



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108136024 A

(43)申请公布日 2018.06.08

(21)申请号 201680058161.3

(22)申请日 2016.06.03

(30)优先权数据

62/201,912 2015.08.06 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.04.04

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2016/053290 2016.06.03

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/021792 EN 2017.02.09

(71)申请人 葛兰素史密斯克莱知识产权发展有
限公司

地址 英国米德尔塞克斯

(72)发明人 C.W.克拉夫 H-X.高

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

代理人 曹立莉

(51)Int.Cl.

A61K 45/06(2006.01)

A61K 31/407(2006.01)

A61K 31/675(2006.01)

A61K 31/7032(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书29页 附图31页

(54)发明名称

TLR4激动剂及其组合物和它们在治疗癌症
中的用途

(57)摘要

本发明公开了单独的或与抗癌剂组合的
TLR4激动剂,以及其药物组合物、其用途和治疗
方法,所述方法包括给予所述组合物或组合,所
述用途包括在癌症中的用途。

1. 用于治疗癌症且任选组合有抗癌剂的TLR4激动剂的组合物。
2. 前述任一项权利要求的组合物或组合,其中所述TLR4激动剂为氨基烷基氨基葡萄糖苷磷酸(AGP)。
3. 前述任一项权利要求的组合物或组合,其中所述TLR4激动剂为式I化合物。
4. 前述任一项权利要求的组合物或组合,其中所述TLR4激动剂为式Ia化合物。
5. 前述任一项权利要求的组合物或组合,其中所述TLR4激动剂选自:CRX-601、CRX-547和CRX-527。
6. 组合试剂盒,其包含TLR4激动剂或前述任一项权利要求的组合,以及一种或多种药学上可接受的载体。
7. 药物组合物,其包含TLR4激动剂或前述任一项权利要求的组合,以及药学上可接受的稀释剂或载体。
8. 药物组合物,其包含治疗有效量的抗癌剂和第二药物组合物,所述第二药物组合物包含治疗有效量的前述权利要求中任一项的TLR4调节剂。
9. 根据前述权利要求中任一项的TLR4激动剂组合或药物组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的组合或药物组合物,其用于治疗。
11. 根据前述权利要求中任一项所述的组合或药物组合物,其用于治疗癌症。
12. 在有需要的人中治疗癌症的方法,其包括给予前述权利要求中任一项的组合或药物组合物。
13. 在有需要的人中治疗癌症的方法,其包括给药治疗有效量的前述权利要求中任一项的抗癌剂和前述权利要求中任一项的TLR4激动剂。
14. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述抗癌剂和TLR4激动剂同时给药。
15. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述抗癌剂和TLR4激动剂以任意顺序依次给药。
16. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述抗癌剂和TLR4激动剂全身给药,例如静脉内给药。
17. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述抗癌剂全身给药,例如静脉内给药,且所述TLR4激动剂肿瘤内给药。
18. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述抗癌剂肿瘤内给药,且所述TLR4激动剂全身给药,例如静脉内给药。
19. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述抗癌剂和TLR4激动剂肿瘤内给药。
20. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述癌症为实体瘤。
21. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述TLR4激动剂提供了远位效应。

TLR4激动剂及其组合物和它们在治疗癌症中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及在哺乳动物中治疗癌症的方法。具体地,本发明涉及给药一种或多种TLR4激动剂,单独的或与其他抗癌剂组合。

背景技术

[0002] 包括癌症在内的过度增殖性疾病的有效治疗是肿瘤学领域的一个持续目标。一般而言,癌症是由控制细胞分裂、分化和凋亡性细胞死亡的正常过程的失调所引起的,其特征在于具有无限生长、局部扩张和全身转移潜力的恶性细胞的增殖。正常过程的失调包括信号传导途径的异常和对与正常细胞中发现的那些因子不同的因子的反应。

[0003] 免疫疗法是治疗过度增殖性疾病的一种途径。科学家和临床医生在开发各种癌症免疫疗法方面遇到的主要障碍是打破对自身抗原(癌症)的耐受性,以便产生强大的抗肿瘤反应,导致肿瘤消退。与靶向肿瘤的小分子和大分子药剂的传统开发不同,癌症免疫疗法靶向免疫系统的细胞,其具有产生效应细胞的记忆库的潜力以诱导更持久的效果并使复发最小化。

[0004] 氨基烷基氨基葡萄糖苷磷酸(aminoalkyl glucosaminide phosphate, AGP)是Toll样受体4(TLR4)的合成配体。已知某些AGP是TLR4激动剂,并且可用作疫苗佐剂和用于刺激细胞因子产生,激活巨噬细胞,促进天然免疫应答以及增强经免疫的动物中的抗体产生。

[0005] 尽管在癌症治疗方面有许多新近的进展,但仍然需要对遭受癌症影响的个体进行更有效和/或加强的治疗。本文的组合物、组合和方法涉及用于增强抗肿瘤免疫性的组合治疗途径,从而解决了此需求。

发明内容

[0006] 因此,本发明提供单独的或与抗癌剂组合的TLR4激动剂,并任选与其他TLR4激动剂组合,用于癌症疗法中。

[0007] 本文还提供了用本发明的TLR4激动剂组合物治疗人类癌症的方法,以及TLR4激动剂在组合疗法中的用途,优选用于癌症的疗法中的用途。

[0008] 进一步提供了调节需要癌症治疗的受试者(优选人)的免疫应答的方法,其包括向所述受试者单独或组合给药有效量的TLR4激动剂,例如,在一种或多种药物组合物中。

附图说明

[0009] 图1是显示用丝裂霉素-C和CRX527治疗具有L1210鼠白血病的BDF1小鼠的图。

[0010] 图2是显示用丝裂霉素-C治疗携带MOT肿瘤的CeH/FeJ小鼠的图。

[0011] 图3是显示携带野生型MOT肿瘤的小鼠中丝裂霉素-C和CRX-527的图。

[0012] 图4是显示携带TLR4突变MOT肿瘤的小鼠中丝裂霉素-C和CRX-527的图。

[0013] 图5是显示CRX527的水性、鼻内和亚微米乳液1 μ g和10 μ g制剂比较的图。

[0014] 图6是显示CRX 527的水性、IN和亚微米乳液制剂的比较图。

- [0015] 图7是显示丝裂霉素-C和CRX-527的单一组合治疗的图。
- [0016] 图8是显示用丝裂霉素-C进行单次局部治疗后用CRX-527全身治疗的结果的图。
- [0017] 图9是显示用丝裂霉素-C进行两次局部治疗,随后用CRX-527进行全身治疗的图。
- [0018] 图10是显示静脉内CRX-527IN与IP环磷酰胺组合治疗小鼠中B16黑素瘤肺转移的图。
- [0019] 图11-14是使用媒介物、单独的CRX-527、单独的环磷酰胺,以及CRX-527+环磷酰胺治疗的小鼠的肺中的肿瘤的照片。
- [0020] 图15是显示用媒介物、单独的CRX-527、单独环磷酰胺,以及CRX-527+环磷酰胺治疗后小鼠肺中肿瘤生长(通过荧光素酶活性测量)的图。
- [0021] 图16是显示用人用级别环磷酰胺(human grade Cytosan)治疗携带4T1的BALB/c小鼠的图。
- [0022] 图17是显示CRX-527 (TLR4) 对CT-26同基因小鼠模型中肿瘤生长的影响的图。
- [0023] 图18是显示在结肠癌的CT-26同基因小鼠模型中4、20或100 μ g的TLR-4激动剂(CRX-601)的剂量依赖性抗肿瘤活性(通过随时间推移的肿瘤体积测量)的图。
- [0024] 图19是显示在CT26同基因小鼠模型中肿瘤内给药的CRX-601的剂量依赖性抗肿瘤活性的图。
- [0025] 图20是显示在CT26同基因小鼠模型中肿瘤内给药CRX-601的剂量依赖性存活益处的图。
- [0026] 图21是显示在CT26同基因小鼠模型中静脉内给药CRX-601的剂量依赖性抗肿瘤活性的图。
- [0027] 图22是显示在CT26同基因小鼠模型中静脉内给药CRX-601的存活益处的图。
- [0028] 图23是显示在CT26同基因小鼠模型中静脉内给药CRX-601的抗肿瘤活性的图。
- [0029] 图24是显示在CT26同基因小鼠模型中肿瘤内给药CRX-601的抗肿瘤活性的图。
- [0030] 图25是显示在CT26同基因小鼠模型中静脉内给药CRX-601的存活益处的图。
- [0031] 图26是显示在CT26同基因小鼠模型中肿瘤内给药CRX-601的存活益处的图。
- [0032] 图27是显示在CT26同基因小鼠模型中静脉内或肿瘤内给药CRX-601的抗肿瘤活性的图。
- [0033] 图28显示了用CRX-601脂质体制剂肿瘤内给药治疗的小鼠中的抗肿瘤活性的图。
- [0034] 图29是显示TLR4激动剂CRX-601以25 μ g/小鼠以1x/周静脉内给药总共3次剂量的抗肿瘤活性(通过随时间推移的肿瘤生长抑制测量) (*p-值=0.041, **p-值<0.001)。
- [0035] 图30是显示TLR4激动剂CRX-601以25 μ g/小鼠以1x/周静脉内给药总共3次剂量治疗的小鼠的存活曲线的图 (*p-值=0.03)。

具体实施方式

[0036] 组合物和组合

[0037] 通过给药一种或多种TLR4激动剂(具体为AGP)来诱导抗癌或抗肿瘤作用是本发明一个实施方案的目的。通过组合给予TLR4激动剂与抗癌剂来增强、提高、改善、增加和以其他方式改变抗癌剂的抗肿瘤作用是本发明的另一个实施方案的。本文描述的是TLR4激动剂和抗癌剂的TLR4激动剂组合物和组合。

[0038] 因此,如本文所用,术语“本发明的组合”是指包含TLR4激动剂例如AGP和癌症药剂的组合,其中的每一种可以如本文所述分开或同时给药。

[0039] 如本文所用,术语“癌症”、“赘生物”和“肿瘤”可互换使用,并且可以是单数或复数形式,指这样的细胞,其中所述细胞经历恶性转化或经历导致异常或不受调节的生长或过度增殖的细胞变化。这种变化或恶性转化通常使得这些细胞对宿主生物体具有病理性,因此预期也包括已经或可能变成病理性并且需要或可能受益于干预的癌前期病变或癌前期细胞。原发性癌细胞(即从恶性转化部位附近获得的细胞)可以通过完善的技术,特别是组织学检查,与非癌性细胞很容易区分开来。如本文所用,癌细胞的定义不仅包括原发性癌细胞,而且包括源自癌细胞祖先的任何细胞。这包括转移的癌细胞,以及源自癌细胞的体外培养物和细胞系。当提到一种通常表现为实体瘤的癌症时,“临床可检测”的肿瘤是基于肿瘤质量可检测的肿瘤;例如通过诸如CAT扫描、MR成像、X射线、超声或触诊的肿瘤,和/或由于一种或多种癌症特异性抗原在可从患者获得的样品中表达而可检测的肿瘤。换句话说,本文的术语包括任何阶段的细胞、赘生物、癌症和肿瘤,包括临床医师称之为癌前期病变、肿瘤、原位生长以及晚期转移性生长的肿瘤,肿瘤可以是造血肿瘤,例如血细胞等的肿瘤,意思是液体肿瘤。基于这种肿瘤的临床病症的具体实例包括白血病如慢性髓细胞性白血病或急性髓细胞性白血病;骨髓瘤如多发性骨髓瘤;淋巴瘤等。

[0040] 如本文所用,术语“药剂”应理解为是指在组织、系统、动物、哺乳动物、人类或其他受试者中产生所需作用的物质。因此,术语“抗癌剂”应理解为是指在组织、系统、动物、哺乳动物、人类或其他受试者中产生抗癌作用的物质,同样,同义词术语“抗肿瘤剂”理解为是指在组织、系统、动物、哺乳动物、人类或其他受试者中产生抗肿瘤作用的物质。还应理解,“试剂”可以是单一化合物或两种或更多种化合物的组合或组合物。

[0041] 本文使用的术语“治疗”及其衍生词意指治疗疗法。提及具体的病症时,治疗是指(1)改善所述病症或该病症的一种或多种生物学表现,(2)干扰(a)导致或引起所述病症的生物学级联中的一个或多个点或(b)所述病症的一种或多种生物学表现,(3)减轻与所述病症相关的一种或多种症状、作用或副作用,或与所述病症或其治疗相关的一种或多种症状、作用或副作用,或(4)减缓所述病症的进展或所述病症的一种或多种生物学表现。

[0042] 如本文所用,“预防”应理解为指预防性给药药物以显著降低其病症或其生物学表现的可能性或严重性,或延迟此类病症或其生物学表现的发作。本领域技术人员将认识到“预防”不是绝对的术语。例如,当受试者被认为处于发展癌症的高风险时,例如当受试者具有强烈的癌症家族史或当受试者已经暴露于致癌物时,预防性疗法是适当的。

[0043] 如本文所用,术语“有效量”是指将引起例如由研究人员或临床医师寻求的组织、系统、动物或人的生物或医学响应的药物或药剂的量。此外,术语“治疗有效量”是指以下的任何量,所述量导致与未接受该量的相应受试者相比,疾病、病症或副作用得以改善的治疗、愈合、预防或改进,或降低疾病或病症发展的速度。该术语在其范围内还包括有效增强正常生理功能的量。

[0044] 在一个实施方案中给药治疗有效量的本发明组合(或治疗有效量的组合的每种组分)相对于单独的组分化合物是有优势的,因为这些组合与单独给药治疗有效量的组分化合物相比提供以下一种或多种改善的性质:i)比最具活性的单一药剂具有更强的抗癌作用,ii)协同或高度协同的抗癌活性,iii)给药方案,其提供增强的抗癌活性,而副作用减

少,iv) 毒性效应减少,v) 治疗窗口增加,或vi) 一种或两种组分化合物的生物利用度增加。

[0045] 本发明进一步提供药物组合物,其包括本文中提及的一种或多种TLR4组分和一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。本发明的组合可以包含抗癌剂和TLR4调节剂,其中的每一种可以具有相同或不同的载体、稀释剂或赋形剂。所述载体、稀释剂或赋形剂在与制剂的其他成分相容方面必须是可接受的,能够配制药剂并且对其接受者无害。

[0046] 本发明组合的组分和包含这些组分的药物组合物可以以任何顺序和不同途径给药;所述组分和包含它们的药物组合物可以同时给药。

[0047] 根据本发明的另一方面,还提供了用于制备药物组合物的方法,其包括混合本发明组合的组分和一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0048] 本发明的组分可以通过任何适当的途径给药。对于一些组分,合适的途径包括口服、直肠、经鼻、局部(包括含服和舌下)、阴道和肠胃外(包括皮下、肌肉、静脉内、皮内、鞘内和硬膜外)。应该理解,优选的途径可以随着例如所述组合的接受者的状况和待治疗的癌症而变化。还应理解的是,每种给药的药剂可以通过相同或不同的途径给药,并且这些组分可以混合在一起或处于分开的药物组合物中。

[0049] 在一个实施方案中,本发明组合的一种或多种组分被静脉内给药。在另一个实施方案中,本发明组合的一种或多种组分被肿瘤内给药。在另一个实施方案中,本发明组合的一种或多种组分被全身给药,例如静脉内,以及本发明组合的一种或多种其他组分被肿瘤内给药。在另一个实施方案中,本发明组合的所有组分被全身给药,例如静脉内。在一个替代实施方案中,本发明组合的所有组分都被肿瘤内给药。在任何实施方案中,例如在本段中,本发明的组分作为一种或多种药物组合物给药。

[0050] 抗原结合蛋白和抗体

[0051] “抗原结合蛋白(ABP)”是指结合抗原的蛋白质,包括抗体或以与抗体类似的方式起作用的工程化分子。这样的可供选择抗体形式包括三链抗体(triobody)、四链抗体(tetradbody)、微型抗体(miniantibody)和小体(minibody)。还包括可供选择的支架,其中根据本公开的任何分子的一种或多种CDR可排列到合适的非免疫球蛋白支架或骨架上,例如亲和体、SpA支架、LDL受体A类结构域、avimer(参见例如美国专利申请公开号2005/0053973、2005/0089932、2005/0164301)或EGF结构域。ABP还包括所述抗体或其他分子的抗原结合片段。此外,当与适当的轻链配对时,ABP可以包含本发明的VH区,其被格式化为全长抗体、(Fab')₂片段、Fab片段、双特异性或双互补位(biparatopic)分子或其等同物(例如scFV、双链-、三链-或四链抗体,Tandabs等)。ABP可以包含为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的抗体;或IgM;IgA、IgE或IgD或其经修饰的变体。可以相应地选择抗体重链的恒定结构域。轻链恒定结构域可以是κ或λ恒定结构域。ABP也可以是W086/01533中所述类型的嵌合抗体,其包含抗原结合区和非免疫球蛋白区。

[0052] 因此,在本文中,本发明的ABP是结合受体的ABP,并且在优选的实施方案中,实现以下的一种或多种:通过受体调节信号传导,调节受体的功能,使受体信号传导激动,刺激受体功能或共刺激受体信号传导。本领域技术人员将容易地认识到确立所述功能的各种众所周知的测定。

[0053] 如本文所用的术语“抗体”是指具有抗原结合结构域和任选的免疫球蛋白样结构

域或其片段的分子,并且包括单克隆抗体(例如IgG、IgM、IgA、IgD或IgE及其经修饰的变体)、重组抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、双互补位抗体、双特异性抗体和杂缀合(heteroconjugate)抗体,或闭合构象多特异性抗体。“抗体”包括异种、同种异体、同基因或其他修饰形式。抗体可以被分离或纯化。抗体也可以是重组的,即通过重组手段产生;例如,与参考抗体90%相同的抗体可以通过使用本领域已知的重组分子生物学技术通过诱变某些残基而产生。因此,本发明的抗体可以包含本发明的重链可变区和轻链可变区,与适当的轻链配对时,其可以被格式化为天然抗体的结构或被格式化为全长重组抗体、(Fab')₂片段、Fab片段、双特异性或双互补位分子或其等同物(如scFV、双链-、三链-或四链抗体、Tandab等)。抗体可以是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4或其经修饰的变体。可以相应地选择抗体重链的恒定结构域。轻链恒定结构域可以是 κ 或 λ 恒定结构域。抗体还可以是W086/01533中描述的类型嵌合抗体,其包含抗原结合区和非免疫球蛋白区。

[0054] 本领域技术人员将认识到,本发明的ABP和抗体结合相关受体的表位。ABP的表位是ABP结合的抗原的区域。如果两个ABP中的一个竞争性抑制(阻断)另一个与抗原的结合,则这两个ABP结合相同或重叠的表位。也就是说,如在竞争性结合测定中所测量的,与缺乏竞争性抗体的对照相比,1x、5x、10x、20x或100x过量的一种抗体以至少50%但优选75%、90%或甚至99%抑制另一种抗体的结合(参见例如Junghans等,Cancer Res.50:1495,1990,其通过引用并入本文)。或者,如果降低或消除一种抗体结合的抗原中基本上所有氨基酸突变都会降低或消除另一种抗体的结合,则两种抗体具有相同的表位。相同的表位也可以包括“重叠的表位”,例如如果降低或消除一种抗体结合的一些氨基酸突变会降低或消除另一种抗体的结合时则为重叠的表位。

[0055] 在分配剂量和给药本发明的ABP或抗体时,结合强度可能是重要的。在一个实施方案中,本发明的ABP或抗体以高亲和力结合受体,优选人受体。例如,当通过Biacore测量时,抗体与受体结合,具有1-1000nM或500nM或更低的亲和力、或200nM或更低的亲和力、或100nM或更低的亲和力、或50nM或更低的亲和力、或500pM或更低的亲和力、或者400pM或更低的亲和力、或者300pM或更低的亲和力。在另一方面,当通过Biacore测量时,抗体与受体结合,亲和力为约50nM至约200nM或约50nM至约150nM。在本发明的一个方面,抗体以小于100nM的亲和力结合受体。

[0056] 在另一个实施方案中,结合由Biacore测量。亲和力是一个分子(例如,本发明的抗体)在单个结合位点结合另一个分子(例如其靶抗原)的强度。可以通过平衡法(例如酶联免疫吸附测定(ELISA)或放射免疫测定(RIA))或动力学(例如BIACORE分析)确定抗体与其靶标的结合亲和力。例如,本领域已知的Biacore方法可用于测量结合亲和力。

[0057] 结合性(avidity)是两个分子在多个位点处彼此结合的强度的总和,例如,当考虑到相互作用的化合价时。

[0058] 一方面,ABP或抗体与受体的相互作用的平衡解离常数(KD)为100nM或更小,10nM或更小,2nM或更小或1nM或更小。或者,KD可以在5和10nM之间;或在1和2nM之间。KD可以在1pM和500pM之间;或在500pM和1nM之间。本领域技术人员将会理解,KD数值越小,结合越强。KD的倒数(即1/KD)是具有单位M⁻¹的平衡缔合常数(KA)。本领域技术人员将会理解,KA数值越大,结合越强。

[0059] 解离速率常数(kd)或“解离速率(off-rate)”一方面描述了ABP或抗体复合物的稳

定性,另一方面描述了ABP或抗体与受体的复合物的稳定性,即每秒衰变的复合物的分数。例如, 0.01s^{-1} 的kd等同于复合物每秒衰减1%。在一个实施方案中,解离速率常数(kd)为 $1\times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 或更小, $1\times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ 或更小, $1\times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ 或更小或 $1\times 10^{-6}\text{s}^{-1}$ 或更小。kd可以在 $1\times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ 和 $1\times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ 之间;或者在 $1\times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ 和 $1\times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 之间。

[0060] 本发明的ABP或抗体与参考抗体之间的竞争(例如竞争结合于受体或的表位或受体的片段)可以通过竞争性ELISA,FMAT或BIAcore来确定。一方面,竞争测定由Biacore进行。这种竞争有几种可能的原因:两种蛋白质可能结合相同或重叠的表位,可能存在对结合的空间抑制,或者第一种蛋白质的结合可能诱导抗原的构象变化,从而阻止或减少第二种蛋白质的结合。

[0061] 如本文所用的“结合片段”是指包含抗原结合位点并能够结合如本文所定义的受体的本发明的ABP或抗体的一部分或片段,例如,但不限于能够结合母体或全长抗体的相同表位的那些。

[0062] 本文考虑涵盖了本发明的ABP和抗体的功能片段。

[0063] 因此,“结合片段”和“功能片段”可以是Fab和F(ab')₂片段,其缺少完整抗体的Fc片段,与完整的抗体相比,其从循环中更快地清除,并且可能具有更少的非特异性组织结合(Wahl等,J.Nuc.Med.24:316-325(1983))。还包括Fv片段(Hochman,J.等(1973) Biochemistry 12:1130-1135;Sharon,J.等(1976) Biochemistry 15:1591-1594)。使用常规技术如蛋白酶断裂或化学断裂产生这些不同片段(参见例如Rousseaux等,Meth.Enzymol.,121:663-69(1986))。

[0064] 如本文所用,“功能片段”是指以下的本发明的ABP或抗体的一部分或片段,其包含抗原结合位点并且能够像母体ABP或抗体那样结合相同靶标(例如,但不限于结合相同的表位),并且还保留本文所述或本领域已知的一种或多种调节或其他功能。

[0065] 由于本发明的ABP和抗体可以包含可以被格式化为天然抗体结构的本发明的重链可变区和轻链可变区,所以功能片段是保留了如本文所述的全长ABP或抗体的结合或一种或多种功能的片段。因此,当与适当的轻链配对时,本发明的ABP或抗体的结合片段可包含VL或VH区,(Fab')₂片段,Fab片段,双特异性或双互补位分子的片段或其等同物(诸如scFV,双链-、三链-或四链抗体,Tandabs等)。

[0066] 如本文所用的术语“CDR”是指抗原结合蛋白的互补决定区氨基酸序列。这些是免疫球蛋白重链和轻链的高可变区。在免疫球蛋白的可变部分有三个重链和三个轻链CDR(或CDR区)。

[0067] 对本领域技术人员明显的是,存在CDK序列的多种编号方式:Chothia(Chothia等,(1989) Nature 342:877-883)、Kabat(Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,4th Ed.,U.S.Department of Health and Human Services,National Institutes of Health(1987))、AbM(University of Bath)和Contact(University College London)。使用Kabat,Chothia,AbM和Contact方法中的至少两种可以确定最小重叠区域,从而提供“最小结合单位”。最小结合单位可以是CDR的子部分。抗体的结构和蛋白质折叠可能意味着其他残基被认为是CDR序列的一部分,并且将被本领域技术人员理解为是这样。需要注意的是,某些CDR定义可能会因所使用的个别出版物而异。

[0068] 除非另有说明和/或缺少特异性鉴定的序列,本文中提及“CDR”、“CDRL1”、

“CDRL2”、“CDRL3”、“CDRH1”、“CDRH2”、“CDRH3”时是指根据任何已知的惯例编号的氨基酸序列；或者，CDR称为可变轻链的“CDR1”、“CDR2”、“CDR3”和可变重链的“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”。在具体实施方式中，编号惯例是Kabat惯例。

[0069] 如本文所用的术语“CDR变体”是指已经由至少一个，例如1、2或3个氨基酸取代、缺失或添加而修饰的CDR，其中所述包含CDR变体的修饰的抗原结合蛋白基本上保留了抗原结合蛋白修饰前的生物学特征。应该理解，可以被修饰的每个CDR可以被单独修饰或与另一个CDR组合修饰。在一个方面，所述修饰是取代，特别是保守性取代，例如如表1所示。

[0070] 表1

[0071]

侧链	成员
疏水性	Met、Ala、Val、Leu、Ile
中性亲水性	Cys、Ser、Thr
酸性	Asp、Glu
碱性	Asn、Gln、His、Lys、Arg
影响链定向的残基	Gly、Pro
芳香性	Trp、Tyr、Phe

[0072] 例如，在变体CDR中，最小结合单位的氨基酸残基可以保持相同，但是包含作为Kabat或Chothia定义的一部分的CDR的侧翼残基可以用保守氨基酸残基取代。

[0073] 包含如上所述的经修饰的CDR或最小结合单位的此类抗原结合蛋白在本文中可称为“功能性CDR变体”或“功能性结合单位变体”。

[0074] 所述抗体可以是任何物种的，或者被修饰为适合给药于跨物种(cross species)。例如，来自小鼠抗体的CDR可以被人源化以给药于人。在任何实施方案中，抗原结合蛋白任选是人源化抗体。

[0075] “人源化抗体”是指一类工程抗体，其CDR来自非人供体免疫球蛋白，该分子的其余免疫球蛋白衍生部分来自一种(或多种)人免疫球蛋白。此外，可以改变框架支持残基以保持结合亲和力(参见例如Queen等, Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson等, Bio/Technology, 9:421 (1991))。通过与供体抗体的核苷酸和氨基酸序列同源，合适的人受体抗体可以选自常规数据库，例如KABAT®数据库、Los Alamos数据库和瑞士蛋白质数据库(Swiss Protein database)的那些。以与供体抗体的框架区同源性为特征的人抗体(基于氨基酸)可适合于提供用于插入供体CDR的重链恒定区和/或重链可变框架区。可按照类似的方式选择能够提供轻链恒定或可变框架区的合适受体抗体。应该注意的是，受体抗体重链和轻链不需要来源于相同的受体抗体。现有技术描述了产生所述人源化抗体的几种方法-参见例如EP-A-0239400和EP-A-054951。

[0076] 在又一个实施方案中，人源化抗体具有为IgG的人抗体恒定区。在另一个实施方案中，IgG是如上述任何参考文献或专利公开中公开的序列。

[0077] 对于核苷酸和氨基酸序列，术语“相同”或“同一性”表示当两个核酸或两个氨基酸序列之间进行最佳比对并与合适的插入或缺失进行比较时的同一性程度。

[0078] 两个序列之间的百分比同一性是由序列共享的相同位置的数量的函数(即，%同一性=相同位置的数量/位置的总数乘以100)，考虑到缺口的数量以及每个缺口的长度(为

了两个序列的最佳比对,需要引入缺口)。如下所述,可以使用数学算法完成序列比较和两个序列之间的百分比同一性测定。

[0079] 在执行成对BLASTN比对之后当主题核酸序列与查询核酸序列具有100%查询覆盖率时,查询核酸序列(query nucleic acid)和主题核酸序列(subject nucleic acid sequence)之间的百分比同一性是“同一性(Identities)”值,以百分比表示,其通过BLASTN算法计算。查询核酸序列和主题核酸序列之间的这种成对BLASTN比对通过使用国家生物技术研究院(National Center for Biotechnology Institute)网站上可用的BLASTN算法的默认设置来执行,其中低复杂度区域的过滤器被关闭。重要的是,查询核酸序列可以由本文的一个或多个权利要求中确定的核酸序列来描述。

[0080] 在执行成对BLASTN比对之后当主题核酸序列与查询核酸序列具有100%查询覆盖率时,查询核酸序列和主题核酸序列之间的百分比同一性是“同一性(Identities)”值,以百分比表示,其通过BLASTN算法计算。查询核酸序列和主题核酸序列之间的这种成对BLASTN比对通过使用国家生物技术研究院网站上可用的BLASTN算法的默认设置来执行,其中低复杂度区域的过滤器被关闭。重要的是,查询核酸序列可以由本文的一个或多个权利要求中确定的核酸序列来描述。

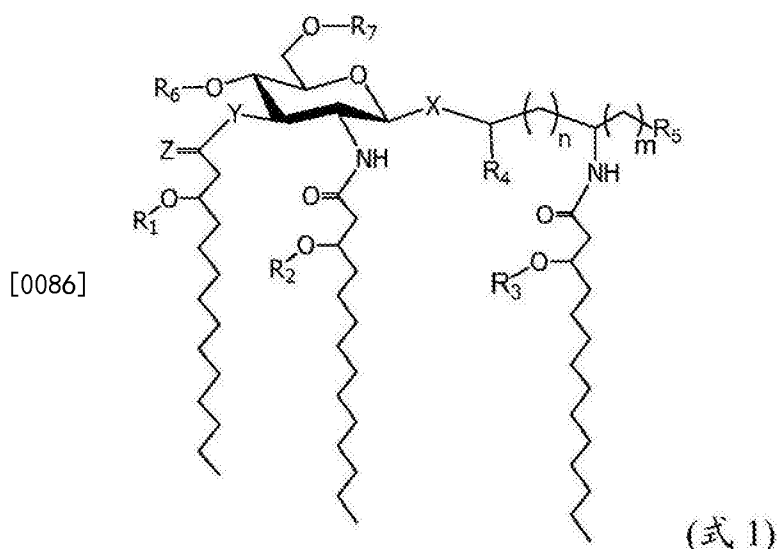
[0081] 在本发明的任何实施方案中,ABP或抗体可以具有任何一个或所有CDR、VH、VL,与所示出的或参考的序列例如SEQ ID NO. 中定义的序列具有99、98、97、96、95、94、93、92、91或90%同一性。

[0082] TLR-4激动剂

[0083] 本发明的组合包含TLR-4激动剂,其是例如通过结合和启动构象变化或通过结合TLR4进行信号传导从而活化TLR4的分子。

[0084] 优选的TLR-4激动剂是氨基烷基氨基葡萄糖苷磷酸化合物(AGP)。Toll样受体4识别细菌LPS(脂多糖),当被激活时启动先天免疫反应。AGP是细菌LPS的脂质A蛋白的单糖模拟物,并且已经在化合物的“酰基链”上用醚键和酯键进行开发。制备这些化合物的方法是已知的并且公开于例如W0 2006/016997,美国专利号7,288,640和6,113,918以及W0 01/90129中,其通过引用整体并入本文。美国专利号7,129,219、美国专利号6,525,028和美国专利号6,911,434中公开了其他AGP和相关方法。在本发明组合中使用的酰基链上具有醚键的AGP是已知的并且公开在W0 2006/016997中,其通过引用整体并入本文。特别感兴趣的是氨基烷基氨基葡萄糖苷磷酸酯化合物,其在W0 2006/016997的段落[0019]至[0021]中以式(III)列出和描述。

[0085] 本发明中使用的氨基烷基氨基葡萄糖苷磷酸化合物具有式1所示的如下结构:



[0087] 其中

[0088] m是0-6;

[0089] n是0-4;

[0090] X是O或S, 优选地O;

[0091] Y是O或NH;

[0092] Z是O或H;

[0093] 各R1、R2、R3独立选自C7-20酰基和C1-20烷基;

[0094] R4是H或Me;

[0095] R5独立选自-H、-OH、-(C1-C4) 烷氧基、-P(O)3R8R9、-OP(O)3R8R9、-S(O)3R8、-OS(O)3R8、-NR8R9、-SR8、-CN、-NO2、-CHO、-CO2R8和-CONR8R9, 其中R8和R9各自独立选自H和(C1-C4) 烷基; 以及

[0096] 各R6和R7独立为H或P(O)3H2。

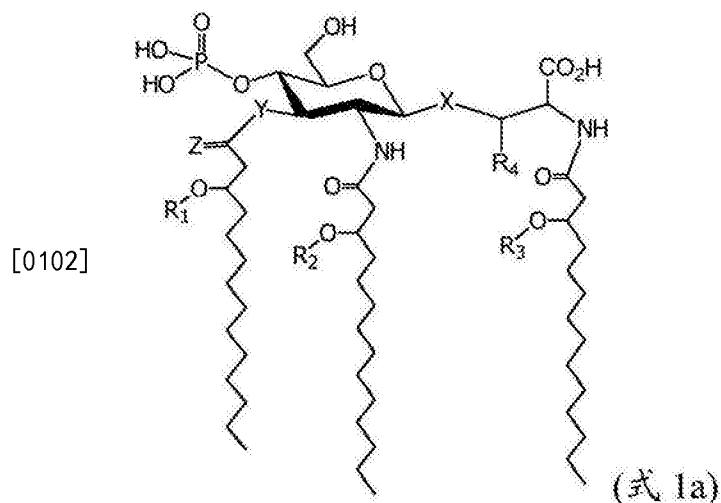
[0097] 在式1中, 与正常脂肪酰基残基(即, 仲酰氧基或烷氧基残基, 例如R10, R20和R30)连接的3'立体异构中心的构型是R或S, 优选地R(如由Cahn-Ingold-Prelog优先规则指定)。与R4和R5连接的糖苷配基立体中心的构型可以是R或S。所有的立体异构体、对映异构体和非对映异构体两者及其混合物均被认为落入本发明的范围内。

[0098] 杂原子X和糖苷配基氮原子之间的碳原子数由变量“n”确定, 该变量可以是0-4的整数, 优选地是0-2的整数。

[0099] 正常脂肪酸R1, R2和R3的链长可以为约7至约16个碳, 优选约9至约14个碳。链长可以相同或不同。一些优选的实施方案包括其中R1、R2和R3为10或12或14的链长。

[0100] 式1包括L/D-丝氨酰基、-苏氨酰基、-半胱氨酰基醚和酯脂质AGP, 即包括这两种激动剂及其同系物(n=1-4), 以及各种羧酸生物电子等排体(即R5是能够形成盐的酸性基团; 磷酸酯可以在葡萄糖胺单元的4-或6-位上, 但优选在4-位上)。

[0101] 在采用式1的AGP化合物的本发明优选实施方案中, n是0, R5是CO2H, R6是P(O)3H2, 并且R7是H。该优选的AGP化合物如下面式1a中的结构所示:



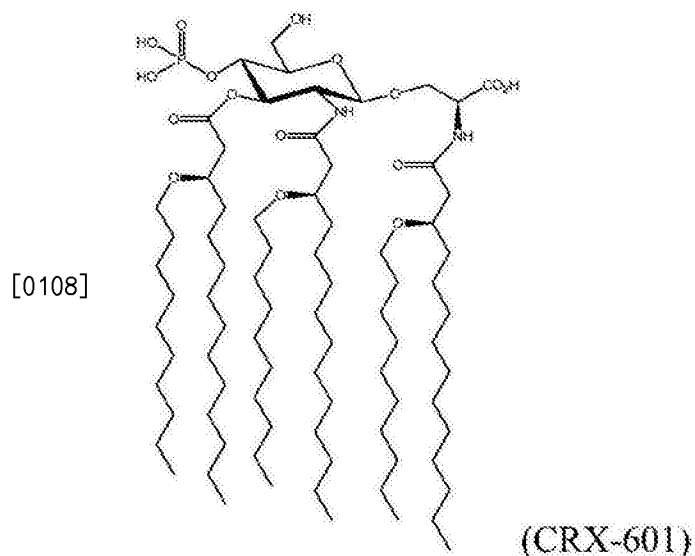
[0103] 其中X是O或S;Y是O或NH;Z是O或H;各R₁,R₂,R₃独立选自C7-20酰基和C7-20烷基;以及R₄是H或甲基。

[0104] 在式1a中,与正常脂肪酰基残基(即,仲酰氧基或烷氧基残基,例如R₁₀,R₂₀和R₃₀)连接的3'立体异构中心的构型是R或S,优选地R(如由Cahn-Ingold-Prelog优先规则指定)。与R₄和CO₂H连接的糖苷配基立体中心的构型可以是R或S。所有的立体异构体、对映异构体和非对映异构体两者及其混合物均被认为落入本发明的范围内。

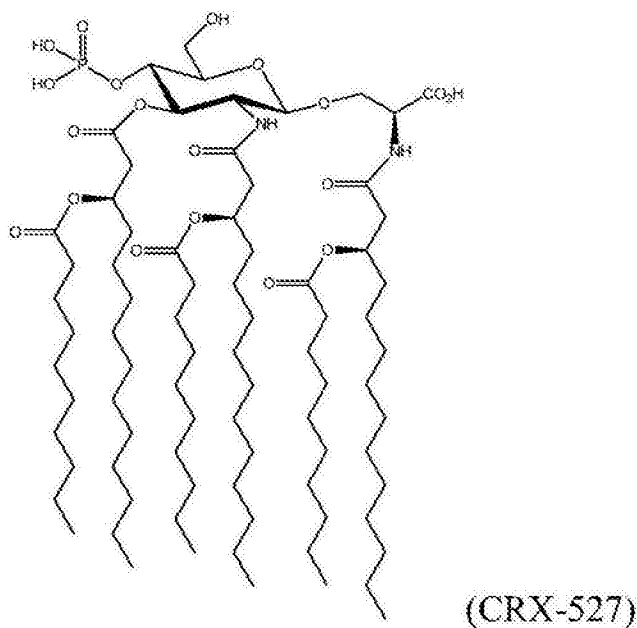
[0105] 式1a包括L/D-丝氨酰基、-苏氨酰基、-半胱氨酰基醚或酯脂质AGP激动剂。

[0106] 在式1和式1a两者中,Z为通过双键连接的O或两个各自通过单键连接的氢原子。即,当Z=Y=O时,化合物为酯键连接的;当Z=O且Y=NH时为酰胺键连接的;并且当Z=H/H和Y=O时为醚键连接的。

[0107] 特别优选的式1化合物被称为CRX-601和CRX-527。其结构如下:



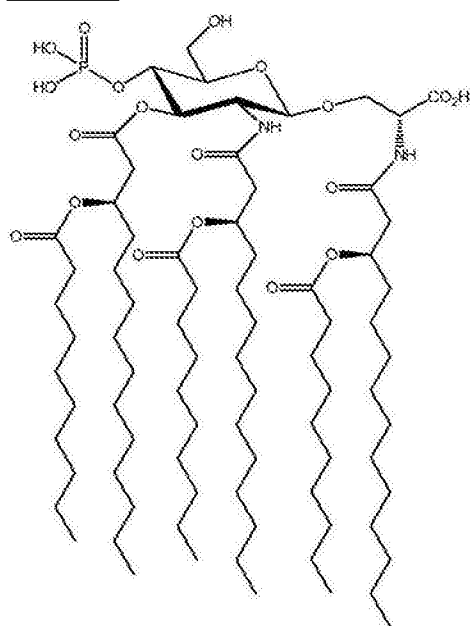
[0109]



[0110] 此外,另一优选的实施方案采用具有以下结构的CRX-547。

[0111] CRX-547

[0112]



[0113] AGP缓冲剂

[0114] 在本发明的一个实施方案中,包含TLR4激动剂优选AGP的组合物使用两性离子缓冲剂缓冲。合适地,两性离子缓冲剂是氨基烷烃磺酸或合适的盐。氨基烷烃磺酸缓冲剂的实例包括但不限于HEPES,HEPPS/EPPS,MOPS,MOBS和PIPES。优选地,所述缓冲剂是适用于人的药学上可接受的缓冲剂,例如用于商业注射产品中。最优选的缓冲剂是HEPES。

[0115] 治疗方法

[0116] 本发明的组合物和组合物被认为在其中接合TLR4是有益的疾病中有效。

[0117] 本发明因此也提供了本发明的组合物或组合,用于治疗,特别是治疗接合TLR4是有益的病症,特别是癌症。

[0118] 本发明的另一方面提供了治疗疾病的方法,其中接合TLR4是有益的,所述方法包

括给药本发明的组合。

[0119] 本发明的另一方面提供了本发明的组合在制备用于治疗其中接合TLR4是有益的障碍的药物中的用途。在优选的实施方案中,所述病症是癌症。

[0120] 适合用本发明组合治疗的癌症的实例包括但不限于头颈癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌、卵巢癌和前列腺癌的原发性和转移性形式。适宜地,所述癌症选自:脑(神经胶质瘤)、成胶质细胞瘤、星形细胞瘤、多形性成胶质细胞瘤、Bannayan-Zonana综合征、考登病、莱-杜病(Lhermitte-Duclos disease)、乳腺癌、炎性乳腺癌、威尔姆斯肿瘤、尤文氏肉瘤、横纹肌肉瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、结肠癌、头颈癌、肾癌、肺癌、肝癌、黑素瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肉瘤、骨肉瘤、骨巨细胞瘤、甲状腺癌、淋巴母细胞性T细胞白血病、慢性髓细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、毛细胞白血病、急性淋巴母细胞性白血病、急性骨髓性白血病、慢性中性粒细胞性白血病、急性淋巴母细胞性T细胞白血病、浆细胞瘤、免疫母细胞性大细胞白血病、套细胞白血病、多发性骨髓瘤巨核母细胞白血病、多发性骨髓瘤、急性巨核细胞性白血病、早幼粒细胞性白血病、红白血病、恶性淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、淋巴母细胞性T细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、神经母细胞瘤、膀胱癌、尿路上皮癌、肺癌、外阴癌、宫颈癌、子宫内膜癌、肾癌、间皮瘤、食道癌、唾液腺癌、肝细胞癌、胃癌、鼻咽癌、口腔癌、嘴部的癌症、GIST(胃肠道间质瘤)和睾丸癌。

[0121] 另外,待治疗的癌症的实例包括巴雷特腺癌;胆道癌;乳腺癌;宫颈癌;胆管癌;中枢神经系统肿瘤,包括原发性CNS肿瘤如成胶质细胞瘤,星形细胞瘤(例如多形性成胶质细胞瘤)和室管膜瘤,和继发性CNS肿瘤(即源自中枢神经系统外但转移至中枢神经系统的肿瘤)包括大肠结肠癌在内的结肠直肠癌;胃癌;头部和颈部癌,包括头部和颈部的鳞状细胞癌;血液系统癌症,包括白血病和淋巴瘤,如急性淋巴母细胞性白血病,急性骨髓性白血病(AML),骨髓增生异常综合征,慢性骨髓性白血病,霍奇金淋巴瘤,非霍奇金淋巴瘤,巨核母细胞性白血病,多发性骨髓瘤和红白血病;肝细胞癌;肺癌,包括小细胞肺癌和非小细胞肺癌;卵巢癌;子宫内膜癌;胰腺癌;垂体腺瘤;前列腺癌;肾癌;肉瘤;皮肤癌,包括黑素瘤;和甲状腺癌。

[0122] 适宜地,本发明涉及治疗选自以下的癌症或减轻其严重度的方法:脑(神经胶质瘤)、成胶质细胞瘤、星形细胞瘤、多形性成胶质细胞瘤、Bannayan-Zonana综合征、考登病、莱-杜病、乳腺癌、结肠癌、头颈癌、肾癌、肺癌、肝癌、黑素瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肉瘤和甲状腺癌。

[0123] 适宜地,本发明涉及一种治疗选自以下的癌症或减轻其严重度的方法:卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌和前列腺癌。

[0124] 适宜地,本发明涉及在哺乳动物中(包括人)治疗癌前综合征或减轻其严重程度的方法,其中癌前综合征选自:宫颈上皮内瘤形成,未知意义的单克隆丙种球蛋白病(MGUS),骨髓增生异常综合征,再生障碍性贫血,宫颈病变,皮肤痣(前黑素瘤),前列腺内皮内(管内)瘤形成(PIN),原位导管癌(DCIS),结肠息肉和严重肝炎或肝硬化。

[0125] 本发明的组合可以单独使用或与一种或多种其他治疗剂组合使用。因此,本发明在另一方面提供包含本发明的组合与另外的一种或多种治疗剂的另一组合,包含所述组合的组合物和药物,和所述另一组合、组合物和药物在治疗中的用途,具体地,用于治疗容易接合TLR4的疾病中的用途。

[0126] 在实施方案中,本发明的组合可以与癌症治疗的其他治疗方法一起使用。具体而言,在抗肿瘤疗法中,与其他化疗剂、激素、抗体试剂以及除了上述那些之外的手术和/或放射治疗组合的组合疗法被预期涵盖在本发明中。根据本发明的组合疗法因此包括给药TLR4激动剂以及任选使用其他治疗剂,包括其他抗肿瘤剂。药剂的所述组合可以一起给药或单独给药,并且当分别给药时,这可以同时或以任何顺序依次发生,既可以在时间上接近又可以相隔很长。在一个实施方案中,所述药物组合包含TLR4激动剂和任选的至少一种另外的抗肿瘤剂。

[0127] 在一个实施方案中,所述其他抗癌疗法是手术和/或放射疗法。

[0128] 在一个实施方案中,所述其他抗癌疗法是至少一种另外的抗肿瘤剂。

[0129] 对所治疗的易感肿瘤具有活性的任何抗肿瘤剂可用在所述组合中。有用的典型抗肿瘤剂包括,但不限于,抗微管剂例如二萜类化合物和长春花生物碱;铂配位络合物;烷化剂例如氮芥、氧氮磷杂环己二烯(oxazaphosphorine)、烷基磺酸盐、亚硝基脲和三氮烯;抗生素例如蒽环类、放线菌素和博来霉素;拓扑异构酶II抑制剂例如表鬼臼毒素;抗代谢剂例如嘌呤和嘧啶类似物和抗叶酸化合物;拓扑异构酶I抑制剂例如喜树碱;激素和激素类似物;信号传导途径抑制剂;非受体酪氨酸血管生成抑制剂;免疫治疗剂;促细胞凋亡剂;以及细胞周期信号传导抑制剂。

[0130] 抗微管或抗有丝分裂剂:抗微管或抗有丝分裂剂是时相特异性药物(phase specific agent),其在细胞周期中的M期或有丝分裂期具有抗肿瘤细胞的微管的活性。抗微管剂的实例包括但不限于二萜类化合物和长春花生物碱。

[0131] 天然来源的二萜类化合物是时相特异性的抗癌剂,其在细胞周期中的G₂/M期起作用。认为二萜类化合物通过与该蛋白结合,使微管的β-微管蛋白亚单位稳定。然后使蛋白的分解受到抑制,有丝分裂停止,接着发生细胞死亡。二萜类化合物的实例包括但不限于紫杉醇及其类似物多西他赛。

[0132] 紫杉醇,5β,20-环氧-1,2α,4,7β,10β,13α-六羟基紫杉-11-烯-9-酮4,10-二乙酸酯2-苯甲酸酯13-(2R,3S)-N-苯甲酰基-3-苯基异丝氨酸酯(5β,20-epoxy-1,2α,4,7β,10β,13α-hexa-hydroxytax-11-en-9-one 4,10-diacetate 2-benzoate 13-ester with (2R,3S)-N-benzoyl-3-phenylisoserine),其是从太平洋紫杉树(*Taxus brevifolia*)中分离出来的天然二萜产物,且作为可注射的溶液**TAXOL®**市售。其为萜类紫杉烷家族的成员。在美国,已经批准紫杉醇的临床使用,用于治疗难治的卵巢癌(Markman等,Yale Journal of Biology and Medicine,64:583,1991;McGuire等,Ann.Intem.,Med.,111:273,1989)和用于治疗乳腺癌(Holmes等,J.Nat.Cancer Inst.,83:1797,1991)。其为治疗皮肤癌(Einzig等,Proc.Am.Soc.Clin.Oncol.,20:46)和头颈癌(Forastire等,Sem.Oncol.,20:56,1990)的可能的候选药物。该化合物还具有治疗多囊性肾病(Woo等,Nature,368:750,1994)、肺癌和疟疾的潜力。采用紫杉醇治疗患者,导致骨髓抑制(多重细胞谱系(multiple cell lineage),Ignoff,R.J.等,Cancer Chemotherapy Pocket Guide,1998),这与长期给药高于阈浓度(50nM)有关(Kearns,C.M.等,Seminars in Oncology,3(6)p.16-23,1995)。

[0133] 多西他赛(Docetaxel),5β-20-环氧-1,2α,4,7β,10β,13α-六羟基紫杉-11-烯-9-酮4-乙酸酯2-苯甲酸酯13-(2R,3S)-N-羧基-3-苯基异丝氨酸N-叔丁基酯,三水合物,作为可注射的溶液**TAXOTERE®**市售。多西他赛可用于治疗乳腺癌。多西他赛是适量(q.v.)

紫杉醇的半合成衍生物,其利用天然前体即从欧洲浆果紫杉树的针叶中提取的10-去乙酰基浆果赤霉素III制备。

[0134] 长春花生物碱是来源于长春花属植物的时相特异性的抗肿瘤药物。长春花生物碱通过特异性地结合微管蛋白而在细胞周期的M期(有丝分裂)起作用。结果,被结合的微管蛋白分子不能聚合成微管。认为有丝分裂在中期被停止,随后细胞死亡。长春花生物碱的实例包括但不限于长春碱,长春新碱和长春瑞滨。

[0135] 长春碱(Vinblastine),长春碱硫酸盐,以**VELBAN®**注射液市售。尽管已经表明其有可能作为各种实体瘤的二线治疗,但是其最初被指示用于治疗睾丸癌和各种淋巴瘤,包括霍奇金病以及淋巴细胞和组织细胞的淋巴瘤。骨髓抑制是长春碱的剂量限制性副作用。

[0136] 长春新碱(Vincristine),长春碱22-氧代-硫酸盐,以**ONCOVIN®**注射溶液市售。长春新碱被指示用于治疗急性白血病,还发现用于治疗霍奇金和非霍奇金恶性淋巴瘤。脱发和神经作用是长春新碱最常见的副作用,并产生较小程度的骨髓抑制和胃肠粘膜炎症作用。

[0137] 长春瑞滨(Vinorelbine),3',4'-二脱氢-4'-脱氧-C'-去甲长春碱(norvincaleukoblastine) [R-(R*,R*)-2,3-二羟基丁二酸二酯(1:2)(盐)],以长春瑞滨酒石酸盐注射溶液(**NAVELBINE®**)市售,是半合成的长春花生物碱。长春瑞滨可作为单独的药物或与其它化学治疗剂(如顺铂)组合,用于治疗各种实体瘤,特别是非小细胞肺癌、晚期乳腺癌和激素难治的前列腺癌。骨髓抑制是长春瑞滨最常见的剂量限制性副作用。

[0138] 铂配位络合物(Platinum coordination complex):铂配位络合物是非时相特异性的抗癌剂,其与DNA相互作用。铂络合物进入肿瘤细胞,进行水合作用,并与DNA形成链内部和之间的交联,导致对肿瘤不利的生物学作用。铂配位络合物的实例包括但不限于奥沙利铂、顺铂和卡铂。

[0139] 顺铂,顺式-二氨二氯合铂,以**PLATINOL®**注射溶液市售。顺铂最初用于治疗转移性睾丸癌和卵巢癌以及晚期的膀胱癌。

[0140] 卡铂,二氨[1,1-环丁烷-二羧酸根(2-)-0,0']合铂,以**PARAPLATIN®**注射溶液市售。卡铂最初被指示用于晚期卵巢癌的一线 and 二线治疗。

[0141] 烷化剂:烷化剂是非时相特异性的抗癌药物和强亲电试剂。通常,烷化剂借助于烷基化作用,通过DNA分子的亲核部分如磷酸基(phosphate)、氨基、巯基、羟基、羧基和咪唑基与DNA形成共价键。这种烷基化作用破坏核酸功能,导致细胞死亡。烷化剂的实例包括但不限于氮芥(如环磷酰胺、美法仑和苯丁酸氮芥)、磺酸烷基酯(如白消安、亚硝基脲如卡莫司汀),以及三氮烯(如达卡巴嗪)。

[0142] 环磷酰胺(Cyclophosphamide),2-[双(2-氯乙基)氨基]四氢-2H-1,3,2-氧氮磷杂环己二烯2-氧化物一水合物(2-[bis(2-chloroethyl)amino]tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorine 2-oxide monohydrate),以**CYTOXAN®**注射溶液或片剂市售。环磷酰胺被指示可作为单独的药物或与其它化学治疗剂组合,用于治疗恶性淋巴瘤、多发性骨髓瘤和白血病。

[0143] 美法仑(Melphalan),4-[双(2-氯乙基)氨基]-L-苯基丙氨酸(4-[bis(2-

chloroethyl) amino]-L-phenylalanine), 以 **ALKERAN®** 注射溶液或片剂市售。美法仑可用于多发性骨髓瘤和不可切除的卵巢上皮癌的姑息疗法。

[0144] 苯丁酸氮芥 (Chlorambucil), 4-[双(2-氯乙基)氨基]苯丁酸 (4-[bis(2-chloroethyl)amino]benzenebutanoic acid), 以 **LEUKERAN®** 片剂市售。苯丁酸氮芥可用于慢性淋巴细胞性白血病, 恶性淋巴瘤 (如淋巴肉瘤、巨滤泡性淋巴瘤和霍奇金病) 的姑息疗法。

[0145] 白消安 (Busulfan), 二甲磺酸 1,4-丁二醇酯 (1,4-butanediol dimethanesulfonate), 以 **MYLERAN®** 片剂市售。白消安用于慢性髓细胞性白血病的姑息疗法。

[0146] 卡莫司汀 (Carmustine), 1,3-[双(2-氯乙基)-1-亚硝基脲 (1,3-[bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea)], 以 **BICNU®** 单瓶装的冻干产物市售。卡莫司汀可作为单独的药物或与其它药物组合, 用于脑瘤、多发性骨髓瘤、霍奇金病和非霍奇金淋巴瘤的姑息疗法。

[0147] 达卡巴嗪 (Dacarbazine), 5-(3,3-二甲基-1-三氮烯基)-咪唑-4-甲酰胺 (5-(3,3-dimethyl-1-triazeno)-imidazole-4-carboxamide), 以 **DTIC-Dome®** 单瓶装的产物市售。达卡巴嗪可用于转移性恶性黑素瘤的治疗, 并且可与其它药物组合, 用于霍奇金病的二线治疗。

[0148] 抗生素类抗肿瘤剂 (Antibiotic anti-neoplastics): 抗生素类抗肿瘤剂是非时相特异性的药物, 其结合或嵌入 DNA 中。通常, 这种作用导致稳定的 DNA 复合物或链断裂, 从而破坏核酸的正常功能, 导致细胞死亡。抗生素类抗肿瘤剂的实例包括但不限于放线菌素 (如放线菌素 D); 蒽环类 (anthrocyclins) (如柔红霉素和多柔比星); 以及博来霉素。

[0149] 放线菌素 D (Dactinomycin, 也称为 Actinomycin D), 以 **COSMEGEN®** 注射形式市售。放线菌素 D 可用于威尔姆斯肿瘤和横纹肌肉瘤的治疗。

[0150] 柔红霉素 (Daunorubicin), (8S-顺式)-8-乙酰基-10-[(3-氨基-2,3,6-三脱氧- α -L-来苏-己吡喃糖基)-氧基]-7,8,9,10-四氢-6,8,11-三羟基-1-甲氧基-5,12-丁省二酮盐酸盐, 以 **DAUNOXOME®** 脂质体可注射形式或 **CERUBIDINE®** 可注射形式市售。柔红霉素可在急性非淋巴细胞性白血病和晚期 HIV 相关的卡波西肉瘤的治疗中用于诱导缓解。

[0151] 多柔比星 (Doxorubicin), (8S,10S)-10-[(3-氨基-2,3,6-三脱氧- α -L-来苏-己吡喃糖基) 氧基]-8-乙醇酰基-7,8,9,10-四氢-6,8,11-三羟基-1-甲氧基-5,12-丁省二酮盐酸盐 ((8S,10S)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxy- α -L-lyxo-hexopyranosyl) oxy]-8-glycoloyl, 7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-1-methoxy-5,12naphthacenedione hydrochloride), 以 **RUBEX®** 或 **ADRIAMYCIN RDF®** 注射形式市售。多柔比星主要用于急性成淋巴细胞性白血病和急性成髓细胞性白血病的治疗, 但也是治疗某些实体瘤和淋巴瘤的有用组分。

[0152] 博来霉素 (Bleomycin), 是从轮丝链霉菌 (streptomyces verticillus) 菌株中分离出来的细胞毒素糖肽类抗生素的混合物, 以 **BLENOXANE®** 市售。博来霉素可作为单独的药物或与其它药物组合, 用于鳞状细胞癌、淋巴瘤和睾丸癌的姑息疗法。

[0153] 拓扑异构酶II抑制剂:拓扑异构酶II抑制剂包括但不限于表鬼臼脂毒素。

[0154] 表鬼臼脂毒素 (Epidophyllotoxins) 是来源于曼德拉草 (mandrake) 植物的时相特异性的抗肿瘤药物。表鬼臼脂毒素通常通过与拓扑异构酶II和DNA形成三元复合物,导致DNA链断裂来影响处于细胞周期的S和G₂期的细胞。链断裂积聚,接着细胞死亡。表鬼臼脂毒素的实例包括但不限于依托泊苷和替尼泊苷。

[0155] 依托泊苷 (Etoposide), 4'-去甲基-表鬼臼脂毒素9[4,6-O- (R)-亚乙基-β-D-吡喃葡萄糖苷], 以**VePESID®**注射溶液或胶囊市售, 并且常称之为VP-16。依托泊苷可作为单独的药物或与其它化疗剂组合, 用于治疗睾丸癌和非小细胞肺癌。

[0156] 替尼泊苷 (Teniposide), 4'-去甲基-表鬼臼脂毒素9[4,6-O- (R)-亚噻吩基-β-D-吡喃葡萄糖苷], 以**VUMON®**注射溶液市售, 并且通常称之为VM-26。替尼泊苷可作为单独的药物或与其它化疗剂组合, 用于治疗儿童急性白血病。

[0157] 抗代谢肿瘤剂 (Antimetabolite neoplasti): 抗代谢肿瘤剂是时相特异性的抗肿瘤药物, 其作用于细胞周期的S期 (DNA合成), 通过抑制DNA的合成, 或者通过抑制嘌呤或嘧啶碱基的合成进而限制DNA的合成。结果, S期不能继续下去, 接着细胞死亡。抗代谢类抗肿瘤药物的实例包括但不限于氟尿嘧啶、甲氨蝶呤、阿糖胞苷、巯基嘌呤、硫鸟嘌呤, 以及吉西他滨。

[0158] 5-氟尿嘧啶, 5-氟-2,4-(1H,3H) 嘧啶二酮, 以氟尿嘧啶市售。5-氟尿嘧啶的给药导致胸苷酸合成的抑制, 并且还掺入到RNA和DNA中。结果通常是细胞死亡。5-氟尿嘧啶可作为单独的药物或与其它化疗剂组合, 用于治疗乳腺癌、结肠癌、直肠癌、胃癌和胰腺癌。其它的氟嘧啶类似物包括5-氟脱氧尿嘧啶核苷 (氟尿苷) 和5-氟脱氧尿嘧啶核苷一磷酸。

[0159] 阿糖胞苷 (Cytarabine), 4-氨基-1-β-D-阿拉伯呋喃糖基-2 (1H)-嘧啶酮 (4-amino-1-β-D-arabinofuranosyl-2 (1H)-pyrimidinone), 以**CYTOSAR-U®**市售, 并且通常称之为Ara-C。认为阿糖胞苷在S-期具有细胞时相特异性, 其通过将阿糖胞苷末端掺入到生长的DNA链中而抑制DNA链的延长。阿糖胞苷作为单独的药物或与其它化疗剂组合, 用于治疗急性白血病。其它的胞苷类似物包括5-氮杂胞苷和2',2'-二氟脱氧胞苷 (吉西他滨)。

[0160] 巯基嘌呤, 1,7-二氢-6H-嘌呤-6-硫酮一水合物 (1,7-dihydro-6H-purine-6-thione monohydrate), 以**PURINETHOL®**市售。巯基嘌呤在S-期通过至今尚未清楚的机理抑制DNA的合成具有细胞时相特异性。巯基嘌呤可作为单独的药物或与其它化疗剂组合, 用于治疗急性白血病。可使用的巯基嘌呤类似物是硫唑嘌呤。

[0161] 硫鸟嘌呤 (Thioguanine), 2-氨基-1,7-二氢-6H-嘌呤-6-硫酮 (2-amino-1,7-dihydro-6H-purine-6-thione), 以**TABLOID®**市售。硫鸟嘌呤在S-期通过至今尚未清楚的机理抑制DNA的合成具有细胞时相特异性。硫鸟嘌呤可作为单独的药物或与其它化疗剂组合, 用于治疗急性白血病。其它的嘌呤类似物包括喷司他丁、赤式羟基壬基腺嘌呤 (erythrohydroxynonyl adenine)、磷酸氟达拉滨和克拉屈滨。

[0162] 吉西他滨 (Gemcitabine), 2'-脱氧-2',2'-二氟胞苷一盐酸盐 (β-异构体), 以**GEMZAR®**市售。吉西他滨通过阻断细胞发展通过G1/S边界而在S-期具有细胞时相特异性。吉西他滨可与顺铂组合, 用于治疗局部的晚期非小细胞肺癌, 也可以单独地用于治疗局部的晚期胰腺癌。

[0163] 甲氨蝶呤, N-[4[[(2,4-二氨基-6-蝶啶基) 甲基] 甲基氨基] 苯甲酰基]-L-谷氨酸,

以甲氨蝶呤钠市售。甲氨蝶呤在S-期具有细胞时相特异性作用,其通过抑制合成嘌呤核苷酸和胸苷酸所需的脱氢叶酸还原酶来抑制DNA的合成、修复和/或复制。甲氨蝶呤可作为单独的药物或与其它化疗剂组合,用于治疗绒毛膜癌、脑膜白血病、非霍奇金淋巴瘤,以及乳腺癌、头癌、颈癌、卵巢癌和膀胱癌。

[0164] 拓扑异构酶I抑制剂:喜树碱(Camptothecins),包括喜树碱和喜树碱衍生物,其可作为拓扑异构酶I抑制剂来使用或开发。认为喜树碱细胞毒素活性与其拓扑异构酶I抑制活性相关。喜树碱的实例包括但不限于伊立替康、托泊替康,以及下述7-(4-甲基哌嗪子基-亚甲基)-10,11-亚乙二氧基-20-喜树碱的各种旋光形式。

[0165] 盐酸伊立替康(Irinotecan HCl), (4S)-4,11-二乙基-4-羟基-9-[(4-哌啶子基哌啶子基)羰基氧基]-1H-吡喃并[3',4',6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-3,14(4H,12H)-二酮盐酸盐,以**CAMPTOSAR®**注射溶液市售。伊立替康(Irinotecan)是喜树碱的衍生物,其与其活性代谢物SN-38一起结合在拓扑异构酶I-DNA复合物上。认为由于双链不可修复的(irreparable)断裂,导致出现细胞毒性,所述断裂是由拓扑异构酶I:DNA:伊立替康或SN-38三元复合物与复制酶之间的相互作用引起的。伊立替康可用于治疗结肠或直肠的转移癌。

[0166] 盐酸托泊替康(Topotecan HCl), (S)-10-[(二甲基氨基)甲基]-4-乙基-4,9-二羟基-1H-吡喃并[3',4',6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-3,14-(4H,12H)-二酮一盐酸盐((S)-10-[(dimethylamino)methyl]-4-ethyl-4,9-dihydroxy-1H-pyrano[3',4',6,7]indolizino[1,2-b]quinoline-3,14-(4H,12H)-dione monohydrochloride),以**HYCAMTIN®**注射溶液市售。托泊替康是喜树碱的衍生物,其与拓扑异构酶I-DNA复合物结合,并阻止单链断裂的再连接,所述单链断裂是拓扑异构酶I响应DNA分子的扭转张力(torsional strain)所引起的。托泊替康用于卵巢转移癌和小细胞肺癌的二线治疗。

[0167] 激素和激素类似物:激素和激素类似物是对癌症治疗有用的化合物,其中激素与癌症生长和/或不生长之间有关系。用于癌症治疗的激素和激素类似物的实例包括但不限于:肾上腺皮质类固醇类,例如泼尼松和泼尼松龙,其有用于治疗恶性淋巴瘤和儿童急性白血病;氨鲁米特和其他芳香酶抑制剂,例如阿那曲唑、来曲唑、伏罗唑(vorazole)和依西美坦,其有用于治疗肾上腺皮质癌和激素依赖的乳腺癌(涉及雌激素受体);孕酮(progestins),例如乙酸甲地孕酮,其用于治疗激素依赖的乳腺癌和子宫内膜癌;雌激素、雄激素和抗雄激素药物,例如氟他米特,尼鲁米特,比卡鲁胺,醋酸环丙孕酮;和5 α -还原酶例如非那雄胺和度他雄胺,其有用于治疗前列腺癌和良性前列腺肥大;抗雌激素药物,例如他莫昔芬、托瑞米芬、雷洛昔芬、屈洛昔芬、艾多昔芬,以及美国专利号5,681,835、5,877,219和6,207,716中公开的选择性雌激素受体调节剂(SERMS),这些物质用于治疗激素依赖的乳腺癌和其他易感性癌症;和促性腺激素释放激素(GnRH)及其类似物,其刺激促黄体生成激素(LH)和/或促卵泡激素(FSH)的释放,用于治疗前列腺癌,这类物质例如LHRH激动剂和拮抗剂,例如醋酸戈舍瑞林和亮丙瑞林。

[0168] 信号传导途径抑制剂:信号传导途径抑制剂是这样的抑制剂,其阻断或抑制引发细胞内变化的化学过程。本文所述的这种变化是细胞增殖或分化。用于本发明的信号传导抑制剂包括受体酪氨酸激酶抑制剂、非受体酪氨酸激酶抑制剂、SH2/SH3结构域阻断剂、丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂、磷脂酰肌醇-3激酶抑制剂、肌肉肌醇信号传导抑制剂和Ras致癌

基因抑制剂。

[0169] 几种蛋白酪氨酸激酶催化参与细胞生长调节的多种蛋白质中的特定酪氨酸残基的磷酸化。所述蛋白酪氨酸激酶广义上可分为受体激酶或非受体激酶。

[0170] 受体酪氨酸激酶是具有细胞外配体结合结构域、跨膜结构域和酪氨酸激酶结构域的跨膜蛋白。受体酪氨酸激酶参与细胞生长的调节,并且通常称为生长因子受体。许多这些激酶例如通过过表达或突变的不适当的活化或不受控制的活化(即异常的激酶生长因子受体活性)已被证明导致不受控制的细胞生长。因此,所述激酶的异常活性与恶性组织生长有关。因此,所述激酶的抑制剂可提供癌症治疗方法。生长因子受体包括例如表皮生长因子受体(EGFr)、来自血小板的生长因子受体(PDGFr)、erbB2、erbB4、ret、血管内皮生长因子受体(VEGFr)、具有免疫球蛋白样和表皮生长因子识别结构域的酪氨酸激酶(TIE-2, tyrosine kinase with immunoglobulin-like and epidermal growth factor identity domains)、胰岛素生长因子-I (IGFI)受体、巨噬细胞集落刺激因子(cfms)、BTK、ckit、cmet、成纤维细胞生长因子(FGF)受体、Trk受体(TrkA、TrkB和TrkC)、肝配蛋白(eph)受体和RET原癌基因。生长受体的几种抑制剂正在开发中,包括配体拮抗剂、抗体、酪氨酸激酶抑制剂和反义寡核苷酸。生长因子受体和抑制生长因子受体功能的药物公开于例如以下文献中: Kath, John C., Exp. Opin. Ther. Patents (2000) 10 (6): 803-818; Shawver等, DDT Vol 2, No. 2 February 1997; 和 Lofts, F. J. 等, "Growth factor receptors as targets", New Molecular Targets for Cancer Chemotherapy, ed. Workman, Paul 和 Kerr, David, CRC press 1994, London.

[0171] 不属于生长因子受体激酶的酪氨酸激酶被称为非受体酪氨酸激酶。用于本发明中的作为抗癌药物的靶标或潜在靶标的非受体酪氨酸激酶包括cSrc、Lck、Fyn、Yes、Jak、cAbl、FAK(黏着斑激酶)、布鲁顿酪氨酸激酶(Brutons tyrosine kinase)和Bcr-Abl。所述非受体激酶和抑制非受体酪氨酸激酶功能的药物描述于以下文献中: Sinh, S. 和 Corey, S. J., (1999) Journal of

[0172] Hematotherapy and Stem Cell Research 8 (5): 465-80; 和 Bolen, J. B., Brugge, J. S., (1997) Annual review of Immunology. 15: 371-404.

[0173] SH2/SH3结构域阻断剂是在多种酶或衔接蛋白中破坏SH2或SH3结构域结合的药物,所述酶或衔接蛋白包括PI3-K p85亚单位、Src家族激酶、衔接分子(Shc、Crk、Nck、Grb2)和Ras-GAP。作为抗癌药物靶标的SH2/SH3区域在以下文献中有所讨论: Smithgall, T. E. (1995), Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. 34 (3) 125-32.

[0174] 丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂包括MAP激酶级联阻断剂,其包括Raf激酶(rafk)阻断剂、分裂素或细胞外调节激酶(MEK)阻断剂和细胞外调节激酶(ERKs)阻断剂;以及蛋白激酶C家族成员阻断剂,包括PKC阻断剂(PKC- α 、 β 、 γ 、 ϵ 、 μ 、 λ 、 ι 、 ζ 阻断剂), IkB激酶家族(IKK α , IKK β)阻断剂, PKB家族激酶阻断剂, akt激酶家族成员阻断剂, 和TGF- β 受体激酶阻断剂。所述丝氨酸/苏氨酸激酶及其抑制剂描述于以下文献中: Yamamoto, T., Taya, S., Kaibuchi, K., (1999), Journal of Biochemistry. 126 (5) 799-803; Brodt, P., Samani, A. 和 Navab, R. (2000), Biochemical Pharmacology, 60. 1101-1107; Massague, J., Weis-Garcia, F. (1996) Cancer Surveys. 27: 41-64; Philip, P. A. 和 Harris, A. L. (1995), Cancer Treatment and Research. 78: 3-27, Lackey, K. et al Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters,

(10), 2000, 223-226; 美国专利号 6,268,391; 和 Martinez-Iacaci, L. 等, Int. J. Cancer (2000), 88 (1), 44-52。

[0175] 磷脂酰肌醇-3 家族成员的抑制剂包括 PI3-激酶、ATM、DNA-PK 和 Ku 的阻断剂, 它们也用在本发明中。该激酶在以下文献中讨论: Abraham, R.T. (1996), Current Opinion in Immunology. 8 (3) 412-8; Canman, C.E., Lim, D.S. (1998), Oncogene 17 (25) 3301-3308; Jackson, S.P. (1997), International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 29 (7): 935-8; 和 Zhong, H. et al, Cancer res, (2000) 60 (6), 1541-1545。

[0176] 肌肉-肌醇信号传导抑制剂也用在本发明中, 诸如磷脂酶 C 阻断剂和肌醇类似物。所述信号传导抑制剂在下述文献中描述: Powis, G. 和 Kozikowski A., (1994) New Molecular Targets for Cancer Chemotherapy ed., Paul Workman 和 David Kerr, CRC press 1994, London。

[0177] 另一组信号传导途径抑制剂为 Ras 致癌基因抑制剂。所述抑制剂包括下述物质的抑制剂: 法尼基转移酶、香叶基-香叶基转移酶和 CAAX 蛋白酶, 以及反义寡核苷酸、核酶和免疫治疗。所述抑制剂已被证明为在含有野生型突变体 ras 的细胞中阻断 ras 活化, 因此作为抗增殖剂。Ras 致癌基因抑制剂在下述文献中讨论: Scharovsky, O.G., Rozados, V.R., Gervasoni, S.I. Matar, P. (2000), Journal of Biomedical Science. 7 (4) 292-8; Ashby, M.N. (1998), Current Opinion in Lipidology. 9 (2) 99-102; 和 BioChim. Biophys. Acta, (1989) 1423 (3): 19-30。

[0178] 如上提及, 针对受体激酶配体结合的抗体拮抗剂也作为信号传导抑制剂。该组信号传导途径抑制剂包括人源化抗体针对受体酪氨酸激酶的细胞外配体结合域的用途。例如 Imclone C225EGFR 特异性抗体 (参见 Green, M.C. 等, Monoclonal Antibody Therapy for Solid Tumors, Cancer Treat. Rev., (2000), 26 (4), 269-286); Herceptin® erbB2 抗体 (参见 Tyrosine Kinase Signalling in Breast cancer: erbB Family Receptor Tyrosine Kinases, Breast cancer Res., 2000, 2 (3), 176-183); 以及 2CB VEGFR2 特异性抗体 (参见 Brekken, R.A. 等, Selective Inhibition of VEGFR2 Activity by a monoclonal Anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice, Cancer Res. (2000) 60, 5117-5124)。

[0179] 抗血管生成剂: 抗血管生成剂包括非受体 MEK 血管生成抑制剂, 也是有用的。抗血管生成剂例如抑制血管内皮生长因子 (例如抗血管内皮细胞生长因子抗体贝伐单抗 [Avastin™]) 的药物和通过其他机制起作用的化合物 (例如, 利诺胺、整合蛋白 $\alpha v \beta 3$ 功能的抑制剂、内皮他丁和血管他丁);

[0180] 免疫治疗剂: 免疫治疗方案中使用的药剂也可以用于与式 (I) 化合物组合使用。免疫疗法包括例如离体和体内方法以增加患者肿瘤细胞的免疫原性, 例如用细胞因子如白细胞介素 2、白细胞介素 4 或粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的转染, 降低 T 细胞无反应性的方法, 使用转染的免疫细胞例如细胞因子转染的树突细胞的方法, 使用细胞因子转染的肿瘤细胞系的方法和使用抗个体基因型抗体的方法。

[0181] 促细胞凋亡剂: 促凋亡方案中使用的药剂 (例如, bcl-2 反义寡核苷酸) 也可以用于本发明的组合中。

[0182] 细胞周期信号传导抑制剂: 细胞周期转导信号抑制剂抑制参与细胞周期控制的分子。称为细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDK) 的蛋白激酶家族及其与称为细胞周期蛋白的蛋白

质家族之间的相互作用控制了整个真核细胞周期的进展。不同细胞周期蛋白/CDK复合物的协调激活和失活对于度过细胞周期的正常进展是必需的。几种细胞周期信号传导抑制剂正在开发中。例如,细胞周期蛋白依赖性激酶(包括CDK2、CDK4和CDK6)以及它们的抑制剂的实例描述于例如Rosania等,Exp.Opin.Ther.Patents (2000) 10 (2) :215-230中。

[0183] 在一个实施方案中,本发明的组合包含TLR4激动剂和至少一种选自以下的抗肿瘤剂:抗微管剂、铂配位络合物、烷化剂、抗生素、拓扑异构酶II抑制剂、抗代谢物、拓扑异构酶I抑制剂、激素和激素类似物、信号传导途径抑制剂、非受体酪氨酸MEK血管生成抑制剂、免疫治疗剂、促细胞凋亡剂和细胞周期信号传导抑制剂。

[0184] 在一个实施方案中,本发明的组合包含TLR4激动剂和至少一种抗肿瘤剂,所述抗肿瘤剂是选自二萜类化合物和长春花生物碱的抗微管剂。

[0185] 在进一步的实施方案中,所述至少一种抗肿瘤剂是二萜类化合物。

[0186] 在进一步的实施方案中,所述至少一种抗肿瘤剂是长春花生物碱。

[0187] 在一个实施方案中,本发明的组合是TLR4激动剂与至少一种为铂配位络合物的抗肿瘤剂。

[0188] 在进一步的实施方案中,所述至少一种抗肿瘤剂为紫杉醇、卡铂或长春瑞滨。

[0189] 在进一步的实施方案中,所述至少一种抗肿瘤剂为卡铂。

[0190] 在进一步的实施方案中,所述至少一种抗肿瘤剂为长春瑞滨。

[0191] 在进一步的实施方案中,所述至少一种抗肿瘤剂是紫杉醇。

[0192] 在一个实施方案中,本发明的组合包含TLR4激动剂和至少一种为信号传导途径抑制剂的抗肿瘤剂。

[0193] 在另一个实施方案中,信号传导途径抑制剂是生长因子受体激酶VEGFR2、TIE2、PDGFR、BTK、erbB2、EGFr、IGFR-1、TrkA、TrkB、TrkC或c-fms的抑制剂。

[0194] 在进一步的实施方案中,所述信号传导途径抑制剂是丝氨酸/苏氨酸激酶rafk、akt或PKC- ζ 的抑制剂。

[0195] 在进一步的实施方案中,所述信号传导途径抑制剂是选自src激酶家族的非受体酪氨酸激酶的抑制剂。

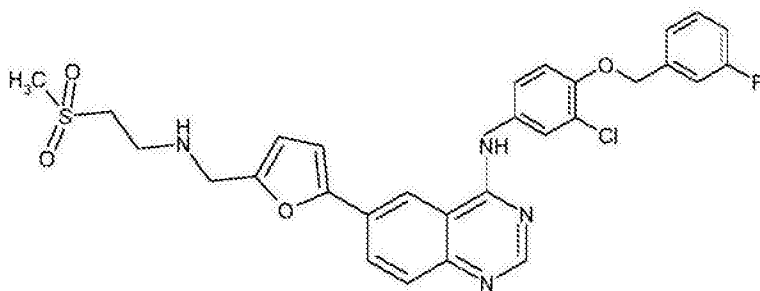
[0196] 在进一步的实施方案中,所述信号传导途径抑制剂是c-src的抑制剂。

[0197] 在进一步的实施方案中,所述信号传导途径抑制剂是Ras致癌基因的抑制剂,其选自法尼基转移酶抑制剂和香叶基-香叶基转移酶抑制剂。

[0198] 在进一步的实施方案中,所述信号传导途径抑制剂是选自PI3K的丝氨酸/苏氨酸激酶的抑制剂。

[0199] 在进一步的实施方案中,所述信号传导途径抑制剂是双重EGFr/erbB2抑制剂,例如N-{3-氯-4-[(3-氟苄基)氧基]苯基}-6-[5-({[2-(甲磺酰基)乙基]氨基}甲基)-2-呋喃基]-4-喹唑啉胺(结构如下):

[0200]



[0201] 在一个实施方案中,本发明的组合包含式I化合物或其盐或溶剂合物和至少一种为细胞周期信号传导抑制剂的抗肿瘤剂。

[0202] 在进一步的实施方案中,所述细胞周期信号传导抑制剂是CDK2、CDK4或CDK6的抑制剂。

[0203] 在一个实施方案中,本发明的方法和用途中的哺乳动物是人类。

[0204] 如所指出的那样,将治疗有效量的本发明组合(抗癌剂和TLR4激动剂)给予人。典型地,本发明给药剂的治疗有效量将取决于许多因素,包括例如受试者的年龄和体重、需要治疗的确切病症、病症的严重程度、制剂的性质和给药途径。最终,治疗有效量将由主治医师决定。

[0205] 以下实施例仅用于说明,并不意图以任何方式限制本发明的范围。

[0206] 实施例

[0207] 非限制性实施例化学疗法和AGP治疗的组合导致鼠癌症模型中存活的显著增强(与单独的化疗或AGP相比)。在以下系统中观察到CRX-527与化疗之间的协同作用的证据:鼠白血病模型(L1210),鼠卵巢畸胎瘤模型(MOT),鼠黑素瘤模型(B16),乳腺癌(4T1)。

[0208] 实施例1L120鼠白血病模型:化疗和免疫调节的组合改善了抗癌响应

[0209] 为了研究由化疗性丝裂霉素C和AGP CRX-527组成的组合治疗是否会比单独使用任一治疗更好地延长带有癌症的小鼠的存活,将已经接种了L1210鼠白血病细胞(通过腹膜内(IP)途径接种 10^4 个肿瘤细胞)的BDF1小鼠(每组10只)在第0天用以下处理:无(未处理的对照),2)在第6天腹膜内注射丝裂霉素C(40ug),3)在第7天IP注射CRX-527-AF(水性制剂(AF)中的100 μ gCRX-527,其是0.02%二棕榈酰磷脂酰胆碱的水溶液),或4)在第6天IP注射丝裂霉素C随后在第7天IP注射CRX-527-AF。图1中给出了每组历经54天的存活曲线。与单独给药任一组分的小鼠相比,给药丝裂霉素C和CRX-527的小鼠具有显著延长的存活。

[0210] 实施例2:小鼠卵巢肿瘤(MOT)模型

[0211] 给药化疗和免疫调节剂的时机

[0212] 在小鼠卵巢肿瘤(MOT)模型中,与单独给药任一组分的小鼠相比,同时给药丝裂霉素C和CRX-527的小鼠也显示显著延长的存活。为了确定给药化疗剂和TLR4配体的时机是否对抗癌响应是重要的,将在第0天用小鼠卵巢肿瘤(MOT)细胞(通过IP途径接种 10^4 个肿瘤细胞)接种的C3H/FeJ小鼠(每组10只)进行以下处理:1)无(未处理的对照),2)第6天丝裂霉素C(40ug)处理,3)在第4天用CRX-527-SE(10ug,在含2%角鲨烯的稳定水包油乳液制剂中),接着在第6天用丝裂霉素C处理,4)第5天用CRX-527-SE处理,接着第6天用丝裂霉素C处理,5)在第6天既用CRX-527-SE处理也用丝裂霉素C处理,6)在第6天用丝裂霉素C处理,然后在第7天用CRX-527-SE处理,7)在第6天用丝裂霉素C处理,然后在第10天用CRX-527-SE处理,和8)在第6天用丝裂霉素C处理,然后在第11天用CRX-527-SE处理。丝裂霉素C和CRX-527-SE

给药的剂量/途径一直分别为40ug IP和10ug IP。与未接受任何处理的组(未处理的对照)、单独的丝裂霉素或先给予CRX527-SE再给予丝裂霉素C相比,与丝裂霉素C同时给药CRX-527或在给药丝裂霉素C后最长5天内给药CRX-527的组具有显著延长的存活时间(图2),表明在与化疗剂诸如丝裂霉素C同时或其之后给药有效的TLR4配体例如CRX-527时,在该癌症模型中观察到组合疗法的益处。

[0213] 实施例3TLR4依赖

[0214] C3H/HeJ小鼠在编码tol1样受体4(TLR4)的基因中具有突变,并且因此不响应于TLR4配体如脂多糖(LPS)或AGP如CRX-527。我们利用这些TLR4无响应小鼠(每组10只)证明CRX-527在野生型小鼠中引发的抗癌活性取决于功能性TLR4的存在。正如所料,CRX-527在C3H/HeOuJ野生型小鼠中在单独给药或与丝裂霉素C组合给药时可促进存活(图3),但不能促进携带MOT的C3H/HeJ小鼠的存活(图4)。

[0215] 实施例4制剂

[0216] 在MOT肿瘤模型中评估制剂对观察到的CRX-527的抗癌活性的影响。在图5所示的实验中,在第0天对C3H/HeN小鼠(野生型TLR4,10个/组)接种MOT肿瘤(10^4 个肿瘤细胞,IP)。在第6天给药丝裂霉素C(40ug IP),在第7天通过IP途径给药配制于AF(含水制剂=0.02%二棕榈酰磷脂酰胆碱的水溶液)中的1或10 μ g CRX-527,IN(鼻内制剂=2%甘油的水溶液)或SE(稳定乳液=2%角鲨烯水包油乳液)。再次,与未处理对照相比,单独用丝裂霉素C处理导致存活的小幅增加。在丝裂霉素C处理后一天给药CRX-527导致存活时间延长,与AF制剂相比,SE和IN制剂具有增强的效力。图5和图6证明了SE和IN制剂的增强效力,其中可以看出在AF制剂中需要10 μ g剂量的CRX-527来诱导高水平的保护,而SE和IN制剂在1ug和10ug剂量下都非常有效。该实验的结果表明,通过制剂可以提高该模型中CRX-527的效力。

[0217] 实施例5诱导适应性免疫

[0218] 图7中显示的数据表明通过用丝裂霉素C和CRX-527的组合治疗而治愈的小鼠MOT肿瘤对用相同肿瘤再次激发是具有抵抗性的(相比于天然的对照小鼠,所述小鼠以基于历史数据的正常速率患病(succumb))。该结果表明在经治疗的/治愈的小鼠中产生肿瘤特异性适应性免疫应答,其能够在再次激发时减缓肿瘤的生长并延长存活。本实验中组大小为10。

[0219] 实施例6多次治疗的效果和局部给药与全身给药免疫调节剂的效果比较

[0220] 图8和图9中显示的数据表明,组合疗法的组分可以通过不同途径成功给药。在该实验中,丝裂霉素C通过IP途径给药于携带MOT的小鼠,并且通过IP或IV途径给药CRX-527-IN。尽管在通过IP途径接受两种组分的组中存活时间延长更为显著,但经IP途径接受丝裂霉素C的组和经IV途径接受CRX-527-IN的组也受到保护,尤其是在两次给药组合疗法后。图8和图9中呈现的数据还表明,就延长MOT肿瘤模型中的存活而言,用组合疗法进行两次治疗比一次治疗更有效。这一结果表明,治疗次数可能对此类治疗的结果有影响。

[0221] 实施例7B16黑素瘤系统

[0222] 还使用称为B16-F10的非免疫原性肿瘤在鼠黑素瘤模型中测试了化学治疗剂和AGP组合疗法的功效。在这些实验中,BDF1小鼠在第0天接种B16-F10黑素瘤细胞(1.5×10^3 IV)。在此后的不同时间,用单独的环磷酰胺(即Cytosan)(3mg IP)、单独的CRX-527-IN(10ug)或两种药物的组合处理带有癌症的小鼠。如图10所示,在第5天单独用CRX-

527-IN治疗没有导致存活改善,而在第5天仅用环磷酰胺治疗导致适度的延长。然而,与其他组相比,一起给药CRX-527-IN和环磷酰胺的组显示存活的改善。

[0223] 在进一步的实验中,用绿色荧光蛋白转染的B16-F10黑素瘤细胞用于量化肿瘤向小鼠肺部的转移。因为绿色荧光蛋白允许定量携带B16-F10的小鼠的肺中的肿瘤量,所以可以使用肺肿瘤负荷作为读出结果(read-out)来评估各种治疗方案的功效。在第0天向BDF1小鼠接种B16-F10黑素瘤细胞(1.5×10^3 IV)。在第1天,用以下物质注射带肿瘤的小鼠(每组5只):媒介物(500 μ l生理盐水IP和100 μ l SE媒介物IV),CRX-527-SE(10 μ g于100 μ l中,IV),环磷酰胺(4mg于500 μ l水中,IP)或CRX-527-SE(10 μ g于100 μ l中,IV)和环磷酰胺(4mg于500 μ l水中,IP)。在第26天,将小鼠处死并收集其肺。对来自每只小鼠的肺进行照相,然后均化,以便可以定量荧光素酶活性以确定存在多少B16-F10肿瘤。通过视觉检查(图11-14),清楚的是,用环磷酰胺/CRX-527组合治疗的小鼠(图14)肺部肿瘤负荷低于任何其他组。当将肺均化并评估荧光素酶活性时,证实了这一观察结果。图15中显示的数据显示,用环磷酰胺和CRX-527处理的小鼠的肺比用媒介物或单独使用任一种药剂处理的小鼠的肺中的荧光素酶活性显著更低,因此肺的肿瘤更少,证实了本系统中的组合疗法的优点。

[0224] 实施例8在乳腺癌模型中的组合疗法

[0225] 在4T1鼠乳腺癌模型中也证实了将化学治疗剂与诸如AGP的TLR4配体组合的益处。对于使用该转移性癌症模型进行的实验,在第0天将4T1肿瘤细胞(50 μ L中的 7×10^3)注射到每只小鼠的下乳腺中。在第14天手术除去原发性肿瘤,将小鼠(每组10只)在第15天用媒介物、环磷酰胺(3mg IP)或用环磷酰胺(3mg IP)和CRX-527(各种剂量,IV)治疗。图16所示的结果表明,接受组合疗法的组的存活时间比仅接受媒介物或环磷酰胺的组的存活时间更长。尽管不像L1210、MOT或B16-F10系统中收集的数据那样明确,但这些结果支持了这样的主张,即与化学治疗剂和免疫调节剂如CRX-527的组合疗法优于单独使用任一药剂的治疗。

[0226] 实施例9:用TLR-4(CRX-527)治疗的CT-26研究结果

[0227] CT26小鼠结肠癌(CT26.WT;ATCC#CRL-2638)细胞系获自ATCC。它是本领域已知的N-亚硝基-N-甲基乌拉坦-(NNMU)诱导的未分化结肠癌细胞系。例如,其在以下文献中描述:Wang M,等,Active immunotherapy of cancer with a nonreplicating recombinant fowlpox virus encoding a model tumor-associated antigen.J.Immunol.154:4685-4692,1995(PubMed:7722321),其全部内容在此引入作为参考。为了制备肿瘤细胞,将来自ATCC(目录号CRL-2638,批号59227052)的CT-26(小鼠结肠癌细胞)的冷冻(-140 $^{\circ}$ C)小瓶解冻并在碱性RPMI(含10%FBS)培养基中在接下来的一周进行培养。

[0228] 从完全培养基的烧瓶中收获CT-26细胞(第12代)。将细胞离心并重悬浮于RPMI(不含FBS)中,该步骤重复3次。通过台盼蓝排除法检查细胞密度和存活力。然后将细胞稀释至所需密度(5×10^5 个细胞/mL)并保持在冰上。

[0229] 评估递增剂量的CRX 527在降低肿瘤生长中的功效。在第0天对动物进行称重并在右后肢接种CT26肿瘤细胞,每只小鼠 0.5×10^5 个。总共向130只小鼠接种肿瘤细胞-假设失败率为30%(在研究开始时太大或太小),目标是每组有n=10。肿瘤细胞接种后,在研究期间每周测量3次肿瘤生长和总体重。随机化发生在第10天或第11天,此时平均肿瘤体积约为100mm³。开始随机化的那一天,给予动物CRX 527或媒介物i.p.每两周一次,共6次剂量。小鼠仍留在研究中,直到两次连续测量的肿瘤达到>2000cu mm为止,由于其他原因(即体重减

轻>20%，肿瘤上溃疡形成等)或直到研究结束时将小鼠从研究中脱离。安乐死后，肿瘤可以被除去并进行解离用于流动分析和/或进行用于IHC分析的FFPE。

	治疗	剂量(每只小鼠)	小鼠的数目
	0 组: 每只 0.5×10^5 个细胞,	媒介物	10-13
[0230]	a 组: 每只 0.5×10^5 个细胞,	CRX-527; 4 ug	10-13
	b 组: 每只 0.5×10^5 个细胞,	CRX-527; 20 ug	10-13
	c 组: 每只 0.5×10^5 个细胞,	CRX-527; 100 ug	10-13

[0231] 第0天:sc接种肿瘤细胞

[0232] 第1、4、6、8天:称重动物并检查肿瘤并测量

[0233] 随机化日(大约第10天):将动物随机化并放置于代表适当组的笼子中

[0234] 给药,每两周一次至研究结束:动物以上述量(每只小鼠)腹膜内给药TLR化合物CRX-527,或给予媒介物

[0235] 测量,每三周一次至研究结束:称量动物并测量肿瘤。

[0236] 上述操作被用于在所示的剂量下生成图17中的结果。在几乎所有情况下,当用媒介物(2%甘油)i.p.处理时,在右后肢接种 0.5×10^5 CT-26结肠直肠肿瘤细胞的Balb/c小鼠发展了肿瘤,并按预期进展。与媒介物处理的动物相比,TLR4激动剂CRX-527以剂量依赖性方式抑制肿瘤生长。图17。剂量依赖性也见于该模型的存活能力中。在类似的实验中,TLR4激动剂CRX-601抑制肿瘤生长。见表2和图18。

[0237] 表2

[0238]

平均抑制%	日期/研究天数					
	给药					
	9/16	9/19	9/23	9/26	9/30	10/3
组	14	17	21	24	28	31
媒介物						
CRX-601 4ug	-59.63%	4.57%	-1.55%	21.73%	7.65%	-34.14%
CRX-601 20ug	42.34%	69.46%	50.75%	66.96%	50.75%	-18.27%
CRX-601 100ug	68.20%	92.51%	98.50%	93.21%	94.68%	80.15%

[0239] 实施例10:用抗癌剂和式I的TLR-4靶向分子进行单一疗法和组合治疗

[0240] 材料和方法

[0241] 体内抗肿瘤效力研究

[0242] 在鼠CT-26结肠癌同基因实体肿瘤模型中评估TLR4激动剂(CRX-601)的体内抗肿瘤功效(作为单一疗法和与一定比例的治疗性抗体的组合)(组合数据未显示)。在这些研究中使用七至八周龄的雌性Balb/c小鼠(BALB/cAnNCr1, Charles River)。将鼠CT-26结肠癌细胞(ATCC目录号CRL-2638,批号59227052)在补充有10%胎牛血清(FBS)的RPMI生长培养

基中在具有5%CO₂的潮湿的37℃培养箱中培养。从组织培养瓶中收集以对数生长培养的CT-26细胞,并在4℃以450xg离心5分钟(10分钟)以沉淀细胞。丢弃上清液,细胞在不含钙和镁的冰冷磷酸盐缓冲盐水(PBS)中洗涤,并再次在4℃以450xg离心5分钟(10分钟)以沉淀细胞。将细胞重悬于无FBS的无菌RPMI培养基中,并调整至细胞浓度为500,000个细胞/ml。将100μl细胞原液通过皮下注射植入每只Ba1b/c小鼠的右胁腹。在平均肿瘤大小达到大约100mm³的10或11天之后,根据肿瘤大小将小鼠随机分入研究群组并且给予第一治疗剂量。如所示,通过全身静脉内或直接肿瘤内注射给予TLR4激动剂(CRX-601)或媒介物。按照指示,用于静脉内和肿瘤内给药的CRX-601媒介物为0.5%。对于CRX-601脂质体肿瘤内给药,使用由GSK批号1783-157-B制备的DOPC/CHOL脂质体。治疗性抗体通过腹膜内注射给药,每周给药两次,总共六次剂量。每周进行三次卡尺测量以评估肿瘤生长,并且具有<2,000mm³肿瘤的小鼠留在研究中,时间为30天至长达约115天。研究中移除了连续2次测量肿瘤>2000mm³的小鼠或具有形成了开放性溃疡的肿瘤的小鼠。使用公式(0.52)×(长度)×(宽度²)计算肿瘤体积。在研究3中,在原始接种部位的相反胁腹,如上所述用CT-26肿瘤细胞对无肿瘤小鼠再次激发,如上所述监测肿瘤生长。所有研究均按照GSK关于实验动物护理、福利和处理的政策(GSK Policy on the Care, Welfare and Treatment of Laboratory Animals)进行,并由GSK的研究动物护理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee)审查。

[0243] 免疫表型和细胞因子分析

[0244] 在第一次CRX-601给药后第0天、第1天和第8天从CT-26小鼠收集肿瘤、血液和组织。用表面或细胞内染色抗体对小鼠白细胞和解离的肿瘤单细胞进行新鲜染色以用于免疫表型的多色流式细胞术分析。使用来自同一研究的小鼠血浆样品进行多重细胞因子分析。

[0245] 统计分析

[0246] 对于研究1和2,为了确定肿瘤生长抑制的显著性,在第一次给药后的第11天(研究1)或15天(研究2)比较不同治疗组之间的肿瘤体积。在分析之前,由于不同治疗组中的方差不等,对肿瘤体积进行自然对数转换。然后对数转换数据进行ANOVA,然后进行成对比较。使用SAS 9.3和R 3.0.2分析软件。进行Kaplan-Meier (KM)方法来估计在给定时间不同治疗组的存活概率。存活分析事件为肿瘤体积为2000mm³或肿瘤溃疡形成,以先达到者为准。通过拟合对数肿瘤体积和两次观察日之间的线性线来估计截止体积的确切时间,所述两次观察为超过截止体积第一次观察和马上到达截止体积之前的一次观察。计算到端点的中值时间及其相应的95%置信区间。然后通过秩检验测试任何两组之间的KM存活曲线是否具有统计学差异。通过存活分析进行的发生事件的天数的比较以及处理组之间在指定日期的对数转换的肿瘤体积的比较中确定了原始p值以及错误发现率(FDR)调整后的p值。具有FDR调整的p值≤0.05的那些被宣布为具有统计显著性。

[0247] 对于研究3,为了确定肿瘤生长抑制的显著性,比较了不同治疗组之间第一次给药后12天的肿瘤体积。通过标准ANOVA方法然后是FDR调整(针对多重性)对治疗进行比较。出于同方差性(等方差)原因,响应是体积的平方根。进行Kaplan-Meier (KM)方法来估计在给定时间不同治疗组的存活概率。对于这些存活分析,“死亡”意味着越过肿瘤体积截止值(2000mm³)。“存活”意味着没有“死亡”的小鼠的比例,“存活时间”意味着直到“死亡”的天数。如果小鼠在两个测量日之间越过了体积截止值,则通过线性插值估计“死亡”日。如果小

鼠不止一次越过体积截止值,则使用第一次越过。通过两种治疗的标准对数秩检验对治疗进行比较。对数秩p值使用FDR(错误发现率)方法针对多重性进行调整。显著性定义为 $FDR < 0.05$ 。所有计算和图形均使用R软件3.2.3版进行。

[0248] 结果

[0249] 进行研究1-3以评估用CRX-601和治疗性抗体治疗(两者单独治疗或彼此组合)的小鼠中的肿瘤大小和存活时间。

[0250] 研究1

[0251] 如“材料和方法”中所述,为了确定肿瘤内给药的CRX-601单一疗法活性,当肿瘤大小达到大约 100mm^3 时,用 5×10^4 CT-26细胞接种小鼠并随机分成下面列出的10组。

[0252] 第1组:媒介物肿瘤内给药,每周两次,共6次剂量

[0253] 第2组:CRX-601 0.1ug/小鼠肿瘤内给药,每周两次,共6次剂量

[0254] 第3组:CRX-601 1ug/小鼠肿瘤内给药,每周两次,共6次剂量

[0255] 第4组:CRX-601 10ug/小鼠肿瘤内给药,每周两次,共6次剂量

[0256] 第5组:CRX-601 50ug/小鼠,单剂量

[0257] 肿瘤内给药时,在CT-26同基因小鼠肿瘤模型中观察到TLR4激动剂CRX-601的剂量依赖性抗肿瘤活性(通过随时间推移的肿瘤生长抑制测量)。与媒介物相比,给药 $10\mu\text{g}$ 和 $50\mu\text{g}$ 的小鼠在初始剂量11天后显示出统计学显著(*p值 ≤ 0.05)的肿瘤生长抑制。结果如图19所示。

[0258] 在这项研究中用TLR4激动剂CRX-601治疗的小鼠也显示存活时间的统计学显著增加。当研究结束时,与CT26肿瘤细胞接种后第42天给予媒介物相比,给药 $50\mu\text{g}$ 的小鼠的存活显示出统计学显著性增加(*p值 ≤ 0.05)。在这一天,只有 $50\mu\text{g}$ 和 $10\mu\text{g}$ CRX-601组的小鼠留在研究中。 $50\mu\text{g}$ 组中的四只小鼠中的三只是无肿瘤的,第四只小鼠显示肿瘤体积为 854.19mm^3 。保留在 $10\mu\text{g}$ 组中的单只小鼠是无肿瘤的。(见图20)。

[0259] 研究2

[0260] 如“材料和方法”中所述,为了确定静脉内给药的CRX-601单一疗法活性,当肿瘤大小达到大约 100mm^3 时,用 5×10^4 CT-26细胞接种小鼠并随机分成10个组。

[0261] 第1组:媒介物,每周两次静脉给药,共6次剂量

[0262] 第2组:CRX-601 1ug/小鼠,静脉注射给药,每周两次,共6次剂量

[0263] 第3组:CRX-601 10ug/小鼠,静脉注射给药,每周两次,共6次剂量

[0264] 第4组:CRX-601 100ug/小鼠,单剂量

[0265] 静脉内给药时,在该CT-26同基因小鼠肿瘤模型中观察到TLR4激动剂CRX-601的剂量依赖性抗肿瘤活性(通过随时间推移的肿瘤生长抑制测量)。与媒介物相比,给药 $10\mu\text{g}$ 和 $50\mu\text{g}$ 的小鼠在初始剂量15天后显示出统计学显著性(*p值 ≤ 0.05)的肿瘤生长抑制(参见图21)。

[0266] 在该CT-26同基因小鼠肿瘤模型中用TLR4激动剂CRX-601治疗的小鼠的存活与媒介物相比也显示出统计学显著增加。当研究在CT-26肿瘤细胞接种后的第32天结束时,与媒介物相比,给药 $100\mu\text{g}$ 的小鼠的存活显示统计学显著增加(*p值 ≤ 0.05)。该组剩余的三只小鼠中有一只没有肿瘤,而其他小鼠显示肿瘤体积为 1500.49 和 962.61mm^3 。保留在 $10\mu\text{g}$ 剂量组中的单个小鼠具有 188.0mm^3 的肿瘤体积。(见图22)

[0267] 研究3

[0268] 作为比较单独的CRX-601活性和与治疗性抗体组合(组合数据未显示)的组合研究的一部分,使用0.5%甘油/4%右旋糖媒介物静脉内(IV)或使用DOPC/CHOL脂质体制剂肿瘤内(IT)给药CRX-601,并且如“材料和方法”中所述,当肿瘤大小达到大约100mm³时,用5x10⁴个CT-26细胞接种小鼠并随机分成10个组。第1组和第5组分别为静脉内/腹膜内和肿瘤内/腹膜内的对照组。第2组和第7组给予CRX-601。第3、4、6和8组给予CRX-601和治疗性抗体的组合(组合数据未显示)。

[0269] 第1组:媒介物(0.5%甘油/4%右旋糖)每周一次静脉内给药,共3次剂量+大鼠IgG1 25μg/小鼠,每周两次腹膜内给药,共6次剂量

[0270] 第2组:CRX-601 25ug/小鼠(在0.5%甘油/4%右旋糖中),每周一次静脉内给药,共3次剂量+大鼠IgG1 25ug/小鼠,每周两次腹膜内给药,共6次剂量

[0271] 第5组:媒介物(DOPC/CHOL脂质体)每周一次肿瘤内给药,共3次剂量+大鼠IgG1 25μg/小鼠,每周两次腹膜内给药、共6次剂量

[0272] 第7组:CRX-601 25ug/小鼠(在DOPC/CHOL脂质体中)每周给药一次,共3次剂量+大鼠IgG1 25ug/小鼠每周两次腹膜内给药、共6次剂量

[0273] 在初始剂量后12天评估治疗组的抗肿瘤活性(通过随时间推移的肿瘤生长抑制测量)。与相应的对照组相比(分别为第1组和第5组),当静脉给药(第2组,图23)或肿瘤内给药(第7组,脂质体制剂,图24)时,CRX-601剂量为25μg/小鼠的次优单一疗法显示出统计学显著性(*p-值≤0.05)的肿瘤生长抑制。

[0274] 在这种CT-26同基因小鼠模型研究中,在第一次剂量后80天也确定了存活优势。与对照组1相比,作为单一疗法IV给药的CRX-601(组2)在存活率方面显示统计学显著性(*p值≤0.05)的增加(图25)。第2组10只小鼠中的5只显示完全肿瘤消退。与对照组5相比,用DOPC/CHOL脂质体制剂(组7)作为单一疗法肿瘤内给药的CRX-601的存活率显示出统计学显著性(*p值≤0.05)增加(图26)。第80天,将首次用于实验的对照小鼠和完全消退的无肿瘤小鼠用CT26肿瘤细胞再次激发。在首次用于实验的对照小鼠中,CT26肿瘤如预期的那样生长,但在治疗组小鼠中受阻而没有肿瘤生长。这个结果表明由于CRX-601而具有持久的抗肿瘤记忆(图27)。这种肿瘤生长的缺乏表明由CRX-601引起的持续的抗肿瘤记忆。

[0275] 实施例11CRX-601的远位效应

[0276] 远位效应(abscopal effect)被描述为局部肿瘤治疗后远处的肿瘤消退。为了评估远位效应,如在用于单一肿瘤接种的“材料和方法”中所描述的,小鼠在左肋腹接种了5x10⁴个CT-26细胞并且在右肋腹接种了5x10⁴个CT-26细胞。因此,在这项研究中,每只小鼠具有两处肿瘤,一种位于右肋腹,另一种位于左肋腹。当肿瘤大小达到右肋腹约100mm³时并且左肋腹肿瘤大小相似时,将小鼠随机分为10组,如下所示。在设计用于确定单独给药CRX-601的活性和与治疗性抗体组合的活性(组合数据未显示)的远位效应的研究中,在左肋腹肿瘤中仅用DOPC/CHOL脂质体制剂肿瘤内给药(IT)CRX-601。监测右肋腹和左肋腹肋骨肿瘤的肿瘤大小。该研究的结果提供了证据,其支持单独给药CRX-601用于治疗癌症的功效。

[0277] 第1组:媒介物(DOPC/CHOL脂质体)每周一次肿瘤内给药、共3次剂量+大鼠IgG1 25μg/小鼠每周两次腹膜内给药、共6次剂量

[0278] 第2组:CRX-601 25ug/小鼠(在DOPC/CHOL脂质体中)每周一次肿瘤内给药、共3次

剂量+大鼠 IgG1 25ug/小鼠每周两次腹膜内给药、共6次剂量

[0279] 评估治疗组的抗肿瘤活性(如通过随时间推移的肿瘤生长抑制测量)。如果一处或两处肿瘤都达到 $2,000\text{mm}^3$,则将小鼠从研究中移除。

[0280] 在第一次剂量后的第60个研究日,留在研究中的所有小鼠完全没有肿瘤,并确定了远位效应和存活优势。观察到CRX-601的远位效应,其中在局部左肋腹肿瘤IT注射导致远端右肋腹肿瘤消退。图28显示,在第2组中,10只小鼠接受脂质体CRX-601肿瘤内注射,10只小鼠中的2只(小鼠#4和小鼠#6)在治疗的肿瘤部位(深灰色线)显示完全肿瘤消退。在另一侧(浅灰色线)未处理的远处肿瘤上,小鼠#4和小鼠#6也都具有完全的肿瘤消退,这表明IT注射CRX-601导致远位效应(图28)。与对照组(空白脂质体+大鼠IgG1IT,第2组, $p=0.011$,图中未显示)相比,CRX-601(脂质体)IT注射导致显著的存活益处。

[0281] 实施例12 EMT6同基因肿瘤模型

[0282] 在小鼠EMT6乳腺上皮同基因实体瘤模型中评估TLR4激动剂(CRX-601)的体内抗肿瘤效力,作为单一疗法并相比于对照和抗PD-1治疗。在这些研究中使用七至八周龄的雌性Balb/c小鼠(BALB/cAnNHsd,Envigo)。将鼠EMT6乳腺上皮细胞(ATCC目录号批号CRL-2755)在补充有10%胎牛血清(FBS)的RPMI生长培养基中在具有5%CO₂的潮湿的37℃培养箱中培养。从组织培养瓶收集以对数生长培养的EMT6细胞,并在4℃以450xg离心5分钟10分钟以沉淀细胞。丢弃上清液,细胞在不含钙和镁的冰冷磷酸盐缓冲盐水(PBS)中洗涤,并再次在4℃以450xg离心5分钟(10分钟)以沉淀细胞。将细胞重悬于无FBS的无菌RPMI培养基中,并调整至细胞浓度为 1×10^6 个细胞/ml。将100μl细胞原液通过皮下注射植入每只Balb/c小鼠的右肋腹。7或9天之后,平均肿瘤大小达到大约 100mm^3 ,此时根据肿瘤大小将小鼠随机分入研究群组并且给予第一治疗剂量。TLR4激动剂(CRX-601)或媒介物通过全身静脉内给药,每周一次,共三次剂量。CRX-601媒介物是0.5%甘油/4%右旋糖,eE 810115-V。通过给予腹膜内注射每隔一天给药大鼠抗小鼠PD-1受体抗体(克隆RMP1-14,BioXCell目录号BE0146,批号5792-599016J1)或大鼠IgG2a同种型对照抗体(BioXCell目录号BE0089,批号601416M1B),共三次剂量,所给予的第一个剂量与第一个CRX-601剂量是同时的。每周进行三次卡尺测量以评估肿瘤生长,并且从研究中移除了连续2次测量肿瘤 $>2000\text{mm}^3$ 的小鼠或具有形成了开放性溃疡的肿瘤的小鼠。使用公式 $(0.52) \times (\text{长度}) \times (\text{宽度}^2)$ 计算肿瘤体积。所有研究均按照GSK关于实验动物护理、福利和处理的政策进行,并由GSK的研究动物护理和使用委员会审查。为了确定肿瘤生长抑制的显著性,比较了不同治疗组之间第一次给药后19天的肿瘤体积。通过标准ANOVA方法然后是FDR调整(针对多重性)对治疗进行比较。出于同方差性(等方差)原因,响应是体积的平方根。进行Kaplan-Meier(KM)方法来估计在给定时间不同治疗组的存活概率。对于这些存活分析,“死亡”意味着越过肿瘤体积截止值(2000mm^3)。“存活”意味着没有“死亡”的小鼠的比例,“存活时间”意味着直到“死亡”的天数。如果小鼠在两个测量日之间越过了体积截止值,则通过线性插值估计“死亡”日。如果小鼠不止一次越过体积截止值,则使用第一次越过。通过两种治疗的标准对数秩检验对治疗进行比较。对数秩p值使用FDR(错误发现率)方法针对多重性进行调整。显著性定义为 $\text{FDR} \leq 0.05$ 。所有计算和图形均使用R软件3.2.3版进行。

[0283] 小鼠群组如下:

[0284] 第1组:媒介物+200ug大鼠IgG2a

[0285] 第2组: 25 μ gCRX-601+200 μ g大鼠 IgG2a

[0286] 第3组: 媒介物+200ug抗-PD-1

[0287] 静脉内给药时, 在EMT6同基因小鼠肿瘤模型中观察到TLR4激动剂CRX-601的抗肿瘤活性(通过随时间推移的肿瘤生长抑制测量)。与媒介物组1相比, 给药25 μ gCRX-601的小鼠在初始剂量19天后显示统计学显著的肿瘤生长抑制(**p值<0.001), 并且与抗PD-1对照组3(*p值=0.041)进行比较。结果如图29所示。与媒介物组1相比, 抗PD-1治疗在初始剂量后的19天显示统计学上显著的肿瘤生长抑制(*p值=0.03)。

[0288] 在这项研究中用TLR4激动剂CRX-601治疗的小鼠也显示存活时间的统计学显著增加。在EMT6肿瘤细胞接种后第33天, 与媒介物组1相比, 给药25 μ gCRX-601的小鼠的存活率显示出统计学显著性(*p值=0.03)增加。在这一天, 来自25ug CRX-601组的6只小鼠留在研究中。4只小鼠无肿瘤, 而两只小鼠具有649mm³和382mm³的肿瘤体积。在EMT6肿瘤细胞接种后第33天, 给药200 μ g抗PD-1的小鼠与媒介物组1相比在存活率方面没有显示统计学显著的增加(p值=0.199)。在这一天, 来自抗PD-1组的5只小鼠留在研究中。3只小鼠无肿瘤, 而两只小鼠具有1517mm³和917mm³的肿瘤体积。结果如图30所示。

与单独的任一治疗相比，用丝裂霉素-C+CRX-527-SE 治疗具有

L1210 鼠白血病的 BDF1 小鼠延长了存活

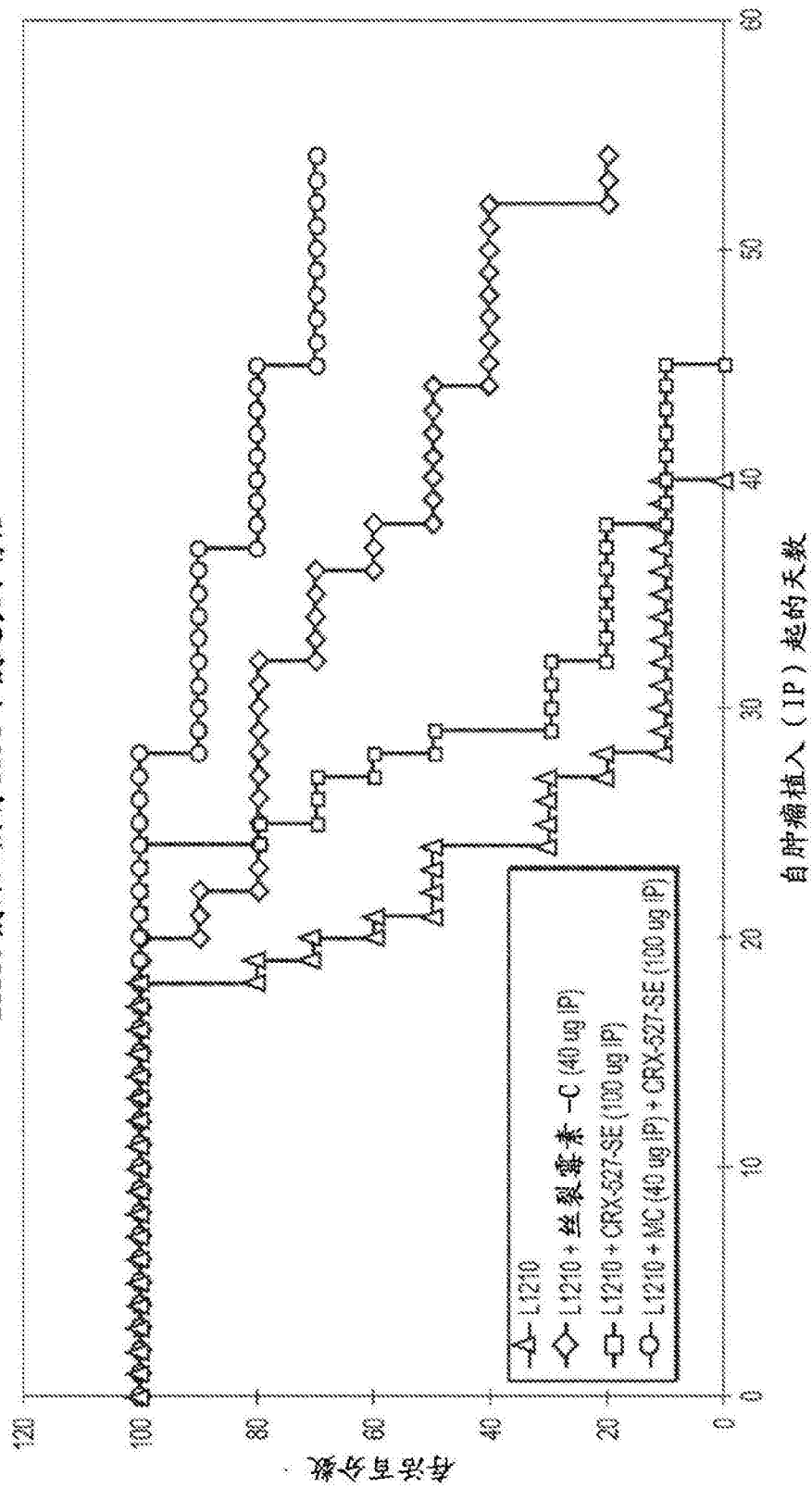


图1

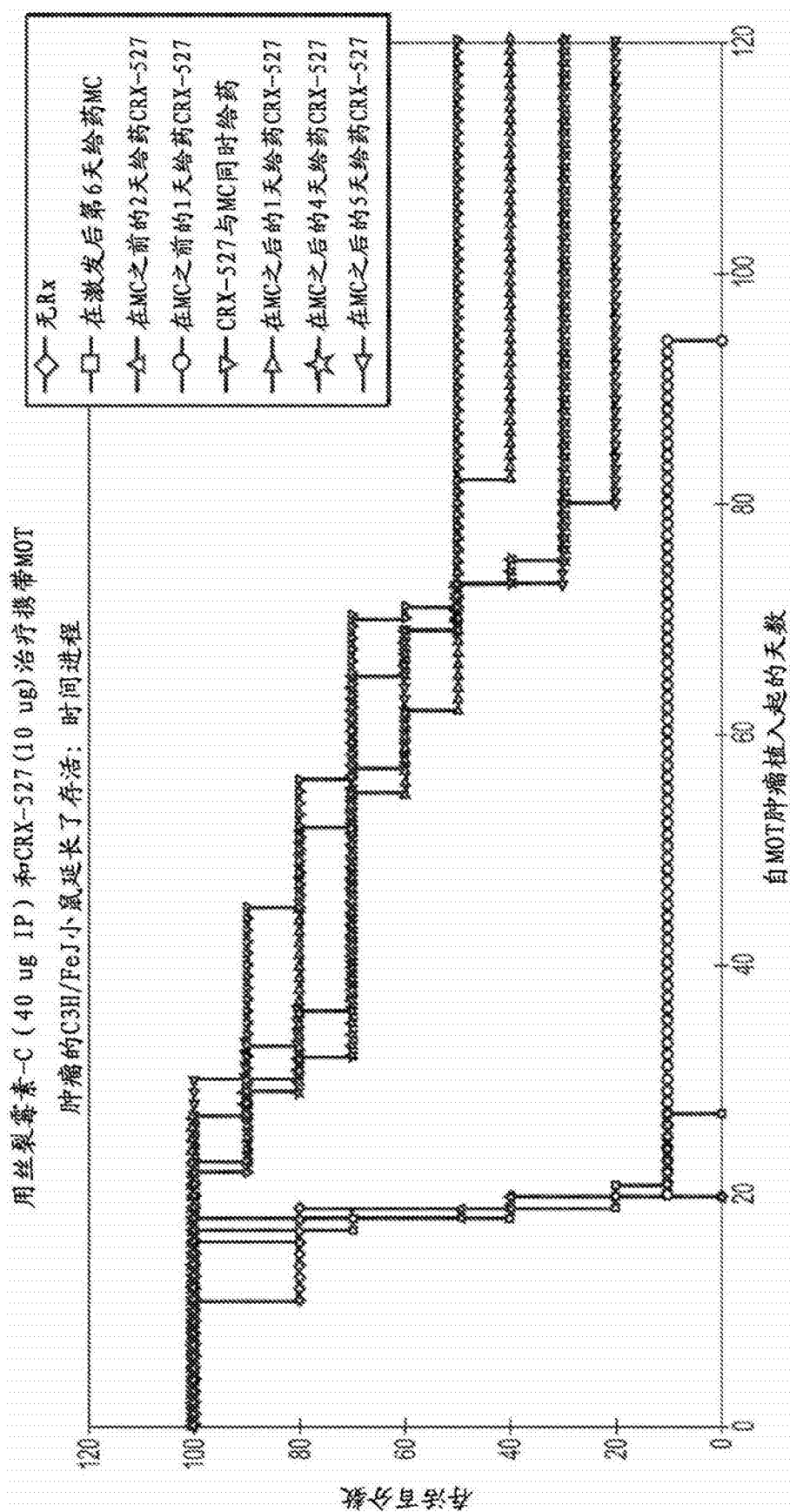


图2

在携带TLR4野生型 (C3H/HeO_uJ) MOT肿瘤的小鼠中

丝裂霉素-C+CRX-527-SE延长了存活

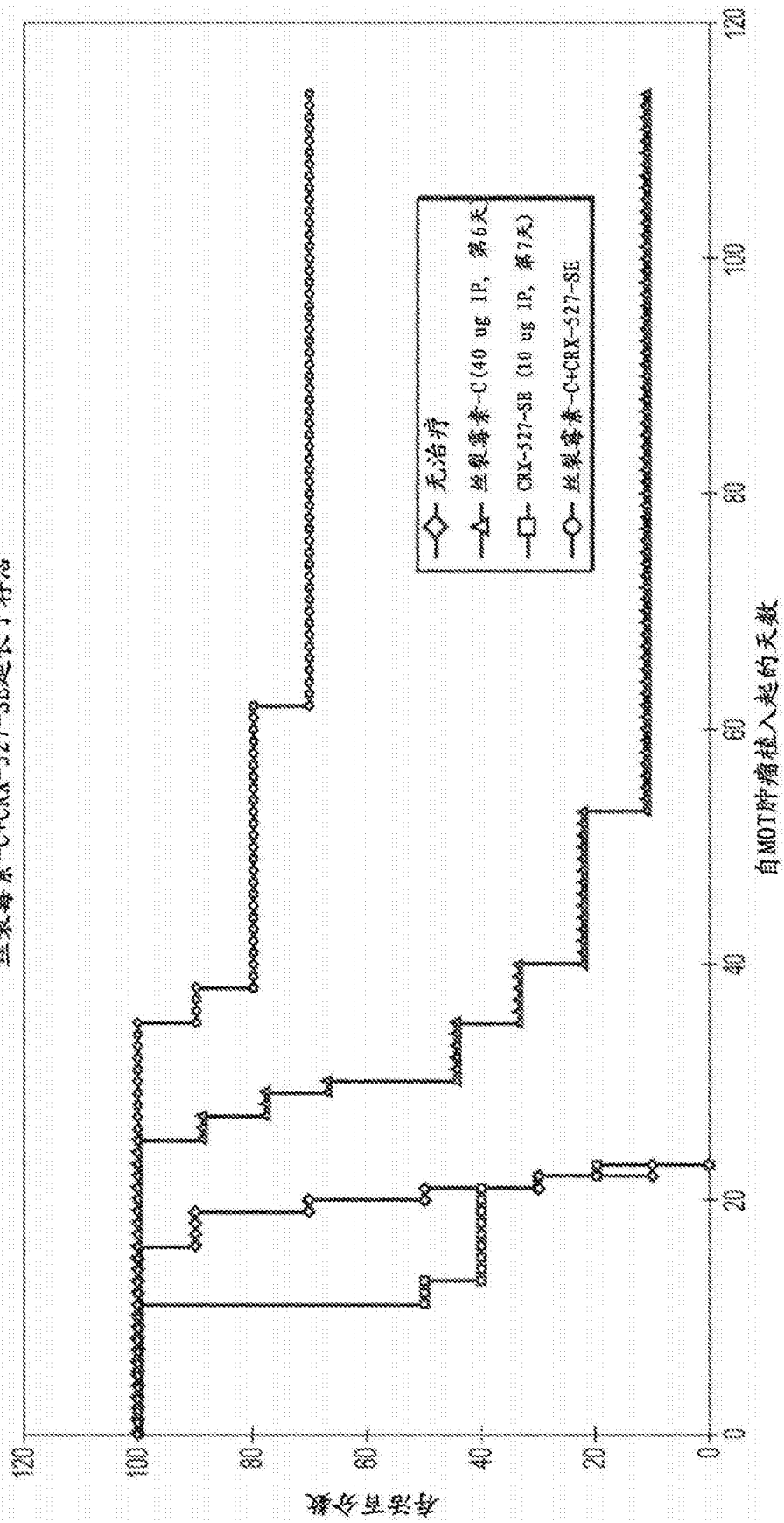


图3

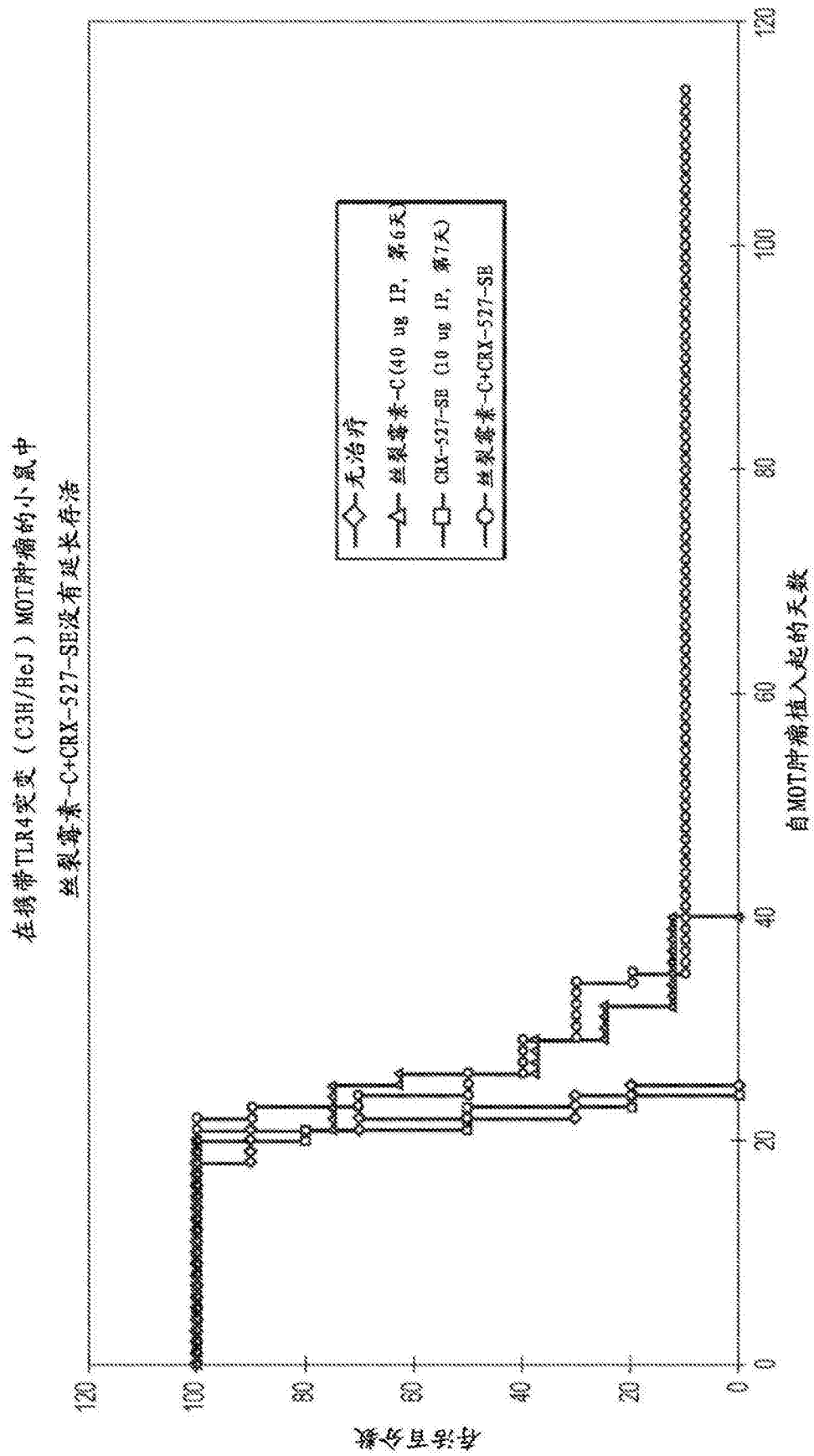


图4

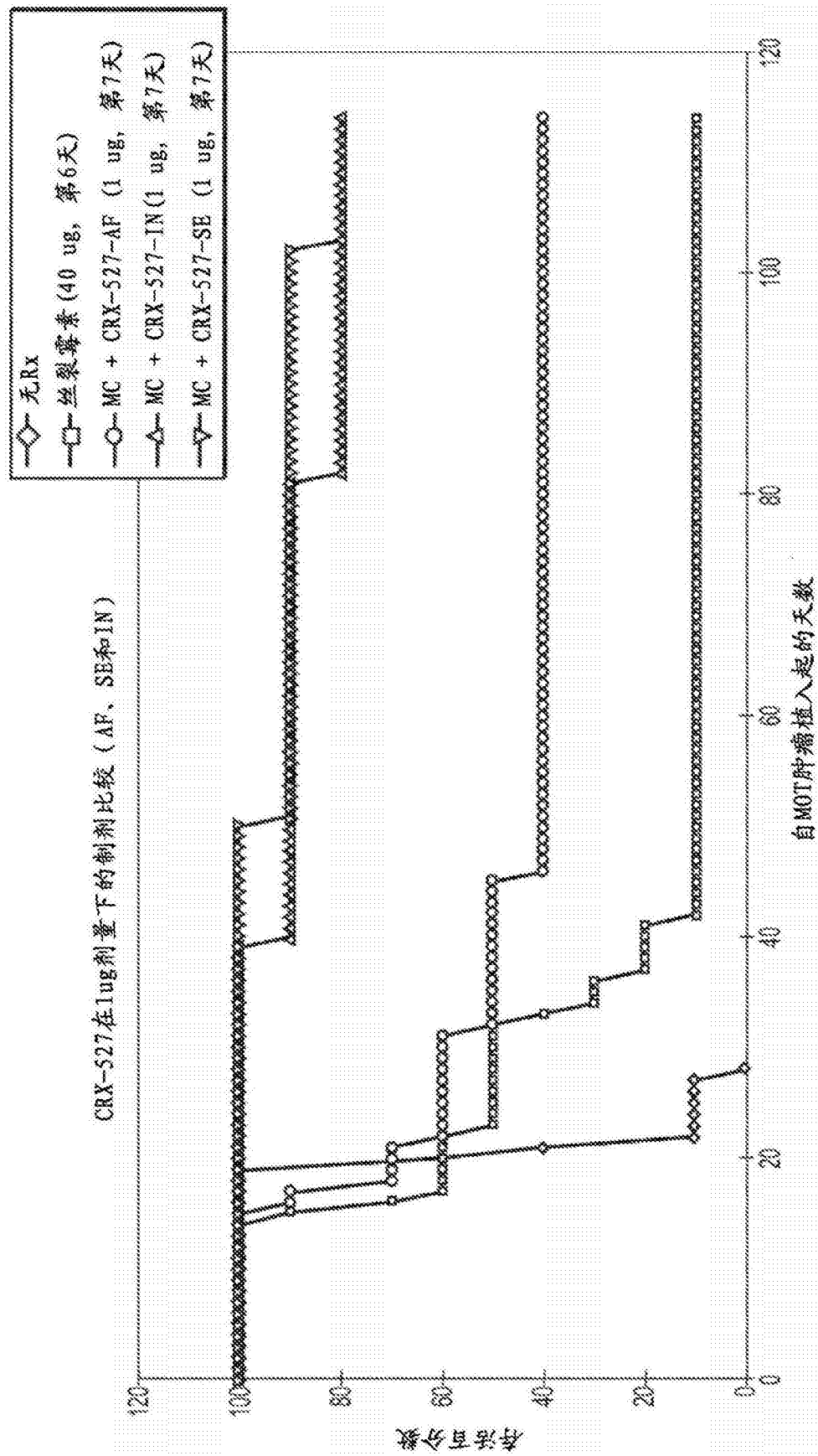


图5

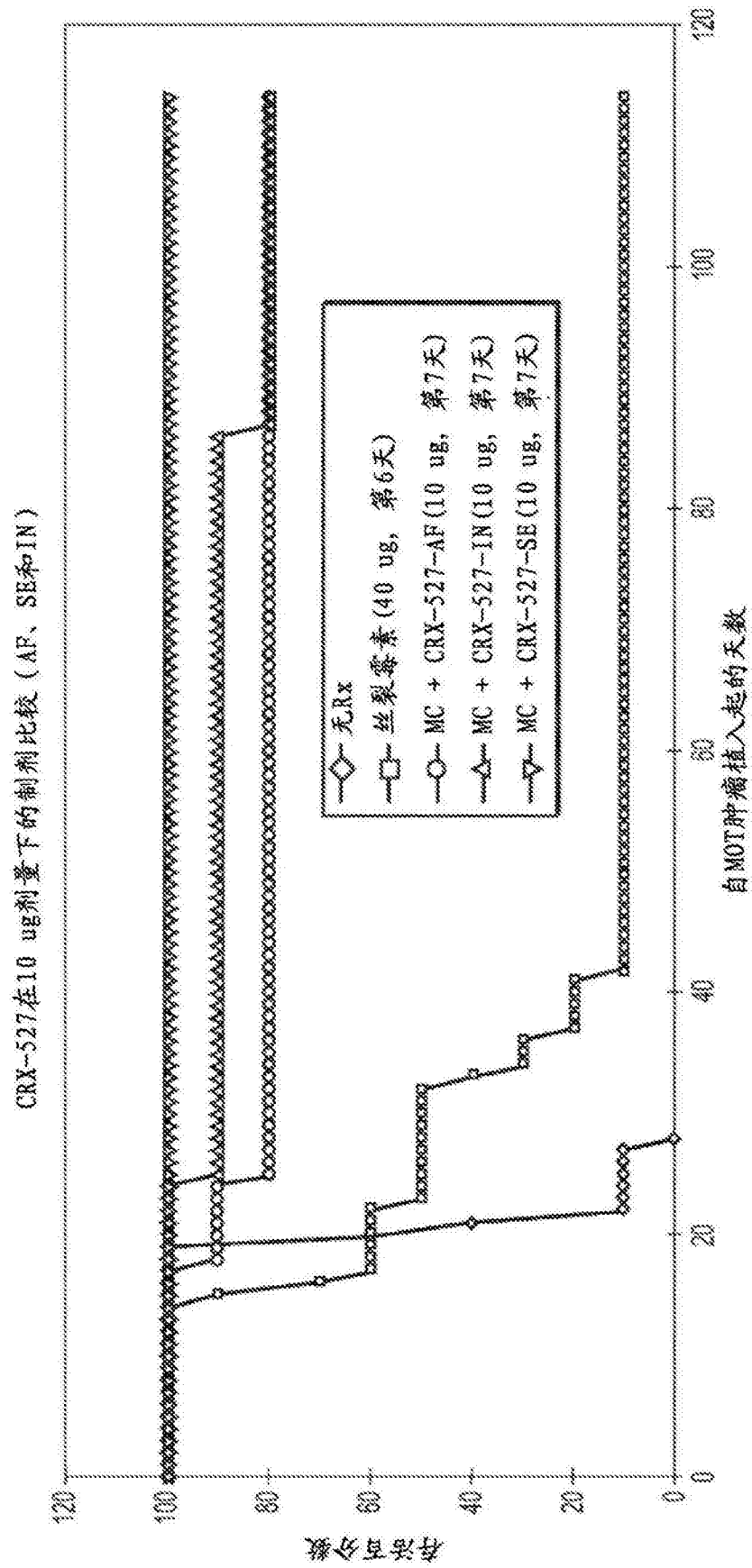


图6

通过用丝裂霉素C和CRX-527的组合单次治疗
治愈的小鼠MOT肿瘤对再次激发是免疫的

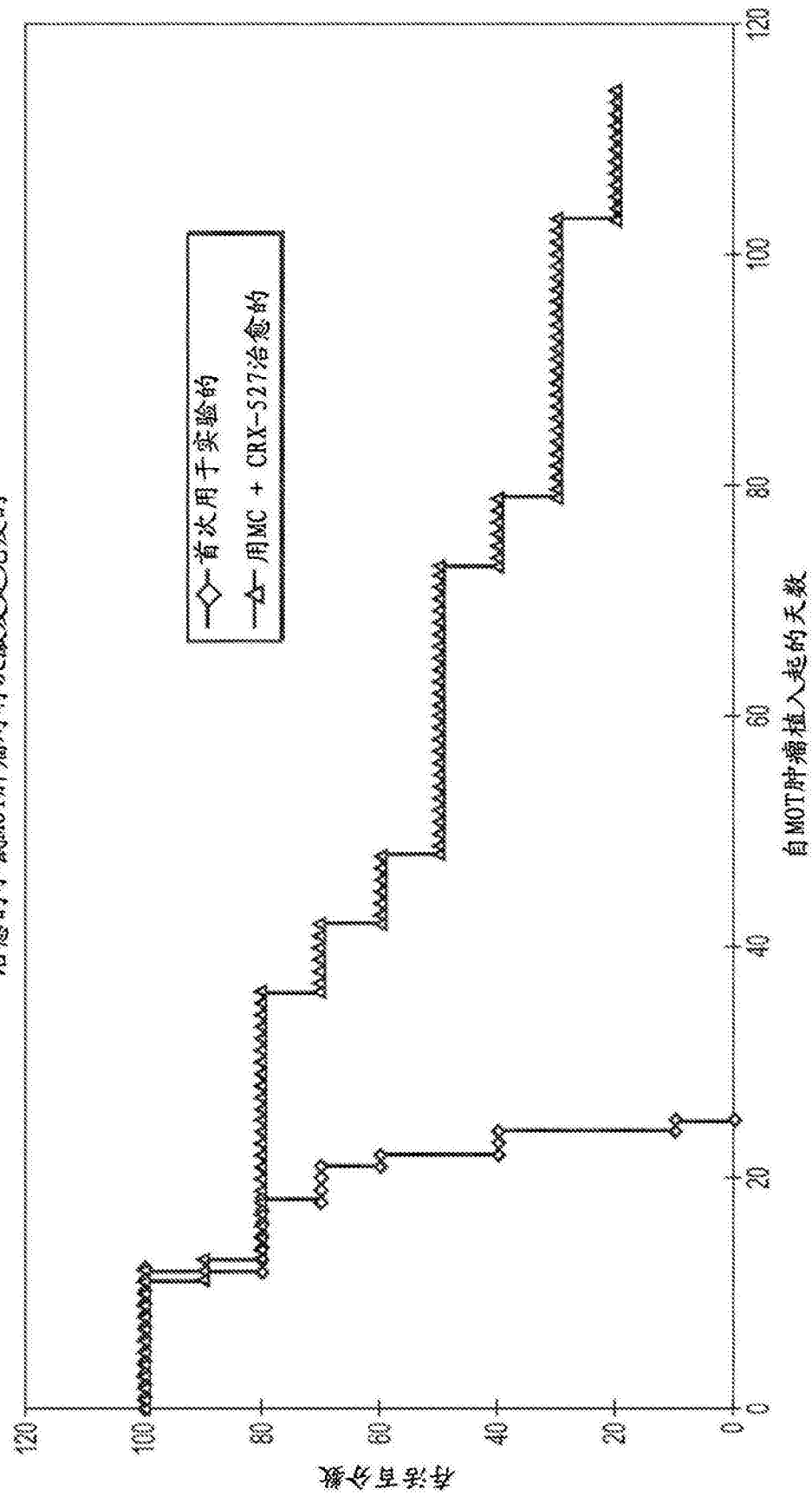


图7

在MOT肿瘤模型中用丝裂霉素C进行单次局部治疗 (IP)

接着用CRX-527全身治疗 (IV) 导致延长的存活

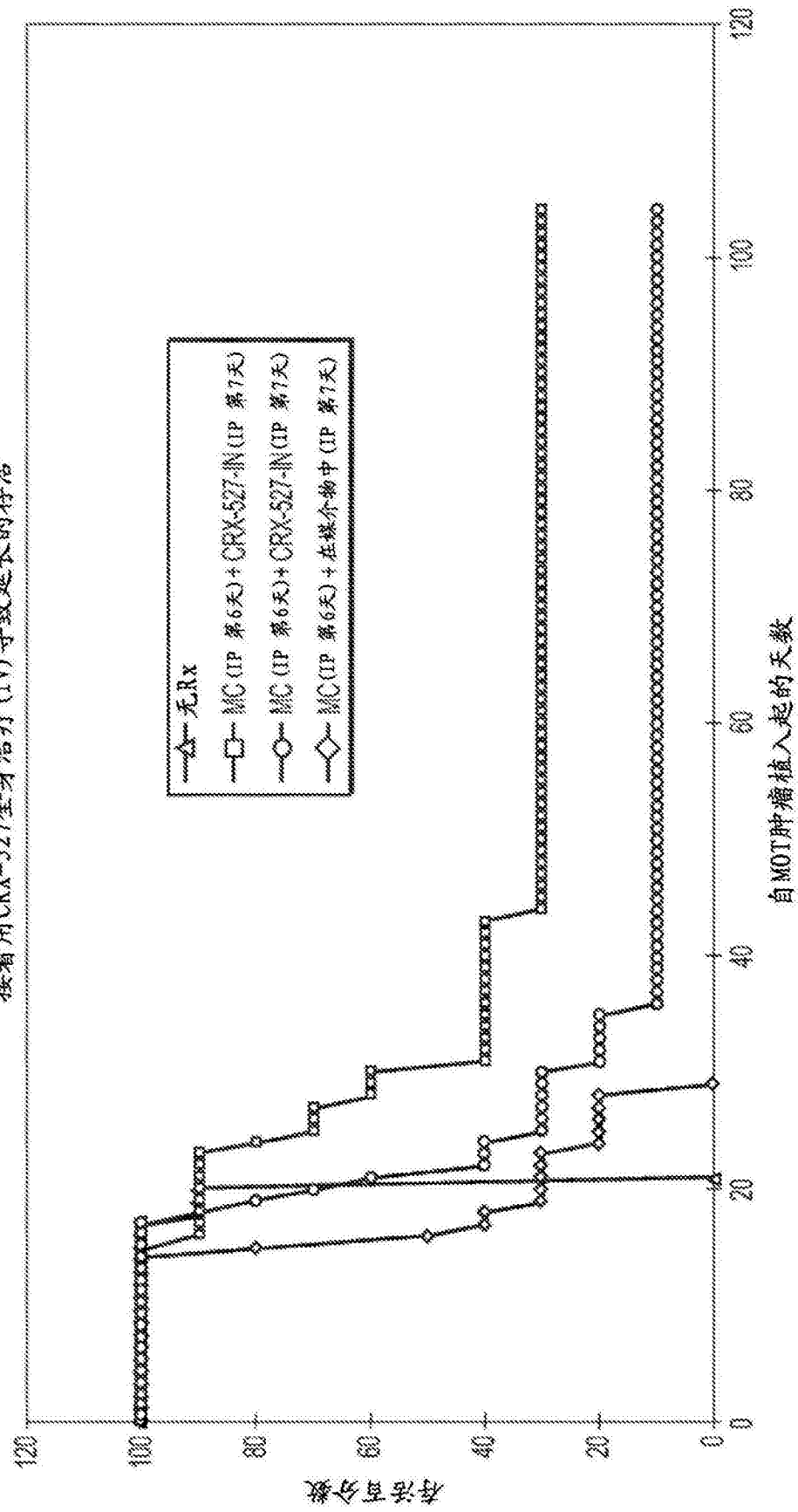


图8

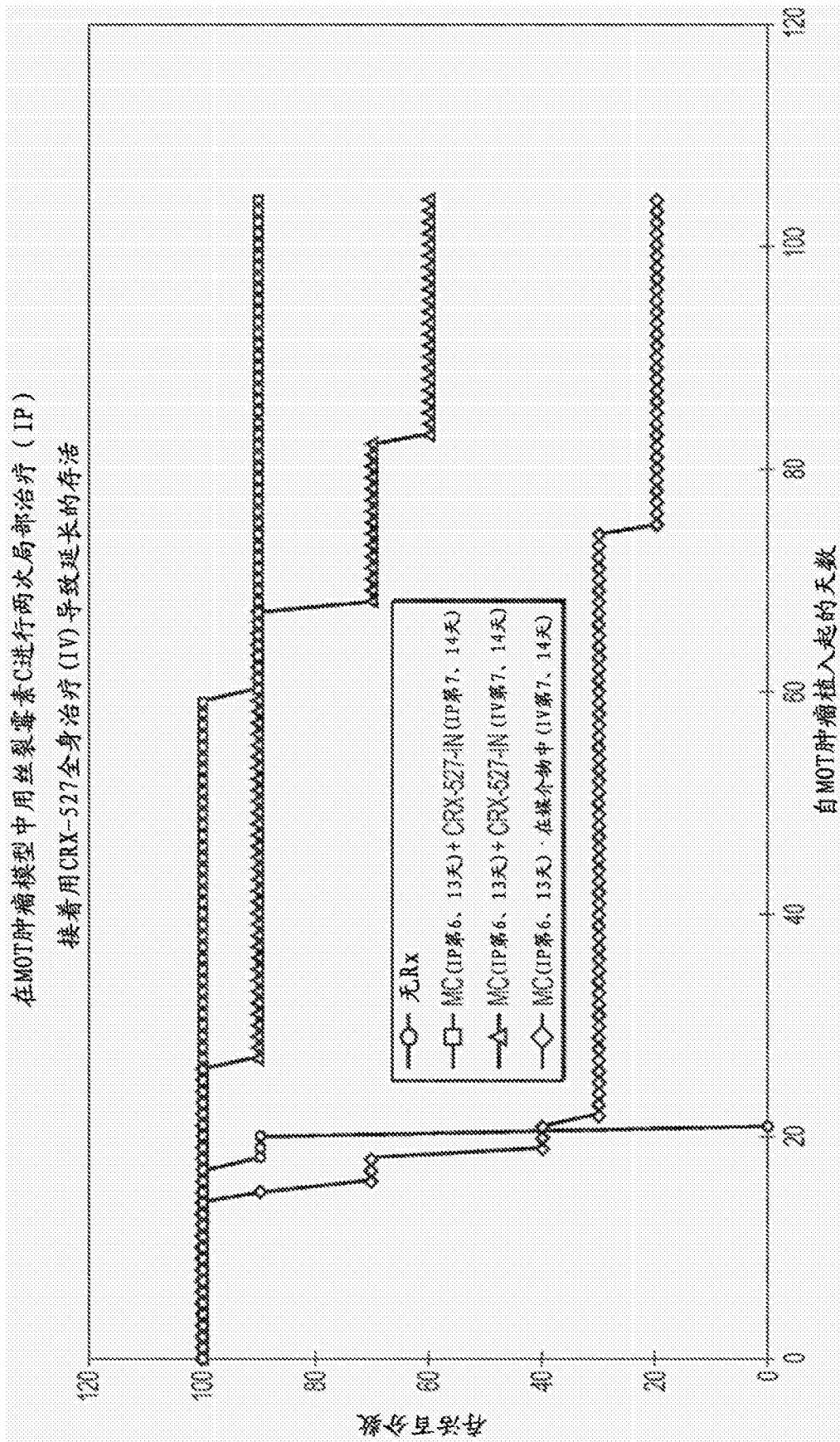


图9

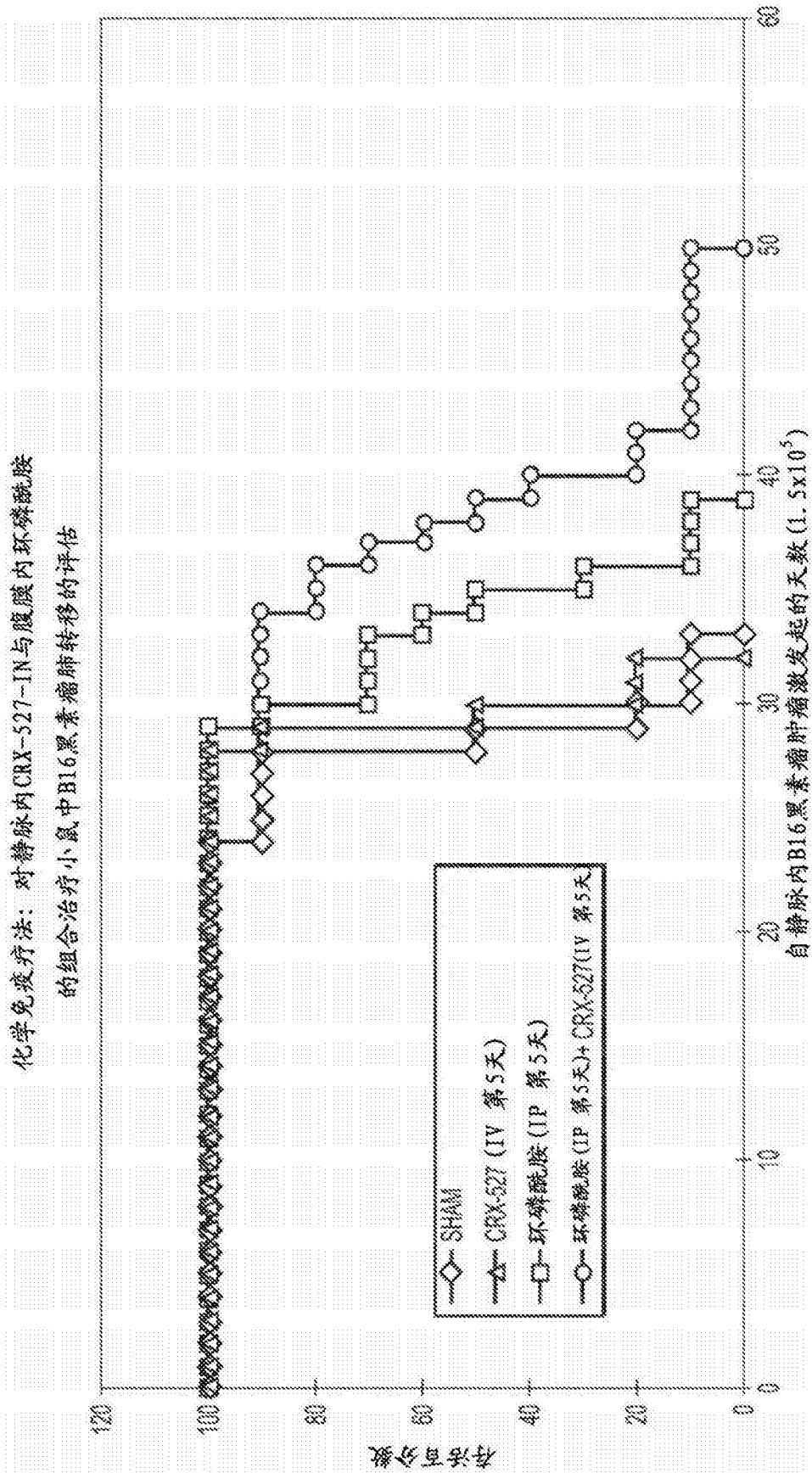


图10

仅媒介物

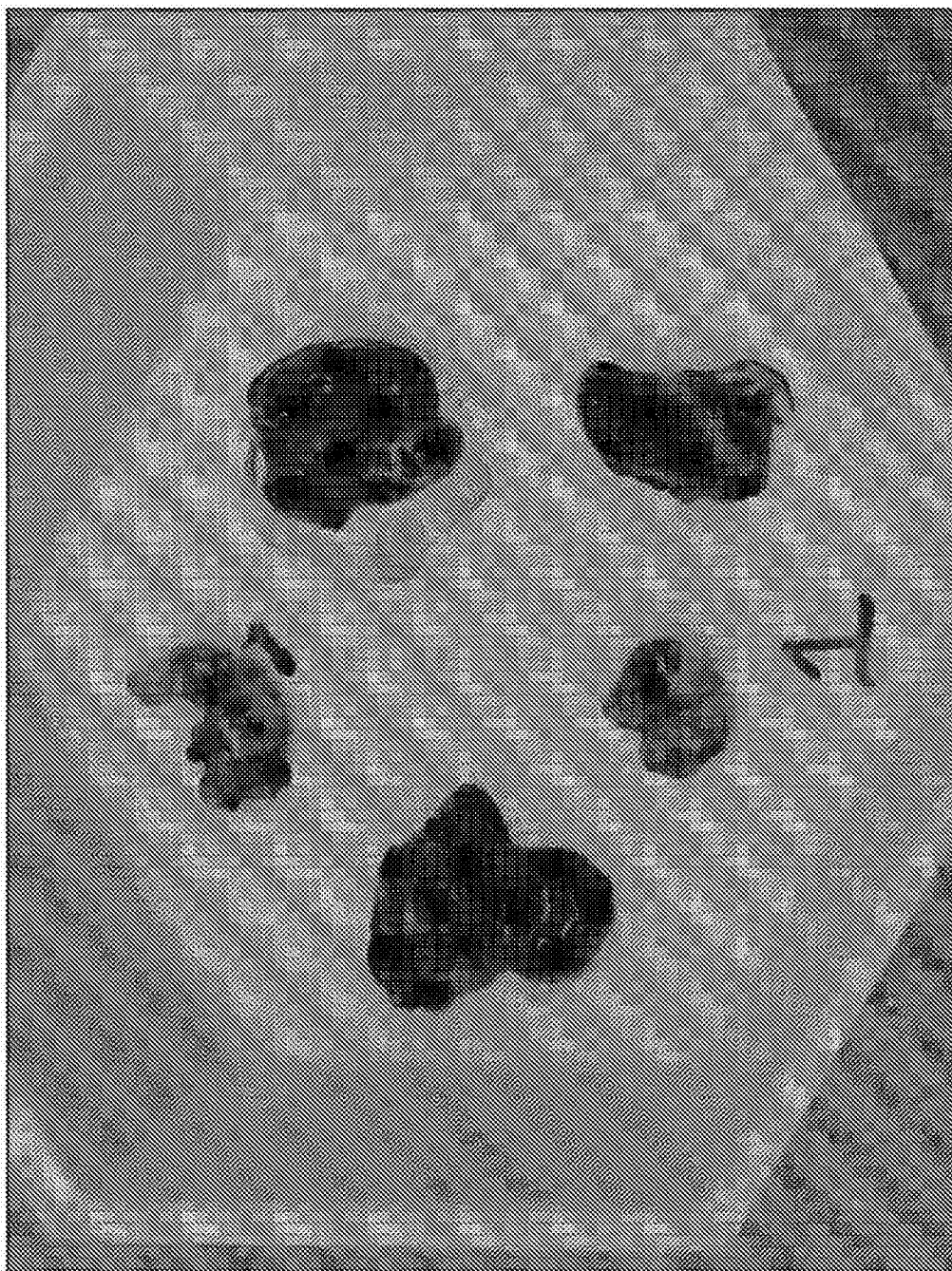


图11

单独的CRX-527

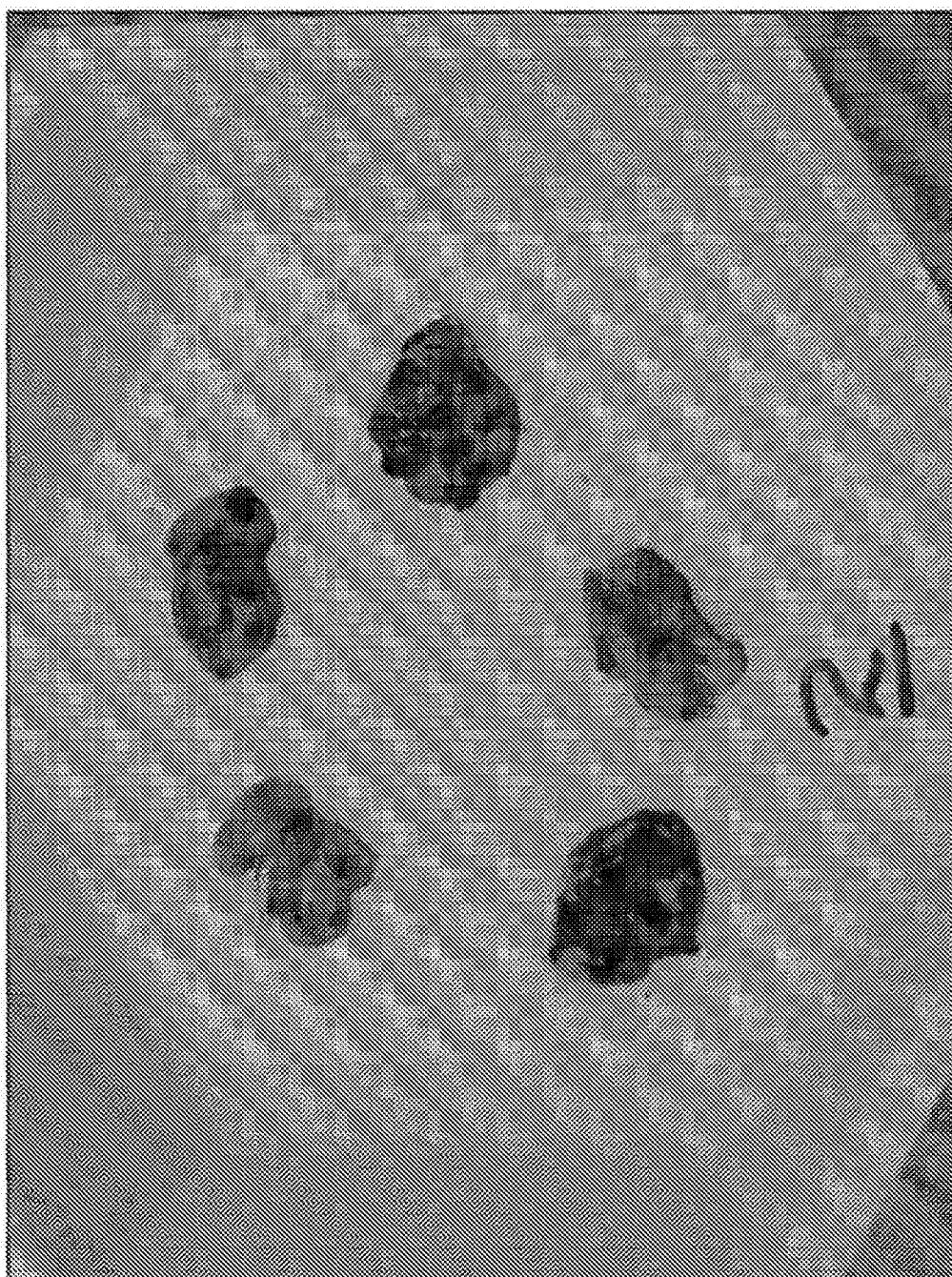


图12

单独的环磷酸胺

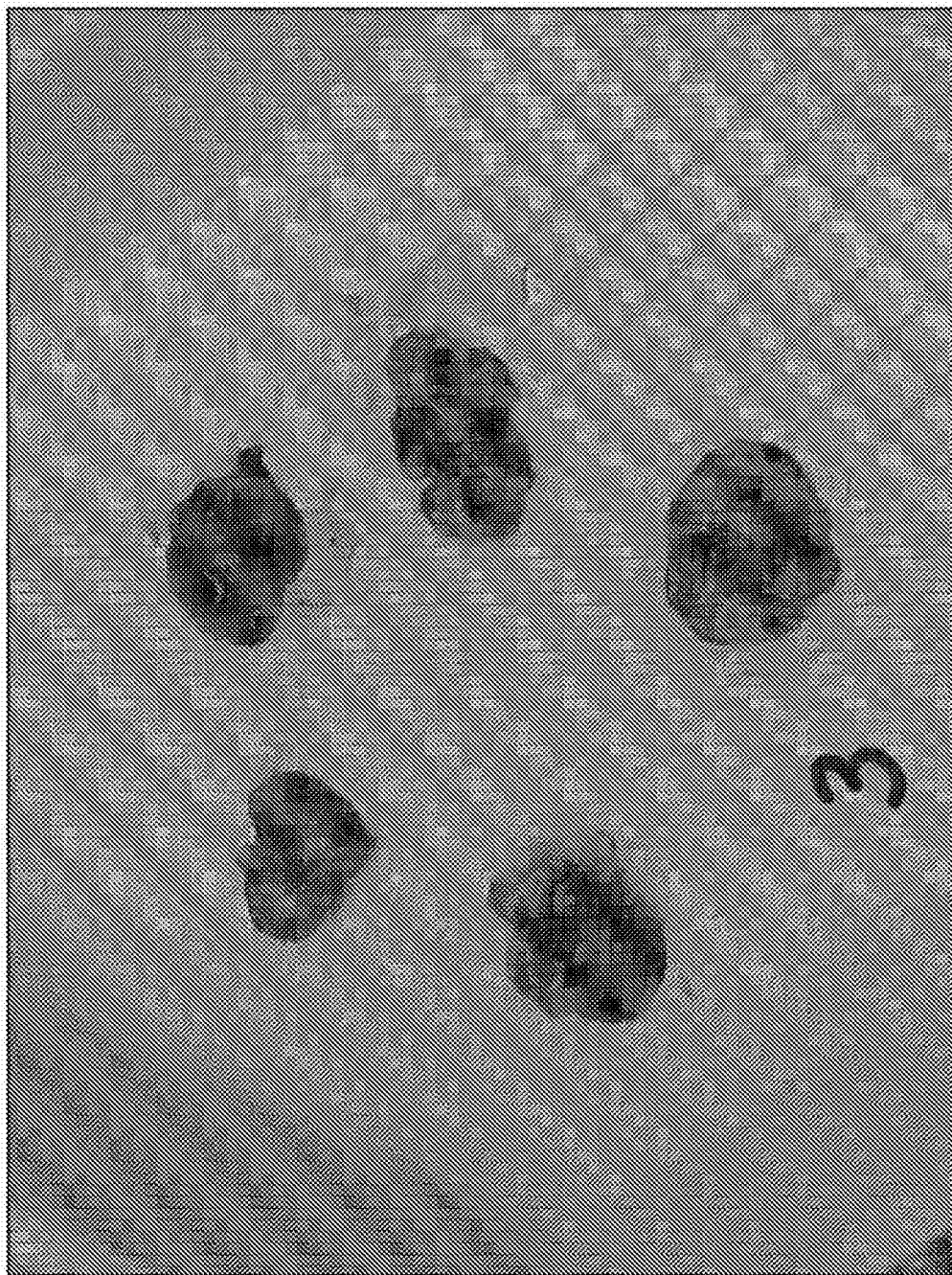


图13

环磷酰胺与CRX-527组合

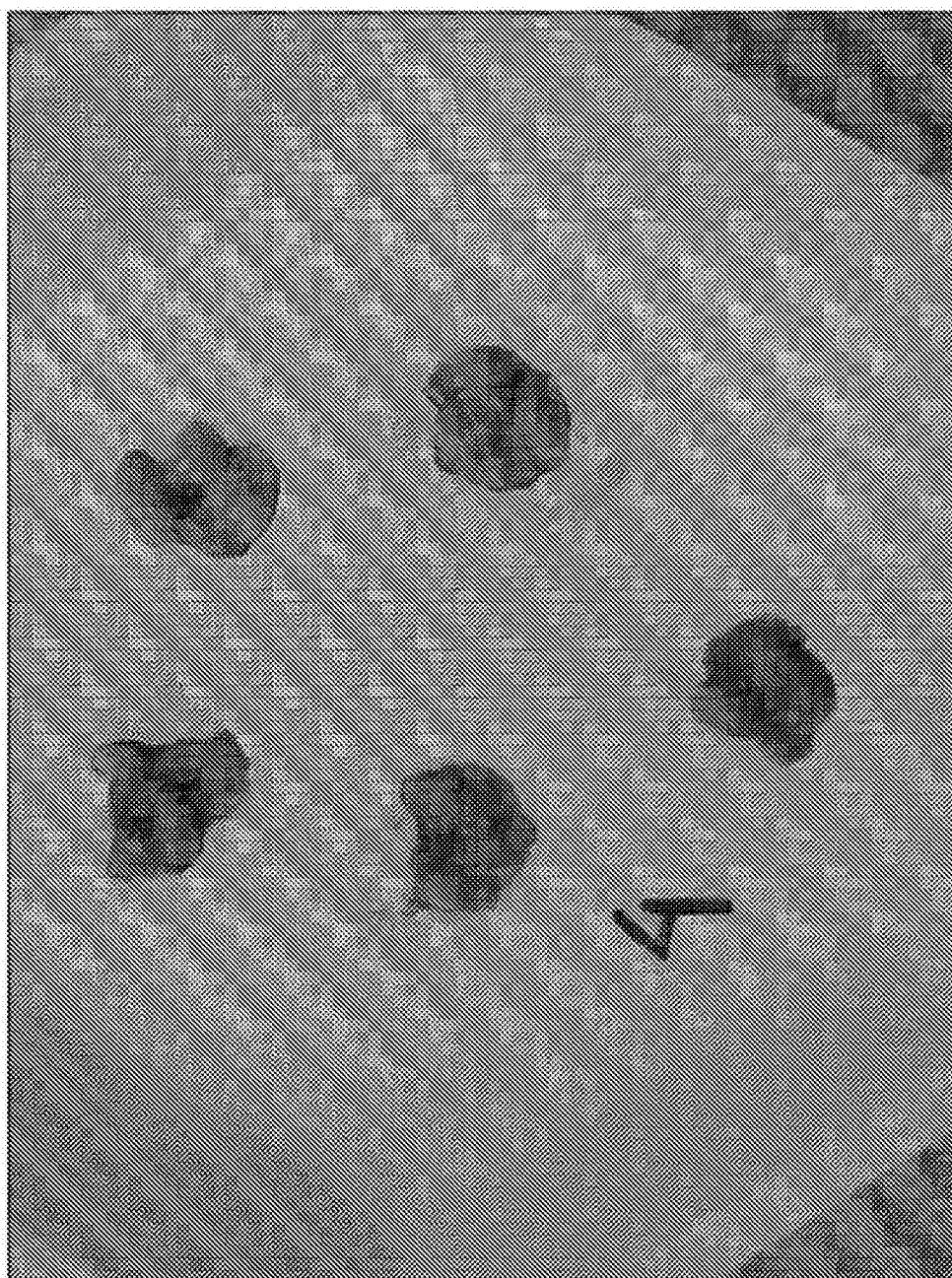


图14

环磷酰胺和CRX-527-SE的组合疗法在激发后的26天显著
降低了荧光素酶转染的B16-F10黑色素瘤在肺中的转移

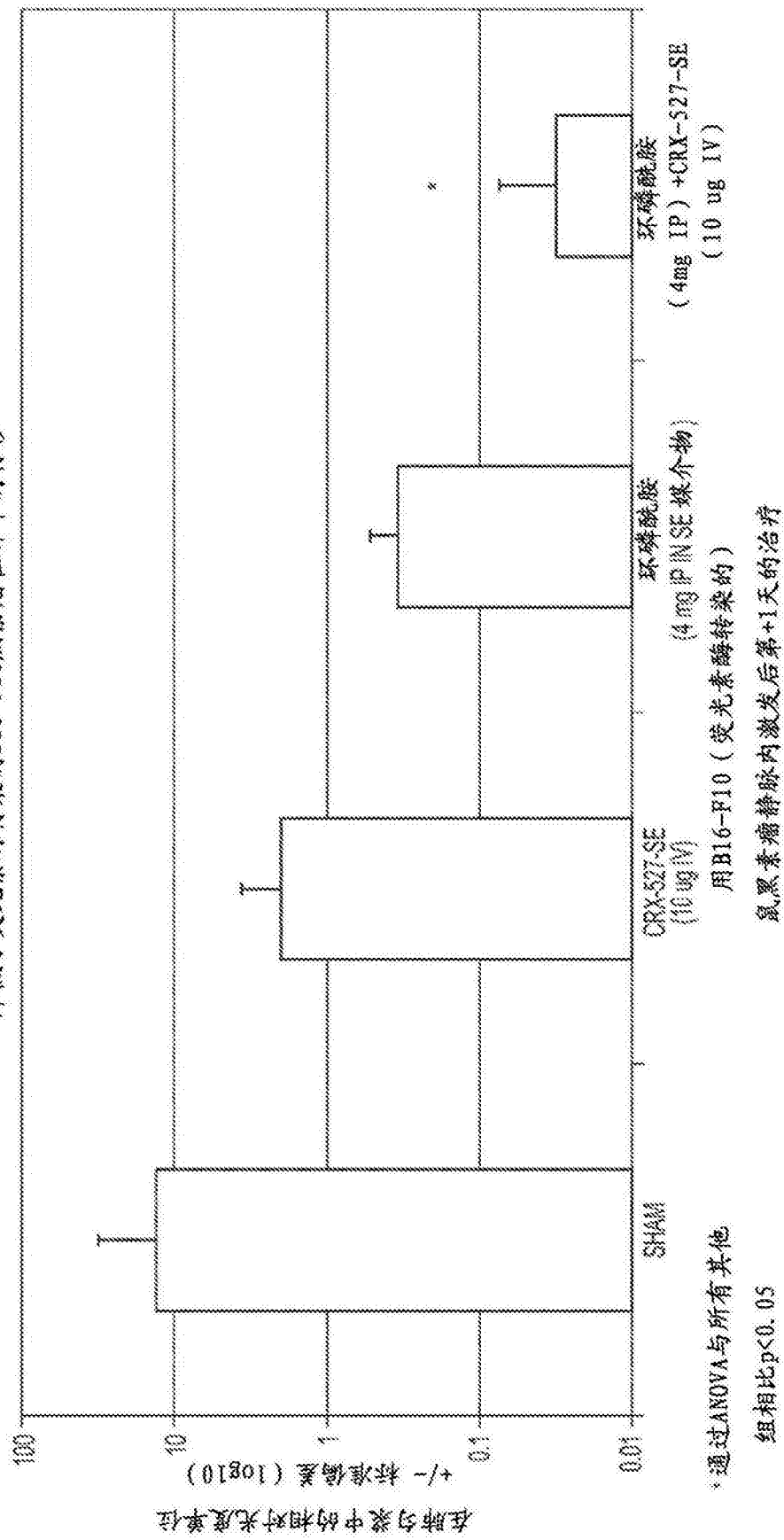


图15

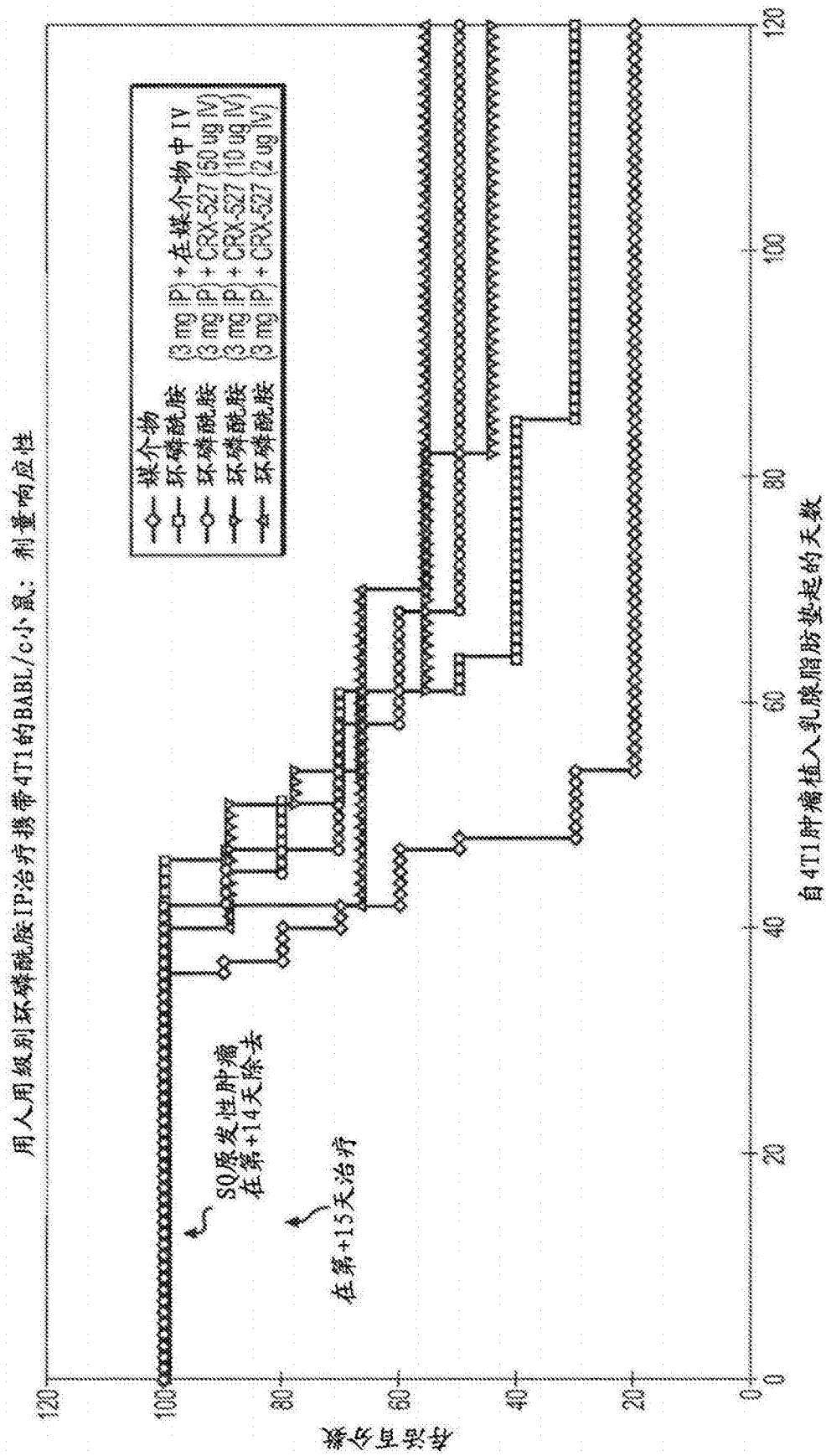


图16

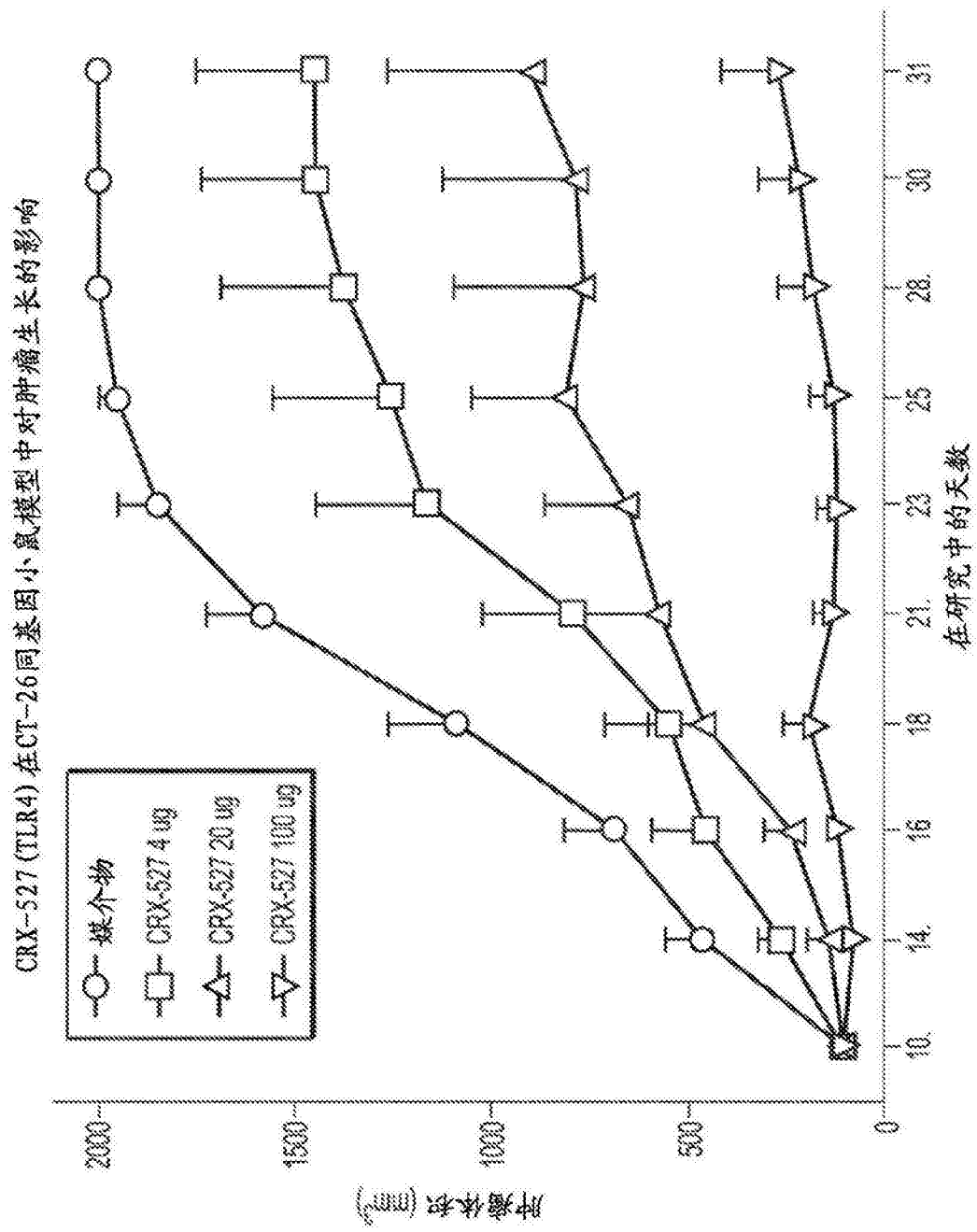


图17

CRX601对BALB/c小鼠中CT-26肿瘤生长的影响

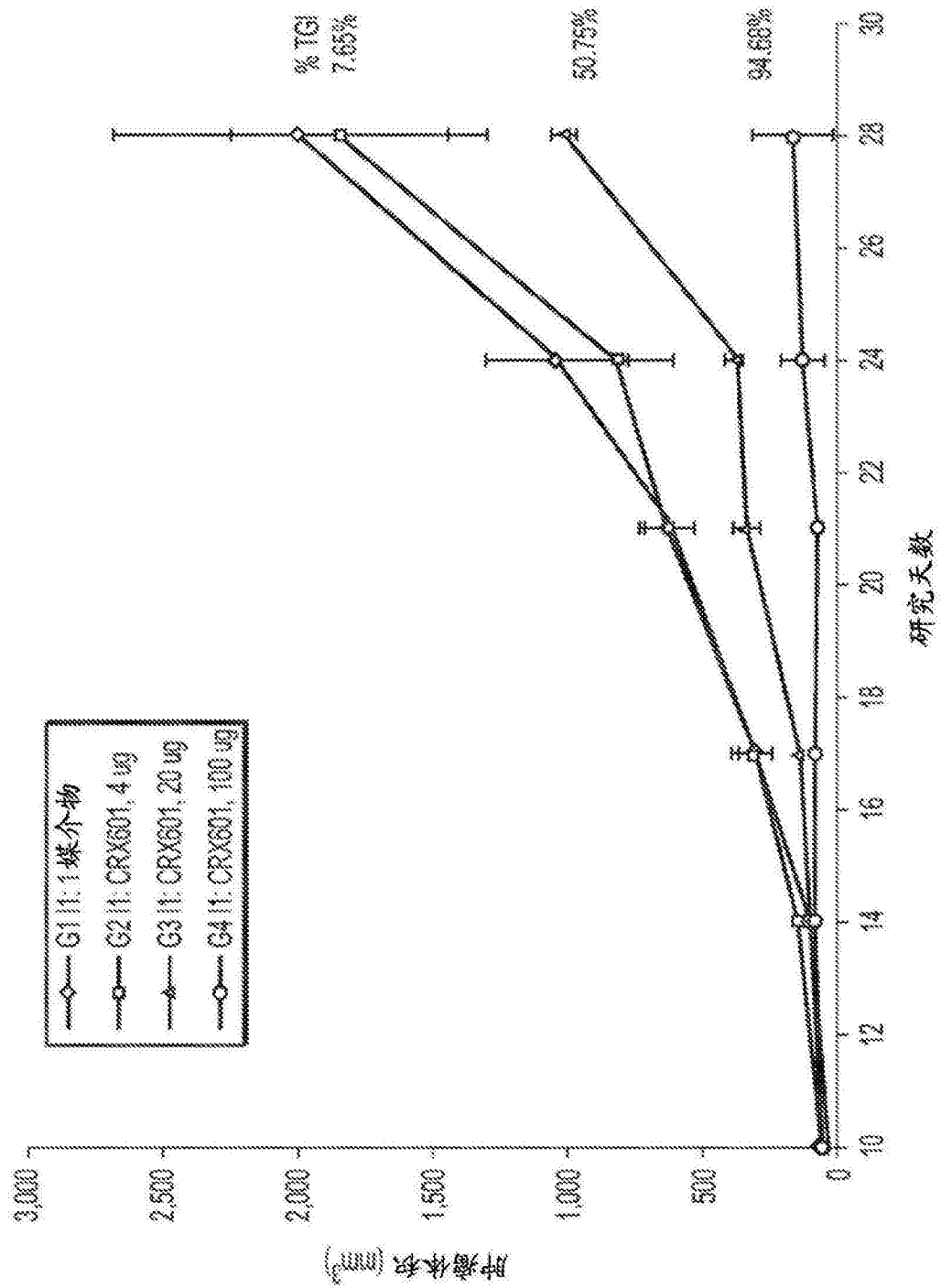


图18

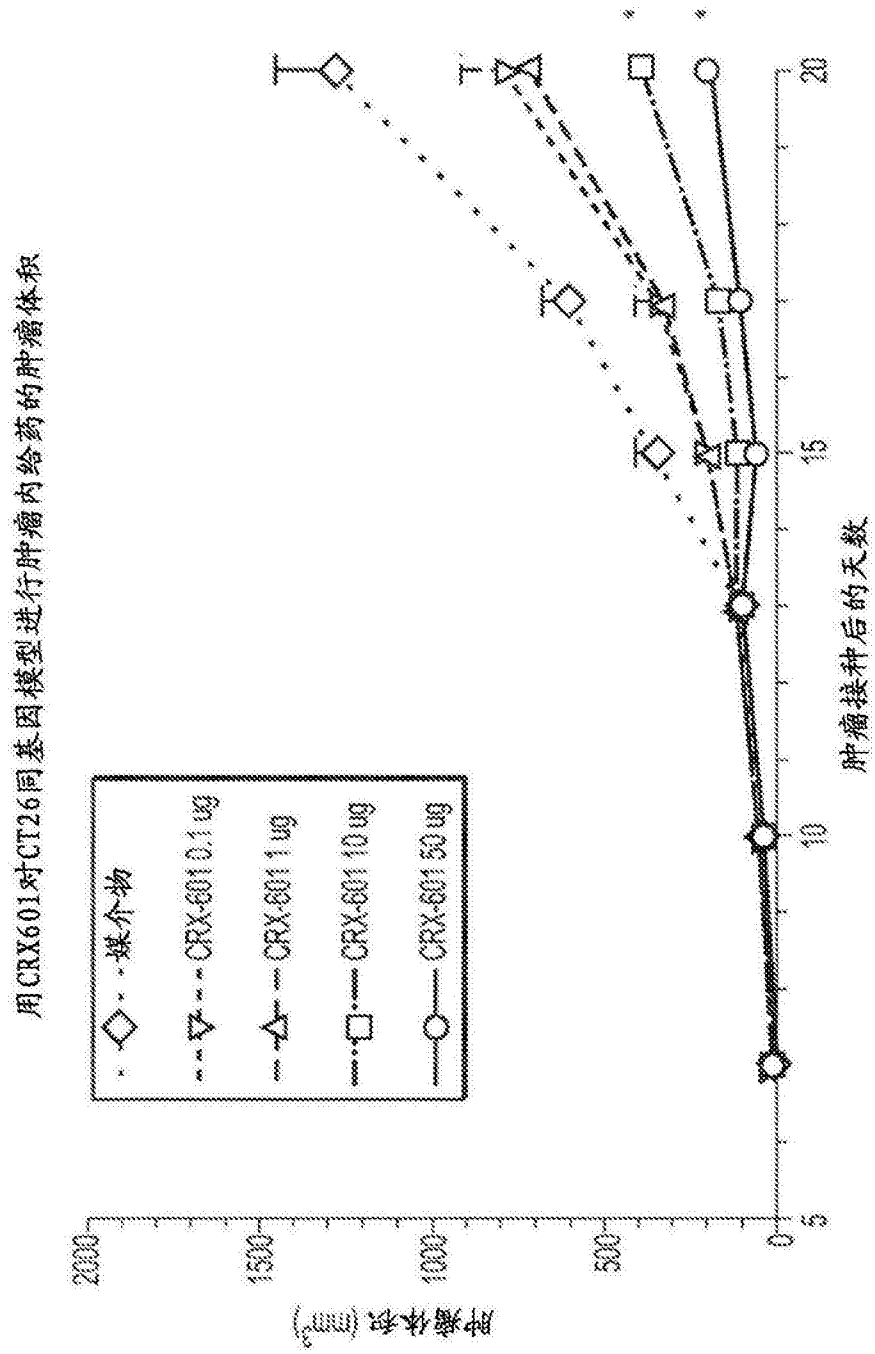


图19

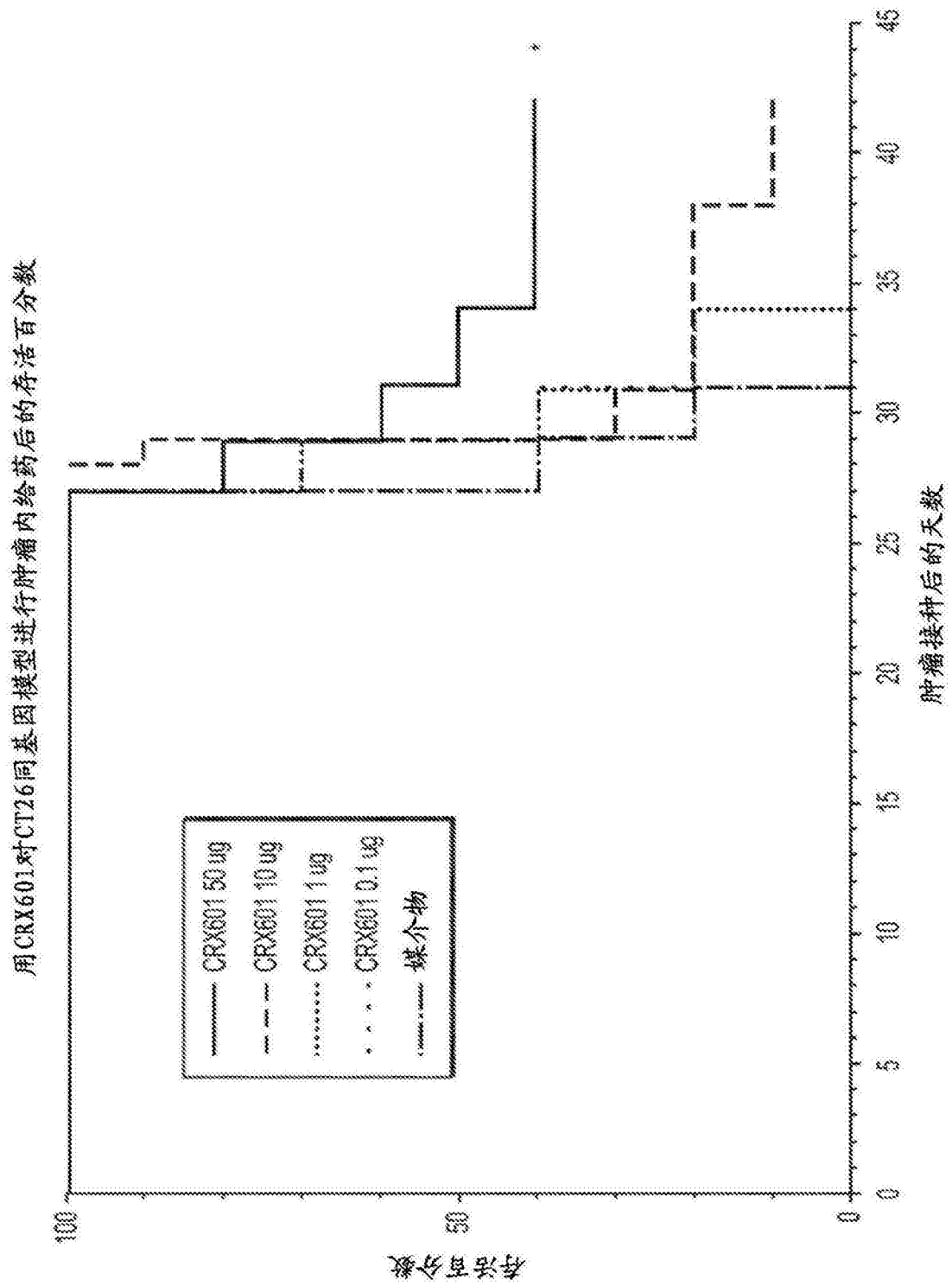


图20

用CRX601对CT26同基因模型进行静脉内给药肿瘤体积

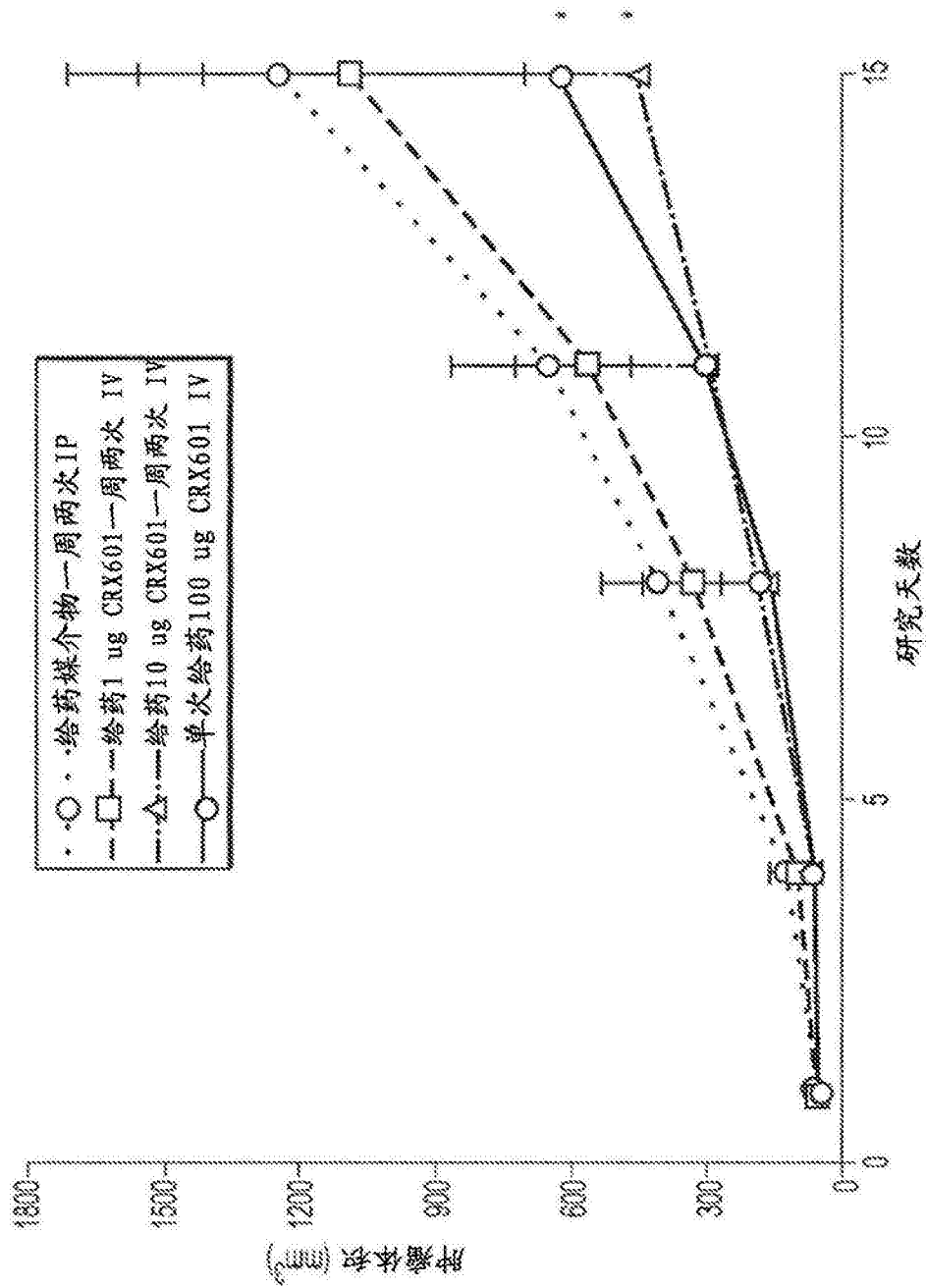


图21

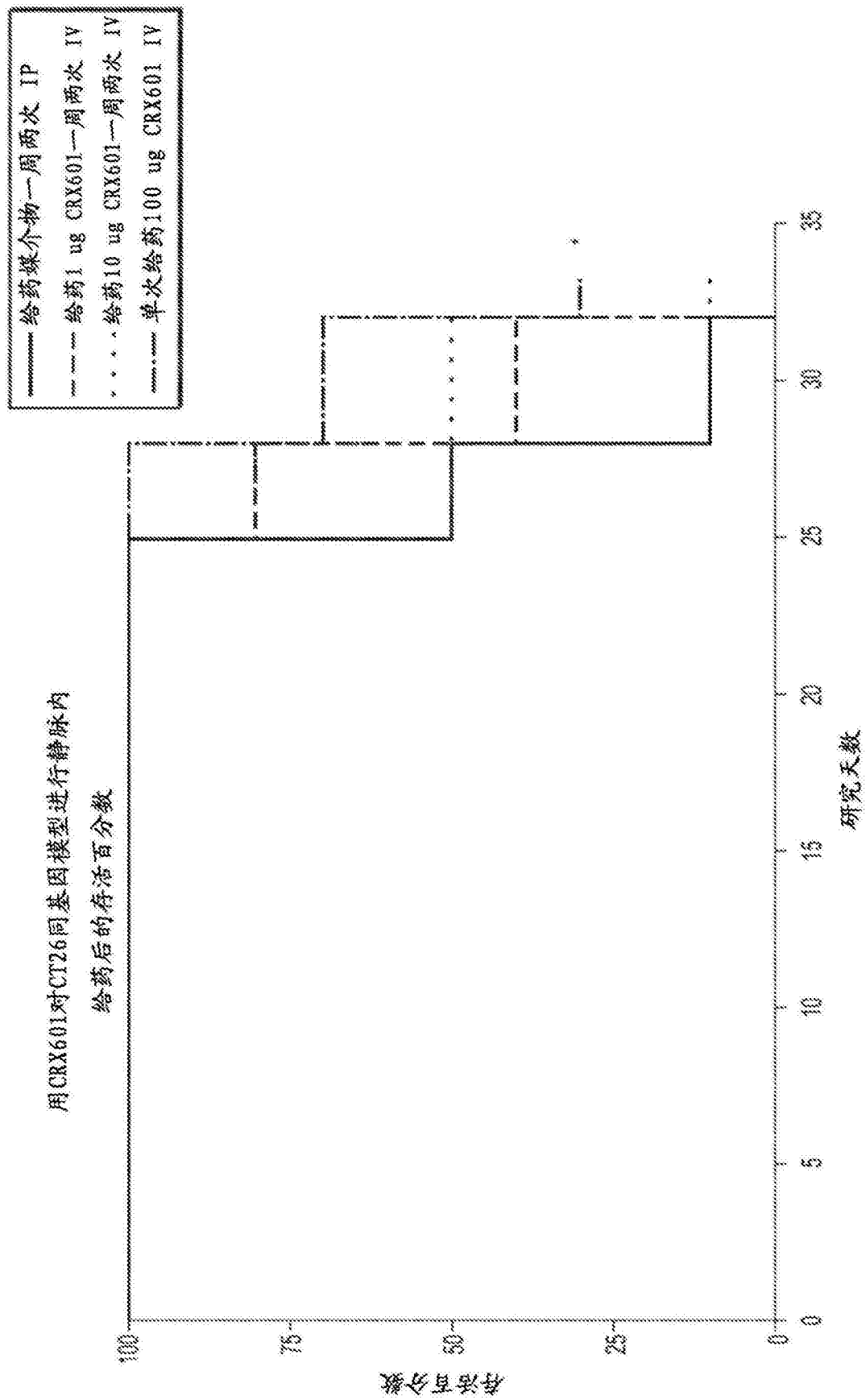


图22

用CRX601对CT26同基因模型进行静脉内给药的肿瘤体积

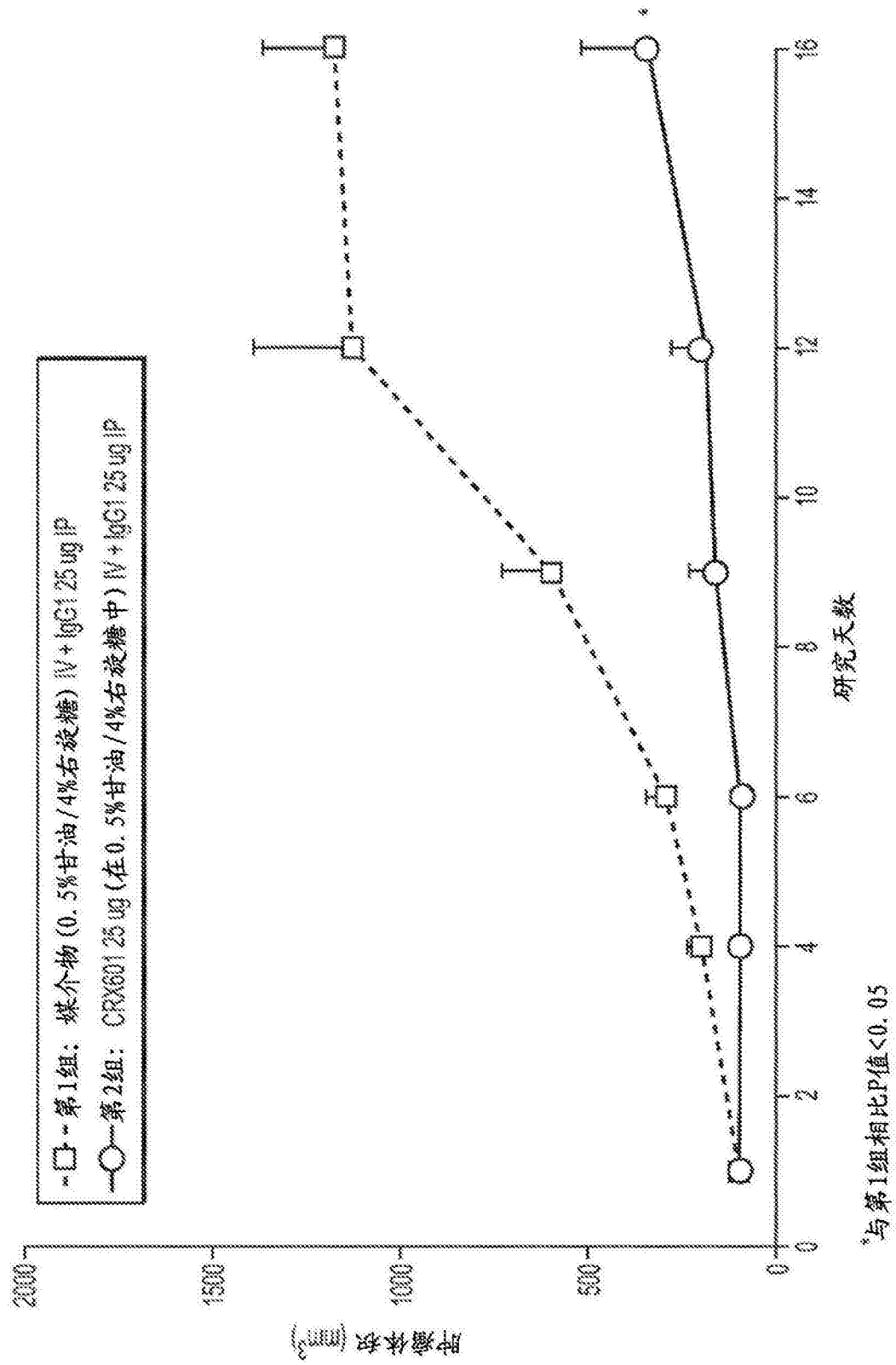


图23

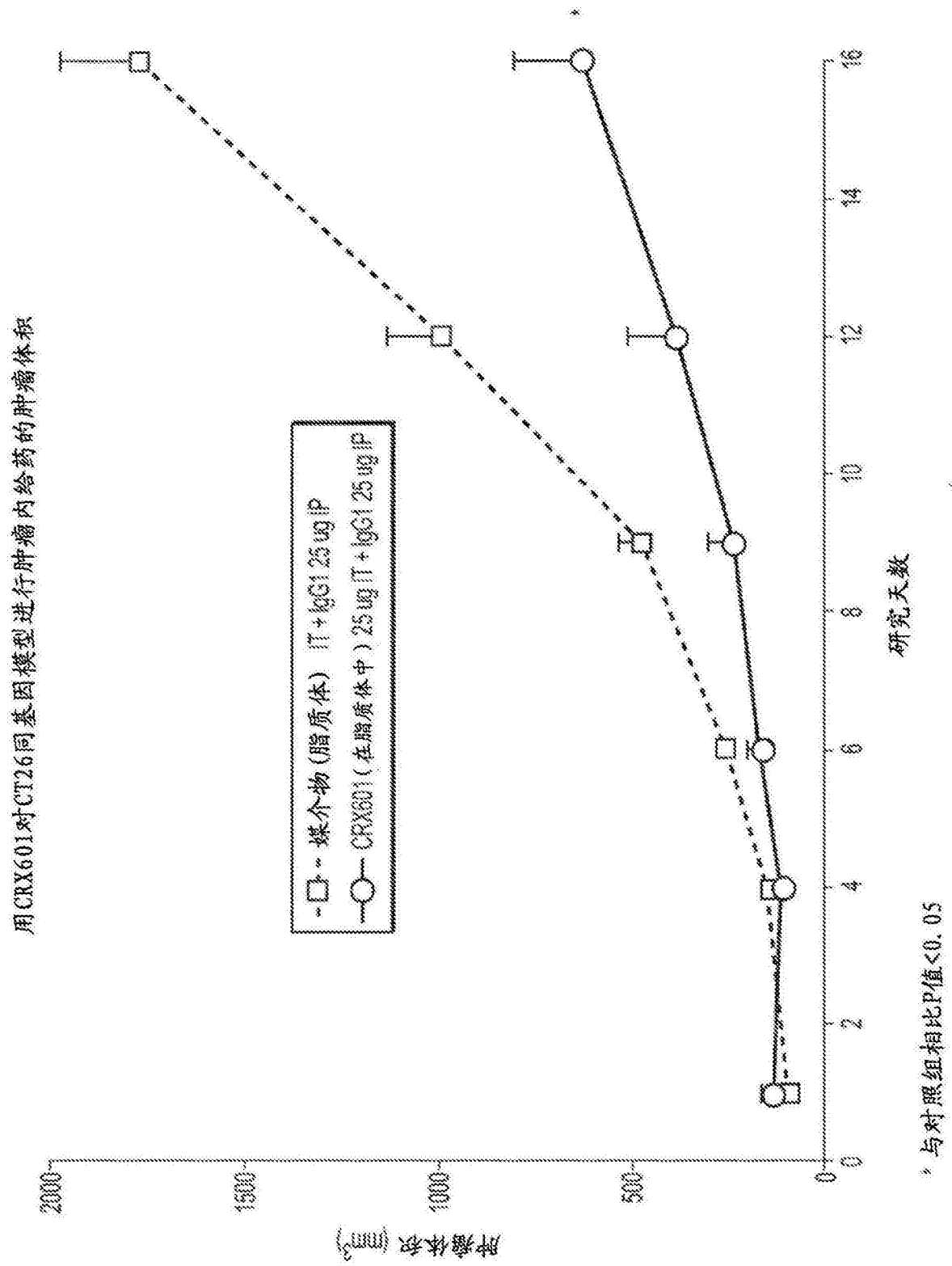


图24

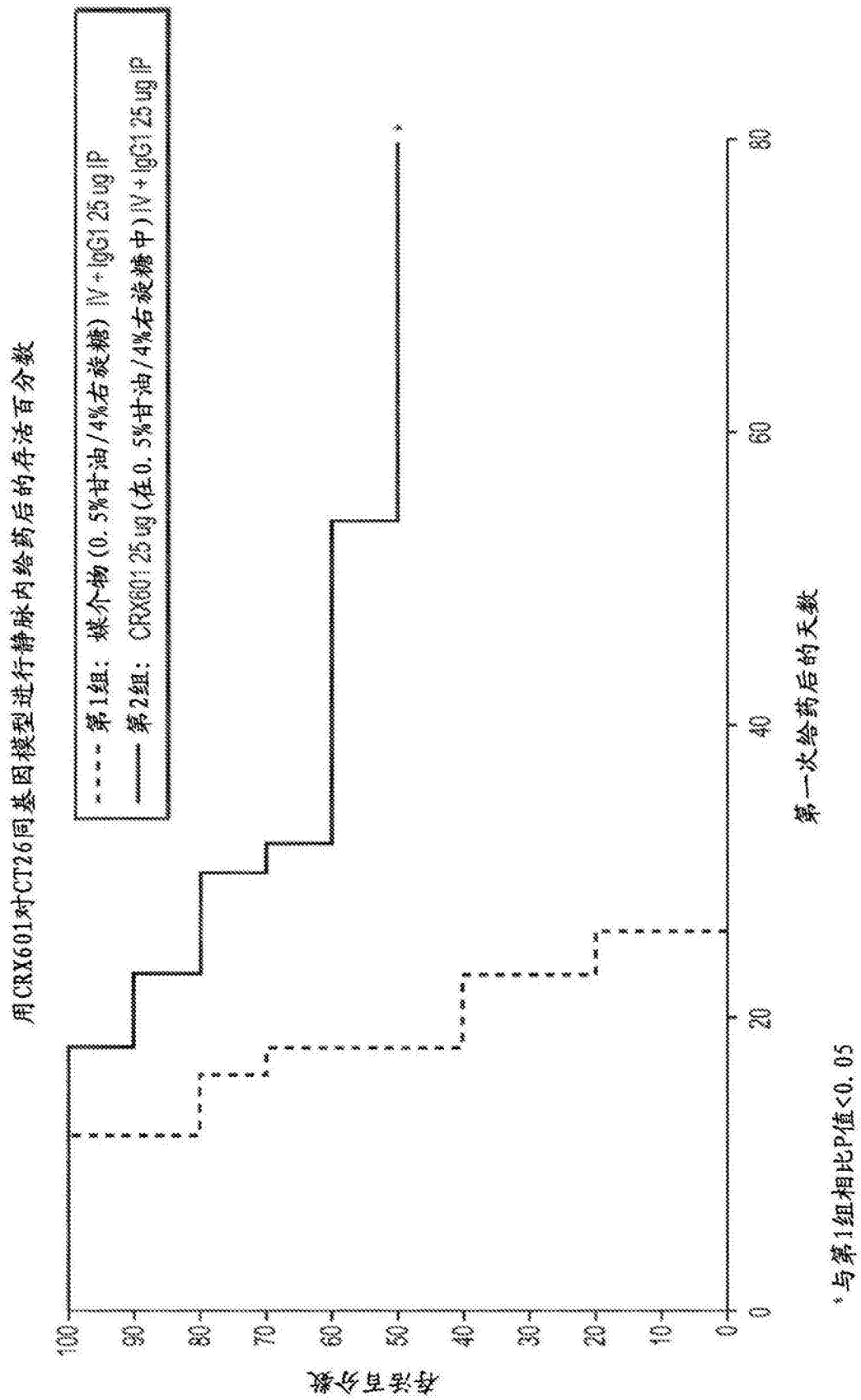


图25

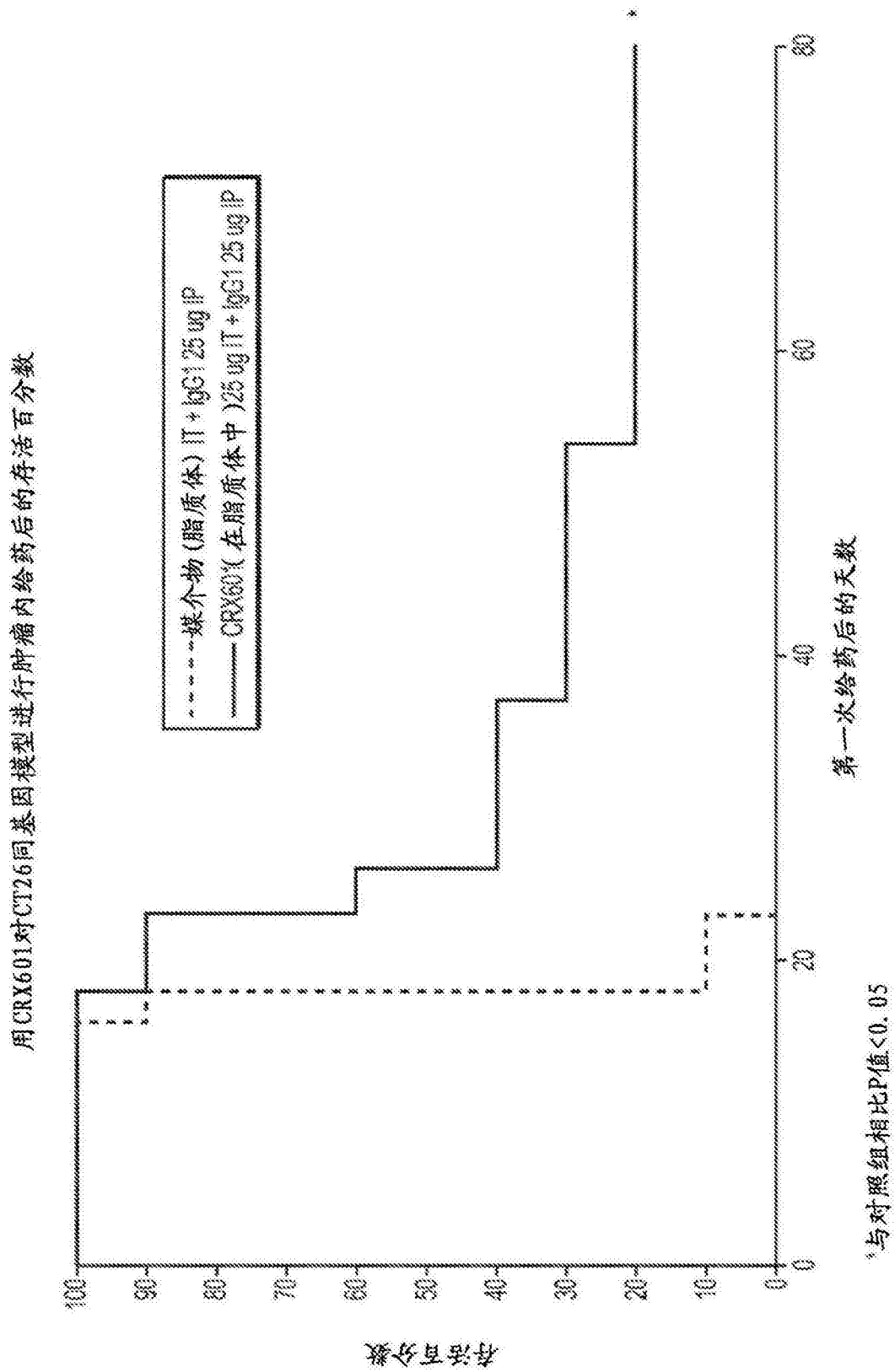


图26

静脉内或肿瘤内给药CRX-601: 肿瘤再激发CT26同基因模型

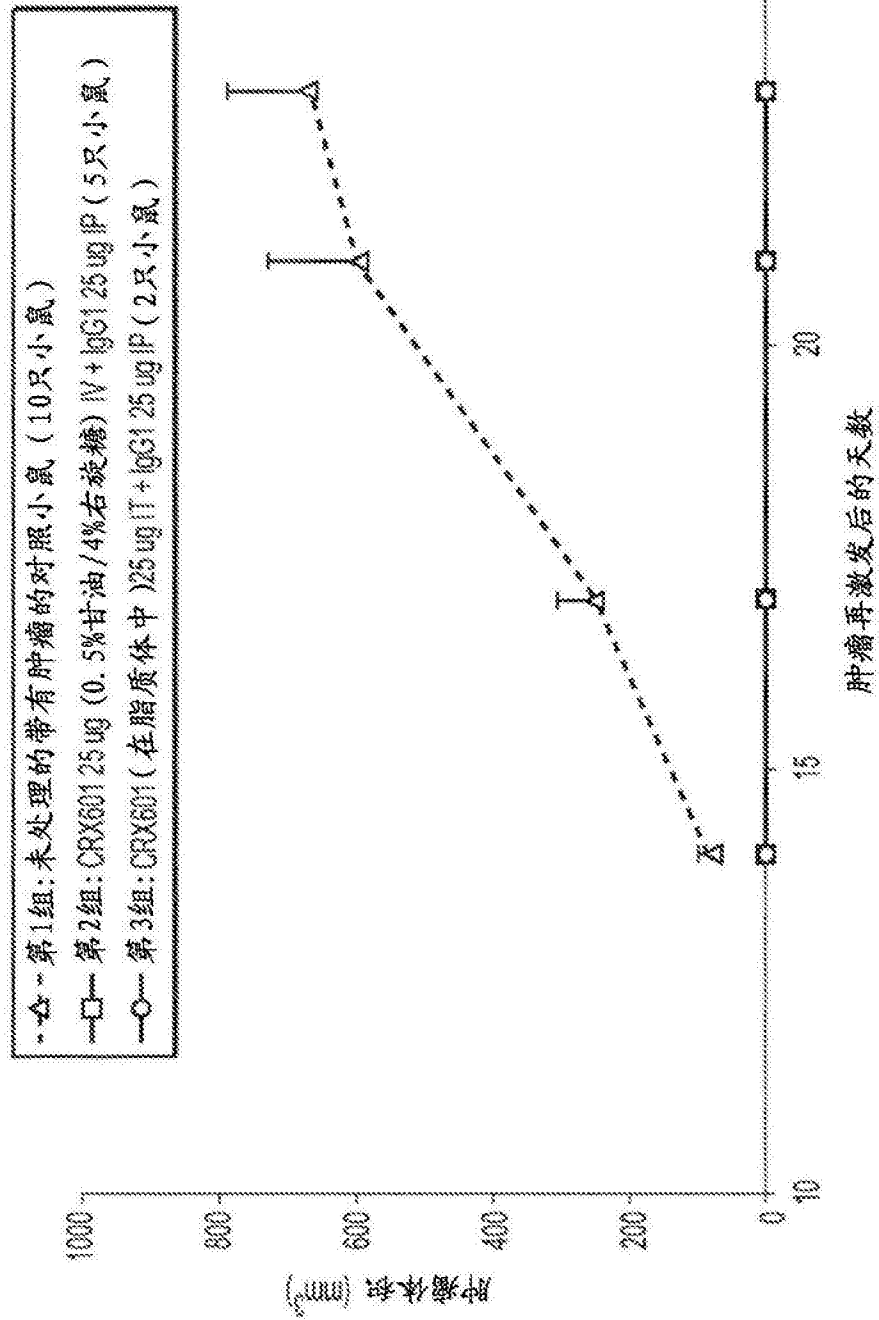


图27

接受肿瘤内注射的CRX601 (DOPC/CHOL脂质体) 的小鼠的远位效应, CT26同基因肿瘤模型

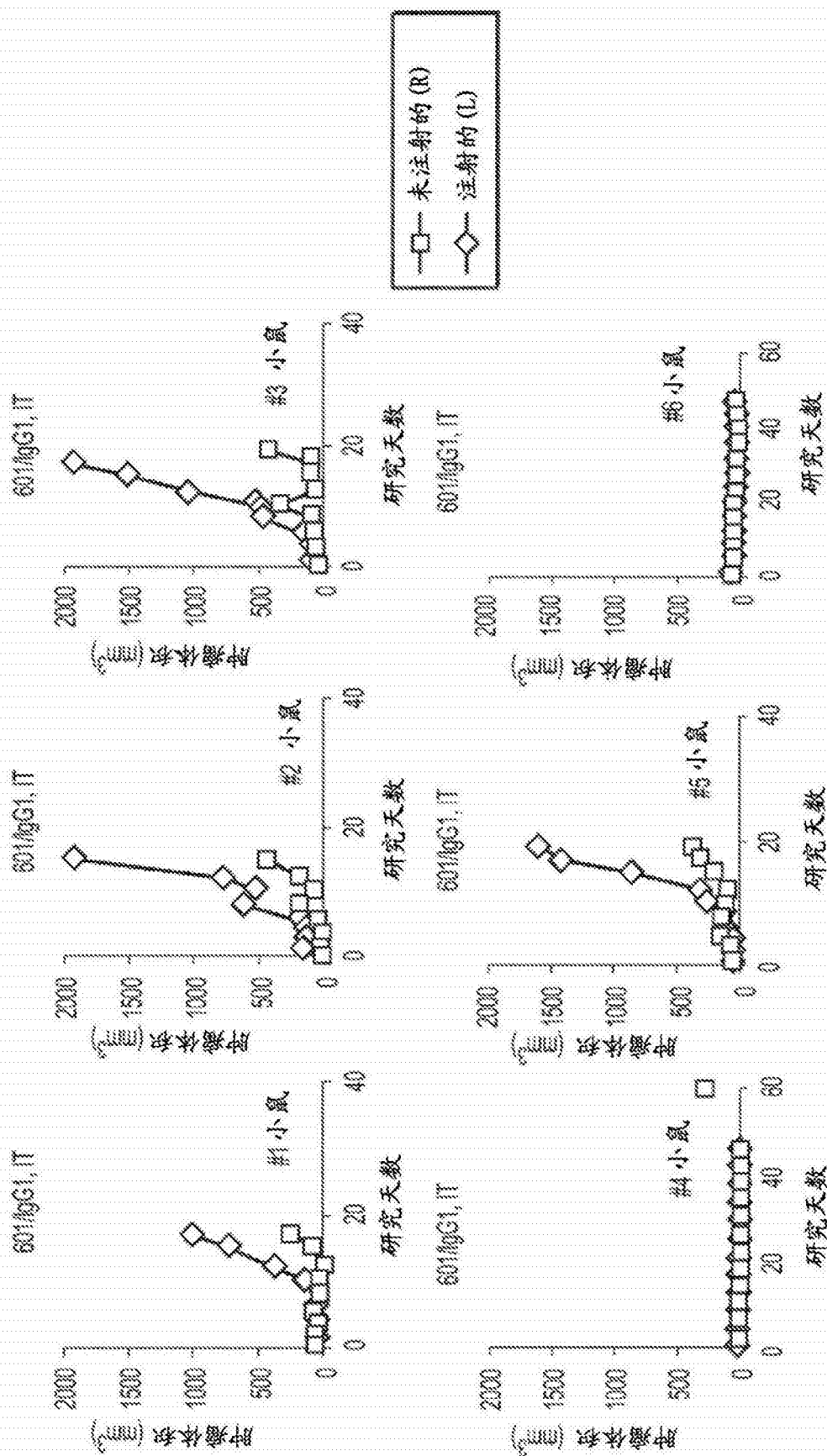


图28

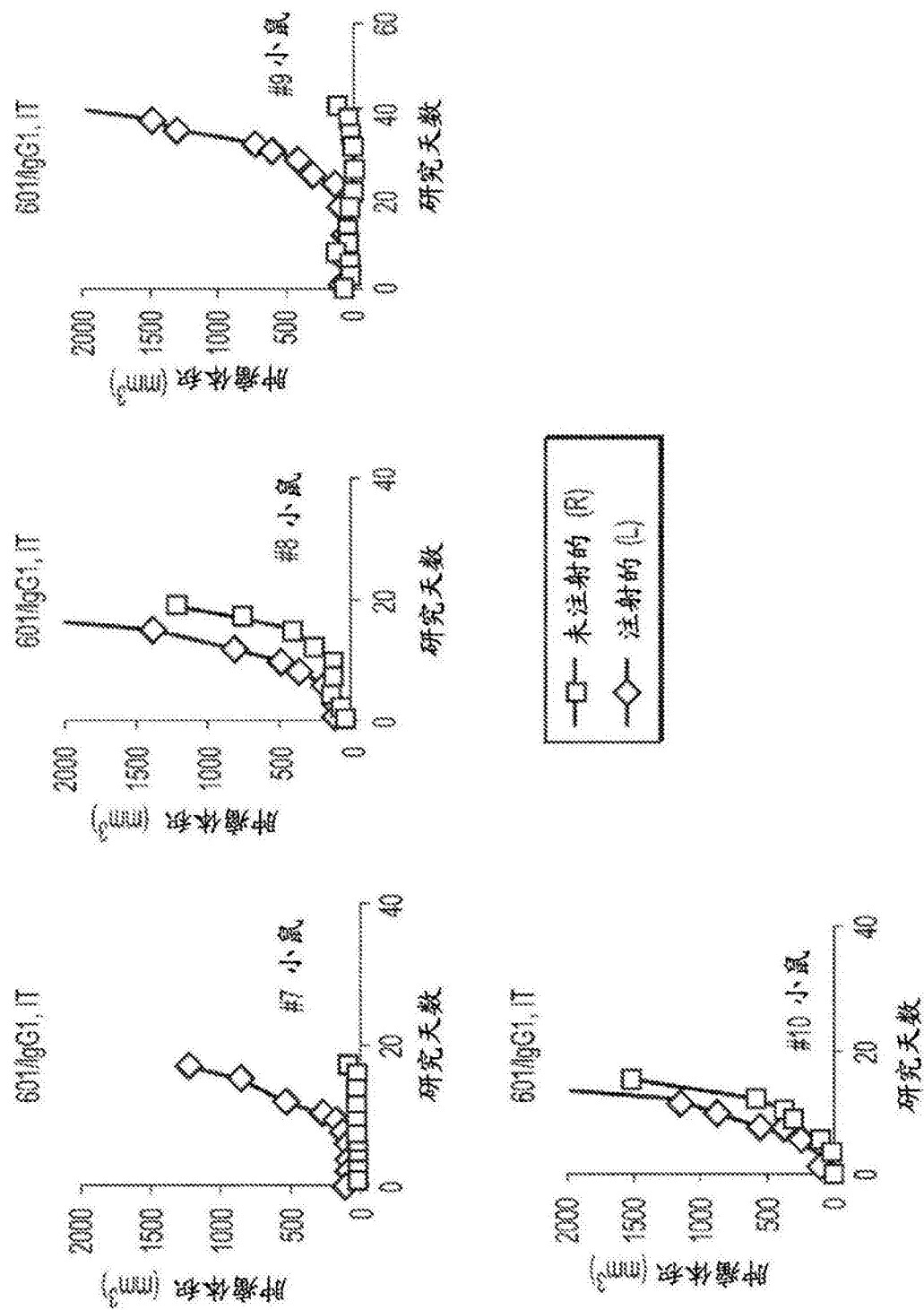


图28 (续)

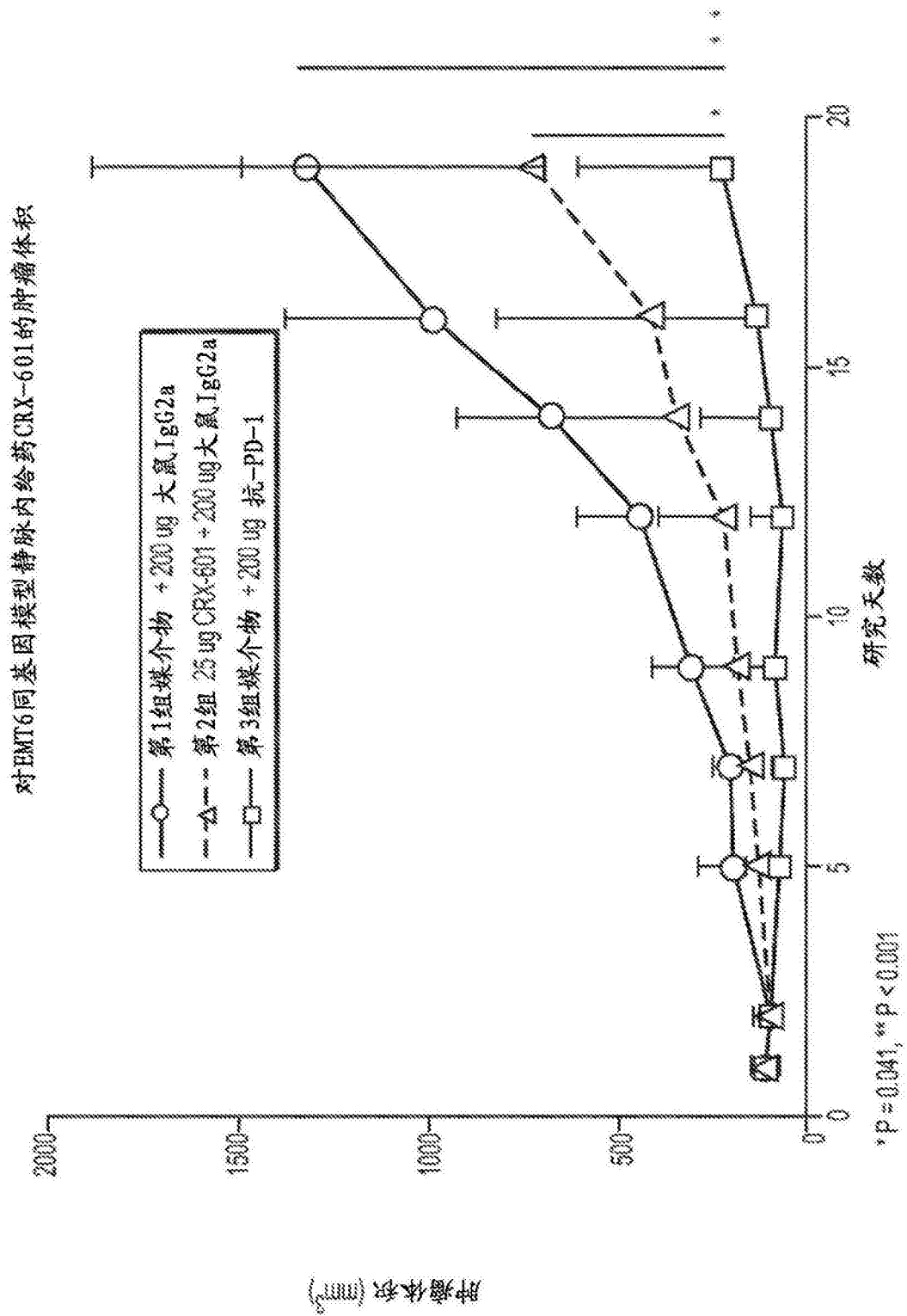


图29

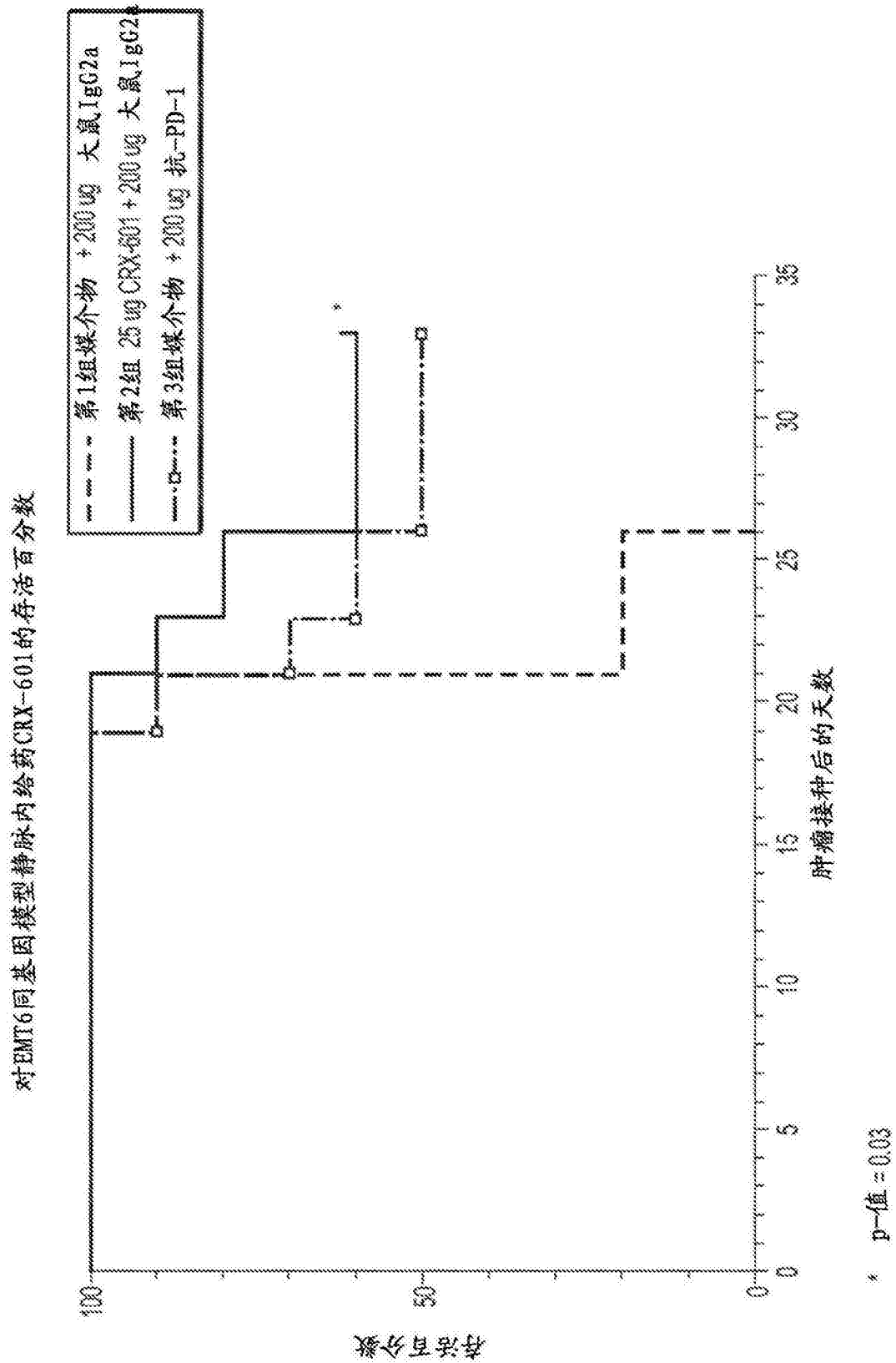


图30