



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113925964 A

(43) 申请公布日 2022. 01. 14

(21) 申请号	202111214612.7	A61K 38/21 (2006.01)
(22) 申请日	2017.02.11	A61K 39/02 (2006.01)
(30) 优先权数据		A61K 39/12 (2006.01)
	62/295,268 2016.02.15 US	A61K 39/39 (2006.01)
		A61K 48/00 (2006.01)
(62) 分案原申请数据		A61P 35/00 (2006.01)
	201780011635.3 2017.02.11	A61P 35/04 (2006.01)
(71) 申请人	崔泽尔有限公司	
地址	英国牛津郡	
(72) 发明人	尼格尔·帕克尔	
(74) 专利代理机构	北京市君合律师事务所	
	11517	
代理人	张怡 顾云峰	
(51) Int. Cl.		
	A61K 39/395 (2006.01)	
	A61K 39/00 (2006.01)	

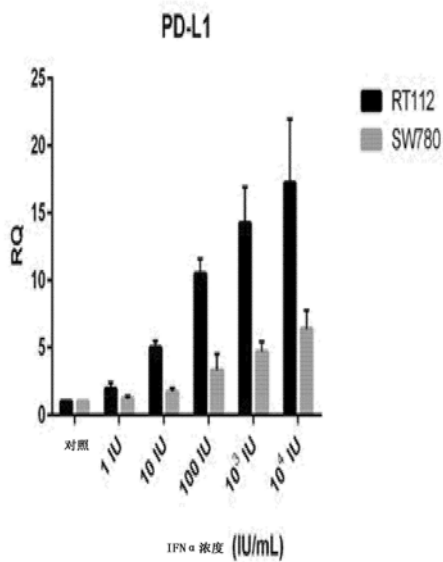
权利要求书2页 说明书12页 附图20页

(54) 发明名称

改善的干扰素疗法

(57) 摘要

干扰素疗法通过共同施用使干扰素上调程序性细胞死亡蛋白1 (也称为CD279) 的表达的能力最小化的药剂来改善。



1. 一种用干扰素治疗人类患者的方法,所述方法包含:
  - a. 在人类患者中诊断可以用干扰素治疗的病状,然后
  - b. 施用第一药剂,所述第一药剂能够提高所述人类患者的干扰素水平,所述人类患者的干扰素水平的提高量足以影响人类免疫系统检查点的功能,由此所述检查点会降低免疫功能,以及
  - c. 向所述人类施用影响同一人类免疫系统检查点的功能的第二药剂,所述第二药剂的施用量能有效地基本上改善免疫功能降低,所述免疫功能降低是所述第一药剂在所述检查点上产生的,由此所述第二化合物基本上改善了所述第一药剂会引起的所述免疫功能降低。
2. 一种方法,其基本上由权利要求1的方法组成。
3. 权利要求1的方法,其中大约同时用所述第一药剂和所述第二药剂治疗所述患者。
4. 权利要求1的方法,其中所述第一药剂包含外源产生的干扰素多肽。
5. 权利要求1的方法,其中所述第一药剂包含诱导所述患者内源表达干扰素的药剂。
6. 权利要求5的方法,其中所述第一药剂是携带可表达的干扰素转基因的载体。
7. 权利要求5的方法,其中所述第一药剂选自:微生物抗原、病毒抗原和微生物抗原类似物或病毒抗原类似物。
8. 权利要求7的方法,其中所述第一药剂包含病毒抗原类似物,所述病毒抗原类似物包含聚I:C。
9. 权利要求7的方法,其中所述第一药剂包含细菌抗原。
10. 权利要求7的方法,其中所述第一药剂包含病毒抗原。
11. 权利要求10的方法,其中所述第一药剂包含抗原性病毒。
12. 权利要求1的方法,其中所述人类患者的干扰素水平的提高量足以提高抑制性人类免疫系统检查点的功能。
13. 权利要求12的方法,其中所述抑制性检查点选自:程序性细胞死亡蛋白1和细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4。
14. 权利要求13的方法,其中所述抑制性检查点包含程序性细胞死亡蛋白1,并且所述第二药剂与程序性细胞死亡蛋白1或程序性细胞死亡蛋白1配体结合。
15. 权利要求1的方法,其中所述病状包含癌症。
16. 一种影响人类免疫系统检查点的功能从而使所述检查点不抑制人类免疫功能的药剂,所述药剂用于消除干扰素对人类患者的免疫抑制作用,所述药剂以有效降低干扰素的免疫抑制作用的量提供。
17. 一种用于改善干扰素作为人类治疗剂的功效的方法,所述方法包含:
  - a. 在人类患者中诊断可以用干扰素治疗的病状,然后
  - b. 向所述人类施用抑制抑制性人类免疫系统检查点的第二药剂,所述药剂的施用量足以降低所述检查点在降低免疫活性上的活性,以及
  - c. 以有效治疗所述病状的量向所述人类施用提高所述人类患者的干扰素水平的第一药剂。
18. 一种方法,其基本上由以下组成:
  - a. 向人类施用抑制抑制性人类免疫系统检查点的第二药剂,以及

b. 向所述人类施用提高人类患者的干扰素水平的第一药剂。

19. 权利要求18的方法, 所述第二药剂的施用量足以降低所述检查点的活性。

## 改善的干扰素疗法

[0001] 本申请是申请号为201780011635.3、申请日为2017年2月11日、发明名称为“改善的干扰素疗法”的中国发明专利申请的分案申请,原申请为国际申请号为PCT/US2017/017568的国家阶段申请,该国际申请要求2016年2月15日提交的临时专利申请序列号US62/295268的优先权,所述临时专利申请的内容通过引用并入本文中。

[0002] 申请人:FKD治疗有限公司,Chinnor,Oxfordshire England,英国公民。

[0003] 联邦政府资助的研究与开发:无。

[0004] 联合研究协议:申请人尤其与M.D.Anderson癌症中心(Houston,Texas)和Mayo Clinic(Rochester,Minnesota)就本申请相关工作达成研究协议。

[0005] 序列表:无。

[0006] 该发明人/发明人的在先公开:无。

### 背景技术

[0007] 干扰素具有许多临床益处。例如,已知干扰素可上调免疫系统。因此,它可用于募集患者的先天免疫系统来识别和攻击癌细胞。然而,干扰素作为抗癌剂的功效迄今已被证明是缺乏的。这一直令人费解。

[0008] 例如,目前在美国批准的最有效的膀胱癌治疗是尿道内卡介苗(*Bacillus Calmette-Guérin vaccine*)。该抗原性疫苗被认为刺激膀胱细胞表达干扰素,干扰素又募集患者的先天免疫系统来更好地识别癌细胞表面抗原并攻击癌细胞。然而,在超过三分之一的病例中,该疫苗无效。

[0009] 类似地,已经测试了膀胱内滴注外源制备的干扰素多肽来治疗膀胱癌,但是已发现其效果低于预期。

[0010] 本人已经发现了原因,并想出了如何解决。

### 发明内容

[0011] 本人已经发现,除了刺激干扰素表达外,干扰素(外源施用或响应于疫苗或上调内源表达的其他药剂而表达)还刺激也称为CD279的程序性细胞死亡蛋白1的表达。因此,本人已鉴定到先前未认识到的干扰素疗法的不良副作用:干扰素有利地刺激患者免疫系统的某些方面,但也上调程序性细胞死亡蛋白1的表达。所引起的程序性细胞死亡蛋白1的增加又下调保护性T细胞功能。这削弱了T细胞识别和攻击携带癌细胞表面抗原的细胞的有效性。因此,干扰素产生两个冲突的作用:其既提高了免疫系统活性,又抑制了免疫系统识别癌细胞表面抗原的能力。

[0012] 因此,本人提出了通过共同施用抑制程序性细胞死亡蛋白1的表达的药剂来改善干扰素疗法。这将使干扰素能够更充分地实现其治疗潜力。

### 附图说明

[0013] 图1是测量RT112和SW780人类细胞系响应于干扰素暴露的PD-L1表达的图。横轴:

干扰素量。纵轴：表达的多肽。

[0014] 图2是测量RT112和SW780人类细胞系响应于干扰素暴露的TRAIL表达的图。横轴：干扰素量。纵轴：表达的多肽。

[0015] 图3是测量RT112和SW780人类细胞系响应于干扰素暴露的IRF1表达的图。横轴：干扰素量。纵轴：表达的多肽。

[0016] 图4是PAGE凝胶的照片，其显示SW780人类癌细胞系中对增加的干扰素 $\alpha$ 的体外剂量反应。横轴：干扰素量。纵轴：表达的多肽。

[0017] 图5测量RT112细胞中响应于干扰素暴露的IRF1、FOX A1和PD-L1的表达，参见实施例2。IRF1用作干扰素刺激的基因对照。FOX A1是I型干扰素调节基因的一个实例，其在干扰素暴露后不改变表达。

[0018] 图6测量UC3细胞中响应于干扰素暴露的IRF1、FOX A1和PD-L1的表达，参见实施例2。IRF1用作干扰素刺激的基因对照。FOX A1是I型干扰素调节基因的一个实例，其在干扰素暴露后不改变表达。

[0019] 图7测量T24细胞中响应于干扰素暴露的IRF1、FOX A1和PD-L1的表达，参见实施例2。IRF1用作干扰素刺激的基因对照。FOX A1是I型干扰素调节基因的一个实例，其在干扰素暴露后不改变表达。

[0020] 图8测量UC14细胞中响应于干扰素暴露的IRF1、FOX A1和PD-L1的表达，参见实施例2。IRF1用作干扰素刺激的基因对照。FOX A1是I型干扰素调节基因的一个实例，其在干扰素暴露后不改变表达。

[0021] 图9是6泳道PAGE凝胶的照片。其测量了在将BBN972细胞暴露于鼠干扰素后PD-L1多肽的存在。泳道是(从左到右)每毫升培养基0(零)、 $1 \times 10^0$ 、 $1 \times 10^1$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$ 和 $1 \times 10^4$ 个国际单位干扰素。

[0022] 图10是6泳道PAGE凝胶的照片。其测量了在将MB49#1(MB49-luc)细胞暴露于鼠干扰素后PD-L1多肽的存在。泳道是(从左到右)每毫升培养基0(零)、 $1 \times 10^0$ 、 $1 \times 10^1$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$ 和 $1 \times 10^4$ 个国际单位干扰素。

[0023] 图11是6泳道PAGE凝胶的照片。其测量了在将BBN972细胞暴露于鼠干扰素后肌动蛋白多肽的存在。泳道是(从左到右)每毫升培养基0(零)、 $1 \times 10^0$ 、 $1 \times 10^1$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$ 和 $1 \times 10^4$ 个国际单位干扰素。

[0024] 图12是6泳道PAGE凝胶的照片。其测量了在将MB49#1细胞暴露于鼠干扰素后肌动蛋白多肽的存在。泳道是(从左到右)每毫升培养基0(零)、 $1 \times 10^0$ 、 $1 \times 10^1$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$ 和 $1 \times 10^4$ 个国际单位干扰素。

[0025] 图13测量了小鼠中响应于腹膜内注射聚I:C的血清干扰素 $\alpha$ 。

[0026] 图14测量了小鼠中响应于肿瘤内注射聚I:C在6小时时的血清干扰素 $\alpha$ 。

[0027] 图15测量了腹膜内注射聚I:C(500mcg)后24小时肿瘤内的PD-L1表达。

[0028] 图16显示用携带人类干扰素 $\alpha$ 2B转基因的INSTILADRIN<sup>TM</sup>重组复制缺陷型腺病毒基因疗法载体治疗的人类中的RNA表达。

[0029] 图17显示皮下C57BL6/J肿瘤的MB49肿瘤尺寸相对于时间的关系( $n=5$ 只雌性小鼠/组)。肿瘤植入后第10天开始治疗，该治疗为200mcg q3天。误差棒表示SEM。

[0030] 图18显示接种肿瘤、用盐水处理(最低线)、用IgG处理(下一个较高线)、用抗PD1单

克隆抗体处理(下一个较高线)、用聚I:C处理(下一个较高线)和用聚I:C与抗PD1单克隆抗体的组合处理(最高线)的雌性小鼠的Kaplan-Meyer存活曲线。

[0031] 图19比较了雄性小鼠中标准化(平均值 $\pm$ SD)辐射率(radiance)随时间的变化。使用对数秩检验,这些数据显示组合疗法优于IgG对照( $p=0.06$ ),优于聚I:C单一疗法( $p=0.32$ ),并且优于抗PD1单克隆抗体( $p=0.14$ )。

[0032] 图20显示“存活部分”,即显示根据图19处理的雄性小鼠中存活倾向的存活率随时间变化的数据。

## 具体实施方式

### [0033] 干扰素疗法

[0034] 干扰素是一组信号转导蛋白。其由人类细胞响应于数种抗原性病原体如病毒、细菌和寄生虫以及肿瘤细胞的存在而表达并分泌。通常,病毒感染的细胞释放干扰素,向附近的旁观细胞转导信号以提高其抗病毒防御。干扰素还活化免疫细胞,如自然杀伤细胞和巨噬细胞。干扰素提高主要组织相容性复合物抗原的表达,所述抗原又增加外来抗原向免疫系统的呈递。

[0035] 干扰素可以根据其转导信号所用的受体类型进行分类或归类。因此,对于人类而言,干扰素通常分为三类:I型(与人类IFN- $\alpha/\beta$ 受体结合的干扰素)、II型(与人类IFN- $\gamma$ 受体结合的干扰素)和III型(与人类IFN- $\lambda$ 受体结合的干扰素)。

[0036] 所有干扰素都有数种共同的作用:它们是抗病毒剂,并且它们调节免疫系统的功能。已经显示施用I型IFN抑制实验动物的肿瘤生长,但是在人类肿瘤中的有益作用尚未被广泛记载。病毒感染的细胞释放可以感染附近细胞的病毒颗粒。然而,感染的细胞可以通过释放干扰素来使相邻细胞准备好抵抗病毒的潜在感染。响应于干扰素,细胞产生大量称为蛋白激酶R(PKR)的酶。这种酶响应于新的病毒感染将称为eIF-2的蛋白质磷酸化;磷酸化的eIF-2与另一种称为eIF2B的蛋白质一起形成无活性复合物来减少细胞内的蛋白质合成。另一种细胞酶RNase L也由于干扰素作用诱导,破坏细胞内的RNA来进一步减少病毒和宿主基因两者的蛋白质合成。受抑制的蛋白质合成破坏病毒和受感染的宿主细胞两者。此外,干扰素诱导产生数百种在对抗病毒和干扰素产生的其它作用中起作用的其它蛋白质——统称为干扰素刺激基因(ISG)。它们还通过提高p53活性来限制病毒传播,p53活性通过促进细胞凋亡来杀死病毒感染的细胞。IFN对p53的作用也与其对抗某些癌症的防护作用有关。

[0037] 干扰素的另一个功能是上调主要组织相容性复合物分子MHC I和MHC II的表达,并提高免疫蛋白酶体活性。较高的MHC I表达增加了病毒肽向细胞毒性T细胞的呈递,而免疫蛋白酶体加工病毒肽来负载到MHC I分子上,从而增加对受感染细胞的识别和杀灭。较高的MHC II表达增加病毒肽向辅助性T细胞的呈递;这些细胞释放向其它免疫细胞转导信号并且共协调其它免疫细胞的活性的细胞因子(尤其诸如更多的干扰素和白细胞介素)。

[0038] 干扰素的产生主要响应于微生物如病毒和细菌以及所述微生物的产物进行。在微生物中独特发现的分子——病毒糖蛋白、病毒RNA、细菌内毒素(脂多糖)、细菌鞭毛、CpG基序——通过模式识别受体如膜结合的Toll样受体或细胞质受体RIG-I或MDA5进行结合,可以触发IFN的释放。Toll样受体3(TLR3)对于响应于双链RNA病毒的存在而诱导干扰素很重要;这种受体的配体是双链RNA(dsRNA)。结合dsRNA后,这种受体活化转录因子IRF3和NF-

kB,所述转录因子对于多种炎性蛋白质的起始合成很重要。RNA干扰技术工具如siRNA或基于载体的试剂可以沉默或刺激干扰素路径。还通过有丝分裂原诱导IFN从细胞释放(特别是淋巴样细胞中的IFN)。其它细胞因子,如白细胞介素1、白细胞介素2、白细胞介素-12、肿瘤坏死因子和集落刺激因子,也可以提高干扰素产生。

[0039] 干扰素疗法被用作(与化疗和放射组合)一些癌症的治疗。这种治疗可以用于血液恶性病;白血病和淋巴瘤,包括毛细胞白血病、慢性粒细胞性白血病、结节性淋巴瘤和皮肤T细胞淋巴瘤。复发性黑色素瘤患者接受重组IFN- $\alpha$ 2b。乙型肝炎和丙型肝炎都用IFN- $\beta$ 治疗,通常与其它抗病毒药物组合。一些用干扰素治疗的患者具有持续的病毒学反应并且可以消除肝炎病毒。可以使用干扰素RIBAVIRIN<sup>TM</sup>和最近批准的蛋白酶抑制剂如Telaprevir (Incivek<sup>TM</sup>) 2011年5月、Boceprevir (VICTRELIS<sup>TM</sup>) 2011年5月或核苷酸类似物聚合酶抑制剂Sofosbuvir (SOVALDI<sup>TM</sup>) 2014年12月的当前标准护理治疗,以60-80%的成功率治疗最有害的菌株-丙型肝炎基因型I病毒。给予所述治疗的患者的活组织检查显示肝损伤和肝硬化减少。一些证据显示,感染后立即给予干扰素可以预防慢性丙型肝炎,但感染早期的诊断很困难,因为早期丙型肝炎感染的身体症状很少。通过IFN控制慢性丙型肝炎与肝细胞癌的减少有关。

[0040] 本领域教导干扰素可以作为外源多肽施用。

[0041] 或者,可以诱导天然干扰素基因的内源表达。例如,本领域教导了例如抗原性卡介苗或分枝杆菌(Mycobacterium)或腺病毒(Adenovirus)疫苗。这种抗原性制剂诱导患者自身的细胞表达干扰素。

[0042] 或者,可以通过用递送干扰素转基因的载体转染宿主细胞来诱导非天然干扰素转基因的内源表达。实际上,甚至外源施用的干扰素多肽自身也充当刺激干扰素产生的信使。

[0043] 如本文所用,术语“干扰素”(缩写为“IFN”)统一指代1型和2型干扰素,包括其缺失、插入或取代变体、生物学活性片段和等位基因形式。如本文所用,术语干扰素(缩写为“IFN”)统一指代1型和2型干扰素。1型干扰素包括干扰素- $\alpha$ 、- $\beta$ 和- $\omega$ 以及其亚型。人类干扰素- $\alpha$ 具有至少14种鉴定的亚型,而干扰素- $\beta$ 具有3种鉴定的亚型。特别地,优选的干扰素- $\alpha$ 包括人类干扰素 $\alpha$ 亚型,包括但不限于 $\alpha$ -1 (GenBank登录号NP 076918)、 $\alpha$ -1b (GenBank登录号AAL35223)、 $\alpha$ -2、 $\alpha$ -2a (GenBank登录号NP000596)、 $\alpha$ -2b (GenBank登录号AAP20099)、 $\alpha$ -4 (GenBank登录号NP066546)、 $\alpha$ -4b (GenBank登录号CAA26701)、 $\alpha$ -5 (GenBank登录号NP 002160和CAA26702)、 $\alpha$ -6 (GenBank登录号CAA26704)、 $\alpha$ -7 (GenBank登录号NP 066401和CAA 26706)、 $\alpha$ -8 (GenBank登录号NP002161和CAA 26903)、 $\alpha$ -10 (GenBank登录号NP 002162)、 $\alpha$ -13 (GenBank登录号NP 008831和CAA 53538)、 $\alpha$ -14 (GenBank登录号NP 002163和CAA 26705)、 $\alpha$ -16 (GenBank登录号NP 002164和CAA 26703)、 $\alpha$ -17 (GenBank登录号NP 067091)、 $\alpha$ -21 (GenBank登录号P01568和NP002166);以及如以下文献中所述的复合干扰素:Stabinsky,美国专利号5,541,293,1996年7月30日授予,Stabinsky,美国专利号4,897,471,1990年1月30日授予以及Stabinsky,美国专利号4,695,629,1987年9月22日授予,其教导通过引用并入本文中;以及如以下文献中所述的杂合干扰素:Goeddel等人,美国专利号4,414,150,1983年11月8日授予,其教导通过引用并入本文中。2型干扰素被称为干扰素 $\gamma$  (EP 77,670A和EP 146,354A)和亚型。人类干扰素 $\gamma$ 具有至少5种鉴定的亚型,包括干扰素 $\omega$  1 (GenBank登录号NP 002168)。用于表达的编码干扰素的DNA序列的构建可以通过常规重

组DNA技术基于上文所提及的以及如Goedde1等人,美国专利号6,482,613,2002年11月19日中所述的众所周知的氨基酸序列来完成,所述美国专利的教导通过引用并入本文中。

[0044] 通过本领域中众所周知的技术测量,干扰素的“生物学活性”片段可以被鉴定为具有任何抗肿瘤或抗增殖活性(参见例如Openakker等人,同上;Mossmann, J. Immunol. Methods, 65:55 (1983))并通过IFN受体介导的机制活化IFN反应性基因。可溶性IFN- $\alpha$ 和IFN- $\beta$ 蛋白通常被鉴定为与I型IFN受体复合物(GenBank登录号NP 000865)关联并且活化类似的细胞内信号转达路径。IFN- $\gamma$ 通常被鉴定为与II型IFN受体关联。两种类型的IFN受体的配体诱导的结合引起Janus激酶将受体磷酸化,接着活化STAT(信号转导子和转录活化子)蛋白以及导致形成IFN诱导型转录因子的其它磷酸化事件,所述IFN诱导型转录因子与IFN诱导性基因中所存在IFN反应元件结合。出于本发明的目的,被鉴定为与I型和/或2型IFN受体结合后活化IFN路径的多肽被认为是干扰素。

[0045] 程序性细胞死亡蛋白1

[0046] 程序性细胞死亡蛋白1(“PD-1”),也称为CD279,是人类中由PDCD1基因编码的蛋白质。PD-1属于免疫球蛋白超家族并且作为细胞表面受体起作用,其与两种已知配体PD-L1和PD-L2结合。

[0047] PD-1通过阻止T细胞活化而在下调人类免疫系统中起重要作用,从而又降低了自身免疫并促进“自身耐受性”。PD-1的免疫调节作用通过剔除活性T细胞同时保护抑制性T细胞来实现。PD-1促进淋巴结中抗原特异性T细胞的凋亡,但减少调节(“抑制”)T细胞的凋亡。

[0048] PD-L1可以在某些肿瘤中高度表达。这导致肿瘤中免疫细胞的增殖减少或甚至消除,损害患者的先天免疫系统识别癌细胞表面抗原和对抗如此鉴定的癌细胞的能力。

[0049] PD-1在T细胞和pro-B细胞上表达。作为免疫检查点的PD-1通过阻止T细胞活化而在下调免疫系统中起重要作用,从而又降低了自身免疫并促进自身耐受性。PD-1的抑制作用通过在淋巴结中的抗原特异性T细胞中促进细胞凋亡(程序性细胞死亡)同时减少调节性T细胞(抑制性T细胞)中的细胞凋亡的双重机制来实现。

[0050] 程序性死亡1是具有268个氨基酸的I型膜蛋白。PD-1是T细胞调节子的延伸CD28/CTLA-4家族的成员。该蛋白质的结构包括细胞外IgV结构域,后面是跨膜区和细胞内尾部。细胞内尾部含有位于基于免疫受体酪氨酸的抑制基序和基于免疫受体酪氨酸的开关基序的两个磷酸化位点,这表明PD-1负调节TCR信号。这与配体结合后SHP-1和SHP-2磷酸酶与PD-1的细胞质尾部的结合一致。此外,PD-1连接上调触发T细胞受体下调的E3-泛素连接酶CBL-b和c-CBL。PD-1在活化的T细胞、B细胞和巨噬细胞的表面上表达,表明与CTLA-4相比,PD-1更广泛地负调节免疫反应。

[0051] PD-1具有两种配体,PD-L1和PD-L2,其为B7家族的成员。PD-L1蛋白在巨噬细胞和树突状细胞(DC)上响应于LPS和GM-CSF治疗上调,并且在T细胞和B细胞上在TCR和B细胞受体信号转导后上调,而在静息小鼠中,PD-L1 mRNA可以在心脏、肺、胸腺、脾和肾中检测到。

[0052] 正在开发增强免疫系统的靶向PD-1的单克隆抗体以治疗癌症。许多肿瘤细胞表达PD-L1,一种免疫抑制性PD-1配体;抑制PD-1与PD-L1之间的相互作用可以提高体外T细胞响应并介导临床前抗肿瘤活性。这被称为免疫检查点阻断。

[0053] 一种这样的抗PD-1抗体药物——纳武单抗(nivolumab), (OPDIVO<sup>TM</sup>,可从Bristol Myers Squibb Co., Princeton, NJ购得)——在具有总共296名患者的临床试验中在非小细



胞肺癌、黑色素瘤和肾细胞癌中产生完全或部分响应。结肠癌和胰腺癌患者没有响应。同样靶向PD-1受体的纳武单抗(OPDIVO™, Bristol-Myers Squibb)于2014年7月在日本获得批准并且在2014年12月被US FDA批准用于治疗转移性黑色素瘤。

[0054] 同样靶向PD-1受体的帕姆单抗(Pembrolizumab) (KEYTRUDA™或MK-3475, 可从Merck&Co., Rahway, N.J. 购得) 在2014年9月被FDA批准用于治疗转移性黑色素瘤。2015年3月, 英国早期获得药物计划(EAMS; UK Early Access to Medicines Scheme) 使帕姆单抗在英国可供晚期黑色素瘤患者使用。其正在美国用于肺癌、淋巴瘤和间皮瘤的临床试验中。其已经取得了成功, 副作用很小。2015年10月2日, 帕姆单抗被FDA批准用于在其它治疗后疾病已经进展的晚期(转移性) 非小细胞肺癌(NSCLC) 患者。

[0055] 靶向PD-1受体的早期开发中的其它药物(通常称为“检查点抑制剂”) : 皮迪祖单抗(Pidilizumab) (CT-011, Cure Tech)、BMS 936559 (Bristol Myers Squibb)、MPDL3280A (Roche) 和阿特株单抗(atezolizumab) (Amgen)。

[0056] 组合疗法

[0057] 本人已发现用干扰素治疗癌症——通过施用干扰素多肽或通过施用诱导细胞表达干扰素的药剂——能够附随地诱导PD-1的表达。

[0058] 因此, 本人提出通过共同施用干扰素与抑制PD-1活性的化合物来改善基于干扰素的癌症疗法的功效。

[0059] 这需要例如以有效作为癌症疗法的量静脉内施用干扰素多肽, 并且以有效阻止干扰素引起的PD-1表达增加的量并优选以降低PD-1作用的量静脉内施用单克隆抗体检查点阻断抑制剂。

[0060] 或者, 这需要以有效作为癌症疗法的量膀胱内滴注诱导干扰素表达的药剂, 并且以有效阻止干扰素引起的PD-1表达增加并优选以降低PD-1作用的量静脉内预防性施用检查点阻断抑制剂。所述药剂可以是诱导干扰素表达的抗原性疫苗(如病毒或BCG疫苗或分枝杆菌疫苗)。或者, 所述药剂可以是转基因载体, 所述转基因载体用可表达的干扰素转基因转化宿主细胞。或者, 它可以是也传递干扰素转基因的抗原性病毒或细菌。

[0061] 本发明提供的各个方面的实施方案也通过以下任意一个段落进行了描述。

[0062] 实施方案1. 一种用干扰素治疗人类患者的方法, 所述方法包含:

[0063] a. 在人类患者中诊断可以用干扰素治疗的病状, 然后

[0064] b. 施用第一药剂, 所述第一药剂能够提高所述人类患者的干扰素水平, 所述人类患者的干扰素水平的提高量足以影响人类免疫系统检查点的功能, 由此所述检查点会降低免疫功能, 以及

[0065] c. 向所述人类施用影响同一人类免疫系统检查点的功能的第二药剂, 所述第二药剂的施用量能有效地基本上改善免疫功能降低, 所述免疫功能降低是所述第一药剂在所述检查点上产生的,

[0066] 由此所述第二化合物基本上改善了所述第一药剂会引起的所述免疫功能降低。

[0067] 实施方案2. 一种方法, 其基本上由实施方案1的方法组成。

[0068] 实施方案3. 实施方案1的方法, 其中大约同时用所述第一药剂和所述第二药剂治疗所述患者。

[0069] 实施方案4. 实施方案1的方法, 其中所述第一药剂包含外源产生的干扰素多肽。

[0070] 实施方案5.实施方案1的方法,其中所述第一药剂包含诱导所述患者内源表达干扰素的药剂。

[0071] 实施方案6.实施方案5的方法,其中所述第一药剂是携带可表达的干扰素转基因的载体。

[0072] 实施方案7.实施方案5的方法,其中所述第一药剂选自:微生物抗原、病毒抗原和微生物抗原类似物或病毒抗原类似物。

[0073] 实施方案8.实施方案7的方法,其中所述第一药剂包含病毒抗原类似物,所述病毒抗原类似物包含聚I:C。

[0074] 实施方案9.实施方案7的方法,其中所述第一药剂包含细菌抗原。

[0075] 实施方案10.实施方案7的方法,其中所述第一药剂包含病毒抗原。

[0076] 实施方案11.实施方案10的方法,其中所述第一药剂包含抗原性病毒。

[0077] 实施方案12.实施方案1的方法,其中所述人类患者的干扰素水平的提高量足以提高抑制性人类免疫系统检查点的功能。

[0078] 实施方案13.实施方案12的方法,其中所述抑制性检查点选自:程序性细胞死亡蛋白1和细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4。

[0079] 实施方案14.实施方案13的方法,其中所述抑制性检查点包含程序性细胞死亡蛋白1,并且所述第二药剂与程序性细胞死亡蛋白1或程序性细胞死亡蛋白1配体结合。

[0080] 实施方案15.实施方案1的方法,其中所述病状包含癌症。

[0081] 实施方案16.一种影响人类免疫系统检查点的功能从而使所述检查点不抑制人类免疫功能的药剂,所述药剂用于消除干扰素对人类患者的免疫抑制作用,所述药剂以有效降低干扰素的免疫抑制作用的量提供。

[0082] 实施方案17.一种用于改善干扰素作为人类治疗剂的功效的方法,所述方法包含:

[0083] a.在人类患者中诊断可以用于干扰素治疗的病状,然后

[0084] b.向所述人类施用抑制抑制性人类免疫系统检查点的第二药剂,所述药剂的施用量足以降低所述检查点在降低免疫活性上的活性,以及

[0085] c.以有效治疗所述病状的量向所述人类施用提高所述人类患者的干扰素水平的第一药剂。

[0086] 实施方案18.一种方法,其基本上由以下组成:

[0087] a.向人类施用抑制抑制性人类免疫系统检查点的第二药剂,以及

[0088] b.向所述人类施用提高人类患者的干扰素水平的第一药剂。

[0089] 实施方案19.实施方案18的方法,所述第二药剂的施用量足以降低所述检查点的活性。

[0090] 实施例1-IFN $\alpha$ 诱导PD-L1和TRAIL表达

[0091] 干扰素- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) 在临床上并不显著有效。本人认为其可能在载体介导的IFN $\alpha$ 基因疗法环境中更有效。数年前,本人开始进行INSTILADRIN<sup>TM</sup>牌腺病毒载体介导的干扰素 $\alpha$ 2b的II期人类临床试验。在这个实验中,测量了PD-L1、TRAIL、IRF1和核纤层蛋白A (Lamin A) 响应于暴露于干扰素的表达。

[0092] 材料与方法:将RT112和SW780细胞在培养基中培养,然后暴露于含有干扰素 $\alpha$ 多肽的培养基中。干扰素的量在零(对照)至 $10^4$ 个国际单位/毫升范围内。通过蛋白质印迹和定

量实时PCR使用市售抗体和引物评估基因表达。用MIRVANA™试剂盒 (Thermo Fisher) 从培养的细胞中分离RNA。使用TAQMAN™阵列卡 (A和B) (Thermo Fisher) 分析RT112中的mIR谱。用Illumina HumanHT\_12\_v4 BEADCHIP™阵列 (47323探针) 进行RT112和UC3中的全基因组mRNA表达谱分析。

[0093] 结果:结果提供于图1至图4中。响应于暴露于干扰素,两种细胞系都上调PD-L1、TRAIL和IRF1表达,并且对核纤层蛋白A表达没有可测量的作用。对于PD-L1、TRAIL和IRF1表达,在不同细胞系中作用大小不同。参见图1、2、3、4。

[0094] 结论:在一组癌细胞系中,干扰素暴露使PD-L1免疫检查点表达显著增加。本人发现这一发现令人惊讶,因为其暗示了本领域中迄今使用干扰素作为有效的癌症疗法失败的原因。虽然干扰素理论上应该是一种有效的抗癌剂,但干扰素也可能上调PD-L1的表达,因此阻挠干扰素的治疗效果。

[0095] 实施例2-IFN $\alpha$ 以剂量依赖性方式诱导PD-L1表达

[0096] 在这里,本人测量了用干扰素 $\alpha$ 处理后免疫检查点PD-L1的表达、micro-RNA (miR) 和mRNA表达谱。

[0097] 材料与方法:将RT112、T24、UC3和UC14细胞在培养基中培养,然后暴露于对照培养基或含有1000IU/ml干扰素 $\alpha$ 多肽的培养基6小时。通过蛋白质印迹和定量实时PCR使用市售抗体和引物评估PD-L1表达。用MIRVANA™试剂盒 (Thermo Fisher) 从培养的细胞中分离RNA。使用TAQMAN™阵列卡 (A和B) (Thermo Fisher) 分析RT112中的mIR谱。用Illumina HumanHT\_12\_v4 BEADCHIP™阵列 (47323探针) 进行RT112和UC3中的全基因组mRNA表达谱分析。所有实验一式三份进行来提高统计学可靠性。

[0098] 结果:所有细胞系都响应暴露于IFN $\alpha$ 而上调PD-L1表达。与图6的UC3细胞相比,这种作用在RT112细胞中最明显,参见图5。相反,在RT112:1233细胞 ( $p=0.0036$ )、19b-1# ( $p=0.0157$ ) 和222# ( $p=0.0061$ ) 中暴露于IFN $\alpha$ 后,三个潜在的oncomiR区的表达被显著下调。分析在IFN $\alpha$ 暴露后log (表达) 相差至少2倍 (错误发现率 $<0.001$ ) 的差异表达的基因,在RT112和UC3细胞系中分别有302和181个差异表达的基因。在两种细胞系中排名最高的IFN $\alpha$ 诱导的基因包括先前在膀胱癌中未描述的数种,包括IFIT2 (转移的负调节因子) 和IFI27 (与对TRAIL的敏感性相关)。IFN $\alpha$ 诱导的PD-L1表达还可在mRNA基因芯片上证实,其倍数变化与实时PCR数据类似。

[0099] 结论:在一组癌细胞系中,IFN $\alpha$ 暴露使PD-L1免疫检查点表达显著增加。基于阵列的microRNA和mRNA谱分析揭示膀胱癌中IFN $\alpha$ 响应的新型潜在调节剂。这个膀胱IFN $\alpha$ 谱可用作测量对腺病毒IFN $\alpha$ 基因疗法的响应的中间终点。IFN $\alpha$ 疗法带来的PD-L1表达的未来预测可以导致利用免疫检查点抑制剂的合理组合治疗。

[0100] 实施例3-鼠干扰素诱导PD-L1表达

[0101] 材料与方法:培养BBN972和MB49#1 (MB49-luc) 细胞,然后暴露于含有0 (零) 至 $1 \times 10^4$ 个国际单位鼠干扰素的培养基中。测量PD-L1和 (作为对照) 肌动蛋白的后续表达。

[0102] 结果:鼠干扰素对任意细胞系中的肌动蛋白的表达均无影响。参见图11、12。相反,鼠干扰素对PD-L1表达具有显著的剂量依赖性作用。参见图9、10。

[0103] 结论:这些数据显示干扰素对PD-L1表达的作用不限于人类干扰素 $\alpha 2a$ ,实际上也不限于人类干扰素。相反,干扰素对PD-L1表达的作用似乎通常对干扰素是通用的。

[0104] 实施例4-聚肌苷酸:聚胞苷酸(聚I:C)诱导PD-L1

[0105] 材料与方法:上述数据指示干扰素以剂量依赖性方式快速且明显响应于来自不同物种的干扰素而诱导PD-L1表达。考虑到该作用与从其获得干扰素的动物物种无关,假设该作用可能不限于干扰素,并且可能更普遍地由其它类型的免疫刺激剂引起。为了测试这个观点,评估了聚肌苷酸:聚胞苷酸(通常缩写为“聚I:C”)。聚I:C是免疫刺激剂。将其以钠盐形式使用来模拟病毒感染。聚I:C在结构上类似于双链RNA。dsRNA存在于一些病毒中。通过向植入plc或ulc肿瘤的实验室小鼠腹膜内注射施用聚I:C。

[0106] 结果:图13显示对照小鼠(n=3)显示血清干扰素a的最小基线测量值。相反,腹膜内注射聚I:C使血清干扰素a呈时间依赖性增加。图14显示聚I:C的肿瘤内注射在6小时的时候的结果。数据(每个系列n=1)显示在plc肿瘤中,肿瘤内干扰素a显著增加,在ulc肿瘤中略微增加,并且在对照肿瘤中没有可测量的增加。图15显示聚I:C(500mcg)也在肿瘤内诱导(在24小时的时候)PD-L1表达(Mann Whitney  $p=0.0495$ )。

[0107] 结论:这些数据指示,PD-L1表达不仅由干扰素诱导,而且由聚I:C诱导,聚I:C是一种模拟dsRNA并诱导干扰素表达的化合物。

[0108] 实施例5-干扰素病毒基因疗法在人体内诱导PD-L1

[0109] 材料与方法:这些数据来自BCG疗法后无反应或难治的患者的人类II期人类临床试验,该试验针对携带人类干扰素 $\alpha 2b$ 转基因的INSTILADRIN<sup>TM</sup>复制缺陷型腺病毒基因疗法载体。该研究计划已经公开,并通过引用并入本文中。

[0110] 结果:图16显示用携带人类干扰素 $\alpha 2B$ 转基因的INSTILADRIN<sup>TM</sup>重组复制缺陷型腺病毒基因疗法载体治疗的人类中八(8)个治疗周期中的RNA表达。奇数(白色标记)柱测量治疗前的RNA转录;偶数(淡蓝色标记)柱测量治疗后的RNA转录。RNA量定量显示,淡绿色显示最少,淡红色显示最多。柱1和2显示PD-L1 RNA从治疗前的-2增加到治疗后的+2。柱3和4类似地显示PD-L1 RNA从治疗前的-2增加到治疗后的+3。总之,三分之一的治疗对显示治疗后PD-L1表达显著增加。治疗还上调了其它免疫检查点标志物。

[0111] 结论:这些数据显示,三分之一的患者在用干扰素基因疗法治疗后表现出诱导T细胞和免疫检查点标志物(包括PD-L1)。

[0112] 实施例6-组合疗法提高存活率

[0113] 材料与方法:向雌性实验室大鼠接种肿瘤细胞,并且使细胞生长成可测量的肿瘤。接着用盐水(对照)、IgG(作为对照)、抗PD1单克隆抗体(单一疗法)、聚I:C(诱导干扰素表达的单一疗法)以及聚I:C与抗PD1单克隆抗体的组合(组合疗法)处理大鼠。

[0114] 结果:图17显示皮下C57BL6/J肿瘤的MB49肿瘤尺寸相对于时间的关系(n=5只雌性小鼠/组)。肿瘤植入后第10天开始治疗,该治疗为200mcg q3天。误差棒表示SEM。在第40天显示最大肿瘤体积的最高(黄色)线是对照组(所有组n=5,仅雌性)。下一个最低(蓝色)线是IgG对照。下一个最低(红色)线是聚I:C。下一个最低(绿色)线是抗PD1单克隆抗体。铺叠在X轴自身上的最低(黑色)线是组合疗法。

[0115] 图18显示接种肿瘤、用盐水处理(最低线)、用IgG处理(下一个较高线)、用抗PD1单克隆抗体处理(下一个较高线)、用聚I:C处理(下一个较高线)和用聚I:C与抗PD1单克隆抗体的组合处理(最高线)的雌性小鼠的Kaplan-Meyer存活曲线。这些数据显示,组合干扰素诱导剂(聚I:C)与PD1抑制剂(抗PD1单克隆抗体)显著提高了存活率:在50天时,约20%的对

照动物仍存活,50%的聚I:C动物仍存活,并且100%的组合处理动物仍存活。

[0116] 图19比较了雄性小鼠中标准化(平均值 $\pm$ SD)辐射率随时间的变化。使用对数秩检验,这些数据显示组合疗法优于IgG对照( $p=0.06$ ),优于聚I:C单一疗法( $p=0.32$ ),并且优于抗PD1单克隆抗体( $p=0.14$ )。

[0117] 图20显示“存活部分”,即显示存活倾向的存活率随时间变化的数据。

[0118] 结论:这些数据显示组合疗法协同有效,而不止仅赋予加和效应。

[0119] 实施例7-浅表扩散型黑色素瘤

[0120] 材料与方法:通过广泛的局部切除来处理诊断患有浅表扩散型黑色素瘤的人类患者并且通过前哨淋巴结活检来证实疾病未扩散至淋巴系统或远端器官。接着用INSTILADRIN<sup>TM</sup>与KEYTRUDA<sup>TM</sup>的组合治疗患者。手术切除后尽快开始治疗。

[0121] INSTILADRIN<sup>TM</sup>腺病毒是一种携带干扰素 $\alpha 2b$ 转基因的复制缺陷型重组腺病毒基因疗法载体。这些基因疗法载体的制备描述于例如Muralidhara Ramachandra等人, Selectively Replicating Viral Vector,美国专利证书号7,691,370中。干扰素转基因的分离描述于例如Charles Weissmann, DNA Sequences, Recombinant DNA Molecules and Processes for Producing Human Interferon-Like Polypeptides,美国专利证书号6,835,557中。

[0122] KEYTRUDA<sup>TM</sup>帕姆单抗是人源化单克隆抗程序性细胞死亡-1 (PD-1) 抗体 (IgG4/ $\kappa$  同种型,其Fc区中具有稳定性序列变更)。

[0123] 在单剂量小瓶提供INSTILADRIN<sup>TM</sup>。将一剂INSTILADRIN<sup>TM</sup>在注射用无菌盐水中复原并局部皮下施用至切除位点。每四周重复施用一次。一小瓶KEYTRUDA<sup>TM</sup>粉末含有50mg帕姆单抗。以静脉内输注形式历时30分钟施用KEYTRUDA<sup>TM</sup>,每3周重复一次,并且患者接受治疗直至疾病进展或出现不可接受的毒性为止。可以观察到非典型反应(即肿瘤尺寸初始瞬时增加或最初几个月内出现小的新病变,接着肿瘤缩小)。优选对具有疾病进展的初始证据的临床稳定患者继续进行治疗,直至确认疾病进展为止。

[0124] 招募测试受试者,然后分配到治疗组:切除后仅施用KEYTRUDA<sup>TM</sup>,切除后仅施用INSTILADRIN<sup>TM</sup>,切除后共同施用KEYTRUDA<sup>TM</sup>和INSTILADRIN<sup>TM</sup>,切除后施用INSTILADRIN<sup>TM</sup>和NSAID (COX-2抑制剂),以及切除后共同施用KEYTRUDA<sup>TM</sup>和INSTILADRIN<sup>TM</sup>和NSAID。

[0125] 结果:主要功效结果量度是无进展存活率(如通过例如使用实体肿瘤中的响应评估标准[RECIST]进行综合放射学和肿瘤学评定评论来评定)、总存活率和前哨淋巴结活检。其它功效结果量度可以是总响应率和响应持续时间。预期随后的前哨淋巴结活检显示该疾病没有扩散。

[0126] 本人预期施用INSTILADRIN<sup>TM</sup>与COX-2抑制剂将表现出优于仅施用INSTILADRIN<sup>TM</sup>的功效。预期共同施用KEYTRUDA<sup>TM</sup>与INSTILADRIN<sup>TM</sup>将表现出优于仅施用任一药剂的功效结果量度,并且预期这种益处大于仅加和作用。预期共同施用KEYTRUDA<sup>TM</sup>与INSTILADRIN<sup>TM</sup>和NSAID将表现出优于仅施用KEYTRUDA<sup>TM</sup>或INSTILADRIN<sup>TM</sup>和仅NSAID的功效结果量度,并且预期这种益处大于仅加和作用。

[0127] 实施例8-浅表扩散型黑色素瘤

[0128] 材料与方法:KEYTRUDA<sup>TM</sup>如前述实施例。

[0129] 作为干扰素的来源,将SYLATRON<sup>TM</sup>PEG化的干扰素 $\alpha 2b$ 以6mcg/kg皮下施用,每周一

次,持续8次剂量(诱导),接着每周一次3mcg/kg,持续长达5年(维持)。如果由于不良反应在治疗的第1-8周(诱导)期间需要调整SYLATRON™剂量,则优选从原始剂量(6mcg/kg,每周一次)进行3步降低(即,将剂量降低至3mcg/kg,每周一次;如果需要,降低至2mcg/kg,每周一次;接着,如果需要,进一步降低至1mcg/kg,每周一次)。如果由于不良反应在治疗的第9-260周(维持)期间需要调整剂量,则推荐从原始剂量(3mcg/kg,每周一次)进行2步降低(即,将剂量降低至2mcg/kg,每周一次;如果需要,降低至1mcg/kg,每周一次)。

[0130] 招募测试受试者,然后分配到治疗组:切除后仅施用KEYTRUDA™,切除后仅施用SYLATRON™,切除后共同施用KEYTRUDA™和SYLATRON™,切除后施用SYLATRON™和NSAID(COX-2抑制剂),以及切除后共同施用KEYTRUDA™和SYLATRON™和NSAID。

[0131] 结果:主要功效结果量度是无进展存活率(如通过例如使用实体肿瘤中的响应评估标准[RECIST]进行综合放射学和肿瘤学评定评论来评定)、总存活率和前哨淋巴结活检。其它功效结果量度可以是总响应率和响应持续时间。预期随后的前哨淋巴结活检显示该疾病没有扩散。

[0132] 本人预期施用SYLATRON™与COX-2抑制剂将表现出优于仅施用SYLATRON™的功效。预期共同施用KEYTRUDA™与SYLATRON™将表现出优于仅施用任一药剂的功效结果量度,并且预期这种益处大于仅加和作用。预期共同施用KEYTRUDA™与SYLATRON™和NSAID将表现出优于仅施用KEYTRUDA™或SYLATRON™和仅NSAID的功效结果量度,并且预期这种益处大于仅加和作用。

[0133] 实施例9-非小细胞肺癌

[0134] 材料与方法:药剂按照上文实施例7。人类测试受试者被诊断为患有非小细胞肺癌。根据Greene, Frederick L., Cancer Staging Manual (American Joint Committee on Cancer, publ., 第6版) 筛选患者来确保可比较的测试受试者患有可比较的疾病。基于PD-L1的肿瘤表达筛选测试受试者来进行治疗,通过验证的测试确认表达。

[0135] KEYTRUDA的推荐剂量为:对于先前未用化疗治疗的NSCLC为200mg,并且先前用化疗治疗的NSCLC或黑色素瘤为2mg/kg。

[0136] 通过胸膜内输注施用INSTILADRIN™。这种方法阐明于美国专利公开US2014/17202的图2中。

[0137] 招募测试受试者,然后分配到治疗组:仅施用KEYTRUDA™,仅施用INSTILADRIN™,共同施用KEYTRUDA™与INSTILADRIN™,施用INSTILADRIN™和NSAID(COX-2抑制剂),以及共同施用KEYTRUDA™与INSTILADRIN™和NSAID。

[0138] 结果:主要功效结果量度是无进展生存率,总生存率和前哨淋巴结活检。其它功效结果量度可以是总响应率和响应持续时间。预期随后的前哨淋巴结活检显示该疾病没有扩散。

[0139] 本人预期施用INSTILADRIN™与COX-2抑制剂将表现出优于仅施用INSTILADRIN™的功效。预期共同施用KEYTRUDA™与INSTILADRIN™将表现出优于仅施用任一药剂的功效结果量度,并且预期这种益处大于仅加和作用。预期共同施用KEYTRUDA™与INSTILADRIN™和NSAID将表现出优于仅施用KEYTRUDA™或INSTILADRIN™和仅NSAID的功效结果量度,并且预期这种益处大于仅加和作用。

[0140] 总结

[0141] 上述实施例讨论治疗某些癌症。然而,我们的发现可以更普遍地用于治疗任何受益于干扰素信号转导和遭受CD279过表达的病状。

[0142] 在权利要求书中,使用术语“治疗”并不要求完全治愈,而是改善。例如,“治疗”癌症可以通过以下方式实现:完全消除癌症,还有例如与没有进行这种治疗的患者相比减缓肿瘤生长,降低死亡风险或减缓疾病进展。

[0143] 鉴于本文的公开,技术人员可以容易地看到具体应用或其变体。例如,虽然上述讨论提到了人类干扰素的特定种类,但起类似作用的其它种类和干扰素衍生物或类似物将提供相同的益处。因此,我们的专利的合法覆盖范围旨在不由讨论的实施例确定,而是由合法的权利要求书以及其允许的等效物确定。

[0144] 当合法的权利要求书提及大约“同时”治疗时,参见例如原始权利要求3,这要求两种化合物同时在患者中起作用。它不要求同期施用。因此,如果第二药剂的作用持续至少一周,则可以在施用第二药剂后一周施用第一药剂。

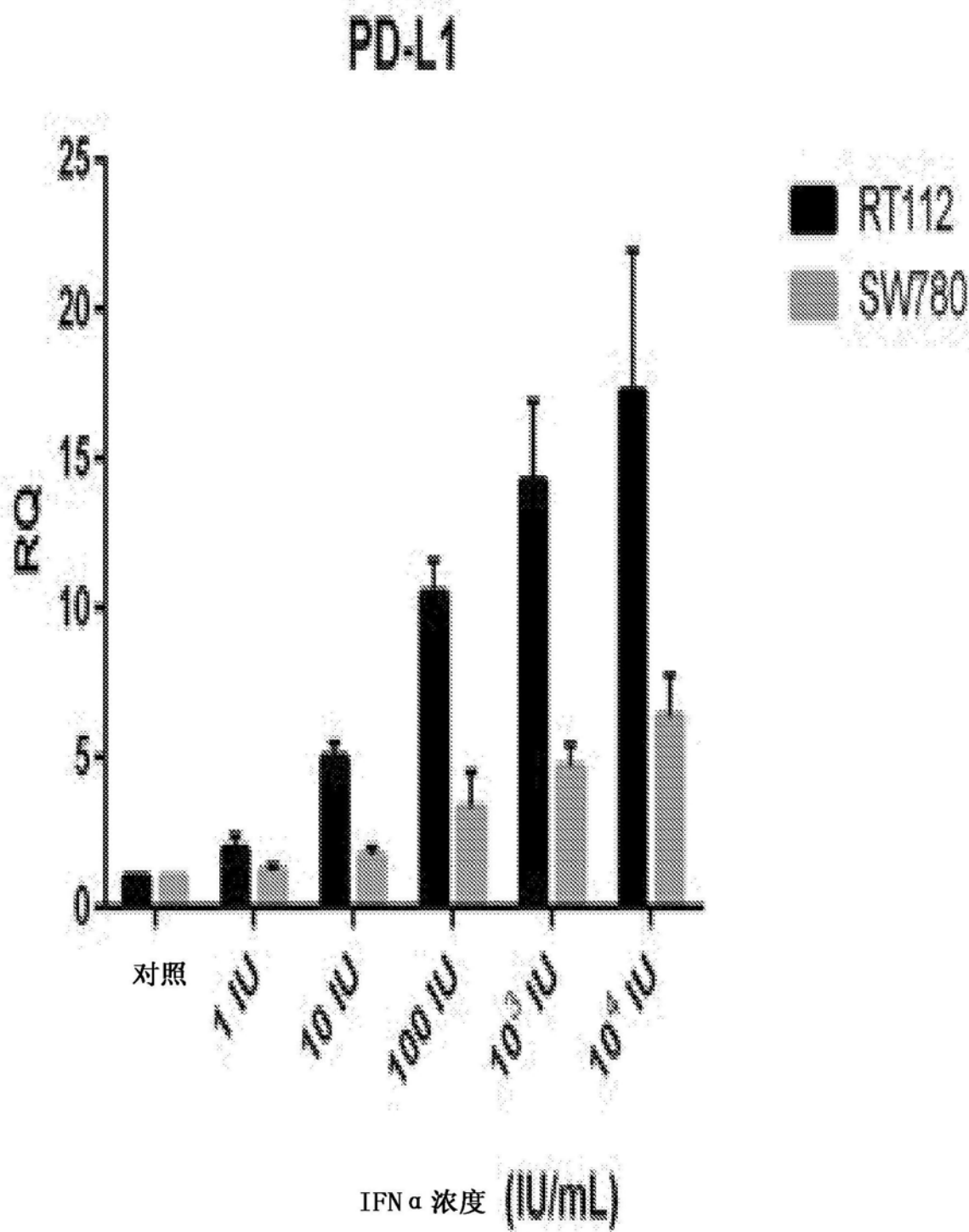


图1



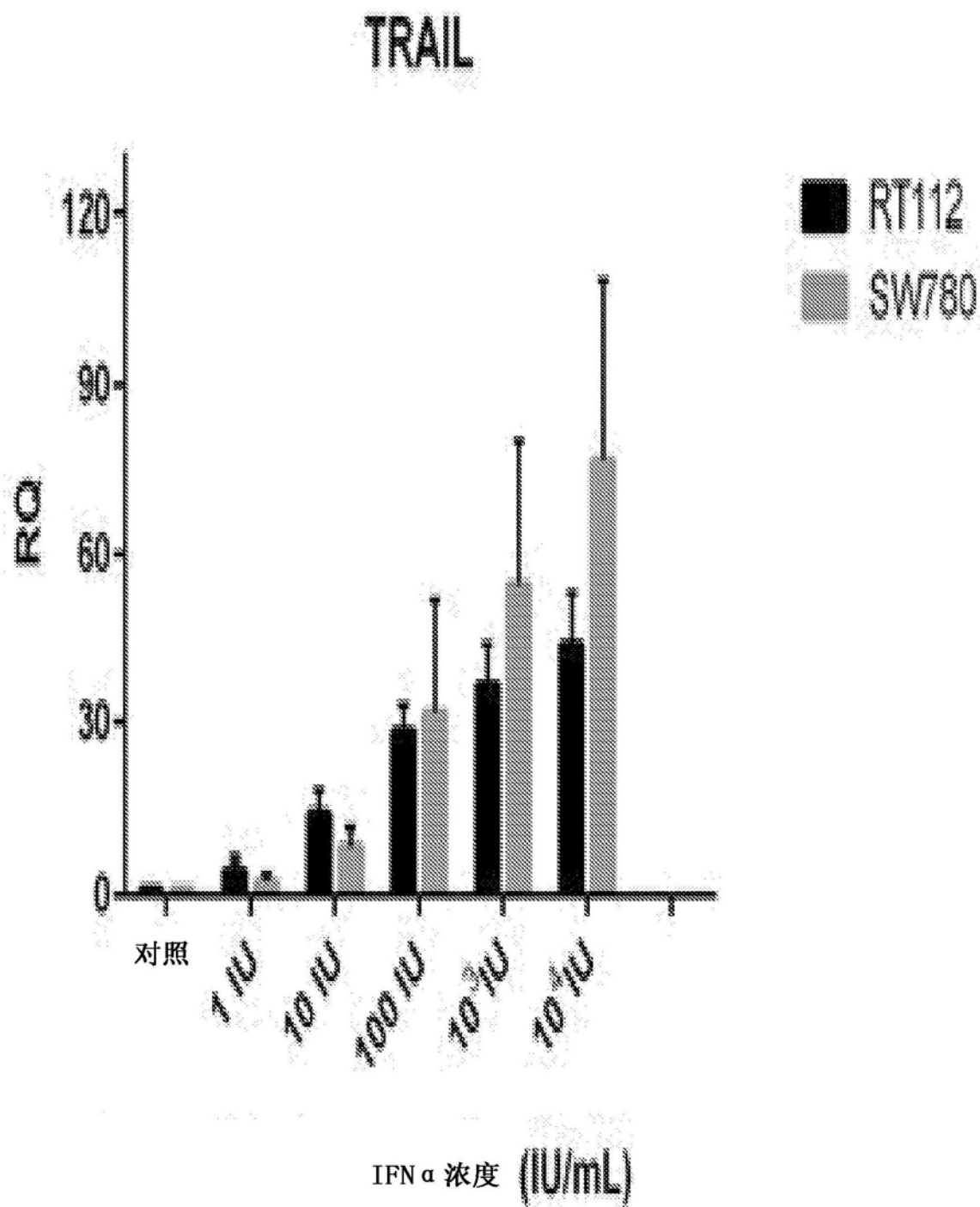


图2

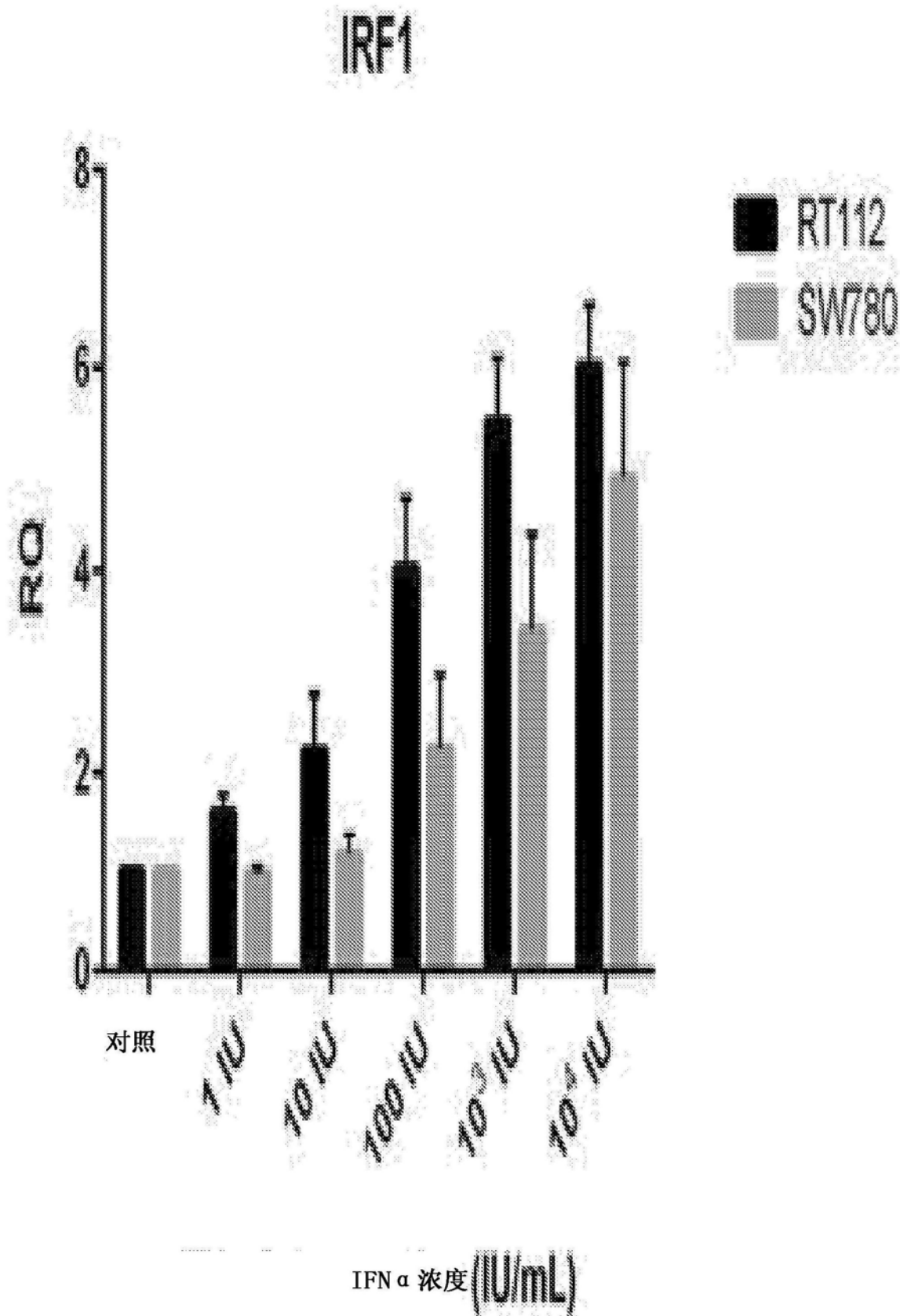


图3

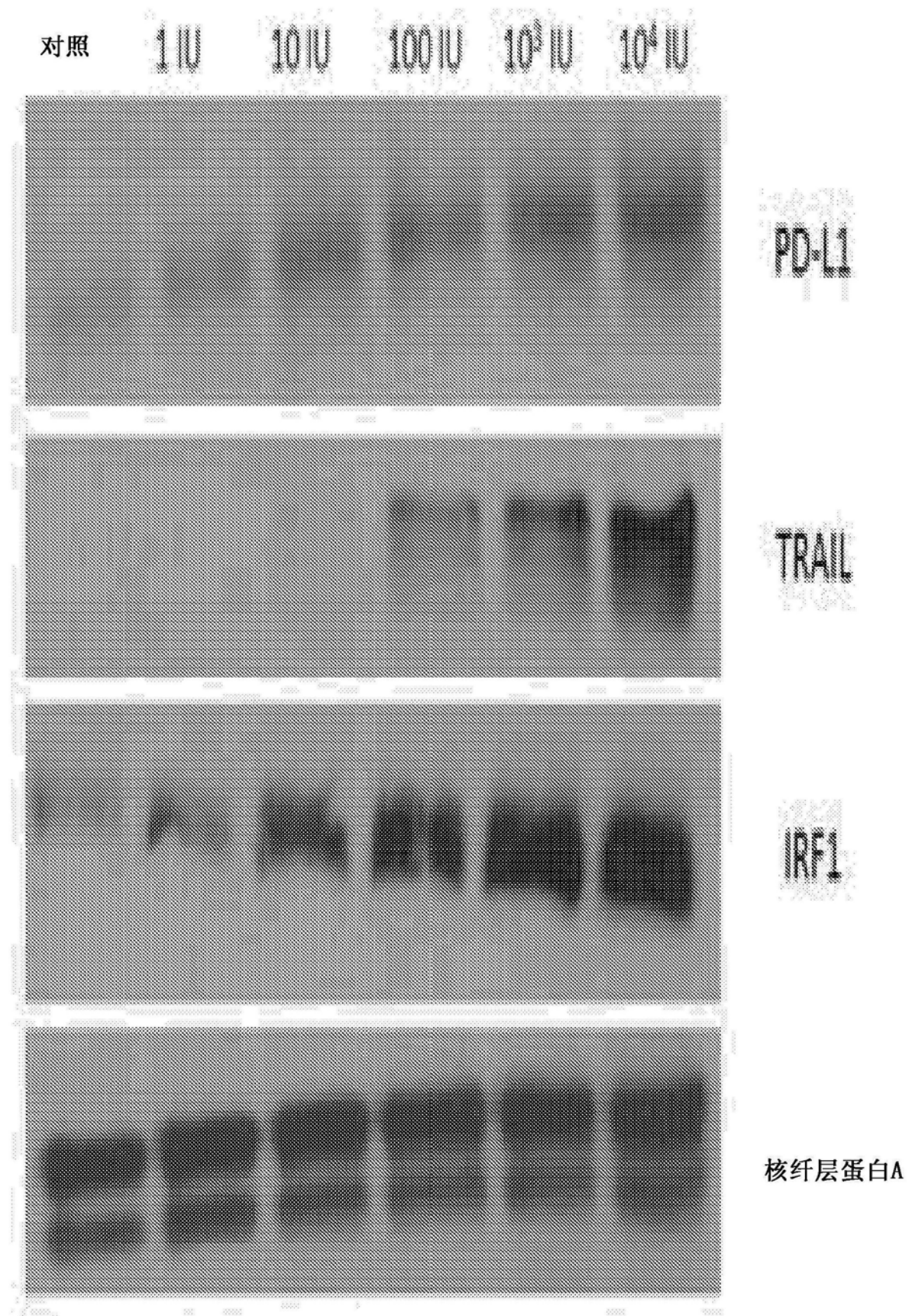


图4

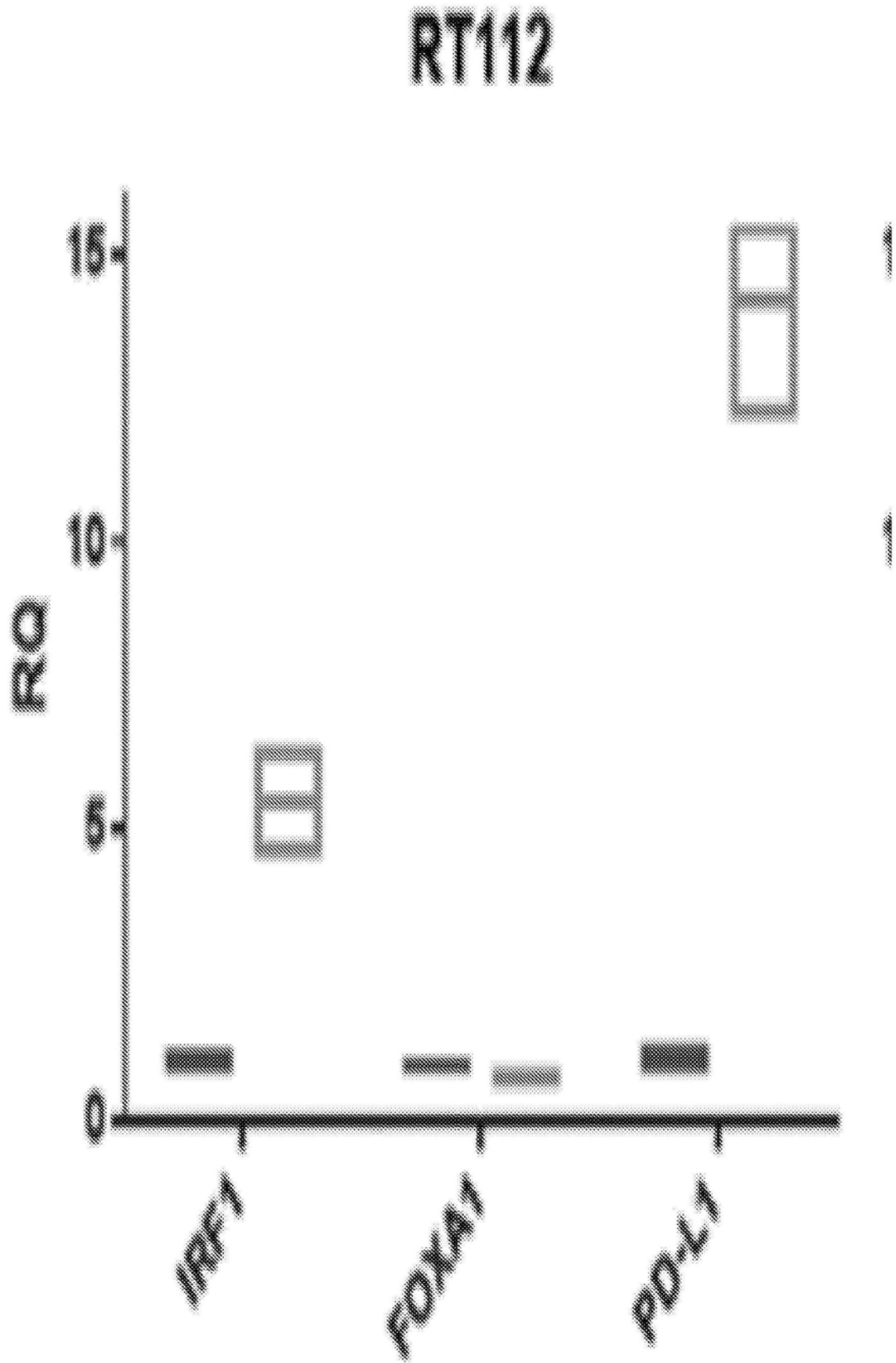


图5

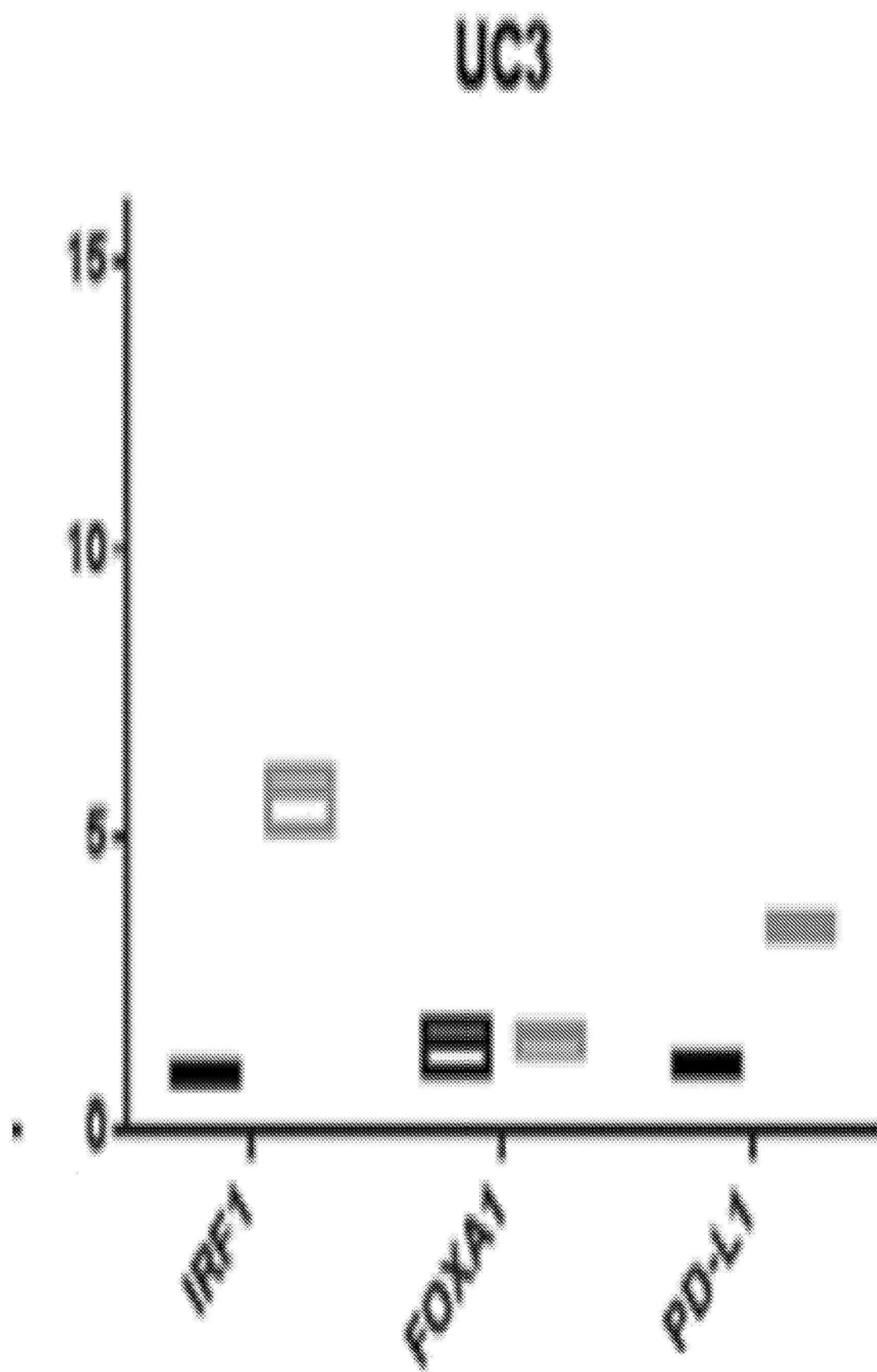


图6

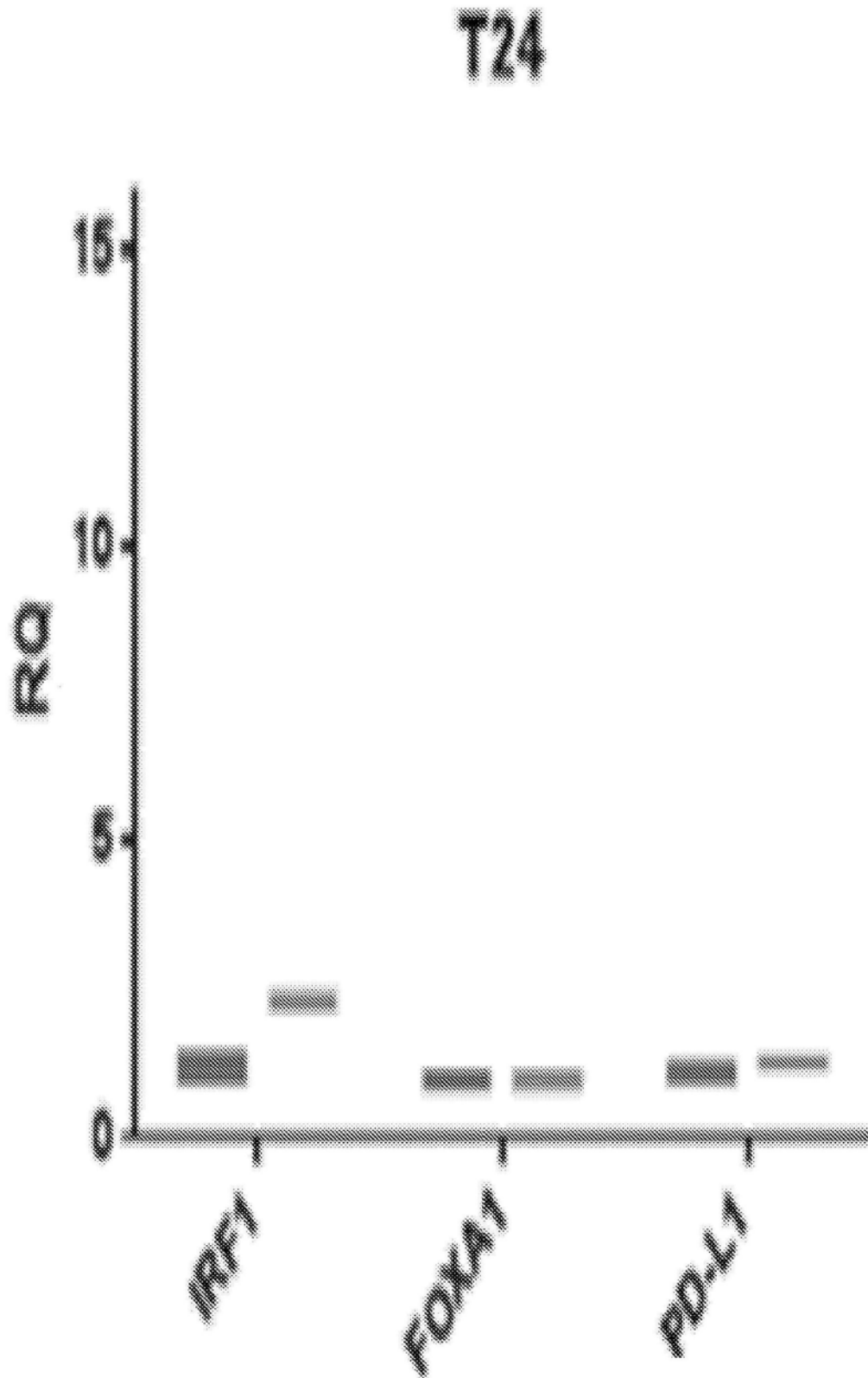


图7

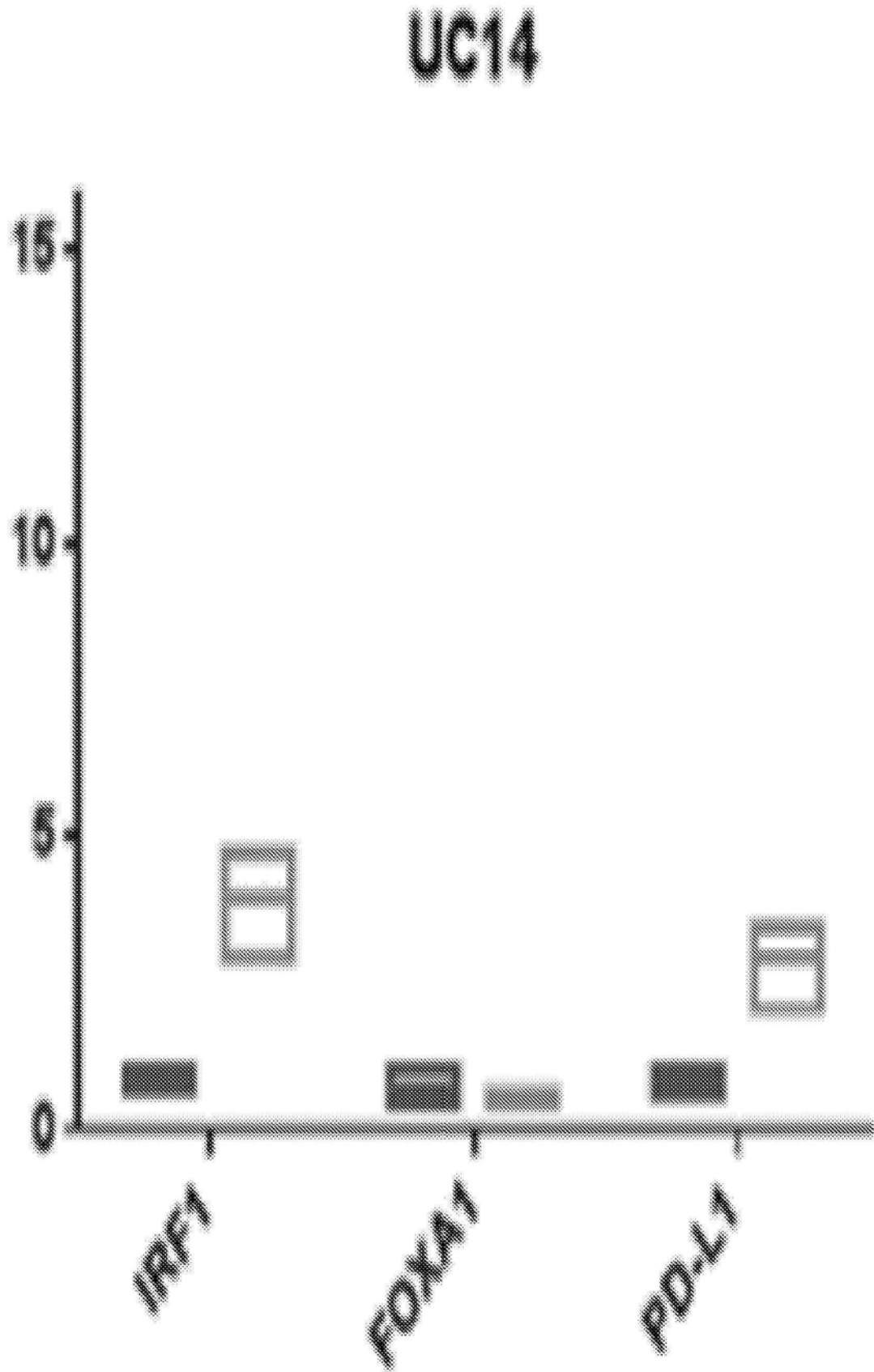


图8



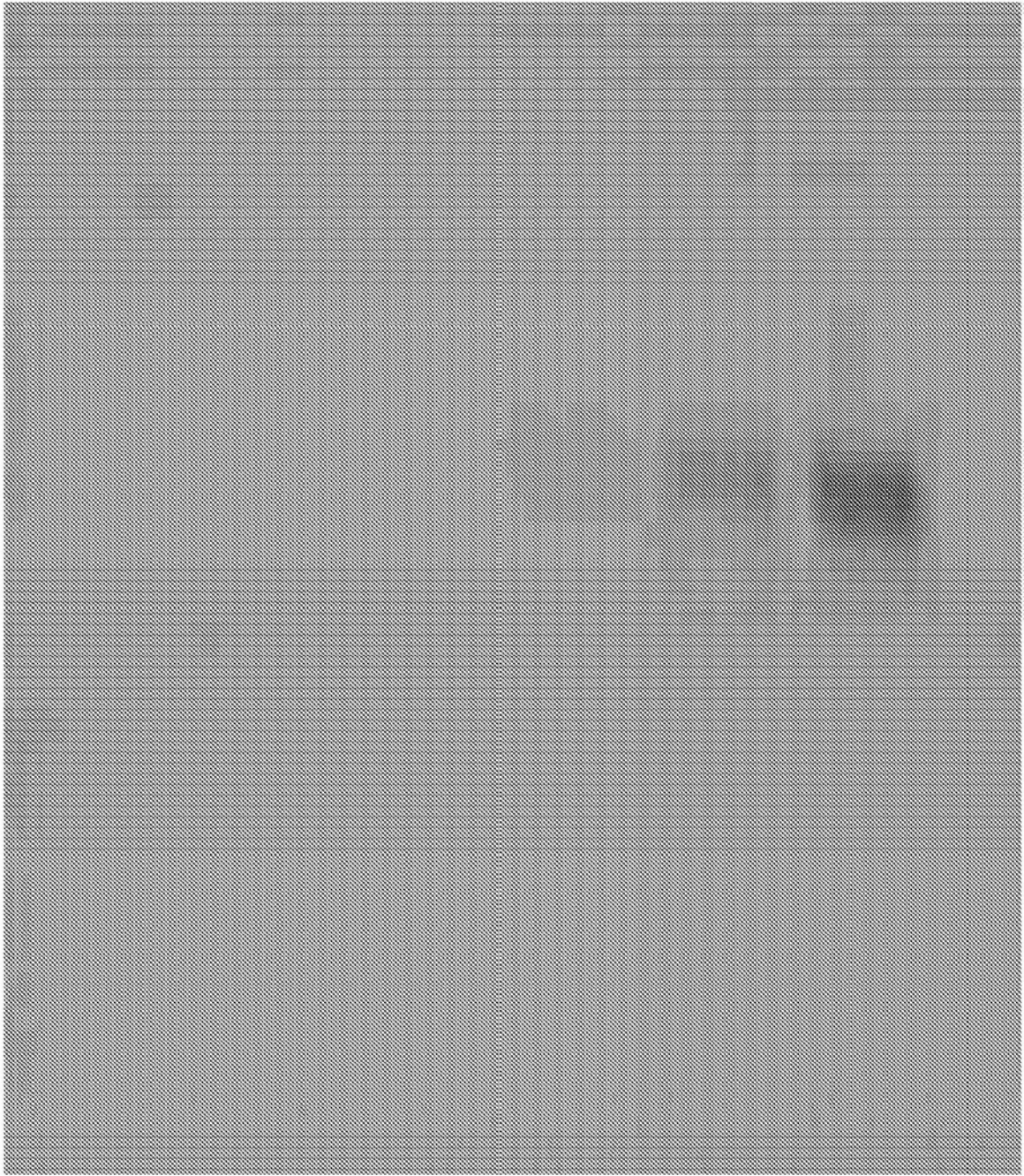


图9



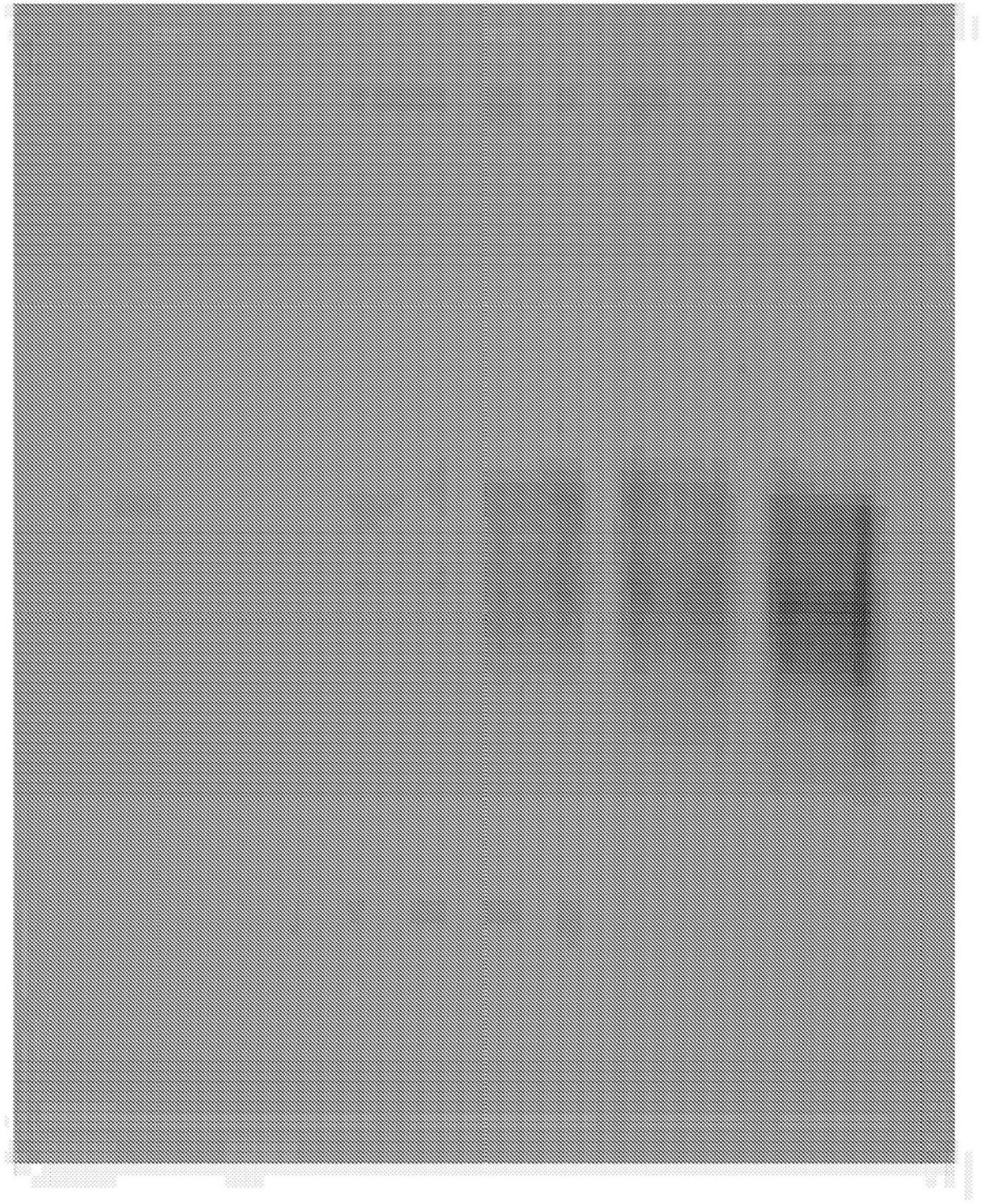


图10

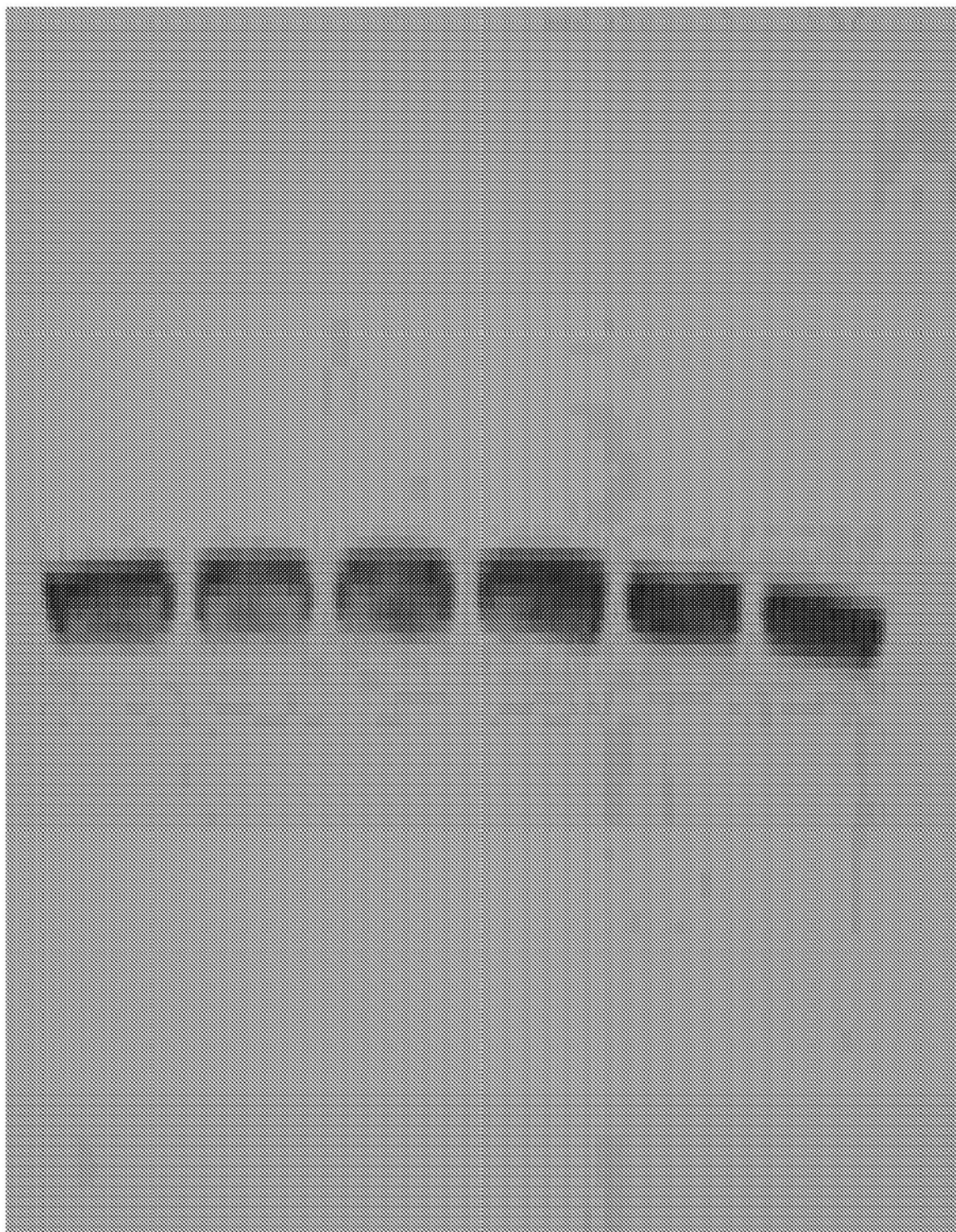


图11



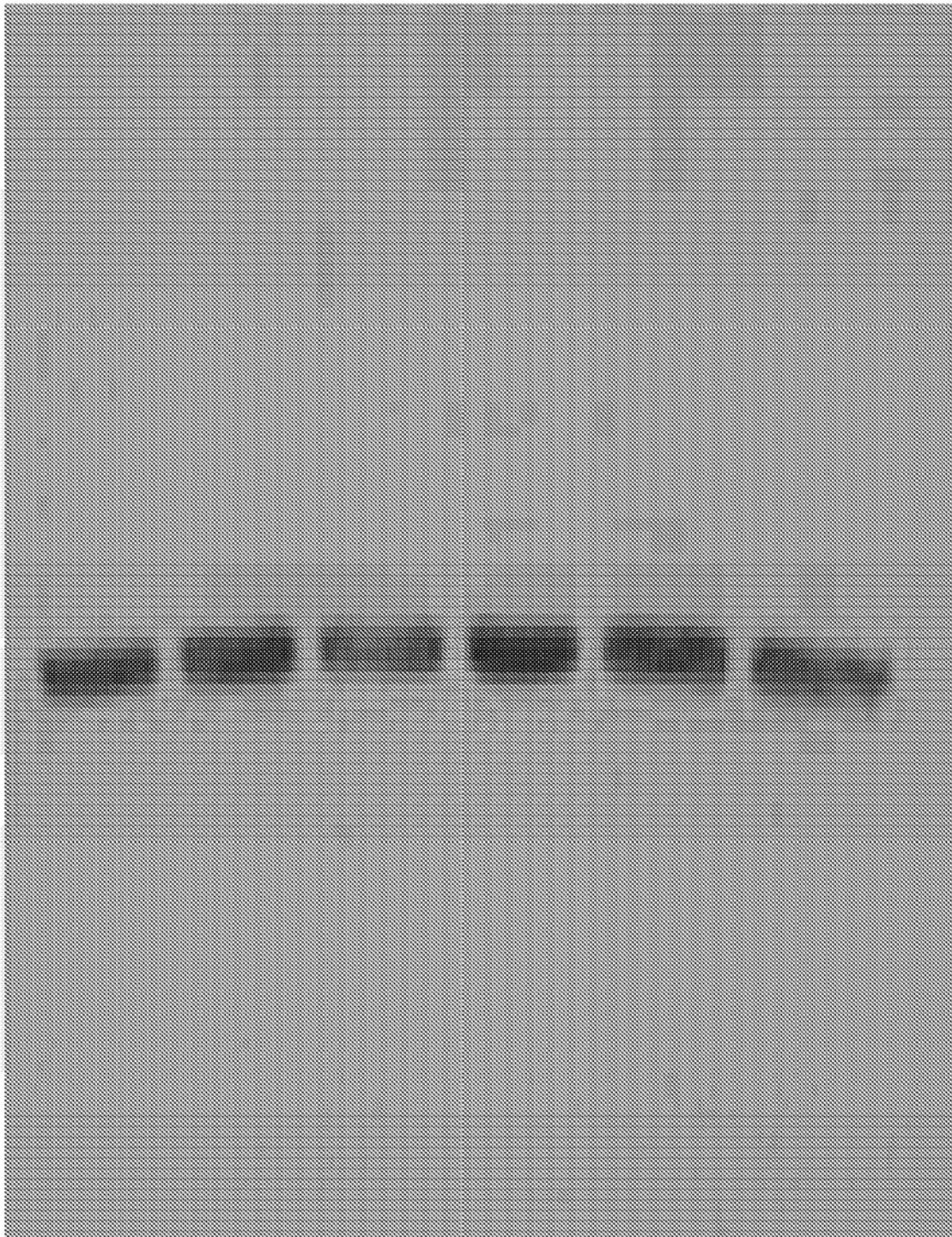


图12

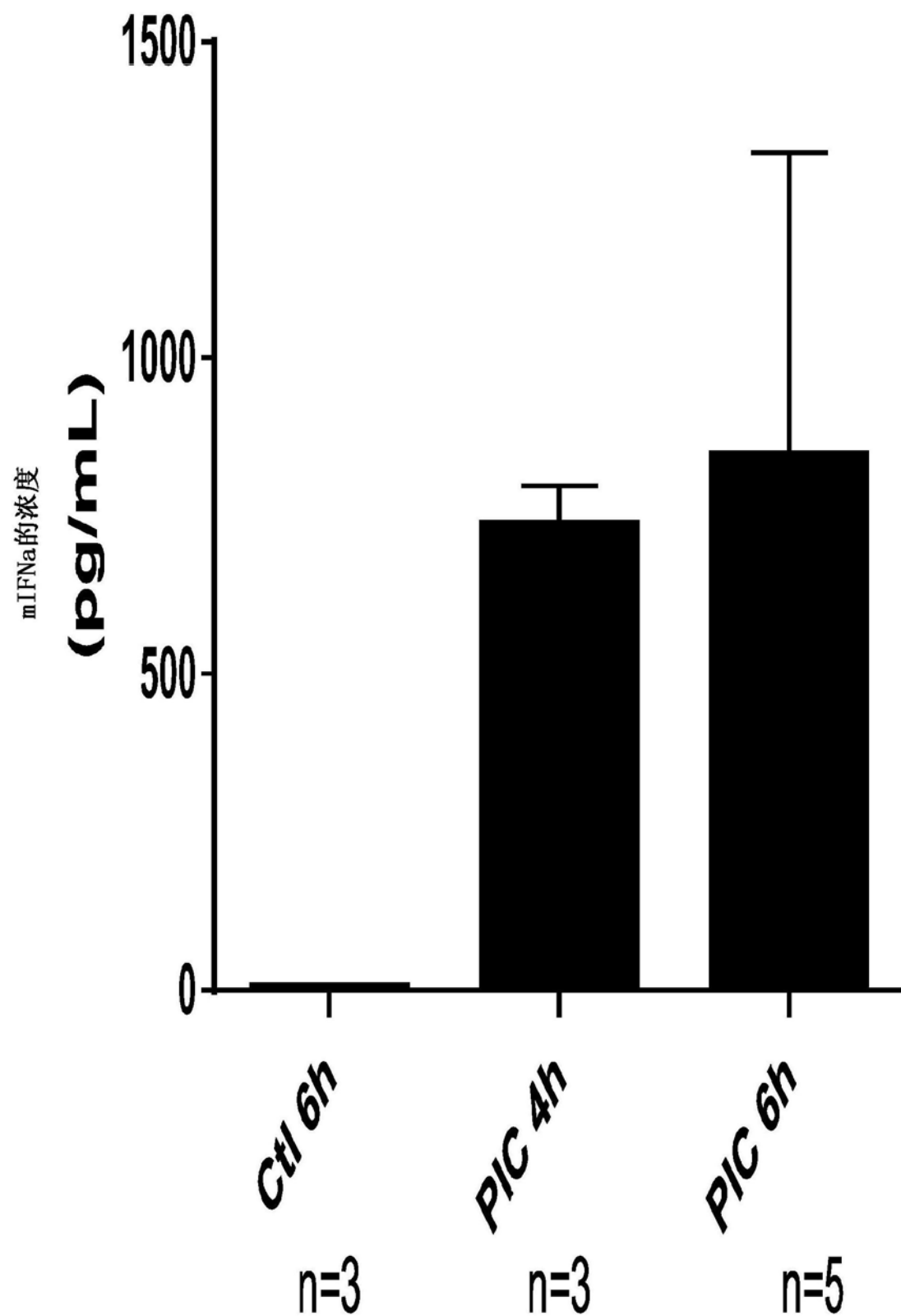


图13

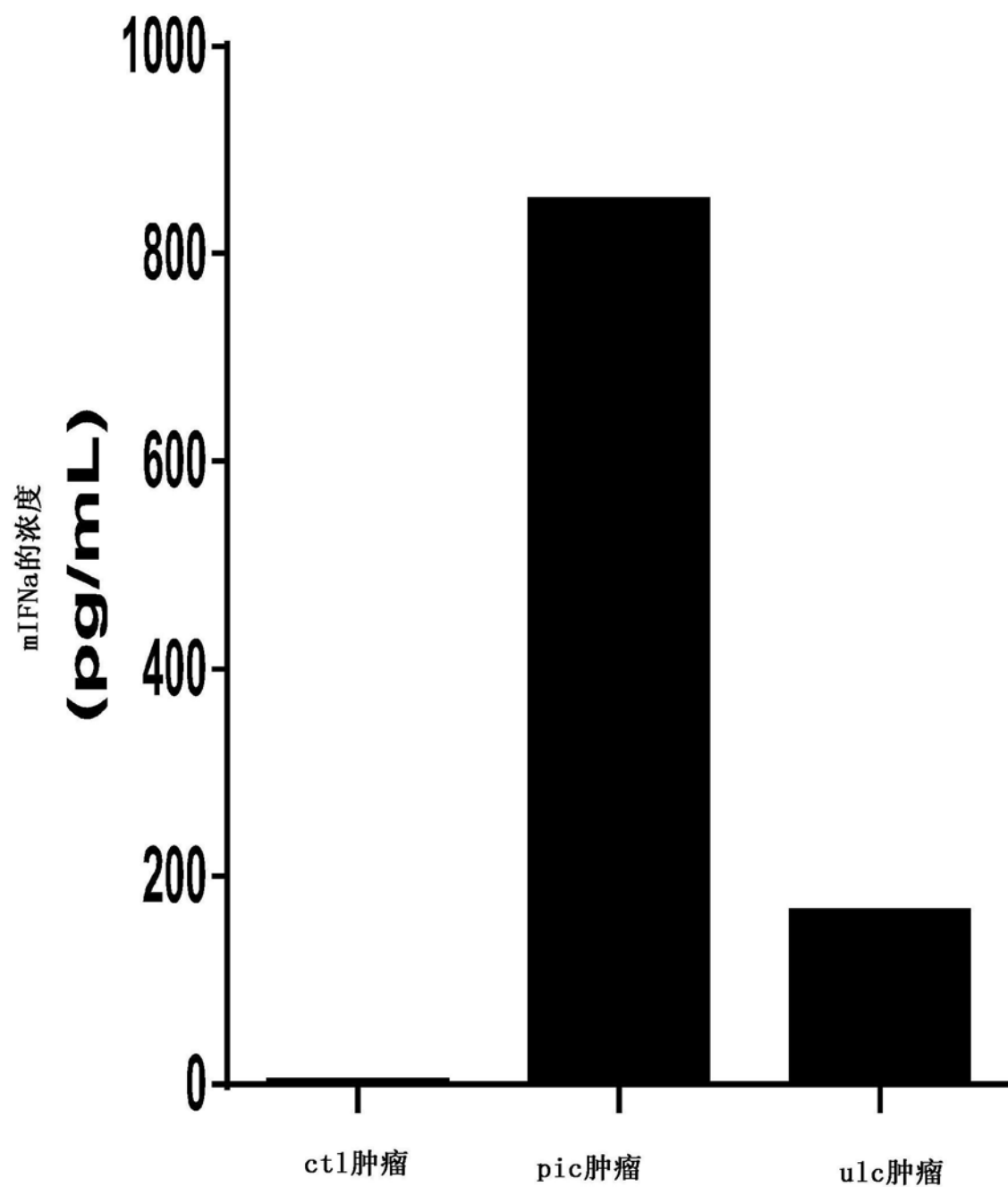


图14

PD-L1 (24 h病变内对照相比于聚(I:C) 500 mcg)

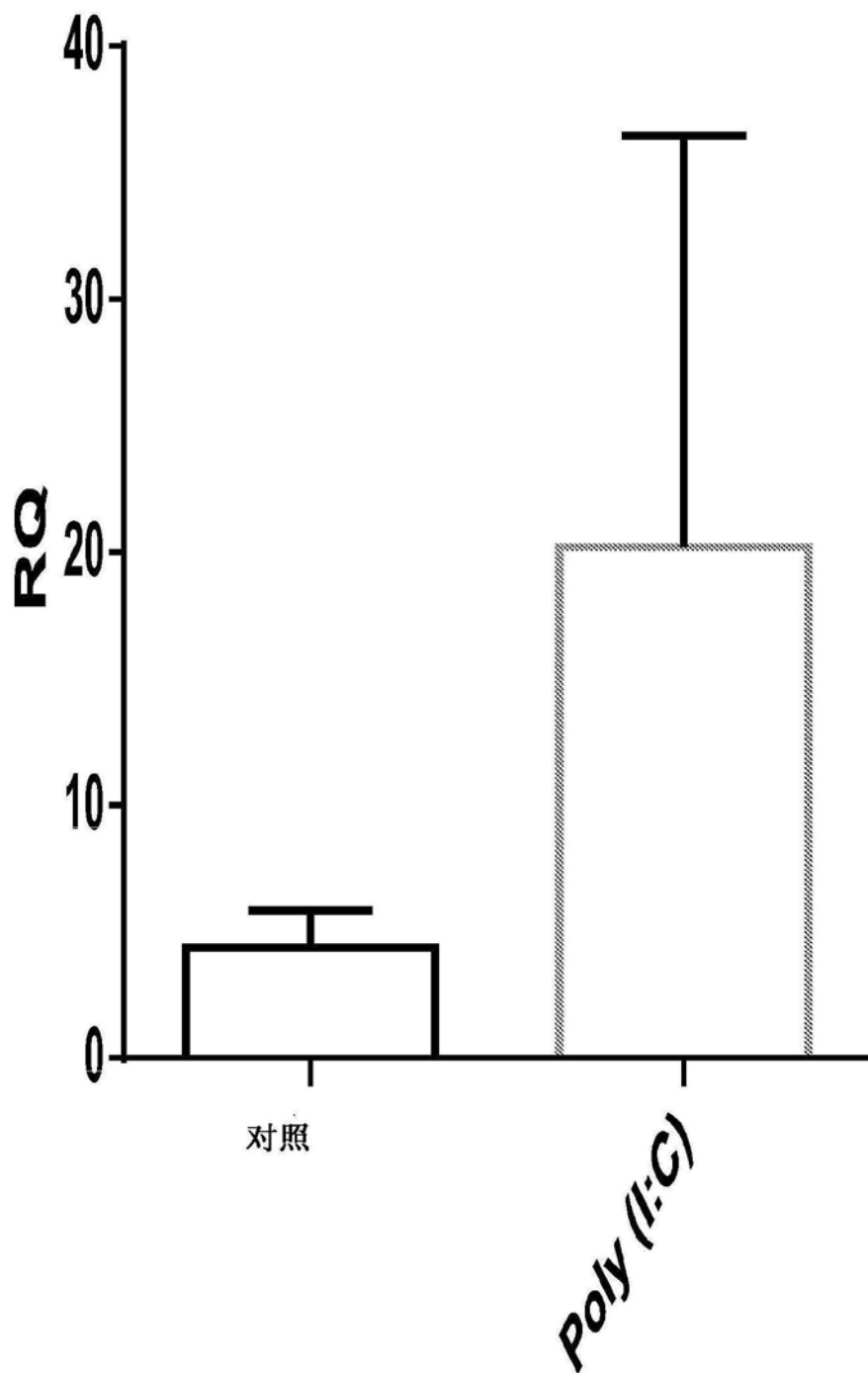


图15

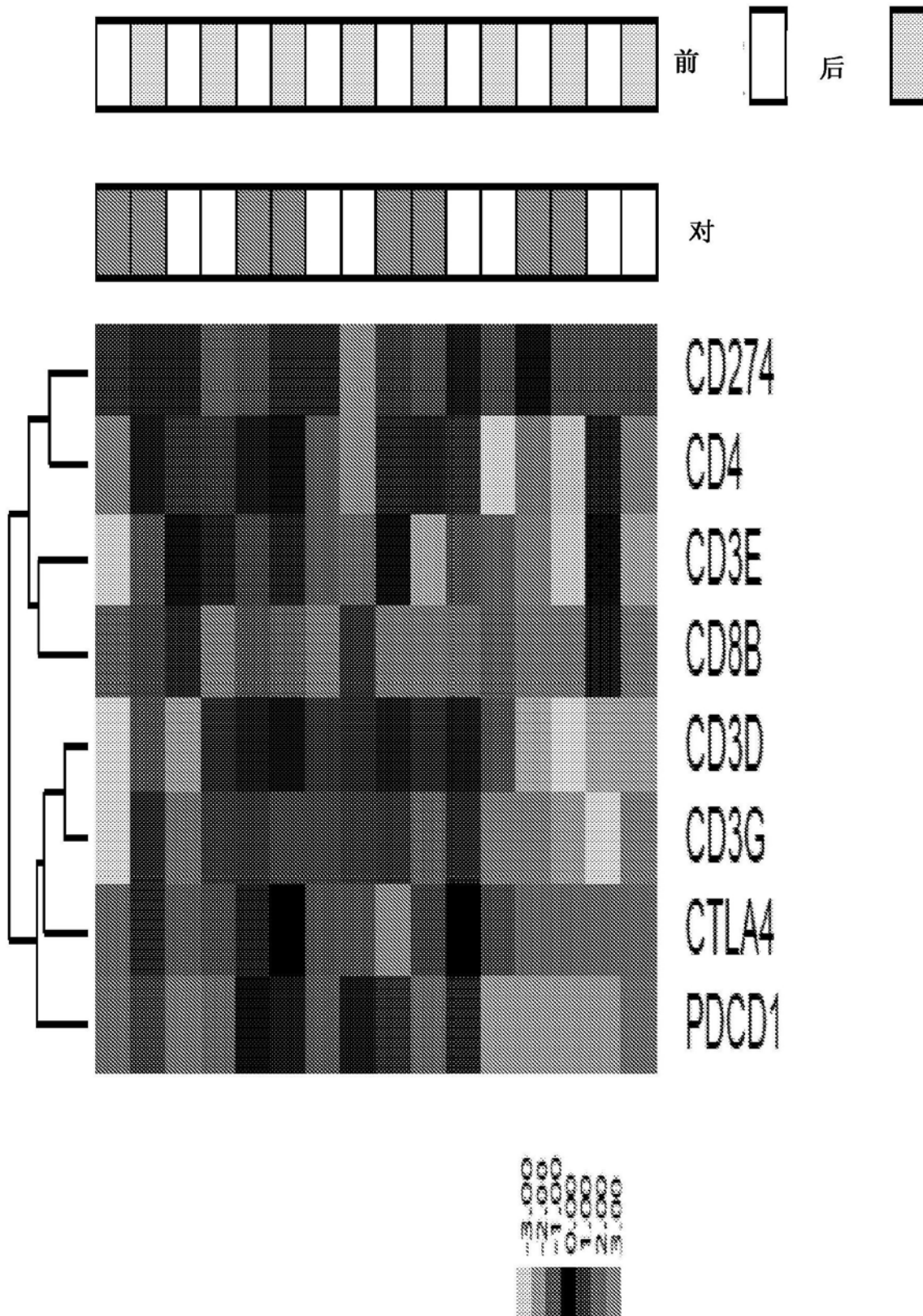


图16

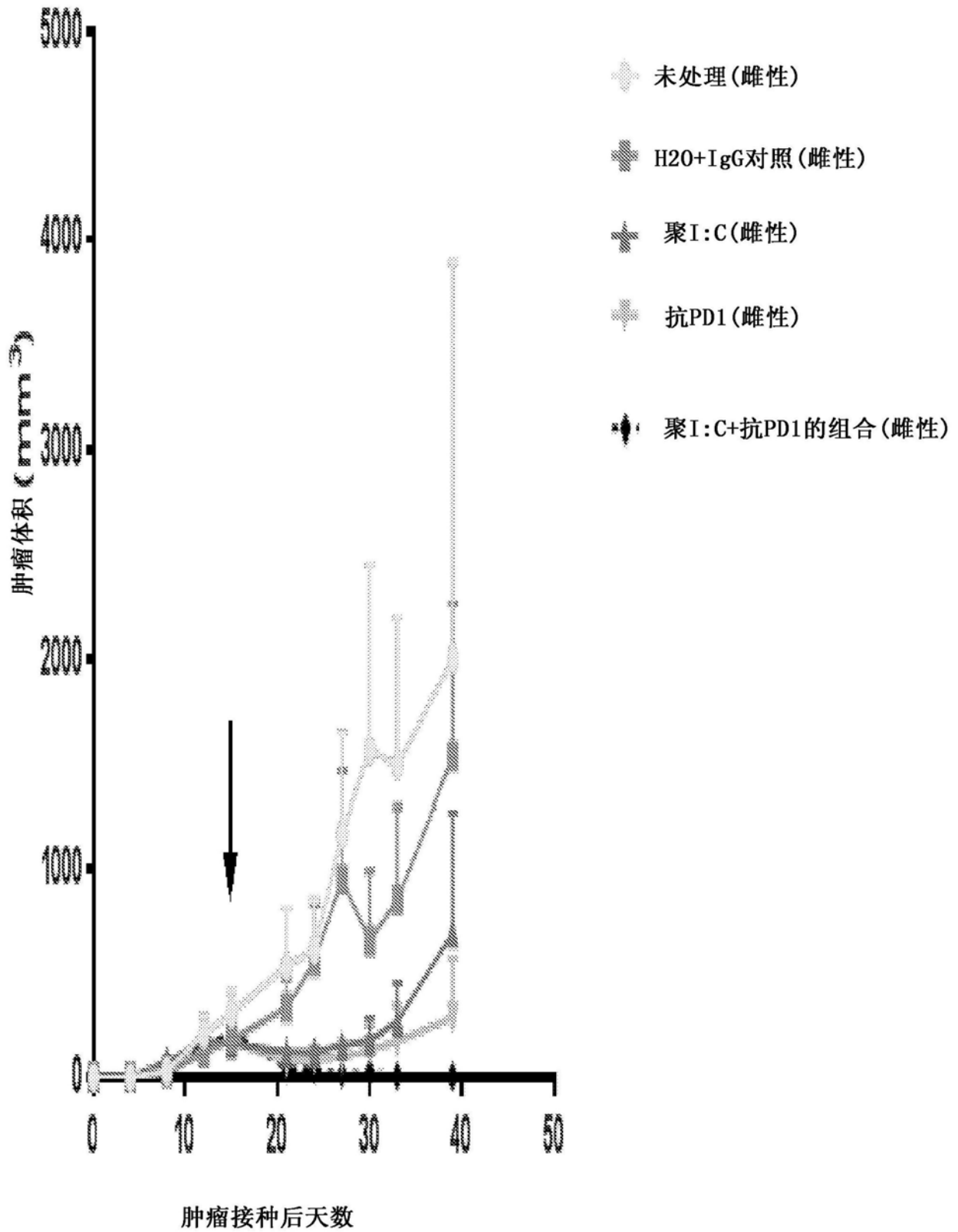


图17



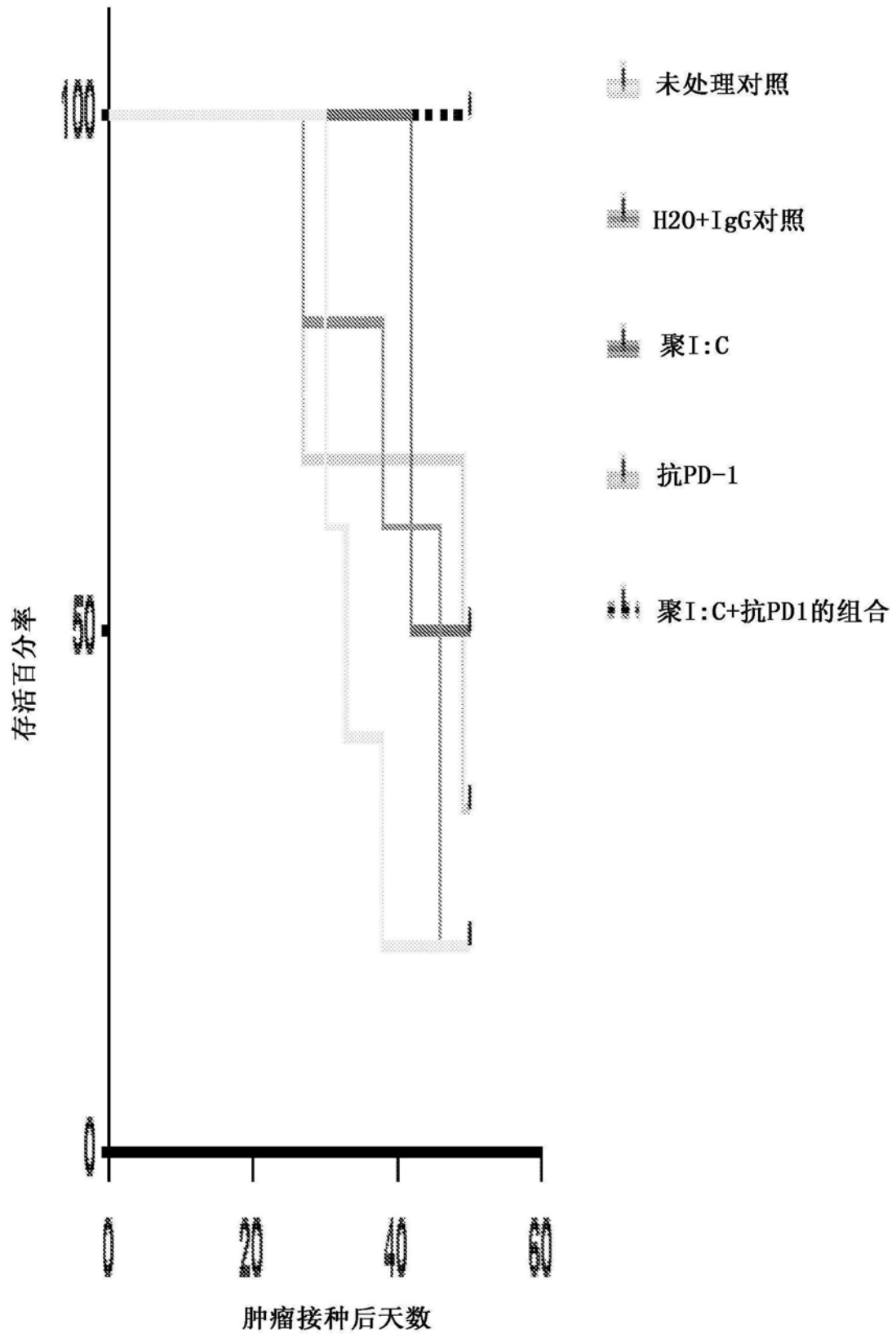


图18

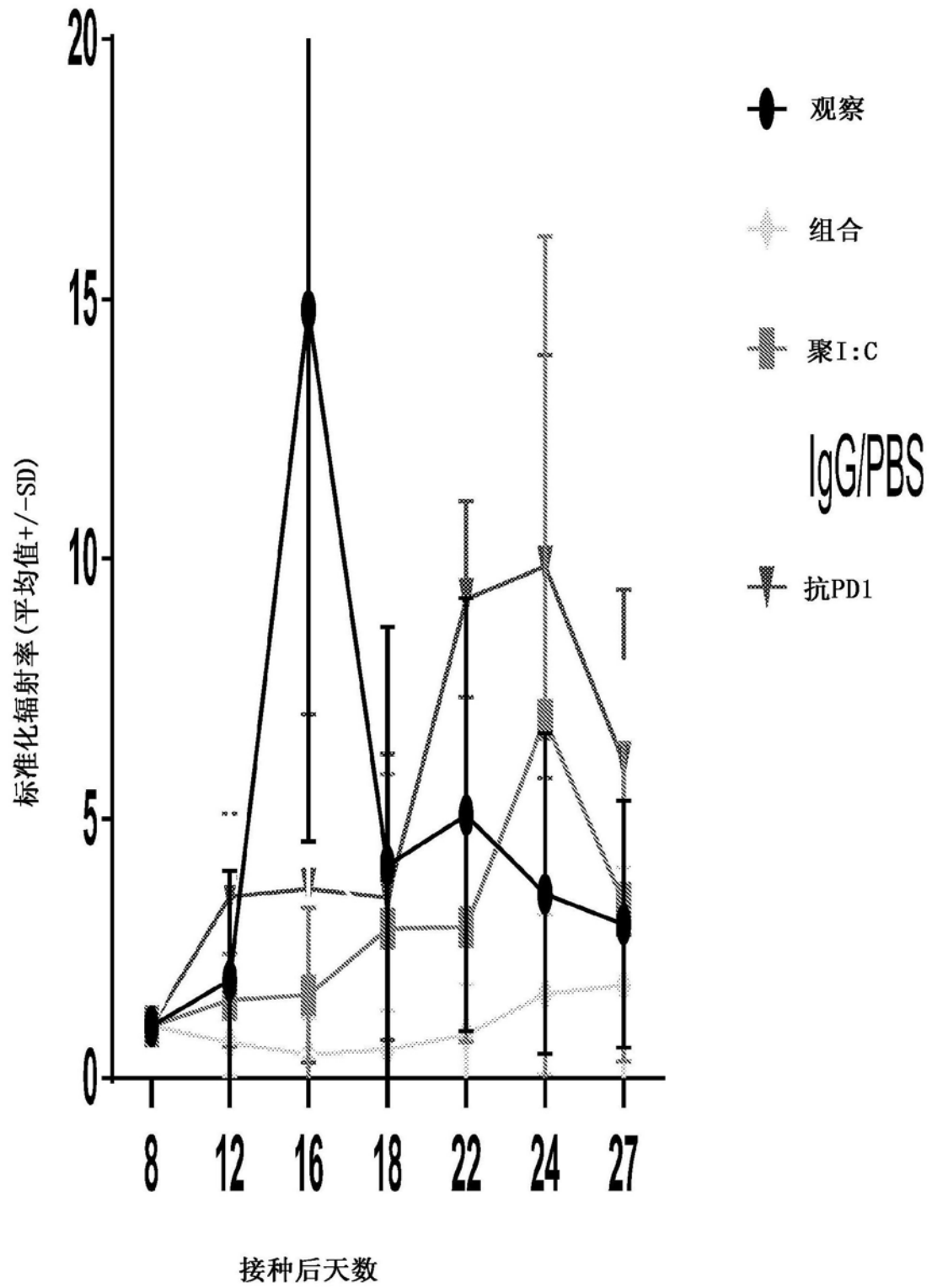


图19

存活数据的存活比例：存活

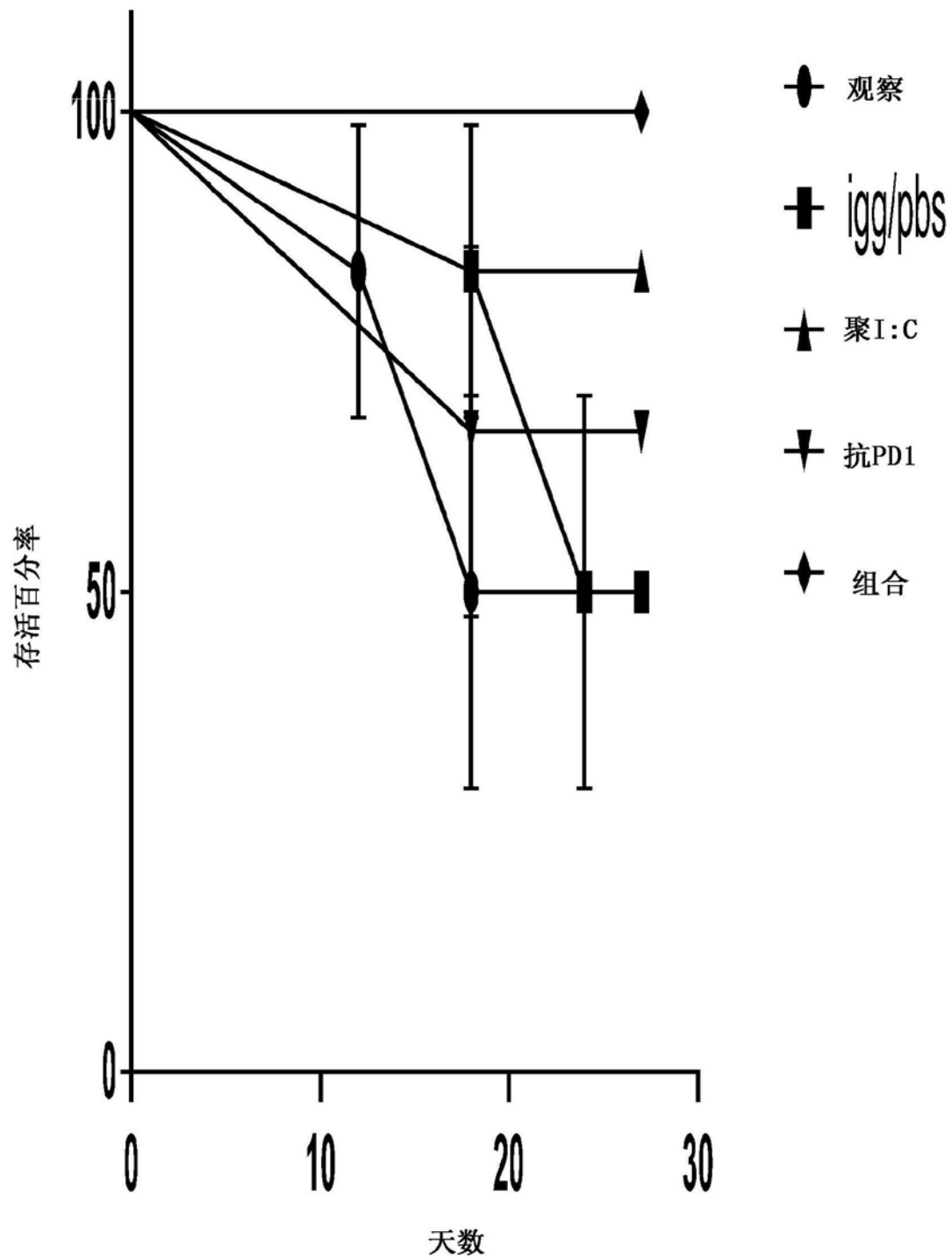


图20