



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118488969 A

(43) 申请公布日 2024.08.13

(21) 申请号 202280075260.8

(22) 申请日 2022.11.15

(30) 优先权数据

63/279,797 2021.11.16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.05.11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/079885 2022.11.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/091909 EN 2023.05.25

(71) 申请人 舒迪安生物技术公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 G·J·维斯

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理师 秦剑

(51) Int.Cl.

C07K 16/30 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

权利要求书3页 说明书43页

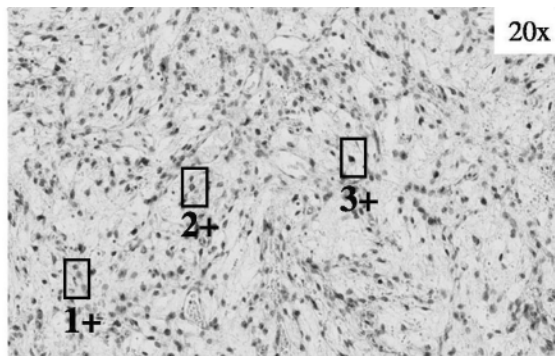
序列表(电子公布) 附图8页

(54) 发明名称

粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤患者的治疗

(57) 摘要

本发明提供了用抗GPC3治疗剂治疗诊断患有粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤的患者的方法。本发明还涉及通过免疫染色测定定量诊断患有粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤的患者的组织样品中的GPC3表达以及识别与选择施用该抗GPC3治疗剂的患者相关的GPC3表达水平。



1. 一种治疗诊断患有粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤的患者的方法,所述方法包括对所述患者施用抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)治疗剂。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中通过诊断为粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤来选择所述患者进行治疗。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤表达GPC3。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中通过免疫染色,任选地通过免疫组织化学(IHC)染色,优选地细胞质/膜H评分大于30,选择诊断患有所述粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤的所述患者。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述患者通过包括以下项的过程诊断:

(a) 从肿瘤活组织检查样品中获得组织切片,所述切片的厚度介于 $3\mu\text{m}$ 至 $15\mu\text{m}$ 之间,

(b) 优选地通过IHC用特异性结合GPC3的抗体进行免疫染色,更具体地使用所述抗体GC33进行免疫染色,

(c) 测定所述细胞质/膜H评分,以及

(d) 选择H评分大于30的患者进行所述治疗。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述选择包括来自所述患者的肿瘤样品中的GPC3的免疫染色,优选地免疫组织化学染色,其中确定所述GPC3表达水平并将其与GPC3表达的预先确定的阈值水平进行比较,并且其中在所述患者的GPC3表达水平等于或高于所述预先确定的阈值水平的情况下,选择所述患者进行治疗。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述治疗剂包含抗GPC3结合结构域,优选地是保留与GPC3结合的抗GPC3抗体或其功能片段,优选地其中所述治疗剂包含所述施用抗GPC3抗体、抗GPC3抗体-药物缀合物、抗GPC3抗体-放射性核素缀合物或者结合GPC3的抗GPC3抗体或抗体衍生物与抗CD3结合结构域或免疫刺激多肽的融合蛋白质。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述治疗剂包含所述施用表达抗GPC3嵌合受体多肽(CAR)的经基因工程化的造血细胞,其中所述CAR多肽包含

(a) 与GPC3结合的细胞外结合结构域;

(b) 跨膜结构域;和

(c) 细胞质信号传导结构域,

并且任选地其中所述造血细胞外源地表达改善所述造血细胞在所述实体瘤微环境中的生存力和/或功能性的基因。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述造血细胞具有

i. 相对于相同类型的野生型造血细胞,改善的葡萄糖摄取活性,而所述造血细胞外源地表达葡萄糖输入多肽,优选地其中所述葡萄糖输入多肽是葡萄糖转运蛋白(GLUT)或钠-葡萄糖协同转运蛋白(SGLT),优选地其中所述葡萄糖输入多肽选自:GLUT1、GLUT3、GLUT1 S226D、SGLT1、SGLT2、GLUT8、GLUT8 L12A L13A、GLUT11、GLUT7和GLUT4;

ii. 相对于相同类型的野生型造血细胞,受调节的Krebs循环,而所述造血细胞外源地表达Krebs循环调节多肽,优选地其中所述Krebs循环调节因子是

a. 催化所述Krebs循环中的反应的酶,优选地是异柠檬酸脱氢酶(IDH)、苹果酸脱氢酶

(MDH) 或磷酸甘油酸脱氢酶 (PHGDH),

b. 使用Krebs循环代谢产物作为底物的酶, 优选地是谷氨酸草酰乙酸转氨酶 (GOT) 或磷酸烯醇丙酮酸羧激酶1 (PCK1), 或

c. 将前体转化为Krebs循环代谢产物的酶, 优选地是磷酸丝氨酸转氨酶 (PSAT1)、谷氨酸脱氢酶 (GDH1)、谷氨酸-丙酮酸转氨酶1 (GPT1) 或谷氨酰胺酶 (GLS); 和/或

iii. 相对于相同类型的野生型造血细胞, 增强的细胞内乳酸浓度, 而所述造血细胞外源性地表达乳酸调节多肽,

优选地其中所述乳酸调节多肽是

a. 单羧酸转运蛋白 (MCT), 优选地是MCT1、MCT2或MCT4,

b. 参与乳酸合成的酶, 优选地是乳酸脱氢酶A (LDHA), 或

c. 抑制竞争乳酸合成底物的途径的多肽, 优选地是丙酮酸脱氢酶激酶1 (PDK1)。

10. 根据权利要求8或权利要求9所述的方法, 其中所述细胞外抗原结合结构域是与GPC3结合的单链抗体片段 (scFv), 优选地其中所述scFv衍生自所述GC33抗体, 任选地其中所述scFv具有SEQ ID NO:2的序列。

11. 根据权利要求8至10中任一项所述的方法, 其中所述CAR多肽包含

(i) CD28共刺激结构域, 与CD28跨膜结构域, 优选地是SEQ ID NO:6, CD28铰链结构域, 或它们的组合, 优选地是SEQ ID NO:4或

(ii) 4-1BB共刺激结构域, 优选地是SEQ ID NO:5, 与CD8跨膜结构域, CD8铰链结构域, 或它们的组合 (SEQ ID NO:3);

更优选地其中所述CAR多肽包含SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

12. 根据权利要求8至11中任一项所述的方法, 其中 (c) 的所述细胞质信号传导结构域是CD3 $\zeta$ 的细胞质结构域, 优选地是SEQ ID NO:7, 或Fc $\epsilon$ R1  $\gamma$ 。

13. 根据权利要求8至12中任一项所述的方法, 其中所述造血细胞是天然杀伤 (NK) 细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞或T细胞, 优选地其中所述造血细胞是其中内源性T细胞受体、内源性主要组织相容性复合物、内源性 $\beta$ -2-微球蛋白或它们的组合的所述表达已被抑制或消除的T细胞; 并且/或者

其中所述造血细胞衍生自外周血单核细胞 (PBMC)、造血干细胞 (HSC) 或诱导型多能干细胞 (iPSC),

优选地其中所述造血细胞对于所述患者是自体的。

14. 根据权利要求8至13中任一项所述的方法, 其中所述造血细胞包含核酸或一组核酸, 优选地是DNA分子或一组DNA分子, 其共同包含:

(a) 第一核苷酸序列, 所述第一核苷酸序列编码所述葡萄糖输入多肽、所述Krebs循环调节多肽和/或所述乳酸调节多肽; 和

(b) 第二核苷酸序列, 所述第二核苷酸序列编码所述嵌合抗原受体多肽;

优选地其中所述造血细胞包含含有所述第一核苷酸序列和所述第二核苷酸序列两者的所述核酸; 和

(c) 任选的第三核苷酸序列, 所述第三核苷酸序列位于所述第一核苷酸序列和所述第二核苷酸序列之间, 其中所述第三核苷酸序列编码核糖体跳跃位点、内部核糖体进入位点 (IRES) 或第二启动子, 优选地其中所述第三核苷酸序列编码核糖体跳跃位点, 所述核糖体

跳跃位点是P2A肽；

优选地其中：

(i) 所述核酸或所述核酸组包含在载体或一组载体内，优选地是表达载体或一组表达载体；并且/或者

(ii) 所述载体或所述一组载体包含一个或多个病毒载体，更优选地是慢病毒载体或逆转录病毒载体。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的方法，其中向所述患者施用每kg至少约 $5 \times 10^4$ 个抗GPC3-CAR T细胞，优选地向所述患者施用于约 $5 \times 10^4$ 至约 $1 \times 10^{12}$ 个抗GPC3-CAR T细胞/kg。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的方法，其中所述治疗剂包含抗GPC3靶向多肽或多肽融合物，优选地是抗GPC3抗体、抗GPC3双特异性或多特异性蛋白质或者抗GPC3抗体-药物缀合物。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的方法，其中如通过计算机断层扫描(CT)扫描所测量的，根据RECIST，所述施用所述抗GPC3治疗剂有效实现稳定的疾病。

18. 根据权利要求1至17中任一项所述的方法，其中如通过计算机断层扫描(CT)扫描所测量的，根据RECIST，所述施用所述抗GPC3治疗剂实现客观反应。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的方法，其中所述方法还包括与所述治疗剂并行或顺序地向所述患者施用至少一种免疫调节剂，优选地其中所述免疫调节剂是免疫检查点抑制剂或免疫刺激性细胞因子。

20. 根据权利要求1至15和权利要求17至19中任一项所述的方法，其中所述方法还包括施用淋巴细胞减少治疗，优选地选自环磷酰胺和氟达拉滨。

## 粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤患者的治疗

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2021年11月16日提交的美国临时申请号63/279,797的提交日期的权益,该美国临时申请的全部内容以引用方式并入本文。

### 背景技术

[0003] 肉瘤,包括软组织肉瘤(STS),是一类罕见的间充质来源的恶性肿瘤,约占所有儿童实体瘤的20%,并且约占成人实体瘤的1%(Abaricia和Hirbe,2018年;Hui,2016年)。脂肪肉瘤(LPS)是最常见的STS类型,起源于脂肪组织,并且是影响脂肪分化的恶性肿瘤。粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤(MRCLS)占LPS的大约30%,并且往往发生在稍年轻的年龄组,其中发病率在生命的第四个十年达到高峰。

[0004] MRCLS的标准治疗包括局部原发性疾病的手术切除。与其他LPS亚型相比,已知MRCLS对放射疗法和细胞毒性化学疗法敏感。然而,尽管进行了适当的局部治疗,但仍约40%的患者确实复发。尽管如此,对患有MRCLS的患者的治疗选择仍然很差,并且需要新的治疗选择来满足这种高医疗需求的指征。

### 发明内容

[0005] 本公开至少部分基于磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(GPC3)可作为MRCLS的诊断生物标记物和治疗靶标的意外发现。在查看来自癌症患者的实体瘤活组织检查中GPC3的表达谱以更好地理解GPC3阳性肿瘤流行率和抗GPC3疗法的指征优先次序时,LPS的亚组,即MRCLS,被鉴定为相对高GPC3表达的患者群体,利用新的评分规则准确且可靠地定量多个组织样品和病理学家进行评分的GPC3表达水平。鉴于在用抗GPC3抗体(GC33)染色的各种肿瘤组织切片中观察到的染色模式的复杂性,该发现是出乎意料的,并且提示MRCLS被优先考虑和/或选择用于用抗GPC3治疗剂进行治疗。

[0006] 因此,在一些方面,本公开的特征在于治疗诊断患有粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤的患者的方法,该方法包括对患者施用抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)治疗剂。在一些实施方案中,通过诊断为粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤来选择患者进行治疗。在一些示例中,粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤表达GPC3。

[0007] 在一些实施方案中,通过免疫染色,例如通过免疫组织化学(IHC)染色选择诊断患有粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤的患者。在一些示例中,如果诊断患有粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤的患者的细胞质/膜H评分大于30,则选择该患者。

[0008] 在一些实施方案中,患者可通过包括以下的过程来诊断:

[0009] (a) 从肿瘤活组织检查样品中获得组织切片,该切片的厚度介于3 $\mu$ m至15 $\mu$ m之间,

[0010] (b) 优选地通过IHC用特异性结合GPC3的抗体进行免疫染色,更具体地使用抗体GC33进行免疫染色,

[0011] (c) 测定细胞质/膜H评分,以及

[0012] (d) 选择H评分大于30的患者进行该治疗。

[0013] 在一些实施方案中,选择可包括免疫染色,例如,来自患者的肿瘤样品中GPC3的免疫组织化学染色。可测定GPC3的表达水平并将其与GPC3表达的预先确定的阈值水平进行比较。在该患者的GPC3表达水平等于或高于该预先确定的阈值水平的情况下,选择该患者进行治疗。

[0014] 在一些实施方案中,治疗剂包含抗GPC3结合结构域,例如抗GPC3抗体,例如保留与GPC3结合的全长抗体或其功能片段。在一些情况下,治疗剂可包含抗GPC3抗体、抗GPC3抗体-药物缀合物、抗GPC3抗体-放射性核素缀合物或者结合GPC3的抗GPC3抗体或抗体衍生物与抗CD3结合结构域或免疫刺激多肽的融合蛋白质。在一些示例中,治疗剂包含表达抗GPC3嵌合受体多肽(CAR)的经基因工程化的造血细胞,这些经基因工程化的造血细胞可包括:

[0015] (a) 与GPC3结合的细胞外结合结构域;

[0016] (b) 跨膜结构域;和

[0017] (c) 细胞质信号传导结构域。

[0018] 在一些示例中,造血细胞还可外源性表达改善造血细胞在实体瘤微环境中的生存力和/或功能性的基因。在一些情况下,相对于相同类型的野生型造血细胞,这些造血细胞可具有改善的葡萄糖摄取活性,而该造血细胞外源地表达葡萄糖输入多肽。在一些示例中,葡萄糖输入多肽是葡萄糖转运蛋白(GLUT)或钠-葡萄糖协同转运蛋白(SGLT)。示例包括但不限于GLUT1、GLUT3、GLUT1 S226D、SGLT1、SGLT2、GLUT8、GLUT8 L12A L13A、GLUT11、GLUT7和GLUT4。

[0019] 在一些情况下,相对于相同类型的野生型造血细胞,这些造血细胞可具有受调节的Krebs循环,而该造血细胞外源地表达Krebs循环调节多肽。在一些示例中,Krebs循环调节因子是催化Krebs循环中的反应的酶。示例包括但不限于异柠檬酸脱氢酶(IDH)、苹果酸脱氢酶(MDH)或磷酸甘油酸脱氢酶(PHGDH)。在一些示例中,Krebs循环调节因子是以Krebs循环代谢产物为底物的酶,例如,谷氨酸草酰乙酸转氨酶(GOT)或磷酸烯醇丙酮酸羧激酶1(PCK1)。另选地,Krebs循环调节因子可以是将前体转化为Krebs循环代谢产物的酶。示例包括但不限于磷酸丝氨酸转氨酶(PSAT1)、谷氨酸脱氢酶(GDH1)、谷氨酸-丙酮酸转氨酶1(GPT1)或谷氨酰胺酶(GLS)。

[0020] 在一些情况下,造血细胞相对于相同类型的野生型造血细胞可具有增强的细胞内乳酸浓度,而造血细胞外源地表达乳酸调节多肽。在一些示例中,乳酸调节多肽是单羧酸转运蛋白(MCT),例如,MCT1、MCT2或MCT4。在其他示例中,乳酸调节多肽是参与乳酸合成的酶,例如,乳酸脱氢酶A(LDHA)。另选地,乳酸调节多肽是抑制竞争乳酸合成底物的途径的多肽,例如,丙酮酸脱氢酶激酶1(PDK1)。

[0021] 在本文所公开的任何方法中,细胞外抗原结合结构域是与GPC3结合的单链抗体片段(scFv)。在一些示例中,scFv衍生自GC33抗体。在一个示例中,scFv可包含SEQ ID NO:2的序列(例如,由其组成)。在一些示例中,抗GPC3 CAR多肽可包含CD28共刺激结构域,与CD28跨膜结构域,CD28铰链结构域,或它们的组合(例如,SEQ ID NO:4)。另选地,抗GPC3 CAR多肽可包含4-1BB共刺激结构域(例如,SEQ ID NO:5),与CD8跨膜结构域,CD8铰链结构域,或它们的组合(例如,SEQ ID NO:3)。另选地或另外地,抗GPC3 CAR多肽可包含(c)的细胞质信号传导结构域,其可以是CD3 $\zeta$ 的细胞质结构域,优选地是SEQ ID NO:7或Fc $\epsilon$ R1  $\gamma$ 。在具体的示例中,抗GPC3 CAR可包含SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0022] 本文所公开的任何造血细胞可以是自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞或T细胞。在一些示例中,造血细胞是T细胞。在一些情况下,在此类T细胞中,内源性T细胞受体、内源性主要组织相容性复合物、内源性 $\beta$ -2-微球蛋白或它们的组合的表达被抑制或消除。在一些示例中,造血细胞可衍生自外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞(HSC)或诱导型多能干细胞(iPSC)。在一些示例中,造血细胞对于患者是自体的。在其他示例中,造血细胞对于患者是同种异体的。

[0023] 在一些实施方案中,造血细胞可包含核酸或一组核酸,例如,DNA分子或一组DNA分子,其共同包含:(a)第一核苷酸序列,该第一核苷酸序列编码葡萄糖输入多肽、Krebs循环调节多肽和/或乳酸调节多肽;和(b)第二核苷酸序列,该第二核苷酸序列编码嵌合抗原受体多肽。在一些示例中,造血细胞可包含核酸,该核酸包含第一核苷酸序列和第二核苷酸序列两者。在一些情况下,核酸可包含位于第一核苷酸序列和第二核苷酸序列之间的第三核苷酸序列。第三核苷酸序列可编码核糖体跳跃位点、内部核糖体进入位点(IRES)或第二启动子。在一些示例中,第三核苷酸序列编码核糖体跳跃位点,例如,P2A肽。在一些示例中,核酸或核酸组可包含在载体或一组载体内,例如,表达载体或一组表达载体。在具体的示例中,该载体或该组载体包含一个或多个病毒载体,例如,慢病毒载体或逆转录病毒载体。

[0024] 在一些实施方案中,向患者施用每kg至少约 $5 \times 10^4$ 个抗GPC3-CAR T细胞。在一些示例中,向患者施用约 $5 \times 10^4$ 至约 $1 \times 10^{12}$ 个抗GPC3-CAR T细胞/kg。

[0025] 在一些实施方案中,治疗剂可包含抗GPC3靶向多肽或多肽融合物,例如,抗GPC3抗体、抗GPC3双特异性或多特异性蛋白质或者抗GPC3抗体-药物缀合物。

[0026] 在一些实施方案中,如通过计算机断层扫描(CT)扫描所测量的,根据RECIST(例如,RECIST 1.1),施用抗GPC3治疗剂可有效实现稳定的疾病。另选地或另外地,如通过计算机断层扫描(CT)扫描所测量的,根据RECIST(例如,RECIST 1.1),施用抗GPC3治疗剂实现客观反应。

[0027] 本文所公开的任何方法还可包括与治疗剂并行或顺序地向患者施用至少一种免疫调节剂。在一些实施方案中,免疫调节剂可以是免疫检查点抑制剂或免疫刺激性细胞因子。另选地或另外地,该方法还可包括使患者接受淋巴细胞减少治疗,其可包括环磷酰胺、氟达拉滨或它们的组合。

[0028] 用于治疗诊断为粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤的患者的抗GPC3治疗剂(例如,本文所公开的那些)以及本文所公开的任何抗GPC3治疗剂在制备用于治疗诊断为粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤的患者的药物中的用途也在本公开的范围之内。

[0029] 此外,本公开还提供了用于诊断患有粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤的患者或用于选择治疗该疾病的患者的方法。该方法可包括:

[0030] (a) 从获自候选患者的肿瘤活组织检查样品中获得组织切片,该切片的厚度介于 $3 \mu\text{m}$ 至 $15 \mu\text{m}$ 之间,

[0031] (b) 优选地通过IHC用特异性结合GPC3的抗体进行免疫染色,更具体地使用抗体GC33进行免疫染色,

[0032] (c) 测定细胞质/膜H评分,以及

[0033] (d) 基于H评分将候选患者诊断为患有或疑似患有粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤。

[0034] 在一些情况下,高于30的H评分指示疾病发生。在一些情况下,可选择H评分大于30

的患者进行治疗。

[0035] 本发明的一个或多个实施方案的细节阐述于以下描述中。从以下附图和若干实施方案的详细描述以及所附权利要求书中,本发明的其他特征或优点将变得显而易见。

### 附图说明

[0036] 图1示出了通过IHC用抗体GC33染色的粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤的FFPE组织切片的图像,其中方框表示在A.1×、B.4×和C.20×放大倍率下观察的特定视野。每个视场内的细胞对于弱染色被评分为1+,对于中等染色被评分为2+,并且对于强染色被评分为3+;1+、2+和3+的示例在C中加方框标示。

[0037] 图2示出了抗体GC33在健康FFPE组织切片A.乳腺)、B.心脏、C.胃和D.肾脏中,在20×放大倍率下的IHC染色的图像。

[0038] 图3示出了在各种癌症类型中,即在FFPE组织切片A.平滑肌(阴性对照;H评分-0)、B.肝细胞癌(H评分-280)、C.非小细胞肺癌(H评分-260)、D.梅克尔细胞癌(H评分-130)和E.脂肪肉瘤(H评分-120)中,在20×放大倍率下,抗体GC33进行IHC染色的图像。所有染色视野都示出了膜和细胞质GPC3染色。

[0039] 图4示出了抗体GC33在脂肪肉瘤亚型中,即在FFPE组织切片A.粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤(H评分-140)、多形性脂肪肉瘤(H评分-0)、高分化脂肪肉瘤(H评分-0)和混合性脂肪肉瘤(H评分-0)中,在20×放大倍率下,IHC染色的图像。

### 具体实施方式

[0040] 缩写

[0041] 在本发明的详细描述和实施例,使用了以下缩写:

[0042] CAR 嵌合抗原受体

[0043] CDR 在免疫球蛋白可变区中的互补决定区,使用Kabat编号系统定义,除非另有说明

[0044] FFPE 福尔马林固定的、石蜡包埋的

FR 抗体框架区:除CDR区以外的免疫球蛋白可变区

[0045] GOT 谷氨酸草酰乙酸转氨酶

[0046] GPC 磷脂酰肌醇蛋白聚糖

[0047] HCC 肝细胞癌

[0048] Hrs 小时

[0049] HSC 造血干细胞

[0050] HRP 辣根过氧化物酶

[0051] IgG 免疫球蛋白G

[0052] IF 免疫荧光

[0053] IHC 免疫组织化学

[0054] ISH 原位杂交

[0055] LPS 脂肪肉瘤

[0056] mAb或Mab或MAb 单克隆抗体



- [0057] mins 分钟
- [0058] MRCLS 粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤
- [0059] NSCLC 非小细胞肺癌
- [0060] PCR 聚合酶链式反应
- [0061] RT 室温
- [0062] V区 IgG链的区段,其在不同抗体之间的序列中是可变的。它延伸至轻链中的Kabat残基109和重链中的113。
- [0063] VH 免疫球蛋白重链可变区
- [0064] VL 免疫球蛋白轻链可变区
- [0065] VK 免疫球蛋白κ轻链可变区
- [0066] 定义
- [0067] 术语“施用”和“治疗”,当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时,是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。细胞的处理包括试剂与细胞的接触,以及试剂与流体的接触,其中流体与细胞接触。“施用”和“治疗”也意指体外和离体治疗,例如,通过试剂、诊断、结合化合物或通过另一种细胞。如本文所用,“治疗”是指试图改变所治疗的个体或细胞的自然过程的临床干预,并且可在临床病理学过程之前或期间进行。治疗的期望效果包括预防疾病或其病症或症状的发生或复发,延迟疾病或病症的发作,减轻疾病的病症或症状,减少疾病的任何直接或间接病理后果,降低疾病进展速率,改善或减轻疾病状态,以及实现缓解或改善预后。
- [0068] 术语“抗体(antibodies/antibody)”,也称为“免疫球蛋白”(Ig),通常包含四条多肽链,两条重链(H)和两条轻链(L),并因此是多聚体蛋白质,或包含其等同物Ig同源物(例如,仅包含重链的骆驼科动物抗体、单结构域抗体(sdAb)或可衍生自重链或轻链的纳米抗体)。术语“抗体”包括基于抗体的结合蛋白质,即保留靶结合能力的经修饰抗体形式。术语“抗体”还包括全长功能性突变体、变体或它们的衍生物(包括但不限于鼠抗体、嵌合抗体、人源化抗体和完全人抗体),其保留了Ig分子的必需表位结合特征,并且包括双重特异性、双特异性、多特异性和双重可变结构域Ig。Ig分子可以是任何类别(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)或亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)和同种异型。Ig分子也可突变,例如,以增强或降低对Fc $\gamma$ 受体或新生儿Fc受体(FcRn)的亲和力。
- [0069] 如本文所用,术语“抗体片段”涉及包含至少一条衍生自抗体的多肽链的分子,该抗体不是全长的并且表现出靶结合。抗体片段能够结合与它们对应的全长抗体相同的表位或靶标。抗体片段包括但不限于(i)Fab片段,其是由可变轻链(VL)、可变重链(VH)、恒定轻链(CL)和恒定重链1(CH1)结构域组成的单价片段;(ii)F(ab')<sub>2</sub>片段,其是二价片段,包含在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段(F(ab')<sub>2</sub>片段的还原产生两个具有游离巯基的Fab'片段);(iii)Fab(Fa)片段的重链部分,其由VH和CH1结构域组成;(iv)可变片段(Fv)片段,其由抗体的单臂的VL和VH结构域组成;(v)结构域抗体(dAb)片段,其包含单个可变结构域;(vi)分离的互补决定区(CDR);(vii)单链Fv片段(scFv);(viii)双抗体,其是二价双特异性抗体,其中VH和VL结构域在单个多肽链上表达,但使用太短以致不允许同一链上的两个结构域之间配对的接头,从而迫使这些结构域与另一条链的互补性结构域配对并产生两个抗原结合位点;(ix)线性抗体,其包含一对串联Fv片段(VH-CH1-VH-CH1),其与互补性轻

链多肽一起形成一对抗原结合区；(x) 双可变结构域免疫球蛋白；(xi) 免疫球蛋白重链和/或轻链的其他非全长部分，或它们的突变体、变体或衍生物，单独或其任何组合。

[0070] 如本文所用，术语“基于抗体的结合蛋白质”可代表在其他非免疫球蛋白或非抗体衍生的组分的背景下含有至少一个抗体衍生的VH、VL或CH免疫球蛋白结构域的任何蛋白质。此类基于抗体的蛋白质包括但不限于(i) 结合蛋白质的Fc融合蛋白质，包括具有免疫球蛋白CH结构域的全部或部分的受体或受体组分，(ii) 结合蛋白质，其中VH和/或VL结构域偶接到另选的分子支架，或(iii) 分子，其中免疫球蛋白VH和/或VL和/或CH结构域以在天然存在的抗体或抗体片段中通常不存在的方式组合和/或装配。

[0071] 术语“抗体-药物缀合物”或“ADC”是指毒素(或药物)已与之连接的抗体或抗体片段。在ADC中，毒素通过可切割或不可切割接头与抗体或抗体片段缀合。

[0072] 术语“抗GPC3治疗剂”是指靶向GPC3的治疗剂。所需或有益效果可包括：(a) 抑制癌细胞的进一步生长或扩散；(b) 杀死癌细胞；(c) 抑制癌症复发；(d) 癌症相关症状(疼痛等)的缓解、减轻、缓和或抑制，或者症状频率的降低；和(e) 提高患者的存活率。靶向治疗剂包含特异性结合在肿瘤细胞上表达的GPC3抗原的结合部分。抗GPC3治疗剂的一些非限制性示例包括具有嵌合抗原受体多肽、抗GPC3抗体和/或抗体-药物缀合物的经遗传修饰的细胞。

[0073] 术语“辅助诊断”在本文用于指帮助进行关于特定类型的癌症(诸如LPS或非LPS)症状或病症的存在、程度或其他性质的临床确定的方法。癌症诸如LPS或其亚型诸如MRCLS的诊断可根据本领域技术人员将使用的任何方案进行。术语“明场型图像”或“虚拟染色图像”(VSI)是指模拟从明场染色方案获得的图像的生物样品的图像。该图像具有与明场图像相似的对比度、强度和色彩。这允许生物样品内的特征，包括但不限于细胞核、上皮、基质或任何类型的细胞外基质材料特征，被表征为如同明场染色方案直接用于生物样品上。

[0074] 术语“癌症”、“癌性”、“肿瘤”或“恶性”是指或描述哺乳动物中通常以不受调节的细胞生长为特征的生理病症。癌症的示例包括但不限于癌、淋巴瘤、白血病、胚细胞瘤和肉瘤。此类癌症的更具体的示例包括鳞状细胞癌、骨髓瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胃肠道(道)癌、肾癌、卵巢癌、肝癌、成淋巴细胞性白血病、淋巴细胞性白血病、前列腺癌、甲状腺癌、黑色素瘤、胰腺癌、多形性胶质母细胞瘤、胃癌、膀胱癌和肉瘤。

[0075] 术语“化学试剂”可包括一种或多种能够修饰荧光团或可切割接头(如果存在)的化学物质，该可切割接头位于荧光团和结合剂之间。化学试剂可以固体、溶液、凝胶或悬浮液的形式与荧光团接触。用于修饰信号的合适的化学试剂包括修饰pH的试剂(例如，酸或碱)、电子供体(例如，亲核试剂)、电子受体(例如，亲电子试剂)、氧化剂、还原剂或它们的组合。

[0076] 术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指人工抗原受体，其被工程化以在免疫效应细胞上表达并特异性结合细胞表面抗原，并采用一种或多种信号传导分子来活化这种免疫效应细胞。在免疫效应细胞是T细胞的情况下，活化可导致细胞杀伤、增殖和/或细胞因子产生(Jena等人，2010年)，CAR可用作过继性细胞转移的疗法。从患者中取出造血细胞，例如PBMC，并对其进行修饰，以使其表达CAR。CAR可对由细胞外抗原结合结构域(例如，scFv)介导的肿瘤相关抗原具有特异性地表达，并且识别不依赖于人白细胞抗原(HLA)呈递，或仍然识别HLA呈递肽的工程化T细胞受体(Zhang和Wang，2019年)。本发明优选的是狭义的CAR，其具有能够结合不依赖HLA呈递的肿瘤相关抗原的抗原结合结构域，例如，单链可变片段

(scFv)。CAR还包含细胞内活化结构域、跨膜结构域和任选的铰链结构域。CAR设计的特异性可衍生自受体(例如,肽)的配体。

[0077] 术语“可切割接头”可被设计成在肿瘤环境中细胞外裂解或在溶酶体内细胞内裂解。解接头利用可存在于靶细胞外部或内部的还原能力或酶促降解的不同条件。在抗体-药物缀合物的一些实施方案中,可切割接头可以是二肽(例如,缬氨酸-瓜氨酸和丙氨酸-丙氨酸)。

[0078] 术语“荧光标记物”是指选择性地对特定亚细胞区室染色的荧光团。合适的荧光标记物(和它们的靶细胞、亚细胞区室或细胞组分,如果适用的话)的示例是本领域公知的。

[0079] 术语“荧光团”是指当通过暴露于特定波长的光而激发时发射光(在不同的波长下)的化合物。术语“荧光”、“荧光的”或“荧光信号”都是指由受激发的荧光团发射光。荧光团可根据其发射谱或“颜色”来描述。例如,绿色荧光团(例如,Cy3、FITC和俄勒冈绿)的特征可在于它们在通常515纳米至540纳米范围内的波长下发射。红色荧光团(例如,德克萨斯红、Cy5和四甲基罗丹明)的特征可在于它们在通常590纳米至690纳米范围内的波长下发射。荧光团的示例是本领域公知的(WO2011138462A1;Giepmans等人,2006年;Zhang等人,2002年)。

[0080] 术语“结合剂”是指可与生物样品中的一种或多种靶标结合的生物分子。结合剂可特异性结合靶标。合适的结合剂可包括天然或经修饰的肽、蛋白质(例如,抗体、亲和体或适体)、核酸(例如,多核苷酸、DNA、RNA或适体)、多糖(例如,凝集素、糖)、脂质、酶、酶底物或抑制剂、配体、受体、抗原、半抗原等中的一者或多者。可根据待分析的样品和可用于检测的靶标选择合适的结合剂。例如,样品中的靶标可包括配体,并且结合剂可包括受体,或者靶标可包括受体,并且探针可包括配体。类似地,靶标可包括抗原,并且结合剂可包括抗体或抗体片段,或反之亦然。

[0081] 术语“原位”通常是指事件发生在原始位置,例如,在完整的器官或组织中或在器官或组织的代表性区段中。在一些实施方案中,可对衍生自各种来源(包括生物体、器官、组织样品或细胞培养物)的细胞进行靶标的原位分析。原位分析提供了当靶标从其原始位置移开时可能丢失的背景信息。因此,靶的原位分析描述了位于全细胞或组织样品中的靶结合探针的分析,无论细胞膜是完全完整的还是部分完整的,其中靶结合探针保留在细胞内。此外,本文所公开的方法可用于原位分析固定或未固定的细胞或组织样品中的靶标。

[0082] 术语“诊断”在本文用于指分子或病理状态、疾病或病症的鉴定或分类。例如,“诊断”可指特定类型的肉瘤的识别。“诊断”也可指LPS的特定亚型的分类。

[0083] 术语“同源性”是指当两个多肽序列最佳比对时,它们之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置被相同的氨基酸单体亚基占据时,例如,如果两个不同的Ab的轻链CDR中的位置被丙氨酸占据,则这两个Ab在该位置同源。同源性百分比是两个序列共有的同源位置数除以比较的位置总数 $\times 100$ 。例如,如果当两个序列最佳比对时,两个序列中10个位置中的8个是匹配或同源的,则两个序列是80%同源的。通常,当两个序列比对以给出最大百分比同源性时进行比较。例如,比较可通过BLAST算法进行,其中选择算法的参数以在相应参考序列的全长上得到相应序列之间的最大匹配。

[0084] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指基本上同质的抗体群体,即构成该群体的抗体分子在氨基酸序列方面是相同的,不同的是可能以少量存在的天然存在的突变。相

反,常规(多克隆)抗体制剂通常包含大量不同的抗体,这些抗体在其可变结构域,特别是其CDR中具有不同的氨基酸序列,这些抗体通常对不同的表位具有特异性。经修饰的“单克隆”表示抗体是从基本上同质的抗体群体获得的特征,并且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。

[0085] 术语“多特异性”、“多特异性抗原结合”和/或“多特异性分子”可互换。它们包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,它们各自结合各自称为靶分子的不同分子。靶分子可以是内化效应蛋白质。如本文所用,在多特异性抗原结合分子的情况下,表述“同时结合”意指多特异性抗原结合分子能够在生理相关条件下使靶分子(T)和内化效应蛋白质(E)两者接触至少一段时间以促进T和E之间的物理连接。多特异性抗原结合分子与T和E组分的结合可以是连续的;例如,多特异性EP3,722,318A1抗原结合分子可首先结合T然后结合E,或者它可首先结合E然后结合T。在任何情况下,只要T和E两者均被多特异性抗原结合分子结合一段时间(无论结合的顺序如何),就本公开而言,多特异性抗体结合分子将被视为“同时结合”T和E。在不受理论约束的情况下,认为T的增强失活是由于T与E的物理联系而在细胞内内化和降解重定向引起的。因此,本发明的多特异性抗原结合分子可用于灭活和/或降低靶分子的活性和/或细胞外浓度,而不直接阻断或拮抗靶分子的功能。多特异性分子可以是单个多功能多肽,或者它可以是彼此共价或非共价缔合的两个或更多个多肽的多聚体复合物。任何多特异性分子或其变体可使用标准分子生物学技术(例如,重组DNA和蛋白质表达技术)构建,如本领域普通技术人员将已知的。

[0086] 如本文所用,术语“经修饰的抗体形式”包括抗体-药物缀合物(ADC),经聚亚烷基氧化物修饰的scFv,单抗体,双抗体,骆驼抗体,结构域抗体,双、三或多特异性抗体,IgA或通过J链和分泌组分连接的两个IgG结构,鲨鱼抗体,新世界灵长类动物构架和非新世界灵长类动物CDR,去除铰链区的IgG4抗体,工程化到CH3结构域中的具有两个另外结合位点的IgG,具有改变的Fc区以增强或降低对Fc $\gamma$ 受体的亲和力的抗体,包含CH3、VL和VH的二聚构建体等。

[0087] 术语“不可切割接头”是指需要ADC被内化的接头,抗体-接头组分需要被溶酶体蛋白酶降解以释放毒素。接头与抗体的缀合也可变化。缀合可依赖于抗体的多肽结构内赖氨酸和半胱氨酸残基作为缀合点的存在。接头上的反应性基团可例如通过酰胺或脒键形成而缀合至赖氨酸残基的侧链。经由半胱氨酸残基的缀合需要抗体的部分还原。另选地,可使用位点特异性酶促缀合。这需要与抗体反应并可诱导位点或氨基酸序列特异性修饰的酶。由这些酶识别的肽序列可能必须插入到待缀合的经基因工程化的抗体或片段中。用于这种目的的酶是分选酶、转谷氨酰胺酶、半乳糖基转移酶、唾液酸转移酶和微管蛋白-酪氨酸连接酶。ADC接头缀合和毒素的概述可参见(Ponziani等人,2020年)。毒素与抗体片段缀合的概述可参见(Aguiar等人,2018年)。用于将毒素与抗体或抗体片段缀合的接头类型和缀合方法可确定药物抗体比(DAR)。

[0088] 如本文所用,术语“寡核苷酸”是指长度为至少约七个核苷酸且长度小于约250个核苷酸的短的单链多核苷酸。寡核苷酸可以是合成的。术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”并不相互排斥。上述多核苷酸的描述同样完全适用于寡核苷酸。

[0089] 术语“药学上可接受的”是指当施用给哺乳动物(例如,人)时生理上可耐受并且通常不产生不良反应的此类组合物的分子实体和其他成分。优选地,如本文所用,术语“药学

上可接受的”意指经联邦或州政府监管机构批准,或在美國药典或其他公认药典中列出用于哺乳动物,尤其是用于人。“可接受的”意指载体与组合物的活性成分(例如,核酸、载体、细胞或治疗性抗体)相容,并且不会负面影响施用组合物的受试者。用于本发明方法的任何药物组合物可包含冻干制剂形式或水溶液形式的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂。药学上可接受的载体,包括缓冲剂,是本领域公知的,并且可包括磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂;低分子量多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;氨基酸;疏水性聚合物;单糖;二糖;和其他碳水化合物;金属络合物;和/或非离子表面活性剂。

[0090] 术语“多核苷酸”或“核酸”在本文中可互换使用,是指任何长度的核苷酸聚合物,并且包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经修饰的核苷酸或碱基和/或它们的类似物,或任何可通过DNA或RNA聚合酶掺入到聚合物中的底物。多核苷酸可包含经修饰的核苷酸,诸如甲基化的核苷酸和它们的类似物。如果存在,可在聚合物组装之前或之后对核苷酸结构进行修饰。核苷酸序列可被非核苷酸组分中断。多核苷酸可在聚合之后进行进一步修饰,诸如通过与标记组分缀合,如本领域所述(例如参见WO 2013/148448)。

[0091] 术语“一级抗GPC3抗体”是指在组织切片中特异性结合GPC3的抗体,例如,GC33,并且通常是在GPC3表达的免疫染色测定中使用的第一抗体,例如,在肿瘤样品中的免疫组织化学和免疫荧光。

[0092] 如本文所用,术语“样品”是指从患者获得或衍生的组合物,其含有例如基于物理、生物化学、化学和/或生理特征待表征和/或识别的细胞和/或其他分子实体。

[0093] 术语“二抗”是指在GPC3表达的免疫染色测定中,例如IHC和IF或原位杂交中,特异性结合一级抗GPC3抗体,从而在一抗和随后的检测试剂(如果有的话)之间形成桥的抗体。

[0094] 术语“受试者”包括任何生物体,优选地是动物,更优选地是哺乳动物(例如,大鼠、小鼠、食蟹猴和人)。“患者”或“受试者”是指需要疗法或参与临床试验、流行病学研究或用作对照的任何单个受试者,包括人和哺乳动物兽医患者,诸如小鼠、大鼠和食蟹猴。如本文所用,术语“患者”是指人或非人动物。通常,术语“受试者”、“个体”和“患者”在本文中关于受试者可互换使用。因此,“患者”包括正在治疗和/或诊断/患有疾病诸如癌症的人或非人哺乳动物。

[0095] 术语“组织样品”是指从受试者的组织获得的相似细胞的集合。组织样品的来源可以是来自新鲜、冷冻和/或保存的组织样品的固体组织。组织样品也可能是取自和/或衍生自个体的原代或培养细胞或细胞系。组织样品可含有不与自然组织自然混合的化合物,诸如防腐剂、抗凝血剂、缓冲剂、固定剂、营养素、抗生素等。组织样品也可以是从受试者分离的液体。在非限制性方面,此类样品的示例包括血浆、血清、脊髓液、淋巴、全血或任何血液级分、血液衍生物、血细胞、肿瘤、通过灌洗获得的任何样品(例如,衍生自支气管的样品)和构成体外细胞培养物的组分的样品。

[0096] 术语“治疗剂”是可用于治疗癌症的化合物或生物分子。治疗剂的类别包括但不限于:烷化剂、抗代谢物、激酶抑制剂、纺锤体毒素植物生物碱、细胞毒性/抗肿瘤抗生素、拓扑异构酶抑制剂、光敏剂以及阻断支持肿瘤维持和/或生长的任何生物途径中的配体/受体信号传导的抗体和融合蛋白质。可用于本发明的治疗方法的治疗剂包括细胞抑制剂、细胞毒性剂、抗体-药物缀合物、嵌合抗原受体多肽和免疫治疗剂。

[0097] 术语“治疗有效量”是指通过实现至少一种积极治疗效果,诸如例如减小癌细胞的数量、减小肿瘤大小、减小癌细胞浸润到外周器官的速率和减小肿瘤转移或肿瘤生长的速率,有效“治疗”受试者或哺乳动物中的癌症的治疗剂的量。癌症中的积极治疗效果可用许多方法来测量(参见Weber,2009年)。

[0098] 术语“组织切片”是指组织样品的单个部分或片,例如从正常组织或肿瘤样品切割的组织的薄片。

[0099] 术语“毒素”是指细胞毒性剂和/或细胞抑制剂,其可基于合成的、植物的、真菌的或细菌的分子。细胞毒性或细胞抑制意指它们通常由于其周转增加而抑制细胞、特别是恶性细胞的生长和/或抑制其复制和/或杀死细胞。

[0100] 术语“治疗(treat/treating)”意指向患有的一种或多种疾病症状或疑似患有疾病的受试者或患者内部或外部施用治疗剂,诸如含有本发明的任何抗体或抗原结合片段的组合,其中该试剂对该疾病具有治疗活性。通常,以有效减轻所治疗的受试者或群体的一种或多种疾病症状的量施用该试剂,无论是通过以任何临床可测量程度诱导这种症状的消退还是抑制这种症状的进展。有效减轻任何特定疾病症状的治疗剂的量(也称为“治疗有效量”)可根据因素诸如患者的疾病状态、年龄和体重以及药物在受试者中引起期望反应的能力而变化。疾病症状是否已减轻可通过医师或其他熟练的健康护理提供者通常用于评估该症状的严重性或进展状态的任何临床测量来评估。

[0101] 具体实施方式

[0102] 肉瘤是一类罕见的间充质来源的恶性肿瘤,约占所有儿童实体瘤的20%,并且约占成人实体瘤的1%(Abaricia和Hirbe,2018年;Hui,2016年)。肉瘤大致分为(i)软组织肉瘤(STS)和(ii)骨肉瘤。据报道,STS的发病率大约为3.4/100,000,其中诊断年龄中值为59岁(按照国家癌症研究所的监视、流行病学和最终结果计划,并且骨肉瘤甚至更罕见,大约占有癌症诊断的0.2%(Hui,2016年)。脂肪肉瘤(LPS)起源于脂肪组织,并且是影响脂肪分化的恶性肿瘤。它是最常见的STS类型,并且占有新诊断的成人肉瘤的17%至25%(Dodd,2012年;Henze和Bauer,2013年;Singhi和Montgomery,2011年)。世界卫生组织(WHO)从组织学上将LPS分为四种亚型,即,(i)非典型脂肪瘤(ALT)/高分化LPS(WDLPS;占有LPS的40%至45%;低级别,5年存活率为93%),(ii)去分化LPS(DDLPS;高级别,5年存活率为45%),(iii)粘液样LPS(MLPS;低级别,但10%的患者发展转移,10年存活率为60%)/圆形细胞LPS(RCLPS;占有LPS的30%至35%;高级别),以及粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤(MRCLS),(iv)多形性LPS(PLPS;占有LPS的<15%;高级别且预后差)。第五种亚型称为混合性LPS,由一种或多种亚型的组织学组合组成。WDLPS和DDLPS两者现在被归类在一起,因为它们共享相同的潜在遗传改变并显示相似的临床特征(Amer等人,2020年;Henze和Bauer,2013年;Jo和Fletcher,2014年)。

[0103] 粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤(MRCLS)占LPS的大约30%,并且往往发生在稍年轻的年龄组,其中发病率在生命的第四个十年达到高峰。这些肿瘤优选在腿或腘窝(75%)内的下肢中发展,而它们几乎从未在腹膜后发展。总体上,报道的MRCLS的局部复发率为15%至30%。一些研究已经报道了20%至40%的远端转移风险。有趣的是,与DDL和其他STS相比,MRCLS具有异常的转移模式,向其他软组织部位、腹内/腹膜后间隙或骨的常见转移(66%)和独立的较低肺转移率(34%)。报道的MRCLS的疾病特异性死亡率为12%至30%。细胞发生

和分子分析通过反复互换易位t(12;16)(q13;p11)表征MRCLS,在超过95%的病例中导致FUS-DDIT3基因融合。正在开发靶向抑制这些融合蛋白质的疗法用于治疗MRCLS( Lee等人, 2018年)。

[0104] MRCLS的标准治疗包括局部原发性疾病的手术切除。在患有晚期或转移性疾病的患者中,与其他LPS亚型相比,已知MRCLS对放射疗法和细胞毒性化学疗法敏感。然而,尽管进行了适当的局部治疗,但仍约40%的患者确实复发。通常对晚期或不可切除的疾病施用化疗。通常,这包括单独的阿霉素或与异环磷酰胺组合作为一线疗法以及与曲贝替定组合作为二线疗法。在MRCLS中对基于阿霉素的方案进行的研究显示总反应率为45%至50%。曲贝替定被证明在MRCLS中极其有活性。现今,曲贝替定被批准作为STS的二线疗法,并在所谓的STS的“组织学驱动的”医学疗法中起关键作用。在MRCLS中,如果通过标准尺寸标准进行评估,则曲贝替定可获得50%范围内的反应率,以及80%范围内的6个月无进展存活(PFS)。然而,这对于两种药物是正确的:阿霉素和曲贝替定。当肿瘤对这些药物有抗性时,目前没有其他的医学选项在MRCLS患者中具有突出的活性(Regina和Hettmer, 2019年; Sanfilippo等人, 2013年)。评价了酪氨酸激酶抑制剂帕唑帕尼和Sunitinib,但不能保证它们单独用于治疗MRCLS。最近,已经开始了使用经基因修饰的T细胞用于MRCLS患者的免疫疗法方案(例如, ClinicalTrials.gov标识符: NCT03450122和ClinicalTrial.gov标识符NCT03399448)(Abaricia和Hirbe, 2018年; Lee等人, 2018年; Regina和Hettmer, 2019年; Suarez-Kelly等人, 2019年)。尽管如此,对患有不宜手术或转移性MRCLS的患者的治疗选择仍然很差,并且需要新的治疗选择来满足这种高医疗需求的指征。

[0105] 据本文报道,由于在用抗GPC3抗体(GC33)染色的各种肿瘤组织切片中观察到的染色模式的复杂性,因此需要新的评分规则准确且可靠地定量多个组织样品和病理学家进行评分的GPC3表达水平。并且在查看来自癌症患者的实体瘤活组织检查中GPC3的表达谱以更好地理解GPC3阳性肿瘤流行率和抗GPC3治疗的指征优先次序时,令人惊讶地识别了LPS亚组,即MRCLS,作为相对高GPC3表达的患者群体,提示该指征,即MRCLS,将被优先化和/或选择用抗GPC3治疗剂治疗。

[0106] 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3也称为DGSX、GTR2-2、MXR7、OCI-5、SDYS、SGB、SGBS和SGBS1)是一种癌胚肿瘤抗原,由于其在正常组织上的高度限制性表达以及在一些成人和儿童实体瘤中的高流行性,其是抗GPC3治疗的有吸引力的靶标(Ho和Kim, 2011年)。GPC3表达已经在多种人癌症中观察到,例如,卵巢癌、肾癌、结直肠癌、胰腺癌、肝癌和黑素瘤。因此,定量和识别符合条件的患者亚群并从而有益于抗GPC3治疗的方法对于成功变得关键。

[0107] 本公开基于MRCLS作为LPS生态位亚型显示GPC3表达呈高频率阳性增加的惊人发现。GPC3在该LPS亚型患者中的表达频率允许选择具有高度未满足的医疗需求的MRCLS患者用具有高临床获益机会的抗GPC3治疗剂进行治疗。因此,本公开的一个方面的特征在于治疗诊断患有MRCLS的患者的方法,该方法包括向患者施用抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)治疗剂。此类专利可通过本文所公开的用于检测肿瘤组织样品中GPC3存在的任何诊断方法识别。

[0108] 在一个实施方案中,通过诊断MRCLS选择患者进行治疗。脂肪肉瘤尚未描述过高GPC3表达,也没有描述过任何其亚组。本发明人出人意料地将MRCLS鉴定为具有相对高GPC3表达的患者组,使得这种靶GPC3疗法能够成功,并且使用基于GC33抗体的评分规则可靠地准



确定量多个组织样品的GPC3表达,以便发现肿瘤中的这种GPC3表达。由于在MRCLS患者中GPC3表达的阳性相对高,因此可能不需要对GPC3表达进行患者分级,以使用抗GPC3治疗剂实现显著的反应率。MRCLS通常通过成像方式诸如CT或MRI诊断,随后主要在活组织检查样品的FFPE组织切片上用苏木精和曙红染色后进行组织学评估。从组织学上来说,MRCLS的特征是由透明质酸和印戒成脂肪细胞的粘液样基质组成的多结节肿块,含有纺锤形或圆形细胞的低中心细胞结构和增加的外周细胞结构,具有脆弱的丛状毛细血管网。由于这些肿瘤丧失了分化,因此它们形成了细胞结构增加的区域。接下来,由于大多数诊断患有MRCLS的患者携带导致FUS-DDIT3(CHOP)的互换易位t(12;16)(q13;p11),因此可高置信度地确认诊断,例如在FFPE切片上使用FISH检测DDIT3(CHOP)(Fritchie等人,2012年)。诊断为MRCLS患者的另一个非限制性示例是通过NY-ESO-1的IHC染色(Hemminger和Iwenofu,2013年)。

[0109] 在本发明中,用于检测组织中GPC3表达水平的生物样品的优选示例包括受试者衍生的制剂。受试者衍生的制剂优选地是从受试者获得的组织,更优选地是MRCLS患者的组织。MRCLS患者中GPC3表达水平可通过免疫染色和/或原位杂交测定。在优选的实施方案中,选择用于治疗MRCLS的患者表达GPC3。在非限制性方面,本发明还可提供用于由游离GPC3的浓度以及通过下述方法在组织中检测到的GPC3的表达水平来测定抗GPC3治疗剂的疗效或测定抗GPC3治疗剂的持续的方法。

[0110] 免疫染色和原位杂交的方法是本领域公知的(参见(Lu等人,2021年;Wang等人,2018年;Zhou等人,2018年);WO 2006/006693;WO2009/116659;WO 2013/148448;WO 2014/165422;WO 2014/097648)。任一诊断测定可具有共同的程序步骤。

[0111] I.MRCLS患者通过抗GPC3治疗剂治疗的识别

[0112] 在一些方面,本公开的特征在于用于诊断适于通过本文所公开的任何抗GPC3治疗剂(例如,抗GPC3 CAR-T细胞疗法)治疗的粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤(MRCLS)患者的方法。简言之,可从候选患者收集肿瘤活组织检查样品并经由例如免疫染色测定检查活组织检查样品中GPC3的存在和/或水平。可识别显示GPC3的存在或GPC3的特定水平的肿瘤活组织检查样品,并且可将从其获得活组织检查样品的患者识别为适于通过抗GPC3疗法治疗的患者,例如本文所公开的那些。在一些实施方案中,固定的组织样品可用于本文所公开的诊断测定。另选地,可使用流体样品。

[0113] 此外,GPC3水平也可用作评估本文所公开的任何治疗方法的疗效的生物标记物。因此,本公开还提供了用于评估正在接受或将接受MRCLS治疗,例如本文所公开的任何抗GPC3疗法的MRCLS患者的治疗疗效的方法。来自MRCLS患者的合适生物样品中的GPC3水平可使用此处所公开的任何测定方法或本领域已知的那些测定方法测量。如本文所公开的针对MRCLS患者的GPC3靶向药物疗法的疗效可在患者的抗GPC3治疗剂开始之前或在抗GPC3疗法继续之前测定。例如,医师可使用GPC3表达评分(例如,如本文所公开的)作为决定如何治疗患者的指导,该患者已被诊断为患有对抗GPC3治疗剂治疗敏感的MRCLS型。在一些情况下,医师可使用诊断测试,用上文所公开的任何方法来测定在用抗GPC3治疗剂和/或其他化学治疗剂治疗开始之前从患者取出的肿瘤组织样品中的GPC3表达,但设想医师可在个体施用第一剂抗GPC3治疗剂之后的任何时间安排随后的测试。

[0114] A. 使用固定的组织样品的诊断测定

[0115] (i) 样品收集和组织切片的制备



[0116] 来自MRCLS患者的肿瘤活组织检查用于制备染色的组织切片以对GPC3表达评分。该活组织检查通常在开始用抗GPC3治疗剂治疗之前从受试者收集。此外,在治疗期间可获得活组织检查以证实GPC3呈阳性或甚至观察到其表达的上调。因此,可在一段时间内从受试者收集肿瘤样品。肿瘤样品可通过多种程序获得,包括但不限于手术切除、抽吸或活组织检查。在一些实施方案中,组织样品可被首先固定,然后通过一系列递增的醇脱水,用石蜡或其他切片介质浸润和包埋,使得组织样品可被切片。在另选的实施方案中,组织样品可被切片,并随后被固定。在一些实施方案中,组织样品可在石蜡中包埋和处理。固定剂的非限制性示例是中性缓冲福尔马林、戊二醛、Bouin's或多聚甲醛。在优选的实施方案中,组织样品用福尔马林固定。在一些实施方案中,还将固定的组织样品包埋在石蜡中以制备福尔马林固定和石蜡包埋(FFPE)的组织样品。石蜡的示例包括但不限于Paraplast、Broid和Tissuemay。

[0117] 应当理解,根据本发明可制备和分析单个组织样品的多个切片。每个组织切片的厚度介于 $3\mu\text{m}$ 至 $15\mu\text{m}$ 之间,优选地介于 $3\mu\text{m}$ 至 $8\mu\text{m}$ 之间。在一个实施方案中,从肿瘤活组织检查样品获得组织切片,该切片的厚度介于 $3\mu\text{m}$ 至 $15\mu\text{m}$ 之间。在一个实施方案中, $5\mu\text{m}$ 厚的FFPE固定的组织切片用于肿瘤样品中GPC3表达的IHC测定。在另一个实施方案中, $6\mu\text{m}$ 厚的FFPE固定的组织切片用于肿瘤样品中GPC3表达的ISH测定。在一些实施方案中,本发明的评分过程是针对约 $3\mu\text{m}$ 至 $8\mu\text{m}$ 并且优选地 $5\mu\text{m}$ 的FFPE组织切片进行的,将其在显微镜载玻片上固定并干燥。

#### [0118] (ii) 用于免疫染色的抗GPC3抗体

[0119] 如本文所用,一抗是用于IHC和IF两者免疫染色的抗GPC3抗体(小鼠单克隆Ab GC33;目录号790-4564;Ventana)。GC33抗体特异性地针对硫酸乙酰肝素蛋白聚糖GPC3。与其他抗原相比,抗GPC3抗体表现出与人GPC3的优先结合,但该特异性不需要绝对的结合特异性。如果抗hGPC3抗体的结合决定了样品中人GPC3的存在,例如在IHC诊断测定中不产生不期望的结果诸如假阳性,则认为其对人GPC3具有特异性。在本发明的过程和方法中用作一抗的抗体或其结合片段将以比对任何非GPC3蛋白质的亲和力大至少两倍、优选地大至少十倍、更优选地大至少20倍并且最优选地大至少100倍的亲和力与人GPC3结合。可使用任何在来自人的肿瘤样品的FFPE或冷冻组织切片上产生与由GC33 Ab产生的基本相同的染色结果的抗hGPC3 Ab对来自人受试者的肿瘤样品的组织切片进行GPC3表达评分。

[0120] 通常,可用于通过IHC测定对人GPC3的表达进行评分的抗GPC3 Ab或抗原结合片段将对人GPC3表现出与GC33抗体相同程度的特异性,并且当以摩尔为基础表示亲和力时保留其人GPC3结合亲和力的至少80%、85%、90%、95%或100%。还旨在用于本发明的抗GPC3抗体或抗原结合片段可包括来自GC33 Ab或GC33的保守或非保守氨基酸取代,这些保守或非保守氨基酸取代基本上不改变其结合特异性或亲和力。

#### [0121] (iii) 通过免疫染色诊断测试GPC3表达

[0122] 本发明在GPC3表达增强的LPS群体中识别了生态位亚型MRCLS。还提供了用于对已经在IHC或IF测定中用抗GPC3抗体免疫染色的MRCLS肿瘤组织切片中的GPC3表达评分的过程。在一个实施方案中,选择诊断患有MRCLS的患者通过免疫染色进行治疗,优选地通过IHC用特异性结合GPC3的抗体,更特别地使用抗体GC33。这些评分过程的结果可用于选择用抗GPC3治疗剂治疗的患者。

[0123] IHC或IF测定通常从抗原修复开始,该抗原修复在试剂和方法方面可变化。抗原修复过程的示例是本领域公知的(参见例如Leong,1996年)。在一些实施方案中,蛋白酶处理用于抗原修复。在优选的实施方案中,石蜡包埋的(FFPPE)组织切片经受热诱导的抗原修复过程。IHC或IF两者均可用于直接或间接测定。在直接IHC或IF测定中,直接测定抗体与靶抗原的结合。这种直接测定使用标记试剂,诸如荧光标签或酶标记的一抗,其可在没有进一步抗体相互作用的情况下显现。在典型的间接测定中,未缀合的一抗与抗原结合,然后标记的二抗与一抗结合。

[0124] 在一个实施方案中,优选地在组织切片中特异性结合GPC3的一级抗GPC3抗体是GC33。它通常是用于GPC3表达的免疫染色测定,例如,肿瘤样品中的IHC和IF的第一抗体。在一个实施方案中,一抗是IHC测定中唯一使用的抗体。当二抗与酶标记物缀合时,加入显色或荧光底物以使抗原显现。发生信号扩增是因为几种二抗可与一抗上的不同或相同表位反应。在GPC3表达的免疫染色测定中,例如IHC和IF或原位杂交中,二抗特异性结合一级抗GPC3抗体,从而在一抗和随后的检测试剂(如果有的话)之间形成桥。在一个实施方案中,二抗通常是用于肿瘤样品中GPC3表达的IHC测定的二抗。

[0125] 用于IHC或IF的一抗和/或二抗通常将用可检测部分标记。在一些实施方案中,一抗与可检测标记物连接,诸如顺磁离子、放射性同位素、荧光染料和NM可检测物质,并使用适当的成像装置评价载玻片的GPC3染色。在其他实施方案中,GPC3和一抗之间的免疫复合物可使用与可检测标记物连接的第二结合剂检测。第二结合剂优选地是二抗,其足以允许形成第二免疫复合物的浓度和时间段被施加到载玻片。然后,通常洗涤载玻片以去除任何非特异性结合的二抗,并检测第二免疫复合物中的标记物。二抗可使用抗生物素蛋白、链霉亲和素或生物素标记,该抗生物素蛋白、链霉亲和素或生物素独立地用可检测部分标记,诸如荧光染料(染色剂)、发光染料或非荧光染料。许多标记物是可用的,其通常可被分成以下类别;(a)放射性同位素,(b)胶体金颗粒和(c)荧光或化学发光标记物。可检测部分的示例已广泛公开于WO 2013/148448中。一些示例包括但不限于荧光素及其衍生物、罗丹明及其衍生物、藻红蛋白、藻蓝蛋白或商业上可获得的荧光团如SPECTRUMORANGE®和SPECTRUMGREEN®和/或上述任一者或多者的衍生物。

[0126] 各种酶-底物标记物是可用的,并且US4,275,149提供了对这些中的一些的综述。酶通常催化可使用各种技术测量的显色底物的化学改变。例如,该酶可催化底物的颜色变化,这可在明场显微镜下评估。在一个实施方案中,MRCLS中GPC3表达在IHC显色测定中在明场显微镜下进行评估,该明场显微镜优选地是扫描仪(Lecia或Ventana,例如Ventana DP 200扫描仪,Aperio AT2)。在另一个实施方案中,MRCLS中GPC3表达在IF测定中在荧光显微镜优选地荧光扫描仪下评估。荧光显微镜的示例并不局限于倒置显微镜、复式显微镜、立体显微镜、偏振显微镜,优选地是共焦显微镜(Leica)和扫描仪型(Leica和Ventana,例如,Ventana DP 200扫描仪)。

[0127] 另选地,酶可改变底物的荧光或化学发光。用于定量荧光变化的技术如上所述。化学发光底物通过化学反应而被电子激发,然后可发射光,该光可被测量(例如,使用化学发光计)或将能量提供给荧光受体。酶标记物的非限制性示例包括荧光素酶(例如,萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶;US4,737,456;WO2013095896A1)、荧光素、过氧化物酶(诸如辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、乳过氧化物酶、微过氧化物酶)等。在一些实施

方案中,标记物与抗体间接缀合。本领域技术人员将知道用于实现这一点的各种技术。例如,抗体可与生物素缀合,并且上述四种广泛类别的标记物中的任一者可与抗生物素蛋白缀合,或反之亦然。用于将酶缀合到抗体上的技术描述于(O'Sullivan和Marks,1981年)。

[0128] 本领域技术人员可获得许多酶-底物组合。对于这些的一般性综述,参见US4,275,149和US4,318,980。酶-底物组合的示例是:

[0129] (i) 辣根过氧化物酶(HRP)与作为底物的过氧化氢酶,其中过氧化氢酶氧化染料前体,诸如例如3,3'-二氨基联苯胺(DAB),产生棕色终产物;3-氨基-9-乙基吡啶(AEC),在氧化后形成玫瑰红色终产物;4-氯-1-萘酚(CN),作为蓝色终产物沉淀;和对苯二胺二盐酸盐/邻苯二酚,产生蓝黑色产物;邻苯二胺(OPD)和3,3',5,5'-四甲基联苯胺盐酸盐(TMB);

[0130] (ii) 碱性磷酸酶(AP)和对硝基苯基磷酸盐、萘酚AS-MX磷酸盐、坚牢红TR和坚牢蓝BB、萘酚AS-BI磷酸盐、萘酚AS-TR磷酸盐、5-溴-4-氯-3-吡啶氧基磷酸盐(BCIP)、坚牢红LB、坚牢石榴石GBC、硝基蓝四唑(NBT)和碘硝基四唑紫(INT);和

[0131] (iii)  $\beta$ -D-半乳糖苷酶( $\beta$ -D-Gal)与显色底物(例如,对硝基苯基-P-D-半乳糖苷酶)或荧光底物(例如,4-甲基伞形基-P-D-半乳糖苷酶)。

[0132] 可采用本领域已知的将抗体分子缀合到各部分的任何方法,包括(David和Reisfeld,1974年;Nygren,1982年;Pain和Surolia,1981年)所述的那些方法。

[0133] (iv) 免疫染色评分过程

[0134] 在完成MRCLS患者的组织切片上的染色过程之后,通过人例如病理学家或编程为区分特异性和非特异性染色结果的计算机来分析载玻片的GPC3染色。可通过在低、中(例如10-20 $\times$ )和高倍率(例如40-63 $\times$ )下通过显微镜观察载玻片,或者通过观察在低、中和高倍率下拍摄的载玻片的高分辨率图像,直接进行分析。低和中倍率通常用于检测和用于染色的肿瘤细胞的一般性概述。中和高倍率通常用于检查单个肿瘤细胞,以估计表现出GPC3至少部分定位于细胞膜(顶端和圆周)和细胞质染色的活细胞的数量和强度。还记录小管染色图案。在优选的实施方案中,在测定的IHC中,每个染色的组织切片被赋予一个H评分。H评分包括(i)在所有检查的切片中的所有活的GPC3染色的肿瘤细胞中,对于没有染色的细胞估计四个单独的百分比,弱染色(+1)、中染色(+2)和强染色(+3),其中细胞必须具有至少部分膜和/或细胞质染色以包括在弱、中或强染色百分比中,并且其中所有四个百分比的总和等于100;以及(ii)将上述推定的百分比代入公式 $1*(1+染色强度的肿瘤细胞的百分比)+2*(2+染色强度的肿瘤细胞的百分比)+3*(1+染色强度的肿瘤细胞的百分比)$ 中,并将上述公式的结果作为H分数赋予上述组织切片。H评分将染色强度的组分与阳性细胞的百分比结合,范围介于0至500之间,优选地介于0至300之间。肿瘤细胞中总(细胞质和膜)H评分的截断值 $>30$ ,用于确定用GPC3(GC33) IHC测定染色的标本的阳性/阴性状态。

[0135] 由于存在用于用GPC3治疗剂治疗的靶抗原GPC3,这种染色方法可用于选择患者。在一个实施方案中,通过测定细胞质/膜H评分选择MRCLS患者。在一些实施方案中,在MRCLS组织样品中GPC3表达的预先指定的阈值介于30至300之间。因此,在优选的实施方案中,通过免疫染色,优选地通过免疫组织化学(IHC)染色,优选地细胞质/膜H评分大于30,选择诊断患有MRCLS的患者的治疗方法。在另一个实施方案中,选择H评分大于30的MRCLS患者进行治疗。

[0136] 在一些实施方案中,涉及通过IHC测定制备和分析组织切片的个体不知道其样品

正被测试的受试者的身份;即,在被发送到实验室之前,以某种方式使实验室接收的样品匿名。例如,样品可仅通过数字或一些其他代码(“样品ID”)来识别,并且IHC测定的结果被报告给使用该样品ID进行测试的一方。在优选的实施方案中,受试者的身份和受试者的组织样品之间的联系仅对于个体或个体的医师是已知的。

[0137] 在一些实施方案中,在获得测试结果之后,诊断实验室生成测试报告,其可包括以下结果中的任一者或多者:基于阈值H评分,组织样品对于GPC3表达为阳性或阴性。测试报告还可包括关于如何解释结果的指导,以预测受试者是否可能对抗GPC3治疗剂有应答。例如,在一个实施方案中,患者的肿瘤来自MRCLS,并且如果H评分等于或高于截断阈值,则测试报告可指示患者具有与对抗GPC3治疗剂治疗有反应或有更好反应相关的GPC3表达评分,而如果H评分低于截断阈值,则测试报告指示患者具有可与对抗GPC3治疗剂治疗无反应或差反应相关的GPC3表达评分。在优选的实施方案中,诊断患有MRCLS的患者的治疗方法,其中选择包括来自该患者的肿瘤样品中的GPC3的免疫染色,优选地免疫组织化学染色,其中确定GPC3表达水平并将其与GPC3表达的预先确定的阈值水平进行比较,并且其中在该患者的GPC3表达水平等于或高于该预先确定的阈值水平的情况下,选择该患者进行治疗。

[0138] (v) 通过原位杂交诊断检测GPC3表达

[0139] 另一种评估补充或另外补充免疫染色测定的MRCLS中GPC3表达的方法是通过原位杂交测定。样品标本收集和切片制备与上文在免疫染色测定的情况下所公开的类似。本发明包括一般涉及可应用于分析、诊断或预后应用的方法的实施方案,这些方法单独地和/或将显色或免疫荧光检测与基于显色或荧光的核酸分析组合。所公开的方法一般涉及来自单一生物样品的不同种类的靶标(即,蛋白质和/或核酸)的检测和关联。在一些实施方案中,公开了使用相同的检测通道检测相同种类的多个靶标(即,分别为蛋白质和/或核酸)的方法。在此类实施方案中,可绘制多个不同种类的靶标之间的相关性。

[0140] 在一个实施方案中,靶标可包括核酸,并且结合剂可包括互补核酸。在一些实施方案中,靶标和结合剂两者均可包括能够彼此结合的蛋白质。在一些实施方案中,生物样品中多种靶标的检测方法包括顺序检测生物样品中的靶标。该方法通常包括以下步骤:检测生物样品中的第一靶标,任选地修饰来自第一靶标的信号,以及检测生物样品中的第二靶标。该方法还可包括重复修饰来自第一或第二靶标的信号的步骤,随后检测生物样品中的不同靶标,等等。设计和进行原位杂交测定的详细方法是本领域公知的。它可与一个长寡核苷酸段一起使用,或者可包含短寡核苷酸段作为探针(参见WO 2013/148448; (Wang等人,2012年))。总之,该测定包括:

[0141] (a) 开发靶核酸序列,其是含有在生物样品中的核酸分子(例如,GPC3)中的目标序列。核酸分子可存在于生物样品的细胞核(例如,染色体DNA)中或存在于细胞质(例如,mRNA)中。在一些实施方案中,核酸分子可能不是固有地存在于生物样品的表面上,并且可能必须处理生物样品以使核酸分子可被探针接近。在一些实施方案中,该分析可提供关于生物样品中GPC3基因表达水平的信息。在某些实施方案中,靶核酸序列包括作为编码GPC3基因序列的一部分的序列。在其他实施方案中,靶核酸序列不包括作为编码GPC3基因序列的一部分的序列。因此,靶核酸序列可包括作为编码与靶蛋白不同的蛋白质的基因序列的一部分的序列。

[0142] (b) 探针-用于检测上述定义的靶核酸序列。希望探针特异性结合含有目标序列的

核酸分子(例如, GPC3)的区域。因此, 在一些实施方案中, 探针是GPC3序列特异性的。序列特异性探针可包括核酸, 并且探针可能够识别核苷酸或其衍生物的特定线性排列。在一些实施方案中, 线性排列可包括连续的核苷酸或其衍生物, 其可各自结合探针中的对应互补核苷酸。在另选的实施方案中, 序列可以是不连续的, 因为可存在一个、两个或更多个核苷酸, 它们在探针上可不具有对应的互补残基。探针的合适示例可包括但不限于DNA或RNA寡核苷酸或多核苷酸、肽核酸(PNA)序列、锁核酸(LNA)序列或适体。在一些实施方案中, 合适的探针可包括核酸类似物, 诸如二氧配基dCTP、生物素dCTP 7-氮杂鸟苷、叠氮胸苷、肌苷或尿苷。在一些实施方案中, 探针可包括核酸探针、肽核酸探针、锁核酸探针或mRNA探针。

[0143] 探针的长度也可决定结合的特异性。在一些实施方案中, 较小探针的杂交可能比较长探针的杂交更具特异性, 因为较长探针可能更容易发生错配, 并且可能根据条件继续与核酸结合。探针还可由另外的核酸序列(例如, 间隔区、头部和/或尾部序列)组成。在一些实施方案中, 探针可具有约4个核苷酸至约12个核苷酸、约12个核苷酸至约25个核苷酸、约25个核苷酸至约50个核苷酸、约50个核苷酸至约100个核苷酸、约100个核苷酸至约250个核苷酸、约250个核苷酸至约500个核苷酸或约500个核苷酸至约1000个核苷酸范围内的长度。在一些实施方案中, 探针可具有大于约1000个核苷酸范围内的长度。在一个实施方案中, 所设计的GPC3靶向核糖探针长度是1bp至1000bp, 优选地是300bp至700bp。在另一个实施方案中, 所设计的GPC3靶向探针包括多个短适体, 长度是1bp至100bp, 优选地是15bp至30bp。在另一个实施方案中, 所设计的GPC3靶向探针还由另外的核酸序列组成。

[0144] 接下来, 核酸(例如, mRNA)回收过程可涉及本领域公知的处理(参见(Chen等人, 2004年; Leong, 1996年; Patil等人, 2005年; Wang等人, 2012年))。通常, 在ISH中使用间接测定。在典型的间接测定中, 可标记有义或反义核酸(例如, 地高辛和FITC)。未缀合的初级探针和/或适体与靶核酸序列结合。用于ISH的二抗通常用可检测部分标记。标记的二抗与一级探针结合, 其中二抗与酶标记物缀合, 加入显色或荧光底物以使抗原显现(例如, HRP缀合的抗DIG)。许多标记物、酶底物、通过显微镜/扫描仪的检测是可用的, 并且示例已经在上文列出和公开在免疫染色中。在一些实施方案中, 标记物与抗体间接缀合。本领域技术人员将知道用于实现这一点的各种技术。发生信号扩增是因为在一抗的情况下, 几种二抗可与不同或相同表位反应。另选地, 在使用多个探针的情况下, 这些探针中的每一者可与不同的荧光团或酶缀合, 从而使得能够在测定内进行一级探针检测。

[0145] 在某些实施方案中, 生物样品可包括MRCLS肿瘤组织样品, 其可使用探针进行ISH。在一些实施方案中, MRCLS组织样品除了免疫荧光(IF)之外还可进行ISH以获得关于组织样品的所需信息。在一些实施方案中, 探针如核酸(例如, DNA)可使用对其合适的化学物进行直接化学标记。

[0146] 核酸序列的检测方法诸如杂交是众所周知的。在某些实施方案中, 通过FISH、聚合酶链式反应(PCR)(或PCR的变体, 诸如原位PCR)、RCA(滚环扩增)或PRINS(引物介导的原位标记)(在WO 2013/148448中详细公开)来检测特定核酸序列。在示例性实施方案中, 通过FISH检测特定核酸序列。优选的ISH测定采用如Wang等人(2012年)公开的具有RNAscope<sup>TM</sup>的市售产品。靶核酸序列可通过其存在、不存在、表达或扩增水平来分析。还可比较蛋白质表达数据和核酸分析数据以提供组合的数据集。

[0147] B. 使用流体样品的诊断测定

[0148] 在本发明中,可通过各种方法对流体样品进行MRCLS患者的GPC3表达分析。在非限制性示例中,可在分离自MRCLS患者的血清或血浆中测量GPC3浓度。在优选的实施方案中,通过ELISA测量从诊断患有MRCLS的患者分离的血清或血浆中的GPC3浓度。例如,使用人磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3ELISA试剂盒(BioMosaics公司)定量全血血清中的游离GPC3。用于测定游离GPC3的优选方法的示例可包括使用能够与GPC3中存在的表位结合的抗体的免疫学方法,并且已经在WO 2006/006693、WO2009/116659、WO 2014/097648(Hippo等,2004年)中公开。

[0149] 此外,在另一个非限制性示例中,可在液体活组织检查样品中非侵入性地评估GPC3浓度,该液体活组织检查样品包括循环肿瘤DNA(ctDNA)或游离细胞DNA(cfDNA)或循环RNA(ctRNA,例如,微RNA)、循环肿瘤细胞(CTC)和/或细胞外小泡(EV,例如外来体)(参见Maravelia等人,2021年)。在一个实施方案中,MRCLS患者的循环细胞优选地是肿瘤细胞,可通过非侵入性方法获得。在另一个实施方案中,MRCLS患者的循环细胞是基于密度分离的,优选地通过Ficoll-paque。在另一个实施方案中,分离的循环细胞,优选地是肿瘤细胞用抗GPC3抗体GC33染色。在优选的实施方案中,分离的CTC用抗GPC3抗体GC33染色,优选地通过流式细胞术和/或免疫染色。在另一个实施方案中,用抗GPC3探针使CTC进行原位杂交。ctDNA或ctRNA可从循环细胞例如CTC中分离,或直接从MRCLS患者的液体活组织检查样品中分离。在实施方案中,确认从MRCLS患者分离的生物样品中GPC3突变或表达改变(增加或减少)的步骤优选地通过qRT-PCR、下一代测序方法、数字PCR、数字液滴PCR等。然而,如果它是用于分析ctDNA序列或测量ctDNA量的一般方法,则不限于此。在本发明的另一个实施方案中,该方法可提供MRCLS关于整体疾病诸如诊断、复发、晚期进展的信息,该信息有助于决定用抗GPC3治疗剂的进一步治疗。另外,本发明可包括步骤(a)从施用抗GPC3治疗剂的MRCLS患者癌症的生物样品提取循环肿瘤DNA(ctDNA);(b)施用抗GPC3治疗剂,以及(c)从施用抗GPC3治疗剂的相同的MRCLS患者提取循环肿瘤DNA(ctDNA)。用于测定CTC或ctDNA的优选方法的示例已经公开在WO 20150/58079、WO 2016/179530、WO 2020/112566(Cree等人,2017年;Ge等人,2021年;Ono等人,2015年;Yi等人,2021年)中。

[0150] 本文所公开的任何检测剂(例如,抗GPC3抗体)也可用于对流体样品进行的诊断测定。

## [0151] II. 用抗GPC3治疗剂治疗MRCLS

[0152] MRCLS具有中等风险,其中大约三分之一的患者发生转移并最终死于其肿瘤。将MRCLS与其他类型的脂肪肉瘤和大多数其他软组织肉瘤区分开的另一个特征是其倾向于转移到其他软组织部位,包括躯干和四肢、腹膜后、胸壁、胸膜和心包。从组织学上讲,MRCLS切除标本被分类为纯粘液样类型或具有圆形细胞组分的粘液样类型。纯粘液样亚组内的肿瘤在细胞结构和脂肪生成分化方面显示了宽的形态学谱。圆形细胞组分被看作是界限清晰的结节或从粘液样脂肪肉瘤细胞区域逐渐过渡。圆形细胞组分被定义为具有显著的原始圆形细胞的高度细胞区域,其中核质比增加,并且通常具有显著的核仁。根据Trojani分级系统,纯粘液样脂肪肉瘤为2级,而具有显著圆形细胞组分的肿瘤为3级(Haniball等人,2011年)。已知MRCLS与向骨诸如脊柱和其他软组织诸如腹膜后、肢和腋窝的异常转移模式有关,而其他软组织肉瘤倾向于向肺转移,而其他部位通常涉及疾病的晚期。此外,仅在少数MRCLS患者中观察到肺外转移(Asano等人,2012年)。

[0153] 在一些方面,本公开提供了用抗GPC3治疗剂诸如本文提供的那些治疗MRCLS患者的方法。在一些实施方案中,用抗GPC3治疗剂治疗MRCLS患者的方法可分为1级。在另一个实施方案中,用抗GPC3治疗剂治疗MRCLS患者的方法可分为2级。在另一个实施方案中,用抗GPC3治疗剂治疗MRCLS患者的方法可分为3级。此外,在优选的实施方案中,用抗GPC3治疗剂治疗MRCLS患者的方法可分为晚期和不可切除的。在一些示例中,抗GPC3治疗剂为本文所公开的抗GPC3 CAR-T细胞。在一些实施方案中,可使用本文还公开的任何诊断方法来识别进行本文所公开的抗GPC3疗法的患者。

[0154] 在一些实施方案中,医师可考虑是否用指示MRCLS肿瘤测试为GPC3表达阳性的患者的药物产品治疗患者。在一个实施方案中,治疗剂包含抗GPC3结合结构域,优选地是保留与GPC3结合的抗GPC3抗体或其功能片段,优选地其中治疗剂包含施用抗GPC3抗体、抗GPC3抗体-药物缀合物、抗GPC3抗体-放射性核素缀合物或者结合GPC3的抗GPC3抗体或抗体衍生物与抗CD3结合结构域或免疫刺激多肽的融合蛋白质。

[0155] 在决定如何使用GPC3测试结果治疗任何个体患者中,医师也可考虑其他相关情况,诸如待治疗的MRCLS分级、患者的年龄、体重、性别、遗传背景和种族,包括将这些因素和测试结果的组合输入到模型中,该模型帮助指导医师选择疗法和/或用该疗法的治疗方案。抗GPC3治疗剂的一些非限制性示例包括嵌合抗原受体多肽、抗体-药物缀合物、双特异性和多特异性抗体。抗GPC3治疗剂可静脉内、皮内、腹膜内和/或以包封形式优选地作为口服组合物施用。

#### [0156] A. 抗GPC3治疗剂

[0157] 任何靶向GPC3的治疗剂都可用于本文所公开的方法。在一些实施方案中,用于治疗本文所公开的MRCLS的抗GPC3治疗剂可以是抗GPC3抗体。另选地,抗GPC3治疗剂可以是抗GPC3嵌合抗原受体(CAR)和造血细胞诸如表达该受体的免疫细胞(例如,T细胞)。

##### [0158] (i) 抗GPC3抗体

[0159] 在非限制性方面,可用作本发明的抗GPC3治疗剂的抗GPC3抗体的示例可包括抗体-药物缀合物(ADC)(WO 2007/137170),其包含与细胞毒性毒素缀合的1G12抗体(WO 2003/100429)(以目录号B0134R出售,BioMosaics公司)。抗GPC3 ADC的其他示例公开于WO 2017/196764和CN110577600中。抗原结合分子经由合适的接头等与这些化合物缀合。

[0160] 在另选的非限制性方面,抗GPC3抗体的示例包括WO 2006/006693、WO 2009/041062、WO 2013/070468中所述的人源化抗GPC3抗体。

[0161] 在另一个另选的非限制性方面,抗GPC3抗体的示例包括双特异性抗体,该双特异性抗体包含抗GPC3抗体,诸如靶向GPC3和ASGPR1(WO 2016/086813)以及GPC3和CD40(WO 2020/230901)。

##### [0162] (ii) 抗GPC3 CAR和表达其的经遗传修饰的造血细胞

[0163] 在其他实施方案中,本文所公开的抗GPC3治疗剂可以是抗GPC3嵌合抗原受体(CAR)和造血细胞诸如表达这种抗GPC3 CAR的免疫细胞(例如,T细胞),例如,WO 2015/172341、CN105949324和WO 2016/049459中所述的那些。

[0164] 本文所述的CAR多肽用于基于细胞的免疫疗法。本文所述的CAR多肽可包含含有对GPC3具有结合亲和力的scFv的细胞外结构域和跨膜结构域,以及CD3 $\zeta$ 细胞质信号传导结构域。在一些实施方案中,如本文所述的CAR多肽可从N端至C端包含细胞外抗原结合结构域、



跨膜结构域、任选的一个或多个共刺激结构域(例如,CD28共刺激结构域、4-1BB共刺激信号传导结构域、OX40共刺激信号传导结构域、CD27共刺激信号传导结构域或ICOS共刺激信号传导结构域;SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22)和CD3 $\zeta$ 细胞质信号传导结构域。

[0165] 另选地或另外地,本文所述的CAR多肽可含有两个或更多个共刺激信号传导结构域,该两个或更多个共刺激信号传导结构域可彼此连接或被细胞质信号传导结构域分开。CAR多肽中的细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域、任选的共刺激信号传导结构域和细胞质信号传导结构域可直接或经由肽接头彼此连接。在一些实施方案中,本文所述的任何CAR多肽可在N端包含信号序列。

[0166] 在一些示例中,经修饰的造血细胞可表达结合GPC3的嵌合受体多肽。这种抗GPC3 CAR可包含(a)结合GPC3的细胞外靶结合结构域;(b)跨膜结构域;和(c)细胞质信号传导结构域(例如,包含基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)的细胞质结构域)。在一些示例中,(c)位于嵌合受体多肽的C端。在一些情况下,嵌合多肽还可包含至少一个共刺激信号传导结构域。在其他情况下,嵌合受体多肽可不含共刺激信号传导结构域。在其他情况下,CAR多肽可不含共刺激信号传导结构域。本文所述的任何CAR多肽还可包含铰链结构域,其位于(a)的C端和(b)的N端。在其他示例中,嵌合受体多肽可不含任何铰链结构域。在一个实施方案中,细胞外抗原结合结构域是与GPC3结合的单链抗体片段(scFv),优选地其中scFv衍生自GC33抗体。在一些示例中,scFv具有SEQ ID NO:2的序列。在一些实施方案中,CAR中(b)的跨膜结构域可以是单跨膜蛋白质,例如CD8 $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、4-1BB、CD28、CD34、CD4、Fc $\epsilon$ RI  $\gamma$ 、CD16A、OX40、CD3 $\zeta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD3  $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、TCR $\alpha$ 、CD32、CD64、VEGFR2、FAS和FGFR2B(分别是SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45)。CD16A包含CD16A多态性变体CD16<sup>158F</sup>(SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17)和CD16<sup>158V</sup>(SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:18)(Arriga等人,2020年)。另选地,(b)的跨膜结构域可以是非天然存在的疏水蛋白质区段。在一些实施方案中,如果适用,本文所述的CAR多肽的至少一个共刺激信号传导结构域可以是共刺激分子,其可以是例如4-1BB、CD28、CD28<sub>LL-GG</sub>变体、OX40、ICOS、CD27、GITR、HVEM、TIM1、LFA1和CD2(分别是SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27)。

[0167] 在一些示例中,该至少一种共刺激信号传导结构域是CD28共刺激信号传导结构域或4-1BB共刺激信号传导结构域。在一些情况下,共刺激信号传导结构域中的一者是CD28共刺激信号传导结构域;另一种共刺激结构域可以是4-1BB共刺激信号传导结构域、OX40共刺激信号传导结构域、CD27共刺激信号传导结构域或ICOS共刺激信号传导结构域。具体示例包括但不限于CD28和4-1BB;或CD28<sub>LL-GG</sub>变体和4-1BB。另选地,任何嵌合受体多肽可不含任何共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,CAR多肽还可包含(i)CD28共刺激结构域(SEQ ID NO:6),与CD28跨膜结构域、CD28铰链结构域或它们的组合(SEQ ID NO:4),或(ii)4-1BB共刺激结构域,优选地是SEQ ID NO:5,与CD8跨膜结构域、CD8铰链结构域,或它们的组合(SEQ ID NO:3);更优选地其中CAR多肽包含SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9的氨基酸序



列。

[0168] 在一个实施方案中,一个或多个共刺激信号传导结构域,其中之一可以是CD28共刺激信号传导结构域或4-1BB共刺激信号传导结构域。CAR多肽被配置为使得当在宿主细胞上表达时,细胞外抗原结合结构域位于细胞外以与靶分子结合,并且CD3 $\zeta$ 细胞质信号传导结构域位于细胞内以向细胞发出信号。共刺激信号传导结构域可位于细胞质中以触发活化和/或效应信号传导。在一些实施方案中,本文所述的任何CAR多肽中(c)的细胞质信号传导结构域可以是CD3 $\zeta$ (SEQ ID NO:7)或Fc $\epsilon$ R1  $\gamma$ 的细胞质结构域。

[0169] 在一些实施方案中,当适用时,本文所述的CAR多肽的铰链结构域可以是CD28、CD16A、CD8 $\alpha$ ,或IgG的铰链结构域。在其他示例中,铰链结构域是非天然存在的肽。例如,非天然存在的肽可以是延伸的重组多肽(XTEN)或(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>n</sub>多肽,其中n是3至12的整数,包括端值。在一些示例中,铰链结构域是短区段,其可含有至多60个氨基酸残基。

[0170] 在具体示例中,本文所述的CAR多肽可包含(i) CD28共刺激结构域或4-1BB共刺激结构域;和(ii) CD28跨膜结构域、CD28铰链结构域或它们的组合。在另一个具体示例中,本文所述的CAR多肽可包含(i) CD28共刺激结构域或4-1BB共刺激结构域,(ii) CD8跨膜结构域,CD8铰链结构域,或它们的组合。

[0171] 表1.CAR多肽的示例性组分。

信号序列	细胞外结构域 (抗原结合)	铰链结构域	跨膜结构域	共刺激结构域	细胞质信号传导结构域
[0172] CD8 $\alpha$ SEQ ID NO: 1	scFv (例如, 抗 GPC3 scFv) SEQ ID NO: 2	CD8	CD8	4-1BB	CD3 $\zeta$
		SEQ ID NO: 3		SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 7
CD8 $\alpha$ SEQ ID NO: 1	scFv (例如, 抗 GPC3 scFv) SEQ ID NO: 2	CD28	CD28	CD28	CD3 $\zeta$
		SEQ ID NO: 4		SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7

[0173] 例如,CAR多肽可包含选自SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的氨基酸序列。示例CAR多肽的氨基酸序列提供于SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11中。

[0174] 在一些实施方案中,表达抗GPC3 CAR的造血细胞还可表达或过度表达影响造血细胞诸如免疫细胞中葡萄糖代谢的因子(例如,外源性因子)(参见WO 2020/037066、WO 2020/097346和WO 2020/010110,其各自的相关公开内容以引用方式并入本文以用于本文参考的主题和目的)。这种因子可用于将葡萄糖代谢产物转移或重定向离开造血细胞诸如免疫细胞中的糖酵解途径。

[0175] 在一些实施方案中,将葡萄糖代谢产物重定向离开的糖酵解途径可通过在造血细胞(例如,T细胞或自然杀伤细胞)中表达(例如,过表达)一种或多种因子(例如,蛋白质或核酸)诸如本文所述的那些来实现。预期此类经基因工程化的造血细胞相对于相同类型的天然造血细胞具有增强的代谢活性,例如,在低葡萄糖、低氨基酸、低pH和/或低氧环境中(例如,在肿瘤微环境中)。因此,在CAR的存在下,造血细胞诸如HSC或免疫细胞将表现出优异的生物活性(例如,在低葡萄糖、低氨基酸、低pH和/或低氧条件下),例如,细胞增殖、活化(例如,增加的细胞因子产生,例如,IL-2或IFN  $\gamma$ 产生)、细胞毒性和/或体内抗肿瘤活性,这些免疫细胞共表达一种或多种因子(例如,多肽或核酸)和嵌合受体多肽,该一种或多种因子将葡萄糖代谢产物重定向离开造血细胞中的糖酵解途径。

[0176] 因此,本文提供了经修饰的(例如,经遗传修饰的)造血细胞(例如,造血干细胞,例如,免疫细胞,诸如T细胞或自然杀伤细胞),其相对于相同类型的天然造血细胞具有受调节的Krebs循环,特别是例如在低葡萄糖、低氨基酸、低pH和/或低氧条件下。经修饰的造血细胞可表达或过度表达Krebs循环调节多肽。在一些实施方案中,Krebs循环调节多肽可以是催化Krebs循环反应的酶。示例包括但不限于异柠檬酸脱氢酶(IDH)诸如IDH1或IDH2,苹果酸脱氢酶(MDH)诸如MDH1或MDH2,或磷酸甘油酸脱氢酶(PHGDH)。在其他实施方案中,Krebs循环调节多肽是利用Krebs循环代谢产物作为底物的酶。示例包括但不限于谷氨酸草酰乙酸转氨酶(GOT),诸如GOT1(例如,SEQ ID NO:13)或GOT2(例如SEQ ID NO:12)(也称为天冬氨酸转氨酶或天冬氨酸氨基转氨酶)或磷酸烯醇丙酮酸羧激酶1(PCK1)。在其他实施方案中,Krebs循环调节多肽是将前体转化为Krebs循环代谢产物的酶。示例包括但不限于磷酸丝氨酸转氨酶(PSAT1)、谷氨酸脱氢酶(GDH1)、谷氨酸-丙酮酸转氨酶1(GPT1)或谷氨酰胺酶(GLS)。在具体的示例中,将葡萄糖代谢产物重定向离开用于任何经修饰的造血细胞诸如免疫细胞的糖酵解途径的多肽可以是如先前在WO 2020/037066中公开的GOT2。其他实施方案可以是经修饰的造血细胞,诸如免疫细胞,其具有葡萄糖输入多肽诸如WO 2020/010110中公开的葡萄糖转运蛋白(GLUT1、GLUT3)或乳酸调节剂诸如WO 2020/051493中公开的单羧酸转运蛋白(MCT1、MCT2、MCT4)。

[0177] 在一些示例中,共表达抗GPC3 CAR和影响葡萄糖代谢的因子的造血细胞可具有相对于相同类型的野生型造血细胞改善的葡萄糖摄取活性。在一些情况下,造血细胞可外源性地表达葡萄糖输入多肽,例如葡萄糖转运蛋白(GLUT)或钠-葡萄糖协同转运蛋白(SGLT)。示例包括但不限于GLUT1、GLUT3、GLUT1 S226D、SGLT1、SGLT2、GLUT8、GLUT8L12A L13A、GLUT11、GLUT7和GLUT4。

[0178] 在其他示例中,共表达抗GPC3 CAR和影响葡萄糖代谢的因子的造血细胞可具有相对于相同类型的野生型造血细胞受调节的Krebs循环。在一些情况下,造血细胞可外源性地表达Krebs循环调节多肽。在一些示例中,Krebs循环调节因子可以是催化Krebs循环中的反应的酶。示例包括但不限于异柠檬酸脱氢酶(IDH)、苹果酸脱氢酶(MDH)或磷酸甘油酸脱氢酶(PHGDH)。在其他情况下,Krebs循环调节多肽可以是使用Krebs循环代谢产物作为底物的酶。示例包括但不限于谷氨酸草酰乙酸转氨酶(GOT)或磷酸烯醇丙酮酸羧激酶1(PCK1)。在其他情况下,Krebs循环调节多肽可以是将前体转化为Krebs循环代谢产物的酶。示例包括但不限于磷酸丝氨酸转氨酶(PSAT1)、谷氨酸脱氢酶(GDH1)、谷氨酸-丙酮酸转氨酶1(GPT1)或谷氨酰胺酶(GLS)。

[0179] 在其他示例中,共表达抗GPC3 CAR和影响葡萄糖代谢的因子的造血细胞可具有相对于相同类型的野生型造血细胞增加的细胞内乳酸浓度。在一些情况下,造血细胞可外源性地表达乳酸调节多肽。在一些示例中,乳酸调节多肽可以是单羧酸转运蛋白(MCT),优选地是MCT1、MCT2或MCT4。在一些示例中,乳酸调节多肽可以是参与乳酸合成的酶,例如,乳酸脱氢酶A(LDHA)。在其他示例中,乳酸调节多肽可以是抑制竞争乳酸合成底物的途径的多肽,例如丙酮酸脱氢酶激酶1(PDK1)。

[0180] Krebs循环调节多肽可以是来自合适物种的天然存在的多肽,例如哺乳动物Krebs循环调节多肽,诸如衍生自人或非人灵长类的那些。此类天然存在的多肽是本领域已知的,并且可例如使用任何上述氨基酸序列作为询问以搜索公众可获得的基因数据库例如

GenBank来获得。用于本公开的Krebs循环调节多肽可与任何示例性蛋白质GOT1 (SEQ ID NO:13) 和GOT2 (SEQ ID NO:12) 优选地与GOT2 (SEQ ID NO:12) 共享至少85% (例如,90%、95%、97%、98%、99%或以上) 的序列同一性。

[0181] 为了构建表达抗GPC3 CAR和任选地本文所述的任何葡萄糖输入多肽的造血细胞, 可经由如本文所述的常规方法产生用于稳定或瞬时表达葡萄糖输入多肽和/或嵌合受体多肽的表达载体并将其引入免疫宿主细胞中。例如, 编码葡萄糖输入多肽和/或嵌合受体多肽的核酸可克隆到一个或两个合适的表达载体中, 诸如与合适的启动子有效连接的病毒载体。在一些情况下, 嵌合受体多肽和葡萄糖输入多肽的编码序列中的每一者位于两个单独的核酸分子上, 并且可克隆到两个单独的载体中, 这两个单独的载体可同时或顺序地引入合适的宿主细胞中。

[0182] 另选地, 嵌合受体多肽和葡萄糖输入多肽的编码序列位于一个核酸分子上, 并且可克隆到一个载体中。嵌合受体多肽和葡萄糖输入多肽的编码序列可与两个不同的启动子可操作地连接, 使得两个多肽的表达由不同的启动子控制。另选地, 嵌合受体多肽和葡萄糖输入多肽的编码序列可与一个启动子可操作地连接, 使得两个多肽的表达由单个启动子控制。合适的序列可插入到两个多肽的编码序列之间, 以便两个单独的多肽可从单个mRNA分子翻译。此类序列, 例如IRES或核糖体跳跃位点, 是本领域公知的。

[0183] 核酸和载体可在合适的条件下与限制酶接触, 以在每个分子上产生互补端, 这些互补端可彼此配对并与连接酶连接。另选地, 可将合成核酸接头连接到编码葡萄糖输入多肽和/或嵌合受体多肽的核酸的末端。合成接头可含有对应于载体中特定限制位点的核酸序列。表达载体/质粒/病毒载体的选择将取决于用于表达葡萄糖输入多肽和/或嵌合受体多肽的宿主细胞的类型, 但应适于在真核细胞中整合和复制。

[0184] 多种启动子可用于表达本文所述的葡萄糖输入多肽和/或嵌合受体多肽, 包括但不限于巨细胞病毒 (CMV) 中间早期启动子, 病毒LTR诸如Rous肉瘤病毒LTR、HIV-LTR、HTLV-1LTR, 猿猴病毒40 (SV40) 早期启动子, 人EF1- $\alpha$ 启动子或单纯疱疹tk病毒启动子。用于表达葡萄糖输入多肽和/或嵌合受体多肽的另外的启动子包括造血细胞中的任何组成型活性启动子。另选地, 可使用任何可调节的启动子, 使得其在造血细胞中的表达受到调节。

[0185] 另外地, 载体可含有例如以下中的一些或全部: 用于在宿主细胞中选择稳定或瞬时转染子的选择性标记物基因, 诸如新霉素基因或卡那霉素基因; 来自人CMV的立即早期基因的用于高水平的转录的增强子/启动子序列; 人EF1- $\alpha$ 基因的内含子序列; 来自SV40的用于mRNA稳定性的转录终止和RNA加工信号; SV40多瘤病毒复制起点和用于适当的附加型复制的Co1E1; 内部核糖体结合位点 (IRES), 多用途多克隆位点; 用于体外转录有义和反义RNA的T7和SP6 RNA启动子; “自杀开关”或“自杀基因”, 当被触发时, 其引起携带载体的细胞死亡 (例如, HSV胸苷激酶或可诱导的半胱天冬酶, 诸如iCasp9), 和用于评估葡萄糖输入多肽和/或嵌合受体多肽的表达的报告基因。

[0186] 合适的载体和产生含有转基因的载体的方法是本领域公知的和可获得的。用于表达葡萄糖输入多肽和/或嵌合受体多肽的载体的制备的示例可在例如US2014/0106449中找到, 其以引用方式整体并入本文。本文所述的包含编码葡萄糖输入多肽和/或嵌合受体多肽的核酸序列的载体中的任一者也在本公开的范围之内。这种载体, 或其中含有的编码葡萄糖输入多肽和/或嵌合受体多肽的序列, 可通过任何合适的方法被递送到宿主细胞诸如宿主

造血细胞中。将载体递送到造血细胞的方法是本领域公知的,并且可包括DNA电穿孔、RNA电穿孔、使用试剂诸如脂质体的转染或病毒转导(例如,逆转录病毒转导,诸如慢病毒转导)。

[0187] 在一些实施方案中,用于表达葡萄糖输入多肽和/或嵌合受体多肽的载体通过病毒转导(例如,逆转录病毒转导,诸如慢病毒转导)递送到宿主细胞。用于递送的示例性病毒方法包括但不限于重组逆转录病毒(参见例如WO 90/07936、WO 94/03622、WO 93/25698、WO 93/25234、WO 93/11230、WO 93/10218和WO 91/02805、US 5,219,740和US4,777,127、GB2,200,651和EP0345242)、基于 $\alpha$ 病毒的载体和腺相关病毒(AAV)载体(参见例如WO 94/12649、WO 93/03769、WO 93/19191、WO 94/28938、WO 95/11984和WO 95/00655)。在一些实施方案中,用于表达葡萄糖输入多肽和/或嵌合受体多肽的载体是逆转录病毒。在一些实施方案中,用于表达葡萄糖输入多肽和/或嵌合受体多肽的载体是慢病毒。描述逆转录病毒转导的参考文献的示例包括US5,399,346(Mann等人,1983年)、US 4,650,764、US4,980,289(Markowitz等人,1988年)、US5,124,263、WO 95/07358(Kuo等人,1993年)。WO 95/07358描述了原代B淋巴细胞的高效转导。还参见WO 2016/040441 A1,其以引入方式并入本文以用于本文参考的目的和主题。

[0188] 在其中使用病毒载体将编码葡萄糖输入多肽和/或嵌合受体多肽的载体引入宿主细胞的示例中,能够通过本领域已知的任何方法产生能够感染造血细胞并携带载体的病毒颗粒,并且可在例如WO 1991/002805 A2、WO 1998/009271A1和US 6,194,191中找到。从细胞培养上清液中收获病毒颗粒,并在使病毒颗粒与造血细胞接触之前可分离和/或纯化。在其他情况下,编码葡萄糖输入多肽的核酸和编码嵌合受体多肽的核酸可被克隆到相同的表达载体中。用于表达嵌合受体多肽和葡萄糖输入多肽的多核苷酸(包括其中此类多核苷酸可操作地连接到至少一个调控元件的载体)也在本公开的范围之内。本公开的有用载体的非限制性示例包括病毒载体,诸如例如逆转录病毒载体,包括 $\gamma$ 逆转录病毒载体、腺相关病毒载体(AAV载体)和慢病毒载体。在一些情况下,编码葡萄糖输入多肽和/或嵌合受体多肽的核酸可经由转座子递送到宿主细胞中。在一些情况下,编码核酸可经由基因编辑(例如,通过CRISPR、TALEN、ZFN或大范围核酸酶)递送到宿主细胞中。

[0189] 在一些情况下,本文所述的核酸可包含两个编码序列,一个编码如本文所述的嵌合受体多肽,并且另一个编码能够增强葡萄糖输入的多肽(即,葡萄糖输入多肽)。包含本文所述的两种编码序列的核酸可被配置为使得由两种编码序列编码的多肽可表达为独立的(和物理上分开的)多肽。为了实现这个目标,本文所述的核酸可含有位于第一编码序列和第二编码序列之间的第三核苷酸序列。该第三核苷酸序列可例如编码核糖体跳跃位点。核糖体跳跃位点是损害正常肽键形成的序列。这种机制导致来自一个信使RNA的另外的开放阅读框的翻译。该第三核苷酸序列可例如编码P2A、T2A或F2A肽(参见例如Kim等人,2011年)。作为非限制性示例,示例性P2A肽可具有ATNFSLLKQAGDVEENPGP(SEQ ID NO:14)的氨基酸序列。在另一个实施方案中,第三核苷酸序列可编码内部核糖体进入位点(IRES)。IRES是RNA元件,其允许以端独立的方式起始翻译,也允许从一个信使RNA翻译另外的开放阅读框。另选地,第三核苷酸序列可编码控制第二多肽表达的第二启动子。第三核苷酸序列也可编码多于一个核糖体跳跃序列、IRES序列、另外的启动子序列或它们的组合。在一些示例中,核酸或核酸组包含在载体或一组载体内,该载体或一组载体可以是表达载体或一组表达载体(例如,病毒载体,诸如慢病毒载体或逆转录病毒载体)。核酸组或载体组是指一组两个或

更多个核酸分子或两个或更多个载体,它们各自编码目标多肽(即,将葡萄糖代谢产物重定向离开糖酵解途径的多肽或核酸和CAR多肽)中的一种多肽。本文所述的任何核酸也在本公开的范围內。

[0190] 本文所述的造血细胞可以是表达葡萄糖输入多肽的免疫细胞,可以是自然杀伤细胞、单核细胞/巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞或T细胞。此外,造血细胞,优选地免疫细胞,可从任何来源获得,诸如外周血单核细胞(PBMC),骨髓,或组织诸如脾、淋巴结、胸腺、干细胞或肿瘤组织。另选地,造血细胞可衍生自干细胞,例如,造血干细胞和诱导型多能干细胞(iPSC)。适于获得所需宿主细胞类型的来源对于本领域技术人员是显而易见的。在一些实施方案中,造血细胞,优选地免疫细胞,衍生自PBMC,其可从需要本文所述治疗的患者(例如,人患者)获得。作为非限制性示例,抗CD3、抗CD28抗体IL-2IL-15、植物血球凝集素或工程化人工刺激细胞或颗粒可用于T细胞的扩增。在优选的实施方案中,在一些示例中,免疫细胞是T细胞,其中内源性T细胞受体、内源性主要组织相容性复合物、内源性 $\beta$ -2-微球蛋白或它们的组合的表达被抑制或消除。本文所述的造血细胞可以是造血干细胞或其子代,这些造血细胞表达重定向葡萄糖代谢产物的因子(例如,多肽或核酸)以及任选的嵌合受体多肽。在一些实施方案中,造血细胞可以是免疫细胞诸如自然杀伤细胞、单核细胞/巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞或T细胞。

[0191] 在一些实施方案中,造血细胞是自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞或T细胞,优选地其中造血细胞是T细胞,其中内源性T细胞受体、内源性主要组织相容性复合物、内源性 $\beta$ -2-微球蛋白或它们的组合的表达已被抑制或消除;并且/或者其中造血细胞衍生自外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞(HSC)或诱导型多能干细胞(iPSC),优选地其中造血细胞对于患者是自体的。

[0192] 本文所述的任何经遗传修饰的造血细胞(例如,HSC或免疫细胞)可包含核酸或核酸组,其共同包含:(a)第一核苷酸序列,该第一核苷酸序列编码使葡萄糖代谢产物重定向的因子(例如,多肽或核酸);和(b)第二核苷酸序列,该第二核苷酸序列编码嵌合抗原受体(CAR)多肽。核酸或核酸组是DNA和/或RNA分子或一组DNA和/或RNA分子。在一些情况下,造血细胞包含核酸,该核酸包含第一核苷酸序列和第二核苷酸序列两者。在一些实施方案中,重定向葡萄糖代谢产物的因子(例如,多肽或核酸)的编码序列在CAR多肽的编码序列的上游。在一些实施方案中,CAR多肽的编码序列在重定向葡萄糖代谢产物的因子的上游。这种核酸还可包含位于第一核苷酸序列和第二核苷酸序列之间的第三核苷酸序列,其中第三核苷酸序列编码核糖体跳跃位点(例如,P2A肽)、内部核糖体进入位点(IRES)或第二启动子。

[0193] 在一些实施方案中,造血细胞可包含核酸或一组核酸(例如,DNA分子或一组DNA分子),其共同包含:

[0194] (a) 第一核苷酸序列,该第一核苷酸序列编码葡萄糖输入多肽、Krebs循环调节多肽和/或乳酸调节多肽;和

[0195] (b) 第二核苷酸序列,该第二核苷酸序列编码嵌合抗原受体多肽。在一些示例中,造血细胞包含核酸,该核酸包含第一核苷酸序列和第二核苷酸序列两者。在一些示例中,该核酸还可包含位于第一核苷酸序列和第二核苷酸序列之间的(c)第三核苷酸序列。该第三核苷酸序列可编码核糖体跳跃位点或包含内部核糖体进入位点(IRES)或第二启动子。在一个示例中,第三核苷酸序列编码核糖体跳跃位点。在一个具体示例中,核糖体跳跃位点是

P2A肽。

[0196] 在一些实施方案中,核酸或核酸组可包含在载体或一组载体内。在一些示例中,载体或载体组可以是表达载体或一组表达载体。在其他示例中,载体或载体组可包含一个或多个病毒载体,例如慢病毒载体或逆转录病毒载体。

[0197] B. 药物组合物

[0198] 本文所公开的任何抗GPC3治疗剂可被配制成药学上可接受的药物组合物,以用于本文所公开的治疗方法。在一些实施方案中,除了抗GPC3治疗剂之外,药物组合物可以包含合适的载体、缓冲剂和/或赋形剂。优选地,药物组合物包含本文所述的任何造血细胞以及药学上可接受的载体和赋形剂。

[0199] 与本公开的组合物结合使用的短语“药学上可接受的”是指当施用给哺乳动物(例如,人)时生理上可耐受并且通常不产生不良反应的此类组合物的分子实体和其他成分。优选地,如本文所用,术语“药学上可接受的”意指经联邦或州政府监管机构批准,或在美国药典或其他公认药典中列出用于哺乳动物,尤其是用于人。“可接受的”意指载体与组合物的活性成分(例如,核酸、载体、细胞或治疗性抗体)相容,并且不会负面影响施用组合物的受试者。用于本发明方法的任何药物组合物可包含冻干制剂形式或水溶液形式的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂。

[0200] 药学上可接受的载体,包括缓冲剂,是本领域公知的,并且可包括磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂;低分子量多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;氨基酸;疏水性聚合物;单糖;二糖;和其他碳水化合物;金属络合物;和/或非离子表面活性剂。参见例如Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 第20版, 2000年, Lippincott Williams and Wilkins, 编辑K.E. Hoover。

[0201] 本公开的药物组合物还可含有一种或多种对于所治疗的特定指征必要的另外的活性化合物,优选地具有不负面影响彼此的互补活性的那些。可能的其他活性化合物的非限制性示例包括例如IL-2以及本领域已知的和下文在联合治疗的讨论中列出的各种试剂。

[0202] C. MRCLS的治疗

[0203] 此外,本文提供了在可能患有或疑似患有MRCLS的受试者中抑制表达GPC3的细胞(例如,减少此类细胞的数量、阻断细胞增殖和/或抑制细胞活性)的方法。该方法可以包括向对其有需要的受试者施用本文所述的造血细胞群体,其可共表达重定向葡萄糖代谢产物的因子(例如,多肽或核酸)以及CAR多肽。受试者(例如,人患者,诸如患有癌症的人患者)可能已经用或正在用抗癌疗法(例如,抗癌剂)治疗。在一些示例中,表达靶抗原的细胞中的至少一些处于低葡萄糖环境、低氨基酸(例如,低谷氨酰胺)环境、低pH环境和/或低氧环境中,例如肿瘤微环境。

[0204] 本文所述的方法可包括向受试者中引入治疗有效量的抗体和治疗有效量的经基因工程化的造血细胞,诸如免疫细胞(例如,T细胞或NK细胞),其共表达本公开的CAR多肽和改善造血细胞在本公开的实体肿瘤微环境中的生存力和/或功能性的基因。在一些示例中,免疫细胞是自体的。在其他示例中,免疫细胞是同种异体的。在本文所述的任何方法中,造血细胞可被活化、扩增或者离体活化和扩增。在一些情况下,免疫细胞包含T细胞,其在抗CD3抗体、抗CD28抗体、IL-2、IL-15、植物血球凝集素和工程化人工刺激细胞或颗粒中的一者或多者存在下活化。在其他情况下,造血细胞包含自然杀伤细胞,其在4-1BB配体、抗-4-

1BB抗体、IL-15、抗-IL-15受体抗体、IL-2、IL-12、IL-21和K562细胞、工程化人工刺激细胞或颗粒中的一者或多者存在下被活化。

[0205] 在一些实施方案中,以有效抑制表达靶抗原的细胞至少20%和/或至少2倍的量将造血细胞施用给受试者,例如,抑制表达靶抗原的细胞50%、80%、100%、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍或更多。本文所述的基于细胞的免疫疗法的疗效可通过本领域已知的任何方法来评估,并且对于熟练的医学专业人员将是显而易见的。例如,基于细胞的免疫疗法的疗效可通过受试者的存活或受试者或其组织或样品中的肿瘤或癌症负荷来评估。在一些实施方案中,与使用不表达葡萄糖输入多肽的相同类型的造血细胞的疗效相比,以有效增强基于细胞的免疫疗法的疗效至少10%和/或至少2倍,例如,增强免疫疗法的疗效50%、80%、100%、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍或更多的量,向需要治疗的受试者施用造血细胞。

[0206] 在本文所述的任何组合物或方法中,造血细胞(例如,NK和/或T细胞)可以是受试者自体的,即造血细胞可从需要治疗的受试者获得。另选地,宿主细胞是同种异体细胞,即,细胞获自第一受试者,如本文所述进行基因工程化,并施用给不同于第一受试者但属于相同物种的第二受试者。在递送给受试者之前,自体或同种异体造血细胞可被离体活化和/或扩增。

[0207] 根据本公开,可通过输注治疗有效剂量的造血细胞,诸如T淋巴细胞或NK细胞来治疗患者,这些造血细胞包含约 $10^4$ 至 $10^{10}$ 个或更多细胞/千克体重(细胞/kg)的本公开的葡萄糖输入多肽和/或CAR多肽。输注可按照患者所能忍受的频率和次数重复,直到患者不再对治疗作出应答,例如诊断出进行性疾病。适当的输注剂量和时间表将随患者而变化,但可由治疗医师针对特定患者确定。在优选的实施方案中,将每kg至少约 $5 \times 10^4$ 个抗GPC3-CAR T细胞施用给所选择的MRCLS患者,优选地将约 $5 \times 10^4$ 至约 $1 \times 10^{12}$ 个抗GPC3-CAR细胞/kg施用给MRCLS患者。

[0208] 本文所述的组合物或方法的疗效可通过本领域已知的任何方法来评估,并且对于熟练的医学专业人员将是显而易见的。例如,本文所述的组合物或方法的疗效可通过受试者的存活或受试者或其组织或样品中的癌症负荷来评估。在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法可基于受试者中治疗(例如,施用如本文所述的GPC3靶向造血细胞、抗体-药物缀合物、双特异性或多特异性靶向GPC3)的安全性或毒性,例如通过受试者的总体健康和/或不良事件或严重不良事件的存在来评估。在一个实施方案中,如通过计算机断层扫描(CT)扫描所测量的,施用抗GPC3治疗剂在降低肿瘤尺寸至少10%中是有效的。在另一个实施方案中,如果实现了根据RECIST(例如,RECIST 1.1)的稳定疾病,即总肿瘤直径总和可提高19%或降低29%,而没有新的可测定病变,则施用抗GPC3治疗剂是有效的。优选地,实现了根据RECIST(例如,RECIST 1.1)的客观反应,即总肿瘤直径降低30%或更多,而没有新的可测定病变。优选地,通过计算机断层扫描(CT)扫描对肿瘤进行分期。在另一个方面,可切除的肿瘤是组织学分期的。

[0209] 在一些示例中,待通过本文所述的方法治疗的受试者是患有按1级、2级、3级分期的MRCLS(例如,转移性MRCLS或晚期不可切除的MRCLS)的人患者。在一个实施方案中,将GPC3特异性CAR-T施用给患有分期为1级的MRCLS的患者。在另一个实施方案中,将GPC3特异性CAR-T施用给患有分期为2级的MRCLS的患者。此外,在另一个实施方案中,将GPC3特异性



CAR-T施用给患有分期为3级的MRCLS的患者。在优选的实施方案中,将GPC3特异性CAR-T施用给患有MRCLS(例如,转移性MRCLS或晚期不可切除的MRCLS)的患者。

[0210] 同样,在本公开的范围内是本文所述的抗GPC3治疗剂用于治疗MRCLS的用途,以及其用于制备预期医学治疗的药物的用途。

[0211] 在一些实施方案中,表达改善造血细胞在本公开的实体瘤微环境中的生存力和/或功能性的基因的经基因工程化的造血细胞可衍生自对MRCLS细胞(例如,MRCLS细胞)具有特异性的天然造血细胞。此类经基因工程化的造血细胞(例如,肿瘤浸润淋巴细胞或TIL)可以不共表达任何嵌合受体多肽,并且可用于破坏靶疾病细胞,例如,MRCLS细胞。这些表达改善生存力和/或功能性的所述基因但不表达嵌合受体的经基因工程化的TIL可与能够与靶肿瘤细胞和TIL(BiTE)结合的双特异性抗体共同使用。

[0212] 此外,本公开中描述的组合物和方法可与癌症的其他类型的疗法结合使用,诸如化疗、手术、放射、基因疗法等,优选地与确立的护理标准一起使用,例如如在(Abaricia和Hirbe,2018年;Lee等人,2018年;Regina和Hettmer,2019年;Sanfilippo等人,2013年;Suarez-Kelly等人,2019年)中公开的用于MRCLS的阿霉素、异环磷酰胺、曲贝替定。此类疗法可与根据本公开的免疫疗法同时或顺序(以任何次序)施用。

[0213] 当与另外的治疗剂共同施用,由于叠加作用或协同效应,可降低每种试剂的合适的治疗有效剂量。本公开的治疗可与其他免疫调节治疗组合,诸如例如治疗性疫苗(包括但不限于GVAX、基于DC的疫苗等)、检查点抑制剂(包括但不限于阻断CTLA-4、PD-1、LAG-3、TIM-3等的试剂)或活化剂(包括但不限于增强41BB、OX40等的试剂)。可用于与本公开的免疫疗法组合的其他治疗剂的非限制性示例包括:(i)抗血管生成剂(例如,TNP-470、血小板因子4、血小板反应蛋白-1、金属蛋白酶组织抑制剂(TIMP1和TIMP2)、催乳素(16-kD片段)、血管抑素(38-kD片段的纤溶酶原)、内皮抑素、bFGF可溶性受体、转化生长因子 $\beta$ 、干扰素 $\alpha$ 、可溶性KDR和FLT-1受体、胎盘增殖素相关蛋白,以及由(Carmeliet和Jain,2000年)列出的那些),(ii)VEGF拮抗剂或VEGF受体拮抗剂诸如抗VEGF抗体、VEGF变体、可溶性VEGF受体片段、能够阻断VEGF或VEGFR的适体、中和抗VEGFR抗体、VEGFR酪氨酸激酶抑制剂以及它们的任何组合;和(iii)化疗化合物诸如例如嘧啶类似物(5-氟尿嘧啶、氟尿苷、卡培他滨、吉西他滨和阿糖胞苷)、嘌呤类似物、叶酸拮抗剂和相关抑制剂(巯嘌呤、硫鸟嘌呤、喷司他丁和2-氯脱氧腺苷(克拉屈滨));抗增殖/抗有丝分裂剂,包括天然产物诸如长春花生物碱(长春碱、长春新碱和长春瑞滨)、微管破坏剂诸如紫杉烷(紫杉醇、多西他赛)、长春新碱、长春碱、诺可达唑、埃博霉素和异长春花碱、表鬼臼毒素(依托泊苷和替尼泊苷)、DNA损伤剂(放线菌素、安吡啶、蒽环霉素、博来霉素、白消安、喜树碱、卡铂、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、癌得星、更生霉素、柔红霉素、阿霉素、表柔比星、六甲基蜜胺奥沙利铂、异环磷酰胺、美法仑、二氯甲基二乙胺(merchlorehtamine)、丝裂霉素、米托蒽醌、亚硝基脲、普卡霉素、丙卡巴肼、紫杉醇、泰索帝、替尼泊苷、三亚乙基硫代磷酰胺和依托泊苷(VP16));抗生素诸如更生霉素(放线菌素D)、柔红霉素、多柔比星(阿霉素)、伊达比星、蒽环霉素、米托蒽醌、博来霉素、普卡霉素(光辉霉素)和丝裂霉素;酶(L-天冬酰胺酶,其全身性代谢L-天冬酰胺并剥夺不具有合成其自身天冬酰胺的能力的细胞);抗血小板剂;抗增殖/抗有丝分裂烷化剂诸如氮芥类(氮芥、环磷酰胺和类似物、美法仑、苯丁酸氮芥)、乙烯亚胺和甲基蜜胺(六甲基蜜胺和噻替哌)、烷基磺酸盐-白消安、亚硝基脲(卡莫司汀(BCNU)和类似物、链脲霉素)、三氮烯-达卡巴



嗪(DTIC);抗增殖/抗有丝分裂抗代谢药诸如叶酸类似物(甲氨蝶呤);铂配位络合物(顺铂、卡铂)、丙卡巴肼、羟基脲、米托坦、氨鲁米特;激素、激素类似物(雌激素、他莫昔芬、戈舍瑞林、比卡鲁胺、尼鲁米特)和芳香酶抑制剂(来曲唑、阿那曲唑);抗凝血剂(肝素、合成肝素盐和凝血酶的其他抑制剂);纤维蛋白溶解剂(诸如组织纤溶酶原激活物、链激酶和尿激酶)、阿司匹林、双嘧达莫、噻氯匹定、氯吡格雷、阿昔单抗;抗迁移剂;抗分泌剂(布雷菲德菌素);免疫抑制剂(环孢霉素、他克莫司(FK-506)、西罗莫司(雷帕霉素)、硫唑嘌呤、霉酚酸酯);抗血管生成化合物(例如,TNP-470、染料木黄酮、贝伐单抗)和生长因子抑制剂(例如,成纤维细胞生长因子(FGF)抑制剂);血管紧张素受体阻断剂;一氧化氮供体;反义寡核苷酸;抗体(曲妥珠单抗);细胞周期抑制剂和分化诱导剂(维甲酸);AKT抑制剂(诸如MK-22062HC1、哌立福辛(KRX-0401)、GSK690693、帕他色替(GDC-0068)、AZD5363、优普色替、afuresertib或曲西立滨);mTOR抑制剂、拓扑异构酶抑制剂(多柔比星(阿霉素)、安吡啶、喜树碱、柔红霉素、更生霉素、eniposide、表柔比星、依托泊苷、伊达比星、米托蒽醌、拓扑替康和伊立替康)、皮质类固醇(可的松、地塞米松、氢化可的松、甲基强的松龙、强的松和强的松龙);生长因子信号传导激酶抑制剂;线粒体功能障碍诱导剂和半胱天冬酶活化剂;和染色质破坏剂。

[0214] 在一个实施方案中,该方法还包括与治疗剂并行或相继地向患者施用至少一种免疫调节剂,优选地其中免疫调节剂是免疫检查点抑制剂或免疫刺激性细胞因子。预期免疫检查点抑制剂将在微肿瘤环境中提升抑制信号,这些抑制信号可不利地干扰抗GPC3治疗剂的作用模式,例如,干扰表达CAR的造血细胞(例如,免疫细胞诸如T细胞或NK细胞),因为此类免疫检查点可调节造血细胞的活化并由此降低或阻断它们的活性。在一些实施方案中,该方法还包括施用淋巴细胞减少治疗,优选地选自环磷酰胺和氟达拉滨。优选地在输注表达CAR的造血细胞之前应用这种淋巴细胞清除治疗,以允许输注细胞的更大的T细胞扩增(Shank等人,2017年)。

[0215] 本公开的一个或多个实施方案的细节阐述于以下描述中。本公开的其他特征或优点将从若干实施方案的详细描述和所附权利要求书中显而易见。

[0216] 通用技术

[0217] 除非另有说明,本公开的实践将采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,这些技术在本领域的技术范围内。此类技术在文献中有充分的解释,诸如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版(Sambrook等人,1989年),Cold Spring Harbor Press;Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait编辑,1984年);Methods in Molecular Biology,Humana Press;Cell Biology:ALaboratory Notebook(J.E.Cellis编辑,1989年),Academic Press;Animal Cell Culture(R.I.Freshney编辑,1987年);Introduction to Cell and Tissue Culture(J.P.Mather和P.E.Roberts,1998年),Plenum Press;Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures(A.Doyle、J.B.Griffiths和D.G.Newell编辑,1993年8月),J.Wiley and Sons;Methods in Enzymology(Academic Press,Inc.);Handbook of Experimental Immunology(D.M.Weir和C.C.Black-well编辑),Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller和M.P.Calos编辑,1987年);Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等人编辑,1987年);PCR:The Polymerase Chain Reaction(Mullis等人编辑,1994年);Current Protocols in Immunology(J.E.Coligan等人编辑,1991年);

Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999年); Immunobiology (C.A. Janeway和P. Travers, 1997年); Antibodies (P. Finch, 1997年); Antibodies: a practice approach (D. Catty. 编辑, IRL Press, 1988-1989年); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd和C. Dean编辑, Oxford University Press, 2000年); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow和D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999年); The Antibodies (M. Zanetti和J.D. Capra编辑, Harwood Academic Publishers, 1995年); DNA Cloning: A practical Approach, 第I卷和第II卷 (D.N. Glover编辑, 1985年); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames和S.J. Higgins编辑, (1985年); Transcription and Translation (B.D. Hames和S.J. Higgins编辑, (1984年); Animal Cell Culture (R.I. Freshney编辑, (1986年); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, (1986年); 以及B. Perbal, A practical Guide To Molecular Cloning (1984年), F.M. Ausubel等人, 编辑。

[0218] 无需进一步详述, 相信本领域技术人员基于上述描述可最大限度地利用本公开。因此, 以下具体实施方案将被解释为仅是例示性的, 并且无论如何不以任何方式限制本公开的其余部分。本文所引用的所有出版物都以引用方式并入本文以用于本文参考的目的或主题。

#### [0219] 实施例

[0220] 以下实施例仅旨在例示根据本发明的方法和实施方案, 因此不应被解释为对权利要求书施加限制。

[0221] 实施例1. 用抗GPC3单克隆抗体GC33进行FFPE组织切片的IHC测定

[0222] 根据常规方案用GPC3特异性抗体进行IHC染色。按照标准程序, 将人活组织检查标本(肿瘤和健康组织)、异种移植物活组织检查标本(肿瘤和健康组织)和细胞系标本在中性缓冲的10%福尔马林溶液中固定24小时, 然后包埋在石蜡中。标准样品尺寸为0.5cm×1cm×1cm。在切片机(Leica)上切下5μm厚的组织切片, 并将其固定在带正电荷的载玻片上。将载玻片风干, 并在整个研究期间于室温下储存。在EZ Prep (Ventana) 中将组织切片脱蜡, 随后在热水浴(98℃, 60分钟)中用靶修复溶液(Ventana)进行抗原修复。用初级过氧化物酶抑制剂(Ventana)于室温下封闭内源性过氧化物酶5分钟。此后, 将切片与一级抗GPC3抗体(抗体GC33; Ventana#790-4564)温育32分钟, 随后揭示酶活性(OptiView DAB检测试剂盒, Ventana)。将切片用苏木精(Ventana)在室温下复染30秒。使用适当的同种型对照确定染色的特异性。使用Leica Aperio AT2扫描仪(Leica)获得整个肿瘤切片的图像。

[0223] 实施例2. 用抗GPC3单克隆抗体GC33进行FFPE组织切片的IF测定。

[0224] 根据常规方案用GPC3特异性抗体进行IF染色。按照标准程序, 将人活组织检查标本(肿瘤和健康组织)、异种移植物活组织检查标本(肿瘤和健康组织)和细胞系标本在中性缓冲的10%福尔马林溶液中固定24小时, 然后包埋在石蜡中。标准样品尺寸为0.5cm×1cm×1cm。在切片机(Leica)上切下5μm厚的组织切片, 并将其固定在带正电荷的载玻片上。将载玻片风干, 并在整个研究期间于室温下储存。简言之, 将组织切片脱蜡并再水化递减的醇系列(100%、96%、70%和50%), 随后在预热的水浴(97℃, 30分钟)中用靶修复溶液(Leica)进行抗原修复。将切片冷却至室温下30分钟。然后将切片用信号增强剂(Fisher ThermoScientific)在室温下处理30分钟, 随后用封闭缓冲液在室温下处理60分钟。将抗

GPC3抗体(抗体GC33;Ventana#790-4564)在室温下施用2小时。然后,将载玻片与适当的荧光团标记的二抗在室温下温育1小时。最后,将切片用 TrueBlack<sup>®</sup> 脂褐素自发荧光淬灭剂(Biotium)处理30秒,并用含有DAPI的ProLong Gold抗褪色剂(Thermo Fisher Scientific)固定。使用适当的同种型对照确定染色的特异性。使用Leica Aperio AT2扫描仪(Leica)获得整个肿瘤切片的图像。

[0225] 实施例3.来自不同癌症类型的FFPE组织切片的GPC3表达的IHC评分

[0226] 使用详细的评分过程对实施例1的GPC3表达进行评分。附图的简要说明仅为了说明的目的列出了分配给每个组织切片的各个区域的各种评分。然而,通过检查载玻片上的整个组织切片来进行评分过程,并且实际上,病理学家通过以低、中和高放大倍率观察载玻片上的组织切片来对载玻片的GPC3表达进行评分。低和中倍率用于检测染色的肿瘤细胞。中和高倍率用于检查个体肿瘤细胞,以估计表现出至少部分膜和细胞质染色的活肿瘤细胞的数量和强度。给每个染色的组织切片分配H评分。H评分包括(i)在所有检查的染色组织切片中的所有活肿瘤细胞中,对于没有染色的细胞估计四个单独的百分比,弱染色(+1)、中染色(+2)和强染色(+3),其中细胞必须具有至少部分膜和/或细胞质染色以包括在弱、中或强染色百分比中,并且其中所有四个百分比的总和等于100;以及(ii)将上述推定的百分比代入公式 $1*(1+染色强度的肿瘤细胞的百分比)+2*(2+染色强度的肿瘤细胞的百分比)+3*(1+染色强度的肿瘤细胞的百分比)$ 中,并将上述公式的结果作为H分数赋予上述组织切片。

[0227] 实施例4.来自不同癌症类型的FFPE组织切片的GPC3表达的IF评分。

[0228] 可使用详细的评分过程对实施例2的GPC3表达进行评分。附图的简要说明仅为了说明的目的列出了分配给每个组织切片的各个区域的各种评分。然而,通过检查载玻片上的整个组织切片来进行评分过程,并且实际上,病理学家通过以低、中和高放大倍率观察载玻片上的组织切片来对载玻片的GPC3表达进行评分。低和中倍率用于检测染色的肿瘤细胞。中和高倍率用于检查个体肿瘤巢,以估计表现出至少部分膜和细胞质染色的活肿瘤细胞的数量和强度。给每个染色的组织切片分配H评分。H评分包括(i)在所有检查的染色组织切片中的所有活肿瘤细胞中,对于没有染色的细胞估计四个单独的百分比,弱染色(+1)、中染色(+2)和强染色(+3),其中细胞必须具有至少部分膜和/或细胞质染色以包括在弱、中或强染色百分比中,并且其中所有四个百分比的总和等于100;以及(ii)将上述推定的百分比代入公式 $1*(1+染色强度的肿瘤细胞的百分比)+2*(2+染色强度的肿瘤细胞的百分比)+3*(1+染色强度的肿瘤细胞的百分比)$ 中,并将上述公式的结果作为H分数赋予上述组织切片。

[0229] 实施例5.用GPC3特异性探针对FFPE组织切片进行ISH测定。

[0230] 靶基因GPC3的原位杂交染色可根据常规方案(Wang等人,2012年)进行。按照标准程序,将人活组织检查标本(肿瘤和健康组织)、异种移植物活组织检查标本(肿瘤和健康组织)和细胞系标本在中性缓冲的10%福尔马林溶液中固定24小时,然后包埋在石蜡中。标准样品尺寸为0.5cm×1cm×1cm。在切片机(Leica)上切下6μm厚的组织切片,并将其固定在带正电荷的载玻片上。根据常规方法(Wang等人,2012年),通过进行管家基因泛素C(UBC)的mRNA进行RNA杂交来评估每个样品的组织质量。该方案从风干的载玻片开始,并在整个研究期间于室温下储存。简言之,将组织切片脱蜡并再水化递减的醇系列(100%、96%、70%和50%),然后在室温下风干5分钟。将载玻片在40℃下的预杂交缓冲液中预处理30分钟,随后将过氧化物酶在室温下淬灭10分钟(ACD Biotechnie)。将载玻片在40℃下浸没于靶修复溶

液中30分钟,随后在40℃下用蛋白酶处理30分钟。将载玻片与靶探针一起温育,并在40℃下温育2小时,随后在适当的缓冲液(ACD Biotechnie)中洗去过量的探针。探针的检测,例如,在显色测定的情况下在固红溶液中通过在室温下温育10分钟进行。将切片用苏木精(Ventana)在室温下复染30秒。使用适当的同种型对照确定染色的特异性。使用Leica Aperio AT2扫描仪(Leica)获得整个肿瘤切片的图像。

[0231] 实施例6.分离游离细胞DNA(cfDNA)并通过靶向下一代测序(NGS)进行分析。

[0232] 血样可在疑似患者的手术前或手术后分离。此外,它们可与原发性和/或继发性肿瘤组织活组织检查的患者匹配。血样可在收集之后24小时内被分离和处理。将血液在1700g下首先离心10分钟以分离血浆和血细胞。将分离的血浆在12,000g下离心另外10分钟以去除细胞碎片。收集血浆并将其等分到每2ml的小瓶中,并在-80℃下储存直至进一步处理。使用循环核酸试剂盒(Qiagen)从440μl至4ml(中值3.95ml)血浆中分离cfDNA,然后在30μl洗脱缓冲液中洗脱。ctDNA浓度通过Qubit™ 1X dsDNA HS测定试剂盒(Thermo Fisher scientific)使用2μl的ctDNA测定。

[0233] 测序可通过离子半导体测序在Ion Torrent S5XL下一代测序(NGS)系统上进行,该系统使用在Ion 540芯片上加载了分子条形码的ctDNA测定。根据制造商的方案(Thermo Fisher Scientific/Life Technologies)进行实验。若干ctDNA面板可用于覆盖与MRCLS相关的多个基因的突变热点(例如,Oncomine™ Colon ctDNA面板,Thermo Fisher Scientific/Life Technologies)。分析和截断值根据(Ge等人,2021年)进行。

[0234] 实施例7.分离循环肿瘤细胞RNA(ctRNA)并通过RT-PCR分析。

[0235] 循环肿瘤细胞(CTC)可基于密度梯度从7.5ml全血中分离。通过倒置将等体积的全血和PBS小心混合,覆盖在Ficoll-paque上,然后在400g下组织室温下离心30分钟。从血浆层回收CTC(参见Low和Wan Abas,2015年)。按照制造商的方案(QIAGEN)从CTC中提取RNA。逆转录可使用Invitrogen Superscript III逆转录酶和随机六聚体作为引物(Invitrogen)进行,并且在37℃下进行1小时,随后在95℃下失活5分钟。cDNA(5μl)用于随后的PCR反应。GPC3特异性引物和PCR反应如(Wang等人,2011年)所述进行。

[0236] 序列

[0237] SEQ ID NO:1-CD8α信号序列

[0238] MALPVTALLLPLALLLHAARP

[0239] SEQ ID NO:2-衍生自GC33的GPC3 scFv

DVVMTQSPLSLPVTGPESISCRSSQSLVHSNRNTYLHWYLQKPGQSP

QLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQNTH

[0240] VPPTFGQGKLEIKRGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASV

KVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPKTDGDTAYSQKF

KGRVTLTADKSTSTAYMELSSLTSEDVAVYYCTRFYSYTYWGQGLT

VSS

[0241] SEQ ID NO:3-CD8铰链和跨膜结构域

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA

[0242]

PLAGTCGVLLLSLVITLYC

- [0243] SEQ ID NO:4-CD28铰链和跨膜结构域  
IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWLVVVGGVL
- [0244] ACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP  
RDFAAYRS
- [0245] SEQ ID NO:5-4-1BB共刺激结构域
- [0246] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
- [0247] SEQ ID NO:6-CD28共刺激结构域
- [0248] RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP RDFAAYRS
- [0249] SEQ ID NO:7-CD3 $\zeta$ 信号传导结构域  
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGG
- [0250] KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLS  
TATKDTYDALHMQUALPPR
- [0251] SEQ ID NO:8-GPC3 CAR多肽(具有斜体信号序列)(CD8 $\alpha$ /GC33 scFv/CD8 $\alpha$ -CD8 $\alpha$ /  
4-1BB/CD3 $\zeta$ )  
*MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVM*TQSPLSLPVTGPASISCRSSQSLVH
- [0252] SNRNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSQVDFRFSGSGSGTDFTLKIS  
RVEAEDVGVYYCSQNTHPPTFGQGTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSQ  
VQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEW  
MGALDPKGTDTAYSQKFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSLTSEDVAVYY  
CTRFYSYTYWGQGLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA  
AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYI
- [0253] FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQ  
NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK  
DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPP  
R
- [0254] SEQ ID NO:9-成熟GPC3 CAR多肽(GC33 scFv/CD8 $\alpha$ -CD8 $\alpha$ /4-1BB/CD3 $\zeta$ )

DVVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLVHSNRNTYLHWYLQKPGQSP  
 QLLIYKVS NRFS GVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQNTH  
 VPPTFGQGTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASV  
 KVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPKTGDTAYSQKF  
 KGRVTLTADKSTSTAYMELSSLTSED TAVYYCTRFYSYTYWGQGLVT  
 [0255] VSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI  
 WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC  
 SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV  
 LDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR  
 RGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0256] SEQ ID NO:10-GPC3-CAR多肽 (具有斜体信号序列) (CD8 $\alpha$ /GC33 scFv/CD28-CD28/  
 CD3 $\zeta$ ) -无刺激结构域

*MALPVTALLPLALLHAARPDVVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLVH*  
 [0257] *SNRNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVS NRFS GVPDRFS GSGSGTDFTLKIS*  
*RVEAEDVGVYYCSQNTHVPPTFGQGTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSQ*  
*VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEW*  
*MGALDPKTGDTAYSQKFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSLTSED TAVYY*  
*CTRFYSYTYWGQGLVTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP*  
 [0258] *SPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDY*  
*MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQN*  
*QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK*  
*DMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*

[0259] SEQ ID NO:11-成熟GPC3-CAR多肽 (GC33 scFv/CD28-CD28/CD3 $\zeta$ ) -无刺激结构域

*DVVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLVHSNRNTYLHWYLQKPGQSPQLLI*  
 [0260] *YKVS NRFS GVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQNTHVPPTFGQ*  
*GTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY*  
*TFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPKTGDTAYSQKFKGRVTLTADKSTS*  
*TAYMELSSLTSED TAVYYCTRFYSYTYWGQGLVTVSSIEVMYPPPYLDNEKS*  
 [0261] *NGTIIHVKGKHLCP*  
*SPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRS*  
*KRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAY*  
*QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNEL*  
*QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*

[0261] SEQ ID NO:12-GOT2

- MALLHSGRVLPGIAAAFHPGLAAAASARASSWWTHVEMGPPDPILGVT  
EAFKRDTNSKKMNLGVGAYRDDNGKPYVLPVSRKAEAQIAAKNLDKE  
YLPIGGLAEFCKASAELALGENSEVLKSGRFVTVQTISGTGALRIGASFL  
[0262] QRFFKFSRDVFLPKPTWGNHTPIFRDAGMQLQGYRYYPKTCGFDFGTG  
AVEDISKIPEQSVLLHACAHNPTGVDPRPEQWKEIATVVKKRNLF  
DMAYQGFASGDGDKDAWAVRHFIQGINVCLCQSYAKNMGLYGERV  
GAFTMVCKDADEAKRVESQLKILIRPMYSNPPLNGARIAAAAILNTPDLR  
[0263] KQWLQEVKVMADRIIGMRTQLVSNLKKKEGSTHNWQHITDQIGMFCFTG  
LKPEQVERLIKEFSIYMTKDGRISVAGVTSSNVGYLAHAIHQVTK
- [0264] SEQ ID NO:13-GOT1  
MAPPSVFAEVPQAQPVLVFKLTADFREDPDPRKVN LGVGAYRTDDCHP  
WVLPVVKKVEQKIANDNSLNHEYLPILGLAEFRSCASRLALGDDSPALK  
EKRVGGVQSLGGTGALRIGADFLARWYNGTNNKNTPVYVSSPTWENH  
NAVFSAAAGFKDIRSYRYWDAEKRGLDLQGFLNDLENAPEFSIVVLHAC  
[0265] AHNPTGIDPTPEQWKQIASVMKHRFLFPFFDSAYQGFASGNLERDAWAI  
RYFVSEGFEFFCAQSFSKNFGLYNERVGNLTVVGKEPESILQVLSQMEKI  
VRITWSNPPAQQGARIVASTLSNPELFEEWTGNVKT MADRIL TMRSELRA  
RLEALKTPGTWNHITDQIGMFSFTGLNPKQVEYLVNEKHIIYLLPSGRINV  
SGLTTKNLDYVATSIHEAVTKIQ
- [0266] SEQ ID NO:14-P2A  
[0267] ATNFSLLKQAGDVEENPGP
- [0268] SEQ ID NO:15-GLUT1  
MEPSSKLTGRLMLAVGGAVLGLSLQFGYNTGVINAPQKVIEEFYNQTW  
VHRYGESILPTTLTTLWLSVAIFS VGGMIGSFSVGLFVNRFGRNSMLM  
MNLLAFVSAVLMGFSKLGKSFEMLILGRFIIIGVYCGLTTGFVPMYVGEV  
[0269] SPTALRGALGTLHQLGIWGILIAQVFGLD SIMGNKDLWPLLLSIIFIPALL  
QCIVLPFCPE SPRFL LINRNEENRAKSVLKKLRGTADVTHDLQEMKEESR  
QMMREKKVTILELFRSPAYRQPILIAWLQLSQQLSGINAVFYYSTSIFEK  
AGVQQPVYATIGSGIVNTAFTWSLFWERAGRRTLHLIGLAGMAGCAIL  
MTIALALLEQLPWMSYLSIVAIFGFVAFFEVGPGPIPFIVAELFSQGPRP  
AAIAVAGFSNWT SNFIVGMCFQYVEQLCGPYVFIIFTVLLVLF FIFTYFK  
[0270] VPETKGRTFDEIASGFRQGGASQSDKTPEELFHPLGADSQV
- [0271] SEQ ID NO:16-CD16A<sup>158F</sup>多肽(具有斜体信号序列)



- MWQLLLPTALLLV*SAGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQG  
 AYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDP  
 VQLEVHIGWLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGK  
 [0272] GRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLFGSKNVSSSETVNITITQGLAV  
 STISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFK  
 WRKDPQDK
- [0273] SEQ ID NO:17-成熟CD16A<sup>158F</sup>多肽  
 GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHN  
 ESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLQ  
 APRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPK  
 ATLKDSGSYFCRGLFGSKNVSSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQVSFC  
 LVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFKWRKDPQDK
- [0274] SEQ ID NO:18-CD16A<sup>158V</sup>多肽(具有斜体信号序列)  
*MWQLLLPTALLLV*SAGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQG  
 AYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDP  
 VQLEVHIGWLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGK  
 [0275] GRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSSSETVNITITQGLAV  
 STISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFK  
 WRKDPQDK
- [0276] SEQ ID NO:19-成熟CD16A<sup>158V</sup>  
 GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHN  
 ESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLQ  
 [0277] PRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPK  
 ATLKDSGSYFCRGLVGSKNVSSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQVSFC  
 LVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFKWRKDPQDK
- [0278] SEQ ID NO:20-0X-40共刺激结构域  
 ALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI
- [0279] SEQ ID NO:21-CD27共刺激结构域  
 QRRKYRSNKGESPVEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP
- [0280] SEQ ID NO:22-ICOS共刺激结构域  
 KKKYSSSVHDPNGEYMFMAVNTAKKSRLTDVTL
- [0281] SEQ ID NO:23-GITR共刺激结构域  
 QLGLHIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPSTEDARSCQFPPEERGERSAEE  
 KGRLGDLWV



- [0282] SEQ ID NO:24-HVEM共刺激结构域  
CVKRRKPRGDVVKVIVSVQRKRQEAEGEATVIEALQAPPDVTTVAVEE  
TIPSFTGRSPNH
- [0283] SEQ ID NO:25-TIM1共刺激结构域  
KKYFFKKEVQQLSVSFSSLQIKALQNAVEKEVQAEDNIYIENSLYATD
- [0284] SEQ ID NO:26-LFA-1共刺激结构域  
DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCYKVGFFKRNLKEKMEAGRGPNGI  
PAEDSEQLASGQEAGDPGCLKPLHEKDSESGGGKD
- [0285] SEQ ID NO:27-CD2共刺激结构域  
DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRKKQRSRRNDEELETRAHRVATE  
ERGRKPHQIPASTPQNPATSQHPPPPGHRSQAPSHRPPPPGHRVQHQPQ  
KRPPAPSGTQVHQQKGPPLPRPRVQPKPPHGAAENSLSPSSN
- [0286] SEQ ID NO:28-CD8 $\alpha$ 跨膜结构域DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
- [0287] SEQ ID NO:29-CD8 $\beta$ 跨膜结构域DITLGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLC
- [0288] SEQ ID NO:30-4-1BB跨膜结构域DIISFFLALTSTALLFLFFLTLRFSVV
- [0289] SEQ ID NO:31-CD28跨膜结构域  
DFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRS
- [0290] SEQ ID NO:32-CD34跨膜结构域 DLIALVTSGALLAVLGITGYFLMNR
- [0291] SEQ ID NO:33-CD4跨膜结构域
- [0292] DMALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVR
- [0293] SEQ ID NO:34-Fc $\epsilon$ RI  $\gamma$  跨膜结构域
- [0294] DLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLK
- [0295] SEQ ID NO:35-OX-40跨膜结构域
- [0296] DVAAAILGLGLVLGLLGPLAILLALY
- [0297] SEQ ID NO:36-CD3 $\zeta$ 跨膜结构域
- [0298] DLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVK
- [0299] SEQ ID NO:37-CD3 $\epsilon$ 跨膜结构域
- [0300] DVMSVATIVIVDICITGGLLLL VYYWSKN
- [0301] SEQ ID NO:38-CD3  $\gamma$  跨膜结构域
- [0302] DGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQD
- [0303] SEQ ID NO:39-CD3 $\delta$ 跨膜结构域
- [0304] DGIIVTDVIATLLLALGVFCFAGHET
- [0305] SEQ ID NO:40-TCR- $\alpha$ 跨膜结构域
- [0306] DVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLW
- [0307] SEQ ID NO:41-CD32跨膜结构域

[0308] **DIIVAVVIATAVAAIIVAAVVVALIYCRK**

[0309] SEQ ID NO:42-CD64跨膜结构域

[0310] **DVLFYLA VGIMFLVNTVLWVTIRKE**

[0311] SEQ ID NO:43-VEGFR2跨膜结构域

[0312] **DIILVGTAVIAMFFWLLLVILRT**

[0313] SEQ ID NO:44-FAS跨膜结构域

[0314] **DLGWLCLLLLPIPLIVWVKRK**

[0315] SEQ ID NO:45-FGFR2B跨膜结构域

[0316] **DIAIYCIGVFLIACMVVTVILCRMK**

[0317] 参考文献:

[0318] Abaricia,S.,&Hirbe,A.C. (2018).Diagnosis and Treatment of Myxoid Liposarcomas:Histology Matters.Curr Treat Options Oncol,19(12),64.

[0319] Aguiar,S.,Dias,J.,Manuel,A.M.,Russo,R.,Gois,P.M.P.,da Silva,F.A.,& Goncalves,J. (2018).Chimeric Small Antibody Fragments as Strategy to Deliver Therapeutic Payloads.Adv Protein Chem Struct Biol,112,143-182.

[0320] Amer,K.M.,Congiusta,D.V.,Thomson,J.E.,Elsamna,S.,Chaudhry,I.,Bozzo,A.,Amer,R.,Siracuse,B.,Ghert,M.,&Beebe,K.S. (2020).Epidemiology and survival of liposarcoma and its subtypes:A dual database analysis.J Clin Orthop Trauma,11(Suppl 4),S479-s484.

[0321] Arriga,R.,Caratelli,S.,Lanzilli,G.,Ottaviani,A.,Cenciarelli,C.,Sconocchia,T.,Spagnoli,G.C.,Iezzi,G.,Roselli,M.,Lauro,D.,Coppola,A.,Dotti,G.,Ferrone,S.,&Sconocchia,G. (2020).CD16-158-valine chimeric receptor T cells overcome the resistance of KRAS-mutated colorectal carcinoma cells to cetuximab.Int J Cancer,146(9),2531-2538.

[0322] Asano,N.,Susa,M.,Hosaka,S.,Nakayama,R.,Kobayashi,E.,Takeuchi,K.,Horiuchi,K.,Suzuki,Y.,Anazawa,U.,Mukai,M.,Toyama,Y.,Yabe,H.,&Morioka,H. (2012).Metastatic patterns of myxoid/round cell liposarcoma:a review of a 25-year experience.Sarcoma,2012,345161-345161.

[0323] Carmeliet,P.,&Jain,R.K. (2000).Angiogenesis in cancer and other diseases.Nature,407(6801),249-257.

[0324] Chen,X.,Higgins,J.,Cheung,S.T.,Li,R.,Mason,V.,Montgomery,K.,Fan,S.T.,van de Rijn,M.,&So,S. (2004).Novel endothelial cell markers in hepatocellular carcinoma.Mod Pathol,17(10),1198-1210.

[0325] Cree,I.A.,Uttley,L.,Buckley Woods,H.,Kikuchi,H.,Reiman,A.,Harnan,S.,Whiteman,B.L.,Philips,S.T.,Messenger,M.,Cox,A.,Teare,D.,Sheils,O.,&Shaw,J. (2017).The evidence base for circulating tumour DNA blood-based biomarkers for the early detection of cancer:a systematic mapping review.BMC Cancer,17(1),697.

- [0326] David,G.S.,&Reisfeld,R.A. (1974).Protein iodination with solid state lactoperoxidase.Biochemistry,13(5),1014-1021.
- [0327] Dodd,L.G. (2012).Update on liposarcoma:a review for cytopathologists.Diagn Cytopathol,40(12),1122-1131.
- [0328] Fritchie,K.J.,Goldblum,J.R.,Tubbs,R.R.,Sun,Y.,Carver,P.,Billings,S.D.,&Rubin,B.P. (2012).The Expanded Histologic Spectrum of Myxoid Liposarcoma With an Emphasis on Newly Described Patterns:Implications for Diagnosis on Small Biopsy Specimens.American Journal of Clinical Pathology,137(2),229-239.
- [0329] Ge,Z.,Helmijr,J.C.A.,Jansen,M.P.H.M.,Boor,P.P.C.,Noordam,L.,Peppelenbosch,M.,Kwekkeboom,J.,Kraan,J.,&Sprengers,D. (2021).Detection of oncogenic mutations in paired circulating tumor DNA and circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma.Translational Oncology,14(7),101073.
- [0330] Giepmans,B.N.,Adams,S.R.,Ellisman,M.H.,&Tsien,R.Y. (2006).The fluorescent toolbox for assessing protein location and function.Science,312(5771),217-224.
- [0331] Haniball,J.,Sumathi,V.P.,Kindblom,L.G.,Abudu,A.,Carter,S.R.,Tillman,R.M.,Jeys,L.,Spooner,D.,Peake,D.,&Grimer,R.J. (2011).Prognostic Factors and Metastatic Patterns in Primary Myxoid/Round-Cell Liposarcoma.Sarcoma,2011,538085.
- [0332] Hemminger,J.A.,&Iwenofu,O.H. (2013).NY-ESO-1 is a sensitive and specific immunohistochemical marker for myxoid and round cell liposarcomas among related mesenchymal myxoid neoplasms.Mod Pathol,26(9),1204-1210.
- [0333] Henze,J.,&Bauer,S. (2013).Liposarcomas.Hematol Oncol Clin North Am,27(5),939-955.
- [0334] Hippo,Y.,Watanabe,K.,Watanabe,A.,Midorikawa,Y.,Yamamoto,S.,Ihara,S.,Tokita,S.,Iwanari,H.,Ito,Y.,Nakano,K.,Nezu,J.,Tsunoda,H.,Yoshino,T.,Ohizumi,I.,Tsuchiya,M.,Ohnishi,S.,Makuuchi,M.,Hamakubo,T.,Kodama,T.,&Aburatani,H. (2004).Identification of soluble NH2-terminal fragment of glypican-3 as a serological marker for early-stage hepatocellular carcinoma.Cancer Res,64(7),2418-2423.
- [0335] Ho,M.,&Kim,H. (2011).Glypican-3:a new target for cancer immunotherapy.Eur J Cancer,47(3),333-338.
- [0336] Hui,J.Y. (2016).Epidemiology and Etiology of Sarcomas.Surg Clin North Am,96(5),901-914.
- [0337] Jena,B.,Dotti,G.,&Cooper,L.J. (2010).Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor.Blood,116(7),1035-1044.
- [0338] Jo,V.Y.,&Fletcher,C.D.M. (2014).WHO classification of soft tissue

tumours:an update based on the 2013(4th)edition.Pathology,46(2),95-104.

[0339] Kim,J.H.,Lee,S.R.,Li,L.H.,Park,H.J.,Park,J.H.,Lee,K.Y.,Kim,M.K.,Shin,B.A.,&Choi,S.Y. (2011).High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines,zebrafish and mice.PLoS One,6(4),e18556.

[0340] Kuo,M.L.,Sutkowski,N.,Ron,Y.,&Dougherty,J.P. (1993).Efficient gene transfer into primary murine lymphocytes obviating the need for drug selection.Blood,82(3),845-852.

[0341] Lee,A.T.J.,Thway,K.,Huang,P.H.,&Jones,R.L. (2018).Clinical and Molecular Spectrum of Liposarcoma.J Clin Oncol,36(2),151-159.

[0342] Leong,A.S. (1996).Microwaves in diagnostic immunohistochemistry.Eur J Morphol,34(5),381-383.

[0343] Low,W.S.,&Wan Abas,W.A. (2015).Benchtop technologies for circulating tumor cells separation based on biophysical properties.Biomed Res Int,2015,239362.

[0344] Lu,S.X.,Huang,Y.H.,Liu,L.L.,Zhang,C.Z.,Yang,X.,Yang,Y.Z.,Shao,C.K.,Li,J.M.,Xie,D.,Zhang,X.,Jain,D.,&Yun,J.P. (2021). $\alpha$ -Fetoprotein mRNA in situ hybridisation is a highly specific marker of hepatocellular carcinoma:a multi-centre study.Br J Cancer,124(12),1988-1996.

[0345] Mann,R.,Mulligan,R.C.,&Baltimore,D. (1983).Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus.Cell,33(1),153-159.

[0346] Maravelia,P.,Silva,D.N.,Rovesti,G.,Chrobok,M.,**Stål**,P.,Lu,Y.C.,& Pasetto,A. (2021).Liquid Biopsy in Hepatocellular Carcinoma:Opportunities and Challenges for Immunotherapy.Cancers(Basel),13(17).

[0347] Markowitz,D.,Goff,S.,&Bank,A. (1988).A safe packaging line for gene transfer:separating viral genes on two different plasmids.J Virol,62(4),1120-1124.

[0348] Nygren,H. (1982).Conjugation of horseradish peroxidase to Fab fragments with different homobifunctional and heterobifunctional cross-linking reagents.A comparative study.J Histochem Cytochem,30(5),407-412.

[0349] O'Sullivan,M.J.,&Marks,V. (1981).Methods for the preparation of enzyme-antibody conjugates for use in enzyme immunoassay.Methods Enzymol,73 (Pt B),147-166.

[0350] Ono,A.,Fujimoto,A.,Yamamoto,Y.,Akamatsu,S.,Hiraga,N.,Imamura,M.,Kawaoka,T.,Tsuge,M.,Abe,H.,Hayes,C.N.,Miki,D.,Furuta,M.,Tsunoda,T.,Miyano,S.,Kubo,M.,Aikata,H.,Ochi,H.,Kawakami,Y.I.,Arihiro,K.,Ohdan,H.,Nakagawa,H.,& Chayama,K. (2015).Circulating Tumor DNA Analysis for Liver Cancers and Its Usefulness as a Liquid Biopsy.Cell Mol Gastroenterol Hepatol,1(5),516-534.

- [0351] Pain,D.,&Surolia,A. (1981).Preparation of protein A-peroxidase monoconjugate using a heterobifunctional reagent,and its use in enzyme immunoassays.J Immunol Methods,40(2),219-230.
- [0352] Patil,M.A.,Chua,M.S.,Pan,K.H.,Lin,R.,Lih,C.J.,Cheung,S.T.,Ho,C.,Li,R.,Fan,S.T.,Cohen,S.N.,Chen,X.,&So,S. (2005).An integrated data analysis approach to characterize genes highly expressed in hepatocellular carcinoma.Oncogene,24(23),3737-3747.
- [0353] Ponziani,S.,Di Vittorio,G.,Pitari,G.,Cimini,A.M.,Ardini,M.,Gentile,R.,Iacobelli,S.,Sala,G.,Capone,E.,Flavell,D.J.,Ippoliti,R.,&Giansanti,F. (2020).Antibody-Drug Conjugates:The New Frontier of Chemotherapy.Int J Mol Sci,21(15).
- [0354] Regina,C.,&Hettmer,S. (2019).Myxoid liposarcoma:it's a hippo's world.EMBO Mol Med,11(5).
- [0355] Sanfilippo,R.,Dei Tos,A.P.,&Casali,P.G. (2013).Myxoid liposarcoma and the mammalian target of rapamycin pathway.Current Opinion in Oncology,25(4).
- [0356] Shank,B.R.,Do,B.,Sevin,A.,Chen,S.E.,Neelapu,S.S.,&Horowitz,S.B. (2017).Chimeric Antigen Receptor T Cells in Hematologic Malignancies.Pharmacotherapy,37(3),334-345.
- [0357] Singhi,A.D.,&Montgomery,E.A. (2011).Liposarcomas.Surg Pathol Clin,4(3),963-994.
- [0358] Suarez-Kelly,L.P.,Baldi,G.G.,&Gronchi,A. (2019).Pharmacotherapy for liposarcoma:current state of the art and emerging systemic treatments.Expert Opinion on Pharmacotherapy,20(12),1503-1515.
- [0359] Wang,F.,Flanagan,J.,Su,N.,Wang,L.C.,Bui,S.,Nielson,A.,Wu,X.,Vo,H.T.,Ma,X.J.,&Luo,Y. (2012).RNAscope:a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed,paraffin-embedded tissues.J Mol Diagn,14(1),22-29.
- [0360] Wang,S.,Chen,N.,Chen,Y.,Sun,L.,Li,L.,&Liu,H. (2018).Elevated GPC3 level promotes cell proliferation in liver cancer.Oncol Lett,16(1),970-976.
- [0361] Wang,Y.,Shen,Z.,Zhu,Z.,Han,R.,&Huai,M. (2011).Clinical values of AFP, GPC3 mRNA in peripheral blood for prediction of hepatocellular carcinoma recurrence following OLT:AFP,GPC3 mRNA for prediction of HCC.Hepat Mon,11(3),195-199.
- [0362] Weber,W.A. (2009).Assessing tumor response to therapy.J Nucl Med,50Suppl 1,1s-10s.
- [0363] Yi,B.,Wu,T.,Zhu,N.,Huang,Y.,Yang,X.,Yuan,L.,Wu,Y.,Liang,X.,&Jiang,X. (2021).The clinical significance of CTC enrichment by GPC3-IML and its genetic analysis in hepatocellular carcinoma.J Nanobiotechnology,19(1),74.
- [0364] Zhang,J.,Campbell,R.E.,Ting,A.Y.,&Tsien,R.Y. (2002).Creating new fluorescent probes for cell biology.Nature Reviews Molecular Cell Biology,3

(12), 906-918.

[0365] Zhang, J., & Wang, L. (2019). The Emerging World of TCR-T Cell Trials Against Cancer: A Systematic Review. *Technol Cancer Res Treat*, 18, 1533033819831068.

[0366] Zhou, F., Shang, W., Yu, X., & Tian, J. (2018). Glypican-3: A promising biomarker for hepatocellular carcinoma diagnosis and treatment. *Med Res Rev*, 38(2), 741-767.

[0367] 其他实施方案

[0368] 本说明书所公开的所有特征可以任何组合方式组合。本说明书所公开的每个特征可由用于相同、等同或类似目的替代特征代替。因此,除非另有明确说明,否则所公开的每个特征仅仅是等同或类似特征的通用系列的示例。

[0369] 通过以上描述,本领域技术人员可容易地确定本公开的基本特征,并且在不脱离其实质和范围的情况下,可对本公开进行各种改变和修改以使其适应各种用途和条件。因此,其他实施方案也落入权利要求书内。

[0370] 等同物

[0371] 虽然本文已经描述和例示了若干发明性实施方案,但本领域的普通技术人员将容易地设想用于执行本文所述的功能和/或获得本文所述的结果和/或一个或多个优点的多种其他手段和/或结构,并且此类变化和/或修改中的每一者被认为在本文所述的发明性实施方案的范围内。更一般地,本领域技术人员将容易地理解,本文所述的所有参数、尺寸、材料和配置是示例性的,并且实际的参数、尺寸、材料和/或配置将取决于使用本发明教导的一个或多个具体应用。本领域技术人员将仅使用常规实验就将认识到或能够确定本文所述具体发明实施方案的许多等同物。因此,应当理解,前述实施方案仅以示例的方式呈现,并且在所附权利要求及其等同物的范围内,可以不同于具体描述和要求保护的方式来实践发明性实施方案。本公开的发明性实施方案涉及本文所述的每个单独的特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法。此外,如果此类特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法不是相互矛盾的,则两个或更多个此类特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法的任何组合都包括在本公开的发明范围内。

[0372] 如本文所定义和使用的定义应被理解为控制字典定义、以引用方式并入的文献中的定义和/或所定义术语的普通含义。

[0373] 本文所公开的所有参考文献、专利和专利申请均以引用方式并入本文,这些文献各自引用的主题在一些情况下可涵盖文件全文。

[0374] 除非明确地相反指明,否则如本说明书和权利要求书中所使用的不定冠词“一”和“一个”应当理解为意指“至少一个”。

[0375] 如本说明书和权利要求书中所使用的短语“和/或”应当理解为意指如此结合的要素:即,在一些情况下联合存在并且在其他情况下分离存在的要素中的“任一者或两者”。用“和/或”列出的多个要素应当以相同的方式来解释,即,如此结合的要素中的“一者或多者”。除了“和/或”条款具体指出的要素之外,还可任选地存在其他要素,无论与具体指出的那些要素相关还是不相关。因此,作为非限制性示例,“A和/或B”的提及在与开放式语言诸如“包含/包括”结合使用时,在一个实施方案中,可仅指A(任选地包括除B之外的元素);在

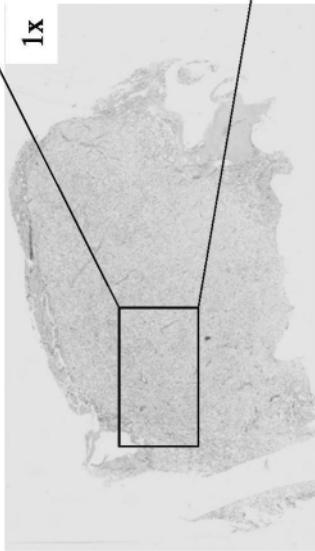
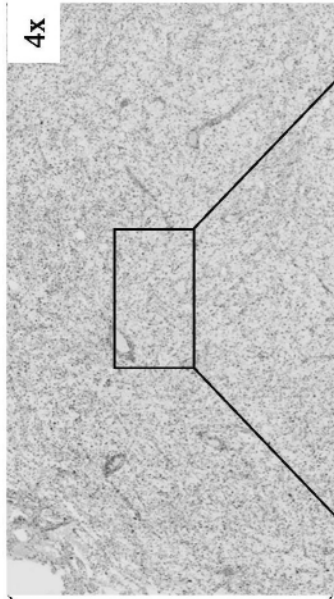
另一个实施方案中,仅指B(任选地包括除A之外的元素);在又一个实施方案中,指A和B两者(任选地包括其他元素);等等。

[0376] 如本说明书和权利要求书中所使用的,“或”应当理解为具有与如上所定义的“和/或”相同的含义。例如,当分离列表中的项目时,“或”或“和/或”应当解释为包括性的,即,包括多个要素或要素列表中的至少一个,但也包括多于一个,以及任选地,额外的未列出的项目。仅有明确地相反指明的术语,诸如“仅一个”或“恰好一个”,或者当在权利要求中使用,“由……组成”将指包括多个要素或要素列表中的恰好一个要素。通常,当前面有排他性的术语,诸如“任一者”、“……中的一者”、“……中的仅一者”或“……中的恰好一者”时,如本文所用的术语“或”应当仅解释为指示排他性的替代(即,“一者或另一者,但不是两者”)。当在权利要求中使用,“基本上由……组成”应当具有在专利法领域中使用的其普通含义。

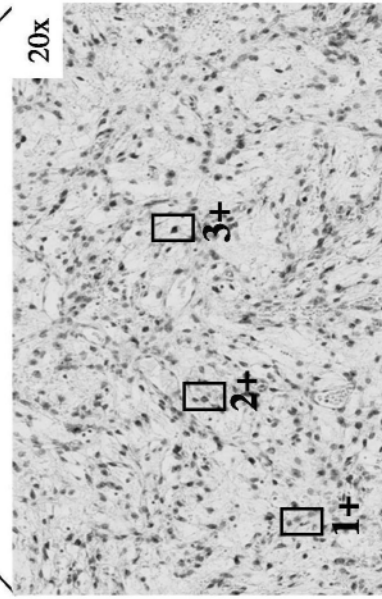
[0377] 如本说明书和权利要求书中所使用的,在提及一个或多个要素的列表时,短语“至少一个/至少一者”应当理解为表示选自要素列表中的任何一个或多个要素的至少一个要素,但不一定包括要素列表内具体列出的各个要素和每个要素中的至少一个要素,并且不排除要素列表中的要素的任何组合。除了短语“至少一个/至少一者”所指的要素列表内具体指出的要素之外,该定义还允许任选地存在的要素,无论与具体指出的那些要素相关还是不相关。因此,作为非限制性示例,“A和B中的至少一者”(或者等效地,“A或B中的至少一者”,或者等效地,“A和/或B中的至少一者”),在一个实施方案中,可以指至少一个A,任选地包括多于一个A,其中B不存在(并且任选地包括除B之外的要素);在另一个实施方案中,可以指至少一个B,任选地包括多于一个B,其中A不存在(并且任选地包括除A之外的要素);在又一个实施方案中,指至少一个A,任选地包括多于一个A,和至少一个B,任选地包括多于一个B(并且任选地包括其他要素);等等。

[0378] 还应当理解,除非明确地相反指明,否则在本文要求保护的包括多于一个步骤或动作的任何方法中,方法的步骤或动作的顺序不一定受限于所叙述的方法的步骤或动作的顺序。

**FIG. 1B**



**FIG. 1A**



**FIG. 1C**



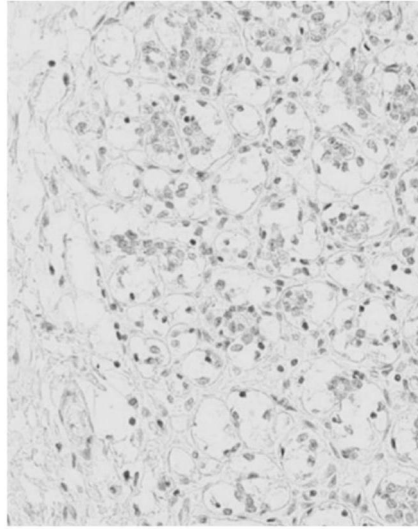


FIG. 2A

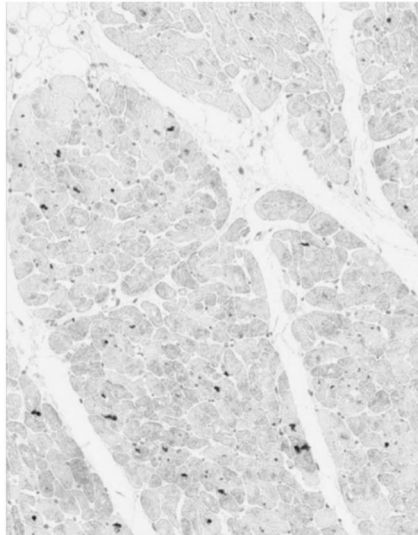


FIG. 2B

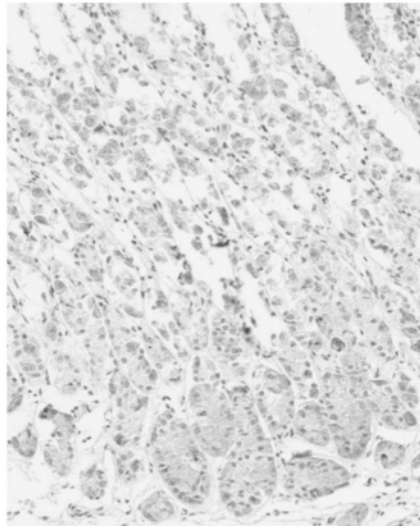


FIG. 2C

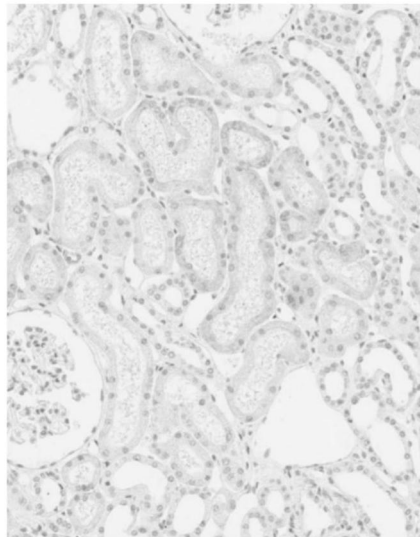


FIG. 2D

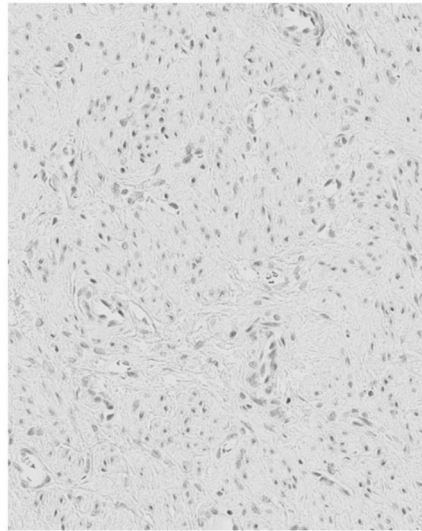


FIG.3A

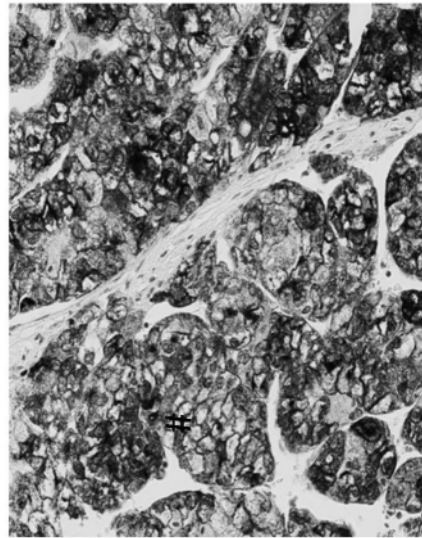


FIG.3B

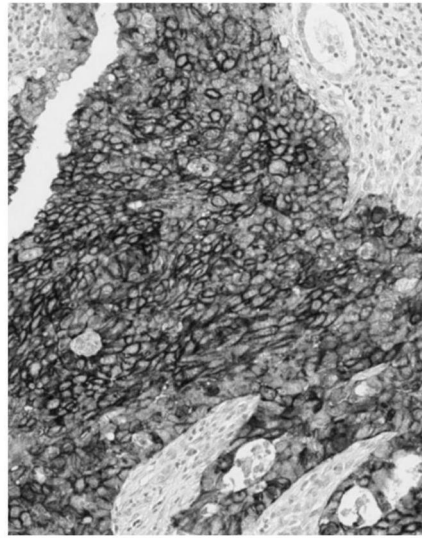


FIG.3C

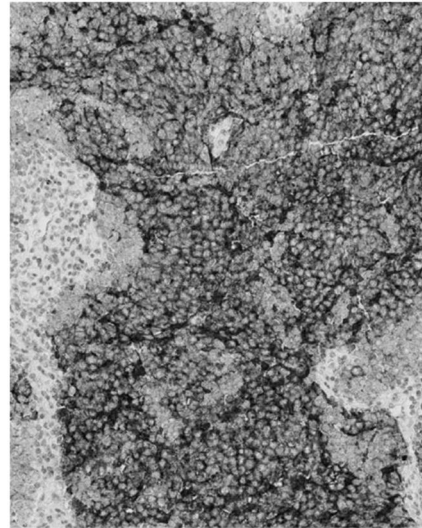


FIG.3D

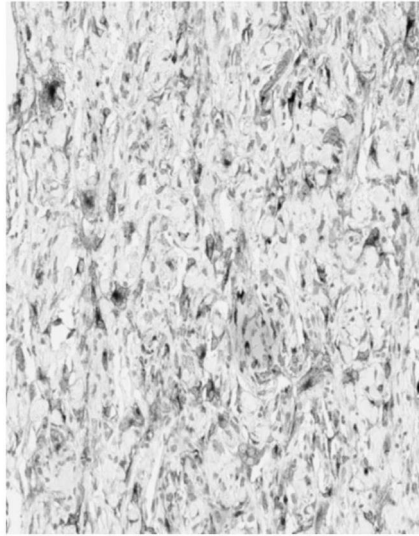


FIG. 3E

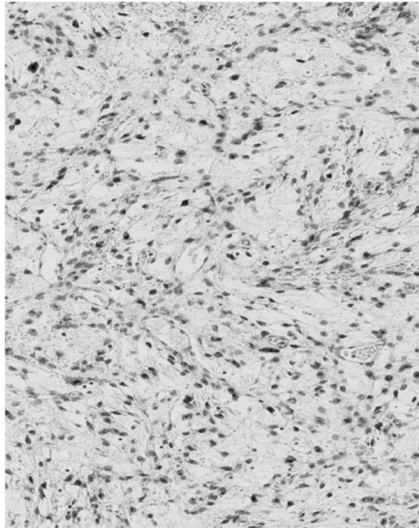


FIG. 4A

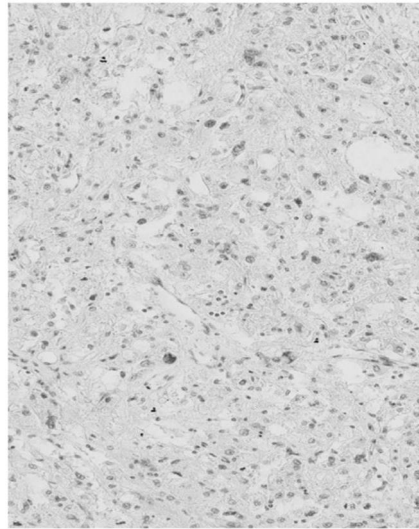


FIG.4B

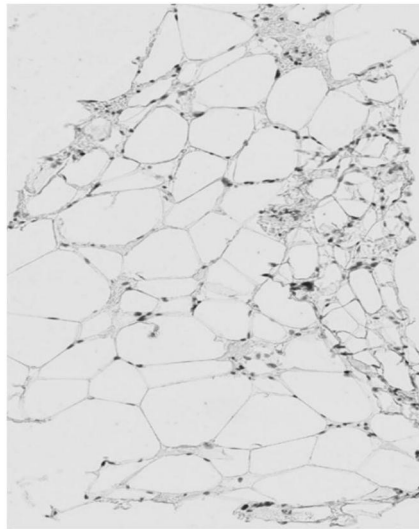


FIG.4C



FIG.4D