



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104023733 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 03

(21) 申请号 201280059421. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 12. 03

A61K 35/74 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 35/00 (2006. 01)

1120779. 2 2011. 12. 02 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 05. 30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2012/052992 2012. 12. 03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/079980 EN 2013. 06. 06

(71) 申请人 英模度伦医疗公司

地址 英国伦敦

(72) 发明人 查尔斯·艾科 赛特温德·穆旦

约翰·格兰奇

(74) 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事

务所(普通合伙) 11201

代理人 李志东

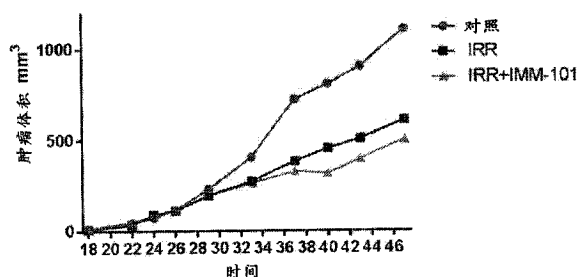
权利要求书2页 说明书15页 附图1页

(54) 发明名称

癌症的免疫原性治疗

(57) 摘要

本发明提供了一种免疫调节剂,其用于在打算与施用所述免疫调节剂同时、分开或按顺序接受免疫原性细胞死亡疗法的患者中治疗和/或控制赘生性疾病。所述疗法可选自微波照射、靶向放疗、栓塞术、冷冻疗法、超声、高强度聚焦超声、射频刀、热疗法、射频消融、冷冻消融、电刀加热、热水注射、醇注射、栓塞、辐射暴露、光动力疗法、激光束照射以及它们的组合。



1. 一种免疫调节剂,其用于在打算与施用所述免疫调节剂同时、分开或按顺序接受免疫原性细胞死亡疗法的患者中治疗和 / 或控制赘生性疾病。

2. 根据权利要求 1 所述的免疫调节剂,其中所述免疫原性细胞死亡疗法选自微波照射、靶向放疗、栓塞术、冷冻疗法、超声、高强度聚焦超声、射波刀、热疗法、射频消融、冷冻消融、电刀加热、热水注射、醇注射、栓塞、辐射暴露、光动力疗法、激光束照射以及它们的组合。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的免疫调节剂,其中所述肿瘤为转移性的。

4. 根据任何前述权利要求所述的免疫调节剂,其中所述免疫调节剂包括全细胞分枝杆菌。

5. 根据权利要求 4 所述的免疫调节剂,其中所述分枝杆菌为非病原性热杀灭分枝杆菌。

6. 根据权利要求 5 所述的免疫调节剂,其中所述非病原性热杀灭分枝杆菌选自母牛分枝杆菌、奥布分枝杆菌、副偶然分枝杆菌、金色分枝杆菌、M. w 以及它们的组合。

7. 根据权利要求 5 至 6 中任一项所述的免疫调节剂,其中所述非病原性热杀灭分枝杆菌优先地为粗变体。

8. 根据权利要求 5 至 7 中任一项所述的免疫调节剂,其中所述非病原性热杀灭分枝杆菌用于通过肠胃外、口、舌下、鼻腔或肺部途径施用。

9. 根据权利要求 8 所述的免疫调节剂,其中所述肠胃外途径选自皮下、真皮内、真皮下、腹膜内、静脉内或囊内注射。

10. 根据权利要求 9 所述的免疫调节剂,其中所述肠胃外途径不包括瘤内注射。

11. 根据任何前述权利要求所述的免疫调节剂,其中所述免疫原性细胞死亡疗法通过电离辐射进行。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的免疫调节剂,其中所述免疫调节剂的施用在所述免疫原性细胞死亡疗法之前和 / 或之后进行。

13. 根据权利要求 12 所述的免疫调节剂,其中所述免疫调节剂的施用在所述免疫原性细胞死亡疗法之前和 / 或之后 4 周与 1 周之间进行。

14. 根据权利要求 13 所述的免疫调节剂,其中免疫调节剂的所述施用包括在所述免疫原性细胞死亡疗法之前和 / 或之后约 4 周与 1 周之间的一个或多个时间间隔施用的有效量的一个或多个等分量的施用,并在用于肿瘤消退的治疗后继续应用于所述患者。

15. 根据任何前述权利要求所述的免疫调节剂,其中所述免疫调节剂在所述肿瘤细胞的免疫原性细胞死亡之后和 / 或在所述疾病的稳定期间施用给所述患者。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的免疫调节剂,其中所述肿瘤与选自以下的癌症相关:前列腺癌、肝癌、肾癌、肺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、乳腺癌、胰腺癌、脑癌、肝细胞癌、淋巴瘤、白血病、胃癌、宫颈癌、卵巢癌、甲状腺癌、黑素瘤、恶性肿瘤、头颈癌、皮肤癌和软组织肉瘤。

17. 根据权利要求 16 所述的免疫调节剂,其中所述肿瘤与结肠直肠癌相关。

18. 根据任何前述权利要求所述的免疫调节剂,其中所述疗法包括对患者中的赘生性疾病的异位效应。

19. 一种治疗、抑制或控制受试者中的肿瘤发生的方法,包括在受试者中开展免疫原性

细胞死亡疗法并同时、按顺序或分开向所述受试者施用有效量的免疫调节剂。

20. 根据权利要求 19 所述的方法,其中所述免疫原性细胞死亡疗法选自微波照射、射频消融、靶向放疗、栓塞术、冷冻疗法、超声、高强度聚焦超声、射波刀、热疗法、冷冻消融、电刀加热、热水注射、醇注射、栓塞、辐射暴露、光动力疗法、激光束照射以及它们的组合。

21. 根据权利要求 19 至 20 中任一项所述的方法,其中所述肿瘤如权利要求 15 至 17 任一项中所定义。

22. 根据权利要求 19 至 21 中任一项所述的方法,其中所述疗法包括对患者中的赘生性疾病的异位效应。

23. 根据权利要求 19 至 22 中任一项所述的方法,其中所述免疫调节剂如权利要求 3 至 6 任一项中所定义。

24. 根据权利要求 23 任一项所述的方法,其中所述免疫调节剂如权利要求 7 至 9 任一项中所定义而施用。

癌症的免疫原性治疗

发明领域

[0001] 本发明涉及癌症疗法的领域。具体地讲,本发明涉及与导致局部肿瘤细胞损伤或免疫细胞死亡的程序组合的治疗受试者中肿瘤发生或转移的方法以及用于这种疗法的免疫调节剂。

[0002] 发明背景

[0003] 在最近几年中,日渐认识到,免疫反应通过在很早的阶段消除许多肿瘤并以平衡状态保持避免完全消除的某些肿瘤,有时达数年,从而在癌症生物学中发挥着重要作用(Dunn 等, Annu Rev Immunol 2004 ;22 :329-360)。最终以疾病的临床表现从这种平衡阶段中脱离与免疫反应失调有关,从而表现为例如慢性炎症或免疫抑制。免疫系统在癌症的发生、结构特性和进展中起着关键作用的强有力和渐增的证据引起了在治疗这类疾病的免疫治疗策略中新的兴趣。迄今为止,开发此类策略的大部分尝试基于:使用源自患者自身肿瘤或源自肿瘤细胞系的抗原,以及转移肿瘤抗原特异性细胞毒性细胞和抗原呈递细胞的离体扩增群。

[0004] 自 1863 年起,当 Rudolf Virchow 在赘生性组织中发现白细胞并因此首次建立了炎症与癌症之间的联系时,癌症就与炎症存在关联(Balkwill 等, Lancet 2001 ;357 :539-545)。从那时起,慢性炎症就被视为癌症的风险因素。这些报告阐述了炎性环境支持肿瘤的发生,且与在肿瘤部位的观察一致。然而,癌症和炎症的关系并不限于由慢性炎症引起的疾病的发作。Schwartzburd(Cancer and Metastasis reviews 2003 ;22 :95-102) 提出慢性炎症由于肿瘤环境应力而发生,并且这将产生免受免疫系统影响的防御作用。最近,已证实肿瘤微环境类似于炎症部位,其通过趋化因子、细胞因子、淋巴细胞和巨噬细胞而明显支持肿瘤进展,这些因子和细胞有助于可增加血流量的新血管形成和血管扩张、与恶性疾病相关的免疫抑制以及肿瘤转移的确立。此外,该炎症部位肿瘤发生微环境,且不说其在逃避免疫系统和促进癌症进展中的显著作用,还对现今癌症治疗的成功具有不利的影响。实际上,已发现癌症中的炎性反应会危害化疗剂的药效动力学(Slaviero 等, Lancet Oncol 2003 ;4 :224-32)。

[0005] 此外,转移癌细胞作为包含淋巴细胞、血小板和肿瘤细胞的小集落而离开肿瘤。炎症通过创造有利于肿瘤生长的细胞因子环境继续在转移部位发挥作用。

[0006] 免疫稳态由促炎和抗炎信号受到严格调控的相互作用构成。例如,抗炎信号的丢失导致慢性炎症和信号转导增生。有趣的是,促进和抑制肿瘤细胞增殖的细胞因子都在肿瘤部位产生。就癌症初始阶段而言,它是这些不同过程的作用之间的一种不平衡状态,这些过程导致肿瘤启动。

[0007] 据信,为了治疗癌症,最有效的免疫反应类型是 1 型,其有利于对 CD4+Th1 细胞反应和 CD8+CTL 反应的诱导。在癌症疫苗的背景下,使用许多促进 Th1 反应的发生且被认为抑制 Th2 反应的产生的免疫刺激剂。

[0008] 迄今为止,尝试开发用于癌症的有效免疫疗法的主要障碍是不能破坏癌症部位的免疫抑制以及修复免疫反应性的正常网络。免疫疗法的生理学方法是使免疫反应性正常

化,以使得内源性肿瘤抗原将被再次识别,并且将针对具有这些抗原的细胞发生有效的溶细胞反应。

[0009] 伴随着化疗和放疗活动的抗癌免疫反应最近有人进行了评述,并表明此类反应通过消除残留癌症细胞并将微转移维持在休眠状态而对治疗成功具有关键作用(Zitvogel等,J Clin Invest2008 ;118 :1991-2001)。然而,该参考文献明确表示没有简单的可用于一致地提高此类免疫反应的免疫治疗策略。

[0010] 有证据表明,引起某些形式的免疫原性癌细胞死亡的治疗程序也导致肿瘤抗原的释放。存在三种主要类型的细胞死亡(Tesniere等,Cell Death Differ2008 ;15 :3-12):细胞凋亡(1型)、自我吞噬(2型)和坏死(3型)。细胞凋亡或程序性细胞死亡对于组织重构(尤其是不仅在子宫内而且还在子宫外)是一种必不可少的普通且定期发生的现象。其特征不在于细胞核中的DNA断裂和细胞质凝缩形成被吞噬细胞吞噬和消化的“凋亡小体”。在自我吞噬中,细胞器和细胞质隐蔽在从细胞挤压出的液泡中。尽管这为细胞在不利的营养条件或其他应急条件下的存活提供了便利,但是过多的自我吞噬会引起细胞死亡。坏死是一种特征在于细胞内细胞器损坏和细胞肿胀的“天然”过程,从而导致细胞膜的破裂和细胞内物质的释放。

[0011] 如从其生理学作用所预期以及借助局部炎症受抗炎介质的释放所抑制这一发现,人们普遍认为细胞凋亡是免疫“沉默的”。最近,有人提出,细胞凋亡有不同的形式并且一些是免疫原性的(Zitvogel等,Adv Immunol2004 ;84 :131-179)。人们对自我吞噬与免疫原性的关系知之甚少,尽管在进展性癌症中,这样的细胞坏死也可能增强有利于肿瘤生长的慢性炎症,但是细胞坏死无疑地释放许多抗原(Vakkila等,Nat Rev Immunol2004 ;4 :641-648 ;Zeh等,J Immunother2005 ;28 :1-9)。从这层意义上讲,癌症类似于无法愈合的慢性发炎伤口(Dvorak.N Engl J Med1986 ;315 :1650-1659)。

[0012] 细胞坏死主要归类为免疫原性细胞死亡。有限数量的研究表明,引起免疫原性细胞死亡的程序释放介质和肿瘤抗原,它们既能引起免疫反应(包括细胞毒性CD8⁺T细胞和NK细胞的激活)也能充当靶标(包括使得抗原可被树突细胞(DC)触及),在原则上能够产生体内DC疫苗。

[0013] 更有用的是,不考虑这种细胞死亡的明确机理,而将细胞死亡分类成免疫原性和非免疫原性形式。在恢复有益的免疫调节的治疗环境中,由免疫原性细胞死亡所释放的抗原于是能够引起有效的抗肿瘤免疫反应,特别是当它们存在存在危险相关(或损害相关)分子模式(DAMP)的情况下释放时(Jerome等,N. Eng. J. Med. 2004 ;350 :41141-2)。

[0014] 在本领域中已努力为肿瘤的治疗提供联合消融和化疗。WO 2000064476和US 20050187207公开了与光动力疗法组合以治疗转移肿瘤的免疫佐剂的用途。这些文献公开了免疫佐剂包含分枝杆菌细胞壁骨架和去-3-0-酰化脂质A并通过注射进肿瘤而施用。Castano等(Nat Rev Cancers2006 ;6 :535)、Korbelik等(J Photochem and Photobiol 1998 ;44 :151)和Korbelik等(J Photochem and Photobiol,2001 ;73 :403)也公开了使用光动力疗法和施用分枝杆菌细胞壁提取物作为免疫佐剂的组合治疗肿瘤。分枝杆菌细胞壁包含诸如海藻糖二霉菌酸酯和胞壁酰二肽(它们是已知的免疫刺激剂)的化合物。在现有技术的联合疗法中使用的分枝杆菌细胞壁提取物还引起促炎性细胞因子、活性氮和募集白细胞,它们与和脂血症、低血糖症和在GI道中具有缺血性和出血性损伤的腹膜炎相关的TNF- α

介导的恶病质所引起的病理学（包括体重减轻）相关。现有技术的联合疗法可因此加剧炎症反应并具有严重的副作用。

发明概要

[0015] 本发明提供了通过采用与免疫疗法协同作用导致免疫原性细胞死亡的技术而用于治疗癌症的安全、耐受良好且有效的方法。本发明提供了适用于肿瘤的免疫原性细胞死亡疗法与特定类型的免疫疗法的组合。发明人已发现，两种疗法的组合具有协同作用，超过单独使用的每种疗法的简单叠加效果。

[0016] 在第一方面，本发明提供了一种免疫调节剂，其用于在打算与施用免疫调节剂同时、分开或按顺序接受免疫原性细胞死亡疗法的患者中治疗和 / 或控制赘生性疾病。

[0017] 在第二方面，本发明是治疗、抑制或控制受试者中肿瘤发生的方法，包括在受试者中开展免疫原性细胞死亡疗法并同时、分开或按顺序向受试者施用有效量的免疫调节剂。

[0018] 附图简述

[0019] 参考以下附图描述本发明，其中：

[0020] 图 1 显示了对正接受癌症消融放射治疗的动物施用免疫调节剂（热杀灭奥布分枝杆菌（*Mycobacterium obuense*）；IMM-101）的效果进行的研究的结果。结果表明联合疗法以协同方式优于通过单独放射的治疗。

[0021] 发明详述

[0022] 根据本发明所定义的免疫调节剂是一种刺激 1 型反应并下调 2 型反应且通过免疫调节而恢复免疫系统的健康平衡的组分。

[0023] 本发明需要免疫原性细胞死亡疗法。该疗法导致对包括细胞凋亡（1 型）、自我吞噬（2 型）和坏死（3 型）在内的肿瘤免疫原性细胞死亡的诱导，因而释放既能诱导免疫反应（包括细胞毒性 CD8+T 细胞和 NK 细胞的激活）也能充当靶标（包括使得抗原可被树突细胞触及）的肿瘤抗原。引起肿瘤的免疫原性细胞死亡的程序在下文着重指出。

[0024] 在本发明的背景下，“免疫原性肿瘤细胞死亡疗法”是指在生理上诱导肿瘤或肿瘤细胞中的损伤的能力，以使得细胞释放为免疫系统所利用来识别并靶向肿瘤的抗原。该术语包括消融疗法。肿瘤抗原的释放可通过观察例如召回反应（recall response）和细胞毒性 T 细胞反应的增加而表明。

[0025] 免疫原性细胞死亡疗法可以次优水平执行（即非根治性疗法），使得其无意完全除去或根除肿瘤，只不过导致一些肿瘤细胞或组织发生坏死。技术人员将会知道为了实现此目的而需要的治疗程度，具体取决于所用的技术、患者的年龄、病情，并且特别是肿瘤的大小或位置或转移。

[0026] 如本文所定义，同时施用包括免疫调节剂和细胞死亡疗法程序的施用在彼此约 2 小时或约 1 小时内或更短，甚至更优选地是在同时。

[0027] 如本文所定义，分开施用包括免疫调节剂和细胞死亡疗法程序的施用相隔超过几周、几天、约 12 小时或约 8 小时或约 6 小时或约 4 小时或约 2 小时。

[0028] 如本文所定义，顺序施用包括免疫调节剂和细胞死亡疗法程序以多个等分量和 / 或剂量和 / 或在分开的场合施用。优选地，在细胞死亡疗法程序发生之前为患者施用免疫调节剂并在之后继续施用。更优选地，在用于肿瘤消退的治疗后继续将免疫调节剂应用于

患者。

[0029] 在本发明的一个方面,免疫调节剂包含热杀灭分枝杆菌。在本发明中使用的优选的分枝杆菌种包括母牛分枝杆菌 (*M. vaccae*)、抗热分枝杆菌 (*M. thermoresistibile*)、转黄分枝杆菌 (*M. flavescens*)、杜氏分枝杆菌 (*M. duvalii*)、草分枝杆菌 (*M. phlei*)、奥布分枝杆菌 (*M. obuense*)、副偶然分枝杆菌 (*M. parafortuitum*)、泥炭藓分枝杆菌 (*M. sphagni*)、爱知分枝杆菌 (*M. aichiense*)、罗德岛分枝杆菌 (*M. rhodesiae*)、新金色分枝杆菌 (*M. neoaurum*)、楚布分枝杆菌 (*M. chubuense*)、东海分枝杆菌 (*M. tokaiense*)、科莫斯分枝杆菌 (*M. komossense*)、金色分枝杆菌 (*M. aurum*)、*M. w*、结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*)、田鼠分枝杆菌 (*M. microti*)、非洲分枝杆菌 (*M. africanum*)、堪萨斯分枝杆菌 (*M. kansasii*)、海分枝杆菌 (*M. marinum*)、猿分枝杆菌 (*M. simiae*)、胃分枝杆菌 (*M. gastri*)、不产色分枝杆菌 (*M. nonchromogenicum*)、土地分枝杆菌 (*M. terrae*)、次要分枝杆菌 (*M. triviale*)、戈登分枝杆菌 (*M. gordonae*)、瘰癧分枝杆菌 (*M. scrofulaceum*)、石蜡分枝杆菌 (*M. paraffinicum*)、胞内分枝杆菌 (*M. intracellulare*)、禽分枝杆菌 (*M. avium*)、蟾蜍分枝杆菌 (*M. xenopi*)、溃疡分枝杆菌 (*M. ulcerans*)、迪氏分枝杆菌 (*M. diernhoferi*)、耻垢分枝杆菌 (*M. smegmatis*)、蛇分枝杆菌 (*M. thamnophaeos*)、转黄分枝杆菌 (*M. flavescens*)、偶发分枝杆菌 (*M. fortuitum*)、外来分枝杆菌 (*M. peregrinum*)、龟分枝杆菌 (*M. chelonae*)、副结核分枝杆菌 (*M. paratuberculosis*)、麻风分枝杆菌 (*M. leprae*)、鼠麻风分枝杆菌 (*M. lepraemurium*) 以及它们的组合。

[0030] 优选地,热杀灭分枝杆菌是非病原性的。非病原性热杀灭分枝杆菌选自母牛分枝杆菌、奥布分枝杆菌、副偶然分枝杆菌、金色分枝杆菌、*M. w*、草分枝杆菌以及它们的组合。更优选地,非病原性热杀灭分枝杆菌为粗变体 (rough variant)。向患者施用的免疫调节剂的量足以引起患者中的保护性免疫反应,使得患者的免疫系统在肿瘤细胞消融或者免疫原性细胞死亡后能够建立对肿瘤细胞抗原的有效免疫反应。在本发明的某些实施方案中,优选的是向受试者施用特定剂量的免疫调节剂。因此,在本发明的某些实施方案中,提供了一种容纳装置,其包含用于本发明的热杀灭分枝杆菌的有效量,其通常可以为从 10^3 至 10^{11} 个有机体,优选地从 10^4 至 10^{10} 个有机体,更优选地从 10^6 至 10^{10} 个有机体,并且甚至更优选地从 10^6 至 10^9 个有机体。用于本发明的热杀灭分枝杆菌的有效量可以从 10^3 至 10^{11} 个有机体,优选地从 10^4 至 10^{10} 个有机体,更优选地从 10^6 至 10^{10} 个有机体,并且甚至更优选地从 10^6 至 10^9 个有机体。最优选地,用于本发明的热杀灭分枝杆菌的量从 10^7 至 10^9 个细胞或有机体。通常,根据本发明的组合物用于人和动物时可以按 10^8 至 10^9 个细胞的剂量施用。或者,剂量从 0.01mg 至 1mg 或 0.1mg 至 1mg 以混悬液或干燥制剂形式呈现的有机体。

[0031] 母牛分枝杆菌具有调节免疫反应的能力。其 1 型佐剂性质不受热杀灭影响,然而诸如 BCG 的其他分枝杆菌死后几乎不具有 1 型佐剂效果。母牛分枝杆菌也以似乎不依赖其增强 1 型反应的能力的方式下调预先存在的 Th2 反应。这样的效应现已归因于对 CD4⁺CD45RB^{low} 调节性 T 细胞的诱导,其在肺部过敏性炎症实验模型中可在转移到过敏接受者时抑制过敏性炎症和呼吸道高敏性。奥布分枝杆菌也表现出免疫调节作用。

[0032] 不同于靶向单个细胞因子介质的药剂,母牛分枝杆菌通过其减少包括 IL-4、IL-5 和 IL-13 在内的若干 Th2 细胞因子的能力而具有更广泛的作用,这种能力通过免疫调节机理而发生,这些机理包括对调节性 T 细胞的诱导,而调节性 T 细胞通过涉及 IL-10 和转化生

长因子 (TGF)- β 的机理下调 Th2。

[0033] 母牛分枝杆菌和奥布分枝杆菌在宿主中诱导复杂的免疫反应。采用这些制剂进行治疗将刺激固有的和 1 型免疫力 (Th1 和 CD8+CTL), 类似于使用其他分枝杆菌制剂 (例如减活 BCG 和分枝杆菌细胞壁提取物) 治疗时所观察到的情况。然而, 使用母牛分枝杆菌和奥布分枝杆菌进行治疗的一个明显的另外的有益效果是对免疫反应的调控, 这种调控通过诱导控制和调节持久且过度旺盛的免疫反应 (例如, 以下肿瘤消融) 的调节细胞 (T 调节和具有调节表型的 DC) 而进行。通过免疫调节对免疫反应的严格控制不仅限制组织病理学, 而且还确保快速返回到节能稳态免疫平衡。

[0034] 本发明可用于治疗、控制或抑制赘生性疾病。可根据本发明进行治疗的癌症包括但不限于膀胱、血液、骨骼、骨髓、脑、乳腺、结肠、食道、胃肠、齿龈、头部、肾、肝脏、肺、鼻咽、颈、卵巢、前列腺、皮肤、胃、睾丸、舌头或子宫的细胞或赘生物。此外, 癌症可具体具有以下组织学类型, 但不限于以下组织学类型: 赘生物, 恶性; 癌; 癌, 未分化型; 巨细胞及纺锤细胞癌; 小细胞癌; 乳突癌; 鳞状细胞癌; 淋巴上皮癌; 基底细胞癌; 毛母质癌; 移行细胞癌; 乳突状移行细胞癌; 腺癌; 胃泌素瘤, 恶性; 胆管癌; 肝细胞癌; 结合性肝细胞癌及胆管癌; 小梁腺瘤; 腺样囊性癌; 腺瘤性息肉中的腺癌; 腺癌, 家族性结肠息肉症; 实体癌; 类癌, 恶性; 细支气管-肺泡腺癌; 乳突状腺癌; 嫌色细胞癌; 嗜酸细胞癌; 嗜酸性腺癌; 嗜碱细胞癌; 透明细胞腺癌; 颗粒细胞癌; 滤泡状腺癌; 乳突状及滤泡状腺癌; 非包囊性硬化癌; 肾上腺皮质癌; 类子宫内膜癌; 皮肤附器癌; 大汗腺腺癌; 皮脂腺癌; 耵聍腺癌; 黏液表皮样癌; 囊腺癌; 乳突状囊腺癌; 乳突状浆液性囊腺癌; 黏液性囊腺癌; 黏液性腺癌; 印戒细胞癌; 浸润性腺管癌; 髓样癌; 小叶癌; 炎性癌; 柏哲氏 (Paget's) 病, 乳房; 腺泡细胞癌; 腺鳞状细胞癌; 具有鳞状细胞化生的腺癌; 胸腺瘤, 恶性; 卵巢间质瘤, 恶性; 卵泡膜细胞瘤, 恶性; 巢颗粒细胞瘤, 恶性; 男性母细胞瘤, 恶性; 赛托利 (Sertoli) 细胞瘤; 莱迪希氏 (Leydig) 细胞瘤, 恶性; 脂细胞瘤, 恶性; 副神经节瘤, 恶性; 乳房外副神经节瘤, 恶性; 嗜铬细胞瘤; 血管球肉瘤; 恶性黑素瘤; 无黑色素性黑素瘤; 表浅散播型黑素瘤; 巨大色素痣中的恶性黑素瘤; 类上皮细胞黑素瘤; 蓝痣, 恶性; 肉瘤; 纤维肉瘤; 纤维组织细胞瘤, 恶性; 黏液肉瘤; 脂肪肉瘤; 平滑肌肉瘤; 横纹肌肉瘤; 胚胎型横纹肌肉瘤; 腺泡型横纹肌肉瘤; 间质肉瘤; 混合肿瘤; 米勒氏 (Mullerian) 混合肿瘤; 肾母细胞瘤; 肝母细胞瘤; 癌肉瘤; 间质瘤, 恶性; 布雷纳氏 (Brenner) 肿瘤, 恶性; 叶状肿瘤, 恶性; 滑膜肉瘤; 间皮瘤, 恶性; 恶性胚胎瘤; 胚胎癌; 畸胎瘤, 恶性; 甲状腺肿样卵巢瘤, 恶性; 绒毛膜癌; 中肾瘤, 恶性; 血管瘤; 血管内皮细胞瘤, 恶性; 卡波西氏肉瘤 (Kaposi's sarcoma); 血管周围细胞瘤, 恶性; 淋巴管肉瘤; 骨肉瘤; 皮质旁骨肉瘤; 软骨肉瘤; 软骨母细胞瘤, 恶性; 间叶性软骨肉瘤; 骨的巨细胞瘤; 尤文氏 (Ewing) 肉瘤; 牙源性瘤, 恶性; 成釉细胞牙肉瘤; 成釉细胞瘤, 恶性; 成釉细胞纤维肉瘤; 松果体瘤, 恶性; 脊索瘤; 神经胶质瘤, 恶性; 室管膜瘤; 星形细胞瘤; 原浆型星形细胞瘤; 纤维型星形细胞瘤; 星形母细胞瘤; 胶质母细胞瘤; 寡树突胶质细胞瘤; 寡树突胶质母细胞瘤; 原始神经外胚层瘤; 小脑肉瘤; 神经节神经母细胞瘤; 神经母细胞瘤; 视网膜母细胞瘤; 嗅神经源性肿瘤; 脑膜瘤, 恶性; 神经纤维肉瘤; 神经鞘瘤, 恶性; 颗粒细胞瘤, 恶性; 恶性淋巴瘤; 霍奇金病; 霍奇金副肉芽肿; 恶性淋巴瘤, 小淋巴细胞性; 恶性淋巴瘤, 大细胞, 弥漫性; 恶性淋巴瘤, 滤泡性; 蕈状肉芽肿; 其他特定的非霍奇金淋巴瘤; 恶性组织细胞增生症; 多发性骨髓瘤; 肥大细胞肉瘤; 免疫增生性小肠疾病; 白血病;

淋巴细胞性白血病；浆细胞白血病；红白血病；淋巴肉瘤细胞白血病；骨髓性白血病；嗜碱细胞性白血病；嗜伊红性白血病；单核细胞性白血病；肥大细胞白血病；巨核母细胞性白血病；骨髓性肉瘤；及多毛细胞白血病。优选地，赘生性疾病可以是与选自以下的癌症相关的肿瘤：前列腺癌、肝癌、肾癌、肺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、胰腺癌、脑癌、肝细胞癌、淋巴瘤、白血病、胃癌、宫颈癌、卵巢癌、甲状腺癌、黑色素瘤、头颈癌、皮肤癌和软组织肉瘤和 / 或其他形式的癌。肿瘤可以是转移性的或恶性肿瘤。

[0035] 消融诱导的肿瘤损伤的特征在于例如抗原泄漏、细胞碎片以及产生强免疫反应的介质的释放。进一步添加侵害（诸如通过瘤内施用现有技术的分枝杆菌细胞壁提取物而递送的侵害）进一步刺激免疫系统，从而导致另外的炎症和免疫反应性的产生以及肿瘤抗原。由于其性质，对分枝杆菌细胞壁提取物的这种反应可不受控制地进行。用热杀灭全细胞母牛分枝杆菌和奥布分枝杆菌预处理产生更复杂的免疫力，不仅包括发生固有免疫力和 1 型免疫力，还产生更有效恢复合适的免疫功能的免疫调节。

[0036] 免疫原性细胞死亡疗法优选地对转移性癌细胞或组织而非原发性肿瘤进行。转移性癌细胞是已从原发性肿瘤扩散的那些癌细胞。进行治疗的目的是导致肿瘤破坏，使得释放出可随后被免疫系统识别的肿瘤抗原。因此，治疗可在足以诱导轻微细胞损伤的亚致死水平上进行。转移性癌细胞或组织可存在于与原发性肿瘤不同的器官或部位中。

[0037] 转移癌可使用本领域的常规技术进行鉴定，包括实验室检验、X 射线、计算机断层 (CT) 扫描、磁共振成像 (MRI) 扫描和正电子发射断层 (PET) 扫描或它们的组合。

[0038] 治疗不必导致根治，但是可致力于破坏一定比例的细胞或组织，以触发免疫反应，例如，治疗可导致一定比例的转移性癌细胞或组织坏死。就这一点而言，这些技术可在亚最佳条件下采用，从而只需要破坏一定比例的细胞或组织。

[0039] 在破坏肿瘤组织之前和 / 或之后，可以约 2 周或约 4 周或约 8 周的间隔以多个（重复）剂量（例如两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、十个或更多个或二十个或更多个重复剂量）施用有效量的免疫调节剂，例如全细胞分枝杆菌。

[0040] 或者，可与施用有效量的免疫调节剂（例如全细胞分枝杆菌）同时地进行免疫原性细胞死亡疗法。

[0041] 在另外的实施方案中，可在施用有效量的免疫调节剂（例如全细胞分枝杆菌）后进行免疫原性细胞死亡疗法。

[0042] 在另外的实施方案中，可在施用有效量的免疫调节剂（例如全细胞分枝杆菌）后进行或施用免疫原性细胞死亡疗法。

[0043] 在另外的实施方案中，可在施用有效量的分枝杆菌前进行或施用免疫原性细胞死亡疗法。

[0044] 可通过肠胃外、口、舌下、鼻腔或肺部途径向患者使用免疫调节剂。在优选的实施方案中，通过选自皮下、真皮内、真皮下、腹膜内、静脉内和囊内注射的肠胃外途径施用免疫调节剂。更优选地，通过肠胃外途径施用不包括瘤内注射分枝杆菌细胞壁提取物。

[0045] 免疫原性细胞死亡疗法可包括使肿瘤组织物理变性或破坏的任何方式，包括肿瘤消融。消融可涉及任何被设计用于以对周围正常组织的轻微损害而破坏恶性组织的微创技术。这些技术在最近几年已受到了广泛的关注，因为它们可能降低成本、降低发病率并用于门诊。另外，与手术切除相对，肿瘤复发可通过这些较新的消融疗法容易地治疗。在优选的

实施方案中,消融肿瘤破坏疗法可选自微波照射、射频消融、靶向放疗、栓塞术、冷冻疗法、超声、高强度聚焦超声、射波刀、热疗法、冷冻消融、电刀加热、热水注射、醇注射、栓塞、包括铯-131 短距离放射治疗(内放疗)粒子的辐射暴露、光动力疗法、激光束照射以及它们的组合。然而,物理变性或破坏的方式不限于这些实例,并且可以使用可诱导肿瘤组织中的肿瘤细胞的免疫原性细胞死亡的任何方式。更优选地,可适当地联合两种或更多种消融肿瘤疗法。物理变性或破坏肿瘤组织的方式优选地导致至少一部分肿瘤细胞坏死或凋亡。物理变性或破坏肿瘤组织的方式可导致对至少一部分肿瘤细胞或组织的亚致死损伤。

[0046] 在尤其优选的实施方案中,免疫原性肿瘤细胞死亡疗法的方式包括照射,包括电离辐射,诸如 γ 射线、UV-C 照射、靶向辐射等。

[0047] 在另一个实施方案中,该疗法包括与免疫调节剂的施用组合的照射,包括电离辐射,诸如 γ 射线、UV-C 照射、靶向辐射等,其中对辐射的剂量进行划分。合适的照射剂量方案包括单个全剂量或约 3 个部分,每个部分包含全剂量的约 40% 或更多,或约 5 个部分,每个部分包括全剂量的约 30% 或更多,或本领域技术人员已知的剂量和部分。

[0048] 在另一个尤其优选的实施方案中,免疫原性细胞死亡疗法的方式包括与免疫调节剂的施用组合的照射,包括电离辐射,诸如 γ 射线、UV-C 照射、靶向辐射等,从而导致异位效应。

[0049] 电离辐射可减缓辐射场之外的肿瘤生长,称为异位效应(来自拉丁文 "abscopus")、“远离靶标”。虽然其已在多种恶性肿瘤中有所报道,但是异位效应仍是一种罕见的且知之甚少的事件。它们的罕见发生反映了这样一种事实:标准放疗自身不足以推翻既定肿瘤微环境的现有免疫抑制特性。

[0050] 异位效应定义为在辐射场之外任何可测量的病变中的可测量响应,如通过 PET-CT 所评估。

[0051] 具体地讲,放疗导致肿瘤内信号的上调或释放,这些信号涉及树突细胞(DC)向肿瘤的迁移、肿瘤抗原的摄取以及成熟。这些抗原负载 DC 迁移到区域淋巴结并激活能够破坏肿瘤的肿瘤抗原特异性 T 细胞。最后,放疗可消除调节性免疫细胞群,否则这些细胞群将会阻碍有效的抗肿瘤 T 细胞反应的发生(Morse 等,评论;Oncology:2008 年 8 月,第 22 卷第 9 期)。

[0052] 在另一个优选的实施方案中,免疫原性细胞死亡疗法的方式包括与免疫调节剂的施用组合照射,包括电离辐射,诸如 γ 射线、UV-C 照射、靶向辐射等,从而导致异位效应,如通过局部肿瘤和/或远侧转移的消退所证实。

[0053] 在另一个尤其优选的实施方案中,本发明提供在打算与施用免疫调节剂同时、分开或按顺序接受免疫原性细胞死亡疗法(通过射波刀)的患者中治疗增生性疾病(任选地治疗结直肠癌或其转移癌)而使用的免疫调节剂。

[0054] 根据本发明的合适的剂量计划包括在所述消融或免疫原性细胞死亡疗法前 2 周和当天施用免疫调节剂,然后在 2 周和 4 周后施用另外剂量的所述免疫调节剂。另外剂量的免疫调节剂可以每周或每两周的间隔诸如在第 8 周、10 周和 12 周施用。优选地,在消融或免疫原性细胞死亡疗法后 16 周时继续施用免疫调节剂,并在之后每 4 周重复一次,直到给予第一剂量后 12 个月。

[0055] 在一些情况下,免疫原性细胞死亡疗法可能需要开放手术以暴露肿瘤,但是大多

数可通过腹腔镜或经由皮肤以低风险进行。除了节省成本外,经皮途径具有在有意识的镇静下开展的潜力,从而进一步降低可能的发病率。

[0056] 射频消融(RFA)和冷冻消融主要用于肝脏肿瘤,是一种需要插入探头的侵入性手术,且并非没有风险。除了直接破坏肿瘤外,还存在强有力的证据表明该手术产生抗肿瘤免疫反应。(Napoletano等,Int J Oncol2008 ;32 :481-490)。

[0057] RFA、激光和微波消融均通过热疗损伤而产生组织死亡。RFA通过使用射频范围(460-500kHz)内的交变电流而产生热损伤。周围组织中的后续离子搅动(ionic agitation)导致摩擦热,其随后通过传导从电极向外扩散。在美国销售的合适RF装置可来自RITA Medical Systems Inc., Mountain View, CA 和 Radiotherapeutics, Mountain View, CA。这些装置由针与可拆卸针座构成,所述针座以径向方式将可变数量的弯曲电极部署到相邻组织中。多个电极的构造被设计来产生大球形热损伤。另外的装置(Radionics, Burlington, MA)由直的、内部冷却的针电极构成。内部冷却被设计成防止相邻的组织炭化并因而防止较大的热损伤。其他合适的设备包括计算机辅助射频发生器(Elektrotom 106 HF, Berchtold, Tuttlingen, Germany),其任选地采用水冷治疗探针(Cool-Tip, ValleyLab, Boulder, CO)。RFA针诸如具有8mm有效尖端的那些(SMK-15 ;Cotop, Amsterdam, the Netherlands)可与RF消融发生器系统(型号RFG-3B ;Radionics, Burlington, MA)结合使用。治疗优选地在某些肿瘤或转移中导致75-80℃或甚至高于100℃的尖端温度。如果尖端的温度低于50℃,则优选地进行在相同位置的另一消融。

[0058] 在通过激光诱导的热疗导致肿瘤损伤后肿瘤抗原的泄漏由以下观察结果的支持:在治疗后,存在细胞毒性T细胞反应的增强。在对患有结直肠癌肝转移的11名患者进行的研究中,治疗明显增加了CD3+、CD4+和CD8+T细胞对异种肿瘤细胞系的溶胞活性(Vogl等, Cancer Immunol Immunother 2009 ;58 :1557-1563)。还已表明, SABR通过在存在DAMP(诸如热休克蛋白)的情况下诱导肿瘤抗原泄漏而形成一种导致抗肿瘤免疫反应增强的环境(Finkelstein等, Clin and Dev Immunol ;第2011卷 :ID439752)。我们认为,这些效应可通过与免疫治疗剂联合递送低剂量照射而加以诱导,所述免疫治疗剂将建立对肿瘤的自持、长期免疫反应并促进抗肿瘤免疫力。

[0059] 任何RFA技术的严重并发症比较罕见,但大多数系列报道了少量患者存在轻微并发症,不需要特定的治疗。在所报道的并发症之中,最常见的是疼痛,但其通常为短期的。其他报道的并发症包括发烧、腹膜内和肝内出血、胆道出血、胸腔积血、膈肌损伤、胸膜积液、胆囊炎、转氨酶水平升高和针道出血(needle track seeding)。

[0060] 立体定向消融放疗(SABR)可在本发明中用作一种形式的物理肿瘤破坏,以诱导免疫原性肿瘤细胞死亡。SABR是一种对躯干中的肿瘤的放射外科手术形式。有时也称为立体定向体部放射治疗或SBRT的SABR已显示出用于治疗不能动手术的和可动手术的1期非小细胞肺癌(NSCLC)的前景。有效的放射手术剂量在15-20Gy的范围内。用于进行立体定向放射治疗的系统和方法是本领域已知的,并例如在1993年5月4日授予Adler的美国专利号5,207,223以及在1995年10月17日授予Schweikard的美国专利号5,458,125中有所公开,这些专利整体以引用方式并入本文。

[0061] 微波消融可用作产生组织热凝固的替代方式,涉及使用微波引起超高速(2450MHz)交变电场,从而导致水分子的旋转。与RFA一样,微波消融涉及将针电极直接置

入靶肿瘤。合适的设备包括 Acculis 微波组织消融 (MTA) 系统 (得自 Microsulis Medical), 其在 2.45GHz 下运行并与射频消融 (RFA) 装置和低功率 915MHz 微波系统相比是一种非常强效的设备。该系统可选一系列针状施加装置, 以最大程度增加其可用程序的类型: 开放式、腹腔镜式和经皮。微波能量从施加装置的顶端发出, 并被周围的组织吸收。吸收深度取决于微波频率和功率。这通过 Sulis VpMTA 发生器加以控制。在 2.45GHz 下, 能量将穿入组织 2cm。这是主动微波加热区。在主动微波加热区内部, 微波使水分子旋转, 从而导致它们快速加热。来自主动微波加热区的热然后向外传导, 从而形成二级热传导加热区。这使治疗完成。凝固区主要为球形, 在施加装置的轴的方向上略微伸长。通过选择功率和时间, 使用者可控制凝固区的产生的大小和速率。主动微波加热在靶区内形成可见蒸汽, 并且这可通过术中超声或 CT 成像而实时监控, 从而得到实时控制。

[0062] 已报道的微波消融并发症与对于 RFA 所报道的那些相似, 并通常较轻, 包括疼痛、发烧、肝脏酶升高、腹水 / 胸膜积液、隔膜损伤和针道出血。

[0063] 在可供选择的实施方案中, 可以使用激光消融。该技术使用钕钇铝石榴石 (Nd-YAG) 激光器向靶病变递送高能光。光随后在组织内发散, 从而转化成熟。将光纤通过经由皮肤放置的针而置入肿瘤。可以规则的间距将多根光纤插入肿瘤, 以扩大坏死区。治疗时间可以变化, 但对于大的消融可超过 1 小时。另一种替代形式是病灶激光消融 (FLA), 其被定义为通过激光对组织的热破坏。FLA 的作用基于光热效应; 热作用通过在非常短的时间 (几秒) 内诱导热能的组织接受发色团对辐射能的吸收而产生。该增加的温度可导致不可逆的损伤和远程体内破坏。热效应取决于递送的热能的量, 但也取决于光分布的深度。因此, 深层组织损伤取决于所用激光的波长。由于水或血红蛋白的弱吸收, 通常将 590 与 1064nm 之间的波长用于获得较深的组织穿透。热组织损伤的延伸同时取决于温度和加热持续时间。细胞活力与多种关键蛋白的热稳定性相关。不可逆的蛋白变性可在约 60°C 发生, 而在超过 60°C 时, 凝固几乎瞬间发生, 在用于本发明的优选温度范围 42 与 60°C 之间, 通过较长的加热周期获得热损伤。接受低于 60°C 的超生理热疗的区域将在治疗后 24 至 72h 内发生凝固性坏死。

[0064] 冷冻消融可用作通过加热导致对组织的热损伤的替代形式。冷冻消融通过在其中循环冷冻剂的探针递送冰点下温度而破坏组织。细胞死亡由直接冷冻、细胞蛋白变性、细胞膜破裂、细胞脱水和缺血性缺氧而产生。虽然冷冻可能产生所有热技术之中最大的消融, 但是最常见的实用形式的程序需要全身麻醉和剖腹手术以放置探针。冷冻消融可在约零下 40 摄氏度或约零下 60 摄氏度的温度下进行, 或可使用液氮 (-170 摄氏度) 进行并通过采用 Cryobar 设备 (Tori) 的接触方法而施加。在冷冻消融期间, 冷冻 / 未冻肝脏的界面可通过术中超声借助具有后方声影的回波边缘的出现而容易地评估, 这是冷冻消融相比 RFA 的一个优点。因此, 在某些实施方案中, 冷冻消融是相比于热方法诱导免疫原性肿瘤细胞死亡的优选方法。

[0065] 冷冻消融的并发症率可高于 RFA, 但冷冻消融可不受病变大小的限制。此外, 存在以下证据: 肺炎可能是冷冻消融特有的并发症, 并可能与消融组织的解冻期相关。

[0066] 在可供选择的实施方案中, 乙醇消融可用作消融疗法。经皮乙醇注射 (PEI) 的开展相对简单, 并且是最便宜的, 仅需要很少的设备。PEI 通过经由皮肤直接置入肿瘤的针注射无水乙醇而进行。通过注射乙醇而产生的坏死由细胞脱水和血管栓塞导致的组织缺血而

产生。乙醇消融也可考虑用于之前通过替代微创技术管理的复发性或部分治疗的疾病。治疗禁忌除了门静脉主干血栓形成外还包括上文针对 RFA 提及的那些。患有梗阻性黄疸的患者出现诸如胆汁性腹膜炎的并发症的风险也可能升高。与前述技术一样,乙醇的完全消融率对于小肿瘤更高。

[0067] 栓塞是用于治疗肝脏肿瘤的成熟技术。栓塞是一种血管内技术(在血管内部进行)以阻断肿瘤的血管。栓塞使用导管和血管造影技术进行。对于栓塞术,将极小的导管从交叉拱直接穿入例如脑、头颈或脊柱周围的肿瘤血管。在 X 射线引导下,将材料通过导管注入以永久性阻断并关闭肿瘤血管。所用的材料包括粒子和小铂线圈。栓塞剂的选择由风险与疗效之间的平衡决定。较小的粒子(45-150 微米)和液体栓塞剂(丁氰酯、乙醇、乙烯-乙烯醇)更好地穿透组织并实现更程度的坏死。操作者对栓塞剂的选择由风险与疗效之间的平衡决定。微粒的临界尺寸通常被考虑为高于 150 微米。在一项研究中,对肿瘤抗原甲胎蛋白的表位特异的 CD4+T 细胞群在栓塞过程中和之后明显扩增(Ayaru 等, J Immunol. 2007 ;178 :1914-1922)。这些 T 细胞产生 Th1 细胞因子 (IFN- γ 和 TNF- α) 而非 Th2 细胞因子 IL-5 并且作者得出结论:这些结果提供了将栓塞与免疫疗法相结合的基本原理。在另一项研究中(Zerbini 等, Cancer Res 2006 ;66 :1139-1146),在栓塞后一个月在患者中证实了增加的 Th2 细胞数,并且细胞具有增加的细胞毒性活性标记物的表达。但是,这些 T 细胞未能防止疾病的复发,并且一名患者出现了新的结节,其抗原未能被 T 细胞识别,从而表明免疫逃逸。因此,需要维持免疫识别的另外的免疫治疗策略。

[0068] 在又一个实施方案中,可将光动力疗法用作消融疗法。光动力疗法涉及向受试者施用有效量的光敏剂,并用被所述光敏剂吸收的光对所述受试者进行照射。光敏剂的有效量可在 0.05 至 10mg/kg、或 0.05 至 1mg/kg、或 1 至 10mg/kg 的范围内。在用于癌症治疗的 PDT 的第一步中,将光敏剂注入血流。光敏剂被全身细胞吸收,但留在癌细胞中的时间长于留在正常细胞中的时间。在注射后大约 24 至 72 小时,此时大部分光敏剂离开正常细胞而留在癌细胞中,将肿瘤暴露于光。肿瘤中的光敏剂吸收光并产生破坏附近癌细胞的活性形式的氧。除了直接杀灭癌细胞外, PDT 似乎以两种其他方式收缩或破坏肿瘤。光敏剂可破坏肿瘤中的血管,从而防止癌症接收必需的营养物。如本发明中所需, PDT 还激活免疫系统以攻击肿瘤细胞。用于 PDT 的光可来自激光器或其他来源。激光可通过纤维光缆(传输光的细纤维)引导以将光递送到体内的区域。例如,纤维光缆可通过内窥镜(用于观察体内组织的薄细照亮管)插入肺部或食道以治疗这些器官中的癌症。其他光源包括发光二极管(LED),其可用于表面肿瘤,例如皮肤癌。

[0069] 光敏剂可经静脉内或肿瘤内施用,并且照射优选地局限于肿瘤。合适的光敏剂包括苯并卟啉衍生物(BPD),例如 BPD-MA、EA6 或 B3 或绿卟啉。此类光敏剂可在脂质体制剂中配制。

[0070] 将经历根据本发明的免疫原性肿瘤细胞死亡或消融肿瘤破坏疗法的患者可与施用免疫调节剂同时、分开或按顺序地进行所述细胞死亡或疗法。优选地,在肿瘤组织的物理肿瘤破坏疗法之前向患者施用免疫调节剂。更具体地讲,可在肿瘤破坏疗法之前约 4 周与 1 周之间向患者施用免疫调节剂。优选地,可作为可在肿瘤破坏疗法之前约 4 周与 1 周之间的一个或多个时间间隔施用的一个或多个等分样(每一个包含有效量的免疫调节剂)施用免疫调节剂,和/或可在所述疗法之后施加免疫调节剂。甚至更优选地,可作为可在肿瘤破

坏疗法之后 4 周与 1 周之间的一个或多个时间间隔施用的一个或多个等分样（每一个包含有效量的免疫调节剂）施用免疫调节剂，和 / 或可在所述疗法之后施加免疫调节剂，并在所述疗法之前或之后至少约 2、4、6、8、10、12、15、20 或更多个场合进行重复。

[0071] 在本发明的一个实施方案中，免疫调节剂可以是以如实施例中所示的剂型和 / 或方案施用给患者的药剂的形式。

[0072] 在本发明的一个方面，可作为单剂量施用有效量的免疫调节剂。或者，可以多个（重复）剂量例如两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、十个或更多个、或二十个或更多个重复剂量施用有效量的免疫调节剂。优选地，在肿瘤组织的肿瘤破坏疗法之前约 4 周与 1 天之间施用免疫调节剂，更优选地在约 4 周与 1 周之间，或约 3 周与 1 周之间，或约 3 周与 2 周之间。施用可以单剂量或多剂量的方式呈现。

[0073] 在某些情况下根据本发明的容器可以为小瓶、安瓿、注射器、胶囊、片剂或管。在一些情况下，可将分枝杆菌冻干并配制以在施用前重悬。然而，在其他情况下，将分枝杆菌悬浮在一定体积的药理学上可接受的液体中。在一些最优选的实施方案中，提供一种容器，其容纳悬浮在药理学上可接受的载体中的单一单位剂量的分枝杆菌，其中单位剂量包含约 1×10^6 至约 1×10^{10} CFU 的分枝杆菌。在一些非常具体的实施方案中，以约 0.1ml 与 10ml、约 0.3ml 与 2ml 或约 0.5ml 与 2ml 之间的体积提供包含悬浮的分枝杆菌的液体。还将理解的是，在某些情况下，对在容纳装置中包含分枝杆菌的组合物进行冷冻（即，维持在低于约零摄氏度下）。前述组合物提供用于本文所述的免疫治疗应用的理想单元。

[0074] 在本发明的方法和 / 或组合物的背景下所讨论的实施方案可相对于本文所述的任何其他方法或组合物使用。因此，涉及一种方法或组合物的实施方案也可适用于本发明的其他方法和组合物。

[0075] 在一些情况下，将热杀灭的分枝杆菌施用到受试者体表上或受试者体内的具体部位。例如，根据本发明的分枝杆菌组合物（诸如尤其是包含奥布分枝杆菌的那些组合物）可靠近肿瘤或靠近淋巴结（诸如引流肿瘤周围组织的那些淋巴结）施用。因此，在某些情况下，分枝杆菌组合物的施用部位可以在颈后、扁桃体、腋窝、腹股沟、颈前、下颌下、颌下或锁骨上淋巴结附近。此类施用部位可在身体右侧、左侧或两侧上。在某些非常具体的实施方案中，靠近腋窝、颈和 / 或腹股沟淋巴结递送分枝杆菌组合物。例如，分枝杆菌剂量可分布到靠近左右腋窝淋巴结和左右腹股沟淋巴结的组织中。

[0076] 在一个非常具体的实施方案中，通过皮内注射将分枝杆菌剂量施用给受试者，其中剂量在身体两侧分布到腋窝和腹股沟，并且其中在每个部位存在两次注射（即，两个风团（wheal））。

[0077] 在本发明的一些另外的实施方案中，本发明的方法涉及施用间隔一天或更长时间的 2、3、4、5、6、7、8、9、10 剂或更多剂分枝杆菌。在某些优选的实施方案中，此类分开的剂量将间隔几天、一周、两周、一个月或更长。例如，根据本发明的方法可包括经一段三周或更长的时间施用 1 至 5 剂分枝杆菌。在另外其他实施方案中，本发明的方法包括经一段约三周的时间施用 1 至 5、1 至 4、1 至 3、1 至 2 或 2 剂分枝杆菌。所施用的每一剂可以是相对于之前或之后的施用剂量相同或不同的剂量。例如，在某些情况下，优选的是，分枝杆菌的剂量低于之前施用的任何剂量。因此，在一些具体的情况下，热杀灭分枝杆菌的剂量将按任何之前治疗中所施用的剂量的大约一半进行施用。此类方法在某些情况下可以是优选的，在这些

情况中,受试者对分枝杆菌的免疫反应在后续治疗过程中更大。因此,在某些情况下,可以最少的次数施用免疫调节剂,例如,以少于 10、9、8、7、6、5、4、3 或更少的单独剂量施用。在一些情况下,将分枝杆菌组合物施用两次。或者,免疫调节剂的施用可以持续癌症或肿瘤存在于患者中的时长或直到癌症消退或稳定的时间。免疫调节剂还可以在癌症或肿瘤消退或稳定后继续施用给患者。

[0078] 根据本发明的分枝杆菌组合物将包含有效量的通常溶于或分散于药学上可接受的载体中的分枝杆菌。短语“药学上或药理学上可接受的”是指当酌情施用给动物诸如人时不产生有害、过敏或其他不良反应的分子实体和组合物。按照本公开,包含分枝杆菌的药物组合物的制备将是本领域技术人员已知的,如 Remington' s Pharmaceutical Sciences, 第 18 版 Mack Printing Company, 1990 中示例性示出。此外,对于动物(例如人类)施用,应当理解,制剂应当满足无菌性、致热原性、一般安全性和纯度标准。如本文所述的药理学上可接受的载体的具体实例为硼酸盐缓冲液或无菌盐水溶液(0.9% NaCl)。

[0079] 如本文所用,“药学上可接受的载体”包括如本领域普通技术人员已知的任何及所有溶剂、分散介质、包衣料、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(例如,抗菌剂、抗真菌剂)、等渗剂、吸收延迟剂、盐、防腐剂、药物、药物稳定剂、凝胶、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、矫味剂、染料、此类类似材料以及它们的组合(参见例如 Remington' s Pharmaceutical Sciences, 第 18 版 Mack Printing Company, 1990, 1289-1329 页)。

[0080] 在优选的实施方案中,通过选自皮下、真皮内、真皮下、腹膜内、静脉内和囊内注射的肠胃外途径施用免疫调节剂。皮内注射使得能够将整个比例的分枝杆菌组合物递送到真皮层,该真皮层可接受免疫监督并因此能够引起抗癌免疫反应并促进局部淋巴结的免疫细胞增殖。

[0081] 虽然在本发明的高度优选的实施方案中通过直接皮内注射施用分枝杆菌组合物,但是还设想了在一些情况下可以使用其他施用方法。因此,在某些情况下,本发明的热杀灭分枝杆菌可通过注射、输注、连续输注、经静脉内、皮内、动脉内、腹膜内、病灶内、玻璃体内、阴道内、直肠内、外用、瘤内、肌内、腹膜内、皮下、结膜下、囊内、粘膜、心包内、脐内、眼内、口、颅内、关节内、前列腺内、胸膜内、气管内、鼻内、外用、局部、吸入(例如气溶胶吸入)、经由导管、经由灌洗或通过其他方法或前述方法的任何组合而施用,如本领域的普通技术人员所已知(参见例如 Remington' s Pharmaceutical Sciences, 第 18 版 Mack Printing Company, 1990)。更优选地,通过肠胃外途径施用不包括瘤内注射分枝杆菌细胞壁提取物。

[0082] 在上述说明书中提到的所有出版物均以引用方式并入本文。本发明的所述方法和系统的各种修改形式和变型形式将在不脱离本发明范围和精神的情况下对本领域的技术人员显而易见。虽然已结合具体优选实施方案对本发明进行了描述,但是应当理解,如要求保护的本发明不应不当地限于此类具体实施方案。实际上,对生物化学和免疫学或相关领域技术人员显而易见的对用于实践本发明的所述模式的各种修改旨在落在以下权利要求书的范围内。

[0083] 参照以下非限制性实施方案进一步描述本发明。

[0084] 实施例 1

[0085] 为了探究本发明,我们在雌性 Balb/c 小鼠中进行了一项研究,这些小鼠经皮下注射了 Renca 肿瘤细胞接种体并用与 IMM-101(奥布分枝杆菌,粗菌株,热杀灭的)组合的照

射疗法进行治疗。

[0086] 简而言之,将成年小鼠维持在处于受控温度 ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$)、湿度 ($45\pm 10\%$) 和光周期 (12h 光照 /12h 黑暗) 的 SPF 条件下。向它们随意提供水和食物。对各只小鼠贴上标签以便识别。在第 0 天,小鼠在其右腰窝经皮下接受了在 0.2ml 体积的 RPMI 1640 培养基中的 10^5 个 Renca 肿瘤细胞接种体。每天监测肿瘤建立和生长。一旦肿瘤变得明显 (在第 25 天 $100\text{--}200\text{mm}^3$) 后,将小鼠随机分成三组。第 1 组不进行治疗。第 2 组和第 3 组接受以下治疗:第 2) 组:对肿瘤每两天进行两轮一次剂量为 2Gy/ 天的照射,总共三次照射 / 轮 (总照射剂量为 12Gy,计划 $[\text{Q2D}\times 3]\times 2$ 从第 25 天开始并在第 28、30、32、35 和 37 天继续);第 3) 组:如上所述的两轮照射,同时大约每两天皮下注射 IMM-101 (0.1mg),从第 25 天开始并在第 28、30、32、35、37、39、42 天等重复。

[0087] 每天监测动物,并通过卡尺对肿瘤的长度和宽度一周测量两次以估计肿瘤体积 ($1/2\times \text{长度}\times \text{宽度}^2$)。记录每只小鼠的个体体重和肿瘤体积。对数据作图,以跟踪三个治疗组中肿瘤体积随时间推移的变化 (图 1)。

[0088] 我们发现了,与对照未治疗的动物相比,接受照射和 IMM-101 的小鼠显示肿瘤体积的明显减小 (方差分析,Dunne's 比较)。这提供了以下证据:所述联合治疗提供改良的疗法和改善的生存预后。

[0089] 实施例 2

[0090] 根据表 1 中所述的方案,在患者中进行了对在患有之前接受了治疗的结直肠癌的患者中组合使用辐射诱导性免疫原性肿瘤坏死与热杀灭全细胞奥布分枝杆菌 (IMM-101) 制剂的调查研究。患者在建立基线的当天接受了一剂奥布分枝杆菌 IMM-101,并且插入基准种子 (fiducial seed) 需要射波刀能量的正确聚焦;使用射波刀技术诱导肿瘤坏死的后续 SBRT 在第 14 天与另一剂奥布分枝杆菌 (IMM-101) 一起施用。患者在第 28 天接受了另一剂奥布分枝杆菌 (IMM-101),然后在第 8 周与第 12 周之间 (包括第 8 周和第 12 周) 以每两周的间隔继续接受奥布分枝杆菌 (IMM-101) 剂量,于是将剂量频率在为期一年的研究的所有其余时间中降低到每月一次。然后在第 12 周和之后的每 12 周评估患者的肿瘤消退和疾病稳定。结果表明在第 12 周后肿瘤消退,并在初始应用射波刀后继续施用奥布分枝杆菌 (IMM-101) 第 24 周时疾病普遍稳定。

[0091]

CD4(+) T cell responses in hepatocellular carcinoma patients undergoing embolization. *J Immunol.* 2007 ;178 :1914-1922.

[0094] den Brok MH, Suttmuller RP, Nierkens S, et al. Efficient loading of dendritic cells following cryo and radiofrequency ablation in combination with immune modulation induces anti-tumour immunity. *Br J Cancer.* 2006a ;95 :896-905.

[0095] den Brok MH, Suttmuller RP, Nierkens S, et al. Synergy between in situ cryoablation and TLR9 stimulation results in a highly effective in vivo dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 2006b ;66 :7285-7292.

[0096] Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004 ;22 :329-360.

[0097] Dvorak HF. Tumors :wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986 ;315 :1650-1659.

[0098] Finkelstein et al. The Confluence of Stereotactic Ablative Radiotherapy and Tumor Immunology. *Clin and Dev Immunol* :vol 2011 :ID 439752.

[0099] Morse et al, An Odd But Synergistic Couple :Immunotherapy Comblned With Radiotherapy ;*Oncology* :Aug 2008. Vol. 22No. 9).

[0100] Napoletano C, Taurino F, Biffoni M, et al. RFA strongly modulates the immune system and anti-tumor immune responses in metastatic liver patients. *Int J Oncol* 2008 ;32 :481-490.

[0101] Tesniere A, Panaretakis T, Kepp O, et al. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ* 2008 ;15 :3-12.

[0102] Vakkila J, Lotze MT. Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat Rev Immunol* 2004 ;4 :641-648.

[0103] Vogl TJ, Wissniowski TT, Naguib NN, et al. Activation of tumor-specific T lymphocytes after laser-induced thermotherapy in patients with colorectal liver metastases. *Cancer Immunol Immunother* 2009 ;58 :1557-1563.

[0104] Zerbini A, Pilli M, Penna A, et al. Radiofrequency thermal ablation of hepatocellular carcinoma liver nodules can activate and enhance tumor-specific T-cell responses. *Cancer Res* 2006 ;66 :1139-1146.

[0105] Zeh HJ, Lotze MT. Addicted to death :invasive cancer and the immune response to unscheduled cell death. *J Immunother* 2005 ;28 :1-9.

[0106] Zitvogel L, Casares N, Pequignot MO, et al. Immune response against dying tumor cells. *Adv Immunol* 2004 ;84 :131-179.

[0107] Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, et al. The anticancer immune response : indispensable for therapeutic success ? *J Clin Invest* 2008 ;118 :1991-2001.

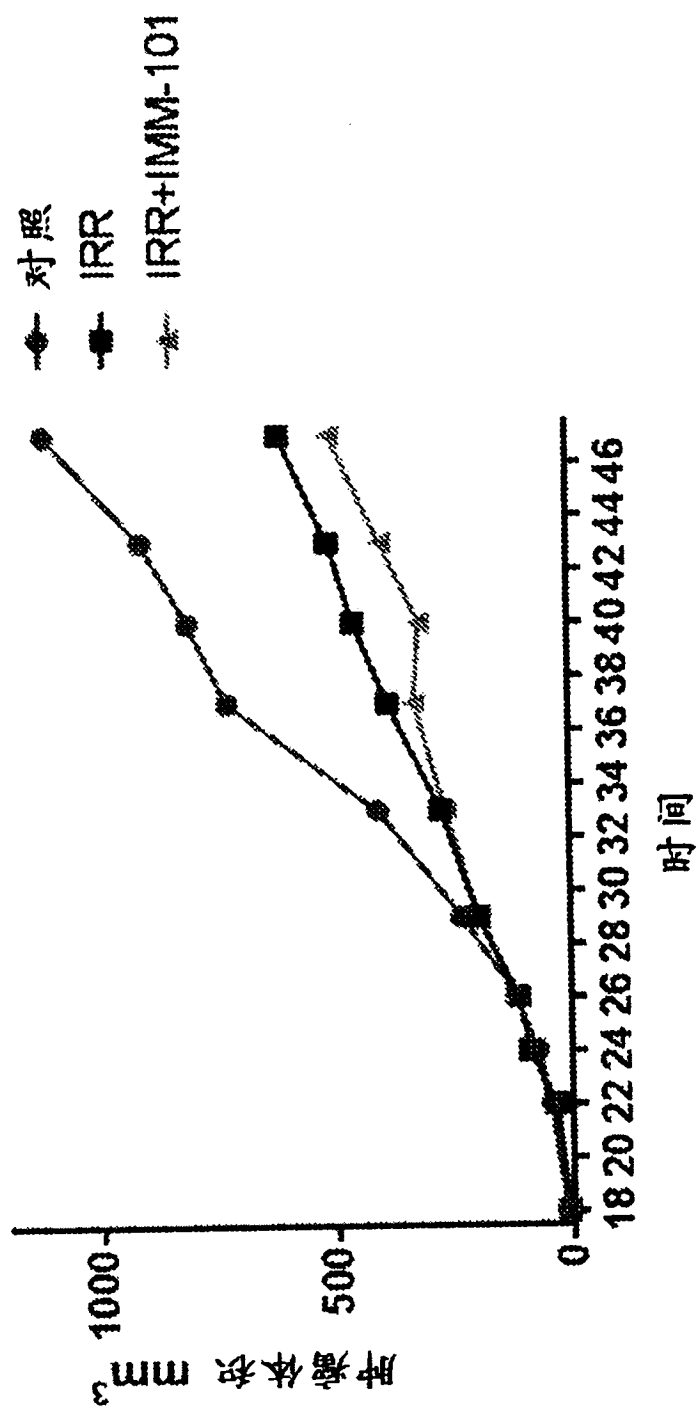


图 1