



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110831581 A

(43)申请公布日 2020.02.21

(21)申请号 201780092798.9

M·波苏埃洛鲁比奥

(22)申请日 2017.11.17

L·普拉奈尔卡拉索

(30)优先权数据

17171617.8 2017.05.17 EP

17382301.4 2017.05.26 EP

17200469.9 2017.11.07 EP

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟 韩文华

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.12.31

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/079688 2017.11.17

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/210439 EN 2018.11.22

(51)Int.Cl.

A61K 9/08(2006.01)

A61K 9/19(2006.01)

A61K 47/26(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 31/04(2006.01)

A61P 31/12(2006.01)

(71)申请人 拜昂科技医疗公司

地址 西班牙, 帕特纳

(72)发明人 M·金特罗奥尔蒂斯

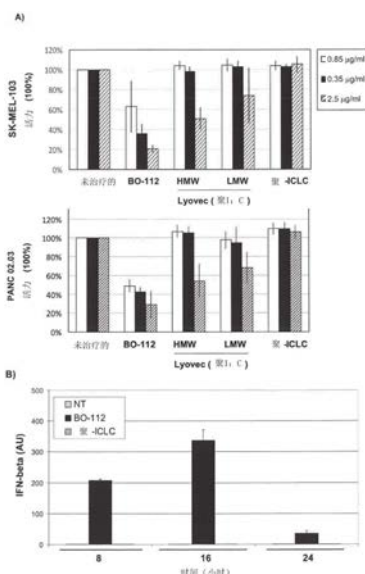
权利要求书3页 说明书53页 附图17页

(54)发明名称

包含具有双链多核糖核苷酸和聚乙烯亚胺的复合物的粒子的新型药物组合物

(57)摘要

本发明涉及组合物,其包含由聚肌苷酸-聚胞苷酸与聚亚烷基胺(例如聚乙烯亚胺)形成的复合物,所述复合物具有均匀性的结构和功能特征,以及本发明还涉及制备符合监管要求的所述组合物的方法。本发明还涉及所述组合物作为药物(具体是用于治疗癌症)单独使用、与其他治疗剂组合和/或在特定医学方法中的用途。而且,这些组合物的施用与特定基因的表达、细胞应答和/或免疫细胞群组成的改变有关,而这些改变可以用作特定的生物标记物和/或作为医学治疗的额外靶标。



1. 一种水性组合物,其包含粒子,其中:
 - (i) 所述粒子中的每一个包含以下的复合物:
 - (a) 聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C))或其盐或溶剂化物,其中包含在所述粒子中的至少40%的聚(I:C)分子具有至少850个碱基对,并且包含在所述粒子中的至少50%的聚(I:C)分子具有400至5000个碱基对;和
 - (b) 水溶性的线性均-聚亚烷基亚胺或杂-聚亚烷基亚胺、或其盐和/或溶剂化物,其中所述线性聚亚烷基亚胺的平均分子量为17至23kDa;
 - (ii) 至少90%的所述粒子的单峰直径分布低于300nm;
 - (iii) 根据ISO 22412:2017所测量的,所述粒子的z平均直径为80+/-20nm,所述粒径的多分散指数小于1.5;
 - (iv) 所述组合物包含浓度为至少0.5mg/mL的聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C));
 - (v) 所述组合物具有2至4的pH、和200至600mOsm/kg的重量克分子渗透压浓度;和
 - (vi) 根据ISO 13099-2:2012,所述组合物的 ζ 电位为35mV至50mV。
 2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述粒子的中值直径(D50%)为85+/-20nm。
 3. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述粒子包含:
 - (i) 至少10%的聚(I:C)分子具有少于400个碱基对,至少40%的聚(I:C)分子具有至少850个碱基对,至少70%的聚(I:C)分子具有400至5000个碱基对,20%至45%的聚(I:C)分子具有400至850个碱基对;或
 - (ii) 5%至60%的聚(I:C)分子具有少于400个碱基对,15%至30%的聚(I:C)分子具有400至850个碱基,10%至70%的聚(I:C)分子具有850至5000个碱基对,0%至10%的聚(I:C)分子具有超过5000个碱基对。
 4. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述水溶性的线性均-聚亚烷基亚胺或杂-聚亚烷基亚胺是线形聚乙烯亚胺。
 5. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述粒径的多分散指数是0.2至0.3。
 6. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述组合物还包含至少一种药学上可接受的载体、有机溶剂、赋形剂和/或佐剂。
 7. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述组合物还包含至少一种选自以下的化合物:有机化合物、无机化合物、核酸、适体、肽或蛋白。
 8. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述组合物还包含非编码RNA或编码蛋白的RNA。
 9. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述组合物还包含浓度为1%至10% (重量/体积)的葡萄糖或甘露醇。
 10. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述水性组合物的pH为3.0+/-0.2,重量克分子渗透压浓度为300至310mOsm/kg。
 11. 一种水性组合物,其包含前述权利要求中任一项所述的粒子,其中所述粒子按以下之比形成:所述水溶性的线性均-聚亚烷基亚胺或杂-聚亚烷基亚胺的氮摩尔数相对于聚(I:C)分子的磷摩尔数之比为2.5至4.5。
 12. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述粒子是通过在混合室内分别注射包含所

述聚(I:C)分子的溶液和包含所述水溶性的线性均-聚亚烷基亚胺或杂-聚亚烷基亚胺的溶液而形成的。

13. 根据权利要求11或12所述的组合物,其中所述组合物是通过添加浓度为1%至10% (所述组合物的重量/总体积)的葡萄糖或甘露醇而形成的。

14. 根据权利要求13所述的组合物,其中将葡萄糖添加到含有聚(I:C)的溶液中。

15. 根据权利要求13所述的组合物,其中分别注射包含所述聚(I:C)分子的溶液和包含所述水溶性的线性均-聚亚烷基亚胺或杂-聚亚烷基亚胺的溶液,其中用于注射任一种溶液的流速是1mL/min至50mL/min,和/或以50rpm至600rpm的速率混合。

16. 一种组合物,其能够通过冻干前述权利要求中任一项所述的水性组合物而获得。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的组合物用作药物的用途。

18. 根据权利要求17所述的组合物的用途,其中所述药物是可注射的水性组合物,其任选地包含药学上可接受的载体、赋形剂和/或佐剂。

19. 权利要求1至16中任一项所述的组合物在用于治疗细胞生长病症中的用途,所述细胞生长病症特征在于人或动物细胞的异常生长。

20. 根据权利要求19所述的组合物的用途,其中所述的细胞生长病症是特征在于雌性哺乳动物生殖器官的细胞异常生长的癌症或妇科疾病。

21. 根据权利要求19或20所述的组合物的用途,其中所述组合物用于肿瘤内或肿瘤周的注射。

22. 根据权利要求19或20所述的组合物的用途,其中所述组合物用于在皮肤或内部器官或组织的水平注射。

23. 根据权利要求19或20所述的组合物的用途,其中所述组合物与第二治疗剂组合使用,所述第二治疗剂选自:抗CTLA4、抗PD1、抗PDL1、CAR-T细胞、癌抗原疫苗、或靶向调节性T细胞的药剂、靶向代谢酶的药剂、靶向DNA修复和/或复制的药剂、或靶向表I中任何基因所表达的蛋白的药剂。

24. 根据权利要求19或20所述的组合物的用途,其中所述组合物与第二治疗剂组合使用以减少所述第二治疗剂的剂量和/或施用频率。

25. 根据权利要求19或20所述的组合物的用途,其中所述组合物与第二治疗剂组合使用以治疗对所述第二治疗剂耐受、不敏感、或弱反应(或无反应)的患者。

26. 组合物用作药物的用途,其中根据施用方案向受试者施用所述组合物,所述的施用方案包括:

(i) 至少第一次肿瘤内注射;和

(ii) 至少第二次皮下或肌肉内注射,

其中在所述至少一次皮下或肌肉内注射之前,施用所述至少一次肿瘤内注射,并且其中所述组合物是权利要求1至16中任一项所述的组合物。

27. 组合物用作药物的用途,其中根据施用方案向受试者施用所述组合物,所述的施用方案包括:

(i) 在第一病灶至少进行第一次肿瘤内注射;和

(ii) 在一个或更多其他病灶进行至少第二次肿瘤内注射;

其中所述组合物是权利要求1至16中任一项所述的组合物。

28. 根据权利要求26或27所述的组合物用作药物的用途, 其中在施用第二治疗剂之前或之后施用所述组合物, 在相同和/或其他病灶中通过肿瘤内或肿瘤周注射施用所述第二治疗剂, 通过皮下注射、或通过肌肉内注射施用。

29. 根据权利要求28所述的组合物用作药物的用途, 其中在确定所述受试者对所述第二治疗剂是否耐受、不敏感、或弱反应(或无反应)之后, 向所述受试者施用所述第二治疗剂。

30. 根据权利要求28所述的组合物用作药物的用途, 其中在施用权利要求1至16中任一项所述的组合物之后, 在确定统计学上是否显著提高循环免疫细胞的数量和/或表I中任何基因的表达变化之后, 向受试者施用所述第二治疗剂。

31. 根据权利要求29或30所述的组合物用作药物的用途, 其中所述第二治疗剂选自: 抗CTLA4、抗PD1、抗PDL1、CAR-T细胞、癌抗原疫苗、或靶向调节性T细胞的药剂、靶向代谢酶的药剂、靶向DNA修复和/或复制的药剂、或靶向表I中任何基因所表达的蛋白的药剂。

32. 根据权利要求26至31中任一项所述的组合物的医学用途, 其中所述用途是治疗或预防细胞生长病症, 所述细胞生长病症的特征在于人或动物细胞的异常生长。

33. 根据权利要求26至31中任一项所述的组合物的用途, 其中所述医学用途是治疗或预防细菌或病毒感染。

34. 根据权利要求26至31中任一项所述的组合物的用途, 其中在所述至少第一次肿瘤内注射之后至少24小时, 进行所述任何第二次或其他额外的肿瘤内、肿瘤周、皮下或肌肉内注射。

35. 组合物用作药物的用途, 其中根据施用方案向受试者施用所述组合物, 所述的施用方案包括:

- (i) 从所述受试者获得细胞;
- (ii) 离体地, 使所述细胞接触所述组合物; 和
- (iii) 向所述受试者施用这些细胞;

其中所述组合物是权利要求1至16中任一项所述的组合物。

36. 根据权利要求35所述的组合物的医学用途, 其中所述用途是治疗或预防细胞生长病症, 所述细胞生长病症的特征在于人或动物细胞的异常生长。

37. 根据权利要求35所述的组合物的用途, 其中所述用途是治疗或预防细菌或病毒感染。

38. 根据权利要求35至37中任一项所述的组合物的用途, 其中所述细胞分离自血液、组织或肿瘤。

39. 根据权利要求35至38中任一项所述的组合物的用途, 其中在暴露于所述组合物之前和/或之后, 针对一种或更多种标记物的表达来选择所述细胞。

包含具有双链多核糖核苷酸和聚乙烯亚胺的复合物的粒子的 新型药物组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及包含由多核糖核苷酸和聚合物形成的粒子的药物制剂 (formulation)、其生产及其医学用途的领域。

背景技术

[0002] 近年来,已研究使用模拟病毒dsRNA的双链RNA (dsRNA) 的合成类似物用于特异性地激活针对肿瘤的免疫系统,其具有抑制癌细胞生长和诱导癌细胞细胞凋亡的作用。特定来说,双链聚肌苷酸-聚胞苷酸(称为聚(I:C)或pIC)已表征为一种按照以下方式针对各种癌症类型(如黑色素瘤、肝癌、结肠癌、胃癌和口癌、宫颈癌、乳癌、卵巢癌、泌尿道肿瘤、肺癌和前列腺癌)及其转移具有各种治疗性作用的dsRNA类型:可能与免疫系统激活、自然杀伤细胞和/或树突细胞介导的活性和/或肿瘤基因表达与微环境的改变相关或无关的方式(Hafner A等人,2013)。

[0003] 令人遗憾的是,这些初始临床前报道是不充分地,或在用裸聚(I:C)分子的临床研究中未得到确认,所述分子由于各种机制,如较差的细胞摄取或被胞质RNA酶降解,显示其较低稳定性、较差均匀性、不可预测的药物动力学和受限抗-肿瘤作用(Hafner A等人,2013)。实际上,为了实现有效治疗性或预防性作用,聚(I:C)分子可能需要在临用前或使用前不久再溶解,可以呈较低浓度的制剂获得,和/或必须频繁地施用(例如每2小时)。

[0004] 在近几年中,在配制具有免疫调节和/或治疗性特性的聚(I:C)分子上已有显著进展。已公开将聚(I:C)分子制备和配制为粉末和/或结合在具有或不具有靶向部分和额外化学接头的聚合物基微粒子内的各种方法(CN103599071;CN102988303;W02004045491;W02008057696;W02013164380;W02015067632;W02014057432;W02014165296;Schaffert D等人,2011;W02015173824;Kabilova T等人,2014;Kübler K等人,2011;Palchetti S等人,2013;Saheki A等人,2011)。聚(I:C)分子已用载体聚合物配制,且配制为可与鼻内施用相容的形式(W02013164380),用聚赖氨酸和羧甲基纤维素稳定化(W02005102278),囊封在阳离子脂质包被的磷酸钙纳米粒子、脂质体或其他囊状结构内(Chen L等人,2013;US2009117306;US2011003883),或与单链RNA和与阳离子肽(如鱼精蛋白(W02013087083))一起。替代地,聚(I:C)分子也已固定于具有或不具有将辅助聚(I:C)分子靶向到特定细胞或组织的药剂的固体粒子和载体上,如氧化铁纳米粒子(McBain S等人,2007;Cobaleda-Siles M等人,2014)。

[0005] 一些公开物进一步公开各种在亚微米范围内的三元或四元复合物,所述复合物在具有或不具有其他组分和基因特异性的情况下通过聚合物、聚(I:C)分子和/或双链DNA形成(Kurosaki T等人,2009;W02013040552;W02013063019;Tutin-Moeavin I等人,2015)。然而,这些方法的目标是提供基本上将DNA施用到细胞,同时维持其活力,且不选择性杀伤癌细胞的药剂。

[0006] 限制聚(I:C)分子作为药物的临床开发和其与满足监管要求顺应性的缺陷,可通

过制造结构上复杂的抗癌复合物来克服,该复合物包含聚(I:C)分子连同用于癌症疗法的药物递送系统,所述药物递送系统通常基于阳离子聚合物,如壳聚糖、聚乙烯亚胺(PEI)、聚L-赖氨酸、聚甲基丙烯酸酯、含咪唑的聚合物或含环糊精的聚合物、聚(β -氨基酯)和相关树枝状分子。这些聚合物系统(也称为Polyplex)结构上和功能上不同于类似地用于局部或全身性递送核酸的基于脂质的系统(也称为Lipoplex)和杂合系统(也称为Lipopolyplex)(Bilensoy E,2010;Germershaus O和Nultsch K,2015)。在聚合复合体当中,PEI是尤其感兴趣的阳离子聚合物的聚乙烯亚胺,其可在线性/支链结构和尺寸、化学键、可降解性和衍生作用的水平上进行改性(Islam M等人,2014),且不同于由细胞内在化的脂复合体,而是通过网格蛋白介导的和通过窖蛋白(caveolae)介导的胞吞作用得以内在化(Shabani M等人,2010)。

[0007] 涉及制备和施用与PEI结合的聚(I:C)分子的这种治疗性方法已示例在称为B0-110的药剂的文献中(Pozuelo-Rubio M等人,2014;Tormo D等人,2009;W02011003883)。这种复合物,也鉴别为 $[pIC]^{PEI}$,不仅在黑色素瘤和其他肿瘤类型(如神经胶质瘤或癌)的若干癌细胞系中参与自噬和细胞凋亡的双诱导,且还对正常细胞(如黑色素细胞)的活力没有或具有有限的作用。B0-110在动物模型中抑制黑色素瘤生长,表明在活体内,甚至在严重免疫功能不全的小鼠中的抗肿瘤和抗转移性活性。此外,类似的基于 $[pIC]^{PEI}$ 的药剂刺激胰腺导管腺癌细胞中的细胞凋亡,而不影响正常胰腺上皮细胞,且 $[pIC]^{PEI}$ 的体内施用抑制肿瘤动物模型中的肿瘤生长(Bhoopathi P等人,2014)。在子宫内膜异位的模型中表征施用B0-110的其它作用,其中这种药剂减少血管生成和细胞增殖且增加细胞凋亡(Garcia-Pascual C和Gomez R,2013)。因此,B0-110和包含双链多核糖核苷酸的类似的 $[pIC]^{PEI}$ 药剂表现出具有广谱作用的新颖抗癌策略,这是由于自主地和选择性地激活自噬和细胞凋亡的组合,同时维持不同谱系的正常细胞的活力。然而,对于已在各种临床前模型中证实的当与载体结合时作用的其它基于双链多核糖核苷酸的药剂,仍需要以在不同存储条件下稳定、均匀地制造和设定尺寸的制剂形式来提供B0-110,并且当使用其他药物和疗法时,针对最有效的组合、方案、剂量和临床随访,更加容易适用于医学用途(尤其是针对癌症的那些用途)。

[0008] 实际上,现有技术并没有提供适当的教导,用于解决关于结构和生物物理准则的最有效组合的问题,以允许产生用于治疗癌症的含聚(I:C)组合物的。监管机构也需要严格地遵守关于包含于人用组合物内的含聚(I:C)粒子的再现性、存储和尺寸与浓度均匀性的规范。基于双链多核糖核苷酸(如聚(I:C)分子)的制剂、以及相关药剂、组合物(统称为B0-11X产品)、以更高和良好受控浓度提供双链多核糖核苷酸分子的相关方法的一般特征,描述于PCT申请PCT/EP2016/078078中。然而,仍需要结合特定的适应症、正在进行的治疗、和/或方案,对B0-11X产品进行临床前和临床表征,以实现其作为药物的有效医学用途(特定是针对癌症来说),同时改进临床评价的手段以及患者使用的顺应性,且降低具有明确界定安全性界限和治疗作用的双链多核糖核苷酸分子的给药频率。

发明内容

[0009] 本发明涉及一种组合物,其包含粒子,其中:

[0010] (i) 所述粒子中的每一个包含至少一种双链多核糖核苷酸或其盐或溶剂化物与至

少一种聚亚烷基亚胺或其盐和/或溶剂化物的复合物；

[0011] (ii) 至少95%或至少90%的所述粒子的直径小于或等于600nm, 优选地小于或等于300nm(例如, 140nm至250nm); 以及

[0012] (iii) 所述粒子的z平均直径小于或等于200nm, 优选地小于或等于150nm, 具体地, 如根据ISO 22412:2017所测量的。

[0013] 在一优选实施方案中, 本发明涉及一种水性组合物, 其包含粒子, 其中:

[0014] (i) 所述粒子中的每一个包含至少一种双链多核糖核苷酸或其盐或溶剂化物与至少一种线性聚亚烷基亚胺或其盐和/或溶剂化物的复合物, 其中所述双链多核糖核苷酸是聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C)), 且所述线性聚亚烷基亚胺的平均分子量是17kDa至23kDa;

[0015] (ii) 至少90%的所述粒子的单峰(mono-modal) 直径分布低于300nm;

[0016] (iii) 所述粒子的z平均直径小于或等于200nm, 如根据ISO 22412:2017所测量的; 以及

[0017] (iv) 根据ISO 13099-2:2012, 所述组合物的 ζ 电位等于或大于30mV, 优选35至50mV。

[0018] 本发明还涉及一种水性组合物, 其包含如本文中所公开的粒子, 其中:

[0019] (i) 所述粒子中的每一个通过制备复合物而形成, 所述复合物是至少一种双链多核糖核苷酸或其盐或溶剂化物与至少一种线性聚亚烷基亚胺或其盐和/或溶剂化物的复合物, 其中所述双链多核糖核苷酸是聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C)), 且所述线性聚亚烷基亚胺的平均分子量是17kDa至23kDa;

[0020] (ii) 至少90%的所述粒子的单峰直径低于300nm;

[0021] (iii) 所述粒子的z平均直径小于或等于200nm, 如根据ISO 22412:2017所测量的; 以及

[0022] (iv) 根据ISO 13099-2:2012, 所述组合物的 ζ 电位等于或大于30mV, 优选35至50mV;

[0023] 其中所述粒子以所述组合物中所述聚亚烷基亚胺的氮摩尔数相对于所述双链多核糖核苷酸的磷摩尔数之比等于或大于2.5的比而形成。

[0024] 本发明还涉及一种组合物, 其能够通过冻干如本文中所公开的水性组合物而获得。

[0025] 可以基于与以下标准相关的特征进一步定义这些组合物: pH在2-4之间, 并且一种双链多核糖核苷酸的浓度等于或大于0.5mg/mL所述组合物的总体积。

[0026] 可以根据双链多核糖核苷酸的量和尺寸来进一步定义这些组合物, 具体是:

[0027] (i) 所述粒子中包含的至少40%的双链多核糖核苷酸具有至少850个碱基对, 并且所述粒子中包含的至少50%的双链多核糖核苷酸具有400至5000个碱基对; 和/或

[0028] (ii) 5%至60%的双链多核糖核苷酸具有少于400个碱基对, 其中15%至30%的双链多核糖核苷酸具有400至850个碱基, 10%至70%的双链多核糖核苷酸具有850至5000个碱基对, 并且0%至10%的双链多核糖核苷酸具有超过5000个碱基对。

[0029] 已经成功地优化了这些组合物的药物生产和临床用途, 具体是通过针对期望的用途和方法来确定最佳且更为可重现的组分组合、物理和/或化学标准以及相关的数值范围(适用于粒子或组合物)。因此, 进一步优选的组合物是包含粒子的水性组合物, 其中:

[0030] (i) 所述粒子中的每一个包含以下的复合物:

[0031] (a) 聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C))或其盐或溶剂化物,其中包含在所述粒子中的至少40%的聚(I:C)分子具有至少850个碱基对,并且包含在所述粒子中的至少50%的聚(I:C)分子具有400至5000个碱基对;并且

[0032] (b) 水溶性的线性均-聚亚烷基亚胺或杂-聚亚烷基亚胺、或其盐和/或溶剂化物,其中所述线性聚亚烷基亚胺的平均分子量为17至23kDa;

[0033] (ii) 至少90%的所述粒子的单峰直径分布低于300nm(优选低于250nm);

[0034] (iii) 根据ISO 22412:2017所测量的,所述粒子的z平均直径为60nm至130nm的直径(更优选80+/-20nm),所述粒径的多分散指数小于1.5;

[0035] (iv) 所述组合物包含浓度为至少0.5mg/mL的聚(I:C);

[0036] (v) 所述组合物具有:2至4的pH、和200至600mOsm/kg的重量克分子渗透压浓度;和

[0037] (vi) 根据ISO 13099-2:2012,所述组合物的 ζ 电位为35mV至50mV。

[0038] 以上定义的水性组合物和粒子中确定的这些范围可以进一步定义和/或限于:

[0039] (i) 粒子,其包含的至少10%的聚(I:C)分子具有少于400个碱基对,至少40%的聚(I:C)分子具有至少850个碱基对,至少70%的聚(I:C)分子具有400至5000个碱基对,并且20%至45%的聚(I:C)分子具有400至850个碱基对;

[0040] (ii) 粒子,其包含的5%至60%的聚(I:C)分子具有少于400个碱基对,15%至30%的聚(I:C)分子具有400至850个碱基,10%至70%的聚(I:C)分子具有850至5000个碱基对,并且0%至10%的聚(I:C)分子具有超过5000个碱基对。

[0041] (iii) 所述粒子的中值直径(D50%)为75nm至150nm(并且优选地具有至少85+/-20nm的中值直径);

[0042] (v) 水溶性线性均-聚亚烷基亚胺或杂-聚亚烷基亚胺为线性聚乙烯亚胺;

[0043] (vi) 所述粒径的多分散指数是0.2至0.3;

[0044] (vii) 所述组合物的pH为3.0+/-0.2,且重量克分子渗透压浓度为300至310mOsm/kg。

[0045] 另外,本发明涉及如本文所公开的组合物,即BO-11X制剂或组合物,其单独地或者与其他治疗剂组合用作药物。这些组合物可以进一步包含至少一种药学上可接受的载体、有机溶剂、赋形剂和/或佐剂,它们本身包含在粒子中、或者添加到水性组合物中,例如添加的葡萄糖浓度为1%至10%(重量/体积)。此外,组合物还可包含至少一种化合物,具体是治疗化合物,其选自有机化合物、无机化合物、核酸(例如非编码RNA或编码蛋白的RNA)、适体、肽或蛋白,它们本身包含在粒子中或者添加到水性组合物中。

[0046] 而且,可以使用组合不同施用途(例如,在1周或多周的时期内,一次或多次肿瘤内注射,随后是一次或多次皮下或肌肉内注射)和/或将细胞再次施用至患者之前使人细胞离体暴露于该组合物的方案,施用该组合物来用于医学用途。在后一种情况下,这种方案涉及在暴露于该组合物的患者细胞内诱导特定活性,例如在体外诱导所述细胞产生干扰素。另外,关于对这种组合物的免疫反应的体外和/或离体研究表明,BO-11X组合物触发了其他生物学机制(例如干扰素非依赖性和/或靶向免疫细胞),这些机制可开发用于促进治疗相关性事件,例如肿瘤细胞死亡、增强的局部和/或全身性T细胞直接(在注射的肿瘤内)或在远端肿瘤中的免疫反应,以及可能治疗复发性、对其他疗法无反应或难治性的癌症有效

的其他机制。

[0047] 因此,组合物的剂量(尤其是对于双链多核糖核苷酸的含量)可以根据每种类型的施用、方案(例如,对于肿瘤内注射而言最高,对于皮下或肌肉内注射而言更低,对于离体细胞治疗而言甚至更低)和/或(在组合疗法中施用)其他药物进行调整。本发明还涉及如本文所公开的组合物,其用于治疗或预防细胞生长病症,所述细胞生长病症特征在于人或动物细胞的异常生长,优选癌症,最优选实体癌或淋巴瘤。此外,施用该组合物可以用于支持疫苗、细胞因子、抗原、抗体、化学化合物和其他具有免疫调节活性的化合物,以治疗或预防癌症(实体或非实体)或感染,例如其作为佐剂和/或用于援救对药物(包括癌症免疫治疗剂)弱反应或耐受的患者、用于改变细胞代谢和/或功能(优选在免疫和/或癌细胞中)、调节DNA表达、复制和/或修复(包括靶向表观遗传机制的药物)、或者用于标准护理疗法(例如化学疗法或放射疗法、或涉及癌症或病毒抗原的基于疫苗的疗法)。

[0048] 本发明的其他目的涉及与本文所述组合物有关的方法,所述方法用于评价功效、最适合的方案、与另一种抗癌药或标准护理方案的最适合治疗组合、和/或对BO-11X治疗表现出最佳反应的受试者。这些方法涉及在暴露于BO-11X组合物之后,测量所选细胞类型(例如免疫细胞和癌细胞)中基因谱表达的上调和下调,并随后采用适当的手段来提高治疗作用(例如用于分层或选择患者进行进一步治疗,施用或者不施用靶向特定生物靶标的药物和/或减少或增加BO-11X和/或其他组合物的剂量)。

[0049] 此外,本发明涉及制造组合物(即本文公开的BO-11X制剂或组合物)的方法,其包括:

[0050] (i) 制备至少一种双链多核糖核苷酸或其盐或溶剂化物的水溶液,和至少一种聚亚烷基胺或其盐或溶剂化物的水溶液,其中任一种或两种溶液任选还包含药学上可接受的载体、有机溶剂、赋形剂和/或佐剂;

[0051] (ii) 通过孔径小于或等于500nm的过滤器独立过滤每种溶液,以形成灭菌溶液;

[0052] (iii) 任选通过以大于或等于1mL/min的速率进行注射,在混合室内将所述溶液中的一种加入到另一种溶液中;或者,任选通过以大于或等于1mL/min的速率进行注射,同时将每种溶液添加到所述混合室中,在所述混合室中混合所得的灭菌溶液,以形成水性组合物;以及任选地,

[0053] (iv) 通过孔径小于或等于600nm的过滤器过滤所得的水性组合物以形成滤液,或者以大于或等于22480m/s²离心所得的水性组合物以形成上清液。

[0054] 本发明还涉及通过所述方法可获得的水性组合物(包括可定义为轻悬浮液的组合物),以及可任选地通过以下获得的组合物:冻干所得水性组合物、滤液或上清液,然后单独地(或在试剂盒中)和其他医学化合物或装置(例如缓冲液、稀释剂、导管、针、过滤器、或适用于肿瘤内施用的装置)提供和/或使用。

[0055] 优选地,本发明还涉及包含粒子的组合物,其中:

[0056] (i) 每个所述粒子包含至少一种双链多核糖核苷酸或其盐或溶剂化物和至少一种聚亚烷基胺或其盐和/或溶剂化物的复合物,其中

[0057] (a) 所述双链多核糖核苷酸是聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C))或者聚腺苷酸-聚尿苷酸(聚(A:U)),其中至少10%的双链多核糖核苷酸具有少于400个碱基对,至少40%的所述双链多核糖核苷酸具有至少850个碱基对,至少70%的所述双链多核糖核苷酸具有400至

5000个碱基对,并且20%至45%所述双链多核糖核苷酸具有400至850个碱基对;和

[0058] (b) 所述聚亚烷基亚胺包含至少95%的聚乙烯亚胺,其中所述聚亚烷基亚胺的重均分子量为17至23kDa,且多分散指数 <1.5 ,其中所述组合物中所述聚亚烷基亚胺的氮摩尔数与所述双链多核糖核苷酸的磷摩尔数之比为2.5至5.5;

[0059] (ii) 至少99%所述粒子的直径小于或等于600nm;并且

[0060] (iii) 所述粒子的z平均直径为30nm至150nm。

[0061] 更优选地,本发明还涉及包含粒子的水性组合物,其中:

[0062] (i) 每个所述粒子包含至少一种双链多核糖核苷酸或其盐或溶剂化物和至少一种聚亚烷基亚胺或其盐和/或溶剂化物的复合物,其中

[0063] (a) 所述双链多核糖核苷酸是聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C)),其中至少10%的双链多核糖核苷酸具有少于400个碱基对,至少40%的所述聚(I:C)具有至少850个碱基对,至少70%的所述聚(I:C)具有400至5000个碱基对,并且20%至45%所述聚(I:C)具有400至850个碱基对;和

[0064] (b) 所述聚亚烷基亚胺是聚乙烯亚胺(PEI),其中所述PEI的重均分子量为17.5至22.6kDa,并且多分散指数 <1.5 ,并且所述组合物中所述聚亚烷基亚胺的氮摩尔数与所述双链多核糖核苷酸的磷摩尔数之比为2.5至4.5;

[0065] (ii) 至少99%的所述粒子的直径小于或等于500nm;

[0066] (iii) 所述粒子的z平均直径为60nm至130nm;并且

[0067] (iv) 所述粒子的中值直径(D50%)为75nm至150nm。

[0068] 关于制造过程的特征,可以进一步定义如上定义的任何组合物,包括可通过将以上定义的水性组合物冻干获得的组合物。例如,按照所述水溶性的线性均-聚亚烷基亚胺或杂-聚亚烷基亚胺的氮摩尔数相对于聚(I:C)分子的磷摩尔数之比为2.5至4.5,而形成粒子。优选地,通过在混合室中分别注入含有所述聚(I:C)分子的溶液和含有所述水溶性线性均-聚亚烷基亚胺或杂-聚亚烷基亚胺的溶液,来形成粒子。可通过添加浓度为1至10%(重量/所述组合物的总体积)的葡萄糖,优选通过将葡萄糖添加至含聚(I:C)的溶液中而形成水性组合物。此外,其中分别注入含有所述聚(I:C)分子的溶液和含有所述水溶性线性均-聚亚烷基亚胺或杂-聚亚烷基亚胺的溶液,其中注入任一种溶液的流速在1mL/min至50mL/min,和/或以50rpm至600rpm的速率混合。

[0069] 关于粒子中所含的聚(I:C)分子的尺寸、粒子的单峰直径分布、线性聚亚烷基亚胺是聚乙烯亚胺、粒径的多分散指数、组合物的重量克分子渗透压浓度和/或组合物的pH值(以及一种药学上可接受的载体、有机溶剂、赋形剂和/或佐剂的存在,或至少一种化合物(尤其是治疗性化合物)的存在),以上(i)至(vii)所确定的更优选范围也适用于包含如上所述形成的粒子的水性组合物。

[0070] 在以下具体实施方式和实施例中提供了B0-11X制剂形式的此类组合物的制备、其特征、其分析及其用途(单独地或与其他药剂、以及在特定方案中组合)有关的其他实施方案,具体是为了针对特定的适应症和/或其他药剂和疗法(例如化学疗法、放射疗法、靶向免疫检查点分子的药物、T细胞介导的反应、DNA修复和/或复制、或调节免疫细胞和/或癌细胞活性(包括代谢活性)的激酶和其他酶的抑制剂)的组合,而获得改进的或优化的治疗反应。B0-11X制剂与第二治疗剂组合可用于治疗细胞生长病症的方法中,所述病症特征在于

人或动物细胞的异常生长(尤其是癌症),第二治疗剂选自:抗CTLA4、抗PD1、抗PDL1、CAR-T细胞、癌抗原疫苗、或靶向调节性T细胞的药剂、靶向代谢酶的药剂、靶向DNA修复和/或复制的药剂、或靶向表I中任何基因所表达的蛋白的药剂(参见实施例4)。更具体地,当BO-11X制剂与该第二治疗剂一起施用,可用于获得协同治疗作用,包括降低所述第二治疗剂的常规剂量和/或施用频率的可能性(从而潜在地减少医学干预、对药物的耐受性、和/或患者的不适)。此外,BO-11X制剂与第二治疗剂一起施用,可允许治疗对所述第二治疗剂耐受、不敏感、反应性差(或无反应)的患者,从而克服任何特定的肿瘤耐受性或逃逸机制(包括可改变特定基因、通路和/或对药物或内源性化合物(例如细胞因子)反应的突变)。因此,BO-11X制剂可按照药物-援救或药物-致敏组合治疗的形式使用,具体是用于治疗癌症。

附图说明

[0071] 图1:BO-11X水性组合物(以BO-112为例)的GMP制造和结构分析。(A)流程图概述了制造BO-112化合物的主要步骤,其作为符合GMP要求的药物制备物包含聚(I:C)分子、市售JetPEI制备物和葡萄糖。还可以使用其他类型形成双链分子的多核糖核苷酸来应用这种方法,该双链分子由聚(A)、聚(U)、聚(C)和/或聚(G)根据它们各自的配对特性形成。否则,此方法可能涉及添加另一种化合物(作为免疫相关佐剂或治疗性化合物,例如CD40L、IL12、病毒或肿瘤抗原、miRNA、mRNA、或基于(非编码)RNA/核酸的其他药物、或抗癌药(例如激酶或影响细胞复制、代谢或生物学功能的其他酶的抑制剂))和(或替代)阶段1中的葡萄糖或其他赋形剂。(B)BO-112复合物的尺寸分布与三种含聚(I:C)的市售产品(聚-ICLC、LyoVec-HMW和LyoVec-LMW)进行比较;考虑通过动态光散射(zeta sizer nano ZS technology)的以纳米(d.nm)为单位的粒径定义粒子尺寸。在-20℃下储存后,这些市售制备物的尺寸分布也发生实质性变化,BO-112制备物则没有。

[0072] 图2:在不同的癌细胞模型中,不同的聚(I:C)制剂对细胞活力的作用。(A)将BO-112与未治疗的细胞以及经聚-ICLC、LyoVec-LMW、或LyoVec-HMW治疗的细胞进行比较,每种制剂均根据指定的浓度进行测试,这些浓度是根据复合物重量而确定的,但在黑色素瘤(SK-MEL-103)或胰腺癌(PANC 02.03)细胞模型中具有相似的聚(I:C)分子含量。24小时后使用结晶紫测定法产生细胞活力数据。在其他小鼠模型(4T1乳癌、MC38结肠癌和B16-F10-OVA)黑色素瘤细胞系和人模型(PAN02.03胰腺癌细胞系)中进行这种体外细胞毒性测试,将细胞和0.25-1.0μg/mL的BO-112孵育24或48小时,证实了对此类细胞系的直接细胞毒性作用。(B)通过RT-qPCR法,在暴露于BO-112、聚-ICLC(或未经治疗的,NT)8、16和24小时的SK-MEL-103细胞中,评价不同聚(I:C)制剂对具有治疗意义的信号传导分子(如干扰素-β(IFN-β))表达的作用。在可提供相似聚(I:C)分子含量的浓度下,使用BO-112和聚-ICLC制剂。

[0073] 图3:单独使用线性PEI、聚(I:C)和两种不同的PEI/聚(I:C)制剂(BO-110和BO-112)对正常原代黑素细胞(制备物#1和#2)和对4种癌细胞系的作用,证明这种PEI/聚(I:C)制剂对癌细胞系的特定细胞毒性。用于制备单独的聚(I:C)、BO-110和BO-112治疗所施用的聚(I:C)含量是相同的(每40小时的治疗,1μg/mL)。

[0074] 图4:BO-112不同的聚(I:C)制剂对源自患者的黑色素瘤细胞(SK-Mel 103细胞系)的作用。将BO-112与未经治疗的细胞(NT)以及经聚-ICLC、LyoVec-LMW、或LyoVec-HMW治疗的细胞进行离体比较,每种制剂的测试浓度均根据复合物重量确定,但聚(I:C)分子的含量

相似。(A)以0.35 μ g/ml浓度的每种聚(I:C)制剂处理48小时后,采用结晶紫分析法产生细胞活力数据。(B)在0.5 μ g/ml浓度的每种聚(I:C)制剂处理后的16和24小时,对于干扰素- α/β (IFN α/β ,任意单位)的表达进行了评估。

[0075] 图5:B0-112、脂多糖(LPS)和用于制备B0-112的聚(I:C)制备物对不同类型细胞死亡及相关标记物表达的作用。B16-F10-OVA细胞(10^5 细胞/孔)单独培养(对照)或与LPS、B0-112或仅聚(I:C)分子一起培养(与B0-112制剂中掺入的尺寸分布相同),在指定的浓度下维持48小时,通过流式细胞术测量仍存活细胞的百分比,或呈现与早期/晚期凋亡或坏死有关的标记物(膜联蛋白V和7ADD染色;A)的组合;或表达免疫原性细胞死亡的特异性标记物,例如MHC-I、CD95或钙网蛋白(B)。

[0076] 图6:B0-112对酶聚ADP核糖聚合酶(PARP)激活的作用。用B0-112(0.5 μ g/mL)培养4T1乳癌或MC38结肠癌细胞(3×10^6)。通过Western印记分析在B0-112刺激后在0、16h和24h时,评估PARP(一种参与DNA修复、基因组稳定性和程序性细胞死亡的酶)的激活。分析了在细胞裂解物中完整116kDa PARP蛋白和85kDa细胞凋亡诱导的裂解产物的存在;纳入微管蛋白作为对照,以加载等量的蛋白。结果显示,B0-112制剂可促进MC38和4T1癌细胞中PARP酶的激活,为B0-112组合物与PARP抑制剂组合用于患者的用途提供了证据,所述患者对这种PARP抑制剂类型的药物疗效不佳或无效,可能需要对其致敏(另请参见图14B和15B)。

[0077] 图7:施用B0-112在人黑色素瘤动物模型中的作用。(A)显示治疗时间规划的时间表。在第0天对所有小鼠皮下注射B16-F10鼠黑色素瘤细胞。在第7天,将肿瘤平均尺寸相似(80-100mm³)的小鼠随机分为5组后,以3种不同的浓度,在第2、3和4组(G2、G3、G4)中用B0-112制剂(双圈)直接注入肿瘤组织(i.t.治疗)或在其余两个组(G1和G5)中仅用载体,来治疗动物。在接下来的治疗日(10、14、17、21和24),其他所有组(除G1以外)除了在第7天以相同浓度在肿瘤内施用B0-112制剂以外,还接受腹膜内(ip)施用抗PD-L1鼠抗体(150 μ g/剂量)。每天监测存活,并在发现小鼠死亡时或肿瘤体积达到最大允许尺寸时,记为死亡。在最后一次治疗后,继续监测直到第45天,直到最后一只小鼠死亡并终止实验。(B)比较对照组G1和G5与以指定的三种浓度施用B0-112制剂的三组的存活曲线。比较各组时,对照组和测试组之间存在统计学差异($p < 0.0001$, Log-rank Mantel-Cox检验),相对于单独的载体或抗PD-L1,G4表现出最强的存活提高。(C)B0-112作为单一药剂在进一步的人黑色素瘤B16-F10模型中的治疗作用;B16-F10黑色素瘤细胞(5×10^5 个细胞)经皮下注射,B0-112如A中所述在肿瘤内施用(8-9只小鼠/组;对照组,仅载体;治疗组,B0-112;B0-112剂量/小鼠:2.5mg/Kg/100 μ l)。(D)每周用卡尺测量每只动物的肿瘤尺寸、计算体积(长 $\times$ 宽²/2)。蜘蛛图显示对照(载体)和B0-112治疗的小鼠的各肿瘤的生长曲线,并表明B0-112制剂与载体相比降低了肿瘤的生长。

[0078] 图8:施用B0-112在人黑色素瘤动物模型中的异位作用。(A)通过转移黑色素瘤B16-F10-OVA而诱发两种癌症的小鼠,(针对B0-112)通过肿瘤内施用仅就一个肿瘤块进行治疗,和/或(针对抗PD-L1)通过腹膜内施用进行全身治疗,使用的方案和剂量与图7中所示实验方案相似($n = 10$ 小鼠/组)。(B)在四组(对照、单一治疗或组合治疗)中,在治疗和未治疗的远端肿瘤块中测量肿瘤体积的生长。每周通过卡尺测量肿瘤,并计算每组各动物的体积(长 $\times$ 宽²/2)。

[0079] 图9:施用B0-112在人乳癌动物模型中的作用。(A)模型和治疗方案,使用4T1乳癌

细胞 (5×10^5 个细胞) 皮下注射 (s.c.) 于 8-10 周龄雌性 BALB/c 小鼠右侧 (6-7 只小鼠/组; 对照组, 仅载体; 治疗组, B0-112)。当肿瘤体积为 $80-100 \text{ mm}^3$ 时开始治疗 (第 9 天)。在指定日, 通过单次直接注射到右侧肿瘤块中 (剂量/小鼠: 2.5 mg/Kg , $100 \mu\text{l}$), 进行肿瘤内 B0-112 和载体施用。每周通过卡尺测量肿瘤并计算每组各动物的体积 ($\text{长} \times \text{宽}^2/2$), 获得针对每只动物分别显示的数据 (标明每组的动物数) (B) 或者针对各组合并显示的数据 (C), 在 B0-112 治疗组中观察到肿瘤体积的统计学相关减少。

[0080] 图 10: 施用 B0-112 在人结肠直肠癌动物模型中的作用。(A) 在第一个模型和治疗方案中, 在 8 至 10-周龄雌性 C57BL/6 小鼠右侧 s.c. 注射 MC38 结肠癌细胞 (5×10^5 细胞) (7-8 小鼠/组; G1 对照组, 仅载体; G2 治疗组)。当肿瘤体积为 $80-100 \text{ mm}^3$ 时开始治疗 (第 16 天)。在指定日, 通过单次直接注射到右侧肿瘤块中 (剂量/小鼠: 2.5 mg/Kg , $100 \mu\text{l}$), 进行肿瘤内 B0-112 和载体施用。(B) 使用 Kaplan-Meier 分析, 评估该第一模型中的小鼠存活。还每周通过卡尺测量肿瘤并计算每组各动物的体积 ($\text{长} \times \text{宽}^2/2$), 获得针对每只动物分别显示的数据 (C) 或者针对各组合并显示的数据 (D), 在 B0-112 治疗组中观察到肿瘤体积的统计学相关减少。

[0081] 图 11: 采用不同治疗方案, 施用 B0-112 在第二种人结肠直肠癌模型中的作用。(A) 在 8 至 10-周龄雌性 C57BL/6 小鼠右侧 s.c. 注射 MC38 结肠癌细胞 (1×10^6 细胞) (4-11 小鼠/组; G1 对照组, 仅载体; G2 治疗组)。当肿瘤体积为 $80-100 \text{ mm}^3$ 时开始治疗 (第 11 天)。在指定日, 通过单次直接注射到右侧肿瘤块中 (剂量/小鼠: 2.5 mg/Kg , $100 \mu\text{l}$), 进行肿瘤内 B0-112 和载体施用。在 B0-112 治疗后无肿瘤的那些剩下小鼠中, 在第 60 天通过在左侧 s.c. 注射 MC38 细胞 (2.5×10^5 细胞) 进行了再攻击, 然后肿瘤生长和小鼠存活。(B) 使用 Kaplan-Meier 分析, 评估该第二模型中的小鼠存活, 对四只动物在第 60 天再攻击, 并在第 80 天仍然存活, 这表明 B0-112 既可以触发癌细胞凋亡, 又可以驱动针对它们的免疫记忆。

[0082] 图 12: B0-112 在人的癌症适应性免疫反应激活模型中的治疗作用。(A) 如前所述, 建立了基于 MC38 的人结肠癌模型, 但整合了另外两个组, 其中还施用了用于消耗 CD4 阳性或 CD8 阳性 T 细胞的抗体 (治疗方案: B0112: d8、d11、d15、d18、d22、d25; 抗 CD4 或抗 CD8: d7、d8、d11、d15、d22、d29)。(B) 对用 B0-112 治疗的 MC38 荷瘤小鼠的肿瘤生长曲线的分析表明, 仅 CD8 阳性 T 细胞的消耗会削弱 B0-112 制剂的治疗性能 (平行显示不同组的肿瘤体积, N 表示每组的小鼠数量, 虚线表示在 d25 时 B0-112 治疗结束)。(C) B0-112 治疗对 T 细胞的募集和激活进入肿瘤以及激发抗原特异性 CD8+ T 细胞的作用。通过流式细胞术, 在第二次 B0-112 施用 24 小时后接受载体或 B0-112 制剂治疗的小鼠 B16-F10-OVA 肿瘤中 (以及引流淋巴结中进行四聚体分析), 测量 T 细胞亚群 (CD8 阳性或 CD4 阳性) 和 T 细胞激活 (CD137、IFN- γ 和 PD-1) 中不同细胞标记物的频率。这些图表明, 在该模型中, B0-112 治疗显著增加了肿瘤浸润中的 CD8+ T 细胞并促进了 CD4+ 和 CD8+ T 细胞激活。(D) 对于 T 细胞亚群 (CD8 阳性或 CD4 阳性) 对于 T 细胞引发 (OVA 和 Trp2 四聚体) 中不同细胞标记物的频率, 表明 B0-112 还显著提高了肿瘤 (针对 OVA 和内源性 Trp2 抗原) 中和引流淋巴结 (尤其是针对 Trp2 抗原) 中抗原特异性 CD8+ T 细胞的频率。所有数据 (甚至来自不同的实验) 一致表明, B0-112 制剂可以激活抗肿瘤适应性免疫反应, 具有诱导全身免疫的潜力。

[0083] 图 13: B0-112 在模型中的治疗作用用于评估人癌症中对干扰素表达的依赖性。(A) 通过 MTS 分析在 24、48 和 72h 时的细胞活力, 评价独立于 IFN 的体外肿瘤细胞的细胞毒性。简而言之, 以下各细胞系的细胞: B16、B16-IFN α/β (不响应 IFN γ ; 来自 InvivoGen) 和 B16-IFN

γ (不响应IFN α/β ;来自InvivoGen),单独地或与0.5 μ g/ml B0-112培养(5×10^3 个细胞/孔,96平孔板)24、48和72小时,单独地或与B0-112(0.5 μ g/ml)或与2'3'cGAMP STING激动剂(7 μ g/ml)培养24小时(显示B0-112的疗效优于参考STING激动剂)。进行了两次独立的测定,每种条件至少有8孔。在8至10周龄的雌性C57BL/6小鼠(7-10只小鼠/组)中右侧s.c.注射(5×10^5 个细胞)的上述B16-IFN α/β (B) 和B16-IFN γ (C) 癌细胞中,测试B0-112对人黑色素瘤IFN耐受型B16模型的体内治疗作用。当肿瘤体积为80-100mm³时开始治疗(第8天)。通过单次直接注射到右侧肿瘤块中(B0-112剂量/小鼠:2.5mg/Kg,100 μ l;两个剂量/周,三周),进行肿瘤内B0-112和载体施用。每周通过卡尺测量肿瘤直至处死并计算体积。图表明,与载体相比,在B0-112治疗的小鼠中B0-112减少了肿瘤体积(单个蜘蛛图)并显著提高了存活(Kaplan-Meier曲线),表明B0-112制剂对IFN耐受型癌细胞具有有效的治疗作用。

[0084] 图14:B0-11X施用的替代方法和方案。(A)施用B0-11X制剂(例如B0-112),可以从1-4个肿瘤内注射剂量开始(B0-11X I.T.),每周一次、每两周一次、或每三周一次(0.4-2.4mg/剂量);或更大的间隔,直至每6周一次,因为可以在临床研究中对有反应的或稳定的患者进行治疗。初始剂量后可数次进行B0-11X的皮下或肌肉内注射(B0-11X SQ/I.M.;0.2-2mg剂量)。至于其他肿瘤内治疗,如果最初肿瘤内的注射不能减小该病灶(通过全身免疫激活或其他反应)或其他有关肿瘤负荷、分期、持续性、转移和/或复发的证据,该方案可能涉及对相同病灶的注射(如果仍然存在)或其他病灶(如果原来的病灶不再存在)。(B)或者,在20或更多周内,通过逐渐间隔开(每周、每两周、每四周、每六周或更多周)的肿瘤内注射进行B0-112施用,在相同的(黑色菱形)和其他的癌症病灶(灰色菱形)中交替I.T.施用,施用或不施用在B0-11X治疗之前或之后开始的其他方案和/或施用中的平行治疗,比如化学疗法、放射疗法、小分子、检查点抑制剂、抗体(三角形,例如每2周施用一次,或每3周施用一次)。在前一种情况下,可以将最初的B0-11X单一治疗方案A(例如,与派姆单抗或伊匹单抗)组合,或将B0-11X单一治疗方案B(例如,与纳武单抗)组合用于援救或支持该第二治疗剂的治疗,否则第二治疗剂作用很弱(或无效)。在后一种情况下,B0-11X单一治疗方案A或初始B0-11X单一治疗方案B(两种方案中的每一种均与先前引用的抗体组合使用)可使肿瘤(或患者)对其他治疗剂(具体地,免疫疗法)敏感。(C)作为离体用于从患者获得的细胞上的佐剂(例如树突细胞DC离体成熟的疫苗佐剂),可以通过获得患者血液样本开始治疗,用于通过细胞提取法(一种通过阳性选择和细胞分选来分离细胞的程序)来分离相关细胞类型,如树突细胞(DC)的亚群,例如单核细胞衍生的树突细胞(Mo-DC)、BDCA3阳性以及其他树突细胞亚群(其作为I型干扰素的主要生产者,对刺激物如聚(IC)分子做出响应)或CD34+衍生的树突细胞。然后,可以在给定的天数内,离体扩增这些细胞和/或使其成熟,期间将细胞暴露于B0-112制剂中持续不同小时(例如1小时、3小时、8小时、24小时或更长),然后用于抗原加载以完成基于DC的疫苗的制备。还可以通过肌肉内或皮下注射B0-112、通过肿瘤内注射B0-112诱导肿瘤中的免疫原性细胞死亡、和/或通过体内递送肿瘤抗原,来补充和完成(或直接实现)DC的激活。

[0085] 图15:在患者中评估和使用B0-11X的替代方法。(A)总结了医学相关读数以评估施用B0-11X制剂(例如B0-112)的流程图。可以通过例如物理检查和成像技术进行医学状况的随访,以鉴定和测量肿瘤负荷、和/或监测血液中的癌症特异性生物标记物以评估对治疗的反应或复发。一系列子标准可以与三个主要评估标准(即,流程图底部的框)之一相关联,包

括评估通过活检获得的肿瘤组织和/或血液样本中的特定参数,包括细胞因子(例如干扰素或白介素,单独地或以特定的组合,参见实施例4)或循环/浸润性免疫细胞表达的修饰和/或对其的反应。(B)总结了在施用B0-11X制剂(例如B0-112)之后可获得的治疗机会的流程图(但可能在更早之前同时开始了),涉及先前流程图中定义的读数和其他读数(例如,在B0-112施用前后,在特定细胞或组织中,来自基因表达、蛋白表达、突变负荷状态、或T细胞克隆形成的分析得出的读数)。该分析提供了B0-112诱导的分子标记,这些标记可能指示着继续使用相同或不同的B0-11X治疗方案、或不同类型的医学跟进,包括可能使用抗肿瘤的治疗方法(例如,放射疗法、化学疗法、抗PD-1或其他免疫调节疗法、癌症疫苗接种、基于细胞的疗法等),其中在施用B0-11X制剂之前所述肿瘤在患者中被确认为反应较弱、耐受或不敏感的(即,流程图底部的框)。

[0086] 图16:患者转移性病灶中产生的临床数据。患有转移性平滑肌肉瘤的46岁女性,在接受多线疗法(尤其是化学疗法和抗PD-1/抗LAG-3组合)治疗后发展为进行性疾病。她患有适合注射的腹壁癌病灶,并在知情同意下接受了肿瘤内注射B0-112。在接受三次0.6mg B0-112的剂量后,患者不再接受全身治疗,仅对股骨(骨)转移进行姑息性放射治疗。(A)箭头指示相关病灶,通过影像分析(左列)在4个不同的位置所确定的,显示肿瘤坏死的放射学指征有所增加,三个月后(右列)在相似的位置重复进行影像分析,显示B0-112注射和未注射的病灶均有改善。(B) B0-112治疗前后,在该患者外周血中评估了循环免疫细胞群(根据特定的或组合的细胞表面标记物所定义,例如CD4、CD8、或CD8),表明(初步减少后) B0-112治疗可能会增加循环中特定细胞亚群的量,具体是NK细胞和CD16阳性细胞。

[0087] 图17:在患有进行性疾病的转移性黑色素瘤(IV期)的72岁女性患者中产生临床数据。她以前曾接受过多次手术,包括指/趾骨截肢和腹股沟淋巴结清扫术以及放射疗法。先前的全身性治疗包括在接受派姆单抗和福莫司汀治疗后进行干扰素治疗。评估她在腹股沟区测量为9cm的病灶,该病灶适合肿瘤内注射。在知情同意的情况下,在超声引导下以单剂量0.6mg B0-112注射腹股沟病灶,然后进行影像学分析,并在接下来的几周中在相似位置重复进行影像分析。在单剂量施用后一周,目标病灶的尺寸已减小至8厘米。然后,该患者接受了伊匹单抗(抗CTLA4抗体,每3周3mg/kg,持续4个周期)治疗,从而进一步改善了癌病灶。

具体实施方式

[0088] 本发明公开了组合物,包括在PCT/EP2016/078078的组合物权利要求中限定的那些,其中定义为B0-11X,并且在其实例1和2中说明,其中X是整数。PCT/EP2016/078078中公开的B0-11X组合物的一组特征包括在B0-112组合物中。具体地,可以通过组合适用于B0-112组合物所含粒子的特定特征或适用于与水性组合物相关的物理化学特征的特定特征,来进一步定义B0-112组合物。

[0089] 一种优选的B0-112组合物是包含粒子水性组合物,其中:

[0090] (i) 所述粒子中的每一个包含至少一种双链多核糖核苷酸或其盐或溶剂化物与至少一种线性聚亚烷基胺或其盐和/或溶剂化物的复合物,其中所述双链多核糖核苷酸是聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C)),且所述线性聚亚烷基胺的平均分子量是17kDa至23kDa;

[0091] (ii) 至少90%的所述粒子的单峰直径分布低于300nm;

[0092] (iii) 根据ISO 22412:2017所测量的,所述粒子的z平均直径小于或等于200nm;

- [0093] (iv) 所述组合物包含浓度为至少0.5mg/mL的聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C));
- [0094] (v) 所述组合物具有2至4的pH;且
- [0095] (vi) 根据ISO 13099,所述组合物的 ζ 电位为35mV至50mV。
- [0096] 在优选的实施方案中,B0-112组合物是根据前述的组合物,其中至少90%的所述粒子具有30nm至150nm的单峰直径分布。
- [0097] 在更优选的实施方案中,B0-112组合物是根据前述的组合物,其中所述粒子中包含的至少40%的双链多核糖核苷酸具有至少850个碱基对,所述粒子中包含的至少50%的双链多核糖核苷酸具有400至5000个碱基对。
- [0098] 在甚至更优选的实施方案中,B0-112组合物是根据前述的组合物,其中所述组合物的 ζ 电位是38至45mV。
- [0099] 在更优选的实施方案中,B0-112组合物是根据前述的组合物,其中所述线性聚亚烷基亚胺是水溶性线性均-聚亚烷基亚胺或杂-聚亚烷基亚胺。
- [0100] 在甚至更优选的实施方案中,B0-112组合物是根据前述的组合物,其中所述线性聚亚烷基亚胺是线性聚乙烯亚胺。
- [0101] 在又一个优选的实施方案中,B0-112组合物是根据前述的组合物,其中所述粒径的多分散指数低于1.5。
- [0102] 在前述的另一个优选实施方案中,B0-112组合物是根据前述的组合物,其中聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C))含有的5%至60%的双链多核糖核苷酸具有少于400个碱基对,15%至30%的双链多核糖核苷酸具有400至850个碱基,10%至70%的双链多核糖核苷酸具有850至5000个碱基对,并且0%至10%的双链多核糖核苷酸具有超过5000个碱基对。
- [0103] 在另一个更优选的实施方案中,B0-112组合物是根据前述的组合物,其中所述组合物还包含至少一种药学上可接受的载体、有机溶剂、赋形剂和/或佐剂。
- [0104] 在又一个更优选的实施方案中,B0-112组合物是根据前述的组合物,其中所述组合物还包含选自有机化合物、无机化合物、核酸、适体、肽或蛋白的至少一种化合物。
- [0105] 在甚至更优选的实施方案中,B0-112组合物是根据前述的组合物,其中所述组合物还包含浓度为1%至10%(重量/体积)的葡萄糖或甘露醇。
- [0106] 在又一个甚至更优选的实施方案中,B0-112组合物是根据前述的组合物,其中所述组合物是具有200至600mOsm/kg重量克分子渗透压浓度的水性组合物。
- [0107] 在又一个更优选的实施方案中,B0-112组合物是根据前述的组合物,其中:
- [0108] (i) 所述粒子中的每一个是通过生成至少一种双链多核糖核苷酸或其盐或溶剂化物与至少一种线性聚亚烷基亚胺或其盐和/或其溶剂化物的复合物而形成的,其中所述双链多核糖核苷酸为聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C)),所述线性聚亚烷基亚胺的平均分子量为17至23kDa;
- [0109] (ii) 至少90%的所述粒子的单峰直径分布低于300nm;
- [0110] (iii) 根据ISO 22412:2017所测量的,所述粒子的z平均直径小于或等于200nm;
- [0111] (iv) 所述组合物包含浓度为至少0.5mg/mL的聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C));
- [0112] (v) 所述组合物具有2至4的pH;且
- [0113] (vi) 根据ISO 13099,所述组合物的 ζ 电位等于或高于30mV;
- [0114] 其中所述粒子以所述组合物中所述聚亚烷基亚胺的氮摩尔数相对于所述双链多

核糖核苷酸的磷摩尔数之比等于或大于2.5而形成。

[0115] 在一个优选的实施方案的更优选实施方案中,B0-112组合物是根据前述的组合物,其中所述聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C))通过退火(i)和(ii)形成:

[0116] (i) 聚肌苷酸(聚(I))制备物,其包含的80%至99%的分子具有少于400个碱基,0%至20%的分子具有400至850个碱基,0%至5%的分子具有850至5000个碱基,以及0%至5%的分子具有超过5000个碱基;和

[0117] (ii) 聚胞苷酸(聚(C))制备物,其包含的20%至85%的分子具有少于400个碱基,10%至40%的分子具有400至850个碱基,0%至5%的分子具有850至5000个碱基,以及0%至5%的分子具有超过5000个碱基。

[0118] 在另一个更优选的实施方案及其优选实施方案的一个更优选的实施方案中,B0-112组合物是根据前述的组合物,其中所述组合物是通过另外添加浓度为1%至10%的葡萄糖或甘露醇形成的(重量/所述组合物的总体积)。

[0119] 在所述的更优选实施方案中,所述聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C))通过退火(i)和(ii)形成:

[0120] (i) 聚胞苷酸(聚(C))制备物,其包含的20%至82%的分子具有少于400个碱基,15%至40%的分子具有400至850个碱基,3%至50%的分子具有850至5000个碱基,以及少于1%的分子具有超过5000个碱基;和

[0121] (ii) 聚肌苷酸(聚(I))制备物,其包含的80%至99%的分子具有少于400个碱基,1%至20%的分子具有400至850个碱基,0%至5%的分子具有850至5000个碱基,以及少于1%的分子具有超过5000个碱基。

[0122] 更优选地,通过退火(i)和(ii)形成聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C)):

[0123] (i) 聚胞苷酸(聚(C))制备物,其包含的33%至73%的分子具有少于400个碱基,20%至37%的分子具有400至850个碱基,5%至48%的分子具有850至5000个碱基,以及少于1%的分子具有超过5000个碱基;和

[0124] (ii) 聚肌苷酸(聚(I))制备物,其包含的81%至98%的分子具有少于400个碱基,6%至17%的分子具有400至850个碱基,0%至3%的分子具有850至5000个碱基,以及少于1%的分子具有超过5000个碱基。

[0125] 在所述的甚至更优选的实施方案中,B0-11X和B0-112组合物包含具有尺寸分布的聚(I:C)分子,其中所述聚(I:C)包含的7%至57%的分子具有少于400个碱基,20%至45%的分子具有400至850个碱基,20%至70%的分子具有850至5000个碱基,以及0至9%的分子具有超过5000个碱基。更优选地,B0-11X和B0-112组合物包含具有尺寸分布的聚(I:C)分子,其中所述聚(I:C)包含的10%至30%的分子具有少于400个碱基,20%至30%的分子具有400至850个碱基,40%至60%的分子具有850至5000个碱基,以及0至5%的分子具有超过5000个碱基。甚至更优选地,B0-11X和B0-112组合物包含具有尺寸分布的聚(I:C)分子,其中所述聚(I:C)包含11%至28%的分子具有少于400个碱基,23%至27%的分子具有400至850个碱基,42%至55%的分子具有850至5000个碱基,以及0至3%的分子具有超过5000个碱基。

[0126] B0-112组合物也是通过冻干前述实施方案中任一项的水性组合物而可获得的组合物。然后可以使用适当的溶液将这些冻干的B0-112组合物重构,以提供呈现上述一个或

多个特征的制剂,具体是组合物,其包含粒子,其中:

[0127] (i) 所述粒子中的每一个包含至少一种双链多核糖核苷酸或其盐或溶剂化物与至少一种聚亚烷基胺或其盐和/或溶剂化物的复合物;

[0128] (ii) 至少95%或至少90%的所述粒子的直径小于或等于900nm,优选地小于或等于500nm(例如,140nm至400nm,或140nm至250nm);以及

[0129] (iii) 所述粒子的z平均直径小于或等于300nm,优选小于或等于200nm,更优选地小于或等于150nm,具体地,如根据ISO 22412:2017所测量的。

[0130] 此外,本发明还涉及通过用本文定义的B0-11x组合物(优选B0-112组合物)离体处理受试者的细胞或组织而获得的制剂。优选地,所述制剂包括来自受试者的细胞或组织,其已经被本文所公开的组合物离体处理过。更优选地,所述细胞或组织是来自受试者样本的细胞或组织,如血液样本、淋巴样本或者组织活检。

[0131] 本发明还提供了用于生成聚(I:C)分子水性溶液(已经包含或不包含赋形剂,例如葡萄糖或甘露醇)的方法,并且具有适当的特征以便与聚亚烷基胺(例如聚乙烯亚胺)水性溶液混合,用于生产B0-11X制剂。然后,通过混合这两种水性溶液而得到的含聚(I:C)的制剂保持为分批制备物(优选,仍作为水性溶液,或冻干形式),或者也可以直接制备成等份,每等份装在一次性小瓶、注射器、或其他适合储存、单次使用这种等份和/或冻干的容器中。B0-11X制剂(呈液体或冻干形式)可以在室温、8℃至2℃或低于0℃或低于-20℃的温度下保存。

[0132] 在这种优选的实施方案中,其他化合物(例如一种或多种抗体、激素、肽、赋形剂、载体、酶活性抑制剂、化学治疗剂、抗生素、稳定剂、标记剂、有机溶剂、防腐剂、载体、或者其他药物),在它们混合之前或者在混合两种(双链多核糖核苷酸和聚亚烷基胺的)水性溶液而生产B0-11X制剂之后,可以添加到两种水性溶液中的一种(如果不改变粒子的正确形成,或者以上列出的B0-11X制剂的任何其他特征)。因此,随后与B0-11X成分同时施用的此类其他成分可为组合物提供改善的生物利用度、功效、药代动力学/药效动力学谱、稳定性、代谢或其他感兴趣的药物特性,然而当每种初始B0-11X制剂或其他成分(例如,另一种具有药用意义的化合物)单独施用,或者每种初始B0-11X制剂或其他成分分别施用,均未观察到这些特征的改善。

[0133] 在另一个优选的实施方案中,B0-11X制剂用作药物,例如其配制成(例如可注射的水性组合物,任选地包含药学上可接受的载体、赋形剂和/或佐剂)并被施用而用于向器官或组织递送双链多核糖核苷酸的药物组合物,所述器官或组织处于健康状态、呈现出与外源性病原体(例如细菌或病毒)相关的疾病、或呈现出由于特征在于人或动物细胞异常生长的细胞生长病症(例如,由于癌症(即涉及致瘤性转化、转移、毒性化合物))或妇科病症(特征在于雌性哺乳动物生殖器官细胞的异常生长)而引起的改变。因此,在优选的实施方案中,本发明涉及治疗疾病的方法,该方法包括对人或动物施用本发明的组合物。在另一个优选的实施方案中,本发明涉及治疗细胞生长病症的方法,如本文所定义的所述细胞生长病症的特征在于人或动物细胞的异常生长,所述方法包括将本发明的组合物施用于人或动物。

[0134] 优选地,B0-11X制剂用于(直接或间接)诱导肿瘤细胞死亡或抑制肿瘤细胞生长的方法,其范围在于治疗、减轻、改善或预防癌生长、存活、转移、上皮-间质转化、免疫逃逸或

复发。更优选地，B0-11X制剂用于治疗实体瘤的方法中，所述实体瘤例如癌(carcinomas)、神经胶质瘤、黑色素瘤或肉瘤。具体地，全身施用B0-11X制剂，或更直接施用于肿瘤内或靠近肿瘤的位置，例如肿瘤块的边缘、周围的上皮细胞、淋巴管或血管(如，通过肿瘤内或瘤周注射)、或者雌性哺乳动物生殖器官异常生长的细胞。本发明的另一优选实施方案涉及如上所定义的B0-112组合物，其用作药物的用途。本发明的另一优选实施方案涉及如前所定义的B0-112组合物的用途，其中所述药物是可注射的水性组合物，其任选地包含药学上可接受的载体、赋形剂和/或佐剂。

[0135] 本发明的另一个实施方案涉及如上所定义的B0-112组合物，其用于治疗细胞生长病症，其特征在于人或动物细胞的异常生长。优选的实施方案涉及用于根据前述用途的B0-112组合物，其中所述细胞生长病症是癌症或妇科病症，其特征在于雌性哺乳动物生殖器官的细胞异常生长。前述实施方案的更优选实施方案涉及根据前述用途的B0-112组合物，其中所述组合物用于肿瘤内或肿瘤周注射。可选地，前述实施方案及其优选实施方案的更优选实施方案涉及根据前述用途的B0-112组合物，其中该组合物用于在皮肤或内部器官或组织的水平注射。

[0136] 本发明的另一个实施方案涉及如上文所定义的B0-11X组合物(优选B0-112组合物)用作疫苗的用途。类似地，本发明还涉及在受试者(患者)中使用所述疫苗进行治疗的方法。优选地，所述B0-11X或B0-112组合物用作疫苗用于治疗细胞生长病症，其特征在于人或动物细胞的异常生长，更优选地用于治疗癌症。或者，所述B0-11X或者B0-112组合物用作感染相关疫苗。

[0137] 在一些实施方案中，B0-11X制剂是根据制造方法生产的，然后在结构和功能方面进行定义，如在实施例描述为B0-112制剂。如在W02011003883中所述，B0-11X制剂还可以表现出B0-110特有的生物学活性，即激活家族解旋酶MDA-5或NOXA表达水平，以及诱导癌细胞或源自癌细胞的细胞系(优选人来源的，尽管程度有所改善)中的自噬。与在W02011003883中描述的表征B0-110性质和作用机理的过程无关，用于验证B0-11X制剂的细胞系示例是人SK-Mel-19、SK-Mel-28、SK-Mel-103和SK-Mel-147细胞以及鼠B16细胞，所述黑色素瘤细胞系当暴露于B0-11X制剂时呈现出分子(例如干扰素Beta)的表达增加。此外，在促进癌细胞系中肿瘤细胞死亡的剂量下，B0-11X制剂对用作对照的正常细胞(如黑素细胞、或其他皮肤细胞、以及免疫系统细胞，通常代表癌症治疗中的次要毒性部位)没有毒性。继癌细胞的自噬和凋亡(或在此类细胞中该制剂可能诱导的感兴趣的任何其他治疗作用)之后，B0-11X制剂还可能诱导癌细胞抗原的释放，这些抗原可作为肿瘤特异性免疫反应的诱导剂，特别是当将B0-11X制剂局部施用于癌细胞或肿瘤时(例如通过肿瘤周或肿瘤内注射、在肿瘤块边缘、在周围的上皮细胞、淋巴或血管中、或直接在肿瘤块内施用B0-11X)，无论有或没有同时或顺序施用针对相同适应症的另一种药物或其他治疗。

[0138] 在远离或独立于肿瘤块的位置施用之后(例如，通过肌肉内或皮下注射，或者通过离体施用至获自患者然后又重新注射的细胞)，B0-11X制剂可针对靶标以及癌细胞以外的其他细胞(包括免疫细胞或血液循环中或位于癌旁的的其他细胞)提供感兴趣的的治疗作用。甚至在不可能进行肿瘤周或肿瘤内注射(例如在非实体瘤中，如白血病或其他血液癌症)时，这种作用可能是由于诱导肿瘤特异性效应物的释放、或是细胞向癌细胞或在肿瘤内的迁移。

[0139] 本发明还涉及本文所公开的组合物的制造方法,其包括:

[0140] (i) 制备至少一种双链多核糖核苷酸或其盐或溶剂化物的水性溶液,以及至少一种聚亚烷基胺或其盐或溶剂化物的水性溶液,其中任一种或两种溶液任选地进一步包含药学上可接受的载体、有机溶剂、赋形剂和/或佐剂;

[0141] (ii) 通过孔径小于或等于500nm的过滤器对每种溶液进行独立过滤,以形成灭菌溶液;

[0142] (iii) 任选通过以大于或等于1mL/min的速率进行注射,在混合室内将所述溶液中的一种加入到另一种溶液中;或者,任选通过以大于或等于1mL/min的速率进行注射,同时将每种所述溶液添加到所述混合室中,在所述混合室中混合所得的灭菌溶液,以形成水性组合物;以及任选地,

[0143] (iv) 通过孔径小于或等于600nm的过滤器过滤所得的水性组合物以形成滤液,或者以大于或等于22480m/s²离心所得的水性组合物以形成上清液;以及任选地,

[0144] (v) 冻干所得的水性组合物、滤液或上清液。

[0145] 因此,在一个优选的实施方案中,本发明可以涉及制造如本文所公开的组合物的方法,该方法包括:

[0146] (i) 制备至少一种双链多核糖核苷酸或其盐或溶剂化物的水性溶液,以及至少一种聚亚烷基胺或其盐或溶剂化物的水性溶液,其中任一种或两种溶液任选地进一步包含药学上可接受的载体、有机溶剂、赋形剂和/或佐剂;

[0147] (ii) 通过孔径小于或等于500nm的过滤器对每种溶液进行独立过滤,以形成灭菌溶液;和

[0148] (iii) 任选通过以大于或等于1mL/min的速率进行注射,在混合室内将所述溶液中的一种加入到另一种溶液中;或者,任选通过以大于或等于1mL/min的速率进行注射,同时将每种所述溶液添加到所述混合室中,在所述混合室中混合所得的灭菌溶液,以形成水性组合物;以及,

[0149] (iv) 任选冻干所得的水性组合物。

[0150] 另外,在另一个优选的实施方案中,本发明可以涉及制造如本文所公开的组合物的方法,该方法包括:

[0151] (i) 制备至少一种双链多核糖核苷酸或其盐或溶剂化物的水性溶液,以及至少一种聚亚烷基胺或其盐或溶剂化物的水性溶液,其中任一种或两种溶液任选地进一步包含药学上可接受的载体、有机溶剂、赋形剂和/或佐剂;

[0152] (ii) 通过孔径小于或等于500nm的过滤器对每种溶液进行独立过滤,以形成灭菌溶液;

[0153] (iii) 任选通过以大于或等于1mL/min的速率进行注射,在混合室内将所述溶液中的一种加入到另一种溶液中;或者,任选通过以大于或等于1mL/min的速率进行注射,同时将每种所述溶液添加到所述混合室中,在所述混合室中混合所得的灭菌溶液,以形成水性组合物;以及,

[0154] (iv) 通过孔径小于或等于600nm的过滤器过滤所得的水性组合物以形成滤液,或者以大于或等于22480m/s²离心所得的水性组合物以形成上清液;以及,

[0155] (v) 任选,冻干所得的滤液或上清液。

[0156] 更优选地,本发明的方法不包括最终的冻干步骤。在本发明的过程(或方法)中,所述双链多核糖核苷酸、所述聚亚烷基胺和所述药学上可接受的载体、有机溶剂、赋形剂和/或佐剂如本文所公开。通过将所述溶液通过孔径小于或等于500nm的过滤器独立过滤,优选通过将所述溶液通过孔径小于或等于300nm的过滤器独立过滤,更优选地,通过将所述溶液通过孔径小于或等于200nm的过滤器过滤,对每种溶液进行灭菌以形成灭菌的溶液。优选地,通过大规模的涡旋对流传输,然后通过纯扩散传输来消除浓度差,来进行所得滤液的混合。混合室可以是开始混合所述溶液的任何室或容器,例如烧瓶、反应器或混合器,并可以具有任何适合的形状(例如圆柱形、球形或其他允许在室内正确混合的形状),在密闭空间内以受控方式进行混合。更优选地,所述混合室具有0.1mL至20mL的固定体积(或者甚至更大的体积,例如25mL、50mL、100mL或者更大,从而允许产物连续的更高产率,尤其是在GMP条件),更优选0.2至10mL,更优选0.5至8mL。更优选地,通过以1mL/min至2000mL/min的速率,更优选地10至1000mL/min的速率,进一步优选20至500mL/min的速率进行添加(可选地通过注射)而混合。随后,任选地,可通过孔径小于或等于600nm,优选直径不超过500nm,更优选直径不超过400nm,还更优选直径不超过300nm的过滤器,对所得水性组合物进行过滤以形成或收集滤液。或者,随后任选地,可以以大于 22480m/s^2 (在半径为0.082m的转子上,转速为5000rpm),优选以大于 27202m/s^2 (在半径为0.082m的转子上,转速为5500rpm),更优选以大于 32372m/s^2 (在半径为0.082m的转子上,转速为6000rpm),更优选以 44062m/s^2 (在半径为0.082m的转子上,转速为7000rpm),对所得的水性组合物进行离心,以形成或收集上清液。在一个特别优选的实施方案中,当本发明的方法步骤(i)至(iii)不能获得本发明的组合物时,换言之当以这样的速率进行添加时,所述水性组合物中所包含的少于95%的粒子具有小于或等于600nm的直径;和/或所述粒子的z平均直径大于200nm,更优选地当所述粒子不具有单峰直径分布时,步骤(iv)是必须的。当以1mL/min至20mL/min的速率,具体在0.5至20mL的混合(反应)室中进行添加时,可能是这种情况。最后,可以将所得的水性组合物、滤液或上清液冻干,以提供本发明的组合物,使其成为粒状固体。

[0157] 因此,在本发明方法的一个更特别优选的实施方案中,所述方法包括:

[0158] (i) 制备至少一种双链多核糖核苷酸或其盐或溶剂化物的水性溶液,以及至少一种聚亚烷基胺或其盐或溶剂化物的水性溶液,其中任一种或两种溶液任选地进一步包含药学上可接受的载体、有机溶剂、赋形剂和/或佐剂;

[0159] (ii) 通过孔径小于或等于200nm的过滤器对每种溶液进行独立过滤,以形成灭菌溶液;

[0160] (iii) 任选通过以20mL/min至100mL/min的速率进行注射,在混合室内将所述溶液中的一种加入到另一种溶液中;或者,任选通过以20mL/min至100mL/min的速率进行注射,同时将每种所述溶液添加到所述混合室中,在所述混合室中混合所得的灭菌溶液,以形成水性组合物;其中所述混合室的体积为0.2至10mL;

[0161] (iv) 通过孔径小于或等于500nm的过滤器过滤所得的水性组合物以形成滤液,或者以大于或等于 32372m/s^2 (在半径为0.082m的转子上,转速为6000rpm)离心所得的水性组合物以形成上清液;以及,

[0162] (v) 任选,冻干所得的滤液或上清液。

[0163] 在本发明方法的另一个甚至更特别优选的实施方案中,所述方法包括:

[0164] (i) 制备至少一种双链多核糖核苷酸或其盐或溶剂化物的水性溶液,以及至少一种聚亚烷基亚胺或其盐或溶剂化物的水性溶液,其中任一种或两种溶液任选地进一步包含药学上可接受的载体、有机溶剂、赋形剂和/或佐剂;

[0165] (ii) 通过孔径小于或等于200nm的过滤器对每种溶液进行独立过滤,以形成灭菌溶液;

[0166] (iii) 任选通过以30mL/min至100mL/min的速率进行注射,在混合室内将所述溶液中的一种加入到另一种溶液中;或者,任选通过以30mL/min至100mL/min的速率进行注射,同时将每种所述溶液添加到所述混合室中,在所述混合室中混合所得的灭菌溶液,以形成水性组合物;其中所述混合室的体积为0.5至8mL;以及

[0167] (iv) 任选地冻干所得的水性组合物。

[0168] 在进一步的实施方案中,B0-11X制剂是根据制造方法生产的,该方法涉及两种水性溶液的混合,第一种包含双链多核糖核苷酸(或其盐或溶剂化物),第二种包含聚亚烷基亚胺(或其盐或溶剂化物),使所得粒子具有上述定义的特征,特别是关于直径和单峰直径分布、以及外观基本透明的胶体溶液。

[0169] 在进一步的可选步骤中,在制造上述组合物的方法的步骤(i)期间、或在任何步骤(i)-(v)或步骤(i)-(iv)之后,可以添加其他化合物(作为免疫相关佐剂或治疗性化合物,例如CD40L、IL12、病毒或肿瘤抗原、或抗癌药)。根据本文公开的使用B0-11X组合物(尤其是B0-112组合物)的任何实施方案,可以使用所得的组合物(当呈现上述特征的组合时,可以命名为B0-11X_m,更具体地命名为B0-112_m)。

[0170] 如实施例中更详细描述,可以通过过滤和/或离心包含粒子的药物组合物来提供B0-11X制剂,其中所述粒子由双链多核糖核苷酸和水溶性聚阳离子均聚物或杂聚物形成,以没有可见聚集体的散装或单次使用的液体组合物形式,提供B0-11X制剂。这种制造组合物的方法包括:

[0171] (i) 制备至少一种双链多核糖核苷酸或其盐或溶剂化物的水性溶液,以及至少一种聚亚烷基亚胺或其盐或溶剂化物的水性溶液,其中各溶液任选地包含药学上可接受的载体、有机溶剂、赋形剂和/或佐剂;

[0172] (ii) 混合所述溶液;和

[0173] (iii) 通过孔径小于或等于600nm的过滤器过滤所得混合物,或以大于22480m/s²的速率离心。

[0174] 可以根据组合物的实际成分(双链多核糖核苷酸、聚亚烷基亚胺和其他可选成分)、以及期望的使用、存储、运输、包装和/或施用组合物的方法,进一步调整该方法,尤其是当组合物需要在使用前即刻制备时,或者对于以下情况的药物组合物来说更常见:针对长期储存而制造、和/或以多容器形式而制造其各自用于一次性使用(例如在灭菌小瓶或注射器中)、以及含有最具均匀尺寸、聚(I:C)含量、稳定性、溶解性以及最终施用时的生物学作用的粒子。

[0175] 可以在过滤和/或混合的顺序、混合方法、混合速率和/或混合的溶液量的水平上,调整上面的混合和过滤步骤(ii)和(iii)。在另一个优选的实施方案中,制造B0-11X制剂的方法包括:

[0176] (i) 制备至少一种双链多核糖核苷酸或其盐或溶剂化物的水性溶液,以及至少一

种聚亚烷基亚胺或其盐或溶剂化物的水性溶液,其中各溶液任选地包含药学上可接受的载体、有机溶剂、赋形剂和/或佐剂;

[0177] (ii) 通过分别过滤,将每种溶液灭菌;

[0178] (iii) 通过以超过50rpm的注射速率,以1mL/min至50mL/min的流速,先添加任一种溶液,然后添加另一种溶液,在用于储存、冻干和/或使用所述组合物的容器中,将上述溶液混合;以及

[0179] (iv) 密封容器。

[0180] 在进一步的可选步骤中,可以在制造上述组合物的方法的步骤(i)期间、或在任何步骤(i)-(v)或步骤(i)-(iv)之后,添加另一种化合物(作为免疫相关佐剂或治疗性化合物,例如CD40L、IL12、病毒或肿瘤抗原、或作为佐剂或治疗性化合物,比如抗癌药)。根据本文公开的使用B0-11X组合物(尤其是B0-112组合物)的任何实施方案,可以使用所得的组合物(当呈现上述(i)-(vi)特征的组合时,可以命名为B0-11Xm,更具体地命名为B0-112m)。

[0181] 根据如何施用本发明的水性组合物(例如通过皮下或肿瘤内注射),可以在容器中和/或以最适合单次使用的量或多剂量,提供如上文所定义的B0-11X组合物或者B0-112。

[0182] 组合

[0183] 如果不提供额外的或甚至协同作用时,根据本发明的组合物,可以同包括已知与其相容的其他化合物或治疗组合使用。此外,可以如上所述地生产被称为B0-11Xm(特别是B0-112m)的组合物,从而提供新的产品,其中与使用前B0-11X组合物和其他化合物简单混合的组合相比,B0-11X组合物(例如B0-112组合物)和另一种化合物的组合可提供改善的治疗作用或其他药物有关的作用(包括稳定性或低剂量时的药效,一般而言或就特定适应症或施用途径而言)。

[0184] 例如,聚(I:C)分子可与不同的抗癌药、抗体、放射疗法或化学疗法(Le U等人2008;Le U等人2009;Taura M等人2010;Matijević T等人2011;Levitzi A,2012;Yoshino H和Kashiwakura I,2013;Hafner A等人2013)或不同长度的聚(I:C)分子(Zhou Y等人2013)组合使用。当与其他药剂组合使用时,聚(I:C)分子也可用作佐剂或协同作用剂,例如与癌抗原或细胞裂解液的疫苗接种中(Ammi R等人2015)、PD-1/PD-L1通路的阻断剂(Nagato T和Celis E,2014)、其他TLR激动剂例如TLR9激动剂CpG ODN(Zhang Y等人2014)、二氯乙酸盐(Ohashi T等人2013)、IL27(Chiba Y等人2013)、激酶抑制剂如索拉非尼(Ho V等人2015)、促凋亡蛋白例如NS1(Gupta S等人2016)、唑来膦酸(Chen L等人2013)或全反式维甲酸(Szabo A等人2012)组合使用时。鉴于最近至少使用体外测定法证明的聚(I:C)分子对特定细胞类型的活性,例如在前脂肪细胞上,抑制分化和脂肪细胞(Yu L等人2016)、间充质干细胞的分化、增强免疫抑制作用(Cho K.等人2016;Vega-Letter A等人2016)或激活NK细胞(Perrot I等人2010),B0-11X制剂的其他用途可能会变得明显。

[0185] 在某些方面,本发明涉及药物组合物,其包含有效量的B0-11X制剂和有效量的一种或多种免疫调节剂,特别是靶向免疫检查点分子的试剂(例如PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、CD134、CD134L、CD137、CD137L、CD80、CD86、B7-H3、B7-H4、B7RP1、LAG3、ICOS、TIM3、GAL9、CD28、AP2M1、SHP-2、PPP2R5A或OX-40),所述化合物通常称为检查点抑制剂(CPI)。或者,免疫调节剂阻断T调节细胞的免疫抑制作用,例如药物靶标(如IDO、TGF- β 、STAT3或CSFR1)的抑制剂。

[0186] 因此,本发明提供了在组合疗法和方案中有用的组合物和方法,包括施用BO-11X制剂(或BO-11Xm制剂)和另一种治疗剂或治疗(包括放射疗法、化学疗法、冷冻疗法、肿瘤消融或光动力疗法)。具体地,本发明涉及在受试者中用于治疗、改善、或预防癌症的生长、转移、溃疡、免疫逃逸或复发的方法,包括施用BO-11X制剂和一种或多种抗癌药物,优选免疫调节剂,其中同时(作为单独制剂或在共同配制的情况下)或顺序(以任何顺序或在连续的施用周期中)施用。在一些方面,本发明涉及一种治疗癌症的方法,包括向有需求的受试者施用有效量的BO-11X制剂和有效量的一种或多种免疫调节剂,具体地其中所述受试者正在用一种或多种免疫调节剂进行癌症治疗。

[0187] 在一些实施方案中,免疫调节剂优选地是抗体,包括单克隆抗体和其他抗体形式,或者是与控制免疫反应的细胞表面蛋白相结合的任何其他药学上可获得的试剂,从而作为CPI发挥作用,其可以阻断、减少和/或抑制PD-1和PD-L1、或PD-L2、和/或PD-1与PD-L1或PD-L2的结合。或者,此CPI可以阻断、降低和/或抑制降低和/或抑制其他免疫检查点分子的活性,例如CTLA-4、AP2M1、CD80、CD86、SHP-2和/或PPP2R5A。作为另一个替代,CPI增加和/或刺激CD137(4-1BB)、和/或CD137(4-1BB)与一个或多个4-1BB配体和TRAF2的结合。

[0188] 在一些实施方案中,涉及用于治疗癌症的组合疗法和方案的方法包括施用BO-11X制剂(或BO-11Xm制剂),该方法可以针对特定的施用方法进一步限定,其中BO-11X制剂通过不同于一种其他治疗化合物(例如免疫调节剂,优选CPI)的途径施用。该方法可包括通过肿瘤内或肿瘤周注射(在肿瘤内、肿瘤块边缘、周围的上皮细胞、淋巴或血管中)或允许将BO-11X制剂直接施用至癌细胞或含癌细胞的器官之内或附近(不是间接地,例如通过血流)的其他方式来施用BO-11X制剂,和全身施用CPI或其他免疫刺激剂。BO-11X制剂的肿瘤内或肿瘤周注射,可以在皮肤水平上进行,即进入皮肤(例如用于治疗黑色素瘤或与疫苗组合使用),或在内部器官或组织水平上进行,即进入内部器官或组织(例如通过肝内注射用于治疗肝癌、或囊内(intravesicular)施用用于治疗膀胱癌)。BO-11X制剂的这种局部施用优选在施用免疫刺激剂之前或(优选)之后进行。

[0189] BO-11X制剂(或BO-11Xm制剂)也可以和基于细胞的疗法组合施用,其中BO-11X可以与基于细胞的疗法直接共同施用于患者,或者用于治疗获自患者的细胞(来自血液或来自活检,包括肿瘤块、肿瘤块边缘、周围的上皮细胞、淋巴或血管中的细胞)。可将这些细胞(无论是否针对特定细胞类型进行阳性或阴性选择)在适当的实验室环境中暴露于BO-11X制剂中,在这种处理之后以产生呈现标记物、分泌蛋白和/或暴露抗原的细胞,从而用于进一步的癌症治疗。可以将这种自体细胞(无论有无进一步的阳性或阴性选择)再次施用于患者。在治疗的后期,可以通过任何适当的方式(通过肿瘤内或优选肌肉内或皮下注射)将BO-11X制剂进一步施用于患者。可以在大于1小时,优选大于3小时,更优选大于8小时,甚至更优选大于24小时或更长的时间段,以低于一次肌肉内或皮下注射的浓度(优选以这种剂量的50%,更优选25%,甚至更优选10%,进一步更优选5%、或甚至更优选1%的剂量)离体治疗来自患者的细胞。

[0190] 其他作用和用途

[0191] 在进一步的实施方案中,本发明提供了涉及施用BO-11X制剂(或BO-11Xm制剂)的药物用途和方法,其用于增强针对病原体或不希望的生物试剂的免疫反应,并且具体地用于增强抗肿瘤免疫反应,其潜在地本身作为免疫调节剂起作用。可以通过在相关细胞类型

或亚群(例如树突细胞、T调节细胞、T细胞和/或NK细胞)和/或免疫学生物标记物(例如趋化因子、生长因子、细胞因子及其受体)的水平,测量肿瘤部位和肿瘤微环境(或血流、其他生物液体和组织)中与肿瘤相关的免疫反应来监测这种作用。

[0192] 具体地,当通过肿瘤内注射临床施用BO-11X制剂(或BO-11Xm制剂)时,在肿瘤中观察到凋亡和/或坏死,从而潜在地促进了肿瘤抗原向驻留(resident)树突细胞的呈递。信号级联反应也可能导致免疫细胞的募集,尤其是CD4⁺和CD8⁺ T细胞进入肿瘤块,从而促进针对肿瘤的免疫作用,从而导致BO-11X的细胞毒性作用。

[0193] 另一个实施方案涉及细胞或组织中体外诱导干扰素产生的方法,其包括使细胞或组织与组合物接触的步骤,其中所述细胞或组织表现出细胞生长病症,其特征在人或动物细胞的异常生长,其中所述组合物是BO-11X,更优选BO-112。因此,本发明涉及在来自受试者的细胞中体外诱导干扰素产生的方法,包括:

[0194] (i) 从所述受试者获得细胞;

[0195] (ii) 使所述细胞与BO11X(优选BO-112)的组合物接触。

[0196] 药物组合物

[0197] 还提供了通过将BO-11X制剂及其一种或更多种药学上可接受的佐剂、稀释剂、载体或赋形剂混合用于制备BO-112(和/或其他BO-11X制剂,例如BO-11Xm或者BO-112m制剂)的药物组合物的方法。可以根据特定的医学适应症(例如实体癌或血液系统癌症)和/或施用方式如通过注射(肿瘤周、肿瘤内、肝内、胰腺内、肌肉内、或皮下注射)、通过吸入、局部或口服,调整此类成分。

[0198] 基于BO-11X制剂的组合作用可能涉及BO-11X制剂和其他化合物的相同或不同的施用途径。具体地,对于其他免疫刺激RNA试剂,可以通过肿瘤内或肿瘤周注射来施用BO-11X制剂,其可以在全身施用治疗性抗体作为CPI(如PD-1/PD-L1通路抑制剂)(Bald T等人2014)或激活的T细胞(Amos SM等人2011)之前激活免疫系统。或者,将BO-11X制剂与作为TLR激动剂或配体的其他治疗性化合物(例如CpG分子或瑞喹莫德)一起使用,以增强抗癌疫苗接种(Sajadian A等人2014)或树突细胞(Fujimura T等人2006)的作用。

[0199] 免疫调节剂

[0200] BO-11X制剂(包括BO-11Xm制剂)可以与一种或多种免疫调节剂组合使用。在一些实施方案中,免疫调节剂是共刺激或共抑制分子(例如一种或多种免疫细胞,例如但不限于T细胞和NK细胞)。在一些实施方案中,免疫调节剂是调节CD4和/或CD8 T细胞的试剂,例如作为针对CD3、CD4、CD8、PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、CD137、CD96、CD73、CD90、CD47、CD69、CD26、TIM3和LAG3的激动剂或拮抗剂发挥作用。在其他实施方案中,免疫调节剂是调节NK细胞的试剂,例如作为针对CD3、NKp46、CD16、NKG2D、NKp44和NKp30的激动剂或拮抗剂发挥作用。在其他实施方案中,免疫调节剂是调节肿瘤基质和内皮生物标记物的试剂,例如作为针对CD45、PD-L1、PD-L2、PTEN和CD31或其组合的激动剂或拮抗剂发挥作用。免疫调节剂的组合可用于靶向不同的免疫群体,从而组合的试剂靶向表达不同免疫细胞群体的细胞。

[0201] 以化学有机或无机化合物、核酸、适体、肽、蛋白的形式,更具体是结合生物流体或细胞表面上的相关靶标的抗体形式,作为另一种化合物来提供免疫调节剂。抗体可以是多克隆或单克隆的;完整的或截短的(例如F(ab')₂, Fab, Fv);双特异性或多特异性的;其异源的、同种异体的、同基因的、修饰形式(例如,嵌合抗体或人源化抗体)。当免疫调节剂是单克

隆抗体时,它可以是非人哺乳动物来源的单克隆抗体、重组嵌合单克隆抗体、重组人源化单克隆抗体、或人单克隆抗体。

[0202] 用作免疫调节剂的抗体可以进一步包含通常发挥所需生物活性所需的结构元件,例如通过二硫键相互连接的四条多肽链(两条重(H)链和两条轻(L)链),其能够结合一种或多种抗原(例如双特异性或多特异性抗体),并呈现免疫球蛋白的Fc区(例如IgA、IgG、IgE、IgD或IgM),它们可与Fc受体相互作用并激活免疫反应导致免疫细胞或其他细胞的耗竭和/或细胞死亡。每条重链均由重链可变区(V_H)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域CH₁、CH₂和CH₃组成。每条轻链由轻链可变区(V_L)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。V_H和V_L区可进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),其间散布着更为保守的区,称为构架区(FR)。每个可变区(V_H或V_L)包含3个CDR,分别命名为CDR1、CDR2和CDR3。每个可变区域还包含4个框架子区域,分别命名为FR1、FR2、FR3和FR4。术语抗体包括所有类型的抗体,包括例如IgA、IgG、IgD、IgE和IgM及其各自的亚类(同种型),例如IgG-1、IgG-2、IgG-3和IgG-4;IgA-1和IgA-2。在一些实施方案中,抗体还指抗体片段和抗原结合片段。

[0203] 适用于实施本文所述方法的抗体可以是各种抗体形式,例如单克隆、多克隆、双特异性、多特异性,并且可以包括但不限于人、人源化或嵌合抗体,包括单链抗体、Fab片段、F(ab')片段、Fab表达文库产生的片段、和/或上述任何的结合片段。抗体也指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫学活性部分,即含有至少两个抗原或靶标结合位点的分子,其针对本文所述至少两个靶标。本文描述的免疫球蛋白分子可以是免疫球蛋白分子的任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。另外,可以以文献中公开的任何替代形式提供适用于实施本文所述发明的抗体(例如,单特异性、双特异性和/或多特异性),例如双抗体、柔性抗体(Flexibody)、骆驼抗体、免疫抗体、三功能抗体(Triomab)、肽抗体(Pepbody)、疫苗抗体(Vaccibody)、微抗体(minibody)、Fcab、单体(UniBody)或二体(DuoBody)(Storz U,2011年)。

[0204] PD-1(也称为CD279或程序性细胞死亡蛋白1)是B7受体家族的成员。在一些实施方案中,PD-1是指人PD-1序列(参见,例如NCBI参考序列:NP_005009)及其任何天然存在的等位基因、剪接变体及其加工形式(Keir M等人2008;UniProt:Q15116)。PD-1结合PD-L1(也称为CD274或B7-H1)和PD-L2(也称为CD273或者B7-DC),它们也是B7家族的成员。在一些实施方案中,PD-L1是指人PD-L1(参见,例如GenBank:AF233516),PD-L2是指人PD-L2(例如,NCBI参考序列:NM_025239),以及任何天然存在的等位基因、剪接变体及其加工形式。

[0205] 在一些实施方案中,免疫调节剂靶向PD-1、PD-L1和PD-L2的一个或多个。具体地,免疫调节剂为PD-1抑制剂。在一些实施方案中,免疫调节剂是对PD-1、PD-L1和PD-L2中的一个或多个特异性的抗体。此类免疫调节剂是抗体,例如但不限于,最近综述的纳武单抗(ONO-4538/BMS-936558、MDX1106、OPDIVO)、派姆单抗(KEYTRUDA)、皮地珠单抗(pidilizumab)(CT-011)、MK-3475、BMS 936559、MPDL3280A等(Tan S等人2016)。

[0206] 在一些实施方案中,B0-11X制剂(或B0-11Xm制剂)与BMS-936559和MEDI4736的一种或多种组合用于治疗例如晚期实体瘤。在一些实施方案中,B0-11X制剂与MPDL3280A(可选地与维罗非尼)和MEDI4736(可选地与达布拉非尼和曲美替尼的一种或多种)中的一种或多种组合用于治疗黑色素瘤。在一些实施方案中,B0-11X制剂与MPDL3280A(任选地与厄洛替尼)和MEDI4736(任选地与曲美单抗)中的一种或多种组合用于治疗NSCLC。在一些实施方

案中,B0-11X制剂与MPDL3280A(任选地与贝伐单抗和舒尼替尼中的一种或多种)组合用于治疗RCC。在一些实施方案中,B0-11X制剂与MPDL3280A组合用于治疗实体或血液恶性肿瘤。在一些实施方案中,B0-11X制剂与MPDL3280A(任选地与贝伐单抗、化学疗法和卡比替尼中的一种或多种);MEDI4736(任选地与曲美单抗)和MSB0010718C中的一种或多种组合用于治疗实体瘤。在一些实施方案中,B0-11X制剂与AMP-224组合用于治疗晚期癌症。在一些实施方案中,B0-11X制剂与纳武单抗(任选地与iliolumbar单抗(抗-KIR))组合以治疗晚期实体瘤。在一些实施方案中,B0-11X制剂与纳武单抗组合用于治疗难消除(castration-resistant)的前列腺癌、黑色素瘤、NSCLC和RCC。在一些实施方案中,B0-11X制剂与派姆单抗组合用于治疗结肠癌。在一些实施方案中,B0-11X制剂与派姆单抗组合用于治疗胃癌、头颈癌、TNBC和尿路上皮癌。在一些实施方案中,B0-11X制剂与纳武单抗(任选地与伊匹单抗)组合用于治疗胃癌、胰腺癌、小细胞肺癌和TNBC。在一些实施方案中,B0-11X制剂与纳武单抗(任选地与伊匹单抗)组合用于治疗胶质母细胞瘤。在一些实施方案中,B0-11X制剂与纳武单抗组合用于治疗肝细胞癌。在一些实施方案中,B0-11X制剂与派姆单抗组合用于治疗霍奇金淋巴瘤、骨髓瘤、骨髓增生异常综合征和非霍奇金淋巴瘤。在一些实施方案中,B0-11X制剂与皮地珠单抗组合用于治疗恶性神经胶质瘤。在一些实施方案中,B0-11X制剂与纳武单抗(任选地伊匹单抗、和多种1类肽和Montanide ISA51VG中的一种或多种;并且任选地顺序与伊匹单抗组合)和派姆单抗中的一种或多种组合用于治疗黑色素瘤。在一些实施方案中,B0-11X制剂与派姆单抗组合用于治疗黑色素瘤和NSCLC。在一些实施方案中,B0-11X制剂与纳武单抗(可选地与吉西他滨/顺铂、培美曲塞/顺铂、卡铂/紫杉醇、贝伐单抗、厄洛替尼和伊匹单抗中的一种或多种)和派姆单抗中的一种或多种组合用于治疗NSCLC。在一些实施方案中,B0-11X制剂与皮地珠单抗(任选地与吉西他滨)组合用于治疗胰腺癌。在一些实施方案中,B0-11X制剂与皮地珠单抗(任选地与西普鲁塞(sipuleucel)-T和环磷酰胺中的一种或多种)组合用于治疗前列腺癌。在一些实施方案中,B0-11X制剂与纳武单抗(可选地与舒尼替尼、帕唑帕尼和伊匹单抗中的一种或多种)、派姆单抗(可选地与帕唑帕尼)和皮地珠单抗(可选地与树突细胞/RCC融合细胞疫苗)中的一种或多种组合用于治疗RCC。在一些实施方案中,B0-11X制剂与抗-LAG3(BMS-986016,任选地与纳武单抗)、纳武单抗(任选地与白介素-21)和AMP-554中的一种或多种组合用于治疗实体瘤。在一些实施方案中,B0-11X制剂与派姆单抗组合用于治疗实体瘤。

[0207] 在一些实施方案中,免疫调节剂靶向CD137或CD137L的一种或多种。在一些实施方案中,免疫调节剂是对一种或多种CD137或CD137L具有特异性的抗体。例如,在一些实施方案中,免疫调节剂是抗体,例如但不限于,乌瑞卢单抗(urelumab)(也称为BMS-663513和抗-4-1BB抗体)。在一些实施方案中,B0-11X制剂与乌瑞卢单抗(任选地与纳武单抗、利鲁单抗(lirilumab)和乌瑞卢单抗中的一种或多种)组合用于治疗实体瘤和/或B细胞非霍奇金淋巴瘤和/或头颈癌和/或多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,免疫调节剂是抗体,例如但不限于伊匹单抗(MDX-010、MDX-101、Yervoy、BMS)和/或曲美单抗(Pfizer)。在一些实施方案中,B0-11X制剂与伊匹单抗(任选地与巴维妥昔单抗)组合用于治疗黑色素瘤、前列腺癌和肺癌中的一种或多种。

[0208] 在一些实施方案中,免疫调节剂靶向CD20。在一些实施方案中,免疫调节剂是CD20特异性抗体。例如,在一些实施方案中,免疫调节剂是抗体,例如但不限于奥法木单抗、奥比

妥珠单抗 (obinutuzumab) (GAZYVA)、AME-133v、奥瑞珠单抗 (Ocrelizumab)、TRU-015 和维妥珠单抗 (veltuzumab)。

[0209] BO-11X 制剂的验证

[0210] 可在基于细胞的分析中,进行BO-11X制剂(根据本发明,包括BO-11Xm制剂,并在实施例中以BO-112为例)的治疗功效的临床前验证,最有趣的是,使用单独的BO-11X制剂或与候选或批准的抗癌药物组合使用,在动物模型中测试和比较不同实验标准以建立最适合条件以有效地实现治疗作用。这些标准包括范围内各化合物的剂量、施用途、施用顺序和/或频率,以鉴定在有效性、安全性和/或临床用途方面,哪种条件更适合BO-11X制剂的治疗用途(作为BO-11Xm制剂单独使用、或者与候选或批准的抗癌药物协同使用)。使用动物和/或离体模型时,可以使用以下一种或多种标准验证BO-11X制剂:癌细胞的细胞毒性、PARP激活、免疫原性细胞死亡、治疗效果(具体地,通过直接或间接的远端效应(abscopal effect)所致的癌细胞的凋亡和/或坏死)、在免疫细胞群上标记物的表达增加、免疫细胞群的增加、以及实施例中显示的其他测定。

[0211] BO-11X制剂(或BO-11Xm制剂)的不同剂量、施用的次数和/或部位(具体地,通过在一个或多个部位注射)、每种化合物、施用途、施用频率和/或时间点与相关的终点和生理参数相关联,这些终点和生理参数是在暴露于待测化合物(单独地、或者与其他药物组合)的细胞或(优选)动物中获得的生物样本中测得的。这些参数的非限制性列表包括肿瘤尺寸的消退、肿瘤生长的阻断和/或肿瘤细胞的增殖、细胞凋亡、减少的肿瘤血管化或转移、克服对普通抗癌药物的耐受性(或在治疗的群体中改善对该药物的反应性)、减少对正常组织和功能的治疗相关不良事件、调节免疫反应和/或具有特定活性和特征的免疫细胞、鉴定生物材料中的生物标记物或特定细胞群(例如,在癌细胞制备物中、肿瘤活检或者生物流体中存在的),文献中已知其增加(或减少)通常与抗癌作用有关,尤其是与动物模型甚至癌症患者的存活有关。只要可能,通过使用特定的施用途和/或药物制剂,在以给定的剂量和/或方案施用每种待测化合物或待测的化合物组合之后,在中间的时间点和最终的时间点测量这种终点。

[0212] 可以单独地测试,也可以与护理标准、常规治疗(例如放射疗法、化学疗法、细胞激酶抑制剂、表观遗传作用的药物等)或涉及新机制和/或新候选抗癌药物的治疗组合来测试BO-11X制剂(或BO-11Xm制剂)的治疗性抗癌作用。实际上,可以与BO-11X制剂组合来测试的新型抗癌化合物类别是在肿瘤微环境中改善抗肿瘤免疫反应的化合物,它们通过靶向消除已扩散的肿瘤细胞而提供全身性抗肿瘤免疫力。该方法已在动物模型和患者中被证明是成功的,并且可以改善传统疗法的结果,例如放射疗法或化学疗法(例如,参见Galluzzi L等人2014;Vacchelli E等人2013;Van der Jeught K等人2015)。

[0213] 不断增长的新抗癌药物类别,针对的是癌细胞逃避免疫检测和被人体破坏的机制。与其他癌症疗法(例如肿瘤细胞特异性)相比,癌症特异性免疫疗法可能具有一系列优势。实际上,对癌症免疫疗法的一系列分子靶标的鉴定,使得在定义机制和化合物方面可取得重大进展,这些机制和化合物就可塑性、异质性、耐受性或微环境方面可针对抗肿瘤的免疫反应提供适当的共刺激(或共抑制)作用。

[0214] 各自作用于不同分子靶标和/或机制的癌症被动或主动免疫疗法的非限制性列表包括靶向肿瘤或其他免疫调节性单克隆抗体、溶瘤病毒、免疫刺激性细胞因子、过继细胞转

移和其他基于细胞的治疗法、基于DNA-或肽-的疫苗、免疫抑制代谢抑制剂、或模式识别受体激动剂。在这些机制中,抗体或具有激动活性或拮抗活性的其他化合物(取决于其在免疫反应或癌症逃避免疫反应中的作用)所针对的分子靶标包括一系列细胞膜蛋白,例如作为肿瘤发展检查点的PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、CD137、CD38、OX-40、CD26、TIM3和LAG3,针对它们可以购买不同的激动性或拮抗性抗体,或者在科学库中可获得针对人抗原或(当涉及动物模型时)相应的啮齿动物抗原表征的其抗癌作用的特异性和/或水平。

[0215] 尽管患者对靶向这些共刺激性或共抑制性分子的药剂产生了令人印象深刻的反应(例如,基于抗-PD-1或抗-PD-L1抗体的疗法),但对免疫检查点抑制剂的临床反应仍不完全或在太多癌症患者中无法有效实现所需的治疗作用。与单独施用两种抗癌剂之一的作用相比,B0-11X制剂与化合物(比如抗PD-1、抗CTLA4、抗CD137抗体)适当组合可以增强肿瘤生长和转移的降低(或提高表现出这种降低的受试者数),可能超出了预期的累加作用。

[0216] 可以在几种基于细胞的模型之一中评估B0-11X制剂(或B0-11Xm制剂)的治疗作用,这些模型基于分离的或混合的细胞培养物,包括原代癌细胞或已建立的癌细胞系,优选人源。可以根据癌症类型(比如黑色素瘤(人SK-Mel-19、SK-Mel-103和UACC62细胞;鼠B16细胞)、癌(小鼠Hepa 1-6细胞;大鼠FA0细胞)、乳癌(人BT483、HCC1143、HCC1937、MDA-MB-231、MDA-MB-415、MDA-MB-468和BT549细胞)、胰腺癌(人MiaPaCa2、IMIM-PC2、Panc1、Panc0203、Panc 3.27或BxPc3细胞)、或其他可通过ATCC、其他官方或学术资源库、或市售供应商获得的相关细胞系),来定义用于验证B0-11X制剂的癌细胞系的示例。可以使用多种指标来评估B0-11X制剂的抗癌作用,包括时间段、频率和/或阻断增殖所需的剂量、死亡、生物标记物的表达和/或信号分子(例如趋化因子或干扰素Beta)的释放,这些指标表明在多种生理条件下有待确定B0-11X制剂潜在的相关作用。

[0217] 因此,可以在肿瘤动物模型中评估B0-11X制剂(或B0-11Xm制剂)的作用,在该动物模型中,在针对单一疗法和组合治疗(例如与CPI如抗PD-1抗体组合)的不同方案中,在施用后的更短或更长时间段,评估由于施用示例性制剂(如B0-112)引起的抗肿瘤反应。可以通过在动物中,在由于注射细胞增殖而引起的肿瘤发展的给定时间,即在注射癌细胞后的特定天数后、或(优选)呈现出所需肿瘤尺寸时(例如平均尺寸为80-100mm³)、或者甚至在消失后(用于评估每种药物或药物组合对肿瘤复发的任何作用),施用B0-112和/或抗PD-1抗体来进行该研究。该研究还将涉及阴性(例如单独的载体)或阳性对照(例如化学疗法或其他抗癌药物)的对照化合物,在文献中这些阳性对照被指定为对特定肿瘤和/或特定动物模型中有效性的药物标准。在动物模型和动物细胞中进行的验证活动也可能导致开发出B0-11X制剂的兽医用途。

[0218] 动物模型通常是小鼠模型,在该模型中癌症是在转移和移植人癌细胞(源自永生细胞系或从患者获得的癌组织活检)或在动物中诱导(或转移)小鼠肿瘤细胞后出现的。细胞可以起源于不同类型的肿瘤(例如肺癌、黑色素瘤或淋巴瘤),并且可以皮下注射到每个小鼠的腹侧,整个研究过程中检测肿瘤并分析肿瘤的尺寸和/或组成。然后将小鼠随机分成不同尺寸的组进行治疗,以便对结果进行统计分析(例如,每个对照组或治疗组分别有3、5、10、12、15、20只或更多的动物)。

[0219] B0-11X制剂(例如B0-112)和检查点抑制剂(例如抗PD-1抗体)提供的可能改善,可能会诱导癌症动物模型的改善(具体是在数量、顺序或其他施用标准方面适当合并时)、在

治疗和/或肿瘤消失后动物存活增加、肿瘤复发减少、毒性和/或耐受性作用受限或延迟、以及终止B0-112和/或抗PD-1抗体的治疗后对再次接种肿瘤进行攻击的反应有所改善。

[0220] 在结构上和功能上被鉴定为上述B0-112制剂的示例性B0-11X制剂和抗PD-1抗体，可以在针对肿瘤细胞的不同位置和/或以不同的量进行施用(单独或组合，以单剂量或多剂量)。通常，按照动物体重确定的浓度(例如0.01至2.5mg/kg)、注射量的浓度(例如0.01至0.5mL)和/或每种剂量的含量(例如0.01至250μg每剂量)，将B0-112和对小鼠PD-1特异性的单克隆抗体(例如，BioLegend的克隆RMP1-14或其他供应商提供的类似抗体)通过皮下、囊内、腹膜内、肿瘤周或肿瘤内注射(取决于模型和肿瘤分子及病理特征)。具体地，在不同浓度下的B0-112与抗PD-1抗体的固定剂量组合的剂量反应(反之亦然)，可以允许确定任何由于与其他化合物组合使用而使各化合物所施用的量显著降低后的有利作用(例如疗效和/或安全性谱不受影响甚至得到改善；在不同的未治疗位置的肿瘤中具有远端作用)。

[0221] 可以在一个或多个周期(例如2、3、4或更多)注射B0-112组合物(或B0-112m组合物)，并间隔固定的所需天数(1、2、3、5、7或更多)。或者，当B0-112与抗PD1抗体共同施用时，可以在抗体之前(或之后)立即注射(或以单次注射制备物)、在一个或多个周期中再次(间隔给定的天数)注射B0-112。再或者，可以配制两种药剂、或者以任何顺序施用，但是间隔可变的时间(例如1小时、3小时、6小时、12小时、18小时、24小时、36小时、2天或者更长)。具体地，当在抗PD-1抗体后施用B0-112时，其随后的施用(单独或与抗PD-1抗体组合)可在抗PD-1抗体对肿瘤细胞无效的动物中提供抗肿瘤的援救作用，克服了任何特异性的肿瘤耐受性或逃逸机制。在治疗期结束时，所有存活的动物在可以1、2、3或多个连续星期内不做处理，以监测肿瘤是否再次出现以及如何出现，而无论有无通过进一步皮下注射癌细胞重新挑战那些完全肿瘤消退的动物。

[0222] B0-112组合物(或B0-112m组合物)的单独作用或者与上述抗PD1抗体组合的作用，可以评价为研究期间报告的中期结果，而不会处死动物(例如通过测量肿瘤尺寸、仍存活的小鼠百分比、体重或行为标准)或在处死动物后(或已经死亡的小鼠中)确定肿瘤和/或正常细胞的分子特征，包括NK细胞、肿瘤浸润的淋巴细胞、脾细胞、放射性标记前体的掺入、以及可能参与抗肿瘤局部或全身免疫反应的其他细胞(如骨髓来源的抑制细胞(MDSC)、调节性T细胞(Treg)；肿瘤相关中性粒细胞(TAN)、M2巨噬细胞和肿瘤相关巨噬细胞(TAM))的总数和/或特定亚种。同时，可以通过相关RNA的PCR扩增、或者使用标准免疫测定法和试剂盒在组织中或者血液循环中细胞表面的蛋白水平(如细胞因子或趋化因子)来确定相关生物标记物的存在/不存在。

[0223] 通过使用从肿瘤、血液、脾脏、淋巴结或其他相关组织和位置分离的细胞进行总体表型分析，以检测表达细胞表面标记物的细胞数量在统计学上和/或治疗上的任何相关变化，通过流式细胞术检测所述标记物，并在文献中已有描述，例如CD3、CD4、CD25、FoxP3、CD8、PD-1、PD-L1、PD-L2、PTEN、CTLA-4、CD137、CD96、CD73、CD90、CD47、CD69、CD26、TIM3、LAG3、Gr1、CD11b、Ly6C、Ly6G、NKp46、CD16、NKG2D、NKp44、NKp30、CD45和CD31。还可以在肿瘤抗原特异性免疫反应、相关转录因子、细胞因子或趋化因子(例如IFN- γ 、IFN-beta、TNFalpha、HIF1a、HIF2a、p53)表达的水平上评估此类细胞，或者通过使用其他基于细胞的分析进行评估。

[0224] 此外，在任一免疫缺陷型的完全免疫动物模型中对器官和皮肤的宏观检查和显微

镜病理学分析可以进一步指明关于所研究的化合物(单独的或组合的)的功效或其毒性,如器官炎症和尸检。在类似研究中产生的定量数据可以在不同实验组中通过使用恰当的统计检验来进行比较,在对多个检验进行校正和不进行校正的情况下,评估治疗性(尤其抗肿瘤)作用的范围是通过单独或与另一抗癌药剂组合施用B0-11X制剂来提供的。

[0225] 治疗方法和患者选择

[0226] 在一些实施方案中,本发明涉及一种治疗、降低、减缓或预防癌症生长、存活、转移、上皮-间质转化、免疫逃逸或复发的方法,包含施用B0-11X制剂(或B0-11Xm制剂)和一种或多种免疫调节剂。癌症可以是肿瘤疾病。癌症可以由癌症转移所产生的休眠肿瘤。休眠肿瘤还可以是手术去除肿瘤后留下的。癌症复发可以是例如肿瘤再生、肺转移或肝转移。

[0227] 在一些实施方案中,癌症为以下中的一种或多种:基底细胞癌;胆道癌;膀胱癌;骨癌;大脑和中枢神经系统癌;乳癌;腹膜癌;绒膜癌;结缔组织癌;消化系统癌(包括食道癌、胃癌、结肠癌、直肠癌或其他胃肠癌);眼癌;头颈癌;胶质母细胞瘤;肝癌;肝细胞癌;上皮内肿瘤;肾脏、肾上腺或肾癌;白血病;肺癌(例如小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞癌);黑色素瘤;骨髓瘤;神经母细胞瘤;口腔癌(唇、喉、舌、口腔和咽);胰腺癌;前列腺癌;视网膜母细胞瘤;横纹肌肉瘤;呼吸系统癌;唾液腺癌;皮肤癌;鳞状细胞癌;睾丸癌;甲状腺癌;子宫癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、外阴癌、卵巢癌或其他妇科癌症;泌尿系统癌症;淋巴瘤,包括B细胞淋巴瘤、霍奇金和非霍奇金淋巴瘤(NHL;包括特定类型,如低级/滤泡、较小淋巴球性、中级/滤泡、中级扩散、高级免疫母细胞、高级淋巴母细胞性、高级小非分裂细胞或肿块性病变NHL)、套细胞和AIDS相关淋巴瘤;慢性淋巴细胞性白血病;急性淋巴母细胞性白血病;毛状细胞白血病;慢性髓母细胞白血病;以及其他癌和肉瘤;移植后淋巴增生性疾病(PTLD),以及与母斑病或水肿相关的异常血管增生(如与大脑肿瘤相关的那些)。在一些实施方案中,癌症是胆道癌。在一些实施方案中,胆道癌选自胰腺癌、胆囊癌、胆管癌和乏特氏壶腹癌(cancer of the ampulla of Vater)。在一些实施方案中,癌症是肝癌。在一些实施方案中,癌症是结肠癌。在一些实施方案中,胆道癌是胆管癌和/或腺癌。或者,癌症可以根据欧洲或美国发病标准所定义,列在罕见疾病列表中,并在比如International Rare Cancers Initiative(<http://www.irci.info>)或RaraCare(<http://www.rarecare.eu>)的组织网站上提供的定期更新的列表中指出。

[0228] 在一些实施方案中,B0-11X制剂(或B0-11Xm制剂)和/或免疫调节剂用于治疗各个阶段的癌症(例如I期,或II期,或III期,或IV期)。作为非限制性示例,使用整体阶段分组,I期癌症局限于身体的一部分;II期癌症是局部进展的,III期癌症也是如此。将癌症指定为II期或III期取决于癌症的特异性类型。在一个非限制性示例中,霍奇金氏疾病II期指示仅横膈一侧上的淋巴结受侵袭,而III期指示横膈上方和下方的淋巴结均受侵袭。因此II期和III期的特异性标准根据诊断而不同。IV期癌症通常已转移或扩散到其他器官或整个身体中。

[0229] 在一些实施方案中,B0-11X制剂(或B0-11Xm制剂)和/或免疫调节剂减小了患者可能经受的治疗副作用。举例来说,B0-11X制剂和一种或多种免疫调节剂的组合疗法可以允许较低剂量的B0-11X制剂和/或一种或多种免疫调节剂(例如与单一疗法相比)并由此增加任一种药剂的治疗窗。在一些实施方案中,降低剂量在不(或最小)损耗功效的情况下减轻了一种或多种副作用。在一些实施方案中,B0-11X制剂和/或免疫调节剂用于治疗患有难治

性癌症的受试者。在一些实施方案中,BO-11X制剂用于治疗对于一种或多种免疫调节剂(尤其实际上与BO-11X制剂组合的药剂)难治性的受试者。

[0230] 在一些实施方案(以及参见实施例3)中,受试者对于PD-1和/或PD-L1和/或PD-L2药剂是难治性的,包括例如纳武单抗(ONO-4538/BMS-936558、MDX1106、OPDIVO)、派姆单抗(KEYTRUDA)、皮地珠单抗(CT-011)、MK-3475、BMS-936559、依鲁替尼、和/或MPDL3280A难治性患者。举例来说,在一些实施方案中,受试者对于抗CTLA-4剂是难治性的,例如伊匹单抗(Yervoy)难治性患者(例如黑色素瘤患者)。在一些实施方案中,受试者对于BO-11X制剂是难治性的。因此,在一些实施方案中,本发明提供援救对各种治疗剂不反应的患者的癌症治疗方法,包括BO-11X制剂或一种或多种免疫调节剂的单一疗法。

[0231] 具体地,根据对免疫疗法的敏感性,使用例如抗-PD1、抗-PD-L1或抗-CTLA4抗体,可以选择使用BO-11X制剂(或BO-11Xm制剂)治疗的某些类型的癌症。这些癌症包括黑色素瘤、非小细胞肺癌、头颈癌、肾细胞癌、膀胱癌、肝细胞癌和霍奇金淋巴瘤。或者,可以施用BO-11X制剂(或BO-11Xm制剂)来治疗以前对免疫疗法没有显示任何敏感性的癌症类型,例如前列腺癌、乳癌、结肠直肠癌或这些癌症的亚型,例如具有高度的突变负担(或微卫星不稳定性),例如通过基因序列和/或表达谱检测到的表现出JAK、POLE或其他突变的那些,这些突变会影响对干扰素(具体是干扰素 γ)的反应,如文献报道(Ayers M等人2017; Budczies J等人2016;Gong J等人2017;Shin DS等人2017;Zaretsky JM等人2016)。通常,BO-11X制剂还可以与miRNA(或作为特定基因表达的抑制剂或调节剂的其他非编码RNA分子,例如RNAi、shRNA或siRNA;Ling H,2016;Larsson M等人2017)、mRNA(即,进入细胞时编码蛋白的RNA)、或其他任何基于RNA的药物组合,其中BO-11X制剂(例如BO-112制剂)通过这种组合的或共施用方法可改善RNA的递送、活性和/或稳定性(例如miRNA沉默IDO、TGFbeta或NKG2D配体)。具有互补作用机制的BO-112制剂的协同组合将包括旨在减少免疫抑制和T细胞耗竭、增强T细胞激活或增加肿瘤特异性T细胞数量的药物。这些药物可靶向肿瘤微环境中的肿瘤细胞、T细胞或其他细胞,并包括分子,如免疫调节单克隆抗体(CTLA4、PD1或PDL1、LAG3、TIM3、CD137、OX40、GITR、CD40、CD25)、激活性细胞因子(IL2、IL12)、其他中和性单克隆抗体(TGFbeta、IDO1、IL10、NKG2d配体)、CAR-T细胞或癌抗原疫苗。目前的数据还支持与靶向Treg的药剂和涉及(和靶向)DNA修复和/或复制的药剂进行组合。

[0232] 在一些实施方案中,术语“患者”和“受试者”可以互换地使用。在一些实施方案中,受试者和/或动物是哺乳动物,例如,人、小鼠、大鼠、豚鼠、狗、猫、马、牛、猪、兔、绵羊,或非人类灵长类,如猴(例如狒狒)或黑猩猩。

[0233] 在一些实施方案中,本发明的方法可用于治疗人受试者。在一些实施方案中,人是儿童。在其他实施方案中,人是成人。在其他实施方案中,人是老年人。在其他实施方案中,人可以被称为患者或受试者。在一些实施方案中,人是女性。在一些实施方案中,人是男性。

[0234] 治疗方案和组合疗法

[0235] 在一个实施方案中,本发明涉及如本文所定义的BO-11X组合物(或BO-11Xm组合物),优选BO-112组合物(或BO-112m组合物),用于治疗细胞生长病症,所述细胞生长病症特征在于人或动物细胞的异常生长,包括以下步骤:

[0236] (i) 向所述受试者(患者)施用根据至少一次用所述组合物或所述制剂进行的治疗;随后

[0237] (ii) 对所述受试者(患者)的医学状况进行随访(分析)和/或对肿瘤、癌症和/或其免疫细胞内的基因表达进行随访;连同或者随后

[0238] (iii) 评估(a) 肿瘤活检中的细胞浸润(例如CD8和/或CD4阳性T细胞)、(b) 肿瘤活检中癌细胞的坏死和/或凋亡、或(c) 血液中循环免疫细胞的增加/减少。

[0239] 这种方法可用于评估B0-11X制剂(例如B0-112)的施用,并且可以根据可用技术进行进一步开发,例如与用于评估肿瘤负荷和/或反应的成像联合(另请参见实施例3)。

[0240] 在其他实施方案中,例如在图14和15中概述的实施方案,本发明涉及:

[0241] (i) 本文定义的B0-11X组合物(或B0-11Xm组合物),优选B0-112组合物(或B0-112m组合物),或

[0242] (ii) 一种用本文定义的B0-11x组合物(或B0-11Xm组合物)优选B0-112组合物(或B0-11Xm组合物)离体处理受试者(患者)的细胞或组织而获得的制剂,

[0243] 用于治疗细胞生长病症,所述细胞生长病症特征在于人或动物细胞的异常生长,其中根据包含以下步骤的方法向所述受试者(患者)施用所述组合物:

[0244] (i) 至少一次用所述组合物或所述制剂进行治疗;随后

[0245] (ii) 对所述受试者(患者)的医学状况进行随访(分析)和/或对肿瘤、癌症和/或其免疫细胞内的基因表达进行随访;和/或评估(ii,a) 肿瘤活检中的细胞浸润(例如CD8和/或CD4阳性T细胞)、(ii,b) 肿瘤活检中癌细胞的坏死和/或凋亡、或(ii,c) 血液中循环免疫细胞的增加/减少;连同或随后

[0246] (iii) 至少一次使用所述组合物和/或所述制剂和/或护理标准方案和/或抗癌药或治疗方法(已批准的或临床研究中的方案)来治疗耐受性、没反应或反应不良的受试者(患者),

[0247] 其中步骤(i)和步骤(iii)中用所述组合物和/或所述制剂进行治疗,可以使用相同或不同的剂量、施用方式(肿瘤内或皮下/肌肉内)、或方案进行。更优选地,受试者(患者)所耐受的、没反应或反应不良的标准护理治疗、临床开发中的药物或其他治疗,是放射治疗、化学疗法、抗-PD-1/PD-L1疗法(或其他免疫检查点抑制剂)、基于癌症抗原的疫苗接种或基于细胞的疗法(包括CAR-T疗法)。优选地,基因表达涉及特定蛋白组的mRNA和/或蛋白表达。

[0248] 在另一个实施方案中,本发明涉及B0-11X组合物(或B0-11Xm组合物)优选B0-112组合物,用于治疗细胞生长病症,所述细胞生长病症特征在于人或动物细胞的异常生长,其中根据包含以下的施用方案向所述受试者(患者)施用所述组合物:

[0249] (I) 至少一次(或第一次)肿瘤内注射所述组合物;以及

[0250] (II) 至少一次(或第二次)皮下或者肌肉内注射所述组合物,

[0251] 其中,在所述至少一次皮下或者肌肉内注射之前,进行所述至少一次肿瘤内注射。

[0252] 类似地,本发明还涉及治疗受试者(患者)细胞生长病症的方法,所述细胞生长病症特征在于人或动物细胞的异常生长,其中根据包含以下的施用方案向所述受试者施用B0-11X组合物(或B0-11Xm组合物)优选B0-112组合物(或B0-112m组合物):

[0253] (I) 至少一次(或第一次)肿瘤内注射所述组合物;以及

[0254] (II) 至少一次(或第二次)皮下或者肌肉内注射所述组合物,

[0255] 其中,在所述至少一次皮下或者肌肉内注射之前,进行所述至少一次肿瘤内注射。

[0256] 或者,用于B0-11X组合物(或B0-11Xm组合物)的施用方案或治疗受试者(患者)中特征在于人或动物细胞异常生长的细胞生长病症的相应方法,包括:

[0257] (i) 在第一病灶内,至少第一次肿瘤内注射;以及

[0258] (ii) 在相同的病灶内、或所述病灶如果不再存在时在一个或多个其他病灶内,至少第二次肿瘤内注射。

[0259] 优选地,在所述组合物的用途和所述治疗方法中,在所述至少一次肿瘤内注射后至少24小时进行所述后续的肿瘤内注射,甚至更优选在进行2至4次肿瘤内注射后的至少48小时,仍更优选在进行四次肿瘤内注射后至少一周。甚至更优选地,在所述组合物的用途和所述治疗方法中,以相等或不同的时间间隔重复所述至少一次肿瘤内注射的施用。

[0260] 这些施用方案(或相应的治疗方法)可能还涉及施用B0-11X组合物(或B0-11Xm组合物):

[0261] (a) 在施用第二治疗剂之前或之后,通过在相同和/或其他病灶中的肿瘤内或肿瘤周注射、通过皮下注射、或通过肌肉内注射,来施用所述第二治疗剂;

[0262] (b) 之后,确定所述受试者是否对所述第二治疗剂耐受、不敏感、或反应不良(或没有反应);

[0263] (c) 然后,在确定在施用B0-11X组合物(或B0-11Xm组合物)后是否统计学上显著提高了循环免疫细胞的数量和/或表I中任何一种基因的表达变化(参见实施例4)之后,向受试者施用所述第二治疗剂。

[0264] 关于上述实施方案(b)和(c),第二治疗剂优选选自:抗-CTLA4、抗-PD1、抗-PDL1、CAR-T细胞、癌抗原疫苗、或靶向调节性T细胞、靶向代谢酶、靶向DNA修复和/或复制或靶向表I中任何基因所表达的蛋白的药剂。

[0265] 或者,B0-11X组合物(或B0-11Xm组合物)的施用方案可能涉及用此类组合物离体处理细胞。在这种情况下,根据包含以下的施用方案向受试者施用用作药物的B0-11X组合物(或B0-11Xm组合物):

[0266] (i) 从所述受试者获得细胞;

[0267] (ii) 离体地,使所述细胞接触所述组合物;和

[0268] (iii) 向所述受试者施用这种细胞;

[0269] 优选地,如前述所有实施方案中所述,对细胞生长病症的治疗是癌症的治疗,所述细胞生长病症的特征在于人或动物细胞的异常生长。更优选地,在所述组合物的用途和所述治疗方法中,在所述至少一次(或第一次)肿瘤内注射后的至少24小时,甚至更优选在进行两次至四次肿瘤内注射后至少48小时,甚至更优选在进行四次肿瘤内注射后的至少一周,进行所述至少一次(或任何第二次或另外的)肿瘤内、肿瘤周、皮下或肌肉内注射。甚至更优选地,在所述组合物的用途和所述治疗方法中,以相等或不同的时间间隔重复所述至少一次肿瘤内注射的施用。优选地,以相等或不同的时间间隔,重复所述至少一次皮下注射的施用,和/或以相等或不同的时间间隔,重复肌肉内注射。更优选地,在所述组合物的用途和所述治疗方法中,相较于至少一次肿瘤内注射,至少一次皮下注射或肌肉内注射中所施用的组合物包含相同量的或更低量的聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C))。

[0270] 在一些实施方案中,本发明为特异性癌症治疗方案提供B0-11X制剂(或B0-11Xm组合物)和第二免疫调节剂(和任选地一种或多种额外的治疗剂)。举例来说,在一些实施方案

中,首先向患者施用BO-11X制剂(例如,B0-112),任选地通过降低或消除缺氧,使肿瘤的血管形成正常化。或者,B0-11X制剂(例如,B0-112)的这种第一次施用可以刺激和/或增加T淋巴细胞(例如CD4⁺和CD8⁺T细胞)和/或NK细胞肿瘤和/或抑制和/或减少免疫抑制细胞(例如骨髓衍生的抑制细胞(MDSC)、调节性T细胞(Treg);肿瘤相关嗜中性粒细胞(TAN)、M2巨噬细胞和肿瘤相关巨噬细胞(TAM))募集到肿瘤。在一些实施方案中,当前治疗剂可以改变肿瘤部位中的M1比M2巨噬细胞的比率以促进M1巨噬细胞。在一些实施方案中,B0-11X制剂诱导持久的(即超过短暂的)血管正常化。举例来说,B0-11X制剂-血管正常化可以持续超过1、或2、或3、或4、或5、或6、或7、或14天、或21天。因此,在一些实施方案中,这种持久的B0-11X制剂-血管正常化(或者,通常浸润肿瘤或血液循环中的免疫细胞的变化)允许更有可能对一种或多种免疫调节剂反应的可持续许可的肿瘤微环境。也就是说,在一些实施方案中,B0-11X制剂能够增强、援救或致敏对免疫调节剂的疗法。

[0271] 替代地,在用一种或多种免疫调节剂起始治疗之前或之后,向患者施用BO-11X制剂(或BO-11Xm组合物,例如B0-112或B0-112m)。举例来说,在一些实施方案中,免疫调节剂靶标一种或多种共抑制性分子且降低或消除免疫抑制。在这种有利的背景下,即在去除抑制后,施用BO-11X制剂(或BO-11Xm组合物,例如,B0-112或B0-112m)以刺激免疫系统。或,免疫调节剂首先靶向一种或多种共刺激分子,其次施用BO-11X制剂(或BO-11Xm组合物,例如,B0-112或B0-112m)以加强这种作用,例如协同作用。

[0272] 另外,如本文所描述,在例如共同施用、治疗方案或共配制的背景下,B0-11X制剂和/或免疫调节剂可以与额外治疗剂组合。

[0273] 在一些实施方案中,B0-11X制剂(或BO-11Xm组合物)和/或免疫调节剂,任选地与额外治疗剂,可以顺序地进行施用。如本文所使用的术语“顺序地”是指额外治疗剂和BO-11X制剂和/或免疫调节剂以大于约60分钟的时间间隔来施用。举例来说,在顺序施用额外治疗剂与BO-11X制剂和/或免疫调节剂之间的时间,可以间隔大于约60分钟、大于约2小时、大于约5小时、大于约10小时、大于约1天、大于约2天、大于约3天,或大于约1周。最优的施用时间可以视所施用的额外治疗剂和BO-11X制剂和/或免疫调节剂的代谢速率、分泌速率和/或药效动力学活性而定。可以首先施用额外治疗剂或当前药剂。

[0274] 在一些实施方案中,B0-11X制剂(或BO-11Xm组合物)和/或免疫调节剂,任选地与额外治疗剂可以同时施用。如本文中所使用的术语“同时”是指额外治疗剂与BO-11X制剂和/或免疫调节剂以不超过约60分钟,如不超过约30分钟、不超过约20分钟、不超过约10分钟、不超过约5分钟或不超过约1分钟的时间间隔来施用。额外治疗剂与BO-11X制剂和/或免疫调节剂的施用可以是单一制剂(例如,包含额外治疗剂和BO-11X制剂和/或免疫调节剂的制剂)或分开的制剂(例如,包括额外治疗剂的第一制剂和包括BO-11X制剂和/或免疫调节剂的第二制剂)的同时施用。

[0275] 共施用也不需要通过相同的施用途径来向受试者施用额外治疗剂。相反地,每一种治疗剂可以通过任何恰当的途径,例如肠胃外或非肠胃外来施用。

[0276] 这种组合可以在较低剂量的BO-11X制剂(或BO-11Xm组合物)和/或免疫调节剂下导致协同作用和/或附加和/或强效作用。举例来说,当BO-11X制剂与一种或多种免疫调节剂组合时,B0-11X制剂的有效量可以低于其在单一疗法中的有效量。在一些实施方案中,B0-11X制剂与免疫调节剂组合且B0-11X制剂的有效量是亚治疗剂量,例如当免疫调节剂与

B0-11X制剂组合时,免疫调节剂的有效量可以低于其在单一疗法中的有效量。在一些实施方案中,免疫调节剂与B0-11X制剂组合且免疫调节剂的有效量是亚治疗剂量。在一些实施方案中,免疫调节剂与B0-11X制剂和额外治疗剂组合,且额外治疗剂的有效量是亚治疗剂量。术语“亚治疗剂量或量”是指药理学活性物质的剂量或量低于作为单一物质施用以达到治疗效果的物质的剂量或量。这种物质的亚治疗剂量可以视治疗的受试者和疾病病症、受试者的重量和年龄、疾病病症严重程度、施用方式等而改变,其可以容易地由本领域的普通技术人员判定。在一个实施方案中,化疗剂的亚治疗剂量或量小于化疗剂的审批通过的全剂量的90%,如美国食品与药物管理局审批通过的化疗剂的标签信息中提供的量。在其他实施方案中,化疗剂的亚治疗剂量或量小于审批通过的全剂量的80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%或甚至10%,如20%到90%、30%到80%、40%到70%或本文所提供的所述值内的其他范围。

[0277] 在一些实施方案中,免疫调节剂的有效量小于用于同一癌症的单一疗法和/或用于同一癌症与B0-11X制剂以外的药剂组合的组合疗法中所使用的有效量。在一些实施方案中,B0-11X制剂的有效量小于用于同一癌症或临床状况的单一疗法和/或用于同一癌症或临床状况与药剂(如免疫调节剂)组合的组合疗法中所使用的有效量。

[0278] 在一些实施方案中,B0-11X制剂(或B0-11X_m组合物)与一种或多种免疫调节剂(例如1,或2,或3,或4,或5种免疫调节剂)和任选地一种或多种额外治疗剂(例如1,或2,或3,或4,或5种额外治疗剂)组合。这种组合可以在B0-11X制剂和/或免疫调节剂和/或一种或多种额外治疗剂的较低剂量下产生协同作用和/或附加和/或强效作用。共施用可以是同时的或顺序的。另外,包括B0-11X制剂和/或免疫调节剂的药物组合物可以包含额外治疗剂(例如通过共制剂)。也就是说,在一些实施方案中,本文中所公开的药剂中的任何两种或更多种可以共配制。另外,在一些实施方案中,B0-11X制剂和/或免疫调节剂可以向经历用一种或多种额外治疗剂治疗的患者施用。另外,在一些实施方案中,B0-11X制剂和/或免疫调节剂可以取代患者当前用一种或多种额外治疗剂的治疗。

[0279] 辅助疗法,也被称为辅助护理,是除初始主要的或最初的治疗以外的给定治疗。作为非限制性示例,辅助疗法可以是在手术之后通常给予的额外治疗,在所述手术中所有可检测的疾病已被去除,但仍存在因隐性疾病而导致的统计学复发风险。在一些实施方案中,本文中所描述的药剂在癌症治疗中用作辅助疗法。在一些实施方案中,在切除术之前,施用本文中所描述的治疗剂作为新的辅助疗法。在某些实施方案中,新的辅助疗法是指在任何手术之前缩小和/或降级肿瘤的疗法。在一些实施方案中,新的辅助疗法是指在进行手术或允许肿瘤切除的其他技术之前,向癌症患者施用的本文中所描述的治疗剂。

[0280] 在一些实施方案中,本文中所描述的治疗剂可用作在用一线疗法的初始治疗之后的维持性疗法,包括但不限于本公开的额外治疗剂中的任一种。

[0281] 在一些实施方案中,本发明提供用于治疗受试者的癌症或肿瘤的治疗方案或方法,所述方法包括同时或顺序地施用治疗有效量的B0-11X制剂和/或免疫调节剂和本文中所描述一种或多种额外治疗剂。在一些实施方案中,本发明提供用于治疗受试者的癌症或肿瘤的治疗方案或方法,所述方法包括同时或顺序地施用治疗有效量的B0-11X制剂和/或免疫调节剂和本文中所描述的抗癌剂中的一种或多种,包括但不限于化疗剂。本发明的方法中待使用的适合化疗剂可以包括本文中所描述的那些化疗剂。在某些实施方案中,化疗

剂是5-氟尿嘧啶(5-FU)、多柔比星(doxorubicin)、吉西他滨、紫杉醇和顺铂中的一种或多种。作为示例,在一些实施方案中,本发明提供将BO-11X制剂和/或免疫调节剂与一种或多种通用的癌症治疗方案进行组合(作为非限制性说明,FOLFOX、FOLFIRI、IFL、FL(Mayo)、QUASAR、Machover时间表、CAF、CMF、ECF和FEC)。

[0282] 在一些实施方案中,额外治疗剂是抗过度增殖剂。抗过度增殖剂包括但不限于多柔比星、道诺霉素(daunorubicin)、丝裂霉素、放射菌素D、博莱霉素(bleomycin)、顺铂、VP16、烯二炔(enediyne)、紫杉醇、长春新碱、长春碱、卡莫司汀(carmustine)、美法仑(melphalan)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、苯丁酸氮芥、白消安、洛莫司汀(lomustine)、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、BCNU或喜树碱(camptothecin)。

[0283] 另外,额外治疗剂可以进一步包括辐射的使用。另外,治疗方法可以进一步包括光动力疗法的使用。

[0284] 盐、药物组合物和剂量

[0285] 在一些实施方案中,本发明提供本文中所描述的制剂、组合物(本发明中制剂和组合物可以互换使用)和药剂以及其药学上可接受的酯、前药、盐、溶剂化物、对映异构体、立体异构体、活性代谢物、共晶体,及其他生理学上的功能性衍生物。

[0286] 在一个方面,本发明提供本文中所描述的药剂和药学上可接受的载体或赋形剂。药物组合物可以呈适用于所需用途和施用途的任何适合的形式。药物赋形剂可为液体,如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的油,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。药物赋形剂可为例如盐水、阿拉伯胶、明胶、淀粉糊、滑石、角蛋白、胶态二氧化硅、尿素等。在一个实施方案中,药学上可接受的赋形剂当施用受试者时为无菌的。当本文中所描述的任何药剂静脉内施用时,水为适用的赋形剂。还可以使用盐水溶液和右旋糖水溶液以及甘油溶液作为液体赋形剂,特别是用于可注射溶液。适合的药物赋形剂还包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻、粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、无水脱脂奶、甘油、丙二醇、乙二醇、水、乙醇等。适合药物赋形剂的其他示例描述在《Remington's Pharmaceutical Sciences》(Allen, Loyd V., Jr编辑,第22版本,2012)中。

[0287] 另外,本发明的药物组合物或制剂可以含有佐剂,如防腐剂、润湿剂、乳化剂、pH缓冲剂和分散剂。另外,可以包括助剂、稳定剂、增稠剂、润滑剂和着色剂。预防微生物的作用可以通过纳入各种抗菌和抗真菌剂来确保,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、酚酸等。药物组合物还可以包括等渗剂,如糖、氯化钠等。必要时,药物组合物还可以包括增溶剂。此外,药剂可用如所属领域中已知的适合的载体或递送装置递送。用于施用的组合物可以任选地包括局部麻醉剂(如利多卡因)以减轻注射部位的疼痛。

[0288] 本发明的药物组合物或制剂可以采取以下形式:溶液、悬浮液、乳液、滴剂、片剂、丸剂、球粒、胶囊、含液体胶囊、粉末、持续释放制剂、栓剂、乳液、气雾剂、喷雾剂、悬浮液或任何其他适用的形式。因此,本文中所描述的组合物可以包含在胶囊、片剂、丸剂、囊片、瓶、安瓿、药囊、注射器、料筒、雾化器或其他容器中。在一个实施方案中,药物组合物呈胶囊形式。在另一个实施方案中,药物组合物呈片剂形式。

[0289] 在一些实施方案中,所描述的药剂和组合物中任一种的施用是口服、静脉内和肠胃外中的任一种。在一些实施方案中,施用途包括例如:口服、皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外、舌下、鼻内、脑内、肝内、胰内、囊泡内、阴道内、经皮、经直肠、通过吸

入或局部例如耳朵、鼻、眼睛或皮肤。在一些实施方案中,施用是口服或通过肠胃外注射实现。施用模式可以留给医师判断,且部分取决于医学病症和/或发生治疗的部位(例如化学疗法、放射疗法,或与抗体、疫苗及其他靶向癌症的药物组合)。在一些实施方案中,施用使得本文中所描述的任何药剂释放到血流中。

[0290] 本文中所描述的任何药剂、药物组合物和/或制剂可以口服施用。这类药剂和/或药物组合物还可通过任何其他便利的途径,例如通过静脉内输注或快速注射、通过上皮或粘膜皮肤衬里(例如,口腔粘膜、直肠和肠道黏膜等)的吸收来施用且可以与额外治疗剂一起施用。可全身性或局部施用。各种递送系统为已知的,例如包封在脂质体、微粒、微胶囊、胶囊等中并使用。在特定实施方案中,可能需要局部施用到需要治疗的区域。

[0291] 在一个实施方案中,本文中所描述的药剂和/或本文中所描述的药物组合物和/或本文所述的制剂根据常规程序配制为适合于口服施用于人的组合物。用于口服施用的固体剂型包括例如胶囊、片剂、丸剂、粉末和颗粒。在这类剂型中,活性剂与至少一种惰性的药学上可接受的赋形剂或载体(如柠檬酸钠、磷酸二钙等)和/或以下者混合:a)填充剂或补充剂,如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇、硅酸、微晶纤维素和烘焙专用糖等;b)黏合剂,如羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮等;c)保湿剂,如丙三醇等;d)崩解剂,如琼脂-琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、特定硅酸盐、碳酸钠,交联聚合物,如交联聚维酮(交联聚乙烯吡咯烷酮)、交联羧甲基纤维素钠(交联羧甲基纤维素钠)、羟乙基淀粉粉钠等;e)溶液阻滞剂,如石蜡等;f)吸收加速剂,如季铵药剂等;g)润湿剂,如十六烷醇和单硬脂酸甘油酯等;h)吸附剂,如高岭土和膨润土等;以及i)润滑剂,如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠、山嵛酸甘油酯(glyceryl behenate)等,和这类赋形剂的混合物。所属领域的技术人员将认识到特定赋形剂可在口服剂型中具有两种或更多种功能。在口服剂型(例如胶囊或片剂)的情况下,剂型还可以包含缓冲剂。

[0292] 用于口服施用的液体剂型包括药学上可接受的乳液、溶液、悬浮液、糖浆和酏剂。除了活性剂外,液体剂型可以含有本领域中常用的惰性稀释剂,如水或其他溶剂、增溶剂和乳化剂,如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苯甲酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油(尤其是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇脂肪酸酯及其混合物。适用于肠胃外施用(例如静脉内、肌肉内、肝内、胰内、腹膜内、皮下和关节内注射和输注)的剂型包括例如溶液、悬浮液、分散液、乳液等。它们还可以无菌固体组合物(例如冻干组合物)形式制造,所述无菌固体组合物可在即将使用之前溶解或悬浮于无菌可注射介质中。它们可含有例如所属领域中已知的悬浮或分散剂。用于肠胃外注射的本发明的药物组合物包含药学上可接受的无菌水性或非水性溶液、分散液、悬浮液或乳液,以及在即将使用之前在无菌可注射溶液或分散液中重构的无菌粉末。适合水性和非水性载体、稀释剂、溶剂或载体的示例包括水、乙醇、多元醇(例如丙三醇、丙二醇、聚乙二醇等),及其适合混合物、植物油(例如橄榄油)以及可注射有机酯,例如油酸乙酯。可以例如通过使用包封材料(例如卵磷脂)、通过在分散液情况下维持所需粒度和通过使用表面活性剂来维持适当流动性。

[0293] 本文中所描述的任何药剂和/或本文中所描述的药物组合物可以通过控制释放或持续释放方式或通过本领域普通技术人员已知的递送装置来施用。通过使用例如各种比例的羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、尤特奇(Eudragit)、其他聚合物基

质、凝胶、可渗透膜、渗透系统、多层包封、微粒、脂质体、微球或其组合以提供所要释放曲线,这类剂型可用于提供一种或多种控制或持续释放的活性成分。可以容易地选择适合的控制或持续释放的制剂与本文中所描述的药剂的活性成分一起使用。因此,本发明提供适用于口服施用的单一单位剂型,例如但不限于被调适用于控制或持续释放的片剂、胶囊、囊形片(gelcap)和囊片(caplet)。

[0294] 包含本文中所描述的药剂和/或本发明的药物组合物的制剂,可以便利地以单位剂型呈现,且可以通过药剂学领域中已知的方法中的任一种来制备。这类方法通常包括将治疗剂引入与载体结合的步骤,其构成一种或多种附加成分。典型地,制剂是通过将治疗剂均匀地且紧密引入液体载体、细粉状固体载体或两种结合,然后必要时将制品塑形成所需制剂的剂型(例如,湿式或干式粒化、粉末共混物等,然后使用本领域中已知的常规方法压片)来制备的。

[0295] 应了解,根据本发明将施用的本文中所描述的药剂和/或本发明的药物组合物的实际剂量可以根据特定药剂、特定剂型和施用模式而改变。可以调节B0-11X制剂的作用的多种因素(例如体重、性别、饮食、施用时间、施用途径、分泌速率、受试者病状、药物组合、遗传配置和反应敏感性)可以由本领域技术人员考虑。施用可以连续地或以最大耐受剂量内一个或多个离散剂量进行。对于给定的病症情况,最优施用速率可以由本领域技术人员使用常规的剂量施用测试来确定。

[0296] 可以在单位剂型(例如片剂或胶囊)中施用本文中所描述的药剂和/或本发明的药物组合物的单个剂量,所述单位剂型包含例如B0-11X制剂或B0-11Xm制剂中约0.01mg至约1000mg聚(I:C)分子,其中例如,通过从约0.01mg至约10mg聚(I:C)(优选约0.5mg至约2.5mg聚(I:C),更优选约1mg至约2mg聚(I:C),包括在其之间的所有值和范围)制造复合物来形成所述单个B0-11X制剂。在一些实施方案中,本文中所描述的药剂和/或本发明的药物组合物以每天B0-11X制剂内约0.01mg至约1000mg、或每天约0.1mg至约10mg量的聚(I:C)分子来施用(例如,其中通过从约0.01mg至约1000mg,优选约0.01mg至约10mg聚(I:C)(包括在其之间的所有值和范围)制造复合物来形成所述单个每天B0-11X制剂)。

[0297] 在一些实施方案中,本发明的药剂和/或药物组合物的适合剂量是在B0-11X制剂内约0.001至约10mg聚(I:C)分子/kg受试者体重的范围,优选地B0-11X制剂或B0-11Xm制剂内0.003至约10mg聚(I:C)分子/kg受试者体重(相对于受试者计算的,或者需要时,根据受试者体重计算),更优选地B0-11X制剂内0.005至约10mg聚(I:C)分子/kg受试者体重,并且甚至更优选地B0-11X制剂内0.01至约10mg聚(I:C)分子/kg受试者体重,例如通过从约0.005mg至约10mg聚(I:C)每kg受试者体重、优选约0.003mg至约10mg聚(I:C)每kg受试者体重、更优选约0.001mg至约10mg聚(I:C)每kg受试者体重、包括在0.01mg/kg至约10mg/kg受试者体重之间的所有值和范围(包括在其之间的所有值和范围)制造复合物来形成所述施用的单个B0-11X制剂。在其他实施方案中,B0-11X制剂和/或免疫调节剂和/或额外治疗剂的适合剂量在约0.01mg/kg至约10mg/kg体重的范围内,或约0.05mg/kg至约1mg/kg体重的范围内。

[0298] 根据本发明的某些实施例,本文中所描述的药剂和/或药物组合物可以按照以下施用:例如每天大于一次、大约每天一次、大约隔一天一次、大约每三天一次、大约每周一次、大约每两周一次、大约每月一次、大约每两月一次、大约每三月一次、大约每六个月一

次,或大约每年一次。在一个实施方案中,本发明的药剂和/或药物组合物的适合剂量是指,在一个治疗周期内,在B0-11X制剂内约0.1至10mg聚(I:C)分子每受试者(患者)的范围,优选在B0-11X制剂内约0.5至2mg聚(I:C)分子每受试者,更优选0.6至1mg每受试者。具体地,当皮内或肿瘤内注射施用本发明的组合物时,随之调整组合物总量。

[0299] 试剂盒

[0300] 本发明还提供了可以简化本文所述药剂和/或药物组合物施用的试剂盒。该试剂盒是材料或组分的组合,包括至少一种本文所述试剂。试剂盒中配置的组件的确切性质取决于其预期用途。在一个实施方案中,该试剂盒被配置用于治疗人受试者的目的。

[0301] 试剂盒中可能包含使用说明书。使用说明书通常包括有形的表达,其描述了在使用试剂盒的组分以影响期望结果时所采用的技术,例如治疗或预防癌症、妇科疾病或感染。可选地,该试剂盒还包含其他有用的成分,例如稀释剂、缓冲液、药学上可接受的载体、注射器、导管、涂药器(applicator)、过滤器、(微)针、移液器或测量工具、绷带材料或其他易于本领域技术人员识别的有用用具。具体地,该试剂盒可能包括用于更精确(例如图像引导的)的肿瘤内或肿瘤周药物递送装置、可植入(或不可植入)基质形式(包括多孔、可生物降解和/或聚合体结构和支架)的药物洗脱装置、包封系统或其他适合临床使用的包装。

[0302] 由于B0-11X组合物或者B0-11X_m组合物可以直接使用、与其他化合物(例如疫苗、药物、佐剂等)组合使用,使用不同的施用途径和/或涉及对来自患者的细胞或样本进行回收和分析,试剂盒可包括特定材料,例如用于肿瘤内、肌肉内和/或皮下注射的注射器(预填充或未填充)、用于稀释的载体、用于存储来自患者的生物材料的小瓶和/或用于检测特定细胞标记物的抗体。

[0303] 实施例

[0304] 实施例1:基于jetPEI的聚(I:C)制备物(B0-11X制剂)的结构表征和初步的体外功能验证

[0305] 材料与方法

[0306] 聚(I:C)制备物

[0307] 用于产生双链聚肌苷酸-聚胞苷酸(聚(I:C))分子的单链聚肌苷酸(聚(I))和聚胞苷酸(聚(C))分子获自市售供应商,例如Tide Group、Carbogen、杭州第一制药有限公司或Invivogen。根据供应商和批次的不同,pI(C)分子的尺寸分布定义为:<400个碱基,20-82%(使用制备物进行进一步测试显示,例如33%、43%、50%、70%或73%);400-850个碱基,15至40%(使用制备物进行进一步测试显示,例如20%、27%、30%、34%或37%);850-5000个碱基,3至50%(使用制备物进行进一步测试显示,例如5%、6%、13%、30%、34%、42%或者48%);>5000个碱基,1%或更低(通常不存在)。根据供应商和批次的不同,pI分子的尺寸分布定义为:<400个碱基,80-99%(使用制备物进行进一步测试显示,例如81%、86%、91%、95%、或者98%);400-850个碱基,1至20%(使用制备物进行进一步测试显示,例如6%、8%、12%、或者17%);850-5000个碱基,0至5%(使用制备物进行进一步测试显示,例如3%、1%或以下);>5000个碱基,1%或更低(通常不存在)。用于应用聚(I)聚(C)粉或溶液制造B0-11X制剂的接收标准还包括:最大吸收(对于聚(I)和聚(C)分别为,在波长248±1nm和268±1nm处)、内毒素含量(≤10EU/m⁻)、pH(6.0-8.0)和沉降系数(≥4S)。

[0308] 如PCT/EP2016/078078所述,获得、退火和纯化一批聚(I)制备物和聚(C)制备物。

简而言之,通过以相同的方式和相同的浓度,聚(C)粉,分别获得聚(I)制备物和聚(C)制备物。使用截留值为300kDa或截留值为500kDa的膜(Pellicon2cassette,Millipore),可以执行额外的过滤步骤以进一步提高起始溶液的质量。经过30kDa的膜(Pellicon 2cassette, Millipore),将这些过滤步骤的渗透物浓缩并除去小尺寸杂质(如单体)。将每种溶液的残留物与浓缩缓冲溶液(例如PBS 10X)混合。对于两种溶液,确定光密度以计算浓度,以作为随后退火步骤的1:1化学计量的基础,从而调整退火步骤之前的总体积。将聚(I)溶液混合并与聚(C)溶液分子在55–62℃下搅拌30分钟。将得到的溶液在室温下缓慢冷却约3个小时使单链分子退火并生成聚(I:C)分子,最后通过G3玻璃孔滤器(孔径约15–40μm)过滤。

[0309] 此退火过程将生成包含不同双链聚(I:C)分子池的溶液,然后将其应用于色谱GPC柱。使用直径5cm的Omnifit玻璃柱进行色谱法,该柱中装有40mM磷酸钠缓冲液中700mL Toyopearl HW-65F浆液。使浆液缓慢沉降,然后用40mM磷酸钠缓冲液(pH=6.9)以从10mL/min到60mL/min的递增流速洗涤。该柱安装在制备型HPLC装置中,该装置由两个进料泵、UV检测器、采样阀和计算机组成。将退火得到的反应混合物上样到柱上,并用40mM磷酸钠缓冲液(流速=50mL/min,pH=6.9)洗脱。当UV信号在100mV和1250mV之间时,提取目标馏分,使用切向流装置(TFF,Millipore Pellicon 2,再生纤维素,配备三个各0.1m²、300kDa截留值的膜盒)通过四个稀释和浓缩的脱盐循环,合并馏分用于进一步处理。入口和出口连接到具有合并的色谱馏分的第一玻璃瓶。将最终的保留物和洗涤溶液在膜上过滤,得到澄清的无色溶液,将其用异丙醇脱盐、冷冻干燥、并在室温冻干(1毫巴,约5天)。可以通过以下示例性方法获得聚(I:C)的制备物:将聚(C)溶液在61至66℃加热1.5小时,然后将其与聚(I)溶液混合并在55至58℃搅拌70分钟,然后将混合物冷却并用0.2μm膜过滤。

[0310] 从PolyPlus(产品目录号:201–50G)获得不同的市售体内JetPEI,通过凝胶渗透色谱法(GPC:SOP GPC-0044)从PEOX(聚环氧乙烷,PEI前体)所确定的,其平均分子量为8.3至22.5kDa,多分散指数<1.5。

[0311] 适用于色谱和/或过滤步骤的一些条件(有或无冷冻步骤)以及缓冲液、和退火时间,经调整以进一步降低溶液粘度或复合物的沉淀。甘露醇或葡萄糖在最终制剂中用作赋形剂。通过使用浓缩液体制备物中的JetPEI来获得含有JetPEI的溶液1,或在一定量的可注射灭菌水中溶解JetPEI(分子量17至23kDa)的固体散装制备物以达到150mM并混合以获得均匀的溶液,来获得含有JetPEI的溶液1。进行进一步的稀释步骤以达到11.25–11.7mM的浓度,然后在最终的小瓶中将其最终稀释至5.62–5.85mM。溶液2含有聚(I:C)分子和一水合葡萄糖,其所含的量使得与JetPEI混合后可提供含5%葡萄糖(重量/所述组合物的总体积)和每ml所述组合物总体积0.5–0.7mg聚(I:C)的溶液,由此所述聚(I:C)与所述JetPEI复合。使用Watson Marlon泵(转速30rpm),通过0.2微米过滤器(Sartopore®2150 0.2微米,根据ASTM F-838-05指南被完全验证为灭菌级过滤器),使用双过滤对溶液1和2分别进行灭菌。在每个瓶中按以下顺序的步骤进行两种溶液的自动混合:(i)使用Watson-Marlow泵将溶液1添加到瓶中,剂量为5.95–6.05g(6mL;密度:1g/mL), (ii)使用Flexicon泵以550rpm的速度、通过连接至G20–0.9μm针头的1.8毫米内径管将溶液2加到溶液1中,剂量为6.08–6.40g(6mL)。使用T型混合器可以改善结果。由于静电相互作用,在制造过程结束时(或其储存过程中)通过目视检查仍然存在粒子的聚集体(例如,尺寸在1–100μm或更大的范围内)的情况下,该产品可以在使用前(例如,在注射之前)在0.8μm的过滤器上过滤,而不会改变组合物内粒子的生

物特性或单峰直径分布。例如, B0-112制剂可以通过Minisart针筒式过滤器(Sartorius)进行过滤, 排阻尺寸为0.8 μ m。将小瓶(具有不同体积的B0-112制剂, 例如1mL、2mL、5mL、10mL或更多)用灭菌无热原橡胶塞密封, 并用铝囊压接, 并分别贴上标签。这些小瓶可以直接用于注射, 也可以在使用前将其内容物稀释在适当的载体中。

[0312] 通过色谱法或通过琼脂糖凝胶和未标记的或(^{32} P)标记的聚(I)和聚(I:C)制备物, 确定并比较B0-11X制备物中聚(I:C)分子的尺寸。简而言之, 将1 μ g聚(I)和聚(I:C)(PBS)加载入琼脂糖凝胶中, 并在TBE缓冲液中以80伏特进行电泳1小时。根据初始聚(C)和聚(I)分子的尺寸分布、还可以通过色谱法将B0-11X制备物中存在的聚(I:C)分子的尺寸分布确定为:<400个碱基, 7-57%(使用制备物进行进一步测试显示10%至30%的值, 例如11%、15%、17%、21%、26%、或者28%); 400-850个碱基, 20至45%(使用制备物进行进一步测试显示20%至30%的值, 例如23%、25%、或者27%); 850-5000个碱基, 20至70%(使用制备物进行进一步测试显示40至60%的值, 例如42%、45%、52%、53%、或者55%); >5000个碱基, 0至9%(使用制备物进行进一步测试显示0%至5%的值, 例如3%、1%或0%)。通过色谱法评估并比较了不同批次的聚(I)制备物和聚(C)制备物的尺寸。

[0313] 按照PCT/EP2016/078078中关于B0-11X制剂所述的浓度和粒径分布进行生产和验证B0-112组合物。以含有0.5-0.8mg/mL浓度的聚(I:C)的小瓶提供B0-112组合物。在2-8°C下储存1年后, 证实了B0-112组合物在这些小瓶中的稳定性。

[0314] 市售可获得的含聚(I:C)的制剂

[0315] 聚-ICLC是用聚赖氨酸和羧甲基纤维素稳定化的聚(I:C)制备物(Ewel C等人1992; W02005102278)。LyoVec-HMW(目录号t1rl1-piclv)和LyoVec-LMW(目录号t1rl1-picw)和相应具有高分子量(HMW; 目录名称t1rl1-pic)和低分子量(LMW; 目录名称t1rl1-picw)的聚(I:C)制备物, 可获自Invivogen。

[0316] 分析技术

[0317] 根据根据制造商的说明以及根据ISO 22412(假设所述粒子是球形的), 使用Zetasizer Nano ZS确定不同B0-11X制备物(0.5-0.8mg/mL, 稀释为浓度1.0 μ g/mL的聚(I:C), 用于基于细胞的分析和其他分析)中JetPEI/聚(I:C)粒子的zeta平均(z平均)直径和多分散指数的值。通常, 使用v7.11软件应用动态光散射(Nanosizer技术)。

[0318] B0-11X制备物的体外表征

[0319] 根据描述B0-110复合物对人黑色素瘤细胞系SK-MEL-103和人胰腺癌细胞系c特性的文献(Pozuelo-Rubio M等人2014; Tormo D等人2009; W02011003883), 使用人黑色素瘤细胞、人胰腺细胞或人黑素细胞, 测试不同的基于聚(I:C)的制备物。简而言之, 在治疗前至少12小时对贴壁细胞进行细胞活力分析。通过标准的台盼蓝排除法, 对合并的且用0.4%台盼蓝溶液(Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA)染色的悬浮和贴壁细胞, 在指定时间和处理浓度下评估细胞死亡百分比, 并在光学显微镜下评分(每次处理最少计数100-500个细胞)。测试每种制备物的时间为12到48小时, 不同制备物中的聚(I:C)分子浓度范围为0.3到2.5 μ g/ml。

[0320] 在正常黑素细胞和来自黑色素瘤和胶质母细胞瘤的细胞系中测试了B0-112的死亡诱导活性, 并与分离的成分即聚(I:C)分子和线性PEI(Jet PEI; Polyplus)进行了比较。从无症状供者的包皮中分离出正常的黑素细胞。黑色素瘤细胞SK-Mel-28、SK-Mel-103和

UACC62 (分别在p53、NRAS和BRAF中有突变) 获自ATCC或斯隆·凯特琳纪念癌症中心(美国)建立的保藏,进行短重复序列(STR)谱分析(GenePrint®10系统)以进行细胞系鉴定。使用标准方案从黑色素瘤患者获得原代细胞并进行维护。将细胞铺在96孔板中(6000个细胞/孔)。每个实验一式三份,仅使用聚(I:C)、BO-110或BO-112制剂,以0.5或1 μ g/ml持续24小时或40小时的处理。

[0321] 肿瘤细胞死亡特征

[0322] 小鼠癌细胞系B16-F10、皮肤黑色素瘤(ATCC编号CRL-6475)获自ATCC建立的保藏;B16-OVA细胞(源自B16-F10细胞)获自应用医学研究中心(西班牙纳瓦拉)。对IFN不敏感的B16细胞系获自Invivogen(B16-BlueTMIFN- γ 细胞,目录号bb-ifng;B16-BlueTMIFN α / β 细胞,目录号bb-ifnt1)并按照制造商的指示进行维护。研究了BO-112制剂诱导的肿瘤细胞死亡(凋亡、坏死、免疫原性细胞死亡)的特征,并与分离的聚(I:C)和其他TLR配体(LPS,TLR4特异性)进行了比较。培养B16-OVA细胞(10⁵个细胞/孔):单独地、与超纯LPS(0.25和1 μ g/mL,InvivoGen,圣地亚哥,CA)和BO-112制剂(0.25、0.5和1 μ g/ml)、或者仅使用聚I:C(0.25、0.5和1 μ g/mL)持续48小时。通过流式细胞术,用膜联蛋白V和7ADD联合染色分析细胞凋亡和坏死率(活细胞:7ADD阴性,膜联蛋白V阴性-;细胞坏死:7ADD阳性,膜联蛋白V阴性;早期凋亡7ADD阴性,膜联蛋白V阳性;晚期凋亡:7ADD阳性,膜联蛋白V阳性)。通过流式细胞术检测细胞表面MHC-1、CD95和钙网蛋白的表达,分析了BO-112在诱导免疫原性细胞死亡中的作用。对于流式细胞术,在Gallios Cytometer(Beckman Coulter)中采集样本,并使用Kaluza Flow Analysis Software(Beckman Coulter)分析数据。

[0323] PARP激活

[0324] 此外,还研究了BO-112制剂对激活酶聚ADP核糖聚合酶(PARP)(其参与DNA修复、基因组稳定性和程序性细胞死亡)的作用。MC38结肠腺癌(Cellosaurus编号CVCL_B288、Kerafast目录号ENH204)和4T1乳腺癌细胞(ATCC编号CRL-2539)可获自己建立的细胞保藏,如在ATCC中。用BO-112(0.5 μ g/mL)刺激每种癌细胞系(3 $\times$ 10⁶),并在0、16h和24h通过Western免疫印迹在细胞裂解物中分析PARP激活。使用PARP单克隆抗体(C-2-10克隆,ThermoFisher Scientific)鉴定对应于PARP的116kDa蛋白和85kDa凋亡诱导的裂解产物。

[0325] 结果

[0326] PCT/EP2016/078078公开了有关初步开发和表征BO-11X制剂的方案和实验数据,与文献中所述和实验室规模(Pozuelo-Rubio M等人2014;Tormo D等人2009;W02011003883)获得的BO-110复合物相比,导致BO-11X制剂对癌细胞的细胞毒性提高。将BO-11X的制造过程、以及在GMP条件下所得含聚(I:C)的制备物及其过程和制备的数据,与文献中所公开的数据进行了比较。

[0327] 图1A概述了用于生成第一类BO-11X制备物(称为BO-112制剂)的这种过程,该过程中药物物质(即聚(I)和聚(C)单链分子退火产生的双链聚(I:C)分子)首先在过滤灭菌的溶液中和赋形剂(如葡萄糖)混合,从含有具有载体功能的聚合物(即JetPEI)的溶液分开。然后,将这两部分制备物适当地混合到每个小瓶中,以产生药理毒理学研究和临床应用所需的大量结构上和功能上可比的药物制剂。此过程还可能提供聚(I:C)制剂,其中在阶段1形成的粒子(然后在最终制剂中)中存在其他化合物(例如免疫相关佐剂或其他治疗化合物),具体是通过添加这种治疗有关化合物与(或替代)赋形剂(如葡萄糖),从而提供BO-11Xm制

剂(可命名为B0-112m)的示例。

[0328] 至少一些这种可重复性和可接受性标准可以与已知抗癌活性的其他含聚(I:C)的制剂进行比较。在聚(I:C)分子尺寸的水平上,市售Lyovec-HMW和Lyovec-LMW中包含的聚(I:C)分子的覆盖尺寸范围明显不同于B0-11X制造过程所提供的(HMW几乎完全在0.85kb以上,而LMW几乎完全在0.85kb以下)。聚(I:C)分子的这种尺寸差异可能取决于聚(I:C)分子复合物中相关的不同制造工艺和/或载体。聚-ICLC(包含聚赖氨酸和羧甲基纤维素)和Lyovec-HMW/Lyovec-LMW(根据制造商所述,其包含阳离子脂质基转染试剂二-十四烷基磷酸-N,N,N-三甲基甲基氯化铵或DTCPTA和中性脂质1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺或DiPPE)中的基于聚(I:C)的复合物中的复合物Z均值,与B0-112制剂中的一种相比较,显示这些市售制剂包含的复合物要大得多(大多数大于200nm),并且至少对于Lyovec-LMW而言,具有双峰分布(图1B)。如果在冷冻/解冻循环后进行该分析,则这些市售制备物的稳定性也较差,而B0-112未观察到变异性。的确,当B0-112制剂的Z平均直径(d.nm)为100+/-50nm(例如82.5nm)且不超过400nm时,基于Lyovec的制剂和聚-ICLC制剂Z平均值远高于300nm,从而证实了市售聚(I:C)是作为组成上不均匀的制备物而提供的,或者其包括功能上不好表征的大颗粒,并且其尺寸在冷冻/解冻循环中会发生变化。

[0329] 这种方法可以自动化,以提供具有更加统一特征的B0-11X制剂(例如B0-112制备物)。该制造过程不仅可以防止溶液中的游离JetPEI或者聚(I:C)分子,其没有在B0-112制备物中形成复合物,而且还可以获得B0-112制备物中复合物的可控的平均直径和单峰直径分布,因此Z平均值可以在30至150nm之间进行调节。而且,这种方法可以适用于包括尺寸分布不同的聚(I:C)分子,以及尺寸、尺寸分布不同和/或表现出单链和双链区域的其他多核糖核苷酸(聚(A)、聚(G)和/或聚(U))。

[0330] PCT/EP2016/078078还公开了市售提供的聚(I:C),其作为组合物中非均匀的制备物,或包含功能性表征较差且在冷冻/融化循环中尺寸发生改变的大颗粒。的确,也可以使用增色性来评估B0-112制剂,具体来说温度(或其他条件)变化导致的双链聚(I:C)分子在粒子内的稳定性,决定聚(I)链和聚(C)链之间的分离。B0-112制剂显示出非常低的增色作用,在260nm处的透射率差异低于0.2或0.1。还评估并确认冷冻的B0-11X小瓶在-20℃下不同时间的稳定性,至少长达一个月。

[0331] 相对于原始的B0-112制剂,施用之前B0-112制剂的过滤和冷冻不会促进组合物内粒子的细胞毒特性或稳定性的实质性改变。例如,组合物保持D90%低于250nm,zeta电位超过30mV(例如40mV至50mV),流体力学直径的Z均值为30至150nm,与葡萄糖作为赋形剂的相容性,多分散性值为0.1至0.6,以及其他适用的欧洲药典标准。

[0332] 因此,对于Z-平均直径(d.nm)小于200(当不低于100nm时)的聚(I:C)-JetPEI复合物形成的粒子而言,B0-11X制备物(例如B0-112制备物)是具有高度稳定性和可重复性的制剂,而在基于其他载体和制造方法的市售聚(I:C)制剂中未观察到。所得的B0-112制备物呈现出具有单峰直径分布的B0-112复合物,没有可见的粒子(即粒子数不超过Eur Pharm2.9.20要求的极限),即使在混合大量溶液1和2后最终溶液未经5μm的过滤。也可以在使用前(例如,在注射之前)通过0.8μm的过滤器过滤B0-112制备物,而不会改变组合物内粒子的生物学特性或单峰直径分布。例如,B0-112制剂可以通过Minisart针筒式过滤器(Sartorius)进行过滤,排除尺寸为0.8μm。具体地,可以通过在50rpm至600rpm之间更改混

合速度和/或在1mL/min至50mL/min之间更改聚(I:C)或JetPEI溶液的流速,来调整混合条件。通常,B0-11X制备物(具体为B0-112制备物)具有以下主要特征:无色,无可见颗粒,重量克分子渗透压浓度为220至340mOsm/kg,pH为pH 2至pH4(例如2.7至3.4),旋光度为+1500至+3750,zeta电位等于或大于30mV,Z平均直径(nm)在30和250nm之间(例如,30至150nm)(但优选60nm至130nm)的粒子单峰直径分布,并且包含聚(I:C)分子,其中至少40%、50%或者60%这类双链多核糖核苷酸尺寸大于0.85Kb,以及至少70%这类双链多核糖核苷酸尺寸为0.4至5Kb。可以通过使用T型混合器在溶液1和溶液2的不同流速组合中,调整如粒子直径分布的特性。当该速度高于20mL/min(例如30mL/min)时,所得B0-112制备物的浊度降低与Z-平均粒径的降低和在此值附近的直径分布保持同步,同时保持单峰性,这可能是由于流动状态的变化所致。

[0333] 以小瓶提供示例性B0-112制备物,其中包含Z-平均直径为45+/-5nm至81+/-5nm(例如73+/-5nm)的粒子,其中至少50%的粒子小于85+/-20nm,多分散性为0.25,zeta电位为38mV,pH为3.1。在-20℃下或大量暴露在室温下的冷冻/解冻循环后保持的这些结构特性,在保持特定的数值范围内的接受标准的同时可以在不同批次间变化。具体地,当比较GMP和非GMP批次的理化和功能特性和更可重复的和有效的标准,来评估B0-112制剂(一般来说B0-11X制剂)时,定义了更优选的范围。例如,治疗的和生物有效的B0-112制剂可以呈现Z平均直径为100+/-50nm或80+/-20nm(例如76nm,89nm或96nm)的粒子,电位z约35(或40)至50mV(例如39mV、46mV、或者50mV)或约40至45mV(例如43mV),至少90%的粒子直径小于250nm或者200+/-50nm(例如170nm、172nm、174nm、216nm、218nm、220nm),多分散性为0.2至0.3(例如0.21、0.23或者0.25)。其他标准可以与在水性组合物中测量的特征相关,例如存在低于检测限或不相关的单体肌苷酸(例如,低于1、0.5、0.2或0.1μg/mL),重量克分子渗透压浓度为300至310mOsm/kg,离子强度低于5mM或优选低于1mM(例如0.7、0.76、0.78或0.80)。在低温(例如5℃+/-3℃)保存后,可以调整这些值,但仍应保持在这些范围内。

[0334] 小瓶中的聚(I:C)和粒子浓度可根据最终用途进行调整。但是,为了保持组合物中基于聚(I:C)和PEI的复合物的稳定性,小瓶中应包含B0-11X,其浓度可能要高于0.1mg/mL聚(I:C),可能高于0.5mg/mL的聚(I:C)分子,因此zeta电位和聚集特征稳定,可以均匀有效地使用B0-11X制备物。可以制备用于一次性使用的小瓶(包含4mL、2mL、1mL或者更少体积的B0-11X组合物),而大批量制备物(包含5mL、10mL、15mL或更多B0-11X组合物,或者更多)可分装成单次使用的2、3、5个或更多等份,在治疗期间(3天,5天,7天,10天,15天,30天或更长)进行施用。

[0335] 如果将B0-112制剂的细胞毒活性与市售制剂进行比较,则后者在至少两个体外模型中对杀死癌细胞的作用似乎要小得多(图2A和图2B)。可以测量和验证B0-11X制备物的细胞毒活性,以进一步用于代表不同癌症适应症的不同类型的癌细胞系。这些作用也可以通过测量已知能修饰并可能改善针对癌细胞的细胞反应的蛋白的表达和/或分泌来进行研究。例如,在至少24小时的时间内B0-112制剂比聚-ICLC更有效诱导黑色素瘤细胞系中干扰素-β的表达(图2C)。这种体外证据不仅可用于评估通过施用B0-11X制剂可以更有效地治疗哪些类型的癌症,还可以用于评估其他哪些癌症治疗方法(例如基于细胞或基于抗原的疫苗、佐剂、抗体、化学疗法药物、放射疗法、细胞疗法、免疫疗法、表观遗传疗法或酶(例如激酶或代谢酶)的活性抑制剂)当与B0-11X制剂组合使用时可能起更有效的作用(例如,通过

减少其他方法的剂量、频率和/或疗程)。

[0336] 确实,通过体外比较使用适当的化合物和细胞对照的活性,证实了B0-11X制剂对癌细胞系而非针对正常原代细胞的细胞毒性作用特异性(如先前所述,针对实验室规模的B0-110制剂;Tormo D等人2009)(图3)。线性PEI_L分子和聚(I:C)分子都不会单独显著影响肿瘤细胞(黑色素瘤或神经胶质瘤)的活力。仅当线性PEI和聚(I:C)分子复合时,如在B0-112制剂中所提供的,才能观察到对肿瘤细胞的显著杀伤作用,而不会影响正常黑素细胞的活力。在进一步的临床(前)使用之前,基于细胞的体外细胞毒性分析可能是对B0-112制剂批次进行验证和排序的一部分。这些分析可以基于,在培养介质中暴露在1、2或更高标准浓度(例如0.35、0.5、0.85、1.0、1.5μg/ml,无论是否事先用0.8μm过滤器过滤)的一批B0-112制剂24、36或48小时后,对人黑色素瘤细胞系(如SK-Mel-19、SK-Mel-28、SK-Mel-103和SK-Mel-147细胞)的作用,使用具有可比标准(例如重量克分子渗透压浓度、pH、或离子强度)的载体或其他无颗粒溶液作为阴性对照,并使用SDS或其他生物或化学细胞毒剂。

[0337] 总体而言,基于聚(I:C)、基于粒子、基于组合物和基于细胞毒性的标准可用于生产和验证B0-11X制剂(具体是B0-112制剂),从而使该制剂相对于先前市售的(参见附图)和/或文献(Schaffert D等人2011;W02011003883;W02015173824)描述的基于聚(I:C)的制剂在结构上是不同的,且是功能上改进的制剂。对于这些后来的公开,这些非GMP的基于聚(I:C)的制剂需要添加基团例如PEG(具有屏蔽活性)和/或EGF肽(用于细胞靶向),以实现所需水平的细胞毒性,这些制剂使用具有更大尺寸、更高N/P比、生产中具有额外的化学复杂性、且对仅限于表达细胞表面抗原(例如EGFR)的癌细胞具有特异性的溶液的粒子。

[0338] 上述观察结果,在暴露于B0-112组合物的黑色素瘤患者细胞系中得到了证实(与其他基于聚(I:C)的制剂相比),不仅特异性地且更强烈地降低了癌细胞的活力,还能诱导此类细胞产生干扰素α/β(图4)。此外,相较于浓度相当的LPS(TLR4激动剂)或相应的聚(I:C)分子(一般定义为TLR3激动剂),B0-112组合物可更强程度地促进肿瘤细胞死亡(凋亡和坏死)并增强免疫原性细胞死亡(ICD)(图5A和图5B)。与这些TLR特异性激动剂相比,B0-112制剂具有更强的促凋亡潜能,对消除癌细胞以及激活有效的抗肿瘤免疫反应具有重要意义。实际上,(与未处理的细胞、LPS-或聚I:C-处理的细胞相比)在B0-112刺激后,观察到ICD标记物(如MHC-I、CD95或钙网蛋白)的表达水平显著增加,这证实了B0-112制剂具有强大的诱导抗肿瘤免疫的能力。可以进行类似的体外研究,使用肿瘤小鼠模型进行体内研究并指导临床发展。

[0339] 已经使用基于细胞的相似方法来验证已暴露于过滤和/或冷冻的B0-11X和具体地B0-112制剂,从而证实在这种过程之后B0-112制备物不仅在质和量上都保持了细胞毒作用,还可以用于评估表达增强的细胞死亡标记物和/或癌症抗原或免疫细胞或癌症药物特异性识别的靶标。例如,这种方法还可以用于测量癌症药物生物靶标(如细胞表面标记物和受体、激酶、酶)表达的减少或降低(或降解)。

[0340] 例如,除免疫检查点外,如在来源于自体原发性和转移性头颈部鳞状细胞癌(在其中已经评估了TLR3信号传导对转移进展的作用)的细胞系中和新鲜肿瘤标本中针对PARP1所观察到的,将细胞暴露于B0-11X组合物,可能会影响控制DNA修复的酶(例如聚(ADP-核糖)聚合酶)的活性,观察到在暴露于聚(I:C)分子后的显著凋亡,如在原发性和转移性肿瘤样本和相关细胞系中通过PARP裂解所检测到的(Umemura N.等人2012)。图6显示,当将B0-

112制剂施用于4T1乳癌和MC38结肠癌细胞系时,还观察到PARP的裂解,表明BO-112制剂可用于改善PARP抑制剂的用途,PARP抑制剂的临床用途受到患者中耐受性机制的限制(Lim J和Tan D,2017)。如先前针对抗-PD1或抗PD-L1的图所示,在组合疗法中扩展了PARP抑制剂的治疗用途。

[0341] 可以使用不同的临床前模型对这些体外数据进行更深入分析,以指导临床开发,这涉及不同BO-11X制剂、不同施用方案和/或与疾病(如癌症)相关病症的产生和比较。具体地,其他研究可能涉及确定BO-11X制剂对获自患者的生物材料(例如血液或活检样本)和细胞(是癌细胞、免疫细胞或其他细胞类型)中mRNA和/或相应蛋白的活性、表达和/或浓度的作用。在体外培养、离体测试和/或在小鼠中注射时,可在人细胞(原发性肿瘤细胞、细胞系或遗传修饰的细胞)中评估BO-11X制剂的特性,在这种情况下可研究更为复杂的免疫机制。这种活性的特征以及基因表达的相关变化和潜在的作用机制,可能有助于定义最佳施用途径和方案、与其他药物、后续治疗的组合、和/或适用于BO-11X制剂的患者群,如实施例3所述。

[0342] 实施例2:BO-11X制备物在动物模型中的功能表征

[0343] 材料与方法

[0344] BO-11X制剂和其他化合物

[0345] 如实施例1中所述获得BO-112制剂,并根据每千克动物体重的给药剂量将其用5%葡萄糖PBS溶液(载体;ref:BE14-516F,Lonza,法国)稀释成三种不同浓度,分别为0.05mg/Kg、0.5mg/Kg和2.5mg/Kg。

[0346] 选择鼠抗PD-L1抗体(InVivoPlus,克隆10F.9G2)作为组合免疫治疗化合物。大鼠IgG2b抗体(克隆LTF-2,BioXCell)被用作同种型对照。每天给小鼠注射的抗-PD-L1和大鼠IgG2b(RIgG)抗体用载体稀释至1.5mg/ml终浓度。

[0347] 鼠抗CD4(克隆GK1.5)和抗CD8 α (克隆2.43)以及大鼠-IgG2b(克隆LTF-2)抗体(均来自BioXCell)用于T细胞耗竭。小鼠接受了三次初始剂量的抗CD4或抗CD8 α (300 μ g/小鼠)、或大鼠-IgG2b(100 μ g/剂量)抗体,然后维持100 μ g/小鼠的维持剂量。

[0348] 小鼠细胞系

[0349] B16-F10(皮肤黑色素瘤,ATCC编号CRL-6475)以及源自它们的B16-OVA;MC38(结肠腺癌,Cellosaurus编号CVCL_B288,Kerafast目录号ENH204);4T1(乳癌,ATCC编号CRL-2539);获自ATCC或来自应用医学研究中心(西班牙纳瓦拉)已建立的保藏,并且在可能的情况下,细胞进行短碱基重复序列(STR)谱分析(GenePrint®10System)以确认细胞系。对IFN不敏感的B16细胞系获自Invivogen(B16-Blue™IFN- γ 细胞,目录号bb-ifng;B16-Blue™IFN α / β 细胞,目录号bb-ifnt1)并按照制造商的指示进行维持。

[0350] 人癌症的动物模型

[0351] 将上述细胞系皮下(s.c.)注射到8至10周龄雌性C57BL/6小鼠的右侧(flank)(5×10^5 - 1×10^6 个细胞)。对于远端研究,在左侧进行第二次s.c.注射(3×10^5 个细胞)(在右侧肿瘤细胞的初次注射后立即进行,同时(concomitant)注射模型)。对于再攻击研究,在对BO-112治疗有反应且无肿瘤的小鼠左侧进行第二次s.c.注射(2.5 - 5×10^5 个细胞)。每周用卡尺测量肿瘤直至处死并计算体积(长 $\times$ 宽 $^2/2$)。通过Kaplan-Meier分析评估存活。

[0352] BO-112施用和其他化合物

[0353] 当肿瘤体积为80-100mm³时开始进行B0-112治疗。通过单次直接注射到右侧的肿瘤块,在肿瘤内施用B0-112和载体。B0-112剂量表(2剂量/周,持续3周)。进行腹膜内抗PD-L1和大鼠-IgG2b抗体施用,从B0-11X的第二剂量开始,并按照与B0-112相同的时间表继续进行。腹膜内施用抗-CD4、抗-CD8 α 和大鼠-IgG2b mAb;在开始B0-112施用的前一天注射初始剂量,并随着实验继续进行。图中标出了每个实验的(B0-112和其他化合物)施用的确切时间表。

[0354] 免疫反应研究

[0355] 通过MC38小鼠肿瘤模型中的T细胞耗竭实验,研究了B0-112抗肿瘤作用中不同T细胞亚群的影响。在B0-112治疗之前,在携带MC38肿瘤的小鼠中全身施用抗CD4或抗CD8 α 抗体;之前描述了B0-112、抗CD4或抗CD8 α 抗体的剂量、施用和时间表。每周用卡尺测量肿瘤直至处死并计算体积(长 $\times$ 宽²/2)。在第二次施用B0-112后24小时,评估体内B0-112疗法诱导的T细胞激活和引发。切除肿瘤和引流淋巴结,消化肿瘤(胶原酶/分散酶消化介质)并过滤,处理所有样本以获得单细胞悬液。进行了流式细胞术的表面和细胞内染色的标准操作规程,所用的荧光染料标记的抗体:抗-CD4、-CD8、-CD45、-PD-1、-IFN γ 、-CD137(Biolegend)。分析了针对OVA或Trp2的抗原特异性CD8 $^{+}$ T细胞(iTA γ Tetramer/PE-H-2Kb,BML international Corporation)。使用Gallios Cytometer(Beckman Coulter)采集样本,并使用Kaluza Flow Analysis Software(Beckman Coulter)分析数据。

[0356] 通过MTS分析(CellTiter96[®] Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega),在不响应IFN的小鼠癌细胞中,测试了B0-112的死亡诱导活性。用聚(I:C)(0.5 μ g/mL)单独、B0-112制剂(0.5 μ g/mL)、或者2',3'-环GMP Sting激动剂(7 μ g/mL; InvivoGen, CA圣地亚哥),对B16、B16-IFN- α / β 细胞(对IFN- γ 无反应)和B16-IFN- γ 细胞(对IFN- α / β 无反应)(5000细胞/孔;96孔平板,每种条件下重复8次)培养24小时、48小时、72小时(具体取决于实验),如图所示。用ELISA读数器测量吸光度(OD 492nm)。死细胞%指相对于未处理的细胞(0%)。

[0357] 结果

[0358] 在植入小鼠黑色素瘤细胞的免疫活性小鼠体内,研究了B0-112制剂的体内抗癌效果。在三周期间,用PBS溶液或三种不同浓度(0.05、0.5、或2.5mg/kg,优选肿瘤内施用)的B0-112制剂联合鼠抗PD-L1抗体(优选全身施用)治疗小鼠,并与单独施用载体相比(图7A)。与单独的载体相比,与载体组合使用的抗PD-L1抗体没有显著增加存活。与仅载体或仅抗PD-L1相比,与抗PD-L1(和可能独立形成这种抗体)联合的所有三种待测B0-112制剂组合显著增加了小鼠的存活。此外,与较低剂量的B0-112制剂相比,在2.5mg/kg B0-112制剂+抗PD-L1的组合中存活显著增加(图7B)。的确,在这种模型中,单独施用B0-112制剂可以明显减少肿瘤的生长(图7C-图7D)。在类似的黑色素瘤小鼠模型中,在肿瘤内注射的远端作用模型中还测试了这种组合的作用,其中B0-112制剂不仅减小注射的肿瘤块的尺寸,而且还减小了未注射的肿瘤块的尺寸,因此证实了B0-112制剂的局部和全身抗肿瘤作用(图8)。

[0359] 抗PD-L1抗体是重要且经过验证的抗癌药物,并且是针对癌细胞进行有效免疫反应的调节剂。我们的实验表明,B0-11X复合物可与其他抗癌药联合使用,并且B0-11X化合物与其他抗癌药(例如抗PD1)的组合比单独的抗癌药具有更强的功效,导致存活和抗肿瘤功效显著提高。此外,存活(或免疫记忆细胞,以及更一般为全身性治疗反应)的改善,与B0-

11X制剂相对于该组合的剂量增加有关,支持增加的存活益处是B0-11X制剂介导的。在没有抗PD-L1或任何其他治疗时,在分别基于4T1(图9)和基于MC38(图10)的乳癌和结肠直肠癌两种模型中,也证实了B0-112制剂的这种抗癌体内功效。B0-112不仅减少了4T1乳癌模型中的肿瘤生长,而且还改善了MC38结肠癌模型中的小鼠存活,在结肠癌模型的情况下,还使用了两种不同的方法(用癌细胞进行或不进行再攻击;图10和图11)。

[0360] 因此,B0-11X制剂可以(单独地;或与其他抗癌药(例如抗体)、免疫疗法、或化学疗法组合,可以使用相同或不同的途径施用)用于治疗黑色素瘤和其他癌症适应症,具体是那些允许在肿瘤周或肿瘤内注射的癌症,例如胰腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、肾癌、肝细胞癌或结肠直肠癌。此外,B0112通过促进免疫细胞记忆来诱导全身免疫,使其可用作单一治疗剂。

[0361] 在此范围内,对特定生物学途径和作用机制的鉴定可指导最合适的剂量、方案、与其他药物或疗法的组合、以及B0-11X制剂的适应症,如针对靶向PD-1、CTLA4、PD-L1或CD137的免疫调节型单克隆抗体与聚(I:C)制备物的联合作用所示的,其增强树突细胞的活性(Sanchez-Paulete AR等人2015)。为此,Duewell P等人2015公开了可用于测试本发明组合物用于胰腺癌免疫疗法的替代性疾病动物模型。

[0362] 在聚(I:C)分子的浓度范围内(例如0.5、1、2、2.5或5mg/kg)通过进行肿瘤内(i.t.)施用的体内研究,来测量B0-11X制剂对肿瘤生长(局部和/或远端)的治疗作用和抗肿瘤免疫反应,存在或不存在共-施用其他药物或疫苗的情况下,用以评估这种治疗如何改善相关模型(例如小鼠黑色素瘤、乳癌、卵巢癌、平滑肌肉瘤、子宫内膜癌、或胰腺癌模型)的小鼠存活。同时,可使用人或动物样本,在凋亡诱导(通过Caspase-related Glow)的水平上、免疫原性细胞死亡诱导(例如MHC-1、钙网蛋白、CD95或HMGB1表达)的水平上、生物流体中趋化因子/细胞因子分泌(例如IL-6和IP-10的分泌)的水平上、体外细胞激活和/或增殖(例如,与相关细胞类型中CD40、CD86、CD69的上调有关)的水平上,平行地离体评估B0-11X治疗所诱导的特定生物活性的剂量反应研究。可以使用肿瘤内、淋巴器官中或血液中直接参与疾病的细胞(例如肿瘤细胞、上皮细胞、内皮或上皮细胞)、或由于进行某些免疫或免疫调节活动而间接参与疾病的细胞(例如人外周血单个核细胞、NK细胞、B细胞、CD4+/CD8+T细胞、树突细胞),来进行这些研究。这些研究还可能涉及采用不同施用途径(例如皮下或肌肉内施用)进行B0-11X治疗的作用,以建立B0-11X临床应用的不同时间表,以及确立在癌症有关和/或感染有关的疫苗接种中B0-11X作为佐剂的适用性。

[0363] 这些研究可以进一步与分子的鉴定有关,所述分子可以用作生物标记物以预测对B0-11X的反应(或缺乏反应),从而对疾病阶段和/或针对B0-11X治疗对患者群进行分层。具体地,通过比较免疫细胞(例如NK细胞、B细胞、CD4+/CD8+T细胞)以及动物模型中肿瘤生长动力学的定性和/或定量特征,来分析B0-11X的活性,其中当与B0-11X组合施用(例如,通过共同施用T细胞耗尽或激活抗体、病毒、细菌或癌抗原、基于细胞的治疗(例如过继T细胞疗法)、或具有佐剂特性的化合物)、特定细胞类型被耗尽或被激活时,在所述动物模型中还可测量特定细胞标记物和亚群中的变化。

[0364] 在类似于先前描述的癌症动物模型中探索特定的免疫细胞的参与,其中施用B0-112制剂之后,针对免疫细胞的耗竭或肿瘤内存在的特定免疫细胞群,评估了用B0-112制剂进行的治疗。CD4阳性T细胞的耗竭改善了B0-112制剂的作用,表明B0-112与靶向CD4 Treg的药物联合治疗的临床潜力(图12A和图12B)。CD8阳性T细胞的耗竭表现为降低B0-112制剂

在小鼠肿瘤模型上的抗肿瘤作用,这证实了在BO-112抗肿瘤介导的作用中获得性免疫反应的参与。此外,通过肿瘤内注射BO-112制剂可以修饰肿瘤浸润淋巴细胞中特定细胞群的表达,不仅CD45/CD8阳性T细胞显著增加,而且CD8阳性细胞中的CD137的阳性率、OVA和Trp2四聚体、PD-1和干扰素 γ 表达也显著增加,这些作用在CD4阳性细胞中得到了部分证实;在相同模型中,针对内源性肿瘤抗原Trp2的特异性CD8+T细胞在肿瘤引流淋巴结中也增加(图12C和图12D)。

[0365] 这些数据证实BO-112制剂促进针对肿瘤的适应性免疫反应并能够诱导全身免疫。BO-112诱导肿瘤细胞死亡、促进T细胞浸润和激活的强大作用,为了与靶向肿瘤进展互补机制(例如免疫抑制)的药物进行临床组合而提供了证据(Chen DS和Mellman I, 2013)。BO-112治疗后肿瘤中CD4+和CD8+ T细胞的激活证明了IFN信号传导通路的激活。IFN γ 在抗肿瘤的全身和局部免疫中起着关键作用,但也能诱导癌细胞中PD-L1的表达,其机制被认为削弱了局部肿瘤免疫并促进了免疫抑制(Abiko K等人2015)。不同小鼠肿瘤模型中的BO-112肿瘤内施用可诱导肿瘤细胞中PD-L1的表达,这支持了PD-1/PD-L1靶向药物和BO-112进行联合治疗的合理性。有希望的组合包括靶向其他免疫检查点抑制剂的药物,以解除肿瘤细胞和/或肿瘤微环境所诱导的免疫抑制,例如CTLA4、Tim-3、LAG3或IDO。

[0366] 在对IFN无反应的细胞中,也检测到BO-112制剂对肿瘤细胞有效且直接的细胞毒性作用(对患者选择和BO-112治疗具有相关的临床意义)。不依赖于癌细胞对干扰素的反应能力,BO-112制剂似乎也引发肿瘤细胞死亡(图13)。IFN- γ 受体信号传导中的功能丧失型突变或抗原呈递机制介导对PD-1阻断疗法的原发性耐受性和获得性耐受性的一些情况(Zaretsky J等人2016)。在肿瘤细胞中BO-112激活RIG1/MDA5途径代表了一种克服IFN- γ 耐受性的策略,并可能使肿瘤对自体CD8+T细胞疗法重新敏感。在某些肿瘤类型中,早期染色体异常可能会导致获得性IFN γ 耐受性和T细胞耐受性,因此在进行免疫治疗之前筛选患者转移的染色体异常和基因突变,以确定耐受性发展的风险,可能有助于选择将得益于BO-112疗法的患者。

[0367] 文献提供了一些证据,肿瘤中细胞的人组织标本(包括黑色素瘤、乳腺浸润癌、前列腺癌、肺腺癌和结肠直肠癌)携带JAK1和JAK2的改变,包括JAK1或JAK2中的功能丧失改变,其可能会降低JAK1或JAK2的信号传导(同型缺失(homodeletion)、截短突变、或基因或蛋白下调)。这些证据可能有助于选择患者,考虑到他们肿瘤内的突变负荷,这些患者将尤其得益于BO-112疗法。

[0368] 实施例3使用BO-112制剂的临床研究

[0369] 涉及动物模型中施用BO-112的临床前研究,可作为建立临床研究的基础,在该临床研究中,通过施用BO-112(例如通过肿瘤内递送)寻求更安全更集中的增强局部和全身性抗肿瘤作用。首先在人的概念验证性临床试验(NCT02828098)中分析肿瘤内施用BO-112作为免疫调节疗法的潜力及其毒性/安全性谱。带有癌症病灶的患者可以进行肿瘤内注射,如恶性实体瘤和可感知的皮肤/皮下或淋巴结转移(>1cm),并且从所述患者中可获得活检样本,从含有至少>0.5mg/mL浓度的聚(I:C)分子的BO-112制备物开始,通过肿瘤内注射以不同的剂量水平用BO-112对其进行治疗(每剂量0.6mg-1mg聚(I:C)含量,1-3剂量,一周一次剂量)。例如,在开始治疗之前,和最后一次剂量后的7-14天,或者在6周后,对注射的病灶进行活检。针对临床相关的指征(sign)、和先天性或适应性免疫系统反应和信号传导通路,平

行地评估患者。还可以在血浆中评估BO-112药代动力学和循环细胞因子(例如I型干扰素、TNF- α 和IL-6)。

[0370] 初步结果表明,患者没有经历相关的毒性反应,只有两次血小板减少症,没有治疗就可以恢复。肿瘤内递送后在血流中未检测到BO-112。根据以下至少一种肿瘤相关标准,BO-112确定所有患者在统计学和治疗上的相关变化:注射的肿瘤的尺寸、外观或未发生转移、癌细胞的凋亡和坏死(证明肿瘤中BO-112制剂触发的免疫原性细胞死亡)、CD4阳性肿瘤浸润T细胞的增加、CD8阳性肿瘤浸润T细胞的增加、循环免疫细胞(包括NK细胞、树突细胞、单核细胞和/或T调节细胞、呈现特定标记物(例如CD16或PD-1)的总或特定亚群)的增加。

[0371] 当BO-11X制剂(或BO-11X_m制剂)通过肿瘤内注射临床施用,在肿瘤中观察到凋亡和/或坏死,可能是由于直接的抗肿瘤作用联合了肿瘤中其他驻留细胞对抗肿瘤反应的激活(例如,通过促进肿瘤抗原向树突细胞的递呈)。而级联反应也可能导致免疫细胞的募集和/或激活,特别是CD4⁺和CD8⁺ T细胞进入肿瘤块,从而促进抗肿瘤的免疫作用,促进BO-11X的细胞毒性作用。还触发了免疫细胞群(如CD8、CD4、CD4 Treg、NK T、NK、CD16⁺单核细胞或DC)的系统性变化,这能够增强原发性和记忆性抗肿瘤反应。

[0372] BO-11X制剂(或BO-11X_m制剂)可以作为单一药剂施用、或与方案中通过其它施用途径以及不同的频率而提供的其他抗癌疗法进行组合(如检查点抑制剂或其他免疫肿瘤药剂(连同、或不连同化学疗法和放射疗法)),所述方案在一个或多个治疗周期中不仅涉及随后的肿瘤内注射,还包括替代的施用途径,例如皮下或肌肉内施用(图14A和14B,还包括抗CTLA4、抗PD-1或抗PD-L1的伴随疗法)。BO-11X治疗的周期,可以确定为在相同或不同肿瘤病灶中预定次数的肿瘤内注射(在一、两、三、四或更多周内,从一个到四个或更多连续注射)。

[0373] 在上述人类首次临床试验的第二部分中,除了用抗PD1抗体连续治疗之外,对抗PD1抗体治疗无反应的患者提供多剂量的BO-112(请参见图14B)。如基于成像技术通过总肿瘤负荷、以及在肿瘤组织和循环免疫细胞中评估的生物学活性所测量的,在临床试验中对治疗的临床反应进行了评估(见图15)。然后,可以进行数次肌肉内注射或皮下注射(在一、四、七、十五或更多周内,从一到七次或更多次连续的注射),根据患者的反应,以相同的方案重复该周期(或通过延长注射间隔)。与肿瘤内注射相比,这些肌肉内或皮下注射中的BO-11X制剂可在施用前进行稀释,以提供更低剂量的聚(I:C)分子(例如肿瘤内注射剂量的50%、25%、10%、5%、1%),但它们仍可以维持肿瘤内注射的初始治疗和/或免疫调节作用。除上述参数外,还可以通过身体检查、CT扫描、MRI扫描或其他用于评估肿瘤负荷的成像技术评估临床反应。

[0374] 或者,也可以使用从患者分离的细胞,离体施用BO-11X制剂(或BO-11X_m制剂),具体是为了提高特定免疫细胞(如树突细胞)的成熟、功效和/或激活(图14C)。此方法可用于树突细胞的体外成熟,如针对新抗原、过继性T细胞、细胞裂解物、癌症、妇科疾病和/或感染相关用途的文献中所述(Vanderlocht J等人2010;Gallois A和Bhardwaj N,2013;Da Silva DM等人2015;Fritsch EF等人2014;González FE等人2014;Tai LH等人2013;Hammerich L等人2015;Hervas-Stubbs S等人2012;Ochoa MC等人2017;Osada T等人2015;Perica K等人2015)。同样在这种情况下,在体外/离体方法中,BO-11X制剂可能会在施用前进行稀释,以提供比肿瘤内注射低的聚(I:C)分子剂量(例如,肿瘤内注射剂量的50%、

25%、10%、5%、1%，但可以在基于细胞的模型中为了验证B0-11X制剂所用的剂量和浓度范围内，如实施例1所公开)。这些剂量仍然可以提供适用于这种治疗方法的治疗性和/或免疫调节作用，需要或者无需在同一患者中稍后应用B0-11X治疗周期。

[0375] 通过使用以上所列的任何施用途径和方案，鉴于在患者中使用活检、血液样本所测得的一个或更多组合标准、和/或其他临床标准，可以验证B0-11X制剂(或B0-11Xm制剂，例如B0-112制剂)(请参见上文和图15A)。因此，除了直接评估肿瘤尺寸和转移外，通过方法来确定B0-11X制剂的治疗功效，其中评估了以下三种通用标准中的至少一种：对癌细胞的直接细胞毒性(癌细胞的凋亡和坏死)、肿瘤浸润的增加、免疫细胞(例如CD4阳性和/或CD8阳性肿瘤浸润T细胞)的增加、血液中循环的免疫细胞的增加(淋巴细胞、NK细胞、单核细胞、树突细胞、巨噬细胞、B细胞等的总群体或特定亚群)、和/或治疗前与治疗后的患者在有反应的或无反应的患者中呈现一些差异表达(通过RNA测序或其他质量测序方法确定的)。

[0376] 该验证过程还可能涉及在分子水平上的后续活动，例如筛选mRNA和/或特定蛋白组合的蛋白表达，以便不仅可以确认治疗的功效，还可以确认是否应用其他(以前发现无效的)治疗，因为B0-11X(或B0-11Xm)施用增强了患者的反应性。可在B0-11X或B0-11Xm治疗的患者中鉴定出的这种特征和替代方案的示例，可以在文献中获得，例如关于干扰素表达和/或其他待鉴定的获得对基于PD-1疗法耐受性的标记物，从而对患者进行潜在的救助(Zaretsky J等人2016;Masucci G等人2016)。因此，使用B0-11X制剂，例如单独使用B0-112和/或与可提供进一步治疗益处的其他药物、标准护理方案、或免疫疗法组合使用，安全性、有效性和免疫生物学数据将为选择B0-11X(或B0-11Xm)剂量用于未来的临床试验提供理论依据(图15B)。

[0377] B0-112制剂的治疗功效正在临床评估中，有两个初步的实施例可进一步说明相关的临床作用(图16和图17)。这些初步结果证实了B0-112在减少癌症病灶中的功效，无论是否伴随施用抗CTLA4、抗PD1和/或抗PD-L1抗体，证明其安全性和预期的生物学作用，具有解决癌症患者用检查点疗法难治愈并诱导免疫原性细胞死亡和抗肿瘤免疫的潜在作用。此外，这些初步结果表明，除2例血小板减少症患者外(都恢复了，一例输注了血小板，另一例未接受治疗)，患者没有发生临床相关的毒性反应。肿瘤内递送后在血流中未检测到B0-112。B0-112在下列至少一个肿瘤相关标准中，对所有患者显示出治疗相关性改变：注射肿瘤的尺寸、癌细胞的凋亡和坏死、CD4阳性肿瘤浸润性T细胞增加、CD8阳性肿瘤浸润性T细胞增加、循环免疫细胞(包括NK细胞、树突细胞、单核细胞和/或T调节细胞)增加、呈现出特定的标记物(例如CD16或PD-1)的总或特定亚群。

[0378] 实施例4在患者中由于施用B0-112制剂而评估生物作用

[0379] 材料与方法

[0380] 为了分析凋亡、坏死、免疫浸润和炎性基因RNA表达谱，可以从注射的转移性病灶中获得治疗前和治疗后的活检(例如，使用Nanostring平台和人类基因的特定盘，例如由制造商所列的那些，如PanCancer Pathways、PanCancer Immune Profiling或PanCancer Progression Panels)。在治疗前和治疗后的血液样本中依次研究了药代动力学、血清细胞因子和循环免疫细胞。

[0381] 使用nSolver分析软件(NanoString, Inc.)，首先将计数相对于阴性对照的几何平均值进行归一化，所述阴性对照加到分析中以校正实验变异性。然后，将几何平均值用于计

算阳性对照的归一化因子,最后相对于Human Immunology盘中设置的看家基因进行归一化。详细的归一化分析指南可以在NanoString Technologies网站 (<http://www.NanoString.com>) 找到。归一化的数据被测量为计数。将nSolver程序的归一化数据对750个内源基因进行对数转换(以2为底)。

[0382] 在治疗前和治疗后获得了12位患者的nCounter芯片数据。对于每个基因,使用配对t检验评估差异表达。使用的设计矩阵为:

$$[0383] \begin{pmatrix} \text{前 } 1 \\ \text{后 } 1 \\ \text{前 } 2 \\ \text{后 } 2 \\ \text{前 } 3 \\ \text{后 } 3 \\ \dots \\ \dots \\ \text{前 } 12 \\ \text{后 } 12 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -1 & 1 & 0 & 0 & \dots & 0 \\ 1 & 1 & 0 & 0 & \dots & 0 \\ -1 & 0 & 1 & 0 & \dots & 0 \\ 1 & 0 & 1 & 0 & \dots & 0 \\ -1 & 0 & 0 & 1 & \dots & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 1 & \dots & 0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ -1 & 0 & 0 & 0 & \dots & 1 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & \dots & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \\ \beta_2 \\ \beta_3 \\ \dots \\ \beta_{12} \end{pmatrix}$$

[0384] 其中 β_0 以及 β_1 至 β_{13} 是治疗前后之间的差异表达。治疗后改变为更高表达的基因,显示出阳性倍数变化。使用limma软件包构建了nCounter数据的线性模型。针对多次比较,使用Benjamini和Hochberg方法对p值进行了校正。聚类显著值 $p < 0.05$ 的基因。所有基因表达分析均在R中进行。

[0385] 结果

[0386] 最初,使用从B0-112治疗的患者获得的细胞进行基因表达研究,可以鉴定有限数量的基因下调或上调,如表I所示。

[0387] 表I

基因符号	Uniprot 编号	基因描述
		(BO-112 治疗后的调节)
CYFIP2	Q96F07	细胞质 FMR1 相互作用蛋白 2 (下调)
LRRN3	Q9H3W5	富含亮氨酸重复的神经元 3 (下调)
IL8_2	????	白介素 8 (上调)
IRAK2	O43187	白介素 1 受体相关激酶 2 (上调)
SLC11A1	P49279	溶质载体家族 11 (质子偶联的二价金属离子转运蛋白), 成员 1, 天然耐受性相关巨噬细胞蛋白 1 (上调)
CD36	P16671	CD36 分子 (血小板反应蛋白受体) (上调)
BTK	Q06187	Bruton 丙种球蛋白血症酪氨酸激酶 (上调)
LY96	Q9Y6Y9	淋巴细胞抗原 96 (上调)
CD163	Q86VB7	CD163 分子 (上调)
CCL7	P80098	趋化因子 (C-C 基序) 配体 7 (上调)
IFI35	P80217	干扰素诱导蛋白 35 (上调)
CXCL1	P09341	趋化因子 (C-X-C 基序) 配体 1 (黑色素瘤生长刺激活性, α) (上调)
CTSL	P07711	组织蛋白酶 L1 (上调)
TLR2	O60603	toll 样受体 2, CD282 (上调)
CCL3	P10147	趋化因子 (C-C 基序) 配体 3 (上调)
IL8	P10145	白介素 8 (上调)
LAIR2	Q6ISS4	白细胞相关的免疫球蛋白样受体 2, CD306 (上调)
OAS3	Q9Y6K5	2'-5'-寡腺苷酸合成酶 3, 100kDa (上调)
IL1R2	P27930	白介素 1 受体, II 型, CD121b (上调)
IL10	P22301	白介素 10 (上调)
CREB5	Q02930	cAMP 反应元件结合蛋白 5 (上调)
MARCO	Q9UEW3	具有胶原结构的巨噬细胞受体 (上调)
MSR1	P21757	巨噬细胞清除剂受体 1, CD205 (上调)

[0389] 选择具有 ($\log_2$) 倍数变化、p值和调整后的p值的基因。通过该分析,发现23种基因在肿瘤内治疗前和治疗后差异表达 ($p < 0.05$) (因此可能既包含癌细胞又浸润了免疫细胞)。上表I中列出的基因可能与一个或多个GO(基因本体论 (gene ontology)) 类别相关,这些类别与免疫反应或防御 (针对存在的或潜在的内部和/或侵入性威胁) 的频率、速度或范围的调节 (但优选激活或增加) 相关,通常是免疫和/或炎症过程、或对有机、无机或生物药剂的其他反应。这样的GO类别包括具有系统名称的那些:M14329、M11976、M10574、M13496、M12904、M13657、M12866、M10700、M16728和M16306。具体为,与巨噬细胞特别相关的三个基因 (CCL7、MARCO、MSR1),一个激活DC的基因 (OAS3),一个与Th2 T细胞相关的基因 (LAIR2)。另外两个基因 (CD163、CD36) 对应于参与吞噬作用的受体。

[0390] 或者,可以根据它们的蛋白定位和/或酶活性来分析这些基因。在第一组的上调基因中,相应的蛋白是酶,其作用可以被小分子抑制,这些化学物质在许多情况下具有通过改变和TLR3有关或无关的免疫反应和/或针对癌症的反应而具有治疗特性。例如,IRAK2是TLR3信号传导的调节剂 (Jain A等人2014),OAS3是干扰素诱导的dsRNA活化酶,在细胞固有反应中起关键作用,而组织蛋白酶L1和BTK均是抗癌和/或免疫调节化合物的靶标 (Feng M等人2015;Molina-Cerrillo J等人2017;Ping L等人2017;Li YY等人2017;Sudhan D和Siemann D,2015)。在第二组的上调基因中 (MSR1、MARCO、LAIR2、TLR2、CD163、CD36、

SLC11A1、LRRN3),相应的蛋白是细胞表面受体,多种药剂(抗体或小分子)可激活(或抑制)其作用,这些化合物在许多情况下具有治疗特性。在第三组的上调基因(IL10、IL8、CCL3、CCL7、CXCL1、LY96)中,相应的蛋白是分泌蛋白,其与细胞表面受体的作用或相互作用可被多种药剂(抗体或小分子)抑制,在许多情况下这些化合物具有治疗特性。

[0391] 使用这些分类方案,然后在细胞系、组织样本或其他生物材料上测试适当的抗体、抑制剂或其他市售产品,有可能定义B0-11X施用如何通过影响一组与TLR3相关活性有关或无关的基因、免疫细胞和/或抗癌反应,来影响免疫反应和/或抗癌反应。上述方法可以导致一系列本发明的进一步实施方案,其中,用B0-11X制剂(包括B0-11Xm制剂)治疗后或治疗前,在患者细胞或组织中(例如肿瘤、血液样本或血液馏分)确定联合存在(和/或不存在)一个或多个基因在RNA和/或蛋白水平上的表达之后,将B0-11X制剂(包括B0-11Xm制剂)用于治疗患有疾病(例如癌症)的患者和/或用于预防疾病(例如癌症或感染)的方法中。这些方法可允许定义与以下相关的基因的表达特征:

[0392] (i) B0-11X制剂(或B0-11Xm制剂)的治疗有效量;

[0393] (ii) 预测受试者在B0-11X制剂(或B0-11Xm制剂)治疗后可能具有抗肿瘤或抗感染反应的治疗相关生物标记物:

[0394] (iii) B0-11X制剂(或B0-11Xm制剂)的治疗有效量,可以使受试者用B0-11X制剂(或B0-11Xm制剂)治疗后对化合物的治疗产生反应;和/或

[0395] (iv) 预测受试者在B0-11X制剂(或B0-11Xm制剂)治疗后可能会对化合物的治疗产生反应的治疗相关生物标记物。

[0396] 因此,使用检测/测量这些基因中任何一个的RNA和/或蛋白表达的方式,表I的任何基因均可用于以上(i)-(iv)中概述的用途和方法,这种方式是可商购的并且在普通技术中是可应用的,如RT-PCR或基于抗体的方法。具体地,在表1中所选基因(组)的协同上下调节,可用于定义当治疗性施用时对B0-11X(具体是B0-112)的生物学反应,并且在表现出特定疾病(尤其是特定的癌症相关适应症、临床分期和/或与其他药物的组合)的患者中与调节TLR3介导的活性、干扰素诱导和/或免疫反应有关。除了适用于以上所列技术的产品(例如核酸探针或抗体)外,使用各种可用于适当测试与B0-11X制剂(例如B0-112)施用的潜在相互作用的市售技术药剂,此类基因的生物学活性通常也得到很好的定义。

[0397] 此外,还有其他治疗剂可用于靶向表达受B0-11X制剂(或B0-11Xm制剂)治疗影响的蛋白。有利地,可以通过在相同组合物或不同组合物中将其施用,将靶向上述任何基因的药物与B0-11X制剂组合使用。

[0398] 参考文献

[0399] Abiko K等人2015.Br J Cancer;112:1501-9.

[0400] Ammi R等人2015.Pharmacol.Ther.;146:1 20-31.

[0401] Amos SM等人2011.Cancer Immunol.Immunother.;60:671-83.

[0402] Ayers M等人2017.J Clin Invest.;127(8):2930-2940.

[0403] Bald T等人2014.Cancer Discov.;4:674-87.

[0404] Bhoopathi P等人2014.Cancer Res.;74:6224-35.

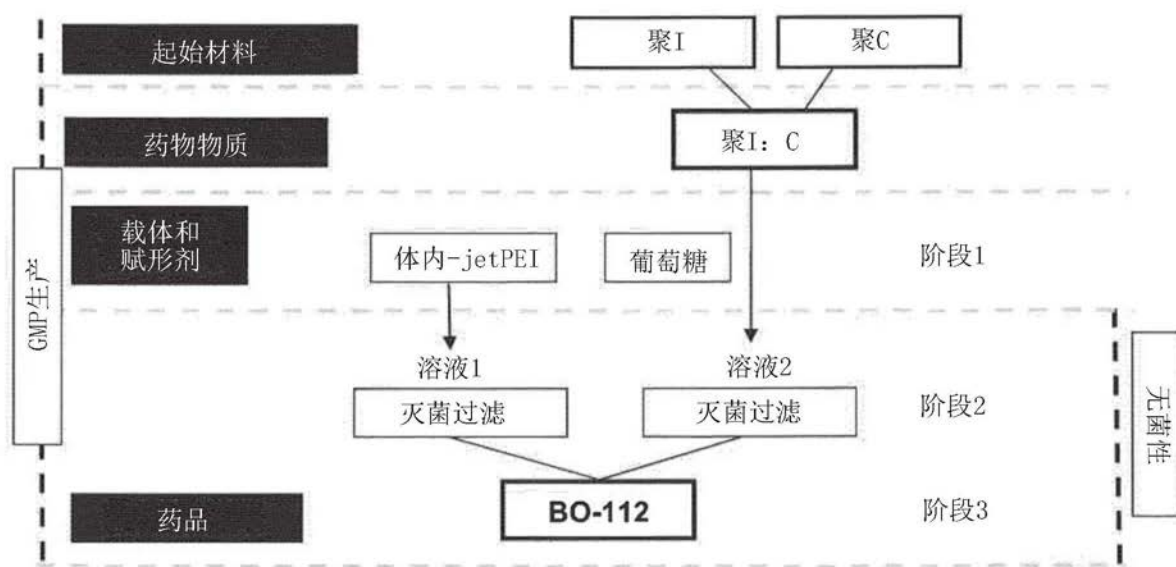
[0405] Bilensoy E,2010.Expert Opin.Drug Deliv.;7:795-809.

[0406] Budczies J等人2017.Genes Chromosomes Cancer;56(8):651-659.

- [0407] Chen DS和Mellman I,2013.Immunity;25;39:1-10
- [0408] Chen L等人2013.Int.J.Nanomed.;8:137-145.
- [0409] Chiba Y等人2013.PLoSOne.;8:e76159.
- [0410] Cho K等人2016,Immunobiology.222 (2) :394-398 (Epub 2016Aug 31) .
- [0411] Cobaleda-Siles M等人2014.Small.;10:5054-67.
- [0412] Da Silva DM等人2015.Papillomavirus Res.1;1:12-21
- [0413] DUEWELL P等人2015.,OncoImmunol.;4 (10) :e1029698.
- [0414] Ewel C等人1992.Cancer Res.;52:3005-10.
- [0415] Feng M等人2015.Proc Natl Acad Sci U S A.;112 (7) :2145-50
- [0416] Fritsch EF等人2014.Oncoimmunology.25;3:e29311
- [0417] Fujimura T等人2006.Eur.J.Immunol.;36:3371-80.
- [0418] Gallois A和Bhardwaj N,2013.Front Immunol.10;4:436.
- [0419] Galluzzi L等人2014.Oncotarget;5:12472-508.
- [0420] Garcia-Pascual C和Gomez R,2013.J.Endometr.;5 (suppl.1) :S13 (SP-04) .
- [0421] Germershaus O和Nultsch K,2015.Asi J Pharm Sci.10:159-175.
- [0422] Gong J等人2017.J Natl Compr Canc Netw.;15 (2) :142-147.
- [0423] González FE等人2014.Hum Vaccin Immunother.10 (11) :3261-9.
- [0424] Gupta S等人2016.Tumor Biol.37:12089-12102.
- [0425] Hafner A等人2013.Advanced Drug Delivery Rev.;65 (10) :1386-1399.
- [0426] Hammerich L等人2015.Mol Oncol.9 (10) :1966-81.
- [0427] Hervás-Stubbs S等人2012.J Immunol.189 (7) :3299-310
- [0428] Ho V等人2015.Oncotarget.6:27252-27266) .
- [0429] Islam M等人2014.Journal of Controlled Release;193:74-89.
- [0430] Jain A等人2014.Front Immunol.;17;5:553.
- [0431] Kabilova T等人2014.BMC Cancer.;14:338.
- [0432] Keir M等人2008.Annu.Rev.Immunol.;26:677-704.
- [0433] Kübler K等人2011.Eur.J.Immunol.;41:3028-39.
- [0434] Kurosaki T等人2009.Biomaterials,30:2846-2853.
- [0435] Le U等人2008.Canc.Biol.Ther.;7:440-447.
- [0436] Le U等人2009.Radiother.Oncol.;90:273-279.
- [0437] Levitzki A,2012.Front.Oncol.;2:4.
- [0438] Li YY等人2017.Expert Opin Ther Pat.;27:643-656.
- [0439] Lim J和Tan D,2017.Cancers (Basel;9 (8) .pii:E109.
- [0440] Ling H,2016.Adv Exp Med Biol.;937:229-37.
- [0441] Masucci G等人2016.J Immunother Cancer.4:76.
- [0442] **Matijević**T等人2011.Chemotherapy;57:460-7.
- [0443] McBain S等人2007.J.Mater.Chem.;17:2561-2565.
- [0444] Molina-Cerrillo J等人2017.Cancer Treat Rev.;58:41-50.
- [0445] Nagato T和Celis E,2014.Oncoimmunology;3:e28440.

- [0446] Ochoa MC等人2017.Immunol Cell Biol.95(4):347-355.
- [0447] Ohashi T等人2013.Int.J.Cancer;133:1107-18.
- [0448] Osada T等人2015.J Immunother.38(4):155-64
- [0449] Palchetti S等人2013.RSC Adv.;3:24597-24604.
- [0450] Perica K等人2015.Rambam Maimonides Med J.6(1):e0004.
- [0451] Perrot I等人2010.J.Immunol.185:2080-2088.
- [0452] Ping L等人2017.Oncotarget;8(24):39218-39229.
- [0453] Pozuelo-Rubio M等人2014.Nano-Oncologicals in Adv.Del.Sci.Tech., Springer,pp.453-470.
- [0454] Saheki A等人2011.Int.J.Pharm.;406:117-21.
- [0455] Sajadian A等人2014.Arch.Virol.;159:1951-1960.
- [0456] Sanchez-Paulete AR等人2015.Cancer Discov.;pii:CD-15-0510.
- [0457] Schaffert D等人2011.Pharm.Res.;28:731-741.
- [0458] Shabani M等人2010.Avicenna J.Med.Biotech.;2:123-130.
- [0459] Shin DS等人2017.Cancer Discov.;7(2):188-201.
- [0460] Storz U,2011.MAbs.3:310-7.
- [0461] Sudhan D和Siemann D,2015.Pharmacol Ther.;155:105-16.
- [0462] Szabo A等人2012.Melanoma Res.;22:351-361.
- [0463] Tai LH等人2013,Clin Cancer Res.19:5104-15.
- [0464] Tan S等人2016.Protein Cell;7(12):866-877.
- [0465] Taura M等人2010.Cancer Sci.;101:1610-7.
- [0466] Tormo D等人2009.Cancer Cell;16:103-114.
- [0467] Tutin-Moeavin I等人2015.Org&Biomol Chem.13:9005-9011.
- [0468] Umemura N.等人2012.Cancer Res.72:45-55.
- [0469] Vacchelli E等人2013.Oncoimmunology;2:e25396,e23510,e25595.
- [0470] Van der Jeught K等人2015.Oncotarget;6:1359-81.
- [0471] Vanderlocht J等人2010.Int J Immunopathol Pharmacol.;23(1):35-50.
- [0472] Vega-Letter A等人2016.Stem Cell Res.&Ther.7:150
- [0473] Yoshino H和Kashiwakura I,2013.Blood;122:4721.
- [0474] Yu L等人2016.Immunol Cell Biol.94:875-885.
- [0475] Zaretsky J等人2016.N Engl J Med.375:819-829
- [0476] Zhang Y等人2014.Cancer Lett.355:76-84.
- [0477] Zhou Y等人2013.Innate Immun.;19:184-192。

A)



B)

尺寸分布 (通过强度)

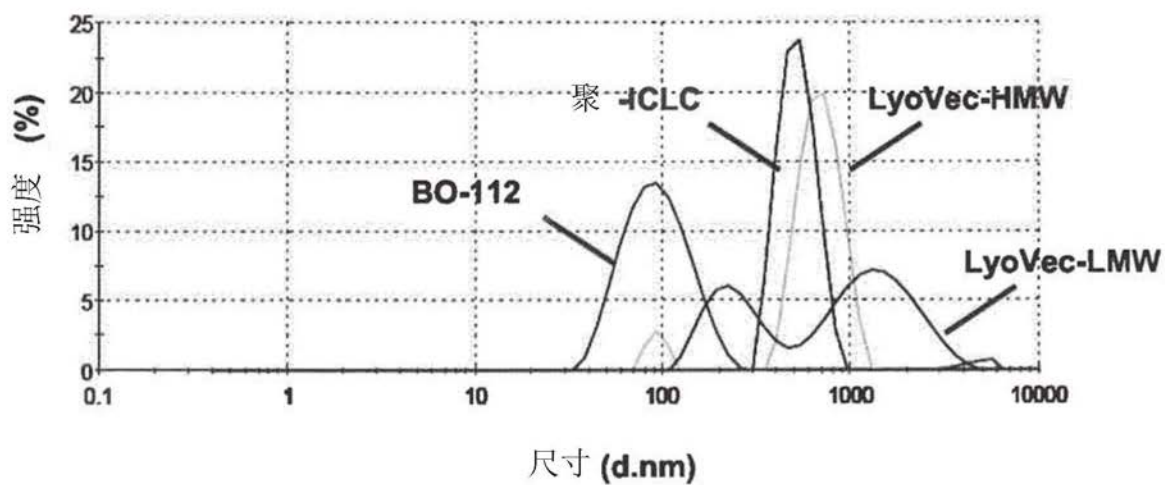


图1

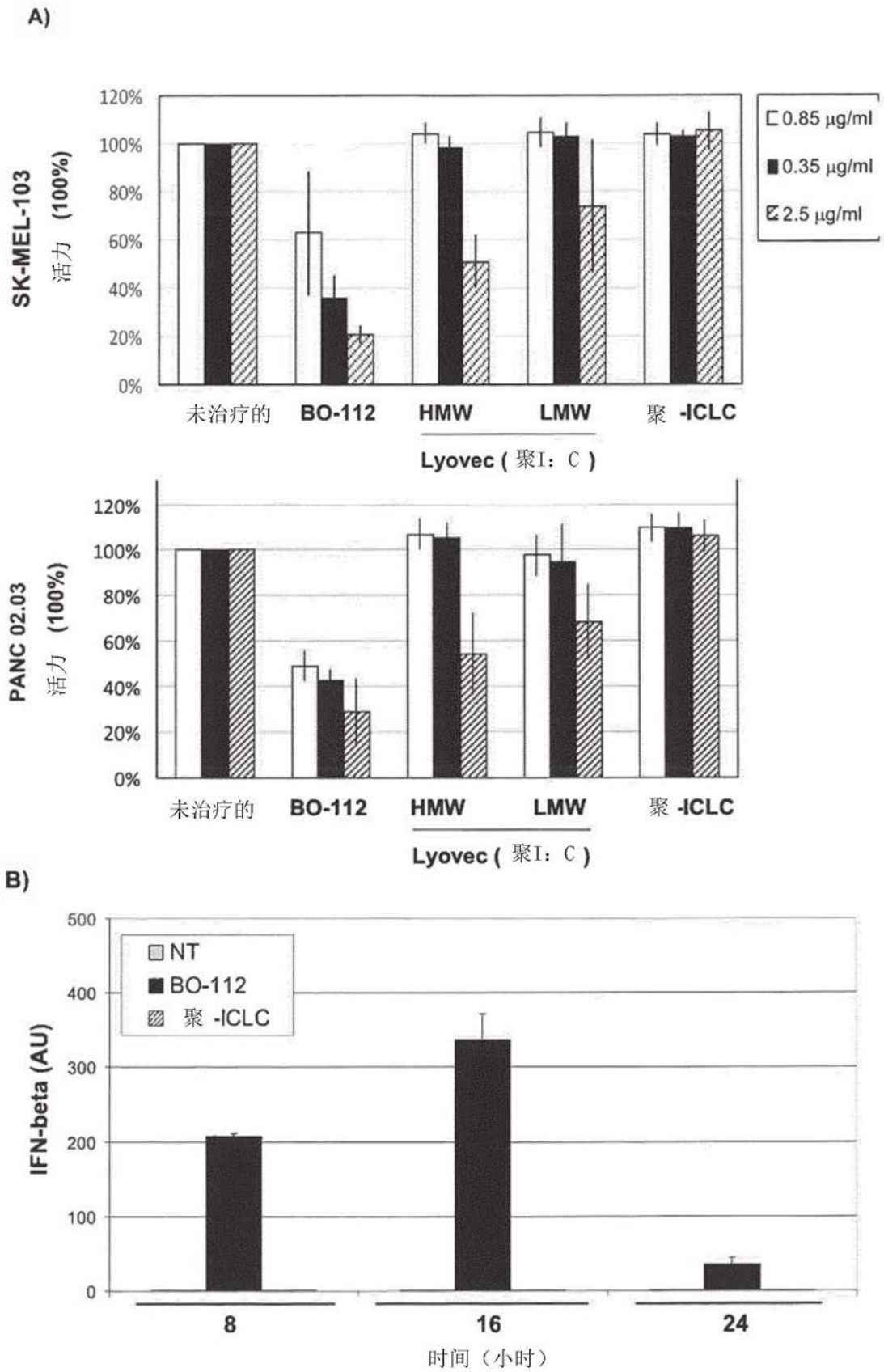


图2

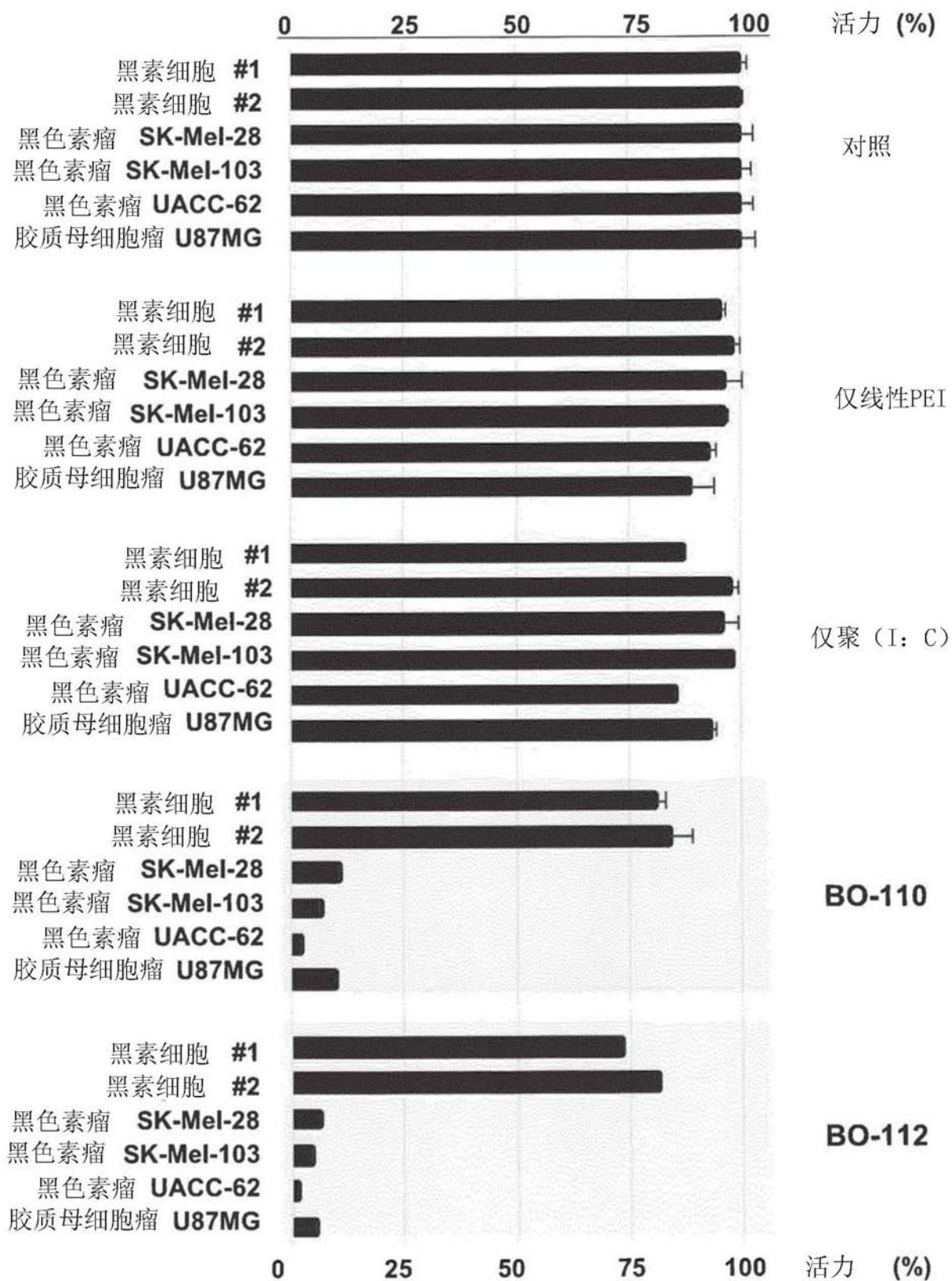


图3

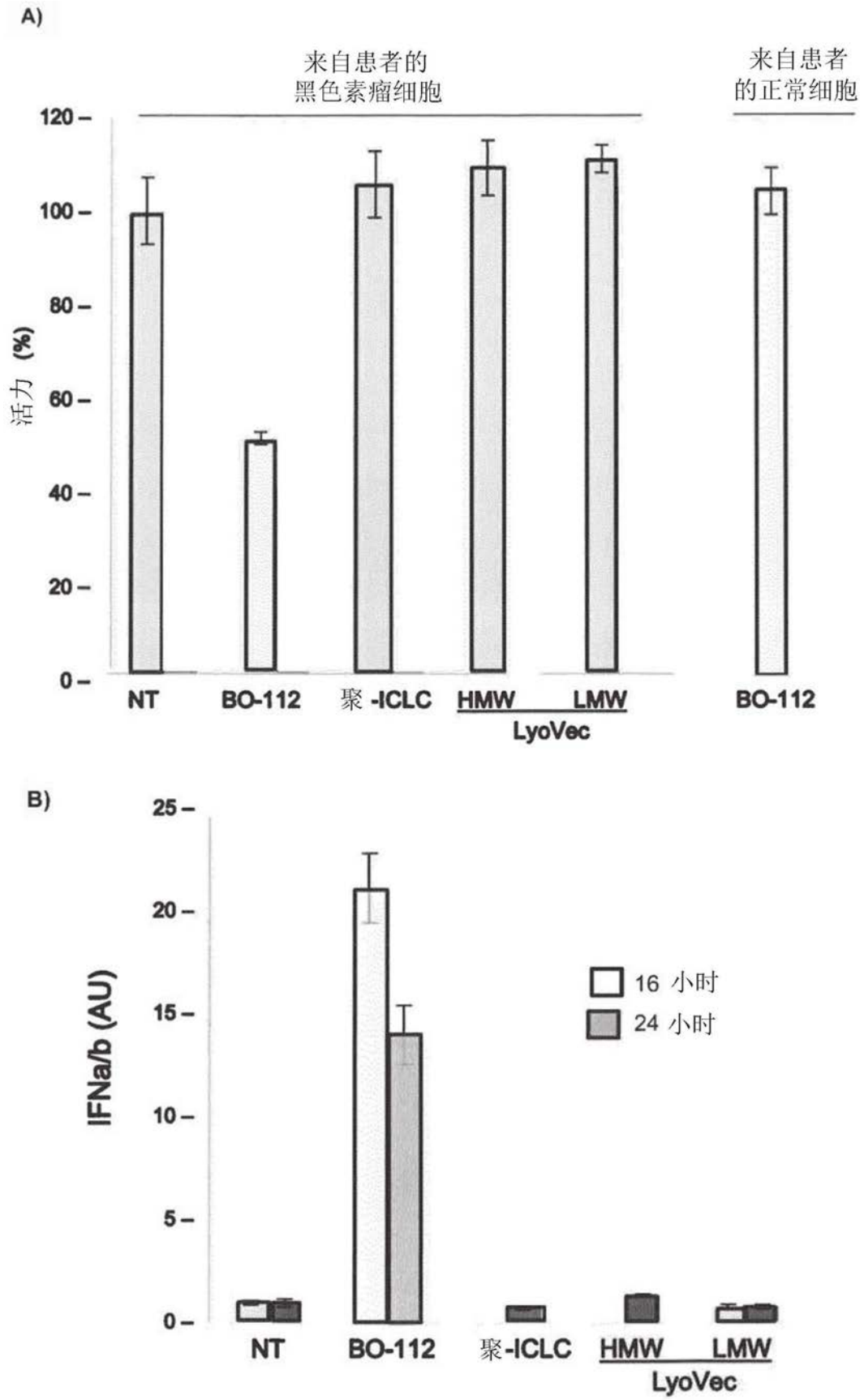


图4

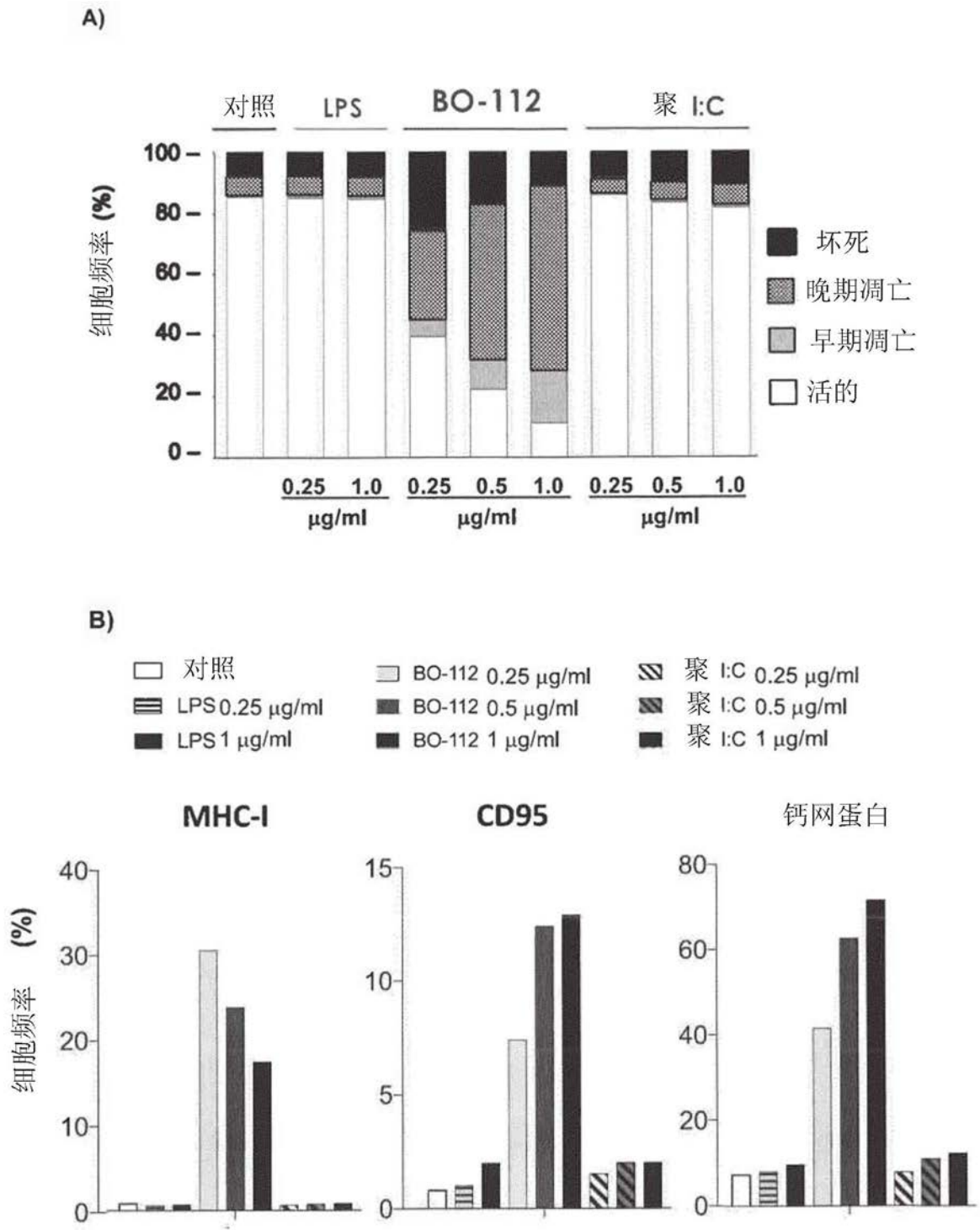


图5

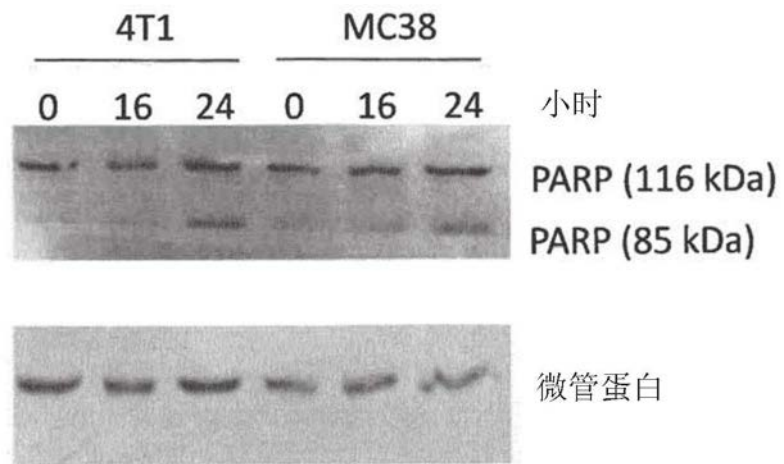


图6

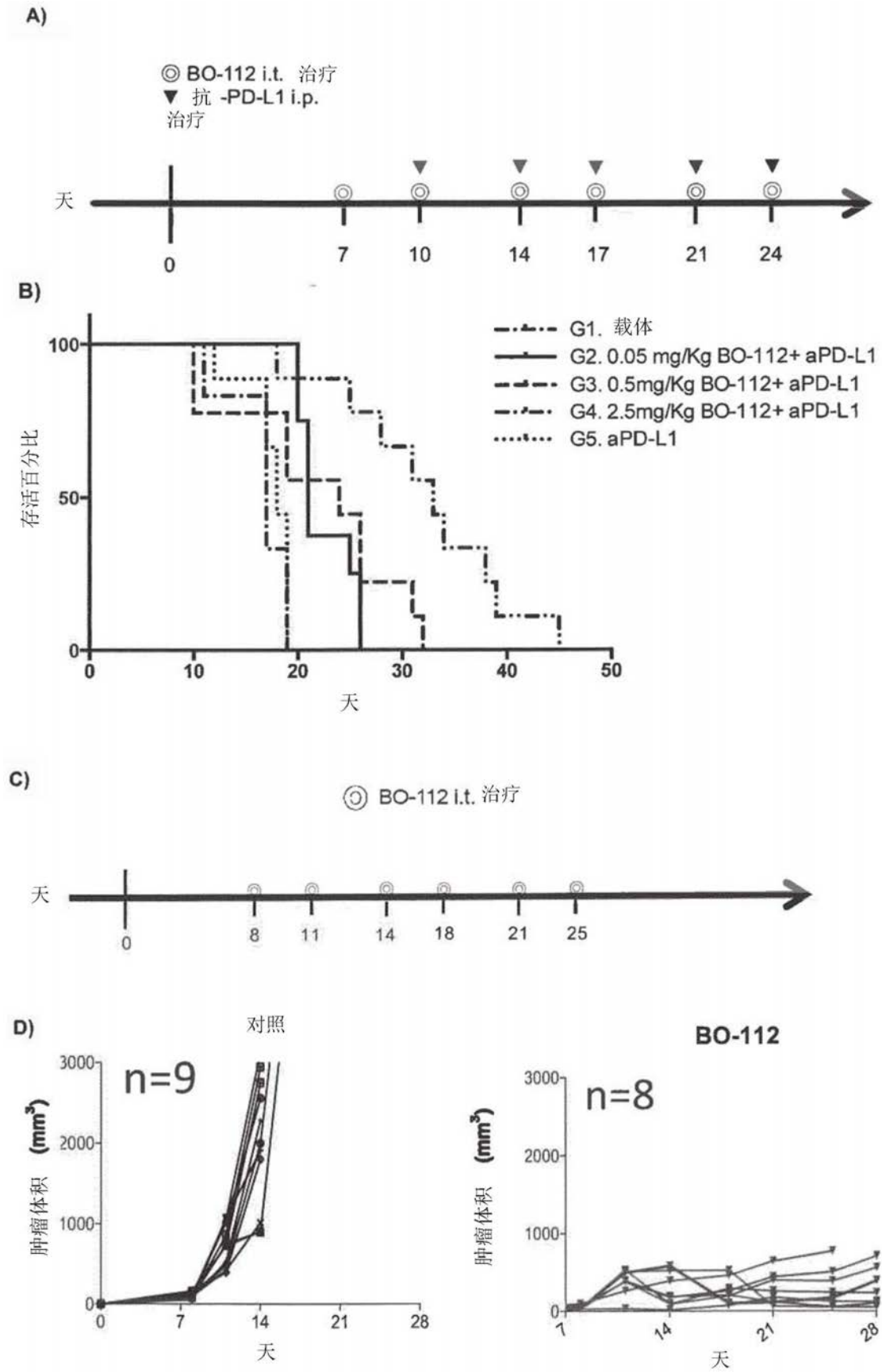
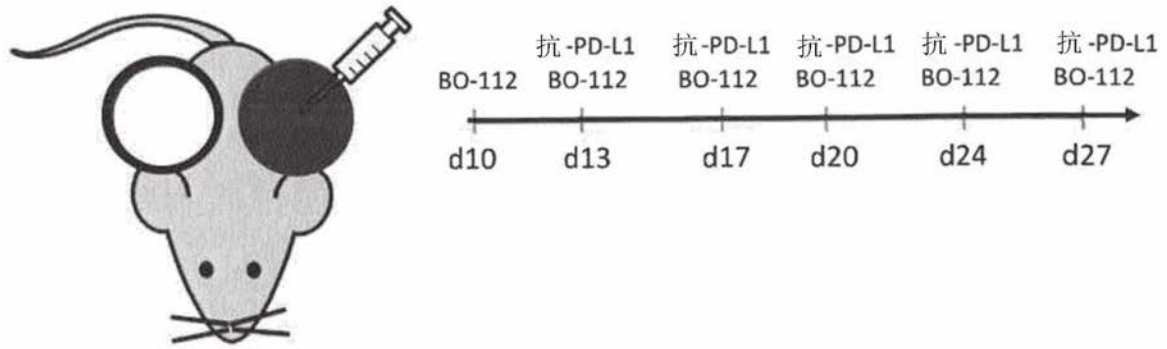


图7

A)



B)

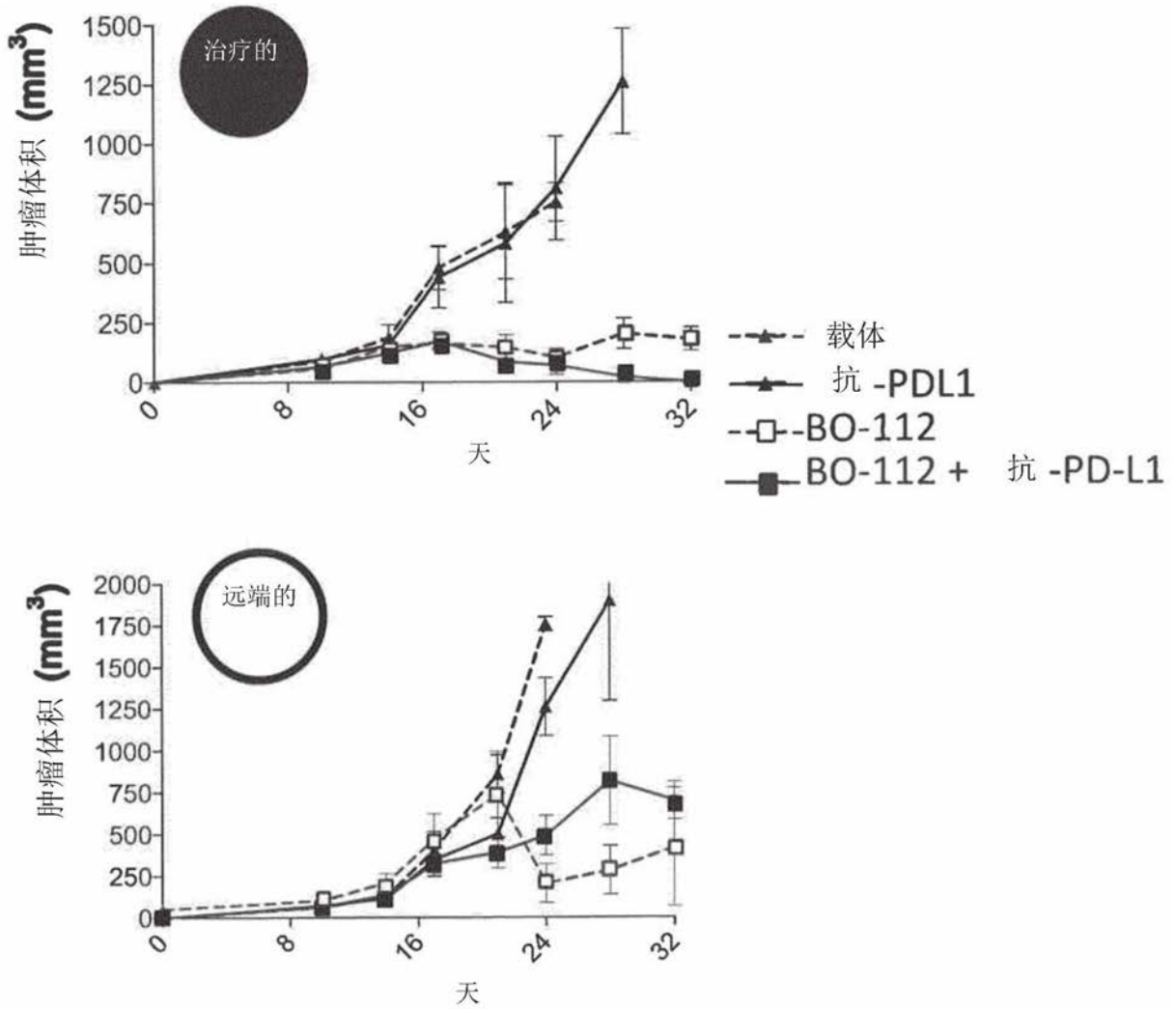
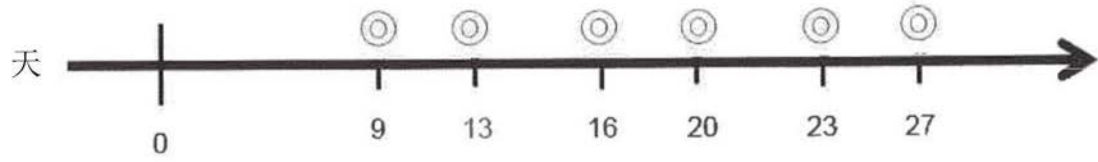


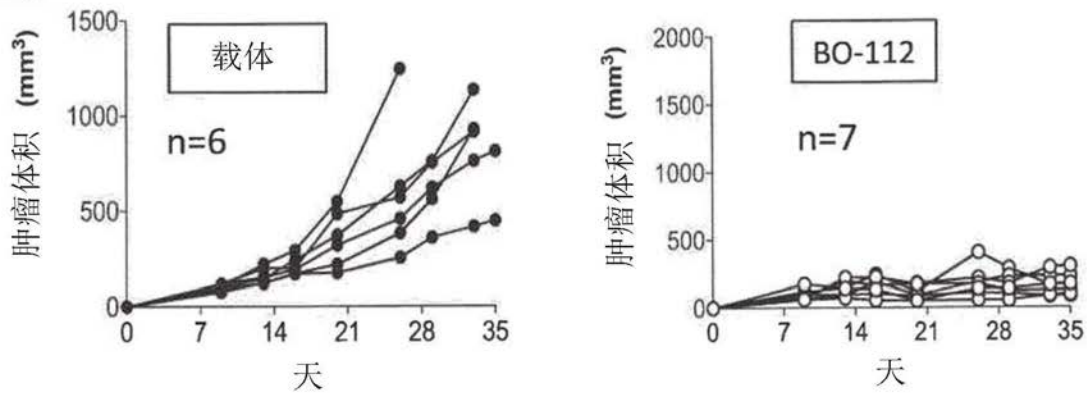
图8

A)

◎ BO-112 i.t. 治疗



B)



C)

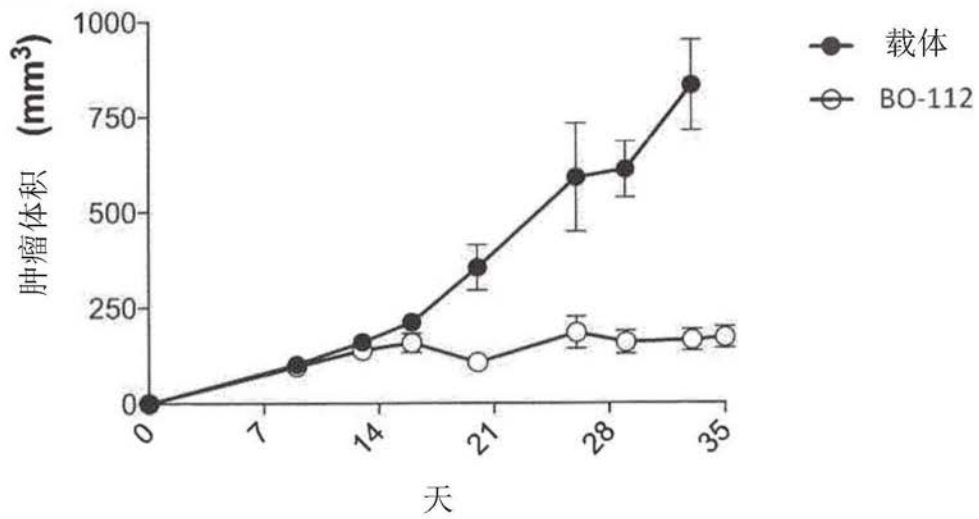


图9

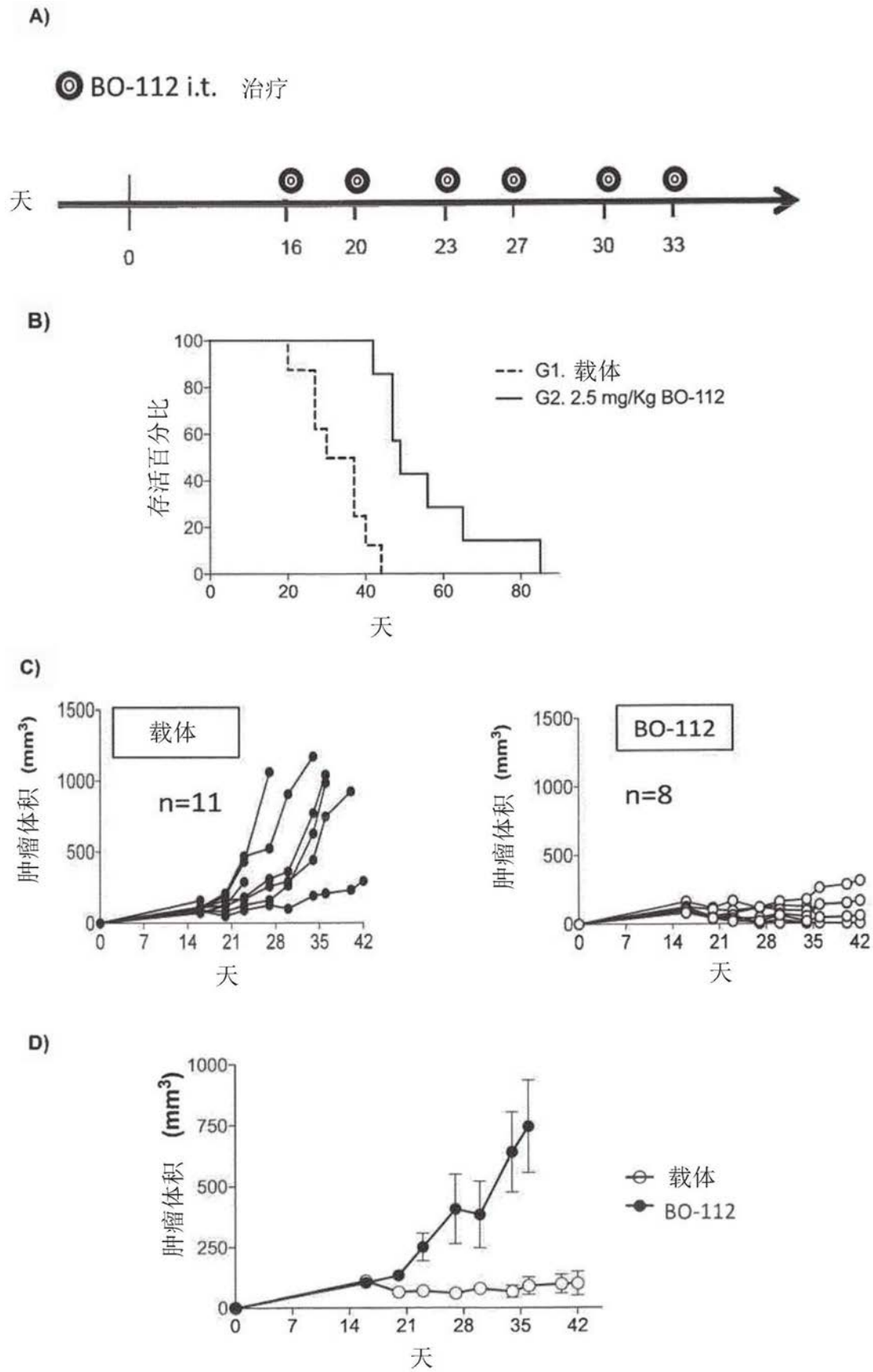


图10

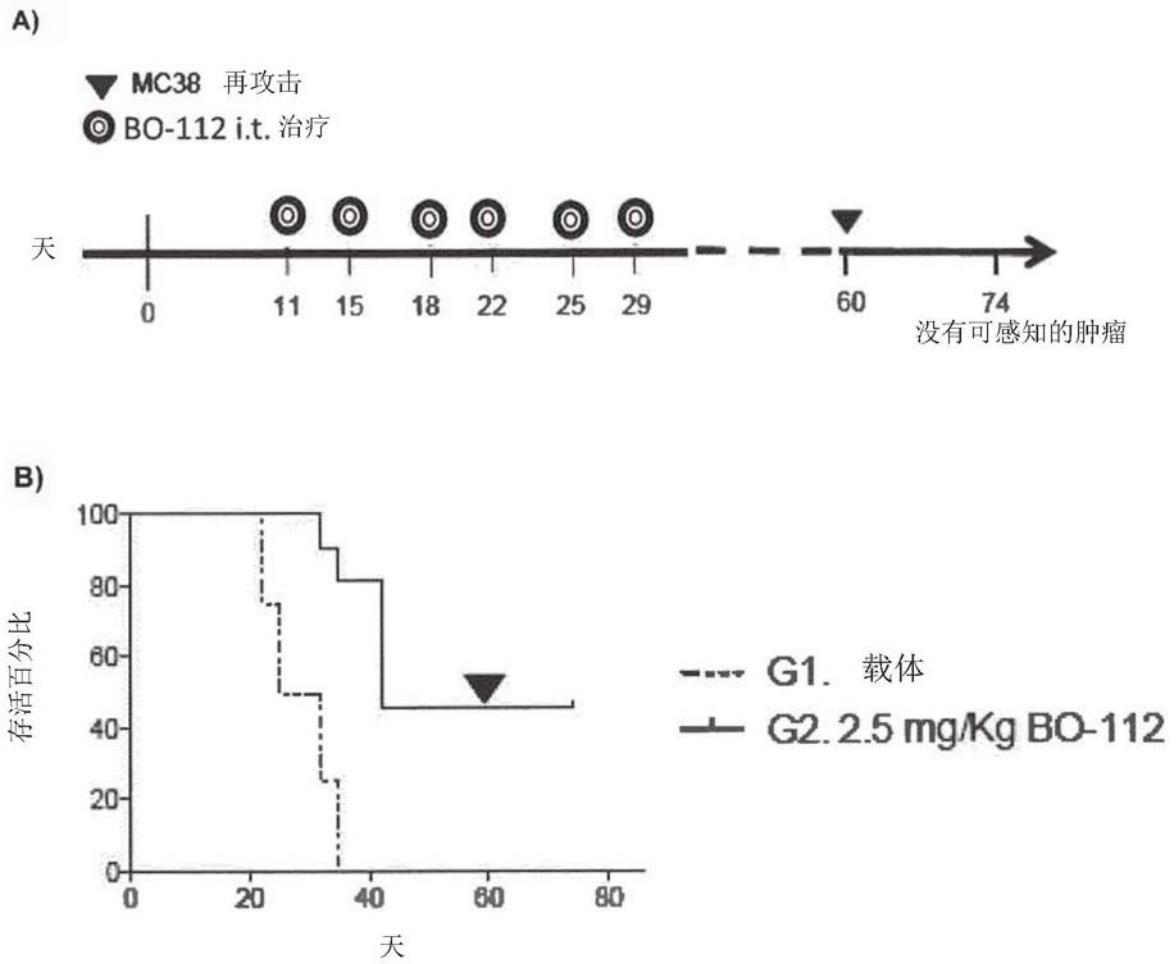


图11

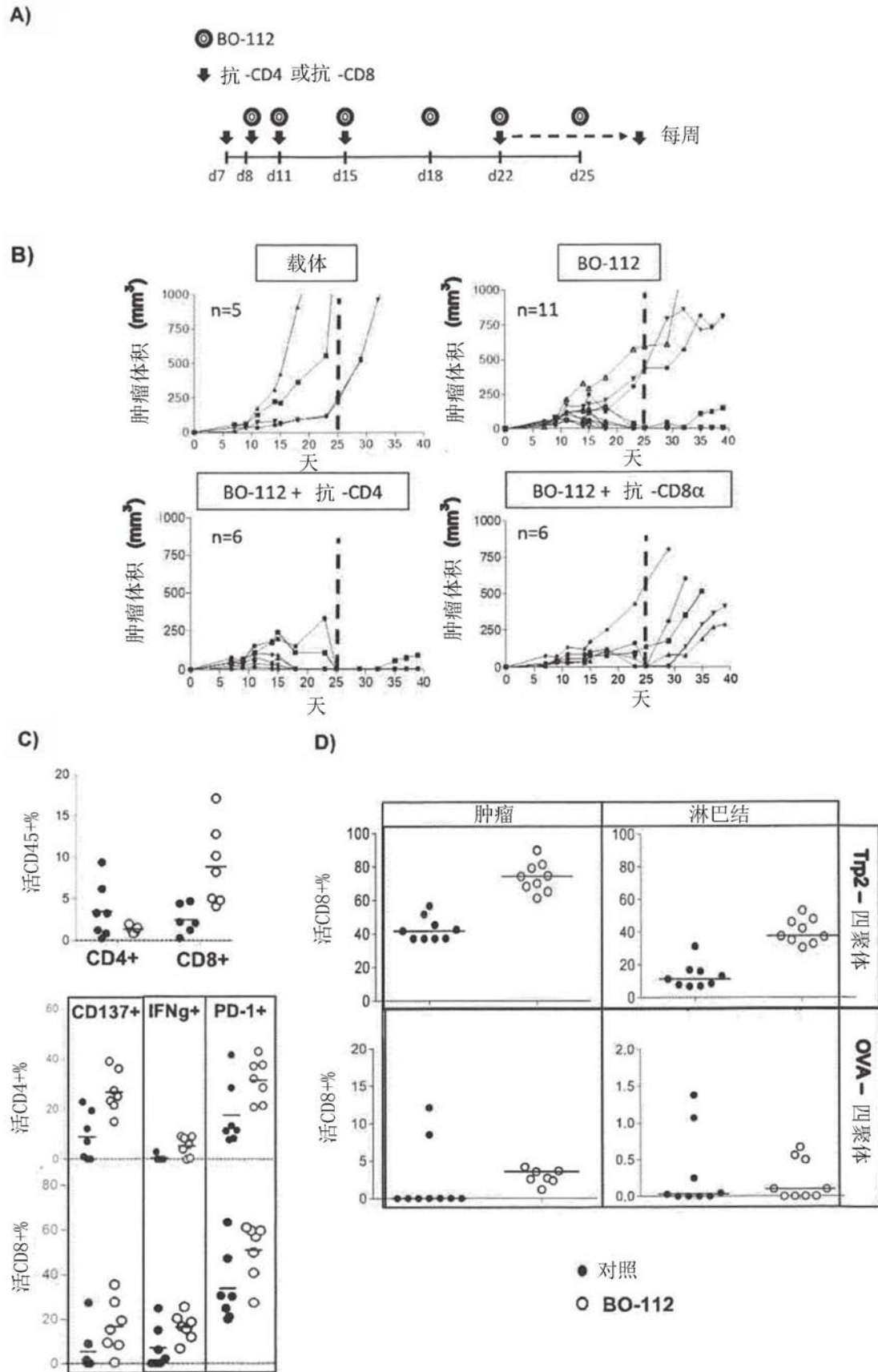


图12

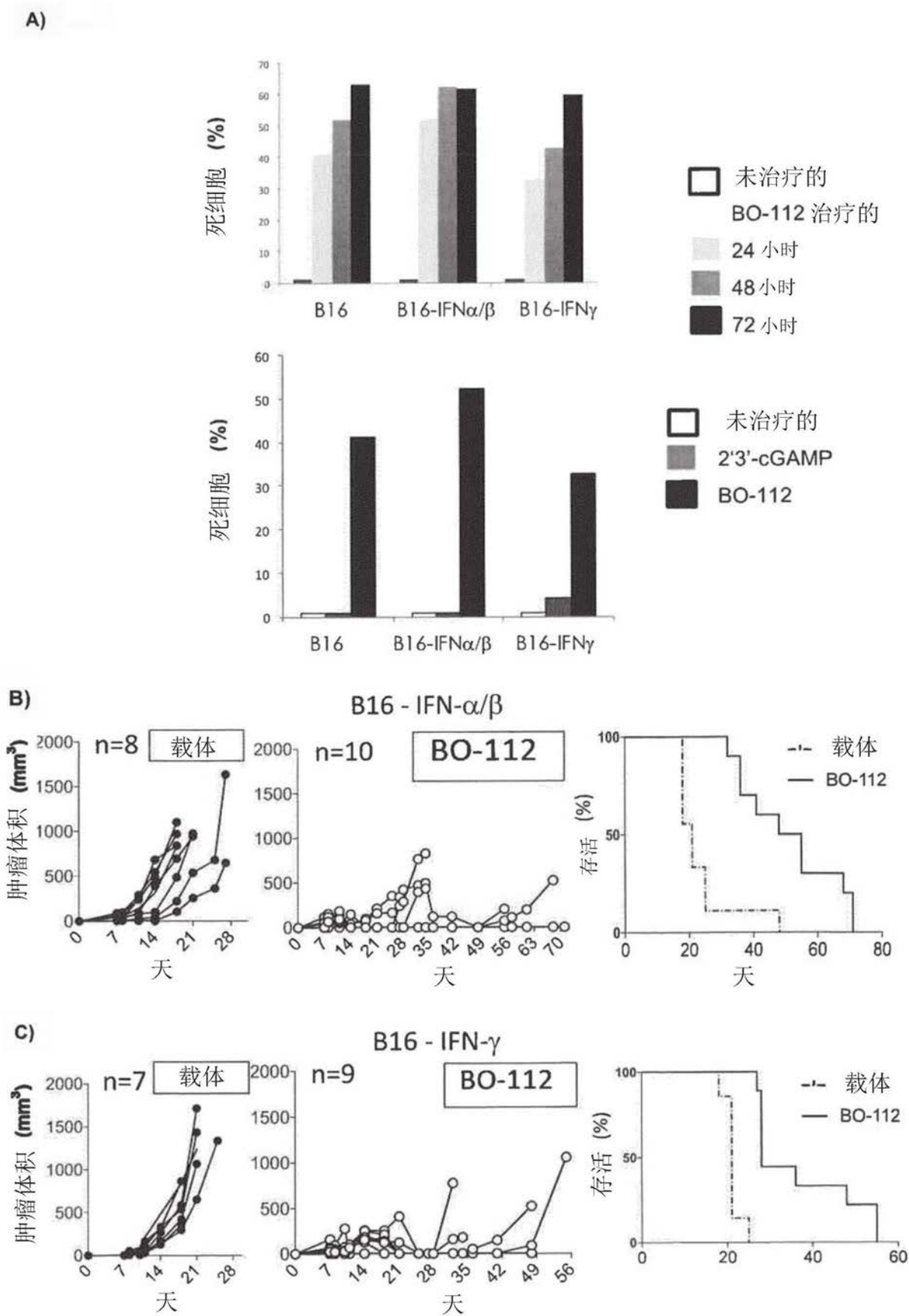
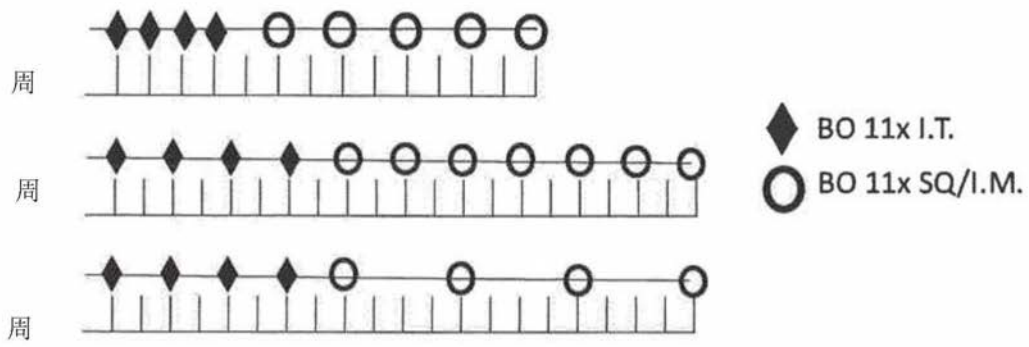
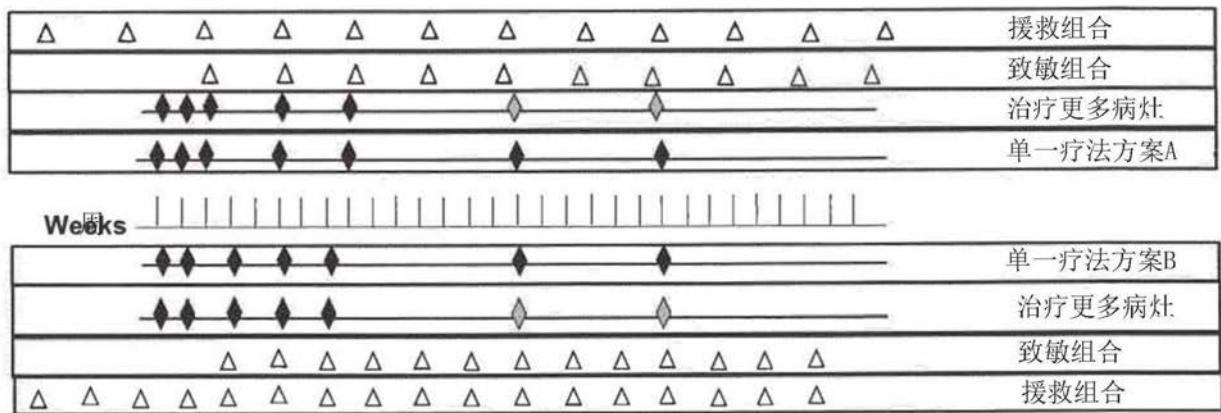


图13

A)



B)



C)

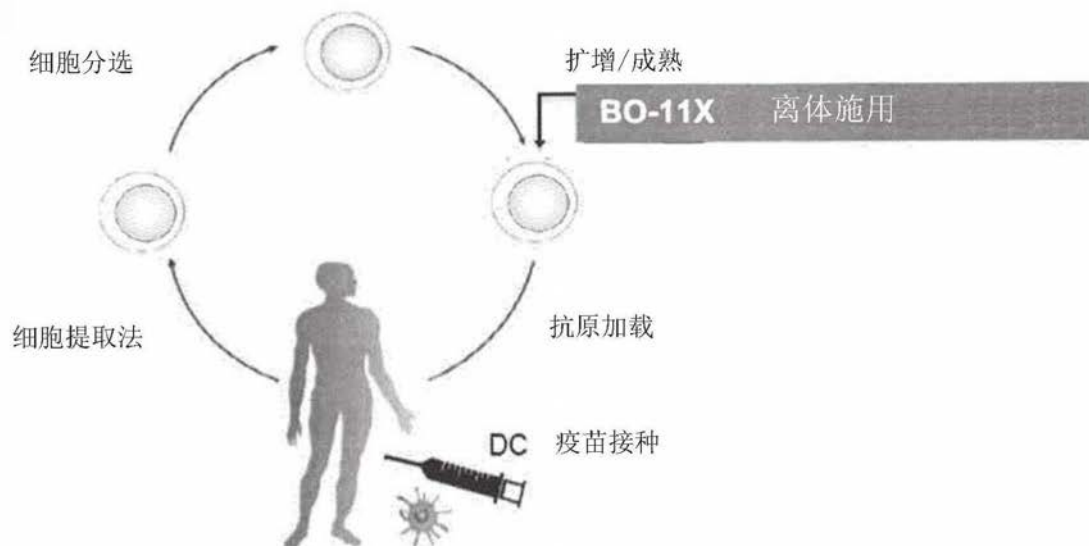
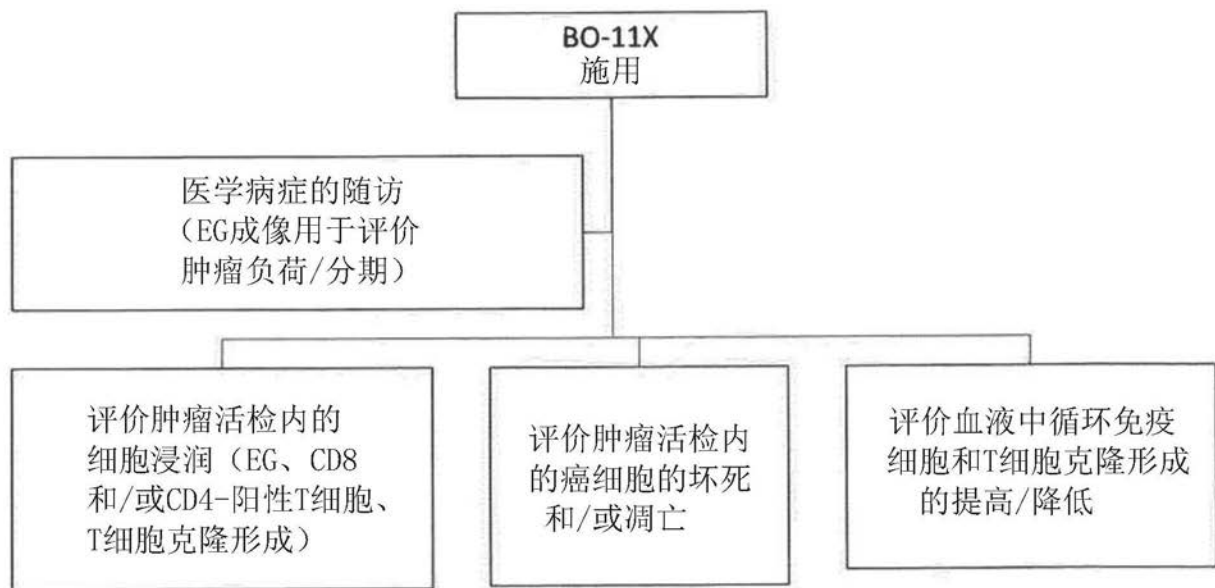


图14

A)



B)

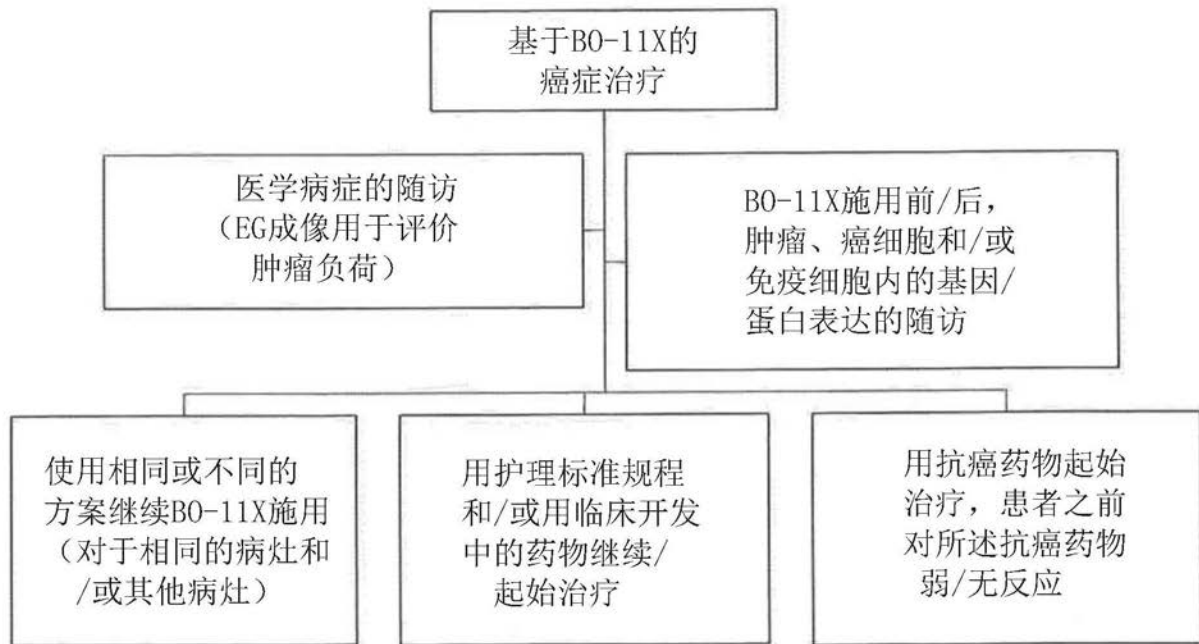


图15

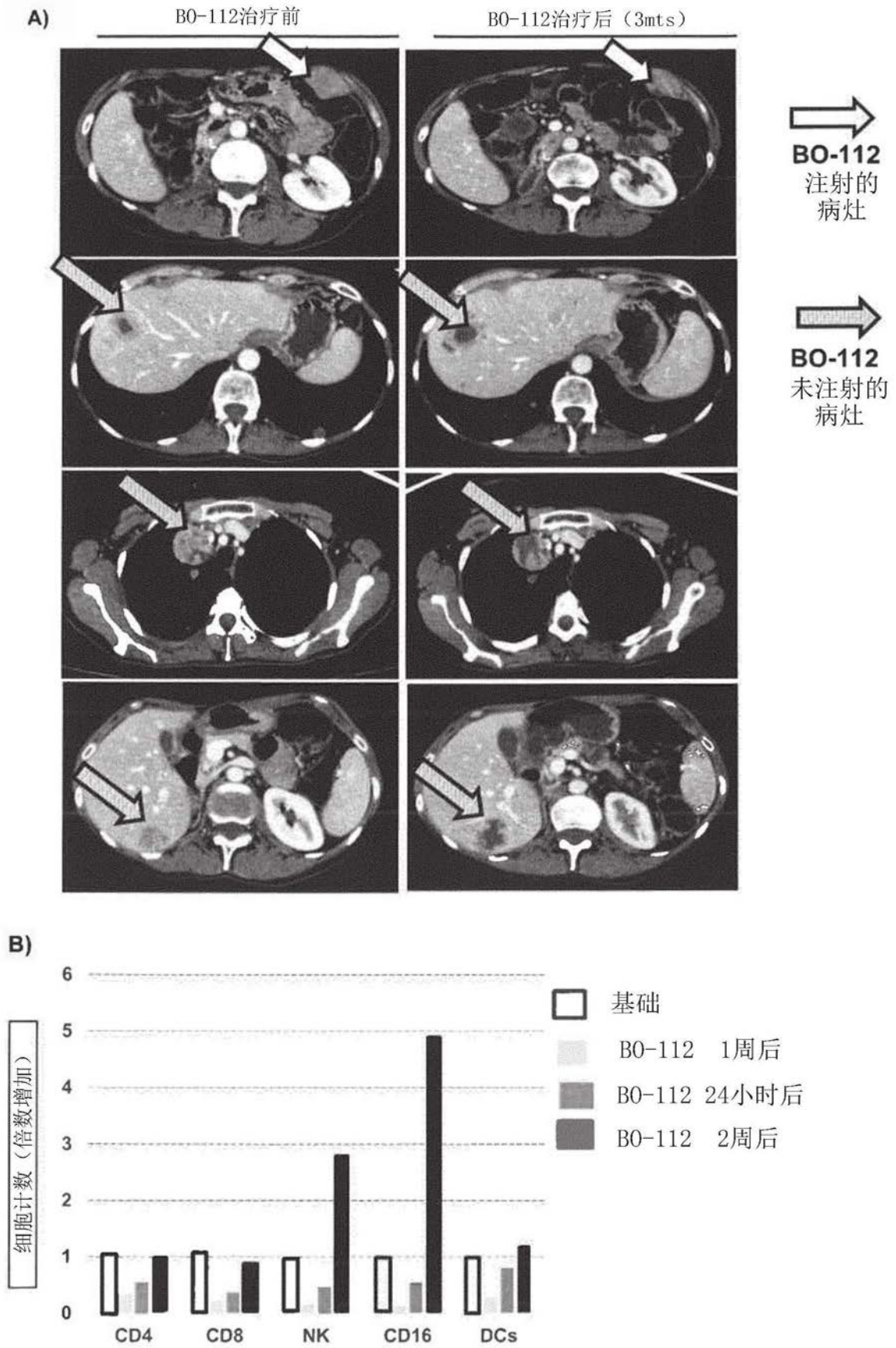


图16



图17