



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114886412 B

(45) 授权公告日 2025.06.24

(21) 申请号 202210152097.2

(22) 申请日 2016.06.02

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 114886412 A

(43) 申请公布日 2022.08.12

(30) 优先权数据  
62/170,378 2015.06.03 US  
62/204,312 2015.08.12 US

(62) 分案原申请数据  
201680045882.0 2016.06.02

(73) 专利权人 蒙特非奥里医疗中心  
地址 美国纽约州  
专利权人 阿尔伯特爱因斯坦医学院

(72) 发明人 C·古哈 斯蒂芬·巴里  
费尔南多·马西安

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理  
有限公司 11262  
专利代理师 韦昌金 武晶晶

(51) Int.Cl.

- A61B 5/06 (2006.01)
- A61B 8/08 (2006.01)
- A61K 45/00 (2006.01)
- A61K 31/395 (2006.01)
- A61P 35/00 (2006.01)
- A61P 35/04 (2006.01)
- A61N 7/00 (2006.01)
- A61N 7/02 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2011128693 A1, 2011.10.20  
Subhrajit Saha 等. Low intensity focused ultrasound (LOFU) modulates unfolded protein response and sensitizes prostate cancer to 17AAG. *Oncoscience*. 2014, 第1卷 (第6期), 第434-445页.

审查员 卢北辰

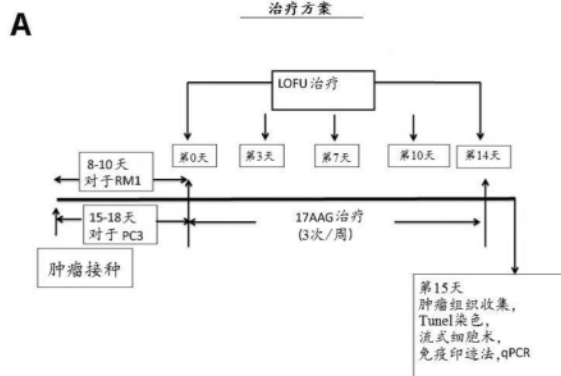
权利要求书2页 说明书49页  
序列表6页 附图26页

(54) 发明名称

用于治疗癌症和转移的低强度聚焦超声

(57) 摘要

本发明公开了使用低强度聚焦超声联合抗癌疗法来治疗癌症且预防转移的系统和方法。



1. 一种系统,其包括:  
声激疗法装置,其包括:  
一个或多个换能器,其被配置为产生一个或多个超声波束,其中所述一个或多个超声波束的频率波形在治疗区中具有1至1000W/cm<sup>2</sup>的空间峰值时间平均声输出强度,其中所述一个或多个超声波束在所述治疗区中施加0.5至5秒,并且其中所述一个或多个超声波束具有在0.01至10MHz的范围内的一个或多个超声频率,其中所述一个或多个换能器包括被配置为产生一个或多个柱式超声波束的至少两个换能器;和  
控制系统,其可操作地配置为控制所述声激疗法装置。
2. 根据权利要求1所述的系统,其中所述系统包括放疗治疗机,其中所述放疗治疗机产生一定量的放射疗法,并且其中所述控制系统可操作地配置为与所述放疗治疗机联合使用。
3. 根据权利要求2所述的系统,其中所述控制系统可操作地配置为控制所述声激疗法装置和所述放疗治疗机,其中所述控制系统控制产生第一量的所述一个或多个超声波束和第二量的放射疗法。
4. 根据权利要求2所述的系统,其中所述放射疗法包括质子疗法、碳离子疗法或带电粒子束的递送。
5. 根据权利要求2所述的系统,其中所述放射疗法包括外部波束放射疗法、近距离放射疗法、三维适形放射疗法、调强放射疗法、图像引导放射疗法、断层放射疗法、立体定向放射外科手术或立体定向体部放射疗法或消融性低分割放射疗法。
6. 根据权利要求1所述的系统,其中所述一个或多个超声波束被配置为诱导所述治疗区中的细胞的非消融性应激。
7. 根据权利要求1所述的系统,其中所述一个或多个超声波束被配置为诱导所述治疗区中的细胞对免疫调节因子的释放。
8. 根据权利要求7所述的系统,其中所述免疫调节因子包括热休克蛋白。
9. 根据权利要求1所述的系统,其中所述一个或多个换能器被配置为顺序地产生两个或更多的超声波束。
10. 根据权利要求1所述的系统,其中所述一个或多个换能器以300KHz至3MHz的频率运行。
11. 根据权利要求1所述的系统,其中所述一个或多个换能器以30KHz至300KHz的频率运行。
12. 根据权利要求1所述的系统,其中所述一个或多个换能器被配置为同时产生两个或更多的超声波束。
13. 根据权利要求1所述的系统,其中所述系统与化疗剂联合使用。
14. 根据权利要求13所述的系统,其中所述化疗剂包括蛋白酶体抑制剂、PI3-激酶抑制剂、自噬抑制剂、mTOR抑制剂、PPAR  $\gamma$  激动剂、COX-2抑制剂、钙通道抑制剂、CHOP表达调节剂、ER应激诱导剂、eIF2 $\alpha$ 磷酸酶抑制剂、拯救 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶的化学分子伴侣或HSP90抑制剂。
15. 根据权利要求13所述的系统,其中所述化疗剂包括17-烯丙基氨基-17-去甲氧基格尔德霉素。

16. 根据权利要求13所述的系统,其中与化疗剂联合的所述系统被配置为诱导所述治疗区中的细胞对免疫原性分子的释放。

17. 根据权利要求1所述的系统,其中所述系统与免疫治疗剂联合使用。

18. 根据权利要求17所述的系统,其中所述免疫治疗剂包括细胞因子、白细胞介素、干扰素、GM-CSF、小分子、与细胞因子或细胞因子受体结合的药剂或靶向检查点的药剂。

19. 根据权利要求18所述的系统,其中所述检查点包括CTLA-4、PD-1或PDL-1。

20. 根据权利要求1所述的系统,其中所述系统与分子伴侣抑制剂联合使用。

21. 根据权利要求20所述的系统,其中所述分子伴侣抑制剂包括热休克蛋白90抑制剂。

22. 根据权利要求21所述的系统,其中所述热休克蛋白90抑制剂包括17-烯丙基氨基-17-去甲氧基格尔德霉素。

23. 根据权利要求21所述的系统,其中所述热休克蛋白90抑制剂包括17-二甲基氨基-乙基氨基-17-去甲氧基格尔德霉素。

24. 根据权利要求1所述的系统,其中所述超声波束在所述治疗区中不引起空化。

25. 根据权利要求1所述的系统,其中所述一个或多个换能器被配置为在治疗区中产生一个或多个超声波束用于治疗受试者的肿瘤。

26. 根据权利要求25所述的系统,其中所述肿瘤包括前列腺、乳房、咽、肺、骨、唾液腺、胃、食道、睾丸、卵巢、子宫、肝脏、小肠、阑尾、结肠、直肠、膀胱、胆囊、胰腺、肾、阴道、外阴、甲状腺、皮肤、头或颈的肿瘤,或软组织肉瘤。

27. 根据权利要求26所述的系统,其中所述肿瘤包括乳房、皮肤、肝脏或骨的肿瘤,或软组织肉瘤。

28. 根据权利要求26所述的系统,其中所述肿瘤包括前列腺、皮肤或肺的肿瘤。

29. 根据权利要求25所述的系统,其中所述肿瘤是鼻咽的肿瘤。

30. 根据权利要求25所述的系统,其中所述肿瘤是子宫内膜的肿瘤。

31. 根据权利要求25所述的系统,其中所述肿瘤是宫颈的肿瘤。

32. 根据权利要求25所述的系统,其中所述肿瘤是神经胶质瘤。

33. 根据权利要求25所述的系统,其中所述肿瘤是脑的肿瘤。

## 用于治疗癌症和转移的低强度聚焦超声

[0001] 本申请是申请日为2016年06月02日、申请号为201680045882.0、发明名称为“用于治疗癌症和转移的低强度聚焦超声”的中国专利申请(其对应PCT申请的申请日为2016年06月02日、申请号为PCT/US2016/35440)的分案申请。

### [0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2015年6月3日提交的美国临时申请号62/170,378和2015年8月12日提交的美国临时申请号62/204,312的权益,其两者的内容均通过引用并入于此。

### [0004] 政府支持声明

[0005] 本发明是通过国立卫生研究院授予的基金EB009040和AI059738在政府支持下完成的。政府对本发明享有一定的权利。

## 背景技术

[0006] 在整个本申请中,各种出版物在括号中加以引用。可以在说明书的最后找到这些参考文献的完整引文。这些出版物以及本文提及的所有专利、专利申请公开文本和书籍的公开内容在此通过引用以其全文并入本申请,以更全面地描述本发明所属领域。

[0007] 针对癌细胞的免疫应答常常受到肿瘤微环境的免疫抑制性质的限制,该免疫抑制性质同样也是癌症免疫疗法的功效受到制约的原因(1、2)。对于肿瘤产生免疫抑制环境的能力已经发现了几种机制,包括分泌具有抑制活性的细胞因子或其他因子(3-5)、募集调节性T细胞和骨髓衍生的抑制性细胞(6-9)、增加共抑制性受体的配体的表达(10-13)或抑制树突细胞成熟(14、15)。作为这些机制的结果,T细胞通常表现出对肿瘤抗原无反应(15)。对肿瘤抗原的低反应状态的诱导在CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞群体中均发生,并且通常导致适应性免疫系统无法建立有效的抗肿瘤应答(16-18)。对肿瘤抗原的T细胞应答的减小在实体瘤和血液系统肿瘤中均发生,并且似乎是由树突细胞呈递抗原不足而引起的,这导致依赖于转录因子NFAT和Egr2的基因表达的耐受原程序的优先激活(18-21)。以下事实强调了肿瘤诱导的T细胞低反应性这一过程的重要作用:阻止该耐受原基因表达程序的诱导的遗传小鼠模型导致增强的抗肿瘤T细胞应答和肿瘤生长的控制(19、21)。

[0008] 通过聚焦超声(FUS)治疗局部肿瘤是使用一定范围的输入能量进行原位肿瘤消融的影像引导微创疗法(22、23)。根据所递送的能量,FUS施加于生物组织伴随产生热效应及空化(cavitation)效应,从而导致靶细胞生理学的变化。高强度聚焦超声(HIFU)已经在临床上用于热消融局部肿瘤(23-26)。由FUS治疗方式产生的大量热能导致靶向焦点处的组织迅速凝固性坏死。尽管几项研究已经报道了一些免疫调节作用,包括淋巴细胞浸润增加、在淋巴器官中生成产生IFN  $\gamma$  的肿瘤特异性T细胞以及树突细胞成熟并迁移到肿瘤中(26、27),由HIFU治疗引起的热诱导的凝固性坏死也可以降低肿瘤微环境中免疫刺激分子的释放。因此,虽然能够阻止已确定的原发性肿瘤的进展,但HIFU可能无法防止存活肿瘤细胞引起的局部和远端转移。

[0009] 本发明提供了采用低强度聚焦超声对肿瘤及癌症的改进的治疗,以及诱导化学增敏且增加癌症疗法治疗的疗效的方法。

## 发明内容

[0010] 提供一种提高受试者中的化学疗法疗效的方法,其包括向所述受试者施用(i)一定量的低强度聚焦超声(LOFU)和(ii)一定量的化疗药物,其中所述化疗药物在肿瘤细胞中实现内质网(ER)应激和/或解折叠蛋白质应答(UPR),其中所述(i)和(ii)的量合起来足以提高所述化学疗法的疗效。

[0011] 还提供了一种在受试者内预定体积的组织中提高化学疗法疗效的方法,该体积小于整个受试者,所述方法包括(i)向所述受试者施用一定量的化疗药物,其中所述化疗药物在肿瘤细胞中实现内质网(ER)应激和/或解折叠蛋白质应答(UPR),和(ii)向受试者中的所述预定体积的组织施用一定量的低强度聚焦超声(LOFU),其中所述(i)和(ii)的量合起来足以在所述预定体积的组织内提高所述化学疗法的疗效。

[0012] 提供了一种治疗受试者的肿瘤的方法,其中所述肿瘤对化疗药物具有抗性,所述方法包括:

[0013] 接收将所述受试者鉴定为具有对特定化疗药物有抗性的肿瘤的鉴定;

[0014] 施用(i)一定量的低强度聚焦超声(LOFU)和(ii)一定量的所述特定化疗药物,

[0015] 其中所述(i)和(ii)的量合起来足以治疗所述肿瘤。

[0016] 还提供了一种治疗受试者的化学抗性肿瘤的方法,其中所述肿瘤已经对先前施用的化疗药物具有化学抗性,所述方法包括:

[0017] 向所述受试者施用(i)一定量的低强度聚焦超声(LOFU)和(ii)一定量的所述化疗药物,

[0018] 其中所述(i)和(ii)的量合起来足以治疗所述化学抗性肿瘤。

[0019] 根据本发明各种示例性实施方案的声激疗法(Acoustic priming therapy, APT)系统包括被配置为在治疗区中产生10至1000W/cm<sup>2</sup>空间峰值时间平均强度(Ispta)的声功率的换能器,其中所述超声的频率在0.01至10MHz的范围内,机械指数小于4,并且对于治疗区中的任何特定体积,所述超声连续地施加0.5至5秒范围内的时间。这类治疗在本文中被确定为声激疗法(APT)治疗。

[0020] 一种根据本发明示例性实施方案的声激疗法装置包括:生成频率波形的控制系统;以及一个或多个换能器,每个换能器被配置为产生基于峰值频率在0.05至5MHz范围内的频率波形且声输出强度为20-1000W/cm<sup>2</sup>的超声波束。

[0021] 在示例性实施方案中,每个换能器被配置为产生柱式(columnated)超声,使得在治疗区中-3dB处的波束轮廓腰部不小于5mm。

[0022] 在示例性实施方案中,两个或更多个换能器可以顺序地或同时运行,并且在治疗期内在治疗区中产生平均空间峰值为250J/cm<sup>2</sup>的超声

[0023] 在示例性实施方案中,所述换能器以连续模式运行,其中在治疗区中产生超声达0.1至10秒范围内的治疗期。

[0024] 一种根据本发明示例性实施方案的系统包括:声激疗法装置,其包括:产生频率波形的控制系统;和一个或多个换能器,所述一个或多个换能器被配置为在治疗区中产生1至1000W/cm<sup>2</sup>空间峰值时间平均声输出强度(Ispta)的基于频率波形的超声,其中所述超声连续施加0.5至5秒范围内的时间,并且其中超声频率在0.01至10MHz的范围内;放疗治疗机;以及控制系统,该控制系统可操作地配置为控制所述声激疗法装置和所述放疗治疗机,使

得向受试者施用第一量的所述超声和第二量的放射疗法,其中所述第一量和第二量合起来足以治疗受试者的肿瘤。

[0025] 根据本发明示例性实施方案的系统包括:声激疗法装置,其包括:产生频率波形的控制系统;和一个或多个换能器,所述一个或多个换能器被配置为在治疗区中产生1至1000W/cm<sup>2</sup>空间峰值时间平均声输出强度(Ispta)的基于频率波形的超声,其中所述超声连续施加0.5至5秒范围内的时间,并且其中超声频率在0.01至10MHz的范围内;所述声激疗法装置与化学疗法联合使用,使得向受试者施用第一量的所述超声和第二量的所述化学疗法,其中所述第一量和第二量合起来足以治疗受试者的肿瘤。

[0026] 根据本发明示例性实施方案的系统包括:声激疗法装置,其包括:产生频率波形的控制系统;和一个或多个换能器,所述一个或多个换能器被配置为在治疗区中产生1至1000W/cm<sup>2</sup>空间峰值时间平均声输出强度(Ispta)的基于频率波形的超声,其中所述超声连续施加0.5至5秒范围内的时间,并且其中超声频率在0.01至10MHz的范围内;所述声激疗法装置与免疫疗法联合使用,使得向受试者施用第一量的所述超声和第二量的所述免疫疗法,其中所述第一量和第二量合起来足以治疗受试者的肿瘤。

[0027] 提供了一种治疗受试者的肿瘤的方法,其包括向所述受试者施用(i)一定量的低强度聚焦超声(LOFU)和(ii)一定量的化学疗法或一定量的放射疗法或一定量的免疫疗法,其中所述(i)和(ii)的量合起来足以治疗肿瘤。

[0028] 还提供了一种抑制受试者的肿瘤转移的方法,其包括向患有肿瘤的受试者施用一定量的低强度聚焦超声(LOFU)和一定量的放射疗法,其中所述量合起来足以使治疗肿瘤。

[0029] 还提供了一种减少治疗受试者肿瘤所需的抗癌化学疗法的有效剂量的方法,其包括向经受所述抗癌化学疗法的所述受试者施用一定量的低强度聚焦超声(LOFU),该量足以减少治疗肿瘤所需的抗癌化学疗法的有效剂量。

[0030] 还提供了一种使受试者的肿瘤对一定量的抗癌疗法变得敏感的方法,所述方法包括在抗癌疗法疗程之前或期间向所述受试者施用一定量的声激疗法,该量有效地使受试者中的肿瘤对一定量的其他抗癌疗法方式变得敏感。

[0031] 提供了一种治疗受试者的肿瘤的方法,其包括向所述受试者施用(i)一定量的低强度聚焦超声(LOFU),其中本文的LOFU表示在APT系统中使用的超声配置的示例性实施方案,和(ii)一定量的化学疗法或一定量的放射疗法或一定量的免疫疗法,其中所述(i)和(ii)的量合起来足以治疗肿瘤。

[0032] 还提供了一种抑制受试者的肿瘤转移的方法,其包括向患有肿瘤的受试者施用一定量的低强度聚焦超声(LOFU)和一定量的放射疗法,其中所述量合起来足以抑制受试者的肿瘤转移。

[0033] 还提供了一种减少治疗受试者肿瘤所需的抗癌化学疗法的有效剂量的方法,其包括向经受所述抗癌化学疗法的所述受试者施用一定量的低强度聚焦超声(LOFU),该量足以减少治疗肿瘤所需的抗癌化学疗法的有效剂量。

[0034] 还提供了一种使受试者的肿瘤对一定量的抗癌疗法变得敏感的方法,所述方法包括在抗癌疗法疗程之前或期间向所述受试者施用一定量的低强度聚焦超声(LOFU),该量有效地使受试者的肿瘤对一定量的抗癌疗法方式变得敏感。

## 附图说明

[0035] 图1A-1F。黑素瘤肿瘤抑制CD4+T细胞的细胞因子输出:1A-B:用 $3 \times 10^5$ 个B16-F1黑素瘤细胞在腰肋部攻击C57B1/6小鼠。使肿瘤生长至 $7-8\text{mm}^3$ 的大小。从肿瘤DLN和远端对侧NDLN分离CD4+T细胞,并用抗CD3和抗CD28抗体刺激。通过ELISA测量IL-2和IFN  $\gamma$ 。使用来自无瘤小鼠的CD4+T细胞作为对照。1C-D:如所述用 $3 \times 10^5$ 个B16-F1-OVA黑素瘤细胞攻击OTII小鼠。用OVA323-339肽负载的脾细胞刺激T细胞,并通过ELISA测量IL-2和IFN  $\gamma$ 的产生。1E-F。如上所述,使用B16-F1细胞在Typr1小鼠中诱导肿瘤。用抗CD3和抗CD28抗体刺激分离的CD4+T细胞,并通过ELISA测定IL-2和IFN  $\gamma$ 的产生。图示出了4(1A-B)或3(1C-F)个独立实验的平均值 $\pm$ SEM。结果显示为来自每个实验3-5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。使用ANOVA和Tukey后检验分析数据(\*\* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ )。

[0036] 图2A-2D。用LOFU治疗黑素瘤肿瘤克服了肿瘤诱导的CD4+T细胞耐受性:2A-B。在C57B1/6小鼠中通过在腰肋部皮下注射 $3 \times 10^5$ 个B16-F1黑素瘤细胞来诱发肿瘤。肿瘤未经治疗或用LOFU治疗。FUS治疗后36小时,从肿瘤DLN或NDLN中分离CD4+T细胞,并用抗CD3和抗CD28抗体刺激。通过ELISA评估IL-2和IFN  $\gamma$ 的产生。结果(总细胞因子产生和每组中由来自NDLN和DLN的T细胞产生的细胞因子水平的比例)呈现为来自每个条件下3只不同小鼠的平均值 $\pm$ SEM。使用双尾t检验分析在未经治疗或治疗过的小鼠中DLN T细胞的细胞因子产生的差异(\* $P < 0.05$ )。2C。用 $3 \times 10^5$ 个B16黑素瘤细胞攻击小鼠以诱发肿瘤。在肿瘤发生之后,从分离自荷瘤小鼠和无瘤对照小鼠的DLN和NDLN的CD4+T细胞中提取总RNA样品。通过定量RT-PCR测量无反应性(anergy)相关基因的表达。结果显示为与从无瘤小鼠中分离的T细胞相比,荷瘤小鼠中DLN或NDLN驻留T细胞中基因表达的诱导倍数。数据表示来自3次独立实验的平均值 $\pm$ SEM。2D。在随后未经治疗或用LOFU治疗的Typr1小鼠中诱发B16-F1黑素瘤肿瘤。在从DLN和NDLN分离的CD4+T细胞中通过RT-PCR测量不同无反应性相关基因的表达。无反应性相关基因的表达呈现为超过无肿瘤Typr1小鼠的T细胞中获得的值的诱导倍数(来自5个独立实验的平均值 $\pm$ SEM)。

[0037] 图3A-3B。来自LOFU治疗的B16-F1黑素瘤肿瘤的裂解物可以逆转无反应性T细胞的低反应状态。3A。从Typr1小鼠的脾和淋巴结中分离幼稚CD4+T细胞,并分化成TH1细胞。然后将细胞不处理或单独用抗CD3处理16小时以诱导无反应性。然后将细胞在严格不含IL-2的情况下放置72小时,并用抗CD3和抗CD28抗体再刺激。通过ELISA测量IL-2水平。结果显示为来自2个独立实验的平均值 $\pm$ SEM。3B。从无瘤Typr1小鼠的脾中分离CD11c+树突细胞。从如(3A)所述的Typr1小鼠来源的CD4+T细胞产生的无反应性TH1细胞与来源于未处理或LOFU处理的B16-F1黑素瘤肿瘤的树突细胞和肿瘤裂解物共培养。24小时后收集上清液并通过ELISA测定IL-2。结果显示为来自2个独立实验的平均值 $\pm$ SEM,其中每个实验中使用独立的3组肿瘤裂解物。使用ANOVA和Tukey后检验分析数据(\*\* $P < 0.01$ )。

[0038] 图4A-4D。FUS处理引起B16-F1黑素瘤细胞中Hsp70和钙网蛋白的表达和细胞分布的变化。4A。从未治疗的和经LOFU治疗的B16-F1黑素瘤荷瘤小鼠中分离总DLN驻留细胞,并针对CD11c进行免疫染色,以门控(gate)树突细胞。然后通过流式细胞术评估B7.1、B7.2和MHCII的表面表达。对每种第一抗体使用适当的同种型对照。显示出代表性的直方图。4B。从未治疗或LOFU治疗的小鼠中获得的B16肿瘤细胞悬浮液的代表性FACS点图用活力标记物(活/死Mk)进行染色。报告死细胞的相对定量。框和箭头表示死细胞(活/死MK+)。4C。从未治

疗的小鼠或从用LOFU治疗的小鼠中分离的B16-F1肿瘤组织的免疫荧光染色。组织切片用检测钙网蛋白或Hsp70和TRP1的抗体染色。细胞核用DAPI染色。放大倍数为60倍。4D. 针对CD45和针对TRP1的表达对来自LOFU治疗的小鼠和未治疗的小鼠的肿瘤的细胞进行染色。然后分析CD45-TRP1+B16细胞的Hsp70表达。显示出代表性的直方图。门和箭头表示选定的供分析群体。

[0039] 图5A-5B。黑素瘤肿瘤的FUS治疗增强了树突细胞介导的CD4+T细胞的引发(priming):5A.从C57B1/6小鼠纯化得到CD11c+脾树突细胞,并与从OT-II小鼠中分离的应答幼稚CD4+T细胞共培养。从未治疗的或LOFU治疗的荷瘤小鼠制取B16-F1-OVA黑素瘤肿瘤裂解物,并将其加入到各自的培养物中以驱动树突细胞介导的T细胞刺激。在单独的样品中,还将外源性OVA<sub>323-339</sub>肽与肿瘤裂解物一起加入。24小时后收集上清液,并且通过ELISA评估IL-2产生。结果显示为来自4次独立实验的平均值±SEM,并用单因素ANOVA及随后的Tukey后检测(\*P<0.05;\*\*\*P<0.001;n.s.,不显著)进行分析。5B.B16-F1黑素瘤肿瘤未经处理或用LOFU处理。肿瘤DLN经分离并耗尽T细胞。然后将DLN细胞与幼稚Tyrp1 CD4+T细胞共培养,并用从体外培养物中获得的B16黑素瘤肿瘤裂解物进行刺激。24小时后收集上清液并通过ELISA分析IL-2水平。数据显示为来自3次独立实验的平均值±SEM。采用双尾t检验分析使用来自未治疗或LOFU治疗的小鼠的DLN细胞的培养物中的细胞因子产生的差异(\*P<0.05)。

[0040] 图6A-6D。FUS之后进行低分割(hypofractionated)IGRT导致T细胞介导的长期原发性肿瘤控制和减少的远端转移:6A,将具有50mm<sup>3</sup>皮下背侧右后肢肿瘤的C57B1/6小鼠分到四个治疗组之一中:未治疗、LOFU、低分割IGRT或LOGU+IGRT,并监测肿瘤生长62天或直到原发性肿瘤生长超过300mm<sup>3</sup>。图中显示了来自两个代表性实验(每组3-5只小鼠)之一的肿瘤体积的平均值±SEM。使用单因素ANOVA及随后的Bonferroni校正后检验(在第29日之前)或通过双尾student t检验(在第29天之后)来分析数据。第25天之后在未治疗或LOFU治疗的小鼠与IGRT或LOFU+IGRT治疗的小鼠之间,以及在第35天之后在IGRT治疗的小鼠与LOFU+IGRT治疗的小鼠之间发生显著差异(定义为P<0.05)。还显示了在特定日期示出肿瘤大小分布的各个图示。6B.在BALB/c裸小鼠中进行如6A中描述的相似实验。在任何时间点,在不同组之间未观察到显著差异。6C.监测C57B1/6小鼠的原发性肿瘤进展/复发,其被定义为复发达到150mm<sup>3</sup>的体积或发生局部转移至膈或腹股沟淋巴结。此外,自发性死亡的动物被评分为疾病复发或进展。使用Mantel-Cox检验分析无复发存活数据。6D.从自发性死亡、由于肿瘤负荷过大而需要安乐死或在两个月长的实验结束时处死的动物中收集肺。然后测量肺转移。肺具有融合成斑块的结节或超过250个结节被被视为太多而无法计数,并指定为最大值250。每个治疗组均显示代表性的标本。结果显示为平均值±SEM,其中每组n=3-5只小鼠,用Kruskal-Wallis检验及随后的Dunn后检验进行分析。\*P<0.05。

[0041] 图7A-7G:LOFU诱导UPR。7A.LOFU增加Bip/Grp78和EDEM mRNA的表达。与未治疗的对照相比,从LOFU治疗的RM1肿瘤中分离的RNA的实时PCR分析显示出Bip/Grp78增加29.73±0.56倍且EDEM mRNA水平增加9.27±1.18倍。7B.LOFU使IRE1αmRNA的表达增加了2.8±0.4倍。实时PCR分析表明,LOFU诱导的IRE1α表达的增加没有随17AAG治疗而改变。7C.LOFU诱导XBP1 mRNA的剪接。17AAG治疗抑制XBP1的剪接。XBP1s、XBP1h和XBP1u分别表示XBP1的剪接、杂合和非剪接形式。7D-G.LOFU+17AAG联合疗法延长了RM1肿瘤细胞的ER应激。

Western印迹和条形图显示,在联合治疗组中诱导了ERP78 (7D和7E)、ERP57 (7D和7F) 和 ERp44 (7D和7G) 蛋白质的表达。

[0042] 图8A-8E: LOFU+17AAG激活UPR的促凋亡途径并诱导肿瘤细胞的凋亡。8A和8B。pPERK (8A) 和peIF2a (8B) 的Western印迹。LOFU+17AAG通过PERK的磷酸化 (pPERK) 激活PERK, 其进一步诱导eIF2 $\alpha$ 磷酸化 (peIF2 $\alpha$ ) 的磷酸化。8C。CHOP mRNA的实时PCR分析。与对照相比, LOFU+17AAG治疗组中的CHOP转录物的增加达 $25 \pm 1.3$ 倍。8D。从LOFU+17AAG治疗的肿瘤中分离的RNA的实时PCR阵列。热图分析显示,与未治疗对照或LOFU组相比, LOFU+17AAG治疗组将凋亡基因的转录物水平提高数倍。8E。TUNEL染色。免疫组织化学染色显示,与对照或LOFU组相比,在LOFU+17AAG治疗组中主要有tune1阳性细胞。注意单独施用17AAG也诱导被LOFU增强的肿瘤组织中的凋亡。

[0043] 图9A-9C: LOFU+17AAG治疗抑制RM1肿瘤细胞中的分子伴侣介导的自噬 (CMA)。(9A和9B) 免疫印迹分析显示联合治疗组中SMA标志物LAMP2a表达水平的数倍下调。用LOFU或17AAG治疗上调LAMP2a表达水平。(9A和9C) LOFU和17AAG的联合治疗未改变Beclin (一种大自噬标志物) 的表达水平。

[0044] 图10A-10C: 在LOFU+17AAG治疗后,鼠和人前列腺肿瘤的肿瘤生长迟缓。10A。治疗模式。每3-4天用LOFU治疗可触知的肿瘤,在两周内施用五个部分。在此期间,动物每周三次接受17AAG。在LOFU的最后一部分后24小时收获肿瘤。10B。RM1肿瘤。在C57B16小鼠中,与对照相比, LOFU+17AAG联合治疗显著减缓了RM1肿瘤生长 ( $p < 0.004$ )。注意,单独的LOFU或17AAG不能明显控制肿瘤。LOFU敏化了低剂量 (25mg/kg体重) 17AAG的作用。10C。PC3肿瘤。在BalbCnu/nu小鼠中, LOFU+17AAG联合治疗显示PC3肿瘤生长显著减少 ( $p < 0.007$ )。

[0045] 图11A-11F: LOFU+17AAG治疗减少了RM1细胞中前列腺癌干细胞标志物的表达。分离的RM1肿瘤细胞的流式细胞术显示,在LOFU+17AAG治疗后, RM1肿瘤细胞上的SCA1 (11A和11B)、CD44 (11A和11C)、CD133 (11A和11D) 和 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白 (11A和11E) 细胞表面表达显著降低。(11F) qRT-PCR阵列及随后的热图分析显示, LOFU+17AAG联合治疗组下调了干细胞转录因子的mRNA水平。

[0046] 图12是根据本发明示例性实施方案的APT装置的框图。

[0047] 图13是根据本发明另一示例性实施方案的APT装置的框图。

[0048] 图14是根据本发明另一示例性实施方案的APT装置的框图。

[0049] 图15-17是包含集成超声成像装置的根据本发明示例性实施方案的APT装置的框图。

[0050] 图18是根据本发明示例性实施方案的换能器的透视图。

[0051] 图19图示了根据本发明示例性实施方案的定位设备。

## 具体实施方式

[0052] 本文公开了将与HIFU配置相比降低的能量水平递送至治疗区的超声 (US) 疗法。在一个示例性实施方案中,特定病变体积的治疗在1MHz连续功率下进行短时间 (例如 ~ 1.5 秒),且肿瘤组织温度升高至小于约 $45^{\circ}\text{C}$ 。利用凹面换能器将超声聚焦在治疗区中并且在本文中称为“低能量非消融聚焦超声” (LOFU) 的这种超声治疗在肿瘤细胞中产生轻度的机械应激和热应激,同时避免了空化和凝固性坏死,这两者均导致组织损伤。在肿瘤中诱导非消

融性“声波”应激应答,其增加热休克蛋白的表达,而实际上不直接杀死它们。LOFU具有释放免疫调节因子(包括热休克蛋白)的潜力(28、29),并可以有效诱导肿瘤特异性免疫激活(30、31)。使用鼠B16黑素瘤肿瘤模型,公开了LOFU治疗逆转肿瘤诱导的耐受性,从而导致在肿瘤抗原特异性CD4+T细胞中效应细胞因子的产生增加,这似乎是由肿瘤细胞释放免疫原性分子引起的。此外,LOFU与消融性低分割锥形束计算机断层扫描(CT)图像引导的放射疗法(IGRT)的组合导致对原发性肿瘤的协同控制,并且还导致免疫活性小鼠中自发性肺转移减少并延长无复发生存期(参见实施例1)。另外,发现LOFU使癌细胞(在该实施例中为前列腺癌)对化学疗法变得敏感(参见实施例2)。

[0053] 在一个示例性实施方案中,LOFU(在本文中也称为“声激疗法”)涉及在治疗区中以10至1000W/cm<sup>2</sup>空间峰值时间平均强度(I<sub>spta</sub>)的声功率施加超声,其中超声连续施加0.5至5秒范围内的时间,其中频率在0.01至10MHz的范围内,且机械指数小于4。机械指数(MI)是以MPa为单位的稀疏压力与以MHz为中心频率的平方根的比值。所施加的超声的能量和强度旨在落在引起主要消融作用或主要诊断效应的超声的能量和强度之间。

[0054] 如下面更详细解释的,本文所讨论的各种治疗方法可以使用LOFU或声激疗法装置来施用,该LOFU或声激疗法装置包括在治疗区中产生10至1000W/cm<sup>2</sup>空间峰值时间平均强度(I<sub>spta</sub>)的声功率的换能器。该超声连续施加0.5至5秒范围内的时间,或以1至100ms的脉冲持续时间进行脉冲式施加,其中频率在0.01至10MHz的范围内。在一些实施方案中,频率在0.05至5MHz的范围内。在一些实施方案中,频率范围为0.1至2MHz。在一些实施方案中,治疗区中的任何超声波束的最小直径为约1cm。在一个实施方案中,所述LOFU在治疗区中以10至100W/cm<sup>2</sup>的I<sub>spta</sub>施用。在一个实施方案中,所述LOFU在治疗区中以100至200W/cm<sup>2</sup>的I<sub>spta</sub>施用。在一个实施方案中,所述LOFU在治疗区中以300至400W/cm<sup>2</sup>的I<sub>spta</sub>施用。在一个实施方案中,所述LOFU在治疗区中以400至500W/cm<sup>2</sup>的I<sub>spta</sub>施用。在一个实施方案中,所述LOFU在治疗区中以500至600W/cm<sup>2</sup>的I<sub>spta</sub>施用。在一个实施方案中,所述LOFU在治疗区中以600至700W/cm<sup>2</sup>的I<sub>spta</sub>施用。在一个实施方案中,所述LOFU在治疗区中以700至800W/cm<sup>2</sup>的I<sub>spta</sub>施用。在一个实施方案中,所述LOFU在治疗区中以800至900W/cm<sup>2</sup>的I<sub>spta</sub>施用。在一个实施方案中,所述LOFU在治疗区中以900至1000W/cm<sup>2</sup>的I<sub>spta</sub>施用。在一个实施方案中,所述超声施加0.5至1秒范围内的时间。在一个实施方案中,所述超声施加1到2秒范围内的时间。在一个实施方案中,所述超声施加2至3秒范围内的时间。在一个实施方案中,所述超声施加4至5秒范围内的时间。在实施方案中,所述超声以0.01至1MHz的频率施加。在实施方案中,所述超声以1至2MHz的频率施加。在实施方案中,所述超声以2至3MHz的频率施加。在实施方案中,所述超声以3至4MHz的频率施加。在实施方案中,所述超声以4至5MHz的频率施加。在实施方案中,所述超声以5至6MHz的频率施加。在实施方案中,所述超声以6至7MHz的频率施加。在实施方案中,所述超声以7至8MHz的频率施加。在实施方案中,所述超声以8至9MHz的频率施加。在实施方案中,所述超声以9至10MHz的频率施加。

[0055] 提供了一种用于提高受试者中的化学疗法疗效的方法,其包括向该受试者施用(i)一定量的低强度聚焦超声(LOFU)和(ii)一定量的化疗药物,其中所述化疗药物在肿瘤细胞中实现内质网(ER)应激和/或解折叠蛋白质应答(UPR),其中所述(i)和(ii)的量合起来足以提高化学疗法的疗效。

[0056] 还提供了一种在受试者内预定体积的组织中提高化学疗法疗效的方法,该体积小

于整个受试者,所述方法其包括(i)向该受试者施用一定量的化疗药物,其中所述化疗药物在肿瘤细胞中实现内质网(ER)应激和/或解折叠蛋白质应答(UPR),以及(ii)向受试者中预定体积的组织施用一定量的低强度聚焦超声(LOFU),其中所述(i)和(ii)的量合起来足以在预定体积的组织内提高该化学疗法的疗效。

[0057] 还提供了治疗受试者的肿瘤的方法,其中所述肿瘤对化疗药物具有抗性,所述方法包括:

[0058] 接受将所述受试者鉴定为具有对特定化疗药物有抗性的肿瘤的鉴定;

[0059] 施用(i)一定量的低强度聚焦超声(LOFU)和(ii)一定量的特定化疗药物,

[0060] 其中,所述(i)和(ii)的量合起来足以治疗所述肿瘤。

[0061] 还提供了治疗受试者的化学抗性肿瘤的方法,其中所述肿瘤对先前施用的化疗药物具有化学抗性,所述方法包括:

[0062] 向所述受试者施用(i)一定量的低强度聚焦超声(LOFU)和(ii)一定量的化疗药物,

[0063] 其中,所述(i)和(ii)的量合起来足以治疗所述化学抗性肿瘤。

[0064] 在所述方法的一个实施方案中,化疗药物在肿瘤细胞中实现内质网(ER)应激和/或解折叠蛋白质应答(UPR)。

[0065] 在所述方法的一个实施方案中,化疗药物先前已经多次施用于受试者,并且其中肿瘤已经在化疗药物的初始给药之后被诊断为对该化疗药物具有抗性。

[0066] 在所述涉及化学抗性的方法的一个实施方案中,所述方法可以进一步包括接受将受试者鉴定为具有对先前施用的化疗药物有化学抗性的肿瘤的鉴定。

[0067] 在所述方法的一个实施方案中,化疗药物在肿瘤细胞中实现UPR。

[0068] 在所述方法的一个实施方案中,化疗药物在肿瘤细胞中实现ER应激。

[0069] 在所述方法的一个实施方案中,所述(i)和(ii)的量合起来足以诱导肿瘤细胞的凋亡或增加肿瘤细胞的凋亡。

[0070] 在所述方法的一个实施方案中,在不提高疗效的情况下,单独施用的化疗药物的量对于治疗肿瘤而言是亚治疗剂量。

[0071] 在所述方法的一个实施方案中,施用的LOFU对准受试者中肿瘤的位置。

[0072] 在所述方法的一个实施方案中,在化学疗法或放射疗法或免疫疗法之前或同时向受试者施用低强度聚焦超声(LOFU)。在所述方法的一个实施方案中,在施用放射疗法之前向受试者施用LOFU。在所述方法的一个实施方案中,在施用化学疗法之前向受试者施用LOFU。在所述方法的一个实施方案中,在施用免疫疗法之前向受试者施用LOFU。在所述方法的一个实施方案中,在施用放射疗法的同时向受试者施用LOFU。在所述方法的一个实施方案中,在施用化学疗法的同时向受试者施用LOFU。在所述方法的一个实施方案中,在施用免疫疗法的同时向受试者施用LOFU。

[0073] 在所述方法的一个实施方案中,化疗药物是HSP90抑制剂。在一个实施方案中,该HSP90抑制剂是17AAG(坦螺旋霉素(tanespimycin)或17-N-烯丙基氨基-17-去甲氧基格尔德霉素)。在一个实施方案中,化疗药物是HSP90抑制剂。HSP90抑制剂的实例是17AAG(坦螺旋霉素或17-N-烯丙基氨基-17-去甲氧基格尔德霉素)。在一个实施方案中,化疗药物是烷化剂。在一个实施方案中,化疗药物是曲贝替定(trabectedin)。在一个实施方案中,化疗药

物是芥子气衍生物。在一个实施方案中,化疗药物是金属盐。在一个实施方案中,化疗药物是植物生物碱。在一个实施方案中,化疗药物是抗肿瘤抗生素。在一个实施方案中,化疗药物是抗代谢物。在一个实施方案中,化疗药物是拓扑异构酶抑制剂。在一个实施方案中,化疗药物是蛋白酶体抑制剂。在一个实施方案中,化疗药物是化学治疗性NSAID。在一个实施方案中,化疗药物是下文列出的其他抗肿瘤药之一。

[0074] 在所述方法的一个实施方案中,LOFU经由来自包括换能器的超声机器的超声波束来递送,并且该机器和受试者被定位成使得肿瘤的至少一部分定位在换能器的焦点处。在所述方法的一个实施方案中,将LOFU递送至肿瘤的至少一部分,并且经由成像技术来监测受试者中肿瘤的位置。在所述方法的一个实施方案中,该成像技术是磁共振成像。在所述方法的一个实施方案中,该成像技术是计算机断层扫描。在所述方法的一个实施方案中,该成像技术是超声成像。

[0075] 在所述方法的一个实施方案中,LOFU在小于1小时的时间段内至少一次施用于肿瘤内的多个体积。

[0076] 在所述方法的一个实施方案中,LOFU是非消融性的。在所述方法的一个实施方案中,LOFU在其施用的组织中不引起空化。

[0077] 在所述方法的一个实施方案中,LOFU的超声分量以0.5MHz至1.5MHz的频率施用。在所述方法的一个实施方案中,LOFU施用1至3秒。在所述方法的一个实施方案中,LOFU通过超声波束施用,使得在治疗区内,原位强度在受试者的1mm至75mm组织深度处为250W/cm<sup>2</sup>至750W/cm<sup>2</sup>。

[0078] 在所述方法的一个实施方案中,LOFU在整个肿瘤体积上施用。在所述方法的一个实施方案中,所述方法将300-3000焦耳/cc肿瘤的能量递送至肿瘤。在所述方法的一个实施方案中,不向受试者施用高强度聚焦超声(HIFU)。在一个实施方案中,HIFU是聚焦超声,其在聚焦区中实现约80°C或更高的组织温度。对于固体组织的几秒钟暴露时间,HIFU导致升高温度高达60至85°C,并且/或者引起组织中的热消融。热消融通常以大于1kW/cm<sup>2</sup>的功率强度实现,并且报道的频率为0.8至7MHz。在另一方面,LOFU可以用例如1至3W/cm<sup>2</sup>的功率强度和0.5至3MHz的频率来实现(然而,参见本文中的其他LOFU范围)。通过调节占空比(duty cycle),LOFU可为连续(100%DC)或脉冲式(<100%DC,一些文献称为低强度脉冲超声或LIPUS)聚焦超声。在1MHz和1W/cm<sup>2</sup>下持续10分钟的连续LOFU可以在组织中产生0.1°C的升温。肌肉组织的体内实验表明,1MHz频率的超声治疗在0.5W/cm<sup>2</sup>下以0.04°C/min的速率升温;在1.0W/cm<sup>2</sup>下为0.16°C/min;在1.5W/cm<sup>2</sup>下为0.33°C/min;在2.0W/cm<sup>2</sup>下则为0.38°C/min。

[0079] 在所述方法的一个实施方案中,所述量的放射疗法和所述量的LOFU的效果在治疗肿瘤时是协同的。

[0080] 在所述方法的一个实施方案中,所述受试者是人。

[0081] 在所述方法的一个实施方案中,所述肿瘤是前列腺、乳房、鼻咽、咽、肺、骨、脑、唾液腺、胃、食道、睾丸、卵巢、子宫、子宫内膜、肝脏、小肠、阑尾、结肠、直肠、膀胱、胆囊、胰腺、肾、膀胱、宫颈、阴道、外阴,前列腺、甲状腺或皮肤、头或颈的肿瘤,神经胶质瘤或软组织肉瘤。在所述方法的一个实施方案中,所述肿瘤是前列腺癌。

[0082] 在所述方法的一个实施方案中,所述转移是肺转移。

[0083] 在所述方法的一个实施方案中,用装置施用LOFU,该装置包括:

[0084] 产生频率波形的控制系统;和

[0085] 一个或多个换能器,其被配置为在治疗区中产生1至1000W/cm<sup>2</sup>空间峰值时间平均声输出强度( $I_{spta}$ )的基于频率波形的超声,其中超声连续地施加至治疗区0.5至5秒范围内的时间,其中超声频率在0.01至10MHz的范围内,并且其中任何波束的机械指数均小于4。在所述方法的实施方案中,所述一个或多个换能器中的每一个被配置为产生基于中心频率在0.05至5MHz范围内的频率波形且声输出强度为20-1000W/cm<sup>2</sup>的超声波束。在所述方法的一个实施方案中,所述一个或多个换能器中的每一个被配置为产生基于中心频率在0.5至1.5MHz范围内的频率波形且声输出强度为20-1000W/cm<sup>2</sup>的超声波束。在所述方法的一个实施方案中,每个换能器被配置为产生柱式超声,使得在治疗区中-3dB处的波束轮廓腰部不小于5mm。在所述方法的一个实施方案中,一个或多个波束在治疗期间机械地移动。在所述方法的一个实施方案中,所述一个或多个换能器包括两个或更多个换能器,所述两个或更多个换能器被配置为顺序地或同时运行,并且在治疗期内在治疗区中产生平均空间峰值为250W/cm<sup>2</sup>的超声。在所述方法的一个实施方案中,所述一个或多个换能器被配置为产生具有在10kHz至300kHz范围内的频率的超声。在所述方法的一个实施方案中,所述一个或多个换能器被配置为产生频率在300kHz至3MHz范围内的超声。在所述方法的一个实施方案中,一个或多个换能器以300kHz至3MHz的频率运行,以及一个或多个换能器以30至300kHz的频率运行。在所述方法的一个实施方案中,两个或更多个超声换能器产生穿过治疗区的超声波束,其中每个波束在交叉区中具有10至500W/cm<sup>2</sup>范围内的 $I_{spta}$ 。在所述方法的一个实施方案中,治疗时间小于5秒/立方厘米肿瘤。在所述方法的一个实施方案中,两个换能器产生在治疗区内相交的超声波束,其中每个波束在交叉区中具有50至500W/cm<sup>2</sup>范围内的 $I_{spta}$ 。在所述方法的一个实施方案中,三个换能器产生穿过治疗区的超声波束,其中每个波束在交叉区中具有50至500W/cm<sup>2</sup>范围内的 $I_{spta}$ 。在所述方法的一个实施方案中,所述一个或多个换能器产生在治疗区内基本上彼此同相的超声波束。在所述方法的一个实施方案中,从单独的超声换能器发射出的两个超声波束基本上同相并在治疗区内相交,并且每个波束在交叉区中具有70至100W/cm<sup>2</sup>范围内的声功率空间峰值强度,并且连续施加超声1至5秒。

[0086] 在所述方法的一个实施方案中,从单独的超声换能器发射出的三个超声波束基本上同相并在治疗区内相交,并且每个波束在交叉区中具有50至70W/cm<sup>2</sup>范围内的声功率空间峰值强度,并且连续施加超声1至5秒。在所述方法的一个实施方案中,源自单独的换能器的超声波束各自在治疗区中产生大约100至1000W/cm<sup>2</sup>范围内的 $I_{spta}$ 。在所述方法的一个实施方案中,至少一个换能器产生具有比治疗区大得多的高强度直径的超声波束,并且将其定向为使得治疗区完全在波束内。在所述方法的一个实施方案中,在两个或更多个超声波束交叉路径的情况下形成强治疗区,该强治疗区在垂直于传输能量方向上等于或大于约1cm,并且也在平行于传输方向上等于或大于约1cm。在所述方法的一个实施方案中,从每个换能器施加到治疗区的声压为0.1至10MPa。在所述方法的一个实施方案中,提供强超声治疗区的换能器的数目为1至1000个。在所述方法的一个实施方案中,在治疗时间期间连续施加来自一个或多个换能器的超声。在所述方法的一个实施方案中,超声是以1个打开时间单位至9个关闭时间单位的范围内的占空比产生的。在所述方法的一个实施方案中,换能器被配置为以单频音调或多频线性调频波(chirps)来产生超声。在所述方法的一个实施方案

中,所述一个或多个换能器在时间上顺序运行。在所述方法的一个实施方案中,在整个施加过程中向靶组织和靶组织周围的所需边缘递送的总能量大于向周围组织递送的总能量。在所述方法的一个实施方案中,所述一个或多个换能器被配置为使得在施加期间扫描超声的频率。在所述方法的一个实施方案中,所述一个或多个换能器包括二维相控阵列。在所述方法的一个实施方案中,所述一个或多个换能器包括环形阵列。在所述方法的一个实施方案中,所述一个或多个换能器包括三维相控阵列。在所述方法的一个实施方案中,将所述一个或多个换能器结合到一个或多个内窥镜装置中。在所述方法的一个实施方案中,将所述一个或多个换能器结合到磁共振成像机中。

[0087] 在所述方法的一个实施方案中,将所述一个或多个换能器结合到放疗治疗机中。

[0088] 在所述方法的一个实施方案中,所述一个或多个换能器被配置为产生超声,使得在将超声施加于治疗区约2秒或更短的治疗期间,在治疗区中达到的最高温度低于45°C。

[0089] 在所述方法的一个实施方案中,所述一个或多个换能器被配置为产生超声,使得在将超声施加于治疗区约2秒或更短的治疗期间,在治疗区中达到的最高温度低于50°C。

[0090] 在所述方法的一个实施方案中,所述一个或多个换能器被配置为产生超声,使得在将超声施加于治疗区约2秒或更短的治疗期间,在治疗区中达到的最高温度低于55°C。

[0091] 在所述方法的一个实施方案中,LOFU和放射疗法通过以下系统来施用,该系统包括:

[0092] LOFU装置,其包括:

[0093] 产生频率波形的控制系统;和

[0094] 一个或多个换能器,其被配置为在治疗区中产生1至1000W/cm<sup>2</sup>空间峰值时间平均声输出强度( $I_{spta}$ )的基于频率波形的超声,其中超声连续施加在0.5至5秒范围内的时间,并且其中超声频率在0.01至10MHz的范围内;

[0095] 放疗治疗机;以及

[0096] 控制系统,其可操作地配置为控制LOFU装置和放疗治疗机,使得向受试者施用第一量的超声和第二量的放射疗法,其中第一量 and 第二量合起来足以治疗受试者的肿瘤。

[0097] 提供了一种治疗受试者的肿瘤的方法,其包括向该受试者施用(i)一定量的低强度聚焦超声(LOFU)和(ii)一定量的化学疗法或一定量的放射疗法或一定量的免疫疗法,其中(i)和(ii)的量合起来足以治疗肿瘤。

[0098] 在所述方法的一个实施方案中,向受试者施用所述量的LOFU和所述量的放射疗法。在所述方法的另一个实施方案中,向受试者施用所述量的LOFU和所述量的放射疗法。在所述方法的另一个实施方案中,向受试者施用所述量的LOFU和所述量的免疫疗法。

[0099] 提供了一种治疗受试者的肿瘤的方法,其包括向该受试者施用(i)一定量的低强度聚焦超声(LOFU)和(ii)一定量的靶向抗癌疗法,其中(i)和(ii)的量合起来足以治疗肿瘤。在一个实施方案中,该靶向疗法包括针对Her2或VEGFR的mAb。在一个实施方案中,该靶向疗法包含酪氨酸激酶抑制剂。

[0100] 还提供了一种抑制受试者中的肿瘤转移的方法,其包括向患有肿瘤的受试者施用一定量的低强度聚焦超声(LOFU)和一定量的放射疗法,其中所述量合起来足以抑制受试者中的肿瘤转移。

[0101] 在所述方法中,所述放射疗法可以是消融性低分割放射疗法。

[0102] 优选地,在所述方法中,LOFU对准受试者中肿瘤的位置。

[0103] 还提供了一种减少治疗受试者肿瘤所需的抗癌化学疗法的有效剂量的方法,其包括向经受该抗癌化学疗法的受试者施用一定量的低强度聚焦超声(LOFU),该足以减少治疗肿瘤所需的该抗癌化学疗法的有效剂量。

[0104] 在每种方法的一个实施方案中,在化学疗法或放射疗法或免疫疗法之前或同时向受试者施用LOFU。

[0105] 在一个实施方案中,在施用放射疗法之前向受试者施用LOFU。

[0106] 在施用抗癌化学疗法的方法中,在一个实施方案中,该抗癌化学疗法包括向受试者施用HSP90抑制剂。该HSP90抑制剂可以是17AAG(坦螺旋霉素或17-N-烯丙基氨基-17-去甲氧基格尔德霉素)。在一个实施方案中,化疗药物是烷化剂。在一个实施方案中,化疗药物是曲贝替定。在一个实施方案中,化疗药物是芥子气衍生物。在一个实施方案中,化疗药物是金属盐。在一个实施方案中,化疗药物是植物生物碱。在一个实施方案中,化疗药物是抗肿瘤抗生素。在一个实施方案中,化疗药物是抗代谢物。在一个实施方案中,化疗药物是拓扑异构酶抑制剂。在一个实施方案中,化疗药物是蛋白酶体抑制剂。在一个实施方案中,化疗药物是化学治疗性NSAID。在一个实施方案中,化疗药物是下文列出的其他抗肿瘤药物之一。

[0107] 在所述方法的一个实施方案中,LOFU经由来自包括换能器的超声机器的超声波束来递送,并且该机器和受试者被定位成使得肿瘤的至少一部分定位在换能器的焦距处

[0108] 在所述方法的一个实施方案中,将LOFU递送至肿瘤的至少一部分,并且经由成像技术监测肿瘤的位置。磁共振成像可以是这样的成像技术。

[0109] 在所述方法中,LOFU可以在小于一小时的时间段内至少一次施用于肿瘤内的多个点。

[0110] 在所述方法的一个实施方案中,LOFU是非消融性的。

[0111] 在所述方法的一个实施方案中,LOFU以0.5MHz至1.5MHz的频率施用。

[0112] 在所述方法的一个实施方案中,LOFU施用1.5-3秒。

[0113] 在所述方法的一个实施方案中,LOFU通过超声波束施用,使得在超声波束的焦点处,原位强度为 $250\text{W}/\text{cm}^2$ 至 $750\text{W}/\text{cm}^2$ 。在所述方法的一个实施方案中,LOFU通过超声波束施用,使得在超声波束的焦点处,原位强度在受试者的1mm至75mm组织深度处为 $250\text{W}/\text{cm}^2$ 至 $750\text{W}/\text{cm}^2$ 。在所述方法的一个实施方案中,LOFU通过超声波束施用,使得在超声波束的焦点处,原位强度在受试者的1mm至75mm组织深度处为 $350\text{W}/\text{cm}^2$ 至 $650\text{W}/\text{cm}^2$ 。在所述方法的一个实施方案中,LOFU通过超声波束施用,使得在超声波束的焦点处,原位强度在受试者的1mm至75mm组织深度处为 $450\text{W}/\text{cm}^2$ 至 $550\text{W}/\text{cm}^2$ 。

[0114] LOFU可以在整个肿瘤体积上施用,或者可以在一部分肿瘤体积上施用。在优选的实施方案中,LOFU在整个肿瘤体积上施用。

[0115] 在所述方法的一个实施方案中,LOFU通过肿瘤递送每cc肿瘤组织至少500-5000焦耳的能量。在所述方法的一个实施方案中,LOFU递送每cc肿瘤组织至少1000-4000焦耳的能量。在所述方法的一个实施方案中,LOFU通过肿瘤递送每cc肿瘤组织至少2000-3000焦耳的能量。

[0116] 在一个实施方案中,不向受试者施用高强度聚焦超声(HIFU)。在一个实施方案中,

未曾向受试者施用高强度聚焦超声。在一个实施方案中,未曾向肿瘤施用高强度聚焦超声。在其中在抗癌疗法之前向受试者施用LOFU的实施方案中,在施用LOFU之后和施用抗癌疗法之前不向受试者施用高强度聚焦超声。

[0117] 在一个实施方案中,所述量的放射疗法和所述量的LOFU的抗癌疗效是协同的。

[0118] 在一个实施方案中,施用的LOFU使组织/肿瘤温度升高至40°C-45°C。在一个实施方案中,施用的LOFU使组织/肿瘤温度升高至不超过40°C。在一个实施方案中,施用的LOFU使组织/肿瘤温度升高至不超过45°C。在一个实施方案中,施用的LOFU使组织/肿瘤温度升高至不超过50°C。HIFU通常会升高组织温度比这更高。

[0119] 在一个实施方案中,LOFU施用0.5至3秒。在一个实施方案中,LOFU施用1.5到3秒。在一个实施方案中,LOFU以100%的占空比施用。在一个实施方案中,LOFU以10、20、30、40、50、60、70、80或90%的占空比的单独实施方案之一施用。

[0120] 还提供一种使受试者的肿瘤对一定量的抗癌疗法变得敏感的方法,所述方法包括在抗癌疗法之前、期间或之后向受试者施用一定量的低强度聚焦超声波(LOFU),该量有效地使受试者的肿瘤对一定量的抗癌疗法变得敏感。在一个实施方案中,该抗癌疗法包括化学疗法,或放射疗法,或免疫疗法,或靶向疗法,或手术。在一个实施方案中,该抗癌疗法包括化学疗法。在一个实施方案中,该抗癌疗法包括免疫疗法。在一个实施方案中,该抗癌疗法包括放射疗法。在一个实施方案中,该抗癌疗法包括手术,例如切除肿瘤。所述方法还可以包括向受试者施用抗癌疗法。肿瘤对一定量的抗癌疗法变得敏感使肿瘤对治疗更敏感。例如,与将给定量的抗癌疗法施加于相同或等效受试者的等效质量、血管供应、位置和类型的非敏化肿瘤相比,对于将相同量的抗癌疗法施加于敏化肿瘤而言,可以衡量肿瘤治疗的参数(例如肿瘤体积减小)更大。在一个实施方案中,有效地使受试者中的肿瘤对一定量的抗癌疗法变得敏感的LOFU量和所述抗癌疗法在效果上是协同的。

[0121] 在本文所述的任何方法中,所述受试者是哺乳动物。在一个实施方案中,所述受试者是人。

[0122] 所述方法中涉及的肿瘤可以是前列腺、乳房、鼻咽、咽、肺、骨、脑、唾液腺、胃、食道、睾丸、卵巢、子宫、子宫内膜、肝脏、小肠、阑尾、结肠、直肠、膀胱、胆囊、胰腺、肾、膀胱、宫颈、阴道、外阴、前列腺、甲状腺或皮肤、头或颈的肿瘤,或者是神经胶质瘤或软组织肉瘤。在一个实施方案中,该肿瘤是前列腺癌。在一个实施方案中,该肿瘤是软组织肉瘤。在一个实施方案中,治疗原发性肿瘤。在一个实施方案中,治疗继发性肿瘤。在一个实施方案中,肿瘤的治疗降低继发性肿瘤的可能性。在一个实施方案中,所述转移包括一个或多个肺转移。

[0123] 如本文所用的术语“肿瘤”,除非另有说明,是指赘生性细胞生长,并且包括癌前和癌性的细胞和组织。肿瘤通常表现为病变或肿块。在一个实施方案中,该肿瘤是恶性肿瘤。

[0124] 就癌症或肿瘤而言,如本文所用的“转移”(或语法上的等同语)意指癌症或肿瘤从受试者的一个器官或组织扩散至在空间上与第一器官或组织隔开的该受试者的另一个器官或组织。

[0125] 如本文所用的,“治疗”肿瘤意指疾病的一种或多种症状,如肿瘤本身、肿瘤的血管形成或表征该疾病的其他参数,得到减少、改善、抑制、置于缓解状态或维持缓解状态。“治疗”肿瘤还意指可以通过治疗消除、减少或防止肿瘤的一个或多个特征。此类特征的非限制性实例包括基底膜和近端细胞外基质的不受控制的降解,内皮细胞迁移、分裂并组织成新

的功能性毛细血管,以及这类功能性毛细血管的持续存在。在一个实施方案中,治疗肿瘤意指减小肿瘤的大小或体积。

[0126] 如本文所用的,受试者中的肿瘤的“抑制转移”意指减少、改善或抑制一种或多种症状或表征疾病的一种或多种其他参数。这类参数的非限制性实例包括基底膜和近端细胞外基质的不受控制的降解,和肿瘤细胞穿过血流或淋巴的行进,在远处或局部第二部位处的侵袭、粘附失调和增殖。在一个实施方案中,治疗转移意指减少转移的发生或抑制转移的发展。

[0127] 放射疗法在本领域中是公知的。本文所包含的放射疗法包括由身体外的机器(外部波束放射疗法)或从放置于体内靠近癌细胞的放射性物质(内部放射疗法,也称为近距离放射疗法)或全身放射疗法递送的医学治疗性辐射。本文所包含的放射疗法包括三维适形放射疗法(3D-CRT)、调强放射疗法(IMRT)、图像引导放射疗法(IGRT)和断层放射疗法。该放射治疗也可以是立体定向放射外科手术或立体定向体部放射疗法(SBRT)的一部分。还包括通过本领域已知的任何粒子束的递送,例如通过质子疗法、碳离子疗法或取决于肿瘤类型和位置的其他带电粒子束的递送。

[0128] 在一个实施方案中,所述放射疗法是CT图像引导的。在一个实施方案中,该放射疗法是低分割锥形束放射疗法。在一个实施方案中,该放射疗法是低分割锥形束CT图像引导的放射疗法。本文所述的各种元件的所有组合均在本发明的范围内,除非在此另有说明或者另外与上下文有明显矛盾。

[0129] 可在本发明中使用的化疗药物是各种各样的。化疗药物的实例包括:

[0130] 烷化剂(例如曲贝替定((1'R,6R,6aR,7R,13S,14S,16R)-6',8,14-三羟基-7',9-二甲氧基-4,10,23-三甲基-19-氧代-3',4',6,7,12,13,14,16-八氢螺[6,16-(环硫丙桥-氧基甲桥)-7,13-亚氨基-6aH-1,3-二氧杂环戊并[7,8]异喹啉并[3,2-b][3]苯并氮杂环辛四烯-20,1'(2'H)-异喹啉]-5-基乙酸酯))

[0131] 芥子气衍生物(例如氮芥、环磷酰胺、苯丁酸氮芥、美法仑和异环磷酰胺);

[0132] 乙烯亚胺类(例如噻替派和六甲蜜胺);

[0133] 烷基磺酸酯类(例如白消安);

[0134] 胍类和三嗪类(例如六甲蜜胺、丙卡巴胍、达卡巴嗪和替莫唑胺);

[0135] 亚硝基脲类(例如卡莫司汀、洛莫司汀和链脲菌素);

[0136] 金属盐类(例如卡铂、顺铂和奥沙利铂);

[0137] 植物生物碱类(例如长春花生物碱类,如长春新碱、长春花碱、长春瑞滨,紫杉烷类,如紫杉醇和多西他赛,鬼臼毒素类,如依托泊苷和替尼泊苷(tenisopide)、喜树碱类似物(拓扑异构酶抑制剂)如伊立替康和拓泊替康);

[0138] 抗肿瘤抗生素(例如蒽环类:多柔比星、柔红霉素、表柔比星、米托蒽醌和伊达比星;色霉素类:更生霉素和普卡霉素;其他类,如丝裂霉素和博来霉素);

[0139] 抗代谢物(例如叶酸拮抗剂:甲氨蝶呤;嘧啶拮抗剂:5-氟尿嘧啶、氟尿苷(foxuridine)、阿糖胞苷、卡培他滨和吉西他滨;嘌呤拮抗剂:6-巯基嘌呤和6-硫鸟嘌呤;腺苷脱氨酶抑制剂:克拉屈滨、氟达拉滨、奈拉滨和喷司他丁);

[0140] 拓扑异构酶抑制剂(例如伊立替康、托泊替康;安吡啶、依托泊苷、磷酸依托泊苷、替尼泊苷);

[0141] 蛋白酶抑制剂;

[0142] 化学治疗性NSAIDS;和

[0143] 其他抗肿瘤药(例如核糖核苷酸还原酶抑制剂:羟基脲;肾上腺皮质类固醇抑制剂:米托坦;酶类:天冬酰胺酶和培门冬酶;抗微管剂:雌莫司汀;类维生素A:贝沙罗汀、异维甲酸、维甲酸(ATRA))。

[0144] 在细胞中实现内质网(ER)应激并且/或者实现解折叠蛋白质应答(UPR)的化疗药物是本领域已知的。例如,蛋白酶体抑制剂如硼替佐米(Velcade;以前称为PS-341)引起ER应激应答。而且,蛋白酶体抑制剂如硼替佐米引起UPR。组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂引起ER应激应答。化学治疗性NSAIDS(例如吲哚美辛、双氯芬酸和塞来昔布)可以引起ER应激应答,并且可以引起UPR。雌激素受体 $\alpha$ 抑制剂如BHPI(1,3-二氢-3,3-双(4-羟苯基)-7-甲基-2H-吲哚-2-酮)可以激活UPR。含铂的抗癌药物:已知顺铂引起ER应激应答。紫杉烷类药物:已知紫杉醇引起ER应激应答。已知蒽环类如多柔比星引起ER应激。已知环磷酰胺引起ER应激。还参见Hetz等人,Nature Reviews,Drug Discovery,12:703-719(2013年9月)的表2,其通过引用并入本文。

[0145] 内质网(ER)是分泌、膜结合和一些细胞器靶向蛋白质的合成和折叠的部位。ER对于干扰细胞能级、氧化还原状态或 $Ca^{2+}$ 浓度的应激高度敏感。这些应激减少了ER的蛋白质折叠能力,这可能导致解折叠蛋白质的积累和聚集,和/或ER中的滞留及运输蛋白质的负载与该细胞器处理这种负载的能力之间的不平衡。这种情况在本文中和在本领域中被称为“ER应激”。ER应激应答可以促进细胞修复和持续存活,这是通过蛋白质合成的整体衰减和/或分子伴侣、酶和ER的结构成分的上调来减少解折叠蛋白质的负载,从而增强蛋白质折叠。这种应答统称为解折叠蛋白质应答(UPR)。解折叠蛋白质的积累导致GRP78从PERK、ATF6和IRE1中解离,从而引发UPR。

[0146] 表1-可以与LOFU一起使用的化学疗法的非限制性实例

[0147]

作用类型	药物名称	作用机制	所选择的与 LOFU 的相互作用
阻断蛋白酶体/降解错误折叠的蛋白质			减少 LOFU 诱导的错误折叠蛋白质的降解,从而增加解折叠蛋白质应答的量,以朝向凋亡。
	硼替佐米	蛋白酶体抑制剂	UPR 引起的 ATF-4 诱导可赋予硼替佐米抗性
	3-甲基腺嘌呤	磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3-激酶) 抑制剂阻止	

		ATG5 的诱导和 LC3-II 的激活并且阻断自噬体形成	
	多酚 (绿茶) 表没食子儿茶素 没食子酸酯	蛋白酶体抑制剂	
	染料木黄酮	蛋白酶体抑制剂	
	姜黄素	蛋白酶体抑制剂	
	白藜芦醇	蛋白酶体抑制剂/ 抑制 XBP-1 促存活信号传导	
[0148]	自噬抑制剂		在应激时, 细胞会诱导自噬以立即补充耗尽的结构单元。预期在用 LOFU 处理的细胞中抑制自噬过程会导致细胞不能立即对应激产生应答, 从而诱导凋亡。
	15,16-二氢丹参酮 I (丹参根)	通过蛋白酶体抑制诱导 UPR	
	氯喹	自噬抑制剂	
	自噬诱导剂		减少由 LOFU 引发的解折叠蛋白质应答并使细胞不那么

[0149]

			敏感。如果自噬被激活足够长的时间，就可以将细胞推向促凋亡状态。增加大自噬与增加的 UPR 的组合可以提供免疫学应答。
	雷帕霉素	mTOR 抑制剂	
	坦罗莫司	mTOR 抑制剂	
	4-O-羧甲基壳二 孢氯素	核激素受体 PPAR $\gamma$ 的激动 剂；ER 应激-诱 导的自噬和凋亡	
ER 应激诱导 剂			结合两种不同来源的 UPR 诱导剂可以为癌症杀伤提供累加效应。
	塞来昔布	Cox-2 抑制剂-通 过引起钙从 ER 向胞质溶胶中的 渗漏	
	维拉帕米	钙通道抑制剂	增强 ER 应激信号 传导
	利托那韦	抑制与蛋白酶体 抑制剂协同的蛋 白质降解	
	3-硫代脂肪酸 十四烷基硫代乙	ER 应激诱导剂	

[0150]

	酸		
	奈非那韦	调节 CHOP 表达	
破坏 DNA 结构/防止 DNA 合成			在 LOFU 损伤后抑制修复机制以阻止细胞修复。
	顺铂	诱导 ER 应激并损伤 DNA	
	吉西他滨	核苷类似物	
阻断蛋白质合成			
	salubrinal	eIF2a 磷酸酶抑制剂	
	环己酰亚胺		
增加死亡信号传导			
	TRAIL		
化学分子伴侣			
	4-苯基丁酸	拯救突变 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶表型的化学分子伴侣	
分子伴侣抑制剂			
	格尔德霉素	HSP90 抑制剂	
	17-烯丙基氨基-17-去甲氧基格尔	HSP90 抑制剂	

	德霉素 (17AAG)		
	17-二甲基氨基-乙 基氨基-17-去甲氧 基格尔德霉素 (17DMAG)	HSP90 抑制剂	
[0151]			
	阻断声孔修复		
	vacuolin	新发现的有机小 分子, 其阻断创 伤和 Ca <sup>2+</sup> 触发 的溶酶体与质膜 的融合	

[0152] 在所述方法的一个实施方案中,所述化疗药物是HSP90抑制剂。HSP90抑制剂的实例是17AAG (坦螺旋霉素或17-N-烯丙基氨基-17-去甲氧基格尔德霉素)。在一个实施方案中,化疗药物是烷化剂。在一个实施方案中,化疗药物是曲贝替定。在一个实施方案中,化疗药物是芥子气衍生物。在一个实施方案中,化疗药物是金属盐。在一个实施方案中,化疗药物是植物生物碱。在一个实施方案中,化疗药物是抗肿瘤抗生素。在一个实施方案中,化疗药物是抗代谢物。在一个实施方案中,化疗药物是拓扑异构酶抑制剂。在一个实施方案中,化疗药物是蛋白酶体抑制剂。在一个实施方案中,化疗药物是化学治疗性NSAID。在一个实施方案中,化疗药物是上文列出的其他抗肿瘤药之一。

[0153] 除非另有说明,否则本发明包含的化疗药物或药剂的其他非限制性实例包括蒽环类、美登木素生物碱、烷化剂、抗代谢物、植物生物碱或萜类和细胞毒性抗生素。在实施方案中,化疗剂是环磷酰胺、博来霉素、依托泊苷、铂剂(顺铂)、氟尿嘧啶、长春新碱、甲氨蝶呤、紫杉醇、表柔比星、甲酰四氢叶酸(亚叶酸)或伊立替康。

[0154] 本文包含的抗肿瘤免疫疗法(i)包括单克隆抗体(包括无修饰的、化学的、放射性的或毒素缀合的抗体和双特异性抗体),其相关的抗原结合片段,如由Fab或scFv片段组成的片段,其以高亲和力与癌症相关的生物分子靶标结合;(ii)对于肿瘤细胞和肿瘤细胞抗原是非特异性的;抗肿瘤免疫疗法,例如细胞因子、白细胞介素、干扰素、GM-CSF、有机小分子(例如1,500道尔顿或更小)或与细胞因子或细胞因子受体结合的其他药物;以及靶向检查点的物质,包括但不限于CTLA-4、PD-1、PDL-1和靶向免疫应答的其他有机小分子、肽和适体中的一种。在一个实施方案中,如本文所用的免疫疗法排除基于细菌的抗癌或抗肿瘤免疫疗法。在一个实施方案中,如本文所用的免疫疗法排除基于李斯特菌的免疫疗法。

[0155] 在一个实施方案中,提高治疗的疗效意味着相对于在不施加疗效提高方法的情况下用相同治疗量(例如给定的治疗剂量)所达到的程度,所获得的治疗效果程度增加。

[0156] 还提供了一种声激疗法装置,其包括:

[0157] 产生频率波形的控制系统;和

[0158] 一个或多个换能器,其被配置为在治疗区中产生1至1000W/cm<sup>2</sup>空间峰值时间平均声输出强度( $I_{spta}$ )的基于频率波形的超声,其中向治疗区连续施加超声0.5至5秒范围内的时间,其中超声频率在0.01至10MHz的范围内,并且其中任何波束的机械指数均小于4。

[0159] 在所述装置的一个实施方案中,所述一个或多个换能器中的每一个被配置为产生基于中心频率在0.05至5MHz范围内的频率波形且声输出强度为20-1000W/cm<sup>2</sup>的超声波束。

[0160] 在所述装置的一个实施方案中,所述一个或多个换能器中的每一个被配置为产生基于中心频率在0.5至1.5MHz范围内的频率波形且声输出强度为20-1000W/cm<sup>2</sup>的超声波束。

[0161] 在所述装置的一个实施方案中,每个换能器被配置为产生柱式超声,使得在治疗区中-3dB处的波束轮廓腰部不小于5mm。

[0162] 在所述装置的一个实施方案中,一个或多个波束在治疗期间机械地移动。

[0163] 在所述装置的一个实施方案中,所述一个或多个换能器包括两个或更多个换能器,所述两个或更多个换能器被配置为顺序地或同时运行,并且在治疗期内在治疗区中产生平均空间峰值为250W/cm<sup>2</sup>的超声。

[0164] 在所述装置的一个实施方案中,所述一个或多个换能器被配置为产生具有在10kHz至300kHz范围内的频率的超声。

[0165] 在所述设备的一个实施方案中,所述一个或多个换能器被配置为产生具有在300kHz至3MHz范围内的频率的超声。

[0166] 在所述装置的一个实施方案中,一个或多个换能器以300kHz至3MHz的频率运行,以及一个或多个换能器以30至300kHz之间的频率运行。

[0167] 在所述装置的一个实施方案中,两个或更多个超声换能器产生穿过治疗区的超声波束,其中每个波束在交叉区中具有10至500W/cm<sup>2</sup>范围内的 $I_{spta}$ 。

[0168] 在所述装置的一个实施方案中,所述治疗时间小于5秒/立方厘米肿瘤。

[0169] 在所述装置的一个实施方案中,两个换能器产生在治疗区内相交的超声波束,其中每个波束在交叉区中具有50至500W/cm<sup>2</sup>范围内的 $I_{spta}$ 。

[0170] 在所述装置的一个实施方案中,三个换能器产生穿过治疗区的超声波束,其中每个波束在交叉区中具有50至500W/cm<sup>2</sup>范围内的 $I_{spta}$ 。

[0171] 在所述装置的一个实施方案中,所述一个或多个换能器产生在治疗区内基本上彼此同相的超声波束。

[0172] 在所述装置的一个实施方案中,从单独的超声换能器发射出的两个超声波束基本上同相并在治疗区内相交,并且每个波束在交叉区中具有70至100W/cm<sup>2</sup>范围内的声功率空间峰值强度,并且连续施加所述超声1至5秒。

[0173] 在所述装置的一个实施方案中,从单独的超声换能器发射出的三个超声波束基本上同相并且在治疗区内相交,并且每个波束在交叉区中具有50至70W/cm<sup>2</sup>范围内的声功率空间峰值强度,并且连续施加所述超声1至5秒。

[0174] 在所述装置的一个实施方案中,源自单独的换能器的超声波束各自在治疗区中产生大约100至1000W/cm<sup>2</sup>范围内的 $I_{spta}$ 。

[0175] 在所述装置的一个实施方案中,至少一个换能器产生具有比治疗区大得多的高强

度直径的超声波束,并且将其定向使得治疗区完全在所述波束内。

[0176] 在所述装置的一个实施方案中,在两个或更多个超声波束交叉路径的情况下形成强治疗区,该强治疗区在垂直于所述传输能量方向上等于或大于约1cm,并且还在平行于所述传输方向上等于或大于约1cm。

[0177] 在所述装置的一个实施方案中,从每个换能器施加到治疗区的声压为0.1至10MPa。

[0178] 在所述装置的一个实施方案中,提供所述强超声治疗区的换能器的数目为1至1000个。

[0179] 在所述装置的一个实施方案中,在治疗时间期间连续施加来自所述一个或多个换能器的所述超声。

[0180] 在所述装置的一个实施方案中,所述超声是以1个打开时间单位至9个关闭时间单位的范围内的占空比产生的。

[0181] 在所述装置的一个实施方案中,所述换能器被配置为以单频音调或多频线性调频波来产生超声。

[0182] 在所述装置的一个实施方案中,所述一个或多个换能器在时间上顺序运行。

[0183] 在所述装置的一个实施方案中,在整个施加过程中向靶组织和靶组织周围所需的边缘递送的总能量大于向周围组织递送的总能量。在该装置的一个实施方案中,所述一个或多个换能器被配置为使得在施加期间扫描超声的频率。在该装置的一个实施方案中,所述一个或多个换能器包括二维相控阵列。在该装置的一个实施方案中,所述一个或多个换能器包括环形阵列。在该装置的一个实施方案中,所述一个或多个换能器包括三维相控阵列。在该装置的一个实施方案中,将所述一个或多个换能器结合到一个或多个内窥镜装置中。在该装置的一个实施方案中,将所述一个或多个换能器结合到磁共振成像机中。在该装置的一个实施方案中,将所述一个或多个换能器结合到放疗治疗机中。

[0184] 在所述装置的一个实施方案中,所述一个或多个换能器被配置为产生超声,使得在将超声施加于治疗区约2秒或更短的治疗期间,在治疗区中达到的最高温度低于45°C。在该装置的一个实施方案中,所述一个或多个换能器被配置为产生超声,使得在将超声施加于治疗区约2秒或更短的治疗期间,在治疗区中达到的最高温度低于50°C。

[0185] 在所述装置的一个实施方案中,所述一个或多个换能器被配置为产生超声,使得在将超声施加于治疗区约2秒或更短的治疗期间,在治疗区中达到的最高温度低于55°C。

[0186] 还提供了一种系统,其包括:

[0187] 声激疗法装置,其包括:

[0188] 产生频率波形的控制系统;和

[0189] 一个或多个换能器,其被配置为基于治疗区中产生1至1000W/cm<sup>2</sup>空间峰值时间平均声输出强度( $I_{spta}$ )的基于频率波形的超声,其中所述超声连续施加在0.5至5秒范围内的时间,并且其中超声频率在0.01至10MHz的范围内;

[0190] 放疗治疗机;以及

[0191] 控制系统,其可操作地配置为控制所述声激疗法装置和所述放疗治疗机,使得向受试者施用第一量的所述超声和第二量的放射疗法,其中所述第一量和第二量合起来足以治疗受试者的肿瘤。

[0192] 还提供了一种系统,其包括:

[0193] 声激疗法装置,其包括:

[0194] 产生频率波形的控制系统;和

[0195] 一个或多个换能器,其被配置为在治疗区中产生1至1000W/cm<sup>2</sup>空间峰值时间平均声输出强度( $I_{spta}$ )的基于频率波形的超声,其中所述超声连续施加在0.5至5秒范围内的时间,并且其中超声频率在0.01至10MHz的范围内;

[0196] 所述声激疗法装置与化学疗法联合使用,使得向受试者施用第一量的所述超声和第二量的所述化学疗法,其中所述第一量和第二量合起来足以治疗受试者的肿瘤。

[0197] 还提供了一种系统,其包括:

[0198] 声激疗法装置,包括:

[0199] 产生频率波形的控制系统;和

[0200] 一个或多个换能器,其被配置为在治疗区中产生1至1000W/cm<sup>2</sup>空间峰值时间平均声输出强度( $I_{spta}$ )的基于频率波形的超声,其中所述超声连续施加在0.5至5秒范围内的时间,并且其中超声频率在0.01至10MHz的范围内;

[0201] 所述声激疗法装置与免疫疗法联合使用,使得向受试者施用第一量的所述超声和第二量的所述免疫疗法,其中所述第一量和第二量合起来足以治疗受试者的肿瘤。

[0202] 通过以下实施例将会更好地理解本发明。然而,本领域技术人员将容易意识到,所讨论的具体方法和结果仅仅是对本发明的说明,本发明在随后的权利要求中更全面地描述。

[0203] 本发明提供了包括但不限于以下实施方式:

[0204] 1.一种提高受试者的化学疗法疗效的方法,包括向所述受试者施用(i)一定量的低强度聚焦超声(LOFU)和(ii)一定量的化疗药物,其中所述化疗药物在肿瘤细胞中实现内质网(ER)应激和/或解折叠蛋白质应答(UPR),其中所述(i)和(ii)的量合起来足以提高所述化学疗法的疗效。

[0205] 2.一种在受试者的预定体积的组织中提高化学疗法疗效的方法,该体积小于整个受试者,所述方法包括(i)向所述受试者施用一定量的化疗药物,其中所述化疗药物在肿瘤细胞中实现内质网(ER)应激和/或解折叠蛋白质应答(UPR),和(ii)向受试者中所述预定体积的组织施用一定量的低强度聚焦超声(LOFU),其中所述(i)和(ii)的量合起来足以在所述预定体积的组织内提高所述化学疗法的疗效。

[0206] 3.一种治疗受试者的肿瘤的方法,其中所述肿瘤对化疗药物具有抗性,所述方法包括:

[0207] 接受所述受试者具有肿瘤的鉴定,所述肿瘤对特定化疗药物有抗性;

[0208] 施用(i)一定量的低强度聚焦超声(LOFU)和(ii)一定量的所述特定化疗药物,

[0209] 其中,所述(i)和(ii)的量合起来足以治疗所述肿瘤。

[0210] 4.一种治疗受试者的化学抗性肿瘤的方法,其中所述肿瘤对先前施用的化疗药物具有化学抗性,所述方法包括:

[0211] 向所述受试者施用(i)一定量的低强度聚焦超声(LOFU)和(ii)一定量的所述化疗药物,

[0212] 其中所述(i)和(ii)的量合起来足以治疗所述化学抗性肿瘤。

- [0213] 5. 根据实施方式3或4所述的方法,其中所述化疗药物在肿瘤细胞中实现内质网(ER)应激和/或解折叠蛋白质应答(UPR)。
- [0214] 6. 根据实施方式3所述的方法,其中所述化疗药物先前已经多次施用于所述受试者,并且其中所述肿瘤已经在所述化疗药物的初始给药之后被诊断为对所述化疗药物具有抗性。
- [0215] 7. 根据实施方式4所述的方法,其进一步包括接受所述受试者具有肿瘤的鉴定,所述肿瘤对先前施用的化疗药物有化学抗性。
- [0216] 8. 根据实施方式1-7中任一项所述的方法,其中所述化疗药物在肿瘤细胞中实现UPR。
- [0217] 9. 根据实施方式1-7中任一项所述的方法,其中所述化疗药物在肿瘤细胞中实现ER应激。
- [0218] 10. 根据实施方式1-9中任一项所述的方法,其中所述(i)和(ii)的量合起来足以诱导肿瘤细胞的凋亡或增加肿瘤细胞的凋亡。
- [0219] 11. 根据实施方式1、2或8-10中任一项所述的方法,其中在不提高疗效的情况下单独施用的化疗药物的量是亚治疗剂量。
- [0220] 12. 一种治疗受试者的肿瘤的方法,其包括向所述受试者施用(i)一定量的低强度聚焦超声(LOFU)和(ii)一定量的化学疗法或一定量的放射疗法或一定量的免疫疗法,其中所述(i)和(ii)的量合起来足以治疗肿瘤。
- [0221] 13. 一种抑制受试者的肿瘤转移的方法,包括向患有肿瘤的受试者施用一定量的低强度聚焦超声(LOFU)和一定量的放射疗法,其中所述量合起来足以抑制受试者的肿瘤转移。
- [0222] 14. 根据实施方式12所述的方法,其中向所述受试者施用所述量的LOFU和所述量的放射疗法。
- [0223] 15. 根据实施方式12所述的方法,其中向所述受试者施用所述量的LOFU和所述量的化学疗法。
- [0224] 16. 根据实施方式12所述的方法,其中向所述受试者施用所述量的LOFU和所述量的免疫疗法。
- [0225] 17. 根据实施方式12、13或14所述的方法,其中所述放射疗法是消融性低分割放射疗法。
- [0226] 18. 根据实施方式1-17中任一项所述的方法,其中所施用的LOFU对准所述受试者中肿瘤的位置。
- [0227] 19. 一种减少治疗受试者的肿瘤所需的抗癌化学疗法的有效剂量的方法,包括向经受所述抗癌化学疗法的所述受试者施用一定量的低强度聚焦超声(LOFU),该量足以减少治疗肿瘤所需的所述抗癌化学疗法的有效剂量。
- [0228] 20. 根据实施方式1-19中任一项所述的方法,其中在所述化学疗法或所述放射疗法或所述免疫疗法之前或同时,向所述受试者施用所述低强度聚焦超声(LOFU)。
- [0229] 21. 根据实施方式12、13、14、17或18中任一项所述的方法,其中在施用所述放射疗法之前,向所述受试者施用所述LOFU。
- [0230] 22. 根据实施方式1-12、15、18或19中任一项所述的方法,其中在施用所述化学疗

法之前,向所述受试者施用所述LOFU。

[0231] 23.根据实施方式22所述的方法,其中所述化疗药物是HSP90抑制剂。

[0232] 24.根据实施方式1-23中任一项所述的方法,其中所述LOFU经由来自包括换能器的超声机器的超声波束来递送,并且所述机器和受试者被定位成使得所述肿瘤的至少一部分定位在所述换能器的焦点处。

[0233] 25.根据实施方式1-24中任一项所述的方法,其中将所述LOFU递送至所述肿瘤的至少一部分,并且经由成像技术来监测所述受试者的所述肿瘤的位置。

[0234] 26.根据实施方式25所述的方法,其中所述成像技术是磁共振成像。

[0235] 27.根据实施方式1-26中任一项所述的方法,其中所述LOFU在小于一小时的时间段内至少一次施用于所述肿瘤内的多个体积。

[0236] 28.根据实施方式1-27中任一项所述的方法,其中所述LOFU是非消融性的。

[0237] 29.根据实施方式1-28中任一项所述的方法,其中所述LOFU在其施用的组织中不引起空化。

[0238] 30.根据实施方式1-29中任一项所述的方法,其中所述LOFU的超声分量以0.5MHz至1.5MHz的频率施用。

[0239] 31.根据实施方式1-30中任一项所述的方法,其中所述LOFU施用1至3秒。

[0240] 32.根据实施方式1-31中任一项所述的方法,其中所述LOFU通过超声波束施用,使得在治疗区内,原位强度在所述受试者的1mm至75mm组织深度处为250W/cm<sup>2</sup>至750W/cm<sup>2</sup>。

[0241] 33.根据实施方式1-32中任一项所述的方法,其中所述LOFU在整个肿瘤体积上施用。

[0242] 34.根据实施方式1-33中任一项所述的方法,其中所述方法将300-3000焦耳/cc肿瘤范围内的能量递送至所述肿瘤。

[0243] 35.根据实施方式1-34中任一项所述的方法,其中不向所述受试者施用高强度聚焦超声(HIFU)。

[0244] 36.根据实施方式12-14、17、18、20、21或24-35中任一项所述的方法,其中所述量的放射疗法和所述量的LOFU的效果在治疗所述肿瘤时是协同的。

[0245] 37.一种使受试者的肿瘤对一定量的抗癌疗法变得敏感的方法,所述方法包括在所述抗癌疗法之前向所述受试者施用一定量的低强度聚焦超声(LOFU),该量有效地使受试者的肿瘤对一定量的抗癌疗法变得敏感。

[0246] 38.根据实施方式37所述的方法,其中所述抗癌疗法包括化学疗法,或放射疗法,或免疫疗法,或手术。

[0247] 39.根据实施方式37或38所述的方法,其进一步包括向所述受试者施用所述抗癌疗法。

[0248] 40.根据实施方式1-39中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

[0249] 41.根据实施方式1-40中任一项所述的方法,其中所述肿瘤是前列腺、乳房、鼻咽、咽、肺、骨、脑、唾液腺、胃、食道、睾丸、卵巢、子宫、子宫内膜、肝脏、小肠、阑尾、结肠、直肠、膀胱、胆囊、胰腺、肾、膀胱、宫颈、阴道、外阴、前列腺、甲状腺或皮肤、头或颈的肿瘤,神经胶质瘤或软组织肉瘤。

[0250] 42.根据实施方式41所述的方法,其中所述肿瘤是前列腺癌。

- [0251] 43. 根据实施方式13、17、18、20或24-35中任一项所述的方法,其中所述转移是肺转移。
- [0252] 44. 根据实施方式1-43中任一项所述的方法,其中用一装置施用所述LOFU,所述装置包括:
- [0253] 产生频率波形的控制系统;和
- [0254] 一个或多个换能器,其被配置为在治疗区中产生1至1000W/cm<sup>2</sup>空间峰值时间平均声输出强度( $I_{spta}$ )的基于频率波形的超声,其中超声连续地施加至所述治疗区0.5至5秒范围内的时间,其中超声频率在0.01至10MHz的范围内,并且其中任何波束的机械指数小于4。
- [0255] 45. 根据实施方式44所述的方法,其中所述一个或多个换能器中的每一个被配置为产生基于中心频率在0.05至5MHz范围内的频率波形且声输出强度为20-1000W/cm<sup>2</sup>的超声波束。
- [0256] 46. 根据实施方式44所述的方法,其中所述一个或多个换能器中的每一个被配置为产生基于中心频率在0.5至1.5MHz范围内的频率波形且声输出强度为20-1000W/cm<sup>2</sup>的超声波束。
- [0257] 47. 根据实施方式44所述的方法,其中每个换能器被配置为产生柱式超声,使得在治疗区中-3dB处的波束轮廓腰部不小于5mm。
- [0258] 48. 根据实施方式44所述的方法,其中一个或多个波束在治疗期间机械地移动。
- [0259] 49. 根据实施方式44所述的方法,其中所述一个或多个换能器包括两个或更多个换能器,所述两个或更多个换能器被配置为顺序地或同时运行,并且在治疗期内在治疗区中产生平均空间峰值为250W/cm<sup>2</sup>的超声。
- [0260] 50. 根据实施方式44所述的方法,其中所述一个或多个换能器被配置为产生具有在10kHz至300kHz范围内的频率的超声。
- [0261] 51. 根据实施方式44所述的方法,其中所述一个或多个换能器被配置为产生具有在300kHz至3MHz范围内的频率的超声。
- [0262] 52. 根据实施方式44所述的方法,其中一个或多个换能器以300kHz至3MHz的频率运行,以及一个或多个换能器以30至300kHz的频率运行。
- [0263] 53. 根据实施方式44所述的方法,其中两个或更多个超声换能器产生穿过治疗区的超声波束,其中每个波束在交叉区中具有10至500W/cm<sup>2</sup>范围内的 $I_{spta}$ 。
- [0264] 54. 根据实施方式53所述的方法,其中所述治疗时间小于5秒/立方厘米肿瘤。
- [0265] 55. 根据实施方式53所述的方法,其中两个换能器产生在治疗区内相交的超声波束,其中每个波束在交叉区中具有50至500W/cm<sup>2</sup>范围内的 $I_{spta}$ 。
- [0266] 56. 根据实施方式52所述的方法,其中三个换能器产生穿过治疗区的超声波束,其中每个波束在交叉区中具有50至500W/cm<sup>2</sup>范围内的 $I_{spta}$ 。
- [0267] 57. 根据实施方式44所述的方法,其中所述一个或多个换能器产生在所述治疗区内基本上彼此同相的超声波束。
- [0268] 58. 根据实施方式57所述的方法,其中从单独的超声换能器发射出的两个超声波束基本上同相并在治疗区内相交,并且每个波束在交叉区中具有70至100W/cm<sup>2</sup>范围内的声功率空间峰值强度,且连续施加所述超声1至5秒。
- [0269] 59. 根据实施方式57所述的方法,其中从单独的超声换能器发射出的三个超声波

束基本上同相并在治疗区内相交,并且每个波束在交叉区中具有50至70W/cm<sup>2</sup>范围内的声功率空间峰值强度,且连续施加所述超声1至5秒。

[0270] 60.根据实施方式44所述的方法,其中源自单独的换能器的超声波束各自在所述治疗区中产生大约100至1000W/cm<sup>2</sup>范围内的 $I_{spta}$ 。

[0271] 61.根据实施方式44所述的方法,其中至少一个换能器产生具有比所述治疗区大得多的高强度直径的超声波束,并且将其定向为使得所述治疗区完全在所述波束内。

[0272] 62.根据实施方式44所述的方法,其中在两个或更多个超声波束交叉路径的情况下形成强治疗区,所述强治疗区在垂直于传输能量方向上等于或大于约1cm,并且还在平行于所述传输方向上等于或大于约1cm。

[0273] 63.根据实施方式44所述的方法,其中从每个换能器施加到治疗区的声压为0.1至10MPa。

[0274] 64.根据实施方式44所述的方法,其中提供所述强超声治疗区的换能器的数目为1至1000个。

[0275] 65.根据实施方式44所述的方法,其中在治疗时间期间连续施加来自所述一个或多个换能器的超声。

[0276] 66.根据实施方式44所述的方法,其中所述超声是以1个打开时间单位至9个关闭时间单位的范围内的占空比产生的。

[0277] 67.根据实施方式44所述的方法,其中所述换能器被配置为以单频音调或多频线性调频波来产生超声。

[0278] 68.根据实施方式44所述的方法,其中所述一个或多个换能器在时间上顺序运行。

[0279] 69.根据实施方式44所述的方法,其中在整个施加过程中向靶组织和靶组织周围的所需边缘递送的总能量大于向周围组织递送的总能量。

[0280] 70.根据实施方式44所述的方法,其中所述一个或多个换能器被配置为使得在施加期间扫描超声的频率。

[0281] 71.根据实施方式44所述的方法,其中所述一个或多个换能器包括二维相控阵列。

[0282] 72.根据实施方式44所述的方法,其中所述一个或多个换能器包括环形阵列。

[0283] 73.根据实施方式44所述的方法,其中所述一个或多个换能器包括三维相控阵列。

[0284] 74.根据实施方式44所述的方法,其中将所述一个或多个换能器结合到一个或多个内窥镜装置中。

[0285] 75.根据实施方式44所述的方法,其中将所述一个或多个换能器结合到磁共振成像机中。

[0286] 76.根据实施方式44所述的方法,其中将所述一个或多个换能器结合到放疗治疗机中。

[0287] 77.根据实施方式44所述的方法,其中所述一个或多个换能器被配置为产生超声,使得在将超声施加于所述治疗区约2秒或更短的治疗期间,在所述治疗区中达到的最高温度低于45°C。

[0288] 78.根据实施方式44所述的方法,其中所述一个或多个换能器被配置为产生超声,使得在将超声施加于所述治疗区约2秒或更短的治疗期间,在所述治疗区中达到的最高温度低于50°C。

[0289] 79. 根据实施方式44所述的方法, 其中所述一个或多个换能器被配置为产生超声, 使得在将超声施加于所述治疗区约2秒或更短的治疗期间在所述治疗区中达到的最高温度低于55°C。

[0290] 80. 一种系统, 其包括:

[0291] 声激疗法装置, 其包括:

[0292] 产生频率波形的控制系统; 和

[0293] 一个或多个换能器, 其被配置为在治疗区中产生1至1000W/cm<sup>2</sup>空间峰值时间平均声输出强度 ( $I_{spta}$ ) 的基于频率波形的超声, 其中所述超声连续地施加0.5至5秒范围内的时间, 并且其中超声频率在0.01至10MHz的范围内;

[0294] 放疗治疗机; 以及

[0295] 控制系统, 其可操作地配置为控制所述声激疗法装置和所述放疗治疗机, 使得向受试者施用第一量的所述超声和第二量的放射疗法, 其中所述第一量和第二量合起来足以治疗受试者的肿瘤。

[0296] 81. 根据实施方式12-14、17、18、20、21、24、25、36或37-43中任一项所述的方法, 其中所述LOFU和放射疗法通过以下系统施用, 所述系统包括:

[0297] LOFU装置, 其包括:

[0298] 产生频率波形的控制系统; 和

[0299] 一个或多个换能器, 其被配置为在治疗区中产生1至1000W/cm<sup>2</sup>空间峰值时间平均声输出强度 ( $I_{spta}$ ) 的基于频率波形的超声, 其中所述超声连续地施加0.5至5秒范围内的时间, 并且其中超声频率在0.01至10MHz的范围内;

[0300] 放疗治疗机; 以及

[0301] 控制系统, 其可操作地配置为控制所述LOFU装置和所述放疗治疗机, 使得向受试者施用第一量的所述超声和第二量的放射疗法, 其中所述第一量和第二量合起来足以治疗受试者的肿瘤。

[0302] 82. 一种系统, 其包括:

[0303] 声激疗法装置, 其包括:

[0304] 产生频率波形的控制系统; 和

[0305] 一个或多个换能器, 其被配置为在治疗区中产生1至1000W/cm<sup>2</sup>空间峰值时间平均声输出强度 ( $I_{spta}$ ) 的基于频率波形的超声, 其中所述超声连续地施加0.5至5秒范围内的时间, 并且其中超声频率在0.01至10MHz的范围内;

[0306] 所述声激疗法装置与化学疗法联合使用, 使得向受试者施用第一量的所述超声和第二量的所述化学疗法, 其中所述第一量和第二量合起来足以治疗受试者的肿瘤。

[0307] 83. 一种系统, 其包括:

[0308] 声激疗法装置, 其包括:

[0309] 产生频率波形的控制系统; 和

[0310] 一个或多个换能器, 其被配置为在治疗区中产生1至1000W/cm<sup>2</sup>空间峰值时间平均声输出强度 ( $I_{spta}$ ) 的基于频率波形的超声, 其中所述超声连续地施加0.5至5秒范围内的时间, 并且其中超声频率在0.01至10MHz的范围内;

[0311] 所述声激疗法装置与免疫疗法联合使用, 使得向受试者施用第一量的所述超声和

第二量的所述免疫疗法,其中所述第一量和第二量合起来足以治疗受试者的肿瘤。

#### [0312] 实施例1

[0313] B16黑素瘤肿瘤抑制肿瘤特异性CD4+T细胞产生IL-2和IFN  $\gamma$ :为了确定黑素瘤细胞如何调节肿瘤诱导的效应CD4+T细胞应答,使用三种不同的小鼠模型。首先,在C57B1/6J小鼠中通过在腰肋部皮下注射B16细胞诱发B16-F1黑素瘤肿瘤。使肿瘤生长至7-8mm大小,并且随后从同侧腹股沟引流淋巴结(DLN)和远侧对侧非引流宫颈淋巴结(NDLN)二者中分离CD4+T细胞。还从没有携带任何肿瘤的对照小鼠中获得T细胞。当用抗CD3和抗CD28抗体离体刺激时,从肿瘤DLN分离的CD4+T细胞产生的IL-2显著少于从同一小鼠的远侧对侧NDLN或从对照无肿瘤小鼠的淋巴节分离的细胞产生的IL-2,这支持先前关于鼠黑素瘤中肿瘤抗原特异性T细胞耐受性的报道(18,21)。对于IFN  $\gamma$ 也观察到类似但不太明显的效果(图1A和B)。

[0314] 为了证实这些数据,使用已经稳定转染以表达OVA作为替代肿瘤抗原的B16-F1黑素瘤细胞系。将这些细胞皮下注射至OT-II小鼠中,该OT-II小鼠是具有表达识别OVA323-339肽的转基因MHC II类限制性TCR的T细胞的小鼠品系。如上所述从这些小鼠中收集T细胞,并用负载有OVA323-339肽的脾细胞离体刺激。与来自对侧NDLN或来自无肿瘤小鼠的细胞相比,来自同侧DLN的CD4+T细胞再次产生显著减少量的IL-2和IFN  $\gamma$ (图1C和1D)。

[0315] 采用Tyrep1小鼠在第三个模型中进一步证实了这些结果,该小鼠缺乏酪氨酸酶相关蛋白1并且携带表达对该内源性黑素细胞分化抗原的TRP-1113-127肽特异性的MHC II类限制性TCR的T细胞。给这些小鼠注射B16-F1细胞。如先前的两个模型一样,从同侧DLN收获的CD4+T细胞产生的IL-2和IFN  $\gamma$ 与从对侧NDLN或从无肿瘤小鼠收获的细胞相比显著减少。(图1E和1F)。总而言之,这些结果支持黑素瘤肿瘤在肿瘤抗原特异性CD4+T细胞中诱导低反应性,这表明在再刺激时产生效应细胞因子的能力降低。

[0316] 用LOFU治疗原发性B16黑素瘤克服了肿瘤诱导的CD4+T细胞耐受性:HIFU目前主要用于通过在肿瘤组织内产生大量热量导致凝固性坏死来导致肿瘤消融。虽然HIFU是实现局部肿瘤控制的非常有效的、非侵入性消融过程,但它几乎瞬间破坏脉管系统和组织基础结构,从而限制树突细胞和免疫细胞的浸润以用于抗原呈递和识别。探究施用LOFU是否能够在肿瘤组织中诱导可以产生新的肿瘤抗原并且/或者诱导应激诱导蛋白质表达的非致死性热/机械应激,这可以增加肿瘤的免疫原性并克服肿瘤诱导的CD4+T细胞的耐受性。为了检查这种可能性,在单独的各组C57B1/6J小鼠上生长的原发性B16-F1黑素瘤肿瘤未经治疗或者用LOFU治疗。LOFU治疗后36小时,从两组小鼠中分离出DLN和NDLN驻留CD4+T细胞,并用抗CD3和抗CD28抗体离体再刺激。与从具有未治疗的肿瘤的小鼠组获得的细胞相比,来自LOFU治疗的小鼠的DLN的CD4+T细胞产生明显更多的IL-2。相反,在治疗和未经治疗的小鼠中,来自相应NDLN的T细胞产生可比较量的IL-2(图2A)。在这些相同的实验组小鼠中观察到对IFN  $\gamma$ 产生的类似但较不明显的作用(图2B)。总的来说,这些结果表示LOFU治疗B16黑素瘤肿瘤似乎增强了CD4+T细胞,从而克服由黑素瘤肿瘤微环境诱导的低反应状态,表明活化改善且肿瘤诱导的T细胞耐受性降低。

[0317] 先前已表明,黑素瘤肿瘤可以诱导NFAT1依赖性基因表达程序,该程序产生一组干扰TCR信号传导并直接抑制细胞因子表达的蛋白质,导致在CD4+T细胞中建立功能性无反应性(21)。为了确定LOFU治疗通过防止无反应性诱导来抑制肿瘤诱导的T细胞耐受性和LOFU治疗造成用LOFU治疗后在DLN驻留CD4+T细胞中观察到的细胞因子表达增加的可能性,首先

监测从携带B16肿瘤的小鼠的DLN中分离的CD4+T细胞中那些无反应性相关基因的表达,并与从相同小鼠的NDLN收获的T细胞中那些基因的表达进行比较。来自荷瘤小鼠的DLN的T细胞表达更高水平的无反应性相关基因,包括E3泛素连接酶Grail、Cbl-b和Itch以及转录因子Egr2(图2C)。然而,在荷瘤小鼠中的DLN和NDLN T细胞之间观察到Foxp3的表达没有差异,表明在本研究中使用的条件下,调节性T细胞的存在增加不可能对CD4+T细胞应答降低有贡献(图2C)。

[0318] 然后确定用LOFU治疗B16黑色素瘤是否会对T细胞中那些无反应性相关基因的表达产生影响。为了评估由内源性肿瘤抗原诱导的应答,在Typr1小鼠上生长的B16肿瘤未经治疗或者用LOFU治疗。从DLN和NDLN中分离CD4+T细胞,并评估几种无反应性相关基因的表达。来源于DLN的T细胞显示出所分析的7个无反应性基因中的6个(包括Grail、Itch和Cblb,以及转录因子Egr2和Grg4和蛋白酶胱天蛋白酶3(Caspase3))的不同程度的上调(图2D)。另一种在几种体外和体内T细胞无反应性模型中也上调的转录因子Ikaros在这种肿瘤诱导的无反应性的黑色素瘤模型中未显著上调,并且其水平在DLN和NDLN来源的T细胞中保持大致相似(图2D)。有趣的是,当用LOFU治疗肿瘤时,从DLN分离的T细胞中,那些基因中的5个(Grail、Itch、Cblb、Egr2和Grg4)的表达未上调,并且表现出与这些基因在NDLN中的表达相当的水平(图2D),从而支持LOFU治疗抑制肿瘤抗原特异性CD4+T细胞中无反应性诱导基因表达的诱导。

[0319] LOFU治疗的黑色素瘤肿瘤能够重新激活无反应性肿瘤抗原特异性T细胞:结果支持在LOFU治疗后可以克服肿瘤诱导的T细胞耐受性。以下事实证实了这一观察结果:在LOFU治疗肿瘤部位后,在来自肿瘤DLN的T细胞中,几种无反应性相关基因的表达降低,而活化诱导的细胞因子表达恢复至接近于从远侧NDLN分离的T细胞中或从对照无瘤小鼠分离的T细胞中所检测到的水平。

[0320] 研究了LOFU是否不仅可以阻止肿瘤抗原特异性T细胞无反应性的诱导,而且可以逆转已建立的无反应性,并在先前耐受的T细胞中产生有效的效应物应答。从Typr1小鼠的脾脏和淋巴结中分离幼稚CD4+T细胞,体外分化成TH1细胞,并且通过在不存在共刺激的情况下使用抗CD3抗体进行部分刺激来激活它们而成为无反应性的。正如预期的那样,T细胞变为低反应性,并且在用抗CD3和抗CD28抗体再刺激时显示出IL-2产生的大幅度降低(图3A)。然后将这些无反应性细胞用负载有源自未治疗或LOFU治疗的黑色素瘤肿瘤的裂解物的CD11c+树突细胞重新激活。正如预期的那样,用负载有来自未治疗的B16-F1黑色素瘤的肿瘤裂解物的树突细胞刺激的无反应性Typr1 T细胞产生可忽略量的IL-2。然而,当树突细胞负载由LOFU治疗的肿瘤制备的肿瘤裂解物时,先前无反应性的T细胞比未经治疗的裂解物激活的T细胞产生显著更多的IL-2(图3B)。这些结果表明,LOFU治疗黑色素瘤肿瘤可能导致产生免疫原性分子,这些分子使得树突细胞能够传递可破坏耐受性的激活信号,在其他方面使得无反应性T细胞能够对抗原重新遭遇作出反应并产生有效应答。

[0321] 用LOFU治疗黑色素瘤诱导分子伴侣蛋白钙网蛋白和Hsp70在黑色素瘤细胞中的表达和亚细胞分布的变化:由树突细胞激活黑色素瘤特异性T细胞是决定其命运的关键事件。能够引发效应T细胞应答的成功的抗原呈递事件严格地依赖于否则会递送致耐受刺激的树突细胞的活化状态。结果表明,用LOFU治疗黑色素瘤肿瘤导致CD4+T细胞活化增加,这是阻碍肿瘤诱导的T细胞耐受性的结果。这可能是由于产生更多的免疫原性树突细胞群体而造成的。为了

检测LOFU对树突细胞向T细胞有效呈递抗原的能力的影响,首先从未经治疗或用LOFU治疗的荷瘤小鼠的DLN中分离总细胞,并通过流式细胞术进行免疫染色以测定B7.1、B7.2和MHCII在CD11c+树突细胞群体上的表达。检测到LOFU治疗的小鼠中这些蛋白质的表达没有显著增强(图4A)。

[0322] 通过包括钙网蛋白和Hsp70在内的分子伴侣来运输肿瘤抗原对于随后将抗原有效呈递给T细胞也是至关重要的(32-35)。采用体内和体外方法来检测未经治疗和用LOFU治疗的B16黑素瘤肿瘤中的膜钙网蛋白和Hsp70。从荷瘤小鼠收获未经治疗或用LOFU治疗的肿瘤,制成单细胞悬浮液,并用活/死标记物染色以评估细胞活力。未观察到响应于LOFU治疗的细胞活力的差异,这支持FUS的低能量形式不直接诱导肿瘤细胞死亡的观点(图4B)。B16黑素瘤肿瘤不进行治疗或暴露于LOFU治疗,并将肿瘤组织切片置于载玻片上。将载玻片用抗Hsp70或抗钙网蛋白抗体进行染色,随后用免疫荧光检测。LOFU治疗的黑素瘤的免疫荧光分析证实LOFU诱导Hsp70表达增加(图4C)。有趣的是,与未经处理的细胞相比,LOFU处理的细胞也显示钙网蛋白分布的变化,其似乎在B16细胞上的质膜非连续区域中积累(图4C)。为了确定Hsp70表达的增加是否也与该蛋白在膜中的存在增加相关,在通过FACS评估LOFU治疗后,对未透化的CD45-TRP-1+B16黑素瘤细胞进行针对Hsp70和细胞表面表达的染色。该分析证实LOFU治疗B16黑素瘤导致肿瘤细胞中Hsp-70的膜存在增加(图4D)。

[0323] LOFU治疗黑素瘤肿瘤增强树突细胞介导的肿瘤抗原呈递,从而引发更强的CD4+T细胞应答:为了确定LOFU治疗肿瘤可能导致驻留树突细胞的刺激能力增强的可能性,直接测试由LOFU治疗的肿瘤制备的裂解物是否可以引发抗原特异性T细胞的引发增强,从而导致更强的效应物应答。对于该实验,使用B16-F1-OVA黑素瘤细胞在C57BL/6小鼠中诱发肿瘤。从未治疗和LOFU治疗的肿瘤制备裂解物。分别从C57BL/6和OT-II无瘤小鼠中分离脾树突细胞和应答幼稚CD4+T细胞,并在存在或不存在上述不同肿瘤裂解物的情况下共培养。尽管含有OVA的肿瘤裂解物可以充当肿瘤抗原的来源以引发应答T细胞,但是还添加了外源性OVA323-339肽以确保树突细胞在所有条件下均匀负载该肽,并且更准确地确定不同肿瘤裂解物的致耐受性或活化性质。

[0324] 正如预期的那样,当用负载有OVA323-339肽的树突细胞激活时,对照应答OT-II T细胞显示出强应答,IL-2产生水平升高。然而,即使向培养物中添加外源性OVA323-339肽,从未经治疗的肿瘤获得的裂解物也明显地抑制OT-II应答并导致IL-2产生的大幅度降低(图5A)。有趣的是,与未经治疗的裂解物相反,来源于LOFU治疗的肿瘤的裂解物不仅对OT-II细胞对OVA323-339的应答没有负面影响,而且还能够甚至在没有外源性肽的情况下引发OT-II应答T细胞的强烈激活(图5A)。这些结果进一步支持了LOFU治疗B16黑素瘤肿瘤阻止对肿瘤微环境中正常发生的树突细胞的T细胞引发能力的负面影响的观察结果。

[0325] 接下来确定肿瘤DLN驻留抗原呈递细胞在LOFU治疗黑素瘤肿瘤后是否会在功能上更有效地激活靶T细胞。为此,在C57BL/6小鼠上诱发B16-F1黑素瘤,并使其不经治疗或用LOFU治疗。使DLN细胞悬浮液耗尽T细胞,并用于测试DLN抗原呈递细胞激活肿瘤抗原特异性T细胞的能力。因此将T细胞耗尽的DLN细胞与幼稚Tyrp1CD4+T细胞和从B16体外培养物制备的裂解物共培养24小时。通过ELISA测量IL-2产生以监测应答T细胞引发。与从未治疗的小鼠中分离的细胞相比,从LOFU治疗的荷瘤小鼠的DLN中分离的细胞显示出激活Tyrp1 CD4+T细胞的能力显著增加(图5B)。这些数据支持LOFU治疗B16黑素瘤导致在功能上更有效地激

活肿瘤抗原应答T细胞的抗原呈递细胞的产生。

[0326] LOFU后通过低分割IGRT进行肿瘤消融导致原发性黑素瘤病变的T细胞介导的控制增强:为了进一步确定我们的观察结果,即LOFU疗法可调节肿瘤免疫原性并增强抗肿瘤免疫应答,使用LOFU与肿瘤消融的组合或不与其组合对位于右背侧后肢皮下的已确立B16-M1肿瘤进行评估原发性肿瘤控制的一系列体内治疗策略,所述肿瘤消融采用每日10Gy低分割IGRT至每只小鼠30Gy的总剂量。当肿瘤体积达到约 $50\text{mm}^3$ 时,对所有小鼠开始治疗。然后每周三次测量每组中的肿瘤体积,持续至多62天(图6A)。未经治疗的C57BL/6或单独用LOFU治疗的小鼠继续经历快速的原发性肿瘤生长,在治疗10天内达到 $\geq 300\text{mm}^3$ 的体积,此时进行膝下截肢(BKA)(图6A)。相反,低分割IGRT或LOFU+IGRT组中的小鼠在治疗后经历最长达3周的显著的生长延迟,之后单独用IGRT治疗的小鼠开始显示原发性肿瘤再生长,在大约5周时达到 $\geq 300\text{mm}^3$ 的体积。值得注意的是,LOFU+IGRT组中的小鼠具有持续的应答,治疗后肿瘤生长受限超过6周。接受LOFU+IGRT或IGRT的组与未经治疗或单独LOFU组相比,肿瘤体积的减小在第25天有统计学显著性( $P<0.05$ )。此外,LOFU+IGRT组与单独IGRT组相比,肿瘤体积的减小在第35天具有统计学显著性,并且在实验持续期间保持统计学显著性( $P<0.05$ )。(图6A)。另外,LOFU+IGRT组的小鼠显示出从其基线量度的肿瘤消退,并且5只小鼠中有4只出现了完全的无肿瘤反应。

[0327] 为了证实LOFU的免疫调节作用,使用免疫受损的BALB/c裸鼠模型进行了类似的实验。在这些小鼠中,B16-M1肿瘤生长得快得多,比C57BL/6小鼠早约1周达到 $\geq 300\text{mm}^3$ 。整体治疗反应相似,其中未经治疗和单用LOFU导致没有显著的原发性肿瘤控制,而IGRT和LOFU+IGRT延迟了原发性肿瘤生长(图6B)。然而,在IGRT和LOFU+IGRT治疗二者中,原发性控制是短暂的。事实上,IGRT组在开始治疗后不到2周需要BKA,而在LOFU+IGRT组中则不到3周需要BKA。此外,与单独的IGRT相比,免疫受损小鼠中的LOFU+IGRT未能带来统计学显著的原发性肿瘤控制(图6B)。

[0328] LOFU后进行低分割IGRT导致无复发存活期延长和肺转移减少:基于该数据,假设LOFU诱导的增强的抗肿瘤T细胞应答可以增强治疗性IGRT,不仅实现对局部疾病的更好的控制,而且实现对微观疾病和远端转移的更好控制。由于B16-F10是侵袭性细胞系,如果不治疗,其迅速生长到不可接受的大小,因此原发性肿瘤 $>300\text{mm}^3$ 的小鼠需要BKA。值得注意的是,在施行BKA时,来自原发性肿瘤细胞已经扩散到引流淋巴结(LN)(数据未显示)。在随后的几周内,引流淋巴结迅速增长并明显增大,而更远端腹股沟淋巴结变得明显可触知。当肿瘤达到这一点时,没有可以执行的程序来缓解不适,于是对这些小鼠施以安乐死。因此,在肿瘤负荷大的小鼠中,不能充分评估整体存活率。因此,决定评估另外两个参数:无复发存活率,其中自发性死亡或具有过度局部复发肿瘤负荷的安乐死动物被评为阳性事件;和肺转移的发展。

[0329] 在C57BL/6小鼠中,与单独治疗相比,LOFU+IGRT的组合提供了统计学显著的( $P=0.04$ )无复发存活率优势(图6C)。值得注意的是,在除C57BL/6LOFU+IGRT外的所有组中,局部转移到引流淋巴结或腹股沟淋巴结常常需要使用安乐死。此外,用LOFU+IGRT治疗的小鼠显示出对肺转移的严格控制,而在其他三组中,即使是局部复发相对较少的动物也最终死于过度肺转移(图6D)。

[0330] 讨论

[0331] 适应性免疫系统不断监查恶性转化细胞。这在很大程度上是通过识别引发适当T

细胞组库 (repertoire) 来建立抗肿瘤免疫应答的肿瘤相关抗原而实现的。然而,肿瘤也采用不同的机制来避开适应性免疫系统并阻止抗肿瘤T细胞应答 (1)。因此,成功的抗癌疗法必须克服肿瘤诱导的耐受性的主要障碍 (36)。已经描述了几种机制来解释肿瘤如何诱导不同T细胞亚型中的耐受性,包括肿瘤抗原的呈递缺陷和抗原呈递细胞的不充分激活,通过共抑制受体的信号传导,肿瘤微环境中释放的因子引起的免疫抑制和抑制细胞的局部募集 (9,15-17,20,37-39)。促进癌细胞的免疫原性细胞死亡 (ICD) 的治疗可以减轻并驱动耐受性的逆转。ICD的特征包括损伤相关分子模式 (DAMP) 的释放、某些分子伴侣复合物向细胞表面的转位和增加的树突细胞介导的肿瘤相关抗原的交叉呈递 (40)。在本研究中,试图研究使用非消融LOFU对黑素瘤的新型治疗是否会导致防止、逆转或减轻肿瘤诱导的耐受性,并因此导致抗肿瘤免疫应答的增强。

[0332] 热消融HIFU虽然能够控制原发性肿瘤,但通常不能有效地阻止周围或远处组织的微转移侵袭,这表明由该FUS形式引起的细胞死亡不能充分引发适应性抗肿瘤免疫应答。事实上,局部或远处的微转移侵袭可以通过充分引发的免疫系统来预防或改善,该免疫系统可以消除逃脱初始消融治疗的细胞的相对较小的肿瘤负荷。在本研究中,我们使用B16鼠黑素瘤模型显示出使用非消融LOFU治疗通过克服肿瘤微环境的耐受性效应而增强T细胞效应物应答,并且在消融治疗之前施用阻止局部复发和远端转移。

[0333] 已经描述了在几种小鼠肿瘤模型和人类癌症的T细胞中对肿瘤抗原的T细胞低反应性的发展 (15,18,41)。该实验室以前曾报道,肿瘤抗原特异性CD4<sup>+</sup>T细胞在荷瘤小鼠中变得无反应性,并且表达一系列的无反应性相关基因,已证明这些基因阻碍其增殖和产生效应细胞因子的能力 (21,42)。此外,在缺乏NFAT1或Egr2 (两种负责无反应性诱导基因表达的转录因子 (43-45)) 的小鼠中阻止这些基因的表达导致抑制肿瘤抗原特异性T细胞低反应性并提高对局部肿瘤生长的控制 (19,21)。使用两种不同的B16小鼠黑素瘤模型,数据证实肿瘤DLN中驻留的肿瘤抗原特异性CD4<sup>+</sup>T细胞上调包括Grail、Itch、Cblb、Grg4和Egr2在内的无反应性相关基因的表达。该基因表达程序的激活与离体再刺激后产生细胞因子的能力降低非常相关,这支持了B16黑素瘤在肿瘤抗原特异性CD4<sup>+</sup>T细胞中诱导低反应性的固有状态。重要的是,用LOFU治疗原发性肿瘤导致那些肿瘤抗原特异性CD4<sup>+</sup>T细胞在再刺激时产生细胞因子的能力增加。FUS诱导对TCR接合的反应性恢复,在另外的无反应性细胞中伴随着不同程度的大部分无反应性诱导基因表达的减少。然而,荷瘤小鼠中DLN驻留CD4<sup>+</sup>T细胞中缺乏FUS诱导的Foxp3转录物变化表明,FUS不影响Foxp3<sup>+</sup>Treg迁移或分化,并且支持LOFU通过抑制T细胞无反应性来阻止肿瘤诱导的耐受性。

[0334] 对肿瘤诱导的T细胞无反应性的初步研究确定了抗原呈递细胞在该过程中发挥的关键作用,并且已经将有缺陷的树突细胞成熟定义为肿瘤抗原特异性T细胞的低效引发的主要决定因素 (20,46)。最近,已经表明在T细胞和呈递肿瘤抗原的树突细胞之间形成的不稳定的免疫突触导致NFAT的核输出延迟和包括Egr2的基因表达的致耐受性NFAT依赖性程序的可能激活 (47)。在LOFU治疗B16黑素瘤之后T细胞活化的增加可能由几种不同的现象引起。首先,用LOFU治疗肿瘤给肿瘤细胞提供热应激和机械应激两者。这种应激可以帮助产生新颖独特的“非自身”肿瘤抗原,该抗原进而可以使肿瘤更具免疫原性,并且不能诱导耐受性。备选地或另外地,由肿瘤细胞释放应激诱导的危险信号可产生肿瘤微环境,其中靶向树突细胞将不太有利于诱导T细胞的耐受性。包括热休克蛋白和钙网蛋白在内的应激相关分

子伴侣与树突细胞成熟和抗肿瘤免疫性增强有关(32,48-51)。有证据表明,原发性肿瘤裂解物富含热休克蛋白,热休克蛋白可触发树突细胞中的成熟信号(52)。重要的是,热休克蛋白也能够与来自肿瘤细胞的抗原肽结合并将其递送至树突细胞,而且它们在肿瘤细胞质膜中的存在与免疫应答增加相关(53-55)。钙网蛋白也被描述为在抗肿瘤应答中起重要作用,并且其向肿瘤细胞表面的转位与树突细胞引起的细胞吞噬作用增加以及免疫激活相关(56,57)。以前在鼠腺癌模型中使用HIFU的研究表明,这种治疗显著增加了树突细胞上的共刺激分子的表达,树突细胞也产生更高水平的IL-12并导致CTL活性增加(58,59)。数据显示,LOFU诱导B16细胞中钙网蛋白的再分布和诱导型热休克蛋白Hsp70的表达增加,表明由LOFU介导的细胞应激能够诱导这些应激诱导蛋白质的表达的变化。虽然检测到MHC-II或B7蛋白质表达没有显著差异,但是不能排除LOFU也可能诱导树突细胞功能的其他变化,该功能可能有助于增强肿瘤抗原的有效呈递。在任何情况下,数据支持由LOFU引起的热/机械应激可能是增强的肿瘤免疫原性和促进T细胞活化而不是无反应性的原因。

[0335] 由肿瘤抗原诱导的T细胞耐受性仍然是治疗癌症的主要障碍。有效逆转肿瘤特异性T细胞的耐受性是临床抗肿瘤策略的关键目标。我们的数据发现,在T细胞中预先确立的无反应性可以通过由LOFU治疗的黑素瘤肿瘤制备的裂解物来逆转。这一发现开辟了以下可能性:LOFU治疗肿瘤可以从肿瘤细胞中释放出新的免疫原性分子,其不仅可以预防而且可以逆转T细胞中预先确立的肿瘤耐受性。早已知道通过IL-2受体的信号传导能阻止和逆转T细胞中的克隆无反应性(60-62)。然而,在任何未经治疗或用LOFU治疗的裂解物中不能检测到IL-2量升高(数据未显示),使IL-2的存在不太可能成为在实验中引起无反应性逆转的候选物。然而,其他因素可能会导致这种表型。事实上,通过TNFR家族成员OX-40配体的T细胞共刺激还显示除了增加CD4+和CD8+T细胞二者中的效应物应答之外,还防止并克服T细胞无反应性(63-65)。也已经报道了CD137、CD40的接合和PD1的阻断在体内能防止并逆转预先确立的CD8+T细胞耐受性(66-68)。

[0336] 在使用低分割IGRT进行消融疗法之前用LOFU预处理黑素瘤肿瘤导致肿瘤生长的显著延迟,并且在几种情况下,仅在免疫活性小鼠中观察到肿瘤的完全消退。该方案后,这些小鼠的无复发存活率也明显改善。另外,与仅接受消融IGRT的小鼠相比,在肿瘤消融之前接受LOFU的小鼠中肺转移的发生率是最低的。引人注目的是,当对T细胞缺陷的裸鼠进行类似的实验时,LOFU未能赋予类似的保护。这一观察表明,LOFU的保护作用不仅限于控制原发性肿瘤,而且可以预防局部或远端转移灶的建立。这种对转移的预防可能是由T细胞对肿瘤抗原的耐受性的防止/逆转或两者造成的。LOFU预处理不仅更有效地控制肿瘤生长,而且如前所述,可能导致产生强免疫原性的IGRT诱导的肿瘤死亡,其提供对转移的预防并确保更长的无复发存活期。

[0337] 防止T细胞对内源性肿瘤抗原的耐受性对于治疗癌症是极其重要的。本文的工作表明,用LOFU治疗原发性肿瘤可以实现这一点,使其成为开发原位自体肿瘤疫苗的候选疗法。实体瘤的FUS治疗,与消融方法联合,可以证明能增强原发性肿瘤根除的疗效以及预防转移。

[0338] 方法和材料

[0339] 小鼠:6-8周龄的C57BL/6,B6.Cg-Rag1tm1MomTyrrp1B-wTg(TcraTcrb)9Rest/J(Tyrrp1)和B6.Cg-Tg(TcraTcrb)425Cbn/J(OT-II)小鼠品系购自The Jackson Laboratory。

BALBc/裸鼠获自国立癌症研究所(National Cancer Institute),由Charles River分销。将所有的小鼠安置和保持在无病原体的设施中。

[0340] B16细胞系和原代CD4+T细胞的培养:B16-F1和B16-F10黑素瘤细胞系购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。B16-F10(B16-M1)的高度侵袭性亚克隆是通过分离和扩增C57BL/6小鼠在手术切除确立的原发性肿瘤后6周出现的转移性克隆而产生的。B16-OVA黑素瘤细胞系由E.M.Lord(University of Rochester Medical Center,Rochester,NY)惠赠。通过实时PCR确认B16-OVA细胞的OVA表达。将所有黑素瘤细胞在补充有10%热灭活的FBS、2mM L-谷氨酰胺和250IU青霉素/链霉素的DMEM(Thermo Scientific)中培养。

[0341] 根据制造商的方案,使用抗CD4缀合的磁性Dynabeads(Life Technologies)分离CD4+T细胞。如所示,通过用板结合的抗-CD3 $\Sigma$ (克隆2C11;0.25 $\mu$ g/mL)和抗CD28(克隆37.51;0.25 $\mu$ g/mL)抗体(BD Biosciences)激活将CD4+T细胞分化成TH1辅助细胞,并在鼠IL-12(10ng/mL)(eBioscience)、抗小鼠IL-4抗体(克隆11C.11;10 $\mu$ g/ml)和10U/mL重组人IL-2(Biological Resources Branch of the National Cancer Institute)的存在下,在补充有10%热灭活的FBS、2mM L-谷氨酰胺、50 $\mu$ M 2-巯基乙醇、非必需氨基酸和必需维生素(Cambrex)的DMEM中培养6天。

[0342] 肿瘤模型:将悬浮于Hanks平衡盐溶液(Invitrogen)中的 $3 \times 10^5$ 个B16-F1黑素瘤细胞皮下注射在小鼠的腰肋部。通过在右后肢的背部注射 $2 \times 10^5$ 个B16-M1细胞在足垫中诱发黑素瘤肿瘤。

[0343] 肿瘤生长监测:用游标卡尺每周三次测量原发性B16-M1黑素瘤背侧后肢肿瘤。使用椭球体公式计算肿瘤体积: $V = (\pi/6 \times \text{长} \times \text{宽} \times \text{高})$ 。原发性背侧后肢肿瘤显示Gompertzian生长,其中I期体积为30-50mm<sup>3</sup>,II期体积为90-150mm<sup>3</sup>,III期体积为300-500mm<sup>3</sup>。因此,通过测定至90-150mm<sup>3</sup>的肿瘤生长延迟(TGD)来确定治疗疗效,此时肿瘤处于指数II期。达到300-500mm<sup>3</sup>的肿瘤由于解剖学和血管受限而开始进入III期。因此,根据IACUC批准的方案,对肿瘤 $\geq 300-500\text{mm}^3$ 的小鼠进行膝下截肢。

[0344] ELISA:将 $1.5-2.5 \times 10^4$ 个T细胞静置或用以下物质刺激:抗CD3 $\Sigma$ +抗CD28抗体;T细胞耗尽的OVA肽323-339(OVA323-339)负载的脾细胞(T细胞:脾细胞之比为1:5);或CD11c+纯化的树突细胞(使用CD11c-珠;Miltenyi Biotech),其负载有OVA323-339或黑素瘤肿瘤裂解物,树突细胞:T细胞之比为1:3。通常在刺激后24小时收获培养上清液,并通过夹心ELISA(BD Biosciences)来测定IL-2或IFN水平。

[0345] 肿瘤裂解物:从荷瘤小鼠切除肿瘤,切成1-2mm的块,并穿过40 $\mu$ m尼龙网。在PBS中洗涤细胞并重悬于无血清DMEM中。然后将细胞悬浮液在液氮中快速冷冻,并在37 $^{\circ}$ C解冻,共5个循环,通过光学显微术目测确认完全裂解。将裂解物在4 $^{\circ}$ C下以10,000g离心15分钟,并且丢弃具有细胞碎片的沉淀物。上清液与纯化的树突细胞一起使用,以刺激T细胞。

[0346] 分离免疫荧光染色的肿瘤组织,在PBS中洗涤,并包埋在OCT化合物(Electron Microscopy Sciences)中。制备组织切片(5 $\mu$ m),并用丙酮透化5min,与山羊血清温育30min以阻断非特异性蛋白质-蛋白质相互作用。将组织切片与下列抗体一起温育过夜:抗钙网蛋白(Pierce,PA5-25922)、抗Trp1(Abcam,ab3312;克隆TA99)和抗Hsp70(Novus Biologicals,NBP1-77455)。室温下使用适当的第二抗体30分钟。使用DAPI(Invitrogen)检测细胞核。用倒置Olympus IX81荧光显微镜对至少10个视野/样品进行试探分析。

[0347] 聚焦超声治疗系统。治疗和成像探头系统 (TIPS, Philips Research North America, Briarcliff Manor, NY, USA) 用于所有的超声暴露。该系统能够递送聚焦且时空控制的超声能量, 并且由治疗控制工作站、RF发生器和控制电子设备、8元球壳环形阵列超声换能器 (80mm曲率半径, 80mm孔径) 以及允许平面内的换能器移动和垂直于超声波束轴线精确定位的移动平台组成。利用焦点的电子偏转, 聚焦的超声波束也可以平面外 (out-of-plane) 引导大约  $\pm 15\text{mm}$ 。超声波束通过薄的 ( $25\mu\text{m}$ ) 圆形塑料膜垂直传播到靶标中, 其中通过脱气水提供声耦合。在治疗期间, 系统允许调节声输出功率、超声暴露持续时间、占空比和超声频率。

[0348] 体内聚焦超声 (FUS) 疗法。用纯氧中1.5升/分钟的1.5%异氟烷连续流麻醉小鼠。为了确保正确的声耦合, 仔细剃光荷瘤的腿部或腰侧的毛。一旦将动物定位用于治疗, 使用脱气水和超声凝胶将肿瘤以声学方式耦合到TIPS系统。然后将肿瘤的中心放置在离换能器80mm的焦距处。使用在整个肿瘤体积上延伸的1mm网格图形将超声暴露递送至肿瘤。在每个肿瘤中执行两层网格点 (间隔5mm), 导致每个肿瘤大约160个离散焦点和5分钟的暴露持续时间。超声换能器在1.0MHz下运行, 如沿着椭圆轴测得的, 导致直径为大约1.5mm和长度为12mm的椭圆焦斑 (-6dB压力)。使用在整个肿瘤体积上延伸的1mm网格图形将超声暴露递送至肿瘤。在治疗之前, 测量肿瘤体积以计算用于特定治疗的网格大小。在每个网格点超声暴露的持续时间为1.5秒, 之后换能器自动定位在下一个网格点上, 并重复该过程直到覆盖整个肿瘤体积。在每个肿瘤中执行两层网格点。治疗超声装置在特定的声功率/压力方案下以连续波模式运行: 声功率3W, 峰值负压 = 2.93MPa (80mm焦距) / 3.81MPa (85mm焦距); 提供非消融低能FUS (LOFU)。估计焦点处产生的原位强度 ( $I_{\text{spta}}$ ) 在组织深度4mm处为  $550\text{W}/\text{cm}^2$ 。肿瘤总能量沉积为大约900J。

[0349] 体内低分割锥形束CT图像引导的放射疗法 (IGRT): 使用Xstrahl Limited的Small Animal Radiation Research Platform (SARRP) 递送全部放射, 以在341秒内向靶肿瘤递送10Gy的剂量。将麻醉的动物放置在附接于机动化平台的台上, 并将荷瘤的右后肢伸展、抬高并固定到1.5cm的粘合剂平台上, 以使无关组织暴露最小化。一旦固定, 进行锥形束CT (CBCT) 并在3D切片机中打开数据用于组织分割和治疗计划。每次10Gy连续三天递送, 总的低分割剂量为30Gy。在联合治疗组中, 在CBCT之前2-4小时进行LOFU。

[0350] 肺转移评估: 从在8周实验结束时自发死亡、安乐死或处死的动物中分离肺。注入1mL的Fekete溶液 (基于乙醇、冰醋酸和甲醛的漂白固定剂) 以吹入肺部。然后夹住气管, 整个肺部和心脏整体移除并用PBS洗涤。然后将肺置于Fekete溶液中, 并在分析之前使其漂白48小时。分离左肺和右肺的4个肺叶并借助解剖显微镜对结节进行计数。不清晰或融合的结节不能可靠地计数; 因此, 肺被标记为太多而无法计数, 且指定250的任意转移计数。使用非参数Kruskal-Wallis检验, 随后进行用于多重比较的Dunn后检验, 进行统计分析。

[0351] 无复发生存率: 在我们的无复发生存率分析中将以下事件评为阳性事件: 尸检证实为肿瘤导致的自发性死亡, 由于大范围的局部转移至引流淋巴结或腹股沟淋巴结而施以安乐死, 或由于垂死外观指示广泛的全身性肿瘤负担而施以安乐死。以下非肿瘤依赖性死亡作为截尾数据而处理: 在8周实验结束时截肢或处死的任何动物在24-48小时内的死亡。为了防止选择性处死对照或治疗动物, 使用字母数字代码对笼子进行标记, 使动物研究所的兽医无从得知治疗组和对照组。使用Mantel-Cox检验分析无复发生存率, 统计学显著性定义

为 $P < 0.05$ 。

[0352] 实时PCR:使用RNeasy Micro试剂盒(Qiagen)从细胞中提取总RNA,并使用qScript cDNA supermix(Quanta Biosciences)合成cDNA。在StepOnePlus实时PCR系统(Applied Biosystems)上使用PowerSYBR(Applied Biosystems)作为报告染料对cDNA样品进行实时PCR。将所研究的转录物的表达相对于 $\beta$ 肌动蛋白进行归一化。使用的引物组如下:

[0353] 肌动蛋白b:F-GTGACGTTGACATCCGTAAAGA(SEQ ID NO:1),

[0354] R-GCCGGACTCATCGTACTCC(SEQ ID NO:2);

[0355] Cblb:F-GCAGCATCATTGACCCTTTCA(SEQ ID NO:3),

[0356] R-ATGTGACTGGTGGATTCTGCC(SEQ ID NO:4);

[0357] Grail:F-ATGCAAGAGCTCAAAGCAGGAAGC(SEQ ID NO:5),

[0358] R-GTGCAGCTGAAGCTTTCCAATA(SEQ ID NO:6);

[0359] Ikaros:F-GCTGGCTCTCGGAGGAG(SEQ ID NO:7),

[0360] R-CGCACTTGTACACCTTCAGC(SEQ ID NO:8);

[0361] 胱天蛋白酶3:F-ACGCGCACAAGCTAGAATTT(SEQ ID NO:9),

[0362] R-CTTTGCGTGAAAGTGGAGT(SEQ ID NO:10);

[0363] Egr2:F-TCAGTGGTTTTATGCACCAGC(SEQ ID NO:11),

[0364] R-GAAGCTACTCGGATACGGGAG(SEQ ID NO:12);

[0365] Grg4:F-TCACTCAAGTTTGCCCACTG(SEQ ID NO:13),

[0366] R-CACAGCTAAGCACCGATGAG(SEQ ID NO:14);

[0367] Itch:F-GTGTGGAGTCACCAGACCCT(SEQ ID NO:15),

[0368] R-GCTTCTACTTGCAGCCCATC(SEQ ID NO:16);

[0369] Foxp3:F-GGCCCTTCTCCAGGACAGA(SEQ ID NO:17);

[0370] R-GCTGATCATGGCTGGGTTGT(SEQ ID NO:18)。

[0371] 流式细胞术:在免疫染色之前用Fc阻断(CD16/CD32)抗体预先阻断细胞。使用以下荧光染料缀合的抗体:抗B7.1、B7.2、CD11c、MHC-II、CD45以及它们各自的同种型对照抗体(eBiosciences);抗Hsp70(Novus Biologicals)和抗TRP1(Abcam)。通过使用UV

**LIVE/DEAD®**Fixable Dead Cell Stain试剂盒(Invitrogen)检测死细胞。在LSR-II流式细胞仪(Becton Dickinson)上分析免疫染色的细胞,并使用FlowJo软件进行采集后分析。

[0372] 实施例2

[0373] 低氧肿瘤微环境产生氧化性内质网(ER)应激,导致蛋白质错误折叠和解折叠蛋白质应答(UPR)。UPR诱导包括热休克蛋白90(HSP90)在内的多种分子伴侣,HSP90纠正蛋白质错误折叠,并且改善癌细胞的存活和对肿瘤治疗的抗性,尽管延长UPR的激活诱导细胞死亡。HSP90抑制剂17AAG已经显示了对抗包括前列腺癌(PC)在内的各种实体瘤的前景。然而,17AAG的治疗剂量引起全身毒性。本文公开了新的范例,其中非消融和非侵入性低能聚焦超声(LOFU)和无毒、低剂量17AAG的联合疗法在小鼠和人PC异种移植物中引起综合致死性和显著的杀肿瘤作用。LOFU在肿瘤细胞中诱导ER应激和UPR而不诱导细胞死亡。用无毒剂量的17AAG治疗进一步增加在LOFU治疗的PC中的ER应激,并将UPR从肿瘤中的细胞保护转变为细胞凋亡应答,导致显著诱导凋亡和肿瘤生长迟缓。LOFU诱导的ER应激使超声治疗的肿瘤对

受化疗药物如17AAG更敏感。LOFU诱导的化学增敏是可用于肿瘤例如局部晚期和复发性肿瘤的新型疗法。

[0374] LOFU和17AAG疗法的治疗方案和毒性:对于每个网格位置,LOFU以100%占空比、3W的声功率并使用1MHz的超声频率施用1.5秒。该方案产生大约 $270\text{W}/\text{cm}^2$ 的原位空间峰值时间平均声强度,导致估计的平均肿瘤内温度升高 $3.2^\circ\text{C}$ 。治疗后,没有正常组织毒性的迹象,如脱发、热损伤或皮肤创伤。小鼠的临床前药代动力学研究显示17AAG广泛分布并经历大量的肝代谢。已知17AAG的系统性给药与显著的肝毒性相关,其特征在于转氨酶和胆汁酸的增加以及胆囊、胆总管和胃肠道中的药物相关组织病理学病变。因此,我们确定了对我们的疗法无毒性的17AAG的剂量。每周三次腹腔内注射17AAG (25-75mg/kg体重) 治疗C57B1/6小鼠。对照小鼠注射等体积的用于溶解17AAG的媒介物DMSO。尽管与未经治疗的对照(未经治疗的肿瘤, $1879 \pm 98.65\text{mm}^3$ ,分别相对于17AAG 75mg/kg体重, $485 \pm 24.25\text{mm}^3$ , $p < 0.003$ 和50-75mg/kg体重, $964\text{mm}^3$ , $p < 0.007$ )相比,较高剂量的17AAG (50mg/kg体重) 治疗实现显著的肿瘤生长迟缓,Kaplan Meier生存分析显示在用75mg/kg体重的剂量治疗21天后,50%的小鼠死亡。

[0375] 发现无毒的低剂量17AAG在C57B1/6小鼠中为25mg/kg,而在Balb/c裸小鼠中为14mg/kg。因此,选择这些剂量水平用于本研究。目标是结合两种无毒的治疗,即使是亚治疗性的,并检查这种组合是否可以治疗性的。LOFU+17AAG的联合治疗增强了ER应激:ER中错误折叠蛋白质的积累诱导应激反应,其中分子伴侣蛋白质的诱导帮助校正蛋白质错误折叠。为了检测ER应激水平,在不同的治疗组中对ER分子伴侣ERp44、ERp57和ERp72的表达水平进行定量。ERp44负责氧化性蛋白质折叠[69]。ERp57是ER驻留硫醇二硫化物氧化还原酶[70],而Erp72是二硫键异构酶。所有这些蛋白质都参与ER的蛋白质折叠机制。与来自未接受治疗或接受单独的LOFU或17AAG的动物的肿瘤组织相比,免疫印迹分析证实LOFU+17AAG联合治疗后的肿瘤组织中ERp78 ( $p < 0.03$ ,图7D和7E)、ERp44 ( $p < 0.05$ ,图7D和7G)和ERp57 ( $p < 0.04$ ,图7D和7F)蛋白质水平的表达显著增加。这表明17AAG介导的HSP90抑制可能增加ER中的解折叠蛋白质负荷,从而延长ER应激。

[0376] LOFU+17AAG激活UPR的促凋亡途径并在小鼠和人前列腺癌组织中诱导凋亡:ER应激同时激活UPR的三个组,从而同时产生拮抗细胞保护和凋亡信号。细胞的命运取决于其蛋白质校正机制降低ER应激从而减弱UPR的能力。如果EER应激持续存在,细胞保护途径最终随着PERK介导的凋亡途径的慢性激活而破坏,从而导致细胞死亡。由于PERK在Thr980处的磷酸化作为其激活状态的标记,我们进行了免疫印迹分析,其显示了用17AAG治疗后肿瘤组织中pPERK水平的显著增加(图8A)。未经治疗和LOFU治疗的肿瘤中不存在磷酸化的PERK水平。然而,LOFU+17AAG的联合治疗表现出最高水平的PERK磷酸化(图8A)。

[0377] 由于延长的PERK激活通过在翻译起始因子eIF2 $\alpha$ 在丝氨酸51处的磷酸化而响应于ER应激减弱蛋白质合成,所以磷酸化的eIF2 $\alpha$ 水平得以确定。用17AAG治疗RM1肿瘤诱导超过未治疗对照组的基础水平的eIF2 $\alpha$ 磷酸化。LOFU治疗导致磷酸化的eIF2 $\alpha$ 水平的微小减少。然而,在接受LOFU+17AAG联合治疗的肿瘤中见到最高水平的磷酸化的eIF2 $\alpha$ (图8B),证实与其他组相比,这些肿瘤中PERK磷酸化的活化最高。

[0378] 尽管磷酸化的eIF2 $\alpha$ 降低了大多数细胞蛋白质(包括促存活蛋白质和抗凋亡蛋白质)的翻译,但提高了转录因子ATF4的翻译,该转录因子负责诱导促凋亡基因如CCAAT/增强

子结合蛋白同源蛋白拷贝 (CHOP) 的转录,从而在未修复错误折叠的蛋白质和ER应激持续存在的情况下准备用于程序性细胞死亡的细胞[71]。正如所期望的,LOFU治疗未能诱导超过未经治疗的对照组的CHOP水平 ( $1.6 \pm 0.7$ 倍)。相反,与未经治疗的对照组相比,用17AAG单独治疗诱导CHOP转录物水平至  $14.8 \pm 2$ 倍,其在LOFU+17AAG联合治疗组中进一步增加至  $25 \pm 1.3$ 倍 ( $p < 0.006$ ) (图8C)。

[0379] 为了检查在通过LOFU+17AAG联合治疗进行的CHOP诱导之后是否表达下游凋亡基因,在从各种治疗组的肿瘤组织中分离的总RNA上使用小鼠UPR qRT-PCR阵列。热图分析证实,与未治疗的对照相比,在用LOFU+17AAG联合治疗后,促凋亡靶基因如Bax、Vcp、Pdia3、Armet、Ddit3、Mapk8、Mapk9和Mapk10被诱导数倍(图8D)。用单独的LOFU或单独的17AAG治疗时,促凋亡基因的诱导最小。这个结果表明LOFU+17AAG联合治疗激活PERK、诱导CHOP并开启UPR的促凋亡途径。事实上,TUNEL染色证明与未治疗的对照组相比,LOFU诱导最低的凋亡。用17AAG治疗在前列腺肿瘤中诱导显著的凋亡,其被LOFU进一步增加 ( $p < 0.004$ ) (图8E)。因此,通过LOFU+17AAG的组合,17AAG介导的HSP90的抑制和CHOP的激活开启了前列腺肿瘤的凋亡细胞死亡。LOFU+17AAG抑制肿瘤细胞中的分子伴侣介导的自噬(CMA)。

[0380] 错误折叠的蛋白质的降解是由蛋白酶体途径和自噬介导的。自噬在环境依赖性作用中与肿瘤发生过程相关,其中它可能为营养缺乏的缺氧肿瘤的代谢途径提供氨基酸和其他必需营养物质[72]。事实上,已经描述了在多种人类肿瘤中CMA活性的增加,并且CMA与肿瘤细胞的存活、增殖和转移相关[73]。因此,对两种参与自噬的关键蛋白质的水平进行定量,即Beclin(大自噬标志物)和LAMP-2A溶酶体受体(各个治疗组的肿瘤组织中的CMA标志物)。如图9A-图9C所示,采用LOFU或17AAG或联合疗法,Beclin水平保持不变(图9A和9C),表明超声疗法没有改变大自噬。然而,单独的LOFU或单独的17AAG诱导LAMP-2A的表达(图9A和9B),表明在增加ER中错误折叠蛋白质负荷的治疗后CMA的补偿性增加。有趣的是,LOFU+17AAG的组合抑制了LAMP-2A的水平,低于这些肿瘤中所见的基础水平。这表明联合疗法减少肿瘤细胞的生长并通过增加ER应激、同时抑制CMA而诱导凋亡。

[0381] LOFU使人和鼠前列腺癌移植对无毒低剂量17AAG变得敏感:用单独的LOFU或单独的低剂量17AAG (25mg/kg体重) 的治疗不显示任何正常组织毒性作用,但未能抑制肿瘤生长。然而,LOFU+17AAG联合疗法则减少了小鼠RM1肿瘤的生长(图10B)。与对照组相比,LOFU、17AAG和LOFU+17AAG组中平均估计的肿瘤生长慢5% ( $p < 0.0001$ )、9% ( $p < 0.0001$ ) 和11% ( $p < 0.0001$ )。在对照、LOFU和LOFU+17AAG中达到肿瘤大小 $2000\text{mm}^3$ 的时间中值分别是18天、22天和42天。17AAG组的所有动物在26-30天的间隔内达到该大小。

[0382] 在LOFU与低无毒剂量的17AAG (14mg/kg体重) 一起应用时,在BalbC nu/nu小鼠的人PC3肿瘤中观察到类似程度的化疗增敏,实现显著的肿瘤生长迟缓 ( $p < 0.007$ ) (图10C),而没有任何直接的不良副作用。

[0383] LOFU+17AAG治疗减少肿瘤组织中的前列腺癌干细胞群体:通过PC干细胞/祖细胞表面标志物的流式细胞术分析来评估LOFU+17AAG诱导的ER应激对PC干细胞/祖细胞群体的影响[24,25]。与对照或单一治疗组相比,表达细胞表面SCA1(图11A和11B) ( $p < 0.004$ )、CD44(图11A和11C) ( $p < 0.003$ )、CD133(图11A和11D) ( $p < 0.007$ ) 和 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白 ( $p < 0.005$ ) (图11A和11E) 的细胞百分比在联合治疗组中显著降低。所有这些标记物的平均荧光强度(MFI)在所有三组中均保持不变。干细胞转录因子的qRT-PCR阵列显示Tlx3、Hoxa11、Pcna、Gli2、

Runx1、Foxa2、Sp1、Tbx5、Hoxa10、Nfatc1、Gata6和Notch2的mRNA水平增加(>2倍)(图11F),表明LOFU诱导PC干细胞转录信号传导。用17AAG治疗也增加一些存在于LOFU治疗的肿瘤中的转录因子mRNA如FoxP1、Nrf2f和Pou5f1的表达。然而,用LOFU+17AAG治疗的肿瘤下调这些基因的表达,表明通过联合治疗使ER应激最大化可能减少肿瘤中的PC干细胞/祖细胞群体。

#### [0384] 讨论

[0385] 结果证明,LOFU和化学疗法的联合疗法重新编程肿瘤中的促凋亡基因的表达并诱导肿瘤异种移植中的大量凋亡,导致小鼠和人PC肿瘤显著的肿瘤生长迟缓。LOFU的作用可以改善对化学疗法的抗性,并且实现化疗增敏。

#### [0386] 方法和材料

#### [0387] 动物

[0388] 自由维持5至6周龄的雄性C57B1/6(NCI-Fort Dietrich,MD,USA)小鼠和无胸腺裸鼠(BalbC nu/nu小鼠,Jackson Laboratory,Bay Harbor,ME,USA),并且在阿尔伯特爱因斯坦医学院实验动物管理和使用委员会(the Institutional Animal Care and Use Committee of the Albert Einstein College of Medicine)的指导和协议下进行所有研究。

#### [0389] 肿瘤模型和治疗

[0390] C57B1/6和BalbC nu/nu小鼠分别在胸部皮下注射 $1 \times 10^5$ 个RM-1(鼠前列腺癌细胞系)和 $1 \times 10^6$ 个PC3(人前列腺癌细胞系)细胞。大约10天后,肿瘤变得可触知(直径3-5mm),于是开始LOFU治疗。将小鼠分成未接受治疗、接受LOFU、17AAG(InvivoGen,San Diego,CA,USA)和17AAG+LOFU的4组(n=5/组)。每3-4天用LOFU治疗可触知的肿瘤,在两周内施用五个部分。在此期间,动物每周三次接受17AAG。每周两次使用游标卡尺进行肿瘤体积测量,同时对全身毒性体征(不适和腹泻)进行身体评估。

#### [0391] LOFU系统

[0392] 所有的超声暴露都采用了治疗和成像探头系统(TIPS,Philips Research North America,Briarcliff Manor,NY,USA)。该系统包括8元球面壳环形阵列换能器(80mm曲率半径,80mm孔径),以及允许换能器移动和准确定位的移动平台。换能器在1.0MHz下运行,产生直径大约1.5mm,长度12mm(-6dB压力)的焦斑。[12,13])

#### [0393] LOFU治疗方案。

[0394] 治疗当天,将动物用氯胺酮和甲苯噻嗪麻醉(对于1001/小鼠7.1mg/ml,腹膜内)。一旦定位以供治疗,使用脱气水和超声凝胶将肿瘤以声学方式耦合到TIPS系统。

[0395] 超声暴露参数如下:声功率为3W且占空比为100%,在组织的超声深度3mm处产生大约 $270\text{W}/\text{cm}^2$ 的原位空间峰值时间平均强度(Ispta)[74],假设衰减系数为 $0.5\text{dB cm}^{-1}\text{MHz}^{-1}$ [75]。使用在整个肿瘤体积上延伸的2mm网格图形将超声暴露递送至肿瘤。在LOFU之前,测量肿瘤体积以计算特定治疗的网格大小。在每个网格点处LOFU暴露的持续时间为1.5s,之后使换能器自动定位在下一个网格点上,并重复该过程直到覆盖整个肿瘤体积。这导致将不均匀的能量输送至肿瘤。

#### [0396] 体外温度升高估计。

[0397] 通过侵入性手段对肿瘤内温度的估计不能理想地调节联合治疗的治疗反应。因此,为了使用上述设置和治疗方案来估计肿瘤内温度升高,在模拟组织体模内的 $6\text{mm} \times 6\text{mm}$

区域中实施超声暴露[76],其中将T型热电偶(直径200 $\mu$ m)包埋在3mm的深度处。这些体外暴露重复5次,结果取平均值。

#### [0398] 原位凋亡检测

[0399] 通过进行TUNEL (TdT介导的洋地黄毒苷标记的dUTP缺口末端标记)染色原位检测凋亡细胞。简言之,将石蜡包埋的切片脱蜡,通过分级醇再水化,并使用ApopTag试剂盒(Intergen Co,Norcross,GA,USA)染色。通过计算每个高倍视野中凋亡细胞的百分比来对肿瘤细胞的凋亡率进行定量。

#### [0400] 免疫印迹分析

[0401] LOFU后24小时,收集肿瘤细胞,用磷酸盐缓冲盐水洗涤,并使用TPER (Thermo Fisher Scientific,Rockford,IL,USA)裂解。细胞裂解物经历SDS-PAGE,转移至聚偏二氟乙烯膜,并用针对PERK、pPERK、eIF2、peIF2、ERp72、ERp44、ERp57、Beclin(Cell signaling,Danvers,MA,USA)、Lamp2a (Abcam,Cambridge,MA,USA)的第一抗体和辣根过氧化物酶缀合的第二抗体进行免疫印迹。使用ECL试剂盒(GE Healthcare,Piscataway,NJ,USA)对印迹进行显色。对每个印迹的免疫反应带的密度分析进行照相,然后通过使用Gel Doc XR系统(Bio-Rad,Hercules,CA,USA)对图像进行数字化和分析。

[0402] 在LOFU治疗后24小时,对UPR靶基因进行实时PCR分析,使用来自RNeasy Mini Kit (Qiagen,Valencia,CA,USA)的与1% $\beta$ -巯基乙醇混合的RLT缓冲液裂解RM1肿瘤细胞。

[0403] 使用针对RNeasy Mini Kit的具有柱上DNA消化的Qiagen方案从肿瘤裂解物中分离RNA。在进一步使用之前,将RNA样品储存在-80 $^{\circ}$ C。使用SuperScript<sup>TM</sup>第一链合成系统(Invitrogen,Grand Island,NY,USA)对分离的RNA进行cDNA合成。使用以下引物对5'-ACTCGGTCTGGAAATCTG-3'(SEQ ID NO:19)和5'-TAGCCAGGAAACGTCTAC-3'(SEQ ID NO:20)(Fisher Scientific,Pittsburg,PA,USA)检测XBP1 RNA的剪接[77]。根据标准ABgene方案,使用Absolute QPCR SYBER Green Mix(ABgene,Rochester,NY,USA),在Light Cycler实时PCR仪(Bio Rad Laboratories,Hercules,CA,USA)中进行实时PCR。为了检查引物扩增特异性,在PCR结束时产生解链曲线,并且含有相同引物对的不同样品显示匹配的扩增子解链温度。

[0404] 用于实时PCR的引物包括GRP78 5' TTGCTTATGGCCTGGATAAGAGGG3'(SEQ ID NO:21)和5' TGTACCCTTGCTTCAGCTGTCAC3'(SEQ ID NO:22);EDEM 5' TCATCCGAGTCCAGAAAGCAGTC 3'(SEQ ID NO:23)和5' TTGACATAGAGTGGAGGGTCTCCT 3'(SEQ ID NO:24)(Fisher Scientific)。所有的qRT-PCR和实时PCR实验重复三次。根据制造商的方案,通过SA Biosciences PCR阵列系统(Frederick,MD,USA)进行凋亡基因和干细胞转录因子的qRT-PCR和PCR阵列。简而言之,使用RT<sup>2</sup>第一链试剂盒(Qiagen)从纯化的总RNA制备cDNA,随后使用SA Bioscience PCR阵列试剂盒进行PCR阵列。通过来自SA Biosciences的基于web的PCR阵列数据分析软件分析数据。

#### [0405] 流式细胞术分析

[0406] 在各种群组中用LOFU、17AAG和LOFU+17AAG治疗肺部肿瘤。治疗24小时后,通过胶原酶消化分离肿瘤细胞,并通过流式细胞术分析前列腺癌干细胞标志物SCA1、CD44和CD133的表达。分离的肿瘤细胞用与FITC(BD Biosciences,La Jolla,CA,USA)缀合的抗SCA1、与pacific blue(eBioscience,San Diego,CA,USA)缀合的抗CD133和与PE(BD Biosciences,

La Jolla, CA, USA) 缀合的抗CD44进行染色。使用LSRII (BD Biosciences) 进行数据采集, 并通过FlowJo v.7.1 (Treestar Inc, Ashland, OR, USA) 软件进行分析。

[0407] Kaplan-Meier生存分析

[0408] 使用Sigma-Plot和GraphPad Prism (OS X的第4.0版, San Diego, CA, USA) 软件通过Kaplan-Meier作为放射剂量的函数来分析不同治疗组中的小鼠存活率/死亡率。

[0409] 统计分析

[0410] 对于数字图像, 随机选择用于数据采集的采样区域以进行数据定量。数字图像数据以盲目的方式对任何治疗进行评估。使用双尾学生Student t检验来确定具有代表性的平均标准误差 (SEM) 的实验群组之间的显著差异 ( $p < 0.05$ )。

[0411] 图12示出了根据本发明示例性实施方案的声激疗法 (APT) 装置, 其一般由附图标记1表示。APT装置1由电源 (未示出) 供电, 并且包括控制系统10、放大器12、匹配变压器14和换能器16。为了提供治疗, 超声换能器16可以定位在患者身体1000的区域附近或之内。临床医生可以使用控制系统10处的功能发生器对由换能器16递送的超声脉冲的频率和持续时间进行适当的调整。当激发超声换能器16时, 换能器元件的发射表面在超声换能器16周围的体液中产生压力波。然后压力波通过患者身体1000内的流体和组织传播并最终到达靶区域, 从而产生对靶组织的非消融性声应激。如本文进一步详细解释的, 传递至组织的声应激可具有许多治疗用途, 并且在癌症治疗的情况下, 例如肿瘤中癌细胞的这种应激可导致免疫原性调节、放射增敏和化疗增敏。可以将超声换能器16重新定位到患者身体的相邻区域用于进一步治疗。

[0412] 匹配变压器14在电源和超声换能器之间提供阻抗变换。

[0413] 放大器12基于控制系统10的输出信号产生用于驱动换能器16的换能器驱动信号。在示例性实施方案中, 放大器12可以是开关谐振功率放大器, 其实例在美国专利号7, 396, 336中公开, 其内容通过引用以其全文并入本文。在另一个实施方案中, 可以采用低阻抗的超声驱动器-换能器系统[78]。

[0414] 换能器16在治疗区中产生10至1000W/cm<sup>2</sup>空间峰值时间平均强度 ( $I_{\text{spta}}$ ) 的声功率。超声连续施加0.5至5秒范围内的时间, 其中频率范围在0.01至10MHz的范围内。在一些实施方案中, 治疗区中的任何超声波束的最小直径为约1cm。

[0415] 在图12所示的实施方案中, 由APT装置1产生的超声的频率在约10KHz至约300KHz的范围内。然而, 根据本发明的APT装置可以产生较高的频率, 例如在约300KHz至约3MHz范围内的频率。如图13所示, 通常由附图标记100表示的这种APT装置的实施方案可以包括控制系统110、放大器112、匹配变压器114和换能器116, 这些组件具有与参考图12先前所描述的相同的功能和结构。在实施方案中, 换能器116可以是由单个或多个元件组成的平坦或凹入的活塞式换能器, 其将另一种类型的能量转换成声能。

[0416] 如图14所示, 可以将APT装置1和APT装置100集成到通常由附图标记200表示的单一系统中, 以提供改善的功效和/或较低的整体能量输入。集成系统200为APT治疗提供聚焦的低频和准直的高频波束。在一些实施方案中, 低频超声根据针对给定频率或频率范围可实现的频率基本上得以聚焦, 并且中频是准直的。在一些实施方案中, 用于产生低频的换能器是凹面的, 并且用于产生中频的换能器是平面的。

[0417] 在图15-17所示, APT装置1、100、200可以与通常由附图标记300表示的超声监测系

统一起运行。超声监测系统300可以由电源(未示出)供电,并且包括控制系统310、放大器312和脉冲接收器系统314。超声监测系统300可用于在APT治疗之前、期间和/或之后监测并且/或者提供靶组织的成像,特别是脉冲接收器系统314可包括接收由靶组织反射或由靶组织产生或从靶组织内产生的压力波的换能器和产生对应于所接收的压力波的电信号的放大器312。控制系统310基于可由临床医生用来确定治疗状态和/或其他参数的电信号来生成输出。虽然超声监测系统300显示为与APT装置1、100、200分开的组件,但是应当理解,监测和APT输送可以通过单一系统进行。

[0418] 在一些实施方案中,超声监测系统300用于提供关于待治疗组织的位置的信息。一个或多个非治疗性超声发射和接收子系统可用于监测APT治疗和治疗对组织的影响。

[0419] 在一些实施方案中,所收集并用于规划放射治疗的数据也至少部分用于规划超声治疗。

[0420] 在一些实施方案中,针对APT治疗规划或APT治疗收集的数据用于放射治疗规划。在一些实施方案中,针对放射治疗规划收集的数据用于APT治疗规划。在一些实施方案中,在APT治疗期间收集的数据用于放射治疗规划。

[0421] 在一些实施方案中,以较低频率施加超声以治疗由以较高频率执行的超声成像予以部分识别的特定位置或多个位置。

[0422] 各种基于超声的成像和监测模式可用于监测APT治疗期间组织中的功率沉积。在一些实施方案中,组织温度可以通过声学手段来监测[79]。

[0423] 在一些实施方案中,使用超声弹性成像来监测治疗。在一些实施方案中,使用谐波成像来监测治疗。在一些实施方案中,测量热应变。在一些实施方案中,该系统由用于测量组织应变的一个或多个超声发射和接收换能器子系统组成。组织应变信息可用于将治疗超声波束瞄准至所需组织,并且在一些实施方案中,在将全部治疗功率施加到治疗换能器之前。例如,在一个实施方案中,将功率以预期治疗功率的10%至50%施加至一个或多个治疗换能器,并且使用超声反馈来测量靶组织的应变。基于应变成像,APT换能器可以物理方式或电子方式重新定位或更有效地定向到靶组织。在一些实施方案中,从一个或多个换能器施加全功率,但是时间比用于治疗效果的、在应变测量期直到确认所需靶向期间的时间短。

[0424] 在一些实施方案中,使用温度测量来监测治疗。

[0425] APT系统1、100、200的每个换能器可以是单个换能器,或者可以是多个换能器的阵列。图18是根据本发明示例性实施方案的一般由附图标记400表示的换能器的透视图。换能器400包括换能器元件阵列402。任何数目的换能器元件402可以沿着方位轴顺序排列。换能器元件402支撑在衬板404上。如众所周知的,信号引线耦合每个换能器元件402的电极以发射和接收电路。换能器元件402将由传输电路提供的电信号转换成压力波。

[0426] 在一些中频实施方案(约300KHz至约3MHz)中,两个或更多个超声波换能器产生在治疗区内相交的超声波束,本文中为交叉区,其中每个波束在交叉区中具有在10至500W/cm<sup>2</sup>范围内的 $I_{spta}$ 。在实施方案中,两个换能器产生在治疗区内相交的超声波束,其中每个波束在交叉区中具有在50至500W/cm<sup>2</sup>范围内的 $I_{spta}$ 。在实施方案中,三个换能器产生在治疗区内相交的超声波束,每个波束在交叉区中具有在50至500W/cm<sup>2</sup>范围内的 $I_{spta}$ 。

[0427] 在一些实施方案中,多个波束基本上彼此同相。在一些实施方案中,从单独的超声换能器发出的两个超声波束基本同相并且在治疗区内相交,且每个波束在交叉区中具有在

70至100W/cm<sup>2</sup>范围内的声功率空间峰值强度,并且超声连续施加1至5秒。在一些实施方案中,从单独的超声换能器发出的三个超声波束基本上具有相同的频率,并且在治疗区内同相并相交,且每个波束在交叉区中具有在50至70W/cm<sup>2</sup>范围内的声功率空间峰值强度,并且超声连续施加1至5秒。

[0428] 在一些实施方案中,源自单独的换能器或换能器元件的波束各自在治疗区中产生大约300W/cm<sup>2</sup>的 $I_{spta}$ 。

[0429] 在一些实施方案中,至少一个换能器直径和从该换能器发出的超声波束基本上大于治疗区。使用一个或多个这种大型换能器与较小的换能器的组合有利地允许对高功率、大容量波束的低精度瞄准,同时实现有效的和更快的治疗。

[0430] 在一些实施方案中,在两个或更多个波束交叉路径的地方形成强治疗区,强治疗区在垂直于传输能量方向上等于或大于约1cm并且还在平行于传输方向上等于或大于约1cm。

[0431] 在一些实施方案中,从每个换能器施加到治疗区的声压为0.1至10MPa。

[0432] 在一些实施方案中,提供强超声治疗区的换能器的数目为1至1000个。

[0433] 在一些实施方案中,在具有约100kHz至20MHz范围的中心频率的治疗期间采用一个或多个中心频率。

[0434] 在一些实施方案中,连续施加来自给定换能器的超声。在一些实施方案中,从给定换能器发出的超声以重复打开时间单位和关闭时间单位(称为占空比)的脉冲来施加。所述占空比可以是在1个打开时间单位至9个关闭时间单位的范围内。

[0435] 在一些实施方案中,所述换能器发送单频音调或多频线性调频波。

[0436] 在一些实施方案中,所述换能器顺序地运行,使得在整个施加过程中递送至靶组织的总能量大于递送至周围组织的总能量。

[0437] 在一些实施方案中,在施加期间扫描所述频率,部分地减少换能器附近的区域中的不期望的高强度区域。

[0438] 在一些实施方案中,包括治疗头的所述换能器是机械地振动的。

[0439] 在一些实施方案中,所述换能器由二维相控阵列、环形阵列和/或三维相控阵列组成。

[0440] 在一些实施方案中,将一个或多个超声换能器结合到一个或多个内窥镜装置中。

[0441] 本文所公开的APT治疗系统与高热和消融热治疗中常见的热量施用方案相比具有低热剂量。在一些实施方案中,在持续约2秒或更短的治疗期间,治疗区达到的最高温度为45°C。

[0442] 考虑到热剂量,预期通过热机制获得治疗效果。尽管不希望被理论所束缚,但是机械效应与热效应相结合可以部分地解释使用所公开的装置、系统和方法的治疗效果。

[0443] 在一些实施方案中,在换能器与患者身体之间使用耦合介质以有效地发射超声波,并且在一些实施方案中提供换能器与治疗区之间所需的距离。在一些实施方案中,在治疗期间将耦合介质循环以冷却换能器或患者的身体或两者。分开的流体可用于传输超声、提供间隔以及为患者和系统组件提供冷却。

[0444] 尽管不受理论束缚,但是使用本文所述系统的APT治疗可以促进细胞之间和细胞与基质蛋白之间的相互作用、癌细胞与免疫细胞之间的相互作用以及免疫细胞(例如T细胞

和DC)之间的相互作用。

[0445] 在一些实施方案中, APT治疗可以破坏蛋白质复合物, 例如蛋白质折叠复合物。

[0446] 对于受益于多种方式治疗的疾病患者, 整个靶向治疗区的渗透和这些区域内的病变、易于应用和每种方式的短持续时间的治疗均是可取的。

[0447] 现在将描述根据本发明的示例性实施方案的APT治疗装置和APT治疗方式的各种其他方面:

[0448] 定位设备

[0449] 在一些实施方案中, 设计换能器施加器, 使得它们可以由临床医生或护理人员手持。在一些实施方案中, 将施加器安装到机械定位装置, 诸如图19中所示的定位装置500。定位装置500可以手动操作或机器人控制。在本实施方案中, 定位装置500是换能器在其上行进的弧形轨道, 并且特别地, 换能器可以附接至依次安装在轨道上的缆线驱动托架。轨道本身可以是可旋转的, 使得换能器可以三维定位。定位装置500可以足够大以使患者可以安放在换能器的目标范围之下和之内。虽然图19仅示出了位于轨道上的一个换能器, 但是应当理解的是, 可以在轨道上配置一个以上的换能器, 并且/或者可以提供支撑一个或多个其他换能器的其他轨道。在一些实施方案中, 在定位设备中可以使用有时被称为六足 (hexapod) 的斯图尔特 (stewart) 平台。计算机编程可以用于设置治疗参数并操作定位设备。

[0450] 设备和患者冷却

[0451] 在一些实施方案中, 所述治疗系统包括患者冷却机构以冷却暴露于超声能量或其他能量的皮肤。

[0452] 参考文献

[0453] 1. Rabinovich, G. A., Gabrilovich, D., and Sotomayor, E. M. 2007. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 25:267-296.

[0454] 2. Dougan, M., and Dranoff, G. 2009. Immune therapy for cancer. *Annu Rev Immunol* 27:83-117.

[0455] 3. Uyttenhove, C., Pilotte, L., Theate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., and Van den Eynde, B. J. 2003. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2, 3-dioxygenase. *Nat Med* 9:1269-1274.

[0456] 4. Thomas, D. A., and Massague, J. 2005. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 8: 369-380.

[0457] 5. Gerlini, G., Tun-Kyi, A., Dudli, C., Burg, G., Pimpinelli, N., and Nestle, F. O. 2004. Metastatic melanoma secreted IL-10 down-regulates CD1 molecules on dendritic cells in metastatic tumor lesions. *Am J Pathol* 165:1853-1863.

[0458] 6. Turk, M. J., Guevara-Patino, J. A., Rizzuto, G. A., Engelhorn, M. E., Sakaguchi, S., and Houghton, A. N. 2004. Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *J Exp Med* 200:771-782.

- [0459] 7. Huang, B., Pan, P. Y., Li, Q., Sato, A. I., Levy, D. E., Bromberg, J., Divino, C. M., and Chen, S. H. 2006. Gr-1+CD115+immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res* 66:1123-1131.
- [0460] 8. Sica, A., and Bronte, V. 2007. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest* 117:1155-1166.
- [0461] 9. Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J. R., Zhang, L., Burow, M. 等人 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10:942-949.
- [0462] 10. van Elsas, A., Hurwitz, A. A., and Allison, J. P. 1999. Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J Exp Med* 190:355-366.
- [0463] 11. Phan, G. Q., Yang, J. C., Sherry, R. M., Hwu, P., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Restifo, N. P., Haworth, L. R., Seipp, C. A., Freezer, L. J. 等人 2003. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8372-8377.
- [0464] 12. Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., Roche, P. C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K. 等人 2002. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8:793-800.
- [0465] 13. Rubinstein, N., Alvarez, M., Zwirner, N. W., Toscano, M. A., Ilarregui, J. M., Bravo, A., Mordoh, J., Fainboim, L., Podhajcer, O. L., and Rabinovich, G. A. 2004. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell* 5:241-251.
- [0466] 14. Troy, A. J., Summers, K. L., Davidson, P. J., Atkinson, C. H., and Hart, D. N. 1998. Minimal recruitment and activation of dendritic cells within renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 4:585-593.
- [0467] 15. Staveley-O'Carroll, K., Sotomayor, E., Montgomery, J., Borrello, I., Hwang, L., Fein, S., Pardoll, D., and Levitsky, H. 1998. Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1178-1183.
- [0468] 16. Willimsky, G., and Blankenstein, T. 2005. Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. *Nature* 437:141-146.
- [0469] 17. Overwijk, W. W., Theoret, M. R., Finkelstein, S. E., Surman, D. R., de Jong, L. A., Vyth-Dreese, F. A., Dellemiijn, T. A., Antony, P. A., Spiess, P. J., Palmer, D. C. 等人

2003. Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8<sup>+</sup>T cells. *J Exp Med* 198:569-580.

[0470] 18. Cuenca, A., Cheng, F., Wang, H., Brayer, J., Horna, P., Gu, L., Bien, H., Borrello, I.M., Levitsky, H.I., and Sotomayor, E.M. 2003. Extra-lymphatic solid tumor growth is not immunologically ignored and results in early induction of antigen-specific T-cell anergy: dominant role of cross-tolerance to tumor antigens. *Cancer Res* 63:9007-9015.

[0471] 19. Zheng, Y., Zha, Y., Driessens, G., Locke, F., and Gajewski, T.F. 2012. Transcriptional regulator early growth response gene 2 (Egr2) is required for T cell anergy in vitro and in vivo. *J Exp Med* 209:2157-2163.

[0472] 31. Zhang, H.G., Mehta, K., Cohen, P., and Guha, C. 2008. Hyperthermia on immune regulation: a temperature's story. *Cancer Lett* 271:191-204.

[0473] 32. Basu, S., and Srivastava, P.K. 1999. Calreticulin, a peptide-binding chaperone of the endoplasmic reticulum, elicits tumor- and peptide-specific immunity. *J Exp Med* 189:797-802.

[0474] 33. Castelli, C., Ciupitu, A.M., Rini, F., Rivoltini, L., Mazzocchi, A., Kiessling, R., and Parmiani, G. 2001. Human heat shock protein 70 peptide complexes specifically activate antimelanoma T cells. *Cancer Res* 61:222-227.

[0475] 34. Haug, M., Dannecker, L., Schepp, C.P., Kwok, W.W., Wernet, D., Buckner, J.H., Kalbacher, H., Dannecker, G.E., and Holzer, U. 2005. The heat shock protein Hsp70 enhances antigen-specific proliferation of human CD4<sup>+</sup> memory T cells. *Eur J Immunol* 35:3163-3172.

[0476] 35. Pawaria, S., and Binder, R.J. 2011. CD91-dependent programming of T-helper cell responses following heat shock protein immunization. *Nat Commun* 2:521.

[0477] 36. Gajewski, T.F., Woo, S.R., Zha, Y., Spaapen, R., Zheng, Y., Corrales, L., and Spranger, S. 2013. Cancer immunotherapy strategies based on overcoming barriers within the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol* 25:268-276.

[0478] 37. Driessens, G., Kline, J., and Gajewski, T.F. 2009. Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. *Immunol Rev* 229:126-144.

[0479] 38. Leach, D.R., Krummel, M.F., and Allison, J.P. 1996. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271:1734-1736.

[0480] 39. Munn, D.H., and Mellor, A.L. 2007. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Invest* 117:1147-1154.

[0481] 40. Green, D.R., Ferguson, T., Zitvogel, L., and Kroemer, G. 2009. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol* 9:353-363.

[0482] 41. Lee, P.P., Yee, C., Savage, P.A., Fong, L., Brockstedt, D., Weber, J.S., Johnson, D., Swetter, S., Thompson, J., Greenberg, P.D. 等人 1999. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma

patients. *Nat Med* 5:677-685.

[0483] 42. Valdor, R., and Macian, F. 2013. Induction and stability of the anergic phenotype in T cells. *Semin Immunol* 25:313-320.

[0484] 43. Macian, F., Garcia-Cozar, F., Im, S.H., Horton, H.F., Byrne, M.C., and Rao, A. 2002. Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell* 109:719-731.

[0485] 44. Safford, M., Collins, S., Lutz, M.A., Allen, A., Huang, C.T., Kowalski, J., Blackford, A., Horton, M.R., Drake, C., Schwartz, R.H. 等人 2005. Egr-2 and Egr-3 are negative regulators of T cell activation. *Nat Immunol* 6:472-480.

[0486] 45. Soto-Nieves, N., Puga, I., Abe, B.T., Bandyopadhyay, S., Baine, I., Rao, A., and Macian, F. 2009. Transcriptional complexes formed by NFAT dimers regulate the induction of T cell tolerance. *J Exp Med* 206:867-876.

[0487] 46. Enk, A.H., Jonuleit, H., Saloga, J., and Knop, J. 1997. Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 73:309-316.

[0488] 47. Marangoni, F., Murooka, T.T., Manzo, T., Kim, E.Y., Carrizosa, E., Elpek, N.M., and Mempel, T.R. 2013. The transcription factor NFAT exhibits signal memory during serial T cell interactions with antigen-presenting cells. *Immunity* 38:237-249.

[0489] 48. Srivastava, P. 2002. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu Rev Immunol* 20:395-425.

[0490] 49. Udono, H., and Srivastava, P.K. 1993. Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *J Exp Med* 178:1391-1396.

[0491] 50. Udono, H., and Srivastava, P.K. 1994. Comparison of tumor-specific immunogenicities of stress-induced proteins gp96, hsp90, and hsp70. *J Immunol* 152:5398-5403.

[0492] 51. Ullrich, S.J., Robinson, E.A., Law, L.W., Willingham, M., and Appella, E. 1986. A mouse tumor-specific transplantation antigen is a heat shock-related protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:3121-3125.

[0493] 52. Somersan, S., Larsson, M., Fonteneau, J.F., Basu, S., Srivastava, P., and Bhardwaj, N. 2001. Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells. *J Immunol* 167:4844-4852.

[0494] 53. Liu, B., DeFilippo, A.M., and Li, Z. 2002. Overcoming Immune Tolerance to Cancer by Heat Shock Protein Vaccines. *Mol Cancer Ther* 1:1147-1151.

[0495] 54. Chen, X., Tao, Q., Yu, H., Zhang, L., and Cao, X. 2002. Tumor cell membrane-bound heat shock protein 70 elicits antitumor immunity. *Immunol Lett* 84:81-87.

[0496] 55. Vega, V.L., Rodriguez-Silva, M., Frey, T., Gehrmann, M., Diaz, J.C.,

Steinem,C.,Multhoff,G.,Arispe,N.,and De Maio,A.2008.Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages.J Immunol 180:4299-4307.

[0497] 56.Basu,S.,Binder,R.J.,Suto,R.,Anderson,K.M.,and Srivastava,P.K.2000.Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway.Int immunol 12:1539-1546.

[0498] 57.Obeid,M.,Panaretakis,T.,Tesniere,A.,Joza,N.,Tufi,R.,Apetoh,L.,Ghiringhelli,F.,Zitvogel,L.,and Kroemer,G.2007.Leveraging the immune system during chemotherapy:moving calreticulin to the cell surface converts apoptotic death from"silent"to immunogenic.Cancer Res 67:7941-7944.

[0499] 58.Hu,Z.,Yang,X.Y.,Liu,Y.,Morse,M.A.,Lyerly,H.K.,Clay,T.M.,and Zhong,P.2005.Release of endogenous danger signals from HIFU-treated tumor cells and their stimulatory effects on APCs.Biochem Biophys Res Comm 335:124-131.

[0500] 59.Hu,Z.,Yang,X.Y.,Liu,Y.,Sankin,G.N.,Pua,E.C.,Morse,M.A.,Lyerly,H.K.,Clay,T.M.,and Zhong,P.2007.Investigation of HIFU-induced anti-tumor immunity in a murine tumor model.J Transl Med 5:34-34.

[0501] 60.Boussiotis,V.A.,Barber,D.L.,Nakarai,T.,Freeman,G.J.,Gribben,J.G.,Bernstein,G.M.,D'Andrea,A.D.,Ritz,J.,and Nadler,L.M.1994.Prevention of T cell anergy by signaling through the gamma c chain of the IL-2receptor.Science 266:1039-1042.

[0502] 61.Dure,M.,and Macian,F.2009.IL-2signaling prevents T cell anergy by inhibiting the expression of anergy-inducing genes.Mol Immunol 46:999-1006.

[0503] 62.Gao,B.,Kong,Q.,Kemp,K.,Zhao,Y.S.,and Fang,D.2012.Analysis of sirtuin 1expression reveals a molecular explanation of IL-2-mediated reversal of T-cell tolerance.Proc Natl Acad Sci USA 109:899-904.

[0504] 63.Gramaglia,I.,Weinberg,A.D.,Lemon,M.,and Croft,M.1998.Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses.J Immunol 161:6510-6517.

[0505] 64.Lathrop,S.K.,Huddleston,C.A.,Dullforce,P.A.,Montfort,M.J.,Weinberg,A.D.,and Parker,D.C.2004.A signal through OX40(CD134)allows anergic, autoreactive T cells to acquire effector cell functions.J Immunol 172:6735-6743.

[0506] 65.Murata,S.,Ladle,B.H.,Kim,P.S.,Lutz,E.R.,Wolpoe,M.E.,Ivie,S.E.,Smith,H.M.,Armstrong,T.D.,Emens,L.A.,Jaffee,E.M.等人2006.OX40 costimulation synergizes with GM-CSF whole-cell vaccination to overcome established CD8+T cell tolerance to an endogenous tumor antigen.J Immunol 176:974-983.

[0507] 66.Tsushima,F.,Yao,S.,Shin,T.,Flies,A.,Flies,S.,Xu,H.,Tamada,K.,

- Pardoll, D.M., and Chen, L. 2007. Interaction between B7-H1 and PD-1 determines initiation and reversal of T-cell anergy. *Blood* 110:180-185.
- [0508] 67. Wilcox, R.A., Tamada, K., Flies, D.B., Zhu, G., Chapoval, A.I., Blazar, B.R., Kast, W.M., and Chen, L. 2004. Ligation of CD137 receptor prevents and reverses established anergy of CD8<sup>+</sup> cytolytic T lymphocytes in vivo. *Blood* 103:177-184.
- [0509] 68. Zhang, L., Chen, X., Liu, X., Kline, D.E., Teague, R.M., Gajewski, T.F., and Kline, J. 2013. CD40 ligation reverses T cell tolerance in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest* 123:1999-2010.
- [0510] 69. Anelli T, Alessio M, Mezghrani A, Simmen T, Talamo F, Bachi A and Sitia R. ERp44, a novel endoplasmic reticulum folding assistant of the thioredoxin family. *EMBO J.* 2002;21(4):835-844.
- [0511] 70. Jessop CE, Chakravarthi S, Garbi N, Hammerling GJ, Lovell S and Bulleid NJ. ERp57 is essential for efficient folding of glycoproteins sharing common structural domains. *EMBO J.* 2007;26(1):28-40.
- [0512] 71. Ron D and Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(7):519-529.
- [0513] 72. White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(6):401-410.
- [0514] 73. Kon M, Kiffin R, Koga H, Chachochnick J, Macian F, Varticovski L and Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy is required for tumor growth. *Sci Transl Med.* 2011;3(109):109ra117.
- [0515] 74. Haar G, Shaw A, Pye S, Ward B, Bottomley F, Nolan R and Coady AM. Guidance on reporting ultrasound exposure conditions for bio-effects studies. *Ultrasound Med Biol.* 2011;37(2):177-183.
- [0516] 75. Duck FA. (1990). *Physical properties of tissue: a comprehensive reference book*: Academic Press).
- [0517] 76. Partanen A, Tillander M, Yarmolenko PS, Wood BJ, Dreher MR and Kohler MO. Reduction of peak acoustic pressure and shaping of heated region by use of multifoci sonications in MR-guided high-intensity focused ultrasound mediated mild hyperthermia. *Med Phys.* 2013;40(1):013301.
- [0518] 77. Back SH, Schroder M, Lee K, Zhang K and Kaufman RJ. ER stress signaling by regulated splicing: IRE1/HAC1/XBP1. *Methods.* 2005;35(4):395-416.
- [0519] 78. Lewis and Olbricht, *Review of Scientific Instruments* 80, 114704 (2009).
- [0520] 79. Pouch 等人 *Ultrasound Med* 2010;29:1595-1606.
- [0521] 80. Sahu 等人 *Scientific Reports* 2014 Dec 3;4:7303. doi:10.1038/srep07303.

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 蒙特非奥里医疗中心
- [0003] 阿尔伯特爱因斯坦医学院公司
- [0004] <120> 用于治疗癌症和转移的低强度聚焦超声
- [0005] <130> 60537/63
- [0006] <140> PCT/US2016/35440
- [0007] <141> 2016-06-02
- [0008] <150> US 62/170,378
- [0009] <151> 2015-06-03
- [0010] <150> US 62/204,312
- [0011] <151> 2015-08-12
- [0012] <160> 24
- [0013] <170> PatentIn version 3.5
- [0014] <210> 1
- [0015] <211> 22
- [0016] <212> DNA
- [0017] <213> 人工序列
- [0018] <220>
- [0019] <223> 用于actinb的正向引物
- [0020] <400> 1
- [0021] gtgacgttga catccgtaaa ga 22
- [0022] <210> 2
- [0023] <211> 19
- [0024] <212> DNA
- [0025] <213> 人工序列
- [0026] <220>
- [0027] <223> 用于actinb的反向引物
- [0028] <400> 2
- [0029] gccggactca tcgtactcc 19
- [0030] <210> 3
- [0031] <211> 21
- [0032] <212> DNA
- [0033] <213> 人工序列
- [0034] <220>
- [0035] <223> 用于Cb1b的正向引物
- [0036] <400> 3
- [0037] gcagcatcat tgaccctttc a 21
- [0038] <210> 4

- [0039] <211> 21  
[0040] <212> DNA  
[0041] <213> 人工序列  
[0042] <220>  
[0043] <223> 用于Cb1b的反向引物  
[0044] <400> 4  
[0045] atgtgactgg tgagttctgc c 21  
[0046] <210> 5  
[0047] <211> 24  
[0048] <212> DNA  
[0049] <213> 人工序列  
[0050] <220>  
[0051] <223> 用于Grail的正向引物  
[0052] <400> 5  
[0053] atgcaagagc tcaaagcagg aagc 24  
[0054] <210> 6  
[0055] <211> 24  
[0056] <212> DNA  
[0057] <213> 人工序列  
[0058] <220>  
[0059] <223> 用于Grail的反向引物  
[0060] <400> 6  
[0061] gtgcgcagct gaagctttcc aata 24  
[0062] <210> 7  
[0063] <211> 17  
[0064] <212> DNA  
[0065] <213> 人工序列  
[0066] <220>  
[0067] <223> 用于Ikaros的正向引物  
[0068] <400> 7  
[0069] gctggctctc ggaggag 17  
[0070] <210> 8  
[0071] <211> 20  
[0072] <212> DNA  
[0073] <213> 人工序列  
[0074] <220>  
[0075] <223> 用于Ikaros的反向引物  
[0076] <400> 8  
[0077] cgcacttgta caccttcagc 20

- [0078] <210> 9  
[0079] <211> 20  
[0080] <212> DNA  
[0081] <213> 人工序列  
[0082] <220>  
[0083] <223> 用于胱天蛋白酶3的正向引物  
[0084] <400> 9  
[0085] acgcgcaaa gctagaattt 20  
[0086] <210> 10  
[0087] <211> 20  
[0088] <212> DNA  
[0089] <213> 人工序列  
[0090] <220>  
[0091] <223> 用于胱天蛋白酶3的反向引物  
[0092] <400> 10  
[0093] ctttgcgtgg aaagtggagt 20  
[0094] <210> 11  
[0095] <211> 21  
[0096] <212> DNA  
[0097] <213> 人工序列  
[0098] <220>  
[0099] <223> 用于Egr2的正向引物  
[0100] <400> 11  
[0101] tcagtggttt tatgcaccag c 21  
[0102] <210> 12  
[0103] <211> 21  
[0104] <212> DNA  
[0105] <213> 人工序列  
[0106] <220>  
[0107] <223> 用于Egr2的反向引物  
[0108] <400> 12  
[0109] gaagctactc ggatacggga g 21  
[0110] <210> 13  
[0111] <211> 20  
[0112] <212> DNA  
[0113] <213> 人工序列  
[0114] <220>  
[0115] <223> 用于Grg4的正向引物  
[0116] <400> 13

- [0117] tcactcaagt ttgcccactg 20  
[0118] <210> 14  
[0119] <211> 20  
[0120] <212> DNA  
[0121] <213> 人工序列  
[0122] <220>  
[0123] <223> 用于Grg4的反向引物  
[0124] <400> 14  
[0125] cacagctaag caccgatgag 20  
[0126] <210> 15  
[0127] <211> 20  
[0128] <212> DNA  
[0129] <213> 人工序列  
[0130] <220>  
[0131] <223> 用于Itch的正向引物  
[0132] <400> 15  
[0133] gtgtggagtc accagaccct 20  
[0134] <210> 16  
[0135] <211> 20  
[0136] <212> DNA  
[0137] <213> 人工序列  
[0138] <220>  
[0139] <223> 用于Itch的反向引物  
[0140] <400> 16  
[0141] gcttctactt gcagcccatc 20  
[0142] <210> 17  
[0143] <211> 19  
[0144] <212> DNA  
[0145] <213> 人工序列  
[0146] <220>  
[0147] <223> Foxp3  
[0148] <400> 17  
[0149] ggcccttctc caggacaga 19  
[0150] <210> 18  
[0151] <211> 20  
[0152] <212> DNA  
[0153] <213> 人工序列  
[0154] <220>  
[0155] <223> Foxp3

- [0156] <400> 18  
[0157] gctgatcatg gctgggttgt 20  
[0158] <210> 19  
[0159] <211> 18  
[0160] <212> DNA  
[0161] <213> 人工序列  
[0162] <220>  
[0163] <223> TAGCCAGGAAACGTCTAC  
[0164] <400> 19  
[0165] actcggctctg gaaatctg 18  
[0166] <210> 20  
[0167] <211> 18  
[0168] <212> DNA  
[0169] <213> 人工序列  
[0170] <220>  
[0171] <223> 基于人序列的引物  
[0172] <400> 20  
[0173] tagccaggaa acgtctac 18  
[0174] <210> 21  
[0175] <211> 24  
[0176] <212> DNA  
[0177] <213> 人工序列  
[0178] <220>  
[0179] <223> 基于人序列的引物  
[0180] <400> 21  
[0181] ttgcttatgg cctggataag aggg 24  
[0182] <210> 22  
[0183] <211> 24  
[0184] <212> DNA  
[0185] <213> 人工序列  
[0186] <220>  
[0187] <223> 基于人序列的引物  
[0188] <400> 22  
[0189] tgtacccttg tcttcagctg tcac 24  
[0190] <210> 23  
[0191] <211> 24  
[0192] <212> DNA  
[0193] <213> 人工序列  
[0194] <220>

- 
- [0195] <223> 基于人序列的引物  
[0196] <400> 23  
[0197] tcatccgagt tccagaaagc agtc 24  
[0198] <210> 24  
[0199] <211> 24  
[0200] <212> DNA  
[0201] <213> 人工序列  
[0202] <220>  
[0203] <223> 基于人序列的引物  
[0204] <400> 24  
[0205] ttgacataga gtggagggtc tcct 24

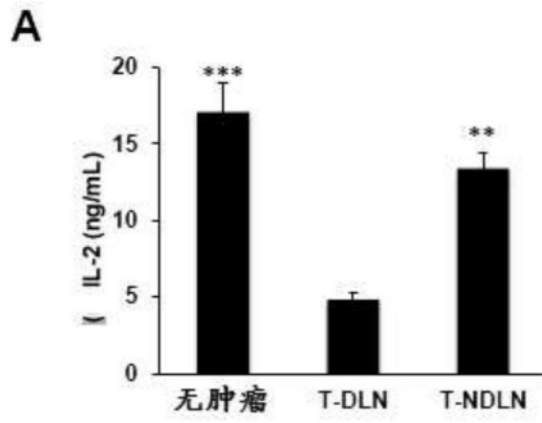


图1A

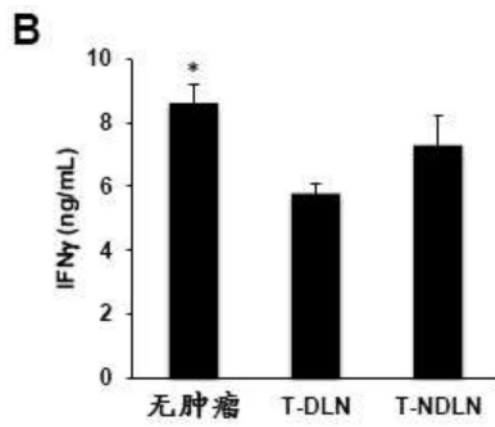


图1B

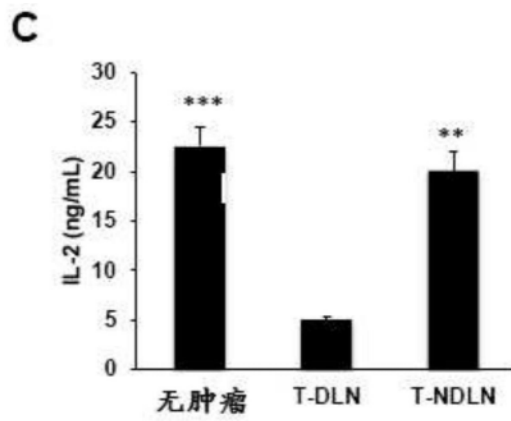


图1C

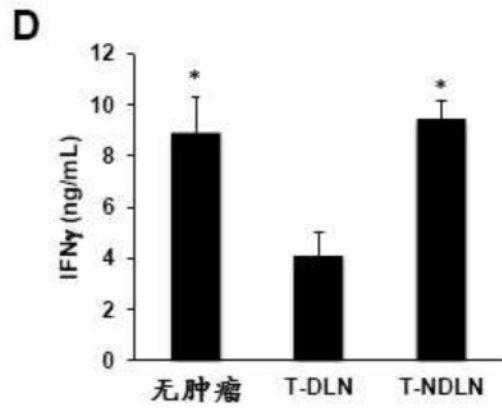


图1D

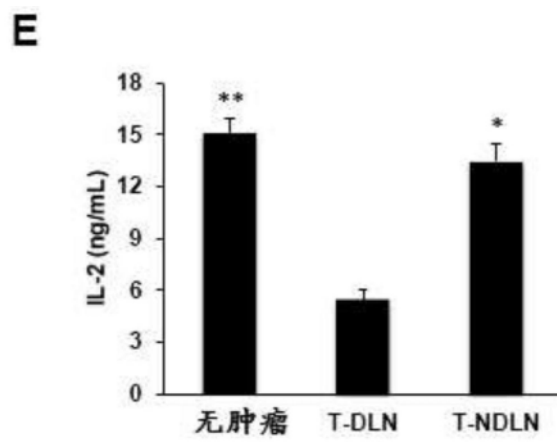


图1E

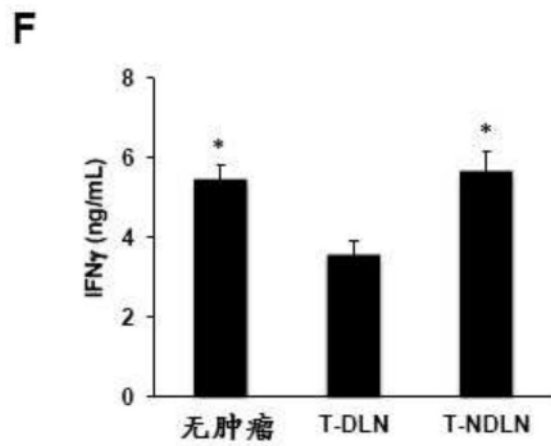


图1F

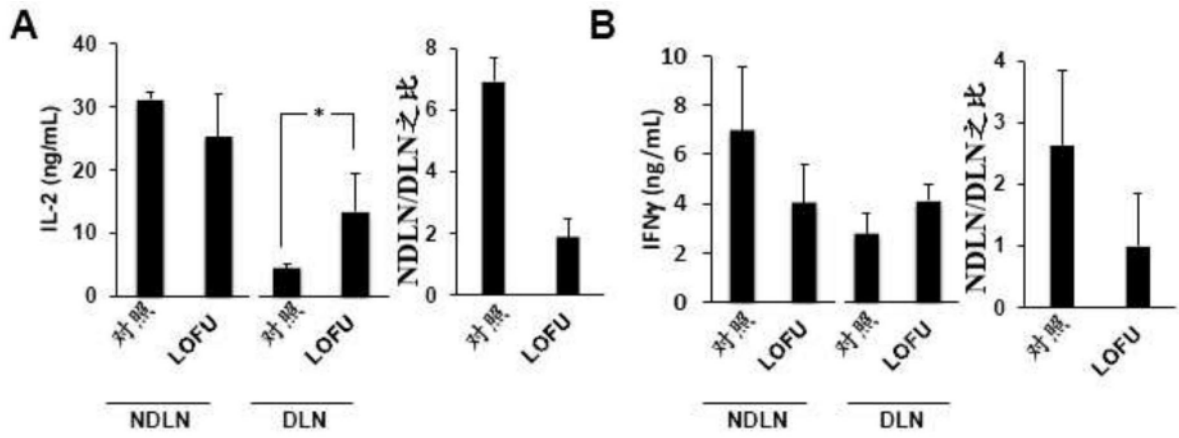


图 2A

图 2B

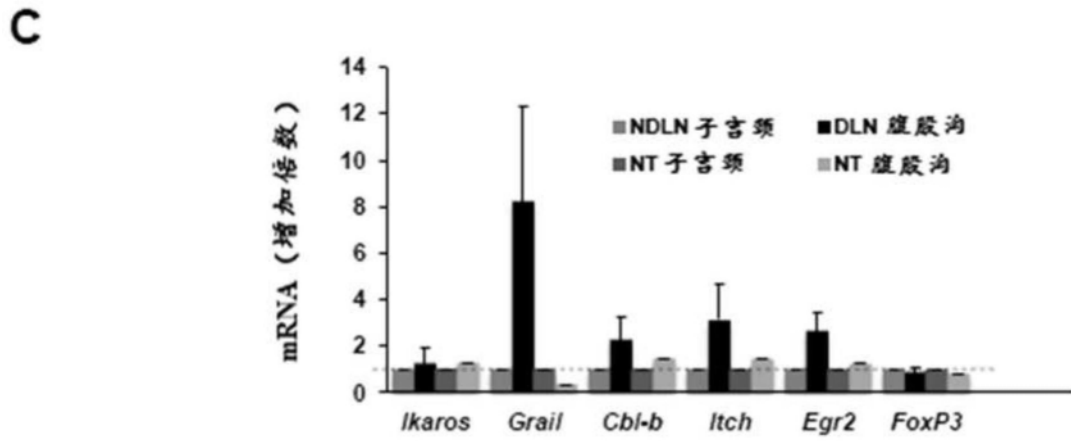


图2C

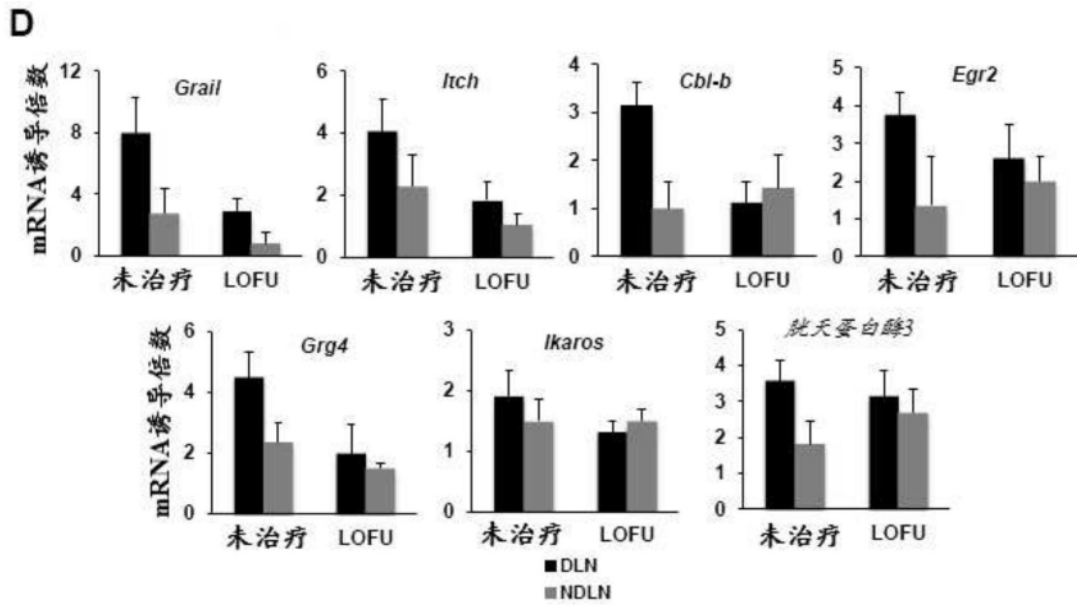


图2D

**A**

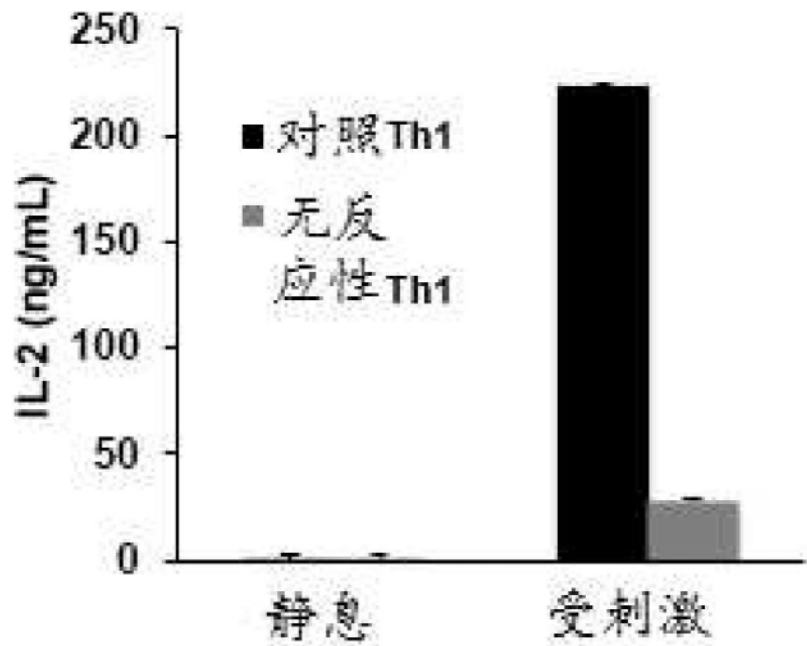


图3A

**B**

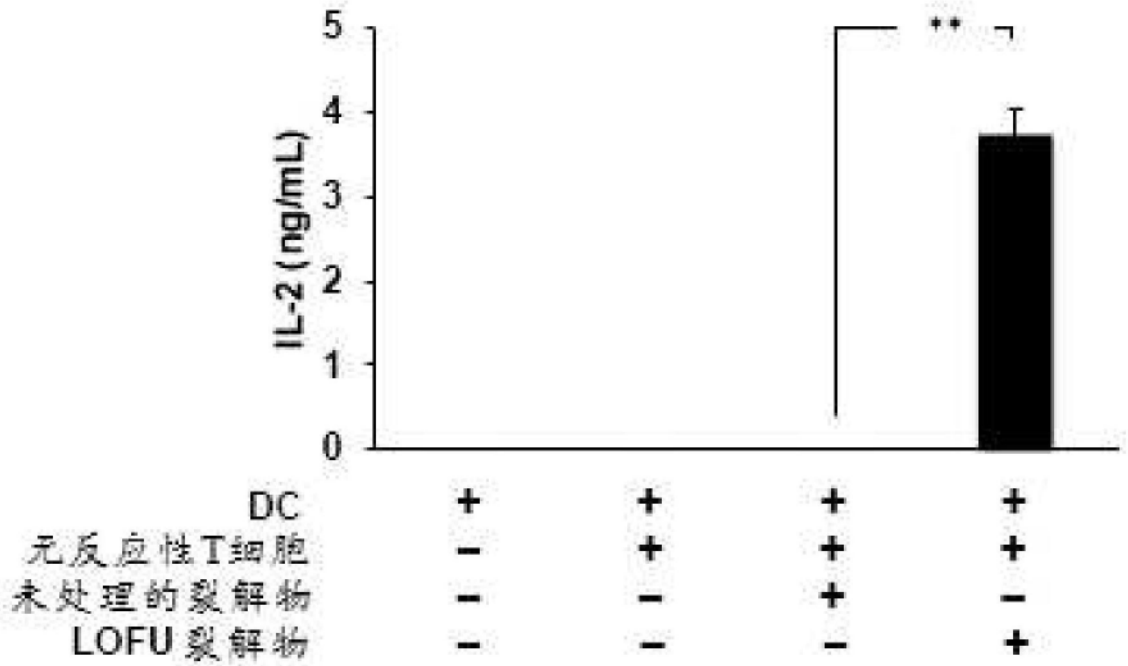


图3B

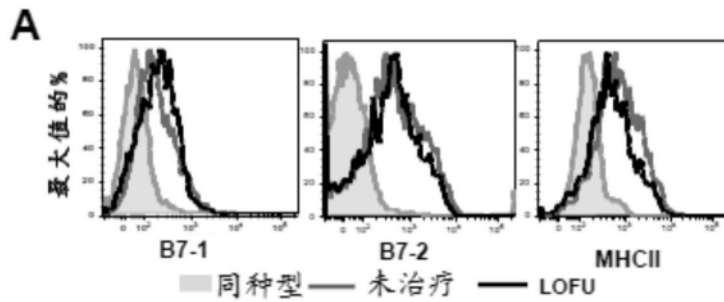


图4A

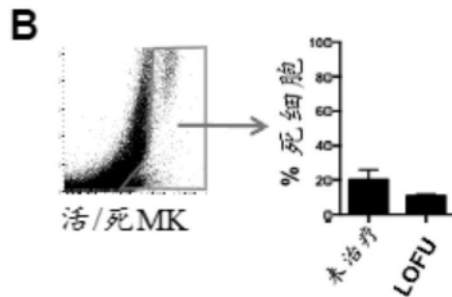


图4B

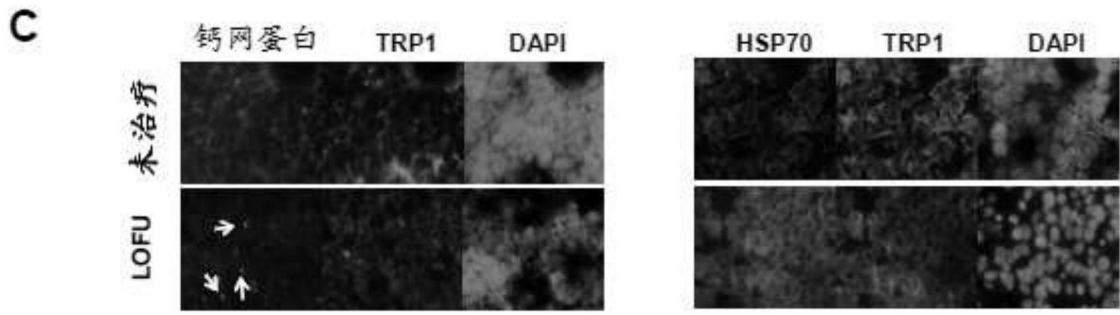


图4C

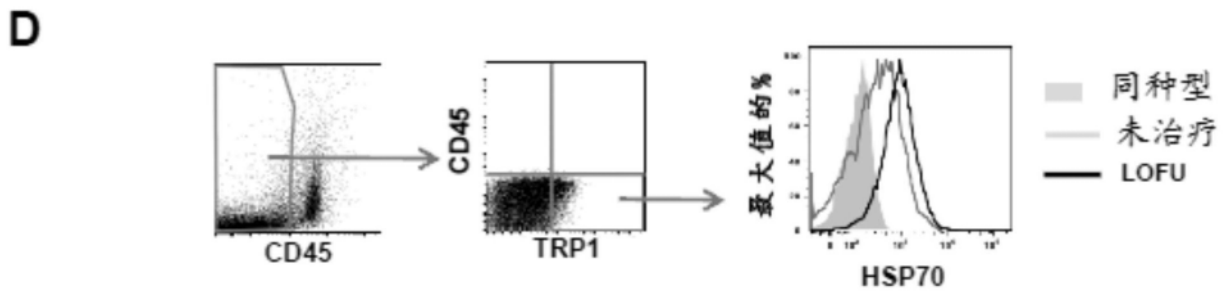


图4D

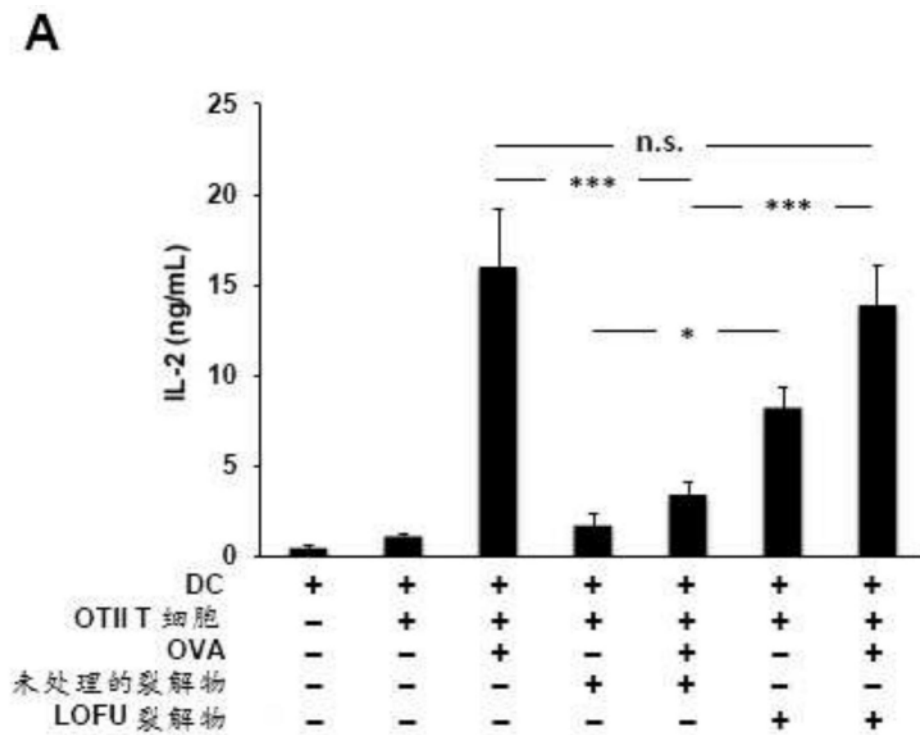


图5A

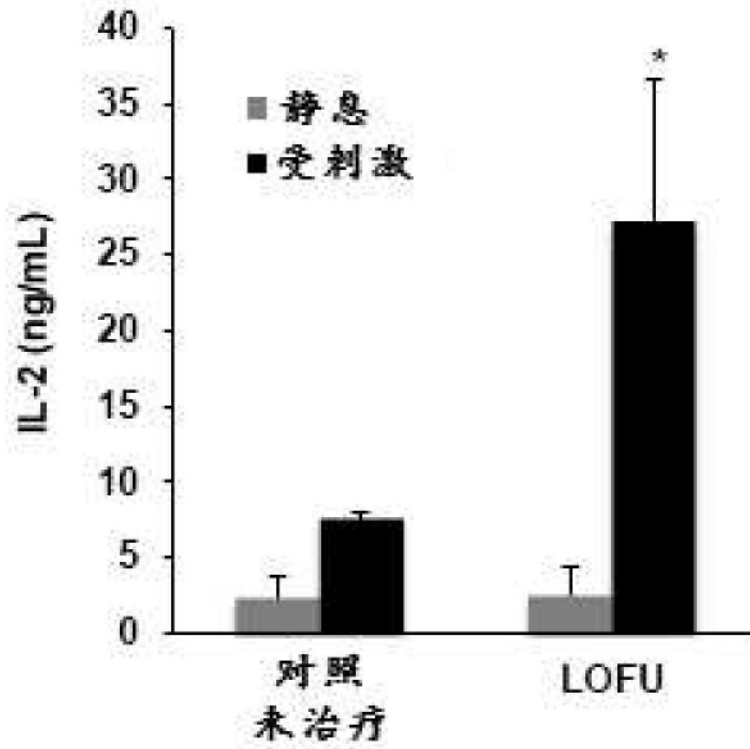


图5B

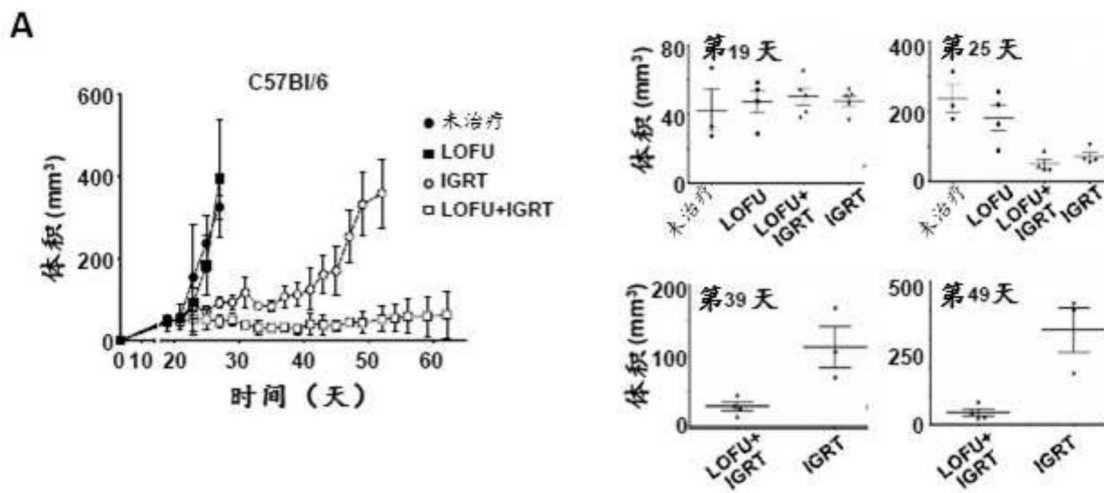


图6A

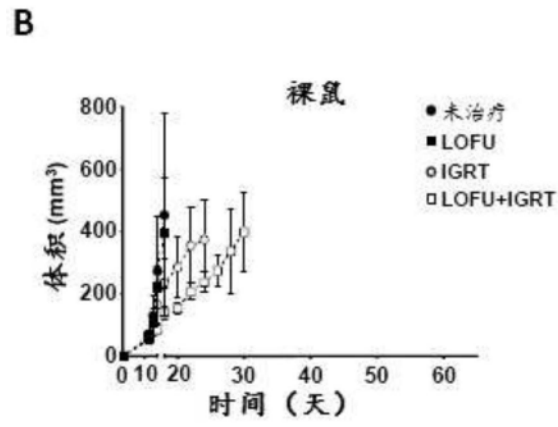


图6B

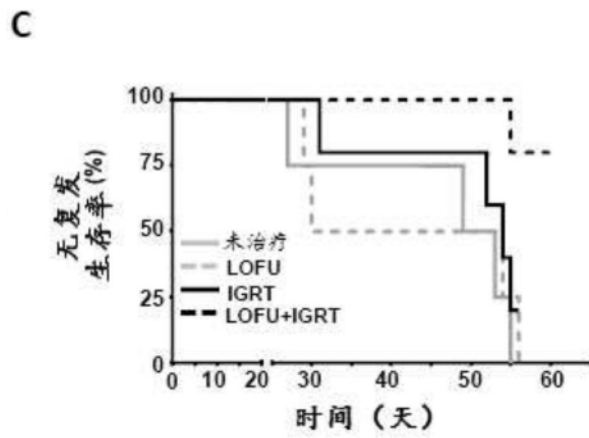


图6C

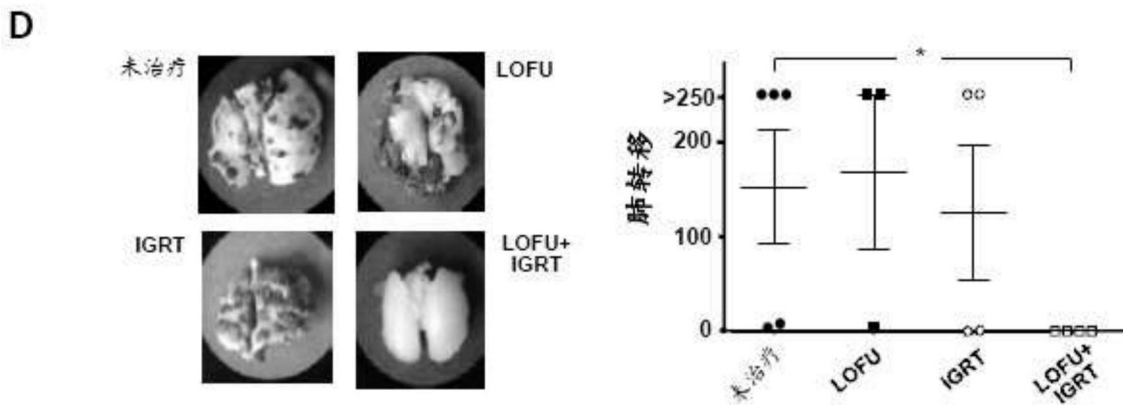


图6D

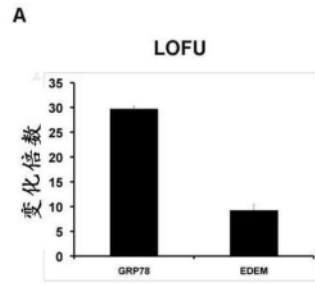


图7A

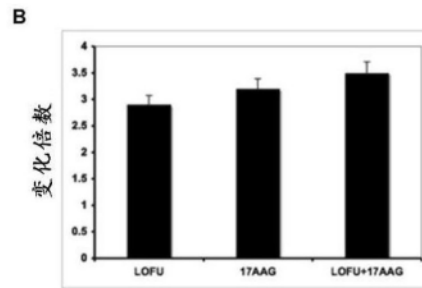


图7B

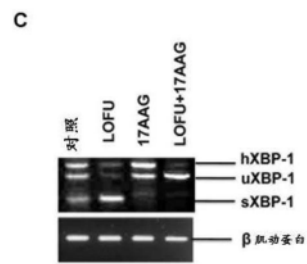


图7C

D

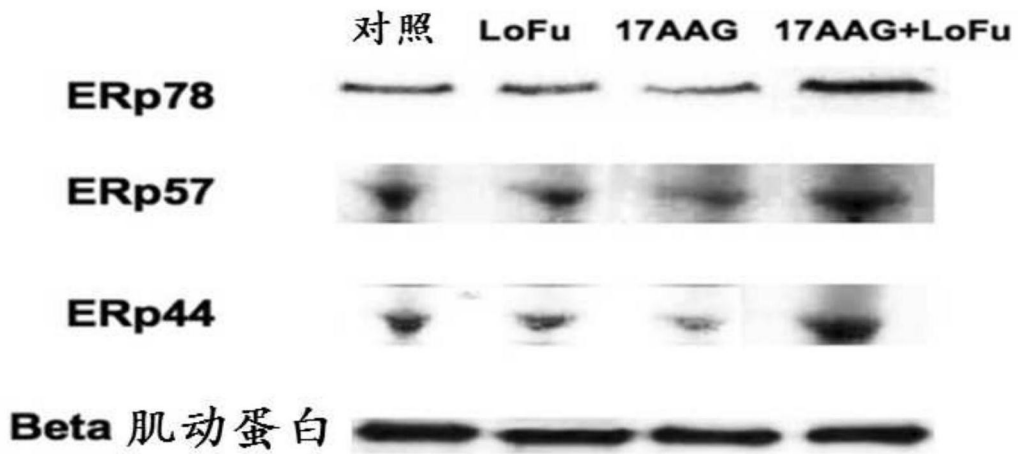


图7D

E

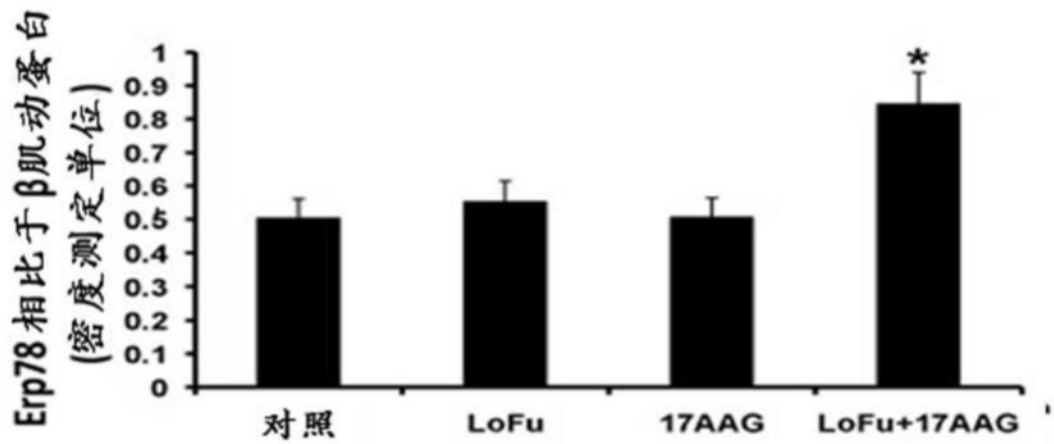


图7E

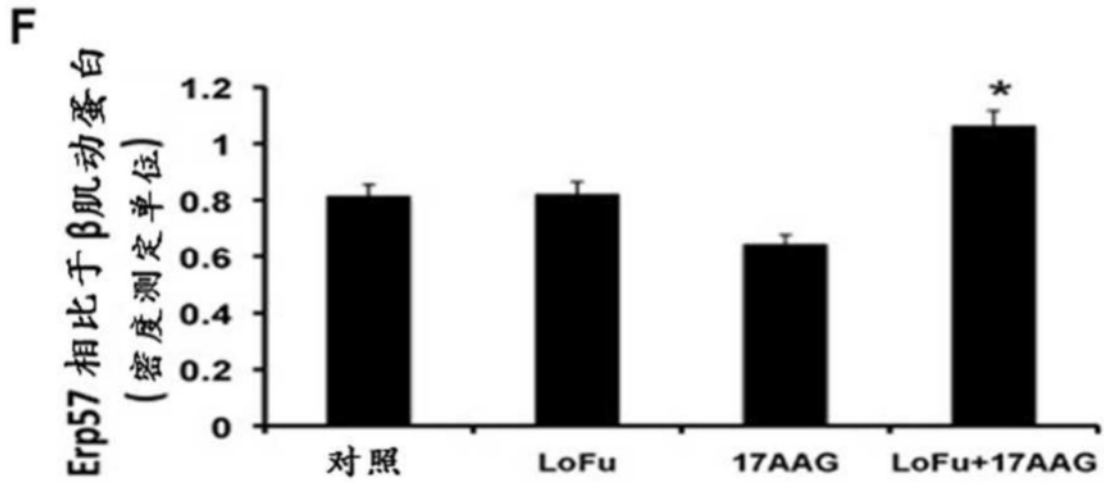


图7F

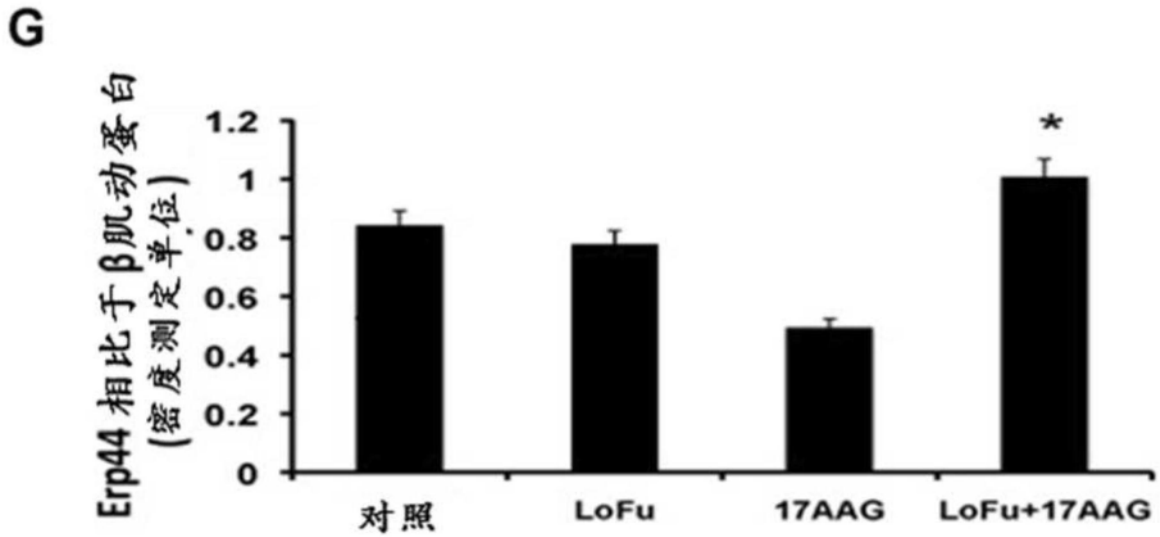


图7G

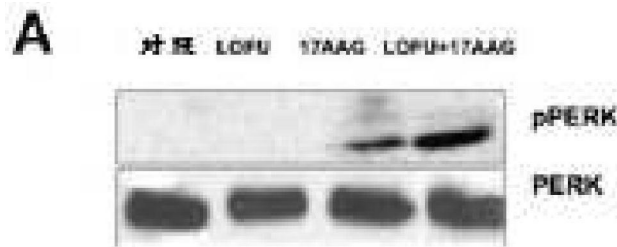


图8A

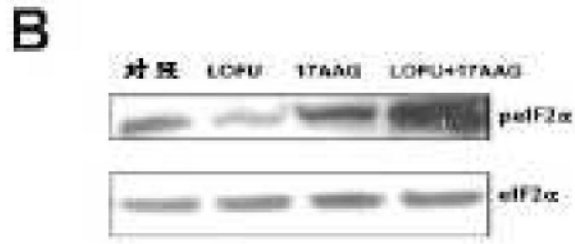


图8B

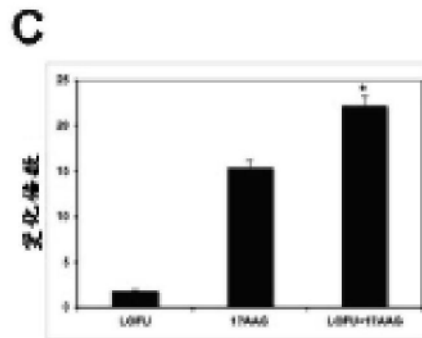


图8C

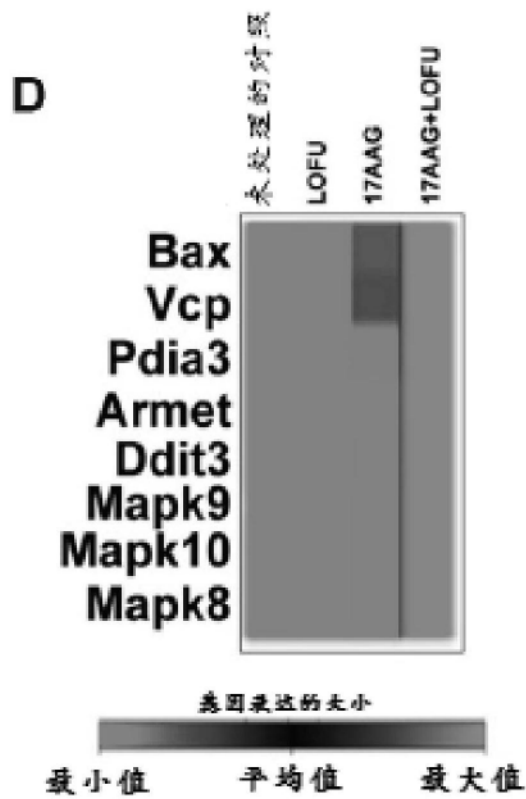


图8D

**E**

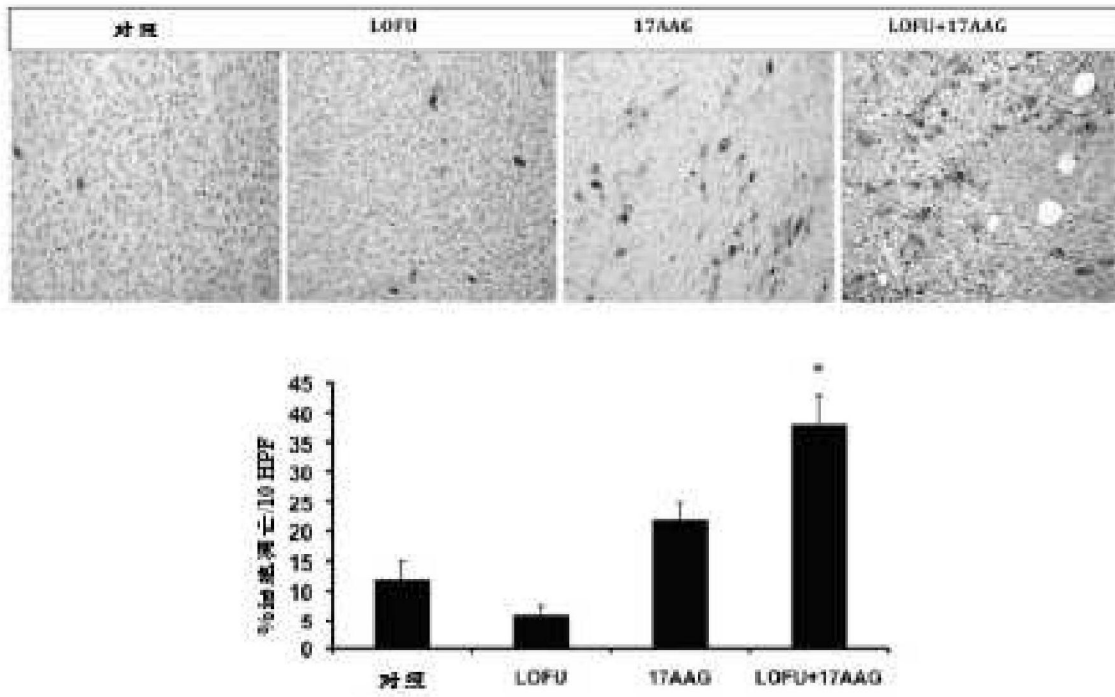


图8E

**A**

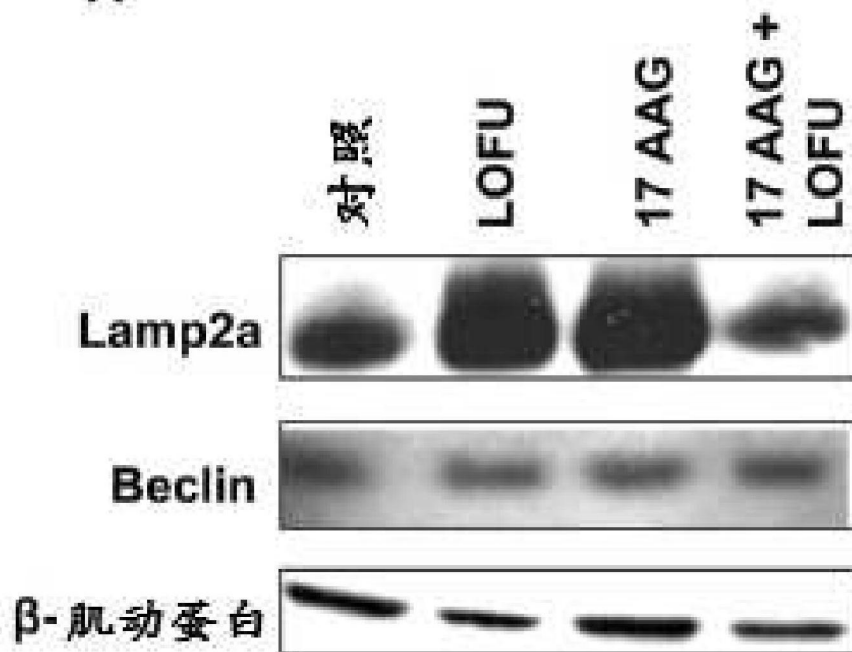


图9A

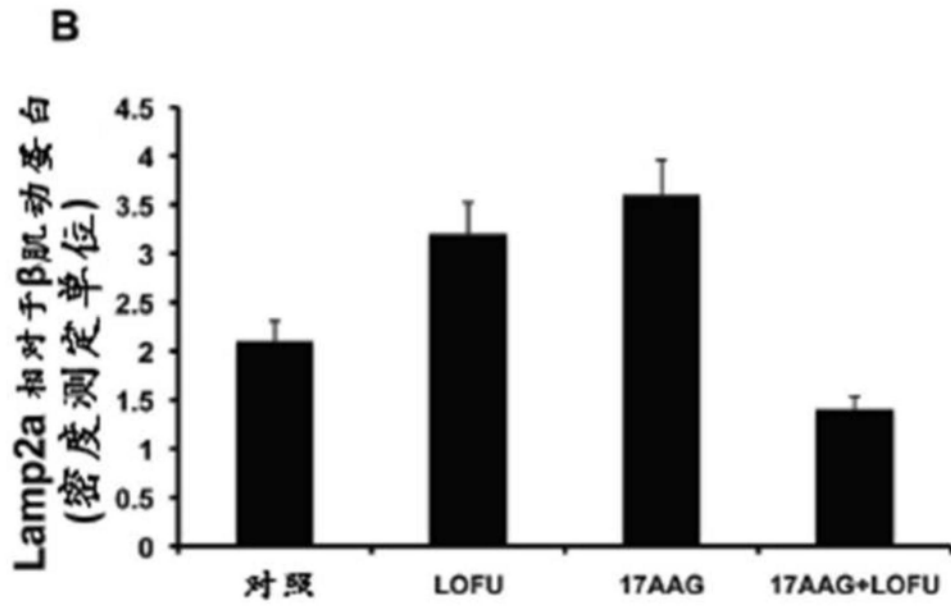


图9B

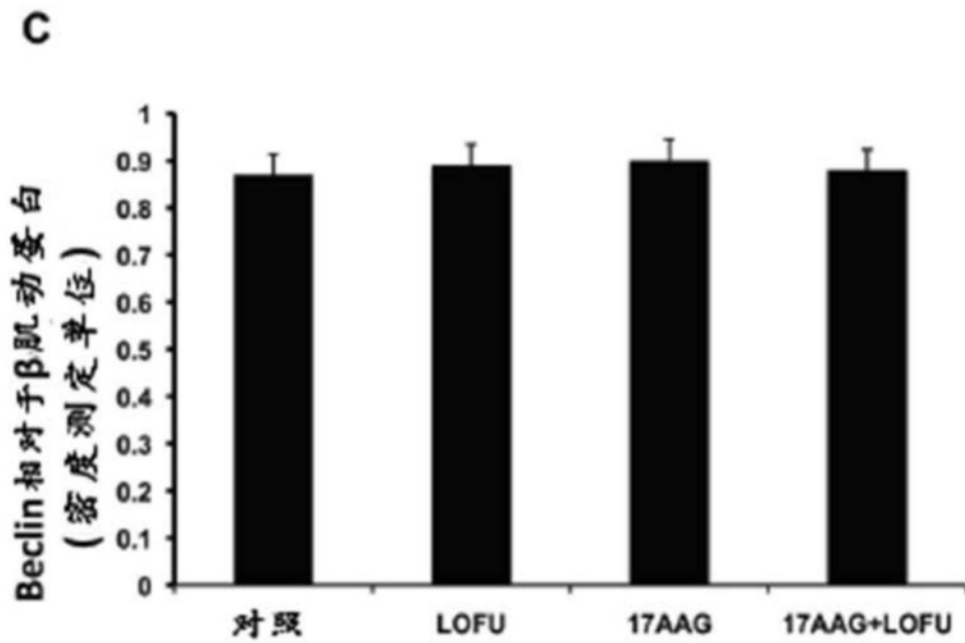


图9C

**A**

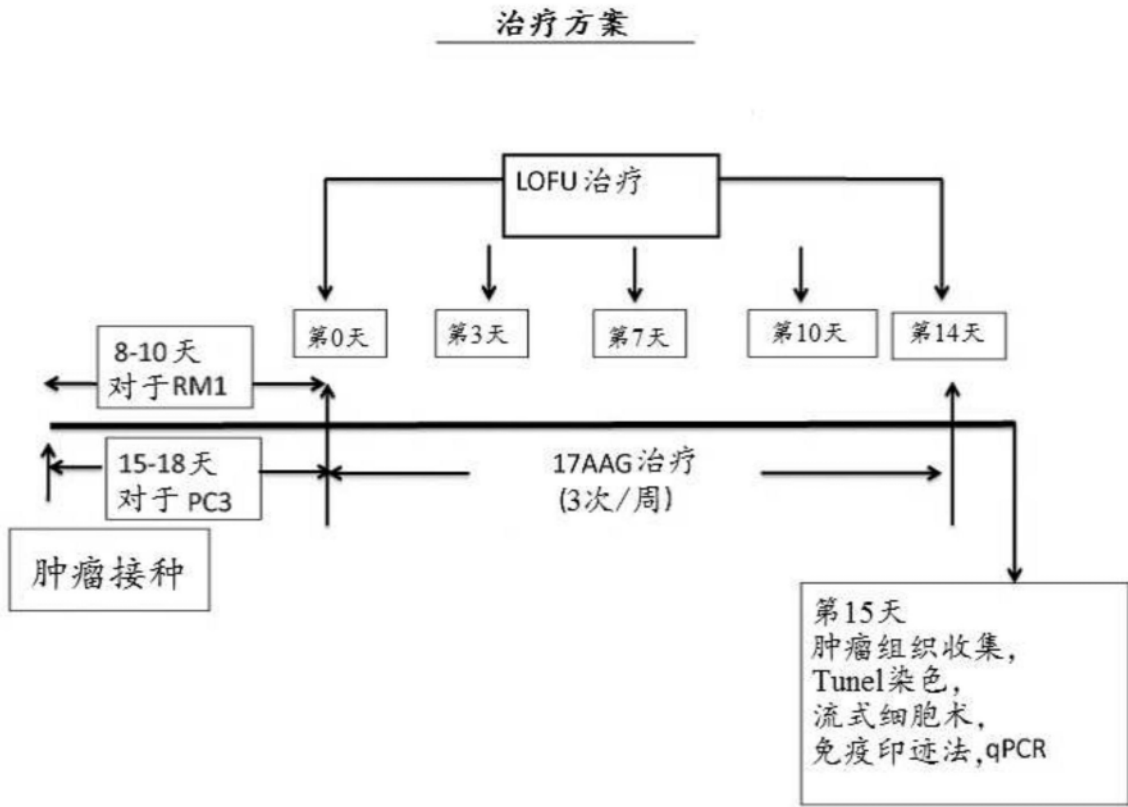


图10A

**B**

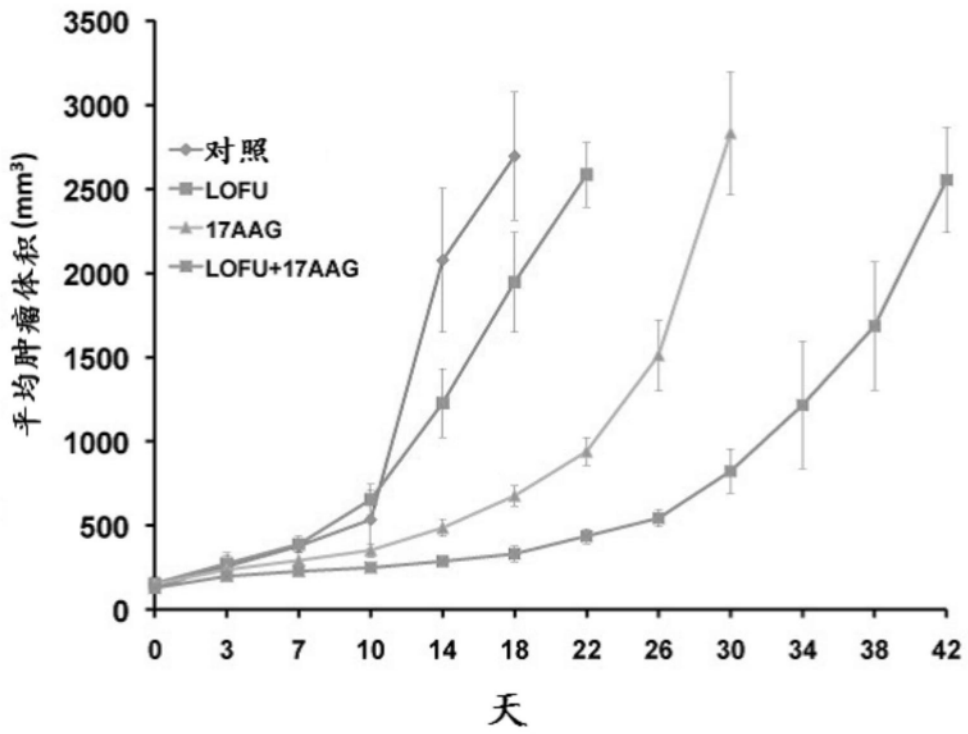


图10B

**C**

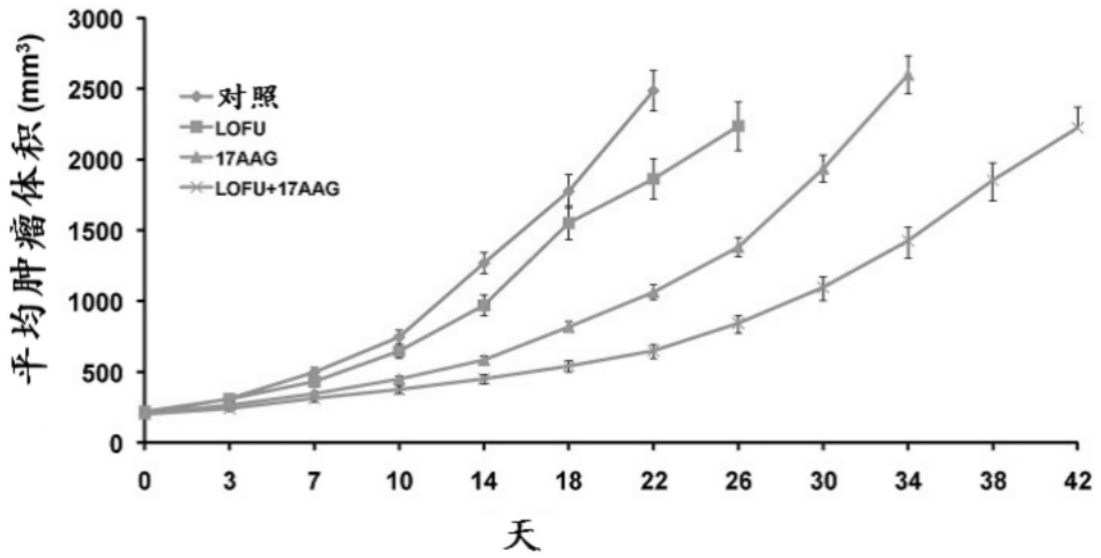


图10C

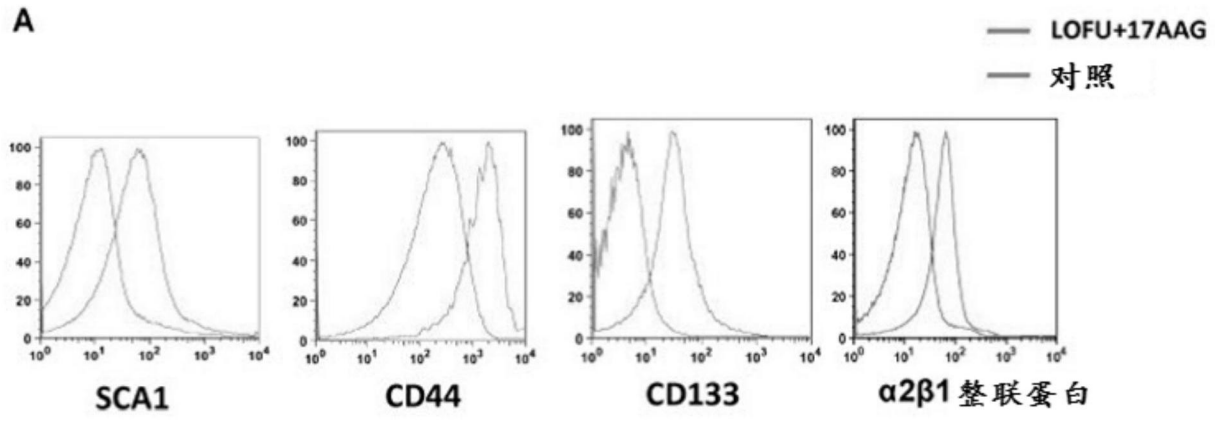


图11A

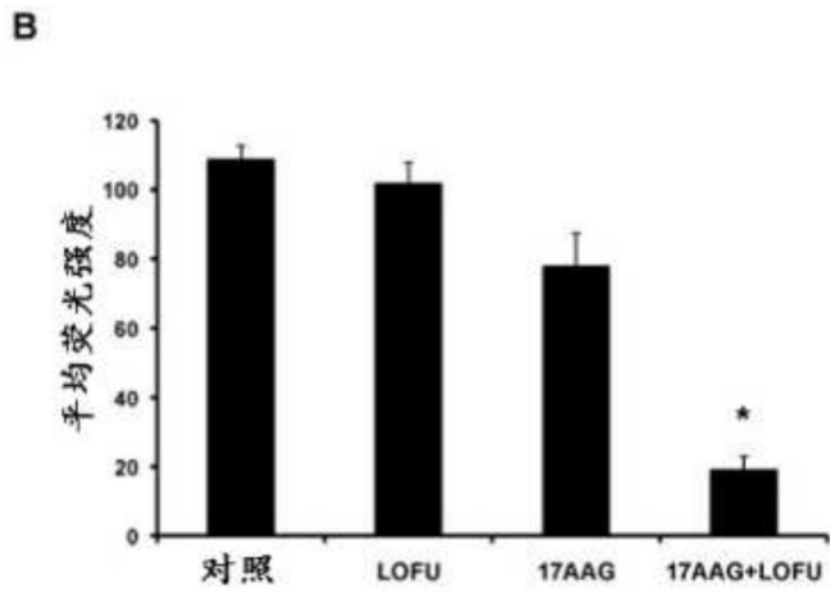


图11B

C

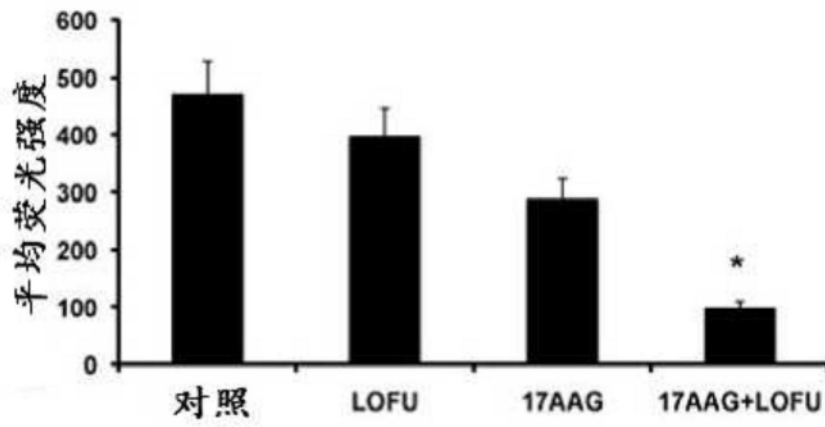


图11C

D

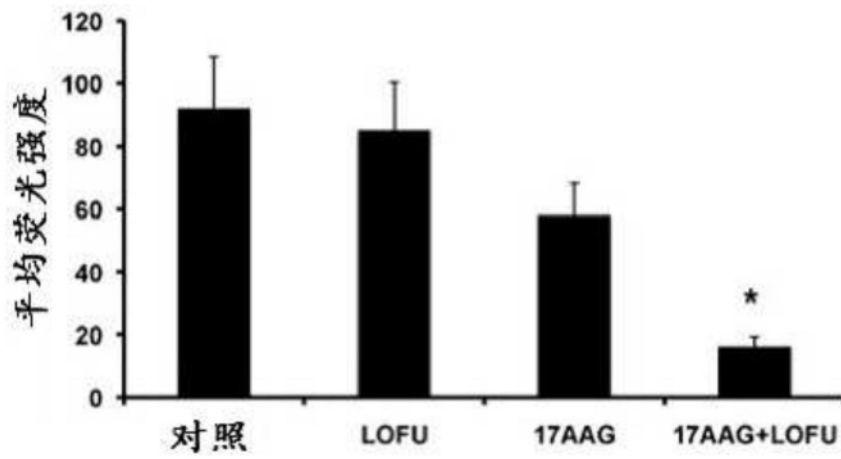


图11D

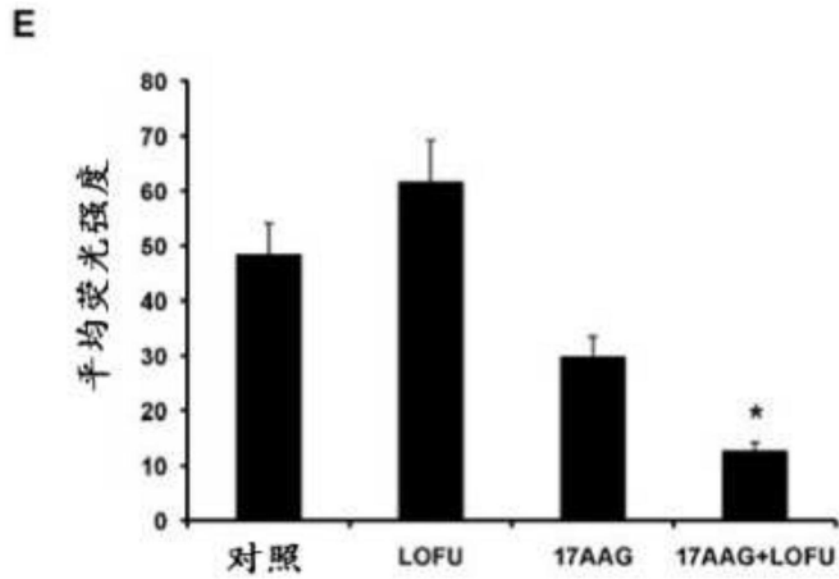


图11E

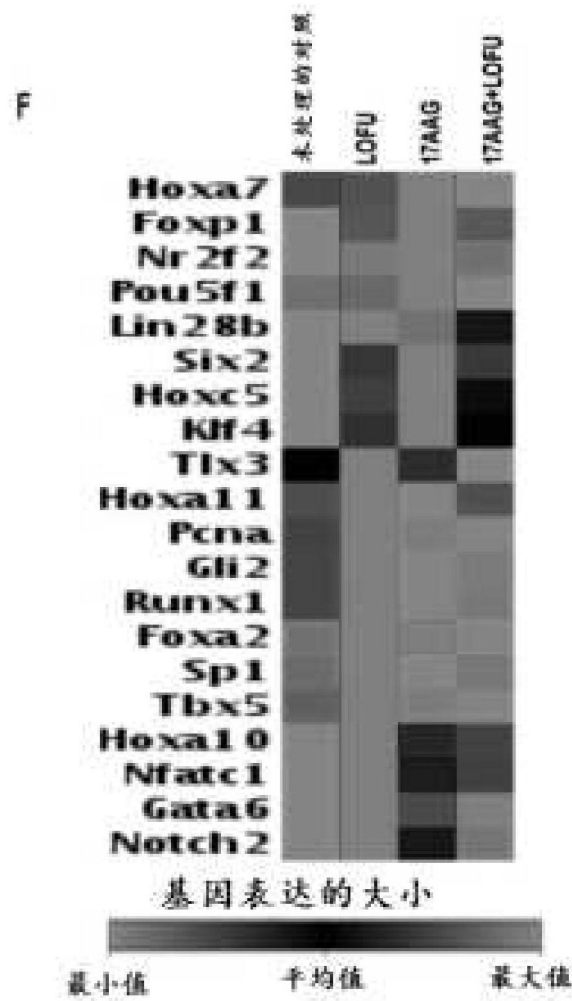


图11F

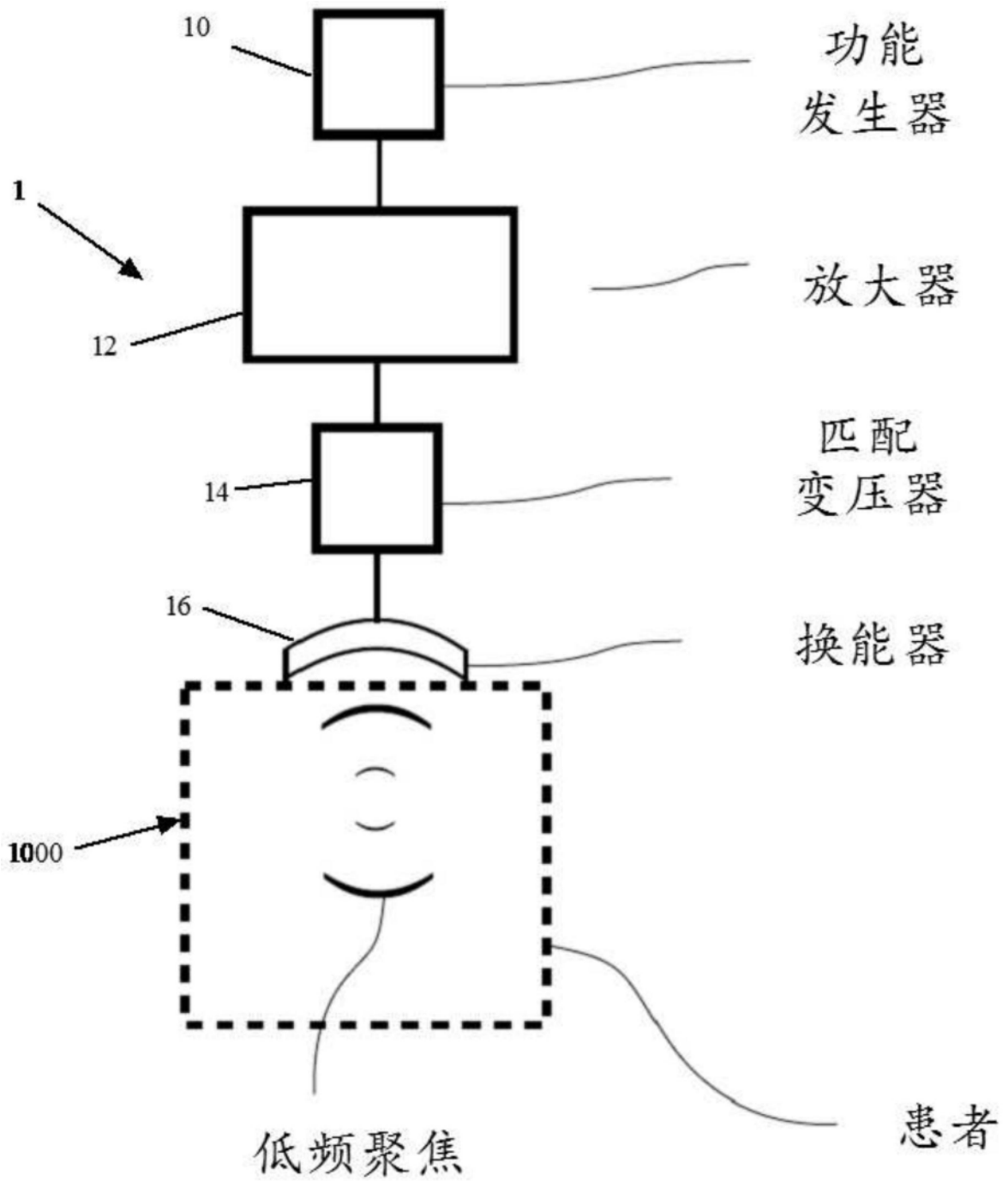


图12

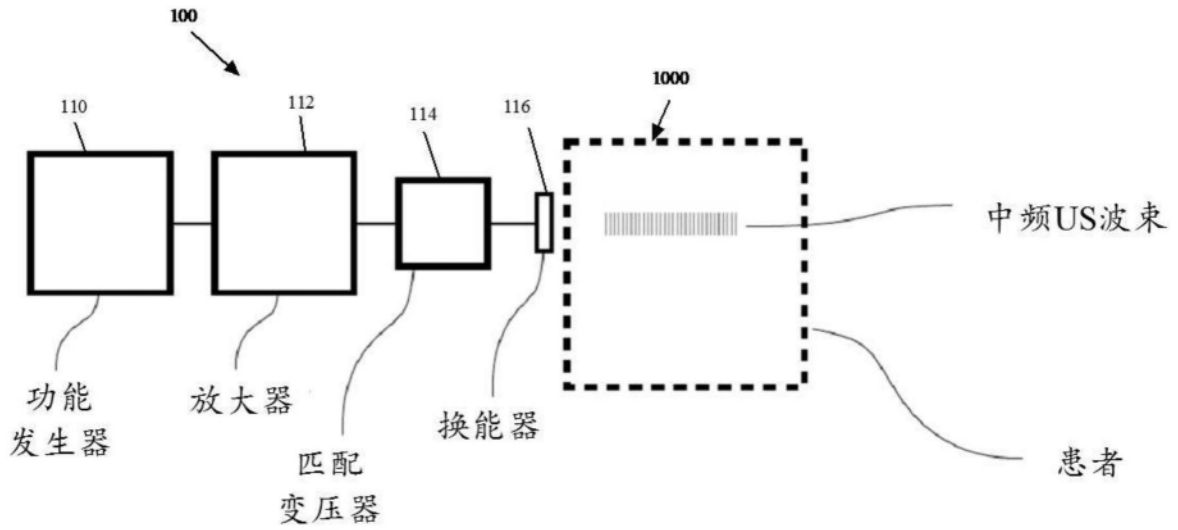


图13

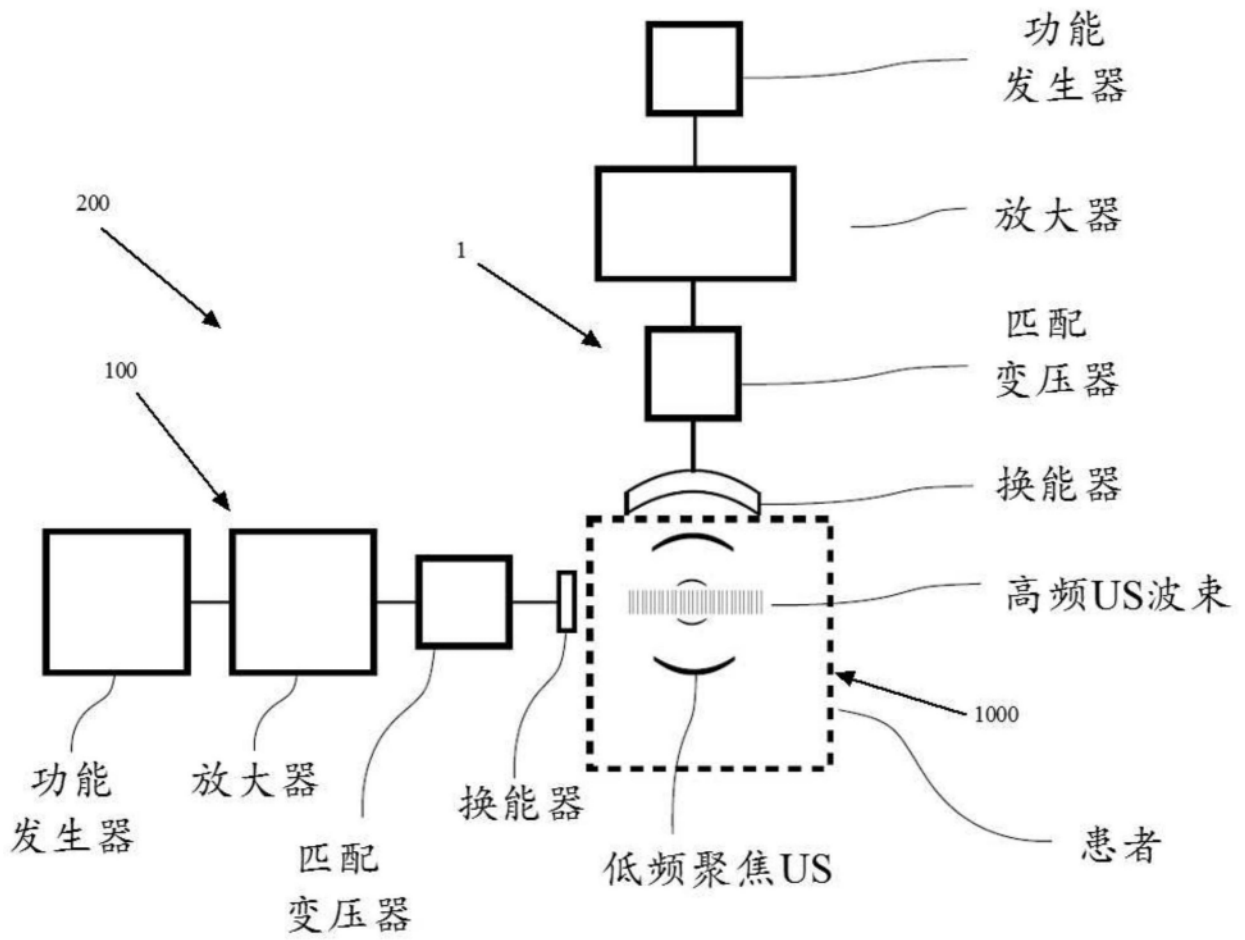


图14

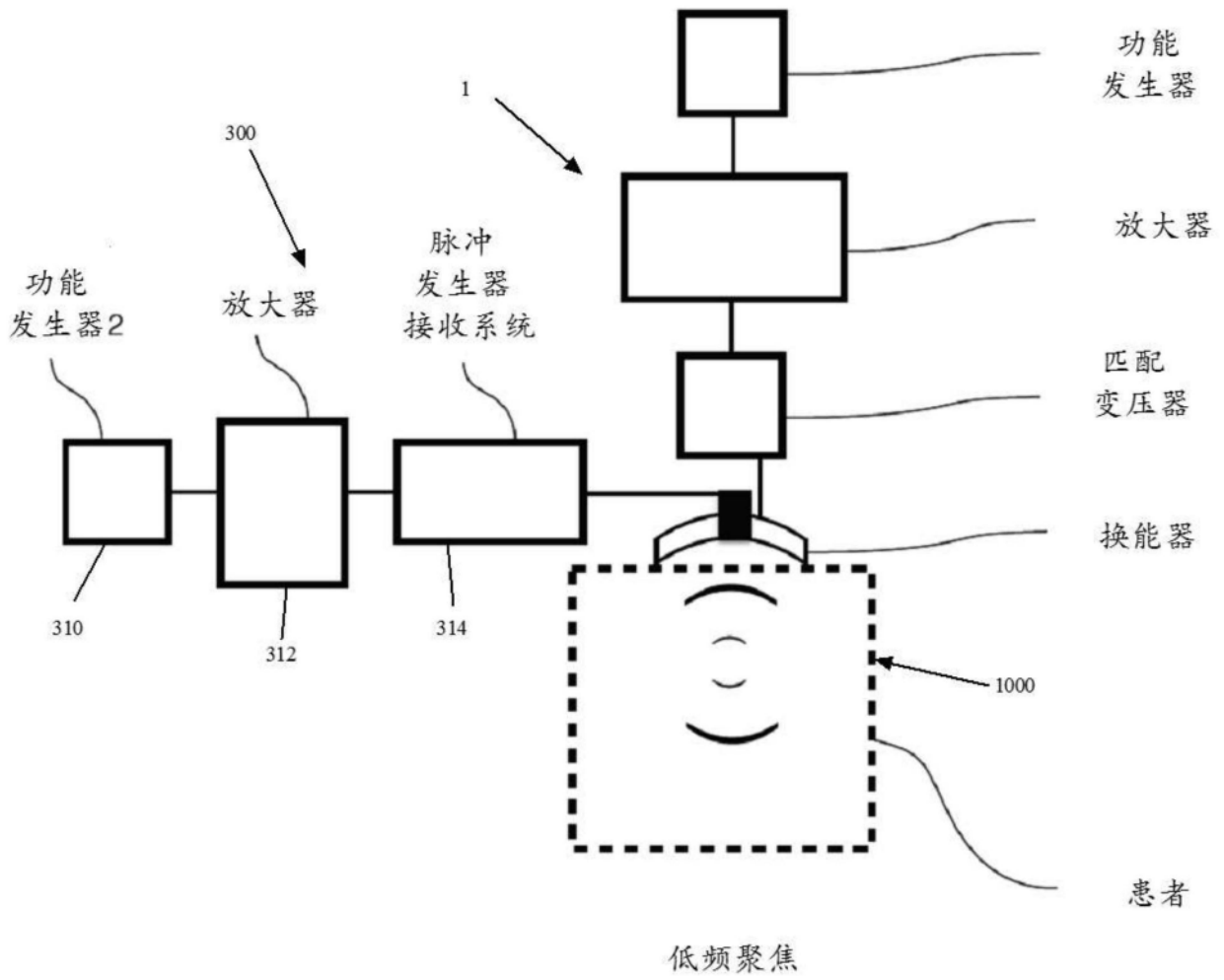


图15

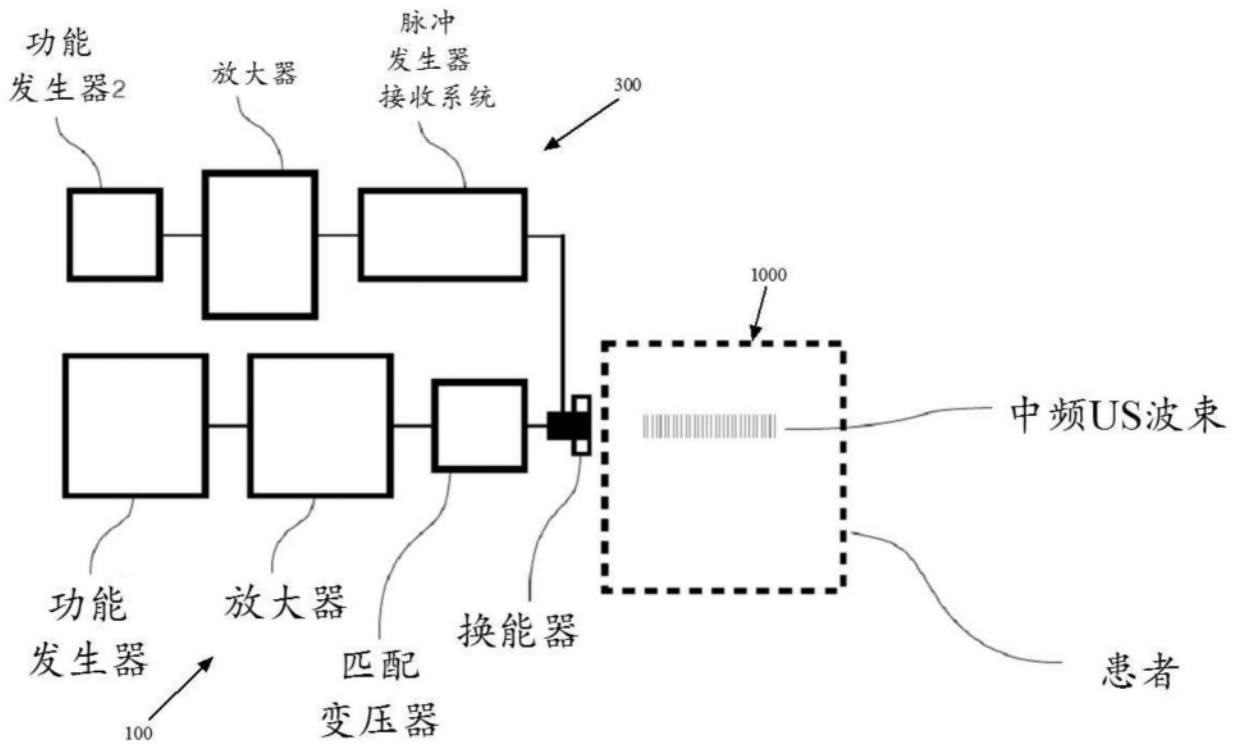


图16

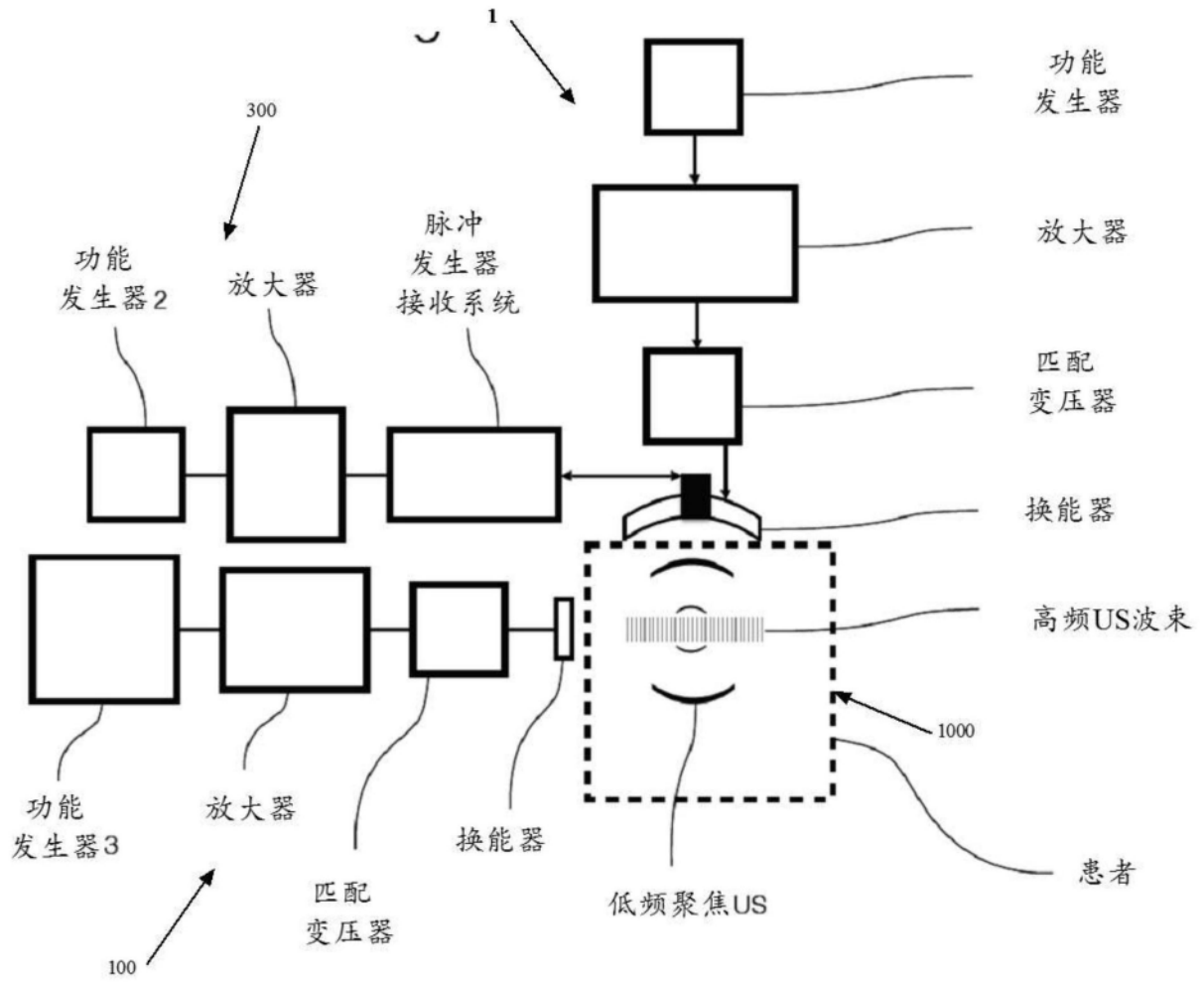


图17

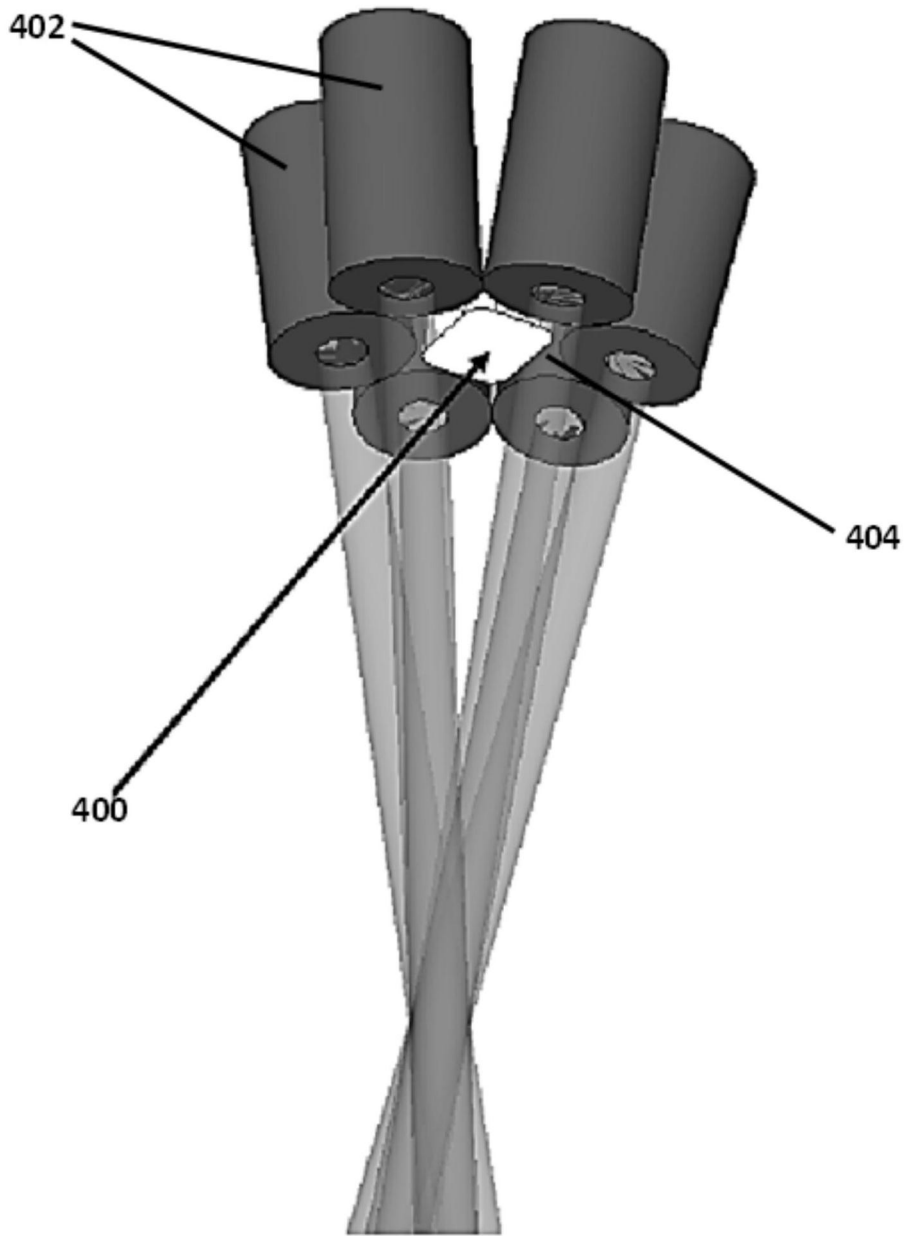


图18

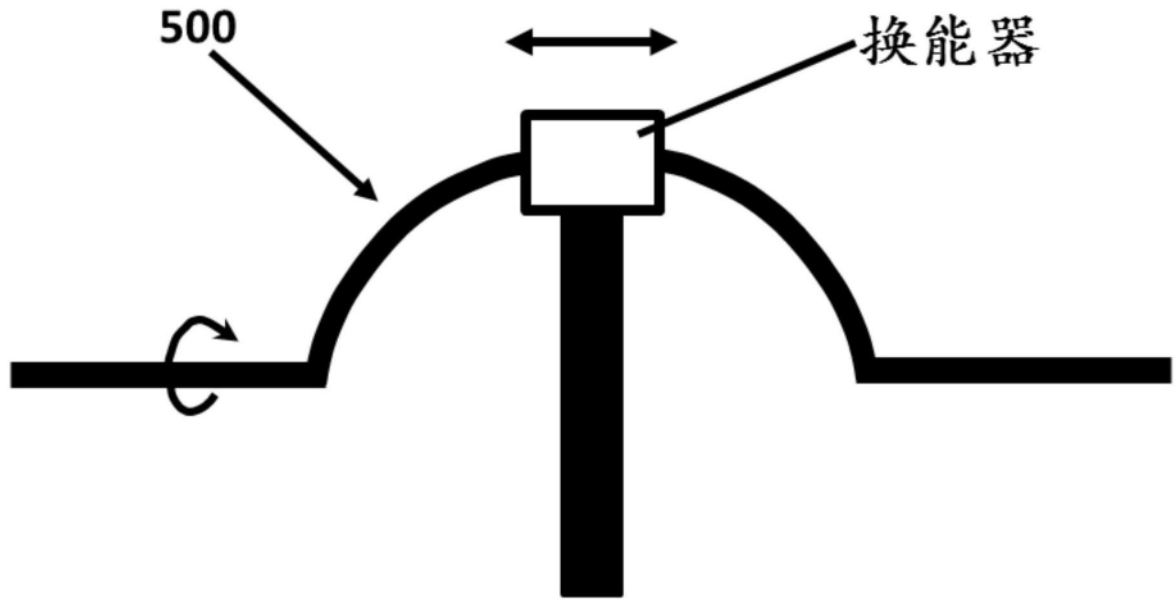


图19