



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108289903 B

(45) 授权公告日 2021.08.03

(21) 申请号 201680071076.0

A61K 31/7042 (2006.01)

(22) 申请日 2016.12.02

A61K 31/70 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 31/02 (2006.01)

申请公布号 CN 108289903 A

A61K 39/395 (2006.01)

(43) 申请公布日 2018.07.17

C07K 16/28 (2006.01)

(30) 优先权数据

C07K 16/32 (2006.01)

62/263,228 2015.12.04 US

(56) 对比文件

62/308,583 2016.03.15 US

US 2015202291 A1, 2015.07.23

62/321,857 2016.04.13 US

CN 103402525 A, 2013.11.20

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

Nicole M. Okeley等. Abstract 2890:

2018.06.04

Mechanistic evaluation of the anti-tumor activities of 2-fluorofucose alone and in combination with anti-idiotype vaccination.《Experimental and Molecular Therapeutics》.2014, 第74卷(第19期), 摘要.

(86) PCT国际申请的申请数据

J. Larkin等. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma.《The New England Journal of Medicine》.2015, 第1-12页.

PCT/US2016/064783 2016.12.02

Chelcie H. Eller等. Human Cancer Antigen Globo H Is a Cell-Surface Ligand for Human Ribonuclease 1.《ACS Cent. Sci.》.2015, 第1卷第181-190页.

(87) PCT国际申请的公布数据

审查员 高超

W02017/096274 EN 2017.06.08

(73) 专利权人 西雅图基因公司

权利要求书1页 说明书17页 附图9页

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 S·加尔达 C-L·朗 P·森特

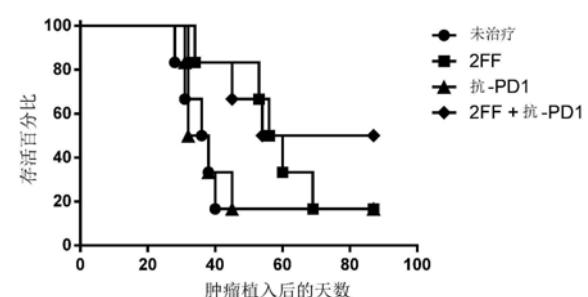
N·奥克利 J·菲尔德

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51) Int.Cl.

A61K 31/7024 (2006.01)



(54) 发明名称

与检验点抑制剂联合使用2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖的癌症治疗

(57) 摘要

本发明涉及用于治疗癌症的方法,所述方法包括与检验点抑制剂联合地给有此需要的受试者施用有效量的2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖或其前药或其药学上可接受的盐。

1.2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖或其药学上可接受的盐与检验点抑制剂联合在制备用于在有此需要的受试者中治疗癌症或抑制肿瘤增殖的药物中的用途,其中所述检验点抑制剂是派姆单抗或克隆J43。

2.根据权利要求1所述的用途,其中所述癌症选自:肺癌、胃肠癌、头颈癌、包括恶性神经胶质瘤和脑转移灶的脑癌、恶性间皮瘤、恶性黑素瘤、梅克尔细胞癌或骨肉瘤、多发性骨髓瘤、淋巴瘤、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、骨髓增生异常综合征和急性成淋巴细胞性白血病、乳腺癌、激素敏感的或激素难治的前列腺癌、结直肠癌、卵巢癌、肝细胞癌、肾细胞癌、胰腺癌、食道癌、胆管细胞癌和软组织肉瘤。

3.根据权利要求2所述的用途,其中所述癌症是乳腺癌或结直肠癌。

4.根据权利要求2所述的用途,其中所述肺癌是非小细胞肺癌或小细胞肺癌。

5.根据权利要求2所述的用途,其中所述结直肠癌是转移性结直肠癌。

6.根据权利要求2所述的用途,其中所述头颈癌是头和颈鳞状细胞癌。

7.根据权利要求2所述的用途,其中所述胃肠癌是胃癌。

8.根据权利要求2所述的用途,其中所述乳腺癌是非转移性或转移性乳腺癌。

9.根据权利要求2所述的用途,其中所述淋巴瘤是霍奇金病或非霍奇金淋巴瘤。

10.根据权利要求1-9中的任一项所述的用途,其中所述药物是固体或液体制剂。

11.根据权利要求1-9中的任一项所述的用途,其中所述受试者是哺乳动物。

12.根据权利要求11所述的用途,其中所述哺乳动物是人。

13.2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖或其药学上可接受的盐与检验点抑制剂联合在制备用于在有此需要的受试者的癌症的治疗或肿瘤细胞的增殖的抑制中开始、增强或延长检验点抑制剂的作用或使受试者能对检验点抑制剂做出应答的药物中的用途,其中所述检验点抑制剂是派姆单抗或克隆J43。

14.根据权利要求13所述的用途,其中所述应答选自抑制肿瘤生长、诱导肿瘤细胞死亡、肿瘤消退、预防或延迟肿瘤复发、肿瘤生长、肿瘤传播和肿瘤消除。

15.根据权利要求13或权利要求14所述的用途,其中所述癌症选自:肺癌、胃肠癌、头颈癌、包括恶性神经胶质瘤和脑转移灶的脑癌、恶性间皮瘤、恶性黑素瘤、梅克尔细胞癌或骨肉瘤、多发性骨髓瘤、淋巴瘤、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、骨髓增生异常综合征和急性成淋巴细胞性白血病、乳腺癌、激素敏感的或激素难治的前列腺癌、结直肠癌、卵巢癌、肝细胞癌、肾细胞癌、胰腺癌、食道癌、胆管细胞癌和软组织肉瘤。

16.根据权利要求15所述的用途,其中所述癌症是非小细胞肺癌、乳腺癌或结直肠癌。

17.根据权利要求15所述的用途,其中所述肺癌是非小细胞肺癌或小细胞肺癌。

18.根据权利要求15所述的用途,其中所述结直肠癌是转移性结直肠癌。

19.根据权利要求15所述的用途,其中所述头颈癌是头和颈鳞状细胞癌。

20.根据权利要求15所述的用途,其中所述胃肠癌是胃癌。

21.根据权利要求15所述的用途,其中所述乳腺癌是非转移性或转移性乳腺癌。

22.根据权利要求15所述的用途,其中所述淋巴瘤是霍奇金病或非霍奇金淋巴瘤。

23.根据权利要求13或权利要求14所述的用途,其中所述药物是固体或液体制剂。

24.根据权利要求13或权利要求14所述的用途,其中所述受试者是哺乳动物。

25.根据权利要求24所述的用途,其中所述哺乳动物是人。

与检验点抑制剂联合使用2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖的癌症治疗

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年12月4日提交的美国临时专利申请号62/263,228、2016年3月15日提交的美国临时专利申请号62/308,583和2016年4月13日提交的美国临时专利申请号62/321,857的权益,它们中的每一篇整体并入本文并用于所有目的。

背景技术

[0003] L-岩藻糖(也被称作6-脱氧-L-半乳糖)是一种单糖,其为动物中的一些N-和O-连接的聚糖和糖脂的组分(参见Becker和Lowe, Glycobiology 13:41R-51R (2003))。岩藻糖通常作为末端修饰添加至聚糖,包括与血型抗原、选择蛋白和抗体连接的聚糖。岩藻糖可以被特异性岩藻糖基转移酶经由 $\alpha(1,2)-$ 、 $\alpha(1,3)-$ 、 $\alpha(1,4)-$ 和 $\alpha(1,6)-$ 键连接至聚糖。 $\alpha(1,2)-$ 岩藻糖键通常与H-血型抗原有关。 $\alpha(1,3)-$ 和 $\alpha(1,4)-$ 岩藻糖键与Lewis^X抗原的修饰有关。 $\alpha(1,6)-$ 岩藻糖键与N-连接的GlcNAc分子(诸如在抗体上的那些)有关。

[0004] 据信蛋白的岩藻糖基化在哺乳动物发育中起作用。对于FX基因的靶向突变而言纯合的小鼠表现出多向性异常,包括致命的表型。也报道了来自杂合杂交的小鼠的恢复减弱(Becker等人,Mammalian Genome 14:130-139 (2003))。已经提出异常的蛋白岩藻糖基化与人类疾病有关,包括唾液酸基Lewis^X在癌症中的上调。这些聚糖是E-和P-选择蛋白分子的配体。据推测,在癌细胞上的唾液酸基Lewis^X聚糖的增加通过与内皮上的E-和P-选择蛋白的相互作用而增加转移灶。已经在国际申请WO 2012019165(其通过引用并入本文)中描述了岩藻糖类似物(包括2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖)的体内施用、它们对蛋白去岩藻糖基化的作用和它们用于治疗癌症的潜在用途。

[0005] 已经研究了作为免疫系统的T-细胞上的关闭开关起作用的免疫检验点以恢复与被靶向的试剂的免疫应答,从而通过活化身体的免疫系统间接地治疗癌症。

[0006] 国际申请W02002086083、W02004004771、W02004056875、W02006121168、W02008156/12、W020100//634、W02011066389、W02014055897和W02014100079报道了PD-1、PD-L1抑制性抗体和/或鉴别这样的抗体的方法。此外,美国专利诸如US8735553和US8168757报道了PD-1或PD-L1抑制性抗体和/或融合蛋白。W02002086083、W02004004771、W02004056875、W02006121168、W02008156712、W02010077634、W02011066389、W02014055897和W02014100079、以及US8735553和US8168757的公开内容通过引用整体并入本文。

[0007] 此外,国际申请W02011161699、W02012168944、W02013144704、W02013132317和W0 2016044900报道了能够遏制和/或抑制程序性细胞死亡1(PD-1)信号传递途径的肽或肽拟似物化合物。W02011161699、W02012168944、W02013144704、W02013132317和W0 2016044900的公开内容通过引用整体并入本文。

[0008] 此外,国际申请W0 2016142852、W0 2016142894、W0 2016142886、W0 2016142835和W0 2016142833报道了能够遏制和/或抑制程序性细胞死亡1(PD-1)信号传递途径和/或通过抑制由PD-1、PD-L1或PD-L2诱导的免疫抑制信号来治疗障碍的小分子化合物。W0 2016142852、W0 2016142894、W0 2016142886、W0 2016142835和W0 2016142833的公开内容

通过引用整体并入本文。

[0009] 近年来,伊匹木单抗(Yervoy[®]) (一种靶向细胞毒性的T-淋巴细胞相关抗原4(CTLA-4)的单克隆抗体)和保疾伏(nivolumab)(Opdivo[®]) (一种靶向T-细胞表面上的程序性细胞死亡蛋白1途径(PD-1)的单克隆抗体)已经被美国食品和药品管理局批准用于治疗晚期黑素瘤、晚期肾细胞癌和非小细胞肺癌。但是,当前的检验点抑制剂疗法在癌症受试者群体的相对小群体中有效地治疗癌症,这部分地由于预先存在的免疫活化和抑制性受体的存在。因此,需要开发方法和联合疗法来开始或增强检验点抑制剂在无应答受试者群体和有应答受试者群体中的有效性。

发明内容

[0010] 本发明公开了使用2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖(在本文中也被称作“2FF”)和检验点抑制剂的联合疗法,其有效地治疗癌症或抑制受试者中的肿瘤细胞的增殖和/或其可以开始、增强或延长对肿瘤细胞的免疫应答。

附图说明

[0011] 图1A显示了在有或没有使用KLH-缀合的A20Id Fab(20mM 2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖在饮用水中)的疫苗接种的情况下2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖对BALB/c小鼠中静脉内植入的A20小鼠淋巴瘤细胞的生长的体内作用。

[0012] 图1B显示了与使用KLH-缀合的A20Id Fab(20mM 2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖在饮用水中)的疫苗接种组合的免疫细胞子集除去在2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖对BALB/c小鼠中静脉内植入的A20小鼠淋巴瘤细胞的生长的体内作用上的影响。

[0013] 图2A显示了在含血清的培养基中与T-细胞共培养的DC上的树突细胞(也被称作“DC”)标志物的测量(与对照共培养物相比2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理过的共培养物的MFI)。

[0014] 图2B显示了在无血清培养基中与T-细胞共培养的DC上的DC标志物的测量(与对照无血清共培养物相比2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理过的无血清共培养物的MFI)。

[0015] 图3显示了对于三种不同的四聚体(EBV、M1和CMV)而言与T-细胞结合的四聚体的对比(与对照T-细胞相比与2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理过的T-细胞的结合的MFI)。

[0016] 图4显示了CD3/CD28活化的T-细胞中的ZAP的由TCR介导的磷酸化(具有或没有2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理)。

[0017] 图5显示了通过FACS评价的具有或没有2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理下T-细胞中的半乳糖凝集素-3的表达。

[0018] 图6显示了与用TGF β 刺激的对照T-细胞相比在2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理过的T-细胞中的SMAD2的磷酸化的对比。

[0019] 图7A和7B显示了与对照T-细胞相比在2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理过的T-细胞中的FOXP3表达和调节性T-细胞的百分比的对比。

[0020] 图8A、8B和8C分别显示了在(A) INF γ 、(B) IL12p40和(C) CD40L中的T-细胞/DC共培养物细胞因子。

[0021] 图9显示了A20疫苗模型细胞因子评价, KLH-独特型(对照)相对于2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖+KLH-独特型(2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖)(BALB/c小鼠)。

[0022] 图10A和10B分别显示了人共培养物中的IFN γ 和IL-12p70的体外生产。

[0023] 图11显示了2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖、抗-PD1抗体、以及2FF与抗-PD1抗体的组合对BALB/c小鼠中静脉内植入的A20小鼠淋巴瘤细胞的生长的体内作用(20mM 2FF在饮用水中, 5mg/kg抗-PD1 q3x3)。

[0024] 图12A-C显示了在肿瘤微环境中的活跃免疫应答。

具体实施方式

[0025] 本发明描述了一种基于活化或增强适应性免疫应答的新联合疗法。适应性免疫应答机制暗示, 检验点抑制剂将仅在有预先存在的抗肿瘤免疫应答(即, 活化的T-细胞)存在时起作用或更有效地起作用。例如, 在不具有预先存在的抗肿瘤应答的患者中, 单独的检验点抑制剂将潜在地不是有效的。因此, 可以活化抗肿瘤活性(例如, 抗肿瘤免疫应答)和抑制检验点阻断的联合疗法是优选的, 因为它将允许对单独检验点抑制剂的治疗没有做出应答的受试者从该联合治疗受益。

[0026] 本发明尤其提供了用于治疗癌症的方法, 所述方法包括与检验点抑制剂联合地给有此需要的受试者施用有效量的2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖或其前药或其药学上可接受的盐。本发明还尤其提供了用于抑制有此需要的受试者中的肿瘤增殖的方法, 所述方法包括与检验点抑制剂联合地给所述受试者施用有效量的2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖或其前药或其药学上可接受的盐。本发明进一步尤其提供了用于在有此需要的受试者中增强或延长检验点抑制剂的作用或使受试者能对检验点抑制剂做出应答的方法, 所述方法包括与检验点抑制剂联合地给所述受试者施用有效量的2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖或其前药或其药学上可接受的盐。

[0027] 在某些方面, 2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖或其前药或其药学上可接受的盐与施用的检验点抑制剂的组合会在癌症的治疗中或在肿瘤细胞的增殖的抑制中提供累加或协同效应。在另一个方面, 2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖或其前药或其药学上可接受的盐与施用的检验点抑制剂的组合会在癌症的治疗中或在肿瘤细胞的增殖的抑制中提供协同效应。在另一个方面, 与检验点抑制剂联合地施用2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖或其药学上可接受的盐。在另一个方面, 与检验点抑制剂联合地施用2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖的前药或其药学上可接受的盐。在某些实施方案中, 与检验点抑制剂联合地施用2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖的羧酸酯前药或其药学上可接受的盐。在某些实施方案中, 与检验点抑制剂联合地施用2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖的乙酸酯或其药学上可接受的盐。

[0028] 在某些实施方案中, 所述检验点抑制剂是生物学治疗剂或小分子。在某些实施方案中, 所述检验点抑制剂选自单克隆抗体、人源化抗体、全人抗体和融合蛋白或它们的组合。在某些实施方案中, 所述检验点抑制剂抑制检验点蛋白的配体或与检验点蛋白的配体相互作用, 所述检验点蛋白的配体选自CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、BMA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD160、CGEN-15049、CHK 1、CHK2、A2aR和B-7家族配体或它们的组合。在某些实施方案中, 所述检验点抑制剂是PD-L1、PD-L2或PD-1抑制剂。在某些实施方案中, 所述检验点抑制剂是PD-1抑制剂。在某些实施方案中, 作为检验点抑制剂

的PD-1抑制剂是保疾伏或派姆单抗(pembrolizumab)。在另一个实施方案中,作为检验点抑制剂的PD-1抑制剂是保疾伏。

[0029] 在某些实施方案中,所述癌症是实体瘤。在某些实施方案中,所述癌症是液体肿瘤。在某些实施方案中,所述癌症选自泌尿生殖器癌、妇科癌、肺癌、胃肠癌、头颈癌、脑癌(包括恶性神经胶质瘤和脑转移灶)、恶性间皮瘤、非转移性或转移性乳腺癌、恶性黑素瘤、梅克尔细胞癌或骨和软组织肉瘤、血液学瘤形成、多发性骨髓瘤、淋巴瘤诸如霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、骨髓增生异常综合征和急性成淋巴细胞白血病、非小细胞肺癌(NSCLC)、乳腺癌、转移性结直肠癌、激素敏感的或激素难治的前列腺癌、结直肠癌、卵巢癌、肝细胞癌、肾细胞癌、胰腺癌、胃癌、食道癌、肝细胞癌、胆管细胞癌、头和颈鳞状细胞癌、软组织肉瘤和小细胞肺癌。在某些实施方案中,所述癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)、乳腺癌或结直肠癌。在某些实施方案中,所述癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)。在某些实施方案中,将包含2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖或其前药或其药学上可接受的盐的组合物施用给受试者。在某些实施方案中,所述组合物是固体或液体制剂。在某些实施方案中,将所述检验点抑制剂和2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖同时或以任意次序依次施用。在某些实施方案中,所述受试者是哺乳动物。在某些实施方案中,所述哺乳动物是人。

[0030] 定义

[0031] 术语“抑制”或“……的抑制”是指减少可测量的量,或完全阻止。本文中使用的术语抑制可以表示至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%或至少约99%的抑制或减少。

[0032] 术语“治疗”或“处理”表示减慢、停止或逆转患者中的疾病或病症的进展,如通过疾病或病症的临床或诊断征状的减少或消除所证实的。治疗可以包括,例如,征状的严重程度、征状的数目或复发的频率的减少。

[0033] 术语“药学上可接受的”是指被联邦或州政府的管理机构批准,或在美国药典中列出,或在用于动物且更特别是人类的其它普遍公认的药典中列出。术语“药学上适合的成分”表示与2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖一起施用的药学上可接受的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。

[0034] 本文中使用的术语“前药”表示这样的化合物:其在体内施用后转化成该化合物的活性形式。例如,活性化合物的前药形式可以是,但不限于,活性化合物的酰化(乙酰化或其它)和醚衍生物、羧酸酯或磷酸酯和各种盐形式。本领域普通技术人员会认识到如何容易地将主题发明的化合物修饰成前药形式以促进活性化合物向宿主生物体或患者内的靶部位的递送。在适用时,熟练的技术人员也将利用前药形式的有利药代动力学参数,将期望的化合物递送至宿主生物体或患者内的靶部位以使所述化合物在癌症治疗中的预期作用最大化。

[0035] 2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖或其前药或其药学上可接受的盐通常是基本上纯的,没有不希望的污染物。这意味着,2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖或其前药或其药学上可接受的盐通常是至少约50%w/w(重量/重量)或约80%w/w纯度,更优选地至少约90%或约95%w/w纯度,以及基本上不含有杂质和其它污染物。使用常规纯化技术,可以得到至少99%w/w的均匀产物。

[0036] 术语“受试者”或“患者”对于治疗的目的而言表示任何动物,特别是被归类为哺乳动物的动物,所述哺乳动物包括人类、驯化动物和耕作动物,和动物园动物、体育动物或宠物动物,诸如狗、马、猫、奶牛等。优选地,所述受试者是人。

[0037] 术语“治疗有效量”或“有效量”表示如本文中所述的一种或多种试剂或组合物的量,其足以减慢、停止或逆转受试者中的癌症的进展或增加患者的存活。治疗有效量可以表示已经被证实例如有效地减慢疾病进展的靶标血清浓度。当术语“治疗有效量”用于表示联合疗法时,它表示组合在一起使得组合的效应引起期望的生物学或医学应答的试剂的组合的量。可以以常规方式测量效力,取决于要治疗的病症。例如,在肿瘤疾病中,通过评估至疾病进展的时间 (TTP) 或确定应答率 (RR),可以测量效力。

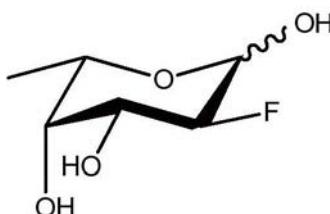
[0038] 本文中使用的术语“协同作用”或“协同效应”当与试剂组合的效力的描述结合使用时,是指所述组合的大于从各种试剂的效果的总和预测到的效果的任何测量效果。

[0039] 本文中使用的术语“累加”或“累加效应”当与试剂组合的效力的描述结合使用时,是指所述组合的类似于从各种试剂的效果的总和预测到的效果的任何测量效果。

[0040] 治疗方法

[0041] 在固相中的2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖具有如下的化学结构 (I) :

[0042]



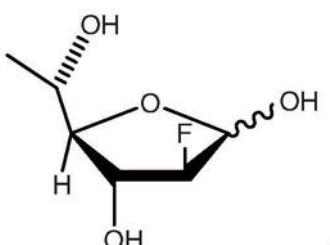
其可以是 α 或 β 端基异构体。

,

(I)

[0043] 在溶液中,2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖可以经由对应的醛糖形式互变成具有如下化学结构 (II) 的化合物:

[0044]



。

(II)

[0045] 因此,本文中使用的术语“2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖”表示式 (I)、(II) 的化合物或对应的醛糖形式或其混合物,其中式 (I) 或 (II) 中的每一个可以独立地是 α 或 β 端基异构体。

[0046] 在WO 2009/135181中描述了2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖,其减少岩藻糖向宿主细胞在体外产生的抗体或抗体衍生物的复杂N-糖苷-连接的糖链中的掺入。在WO 2012/019165中描述了2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖以及它的潜在抗肿瘤作用,其当在体内施用时抑制蛋白岩藻糖基化。WO 2009/135181和WO 2012/019165的公开内容通过引用整体并入本申请的公开内容中。

[0047] 已经令人惊讶地发现,2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖会减少调节性T-细胞。在本文提供

的方法中,2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖可以用作免疫调节剂来治疗癌症,这是由于T-细胞活性的变化(当它们通过2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理而岩藻糖基化时被诱导)。发生的变化包括调节性T-细胞群体的减少、抗原呈递细胞的T-细胞活化的增加、以及增加的T-细胞受体信号传递(其又可以导致增加的APC活化)。T-细胞活性的该调节的结果将是减少免疫抑制性的肿瘤微环境以及增加T-细胞和APC活化。因而,用2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理将导致增加的宿主介导的抗肿瘤免疫应答,从而导致肿瘤进展的延迟或至肿瘤开始的延迟。所述抗肿瘤活性也可以与2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理过的T-细胞的直接过继转移一起发生。用于本文提供的方法的2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖可以与检验点抑制剂联合地以有效地治疗受试者(诸如如有此需要的人)中的癌症的量安全地施用给受试者。在本文提供的方法中,与检验点抑制剂组合的2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖也提供了比现有PD-1联合疗法(诸如PD-1抑制剂和CTLA-4抑制剂的组合)更好的安全性谱。

[0048] 在某些实施方案中,当与癌症疫苗一起施用时,2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖(或2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖的细胞内代谢物或产物)会增加体液和细胞免疫应答。在某些实施方案中,2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖(或2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖的细胞内代谢物或产物)会增加CD45R01+T-细胞群体(记忆T-细胞表型)。在某些实施方案中,2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖(或2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖的细胞内代谢物或产物)处理过的T-细胞会活化树突细胞胜过未处理过的(对照)T-细胞。在某些实施方案中,2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖(或2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖的细胞内代谢物或产物)会增加抗原-特异性的(例如,EBV-特异性的)四聚体结合。在某些实施方案中,2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖(或2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖的细胞内代谢物或产物)会减少调节性T-细胞群体以及FOXP3+细胞的数目。已经证实抗-CTLA4检验点抑制剂会减少调节性T-细胞群体,且已经成功地与具有不同机制靶标的其它检验点抑制剂(诸如抗-PD1和抗-PD-L1抗体)组合。因而,在某些实施方案中,将2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖(或2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖的细胞内代谢物或产物)与另一种检验点抑制剂(诸如抗-PD1或抗-PD-L1抗体)联合施用。

[0049] 本文提供的2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖可用于治疗受试者中的癌症。2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖向有此需要的动物(例如,哺乳动物,诸如人)的施用可以导致肿瘤细胞或癌细胞的繁殖的抑制,或动物(例如,人患者)中的癌症的治疗。因此,2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖可以用在多种场合中用于治疗动物癌症。

[0050] 用2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖可以治疗的特定癌症类型包括实体瘤和血液学恶性肿瘤。这样的癌症包括、但不限于:(1)实体瘤,包括、但不限于纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、结直肠癌、肾癌、胰腺癌、骨癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、食管癌、胃癌、口癌、鼻癌、喉癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管原癌、肾细胞癌、肝细胞瘤胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、威尔曼瘤、宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、小细胞肺癌、膀胱癌、肺癌、上皮癌、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、多形性星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、皮肤癌、黑素瘤、神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤;(2)血液传播的癌症,包括、但不限于急性成淋巴细胞性白血病“ALL”、急性成淋巴细胞性B-细胞白血病、急性成淋巴细胞性T-细胞白血病、急性

成髓细胞白血病“AML”、急性早幼粒细胞性白血病“APL”、急性成单核细胞性白血病、急性红白细胞性白血病、急性巨核母细胞性白血病、急性粒单核细胞性白血病、急性非淋巴细胞性白血病、急性未分化性白血病、慢性粒细胞性白血病“CML”、慢性淋巴细胞性白血病“CLL”、毛细细胞白血病、多发性骨髓瘤、急性和慢性白血病,例如,成淋巴细胞性髓性白血病和淋巴细胞性粒细胞性白血病,和(3)淋巴瘤诸如霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、沃尔登斯泰伦巨球蛋白血症、重链病和真性红细胞增多症。

[0051] 在某些方面,2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖可以以至少10mM的浓度溶解在制剂缓冲液(例如水性制剂缓冲液)中。在某些实施方案中,2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖可以以至少100mM的浓度溶解在制剂缓冲液中。在某些方面,2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖可以以至少100 μ g/ml、至少1mg/ml、至少50mg/ml、至少约100mg/ml、至少约200mg/ml或至少约300mg/ml的浓度溶解在制剂缓冲液(例如水性制剂缓冲液)中。

[0052] 可以将2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖或它的前药或其药学上可接受的盐配制为药物组合物,其包含治疗或预防有效量的2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖或它的前药或其药学上可接受的盐和一种或多种药学上适合的(可接受的)成分。在某些方面,提供了适合用于施用给哺乳动物的2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖和药物赋形剂的药物组合物,其中有有效量的2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖与赋形剂混合。在优选的方面,将2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖配制成用于施用给人。因此,本发明提供了配制成用于施用给人的包含2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖的药物组合物。配制的2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖通常将包含一种或多种药学上适合的(可接受的)成分。

[0053] 示例性的药物或非药物组合物通常包括一种或多种载体(例如,无菌的液体,诸如水和油,包括石油、动物、植物或合成起源的那些,诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等)。当静脉内地施用药物组合物时,水是更典型的载体。盐水溶液和葡萄糖水溶液和甘油溶液还可以用作液体载体,尤其是可注射溶液的液体载体。合适的赋形剂包括,例如,氨基酸、淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、二醇、水、乙醇等。如果需要的话,组合物也可以含有少量润湿剂或乳化剂、或pH缓冲剂。这些组合物可以采取溶液、混悬液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、持续释放制剂等的形式。合适的药用载体的例子被E.W.Martin记载在“Remington's Pharmaceutical Sciences”中。这样的组合物通常将含有治疗有效量的2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖(通常以纯化形式)以及合适量的载体,以便提供适合施用给受试者的形式。所述制剂与施用模式对应。

[0054] 本文描述的药物组合物可以呈允许将所述组合物施用给动物(例如,哺乳动物)的任何形式。所述组合物可以呈固体或液体的形式。典型的施用途径包括、但不限于,口服、胃肠外和舌下。胃肠外施用包括皮下注射、腹膜内注射、静脉内、肌肉内、胸骨内注射或输注技术。优选地,口服施用所述组合物。可以配制这些药物组合物,从而在将所述组合物施用给动物后允许2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖是生物可利用的。组合物还可以呈一个或多个剂量单位的形式,其中例如片剂可以是单个剂量单位,且处于固体形式的2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖的容器可以容纳多个剂量单位。

[0055] 用于制备药物组合物的材料在使用的量可以是无毒的。本领域普通技术人员会明白,所述药物组合物中的活性成分的最佳剂量将取决于多种因素。有关的因素包括、但不限于,动物(例如,人)的类型、2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖的特定形式、施用方式、采用的组合物和

正在治疗的疾病或病症的严重程度。

[0056] 所述药学上可接受的载体或媒介物可以是微粒,使得所述组合物呈例如片剂或粉末形式。所述载体可以是液体,所述组合物是例如口服糖浆剂、矫味的水或可注射的液体。

[0057] 当意图用于口服施用时,所述组合物优选地呈固体或液体形式,其中将半固体、半液体、混悬液和凝胶形式包括于在本文中视作固体或液体的形式中。

[0058] 作为用于口服施用的固体组合物,可以将所述组合物配制成粉末剂、颗粒剂、压缩片剂、丸剂、胶囊剂、口香糖、糯米纸囊剂等形式。这样的固体组合物通常含有一种或多种惰性稀释剂。另外,以下一种或多种可以存在:粘合剂诸如羧甲纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素或明胶;赋形剂诸如淀粉、乳糖或糊精,崩解剂诸如海藻酸、海藻酸钠、Primogel、玉米淀粉等;润滑剂诸如硬脂酸镁或Sterotex;助流剂诸如胶体二氧化硅;甜味剂诸如蔗糖或糖精,矫味剂诸如薄荷、水杨酸甲酯或橙味剂,和着色剂。

[0059] 当所述组合物呈胶囊剂(例如,明胶胶囊剂)的形式时,除了以上类型的物质以外,它还可以含有液体载体诸如聚乙二醇、环糊精或脂肪油。

[0060] 所述组合物可以呈液体的形式,例如,酏剂、糖浆剂、溶液剂、乳剂或混悬液。所述液体可以用于口服施用或用于注射递送。当意图用于口服施用时,组合物可以包含甜味剂、防腐剂、染料/着色剂和增味剂中的一种或多种。在某些方面,将所述组合物配制成粉末,且最终用户将所述粉末混合在水溶液中用于口服施用。在用于通过注射施用的组合物(如上所述)中,还可以包括表面活性剂、防腐剂、润湿剂、分散剂、助悬剂、缓冲剂、稳定剂和等渗剂中的一种或多种。

[0061] 如上面所指出的,在本文所述的方法中有效的2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖的量将取决于障碍或病症的性质,且可以通过标准临床技术确定。另外,可以任选地采用体外或体内测定以帮助鉴别最佳的剂量范围。要在所述组合物中采用的精确剂量也取决于施用途径和所述疾病或障碍的严重程度,且应当根据从业人员的判断和每位患者的情况来决定。

[0062] 所述组合物包含有效量的2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖,从而将得到合适的剂量。通常,该量是所述组合物重量的至少约0.01%的2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖。在某些方面,当意图用于口服施用时,可以将该量变化至所述组合物的重量的约0.1%至约100%范围。优选的口服组合物可以包含,例如,所述组合物的重量的约4%至100%、4%至75%、或4%至约50%的2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖。

[0063] 在某些方面,对于静脉内施用,施用的量将在约1至约500mg/kg体重的2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖范围内。

[0064] 通常,施用给动物的2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖的口服剂量是约1mg/kg至约1g/kg动物体重,更通常地约5mg/kg、10mg/kg、25mg/kg、50mg/kg、100mg/kg、150mg/kg、200mg/kg、250mg/kg或300mg/kg至约500mg/kg动物体重。在某些方面,施用给动物的剂量是每天约1g、约5g、或约10g至约150g,或每天约1g、约5g、约10g、约15g或约20g至约60g。

[0065] 通常,根据期望的作用,可以按每天、每周、每2周或每月计划施用2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖或其药物组合物。在某些方面,可以将2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖或其药物组合物施用约1-5个、约1至约10个、约1至约15个、或更多个周期,其中每个周期是持续1个月。在每个周期内的剂量可以按每天(包括每天1次、每天2次或每天超过2次)、每2天、每周2次、每周、每2周、每3周1次或每月施用。周期可以任选地包括静止阶段。可替换地,可以将静止阶段包括

在周期之间。在某些方面,施用将针对疾病的持续期间。

[0066] 2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖或其药物组合物的优选施用模式由从业人员决定,且将部分地取决于医学病症的部位。在一个实施方案中,胃肠外地施用2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖或组合物。在另一个实施方案中,口服施用2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖或组合物。

[0067] 在另一个实施方案中,可以在囊泡、特别是脂质体中递送2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖(参见Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treat等人,见LIPOSOMES IN THE THERAPY OF INFECTIOUS DISEASE AND CANCER, Lopez-Berestein和Fidler(编), Liss, New York, 第353-365页 (1989); Lopez-Berestein, 文献同上, 第317-327页; 通常参见以上文献)。

[0068] 在另一个实施方案中,可以在控释系统中递送2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖或组合物。在一个实施方案中,可以使用泵(参见 Langer, 出处同上; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201 (1987); Buchwald等人, Surgery 88: 507 (1980); Saudek等人, N. Engl. J. Med. 321: 574 (1989))。在另一个实施方案中,可以使用聚合材料(参见 MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, Langer和Wise(编), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); CONTROLLED DRUG BIOAVAILABILITY, DRUG PRODUCT DESIGN AND PERFORMANCE, Smolen和Ball(编), Wiley, New York (1984); Ranger和Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61 (1983); 也参见 Levy等人, Science 228: 190 (1985); During等人, Ann. Neurol. 25: 351 (1989); Howard等人, J. Neurosurg. 71: 105 (1989))。可以使用在 Langer (Science 249:1527-1533 (1990)) 的综述中讨论的其它控释系统。

[0069] 术语“载体”表示与2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖一起施用的稀释剂、佐剂或赋形剂。这样的药用载体可以是液体,例如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些油,诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。所述载体可以是盐水、金合欢树胶、明胶、淀粉糊剂、滑石粉、角蛋白、胶态二氧化硅、脲等。另外,可以使用辅助剂、稳定剂、增稠剂、润滑剂和着色剂。在一个实施方案中,当施用给动物时,2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖或组合物和药学上可接受的载体是无菌的。当静脉内地施用2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖时,水是优选的载体。盐水溶液和葡萄糖水溶液和甘油溶液还可以用作液体载体,尤其是可注射溶液的液体载体。合适的药用载体还包括赋形剂诸如淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、水稻、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果需要的话,本组合物还可以含有微量润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。

[0070] 免疫检验点表示免疫系统中负责维持自身耐受性和调节免疫系统应答的程度以使周围组织损伤最小化的抑制途径。但是,肿瘤细胞还可以活化免疫系统检验点以减少免疫应答(‘阻断’免疫应答)对肿瘤组织的有效性。不同于大多数的抗癌剂,检验点抑制剂不直接靶向肿瘤细胞,而是靶向淋巴细胞受体或它们的配体以便增强免疫系统的内源性抗肿瘤活性(Pardoll, 2012, Nature Reviews Cancer 12:252-264)。使用针对免疫系统检验点(诸如CTLA4、PD1和PD-L1)的拮抗性检验点阻断抗体的疗法是用于癌症和其它疾病的免疫疗法的最有前途的新途径之一。另外的检验点靶标(诸如TIM-3、LAG-3、各种B-7配体、CHK 1和CHK2激酶、BTLA、A2aR和其它)也在研究中。目前,三种检验点抑制剂已经被美国食品和药品管理局快速批准用于癌症治疗,包括伊匹木单抗(Yervoy®)(一种CTLA-4抑制剂)和派姆单抗(Keytruda®)和保疾伏(Opdivo®)(两种PD-1抑制剂)。另外,几种检验点抑制剂处

于临床试验中。

[0071] 最近的数据提示抗-CTLA-4抗体的第二种机制,其可以发生在肿瘤本身内。已经发现CTLA-4在肿瘤中与肿瘤内效应T-细胞(在本文中也被称作“Teff细胞”)相比在调节性T-细胞(在本文中也被称作“Treg细胞”)上以更高的水平表达,从而产生了抗-CTLA-4优先影响Treg细胞的假设。“Therapeutic use of anti-CTLA-4antibodies”,Christian U.Bank and Alexander Enk,International Immunology,第27卷,第1期,第3-10页。PD-1和CTLA-4组合的一项新近研究表明,CTLA-4和PD-1途径的联合阻断也协作以增加Teff细胞与调节性T-细胞和MDSC的比率,由此减少遏制和促进肿瘤微环境中的炎症。“Combination of CTLA-4and PD-1blockade expands infiltrating T-cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16melanoma tumors”,Curran等人,PNAS|2010年3月2日|第107卷|第9期|4275-4280。检验点抑制剂和另一种治疗剂的组合可以增强或延长检验点抑制剂的抗肿瘤应答和/或治疗剂的作用。在这点上,WO 2015/069770公开了用于治疗癌症的基于活化适应性免疫应答的联合疗法,特别是CTLA-4和PD-1抑制剂的组合。WO 2015/069770的公开内容通过引用整体并入本申请的公开内容中。

[0072] 检验点阻断抗-CTLA-4抗体介导抗肿瘤作用的一种机制是通过减少调节性T-细胞。由于抗-CTLA-4抗体的独特作用机理,它们可以成功地与抗-PD1检验点阻断抗体组合,所述抗-PD1检验点阻断抗体起作用以释放提供给效应T-细胞的遏制性信号传递。这些抗体的双重阻断组合以在临床前(Proc Natl Acad Sci USA 2010,107,4275-4280)和在临幊上(N Engl J Med 2013,369,122-133;N Engl J Med 2015,372,2006-2017)改善抗肿瘤应答。

[0073] 通常,通过标准临幊技术可以确定在癌症的治疗中有效的2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖和检验点抑制剂的最佳量。另外,可以任选地采用体外测定,以辅助鉴别最佳剂量范围。要在所述制剂中采用的精确剂量还将取决于施用途径和恶性肿瘤的阶段,且应当根据从业人员的判断和每位患者的情况来决定。可以从来源于体外或动物模型试验系统的剂量-响应曲线外推有效剂量。

[0074] 在另一个方面,将检验点抑制剂和2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖同时或以任意次序依次施用。在一个具体的方面,所述检验点抑制剂是PD-1抑制剂或CTLA-4抑制剂。在另一个具体方面,所述检验点抑制剂是PD-1抑制剂。

[0075] 在某些实施方案中,将2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖和检验点抑制剂以最大耐受剂量(MTD)或最佳生物剂量(OBD)施用给受试者。确定MTD或OBD是在本领域内。在某些方面,将2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖在它的MTD或OBD提供,并将检验点抑制剂在MTD或OBD的50%-100%、优选50%至90%施用。可替换地,将检验点抑制剂在它的MTD或OBD施用,并将2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖在MTD或OBD的50%-100%、优选50%至90%施用。在某些方面,将2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖和检验点抑制剂在MTD或OBD的60%至90%施用。

[0076] 如在本发明中使用的,所述组合方案可以同时施用,或可以在交错方案中施用,其中在疗程中与2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖不同的时间施用检验点抑制剂。在两种药剂的施用之间的该时间差可以在几分钟、几小时、几天、几周或更长的范围内。因此,术语组合不一定意味着同时或作为单位剂量施用,而是在期望的治疗阶段中施用每种组分。也可以通过不同途径施用所述药剂。

[0077] 本文还提供了2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖的前药、或2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖或它的前药的药学上可接受的盐。因此，在本文提供的不同实施方案中的任一个中，可以使用2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖的前药、或2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖或它的前药的药学上可接受的盐。

[0078] 通过参考以下详细描述、具体实施方案的非限制性实施例和附图，可以更充分地理解本发明的这些和其它方面。

[0079] 实施例

[0080] 提供了实施例来辅助本发明的进一步理解。使用的特定材料、方案和条件意图成为本发明的进一步示例，且不应当解释为限制其合理范围。

[0081] 实施例1.具有免疫子集除去的A20小鼠淋巴瘤研究

[0082] 如在Okeley等人PN4S 2012中所述制备KLH-A20Id Fab。在含有10%FBS、10mM HEPES、1mM丙酮酸钠、50μM 2-巯基乙醇和青霉素(100U/ml)/链霉素(100μg/ml) (PS) 的RPMI 1640中培养A20细胞(ATCC)。在第-21天给免疫接种组(BALB/c, Harlan)与TiterMax佐剂一起(1:1)皮下地注射KLH-Fab缀合物(50μg)，在第-7天强化。2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖治疗组在第-14天开始接受含有20mM 2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖的饮用水。在第二次疫苗接种以后1周(第0天)，所有小鼠接受 2.5×10^6 个A20肿瘤细胞(静脉内)。2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理持续直到第21天，继之以正常饮用水。用在第-6、-5、-4、0和+7天施用的消耗抗体(200μg/小鼠，腹膜内)完成免疫细胞的除去。在第-1、7、14、21、29天在血液中验证通过抗-CD4 (GK1.5) 或-CD8 (53-6.72) 抗体实现的CD4或CD8 T-细胞除去(FACS分析)。在第0和29天在来自BALB/c小鼠的脾中看到了类似的结果。图1A和1B证实，CD4或CD8T-细胞的除去会降低A20独特型疫苗+2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖组合的活性。因而CD4和CD8 T-细胞在组合活性中起作用。

[0083] 实施例2.从全血分离T-细胞和树突细胞

[0084] 从10mL全血分离T-细胞，将其首先在1200rpm(300x g)离心10min(没有制动)。将含有血小板的顶层小心地除去，而不破坏白血细胞层。然后将RosetteSep™人T-细胞富集混合液(来自StemCell technologies, Vancouver, BC的Pan T-细胞)加入剩余的血液(500μL/10mL血液)。将其温育20min，并然后将1mL FBS与10mL PBS一起加入。将Histopaque(20-25mL)放在50mL Falcon中，非常缓慢地覆盖制备的血液/PBS溶液。将其在没有制动下离心(25°C, 1500rpm, 25min)。将顶层除去，并然后将血沉棕黄层中的T-细胞移至新的50mL试管。将T-细胞用PBS洗涤，重新悬浮于1mL ACK裂解缓冲液中并补充至25mL，温育5min，用PBS补充至50mL，然后沉淀。将该红血细胞裂解步骤重复第二次。然后将T-细胞重新悬浮于T-细胞培养基(补充了10%胎牛血清(FCS)、1%PS的RPMI培养基)，并分入两个T25烧瓶(含有或不含100-200μM2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖)。加入CD3/CD28抗体包被的珠子(20μL/烧瓶，Miltenyi Biotec)以活化T-细胞。24小时以后，加入IL2(100ng/μL, R&D Systems)。每次将细胞传代，并加入新的IL2和2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖。

[0085] 与T-细胞类似地分离PBMC，例外是，使用90mL血液，并在除去血小板以后，没有加入RosetteSep™人T-细胞富集混合液，而是加入等体积的PBS(90mL)，然后覆盖在Histopaque上面。如上对Histopaque的离心产生含有PBMC的血沉棕黄层。红血细胞裂解以后，将PBMC重新悬浮于树突细胞(DC)培养基(30%DMEM 70%X-VIVO™15+2mM glutamax+10%ATB血清+1%PS)，在6-孔板中铺板，并温育过夜。次日，将上清液抽吸并抛弃，而将附着细胞在培养基中洗涤并然后每孔补充2mL补加了IL4(100ng/μL, R&D Systems)和GM-CSF

(200ng/μL, R&D Systems) 的培养基以使附着单核细胞分化成DC并繁殖。将所述板温育4-5天, 并然后将细胞移入T25烧瓶中。每次将细胞传代(每2-3天), 加入新的细胞因子。

[0086] T-细胞和DC的共培养

[0087] 在48孔板中以10:1 (T-细胞:DC) 的比率在DC培养基中进行共培养实验。在DC培养基中以共200μL/孔将DC (20000-30000/孔) 和10倍数量的T-细胞铺板在每个孔中。将共培养物温育24h, 此后针对如下所述的DC成熟标志物评价细胞。

[0088] Transwell共培养

[0089] 在24-孔板中执行Transwell测定。以500μL的终体积/孔, 如上所述将共培养物铺板。对于transwell样品, 将DC铺板在孔中, 并将T-细胞放入插入物中。然后将细胞温育24h, 并以与没有transwell的共培养物相同的方式检查。

[0090] 无血清共培养

[0091] 如所述使DC生长直到第8天, 此时将它们分入两个烧瓶中, 一个含有正常培养基, 另一个含有无血清培养基。尽管没有血清存在, X-VIVOTM15培养基含有帮助维持培养物健康的生长因子。如上在48-孔板中执行共培养实验。

[0092] 共培养物中的DC标志物的分析

[0093] 使用FACS分析检查共培养物。温育以后, 将细胞在含有人Fc块 (EMD Millipore) 的BD染色缓冲液 (BSA) 中洗涤, 并在冰上温育30min。然后将细胞用荧光地标记的抗-MHCII、抗-CD86、抗-CD83和抗-CD40第一抗体 (BD, 1:100或1:50在BD染色缓冲液 (BSA) 中) 或用适当的同种型对照 (冰, 暗, 40min) 染色。然后将细胞在BD染色缓冲液 (BSA) 中洗涤2次, 并在LSRII流式细胞计上分析。通过向前和侧向散射来鉴别DC, 并将在2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理过的培养物中的每种目标标志物的MFI与对照培养物的MFI进行对比。图2A和2B证实了对于含血清和无血清测定条件而言这些标志物之间的倍数差异。

[0094] 图2B证实, T-细胞与自体DC的共培养实验揭示, 2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理过的T-细胞与对照T-细胞相比活化更多的DC。这通过DC活化和成熟标志物MHCII、CD86、CD83和CD40的增加来证实。这些增加是接触依赖性的, 因为当将Transwell插入物用于分离T-细胞和DC时它们不会发生, 从而提示, 可溶性因子不可能是唯一负责的。单独的DC没有表现出这些标志物的变化, 无论具有还是没有2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理。该相互作用也要求抗原存在才能实现这些细胞表面活化标志物的增加, 因为无血清培养基不会提供相同的增加。

[0095] 实施例3.T-细胞的四聚体染色

[0096] 抗原特异性的四聚体和阴性对照四聚体购自MBL (Woburn, MA)。将如上所述在有或没有2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖 (100μM) 存在下繁殖的T-细胞铺板在圆底96-孔板中, 离心, 并重新悬浮于含有人Fc块 (EMD Millipore) 的BD染色缓冲液 (BSA) 中, 并在室温温育10min。然后将细胞用期望的四聚体10μL/孔或阴性对照染色, 并在暗处在室温温育30min。将细胞离心并在BD染色缓冲液 (BSA) 中洗涤, 并然后重新悬浮于冷的BD BSA染色缓冲液中用于LSRII流式细胞计分析。图3证实了对于三种不同的四聚体 (EBV、M1和CMV; MBL Bio) 而言与对照T-细胞相比与2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理过的T-细胞的结合的MFI倍数变化。

[0097] 实施例4.TCR信号传递

[0098] 将经纯化的T-细胞铺板在6-孔板 (2.5x10⁶个细胞/孔, 2.5mL T-细胞培养基) 中并用CD3/CD28珠子 (20μL珠子/孔, Miltenyi Biotec, San Diego, CA) 在37°C活化0-4h。在指示

的时间,然后将样品收获,在PBS中洗涤,用RIPA缓冲液(Thermo Scientific,含有DNA酶和蛋白酶/磷酸酶抑制剂)裂解,并在干冰上快速冷冻,随后在-80℃贮存。将细胞裂解物($\sim 3\mu\text{g}$ /样品,通过BCA测定确定)在SDS-PAGE上泳动,并通过蛋白质印迹用抗-pZAP70抗体(Cell Signaling Technologies)在硝酸纤维素膜上检查。简而言之,将印迹在5%奶在TBST中的溶液(来自Cell Signaling Technologies的TBST)中在室温封闭1h,用TBST冲洗,并然后用第一抗体(抗-pZAP70 1:1000,在5%BSA在TBST中的溶液中)在4℃温育过夜。将印迹用TBST洗涤3次,并用HRP-缀合的第二抗体在室温探测1小时(1:2000,在5%脱脂奶在TBST中的溶液中),随后洗涤(3x TBST)和使用Cell Signaling Elite ECL按照生产商的说明书检测。使用AmershamTM600成像仪(GE Healthcare)扫描印迹。一旦成像,将印迹剥离,并使用其它第一抗体针对另外的标志物重新探测。关于该方法,在PBS中第一次洗涤以后,将膜使用来自Thermo Scientific的RestoreTMPLUS Western Blot Stripping Buffer在室温剥离30分钟。此后,将膜在TBST中洗涤,并用5%奶在TBST中的溶液在室温封闭1小时。然后遵循以上印迹方案,用于总ZAP70的染色。图4证实了对于2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理过的T-细胞而言与对照T-细胞相比归一化至ZAP70强度的pZAP70蛋白水平。

[0099] 实施例5.活化的T-细胞的半乳糖凝集素-3表达

[0100] 将经纯化的T-细胞铺板在12-孔板(10^6 个细胞/孔,1-2mL T-细胞培养基)中,并用CD3/CD28珠子(4 μL 珠子/2mL培养基,Miltenyi Biotec)活化。将细胞在37℃温育过夜,并然后在固定和透化以后针对半乳糖凝集素-3表达进行分析,随后FACS分析。简而言之,将细胞沉淀(2×10^5)并用BD染色缓冲液(FBS)洗涤2次,随后重新悬浮在冷的BD CytofixTM固定缓冲液中(30min,RT)。将细胞沉淀,在BD染色缓冲液(FBS)中洗涤2次,并重新悬浮于BD Perm/WashTM缓冲液中(30min,RT)。将细胞洗涤进新鲜BD Perm/WashTM缓冲液中并用抗-半乳糖凝集素-3抗体(Life Technologies,或用适当的同种型对照)在室温(40min,暗)染色。将细胞在BD Perm/WashTM中在室温洗涤2次,并重新悬浮于BD染色缓冲液(FBS)中用于LSRII流式细胞计分析。图5证实了与对照T-细胞相比在2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理过的T-细胞中的半乳糖凝集素-3MFI的倍数变化。

[0101] T-细胞受体(TCR)与抗原呈递细胞上的肽-MHC直接相互作用,并被提示为岩藻糖基化的分子(Garcia等人,1996,Science,274)。我们通过流式细胞计量术观察到与对照细胞相比在2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理过的T-细胞中EBV-特异性的四聚体结合的增加(用其它抗原也观察到稍微增加;flu,CMV)。这指示TCR对p-MHC的亲和力的增加。另外,从T-细胞与DC的共培养物除去抗原(呈血清蛋白形式的肽抗原)导致DC上的活化标志物的微小至无增加。这些结果一起提示,通过2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理调节TCR/pMHC相互作用。为了使TCR变得啮合和T-细胞信号传递发生,TCR/肽-MHC相互作用必须足够强以克服半乳糖凝集素-糖蛋白晶格相互作用,其调节TCR的基础信号传递和活化。我们已经用2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理观察到,在T-细胞中存在半乳糖凝集素-3水平的下降,其会减少半乳糖凝集素-3-糖蛋白相互作用并允许更容易的TCR/pMHC介导的信号传递。当我们检查TCR信号传递时,我们观察到,Zap70(已知在TCR信号传递级联的中心的蛋白)显著地更磷酸化,并与原初细胞相比在2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理过的T-细胞中保持磷酸化更长的时间段(用其它信号传递蛋白观察到类似的结果)。

[0102] 实施例6.TGF β 信号传递和调节性T-细胞分析

[0103] 将细胞铺板在含有无血清RPMI培养基(1%PS, 2.5mL)的6-孔盘(2.5x10⁶个细胞/孔)中, 并在血清饥饿6h以后, 将细胞用TGF β (5ng/mL)刺激10min。将细胞收获, 在PBS中洗涤2次, 并在干冰上快速冷冻, 随后在-80℃贮存。将细胞用RIPA缓冲液(含有DNA酶和蛋白酶/磷酸酶抑制剂)裂解。如前所述, 将细胞裂解物在SDS-PAGE上泳动, 并通过蛋白质印迹用抗-pSMAD2和抗-肌动蛋白抗体在硝酸纤维素膜上检查。图6证实与2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理过的T-细胞的相同比率相比, 对于对照T-细胞而言pSMAD2与肌动蛋白强度的比率。

[0104] 使用人调节性T-细胞混合液(BD PharmingenTM)鉴别培养物中的调节性T-细胞, 并使用FACS分析。简而言之, 将细胞洗涤进含有人Fc块(EMD Millipore)的BD染色缓冲液(BSA)中并在冰上温育30min。然后将细胞用荧光地标记的人调节性T-细胞混合液(BD PharmingenTM, 1:100在BD染色缓冲液(BSA)中)或用适当的同种型对照(冰, 暗, 40min)染色。然后将细胞在BD染色缓冲液(BSA)中洗涤2次并在LSRII流式细胞计上分析。将调节性T-细胞鉴别为CD4+、CD25+和CD127LOW。图7A和7B证实了在该三重门控群体中的细胞的百分比。

[0105] 以与上述细胞内染色相同的方式制备T-细胞, 其中将它们固定和渗透化处理, 并用抗-FOXp3抗体(BD Biosciences)染色和通过FACS分析。简而言之, 如前所述在冰上在含有人Fc块(Miltenyi Biotec)的BD染色缓冲液(FBS)中温育30min以后, 将细胞在暗处(RT)用抗-CD4抗体染色20min。加入等体积的BD染色缓冲液(FBS), 并将样品离心和在BD染色缓冲液(FBS)中洗涤1次, 随后在室温重新悬浮在冷的BD CytofixTM固定缓冲液中30min。将细胞沉淀, 在BD染色缓冲液(FBS)中洗涤2次, 重新悬浮, 并在BD Perm/WashTM缓冲液中在室温温育30min。将细胞洗涤进新鲜BD Perm/WashTM缓冲液中并用抗-FOXp3抗体(或用适当的同种型对照)在室温染色(45min, 暗)。将细胞在BD Perm/WashTM中在室温洗涤2次, 并重新悬浮于BD染色缓冲液(FBS)中用于LSRII流式细胞计分析。将细胞在CD4+上门控, 并从该门鉴别FOXp3+细胞。图7A和7B证实了与对照T-细胞培养物相比在2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理过的培养物中的FOXp3+T-细胞的总数的倍数变化。

[0106] 以0、125、500或2000mg/kg/天的剂量通过经口管饲法每天给Sprague-Dawley大鼠(CD[®] [Cr1:CD[®] (SD)])施用2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖连续42天。在试验前和研究的第2、7、22、43、49、56和71天将血液样品(0.4mL/时间点)收集在肝素钠中。在收集的24小时内处理样品。将样本的等分试样用预定体积的先前试验过并滴定的单克隆抗体(针对每种标志物)染色。将每个试管中的红细胞裂解, 并在染色以后将细胞用Versalyse裂解缓冲溶液(Beckman Coulter)固定。将制备的样本在Beckman-Coulter FC 500MPL流式细胞计上分析。

[0107] TGF β R是岩藻糖基化的, 且文献提示, 该岩藻糖基化可以影响肿瘤细胞中的TGF β 结合(British Journal of Cancer (2014) 110, 156-163)。SMAD介导的转录要求TGF β 与TGF β I受体结合以后的磷酸化。图6证实, T-细胞的2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理会导致在TGF β 刺激以后与对照T-细胞相比减少的SMAD2磷酸化, 从而提示在岩藻糖基化的T-细胞上的TGF β 结合和信号传递的改变。FOXp3表达由在TGF β 信号传递下游的SMAD转录因子驱动。2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理过的T-细胞表现出减少的FOXp3+表达(图7A), 其与调节性T-细胞群体的减少有关(总细胞的百分比, 图7B)。表1表明, 当用2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理大鼠时, 该结果在体内翻译。在第2天收集开始, 调节性T-细胞(CD3+、CD4+、CD25+、FOXp3+)的有关比例倾向于在所有施用2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖的组中相对于试验前值下降(表1)。通过SMAD2转录

因子的磷酸化实现的TGF β 信号传递被2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理减少,这又导致T-细胞培养物中减少的FOXP3表达和减少的T-调节细胞的数目。已知调节性T-细胞的减少会导致更低免疫抑制性的肿瘤微环境。由抗-CTLA4抗体赋予的活性的部分指向调节性T-细胞的除去(Simpson等人(2013)JEM,210)。已经在临床前和最近在临床中成功地将抗-CTLA4抗体与抗-PD1或抗-PDL1检验点抗体组合(Larkin等人(2015)NEJM373)。2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖对减少调节性T-细胞的影响提示,将2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖影响的T-细胞与PD1或PDL1靶向试剂组合会赋予进一步增强的抗肿瘤免疫。

[0108] 表1.

对调节性 T-细胞的影响的总结 ^a								
端点	期间	125 mg/kg/天		500 mg/kg/天		2000 mg/kg/天		
		M	F	M	F	M	F	
[0109]	Treg	第 2 天	-44%	-54	-61%	-56	-42%	-41%
	%门控		%		%			
[0110]		第 7 天	-64%	-67	-63%	-60	-43%	-39%
			%		%			
		第 22 天	-65%	-61	-64%	-60	-51%	-43%
			%		%			
		第 43 天	-59%	-64	-58%	-50	-29%	-28%
			%		%			
		第 49 天	-46%	-40	-48%	-43	-6%	-19%
			%		%			
		第 56 天	-47%	-51	-47%	-38	-12%	-16%
			%		%			
		第 71 天	-42%	-45	-48%	-40	-13%	-26%
			%		%			
M -雄性; F-雌性								
^a - 相对于试验前平均值的变化百分比								
^b - 恢复期								

[0111] 实施例7.在T-细胞/DC共培养物中和在体内观察到的分泌的细胞因子的分析

[0112] 将前述的来自T-细胞/DC共培养物的组织培养物上清液收集,并通过Luminex测定评估细胞因子变化。类似地,允许来自A20疫苗模型研究的血液样品凝结,并收集血清用于细胞因子分析(MCYTOMAG01L1X-13 Mouse Cytokine Magnetic Bead Panel,Millipore)。图8A、8B和8C证实,当与含有对照T-细胞的培养物相比时,在DC和2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理过的T-细胞的共培养物中,对于抗原特异性的T-细胞活化而言重要的细胞因子(诸如

INF γ 、IL12p40和CD40L)在组织培养物上清液中增加。图9证实,除了在组织培养共培养物系统中观察到的细胞因子变化以外,在A20肿瘤疫苗模型中观察到对于免疫应答而言重要的细胞因子的特异性增加(上述,无除去,在第-21、-14、0和1天取的样品;IL15)。这些数据指示2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖处理可以导致对于体外和体内最佳免疫应答而言关键性的细胞因子的上调。

[0113] 实施例8.在人PBMC中的体外2FF和抗-PD1抗体组合

[0114] 将来自CMV阳性供体的CMV反应性人PBMC (AstarteTM Biologics) 融化,铺板在6-孔板中,并在DC培养基 (30%DMEM 70%X-vivo+2mM glutamax+10%ATB血清+1%PS) 中培养过夜。次日,收集上清液以分离T-细胞,并将附着细胞在培养基中洗涤,并然后每孔补充2mL补充加了IL4 (100ng/ μ L) 和GMCSF (200ng/ μ L) 的培养基以使附着单核细胞分化成DC并繁殖。将所述板温育4-5天,并然后将细胞移入T25烧瓶中。每次将细胞传代(每2-3天),提供新的细胞因子。使用StemSep人T-细胞富集试剂盒 (Stemcell technologies) 分离上清液中的T-细胞。然后将T-细胞重新悬浮于T-细胞培养基 (RPMI+10%胎牛血清,1%PS) 中并分入两个T25烧瓶(含有或没有100-200 μ M 2FF)。加入CD3CD28抗体包被的珠子 (Miltenyi Biotec) (20 μ L/烧瓶) 以活化T-细胞。24h以后,加入IL2 (100ng/ μ L)。每次,将细胞传代,加入新的IL2和2FF。将细胞培养10-12天,并在48孔板中在DC培养基中以10:1 (T-细胞:DC) 的比率执行共培养实验,有或没有5 μ g/mL CMV抗原刺激 (Astarte Biologics),且有或没有1 μ g/mL抗-PD1 (Pembrolizumab, Keytruda)。将共培养物温育24h,此后使用人T-细胞高灵敏度Lumenix测定 (Millipore) 按照生产商的说明书针对IFN γ 和IL12p70测定上清液。

[0115] 使用Lumenix测定测量来自5天共培养物的上清液中的IFN γ 和IL12p70,并使用内部标准曲线计算每种细胞因子的浓度。如在图10A和10B中所示,暴露于CMV抗原的2FF成熟的T-细胞具有与对照细胞相比升高的抗原特异性的T细胞应答,且抗-PD1向所述组合的添加进一步增强2FF成熟的T-细胞的抗原特异性应答。

[0116] 实施例9.A20小鼠淋巴瘤研究

[0117] 将A20细胞 (ATCC) 在含有10%FBS、10mM HEPES、1mM丙酮酸钠、50 μ M 2-巯基乙醇和青霉素 (100U/ml) /链霉素 (100 μ g/ml) (PS) 的RPMI1640中培养。给所有小鼠 (BALB/c, n=6/组) 植入 1×10^5 个A20肿瘤细胞(静脉内)并分成四组:未治疗;仅用2FF治疗;仅用抗-PD1抗体治疗;和用2FF与抗-PD1抗体的组合治疗。2FF治疗组在植入肿瘤当天开始接受含有20mM 2FF的饮用水,在研究中继续。给没有接受2FF的小鼠提供正常饮用水。抗-PD1抗体 (Ebiosciences, 克隆J43) 治疗组从肿瘤植入后第5天开始接受每3天3剂的5mg/kg。如在图11中所示,单独的2FF治疗组具有与未治疗组相比增加的存活,而单独的抗-PD1抗体治疗组与未治疗组相比没有改善存活。用2FF与抗-PD1抗体的组合治疗的组在肿瘤植入后54天前表现出50%的小鼠的持久存活,持续至肿瘤植入后约90天时实验结束。将其与未治疗组和单独抗-PD1治疗组中的仅17%存活(在治疗约40天以后,持续至实验结束)对比,并也与单独的2FF治疗组中的仅17%存活(在治疗70天以后,也持续至在约90天时实验结束)对比。这些数据表明,与未治疗和2FF或抗-PD1单一试剂治疗相比,2FF和抗-PD1的组合延长了植入肿瘤的小鼠的存活。

[0118] 讨论

[0119] 如在实施例中所证实的,2FF已经表现出减少调节性T-细胞群体的能力,类似于用

抗-CTLA4抗体观察到的能力。调节性T-细胞群体的减少与对于调节性T-细胞发育而言关键性的TGF- β 信号传递和FOXP3诱导的减弱有关。因此,在体外和在体内评价了2FF在有抗-PD1阻断抗体存在下的组合活性。实施例已经证实,在体外,2FF与抗-PD1抗体协作以增加抗原特异性的T-细胞活化;且在体内,与未治疗组或单一试剂治疗组相比,2FF增强对抗-PD1抗体的抗肿瘤应答并延长在淋巴瘤的同基因小鼠模型中的总存活。

[0120] 实施例10.4T1小鼠肿瘤研究

[0121] 为了评价2FF治疗对肿瘤浸润性免疫细胞的影响,给balb/c小鼠植入4T1细胞(2×10^4 皮下注射),并在同一天开始20mM 2FF饮用水。在第19天(当肿瘤是大约 ~ 250 - 300mm^3 时)或第28天(当肿瘤是 ~ 800 - 1000mm^3 时),取出肿瘤,用剃刀片细微地切碎,并悬浮于5mL冷解离缓冲液(DMEM(高葡萄糖)培养基,5%FBS,1M HEPES,2mg/mL胶原酶D(Roche),0.1mg/mL DNA酶I(50mg/mL储备液在20mM Tris-HCl(ph7.5)中,1mM MgCl₂,50%甘油)中,并转移至Miltenyi C-试管。将GentleMACS在每个试管上运行,并将试管在连续旋转下在37°C温育40分钟。然后将GentleMACS运行2次,并将试管快速地离心以将肿瘤收集在试管底部。然后使用注射器的橡胶塞轻轻解离组织,将试管内容物穿过70μm筛网过滤器进入50mL falcon试管中。将过滤器用5mL冷酶抑制剂缓冲液(DMEM(高葡萄糖),0.25M EDTA)洗涤,并将试管离心,将上清液抛弃,并将样品重新悬浮于PBS中。然后将细胞用eFluor®506生存力染料(eBioscience)按照生产商的说明书染色。将细胞在FACS染色缓冲液(0.5%FBS,0.05%NaN3)中洗涤2次,并用三个不同的抗体组确定免疫表型,每个抗体组含有针对CD45的抗体以鉴别免疫细胞。将针对树突细胞抗原确定表型的细胞在暗处在冰上用期望的抗体染色30分钟,在染色缓冲液中洗涤2次,并重新悬浮于1:4PBS:固定缓冲液(Biologend)中和在4°C储存过夜。次日,将细胞在FACS染色缓冲液中洗涤,并在LSRII流式细胞计上分析。首先将针对T调节细胞确定表型的细胞在暗处在冰上用针对细胞表面抗原的期望抗体染色30分钟。然后将所述细胞洗涤和固定,渗透化处理,并使用eBioscience染色集合按照生产商的说明书(目录#77-5775)用FOXP3染色。

[0122] 如在图12A-C中所示,2FF治疗过的动物具有显著减少的T调节细胞和增加的树突细胞,其在植入以后第19天更活化。结果也表明,在植入以后第28天,来自2FF治疗过的动物的肿瘤具有增加的记忆和效应T细胞。

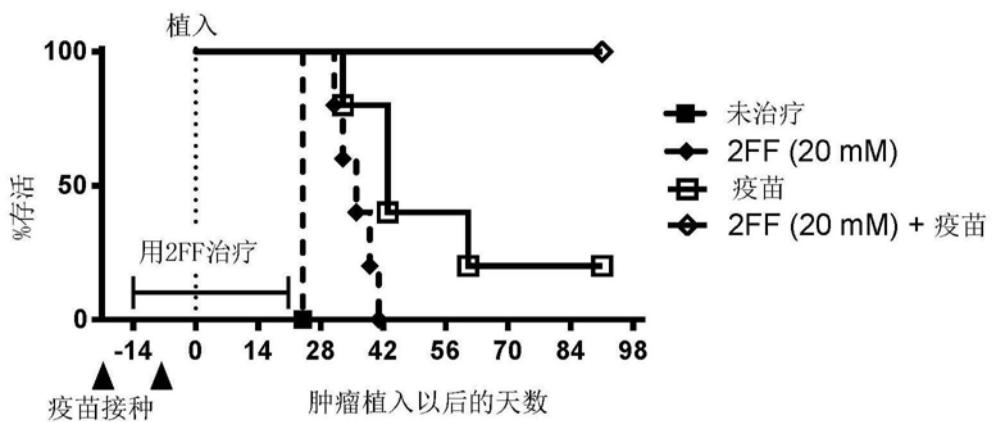


图1A

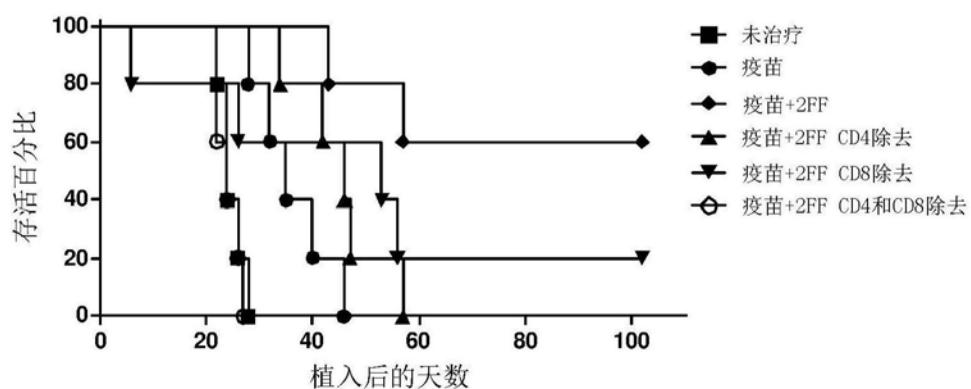


图1B

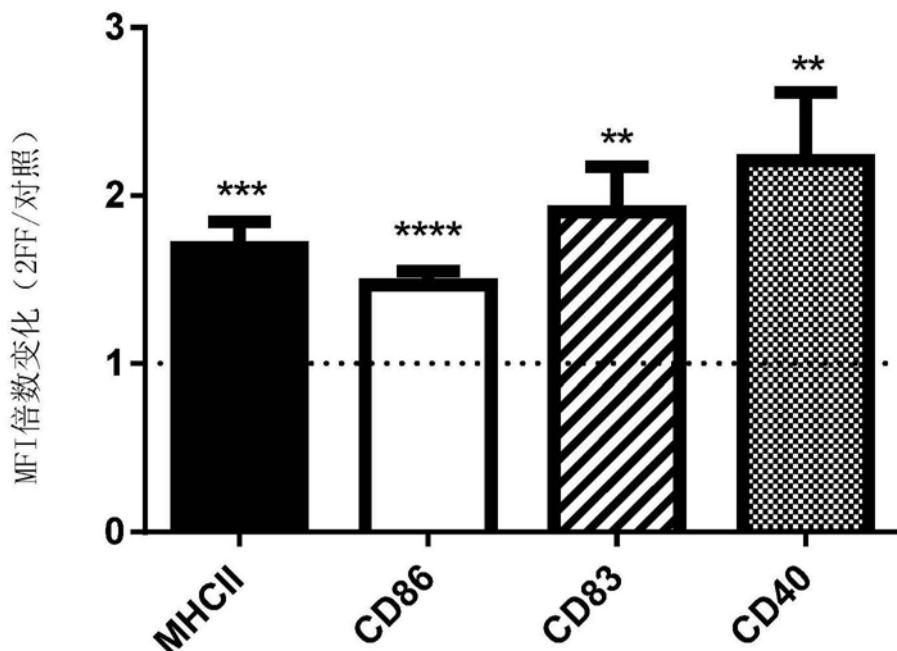


图2A

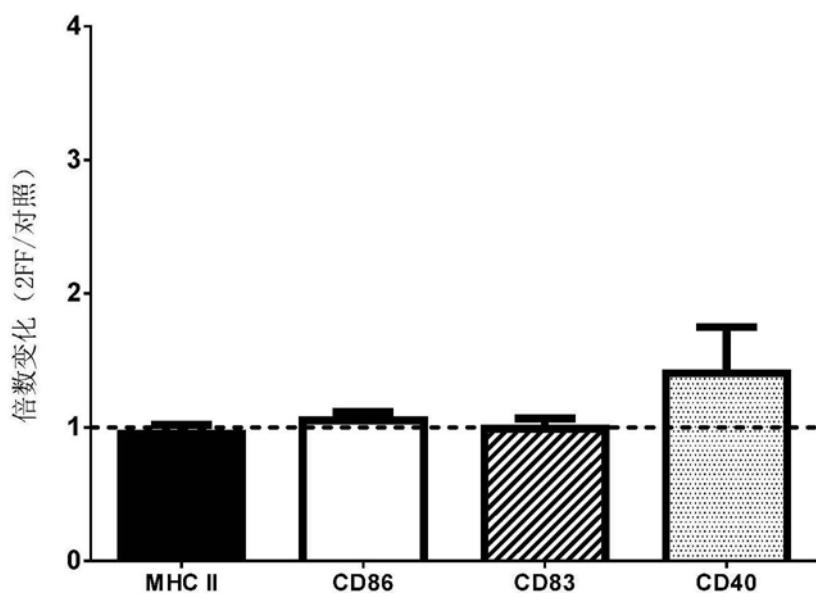
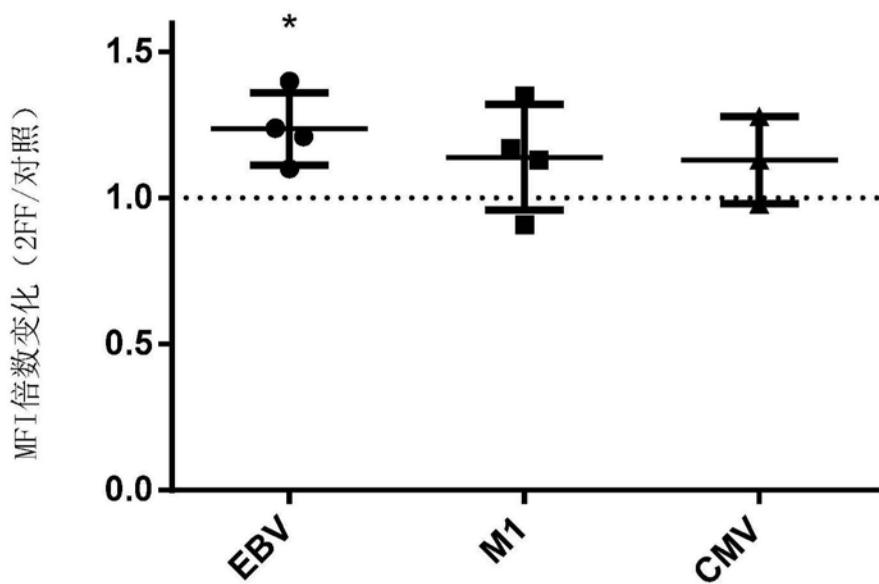


图2B

MFI倍数变化 (2FF/对照) 四聚体染色



一个样品t-检验 $P=0.03$ 统计上不同于1.0

图3

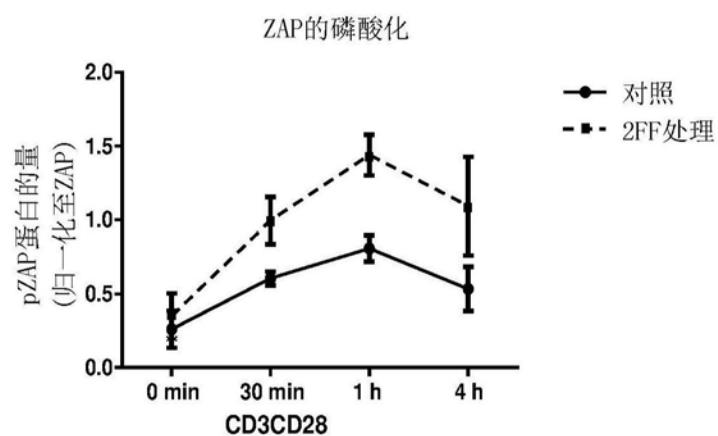


图4

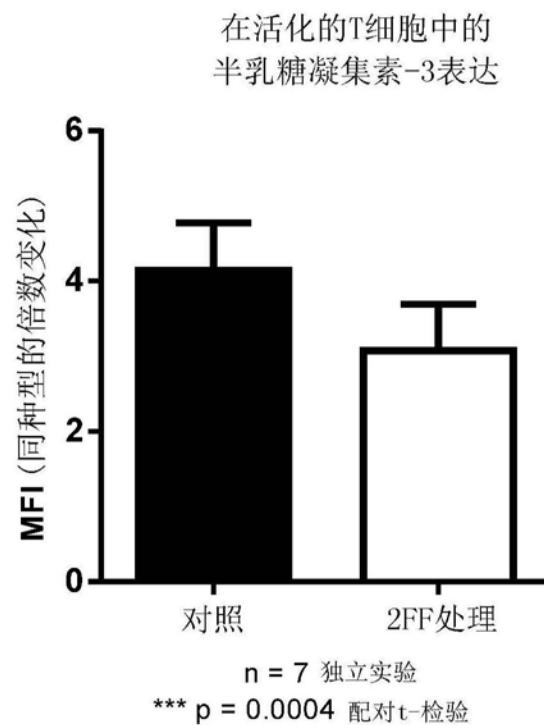


图5

2FF处理过的T细胞中的减少的pSMAD

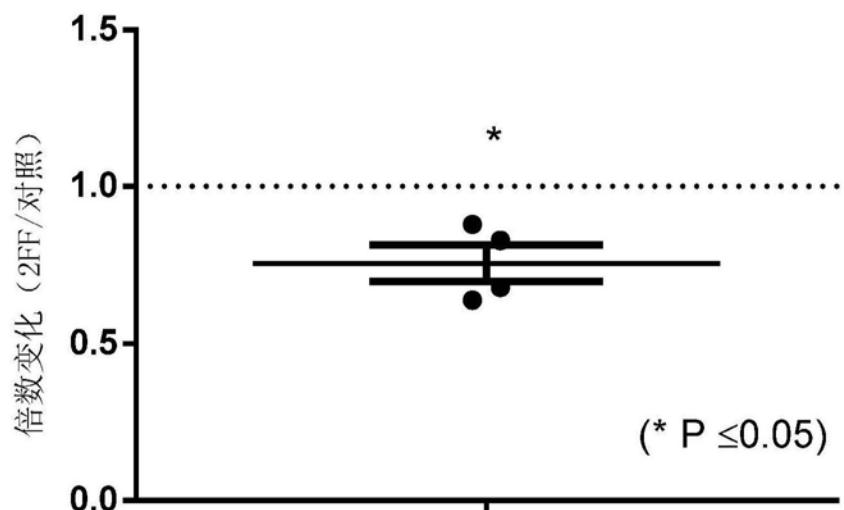


图6

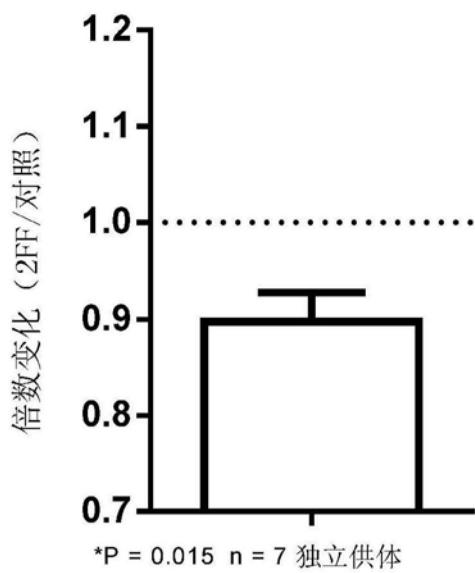
FOXP3+ 细胞

图7A

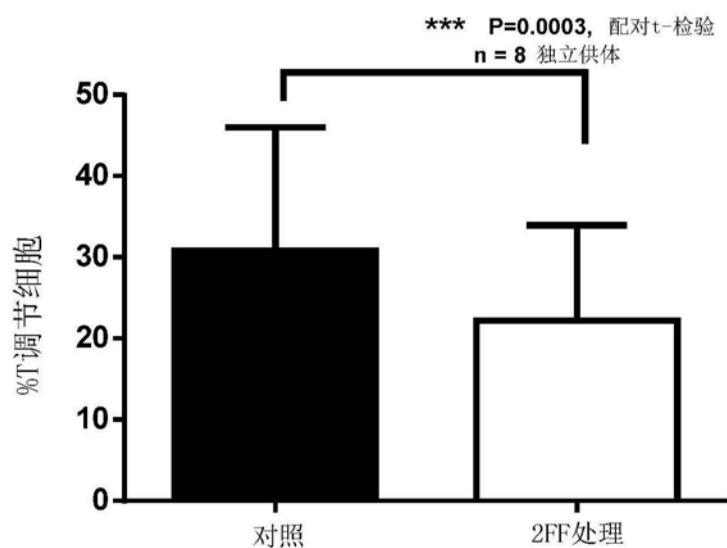


图7B

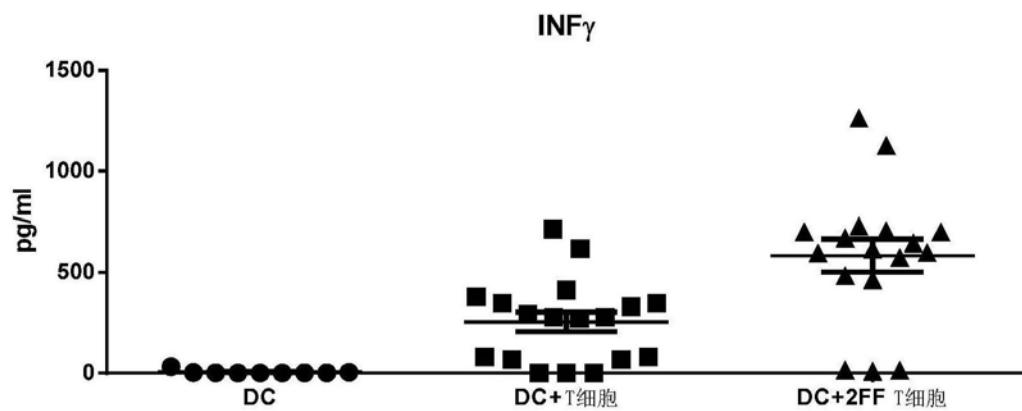


图8A

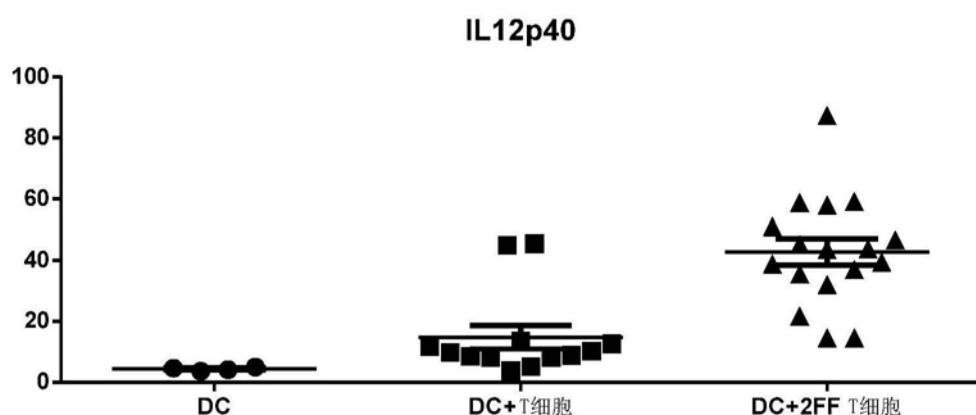


图8B

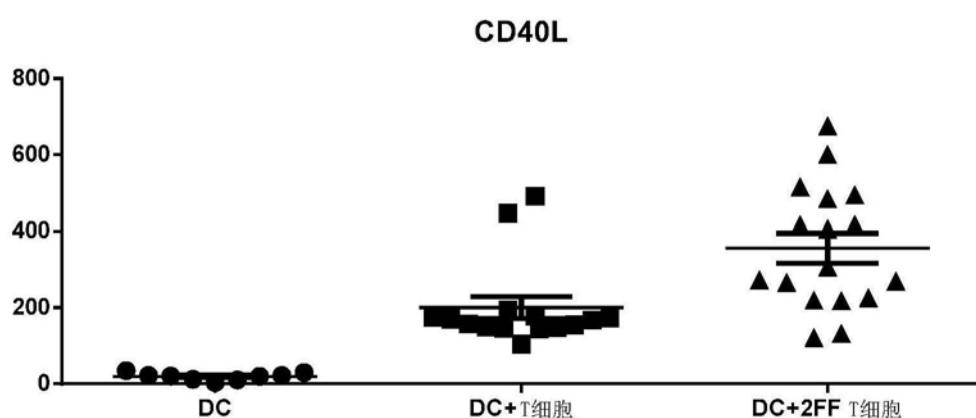


图8C

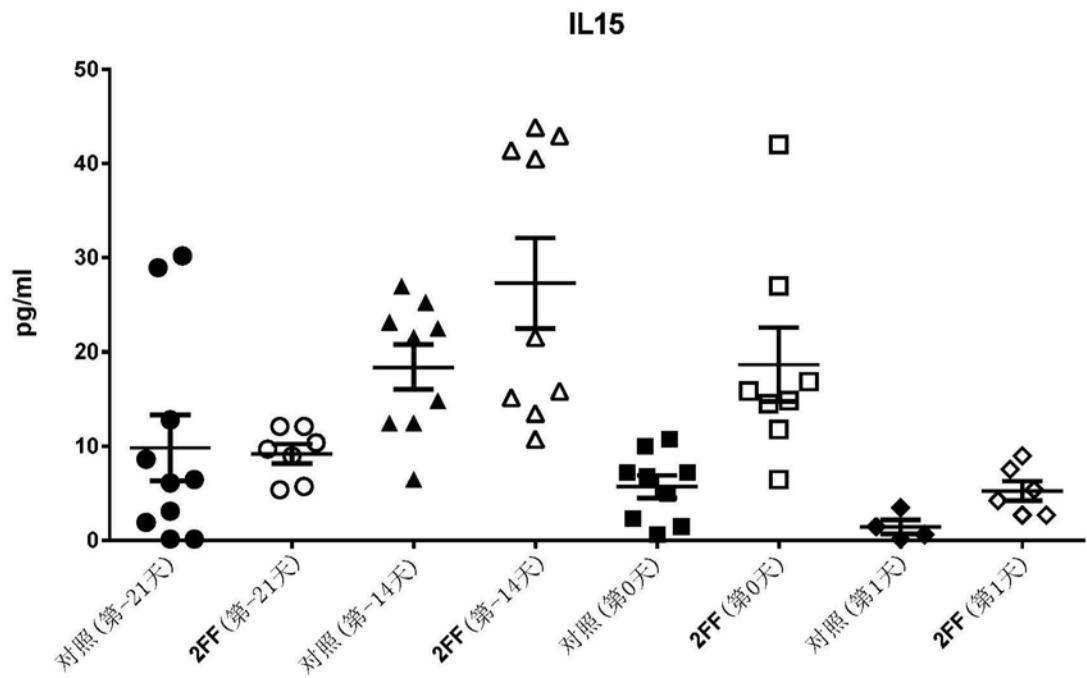
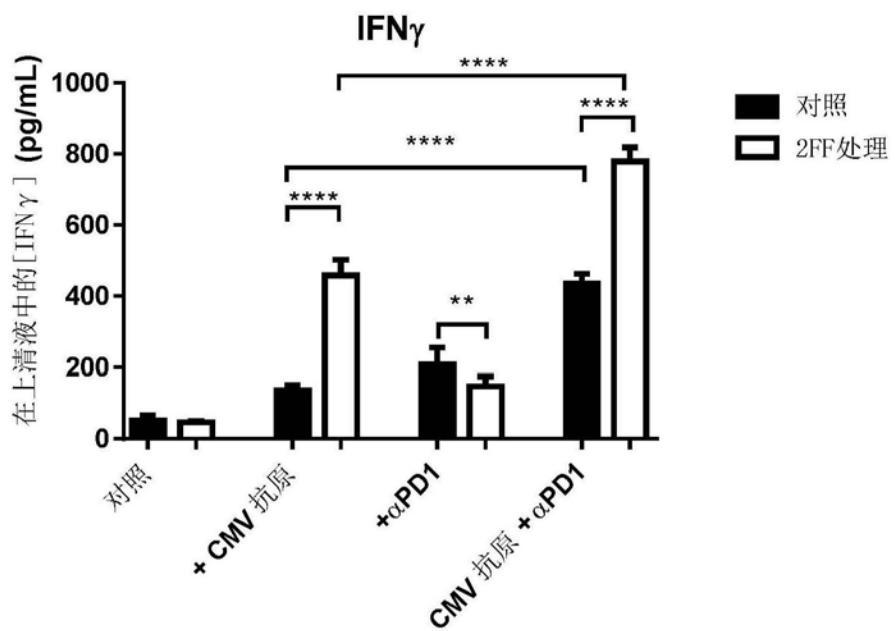
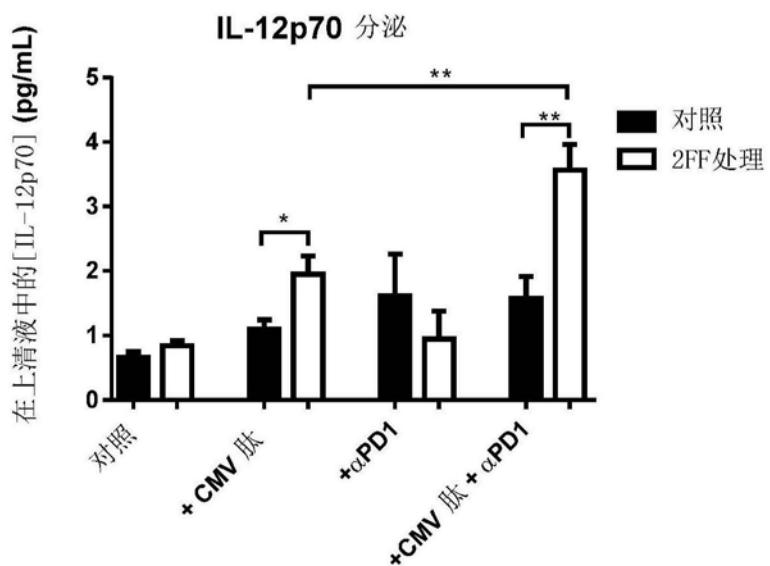


图9



****p<0.0001, **p=0.0026 未配对双尾t检验

图10A



*p=0.014, ** p<0.0020 未配对t双尾检验

图10B

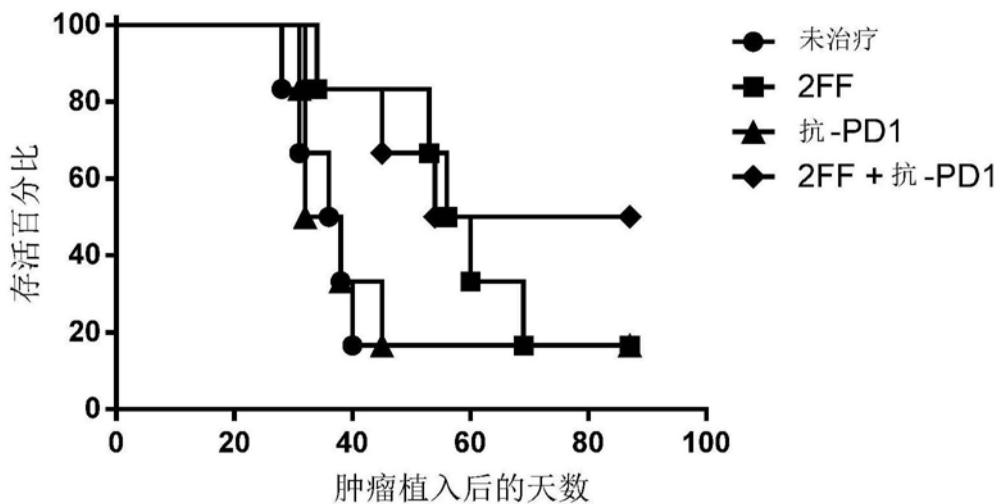


图11

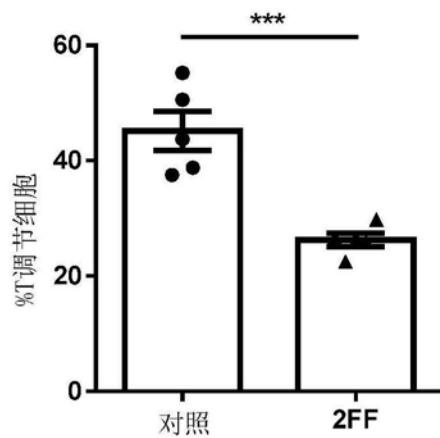


图12A

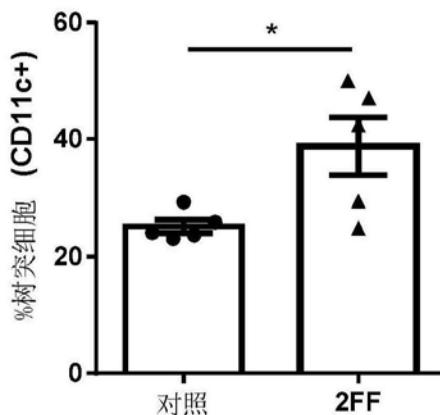


图12B

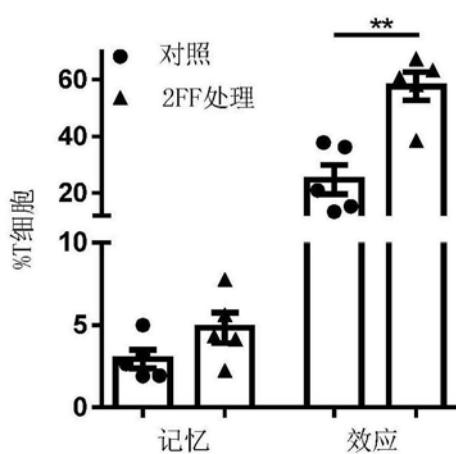


图12C