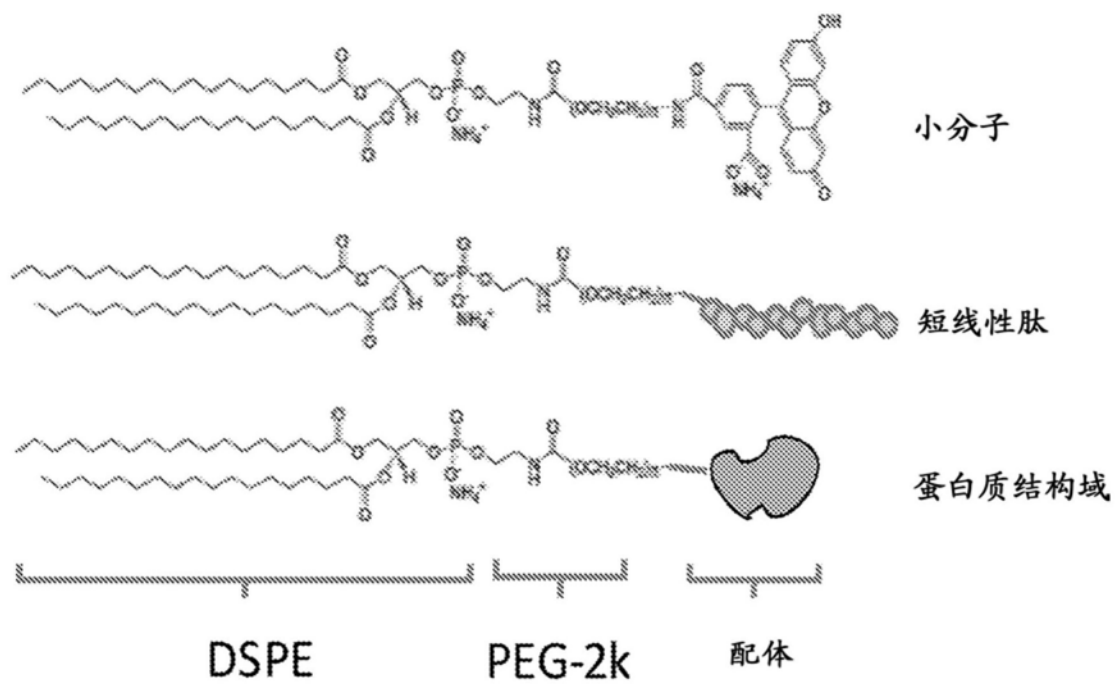


图1A

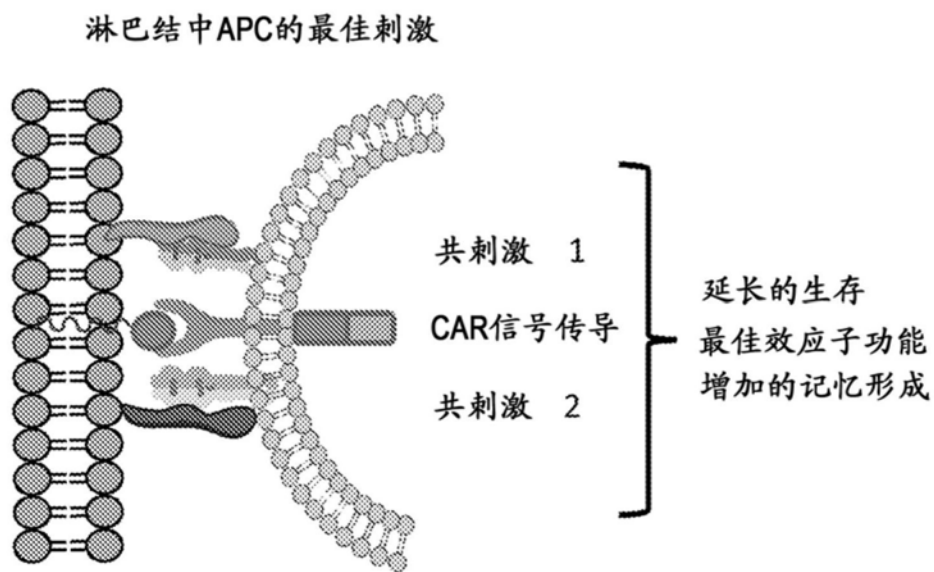


图1B

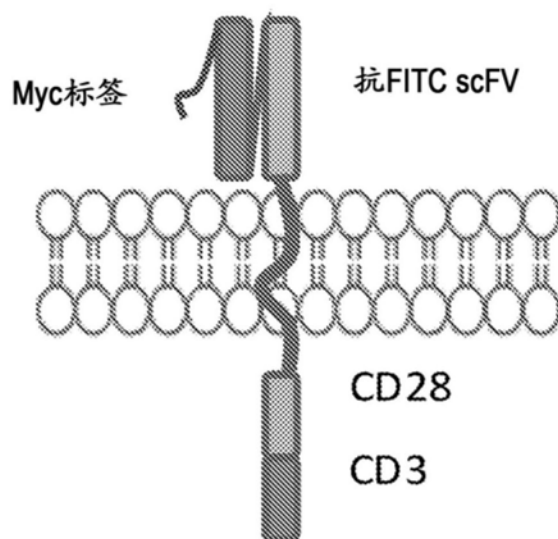


图2A

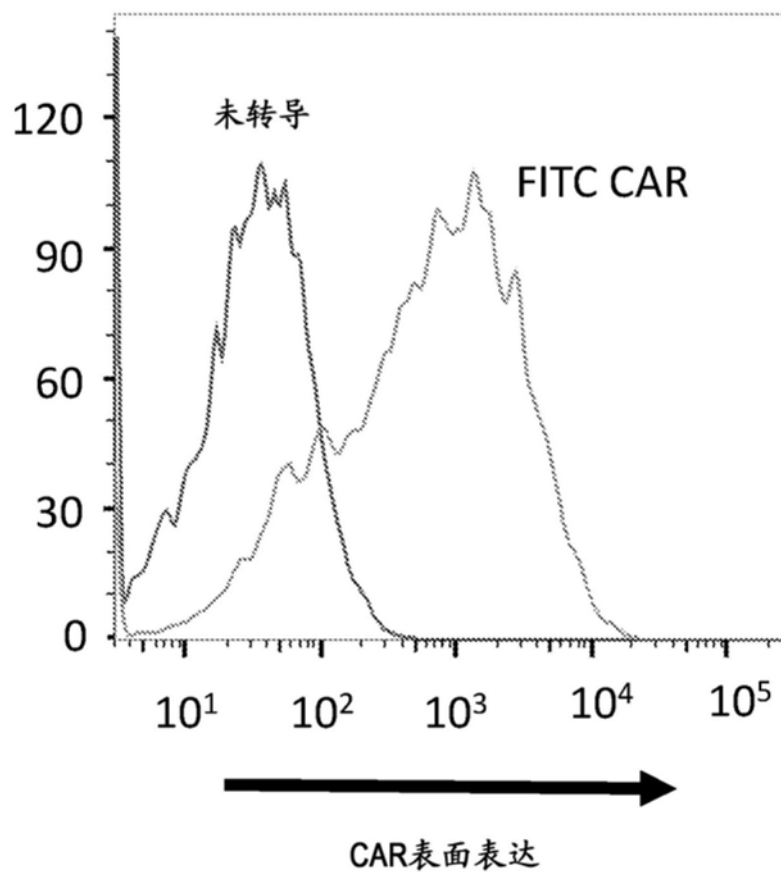


图2B

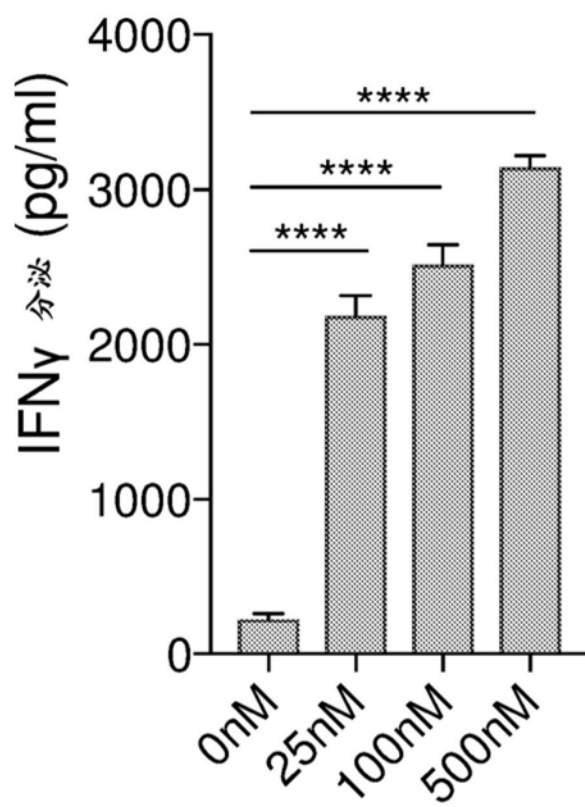


图2C

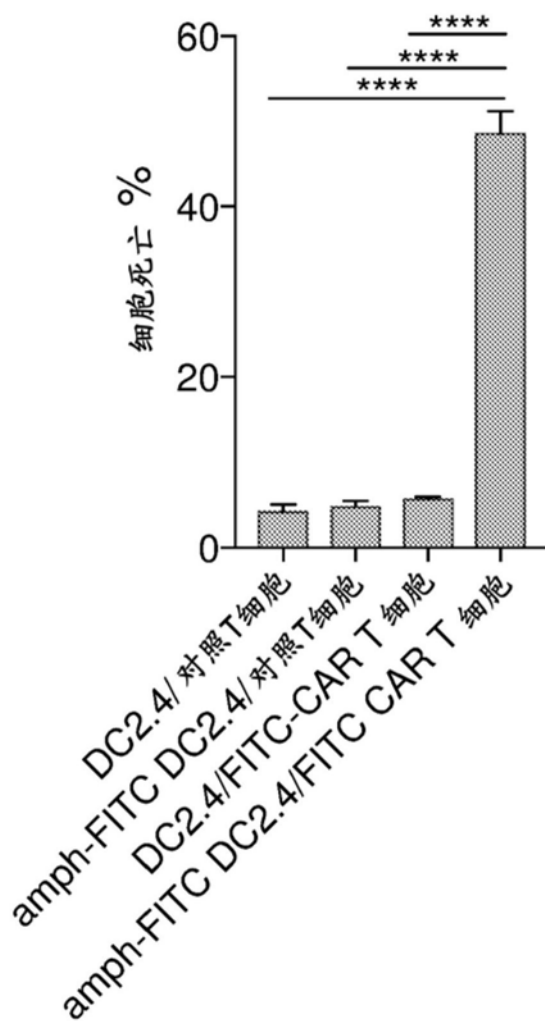


图2D

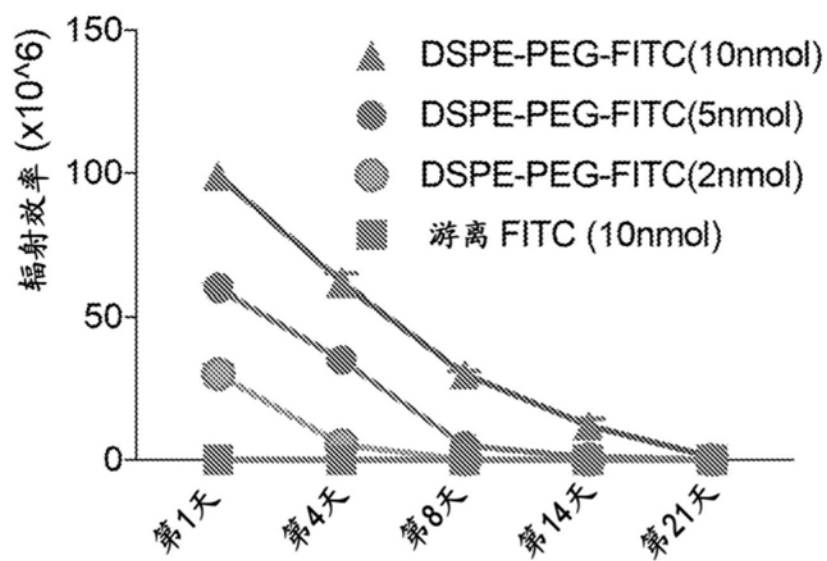


图3A

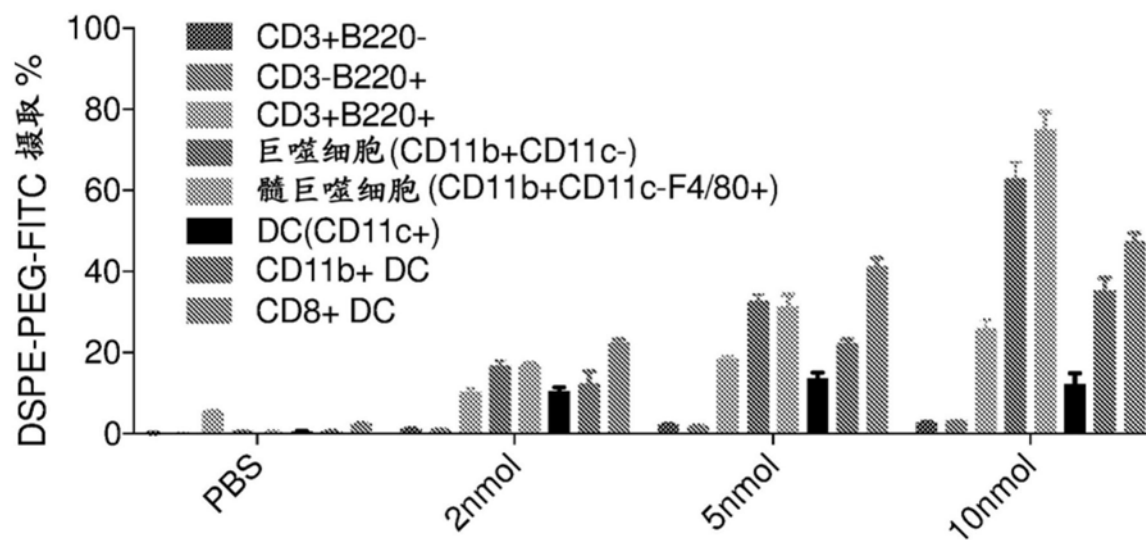


图3B

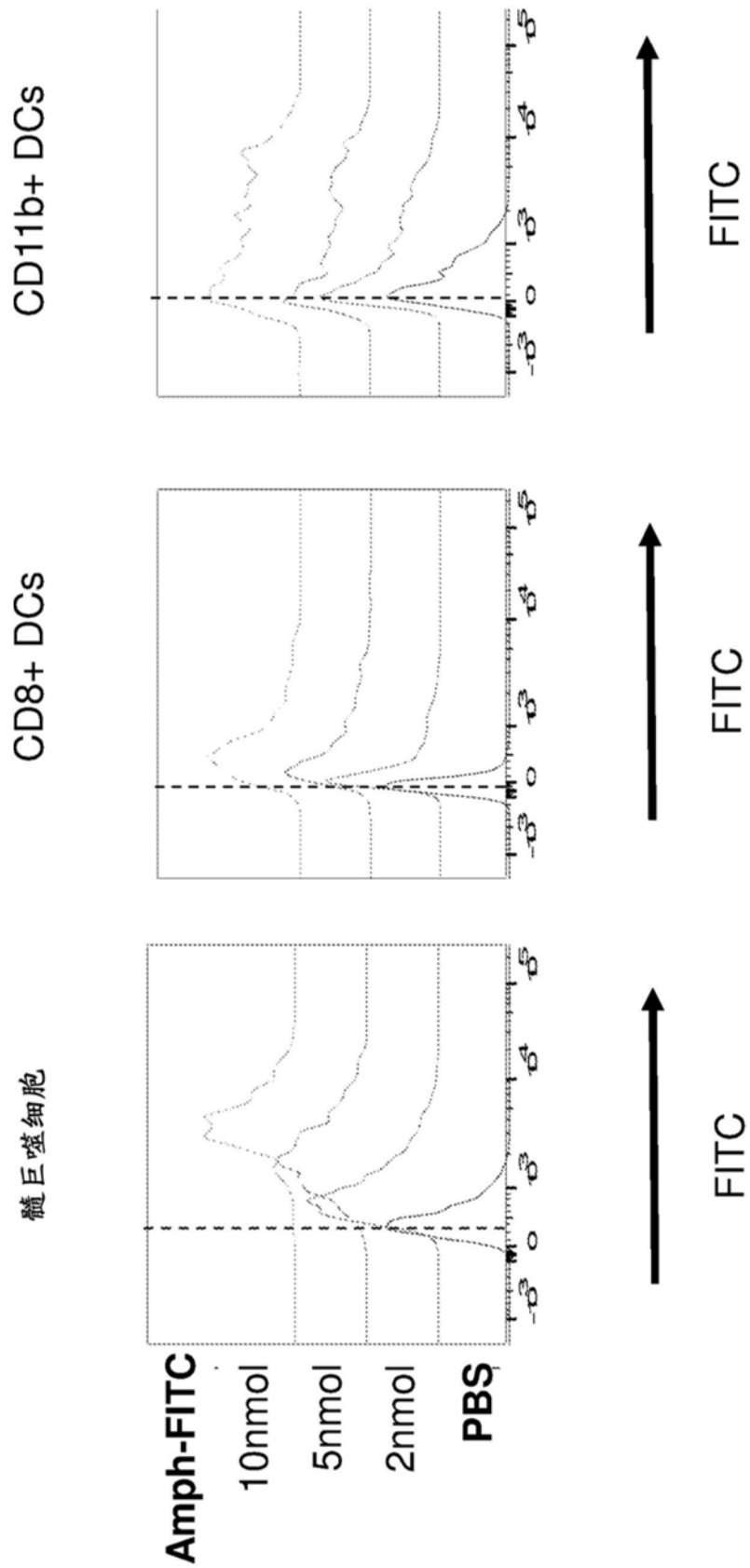


图3C

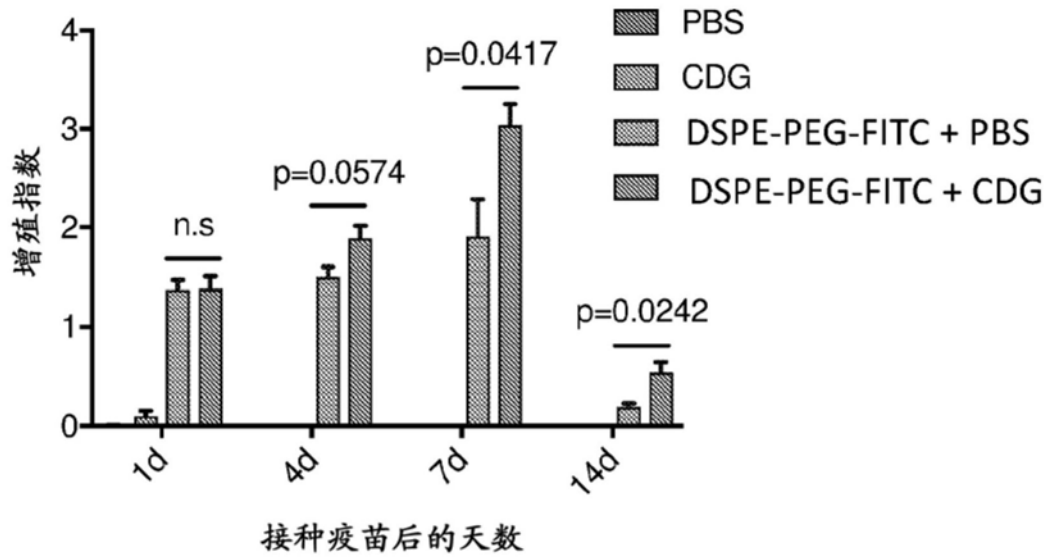


图4

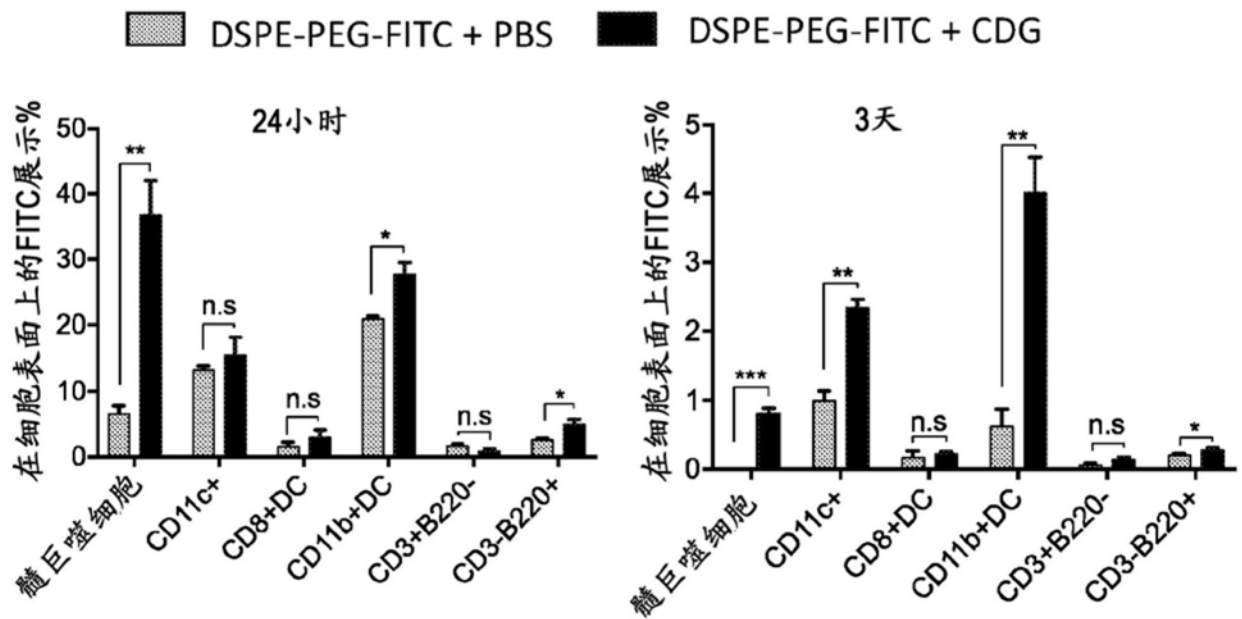


图5

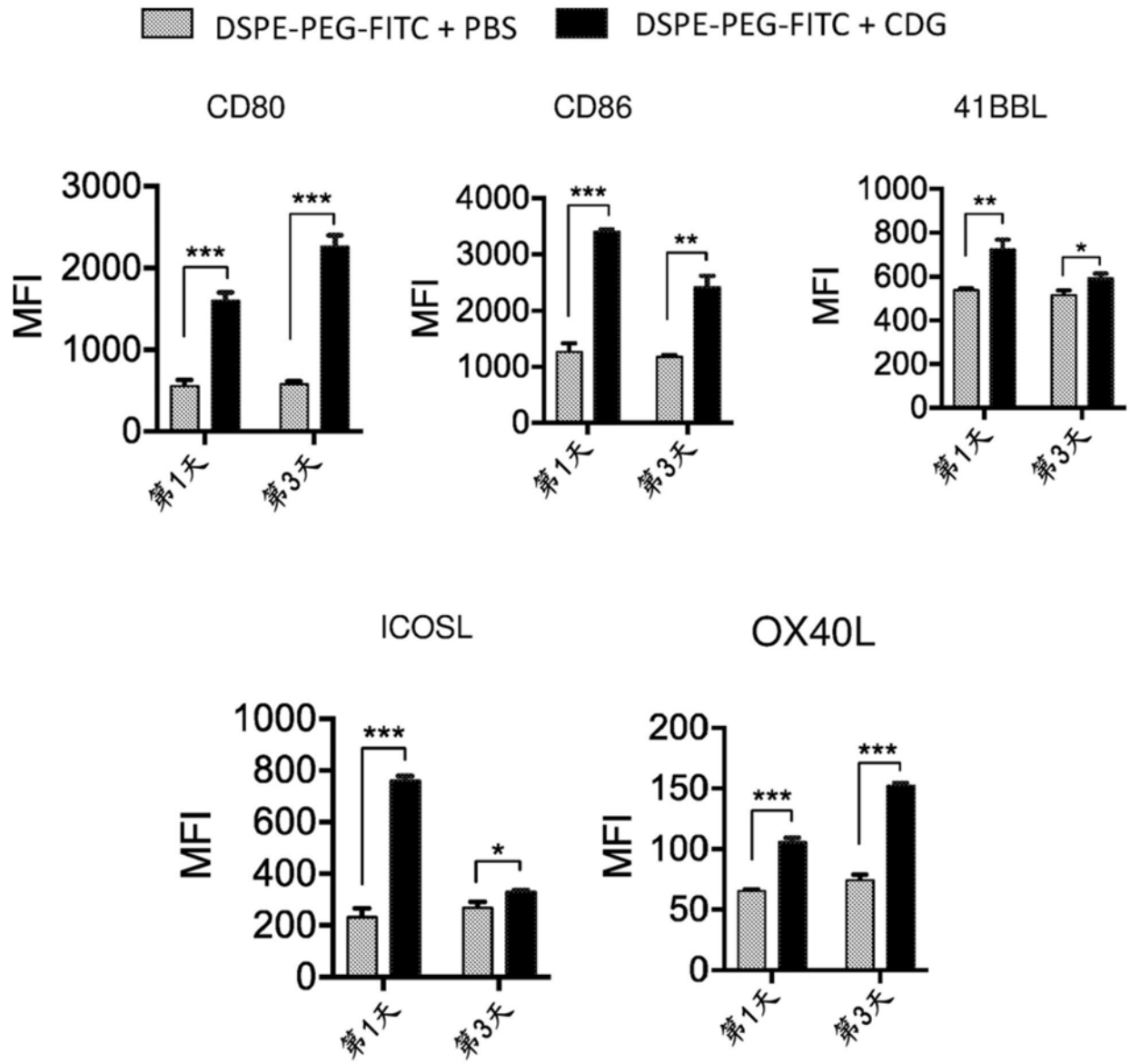


图6

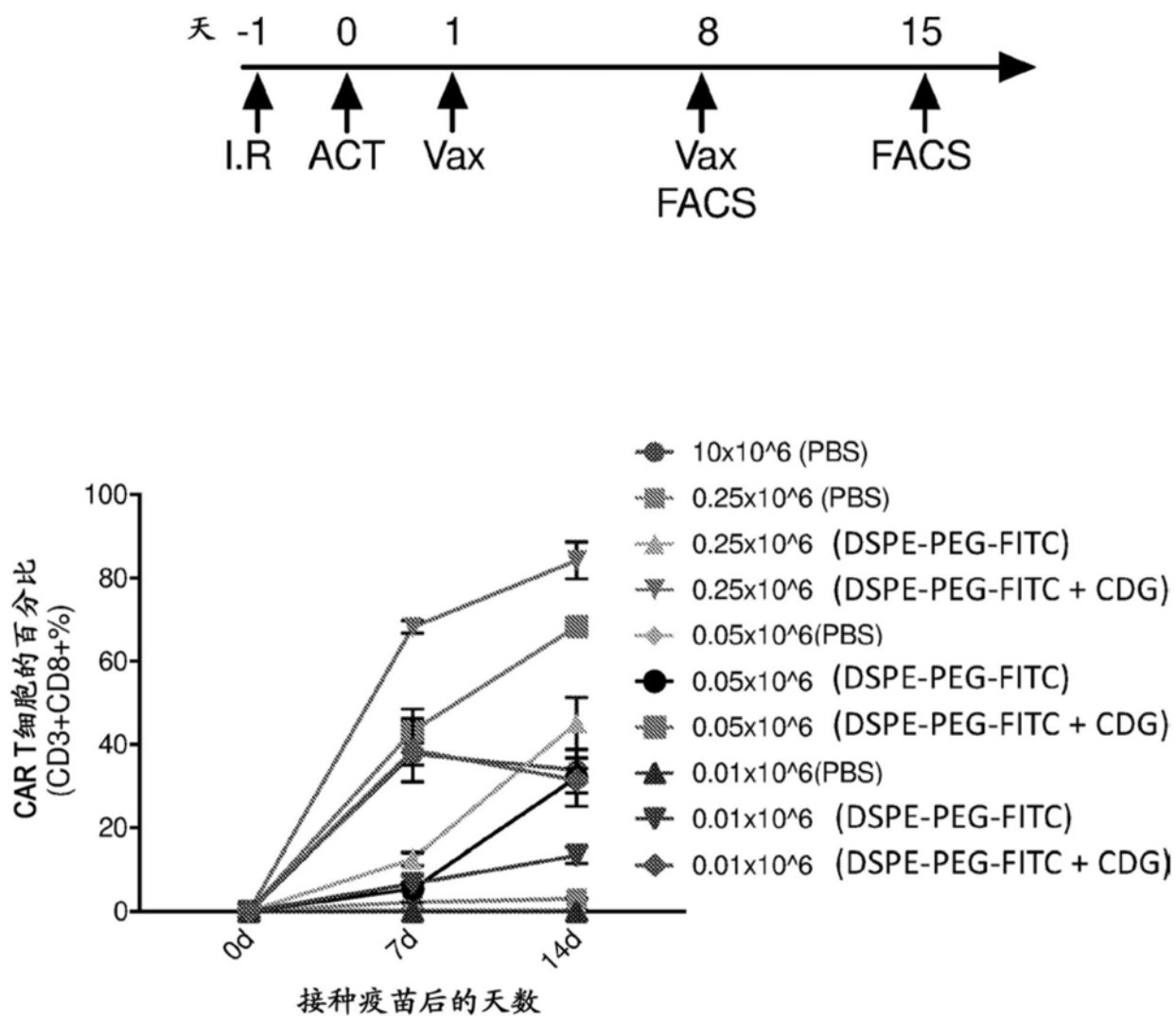


图7

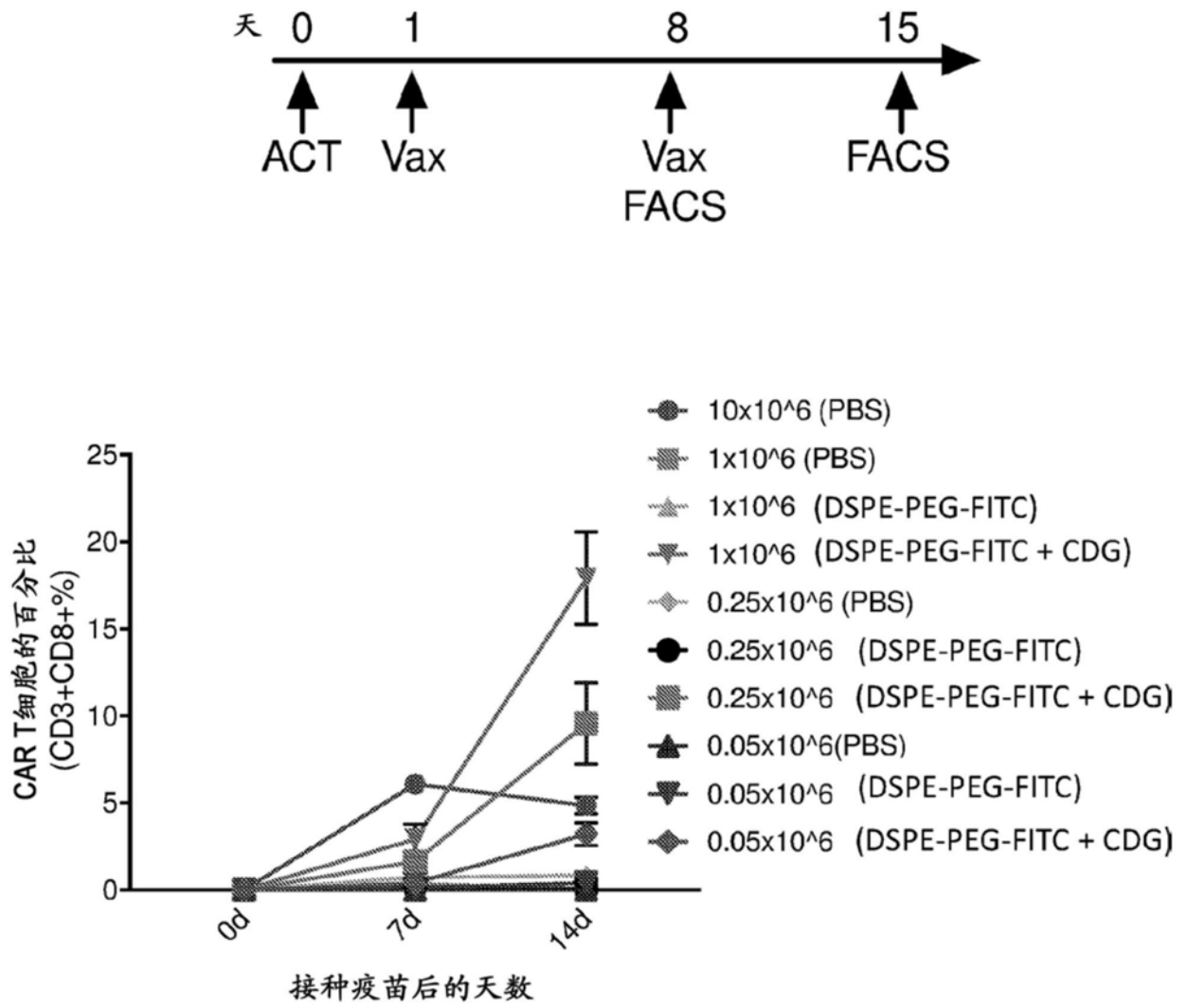


图8

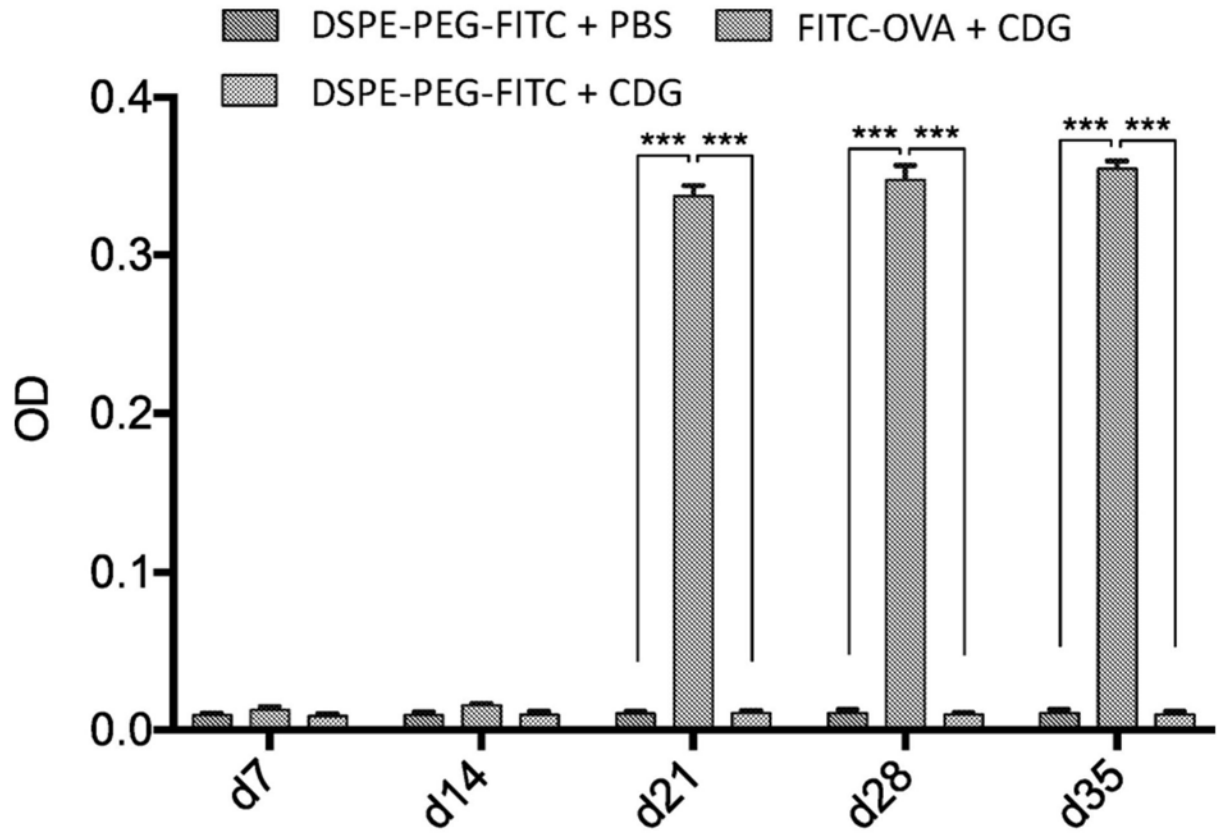


图9

LEKKGNVVT DHC-PEG2k-DSPE

图10A

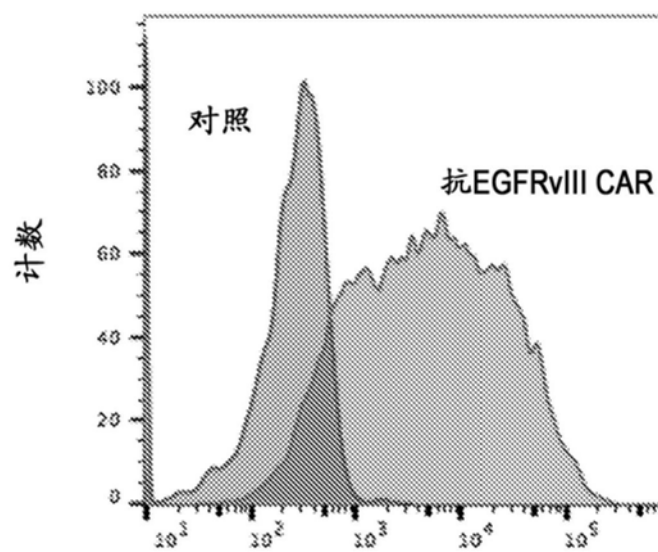


图10B

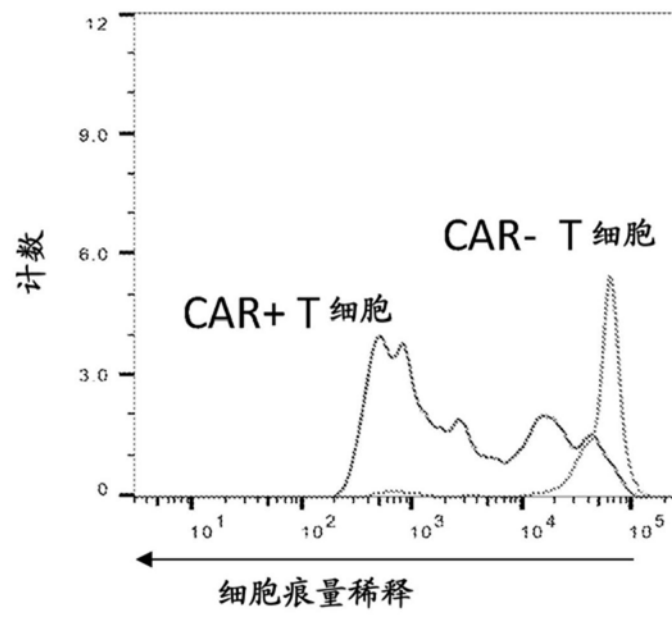


图10C

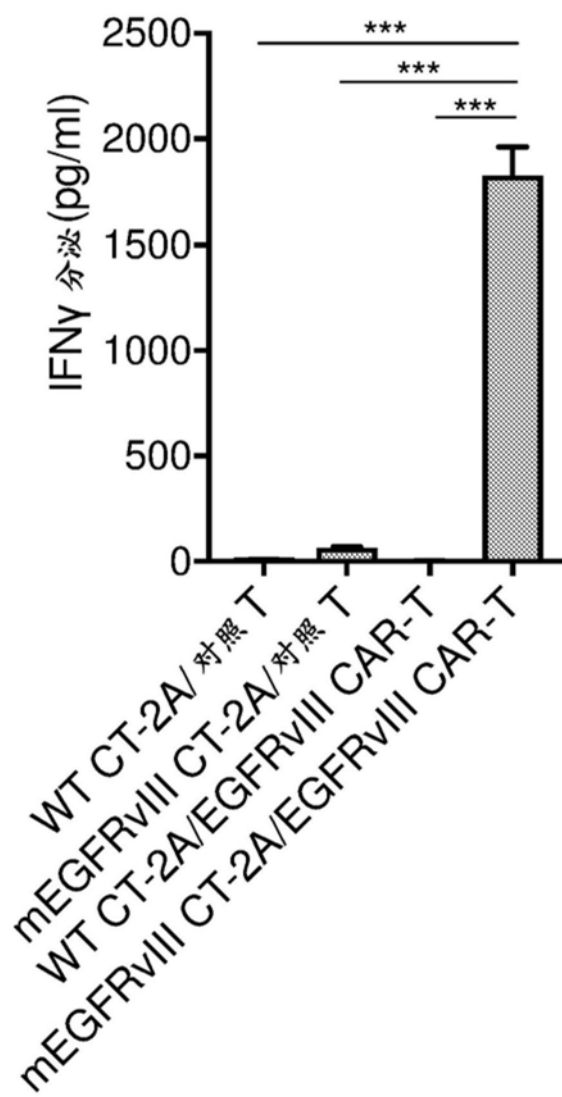


图11A

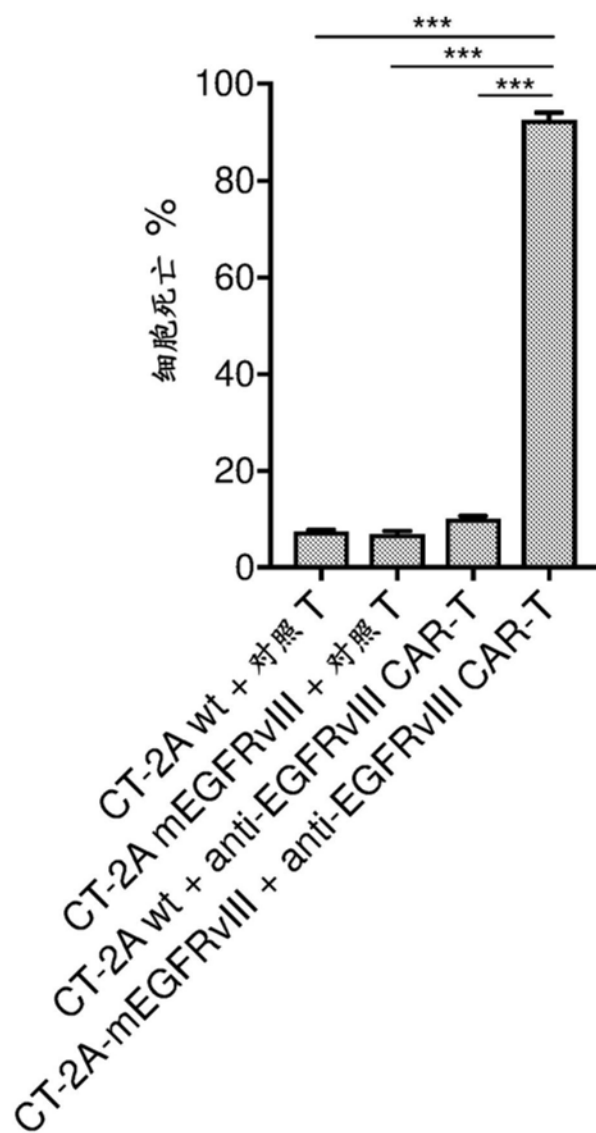


图11B

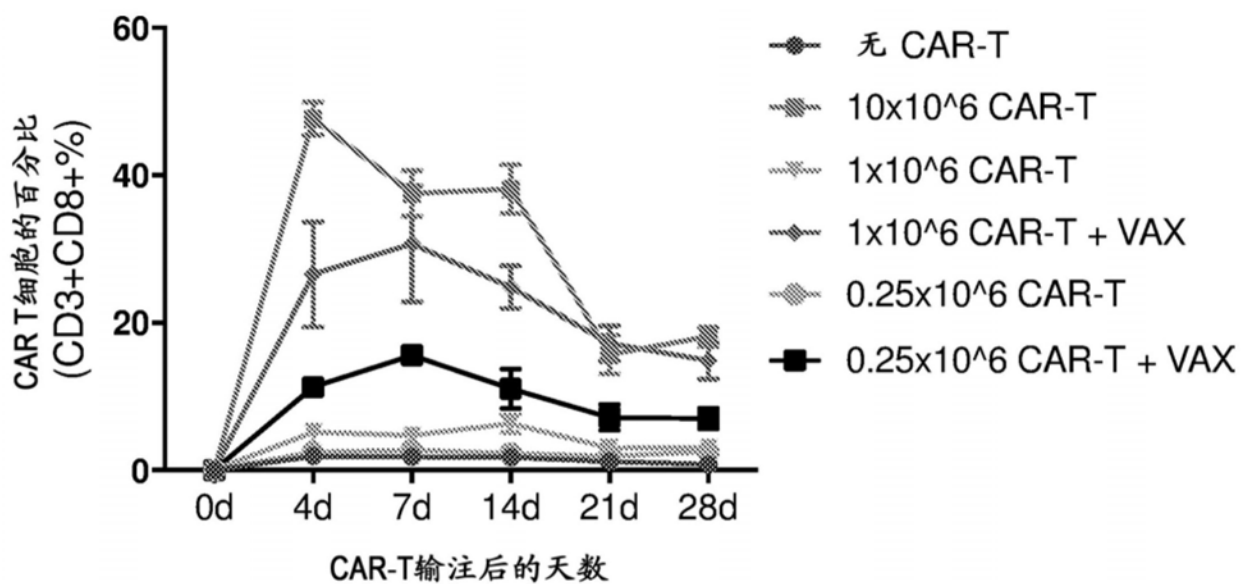


图12

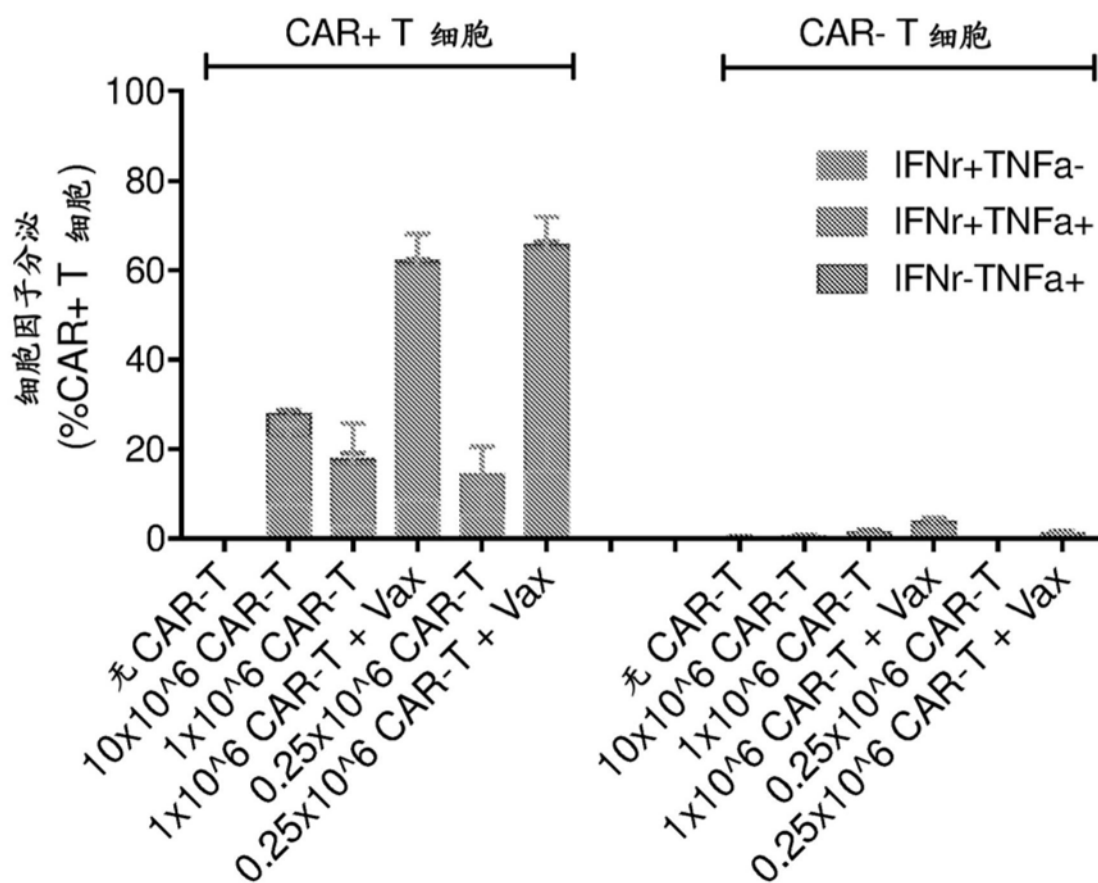


图13

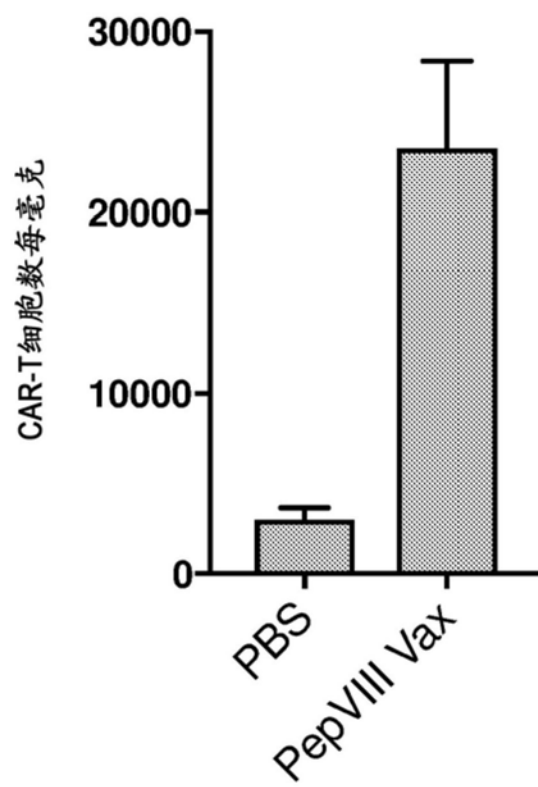
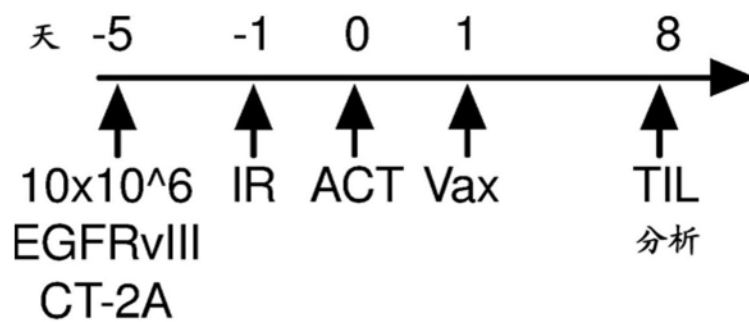


图14

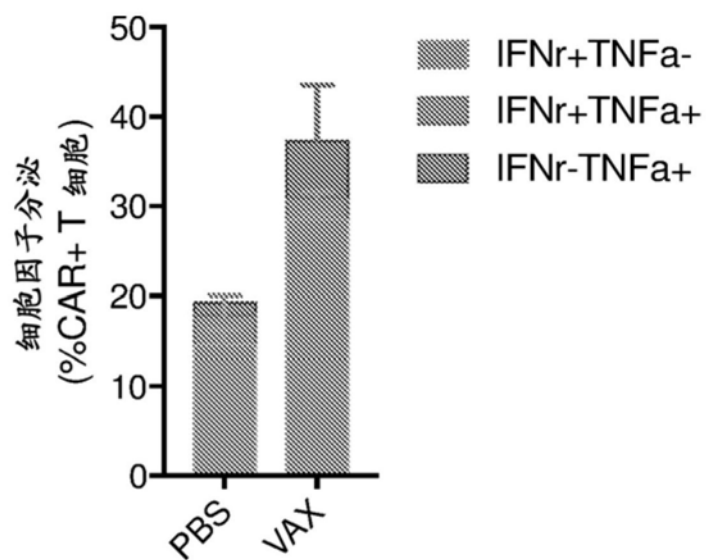


图15

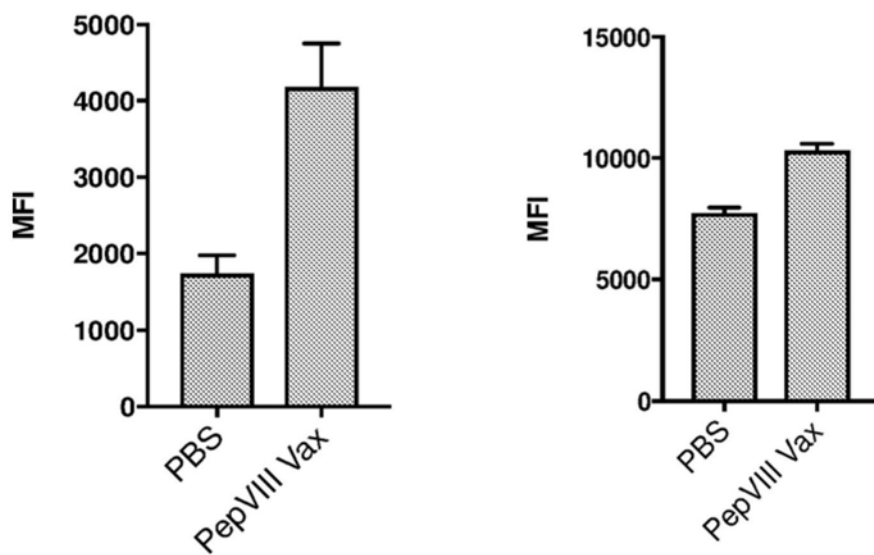


图16

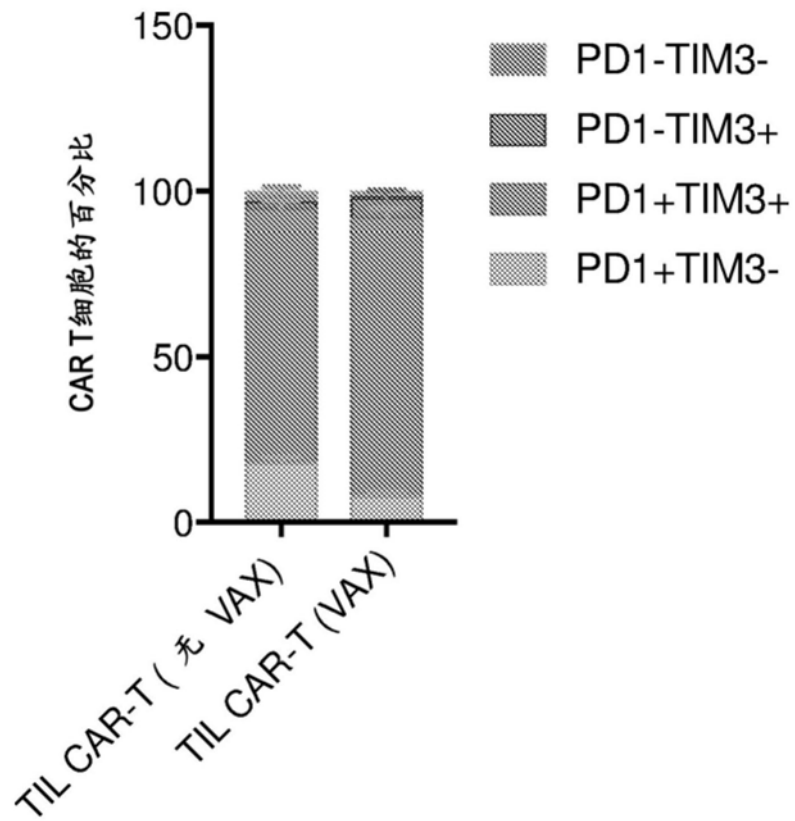


图17

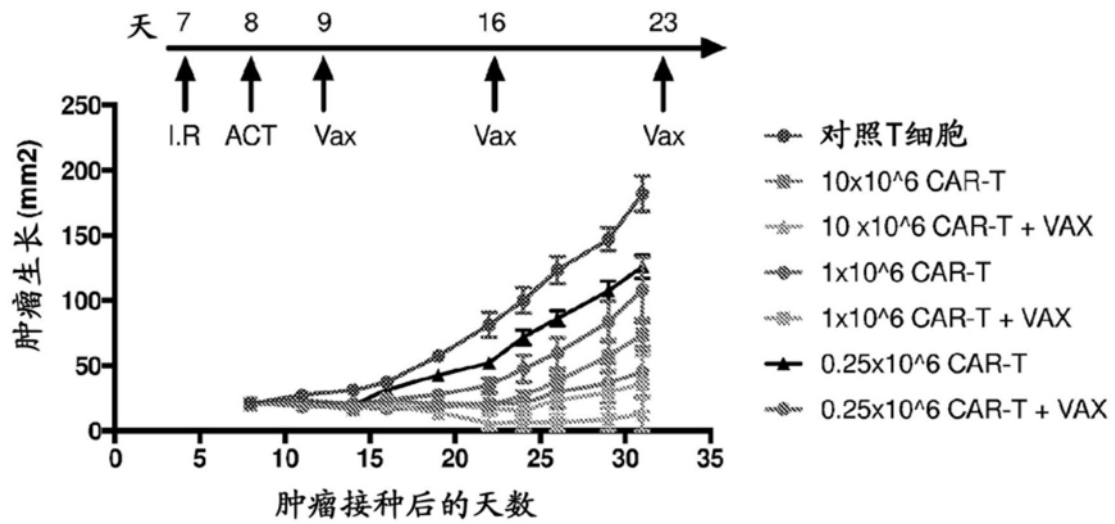


图18A

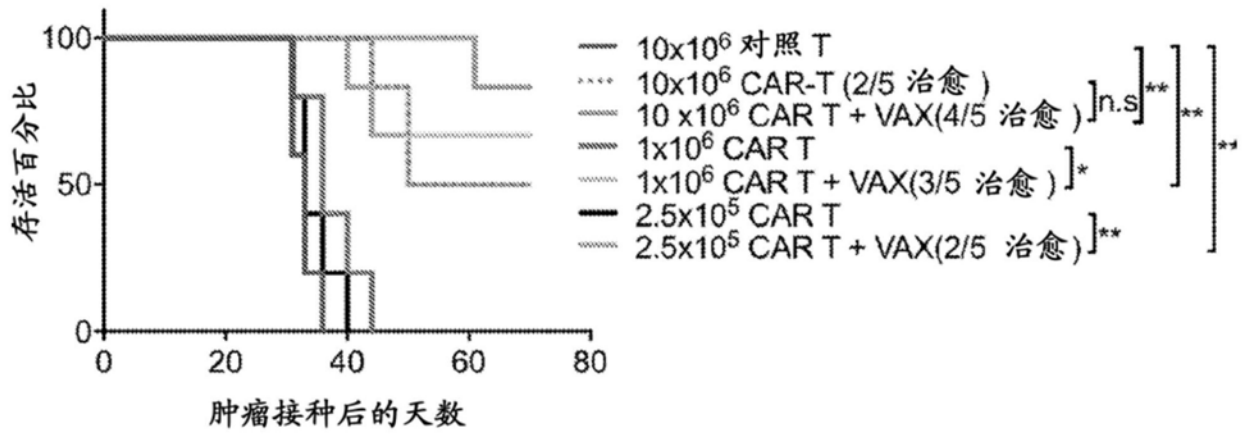


图18B

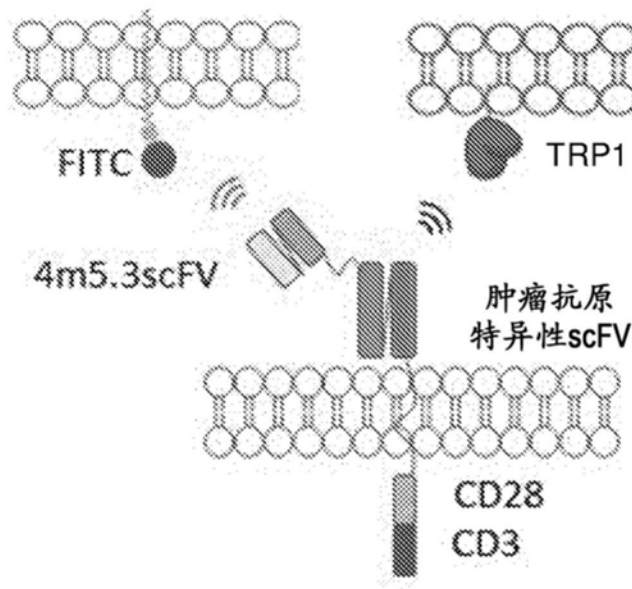


图19

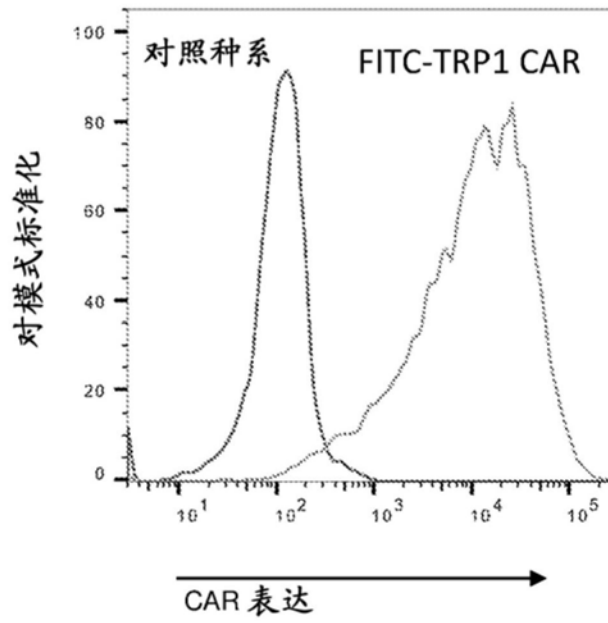


图20

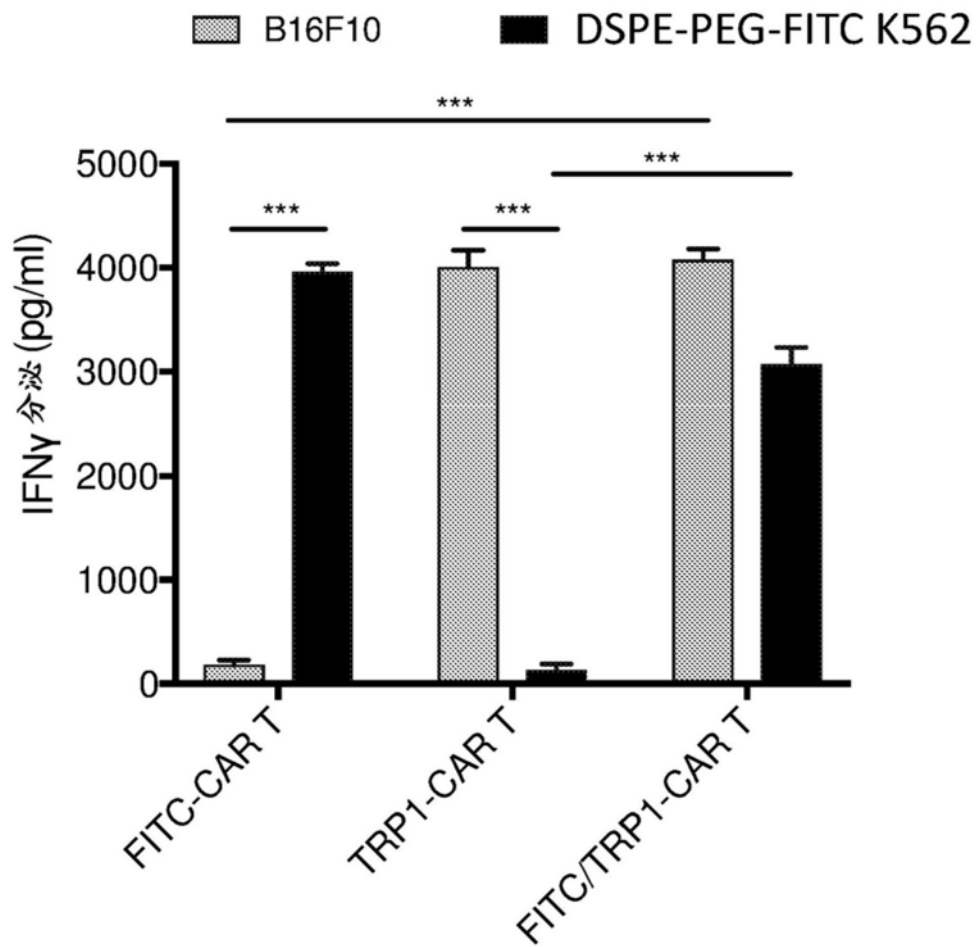


图21

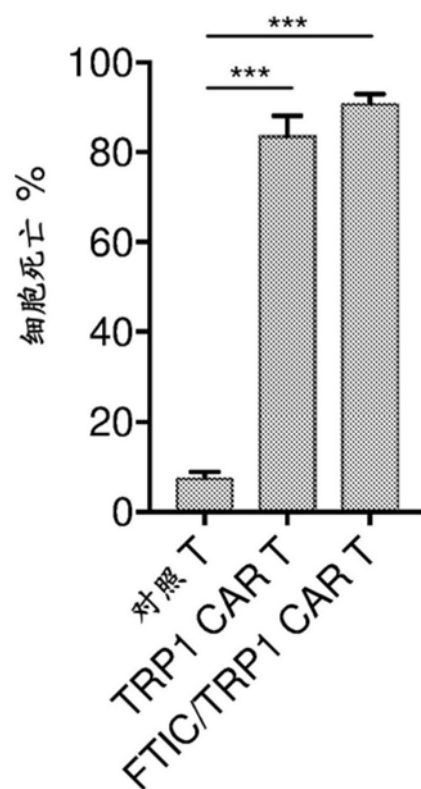


图22

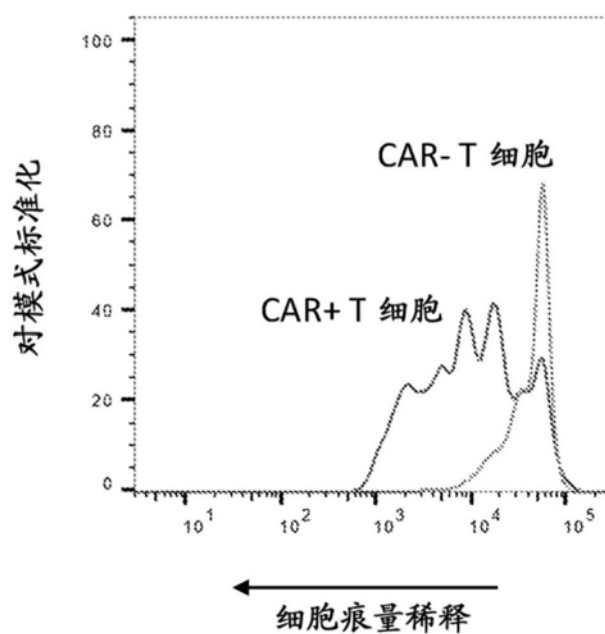


图23

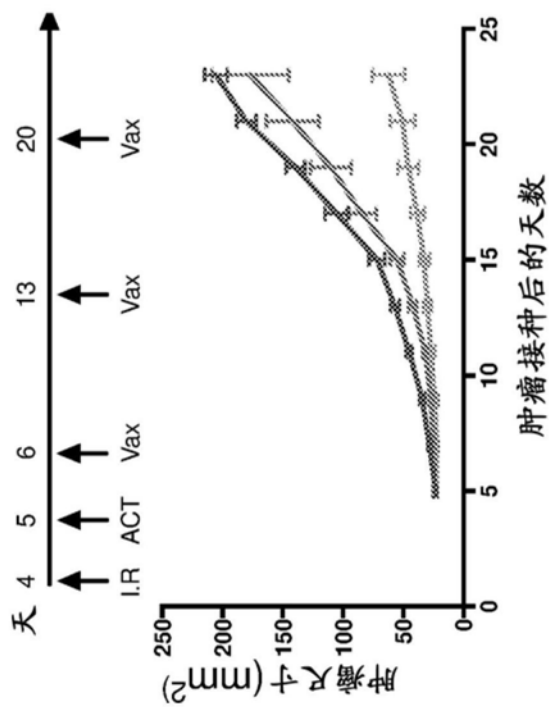


图24A

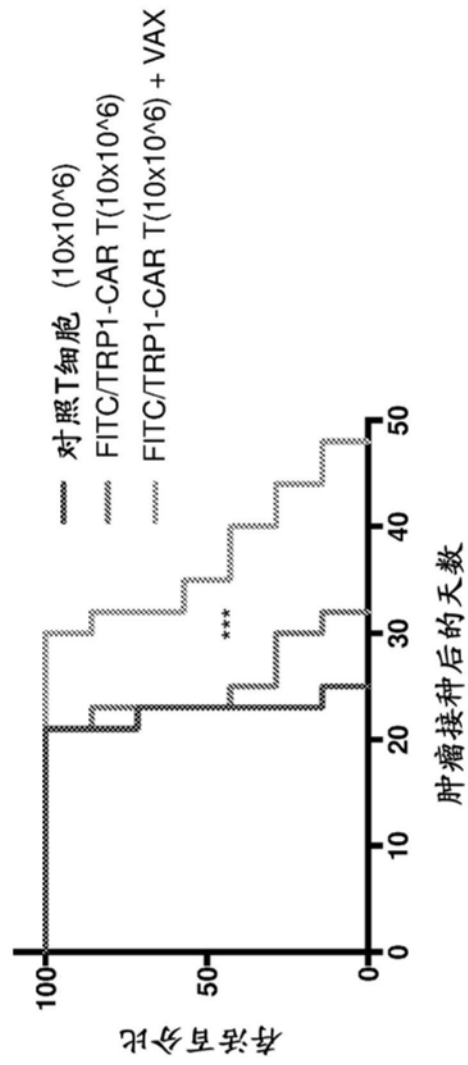


图24B

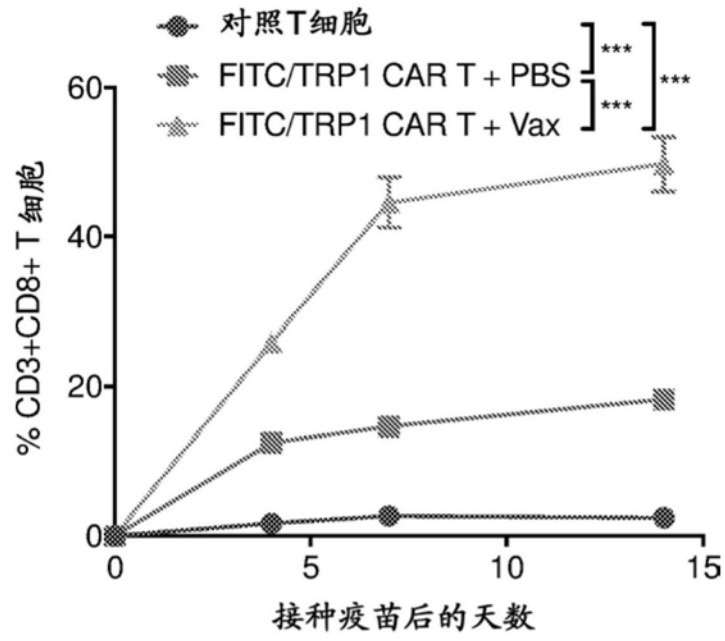


图25

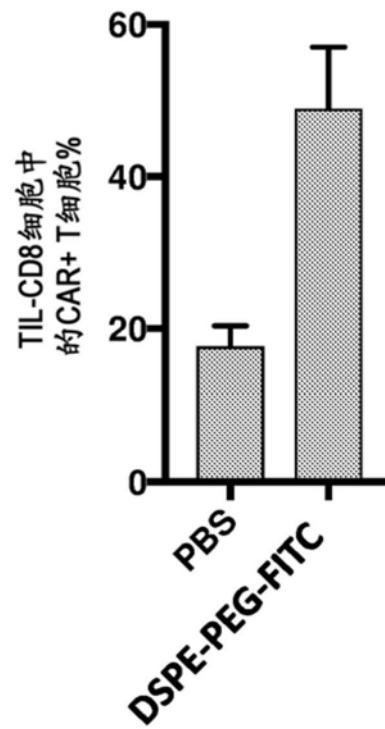


图26

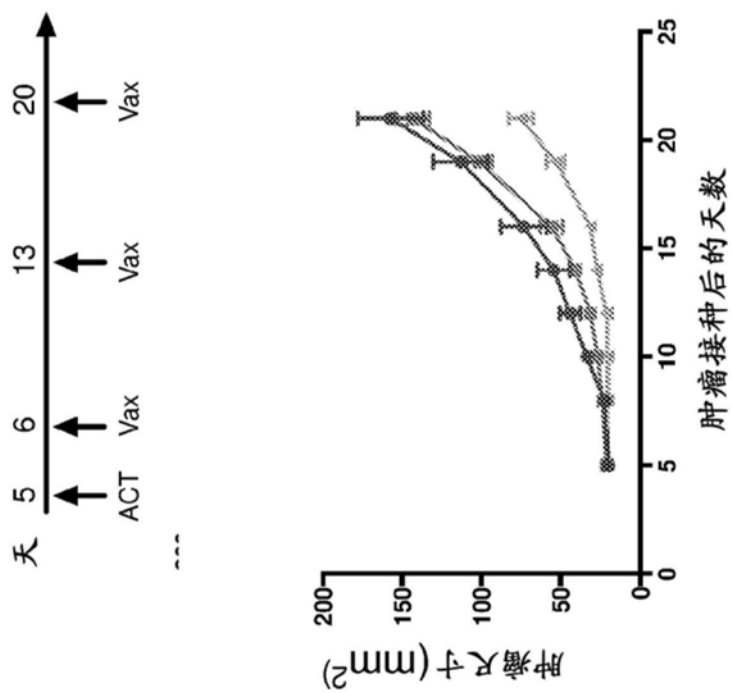


图27A

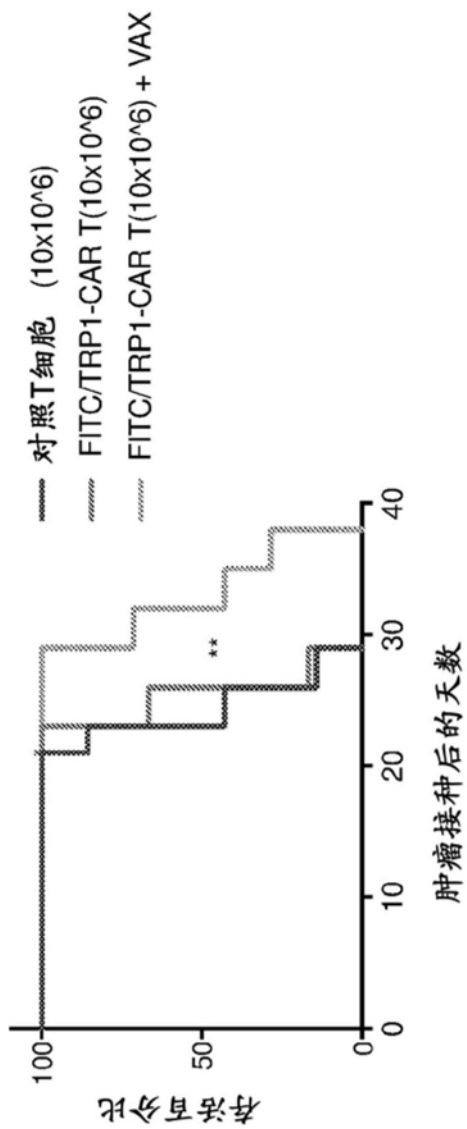


图27B