



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105407901 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 16

(21) 申请号 201480020906. 8

A61P 35/00(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 05. 09

(30) 优先权数据

1308325. 8 2013. 05. 09 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 10. 12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2014/051421 2014. 05. 09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/181121 EN 2014. 11. 13

(71) 申请人 英摩杜伦治疗学公司

地址 英国伦敦

(72) 发明人 T·哈格曼

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 陶启长 杨昀

(51) Int. Cl.

A61K 35/74(2015. 01)

A61K 31/436(2006. 01)

权利要求书2页 说明书14页 附图1页

(54) 发明名称

癌症治疗

(57) 摘要

本发明涉及有助于治疗癌症的药物制剂。根据本发明,具有与 mTOR 抑制剂联用的用于治疗肿瘤疾病的全细胞分枝杆菌,该分枝杆菌是非致病性热杀死的分枝杆菌。

1. 一种与 mTOR 抑制剂联用治疗肿瘤疾病的全细胞分枝杆菌,所述分枝杆菌是非致病性热杀死的分枝杆菌。

2. 如权利要求 1 所述使用的分枝杆菌,所述分枝杆菌选自母牛分枝杆菌、大府分枝杆菌、副偶发分枝杆菌、金色分枝杆菌、印普分枝杆菌、草分枝杆菌及其组合。

3. 如权利要求 2 所述使用的分枝杆菌,所述分枝杆菌是粗变体。

4. 如前述权利要求中任一项所述使用的分枝杆菌,所述 mTOR 抑制剂选自西罗莫司、依维莫司、利达莫司、坦西莫司或二甲双胍,及其组合。

5. 如权利要求 4 所述使用的分枝杆菌,所述 mTOR 抑制剂是雷帕霉素(西罗莫司)。

6. 如前述权利要求中任一项所述使用的分枝杆菌,所述分枝杆菌在给予所述 mTOR 抑制剂之前、同时和 / 或之后给予对象。

7. 如前述权利要求中任一项所述使用的分枝杆菌,所述分枝杆菌和 / 或 mTOR 抑制剂以重复剂量给予。

8. 如前述权利要求中任一项所述使用的分枝杆菌,所述肿瘤疾病为子宫癌、前列腺癌、肝癌、肾癌、肺癌、乳腺癌、结直肠癌、胰腺癌、脑癌、肝细胞癌、淋巴瘤、白血病、胃癌、宫颈癌、卵巢癌、甲状腺癌、黑素瘤、癌、头颈癌、皮肤癌或软组织肉瘤。

9. 如权利要求 8 所述使用的分枝杆菌,所述肿瘤疾病是胰腺癌。

10. 如前述权利要求中任一项所述使用的分枝杆菌,所述治疗降低癌性肿瘤的尺寸使其可手术和 / 或减少转移瘤的形成。

11. 如前述权利要求中任一项所述使用的分枝杆菌,所述分枝杆菌存在于单位剂量中,包含  $10^7$  至  $10^9$  个细胞的有效量非致病性热杀死的分枝杆菌。

12. 如前述权利要求中任一项所述使用的分枝杆菌,所述分枝杆菌用于经由胃肠外、口服、舌下、经鼻或经肺途径给予。

13. 如权利要求 12 所述使用的分枝杆菌,所述胃肠道外途径选自皮下、皮内、真皮下、腹膜内、静脉内或囊内注射。

14. 如权利要求 13 所述使用的分枝杆菌,所述分枝杆菌是用于通过皮内途径给药的。

15. 一种治疗对象原发性瘤、肿瘤或癌症的方法,所述方法包括向所述对象同时、单独或依次给予治疗有效量的 (i) mTOR 抑制剂和 (ii) 全细胞分枝杆菌,所述分枝杆菌是非致病性热杀死的分枝杆菌。

16. 一种治疗原发性瘤、肿瘤或癌症的转移瘤的方法,所述方法包括向对象同时、单独或依次给予治疗有效量的 (i) mTOR 抑制剂和 (ii) 全细胞分枝杆菌,所述分枝杆菌是非致病性热杀死的分枝杆菌。

17. 如权利要求 15 或 16 所述的方法,所述治疗导致选自下组的一种或多种的疾病状态和进展的一种或多种标志物的临床相关改善:(i) 总存活, (ii) 无进展存活, (iii) 总应答率, (iv) 转移性疾病的减少。

18. 如权利要求 15 或 16 所述的方法,所述瘤、肿瘤、癌症或转移瘤与癌症相关,所述癌症选自:前列腺癌、肝癌、肾癌、肺癌、乳腺癌、结直肠癌、胰腺癌、脑癌、肝细胞癌、淋巴瘤、白血病、胃癌、子宫颈癌、卵巢癌、甲状腺癌、黑素瘤、癌、头颈癌、皮肤癌和软组织肉瘤。

19. 如权利要求 18 所述的方法,所述瘤、肿瘤、癌症或转移瘤与胰腺癌相关。

20. 如权利要求 15-17 中任一项所述的方法,所述瘤、肿瘤或癌症是转移性的。

21. 如权利要求 20 所述的方法,所述非病原性热杀死分枝杆菌选自:母牛分枝杆菌、大府分枝杆菌、副偶发分枝杆菌、金色分枝杆菌、印普分枝杆菌、草分枝杆菌及其组合。

22. 如权利要求 21 所述的方法,所述分枝杆菌是大府分枝杆菌。

23. 如权利要求 21 或 22 所述的方法,所述非病原性热杀死分枝杆菌是粗变体。

24. 如权利要求 21-23 中任一项所述的方法,所述非病原性热杀死分枝杆菌经由胃肠道外、口服、舌下、鼻或肺途径给予。

25. 如权利要求 24 所述的方法,所述胃肠道外途径选自皮下、皮内、真皮下、腹膜内、静脉内或囊内注射。

26. 如权利要求 24 所述的方法,所述胃肠道外途径不包括瘤内注射。

27. 如权利要求 21-23 中任一项所述的方法,所述非病原性热杀死分枝杆菌的有效量是  $10^7$  至  $10^9$  个细胞。

28. 如权利要求 15-27 中任一项所述的方法,其中,在给予治疗有效量的所述 mTOR 抑制剂之前、同时和 / 或之后给予所述分枝杆菌,任选地,所述分枝杆菌和 / 或 mTOR 抑制剂以重复剂量给予。

29. 如权利要求 15-28 中任一项所述的方法,所述 mTOR 抑制剂选自:西罗莫司、依维莫司、利达莫司、坦西莫司或二甲双胍,及其组合。

30. 如权利要求 29 所述的方法,所述 mTOR 抑制剂是西罗莫司。

## 癌症治疗

### 发明领域

[0001] 本发明涉及癌症治疗领域。具体而言,本发明涉及与 mTOR 抑制剂联用预防、治疗或抑制对象中肿瘤或转移瘤发展的方法并涉及用于这类疗法的免疫调节剂。

### 背景技术

[0002] 近年来,人们越来越意识到免疫应答在癌症生物学中的重要作用,其在非常早期清除许多肿瘤并将那些避免完全清除的肿瘤维持在平衡状态中,有时持续数年 (Dunn 等, *Annu Rev Immunol* 2004 ;22:329-360)。具有临床疾病表现的最终从该平衡相逃逸与免疫应答失调相关,表现为例如慢性炎症或免疫抑制。强有力和越来越多的证据表明免疫系统在癌症的发展、结构性质和进展方面其关键作用,导致人们重新对使用免疫治疗策略来治疗这类疾病感兴趣。迄今为止,开发这类策略的许多尝试基于使用来源于患者本身肿瘤或来源于肿瘤细胞系的抗原以及转移离体扩增的肿瘤抗原特异性细胞毒性细胞和抗原呈递细胞的群体。

[0003] 从 1863 年开始癌症就与炎症相关,当年 Rudolf Virchow 发现瘤组织中的白细胞并因此首次将炎症与癌症联系 (Balkwill 等, *Lancet* 2001 ;357:539-545)。从那时起,慢性炎症就被认为是癌症的风险因素。这些报道显示炎性环境有利于肿瘤发展且与肿瘤位点处观察到的结果一致。然而,癌症与炎症之间的关联不限于慢性炎症导致的疾病发生。Schwartzburd (*Cancer Met Rev* 2003 ;22:95-102) 提出慢性炎症由于肿瘤环境胁迫而出现且其生成对免疫系统的防护。最近证明,肿瘤微环境通过趋化因子、细胞因子、淋巴细胞和巨噬细胞 (其参与用于增加血流的血管新生和血管扩张、与恶性疾病相关的免疫抑制和肿瘤转移) 来模拟炎症位点,显著支持肿瘤进展。此外,除针对免疫系统进行保护好促进癌症进展外,该炎症位点肿瘤生成微环境还对当前癌症治疗的成功具有不利影响。

[0004] 此外,转移性癌症细胞以小集落的形式离开肿瘤,含有淋巴细胞和血小板以及肿瘤细胞。炎症通过建立有利于肿瘤生长的细胞因子环境持续在转移位点处发挥作用。

[0005] 免疫稳态由严格调节的促炎和抗炎信号的相互作用组成。例如,抗炎信号的确是导致慢性炎症和增值性信号转导。有趣的是,促进和抑制肿瘤细胞增殖的细胞因子均在肿瘤位点处产生。在癌症开始时,正是这些多种过程的作用之间的失衡导致了肿瘤促进。

[0006] 人们认为,对于治疗癌症而言,最有效的免疫应答类型是 1 型,其支持 CD4+Th1 细胞应答和 CD8+CTL 应答的诱导。在癌症免疫治疗过程中,可以使用免疫刺激剂,其促进 Th1 应答的发展。例如,BCG (卡介苗),一种分枝杆菌属的减毒菌株,其被研发用作针对结核杆菌感染的疫苗,也被用于治疗多种其他病症,如膀胱癌和表皮黑素瘤。对于浅表性膀胱移行细胞癌,膀胱内滴注 BCG 目前被认为是针对该疾病的一线治疗方法。虽然膀胱内给予 BCG 的严重并发症是不常见的,但其可在个体中发生且范围可以从局部症状至肝炎、肺炎、脓毒血症和死亡。SRL-172 是一种热杀死的母牛分枝杆菌 (*M. vaccae*) 制剂,其是 BCG 同属的成员但具有额外的免疫性质,其诱导 Th2 应答的免疫调节和 1 型增强作用。

[0007] 迄今为止,开发有效的针对癌症的免疫治疗的尝试的主要障碍是无法破坏癌症位

点处的免疫抑制并恢复正常的免疫反应性网络。免疫治疗的生理方法是标准化免疫反应性从而识别内源性肿瘤抗原并针对携带这些抗原的细胞发展出有效的细胞溶解性应答。

[0008] 伴随化疗和放疗作用的抗癌免疫应答已被详细综述并显示这类应答对治疗成功而言十分关键,其消除残留癌细胞并将微小转移瘤维持在休眠状态(Zitvogel 等, J Clin Invest 2008 ;118:1991-2001)。然而,该文献清楚地说明,没有简单的免疫治疗策略可用于持续增强这类免疫应答。

[0009] 本领域中已尝试提供用于治疗肿瘤的切除和化疗组合治疗方法。W02000064476 和 US20050187207 公开了将免疫佐剂与光动力治疗联用以治疗转移性肿瘤。这些文献公开该佐剂包含分枝杆菌细胞壁骨架和脱-3-O-酰化脂 A 并通过注射给药至肿瘤。Castano 等 (Nat Rev Cancers 2006 ;6:535)、Korbelik 等 (J Photochem Photobiol 1998 ;44:151) 以及 Korbelik 等 (J Photochem Photobiol 2001 ;73:403) 也公开了使用光动力治疗并给予作为免疫佐剂的分枝杆菌细胞壁提取物来治疗肿瘤。分枝杆菌细胞壁含有诸如海藻糖二霉菌酸酯和胞壁酰二肽的化合物,其是已知的免疫刺激剂。现有技术组合治疗中使用的分枝杆菌细胞壁提取物也引发促炎细胞因子、反应性氮物质并招募淋巴细胞,其与包括重量损失 (TNF- $\alpha$  介导的恶病质所致) 的病理学相关,具有相关脂血症、低血糖和腹膜炎,并在胃肠道 (GI tract) 中具有缺血性和出血性损伤。现有技术组合治疗可因此使炎症应答恶化并具有严重的副作用。

[0010] EP2085466 公开了给予减毒活微生物与癌症药物 (如雷帕霉素) 的概念。该减毒微生物必须保留感染巨噬细胞的能力,从而在巨噬细胞中诱导凋亡。

[0011] W02006/109300 公开了分枝杆菌组分在供体细胞分离前后处理供体细胞以重新给予患者的用途。该发明旨在处理供体细胞以减轻移植物对抗宿主疾病的作用。

[0012] 本发明的目的是解决现有技术中观察到的针对肿瘤的组合治疗相关的问题,具体而言是提供对继发性癌症的治疗,该继发性癌症在远离原发性癌症的位点处通过原发性癌症的转移而形成。

## 发明内容

[0013] 本发明提供了一种通过使用 mTOR 抑制剂来治疗和 / 或预防癌症的有效方法,该 mTOR 抑制剂与全细胞分枝杆菌协同作用。本发明因此提供了一种 mTOR 抑制剂与特定类型的免疫疗法的组合疗法。发明人发现,两种疗法的组合是协同的,超过单个使用的各疗法的简单叠加作用。

[0014] 在本发明的第一方面中,具有与 mTOR 抑制剂联用的用于治疗肿瘤疾病的全细胞分枝杆菌,该分枝杆菌是非致病性热杀死的分枝杆菌。

[0015] 在本发明的第二方面中,提供了一种预防、治疗、降低、抑制和 / 或控制对象中原发性瘤、肿瘤或癌症的方法,所述方法包括同时、单独或依次给予该对象治疗有效量的 (i) mTOR 抑制剂和 (ii) 全细胞分枝杆菌。

[0016] 在本发明的第三方面中,提供了一种预防、治疗、降低、抑制和 / 或控制不同于原发性瘤、肿瘤或癌症的一个或多个位点处原发性瘤、肿瘤或癌症转移的形成或建立的方法,所述方法包括同时、单独或依次给予该对象治疗有效量的 (i) mTOR 抑制剂和 (ii) 全细胞分枝杆菌,该分枝杆菌是非致病性热杀死的分枝杆菌。

[0017] 本发明因此提供了一种 mTOR 抑制剂与特定类型的免疫疗法的组合疗法。发明人发现,两种疗法的组合是协同的,超过单个使用的各疗法的简单叠加作用。

## 附图说明

[0018] 参考以下附图描述本发明,其中:

[0019] 图 1 显示原位注射 KPC 细胞后,在小鼠(KC 小鼠)自发性胰腺癌模型中,共同给予或未共同给予雷帕霉素的情况下 IMM-101 对存活的影响。

[0020] 发明详述

[0021] 术语“肿瘤”、“癌症”、“瘤”和“肿瘤疾病”可互换使用并表示其生长、增殖或存活高于正常对等细胞的细胞群或细胞,例如细胞增值性或分化性疾病。通常,该增长是不受控的。术语“恶性肿瘤”指侵入周边组织。术语“转移瘤”指肿瘤、癌症或瘤扩散或传播至对象内的其他位点、位置或区域,这些位点、位置或区域不同于原发性肿瘤或癌症。

[0022] 术语“mTOR”指雷帕霉素的丝氨酸-苏氨酸激酶哺乳动物目标。目前存在两种已识别的 mTOR 的多分子信号转导形式,mTOR 复合物 1(mTORC1) 和 mTOR 复合物 2(mTORC2)。

[0023] 术语“抑制剂”具有本领域中使用的常规含义,即能够结合酶或降低酶活性的实体。优选地,mTOR 抑制剂能够结合并防止或基本防止 mTORC1 从其组分中形成,从而引发 mTORC1 活性的降低;该 mTOR 抑制剂还可用于以类似作用结合 mTORC2。更优选地,该 mTOR 抑制剂选自西罗莫司、依维莫司、利达莫司(ridaforoiimus)、坦西莫司或二甲双胍,或其药学上可接受的盐、溶剂合物、水合物、立体异构体、包合物、前药、类似物或衍生物变体和/或其组合。最优选地,该 mTOR 抑制剂是上文列举的西罗莫司或其衍生物。

[0024] 本文所用术语“患者”和/或“对象”可互换使用。

[0025] 如同本文中定义的那样,“同时”给药包括在各自给药的约 2 小时或约 1 小时或更少时间内给予分枝杆菌和 mTOR 抑制剂,更优选地在同时给药。

[0026] 如同本文中定义的那样,“单独”给药包括相隔超过约 12 小时、或约 8 小时、或约 6 小时或约 4 小时或约 2 小时给予分枝杆菌和 mTOR 抑制剂。

[0027] 如同本文中定义的那样,“依次”给药包括各自以多个等分试样和/或剂量和/或在单独的时刻给予分枝杆菌和 mTOR 抑制剂。任选地,对象在给予 mTOR 抑制剂前给予分枝杆菌,并在给予 mTOR 抑制剂后持续给予分枝杆菌。或者,在治疗肿瘤复发后将分枝杆菌持续施用于对象。

[0028] 雷帕霉素(mTOR)通路的哺乳动物目标是细胞生长和增殖的关键调控因子且该领域的研究表明 mTOR 调节异常在多种癌症中起关键作用。mTOR 似乎在营养物或有丝分裂原(如生长因子)导致的信号传导中起关键作用以调控翻译。理解作为许多细胞过程的调控因子的 mTOR 的功能及其作为治疗目标的潜力背后的科学为若干类型的癌症提供了治疗可能性。mTOR 是一种 290kDa 丝氨酸-苏氨酸激酶,其能够整合来自营养物或生长因子刺激的信号,并由此调控细胞生长或细胞循环进展。mTOR 是磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)-激酶-相关激酶(PIKK)超家族的成员,由被分类为高度保守结构域的 2549 个氨基酸组成。mTOR 是一种胞内激酶,其通过作用于 mRNA 翻译的机制来控制蛋白质的生产。这些蛋白质包括对细胞代谢、细胞生长、细胞分裂和对细胞胁迫(如缺氧或 DNA 损失)应答至关重要的若干过程的重要组分。

[0029] mTOR 感知细胞环境内的生长条件并帮助细胞对该环境中的变化进行应答。活性 mTOR 直接通过其对细胞循环调控因子的作用并间接通过维持向细胞的营养物供应（通过产生营养转运体）和向细胞环境的营养物供应（通过促进血管生成）来协调细胞生长过程中的应答。mTOR 的激活意味着一个决策点，其考虑细胞生长所需的基础材料（如氨基酸、葡萄糖、能量）或来自其他细胞和组织的生长调控信号（如激素、生长因子）的可用性，同时监测细胞胁迫（如缺氧、DNA 损伤、热休克、外部 pH、渗透压、氧化胁迫）的状态。此时，细胞被保护免于在细胞内营养物或能量供应不充分的条件下由细胞外信号起始生长和增殖。

[0030] 生长促进通路的上游是汇聚于 mTOR 的关键分子，其通常在癌症中被以某些方式去调控。癌症中发现的若干突变生成激活 mTOR 开关的不适当信号，驱动癌细胞的生长或增殖。

[0031] mTOR 感知营养物（例如三磷酸腺苷（ATP）、葡萄糖、氨基酸、胆固醇和铁）的可用性并通过 PI3K/Akt/ 结节状硬化复合物（TSC）通路合并该信息与生长因子信号转导。激活的 mTOR 通过磷酸化翻译蛋白 S6 激酶（S6K）和 4E 结合蛋白 1（4E-BP1）调节选定 mRNA 的蛋白质合成速率。mTOR 激活增加刺激细胞生长和血管生成并调节细胞代谢的下游效应物。

[0032] mTOR 运用其对细胞增殖的调控作用的主要方式是通过对生产细胞周期素 D1 的控制。细胞周期素是通过细胞循环的关键 G1-S 限制点调控称作细胞周期素依赖性激酶（CDK）的酶活性的蛋白质，该酶转而调控细胞通道。最近，已证明细胞周期素 D1 在基因转录、细胞代谢或细胞迁移方面起关键作用。

[0033] 细胞周期素 D1 过表达已与多种癌症相关，包括乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、淋巴瘤或黑色素瘤。

[0034] 肿瘤硬化复合物（TSC1 或 TSC2）中的突变也会导致 mTOR 的过度激活。该过度激活导致具有 TSC 的患者中不受调控的细胞增殖或多系统肿瘤。已在 TSC 相关损伤中观察到增加的 mTOR 激活，如同下游信号转导蛋白质的高度磷酸化所示。

[0035] mTOR 在血管生成（即形成新血管以向正在生长或分裂的细胞提供氧气和营养物）中起关键作用。mTOR1 提高缺氧诱导因子 1（HIF-1）/ 缺氧诱导因子 2（HIF-2）的翻译。这些 HIF 转录因子驱动缺氧胁迫应答基因的表达，包括血管生成生长因子如血管内皮生长因子（VEGF）、血小板衍生的生长因子  $\beta$ （PDGF- $\beta$ ）和转化生长因子- $\alpha$ （TGF- $\alpha$ ）。

[0036] 已证明 HIF-1  $\alpha$  和 HIF-1  $\beta$  的水平升高在多种肿瘤类型中与死亡率升高相关，包括宫颈癌、乳腺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、头颈癌和胃肠道间质瘤。此外，缺失冯希佩尔林道（VHL）蛋白也会导致 HIF-1  $\alpha$  水平升高，其是肾细胞癌（RCC）的许多病例的主要病因，并且还涉及胰腺癌和神经内分泌肿瘤（NET）。

[0037] 生物能量学研究证明，mTOR 在调控细胞代谢方面起关键作用。mTOR 提高营养转运蛋白的表面表达。这些蛋白的增加导致细胞摄取更多的氨基酸和其他营养物，导致对异常细胞生长和存活的适当营养支持。此外，异常激活的 mTOR 可通过提高糖酵解所需核心酶的生产而赋予癌细胞竞争性生长优势，其使癌细胞存活并甚至在缺氧条件下生长。

[0038] 有若干证据表明，mTOR 活性在细胞存活中起作用。该研究的大部分内容显示，mTOR 抑制提高了对细胞死亡通路的敏感性；然而，还有越来越多的证据表明 mTOR 激活在通过激活参与肿瘤进展的抗凋亡蛋白来促进细胞存活方面起作用。

[0039] 由于上游通路失调导致的 mTOR 过度激活导致细胞进程、血管生成、细胞代谢或凋

亡方面的异常活性,其已涉及多种癌症类型。

[0040] 肾细胞癌

[0041] mTOR 控制 HIF-1  $\alpha$  (一种 RCC 中的重要蛋白质) 生产,其中其不受控的活性与疾病发病机理有因果关系。mTOR 调控 RCC 中若干血管生成生长因子的生产。mTOR 可调节新血管细胞对生长因子应答的能力。mTOR 调节 RCC 中以及肿瘤微血管的细胞中的细胞生长和细胞分裂,且通常通过 PI3K/Akt/mTOR 通路中 mTOR 上游的信号转导缺陷而在肾癌中失调。mTOR 调控营养物摄取和细胞代谢病参与 RCC 中的特征性代谢变化。

[0042] 神经内分泌肿瘤 (NET)

[0043] NET 中若干重要分子变化涉及 mTOR 通路。增加的生长因子信号转导 (即 mTOR 上游的表皮生长因子 (EGF) 和类胰岛素生长因子 (IGF) 信号转导) 已在 NET 中被频繁观察到。同样,胰岛素分泌被认为涉及胰腺  $\beta$  细胞肿瘤中 mTOR 的自分泌激活。mTOR 由 NET 相关的许多基因突变激活 (VHL 基因的生殖系删除)。mTOR 通过调控血管生成指导营养物向癌细胞供应。NET 是高度血管化的。已在 80-86% 的胃肠道良性肿瘤或胰岛细胞肿瘤中观察到 VEGF 表达。

[0044] 胃癌

[0045] mTOR 在 60-80% 的胃腺癌中激活并在早期和晚期疾病中 (扩散和肠道亚型) 和浸润淋巴管的肿瘤细胞中表达。mTOR 途径被多种生长因子受体激活,即表皮生长因子受体 (EGFR)、人表皮生长因子受体 2 (HER2)、类胰岛素生长因子 1 型受体 (IGF-1R), 其在许多胃部肿瘤中过表达。mTOR 调控血管生成因子 (VEGF/VEGFR) 的产生,这些血管生成因子促进新血管形成并预测胃癌患者中的较差结果。mTOR 调控营养物摄取和细胞代谢病参与癌症中的特征性代谢变化。HIF-1  $\alpha$  在大多数胃癌中表达,且浸润性肿瘤边缘的 HIF-1  $\alpha$  表达与晚期疾病、淋巴结转移瘤或较差的存活相关。

[0046] 乳腺癌

[0047] mTOR 信号转导在乳腺癌的血管生长中至关重要。mTOR 信号转导可涉及雌激素受体 (ER) 激活和适应性雌激素超敏反应。mTOR 途径信号转导在耐受内分泌疗法的 HER2+ 肿瘤细胞中增加。对于使用内分泌疗法治疗的患者,mTOR 激活预测较差的临床结果。mTOR 通过调控营养物摄取、细胞代谢和血管生成来控制向癌细胞的营养物供应。

[0048] 肝细胞癌 (HCC)

[0049] mTOR 依赖性信号转导中 25-45% 的 HCC 中具有活性。激活与较短的总存活时间相关;mTOR 激活是手术后复发的独立预测物。mTOR 调控血管生成因子的生产。高 VEGF 水平已与肿瘤细胞增殖、肿瘤结节的较差包封、静脉浸润、较高等级和切除后的较差预后相关。通过 PI3K/Akt 通路的 mTOR 激活与促进 HCC 细胞增殖和存活的生长因子 (如 EGF、TGF- $\alpha$ 、IGF 和肝细胞生长因子 (HGF)) 的表达增加相关。

[0050] 淋巴瘤

[0051] 约 85% 的非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 来源于 B 细胞细胞系。mTOR 信号转导在霍奇金淋巴瘤细胞系和原发性肿瘤中激活。细胞周期素 D1 过表达是套细胞淋巴瘤的特征性特征。在若干 B 细胞淋巴瘤中频繁观察到 PI3K 和 Akt 过表达。

[0052] 在本发明的一个方面中,该全细胞分枝杆菌是热杀死的。用于本发明的分枝杆菌物种的示例包括:母牛分枝杆菌 (*M. vaccae*)、抗热分枝杆菌 (*M. thermoresistibile*)、



转黄分枝杆菌 (*M. flavescens*)、杜氏分枝杆菌 (*M. duvalii*)、草分枝杆菌 (*M. phlei*)、大府分枝杆菌 (*M. obuense*)、副偶发分枝杆菌 (*M. parafortuitum*)、泥炭藓分枝杆菌 (*M. sphagni*)、爱知分枝杆菌 (*M. aichiense*)、罗得西亚分枝杆菌 (*M. rhodesiae*)、新金色分枝杆菌 (*M. neoaurum*)、楚布医院分枝杆菌 (*M. chubuense*)、东海分枝杆菌 (*M. tokaiense*)、(*M. komossense*)、金色分枝杆菌 (*M. aurum*)、印普分枝杆菌 (*M. indicus pranii*)、结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*)、田鼠分枝杆菌 (*M. microti*)；非洲分枝杆菌 (*M. africanum*)；堪萨斯分枝杆菌 (*M. kansasii*)、海分枝杆菌 (*M. marinum*)；猿分枝杆菌 (*M. simiae*)；胃分枝杆菌 (*M. gastri*)；无色分枝杆菌 (*M. nonchromogenicum*)；土分枝杆菌 (*M. terrae*)；次要分枝杆菌 (*M. triviale*)；戈登分枝杆菌 (*M. gordonae*)；瘰癧分枝杆菌 (*M. scrofulaceum*)；石蜡分枝杆菌 (*M. paraffinicum*)；胞内分枝杆菌 (*M. intracellulare*)；鸟分枝杆菌 (*M. avium*)；蟾蜍分枝杆菌 (*M. xenopi*)；溃疡分枝杆菌 (*M. ulcerans*)；迪氏分枝杆菌 (*M. diernhoferi*)；耻垢分枝杆菌 (*M. smegmatis*)；蛇分枝杆菌 (*M. thamnophaeos*)；微黄分枝杆菌 (*M. flavescens*)；偶发分枝杆菌 (*M. fortuitum*)；(*M. peregrinum*)；(*M. chelonae*)；外来分枝杆菌 (*M. paratuberculosis*)；麻风分枝杆菌 (*M. leprae*)；弥漫型麻风分枝杆菌 (*M. lepraemurium*) 及其组合。

[0053] 该热杀死分枝杆菌是非致病性的。该非致病性热杀死分枝杆菌优选选自：母牛分枝杆菌、大府分枝杆菌、副偶发分枝杆菌、金色分枝杆菌、印普分枝杆菌、草分枝杆菌及其组合。更优选地，该非致病性热杀死分枝杆菌是粗变体 (rough variant)。给予对象的分枝杆菌量足以在对象中引发保护性免疫应答，使得对象的免疫系统能够对癌症进行有效的免疫应答。在本发明的某些实施方式中，优选向对象给予特定剂量的分枝杆菌和 / 或剂量方案。因此，在本发明的某些实施方式中，提供了一种容纳装置 (containment means)，其包含用于本发明的有效量的热杀死分枝杆菌，通常可来自  $10^3$  至  $10^{11}$  个生物体，优选来自  $10^4$  至  $10^{10}$  个生物体，更优选来自  $10^6$  至  $10^{10}$  个生物体，且更优选来自  $10^6$  至  $10^9$  个生物体。用于本发明的有效量的热杀死分枝杆菌可来自  $10^3$  至  $10^{11}$  个生物体，优选来自  $10^4$  至  $10^{10}$  个生物体，更优选来自  $10^6$  至  $10^{10}$  个生物体，且更优选来自  $10^6$  至  $10^9$  个生物体。最优选地，用于本发明的有效量的热杀死分枝杆菌来自  $10^7$  至  $10^9$  个生物体。通常，对于人和动物应用，本发明所述组合物可以  $10^8$  至  $10^9$  个细胞的剂量进行给药。或者，该剂量是约 0.01mg 至 1mg，或约 0.1mg 至 1mg (以生物体的重量计)，以悬浮液或干燥制剂的形式提供。

[0054] 母牛分枝杆菌和大府分枝杆菌是特别优选的。

[0055] 母牛分枝杆菌和大府分枝杆菌在宿主中诱导复杂的免疫应答。使用这些制剂的治疗将刺激先天或 1 型免疫 (Th1)，包括巨噬细胞激活和细胞毒性细胞活性。。它们还通过免疫调节机制独立地下调不适当的 Th2 应答。这恢复了免疫系统的健康平衡。

[0056] 本发明可用于治疗肿瘤疾病。本文中，“治疗”包括预防、减少、控制和 / 或抑制肿瘤疾病。这类疾病包括肉瘤、癌、腺癌、黑素瘤、骨髓瘤、胚细胞瘤、胶质瘤、淋巴瘤或白血病。示例性癌症包括，癌、肉瘤、腺癌、黑素瘤、神经瘤 (胚细胞瘤、胶质瘤)、间皮瘤和网状内皮组织性、淋巴性或造血性肿瘤疾病 (例如黑素瘤、淋巴瘤或白血病)。在具体的方面中，癌、肿瘤或癌症包括肺腺癌、肺癌、扩散性或间质性胃癌、结肠腺癌、前列腺腺癌、食道癌、乳腺癌、胰腺腺癌、卵巢腺癌、肾上腺腺癌、子宫内膜腺癌或子宫腺癌。

[0057] 癌、肿瘤或癌症包括良性、恶性、转移性和非转移性类型，且包括任何阶段 (I、II、

III、IV 或 V) 或级别 (G1、G2、G3 等) 的瘤、肿瘤或癌症,或正在进展、恶化、稳定化或缓解的瘤、肿瘤或癌症。可根据本发明进行治疗的癌症包括但不限于膀胱、血液、骨、骨髓、脑、乳腺、结肠、食道、胃肠道、牙床、头、肾、肝、肺、鼻咽、颈、卵巢、前列腺、皮肤、胃、睾丸、舌或子宫的细胞或瘤。此外,该癌症具体而言可以是以下组织学类型,但不限于此:瘤,恶性;癌;癌,未分化;巨细胞和梭形细胞癌;小细胞癌;乳头状癌;鳞状细胞癌;淋巴上皮癌;基底细胞癌;毛母质癌;移行细胞癌;乳头状移行细胞癌;腺癌;胃泌素瘤,恶性;胆管癌;肝细胞癌;合并的肝细胞癌和胆管癌;小梁腺癌;腺样囊性癌;腺瘤性息肉中的腺癌;腺癌,家族性结肠息肉病;实体癌;类癌瘤,恶性;细支气管肺泡腺癌;乳头状腺癌;嫌色细胞癌;嗜酸细胞癌;亲氧腺癌;嗜碱细胞癌;透明细胞腺癌;颗粒细胞癌;滤泡腺癌;乳头状和滤泡腺癌;非包封性硬化性癌;肾上腺皮质癌;卵巢内膜样癌;皮肤附属器癌;大汗腺腺癌;皮脂腺癌;耵聍腺癌;粘液表皮样癌;囊腺癌;乳头状囊腺癌;乳头状浆液性囊腺癌;粘液性囊腺癌;粘液性腺癌;印戒细胞癌;浸润性导管癌;髓样癌;小叶癌;炎性癌;佩吉特氏病,乳房;腺泡细胞癌;腺鳞癌;腺癌伴鳞状上皮化生;胸腺瘤,恶性;卵巢间质瘤,恶性;泡膜细胞瘤,恶性;颗粒细胞瘤,恶性;男性细胞瘤,恶性;塞尔托利氏细胞瘤;间质细胞瘤,恶性;脂细胞瘤,恶性;副神经节瘤,恶性;乳房外副神经节瘤,恶性;嗜铬细胞瘤;皮肤丝球肉瘤;恶性黑色素瘤;无黑色素性黑色素瘤;浅表扩散性黑色素瘤;巨大色素痣中的恶性黑色素瘤;上皮样细胞黑色素瘤;蓝痣,恶性;肉瘤;纤维肉瘤;纤维性组织细胞瘤,恶性;黏液肉瘤;脂肪肉瘤;平滑肌肉瘤;横纹肌肉瘤;胚胎性横纹肌肉瘤;肺泡横纹肌肉瘤;间质肉瘤;混合瘤;缪氏混合瘤;肾胚胎细胞瘤;肝母细胞瘤;癌肉瘤;间质瘤,恶性;布伦内罗氏瘤,恶性;叶状肿瘤,恶性;滑膜肉瘤;间皮瘤,恶性;无性细胞瘤;胚胎癌;畸胎瘤,恶性;卵巢甲状腺瘤,恶性;绒毛膜癌;中肾瘤,恶性;血管肉瘤;血管内皮瘤,恶性;卡波济氏肉瘤;血管外皮细胞瘤,恶性;淋巴管肉瘤;成骨肉瘤;皮质旁成骨肉瘤;软骨肉瘤;成软骨细胞瘤,恶性;间叶性软骨肉瘤;骨巨细胞瘤;尤因氏肉瘤;牙肉瘤,恶性;成釉细胞性牙肉瘤;成釉细胞瘤,恶性;成釉细胞纤维肉瘤;松果体瘤,恶性;脊索瘤;神经胶质瘤,恶性;室管膜瘤;星形细胞瘤;原浆型星形细胞瘤;纤维型星形细胞瘤;星形细胞瘤;成胶质细胞瘤;少突神经胶质瘤;成少突神经胶质细胞瘤;原始神经外胚层;小脑肉瘤;成神经节细胞瘤;成神经细胞瘤;成视网膜细胞瘤;嗅觉神经源性肿瘤;脑膜瘤,恶性;神经纤维肉瘤;神经鞘膜瘤,恶性;颗粒细胞瘤,恶性;恶性淋巴瘤;霍奇金疾病;霍奇金病;副肉芽肿;恶性淋巴瘤,小淋巴细胞性;恶性淋巴瘤,大细胞性,扩散性;恶性淋巴瘤,滤泡性;蕈样肉芽肿;其他特定的非霍奇金淋巴瘤;恶性组织细胞增生症;多发性骨髓瘤;肥大细胞肉瘤;免疫增生性小肠病;白血病;淋巴样白血病;浆细胞性白血病;红白血病;淋巴肉瘤细胞白血病;骨髓性白血病;嗜碱性粒细胞白血病;嗜酸性粒细胞白血病;单核细胞性白血病;肥大细胞白血病;巨核细胞白血病;髓样肉瘤;以及毛细胞白血病。优选地,该肿瘤疾病可以是与选自下组的癌症相关的肿瘤:前列腺癌、肝癌、肾癌、肺癌、乳腺癌、结直肠癌、胰腺癌、脑癌、肝细胞癌、淋巴瘤、白血病、胃癌、子宫颈癌、卵巢癌、甲状腺癌、黑色素瘤、头颈癌、皮肤癌和软组织肉瘤和/或其他形式的瘤。该肿瘤可以是转移性或恶性肿瘤。

[0058] 更优选地,待治疗的肿瘤疾病是胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌和皮肤癌。最优选地,待治疗的肿瘤疾病是胰腺癌。

[0059] 在本发明的一个实施方式中,mTOR 抑制剂与分枝杆菌联用以减少或抑制原发性肿

瘤或癌症转移至其他位点,或在远离原发性肿瘤或癌症的其他位点处形成或建立转移性肿瘤或癌症,从而抑制或减少肿瘤或癌症复发或者肿瘤或癌症进展。

[0060] 在其他实施方式中,本发明的方法包括 1) 减少或抑制潜在发展为转移瘤的肿瘤或癌细胞的生长、增殖、移动或浸润,2) 减少或抑制一个或多个不同于原发性肿瘤或癌症的位点、位置或区域处生成的转移瘤的形成或建立;3) 在转移瘤形成或建立后,减少或抑制一个或多个不同于原发性肿瘤或癌症的位点、位置或区域处转移瘤的生长或增殖,以及 4) 在转移瘤形成或建立后,减少或抑制其他转移瘤的形成或建立;等。

[0061] 在本发明的一个实施方式中,与分枝杆菌联用给予 mTOR 抑制剂在给定对象的病症中提供可检测或可测量的改进,例如缓解或缓与细胞增殖性或细胞过度增殖性疾病、瘤、肿瘤或癌症、或者转移瘤相关的一种或多种不利(物理)症状或结果,即治疗益处或有益效果。

[0062] 治疗益处或有益效果是病症或病状中任何客观或主观的、瞬时的、暂时的或长期的改进,或者细胞增殖性或细胞过度增殖性疾病(如瘤、肿瘤或癌症)或转移瘤相关的不利症状的开始、严重程度、持续时间或频率的降低。本发明所述治疗方法的满意的临床终点的实现条件是,例如,一种或多种相关病状、不利症状或并发症的严重程度、持续时间或频率的逐步或部分减少,或者细胞增殖或细胞过度增殖性疾病(如瘤、肿瘤或癌症)或转移瘤的生理、生物化学或细胞表现或特征的抑制或反转。治疗益处或改进因此可以是与细胞增殖或细胞过度增殖性疾病(如瘤、肿瘤或癌症)或转移瘤相关或由其所致不利症状或并发症的减少。然而,治疗益处或改进不需要是治愈或完全破坏所有目标增殖性细胞(如瘤、肿瘤或癌症,或者转移瘤)。例如,即使在一部分或大量肿瘤或癌的质量、尺寸或细胞存留时,仍可通过抑制肿瘤或癌症的进展或恶化来稳定肿瘤或癌的质量、尺寸或细胞数目来降低死亡率和延长生命期,有时即使仅持续数天、数周或数月。

[0063] 治疗益处的具体非限制性示例包括瘤、肿瘤或癌症或者转移瘤体积(尺寸或细胞质量)或细胞数目的减少,抑制或防止瘤、肿瘤或癌症体积的增加(例如稳定化),延缓或抑制瘤、肿瘤或癌症进展、恶化或转移,或者抑制瘤、肿瘤或癌症增殖、生长或转移。

[0064] 本发明的方法不立即起效。例如,治疗后对肿瘤体积具有延迟的效果和/或瘤、肿瘤或癌症细胞数目或质量会在开始时增加,但随着时间的变化最终在给定对象中发生肿瘤细胞质量、尺寸或细胞数目的稳定化或减少。

[0065] 可被抑制、减少、降低、延迟或预防的瘤、肿瘤、癌症或转移瘤相关其他不利症状和并发症包括,例如,恶心、食欲不振、嗜睡、疼痛和不适。因此,细胞过度增殖性疾病相关或所致不利症状或并发症的严重程度、持续时间或频率的部分或完全降低或减少,对象健康的改善(例如能量、食欲、心理健康的提升)都是治疗益处的特定非限制性示例。

[0066] 治疗益处或改善因此还可包括所治疗对象的生活质量的主观改善。

[0067] 在其他实施方式中,提供了一种延长或延伸对象寿命(存活)的方法。在其他实施方式中,提供了一种改善对象生活质量的方法。

[0068] 术语“有效量”或“治疗有效量”指足以提供所需生物、治疗和/或预防结果的试剂量。该结果可以是一种或多种疾病迹象、症状或病因的减少、缓解、缓和、减缓、延迟和/或减轻,或生物系统的任何所需变化。对于癌症而言,有效量包含足以导致肿瘤收缩和/或降低肿瘤生长速率(如抑制肿瘤生长)或预防或延缓其他不需要的细胞增殖的量。在一些实

施方式中,有效量是足以延缓发展的量。一些实施方式中,有效量是足以预防或延缓复发的量。可在一次或多次给药中给予有效量。药物或组合物的有效量可以:(i) 减少癌细胞数目;(ii) 减小肿瘤尺寸;(iii) 在一定程度上抑制、延迟、延缓并优选停止癌细胞浸润至周边器官;(iv) 抑制(即在一定程度上延缓并优选停止)肿瘤转移;(v) 抑制肿瘤生长;(vi) 预防或延迟肿瘤的出现和/或复发;和/或(vii) 在一定程度上缓解癌症相关的一种或多种症状。

[0069] 在最优选的实施方式中,给予 mTOR 抑制剂与使用分枝杆菌的疗法联用导致选自下组的一种或多种的疾病状态和进展的一种或多种标志物的临床相关改善:(i) 总存活,(ii) 无进展存活,(iii) 总应答率,(iv) 转移性疾病的减少,(v) 相关时癌症相关抗原的循环水平,(vi) 营养状态(体重、食欲、血清白蛋白),或(vii) 疼痛控制或镇痛剂应用。

[0070] 使用热杀死的全细胞母牛分枝杆菌和大府分枝杆菌进行预治疗生成更复杂的免疫,不仅包括先天免疫和 1 型免疫的发展,还包括更有效地恢复适当免疫功能的免疫调节。

[0071] 本发明所述分枝杆菌与 mTOR 抑制剂联用。

[0072] 在优选的实施方式中,该 mTOR 抑制剂可选自西罗莫司、依维莫司、利达莫司、坦西莫司或二甲双胍或其药学上可接受的盐、溶剂合物、水合物、立体异构体、包合物或前药、类似物或衍生物变体,及其组合。

[0073] 在最优选的实施方式中,该 mTOR 抑制剂是雷帕霉素(西罗莫司)。

[0074] 在通篇说明书中,术语“组合”旨在包括与分枝杆菌的给药同时、单独或依次给予 mTOR 抑制剂。因此,mTOR 抑制剂和分枝杆菌可存在于相同或单独的药物制剂中,并同时或不同时存在。

[0075] 因此,可同时或不同时以单独药物的形式提供分枝杆菌和 mTOR 抑制剂用于给药。

[0076] 优选地,在不同时间以单独药物的形式提供分枝杆菌和 mTOR 抑制剂用于给药。单独并不同时给予时,可首先给予分枝杆菌或 mTOR 抑制剂;然而,优选在给予分枝杆菌后给予 mTOR 抑制剂。此外,两种药物可在同一天或不同天给予,且在治疗周期期间其可使用相同方案或不同方案给予。

[0077] mTOR 抑制剂的各周期的持续时间可以是约 1 至约 3 天或最多 52 周,或更长。可按需要给予各药物的多个周期。因此,在本发明的一个实施方式中,一个治疗周期由每天、每周、隔周或每月给予分枝杆菌并同时给予 mTOR 抑制剂组成。或者,在给予 mTOR 抑制剂之前和/或之后给予分枝杆菌。

[0078] 根据单个患者对治疗的耐受性按需要进行剂量延缓和/或剂量减少和方案调整。

[0079] 可在多个(重复)剂量中给予有效量的分枝杆菌,例如两个或多个、三个或多个、四个或多个、五个或多个、十个或多个,或十二个或多个重复剂量,任选间隔约两天或约 2 周,或约 4 周或约 8 周。

[0080] 在另一个实施方式中,治疗方案包括在开始的 3 个剂量中每 2 天或最多每 2 周给予分枝杆菌,剩余的 4 周中每 2 周给予随后的 3 个剂量,之后每四周给予 mTOR 抑制剂,在所述分枝杆菌的第一剂量后至少 1 天至 14 天开始。

[0081] 在本发明的另一个实施方式中,可在给予分枝杆菌之前、同时和/或之后在多次(重复)每日剂量中给予有效量的 mTOR 抑制剂,任选约 0.5mg/天至约 40mg/天(如约 1.5mg/天至约 15mg/天),任选经由口服途径,所述多次(重复)每日剂量是例如两次或更

多次、三次或更多次、四次或更多次、五次或更多次、十次或更多次,或二十次或更多次重复剂量。例如,在至少约 2、4、6、8、10、12、15、20 或更多的时刻给予并重复分枝杆菌或 mTOR 抑制剂,任选地每天给予 mTOR 抑制剂。

[0082] 在本发明的另一个实施方式中,可在给予分枝杆菌之前、同时和 / 或之后在多次 (重复) 每日剂量中给予有效量的 mTOR 抑制剂,任选约 0.5mg/ 天至约 40mg/ 天 (如约 1.5mg/ 天至约 20mg/ 天,或约 5mg/ 天至约 10mg/ 天),任选经由口服途径且该 mTOR 抑制剂是依维莫司,所述多次 (重复) 每日剂量是例如两次或更多次、三次或更多次、四次或更多次、五次或更多次、十次或更多次,或二十次或更多次重复剂量。

[0083] 在本发明的另一个实施方式中,可在给予分枝杆菌之前、同时和 / 或之后在多次 (重复) 每日剂量中给予有效量的 mTOR 抑制剂,任选约 0.5mg/ 天至约 40mg/ 天 (如约 2mg/ 天至约 6mg/ 天),任选经由口服途径且该 mTOR 抑制剂是雷帕霉素,所述多次 (重复) 每日剂量是例如两次或更多次、三次或更多次、四次或更多次、五次或更多次、十次或更多次,或二十次或更多次重复剂量。

[0084] 该分枝杆菌可经由胃肠道外、口服、舌下、鼻或肺途径递送给患者。在优选的实施方式中,该分枝杆菌经由胃肠道外途径递送,所述胃肠道外途径选自皮下 (subcutaneous)、皮内、真皮下 (subdermal)、腹膜内、静脉内和囊内注射。更优选地,通过胃肠道外途径进行给药不包括瘤内注射分枝杆菌细胞壁提取物。

[0085] 本发明所述剂量方案可包括在所述 mTOR 抑制剂给药当天或之前约 0.25 小时至约 2 周给予分枝杆菌,随后在约两天或约每 2 周或约 4 周后给予所述分枝杆菌的进一步剂量。分枝杆菌的进一步剂量可以每天或每周或隔周或每月的间隔给予,例如在约 8 周或约 10 周和约 12 周,或更长的期间内。在给予第一次剂量后,可连续给予分枝杆菌,持续最多 12 个月或更久。

[0086] 待经历本发明所述 mTOR 抑制剂疗法的对象可同时、单独或依次给予分枝杆菌。可在给予 mTOR 抑制剂前将分枝杆菌给予患者。更具体地,可在给予 mTOR 抑制剂前约 4 周至约 1 天或更短时间内将分枝杆菌给予患者。或者,可在给予 mTOR 抑制剂前约 4 周至约 1 天或更短时间内以一个或多个等分试样 (各自含有有效量的分枝杆菌) 给予分枝杆菌 (可以一个或多个时间间隔进行给药),和 / 或可在给予 mTOR 抑制剂后施用分枝杆菌。在其他选择中,可在给予 mTOR 抑制剂前约 4 周至约 1 天或更短时间内以一个或多个等分试样 (各自含有有效量的分枝杆菌) 给予分枝杆菌 (可以一个或多个时间间隔进行给药) 和 / 或可在给予 mTOR 抑制剂后施用分枝杆菌,并在给予 mTOR 抑制剂之前和 / 或之后在至少约 2、4、6、8、10、12、15、20 或更多的时刻重复。

[0087] 在本发明的优选实施方式中,用于治疗肿瘤疾病的分枝杆菌与 mTOR 抑制剂联用,其中,在给予 mTOR 抑制剂之前、同时和 / 或之后给予所述分枝杆菌。

[0088] 在本发明的其他优选实施方式中,用于治疗肿瘤疾病的分枝杆菌与 mTOR 抑制剂联用,其中,在给予所述 mTOR 抑制剂之前、同时和 / 或之后给予所述分枝杆菌,且以重复剂量给予所述分枝杆菌和 / 或 mTOR 抑制剂。

[0089] 在本发明的另一个优选实施方式中,提供了一种预防、治疗、减少、抑制和 / 或控制对象中原发性瘤、肿瘤或癌症的方法,所述方法包括同时、单独或依次向对象给予治疗有效量的 (i) mTOR 抑制剂和 (ii) 全细胞分枝杆菌,其中在给予所述 mTOR 抑制剂之前、同时和

/ 或之后向对象给予所述分枝杆菌, 任选地以重复剂量给予所述分枝杆菌和 / 或 mTOR 抑制剂。

[0090] 在本发明的另一个优选实施方式中, 提供了一种预防、治疗、减少、抑制和 / 或控制远离原发性瘤、肿瘤或癌症的一个或多个位点处的原发性瘤、肿瘤或癌症的转移瘤的形成或建立的方法, 所述方法包括同时、单独或依次向对象给予治疗有效量的 (i) mTOR 抑制剂和 (ii) 全细胞分枝杆菌, 在给予所述 mTOR 抑制剂之前、同时和 / 或之后向对象给予所述分枝杆菌, 任选地以重复剂量给予所述分枝杆菌和 / 或 mTOR 抑制剂。

[0091] 在本发明的一个实施方式中, 该分枝杆菌可以位于在剂型中给予患者的药物形式中。

[0092] 在本发明的其他实施方式中, 可以单次剂量的形式给予有效量的分枝杆菌。或者, 可在多次 (重复) 剂量中给予有效量的分枝杆菌, 例如两次或更多次、三次或更多次、四次或更多次、五次或更多次、十次或更多次, 或二十次或更多次重复剂量。例如, 在 mTOR 抑制剂给药前约 4 周至约 1 天或更短时间内给予分枝杆菌。可以单次或多次剂量中进行给药。

[0093] 在本发明的其他实施方式中, 可在多次 (重复) 剂量中给予有效量的分枝杆菌, 例如两次或更多次、三次或更多次、四次或更多次、五次或更多次、十次或更多次, 或二十次或更多次重复剂量, 其与 mTOR 抑制剂的给药同时进行。例如, 在至少约 2、4、6、8、10、12、15、20 或更多的时刻给予并重复分枝杆菌或 mTOR 抑制剂, 任选地每天给予 mTOR 抑制剂。分枝杆菌和 mTOR 抑制剂的给药均可以多次剂量进行。

[0094] 在本发明的另一个实施方式中, 可在给予分枝杆菌之前、同时和 / 或之后在多次 (重复) 每日剂量中给予有效量的 mTOR 抑制剂, 任选约 0.5mg/ 天至约 40mg/ 天 (如约 1.5mg/ 天至约 20mg/ 天, 或约 5mg/ 天至约 10mg/ 天), 任选经由口服途径, 所述多次 (重复) 每日剂量是例如两次或更多次、三次或更多次、四次或更多次、五次或更多次、十次或更多次, 或二十次或更多次重复剂量。例如, 在至少约 2、4、6、8、10、12、15、20 或更多的时刻给予并重复分枝杆菌或 mTOR 抑制剂, 任选地每天给予 mTOR 抑制剂。

[0095] 在某些情况下, 本发明所述的容器可以是药瓶、安瓿瓶、注射器、胶囊、片剂或试管。在一些情况下, 该分枝杆菌可以是冻干的且在给药前配置以进行重建。

[0096] 然而, 在其他情况下, 该分枝杆菌悬浮于一定体积的药理学上可接受的液体中。在一些最优选的实施方式中, 提供了抑制包含悬浮于药理学上可接受的运载体中的单次单位剂量的分枝杆菌的容器, 该单位剂量包含约  $1 \times 10^6$  至约  $1 \times 10^{10}$  CFU 的分枝杆菌。在一些非常具体的实施方式中, 在约 0.1ml 至 10ml 或约 0.3ml 至 2ml 或约 0.5ml 至 2ml 的体积中提供包含悬浮的分枝杆菌的液体。还应理解, 在某些情况下, 容纳装置中包含分枝杆菌的组合是冷冻的 (即维持在约零摄氏度以下)。前述组合物提供了用于本发明所述免疫治疗应用的理想单位。

[0097] 可根据本发明所述任何其他方法或组合物来实现在本发明的方法和 / 或组合物的内容中讨论的实施方式。因此, 属于一种方法或组合物的实施方式也可应用于本发明的其他方法和组合物。

[0098] 在一些情况下, 将非致病性热杀死分枝杆菌给予对象上或对象中的特定位点。例如, 本发明所述分枝杆菌组合物 (具体而言例如包含大分枝杆菌的那些) 可在与肿瘤相邻或与淋巴结相邻处注射, 例如耗尽肿瘤周围组织的那些。因此, 在某些情况下, 分枝杆菌

组合物的给药位点可靠近子宫颈后、扁桃体、腋、腹股沟、子宫颈前、颞下、脑下或锁骨上淋巴结。这类给药位点可以在身体右侧、左侧或两侧上。在某些非常具体的实施方式中,分枝杆菌组合物在接近腋、子宫颈和 / 或腹股沟淋巴结处递送。例如,可将分枝杆菌的剂量分配至与右和左腋淋巴结以及右和左腹股沟淋巴结相邻的组织。

[0099] 在非常具体的实施方式中,通过皮内注射将分枝杆菌的剂量给予对象,该剂量分配至身体两侧上的腋和腹股沟且各位点处存在两次注射(即两个水疱)。

[0100] 在本发明的其他实施方式中,本发明的方法涉及给予 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多次分枝杆菌剂量,其间间隔一天或更久的时间。例如,这类单独的剂量可间隔一天,或若干天、一周、两种、一个月或更久。例如,本发明所述方法可包括在 3 周或更久的时间内给予 1 至 5 次分枝杆菌剂量。在其他实施方式中,本发明的方法包括在约一周至约三周或更久的时间内给予 1-5、1-4、1-3、1-2 或 2 剂量的分枝杆菌。相对于之前或随后的给药剂量,各给予的剂量可以是相同或不同的剂量。例如,在某些情况下,优选分枝杆菌的剂量低于先前给予的任何剂量。因此,在一些具体情况下,将以任何先前治疗中所给予剂量的约一半作为非致病性热杀死分枝杆菌的剂量进行给药。这类方法在某些情况下是优选的,其中对象对分枝杆菌的免疫应答在随后的治疗期间较高。因此,在某些情况下,可以最低次数给予分枝杆菌,例如在小于 10、9、8、7、6、5、4、3 或更少的单独剂量给药中。在一些情况下,该分枝杆菌组合物给予两次。或者,可在癌症或肿瘤存在的时间长度中给予分枝杆菌,或直至癌症康复或稳定化。还可在癌症或肿瘤康复或稳定化后将分枝杆菌连续给予患者。

[0101] 本发明所述分枝杆菌组合物将包含有效量的分枝杆菌,其通常分散在药学上可接受的运载体中。词组“药学或药理学上可接受的”指分子实体和组合物在恰当地给予动物,例如人时不产生不利、过敏性或其它不良反应。在本发明的教导下,含有分枝杆菌的药物组合物的制剂是本领域技术人员已知的,参见 Remington's Pharmaceutical Sciences(《雷明顿药物科学》),第 18 版,马克出版公司(Mack Printing Company),1990,此外,对于动物(如人)给药,应理解这些制剂应复合无菌、产热原性、总体安全性和纯度标准。本发明所述药学上可接受的运载体的具体示例是硼酸盐缓冲液或无菌盐水溶液(0.9% NaCl)。

[0102] 本文使用的“药学上可接受载体”包含任何和所有溶剂、分散介质、包衣、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(例如抗菌剂、抗真菌剂)、等渗剂、吸收延迟剂、盐、防腐剂、药物、药物稳定剂、凝胶、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、染料、诸如此类的物质和其组合,此应为本领域普通技术人员已知(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences(《雷明顿药物科学》),马克出版公司(Mack Printing Company),1990,第 1289-1329 页)。

[0103] 在优选的实施方式中,该分枝杆菌经由胃肠道外途径递送,所述胃肠道外途径选自皮下、皮内、真皮下、腹膜内、静脉内和囊内注射。皮内注射能够将分枝杆菌组合物整体递送至可接受免疫监视的真皮层,并因此能够在局部淋巴结处选择抗癌免疫应答并促进免疫细胞增殖。

[0104] 虽然在本发明的高度优选的实施方式中通过直接皮内注射给予分枝杆菌组合物,但也考虑在一些情况下使用其他给药方法。因此,在某些方面中,本发明的热杀死分枝杆菌可通过以下途径给予:注射、输注、连续输注、静脉内、皮内、动脉内、腹膜内、病变内、玻璃体内、阴道内、直肠内、外敷、瘤内、肌肉内、腹膜内、皮下、结膜下、囊内、经粘膜、心包内、脐带

内、眼内、口服、颅内、关节内、前列腺内、胸腔内、气管内、鼻内、外敷、局部、吸入（如气凝胶吸入）、经由导管、经由灌洗,或通过其他方法或前述方法的任何组合,如同本领域普通技术人员已知的那样（参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences(《雷明顿药物科学》),第 18 版,马克出版公司 (Mack Printing Company),1990)。更优选地,通过胃肠道外途径进行给药不包括瘤内注射分枝杆菌细胞壁提取物。

[0105] 上述说明书中提及的所有出版物都通过引用纳入本文。对本发明所述方法和系统的多种改进和变动对本领域技术人员是显而易见的,而不偏离本发明的范围和精神。虽然已结合具体的优选实施方案对本发明作了描述,但应了解,如权利要求所述,本发明不应过分地受限于这些具体实施方案。实际上,对生物活性和免疫学或相关领域一般技术人员显而易见的用于实施本发明的方式的各种改进都落在以下权利要求的范围内。

[0106] 下面参照以下非限制性实施例进一步描述本发明。

[0107] 实施例 1

[0108] 该实施例描述了在良好验证、临床相关的胰腺癌（胰腺导管腺癌）遗传小鼠模型中研究热杀死全细胞大府分枝杆菌 (IMM-101) 和 mTor 抑制剂雷帕霉素（西罗莫司）。根据 Hingorani 等 (Cancer Cell, 2003, 4:437-50) 所述方法繁殖在 Kras 和 Pdx-Cre 中携带突变的遗传工程改造的小鼠 (KC 小鼠) ;一部分这些小鼠发展出类似于人胰腺上皮内瘤的导管病变,其可发展为浸润性和转移性腺癌。使用在 Kras, p53 和 Pdx-Cre 中携带突变的  $10^5$  个 KPC 细胞 (Hingorani 等, Cancer Cell, 2005, 7:469-48) 在出生后 100 天原位注射 KC 小鼠。在第 114 天（图 1 中的第 0 天）如下所述治疗小鼠：

[0109] -12 只小鼠未治疗（对照）；

[0110] -12 只小鼠使用 2mg/kg 雷帕霉素经腹腔内每天治疗,持续整个研究长度；

[0111] -12 只小鼠使用 0.1mg IMM-101/ 小鼠治疗,在 5 天期间隔天在颈背中皮下改变注射并在尾基部处注射,其间间隔 2 天,持续整个研究长度；

[0112] -12 只小鼠使用雷帕霉素和 IMM-101 组合治疗,该治疗使用上文所述两种化合物单独使用时的剂量或方案。

[0113] 如预期的那样,未治疗的小鼠在 20 天内病死。使用 mTor 抑制剂的治疗未对存活产生显著影响,而使用雷帕霉素治疗的小鼠的存活时间与对照动物一致。然而,最出乎意料的是,与对照小鼠相比且最重要的是与单独使用化合物治疗的小鼠相比, mTOR 抑制剂（雷帕霉素）和分枝杆菌 (IMM-101) 的组合显著延长了这类治疗的小鼠的存活（参见图 1）。似乎 mTor 抑制剂的作用与分枝杆菌介导的作用的组合以出乎意料的方式协同作用,其无法用单独使用时的作用解释。

[0114] 参考文献

[0115] Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, 等, Cancer is not just a disease of a tissue: it is a host disease. How to reactivate host defense against tumours using conventional therapies of cancer? (癌症不只是一种组织疾病: 它是一种宿主疾病。如何使用常规癌症疗法重新激活针对肿瘤的宿主防御?) Ann Endocrinol (Paris) 2008a ;69:151-152.

[0116] Apetoh L, Tesniere A, Ghiringhelli F, 等, Molecular interactions between dying tumour cells and the innate immune system determine the efficacy of



conventional anticancer therapies(正在死亡的肿瘤细胞与先天免疫系统之间的分子相互作用确定常规抗癌疗法的效力). *Cancer Res* 2008b ;68:4026-30.

[0117] Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting(癌症免疫编辑的三个E). *Annu Rev Immunol* 2004 ;22:329-360.

[0118] Hingorani SR, Petricoin III EF, Maitra A, 等, Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse(小鼠中浸润前或浸润性导管胰腺癌及其早期检测). *Cancer Cell* 2003 ;4:437-450.

[0119] Hingorani SR, Wang L, Multani AS 等, Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice(Trp53R172H 和 KrasG12D 在小鼠中合作促进染色质不稳定和广泛转移性胰腺导管腺癌). *Cell Cancer* 2005 ;469-483.

[0120] Ladoire S, Arnould L, Apetoh L, 等, Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumour-infiltrating foxp3+regulatory T cells(对肿瘤浸润性 foxp3+ 调节性T细胞消失相关的乳腺癌的新辅助化疗的病理完全应答). *Clin Cancer Res* 2008 ;14:2413-2420.

[0121] Locher C, Conforti R, Aymeric L, 等, Desirable cell death during anticancer chemotherapy(抗癌化疗过程中所需的细胞死亡). *Ann N Y Acad Sci* 2010 ;1209:99-108.

[0122] Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, 等, The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? (抗癌免疫应答:对于治疗成功不可或缺?) *J Clin Invest* 2008 ;118:1991-2001.

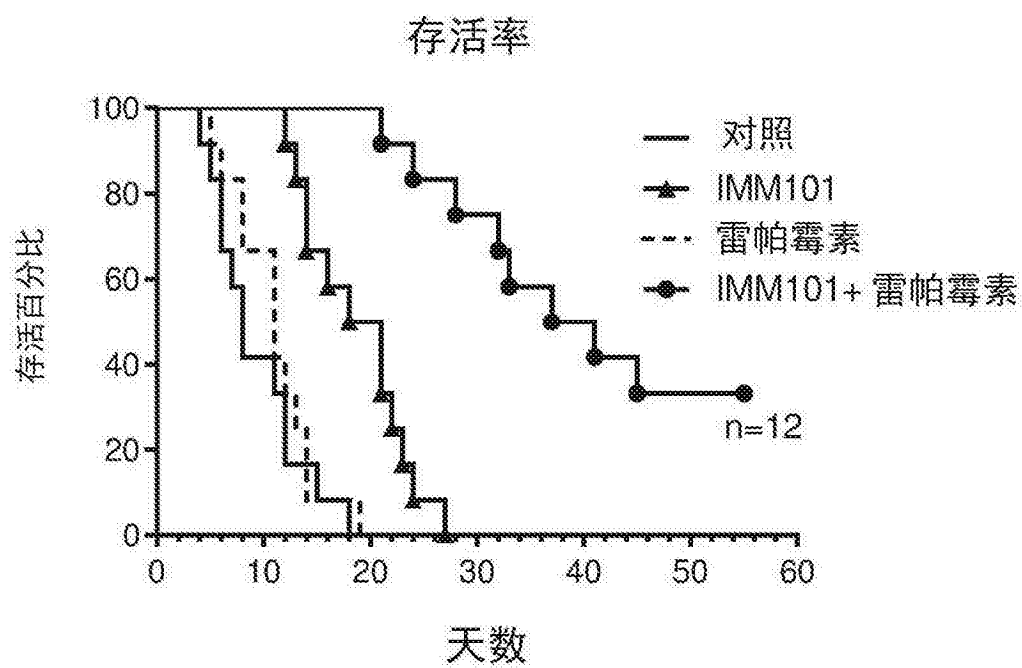


图 1