



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105658233 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 08

(21) 申请号 201480054853. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 10. 03

A61K 38/21(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 48/00(2006. 01)

61/887, 258 2013. 10. 04 US

A61P 35/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016. 04. 01

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2014/002824 2014. 10. 03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/049589 EN 2015. 04. 09

(71) 申请人 安吉尼科分子传输公司

地址 澳大利亚新南威尔士州

(72) 发明人 H·布拉姆巴特 J·麦克迪尔米德

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

11245

代理人 张全信 赵蓉民

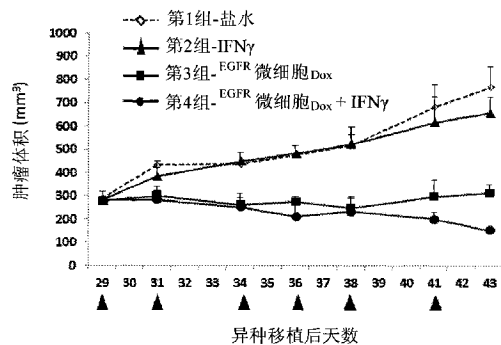
权利要求书1页 说明书26页 附图7页

(54) 发明名称

使用携带药物的、双特异性配体靶向的微细胞和干扰素-γ 的联合肿瘤治疗

(57) 摘要

提供了用于癌症治疗的组合物和方法。该方法需要例如向癌症患者施用第一组合物和第二组合物,所述第一组合物包括多个细菌衍生的完好的微细胞或完好的死细菌细胞,其每个包含抗肿瘤剂并在表面上携带双特异性配体,配体对于哺乳动物细胞组分具有特异性;所述第二组合物包含干扰素-γ (IFN-γ) 或增加对象中的IFN-γ 的表达的药剂。所述组合物包括上述的第一组合物和第二组合物,任选地含有额外的抗肿瘤剂。



▲ = 给药时间
数据=平均值+SEM

1. 治疗对象中肿瘤的方法,包括向所述对象施用第一组合物和第二组合物,所述第一组合物包括多个细菌衍生的完好的微细胞或完好的死细菌细胞,其每个包含抗肿瘤剂并在表面上携带配体,其中所述配体对非吞噬性哺乳动物细胞表面受体具有特异性;所述第二组合物包括干扰素- γ (IFN- γ)或增加所述对象中IFN- γ 的表达的药剂。

2. 权利要求1所述的方法,其中所述第二组合物包括纯化的IFN- γ 蛋白。

3. 权利要求1所述的方法,其中所述第二组合物包括病毒疫苗。

4. 权利要求1所述的方法,其中所述第二组合物包括编码IFN- γ 的核酸。

5. 权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述第一组合物包括大约 10^9 至大约 10^{10} 个微细胞或死细菌细胞。

6. 权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述抗肿瘤剂是放射性核素。

7. 权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述抗肿瘤剂是化疗药物。

8. 权利要求7所述的方法,其中所述化疗药物是小分子药物,其具有小于大约900道尔顿的分子量。

9. 权利要求8所述的方法,其中所述小分子药物是细胞毒素。

10. 权利要求9所述的方法,其中所述小分子药物是吗啉基蒽环类抗生素衍生物。

11. 权利要求10所述的方法,其中所述小分子药物是PNU-159682。

12. 权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述抗肿瘤剂是功能核酸或编码功能核酸的多核苷酸。

13. 权利要求12所述的方法,其中所述功能核酸抑制促进肿瘤细胞增殖、血管生成或化疗抗性和/或抑制凋亡或细胞周期停滞的基因。

14. 权利要求12所述的方法,其中所述功能核酸选自siRNA、miRNA、shRNA、lincRNA、反义RNA或核酶。

15. 包括第一组合物和第二组合物的包装、产品或试剂盒,所述第一组合物包括多个细菌衍生的完好的微细胞或完好的死细菌细胞,其每个包含抗肿瘤剂并在表面上携带配体,其中所述配体对非吞噬性哺乳动物细胞表面受体具有特异性;所述第二组合物包括干扰素- γ (IFN- γ)或增加所述对象中IFN- γ 的表达的药剂。

16. 组合物,其包括(a)多个细菌衍生的完好的微细胞或完好的死细菌细胞,其每个包含抗肿瘤剂并在表面上携带配体,其中所述配体对非吞噬性哺乳动物细胞表面受体具有特异性;和(b)干扰素- γ (IFN- γ)或增加所述对象中IFN- γ 的表达的药剂。

使用携带药物的、双特异性配体靶向的微细胞和干扰素- γ 的 联合肿瘤治疗

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2013年10月4日提交的美国临时专利申请号61/887,258的优先权。那个申请的内容通过引用以其全部并入本文。

背景技术

[0003] 当前,用于治疗癌症的大多数药物是全身性施用的。虽然全身性递送细胞毒素抗癌药物在癌症疗法中起关键作用,但是其还造成严重的问题。例如,将正常组织/器官全身性地暴露于施用的药物可以引起严重的毒性。这由于以下事实恶化:全身性地递送的癌症化疗药物经常必须以非常高的剂量递送以克服药物的差的生物利用度和患者内的大体积分布。同样,全身性药物施用可以是侵入性的,因为其经常需要在大血管中使用固定导管(secured catheter)。因为全身性药物施用经常需要使用静脉——外周或中枢静脉,其可以引起局部并发症比如静脉炎。药物的外渗还可以导致在施用的局部部位处的起疱/组织损伤,比如其在施用长春花生物碱和蒽环类抗生素时是常见的。

[0004] 癌症治疗中的另一个挑战是肿瘤细胞逃避免疫监督。免疫系统和恶性细胞之间的相互作用在肿瘤发生中起重要作用。免疫系统监测和排斥转化细胞的失败可能导致癌症发展。肿瘤使用多种机制以逃避免疫介导的排斥。现在,这些机制中的许多在细胞和分子水平上是已知的。尽管有这种知识,癌症免疫疗法在临床上仍不是完善的疗法。

发明内容

[0005] 本发明人发现当动物正在遭受伴发性病毒感染时,经历使用携带抗肿瘤药物的、双特异性抗体靶向的微细胞的癌症治疗的动物表现出对药物的更大的抗肿瘤应答。进一步的研究揭示了此背景下观察到的抗癌药物的疗效的增强起因于施用的携带药物的、双特异性抗体靶向的微细胞的肿瘤杀伤力(tumor-killing capability)和针对肿瘤细胞的激活的宿主免疫应答之间的协同作用,其自身是由于病毒感染引发的干扰素- γ (IFN- γ 或IFN γ)的增加的表达。

[0006] 已经在单一疗法和与其它抗肿瘤剂联合的情况下研究了IFN- γ 自身的潜在抗肿瘤用途。然而,这样的研究没有导致临床成功。例如,IFN- α 和IFN- γ 的联合治疗没有比单独使用IFN- α 的治疗表现出改进。参见,例如,Kloke等,Eur. J. Haematol. 48:93-8(1992)和Wandl等,Semin. Oncol. 19:88-94(1992)。经美国食品和药物管理局(FDA)批准的仅有的IFN- γ 适应症是用于治疗慢性肉芽肿性疾病(CGD)和严重的恶性骨硬化症(骨病)。

[0007] 因此,在其一个方面,本公开内容提供了用于治疗对象中肿瘤的方法。该方法需要向对象施用(A)第一组合物,其包括多个细菌衍生的完好的微细胞和/或死细菌细胞,其微细胞和死细胞中的每个包含抗肿瘤剂,并且经由附连至微细胞表面的配体靶向至肿瘤细胞表面受体;和(B)第二组合物,其包括IFN- γ 或增加对象中的IFN- γ 的表达或活性的药剂。

[0008] 在一些方面,第二组合物包括IFN- γ 蛋白,特别是药学上适当纯化的IFN- γ 蛋白。

在一些方面,第二组合物包括病毒疫苗。在一些方面,第二组合物包括编码IFN- γ 的核酸。

[0009] 在一些方面,第一组合物包括大约 10^9 至大约 10^{10} 个微细胞或死细菌细胞。

[0010] 在一些方面,抗肿瘤剂是放射性核素。在一些方面,抗肿瘤剂是化疗药物。在一些方面,抗肿瘤剂是功能核酸或编码功能核酸的多核苷酸。在一些方面,功能核酸抑制促进肿瘤细胞增殖、血管生成或化疗抗性的基因和/或抑制细胞凋亡或细胞周期停滞的基因。在一些方面,功能核酸选自siRNA、miRNA、shRNA、lincRNA、反义RNA或核酶。

[0011] 还提供了包括第一组合物和第二组合物的包装、产品或试剂盒,所述第一组合物包括多个细菌衍生的完好的微细胞或完好的死细菌细胞,其每个包含抗肿瘤剂并在表面上携带配体,其中配体具有对非吞噬性哺乳动物细胞表面受体的特异性,并且所述第二组合物包括干扰素- γ (IFN- γ)或增加对象中的IFN- γ 的表达的药剂。

[0012] 在另一个实施方式中,提供了组合物,其包括(a)多个细菌衍生的完好的微细胞或完好的死细菌细胞,其每个包含抗肿瘤剂并在表面上携带配体,其中配体具有对非吞噬性哺乳动物细胞表面受体的特异性;和(b)IFN- γ 或增加对象中的IFN- γ 的表达的药剂。

[0013] 其它目标、特征和优点根据下列描述是显而易见的。给出详细描述和具体实例仅供说明,因为在具体实施方式的精神和范围内的多种改变和修改根据本说明书是显而易见的。

附图说明

[0014] 图1A-1C分别展示了在不同时间点(x轴,显示为剂量数量)处测量的三只狗A、B和C的肿瘤体积(左边的y轴)和血清IFN- γ 浓度(右边的y轴)的图表。这些图表显示了当IFN- γ 的血清浓度升高时肿瘤对药物的应答更大。

[0015] 图2图解了使用IFN- γ 和双特异性配体靶向的且包裹亚德里亚霉素的完好的微细胞,联合治疗在具有大约 285mm^3 的肿瘤尺寸的6周龄的雌性无胸腺的裸鼠中建立的人腺泡状腺癌肿瘤异种移植物的效果。第1组小鼠接受盐水,第2组小鼠只接受IFN- γ ,第3组小鼠接受 $\text{EGFR}^{\text{EGFR}}$ 微细胞 Dox ,并且第4组小鼠接受 $\text{EGFR}^{\text{EGFR}}$ 微细胞 Dox 和IFN- γ 。在此实例和接下来的那些中,x轴下方的三角形表示给药时间。

[0016] 图3描绘了使用IFN- γ 和双特异性配体靶向的且包裹亚德里亚霉素的、完好的微细胞,联合治疗在具有大约 145mm^3 的中等肿瘤尺寸的6周龄的雌性无胸腺的裸鼠中建立的人乳腺肿瘤异种移植物的效果。第1组小鼠接受盐水,第2组小鼠只接受IFN- γ ,第3组小鼠接受 $\text{EGFR}^{\text{EGFR}}$ 微细胞 Dox ,并且第4组小鼠接受 $\text{EGFR}^{\text{EGFR}}$ 微细胞 Dox 和IFN- γ 。

[0017] 图4图解了使用IFN- γ 和双特异性配体靶向的且包裹亚德里亚霉素的完好的微细胞,联合治疗在具有大约 250mm^3 的大肿瘤尺寸的6周龄的雌性无胸腺的裸鼠中建立的人乳腺肿瘤异种移植物的效果。第1组小鼠接受盐水,第2组小鼠只接受IFN- γ ,第3组小鼠接受 $\text{EGFR}^{\text{EGFR}}$ 微细胞 Dox ,并且第4组小鼠接受 $\text{EGFR}^{\text{EGFR}}$ 微细胞 Dox 和IFN- γ 。

[0018] 图5描绘了使用IFN- γ 和双特异性配体靶向的且包裹亚德里亚霉素的完好的微细胞,联合治疗在具有大约 265mm^3 和大约 600mm^3 之间的超大肿瘤尺寸的6周龄的雌性无胸腺的裸鼠中建立的人乳腺肿瘤异种移植物的效果。全部四只小鼠接受 $\text{EGFR}^{\text{EGFR}}$ 微细胞 Dox 和IFN- γ 。

[0019] 图6描绘了使用IFN- γ (两种不同的剂量)和双特异性配体靶向的且包裹亚德里亚霉素的完好的微细胞,联合治疗在具有大约 100mm^3 的肿瘤尺寸的6周龄的雌性无胸腺的裸

鼠中建立的人腺泡状腺癌肿瘤异种移植物的效果。第1组小鼠接受盐水,第2组小鼠接受^{EGFR}微细胞_{Dox},第3组小鼠每周两次接受^{EGFR}微细胞_{Dox}和 0.75×10^4 IU的IFN- γ ,并且第4组小鼠每周三次接受^{EGFR}微细胞_{Dox}和 0.5×10^4 IU的IFN- γ 。

[0020] 图7图解了人受体酪氨酸激酶的20个亚家族和58个成员(摘录自Lemmon和Schlessinger,Cell 141:1117-134(2010))。

具体实施方式

[0021] 如上所述,本发明人确定在其中患者暴露于升高水平的INF- γ 的情况下,向患有肿瘤的患者施用携带抗肿瘤药物的、双特异性抗体靶向的微细胞导致抗肿瘤应答与当INF- γ 未激活时——例如,当其水平低于检测极限时——所观察到的相比极大地改进。微细胞介导的抗肿瘤活性和升高的INF- γ 之间的此协同作用根据增加的肿瘤应答的程度是显而易见的。不承诺为任何具体的机制(一种或多种),本发明人预期本文描述的方法利用了宿主抗肿瘤应答中重要的免疫刺激中的关键的途径。细菌衍生的微细胞和INF- γ 在免疫刺激中引起不同的途径,其在增大抗肿瘤应答中共同地重要,所述抗肿瘤应答在抗肿瘤药物经由根据本公开内容的双特异性抗体靶向的微细胞被细胞内递送至肿瘤细胞后起始。

[0022] 本发明人还发现围绕肿瘤细胞的血管呈现出完整性的损失;即,脉管具有大的穿孔并且是“漏的”,甚至在血脑屏障(BBB)环境中。违反常规的理解,因此,与微细胞一样大的微粒,即,比上面讨论的BBB的一致孔径限制大的多,却比漏的血管的壁中的穿孔小;因此,它们可通过这些穿孔被动地外渗并且进入肿瘤微环境。

[0023] 一旦进入肿瘤微环境,微细胞能够通过宿主肿瘤细胞引发受体介导的内化,并且被它们取出。因而,包裹有抗肿瘤剂的微细胞将释放药剂进入肿瘤细胞的细胞质,将其杀死。

[0024] 虽然已经建议将INF- γ 用于肿瘤治疗,但是很大程度上由于其高毒性,其临床应用迄今为止都有限。INF- γ 刺激对肿瘤细胞的免疫应答的能力还未见非常成功。因此,在本发明的背景下,INF- γ 所起的作用不仅是有利的,而且是真正地意想不到的。

[0025] 因此,在其方面的一个中,本公开内容提供了用于肿瘤的疗法,其需要向患有肿瘤的患者施用由携带抗肿瘤剂的多个完好的、细菌衍生的微细胞组成的组合物,同时还向患者施用增加他或她的INF- γ 水平的药剂。根据另一个方面,死细菌细胞可以与微细胞一起使用或代替微细胞,因为这样的细胞同样可以携带抗癌药物,所述抗癌药物在摄入靶肿瘤细胞时释放。参见,例如,公布的国际申请W0/2008/012695,其内容通过引用并入本文。

[0026] 含有携带药物的微细胞和/或死细菌细胞的组合物的施用优选地是全身性的,例如,静脉内的或动脉内的。进一步,INF- γ 或诱导INF- γ 的表达的药剂可以通过不同的途径施用,即,皮下的或肌肉内的。可以伴随INF- γ 或在不同时间时施用微细胞和/或死细菌细胞治疗剂。

[0027] (A)定义

[0028] 除非另外规定,用于本说明书的所有技术和科学术语具有与相关领域的技术人员一般所理解的相同的含义。

[0029] 为了方便,下面提供了在说明书、实施例和所附的权利要求中采用的某些术语和短语的含义。整个说明书定义了其它术语和短语。

[0030] 单数形式“一个(a)”、“一个(an)”和“该(the)”包括复数指代,除非本文另外明确地规定。

[0031] 在本文可交换地使用的“癌症(cancer)”、“瘤(neoplasm)”、“肿瘤(tumor)”、“恶性肿瘤(malignancy)”和“癌(carcinoma)”是指表现出异常生长表型的细胞或组织,其特征在于细胞增殖控制的显著丧失。本公开内容的方法和组合物特别适用于恶性、预转移性、转移性和非转移性细胞。

[0032] “药物”是指在动物中,特别是在哺乳动物和人中产生局部或全身性效果的任何生理学或药理学活性物质。

[0033] 在本说明书中可交换地使用的术语“个体”、“对象”、“宿主”和“患者”是指期望对其诊断、处理或治疗的任何哺乳动物对象。个体、对象、宿主或患者可以是人或非人动物。因而,合适的对象可以包括但不限于非人灵长类、牛、马、狗、猫、豚鼠、兔、大鼠和小鼠。

[0034] 术语“治疗(treatment、treating、treat)”等是指在肿瘤患者中获得期望的药理学和/或生理学效果。效果在完全地或部分地防止肿瘤或其症状方面可以是预防性的,和/或在部分或完全稳定化或治愈肿瘤和/或归因于肿瘤的不利效果方面可以是治疗性的。治疗涵盖哺乳动物中,特别是人中的肿瘤的任何治疗。特别地,期望的效果是肿瘤应答,其可以测量为肿瘤质量的减少或肿瘤质量增加的抑制。除肿瘤应答以外,总存活率、无进展存活率或肿瘤复发时间的增加,或者不利效果的减少也可以在临床上用作期望的治疗效果。

[0035] (B)治疗

[0036] 本公开内容通过实验证据来反映和证实,与本发明人的发现一致,细菌衍生的且完好的微细胞或完好的死细菌细胞,当连同增加IFN- γ 的水平水平的药剂一起施用至肿瘤患者时,可以实现比当单独地施用微细胞或死细菌细胞时更出人意料地大的疗效。

[0037] (C)抗肿瘤剂

[0038] 术语“抗肿瘤剂”表示预防或抑制瘤细胞的生长、发育、成熟或扩散的化学或生物药物。

[0039] 在本公开内容的背景下,选择用于治疗给定的肿瘤患者的抗肿瘤剂取决于多个因素,其与常规的医疗实践一致。这些因素包括但不限于患者的年龄、肿瘤的阶段、和患者已经接受的任何先前治疗。

[0040] 根据本公开内容,药物可以选自下面详述的类别中的一个,用于包裹进入完好的、细菌衍生的微细胞,其然后被施用以治疗肿瘤。这些药物还可以是根据药物设计和发现工作设计的合成类似物。

[0041] • 多官能烷化剂,例举环磷酰胺(环磷氮芥)、氮芥、苯丙氨酸氮芥(美法兰)、瘤可宁(苯丁酸氮芥)、噻替派(Thiopeta(Thioplex))、白消安(马利兰)。

[0042] • 烷化药物,例举甲基苄肼(丙卡巴肼)、达卡巴嗪(DTIC)、六甲蜜胺(克瘤灵(Hexalen))、苯丁酸氮芥(Cloramubicil)、顺铂(氯氨铂)、卡铂、异环磷酰胺(Ifosafamide)、奥沙利铂。

[0043] • 抗代谢物,例举氨甲蝶呤(MTX)、6-硫嘌呤(Thiopurines(巯基嘌呤[6-MP]、硫鸟嘌呤[6-TG]))、巯基嘌呤(Purinethol)、硫鸟嘌呤、磷酸氟达拉滨、克拉屈滨:(克拉立平(Leustatin))、喷司他丁、氟尿嘧啶(5-FU)、阿糖胞苷(ara-C)、阿扎胞苷。

[0044] • 植物碱、萜类和拓扑异构酶抑制剂,例举长春花碱(长春碱)、长春新碱(长春灭

瘟碱)、长春碱酰胺、长春瑞滨、鬼臼脂素(依托泊甙{VP-16}和替尼泊甙{VM-26})、喜树碱(托泊特坎和伊立替康)、紫杉烷比如紫杉醇(紫杉酚)和多烯紫杉醇(Docetaxel(泰素替尔))。

[0045] • 抗生素,例举亚德里亚霉素(阿霉素、Rubex、阿霉素脂质体(Doxil))、柔红霉素、多卡霉素(Duocarmycin)、伊达比星、放线菌素D(更生霉素)、普卡霉素(光辉霉素)、丝裂霉素:(丝裂霉素C)、博莱霉素(硫酸博莱霉素)。

[0046] • 激素剂,例举雌性激素和雄性激素抑制剂(他莫昔芬和氟他胺)、促性腺激素释放激素激动剂(亮丙瑞林和戈舍瑞林(促效药))、芳香酶抑制剂(氨鲁米特和阿那曲唑(Anastrozole(瑞宁得(Arimidex))))。

[0047] • 各种抗癌药物,例举安吡啶、天冬氨酰酶(左旋门冬酰胺酶)、羟基脲、米托蒽醌(诺安托(Novantrone))、米托坦(解腺瘤(Lysodren))、美登素(Maytansinoid)、视黄酸衍生物、骨髓生长因子(沙格司亭和非格司亭)、氨磷汀。

[0048] • 干扰叶酸代谢的药剂,例如,培美曲塞(Pemetrexed)。

[0049] • DNA低甲基化药剂,例如,阿扎胞苷、地西他滨。

[0050] • 聚(二磷酸腺甙[ADP]-核糖)聚合酶(PARP)途径抑制剂,比如Iniparib、奥拉帕尼(Olaparib)、维利帕尼(Veliparib)。

[0051] • PI3K/Akt/mTOR途径抑制剂,例如,依维莫司(Everolimus)。

[0052] • 组蛋白脱乙酰基酶(HDAC)抑制剂,例如,伏立诺他(Vorinostat)、恩替诺特(Entinostat(SNDX-275))、莫替司他(Mocetinostat(MGCD0103))、帕比司他(Panobinostat(LBH589))、罗咪酯肽(Romidepsin)、丙戊酸。

[0053] • 细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)抑制剂,例如,夫拉平度(Flavopiridol)、奥罗莫星(Olomoucine)、Roscovitine、Kenpaullone、AG-024322(辉瑞)、海洋活性生物碱(Fascaplysin)、Ryuvidine、Purvalanol A、NU2058、BML-259、SU9516、PD-0332991、P276-00。

[0054] • 热激蛋白(HSP90)抑制剂,例如,格尔德霉素、坦螺旋霉素(Tanespimycin)、阿螺旋霉素(Alvespimycin)、根赤壳菌素、鱼藤素、BIIB021。

[0055] • 鼠双微体2(MDM2)抑制剂,例如,顺式-咪唑啉、苯并二氮杂二酮、螺-羟吡啶、异喹啉酮、噻吩、5-脱氮黄素(Deazaflavin)、色胺。

[0056] • 间变性淋巴瘤激酶(ALK)抑制剂,例如,氨基吡啶、二氨基嘧啶、吡啶并异喹啉、吡咯并吡啶、吡啶并咪唑、吡咯并嘧啶、二苯胺嘧啶。

[0057] • 聚[ADP核糖]聚合酶(PARP)抑制剂,示例苯甲酰胺、二氮杂萘酮、三环吡啶、苯并咪唑、吡啶、吡咯并吡啶、二氮杂萘酮、异吡啶啉酮。

[0058] 本公开内容中可使用的活性剂不限于上面列举的那些药物类别或具体药剂。不同的发现平台继续产生针对癌细胞的独特分子特征的新的药剂;实际上,已经发现了数以千计的这样的化学和生物学药物,仅在本文列出了其中的一些。但是,依据本公开内容中的发现,完好的、细菌衍生的微细胞和死细菌细胞适应包裹多种多样的亲水性或疏水性活性剂的令人惊讶的能力意味着基本上任何这样的药物——当包裹在微细胞中时——具有治疗癌症的潜力。

[0059] 同样地,该类抗肿瘤剂的示例是放射性核素、化疗药物和功能核酸,包括但不限于

调控RNA。

[0060] 1.放射性核素

[0061] “放射性核素”是具有不稳定核的原子,即,其特征在于过量的可用能量被赋予至在核内新产生的放射微粒或原子电子。因此,放射性核素经历放射性衰变,并且放射 γ 射线(一种或多种)和/或亚原子微粒。众多放射性核素在本领域中是已知的,并且已知它们中的许多适于医疗用途,比如钷-90、钨-99m、碘-123、碘-124、碘-125、碘-131、铷-82、铊-201、镓-67、氟-18、氙-133和铟-111。

[0062] 已经发现放射性核素在核医学中广泛应用,具体地用作破坏肿瘤细胞的 β 射线放射体。因此,放射性核素适合用作本公开内容中的抗肿瘤剂。

[0063] 放射性核素可以通过任何已知的技术与完好的、细菌衍生的微细胞相关联。因而,蛋白质或其它微细胞表面部分(参见下面)可以以放射性核素标记,其使用商业上可获得的标记手段,比如使用Pierce碘化试剂——Pierce Biotechnology Inc.(Rockford,IL)的产品,在Rice等,Semin.Nucl.Med.41,265-282(2011)中详述。可选地,放射性核素可以并入微细胞内部的蛋白质。

[0064] 在后一种情况中,产微细胞菌株转化有编码外源蛋白的质粒DNA。当微细胞在细胞不对称分裂期间形成时,质粒DNA的多个拷贝分离为微细胞细胞质。在存在放射标记的氨基酸的情况下,在使得外源蛋白在微细胞内部表达的条件下,由质粒DNA得到的重组微细胞被温育,并入携带放射性核素的氨基酸。依据Clark-Curtiss和Curtiss,Methods Enzymol.101:347-362(1983)的方案,例如,重组微细胞在包含 ^{35}S -甲硫氨酸的最小生长培养基中温育,由此新表达的、质粒编码的蛋白质并入 ^{35}S -甲硫氨酸。可以使用相似的方法以使得重组微细胞如期望地被其它放射性标记包裹。

[0065] 例如,使用Fukuda,Curr.Protocols Molec.Biol.(Suppl.26),17.5.1-17.5.8(1994)描述的已经确立的方案,在微细胞表面上的寡糖也可以被放射标记。微细胞特有的这样的寡糖的示例是在衍生自格兰氏阴性菌的微细胞的表面上发现的脂多糖(LPS)的O-多糖组分(参见下面)。

[0066] 在这方面,优选的方法是放射性标记用于将微细胞靶向至特定肿瘤的双特异性抗体。参见下文G部分和专利公开US2007/0237744,其内容通过引用并入本文。即,“包被”在微细胞上的双特异性抗体暴露显著量的额外的表面蛋白用于放射性标记。因此,可能实现与包被抗体的微细胞相关联的放射性标记的较高比活性。相比之下,非包被的微细胞的放射性标记,即,当放射性核素仅标记特有部分时,可以导致较弱的标记(较低的比活性)。在一个实施方式中,认为此较弱的标记的出现是因为衍生自格兰氏阴性菌的微细胞的外膜相关蛋白被LPS掩盖,如下面进一步讨论的,所述LPS包括覆盖微细胞表面的O-多糖的长链。

[0067] 对于治疗肿瘤,本公开内容的组合物将以单剂量或多剂量递送,其完全提供一定程度的肿瘤内辐射,如果不消除全部肿瘤,至少足以减少肿瘤质量。可以根据具体情况沿着此思路监测治疗的进展。然而,一般而言,在组合物中包裹的放射性的量通常将大概是大约30至50Gy,虽然本发明还预期更高量的放射性,即大约50至200Gy,其给出了大约30Gy和大约200Gy之间的整体范围。

[0068] 在一些情况下,包裹在组合物中的放射性的量甚至可以低于上面提及的,前提是微细胞携带的放射性核素被高效和特定地递送至肿瘤。因此,在一个方面,组合物包含大约

20至40Gy,或大约10至30Gy,或大约1至约20Gy,或小于10Gy。

[0069] 2. 化疗药物

[0070] 在本公开内容中采用的抗肿瘤剂还可以是化疗药物。在本说明书中,“化疗药物”、“化疗剂”和“化疗”可交换地使用以指示有能力杀死或破坏瘤细胞的药物。化疗剂可以是小分子药物或生物药物,如下面进一步详述的。

[0071] “小分子药物”亚类包含以下化合物,其特征在于具有(i)对生物学过程的影响和(ii)与蛋白质和聚合物大分子对比低的分子量。小分子药物通常是大约800道尔顿或更小,具有大约150道尔顿的下限,如示例**Temodar®**(替莫唑胺),在大约194道尔顿处,其用于治疗多形性成胶质细胞瘤和其它类型的脑癌。在此背景下,“约”指示合格的分子量值经历测量精度的变化和大概几个道尔顿或十几个道尔顿的实验误差。因而,小分子药物可以具有大约900道尔顿或更小,大约800或更小,大约700或更小,大约600或更小,大约500或更小,或大约400道尔顿或更小,例如,大约150至大约400道尔顿的范围的分子量。更具体地,小分子药物可以具有大约400道尔顿或更大,大约450道尔顿或更大,大约500道尔顿或更大,大约550道尔顿或更大,大约600道尔顿或更大,大约650道尔顿或更大,大约700道尔顿或更大,或大约750道尔顿或更大的分子量。在另一个实施方式中,包裹入微细胞的小分子药物具有大约400和大约900道尔顿之间,大约450和大约900道尔顿之间,大约450和大约850道尔顿之间,大约450和大约800道尔顿之间,大约500和大约800道尔顿之间,或大约550和大约750道尔顿之间的分子量。

[0072] 具体地,合适的小分子药物包括但不限于氮芥、亚硝基脲(nitrosourea)、环乙亚胺、烷基磺酸盐、四嗪、铂化合物、嘧啶类似物、嘌呤类似物、抗代谢物、叶酸类似物、萘环类抗生素、紫杉烷、长春花生物碱和拓扑异构酶抑制剂等。因此,用于本发明的小分子药物可以选自下列等中任一种:烯二炔(enediyne),比如达内霉素A、衣霉素(unicalamycin)、加里刹霉素 γ 1和加里刹霉素 θ 1;meayamicin——FR901464的合成类似物;例如,如由Tanpure等,Bioorg. Med. Chem. 21:8019-32(2013)描述的苯并环庚烯衍生物;阿里他汀(auristatin),比如阿里他汀E、单甲基阿里他汀E(MMAE)和阿里他汀F——其是海兔毒素(dolastatin)的合成类似物;duocarmycin比如多卡霉素SA和CC-1065;美登生碱和其衍生物(美登素),比如DM1和DM4;伊立替康(**Camptosar®**)和其它拓扑异构酶抑制剂,比如托泊特坎、依托泊甙、米托蒽醌和替尼泊甙;和谷田霉素(yatakemycin),其合成由Okano等,J. Am. Chem. Soc. 128:7136-37(2006)详细描述。

[0073] 更具体地,在此段中详细描述的具体的小分子药物中的任一个或多个或全部是那些适用于本发明的示例:放线菌素-D、美法兰、阿糖胞苷、阿那曲唑、BiCNU、比卡鲁胺、比生群、博莱霉素、白消安、卡培他滨(**Xeloda®**)、卡铂、碳铂(carboplatinum)、卡莫司汀、CCNU、瘤可宁、顺铂、克拉屈滨、CPT-11、环磷酰胺、阿糖胞苷、胞嘧啶阿拉伯糖苷、环磷氮芥、达卡巴嗪、放线菌素D、柔红霉素、右雷佐生、多烯紫杉醇、亚德里亚霉素、DTIC、表阿霉素、环乙亚胺、依托泊甙、氟苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、氟他胺、福莫司汀、吉西他滨、六甲铵、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺(ifosfamide)、伊立替康、洛莫司汀、氮芥、苯丙氨酸氮芥、巯基嘌呤、氨甲蝶呤、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、帕米膦酸盐、喷司他丁、普卡霉素、丙卡巴肼、链脲霉素、STI-571、他莫昔芬、替莫唑胺、替尼泊甙、四嗪、硫鸟嘌呤、噻替派、托

姆得司、托泊特坎、曲奥舒凡(treosulphan)、三甲曲沙、长春花碱、长春新碱、长春碱酰胺、长春瑞滨和VP-16。

[0074] 为了本描述的目的,相比之下,“生物药物”被定义以指示通过生物学过程可以产生的任何生物学活性大分子,不包括下面讨论的“功能核酸”和通过大小限定为小分子药物的多肽,如上面限定的。因而,“生物药物”亚类不包括小分子药物和功能核酸亚类并且不与其重叠。生物药物的示例是天然的或重组的或合成地制造的——例如,使用药物化学和药物设计的工具——治疗性蛋白和抗体。

[0075] 然而,设计用于化疗目的的某些分子由于不能接受的毒性或其它安全考虑在临床前或临床试验期间失败。本发明人已经显示将化疗药物包裹在微细胞中,接着全身性递送至肿瘤患者,导致药物递送至肿瘤细胞。进一步,甚至在肿瘤细胞被破坏且含有药物的细胞质被释放至附近正常组织后,该结果对正常组织没有毒性。这是因为药物已经与肿瘤细胞结构比如DNA结合,并且不再攻击正常细胞。因此,本发明对于将高毒性的化疗药物递送至肿瘤患者是特别有用的。

[0076] 本说明书中的短语“高毒性的化疗药物”或“剧毒性的化疗药物”是指与其对癌细胞的有效剂量相比,对正常细胞具有相对低的致死剂量的化疗药物。因而,在一方面,高毒性的化疗药物对靶向癌症具有比其半数有效剂量(ED₅₀)低的半数致死剂量(LD₅₀),所述靶向癌症比如(1)为其设计该药物的癌症类型,(2)其中对该药物运行临床前或临床试验的第一癌症类型,或(3)其中该药物在所有测试的癌症中显示最高功效的癌症类型。例如,高毒性的化疗药物可以具有比用于靶向癌症的药物的ED₅₀低大约500%、400%、300%、250%、200%、150%、120%或100%的LD₅₀。在另一个方面,高毒性的化疗药物具有最大亚致死剂量(即,不引起严重的或不可逆的毒性的最高剂量),其低于其对靶向癌症的最小有效剂量,例如,最小有效剂量的大约500%、400%、300%、250%、200%、150%、120%、100%、90%、80%、70%、60%或50%。

[0077] 因此,根据本说明书的一个实施方式,对象中的肿瘤通过以下方法治疗,所述方法包括全身性施用治疗有效量的由多个完好的、细菌衍生的微细胞组成的组合物,其每个包含高毒性的化疗药物。下面讨论的美登素和多卡霉素代表如此采用的剧毒性的化疗药物类。

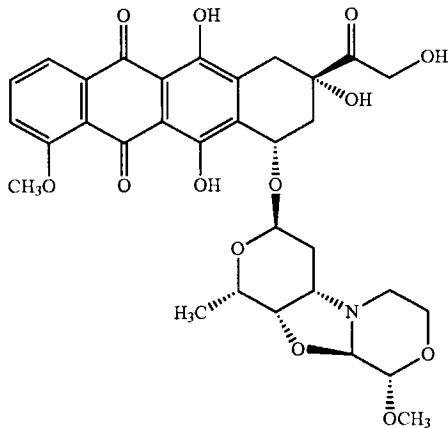
[0078] 在本背景下合适的癌症化疗药物包括氮芥、亚硝基脲、环乙亚胺、烷基磺酸盐、四嗪、铂化合物、嘧啶类似物、嘌呤类似物、抗代谢物、叶酸类似物、蒽环类抗生素、紫杉烷、长春花生物碱、拓扑异构酶抑制剂和激素剂等。

[0079] 作为小分子药物亚类的示例的化疗药物是放线菌素-D、美法兰、阿糖胞苷、阿那曲唑、BicNU、比卡鲁胺、博莱霉素、白消安、卡培他滨(Xeloda®)、卡铂、碳铂、卡莫司汀、CCNU、瘤可宁、顺铂、克拉屈滨、CPT-11、环磷酰胺、阿糖胞苷、胞嘧啶阿拉伯糖苷、环磷氮芥、达卡巴嗪、放线菌素D、柔红霉素、右雷佐生、多烯紫杉醇、亚德里亚霉素、DTIC、表阿霉素、环乙亚胺、依托泊甙、氟苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、氟他胺、福莫司汀、吉西他滨、六甲铵、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊立替康、洛莫司汀、氮芥、苯丙氨酸氮芥、巯基嘌呤、氨甲蝶呤、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、帕米膦酸盐、喷司他丁、普卡霉素、丙卡巴肼、链脲霉素、STI-571、他莫昔芬、替莫唑胺、替尼泊甙、四嗪、硫鸟嘌呤、噻替派、托姆得司、托泊特坎、曲奥舒凡、三甲曲沙、长春花碱、长春新碱、长春碱酰胺、长春瑞滨和VP-16。

[0080] 美登素(分子量:~738道尔顿)是美登生碱的一组化学衍生物,其具有强细胞毒性。虽然由于毒性考虑,认为对人患者使用不安全,但是依据本发明,美登素适于经由微细胞递送至肿瘤患者。

[0081] 多卡霉素(分子量:~588道尔顿)是首先从链霉菌属细菌分离的一系列相关天然产品。它们也具有强细胞毒性,但是认为对人使用不安全。同美登素一样,多卡霉素是用于本发明的适合的化疗药物。

[0082] 同样地,示例是在国际专利申请W01998/002446中描述的吗啉基蒽环类抗生素衍生物类中的化合物。这样的衍生物是奈莫柔比星(nemorubicin)(3'-脱氨基-3'-[2(S)-甲氧基-4-吗啉基]亚德里亚霉素)、a/k/a MMDX和其主要代谢物PNU-159682(3'-脱氨基-3''-4'-脱水-[2''(S)-甲氧基-3''(R)-羟基-4''-吗啉基]亚德里亚霉素),其结构式显示在下面,以及在美国专利号8,470,984中描述的这些四个其它这样的衍生物,其内容通过引用并入本文:3'-脱氨基-3''-4'-脱水-[2''(S)-甲氧基-3''(R)-羟基-4''-吗啉基]伊达比星;3'-脱氨基-3''-4'-脱水-[2''(S)-甲氧基-3''(R)-羟基-4''-吗啉基]柔红霉素;3'-脱氨基-3''-4'-脱水-[2''(S)-甲氧基-3''(R)-羟基-4''-吗啉基]-caminomycin;和3'-脱氨基-3''-4'-脱水-[2''(S)-乙氧基-3''(R)-羟基-4''-吗啉基]亚德里亚霉素。



[0083]

PNU-159682

[0084] 依据本发明,任何上述衍生物的药学上可接受的酸加成盐也是此组自身荧光的吗啉基蒽环类抗生素衍生物的成员。

[0085] 生物化疗药物的亚类包括但不限于天冬氨酰酶、AIN-457、巴比纽单抗(bapineuzumab)、贝利木单抗(belimumab)、brentuximab、briakinumab、卡那单抗(canakinumab)、西妥昔单抗(cetuximab)、达妥珠单抗(dalotuzumab)、地诺单抗(denosumab)、依帕珠单抗(epratuzumab)、estafenatox、法利珠单抗(farletuzumab)、芬妥木单抗(figitumumab)、加利昔单抗(galiximab)、吉妥珠单抗(gemtuzumab)、吉瑞昔单抗(girentuximab(wx-g250))、赫赛汀(herceptin)、替伊莫单抗(ibritumomab)、英妥珠单抗(inotuzumab)、易普利单抗(ipilimumab)、美泊利单抗(mepolizumab)、莫罗单抗(muromonab)-CD3、他那莫单抗(naptumomab)、奈昔木单抗(necitumumab)、尼妥珠单抗(nimotuzumab)、奥克珠单抗(ocrelizumab)、奥法木单抗(ofatumumab)、奥昔珠单抗(otelixizumab)、奥佐米星(ozogamicin)、帕昔单抗(pagibaximab)、帕尼单抗(panitumumab)、帕妥珠单抗(pertuzumab)、雷莫芦单抗(ramucirumab)、瑞利珠单抗

(reslizumab)、利妥昔单抗(rituximab)、regn88、苏兰珠单抗(solanezumab)、他尼珠单抗(tanezumab)、替利珠单抗(teplizumab)、替伊莫单抗(tiuxetan)、托西莫单抗(tositumomab)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、特利姆单抗(tremelimumab)、维珠单抗(vedolizumab)、扎鲁木单抗(zalutumumab)和zanolimumab。

[0086] 组合物可以包含至多大约1mg的化疗药物。可选地,化疗药物的量可以至多为大约750 μ g、500 μ g、250 μ g、100 μ g、50 μ g、10 μ g、5 μ g、1 μ g、0.5 μ g或0.1 μ g。在另一个方面,当不包裹入微细胞使用时,组合物包含的化疗药物的量少于大约1/1,000,或任选地少于大约1/2,000、1/5,000、1/10,000、1/20,000、1/50,000、1/100,000、1/200,000或1/500,000的治疗有效量的药物。依据本公开内容的仍另一个方面,组合物可以包含至少约1nmol的化疗药物。因此,本公开内容还包含其中化疗药物的量分别是至少大约2nmol、约3nmol、约4nmol、约5nmol、约10nmol、约20nmol、约50nmol、约100nmol和约800nmol的实施方式。

[0087] 3. 功能核酸

[0088] “功能核酸”是指当引入宿主细胞后,特异性地干扰蛋白质的表达的核酸分子。关于治疗肿瘤,根据本公开内容,优选的是,经由完好的、细菌衍生的微细胞递送至肿瘤细胞的功能核酸有效负荷抑制促进肿瘤细胞增殖、血管生成或化疗抗性的基因和/或抑制细胞凋亡或细胞周期停滞的基因;即,“肿瘤促进基因”。

[0089] 通常的情况是,在本公开内容中使用的功能核酸分子通过与蛋白质的转录物相互作用具有减少蛋白质表达的能力。本公开内容的此类微细胞有效负荷包括调控RNA,比如siRNA、shRNA、短RNA(通常长度小于400个碱基)、小分子RNA(miRNA)、核酶和诱饵RNA、反义核酸和LincRNA等。在此方面,“核酶”是指具有以核苷酸碱基序列特异性方式重复地切割其它RNA分子的酶活性的RNA分子。“反义寡核苷酸”是指与一部分具体的基因转录物互补的核酸分子,使得该分子可以与转录物杂交并阻断其翻译。反义寡核苷酸可以包括RNA或DNA。“LincRNA”或“长的基因间的非编码RNA”标题包含编码长于200个核苷酸的转录物的非蛋白质。LincRNA可以调控基因的转录、剪接和/或翻译,例如,如Khalil等,Proc Nat'l Acad. USA 106:11667-72(2009)讨论的。

[0090] 每种类型的调控RNA可以是功能核酸分子的来源,其如上面描述的抑制肿瘤促进基因,并且因此,其适于根据本公开内容的用途。因而,在本公开内容的一个优选的实施方式中,完好的微细胞携带介导转录后的基因沉默RNA干扰(RNAi)机制的siRNA分子,可以利用其靶向肿瘤促进基因。例如,参见MacDiarmid等,Nature Biotech. 27:645-51(2009)(抗体呈递微细胞递送剂,和化疗药物、siRNA,其阻止对药物产生抗性),以及Oh和Park, Advanced Drug Delivery Rev. 61:850-62(2009)(递送治疗性siRNA以分别治疗乳腺癌、卵巢癌、子宫颈癌、肝癌、肺癌和前列腺癌)。

[0091] 如指出的,“siRNA”通常是指长为大约10至大约30个核苷酸的双链RNA分子,其因它们特异性地干扰蛋白质表达的能力而命名。优选地,siRNA分子长为12-28个核苷酸,更优选地长为15-25个核苷酸,仍更优选地长为19-23个核苷酸和最优选地长为21-23个核苷酸。因此,siRNA分子的长度可以是12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或29个核苷酸。

[0092] 一条链的长度表示siRNA分子的长度。例如,描述为长为21个核糖核苷酸(21-mer)的siRNA可以包括对19个连续的碱基对退火的RNA的两条相反链。每条链上的两个剩下的核

糖核苷酸将形成“悬突”。当siRNA包含两条不同长度的链时,较长的链表示siRNA的长度。例如,含有长为21个核苷酸的一条链和长为20个核苷酸的第二条链的dsRNA构成21-mer。

[0093] 帮助特异性地设计siRNA和调控RNA的工具通常是现成的。例如,基于计算机的siRNA设计工具在网络上的www.dharmacon.com处是可用的。

[0094] 在另一个优选的实施方式中,本公开内容的完好的微细胞携带miRNA,其像siRNA一样能够介导转录后的基因沉默RNA干扰(RNAi)机制。也像siRNA一样,可以利用由miRNA介导的基因沉默效果靶向肿瘤促进基因。例如,参见Kota等,Cell 137:1005-17(2009)(在鼠肝癌模型中,miRNA经由转染的递送导致抑制癌细胞增殖、肿瘤特异性细胞凋亡,并且明显避免疾病进展,而没有毒性),以及Takeshita等,Molec. Ther. 18:181-87(2010)(合成miRNA经由瞬时转染的递送抑制转移性前列腺肿瘤细胞在骨组织上的生长)。

[0095] 虽然二者都介导RNA干扰,但是已经指出miRNA和siRNA的区别。在此方面,“miRNA”通常是指一类17至27个核苷酸的单链RNA分子(而不是如在siRNA的情况中的双链)。因此,miRNA分子的长度可以是17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27个核苷酸。优选地,miRNA分子长为21-25个核苷酸。

[0096] miRNA和siRNA之间的另一个区别是前者通常不完全互补mRNA靶点。另一方面,siRNA必须完全地与mRNA靶点互补。因此,siRNA通常导致单一的、特定靶点的沉默,而miRNA是混杂的。

[0097] 另外,虽然二者都装配入RISC(RNA-诱导的沉默复合物),但是在RISC装配前,siRNA和miRNA在它们各自的初步加工中不同。这些差别详细地描述在Chu等,PloS Biology 4:1122-36(2006),和Gregory等,Methods in Molecular Biology 342:33-47(2006)中。

[0098] 许多数据库充当miRNA存储库。例如,参见miRBase(www.mirbase.org)和tarbase(<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/DianaToolsNew/index.php?r=tarbase/index>)。在常规用法中,miRNA通常以前缀“-mir”结合顺序号命名。例如,在小鼠mir-352后发现的新的miRNA将命名为小鼠“mir-353”。

[0099] 此外,帮助设计包括miRNA的调控RNA的工具是现成的。在此方面,基于计算机的miRNA设计工具在网络上的wmd2.weigelworld.org/cgi-bin/mirnatools.pl处是可得的。

[0100] 如上面指出的,在本公开内容中采用的功能核酸可以抑制促进肿瘤细胞增殖、血管生成或化疗抗性的基因。受抑制的基因自身还可抑制细胞凋亡或细胞周期停滞。下面提供了可以由功能核酸靶向的基因的实例。

[0101] 本公开内容的功能核酸优选地靶向促进抗药性、抑制细胞凋亡或促进瘤表型的蛋白质的基因或转录物。在本领域已经实现在这些背景下的功能核酸策略的成功应用,但是没有微细胞载体的益处。参见,例如,Sioud,Trends Pharmacol.Sci.25:22-8(2004); Caplen,Expert Opin.Biol.Ther.3:575-86(2003);Nieth等,FEBS Lett.545:144-50(2003);Caplen和Mousses,Ann.NYAcad.Sci.1002:56-62(2003);Duxbury等,Ann.Surg.240:667-74(2004);Yague等,Gene Ther.11:1170-74(2004);和Duan等,Mol.Cancer Ther.3:833-8(2004)。

[0102] 有助于抗药性的蛋白质构成功能核酸的优选靶点。该蛋白质可以有助于获得性抗药性或内在抗药性。当患病细胞比如肿瘤细胞最初应答药物,但是在随后的治疗周期变得难治疗时,获得抗性表型。涉及获得性抗药性的有用的靶点包括ATP结合盒运载体,比如P-

糖蛋白(P-gp、P-170、PGY1、MDR1、ABCB 1、MDR-相关蛋白质,多元抗药性蛋白1)、MDR-2和MDR-3、MRP2(多元抗药性相关蛋白)、BCR-ABL(断点簇区-Abelson原癌基因)、STI-571抗性相关蛋白、肺抗性相关蛋白、环氧合酶-2、核因子 κ 、XRCC1(x射线交叉互补组1)、ERCC1(切除交叉互补基因)、GSTP1(谷胱甘肽S-转移酶)、突变体 β -微管蛋白和生长因子比如IL-6是涉及获得性抗药性的额外的靶点。

[0103] 有助于抗药性的具体有用的靶点包括ATP结合盒运载体,比如P-糖蛋白、MDR-2、MDR-3、BCRP、APT11a和LRP。

[0104] 有用的靶点还包括促进细胞凋亡抗性的蛋白质。这些包括Bcl-2(B细胞白血病/淋巴瘤)、Bcl-X_L、A1/Bfl 1、黏着斑激酶、二氢二醇脱氢酶和p53突变体蛋白质。

[0105] 有用的靶点进一步包括致癌的和突变的肿瘤抑制蛋白。这些的示例是 β -联蛋白、PKC- α (蛋白激酶C)、C-RAF、K-Ras(V12)、DP97Dead框RNA解旋酶、DNMT1(DNA甲基转移酶1)、FLIP(Flice样抑制蛋白)、C-Sfc、53BPI、多梳族蛋白EZH2(zeste同系物的增强子)、ErbB1、HPV-16E5和E7(人乳头瘤病毒早期5和早期7)、Fortilin&MCI1P(骨髓细胞白血病1蛋白)、DIP13 α (DDC相互作用蛋白13a)、MBD2(甲基CpG结合域)、p21、KLF4(Kruppel样因子4)、tpt/TCTP(转录控制肿瘤蛋白)、SPK1和SPK2(鞘氨醇激酶)、P300、PLK1(Polo样激酶-1)、Trp53、Ras、ErbB1、VEGF(血管内皮细胞生长因子)、BAG-1(BCL2-相关抗死亡基因1)、MRP2、BCR-ABL、STI-571抗性相关蛋白、肺抗性相关蛋白、环氧合酶-2、核因子 κ 、XRCC1、ERCC1、GSTP1、突变体 β -微管蛋白和生长因子。

[0106] 作为靶点,全局调控元件也是有用的,其由细胞质多腺苷酸化元件结合蛋白(CEPB)例举。例如,CEPB4在成胶质细胞瘤和胰腺癌中过表达,其中蛋白质激活数百种与肿瘤生长相关联的基因,并且其在健康细胞中检测不到(Oritz-Zapater等,Nature Medicine,doi:10.1038/nm.2540(2011年12月4日在网上出版))。因此,根据本说明书,可以经由施用下述组合物实现成胶质细胞瘤的治疗,所述组合物含有完好的、细菌衍生的微细胞,所述微细胞包含抵制CEPB4过表达的药剂,比如siRNA或破坏肿瘤细胞的CEPB4表达的其它功能核酸分子。

[0107] 进一步有用的功能核酸是涉及DNA复制和修复的那些。实例包括核糖核苷酸还原酶(RR),其是癌症的潜在治疗性靶点,因为其催化核糖核苷5'-二磷酸转化为它们相应的2'-脱氧核糖核苷5'-三磷酸,其对DNA复制和修复是必需的。参见D'Angiolella等,Cell:149:1023-34(2012)。人RR包括两个亚基——RRM1和RRM2,并且靶向两个亚基的功能核酸可用于本发明。有用的功能核酸进一步的实例包括复制蛋白A(RPA)——由70-kDa(RPA1)、32-kDa(RPA2)和14-kDa(RPA3)亚基组成的三聚体复合物,其对所有生物体中的DNA复制是必不可少的。参见Iftode等,Crit.Rev.Biochem.Mol.Biol.34:141-80(1999)。

[0108] (D)肿瘤

[0109] 本公开内容的组合物和方法有用于治疗多种肿瘤类型,而限于具体的种类。这是因为微细胞或死细菌细胞可以包裹不同的抗肿瘤剂,并且特别地,当附加有针对不同的肿瘤细胞具有特异性的双特异性配体时,可以靶向不同肿瘤类型的细胞。此外,微细胞或死细菌细胞结合IFN- γ 的能力期望能够刺激对任何肿瘤细胞的免疫应答。

[0110] 根据本公开内容的一个实施方式,本组合物和方法用于治疗选自以下的一种或多种癌症:肾上腺癌、肛门癌、再生障碍性贫血、胆管癌、膀胱癌、骨癌、成人脑/CNS肿瘤、儿童

脑/CNS肿瘤、乳腺癌、男性乳腺癌、儿童癌症、未知原发灶癌症(cancer of unknown primary)、卡斯尔曼病、宫颈癌、结肠/直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、尤因家族瘤(Ewing family of tumours)、眼癌、胆囊癌、胃肠道类癌瘤、胃肠道间质瘤(gist)、胃肠道滋养层细胞病、何杰金病、卡波西肉瘤、肾癌、喉癌与下咽癌、白血病、成人急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓细胞白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓细胞白血病(cml)、慢性髓单核细胞白血病(CMML)、儿童白血病、肝癌、肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肺类癌瘤、淋巴瘤、皮肤淋巴瘤、恶性间皮瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、鼻腔癌与鼻窦癌、鼻咽癌、成神经细胞瘤、非何杰金淋巴瘤、儿童非何杰金淋巴瘤、口腔癌与口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、垂体瘤、前列腺癌、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤-成人软组织癌、皮肤癌、皮肤癌-基底细胞与鳞状细胞、皮肤癌-黑素瘤、小肠癌、胃癌、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、沃尔丹斯特伦巨球蛋白血症和维尔姆斯肿瘤。

[0111] 在一个实施方式中,组合物和方法适于治疗脑瘤。存在多于120种类型的脑瘤。大部分医学机构使用世界卫生组织(WHO)分类系统鉴定脑瘤。WHO通过细胞起源和细胞如何表现对脑瘤进行分类,从最小攻击性(良性)至最大攻击性(恶性)。一些肿瘤类型被指定级别,范围从I级(最小恶性)至IV级(最大恶性),其表示生长速率。取决于肿瘤类型,分级系统中存在变化。个体肿瘤的分类和级别有助于预测其可能的表现。最频繁诊断的类型包括听神经瘤、星形细胞瘤(包括I级-毛细胞性星形细胞瘤、II级-低级星形细胞瘤、III级-间变性星状细胞瘤、和IV级-成胶质细胞瘤(GBM))、脊索瘤、CNS淋巴瘤、颅咽管瘤、其它神经胶质瘤(脑干神经胶质瘤、室管膜瘤、混合性神经胶质瘤、视神经胶质瘤和星状细胞增生性室管膜瘤)、成神经管细胞瘤、脑膜瘤、转移性脑瘤、少突神经胶质瘤、垂体瘤、原始神经外胚层肿瘤(PNET)、其它脑相关病症、和神经鞘瘤。

[0112] 儿童中,以下脑瘤类型是更常见的:脑干神经胶质瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、青少年毛细胞性星形细胞瘤(JPA)、成神经管细胞瘤、视神经胶质瘤、松果体肿瘤、原始神经外胚层肿瘤(PNET)和横纹肌样瘤。

[0113] (E)微细胞和死细菌细胞

[0114] “微细胞”是指细菌细胞的衍生物,其缺少染色体(“无染色体”)并且由二分裂期间细胞分裂与DNA分离配合的失调造成。微细胞不同于其它小囊泡,比如所谓的“膜泡”(尺寸为~0.2 μ m或更小),其在某些情况下自然地生成和释放,但是其不是由于特定的基因重排或游离基因表达。出于同样理由,完好的微细胞不同于细菌空壳,其不是由于特定的基因重排或游离基因表达生成的。在本公开内容中采用的细菌衍生的微细胞是完全完好的,并且因而区别于特征在于外膜或限定膜破裂或降解、甚至去除的其它无染色体形式的细菌细胞衍生物。参见美国专利号7,183,105的第111栏第54行及以下。表征本公开内容的微细胞的完好的膜使得治疗有效负荷滞留在微细胞内,直到有效负荷在肿瘤细胞内在摄取后被释放。

[0115] 从细菌细胞,比如大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌,可以制备在本公开内容中采用的微细胞。原核染色体复制与正常二分裂相关联,其涉及中期细胞膜形成。在大肠杆菌中,例如,min基因比如minCD的突变可以去除在细胞分裂期间在细胞极处膜形成的抑制,导致正常子细胞和少染色体微细胞的产生。参见Boer等,J.Bacteriol.174(1):63-70(1992);

Raskin&de Boer, J. Bacteriol. 181:6419-6424(1999); Hu&Lutkenhaus, Mol. Microbio. 34(1):82-90(1999); Harry, Mol. Microbiol. 40(4):795-803(2001)。

[0116] 除min操纵子突变以外,少染色体微细胞还在影响膜形成的一系列其它基因重排或突变后——例如,在枯草芽孢杆菌的divIVB1中——生成。参见Reeve和Cornett, J. Virol. 15:1308-16(1975)。微细胞还可在干扰涉及细胞分裂/染色体分离的蛋白质的基因表达水平后形成。例如,minE的过表达导致极性分裂和微细胞的产生。类似地,少染色体微细胞可以由染色体分离中的缺陷引起,例如,枯草芽孢杆菌中的smc突变(Britton等, Genes Dev. 12:1254-9(1998))、枯草芽孢杆菌中的spo0J缺失(Iretton等, J. Bacteriol. 176:5320-29(1994))、大肠杆菌中的mukB突变(Hiraga等, J. Bacteriol. 171:1496-1505(1989))和大肠杆菌中的parC突变(Stewart和D'Ari, J. Bacteriol. 174:4513-6(1992))。进一步,CafA在复制后可以提高细胞分裂速率和/或抑制染色体分区(Okada等, J. Bacteriol. 176:917-22(1994)),导致链接细胞(chained cell)和少染色体微细胞的形成。

[0117] 因此,由于在这些细菌中细菌细胞分裂的保守性质,可以从格兰氏阳性或格兰氏阴性起源的任何细菌细胞制备本公开内容的微细胞。而且,如上面指出的,用于本公开内容的微细胞应当具备完好的细胞壁(即,“完好的微细胞”),并且应当与不区别和分离于归因于特定基因重排或游离基因表达的其它小囊泡,比如膜泡。

[0118] 在给定的实施方式中,如提及的,用于微细胞的亲本(来源)细菌可以是格兰氏阳性,或它们可以是格兰氏阴性。因此,在一个方面,亲本细菌选自Terra-/Glidobacteria (BV1),变形菌(Proteobacteria)(BV2),包括螺旋体属、鞘脂杆菌(Sphingobacteria)和浮游菌(Planctobacteria)的BV4中的一种或多种。依据另一个方面,细菌选自硬壁菌门(BV3)比如杆菌、梭状芽孢杆菌或软皮菌/柔膜体纲,或放线菌(BV5)比如放线菌目或双歧杆菌目中的一种或多种。

[0119] 依据本发明,死细菌细胞是如在第二版的Bergey系统生物学手册中限定的细菌、蓝藻目、真细菌(cubacteria)和古细菌的非生命原核细胞。如果它们具备完好的细胞壁和/或细胞膜并包含内源于细菌物种的遗传物质(核酸),这样的细胞被认为是“完好的”。例如,制备死细菌细胞的方法描述在美国专利公布号2008/0038296中,其内容通过引用并入本文。

[0120] 在仍进一步的方面,细菌选自以下中的一种或多种:真细菌(Eobacteria(绿湾菌(Chloroflexi)、异常球菌(Deinococcus)-栖热菌属))、蓝藻目、热脱硫杆菌(Thermodesulfobacteria)、嗜热细菌(产水菌(Aquificae)、热袍菌(Thermotogae))、 α 、 β 、 γ (肠杆菌科)、 δ 或 ϵ 变形菌、螺旋体属、纤维杆菌(Fibrobacteres)、绿菌(Chlorobi)/拟杆菌(Bacteroidetes)、衣原体/疣微菌(Verrucomicrobia)、浮游菌(Planctomycetes)、酸杆菌(Acidobacteria)、产金菌(Chrysiogenetes)、脱铁杆菌(Deferribacteres)、梭杆菌(Fusobacteria)、芽单孢菌(Gemmatimonadetes)、硝化螺旋菌(Nitrospirae)、互养菌(Synergistetes)、网团菌(Dictyoglomi)、黏胶球形菌芽孢杆菌(Lentisphaerae Bacillales)、芽孢杆菌(Bacillaceae)、利斯特氏菌(Listeriaceae)、葡萄球菌(Staphylococcaceae)、乳杆菌(Lactobacillales)、肠球菌(Enterococcaceae)、乳杆菌(Lactobacillaceae)、明串珠菌(Leuconostocaceae)、链球菌(Streptococcaceae)、梭菌

(Clostridiales)、盐厌氧菌(Halanaerobiales)、热厌氧菌(Thermoanaerobacterales)、支原体(Mycoplasmatales)、虫原体(Entomoplasmatales)、厌氧支原体(Anaeroplasmatales)、无胆留原体(Acholeplasmatales)、Haloplasmatales、放线菌亚目(Actinomycineae)、放线菌科(Actinomycetaceae)、棒杆菌亚目(Corynebacterineae)、分枝杆菌科(Mycobacteriaceae)、诺卡氏菌科(Nocardiaceae)、棒状杆菌科(Corynebacteriaceae)、弗兰克氏菌亚目(Frankineae)、弗兰克氏菌科(Frankiaceae)、微球菌亚目(Micrococccineae)、短杆菌科(Brevibacteriaceae)和双歧杆菌科(Bifidobacteriaceae)。

[0121] 为了药物用途,本公开内容的组合物应当包括尽可能彻底地与免疫原性组分和其它毒性污染物分离的微细胞或死细菌细胞。在WO 2004/113507中描述了纯化细菌衍生的微细胞以去除游离内毒素和亲本细菌细胞的方法,其通过引用以其全部并入本文。简要地,纯化过程实现以下的去除:(a)较小的囊泡,比如膜泡,其大小通常小于 $0.2\mu\text{m}$, (b)从细胞膜释放的游离内毒素,和(c)亲本细菌——不论活的或死的——以及它们的碎片,其也是游离内毒素的来源。在诱导亲本细胞形成丝体、抗生素以杀死活的细菌细胞和抗游离内毒素的抗体后,尤其用去除较小囊泡和细胞碎片的 $0.2\mu\text{m}$ 过滤器,去除亲本细胞的 $0.45\mu\text{m}$ 过滤器等,可以实现该去除。

[0122] 纯化过程的基础是本发明人的发现:尽管它们的细菌来源不同,但是所有完好的微细胞大小大约是 400nm ,即,大于膜泡和其它较小的囊泡,并且仍小于亲本细菌。通过使用固态技术——比如电子显微镜,或通过液基技术——例如,动态光散射——可以完成微细胞的尺寸测定。通过每个这样的技术获得的尺寸值可以具有误差范围,并且该值在技术之间可以略微不同。因而,经由电子显微镜可以测量的干燥状态的微细胞的尺寸大约是 $400\text{nm} \pm 50\text{nm}$ 。另一方面,动态光散射可以测量尺寸为大约 $500\text{nm} \pm 50\text{nm}$ 的相同的微细胞。另外,可以再次使用动态光散射测量大约 400nm 至 $600\text{nm} \pm 50\text{nm}$ 的包裹药物的、配体靶向的微细胞。

[0123] 此尺寸值的散射在实践是容易地适用的,例如,如上所述,为了从免疫原性组分和其它毒性污染物分离微细胞的目的。即,完好的、细菌衍生的微细胞特征在于细胞质被刚性膜围绕,其给予了微细胞刚性的、球形的结构。此结构在透射电子显微图像中是明显的,其中在刚性膜的外部界限之间横跨微细胞测量微细胞直径。此测量提供了上面提及的 $400\text{nm} \pm 50\text{nm}$ 的尺寸值。

[0124] 衍生自格兰氏阴性菌的死细菌细胞或微细胞的另一个结构元素是脂多糖(LPS)的O-多糖组分,其经由脂质A锚钩嵌入外膜中。该组分是重复的糖残基单元的链,每条链具有四至五个糖的多达70至100个的重复单元。因为这些链不是刚性的,所以在液体环境中,如在体内,它们可采用波动的、柔性结构,所述结构给出海藻在珊瑚海环境中的通常表现;即,链随液体移动,同时仍锚定至微细胞膜。

[0125] 受O-多糖组分影响,动态光散射可以提供如上面指出的大约 500nm 至大约 600nm 的微细胞尺寸值。然而,来自格兰氏阴性和格兰氏阳性菌的微细胞以相似的方式容易地穿过 $0.45\mu\text{m}$ 过滤器,其证实了 $400\text{nm} \pm 50\text{nm}$ 的有效的微细胞尺寸。上面提及的散射尺寸被本发明包含,并且特别地,通过短语“大小大约 400nm ”等中的限定词“大约”指示。

[0126] 关于毒性污染物,本公开内容的组合物可以包含小于大约350EU的游离内毒素。在这方面,示例性的游离内毒素的水平分别是大约250EU、大约200EU、大约150EU、大约100EU、

大约90EU、大约80EU、大约70EU、大约60EU、大约50EU、大约40EU、大约30EU、大约20EU、大约15EU、大约10EU、大约9EU、大约8EU、大约7EU、大约6EU、大约5EU、大约4EU、大约3EU、大约2EU、大约1EU、大约0.9EU、大约0.8EU、大约0.7EU、大约0.6EU、大约0.5EU、大约0.4EU、大约0.3EU、大约0.2EU、大约0.1EU、大约0.05EU和大约0.01EU。

[0127] 本公开内容的组合物还可以包含至少大约 10^9 个微细胞或死细菌细胞,例如,至少大约 1×10^9 、至少大约 2×10^9 或至少大约 5×10^9 个。在一些实施方式中,组合物包含不超过大约 10^{11} 个微细胞或死细菌细胞,例如,不超过大约 1×10^{11} 或不超过大约 9×10^{10} 、或不超过大约 8×10^{10} 个。

[0128] (F)将抗肿瘤剂包裹入微细胞或死细菌细胞

[0129] 抗肿瘤剂,比如可以由核酸编码的蛋白质和功能核酸,可以通过将载体——比如编码抗肿瘤剂的质粒——转化入亲本细菌细胞来引入微细胞。当微细胞从亲本细菌细胞形成时,微细胞保留质粒和/或表达产物——抗肿瘤剂——的某些拷贝。在WO 03/033519中提供了将表达产物包裹入微细胞的更多细节,其内容通过引用以其全部并入本公开内容。

[0130] 在WO 03/033519中展示的数据表明,例如,携带哺乳动物基因表达质粒的重组微细胞可以被递送至吞噬细胞和非吞噬细胞。本申请还描述产微细胞的亲本菌株的遗传转化,其中在游离型复制的质粒DNA上携带异源核酸。当亲本细菌和微细胞分离后,一些游离DNA被分离入微细胞。所得的重组微细胞容易被哺乳动物吞噬细胞吞没,并且在细胞内吞噬溶酶体中降解。而且,一些重组DNA逸出吞噬溶酶体膜并被运送至哺乳动物细胞核,在此重组基因被表达。

[0131] 核酸还可直接包裹入微细胞。因而,通过在缓冲液中共温育多个完好的微细胞与核酸,可以直接将核酸包裹入完好的微细胞。缓冲组合物可以根据本领域中众所周知的条件变化,以便使完好的微细胞中的核酸的载荷量最优化。缓冲液也可以取决于待装载在微细胞中的核酸的核苷酸序列和长度变化。适合装载的示例性缓冲液包括但不限于磷酸盐缓冲液(PBS)。一旦被包裹,核酸保留在微细胞内部,并且受保护免于降解。例如,在无盐水中温育的包裹siRNA的微细胞的延长温育研究显示没有siRNA渗漏。

[0132] 在其它实施方式中,针对不同的mRNA靶点的多种核酸可以包裹在相同的微细胞中。这样的方法可以用于防治抗药性和细胞凋亡抗性。例如,癌症患者常规地表现出对化疗药物的抗性。通过比如多元抗药性(MDR)泵的基因和抗细胞凋亡基因等的过表达可以介导这样的抗性。为了防治此抗性,微细胞可以包裹对MDR相关基因治疗上显著浓度的功能核酸,并且在化疗前施用至患者。而且,由于大部分分子靶点经历突变并且具有多个等位基因,因此在相同的微细胞中包裹针对不同的mRNA靶点的多种功能核酸可以增强治疗成功。在WO 2009/027830中提供了将核酸直接包裹入微细胞的更多细节,其内容通过引用以其全部并入本公开内容。

[0133] 亲水性或疏水性小分子药物可以通过在包含微细胞的细胞外培养基和微细胞细胞质之间产生药物浓度梯度而包裹在微细胞中。当细胞外培养基包含比微细胞细胞质高的药物浓度时,药物自然地沿着此浓度梯度向下移动进入微细胞细胞质。然而,当该浓度梯度相反时,药物不移出微细胞。例如,药物装载过程和其令人惊讶的性质的更多细节发现于美国专利申请公布号2008/0051469。

[0134] 为了使微细胞装载有通常不溶于水的药物,药物最初可以溶解在适当的溶剂中。

例如,紫杉醇可以溶解在乙醇和cremophore EL(聚氧乙烯蓖麻油)的1:1掺混物中,接着在PBS中稀释以获得紫杉醇在水介质中部分稀释并且携带最小量的有机溶剂——以确保药物仍在溶液中——的溶液。微细胞可以在此最终培养基中温育以装载药物。因而,本发明人发现甚至疏水性药物可以扩散入细胞质或微细胞的膜,以实现高的和治疗上显著的细胞质药物装载。这是意想不到的,因为微细胞膜由疏水性磷脂双分子层组成,预期其阻止疏水性分子扩散入细胞质。

[0135] 表明将多种多样的具有不同尺寸和化学性质的代表性小分子药物装载入微细胞:亚德里亚霉素、紫杉醇、氟紫杉醇、顺铂、长春花碱、莫那撒尔(monsatrol)、胸苷酸合成酶(TS)抑制剂OSI-7904、伊立替康、5-氟尿嘧啶、吉西他滨和卡铂。而且,全面地讲,所得物——包裹小分子药物的微细胞——显示显著的体外和体内抗肿瘤功效。因此,本文展示的这些数据表明了微细胞装载方法的有效性和通用性。

[0136] (G)将微细胞或死细菌细胞导向特定哺乳动物细胞

[0137] 依据本公开内容的进一步的方面,如上所述,将微细胞或死细菌细胞的组合物经由配体导向至靶哺乳动物肿瘤细胞。在一些实施方式中,配体是“双特异性的”。即,配体呈现出对微细胞和哺乳动物(肿瘤)细胞组分二者的特异性,使得它引起给定的囊泡结合至靶细胞,从而后者吞没前者。在WO 05/056749和WO 05/079854中进一步描述了使用双特异性配体将微细胞靶向至肿瘤细胞,并且在美国专利号8,591,862中进一步描述了使用双特异性配体将死细菌细胞靶向至肿瘤细胞,其各自的内容通过引用以其全部并入本文。一旦这样的配体附加至囊泡,保持配体的空闲特异性(“单特异性”),直到其与靶(肿瘤)哺乳动物细胞相互作用。

[0138] 配体可以凭借配体和细胞膜上的组分——比如多糖、糖蛋白或多肽——之间的相互作用附加至囊泡的细胞膜。表达的配体锚定在囊泡的表面上,以便于暴露配体的表面组分结合部分,使得当囊泡和哺乳动物细胞开始接触时,该部分可以结合靶哺乳动物细胞表面组分。

[0139] 可选地,配体可以通过细菌衍生的囊泡的活的对应体——例如,通过微细胞的亲本细胞或通过变为死细胞前的细菌细胞——表达和呈现。在此情况下,配体不需要对囊泡的特异性并且仅呈现出对为哺乳动物细胞的特征的组分的特异性。即,这样的组分不需要对肿瘤细胞本身唯一,或甚至对治疗的具体种类的肿瘤细胞唯一,只要肿瘤细胞在它们的细胞表面存在该组分。

[0140] 静脉内施用后,囊泡在肿瘤微环境中快速积聚。取决于上述渗漏肿瘤脉管系统出现的此积聚,实现了将包裹囊泡的治疗有效负荷递送至肿瘤细胞,其然后内化包裹的囊泡。

[0141] 本发明人已经发现此递送方法适用于一系列哺乳动物肿瘤细胞,包括对微细胞的特定附着和吞入作用正常地难治疗的细胞。例如,包括针对抗HER2受体或抗EGF受体的抗体的配体可以结合微细胞至在一系列靶向的非吞噬细胞上的各自的受体,比如肺癌、卵巢癌、脑癌、乳腺癌、前列腺癌和皮肤癌细胞。

[0142] 如此实现的结合在每种类型的非吞噬细胞摄取囊泡之前。即,在本发明的背景下,合适的靶细胞展示了细胞表面组分,其与囊泡上的配体结合,这引起那个囊泡的吞入作用。

[0143] 更具体地,本发明人发现(a)微细胞或死细菌细胞上的配体和(b)哺乳动物细胞表

面受体之间的相互作用可以激活摄取途径——本文称为“受体介导的内吞作用”(rME)途径——进入靶宿主细胞比如肿瘤细胞的晚期内体/溶酶体区室。通过此rME途径,本发明人发现,细菌衍生的囊泡通过早期内体、晚期内体和溶酶体加工,导致释放其有效负荷进入哺乳动物宿主细胞的细胞质。而且,为核酸的有效负荷不仅在晚期内体/溶酶体区室中逃离完全降解,而且还由宿主细胞表达。

[0144] 如上所述,用于此递送方法的配体可以是“双特异性的”,因为它分别在携带有效负荷的囊泡和靶细胞上结合至表面组分,并且其与后者组分的相互作用导致摄取囊泡进入rME途径。在任何事件中,依据本发明,给定的靶细胞表面组分可以是被配体结合的候选,如果与组分的相互作用实际上接近内吞途径,其需要来自靶细胞表面的细胞溶质内化。这样的候选经由试验容易评价在本发明中的适用性,在所述试验中,在其表面上展示候选组分的细胞类型在体外与携带配体的微细胞共温育,所述配体结合候选并还连接至荧光染料或可以经受检测——例如,经由共聚焦显微镜可视——的其它标记(此类体外试验由MacDiarmid等(2007)的436页图3图例(legend)中描述)。因而,观察的标记的内化构成了阳性指示,通过这样的试验测试的靶细胞表面组分适用于本发明。

[0145] 候选靶细胞表面组分的示例是(A)受体酪氨酸激酶或“RKT”——以与其它整合膜蛋白类似的速率经历组成型内化(内吞作用)的跨膜蛋白家族——的成员。参见Goh和Sorkin,Cold Spring Harb.Perspect.Biol.5:a017459(2013)。RKT家族由Lemmon和Schlessinger,Cell 141(7):1117-134(2010)描述。下面的表格列举了人蛋白质组中二十个亚家族中的全部五十八个RTK,如上所述,其中的任一个或多个可以测试在本发明中的适用性(还参见图7)。

[0146]

RTK亚家族	示例性RTK
ErbB	EGFR,ErbB2,ErbB3,ErbB4
Ins	InsR,IGF1R,InsRR
PDGF	PDGFR α ,PDGFR β ,CSF1R/Fms,Kit/SCFR,Fit3/F1k2
VEGF	VEGFR1/Fit1,VEGFR2/KDR,VEGFR3/Fit4
FGF	FGFR1,FGFR2,FGFR3,FGFR4
PTK7	PTK7/CCK4
Trk	TrkA,TrkB,TrkC
Ror	Ror1,Ror2
MuSK	MuSK
Met	Met,Ron
Axl	Axl,Mer,Tyro3
Tie	Tie1,Tie2
Eph	EphA1-8,EphA10,EphB1-4,EphB6
Ret	Ret
Ryk	Ryk
DDR	DDR1,DDR2
Ros	Ros

LMR	LMR1, LMR2, LMR3
ALK	ALK, LTK
STYK1	SuRTK106/STYK1

[0147] 类似的示例是以下的成员：(B)膜相关的、高亲和力叶酸结合蛋白(叶酸受体)类，其结合叶酸并减少叶酸衍生物，并且其介导四氢叶酸至细胞内部的递送；(C)膜结合细胞因子受体亚类，其在同源细胞因子比如IL13的内化中起作用；(D)表面抗原，比如CD20、CD33、间皮素和HM1.24，其在某些癌细胞上表达并介导同源单克隆抗体的内化，例如，CD20实例中的利妥昔单抗；和(E)黏着受体(整联蛋白)家族、跨膜糖蛋白——其通过内体途径并且是使癌细胞粘附至细胞外基质的主要介体。

[0148] 根据本发明，配体可以是具体情况表现出期望的特异性(一种或多种)的任何多肽或多糖。优选的配体是抗体。在其本用途中，术语“抗体”包含通过在体外或体内生成免疫原性应答而获得的免疫球蛋白分子。因此，“抗体”类别包括单克隆抗体和人源化抗体，比如单链抗体片段(scFv)、双特异性抗体等。大量不同的双特异性蛋白质和基于抗体的配体是已知的，如Caravella和Lugovskoy, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14:520-28(2010)的综述文章所证明的，其通过引用以其全部并入本文。根据本公开内容有用的抗体也可以通过已知的重组DNA技术获得。

[0149] 因此，依据本发明，通过非限制性实例，携带对表面组分比如肿瘤抗原特异性的抗体可以用于靶向微细胞至待治疗的肿瘤肿的细胞。在这方面，说明性细胞表面受体包括以下任何：RTK表皮生长因子受体(EGFR)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)、血小板衍生生长因子受体(PDGFR)和胰岛素样生长因子受体(IGFR)——其每个在包括脑瘤的多种实体瘤中高度表达、和叶酸受体——其在一些垂体腺瘤中过表达。这样的双特异性配体也可以靶向至突变或变体受体，例如，IL-13R α 2受体，其在50%至80%的人多形性成胶质细胞瘤中表达，参见Wykosky等, *Clin Cancer Res.* 14:199-208(2008)；Jarboe等, *Cancer Res.* 67:7983-86(2007)；Debinski等, *J. Neurooncol.* 48:103-11(2000)；和Okada等, *J. Bacteriol.* 176:917-22(1994)，但是其区别于在正常组织中表达的其生理学对应体IL4R/IL13R。参见Hershey, *J. Allergy Clin. Immunol.* 111:677-90(2003)。因而，IL13R α 2实际上不存在于正常脑细胞中。参见Debinski和Gibo, *Mol. Med.* 6:440-49(2000)。此外，转移至脑的肿瘤可以过表达某些受体，其也可以是合适的靶点。例如，Da Silva等, *Breast Cancer Res.* 12:R46(1-13)(2010)，其显示乳腺癌的脑转移表达RTK的HER家族的所有成员。HER2在20%的脑转移中扩增和过表达，EGFR在21%的脑转移中过表达，HER3在60%的脑转移中过表达，并且HER4在22%的脑转移中过表达。有趣地，HER3表达在存在于脑中的乳腺癌细胞中增加。

[0150] (H)增加IFN- γ 的水平药剂

[0151] 本组合物和方法可以进一步包括增加患者中的IFN- γ 的水平(例如，活性或表达水平)的药剂。

[0152] 在一个实施方式中，药剂包括IFN- γ 蛋白或类似物。IFN- γ 的商业产品，比如 **Actimmune®**，是或将是可获得的。**Actimmune®** 是生物工程形式的干扰素 γ ——通过刺激人免疫系统充当生物学应答改性剂的蛋白质。如上所述，FDA已经批准了 **Actimmune®** 用于患有慢性肉芽肿性疾病和严重的恶性骨硬化症的儿童和成人。

[0153] IFN- γ 产生由APC分泌的细胞因子控制，最显著地是白介素(IL)-12和IL-18。这些

细胞因子充当桥梁以在先天性免疫应答中连接感染与IFN- γ 产生。许多病原体的巨噬细胞识别诱导IL-12和趋化因子的分泌。这些趋化因子将NK细胞吸引至炎症部位,并且IL-12促进这些细胞中的IFN- γ 合成。在巨噬细胞、NK和T细胞中,IL-12和IL-18刺激的组合进一步增加IFN- γ 产生。因此,任何这些蛋白或他们的组合是用于本公开内容的目的合适的药剂。

[0154] IFN- γ 产生的负调节剂包括IL-4、IL-10、转化生长因子 β 和糖皮质激素。抑制这些因子的蛋白质或核酸将能够刺激IFN- γ 的产生。

[0155] 也适用于此背景下的是编码IFN- γ 的多核苷酸或激活IFN- γ 的产生和/或分泌的基因。

[0156] 增加IFN- γ 的水平药剂还可以是病毒疫苗。可以诱导IFN- γ 产生而不引起感染或其它类型的不良反应的大量病毒疫苗是可获得的。此类病毒疫苗药剂的示例是流感(流行性感冒)疫苗。

[0157] 数据显示当患者还接受施用携带药物的、双特异性抗体靶向的微细胞或死细菌细胞时,有效地激活对肿瘤细胞的宿主免疫应答所需的IFN- γ 的血清浓度很低。因而,在一个方面,本发明方法导致血清IFN- γ 浓度增加,其不高于大约30,000pg/mL。在另一个方面,血清IFN- γ 浓度增加至不高于大约5000pg/mL、1000pg/mL、900pg/mL、800pg/mL、700pg/mL、600pg/mL、500pg/mL、400pg/mL、300pg/mL、200pg/mL或100pg/mL。在另一个方面,得到的血清IFN- γ 浓度是至少大约10pg/mL,或者至少大约20pg/mL、30pg/mL、40pg/mL、50pg/mL、60pg/mL、70pg/mL、80pg/mL、90pg/mL、100pg/mL、150pg/mL、200pg/mL、300pg/mL、400pg/mL或500pg/mL。

[0158] 依据一些方面,药剂是IFN- γ 蛋白、工程蛋白或类似物。在一些方面,施用实现每毫升宿主血液中大约0.02ng至1毫克的IFN- γ 。在一个方面,在宿主血液中实现的IFN- γ 浓度是每毫升大约0.1ng至大约500ng、或每毫升大约0.2ng至大约200ng、或每毫升大约0.5ng至大约100ng、或每毫升大约1ng至大约50ng、或每毫升大约2ng至大约20ng。本公开内容的组合物中的IFN- γ 的治疗剂量可以被相应地确定。

[0159] (I)制剂和给药途径和方案

[0160] 本公开内容的组合物的制剂可以以单位剂量形式展示,例如,在安瓿或小瓶中,或在多剂量容器中,具有或不具有添加的防腐剂。制剂可以是溶液、悬浮液或在油性或水性载体中的乳液,并且可以包含配制剂(formulatory agent),比如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。合适的溶液是与接受者的血液等压的并且由盐水、林格溶液和葡萄糖溶液示例。可选地,制剂可以是冻干的粉末形式,用于与合适的载体重构,例如,无菌无热原水或生理盐水。制剂也可以是长效制剂形式。这样的长效制剂可通过植入(例如,皮下地或肌内地)或通过肌肉注射施用。

[0161] 在一些方面中,提供了含有微细胞或死细菌细胞的组合物,其包括治疗有效量的抗肿瘤剂。根据本公开内容,“治疗有效”量的抗肿瘤剂是所讨论的药剂——例如,siRNA或化疗药物——当施用至对象时引起药理学应答的剂量。

[0162] 在一些方面,提供了包括治疗有效量的增加IFN- γ 的水平药剂的组合物。在一些方面,提供了组合物、试剂盒、包装或产品,其包括如所述的微细胞或死细菌细胞二者和增加IFN- γ 的水平药剂。

[0163] 因此,在本公开内容的背景下,如下面进一步描述的,治疗有效量可以通过参考当

施用携带治疗有效负荷的微细胞或死细菌细胞时,动物模型或人对象中的肿瘤的预防或缓解或肿瘤的症状来调整。对于具体的对象,在给定的情况下证明“治疗有效量”的量可以不是对100%的相似地治疗肿瘤的对象有效,即使这样的剂量被熟练的从业者认为是“治疗有效量”。在这方面,适当的剂量也将随着例如肿瘤的类型、阶段和严重性变化。同样地,当“治疗上有效”用于指药物组合中微细胞的数量时,数量可以基于什么抗肿瘤剂包裹入微细胞和该药剂在治疗肿瘤中的功效确定。在这方面,可以使用临床或病理学参数比如肿瘤质量测量疗效。因此,肿瘤质量的减少或减少的增加可以用于测量疗效。

[0164] 关于增加IFN- γ 的水平药剂,“治疗有效量”可以指在施用后实现如上提供的期望的宿主血液浓度的药剂的量。

[0165] 本公开内容内的制剂可以局部或全身性地经由多种途径施用并且施用至哺乳动物身体中的多个部位,以实现期望的疗效(一种或多种)。在具体的方面,给药途径是静脉注射。

[0166] 一般而言,本公开内容的制剂可以在由途径测试限定的适当的剂量下使用,以获得最佳的生理学效果,同时使任何潜在的毒性最小化。可以根据多种因素选择剂量方案,包括患者的年龄、体重、性别、医疗状况;肿瘤的严重性或阶段、给药途径、和患者的肾和肝功能。

[0167] 在获得最大功效与最小副作用的范围内实现微细胞、死细菌细胞和治疗剂的浓度的最佳精度可以并且通常将需要基于靶位点和靶细胞的药剂利用率的动力学的方案。当确定治疗方案的最佳浓度时,可以考虑微细胞或药剂的分布、平衡和消除。可以分别调整微细胞和治疗剂的剂量以实现期望的效果。

[0168] 而且,可以使用药代动力学/药效学模拟系统最优化制剂的剂量施用。因而,可以选择一种或更多种剂量方案并且可以使用药物动力学/药效学模型确定一种或多种剂量方案的药物动力学/药效学特征。基于具体的这样的特征,然后可以选择剂量方案中的一种进行施用,其实现期望的药物动力学/药效学应答。例如,参见WO 00/67776。

[0169] 包裹有抗肿瘤剂和增加IFN- γ 的水平药剂的微细胞或死细菌细胞可以以联合制剂或作为单独的组合物同时地使用,或者一个接一个地顺序施用。当顺序地施用时,可以在增加IFN- γ 的水平药剂之前或之后施用微细胞或死细菌细胞。在一个方面,当微细胞或死细菌细胞在施用后达到最大血浆水平或有效血浆水平时,宿主已经实现或正在维持IFN- γ 的最低水平。这样的最低水平是需要在组合物之间产生协同作用的那种。这可以通过在施用微细胞或死细菌细胞前施用增加IFN- γ 的水平药剂,或者通过在——特别地,在相对高的剂量下——施用微细胞或死细菌细胞后立刻施用药剂来实现。注意,两种组合物的施用可以连续发生。然后,在那方面,施用导致宿主恒定地暴露于微细胞或死细菌细胞和增加IFN- γ 的水平药剂二者。

[0170] 本公开内容的制剂或多种制剂的组合可以在数周的过程中一周至少一次施用至肿瘤患者。因而,制剂可以在数周至数月的时期内一周至少施用一次。

[0171] 更具体地,本发明的制剂可以每天施用至少一次持续大约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31天。可选地,制剂可以大约每天施用一次或大约每2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31天或更多天施用一次。

[0172] 在本公开内容的另一个实施方式中,制剂可以大约每周施用一次或大约每2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20周或更多周施用一次。可选地,制剂可以每周施用至少一次持续大约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20周或更多周。

[0173] 可选地,制剂可以大约每月施用一次或大约每2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月或更多个月施用一次。

[0174] 制剂可以以单日剂量施用。可选地,总的日剂量可以以每天两次、三次或四次的分剂量施用。

[0175] 下列实施例仅是说明性的,而不是限制性的,并且提供本公开内容的更完全的理解。

[0176] 实施例1.与干扰素- γ 水平关联的肿瘤尺寸减小

[0177] 此实施例表明在经历使用携带药物的微细胞的治疗的狗中,脑瘤体积的减小与干扰素- γ (IFN- γ)的表达水平关联。因此,此实施例表明IFN- γ 增加了携带药物的微细胞的功效。考虑到需要低量IFN- γ ,此实施例进一步表明IFN- γ 和携带药物的、双特异性抗体靶向的微细胞之间的协同作用。

[0178] 材料和方法

[0179] 制备和给药包裹亚德里亚霉素的、靶向犬EGFR的微细胞

[0180] 微细胞衍生自肠炎沙门氏菌鼠伤寒血清型(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium)——鼠伤寒沙门氏菌——的minCDE-染色体缺失突变体,经纯化,使用亚德里亚霉素(dox)包裹,并且经由包括抗微细胞表面O-多糖和抗犬EGFR特异性的双特异性单克隆抗体(MAb)的附加靶向,(命名为^{EGFR}微细胞_{Dox})。

[0181] 此研究中的狗是作为患者赠送至澳大利亚悉尼的Veterinary Specialist Centre(VSC)或Small Animal Specialist Hospital(SASH)的宠物狗。向其中标准治疗被狗主人拒绝的患者,或其中不存在有意义的标准治疗的晚期疾病病例提供研究参与。按照由National Health and Medical Research Council(澳大利亚)发布的护理和使用实验室动物的准则,以及在EnGeneIC Animal Ethics Committee的批准下对狗进行治疗。已经从所有主人获得签署的知情同意。

[0182] 在可行的情况,通过组织学或细胞学诊断所有脑瘤。临终诊断基于在磁共振成像(MRI)和临床症状上的特征性表现的组合。在这些脑瘤病例中,组织学诊断被认为过于侵入性,并且通过尸体剖检确认诊断。

[0183] 每周为单位使用每剂量 1×10^{10} 个^{EGFR}微细胞_{Dox}进行治疗。经由无菌放置的外周静脉导管(左头的)施用治疗,在2分钟内注入2ml。

[0184] MRI肿瘤成像

[0185] 使用Philips 1.5T Achieva扫描仪在Specialist Magnetic Resonance Imaging中完成肿瘤成像。取决于狗的尺寸,方案使用8-通道头部线圈(head coil)或8-通道膝盖线圈(knee coil)(小狗使用膝盖线圈)。

[0186] 序列获取自在三个平面中获得矢形的T1、轴向的T2、冠状的梯度回波、造影前轴向的弥散加权成像(DWI)、冠状的体积的液体衰减反转恢复(FLAIR)和钆造影后T1加权成像。

[0187] IFN- γ 酶联免疫吸附测定(ELISA)

[0188] 在直接从兽医诊所接受微细胞剂量和血清之前采血。依照制造商的说明,使用来自Development System(#DY781B)的犬IFN- γ DuoSet ELISA试剂盒,进行两次IFN- γ 测量。

[0189] 结果

[0190] 接受微细胞治疗的三只狗中的肿瘤体积变化方面的结果展示在图1A-1C中。线图代表肿瘤测量(左边的y轴=体积(mm^3)或最长直径(mm))作为微细胞剂量的数量(x轴)的函数。又代表在其下通过磁共振成像(MRI)可视化和测量肿瘤的剂量。

[0191] 在治疗期间,狗中的两只显示在某些治疗时期中肿瘤体积的剧烈减小(图1A和1B中的狗A和B)。已经出乎意料地发现狗在那些时期期间遭受病毒感染。在检验的可能与病毒感染相关联的大量参数中,已经发现IFN- γ 的血清浓度与肿瘤体积减小速率高度关联。

[0192] 在图1A-1C的每个中,三角形标记代表血清干扰素 γ (IFN γ)水平;其是在指示的剂量下通过ELISA测量的。右侧的y轴指示以pg/mL为单位的IFN- γ 水平。在进行测定但是IFN- γ 低于测定的检测极限($<56\text{pg/mL}$)的地方,数据点由0pg/mL处的三角形标记代表。在完成肿瘤长度(l)、宽度(w)和高度(h)测量的地方,使用椭球体公式($V=(\pi/6)*l*w*h$)计算肿瘤体积(V)。

[0193] 因而,这些图表明了血清IFN- γ 水平和肿瘤体积减小速率之间的强关联。还令人惊讶的是任何可检测的IFN- γ 水平导致增加的抗肿瘤应答。指向的最低IFN- γ 水平是大约500pg/mL,在狗B的剂量41处(图1B)。IFN- γ 对携带药物的微细胞的肿瘤治疗的这样一个剧烈的效果是它们之间协同作用的强烈指示。

[0194] 实施例2. 在使用 $\text{EGFR}^{\text{EGFR}}$ 微细胞 Dox 和IFN- γ 治疗后鼠异种移植物(人腺泡状腺癌)中显著的肿瘤退化

[0195] 此实施例表明了使用双特异性配体靶向的且包裹亚德里亚霉素的完好的微细胞与IFN- γ 的联合治疗可以实现在6周龄雌性无胸腺的裸鼠中建立的人腺泡状腺癌肿瘤异种移植物的退化。

[0196] 如上所述,微细胞产生自鼠伤寒沙门氏菌minCDE-体变体菌株,并且使用先前在MacDiarmid等(2007)中描述的梯度离心/丝状形成(filamentation)/过滤/内毒素去除过程进行纯化。还根据MacDiarmid等(2007),纯化的微细胞包裹化疗药物亚德里亚霉素。

[0197] 双特异性抗体(BsAb)是分别含有在微细胞上存在的鼠伤寒沙门氏菌O-多糖和在腺泡状腺癌细胞上过表达的人EGFR的结合特异性的单个多肽。O-多糖特异性源自小鼠单克隆抗体,对于其而言,可变区分离自杂交瘤细胞系并展示为单链可变片段(scFv)。通过使用纯化的LPS免疫小鼠并且融合淋巴细胞与肿瘤细胞来制备杂交瘤细胞系。随后,在克隆中筛选能够结合O-多糖的抗体。也展示为scFv的EGFR特异性源自商业抗体Erbbitux®(Bristol Myers Squibb, USA)。两个scFv组分由柔性接头分隔,并且6 \times His标签并入N末端处以促进通过固定化金属亲和层析进行纯化,和c-myc标签并入C末端处以帮助额外的检测。连接scFv组分的接头是众所周知的,例如,如由Gall等,Protein Engineering, Design and Selection 17:357-66(2004)证明的。

[0198] 编码BsAb的表达载体包含用于高水平表达的hCMV启动子和用于分泌BsAb进入细胞培养基的信号肽。编码BsAb的表达载体稳定地转染入悬浮液,其适合化学限定的蛋白质和无动物源培养基中的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,并且蛋白质在培养中表达超过10天。

[0199] 两个层析柱用于纯化抗体:固定化金属离子亲和层析柱(IMAC-HisTrap Excel)和

羟磷灰石层析柱(BioRad CHT I)。此方法实现>98%的抗体纯度。为了产品的病毒安全性,使用TNBP/吐温使抗体经历溶剂/去污剂灭活和病毒过滤。最终产生的抗体是1L的细胞培养上清液中10mg。

[0200] 在此实施例中使用的小鼠购买自Animal Resources Centre(Perth,Australia),并且所有动物实验按照Guide of Care and Use of Laboratory Animals第八版(National Academies Press,2011)并在Animal Ethics Committee的批准下进行。实验在EnGeneIC Ltd.(Sydney,Australia)中在NSW农业认证的小动物设施中进行。

[0201] 在37℃下,在95%空气和5%CO₂的湿润气氛中,在GIBCO®-RPMI 1640培养基中,人腺泡状腺癌细胞(A549,ATCC)在组织培养中生长至在T-75烧瓶中完全汇合,所述培养基是Life Technologies(Carlsbad,CA,USA)的产品,补充有5%小牛血清和谷氨酰胺。细胞(1×10⁶)₆在50μL无血清培养基中与50μL生长因子减少的Matrigel®——BD Biosciences(Franklin Lakes,NJ)的产品——中。然后使用23号针将细胞皮下地注射在每只鼠的肩胛骨之间。

[0202] 得到的肿瘤每周使用电子数字卡尺(Mitutoyo,日本,具有+/-0.001英寸的测量精度)测量两次,并且使用下列公式计算平均肿瘤体积

[0203] 长度(mm)x宽度(mm²)x0.5=体积(mm³)。

[0204] 当肿瘤达到~285mm³的平均值时开始治疗,并且小鼠随机为每组七只小鼠的四个不同的组。所有治疗以100μl的总体积静脉内地(i.v.)施用。所有微细胞剂量包含1×10⁹个各自类型的微细胞。

[0205] 在实验设计方面,第1组(对照)接受非无菌生理盐水。第2组(对照)接受每剂量IFN-γ(0.5×10⁴IU)。第3组(对照)接受^{EGFR}微细胞_{Dox}。第4组(实验组)接受每剂量^{EGFR}微细胞_{Dox}和IFN-γ(0.5×10⁴IU)。

[0206] 结果(图2)揭示使用^{EGFR}微细胞_{Dox}治疗的小鼠(第3组)实现肿瘤稳定。相比之下,使用^{EGFR}微细胞_{Dox}和IFN-γ治疗的小鼠(第4组)在总计六次剂量后的第43天显示了高度显著的肿瘤退化。使用单独的IFN-γ治疗的小鼠(第2组)未显示抗肿瘤功效,并且肿瘤如在盐水治疗组(第1组)中一样生长。

[0207] 实施例3.在使用^{EGFR}微细胞_{Dox}和IFN-γ治疗后小鼠异种移植物(人乳腺癌-中等尺寸的肿瘤~145mm³)中显著的肿瘤退化

[0208] 此实施例表明了使用双特异性配体靶向的且包裹亚德里亚霉素的完好的微细胞与IFN-γ的联合治疗可以实现在6周龄雌性无胸腺的裸鼠中建立的人乳腺癌肿瘤异种移植物的退化。

[0209] 如上所述,微细胞被纯化,包裹有亚德里亚霉素,并且使用具有抗-O-多糖和抗-EGFR特异性的单链双特异性抗体靶向。额外地,还如所述的,人乳腺癌细胞(MDA-MB-468; ATCC)建立为nu/nu小鼠中的异种移植物,并且测量肿瘤体积。

[0210] 当肿瘤达到~145mm³的平均值时开始治疗,并且小鼠随机为每组七只小鼠的四个不同的组。所有治疗以100μl的总体积i.v.施用。所有微细胞剂量包含1×10⁹个各自类型的微细胞。

[0211] 实验设计如下:第1组(对照)仅接受无菌生理盐水。第2组(对照)接受每剂量IFN-γ(0.5×10⁴IU)。第3组(对照)接受^{EGFR}微细胞_{Dox}。第4组(实验组)接受每剂量^{EGFR}微细胞_{Dox}和

IFN- γ (0.5×10^4 IU)。

[0212] 如在图3中显示的结果揭示使用^{EGFR}微细胞_{Dox}治疗的小鼠(第3组)实现肿瘤稳定,但是大约在第25天肿瘤开始再次生长,可能是由于对亚德里亚霉素的抗性的发展。相比之下,使用^{EGFR}微细胞_{Dox}和IFN- γ 治疗的小鼠(第4组)显示了高度显著的肿瘤退化,并且在第30天,这些肿瘤在总计六次剂量后更像瘢痕组织。使用单独的IFN- γ 治疗的小鼠(第2组)未显示抗肿瘤功效,并且肿瘤如在盐水治疗组(第1组)中一样生长。

[0213] 实施例4. 在使用^{EGFR}微细胞_{Dox}和IFN- γ 治疗后小鼠异种移植瘤(人乳腺癌-大肿瘤 $\sim 250\text{mm}^3$)中显著的肿瘤退化

[0214] 此实施例表明了使用双特异性配体靶向的且包裹亚德里亚霉素的完好的微细胞与IFN- γ 的联合治疗可以甚至在6周龄雌性无胸腺的裸鼠中建立的人乳腺癌肿瘤异种移植物的大尺寸肿瘤($\sim 250\text{mm}^3$)中实现退化。

[0215] 如上所述,微细胞被纯化,包裹有亚德里亚霉素,并且使用具有抗-O-多糖和抗-EGFR特异性的单链双特异性抗体靶向。还如上所述,人乳腺癌细胞(MDA-MB-468)建立为nu/nu小鼠中的异种移植物,并且测量肿瘤体积。

[0216] 当肿瘤达到 $\sim 250\text{mm}^3$ 的平均值时开始治疗。如上所述,小鼠随机为每组七只小鼠的四个不同的组。i.v.施用和微细胞剂量也如上所述。

[0217] 实验设计如下。第1组(对照)仅接受无菌生理盐水。第2组(对照)接受每剂量IFN- γ (0.5×10^4 IU)。第3组(对照)接受^{EGFR}微细胞_{Dox}。第4组(实验组)接受每剂量^{EGFR}微细胞_{Dox}和IFN- γ (0.5×10^4 IU)。

[0218] 如在图4中显示的结果揭示使用^{EGFR}微细胞_{Dox}治疗的小鼠(第3组)实现肿瘤退化,但是在 \sim 第23天肿瘤已经开始再次生长;如以前一样,亚德里亚霉素抗性的发展是可能的原因。另一方面,使用^{EGFR}微细胞_{Dox}和IFN- γ 治疗的小鼠(第4组)显示了高度显著的肿瘤退化,并且在总计3次剂量后(即,第28天),这些肿瘤更像瘢痕组织。使用单独的IFN- γ 治疗的小鼠(第2组)未显示抗肿瘤功效,并且肿瘤如在盐水治疗组(第1组)中一样生长。

[0219] 实施例5. 在使用^{EGFR}微细胞_{Dox}和IFN- γ 治疗后小鼠异种移植瘤(人乳腺癌-超大肿瘤 $\sim 250\text{mm}^3$ 至 600mm^3)中的肿瘤退化

[0220] 此实施例表明了使用双特异性配体靶向的且包裹亚德里亚霉素的完好的微细胞与IFN- γ 的联合治疗可以甚至在6周龄雌性无胸腺的裸鼠中建立的人乳腺癌肿瘤异种移植物的超大尺寸肿瘤($\sim 250\text{mm}^3$ 至 600mm^3)中实现退化。

[0221] 如上所述,微细胞被纯化,包裹有亚德里亚霉素,并且使用具有抗-O-多糖和抗-EGFR特异性的单链双特异性抗体靶向。还如所述的,人乳腺癌(MDA-MB-468)细胞建立为nu/nu小鼠中的异种移植物,并且测量肿瘤体积。

[0222] 当肿瘤达到 $\sim 250\text{mm}^3$ 至 600mm^3 时开始治疗。使用每剂量^{EGFR}微细胞_{Dox}和IFN- γ (0.5×10^4 IU)治疗个体小鼠。所有治疗以 $100\mu\text{l}$ 的总体积i.v.施用,并且所有微细胞剂量包含 1×10^9 个各自类型的微细胞。

[0223] 结果描绘在图5中。虽然是大尺寸的肿瘤,但是全部四只小鼠实现肿瘤退化。这显示甚至可以使用^{EGFR}微细胞_{Dox}和IFN- γ (0.5×10^4 IU)的组合有效地治疗超大肿瘤($\sim 600\text{mm}^3$),正常情况下小鼠将被安乐死。

[0224] 实施例6. 在使用^{EGFR}微细胞_{Dox}和两种剂量水平的IFN- γ 治疗后小鼠异种移植物

(人腺泡状腺癌)中显著的肿瘤退化

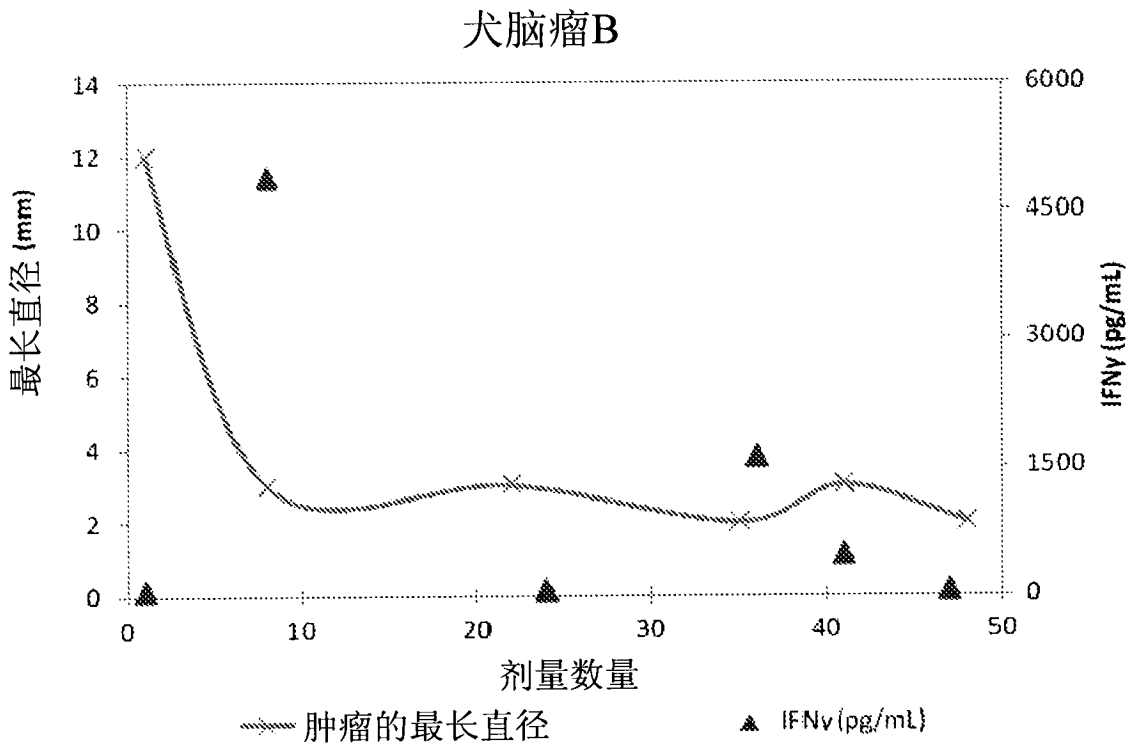
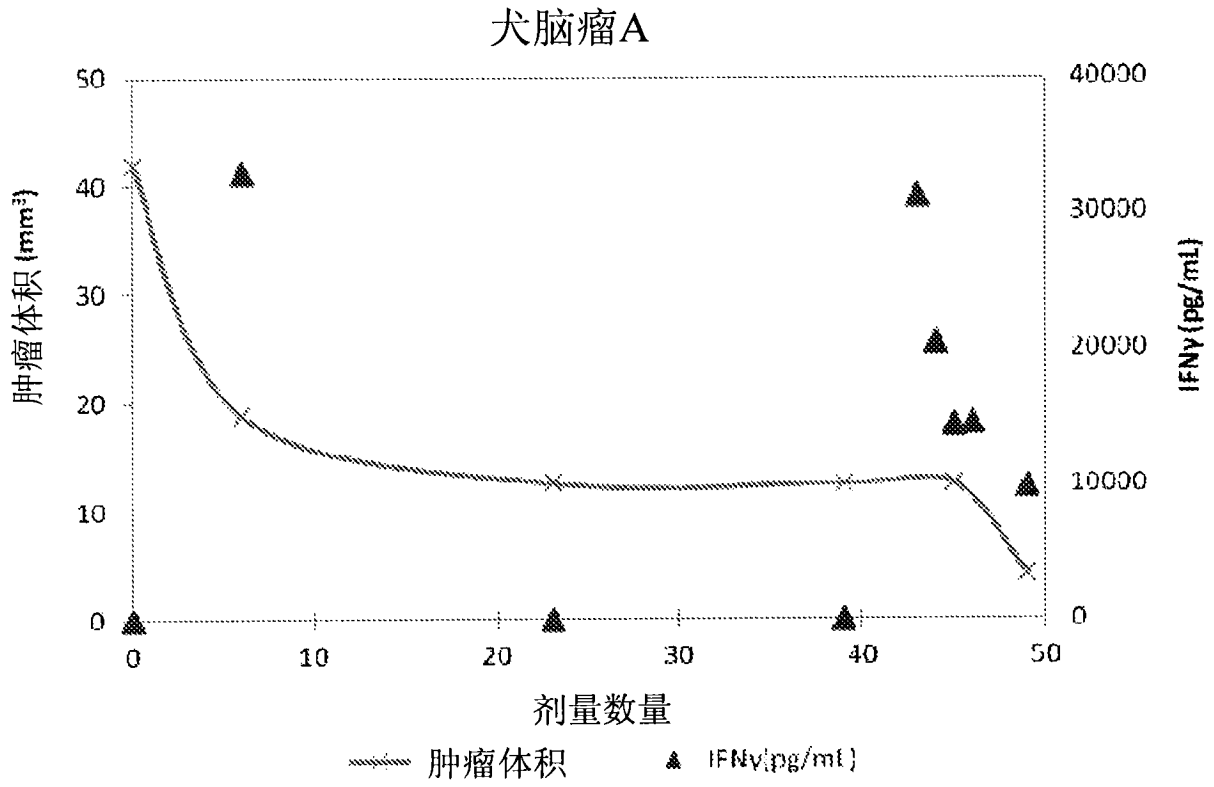
[0225] 此实施例表明了使用双特异性配体靶向的且包裹亚德里亚霉素的完好的微细胞与两种不同剂量水平下的IFN- γ 的联合治疗可以实现在6周龄雌性无胸腺的裸鼠中建立的人腺泡状腺癌异种植物的退化。

[0226] 如上所述,微细胞被纯化,包裹有亚德里亚霉素,并且使用具有抗-O-多糖和抗-EGFR特异性的单链双特异性抗体靶向。还如上所述,人腺泡状腺癌(A549)细胞建立为nu/nu小鼠中的异种植物,并且测量肿瘤体积。

[0227] 当肿瘤达到 $\sim 100\text{mm}^3$ 的平均值时开始治疗,并且小鼠随机为每组七只小鼠的四个不同的组。所有治疗以 $100\mu\text{l}$ 的总体积i.v.施用,并且所有微细胞剂量包含 1×10^9 个各自类型的微细胞。

[0228] 第1组(对照)接受非无菌生理盐水。第2组(对照)接受 $\text{EGFR}^{\text{EGFR}}$ 微细胞 Dox (每周两次)。第3组(实验组)每周两次接受每剂量 $\text{EGFR}^{\text{EGFR}}$ 微细胞 Dox 和IFN- γ ($0.75 \times 10^4\text{IU}$)。第4组(实验组)每周三次接受每剂量 $\text{EGFR}^{\text{EGFR}}$ 微细胞 Dox 和IFN- γ ($0.5 \times 10^4\text{IU}$)。

[0229] 如图6所示,使用 $\text{EGFR}^{\text{EGFR}}$ 微细胞 Dox 和两种剂量($0.5 \times 10^4\text{IU}$ 和 $0.75 \times 10^4\text{IU}$;第3和4组)下的IFN- γ 治疗的小鼠实现肿瘤稳定。相比之下,使用 $\text{EGFR}^{\text{EGFR}}$ 微细胞 Dox 治疗的小鼠(第2组)未显示抗肿瘤功效,并且肿瘤如在盐水治疗组(第1组)中一样生长。这些数据表明在两种IFN- γ 剂量水平下组合IFN- γ 与 $\text{EGFR}^{\text{EGFR}}$ 微细胞 Dox 对在肿瘤治疗中实现肿瘤稳定是必不可少的,所述肿瘤通常抵抗单独的IFN- γ 治疗或单独的 $\text{EGFR}^{\text{EGFR}}$ 微细胞 Dox 治疗。



犬脑瘤C

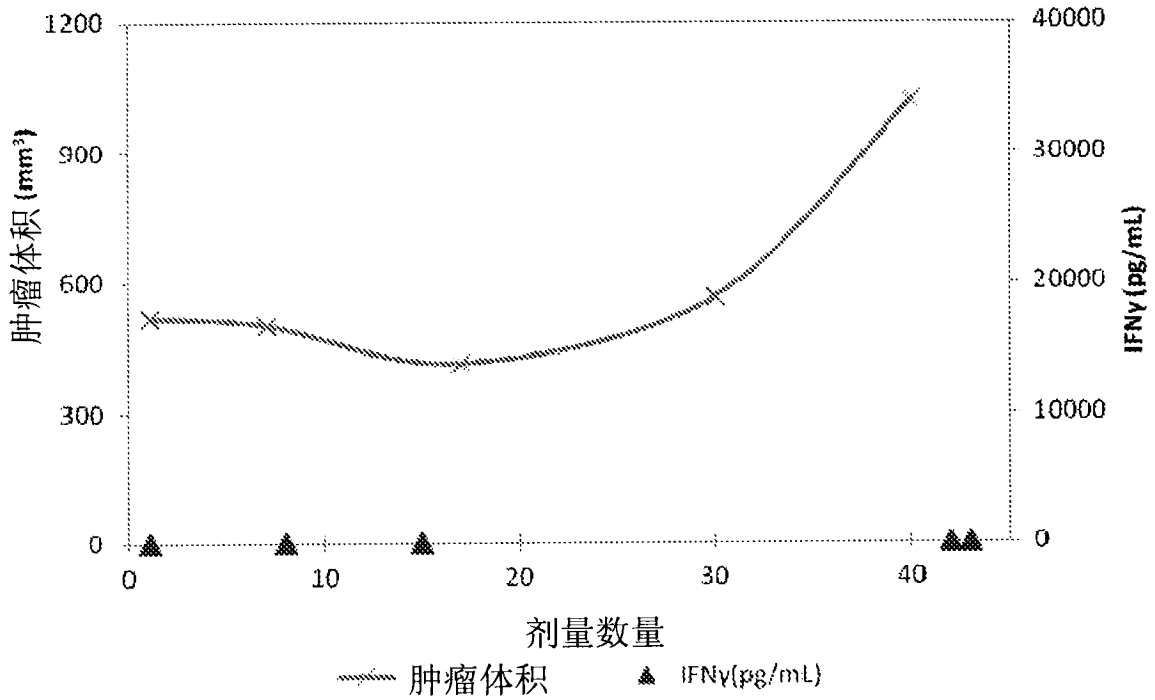
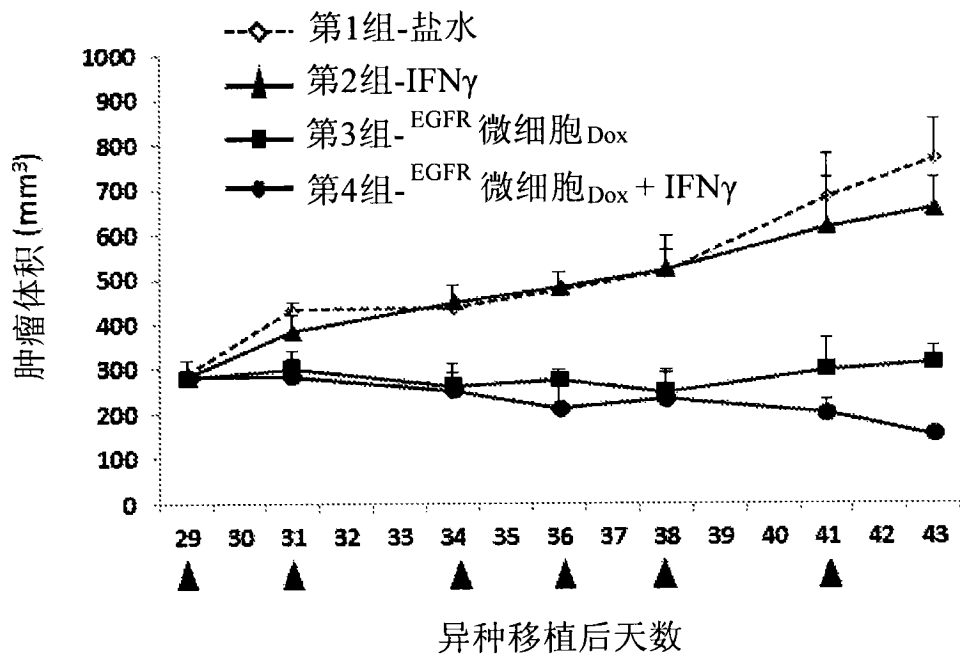


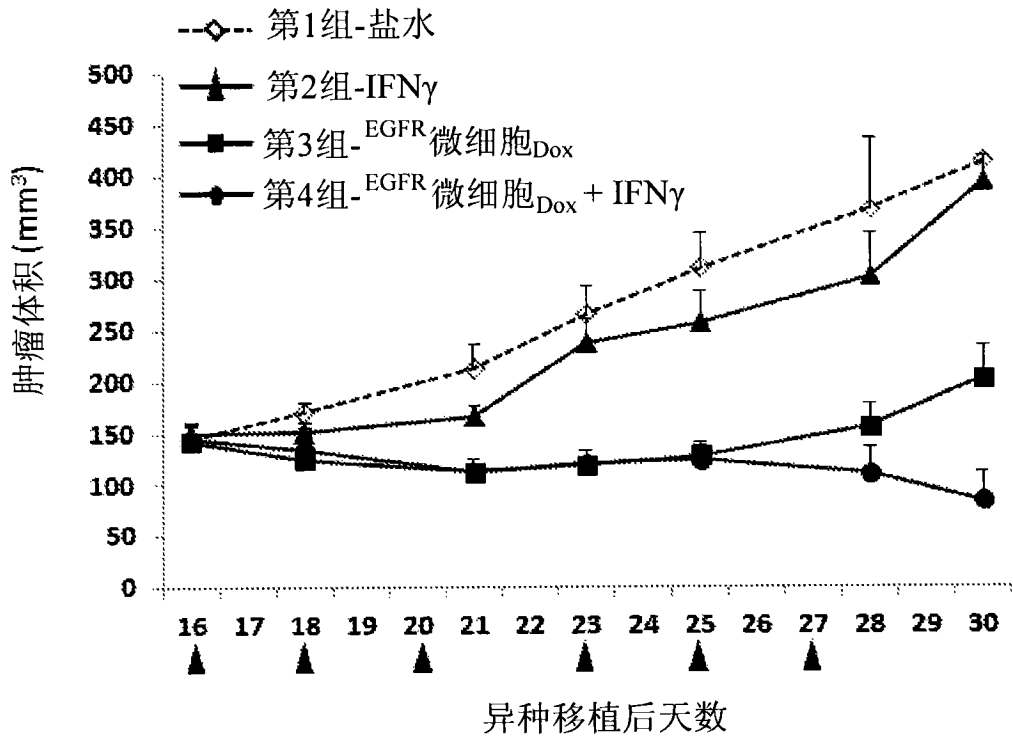
图1C



▲ = 给药时间

数据=平均值+SEM

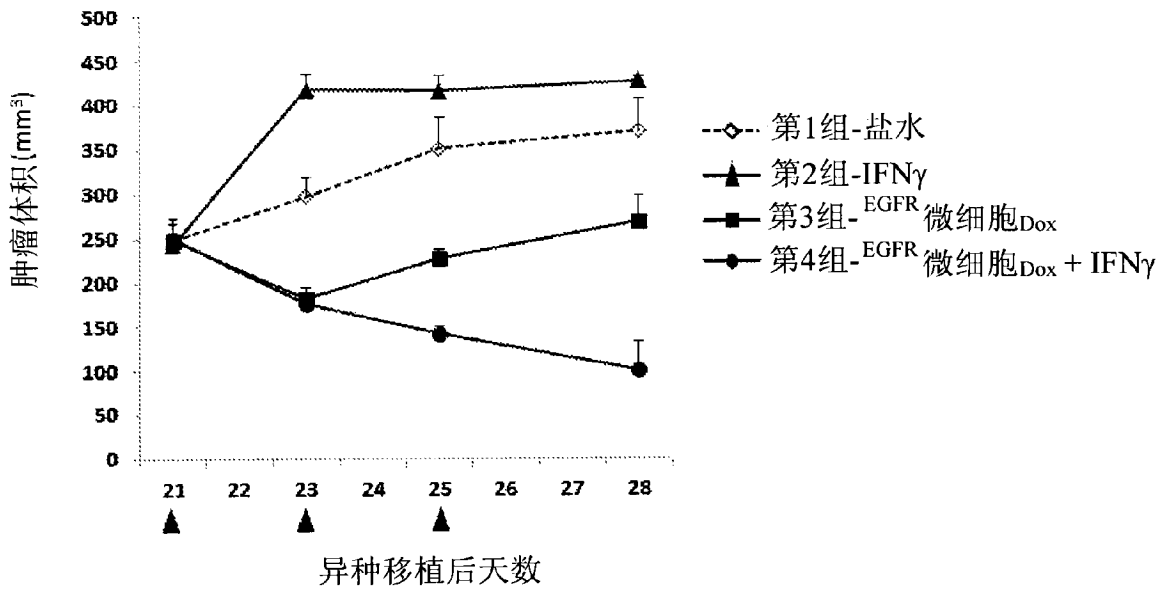
图2



▲ = 给药时间

数据=平均值+SEM

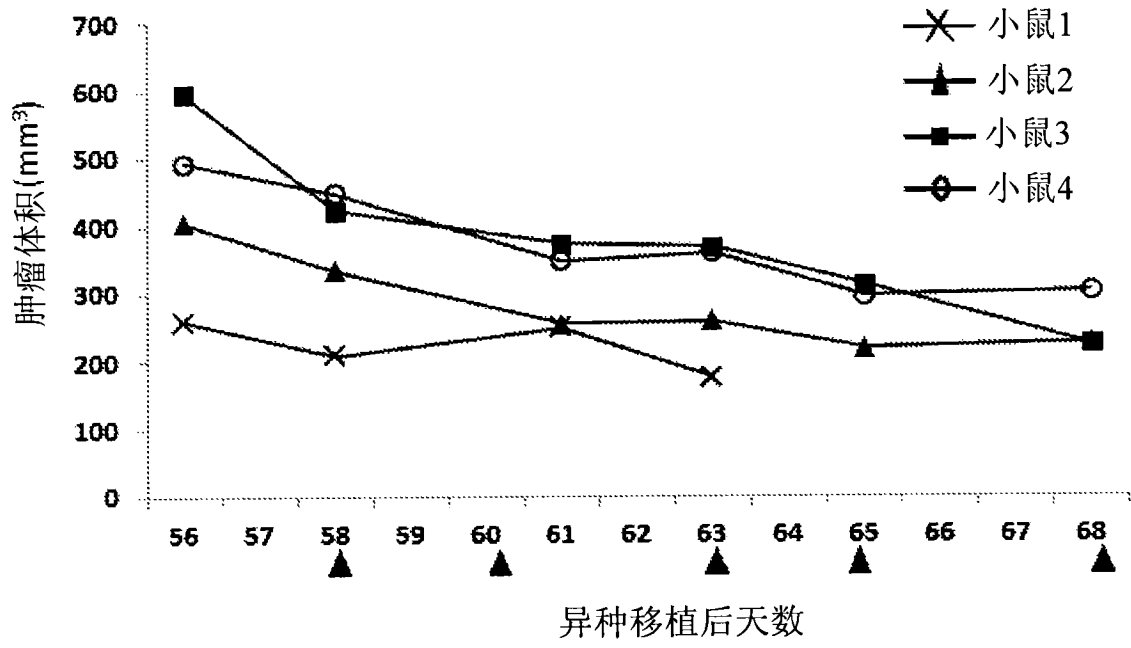
图3



▲ = 给药时间

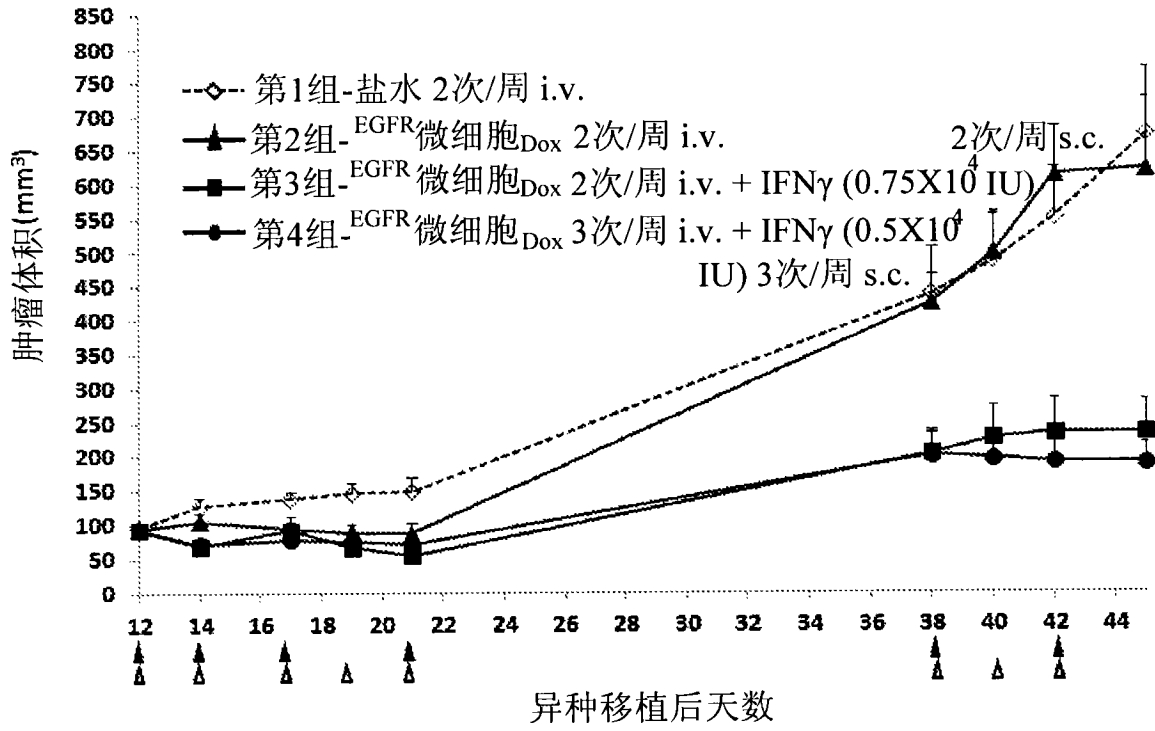
数据=平均值+SEM

图4



▲ = 给药时间
数据 = 个体结果

图5



给药方案:▲ 2次/周 ▲ 3次/周
数据=平均值+SEM

图6

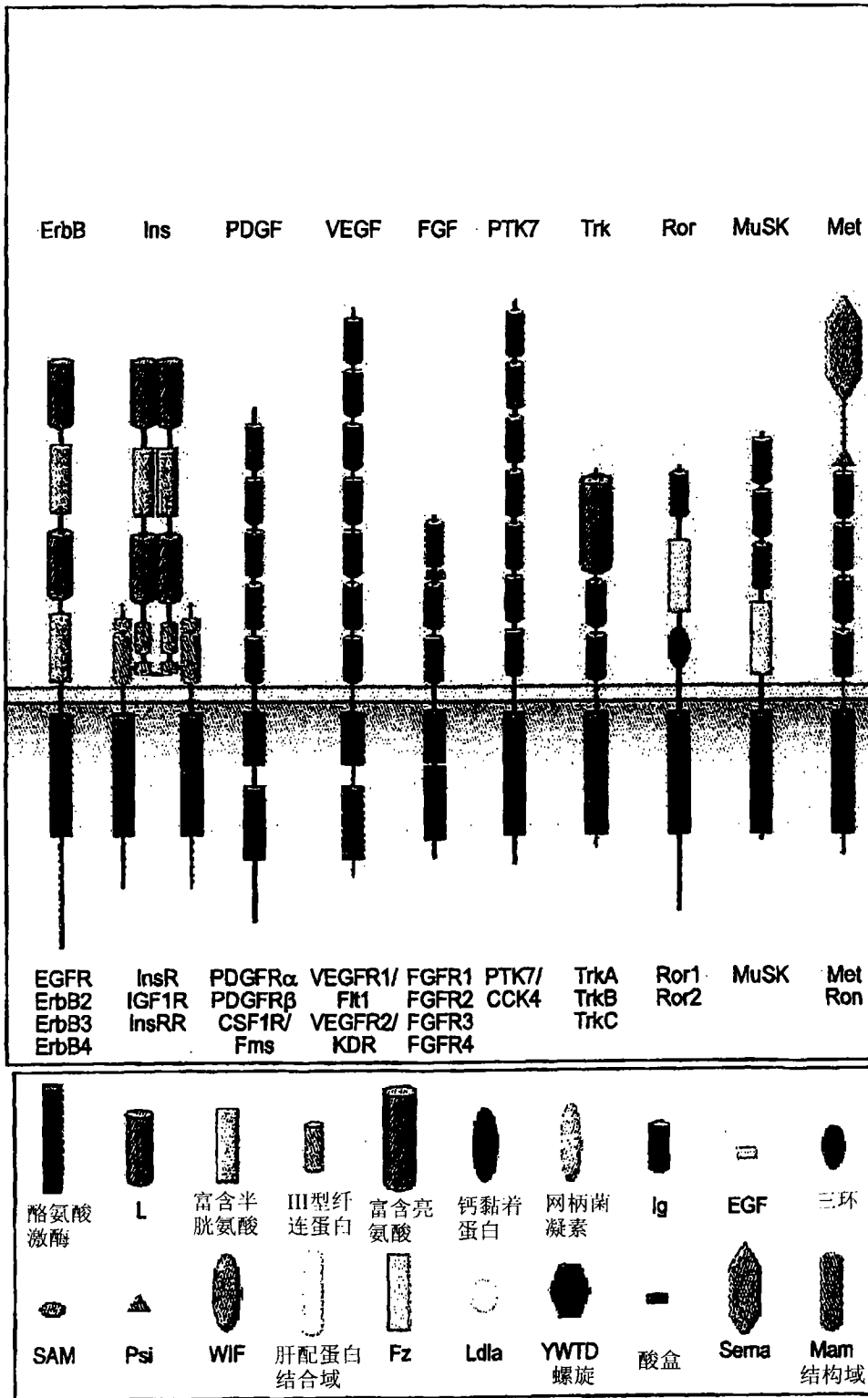


图7

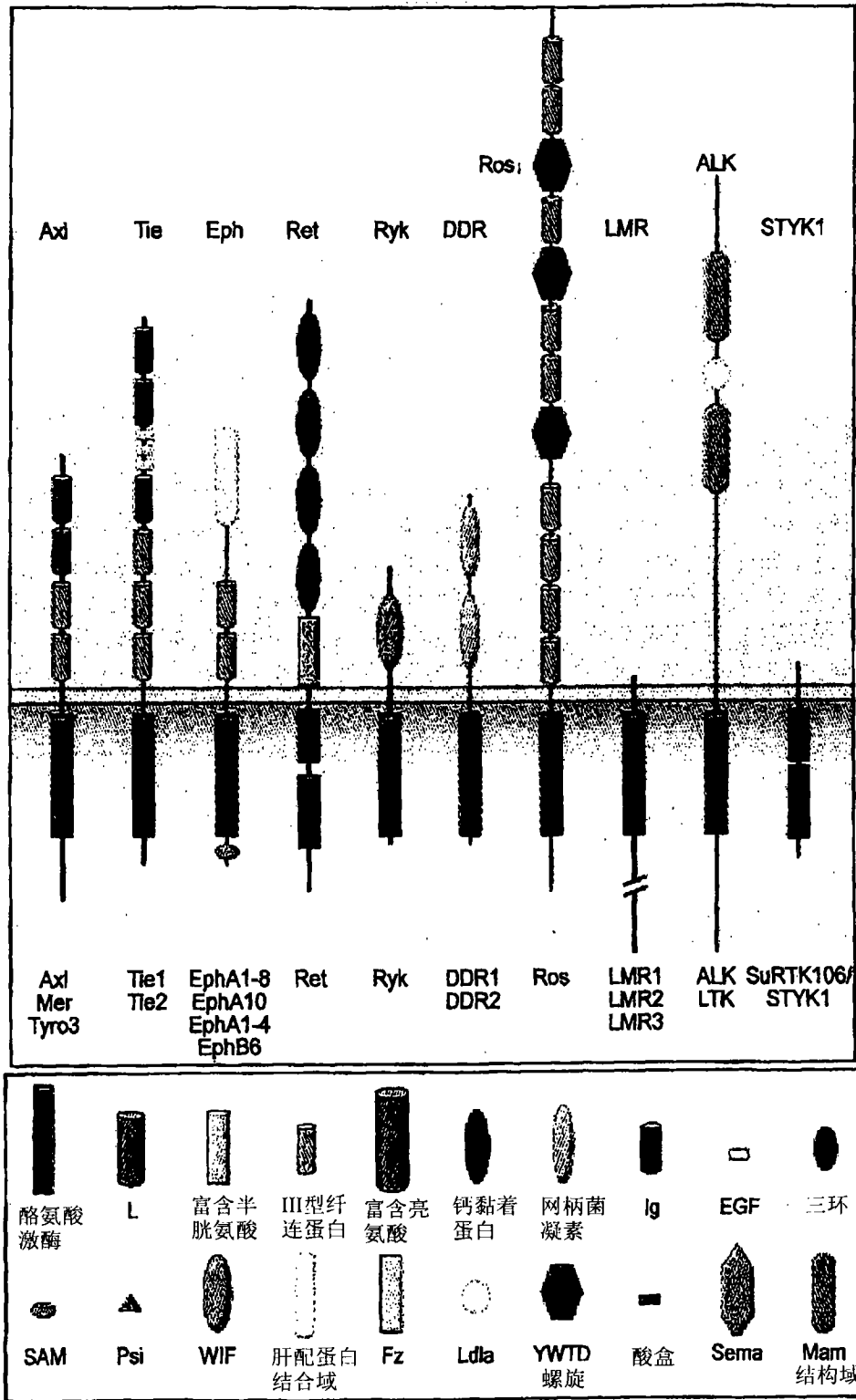


图7(续)