



(21) 申请号 202080013805.3

(22) 申请日 2020.01.16

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113574068 A

(43) 申请公布日 2021.10.29

(30) 优先权数据
62/792,996 2019.01.16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.08.11

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/013817 2020.01.16

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/150434 EN 2020.07.23

(73) 专利权人 艾宝奇生物工艺有限公司
地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 C·D·史密斯 L·W·迈恩斯

(74) 专利代理机构 北京市联德律师事务所
11361

专利代理师 黄大正 张来光

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101248041 A, 2008.08.20

US 2010015653 A1, 2010.01.21

WO 2017129769 A1, 2017.08.03

Josep M. Llovet等. Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma.《Nature Reviews Clinical Oncology》.2018,第15卷(第10期),599-616.

Lu Dai等. The sphingosine kinase 2 inhibitor ABC294640 displays anti-non-small cell lung cancer activities in vitro and in vivo.《International Journal of Cancer》.2018,第142卷(第10期),2153-2162.

(续)

审查员 李浩然

权利要求书1页 说明书32页 附图8页

(54) 发明名称

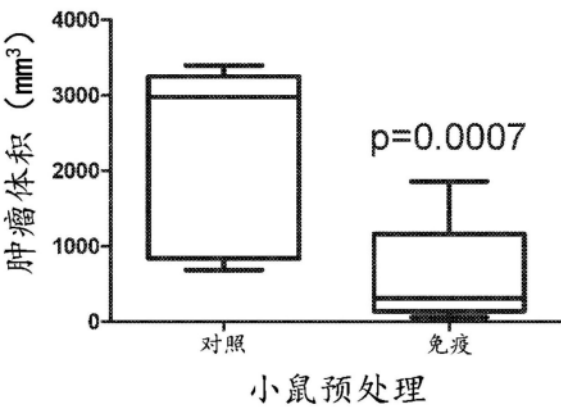
诱导抗癌免疫应答的方法

(57) 摘要

一种使用从患者收集的癌细胞制备免疫致敏癌细胞的方法包括用毒性浓度的改变鞘脂代谢的化合物离体处理所收集的癌细胞,其中毒性浓度足以诱导癌细胞中的免疫原性细胞死亡。在一个实施方案中,该化合物是3-(4-氯-苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺化合物或其药学上可接受的盐。在一个实施方案中,免疫致敏癌细胞在其表面上过表达钙网蛋白。在一个实施方案中,癌细胞是实体肿瘤细胞。在一个实施方案中,癌细胞是循环肿瘤细胞。在一个实施方案中,该方法还包括收获免疫致敏癌细胞的至少一部分;以及将所述细胞悬浮在磷酸盐缓冲盐水中。在一个实施方案中,该方法还包括将免疫致

敏癌细胞的至少一部分运输到患者护理点。

B16黑素瘤第14天



[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

Heather Venant等.The Sphingosine Kinase 2 Inhibitor ABC294640 Reduces the Growth of Prostate Cancer Cells and

Results in Accumulation of Dihydroceramides In Vitro and In Vivo.《Molecular Cancer Therapeutics》.2015,第14卷(第12期),2744-2752.

1. 一种药物组合物, 包含:

治疗有效量的SK2抑制剂, 所述SK2抑制剂是3-(4-氯苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺或其药学上可接受的盐; 以及

治疗有效量的检查点通路抑制剂, 其中所述检查点通路抑制剂是抗PD-L1抗体、抗PD-1抗体、抗CTLA4抗体或它们的组合。

2. 根据权利要求1所述的药物组合物, 其中所述抗PD-L1抗体和所述抗PD-1抗体是单克隆抗体。

3. 根据权利要求2所述的药物组合物, 其中所述单克隆抗体是人抗体或人源化抗体。

4. 根据权利要求1所述的药物组合物, 其中所述抗CTLA4抗体是单克隆抗体。

5. 根据权利要求4所述的药物组合物, 其中所述单克隆抗体是人抗体或人源化抗体。

6. 根据权利要求1所述的药物组合物, 其中所述3-(4-氯苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺还包含含有至少一种赋形剂的药学上可接受的载体。

7. 根据权利要求1所述的药物组合物, 所述药物组合物被包装用于同时、相继或分开施用。

8. 一种试剂盒, 包括:

SK2抑制剂, 所述SK2抑制剂是3-(4-氯-苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺或其药学上可接受的盐; 检查点通路抑制剂; 以及使用说明, 其中所述检查点通路抑制剂是抗PD-L1抗体、抗PD-1抗体、抗CTLA4抗体或它们的组合。

9. 根据权利要求8所述的试剂盒, 其中所述抗PD-L1抗体和所述抗PD-1抗体是单克隆抗体。

10. 根据权利要求9所述的试剂盒, 其中所述单克隆抗体是人抗体或人源化抗体。

11. 根据权利要求8所述的试剂盒, 其中所述抗CTLA4抗体是单克隆抗体。

12. 根据权利要求11所述的试剂盒, 其中所述单克隆抗体是人抗体或人源化抗体。

13. SK2抑制剂和检查点通路抑制剂用于制备治疗黑素瘤的药物的用途, 所述SK2抑制剂是3-(4-氯苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺或其药学上可接受的盐, 所述检查点通路抑制剂是抗PD-L1抗体、抗PD-1抗体或它们的组合。

14. 根据权利要求13所述的用途, 其中所述抗PD-L1抗体和所述抗PD-1抗体是单克隆抗体。

15. 根据权利要求14所述的用途, 其中所述单克隆抗体是人抗体或人源化抗体。

16. SK2抑制剂和检查点通路抑制剂用于制备治疗肺癌的药物的用途, 所述SK2抑制剂是3-(4-氯苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺或其药学上可接受的盐, 所述检查点通路抑制剂是抗CTLA4抗体。

17. 根据权利要求16所述的用途, 其中所述抗CTLA4抗体是单克隆抗体。

18. 根据权利要求17所述的用途, 其中所述单克隆抗体是人抗体或人源化抗体。

诱导抗癌免疫应答的方法

背景技术

[0001] 癌症是一类以异常细胞的失控生长和扩散为特征的疾病。存在许多不同类型的癌症治疗,包括传统疗法(诸如外科手术、化学疗法和放射疗法)、更新形式的治疗(靶向疗法)、以及补充和替代疗法。变得越来越显而易见的是,癌症依赖于多种变更的分子途径并且可对采用单一试剂的疗法产生各种不同的抗性机制。因此,联合方案可为具有持久效应的有效治疗提供最佳前景。

发明内容

[0002] 根据本文所展示的方面,公开了免疫原性细胞死亡(ICD)诱导剂,其包括毒性浓度的鞘氨醇激酶-2(SK2)选择性抑制剂。在一个实施方案中,SK2的选择性抑制剂是3-(4-氯-苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺化合物或其药学上可接受的盐。在一个实施方案中,3-(4-氯-苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺化合物或其药学上可接受的盐的毒性浓度为约35 μ M至约45 μ M。在一个实施方案中,将来自患者的癌细胞在体外用约35 μ M至约45 μ M的3-(4-氯-苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺化合物或其药学上可接受的盐进行处理,以便在癌细胞中导致充分的免疫原性细胞死亡(ICD)。这些致敏癌细胞可以用作癌症免疫疗法并且被施用回患者。在一个实施方案中,这些新植入的致敏癌细胞可以在患者体内未经处理的癌细胞中引起大规模ICD。

[0003] 根据本文所展示的方面,公开了使用从患者收集的癌细胞制备免疫致敏癌细胞的方法,该方法包括用毒性浓度的改变鞘脂代谢的化合物离体处理癌细胞,其中毒性浓度足以诱导癌细胞中的免疫原性细胞死亡。在一个实施方案中,改变鞘脂代谢的化合物是鞘氨醇激酶的抑制剂。在一个实施方案中,作为鞘氨醇激酶抑制剂的化合物是鞘氨醇激酶-2(SK2)的选择性抑制剂。在一个实施方案中,SK2的选择性抑制剂是3-(4-氯-苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺化合物或其药学上可接受的盐。在一个实施方案中,将所收集的癌细胞处理至少24小时。在一个实施方案中,SK2的选择性抑制剂的毒性浓度为约20 μ M至约60 μ M。在一个实施方案中,免疫致敏癌细胞在其表面上过表达钙网蛋白。在一个实施方案中,癌细胞是免疫细胞。在一个实施方案中,免疫细胞包括T细胞、自然杀伤(NK)细胞或树突状细胞。在一个实施方案中,癌细胞是血液癌细胞。在一个实施方案中,血液癌细胞是白血病细胞。在一个实施方案中,癌细胞是实体肿瘤细胞。在一个实施方案中,癌细胞是循环肿瘤细胞。在一个实施方案中,该方法还包括收获免疫致敏癌细胞的至少一部分并且将这些细胞悬浮在磷酸盐缓冲盐水中。在一个实施方案中,该方法还包括将免疫致敏癌细胞的至少一部分运输到患者护理点。在一个实施方案中,患者护理点是医院。在一个实施方案中,患者护理点是癌症中心。在一个实施方案中,该方法还包括将运输的免疫致敏癌细胞的至少一部分施用于患者以引发免疫应答。在一个实施方案中,免疫应答减缓或阻止患者中的癌症生长。在一个实施方案中,免疫应答阻止癌症在患者中转移。在一个实施方案中,免疫应答使得患者的免疫系统更有效地杀死癌细胞。在一个实施方案中,该方法还包括施用有效量的至少一种检查点抑制剂。

[0004] 根据本文所展示的方面,公开了在患者中诱导抗癌免疫应答的方法,包括从患者移除癌细胞并且用3-(4-氯-苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺化合物或其药学上可接受的盐离体处理这些细胞,该化合物或其药学上可接受的盐以足以诱导、增强或促进癌细胞中的免疫原性细胞死亡的量掺入药学上可接受的制剂中,然后将经处理的细胞施用回最初的患者以引发针对患者癌症的免疫应答。在一个实施方案中,患者的细胞是血液癌细胞,诸如白血病细胞。在一个实施方案中,患者的细胞是通过活检获得的实体肿瘤细胞或从患者血液分离的循环肿瘤细胞。

[0005] 根据本文所展示的方面,公开了将有效量的鞘氨醇激酶抑制剂和有效量的至少一种检查点抑制剂用于治疗受试者的癌症的方法中,所述至少一种检查点抑制剂选自以下项组成的组:CTLA-4受体抑制剂、PD-1受体抑制剂、PD-L1配体抑制剂、PD-L2配体抑制剂、LAG-3受体抑制剂、TIM-3受体抑制剂、BTLA受体抑制剂、KIR受体抑制剂或前述检查点抑制剂中的任何一些的组合。在一个实施方案中,检查点抑制剂是PD-L1/PD-1通路的抑制剂。在一个实施方案中,检查点抑制剂是CTLA-4的抑制剂。在一个实施方案中,癌症是化疗或放射线抗性癌症。在一个实施方案中,施用鞘氨醇激酶的抑制剂,然后在合适的时间段内施用另一种抑制剂。在一个实施方案中,鞘氨醇激酶抑制剂是鞘氨醇激酶-2的抑制剂。在一个实施方案中,鞘氨醇激酶-2的抑制剂是3-(4-氯-苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺(ABC294640)。在一个实施方案中,PD-L1/PD-1通路的抑制剂是抗PD-L1抗体、抗PD-1抗体或它们的组合。在一个实施方案中,抗PD-L1抗体或抗PD-1抗体是单克隆抗体。在一个实施方案中,单克隆抗体是人抗体或人源化抗体。在一个实施方案中,CTLA-4的抑制剂是抗CTLA-4抗体。在一个实施方案中,抗CTLA-4抗体是单克隆抗体。在一个实施方案中,单克隆抗体是人抗体或人源化抗体。

[0006] 根据本文所展示的方面,公开了治疗受试者的癌症的方法,包括向受试者施用有效量的鞘氨醇激酶(SK)抑制剂和有效量的检查点抑制剂。在一个实施方案中,检查点抑制剂可以是针对CTLA4的抗体(例如,伊匹单抗)或针对PD-1的抗体(例如,派姆单抗或纳武单抗)或针对PD-L1的抗体(例如,阿特珠单抗或度伐鲁单抗)。其他靶向这些通路的抗体或化学抑制剂也在本发明的范围内。例如,PD-L1通路的附加抑制剂包括BMS-936559、MPDL3280A、BMS-936558、MK-3475、CT-011或MEDI4736。

[0007] 根据本文所展示的方面,公开了治疗患者的癌症的方法,包括向患者施用有效量的鞘氨醇激酶抑制剂和下列中的至少一者:PD-L1/PD-1通路的抑制剂或CTLA-4抑制剂。在一个实施方案中,鞘氨醇激酶抑制剂是鞘氨醇激酶-2的抑制剂。在一个实施方案中,鞘氨醇激酶-2的抑制剂是3-(4-氯-苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺(ABC294640)。在一个实施方案中,PD-L1/PD-1通路的抑制剂是抗PD-L1抗体、抗PD-1抗体或它们的组合。在一个实施方案中,抗PD-L1抗体或抗PD-1抗体是单克隆抗体。在一个实施方案中,单克隆抗体是人抗体或人源化抗体。在一个实施方案中,CTLA-4的抑制剂是抗CTLA-4抗体。在一个实施方案中,抗CTLA-4抗体是单克隆抗体。在一个实施方案中,单克隆抗体是人抗体或人源化抗体。

[0008] 根据本文所展示的方面,公开了治疗有需要的患者的黑素瘤的方法,包括向该患者施用有效量的鞘氨醇激酶抑制剂和CTLA-4抑制剂。在一个实施方案中,鞘氨醇激酶抑制剂是鞘氨醇激酶-2的抑制剂。在一个实施方案中,鞘氨醇激酶-2的抑制剂是3-(4-氯-苯

基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺(ABC294640)。在一个实施方案中,CTLA-4的抑制剂是抗CTLA-4抗体。在一个实施方案中,抗CTLA-4抗体是单克隆抗体。在一个实施方案中,单克隆抗体是人抗体或人源化抗体。在一个实施方案中,治疗黑素瘤被进一步定义为减小肿瘤的尺寸或抑制肿瘤的生长。在一个实施方案中,将抑制剂施用于对其有需要的患者至少两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次或十次。在一个实施方案中,对患者进一步施用第二癌症疗法。在一个实施方案中,第二癌症疗法包括外科手术、放射疗法、化学疗法、毒素疗法、免疫疗法、冷冻疗法或基因疗法。在一个实施方案中,黑素瘤是化疗或放射线抗性黑素瘤。

[0009] 根据本文所展示的方面,公开了治疗有需要的患者的黑素瘤的方法,包括向该患者施用有效量的鞘氨醇激酶抑制剂和PD-L1/PD-1通路的抑制剂。在一个实施方案中,鞘氨醇激酶抑制剂是鞘氨醇激酶-2的抑制剂。在一个实施方案中,鞘氨醇激酶-2的抑制剂是3-(4-氯-苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺(ABC294640)。在一个实施方案中,PD-L1/PD-1通路的抑制剂是抗PD-L1抗体、抗PD-1抗体或它们的组合。在一个实施方案中,抗PD-L1抗体或抗PD-1抗体是单克隆抗体。在一个实施方案中,单克隆抗体是人抗体或人源化抗体。在一个实施方案中,治疗黑素瘤被进一步定义为减小肿瘤的尺寸或抑制肿瘤的生长。在一个实施方案中,将抑制剂施用于患者至少两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次或十次。在一个实施方案中,对患者进一步施用第二癌症疗法。在一个实施方案中,第二癌症疗法包括外科手术、放射疗法、化学疗法、毒素疗法、免疫疗法、冷冻疗法或基因疗法。在一个实施方案中,黑素瘤是化疗或放射线抗性黑素瘤。

[0010] 根据本文所展示的方面,公开了治疗有需要的患者的黑素瘤的方法,包括向该患者施用有效量的3-(4-氯-苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺(ABC294640)和PD-L1通路的抑制剂。

[0011] 根据本文所展示的方面,公开了治疗患有肺癌的患者的方法,包括向对其有需要的患者施用治疗有效量的抗癌剂,该抗癌剂是与PD-1受体特异性结合并且抑制PD-1活性的抗体或其抗原结合部分(“抗PD-1抗体或其抗原结合部分”),其通过少于60分钟的输注,与口服施用的鞘氨醇激酶抑制剂结合施用。在一个实施方案中,鞘氨醇激酶抑制剂是鞘氨醇激酶-2的抑制剂。在一个实施方案中,鞘氨醇激酶-2的抑制剂是3-(4-氯-苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺(ABC294640)。

[0012] 根据本文所展示的方面,公开了用于治疗患有肺癌的患者的方法,包括向对其有需要的患者施用固定剂量的治疗有效量抗癌剂,该抗癌剂是与PD-1受体特异性结合并且抑制PD-1活性的抗体或其抗原结合部分,其与口服施用的治疗有效量的鞘氨醇激酶抑制剂结合施用。在一个实施方案中,鞘氨醇激酶抑制剂是鞘氨醇激酶-2的抑制剂。在一个实施方案中,鞘氨醇激酶-2的抑制剂是3-(4-氯-苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺(ABC294640)。

[0013] 根据本文所展示的方面,公开了治疗患者的肺癌的方法,包括向对其有需要的患者施用有效量的鞘氨醇激酶抑制剂和抗CTLA-4抑制剂。在一个实施方案中,鞘氨醇激酶抑制剂是鞘氨醇激酶-2的抑制剂。在一个实施方案中,鞘氨醇激酶-2的抑制剂是3-(4-氯-苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺(ABC294640)。在一个实施方案中,抗CTLA-4的抑制剂是抗CTLA-4抗体。在一个实施方案中,抗CTLA-4抗体是单克隆抗体。在一个实施方案

中,单克隆抗体是人抗体或人源化抗体。在一个实施方案中,抗CTLA-4单克隆抗体是伊匹单抗。在一个实施方案中,治疗肺癌被进一步定义为减小肿瘤的尺寸或抑制肿瘤的生长。在一个实施方案中,将抑制剂施用于患者至少两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次或十次。在一个实施方案中,对患者进一步施用第二癌症疗法。在一个实施方案中,第二癌症疗法包括外科手术、放射疗法、化学疗法、毒素疗法、免疫疗法、冷冻疗法或基因疗法。

[0014] 根据本文所展示的方面,公开了治疗有需要的患者的肺癌的方法,包括向该患者施用有效量的3-(4-氯-苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺(ABC294640)和抗CTLA-4的抑制剂。在一个实施方案中,抗CTLA-4的抑制剂是抗CTLA-4抗体。在一个实施方案中,抗CTLA-4抗体是单克隆抗体。在一个实施方案中,抗CTLA-4单克隆抗体是伊匹单抗。

[0015] 根据本文所展示的方面,公开了用于制备细胞以产生免疫原性细胞死亡的试剂盒。该试剂盒包括毒性浓度的改变鞘脂代谢的化合物,其中毒性浓度足以诱导癌细胞中的免疫原性细胞死亡;以及一组使用说明。在一个实施方案中,改变鞘脂代谢的化合物是鞘氨醇激酶的抑制剂。在一个实施方案中,作为鞘氨醇激酶抑制剂的化合物是鞘氨醇激酶-2(SK2)的选择性抑制剂。在一个实施方案中,SK2的选择性抑制剂是3-(4-氯-苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺化合物或其药学上可接受的盐。在一个实施方案中,SK2的选择性抑制剂的毒性浓度为约20 μ M至约60 μ M。

[0016] 根据本文所展示的方面,公开了用于治疗肿瘤的试剂盒。该试剂盒可以包括至少一种检查点抑制剂化合物;3-(4-氯-苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺或其药学上可接受的盐;以及一组使用说明。在一个实施方案中,这些使用说明包括指示如何施用抑制剂的标签,其包括施用途径、施用剂量和施用时间段。在该试剂盒的一些实施方案中,3-(4-氯-苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺或其药学上可接受的盐储存在与至少一种免疫检查点抑制剂化合物分开的容器中。在该试剂盒的一些实施方案中,至少一种免疫检查点抑制剂化合物是CTLA-4受体抑制剂、PD-1受体抑制剂、PD-L1抑制剂或PD-L2抑制剂、LAG-3受体抑制剂、TIM-3受体抑制剂、BTLA受体抑制剂、KIR受体抑制剂,或前述免疫检查点抑制剂化合物中的任何一些的组合。在该试剂盒的一些实施方案中,免疫检查点抑制剂化合物是抗体或抗体片段。在该试剂盒的一些实施方案中,至少一种免疫检查点抑制剂化合物是抗CTLA-4受体抗体、抗PD-1受体抗体、抗LAG-3受体抗体、抗TIM-3受体抗体、抗BTLA受体抗体、抗KIR受体抗体、抗PD-L1抗体或抗PD-L2抗体,或前述抗体中的任何一些的组合。在该试剂盒的一些实施方案中,至少一种免疫检查点抑制剂化合物是冻干固体的形式。在一些实施方案中,该试剂盒还包括水性复溶溶剂。在该试剂盒的一些实施方案中,至少一种免疫检查点抑制剂化合物掺入第一药学上可接受的制剂中,并且3-(4-氯-苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺掺入第二药学上可接受的制剂中。

[0017] 根据本文所展示的方面,公开了用于治疗患有肺癌的受试者的试剂盒,该试剂盒包括:固定剂量至少约240mg的与PD-1受体特异性结合并且抑制PD-1活性的抗体或其抗原结合部分;一定剂量的鞘氨醇激酶抑制剂;以及在本公开的方法中使用抗PD-1抗体或其抗原结合部分和鞘氨醇激酶抑制剂的使用说明。在一个实施方案中,使用说明包括指示如何施用抗PD-1抗体或其抗原结合部分以及鞘氨醇激酶抑制剂的标签,其包括施用途径、施用剂量和施用时间段。在一个实施方案中,该试剂盒还包括一定剂量的另一种抗癌剂,所述另一种抗癌剂是剂量在0.1mg/kg体重至10mg/kg体重范围内的与CTLA-4特异性结合并且对其

进行抑制的抗体或其抗原结合部分,并且这些说明还描述了如何使用抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段。

[0018] 根据本文所展示的方面,公开了用于治疗患有肺癌的受试者的试剂盒,该试剂盒包括:剂量在0.1mg/kg体重至10mg/kg体重范围内的抗癌剂,该抗癌剂是与PD-1受体特异性结合并且抑制PD-1活性的抗体或其抗原结合部分;一定剂量的鞘氨醇激酶抑制剂;以及在本公开的方法中使用抗PD-1抗体或其抗原结合部分和鞘氨醇激酶抑制剂的使用说明。在一个实施方案中,该试剂盒还包括一定剂量的另一种抗癌剂,所述另一种抗癌剂是剂量在0.1mg/kg体重至10mg/kg体重范围内的与CTLA-4特异性结合并且对其进行抑制的抗体或其抗原结合部分,并且这些说明还描述了如何使用抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段。

[0019] 根据本公开的方面,待治疗的癌症选自以下项组成的组:黑素瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)、蕈样肉芽肿、佩吉特样网状细胞增多症(Pagetoid reticulosis)、塞扎里综合征(Sezary syndrome)、肉芽肿性皮肤松弛症、淋巴瘤样丘疹病、慢性苔癣样糠疹、急性痘疮样苔藓样糠疹、CD30+皮肤T细胞淋巴瘤、继发性皮肤CD30+大细胞淋巴瘤、非蕈样肉芽肿性CD30皮肤大T细胞淋巴瘤、多形性T细胞淋巴瘤、伦纳特淋巴瘤(Lennert lymphoma)、皮下T细胞淋巴瘤、血管中心性淋巴瘤、母细胞性NK细胞淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤(HL)、头颈部肿瘤;鳞状细胞癌、横纹肌肉瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、食管鳞状细胞癌、食管腺癌、肾细胞癌(RCC)、结肠直肠癌(CRC)、急性骨髓性白血病(AML)、乳腺癌、宫颈癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、尿道上皮癌、膀胱癌、胃癌、前列腺小细胞神经内分泌癌(SCNC)、肝癌、肉瘤、恶性胶质瘤、肝癌、口腔鳞状细胞癌、胰腺癌、肾癌、甲状腺乳头状癌、肝内胆管细胞癌、肝细胞癌、骨癌、转移癌和鼻咽癌。在一个实施方案中,治疗癌症被进一步定义为减小肿瘤的尺寸或抑制肿瘤的生长。

[0020] 根据本公开的方面,可以将抑制剂施用于对其有需要的受试者至少两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次或十次。在本公开的一个实施方案中,对有需要的受试者进一步施用第二癌症疗法。在一个实施方案中,第二癌症疗法包括外科手术、放射疗法、化学疗法、毒素疗法、免疫疗法、冷冻疗法或基因疗法。在一个实施方案中,癌症是化疗或放射线抗性癌症。

附图说明

[0021] 图1示出施用经ABC294640处理的B16黑素瘤细胞引发针对随后注射的未经处理的B16肿瘤细胞的免疫。这证明ABC294640在肿瘤细胞中诱导免疫原性细胞死亡。对于图1、图2和图3A至图3C中所示的“箱须”图,中值肿瘤体积由每个条中的水平线指示;条的范围指示四分位距;并且须指示每个处理组的最小肿瘤与最大肿瘤之间的范围。

[0022] 图2示出施用经ABC294640处理的Neuro-2a神经母细胞瘤细胞引发针对随后注射的未经处理的Neuro-2a肿瘤细胞的免疫。这进一步证明ABC294640在肿瘤细胞中诱导免疫原性细胞死亡。

[0023] 图3A至图3C示出施用经ABC294640处理的路易斯肺癌(LLC)细胞引发针对随后注射的未经处理的LLC肿瘤细胞的免疫。示出了第15天的肿瘤尺寸(图3A)、第17天的肿瘤尺寸(图3B)和第20天的肿瘤尺寸(图3C),以证明施用经ABC294640处理的细胞导致对未经处理的肿瘤细胞引起的肿瘤生长的持续抑制。这进一步证明ABC294640在肿瘤细胞中诱导免疫

原性细胞死亡。

[0024] 图4示出施用经ABC294640处理的B16黑素瘤细胞或路易斯肺癌 (LLC) 细胞引发针对随后注射的未经处理的B16肿瘤细胞的免疫。这证明ABC294640诱导了交叉免疫。

[0025] 图5示出施用经ABC294640处理的B16黑素瘤细胞或路易斯肺癌 (LLC) 细胞引发针对随后注射的未经处理的LLC肿瘤细胞的免疫。这进一步证明ABC294640诱导了交叉免疫。

[0026] 图6示出B16黑素瘤肿瘤的生长通过用单独的ABC294640 (ABC) 或单独的抗PD-1抗体处理小鼠而被部分抑制。用ABC294640加抗PD-1抗体的组合处理小鼠导致对肿瘤生长的抑制显著增加。符号指示平均肿瘤体积,并且误差条指示每个处理组在所指示时间的平均值的标准误差。

[0027] 图7示出携带B16黑素瘤肿瘤的小鼠的生存期通过用单独的ABC294640 (ABC) 或单独的抗PD-1抗体处理小鼠而被略微延长。用ABC294640加抗PD-1抗体的组合处理小鼠导致荷瘤小鼠的生存期显著增加。

[0028] 图8示出LLC肺肿瘤的生长通过用单独的ABC294640 (ABC) 或单独的抗CTLA4抗体处理小鼠而被部分抑制。用ABC294640加抗CTLA4抗体的组合处理小鼠导致对肿瘤生长的抑制显著增加。

[0029] 图9示出携带LLC肿瘤的小鼠的生存期通过用单独的ABC294640 (ABC) 或单独的抗CTLA4抗体处理小鼠而被略微延长。用ABC294640加抗CTLA4抗体的组合处理小鼠导致荷瘤小鼠的生存期显著增加。

具体实施方式

[0030] 本公开的鞘氨醇激酶 (SK) 抑制剂将与一种或多种其他抗癌疗法结合使用。此类其他药物可以通过其通常使用的途径和量与本发明的SK抑制剂同时或相继施用。当本发明的SK抑制剂与一种或多种其他药物同时使用时,除了本发明的SK抑制剂之外还含有此类其他药物的药物组合物是优选的。因此,本发明的药物组合物包括除了本发明的SK抑制剂之外还含有一种或多种其他活性成分或治疗剂的那些。可以与本发明的SK抑制剂结合的其他治疗剂(分开施用或在相同的药物组合物中施用)的示例包括但不限于抗CTLA-4、PD1或PD-L1的抗体。本发明的SK抑制剂与第二活性成分的重量比可以变化,并且将取决于每种成分的有效剂量。一般来讲,将使用各自的有效剂量。本发明的SK抑制剂与其他活性成分的组合通常也将在前述范围内,但在每种情况下,应当使用每种活性成分的有效剂量。在一个实施方案中,SK抑制剂与检查点抑制剂结合使用。在一个实施方案中,SK抑制剂与阻断CTLA-4 (CD 152)、PD-1 (CD279)、PDL-1 (CD274)、TIM-3、LAG-3 (CD223)、VISTA、KIR、NKG2A、BTLA、PD-1H、TIGIT、CD96、4-1BB (CD137)、4-1BBL (CD137L)、GARP、CSF-1R、A2AR、CD73、CD47、色氨酸2,3-双加氧酶 (TDO) 或吲哚胺2,3-双加氧酶 (IDO) 的活性的化合物中的一种或多种结合使用。

[0031] 术语

[0032] 为了可以更容易地理解本公开,首先定义了某些术语。如本申请中所用,除非本文中另有明确规定,否则以下术语中的每一者都应当具有下文阐述的含义。另外的定义在整个申请中阐述。

[0033] 如本文所用,“一个/种”、“该”、“至少一个/种”和“一种或多种/一个或多个”可互换使用。

[0034] “施用”是指使用本领域技术人员已知的各种方法和递送系统中的任一种,将包含本发明的抑制剂的组合物物理引入受试者。抗PD-1抗体的优选施用途径包括静脉内、肌内、皮下、腹膜内、脊髓或其他胃肠外施用途径,例如通过注射或输注。如本文所用,短语“胃肠外施用”意味着除了肠内施用和局部施用之外的施用模式,通常通过注射,并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、淋巴管内、病灶内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注,以及体内电穿孔。本发明的SK抑制剂通常经由非胃肠外途径施用,优选口服施用。其他非胃肠外途径包括局部、表皮或粘膜施用途径,例如鼻内、阴道、直肠、舌下或局部施用。施用也可以例如进行一次、多次和/或在一个或多个延长时段内进行。

[0035] 如本文所用,术语“作用剂”是指具有药理活性(即作用剂对个体的作用)的化合物。术语“作用剂”、“化合物”和“药物”在本文中可互换使用。

[0036] “改善”是指特定病症的症状或临床征象特征的程度、严重性、频率和/或可能性的任何降低。

[0037] 本发明的“经SK抑制剂处理的癌细胞”或“经ABC296460处理的癌细胞”将在经处理细胞的表面上具有增加的钙网蛋白表达。不受理论的束缚,据信钙网蛋白的过表达充当促进免疫应答的新抗原中的至少一种。钙网蛋白的表面表达可以在注射前通过细胞的流式细胞术测量,并且细胞甚至可以被分选成具有高钙网蛋白表达的亚组以优化免疫应答。通过本文所公开的方法制备的经SK抑制剂处理的癌细胞或经ABC296460处理的癌细胞在引发抗癌免疫应答中特别有效。

[0038] 钙网蛋白也称为钙调蛋白、CRP55、CaBP3、肌集钙蛋白样蛋白和内质网驻留蛋白60(ERp60),是一种多功能可溶性蛋白,其与 Ca^{2+} 离子(信号转导中的第二信使)结合,使其失活。

[0039] “抗体”(Ab)应当包括但不限于与抗原特异性结合并且包含通过二硫键互连的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白免疫球蛋白,或其抗原结合部分。每条H链都包含重链可变区(本文中缩写为 Y_H)和重链恒定区。重链恒定区包含三个恒定结构域,即 Cm 、 Cm 和 m 。每条轻链都包含轻链可变区(本文中缩写为 Y_L)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个恒定结构域 CL 。 V_H 区和 Y_L 区可以进一步细分为称为互补决定区(CDR)的高变区,其中散布有称为框架区(FR)的更保守的区域。每个 Y_H 和 Y_L 都包括三个CDR和四个FR,从氨基端到羧基端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链的可变区和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或宿主因子的结合,所述宿主组织或宿主因子包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。

[0040] “抗体片段”是指抗体的保留了亲本抗体对配体的至少一些结合功能的子部分。

[0041] “抗体衍生物”是指抗体或抗体片段的化学修饰形式。衍生物的一些示例包括与其他功能分子(诸如PEG基团、肽、蛋白质或其他抗体)的连接。

[0042] 术语“免疫原性细胞死亡”(“ICD”)是引发免疫应答的任何类型的细胞死亡。ICD涉及细胞表面组成的变化。

[0043] “已知引起体外免疫原性细胞死亡”的SK抑制剂(例如化合物ABC296460)的浓度意味着所选择化合物的导致至少75%的肿瘤细胞杀伤的毒性量。在一个实施方案中,已知引

起体外细胞死亡的SK抑制剂(例如ABC294640)的浓度为约10 μ M至约100 μ M;约20 μ M至约60 μ M;约25 μ M至约55 μ M;约30 μ M至约50 μ M;约35 μ M至约45 μ M。在一个实施方案中,已知引起体外免疫原性细胞死亡的SK抑制剂(例如ABC294640)的浓度为40 μ M。

[0044] 本文所公开的“离体”方法意味着用在体外改变鞘脂代谢的化合物处理取自患者的细胞,然后灌注,使得它们可以返回患者体内。

[0045] 术语“单克隆抗体”(“mAb”)是指具有单分子组成的非天然存在的抗体分子制剂,即,一级序列基本上相同并且对特定表位表现出单一结合特异性和亲和力的抗体分子。单克隆抗体是分离抗体的示例。MAb可以通过杂交瘤技术、重组技术、转基因技术或本领域技术人员已知的其他技术产生。

[0046] 用于阻断免疫检查点通路的单克隆抗体、抗体片段和抗体衍生物可以通过本领域普通技术人员已知的几种方法中的任一种来制备,包括但不限于体细胞杂交技术和杂交瘤方法。产生杂交瘤在Antibodies, A Laboratory Manual, Harlow and Lane, 1988, Cold Spring Harbor Publications, New York中有所描述。人单克隆抗体可以借助通过例如美国专利号5,223,409、5,403,484、5,571,698、6,582,915和6,593,081中所述的方法筛选人免疫球蛋白基因的噬菌体展示文库来鉴定和分离。单克隆抗体可以使用美国专利号6,331,415(Cabilly)中描述的一般方法来制备。

[0047] “新抗原”是有助于免疫细胞鉴定和对抗癌细胞的独特分子或蛋白质。在一个实施方案中,用毒性浓度的SK抑制剂(例如ABC294640)对来源于患者的癌细胞进行体外处理导致在经处理癌细胞的表面上的钙网蛋白过表达。然后可以将这些经处理(“致敏”)癌细胞施用于患者以帮助对抗/治疗癌症。

[0048] “人”抗体(HuMAb)是指具有可变区的抗体,其中框架区和CDR区均来源于人种系免疫球蛋白序列。此外,如果该抗体包含恒定区,则恒定区也来源于人种系免疫球蛋白序列。本发明的人抗体可以包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或者通过体内体细胞突变引入的突变)。然而,如本文所用的术语“人抗体”并不旨在包括其中来源于另一哺乳动物物种(诸如小鼠)的种系的CDR序列已被移植到人框架序列上的抗体。术语“人”抗体和“全人”抗体同义地使用。例如,人单克隆抗体可以使用来自XenoMouse的XenoMouseTM(Abgenix, Fremont, Calif.)或B细胞杂交瘤来制备。XenoMouse是具有功能性人免疫球蛋白基因的鼠宿主,如美国专利号6,162,963(Kucherlapati)中所述。

[0049] “人源化抗体”是指其中非人抗体的CDR结构域之外的一些、大多数或所有氨基酸被来源于人免疫球蛋白的对应氨基酸替换的抗体。在人源化形式抗体的一个实施方案中,CDR结构域之外的一些、大多数或所有氨基酸已被来自人免疫球蛋白的氨基酸替换,而一个或多个CDR区内的一些、大多数或所有氨基酸未改变。氨基酸的小的添加、缺失、插入、取代或修饰是允许的,只要它们不消除抗体结合特定抗原的能力。“人源化”抗体保持与初始抗体类似的抗原特异性。

[0050] “嵌合抗体”是指其中可变区来源于一个物种而恒定区来源于另一个物种的抗体,诸如其中可变区来源于小鼠抗体而恒定区来源于人抗体的抗体。

[0051] “抗-抗原”抗体是指特异性结合抗原的抗体。例如,抗PD-1抗体特异性结合PD-1,并且抗CTLA-4抗体特异性结合CTLA-4。

[0052] “阻断”及其变型形式具有与“抑制”及其变型形式相同的含义。术语“阻断”意在涵盖部分阻断和完全阻断两者。

[0053] “细胞介导的免疫活性”是指被认为是细胞介导的免疫应答的一部分的生物活性，诸如至少一种 T_H 细胞因子的产生的增加。

[0054] “检查点抑制剂”或“免疫检查点抑制剂”包括增强免疫系统或免疫应答的任何作用剂。此类抑制剂可以包括结合并且阻断或抑制免疫检查点受体的小分子、肽、多肽、蛋白质、抗体、抗体片段或其抗原结合片段，或者结合并且阻断或抑制免疫检查点受体配体的抗体。可以被靶向用于阻断或抑制的例示性检查点分子包括但不限于CTLA-4、PDL1、PDL2、PD1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、GAL9、LAG3、TIM3、VISTA、KIR、2B4（属于CD2分子家族并且在所有NK T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞和记忆CD8⁺（ $\alpha\beta$ ）T细胞上表达）、CD160（也称为BY55）、CGEN-15049、CHK1激酶和CHK2激酶、A2aR和各种B7家族配体。B7家族配体包括但不限于B7-1、B7-2、B7-DC、B7-H1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H5、B7-H6和B7-H7。检查点抑制剂包括抗体或其抗原结合片段、其他结合蛋白、生物治疗剂或小分子，其结合并且阻断或抑制CTLA-4、PDL1、PDL2、PD1、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD160和CGEN-15049中的一者或多者的活性。例示性免疫检查点抑制剂包括替西木单抗（CTLA-4阻断抗体）、抗OX40、PD-L1单克隆抗体（抗B7-H1；MEDI4736）、MK-3475（PD-1阻断剂）、纳武单抗（抗PD1抗体）、CT-011（抗PD1抗体）、BY55单克隆抗体、AMP224（抗PDL1抗体）、BMS-936559（抗PDL1抗体）、MPLDL3280A（抗PDL1抗体）、MSB0010718C（抗PDL1抗体）和Yervoy/伊匹单抗（抗CTLA-4检查点抑制剂）。检查点蛋白质配体包括但不限于PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、CD28、CD86和TIM-3。

[0055] “免疫细胞”是指免疫系统的细胞，即，直接或间接参与免疫应答的产生或维持的细胞，无论免疫应答是先天性的、获得性的、体液性的，还是细胞介导的。

[0056] “诱导”及其变型形式是指细胞活性的任何可测量的增加。例如，诱导免疫应答可以包括例如细胞因子的产生增加，免疫细胞群的活化、增殖或成熟增加，以及/或者增加的免疫功能的其他指标增加。

[0057] 如本文所用，“受试者”或“患者”是同义词，并且是指成人、儿童或婴儿。

[0058] 程序性死亡-1（PD-1）是由活化的T细胞和B细胞表达的关键免疫检查点受体，并且介导免疫抑制。PD-1是CD28受体家族的成员，其包括CD28、CTLA-4、ICOS、PD-1和BTLA。已鉴定了PD-1的两种细胞表面糖蛋白配体，即程序性死亡配体-1（PD-L1、CD274、B7-H1）和程序性死亡配体-2（PD-L2、CD273、B7-DC）。PD-L1和PD-L2在结合PD-1时下调T细胞活化和细胞因子分泌，其在抗原递呈细胞以及许多人癌症上表达，并且已示出在结合PD-1时下调T细胞活化和细胞因子分泌。如本文所用，术语“PD-1”包括人PD-1（hPD-1），hPD-1的变体、同种型和物种同源物，以及与hPD-1具有至少一个共用表位的类似物。完整的hPD-1序列可以在GenBank登录号U64863下找到。对PD-1/PD-L1相互作用的抑制在临床前模型中介导强效的抗肿瘤活性（美国专利号8,008,449和7,943,743），并且PD-1/PD-L1相互作用的抗体抑制剂用于治疗癌症的用途已进入临床试验（Brahmer等人，2010；Topalian等人，2012a；Topalian等人，2014；Hamid等人，2013；Brahmer等人，2012；Flies等人，2011；Pardoll，2012；Hamid和Carvajal，2013）。

[0059] 使用针对PD-L1的抗体阻断PD-1/PD-L1连接已示出在许多系统中恢复并且增强了T细胞活化。晚期癌症患者受益于使用针对PD-L1的单克隆抗体的疗法。肿瘤和慢性感染的

临床前动物模型已示出,由单克隆抗体阻断PD-1/PD-L1通路可以增强免疫应答并且导致肿瘤排斥或对感染的控制。经由PD-1/PD-L1阻断的抗肿瘤免疫疗法可以增强对许多组织学上不同的肿瘤的治疗性免疫应答。

[0060] 目前在美国市场上的PD-1/PD-L1抑制剂的示例包括派姆单抗(Keytruda[®], Merck)、纳武单抗(Opdivo[®], Bristol-Myers Squibb)、阿特珠单抗(Tecentriq[®], Roche)、阿维鲁单抗(Bavencio[®], EMD和Pfizer)和度伐利尤单抗(Imfinzi[®], AstraZeneca)。这些PD-1/PD-L1抑制剂中的任一种可以与本发明的SK抑制剂一起使用。

[0061] 纳武单抗(先前被命名为5C4、BMS-936558、MDX-1 106或ONO-4538)是全人IgG4 (S228P) PD-1免疫检查点抑制剂抗体,其选择性地防止与PD-1配体(PD-L1和PD-L2)的相互作用,从而阻断抗肿瘤T细胞功能的下调(美国专利号8,008,449;Wang等人,2014)。纳武单抗已在多种晚期实体肿瘤中显示活性,包括肾细胞癌(肾腺癌或肾上腺样瘤)、黑素瘤和非小细胞肺癌(NSCLC)(Topalian等人,2012a;Topalian等人,2014;Drake等人,2013;WO 2013/173223)。

[0062] 伊匹单抗(YERVOY[®])是2011年由FDA批准的第一检查点抗体,并且是阻断CTLA-4结合其B7配体从而刺激T细胞活化并改善晚期黑素瘤患者的总生存期(OS)的全人IgG1单克隆抗体(Hodi等人,2010),如美国专利号6,984,720中所公开的。伊匹单抗被批准以3mg/kg用于治疗黑素瘤,每3周静脉内给予一次,共4剂。因此,在优选的实施方案中,3mg/kg是与抗PD-1抗体结合使用的伊匹单抗的最高剂量,但是在某些实施方案中,当与纳武单抗结合时,抗CTLA-4抗体(诸如伊匹单抗)可以在每两周或每三周约0.3mg/kg体重至10mg/kg体重的范围内给药。伊匹单抗的显著低于批准的每3周3mg/kg(例如每3周或每4周0.3mg/kg或更少)的剂量被认为是亚治疗剂量。已证实,3mg/kg的纳武单抗和3mg/kg的伊匹单抗的组合给药超过了黑素瘤群体中的MTD,而据发现,1mg/kg的纳武单抗加上3mg/kg的伊匹单抗或者3mg/kg的纳武单抗加上1mg/kg的伊匹单抗的组合在黑素瘤患者中是可耐受的(Wolchok等人,2013)。因此,虽然纳武单抗在每两周静脉内给予至多10mg/kg时是耐受的,但是在优选的实施方案中,当与伊匹单抗结合时,抗PD-1抗体的剂量不超过3mg/kg。在某些实施方案中,基于风险-效益评估和PK-PD评估,所用的剂量包括使用以下组合:1mg/kg的纳武单抗加上3mg/kg的伊匹单抗、3mg/kg的纳武单抗加上1mg/kg的伊匹单抗,或3mg/kg的纳武单抗加上3mg/kg的伊匹单抗,各自以每2周至每4周一次(优选地每3周一次)的给药频率施用。在某些其他实施方案中,纳武单抗以0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg或5mg/kg的剂量与以0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg或5mg/kg的剂量施用的伊匹单抗结合,每两周施用一次、每3周施用一次或每4周施用一次。

[0063] 如本文所用,术语“PD-1抗体”是指通过激动PD-1来拮抗淋巴细胞的活性和/或增殖的抗体。术语“拮抗活性”涉及淋巴细胞增殖或活性的降低(或减少)为至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。术语“拮抗”可以与术语“抑制性”和“抑制”互换使用。PD-1介导的活性可以使用如本文所述的T细胞增殖测定法来定量测定。

[0064] “药学上可接受的制剂”可以通过所选择的施用途径将治疗有效量的本公开的化合物递送给受试者,通常被受试者耐受,并且具有可接受的毒性特征(优选地在施用剂量下最小至没有毒性)。合适的药学上可接受的制剂在Remington's Pharmaceutical

Sciences,第18版(1990),Mack Publishing Co.中有所描述,并且可以由本领域的普通技术人员容易地选择。

[0065] “药学上可接受的盐”是指其中通过将化合物中的至少一个酸基或碱基转化成无毒盐形式而对该化合物进行修饰的化合物衍生物。“药学上可接受的盐”的示例由Berge在Journal of Pharmaceutical Science(1977),66的第1页至第19页中描述,并且包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括化合物中碱性部分(诸如胺基团)的矿物酸盐或有机酸盐。合适的酸加成盐包括衍生自无机酸诸如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸等的那些。合适的酸加成盐衍生自有机酸,诸如单羧酸和二羧酸(例如,乙酸、丙酸)、羟基链烷酸(例如,柠檬酸、酒石酸)、芳族酸(例如,苯甲酸、1-羟基-2-萘甲酸(xinofic acid)、双羟萘酸)、脂族和芳族磺酸(例如,对甲苯磺酸)等。碱加成盐包括化合物中酸性部分(诸如羧酸基团)的碱土金属矿物盐和有机胺盐。合适的碱加成盐包括钠盐、钾盐、镁盐、钙盐等。附加的合适的碱加成盐包括无毒的有机胺,诸如胆碱、乙二胺等。

[0066] 如本文所用,术语“合适的时段”是指这样的时段:在整个治疗中,起始于受治疗者使用本公开的方法开始治疗进行癌症诊断,直至受治疗者停止治疗。在一个实施方案中,合适的时间段是一(1)周。在一个实施方案中,合适的时间段介于一(1)周和两(2)周之间。在一个实施方案中,合适的时间段是两(2)周。在一个实施方案中,合适的时间段介于两(2)周和三(3)周之间。在一个实施方案中,合适的时间段是三(3)周。在一个实施方案中,合适的时间段介于三(3)周和四(4)周之间。在一个实施方案中,合适的时间段是四(4)周。在一个实施方案中,合适的时间段介于四(4)周和五(5)周之间。在一个实施方案中,合适的时间段是五(5)周。在一个实施方案中,合适的时间段介于五(5)周和六(6)周之间。在一个实施方案中,合适的时间段是六(6)周。在一个实施方案中,合适的时间段介于六(6)周和七(7)周之间。在一个实施方案中,合适的时间段是七(7)周。在一个实施方案中,合适的时间段介于七(7)周和八(8)周之间。在一个实施方案中,合适的时间段是八(8)周。在一个实施方案中,合适的时间段为至少两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、十一个月、十二个月。在一个实施方案中,合适的时间段为至少一年。

[0067] 如本文所用,术语“协同”是指本发明的两种或更多种作用剂的协调或相关作用,使得组合作用大于每种作用剂单独作用的总和。在一个实施方案中,本发明的作用剂当作为治疗方案的一部分一起施用,提供治疗协同作用而不伴随协同副作用(例如但不限于交叉反应剂)。

[0068] “治疗有效量”或“治疗有效剂量”是改善肿瘤的至少一种症状或临床征象的量。改善肿瘤的至少一种症状或临床征象可以包括肿瘤尺寸的减小、肿瘤尺寸或生长的稳定、肿瘤生长速率的减小、肿瘤坏死的增加、肿瘤结构的变化(诸如崩解)、与肿瘤建立的减少相关联的生物化学标志物的变化、肿瘤进展的减少或肿瘤生存期的减少。

[0069] 如本文所用,“治疗癌症”、“治疗”和“处理”包括但不限于防止或减少癌症发展,减轻癌症症状,阻碍或抑制已形成的癌症生长,防止现有癌症的癌细胞转移和/或侵入,促进或诱导癌症消退,抑制或阻碍癌细胞增殖,减少血管新生,杀死恶性或癌性肿瘤细胞,或增加癌细胞凋亡的量。

[0070] 如本文所用,“有治疗需要的患者”意指被鉴定为需要治疗的患者。例如,有癌症治疗需要的患者被鉴定为患有癌症或处于发展成癌症风险的患者。可通过保健专家并且/或

者通过进行一个或多个诊断测定,将患者诊断为需要治疗。例如,有癌症治疗需要的患者可为被保健专家诊断患有癌症或处于癌症风险的患者。评价患者是否患有癌症或处于发展成癌症的风险的诊断测定在本领域中是已知的。

[0071] 使用关于本发明的方法和剂量的术语“固定剂量”意味着在不考虑患者的体重或体表面积(BSA)的情况下施用于患者的剂量。因此,固定剂量不作为mg/kg剂量提供,而是作为作用剂(例如,抗PD-1抗体)的绝对量提供。例如,60kg的人和100kg的人将接受相同剂量的抗体(例如,240mg的抗PD1抗体)。

[0072] 如本文所提及的术语“基于体重的剂量”意味着基于患者的体重计算的施用于患者的剂量。例如,当体重为60kg的患者需要3mg/kg的抗PD-1抗体时,可以计算并且使用适量的抗PD-1抗体(即,180mg)进行施用。

[0073] 包括肿瘤细胞的细胞群的至少一种细胞介导免疫应答的增加是指与肿瘤微环境的免疫谱改善相关联的至少一种生物化学标志物、组织学标志物或免疫学标志物的增加。其中标志物的量增加与肿瘤微环境的免疫谱改善相关联的标志物包括但不限于干扰素- α ; 干扰素- γ ; 干扰素诱导蛋白; TNF- α ; 趋化因子,诸如CCL2、CCL3、CCL4、CXCL2; 活化的T细胞; 活化的B细胞; 活化的NK细胞; 肿瘤特异性T细胞、活化的肿瘤相关巨噬细胞; 趋化因子受体,诸如CCR6; 或肿瘤相关淋巴聚集体。

[0074] 与肿瘤微环境相关联的标志物可以例如通过分析来自肿瘤、局部肿瘤区域或肿瘤引流淋巴结的活检样本(例如针穿活检样本)确定。对标志物的分析可以使用标准技术来完成,诸如通过组织学(H&E染色)、流式细胞术、基因表达测定(定量PCR)、免疫化学技术,以及本领域普通技术人员通常已知的其他技术。

[0075] 如本文所用,术语“体外”是指在人工环境中执行的规程,诸如但不限于在试管或细胞培养系统中。技术人员将理解,例如,分离的SK酶可以在体外环境中与调节剂接触。替代性地,分离的细胞可以在体外环境中与调节剂接触。

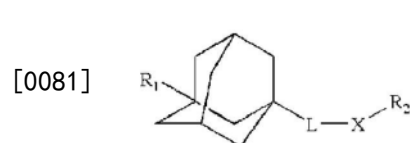
[0076] 如本文所用,术语“体内”是指在活的生物体内执行的规程,所述活的生物体诸如但不限于人、猴、小鼠、大鼠、兔、牛、马、猪、犬科动物、猫科动物或灵长类动物。

[0077] 可用于本发明的活性成分或试剂包括任何其药学上可接受的形式本文所述的那些,包括它们的异构体、盐、溶剂化物和多晶型物,以及外消旋的混合物和前药。

[0078] 本公开的鞘氨醇激酶抑制剂

[0079] 鞘氨醇激酶(SK)是致癌的鞘脂代谢酶,其以促凋亡神经酰胺为代价来催化促有丝分裂的第二信使鞘氨醇-1-磷酸(SIP)的形成。因此,SK是癌症疗法的有吸引力的靶标,因为阻断SIP导致癌细胞中增殖的抑制以及凋亡的诱导。本公开提供了抑制SK的芳基金刚烷化合物。在一个实施方案中,SK抑制剂是鞘氨醇激酶-1(SK1)的选择性抑制剂。在一个实施方案中,SK抑制剂是鞘氨醇激酶-2(SK2)的选择性抑制剂。在一个实施方案中,SK抑制剂是鞘氨醇激酶的双重抑制剂(抑制鞘氨醇激酶-1和鞘氨醇激酶-2两者)。

[0080] 作为SK抑制剂的本发明的芳基金刚烷化合物的示例通常由下面示出的式1表示:



[0082] 以及其药学上可接受的盐,其中

[0083] L为化学键或为 $-C(R_3, R_4)-$;

[0084] X为 $-C(R_3, R_4)N(R_5)-$ 、 $-C(O)N(R_4)-$ 、 $-N(R_4)C(O)-$ 、 $-C(R_4, R_5)-$ 、 $-N(R_4)-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2N(R_4)-$ 或 $-N(R_4)S(O)_2-$;

[0085] R_1 为H、烷基、环烷基、环烷基烷基、烯基、炔基、杂烷基、芳基、烷基芳基、烯基芳基、杂环基、杂芳基、烷基杂芳基、杂环烷基、烷基-杂环烷基、酰基、芳酰基、卤素、卤代烷基、烷氧基、卤代烷氧基、羟烷基、烷酰基、 $-COOH$ 、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-S-$ 烷基、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-CO_2$ (烷基)、 $-OC(O)$ 烷基、氨基甲酰基、单或二烷基氨基氨基甲酰基、单或二烷基氨基甲酰基、单或二烷基氨基、氨基烷基、单或二烷基氨基烷基、硫代氨基甲酰基,或者单或二烷基硫代氨基甲酰基;

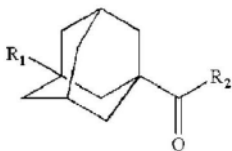
[0086] R_2 为H、烷基、环烷基、环烷基烷基、烯基、炔基、杂烷基、芳基、烷基芳基、烯基芳基、杂环基、杂芳基、烷基杂芳基、杂环烷基、烷基-杂环烷基、酰基、芳酰基、卤素、卤代烷基、烷氧基、卤代烷氧基、羟烷基、烷酰基、 $COOH$ 、 OH 、 SH 、 $-S-$ 烷基、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-CO_2$ (烷基)、 $-OC(O)$ 烷基、氨基甲酰基、单或二烷基氨基氨基甲酰基、单或二烷基氨基甲酰基、单或二烷基氨基、氨基烷基、单或二烷基氨基烷基、硫代氨基甲酰基、单或二烷基硫代氨基甲酰基、烷基-S-烷基、-杂芳基-芳基、-烷基-杂芳基-芳基、 $-C(O)-NH-$ 芳基、-烯基-杂芳基、 $-C(O)-$ 杂芳基,或者-烯基-杂芳基-芳基;

[0087] R_3 为H、烷基、环烷基、环烷基烷基、烯基、炔基、杂烷基、芳基、烷基芳基、烯基芳基、杂环基、杂芳基、烷基杂芳基、杂环烷基、烷基-杂环烷基、酰基、芳酰基、卤素、卤代烷基、烷氧基、卤代烷氧基、羟烷基、烷酰基、氧代基($=O$)、 $-COOH$ 、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-S-$ 烷基、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-CO_2$ (烷基)、 $-OC(O)$ 烷基、氨基甲酰基、单或二烷基氨基氨基甲酰基、单或二烷基氨基甲酰基、单或二烷基氨基、氨基烷基、单或二烷基氨基烷基、硫代氨基甲酰基,或者单或二烷基硫代氨基甲酰基;其中以上 R_1 基团、 R_2 基团和 R_3 基团中的每一者的烷基和环部分任选地被至多5个独立地为以下的基团取代: (C_1-C_6) 烷基、卤素、卤代烷基、 $-OC(O)(C_1-C_6)$ 烷基、 $-C(O)O(C_1-C_6)$ 烷基、 $-CONR'R''$ 、 $-OC(O)NR'R''$ 、 $-NR'C(O)R''$ 、 $-CF_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OH$ 、 C_1-C_6 烷氧基、羟烷基、 $-CN$ 、 $-CO_2H$ 、 $-SH$ 、 $-S-$ 烷基、 $-SOR'R''$ 、 $-SO_2R'$ 、 $-NO_2$ 或 $NR'R''$,其中 R' 和 R'' 独立地为H或 (C_1-C_6) 烷基,并且其中取代基的每个烷基部分任选地进一步被1、2或3个独立地选自卤素、 CN 、 OH 和 NH_2 的基团取代;并且 R_4 和 R_5 独立地为H或烷基,前提条件是当 R_3 和 R_4 处于同一碳上并且 R_3 为氧代基时, R_4 不存在。

[0088] 式1的芳基金刚烷化合物包括式I-1的化合物:

(I-1)

[0089]



[0090] 以及其药学上可接受的盐,其中

[0091] R_1 为H、烷基、环烷基、环烷基烷基、烯基、炔基、杂烷基、芳基、烷基芳基、烯基芳基、杂环基、杂芳基、烷基杂芳基、杂环烷基、烷基-杂环烷基、酰基、芳酰基、卤素、卤代烷基、烷氧基、卤代烷氧基、羟烷基、烷酰基、 $-COOH$ 、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-S-$ 烷基、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-CO_2$ (烷基)、 $-OC(O)$ 烷基、氨基甲酰基、单或二烷基氨基氨基甲酰基、单或二烷基氨基甲酰基、单或二烷基氨基、氨基烷基、单或二烷基氨基烷基、硫代氨基甲酰基,或者单或二烷基硫代

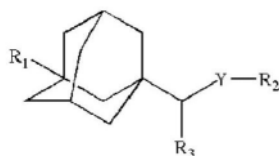
氨基甲酰基;并且 R_2 为H、烷基、环烷基、环烷基烷基、烯基、炔基、杂烷基、芳基、烷基芳基、烯基芳基、杂环基、杂芳基、烷基杂芳基、杂环烷基、烷基-杂环烷基、酰基、芳酰基、卤素、卤代烷基、烷氧基、卤代烷氧基、羟烷基、烷酰基、 $-COOH$ 、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-S$ -烷基、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-CO_2$ (烷基)、 $-OC(O)$ 烷基、氨基甲酰基、单或二烷基氨基氨基甲酰基、单或二烷基氨基甲酰基、单或二烷基氨基、氨基烷基、单-或二烷基氨基烷基、硫代氨基甲酰基、单或二烷基硫代氨基甲酰基、烷基-S-烷基、-杂芳基-芳基、-烷基-杂芳基-芳基、 $-NH$ -芳基、-烯基-杂芳基、-杂芳基、 $-NH$ -烷基、 $-NH$ -环烷基,或者-烯基-杂芳基-芳基,

[0092] 其中以上 R_1 基团和 R_2 基团中的每一者的烷基和环部分任选地被至多5个独立地为以下的基团取代: (C_1-C_6) 烷基、卤素、卤代烷基、 $-OC(O)$ (C_1-C_6 烷基)、 $-C(O)O$ (C_1-C_6 烷基)、 $-CONR'R''$ 、 $OC(O)NR'R''$ 、 $-NR'C(O)R''$ 、 $-CF_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OH$ 、 C_1-C_6 烷氧基、羟烷基、 $-CN$ 、 $-CO_2H$ 、 $-SH$ 、 $-S$ -烷基、 $-SOR'R''$ 、 $-SO_2R'$ 、 $-NO_2$ 或 $NR'R''$,其中 R' 和 R'' 独立地为H或 (C_1-C_6) 烷基,并且其中取代基的每个烷基部分任选地进一步被1、2或3个独立地选自卤素、 CN 、 OH 、 NH_2 的基团取代。

[0093] 式I的芳基金刚烷化合物包括式II的那些:

(II)

[0094]



[0095] 以及其药学上可接受的盐,其中

[0096] Y 为 $-C(R_4, R_5)-$ 、 $-N(R_4)-$ 、 $-O-$ 或 $-C(O)-$;

[0097] R_1 为H、烷基、环烷基、环烷基烷基、烯基、炔基、杂烷基、芳基、烷基芳基、烯基芳基、杂环基、杂芳基、烷基杂芳基、杂环烷基、烷基-杂环烷基、酰基、芳酰基、卤素、卤代烷基、烷氧基、卤代烷氧基、羟烷基、烷酰基、 $-COOH$ 、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-S$ -烷基、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-CO_2$ (烷基)、 $-OC(O)$ 烷基、氨基甲酰基、单或二烷基氨基氨基甲酰基、单或二烷基氨基甲酰基、单或二烷基氨基、氨基烷基、单或二烷基氨基烷基、硫代氨基甲酰基,或者单或二烷基硫代氨基甲酰基;

[0098] R_2 为H、烷基、环烷基、环烷基烷基、烯基、炔基、杂烷基、芳基、烷基芳基、烯基芳基、杂环基、杂芳基、烷基杂芳基、杂环烷基、烷基-杂环烷基、酰基、芳酰基、卤素、卤代烷基、烷氧基、卤代烷氧基、羟烷基、烷酰基、 $-COOH$ 、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-S$ -烷基、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-CO_2$ (烷基)、 $-OC(O)$ 烷基、氨基甲酰基、单或二烷基氨基氨基甲酰基、单或二烷基氨基甲酰基、单或二烷基氨基、氨基烷基、单或二烷基氨基烷基、硫代氨基甲酰基、单或二烷基硫代氨基甲酰基、烷基-S-烷基、-杂芳基-芳基、-烷基-杂芳基-芳基、 $-C(O)-NH$ -芳基、-烯基-杂芳基、 $-C(O)$ -杂芳基,或者-烯基-杂芳基-芳基;

[0099] R_3 为H、烷基、环烷基、环烷基烷基、烯基、炔基、杂烷基、芳基、烷基芳基、烯基芳基、杂环基、杂芳基、烷基杂芳基、杂环烷基、烷基-杂环烷基、酰基、芳酰基、卤素、卤代烷基、烷氧基、卤代烷氧基、羟烷基、烷酰基、氧代基($=O$)、 $-COOH$ 、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-S$ -烷基、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-CO_2$ (烷基)、 $-OC(O)$ 烷基、氨基甲酰基、单或二烷基氨基氨基甲酰基、单或二烷基氨基甲酰基、单或二烷基氨基、氨基烷基、单或二烷基氨基烷基、硫代氨基甲酰基,或者单或二烷基硫代氨基甲酰基;

[0100] 其中以上 R_1 基团、 R_2 基团和 R_3 基团中的每一者的烷基和环部分任选地被至多5个独立地为以下的基团取代： (C_1-C_6) 烷基、卤素、卤代烷基、 $-OC(O)$ (C_1-C_6 烷基)、 $-C(O)O$ (C_1-C_6 烷基)、 $-CONR'R''$ 、 $OC(O)NR'R''$ 、 $-NR'C(O)R''$ 、 $-CF_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OH$ 、 C_1-C_6 烷氧基、羟烷基、 $-CN$ 、 $-CO_2H$ 、 $-SH$ 、 $-S-$ 烷基、 $-SOR'R''$ 、 $-SO_2R'$ 、 $-NO_2$ 或 $NR'R''$ ，其中 R' 和 R'' 独立地为H或 (C_1-C_6) 烷基，并且其中取代基的每个烷基部分任选地进一步被1、2或3个独立地选自卤素、 CN 、 OH 、 NH_2 的基团取代；并且 R_4 和 R_5 独立地为H或烷基。

[0101] 式II的化合物包括如下那些，其中：

[0102] Y为 $-C(R_4, R_5)-$ 或 $-N(R_4)-$ ；

[0103] R_1 为H、烷基、环烷基、环烷基烷基、烯基、炔基、杂烷基、芳基、烷基芳基、烯基芳基、杂环基、杂芳基、烷基杂芳基、杂环烷基、烷基-杂环烷基、酰基、芳酰基、卤素、卤代烷基、烷氧基、卤代烷氧基、羟烷基、烷酰基、 $-COOH$ 、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-S-$ 烷基、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-CO_2$ (烷基)、 $-OC(O)$ 烷基、氨基甲酰基、单或二烷基氨基氨基甲酰基、单或二烷基氨基甲酰基、单或二烷基氨基、氨基烷基、单或二烷基氨基烷基、硫代氨基甲酰基，或者单或二烷基硫代氨基甲酰基；

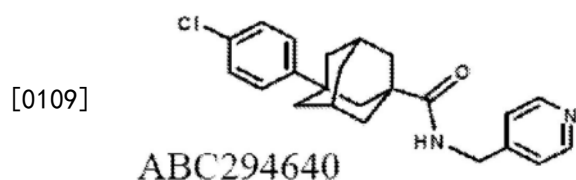
[0104] R_2 为H、烷基、环烷基、环烷基烷基、烯基、炔基、杂烷基、芳基、烷基芳基、烯基芳基、杂环基、杂芳基、烷基杂芳基、杂环烷基、烷基-杂环烷基、酰基、芳酰基、卤素、卤代烷基、烷氧基、卤代烷氧基、羟烷基、烷酰基、 $-COOH$ 、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-S-$ 烷基、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-CO_2$ (烷基)、 $-OC(O)$ 烷基、氨基甲酰基、单或二烷基氨基氨基甲酰基、单或二烷基氨基甲酰基、单或二烷基氨基、氨基烷基、单或二烷基氨基烷基、硫代氨基甲酰基、单或二烷基硫代氨基甲酰基、烷基-S-烷基、-杂芳基-芳基、-烷基-杂芳基-芳基、 $-C(O)-NH-$ 芳基、-烯基-杂芳基、 $-C(O)-$ 杂芳基，或者-烯基-杂芳基-芳基；

[0105] 其中以上 R_1 基团和 R_2 基团中的每一者的烷基和环部分任选地被至多5个独立地为以下的基团取代： (C_1-C_6) 烷基、卤素、卤代烷基、 $-OC(O)$ (C_1-C_6 烷基)、 $C(O)O$ (C_1-C_6 烷基)、 $CONR_4R_5$ 、 $-OC(O)NR_4R_5-NR_4C(O)R_5$ 、 $-CF_3$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OH$ 、 C_1-C_6 烷氧基、羟烷基、 $-CN$ 、 $-CO_2H$ 、 $-SH$ 、 $-S-$ 烷基、 $-SOR_4R_5$ 、 $-SO_2R_4R_5$ 、 $-NO_2$ 或 NR_4R_5 ，并且其中取代基的每个烷基部分任选地进一步被1、2或3个独立地选自卤素、 CN 、 OH 、 NH_2 的基团取代；

[0106] R_3 为H、烷基或氧代基(=O)；并且

[0107] R_4 和 R_5 独立地为H或 (C_1-C_6) 烷基。

[0108] 本发明的特别优选的芳基金刚烷SK抑制剂化合物在下文示出并且称为ABC294640 [3-(4-氯苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)酰胺]：



[0110] 掺入本公开的特定方法或治疗组合中的SK抑制剂的精确量可以根据本领域已知的因素而变化，这些因素诸如受试者的身体状态和临床状态、施用方法、制剂的含量、预期给药方案或顺序。因此，具体地列出构成对所有可能的应用都有治疗效果的SK抑制剂的量是不实际的。然而，本领域的普通技术人员在适当考虑这些因素的情况下可以容易地确定适当的量。

[0111] 抗PD-1抗体

[0112] 以高亲和力特异性结合PD-1的人单克隆抗体已公开于美国专利号8,008,449中。其他抗PD-1单克隆抗体已描述于例如美国专利号6,808,710、7,488,802、8,168,757和8,354,509以及PCT公开号WO 2012/145493中。已证明美国专利号8,008,449中所公开的抗PD-1人单克隆抗体中的每一种均表现出以下特征中的一种或多种特征：(a) 以 $1 \times 10^7 \text{M}$ 或更小的KD与人PD-1结合，如使用Biacore生物传感器系统通过表面等离子体共振所测定的；(b) 基本上不与人CD28、CTLA-4和ICOS结合；(c) 在混合淋巴细胞反应 (MLR) 测定中增加T细胞增殖；(d) 在MLR测定中增加干扰素- γ 产生；(e) 在MLR测定中增加IL-2分泌；(f) 与人PD-1和食蟹猴PD-1结合；(g) 抑制PD-L1和/或PD-L2与PD-1结合；(h) 刺激抗原特异性记忆应答；(i) 刺激抗体应答；以及(j) 抑制体内肿瘤细胞生长。可用于本发明中的抗PD-1抗体包括特异性结合人PD-1并且表现出前述特征中的至少一种、优选地至少五种的单克隆抗体。优选的抗PD-1抗体是纳武单抗。另一种优选的抗PD-1抗体是派姆单抗。

[0113] 可用于所公开的方法中的抗PD-1抗体还包括特异性结合人PD-1并且与纳武单抗交叉竞争结合人PD-1的分离抗体(参见例如美国专利号8,008,449;WO 2013/173223)。抗体交叉竞争结合抗原的能力表明,这些抗体与抗原的相同表位区结合,并且在空间上阻碍其他交叉竞争抗体与该特定表位区的结合。预期这些交叉竞争抗体由于它们与PD-1的相同表位区结合而具有与纳武单抗非常相似的功能特性。交叉竞争抗体可以容易地基于它们在标准的PD-1结合测定诸如Biacore分析、ELISA测定或流式细胞术中与纳武单抗交叉竞争的能力来鉴定(参见例如WO 2013/173223)。

[0114] 在某些实施方案中,与纳武单抗交叉竞争结合人PD-1或者与纳武单抗结合人PD-1的相同表位区的抗体是单克隆抗体。对于施用于人受试者,这些交叉竞争抗体优选地为嵌合抗体,或更优选地为人源化抗体或人抗体。此类嵌合、人源化或人单克隆抗体可以通过本领域熟知的方法来制备和分离。

[0115] 可用于所公开发明的方法中的抗PD-1抗体还包括上述抗体的抗原结合部分。已充分证明抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段来执行。涵盖在抗体的术语“抗原结合部分”内的结合片段的示例包括(i) Fab片段,即由 L_C 结构域、 H_C 结构域、 C_L 结构域和 C_H 结构域组成的单价片段；(ii) F(ab')_2 片段,即包含在铰链区通过二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段；(iii) 由 V_H 结构域和 C 结构域组成的Fd片段；以及(iv) 由抗体的单臂的 V_H 结构域和 V_L 结构域组成的Fv片段。

[0116] 本发明的抗CTLA-4抗体与人CTLA-4结合,以便破坏CTLA-4与人B7受体的相互作用。因为CTLA-4与B7的相互作用转导导致携带CTLA-4受体的T细胞失活的信号,所以破坏该相互作用有效地诱导、增强或延长此类T细胞的活化,从而诱导、增强或延长免疫应答。

[0117] 以高亲和力特异性结合CTLA-4的人单克隆抗体已公开于美国专利号6,984,720和7,605,238中。其他抗PD-1单克隆抗体已描述于例如美国专利号5,977,318、6,051,227、6,682,736和7,034,121中。美国专利号6,984,720和7,605,238中公开的抗PD-1人单克隆抗体已被证明表现出以下特征中的一种或多种特征：(a) 以由至少约 10^7M^{-1} 、或约 10^9M^{-1} 、或约 10^{10}M^{-1} 至 10^{11}M^{-1} 或更高的平衡缔合常数(K_a)反映的结合亲和力特异性结合人CTLA-4,如通过Biacore分析测定的；(b) 至少约 10^3 、约 10^4 或约 $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 的动力学缔合常数(k_a)；(c) 至少约 10^3 、约 10^4 或约 $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 的动力学解离常数(k^d)；以及(d) 抑制CTLA-4与B7-1 (CD80) 和B7-

2 (CD86) 结合。可用于本发明中的抗CTLA-4抗体包括特异性结合人CTLA-4并且表现出前述特征中的至少一种、并且优选地至少三种的单克隆抗体。

[0118] 可用于所公开的方法中的抗CTLA-4抗体还包括特异性结合人PD-1并且与伊匹单抗或替西木单抗交叉竞争结合人CTLA-4或者结合相同的人CTLA-4表位区的分离抗体。在某些优选的实施方案中,与伊匹单抗或替西木单抗交叉竞争结合人CTLA-4或者结合相同的人PD-1表位区的抗体是包含人IgG1同种型的重链的抗体。对于施用于人受试者,这些交叉竞争抗体优选地为嵌合抗体,或更优选地为人源化抗体或人抗体。可用的抗CTLA-4抗体还包括上述抗体的抗原结合部分,诸如Fab、F(ab')₂、Fd或Fv片段。

[0119] 在一个具体实施方案中,本发明涵盖特定类别的检查点抑制剂药物的用途,所述检查点抑制剂药物抑制细胞毒性T淋巴细胞抗原-4 (CTLA-4) 的活性。在本发明的方法中使用的合适的抗CTLA4拮抗剂包括但不限于抗CTLA4抗体、人抗CTLA4抗体、小鼠抗CTLA4抗体、哺乳动物抗CTLA4抗体、人源化抗CTLA4抗体、单克隆抗CTLA4抗体、多克隆抗CTLA4抗体、嵌合抗CTLA4抗体、MDX-010 (伊匹单抗)、替西木单抗、抗CD28抗体、抗CTLA4 Adnectin、抗CTLA4结构域抗体、单链抗CTLA4片段、重链抗CTLA4片段、轻链抗CTLA4片段、激动共刺激通路的CTLA4抑制剂、PCT公开号W02001/014424中所公开的抗体、PCT公开号W02004/035607中所公开的抗体、美国专利公开号2005/0201994中所公开的抗体,以及已授权的欧洲专利号EP1212422 B1中所公开的抗体。附加的CTLA-4抗体在以下专利中有所描述:美国专利号5,811,097、5,855,887、6,051,227和6,984,720;PCT公开号W001/14424和W000/37504;以及美国专利公开号2002/0039581和2002/086014。可以用于本发明的方法中的其他抗CTLA-4抗体包括例如以下专利中公开的那些:W098/42752;美国专利号6,682,736和6,207,156;Hurwitz等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,95 (17):10067-10071 (1998);Camacho等人,J.Clin.Oncology,22 (145):摘要编号2505 (2004) (抗体CP-675206);Mokyr等人,Cancer Res.,58:5301-5304 (1998),以及美国专利号5,977,318、6,682,736、7,109,003和7,132,281。

[0120] 附加的抗CTLA4拮抗剂包括但不限于以下能够破坏CD28抗原的下述能力的任何抑制剂:结合其同源配体、抑制CTLA4结合其同源配体的能力、经由共刺激通路增强T细胞应答、破坏B7结合CD28和/或CTLA4的能力、破坏B7活化共刺激通路的能力、破坏CD80结合CD28和/或CTLA4的能力、破坏CD80活化共刺激通路的能力、破坏CD86结合CD28和/或CTLA4的能力、破坏CD86活化共刺激通路的能力,以及破坏共刺激通路,通常是防止其被活化。这必然包括CD28、CD80、CD86、CTLA4以及共刺激通路的其他成员的小分子抑制剂;针对CD28、CD80、CD86、CTLA4以及共刺激通路的其他成员的抗体;针对CD28、CD80、CD86、CTLA4以及共刺激通路的其他成员的反义分子;针对CD28、CD80、CD86、CTLA4以及共刺激通路的其他成员的Adnectin,CD28、CD80、CD86、CTLA4以及共刺激通路的其他成员的RNAi抑制剂 (既有单链,又有双链),以及其他抗CTLA4拮抗剂。

[0121] 在本公开的一些实施方案中,免疫检查点抑制剂化合物抑制免疫检查点受体与免疫检查点受体的对应配体之间的信号传导相互作用。免疫检查点抑制剂化合物可以通过阻断免疫检查点通路的活化来发挥作用,方式为抑制 (拮抗) 免疫检查点受体 (受体的一些示例包括CTLA-4、PD-1、LAG-3、TIM-3、BTLA和KIR) 或通过抑制免疫检查点受体的配体 (配体的一些示例包括PD-L1和PD-L2)。在此类实施方案中,免疫检查点抑制剂化合物的作用是减少

或消除肿瘤微环境中的免疫系统抗肿瘤应答的某些方面的下调。

[0122] 免疫检查点受体细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4 (CTLA-4) 在T细胞上表达,并且参与降低T细胞活化水平的信号传导通路。据信,CTLA-4可以通过CD80和CD86的竞争性结合和螯合来下调T细胞活化。此外,已证实CTLA-4参与增强 T_{Reg} 细胞的免疫抑制活性。

[0123] 在本公开的一些实施方案中,免疫检查点抑制剂化合物是小有有机分子(分子量小于1000道尔顿)、肽、多肽、蛋白质、抗体、抗体片段或抗体衍生物。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂化合物是抗体。在一些实施方案中,该抗体是单克隆抗体,具体地讲,人或人源化单克隆抗体。

[0124] 用于制备和使用免疫检查点抗体的方法在以下例示性出版物中有所描述。抗CTLA-4抗体的制备和治疗性用途在美国专利号7,229,628 (Allison)、美国专利号7,311,910 (Linsley) 和美国专利号8,017,144 (Korman) 中有所描述。抗PD-1抗体的制备和治疗性用途在美国专利号8,008,449 (Korman) 和美国专利号8,552,154 (Freeman) 中有所描述。抗PD-L1抗体的制备和治疗性用途在美国专利号7,943,743 (Korman) 中有所描述。抗TIM-3抗体的制备和治疗性用途在美国专利号8,101,176 (Kuchroo) 和美国专利号8,552,156 (Tagayanagi) 中有所描述。抗LAG-3抗体的制备和治疗性用途在美国专利申请号2011/0150892 (Thudium) 和国际公布号W02014/008218 (Lonberg) 中有所描述。抗KIR抗体的制备和治疗性用途在美国专利号8,119,775 (Moretta) 中有所描述。阻断BTLA调控的抑制性通路的抗体(抗BTLA抗体)的制备在美国专利号8,563,694 (Mataraza) 中有所描述。

[0125] 在本公开的一些实施方案中,免疫检查点抑制剂化合物是CTLA-4受体抑制剂、PD-1受体抑制剂、LAG-3受体抑制剂、TIM-3受体抑制剂、BTLA受体抑制剂或KIR受体抑制剂。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂化合物是PD-L1的抑制剂或PD-L2的抑制剂。

[0126] 设想将任何合适日剂量的检查点抑制剂与本文所公开的组合物、剂型和方法一起使用。检查点抑制剂的日剂量取决于多个因素,其确定在本领域技术人员的技能范围内。例如,检查点抑制剂的日剂量取决于检查点抑制剂的强度。弱免疫检查点抑制剂将需要比中度免疫检查点抑制剂更高的日剂量,并且中度免疫检查点抑制剂将需要比强免疫检查点抑制剂更高的日剂量。例如,Merck的派姆单抗 (Keytruda) 被批准为每三周在30分钟内以2mg/kg进行静脉注射(50mg冻干粉末)。纳武单抗 (OPDIVO) 每2周在60分钟内以3mg/kg通过静脉注射进行施用(一次性使用小瓶中的注射剂型:40mg/4ml和100mg/10ml)。伊匹单抗 (YERVOY) 每3周在90分钟内以3mg/kg通过静脉注射进行施用,总共4剂(剂型:50mg/10ml, 200mg/40ml)。

[0127] 用于口服的固体形式可包含药学上可接受的粘合剂、甜味剂、崩解剂、崩解剂、调味剂、包衣剂、防腐剂、润滑剂和/或延时剂。合适的粘合剂包括阿拉伯树胶、明胶、玉米淀粉、黄蓍胶、藻酸钠、羧甲基纤维素或聚乙二醇 (PEG)。合适的甜味剂包括蔗糖、乳糖、葡萄糖、天冬甜素或糖精。合适的崩解剂包括玉米淀粉、甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、黄原胶、膨润土、藻酸或琼脂。合适的稀释剂包括乳糖、山梨醇、甘露糖醇、右旋糖、高岭土、纤维素、碳酸钙、硅酸钙或磷酸二钙。合适的矫味剂包括薄荷油、冬青油、樱桃、橙或覆盆子矫味剂。合适的包衣剂包括丙烯酸和/或甲基丙烯酸和/或它们的酯的聚合物或共聚物、蜡、脂肪醇、玉米素、紫胶或谷蛋白。合适的防腐剂包括苯甲酸钠、维生素E、 α -生育酚、抗坏血酸、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯或亚硫酸氢钠。合适的润滑剂包括硬脂酸镁、硬脂酸、油酸

钠、氯化钠或滑石。合适的延时剂包括单硬脂酸甘油酯或双硬脂酸甘油酯。

[0128] 本发明的组合物和方法可以包括化合物的制剂,所述制剂在施用于受试者时,导致所述化合物的浓度对丝状病毒介导的疾病进行治疗。所述化合物可以以任何适当的量被包含在任何合适的载体物质中,并且通常以按组合物总重量的1重量%至95重量%的量存在。该组合物可以以适于口服、胃肠外(例如,静脉内或肌内)、直肠、皮肤病学、皮肤(cutaneous)、鼻、阴道、吸入、皮肤(skin)(贴剂)、眼、鞘内或颅内施用途径的剂型提供。因此,该组合物可以为例如片剂、胶囊、药丸、粉末、颗粒剂、混悬剂、乳剂、溶液剂、凝胶剂(包括水凝胶)、糊剂、膏剂、霜剂、硬膏剂、浸液、渗透递送装置、栓剂、灌肠剂、注射剂、植入物、喷射剂或气溶胶剂的形式。这些药物组合物可以根据常规的制药操作来配制。

[0129] 根据本发明的或用于本发明的方法中的药物组合物可以被配制成在施用后立即或者在施用后的任何预定时间或时间段释放活性化合物。后一类型的组合物通常被称为控释制剂,其包括:(i)在体内在延长的时间段内产生基本上恒定浓度的本发明的作用剂的制剂;(ii)在预定的延滞时间之后,在体内在延长的时间段内产生基本上恒定浓度的本发明的作用剂的制剂;(iii)通过维持体内作用剂的相对恒定的有效水平,同时将与作用剂血浆水平的波动相关联的不期望的副作用(锯齿动力学模式)最小化,来在预定的时间段期间维持作用剂的作用的制剂;(iv)使作用剂的作用局部化(例如将控释组合物在空间上布置于患病组织或器官附近或之中)的制剂;(v)实现给药便利性(例如每周施用一次或每两周施用一次组合物)的制剂;以及(vi)通过使用载体或化学衍生物将所述组合递送至特定靶细胞类型来靶向作用剂的作用的制剂。

[0130] 可以采取许多策略中的任一种以便获得控释,其中释放速率超过所考虑化合物的代谢速率。在一个示例中,通过适当选择各种制剂参数和成分(包括例如各种类型的控释组合物和包衣)来获得控释。因此,将所述化合物与适当的赋形剂一起配制成药物组合物,该药物组合物在施用时以受控方式释放所述化合物。示例包括单或多单元片剂或胶囊组合物、油溶液、混悬剂、乳剂、微胶囊、分子复合物、微球、纳米颗粒、贴剂和脂质体。

[0131] 不旨在将化合物的施用限于组合中的所有化合物只具有单一的制剂和递送方法。该组合可以使用独立的制剂和/或针对该组合中的每种化合物使用例如上述制剂和方法中的任一种的递送方法来施用。在一个示例中,第一作用剂口服递送,并且第二作用剂静脉内递送。

[0132] 化合物或化合物组合的剂量取决于若干因素,包括:施用方法、待治疗疾病的类型、感染的严重程度、首次施用是在感染的早期还是晚期进行的,以及待治疗患者的年龄、体重和健康状况。对于包括本文所鉴定的成对协同作用剂的组合,抗病毒剂的推荐剂量可以小于或等于如Physician's Desk Reference,第69版(2015)中所给出的推荐剂量。

[0133] 如上所述,所考虑的化合物可以以片剂、胶囊、酏剂或糖浆的形式口服施用,或者以栓剂的形式直肠施用。化合物的胃肠外施用适宜地例如以盐水溶液的形式或用掺入到脂质体中的化合物进行。在化合物本身不具有充分的溶解性以被溶解的情况下,可以施用增溶剂诸如乙醇。化合物的正确剂量可以通过检查化合物在病毒复制测定中的功效及其在人类中的毒性来确定。

[0134] 本发明的作用剂也是阐明关于病毒性疾病中所涉及的生物学通路的机制信息的有用工具。这种信息可以导致对用于治疗、预防或减少病毒性疾病的新组合或单一作用剂

的开发。本领域已知的确定生物学通路的方法可以用于确定通过使感染病毒的细胞(例如,原代巨噬细胞)与本发明的化合物接触而影响的通路或通路网络。此类方法可以包括分析与未经处理的阳性或阴性对照化合物和/或新的单一作用剂和组合相比,在与本发明的化合物接触之后表达或受到抑制的细胞成分,或者分析细胞或病毒的其他一些活性,诸如酶活性、营养物质摄取和增殖。所分析的细胞组分可以包括基因转录物和蛋白质表达。合适的方法可以包括标准生物化学技术、放射标记本发明的化合物(例如, ^{14}C 或 ^3H 标记),以及观察化合物与蛋白质的结合,例如使用2D凝胶、基因表达谱分析。一旦被鉴定,此类化合物就可以用于体内模型(例如敲除小鼠或转基因小鼠)中以进一步验证该工具或者开发新的作用剂或策略来治疗病毒性疾病。

[0135] 试剂盒和包装

[0136] 术语“试剂盒”和“药物试剂盒”是指商业试剂盒或包装,其在一个或多个合适的容器中包含一种或多种药物组合物及其使用说明。在一个实施方案中,提供了包括ABC294640及其施用说明的试剂盒。在一个实施方案中,提供了包括ABC294640与一种或多种(例如,一种、两种、三种、一种或两种,或者一种至三种)附加治疗剂的组合及其施用说明的试剂盒。

[0137] 在一个实施方案中,将本公开的检查点抑制剂配制成包装在单个包装中的施用单元。单个包装涵盖但不限于瓶子、防儿童开启的瓶子、安瓿和管。在一个实施方案中,将本公开的检查点抑制剂和任选的附加治疗剂配制成施用单元,并且每个单一施用单元被单独包装在单个包装中。此类单独包装的单元可以包含任何形式的药物组合物,包括但不限于液体形式、固体形式、粉末形式、颗粒形式、泡腾粉末或片剂、硬胶囊或软胶囊、乳剂、混悬剂、糖浆、栓剂、片剂、糖锭、锭剂、溶液剂、口腔贴片、薄膜、口腔凝胶、咀嚼片、口香糖和一次性使用注射器。此类单独包装的单元可以组合在由纸材、硬纸板、纸板、金属箔和塑料箔中的一者或多者制成的包装(例如泡罩包装)中。一个或多个施用单元可以每天施用一次或几次。一个或多个施用单元可以每天施用三次。一个或多个施用单元可以每天施用两次。一个或多个施用单元可以在第一天施用,并且一个或多个施用单元可以在随后的日子里施用。

[0138] 实施例

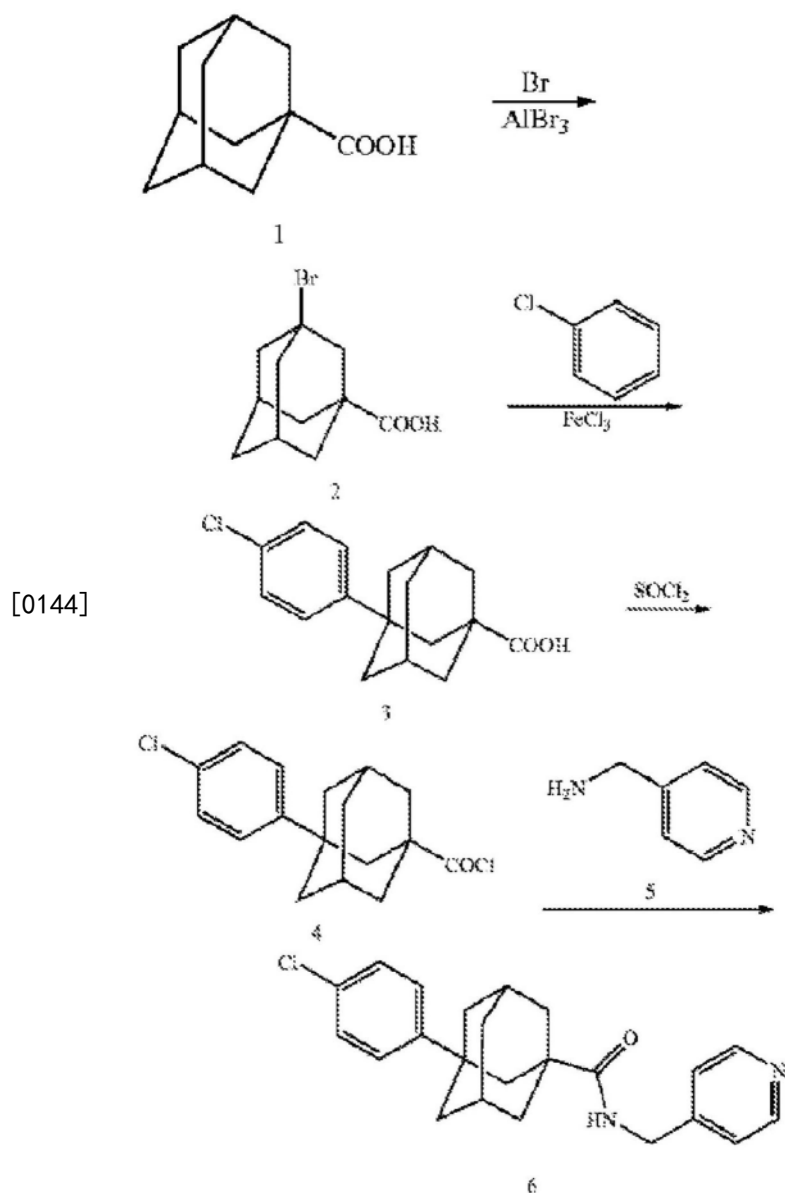
[0139] 参考以下实施例可以更好地理解本发明。这些实施例旨在代表本发明的具体实施方案,并且不旨在限制本发明的范围。

[0140] 实施例1

[0141] 用于合成3-(4-氯-苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺(ABC294640)的方法

[0142] 例如,用于合成ABC294640的方法描述于方案1中。在氯化铝(AlCl_3)存在下,金刚烷-1-羧酸(1)的直接溴化得到1的3-溴化物衍生物(2),通过傅里德-克拉夫茨(Friedel-Crafts)反应将其转化为(3)。3与亚硫酸氯(SOCl_2)反应,得到3-R-取代的-1-金刚烷碳酰氯4。通过使4与经取代的胺(例如,4-氨基甲基吡啶(5)在THF中反应,获得了(6,也表示为ABC294640)和相关的酰胺化合物。

[0143] 方案1



[0145] 更具体地讲,在0℃处将金刚烷-1-羧酸(1)(45g,0.25mol)添加到AlCh(45g,0.34mol)和Bn(450g)的混合物中并且在0℃至10℃处搅拌48小时,在约20℃处保持5小时,倾注到500g碎冰上,用300ml CHCl_3 稀释并且用固体 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 脱色。用Et₂O(50ml×2)萃取水相。将合并的有机溶液用 H_2O 洗涤,并且用10%NaOH萃取。将碱性萃取物用2N H_2SO_4 酸化,提供了49g(收率=75.7%)3-溴-金刚烷-1-羧酸(2)。

[0146] 在30分钟的时段内,在-10℃处将3-溴-金刚烷-1-羧酸(2)(16.0g,61.7mmol)在50ml无水氯苯中的溶液添加到100ml无水氯苯和9.3g,70mmol AlCl_3 中。然后将混合物升温至室温维持1小时,然后加热至90℃维持10小时。然后将混合物倾注到200g碎冰上,并且过滤,得到14.2g(收率=79.3%)3-(4-氯-苯基)-金刚烷-1-羧酸(3)。

[0147] 将3与等摩尔量的1,1'-羰基二咪唑(CDI)反应,得到中间体3-R-取代的-1-金刚烷羰基咪唑(4)。通过使4与经取代的胺反应,获得了对应的金刚烷基酰胺。

[0148] 例如,3与4-氨基甲基吡啶(5)在甲苯中的反应产生了{3-(4-氯-苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺}(6,也表示为ABC294640),收率为92.6%。并且熔点为128℃至130℃,¹HNMR(300MHz, CDCl_3) δ 1.72-2.25(m,12H,Admant-CH),4.44-4.46(d,J=6Hz,2H,

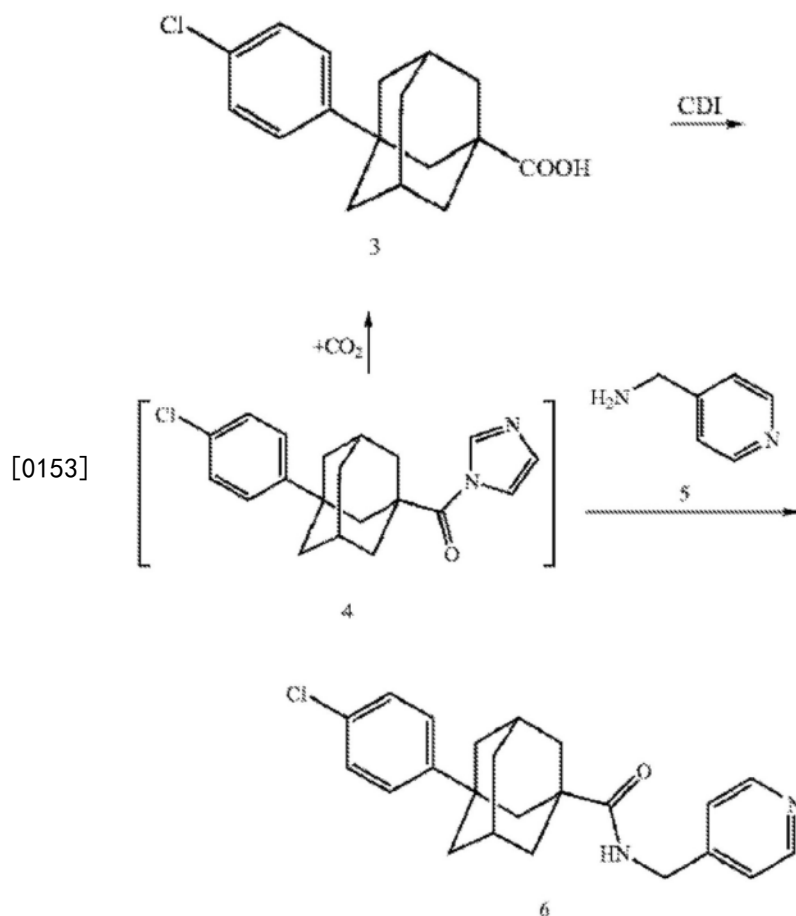
$\text{CH}_2\text{-Py}$) , 6.18 (m, 1H, HN) , 7.13-7.15 (d, $J=6\text{Hz}$, 2H, H-Py) , 7.15-7.30 (m, 4H, H-Ph) , 8.52-8.54 (d, $J=6\text{Hz}$, 2H, H-Py) ; ^{13}C NMR (300MHz, CDCl_3) δ 28.98, 35.73, 36.71, 38.77, 42.18, 42.37, 44.88, 122.38, 125.30, 126.57, 128.56, 129.26, 148.39, 150.20 177.76; MS m/z (相对强度) 381.50 (MH^+ , 100) , 383.41 (90) , 384.35 (80) 。

[0149] 实施例2

[0150] 用于合成ABC294640的第二方法

[0151] 用于合成ABC294640和相关金刚烷基酰胺的第二方法描述于方案2中。如上所述制备3-苯基取代的中间体(3)。将3与1,1'-羰基二咪唑(CDI)反应,得到3-R-取代的-1-金刚烷羧基咪唑中间体(4)。通过使4与经取代的胺(例如4-氨基甲基吡啶5)在甲苯中反应,获得了6{3-(4-氯-苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺}。

[0152] 方案2.



[0154] 一组多样化的经取代的芳基金刚烷可以通过各种芳族化合物与2的缩合来有效地合成,并且多种此类化合物是可商购获得的。此外,3的酰胺化可以使用多种偶联试剂和含伯胺的化合物来有效地完成。以下实施例提供了该方法的产物的若干代表;然而,这些方法可以适于产生被认为是本发明主题的许多结构上相关的金刚烷基酰胺。为了充分公开这些方法,美国专利号7,338,961以引用方式并入本文以获得其中的教导内容。

[0155] 实施例3

[0156] ABC294640增加肿瘤细胞表面上钙网蛋白的表达

[0157] 肿瘤细胞正在经历免疫原性细胞死亡(ICD)的一个指标是细胞表面上钙网蛋白的表达增加。钙网蛋白通常在细胞的内质网(ER)中表达;然而,当用促进ER应激的作用剂处理

细胞时,可以在细胞的外表面上观察到钙网蛋白表达。ER应激的促进是诱导ICD的典型机制,因此测量钙网蛋白的表面表达是确定化合物是否引起ICD的已建立的方法。检查了ABC294640(鞘氨醇激酶-2的抑制剂)对若干不同类型的肿瘤细胞中的钙网蛋白的表面表达的影响。在这些实验中,将测试肿瘤细胞与不同浓度的ABC294640一起温育,并且在添加ABC294640之后4小时至24小时收获细胞。然后将细胞与选择性结合钙网蛋白的荧光标记抗体一起温育,洗涤,然后通过流式细胞术分析,以对许多单个细胞上的表面钙网蛋白的量进行定量。使用流式细胞术领域中熟知的算法,通过测定细胞群的荧光强度的几何平均值来分析所得数据。表1中提供的数据汇总了用ABC294640处理对一组肿瘤细胞中的钙网蛋白的表面表达的影响。对于每种细胞类型,用二甲基亚砜(DMSO,用于溶解ABC294640的溶剂)或40 μ M ABC294640处理样品,持续24小时的时段。用DMSO处理的细胞样品的荧光强度的几何平均值表示为1.0,并且用ABC294640处理的细胞样品的数据相对于DMSO对照表示。在所有情况下,用ABC294640处理均引起钙网蛋白的表面表达增加,应答范围为1.46至3.64。应当指出的是,该数据是在对数标度上计算的,因此2.0的几何平均荧光表明表面钙网蛋白的量增加了10倍。概括地说,用ABC294640处理使胰腺肿瘤细胞、前列腺肿瘤细胞、神经母细胞瘤肿瘤细胞、乳腺肿瘤细胞、肺肿瘤细胞和黑素瘤肿瘤细胞中的表面钙网蛋白表达增加了介于大约3倍至>400倍之间的倍数。因此,ABC294640在大范围的肿瘤中增加了ICD。

[0158] 表.1.ABC294640促进一系列肿瘤细胞系中钙网蛋白的表面表达。

[0159]			表面钙网蛋白表达	
			(荧光强度的几何平均值)	
	组织	细胞系	对照	40μM ABC294640
	胰腺	PAN02	1.0	2.31
	前列腺	TRAMP-C2	1.0	3.64
	神经母细胞瘤	Neuro-2a	1.0	3.0
	乳房	E0771	1.0	1.46
	肺	路易斯肺癌	1.0	3.0
	黑素瘤	B16-F10	1.0	2.7

[0160] 实施例4

[0161] 体内证明ABC294640在B16肿瘤细胞中诱导了免疫原性细胞死亡

[0162] 使用同系小鼠模型评价了ABC294640诱导ICD的能力,其中鼠黑素瘤B16细胞(ATCC CRL-6322)在体外用ABC294640处理,然后皮下植入到免疫活性(C57BL/6)小鼠中。C57BL/6小鼠(6至8周龄,雄性)得自Jackson Labs,并且保持在标准条件下,以自由采食方式提供食物和水。临床级ABC294640(BatchCHP 110607)由ChemPacific Corporation(Baltimore, MD)在GMP合同下制造,并且用于所有研究。B16细胞购自ATCC,并且在标准条件下在含有10%胎牛血清的杜氏改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)中培养。将B16细胞在培养物中用已知引起细胞死亡的一定浓度的ABC294640处理24小时,以诱导细胞死亡—将细胞用40 μ M ABC294640处理。然后将培养物胰蛋白酶化并且刮取平板的细胞来收获经ABC294640处理的细胞,将其悬浮在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中并且以0.1ml总体积皮下注射(500,000个垂死细胞)到左后肋腹中。对照组的左后肋腹用单独的PBS进行注射。7天之后,将100,000个未经处理的B16细胞植入两组小鼠(n=10只/组)的右后肋腹中。每周用数字卡尺测量肿瘤生长三次,并且使用公式 $(L \times W^2)/2$ 计算肿瘤体积。当肿瘤体积达

到 $\geq 3,000\text{mm}^3$ 时,将小鼠安乐死。图1示出了在植入到经PBS预处理的小鼠(对照)或用经ABC294640处理的B16细胞预处理过的小鼠中(免疫)之后第14天B16肿瘤尺寸的数据。对照小鼠中的肿瘤在第14天达到 $2344 \pm 361\text{mm}^3$ 的平均尺寸。相比之下,注射到免疫小鼠中的细胞在第14天仅达到 $641 \pm 210\text{mm}^3$ 的平均尺寸($p=0.0007$)。这些数据证明,用ABC294640处理B16肿瘤细胞引起ICD,这显著减少了随后被攻击的小鼠中的肿瘤生长。

[0163] 实施例5

[0164] 体内证明ABC294640在Neuro-2a肿瘤细胞中诱导免疫原性细胞死亡

[0165] 在该实验的第二版本中,使用同系小鼠模型评价了ABC294640诱导ICD的能力,其中鼠Neuro-2a神经母细胞瘤细胞在体外用ABC294640处理,然后皮下植入到免疫活性(A/J)小鼠中。小鼠、ABC294640和肿瘤细胞的来源与实施例4中详述的相同。将Neuro-2a细胞在培养物中用已知引起细胞死亡的一定浓度的ABC294640处理24小时,以诱导细胞死亡—将细胞用 $40\mu\text{M}$ ABC294640处理。然后将培养物胰蛋白酶化并且将细胞从平板刮下,来收获经ABC294640处理的细胞,将其悬浮在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中并且以 0.1ml 总体积皮下注射($5,000,000$ 个垂死细胞)到左后肋腹中。对照组的左后肋腹用单独的PBS进行注射。7天之后,将 $1,000,000$ 个未经处理的Neuro-2a细胞植入两组小鼠($n=4$ 至 5 只/组)的右后肋腹中。如实施例1所述测量肿瘤生长并且计算肿瘤体积。图2示出了在植入到经PBS预处理的小鼠(对照)或用经ABC294640处理的Neuro-2a细胞预处理过的小鼠中(免疫)之后第22天Neuro-2a肿瘤尺寸的数据。对照小鼠中的肿瘤在第22天达到 $1039 \pm 450\text{mm}^3$ 的平均尺寸。形成鲜明对比的是,注射到免疫小鼠中的细胞在第22天仅达到 $15 \pm 15\text{mm}^3$ 的平均尺寸($p=0.085$)。尽管对照组中的所有小鼠都有肿瘤,但是免疫组的75%在第22天却没有可测量的肿瘤。这些数据证明,用ABC294640处理Neuro-2a肿瘤细胞引起ICD,这显著减少了随后被攻击的小鼠中的肿瘤生长。

[0166] 实施例6

[0167] 体内证明ABC294640在路易斯肺癌(LLC)肿瘤细胞中诱导免疫原性细胞死亡

[0168] 在该实验的第三版本中,使用同系小鼠模型评价了ABC294640诱导ICD的能力,其中鼠LLC细胞(ATCC CRL-1642)在体外用ABC294640处理,然后皮下植入到免疫活性(C57BL/6)小鼠中。小鼠、ABC294640和肿瘤细胞的来源与实施例4中详述的相同。将LLC细胞在培养物中用 $40\mu\text{M}$ ABC294640处理24小时,以诱导细胞死亡。然后将培养物胰蛋白酶化并且将细胞从平板刮下,来收获经ABC294640处理的细胞,将其悬浮在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中并且以 0.1ml 总体积皮下注射($5,000,000$ 个垂死细胞)到左后肋腹中。对照组的左后肋腹用单独的PBS进行注射。7天之后,将 $1,000,000$ 个未经处理的LLC细胞植入两组小鼠($n=10$ 只/组)的右后肋腹中。如实施例1所述测量肿瘤生长并且计算肿瘤体积。图3A至图3C示出了在植入到经PBS预处理的小鼠(对照)或用经ABC294640处理的LLC细胞预处理过的小鼠中(免疫)之后第15天、第17天和第20天的LLC肿瘤尺寸的数据。对照小鼠中的肿瘤在实验过程中逐渐增大,在第15天、第17天和第20天分别达到 $651 \pm 114\text{mm}^3$ 、 $1190 \pm 143\text{mm}^3$ 和 $2263 \pm 227\text{mm}^3$ 的平均尺寸。相比之下,注射到免疫小鼠中的细胞在第15天、第17天和第20天,分别达到 $209 \pm 18\text{mm}^3$ ($p=0.0012$)、 $510 \pm 94\text{mm}^3$ ($p=0.0009$)和 $1220 \pm 320\text{mm}^3$ ($p=0.016$)的平均尺寸。这些数据证明,用ABC294640处理LLC肿瘤细胞引起ICD,这显著减少了随后被攻击的小鼠中的肿瘤生长。

[0169] 实施例7

[0170] 体内证明ABC294640诱导交叉免疫

[0171] 以上实施例证明,用ABC294640体外处理多个肿瘤细胞系,之后将经处理的细胞施用于正常小鼠,抑制了随后施用的相同肿瘤细胞的未经处理的样品的生长。在以下研究中,测试了施用一种类型的经ABC294640处理的肿瘤细胞不仅抑制相同类型的肿瘤细胞的生长,而且还提供对不同类型的肿瘤细胞的“交叉”免疫的假说。小鼠、ABC294640和肿瘤细胞的来源与前述实施例中详述的相同。单独地,将B16细胞或LLC细胞在培养物中用40 μ M ABC294640处理24小时,以诱导细胞死亡。然后通过将培养物胰蛋白酶化并且将细胞从平板刮下,来收获经ABC294640处理的B16细胞或LLC细胞,将其悬浮在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中并且以0.1ml总体积皮下注射(500,000个垂死的B16细胞或5,000,000个垂死的LLC细胞)到左后肋腹中。对照小鼠的左后肋腹用单独的PBS进行注射。7天之后,将小鼠随机分成4组,如下所概述,用100,000个活B16细胞或1,000,000个活LLC细胞在右后肋腹进行攻击,以评价肿瘤生长。因此,“交叉”测试组为:组3,其由用经ABC294640处理的肺癌细胞免疫并且用未经处理的黑素瘤细胞攻击的小鼠构成;以及组6,其由用经ABC294640处理的黑素瘤细胞免疫并且用未经处理的肺癌细胞攻击的小鼠构成。

[0172]

组	小鼠的数目	第一次处理	第二次处理
1	6	PBS	未经处理的B16细胞
2	7	经ABC294640处理过的B16细胞	未经处理的B16细胞
3	7	经ABC294640处理过的LLC细胞	未经处理的B16细胞
4	6	PBS	未经处理的LLC细胞
5	7	经ABC294640处理过的B16细胞	未经处理的LLC细胞
6	7	经ABC294640处理过的LLC细胞	未经处理的LLC细胞

[0173] 如实施例1所述测量肿瘤生长并且计算肿瘤体积。当肿瘤体积达到 $\geq 3,000\text{mm}^3$ 时,将小鼠安乐死。图4示出了在植入到经PBS预处理的小鼠(对照)、用经ABC294640处理的B16细胞预处理过的小鼠或用经ABC294640处理的LLC细胞预处理过的小鼠中之后第19天B16肿瘤尺寸的数据。对照小鼠中的肿瘤达到 $702 \pm 144\text{mm}^3$ 的平均尺寸。相比之下,注射到B16免疫小鼠中的细胞达到 $203 \pm 15\text{mm}^3$ 的平均尺寸($p=0.018$);而注射到LLC免疫小鼠中的细胞达到 $102 \pm 51\text{mm}^3$ 的平均尺寸($p=0.0009$)。因此,用经ABC294640处理的黑素瘤细胞或肺癌细胞进行疫苗接种抑制了未经处理的黑素瘤细胞的后续生长。图5示出了在植入到经PBS预处理的小鼠(对照)、用经ABC294640处理的B16细胞预处理过的小鼠或用经ABC294640处理的LLC细胞预处理过的小鼠中之后第28天LLC肿瘤尺寸的数据。对照小鼠中的肿瘤达到 $479 \pm 113\text{mm}^3$ 的平均尺寸。相比之下,注射到B16免疫小鼠中的细胞达到 $208 \pm 74\text{mm}^3$ 的平均尺寸($p=0.0003$);而注射到LLC免疫小鼠中的细胞达到 $177 \pm 68\text{mm}^3$ 的平均尺寸($p<0.001$)。因此,用经ABC294640处理的黑素瘤细胞或肺癌细胞进行疫苗接种抑制了未经处理的肺癌细胞的后续生长。这些数据证明,用ABC294640体外处理肿瘤细胞促进了在随后被攻击的小鼠中对多种肿瘤类型的免疫。

[0174] 实施例8

[0175] ABC294640与抗PD-1抗体组合的体内抗肿瘤活性

[0176] 诱导ICD的作用剂可以增强检查点抗体的抗肿瘤活性。因为上述数据清楚地证明

ABC294640在若干类型的癌症中诱导ICD,所以在B16肿瘤模型中检查了用ABC294640和抗PD-1抗体处理荷瘤小鼠的组合效果。抗小鼠PD-1(目录号BE0146)抗体购自BioXCell(West Lebanon, NH)。在实验的第0天,将悬浮在PBS中的100,000个B16细胞皮下注射到C57BL/6小鼠的右后肋腹中。在实验的第3天,将小鼠随机分成以下四个处理组($n=10$ 只/组):对照(仅溶媒);单独的ABC294640;单独的抗PD-1抗体;以及ABC294640与抗PD-1抗体的组合。将ABC294640悬浮在溶媒(46.7%PEG、46.7%盐水和6.6%乙醇)中并且以50mg/kg, 5天/周(即,第3天至第7天、第10天至第14天、第17天至第21天等)通过口服管饲法给药,直到将其处死。将抗PD-1抗体悬浮在无菌PBS中,并且在第3天、第6天和第10天通过腹膜内(i.p.)注射以200 μ g/小鼠的剂量施用。联合处理组小鼠在安排抗体的日子同时接受抗体处理和ABC294640处理。对照组小鼠在经处理小鼠接受ABC294640或抗体的所有日子接受口服溶媒和/或无菌PBS腹膜内注射。每周用数字卡尺测量肿瘤三次,并且使用公式 $(L \times W^2)/2$ 计算体积。当肿瘤体积达到 $\geq 3,000\text{mm}^3$ 时,将小鼠安乐死。图6展示了B16肿瘤在该实验中的生长。对照小鼠中的肿瘤在大约10天的延滞之后非常猛烈地生长。在第19天,对照、单独的ABC294640、单独的抗PD-1抗体和联合处理组的平均肿瘤体积分别为 $1702 \pm 373\text{mm}^3$ 、 $892 \pm 364\text{mm}^3$ 、 $783 \pm 265\text{mm}^3$ 和 $190 \pm 114\text{mm}^3$ 。单独的ABC294640的肿瘤体积和单独的抗PD-1抗体的肿瘤体积与对照组没有显著差异;然而,ABC294640加上抗PD-1处理组中的肿瘤体积与对照组相比极显著减小($p=0.0011$)。如IACUC协议所指导的,当每只小鼠的肿瘤体积达到3,000 mm^3 时将其处死。图7示出了该实验中小鼠的生存曲线。对照组中的小鼠的中位生存期为21天,并且截至第29天将所有小鼠处死。用单独的ABC294640处理提供了24天的中位生存期,并且在实验终止时的第56天,30%的小鼠是活的($p=0.009$)。类似地,用单独的抗PD-1处理将中位生存期延长至23天($p=0.033$),并且导致20%的小鼠生存至第56天。ABC294640加上抗PD-1抗体的组合将中位生存期显著增加至35天,并且30%的这些小鼠生存至第56天($p<0.0001$)。因此,将ABC294640与PD-1检查点抗体组合提供了大大改善的抗肿瘤活性,并且比单独的任一种作用剂将生存期增加得更长。

[0177] 实施例9

[0178] ABC294640与抗CTLA4抗体的组合的体内抗肿瘤活性

[0179] 在LLC肿瘤模型中检查了用ABC294640和抗CTLA4抗体处理荷瘤小鼠的组合效果。抗小鼠CTLA-4(目录号BE0131)抗体购自BioXCell(West Lebanon, NH)。在实验的第0天,将悬浮在PBS中的1,000,000个LLC细胞皮下注射到小鼠的右后肋腹中。在实验的第3天,将小鼠随机分成以下四个处理组($n=5$ 只/组):对照(仅溶媒);单独的ABC294640;单独的抗CTLA4抗体;以及ABC294640与抗CTLA4抗体的组合。将ABC294640悬浮在溶媒(46.7%PEG、46.7%盐水和6.6%乙醇)中并且以50mg/kg, 5天/周(即,第3天至第7天、第10天至第14天、第17天至第21天等)通过口服管饲法给药,直到将其处死。将抗CTLA4抗体悬浮在稀释缓冲液(BioXCell, 目录号IP0070)中,并且在第3天、第6天、第10天、第13天、第17天和第20天通过腹膜内(i.p.)注射以200 μ g/小鼠的剂量施用。联合处理组小鼠在安排抗体的日子同时接受抗体处理和ABC294640处理。对照组小鼠在经处理小鼠接受ABC294640或抗体的所有日子接受口服溶媒和/或无菌PBS腹膜内注射。每周用数字卡尺测量肿瘤三次,并且使用公式 $(L \times W^2)/2$ 计算体积。当肿瘤体积达到 $\geq 3,000\text{mm}^3$ 时,将小鼠安乐死。图8展示了LLC肿瘤在该实验中的生长。对照小鼠中的肿瘤在大约7天的延滞之后逐渐生长。在第21天,对照、单独的

ABC294640、单独的抗CTLA4抗体和联合处理组的平均肿瘤体积分别为 $4622 \pm 548 \text{mm}^3$ 、 $3197 \pm 914 \text{mm}^3$ 、 $3029 \pm 675 \text{mm}^3$ 和 $1274 \pm 336 \text{mm}^3$ 。单独的ABC294640的肿瘤体积和单独的抗CTLA4抗体的肿瘤体积与对照组没有显著差异；然而，ABC294640加上抗CTLA4处理组中的肿瘤体积与对照组相比极显著减小 ($p=0.0008$)。如IACUC协议所指导的，当每只小鼠的肿瘤体积达到 $3,000 \text{mm}^3$ 时将其处死。图9示出了该实验中小鼠的生存曲线。对照组中的小鼠的中位生存期为19天，并且截至第21天将所有小鼠处死。用单独的ABC294640处理提供了22天的中位生存期；而用抗CTLA4处理却未影响中位生存期。ABC294640加上抗CTLA4抗体的组合将中位生存期增加至 >26 天，并且60%的这些小鼠生存至第26天。因此，将ABC294640与CTLA4检查点抗体组合提供了显著改善的抗肿瘤活性，并且比单独的任一种作用剂将生存期增加得更长。

[0180] 实施例10

[0181] ABC294640与抗PD-L1抗体的组合的体内抗肿瘤活性

[0182] 在B16肿瘤模型中检查了用ABC294640和抗PD-L1抗体处理荷瘤小鼠的组合效果。抗小鼠PD-L1 (目录号BE0101) 抗体购自BioXCell (West Lebanon, NH)。在实验的第0天，将悬浮在PBS中的100,000个B16细胞皮下注射到小鼠的右后肋腹中。当肿瘤达到 $\geq 300 \text{mm}^3$ 的体积时，将小鼠随机分成以下四个处理组 ($n=5$ 至6只/组)：对照 (仅溶媒)；单独的ABC294640；单独的抗PD-L1抗体；以及ABC294640与抗PD-L1抗体的组合。随机化选择当天记录为针对每只小鼠的实验的第1天。将ABC294640悬浮在溶媒 (46.7% PEG、46.7% 盐水和6.6% 乙醇) 中并且以50mg/kg, 5天/周通过口服管饲法给药，直到将其处死。将抗PD-L1抗体悬浮在稀释缓冲液 (BioXCell, 目录号IP0070) 中，并且在第1天、第3天、第5天和第7天通过腹膜内 (i.p.) 注射以200 μg /小鼠的剂量施用。联合处理组小鼠在安排抗体的日子同时接受抗体处理和ABC294640处理。对照组小鼠在经处理小鼠接受ABC294640或抗体的所有日子接受口服溶媒和/或无菌PBS腹膜内注射。每周用数字卡尺测量肿瘤三次，并且使用公式 $(L \times W^2) / 2$ 计算体积。当肿瘤体积达到 $\geq 3,000 \text{mm}^3$ 时，将小鼠安乐死。下表指出了每个处理组的中位生存期。

组	治疗	小鼠的数目	中位生存期 (天)	与对照相比的显著性 (p)
[0183]	1 溶媒	6	8.5	
	2 单独的 ABC294640	5	10	0.19
	3 单独的抗 PD-L1 抗体	6	10.5	0.2
	4 ABC294640 加抗 PD-L1 抗体	5	16	0.0029

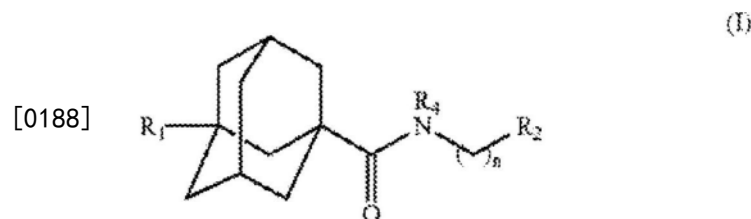
[0184] 对照组中的小鼠的中位生存期为8.5天，并且截至第12天将所有小鼠处死。用单独的ABC294640或用单独的抗PD-L1处理分别提供了10天和10.5天的中位生存期。ABC294640加上抗PD-L1抗体的组合将中位生存期增加至16天 (与对照相比， $p=0.0029$)。因此，将ABC294640与PD-L1检查点抗体组合提供了显著改善的抗肿瘤活性，并且比单独的任一种作用剂将生存期增加得更长。

[0185] 本文公开了治疗受试者的癌症的方法，包括向受试者施用有效量的鞘氨醇激酶 (SK) 抑制剂和有效量的检查点抑制剂。在一个实施方案中，检查点抑制剂可以是针对CTLA4的抗体 (例如，伊匹单抗) 或针对PD-1的抗体 (例如，派姆单抗或纳武单抗) 或针对PD-L1的抗体 (例如，阿特珠单抗或度伐鲁单抗)。其他靶向这些通路的抗体或化学抑制剂也在本发明的范围内。例如，PD-L1通路的附加抑制剂包括BMS-936559、MPDL3280A、BMS-936558、MK-

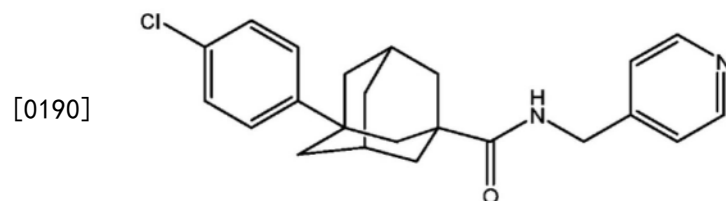
3475、CT-011或MEDI4736。

[0186] 在一个实施方案中,肿瘤细胞可以从癌症患者的血液或受感染组织中分离,并且用ABC294640离体处理大约24小时。然后将经处理的细胞递送至患者的血流,以促进对癌症的免疫应答。

[0187] 在一个实施方案中,鞘氨醇激酶抑制剂是由式I表示的化合物:



[0189] 或其药学上可接受的盐,其中: R_1 是苯基、4-氯苯基或4-氟苯基, R_2 是4-吡啶基,其任选地被至多4个独立地为以下的基团取代: (C_1-C_6) 烷基、卤素、卤代烷基、 $-OC(O)(C_1-C_6)$ 烷基、 $-C(O)O(C_1-C_6)$ 烷基、 $-CONR'R''$ 、 $OC(O)NR'R''$ 、 $NR'C(O)R''$ 、 CF_3-OCF_3 、 $-OH$ 、 C_1-C_6 烷氧基、羟烷基、 $-CN$ 、 $-CO_2H$ 、 $-SH$ 、 $-S-$ 烷基、 $-SOR'R''$ 、 $-SO_2R'$ 、 $-NO_2$ 或 $NR'R''$,其中 R' 和 R'' 独立地为H或 (C_1-C_6) 烷基,并且其中取代基的每个烷基部分任选地进一步被1、2或3个独立地选自卤素、 CN 、 OH 和 NH_2 的基团取代, R_4 为H或烷基,并且 n 为1或2。在一个实施方案中,鞘氨醇激酶抑制剂是:



[0191] 3-(4-氯-苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺。

[0192] 在一个实施方案中,治疗癌症被进一步定义为减小肿瘤的尺寸或抑制肿瘤的生长。在一个实施方案中,将抑制剂施用于受试者至少两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次或十次。在一个实施方案中,对受试者进一步施用第二癌症疗法。在一个实施方案中,第二癌症疗法包括外科手术、放射疗法、化学疗法、毒素疗法、免疫疗法、冷冻疗法或基因疗法。在一个实施方案中,黑素瘤是化疗或放射线抗性黑素瘤。在一个实施方案中,有效量包括至少约0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250或300 μ g/kg或mg/kg受试者体重。

[0193] 一种使用从患者收集的癌细胞制备免疫致敏癌细胞的方法包括用毒性浓度的改变鞘脂代谢的化合物离体处理癌细胞,其中毒性浓度足以诱导癌细胞中的免疫原性细胞死亡。在一个实施方案中,改变鞘脂代谢的化合物是鞘氨醇激酶的抑制剂。在一个实施方案中,作为鞘氨醇激酶抑制剂的化合物是鞘氨醇激酶-2(SK2)的选择性抑制剂。在一个实施方案中,SK2的选择性抑制剂是3-(4-氯-苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺化合物或其药学上可接受的盐。在一个实施方案中,将所收集的癌细胞处理至少24小时。在一个实施方案中,SK2的选择性抑制剂的毒性浓度为约20 μ M至约60 μ M。在一个实施方案中,免疫致敏癌细胞在其表面上过表达钙网蛋白。在一个实施方案中,癌细胞是免疫细胞。在一个实施

方案中,免疫致敏癌细胞在其表面上表达的钙网蛋白是未致敏癌细胞的约3倍或更多倍(例如,约3倍至约400倍或更多倍)。在一些实施方案中,免疫致敏癌细胞在其表面上表达的钙网蛋白是未致敏癌细胞的约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约7倍、约8倍、约9倍、约10倍、约15倍、约20倍、约30倍、约40倍、约50倍、约60倍、约70倍、约80倍、约90倍、约100倍、约150倍、约200倍、约250倍、约300倍、约350倍、约400倍或更多倍。在一些实施方案中,免疫致敏癌细胞在其表面上表达的钙网蛋白是未致敏癌细胞的约3倍至约10倍、约3倍至约50倍、约3倍至约100倍、约3倍至约150倍、约3倍至约200倍、约3倍至约250倍、约3倍至约300倍、约3倍至约350倍、约3倍至约400倍或更多倍。在一些实施方案中,免疫致敏癌细胞在其表面上表达的钙网蛋白是未致敏癌细胞的约10倍至约50倍、约10倍至约100倍、约10倍至约150倍、约10倍至约200倍、约10倍至约250倍、约10倍至约300倍、约10倍至约350倍、约10倍至约400倍或更多倍。在一些实施方案中,免疫致敏癌细胞在其表面上表达的钙网蛋白是未致敏癌细胞的约50倍至约100倍、约50倍至约150倍、约50倍至约200倍、约50倍至约250倍、约50倍至约300倍、约50倍至约350倍、约50倍至约400倍或更多倍。在一些实施方案中,免疫致敏癌细胞在其表面上表达的钙网蛋白是未致敏癌细胞的约100倍至约150倍、约100倍至约200倍、约100倍至约250倍、约100倍至约300倍、约100倍至约350倍、约100倍至约400倍或更多倍。在一些实施方案中,免疫致敏癌细胞在其表面上表达的钙网蛋白是未致敏癌细胞的约150倍至约200倍、约150倍至约250倍、约150倍至约300倍、约150倍至约350倍、约150倍至约400倍或更多倍。在一些实施方案中,免疫致敏癌细胞在其表面上表达的钙网蛋白是未致敏癌细胞的约200倍至约250倍、约200倍至约300倍、约200倍至约350倍、约200倍至约400倍或更多倍。在一些实施方案中,免疫致敏癌细胞在其表面上表达的钙网蛋白是未致敏癌细胞的约250倍至约300倍、约250倍至约350倍、约250倍至约400倍或更多倍。在一些实施方案中,免疫致敏癌细胞在其表面上表达的钙网蛋白是未致敏癌细胞的约300倍至约350倍、约300倍至约400倍或更多倍。在一些实施方案中,免疫致敏癌细胞在其表面上表达的钙网蛋白是未致敏癌细胞的约350倍至约400倍或更多倍。在一个实施方案中,免疫细胞包括T细胞、自然杀伤(NK)细胞或树突状细胞。在一个实施方案中,癌细胞是血液癌细胞。在一个实施方案中,血液癌细胞是白血病细胞。在一个实施方案中,癌细胞是实体肿瘤细胞。在一个实施方案中,癌细胞是循环肿瘤细胞。在一个实施方案中,该方法还包括收获免疫致敏癌细胞的至少一部分并且将这些细胞悬浮在磷酸盐缓冲盐水中。在一个实施方案中,该方法还包括将免疫致敏癌细胞的至少一部分运输到患者护理点。在一个实施方案中,患者护理点是医院。在一个实施方案中,患者护理点是癌症中心。在一个实施方案中,该方法还包括将运输的免疫致敏癌细胞的至少一部分施用于患者以引发免疫应答。在一个实施方案中,免疫应答减缓或阻止患者中的癌症生长。在一个实施方案中,免疫应答阻止癌症在患者中转移。在一个实施方案中,免疫应答使得患者的免疫系统更有效地杀死癌细胞。在一个实施方案中,该方法还包括施用有效量的至少一种检查点抑制剂。

[0194] 一种用于治疗癌症的作用剂,包括通过根据本发明的方法获得的免疫致敏癌细胞。

[0195] 一种免疫致敏癌细胞,其通过包括以下步骤的方法制备:接收从患者收集的癌细胞;以及用毒性浓度的改变鞘脂代谢的化合物离体处理所收集的癌细胞,以制备免疫致敏癌细胞,其中毒性浓度足以诱导癌细胞中的免疫原性细胞死亡。在一个实施方案中,改变鞘

脂代谢的化合物是鞘氨醇激酶的抑制剂。在一个实施方案中,鞘氨醇激酶抑制剂是鞘氨醇激酶-2(SK2)的选择性抑制剂。在一个实施方案中,SK2的选择性抑制剂是3-(4-氯苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺或其药学上可接受的盐。在一个实施方案中,将所收集的癌细胞处理至少24小时。在一个实施方案中,SK2的选择性抑制剂的毒性浓度为约20 μ M至约60 μ M。在一个实施方案中,免疫致敏癌细胞在其表面上过表达钙网蛋白。在一个实施方案中,免疫致敏癌细胞在其表面上表达的钙网蛋白是未致敏癌细胞的约3倍或更多倍(例如,约3倍至约400倍或更多倍)。在一些实施方案中,免疫致敏癌细胞在其表面上表达的钙网蛋白是未致敏癌细胞的约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约7倍、约8倍、约9倍、约10倍、约15倍、约20倍、约30倍、约40倍、约50倍、约60倍、约70倍、约80倍、约90倍、约100倍、约150倍、约200倍、约250倍、约300倍、约350倍、约400倍或更多倍。在一些实施方案中,免疫致敏癌细胞在其表面上表达的钙网蛋白是未致敏癌细胞的约3倍至约10倍、约3倍至约50倍、约3倍至约100倍、约3倍至约150倍、约3倍至约200倍、约3倍至约250倍、约3倍至约300倍、约3倍至约350倍、约3倍至约400倍或更多倍。在一些实施方案中,免疫致敏癌细胞在其表面上表达的钙网蛋白是未致敏癌细胞的约10倍至约50倍、约10倍至约100倍、约10倍至约150倍、约10倍至约200倍、约10倍至约250倍、约10倍至约300倍、约10倍至约350倍、约10倍至约400倍或更多倍。在一些实施方案中,免疫致敏癌细胞在其表面上表达的钙网蛋白是未致敏癌细胞的约50倍至约100倍、约50倍至约150倍、约50倍至约200倍、约50倍至约250倍、约50倍至约300倍、约50倍至约350倍、约50倍至约400倍或更多倍。在一些实施方案中,免疫致敏癌细胞在其表面上表达的钙网蛋白是未致敏癌细胞的约100倍至约150倍、约100倍至约200倍、约100倍至约250倍、约100倍至约300倍、约100倍至约350倍、约100倍至约400倍或更多倍。在一些实施方案中,免疫致敏癌细胞在其表面上表达的钙网蛋白是未致敏癌细胞的约150倍至约200倍、约150倍至约250倍、约150倍至约300倍、约150倍至约350倍、约150倍至约400倍或更多倍。在一些实施方案中,免疫致敏癌细胞在其表面上表达的钙网蛋白是未致敏癌细胞的约200倍至约250倍、约200倍至约300倍、约200倍至约350倍、约200倍至约400倍或更多倍。在一些实施方案中,免疫致敏癌细胞在其表面上表达的钙网蛋白是未致敏癌细胞的约250倍至约300倍、约250倍至约350倍、约250倍至约400倍或更多倍。在一些实施方案中,免疫致敏癌细胞在其表面上表达的钙网蛋白是未致敏癌细胞的约300倍至约350倍、约300倍至约400倍或更多倍。在一些实施方案中,免疫致敏癌细胞在其表面上表达的钙网蛋白是未致敏癌细胞的约350倍至约400倍或更多倍。在一个实施方案中,癌细胞是免疫细胞。在一个实施方案中,免疫细胞包括T细胞、自然杀伤(NK)细胞或树突状细胞。在一个实施方案中,癌细胞是血液癌细胞。在一个实施方案中,血液癌细胞是白血病细胞。在一个实施方案中,癌细胞是实体肿瘤细胞。在一个实施方案中,癌细胞是循环肿瘤细胞。在一个实施方案中,药物组合物包含上述的免疫致敏癌细胞。在一个实施方案中,该药物组合物还包含有效量的至少一种检查点抑制剂。在一个实施方案中,公开了上述免疫致敏癌细胞在制备用于促进患者免疫应答的药物组合物中的用途。在一个实施方案中,免疫应答减缓或阻止患者中的癌症生长。在一个实施方案中,免疫应答阻止癌症在患者中转移。在一个实施方案中,免疫应答使得患者的免疫系统更有效地杀死癌细胞。

[0196] 陈述1:一种用于对从患者收集的癌细胞进行免疫致敏的离体方法,所述方法包括以下步骤:用毒性浓度的改变鞘脂代谢的化合物处理从患者收集的癌细胞,以便在所收集

的癌细胞中诱导免疫原性细胞死亡。

[0197] 陈述2:一种产生从患者收集的免疫致敏癌细胞的离体方法,所述方法包括以下步骤:用毒性浓度的改变鞘脂代谢的化合物处理从患者收集的癌细胞,以便在所收集的癌细胞中诱导免疫原性细胞死亡,从而产生免疫致敏癌细胞。

[0198] 陈述3:改变鞘脂代谢以诱导从患者收集的癌细胞中的免疫原性细胞死亡的化合物的离体用途。

[0199] 陈述4a:陈述1或陈述2的方法或陈述3的用途,其中改变鞘脂代谢的化合物是鞘氨醇激酶的抑制剂。

[0200] 陈述4b:陈述1或陈述2的方法或陈述3的用途,其中改变鞘脂代谢的化合物的毒性浓度为约20 μ M至约60 μ M。

[0201] 陈述5:陈述4a或4b的方法或用途,其中鞘氨醇激酶的抑制剂是鞘氨醇激酶-2 (SK2) 的选择性抑制剂。

[0202] 陈述6:陈述5的方法或用途,其中SK2的选择性抑制剂是3-(4-氯苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺或其药学上可接受的盐。

[0203] 陈述7:陈述1、2或4a至6中任一项的方法或者陈述3至6中任一项的用途,其中所收集的癌细胞被处理至少24小时。

[0204] 陈述8:陈述1、2或4a至7中任一项的方法或者陈述3至7中任一项的用途,其中癌细胞是免疫细胞。

[0205] 陈述9:陈述8的方法或用途,其中免疫细胞包括T细胞、自然杀伤(NK)细胞或树突状细胞。

[0206] 陈述10:陈述1、2或4a至7中任一项的方法或者陈述3至7中任一项的用途,其中癌细胞是血液癌细胞。

[0207] 陈述11:陈述10的方法或用途,其中血液癌细胞是白血病细胞。

[0208] 陈述12:陈述1、2或4a至7中任一项的方法或者陈述3至7中任一项的用途,其中癌细胞是实体肿瘤细胞。

[0209] 陈述13:陈述1、2或4a至7中任一项的方法或者陈述3至7中任一项的用途,其中癌细胞是循环肿瘤细胞。

[0210] 陈述14:陈述1、2或4a至13中任一项的方法或者陈述3至13中任一项的用途,还包括:将免疫致敏癌细胞的至少一部分运输到患者护理点。

[0211] 陈述15:陈述14的方法或用途,其中运输的致敏癌细胞的该部分包括死亡的癌细胞。

[0212] 陈述16:陈述14或15的方法或用途,其中患者护理点是医院。

[0213] 陈述17:陈述14或15的方法或用途,其中患者护理点是癌症中心。

[0214] 陈述18:由陈述2或4至13中任一项的方法产生的免疫致敏癌细胞,其在医学中使用。

[0215] 陈述19:由陈述2或4至13中任一项的方法产生的免疫致敏癌细胞,其用于促进患者中的对癌细胞的免疫应答。

[0216] 陈述20:由陈述2或4至13中任一项的方法产生的免疫致敏癌细胞,其用于减缓或阻止患者中的癌症生长。

[0217] 陈述21:由陈述2或4至13中任一项的方法产生的免疫致敏癌细胞,其用于阻止癌症在患者中转移。

[0218] 陈述22:由陈述2或4至13中任一项的方法产生的免疫致敏癌细胞,其用于使得患者的免疫系统更有效地杀死癌细胞。

[0219] 陈述23:由陈述2或4至13中任一项的方法产生的免疫致敏癌细胞,其用于治疗癌症的方法中。

[0220] 陈述24:根据陈述20所述使用的免疫致敏癌细胞,其中所述方法还包括施用有效量的至少一种检查点抑制剂。

[0221] 一种通过增强或诱导有需要的受试者中针对细胞的免疫原性细胞死亡来治疗癌症的方法包括向受试者施用有效量的改变鞘脂代谢的化合物并且向受试者施用有效量的检查点通路抑制剂。在一个实施方案中,改变鞘脂代谢的化合物是鞘氨醇激酶的抑制剂。在一个实施方案中,作为鞘氨醇激酶抑制剂的化合物是鞘氨醇激酶-2(SK2)的选择性抑制剂。在一个实施方案中,SK2的选择性抑制剂是3-(4-氯-苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺化合物或其药学上可接受的盐。在一个实施方案中,免疫原性细胞死亡包括癌细胞表面的钙网蛋白的表达增加。在一个实施方案中,癌细胞是黑素瘤细胞。在一个实施方案中,癌细胞是肺癌细胞。在一个实施方案中,检查点通路的抑制剂是抗PD-L1抗体、抗PD-1抗体或它们的组合。在一个实施方案中,检查点通路抑制剂是抗CTLA4抗体。在一个实施方案中,抗PD-L1抗体或抗PD-1抗体是单克隆抗体。在一个实施方案中,抗CTLA4抗体是单克隆抗体。在一个实施方案中,单克隆抗体是人抗体或人源化抗体。在一个实施方案中,进行了多次施用。在一个实施方案中,对受试者进一步施用第二癌症疗法。在一个实施方案中,第二癌症疗法包括外科手术、放射疗法、化学疗法、毒素疗法、免疫疗法、冷冻疗法或基因疗法。

[0222] 试剂盒包括3-(4-氯-苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺化合物或其药学上可接受的盐;至少一种检查点抑制剂;以及使用说明。在一个实施方案中,至少一种检查点抑制剂是CTLA-4受体抑制剂、PD-1受体抑制剂、PD-L1配体抑制剂、PD-L2配体抑制剂、LAG-3受体抑制剂、TIM-3受体抑制剂、BTLA受体抑制剂、KIR受体抑制剂,或者前述检查点抑制剂中的任何一些的组合。在一个实施方案中,检查点抑制剂是抗体或抗体片段。在一个实施方案中,至少一种检查点抑制剂是抗CTLA-4受体抗体、抗PD-1受体抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体,或前述抗体中的任何一些的组合。在一个实施方案中,至少一种检查点抑制剂是冻干固体的形式。在一个实施方案中,该试剂盒还包括水性复溶溶剂。在一个实施方案中,至少一种检查点抑制剂掺入第一药学上可接受的制剂中,并且3-(4-氯-苯基)-金刚烷-1-羧酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺化合物或其药学上可接受的盐掺入第二药学上可接受的制剂中。

[0223] 本文引用的所有出版物、专利和专利申请据此全文以引用方式并入以用于所有目的。

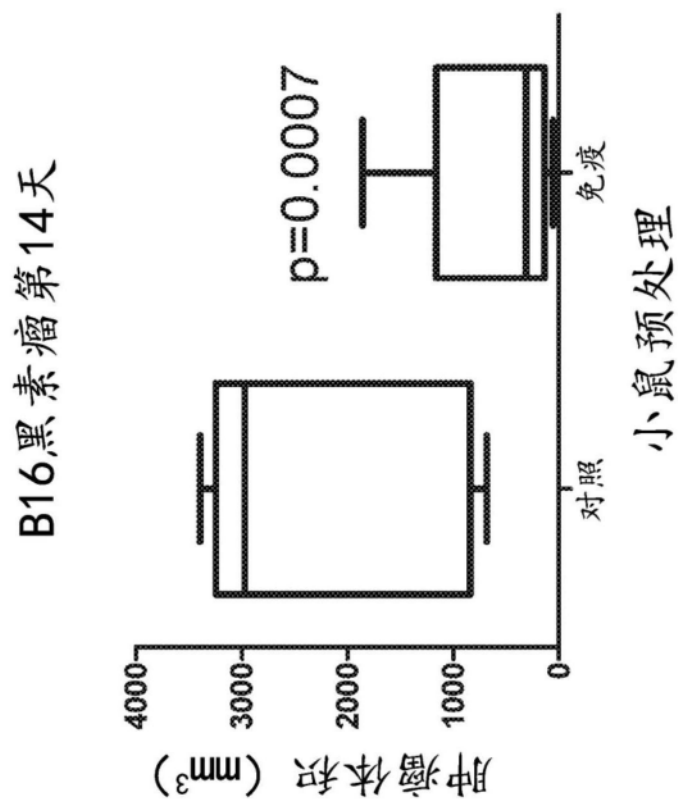


图1

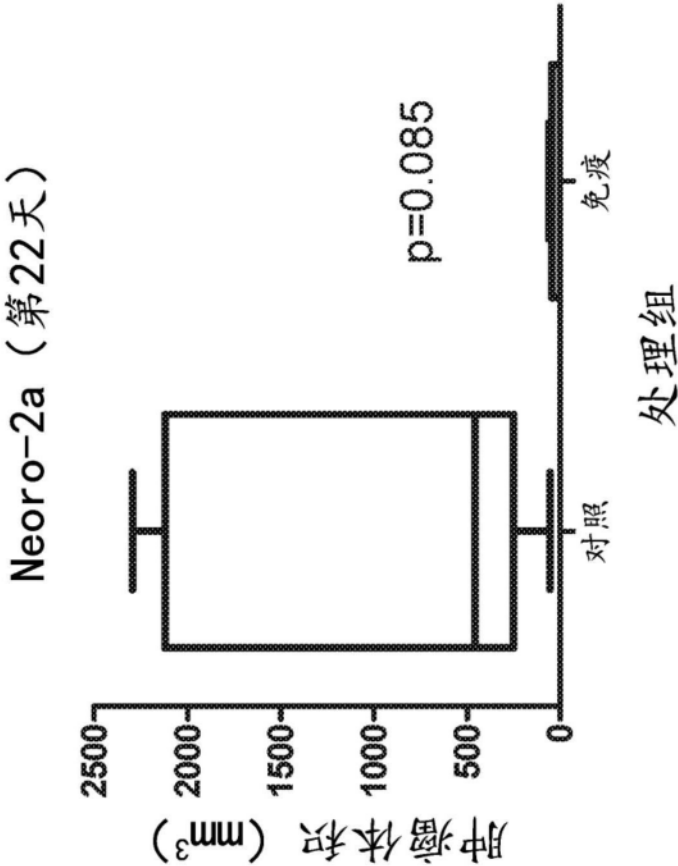


图2

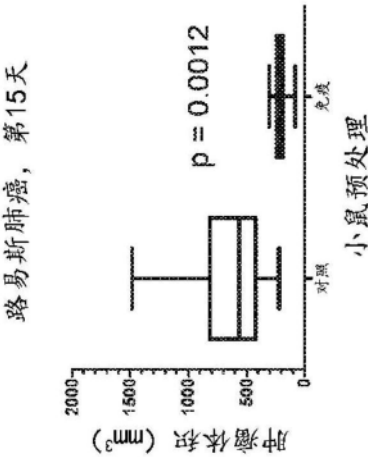


图3A

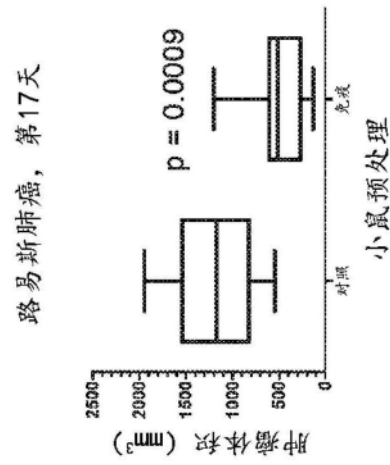


图3B

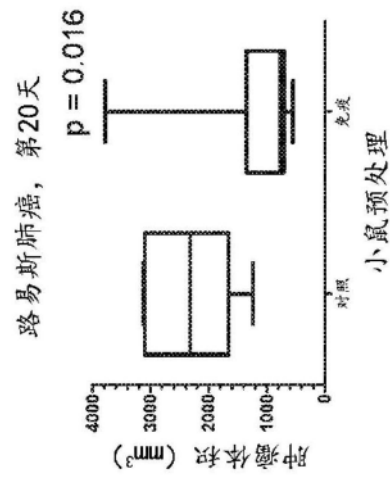


图3C

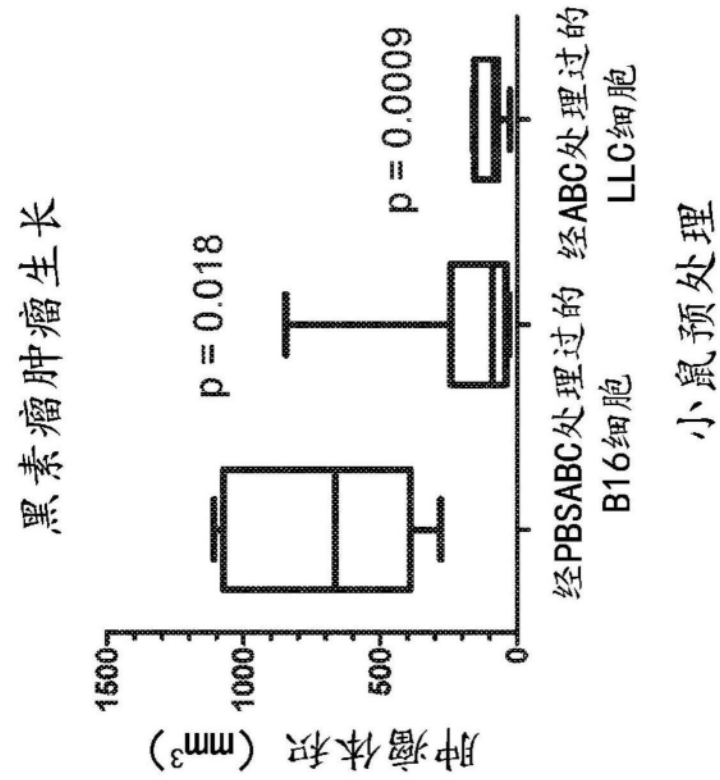


图4

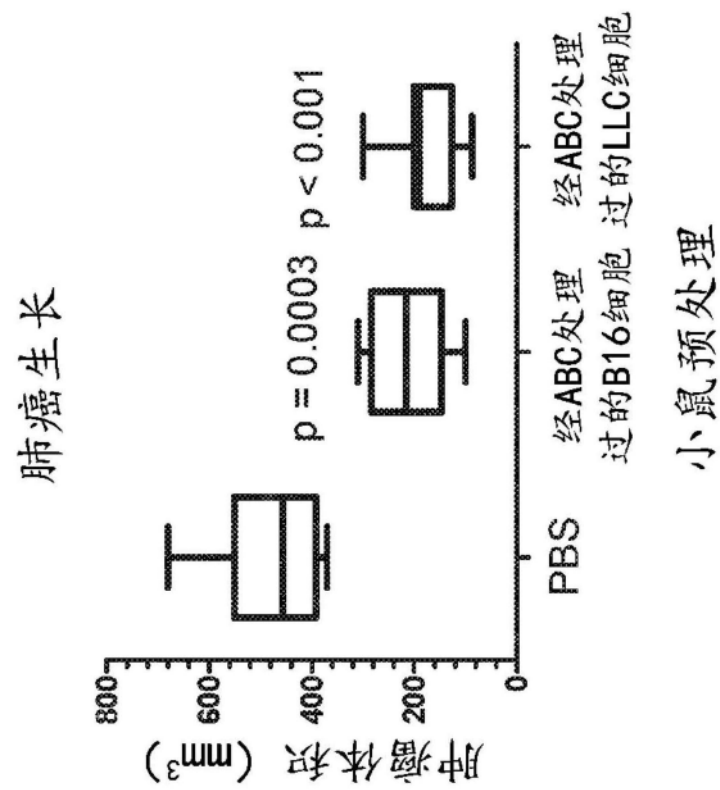


图5

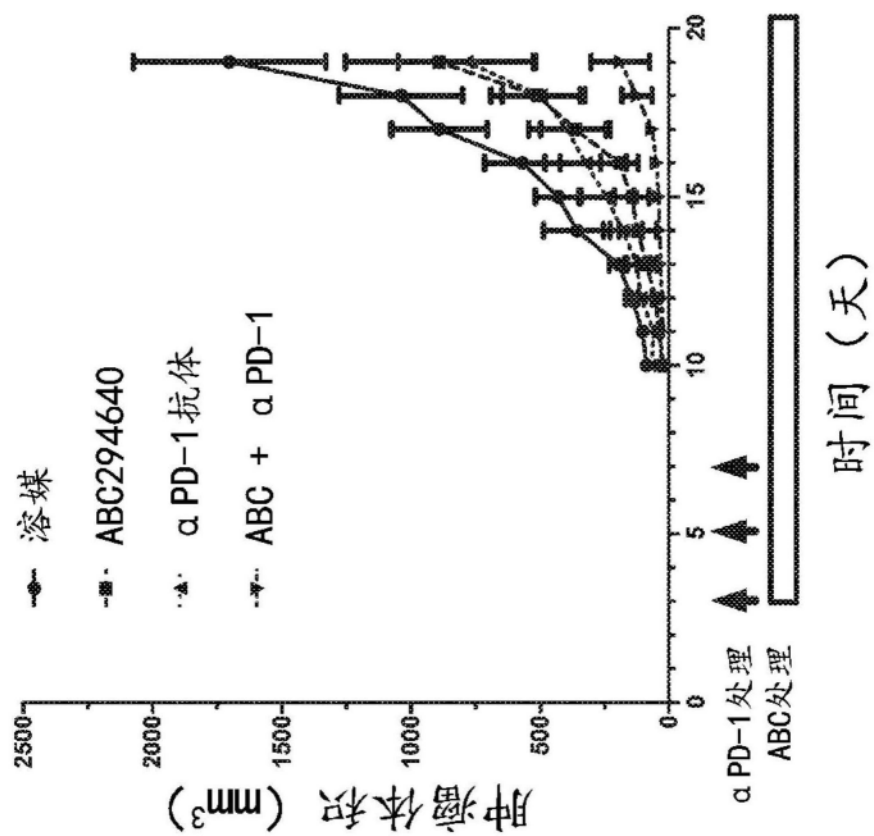


图6

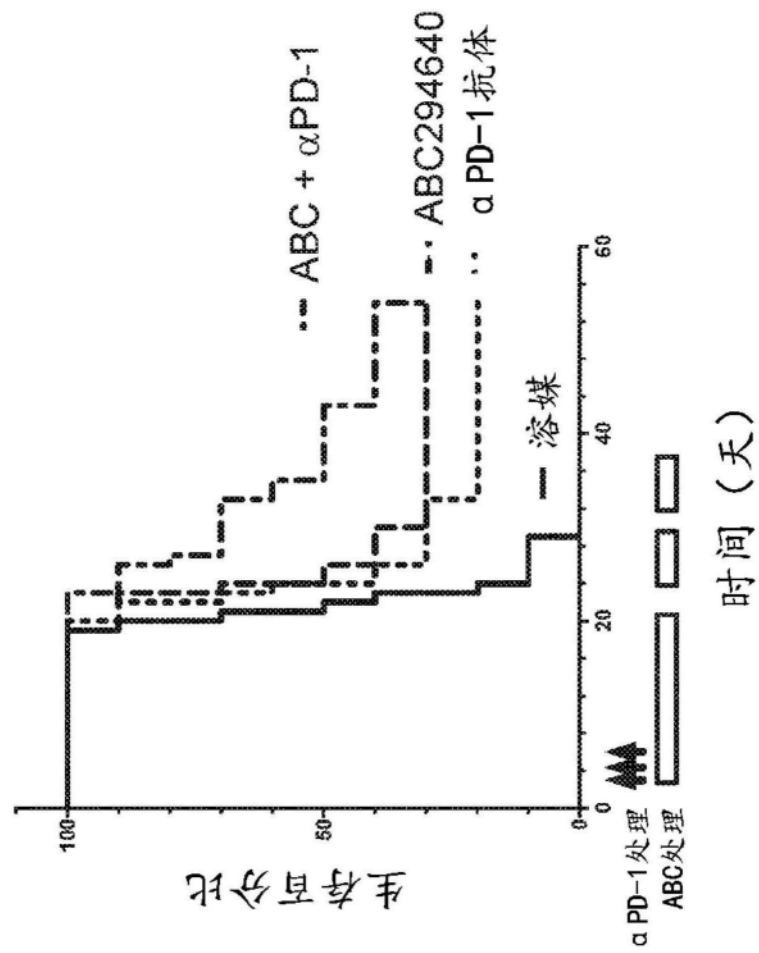


图7

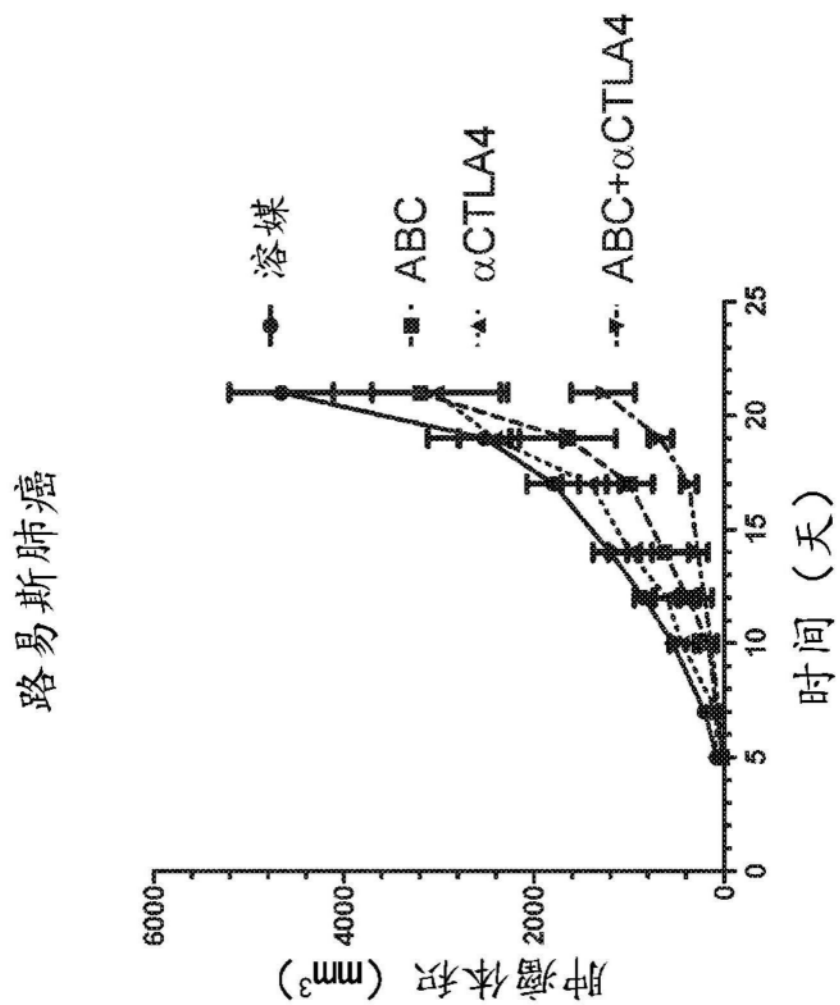


图8

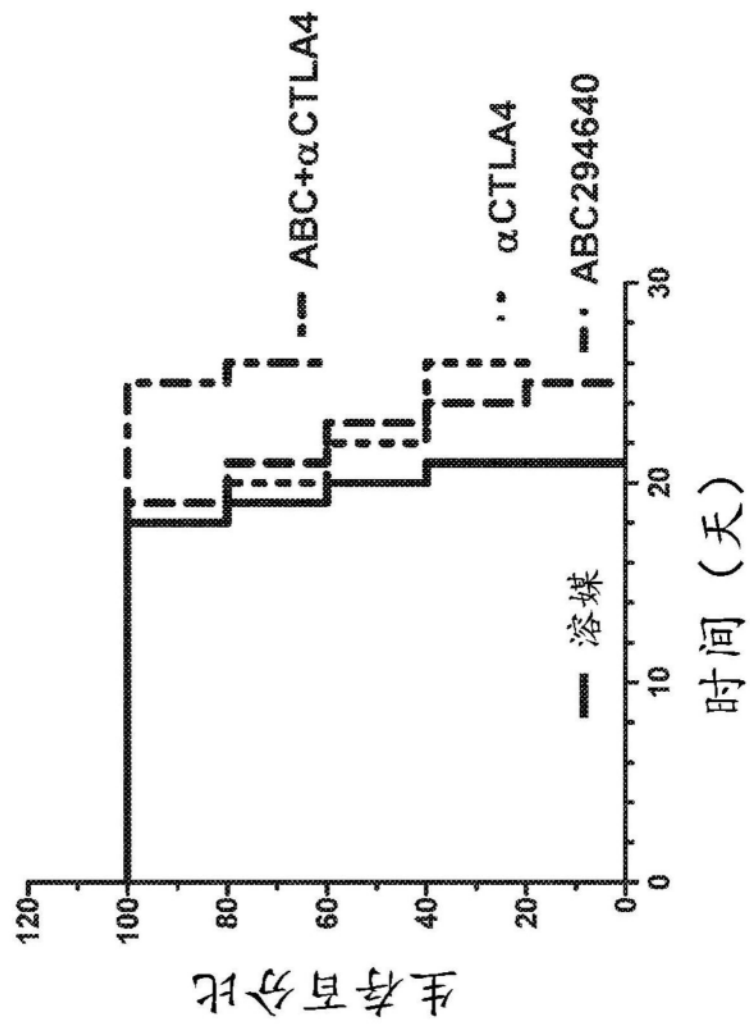


图9