



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109862918 A

(43)申请公布日 2019.06.07

(21)申请号 201780035366.4

J·科尔曼

(22)申请日 2017.04.10

(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事

(30)优先权数据

务所(普通合伙) 11277

62/320,549 2016.04.10 US

代理人 刘新宇 李茂家

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(51)Int.Cl.

2018.12.06

A61K 45/06(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

A61K 31/409(2006.01)

PCT/IL2017/050440 2017.04.10

A61K 31/675(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

A61K 31/7068(2006.01)

W02017/179053 EN 2017.10.19

A61K 31/7135(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(71)申请人 耶达研究及发展有限公司

地址 以色列雷霍沃特

申请人 纪念斯隆凯特琳癌症中心

(72)发明人 A·舍茨 Y·所罗门 L·阿格美

R·哈姆瑞 D·普瑞斯 K·金姆

权利要求书4页 说明书22页 附图44页

(54)发明名称

包括细菌叶绿素衍生物的用于治疗癌症的
联合疗法

(57)摘要

在用于癌症的联合疗法中使用的抗髓源抑制细胞药剂(“抗MDSC药剂”)和细菌叶绿素衍生物(下文中“Bchl-D”),其中所述抗MDSC药剂和所述Bchl-D依次给药并且所述Bchl-D的给药之后是光动力疗法(PDT)或血管靶向PDT(VTP)。

1. 一种在用于癌症的联合疗法中使用的抗MDSC药剂(下文中“抗MDSC药剂”)和细菌叶绿素衍生物(下文中“Bchl-D”),其中所述抗MDSC药剂和所述Bchl-D依次给药并且所述Bchl-D的给药之后是光动力疗法(PDT)。

2. 根据权利要求1所述的使用的抗MDSC药剂和Bchl-D,其中与在各自单独给药时所述抗MDSC药剂或所述Bchl-D接着是PDT的效果相比,所述联合疗法具有增强的治疗效果。

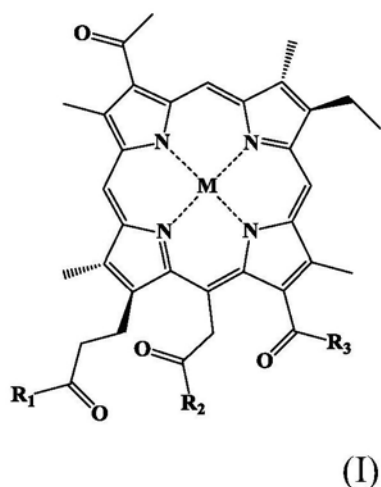
3. 根据权利要求2所述的使用的抗MDSC药剂和Bchl-D,其中所述增强的治疗效果为协同治疗效果。

4. 根据权利要求1至3任一项所述的使用的抗MDSC药剂和Bchl-D,其中所述抗MDSC药剂选自吉西他滨、5-氟尿嘧啶(5-FU)、顺铂、紫杉醇、环磷酰胺、舒尼替尼、例如SC-58236和SC-58125等环氧化酶2(COX-2)抑制剂、例如唑来膦酸等双膦酸盐或例如阿伦膦酸盐等氨基双膦酸盐、全反式视黄酸(ATRA)、维生素D3、维生素A、KIT特异性抗体、硝基阿司匹林衍生物、例如甲基巴多索隆(已知为CDDO-Me)等合成三萜系衍生物、和例如西地那非和他达拉非等磷酸二酯酶-5(PDE-5)抑制剂。

5. 根据权利要求4所述的使用的抗MDSC药剂和Bchl-D,其中所述抗MDSC药剂为吉西他滨或环磷酰胺。

6. 根据权利要求1至5任一项所述的使用的抗MDSC药剂和Bchl-D,其中所述Bchl-D为任选与含RGD肽或RGD-肽模拟物残基缀合的阴离子细菌叶绿素衍生物。

7. 根据权利要求6所述的使用的抗MDSC药剂和Bchl-D,其中阴离子Bchl-D具有式I:



其中

M表示2H或Pd;

R₁为O-R₄或-NHR₅,其中R₄为H、H⁺、铵基或例如Na⁺或K⁺等一价金属阳离子,并且R₅为含RGD肽或RGD肽模拟物残基;

R₂为-O-C₁-C₆烷基,优选甲基;

R₃为-NH-(CH₂)_n-SO₃⁻R₆⁺,其中n为2或3且R₆⁺为例如Na⁺或K⁺等一价金属阳离子;和其药学上可接受的盐和光学异构体。

8. 根据权利要求7所述的使用的抗MDSC药剂和Bchl-D,其中所述阴离子Bchl-D未缀合至含RGD肽或RGD肽模拟物残基,如本文中指定为WST11和STL-7012的Bchl-D。

9. 根据权利要求8所述的使用的抗MDSC药剂和Bchl-D,其中所述PDT为血管靶向PDT

(VTP), 并且, 在完成非缀合的Bchl-D的给药之后, 在短时间如0-30min照射要治疗的区域。

10. 根据权利要求7所述的使用的抗MDSC药剂和Bchl-D, 其中式I的阴离子Bchl-D缀合至含RGD肽或RGD肽模拟物残基。

11. 根据权利要求10所述的使用的抗MDSC药剂和Bchl-D, 其中式I的阴离子Bchl-D缀合至环状的含RGD肽或RGD肽模拟物残基, 如本文中指定为STL-6014、STL-6033、STL-6038和STL-6068的Bchl-D。

12. 根据权利要求8所述的使用的抗MDSC药剂和Bchl-D, 其中所述PDT为组织靶向的, 并且, 在给予缀合的Bchl-D之后, 照射要治疗的局部至少4h, 优选6h。

13. 根据权利要求8所述的使用的抗MDSC药剂和Bchl-D, 其中PDT或VTP治疗包括所述Bchl-D的单次给药接着是要治疗的局部的照射, 并且抗MDSC治疗包括所述抗MDSC药剂以各种确定的时间间隔的数次给药。

14. 根据权利要求13所述的使用的抗MDSC药剂和Bchl-D, 其中所述抗MDSC药剂在所述PDT或VTP治疗之前给药一次并且此后以确定的时间间隔给药数次。

15. 根据权利要求13所述的使用的抗MDSC药剂和Bchl-D, 其中所述抗MDSC药剂在所述PDT或VTP治疗之后以确定的时间间隔给药数次。

16. 根据权利要求13至15任一项所述的使用的抗MDSC药剂和Bchl-D, 其中所述抗MDSC治疗包括所述抗MDSC药剂以5至12天以上的确定的时间间隔给药4至10次, 并且其中两个这样的确定的间隔之间的间隔可以比各确定的间隔长。

17. 根据权利要求13至16任一项所述的使用的抗MDSC药剂和Bchl-D, 其中所述抗MDSC药剂为吉西他滨并且PDT用Bchl-D STL-6014来进行。

18. 根据权利要求13至16任一项所述的使用的抗MDSC药剂和Bchl-D, 其中所述抗MDSC药剂为吉西他滨并且VTP用Bchl-D WST11来进行。

19. 根据权利要求13至16任一项所述的使用的抗MDSC药剂和Bchl-D, 其中所述抗MDSC药剂为环磷酰胺并且VTP用Bchl-D WST11来进行。

20. 根据权利要求1至19任一项所述的使用的抗MDSC药剂和Bchl-D, 其中所述抗MDSC药剂以低剂量给药, 例如比常规的单药化疗中的药剂的常规剂量低3或4倍的剂量。

21. 根据权利要求1至20任一项所述的在用于癌症的联合疗法中使用的抗MDSC药剂和Bchl-D, 其中要治疗的癌症为原发性癌症实体瘤和转移, 如黑素瘤、肾细胞癌、结肠肿瘤、乳腺肿瘤、肺肿瘤、前列腺肿瘤、膀胱肿瘤、脑肿瘤、胰腺腺癌或头颈部肿瘤。

22. 一种用于癌症的治疗的在与Bchl-D的联合疗法中使用的抗MDSC药剂, 其中所述抗MDSC药剂和所述Bchl-D依次给药并且所述Bchl-D的给药之后是光动力疗法(PDT)。

23. 一种用于癌症的治疗的在与抗MDSC药剂的联合疗法中使用的Bchl-D, 其中所述抗MDSC药剂和所述Bchl-D依次给药并且所述Bchl-D的给药之后是光动力疗法(PDT)。

24. 根据权利要求22所述的使用的抗MDSC药剂或根据权利要求23所述的使用的Bchl-D, 其中与在它们各自单独给药时所述抗MDSC药剂或所述Bchl-D接着是PDT的效果相比, 所述联合疗法具有增强的治疗效果。

25. 根据权利要求24所述的使用的抗MDSC药剂或Bchl-D, 其中所述增强的治疗效果为协同治疗效果。

26. 一种用于通过联合疗法治疗癌症的方法, 其包括对有需要的患者给予: (i) 治疗有

效量的抗髓源抑制细胞 (MDSC) 药剂 (下文中“抗MDSC药剂”); 和 (ii) 治疗有效量的细菌叶绿素衍生物 (Bchl-D), 接着是光动力疗法 (PDT) (下文中“Bchl-D PDT”)。

27. 根据权利要求26所述的方法, 其中与各自单独给药的所述抗MDSC药剂或所述Bchl-D PDT的效果相比, 所述联合疗法提供增强的治疗效果。

28. 根据权利要求27所述的方法, 其中所述联合疗法具有协同治疗效果。

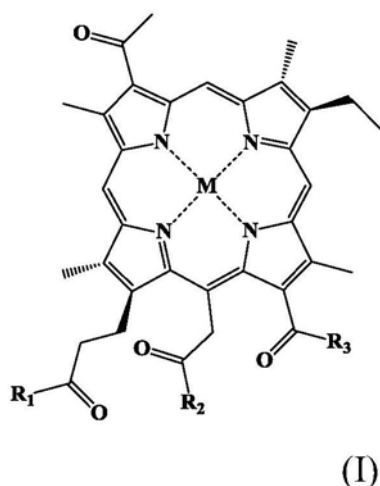
29. 根据权利要求26所述的方法, 其中依次给予所述抗MDSC药剂和所述Bchl-D PDT。

30. 根据权利要求26所述的方法, 其中所述抗MDSC药剂选自由吉西他滨、5-氟尿嘧啶 (5-FU)、顺铂、紫杉醇、环磷酰胺、舒尼替尼、例如SC-58236和SC-58125等环氧化酶2 (COX-2) 抑制剂、例如唑来膦酸等双膦酸盐或例如阿伦膦酸盐等氨基双膦酸盐、全反式视黄酸 (ATRA)、维生素D3、维生素A、KIT特异性抗体、硝基阿司匹林衍生物、例如甲基巴多索隆 (已知为CDDO-Me) 等合成三萜系衍生物、和例如西地那非和他达拉非等磷酸二酯酶-5 (PDE-5) 抑制剂组成的组。

31. 根据权利要求30所述的方法, 其中所述抗MDSC药剂为吉西他滨或环磷酰胺。

32. 根据权利要求26所述的方法, 其中所述Bchl-D为任选与含RGD肽或RGD-肽模拟物残基缀合的阴离子细菌叶绿素衍生物。

33. 根据权利要求32所述的方法, 其中阴离子Bchl-D具有式I:



其中

M表示2H或Pd;

R₁为O-R₄或-NHR₅, 其中R₄为H、H⁺、铵基或例如Na⁺或K⁺等一价金属阳离子, 并且R₅为含RGD肽或RGD肽模拟物残基;

R₂为-O-C₁-C₆烷基, 优选甲基;

R₃为-NH-(CH₂)_n-SO₃-R₆⁺, 其中n为2或3且R₆⁺为例如Na⁺或K⁺等一价金属阳离子; 和其药学上可接受的盐和光学异构体。

34. 根据权利要求33所述的方法, 其中式I的阴离子Bchl-D未缀合至含RGD肽或RGD肽模拟物残基, 如本文中指定为WST11和STL-7012的Bchl-D。

35. 根据权利要求34所述的方法, 其中所述PDT为血管靶向PDT (VTP), 并且在完成非缀合的Bchl-D的给药之后, 在短时间如0-30min照射要治疗的区域。

36. 根据权利要求33所述的方法, 其中式I的阴离子Bchl-D缀合至含RGD肽或RGD肽模拟

物残基。

37. 根据权利要求36所述的方法, 其中式I的阴离子Bchl-D缀合至环状的含RGD肽或RGD肽模拟物残基, 如本文中指定为STL-6014、STL-6033、STL-6038和STL-6068的Bchl-D。

38. 根据权利要求26所述的方法, 其中所述PDT是组织靶向的, 并且, 在给予缀合的Bchl-D之后, 照射要治疗的局部至少4h, 优选6h。

39. 根据权利要求26所述的方法, 其中PDT或VTP治疗包括所述Bchl-D的单次给药接着是照射要治疗的局部, 并且抗MDSC治疗包括所述抗MDSC药剂以各种确定的时间间隔的数次给药。

40. 根据权利要求39所述的方法, 其中所述抗MDSC药剂在所述PDT或VTP治疗之前给药一次并且此后以确定的时间间隔给药数次。

41. 根据权利要求39所述的方法, 其中所述抗MDSC药剂以确定的时间间隔在所述PDT或VTP治疗之后给药数次。

42. 根据权利要求40或41所述的方法, 其中所述抗MDSC治疗包括所述抗MDSC药剂以5至10天以上的确定的时间间隔给药4至10次, 并且其中两个这样的确定的间隔之间的间隔可以比各确定的间隔长。

43. 根据权利要求26所述的方法, 其中所述抗MDSC药剂为吉西他滨并且PDT用Bchl-D STL-6014来进行。

44. 根据权利要求26所述的方法, 其中所述抗MDSC药剂为吉西他滨并且VTP用Bchl-D WST11来进行。

45. 根据权利要求26所述的方法, 其中所述抗MDSC药剂为环磷酰胺并且VTP用Bchl-D WST11来进行。

46. 根据权利要求26所述的方法, 其中所述抗MDSC药剂以低剂量给药, 例如比常规的单药化疗中的所述药剂的常规剂量低3或4倍的剂量。

包括细菌叶绿素衍生物的用于治疗癌症的联合疗法

技术领域

[0001] 本发明涉及癌症的治疗及其联合疗法。

[0002] 定义和缩写:Bchl:细菌叶绿素;Bchl-D:细菌叶绿素衍生物;BLI,生物发光成像;Bpheid:细菌脱镁叶绿甲酯酸a(源自没有中心金属原子的Bphe的没有C-17²的羧酸);CTX、CY:环磷酸胺;DC:树突细胞;DDW,双蒸水;GEM:健择、吉西他滨;GFP,绿色荧光蛋白;IVIS,活体光学成像系统(In Vivo Optical Imaging System);Luc,荧光素,荧光素酶;IVIS,活体光学成像系统;luc,荧光素酶;Ly6G,淋巴细胞抗原6复合物为由髓源细胞表达的21-25kD的连接糖基磷脂酰肌醇(GPI)的分化抗原;Ly6G,淋巴细胞抗原6复合物为由髓源细胞表达的21-25kD的连接糖基磷脂酰肌醇(GPI)的分化抗原;MDSC:髓源抑制细胞(myeloid-derived suppressor cell);红螺菌菌绿素(Rhodobacteriochlorin):四环7,8,17,18-四氢卟啉,在17位具有-CH₂CH₂COOH基团,在13位具有-COOH,在2位、7位、12位、8位具有甲基,并且在3位和8位具有乙基;Pd-Bpheid:Pd-细菌脱镁叶绿甲酯酸a;NIR:近红外;PDT:光动力疗法;RGD-4C:环状九肽CDCRGDCFC-NH₂;ROS:活性氧类;VTP:血管靶向PDT。

背景技术

[0003] 靶向癌症和免疫抑制细胞的治疗方式的组合构成了用于控制原发性肿瘤生长和用于预防转移性生长的有前景的途径。

[0004] 髓源抑制细胞(MDSC)为由它们的骨髓起源、未成熟状态和有效地抑制T细胞应答的能力定义的异质细胞群体。它们在健康的个体中调节免疫应答和组织修复并且所述群体在发炎、感染和癌症期间迅速地扩散。MDSC大致地由两个亚群构成一粒细胞样(G-MDSC)和单核细胞样(M-MDSC),其在形态学上分别与粒细胞和单核细胞类似(Gabrilovich,2017)。

[0005] MDSC在癌症中显示有效的免疫抑制活性。MDSC浸润肿瘤并且强烈地抑制癌症特异性细胞毒性T细胞(Gabrilovich,2017)。肿瘤已经演进为“利用(harness)”MDSC的这些性质以通过对血管生成和转移的影响来抑制抗肿瘤免疫并且在周围环境中和在远端部位处促进肿瘤扩散。抑制MDSC活性的新的疗法对于通过免疫应答有效控制肿瘤细胞是至关重要的(Condamine等人,2015;Diaz-Montero等人,2009;Gabrilovich,2017;Marvel和Gabrilovich,2015;Najjar和Finke,2013;Quail,2013#18)。

[0006] 单或多形核类型的髓源抑制细胞(MDSC)通过借助一氧化氮和过氧化亚硝酸盐的产生而中和细胞毒性T细胞来促进免疫抑制并且由此癌细胞从抗肿瘤免疫逃逸(evasion)(Condamine等人,2015;Gabrilovich和Nagaraj,2009)。此外,发生髓系祖细胞(myeloid progenitor cell)向MDSC的早期分化,这是因为肿瘤相关抗原(TAA)的专门呈递、固有免疫和开始适应性免疫应答所需的树突细胞成熟(Gabrilovich,2017)。发现乳腺癌、前列腺癌、肺癌、肾癌和其它癌症从早期局部性阶段向扩散和转移的进展与MDSC的增殖(在患者的外周、脾脏、淋巴结和肿瘤微环境中(Brusa等人,2013;Condamine等人,2015;Gabrilovich,2017;Gabrilovich和Nagaraj,2009;Najjar和Finke,2013))紧密相关。MDSC升高通过阻断CD4和CD8T细胞活化而增强免疫抑制(Gabrilovich,2017)。该升高主要与细胞因子如G-

CSF、GM-CSF、IL-6和来自癌细胞的其它细胞因子的分泌接着是通过IL-6和来自MDSC的其它的自分泌刺激相关 (Gabrilovich和Nagaraj,2009)。在增加的浓度下,MDSC从免疫监视和毒性对原发性肿瘤和循环癌细胞提供保护并且帮助建立肿瘤壁龛 (niche)。

[0007] 目前正在研究抑制MDSC的多种方法。可以将这些大致地分类为以下方法:(a)促进MDSC分化为成熟的、非抑制细胞(全反式视黄酸(ATRA)、维生素D)(Najjar和Finke,2013), (b)降低MDSC水平(舒尼替尼、吉西他滨(GEM)、氟尿嘧啶(5-FU)、甲基巴多索隆(CDDO-Me)(Najjar和Finke,2013),或者(c)在功能上抑制MDSC(磷酸二酯酶5型(PDE-5)抑制剂、环氧化酶2(COX-2)抑制剂)(Najjar和Finke,2013)。

[0008] 发现在临床领域用于多种癌症的治疗的吉西他滨(GEM、健择)、氟尿嘧啶(5-FU)和其它FDA批准的化疗剂在携带肿瘤的小鼠和人类二者中选择性地降低MDSC的含量(Le等人,2009;Suzuki等人,2005;Vincent等人,2010)。然而,尽管延迟了癌症进展,但是发现这些药物均不显著地增加发生转移的时间和患者存活率(例如在胰腺癌的治疗中)。

[0009] 显示通常的光动力疗法(PDT)和特别使用新型细菌叶绿素衍生物(下文中Bchl-D)的血管靶向PDT(VTP)在不同的靶点选择性地消融局部实体瘤(WO 00/33833;WO 2004/045492)。特别地,在成功的临床试验(Azzouzi等人,2013,2017;Eymerit-Morin等人,2013)之后,使用指定为WST11的Bchl-D的VTP最近已经被批准用于早期前列腺癌治疗。

[0010] 最初设计用于抑制血管生成的节律化疗(metronomic chemotherapy)涉及在没有延长的中断的情况下以频繁、规律的时间表给药的低剂量化疗剂并且使严重的毒性最小化(Ge等人,2012;Ghiringhelli等人,2007)。发现这样的治疗以特定的细胞群方式特别地影响促肿瘤(protumor)免疫细胞增殖。

发明内容

[0011] 在一方面,本发明提供在用于癌症的联合疗法中使用的抗髓源抑制细胞药剂(下文中“抗MDSC药剂”)和细菌叶绿素衍生物(下文中“Bchl-D”),其中所述抗MDSC药剂和所述Bchl-D依次给药并且所述Bchl-D的给药之后是光动力疗法(PDT)。

[0012] 在另一方面,本发明提供用于通过联合疗法治疗癌症的方法,所述方法包括对有需要的患者给予:(i)治疗有效量的抗髓源抑制细胞(MDSC)药剂(下文中“抗MDSC药剂”);和(ii)治疗有效量的细菌叶绿素衍生物(Bchl-D)接着是光动力疗法(PDT)(下文中“Bchl-D PDT”)。

附图说明

[0013] 本专利或申请文件包含至少一幅以彩色绘制的附图。在请求和支付必要的费用时,具有彩色附图的本专利或专利申请公开的副本将由美国专利商标局来提供。

[0014] 图1A示出STL-6014(上排)和STL-7012(下排)在携带4T1乳腺肿瘤的小鼠中的体内蓄积和清除。图1B示出在给药后16h STL-6014在肿瘤和不同的器官中的蓄积和/或保留。

[0015] 图2示出:(图2A)在乳腺脂垫中携带4T1肿瘤的小鼠的治疗流程(Scheme)1,在PDT之前2天(蓝色箭头)或在PDT之后1天(橙色箭头)开始使用STL-6014PDT和健择(Gemzar)给药的组合;(图2B)在STL-6014的推注后(post-bolus injection)6h被照射的肿瘤;(图2C)具有原发性和转移性肿瘤的小鼠(左侧)、仅具有原发性肿瘤的小鼠(中间)和治愈的小鼠

(右侧)的荧光素生物发光。

[0016] 图3示出在5种治疗方案(regimen)之一后第7天(空白)和第30天(黑色)没有原位4T1肿瘤的动物的百分比。在乳腺脂垫中移植4T1后第7天施加STL-6014PDT治疗并且按照图2中描绘的治疗流程1给予健择(GEM)。应用以下方案:(1)无治疗(对照,N=18);(2)STL-6014PDT(PDT,N=29);(3)在移植后5天开始的节律性的健择(GEM,N=11);(4)在STL-6014PDT后第1天开始的节律性的健择(N=19,在STL-6014注射后6h施加PDT);和(5)在STL-6014PDT之前第2天开始节律性的健择(N=20,在STL-6014注射后6h施加PDT)。

[0017] 图4呈现了携带原位4T1肿瘤并且通过图3中描述的不同的治疗方案治疗的Balb/C小鼠的Kaplan-Meier生存曲线。对照(N=18)(◆)-无治疗;STL-6014(N=29)(■)-如材料和方法中所述,在肿瘤移植后第7天施加作为单一疗法的STL-6014PDT;Gem(▲)(N=11)-第一次健择给药在肿瘤移植后第5天作为单一疗法来施加;PDT 6h+GEM(N=19)-在STL-6014给药后6h施加PDT,与在PDT后1天开始并且此后每周给药再持续5周的健择给药组合;在第2天开始的PDT 6h+GEM(N=20)(●)-在STL-6014给药后6h施加PDT,与在PDT之前第2天开始并且此后每周给药再持续5周的5次健择给药组合。

[0018] 图5描绘了示出在STL-6014PDT与健择组合的两种不同的方案之后在动物处死当天发现有4T1肺转移的动物的百分比的饼图。(图5A)STL-6014-PDT与在施加STL-6014-PDT后1天开始的健择给药组合(N=20)。(图5B)STL-6014-PDT与在施加STL-6014-PDT之前2天开始的健择给药组合(N=19)。

[0019] 图6表明了Balb/C小鼠中的4T1肿瘤进展,所述Balb/C小鼠在4T1肿瘤由与在PDT之前2天给予的健择组合的STL-6014PDT治愈之后被 2×10^5 个4T1细胞的第二次原位移植再次激发。在第一次治愈后第120天(第一次肿瘤移植后240天)进行再次激发。(图6A)在首次用于实验的动物(naïve animal)中移植4T1肿瘤后的个体动物(N=10)存活,各曲线代表1只动物。(图6B)在第一次肿瘤移植之后经治疗且被治愈的动物中移植4T1肿瘤后的个体动物(N=15)存活。除了代表10只动物的橙色/绿色曲线以外,各曲线代表1只动物。在治疗后第50天,这10只/15只动物不具有原发性肿瘤且不具有转移性肿瘤。

[0020] 图7描绘了用于携带MB49(膀胱)肿瘤的小鼠的组的WST11VTP和健择给药的治疗流程2。在第-15天在Balb/C小鼠的后腿上移植MB49癌细胞(10^6 个)。第一次健择给药(50mg/kg)在第-3天进行,然后在第4天进行并且以2次/周、3周/月的循环持续至总共12次治疗/90天。WST11VTP在肿瘤移植后第15天进行。静脉内输注WST11(9mg/kg)5分钟,接着使用Modulight激光器在 $120\text{mW}/\text{cm}^2$ 下在753nm下照射10分钟。

[0021] 图8示出移植有MB49肿瘤的小鼠对基于治疗流程2的不同的治疗方案的反应(图7)。(图8A)平均肿瘤生长(误差线-SEM)。黑色-对照(0/17治愈,相对于VTP+健择, $p < 0.0001$);蓝色-仅健择(0/19治愈,相对于VTP+健择, $p < 0.0001$);红色-仅VTP(3/19治愈,相对于VTP+健择, $p < 0.0005$);绿色-VTP+健择(11/17治愈)。P值计算基于双因素方差分析。(图8B)在以上WST11VTP治疗组合之后个体小鼠的后腿中的肿瘤生长。左上图-对照,0/17治愈;右上图-仅健择,0/19治愈;左下图-仅VTP,3/19治愈;右下图-VTP+健择,11/17治愈。(图8C)如在治疗开始后第25天它们的生物发光所反映的肺转移的预防:上图-个体小鼠的肺中的平均光度(* $p < 0.005$,** $p < 0.0001$);下图上排-对照动物和仅由健择治疗的动物的图像;下图下排-治愈动物的图像。(图8D)在不同的治疗方案之后的总体动物存活率。

[0022] 图9示出在不同的治疗方案之后全身性抗肿瘤反应的演进(evolution)。在第-15天在Balb/C小鼠的右后腿上移植MB49癌细胞。(图9A)第一次健择给药(50mg/kg)在第-3天进行,然后在第4天进行,并且以2次/周的循环持续3周。然后停用1周并且再进行3周循环,至总共12次治疗/90天。WST11VTP在移植后第15天以9mg/kg静脉内输注WST11 5分钟,接着使用Modulight激光器在120mW/cm²下在753nm下照射10分钟来进行。在VTP后第1天在左后腿移植第二肿瘤。(图9B)在WST11VTP后1天移植在左后腿处的第二肿瘤在个体动物中的肿瘤生长;左上图-对照(14只/20只动物中的生长),右上图-健择(15只/20只动物中的生长),左下图-仅WST11VTP(12只/19只生长),右下图-VTP+健择(5只/17只生长)。(图9C)通过PDT治愈了MB49然后将MB49细胞注射至尾静脉中的动物的Kaplan-Meier生存曲线。

[0023] 图10显示缺乏T细胞群和B细胞群降低VTP、吉西他滨及其组合在MB49肿瘤中的治疗效果。(图10A)示出免疫受损的(Rag1KO, N=22)小鼠的总体存活率与用WST11VTP治疗的有免疫能力的(WT N=19)小鼠相比在统计学上显著的降低($p<0.0001$)的Kaplan-Meier曲线。(图10B)仅用健择治疗的小鼠的总体存活率(WT N=10, Rag1KO N=10, $p<0.05$)。(图10C)用组合治疗的小鼠的总体存活率(WT N=10, Rag1KO N=7, $p<0.005$)。

[0024] 图11提供未治疗的(对照)动物中的携带4T1的小鼠的脾脏中的免疫细胞群的代表性图:(图11A)粒细胞样/单核细胞样髓源抑制细胞(G/M-MDSC)和中性粒细胞;(图11B)树突细胞(DC);(图11C)肿瘤相关巨噬细胞(TAM);(图11D)CD4和CD8T细胞;(图11E)调节性T细胞(Treg)的控制(gating)。

[0025] 图12表明了如由治疗流程1(图2中所描绘的)描述的与健择给药组合的STL-6014-PDT在治疗后1-3周对携带4T1的小鼠中的脾脏的免疫细胞群的治疗影响。(图12A)G/M-MDSC(空白)、TAM(黑色)。(图12B)DC(空白)、CD8(黑色);(图12C)Treg。

[0026] 图13示出原位移植有4T1癌细胞的动物在移植后7天不治疗携带肿瘤的动物、仅由STL-6014PDT治疗、仅由健择治疗、和联合治疗之后1周和3周的脾脏重量的变化。治疗流程在图2中示出。

[0027] 图14描绘了在后腿移植有MB49肿瘤并且未经历治疗(对照)的动物和经历与两种健择治疗方案之一组合的WST11VTP的动物的脾脏中的固有免疫细胞群。(图14A)在VTP后第6天脾脏中的CD11b+的免疫组织化学(IHC)染色(4×标尺(Bar) 200μm)。(图14B)在WST11VTP后第9天的中性粒细胞/G-MDSC(CD11b+Ly6G+, 中图)和单核细胞/M-MDSC(CD11b+Ly6C+, 最右图)。以低剂量(60mg/kg, 红色)或高剂量(120mg/kg, 绿色)在第-3天、第1天、第4天、第7天对被选择用于FACS分析的动物给予健择(** $p<0.01$, * $p<0.05$)。

[0028] 图15描绘了携带MB49肿瘤的小鼠对不同的治疗方案的适应性免疫应答。左侧-引流淋巴结, 中间-脾脏, 右侧-血液;(图15A)上图-CD8+细胞, 下图-CD8+/Treg。绿色-与在120mg/Kg下的健择治疗组合的治疗或对照;蓝色-没有健择治疗的治疗或对照。与在高剂量(120mg/kg)下的如图7(流程2)中描述的健择给药组合的WST11VTP在治疗后第6天对肿瘤、血液和脾脏中的CD8+和CD8+/Treg的影响(** $p<0.01$, * $p<0.05$)。(图15B)上图-第6天, 蓝色-没有健择治疗, 绿色-在120mg/kg下的健择治疗;下图-第9天;蓝色-没有健择治疗, 红色-在75mg/kg下的健择治疗;绿色-在120mg/kg下的健择治疗;左侧的柱-Treg, 中间的柱-Teff/Treg, 右侧的柱-Tcm(活化的CD8T细胞)。

[0029] 图16描绘了在后腿中携带4T1肿瘤的小鼠中、在有或没有通过在VTP之前第3天给

予的环磷酰胺 (CTX) 的免疫调节的情况下、在肿瘤移植之后第7天给予的WST11VTP治疗流程。

[0030] 图17表明了在后腿携带4T1肿瘤的个体Balb/C小鼠对在不同的光强度 (mW/cm^2) 和 CTX剂量下具有固定剂量9.0mg/kg WST11的不同的治疗方案的局部反应。上排:未治疗的小鼠 (左侧, $N=5$), 用50mg/kg CTX治疗 (中间, $N=4$), 用150mg/kg CTX治疗 (右侧, $N=6$)。中排:在100mW (左侧, $N=8$) 或150mW (右侧, $N=7$) 下用WST11VTP治疗。下排:用组合50mg/kg CTX+VTP 100mW (左侧, $N=10$)、150mg/kg CTX+VTP 100mW (中间, $N=7$) 治疗, 用50mg/kg CTX +VTP 150mW (右侧, $N=7$) 治疗。

[0031] 图18呈现了Balb/c小鼠的Kaplan-Meier生存曲线, 所述Balb/c小鼠携带在后腿皮下移植的4T1-luc乳腺肿瘤并且仅进行使用低的光强度 ($100\text{mW}/\text{cm}^2$) (图18A、图18B) 或高的光强度 ($150\text{mW}/\text{cm}^2$) (图18C、图18D) 的WST11VTP或者在VTP之前3天与单剂量CTX (CY) 给药 (150或50mg/kg) 组合。示出了所有经治疗的小鼠 (图18A、图18C、图18D) 或者经历原发性肿瘤的不可逆的完全消融并且在第90天存活且无转移的动物的治疗结果 (图18D)。

[0032] 图19示出不同的治疗方案对在它们的后腿中携带皮下4T1-luc乳腺肿瘤的Balb/c小鼠中的具有肺转移的动物的百分比的影响。(图19A) . 示出从在后腿移植4T1-luc乳腺癌细胞后第7天 (WST11VTP的当天) 从Balb/c小鼠的肺分离的细胞演进的4T1-luc集落的培替氏培养皿 (Petri dish)。(图19B) . 在用以下治疗后90天在完全的原发性肿瘤消融之后没有转移的动物的百分比:CTX (50mg/kg) +在低的 ($N=10$) 或高的 ($N=5$) 光强度下的VTP、或仅在低的 ($N=4$) 或高的 ($N=5$) 光强度下的VTP。

[0033] 图20示出Foxp3阳性细胞 (Treg细胞) 浸润至4T1-luc肿瘤。当在CTX或盐水给药后指定的时间达到30–60mm³时, 将移植在Balb/C小鼠的后腿的4T1肿瘤切除、用福尔马林固定并且用石蜡包埋。制备切片并且针对Foxp3表达染色。阳性细胞的数量使用Fiji软件来测量。图20A描绘了未治疗的对照的在肿瘤移植后第7天的代表性图片和定量, 图20B描绘了由CTX治疗的动物的代表性图片。图20C描绘了未治疗的动物、在治疗后24小时由CTX治疗的动物和在治疗后72小时由CTX治疗的动物中的Foxp3 (Treg细胞) 的百分比。

[0034] 图21示出在WST11VTP之前3天的低剂量CTX给药对携带4T1-luc肿瘤的小鼠的引流淋巴结和脾脏中的T细胞群的效果。图21A:引流淋巴结 (LN, 左侧) 和脾脏 (右侧) 中的总细胞计数。如图16中描绘的, 在治疗流程4之后有 (黑色) 和没有 (空白) CTX给药的情况下, 在WST11VTP之后指定的时间收集LN和脾脏。将细胞分离并且染色用于使用抗CD4、CD8和Foxp3抗体的流式细胞术。在红细胞耗竭之后对脾脏中的总细胞计数。图21B. 在VTP之前3天有 (黑色) 或没有 (空白) CTX治疗的情况下, 在WST11VTP之后不同的时间, 引流LN中的CD8+ (左侧)、CD4+ (中间) 和Foxp3 (Treg, 右侧) 的百分比 (* $p<0.001$, ** $p<0.05$); 图21C. 在VTP之前3天有 (黑色) 或没有CTX (空白) 治疗的情况下, 在WST11VTP之后不同的时间, 脾脏中的CD8+ (左侧)、CD4+ (中间) 和Foxp3 (Treg, 右侧) 的百分比 (* $p<0.001$, ** $p<0.001$, *** $p<0.05$)

[0035] 图22描绘了在移植后7天 (VTP日) 低剂量CTX给药对在后腿携带皮下4T1-luc肿瘤的小鼠的肿瘤和脾脏中的骨髓细胞群的效果。左侧-肿瘤; 右侧-脾脏。

[0036] 图23A示出使用如下的用于在乳腺脂垫中携带4T1肿瘤的小鼠的联合治疗的治疗流程5:仅WST11VTP (在移植后7天, 当肿瘤达到直径为5–7mm时); 与在VTP之前3天开始并且再给予三次 (黑色箭头) (CTX 2) 的CTX的节律给药组合的WST11VTP; 与在VTP WST11之前1天

给予一次剂量的CTX (CTX 1) 并且再给予三次 (红色箭头) 组合的WST11VTP; 与在VTP之前2天 (蓝色) 或1天 (黄色) 开始并且以5天的间隔再持续3次的健择的节律给药组合的VTP。经治疗的动物的跟踪持续至第90天或直至动物由于肿瘤负荷而被处死。图23B呈现了表明在乳腺中携带4T1-luc肿瘤的动物在通过WST11VTP与CTX或健择的组合的不同的方案 (protocol) 治疗之后的存活率的Kaplan-Meier曲线。图23C呈现了在不同的治疗方案之后第90天, 完全治愈的 (空白)、原发性肿瘤治愈但是发生转移 (虚线) 的在乳腺脂垫中携带4T1肿瘤的小鼠以及呈现原发性肿瘤的复发和转移的发生 (黑色) 二者的动物的百分比。

具体实施方式

[0037] 在某些实施方案中, 本发明涉及如下的联合疗法, 所述联合疗法使用基于细菌叶绿素的光动力疗法 (PDT) 或血管靶向PDT (VTP) 和免疫细胞调节剂, 特别是髓源抑制细胞 (MDSC) 调节剂, 用于消除原发性肿瘤和预防癌症扩散。

[0038] 根据本发明发现, 通过将在原发性肿瘤消融中发现有效的细菌叶绿素的不同的衍生物与发现具有抗MDSC活性的药剂组合使用, 实现了原发性肿瘤消融, 并伴有最可能是经由消灭远端微小转移 (remote micrometastases) 导致的转移性肿瘤进展的预防。

[0039] 在某些实施方案中, 本发明针对局部实体瘤的非热消融和它们的远端微小转移的消除。

[0040] 在一方面, 本发明提供在用于癌症的联合疗法中使用的抗髓源抑制细胞药剂 (下文中“抗MDSC药剂”) 和细菌叶绿素衍生物 (下文中“Bchl-D”), 其中抗MDSC药剂和Bchl-D依次给药并且Bchl-D的给药之后是光动力疗法 (PDT)。

[0041] 与在各自单独给药时抗MDSC药剂或Bchl-D接着是PDT的效果相比, 本发明的联合疗法具有增强的治疗效果。在某些实施方案中, 该增强的治疗效果为协同治疗效果, 即, 比单独治疗方式的加和治疗效果强得多。

[0042] 根据本发明的使用的抗MDSC药剂可以是, 而不限于, 吉西他滨、5-氟尿嘧啶 (5-FU)、顺铂、紫杉醇、环磷酰胺 (CTX、CY)、舒尼替尼、例如SC-58236和SC-58125等环氧化酶2 (COX-2) 抑制剂、例如唑来膦酸等双膦酸盐或例如阿伦膦酸盐等氨基双膦酸盐、全反式视黄酸 (ATRA)、维生素D3、维生素A、KIT特异性抗体、硝基阿司匹林衍生物、例如甲基巴多索隆 (已知为CDDO-Me) 等合成三萜系衍生物、和例如西地那非和他达拉非等磷酸二酯酶-5 (PDE-5) 抑制剂。

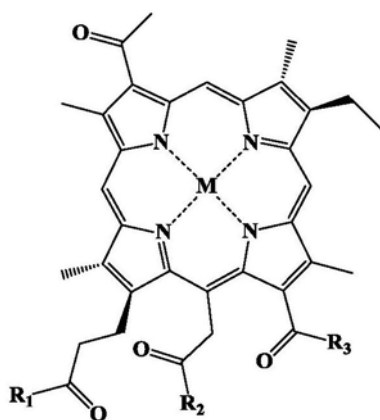
[0043] 在某些实施方案中, 抗MDSC药剂为吉西他滨或环磷酰胺。

[0044] 根据本发明可以使用显示引起肿瘤的消融的任何Bchl-D。

[0045] 在某些实施方案中, 根据本发明的使用的Bchl-D优选为任选与含RGD肽或RGD-肽模拟物残基缀合的水溶性阴离子细菌叶绿素衍生物。

[0046] 在某些实施方案中, Bchl-D为式I的阴离子Bchl-D:

[0047]



(I)

[0048] 其中

[0049] M表示2H或Pd;

[0050] R_1 为 $O-R_4$ 或 $-NHR_5$,其中 R_4 为H、 H^+ 、铵基或例如 Na^+ 或 K^+ 等一价金属阳离子,并且 R_5 为含RGD肽或RGD肽模拟物残基;[0051] R_2 为 $-O-C_1-C_6$ 烷基,优选甲基;[0052] R_3 为 $-NH-(CH_2)_n-SO_3-R_6^+$,其中n为2或3且 R_6^+ 为例如 Na^+ 或 K^+ 等一价金属阳离子;和

[0053] 其药学上可接受的盐和光学异构体。

[0054] 在某些实施方案中,用于本发明的阴离子Bchl-D具有式I,在所述式I中,在17³位的 R_1 为 OR_4 ,即,其未缀合至含RGD肽或RGD肽模拟物残基(下文中“非缀合的Bchl-D”),例如但不限于本文中指定为WST11和STL-7012的Bchl-D。[0055] WST11,红螺菌菌绿素衍生物钯3¹-氧代-15-甲氧基羰基甲基-红螺菌菌绿素13¹-(2-磺乙基)酰胺二钾盐在Weizmann Institute of Sciences (Rehovot, Israel) 本申请的共同发明人Avigdor Scherz教授的实验室中合成并且在WO 2004/045492中公开。在成功的临床试验之后,WST11最近已经获批用于早期前列腺癌治疗。[0056] STL-7012为非金属化的Bchl-D 3¹-氧代-15-甲氧基羰基甲基-红螺菌菌绿素13¹-(2-磺乙基)酰胺二钾盐(在WO 2008/023378中公开,下文中的附录中的式)。[0057] 根据本发明可以使用的其它阴离子Bchl-D包括在WO 2004/045492中公开的以下化合物:钯3¹-氧代-15-甲氧基羰基甲基-红螺菌菌绿素13¹-(3-磺丙基)酰胺二钾盐;3¹-氧代-15-甲氧基羰基甲基-红螺菌菌绿素13¹-(2-磺乙基)酰胺二钾盐;3¹-氧代-15-甲氧基羰基甲基-红螺菌菌绿素13¹-(3-磺丙基)酰胺二钾盐;和钯3¹-氧代-15-甲氧基羰基甲基-红螺菌菌绿素13¹-(2-磺乙基)酰胺钾盐。

[0058] 当非缀合的Bchl-D用于本发明时,PDT为血管靶向PDT(VTP),并且,在完成非缀合的Bchl-D的给药之后,在短时间照射要治疗的局部的区域。该时间通常为0-30min,例如,0min、10min、15min、20min、25min或30min。

[0059] 在某些实施方案中,用于本发明的Bchl-D为缀合至含RGD肽或RGD肽模拟物残基的式I的Bchl-D,具有其中在17³位的 R_1 为 $NH-R_5$ 的式I,即,其缀合至C(下文中“缀合的Bchl-D”)。含RGD肽或RGD肽模拟物残基可以为非环状的或环状的肽。

[0060] 在某些优选的实施方案中,用于本发明的缀合的Bchl-D缀合至环状的含RGD肽或

RGD肽模拟物残基。用于本发明的缀合有环状的含RGD肽或RGD肽模拟物残基的Bchl-D的实例包括但不限于在W0 2008/023378和W02010/046900公布文本中公开的那些,例如本文中指定为STL-6014、STL-6033、STL-6038和STL-6068(在下文中的附录中呈现的结构)的Bchl-D。

[0061] 在某些优选的实施方案中,缀合的Bchl-D为STL-6014,在W0 2008/023378中公开的 3^1 -氧代-15-甲氧基羰基甲基-红螺菌菌绿素 13^1 -(2-磺乙基)酰胺- 17^3 -(环RGDfK)酰胺钾盐,其中f表示D-Phe。

[0062] 根据本发明可以使用的在W0 2008/023378中公开的其它缀合的Bchl-D包括但不限于:

[0063] 钯 3^1 -氧代-15-甲氧基羰基甲基-红螺菌菌绿素 13^1 -(2-磺乙基)酰胺- 17^3 -(环RGDfK)酰胺钾盐

[0064] 钯 3^1 -氧代-15-甲氧基羰基甲基-红螺菌菌绿素 13^1 -(2-磺乙基)酰胺- 17^3 -(环RADfK)酰胺钾盐

[0065] 25. 钯 3^1 -氧代-15-甲氧基羰基甲基-红螺菌菌绿素 13^1 -(2-磺乙基)酰胺- 17^3 -(环RGDf-N(Me)K)酰胺钾盐

[0066] 当根据本发明使用缀合的Bchl-D时,PDT是组织靶向的,并且在一段时间之后照射要治疗的局部的区域,以允许缀合的Bchl-D在靶组织中的蓄积和最佳浓度。在完成缀合的Bchl-D的给药之后,该时间可以为至少4h,优选6h。

[0067] 根据本发明的使用的抗MDSC药剂和Bchl-D根据数种不同的方案依次给药。一般地,在用于原发性肿瘤或转移的消融的治疗疗程(session)中,PDT或VTP治疗包括Bchl-D的单次给药接着是照射要治疗的局部的区域,并且抗MDSC治疗包括抗MDSC药剂以各种确定的时间间隔的数次给药。如果必要,如果随后发现新的转移和当随后发现新的转移时,所述疗程可以重复一次以上。

[0068] 根据一个方案流程,抗MDSC药剂在PDT或VTP治疗之前给药一次并且此后以确定的时间间隔给药数次。

[0069] 根据另一方案流程,抗MDSC药剂在PDT或VTP治疗之后以确定的时间间隔给药数次。

[0070] 在某些实施方案中,抗MDSC治疗可以包括抗MDSC药剂以5至12天以上的确定的时间间隔给药4至12次以上。例如,抗MDSC治疗可以包括抗MDSC药剂以5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天或12天以上的确定的时间间隔给药4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次、11次或12次以上。

[0071] 应当注意的是这些数字基于本文中描述的动物实验并且对于人类的治疗不应当是限制性的。根据所治疗的癌症的种类、患者的免疫系统的状态和患者对治疗的反应,可以由医师通过改变抗MDSC给药的次数和/或改变抗MDSC给药之间的确定的时间间隔的天数来修改治疗方案。例如,医师可以确定在治疗中暂停并且在治疗期间提供比确定的间隔长的间隔,然后在该中断(break)之后再采取原始的方案。例如,如果治疗方案确定抗MDSC药剂的给药之间的间隔为5天,则医师可以决定在第2次或第3次给药之后中断10至20天以上,然后返回至5天的确定的间隔用于以下给药。该中断间隔总是比确定的方案间隔长。

[0072] 在某些实施方案中,抗MDSC药剂为吉西他滨并且PDT用Bchl-D STL-6014.18来进

行。在其它实施方案中,抗MDSC药剂为吉西他滨并且VTP用Bchl-D WST11来进行。

[0073] 在某些其它实施方案中,抗MDSC药剂为环磷酰胺并且VTP用Bchl-D WST11来进行。

[0074] 根据本发明的某些实施方案,抗MDSC药剂以低剂量给药,例如比常规的单药化疗中的所述药剂的常规剂量低3或4倍的剂量。这是根据节律化疗的概念,所述节律化疗涉及在没有延长的中断的情况下以频繁、规律的时间表给药的低剂量化疗剂并且使严重的毒性最小化。

[0075] 根据本发明可以治疗数种类型的癌症,原发性癌症实体瘤和转移二者,包括但不限于黑素瘤、肾细胞癌、结肠肿瘤、乳腺肿瘤、肺肿瘤、前列腺肿瘤、膀胱肿瘤、脑肿瘤、胰腺腺癌或头颈部肿瘤。

[0076] 本发明进一步涉及用于癌症的治疗的在与Bchl-D的联合疗法中使用的抗MDSC药剂,其中抗MDSC药剂和Bchl-D依次给药并且Bchl-D的给药之后是光动力疗法(PDT)。

[0077] 本发明还涉及用于癌症的治疗的在与抗MDSC药剂的联合疗法中使用的Bchl-D,其中抗MDSC药剂和Bchl-D依次给药并且Bchl-D的给药之后是光动力疗法(PDT)。

[0078] 在两种情况下,与在各自单独给药时抗MDSC药剂或Bchl-D接着是PDT的效果相比,联合疗法具有增强的治疗效果。该增强的治疗效果可以为协同治疗效果。

[0079] 在另一方面,本发明提供用于通过联合疗法治疗癌症的方法,其包括对有需要的患者给予:(i) 治疗有效量的抗髓源抑制细胞(MDSC) 药剂(下文中“抗MDSC药剂”);和(ii) 治疗有效量的细菌叶绿素衍生物(Bchl-D) 接着是光动力疗法(PDT)(下文中“Bchl-D PDT”)。

[0080] 在某些实施方案中,与各自单独给药的抗MDSC药剂或Bchl-D PDT的效果相比,本发明的方法的联合疗法提供增强的治疗效果。该增强的效果可以为协同治疗效果。

[0081] 在某些实施方案中,本发明同步给予作为抗MDSC起作用的化疗剂和使用细菌叶绿素(Bchl-D) 的不同的化学衍生物的细胞/组织定向的光动力疗法(PDT) 或血管靶向光动力疗法(VTP)。以确定的时间间隔数次对所治疗的受试者低剂量给予化疗剂实现了MDSC负荷的降低。在某些实施方案中,在第一化疗剂给药之后以选定的时间间隔施加使用Bchl-D的PDT或VTP从而消融原发性肿瘤或观察到的转移。使用一些药剂,节律施加(低剂量的每周施加) 此后持续数周。通过但不限于使用不同的成像技术(例如MRI、超声) 的原发性肿瘤消融的跟踪、组织学(例如活组织检查)、循环中MDSC计数的减少、转移生长的延迟或消除以及延长的受试者生存来监测治疗疗效。在患者中发现新的转移的情况下,随后可以重复治疗。

[0082] 在某些实施方案中,本发明提供治疗癌症的方法,所述方法包括对有需要的患者给予:(i) 治疗有效量的抗髓源抑制细胞(MDSC) 药剂(下文中“抗MDSC药剂”);和(ii) 治疗有效量的细菌叶绿素衍生物(Bchl-D) 接着是光动力疗法(PDT)(下文中“Bchl-D PDT”)或血管靶向PDT(下文中“Bchl-D VTP”),从而提供与各自单独给予的抗MDSC药剂或Bchl-D PDT的效果相比具有增强的治疗效果的联合疗法。

[0083] 如本文中使用的术语“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”或短语“治疗(to treat)”是指任何类型的治疗,所述治疗赋予患有癌症的患者益处,包括患者的病况(例如,在一种以上的症状方面) 的改善、病况的进展的延迟、生存时间的延长等。

[0084] 用于抗MDSC药剂的如本文中使用的术语“治疗有效量”是指当根据本发明用于联合疗法并且以重复剂量给药时如上文中定义的在癌症的治疗方面治疗有效的量。用于Bchl-D的如本文中使用的术语“治疗有效量”是指其在进行PDT或VTP之后引起肿瘤或转移

的消融的能力。

[0085] 在例如以新的转移的形式肿瘤复发的情况下,可以重复调节免疫的Bchl-D PDT或VTP,这是因为新的转移可以表明与原发肿瘤相比不同的克隆的新的微小转移的发生。

[0086] 本文中描述的和图中的研究显示,所建议的两种治疗方式的组合使它们的影响协同增强,在40-50%的呈现侵袭性和转移性癌症的动物中导致原发性肿瘤消融伴有微小转移和随后的转移形成的退化和消除。这些研究和演进的方案可以以直接的方式转化至临床领域。

[0087] 现在将通过以下非限制性实施例说明本发明。

[0088] 实施例

[0089] 材料和方法

[0090] 材料

[0091] (i) 细菌叶绿素衍生物—Bchl衍生物及其RGD-缀合物由Steba Biotech (Rehovot, Israel) 提供。STL-6014以粉末形式的铵盐提供,通过将所述粉末溶解在DDW (1mg/ml) 中转化为K⁺盐,通过添加KOH 1N将pH调节为8,将所得溶液通过液氮冷冻并且冻干从而得到STL-6014K⁺盐。通过将STL-6014K⁺盐溶解在5%甘露醇溶液 (1mg/ml) 中来制备工作液,通过在5%甘露醇中添加tris缓冲液 (0.15%) 将溶液的pH调节为8,基于实验要求将溶液等分至数个试管中、冷冻并且冻干从而得到配制的STL-6014K⁺盐。通过分光光度测量来验证浓度。STL-7012以二钾盐提供。通过将STL-7012K⁺盐溶解在5%甘露醇溶液 (1mg/ml) 中来制备工作液。如STL-6014进行pH的调节、等分试样 (aliquots) 的制备和浓度的验证。WST11以粉末供应并且在-20℃下在黑暗中保存。通过将WST11溶解在包含5%葡萄糖和0.67%甘露醇的DDW中制备储备液 (stock)、等分并且冻干。工作液用DDW来重构并且溶液的浓度通过分光光度法确认。可选地,临床WST11 (批次:P00611和10-130611) 以冻干制剂供应。将材料溶解在5%右旋糖中、等分并且在-20℃下储存。在治疗的当天,将等分试样解冻、过滤,并且溶液的浓度通过分光光度法确认。

[0092] (ii) 化学治疗药物制备和储存—吉西他滨 (GEM, 健择[®], Lilly) 以粉末购自当地药房,溶解在盐水中至浓度为38mg/ml,等分并且在-20℃下储存。将等分试样解冻,用盐水稀释至期望的浓度并且以75mg/kg的剂量在同一天使用。环磷酰胺 (CTX, Endoxan[®], Baxter Oncology GmbH, Germany) 购自当地药房。通过溶解在0.9%NaCl中来制备20mg/ml的储备溶液,等分并且在-20℃下储存。将等分试样解冻,如果需要,用盐水稀释至期望的浓度,并且以指定的剂量在制备当天使用。

[0093] (iii) 鼠细胞系—乳腺荧光素酶 (luc) 标记的4T1细胞系 (4T1-Luc) 由Zvi Granot 博士 (医学系,耶路撒冷希伯来大学,以色列) 惠赠;黑素瘤B16-F10细胞系得自美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection) (ATCC, Manassas, VA);膀胱MB49细胞系由James Allison (MSKCC, New York, USA) 惠赠,并且使用鼠干细胞病毒 (MSCV) -嘌呤霉素-luc-GFP构建物 (由Dr. Emily Cheng博士惠赠,人类肿瘤及发病机制项目 (Human Oncology and Pathogenesis Program), MSKCC) 建立luc标记的MB49-细胞系。将4T1和MB49细胞保持在DMEM培养基中并且将B16-F10细胞保持在补充有1mmol/L丙酮酸钠、10%胎牛血清 (FCS)、250μg/ml潮霉素、0.06mg/ml青霉素和0.1mg/ml链霉素的RPMI培养基中。细胞在潮

湿的气氛 (5%CO₂, 95%空气) 下在37℃下以单层生长。

[0094] (iv) 鼠肿瘤模型—对于雌性、Balb/c小鼠 (6-8周龄), 将悬浮在50μl或100μl PBS中的1×10⁶个4T1细胞皮下 (s.c.) 移植至右后腿中或原位移植。对于再次激发研究, 原位移植2×10⁵个4T1细胞。对于膀胱癌模型, 在VTP治疗之前15天, 将5×10⁴个MB49或MB49-荧光素酶细胞系皮下注射至C57B/6雄性小鼠 (7-8周龄, Taconic, Hudson, NY) 的右肋腹。对于VTP在免疫受损的小鼠中的疗效研究, 在C57B/6背景的Rag^{-/-}小鼠或C57B/6雄性小鼠 (7-8周龄, Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) 的肋腹注射相同数量的MB49细胞。对于MB49细胞的双侧模型, 动物分别在第-15天和第+1天在右肋腹接受5×10⁴个MB49细胞并且在左肋腹接受5×10⁴个细胞。所有实验程序均由在Weizmann Institute of Science (Rehovot, Israel) 和The Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC, New York, USA) 的机构动物管理与使用委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee) 批准。

[0095] 方法

[0096] (v) 全身荧光成像 (PDT研究): 在静脉内 (i.v.) 注射7.5mg/kg STL-6014或STL-7012之后, 使用具有分别用于激发和发射的847/875nm滤光片的活体光学成像系统 (IVIS® Spectrum, Caliper LifeScience., Alameda, CA) 以1秒的积分时间来记录肿瘤组织和正常器官的全身近红外荧光图像。使用各自的滤光片组在D-荧光素的75mg Kg⁻¹的腹膜内 (i.p.) 注射之后记录荧光素酶转染的肿瘤和转移的全身成像5分钟。

[0097] (vi) PDT治疗方案: 在Balb/c小鼠的乳腺脂垫中移植4T1-Luc细胞。当原发性肿瘤达到~50mm³时, 对小鼠静脉内注射7.5mg/kg STL-6014并且将其在暗光条件下放置6h, 其后用通过正面光纤 (Medlight SA, Switzerland) 施加的753nm的激光在200mW/cm²下照射包括肿瘤的1cm²的区域。在治疗后的前两天期间, 小鼠接受镇痛 (2.5mg/kg Flunixin, 每天一次)。通过使用IVIS使肿瘤的荧光素酶介导的生物发光信号成像, 每7天评价原发性肿瘤的消融。当肿瘤达到直径为15mm时或者当小鼠发生转移时 (通过IVIS全身荧光确定), 将小鼠处死 (根据Weizmann Institute of Science的指南)。

[0098] (vii) VTP治疗方案: 对于皮下肿瘤治疗: 通过分别i.p.注射克他命 (Ketamine)/赛拉嗪 (Xylazine) 溶液 (100mg/10mg/kg体重) 的混合物来麻醉携带肿瘤的小鼠。然后将WST11通过5min恒定速率静脉内输注以9mg/kg的剂量给药至尾静脉中。使用装配有正面的光学扩散器 (optical diffuser) 的4W、755nm二极管激光器 (Ceramoptec, Germany) 在输注完成之后立即开始以100mW/cm²或150mW/cm²的流动速率 (fluency rate) 照射10min。将小鼠左侧朝下放置从而暴露肿瘤并且用不透明的材料来覆盖从而保护正常组织。对于乳腺肿瘤治疗: 如前所述将小鼠麻醉。WST11剂量为9mg/kg, 通过5min输注给予。将小鼠背部朝下放置, 将肿瘤用夹子提起从而将其从身体分离, 并且用黑色材料遮盖动物从而防止致命的器官损伤。使用装配有正面的光学扩散器的4W、755nm二极管激光器 (Modulight, Finland) 在输注完成之后立即开始在200mW/cm²的流动速率下照射15min。

[0099] (viii) 包括与低剂量健择™ (GEM) 联用的PDT的联合疗法: 在4T1-luc细胞移植之后6天 (当原发性肿瘤达到~50mm³时), 对小鼠静脉内注射7.5mg/kg STL-6014。药物给药之后6小时, 在753nm (200mW/cm²) 下照射肿瘤15min。应用了用于GEM共同治疗的两种方案: (1) 在PDT之前2天、之后一天和此后每5天、直至第33天腹膜内给予75mg/kg GEM (溶解在100μl盐水中), 或 (2) 在PDT之后1天和此后每5天直至第33天给予75mg/kg GEM剂量。转移进展/退化

通过荧光素酶生物发光的全身成像来跟踪120天。

[0100] (ix) 包括VTP和低剂量GEM的联合疗法:以75mg/kg的剂量腹膜内给予GEM。使用的治疗方案如下: (i) 在第(-1)天开始,在VTP后第1天、第6天和第11天有三次后续给药; (ii) 在第(-2)天开始,在第3天、第8天和第13天有三次给药。可选地,如各实验所示的3周周期、第3周停用的临床时间表上的50mg/kg或者BIW(每周两次)时间表上的120mg/kg,在VTP治疗之前3天开始第一次给药。

[0101] (x) 包括VTP和环磷酰胺(CTX)的联合疗法:对于皮下肿瘤治疗,在VTP之前3天,以150mg/kg或50mg/kg的单剂量(对于后者,将储备溶液用0.9%NaCl以1:3新鲜稀释,从而保持体积范围)腹膜内给予CTX。对照组接受0.9%NaCl。对于乳腺肿瘤治疗,根据以下方案给药50mg/kg: (i) 在第(-1)天开始,在VTP后第1天、第6天和第11天有三次后续给药; (ii) 在第(-3)天开始,在第3天、第10天和第17天有三次给药。

[0102] (xi) 对原发性肿瘤和肺转移的VTP结果的体内跟踪:局部肿瘤反应通过生物发光成像(BLI)和卡尺测量来评估。如先前所公开的(Preise等人,2003)计算肿瘤体积。对于BLI评估,将携带肿瘤的小鼠麻醉并且腹膜内注射荧光素(1.2 μ g/小鼠,Regis,USA)。然后将小鼠放置在Xenogen IVIS光谱成像系统(Caliper LifeSciences,MA,USA)中并且在~10min的蓄积之后获取图像60秒。对于皮下肿瘤,将小鼠一侧朝下放置用于原发性肿瘤成像,然后将背部朝下放置用于转移评估。使用仰卧位,从而使乳腺模型中的原发性肿瘤和肺转移二者成像。当原发性肿瘤负荷的长径(large diameter)超过15mm时或者当检测到转移时,进行提前终止从而防止动物痛苦和死亡。

[0103] (xii) 组织学:根据Weizmann Institute of Science(IACUC,Rehovot,Israel)的机构动物管理与使用委员会的指南处死小鼠。将组织取出并且在4%/10%缓冲的福尔马林中固定48h。然后将样品包埋在石蜡中、切片并且以根据标准程序的组织学单位用于苏木精和曙红(H&E)染色。在Memorial Sloan Kettering通过自动化的程序进行针对Foxp3、CD4、CD8、CD11b和Ki67抗体的免疫染色。

[0104] (xiii) Ly6G染色(PDT研究):将在两个部位(右侧和左侧乳腺脂垫)携带原位4T1-Luc肿瘤的小鼠仅在一侧进行PDT,与第二GEM治疗方案组合。将肿瘤在PDT后24h、3天和3周切除、固定并且针对Ly6G进行染色。使用玻片扫描仪(slide scanner)获取图像用于离线分析。

[0105] (xiv) 流式细胞术(FACS分析):将脾脏从人为处死的动物切除并且通过70 μ m网筛过滤。红细胞用氯化铵裂解溶液(ACK)来裂解并且将细胞计数并调节以用于染色。将淋巴结在PBS中切碎、洗涤并且调节以用于染色。将肿瘤切成小片并且在每1ml包含PBS的1%BSA中2.5mg胶原酶II、2.5mg胶原酶IV和0.5mg DNA酶的混合物中振荡的情况下在37 $^{\circ}$ C下温育30min。将细胞悬浮液(肿瘤或脾脏)挤压通过70 μ m过滤器、用FACS缓冲液洗涤两次并且用在PBS中稀释(1:1000)的可固定的死活细胞鉴定染料(fixable viability dye)eFluor 450(eBioscience, San Diego, CA)在冰上温育(如有说明)30min。将 $1-5 \times 10^6$ 细胞悬浮在100 μ l PBS中并且用大鼠抗小鼠CD16/CD32(0.5 μ g eBioscience, San Diego, CA)在4 $^{\circ}$ C下温育15min,从而防止非特异性抗体结合。根据不同的实验,随后将细胞用包括如下的荧光抗体在RT下温育30min:percp-cy5.5/APC-Cy7-CD11b、PE/PerCP-Cy5-Ly6G、PE-cy7-Ly6C、APC-F4/80、Alexa488/PE-CD11c、eVolve655/v450-MHCII、percp-cy5.5-CD3、APC/v450-CD4、

Alexa488-CD8、PE-cy7-Foxp3、CD4-APC、Alexa488/PerCP-Cy5/PE-Texas Red-CD8和PE/APC-Foxp3、Alexa 700/FITC-CD45、FITC-Ki67、APC-Cy7-CD25、PE Texas Red-Granzyme B、PE-CD62L、PE-Cy7-CD44和APC-CD86 (抗体购自eBioScience (San Diego, CA) 和购自BioLegend (San Diego, CA))。数据获取使用定制的LSRII流式细胞仪 (BD Bioscience, San Jose, CA) 来进行并且使用FlowJo软件 (Tree Star, Ashland, OR) 来分析。

[0106] (xv) 转移性细胞分离和集落形成试验: 将4T1-luc细胞植入小鼠。7天后, 在用无菌冰冷的PBS灌注之后, 将肺从麻醉的小鼠中分离。在切除之后, 将小鼠处以安乐死。将肺在PBS中切碎、洗涤并且通过100 μ m网筛过滤。然后将组织用5mg/ml胶原酶A在37 $^{\circ}$ C下消化45min、洗涤并且重新悬浮于温暖的完全培养基中。使悬浮液通过70 μ m网筛并且在组织培养温育箱中铺板。在7天之后, 在添加荧光素之后使用IVIS成像系统检测培养物生物发光中的繁殖。

[0107] (xvi) 统计学分析: 通过Microsoft Excel或双因素方差分析检验 (GraphPad, San Diego, CA, USA) 中的双尾学生非配对t检验分析数据。认为小于0.05的p值在统计学上是显著的。使用对数秩检验 (log-rank test) (GraphPad Prism 6, San Diego, CA, USA) 来比较生存曲线。

[0108] 实施例1. 携带4T1肿瘤的小鼠中STL-6014通过原发性肿瘤和转移的药物代谢动力学和摄取

[0109] 在初步实验中, 对携带原位4T1-Luc乳腺肿瘤的雌性Balb/c小鼠静脉内注射STL-6014 (7.5mg/kg) 或STL-7012 (9.5mg/kg)。近红外 (NIR) 荧光图像证明STL-6014在肿瘤中的选择性蓄积 (图1A, 上排)。肿瘤在给药之后 $\sim$ 2hr变得明显, 但是在清除器官 (例如, 膀胱) 中观察到相当强的信号。在给药后第二天, 相对于周围组织, STL-6014已经在肿瘤中显著地蓄积 (图1B, 上排), 在腹部的清除器官中具有相当低的水平。STL-7012未在肿瘤中蓄积 (图1A, 下图) 并且在注射的几小时内通过肝脏清除 (图1A, 下图)。对于WST11也是如此 (数据未示出)。在肿瘤和肺转移中的蓄积伴有在清除器官中的蓄积在图1B中得到证明。上图-携带肿瘤的小鼠中的不同的组织的生物发光; 下图-这些器官中的STL-6014的荧光。

[0110] 实施例2. 根据流程1使用STL-6014和健择治疗携带4T1的动物

[0111] 在乳腺脂垫中用 1×10^6 个4T1-Luc细胞接种Balb/c小鼠。在移植后第7天, 当肿瘤达到直径为5-7mm时, 可以对携带4T1-Luc的小鼠进行如以下治疗流程1 (图2A) 描述的数种治疗选择中的一种:

[0112] (i) 在使用光动力疗法 (PDT) 作为唯一的治疗方式的情况下, 对动物静脉内推注 (3min) 7.5mg/kg STL-6014。在注射后6h, 将肿瘤在200mW/cm² (Modulight Inc., Finland) 下通过753nm照射10min。

[0113] (ii) 在使用吉西他滨 (健择) 作为唯一的治疗途径时, 如治疗流程1所描述的, 在肿瘤移植后第5天 (蓝色) 或第8天 (橙色) 开始腹膜内给予携带肿瘤的动物75mg/kg健择, 然后以5天间隔再给予6次。

[0114] (iii) 在联合治疗途径的情况下, 对动物 (a) 在第5天腹膜内给予75mg/kg健择, 接着在第7天给予STL-6014PDT并且再进行6次健择给药; 或者 (b) 接着在第7天给予STL-6014PDT, 然后在第8天给予健择, 接着再进行6次健择给药。使用通过IVIS (氧) 记录的荧光素的生物发光信号每周一次监测肿瘤进展和扩散直至第120天或直至由于肿瘤负荷导致的

动物终止(termination)。

[0115] 实施例3.携带4T1的动物中的原发性肿瘤对使用STL-6014PDT和健择的治疗的反应

[0116] 将携带4T1肿瘤的Balb/c分成5组:(1)未治疗(对照);(2)使用STL-6014PDT的治疗;(3)使用节律性的健择的治疗;(4)使用STL-6014PDT和在PDT后1天开始的节律性的健择的治疗;和(5)使用STL-6014PDT和在PDT之前2天开始的节律性的健择的治疗。图3示出在仅STL-6014PDT之后或与健择组合之后第7天(白色)和第30天(黑色)的原发性肿瘤反应,所述健择以治疗流程1中描述的两种治疗方式中的一种来提供。在治疗后第7天,在仅由STL-6014PDT治疗或与健择组合来治疗的小鼠的70-80%中观察到没有原发性肿瘤。然而,在治疗后第30天,与组合的STL-6014PDT+健择治疗中仅30-40%相比,仅由STL-6014PDT治疗的动物的82%具有原发性肿瘤再生。没有对照动物(无治疗或仅由健择治疗)显示基本治愈(primary cure)(0%)。

[0117] 实施例4.携带4T1肿瘤的小鼠对STL-6014PDT和健择治疗的存活率

[0118] 图4示出进行了不同的治疗方案和对照的携带4T1-Luc的小鼠在120天跟踪中的Kaplan-Meier生存曲线。与对照小鼠(N=18)相比,通过STL-6014PDT(N=29)的治疗未示出任何显著的存活率差异。在健择治疗的小鼠中观察到延长的小鼠存活但是未观察到原发性肿瘤治愈(N=11)。在组合STL-6014PDT和在PDT后1天给予的健择之后,32%的移植有4T1的动物存活(N=19),而在STL-6014PDT之前2天给予健择之后,50%的小鼠被治愈(存活120天)(N=20)。

[0119] 实施例5.肺微小转移对STL-6014PDT和健择治疗的反应

[0120] 图5A-B呈现了两个饼图,其示出在动物处死当天通过STL-6014PDT与健择组合的不同的治疗方案之后呈现有4T1肺转移的动物的百分比。接受与在PDT之前2天给予的健择组合的STL-6014PDT的小鼠的79%(N=20)无转移(5B),而由STL-6014PDT和在PDT后1天给予的健择治疗的动物的61%(N=19)无转移(5A)。该差异在统计学上是显著的($p < 0.01$),证明了在PDT之前给予健择的可能的优势。

[0121] 实施例6.通过STL-6014PDT和健择治疗的携带4T1的小鼠的存活

[0122] 图6B示出在个体动物经历从第一次移植的肿瘤完全治愈(如由在第一次移植后第120天没有4T1细胞的生物发光而显而易见的)之后120天被 2×10^5 个4T1细胞的第二次移植再次激发的个体动物的存活。为了比较,图6A呈现了第一次移植了 2×10^5 个4T1细胞的首次用于实验的小鼠的存活。67%的动物排斥4T1肿瘤(黄色-绿色曲线,N=10)并且15只中的5只呈现延迟的肿瘤生长,而同时激发的10只首次用于实验的小鼠中的10只发生肿瘤。这些发现证明组合的PDT/健择治疗为经治疗的动物提供长期适应性免疫。

[0123] 实施例7.用WST11VTP和健择治疗MB49小鼠膀胱癌模型的流程2

[0124] 图7描绘了当在右后腿中移植 2×10^5 个MB49细胞的第15天肿瘤达到直径约4-7mm时在本文中应用至携带MB49(小鼠膀胱癌)的Balb/C小鼠的第二治疗流程。所述治疗流程包括:仅施加WST11VTP,或在移植后第12天腹膜内给予50mg/kg健择、接着是在每周的第1天和第7天给予健择的3周循环、接着是在每个月的第4周不给药。动物总共接受12次健择给药。在VTP治疗中,静脉内输注9.0mg/kg WST11 5分钟,接着使用Modulight激光器在120mW/cm²下在753nm下照射10分钟。

[0125] 实施例8. 移植有MB49肿瘤的小鼠对使用WST11VTP和健择治疗的不同的方案的反应

[0126] 图8A-D示出移植有MB49肿瘤的Balb/C小鼠对图7中描述的不同的治疗方案的反应。图8A-8B分别示出在用以上WST11VTP/健择组合治疗之后小鼠后腿中的平均和个体MB49肿瘤生长(误差线, SEM对照对联合疗法 $p<0.0001$, 健择对联合疗法 $p<0.0001$, VTP对联合疗法 $p<0.0005$ (双因素方差检验))。所有对照动物在移植后20-25天由于肿瘤负荷而必须处死。健择或WST11VTP单一治疗方式轻微地延迟了肿瘤进展并且分别导致0 (健择对联合疗法 $p<0.0001$) 和16% (VTP对联合疗法 $p<0.001$) 治愈。然而, 联合治疗在肿瘤移植后100天显示65%无病动物。图8C描绘了响应于未治疗(对照)和通过不同的治疗方案(健择、VTP或VTP+健择)治疗的在第25天的肺远端转移(成像, A103+A112)的预防, 通过IVIS生物发光成像每周监测。来自4个治疗组的动物的代表性发光图像在下图示出并且将在VTP后第25天来自转移性肿瘤部位的平均发光强度的定量绘制在上图中。图8D中示出的联用组群(combination cohort)的总体存活率的改善在统计学上是显著的(VTP对联合疗法, $p<0.001$; 健择对联合疗法, $p<0.0001$)。将总体存活率(OS)绘制为Kaplan-Meier曲线并且对数秩检验用于统计学分析。当腿部肿瘤达到2500mm³时将小鼠处以安乐死并且记为死亡。从两个独立的实验组合所有数据。

[0127] 实施例9. 如在转移性演进中反映的适应性抗肿瘤免疫的演进和在由WST11VTP和健择治疗的动物中的再次激发成功

[0128] 如图9中所示, 对旨在考察在具有和不具有健择给药的WST11VTP的不同的给药方案之后在携带Mb49细胞的动物中的全身性抗肿瘤反应的演进的动物模型和治疗流程进行试验。图9A描绘了治疗流程3。在移植后第15天肿瘤达到直径为4-7mm(第0天)时进行VTP。在VTP消融之后第二天在左后腿上用第二次注射MB49来激发小鼠。从VTP之前3天开始, 在长达90天对健择和联用的组群以50mg/kg每周(3周循环, 第3周停用)给予健择。图9B涉及双侧模型的个体动物中的第二肿瘤生长。四张图示出未治疗的小鼠(对照)或用健择、WST11VTP或其组合治疗的小鼠中的肿瘤生长, 显示联用组群中的小鼠的71%处于无瘤状态。图9C呈现了Kaplan-Meier存活的小鼠, 其在VTP治疗后第125天(在第90天给予最后一次健择剂量)经由MB49细胞系的尾静脉注射被再次激发。所有未治疗的首次用于实验的小鼠到在MB49细胞的注射之后35天均死亡而在WST11VTP或WST11VTP/健择之后存活的小鼠的70%排斥肿瘤细胞。

[0129] 实施例10. T细胞缺陷和B细胞缺陷对携带肿瘤的小鼠对使用WST11VTP和健择的治疗的反应的影响

[0130] 图10示出缺乏T-细胞群和B-细胞群降低WST11VTP、健择及其组合在携带MB49肿瘤的Balb/C小鼠中的治疗效果。宿主免疫系统对治疗疗效的影响使用匹配WT C57B/6小鼠(WT, 实线)的背景的免疫受损的(裸)Rag1KO小鼠(KO, 虚线)来评估。图10A中的Kaplan-Meier曲线示出免疫受损的小鼠与用WST11VTP治疗的WT小鼠相比总体存活率的在统计学上显著的降低(WT $n=19$, Rag1KO $n=22$, $p<0.0001$)。在仅用吉西他滨(健择)治疗的小鼠的总体存活率方面发现了相似的差异(图10B) (WT $n=10$, Rag1KO $n=10$, $p<0.05$)。虽然在该实验中通过联合治疗治愈了30%的有免疫能力的小鼠(图10C), 但是在用WST11VTP和在120mg/kg或60mg/kg下的健择的组合治疗的免疫受损的小鼠中未发现治愈($p<0.24$) (WT n

=10, Rag1K0 n=7, $p<0.005$)。所有三种治疗方式的影响在Rag1K0小鼠中均减弱,表明T细胞群介导VTP、健择或其组合的治疗效果。

[0131] 以下实施例11-18提供了对携带肿瘤的动物对本申请中所述的不同的治疗方案的固有免疫应答的了解。

[0132] 实施例11:未治疗的Balb/C小鼠的脾脏中的免疫细胞群

[0133] 对照(未治疗)携带4T1的小鼠的脾脏中的免疫细胞群的FACS分析如上文中材料和方法所述来进行。结果在图11中示出:(A)粒细胞样/单核细胞样髓源抑制细胞(G/M-MDSC)和中性粒细胞;(B)树突细胞(DC);(C)肿瘤相关巨噬细胞(TAMs);(D)CD4和CD8T细胞;(E)调节性T细胞(Treg)。

[0134] 实施例12:与健择给药组合的STL-6014-PDT对携带4T1的小鼠的脾脏中的免疫细胞概况(profile)的治疗影响

[0135] 图12呈现了与健择给药组合的STL-6014-PDT对携带4T1的小鼠的脾脏中的免疫细胞概况的治疗影响。在3种治疗方案之后评估脾脏的细胞群的概况:STL-6014PDT、STL-6014PDT与健择(在PDT之前2天开始)、和仅健择。将治疗组与携带肿瘤的对照进行对比。取具有良好的治疗反应(通过在治疗后1周、2周和3周的原发性肿瘤消融来判断)的动物用于分析。针对固有免疫标记物和适应性免疫标记物对脾细胞进行染色,通过LSRII流式细胞仪(BD Bioscience, San Jose, CA)分析并且使用FlowJo软件(Tree Star, Ashland, OR)分析。在治疗后第一周,与对照相比,PDT和仅健择二者均显著地降低G-MDSC/中性粒细胞和M-MDSC的百分比。但是联合治疗方式的效果看起来更强。在治疗后第二周,相对于对照,仅健择的影响减弱,而PDT的影响是高度显著的且联合疗法的影响非常强。在第三周,与对照相比,MDSC仅在联合治疗的动物中减少。联合疗法对MDSC概况的持续性与适应性免疫的演进所需的时间很好地相关(Fisher等人,2017;Nowak等人,2003;Pitt等人,2016)。补充地,与对照相比,联合治疗使树突细胞群急剧地增加,特别是在前两周,并且贯穿治疗后3周使CD8细胞的细胞群急剧地增加。与对照相比,对于所有三种治疗方式,观察到对Treg群小得多的影响。

[0136] 实施例13:WST11VTP和健择对经治疗的动物的脾脏的影响

[0137] 图13将原位移植有4T1癌细胞并且未治疗的动物(对照)的脾脏重量的变化与经历健择治疗、WST11VTP治疗或它们的组合的携带肿瘤的动物进行比较。VTP和VTP+健择完全防止了在未治疗的动物中发现的脾脏重量的6倍增加,并且通过仅健择几乎完全避免了该增加。与图11和12中呈现的数据结合,脾脏重量增加主要是由于增加的粒细胞群和单核细胞群,其通过VTP+健择治疗大大降低。

[0138] 实施例14:与健择给药组合的WST11VTP对携带MB49肿瘤的小鼠中的抗肿瘤固有免疫的演进的影响

[0139] 在图14中描绘了携带MB49肿瘤的小鼠的对不同的治疗方案的固有免疫应答。(A)脾脏中的CD11b+的免疫组织化学(IHC)染色显示仅VTP和仅吉西他滨均耗竭脾脏中的CD11b+细胞但是联合治疗具有更强的效果。(B)对经治疗的动物的脾细胞的FACS分析显示,在治疗后第9天,通过仅WST11VTP或吉西他滨治疗全身性地耗竭中性粒细胞/G-MDSC和单核细胞/M-MDSC。这里,联用没有使骨髓群(myeloid population)减少,表明VTP和健择可能靶向相同的细胞群。用于流式的健择的给药时间表为在低剂量(60mg/kg)或高剂量(120mg/kg)

下在第-3天、第1天、第4天、第7天。重要的是,在4T1小鼠模型中,联合治疗与各单独治疗方式相比具有更深远的影响。

[0140] 实施例15:与健择给药组合的WST11VTP对抗肿瘤适应性免疫的演进的影响

[0141] 通过VTP和VTP+健择治疗携带MB49肿瘤的动物在治疗后6天导致脾脏、血液和引流淋巴结中的CD8细胞群的显著的升高。有趣的是,此时没有在Treg群中观察到显著的效果。然而,在联合疗法之后6天看到肿瘤中的Treg群几乎完全耗竭(图15B)。WST11-VTP/健择组合在VTP后第6天增加了淋巴结(LN)、脾脏和血液中的细胞毒性T细胞群(CD8)和Teff (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$),显示仅VTP未使CD8T细胞/Treg比率增加,但是VTP/健择组合具有强的效果。VTP/Gem组合减少了Treg群并且显著地增加了肿瘤中的Teff群。在治疗后第9天维持Teff/Treg值的升高。在VTP后第6天和第9天,通过联用增加肿瘤中的中央型记忆T细胞(central memory T cell, T_{CM})的水平。已经报道该群与 T_{EM} 细胞相比在数种不同的模型系统中赋予针对癌症的优异的保护。

[0142] 实施例16:与环磷酰胺(CTX)的低剂量应用组合的WST11VTP的治疗流程

[0143] 图16表明了与作为免疫调节剂的环磷酰胺(CTX)的低剂量应用组合的WST11VTP用于携带4T1肿瘤的小鼠的治疗的治疗流程。在动物的后腿中移植 1×10^6 个癌细胞后4天,腹膜内给予环磷酰胺(例如50/150mg/kg)。3天后,当肿瘤达到直径为4-7mm,对动物输注WST11 (9.5mk/Kg) 10min并且此后立即施加在753nm ($120-200\text{mW}/\text{cm}^2$) 下的照射10-15min。

[0144] 实施例17. 低和高剂量环磷酰胺(CTX)给药对移植在小鼠后腿中的皮下(s.c.) 4T1-luc乳腺肿瘤的WST11VTP介导的消融的影响

[0145] 图17和18描绘了低和高剂量环磷酰胺(CTX)给药对移植在小鼠后腿中的皮下(s.c.) 4T1-luc乳腺肿瘤的WST11VTP介导的消融的影响。在后腿携带4T1-luc乳腺肿瘤的小鼠是未治疗的或者进行仅单次CTX给药(上图);通过WST11治疗(在低的或高的光强度下的VTP)(中图);或者通过与在VTP之前3天给予的单剂量CTX(50或150mg/kg)组合的WST11 (9.0mg WST11/kg) VTP治疗(下图)。在图17中描绘了不同的治疗方案对个体动物中的疾病进展的影响。

[0146] 通过在两种剂量下的CTX给药的单一疗法以及在低的光强度下的WST11VTP似乎不能抑制原发性肿瘤生长。在高的光剂量下的WST11VTP使肿瘤再生的时间加倍。WST11VTP与CTX的组合显著地抑制肿瘤生长,导致原发性肿瘤的~60%完全消融。在图18中描绘了在不同的治疗方案之后的累积的小鼠存活率。这里,在VTP之前3天,将携带皮下移植在后腿的4T1-luc乳腺肿瘤的Balb/c小鼠进行仅使用低的(上图)或高的(下图)光强度或者与单剂量CTX给药(50或50mg/kg)组合的WST11VTP。对于所有经治疗的小鼠(图18A、C)或对于经历了原发性肿瘤的不可逆的完全消融的动物(图18B、D),通过Kaplan-Meier曲线示出治疗结果。与低剂量(50mg/kg)CTX组合的WST11VTP显著地改善小鼠存活率,最终30%的小鼠在90天跟踪之后被完全治愈。其它治疗方案,例如具有较高的光剂量或较高剂量的CTX给药的VTP未能提供延长的存活,导致局部复发和随后进展为肺转移。在呈现原发性肿瘤完全消融的小鼠的组中,仅联合治疗在显著比例的经治疗的小鼠(60-80%,取决于VTP方案)中诱导针对肺转移的保护。

[0147] 实施例18:不同的治疗方案对携带皮下4T1-luc乳腺肿瘤的Balb/c小鼠中的具有肺转移的动物的百分比的影响

[0148] 如由图19A中的集落试验描绘的,在它们的后腿移植有4T1癌细胞的Balb/C在肺中呈现癌细胞。当施加高的光剂量和低的CTX剂量时,通过与CTX给药组合的WST11VTP(如图16中描述的治疗流程4)治疗携带肿瘤的动物导致在移植后第90天肺转移的完全消灭(图19B)。相比之下,即使当原发性肿瘤完全消融时,仅进行VTP的小鼠的大多数也发生肺转移。

[0149] 实施例19:CTX对移植的肿瘤中的调节性T细胞(Treg)群的影响

[0150] 先前显示,CTX在节律性方案下在低剂量下向患者提供时使Treg群减少。因此,其对WST11VTP结果的协同效果可以由通过降低促肿瘤(proto-tumor) Treg的相对百分比来增强细胞毒性T细胞活性导致。事实上,在图20中描绘了Foxp3阳性细胞向移植在Balb/C小鼠的后腿中的4T1-luc肿瘤的浸润。这里,当在CTX或盐水给药后指定的时间达到30-60mm³时,将4T1肿瘤切除、用福尔马林固定并且用石蜡包埋。制备切片并且针对Foxp3表达染色。阳性细胞的数量使用Fiji软件来测量。示出了VTP日的代表性图片和定量(图19A、B)。3天后,CTX给药显著地降低了通过调节性Foxp3⁺T细胞的肿瘤浸润(图19C)。这减轻了肿瘤中的免疫抑制微环境,使抗肿瘤免疫应答在VTP之后演进。

[0151] 实施例20:在WST11VTP之前3天的低剂量CTX给药对携带4T1-luc肿瘤的小鼠的引流淋巴结和脾脏中的T细胞群的影响

[0152] 图20示出在WST11VTP之前3天给予的低剂量CTX在VTP日降低携带肿瘤的小鼠的引流淋巴结和脾脏中的细胞的数量。与显示细胞计数的下降的仅接受VTP的那些相比,在CTX治疗的动物中观察到总细胞数量的显著的增加。该发现表明了CTX介导的免疫细胞的耗竭,接着是原初(naïve)免疫细胞的再生(repopulation)。更具体地,与仅进行VTP的动物相比,CTX给药在VTP之后降低淋巴结和脾脏二者中的调节性Foxp3⁺T细胞的数量。在脾脏中,还存在CD8⁺细胞毒性T细胞的小但是显著的增加,证明总体向对于抗肿瘤免疫发展有益的免疫活性状态转变。

[0153] 实施例21:低剂量CTX给药对在后肋腹携带皮下4T1-luc肿瘤的小鼠的肿瘤和脾脏中的骨髓细胞群的影响

[0154] 在CTX给药后3天(VTP日)收集肿瘤和脾脏,将细胞分离并且染色用于使用抗CD11b、Ly6G和Ly6C抗体的流式细胞术。

[0155] 图21示出低剂量CTX使已知在肿瘤微环境中抑制抗肿瘤免疫应答的G-MDSCs/中性粒细胞减少,允许更有效的免疫应答在VTP之后演进。

[0156] 在实施例20和21之后,我们得出结论,在WST11VTP之前的CTX给药的治疗优势反映了Treg减少和MDSC减少二者,使动物经受固有和适应性免疫系统二者的增强的效果。

[0157] 实施例22:在乳腺脂垫携带皮下4T1-luc肿瘤的Balb/C小鼠在不同的治疗方案之后的存活率

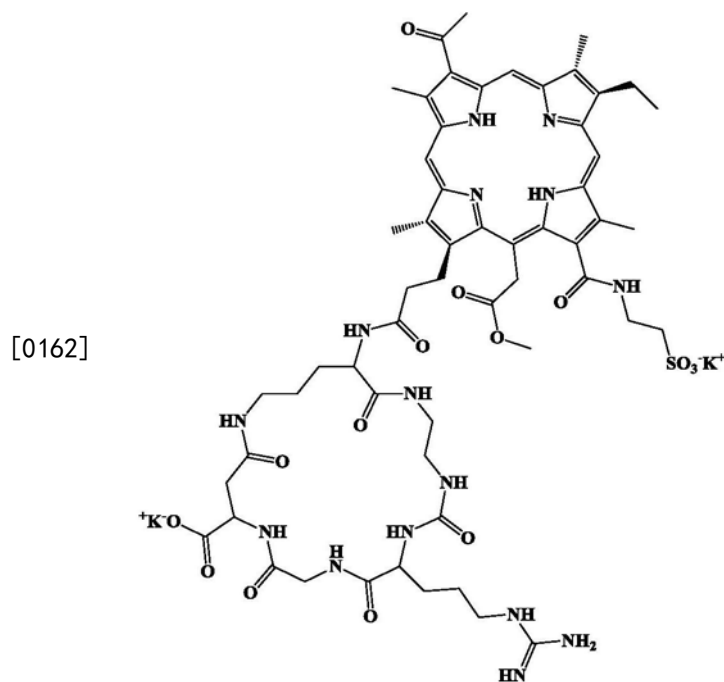
[0158] 将在与CTX给药(图23A,黑色,50mg/kg)组合的WST11VTP之后的动物存活率与通过与健择(图23A,蓝色,75mg/kg)组合的WST11VTP治疗的动物的那些进行比较。

[0159] 使用在200mW/cm²下照射15min的9mg/kg WST11VTP的单独的VTP导致在发生局部复发和肺转移的小鼠的大多数中非常有限的存活率(图23B-绿色)。将VTP与在VTP之前1天开始并且在VTP后第1天、第6天和第11天继续的CTX给药组合未能显著地改善治疗结果(图23B-红色),而根据相同的方案的健择给药与VTP治愈了~20%的小鼠(图23B-黄色)。与根据第2个方案(在第-2天开始,接着是另外3次给药、每5天1次)的健择组合的VTP使存活率增

加至超过30% (图23B-蓝色)。在第-3天、第3天、第8天和第13天给予CTX的情况下,获得了最成功的结果,总计几乎60%的治愈动物 (图23B-灰色)。在图23C中描绘了这些结果的图表总结,并且可以表明,在与WST11VTP组合时,CTX相对于健择治疗可能具有一些优势。另外,当与WST11VTP组合时,健择的节律性方案的延长如以上MB49所证明的可以达到与CTX1和WST11VTP相似的治愈率。

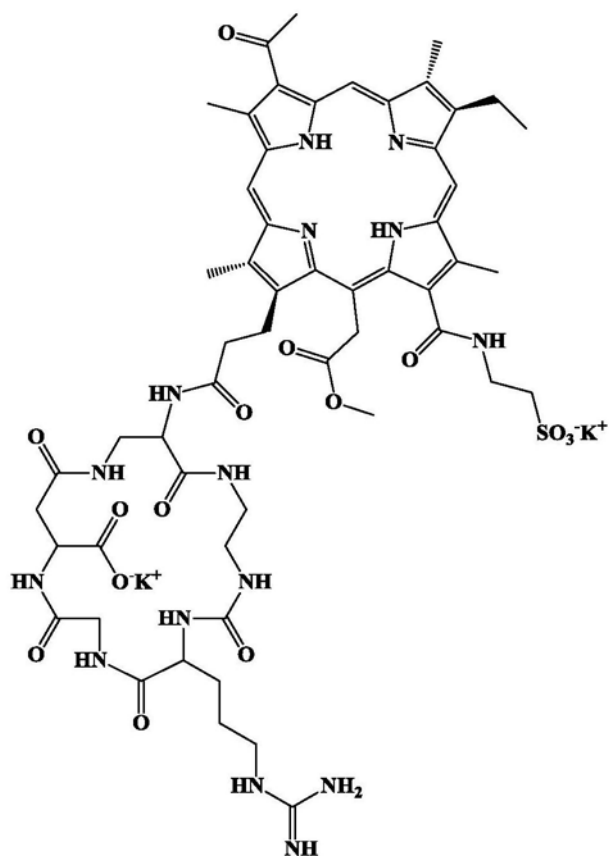
[0160] 附录

[0161] STL-6038



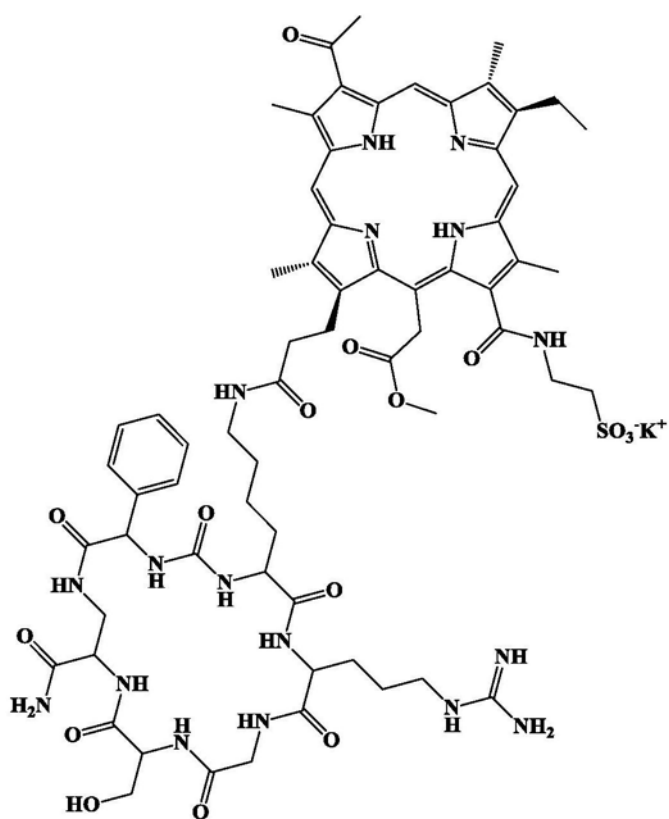
[0163] STL-6033

[0164]



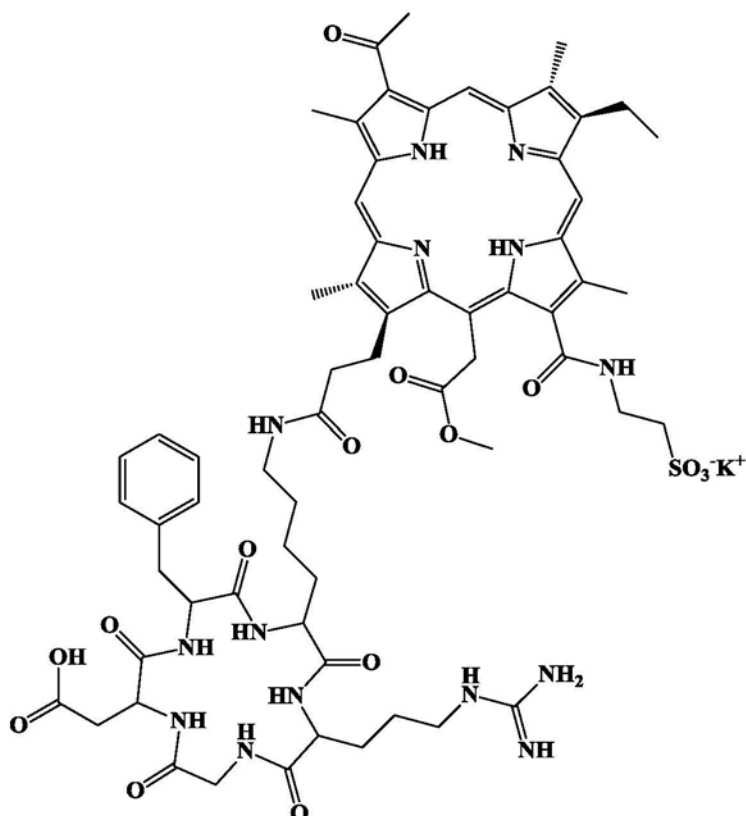
[0165] STL-6068

[0166]



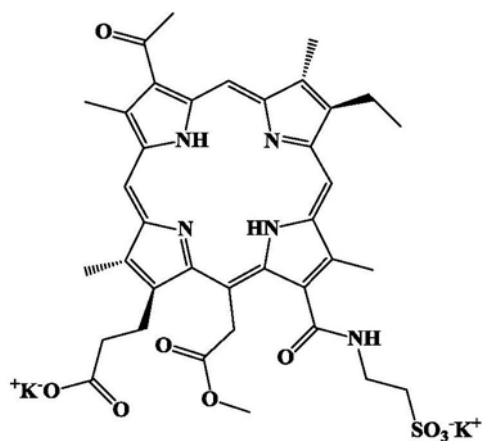
[0167] STL-6014

[0168]



[0169] STL-7012

[0170]



[0171] 参考文献

[0172] Barbon, C.M., et al., 2010, Consecutive low doses of cyclophosphamide preferentially target Tregs and potentiate T cell responses induced by DNA PLG microparticle immunization. *Cell. Immunol.* 262 (2): 150-161.

[0173] Castano, A.P., et al., 2008, Photodynamic therapy plus low-dose cyclophosphamide generates antitumor immunity in a mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105 (14): 5495-5500.

[0174] Gabrilovich D.I., 2017, Myeloid-Derived Suppressor Cells, *Cancer Immunol. Res.* 5 (1): 3-8.

[0175] Ge, Y., et al., 2012, Metronomic cyclophosphamide treatment in metastasized breast cancer patients: immunological effects and clinical

outcome.Cancer Immunol.Immunother.61(3):353-362.

[0176] Ghiringhelli F.,et al.,2007,Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients.Cancer Immunol.Immunother.56(5):641-648.

[0177] Goldshaid L.,Rubinstein E.,Brandis A.,Segal D.,Leshem N.,Brenner O.,Kalchenko V.,Eren D.,Yechezkel T.,Salitra Y.,Salomon Y.and Scherz A.,2010,Novel design principles enable specific targeting of imaging and therapeutic agents to necrotic domains in breast tumors.Breast Cancer Research 12:R29.

[0178] Le H.K.,Graham L.,Cha E.,Morales J.K.,Manjili M.H.,and Bear H.D.,2009,Gemcitabine directly inhibits myeloid derived suppressor cells in BALB/c mice bearing 4T1 mammary carcinoma and augments expansion of T cells from tumor-bearing mice.International Immunopharmacology 9:900-909.

[0179] Levy M.Y.,et al.,2009,Cyclophosphamide unmasks an antimetastatic effect of local tumor cryoablation.J.Pharmacol.Exp.Ther.330(2):596-601.

[0180] Madondo M.T.,et al.,2016,Low dose cyclophosphamide:Mechanisms of T cell modulation.Cancer Treat.Rev.42:3-9.

[0181] Marvel D.,and Gabrilovich D.I.,2015,Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment:expect the unexpected.J.Clin.Invest.125(9):3356-64.

[0182] Mroz P.,et al.,2010,Photodynamic therapy of tumors can lead to development of systemic antigen-specific immune response.PLoS One 5(12):e15194.

[0183] Najjar Y.G.,and Finke J.H.,2013,Clinical perspectives on targeting of myeloid derived suppressor cells in the treatment of cancer.Front Oncol.15(3):49.

[0184] Ramachandran I.,Youn J.I.,Gabrilovich D.I.,and Condamine T.,2015,Regulation of tumor metastasis by myeloid-derived suppressor cells,Annu.Rev.Med.66:97-110.

[0185] Reginato,E.,et al.,2013,Photodynamic therapy plus regulatory T-cell depletion produces immunity against a mouse tumour that expresses a self-antigen.Br.J.Cancer 109(8):2167-2174

[0186] Suzuki E.,Kapoor V.,Jassar A.S.,Kaiser L.R.,and Albelda S.M.,2005,Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity.Clin.Cancer Res.11(18):6713-21.

[0187] Xia,Y.,et al.,2014,CpG oligodeoxynucleotide as immune adjuvant enhances photodynamic therapy response in murine metastatic breast cancer.J.Biophotonics 7(11-12):897-905.



图1A

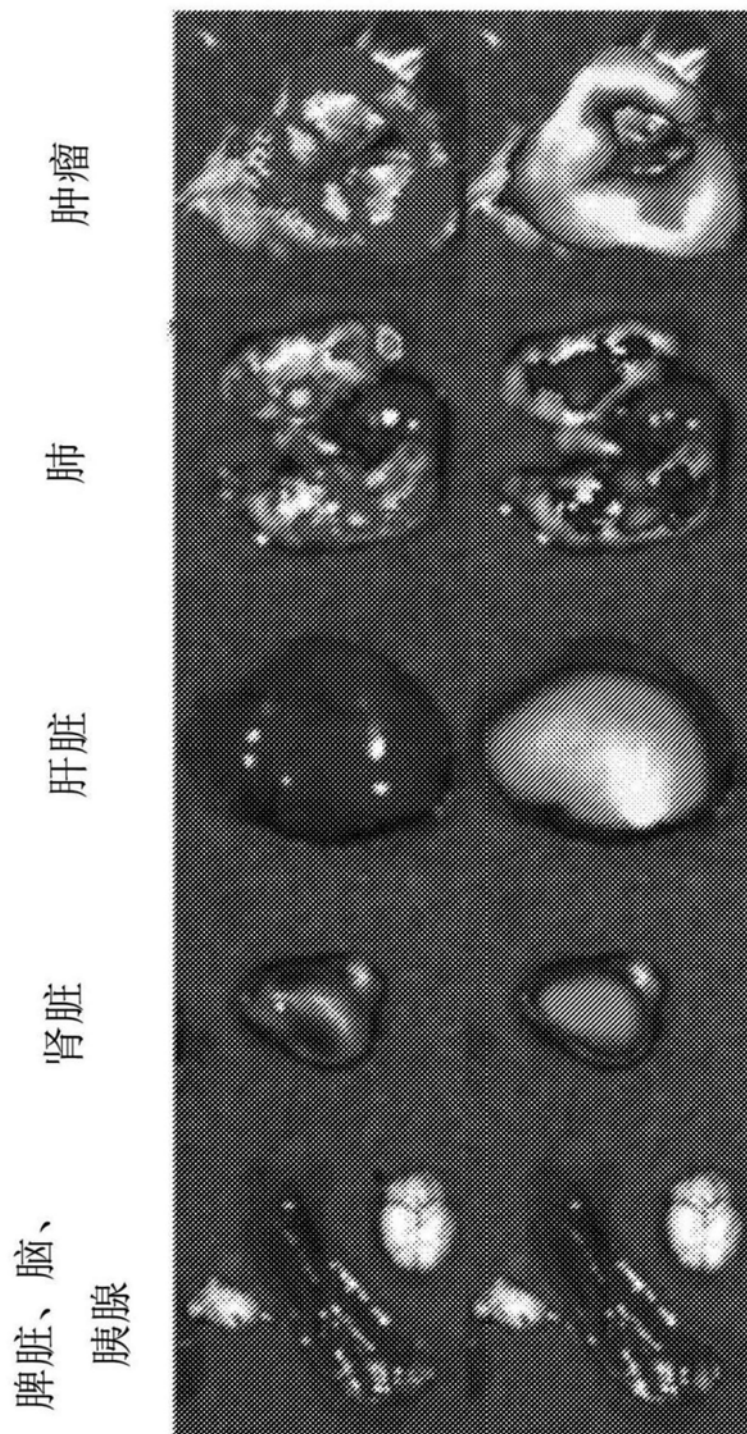


图1B

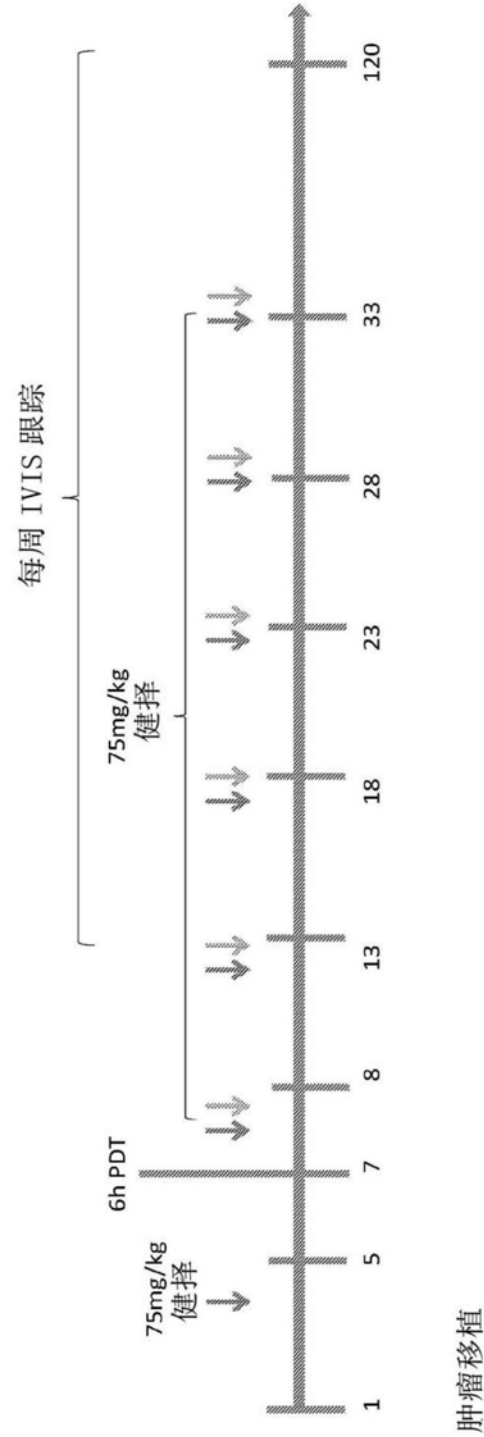


图2A

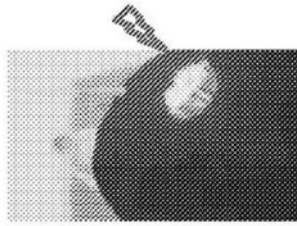


图2B

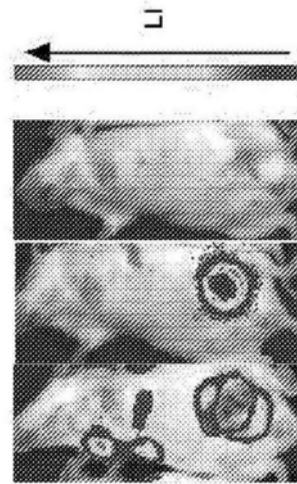


图2C

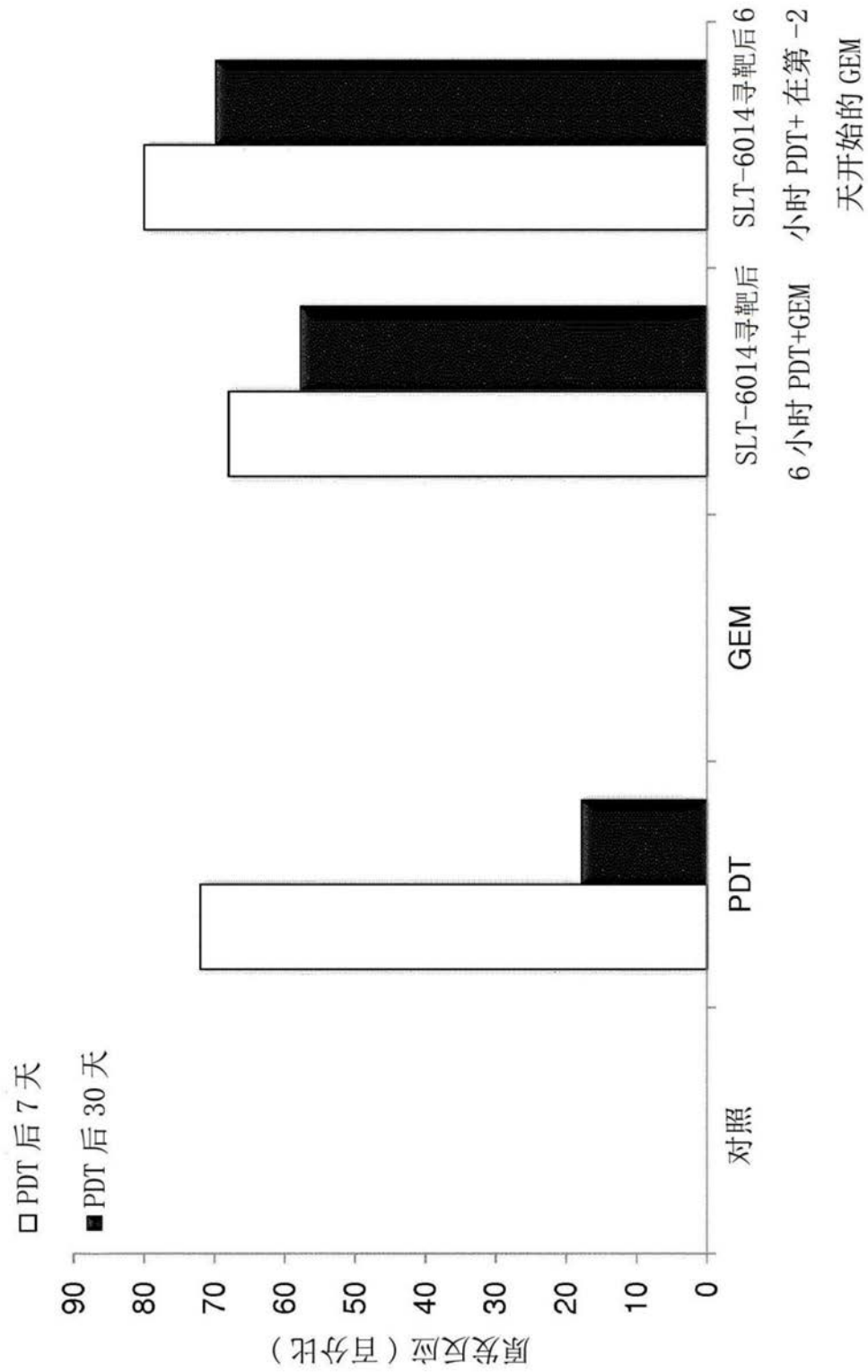


图3

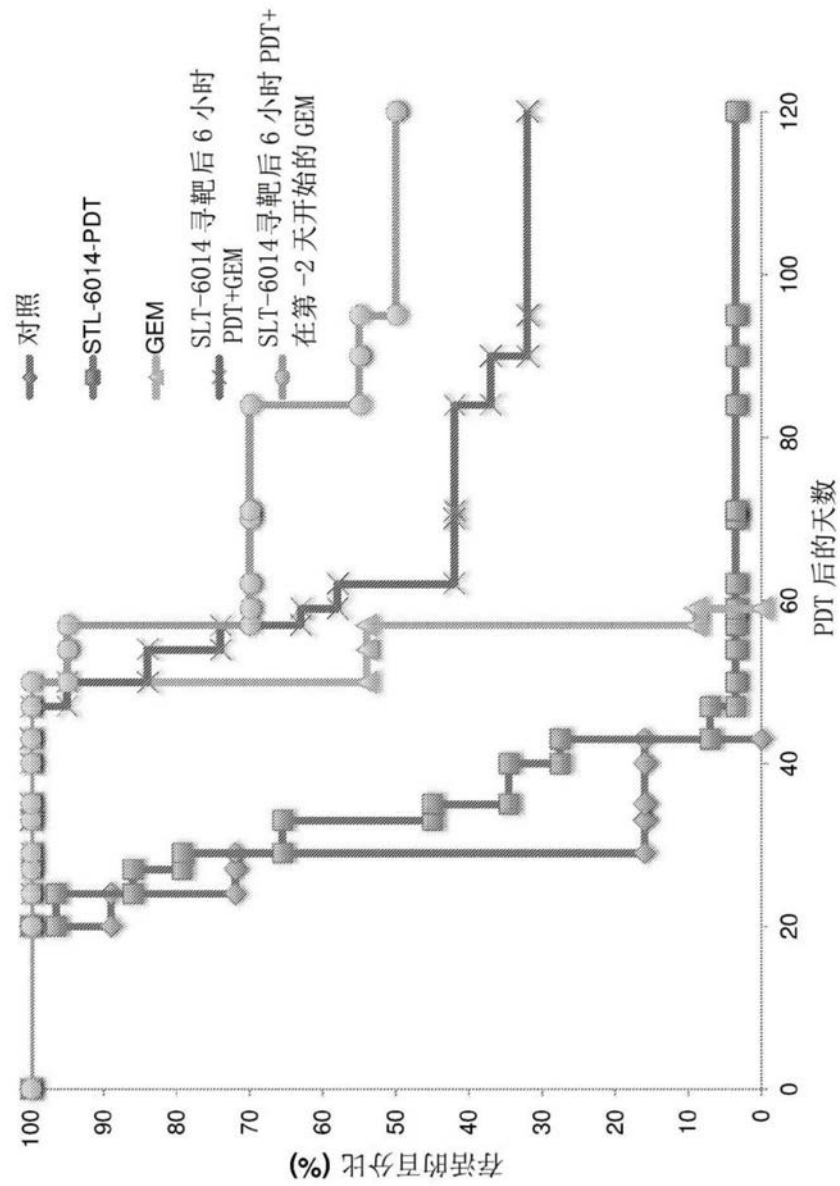


图4

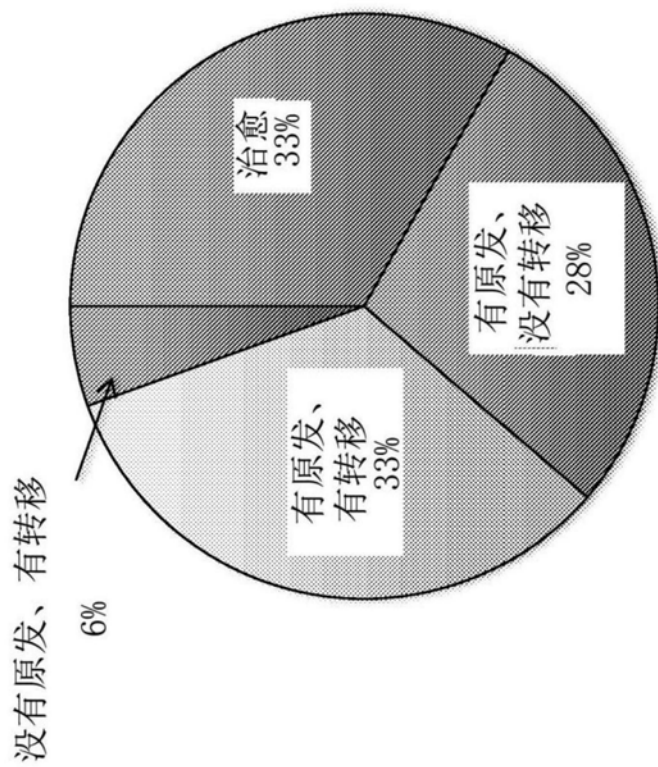


图5A

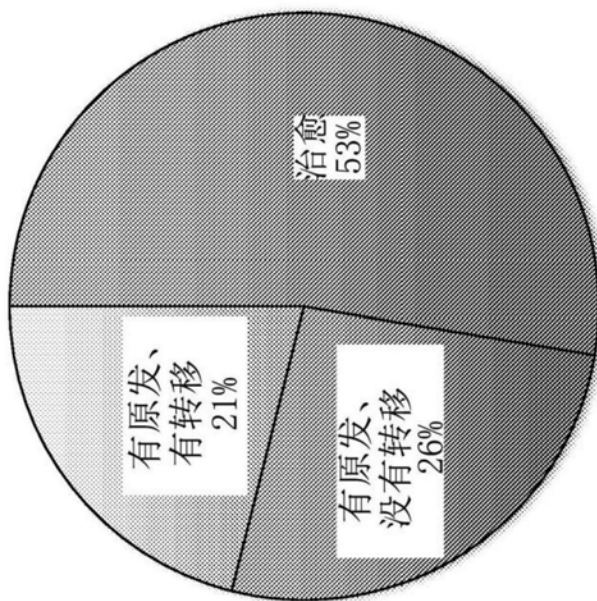


图5B

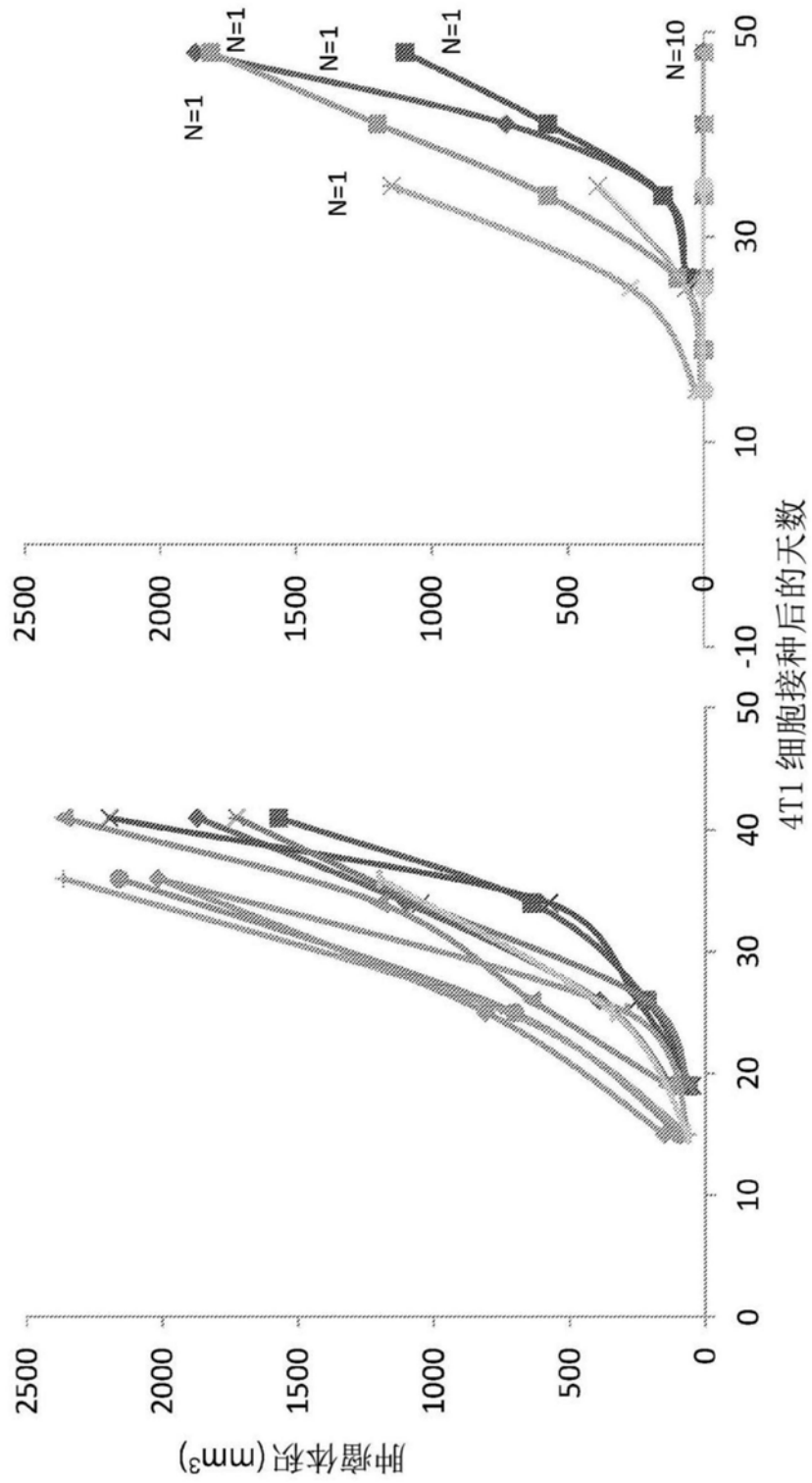


图 6A

图 6B

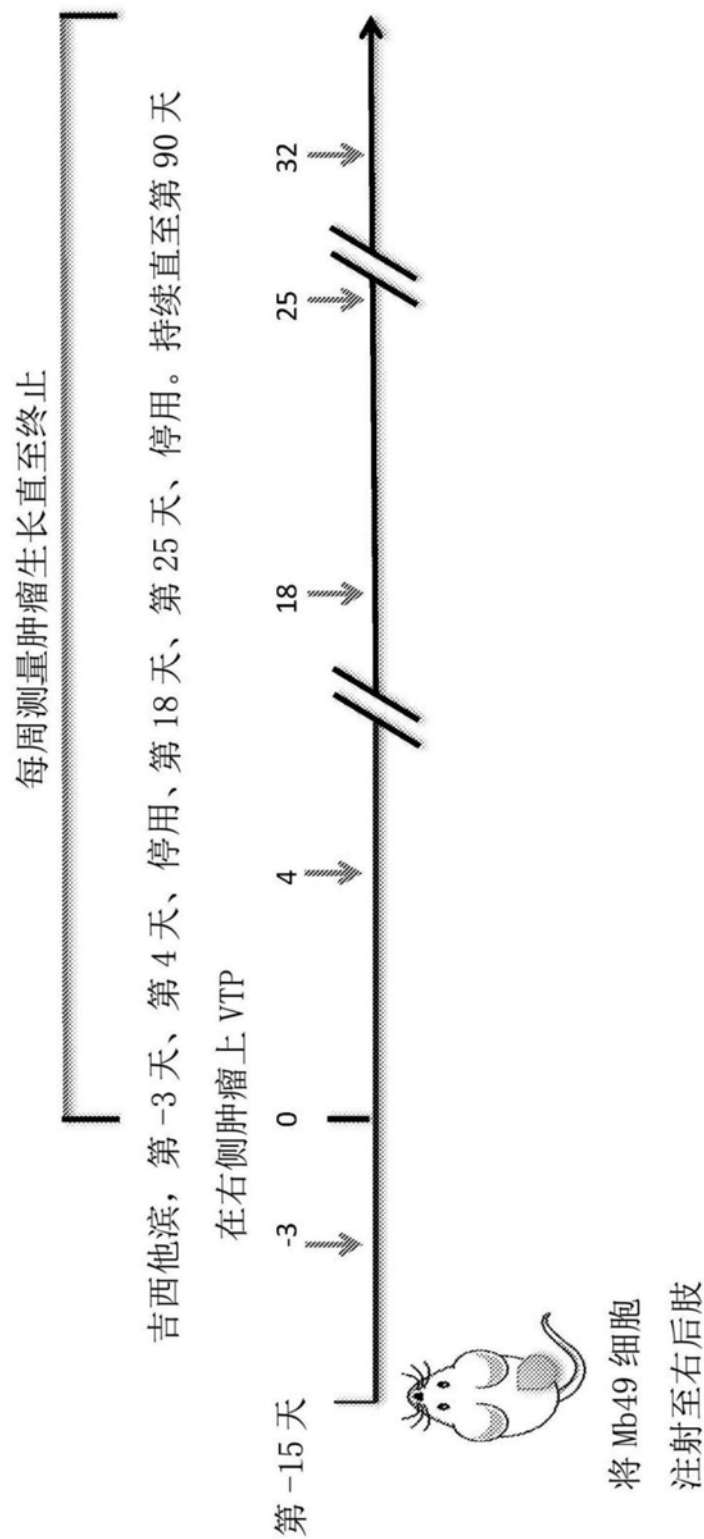


图7

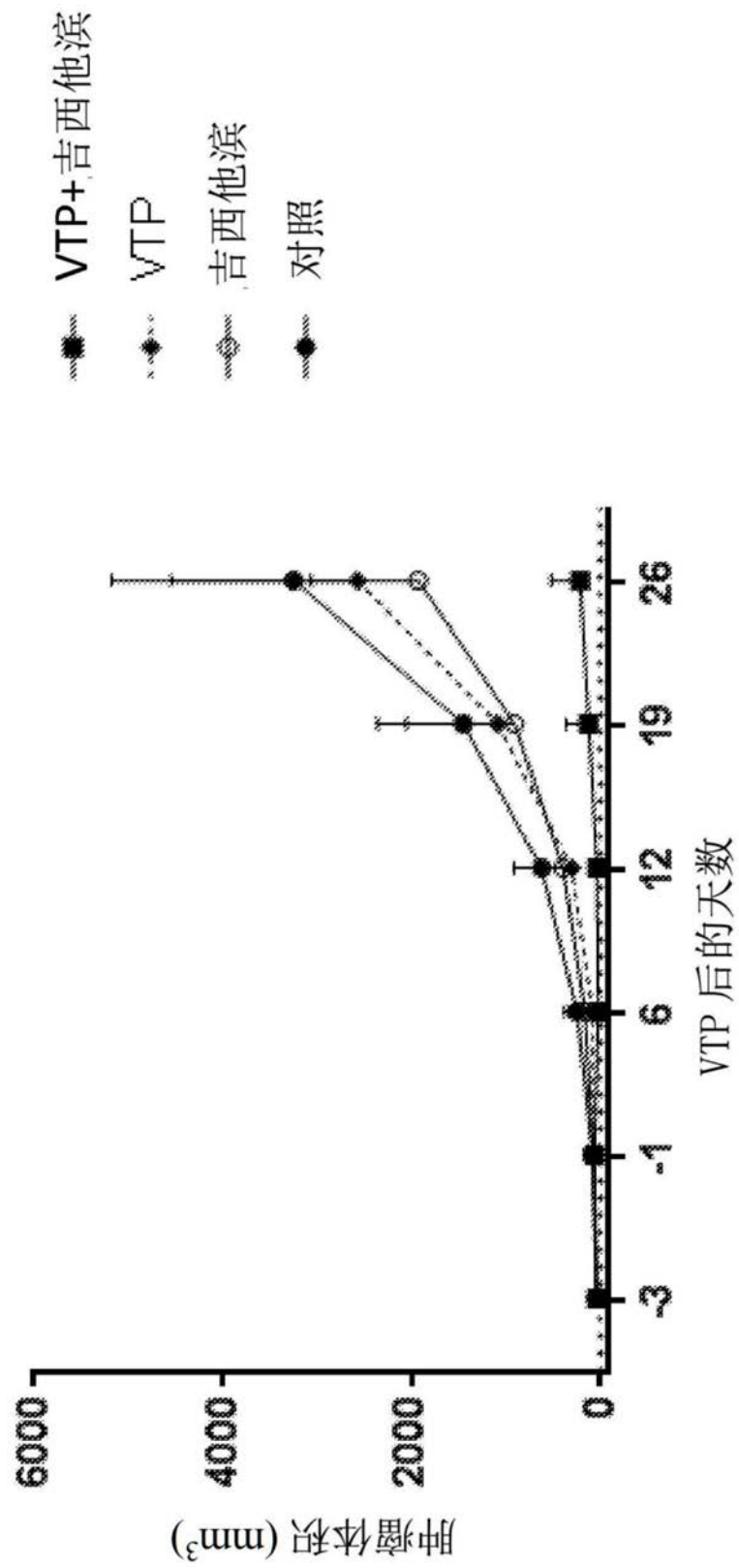


图8A

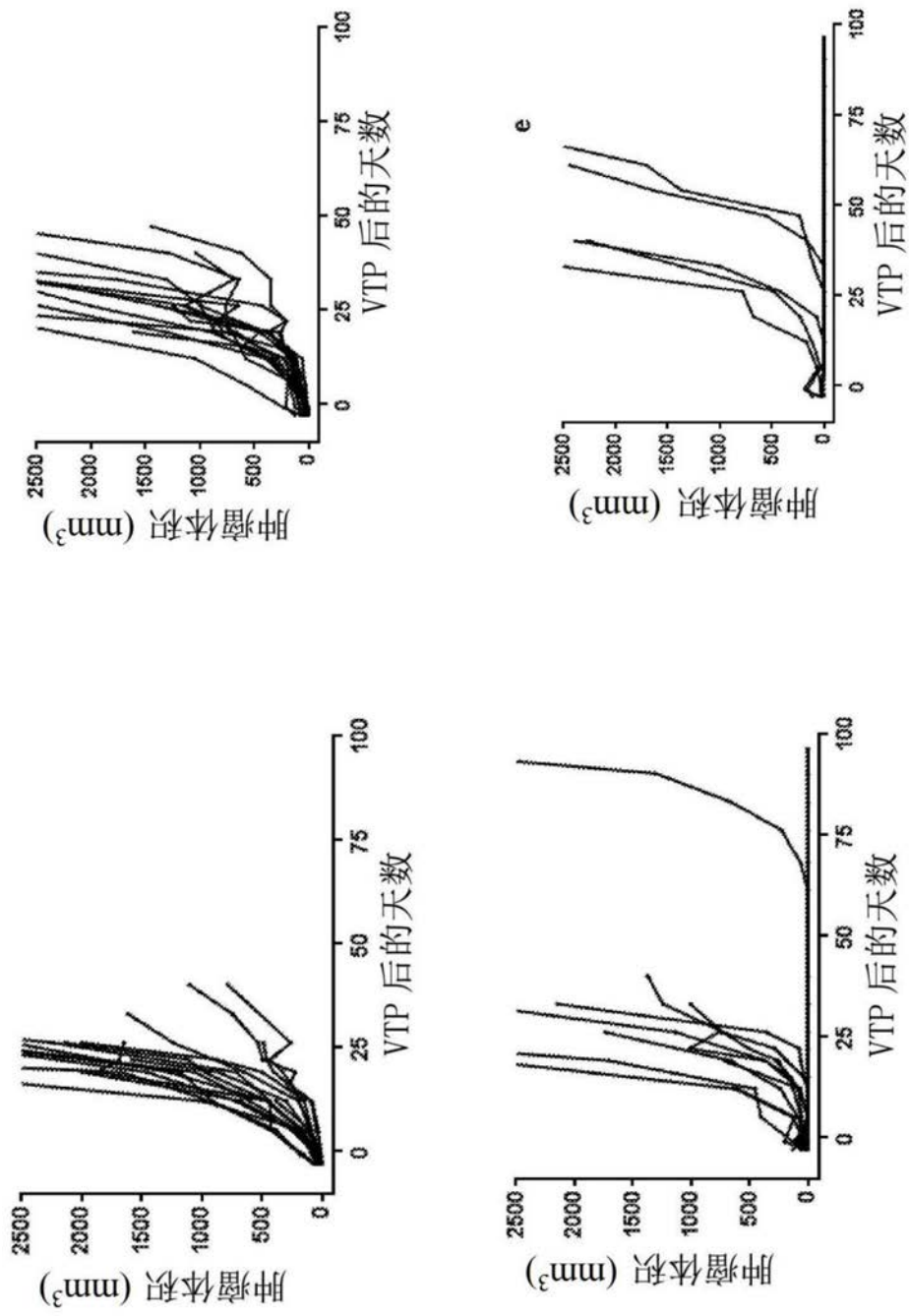


图8B

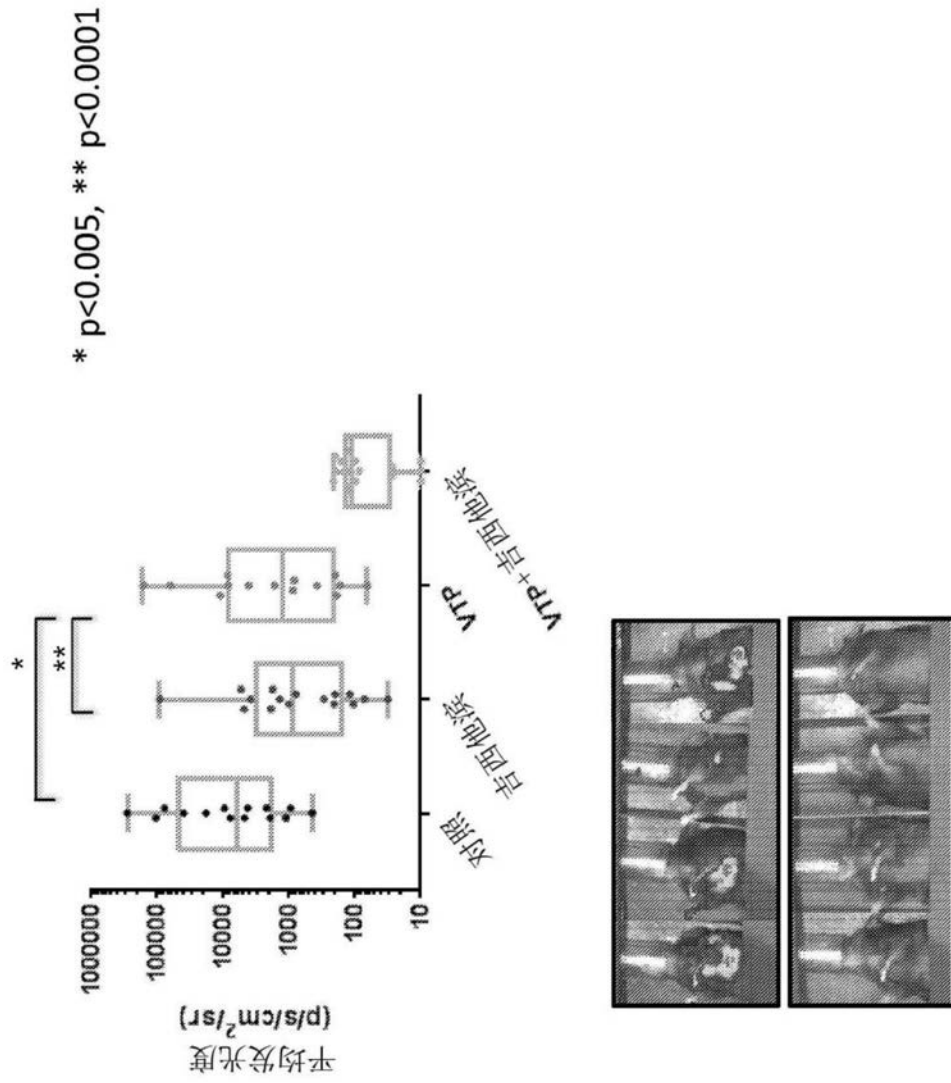


图8C

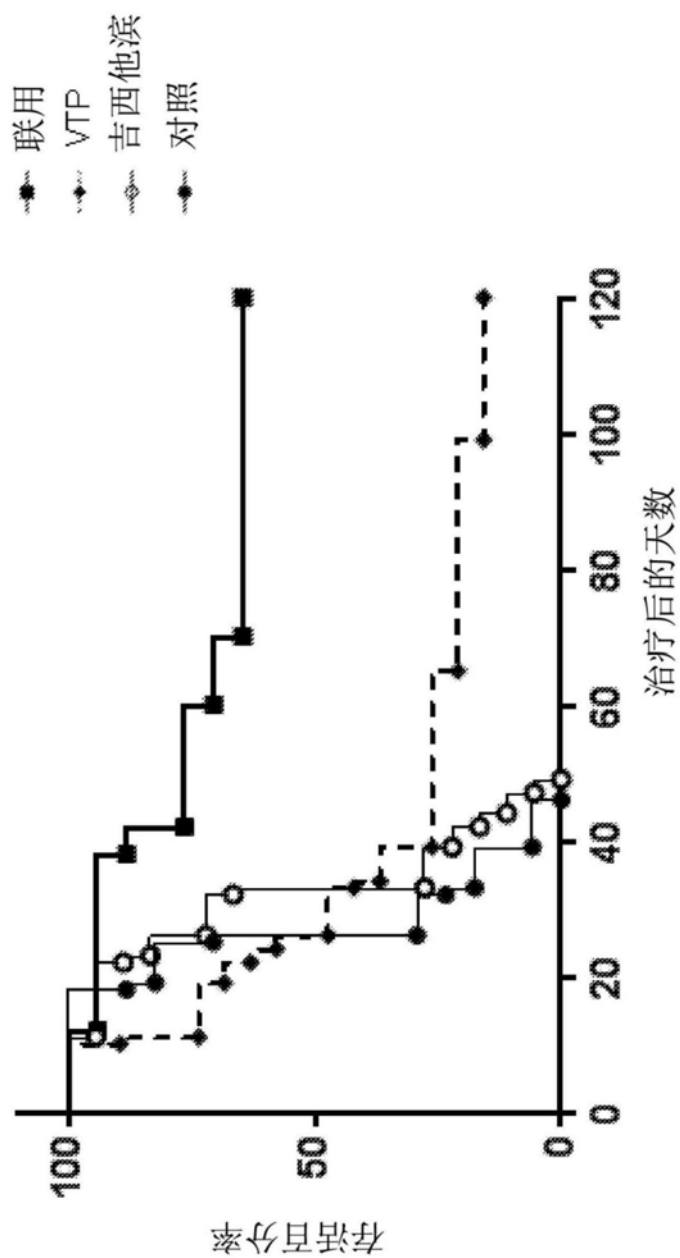


图8D

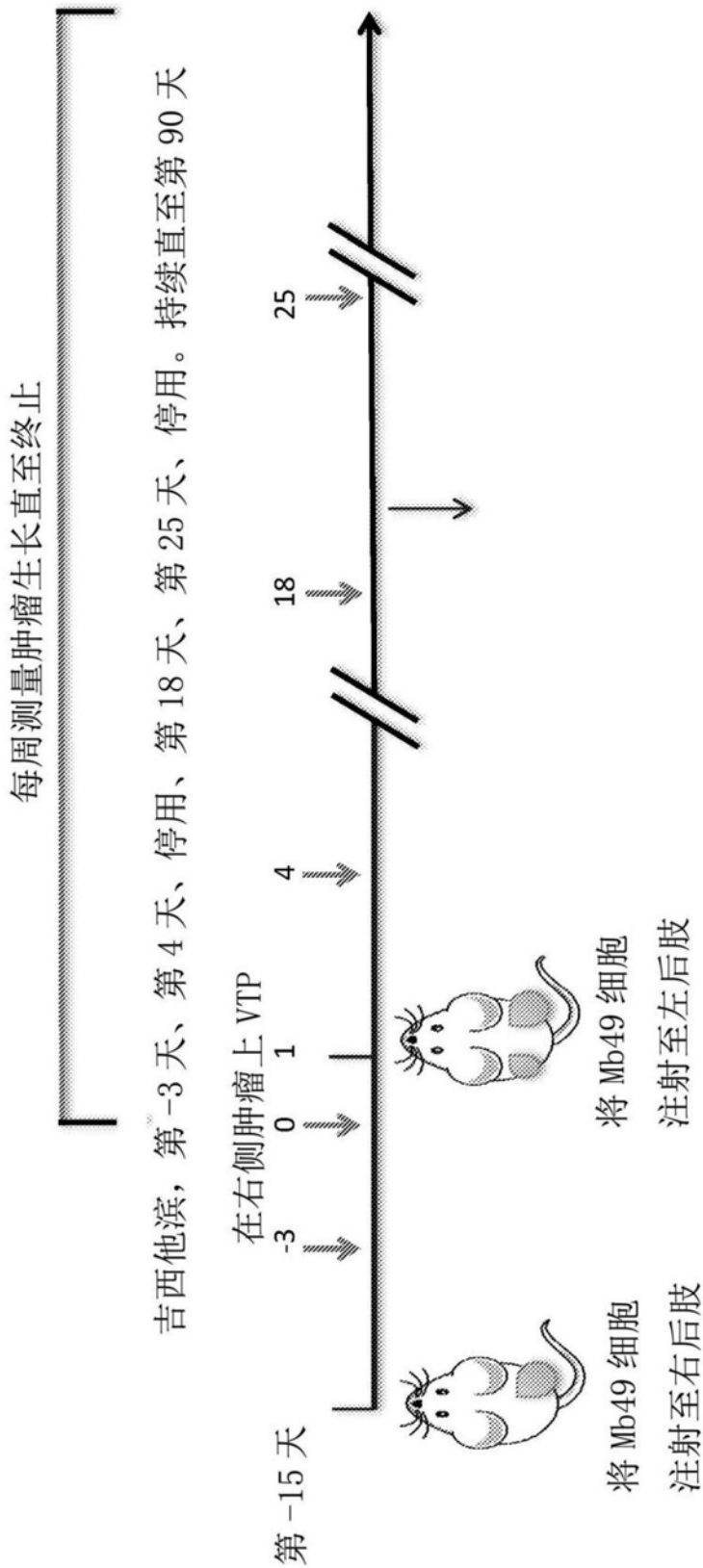


图9A

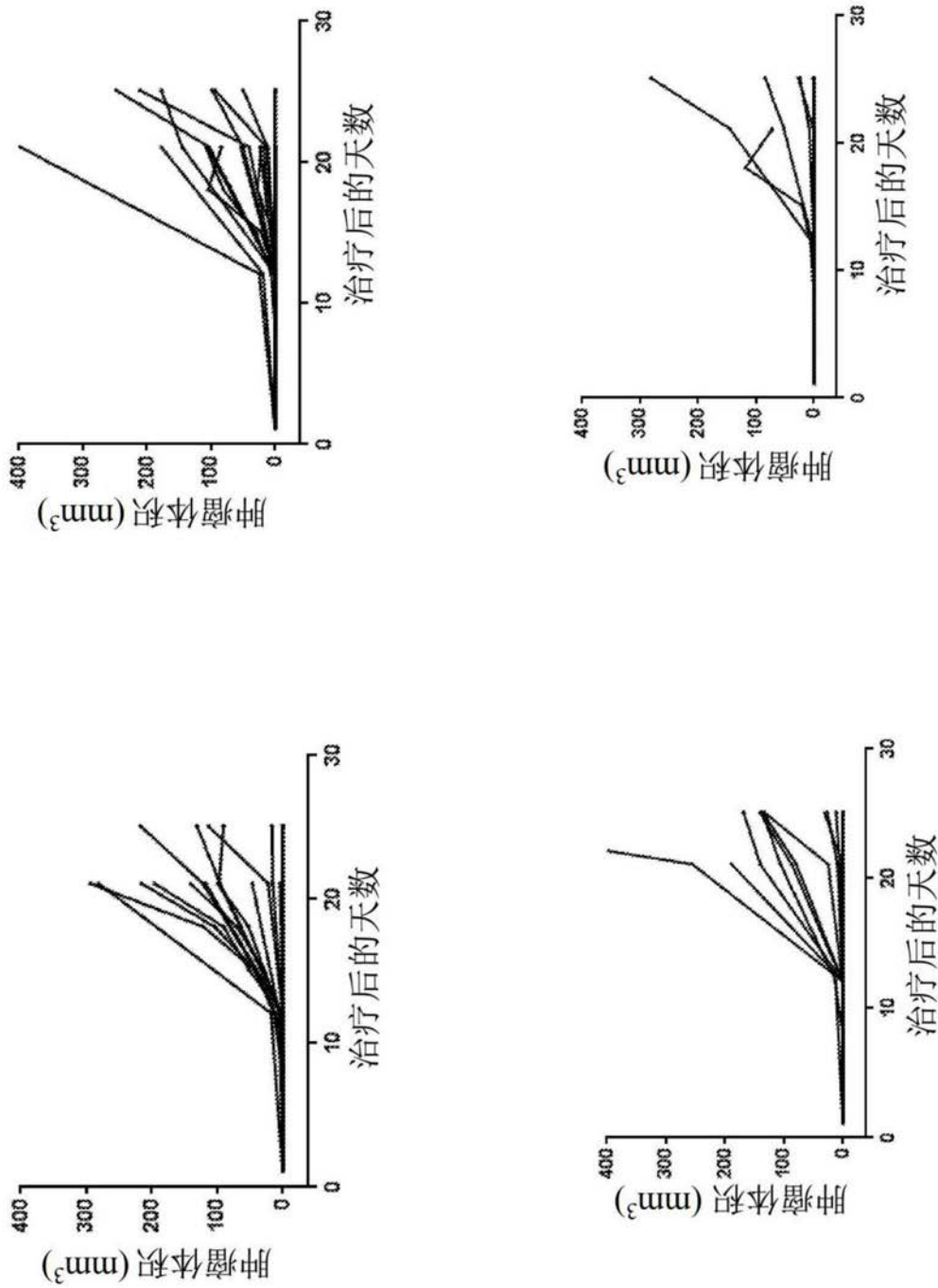


图9B

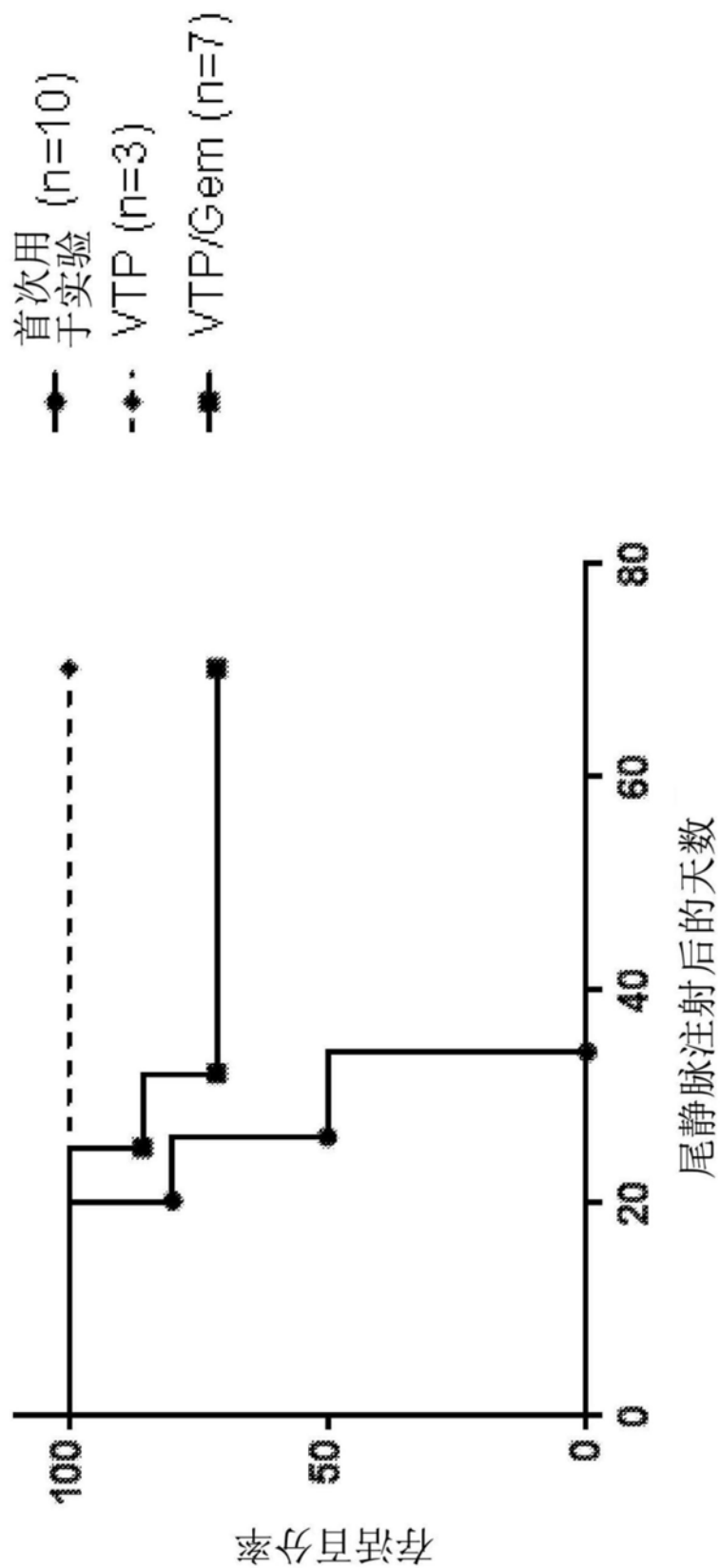


图9C

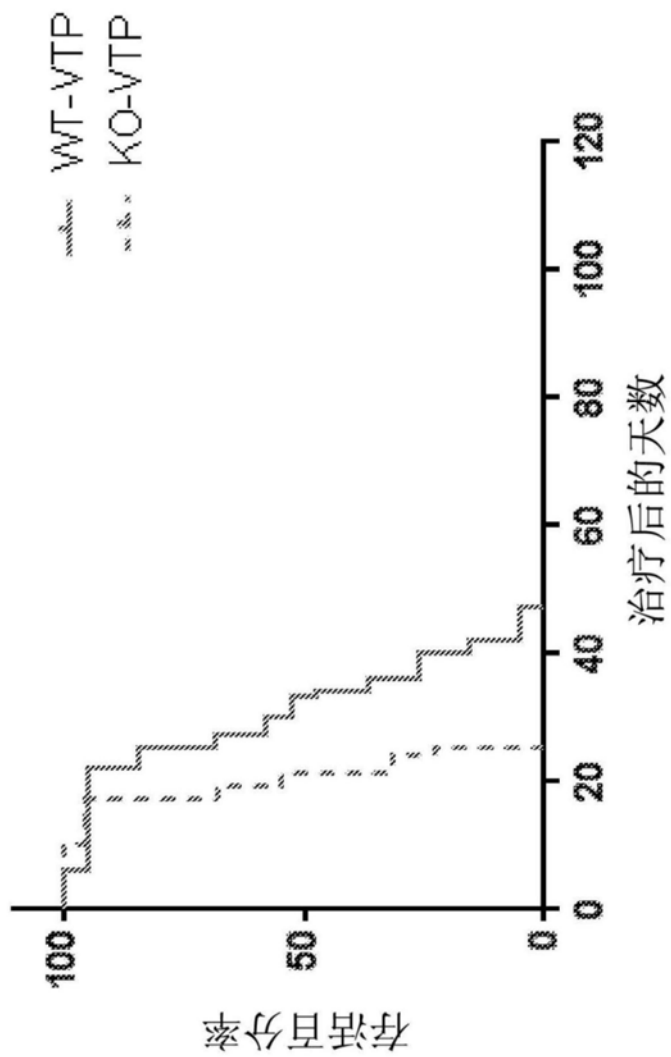


图10A

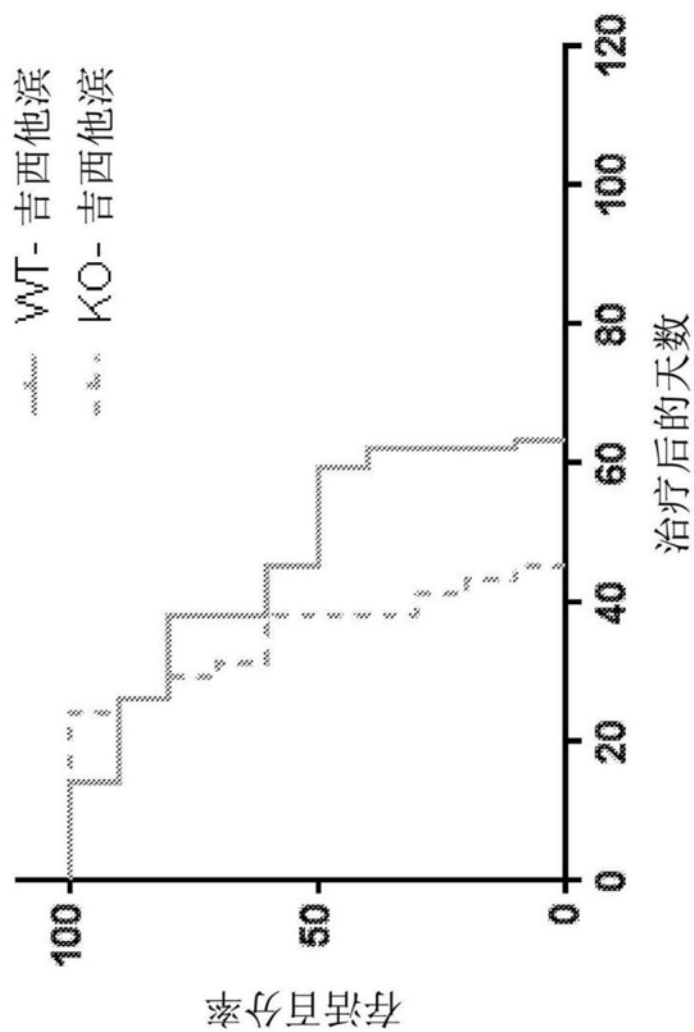


图10B

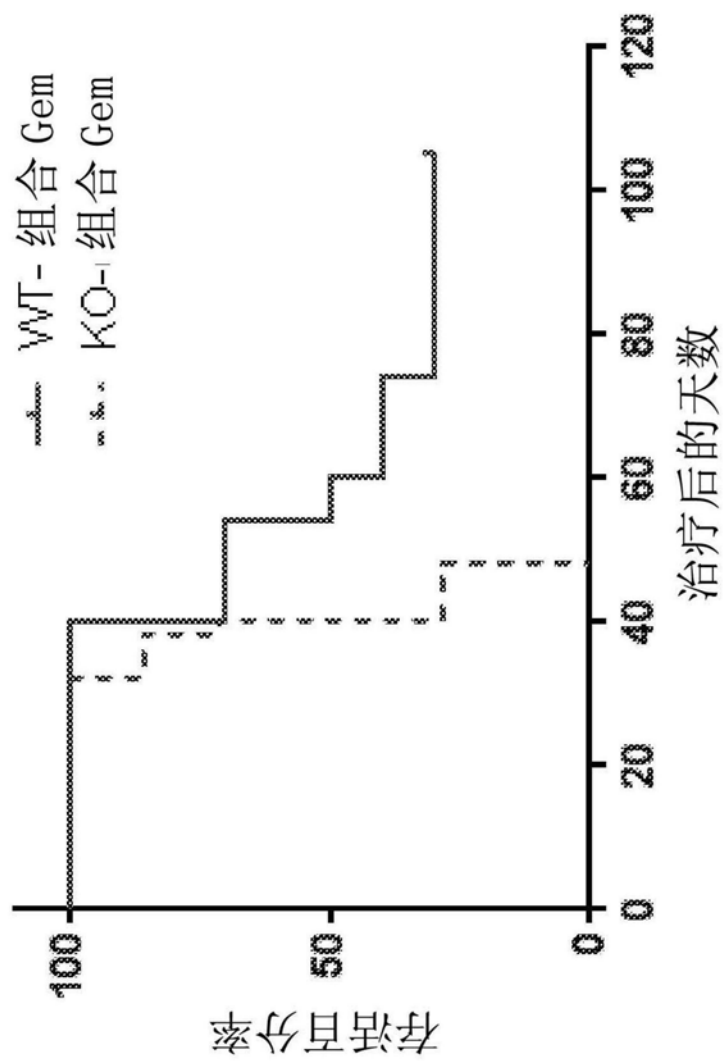


图10C

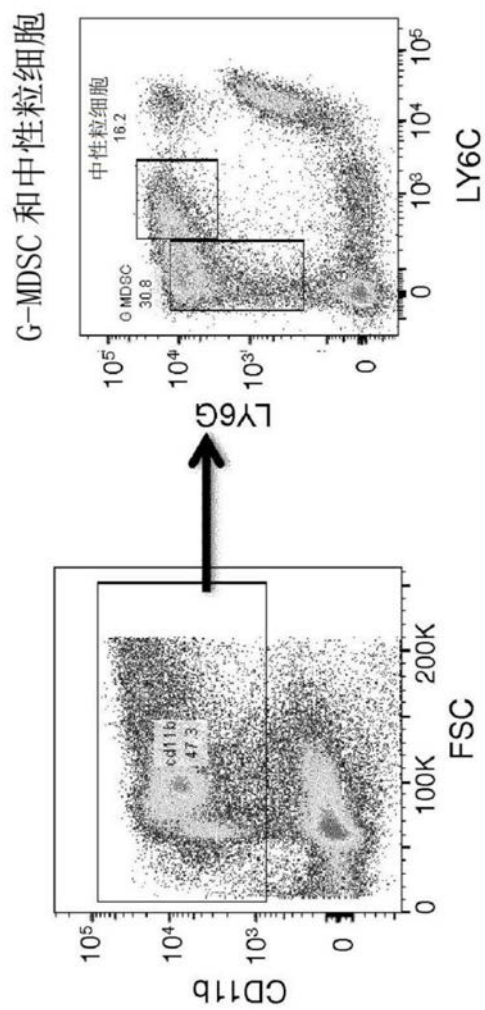


图11A

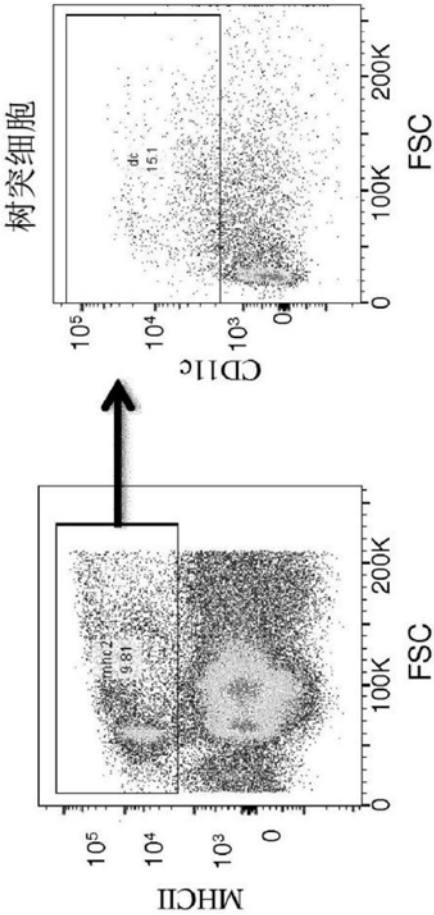


图11B

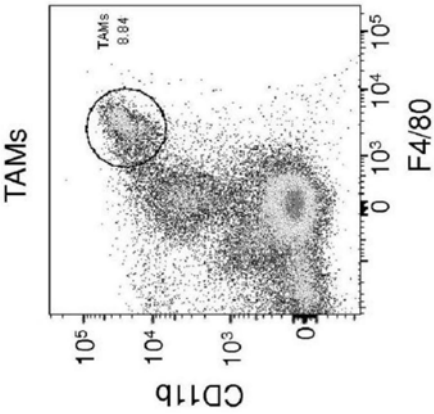


图11C

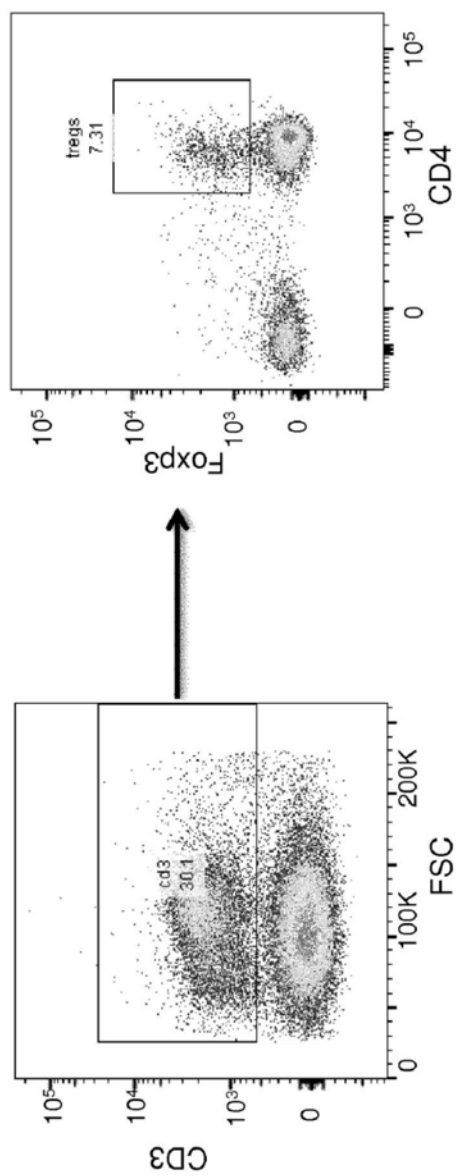
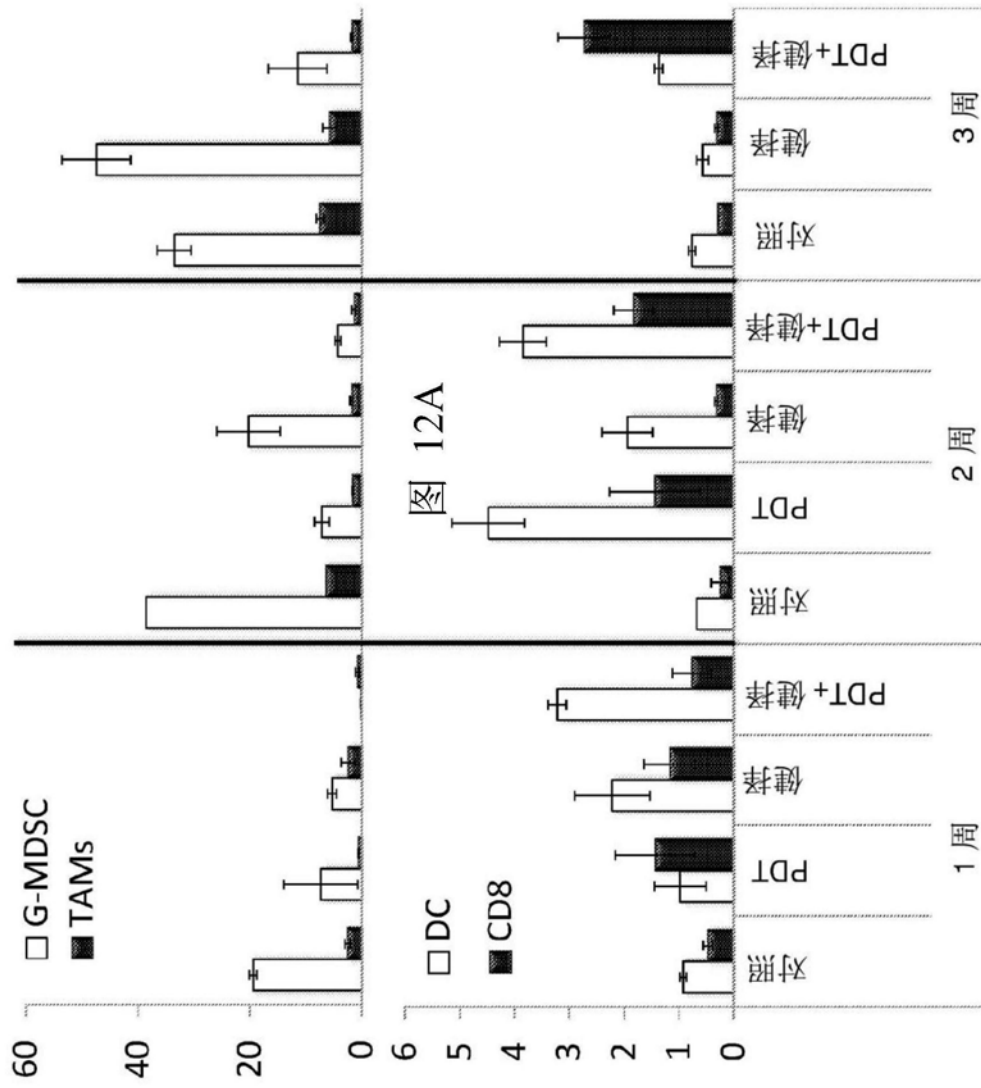


图11E



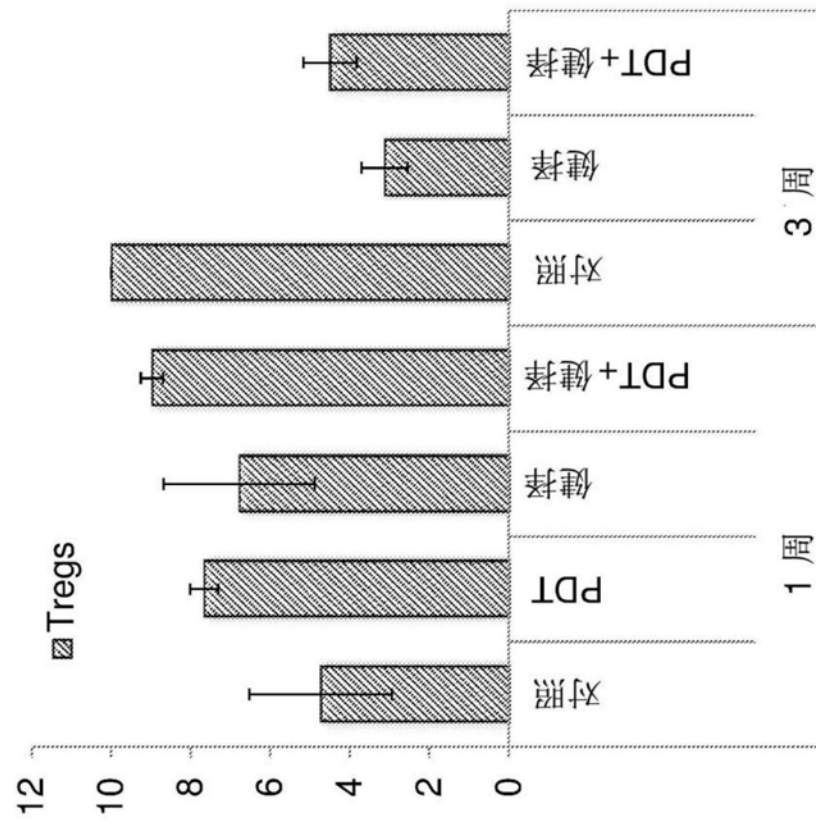


图12C

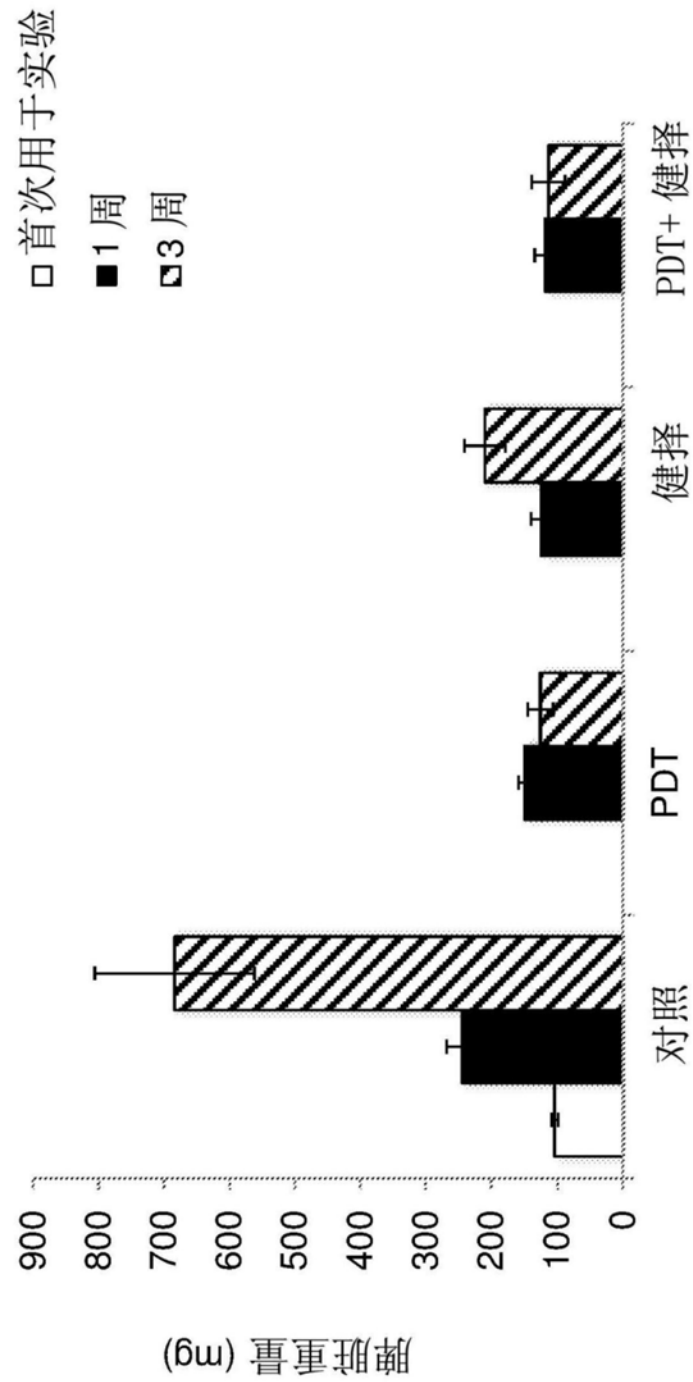


图13

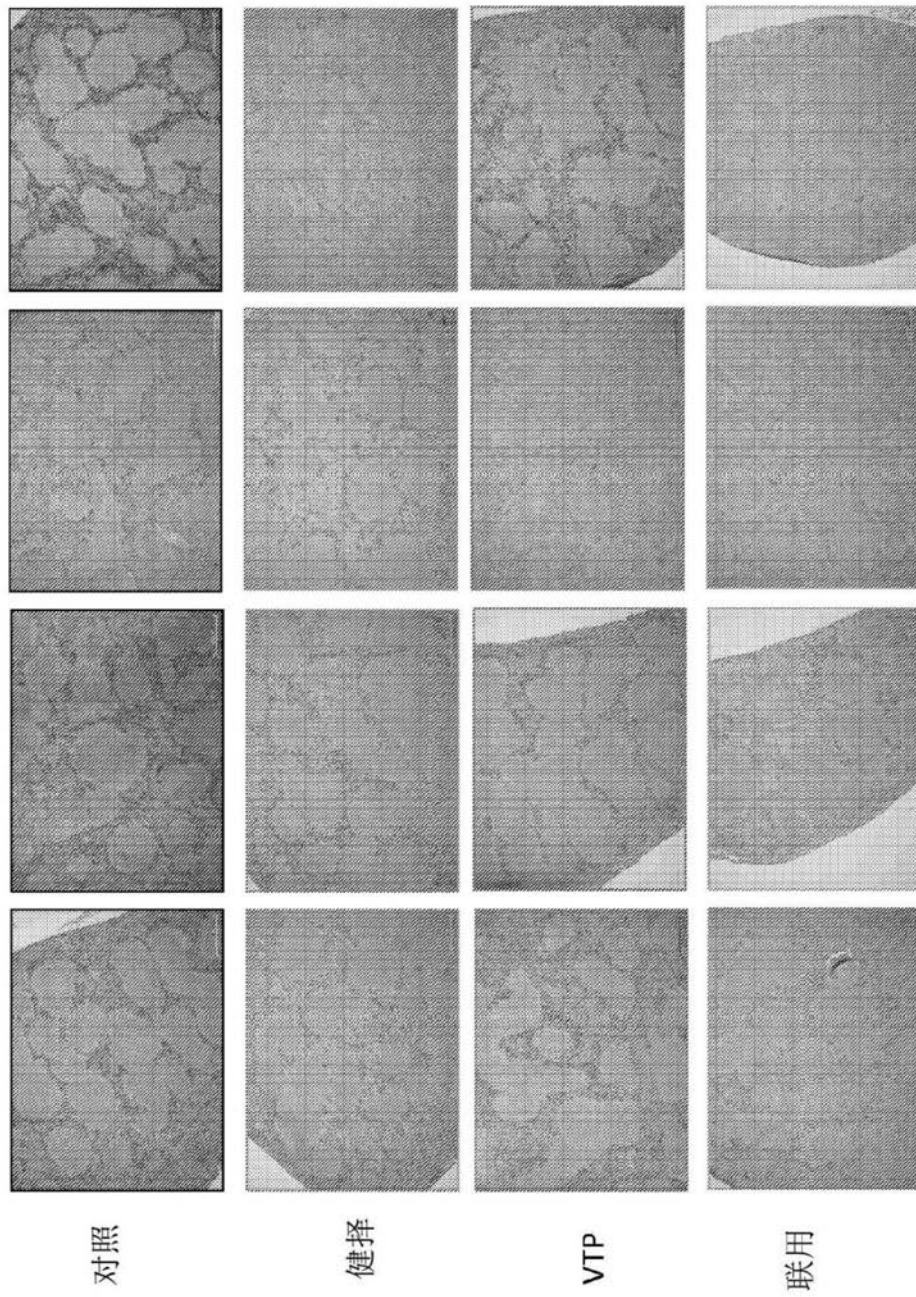


图14A

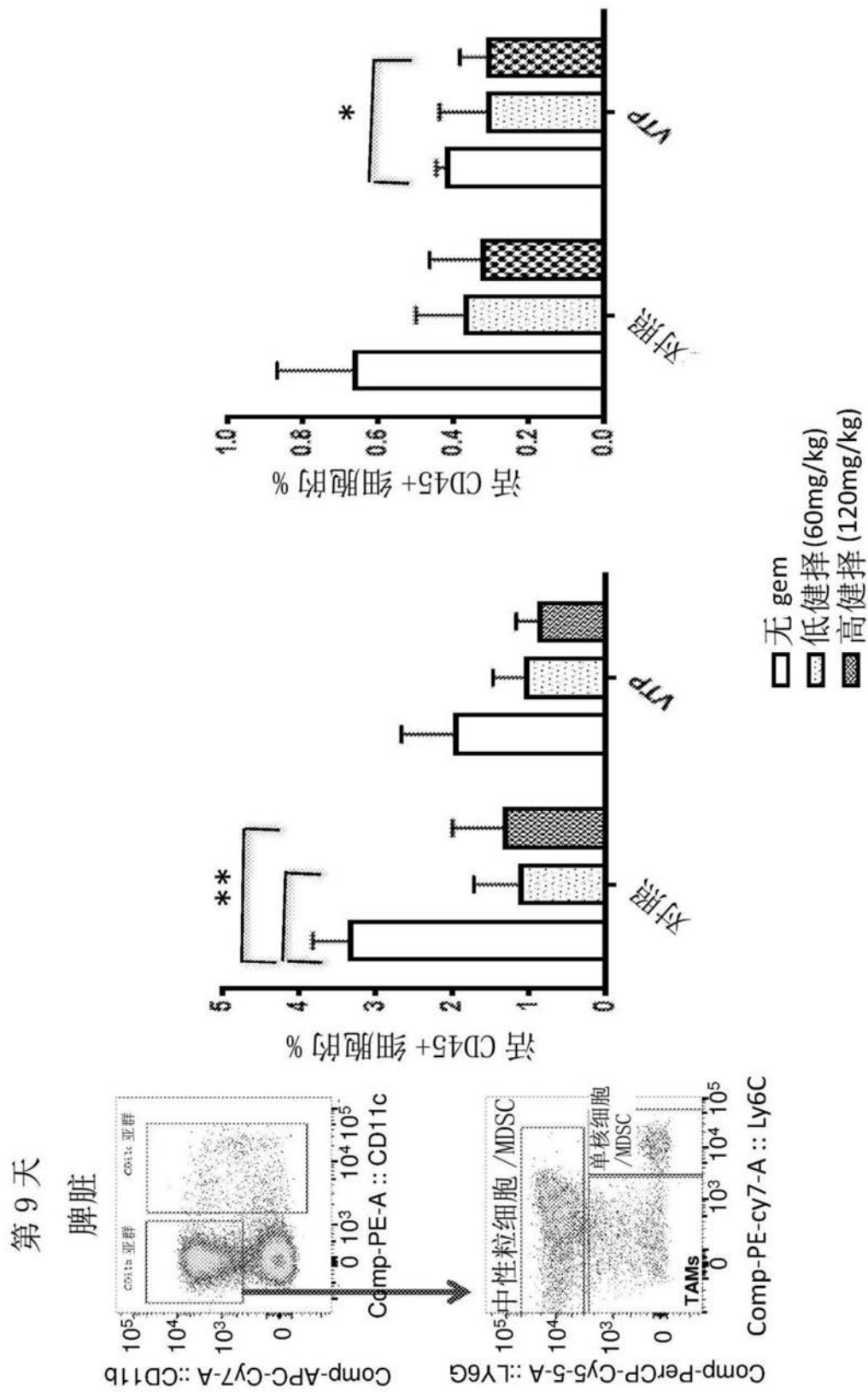


图14B

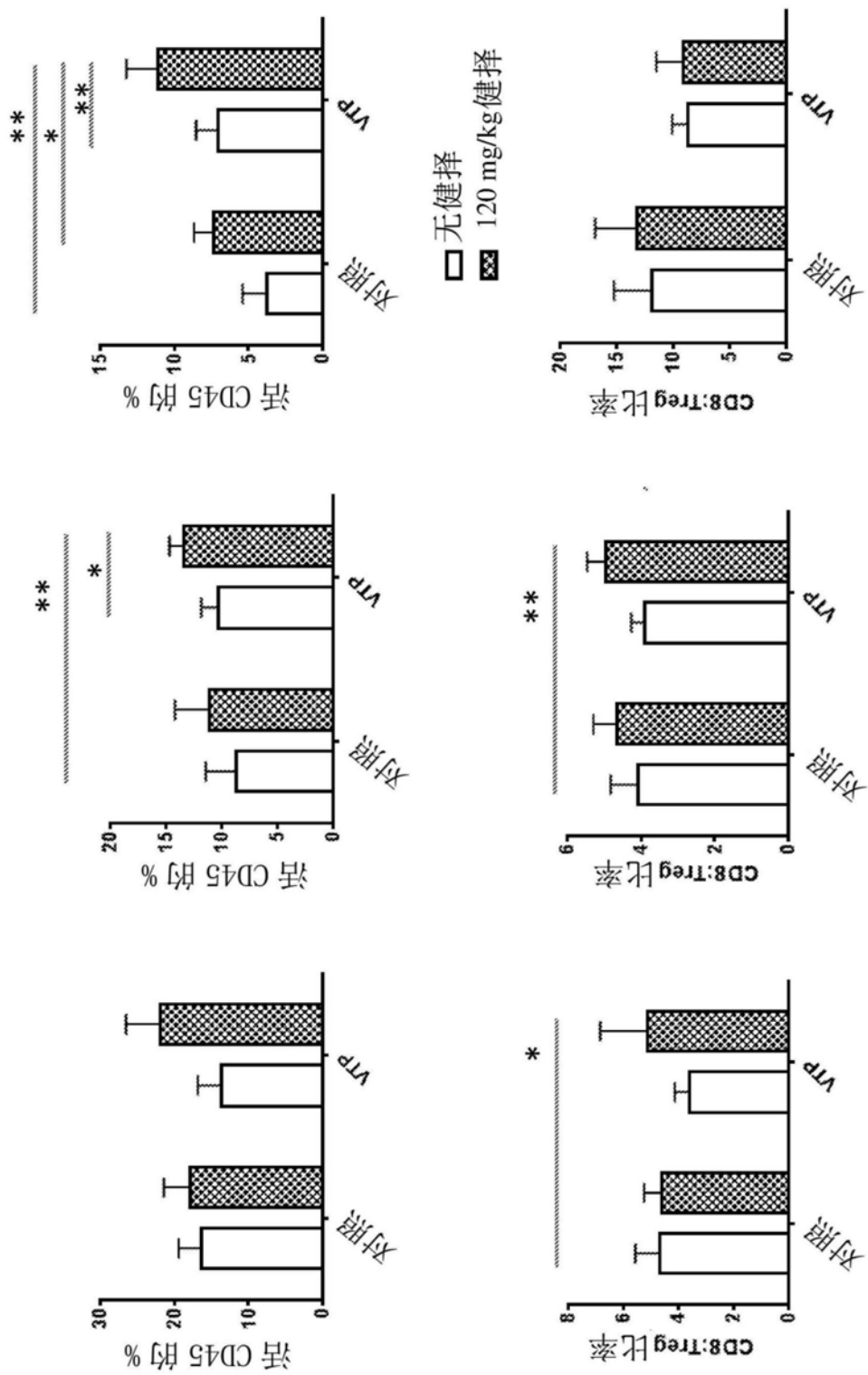


图15A

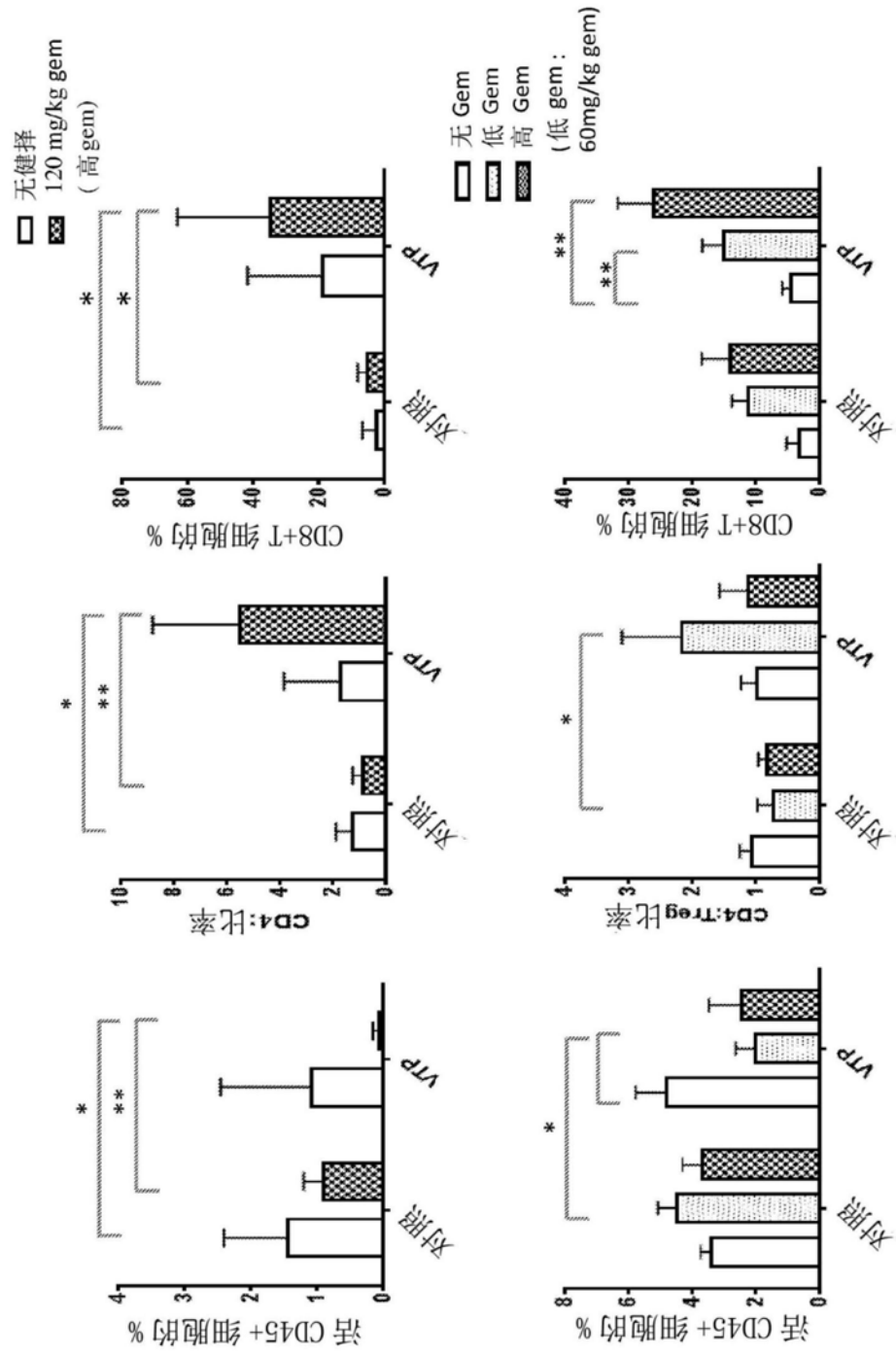


图15B

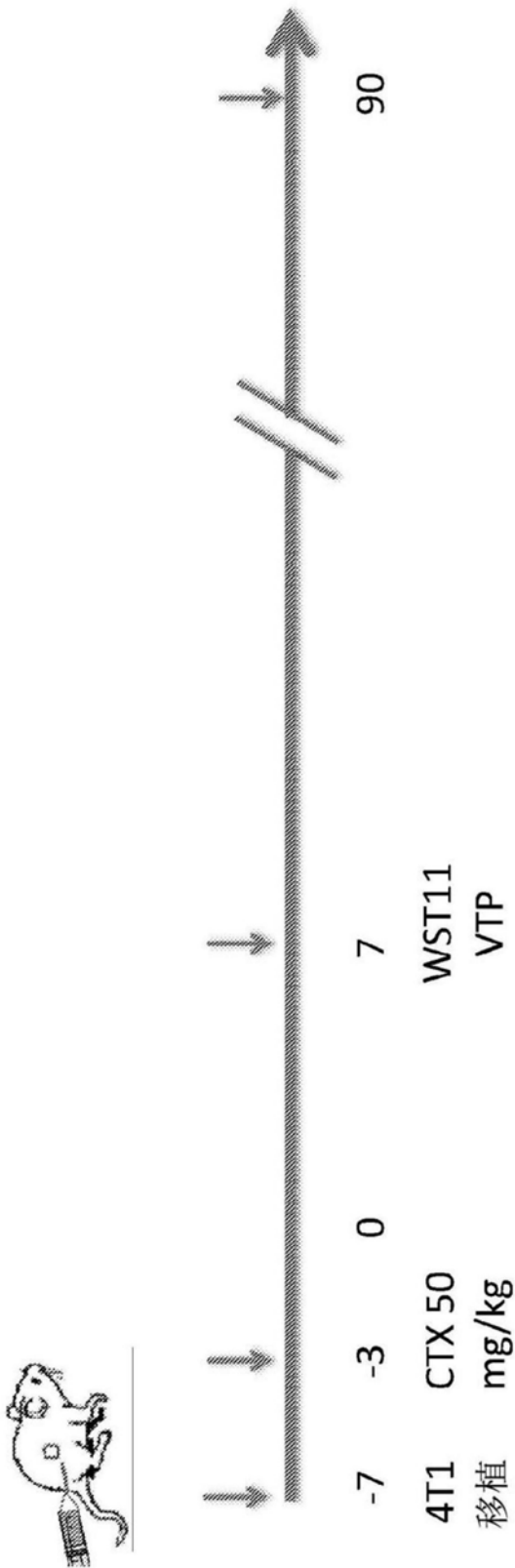


图16

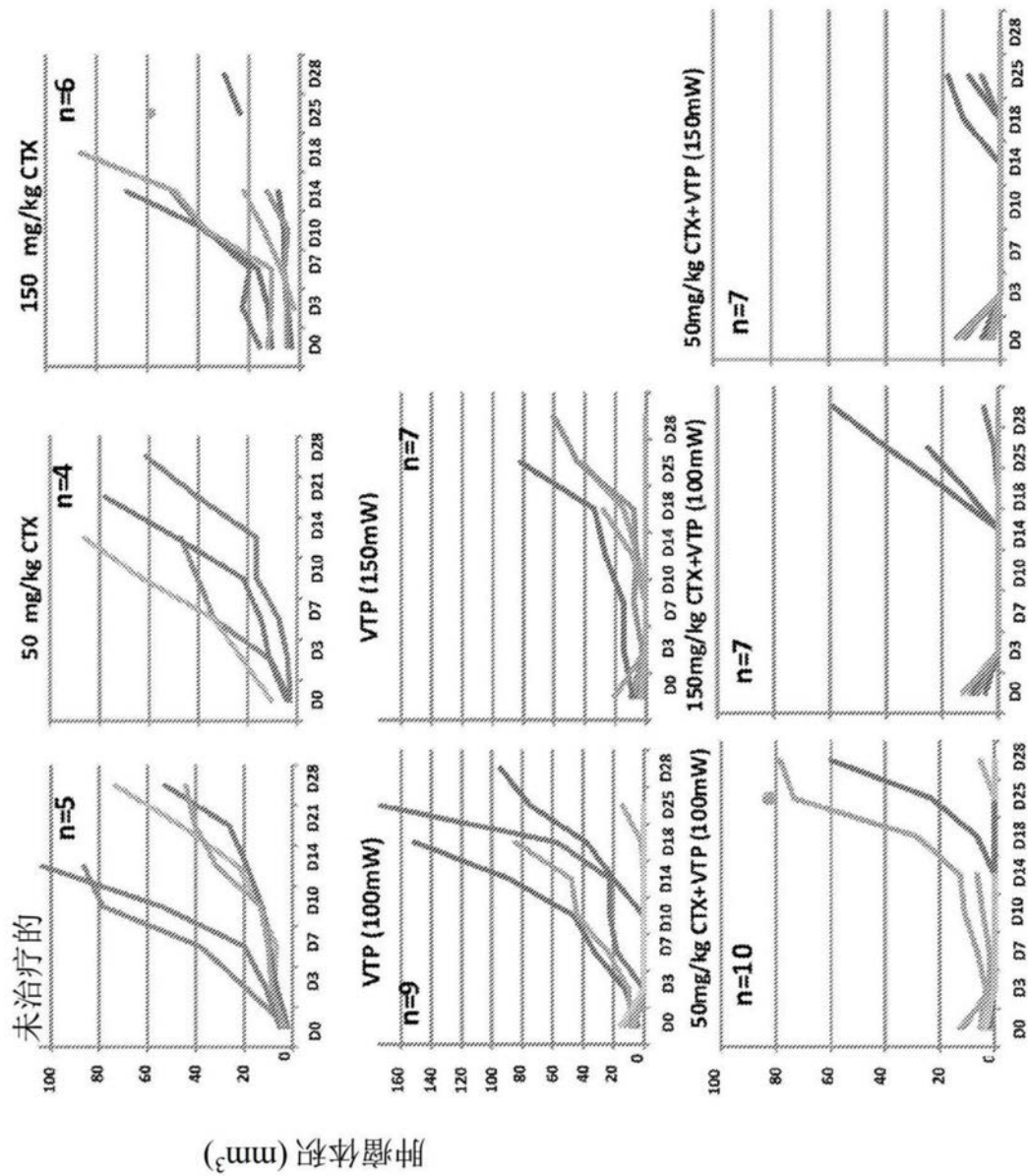


图17

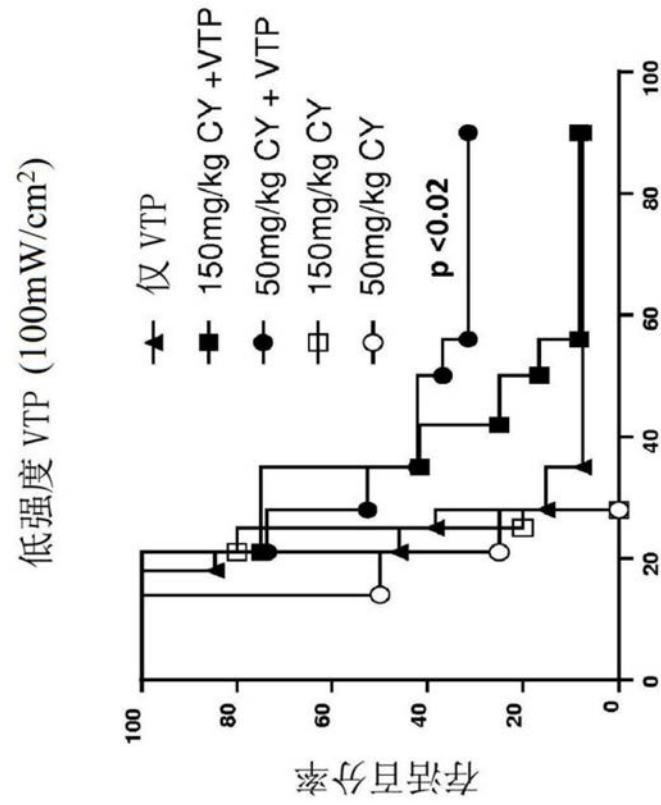


图18A

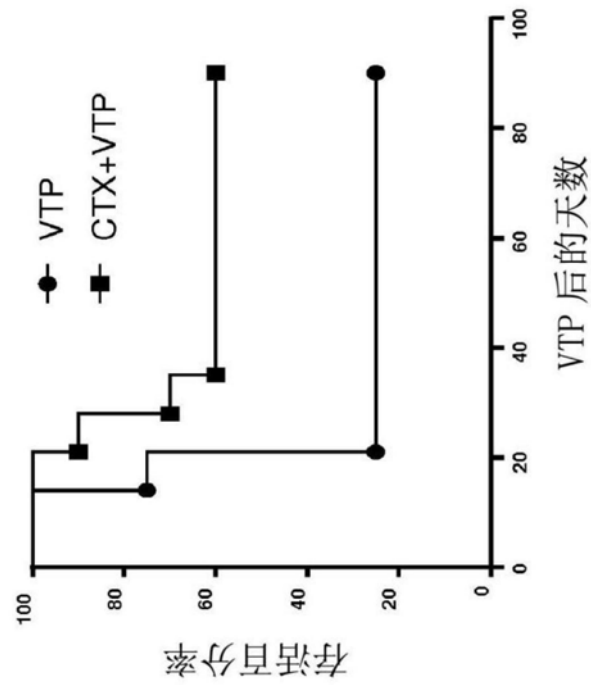


图18B

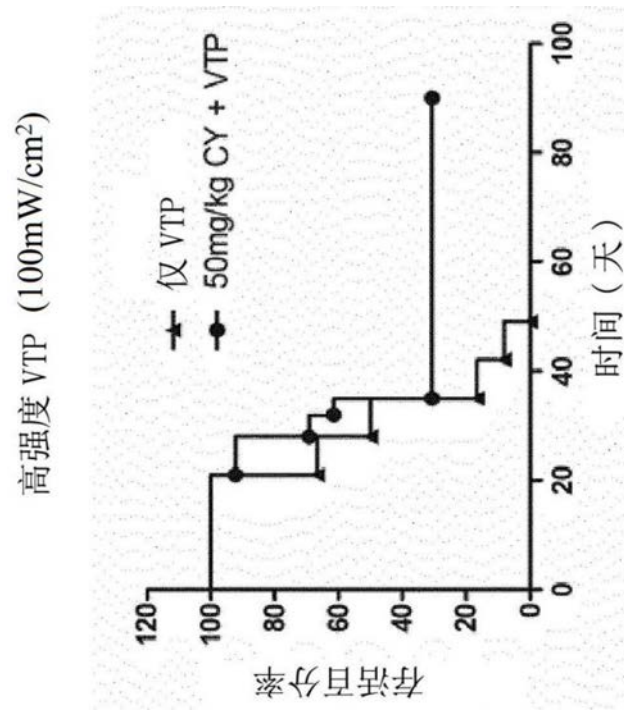


图18C

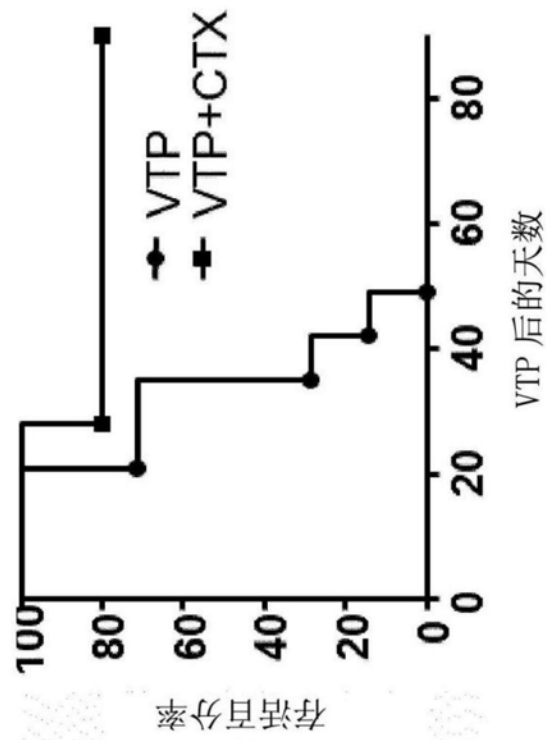


图18D

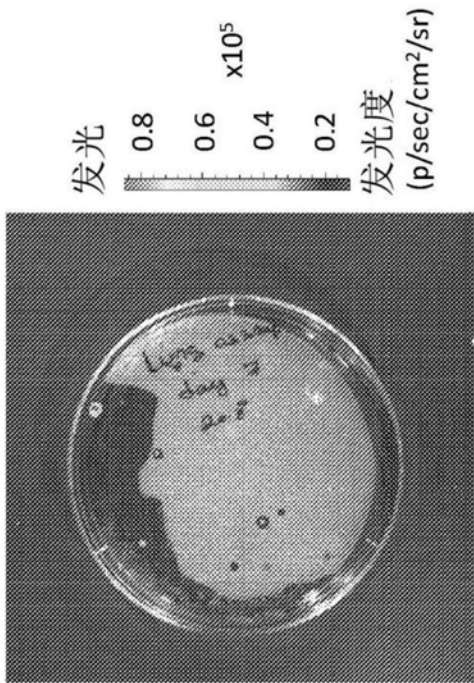


图19A

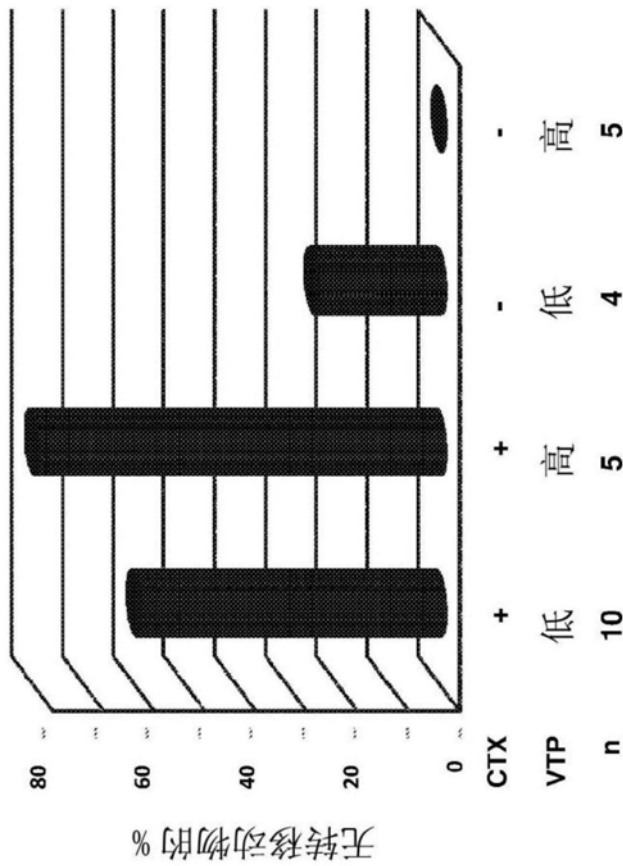


图19B

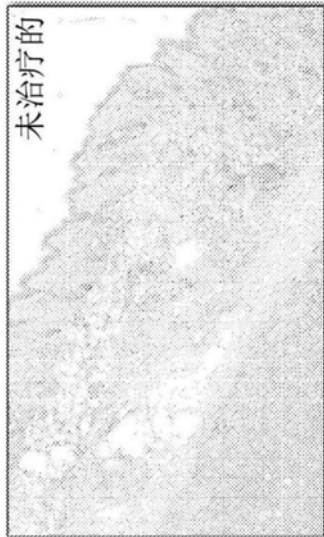


图20A

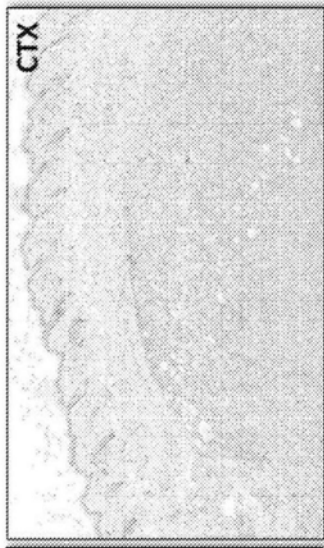


图20B

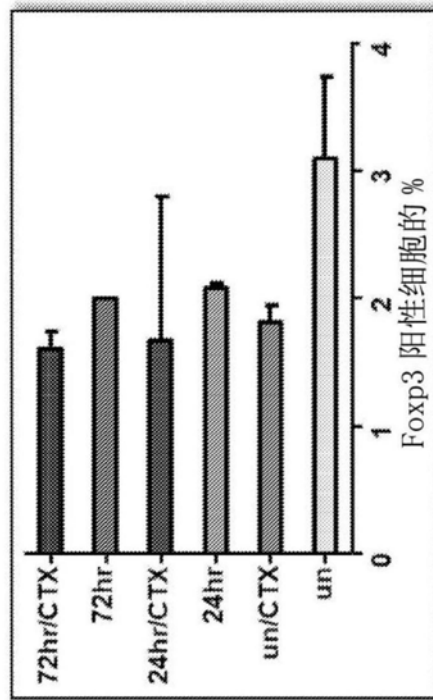


图20C

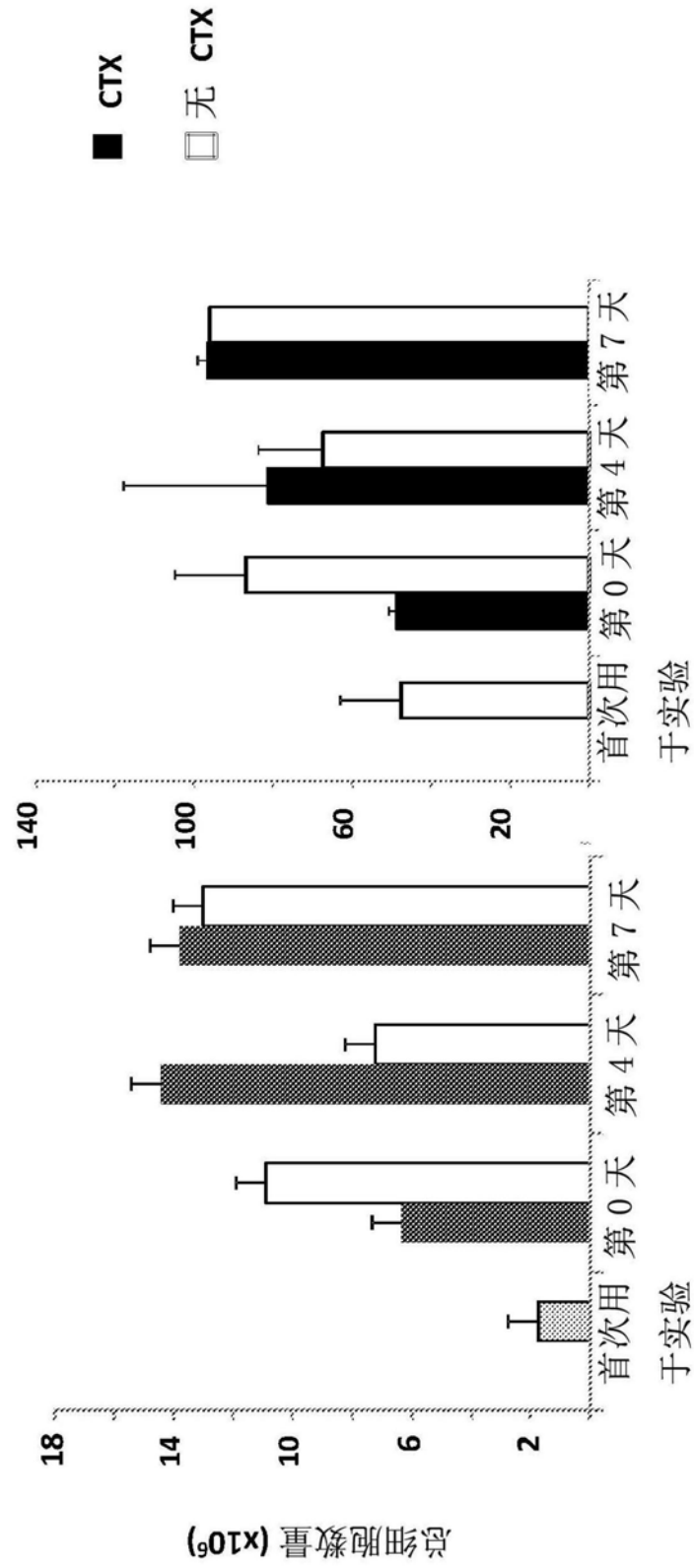


图21A

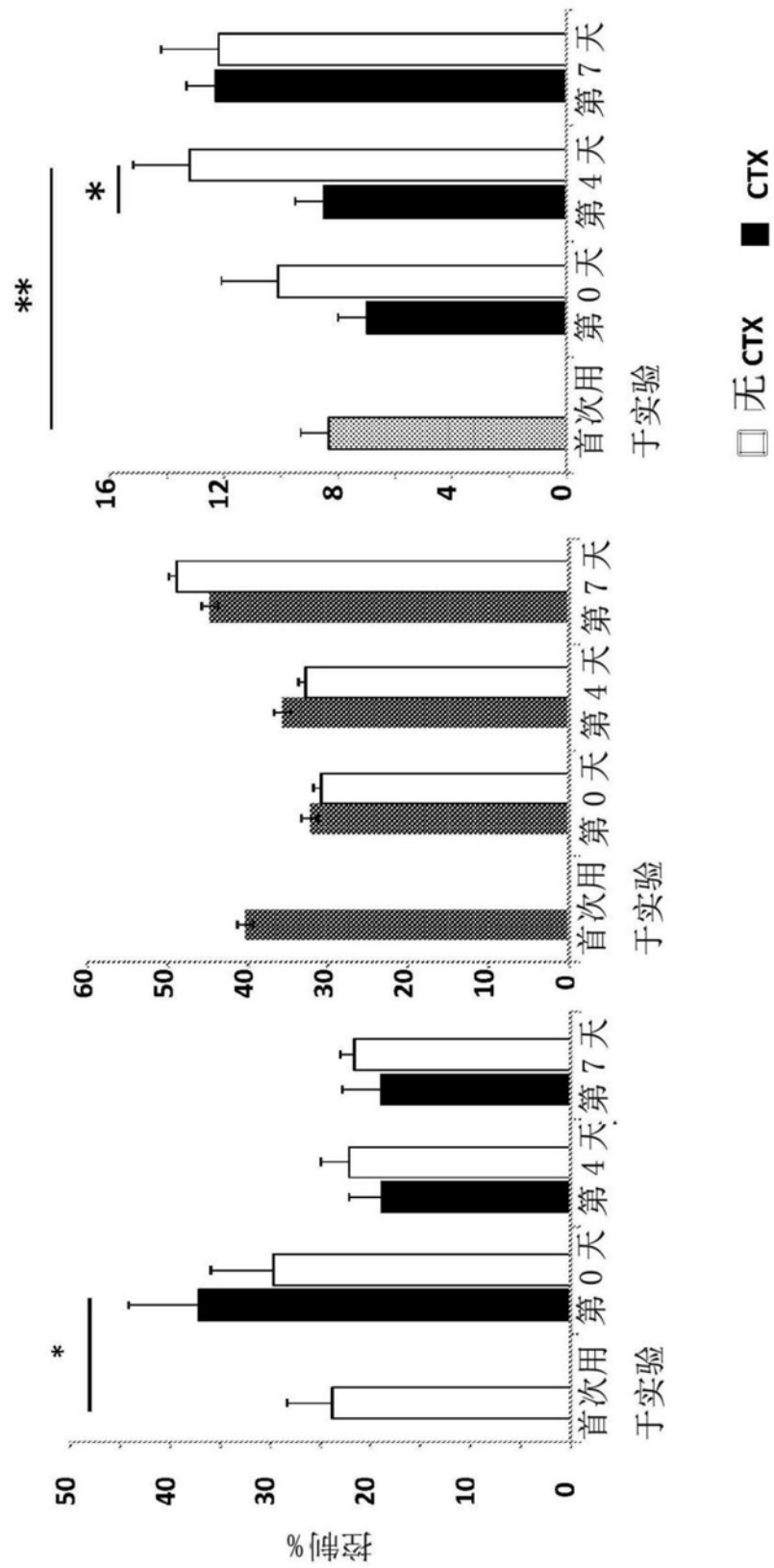


图21B

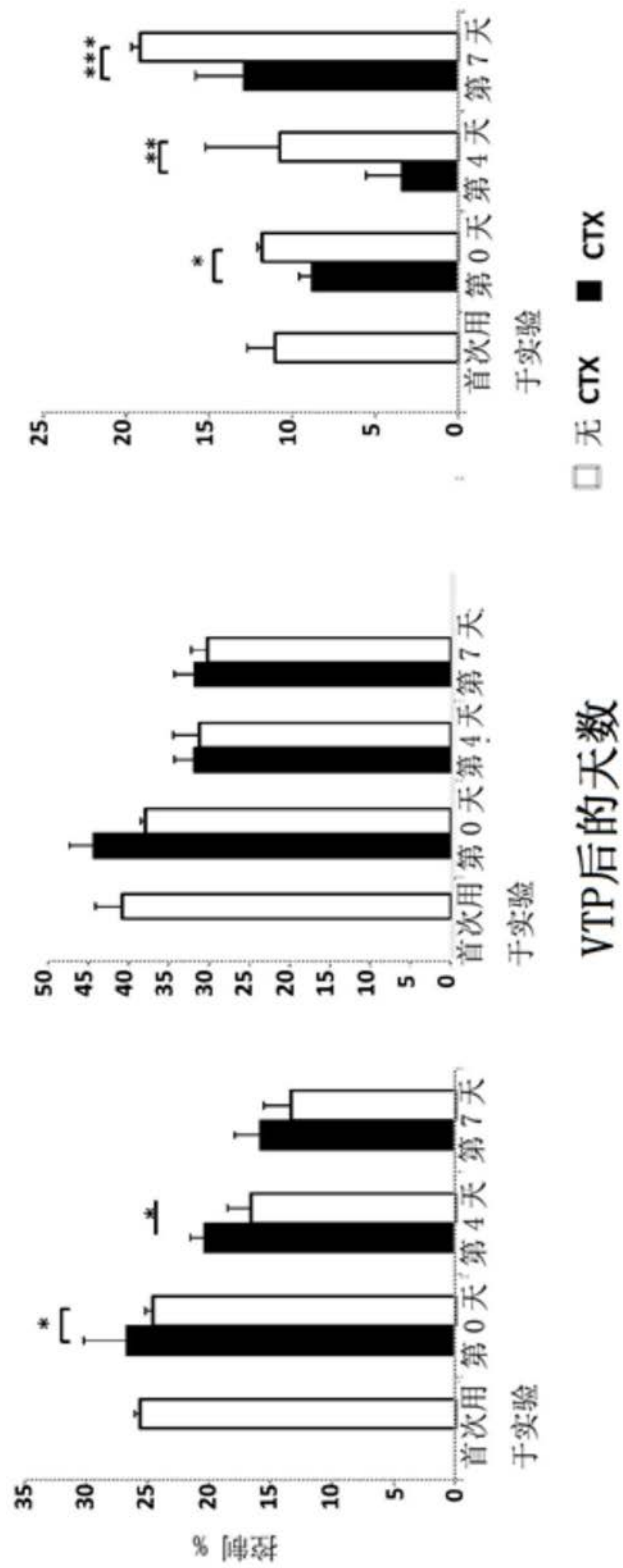


图21C

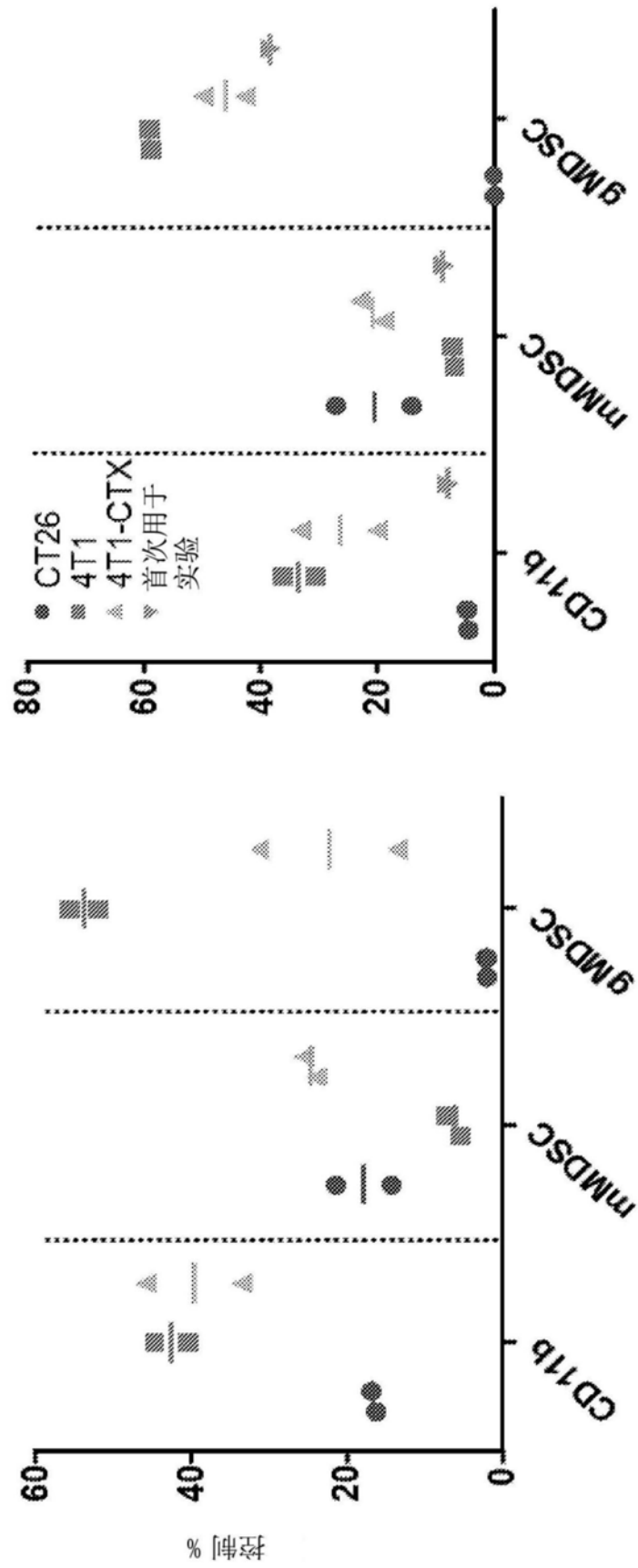


图22

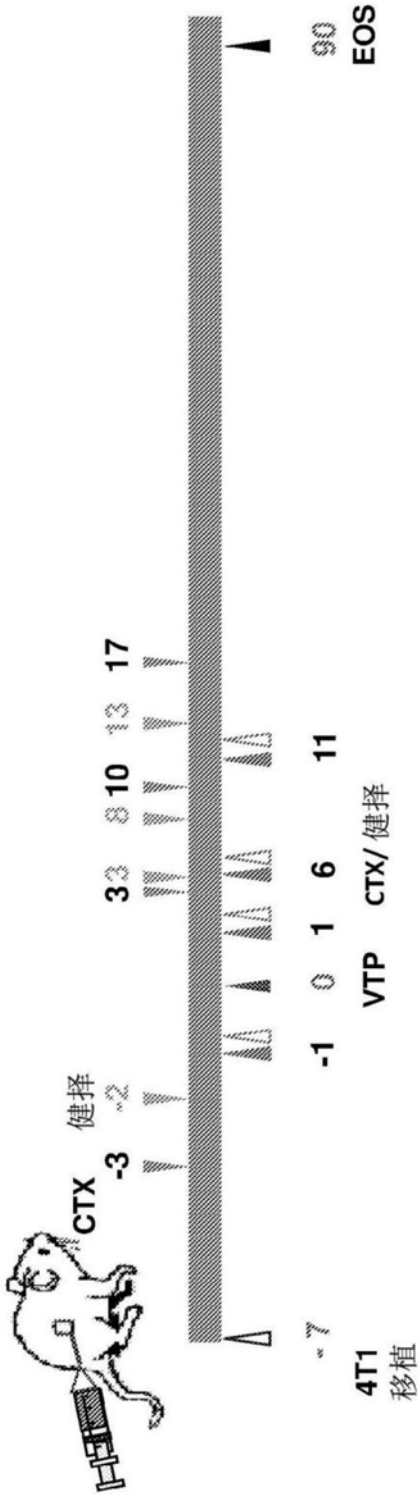


图23A

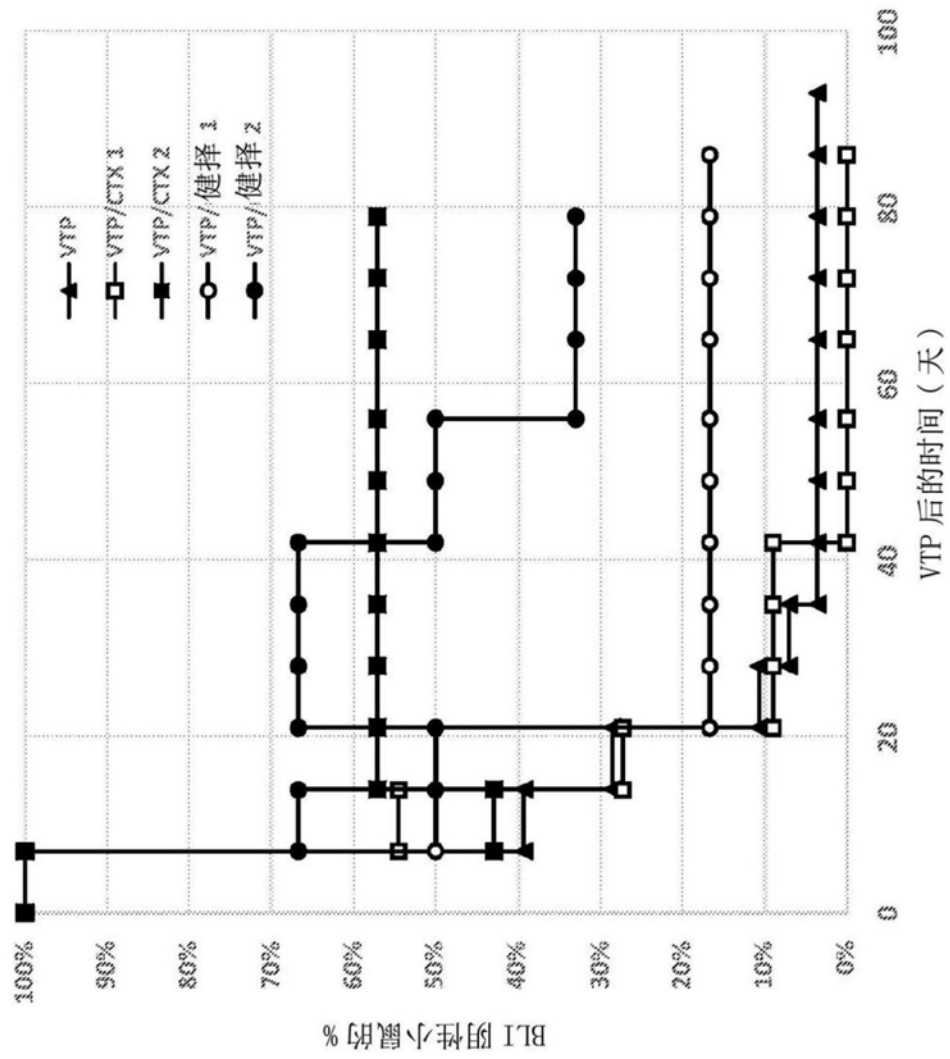


图23B

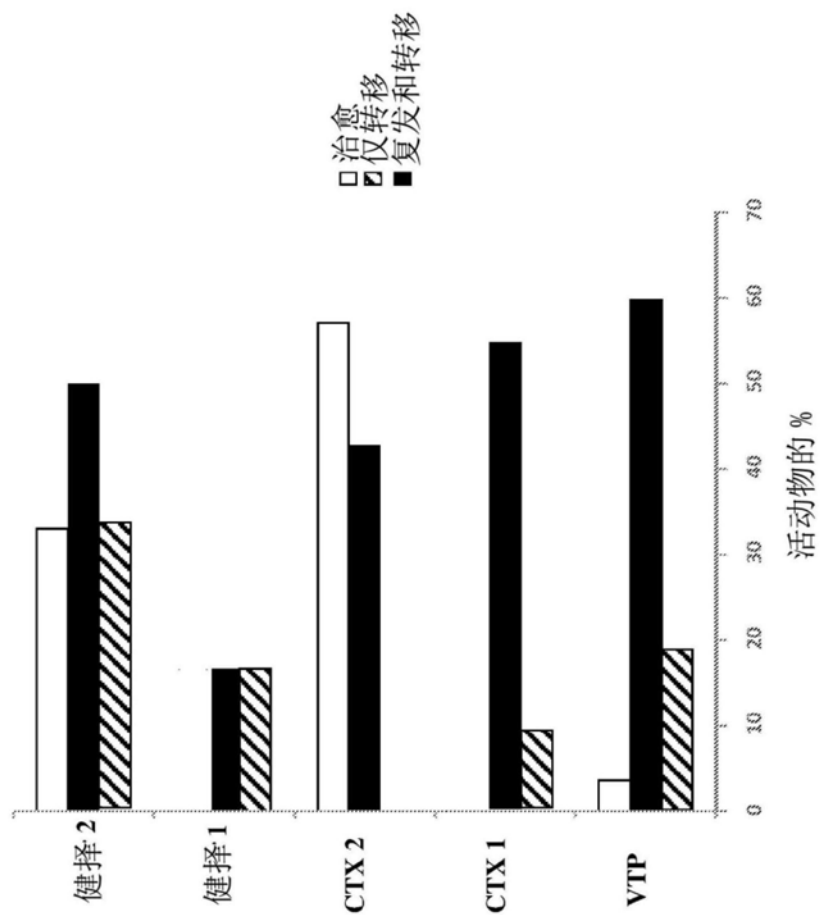


图23C