



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105899232 A

(43)申请公布日 2016.08.24

(21)申请号 201480072942.9

(22)申请日 2014.11.13

(30)优先权数据

61/903,636 2013.11.13 US

62/027,121 2014.07.21 US

62/052,629 2014.09.19 US

62/076,142 2014.11.06 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.07.12

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/065408 2014.11.13

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/073644 EN 2015.05.21

(71)申请人 诺华股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 J·曼尼克 D·J·格拉斯

L·墨菲

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 陈迎春 黄革生

(51)Int.Cl.

A61K 45/06(2006.01)

A61K 31/436(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 37/04(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

A61K 39/09(2006.01)

A61K 39/145(2006.01)

A61K 31/4745(2006.01)

A61K 31/519(2006.01)

A61K 39/12(2006.01)

权利要求书5页 说明书85页 附图8页

(54)发明名称

用于增强免疫应答的mTOR抑制剂

(57)摘要

本发明部分地涉及通过部分mTOR抑制用于增强免疫应答的组合物和方法,例如,使用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂,如RAD001。

1. 低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂,用于在受试者中促进免疫应答、从而增强或促进免疫应答的用途。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中mTOR抑制剂是变构mTOR抑制剂或催化抑制剂。

3. 根据前述权利要求任一项所述的用途,其中mTOR抑制剂是RAD001或雷帕霉素。

4. 根据权利要求2所述的用途,其中催化抑制剂是激酶抑制剂。

5. 根据权利要求4所述的用途,其中激酶抑制剂是mTOR选择性的或选自BEZ235和CCG168。

6. 根据前述权利要求任一项所述的用途,其中剂量包括变构和催化mTOR抑制剂。

7. 根据前述权利要求任一项所述的用途,其中mTOR抑制剂施用一段时间使足以发生以下中的一个或多个:

i) PD-1阳性免疫效应细胞数目的减少;

ii) PD-1阴性免疫效应细胞数目的增加;

iii) PD-1阴性免疫效应细胞/PD-1阳性免疫效应细胞比率的增加;

iv) 初始T细胞数目的增加;

v) 下列标志物中一个或多个的表达的增加:CD62L^{hi}g^h, CD127^{hi}g^h, CD27⁺和BCL2,例如,在记忆T细胞上,例如,记忆T细胞前体上;

vi) KLRG1表达的减少,例如在记忆T细胞上,例如,记忆T细胞前体上;或者

vii) 记忆T细胞前体数目的增加,例如,具有以下特征中的任何一个或组合的细胞:增加的CD62L^{high},增加的CD127^{high},增加的CD27⁺,降低的KLRG1,和增加的BCL2;

其中相比于未治疗的受试者,i), ii), iii), iv), v), vi), 或vii)至少瞬时发生。

8. 根据前述权利要求任一项所述的用途,其中方法包括抑制由PD-1与PD-L1或PD-2交互作用介导的负免疫应答。

9. 根据前述权利要求任一项所述的用途,其包括增加能够增殖、发挥细胞毒性作用、分泌细胞因子、或活化的T细胞数目。

10. 根据前述权利要求任一项所述的用途,其中施用导致部分的、但不是全部的mTOR抑制至少1, 5, 10, 20, 30, 或60天。

11. 根据前述权利要求任一项所述的用途,其中mTOR抑制剂的剂量与mTOR抑制至少5%,但不超过90%相关,如由P70S6K抑制所测定。

12. 根据前述权利要求任一项所述的用途,其中mTOR抑制剂包含RAD001。

13. 一种促进受试者中免疫应答的方法,其包括

向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂,从而增强或促进受试者的免疫应答。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中mTOR抑制剂是变构mTOR抑制剂或催化抑制剂。

15. 根据权利要求12-14任一项所述的方法,其中mTOR抑制剂是RAD001或雷帕霉素。

16. 根据权利要求14所述的方法,其中催化抑制剂是激酶抑制剂。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中激酶抑制剂是mTOR选择性的或选自BEZ235和CCG168。

18. 根据权利要求12-17任一项所述的方法,其中剂量包括变构和催化mTOR抑制剂。

19. 根据权利要求12-18任一项所述的方法,其中mTOR抑制剂施用一段时间使足以发生以下中的一个或多个:

- i) PD-1阳性免疫效应细胞数目的减少;
 - ii) PD-1阴性免疫效应细胞数目的增加;
 - iii) PD-1阴性免疫效应细胞/PD-1阳性免疫效应细胞比率的增加;
 - iv) 初始T细胞数目的增加;
 - v) 下列标志物中一个或多个的表达的增加: CD62L^{high}, CD127^{high}, CD27⁺和BCL2, 例如, 在记忆T细胞上, 例如, 记忆T细胞前体上;
 - vi) KLRG1表达的减少, 例如在记忆T细胞上, 例如, 记忆T细胞前体上; 或者
 - vii) 记忆T细胞前体数目的增加, 例如, 具有以下特征中的任何一个或组合的细胞: 增加的CD62L^{high}, 增加的CD127^{high}, 增加的CD27⁺, 降低的KLRG1, 和增加的BCL2;
- 其中相比于未治疗的受试者, i), ii), iii), iv), v), vi), 或vii)至少瞬时发生。
20. 根据权利要求12-19任一项所述的方法, 其中方法包括抑制由PD-1与PD-L1或PD-2交互作用介导的负免疫应答。
21. 根据权利要求12-20任一项所述的方法, 其包括增加能够增殖、发挥细胞毒性作用、分泌细胞因子、或活化的T细胞数目。
22. 根据权利要求12-21任一项所述的方法, 其中施用导致部分的、但不是全部的mTOR抑制至少1, 5, 10, 20, 30, 或60天。
23. 根据权利要求12-22任一项所述的方法, 其中mTOR抑制剂的剂量与mTOR抑制至少5%, 但不超过90%相关, 如由P70S6K抑制所测定。
24. 根据权利要求12-23任一项所述的方法, 其中mTOR抑制剂包含RAD001。
25. 根据权利要求12-24任一项所述的方法, 其中施用包括每周一次、以立即释放剂型、施用0.1至20, 0.5至10, 2.5至7.5, 3至6, 或约5mg的RAD001, 或生物等效剂量的不同mTOR抑制剂。
26. 根据权利要求12-24任一项所述的方法, 其中施用包括每周一次、以立即释放剂型、施用约5mg的RAD001, 或生物等效剂量的不同mTOR抑制剂。
27. 根据权利要求12-24任一项所述的方法, 其中施用包括每周一次、以缓释剂型、施用0.3至60, 1.5至30, 7.5至22.5, 9至18, 或约15mg的RAD001, 或生物等效剂量的不同mTOR抑制剂。
28. 根据权利要求12-24任一项所述的方法, 其中施用包括每周一次、以缓释剂型、施用约15mg的RAD001或生物等效剂量的不同mTOR抑制剂。
29. 根据权利要求12-24任一项所述的方法, 其中施用包括, 每天一次、以立即释放剂型施用0.005至1.5, 0.01至1.5, 0.1至1.5, 0.2至1.5, 0.3至1.5, 0.4至1.5, 0.5至1.5, 0.6至1.5, 0.7至1.5, 0.8至1.5, 1.0至1.5, 0.3至0.6, 或约0.5mg的RAD001, 或生物等效剂量的不同mTOR抑制剂。
30. 根据权利要求12-24任一项所述的方法, 其中施用包括, 每天一次、以立即释放剂型施用约0.5mg的RAD001, 或生物等效剂量的不同mTOR抑制剂。
31. 根据权利要求12-24任一项所述的方法, 其中施用包括每天一次、以缓释剂型施用0.015至4.5, 0.03至4.5, 0.3至4.5, 0.6至4.5, 0.9至4.5, 1.2至4.5, 1.5至4.5, 1.8至4.5, 2.1至4.5, 2.4至4.5, 3.0至4.5, 0.9至1.8, 或约1.5mg的RAD001, 或生物等效剂量的不同mTOR抑制剂。

32. 根据权利要求12-24任一项所述的方法, 其中施用包括每周一次、以缓释剂型施用0.1至30, 0.2至30, 2至30, 4至30, 6至30, 8至30, 10至30, 1.2至30, 14至30, 16至30, 20至30, 6至12, 或约10mg的RAD001或生物等效剂量的不同mTOR抑制剂。

33. 根据权利要求12-24任一项所述的方法, 其中mTOR抑制剂是RAD001, 且剂量提供RAD001的波谷水平范围在约0.1和3ng/ml之间, 或0.3或更少和3ng/ml之间, 或0.3或更少和1ng/ml之间, 或生物等效剂量的不同mTOR抑制剂。

34. 根据权利要求12-33任一项所述的方法, 其中受试者患有癌症和方法包括促进受试者对癌症的免疫应答。

35. 根据权利要求12-34任一项所述的方法, 其中在所患癌症的基础上选择受试者。

36. 根据权利要求34-35任一项所述的方法, 其中癌细胞表达PD-L1或PD-L2。

37. 根据权利要求34-36任一项所述的方法, 其中在癌症微环境中的细胞表达PD-L1或PD-L2。

38. 根据权利要求34-37任一项所述的方法, 其中癌症包括实体肿瘤。

39. 根据权利要求34-37任一项所述的方法, 其中癌症是血液癌症。

40. 根据权利要求34-37任一项所述的方法, 其中癌症选自表1。

41. 根据权利要求34-37任一项所述的方法, 其中癌症是黑色素瘤。

42. 根据权利要求34-41任一项所述的方法, 其进一步包括向受试者施用第二治疗。

43. 根据权利要求42所述的方法, 其中第二治疗是化疗、放射、细胞疗法或骨髓移植。

44. 根据权利要求42或43所述的方法, 其包括施用杀死T细胞的第二治疗。

45. 根据权利要求44所述的方法, 其中第二治疗是放疗或细胞毒性化疗。

46. 根据权利要求42-45任一项所述的方法, 其中在第二治疗开始之前、同时或之后施用mTOR抑制剂。

47. 根据权利要求34-46任一项所述的方法, 其包括治疗选自表1的癌症, 和针对该癌症施用表1所列的治疗。

48. 根据权利要求12-47任一项所述的方法, 其中受试者是无免疫应答的。

49. 根据权利要求12-33或48任一项所述的方法, 其中受试者是HIV+或患有AIDS。

50. 根据权利要求12-33或48-49任一项所述的方法, 其中受试者患有感染性疾病。

51. 根据权利要求12-33或48-50任一项所述的方法, 其中受试者具有受损的免疫应答。

52. 根据权利要求12-51任一项所述的方法, 其中受试者免疫功能衰老。

53. 根据权利要求12-33、48或52任一项所述的方法, 其包括治疗受试者年龄相关的病症。

54. 根据权利要求53所述的方法, 其中年龄相关的病症选自肌少症, 皮肤萎缩, 肌肉萎缩, 脑萎缩, 动脉粥样硬化, 动脉硬化, 肺气肿, 骨质疏松症, 骨关节炎, 高血压, 勃起功能障碍, 痴呆症, 亨廷顿氏病, 阿尔茨海默氏病, 白内障, 年龄相关性黄斑变性, 前列腺癌, 中风, 寿命减少, 肾功能受损和年龄相关性听力损失, 衰老相关的移动性残疾(例如, 衰弱), 认知功能减退, 老年性痴呆, 记忆损伤, 腱僵硬, 心脏功能障碍如心肌肥厚和收缩和舒张功能障碍, 免疫功能衰老, 癌症, 肥胖症和糖尿病。

55. 根据权利要求12-54任一项所述的方法, 其包括增强受试者对抗原的免疫应答。

56. 根据权利要求55所述的方法, 其进一步包括向受试者施用抗原或疫苗。

57. 根据权利要求56所述的方法, 其中在施用步骤之前, 方法包括鉴定具有对抗原受损的免疫应答的受试者的步骤。

58. 根据权利要求55-56任一项所述的方法, 其中抗原是流感抗原。

59. 根据权利要求58所述的方法, 其中抗原选自H1N1、H2N3和乙型流感亚型组成的流感亚组。

60. 根据权利要求55-56任一项所述的方法, 其中抗原是肺炎球菌抗原。

61. 根据权利要求55-60任一项所述的方法, 其中抗原和mTOR抑制剂共同施用。

62. 根据权利要求55-61任一项所述的方法, 其中抗原和mTOR抑制剂相继施用。

63. 根据权利要求12-62任一项所述的方法, 其中受试者小于65岁。

64. 根据权利要求12-63所述的方法, 其中当mTOR抑制剂以促进免疫应答的水平存在时不接受疫苗。

65. 根据权利要求64所述的方法, 其中疫苗是抗癌疫苗或针对传染源的疫苗。

66. 根据权利要求64所述的方法, 其中疫苗是用于神经疾患或阿尔茨海默氏病的治疗性疫苗。

67. 根据权利要求12-66任一项所述的方法, 其中受试者在低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂开始之前或之后的10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80或90天内没有接受疫苗。

68. 根据权利要求12-67任一项所述的方法, 其中低的mTOR抑制剂在疫苗接种时, 或疫苗接种后施用。

69. 一种评估用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂治疗, 以促进或增强对流感疫苗或抗原的免疫应答的受试者的方法, 其包括:

测定抗流感抗体的基线或免疫前水平,

其中相对低的抗流感抗体基线或免疫前水平预示较强的mTOR抑制剂相关的针对流感抗原的抗体滴度增加,

从而评估受试者。

70. 根据权利要求69所述的方法, 进一步包括比较测定水平与参考值, 其中值小于或等于参考值是较强的mTOR抑制剂相关的抗体滴度增加的指征。

71. 根据权利要求69-70任一项所述的方法, 其中回应测定的抗体滴度的水平, 受试者被分类为可能从低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂受益。

72. 根据权利要求69-70任一项所述的方法, 其中回应测定的抗体滴度的水平, 向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂。

73. 根据权利要求69所述的方法, 其中测定步骤进一步包括

测定受试者抗流感抗体的基线或免疫前滴度是否等于或小于1:40和

回应所述测定, 分类受试者为可能从低、免疫增强剂量的mTOR受益, 或为所述受试者选择一个治疗疗程。

74. 根据权利要求69-73任一项所述的方法, 其中mTOR抑制剂是RAD001。

75. 根据权利要求1-74任一项所述的方法, 其中受试者是人。

76. 一种疫苗佐剂, 其包含约0.005mg至1.5mg的mTOR抑制剂RAD001, 或生物等效剂量的不同mTOR抑制剂。

77. 根据权利要求76所述的疫苗佐剂, 其包含mTOR抑制剂的量足以在细胞中抑制P70S6

激酶活性不大于80%。

78. 根据权利要求76或77所述的疫苗佐剂, 其中所述mTOR抑制剂是雷帕霉素或雷帕霉素类似物。

79. 根据权利要求76-78任一项所述的疫苗佐剂, 其包含0.01-1mg, 0.01-0.7mg, 0.01-0.5mg, 或0.1-0.5mg的RAD001或生物等效剂量的不同mTOR抑制剂。

80. 根据权利要求76-78任一项所述的疫苗佐剂, 其包含0.5mg的RAD001或生物等效剂量的不同mTOR抑制剂。

81. 一种组合物, 其包含

(a) 疫苗抗原和

(b) 约0.005mg-1.5mg的mTOR抑制剂RAD001, 或生物等效剂量的不同mTOR抑制剂。

82. 根据权利要求81所述的组合物, 其中所述组合物用于促进有需要的受试者中的免疫应答。

83. 根据权利要求81或82所述的组合物, 其中所述组合物包含约0.01-1mg, 约0.01-0.7mg, 约0.01-0.5mg, 或约0.1-0.5mg的RAD001或生物等效剂量的不同mTOR抑制剂。

84. 根据权利要求81-83任一项所述的组合物, 其包含约0.5mg的RAD001或生物等效剂量的不同mTOR抑制剂。

85. 根据权利要求81-84任一项所述的组合物, 其中所述组合物包含mTOR抑制剂的量足以在施用所述组合物的受试者中抑制P70S6激酶活性不大于80%。

86. 根据权利要求81-85任一项所述的组合物, 其中相比于安慰剂, 所述组合物在施用所述组合物的受试者中产生至少1.2倍免疫应答的增加。

87. 根据权利要求81-86任一项所述的组合物, 其中mTOR抑制剂是雷帕霉素或雷帕霉素类似物。

88. 根据权利要求81-87任一项所述的组合物, 其中所述疫苗抗原来自流感。

89. 根据权利要求81-88任一项所述的组合物, 其中所述疫苗抗原选自H1N1, H2N3和乙型流感亚型。

90. 根据权利要求81-87任一项所述的组合物, 其中所述疫苗抗原来自肺炎球菌。

用于增强免疫应答的mTOR抑制剂

[0001] 本申请要求2013年11月13日提交的美国系列号:61/903,636、2014年7月21日提交的美国系列号:62/027,121、2014年9月19日提交的美国系列号:62/052,629、和2014年11月6日提交的美国系列号:62/076,142的优先权,这些申请中每一个的全部内容通过引用并入本文。

背景技术

[0002] 功能和有效的T细胞反应在有效的免疫应答中起重要作用,例如,针对感染性疾病和癌症。然而,在某些条件下,例如慢性感染或癌症,效应T细胞可以被各种免疫机制抑制,包括程序性死亡配体-1(PD-L1)/程序性死亡-1(PD-1)的相互作用,导致T细胞耗尽(Pen等人, Gene Therapy 21,262-271,2014)。认为PD-L1通常由大多数细胞类型表达,而它的受体PD-1只出现在某些免疫细胞上,如活化的T细胞和调节性T(Treg细胞)细胞。也认为PD-L1/PD-1结合在维持外周T细胞耐受、防止自体免疫应答中是重要的。另一方面,高水平的PD-1表达通常与T细胞功能缺失相关,在病毒感染的情况下,导致增加的病毒载量(Pen等人, Gene Therapy 21,262-271,2014)。

发明内容

[0003] 本文所公开的方法和组合物至少部分地基于以下发现:部分mTOR的抑制(例如,使用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂,例如变构mTOR抑制剂,如RAD001),有效地改善受试者中的免疫功能。虽然不希望受理论的束缚,据信用低、免疫增强剂量(例如,其剂量不足以完全抑制免疫系统,但足以提高免疫功能)的mTOR抑制剂的治疗伴随PD-1阳性免疫效应细胞(例如,T细胞)的减少,PD-1阴性免疫效应细胞(例如T细胞)的增加,或PD-1阴性免疫效应细胞(例如T细胞)/PD-1阳性免疫效应细胞(例如T细胞)的比率增加。PD-1阳性T细胞,而不是PD-1阴性T细胞,可以被与表达PD-1配体(例如,PD-L1或PD-L2)的细胞的交互作用(engagement)耗尽。因此,本发明的实施方案至少部分地基于认识到部分mTOR抑制(例如,使用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂)与程序性死亡(PD)-1阳性的CD4和CD8T淋巴细胞的百分比减少相关。

[0004] 因此,在一个方面,本发明涉及促进受试者(例如,人受试者)中免疫应答的方法,其包括

[0005] 向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂,例如,RAD001或雷帕霉素,

[0006] 从而增强或促进受试者的免疫应答。

[0007] 在一个实施方案中,低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂(例如,RAD001或雷帕霉素)和抗原作为疫苗施用。

[0008] 在一个实施方案中,低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂(例如,RAD001或雷帕霉素)作为佐剂组合物或化合物施用。

[0009] 本文描述了示例性的mTOR抑制剂,例如,在以下标题为“mTOR抑制剂”的部分。

[0010] 在一个实施方案中,mTOR抑制剂是变构mTOR抑制剂。在一个实施方案中,mTOR抑制

剂是RAD001。在一个实施方案中,mTOR抑制剂是雷帕霉素。

[0011] 在一个实施方案中,mTOR抑制剂是催化抑制剂,例如激酶抑制剂。在一个实施方案中,针对mTOR选择激酶抑制剂。在一个实施方案中,所述激酶抑制剂选自BEZ235和CCG168。

[0012] 在一个实施方案中,低、免疫增强剂量包含多种mTOR抑制剂。在一个实施方案中,低、免疫增强剂量包含变构和催化的mTOR抑制剂。

[0013] 在一个实施方案中,低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂施用一段时间使足以发生以下中的一个或多个:

[0014] i)PD-1阳性免疫效应细胞数目的减少;

[0015] ii)PD-1阴性免疫效应细胞数目的增加;

[0016] iii)PD-1阴性免疫效应细胞/PD-1阳性免疫效应细胞比率的增加;

[0017] iv)初始T细胞数目的增加;

[0018] v)下列标志物中一个或多个的表达的增加:CD62L^{high},CD127^{high},CD27⁺和BCL2,例如,在记忆T细胞上,例如,记忆T细胞前体上;

[0019] vi)KLRG1表达的减少,例如在记忆T细胞上,例如,记忆T细胞前体上;或者

[0020] vii)记忆T细胞前体数目的增加,例如,具有以下特征中的任何一个或组合的细胞:增加的CD62L^{high},增加的CD127^{high},增加的CD27⁺,降低的KLRG1,和增加的BCL2;

[0021] 并且其中i)、ii)、iii)、iv)、v)、vi)、或vii)例如,至少瞬时发生,例如,相比于未治疗的受试者。

[0022] 在一个实施方案中,治疗,例如,促进受试者(例如人受试者)免疫应答的方法,包括抑制由PD-1与PD-L1或PD-2交互作用介导的负免疫应答(negative immune response)。

[0023] 在一个实施方案中,治疗方法,例如,促进受试者(例如人受试者)免疫应答的治疗方法,包括增加能够增殖的T细胞的数量。

[0024] 在一个实施方案中,治疗方法,例如,促进受试者(例如人受试者)免疫应答的治疗方法,包括增加能够发挥细胞毒性作用、分泌细胞因子、或活化的T细胞数目。

[0025] 在一个实施方案中,治疗方法,例如,促进受试者(例如人受试者)免疫应答的治疗方法,包括增加能够提供T细胞辅助B细胞的T细胞数目。

[0026] 在一个实施方案中,低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂的施用导致部分的、但不是全部的mTOR抑制至少1,5,10,20,30,或60天。

[0027] 在一个实施方案中,低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂的施用导致部分的、但不是全部的mTOR抑制需要增强免疫应答的时间。

[0028] 在一个实施方案中,低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂与mTOR抑制至少5%,但不超过90%相关,例如由P70S6K抑制所测定。在一个实施方案中,mTOR抑制剂包括RAD001。(用于评估mTOR抑制水平的方法如本文中描述,例如,在以下标题为“mTOR抑制的评估”的部分中)。

[0029] 在一个实施方案中,低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂与mTOR抑制至少10%,但不超过80%相关,例如由P70S6K抑制所测定。在一个实施方案中,mTOR抑制剂包括RAD001。

[0030] 在一个实施方案中,低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂与mTOR抑制至少10%,但不超过40%相关,例如由P70S6K抑制所测定。在一个实施方案中,mTOR抑制剂包括RAD001。

[0031] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂包括,例如,每

周一一次,例如,以立即释放剂型,施用0.1至20,0.5至10,2.5至7.5,3至6,或约5毫克的RAD001。

[0032] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂包括,每周一次以立即释放剂型施用约5毫克的RAD001。

[0033] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂包括,例如,每周一次,例如,以立即释放剂型,施用RAD001之外的mTOR抑制剂的量,其生物等效于每周一次立即释放剂型的0.1至20,0.5至10,2.5至7.5,3至6,或约5毫克的RAD001。

[0034] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂,包括每周一次以立即释放剂型施用RAD001之外的mTOR抑制剂的量,其生物等效于每周一次立即释放剂型的约5毫克的RAD001。

[0035] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂,包括例如,每周一次,例如,以缓释剂型,施用0.3至60,1.5至30,7.5至22.5,9至18,或约15毫克的RAD001。

[0036] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂,包括每周一次以缓释剂型施用约15毫克的RAD001。

[0037] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂,包括例如,每周一次,例如,以缓释剂型,施用RAD001之外的mTOR抑制剂的量,其生物等效于每周一次缓释剂型的0.3至60,1.5至30,7.5至22.5,9至18,或约15毫克的RAD001。

[0038] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂,包括每周一次以缓释剂型施用RAD001之外的mTOR抑制剂的量,其生物等效于每周一次缓释剂型的约15毫克的RAD001。

[0039] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂,包括例如,每天一次,例如,以立即释放剂型,施用0.005至1.5,0.01至1.5,0.1至1.5,0.2至1.5,0.3至1.5,0.4至1.5,0.5至1.5,0.6至1.5,0.7至1.5,0.8至1.5,1.0至1.5,0.3至0.6,或约0.5毫克的RAD001。

[0040] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂,包括每天一次以立即释放剂型施用约0.5毫克的RAD001。

[0041] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂,包括例如,每天一次,例如,以立即释放剂型,施用RAD001之外的mTOR抑制剂的量,其生物等效于每天一次立即释放剂型的0.005至1.5,0.01至1.5,0.1至1.5,0.2至1.5,0.3至1.5,0.4至1.5,0.5至1.5,0.6至1.5,0.7至1.5,0.8至1.5,1.0至1.5,0.3至0.6,或约0.5毫克的RAD001。

[0042] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂包括,每天一次以立即释放剂型施用RAD001之外的mTOR抑制剂的量,其生物等效于每天一次立即释放剂型的约0.5毫克的RAD001。

[0043] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂包括,例如,每天一次,例如,以缓释剂型施用0.015至4.5,0.03至4.5,0.3至4.5,0.6至4.5,0.9至4.5,1.2至4.5,1.5至4.5,1.8至4.5,2.1至4.5,2.4至4.5,3.0至4.5,0.9至1.8,或约1.5毫克的RAD001。

[0044] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂包括,例如,每

天一次,例如,以缓释剂型,施用RAD001之外的mTOR抑制剂的量,其生物等效于每天一次缓释剂型的0.015至4.5,0.03至4.5,0.3至4.5,0.6至4.5,0.9至4.5,1.2至4.5,1.5至4.5,1.8至4.5,2.1至4.5,2.4至4.5,3.0至4.5,0.9至1.8,或约1.5毫克的RAD001。

[0045] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂包括,例如,每周一次,例如,以缓释剂型施用0.1至30,0.2至30,2至30,4至30,6至30,8至30,10至30,1.2至30,14至30,16至30,20至30,6至12,或约10毫克的RAD001。

[0046] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂包括,例如,每周一次,例如,以缓释剂型施用RAD001之外的mTOR抑制剂的量,其生物等效于每周一次的缓释剂型的0.1至30,0.2至30,2至30,4至30,6至30,8至30,10至30,1.2至30,14至30,16至30,20至30,6至12,或约10毫克的RAD001。

[0047] 在一个实施方案中,mTOR抑制剂是RAD001,并且剂量提供RAD001的波谷水平范围在约0.1和3ng/ml之间,或0.3或更少和3ng/ml之间,或0.3或更少和1ng/ml之间。

[0048] 在一个实施方案中,mTOR抑制剂是RAD001之外的抑制剂,其剂量生物等效于提供如下的RAD001剂量,即RAD001的波谷水平范围在约0.1和3ng/ml之间,或0.3或更少和3ng/ml之间,或0.3或更少和1ng/ml之间。

[0049] 在一个实施方案中,受试者患有癌症。示例性癌症在本文中,例如,在以下标题为“病症癌症”的部分中描述。在一个实施方案中,受试者患有癌症,但另外并不是无免疫应答的,例如,不是HIV+,不具有爱滋病,或者不是免疫功能衰老的(immunosenescent)。在一个实施方案中,受试者患有癌症,但是,除了由于任何抗癌治疗,其否则不是无免疫应答的,例如,是不是HIV+,不具有爱滋病,或者不是免疫功能衰老的。

[0050] 在一个实施方案中,受试者患有癌症,并且所述方法包括促进受试者对癌症的免疫应答。在一个实施方案中,在所患癌症的基础上选择受试者。在一个实施方案中,在需要或可能从促进免疫应答中受益的基础上选择受试者。在一个实施方案中,癌细胞表达PD-L1或PD-L2。在一个实施方案中,在癌症微环境中的细胞表达PD-L1或PD-L2。

[0051] 在一个实施方案中,癌症包括实体肿瘤。在一个实施方案中,癌症是血液癌症。在一个实施方案中,癌症是白血病。在一个实施方案中,癌症是黑色素瘤。

[0052] 在一个实施例中,促进受试者的免疫应答包括为受试者(例如,患有癌症的受试者)准备抑制免疫系统或杀伤T细胞的附加治疗,例如,施用药物,例如,化疗或放疗。在一个实施方案中,低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂(例如,RAD001)降低与附加治疗相关的免疫抑制。

[0053] 在一个实施方案中,该方法进一步包括对受试者施用附加治疗,例如化疗、放疗、细胞疗法、骨髓移植。在一个实施方案中,附加治疗包括如本文所描述的药物或治疗的组合,参见,例如以下标题为“组合治疗”的部分。在一个实施方案中,方法进一步包括施用杀伤T细胞的附加治疗,例如,放疗或细胞毒性化疗。在一个实施方案中,在附加治疗开始之前、伴随或之后施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂。在一个实施方案中,方法还包括施用用于癌症的附加治疗。

[0054] 在一个实施方案中,方法进一步包括施用抑制免疫系统的附加治疗,例如,施用药物,例如化疗或放疗。在一个实施方案中,在抑制免疫系统的附加治疗开始之前、伴随或之后施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂,例如,RAD001。不希望受理论的束缚,据信低、免疫

增强剂量的mTOR抑制剂,允许更广泛的治疗选择。不希望受理论的束缚,据信,这是由于改善受试者的免疫应答。在一个实施方案中,低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂,可以允许更积极地施用附加治疗。因此,在一个实施方案中,增加单位剂量、总剂量、施用频率或施用次数。在一个实施方案中,增加是相对于参考施用的,例如,在不存在低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂时提供的护理标准。在一个实施方案中,增加是相对于在不存在低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂时,将给予最大耐受或可接受水平的免疫抑制的施用。在另一个实施方案中,免疫增强剂量的mTOR抑制剂,可以允许不太积极的施用附加治疗。因此,在一个实施方案中,减少单位剂量、总剂量、施用频率或施用次数。在一个实施方案中,减少是相对于参考施用的,例如,在不存在低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂时提供的护理标准。在一个实施方案中,减少是相对于在不存在低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂时,将给予最大耐受或可接受水平的免疫抑制的施用。

[0055] 在一个实施方案中,受试者是无免疫应答的。在一个实施方案中,受试者是HIV+或患有AIDS。

[0056] 因此,在一个实施方案中,促进受试者的免疫应答包括促进无免疫应答的受试者的免疫应答,例如,具有免疫缺陷的受试者,例如,遗传性或获得性免疫缺陷,例如,病毒介导的免疫缺陷,例如,HIV+受试者,或患有AIDS的受试者。在一个实施方案中,方法还包括施用针对免疫缺陷的附加治疗,例如,抗病毒剂。在一个实施方案中,受试者是HIV+或患有AIDS,附加治疗包括施用抗病毒剂,例如,核苷逆转录酶抑制剂,例如,阿巴卡韦、去羟肌苷、恩曲他滨、拉米夫定、司他夫定、替诺福韦、扎西他滨、或齐多夫定、或其组合,例如双汰芝(齐多夫定和拉米夫定)、三协唯(齐多夫定,拉米夫定和阿巴卡韦)、epzicom(阿巴卡韦和拉米夫定)和特鲁瓦达(替诺福韦和拉米夫定)。在一个实施方案中,附加治疗方法包括施用蛋白酶抑制剂,例如,安普那韦、安泼那韦、阿扎那韦、福沙那韦、茚地那韦、洛匹那韦、利托那韦或沙奎那韦、或它们的组合。在一个实施例中,低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂,例如,RAD001,在附加治疗开始之前、伴随或之后施用。虽然不希望受理论的束缚,据信低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂,允许更广泛的治疗选择。不希望受理论的束缚,据信,这是由于改善受试者的免疫应答。在一个实施方案中,低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂,可以允许更积极地施用附加治疗。因此,在一个实施方案中,增加单位剂量、总剂量、施用频率或施用次数。在一个实施方案中,增加是相对于参考施用的,例如,在不存在低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂时提供的护理标准。在一个实施方案中,增加是相对于在不存在低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂时,将给予最大耐受或可接受水平的副作用的施用。在另一个实施方案中,免疫增强剂量的mTOR抑制剂,可以允许不太积极的施用附加治疗。因此,在一个实施方案中,减少单位剂量、总剂量、施用频率或施用次数。在一个实施方案中,减少是相对于参考施用的,例如,在不存在低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂时提供的护理标准。在一个实施方案中,减少是相对于在不存在低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂时,将给予最大耐受或可接受水平的副作用的施用。

[0057] 在一个实施方案中,受试者患有感染性疾病,例如肝炎,例如甲型、乙型或丙型肝炎,或其它病原体感染。示例性病原体感染在本文中描述,例如,在以下标题为“疾患病原体感染”的部分。在一个实施方案中,受试者患有感染性疾病或具有病原体感染,但另外不是无免疫应答的,例如,不是免疫功能衰老。

[0058] 在一个实施方案中,受试者具有受损的免疫应答。在一个实施方案中,受试者免疫功能衰老。

[0059] 在一个实施方案中,受试者患有与年龄相关的病症。在一个实施方式中,年龄相关的病症选自肌少症,皮肤萎缩,肌肉萎缩,脑萎缩,动脉粥样硬化,动脉硬化,肺气肿,骨质疏松症,骨关节炎,高血压,勃起功能障碍,痴呆症,亨廷顿氏病,阿尔茨海默氏病,白内障,年龄相关性黄斑变性,前列腺癌,中风,预期寿命减少,肾功能受损和年龄相关性听力损失,衰老相关的移动性残疾(例如,衰弱),认知功能减退,老年性痴呆,记忆损伤,腱僵硬,心脏功能障碍如心肌肥厚和收缩和舒张功能障碍(ndsystolic and diastolic dysfunction),免疫功能衰老,癌症,肥胖症和糖尿病。

[0060] 在一个实施方案中,方法包括增强受试者对抗原的免疫应答。在一个实施方案中,方法包括向受试者提供或施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂,例如,RAD001或雷帕霉素作为佐剂组合物或化合物。在一个实施方案中,方法包括向受试者提供或施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂(例如,RAD001或雷帕霉素)和抗原,作为疫苗,或与疫苗组合。在一个实施方案中,抗原是癌抗原。在一个实施方案中,抗原是感染性疾病、病毒、细菌、原生动物、微生物、病原体、或者寄生虫抗原。在一个实施方案中,方法进一步包括向受试者施用抗原或疫苗。在一个实施方案中,在施用步骤之前,方法包括鉴定具有对抗原受损的免疫应答的受试者的步骤。

[0061] 在一个实施方案中,针对抗原的抗体的相对低的基线或免疫前水平或滴度预示较强的mTOR抑制剂(例如,RAD001)相关的针对抗原的抗体滴度增加。在一个实施方案中,在施用抗原或疫苗之前评估受试者针对抗原的抗体水平或滴度。在一个实施方案中,评估包括获得(例如,直接或间接地获得)抗体滴度或水平的测定值。抗体滴度或水平可以与参考值进行比较。相对低的滴度,例如,滴度低于或等于参考值,是较强的mTOR抑制剂(例如,RAD001)相关的抗体滴度增加的指征。因此,基线或免疫前滴度可用于针对低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂而选择患者,例如,与疫苗接种或抗原施用组合,以刺激免疫应答。在一个实施方案中,回应(responsive to)测定的抗体经测定的水平或滴度,受试者被分类为可能从(例如,在施用疫苗或抗原之前或伴随)施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂受益。在一个实施方案中,回应测定的抗体经测定的水平或滴度,例如,水平或滴度等于或低于参考值,选择受试者在疫苗或抗原施用之前或伴随使用或施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂。在一个实施方案中,回应经测定的抗体水平或滴度,例如,水平或滴度高于参考值,选择受试者使用或施用替代疗法(例如,施用疫苗或抗原),而不施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂。

[0062] 在一个实施方案中,受试者感染或处于感染流感病毒,例如,甲型流感病毒或乙型流感病毒的风险。

[0063] 在一个实施方案中,方法包括增强对流感病毒,例如,甲型流感病毒或乙型流感病毒的免疫应答。甲型流感病毒的特征在于两个糖蛋白中的一个或两个,血凝素(HA)多肽和神经氨酸酶(NA)多肽,其都展示在病毒表面上。有17种HA抗原,表示为H1-17,和九种不同的NA抗原,表示N1-9。

[0064] 在这样的实施方案中,抗原或疫苗包含流感抗原,例如,甲型流感或乙型流感抗原。在一个实施方案中,抗原包括HA抗原,例如,H1-17中的任何。在一个实施方案中,抗原选

自H1N1,H2N2,H3N2,H5N1,H7N7,H1N2,H9N2,H7N2H7N3,H10N7,或H7N9。

[0065] 在一个实施方案中,抗原选自H1N1,H2N3,和乙型流感亚型。在一个实施方案中,抗原是肺炎球菌抗原。

[0066] 在一个实施方案中,抗原和mTOR抑制剂共同施用。在一个实施方案中,抗原和mTOR抑制剂相继施用。在一个实施方案中,受试者小于65岁。

[0067] 在一个实施方案中,流感抗体的相对低的基线或免疫前水平或滴度预示较强的mTOR抑制剂(例如,RAD001)相关的针对流感病毒的抗体滴度的增加,例如甲型流感病毒。在一个实施方案中,在施用抗原或疫苗之前评估受试者的抗流感抗体滴度。在一个实施方案中,评估包括获得,例如,直接或间接地获得,抗流感抗体滴度的测量值。抗体滴度可与参考值进行比较。相对低的滴度,例如,滴度等于或低于参考值,例如,低于或等于1:40的滴度(例如,如本文所测量的),是较强的mTOR抑制剂(例如,RAD001)相关的抗体滴度增加的指征。因此,基线或免疫前滴度可用于选择使用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂的患者,例如,与疫苗接种或抗原施用组合,以防止流感,例如,甲型流感。在一个实施方案中,回应测定的抗体滴度,受试者被分类为可能从(例如,在施用疫苗或抗原之前或伴随)施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂受益。在一个实施方案中,回应测定的抗体滴度,例如,滴度等于或低于参考值,选择在疫苗或抗原施用之前或伴随使用或施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂的受试者。在一个实施方案中,回应测定的抗体滴度(例如,滴度高于参考值),选择受试者使用或施用替代疗法,例如,施用疫苗或抗原,而不施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂。

[0068] 在一个实施方案中,受试者没有接受疫苗,例如,当mTOR抑制剂以促进免疫应答的水平存在时不接受疫苗。在一个实施方案中,疫苗是抗癌疫苗或针对传染源的疫苗。在一个实施方案中,疫苗是用于神经疾患,例如,阿尔茨海默氏病的治疗性疫苗。

[0069] 在一个实施方案中,受试者在低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂开始之前的10,20,30,40,50,60,70,80或90天内没有接受疫苗,例如,癌症疫苗。

[0070] 在一个实施方案中,受试者在低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂开始之后的10,20,30,40,50,60,70,80或90天内没有接受疫苗,例如,癌症疫苗。

[0071] 在一个实施方案中,低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂在疫苗接种时,或疫苗接种后施用。在一个实施方案中,低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂在疫苗接种之前24,10,5,4,3,2或1小时内、疫苗接种时或之后24,10,5,4,3,2或1小时内施用。

[0072] 在另一个方面,本发明的特征在于,评估用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂治疗,例如,以促进或增强对流感疫苗或抗原的免疫应答的受试者的方法,其包括:

[0073] 测定受试者抗流感抗体的基线或免疫前滴度是否等于或小于1:40和

[0074] 回应该测定,分类受试者,例如,为可能从低、免疫增强剂量的RAD001受益,或为所述受试者选择一个治疗疗程。

[0075] 在一个实施方案中,测定包括直接获得抗体滴度。

[0076] 在一个实施方案中,测定包括间接获得抗体滴度。

[0077] 在一个实施方案中,抗体滴度等于或小于1:40,所述受试者分类为可能从低、免疫增强剂量的RAD001受益。

[0078] 在一个实施方案中,抗体滴度等于或小于1:40,向所述受试者施用低、免疫增强剂量的RAD001。

- [0079] 在一个实施方案中,受试者施用流感疫苗或抗原。
- [0080] 在一个实施方案中,抗体滴度大于1:40,受试者分类为不太可能从低、免疫增强剂量的RAD001受益。
- [0081] 在另一个方面,本发明的特征在于,包含本文所述的低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂(例如,RAD001或雷帕霉素)和抗原的疫苗或疫苗组合物。
- [0082] 在一个实施方案中,疫苗或疫苗组合物包含疫苗抗原,和约0.005mg至1.5mg的mTOR抑制剂RAD001,或生物等效剂量的不同mTOR抑制剂。
- [0083] 在一个实施方案中,疫苗或疫苗组合物包含约0.01-1mg,约0.01-0.7mg,约0.01-0.5mg,或约**0.1~0.5mg**的RAD001,或生物等效剂量的不同mTOR抑制剂。
- [0084] 在一个实施方案中,组合物包含约0.5mg的RAD001或生物等效剂量的不同mTOR抑制剂。
- [0085] 在一个实施方案中,组合物包含mTOR抑制剂的量足以在施用所述组合物的受试者中抑制P70S6激酶活性不大于80%。
- [0086] 在一个实施方案中,组合物包含mTOR抑制剂的量足以在施用所述组合物的受试者中抑制P70S6激酶活性不大于38%。
- [0087] 在一个实施方案中,相比于安慰剂,组合物在施用所述组合物的受试者中产生至少1.2倍免疫应答的增加。
- [0088] 在一个实施方案中,mTOR抑制剂是雷帕霉素。
- [0089] 在一个实施方案中,mTOR抑制剂是雷帕霉素类似物(rapalog)。
- [0090] 在一个实施方案中,疫苗抗原来自流感。
- [0091] 在一个实施方案中,疫苗抗原选自H1N1,H2N3和乙型流感亚型。
- [0092] 在一个实施方案中,疫苗抗原来自肺炎球菌。
- [0093] 在另一方面,本发明的特征在于,包含本文所述的低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂(例如,RAD001或雷帕霉素)的佐剂或佐剂组合物或化合物。
- [0094] 在一个实施方案中,疫苗佐剂包含约0.005mg至1.5mg的mTOR抑制剂RAD001,或生物等效剂量的不同mTOR抑制剂。
- [0095] 在一个实施方案中,疫苗佐剂包含mTOR抑制剂的量足以在细胞中抑制P70S6激酶活性不大于80%。在另一个实施方案中,疫苗佐剂包含mTOR抑制剂的量足以在细胞中抑制P70S6激酶活性不大于38%。
- [0096] 在一个实施方案中,疫苗佐剂包含mTOR抑制剂,其中所述mTOR抑制剂是雷帕霉素。
- [0097] 在一个实施方案中,疫苗佐剂包含mTOR抑制剂,其中所述mTOR抑制剂是雷帕霉素类似物。
- [0098] 在一个实施方案中,疫苗佐剂包含约0.01-1mg,0.01-0.7mg,0.01-0.5mg,或0.1-0.5mg的RAD001或生物等效剂量的不同mTOR抑制剂。
- [0099] 在一个实施方案中,疫苗佐剂包含约0.5mg的RAD001或生物等效剂量的不同mTOR抑制剂。
- [0100] 在一个方面,本发明的特征在于如上文和本文中所描述的低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂,用于在受试者中促进免疫应答的用途。在一个方面,本发明进一步的特征在于包含上文和本文中所描述的低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂的组合物,用于在受试者中促

进免疫应答的用途。合适的剂量和mTOR抑制剂在本文中描述。在一个实施方案中,受试者是人。

[0101] 在一个方面,本发明的特征在于收集免疫效应细胞,如T细胞,或制备用于收集T细胞以形成免疫效应细胞(T细胞)的制剂的哺乳动物的方法,例如,灵长类动物,例如,人类,其中方法包括:向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂,例如,RAD001或雷帕霉素,持续一段时间以足以降低哺乳动物中或从哺乳动物收集的免疫效应细胞(例如T细胞)制剂中PD-1阳性免疫效应细胞(例如T细胞)的比率或增加PD-1阴性免疫效应细胞(例如T细胞)的比率。

[0102] 在一个实施方案中,方法包括收集免疫效应细胞,例如T细胞。在一个实施方案中,方法包括形成免疫效应细胞的制剂,例如,T细胞的制剂。

[0103] 在一个实施方案中,免疫效应细胞是T细胞。在一个实施方案中,T细胞是CD4表达(CD4+或CD4)的T细胞。在一个实施方案中,T细胞是CD8表达(CD8+或CD8)的T细胞。在一个实施方案中,T细胞包括多种CD4+T细胞和CD8+T细胞。

[0104] 在一个实施方案中,收集免疫效应细胞的方法进一步包括评估受试者中或从受试者采取的T细胞中PD1阴性或PD1阳性免疫效应细胞(例如,T细胞)的水平。

[0105] 在一个实施方案中,收集免疫效应细胞的方法进一步包括收集T细胞以形成T细胞制剂。

[0106] 在一个实施方案中,收集免疫效应细胞的方法进一步包括提供T细胞的制剂。

[0107] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂在收集T细胞之前至少1,2,3,4,5,10,15,20,25,或30天开始。

[0108] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂在T细胞收集之前至少30,60,90或120天开始。

[0109] 在一个实施方案中,T细胞的收集在最后一次施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂后1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,20,30,60,或90天内进行。

[0110] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂导致在T细胞收集以形成来自哺乳动物的T细胞制剂之前至少1,2,3,4,5,10,15,20,25,或30天部分、但不是全部抑制mTOR。

[0111] 在一个实施方案中,T细胞的收集在已经确认在受试者中部分抑制mTOR之后1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,20,30,60或90天内进行。

[0112] 在一个实施方案中,T细胞的收集在受试者中部分mTOR抑制发生后1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,20,30,60或90天内进行。

[0113] 在一个实施方案中,T细胞制剂包含PD-1阴性T细胞。

[0114] 在一个实施方案中,收集的T细胞的至少80%-90%是PD-1阴性。

[0115] 在一个实施方案中,收集的T细胞的不超过10-20%是PD-1阳性。

[0116] 在一个实施方案中,mTOR抑制剂是变构mTOR抑制剂。在一个实施方案中,mTOR抑制剂是RAD001。在一个实施方案中,mTOR抑制剂是雷帕霉素。

[0117] 在一个实施方案中,mTOR抑制剂是催化抑制剂,例如激酶抑制剂。在一个实施方案中,激酶抑制剂是mTOR选择性的。在一个实施方案中,激酶抑制剂选自BEZ235和CCG168。

[0118] 在一个实施方案中,低、免疫增强剂量包含多种mTOR抑制剂。在一个实施方案中,

剂量包含变构和催化mTOR抑制剂。

[0119] 在一个实施方案中,低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂施用一段时间使足以发生以下中的一个或多个:

[0120] i)PD-1阳性免疫效应细胞数目的减少;

[0121] ii)PD-1阴性免疫效应细胞数目的增加;

[0122] iii)PD-1阴性免疫效应细胞/PD-1阳性免疫效应细胞比率的增加;

[0123] iv)初始(naive)T细胞数目的增加;

[0124] v)下列标志物中一个或多个的表达的增加:CD62L^{high},CD127^{high},CD27⁺和BCL2,例如,在记忆T细胞上,例如,记忆T细胞前体上;

[0125] vi)KLRG1表达的减少,例如在记忆T细胞上,例如,记忆T细胞前体上;或者

[0126] vii)记忆T细胞前体数目的增加,例如,具有以下特征中的任何一个或组合的细胞:增加的CD62L^{high},增加的CD127^{high},增加的CD27⁺,降低的KLRG1,和增加的BCL2;

[0127] 其中i)、ii)、iii)、iv)、v)、vi)或vii)例如,至少瞬时发生,例如,相比于未治疗的受试者。

[0128] 在一个实施方案中,治疗,例如,促进受试者(例如人受试者)免疫应答的方法,包括抑制由PD-1与PD-L1或PD-2交互作用介导的负免疫应答。

[0129] 在一个实施方案中,治疗,例如,促进受试者(例如人受试者)免疫应答的方法,包括增加能够增殖的T细胞的数量。

[0130] 在一个实施方案中,治疗,例如,促进受试者(例如人受试者)免疫应答的方法,包括增加能够发挥细胞毒性作用、分泌细胞因子、或活化的T细胞数目。

[0131] 在一个实施方案中,治疗,例如,促进受试者(例如人受试者)免疫应答的方法,包括增加能够提供辅助B细胞的T细胞的T细胞数目。

[0132] 在一个实施方案中,低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂的施用导致部分的、但不是全部的mTOR抑制持续至少1,5,10,20,30,或60天。

[0133] 在一个实施方案中,低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂的施用导致部分的、但不是全部的mTOR抑制持续需要增强免疫应答的时长。

[0134] 在一个实施方案中,低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂与mTOR抑制至少5%,但不超过90%相关,例如由P70S6K抑制所测定。在一个实施方案中,mTOR抑制剂包括RAD001。

[0135] 在一个实施方案中,低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂与mTOR抑制至少10%,但不超过80%相关,例如由P70S6K抑制所测定。在一个实施方案中,mTOR抑制剂包括RAD001。

[0136] 在一个实施方案中,低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂与mTOR抑制至少10%,但不超过40%相关,例如由P70S6K抑制所测定。在一个实施方案中,mTOR抑制剂包括RAD001。

[0137] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂包括,例如,每周一次,例如,以立即释放剂型,施用0.1至20,0.5至10,2.5至7.5,3至6,或约5毫克的RAD001。

[0138] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂包括,每周一次以立即释放剂型施用约5毫克的RAD001。

[0139] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂包括,例如,每周一次,例如,以立即释放剂型,施用RAD001之外的mTOR抑制剂的量,其生物等效于每周一次

次立即释放剂型的0.1至20,0.5至10,2.5至7.5,3至6,或约5毫克的RAD001。

[0140] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂包括,每周一次以立即释放剂型施用RAD001之外的mTOR抑制剂的量,其生物等效于每周一次立即释放剂型的约5毫克的RAD001。

[0141] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂包括,例如,每周一次,例如,以缓释剂型,施用0.3至60,1.5至30,7.5至22.5,9至18,或约15毫克的RAD001。

[0142] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂包括,每周一次以缓释剂型施用约15毫克的RAD001。

[0143] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂包括,例如,每周一次,例如,以缓释剂型,施用RAD001之外的mTOR抑制剂的量,其生物等效于每周一次缓释剂型的0.3至60,1.5至30,7.5至22.5,9至18,或约15毫克的RAD001。

[0144] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂包括,每周一次以缓释剂型施用RAD001之外的mTOR抑制剂的量,其生物等效于每周一次缓释剂型的约15毫克的RAD001。

[0145] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂包括,例如,每天一次,例如,以立即释放剂型,施用0.005至1.5,0.01至1.5,0.1至1.5,0.2至1.5,0.3至1.5,0.4至1.5,0.5至1.5,0.6至1.5,0.7至1.5,0.8至1.5,1.0至1.5,0.3至0.6,或约0.5毫克的RAD001。

[0146] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂包括,每天一次以立即释放剂型施用约0.5毫克的RAD001。

[0147] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂包括,例如,每天一次,例如,以立即释放剂型,施用RAD001之外的mTOR抑制剂的量,生物等效于每天一次立即释放剂型的0.005至1.5,0.01至1.5,0.1至1.5,0.2至1.5,0.3至1.5,0.4至1.5,0.5至1.5,0.6至1.5,0.7至1.5,0.8至1.5,1.0至1.5,0.3至0.6,或约0.5毫克的RAD001。

[0148] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂包括,每天一次以立即释放剂型施用RAD001之外的mTOR抑制剂的量,其生物等效于每天一次立即释放剂型的约0.5毫克的RAD001。

[0149] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂包括,例如,每天一次,例如,以缓释剂型施用0.015至4.5,0.03至4.5,0.3至4.5,0.6至4.5,0.9至4.5,1.2至4.5,1.5至4.5,1.8至4.5,2.1至4.5,2.4至4.5,3.0至4.5,0.9至1.8,或约1.5毫克的RAD001。

[0150] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂包括,例如,每天一次,例如,以缓释剂型,施用RAD001之外的mTOR抑制剂的量,其生物等效于每天一次缓释剂型的0.015至4.5,0.03至4.5,0.3至4.5,0.6至4.5,0.9至4.5,1.2至4.5,1.5至4.5,1.8至4.5,2.1至4.5,2.4至4.5,3.0至4.5,0.9至1.8,或约1.5毫克的RAD001。

[0151] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂包括,例如,每周一次,例如,以缓释剂型施用0.1至30,0.2至30,2至30,4至30,6至30,8至30,10至30,1.2至30,14至30,16至30,20至30,6至12,或约10毫克的RAD001。

[0152] 在一个实施方案中,向受试者施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂包括,例如,每周一次,例如,以缓释剂型施用RAD001之外的mTOR抑制剂的量,其生物等效于每周一次的缓释剂型的0.1至30,0.2至30,2至30,4至30,6至30,8至30,10至30,1.2至30,14至30,16至30,20至30,6至12,或约10毫克的RAD001。

[0153] 在一个实施方案中,mTOR抑制剂是RAD001,和剂量提供RAD001的波谷水平范围在约0.3或更少和3ng/ml之间,或0.3或更少和1ng/ml之间。

[0154] 在一个实施方案中,mTOR抑制剂是RAD001之外的抑制剂,其剂量生物等效于提供RAD001的波谷水平范围在约0.3或更少和3ng/ml之间,或0.3或更少和1ng/ml之间的RAD001的剂量。

[0155] 在一个实施方案中,受试者患有癌症,并且所述方法包括促进受试者对癌症的免疫应答。在一个实施方案中,在所患癌症的基础上选择受试者。在一个实施方案中,癌细胞表达PD-L1或PD-L2。在一个实施方案中,在癌症微环境中的细胞表达PD-L1或PD-L2。

[0156] 在一个实施方案中,癌症包括实体肿瘤。在一个实施方案中,癌症是血液癌症。在一个实施方案中,癌症是白血病。在一个实施方案中,癌症是黑色素瘤。在一个实施方案中,癌症选自表1。

[0157] 在一个实施方案中,受试者是无免疫应答的。在一个实施方案中,受试者是HIV+或患有AIDS。在一个实施方案中,受试者具有感染性疾病。

[0158] 在一个实施方案中,受试者具有感染性疾病,例如肝炎,例如甲型、乙型或丙型肝炎。在一个实施方案中,受试者患有感染性疾病,但否则不是无免疫应答的,例如,不是免疫功能衰老。

[0159] 在一个实施方案中,受试者具有受损的免疫应答。在一个实施方案中,受试者免疫功能衰老。

[0160] 在一个实施方案中,受试者感染有病毒、细菌、原生动物、微生物、病原体、或者寄生虫。

[0161] 在一个实施方案中,受试者患有与年龄相关的病症。

[0162] 在一个实施例中,受试者小于65岁。

[0163] 在一个实施方案中,受试者没有接受疫苗,例如,当mTOR抑制剂以促进免疫应答的水平存在时不接受疫苗。在一个实施方案中,疫苗是抗癌疫苗或针对传染源的疫苗。在一个实施方案中,疫苗是用于神经疾患,例如,阿尔茨海默氏病的治疗性疫苗。

[0164] 在一个实施方案中,受试者在低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂开始之前的10,20,30,40,50,60,70,80或90天内没有接受疫苗,例如,癌症疫苗。

[0165] 在一个实施方案中,受试者在低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂开始之后的10,20,30,40,50,60,70,80或90天内没有接受疫苗,例如,癌症疫苗。

[0166] 在一个实施方案中,低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂在疫苗接种时、或之后施用。

[0167] 在一个方面,本文提供了例如,通过本文所述的方法制备的人T细胞制剂,其富集了PD-1阴性T细胞。在一个实施方案中,受试者患有癌症或是无免疫应答的。

[0168] 在另一个方面,本发明的特征在于,T细胞(例如,人T细胞)制剂,其可通过实践本文所述的方法获得或制备。

[0169] 在另一个方面,本发明的特征在于,mTOR抑制剂(例如,RAD001)的单位剂型、组合

物或制剂,例如,适于口服施用的剂型。实施方案在本文中描述,例如,在以下标题为“低剂量mTOR抑制剂”的部分描述。单位剂型或组合物可作为立即释放或缓释制剂提供,参见,例如以下标题为“药物组合物”和“缓释”的部分。

附图说明

[0170] 图1A和1B是示出与安慰剂相比针对流感疫苗株的滴度增加的图。在图1A中,示出了旨在治疗人群的各RAD001剂量组中,疫苗接种后4周,相对于安慰剂组中的增加,针对3株流感疫苗株(H1N1 A/California/07/2009、H3N2 A/Victoria/210/2009、B/Brisbane/60/2008)的每一种的流感几何平均滴度的增加高于基线。粗黑线表示相对于安慰剂滴度增加1.2倍,其要求3株流感疫苗株中的2株满足这个条件,以满足该研究的主要终点。星形“*”表示相对于安慰剂GMT滴度的增加超过1,其中后验概率至少80%。图1B是与图1A中相同数据的图,用于基线流感滴度 $\leq 1:40$ 的受试者亚组。

[0171] 图2示出RAD001浓度对疫苗接种4周后针对每个流感疫苗株的几何平均滴度增加倍数的散点图。受试者给药4周后,测量RAD001浓度(给药后1小时)。药代动力学测量的所有受试者被纳入分析组中。在疫苗接种后4周相对于基线的几何平均滴度的增加倍数在y轴上示出。

[0172] 图3是表示与安慰剂相比针对异源流感病毒株的滴度增加的图示。示出了旨在治疗人群的各RAD001剂量组中,疫苗接种后4周,相对于安慰剂组中的增加,针对流感疫苗中不包含的2株异源流感株(A/H1N1株A/New Jersey/8/76和A/H3N2株A/Victoria/361/11)的流感几何平均滴度的增加高于基线。*表示相对于安慰剂滴度的增加超过1,其中后验概率至少80%。

[0173] 图4A和4B是接种流感疫苗前和后IgG和IgM水平的图示。测量来自接种流感疫苗前和接种流感疫苗4周后的受试者血清中的抗A/H1N1/California/07/2009流感IgG和IgM水平。在RAD001和安慰剂组群之间没有检测到从基线至疫苗接种4周后抗H1N1流感IgG和IgM水平变化的显著差异(所有P值 >0.05 ,由Kruskal-Wallis秩和检验确定)。

[0174] 图5A,5B和5C是在RAD001治疗后PD-1阳性CD4和CD8百分比降低和PD-1阴性CD4T细胞增加的图示。PD-1阳性CD4,CD8和PD-1阴性CD4T细胞的百分比通过在基线、研究药物治疗6周后(第6周)和研究药物停药后6周和接种流感疫苗后4周(第12周),通过FACS分析PBMC样品测定。图5A显示与安慰剂组($n=25$)相比,接受剂量水平0.5mg/天($n=25$)、5mg/周($n=29$)和20mg/周($n=30$)的RAD001组在第12周,PD-1阳性的CD4T细胞显著下降(-37.1-28.5%),分别为 $p=0.002(0.02)$, $p=0.003(q=0.03)$,和 $p=0.01(q=0.05)$ 。图5B显示与安慰剂组($n=25$)相比,接受剂量水平0.5mg/天($n=25$)、5mg/周($n=29$)和20mg/周($n=30$)的RAD001组($n=109$)在第12周,PD-1阳性的CD8T细胞显著下降(-43.3-38.5%),分别为 $p=0.01(0.05)$ 、 $p=0.007(q=0.04)$ 、和 $p=0.01(q=0.05)$ 。图5C显示与安慰剂组($n=25$)相比,接受剂量水平0.5mg/天($n=25$)、5mg/周($n=29$)和20mg/周($n=30$)的RAD001组($n=109$)在第12周,PD-1阴性的CD4T细胞显著增加(3.0-4.9%),分别为 $p=0.0007(0.02)$ 、 $p=0.03(q=0.07)$ 、和 $p=0.03(q=0.08)$ 。

[0175] 图6A和6B在RAD001治疗后PD-1阳性CD4和CD8百分比降低和PD-1阴性CD4T细胞增加的图示,调整为基线PD-1表达的差异。PD-1阳性CD4,CD8和PD-1阴性CD4T细胞的百分比通

过在基线、研究药物治疗6周后(第6周)和研究药物停药后6周和接种流感疫苗后4周(第12周),通过FACS分析PBMC样品测定。图6A示出与安慰剂组($n=25$)相比,在第6周在汇集的RAD组($n=84$)中,PD-1+CD4T细胞显著降低30.2%,其中 $p=0.03$ ($q=0.13$)。与安慰剂组相比,在第12周在汇集的RAD中,PD-1阳性CD4T细胞降低32.7%,其中 $p=0.05$ ($q=0.19$)。图6B示出与安慰剂组($n=25$)相比,在第6周在汇集的RAD001组($n=84$)中,PD-1阳性CD8T细胞显著降低37.4%,其中 $p=0.008$ ($q=0.07$)。与安慰剂组相比,在第12周在汇集的RAD001中,PD-1阳性CD8T细胞降低41.4%,其中 $p=0.066$ ($q=0.21$)。图6A和6B代表图5A,5B,和5C中的数据,但将图5A,5B,和5C不同的RAD001剂量组汇集到图6A和6B中单一的RAD001治疗组。

[0176] 图7描绘对RAD001反应的在老年受试者中运动和能量增加。

[0177] 图8A和8B描绘RAD001对细胞中P70S6K活性的预测的效果。图8A描绘较高剂量的每周和每天的RAD001抑制P70S6激酶;图8B描绘了较低剂量每周的RAD001抑制P70S6激酶。

[0178] 详细说明

[0179] 定义

[0180] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域中普通技术人员通常理解的相同含义。

[0181] 术语“一(a)”和“一(an)”是指一个或多于一个(即,至少一个)冠词的语法对象。通过举例的方式,“一个元件”意指一个元件或多于一个元件。

[0182] 术语“约”当指可测量值时,如量、时距等,其指从指定值 $\pm 20\%$ 的变化,或在一些情况下为 $\pm 10\%$,或在一些情况下为 $\pm 5\%$,或在一些情况下为 $\pm 1\%$,或在一些情况下为 $\pm 0.1\%$ 的变化,因为这样的变化适合实施所公开的方法。

[0183] 当与特定的免疫原(例如,疫苗免疫原)组合使用时,术语“佐剂”是指在制剂中增加或以其它方式改变、修饰或增强所得的免疫应答的化合物。

[0184] 术语“抗肿瘤作用”是指可以通过各种方式来体现的生物作用,包括但不限于,例如,肿瘤体积的减小、肿瘤细胞数目的减少、转移灶数目的降低、预期寿命的增加、肿瘤细胞增殖的减少、肿瘤细胞存活的减少、或与癌性病症相关的各种生理症状的改善。“抗肿瘤作用”也可以通过本发明的化合物(例如,mTOR抑制剂)、肽、多核苷酸、细胞和抗体预防肿瘤在第一位置的發生的能力来体现。

[0185] 术语“抗体”是指一种蛋白质或多肽序列,其源自特异性结合抗原的免疫球蛋白分子。抗体可以是多克隆或单克隆、多链或单链、或完整免疫球蛋白,其可以从天然来源或从重组来源衍生。抗体可以是免疫球蛋白分子的四聚体。

[0186] 术语“抗体片段”是指完整抗体的至少一部分,或其重组变体,以及指抗原结合结构域,例如,完整抗体的抗原决定可变区,其足以赋予抗体片段识别和特异性结合靶标,如抗原。抗体片段的实例包括,但不限于Fab,Fab',F(ab')₂和Fv片段,scFv抗体片段,线性抗体,单结构域抗体,如sdAB(VL或VH),骆驼科VHH结构域,和由抗体片段形成的多特异性抗体。术语“scFv”指的是一种融合蛋白,其包含含有轻链可变区的至少一个抗体片段和含有重链可变区的至少一个抗体片段,其中轻链和重链可变区经由短的柔性多肽接头连续地连接,并且能够作为单链多肽表达,并且其中scFv保留其所来源的完整抗体的特异性。除非指明,如本文所用的scFv可具有任一顺序的VL和VH可变区,例如,对于所述多肽的N-末端和C-末端,scFv可以包含VL-接头-VH或者可以包含VH-接头-VL。

[0187] 术语“抗体重链”，指的是以其天然存在的构象存在于抗体分子中的两种类型多肽链中较大的一种，其通常决定该抗体所属的类。

[0188] 术语“抗体轻链”，指的是以其天然存在的构象存在于抗体分子中的两种类型多肽链中较小的一种，kappa(κ)和lambda(λ)轻链是指两个主要的抗体轻链同种型。

[0189] 术语“抗原”或“Ag”指的是引发免疫应答的分子。这种免疫应答可以包括抗体的产生，或特定的具有免疫能力的细胞的活化，或者两者均有。熟练的技术人员将理解，任何大分子，包括几乎所有的蛋白质或肽，可以作为抗原。另外，抗原可来自重组或基因组DNA。熟练的技术人员将理解，本文中使用任何DNA，其包含编码引发免疫应答的蛋白质因此编码如术语“抗原”的核苷酸序列或部分核苷酸序列。此外，本领域技术人员将理解抗原不必仅由基因的全长核苷酸序列编码。很显然的是，本发明包括，但不限于，使用一个以上基因的部分核苷酸序列，这些核苷酸序列以不同的组合排列以编码引起期望的免疫应答的多肽。此外，熟练的技术人员将理解，抗原根本不需要由一个“基因”编码。很显然，抗原可以合成产生或可从生物样品得到，或可以是除多肽之外的大分子。这样的生物样品可以包括但不限于组织样品、肿瘤样品、细胞或具有它生物组分的流体。

[0190] 术语“抗原提呈细胞”或“APC”是指免疫系统细胞如辅助细胞（例如，B-细胞，树突细胞(DC)等），其在其表面上展示与主要组织相容性复合物(MHC的)复合的外来抗原。T细胞可以利用其T细胞受体(TCR)识别这些复合物。APC加工抗原，并将其提呈给T细胞。

[0191] 术语“生物等效”是指为了产生与参考化合物(例如RAD001)的参考剂量或参考量所产生的效果相当的效果，所需要的除参考化合物(例如，RAD001)之外的其它试剂的量。在一个实施方案中，效果是mTOR抑制水平，例如，如通过P70S6激酶抑制测量的，例如，如在体内或在体外测定法中评估的，例如，如通过本文所述的测定法测量的，例如，布雷测定法，或通过免疫印迹测量磷酸化的S6水平。在一个实施方案中，效果是PD-1阳性/PD-1阴性T细胞比率的改变，如通过细胞分选测定的。在一个实施方案中，mTOR抑制剂的生物等效量或剂量是实现与参考化合物的参考剂量或参考量所实现的P70S6激酶抑制水平相同的量或剂量。在一个实施方案中，mTOR抑制剂的生物等效量或剂量是实现与参考化合物的参考剂量或参考量所实现的PD-1阳性/PD-1阴性T细胞比率的改变相同水平的量或剂量。

[0192] 术语“癌症”指特征在于异常细胞的快速和不受控制的生长的疾病。癌细胞可以局部播散或通过血流和淋巴系统扩散到身体的其它部位。在本文中描述的各种癌症的实例，包括但不限于，乳腺癌，前列腺癌，卵巢癌，子宫颈癌，皮肤癌，胰腺癌，结肠直肠癌，肾癌，肝癌，脑癌，淋巴瘤，白血病，肺癌等。在一个实施方案中，癌症的特征在于在癌细胞上或在肿瘤微环境中表达PD-1配体，例如，PD-L1或PD-L2。术语“癌症”是指癌性生长或致癌过程，转移的组织或恶性转化的细胞、组织或器官的所有类型，不论组织病理学类型或侵袭的阶段。

[0193] 如本文使用的术语“共同施用”或“联合施用”或类似，是指包括向单个患者施用所选择的治疗剂，并且旨在包括其中试剂不一定以相同的施用途径或在同一时间施用的治疗方案。在本文所描述的方法的一个方面中，mTOR抑制剂和抗原可以共同施用。

[0194] 术语“有效量”或“治疗上有效的量”在本文中可互换使用，并且是指如本文所述的化合物、制剂、材料或组合物有效地实现特定生物结果的量。

[0195] 术语“编码”指的是在多核苷酸，如基因、cDNA或mRNA中核苷酸的特定序列的固有属性，其作为模板在生物过程中合成具有限定核苷酸序列的(例如，rRNA，tRNA和mRNA)或限

定氨基酸序列的和由此获得的生物性质的其它聚合物和大分子。因此,如果对应于该基因的mRNA的转录和翻译在细胞或其它生物系统中产生蛋白,那么基因、cDNA、或RNA编码蛋白质。核苷酸序列与mRNA序列相同,并且通常在序列表中提供的编码链,和用作基因或cDNA转录的模板的非编码链,都可称为编码蛋白质或编码该基因或cDNA的其它产物。

[0196] 术语“内源性”指的是来自或产生于生物体、细胞、组织或系统内的任何材料。

[0197] 术语“外源”是指从生物体、细胞、组织或系统外部引入或产生的任何材料。

[0198] 术语“表达”是指由启动子驱动的特定核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0199] 术语“完全人”指的是免疫球蛋白,如抗体或抗体片段,其中整个分子是人源的或由与抗体或免疫球蛋白的人形式相同的氨基酸序列组成。

[0200] 术语“同源”或“同一性”是指两个聚合分子之间,例如两个核酸分子之间,如,两个DNA分子或两个RNA分子,或两个多肽分子之间亚基序列的同一性。当在这两个被比较的分子中的一个亚基位置上由相同的单体亚基占据时;例如,如果两个DNA分子的每个中的一个位置由腺嘌呤占据,则它们在该位置是同源的或同一的。两个序列之间的同源性是匹配数目或同源位置的正函数;例如,如果两个序列的位置中一半(例如,在10个亚基长的聚合物中5个位置)是同源的,则两个序列是50%同源的;如果位置的90%(例如,10个中的9个)匹配或同源,则两个序列是90%同源的。

[0201] 非人(例如,鼠)抗体的“人源化”形式是嵌合免疫球蛋白,其免疫球蛋白链或片段(例如Fv,Fab,Fab',F(ab')₂或抗体的其它抗原结合亚序列),其含有来自非人免疫球蛋白的最小序列。在大多数情况下,人源化抗体和其抗体片段是人免疫球蛋白(受体抗体或抗体片段),其中来自受体互补决定区(CDR)的残基被来自非人物种(供体抗体)如小鼠,大鼠或兔子的具有所需特异性、亲和力和能力的CDR残基取代。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv构架区(FR)残基被相应的非人残基取代。此外,人源化抗体/抗体片段可以包含在受体抗体或在引入的CDR或框架序列中均不存在的残基。这些修饰可进一步细化和优化抗体或抗体片段的性能。在一般情况下,人源化抗体或其抗体片段将包含至少一个,通常两个可变结构域的基本上全部,其中全部或基本上全部CDR区对应于非人免疫球蛋白的那些,以及全部或显著部分的FR区是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体或抗体片段还可以包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区。对于更多详情,请参见Jones等人.,*Nature*,321:522-525,1986;Reichmann等人.,*Nature*,332:323-329,1988;Presta,*Curr.Op.Struct.Biol.*,2:593-596,1992。

[0202] 术语“免疫功能衰老或免疫功能衰老”是指免疫功能降低导致受损的免疫应答,例如,对癌症、疫苗接种、感染性病原体等等的受损免疫应答。其既涉及宿主对感染应答的能力又涉及特别是通过免疫接种的长期免疫记忆的发展。这种免疫缺陷无处不在,并见于长寿命和短寿命的物种,作为相对于其预期寿命的年龄的函数,而不是物理时间的函数。它被认为是在老年人中发病率和死亡率频率增加的一大原因。免疫功能衰老不是一个随机衰退的现象,相反,其似乎反向重复进化模式,受免疫功能衰老影响的大多数参数似乎受遗传控制的。免疫功能衰老,有时也可以设想为不可避免的暴露各种抗原(例如病毒和细菌)的不断攻击的结果。免疫功能衰老是一个多因素的病症,导致许多病理显著的健康问题,例如,在老年人口。年龄依赖的生物变化,如造血干细胞的耗竭、PD1+淋巴细胞的增加、吞噬细胞和NK细胞总数量的下降、和体液免疫的下降导致免疫功能衰老的发生。在一个方面,个体中

免疫功能衰老可通过测量免疫细胞中的端粒长度(参见,例如,US5741677)测定。免疫功能衰老还可通过记录个体中低于正常的初始(**naïve**)CD4和/或CD8+T细胞数、T细胞库、表达PD1的T细胞数测定,例如,低于正常的PD-1阴性T细胞数,或测量大于或等于65岁的受试者中对疫苗接种的应答。

[0203] 术语“受损的免疫应答”是指其中受试者不具有适当的免疫应答的状态,例如,对癌症、疫苗接种、病原体感染等等不具有适当的免疫应答。在一些实施方案中,预期具有受损的免疫应答的受试者在预防性疫苗接种后无法得到保护性抗体滴度水平,或其中在治疗性疫苗接种后受试者不具有疾病负担的降低。如果受试者是已知具有下降的免疫功能或具有下降的免疫功能史的人群中的一员,如老年人、接受化疗治疗的受试者、无脾的受试者、无免疫应答的受试者、或有HIV/AIDS的患者,则受试者也可以有受损的免疫应答。本文描述的方法允许通过施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂,例如,变构mTOR抑制剂,如RAD001治疗受损的免疫应答。

[0204] 术语“分离的”是指从天然状态的改变或移除。例如,天然存在于活的动物中的核酸或肽不是“分离的”,但从其天然状态的共存物质部分或完全分开的同样的核酸或肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白质可以基本上纯化的形式存在,或者可以在非天然环境中存在,如,例如,在宿主细胞中存在。

[0205] 当与mTOR抑制剂,例如变构mTOR抑制剂,例如,RAD001或雷帕霉素,或催化mTOR抑制剂结合使用时,“低、免疫增强剂量”是指部分地、但并不完全地抑制mTOR活性的mTOR抑制剂的剂量,例如,如由P70S6激酶活性抑制所测定。用于评估mTOR活性的方法,例如,通过抑制P70S6激酶,在本文中讨论。剂量不足以导致完全的免疫抑制,但足以增强免疫应答。在一个实施方案中,低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂导致PD-1阳性T细胞数量的降低和/或PD-1阴性T细胞数量的增加,或PD-1阴性T细胞/PD-1阳性T细胞比率的增加。在一个实施方案中,低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂导致初始T细胞数量的增加。在一个实施方案中,低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂导致以下的一个或多个:

[0206] 下列标志物中一个或多个的表达增加:CD62L^{high},CD127^{high},CD27⁺和BCL2,例如,在记忆T细胞上,例如,记忆T细胞前体上;

[0207] KLRG1表达的减少,例如在记忆T细胞上,例如,记忆T细胞前体上和

[0208] 记忆T细胞前体数目的增加,例如,具有以下特征中的任何一个或组合的细胞:增加的CD62L^{high},增加的CD127^{high},增加的CD27⁺,降低的KLRG1,和增加的BCL2;

[0209] 其中与未治疗的受试者相比,发生上述变化的任意,例如,至少瞬时发生。

[0210] 在一个实施方案中,mTOR抑制剂的剂量与以下相关,或提供以下:至少5但不超过90%的mTOR抑制,至少10但不超过90%的mTOR抑制,至少15但不超过90%的mTOR抑制,至少20但不超过90%的mTOR抑制,至少30但不超过90%的mTOR抑制,至少40但不超过90%的mTOR抑制,至少50但不超过90%的mTOR抑制,至少60但不超过90%的mTOR抑制,或至少70但不超过90%的mTOR抑制。

[0211] 在一个实施方案中,mTOR抑制剂的剂量与以下相关,或提供以下:至少5但不超过80%的mTOR抑制,至少10但不超过80%的mTOR抑制,至少15但不超过80%的mTOR抑制,至少20但不超过80%的mTOR抑制,至少30但不超过80%的mTOR抑制,至少40但不超过80%的mTOR抑制,至少50但不超过80%的mTOR抑制,或至少60但不超过80%的mTOR抑制。

[0212] 在一个实施方案中,mTOR抑制剂的剂量与以下相关,或提供以下:至少5但不超过70%的mTOR抑制,至少10但不超过70%的mTOR抑制,至少15但不超过70%的mTOR抑制,至少20但不超过70%的mTOR抑制,至少30但不超过70%的mTOR抑制,至少40但不超过70%的mTOR抑制,至少50但不超过70%的mTOR抑制。

[0213] 在一个实施方案中,mTOR抑制剂的剂量与以下相关,或提供以下:至少5但不超过60%的mTOR抑制,至少10但不超过60%的mTOR抑制,至少15但不超过60%的mTOR抑制,至少20但不超过60%的mTOR抑制,至少30但不超过60%的mTOR抑制,或至少40但不超过60%的mTOR抑制。

[0214] 在一个实施方案中,mTOR抑制剂的剂量与以下相关,或提供以下:至少5但不超过50%的mTOR抑制,至少10但不超过50%的mTOR抑制,至少15但不超过50%的mTOR抑制,至少20但不超过50%的mTOR抑制,至少30但不超过50%的mTOR抑制,或至少40但不超过50%的mTOR抑制。

[0215] 在一个实施方案中,mTOR抑制剂的剂量与以下相关,或提供以下:至少5但不超过40%的mTOR抑制,至少10但不超过40%的mTOR抑制,至少15但不超过40%的mTOR抑制,至少20但不超过40%的mTOR抑制,至少30但不超过40%的mTOR抑制,或至少35但不超过40%的mTOR抑制。

[0216] 在一个实施方案中,mTOR抑制剂的剂量与以下相关,或提供以下:至少5但不超过30%的mTOR抑制,至少10但不超过30%的mTOR抑制,至少15但不超过30%的mTOR抑制,至少20但不超过30%的mTOR抑制,或至少25但不超过30%的mTOR抑制。

[0217] 在一个实施方案中,mTOR抑制剂的剂量与以下相关,或提供以下:至少1、2、3、4或5但不超过20%的mTOR抑制,至少1、2、3、4或5但不超过30%的mTOR抑制,至少1、2、3、4或5但不超过35%的mTOR抑制,至少1、2、3、4或5但不超过40%的mTOR抑制,或者至少1、2、3、4或5但不超过45%的mTOR抑制。

[0218] 在一个实施方案中,mTOR抑制剂的剂量与以下相关,或提供以下:至少1、2、3、4或5但不超过90%的mTOR抑制。

[0219] 正如文中所讨论的,mTOR抑制的程度可以表示为P70S6K抑制的程度,例如,mTOR抑制的程度可以通过P70S6K活性的减少水平来确定,例如,通过P70S6K底物磷酸化的减少来确定.mTOR抑制的水平可通过本文描述的方法,例如,布雷测定法来评估。

[0220] 除非另有规定,“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括互为简并形式和编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。短语编码蛋白质或RNA的核苷酸序列还可以包括内含子,程度为编码蛋白质的核苷酸序列在一些版本中可以含有一个(多个)内含子。

[0221] 在本发明的上下文中,使用通常存在的核酸碱基的以下缩写。“A”指腺苷,“C”指胞嘧啶,“G”指鸟苷,“T”指胸苷,和“U”是指尿苷。

[0222] 如文中使用的术语“获得(acquire)”或“获得(acquiring)”,是指获得物理实体(例如,样本)的占有,或值,例如,数值,或图像,通过“直接获得”或“间接获得”物理实体或值。“直接获得”是指执行过程(例如,执行合成或分析方法,使样品与检测试剂接触,或从样品捕获信号),以获得物理实体或值。“间接获得”是指从另一方或来源(例如,直接获得物理实体或值的第三方实验室)接收物理实体或值。直接获得物理实体包括执行包括物理物质中物理变化的过程。示例性改变包括从两个或更多的原料制作物理实体、剪切或片段化物

质、分离或纯化物质,组合两个或更多个单独的实体成为混合物、进行化学反应,包括破坏或形成共价或非共价键。直接获得值包括执行包括样品或另一物质中物理变化的过程,例如,执行分析过程,其包括在物质(例如,样品、分析物、或试剂)中的物理变化,有时在本文中称为“物理分析”,执行分析方法,例如,包括以下一种或多种的方法:从另一物质分离或纯化物质,例如,分析物、或其片段或其它衍生物;组合分析物、或其片段或其它衍生物与另一物质,例如,缓冲剂、溶剂或反应物;或改变分析物、或其片段或其它衍生物的结构,例如通过破坏或形成分析物的第一和第二个原子之间的共价或非共价键;诱导或收集信号,例如,基于光的信号,例如荧光信号,或改变试剂、或其片段或其它衍生物的结构,例如,通过破坏或形成试剂的第一和第二个原子之间的共价或非共价键。直接获得值包括其中使用计算机或检测装置(例如,扫描仪)的方法,例如,当对应检测器上光子冲击的电子状态中的变化。直接获得的值包括捕获来自样品的信号。

[0223] 术语“核酸”或“多核苷酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)和其聚合物。除非特别限定,该术语包括这样的核酸,其包含与参考核酸具有相似结合特性的天然存在核苷酸的已知类似物,该核酸以与天然存在的核苷酸类似的方式代谢。除非另有指出,特定核酸序列也隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如,简并密码子取代)、等位基因、直向同源物、SNP、和互补序列以及明确指出的序列。具体而言,简并密码子取代可通过产生其中一个或多个所选(或全部)密码子的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现(Batzer等人., *Nucleic Acid Res.* 19:5081(1991); Ohtsuka等人., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608(1985)和Rossolini等人., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98(1994))。

[0224] 术语免疫原性组合物的“肠胃外”施用包括,例如,皮下(s.c.)、静脉内(i.v.)、肌肉内(i.m.)、或胸骨内注射、瘤内、或输注技术。

[0225] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用,是指包含由肽键共价连接的氨基酸残基的化合物。蛋白质或肽必须包含至少两个氨基酸,并且可包含蛋白质或肽序列的氨基酸的最大数目而没有限制。多肽包括任何肽或蛋白质,所述肽或蛋白质包含彼此通过肽键连接的两个或更多个氨基酸。如本文所用,该术语指短链和长链,例如,短链通常在本领域中被称为肽、寡肽和寡聚体,长链通常在本领域中被称为蛋白质,其中有许多类型。“多肽”包括,例如,生物活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同源二聚体、异源二聚体、多肽的变体、修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白、等等。多肽包括天然肽、重组肽、或它们的组合。

[0226] “前体药物”或“前药”指的是在受试者身体内被处理成药物的化合物。在一个实施方案中,处理包括键(例如共价键)的断裂或形成。通常情况下,共价键的断裂释放药物。

[0227] 在免疫应答的上下文中术语“促进”或“提高”是指免疫应答的增强,如免疫细胞靶向和/或杀死癌细胞的能力增强,靶向和/或杀死病原体和病原体感染细胞的能力增强,和疫苗接种后的保护性免疫增强,等等。在一些实施方案中,保护性免疫是指存在足够的免疫应答(如抗体滴度)以防止表达相同抗原的病原体引起的继发感染。

[0228] 术语“预防”是指对疾病或疾病状态的预防或保护治疗。预防可能是完全的,例如,完全没有疾病或疾病状态。预防也可以是部分的,使得受试者中疾病或疾病状态发生的可能性小于没有接受预防性治疗的受试者。

[0229] 如本文中所使用的,术语“雷帕霉素类似物”是指雷帕霉素的小分子类似物。

[0230] 术语“重组抗体”指的是使用重组DNA技术产生的抗体,如,例如,通过噬菌体或酵母表达系统表达的抗体。该术语也应理解为是指已通过编码抗体的DNA分子合成产生的抗体,所述DNA分子表达抗体蛋白,或特定抗体的氨基酸序列,其中使用在本领域中可获得的和公知的重组DNA或氨基酸序列的技术获得所述DNA或氨基酸序列。

[0231] 术语“信号传导通路”是指各种信号传导分子之间的生化关系,所述信号传导分子在从细胞的一部分至细胞的另一部分的信号传输中发挥作用。短语“细胞表面受体”包括分子和分子的复合体,其能够接收信号,并且跨越细胞膜传递信号。

[0232] 术语“特异性结合”是指抗体或配体,其识别并结合存在于样品中的相关结合伴侣(例如,存在于T细胞上的分子)蛋白,但该抗体或配体基本上不识别或结合样品中的其它分子。

[0233] 术语“受试者”是指其中可引起免疫应答的任何活的生物体(例如,哺乳动物、人类)。在一个实施方案中,受试者是人。受试者可以是任何年龄。在一个实施方案中,受试者是老年人受试者,例如,65岁或以上。在一个实施方案中,受试者是非老人的人类受试者,例如,小于65岁。在一个实施方案中,受试者是人类儿科受试者,例如,18岁或以下。在一个实施方案中,受试者是成人受试者,例如,年龄超过18岁。

[0234] 术语“治疗”是指治疗。治疗效果是通过降低、抑制、缓解、或根除疾病状态而获得。

[0235] 术语“肿瘤抗原”或“过度增殖性疾病的抗原”或“与过度增殖性疾病相关的抗原”是指特定过度增殖性疾病所共有的抗原。在某些方面,本发明的过度增殖性疾病的抗原源自癌症,所述癌症包括但不限于原发性或转移性黑色素瘤,胸腺瘤,淋巴瘤,肉瘤,肺癌,肝癌,非何杰金氏淋巴瘤,非何杰金氏淋巴瘤,白血病,子宫癌,子宫颈癌,膀胱癌,肾癌和腺癌如乳腺癌,前列腺癌,卵巢癌,胰腺癌,等等。

[0236] 如本文中使用的术语“单位剂型”是指适合于一次施用的剂量。通过示例的方式,单位剂型可以是片剂,胶囊,或在递送装置中配置的治疗性的量,所述递送装置例如,注射器或静脉滴注袋。在一个实施方案中,单元剂型在单次施用中施用。在一个实施方案中,一个以上的单位剂型,例如,两片片剂,可同时施用。术语“疫苗”是指一种组合物,如抗原或抗原部分的悬浮液或溶液,通常含有注射或通过其它方式导入身体以产生主动免疫的抗原(例如,灭活的传染源,或传染源的某些部分,肿瘤抗原,等等)。构成疫苗的抗原或抗原部分可以是活的或杀死的微生物,或从微生物或其它细胞纯化的天然产物,包括但不限于肿瘤细胞、合成的产物、基因工程的蛋白质,肽,多糖或类似产物或过敏原。抗原或抗原部分也可以是蛋白质、肽、多糖或者类似产物的亚基。

[0237] 范围:贯穿本公开内容,本发明的各个方面可以以范围形式呈现。但是应当理解的是,范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁,不应该被解释为对本发明范围的硬性限制。因此,范围的描述应当被认为具体公开了该范围内的所有可能的子范围以及单独的数值。例如,范围的描述,如从1到6应被认为具体公开了如从1到3,从1到4,从1到5,从2到4,从2到6,从3到6等的子范围,以及具体公开了该范围内的单独的数值,例如,1,2,2.7,3,4,5,5.3和6。作为另一示例,范围,如95-99%的同一性,包括具有95%,96%,97%,98%或99%同一性的一些,并且包括,如96-99%,96-98%,96-97%,97-99%,97-98%和98-99%同一性的子范围。不管范围的大小,其均适用。

[0238] 术语“T细胞制剂”,是指包含至少一种T细胞的制剂。在一个实施方案中,其与外周

血相比富含T细胞。

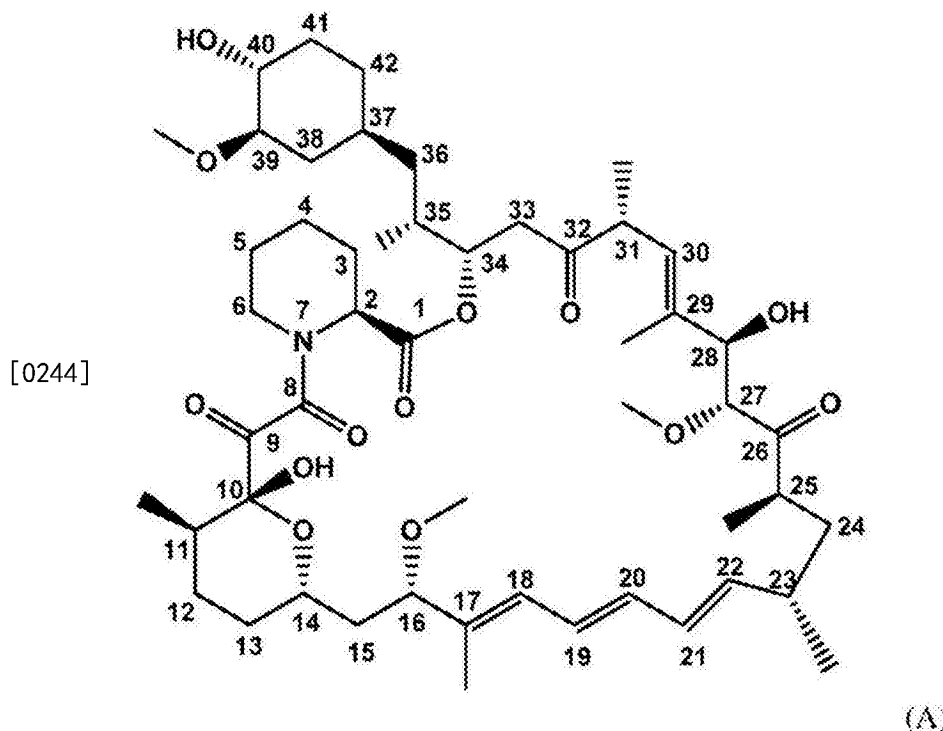
[0239] 术语“基本上纯化的”细胞是指基本上不含其它细胞类型的细胞。基本上纯化的细胞还指已经从在其天然存在的状态中通常相关联的其它细胞类型中分离的细胞。在一些情况下,基本上纯化的细胞群是指细胞的同源性群体。在其它情况下,该术语简单地指已经从在其天然状态下天然相关联的细胞中分离的细胞。在一些方面,所述细胞体外培养。在其它方面中,细胞不在体外培养。

[0240] mTOR抑制剂

[0241] 如本文所用的术语“mTOR抑制剂”指的是抑制细胞中mTOR激酶的化合物或配体,或其药学上可接受的盐。在一个实施方案中,mTOR抑制剂是变构抑制剂。在一个实施方案中,mTOR抑制剂是催化抑制剂。

[0242] 变构mTOR抑制剂包括中性三环化合物雷帕霉素(西罗莫司)、雷帕霉素相关的化合物,也就是与雷帕霉素具有结构和功能相似性的化合物,包括,例如,雷帕霉素衍生物、雷帕霉素类似物(也称为rapalogs)和其它抑制mTOR活性的大环内酯化合物。

[0243] 雷帕霉素是由吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)产生的已知的大环内酯抗生素,其具有在式A所示的结构



[0245] 参见,例如,McAlpine,J.B.等人.,*J.Antibiotics*(1991)44:688;Schreiber,S.L.等人.,*J.Am.Chem.Soc.*(1991)113:7433;U.S.Patent No.3,929,992。针对雷帕霉素提出了各种编号方案。为了避免混淆,当在本文中命名特定的雷帕霉素类似物时,给出参照式A的编号方案的雷帕霉素的名称。

[0246] 用于本发明中的雷帕霉素类似物,例如,0-取代类似物,其中雷帕霉素的环己基环上的羟基被OR₁取代,其中R₁为羟基烷基、羟基烷氧基烷基、酰氨基烷基或氨基烷基;例如RAD001,也称为依维莫司,如US 5,665,772和W094/09010中描述的,其内容通过引用并入本文。其它合适的雷帕霉素类似物包括在26-或28位上取代的那些。雷帕霉素类似物可以是上

面提到的类似物的差向异构体,特别是在40,28或26位上取代的类似物的差向异构体,任选地可进一步氢化,例如,如US 6,015,815,W095/14023和W099/15530中所描述的,其内容通过引用并入文中,例如ABT578也称为唑他莫司或雷帕霉素类似物,在US7,091,213,W098/02441和W001/14387中描述,其内容通过引用并入,例如AP23573也称为地磷莫司。

[0247] 来自US5,665,772的适合用于本发明的雷帕霉素类似物的实例包括,但不限于,40-0-苄基-雷帕霉素,40-0-(4'-羟甲基)苄基-雷帕霉素,40-0-[4'-(1,2-二羟乙基)]苄基-雷帕霉素,40-0-烯丙基-雷帕霉素,40-0-[3'-(2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4(S)基)-丙-2'-烯-1'-基]-雷帕霉素,(2'E,4'S)-40-0-(4',5'-二羟基戊-2'-烯-1'-基)-雷帕霉素,40-0-(2-羟基)乙氧基羰基甲基-雷帕霉素,40-0-(2-羟基)乙基-雷帕霉素,40-0-(3-羟基)丙基-雷帕霉素,40-0-(6-羟基)己基-雷帕霉素,40-0-[2-(2-羟基)乙氧基]乙基-雷帕霉素,40-0-[(3S)-2,2-二甲基二氧戊烷-3-基]甲基-雷帕霉素,40-0-[(2S)-2,3-二羟丙基-1-基]-雷帕霉素,40-0-(2-乙酰氧基)乙基-雷帕霉素,40-0-(2-烟酰氧基)乙基-雷帕霉素,40-0-[2-(N-吗啉代)乙酰氧基]乙基-雷帕霉素,40-0-(2-N-咪唑基乙酰氧基)乙基-雷帕霉素,40-0-[2-(N-甲基-N'-哌嗪基)乙酰氧基]乙基-雷帕霉素,39-0-去甲基-39,40-0,0-亚乙基-雷帕霉素,(26R)-26-二氢-40-0-(2-羟基)乙基-雷帕霉素,40-0-(2-氨基乙基)-雷帕霉素,40-0-(2-乙酰氨基乙基)-雷帕霉素,40-0-(2-尼古丁酰氨基乙基)-雷帕霉素,40-0-(2-(N-甲基-咪唑-2'-基carbethoxamido)乙基)-雷帕霉素,40-0-(2-乙氧羰基氨基乙基)-雷帕霉素,40-0-(2-甲苯磺酰氨基乙基)-雷帕霉素和40-0-[2-(4',5'-二乙氧羰基-1',2',3'-三唑-1'-基)-乙基]-雷帕霉素。

[0248] 本发明中有用的其它雷帕霉素类似物是以下类似物,其中雷帕霉素环己基环上的羟基和/或在28位的羟基被羟基酯基取代,这些类似物是公知的,例如,在US RE44,768中发现的雷帕霉素类似物,例如:替西罗莫司。

[0249] 在本发明中有用的其它雷帕霉素类似物包括以下那些类似物,其中在16位的甲氧基被其它取代基(优选(任选羟基取代)炔氧基,苄基,邻甲氧苄基或氯苄基)取代,和/或其中39位的甲氧基与39碳一起缺失,由此雷帕霉素的环己基环变成缺乏39位甲氧基的环戊环;例如如W095/16691和W096/41807中描述,其内容通过引用并入本文。可进一步修饰类似物,使得雷帕霉素40位的羟基被烷基化和/或32-羰基被还原。

[0250] 来自W095/16691的雷帕霉素类似物包括,但不限于,16-脱甲氧基-16-(戊-2-炔基)氧-雷帕霉素,16-脱甲氧基-16-(丁-2-炔基)氧-雷帕霉素,16-脱甲氧基-16-(炔丙基)氧-雷帕霉素,16-脱甲氧基-16-(4-羟基-丁-2-炔基)氧-雷帕霉素,16-脱甲氧基-16-苄氧基-40-0-(2-羟乙基)-雷帕霉素,16-脱甲氧基-16-苄氧基-雷帕霉素,16-脱甲氧基-16-邻甲氧基苄基-雷帕霉素,16-脱甲氧基-40-0-(2-甲氧基乙基)-16-戊-2-炔基)氧-雷帕霉素,39-脱甲氧基-40-脱氧-39-甲酰基-42-去甲-雷帕霉素,39-脱甲氧基-40-脱氧-39-羟甲基-42-去甲-雷帕霉素,39-脱甲氧基-40-脱氧-39-羧基-42-去甲-雷帕霉素,39-脱甲氧基-40-脱氧-39-(4-甲基-哌嗪-1-基)羰基-42-去甲-雷帕霉素,39-脱甲氧基-40-脱氧-39-(吗啉-4-基)羰基-42-去甲-雷帕霉素,39-脱甲氧基-40-脱氧-39-[N-甲基,N-(2-吡啶-2-基-乙基)]氨基甲酰基-42-去甲-雷帕霉素和39-脱甲氧基-40-脱氧-39-(对-甲苯磺酰肼基甲基)-42-去甲-雷帕霉素。

[0251] 来自W096/41807的雷帕霉素类似物包括但不限于,32-脱氧-雷帕霉素,16-0-戊-

2-炔基-32-脱氧-雷帕霉素,16-O-戊-2-炔基-32-脱氧-40-O-(2-羟基-乙基)-雷帕霉素,16-O-戊-2-炔基-32-(S)-二氢-40-O-(2-羟基乙基)-雷帕霉素,32(S)-二氢-40-O-(2-甲氧基)乙基-雷帕霉素和32(S)-二氢-40-O-(2-羟基乙基)-雷帕霉素。

[0252] 其它合适的雷帕霉素类似物是佐他莫司,如在US2005/0101624中描述的,其内容通过引用并入。

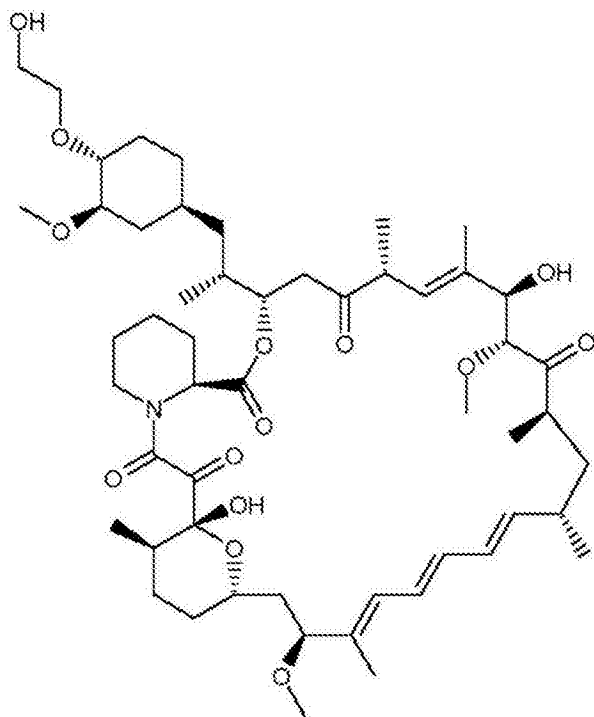
[0253] 在哺乳动物细胞中,雷帕霉素(mTOR)激酶的靶标作为多蛋白复合体存在,描述为mTORC1复合体或mTORC2复合体,其感测营养和能量的可用性并整合来自生长因子和应激信号的输入。mTORC1复合体对变构mTOR抑制剂(如雷帕霉素)是敏感的,该mTORC1复合体由mTOR、GβL和mTOR调节相关蛋白(raptor)组成,结合肽基-脯氨酰异构酶FKBP12蛋白(FK506结合蛋白1A,12kDa)。与此相反,mTORC2复合体由mTOR、GβL和mTOR的雷帕霉素不敏感伴侣蛋白(rictor)组成,其在体外不结合FKBP12蛋白。

[0254] 已经表明mTORC1复合体参与蛋白质翻译控制,作为生长因子和营养物敏感装置运行用于生长和增殖调控。mTORC1通过两个关键的下流底物调节蛋白质的翻译:P70S6激酶和真核翻译起始因子4E结合蛋白1(4EBP1),所述P70S6激酶反过来磷酸化核糖体蛋白P70S6,所述真核翻译起始因子4E结合蛋白1(4EBP1)在调节eIF4E调控的帽依赖性翻译中起关键作用。所述mTORC1复合体响应细胞的能量和营养稳态调节细胞生长,mTORC1的失调常见于多种人类癌症。mTORC2的功能涉及通过Akt磷酸化来调节细胞存活和肌动蛋白细胞骨架动力学的调节。

[0255] mTORC1复合体对变构mTOR抑制剂(如雷帕霉素和衍生物)是敏感的,这在很大程度上是由于雷帕霉素的作用模式,其中涉及与FKBP12形成细胞内复合体,以及结合到mTOR的FKBP12-雷帕霉素结合(FRB)结构域。这导致mTORC1的构象变化,其被认为改变和削弱了其支架蛋白raptor的相互作用,反过来阻碍了底物如P70 S6K1接近mTOR和被磷酸化。通过抑制与良性和恶性增殖性疾病相关的mTOR过度活化,雷帕霉素和雷帕霉素类似物(rapalogues)如RAD001已获得临床相关性。

[0256] RAD001,也称为依维莫司(**Afinitor®**),具有化学名称(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28E,30S,32S,35R)-1,18-二羟-12-[(1R)-2-[(1S,3R,4R)-4-(2-羟乙氧基)-3-甲氧基环己基]-1-甲基乙基]-19,30-二甲氧基-15,17,21,23,29,35-六甲基-11,36-二氧杂-4-氮杂-三环[30.3.1.0^{4,9}]三十六-16,24,26,28-四烯-2,3,10,14,20-戊烷(pentaone),化学结构如下

[0257]

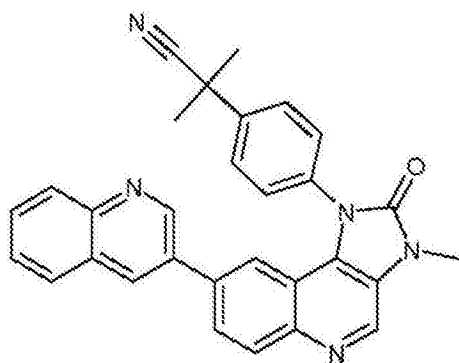


[0258] 依维莫司是FDA批准的用于晚期肾癌治疗的药物,正在研究其在肿瘤学中的几个其它III期临床试验。临床前研究表明,依维莫司是能够抑制多种肿瘤细胞系在体外和体内的增殖,大概是通过抑制雷帕霉素敏感的mTORC1功能。作为雷帕霉素的衍生物,依维莫司是变构mTOR抑制剂,其高度有效地抑制mTORC1功能的部分,即P70S6激酶(P70 S6K)和下游P70S6K底物P70S6。变构mTOR抑制剂,如依维莫司(和其它雷帕霉素类似物)对mTORC2通路或者其导致的Akt信号传导的激活,具有很少或没有抑制作用。变构mTOR抑制剂的进一步的实例包括西罗莫司(雷帕霉素,AY-22989),40-[3-羟基-2-(羟甲基)-2-甲基-丙酸]-雷帕霉素(也称为替西罗莫司或CCI-779)和地磷莫司(AP-23573/MK-8669)。变构mTOR抑制剂的其它实例包括唑他莫司(zotarolimus)(ABT578)和佐他莫司(umirilimus)。

[0259] 或者或另外,已发现催化的、ATP竞争的mTOR抑制剂直接靶向mTOR激酶结构域且靶向mTORC1和mTORC2两者。其也是比这种变构mTOR抑制剂,如雷帕霉素更完全的mTORC1抑制剂,因为其调节雷帕霉素抗性mTORC1输出,如4EBP1-T37/46磷酸化和帽依赖性翻译。

[0260] BEZ235是催化的mTOR抑制剂,具有化学名称2-甲基-2-[4-(3-甲基-2-氧代-8-喹啉-3-基-2,3-二氢-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)-苯基]-丙腈,化学结构如下

[0261]



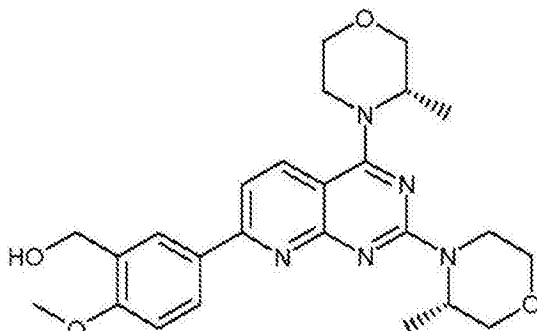
[0262] BEZ235也可以其单甲苯磺酸酯盐形式使用。BEZ235的合成在W02006/122806中描

述。

[0263] 作为催化的mTOR抑制剂,BEZ235能够停止mTORC1复合体的全部功能,既包括雷帕霉素敏感功能(P70S6K的磷酸化,和随后的P70S6磷酸化)和也包括雷帕霉素不敏感功能(4EBP1的磷酸化)。根据所使用的药物浓度,BEZ235具有不同的作用,其中在低浓度(小于100nmol/L)mTOR抑制占优势,但在相对较高的浓度(约500nmol/L)双PI3K/mTOR抑制,Serra等人,2008。

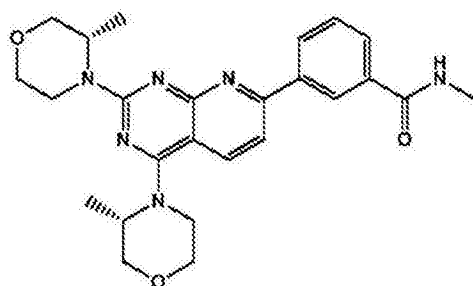
[0264] 在文献中描述的另一催化的mTOR抑制剂是CCG168(或称为AZD-8055,Chresta,C.M.等人,Cancer Res,2010,70(1),288-298),其具有化学名称{5-[2,4-双-((S)-3-甲基吗啉-4-基)-吡啶并[2,3d]嘧啶-7-基]-2-甲氧基-苯基}-甲醇,化学结构如下

[0265]



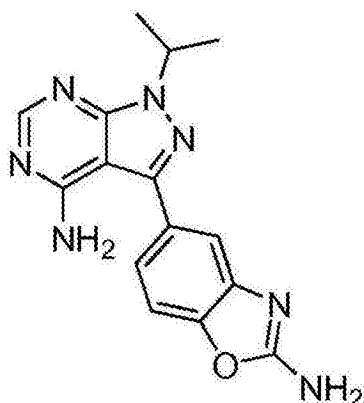
[0266] 在文献中描述的另一催化的mTOR抑制剂是3-[2,4-双[(3S)-3-甲基吗啉-4-基]吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-基]-N-甲基苯甲酰胺(W009104019),其具有下列化学结构:

[0267]



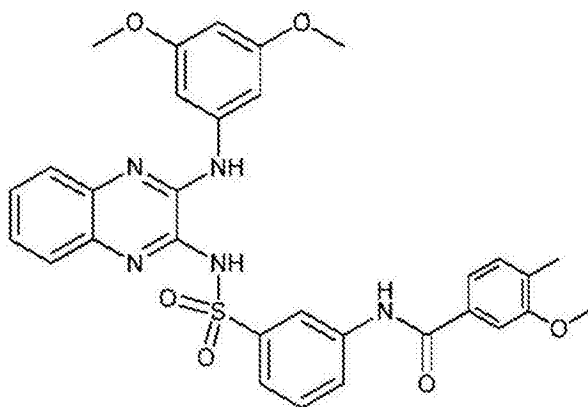
[0268] 在文献中描述的另一催化的mTOR抑制剂是3-(2-氨基苯并[d]恶唑-5-基)-1-异丙基-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺(W010051043和W02013023184),具有以下化学结构:

[0269]



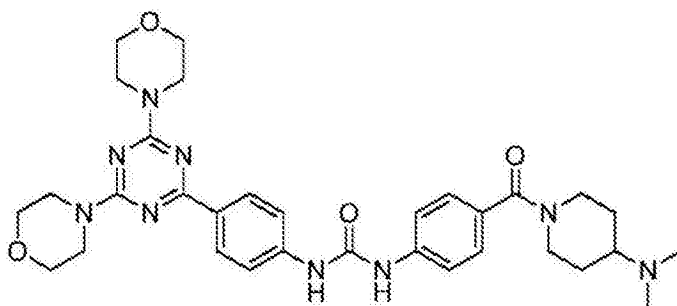
[0270] 在文献中描述的另一催化的mTOR抑制剂是N-(3-(N-(3-((3,5-二甲氧基苯基)氨基)喹啉-2-基)氨磺酰)苯基)-3-甲氧基-4-甲基苯甲酰胺(W007044729和W012006552),具有以下化学结构:

[0271]



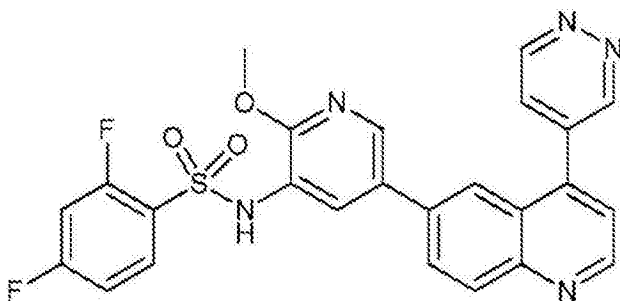
[0272] 在文献中描述的另一催化的mTOR抑制剂是PKI-587(Venkatesan, A.M., J. Med. Chem., 2010, 53, 2636-2645), 具有化学名称1-[4-[4-(二甲基氨基)哌啶-1-羰基]苯基]-3-[4-(4,6-二吗啉代-1,3,5-三嗪-2-基)苯基]脲, 具有以下化学结构:

[0273]



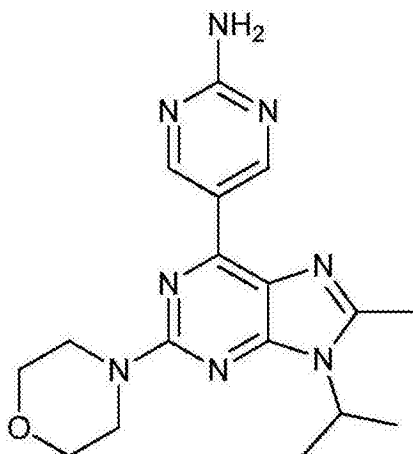
[0274] 在文献中描述的另一催化的mTOR抑制剂是GSK-2126458(ACS Med. Chem. Lett., 2010, 1, 39-43), 其具有化学名称2,4-二氟-N-[2-甲氧基-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基]苯磺酰胺, 并具有下列化学结构:

[0275]



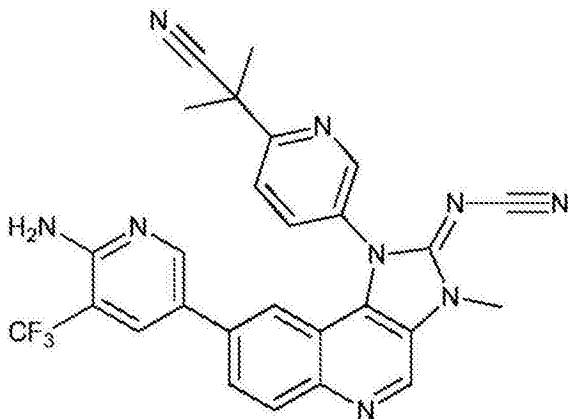
[0276] 在文献中描述的另一催化的mTOR抑制剂为5-(9-异丙基-8-甲基-2-吗啉代-9H-嘌呤-6-基)嘧啶-2-胺(W010114484), 具有以下化学结构:

[0277]



[0278] 在文献中描述的另一催化的mTOR抑制剂是(E)-N-(8-(6-氨基-5-(三氟甲基)吡啶-3-基)-1-(6-(2-氰丙-2-基)吡啶-3-基)-3-甲基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-2(3H)-亚基)脒(WO12007926),具有以下化学结构

[0279]



[0280] 催化的mTOR抑制剂的其它实例包括8-(6-甲氧基-吡啶-3-基)-3-甲基-1-(4-哌嗪-1-基-3-三氟甲基-苯基)-1,3-二氢-咪唑并[4,5-c]喹啉-2-酮(WO2006/122806)和Ku-0063794(Garcia-Martinez JM,等人,Biochem J.,2009,421(1),29-42。Ku-0063794是雷帕霉素(mTOR)的哺乳动物靶标的特异性抑制剂)。WYE-354是催化的mTOR抑制剂的另一个例子(Yu K,等人.(2009).Biochemical,Cellular,and In vivo Activity of Novel ATP-Competitive and Selective Inhibitors of the Mammalian Target of Rapamycin.Cancer Res.69(15):6232-6240)。

[0281] 根据本发明有用的mTOR抑制剂还包括前体药物、衍生物、药学上可接受的盐、或前述任何物质的其类似物。

[0282] mTOR抑制剂,如RAD001,可以基于本领域中成熟的方法、基于本文所描述的特定剂量、配制用于递送。特别是,美国专利6,004,973(通过引用并入本文)提供了可用于本文所述的mTOR抑制剂使用的制剂实例。

[0283] 下游抑制剂

[0284] 本文所述的许多方法依赖于使用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂,例如,以增加PD1阴性免疫效应细胞(如T细胞)的水平,降低PD1阳性免疫效应细胞(如T细胞)的水平,增加PD1阴性免疫效应细胞(如T细胞)/PD1阳性免疫效应细胞(如T细胞)的比率,增加初始T细胞的水平,或增加记忆T细胞前体的数目或增加记忆T细胞前体标记物的表达水平。这些方

法中的任何也可以如下实施,即通过施用通路中下游要素(例如,P70S6K或mTORC1)的抑制剂,代替低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂。P70S6K抑制剂的例子包括PF-4708671(Pfizer)或LY2584702甲苯磺酸酯(Eli Lilly)。mTORC1抑制剂的实例包括变构mTOR抑制剂,其特异性抑制mTORC1,但不抑制mTORC2。在一个实施方案中,下游抑制剂以有效剂量施用,所述有效剂量增加PD1阴性免疫效应细胞(如T细胞)的水平,降低PD1阳性免疫效应细胞(如T细胞)的水平,增加PD1阴性免疫效应细胞(如T细胞)/PD1阳性免疫效应细胞(如T细胞)的比率,增加初始T细胞的水平,或增加记忆T细胞前体的数目或增加记忆T细胞前体标记物的表达水平。

[0285] mTOR抑制剂的评估

[0286] mTOR磷酸化激酶P70S6,从而激活P70S6K并允许其磷酸化其底物。mTOR抑制的程度可以表示为P70S6K抑制的程度,例如,mTOR抑制的程度可以通过P70S6K活性降低的水平来测定,例如,通过P70S6K底物磷酸化的降低来测定。可以通过测量不存在抑制剂(例如,在抑制剂施用前)和存在抑制剂时或抑制剂施用之后,P70S6K活性(P70S6K磷酸化底物的能力),来测定mTOR抑制的水平。抑制P70S6K的水平给出mTOR抑制的水平。因此,如果P70S6K抑制40%,则如通过P70S6K活性测定的,mTOR活性抑制40%。文中所指的抑制的程度或水平是在剂量间隔的平均抑制水平。以举例的方式,如果该抑制剂每周一次给予,则抑制水平是通过该间隔(即一个星期)的平均抑制水平给出。

[0287] Boulay等人,Cancer Res,2004,64:252-61(其通过引用并入本文)教导了可用于评估mTOR抑制水平的测定法(本文中称为布雷测定法)。在一个实施方案中,该测定法依赖于mTOR抑制剂,例如,RAD001施用前或之后,从生物样品测量P70S6激酶活性。样品可在用mTOR抑制剂治疗后的预选时间上采取,例如,在治疗后24小时,48小时和72小时采取样品。可以使用,例如,来自皮肤或外周血单核细胞(PBMCs)的生物样品。从样品中制备总蛋白质提取物。使用特异性识别P70S6激酶的抗体、通过免疫沉淀从蛋白质提取物分离P70S6激酶。可在体外激酶测定法中测量分离的P70S6激酶活性。分离的激酶可与40S核糖体亚基底物(即P70S6K的内源底物)和 γ - ^{32}P 在允许底物磷酸化的条件下孵育。然后将反应混合物在SDS-PAGE凝胶上分离,并用磷相仪分析 ^{32}P 信号。对应于40S核糖体亚基的大小的 ^{32}P 信号指示磷酸化的底物和P70S6K活性。激酶活性的增加和减少可以通过以下计算:定量磷酸化底物的 ^{32}P 信号的面积和强度(例如,使用ImageQuant,分子动力学)、给量化信号分配任意单位值、以及将施用后的值与施用前的值或参考值比较。例如,可以用下面的公式计算激酶活性的抑制百分比: $1 - (\text{施用后获得的值} / \text{施用前获得的值}) \times 100$ 。如上所述,本文涉及的抑制程度或水平是在剂量间隔的平均抑制水平。

[0288] 评估激酶活性(例如P70S6激酶活性)的方法,在US7,727,950中提供,其通过引用并入本文。

[0289] 也可以通过PD1阴性比PD1阳性T细胞比率的变化评估mTOR抑制水平。可以通过本领域已知的方法鉴定来自外周血的T细胞为PD1阴性或阳性。

[0290] 低剂量mTOR抑制剂

[0291] 本文描述的方法使用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂,免疫增强剂量的mTOR抑制剂,例如变构的mTOR抑制剂,包括雷帕霉素类似物如RAD001。与此相反,完全或几乎完全抑制mTOR通路的抑制剂水平是免疫抑制的,被用于,例如,以防止器官移植排斥。此外,完全抑制mTOR的高剂量雷帕霉素类似物,也抑制肿瘤细胞的生长和用于治疗多种癌症(例如,见

Antineoplastic effects of mammalian target of rapamycin inhibitors.Salvadori M.World J Transplant.2012 Oct 24;2(5):74-83;Current and Future Treatment Strategies for Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma:Role of mTOR Inhibition.Finn RS.Liver Cancer.2012 Nov;1(3-4):247-256;Emerging Signaling Pathways in Hepatocellular Carcinoma.Moeini A,CornellàH,Villanueva A.Liver Cancer.2012Sep;1(2):83-93;Targeted cancer therapy-Are the days of systemic chemotherapy numbered?Joo WD,Visintin I,Mor G.Maturitas.2013Sep 20.;Role of natural and adaptive immunity in renal cell carcinoma response to VEGFR-TKIs and mTOR inhibitor.Santoni M,Berardi R,Amantini C,Burattini L,Santini D,Santoni G,Cascinu S.Int J Cancer.2013 Oct 2)。

[0292] 本发明至少部分基于令人惊讶的发现,即远低于在目前临床设置中使用的那些剂量的mTOR抑制剂的剂量在受试者中具有增加免疫应答和增加PD-1阴性T细胞/PD-1阳性T细胞比率的优异效果。令人惊奇的是,仅产生mTOR活性部分抑制的低剂量mTOR抑制剂,能够有效地提高人类受试者的免疫应答,并提高PD-1阴性T细胞/PD-1阳性T细胞的比率。

[0293] 可替代地,或另外,不希望受到任何理论的束缚,相信低、低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂可以增加初始T细胞(naive T cell)的数目,例如,至少瞬时地,例如与未治疗的受试者相比。或者或另外地,再次不希望受理论的束缚,相信用mTOR抑制剂治疗足够的时间后或足够的剂量后,导致以下一个或多个:

[0294] 下列标志物中一个或多个的表达的增加:CD62L^{high},CD127^{high},CD27⁺和BCL2,例如,在记忆T细胞上,例如,记忆T细胞前体上;

[0295] KLRG1表达的减少,例如在记忆T细胞上,例如,记忆T细胞前体上;或者

[0296] 记忆T细胞前体数目的增加,例如,具有以下特征中的任何一个或组合的细胞:增加的CD62L^{high},增加的CD127^{high},增加的CD27⁺,降低的KLRG1,和增加的BCL2;

[0297] 并且其中例如与未治疗的受试者相比发生上述任何变化,如,至少瞬时地发生(Araki,K等人(2009)Nature 460:108-112)。记忆T细胞前体是在分化程序早期的记忆T细胞。例如,记忆性T细胞具有以下特征中的一种或多种:增加的CD62L^{high},增加的CD127^{high},增加的CD27⁺,降低的KLRG1,和/或增加的BCL2。

[0298] 因此,在一个方面,本发明提供了组合物,例如,本发明提供了作为单位剂型包含mTOR抑制剂,例如,变构的mTOR抑制剂,例如,RAD001的组合物,其中所述mTOR抑制剂,例如,变构的mTOR抑制剂,例如,RAD001的浓度为约0.005-1.5mg,约0.005-1.5mg,约0.01-1mg,约0.01-0.7mg,约0.01-0.5mg,或约0.1-0.5mg。在进一步的方面,本发明提供了包含mTOR抑制剂(例如,RAD001)的组合物,其中所述mTOR抑制剂(例如,RAD001)的浓度为0.005-1.5mg,0.005-1.5mg,0.01-1mg,0.01-0.7mg,0.01-0.5mg,或0.1-0.5mg。更具体地,在一个方面,本发明提供了包含mTOR抑制剂,例如,RAD001的组合物,所述mTOR抑制剂,例如,RAD001的剂量为约0.005mg,0.006mg,0.007mg,0.008mg,0.009mg,0.01mg,0.02mg,0.03mg,0.04mg,0.05mg,0.06mg,0.07mg,0.08mg,0.09mg,0.1mg,0.2mg,0.3mg,0.4mg,0.5mg,0.6mg,0.7mg,0.8mg,0.9mg,或1.0mg。在一个方面中,mTOR抑制剂,例如RAD001的剂量为0.5mg或更少。在仍然进一步的方面中,mTOR抑制剂,例如,RAD001的剂量为约0.5mg。在进一步的方面,本发明提供包含mTOR抑制剂,例如,RAD001的组合物,所述mTOR抑制剂,例如,RAD001的剂量为

0.005mg, 0.006mg, 0.007mg, 0.008mg, 0.009mg, 0.01mg, 0.02mg, 0.03mg, 0.04mg, 0.05mg, 0.06mg, 0.07mg, 0.08mg, 0.09mg, 0.1mg, 0.2mg, 0.3mg, 0.4mg, 0.5mg, 0.6mg, 0.7mg, 0.8mg, 0.9mg, 或1.0mg。在一个方面中, mTOR抑制剂, 例如, RAD001的剂量为0.5mg或更少。在仍然进一步的方面中, mTOR抑制剂, 例如, RAD001的剂量为0.5mg。

[0299] 在进一步的方面, 本发明涉及包含非RAD001的mTOR抑制剂的组合物, 所述非RAD001的mTOR抑制剂的量生物等效于特定量的RAD001或RAD001的指定剂量。

[0300] 在进一步的方面, 本发明涉及包含mTOR抑制剂的组合物, 所述mTOR抑制剂的量足以抑制P70S6激酶不超过80%。在进一步的方面, 文中所述的组合物包含足以抑制P70S6激酶不超过38%的量的mTOR抑制剂。

[0301] 在一个实施方案中, 本发明涉及mTOR抑制剂(例如, 变构mTOR抑制剂, 例如, 雷帕霉素类似物、雷帕霉素、或RAD001或催化的mTOR抑制剂)的组合物或剂型, 当所述mTOR抑制剂的组合物或剂型以所选择的给药方案施用, 例如, 每天一次或每周一次, 其与mTOR的抑制水平相关: 所述mTOR的抑制水平与完全的, 或显著的免疫抑制不相关, 但与免疫应答的增强相关。

[0302] 在进一步的方面, 本发明提供了用于增强免疫应答的方法, 例如, 用于治疗免疫功能衰老的方法, 所述方法包括向受试者施用mTOR抑制剂的步骤。在一些实施方案中, mTOR抑制剂, 例如, 变构mTOR抑制剂, 例如, RAD001, 可以以约0.005-1.5mg每天、约0.01-1mg每天、约0.01-0.7mg每天、约0.01-0.5mg每天、或约0.1-0.5mg每天的剂量施用。在进一步的方面, mTOR抑制剂, 例如, RAD001, 可以以约0.1-20mg每周、约0.5-15mg每周、约1-10mg每周、或约3-7mg每周的剂量施用。在一些实施方案中, mTOR抑制剂, 例如, RAD001, 可以以0.005-1.5mg每天、0.01-1mg每天、0.01-0.7mg每天、0.01-0.5mg每天、或0.1-0.5mg每天的剂量施用。在一些实施方案中, mTOR抑制剂, 例如, RAD001, 可以以约0.1-20mg每周、0.5-15mg每周、1-10mg每周、3-7mg每周、或5mg每周的剂量施用。

[0303] 在进一步的方面, 本发明涉及用于增强免疫应答的方法, 例如, 治疗免疫功能衰老的方法, 所述方法包括施用非RAD001的mTOR抑制剂的步骤, 所述非RAD001的mTOR抑制剂以生物等效于本文描述的特定量或剂量的RAD001的量施用。

[0304] 在一些实施方案中, mTOR抑制剂, 例如, 变构mTOR抑制剂, 例如, 如, RAD001, 可以以约0.005mg每天、0.006mg每天、0.007mg每天、0.008mg每天、0.009mg每天、0.01mg每天、0.02mg每天、0.03mg每天、0.04mg每天、0.05mg每天、0.06mg每天、0.07mg每天、0.08mg每天、0.09mg每天、0.1mg每天、0.2mg每天、0.3mg每天、0.4mg每天、0.5mg每天、0.6mg每天、0.7mg每天、0.8mg每天、0.9mg每天、或1.0mg每天的剂量施用。在一些实施方案中, RAD001可以在24小时的期间不超过约0.7mg的剂量施用。在一些实施方案中, mTOR抑制剂, 例如, 变构mTOR抑制剂, 例如, RAD001, 可以以在24小时的期间不超过约0.5mg的剂量施用。在一些实施方案中, RAD001可以以每天0.5mg或更少的剂量施用。在一些实施方案中, RAD001可以以每天0.5mg的剂量施用。

[0305] 在进一步的方面, 本发明可以使用生物等效于特定量或剂量的RAD001的量的非RAD001的mTOR抑制剂。

[0306] 在一些实施方案中, mTOR抑制剂, 例如, 变构mTOR抑制剂, 例如, RAD001, 可以以0.1mg每周、0.2mg每周、0.3mg每周、0.4mg每周、0.5mg每周、0.6mg每周、0.7mg每周、0.8mg每

周、0.9mg每周、1mg每周、2mg每周、3mg每周、4mg每周、5mg每周、6mg每周、7mg每周、8mg每周、9mg每周、10mg每周、11mg每周、12mg每周、13mg每周、14mg每周、15mg每周、16mg每周、17mg每周、18mg每周、19mg每周、或20mg每周的剂量施用。在一些实施方案中，mTOR抑制剂，例如，变构mTOR抑制剂，例如，RAD001，以每周5mg或更少的剂量施用。在一些实施方案中，mTOR抑制剂，例如，变构mTOR抑制剂，例如，RAD001，以每周5mg的剂量施用。

[0307] 在一些实施方案中，本发明可以使用生物等效于特定量或剂量的RAD001的量的非RAD001的mTOR抑制剂。

[0308] 一种mTOR抑制剂，例如，变构mTOR抑制剂，例如雷帕霉素类似物、雷帕霉素、或RAD001或催化的mTOR抑制剂，可以以缓释制剂提供。本文中所描述的组合物或单位剂型中的任意可以缓释制剂提供。在一些实施方案中，缓释制剂比立即释放制剂具有较低的生物利用度。例如，在实施方案中，为达到立即释放制剂相似的治疗效果，缓释制剂将具有立即释放制剂中提供的抑制剂的量约2至约5，约2.5至约3.5，或约3倍的量。

[0309] 在一个实施方案中，提供了通常用于每周给药一次的，例如RAD001的立即释放形式，其具有0.1至20，0.5至10，2.5至7.5，3至6，或约5mg每单位剂型。对于每周施用一次，这些立即释放制剂对应于分别具有0.3至60，1.5至30，7.5至22.5，9至18，或约15mg的mTOR抑制剂，例如，变构mTOR抑制剂，如雷帕霉素或RAD001的缓释形式。在实施方案中，这两种形式都是在一次/周的基础上施用的。

[0310] 在一个实施方案中，提供了通常用于每天一次施用的，例如RAD001的立即释放形式，其具有0.005至1.5，0.01至1.5，0.1至1.5，0.2至1.5，0.3至1.5，0.4至1.5，0.5至1.5，0.6至1.5，0.7至1.5，0.8至1.5，1.0至1.5，0.3至0.6，或约0.5mg每单位剂型。对于每天施用一次，这些立即释放形式分别对应于具有0.015至4.5，0.03至4.5，0.3至4.5，0.6至4.5，0.9至4.5，1.2至4.5，1.5至4.5，1.8至4.5，2.1至4.5，2.4至4.5，3.0至4.5，0.9至1.8，或约1.5mg的mTOR抑制剂，例如，变构mTOR抑制剂，例如雷帕霉素或RAD001的缓释形式。对于每周施用一次，这些立即释放形式对应于分别具有0.1至30，0.2至30，2至30，4至30，6至30，8至30，10至30，1.2至30，14至30，16至30，20至30，6至12，或约10mg的mTOR抑制剂，例如，变构mTOR抑制剂，例如雷帕霉素或RAD001的缓释形式。

[0311] 在一个实施方案中，提供了通常用于每天施用一次的，例如RAD001的立即释放形式，其具有0.01至1.0mg每单位剂型。对于每天施用一次，这些立即释放形式对应于分别具有0.03至3mg的mTOR抑制剂，例如，变构mTOR抑制剂，例如雷帕霉素或RAD001的缓释形式。对于每周施用一次，这些立即释放形式对应于分别具有0.2至20mg的mTOR抑制剂，例如，变构mTOR抑制剂，例如雷帕霉素或RAD001的缓释形式。

[0312] 在一个实施方案中，提供了通常用于每周施用一次的，例如RAD001的立即释放形式，其具有**0.5~5.0mg**每单位剂型。对于每周施用一次，这些立即释放形式对应于分别具有1.5至15mg的mTOR抑制剂，例如，变构mTOR抑制剂，例如雷帕霉素或RAD001的缓释形式。

[0313] 如上所述，mTOR通路中的一个靶标是P70S6激酶。因此，用于本文描述的方法和组合物中的mTOR抑制剂的剂量是，相对于不存在mTOR抑制剂时P70S6激酶的活性，足以达到对P70S6激酶活性的抑制不超过80%的那些剂量，例如，如通过本文所述的测定法，例如，布雷测定法所测量的。在进一步的方面，本发明提供mTOR抑制剂的剂量足以达到相对于不存在mTOR抑制剂时P70S6激酶的活性，对P70S6激酶活性的抑制不超过38%，例如，如通过本文所

述的测定法,例如,布雷测定法所测量的。在一个方面中,用于本发明的方法和组合物中的mTOR抑制剂的剂量,例如,当施用于人类受试者时,足以实现90%,89%,88%,87%,86%,85%,84%,83%,82%,81%,80%,79%,78%,77%,76%,75%,74%,73%,72%,71%,70%,69%,68%,67%,66%,65%,64%,63%,62%,61%,60%,59%,58%,57%,56%,55%,54%,53%,52%,51%,50%,49%,48%,47%,46%,45%,44%,43%,42%,41%,40%,39%,38%,37%,36%,35%,34%,33%,32%,31%,30%,29%,28%,27%,26%,25%,24%,23%,22%,21%,20%,19%,18%,17%,16%,15%,14%,13%,12%,11%,或10%或更少的P70S6激酶活性的抑制,例如,如通过本文所述的测定法,例如,布雷测定法所测量的。

[0314] 在一个方面中,用于本发明的方法和组合物中的mTOR抑制剂的剂量,例如,当施用于人类受试者时,足以实现90+/-5%(即,85-95%),89+/-5%,88+/-5%,87+/-5%,86+/-5%,85+/-5%,84+/-5%,83+/-5%,82+/-5%,81+/-5%,80+/-5%,79+/-5%,78+/-5%,77+/-5%,76+/-5%,75+/-5%,74+/-5%,73+/-5%,72+/-5%,71+/-5%,70+/-5%,69+/-5%,68+/-5%,67+/-5%,66+/-5%,65+/-5%,64+/-5%,63+/-5%,62+/-5%,61+/-5%,60+/-5%,59+/-5%,58+/-5%,57+/-5%,56+/-5%,55+/-5%,54+/-5%,53+/-5%,52+/-5%,51+/-5%,50+/-5%,49+/-5%,48+/-5%,47+/-5%,46+/-5%,45+/-5%,44+/-5%,43+/-5%,42+/-5%,41+/-5%,40+/-5%,39+/-5%,38+/-5%,37+/-5%,36+/-5%,35+/-5%,34+/-5%,33+/-5%,32+/-5%,31+/-5%,30+/-5%,29+/-5%,28+/-5%,27+/-5%,26+/-5%,25+/-5%,24+/-5%,23+/-5%,22+/-5%,21+/-5%,20+/-5%,19+/-5%,18+/-5%,17+/-5%,16+/-5%,15+/-5%,14+/-5%,13+/-5%,12+/-5%,11+/-5%,或10+/-5%的P70S6激酶活性的抑制,例如,如通过本文所述的测定法,例如,布雷测定法所测量的。

[0315] 在受试者中P70S6激酶的活性可以使用本领域已知的方法来测量,如,例如根据在美国专利7,727,950中描述的方法,通过磷酸P70S6K水平和/或磷酸P70S6水平的免疫印迹分析或通过体外激酶活性测定。

[0316] 在进一步的方面,本发明涉及包含mTOR抑制剂如mTOR抑制剂,例如,变构mTOR抑制剂,例如,RAD001的组合物。在这样的组合物中,mTOR抑制剂,例如,变构mTOR抑制剂,例如,RAD001的剂量可在约30pM至4nM的范围内。在一个方面,mTOR抑制剂,例如,变构mTOR抑制剂,例如,RAD001的剂量在如下的范围:约50pM至2nM,约100pM至1.5nM,约200pM至1nM,或约300pM至500pM。在一个方面,RAD001的剂量在如下的范围:50pM至2nM,100pM至1.5nM,200pM至1nM,或300pM至500pM。在进一步的方面,RAD001的剂量为:约30pM,40pM,50pM,60pM,70pM,80pM,90pM,100pM,150pM,200pM,250pM,300pM,350pM,400pM,450pM,500pM,550pM,600pM,650pM,700pM,750pM,800pM,850pM,900pM,950pM,1nM,1.5nM,2nM,2.5nM,3nM,3.5nM或4nM。

[0317] 在进一步的方面,本发明可以利用非RAD001的其它mTOR抑制剂,其剂量生物等效于RAD001的特定量或特定剂量。

[0318] 本发明还涉及包括向受试者施用mTOR抑制剂的方法。这种方法可以使用约30pM至4nM剂量范围的mTOR抑制剂RAD001。在进一步的方面,RAD001的剂量可以在如下的范围:约50pM至2nM,约100pM至1.5nM,约200pM至1nM,或约300pM至500pM。在一个方面,RAD001的剂

量可以在如下的范围:50pM至2nM,100pM至1.5nM,200pM至1nM,或300pM至500pM。在另一个方面,RAD001的剂量为约30pM,40pM,50pM,60pM,70pM,80pM,90pM,100pM,150pM,200pM,250pM,300pM,350pM,400pM,450pM,500pM,550pM,600pM,650pM,700pM,750pM,800pM,850pM,900pM,950pM,1nM,1.5nM,2nM,2.5nM,3nM,3.5nM或4nM。

[0319] 在进一步的方面,本发明的方法可以利用非RAD001的其它mTOR抑制剂,其剂量生物等效于RAD001的特定量或特定剂量。

[0320] 如本文使用的,涉及mTOR抑制剂剂量的术语“约”是指在mTOR抑制剂的量中至多 $\pm 10\%$ 的变化,但可以包括围绕规定剂量的无变化。

[0321] 在一些实施方案中,本发明提供包括向受试者施用目标波谷水平内的剂量的mTOR抑制剂,例如,变构抑制剂,例如,RAD001的方法。在一些实施方案中,波谷水平显著低于与器官移植和癌症患者中使用的给药方案相关的波谷水平。在一个实施方案中,施用mTOR抑制剂,例如,RAD001,或雷帕霉素,导致的波谷水平低于导致免疫抑制或抗癌作用的波谷水平的 $1/2, 1/4, 1/10$,或者 $1/20$ 。在一个实施方案中,施用mTOR抑制剂,例如,RAD001,或雷帕霉素,导致的波谷水平低于FDA批准的用于免疫抑制或抗癌适应症的包装说明书中提供的波谷水平的 $1/2, 1/4, 1/10$,或 $1/20$ 。

[0322] 在一个实施方案中,本文公开的方法包括向受试者施用mTOR抑制剂,例如,变构抑制剂,例如,RAD001,所述mTOR抑制剂以提供0.1至3ng/ml,0.1至2ng/ml,或0.1至1ng/ml的目标波谷水平的剂量施用。

[0323] 在一个实施方案中,本文公开的方法包括向受试者施用mTOR抑制剂,例如,变构抑制剂,例如,RAD001,所述mTOR抑制剂以提供0.02至3ng/ml,0.2至2ng/ml,或0.2至1ng/ml的目标波谷水平的剂量施用。

[0324] 在一个实施方案中,本文公开的方法包括向受试者施用mTOR抑制剂,例如,变构抑制剂,例如,RAD001,所述mTOR抑制剂以提供0.3至3ng/ml,0.3至2ng/ml,或0.3至1ng/ml的目标波谷水平的剂量施用。

[0325] 在一个实施方案中,本文公开的方法包括向受试者施用mTOR抑制剂,例如,变构抑制剂,例如,RAD001,所述mTOR抑制剂以提供0.4至3ng/ml,0.4至2ng/ml,或0.4至1ng/ml的目标波谷水平的剂量施用。

[0326] 在一个实施方案中,本文公开的方法包括向受试者施用mTOR抑制剂,例如,变构抑制剂,例如,RAD001,所述mTOR抑制剂以提供0.5至3ng/ml,0.5至2ng/ml,或0.5至1ng/ml的目标波谷水平的剂量施用。

[0327] 在一个实施方案中,本文公开的方法包括向受试者施用mTOR抑制剂,例如,变构抑制剂,例如,RAD001,所述mTOR抑制剂以提供1至3ng/ml,或1至2ng/ml的目标波谷水平的剂量施用。

[0328] 如本文所用,术语“水平”是指刚好在下一个剂量之前的血浆中的药物浓度,或者在两个剂量之间的最小药物浓度。

[0329] 在一些实施方案中,RAD001的目标波谷水平在约0.1和3ng/ml的范围内。在一个实施方案中,目标波谷水平低于3ng/ml,例如,在0.3或更低和3ng/ml之间。在一个实施方案中,目标波谷水平低于3ng/ml,例如,在0.3或更低和1ng/ml之间。在一些实施方案中,RAD001的目标波谷水平在约2.4和3的范围内。在一些实施方案中,RAD001的目标波谷水平

在约0.1和2.4ng/ml的范围内。在一些实施方案中，RAD001的目标波谷水平在约0.1和1.5ng/ml的范围内。在一些实施方案中，RAD001的目标波谷水平在0.1和3ng/ml的范围内。在一些实施方案中，RAD001的目标波谷水平在2.4和3ng/ml的范围内。在一些实施方案中，RAD001的目标波谷水平在0.1和2.4ng/ml的范围内。在一些实施方案中，RAD001的目标波谷水平在0.1和1.5ng/ml的范围内。在一些实施方案中，RAD001的目标波谷水平为0.1ng/ml。在一些实施方案中，RAD001的目标波谷水平为0.2ng/ml。在一些实施方案中，RAD001的目标波谷水平为0.3ng/ml。在一些实施方案中，RAD001的目标波谷水平为0.4ng/ml。在一些实施方案中，RAD001的目标波谷水平为0.5ng/ml。在一些实施方案中，RAD001的目标波谷水平为0.6ng/ml。在一些实施方案中，RAD001的目标波谷水平为0.7ng/ml。在一些实施方案中，RAD001的目标波谷水平为0.8ng/ml。在一些实施方案中，RAD001的目标波谷水平为0.9ng/ml。在一些实施方案中，RAD001的目标波谷水平为1.0ng/ml。在一些实施方案中，RAD001的目标波谷水平为1.1ng/ml。在一些实施方案中，RAD001的目标波谷水平为1.2ng/ml。在一些实施方案中，RAD001的目标波谷水平为1.3ng/ml。在一些实施方案中，RAD001的目标波谷水平为1.4ng/ml。在一些实施方案中，RAD001的目标波谷水平为1.5ng/ml。在一些实施方案中，RAD001的目标波谷水平低于3ng/ml。在一些实施方案中，RAD001的目标波谷水平低于2.5ng/ml。在一些实施方案中，RAD001的目标波谷水平低于3ng/ml 2ng/ml, 1.9ng/ml, 1.8ng/ml, 1.7ng/ml, 1.6ng/ml, 1.5ng/ml, 1.4ng/ml, 1.3ng/ml, 1.2ng/ml, 1.1ng/ml, 1.0ng/ml, 0.9ng/ml, 0.8ng/ml, 0.7ng/ml, 0.6ng/ml, 0.5ng/ml, 0.4ng/ml, 0.3ng/ml, 0.2ng/ml, 或0.1ng/ml。

[0330] 在进一步的方面，本发明可以利用非RAD001的其它mTOR抑制剂，其量与生物等效于RAD001的特定目标波谷水平的目标波谷水平相关。在一个实施方案中，非RAD001的其它mTOR抑制剂的目标波谷水平，是给出与本文描述的RAD001的波谷水平给出的mTOR抑制相同水平(例如，如通过本文中所述的方法，例如，P70S6K抑制所测定的)的波谷水平。

[0331] 疾病

[0332] 癌症

[0333] 本文描述的方法可以与任何癌症使用。在一个实施方案中，所述癌症包括实体肿瘤。在一个实施方案中，癌症是血液癌症。所述癌症可以是癌，肉瘤，骨髓瘤，白血病，淋巴瘤或混合型。

[0334] 在一些实施方案中，癌症与受试者中升高的PD1+T细胞百分比相关。在某些实施方案中，癌症通常是对PD-1靶向药物有反应的癌症，如黑色素瘤。在某些实施方案中，癌症通常是对T细胞定向免疫疗法有反应的癌症，如肾细胞癌。在一个实施方案中，癌症是可通过增加PD-1阴性与PD-1阳性T细胞比率的治疗的癌症。

[0335] 可以用本文公开的方法治疗的癌症的实例包括骨癌，胰腺癌，皮肤癌，头部或颈部癌症，皮肤或眼内恶性黑色素瘤，子宫癌，卵巢癌，直肠癌，肛门区癌症，胃癌，睾丸癌，子宫癌，输卵管癌，子宫内膜癌，宫颈癌，阴道癌，阴户癌，霍奇金氏病，非霍奇金淋巴瘤，食道癌，小肠癌，内分泌系统癌症，甲状腺癌，甲状旁腺癌，肾上腺癌，软组织肉瘤，尿道癌，阴茎癌，慢性或急性白血病，包括急性髓性白血病，慢性骨髓性白血病，急性淋巴细胞性白血病，慢性淋巴细胞性白血病，儿童实体肿瘤，淋巴细胞性淋巴瘤，膀胱癌，肾或输尿管癌，肾盂癌，中枢神经系统(CNS)的肿瘤，原发性CNS淋巴瘤，肿瘤血管形成，脊椎肿瘤，脑干神经胶质瘤，

垂体腺瘤,卡波西肉瘤,表皮样癌,鳞状细胞癌,T细胞淋巴瘤,环境诱发的癌症,包括那些由石棉诱发的癌症,和所述癌症的组合。

[0336] 可以用本文所公开的方法治疗的实体肿瘤的实例包括各种器官系统的恶性肿瘤,例如,肉瘤,腺癌,和癌,如那些影响肝,肺,乳腺,淋巴,胃肠(例如结肠),泌尿生殖道(例如,肾,尿路上皮细胞),前列腺和咽的癌症。腺癌包括恶性肿瘤如大多数结肠癌,直肠癌,肾细胞癌,肝癌,非小细胞肺癌,小肠癌和食道癌。在一个实施方案中,所述癌症是黑色素瘤,例如,晚期黑色素瘤。还可以使用本发明的方法和组合物治疗或预防上述癌症的转移灶。

[0337] 本文描述的方法可用于治疗任何下列癌症:

[0338] 消化道/胃肠道癌症如肛门癌;胆管癌;肝外胆管癌;阑尾癌;类癌瘤;胃肠道肿瘤;结肠癌;结肠直肠癌包括儿童结肠直肠癌;食道癌包括儿童食道癌;胆囊癌;胃(胃)癌,包括儿童胃(胃)癌;肝细胞(肝)癌,包括成人(原发性)肝细胞(肝)癌和儿童(原发性)肝细胞(肝)癌;胰腺癌包括儿童胰腺癌;肉瘤,横纹肌肉瘤;胰岛细胞胰腺癌;直肠癌和小肠癌;

[0339] 内分泌癌症如胰岛细胞癌(内分泌胰腺);肾上腺皮质癌包括儿童肾上腺皮质癌;胃肠道癌瘤;甲状旁腺癌症;嗜铬细胞瘤;垂体瘤;甲状腺癌包括儿童甲状腺癌;儿童多发性内分泌腺瘤综合征和儿童癌瘤;

[0340] 眼部癌症,如眼内黑色素瘤;和视网膜母细胞瘤;

[0341] 肌肉骨骼癌症,如尤文氏家族肿瘤;骨的骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤;儿童横纹肌肉瘤;软组织肉瘤包括成人和儿童软组织肉瘤;腱鞘的透明细胞肉瘤和子宫肉瘤;

[0342] 乳腺癌如包括儿童和男性乳腺癌和妊娠的乳腺癌;

[0343] 神经系统癌症如儿童脑干胶质瘤;脑肿瘤;儿童小脑星形细胞瘤;儿童脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤;儿童室管膜瘤;儿童髓母细胞瘤;儿童松果体和幕上原始神经外胚层肿瘤;儿童视觉通路和下丘脑胶质瘤;其它儿童脑癌;肾上腺皮质癌;中枢神经系统淋巴瘤,原发性;儿童小脑星形细胞瘤;神经母细胞瘤;颅咽管瘤;脊髓肿瘤;中枢神经系统非典型畸胎瘤/横纹肌样肿瘤;中枢神经系统胚胎肿瘤;和儿童幕上原始神经外胚层肿瘤及垂体瘤;

[0344] 泌尿生殖系统癌症如膀胱癌包括儿童膀胱癌;肾细胞(肾)癌;卵巢癌包括儿童卵巢癌;卵巢上皮癌;卵巢低度恶性潜能肿瘤;阴茎癌;前列腺癌;肾细胞癌包括儿童肾细胞癌;肾盂和输尿管癌,移行细胞癌;睾丸癌;尿道癌;阴道癌;外阴癌;宫颈癌;肾母细胞瘤和其它儿童肾肿瘤;子宫内膜癌和妊娠滋养细胞肿瘤;

[0345] 生殖细胞癌症如儿童颅外生殖细胞肿瘤;性腺外生殖细胞肿瘤;卵巢生殖细胞肿瘤和睾丸癌;

[0346] 头部和颈部癌症,如唇和口腔癌;口腔癌包括儿童口腔癌;下咽癌;喉癌包括儿童喉癌;隐匿性原发性鳞状转移性颈部癌症;口癌;鼻腔和鼻窦癌;鼻咽癌包括儿童鼻咽癌;口咽癌;甲状旁腺癌;咽癌;唾液腺癌症包括儿童唾液腺癌;喉癌和甲状腺癌;

[0347] 肺癌,如非小细胞肺癌和小细胞肺癌;

[0348] 呼吸道癌症,如恶性间皮瘤,成人;恶性间皮瘤,儿童;恶性胸腺瘤;儿童胸腺瘤;胸腺癌;支气管腺瘤/类癌包括儿童支气管腺瘤/类癌;胸膜肺母细胞瘤;非小细胞肺癌和小细胞肺癌;

[0349] 皮肤癌如卡波西肉瘤;默克尔细胞癌;黑色素瘤;和儿童皮肤癌;

[0350] AIDS相关的恶性肿瘤;

[0351] 其它儿童癌症,儿童不常见癌症和原发部位不明的癌症;

[0352] 以及还可以根据本文所述的方法治疗或预防上述癌症的转移。

[0353] 本文描述的方法可以用于治疗血液癌症或恶性肿瘤或癌前病变,例如,白血病或淋巴瘤。癌症可以是与本文所述的癌症相关抗原的表达相关的癌症。血液癌症和恶性肿瘤包括,一种或多种急性白血病包括,例如,B细胞急性淋巴性白血病(“BALL”),T细胞急性淋巴性白血病(“TALL”),急性淋巴性白血病(或急性淋巴细胞性白血病)(ALL),包括成人和儿童急性淋巴性白血病;急性髓性白血病,包括成人和儿童急性髓性白血病;一种或多种慢性白血病,例如慢性髓性白血病(CML),慢性淋巴性白血病(或慢性淋巴细胞性白血病)(CLL)。可以用本文所公开的方法治疗的另外的癌症或血液病症包括,例如,AIDS相关淋巴瘤,B细胞幼稚淋巴细胞白血病,急浆细胞树突状细胞瘤,伯基特淋巴瘤,慢性骨髓增殖性疾病;皮肤T细胞淋巴瘤,弥漫性大B细胞淋巴瘤,滤泡性淋巴瘤,毛细胞白血病,霍奇金淋巴瘤(包括成人和儿童霍奇金淋巴瘤和怀孕期间霍奇金淋巴瘤),小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤,恶性淋巴增殖病症,MALT淋巴瘤,套细胞淋巴瘤,边缘区淋巴瘤,多发性骨髓瘤,多发性骨髓瘤/浆细胞瘤,骨髓增生异常和骨髓增生异常综合征,骨髓增生异常/骨髓增生性疾病,蕈样肉芽肿,非霍奇金淋巴瘤(包括成人和儿童非霍奇金淋巴瘤和怀孕期间非霍奇金淋巴瘤),浆母细胞淋巴瘤,浆细胞样树突细胞肿瘤,塞扎里综合征,华氏巨球蛋白血症,原发性中枢系统淋巴瘤和“前白血病”,其是多种多样的合并髓血细胞无效产生(或发育异常)的血液病症,等等。进一步地,与如本文所述的癌症相关抗原表达相关的疾病包括,但不限于,例如,非典型和/或非经典癌症,恶性肿瘤,癌前病变或与本文所述的癌症相关抗原的表达相关的增殖性疾病。

[0354] 病原体感染

[0355] 在另一个方面,本文提供的方法可用于治疗受试者中的病原体感染。在一些实施方案中,所述病原体是病毒病原体,例如病毒病原体如HIV,引起脑膜炎的病毒,引起脑炎的病毒,甲型肝炎,乙型肝炎,丙型肝炎,狂犬病病毒,脊髓灰质炎病毒,流感病毒,副流感病毒,腺病毒,鼻病毒,麻疹病毒,腮腺炎病毒,风疹,百日咳,乳头状瘤病毒,黄热病病毒,呼吸道合胞病毒,细小病毒,诺沃克病毒,切昆贡亚病毒,出血热病毒,登革热病毒,和疱疹病毒,例如,水痘,巨细胞病毒和EB病毒。在一些实施方案中,感染是病毒感染,例如慢性病毒感染。在一些实施方案中,慢性病毒感染选自甲型肝炎,乙型肝炎,丙型肝炎,EB病毒,HIV,巨细胞病毒,单纯疱疹病毒1,单纯疱疹病毒2,人乳头状瘤病毒,腺病毒,和卡波西肉瘤相关疱疹病毒。在一些实施方案中,慢性病毒感染包括HIV。

[0356] 例如,Lichterfeld和其同事发现,HIV特异性CD8+T细胞显示降低的端粒长度,以及在抑制PD-1时,端粒长度和端粒酶活性增加(参见例如,Lichterfeld,M等人.(2008) Blood 112(9):3679-3687)。在另一个例子中,在丙型肝炎(HVC)-特异性CD8+细胞毒性T淋巴细胞中显著上调的PD-1(例如,参见Golden-Mason,L(2007)J.Virol.81(17):9249-9258)。

[0357] 在一些实施方案中,病毒感染包括病毒急性下呼吸道感染。在一些实施方案中,病毒急性下呼吸道感染是由鼻病毒,冠状病毒,流感病毒,呼吸道合胞病毒(RSV),腺病毒和/或副流感引起。在一些实施方案中,病毒急性下呼吸道感染是肺炎。在一些实施方案中,病毒急性下呼吸道感染包括肺脓肿。在一些实施方案中,病毒急性下呼吸道感染包括支气管

炎。

[0358] 在一些实施方案中,病原体是细菌病原体,例如,选自脑膜炎球菌,流感嗜血杆菌,肺炎球菌,葡萄球菌,链球菌,奈瑟氏菌属,莫拉氏菌属,大肠杆菌,克雷伯氏菌属,假单胞菌属,肠杆菌属,变形杆菌,沙雷氏菌属,军团菌,沙门氏菌,志贺氏菌,不动杆菌属(*Acinetobacter*),李斯特菌,衣原体和分枝杆菌的细菌病原体。

[0359] 在一些实施方案中,病原体是寄生病原体例,例如弓形虫,利什曼原虫和疟疾,*T. cruzii*,蠕虫,例如,血吸虫。

[0360] 在一些实施方案中,病原体是酵母或真菌病原体,例如,假丝酵母菌属,隐球酵母属或球孢菌属。

[0361] 衰老和其它疾病

[0362] 在另一个方面,本文所提供的方法可用于治疗受试者中的衰老。如本文所用,术语“衰老”是指包括所有类型的衰老。在一些实施方案中,衰老包括免疫功能衰老。免疫功能衰老包括随年龄降低的对感染的免疫应答,并且起因于T细胞谱系中的胸腺退化,从而导致降低的T细胞产生和输出(见,例如,Shimatani, K等人(2009)PNAS 106(37):15807-15812)。在一些实施方案中,存在由PD-1的组成型表达限定的真实年龄依赖性CD4+T细胞群在群中的增加,这只是由常规T细胞活化瞬时诱导的,因此对感染的免疫应答降低(参见例如,Shimatani, K等人(2009)PNAS 106(37):15807-15812)。在一些实施方案中,存在由受体介导的CD8+T细胞的激活而增加的PD-1表达限定的CD8+T细胞群在群中的增加(参见例如, Nunes, C等人(2012)Clinical Cancer Research 18(3):678-687)。在一些实施方案中,衰老包括细胞衰老,其中细胞不再分裂。在一些实施方案中,年龄相关的免疫功能衰老包括由造血干细胞引起的幼稚淋巴细胞的生成减少(Chen, Science Signaling, ra75, 2009)。细胞衰老与每个细胞分裂时发生的端粒的逐渐缩短相关。

[0363] 术语“年龄相关的病症”是指任何疾病、疾患或病理,其在群体中的发病率或在个体中的严重性与年龄的进展相关。更具体地,年龄相关病症是疾病、病患或病理,其在超过100,000个个体的选定人群中,在超过60岁的人类个体中的发病率为年龄30-40之间的人类个体的至少1.5倍。在一个方面,本发明涉及治疗病症,包括但不限于肌少症,皮肤萎缩,肌肉萎缩,脑萎缩,动脉粥样硬化,动脉硬化,肺气肿,骨质疏松症,骨关节炎,高血压,勃起功能障碍,痴呆症,亨廷顿氏病,阿尔茨海默氏病,白内障,年龄相关性黄斑变性,前列腺癌,中风,预期寿命减少,肾功能受损和年龄相关性听力损失,衰老相关的移动性残疾(例如,衰弱),认知功能减退,老年性痴呆,记忆损伤,腱僵硬,心脏功能障碍如心肌肥厚和收缩和舒张功能障碍,免疫功能衰老,癌症,肥胖症和糖尿病。

[0364] 抗原和疫苗

[0365] 本文中所描述的mTOR抑制剂,如RAD001,可以与抗原组合使用以增强受试者对抗原的免疫应答。选择用于本发明的方法和组合物中的抗原不是对本发明的限制。抗原可以是,但不限于,全细胞,病毒,蛋白质,蛋白质亚基或片段。可通过与mTOR抑制剂施用而被增强的病毒抗原的例子,包括但不限于,源自和/或用于治疗或预防以下疾病的那些抗原: HIV,引起脑膜炎和脑炎的病毒,甲型肝炎,乙型肝炎,丙型肝炎,狂犬病毒,脊髓灰质炎病毒,流感病毒,麻疹病毒,腮腺炎病毒,风疹,百日咳,乳头状瘤病毒,黄热病毒,呼吸道合胞病毒,细小病毒,切昆贡亚病毒,出血热病毒,和疱疹病毒,特别是,水痘,巨细胞病毒和EB病

毒。细菌和分枝杆菌抗原的例子包括源自和/或用于抗以下疾病的那些抗原：脑膜炎双球菌，嗜血杆菌，肺炎球菌，葡萄球菌，麻风病和结核等等。寄生虫抗原的例子包括源自和/或抗以下感染的那些抗原：如弓形体病，利什曼病和疟疾。还有其它组合物的抗原包括源自以下原生动物的那些抗原，例如，*T. cruzii*，或抗蠕虫，例如，血吸虫的抗原。仍然在本文所描述的方法中使用的其它抗原包括源自酵母或真菌如隐球酵母属或球孢菌属的抗原。仍然在本文所描述的方法中使用的其它抗原包括源自病理组织如肿瘤的那些抗原。

[0366] 特别地，mTOR抑制剂如RAD001可以与抗病毒或病原体的疫苗组合使用，例如流感疫苗，肺炎球菌疫苗或HIV疫苗。更具体地，如本文所述mTOR抑制剂可用于以增强对任何流感病毒株，如H1N1，H2N3，和乙型流感亚型的免疫应答，或用作疫苗佐剂。

[0367] 进一步预期mTOR抑制剂可以用作某些癌症和实体肿瘤和感染性疾病的治疗性疫苗中的佐剂，所述感染性疾病包括但不限于，疟疾，HIV和流感。这样的治疗性疫苗可以以类似于上述的方式使用，其作为含有致病微生物或病毒的抗原的疫苗的佐剂。特别是在肿瘤抗原本身激活对特定癌症的应答不成功的情况中，使用mTOR抑制剂作为癌症疫苗或治疗剂中的佐剂包括在本发明中。癌症疫苗通常包括癌细胞上表达和分离的抗原或用所选抗原转染并能够表达所选抗原的癌细胞。例如，任何纯化的肿瘤抗原可以与上述mTOR抑制剂如RAD001共同施用用于致病性疫苗。有关癌抗原的鉴定将允许这种疫苗的开发。可替代地，使用通常在癌细胞上不表达的抗原设计其它癌症治疗剂。例如，所选抗原可以被转染到癌细胞和表达抗原的转染细胞本身用作疫苗或治疗。

[0368] 可以使用本领域中公知的方法测定mTOR抑制剂在疫苗中提供佐剂效果或加强对抗原（例如疫苗抗原（例如，流感））的免疫应答的能力，例如，但不限于ELISA测定法和血凝抑制测定法（参见，例如，Lee等人，*Pediatr Infect Dis J.* 2004 Sep; 23(9):852-6）。通常，由mTOR抑制剂导致的对抗原的免疫应答增强，可以通过测量受试者中针对抗原的抗体滴度测定，其中针对特定抗原的抗体滴度的增加指示mTOR抑制剂具有增强的对抗原的免疫应答。

[0369] 当用作所选抗原的疫苗佐剂时，或当根据本文所述的方法使用时，mTOR抑制剂可以混合作为含抗原组合物本身的一部分。这种组合物是所需疫苗组合物，其包含合适的载体和任选的其它所需成分。选择适当的载体，例如，磷酸盐缓冲液等，是本领域技术人员所公知的。同样地，本领域技术人员可以容易地选择合适的稳定剂，防腐剂等，以包括在组合物中。本领域中任何已知的施用途径可用于抗原或疫苗的施用，例如，皮下、腹膜内、口服、肌肉内、鼻内等。

[0370] 或者，可以通过与疫苗组合物分开施用mTOR抑制剂获得mTOR抑制剂的免疫刺激效果。当分开施用时，mTOR抑制剂可以以如上所述的制剂施用。mTOR抑制剂可以与疫苗组合物同期（contemporaneously）施用，或与其同时（simultaneously）施用或在疫苗抗原之前或之后施用。如果mTOR抑制剂在疫苗组合物之前施用，期望在疫苗之前的一天或几天施用。在一个方面，可以在抗原施用前施用mTOR抑制剂一段时间。例如，可以在疫苗施用前施用mTOR抑制剂1-7天、一周、二周、三周、四周、五周或六周或更长时间。在一个方面，在mTOR抑制剂施用后立即施用抗原。在另一个方面，在mTOR抑制剂施用和抗原施用之间可以有一段时间。例如，可以在mTOR抑制剂施用1-7天后施用抗原，或者可以在mTOR抑制剂施用一周、二周、三周或更长时间后施用抗原。在一个方面中，mTOR抑制剂持续六周施用给受试者，随后的两周

时间内既不给受试者mTOR抑制剂又不给抗原,然后施用抗原。当mTOR抑制剂作为与疫苗分开的组分施用时,其可以通过与疫苗抗原相同的施用途径施用,或者可以通过不同的途径施用,或者可以通过医师选择的任何其它途径施用。在前述给药方案的进一步的方面,可以在抗原施用之后继续施用mTOR抑制剂。例如,无论在抗原施用之前或与抗原施用同时施用,均可以在抗原施用之后继续按如本文所述的每周或每日剂量方案施用mTOR抑制剂1,2,3,4,5,6或7或更多天。可以在抗原施用之后继续施用mTOR抑制剂1,2,3,4,5,或6周或更长时间。

[0371] 利用mTOR抑制剂的其它方法

[0372] 在一个方面,本发明涉及低剂量的mTOR抑制剂在增强受试者对抗原的免疫应答的方法中的用途。在一个方面中,当抗原暴露与低剂量mTOR抑制剂组合时,对抗原的免疫应答增加了1.2倍。在进一步的方面,当抗原暴露与如本文所述的低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂组合时,对抗原的免疫应答增加了0.5,0.6,0.7,0.8,0.9,1.0,1.1,1.2,1.3,1.4,或1.5倍或更大。在进一步的方面,mTOR抑制剂是本文所述的mTOR抑制剂,例如,RAD001,并且其以本文所述的剂量施用,例如,0.005-1.5mg每天、0.01-1mg每天、0.01-0.7mg每天、0.01-0.5mg每天、或0.1-0.5mg每天、或0.1-20mg每周、0.5-15mg每周、1-10mg每周、或3-7mg每周的剂量。在一个方面中,mTOR抑制剂RAD001以剂量0.5mg每天或5mg每周施用。在前述的每个方面中,非RAD001的其它mTOR抑制剂可以以生物等效剂量施用。

[0373] 在进一步的方面,本发明涉及用于增强对抗原的免疫应答的方法,所述方法通过施用mTOR抑制剂的量足以抑制P70S6激酶如本文所述的量,例如,不超过80%。在进一步的方面,mTOR抑制剂足以抑制P70S6激酶不超过38%。在一个方面,mTOR抑制剂是RAD001、雷帕霉素、雷帕霉素类似物、或本领域中已知的其它mTOR抑制剂,例如地磷莫司、青霉西罗莫司(emsirrolimus)。在进一步的方面,mTOR抑制剂可以是两种或更多种mTOR抑制剂的组合。方法包括向受试者施用抗原,如,例如,疫苗(例如,流感疫苗)和mTOR抑制剂如RAD001的步骤。

[0374] 在一个方面,抗原是疫苗抗原,可以包括,例如,流感、肺炎球菌、HIV、或其它疫苗抗原。特别地,疫苗抗原可以是流感抗原如H1N1、H2N3和乙型流感亚型。

[0375] 增强对抗原的免疫应答的本发明的方法包括受试者中对抗原的免疫应答增加的方法。即,由于施用的抗原包含mTOR抑制剂,在暴露于抗原后具有保护性免疫的增强,其中保护性免疫是指存在足够的抗体滴度,以防止由相同抗原引起的后续感染。此外,针对mTOR抑制剂治疗引起的对抗原免疫应答的增强可能意味着在人群中,暴露于抗原如疫苗后,具有保护性免疫的个体的百分比增加。

[0376] 在一个方面,抑制或受损的免疫功能/应答的指征是淋巴细胞数目减少或淋巴细胞功能降低,如对促有丝分裂刺激的应答降低。以下情况时也可以认为人的免疫系统受损(1)Th/Ts的比率小于约1.0,(2)当对ConA的刺激指数约50%小于“正常”时或(2)当对PHA的刺激指数约50%小于“正常”时(参见,例如,EP0507872)。当巨噬细胞和树突状细胞引起的抗原呈递和/或淋巴细胞活化低于来自小于40岁的健康人的细胞中所见的、当淋巴细胞对激活信号的应答低于来自小于40岁的健康人的淋巴细胞中所见的、当炎性细胞因子的分泌高于小于40岁的健康人中所见的、当造血干细胞的淋巴细胞生成低于来自小于40岁的健康人的造血干细胞的淋巴细胞生成、或当PD1+CD4+和/或CD8+T细胞的百分比高于小于40岁的健康人中的PD1+CD4+和/或CD8+T细胞的百分比时,也可以认为人的免疫系统受损。

[0377] 受损的人免疫应答常常作为以下病症的次级效应被观察到,这样的病症如创伤,例如,由于事故或经历重大外科手术、由于衰弱性疾病,如癌症或HIV病毒感染(AIDS),或由于营养不良或老年导致的创伤。因为免疫应答受损,患者无法应对并从其身体消除传染源,如细菌、病毒和真菌。

[0378] 在一个方面,增强受试者免疫应答的方法还包括首先鉴定具有受损免疫应答的受试者的步骤。具有受损免疫应答的受试者是指预测在预防性疫苗接种后不能获得保护性抗体滴度水平、或在治疗性疫苗接种后受试者不具有疾病负担的降低。用于测定疫苗接种后抗体滴度的方法和/或测量疾病负担的方法在本领域是公知的,并且可以由医师或其它医疗专业人员常规进行。

[0379] 例如,抗流感病毒抗体滴度可通过血凝抑制(HI)测定法测定。可以如Kendal, AP等人(1982) Concepts and procedures for laboratory-based influenza surveillance. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention B17-B35中及以下描述的进行HI测定法。恒定量的血凝抗原(HA)加入到微量滴定板的每个孔中。测试样品,例如患者血清,加入到第一孔并系列稀释(例如,2倍)至所希望的稀释度或孔的数目。红细胞加入到每个孔中。将板孵育一段时间,以足以发生血凝,例如孵育1小时。然后观察所述板的孔中的凝集红细胞(指示存在的抗体不足以防止血凝)或未凝集红细胞(指示存在足以防止血凝的抗体)。为了防止血凝所需的测试样品的最高稀释度表示HI滴度。

[0380] 如果受试者是已知的具有下降的免疫功能的人群中的一员,如老人、经历免疫抑制剂或化疗治疗的受试者、无脾的受试者、无免疫应答的受试者或患有HIV/AIDS的受试者,则也可以说所述受试者具有受损的免疫应答。即,可以根据将其包括在通常与受损的免疫功能相关的受试者类别中,来预期受试者具有受损的免疫应答。这样的个体可被视为具有受损的免疫应答,而无需特定的测试,或者随后使用本领域的常规方法确认受损的免疫应答。另外,如果受试者具有免疫功能下降的历史,例如在疫苗接种或暴露于抗原后,不能建立保护性免疫的历史,则受试者可被认为具有受损的免疫应答。

[0381] 一旦受试者被鉴定为具有受损的免疫应答,可以在疫苗接种和/或如本文所述暴露于抗原的情况中用mTOR抑制剂治疗受试者。

[0382] 此外,在进一步的方面,本发明涉及治疗受试者中免疫功能衰老的方法,所述方法通过向受试者施用有效提高对抗原(例如,疫苗抗原)免疫应答的量的mTOR抑制剂,从而实现保护性抗体滴度或对抗原的T细胞应答。在一个方面,本发明提供了治疗受试者中免疫功能衰老的方法,所述方法通过向受试者施用低剂量的mTOR抑制剂如RAD001。mTOR抑制剂RAD001可以以本文中所描述的剂量施用,例如,可以以约0.005-1.5mg每天、约0.01-1mg每天、约0.01-0.7mg每天、约0.01-0.5mg每天、或约0.1-0.5mg每天或约0.1-20mg每周、约0.5-15mg每周、约1-10mg每周、或约3-7mg每周的剂量施用。在一个方面,RAD001以0.5mg每天或5mg每周的剂量施用。在上述的另一个实施方案中,mTOR抑制剂可以为非RAD001的抑制剂,其以生物等效于上述RAD001剂量的剂量施用。在进一步的方面,本发明涉及治疗受试者中免疫功能衰老的方法,所述方法通过施用足以抑制P70S6激酶不超过80%的量的mTOR抑制剂。在进一步的方面,mTOR抑制剂足以抑制P70S6激酶不超过38%。在一个方面,mTOR抑制剂是RAD001、雷帕霉素、雷帕霉素类似物,或本领域中已知的其它mTOR抑制剂。在进一步的方面,mTOR抑制剂可以是两种或更多种mTOR抑制剂的组合。

[0383] 免疫功能衰老是指与年龄相关的免疫功能降低,导致对疫苗接种和传染病病原体受损的应答。其包括宿主对感染应答的能力和形成长期免疫记忆的能力,尤其是通过疫苗接种。这种年龄相关的免疫缺陷无处不在,并见于长寿命和短寿命的物种,作为相对于其预期寿命而不是物理时间的年龄的函数。它被认为是在老年人中发病率和死亡率频率增加的一大原因。免疫功能衰老不是一个随机衰退的现象,相反,其似乎反向重复进化模式,受免疫功能衰老影响的大多数参数似乎受遗传控制的。免疫功能衰老,有时也可以设想为不可避免的暴露于各种抗原,例如病毒和细菌的不断攻击的结果。免疫功能衰老是一个多因素的病症,导致年老人群中许多病理显著的健康问题。年龄依赖的生物变化,如造血干细胞的耗竭、吞噬细胞和NK细胞总数量的下降、和体液免疫的下降导致免疫功能衰老的发生,可用作免疫功能衰老的发生或存在的指征。在一个方面,个体中免疫功能衰老可通过测量免疫细胞中的端粒长度(参见,例如,US5741677)测定。免疫功能衰老还可通过在个体中测量初始(**naïve**)CD4和/或CD8+T细胞数、通过测量T细胞库、通过测量PD1+CD4和CD8T细胞的百分比、或通过测量年龄大于65岁的受试者对疫苗接种的反应测定。在进一步的方面,本发明涉及治疗受试者中年龄相关病症的方法,所述方法通过向受试者施用以下剂量的mTOR抑制剂RAD001:约0.005-1.5mg每天、约0.01-1mg每天、约0.01-0.7mg每天、约0.01-0.5mg每天、或约0.1-0.5mg每天或约0.1-20mg每周、约0.5-15mg每周、约1-10mg每周、或约3-7mg每周。在一个方面,mTOR抑制剂以约0.5mg每天或约5mg每周的剂量施用。在一个方面,mTOR抑制剂可以为非RAD001的,mTOR抑制剂,其以生物等效于特定剂量的RAD001的剂量施用。在进一步的方面,本发明涉及治疗受试者中年龄相关的病症的方法,所述方法通过施用足以抑制P70S6激酶不超过80%的量的mTOR抑制剂。在进一步的方面,mTOR抑制剂足以抑制P70S6激酶不超过38%。在一个方面,mTOR抑制剂是RAD001、雷帕霉素、雷帕霉素类似物,或本领域中已知的其它mTOR抑制剂。在进一步的方面,mTOR抑制剂可以是两种或更多种mTOR抑制剂的组合。

[0384] 年龄相关病症可以是任何疾病、疾患或病理,其在群体中的发病率或在个体中的严重性与年龄的进展相关。更具体地,年龄相关病症是疾病、病患或病理,其在超过100,000个个体的选定人群中,在超过60岁的人类个体中的发病率为相对于年龄30-40之间的人类个体的至少1.5倍。与本发明有关的年龄相关病症,包括但不限于肌少症,皮肤萎缩,肌肉萎缩,脑萎缩,动脉粥样硬化,动脉硬化,肺气肿,骨质疏松症,骨关节炎,高血压,勃起功能障碍,痴呆症,亨廷顿氏病,阿尔茨海默氏病,白内障,年龄相关性黄斑变性,前列腺癌,中风,预期寿命减少,肾功能受损和年龄相关性听力损失,衰老相关的移动性残疾(例如,衰弱),认知功能减退,老年性痴呆,记忆损伤,腱僵硬,心脏功能障碍如心肌肥厚和收缩和舒张功能障碍,免疫功能衰老,癌症,肥胖症和糖尿病。

[0385] 使用本文所述的mTOR抑制剂对年龄相关病症的治疗可以是完全的,例如,完全不存在年龄相关性的病症或代谢紊乱。预防也可以是部分的,使得在受试者中年龄相关的病症或代谢紊乱发生的可能性可能低于没有接受本公开的mTOR抑制剂的受试者。测量mTOR抑制剂治疗如本文所述的年龄相关病症的有效性的方法是本领域公知的,这样的方法的例子见于美国专利8,420,088中。

[0386] 组合治疗

[0387] 在一些实施方案中,可能有利的是施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂,例如,本

文所述的mTOR抑制剂,和一种或多种治疗剂(药物组合)。例如,可以与其它免疫刺激、抗感染、抗肿瘤或抗增殖试剂产生协同效果,例如,有丝分裂抑制剂,烷化剂,抗代谢物,嵌入抗生素,生长因子抑制剂(例如,曲妥单抗,帕尼单抗,西妥昔单抗,吉非替尼,埃罗替尼,拉帕替尼,索拉非尼等),细胞周期抑制剂,酶,拓扑异构酶抑制剂,生物反应调节剂,抗体,细胞毒素,支气管扩张剂,抗激素,抗雄激素,抗血管生成剂,激酶抑制剂,pan激酶抑制剂或生长因子抑制剂。其它合适的治疗剂列在医师参考(Physicians' Desk Reference)中。当本发明的化合物与其它疗法结合施用,共同施用的化合物的剂量当然将取决于共同使用的药物类型、使用的具体药物、被治疗的病症等等。

[0388] 相应地,mTOR抑制剂,例如,本文所述的mTOR抑制剂,可以以低、免疫增强剂量与其它已知的试剂和治疗组合使用。如本文所使用的“组合”施用,是指在受试者患有疾患的过程中,向受试者递送两种(或更多种)不同的治疗,例如,在诊断受试者患有疾患后和该疾患被治愈或消除前或由于其它原因停止治疗前,递送两种或更多种治疗。在一些实施方案中,在第二治疗递送开始时,一种治疗的递送仍然发生,使得在施用方面有重叠。这有时在本文中称为“同时”或“并行(concurrent)递送”。在其它实施方案中,一种治疗的递送在其它治疗递送的开始之前结束。在这两种情况中任一的一些实施方案中,由于组合施用使得治疗更有效。例如,第二治疗更有效,例如,与没有第一治疗而施用第二治疗中看到的相比,用更少的第二治疗看到等同的效果,或第二治疗在更大程度上减少症状,或者关于第一治疗看到类似的情况。在一些实施方案中,相比于用一种递送的治疗而不存在另一种治疗时观察到的,递送使得与病患相关的症状或其他参数更大地减少。两种治疗的效果可以部分加成,全部加成,或大于加成。递送可以是这样的,当第二治疗递送时,递送的第一治疗的效果仍然是可检测的。

[0389] mTOR抑制剂,例如,本文所述的mTOR抑制剂,以低、免疫增强剂量,和至少一种其它治疗剂可以同时、在相同或分开的组合物中、或相继地施用。对于相继施用,mTOR抑制剂可以第一施用,其它试剂可以第二施用,或施用的顺序可以颠倒。在一些实施方案中,mTOR抑制剂作为预处理施用,例如,在用至少一种其它治疗剂治疗1周,2周,3周,4周,5周,6周,第7周,8周,9周,10周,11周,12周或更长时间之前施用。

[0390] 在一些实施方案中,mTOR抑制剂,例如,本文所述的mTOR抑制剂,以低、免疫增强剂量施用给患有癌症的受试者,例如,本文所述的癌症。受试者可以接受其它治疗剂(如用于该类型癌症的批准的药物)与mTOR抑制剂的组合治疗。例如,下面的表1提供了各种癌症和其批准的治疗的列表。

[0391] 表1. 癌症和批准的治疗

[0392]

癌症	治疗
急性淋巴细胞白血 血病	甲氨蝶呤（甲氨蝶呤(Methotrexate)）；阿霉素 PFS（盐酸多柔比星）；阿霉素 RDF（盐酸多柔比星）；奈拉滨（奈拉滨(Nelarabine)）；门冬酰胺酶菊欧文氏菌（Asparaginase Erwinia chrysanthemi）；柔红霉素（盐酸柔红霉素）；Clafen（环磷酰胺）；氟达拉滨；Clofarex（氟达拉滨）；科罗拉（氟达拉滨）；环磷酰胺；阿糖胞苷；阿糖胞苷-U（阿糖胞苷）；环磷酰胺（环磷酰胺(Cyclophosphamide)）；达沙替尼；盐酸柔红霉素；盐酸阿霉素；Erwinaze（门冬酰胺酶菊欧文氏菌）；重氮片（甲氨蝶呤）；重氮片 PFS（甲氨蝶呤）；格列卫（甲磺酸伊马替尼）；普纳替尼（普纳替尼盐酸盐）；甲磺酸伊马替尼；Marqibo（硫酸长春新碱脂质体）；巯嘌呤； 甲氨蝶呤；甲氨蝶呤 LPF（安甲喋呤）；氮甲喋呤钠（甲氨蝶呤）；Mexate-AQ（甲氨蝶呤）；奈拉滨；环磷酰胺（环磷酰胺(Cyclophosphamide)）；培门冬酶（培门冬酶）；培门冬酶；巯基嘌呤（巯嘌呤）；Purixan（巯嘌呤）；红比霉素（盐酸柔红霉素）；施达赛（达沙替尼）；Tarabine PFS（阿糖胞苷）；Vincasar PFS（硫酸长春新碱）；硫酸长春新碱；或硫酸长春新碱脂质体。

[0393]

	药物组合 超 CVAD: 环磷酰胺; 硫酸长春新碱; 盐酸阿霉素(阿霉素); 地塞米松。
急性髓性白血病	阿霉素 PFS (盐酸阿霉素); 阿霉素 RDF (盐酸阿霉素); 三氧化二砷; 柔红霉素 (盐酸柔红霉素); Clafen (环磷酰胺); 环磷酰胺; 阿糖胞苷; 阿糖胞苷-U (阿糖胞苷); 环磷酰胺 (环磷酰胺(Cyclophosphamide)); 盐酸柔红霉素; 盐酸阿霉素; 环磷酰胺 (环磷酰胺(Cyclophosphamide)); 红比霉素 (盐酸柔红霉素); Tarabine PFS (阿糖胞苷); 三氧化二砷 (三氧化二砷); Vincasar PFS (硫酸长春新碱); 或硫酸长春新碱。 药物组合 ADE: 阿糖胞苷; 盐酸柔红霉素和依托泊苷。
AIDS 相关的卡波氏肉瘤	DOX-SL (盐酸阿霉素脂质体); 阿霉素脂质体 (盐酸阿霉素脂质体); 盐酸阿霉素脂质体; 阿霉素脂质体 (盐酸阿霉素脂质体); 甘乐能 (重组干扰素 α-2b); LipoDox (盐酸阿霉素脂质体); 紫杉醇; 重组干扰素 α-2b; 紫杉酚 (紫杉醇); 长春花碱 (硫酸长春碱); Velsar (硫酸长春碱); 或硫酸长春碱。
基底细胞癌	氟尿嘧啶 (氟尿嘧啶 (Fluorouracil)); 咪喹莫特 (咪喹莫特); 氟尿嘧啶 (氟尿嘧啶 (Fluorouracil)); 维莫德吉 (维莫德吉(Vismodegib)); 氟尿嘧啶 (氟尿嘧啶(Fluorouracil)); 氟尿嘧啶; 咪喹莫特; 或维莫德吉。
膀胱癌	阿霉素 PFS (盐酸阿霉素); 阿霉素 RDF (盐酸阿霉素); 顺铂; 盐酸阿霉素; 顺铂 (顺铂 (Cisplatin)); 或顺铂-AQ (顺铂)。

[0394]

骨癌	甲氨蝶呤 (甲氨蝶呤 (Methotrexate)); 阿霉素 PFS (盐酸阿霉素); 阿霉素 RDF (盐酸阿霉素); 盐酸阿霉素; 重氮片 (甲氨蝶呤); 重氮片 PFS (甲氨蝶呤); 甲氨蝶呤; 甲氨蝶呤 LPF (甲氨蝶呤); 氮甲喋呤钠 (甲氨蝶呤); 或氮甲喋呤钠-AQ (甲氨蝶呤)。
脑肿瘤	依维莫司 (依维莫司 (Everolimus)); 依维莫司 (依维莫司 (Everolimus)); 阿瓦斯丁 (贝伐单抗); 贝伐单抗; CeeNu (洛莫司汀); 依维莫司; 洛莫司汀; 替莫唑胺 (替莫唑胺 (Methotrexate)); 替莫唑胺 (替莫唑胺); 或替莫唑胺。
乳腺癌	甲氨蝶呤 (甲氨蝶呤 (Methotrexate)); 白蛋白结合型紫杉醇 (紫杉醇白蛋白稳定的纳米颗粒制剂); Ado-曲妥珠单抗 Emtansine; 阿霉素 PFS (盐酸阿霉素); 阿霉素 RDF (盐酸阿霉素); 氟尿嘧啶 (氟尿嘧啶 (Fluorouracil)); 依维莫司 (依维莫司 (Everolimus)); 阿那曲唑; 阿可达 (帕米膦酸二钠); 瑞宁得 (阿那曲唑); 阿诺斯 (依西美坦); 卡培他滨; Clafen (环磷酰胺); 环磷酰胺; 环磷酰胺 (环磷酰胺 (Cyclophosphamide)); 多西他赛; 盐酸阿霉素; 氟尿嘧啶 (氟尿嘧啶 (Fluorouracil)); 表阿霉素 (盐酸表柔比星); 盐酸表柔比星; 依维莫司; 依西美坦; 法乐通 (托瑞米芬); 氟维司群 (氟维司群); 弗隆 (来曲唑); 氟尿嘧啶 (氟尿嘧啶 (Fluorouracil)); 氟尿嘧啶; 重氮片 (甲氨蝶呤); 重氮片 PFS (甲氨蝶呤); 氟维司群; 盐酸吉西他滨; 健择 (盐酸吉西他滨); 醋酸戈舍瑞林; 赫赛汀 (曲妥珠单抗); 伊沙匹隆; 伊沙匹隆 (伊沙匹隆); 曲妥珠单抗 (ADO-曲妥珠单抗 Emtansine); 二甲苯磺酸拉帕替尼; 来曲唑; 甲地孕酮 (醋酸甲地孕酮); 醋

[0395]

	酸甲地孕酮;甲氨蝶呤;甲氨蝶呤 LPF (甲氨蝶呤);氮甲喋呤钠(甲氨蝶呤);氮甲喋呤钠-AQ(甲氨蝶呤);环磷酰胺(环磷酰胺(Cyclophosphamide));诺瓦得士(枸橼酸他莫昔芬)他莫昔芬(枸橼酸他莫昔芬);紫杉醇;紫杉醇白蛋白稳定的纳米颗粒制剂;帕米麟酸二钠;帕妥珠单抗(帕妥珠单抗(Pertuzumab));帕妥珠单抗;枸橼酸他莫昔芬;紫杉酚(紫杉醇);泰索帝(多西他赛);曲妥珠单抗;托瑞米芬;Tykerb(二甲苯磺酸拉帕替尼);希罗达(卡培他滨);或诺雷德(醋酸戈舍瑞林)。 药物组合 AC: 盐酸阿霉素(阿霉素)和环磷酰胺。 AC-T: 盐酸阿霉素(阿霉素);环磷酰胺和紫杉醇(紫杉酚)。 CAF: 环磷酰胺;盐酸阿霉素(阿霉素)和氟尿嘧啶。 CMF: 环磷酰胺;甲氨蝶呤和氟尿嘧啶。 FEC: 氟尿嘧啶;盐酸表柔比星和环磷酰胺。 TAC: 多西他赛(泰索帝);盐酸阿霉素(阿霉素)和环磷酰胺。
宫颈癌	博莱霉素(博莱霉素);博莱霉素;顺铂;美新(盐酸拓扑替康);顺铂(顺铂(Cisplatin));顺铂-AQ(顺铂);或盐酸拓扑替康。 药物组合 吉西他滨-顺铂: 盐酸吉西他滨和顺铂。
慢性淋巴细胞白血血病	阿仑单抗; Ambochlorin(苯丁酸氮芥); Amboclorin(苯丁酸氮芥);奥法木单抗(奥法木单抗);盐酸苯达莫司汀;阿仑单抗(阿仑单抗);苯丁酸氮芥; Clafen(环磷酰胺);环磷酰胺;环磷酰胺(环磷酰胺)

[0396]

	(Cyclophosphamide) ; 氟达拉滨 (磷酸氟达拉滨) ; 磷酸氟达拉滨; Gazyva (阿托珠单抗) ; 依鲁替尼; 依鲁替尼 (依鲁替尼) ; 留可然 (苯丁酸氮芥) ; Linfofizin (苯丁酸氮芥) ; 环磷酰胺 (环磷酰胺 (Cyclophosphamide)) ; 阿托珠单抗; 奥法木单抗或苯达莫司汀 (盐酸苯达莫司汀) 。 药物组合 苯丁酸氮芥-泼尼松: 苯丁酸氮芥和泼尼松。 CVP: 环磷酰胺; 硫酸长春新碱和泼尼松。
慢性髓性白血病	波舒替尼 (波舒替尼) ; 波舒替尼; 白消安; 白消安 (白消安) ; Clafen (环磷酰胺) ; 环磷酰胺; 阿糖胞苷; 阿糖胞苷-U (阿糖胞苷) ; 环磷酰胺 (环磷酰胺 (Cyclophosphamide)) ; 达沙替尼; 格列卫 (甲磺酸伊马替尼) ; 普纳替尼 (普纳替尼盐酸盐) ; 甲磺酸伊马替尼; 马利兰 (白消安) ; 环磷酰胺 (环磷酰胺 (Cyclophosphamide)) ; 尼罗替尼; 美琥他辛; 普纳替尼盐酸盐; 施达赛 (达沙替尼) ; Synribo (美琥他辛) ; Tarabine PFS (阿糖胞苷) ; 或尼罗替尼 (尼罗替尼) 。
结肠癌	氟尿嘧啶 (氟尿嘧啶 (Fluorouracil)) ; 阿瓦斯丁 (贝伐单抗) ; 贝伐单抗; 伊立替康 (盐酸伊立替康) ; 卡培他滨; 西妥昔单抗; 氟尿嘧啶 (氟尿嘧啶 (Fluorouracil)) ; 乐沙定 (奥沙利铂) ; 爱必妥 (西妥昔单抗) ; 氟尿嘧啶 (氟尿嘧啶 (Fluorouracil)) ; 氟尿嘧啶; 盐酸伊立替康; 亚叶酸钙; 奥沙利铂; 帕尼单抗; 瑞格非尼; 瑞格菲尼 (瑞格非尼) ; 维克替比 (帕尼单抗) ; 维尔康沃林 (亚叶酸钙) ; 希罗达 (卡培他滨) ; 阿柏西普 (Ziv-阿柏西普) ; 或 Ziv-阿柏西普。 药物组合

[0397]

	CAPOX: 卡培他滨和奥沙利铂。 FOLFIRI: 亚叶酸钙 (亚叶酸); 氟尿嘧啶和盐酸伊立替康。 FOLFIRI-BEVACIZUMAB: 亚叶酸钙 (亚叶酸); 氟尿嘧啶; 盐酸伊立替康和贝伐单抗。 FOLFIRI-CETUXIMAB: 亚叶酸钙 (亚叶酸); 氟尿嘧啶; 盐酸伊立替康和西妥昔单抗。 FOLFOX: 亚叶酸钙 (亚叶酸); 氟尿嘧啶和奥沙利铂。 XELOX: 卡培他滨 (希罗达) 和奥沙利铂。
子宫内膜癌	梅格施(醋酸甲地孕酮) 或醋酸甲地孕酮。
胃 (胃) 癌	阿霉素 PFS (盐酸阿霉素); 阿霉素 RDF (盐酸阿霉素); 氟尿嘧啶 (氟尿嘧啶(Fluorouracil)); Cyramza (雷莫芦单抗); 多西他赛; 盐酸阿霉素; 氟尿嘧啶 (氟尿嘧啶(Fluorouracil)); 氟尿嘧啶 (氟尿嘧啶(Fluorouracil)); 氟尿嘧啶 (氟尿嘧啶(Fluorouracil)); 氟尿嘧啶; 赫赛汀 (曲妥珠单抗); 丝裂霉素 C; Mitozytrex (丝裂霉素 C); 密吐霉素 (丝裂霉素 C); 雷莫芦单抗; 泰索帝 (多西他赛) 或曲妥珠单抗
胃肠道间质瘤	格列卫 (甲磺酸伊马替尼); 甲磺酸伊马替尼; 瑞格非尼; 瑞格非尼 (瑞格非尼); 苹果酸舒尼替尼; 索坦 (苹果酸舒尼替尼)
头颈部肿瘤	甲氨蝶呤 (甲氨蝶呤); 氟尿嘧啶 (氟尿嘧啶(Fluorouracil)); 博莱霉素 (博莱霉素); 博莱霉素; 西妥昔单抗; 顺铂; 多西他赛; 氟尿嘧啶 (氟尿嘧啶(Fluorouracil)); 爱必妥 (西妥昔单抗); 氟尿嘧啶 (氟尿嘧啶(Fluorouracil)); 氟尿嘧啶; 重氮片 (甲氨蝶呤); 重氮片 PFS (甲氨蝶呤); 甲氨蝶呤; 甲氨蝶呤 LPF (甲氨蝶呤); 氮甲喋呤钠 (甲氨蝶呤); 氮甲喋呤

[0398]

	钠-AQ (甲氨蝶呤); 顺铂(顺铂(Cisplatin)); 顺铂-AQ (顺铂);或泰索帝 (多西他赛)。
霍奇金淋巴瘤	Adcetris (Brentuximab Vedotin); 阿霉素 PFS (盐酸阿霉素); 阿霉素 RDF (盐酸阿霉素); Ambochlorin (苯丁酸氮芥); Amboclorin (苯丁酸氮芥); 博莱霉素 (博莱霉素); 博莱霉素; Brentuximab Vedotin; 苯丁酸氮芥; Clafen (环磷酰胺); 环磷酰胺; 环磷酰胺 (环磷酰胺(Cyclophosphamide)); 达卡巴嗪; 盐酸阿霉素; 达卡巴嗪 (达卡巴嗪); 留可然 (苯丁酸氮芥); Linfolizin (苯丁酸氮芥); 洛莫司汀; Matulane (盐酸丙卡巴肼); 环磷酰胺 (环磷酰胺(Cyclophosphamide)); 盐酸丙卡巴肼; 长春花碱 (硫酸长春碱); Velsar (硫酸长春碱); 硫酸长春碱; Vincasar PFS (硫酸长春新碱); 或硫酸长春新碱。 药物组合: ABVD: 盐酸阿霉素 (阿霉素); 博莱霉素; 硫酸长春碱和达卡巴嗪。 ABVE: 盐酸阿霉素 (阿霉素); 博莱霉素; 硫酸长春碱和依托泊苷。 ABVE-PC: 盐酸阿霉素 (阿霉素); 博莱霉素; 硫酸长春碱; 依托泊苷; 泼尼松和环磷酰胺。 BEACOPP: 博莱霉素; 依托泊苷; 盐酸阿霉素 (阿霉素); 环磷酰胺; 硫酸长春新碱 (长春新碱); 盐酸丙卡巴肼和泼尼松。 COPP: 环磷酰胺; 硫酸长春新碱 (长春新碱); 盐酸丙卡巴肼和泼尼松。 COPP-ABV: 环磷酰胺; 硫酸长春新碱 (长春新碱); 盐酸丙卡巴肼; 泼尼松; 盐酸阿霉素 (阿霉素); 博莱霉

[0399]

	素和硫酸长春碱。 ICE: 异环磷酰胺;卡铂和依托泊苷。 MOPP: 盐酸氮芥;硫酸长春新碱(长春新碱);盐酸丙卡巴肼和泼尼松。 OEPA: 硫酸长春新碱(长春新碱);依托泊苷;泼尼松和盐酸阿霉素(阿霉素)。 OPPA: 硫酸长春新碱(长春新碱);盐酸丙卡巴肼;泼尼松和盐酸阿霉素(阿霉素)。 STANFORD V: 盐酸氮芥;盐酸阿霉素;硫酸长春碱;硫酸长春新碱;博莱霉素;依托泊苷和泼尼松。 VAMP: 硫酸长春新碱;盐酸阿霉素(阿霉素)和甲氨蝶呤和泼尼松。
肾(肾细胞)癌	依维莫司(依维莫司(Everolimus));阿地白介素;阿瓦斯丁(贝伐单抗);阿西替尼;贝伐单抗;依维莫司;阿西替尼(阿西替尼);Nexavar(甲苯磺酸索拉非尼);帕唑帕尼盐酸盐;阿地白介素(阿地白介素);甲苯磺酸索拉非尼;苹果酸舒尼替尼;索坦(苹果酸舒尼替尼);替西罗莫司;Torisel(替西罗莫司);或帕唑帕尼(帕唑帕尼盐酸盐)。
肝癌	Nexavar(甲苯磺酸索拉非尼)或甲苯磺酸索拉非尼
黑色素瘤	阿地白介素;达拉菲尼;达卡巴嗪;DTIC-Dome(达卡巴嗪);甘乐能(重组干扰素α-2b);伊匹木单抗;曲美替尼(曲美替尼);培干扰素α-2b;佩乐能(聚乙二醇干扰素α-2b);阿地白介素(阿地白介素);重组干扰素α-2b;Sylatron(培干扰素α-2b);Tafinlar(达拉菲尼);曲美替尼;维罗非尼;伊匹单抗(伊匹木单抗);或Zelboraf(维罗非尼)。
恶性间皮瘤	力比泰(培美曲塞二钠);顺铂;培美曲塞二钠;顺铂(顺

[0400]

	铂(Cisplatin) ;或顺铂-AQ (顺铂)
多发性骨髓瘤	阿可达(帕米膦酸二钠); 硼替佐米; 卡非佐米; Clafen (环磷酰胺); 环磷酰胺; 环磷酰胺 (环磷酰胺 (Cyclophosphamide)); 阿霉素脂质体 (盐酸阿霉素脂质体); 盐酸阿霉素脂质体; Dox-SL (盐酸阿霉素脂质体); 阿霉素脂质体 (盐酸阿霉素脂质体); Kyprolis (卡非佐米); 来那度胺; LipoDox (盐酸阿霉素脂质体); Mozobil (普乐沙福); 环磷酰胺 (环磷酰胺 (Cyclophosphamide)); 帕米膦酸二钠; 普乐沙福; 泊马度胺 (泊马度胺); 泊马度胺; Revlimid (来那度胺); 昔诺韦 (沙利度胺); 沙利度胺; 反应停 (沙利度胺); 万珂 (硼替佐米); 唑来膦酸; 择泰 (唑来膦酸)
骨髓增殖性疾病	阿霉素 PFS (盐酸阿霉素); 阿霉素 RDF (盐酸阿霉素); 三氧化二砷; 阿扎胞苷; 柔红霉素 (盐酸柔红霉素); Clafen (环磷酰胺); 环磷酰胺; 阿糖胞苷; 阿糖胞苷-U (阿糖胞苷); 阿糖胞苷; 环磷酰胺 (环磷酰胺 (Cyclophosphamide)); 达克金 (地西他滨); 达沙替尼; 盐酸柔红霉素; 地西他滨; 盐酸阿霉素; 格列卫 (甲磺酸伊马替尼); 甲磺酸伊马替尼; Jakafi (磷酸鲁索替尼); 来那度胺; Mylosar (阿扎胞苷); 环磷酰胺 (环磷酰胺 (Cyclophosphamide)); 尼罗替尼; 来那度胺 (来那度胺); 红比霉素 (盐酸柔红霉素); 磷酸鲁索替尼磷酸盐; 施达赛 (达沙替尼); Tarabine PFS (阿糖胞苷); Tassigna (尼罗替尼); 三氧化二砷 (三氧化二砷); 阿扎胞苷 (阿扎胞苷); Vincasar PFS (硫酸长春新碱); 或硫酸长春新碱。 药物组合 ADE: 阿糖胞苷; 盐酸柔红霉素和依托泊苷

[0401]

神经母细胞瘤	阿霉素 PFS (盐酸阿霉素); 阿霉素 RDF (盐酸阿霉素); Clafen (环磷酰胺); 环磷酰胺; 环磷酰胺 (环磷酰胺(Cyclophosphamide)); 盐酸阿霉素; 环磷酰胺 (环磷酰胺(Cyclophosphamide)); Vincasar PFS (硫酸长春新碱);或硫酸长春新碱。
非霍奇金淋巴瘤	Abitrexate (甲氨蝶呤); Adcetris (Brentuximab Vedotin);阿霉素 PFS (盐酸阿霉素);阿霉素 RDF (盐酸阿霉素); Ambochlorin (苯丁酸氮芥); Amboclorin (苯丁酸氮芥); Arranon (奈拉滨);盐酸苯达莫司汀;百克沙(托西莫单抗和碘 131 托西莫单抗);博莱霉素 (博莱霉素);博莱霉素;硼替佐米;Brentuximab Vedotin;苯丁酸氮芥; Clafen (环磷酰胺); 环磷酰胺; 环磷酰胺 (环磷酰胺(Cyclophosphamide));地尼白介素; DepoCyt (脂质体阿糖胞苷);盐酸阿霉素; DTIC-Dome (达卡巴嗪);重氮片 (甲氨蝶呤);重氮片 PFS (甲氨蝶呤); Folutyn (普拉曲沙);Ibritumomab Tiuxetan;依鲁替尼; Imbruvica (依鲁替尼);甘乐能 (重组干扰素 α -2b); Istodax (罗米地辛);来那度胺;留可然 (苯丁酸氮芥); Linfovizin (苯丁酸氮芥);脂质体阿糖胞苷; Matulane (盐酸丙卡巴肼);甲氨蝶呤;甲氨蝶呤 LPF (甲氨蝶呤);氮甲喋呤钠 (甲氨蝶呤);氮甲喋呤钠-AQ (甲氨蝶呤); Mozobil (普乐沙福);奈拉滨;环磷酰胺 (环磷酰胺(Cyclophosphamide)); ONTAK (地尼白介素);普乐沙福;普拉曲沙;重组干扰素 α -2b;来那度胺 (来那度胺);美罗华 (利妥昔单抗);利妥昔单抗;罗米地辛;托西莫单抗和碘 131 托西莫单抗; 苯达莫司汀 (盐酸苯达莫司汀);长春花碱 (硫酸长春碱);万珂 (硼替

[0402]

	佐米); Velsar (硫酸长春碱); 硫酸长春碱; Vincasar PFS (硫酸长春新碱); 硫酸长春新碱; 伏立诺他; 泽娃灵 (替伊莫单抗); 或伏立诺他 (伏林司他)。 药物组合 CHOP: 环磷酰胺; 盐酸阿霉素 (羟基柔红霉素); 硫酸长春新碱 (长春新碱) 和泼尼松。 COPP: 环磷酰胺; 硫酸长春新碱 (长春新碱); 盐酸丙卡巴肼和泼尼松。 CVP: 环磷酰胺; 硫酸长春新碱和泼尼松。 EPOCH: 依托泊苷; 泼尼松; 硫酸长春新碱 (长春新碱); 环磷酰胺和盐酸阿霉素 (羟基柔红霉素)。 超 CVAD: 环磷酰胺; 硫酸长春新碱; 盐酸阿霉素 (阿霉素) 和地塞米松。 ICE: 异环磷酰胺; 卡铂和依托泊苷。 R-CHOP: 利妥昔单抗; 环磷酰胺; 盐酸阿霉素 (羟基柔红霉素); 硫酸长春新碱 (长春新碱) 和泼尼松。
非小细胞肺癌	甲氨蝶呤 (甲氨蝶呤); 白蛋白结合型紫杉醇 (紫杉醇白蛋白稳定的纳米颗粒制剂); 马来酸阿法替尼; 力比泰 (培美曲塞二钠); 阿瓦斯丁 (贝伐单抗); 贝伐单抗; 卡铂; Ceritinib; 顺铂; 克唑替尼; 多西他赛; 盐酸厄洛替尼; 重氮片 (甲氨蝶呤); 重氮片 PFS (甲氨蝶呤); 吉非替尼; 阿法替尼 (马来酸阿法替尼); 盐酸吉西他滨; 健择 (盐酸吉西他滨); 易瑞沙 (吉非替尼); 甲氨蝶呤; 甲氨蝶呤 LPF (甲氨蝶呤); 氮甲喋呤钠 (甲氨蝶呤); 氮甲喋呤钠-AQ (甲氨蝶呤); 紫杉醇; 紫杉醇白蛋白稳定的纳米颗粒制剂; Paraplat (卡铂); 伯尔 (卡铂); 培美曲塞二钠; 顺铂 (顺铂 (Cisplatin)); 顺铂-AQ (顺铂); 特罗凯 (盐酸厄洛替尼); 紫杉酚 (紫杉

[0403]

	醇), 泰索帝(多西他赛); Xalkori(克里唑蒂尼); 或 Zykadia(Ceritinib)。 药物组合 卡铂-紫杉酚; 卡铂和紫杉醇(紫杉酚)。 吉西他滨-顺铂: 盐酸吉西他滨与顺铂。
卵巢癌	阿霉素 PFS(盐酸阿霉素); 阿霉素 RDF(盐酸阿霉素); 卡铂; Clafen(环磷酰胺); 顺铂; 环磷酰胺; 环磷酰胺(环磷酰胺(Cyclophosphamide)); 盐酸阿霉素; Dox-SL(盐酸阿霉素脂质体); DOXIL(盐酸阿霉素脂质体); 盐酸阿霉素脂质体; 阿霉素脂质体(盐酸阿霉素脂质体); 盐酸吉西他滨; 健择(盐酸吉西他滨); 和美新(盐酸拓扑替康); LipoDox(盐酸阿霉素脂质体); 环磷酰胺(环磷酰胺(Cyclophosphamide)); 紫杉醇; Paraplat(卡铂); 伯尔(卡铂); 顺铂(顺铂(Cisplatin)); 顺铂-AQ(顺铂); 紫杉酚(紫杉醇); 或盐酸拓扑替康。 药物组合 BEP: 博莱霉素; 依托泊苷和顺铂(顺铂(Cisplatin))。 卡铂-紫杉酚: 卡铂和紫杉醇(紫杉酚)。 吉西他滨-顺铂: 盐酸吉西他滨和顺铂。
胰腺癌	氟尿嘧啶(氟尿嘧啶(Fluorouracil)); 依维莫司(依维莫司(Everolimus)); 氟尿嘧啶(氟尿嘧啶(Fluorouracil)); 盐酸厄洛替尼; 依维莫司; 氟尿嘧啶(氟尿嘧啶(Fluorouracil)); 氟尿嘧啶; 盐酸吉西他滨; 健择(盐酸吉西他滨); 丝裂霉素 C; Mitozytrex(丝裂霉素 C); 密吐霉素(丝裂霉素 C); 苹果酸舒尼替尼; 索坦(苹果酸舒尼替尼); 或特罗凯(盐酸厄洛替尼)。

[0404]

	药物组合 吉西他滨-奥沙利铂: 盐酸吉西他滨和奥沙利铂。
阴茎癌	博莱霉素 (博莱霉素); 博莱霉素
直肠癌	氟尿嘧啶 (氟尿嘧啶(Fluorouracil)); 阿瓦斯丁(贝伐单抗); 贝伐单抗; 伊立替康 (盐酸伊立替康); 西妥昔单抗; 氟尿嘧啶(氟尿嘧啶(Fluorouracil)); 爱必妥(西妥昔单抗); 氟尿嘧啶 (氟尿嘧啶(Fluorouracil)); 氟尿嘧啶; 盐酸伊立替康; 帕尼单抗; 瑞格非尼; 瑞格非尼 (瑞格非尼); 维克替比 (帕尼单抗); Zaltrap (阿柏西普);或 Ziv-阿柏西普。 药物组合 CAPOX: 卡培他滨和奥沙利铂。 FOLFIRI: 亚叶酸钙 (亚叶酸); 氟尿嘧啶 L; 盐酸伊立替康。 FOLFIRI-BEVACIZUMAB: 亚叶酸钙 (亚叶酸); 氟尿嘧啶; 盐酸伊立替康和贝伐单抗。 FOLFIRI-CETUXIMAB: 亚叶酸钙 (亚叶酸); 氟尿嘧啶;盐酸伊立替康和西妥昔单抗。 FOLFOX: 亚叶酸钙 (亚叶酸); 氟尿嘧啶和奥沙利铂。 XELOX: 卡培他滨 (希罗达) 和奥沙利铂。
肾细胞癌	依维莫司 (依维莫司(Everolimus));阿地白介素,阿瓦斯丁(Bevacimub); 阿西替尼; 贝伐单抗; 依维莫司, Inlyta (阿西替尼); Nexavar (甲苯磺酸索拉非尼); 苹果酸舒尼替尼; 索坦(苹果酸舒尼替尼); 坦西莫司;Torisel (坦西莫司); 帕唑帕尼 (帕唑帕尼盐酸盐)
视网膜母细胞瘤	Clafen (环磷酰胺); 环磷酰胺; 环磷酰胺 (环磷酰胺 (Cyclophosphamide)); 或环磷酰胺 (环磷酰胺

[0405]

	(Cyclophosphamide)) 。
横纹肌肉瘤	更生霉素 (放线菌素 D) ; 放线菌素 D; Vincasar PFS (硫酸长春新碱) ;或硫酸长春新碱
皮肤癌 (基底细胞癌)	氟尿嘧啶 (氟尿嘧啶(Fluorouracil)) ; 艾达乐(咪喹莫特); 氟尿嘧啶 (氟尿嘧啶(Fluorouracil)) ; 维莫德吉 (维莫德吉); 氟尿嘧啶 (氟尿嘧啶(Fluorouracil)) ; 氟尿嘧啶; 咪喹莫特; 或维莫德吉。
皮肤癌 (黑色素瘤)	阿地白介素; 达卡巴嗪; DTIC-Dome (达卡巴嗪); 伊匹木单抗; 阿地白介素 (阿地白介素); 维罗非尼; 伊匹单抗 (伊匹木单抗);或 Zelboraf (维罗非尼)
小细胞肺癌	甲氨蝶呤 (甲氨蝶呤); 凡毕复(磷酸依托泊苷); 依托泊苷; 磷酸依托泊苷; 重氮片 (甲氨蝶呤); 重氮片 PFS (甲氨蝶呤); 和美新 (盐酸拓扑替康); 甲氨蝶呤; 甲氨蝶呤 LPF (甲氨蝶呤); 氮甲喋呤钠(甲氨蝶呤); 氮甲喋呤钠-AQ (甲氨蝶呤); Toposar (依托泊苷); 盐酸拓扑替康;或凡毕士 (依托泊苷)。
软组织肉瘤	阿霉素 PFS (盐酸阿霉素); 阿霉素 RDF (盐酸阿霉素); 可美净 (放线菌素 D);放线菌素 D;或盐酸阿霉素
睾丸癌	博莱霉素 (博莱霉素); 博莱霉素; 顺铂; 可美净 (放线菌素 D); Cyfos (异环磷酰胺); 放线菌素 D; 凡毕复 (磷酸依托泊苷); 依托泊苷;磷酸依托泊苷; 异环磷酰胺(异环磷酰胺); 异环磷酰胺;异环磷酰胺(异环磷酰胺); 顺铂 (顺铂(Cisplatin)) ; 顺铂-AQ (顺铂); Toposar (依托泊苷); 长春花碱 (硫酸长春碱); Velsar (硫酸长春碱);或凡毕士 (依托泊苷); 硫酸长春碱
甲状腺癌	阿霉素 PFS (盐酸阿霉素) ;阿霉素 RDF (盐酸阿霉素) ;卡博替尼-S-苹果酸; 凡德他尼 (凡德他尼) ; Cometriq (卡博替尼-S-苹果酸);盐酸阿霉素;Nexavar

[0406]

	(甲苯磺酸索拉非尼); 或甲苯磺酸索拉非尼; 凡德他尼
阴道癌	加德西 (重组 HPV 四价疫苗); 或重组人乳头瘤病毒 (HPV) 四价疫苗。
外阴癌	博莱霉素 (博莱霉素 (Bleomycin)); 博莱霉素; 加德西 (重组 HPV 四价疫苗); 或重组人乳头瘤病毒 (HPV) 四价疫苗。
肾母细胞瘤或其它儿童肾癌	阿霉素 PFS (盐酸阿霉素); 阿霉素 RDF (盐酸阿霉素); 更生霉素 (放线菌素 D); 放线菌素 D; 盐酸阿霉素; Vincasar PFS (硫酸长春新碱); 或硫酸长春新碱。

[0407] 在进一步的方面中, mTOR 抑制剂, 例如, 本文所述的 mTOR 抑制剂, 可与以下组合用于治疗方案中: 手术、化疗、放射、免疫抑制剂, 如环孢菌素, 硫唑嘌呤, 甲氨蝶呤, 麦考酚酯和 FK506、抗体或其它免疫消除剂 (immunoablative agent) 如 CAMPATH, 抗 CD3 抗体或其它抗体治疗剂、cytotoxin、氟达拉滨、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、麦考酚酯、类固醇、FR901228、细胞因子和照射。肽疫苗, 如在 Izumoto 等人 2008 J Neurosurg 108:963-971 中描述的。

[0408] 在一个实施方案中, 本文中描述的 mTOR 抑制剂可以与化疗剂组合使用。示例性的化疗剂包括蒽环类抗生素 (例如, 阿霉素 (例如, 脂质体阿霉素))、长春花生物碱 (例如, 长春碱, 长春新碱, 长春地辛, 长春瑞滨)、烷化剂 (例如, 环磷酰胺, 达卡巴嗪, 美法仑, 异环磷酰胺, 替莫唑胺)、免疫细胞抗体 (例如, alemtuzamab, 吉妥珠单抗, 利妥昔单抗, 托西莫单抗)、抗代谢物 (包括, 例如, 叶酸拮抗剂, 嘧啶类似物, 嘌呤类似物和腺苷脱氨酶抑制剂 (例如, 氟达拉滨))、mTOR 抑制剂、TNFR 糖皮质激素诱导的 TNFR 相关蛋白 (GITR) 激动剂、蛋白酶体抑制剂 (例如, 阿克拉霉素 A, 曲霉菌素或硼替佐米)、免疫调节剂, 如沙利度胺或沙利度胺衍生物 (如, 来那度胺)。

[0409] 考虑用于组合疗法中的一般化疗剂包括阿那曲唑 (**Arimidex®**), 比卡鲁胺 (**Casodex®**), 博莱霉素硫酸盐 (**Blenoxane®**), 白消安 (**Myleran®**), 白消安注射液 (**Busulfex®**), 卡培他滨 (**Xeloda®**), N4-戊氧基羰基-5-脱氧-5-氟胞苷, 卡铂 (**Paraplatin®**), 卡莫司汀 (**BiCNU®**), 苯丁酸氮芥 (**Leukeran®**), 顺铂 (**Platinol®**), 克拉屈滨 (**Leustatin®**), 环磷酰胺 (**Cytosan®** 或 **Neosar®**), 阿糖胞苷, 胞嘧啶阿拉伯糖苷 (**Cytosar-U®**), 阿糖胞苷脂质体注射液 (**DepoCyt®**), 达卡巴嗪 (**DTIC-Dome®**), 更生霉素 (放线菌素 D, Cosmegen), 盐酸柔红霉素 (**Cerubidine®**), 柔红霉素柠檬酸脂质体注射液 (**DaunoXome®**), 地塞米松, 多西他赛 (**Taxotere®**), 盐酸阿霉素 (**Adriamycin®**, **Rubex®**), 依托泊苷

(**Vepesid®**), 磷酸氟达拉滨(**Fludara®**), 5-氟尿嘧啶(**Adrucil®**, **Efudex®**), 氟他胺(**Eulexin®**), **tezacitibine**, 吉西他滨(二氟脱氧胞二磷胆碱), 羟基脲(**Hydrea®**), 伊达比星(**Idamycin®**), 异环磷酰胺(**IFEX®**), 伊立替康(**Camptosar®**), L-门冬酰胺酶(**ELSPAR®**), 亚叶酸钙, 美法仑(**Alkeran®**), 6-巯嘌呤(**Purinethol®**), 甲氨蝶呤(**Folex®**), 米托蒽醌(**Novantrone®**), 麦罗塔, 紫杉醇(**Taxol®**), **phoenix** (钇90/MX-DTPA), 喷司他丁, 带有卡莫司汀植入物的聚苯丙生20(**Gliadel®**), 枸橼酸他莫昔芬(**Nolvadex®**), 替尼泊苷(**Vumon®**), 6-巯鸟嘌呤, 噻替派, 替拉扎明(**Tirazone®**), 盐酸拓扑替康注射(**Hycamptin®**), 长春碱(**Velban®**), 长春新碱(**Oncovin®**)和长春瑞滨(**Navelbine®**)。

[0410] 示例性的烷化剂包括,但不限于,氮芥,氮丙啶衍生物,烷基磺酸盐,亚硝基脲和三氮烯:尿嘧啶氮芥(**Aminouracil Mustard®**, **Chlorethaminacil®**, **Demethyldopan®**, **Desmethyldopan®**, **Haemanthamine®**, **Nordopan®**, **Uracil nitrogen mustard®**, **Uracillost®**, **Uracilmostaza®**, **Uramustin®**, **Uramustine®**), 氮芥(**Mustargen®**), 环磷酰胺(**Cytoxan®**, **Neosar®**, **Clafen®**, **Endoxan®**, **Procytox®**, **Revimmune™**), 异环磷酰胺(**Mitoxana®**), 美法仑(**Alkeran®**), 苯丁酸氮芥(**Leukeran®**), 哌泊溴烷(**Amedel®**, **Vercyte®**), 三乙撑蜜胺(**Hemel®**, **Hexalen®**, **Hexastat®**), **triethylenethiophosphoramine**, 替莫唑胺(**Temodar®**), 噻替派(**Thioplex®**), 白消安(**Busilvex®**, **Myleran®**), 卡莫司汀(**BiCNU®**), 洛莫司汀(**CeeNU®**), 链脲霉素(**Zanosar®**)和达卡巴嗪(**DTIC-Dome®**)。其它示例性的烷化剂包括,但不限于,奥沙利铂(**Eloxatin®**); 替莫唑胺(**Temodar®**和**Temodal®**); 更生霉素(也称为放线菌素-D, **Cosmegen®**); 美法仑(也称为L-PAM, L-沙可来新和苯丙氨酸氮芥, **Alkeran®**); 六甲蜜胺(也称为六甲基蜜胺(HMM), **Hexalen®**); 卡莫司汀(**BiCNU®**); 苯达莫司汀(**Treanda®**); 白消安(**Busulfex®**和**Myleran®**); 卡铂(**Paraplatin®**); 洛莫司汀(也称为CCNU, **CeeNU®**); 顺铂(也称为CDDP, **Platinol®**和**Platinol®-AQ**); 苯丁酸氮芥(**Leukeran®**); 环磷酰胺(**Cytoxan®**和**Neosar®**); 达卡巴嗪(也称为DTIC, DIC和咪唑羧酰胺, **DTIC-Dome®**); 六甲蜜胺(也称为六甲基蜜胺(HMM), **Hexalen®**); 异环磷酰胺(**Ifex®**); **Prednumustine**; 丙卡巴肼(**Matulane®**); 二氯甲基二乙胺(也称为氮芥, 氮芥和**mechloroethamine hydrochloride**, **Mustargen®**); 链脲佐菌素(**Zanosar®**); 噻替派(也称为硫代磷胺, **TESPA**和**TSPA**, **Thioplex®**); 环磷酰胺(**Endoxan®**, **Cytoxan®**, **Neosar®**, **Procytox®**, **Revimmune®**); 和盐酸苯达

莫司汀(**Treanda®**)。

[0411] 示例性的免疫调节剂包括,例如,阿托珠单抗(购自**Roche®**);培非司亭(**Neulasta®**);来那度胺(CC-5013,**Revlimid®**);沙利度胺(**Thalomid®**), actimid(CC4047);和IRX-2(人细胞因子的混合物,包括白细胞介素1,白细胞介素2,和干扰素 γ ,CAS 951209-71-5,可获自IRX Therapeutics)。

[0412] 示例性的蒽环类抗生素包括,例如,阿霉素(**Adriamycin®**和**Rubex®**);博来霉素(**lenoxane®**);柔红霉素(盐酸柔红霉素、道诺霉素和盐酸红比霉素,**Cerubidine®**);柔红霉素脂质体(柔红霉素柠檬酸脂质体,**DaunoXome®**);米托蒽醌(DHAD,**Novantrone®**);表柔比星(Ellence);伊达比星(**Idamycin®**, Idamycin **PFS®**);丝裂霉素C(**Mutamycin®**);格尔德霉素;除莠霉素;茴香霉素;和脱乙酰茴香霉素。

[0413] 示例性长春花生物碱包括,例如,酒石酸长春瑞滨(**Navelbine®**),长春新碱(**Oncovin®**)和长春地辛(**Eldisine®**);长春碱(也称为硫酸长春碱,长春花碱和VLB,**Alkaban-AQ®**和**Velban®**);和长春瑞滨(**Navelbine®**)。

[0414] 典型的蛋白酶抑制剂包括硼替佐米(**Velcade®**);卡非佐米(PX-171-007, (S)-4-甲基-N-(((S)-1-(((S)-4-甲基-1-((R)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-1-氧代戊烷-2-基)氨基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基)-2-((S)-2-(2-吗啉代乙酰氨基)-4-苯基丁酰胺)-戊酰胺);marizomib(NPI-0052);ixazomib柠檬酸盐(MLN-9708);delanzomib(CEP-18770);以及O-甲基-N-[(2-甲基-5-噻唑基)羰基]-L-丝氨酸-O-甲基-N-[(1S)-2-[(2R)-2-甲基-2-环氧乙烷基]-2-氧代-1-(苯基甲基)乙基]-L-丝氨酸酰胺(ONX-0912)。

[0415] 示例性GITR激动剂包括,例如,GITR融合蛋白和抗GITR抗体(例如,二价抗GITR抗体)如,例如,美国专利号:6,111,090,欧洲专利号:090505B1,美国专利号:8,586,023,PCT公开号:W0 2010/003118和2011/090754中描述的GITR融合蛋白,或,例如,美国专利号.:7,025,962,欧洲专利号:1947183B1,美国专利号:7,812,135,美国专利号:8,388,967,美国专利号:8,591,886,欧洲专利号:EP 1866339,PCT公开号:W0 2011/028683,PCT公开号.:W0 2013/039954,PCT公开号:W02005/007190,PCT公开号:W0 2007/133822,PCT公开号:W02005/055808,PCT公开号:W0 99/40196,PCT公开号:W0 2001/03720,PCT公开号:W099/20758,PCT公开号:W02006/083289,PCT公开号:W0 2005/115451,美国专利号:7,618,632,和PCT公开号:W0 2011/051726中描述的抗GITR抗体。

[0416] 在一个实施方案中,本文中描述的mTOR抑制剂以低、免疫增强剂量与蛋白质酪氨酸磷酸酶抑制剂组合施用给受试者,例如,与本文所述的蛋白质酪氨酸磷酸酶抑制剂组合。在一个实施方案中,蛋白质酪氨酸磷酸酶抑制剂是SHP-1抑制剂,例如,本文所述的SHP-1抑制剂,如,例如,葡萄糖酸铈钠。在一个实施方案中,蛋白质酪氨酸磷酸酶抑制剂是SHP-2抑制剂,例如,本文所述的SHP-2抑制剂。

[0417] 在一个实施方案中,低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂,例如,变构抑制剂,例如,RAD001或催化抑制剂与激酶抑制剂组合施用。

[0418] 在一个实施方案中,激酶抑制剂是MNK抑制剂,例如选自CGP052088;4-氨基-3-(对氟苯基氨基)-吡唑并[3,4-d]嘧啶(CGP57380);尾孢素酰胺(cercosporamide);ETC-1780445-2和4-氨基-5-(4-氟苯胺基)-吡唑并[3,4-d]嘧啶的MNK抑制剂。MNK抑制剂可以是,例如,MNK1a,MNK1b,MNK2a和/或MNK2b抑制剂。在一个实施方案中,激酶抑制剂为4-氨基-5-(4-氟苯胺基)-吡唑并[3,4-d]嘧啶。

[0419] 在一个实施方案中,激酶抑制剂是选自7-环戊基-N,N-二甲基-2-((5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-甲酰胺(也称为LEE011);aloesine A;夫拉平度或HMR-1275,2-(2-氯苯基)-5,7-二羟基-8-[(3S,4R)-3-羟基-1-甲基-4-哌啶基]-4-chromenone;克唑替尼(PF-02341066;2-(2-氯苯基)-5,7-二羟基-8-[(2R,3S)-2-(羟甲基)-1-甲基-3-吡咯烷基]-4H-1-苯并吡喃-4-酮,盐酸盐(P276-00);1-甲基-5-[[2-[5-(三氟甲基)-1H-咪唑-2-基]-4-吡啶基]氧基]-N-[4-(三氟甲基)苯基]-1H-苯并咪唑-2-胺(RAF265);indisulam(E7070);roscovitine(CYC202);帕布昔利布(PD0332991);dinaciclib;(SCH727965)N-[5-[[5-(叔丁基恶唑-2-基)甲基]硫代]噻唑-2-基]哌啶-4-甲酰胺(BMS387032);4-[[9-氯-7-(2,6-二氟苯基)-5H-嘧啶并[5,4-D][2]苯并氮卓杂-2-基]氨基]-苯甲酸(MLN8054);5-[3-(4,6-二氟-1H-苯并咪唑-2-基)-1H-吡唑-5-基]-N-乙基-4-甲基-3-吡啶甲胺(AG-024322);4-(2,6-二氯苯甲酰胺)-1H-吡唑-3-羧酸N-(哌啶-4-基)酰胺(AT7519);4-(2-甲基-1-(1-甲基乙基)-1H-咪唑-5-基)-N-[4-(甲磺酰基)苯基]-2-嘧啶胺(AZD5438)和XL281(BMS908662)的CDK4抑制剂。

[0420] 在一个实施方案中,激酶抑制剂是CDK4抑制剂,例如,本文中所描述的CDK4抑制剂,例如,CDK4/6抑制剂,如,例如,7-环戊基-N,N-二甲基-2-((5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-甲酰胺(也称为LEE011)或6-乙酰基-8-环戊基-5-甲基-2-(5-哌嗪-1-基-吡啶-2-基氨基)-8H-吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-酮,盐酸盐(也称为帕布昔利布或PD0332991)。

[0421] 在一个实施方案中,激酶抑制剂是CDK4抑制剂,例如,帕布昔利布(PD0332991),帕布昔利布以剂量为约50mg,60mg,70mg,75mg,80mg,90mg,100mg,105mg,110mg,115mg,120mg,125mg,130mg,135mg(例如,75mg,100mg或125mg)的每天剂量施用持续一段时间,例如,每天施用,持续28天周期的14-21天,或每天施用,持续21天周期的7-12天。在一个实施方案中,帕布昔利布施用1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12或更多个周期。

[0422] 在一个实施方案中,激酶抑制剂是BTK抑制剂,例如选自依鲁替尼(PCI-32765);GDC-0834;RN-486;CGI-560;CGI-1764;HM-71224;CC-292;ONO-4059;CNX-774和LFM-A13。

[0423] 在一个实施方案中,激酶抑制剂是BTK抑制剂,例如依鲁替尼(PCI-32765),依鲁替尼以约250mg,300mg,350mg,400mg,420mg,440mg,460mg,480mg,500mg,520mg,540mg,560mg,580mg,600mg(例如,250mg,420mg或560mg)的每天剂量施用持续一段时间,例如,每天施用,持续21天周期,或每天施用,持续28天周期。在一个实施方案中,依鲁替尼施用1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12或更多个周期。

[0424] 在一个实施方案中,激酶抑制剂是mTOR抑制剂。mTOR抑制剂选自本文其它地方题为mTOR抑制剂的部分。这里所指的剂量不是低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂,而是足以给予抗癌效果的剂量,并且比本文中所描述的低、免疫增强剂量高,例如,剂量。因此,在一个实施方案中,给出两种不同的mTOR抑制剂施用,例如,优化免疫效应细胞功能的低、免疫增强

剂量,和用于抗癌效果的较高的剂量。

[0425] 在一个实施方案中,激酶抑制剂是mTOR抑制剂,例如雷帕霉素,雷帕霉素以足以给予抗癌效果的剂量施用,该剂量比文中所述的低、免疫增强剂量高,例如,以约3mg,4mg,5mg,6mg,7mg,8mg,9mg,10mg(例如,6mg)的每天剂量施用一段时间,例如每天施用,持续21天周期,或每天施用,持续28天周期。在一个实施方案中,雷帕霉素施用1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12或更多个周期。

[0426] 在一个实施方案中,激酶抑制剂是mTOR抑制剂,例如依维莫司,依维莫司以足以给予抗癌效果的剂量施用,该剂量比文中所述的低、免疫增强剂量高,例如,以约2mg,2.5mg,3mg,4mg,5mg,6mg,7mg,8mg,9mg,10mg,11mg,12mg,13mg,14mg,15mg(例如,10mg)每天的剂量施用一段时间,例如每天施用,持续28天周期。在一个实施方案中,依维莫司施用1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12或更多个周期。

[0427] 在另一个方面,mTOR抑制剂,例如,本文所述的mTOR抑制剂,可以以低、免疫增强剂量与其它试剂组合施用,所述其它试剂抑制一种或多种抑制性分子,例如,PD1,PD-L1,CTLA4,TIM3,LAG3,VISTA,BTLA,TIGIT,LAIR1,CD160,2B4和TGFR β 。如本文所述,例如,通过在DNA、RNA或蛋白质水平抑制抑制性分子,可导致增加的免疫功能。在实施方案中,抑制性核酸,例如,抑制性核酸,例如dsRNA,例如siRNA或shRNA,可用于抑制一种抑制性分子的表达。在一个实施方案中,抑制剂是shRNA。在一个实施方案中,抑制性信号的抑制剂可以是,例如,结合抑制性分子的抗体或抗体片段。例如,试剂可以是结合PD1,PD-L1,PD-L2或CTLA4(例如,伊匹木单抗(也称为MDX-010和MDX-101,销售为**Yervoy®**;Bristol-Myers Squibb;Tremelimumab(可购自辉瑞的IgG2单克隆抗体,原名ticilimumab,CP-675206))的抗体或抗体片段。在一个实施方案中,试剂是结合TIM3的抗体或抗体片段。在一个实施方案中,试剂是结合LAG3的抗体或抗体片段。

[0428] 在一个实施方案中,mTOR抑制剂可以以低、免疫增强剂量与PD1的抑制剂组合使用,例如,与PD1和其天然配体之一相互作用的抑制剂组合使用。在一个实施方案中,mTOR抑制剂第一施用,例如,直到PD1阳性T细胞水平降低,才施用PD1抑制剂。在一个实施方案中,mTOR抑制剂与PD1抑制剂同时施用或在PD1抑制剂之后施用。

[0429] PD1还包括CD28、CTLA-4、ICOS和BTLA的受体CD28家族中的抑制性成员。PD1在活化的B细胞、T细胞和骨髓细胞中表达(Agata等人1996Int. Immunol 8:765-75)。已经表明PD1的两个配体,PD-L1和PD-L2在结合PD1后下调T细胞活化(Freeman等人,2000J Exp Med 192:1027-34;Latchman等人.2001Nat Immunol 2:261-8;Carter等人.2002Eur J Immunol 32:634-43)。PD-L1在人类癌症中丰富(Dong等人.2003J Mol Med 81:281-7;Blank等人.2005Cancer Immunol.Immunother 54:307-314;Konishi等人.2004Clin Cancer Res 10:5094)。可通过抑制PD1与PD-L1的局部相互作用逆转免疫抑制。PD1,PD-L1和PD-L2的抗体、抗体片段、和其它抑制剂是本领域中可用的并且可以与本文所述的mTOR抑制剂组合使用。例如,nivolumab(也被称作BMS-936558或MDX1106;Bristol-Myers Squibb)是完整人IgG4单克隆抗体,其特异性阻断PD1.Nivolumab(克隆5C4)和特异性结合PD1的其它人单克隆抗体在US 8,008,449和W02006/121168中公开。Pidilizumab(CT-011;Cure Tech)是结合PD1的人源化IgG1k单克隆抗体,Pidilizumab和其它人源化抗PD1单克隆抗体在W02009/101611中公开。Lambrolizumab(也称为MK03475;Merck)是结合PD1的人源化IgG4单克隆抗体。

Lambrolizumab和其它人源化抗PD1抗体在US 8,354,509和W02009/114335中公开。MDPL3280A(Genentech/Roche)是人Fc优化的IgG1单克隆抗体,其结合PD-L1。MDPL3280A和其它PD-L1的人单克隆抗体在美国专利号:7,943,743和美国公开号:20120039906中公开。其它抗PD-L1的结合剂包括YW243.55.S70(重和轻链可变区显示在W02010/077634中的SEQ ID NO 20和21)和MDX-1 105(也称为BMS-936559,和,例如,W02007/005874中公开的抗PD-L1结合剂)。AMP-224(B7-DCIg;Amplimmune;例如,在W02010/027827和W02011/066342中公开的),是PD-L2Fc融合可溶性受体,其阻断PD1和B7-H1之间的相互作用。其它抗PD1抗体包括AMP 514(Amplimmune)等,例如,抗PD1抗体在US 8,609,089,US 2010028330,和/或US 20120114649中公开。

[0430] 在一些实施方案中,mTOR抑制剂,例如,本文所述的mTOR抑制剂,以低、免疫增强剂量施用给病毒感染(例如,本文所述的病毒感染)的受试者。受试者可以接受其它治疗剂(如该类型病毒感染的批准药物)与mTOR抑制剂组合的治疗。可以用在本发明的组合物和方法中的示例性抗病毒剂包括,但不限于:阿巴卡韦;阿昔洛韦;阿德福韦;金刚烷胺;安普那韦;安普利近;阿比朵尔;阿扎那韦;Atripla;Balavir;Boceprevirertet;西多福韦;双汰芝;Dolutegravir;达芦那韦;拉韦定;去羟肌苷;二十二烷醇;依度尿苷;依法韦仑;恩曲他滨;恩夫韦肽;恩替卡韦;Ecoliever;泛昔洛韦;福米韦生;福沙那韦;膦甲酸钠;膦乙酸;更昔洛韦;伊巴他滨;Imunovir;碘苷;咪喹莫特;茚地那韦;肌苷;干扰素;干扰素I型;干扰素II型;干扰素III型;拉米夫定;洛匹那韦;洛韦胺;马拉韦罗;吗啉胍;美替沙脞;奈非那韦;奈韦拉平;Nexavir;核苷类似物;奥司他韦(达菲);培干扰素 α -2a;喷昔洛韦;帕拉米韦;普来可那立;鬼臼毒素;拉替拉韦;利巴韦林;金刚乙胺;利托那韦;Pyrimidine;沙奎那韦;索非布韦;司他夫定;替拉瑞韦;替诺福韦;替诺福韦酯化物;替拉那韦;曲氟尿苷;三协唯;醋胺金刚烷;恩曲他滨;/;traporved;伐昔洛韦;缬更昔洛韦;Vicriviroc;阿糖腺苷;伟拉咪定(Viramidine);扎西他滨;扎那米韦和齐多夫定。

[0431] 在一个实施方案中,方法进一步包括与抗细菌、抗分支杆菌、抗真菌或抗寄生虫或原生动试剂组合施用低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂。

[0432] 药物组合物

[0433] 在一个方面,本发明涉及包含mTOR抑制剂,例如,如本文所描述的mTOR抑制剂的药物组合物。在一些实施方案中,mTOR抑制剂被配制用于与另一种试剂,例如,如本文所述的试剂组合施用。

[0434] 在一个方面,本发明涉及包含如本文所描述的mTOR抑制剂的药物组合物,其有可能与抗原组合,如与疫苗或疫苗抗原组合。

[0435] 一般而言,本发明的化合物将以如上所述的治疗有效量经由任何本领域中已知的常用和可接受的方式、或者单独施用或者与一种或多种治疗剂(例如,疫苗或其它抗原)组合施用。

[0436] 可以使用常规的溶解和混合方法来制备药物制剂。例如,原料药物质(例如,mTOR抑制剂或化合物的稳定形式(例如,与环糊精衍生物或其它已知的复合剂复合)溶解在适当的溶剂中,所述溶剂中存在本文描述中一种或多种赋形剂。mTOR抑制剂通常被配制成药物剂型,以提供药物的容易控制的剂量和为病人提供简洁和易处理的产品。

[0437] 本发明的化合物可以作为药物组合物通过任何常规途径施用,特别是肠内施用,

例如口服,例如以片剂或胶囊形式施用,或肠胃外施用,例如,以可注射溶液或悬浮液形式、局部施用,例如以洗剂、凝胶、软膏或乳膏的形式施用,或鼻内或栓剂形式施用。其中,mTOR抑制剂与如本文描述的另一试剂组合施用(同时或分开地),在一个方面中,两种成分可以通过相同的途径(例如,肠胃外)施用。可替代地,另一种试剂可以通过相对于mTOR抑制剂不同的途径施用。例如,mTOR抑制剂可以口服施用,而另一试剂可以肠胃外施用。可以以常规方式通过混合、制粒或包衣方法制备组合有至少一种药学上可接受的载体或稀释剂的包含游离形式的或药学上可接受的盐形式的mTOR抑制剂的药物组合物。例如,口服组合物可以是片剂或明胶胶囊,其包含活性成分与a)稀释剂,例如,乳糖、葡萄糖、蔗糖、甘露醇、山梨醇、纤维素和/或甘氨酸;b)润滑剂,例如二氧化硅、滑石粉、硬脂酸、其镁或钙盐和/或聚乙二醇;对于片剂还包含c)粘合剂,例如,硅酸镁铝、淀粉糊、明胶、西黄蓍胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和或聚乙烯吡咯烷酮;如果需要,d)崩解剂,例如淀粉、琼脂、海藻酸或其钠盐、或泡腾混合物;和/或e)吸附剂、着色剂、调味剂和甜味剂。口服制剂还可以包含活性成分与20-60%的Eudragit EP0、羟丙基纤维素EF、羟丙基甲基纤维素、或Kollidon VA64,以及高达5%的普朗尼克F68、聚氧乙烯蓖麻油、或单硬脂酸甘油酯(Gelucire)44/14。可注射组合物可以是等渗水溶液或混悬液,栓剂可以由脂肪乳剂或混悬剂制备。组合物可以被灭菌和/或含有佐剂,例如防腐剂、稳定剂、润湿剂或乳化剂、溶液促进剂、用于调节渗透压的盐和/或缓冲剂。此外,其还可以含有其它治疗上有价值的物质。用于透皮应用的合适的制剂包含有效量的本发明的化合物和载体。载体可以包括可吸收的药学上可接受的溶剂,以协助通过宿主的皮肤。例如,透皮装置是绷带的形式,其包含背衬部件、含有化合物(任选和载体)的储库、任选速率控制屏障从而以受控和预定的速率在延长的时间期间将化合物递送至宿主皮肤、以及将装置固定在皮肤上的设备。还可以使用基质透皮制剂。在进一步的方面,本文中描述的mTOR抑制剂可以经由微针贴剂施用。基于微针的药物递送是本领域熟知的(参见,例如,美国专利8,162,901),这些技术和方法可以由本领域技术人员调整,用于施用如本文所述的mTOR抑制剂。用于局部应用的适宜制剂,例如用于皮肤和眼睛的的适宜制剂,优选是本领域中公知的水溶液、软膏、乳膏或凝胶。这类制剂可以含有增溶剂、稳定剂、张力增强剂、缓冲剂和防腐剂。

[0438] 用于应用的药物组合物(或制剂)可以以多种方式包装,这取决于用于施用药物的方法。一般地,用于分配的物品包括容器,其中药物制剂以适当的形式储存。合适的容器是那些本领域技术人员公知的,包括如瓶(塑料和玻璃)、药囊、安瓿、塑料袋、金属圆筒等的物质。容器还可以包括防干扰组件,以防止不慎进入包装的内容物。此外,在该容器上具有描述容器内含物的标签。标签还可以包括适当的警告。本发明还提供了药物组合,例如试剂盒,所述试剂盒包括:a)第一试剂,其是游离形式或药学上可接受的盐形式的如本文所公开的mTOR抑制剂的,和b)至少一种其它试剂。所述试剂盒可包含用于其施用的说明书。

[0439] 如本文所使用的术语“药物组合”是指由混合或组合一种以上的活性成分得到的产品,其包括固定和非固定的活性成分组合。术语“固定组合”是指活性成分,例如mTOR抑制剂和其它试剂,以单一实体或剂量的形式同时施用于患者。术语“非固定组合”指活性成分,例如mTOR抑制剂和其它试剂,作为分开的实体,没有具体的时间限制地同时、并行或相继施用于患者,其中这类施用在患者体内提供两种化合物的治疗有效水平。后者还适用于鸡尾酒疗法,例如3个或更多的活性成分的施用。

[0440] 缓释

[0441] 本文公开的mTOR抑制剂,例如变构的mTOR抑制剂或催化mTOR抑制剂,可以作为药物制剂以口服固体剂型的形式来提供,所述药物制剂包含本文公开的mTOR抑制剂,例如雷帕霉素或RAD001,其满足产品稳定性的要求和/或具有比立即释放(IR)片剂有利的药物动力学性质,如降低的平均血浆峰浓度、降低的药物吸收程度和血浆峰浓度中患者间和患者内的差异性、降低的 $C_{\max}/C_{\min}$ 比和/或降低的食物效果。提供的药物制剂可以允许更精确的剂量调整和/或降低的副作用的频率,从而为施用本文公开的mTOR抑制剂,例如雷帕霉素或RAD001的患者提供更安全的治疗。

[0442] 在一些实施方案中,本公开提供了本文所公开的mTOR抑制剂(例如,雷帕霉素或RAD001)的稳定的延长释放的制剂,其是多颗粒系统,并且可以具有功能层和包衣。

[0443] 如本文所使用的术语“延长释放的多颗粒制剂是指一种制剂,其能在延长的时间期间(例如在至少1,2,3,4,5或6小时的时间期间)释放本文公开的mTOR抑制剂,例如雷帕霉素或RAD001。延长释放的制剂可以含有由例如,如本文所述的特殊的赋形剂制备的基质和包衣,其以使活性成分在摄取之后可在延长的时间期间被利用的方式配制。

[0444] 术语“延长释放”可以与术语“缓释”(SR)或“持续释放”互换使用。根据欧洲药典(第7版)片剂和胶囊专著的定义和USP关于药物剂型的概述性章节<1151>,术语“延长释放”涉及口服给药后不立即释放活性药物,而是延长释放的药物制剂。如本文中使用的术语“立即释放”(IR)是指根据“Guidance for Industry:“Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms”(FDA CDER,1997)的定义,在少于60分钟内释放活性药物的85%的药物制剂。在一些实施方案中,术语“立即释放”是指在30分钟的时间内,从片剂释放everolimus,例如,如在本文中所描述的溶出测定法中测定。

[0445] 本文公开的mTOR抑制剂,例如雷帕霉素或RAD001的稳定的延长释放制剂可使用本领域已知的测定法通过体外释放曲线来表征,如本文所述的溶出测定法:含有十二烷基硫酸钠0.2%的900mL磷酸盐缓冲液pH 6.8在37℃下注入溶出容器,分别根据USP根据USP试验专著711和欧洲药典测试专著2.9.3,使用桨法(paddle method)在75rpm进行溶出。

[0446] 在一些实施方案中,在体外释放测定法中本文公开的mTOR抑制剂,例如雷帕霉素或RAD001的稳定的延长释放制剂,根据以下释放说明释放mTOR抑制剂:

[0447] 0.5小时:<45%,或<40,例如,<30%

[0448] 1小时:20-80%,例如30-60%

[0449] 2小时:>50%,或>70%,例如>75%

[0450] 3小时:>60%,或>65%,例如>85%,例如>90%。

[0451] 在一些实施方案中,在体外溶出试验中本文公开的mTOR抑制剂,例如雷帕霉素或RAD001的稳定的延长释放制剂,释放50%的mTOR抑制剂不早于45,60,75,90,105分钟或120分钟。

[0452] 在一个实施方案中,本文公开的mTOR抑制剂,例如雷帕霉素或RAD001的稳定的延长释放制剂,包含快速溶解或崩解载体基质中的mTOR抑制剂和包衣,其中包衣中的至少一个是延长释放的包衣。在另一个实施方案中,本文公开的mTOR抑制剂,例如雷帕霉素或RAD001的稳定的延长释放制剂,包含具有延长释放特性的非崩解载体基质中的mTOR抑制剂,其可以任选地与另外的包衣组合。

[0453] 在一些实施方案中,载体基质包括基质形成剂(matrix former),典型地基质形成聚合物,并且可以含有另外的赋形剂,如填充剂,例如乳糖、甘露醇、麦芽糖糊精、预胶化淀粉、磷酸钙、或微晶纤维素和崩解剂,例如,玉米淀粉、croscamellose、羧甲基淀粉钠、或交聚维酮,抗氧化剂,如丁基羟基苯甲醚、丁基羟基甲苯、抗坏血酸棕榈酸酯、生育酚、维生素E聚乙二醇琥珀酸酯,和加工增强剂,如润滑剂和助流剂,例如胶态二氧化硅、滑石、单硬脂酸甘油酯、硬脂酸镁、硬脂酸钙或硬脂酰富马酸钠。术语“基质形成剂”通常涉及提供物理稳定性的药学惰性物质,如,例如提供机械或结合稳定性。

[0454] 用于快速溶解或崩解载体基质的合适的基质形成聚合物在本领域中是已知的,包括,例如纤维素或淀粉,例如微晶纤维素(“MCC”),例如Avicel PH 101(FMC BioPolymer),阿拉伯树胶,藻酸钠,明胶,淀粉,预明胶化(pregelatinised)淀粉,甲基纤维素,羟丙基甲基纤维素(“HPMC”),羟丙基纤维素,羟乙基纤维素,聚乙二醇或聚乙烯吡咯烷酮(“PVP”),角叉菜,如Gelcarin GP 812或其组合。

[0455] 用于具有延长释放特性的非崩解载体基质的合适的基质形成赋形剂是本领域中公知的,包括例如阿拉伯胶,藻酸钠,明胶,羧甲基纤维素(carboxymethylcellulose)钠,(或“CMC钠”),甲基纤维素,乙基纤维素和乙酸纤维素或聚丙烯酸酯,例如,甲基丙烯酸铵共聚物(Eudragit RS/RL),羟丙基甲基纤维素(“HPMC”),羟丙基纤维素,羟乙基纤维素,聚乙酸乙烯酯,聚乙二醇或聚乙烯吡咯烷酮(“PVP”),例如,角叉菜,如Gelcarin GP 812,单硬脂酸甘油酯,硬脂醇,硬脂酸,山嵛酸甘油酯,维生素E聚乙二醇琥珀酸酯,或其组合。

[0456] 在一个实施方案中,延长释放的包衣是由不溶于水、非崩解的聚合物形成的层,其通过药物穿过该层的渗透控制释放。

[0457] 延长释放的包衣还可含有成孔剂、增塑剂、和加工增强剂,如润滑剂和抗粘着剂中的一种或多种。能够使扩散受控释放的形成延长释放的包衣的合适的聚合物是本领域中已知的,包括例如乙基纤维素和乙酸纤维素或聚丙烯酸酯,例如,甲基丙烯酸铵共聚物(Eudragit RS/RL)、聚醋酸乙烯酯或其组合。在一个具体的实施方案中,形成延长释放的包衣的聚合物是乙基纤维素或醋酸纤维素或聚丙烯酸酯,例如,甲基丙烯酸铵共聚物A型(Eudragit RS)或甲基丙烯酸铵共聚物B型(Eudragit RL)或其组合。此外,延长释放的包衣可包括增塑剂,如甘油三乙酸酯(triacetate)、柠檬酸三乙酯、癸二酸二丁酯、癸二酸二乙酯、聚乙二醇3000、4000或6000、乙酰柠檬酸三乙酯、乙酰柠檬酸三丁酯、或邻苯二甲酸二乙酯、和/或抗粘着剂,如Sylolid 244FP、滑石、单硬脂酸甘油酯、或二氧化钛。在一些实施方案中,增塑剂的量可以是相对于缓释聚合物的量的5至40%之间,优选10至25%之间。

[0458] 在一个实施方案中,延长释放的包衣是孔形成系统,其包含不溶于水的包衣形成聚合物和成孔剂。术语“成孔剂”涉及易溶赋形剂,其允许引入孔或增加包衣的渗透性,和活性成分的扩散受控释放。在本领域中是公知的合适的成孔剂包括例如羟丙基纤维素(HPC(例如,KlucelTMEF,EXF,LF)、或羟丙基甲基纤维素(HPMC,例如,MethocelTME3/E5,Pharmacoat 603TM)、聚乙二醇(如Macrogol 1500,3500,4000,6000)、泊洛沙姆188(Pluronic F68TM)或聚维酮(PVP,例如Kollidon K25/K30)、糖类,例如单糖,如葡萄糖、甘露糖、果糖、二糖,如蔗糖或glucodifructose或其组合。优选地,成孔剂是羟丙基纤维素(HPC(KlucelTMEF,EXF,LF)、或羟丙基甲基纤维素(HPMC,MethocelTME3/E5,Pharmacoat 603TM)、聚乙二醇(Macrogol 1500,3500,4000,6000)、泊洛沙姆188(Pluronic F68TM)或聚维酮

(PVP, Kollidon K25/K30)或其组合。在一些实施方案中,包含在包衣中的成孔剂的合适量等于包衣聚合物与成孔剂的比率,例如100:20至100:50,或100:20至100:100,优选100:35至100:45的比率,尤其是100:35至100:50的比率,相对于包衣形成聚合物的量。在一些实施方案中,包含的包衣形成聚合物的合适量等于聚合物重量增加的百分比,例如,药物制剂总重量的4%至15%,5%至15%,优选5%至12%,更优选为6%至12%的重量。

[0459] 在另一个实施方案中,非崩解延长释放的载体基质包括基质形成聚合物,其通过聚合物的水合能够使活性成分的扩散受控释放。延长载体基质可以含有其它赋形剂,如粘合剂和或填充剂和加工增强剂,如润滑剂和助流剂等等。

[0460] 以下示例性基质形成聚合物可以用于扩散受控释放:藻酸钠、聚丙烯酸(或“卡波姆”)、羧甲基纤维素钠、(或“CMC钠”)、甲基纤维素、乙基纤维素和乙酸纤维素或聚丙烯酸酯,如,甲基丙烯酸铵共聚物(Eudragit RS/RL)、不同粘度等级(即平均聚合物链长度)的羟丙基甲基纤维素(“HPMC”)和其组合,例如,Methocel™CR等级,羟丙基纤维素,例如Klucel™HF/MF,聚氧乙烯,例如,POLYOX™或聚乙烯吡咯烷酮(“PVP”),例如,PVP K60,K90,角叉菜胶,如Viscarin™GP-209/GP-379,或其组合。基质形成聚合物的组合允许根据需要调整活性成分的溶出速率。

[0461] 在一些实施方案中,非崩解的延长释放基质由赋形剂形成,其允许活性成分通过受控侵蚀释放。侵蚀受控基质可以包含亲脂性基质形成剂,并且还进一步包含赋形剂,如填充剂、崩解剂和加工增强剂,如润滑剂和助流剂。与该基质类型相关的示例性亲脂性基质形成赋形剂包括亲脂性赋形剂,如单硬脂酸甘油酯,例如,Cutina GMS,山嵛酸甘油酯,例如,Compritol 888 AT0,硬脂醇,硬脂酸,哈特脂肪,例如,Gelucire™或维生素E聚乙二醇琥珀酸酯,例如,Speziol TPGS或其组合。

[0462] 示例性的合适的粘合剂、填充剂或其它赋形剂包括,但不限于,甘露糖醇、预胶化淀粉、微晶纤维素、乳糖、磷酸钙、滑石、二氧化钛、柠檬酸三乙酯、气相二氧化硅、抗氧化剂,如,例如BHT,干燥剂和崩解剂,如,例如交聚维酮或羧甲基淀粉钠、淀粉、或交联甲羧纤维素。

[0463] 在一个实施方案中,稳定的延长释放制剂包含如本文公开的mTOR抑制剂,例如雷帕霉素或RAD001,存在于快速溶解/崩解基质中,例如,其以如本文所述的固体分散体形式,以及功能层或包衣,其中功能层或包衣的至少一个具有释放控制行为,能够使活性成分延长释放。在另一个实施方案中,稳定的延长释放制剂包含在延长释放基质中的本文公开的mTOR抑制剂,例如雷帕霉素或RAD001,任选地可进一步包含功能层或包衣,如保护性或缓释层或包衣。在一些实施方案中,包衣,例如,延长释放的包衣可以具有范围10至100μm,例如10至50μm的厚度(由共焦RAMAN光谱评估)。

[0464] 在一些实施方案中,本文公开的mTOR抑制剂,例如雷帕霉素或RAD001的配方,是多颗粒递送系统的形式。在一些实施方案中,多颗粒药物递送系统是由多个小的离散剂量单位组成的口服剂型。在这样的系统中,药物剂型如胶囊、片剂、药囊或片装(stickpack),可含有多个亚单位,典型地由几十到几百或甚至高达数千的具有0.05-2.00mm直径的球形颗粒组成。大小1.5-3mm的制剂,例如迷你片,呈现另一种选择。剂型可被设计为在胃内迅速崩解释放多颗粒。不希望受特定理论的束缚,认为多颗粒在胃肠腔内扩散和将逐渐从胃排空,以受控方式释放药物。

[0465] 在一个实施方案中,例如,多颗粒递送系统形式的本文公开的mTOR抑制剂,例如,雷帕霉素或RAD001的制剂,包含作为活性成分的mTOR抑制剂,例如,溶解或分散在颗粒(例如,珠、丸、颗粒或迷你片)的核心,或溶解或分散在环绕颗粒惰性核心的层中。活性成分可以是例如嵌入延长释放的基质中,优选所述延长释放的基质包含亲水性或亲脂性基质形成赋形剂,或嵌入组合有功能层和顶部包衣的快速崩解和/或溶解基质中,其中所述功能层或顶部包衣中的至少一个包含包衣形成聚合物,其能够使活性成分的扩散受控延长释放。任选地,用于改善活性成分稳定性的保护层将含有活性物质的基质从功能层或顶部包衣分开,以确保药物产品的稳定性。

[0466] 在另一实施方案中,例如,多颗粒递送系统形式的本文公开的mTOR抑制剂,例如雷帕霉素或RAD001的制剂,包含作为活性成分的mTOR抑制剂和含有不溶性聚合物和作为成孔剂的可溶性组分的外层包衣,以及任选进一步包含功能层。对于本发明的目的,术语“外层”是位于朝向颗粒外侧的层,并且可以用另外的层包被或可以是顶部包衣。术语“外层”、“包衣层”或“顶部包衣”可互换使用,这取决于术语所使用的上下文。

[0467] 在一个实施方案中,颗粒包含一层或多层能够使活性成分延长释放的顶部包衣。顶部包衣通常是具有释放控制行为的最后层,其分别包封多颗粒的每个颗粒。

[0468] 在一个实施方案中,本文公开的mTOR抑制剂,例如雷帕霉素或RAD001的制剂包含外层或顶部包衣,其通过药物穿过可渗透的包衣层的扩散控制释放,任选通过在不溶性聚合物层中形成孔,或者仅通过不溶性聚合物的水合作用,或通过成孔剂组合不溶性聚合物的水合作用控制释放。聚合物是不溶性的,不依赖于pH,并任选地含有水溶性成孔剂。释放速率受成孔剂溶解后孔形成程度的影响。不溶性包衣聚合物可以是纤维素醚,如乙基纤维素和纤维素乙酸酯或聚丙烯酸酯,例如,甲基丙烯酸铵共聚物(Eudragit RS/RL)。合适的成孔剂包括水溶性纤维素醚,例如羟丙基纤维素(HPC(KlucelTMEF, EXF, LF)或羟丙基甲基纤维素(HPMC, MethocelTME3/E5, Pharmacoat 603TM),聚乙二醇(Macrogol 1500, 3500, 4000, 6000),泊洛沙姆188(Pluronic F68TM)或聚维酮(PVP, Kollidon K12, K25, K30)。例如,水溶性成孔剂可以2:1至1:10,例如1:1至1:5, 1:3或1:5的比率与不溶性聚合物混合。在一个实施方案中,成孔剂与不溶性聚合物的比率是HPC,例如KlucelTMEF, EXF, LF或HMP 3cP,例如, MethocelTME3,以1:1至1:4,例如,约1:1, 1:1.2, 1:1.5或1:2的比率。示例性不溶性聚合物包括但不限于:乙基纤维素(EC, Aqualon EC N10TM)组合成孔剂。在一些实施方案中,不使用成孔剂,不溶性聚合物甲基丙烯酸铵共聚物A型(Eudragit RS)和甲基丙烯酸铵共聚物B型(Eudragit RL)的组合可以是1:2至9:1的比率,优选1:1至4:1的比率。

[0469] 缓释顶部包衣可以实现大多数活性物质释放进入小肠,并允许保护活性物质免受胃液影响,和最小化活性物质暴露于口腔,食道和胃。

[0470] 在一个实施方案中,本文公开的mTOR抑制剂,例如雷帕霉素或RAD001的制剂,包含药物基质,例如,快速崩解和/或溶解基质层或在延长释放基质层中,例如,在起始核心如珠、丸或颗粒上,其可以由一种或多种组分组成,并且活性成分分散或溶解于其中。例如,无定形的或结晶的mTOR抑制剂,例如雷帕霉素或RAD001,可以分散或溶解在基质中,以从1:100至100:1的比率溶解在基质中,例如,1:50至5:1;或1:50至1:1重量比,或1:5至2:3,或1:10至1:5重量比(就基质形成剂而言)。

[0471] 在一个实施方案中,含药物基质层积于起始核心的表面上。可以通过在流化床工

艺中向均匀、常规尺寸和形状的颗粒上喷雾基质组分和药物的分散剂或溶液,建立层。可替换地,基质组分的粉末混合物可以使用旋转圆盘处理器进行分层。起始核心具有平均粒径0.1到2.5mm。它们可以是单晶体,例如,通过流化床造粒、转子造粒、挤出和滚圆,或压缩工艺制造的蔗糖或颗粒聚集体。在一些实施方案中,迷你片可以用作起始核心。在具体实施方案中,起始核心具有球形形状,并且由惰性材料如蔗糖和淀粉(Sugar Spheres, Suglets™, Non-pareils)、甘露糖醇(例如MCells™)、乳糖(例如喷雾干燥的乳糖)或微晶纤维素(如Cellets™)组成。

[0472] 在另一个实施方案中,含药物基质并入颗粒的核心中。基质形成赋形剂、填充剂、和其它用于增强进程的成分与药物混合在一起。得到的粉末混合物可以通过使用湿法挤出或熔融挤出和随后的滚圆制成颗粒,或通过压缩混合物制成迷你片。形成的基质可以是快速崩解/溶解基质,或由亲水性或亲脂性基质形成赋形剂构成的具有延长释放特性的非崩解基质。

[0473] 在一个实施方案中,由亲水性、非崩解基质组成的含有药物或其固体分散体的多颗粒,通过混合活性成分、填充剂(例如,乳糖)与亲水性水凝胶形成聚合物、助流剂和润滑剂制备,所述亲水性水凝胶形成聚合物具有不同粘度。在一些实施方案中,亲水性水凝胶形成聚合物可以是,例如具有低粘度级的羟丙基甲基纤维素(对于2%重量水性溶液其粘度小于20mPas,例如,Methocel E5),与具有高粘度级的羟丙基甲基纤维素(对于2%重量水性溶液其粘度大于100mPas,例如,Methocel K100)组合。然后将粉末混合物在制片机上压制,得到迷你片。可替代地,可以用有机溶剂,例如乙醇,润湿粉末混合物,然后挤出并滚圆用于获得多颗粒。

[0474] 在另一个实施方案中,由亲脂性、非崩解基质组成的含有药物或其固体分散体的多颗粒,可通过混合活性成分、亲脂性可熔的基质形成赋形剂和填充剂制备。混合物通过熔化和在挤出机混合处理。将所得挤出条切成颗粒和任选地滚圆。所用的亲脂性赋形剂是例如维生素E聚乙二醇琥珀酸酯(Vit E TPGS, 例如,BASF的Kolliphor TPGS Pharma)单独、或以9:1至1:9的比率与单硬脂酸甘油酯(GMS, 例如BASF的Kolliwax GMS)组合。

[0475] 在一些实施方案中,本文公开的mTOR抑制剂,例如雷帕霉素或RAD001的延长释放制剂在24名健康受试者中单剂量施用后,相比于立即释放片剂,例如,提供给患者的雷帕霉素或RAD001立即释放片剂(Final Market Image或“FMI”片剂),降低峰浓度(C_{max})与给药后24小时浓度(C_{24h})的比率。在一些实施方案中, C_{max}/C_{24h} 比率降低,例如,如由药物动力学模型模拟所测量的。降低的 C_{max}/C_{min} 比率的优点在于,根据mTOR抑制剂相对于FMI制剂的生物利用度使用合适的剂量,mTOR抑制剂的浓度可以维持在药物较低的治疗范围(为了足够的功效)以上,同时与药物较高的治疗范围(毒性浓度区)有距离。因此,在一些实施方案中,本文公开的mTOR抑制剂,例如雷帕霉素或RAD001的延长释放制剂,能够提高mTOR抑制剂的安全性特征,而不影响其功效。在一个实施方案中,已施用本文公开的mTOR抑制剂,例如雷帕霉素或RAD001的延长释放制剂的患者中 C_{max}/C_{24h} (因此是 C_{max}/C_{min})的比率是, <5 或 <4 ,例如 3.5 ± 1 或 3 ± 0.5 。

[0476] 在一个实施方案中,本文公开的mTOR抑制剂,例如,雷帕霉素或RAD001,包含在从控制制剂的延长释放特性的功能层或顶部包衣分开的层。这样的层可以由适合于分散或溶解mTOR抑制剂的任何物质制成。在一个实施方案中,包含mTOR抑制剂的层由亲水性载体基

质制成。载体基质可以包埋活性成分并防止该活性成分降解。合适的基质形成剂包括但不限于,亲水聚合物,例如HPMC2910型或2280型,HPC,HEC,MEC,MHEC,聚维酮,其可以溶解或迅速分散在水中。在一个实施方案中,基质层是固体分散体的形式,例如如W097/03654或W003 028705中描述,其各自的全部内容通过引用并入本文。

[0477] 在一个实施方案中,本文公开的mTOR抑制剂,例如,雷帕霉素或RAD001的快速溶解/崩解载体基质是固体分散体的形式。在一些实施方案中,固体分散体包含载体,例如,水溶性聚合物,例如,可以使用以下聚合物的一种或者混合物:

[0478] -羟丙基甲基纤维素(HPMC),例如,Hypromellose 2910型,其可作为Methocel™从Dow Chemicals或从Shin Etsu作为Pharmacoat™购买。可使用具有低表观粘度的HPMC得到良好的结果,例如,如在20℃下测定2%重量水性溶液,低于100cps,例如低于50cps,优选低于20cps,例如HPMC 3cps;

[0479] -聚乙烯吡咯烷酮(聚维酮,PVP),例如PVP K25,K30或PVP K12。PVP是市售,例如作为**Kollidon®**从BASF公司或作为**Plasdone®**从ISP公司购买。具有约8,000至约50,000道尔顿之间平均分子量的PVP是优选的,例如,PVP K30;

[0480] -羟丙基纤维素(HPC),例如,Klucel EF/LF/JF或其衍生物。HPC衍生物的实例包括在水性介质中,例如水中具有低动力粘度的那些,例如,如在25℃下在5%水性溶液中测定的,低于约400cps的。优选的HPC衍生物的平均分子量低于约200,000道尔顿,例如,在80,000道尔顿和140,000道尔顿之间。商业可售的HPC的例子包括来自Hercules Aqualon公司的**Klucel®**LF,**Klucel®**EF和**Klucel®**JF;和来自Nippon Soda Ltd的**Nisso®**HPC-L;

[0481] -聚乙二醇(PEG)。实例包括具有平均分子量1000和9000道尔顿之间,例如约1800至7000之间的PEG,例如PEG 2000,PEG 4000或PEG 6000(*Handbook of Pharmaceutical Excipients*,第355-361);

[0482] -饱和聚乙二醇化甘油酯(polyglycolised glyceride),可获自例如,如**Gelucire®**,例如Gattefossé公司的**Gelucire®**44/14,53/10,50/13,42/12,or 35/10;或者

[0483] -环糊精,例如β-环糊精或α-环糊精。合适的β-环糊精的实例包括,但不限于,甲基-β-环糊精;二甲基-β-环糊精;羟丙基-β-环糊精;糖基-β-环糊精;麦芽糖基-β-环糊精;磺基-β-环糊精;β-环糊精的磺基烷基醚,例如,磺基C₁₋₄-烷基醚。α-环糊精的实例包括,但不限于,葡萄糖基α-环糊精和麦芽糖基α-环糊精。

[0484] 在一个实施方案中,含mTOR抑制剂的层含有相对于药物含量1:1000至1:1比率的抗氧化剂。抗氧化剂也可以存在于其它功能层,例如,以0.1至10%的浓度,优选0.1%至1%。合适的抗氧化剂包括,但不限于,丁基羟基甲苯、丁基羟基茴香醚、抗坏血酸棕榈酸酯、生育酚、维生素E聚乙二醇琥珀酸酯。在一个具体的实施方案中,抗氧化剂是丁基羟基甲苯。

[0485] 在一个实施方案中,保护层从其它功能层分开含有活性物质的层,所述其它功能层如,例如,顶部包衣,以提高药物产品的稳定性。通过排除与顶部包衣的任何直接接触使药物稳定。保护层还充当扩散屏障,防止顶部包衣中的任何组分(例如,聚合物副产物或增塑剂,其可以通过各层迁移)与活性直接接触。除了也用作基质形成剂(例如,上述的基质形成剂)的聚合物外,高含量、无机颜料或抗粘着剂,如,例如,相对于聚合物应用量10至100%,例如,20至50%的滑石和/或二氧化钛,有助于屏障功能。保护层的厚度可以调整以

获得优化的药物产品稳定性。

[0486] 在另一个实施方案中,mTOR抑制剂,例如雷帕霉素或RAD001,直接嵌入在延长释放的载体基质中。

[0487] 在一些实施方案中,包含本文公开的mTOR抑制剂,例如雷帕霉素或RAD001的制剂,含有强吸湿性赋形剂,其能够作为内部干燥剂结合封闭在制剂中的水湿气。吸附剂如,例如,可以使用交聚维酮、交联羧甲基纤维素钠、羟乙酸淀粉钠或淀粉。例如,在一些实施方案中,交聚维酮用作片剂崩解剂,例如,以2%至25%的交聚维酮。吸附剂,例如,交聚维酮,可以是粉末混合物的一部分用于湿和熔融挤出,粉末混合物的一部分用于压缩迷你片,粉末混合物的一部分用于压片多颗粒和/或在药囊或胶囊填充过程中直接加入到多颗粒。

[0488] 在一个方面,本文公开的mTOR抑制剂,例如雷帕霉素或RAD001,是以颗粒(例如,为0.1至0.5mm)、珠、丸(例如,0.2至2mm)或迷你片(例如,1.5至3mm)存在,具有低水分含量,总的水分含量低于5%,例如,总的水分含量低于3%或低于2.5%。

[0489] 在一些实施方案中,药物组合物,例如,本文公开的mTOR抑制剂,例如雷帕霉素或RAD001的多颗粒递送系统,可以配制成药物产品,如,例如,胶囊(例如,HPMC或Hart Gelatine胶囊),或装入药囊或片装(stick-packs)中,或者配制成片剂,其解体后释放颗粒。

[0490] 在一些实施方案中,初级包装,如药囊、片装、水泡眼或瓶可包括吸水成分,例如,硅胶,其降低或稳定在保质储存过程中和/或使用过程中的药物产品的水分含量。

[0491] 提供的制剂可包含和/或释放多个丸、颗粒或迷你片。

[0492] 在一些实施方案中,提供的制剂,例如,多颗粒制剂,可通过在热或润湿液体的辅助下挤出和滚圆(spheronizing)基质形成赋形剂与药物的混合物制备,或者通过用含药物混合物压缩迷你片制备,或者通过在流化床或转子造粒工艺中将含有药物的基质层层叠到核心。

[0493] 在一些实施方案中,含有活性物质的层可以通过喷雾有机溶剂的喷雾分散体制备,其中亲水性组分和活性物质分散或溶解到核心物质上,同时在加热、干燥空气的帮助下连续除去溶剂。用这种方法,形成环绕核心的基质层,例如,所形成的层是聚合物中的活性固体分散体,如,例如,HPMC,HPC,HEC。

[0494] 在一个方面,所提供的药物制剂可以如下制备:用于喷雾的有机原料混合物(其中亲水性聚合物以胶体方式分散)和本文公开的mTOR抑制剂,例如雷帕霉素或RAD001,是分散的或溶解的,在除去溶剂时其作为固体分散体的均匀、光滑层共同沉淀,以这样的方式,它们可以用调节释放的包衣包被。在一些实施方案中,所获得的包含药物的多颗粒可以包被附加功能层和顶部包衣。溶解、分散并悬浮在有机溶剂中的含有包衣聚合物、润滑剂、抗粘着剂、成孔剂和增塑剂的喷雾分散体,和其混合物喷雾到含有药物的多颗粒上。在加工过程中多颗粒持续保持受控运动或流化,同时干燥、加热处理气体被施加到产品床用于从多颗粒的表面蒸发溶剂,其中在限定温度下形成薄膜层。薄膜层的厚度可通过喷雾的包被分散液的含量来控制。最后施加干燥以减少在分层和包被的多颗粒上的残余溶剂含量。

[0495] 在另一个方面,本文公开的mTOR抑制剂,例如,雷帕霉素或RAD001,可以配制成延长释放制剂的高药物负载部分的一部分。在一些实施方案中,制剂还包含表面活性剂。术语“表面活性剂”可以与“湿润剂”或“洗涤剂”互换使用,并且是指非离子型、离子型、阴离子、

阳离子或两性表面活性剂,例如非离子、离子、阴离子或两性表面活性剂。合适的表面活性剂/润湿剂的例子包括,但不限于,聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物和嵌段共聚物,例如,以商标普朗尼克或泊洛沙姆已知(例如泊洛沙姆188(普朗尼克F68)、聚氧乙烯、山梨醇脂肪酸酯包括以商品名Tween已知的类型的单和三月桂基、棕榈基、十八烷基和油酯、聚氧乙烯脂肪酸酯,包括以商品名Myrj已知的类型的聚氧乙烯硬脂酸酯、以商品名Brij已知的聚氧乙烯烷基醚、烷基硫酸钠如二烷基硫酸钠(SDS)和磺酸盐、和钠烷基芳基磺酸钠、水溶性生育酚聚乙二醇琥珀酸酯(TPGS)、聚甘油脂肪酸酯、亚烷基多元醇醚或酯、聚乙二醇甘油酯脂肪酸酯、甾醇及其衍生物、酯交换、聚氧乙烯辛酸-癸酸甘油酯、糖脂肪酸酯、PEG甾醇醚、磷脂、脂肪酸盐、脂肪酸硫酸盐和磺酸盐、脂肪酸盐、脂肪酸硫酸盐和磺酸盐、中或长链烷基,例如, C₆-C₁₈、铵盐、胆汁酸或其盐;例如胆酸、乙醇酸或其盐,例如,胆酸钠和饱和C₁₀至C₂₂脂肪酸的聚氧乙烯单酯。在一个具体的实施方案中,表面活性剂是聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物或嵌段共聚物,或水溶性生育酚聚乙二醇琥珀酸酯,例如,水溶性生育酚聚乙二醇琥珀酸酯,例如,维生素E聚乙二醇1000琥珀酸酯(TPGS)。在另一个实施方案中,本发明药物制剂中的表面活性剂是聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物,例如,泊洛沙姆188。在另一个实施方案中,药物制剂包含表面活性剂烷基硫酸钠,例如,十二烷基硫酸钠。

[0496] 表面活性剂或润湿剂可以在制剂中以对mTOR抑制剂,例如雷帕霉素或RAD001,从10:1至1:200的重量比存在,例如,1:1至1:100的重量比,1:2至1:8的重量比,1:4至1:6的重量比。

[0497] 在一些实施方案中,mTOR抑制剂,例如雷帕霉素或RAD001,是在含有高药物负载的第一层,和表面活性剂在第二层,其中第二层在所述第一层之下,任选具有额外的延长释放的包衣。在一些这样的实施方案中,表面活性剂不是泊洛沙姆188和TPGS。在一些实施方案中,在第二层中的表面活性剂或润湿剂可形成保护层,从覆盖所述制剂的包衣分离含有活性成分的层。覆盖制剂的包衣可以是延长释放的包衣。

[0498] 其它实施方案

[0499] 本发明还提供用如本文所描述的低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂处理的T细胞的T细胞制剂,例如,用于治疗患病受试者,例如,患淋巴增生性疾病的受试者。在一些实施方案中,从已经施用如本文所述的低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂的受试者中回收T细胞。从受试者中回收T细胞的合适方法在本领域中是已知的,包括通过过滤、亲和层析、或磁标记和分离从外周血或骨髓中分离。在其它实施方案中,用如本文所描述的低、免疫增强剂量的mTOR抑制剂在体外,例如,在细胞培养物中处理从受试者中回收的T细胞。在一个实施方案中,在受试者接受骨髓或干细胞移植之前,从患有淋巴增生性疾病的受试者获得T细胞制剂,并在骨髓或干细胞移植之后将T细胞制剂递送至受试者。T细胞制剂可以增加或提高骨髓或干细胞移植的效果,例如,增加抗癌细胞免疫功能和免疫系统的恢复。淋巴增生性疾病可以是白血病或淋巴瘤,如慢性髓细胞性白血病(CML),急性骨髓性白血病(AML),伯基特淋巴瘤,弥漫性大细胞淋巴瘤,滤泡性淋巴瘤,毛细胞淋巴瘤,套细胞淋巴瘤,骨髓增生异常综合征,和非霍奇金淋巴瘤。

实施例

[0500] 参考以下实验的实施例对本发明进行详细的进一步描述。这些实施例仅提供用于

说明的目的,并不旨在是限制性的,除非另有说明。因此,本发明不应以任何方式被解释为限于以下实施例,而是应该被解释为包括明显可作为本文所提供的教导结果的任何和所有变化。

[0501] 没有进一步的说明,认为本领域的普通技术人员使用前述的说明和下面的说明性实施例,能够制备并利用本发明的化合物和实践所要求保护的方法。下列工作实施例中具体指出本发明的各个方面,而不应被解释为以任何方式限制本公开的其余部分。

[0502] 实施例1:mTOR抑制剂对老年人免疫功能衰老的作用

[0503] 与衰老最明确相关的通路之一是mTOR通路。mTOR抑制剂雷帕霉素已显示在小鼠中延长寿命和在老年小鼠中改善各种衰老相关的病症(Harrison,DE等人(2009)Nature 460:392-395;Wilkinson JE等人(2012)Aging Cell 11:675-682;和Flynn,JM等人(2013)Aging Cell 12:851-862)。因此,这些发现表明mTOR抑制剂可能对人类中的衰老和衰老相关的病症的具有有益作用。

[0504] 可以在短的临床试验时间内研究的与年龄相关的表型是免疫功能衰老。免疫功能衰老是发生于老年人中的免疫功能下降,导致对感染的易感性增加,并降低对疫苗接种的反应,包括流感疫苗接种。随着年龄的免疫功能下降是由于免疫缺陷的累积,包括造血干细胞(HSC)产生幼稚淋巴细胞的能力降低,和具有对抗原刺激反应缺陷的衰竭的(exhausted)PD-1阳性淋巴细胞数目的增加,(Boraschi,D等人(2013)Sci.Transl.Med.5:185ps8;Lages,CS等人(2010)Aging Cell 9:785-798;和Shimatani,K等人,(2009)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 106:15807-15812)。在老年小鼠中的研究表明,用mTOR抑制剂雷帕霉素治疗6周恢复HSC功能,导致产生增多的幼稚淋巴细胞,改善对流感疫苗接种的反应,并延长寿命(Chen,C等人(2009)Sci.Signal.2:ra75)。

[0505] 为了评估mTOR抑制对人衰老相关表型的作用,以及mTOR抑制剂RAD001是否可改善免疫功能衰老,评估了接受RAD001或安慰剂的老年志愿者对流感疫苗的反应。本文呈现的结果显示,在老年志愿者中RAD001在耐受性良好的剂量下增强对流感疫苗的反应。RAD001也降低随年龄累积的程序性死亡(PD)-1阳性CD4和CD8T淋巴细胞的百分比。这些结果表明,mTOR抑制对老年志愿者中的免疫功能衰老具有有益的效果。

[0506] 如本文所述,用mTOR抑制剂RAD001,雷帕霉素类似物,治疗6周,改善老年人志愿者对流感疫苗接种的反应。

[0507] 方法

[0508] 研究人群

[0509] ≥ 65 岁、没有不稳定的潜在医疗疾病的老年志愿者在新西兰和澳大利亚9处募集。筛选中的排除标准包括血红蛋白 $<9.0\text{g/dL}$,白细胞计数 $<3500/\text{mm}^3$,中性粒细胞计数 $<2000/\text{mm}^3$,或血小板计数 $<125000/\text{mm}^3$,未控制的糖尿病,不稳定缺血性心脏疾病,临床上显著的潜在性肺疾病,免疫缺陷或接受免疫抑制治疗的病史,需要长期抗凝治疗的凝血障碍或医疗病症史,估计肾小球滤过率 $<30\text{ml/min}$,存在严重的失控高胆固醇血症($>350\text{mg/dL}$, 9.1mmol/L)或高甘油三酯血症($>500\text{mg/dL}$, 5.6mmol/L)。

[0510] 治疗组之间的基线人口统计资料相似(表2)。募集的218名受试者中,211完成了研究。7名退出了研究。5名退出是由于不良事件(AE),1名受试者撤回知情同意书,一个受试者违反协议离开研究。

[0511] 表2:研究患者的人口统计资料和基线特征

[0512]

人群		RAD001 0.5 mg 每天 N=53	RAD001 5 mg 每周 N=53	RAD001 20 mg 每周 N=53	合并的 安慰剂 N=59	总共 N=218
年龄 (岁)	平均 (SD)	70.8 (5.0)	72.0 (5.3)	71.4 (5.2)	71.1 (5.1)	71.3 (5.2)
性别	男性- n (%)	34 (64%)	27 (51%)	32 (60%)	31 (53%)	124 (57%)
BMI* (kg/m ²)	平均 (SD)	27.4 (4.2)	28.8 (5.0)	28.0 (4.1)	28.0 (4.2)	28.0 (4.4)
人种 - n (%)	高加索 人	48 (91%)	50 (94%)	46 (87%)	54 (92%)	198 (91%)
	其它	5(9%)	3 (6%)	7 (13%)	5 (8%)	20 (9%)

[0513] *身体质量指数是体重(公斤)除以身高(米)的平方

[0514] 研究设计和执行

[0515] 从2011年12月至2012年4月,218名老年志愿者进行了随机、观察者盲、安慰剂对照试验的入选。使用经过验证的自动随机系统将受试者随机分配到治疗组:在每个治疗组中RAD001与安慰剂的比为5:2。治疗组:

[0516] 每天0.5mg的RAD001或安慰剂

[0517] 每周5mg的RAD001或安慰剂

[0518] 每周20mg的RAD001或安慰剂

[0519] 试验是观察者盲的,因为在每天0.5mg和每周20mg RAD001的组中安慰剂略不同于那些组中的RAD001片。评估受试者的研究人员没有看到研究药物,因此被完全蒙蔽。对于所有组的治疗持续时间为6星期,这期间受试者每2周在诊所进行安全性评价。受试者已给药4周后,在给药前和给药后1小时测定RAD001稳态水平。在完成研究药物的6周过程后,受试者被给予2周的无药物休息,以逆转任何可能的RAD001导致的免疫抑制,然后给予2012年季节性流感疫苗接种(**Agrippal®**, Novartis Vaccines and Diagnostics, Siena, Italy),其含有H1N1 A/California/07/2009、H3N2 A/Victoria/210/2009、B/Brisbane/60/2008株。流感疫苗接种四周后,收集受试者血清用于流感滴度测量。通过标准血凝抑制测定法测量对3株流感疫苗株以及2株异源株((A/H1N1株A/New Jersey/8/76和A/H3N2株A/Victoria/

361/11)的抗体滴度(Kendal, AP等人(1982)Concepts and procedures for laboratory-based influenza surveillance. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention B17-B35)。如前所述在流感疫苗接种之前和流感疫苗接种4周后采取的血清样品中测定特异于A/H1N1/California/07/2009的IgG和IgM水平(Spensieri, F.等人(2013)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110:14330-14335)。结果表示为荧光强度。

[0520] 所有受试者签署知情同意书。这项研究根据Good Clinical Practice的准则进行,并得到相应的伦理委员会和监管机构批准。

[0521] 安全性

[0522] 在研究访问期间进行不良事件评估以及血液采集用于血液和生化安全性评估的。不良事件信息也被收集在受试者在药物研究的6周期间在家里填写的日记中。从知情同意时至最后的研究访问后30天收集所有不良事件的数据。事件由研究者分类为轻度、中度或重度。

[0523] 统计分析

[0524] 使用正常贝叶斯回归模型以及无信息先验分布进行几何平均滴度比率的初步分析。该模型拟合对数标度上的每种抗体滴度。每个模型中的初步结果是第84天测量。第63天测量包括在结果向量中。使用SAS 9.2 proc混合事先说明拟合模型。矩阵的协方差结构被认为是非结构化(选项类型=UN)。使用前持平(a flat prior)。对于血清转变率的二次分析,采用逻辑回归。

[0525] 意向治疗的人群被定义为接受至少1个全剂量研究药物和没有影响疗效数据的重大方案偏离的所有受试者。在研究中募集的总共218名受试者中199名在意向治疗的人群中。

[0526] 免疫表型分型

[0527] 从在3个时间点收集的全血中分离外周血单核细胞:基线;研究药物治疗6周后;在研究结束时,受试者已经脱离研究药物6周和流感疫苗接种后4周。如之前所述,在美国加利福尼亚州斯坦福大学人工免疫监测中心使用8色免疫表型分型板通过流式细胞仪分析76个PBMC亚群(Maecker, HT等人(2012)Nat Rev Immunol. 12:191-200)。采用8色冻干免疫表型分型板用流式细胞仪(BD Lyoplate, BD Biosciences, San Diego, CA)对76个PBMC亚群进行分析。活力>80%和产率 2×10^6 细胞或更高的PBMC样品被包括在分析中。

[0528] 对于RAD001给药组的每个计算出从基线到研究药物治疗的第6周免疫表型的相对变化和从基线到研究结束(第12周)的免疫表型的相对变化。进行学生t检验以检查从基线到两个采血时间点免疫表型的相对变化是否分别显著不同于在每个给药组中针对安慰剂效应调整后的零。在治疗效果分析中未进行缺失的数据估算。因此,如果患者在基线缺失表型数据,则该患者不包括在这种表型分析中。如果患者在第6或第12周缺失表型数据,则该患者对受影响的时间点的这种表型分析没有贡献。

[0529] 在3个给药组中进行76个表型的608个检验,以比较相对安慰剂效应的治疗效果。实施了分层错误发现率(FDR)控制方法,来控制与多重检验相关的假阳性的发生,尽管其提供相当大地更好的能力。取细胞类型组作为分层因子,分别在各阶层内进行FDR(q值)计算。在相应的q值 ≤ 0.1 的0.05显著水平拒绝所有的零假设。采用在0.05显著性水平和相应的q < 0.1 进行拒绝的多重检验的调整策略确保了小于10%的结果是假的。

[0530] 在第二分析中,在合并的治疗组和安慰剂组之间分析免疫表型改变,其中组合了所有三个RAD001给药组。为了确定在治疗组和安慰剂组之间哪种免疫表型变化不同,计算了基线和研究药物治疗第6周之间以及基线和研究结束时(第12周)之间、对于每个测量的表型的患者内细胞计数比率。比率是对数转换,并通过在每个时间点的协方差分析来分析,以检测合并的治疗组和安慰剂组之间的差异。进行76个表型的152个检验,来比较针对安慰剂效应的合并的治疗效果。实施分层错误发现率(FDR)控制方法,来控制与多重检验相关的假阳性的发生,尽管其仍提供相当好的能力(Benjamini,Y.等人(1995)J.Roy.Statist.57:289-300;和Sun,L.等人(2006)Genet.Epidemiol.30:519-530)。取细胞类型组作为分层因子,分别在各阶层内进行FDR(q值)计算。拒绝所有在0.05显著水平和q值低于20%的零假设。这可以解释为仅拒绝那些p值小于0.05和小于20%概率的假设,每一个观察到的显著结果是由于多重检验。

[0531] 结果

[0532] 一般而言,RAD001耐受性良好,特别是每天0.5mg和每周5mg的给药方案。在研究过程中无死亡发生。三个受试者经历了四种严重不良事件(SAE),被评估为与RAD001无关。4种SAE是正常血小板计数的受试者中的左眼视网膜出血继发失明,该受试者之前已经完成了每周5mg RAD001、6周的6周疗程;用安慰剂治疗的受试者的严重背部疼痛和用安慰剂治疗的受试者的严重胃肠炎。在表3中提供了任何治疗组中发病率>2%的治疗相关的不良事件(AE)的列表。最常见的RAD001相关AE是口腔溃疡,在大多数情况下,口腔溃疡是中度严重的。总体而言,接受RAD001的受试者也具有与接受安慰剂治疗的受试者类似的严重AE的发生率。在每周20mg RAD001治疗的受试者中只有一种严重的AE评估为与RAD001相关的口腔溃疡。

[0533] 表3:在任何治疗组中通过首选项的治疗相关的AE>2%的发生率

[0534]

	RAD001 0.5 mg 每 天 N=53 n (%)	RAD001 5 mg 每周 N=53 n (%)	RAD001 20 mg 每 周 N=53 n (%)	安慰剂, 合 并的 N=59 n (%)	总共 N=218 n (%)
总 AE	35	46	109	21	211
具有 AE 的患者	22 (41.5%)	20 (37.7%)	27 (50.9%)	12 (20.3%)	81 (37.2%)
口腔溃疡	6 (11.3%)	2 (3.8%)	9 (17.0%)	3 (5.1%)	20 (9.2%)
头痛	0	2 (3.8%)	9 (17.0%)	1 (1.7%)	12 (5.5%)
血胆固醇增加	2 (3.8%)	2 (3.8%)	2 (3.8%)	0	6 (2.8%)
腹泻	1 (1.9%)	4 (7.5%)	1 (1.9%)	0	6 (2.8%)
消化不良	0	3 (5.7%)	2 (3.8%)	1 (1.7%)	6 (2.8%)
疲劳	0	2 (3.8%)	4 (7.5%)	0	6 (2.8%)
低密度脂蛋白增 加	2 (3.8%)	1 (1.9%)	2 (3.8%)	0	5 (2.3%)
舌溃疡	3 (5.7%)	1 (1.9%)	0	1 (1.7%)	5 (2.3%)

[0535]

	RAD001 0.5 mg 每 天 N=53 n (%)	RAD001 5 mg 每周 N=53 n (%)	RAD001 20 mg 每 周 N=53 n (%)	安慰剂, 合 并的 N=59 n (%)	总共 N=218 n (%)
失眠	1 (1.9%)	2 (3.8%)	1 (1.9%)	0	4 (1.8%)
口干	0	0	2 (3.8%)	1 (1.7%)	3 (1.4%)
中性粒细胞减少	0	0	3 (5.7%)	0	3 (1.4%)
口腔疼痛	0	2 (3.8%)	1 (1.9%)	0	3 (1.4%)
瘙痒症	0	2 (3.8%)	1 (1.9%)	0	3 (1.4%)
结膜炎	0	2 (3.8%)	0	0	2 (0.9%)
红斑	0	2 (3.8%)	0	0	2 (0.9%)
肢体不适	0	2 (3.8%)	0	0	2 (0.9%)
粘膜炎症	0	0	2 (3.8%)	0	2 (0.9%)
口腔感觉异常	2 (3.8%)	0	0	0	2 (0.9%)
口腔炎	0	0	2 (3.8%)	0	2 (0.9%)

[0536]

	RAD001 0.5 mg 每 天 N=53 n (%)	RAD001 5 mg 每周 N=53 n (%)	RAD001 20 mg 每 周 N=53 n (%)	安慰剂, 合 并的 N=59 n (%)	总共 N=218 n (%)
血小板减少	0	0	2 (3.8%)	0	2 (0.9%)
尿路感染	0	0	2 (3.8%)	0	2 (0.9%)

[0537] 通过测量对2012年季节性流感疫苗的血清学反应评价了RAD001改善老年志愿者中免疫功能的能力。表4中提供了在基线和流感疫苗接种后4周的对3株流感疫苗株的每一个的血凝抑制(HI)的几何平均滴度(GMT)。初步分析的变量是HI GMT比率(疫苗接种后4周/基线)。该研究能够有力地证明,在3株流感疫苗株中的至少2株中具有1)相对于安慰剂 ≥ 1.2 倍的GMT增加;和2)安慰剂校正的GMT比率超过1的后验概率不低于80%。选择这一端点因为在由MF-59疫苗佐剂诱导的流感GMT比率1.2倍的增加与流感疾病的降低相关(Iob, A等人(2005)Epidemiol Infect 133:687-693)。

[0538] 表4. 在基线和流感疫苗接种后4周对于各流感疫苗株的HI GMT

[0539]

			RAD001 0.5mg 每天 N=50	RAD001 5mg 每周 N=49	RAD001 20mg 每 周 N=49	安慰剂 N=55
流感疫 苗株		时间				
A/H1N1	GMT (CV%)	基线	102.8 (186.9)	84.2 (236.4)	90.1 (188.4)	103.2 (219.7)

[0540]

		第 4 周	190.2 (236.9)	198.73(195.6)	129.7 (175.9)	169.4 (259.8)
	GMT 比率(CV%)		2.6 (302.5)	2.5 (214.3)	1.8 (201.5)	2.0 (132.7)
A/H3N2	GMT (CV%)	基线	106.8 (168.2)	126.04 (162.6)	137.1 (211.5)	131.7 (162.3)
		第 4 周	194.4 (129.1)	223.0 (118.8)	223.0 (163.6)	184.3 (153.2)
	GMT 比率 (CV%)		2.1 (152.6)	2.0 (189.2)	2.1 (277.3)	1.6 (153.6)
B	GMT (CV%)	基线	44.2 (96.6)	64.8 (87.3)	58.0 (156.0)	57.0 (112.6)
		第 4 周	98.4 (94.8)	117.3 (99.9)	99.2 (124.1)	114.6 (136.7)
	GMT 比率 (CV%)		2.5 (111.2)	2.2 (112.8)	2.1 (126.5)	2.2 (109.2)

[0541] 基线表示流感疫苗接种前2周

[0542] 第4周表示流感疫苗接种后4周

[0543] N是每组受试者数

[0544] GMT是几何平均滴度

[0545] GMT比率是疫苗接种后第4周GMT/基线GMT

[0546] CV%表示变异系数

[0547] 在意向治疗(ITT)的人群中,低、免疫增强剂量的RAD001(0.5mg每天或5mg每周)

组,而不是较高剂量(20mg每周)组符合研究的主要终点(图1A)。这表明,在较低剂量下有独特的RAD001免疫调节机制,在较高剂量下已知的mTOR抑制的免疫抑制作用可能会发挥作用。此外,研究结果表明低、免疫增强剂量的RAD001治疗后有改善老年人免疫功能的趋势。

[0548] 在亚组分析中,具有低基线流感滴度($\leq 1:40$)的受试者亚组经历了比ITT人群更大的RAD001相关滴度增加(图1B)。这些数据表明,RAD001在提高受试者的流感疫苗应答中是特别有效的,所述受试者在基线不具保护性($>1:40$)滴度,因此对流感疾病的风险最高。

[0549] RAD001浓度对各流感疫苗株滴度增加的散点图显示相反的暴露/反应关系(图2)。基于mTOR介导的S6激酶(S6K)磷酸化的建模和模拟预示,20mg每周的给药方案几乎完全抑制mTOR介导的S6K活性,5mg每周的给药方案抑制S6K活性超过50%,0.5mg每天的给药方案在给药间隔期间抑制S6K磷酸化约38%(Tanaka,C等人(2008)J.Clin.Oncol 26:1596-1602)。因此,使用低、免疫增强剂量的RAD001的部分mTOR抑制,例如,mTOR介导的S6K磷酸化,如果不是比高剂量RAD001的接近完全抑制mTOR在加强老年人免疫应答中更有效,可以与之类似。

[0550] 对流感疫苗接种后4周的血清学转换率进行了评价。血清学转换被定义为从阴性疫苗接种前滴度(即,HI滴度 $<1:10$)变化为疫苗接种后HI滴度 $\geq 1:40$ 或从非阴性($\geq 1:10$)疫苗接种前HI滴度增加至少4倍。在意向治疗人群,RAD001中的H3N2和B菌株的血清学转换率比安慰剂组增加,虽然该增加没有达到统计学显著性(表5)。在基线流感滴度 $\leq 1:40$ 的受试者亚群,RAD001治疗也增加对H3N2和B菌株的血清学转换率,在针对B菌株的0.5mg每天给药组中这些结果达到统计学显著性。这些数据进一步显示,RAD001增强老年人流感疫苗接种的血清学反应。

[0551] 表5:疫苗接种后4周具有对流感血清学转换的受试者百分比

[0552]

	安慰剂 N=54	0.5 mg N=48	5 mg N=49	20 mg N=48
意向治疗人群				
H1N1	24	27	27	17
H3N2	17	27	24	25
B	17	27	22	19
基线滴度 ≤ 40 的受试者				
H1N1	40	42	45	36
H3N2	42	64	53	71
B	16	40*	33	28

[0553] *RAD001和安慰剂之间血清学转换的优势比显著不同于1(逻辑回归得到的双侧p值 <0.05 ,治疗作为固定效应)

[0554] 目前的季节性流感疫苗针对不断出现的表现为以前流行的病毒的变种的流感株通常不能提供足够的保护。然而,与安慰剂相比,在mTOR抑制剂雷帕霉素存在下针对流感免疫接种小鼠,产生了针对流感更广泛的血清学反应。更广泛的血清学反应包括针对流感的多亚型表达的保守表位的抗体,其提供对未包含在疫苗中的异源流感株感染的保护(Keating,R等人(2013)Nat Immunology 14:2166-2178)。为了确定RAD001在老年志愿者中是否扩大对流感的血清学反应,测量了针对不包含在流感疫苗中的2个异源流感株(A/H1N1株A/New Jersey/8/76和A/H3N2株A/Victoria/361/11)的HI滴度。与安慰剂组相比,在RAD001中异源株的HI GMT比率的增加更高(图3)。此外,异源株的血清学转换率在RAD001中比在安慰剂组中高。在5和20mg每周RAD001给药组中对H3N2异源株的血清学转换率的增加是统计学显著的(表6)。合并的RAD001组中H3N2血清学转换率为39%,而安慰剂组为20%($p=0.007$)。本文中所呈现的结果表明,mTOR抑制剂扩大了老年志愿者对流感疫苗接种的血清学反应,并且增加了针对未包含在季节性流感疫苗中的流感异源株的抗体滴度。

[0555] 在用雷帕霉素治疗的小鼠中针对流感异源株的扩大的血清学反应,已与B细胞中类别转换的抑制和抗流感IgM水平的增加相关联(Keating,R.等人(2013)Nat Immunol 14:2166-2178)。然而,类别转换的抑制可能不包含在RAD001治疗的人中扩大的血清学反应,因为疫苗接种后抗流感IgM和IgG水平在RAD001和安慰剂治疗组之间没有不同(图4)。

[0556] 表6:季节性流感疫苗接种4周后针对流感异源株血清学转换的受试者百分比

[0557]

	安慰剂, 合并的	RAD001 0.5mg 每 天	RAD001 5 mg 每周	RAD001 20 mg 每周
A/H1N1 株: A/NewJersey/8/76	7%	17%	16%	8%
A/H3N2 株: A/Victoria/361/11	20%	38%	39%*	40% *

[0558] *RAD001和安慰剂之间血清学转换的优势比显著不同于1(逻辑回归得到的双侧p值<0.05,治疗作为固定效应)

[0559] 为了了解RAD001增强老年志愿者免疫功能的机制,在从基线、研究药物治疗后6周和流感疫苗接种后4周(研究药物停药后6周)的受试者获得的PBMC样品上进行免疫表型分型。虽然在RAD001和安慰剂组之间大多数PBMC亚组的百分比没有不同,但是与安慰剂组相比,PD-1阳性CD4和CD8细胞的百分比在RAD001中较低(图5)。PD-1阳性CD4和CD8细胞随年龄累积,并对抗原刺激具有缺陷反应,因为PD-1抑制T细胞受体诱导的T细胞增殖、细胞因子产生和细胞溶解作用(Lages,CS等人(2010)Aging Cell 9:785-798)。在安慰剂组中PD-1阳性T细胞的百分比随时间增加。在第12周(疫苗接种后4周)这种增加可能是由于流感疫苗接种,理由是流感病毒已被证明增加PD-1阳性T细胞(Erikson,JJ等人(2012)JCI 122:2967-2982)。然而在所有RAD001组中CD4PD-1阳性T细胞的百分比在第6周和第12周从基线下降

(图5A)。在两个较低剂量的RAD001组中CD8PD-1阳性细胞的百分比在第6周和第12周也从基线下降(图5B)。对PD-1阴性CD4T细胞的百分比进行了评估,相比于安慰剂组,其在RAD001组中增加(图5C)。

[0560] 在更严格的统计分析中,其中来自RAD001组的结果合并并针对基线PD-1的表达差异调整,与安慰剂组($n=25$)相比,在合并的RAD组($n=84$)中在第6周PD-1阳性CD4T细胞有30.2%的统计学上显著的减少, $p=0.03$ ($q=0.13$)(图6A)。与安慰剂组相比,在合并的RAD组中在第12周PD-1阳性CD4T细胞减少32.7%, $p=0.05$ ($q=0.19$)。图6B显示与安慰剂组($n=25$)相比,在合并的RAD001组($n=84$)中在第6周PD-1阳性CD8T细胞有37.4%的统计学上显著的减少, $p=0.08$ ($q=0.07$)。与安慰剂组相比,在合并的RAD001组中在第12周PD-1阳性CD8T细胞减少41.4%, $p=0.066$ ($q=0.21$)。因此,从图5和6的结果一起表明,与RAD001相关的PD-1阳性CD4和CD8T细胞百分比的减少可能有助于增强免疫功能。

[0561] 结论

[0562] 总之,本文中所呈现的数据表明,mTOR抑制剂RAD001可改善与年龄相关的人类老年人免疫功能衰退,如通过流感疫苗接种反应所评估的,并且这种改善通过可接受的风险/利益平衡获得。在老年小鼠的研究中,用mTOR抑制剂雷帕霉素治疗6周不仅提高流感疫苗接种的反应,还延长寿命,这表明免疫功能衰老的改善可能是对与衰老相关表型更广阔的效果的标志。

[0563] 由于在疫苗接种之前2周RAD001给药已经停止,RAD001的免疫增强作用可能通过药物治疗停药后仍然存在的相关细胞群的变化来介导。本文所呈现的结果表明,与安慰剂相比,RAD001减小耗竭的PD-1阳性CD4和CD8T细胞的百分比。PD-1的表达是由TCR信号传导所诱导并在持久性抗原刺激(包括慢性病毒感染)情况下保持高(水平)。虽然不希望被理论束缚,可能的是RAD001在老年志愿者中降低慢性免疫激活,并由此导致PD-1表达的减少。RAD001也可以直接抑制PD-1的表达,如同已经报道的免疫亲环孢素A(Oestreich,KJ等人(2008)J Immunol.181:4832-4839)。RAD001诱导的PD-1阳性T细胞百分比的减少有可能改善T细胞应答的质量。这与先前的研究(Araki,K等人(2009)Nature 460:108-112)一致,该研究显示在小鼠和灵长类动物中mTOR抑制改善记忆CD8T细胞对疫苗接种的应答质量。在老年小鼠中,mTOR抑制也已显示出增加造血干细胞的数量,从而导致增加的幼稚淋巴细胞的产生(Chen,C等人(2009)Sci Signal 2:ra75)。虽然在本实施例中未检测到RAD001与安慰剂组幼稚淋巴细胞百分比的显著差异,可进一步调查该可能的机制。

[0564] 可进一步调查由RAD001扩大的对异源流感株的血清学反应的机制。雷帕霉素也已显示出在流感疫苗接种后抑制B细胞中的类型转换。其结果是,产生独特的抗流感抗体组群,其促进对未包含在流感疫苗中的流感病毒亚型的致死性感染的跨株保护(Keating,R等人(2013)Nat Immunol.14:2166-2178)。本文所描述的结果没有显示RAD001在流感疫苗接种前2周停止RAD001的老年受试者中改变B细胞类型转换。虽然潜在的机制需要进一步阐明,但是在季节性疫苗和群体中流行的流感株之间存在匹配不良的时期中,本文所述的对异源流感株增加的血清学反应可赋予对流感疾病增强的保护。

[0565] RAD001对流感抗体滴度的作用可媲美批准用于增强老年人对流感疫苗接种反应的MF59疫苗佐剂的作用(Podda,A(2001)Vaccine 19:2673-2680)。因此,RAD001驱动的对流感疫苗接种抗体反应的增强可以转化为如MF59佐剂流感疫苗所证实的在老年人中的临床

益处(Iob,A等人(2005)*Epidemiol Infect.*133:687-693)。然而,RAD001也用于抑制器官移植患者的免疫应答。这些看似矛盾的发现提出了mTOR抑制剂的免疫调节作用可能是剂量和/或抗原依赖的可能性(Ferrer,IR等人(2010)*J Immunol.*185:2004-2008)。本文看到相反的RAD001暴露/疫苗接种反应关系的趋势。可能的是完全的mTOR抑制通过正常的亲环蛋白-雷帕霉素机制抑制免疫功能,而部分mTOR抑制,至少在老年人,由于独特的衰老相关表现型的抑制增强免疫功能。有趣的是,mTOR活性在多种组织中增加,包括衰老动物模型中的造血干细胞(Chen C.等人(2009)*Sci Signal* 2:ra75 and Barns,M.等人(2014)*Int J Biochem Cell Biol.*53:174-185)。因此,相对于mTOR活性的更完全的抑制,将mTOR活性调低到年轻组织中的可见水平,可能在衰老适应症中是有临床益处的。

[0566] mTOR抑制剂如RAD001在治疗衰老相关适应症中的安全性特征一直备受关注。在肿瘤或器官移植适应症中使用的剂量的RAD001的毒性包括口腔炎、腹泻、恶心、血细胞减少、高脂血症、和高血糖的比率,这对许多衰老相关适应症是不能接受的。然而,这些AE都与血液中RAD001的波谷水平相关。因此,在本研究中选择使用的RAD001给药方案,以最小化波谷水平。0.5mg每天、5mg每周和20mg每周给药组的平均RAD001波谷水平分别为0.9ng/ml、低于0.3ng/ml(定量下限)和0.7ng/ml。这些波谷水平比在器官移植和癌症患者中使用的给药方案相关的波谷水平显著降低。此外,治疗限定的6周疗程降低了不良事件的风险。这些结果表明,在本研究中所用的给药方案对老年人的某些病症可具有可接受的风险/利益。然而,即使剂量低至每天0.5mg时,文中描述的实验中显著数量的受试者出现口腔溃疡。因此低、免疫增强剂量的RAD001的安全谱需要进一步研究。比现有的雷帕霉素类似物具有更清晰的安全性特征的mTOR抑制剂的开发可能在未来为衰老相关病症提供更好的治疗选择。

[0567] 实施例2:在老年受试者中增强对疫苗的免疫反应

[0568] 老年人免疫功能下降,导致感染发生率的增加,以及对疫苗接种反应的降低。作为确定mTOR抑制是否对人类具有抗衰老作用的第一步骤,进行随机的安慰剂对照试验,以确定mTOR抑制剂RAD001是否逆转衰老相关的免疫功能下降,如在老年志愿者中由对疫苗接种的反应所评估的。在所有情况下,获得了相应的专利同意,研究经国家卫生主管部门批准。

[0569] 在研究中使用以下3个RAD001给药方案:

[0570] 20mg每周(波谷水平:0.7ng/ml)

[0571] 5mg每周(波谷水平低于检测限)

[0572] 0.5mg每天(波谷水平:0.9ng/ml)

[0573] 选择这些给药方案是因为它们具有比批准用于移植和肿瘤适应症的RAD001剂量更低的波谷水平。波谷水平是体内药物的最低水平。与10mg每天肿瘤给药方案相关的RAD001的波谷水平是大约20ng/ml。与0.75-1.5mg bid移植给药方案相关的波谷水平是大约3ng/ml。与此相反,在我们的免疫接种研究中使用的给药方案相关的波谷水平则比其低3-20倍。

[0574] 由于RAD001相关的AE与波谷水平相关联,预测3个给药方案对正常志愿者具有足够的安全性。另外,预测3个剂量给出mTOR抑制的范围。P70S6激酶(P70S6K)是由mTOR磷酸化的下游靶标。P70S6K磷酸化水平作为mTOR活性的量度。基于RAD001临床前和临床研究中获得的P70S6K磷酸化数据的建模和模拟,预测20mg每周整整一个星期几乎完全抑制mTOR活性,而预测5mg每周和0.5mg每天部分抑制mTOR活性。

[0575] 年龄 ≥ 65 岁的老年志愿者被随机分配到3个RAD001治疗组之一(每组50名受试者)或安慰剂组(每组20受试者)。受试者用研究药物治疗6周,给予2周的休息,然后接受流感(Agrippal,Novarti)和肺炎球菌(Pneumovax 23,Merck)的疫苗接种。在疫苗接种4周后通过流感疫苗中3个流感株(H1N1,H3N2和B流感亚型)的血凝抑制测定法测定几何平均滴度(GMT),评估对流感疫苗接种的反应。研究的主要终点为(1)安全性和耐受性和(2)与安慰剂相比,疫苗接种4周后流感疫苗株的2/3中的流感滴度1.2倍增加。选择这个端点是因为流感滴度1.2倍的增加与疫苗接种后流感疾病的降低相关,因此在临床上相关的。不同于20mg每周的剂量,5mg每周和0.5mg每天的剂量耐受性良好,满足了GMT主要终点(图1A)。与安慰剂相比,RAD001不仅改善了老年志愿者对流感疫苗接种的反应,还改善了对肺炎球菌疫苗接种的反应。肺炎球菌疫苗包含来自23个肺炎球菌血清型的抗原。在我们的受试者中测量了对7个血清型的抗体滴度。与安慰剂相比,在所有3个RAD组中对6/7血清型的抗体滴度增加。

[0576] 组合流感和肺炎球菌滴度的数据表明,部分(小于80%–100%)mTOR抑制比更完全的mTOR抑制更有效地反转衰老相关的免疫功能下降。

[0577] 实施例3:低剂量mTOR抑制增加能量和运动

[0578] 在临床前模型中,使用雷帕霉素类似物雷帕霉素的mTOR抑制增加老年小鼠的自发运动量(Wilkinson等人Rapamycin slows aging in mice.(2012)Aging Cell;11:675–82)。有趣的是,在给药后1年实施的问卷中也报告实施例2中所述的0.5mg每天给药组中的受试者与安慰剂相比,具有增加的能量和运动能力(图7)。这些数据表明,使用雷帕霉素类似物的部分mTOR抑制对衰老相关的发病率(不仅仅是免疫功能)具有有益效果。

[0579] 实施例4:用RAD001的P70S6激酶抑制

[0580] 进行建模和模拟来预测每天和每周的RAD001剂量范围,预计该剂量范围部分抑制mTOR活性。如上所述,P70S6K由mTOR磷酸化,是与衰老最密切相关的mTOR的下游靶标,因为敲除P70S6K增加了寿命。因此对部分抑制P70S6K活性的RAD001剂量进行建模。预测每周给药在 $\geq 0.1\text{mg}$ 和 $< 20\text{mg}$ 的范围内,实现部分抑制P70S6K活性(图8)。

[0581] 对于每天给药,RAD001的浓度从30pM至4nM部分抑制细胞系中P70S6K活性(表7)。这些血清浓度被预测为通过每天的RAD001剂量 $\geq 0.005\text{mg}$ 至 $< 1.5\text{mg}$ 实现。

[0582] 表7:在HeLa细胞中在体外的P70S6K活性抑制百分比

[0583]

RAD001浓度	0	6pM	32pM	160pM	800pM	4nM	20nM
%P70S6K抑制	0	0	18	16	62	90	95

[0584] 结论

[0585] 用仅部分抑制P70S6K的剂量的mTOR抑制剂治疗衰老相关的发病率,或通常增强免疫应答的方法。用低剂量的RAD001部分抑制mTOR在衰老适应症中的效果是意想不到的发现。RAD001剂量范围 $\geq 0.1\text{mg}$ 至 $< 20\text{mg}$ 每周之间和 $\geq 0.005\text{mg}$ 至 $< 1.5\text{mg}$ 每天之间将实现部分的mTOR抑制,因此预期在衰老相关的发病率或在增强免疫应答中具有效果。

[0586] 等同

[0587] 在此引用的各个和每个专利、专利申请和出版物的公开内容通过引用整体并入本文。虽然本发明已经公开了参考具体的方面,显而易见本发明的其它方面和变化可以通过

本领域技术人员在不脱离本发明的真正精神和范围的情况下设计。所附权利要求意在解释为包括所有这些方面和等效变化。

[0588] 其它实施方案在以下权利要求中。

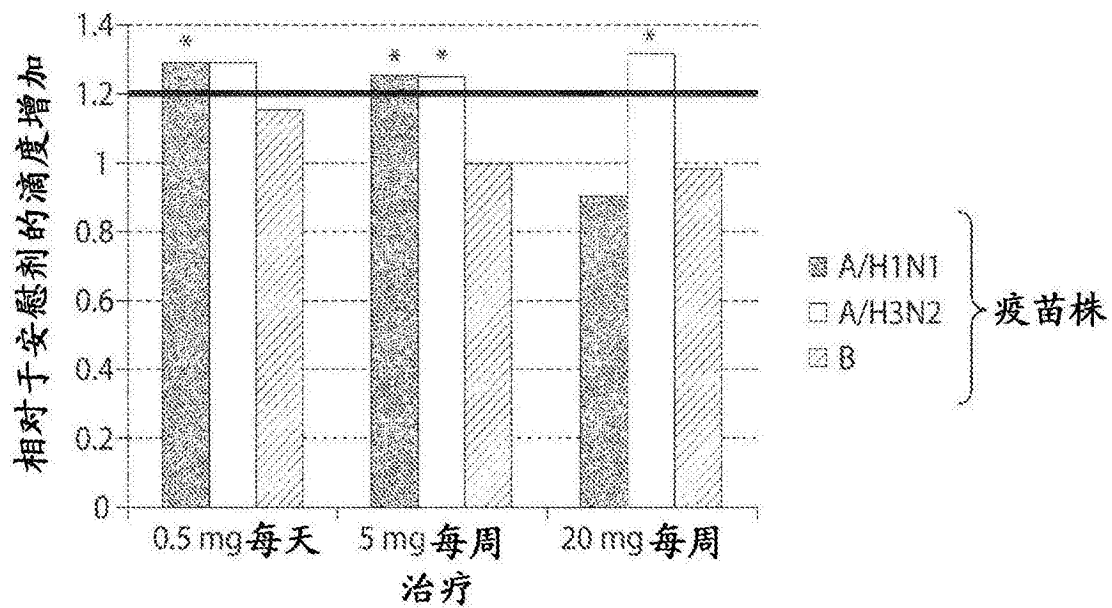


图1A

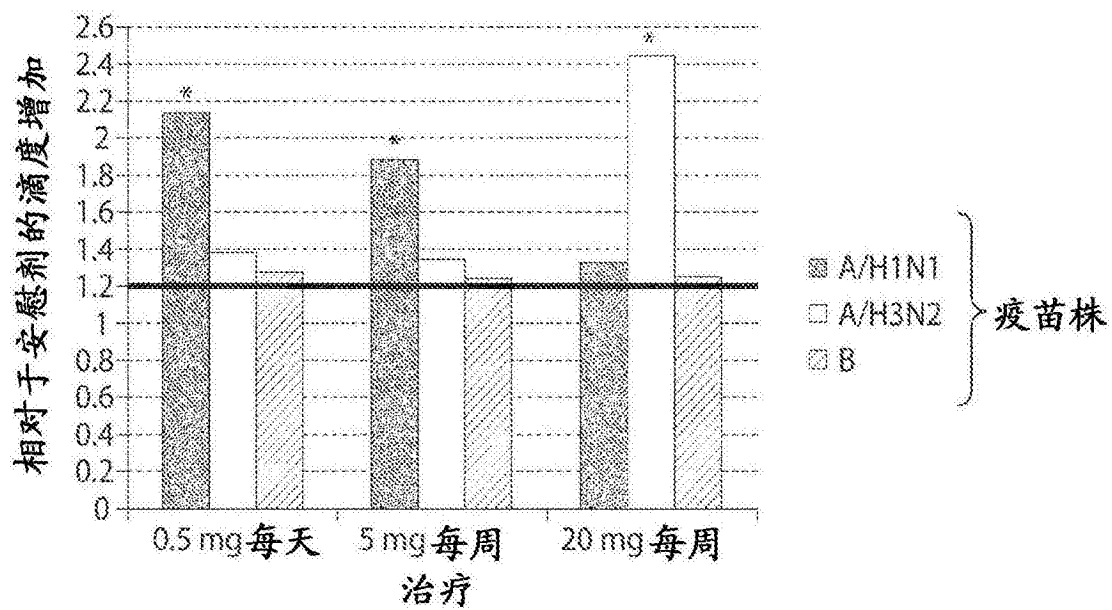


图1B

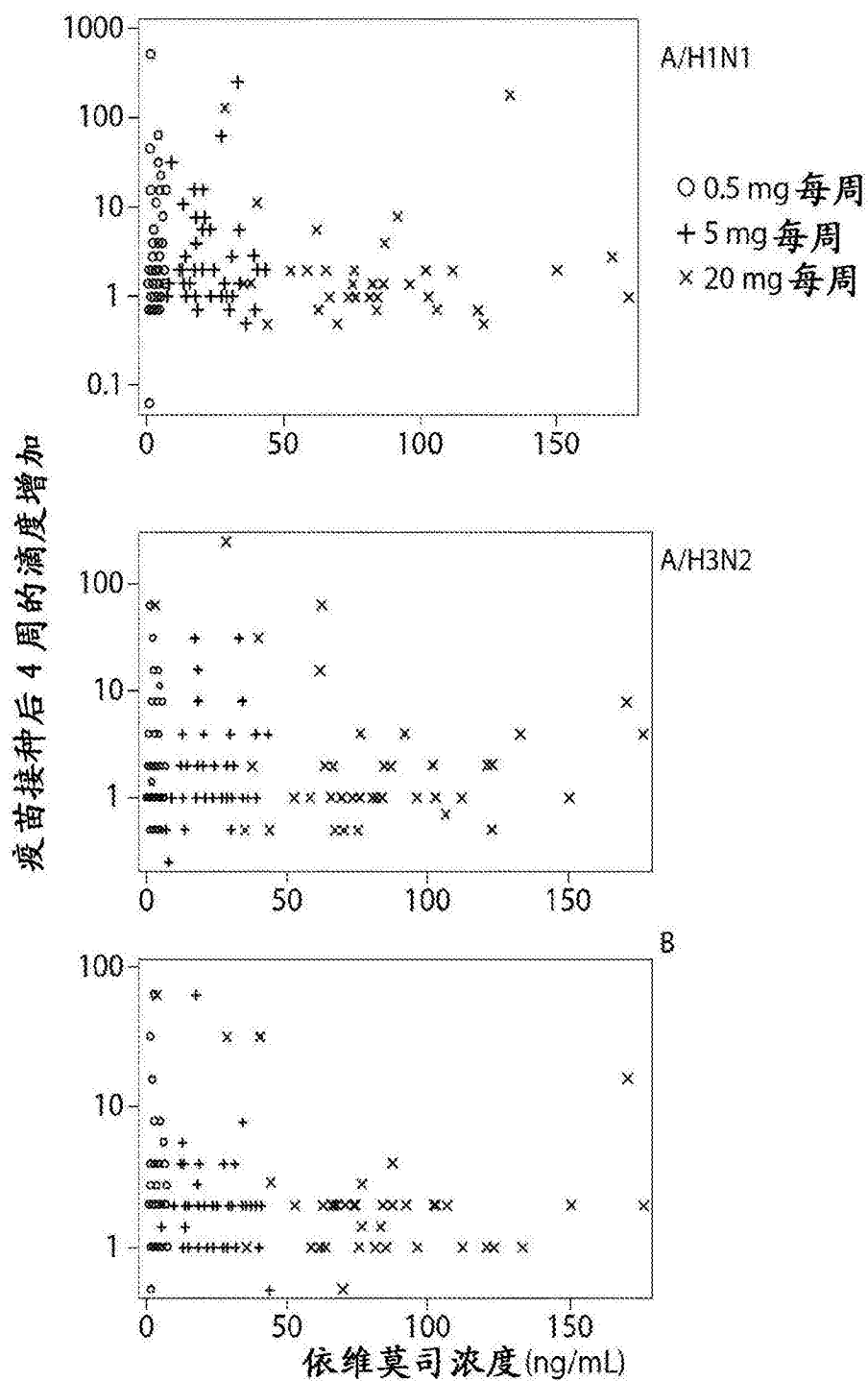


图2

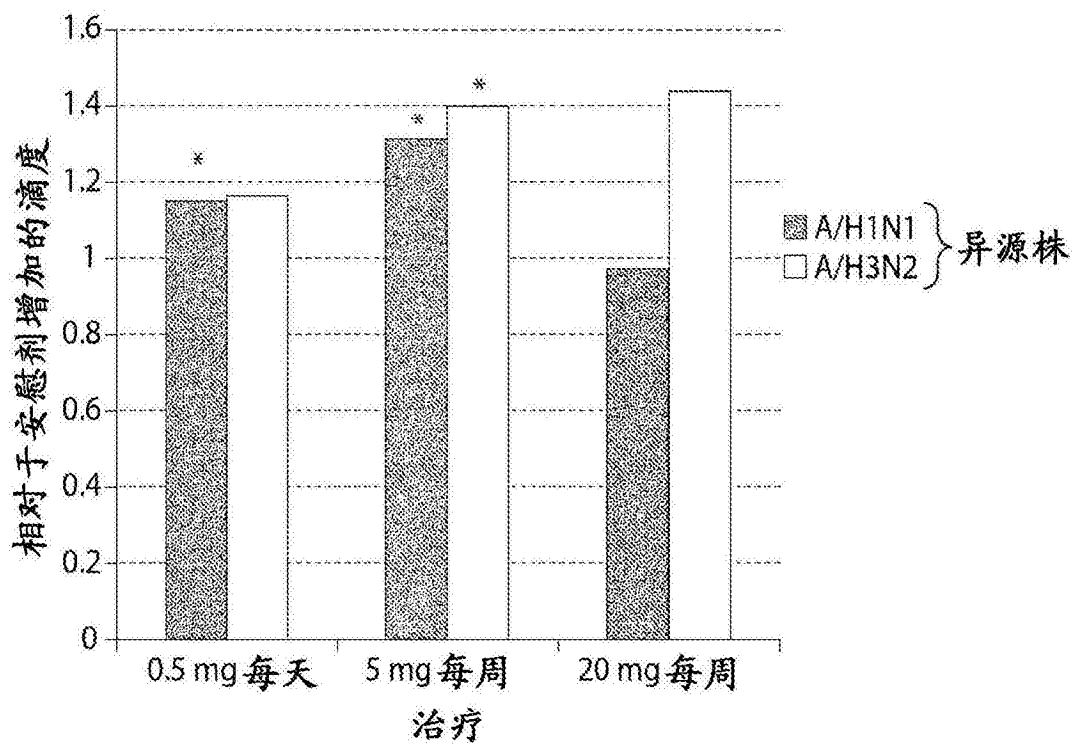


图3

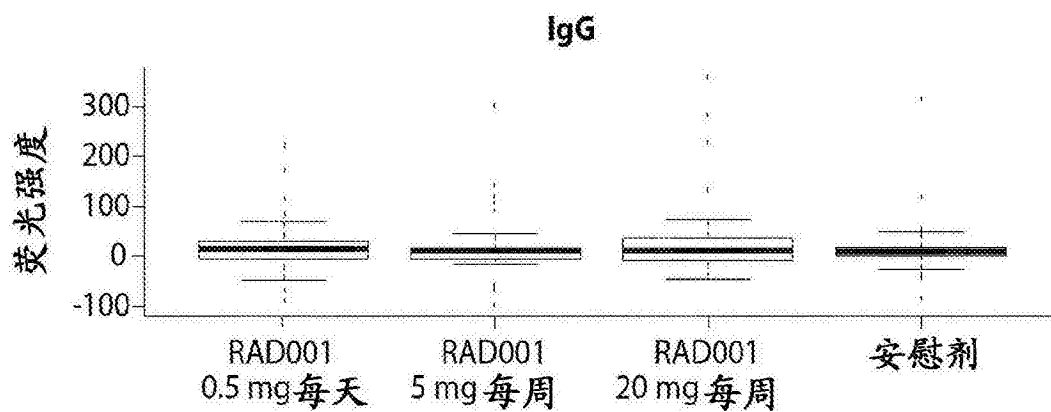


图4A

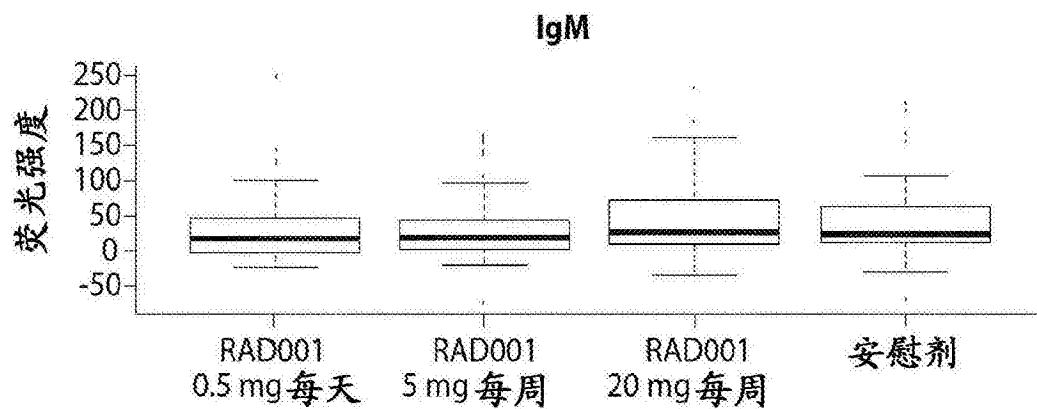


图4B

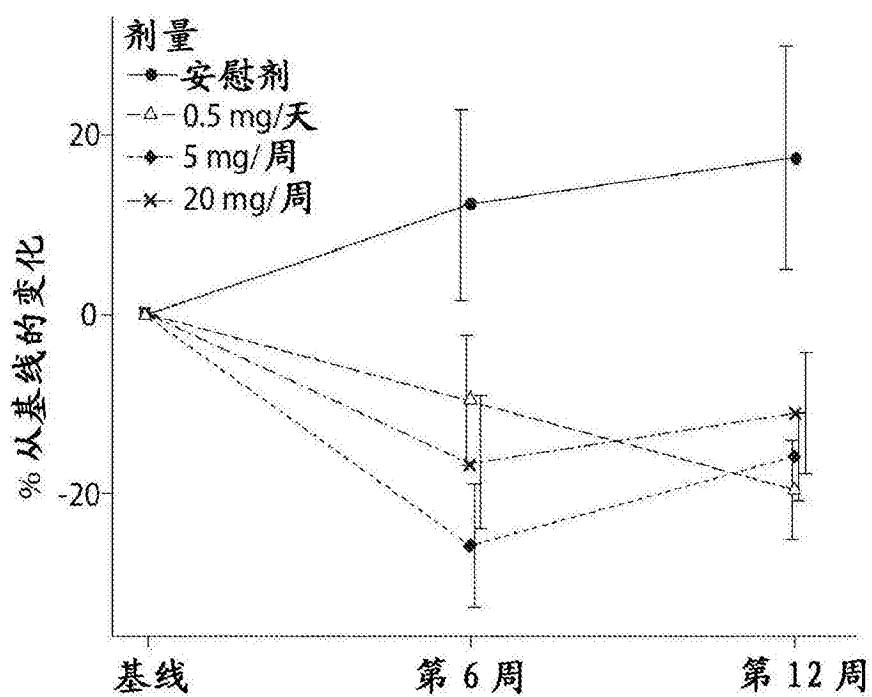


图5A

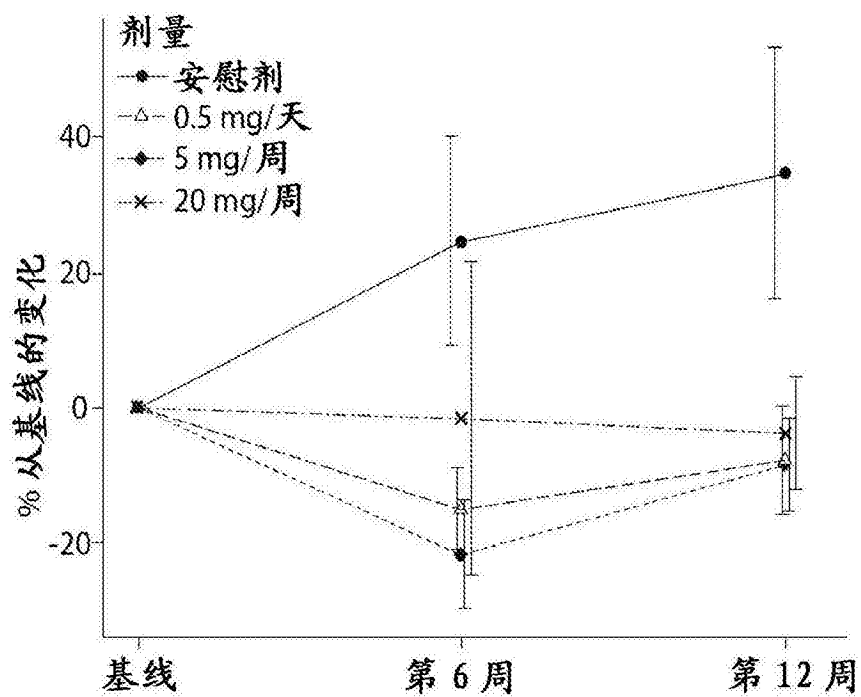


图5B

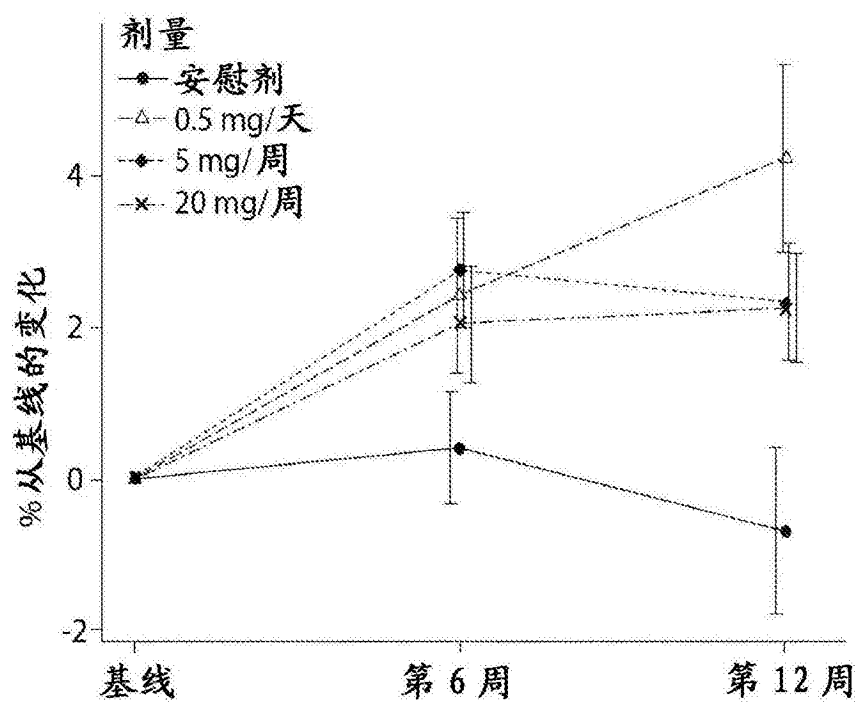


图5C

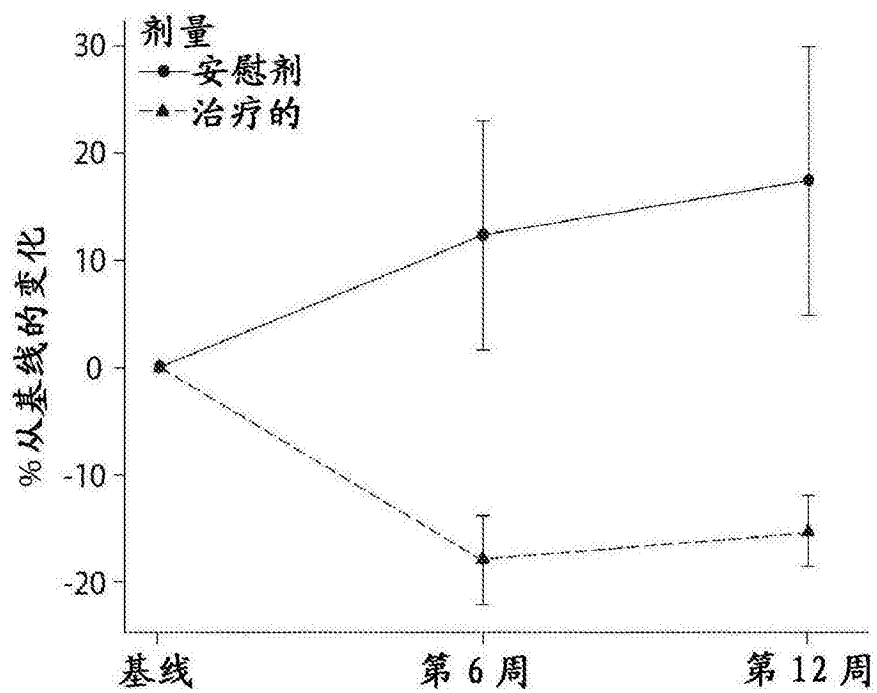


图6A

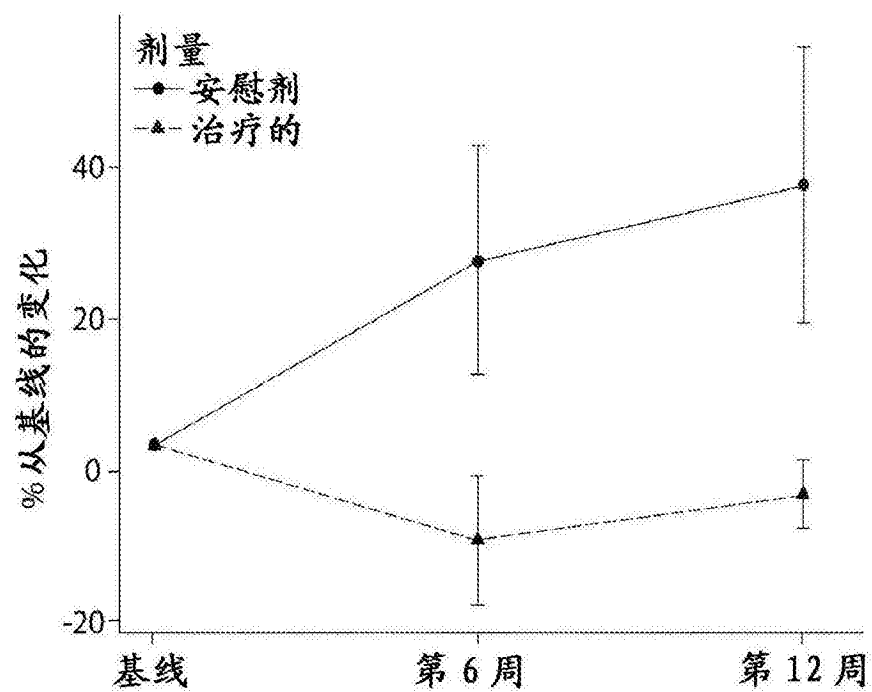


图6B

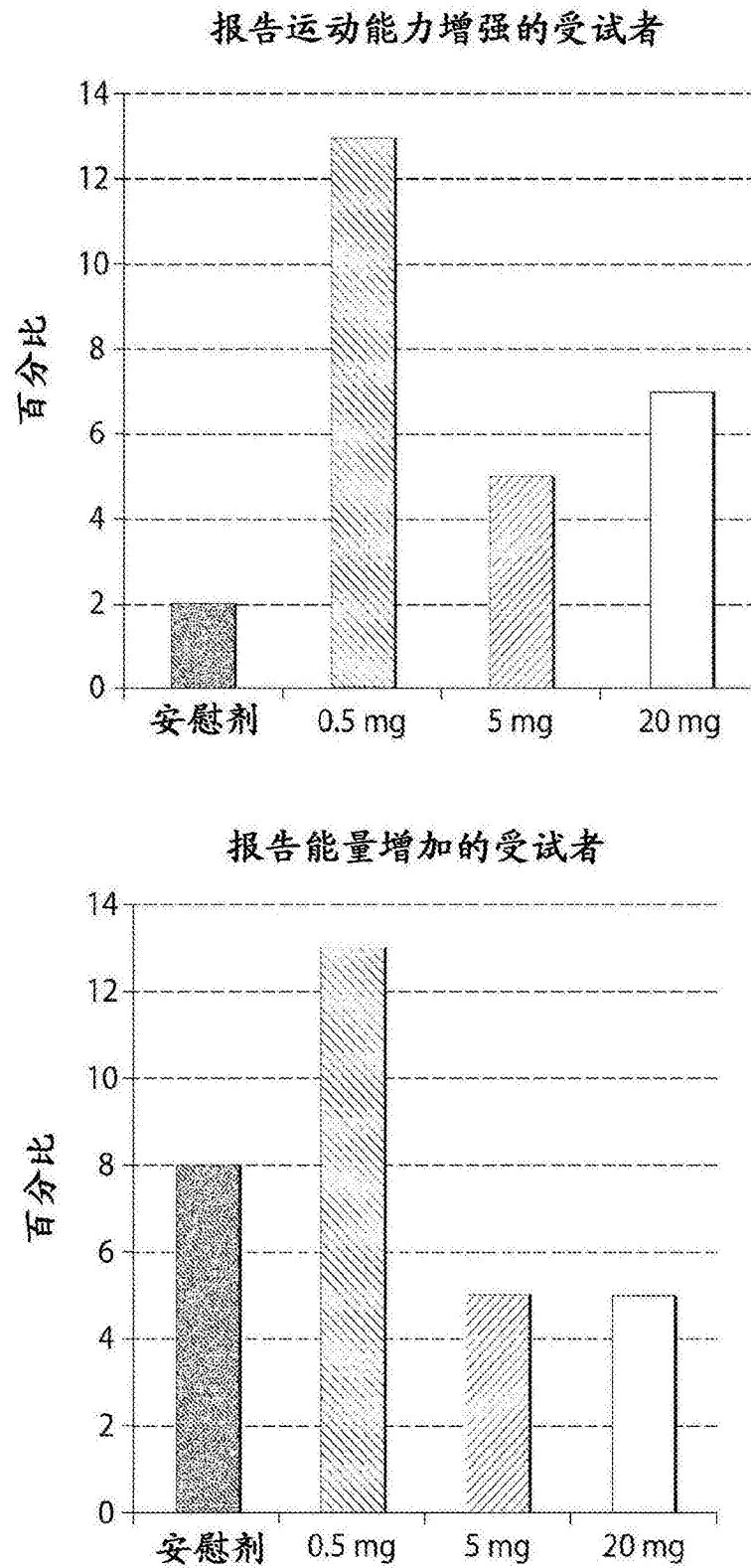


图7

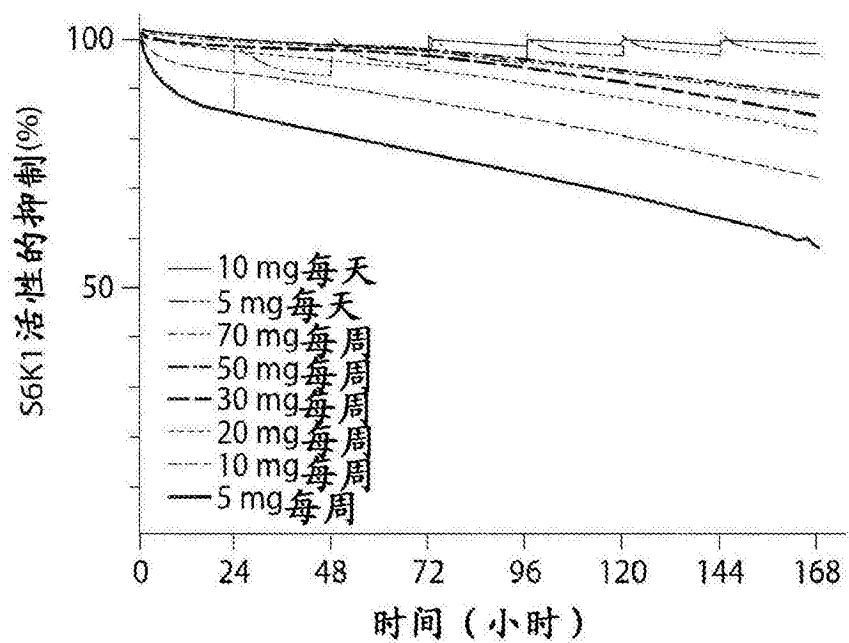


图8A

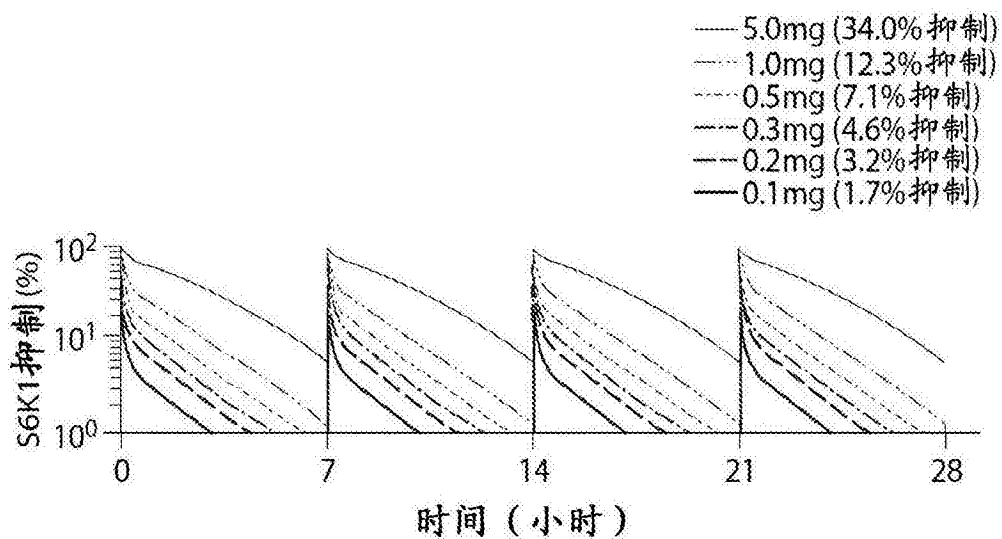


图8B