



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 115335085 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 11

(21) 申请号 202180009173.8

(22) 申请日 2021.01.12

(30) 优先权数据

62/960,583 2020.01.13 US

63/034,868 2020.06.04 US

63/061,634 2020.08.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.07.13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/013130 2021.01.12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/146213 EN 2021.07.22

(71) 申请人 格兰达利斯有限公司

地址 美国德克萨斯

(72) 发明人 J·尼穆奈缇斯 E·博格纳尔

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

专利代理师 左路 林晓红

(51) Int.Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/535 (2006.01)

G12N 15/11 (2006.01)

权利要求书4页 说明书73页

序列表8页 附图66页

(54) 发明名称

用编码GM-CSF的多核苷酸和额外药剂治疗癌症的方法

(57) 摘要

本文公开了防止卵巢癌复发和治疗BRCA1/2-野生型卵巢癌的组合物和方法。在一些实施方案中,所述组合物包含自体肿瘤细胞疫苗,其包含就弗林蛋白酶敲减和GM-CSF表达进行遗传修饰的细胞。在一些实施方案中,所述方法包括在施用自体肿瘤细胞疫苗与阿特珠单抗的组合前施用自体肿瘤细胞疫苗。本文还公开了治疗个体中癌症的方法,所述癌症包含野生型BRCA1基因、野生型BRCA2基因或其组合,并鉴定为同源重组缺陷(HRD)-阴性。

1. 一种治疗有需要的个体中的癌症的方法,所述方法包括给所述个体施用包含以下的表达载体:

- a. 第一插入物,包含编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)序列的核酸序列;和
- b. 第二插入物,包含2个茎环结构,各有miR-30a环;第一茎环结构具有完全互补的引导链和过客链,而第二茎环结构具有在过客链9-11位处的3个碱基对(bp)错配,

其中该个体是同源重组缺陷(HRD)-阴性的,和/或

其中该个体具有野生型BRCA1基因、野生型BRCA2基因或其组合。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述第一茎环结构中的引导链包括SEQ ID NO:6的序列,且第一茎环结构中的过客链具有SEQ ID NO:5的序列。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述第二茎环结构中的引导链包括SEQ ID NO:6的序列,且第二茎环结构中的过客链具有SEQ ID NO:7的序列。

4. 一种治疗有需要的个体中的癌症的方法,所述方法包括给所述个体施用包含以下的表达载体:

- a. 第一插入物,包含编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)序列的核酸序列;和

- b. 第二插入物,包含根据SEQ ID NO:4或2的序列,

其中该个体是同源重组缺陷(HRD)-阴性的,和/或

其中该个体具有野生型BRCA1基因、野生型BRCA2基因或其组合。

5. 如权利要求1或4所述的方法,所述癌症选自实体瘤癌症、卵巢癌、肾上腺皮质癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管癌、结直肠癌、食管癌、成胶质细胞瘤、胶质瘤、肝细胞癌、头颈癌、肾癌、白血病、淋巴瘤、肺癌、黑素瘤、间皮瘤、多发性骨髓瘤、胰腺癌、嗜铬细胞瘤、浆细胞瘤、成神经细胞瘤、前列腺癌、肉瘤、胃癌、子宫癌、甲状腺癌和血液癌症。

6. 如权利要求5所述的方法,其中所述实体瘤癌症选自子宫内膜癌、胆管癌、膀胱癌、肝细胞癌、胃/食管癌、卵巢癌、黑素瘤、乳腺癌、胰腺癌、结直肠癌、胶质瘤、非小细胞肺癌、前列腺癌、宫颈癌、肾癌、甲状腺癌、神经内分泌癌、小细胞肺癌、肉瘤、头颈癌、脑癌、肾透明细胞癌、皮肤癌、内分泌肿瘤、甲状腺癌、来源不明的肿瘤和胃肠道间质瘤。

7. 如权利要求5所述的方法,其中所述癌症是卵巢癌、乳腺癌、黑素瘤或肺癌。

8. 如权利要求7所述的方法,其中所述个体基本消除的卵巢癌且所述方法预防或延迟该基本消除的卵巢癌的复发。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述表达载体在用该表达载体转染的自体癌细胞内。

10. 如权利要求8所述的方法,其中所述基本消除的卵巢癌是III期或IV期卵巢癌。

11. 如权利要求1-10中任一项所述的方法,其中相对于未施用经转染的肿瘤细胞的卵巢癌基本消除的个体,所述个体的无复发生存(RFS)增加。

12. 如权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述个体接受了初始疗法。

13. 如权利要求12所述的方法,其中所述初始疗法包括减积手术、化疗或其组合。

14. 如权利要求13所述的方法,其中所述化疗包括施用基于铂的药物和紫杉烷。

15. 如权利要求14所述的方法,其中所述基于铂的药物包含卡铂。

16. 如权利要求14所述的方法,其中所述紫杉烷包含紫杉醇。

17. 如权利要求1-16中任一项所述的方法,其中所述GM-CSF是人GM-CSF序列。

18. 如权利要求1-17中任一项所述的方法,其中所述表达载体还包含启动子。
19. 如权利要求18所述的方法,其中所述启动子是巨细胞病毒 (CMV) 哺乳动物启动子。
20. 如权利要求19所述的方法,其中所述表达载体还包含CMV增强子序列和CMV内含子序列。
21. 如权利要求18-20中任一项所述的方法,其中所述第一插入物和第二插入物与所述启动子可操作连接。
22. 如权利要求1-21中任一项所述的方法,其中所述表达载体在第一与第二核酸插入物之间还包含编码小核糖核酸病毒2A核糖体跳跃肽的核酸序列。
23. 如权利要求1-22中任一项所述的方法,其中所述自体肿瘤细胞以约 1×10^6 细胞-约 5×10^7 细胞的剂量施用于所述个体。
24. 如权利要求23所述的方法,其中所述自体肿瘤细胞一月一次施用于所述个体。
25. 如权利要求24所述的方法,其中给所述个体施用所述自体肿瘤细胞1-12个月。
26. 如权利要求1-25中任一项所述的方法,其中所述自体肿瘤细胞通过皮内注射施用于所述个体。
27. 一种治疗有需要的个体中的BRCA1/2野生型卵巢癌的方法,所述方法包括给所述个体施用用包含以下的表达载体转染的自体肿瘤细胞:
 - a. 第一插入物,包含编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 序列的核酸序列;和
 - b. 第二插入物,包含根据SEQ ID NO:2或4的序列。
28. 如权利要求27所述的方法,其中所述卵巢癌是III期或IV期卵巢癌。
29. 如权利要求27或28所述的方法,其中所述卵巢癌是难治性卵巢癌。
30. 如权利要求29所述的方法,其中所述难治性卵巢癌是化疗难治的。
31. 如权利要求30所述的方法,其中所述化疗包含基于铂的药物或紫杉烷。
32. 如权利要求31所述的方法,其中所述基于铂的药物包含卡铂。
33. 如权利要求31所述的方法,其中所述紫杉烷包含紫杉醇。
34. 如权利要求27-33中任一项所述的方法,还包括施用额外的治疗剂。
35. 如权利要求34所述的方法,其中所述额外治疗剂选自给个体的血管生成抑制剂、PARP抑制剂和检查点抑制剂。
36. 如权利要求35所述的方法,其中所述血管生成抑制剂是血管内皮生长因子 (VEGF) 抑制剂。
37. 如权利要求36所述的方法,其中所述VEGF抑制剂选自索拉非尼、舒尼替尼、贝伐单抗、帕唑帕尼、阿昔替尼、卡博替尼和乐伐替尼。
38. 如权利要求36所述的方法,其中所述VEGF抑制剂是贝伐单抗。
39. 如权利要求35所述的方法,其中所述PARP抑制剂选自尼拉帕利、奥拉帕尼、卢卡帕尼、尼拉帕利、他拉唑帕利、维利帕尼和帕米帕利。
40. 如权利要求35所述的方法,其中所述PARP抑制剂是尼拉帕利。
41. 如权利要求35所述的方法,其中所述检查点抑制剂选自PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂和CTLA-4抑制剂。
42. 如权利要求35所述的方法,其中所述检查点抑制剂选自经静脉输注施用的派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗、阿特珠单抗、阿维单抗、德瓦鲁单抗和易普利姆玛。

43. 如权利要求27-42中任一项所述的方法,其中所述GM-CSF是人GM-CSF序列。
44. 如权利要求27-43中任一项所述的方法,其中所述表达载体还包含启动子。
45. 如权利要求44所述的方法,其中所述启动子是巨细胞病毒(CMV)哺乳动物启动子。
46. 如权利要求45所述的方法,其中所述表达载体还包含CMV增强子序列和CMV内含子序列。
47. 如权利要求44-46中任一项所述的方法,其中所述第一插入物和第二插入物与所述启动子可操作连接。
48. 如权利要求27-47中任一项所述的方法,其中所述表达载体在第一与第二核酸插入物之间还包含编码小核糖核酸病毒2A核糖体跳跃肽的核酸序列。
49. 如权利要求27-48中任一项所述的方法,其中所述自体肿瘤细胞以约 1×10^6 细胞-约 5×10^7 细胞的剂量施用于所述个体。
50. 如权利要求49所述的方法,其中所述自体肿瘤细胞一月一次施用于所述个体。
51. 如权利要求50所述的方法,其中给所述个体施用所述自体肿瘤细胞1-12个月。
52. 如权利要求27-51中任一项所述的方法,其中所述自体肿瘤细胞通过皮内注射施用于所述个体。
53. 一种防止有需要的个体中基本消除的卵巢癌复发的方法,所述方法包括给所述个体施用:
- a. 至少一个第一剂量的自体肿瘤细胞疫苗,其包含用包含以下的表达载体转染的自体肿瘤细胞:
- i. 第一插入物,包含编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)序列的核酸序列;和
- ii. 第二插入物,包含根据SEQ ID NO:2或4的序列;和
- b. 至少一个第二剂量的所述自体肿瘤细胞疫苗,其与至少一个剂量的额外治疗剂联合施用。
54. 如权利要求1-53中任一项所述的方法,其中所述至少一个剂量的额外治疗剂是1100mg-1300mg。
55. 如权利要求53-54中任一项所述的方法,其中所述至少一个第一剂量的自体肿瘤细胞疫苗包含 1×10^6 细胞-约 5×10^7 细胞。
56. 如权利要求53-55中任一项所述的方法,其中所述至少一个第二剂量的自体肿瘤细胞疫苗包含 1×10^6 细胞-约 5×10^7 细胞。
57. 如权利要求53-56中任一项所述的方法,其中所述至少一个第一剂量的自体肿瘤细胞通过皮内注射施用于所述个体。
58. 如权利要求53-57中任一项所述的方法,其中所述至少一个第二剂量的自体肿瘤细胞通过皮内注射施用于所述个体。
59. 如权利要求53-58中任一项所述的方法,其中所述至少一个剂量的额外治疗剂通过静脉输注施用。
60. 如权利要求53-59中任一项所述的方法,其中所述至少一个第一剂量的自体肿瘤细胞疫苗包含2个剂量。
61. 如权利要求53-60中任一项所述的方法,其中至少第一剂量的自体肿瘤细胞疫苗的每个剂量一月一次施用于所述个体。

62. 如权利要求53-61中任一项所述的方法,其中至少第二剂量的自体肿瘤细胞疫苗的每个剂量一月一次施用于所述个体。

63. 如权利要求53-62中任一项所述的方法,其中所述至少一个剂量的额外治疗剂的每个剂量至少一月一次施用于所述个体。

64. 如权利要求53-63中任一项所述的方法,其中所述至少第一剂量的自体肿瘤细胞疫苗和至少第二剂量的自体肿瘤细胞疫苗包含总共至少12个剂量。

65. 一种治疗有需要的个体中的BRCA1/2野生型卵巢癌的方法,所述方法包括给所述个体施用:

a. 至少一个第一剂量的自体肿瘤细胞疫苗,其包含用包含以下的表达载体转染的自体肿瘤细胞:

- i. 第一插入物,包含编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)序列的核酸序列;和
- ii. 第二插入物,包含根据SEQ ID NO:2或4的序列;和

b. 至少一个第二剂量的自体肿瘤细胞疫苗,其与至少一个剂量的额外治疗剂联合施用。

用编码GM-CSF的多核苷酸和额外药剂治疗癌症的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年1月13日提交的美国临时申请号62/960,583;2020年6月4日提交的美国临时申请号63/034,868;和2020年8月5日提交的美国临时申请号63/061,634的优先权及权益。所有上述临时申请通过引用纳入本文以用于所有目的。

[0003] 发明背景

[0004] 卵巢癌在女性恶性肿瘤中致死率高。高致死率由卵巢癌的化学抗性和频繁复发引起。尽管开发了治疗卵巢癌的药剂(agent),但卵巢癌的死亡率和复发率一直高。通常,治疗晚期卵巢癌是基于手术与化疗的组合。手术之后是辅助基于铂的化疗。晚期卵巢癌患者的2个最重要预后因子是术后剩余的残留病量以及对基于铂的化疗的反应。

[0005] 发明概述

[0006] 本文公开了治疗有需要的个体中的癌症的方法,所述方法包括给所述个体施用包含以下的表达载体:a.第一插入物,包含编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)序列的核酸序列;和b.第二插入物,包含2个茎环结构,各有miR-30a环;第一茎环结构具有完全互补的引导链和过客链,而第二茎环结构具有在过客链9-11位处的3碱基对(bp)错配,其中该个体是同源重组缺陷(HRD)-阴性的,和/或其中该个体具有野生型BRCA1基因、野生型BRCA2基因或其组合。

[0007] 在一些实施方案中,所述第一茎环结构中的引导链包含SEQ ID NO:6的序列,第一茎环结构中的过客链具有SEQ ID NO:5的序列。

[0008] 在一些实施方案中,所述第二茎环结构中的引导链包含SEQ ID NO:6的序列,第二茎环结构中的过客链具有SEQ ID NO:7的序列。

[0009] 在一些实施方案中,所述miR-30a环包含SEQ ID NO:8的序列。

[0010] 在某些实施方案中,本文公开了治疗有需要的个体中的癌症的方法,所述方法包括给所述个体施用包含以下的表达载体转染的自体肿瘤细胞:a.第一插入物,包含编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)序列的核酸序列;和b.第二插入物,包含根据SEQ ID NO:2或4(SEQ ID NO:4)的序列。在一些实施方案中,所述个体是同源重组缺陷(HRD)-阴性的。在一些实施方案中,所述个体基本消除(eradicate)卵巢癌且所述方法预防或延迟基本消除的卵巢癌复发或重新出现。术语“复发(relapse)”与“复发(recurrence)”可以互换使用。

[0011] 在某些实施方案中,本文公开了防止或预防性治疗有需要的个体中的基本消除的卵巢癌复发的方法,所述方法包括给所述个体施用包含以下的表达载体转染的自体肿瘤细胞:(a)第一插入物,包含编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)序列的核酸序列;和(b)第二插入物,包含根据SEQ ID NO:2或4(SEQ ID NO:4)的序列。在一些实施方案中,所述基本消除的卵巢癌是III期或IV期卵巢癌。在一些实施方案中,所述个体包含野生型BRCA1基因、野生型BRCA2基因或其组合。在一些实施方案中,所述个体无复发生存(RFS)相对于未施用经转染的肿瘤细胞的具有基本消除的卵巢癌个体增加。

[0012] 在一些实施方案中,所述个体接受初始疗法。在一些实施方案中,所述初始疗法包

括减积手术 (debulking surgery)、化疗或其组合。在一些实施方案中,所述化疗包括施用基于铂的药物和紫杉烷。在一些实施方案中,所述基于铂的药物包含卡铂。在一些实施方案中,所述紫杉烷包含紫杉醇。

[0013] 在一些实施方案中,所述GM-CSF是人GM-CSF序列。在一些实施方案中,所述表达载体还包含启动子。在一些实施方案中,所述启动子是巨细胞病毒 (CMV) 哺乳动物启动子。在一些实施方案中,所述表达载体还包含CMV增强子序列和CMV内含子序列。在一些实施方案中,所述第一插入物和第二插入物可操作连接启动子。在一些实施方案中,所述表达载体在第一与第二核酸插入物之间还包含编码小核糖核酸病毒2A核糖体跳跃肽的核酸序列。

[0014] 在一些实施方案中,所述自体肿瘤细胞以约 1×10^6 细胞-约 5×10^7 细胞的剂量施用于所述个体。在一些实施方案中,所述自体肿瘤细胞一月一次施用于所述个体。在一些实施方案中,所述自体肿瘤细胞以1个月的时间到12个月的时间施用于所述个体,如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月。在一些实施方案中,所述自体肿瘤细胞通过皮内注射施用于所述个体。

[0015] 在某些实施方案中,公开了治疗有需要的个体中的BRCA1/2野生型卵巢癌的方法,所述方法包括给所述个体施用用包含以下的表达载体转染的自体肿瘤细胞:(a) 第一插入物,包含编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 序列的核酸序列;和(b) 第二插入物,包含根据SEQ ID NO:2或4 (SEQ ID NO:4) 的序列。在一些实施方案中,所述卵巢癌是III期或IV期卵巢癌。在一些实施方案中,所述卵巢癌是复发性卵巢癌。在一些实施方案中,所述卵巢癌是难治性卵巢癌。在一些实施方案中,所述难治性卵巢癌是化疗难治的。在一些实施方案中,所述化疗包括基于铂的药物或紫杉烷。在一些实施方案中,所述基于铂的药物包括卡铂。在一些实施方案中,所述紫杉烷包括紫杉醇。在一些实施方案中,所述卵巢癌是复发/难治(r/r)性卵巢癌。在一些实施方案中,所述复发或复发/难治性卵巢癌被称为复发卵巢癌。

[0016] 在一些实施方案中,所述方法还包括施用额外治疗剂。在一些实施方案中,所述额外治疗剂选自个体的血管生成抑制剂、PARP抑制剂和检查点抑制剂。在一些实施方案中,所述血管生成抑制剂是血管内皮生长因子 (VEGF) 抑制剂。在一些实施方案中,所述VEGF抑制剂选自下组:索拉非尼、舒尼替尼、贝伐单抗、帕唑帕尼、阿昔替尼、卡博替尼和乐伐替尼。在一些实施方案中,所述VEGF抑制剂是贝伐单抗。在一些实施方案中,所述PARP抑制剂选自尼拉帕利、奥拉帕尼、卢卡帕尼、尼拉帕利、他拉唑帕利、维利帕尼和帕米帕利。在一些实施方案中,所述PARP抑制剂是尼拉帕利。在一些实施方案中,所述检查点抑制剂选自PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂和CTLA-4抑制剂。在一些实施方案中,所述检查点抑制剂选自派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗、阿特珠单抗、阿维单抗、德瓦鲁单抗和易普利姆玛。

[0017] 在一些实施方案中,所述GM-CSF是人GM-CSF序列。在一些实施方案中,所述表达载体还包括启动子。在一些实施方案中,所述启动子是巨细胞病毒 (CMV) 哺乳动物启动子。在一些实施方案中,所述表达载体还包括CMV增强子序列和CMV内含子序列。在一些实施方案中,所述第一插入物和第二插入物可操作连接启动子。在一些实施方案中,所述表达载体在第一与第二核酸插入物之间还包含编码小核糖核酸病毒2A核糖体跳跃肽的核酸序列。

[0018] 在一些实施方案中,所述自体肿瘤细胞以约 1×10^6 细胞-约 5×10^7 细胞的剂量施用于所述个体。在一些实施方案中,所述自体肿瘤细胞一月一次施用于所述个体。在一些实施

方案中,给所述个体施用所述自体肿瘤细胞1-12个月。在一些实施方案中,所述自体肿瘤细胞通过皮内注射施用于所述个体。

[0019] 在一些实施方案中,本文公开了防止或预防性治疗有需要的个体中的基本消除卵巢癌复发的方法,所述方法包括给所述个体施用:a.至少一个第一剂量的自体肿瘤细胞疫苗,其包含用包含以下的表达载体转染的自体肿瘤细胞:i.第一插入物,包含编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)序列的核酸序列;和ii.第二插入物,包含根据SEQ ID NO:2或4(SEQ ID NO:4)的序列;和b.至少一个第二剂量的自体肿瘤细胞疫苗,其与至少一个剂量额外治疗剂联合施用。在一些实施方案中,所述基本消除卵巢癌是III期或IV期卵巢癌。在一些实施方案中,所述个体具有野生型BRCA1基因、野生型BRCA2基因或其组合。在一些实施方案中,所述个体无复发生存(RFS)相对于未施用转染肿瘤细胞的卵巢癌基本消除的个体增加。

[0020] 在一些实施方案中,所述个体接受初始疗法。在一些实施方案中,所述初始疗法包括减积手术、化疗或其组合。在一些实施方案中,所述化疗包括施用基于铂的药物和紫杉烷。在一些实施方案中,所述基于铂的药物包括卡铂。在一些实施方案中,所述紫杉烷包括紫杉醇。在一些实施方案中,所述GM-CSF是人GM-CSF序列。

[0021] 在一些实施方案中,所述表达载体还包含启动子。在一些实施方案中,所述启动子是巨细胞病毒(CMV)哺乳动物启动子。在一些实施方案中,所述表达载体还包含CMV增强子序列和CMV内含子序列。在一些实施方案中,所述第一插入物和第二插入物可操作连接启动子。在一些实施方案中,所述表达载体在第一与第二核酸插入物之间还包含编码小核糖核酸病毒2A核糖体跳跃肽的核酸序列。

[0022] 在一些实施方案中,所述额外治疗剂选自给所述个体的血管生成抑制剂、PARP抑制剂和检查点抑制剂。在一些实施方案中,所述血管生成抑制剂是血管内皮生长因子(VEGF)抑制剂。在一些实施方案中,所述VEGF抑制剂选自索拉非尼、舒尼替尼、贝伐单抗、帕唑帕尼、阿昔替尼、卡博替尼和乐伐替尼。在一些实施方案中,所述VEGF抑制剂是贝伐单抗。在一些实施方案中,所述PARP抑制剂选自尼拉帕利、奥拉帕尼、卢卡帕尼、尼拉帕利、他拉唑帕利、维利帕尼和帕米帕利。在一些实施方案中,所述PARP抑制剂是尼拉帕利。在一些实施方案中,所述检查点抑制剂选自PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂和CTLA-4抑制剂。在一些实施方案中,所述检查点抑制剂选自派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗、阿特珠单抗、阿维单抗、德瓦鲁单抗和易普利姆玛。在一些实施方案中,所述检查点抑制剂是阿特珠单抗。

[0023] 在一些实施方案中,所述至少一个剂量的额外治疗剂施用是1100mg-1300mg。在一些实施方案中,所述至少一个第一剂量的自体肿瘤细胞疫苗包含 1×10^6 细胞-约 5×10^7 细胞。在一些实施方案中,所述至少一个第二剂量的自体肿瘤细胞疫苗包含 1×10^6 细胞-约 5×10^7 细胞。在一些实施方案中,所述至少一个第一剂量的自体肿瘤细胞通过皮内注射施用于所述个体。在一些实施方案中,所述至少一个第二剂量的自体肿瘤细胞通过皮内注射施用于所述个体。在一些实施方案中,所述至少一个剂量的额外治疗剂通过静脉输注施用。

[0024] 在一些实施方案中,所述至少一个第一剂量的自体肿瘤细胞疫苗包含2个剂量,如2、3、4或5剂或者更多。在一些实施方案中,至少第一剂量自体肿瘤细胞疫苗的每个剂量一月一次施用于所述个体。在一些实施方案中,至少第二剂量自体肿瘤细胞疫苗的每个剂量一月一次施用于所述个体。在一些实施方案中,至少一个剂量额外治疗剂的每个剂量至少

一月一次施用于所述个体。在一些实施方案中,至少第一剂量的自体肿瘤细胞疫苗和至少第二剂量的自体肿瘤细胞疫苗包含总共至少12个剂量。

[0025] 在某些实施方案中,本文公开了治疗有需要的个体中的BRCA1/2野生型卵巢癌的方法,所述方法包括给所述个体施用:a.至少一个第一剂量的自体肿瘤细胞疫苗,其包含用包含以下的表达载体转染的自体肿瘤细胞:i.第一插入物,包含编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)序列的核酸序列;和ii.第二插入物,包含根据SEQ ID NO:2或4(SEQ ID NO:4)的序列;和b.至少一个第二剂量的自体肿瘤细胞疫苗,其与至少一个剂量额外治疗剂联合施用。在一些实施方案中,所述卵巢癌是III期或IV期卵巢癌。在一些实施方案中,所述卵巢癌是难治性卵巢癌。在一些实施方案中,所述难治性卵巢癌是化疗难治的。在一些实施方案中,所述化疗包括基于铂的药物或紫杉烷。在一些实施方案中,所述基于铂的药物包括卡铂。在一些实施方案中,所述紫杉烷包括紫杉醇。在一些实施方案中,所述GM-CSF是人GM-CSF序列。

[0026] 在一些实施方案中,所述表达载体还包含启动子。在一些实施方案中,所述启动子是巨细胞病毒(CMV)哺乳动物启动子。在一些实施方案中,所述表达载体还包含CMV增强子序列和CMV内含子序列。在一些实施方案中,所述第一插入物和第二插入物可操作连接启动子。在一些实施方案中,所述表达载体还包含在第一与第二核酸插入物之间还包含编码小核糖核酸病毒2A核糖体跳跃肽的核酸序列。

[0027] 在一些实施方案中,所述额外治疗剂选自个体的血管生成抑制剂、PARP抑制剂和检查点抑制剂。在一些实施方案中,所述血管生成抑制剂是血管内皮生长因子(VEGF)抑制剂。在一些实施方案中,所述VEGF抑制剂选自下组:索拉非尼、舒尼替尼、贝伐单抗、帕唑帕尼、阿昔替尼、卡博替尼和乐伐替尼。在一些实施方案中,所述VEGF抑制剂是贝伐单抗。在一些实施方案中,所述PARP抑制剂选自尼拉帕利、奥拉帕尼、卢卡帕尼、尼拉帕利、他拉唑帕利、维利帕尼和帕米帕利。在一些实施方案中,所述PARP抑制剂是尼拉帕利。在一些实施方案中,所述检查点抑制剂选自PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂和CTLA-4抑制剂。在一些实施方案中,所述检查点抑制剂选自派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗、阿特珠单抗、阿维单抗、德瓦鲁单抗和易普利姆玛。在一些实施方案中,所述检查点抑制剂是阿特珠单抗。

[0028] 在一些实施方案中,所述至少一个剂量的额外治疗剂是1100mg-1300mg。在一些实施方案中,所述至少一个第一剂量的自体肿瘤细胞疫苗包括 1×10^6 细胞-约 5×10^7 细胞。在一些实施方案中,所述至少一个第二剂量的自体肿瘤细胞疫苗包括 1×10^6 细胞-约 5×10^7 细胞。在一些实施方案中,所述至少一个第一剂量的自体肿瘤细胞通过皮内注射施用于所述个体。在一些实施方案中,所述至少一个第二剂量的自体肿瘤细胞通过皮内注射施用于所述个体。在一些实施方案中,所述至少一个剂量的额外治疗剂通过静脉输注施用。

[0029] 在一些实施方案中,所述至少一个第一剂量的自体肿瘤细胞疫苗包括2个剂量。在一些实施方案中,至少第一剂量自体肿瘤细胞疫苗的每个剂量一月一次施用于所述个体。在一些实施方案中,至少第二剂量自体肿瘤细胞疫苗的每个剂量一月一次施用于所述个体。在一些实施方案中,至少一个剂量额外治疗剂的每个剂量至少一月一次施用于所述个体。在一些实施方案中,至少第一剂量的自体肿瘤细胞疫苗和至少第二剂量的自体肿瘤细胞疫苗包含总共至少12个剂量。

[0030] 在一些实施方案中,本公开特征在于治疗有需要的个体中的癌症的方法,所述方

法包括给所述个体施用包含以下的表达载体:a) 第一插入物, 包含编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 序列的核酸序列; 和b) 第二插入物, 包含根据SEQ ID NO:2或4 (SEQ ID NO:4) 的序列, 其中个体具有野生型BRCA1基因、野生型BRCA2基因或其组合, 并鉴定为同源重组缺陷 (HRD) - 阴性。

[0031] 在一些实施方案中, 所述GM-CSF是人GM-CSF序列。

[0032] 在一些实施方案中, 所述表达载体还包括启动子。在一些实施方案中, 所述启动子是巨细胞病毒 (CMV) 哺乳动物启动子。在一些实施方案中, 所述表达载体还包括CMV增强子序列和CMV内含子序列。在一些实施方案中, 所述第一插入物和第二插入物可操作连接启动子。在一些实施方案中, 所述表达载体在第一与第二核酸插入物之间还包含编码小核糖核酸病毒2A核糖体跳跃肽的核酸序列。

[0033] 在一些实施方案中, 所述癌症是HRD-阴性、野生型BRCA1/2的癌症。在一些实施方案中, 所述癌症选自实体瘤癌症、卵巢癌、肾上腺皮质癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管癌、结直肠癌、食管癌、成胶质细胞瘤、胶质瘤、肝细胞癌、头颈癌、肾癌、白血病、淋巴瘤、肺癌、黑素瘤、间皮瘤、多发性骨髓瘤、胰腺癌、嗜铬细胞瘤、浆细胞瘤、成神经细胞瘤、前列腺癌、肉瘤、胃癌、子宫癌、甲状腺癌和血液癌症。在特定实施方案中, 所述实体瘤癌症选自子宫内膜癌、胆管癌、膀胱癌、肝肝细胞癌、胃/食管癌、卵巢癌、黑素瘤、乳腺癌、胰腺癌、结直肠癌、胶质瘤、非小细胞肺癌、前列腺癌、宫颈癌、肾癌、甲状腺癌、神经内分泌癌、小细胞肺癌、肉瘤、头颈癌、脑癌、肾透明细胞癌、皮肤癌、内分泌肿瘤、甲状腺癌、来源不明的肿瘤和胃肠道间质瘤。

[0034] 在一些实施方案中, 所述方法防止或延迟基本消除的卵巢癌复发。在特定实施方案中, 所述基本消除的卵巢癌是III期或IV期卵巢癌。在一些实施方案中, 所述癌症是乳腺癌。在一些实施方案中, 所述癌是黑素瘤。在一些实施方案中, 所述癌症是肺癌。

[0035] 在一些实施方案中, 所述表达载体在用所述表达载体转染的自体癌细胞内。在特定实施方案中, 所述自体癌细胞以约 1×10^6 细胞-约 5×10^7 细胞的剂量施用于所述个体。在一些实施方案中, 所述自体癌细胞一月一次施用于所述个体。在一些实施方案中, 给所述个体施用所述自体肿瘤细胞1-12个月。在一些实施方案中, 所述自体癌细胞通过皮内注射施用于所述个体。

[0036] 在一些实施方案中, 所述个体接受初始疗法。在特定实施方案中, 所述初始疗法包括减积手术、化疗或其组合。在某些实施方案中, 所述化疗包括施用基于铂的药物和紫杉烷。在某些实施方案中, 所述基于铂的药物包括卡铂。在一些实施方案中, 所述紫杉烷包括紫杉醇。

[0037] 在一些实施方案中, 所述方法还包括施用额外治疗剂。在一些实施方案中, 所述额外治疗剂是选自下组的成员: 个体的血管生成抑制剂、PARP抑制剂和检查点抑制剂。

[0038] 附图简要说明

[0039] 本公开的新特征通过所附权利要求具体列出。通过参考下列阐述说明性实施方案的详细描述可更好地理解本公开的特征和优点, 其中应用本公开原则, 以及其附图:

[0040] 图1的示意图显示bi-shRNA^{furin} (SEQ ID NO:2), 包含2个茎环结构, 各具有miR-30a环; 第一茎环结构具有完全互补的引导链和过客链, 而第二茎环结构具有在过客链9-11位处的3碱基对 (bp) 错配。

[0041] 图2A-2D阐明从手术/获取或随机接受Vigil®vs.安慰剂开始,患者的无复发生存(RFS)。图2A阐明从手术/获取开始的BRCA1/2野生型(wt)群体的RFS。图2B阐明从随机接受Vigil®vs.安慰剂开始的BRCA1/2野生型(wt)群体的RFS。图2C阐明从手术/获取开始的RFS,而无论BRCA1/2状态如何。图2D阐明从随机接受Vigil®vs.安慰剂开始的RFS,而无论BRCA1/2状态如何。处于风险数指存活曲线中的患者数,其仍然无复发和/或存活且后续随访延伸到至少曲线远处(far into the curve)。

[0042] 图3A-3B阐明Vigil®与安慰剂之间所有复发疾病的部分。图3A显示Vigil®(n=24)与安慰剂(n=24)BRCA1/2-wt患者之间所有复发疾病的部分。图3B显示所有n=91符合方案的患者中Vigil®(n=46)与安慰剂(n=45)符合方案患者之间所有复发疾病的部分。

[0043] 图4阐明Vigil®/安慰剂患者之间的森林图关键人口统计数据。

[0044] 图5的示意图显示bi-shRNA^{furin}(SEQ ID NO:2),包含2个茎环结构,各有miR-30a环;第一茎环结构具有完全互补的引导链和过客链,而第二茎环结构具有在过客链9-11位处的3碱基对(bp)错配。

[0045] 图6A-6F阐明从手术/获取或随机接受Vigil®vs.安慰剂开始的患者的无复发生存(RFS)或总体生存(OS)。图6A阐明从随机化开始的所有患者的RFS。图6B阐明从手术/获取开始的所有患者的RFS。图6C阐明从随机化开始的BRCA1/2野生型(wt)群体的RFS。图6D阐明从手术/获取开始的BRCA1/2野生型(wt)群体的RFS。图6E阐明从随机化开始的BRCA1/2野生型(wt)群体的OS。图6F阐明从手术/获取开始的BRCA1/2野生型(wt)群体的OS。处于风险数指存活曲线中的患者数,其仍然无复发和/或存活且后续随访延伸到至少曲线深处。

[0046] 图7A-7B阐明森林图。图7A阐明PP的关键亚组的森林图,RFS从随机化的时间起计算,直至记录复发或死亡的第一天。图7B阐明BRCA-wt群体的关键亚组的森林图,RFS从随机化时间起计算,直至记录复发或死亡的第一天。

[0047] 图8阐明研究第2部分中Vigil®-1st vs. Atezo-1st的所有阿特殊单抗相关不良事件(AE)。Atezo-1st组中有24个1、2级阿特殊单抗相关AE,Vigil®-1st组中有50个。Atezo-1st组中有1个1、2级Vigil®相关AE,Vigil®-1st组中有31个。Atezo-1st组中有5个3、4级阿特殊单抗相关AE,Vigil®-1st组中有1个。Atezo-1st组中有0个3、4级Vigil®相关AE,Vigil®-1st组中有1个。

[0048] 图9A-9D阐明来自研究随机时间的功效分析。图9A阐明Vigil®-1st(n=11)和Atezo-1st(n=10)中所有研究对象的总体生存(OS),OS中值(mOS)NR vs 10.8个月,危害比(HR)0.33(95%CI[0.064-1.7],p=0.097)。图9B阐明BRCA1/2-wt的OS,比较Vigil®-1st(n=6)和Atezo-1st(n=7),OS中值(mOS)NR vs 5.2个月,HR 0.16(95%CI[0.026-1.03],p=0.027)。图9C阐明通过RECIST1.1的Vigil®-1st(n=11)和Atezo-1st(n=10)调查者评估中所有研究对象的无进展生存(PFS),PFS中值(mPFS)3.4个月vs 2.8个月,HR 0.76(95%CI[0.28-2.0],p=0.29)。图9D所述BRCA1/2-wt的PFS,比较Vigil®-1st(n=6)和Atezo-1st(n=7),PFS中值3.5个月vs 2.8个月,HR 0.60(95%CI[0.16-2.2],p=0.22)。

[0049] 图10A-10D阐明从手术/获取或随机接受Vigil®vs.安慰剂开始的患者的无复发生存(RFS)。图10A阐明从手术/获取开始的BRCA1/2野生型(wt)群体的RFS。图10B阐明从随机

接受Vigil® vs. 安慰剂开始的BRCA1/2野生型(wt)群体的RFS。图10C阐明从手术/获取开始的RFS,而无论BRCA1/2状态如何。图10D阐明才随机接受Vigil® vs. 安慰剂开始的RFS而无论BRCA1/2状态如何。处于风险数指存活曲线中的患者数,其仍然无复发和/或存活且后续随访延伸到至少曲线深处。

[0050] 图11A和11B阐明Vigil®与安慰剂之间所有复发疾病的部分。图11A阐明Vigil® (n=24)与安慰剂(n=24) BRCA1/2-wt患者之间所有复发疾病的部分。图11B阐明全部n=91符合方案患者中Vigil® (n=46)与安慰剂(n=45)之间所有复发疾病的部分。

[0051] 图12阐明Vigil®/安慰剂患者之间的森林图关键人口统计数据。

[0052] 图13显示接受安慰剂的个体与接受Vigil®的个体中的BRCA突变状态和HRD状态。

[0053] 图14和15显示Vigil®/安慰剂患者之间的森林图关键人口统计数据。

[0054] 图16显示接受安慰剂的个体与接受Vigil®的个体中的BRCA突变状态和HRD状态。

[0055] 图17-20显示Vigil®/安慰剂患者之间的森林图关键人口统计数据。

[0056] 图21和22阐明从手术/获取(图13)开始与从随机化开始(图14)的患者群体的RFS。

[0057] 图23和24阐明从手术/获取(图15)与从随机化开始(图16)的患者群体的总体生存(OS)。

[0058] 图25显示从随机化开始的患者群体的RFS可能性。

[0059] 图26显示从随机化开始的患者群体的OS可能性。

[0060] 图27显示接受Vigil®与其他药剂的患者中的BRCA状态、HRD状态和OS。

[0061] 图28显示多个癌症类型中的HR-DDR突变频率。

[0062] 图29显示BRCA状态、HRD状态和其他蛋白表达之间的关系。

[0063] 图30和31显示HRD阴性与HRD阳性患者之间的森林图关键人口统计数据。

[0064] 图32和33显示BRCA1/2-WT和HRD阳性患者的森林图关键人口统计数据。

[0065] 图34显示试验患者谱(profile)。BRCA^{WT}=BRCA野生型。BRCA^{mut}=BRCA突变体。

[0066] 图35A-35F显示从随机化(35A)和组织获取(35B)开始的所有患者的无复发生存。从随机化(35C)和组织获取(35D)开始的BRCA野生型疾病患者的无复发生存。从随机化(35E)和组织获取(35F)开始的所有患者的总体生存。HR=危害比。

[0067] 图36A和36B显示符合方案群体(36A)和BRCA野生型群体(36B)关键亚组的无复发生存,从随机时间起计算,直至记录复发或死亡的第一天。数据是事件数/患者数,除非另有说明。HR=危害比。*高于30%敲减。†超过30pg/10⁶细胞释放阈值。

[0068] 图37A-37D显示ITT群体的Kaplan Meier分析。从组织获取(A)和随机化(B)开始BRCA野生型的待治疗的患者的无复发生存。从组织获取(C)和随机化(D)开始的所有待治疗的患者的无复发生存。

[0069] 图38显示从患者群体随机化时间开始的总体生存的森林图。

[0070] 图39显示符合方案群体和BRCA野生型群体的总体生存森林图。

[0071] 图40A-40D显示从随机(图40A)和组织获取(图40B)时间开始的BRCA野生型患者总体生存。从随机(图40C)和组织获取(图40D)时间开始的BRCA突变患者总体生存。

[0072] 图41A和41B显示从随机(图41A)和组织获取(图41B)时间开始的BRCA突变患者的无复发生存。

[0073] 发明详述

[0074] 大部分诊断患有卵巢癌的女性处于晚期。最佳护理标准会实现5年存活率,其从41% (IIIa期)变化到20% (IV期)。新诊断卵巢癌 (III/IV期) 的护理标准包括最优减积手术和一线化疗,采用紫杉醇和卡铂。大部分患者实现完全缓解,但约75%会在约12个月内复发,包括实现病理完全缓解的患者的70%。一些研究尝试如下在第一治疗卵巢癌中改善结果:在患者用紫杉醇和卡铂巩固后达到全响应之后,施用维持疗法,但无人显示在无复发 (RFS) 或总体生存 (OS) 方面的显著优势。

[0075] 在某些实施方案中,本文公开了治疗有需要的个体中的癌症的方法,所述方法包括给所述个体施用包含以下的表达载体:a. 第一插入物,包含编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 序列的核酸序列;和b. 第二插入物,包括2个茎环结构,各有miR-30a环;第一茎环结构具有完全互补的引导链和过客链,而第二茎环结构具有在过客链9-11位处的3碱基对 (bp) 错配,其中该个体是同源重组缺陷 (HRD) -阴性的,和/或其中该个体具有野生型BRCA1基因、野生型BRCA2基因或其组合。本领域已知关于miR-30a环和其序列的描述,参见例如Rao等,Cancer Gene Ther.17 (11):780-91,2010;Jay等,Cancer Gene Ther.20 (12):683-9,2013;Rao等,Mol Ther.24 (8):1412-22,2016;Phadke等,DNA Cell Biol.30 (9):715-26,2011;Barve等,Mol Ther.23 (6):1123-1130,2015;Rao等,Methods Mol Biol.942:259-78,2013;和Senzer等,Mol Ther.20 (3):679-86,2012。在一些实施方案中,所述miR-30a环包含GUGAAGCCACAGAUG序列 (SEQ ID NO:8)。在一些实施方案中,所述第一茎环结构中的引导链包含SEQ ID NO:6序列且第一茎环结构中的过客链包含SEQ ID NO:5序列。在一些实施方案中,所述第二茎环结构中的引导链包含SEQ ID NO:6序列且第二茎环结构中的过客链包含SEQ ID NO:7序列。

[0076] 在某些实施方案中,本文公开了防止有需要的个体中的基本消除的卵巢癌复发的方法,所述方法包括给所述个体施用用包含以下的表达载体转染的自体肿瘤细胞:a. 第一插入物,包含编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 序列的核酸序列;和b. 第二插入物,包含根据SEQ ID NO:2或4 (SEQ ID NO:4) 的序列。在某些实施方案中,本文还公开了治疗有需要的个体中的BRCA1/2野生型卵巢癌的方法,所述方法包括给所述个体施用用包含以下的表达载体转染的自体肿瘤细胞:a) 第一插入物,包含编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 序列的核酸序列;和b) 第二插入物,包含根据SEQ ID NO:2或4 (SEQ ID NO:4) 的序列。

[0077] 大部分诊断卵巢癌的女性处于晚期。最佳护理标准会实现5年存活率,其从41% (IIIa期)变化到20% (IV期)。新诊断卵巢癌 (III/IV期) 的护理标准包括初次减积手术,然后是用紫杉醇和卡铂的辅助化疗,或者新辅助化疗与间隔减积手术。大部分患者实现完全缓解,但约75%会在2年内复发。一些研究尝试如下在一线治疗卵巢癌中改善结果:在患达到完全缓解之后施用维持疗法,但尽管有无进展生存 (PFS) 益处,没有显示在RFS或OS或毒性限制剂量方面的显著优势。聚 (ADP-核糖) 聚合酶 (PARP) 抑制剂提供了临床新平台用于一线维持,但活性以BRCA-m患者为主。PARP抑制剂也批准用于复发铂敏感性维持,无论BRCA状态如何;然而,在作为BRCA-m或显示同源重组缺陷 (HRD) 的那些患者中的效益幅度最大。

[0078] 在某些实施方案中,本文公开了防止有需要的个体中的基本消除的卵巢癌复发或预防性治疗其复发的方法,所述方法包括给所述个体施用用包含以下的表达载体转染的自

体肿瘤细胞:a) 第一插入物,包含编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 序列的核酸序列;和b) 第二插入物,包含根据SEQ ID NO:2或4 (SEQ ID NO:4) 的序列。在某些实施方案中,本文还公开了治疗有需要的个体中的BRCA1/2野生型卵巢癌的方法,所述方法包括给所述个体施用包含以下的表达载体转染的自体肿瘤细胞:a) 第一插入物,包含编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 序列的核酸序列;和b) 第二插入物,包含根据SEQ ID NO:2或4 (SEQ ID NO:4) 的序列。在一些实施方案中,所述BRCA1/2野生型卵巢癌不具有BRCA基因中的胚系突变。在一些实施方案中,所述BRCA1/2野生型卵巢癌不具有BRCA基因中的体细胞突变。在一些实施方案中,所述BRCA基因是BRCA1基因、BRCA2基因,或BRCA1与BRCA2基因。

[0079] 在某些实施方案中,本文公开了治疗有需要的个体中的癌症的方法,所述方法包括给所述个体施用包含以下的表达载体:a) 第一插入物,包含编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 序列的核酸序列;和b) 第二插入物,包含根据SEQ ID NO:2或4 (SEQ ID NO:4) 的序列,其中个体具有野生型BRCA1基因、野生型BRCA2基因或其组合,且其鉴定为同源重组缺陷 (HRD) - 阴性。

[0080] 定义

[0081] 除非另有定义,本文所用全部技术和科学术语具有与所要求权利的主题所属领域技术人员通常理解相同的含义。

[0082] 如本文所用,范围和量能表示为“大约”某一特定值或范围。“大约”还包括实际量。由此,“大约5 μ g”指“约5 μ g”以及“5 μ g”。一般,术语“大约”包括预期在实验误差内的量。在一些实施方案中,“大约”指所引用数字或值,该数字或值的“+”或“-”20%,10%,或5%。

[0083] 本文所用术语“有效量”或“治疗有效量”指施用的足够量药剂或化合物,其会一定程度缓解所治疗疾病或病症的一个或多个症状或者预防所治疗疾病或病症的一个或多个症状发生或复发。在一些实施方案中,所述结果是疾病的征兆、症状或病因的减少和/或缓解,或者生物系统的任何其他所需改变。例如,用于治疗用途的“有效量”是提供疾病症状临床显著减少所需的自体肿瘤细胞疫苗,而没有过度不良副作用。另一示例中,用于治疗用途的“有效量”是防止疾病症状复发所需的本文所公开自体肿瘤细胞疫苗,而没有过度不良副作用。任意个体病例中的适当“有效量”可用技术确定,如剂量递增试验。术语“治疗有效量”包括例如预防有效量。“有效量”的本文所公开化合物是有效实现预期效果或治疗改善的量,而没有过度不良副作用。在一些实施方案中,应理解“有效量”或“治疗有效量”因对象而异,这归因于自体肿瘤细胞疫苗代谢、对象的年龄、体重、一般情况、所治疗病症、所治疗病症严重性、处方医生判断的变化。

[0084] 本文所用术语“对象”、“个体”和“患者”可互换使用。没有一个术语意在解释为需要医学专业人员(如医生、护士、助理医师、护理员、安宁工人)监督。如本文所用,对象是任何动物,包括哺乳动物(如人和非人动物)和非哺乳动物。在本文所提供方法和自体肿瘤细胞疫苗的一个实施方案中,所述哺乳动物是人。

[0085] 本文所用术语“治疗”、“处理”或“对待”和其他语法上等价物,包括但不限于缓解、减少或改善疾病或病症的一个或多个症状,改善、防止或降低疾病或病症的一个或多个额外症状的出现、严重性或频率,改善或防止疾病或病症的一个或多个症状的潜在代谢病因,抑制疾病或病症,例如阻滞疾病或病症发展,减轻疾病或病症,导致疾病或病症倒退,减轻疾病导致的病症或病症,防止疾病或病症复发或者预防性治疗其复发,或预防性和/或治疗

性抑制疾病或病症症状。在一个非限制性示例中,出于预防性益处,将本文公开的自体肿瘤细胞疫苗组合物施用有发展特定疾病或病症风险,倾向于发展特定疾病或病症的个体,或之前患有疾病或病症并进行治疗的个体。在一些实施方案中,所述疾病或病症是卵巢癌。

[0086] 本文所用术语“防止”指在先前诊断患有疾病或病症的对象在恶化前进行的预防性治疗,从而使对象能够避免、防止或降低疾病症状或相关疾病的可能性。所述对象可以是发展疾病风险增加的或先前诊断疾病恶化的对象。

[0087] 本文所用术语“皮内注射”是将物质浅注射入真皮,真皮位于上皮与下皮之间。

[0088] 本文所用术语“转染”指向真核细胞引入外来DNA。在一些实施方案中,所述转染通过任何适当方式完成,例如磷酸钙-DNA共沉淀、DEAE-葡聚糖-介导转染、聚凝胺介导转染、电穿孔、微注射、脂质体融合、脂转染、原生质体融合、逆转录病毒感染或基因枪。

[0089] 本文所用术语“核酸”或“核酸分子”指多核苷酸,如脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)、寡核苷酸、由聚合酶链反应(PCR)产生的片段以及通过任意连接、切断、核酸内切酶作用和核酸外切酶作用产生的片段。在一些实施方案中,所述核酸分子由单体构成,其是天然产生的核苷酸(如DNA和RNA)、天然产生的核苷酸类似物(如天然产生核苷酸的 α -对映体形式)或两者的组合。在一些实施方案中,所述经修饰核苷酸在糖部分和/或嘧啶或嘌呤碱基部分有改变。例如,糖修饰包括一个或多个羟基用卤素、烷基、胺和叠氨基取代,或糖能作为醚或酯功能化。此外,在一些实施方案中,所述完整糖部分用空间和电子相似结构取代,如氮糖和碳环糖类似物。碱基部分中的修饰示例包括烷基化嘌呤和嘧啶,酰化嘌呤或嘧啶,或其他熟知的杂环取代基。在一些实施方案中,所述核酸单体由磷酸二酯键或这类链接的类似物来连接。磷酸二酯键的类似物包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、苯胺硫代磷酸酯、苯胺磷酸酯、氨基磷酸酯等。在一些实施方案中,所述术语“核酸”或“核酸分子”还包括所谓的“肽核酸”,其包括附于聚酰胺骨架的天然产生或经修饰核酸碱基。在一些实施方案中,所述核酸是单链或双链。

[0090] 本文所用术语“表达载体”指编码在宿主细胞中所表达基因的核酸分子。在一些实施方案中,所述表达载体包括转录启动子、基因和转录终止子。在一些实施方案中,所述基因表达置于启动子控制下,这种基因称为“可操作连接”启动子。在一些实施方案中,如果调控元件调节核心启动子活性,则调控元件和核心启动子可操作连接。本文所用术语“启动子”指任何DNA序列,其与宿主酵母细胞中的结构基因相关联时,相较没有启动子序列时的转录、翻译或mRNA稳定性(mRNA半衰期更长),在合适生长条件下对于结构基因增加以下一种或多种:1) 转录,2) 翻译或3) mRNA稳定性。

[0091] 本文所用术语“双功能”指shRNA,其具有siRNA和miRNA的2种作用机理途径。术语“传统”shRNA指DNA转录衍生的RNA,这是通过siRNA作用机制作用。术语“双重”shRNA指2个shRNA,各自针对2种不同基因表达作用,但采用“传统”siRNA模式。

[0092] 额外治疗剂可以是1100mg到1300mg,如1100、1125、1150、1175、1200、1225、1250、1275或1300mg。

[0093] 自体肿瘤细胞疫苗包含 1×10^6 细胞-约 5×10^7 细胞如 1×10^6 细胞、 2×10^6 细胞、 3×10^6 细胞、 4×10^6 细胞、 5×10^6 细胞、 6×10^6 细胞、 7×10^6 细胞、 8×10^6 细胞、 9×10^6 细胞、 1×10^7 细胞、 2×10^7 细胞、 3×10^7 细胞、 4×10^7 细胞或 5×10^7 。

[0094] III期卵巢癌指在1个或2个卵巢中发现癌症,且癌症扩散出骨盆外到腹部和/或淋

巴结附近的其他部分。当扩散到肝表面时,也视作III期卵巢癌。IV期卵巢癌中,癌扩散超过腹部,到身体其他部分,如肺或肝内组织。肺周围液体中的癌也视作IV期卵巢癌。

[0095] 治疗卵巢癌的方法

[0096] 在某些实施方案中,本文公开了防止有需要的个体中的基本消除的卵巢癌复发或预防性治疗其复发的方法,所述方法包括给所述个体施用自体肿瘤细胞疫苗,其包含用包含以下的表达载体转染的自体肿瘤细胞:编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的第一核酸,和编码至少一个短发夹RNA(shRNA)的第二核酸,其能够与编码弗林蛋白酶的mRNA转录物的区域杂交,从而通过RNA干扰抑制弗林蛋白酶表达。在某些实施方案中,还公开了治疗有需要的个体中的BRCA1/2野生型卵巢癌的方法,所述方法包括给所述个体施用自体肿瘤细胞疫苗,其包含用包含以下的表达载体转染的自体肿瘤细胞:编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的第一核酸,和编码至少一个短发夹RNA(shRNA)的第二核酸,其能够与编码弗林蛋白酶的mRNA转录物区域杂交,从而通过RNA干扰抑制弗林蛋白酶表达。在一些实施方案中,所述第二核酸包含根据SEQ ID NO:2或4(SEQ ID NO:4)的序列。在一些实施方案中,所述表达载体是bishRNA^{furin}/GMCSF表达载体。在一些实施方案中,所述抑制弗林蛋白酶表达可抑制转化生长因子 β (TGF β)的表达。在一些实施方案中,所述TGF β 包括TGF- β 亚型:TGF β 1和TGF β 2。

[0097] 在某些实施方案中,本文公开了防止有需要的个体中的基本消除的卵巢癌复发或预防性治疗其复发的方法,所述方法包括给所述个体施用:(a)至少一个第一剂量的自体肿瘤细胞疫苗,其包含用包含以下的表达载体转染的自体肿瘤细胞:(i)编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的第一核酸和(ii)编码至少一个短发夹RNA(shRNA)的第二核酸,其能够与编码弗林蛋白酶的mRNA转录物的区域杂交,从而通过RNA干扰抑制弗林蛋白酶表达;和(b)至少一个第二剂量的自体肿瘤细胞疫苗与至少一个剂量额外治疗剂的组合。在某些实施方案中,本文还公开了治疗有需要的个体中的BRCA1/2野生型卵巢癌的方法,所述方法包括给所述个体施用:(a)至少一个第一剂量的自体肿瘤细胞疫苗,其包含用包含以下的表达载体转染的自体肿瘤细胞:(i)编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的第一核酸和(ii)编码至少一个短发夹RNA(shRNA)的第二核酸,其能够与编码弗林蛋白酶的mRNA转录物区域杂交,从而通过RNA干扰抑制弗林蛋白酶表达;和(b)至少一个第二剂量的自体肿瘤细胞疫苗,其与至少一个剂量额外治疗剂联合施用。

[0098] 在一些实施方案中,所述第二核酸包含根据SEQ ID NO:2或4(SEQ ID NO:4)的序列。在一些实施方案中,所述表达载体是bishRNA^{furin}/GMCSF表达载体。在一些实施方案中,所述抑制弗林蛋白酶表达可抑制转化生长因子 β (TGF β)表达。在一些实施方案中,所述TGF β 包括TGF- β 亚型:TGF β 1和TGF β 2。

[0099] 在某些实施方案中,本文公开了治疗有需要的个体中的癌症的方法,这是通过给所述个体施用包含以下的表达载体:a)第一插入物,包含编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)序列的核酸序列;和b)第二插入物,包含根据SEQ ID NO:2或4(SEQ ID NO:4)的序列,其中所述个体具有野生型BRCA1基因、野生型BRCA2基因或其组合,并鉴定为同源重组缺陷(HRD)-阴性。

[0100] 同源重组(HR)是细胞用于修复双链DNA断裂的机制,使用同源模板。HR缺陷可影响DNA修复。然而,仅HR缺陷时,其他DNA修复机制的活性能阻止过量DNA损伤和细胞凋亡的积

聚。本文所用术语“同源重组缺陷-阳性”、“HRD阳性”和“HRD”可互换使用且其指HR缺陷的状态。相反,术语“同源重组缺陷阴性”、“HRD阴性”、“同源重组”和“HRD”可互换使用且其指HR非缺陷的状态。

[0101] 在一些实施方案中,所述HRD能通过筛选HR修复相关基因的胚系或体细胞突变来评估。例如,来自血液或其他组织的DNA能通过二代测序分析。

[0102] 在一些实施方案中,为鉴定个体是HRD阳性还是HRD阴性的,可确定HRD评分。在一些实施方案中,HRD得分能基于杂合性丢失(LOH)、端粒等位基因不平衡(TAI)和大片段迁移(Large-scale state transition,LST)的评分计算。在一些实施方案中,所述LOH通过存在单一等位基因来表明。在一些实施方案中,所述LOH定义为杂合性区域的染色体损失数量大于15Mb。在一些实施方案中,所述TAI通过染色体末端1:1等位基因比例的差异来表明。在一些实施方案中,所述LST通过异常与正常DNA区域之间或2个不同异常区域之间的转变点来表明。在一些实施方案中,所述LST定义为过滤小于3Mb区域后,在大于10Mb区域之间的断点数。在一些实施方案中,所述HRD评分计算为LOH,TAI和LST评分总和。本领域可获得确定HRD评分的方法,例如描述于Takaya等,Sci Rep.10(1):2757,2020,Telli等,Clin Cancer Res 22(15):3764-73,2016以及Marchetti和McNeish,Cancer Breaking News 5(1):15-20,2017。此外,也有用于HRD评分确定的商业服务,例如由Ambry Genetics、Caris生命科学(Caris Life Sciences)、Counsylgenetic,基础医学公司(Foundation Medicine)、GeneDX、综合遗传学公司(Integrated Genetics)、Invitae、利亚德基因公司(Myriad Genetics)和Neogenomics提供的服务。

[0103] 在本文所述的方法中,个体具有野生型BRCA1基因、野生型BRCA2基因或其组合。在一些实施方案中,所述具有野生型BRCA1基因、野生型BRCA2基因或其组合的个体可以是HRD阴性或HRD阳性的。在其他实施方案中,所述BRCA1/2基因突变能导致HRD。换言之,BRCA1/2基因突变能导致个体具有HRD阳性状态。在特定实施方案中,所述鉴定为具有HRD阳性状态的个体的HRD评分是42或更高(如42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60或更高)。其他机制如其他同源重组基因中的胚系和体细胞突变以及表观遗传修饰,也可参与同源重组。

[0104] 表达载体

[0105] 在一些实施方案中,所述至少一个shRNA是至少一个双功能shRNA(bi-shRNA)。在一些实施方案中,所述bi-shRNA包含第一茎环结构和第二茎环结构,所述第一茎环结构包含siRNA组分,所述第二茎环结构包含miRNA组分。在一些实施方案中,所述双功能shRNA具有siRNA和miRNA的2种作用机制途径。因此,在一些实施方案中,本文所述的双功能shRNA不同于传统shRNA(即通过siRNA作用机制起作用的DNA转录衍生的RNA)或“双重shRNA”,其是涉及2种shRNA,各自针对2个不同基因表达作用,但采用传统siRNA模式。在一些实施方案中,所述bi-shRNA纳入siRNA(剪切依赖性)和miRNA(非剪切依赖性)基序。

[0106] 在一些实施方案中,所述表达载体中的GM-CSF是人GM-CSF序列。在一些实施方案中,所述表达载体包括启动子,如启动子是巨细胞病毒(CMV)哺乳动物启动子。在一些实施方案中,所述哺乳动物启动子包含CMV即刻早期(IE)5'UTR增强子序列和CMV IE内含子A。在其他实施方案中,所述表达载体还包含CMV增强子序列和CMV内含子序列。

[0107] 表达载体中的第一插入物和第二插入物可操作连接启动子。在特定实施方案中,

所述表达载体在第一与第二核酸插入物之间还包含编码小核糖核酸病毒2A核糖体跳跃肽的核酸序列。

[0108] 在一些实施方案中,所述表达载体包括至少一种双功能shRNA (bi-shRNA)。在一些实施方案中,所述bi-shRNA包含第一茎环结构和第二茎环结构,所述第一茎环结构包含siRNA组分,所述第二茎环结构包含miRNA组分。在一些实施方案中,所述双功能shRNA具有siRNA和miRNA的2种作用机制途径。因此,在一些实施方案中,本文所述的双功能shRNA不同于传统shRNAshRNA (即通过siRNA作用机制起作用的DNA转录衍生的RNA) 或“双重shRNA”,其是涉及2种shRNA,各自针对2个不同基因表达作用,但采用传统siRNA模式。在一些实施方案中,所述bi-shRNA纳入siRNA (剪切依赖性) 和miRNA (非剪切依赖性) 基序。

[0109] 在一些实施方案中,所述至少一种bi-shRNA能够与编码弗林蛋白酶的mRNA转录物的一个或多个区域杂交。在一些实施方案中,所述编码弗林蛋白酶的mRNA转录物是SEQ ID NO:1的核酸序列。在一些实施方案中,所述编码弗林蛋白酶的mRNA转录物的一个或多个区域选自SEQ ID NO:1的碱基序列300-318、731-740、1967-1991、2425-2444、2827-2851和2834-2852。在一些实施方案中,所述表达载体靶向弗林蛋白酶mRNA转录物的编码区,弗林蛋白酶mRNA转录物的3'UTR区序列,或同时靶向弗林蛋白酶mRNA转录物的编码序列和3'UTR序列。在一些实施方案中,所述bi-shRNA包括SEQ ID NO:2或4 (SEQ ID NO:4)。在一些实施方案中,所述bi-shRNA能够与编码弗林蛋白酶的mRNA转录物的一个或多个区域杂交,该bi-shRNA在本文称为bi-shRNA^{furin}。在一些实施方案中,所述bi-shRNA^{furin}包含2个茎环结构或由其组成,所述茎环结构各有miR-30a环。在一些实施方案中,所述两个茎环结构的第一茎环结构包含互补的引导链和过客链 (图1)。在一些实施方案中,所述两个茎环结构的第二茎环结构包括过客链中的3个错配。在一些实施方案中,所述3个错配在过客链9-11位处。

[0110] 表1-序列

[0111]

SEQ ID NO:	描述	序列
1	编码弗林蛋白酶 的 mRNA 转录物	GCGGGGAAGCAGCAGCGGCCAGGATGAATCCAGGTGCTCTGGAGC TGGATGGTGAAGGTCGGCACTCTTCACCCTCCCGAGCCCTGCCCGT CTCGGCCCCATGCCCCACCAGTCAGCCCCGGGCCACAGGCAGTGA GCAGGCACCTGGGAGCCGAGGCCCTGTGACCAGGCCAAGGAGACGG GCGCTCCAGGGTCCCAGCCACCTGTCCCCCATGGAGCTGAGGCC CTGGTTGCTATGGGTGGTAGCAGCAACAGGAACCTTGGTCTTGCTA GCAGCTGATGCTCAGGGCCAGAAGGTCTTCACCAACACGTGGGCTG TGCGCATCCCTGGAGGCCAGCGGTGGCCAACAGTGTGGCACGGAA GCATGGGTTCCCTCAACCTGGGCCAGATCTTCGGGGACTATTACCAC TTCTGGCATCGAGGAGTGACGAAGCGGTCCCTGTGCGCTCACCGCC CGCGGCACAGCCGGCTGCAGAGGGAGCCTCAAGTACAGTGGCTGGA ACAGCAGGTGGCAAAGCGACGGACTAAACGGGACGTGTACCAGGAG CCACAGACCCCCAAGTTTCCTCAGCAGTGGTACCTGTCTGGTGCA CTCAGCGGGACCTGAATGTGAAGCGGCCTGGGCGCAGGGCTACAC AGGGCACGGCATTGTGGTCTCCATTCTGGACGATGGCATCGAGAAG AACCACCCGGACTTGGCAGGCAATTATGATCCTGGGGCCAGTTTTG ATGTCAATGACCAGGACCTGACCCCCAGCCTCGGTACACACAGAT GAATGACAACAGGCACGGCACACGGTGTGCGGGGAAGTGGCTGCG GTGGCCAACAACGGTGTCTGTGGTGTAGGTGTGGCCTACAACGCC GCATTGGAGGGGTGCGCATGCTGGATGGCGAGGTGACAGATGCAGT GGAGGCACGCTCGCTGGGCCTGAACCCCAACCACATCCACATCTAC AGTGCCAGCTGGGGCCCCGAGGATGACGGCAAGACAGTGGATGGGC CAGCCCGCCTCGCCGAGGAGGCCTTCTTCCGTGGGGTTAGCCAGGG CCGAGGGGGGCTGGGCTCCATCTTGTCTGGGCCTCGGGGAACGGG GGCCGGAACATGACAGCTGCAACTGCGACGGCTACACCAACAGTA TCTACACGCTGTCCATCAGCAGCGCCACGCAGTTTGGCAACGTGCC GTGGTACAGCGAGGCCTGCTCGTCCACACTGGCCACGACCTACAGC AGTGGCAACCAGAATGAGAAGCAGATCGTGACGACTGACTTGCGGC AGAAGTGCACGGAGTCTCACACGGGCACCTCAGCCTCTGCCCCCTT AGCAGCCGGCATCATTGCTCTCACCTGGAGGCCAATAAGAACCTC ACATGGCGGGACATGCAACACCTGGTGGTACAGACCTCGAAGCCAG CCCACCTCAATGCCAACGACTGGGCCACCAATGGTGTGGGCCGGAA AGTGAGCCACTCATATGGCTACGGGCTTTTGGACGCAGGCGCCATG GTGGCCCTGGCCCAGAATTGGACCACAGTGGCCCCCAGCGGAAGT GCATCATCGACATCTCACCGAGCCCAAAGACATCGGGAAACGGCT CGAGGTGCGGAAGACCGTGACCGCGTGCCTGGGCGAGCCCAACCAC ATCACTCGGCTGGAGCACGCTCAGGCGCGGCTCACCTGTCTCTATA

[0112]

SEQ ID NO:	描述	序列
		ATCGCCGTGGCGACCTGGCCATCCACCTGGTCAGCCCCATGGGCAC CCGCTCCACCCTGCTGGCAGCCAGGCCACATGACTACTCCGCAGAT GGGTTTAAATGACTGGGCCTTCATGACAACTCATTCCTGGGATGAGG ATCCCTCTGGCGAGTGGGTCCCTAGAGATTGAAAACACCAGCGAAGC CAACAACATATGGGACGCTGACCAAGTTCACCCTCGTACTCTATGGC ACCGCCCCCTGAGGGGCTGCCCCGTACCTCCAGAAAGCAGTGGCTGCA AGACCCTCACGTCCAGTCAGGCCTGTGTGGTGTGCGAGGAAGGCTT CTCCCTGCACCAGAAGAGCTGTGTCCAGCACTGCCCTCCAGGGTTC GCCCCCAAGTCCTCGATACGCACTATAGCACCGAGAATGACGTGG AGACCATCCGGGCCAGCGTCTGCGCCCCCTGCCACGCCTCATGTGC CACATGCCAGGGGCCGGCCCTGACAGACTGCCTCAGCTGCCCCAGC CACGCCTCCTTGGACCTGTGGAGCAGACTTGCTCCCGGCAAAGCC AGAGCAGCCGAGAGTCCCCGCCACAGCAGCAGCCACCTCGGCTGCC CCCGGAGGTGGAGGCGGGGCAACGGCTGCGGGCAGGGCTGCTGCCC TCACACCTGCCTGAGGTGGTGGCCGGCCTCAGCTGCGCCTTCATCG TGCTGGTCTTCGTCACTGTCTTCCTGGTCCTGCAGCTGCGCTCTGG CTTTAGTTTTTCGGGGGGTGAAGGTGTACACCATGGACCGTGGCCTC ATCTCCTACAAGGGGCTGCCCCCTGAAGCCTGGCAGGAGGAGTGCC CGTCTGACTCAGAAGAGGACGAGGGCCGGGGCGAGAGGACCGCCTT TATCAAAGACCAGAGCGCCCTCTGATGAGCCCACTGCCACCCCTT CAAGCCAATCCCCCTCCTTGGGCACTTTTTAATTACCAAAGTATTT TTTTATCTTGGGACTGGGTTTGGACCCAGCTGGGAGGCAAGAGGG GTGGAGACTGCTTCCCATCCTACCCTCGGGCCACCTGGCCACCTG AGGTGGGCCCAGGACCAGCTGGGGCGTGGGGAGGGCCGTACCCAC CCTCAGCACCCTTCCATGTGGAGAAAGGAGTGAACCTTTAGGGC AGCTTGCCCCCGGCCCGGCCCCAGCCAGAGTTCTCTGCGGAGTGAAG AGGGGCAGCCCTTGCTTGTGGGATTCTGACCCAGGCCGCGAGCTC TTGCCCTTCCCTGTCCCTCTAAAGCAATAATGGTCCCATCCAGGCA GTCGGGGGCTGGCCTAGGAGATATCTGAGGGAGGAGGCCACCTCTC CAAGGGCTTCTGCACCCTCCACCCTGTCCCCAGCTCTGGTGAGTC TTGGCGGCAGCAGCCATCATAGGAAGGGACCAAGGCAAGGCAGGTG CCTCCAGGTGTGCACGTGGCATGTGGCCTGTGGCCTGTGTCCCATG ACCCACCCTGTGCTCCGTGCCTCCACCACCACTGGCCACCAGGCT GGCGCAGCCAAGGCCGAAGCTCTGGCTGAACCCTGTGCTGGTGTCC TGACCACCCTCCCTCTCTTGACCCGCTCTCCCGTCAGGGCCCCA AGTCCCTGTTCCTGAGCCCGGGCTGCCTGGGCTGTTGGCACTCAC AGACCTGGAGCCCTGGGTGGGTGGTGGGGAGGGCGCTGACCCAG CCGGCCTCTCTGGCCTCCACCCGATGCTGCTTTCCCTGTGGGGA TCTCAGGGGCTGTTTGAGGATATATTTTCACTTTGTGATTATTTCA CTTTAGATGCTGATGATTTGTTTTTGTATTTTAAATGGGGGTAGCA GCTGGACTACCCACGTTCTCACACCCACCGTCCGCCCTGCTCCTCC CTGGCTGCCCTGGCCCTGAGGTGTGGGGGCTGCAGCATGTTGCTGA GGAGTGAGGAATAGTTGAGCCCCAAGTCTGAAGAGGCGGGCCAGC CAGGCGGGCTCAAGGAAAGGGGTCCCAGTGGGAGGGGCAGGCTGA CATCTGTGTTTCAAGTGGGGCTCGCCATGCCGGGGGTTCATAGGTC ACTGGCTCTCCAAGTGCCAGAGGTGGGCAGGTGGTGGCACTGAGCC CCCCCAACACTGTGCCCTGGTGGAGAAAGCACTGACCTGTCTATGCC CCCCTCAAACCTCCTCTCTGACGTGCCTTTTGCACCCCTCCCATT AGGACAATCAGTCCCTCCCATCTGGGAGTCCCTTTTCTTTTCTA CCCTAGCCATTCTGGTACCCAGCCATCTGCCCAGGGGTGCCCCCT CCTCTCCCATCCCCCTGCCCTCGTGGCCAGCCCGGCTGGTTTTGT AGATGCTGGGTTGGTGCACAGTGATTTTTTCTTGTAATTTAAACA GGCCAGCATTGCTGGTTCTATTTAATGGACATGAGATAATGTTAG AGGTTTTAAAGTGATTAAACGTGCAGACTATGCAAACCAG
2	bi-shRNA ^{turnin}	GGAUCCUGCUGUUGACAGUGAGCGCGAGAAAGGAGUGAAACCUUA GUGAAGCCACAGAUGUAAGGUUUCACUCCUUUCUCCUUGCCUACUG

[0113]

SEQ ID NO:	描述	序列
		CCUCGGAGUCCUGCUGUUGACAGUGAGCGCGGAGAAAGAUUAUGAAACCUUAGUGAAGCCACAGAUUAAGGUUUCACUCCUUUCUCCUUGCCUACUGCCUCGGAAGCUUUG
4	bi-shRNA ^{furin}	GAUCCUGCUGUUGACAGUGAGCGCGGAGAAAGGAGUGAAACCUUAGUGAAGCCACAGAUUAAGGUUUCACUCCUUUCUCCUUGCCUACUGCUCUGGAAGCAGCUCACUACAUUACUCAGCUGUUGACAGUGAGCGCGGAGAAAGAUUAUGAAACCUUAGUGAAGCCACAGAUUAAGGUUUCACUCCUUUCUCCUUGCCUACUGCCUCGGAAGCUUAAUAAAGGAUCUUUUAUUUUCAUUGGAUC
5	bi-shRNA ^{furin} 中第一茎环结构的过客链	GGAGAAAGGAGUGAAACCUUA
6	bi-shRNA ^{furin} 中第一和第二茎环结构的引导链	UAAGGUUUCACUCCUUUCUCC
7	bi-shRNA ^{furin} 中第二茎环结构的过客链	GGAGAAAGAUUAUGAAACCUUA
8	miR-30a 环	GUGAAGCCACAGAUG

[0114] 表达载体包含编码GM-CSF的第一核酸和编码至少一种双功能短发夹RNA (bi-shRNA) 的第二核酸, 能够与编码弗林蛋白酶的mRNA转录物的区域杂交, 所述表达载体称为bi-shRNA^{furin}/GMCSF表达载体。

[0115] 在一些实施方案中, 所述第一核酸和第二核酸可操作连接启动子。在一些实施方案中, 所述启动子是巨细胞病毒 (CMV) 启动子。在一些实施方案中, 所述CMV启动子是哺乳动物CMV启动子。在一些实施方案中, 所述哺乳动物CMV启动子包括CMV即刻早期 (IE) 5'UTR增强子序列和CMV IE内含子A。

[0116] 在一些实施方案中, 所述GM-CSF是人GM-CSF。在一些实施方案中, 所述编码小核糖核酸病毒2A核糖体跳跃肽的核苷酸序列插入第一与第二核酸插入物之间。

[0117] 在一些实施方案中, 所述表达载体质粒能具有与SEQ ID NO:3序列至少90% (如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列。载体质粒可包括操作性连接启动子的第一核酸插入物和操作性连接启动子的第二核酸插入物, 其中第一插入物编码GM-CSF cDNA, 第二插入物编码一个或多个短发夹RNA (shRNA), 其能够与编码弗林蛋白酶的mRNA转录物区域杂交, 从而通过RNA干扰抑制弗林蛋白酶表达。

[0118] SEQ ID NO:3

[0119] GGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAACTGCCCATTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCAATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTG

ACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTG
GAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGAACGGTGCA
TTGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTATAGACTCTATAGGCACACCCCTTTGGCTCTT
ATGCATGCTATACTGTTTTTGGCTTGGGGCCTATACACCCCGCTTCCTTATGCTATAGGTGATGGTATAGCTTAGC
CTATAGGTGTGGGTATTGACCATTATTGACCACTCCAACGGTGGAGGGCAGTGTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGCT
GCCGCGCGGCCACCAGACATAATAGCTGACAGACTAACAGACTGTTCCCTTCCATGGGTCTTTTCTGCAGTCACCG
TCGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCGGCTGGAGGATGTGGCTGCAGAGCCTGCTGCTCTTGGGCACT
GTGGCCTGCAGCATCTCTGCACCCGCCGCTCGCCAGCCCCAGCACGCAGCCCTGGGAGCATGTGAATGCCATCCA
GGAGGCCCGGCGTCTCTGAACCTGAGTAGAGACTGCTGCTGAGATGAATGAAACAGTAGAAGTCATCTCAGAAA
TGTTTGACCTCCAGGAGCCGACCTGCCTACAGACCCGCTGGAGCTGTACAAGCAGGGCCTGCGGGGCAGCCTCACC
AAGCTCAAGGGCCCTTGACCATGATGGCCAGCCACTACAAGCAGCACTGCCCTCCAACCCCGGAAACTTCCTGTGC
AACCCAGACTATCACCTTTGAAAGTTTCAAAGAGAACCTGAAGGACTTTCTGCTTGTATCCCTTTGACTGCTGGG
AGCCAGTCCAGGAGTGAGACCGGCCAGATGAGGCTGGCCAAGCCGGGAGCTGCTCTCATGAAACAAGAGCTAGA
AACTCAGGATGGTCATCTTGAGGGACCAAGGGGTGGGCCACAGCCATGGTGGGAGTGGCCTGGACCTGCCCTGGGC
CACACTGACCCTGATACAGGCATGGCAGAAGAATGGGAATATTTTATACTGACAGAAATCAGTAATATTTATATATT
TATATTTTTAAATATTTATTTATTTATTTATTTAAGTTCATATTCCATATTTATTCAAGATGTTTTACCGTAATAA
TTATTATTAATAATATGCTTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACGGAATTCACGTGGGCCCGGTACCGTATACTC
TAGAAGATCTGGCAGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGA
TGTCTAGAGCGGCCGCGGATCCTGCTGTTGACAGTGAGCGGAGAAAGGAGTGAACCTTAGTGAAGCCACAGATG
TAAGGTTTCACTCCTTTCTCCTTGCCCTACTGCCTCGGAAGCAGCTCACTACATTACTCAGCTGTTGACAGTGAGCGC
GGAGAAAGATATGAAACCTTAGTGAAGCCACAGATGTAAGGTTTCACTCCTTTCTCCTTGCCCTACTGCCTCGGAAGC
TTAATAAAGGATCTTTTATTTTATTGGATCCAGATCTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCC
CCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCT
CACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTAAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATAT
GCCATTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTCGGTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTC
AAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGG
CCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGA
CGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCG
CTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATA
GCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACG
CCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGC
AGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACG
GCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCT
TGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGG
ATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGG
TCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATA
TATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTT
ATCCATAGTTGCTGACTCGGGGGGGGGGGCGCTGAGGTCTGCCTCGTGAAGAAGGTGTTGCTGACTCATACCAGG
CCTGAATCGCCCCATCATCCAGCCAGAAAGTGAGGGAGCCACGGTTGATGAGAGCTTTGTTGTAGGTGGACCAGTTG

GTGATTTTGAAC TTTTGCTTTGCCACGGAACGGTCTGCGTTGTTCGGGAAGATGCGTGATCTGATCCTTCAACTCAGC
AAAAGTTTCGATTTATTCAACAAAGCCGCCGTCCCGTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCCAGTGTTACAACCAATTAAC
CAATTCTGATTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATT
TTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGG
TCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAA
ATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGCTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCC
AGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGA
AATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATC
AACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGTTGAGTA
ACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCGTCAGCCAGTTTAGTCTG
ACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACTCTGGCGCATCGGGCTTCCC
ATACAATCGATAGATTGTGCGACCTGATTGCCCCGACATTATCGCGAGCCCATTATACCCATATAAATCAGCATCCA
TGTTGGAATTTAATCGCGGCCTCGAGCAAGACGTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTTACTGTTT
ATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGATGATATATTTTTATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACAC
AACGTGGCTTTCCCCCCCCCCCCATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAAT
GTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATT
ATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGA
AAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTC
AGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCGGGTGTCGGGGCTGGCTTAATATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTG
CACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGATTGGCTATT

[0120] 表达载体包含编码GM-CSF的第一核酸和编码至少一种双功能短发夹RNA (bi-shRNA) 的第二核酸, 能够与编码弗林蛋白酶的mRNA转录物区域杂交, 所述表达载体称为bishRNA^{furin}/GMCSF表达载体。

[0121] 肿瘤细胞

[0122] 在一些实施方案中, 所述细胞是自体肿瘤细胞、异种移植物扩增的自体肿瘤细胞、同种异体肿瘤细胞、异种移植物扩增的同种异体肿瘤细胞或其组合。在一些实施方案中, 所述细胞是自体肿瘤细胞。在一些实施方案中, 所述同种异体肿瘤细胞是已建立的细胞系。在一些实施方案中, 所述自体肿瘤细胞获自有需要的个体。在一些实施方案中, 当细胞是自体肿瘤细胞时, 所述组合物称为自体肿瘤细胞疫苗。

[0123] 在一些实施方案中, 所述细胞收获自个体。在一些实施方案中, 所述细胞收获自个体组织。在一些实施方案中, 所述组织是肿瘤组织。在一些实施方案中, 所述肿瘤组织是卵巢肿瘤组织。在一些实施方案中, 所述肿瘤组织在个体的活组织检查或减积手术中收获。在一些实施方案中, 所述肿瘤组织或来自肿瘤组织的细胞被置于无菌容器的抗生素溶液内。在一些实施方案中, 所述抗生素溶液包含庆大霉素、氯化钠或其组合。

[0124] 使用方法

[0125] 在一些实施方案中, 所述卵巢癌是III期或IV期卵巢癌。在一些实施方案中, 所述III期卵巢癌是IIIb期或更恶化。在一些实施方案中, 所述卵巢癌是高级别浆液性卵巢癌、卵巢透明细胞癌、内膜性卵巢癌、卵巢粘液癌或低级别浆液性卵巢癌。

[0126] 在一些实施方案中, 所述个体具有野生型BRCA1基因、野生型BRCA2基因或野生型

BRCA1基因和野生型BRCA2基因。在一些实施方案中,所述野生型BRCA1基因不包括胚系BRCA1基因突变。在一些实施方案中,所述野生型BRCA2基因不包含胚系BRCA2基因突变。在一些实施方案中,所述有野生型BRCA1基因、野生型BRCA2基因的个体中的卵巢癌在本文中称为BRCA1/2-wt卵巢癌、BRCA-wt卵巢癌或BRCA1/2野生型卵巢癌。相反,在一些实施方案中,包含突变BRCA1基因、突变BRCA2基因、或突变BRCA1基因和突变BRCA2基因的个体中的卵巢癌在本文中称为BRCA1/2-m卵巢癌或BRCA-m卵巢癌。在一些实施方案中,所述突变BRCA1基因或突变BRCA2基因包括胚系突变。在一些实施方案中,所述突变BRCA1基因或突变BRCA2基因包括体细胞突变。在一些实施方案中,所述个体的无复发生存(RFS)相对于未施用自体肿瘤细胞疫苗的卵巢癌基本消除的个体而增加。

[0127] 在一些实施方案中,所述癌症是RD-阴性、野生型BRCA1/2的癌症。在一些实施方案中,所述癌症选自实体瘤癌症、卵巢癌、肾上腺皮质癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管癌、结直肠癌、食管癌、成胶质细胞瘤、胶质瘤、肝细胞癌、头颈癌、肾癌、白血病、淋巴瘤、肺癌、黑色素瘤、间皮瘤、多发性骨髓瘤、胰腺癌、嗜铬细胞瘤、浆细胞瘤、成神经细胞瘤、前列腺癌、肉瘤、胃癌、子宫癌、甲状腺癌和血液癌症。所述实体瘤癌症选自子宫内膜癌、胆管癌、膀胱癌、肝肝细胞癌、胃/食管癌、卵巢癌、黑色素瘤、乳腺癌、胰腺癌、结直肠癌、胶质瘤、非小细胞肺癌、前列腺癌、宫颈癌、肾癌、甲状腺癌、神经内分泌癌、小细胞肺癌、肉瘤、头颈癌、脑癌、肾透明细胞癌、皮肤癌、内分泌肿瘤、甲状腺癌、来源不明的肿瘤和胃肠道间质瘤。

[0128] 本文所用术语“无复发(recurrence)生存”与术语“无复发(relapse)生存”可互换施用,且指施用初始疗法治疗癌症后癌仍然无法检测的时间(即直至癌复发)。在一些实施方案中,所述接受自体肿瘤细胞疫苗的个体的无复发生存比未接受自体肿瘤细胞疫苗的个体无复发生存,长5个月到11个月。在一些实施方案中,所述接受自体肿瘤细胞疫苗的个体的无复发生存比未接受自体肿瘤细胞疫苗的个体无复发生存,长至少5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月或11个月。

[0129] 本文所用术语“基本消除”指接受治疗卵巢癌的初始疗法后在个体中无法测得(如低于检测水平或低于检测极限(LOD))的卵巢癌。在一些实施方案中,检测卵巢癌或其缺乏是通过胸部X射线、计算机断层(CT)扫描、磁共振成像(MRI)、检测癌症抗原125(CA-125)水平、体检或存在提示活性癌的症状,或其任何组合。在一些实施方案中,癌症抗原125(CA-125)水平检测 ≤ 35 单位/ml表明,个体中不存在卵巢癌。在一些实施方案中,基本消除的卵巢癌是指实现了临床完全缓解(cCR)。在一些实施方案中,在对象先前卵巢癌基本消除后于该对象中检测到的卵巢癌,称为复发性(recurrent或relapsed)卵巢癌。

[0130] 在一些实施方案中,所述接受自体肿瘤细胞疫苗的个体的无复发生存比未接受自体肿瘤细胞疫苗的个体无复发生存,长至少5个月,而无论BRCA1、BRCA2或其组合的状态(即突变或未突变)如何。在一些实施方案中,所述接受自体肿瘤细胞疫苗的BRCA-wt个体从减积手术开始的无复发生存超过15个月,其中未接受自体肿瘤细胞疫苗的个体从减积手术开始的无复发生存小于15个月。在一些实施方案中,所述接受自体肿瘤细胞疫苗的BRCA-wt个体的无复发生存比未接受自体肿瘤细胞疫苗的个体无复发生存,长至少11个月。

[0131] 在一些实施方案中,所述个体接受初始疗法。在一些实施方案中,所述施用初始疗法使得癌症临床完全响应治疗。在一些实施方案中,所述初始疗法包括减积手术、施用化疗、施用治疗剂或其组合。在一些实施方案中,所述化疗包括基于铂的药物、紫杉烷或其组

合。在一些实施方案中,所述基于铂的药物包括顺铂、卡铂、奥沙利铂、奈达铂、四硝酸三铂、菲铂、吡铂、赛特铂或其组合。在一些实施方案中,所述基于铂的药物包括卡铂。在一些实施方案中,所述紫杉烷包括紫杉醇、多西他赛、卡巴他赛或其组合。在一些实施方案中,所述紫杉烷包括紫杉醇。在一些实施方案中,所述治疗剂包括血管生成抑制剂、PARP抑制剂、检查点抑制剂或其组合。在一些实施方案中,所述血管生成抑制剂包括血管内皮生长因子(VEGF)抑制剂。在一些实施方案中,所述VEGF抑制剂包括索拉非尼、舒尼替尼、贝伐单抗、帕唑帕尼、阿昔替尼、卡博替尼、乐伐替尼或其组合。在一些实施方案中,所述VEGF抑制剂是贝伐单抗。在一些实施方案中,所述PARP抑制剂包括尼拉帕利、奥拉帕尼、卢卡帕尼、尼拉帕利、他拉唑帕利、维利帕尼、帕米帕利或其组合。在一些实施方案中,所述PARP抑制剂是尼拉帕利。在一些实施方案中,所述检查点抑制剂包括PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂、CTLA-4抑制剂或其组合。在一些实施方案中,所述检查点抑制剂包括派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗、阿特珠单抗、阿维单抗、德瓦鲁单抗、易普利姆玛或其组合。在一些实施方案中,所述卵巢癌对化疗或治疗剂而言耐受或难治。

[0132] 在一些实施方案中,所述方法还包括确定BRCA1基因、BRCA2基因或其组合在个体中的状态(即野生型或突变)。在一些实施方案中,所述确定包括测序定BRCA1基因、BRCA2基因或组合。在一些实施方案中,所述测序包括桑格测序或下一代测序。在一些实施方案中,所述下一代测序包括大规模平行测序。在一些实施方案中,所述确定包括提取自个体的核酸与阵列杂交。在一些实施方案中,所述阵列是微阵列。在一些实施方案中,所述确定包括提取自个体的核酸的阵列比较基因组杂交。

[0133] 施用、配制和给药

[0134] 在一些实施方案中,所述自体肿瘤细胞疫苗包含约 1×10^6 或约 1×10^7 个本文所述转染的自体肿瘤细胞。在一些实施方案中,所述自体肿瘤细胞疫苗包含至少 1×10^6 或至少 1×10^7 个本文所述转染的自体肿瘤细胞。在一些实施方案中,所述自体肿瘤细胞疫苗包含约 1×10^6 细胞-约 1×10^7 个本文所述转染的自体肿瘤细胞。在一些实施方案中,所述自体肿瘤细胞疫苗包含约 1×10^6 细胞-约 2.5×10^7 个本文所述转染的自体肿瘤细胞。在一些实施方案中,所述自体肿瘤细胞疫苗包含约 1×10^6 细胞-约 5×10^7 个本文所述转染的自体肿瘤细胞。

[0135] 在一些实施方案中,所述自体肿瘤细胞疫苗还包含一种或多种疫苗佐剂。

[0136] 在一些实施方案中,所述自体肿瘤细胞疫苗采用单位剂型。本文所用术语“单位剂型”描述了物理上分开的单元,含有预定量的本文所述的自体肿瘤细胞疫苗以及其他成分(如疫苗佐剂)。在一些实施方案中,所述预定量是一定数量的细胞。

[0137] 在一些实施方案中,所述个体每个月施用一剂自体肿瘤细胞疫苗。在一些实施方案中,所述一剂自体肿瘤细胞疫苗每月一次施用于所述个体,持续1个月-12个月。在一些实施方案中,给所述个体施用至少一剂自体肿瘤细胞疫苗。在一些实施方案中,给所述个体施用不超过12剂的自体肿瘤细胞疫苗。在一些实施方案中,所述个体施用1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12剂的自体肿瘤细胞疫苗。在一些实施方案中,所述剂量是自体肿瘤细胞疫苗的单位剂型。在一些实施方案中,所述一剂自体肿瘤细胞疫苗每3个月、每2个月、每月1次、每月2次或每月3次施用于所述个体。在一些实施方案中,所述自体肿瘤细胞疫苗施用于所述个体,至多1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、12个月、18个月、24个月或36个月。在一些实施方案中,所述自体肿瘤细胞疫苗通过注射施用于所述个体。在一些实施方案中,所

述注射是皮内注射。在一些实施方案中,所述第一剂自体肿瘤细胞疫苗在确认个体实现临床完全缓解(cCR)后施用于所述个体。在一些实施方案中,所述第一剂自体肿瘤细胞疫苗在不早于初始疗法最终治疗的同一天,施用于所述个体。在一些实施方案中,所述第一剂自体肿瘤细胞疫苗在不晚于初始疗法最终治疗后8周,施用于所述个体。

[0138] 组合

[0139] 在一些实施方案中,所述自体肿瘤细胞疫苗与另一治疗剂一起施用于所述个体。在一些实施方案中,所述至少第一剂自体肿瘤细胞疫苗在没有额外治疗剂情况下施用于所述个体,至少第二剂自体肿瘤细胞疫苗与至少一剂额外治疗剂联合施用于所述个体。在一些实施方案中,本文所用“联合”指一剂额外治疗剂在自体肿瘤细胞疫苗给药1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周或4周内施用,或与自体肿瘤细胞疫苗给药同一天施用。额外治疗剂能在自体肿瘤细胞疫苗之前、同时或之后施用。

[0140] 在一个说明性示例中,个体经皮内注射间隔一个月接受2剂自体肿瘤细胞疫苗,且从第3个月开始接受:(i) 额外10剂肿瘤细胞疫苗,各间隔一个月,和(ii) 12剂阿特殊单抗,各间隔3周,经静脉输注。

[0141] 在另一个说明性示例中,个体皮内注射间隔一个月接受2剂自体肿瘤细胞疫苗,且从第3个月开始接受:(i) 额外10剂肿瘤细胞疫苗,各间隔一个月,和(ii) 10剂阿特殊单抗,经静脉输注,与额外10剂肿瘤细胞疫苗同一天。

[0142] 在一些实施方案中,给所述个体施用自体肿瘤细胞疫苗和紧随之后施用自体肿瘤细胞疫苗与额外治疗剂的组合,引起的毒性低于单独施用额外治疗剂。在一些实施方案中,给所述个体施用自体肿瘤细胞疫苗和紧随之后自体肿瘤细胞疫苗与检查点抑制剂联合施用,引起的毒性低于单独施用检查点。

[0143] 在一些实施方案中,所述至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12剂自体肿瘤细胞疫苗在施用自体肿瘤细胞疫苗与额外治疗剂组合前施用于所述个体。在一些实施方案中,至少2剂自体肿瘤细胞疫苗在施用自体肿瘤细胞疫苗与额外治疗剂组合前施用于所述个体。

[0144] 在一些实施方案中,所述额外治疗剂包括血管生成抑制剂、PARP抑制剂、检查点抑制剂或其组合。在一些实施方案中,所述血管生成抑制剂包括血管内皮生长因子(VEGF)抑制剂。在一些实施方案中,所述VEGF抑制剂包括索拉非尼、舒尼替尼、贝伐单抗、帕唑帕尼、阿昔替尼、卡博替尼、乐伐替尼或其组合。在一些实施方案中,所述VEGF抑制剂是贝伐单抗。在一些实施方案中,所述PARP抑制剂包括尼拉帕利、奥拉帕尼、卢卡帕尼、尼拉帕利、他拉唑帕利、维利帕尼、帕米帕利或其组合。在一些实施方案中,所述PARP抑制剂是尼拉帕利。在一些实施方案中,所述检查点抑制剂包括PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂、CTLA-4抑制剂或其组合。在一些实施方案中,所述检查点抑制剂包括派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗、阿特殊单抗、阿维单抗、德瓦鲁单抗、易普利姆玛或其组合。在一些实施方案中,所述额外治疗剂是检查点抑制剂。在一些实施方案中,所述检查点抑制剂是阿特殊单抗。在一些实施方案中,所述额外治疗剂是VEGF抑制剂。在一些实施方案中,所述VEGF抑制剂是贝伐单抗。在一些实施方案中,所述额外治疗剂是PARP抑制剂。在一些实施方案中,所述额外治疗剂通过静脉输注施用。

[0145] 在一些实施方案中,所述额外治疗剂包括治疗有效剂量的阿特殊单抗。在一些实施方案中,所述治疗有效剂量的阿特殊单抗是约900mg-约1500mg或约1100mg-1300mg。在一

些实施方案中,所述治疗有效剂量的阿特殊单抗是约900mg、1000mg、1100mg、1200mg、1300mg、1400mg或1500mg。在一些实施方案中,所述治疗有效剂量的阿特殊单抗是约1200mg。在一些实施方案中,所述阿特殊单抗通过静脉输注给药。

[0146] 在一些实施方案中,所述额外治疗剂包括治疗有效剂量的 γ IFN(γ -干扰素)。在一些实施方案中,所述治疗有效剂量的 γ IFN是约 $50\mu\text{g}/\text{m}^2$ -约 $100\mu\text{g}/\text{m}^2$ 。在一些实施方案中,所述治疗有效剂量的 γ IFN是约 $50\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、约 $60\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、约 $70\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、约 $80\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、约 $90\mu\text{g}/\text{m}^2$ 或约 $100\mu\text{g}/\text{m}^2$ 。

[0147] 在一些实施方案中,所述表达载体或自体癌细胞疫苗与额外治疗剂一起施用。在一些实施方案中,所述额外治疗剂包括治疗有效剂量的 γ IFN(γ -干扰素)。在一些实施方案中,所述治疗有效剂量的 γ IFN是约 $50\mu\text{g}/\text{m}^2$ -约 $100\mu\text{g}/\text{m}^2$ 。在一些实施方案中,所述治疗有效剂量的 γ IFN是约 $50\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、约 $60\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、约 $70\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、约 $80\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、约 $90\mu\text{g}/\text{m}^2$ 或约 $100\mu\text{g}/\text{m}^2$ 。在一些实施方案中,所述额外治疗剂包括血管生成抑制剂、PARP抑制剂、检查点抑制剂或其组合。在一些实施方案中,所述血管生成抑制剂包括血管内皮生长因子(VEGF)抑制剂。在一些实施方案中,所述VEGF抑制剂包括索拉非尼、舒尼替尼、贝伐单抗、帕唑帕尼、阿昔替尼、卡博替尼、乐伐替尼或其组合。在一些实施方案中,所述VEGF抑制剂是贝伐单抗。在一些实施方案中,所述PARP抑制剂包括奥拉帕尼、卢卡帕尼、尼拉帕利、他拉唑帕利、维利帕尼、帕米帕利或其组合。在一些实施方案中,所述检查点抑制剂包括PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂、CTLA-4抑制剂或其组合。在一些实施方案中,所述检查点抑制剂包括派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗、阿特殊单抗、阿维单抗、德瓦鲁单抗、易普利姆玛或其组合。

[0148] 制备

[0149] 在一些实施方案中,制备本文所述自体肿瘤细胞疫苗的方法包括步骤:(i)从个体无菌收获一个或多个癌细胞,(ii)将收获的细胞置于无菌容器的抗生素溶液内,(iii)从形成细胞的收获溶液中形成细胞悬液,(iv)悬液通过酶分离、机械崩解或两者来实现,(v)通过细胞悬液电穿孔来遗传修饰细胞,以用bishRNA^{furin}/GMCSF表达载体质粒制备疫苗,其中载体质粒包括可操作连接启动子的第一核酸插入物和可操作连接启动子的第二核酸插入物,其中第一插入物编码GM-CSF cDNA,第二插入物编码一个或多个短发夹RNA(shRNA),其能够与编码弗林蛋白酶的mRNA转录物的区域杂交,从而通过RNA干扰抑制弗林蛋白酶表达,(vi)收获疫苗,(vii)辐照疫苗和(viii)冷冻疫苗。在一些实施方案中,所述抗生素溶液包括庆大霉素。在一些实施方案中,所述一个或多个癌细胞收获自卵巢癌患者。在一些实施方案中,所述遗传修饰细胞通过辐照变得无法增殖。在一些实施方案中,所述遗传修饰细胞是自体、同种异体或异种移植的扩增细胞。在一些实施方案中,所述方法还包括转染后用 γ IFN孵育遗传修饰细胞的步骤。在一些实施方案中,所述转染后施用于遗传修饰细胞的 γ IFN剂量是约250U/ml(24小时500U/ml到48小时100U/ml)。在一些实施方案中,所述自体肿瘤细胞疫苗在冷冻前置于介质内。在一些实施方案中,所述在冷冻前放置自体肿瘤细胞疫苗的介质包括DMSO、人血清白蛋白(HSA)或其组合。在一些实施方案中,所述自体肿瘤细胞疫苗可选包括DMSO和HSA,以1.1-1.3mL或约1.2mL的终填充体积冷冻。在一些实施方案中,所述自体肿瘤细胞疫苗在约-80℃冷冻。

[0150] 示范性实施方案

[0151] 以下是本发明的非限制性实施方案。

[0152] 实施方案1.一种防止有需要的个体中的基本消除的卵巢癌复发的方法,所述方法包括给所述个体施用用包含以下的表达载体转染的自体肿瘤细胞:

[0153] a.第一插入物,包含编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)序列的核酸序列;和

[0154] b.第二插入物,包含根据SEQ ID NO:2或4(SEQ ID NO:4)的序列。

[0155] 实施方案2.如实施方案1所述的方法,其中所述基本消除的卵巢癌是III期或IV期卵巢癌。

[0156] 实施方案3.如实施方案1或实施方案2所述的方法,其中所述个体包含野生型BRCA1基因、野生型BRCA2基因或其组合。

[0157] 实施方案4.如实施方案1-3中任一项所述的方法,其中所述个体无复发生存(RFS)相对于未施用转染肿瘤细胞的卵巢癌基本消除的个体增加。

[0158] 实施方案5.如实施方案1-4中任一项所述的方法,其中所述个体接受初始疗法。

[0159] 实施方案6.如实施方案5所述的方法,其中所述初始疗法包括减积手术、化疗或其组合。

[0160] 实施方案7.如实施方案6所述的方法,其中所述化疗包括施用基于铂的药物和紫杉烷。

[0161] 实施方案8.如实施方案7所述的方法,其中所述基于铂的药物包括卡铂。

[0162] 实施方案9.如实施方案7所述的方法,其中所述紫杉烷包括紫杉醇。

[0163] 实施方案10.如实施方案1-9中任一项所述的方法,其中所述GM-CSF是人GM-CSF序列。

[0164] 实施方案11.如实施方案1-10中任一项所述的方法,其中所述表达载体还包含启动子。

[0165] 实施方案12.如实施方案11所述的方法,其中所述启动子是巨细胞病毒(CMV)哺乳动物启动子。

[0166] 实施方案13.如实施方案12所述的方法,其中所述表达载体还包含CMV增强子序列和CMV内含子序列。

[0167] 实施方案14.如实施方案11-13中任一项所述的方法,其中所述第一插入物和第二插入物可操作连接启动子。

[0168] 实施方案15.如实施方案1-14中任一项所述的方法,其中所述表达载体在第一与第二核酸插入物之间还包含编码小核糖核酸病毒2A核糖体跳跃肽的核酸序列。

[0169] 实施方案16.如实施方案1-15中任一项所述的方法,其中所述自体肿瘤细胞以约 1×10^6 细胞-约 5×10^7 细胞的剂量施用于所述个体。

[0170] 实施方案17.如实施方案16所述的方法,其中所述自体肿瘤细胞一月一次施用于所述个体。

[0171] 实施方案18.如实施方案17所述的方法,其中给所述个体施用所述自体肿瘤细胞1-12个月。

[0172] 实施方案19.如实施方案1-18中任一项所述的方法,其中所述自体肿瘤细胞通过皮内注射施用于所述个体。

[0173] 实施方案20.一种治疗有需要的个体中的BRCA1/2野生型卵巢癌的方法,所述方法

包括给所述个体施用用包含以下的表达载体转染的自体肿瘤细胞：

[0174] a. 第一插入物，包含编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 序列的核酸序列；和

[0175] b. 第二插入物，包含根据SEQ ID NO:2或4 (SEQ ID NO:4) 的序列。

[0176] 实施方案21. 如实施方案20所述的方法，其中所述卵巢癌是III期或IV期卵巢癌。

[0177] 实施方案22. 如实施方案20或实施方案21所述的方法，其中所述卵巢癌是难治性卵巢癌。

[0178] 实施方案23. 如实施方案22所述的方法，其中所述难治性卵巢癌是化疗难治的。

[0179] 实施方案24. 如实施方案23所述的方法，其中所述化疗包括基于铂的药物或紫杉烷。

[0180] 实施方案25. 如实施方案24所述的方法，其中所述基于铂的药物包括卡铂。

[0181] 实施方案26. 如实施方案24所述的方法，其中所述紫杉烷包括紫杉醇。

[0182] 实施方案27. 如实施方案20-26中任一项所述的方法，其中所述方法还包括施用额外的治疗剂。

[0183] 实施方案28. 如实施方案27所述的方法，其中所述额外治疗剂选自个体的血管生成抑制剂、PARP抑制剂和检查点抑制剂。

[0184] 实施方案29. 如实施方案28所述的方法，其中所述血管生成抑制剂是血管内皮生长因子 (VEGF) 抑制剂。

[0185] 实施方案30. 如实施方案29所述的方法，其中所述VEGF抑制剂选自索拉非尼、舒尼替尼、贝伐单抗、帕唑帕尼、阿昔替尼、卡博替尼和乐伐替尼。

[0186] 实施方案31. 如实施方案29所述的方法，其中所述VEGF抑制剂是贝伐单抗。

[0187] 实施方案32. 如实施方案28所述的方法，其中所述PARP抑制剂选自尼拉帕利、奥拉帕尼、卢卡帕尼、尼拉帕利、他拉唑帕利、维利帕尼和帕米帕利。

[0188] 实施方案33. 如实施方案28所述的方法，其中所述PARP抑制剂是尼拉帕利。

[0189] 实施方案34. 如实施方案28所述的方法，其中所述检查点抑制剂选自PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂和CTLA-4抑制剂。

[0190] 实施方案35. 如实施方案28所述的方法，其中所述检查点抑制剂选自派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗、阿特珠单抗、阿维单抗、德瓦鲁单抗和易普利姆玛，经静脉输注给药。

[0191] 实施方案36. 如实施方案20-35中任一项所述的方法，其中所述GM-CSF是人GM-CSF序列。

[0192] 实施方案36. 如实施方案20-36中任一项所述的方法，其中所述表达载体还包含启动子。

[0193] 实施方案38. 如实施方案37所述的方法，其中所述启动子是巨细胞病毒 (CMV) 哺乳动物启动子。

[0194] 实施方案39. 如实施方案38所述的方法，其中所述表达载体还包含CMV增强子序列和CMV内含子序列。

[0195] 实施方案40. 如实施方案37-39中任一项所述的方法，其中所述第一插入物和第二插入物可操作连接启动子。

[0196] 实施方案41.如实施方案20-40中任一项所述的方法,其中所述表达载体在第一与第二核酸插入物之间还包含编码小核糖核酸病毒2A核糖体跳跃肽的核酸序列。

[0197] 实施方案42.如实施方案20-41中任一项所述的方法,其中所述自体肿瘤细胞以约 1×10^6 细胞-约 5×10^7 细胞的剂量施用于所述个体。

[0198] 实施方案43.如实施方案42所述的方法,其中所述自体肿瘤细胞一月一次施用于所述个体。

[0199] 实施方案44.如实施方案43所述的方法,其中给所述个体施用所述自体肿瘤细胞1-12个月。

[0200] 实施方案45.如实施方案20-44中任一项所述的方法,其中所述自体肿瘤细胞通过皮内注射施用于所述个体。

[0201] 实施方案46.一种防止有需要的个体中的基本消除的卵巢癌复发或预防性治疗其复发的方法,所述方法包括给所述个体施用:

[0202] a.至少一个第一剂量的自体肿瘤细胞疫苗,其包含用包含以下的表达载体转染的自体肿瘤细胞:

[0203] i.第一插入物,包含编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)序列的核酸序列;和

[0204] ii.第二插入物,包含根据SEQ ID NO:2或4(SEQ ID NO:4)的序列;和

[0205] b.至少一个第二剂量的自体肿瘤细胞疫苗,其与至少一个剂量额外治疗剂联合施用。

[0206] 实施方案47.如实施方案46所述的方法,其中所述基本消除卵巢癌是III期或IV期卵巢癌。

[0207] 实施方案48.如实施方案46或实施方案47所述的方法,其中所述个体包含野生型BRCA1基因、野生型BRCA2基因或其组合。

[0208] 实施方案49.如实施方案46-48中任一项所述的方法,其中所述个体的无复发生存(RFS)相对于未施用转染肿瘤细胞的卵巢癌基本消除的个体增加。

[0209] 实施方案50.如实施方案46-49中任一项所述的方法,其中所述个体接受初始疗法。

[0210] 实施方案51.如实施方案50所述的方法,其中所述初始疗法包括减积手术、化疗或其组合。

[0211] 实施方案52.如实施方案51所述的方法,其中所述化疗包括施用基于铂的药物和紫杉烷。

[0212] 实施方案53.如实施方案52所述的方法,其中所述基于铂的药物包括卡铂。

[0213] 实施方案54.如实施方案52所述的方法,其中所述紫杉烷包括紫杉醇。

[0214] 实施方案55.如实施方案46-54中任一项所述的方法,其中所述GM-CSF是人GM-CSF序列。

[0215] 实施方案56.如实施方案46-55中任一项所述的方法,其中所述表达载体还包括启动子。

[0216] 实施方案57.如实施方案56所述的方法,其中所述启动子是巨细胞病毒(CMV)哺乳动物启动子。

[0217] 实施方案58.如实施方案57所述的方法,其中所述表达载体还包含CMV增强子序列和CMV内含子序列。

[0218] 实施方案59.如实施方案56-58中任一项所述的方法,其中所述第一插入物和第二插入物可操作连接启动子。

[0219] 实施方案60.如实施方案46-59中任一项所述的方法,其中所述在第一与第二核酸插入物之间还包含编码小核糖核酸病毒2A核糖体跳跃肽的核酸序列。

[0220] 实施方案61.如实施方案46-60中任一项所述的方法,其中所述额外治疗剂选自个体的血管生成抑制剂、PARP抑制剂和检查点抑制剂。

[0221] 实施方案62.如实施方案61所述的方法,其中所述血管生成抑制剂是血管内皮生长因子(VEGF)抑制剂。

[0222] 实施方案63.如实施方案62所述的方法,其中所述VEGF抑制剂选自下组:索拉非尼、舒尼替尼、贝伐单抗、帕唑帕尼、阿昔替尼、卡博替尼和乐伐替尼。

[0223] 实施方案64.如实施方案62所述的方法,其中所述VEGF抑制剂是贝伐单抗。

[0224] 实施方案65.如实施方案61所述的方法,其中所述PARP抑制剂选自尼拉帕利、奥拉帕尼、卢卡帕尼、尼拉帕利、他拉唑帕利、维利帕尼和帕米帕利。

[0225] 实施方案66.如实施方案61所述的方法,其中所述PARP抑制剂是尼拉帕利。

[0226] 实施方案67.如实施方案61所述的方法,其中所述检查点抑制剂选自PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂和CTLA-4抑制剂。

[0227] 实施方案68.如实施方案61所述的方法,其中所述检查点抑制剂选自派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗、阿特珠单抗、阿维单抗、德瓦鲁单抗和易普利姆玛。

[0228] 实施方案69.如实施方案61所述的方法,其中所述检查点抑制剂是阿特珠单抗。

[0229] 实施方案70.如实施方案46-69中任一项所述的方法,其中所述至少一个剂量的额外治疗剂是1100mg-1300mg。

[0230] 实施方案71.如实施方案46-70中任一项所述的方法,其中所述至少一个第一剂量的自体肿瘤细胞疫苗包括 1×10^6 细胞-约 5×10^7 细胞。

[0231] 实施方案72.如实施方案46-71中任一项所述的方法,其中所述至少一个第二剂量的自体肿瘤细胞疫苗包括 1×10^6 细胞-约 5×10^7 细胞。

[0232] 实施方案73.如实施方案46-72中任一项所述的方法,其中所述至少一个第一剂量的自体肿瘤细胞通过皮内注射施用于所述个体。

[0233] 实施方案74.如实施方案46-73中任一项所述的方法,其中所述至少一个第二剂量的自体肿瘤细胞通过皮内注射施用于所述个体。

[0234] 实施方案75.如实施方案46-74中任一项所述的方法,其中所述至少一个剂量的额外治疗剂通过静脉输注施用。

[0235] 实施方案76.如实施方案46-75中任一项所述的方法,其中所述至少一个第一剂量的自体肿瘤细胞疫苗包括2个剂量。

[0236] 实施方案77.如实施方案46-76中任一项所述的方法,其中所述各剂量的至少第一剂量自体肿瘤细胞疫苗一月一次施用于所述个体。

[0237] 实施方案78.如实施方案46-77中任一项所述的方法,其中所述各剂量的至少第二剂量自体肿瘤细胞疫苗一月一次施用于所述个体。

[0238] 实施方案79.如实施方案46-78中任一项所述的方法,其中所述各剂量的至少一个剂量额外治疗剂至少一月一次施用于所述个体。

[0239] 实施方案80.如实施方案46-79中任一项所述的方法,其中所述至少第一剂量的自体肿瘤细胞疫苗和至少第二剂量的自体肿瘤细胞疫苗包括总共至少12个剂量。

[0240] 实施方案81.一种治疗有需要的个体中的BRCA1/2野生型卵巢癌的方法,所述方法包括给所述个体施用:

[0241] a.至少一个第一剂量的自体肿瘤细胞疫苗,其包含用包含以下的表达载体转染的自体肿瘤细胞:

[0242] i.第一插入物,包含编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)序列的核酸序列;和

[0243] ii.第二插入物,包含根据SEQ ID NO:2或4(SEQ ID NO:4)的序列;和

[0244] b.至少一个第二剂量的自体肿瘤细胞疫苗,其与至少一个剂量额外治疗剂联合施用。

[0245] 实施方案82.如实施方案81所述的方法,其中所述卵巢癌是III期或IV期卵巢癌。

[0246] 实施方案83.如实施方案81或实施方案82所述的方法,其中所述卵巢癌是难治性卵巢癌。

[0247] 实施方案84.如实施方案83所述的方法,其中所述难治性卵巢癌是化疗难治的。

[0248] 实施方案85.如实施方案84所述的方法,其中所述化疗包括基于铂的药物或紫杉烷。

[0249] 实施方案86.如实施方案85所述的方法,其中所述基于铂的药物包括卡铂。

[0250] 实施方案87.如实施方案85所述的方法,其中所述紫杉烷包括紫杉醇。

[0251] 实施方案88.如实施方案81-87中任一项所述的方法,其中所述GM-CSF是人GM-CSF序列。

[0252] 实施方案89.如实施方案81-88中任一项所述的方法,其中所述表达载体还包含启动子。

[0253] 实施方案90.如实施方案89所述的方法,其中所述启动子是巨细胞病毒(CMV)哺乳动物启动子。

[0254] 实施方案91.如实施方案90所述的方法,其中所述表达载体还包含CMV增强子序列和CMV内含子序列。

[0255] 实施方案92.如实施方案89-91中任一项所述的方法,其中所述第一插入物和第二插入物可操作连接启动子。

[0256] 实施方案93.如实施方案81-92中任一项所述的方法,其中所述表达载体在第一与第二核酸插入物之间还包含编码小核糖核酸病毒2A核糖体跳跃肽的核酸序列。

[0257] 实施方案94.如实施方案81-93中任一项所述的方法,其中所述额外治疗剂选自个体的血管生成抑制剂、PARP抑制剂和检查点抑制剂。

[0258] 实施方案95.如实施方案94所述的方法,其中所述血管生成抑制剂是血管内皮生长因子(VEGF)抑制剂。

[0259] 实施方案96.如实施方案95所述的方法,其中所述VEGF抑制剂选自下组:索拉非尼、舒尼替尼、贝伐单抗、帕唑帕尼、阿昔替尼、卡博替尼和乐伐替尼。

- [0260] 实施方案97.如实施方案95所述的方法,其中所述VEGF抑制剂是贝伐单抗。
- [0261] 实施方案98.如实施方案94所述的方法,其中所述PARP抑制剂选自尼拉帕利、奥拉帕尼、卢卡帕尼、尼拉帕利、他拉唑帕利、维利帕尼和帕米帕利。
- [0262] 实施方案99.如实施方案94所述的方法,其中所述PARP抑制剂是尼拉帕利。
- [0263] 实施方案100.如实施方案94所述的方法,其中所述检查点抑制剂选自PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂和CTLA-4抑制剂。
- [0264] 实施方案101.如实施方案94所述的方法,其中所述检查点抑制剂选自派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗、阿特珠单抗、阿维单抗、德瓦鲁单抗和易普利姆玛。
- [0265] 实施方案102.如实施方案94所述的方法,其中所述检查点抑制剂是阿特珠单抗。
- [0266] 实施方案103.如实施方案81-102中任一项所述的方法,其中所述至少一个剂量的额外治疗剂是1100mg-1300mg。
- [0267] 实施方案104.如实施方案81-103中任一项所述的方法,其中所述至少一个第一剂量的自体肿瘤细胞疫苗包含 1×10^6 细胞-约 5×10^7 细胞。
- [0268] 实施方案105.如实施方案81-104中任一项所述的方法,其中所述至少一个第二剂量的自体肿瘤细胞疫苗包含 1×10^6 细胞-约 5×10^7 细胞。
- [0269] 实施方案106.如实施方案81-105中任一项所述的方法,其中所述至少一个第一剂量的自体肿瘤细胞通过皮内注射施用于所述个体。
- [0270] 实施方案107.如实施方案81-106中任一项所述的方法,其中所述至少一个第二剂量的自体肿瘤细胞通过皮内注射施用于所述个体。
- [0271] 实施方案108.如实施方案81-107中任一项所述的方法,其中所述至少一个剂量的额外治疗剂通过静脉输注施用。
- [0272] 实施方案109.如实施方案81-108中任一项所述的方法,其中所述至少一个第一剂量的自体肿瘤细胞疫苗包含2个剂量。
- [0273] 实施方案110.如实施方案81-109中任一项所述的方法,其中所述各剂量的至少第一剂量自体肿瘤细胞疫苗一月一次施用于所述个体。
- [0274] 实施方案111.如实施方案81-110中任一项所述的方法,其中所述各剂量的至少第二剂量自体肿瘤细胞疫苗一月一次施用于所述个体。
- [0275] 实施方案112.如实施方案81-111中任一项所述的方法,其中所述各剂量的至少一个剂量额外治疗剂至少一月一次施用于所述个体。
- [0276] 实施方案113.如实施方案81-112中任一项所述的方法,其中所述至少第一剂量的自体肿瘤细胞疫苗和至少第二剂量的自体肿瘤细胞疫苗包含总共至少12个剂量。
- [0277] 实施方案114.一种治疗有需要的个体中的癌症的方法,所述方法包括给所述个体施用包含以下的表达载体:
- [0278] a) 第一插入物,包含编码粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)序列的核酸序列;和
- [0279] b) 第二插入物,包含根据SEQ ID NO:2或4(SEQ ID NO:4)的序列,
- [0280] 其中个体具有野生型BRCA1基因、野生型BRCA2基因、或其组合,并鉴定为同源重组缺陷(HRD)-阴性。
- [0281] 实施方案115.如实施方案114所述的方法,其中所述GM-CSF是人GM-CSF序列。

- [0282] 实施方案116.如实施方案114所述的方法,其中所述表达载体还包含启动子。
- [0283] 实施方案117.如实施方案116所述的方法,其中所述启动子是巨细胞病毒(CMV)哺乳动物启动子。
- [0284] 实施方案118.如实施方案114所述的方法,其中所述表达载体还包含CMV增强子序列和CMV内含子序列。
- [0285] 实施方案119.如实施方案114所述的方法,其中所述第一插入物和第二插入物可操作连接启动子。
- [0286] 实施方案120.如实施方案114所述的方法,其中所述表达载体在第一与第二核酸插入物之间还包含编码小核糖核酸病毒2A核糖体跳跃肽的核酸序列。
- [0287] 实施方案121.如实施方案114所述的方法,其中所述癌症是HRD-阴性、野生型BRCA1/2的癌症。
- [0288] 实施方案122.如实施方案114所述的方法,其中所述癌症选自实体瘤癌症、卵巢癌、肾上腺皮质癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管癌、结直肠癌、食管癌、成胶质细胞瘤、胶质瘤、肝细胞癌、头颈癌、肾癌、白血病、淋巴瘤、肺癌、黑素瘤、间皮瘤、多发性骨髓瘤、胰腺癌、嗜铬细胞瘤、浆细胞瘤、成神经细胞瘤、前列腺癌、肉瘤、胃癌、子宫癌、甲状腺癌和血液癌症。
- [0289] 实施方案123.如实施方案122所述的方法,其中所述实体瘤癌症选自子宫内膜癌、胆管癌、膀胱癌、肝肝细胞癌、胃/食管癌、卵巢癌、黑素瘤、乳腺癌、胰腺癌、结直肠癌、胶质瘤、非小细胞肺癌、前列腺癌、宫颈癌、肾癌、甲状腺癌、神经内分泌癌、小细胞肺癌、肉瘤、头颈癌、脑癌、肾透明细胞癌、皮肤癌、内分泌肿瘤、甲状腺癌、来源不明的肿瘤和胃肠道间质瘤。
- [0290] 实施方案124.如实施方案122所述的方法,其中所述癌症是卵巢癌。
- [0291] 实施方案125.如实施方案124所述的方法,其中所述方法防止或延迟基本消除的卵巢癌复发。
- [0292] 实施方案126.如实施方案125所述的方法,其中所述基本消除的卵巢癌是III期或IV期卵巢癌。
- [0293] 实施方案127.如实施方案122所述的方法,其中所述癌症是乳腺癌。
- [0294] 实施方案128.如实施方案122所述的方法,其中所述癌是黑素瘤。
- [0295] 实施方案129.如实施方案122所述的方法,其中所述癌是肺癌。
- [0296] 实施方案130.如实施方案114所述的方法,其中所述表达载体在用所述表达载体转染的自体癌细胞内。
- [0297] 实施方案131.如实施方案130所述的方法,其中所述自体癌细胞以约 1×10^6 细胞-约 5×10^7 细胞的剂量施用于所述个体。
- [0298] 实施方案132.如实施方案131所述的方法,其中所述自体癌细胞一月一次施用于所述个体。
- [0299] 实施方案133.如实施方案131所述的方法,其中给所述个体施用所述自体肿瘤细胞1-12个月。
- [0300] 实施方案134.如实施方案114所述的方法,其中所述自体癌细胞通过皮内注射施用于所述个体。

- [0301] 实施方案135.如实施方案114所述的方法,其中所述个体接受初始疗法。
- [0302] 实施方案136.如实施方案135所述的方法,其中所述初始疗法包括减积手术、化疗或其组合。
- [0303] 实施方案137.如实施方案135所述的方法,其中所述化疗包括施用基于铂的药物和紫杉烷。
- [0304] 实施方案138.如实施方案137所述的方法,其中所述基于铂的药物包括卡铂。
- [0305] 实施方案139.如实施方案137所述的方法,其中所述紫杉烷包括紫杉醇。
- [0306] 实施方案140.如实施方案1-139中任一项所述的方法,其中所述方法还包括施用额外治疗剂。
- [0307] 实施方案141.如实施方案140所述的方法,其中所述额外治疗剂是选自下组的成员:个体的血管生成抑制剂、PARP抑制剂和检查点抑制剂。

实施例

- [0308] 实施例1-用 **Vigil®** 的BRCA1/2野生型一线III/IV期卵巢癌无复发和总体生存优势
- [0309] 考虑到对晚期卵巢癌一线治疗的限制、卵巢癌中的高TGFβ表达与免疫抑制的关系以及BRCA1/2-wt患者的治疗选择有限,启动研究以检测 **Vigil®** 在卵巢癌患者中作为一线维持疗法的应用。

[0310] 材料与方法

[0311] 试验设计和治疗

[0312] 此 **Vigil®** vs. 安慰剂的2b期、双盲试验涉及25个位置。纳入III/IV期高级别浆液性卵巢癌患者,其在手术与包括卡铂和紫杉醇的化疗组合后处于临床完全缓解。招募的患者可在初次减积手术后接受辅助化疗或新辅助化疗,然后是间隔减积手术和辅助化疗。收集并分析组织/血液的胚系和/或体细胞BRCA1/2分子谱 (Ocean Ridge Biosciences, 佛罗里达州迪尔菲尔德比奇)。患者接受 1×10^7 细胞/胞内注射 **Vigil®** 或安慰剂,每月一次(最后一次化疗后8周内),持续多至12剂。持续治疗,直至疾病复发或治疗供给耗尽。用CTCAE v 4.03评估毒性。

[0313] 患者

[0314] 纳入在组织学上证实III或IV期高级别浆液性卵巢癌(HGSC)的女性,其在手术与化疗组合后获得cCR。

[0315] 肿瘤获取与制备的关系

[0316] Gradalis公司(Gradalis, Inc., 得克萨斯州卡罗尔顿)从收获的肿瘤组织制备 **Vigil®**。基于 **Vigil®** 小瓶数量生产等剂量安慰剂(冷冻介质)。疫苗生产需要10-30克组织。排除延伸至肠腔的损伤(细菌污染风险)。

[0317] 研究产品和安慰剂制备

[0318] 获得手术切除的肿瘤组织并切成1/4英寸的段(section),然后置于样本容器内,该容器补充有庆大霉素(费森尤斯卡比(Fresenius Kabi))并以湿冰包装从而过夜转运。在第1天,测试运输介质和肿瘤样本的无菌性(BacT/Alert 3D微生物鉴定系统,生物梅里埃(BioMerieux))。肿瘤组织通过手术刀修整和分离,然后是酶解分离(I型胶原酶溶液)并37

℃孵育以形成单细胞悬液。悬液调至4千万细胞/mL浓度,用Gene Pulser XL(伯乐(BioRad))电穿孔以帮助质粒插入。

[0319] 在第2天,收获过夜培养物并重悬于新鲜X-VIVO培养基。推进前需要QC样品和最小4剂/患者。细胞用补充有1%人血清白蛋白(HSA)(奥克特珐玛(Octapharma))的PlasmaLyte(巴克斯特(Baxter))洗涤,移出QC样品。细胞置于冷冻介质,该介质由含10%DMSO(二甲亚砜;Cryoserv USP;迈兰公司(Mylan))、1%HSA(奥克特珐玛)的Plasma-Lyte A,pH 7.4(巴克斯特)组成,以 1×10^7 细胞/mL无菌等分入无菌2.0mL硼硅玻璃小瓶(加铝惠顿医药包装公司(Algroup Wheaton Pharmaceutical and Cosmetics Packaging));用包被有Flurotec® barrier file(西氏医药服务公司(West Pharmaceutical Services))的丁基橡胶塞密闭,终填充体积是1.2mL。终产物小瓶用CoolCell®冷冻容器(Biocision)按控制速度冷冻,置于-80℃冰箱(三洋(Sanyo))。

[0320] 安慰剂由冷冻介质构成,该介质由含10%DMSO(Cryoserv USP;迈兰公司)、1%HSA(奥克特珐玛)的Plasma-Lyte A,pH 7.4(巴克斯特)组成。缓慢冷冻介质到-80℃后,小瓶保存于液氮的汽相,直到无菌性和内毒素释放检测。安慰剂小瓶生产与就对象制备的可用产物剂量匹配。

[0321] 疾病评估

[0322] 对象维持治疗,直至疾病复发或者对象的Vigil®或安慰剂供应耗尽。疾病复发通过WorldCare Clinical(WCC)(马萨诸塞州波士顿)评估,使用实体瘤疗效评价标准1.1版(RECIST 1.1)。

[0323] 终点和统计评估

[0324] 初级终点是从随机开始的无复发生存(RFS),比较Vigil® vs. 安慰剂。所有在揭盲前计划的统计分析独立实施(Stat Beyond Consulting,加利福尼亚州欧文)。二级终点按优先顺序包括从获取时间开始的BRCA-wt的RFS,从随机化时间开始的BRCA-wt的RFS,从获取时间开始的所有患者的RFS,从随机化时间开始的所有患者的OS以及从获取时间开始的所有患者的OS。从随机化和获取时间开始的BRCA-wt的OS是预先计划的子分析。所有患者(接受至少一剂Vigil®或安慰剂)纳入安全性分析。符合方案的单侧p值为0.05或更低时(分层时序检验),视作指示分析的统计学显著性。基于样本量计算,此分析需要总共54个事件。RFS的危害比经考克斯比例风险模型估计,由随机分层因子[残留病(宏观/微观),一线化疗(新辅助,辅助)]分层。RFS分布用Kaplan-Meier法预估。通过森林图评估所有患者和BRCA-wt患者的计划亚组分析。亚组包括注射数、年龄、ECOG、BRCA-wt/m,种族、阶段和制备释放标准(TGFβ1,GMCSF,生存能力)。检查基线人口统计学变量平衡的p值就分类数据而言用双侧费希尔精确检验计算,就连续数据而言用双侧t检验,而没有多重性调整。完成Grambsch和Therneau检验以核对有分层的考克斯模型的比例风险假定。

[0325] 结果

[0326] 患者

[0327] 从2015年2月到2017年3月,310名患者在22个位置签署知情同意书。128名患者由于组织学或筛选失败参数而被认为不合格。在经历制备的剩余181人中,92个对象(56%)成功制备且随机化,尽管有一个出于个人身体健康原因在治疗前、随机化后退出。17个未签署

随机化的知情同意书且72个在产品释放标准方面失败(65个的细胞不足)。91个对象接受Vigil® (n=46) 或安慰剂 (n=45), 并分析安全性和功效。67个对象是BRCA-wt (Vigil®: 39BRCA-wt, 安慰剂: 28BRCA-wt) 且有24个BRCA-m。通过2019年8月的独立第三方放射学评估(WCC), 在试验中观察到55个复发事件。人口统计资料如表2所示。在组之间没有检测到显著差异, 除了45.7% Vigil® 患者具有ECOG表现, 相比之下安慰剂为20%。

[0328] 表2-符合方案人群的人口统计资料 (PP)

[0329]

特征	治疗组, 数量 (%)			
	所有患者		BRCA1/2-wt	
	Vigil®	安慰剂	Vigil®	安慰剂
患者数	46	45	39	28
年龄, 岁				
中值	62.5	63.0	63	64
范围	42 - 84	38 - 79	42-84	38-79
< 65	25 (54.3)	28 (62.2)	21 (53.8)	15 (53.6)
≥65	21 (45.7)	17 (37.8)	18 (46.2)	13 (46.4)
人种				
亚裔	0 (0)	2 (4.4)	0 (0)	1 (3.6)
黑人或非裔美国人	1 (2.2)	4 (8.9)	0 (0)	2 (7.1)
白人	45 (97.8)	38 (84.4)	39 (100)	24 (85.7)
未报告	0 (0)	1 (2.2)	0 (0)	0 (0)
种族				
西班牙裔或拉丁裔	1 (2.2)	0 (0)	1 (2.6)	0 (0)
非西班牙裔或拉丁裔	45 (97.8)	44 (97.8)	38 (97.4)	27 (96.4)
未报告	0 (0)	1 (2.2)	0 (0)	1 (2.2)
ECOG				
0	25 (54.3)	36 (80.0)	21 (53.8)	22 (78.6)
1	21 (45.7)	9 (20.0)	18 (46.2)	6 (21.4)
FIGO 期				
III	37 (80.4)	40 (88.9)	31 (79.5)	25 (89.3)
IV	9 (19.6)	5 (11.1)	8 (20.5)	3 (10.7)
一线化疗				
新辅助	38 (82.6)	38 (84.4)	34 (87.2)	26 (92.9)
辅助	8 (17.4)	7 (15.6)	5 (12.8)	2 (7.1)
一线手术残留病状态				
宏观	15 (32.6)	12 (26.7)	13 (33.3)	9 (32.1)
微观/NED	31 (67.4)	33 (73.3)	26 (67.7)	19 (67.9)
组织学				
子宫内膜癌	1 (2.2)	0 (0)	1 (2.6)	0 (0)
混合浆液/透明细胞	0 (0)	1 (2.2)	0 (0)	1 (2.2)
高级别浆液性癌	45 (97.8)	44 (97.8)	38 (97.4)	27 (96.4)
BRCA 突变状态				
BRCA-wt	39 (84.8)	28 (62.2)	39 (100)	28 (100)
BRCA-m	7 (15.2)	17 (37.8)	0 (0)	0 (0)
从最后施用化疗到第一剂 Vigil® / 安慰剂的时间				
均值	49.5 (1.6 mo.)	47.2 (1.5 mo.)	49.6 (1.6 mo.)	47.9 (1.6 mo.)
中值(范围)	49 (22-121) (1.6 mo. (0.7	47 (16-110) (1.5 mo. (0.5	49 (22-121) (1.6 mo. (0.7	46 (23-110) (1.5 mo. (0.8

特征	治疗组, 数量 (%)			
	所有患者		BRCA1/2-wt	
	Vigil® mo.-4.0 mo.)	安慰剂 mo.- 3.6 mo.)	Vigil® mo.- 4.0 mo.)	安慰剂 mo.- 3.6 mo.)
实体瘤重量 (g)				
均值(SD)	54 (28)	56 (30)	55 (27)	59 (27)
中值(范围)	51.8 (9.6-136.5)	51.6 (7.8-137.5)	54 (10-136)	53 (11-114)
每克肿瘤组织收获的细胞(x10e6)				
均值(SD)	6 (4)	7 (7)	5 (3)	6 (5)
中值(范围)	4.8 (0.7-17.0)	4.7 (1.6-33.6)	5 (1-13)	5 (2-29)
从手术到随机化范围的时间				
均值	214.1 (7.1 mo.)	200.3 (6.7 mo.)	205.7 (6.8 mo.)	201.8 (6.6 mo.)
中值	208.5 (161-471)	200 (156-315)	204 (161-286)	198.5 (156-315)
	(7.0 mo. (5.3 mo. -15.5 mo.)	(6.7 mo.) (5.1 mo. - 10.4 mo.)	(6.7 mo. (5.3 mo.- 9.4 mo.)	(6.5 mo. (5.1 mo.- 10.4 mo.)

[0331] 功效

[0332] 从所有患者的随机化时间开始计算中值RFS的初级终点,比较 Vigil® vs. 安慰剂,为12.7与8.4个月(HR 0.67,90%CI[0.432相比1.042],单侧p=0.065)。从手术/获取时间开始的RFS是18.3与15.9个月(Vigil® vs. 安慰剂)HR 0.63 (90%CI[0.403相比0.971],单侧p=0.038) (图6A-6B)。Vigil® 与安慰剂之间的复发是54%相比76% (费希尔精确p=0.048)。此外,Vigil®的1年RFS率是51%,相比之下安慰剂的是38% (p 0.13,单侧Z检验),Vigil®的2年RFS率是33%,相比之下安慰剂的是25% (p 0.22,单侧Z检验),从随机化时间开始。从第一剂gemogenovatucel-T开始随访的中值是38.5个月,安慰剂是38.6个月。PP和ITT分析显示相同结果。从手术到随机化的中值时间是7.0和6.7个月,从化疗结束到开始治疗的中值持续时间是1.6和1.5个月(分别为gemogenovatucel-T、安慰剂)。

[0333] BRCA状态分层证明 Vigil®BRCA-wt患者改善。从随机化开始的 Vigil®BRCA-wt的中值RFS (图6C) 是12.7个月,相比之下安慰剂的是8.0个月(HR 0.493,90%CI[0.287相比0.846],单侧p=0.014),从手术/获取时间开始的 Vigil®是19.4个月且安慰剂是14.4个月(HR 0.459,90%CI[0.268相比0.787],单侧p=0.007) (图6D)。51%的 Vigil®BRCA1/2-wt患者显示疾病复发,相比之下安慰剂BRCA1/2-wt患者为79% (费希尔精确p=0.039)。相较于安慰剂,在从随机化和手术/获取时间开始的 Vigil®BRCA-wt患者的预先计划子分析中观察到总体生存优势(图6E-6F)。旨在治疗分析RFS以及计算从随机化和手术/获取时间开始的生存,显示相同结果。从BRCA-m患者随机化开始的中值RFS就 Vigil®而言是10.5个月且就安慰剂而言是13.3个月。图7A-7B显示涉及疾病效果的预研究人口统计资料(预先计划的子分析),其包括预先鉴定的分层(残留病、化疗方案)和产品释放标准,以用于影响从随机化时间开始的BRCA-wt和所有患者对RFS。

[0334] 从BRCA-wt患者的手术/获取时间开始计算中值RFS的二级终点,比较 Vigil® vs. 安

慰剂, gemogenovatucl-T中是19.4个月且安慰剂中是14.4个月(HR 0.459, 90%CI[0.268相比0.787], 单侧p 0.007) (图6D)。在功效评估时间, 51%的 Vigil®BRCA1/2-wt患者显示疾病复发, 相比之下安慰剂BRCA1/2-wt患者为79% (p 0.0195, 单侧费希尔精确t检验)。Vigil®BRCA-wt患者的1年RFS率是80%, 安慰剂BRCA-wt患者则是64% (p 0.075, 单侧Z检验), Vigil®的2年RFS率是43%, 安慰剂则是23% (p 0.05, 单侧Z检验), 从手术/获取时间开始。从随机化开始的 Vigil®BRCA-wt患者的中值RFS是12.7个月, 相比之下安慰剂是8.0个月 (HR 0.493, 90%CI[0.287相比0.846], 单侧p 0.014) (图6C)。对于BRCA-wt患者, Vigil®的1年RFS率是52%, 安慰剂则是27% (p 0.02, 单侧Z检验), Vigil®的2年RFS率是34%, 安慰剂则是13% (p 0.035, 单侧Z检验), 从随机化时间开始。旨在治疗分析从随机化和手术/获取时间开始计算的RFS, 显示相同结果(图5A-D)。从所有患者手术/获取时间开始的中值RFS是18.3相比15.9 (Vigil® vs. 安慰剂), HR 0.63 (90%CI[0.403相比0.971], 单侧p 0.038) (图6B)。

[0335] 对BRCA-wt患者进行基于RMST的灵敏度分析以比较 Vigil®与安慰剂, 结果与基于分层对数秩检验的那些一致。对于BRCA-wt患者, 就从随机化开始的RFS而言, Vigil®与安慰剂之间RMST差异是7.8个月 (p 0.021), 就从随机化开始的OS而言, 是7.1个月 (p 0.020)。截断点等于任一臂的最长随访时间的最小值, 其用于RMST分析。

[0336] 安全性

[0337] 每患者平均施用6次 Vigil® (范围1-12) 或6次安慰剂 (范围3-12) 注射。安慰剂患者的一次治疗延迟归因于盆腔炎, 记录为可能与研究药物相关。2个安慰剂患者经历3级相关毒性; 没有观察到 Vigil® 3级治疗相关不良事件。Vigil®中9%的报告AE是2, 3级不良事件, 相比之下安慰剂为2.9%。7个 (4个安慰剂; 3个 Vigil®) 患者报告有11项严重不良事件 (SAE)。除了一个以外, 都不太可能涉及或未涉及研究治疗。

[0338] 产品释放结果

[0339] 84个 (92%) 对象符合所有产品释放标准。收获的平均肿瘤质量是52克 (范围8-137gm)。产品释放的生存力中值是88% (72-98%, n=91)。91个中的7个 (8%, 5 Vigil®, RFS随机化7.4个月/2安慰剂) 未显示质粒转移后的GMCSF表达增加足够。然而, 这7个患者的6个 (七分之六) 显示有适当的TGFβ1敲减。表3显示额外产品释放结果。可评估的平均GMCSF生成 (pg/10e6细胞) 是860 (36-37669, n=84), 可评估的平均TGFβ1敲减是100% (66-100%, n=84)。7个患者的TGFβ1敲减结果未确定 (6个有适当GMCSF表达释放, 3 Vigil®, RFS随机化5.6个月/4安慰剂), 然而, 78名 (86%) 患者有≥90% TGFβ1敲减, 证明涉及弗林蛋白酶bi-shRNAi敲减的活性稳健, 尽管RFS差异不显著。所有患者中以可检测水平质粒转染前的基线TGFβ1生成揭示, 中值TGFβ1表达为164pg/10e6细胞 (平均241, 范围52-882)。BRCA1/2-wt TGFβ1表达显示2个组的中值为181 (平均249, 范围60-662) pg/10e6细胞, BRCA1/2-m TGFβ1表达显示中值146 (平均219, 范围52-882) pg/10e6细胞 (表4)。

[0340] 表3-数值释放概括

[0341]

	生存力 (%)	GMCSF 生成 (pg/10 ⁶ 细胞)	TGF-β1 敲减(%)	凝胶内毒素(疫苗 <EU/mL)
计数	91	91	84	91
均值	86%	1806	96%	0.4
标准偏差	5%	2433	8%	0.4
中值	86%	826	100%	0.4
最小	72%	-1339	66%	0.2
最大	98%	10151	100%	3.2
范围	0	11491	34%	3.0
就所有患者而言细胞剂量 1x10 ⁷ ; USP<71> 无菌性阴性的所有患者; 支原体 DNA 阴性的所有患者				

[0342] 表4-BRCA 1/2突变状态与TGFβ1的相关性

[0343]

	Vigil®			安慰剂			总体		
	1/2 wt	1/2 mut	所有	1/2 wt	1/2 mut	所有	1/2 wt	1/2 mut	所有
对象	24	4	46	24	10	45	48	14	91
TGFβ1 Pre									
计数	24	4	43	22	9	41	46	13	84
平均(pg/10 ⁶)	263	131	224	247	275	259	255	231	241
SD (pg/10 ⁶)	161	98	148	150	267	175	154	234	162
中值(pg/10 ⁶)	262	93	164	166	146	168	212	122	166
最小(pg/10 ⁶)	71	65	60	86	52	52	71	52	52
最大(pg/10 ⁶)	662	273	662	561	882	882	662	882	882

[0344] 功效

[0345] 91个可评估患者外,有62个患者在局部位点分析中有BRCA1/2分子谱。BRCA1/2-wt患者亚组显示Vigil®组相较于安慰剂组的RFS益处。结果如图2A-2B所示。在Vigil®组的BRCA-wt卵巢癌患者中未达到从手术/获取时间开始计算的中值RFS,相比之下安慰剂组为14.8个月(HR=0.49,90%CI,0.25-0.97,单侧p=0.038)。类似地,当从随机化时间开始计算RFS时,BRCA1/2-wt亚组的中值RFS在Vigil®中是19.4个月,而安慰剂臂中是8.0个月(HR=0.51,90%CI,0.26-1.01,单侧p=0.050)。38%的Vigil®治疗BRCA1/2-wt患者证实疾病复发,相比之下安慰剂BRCA1/2-wt患者为71%(卡方检验0=0.021)(图3A)。62%的Vigil®BRCA-wt患者迄今为止继续无复发(10/31/2019)。

[0346] 图2C-2D显示计算从减积手术时间和随机化时间开始的RFS,而无论BRCA1/2状态如何。Vigil®组中从随机化时间开始计算的中值RFS是13.67个月(416天),相比之下安慰剂为8.38个月(255天)(HR=0.69,单侧对数秩p=-.054)。计算从减积手术时间开始的RFS有改善,HR为0.64(单侧p=0.054)。48%的Vigil®治疗患者中报告了复发,相比之下安慰剂为73%(图3B)。与Vigil®反应趋势优势相关的其他因素是低龄≤65(p=0.057)、晚期IIIb-IV(p=0.075)和微残留病(<10mm)/无疾病证据(p=0.066)(图4)。

[0347] 讨论

[0348] BRCA1/2-wt患者显示Vigil®相较安慰剂的显著RFS(从减积手术时间开始计算)优势(未达到vs.14.个月;HR=0.49,单侧p=0.038)以及治疗后的较低复发率(38%vs.71%,

$p=0.021$)。这些结果支持了在完全减积手术和辅助或新辅助化疗后,考虑将Vigil®作为BRCA1/2-wt卵巢癌患者中的维持。安全性分析证明Vigil®相较安慰剂没有毒性作用证据。

[0349] 越来越多的证据表明GMCSF参与通过树突细胞(DC)增强肿瘤抗原呈递。显示诱导了优于凋亡肿瘤细胞吞噬作用的DC亚组。其引发高水平的共刺激分子,这是更高功能成熟和更有效T细胞刺激的特征,从而扩宽诱导淋巴细胞效应机制的储库。GMCSF还通过树突细胞促进脂类抗原呈递,其进而激活自然杀伤T细胞(NKT细胞),这是在肿瘤内源性和治疗反应中可能关键的淋巴细胞群体。树突细胞引起抗原特异性免疫应答并表达不同受体,其允许在周边组织如真皮中识别和捕获抗原。它们将此物质有效加工入MHC I和II型呈递通路,在成熟后上调共刺激分子,迁移到次级淋巴组织,在该处其呈递抗原给T细胞。Vigil® GMCSF蛋白以1806/826pg/10e6细胞的稳健均值/中值上调。在91个制备患者中的84个(91%),这与GMCSF质粒转移完全相关。

[0350] 先前显示恶性卵巢组织中TGFβ的卵巢恶性细胞表达比非恶性卵巢组织高许多。在超过1500个OvC患者中实施的基因表达荟萃分析,基于数个基因表达鉴定了高和低风险组并通过IHC或qRT-PCR验证结果。基因标签的路径分析显示不良预后患者中的TGFβ信号传递富集。TGFβ信号通过结合丝氨酸/苏氨酸激酶受体TGFβRI和II来介导,其引起胞内效应物Smad2和Smad3的磷酸化及活化。Smad2/3与Smad4形成转录复合物,易位到分子,调节TGFβ相关基因的基因表达。TGFβ参与非浸润性浆液性卵巢肿瘤发展到浸润性浆液性卵巢癌。其能通过Smad依赖性和Smad非依赖性通路激活并认为促进卵巢癌中的肿瘤转移。在前列腺、结肠和肾细胞癌中还描述了TGFβ过表达以及与肿瘤细胞增殖和转移的相关性。

[0351] 来自卵巢癌细胞的分泌TGFβ在肿瘤微环境中产生免疫抑制Treg细胞(CD4+CD25+)扩增。这显示与高级别浆液性卵巢癌患者的预后不良相关,该患者用一线减积手术/化疗治疗。TGFβ抑制GMCSF诱导的骨髓来源树突状细胞(DC)成熟以及MHC II型和共刺激分子表达。TGFβ还抑制活化的巨噬细胞,包括其抗原呈递功能,以及卵巢癌和肿瘤相关髓细胞PD-L1配体表达,其也与卵巢癌总生存不佳进一步相关。有证据揭示,相关抗肿瘤免疫能修复涉及TGFβ的免疫监督。

[0352] TGFβ1还显示下调miR181/BRCA1轴,从而在携带野生型BRCA基因的乳腺癌中协调DNA修复缺陷和诱导“BRCAness”。术语“BRCAness”用于鉴定零星肿瘤,其临床病理和分子特征与BRCA1/2胚系突变相关的那些类似(DNA修复抑制)。另外,证明HRD低级别肿瘤中TGFβ信号传递升高能诱导NF-κB活化和引起淋巴细胞的抗肿瘤免疫应答。因此,看来除了BRCA分子信号,同源重组缺陷(HRD)评分也可能与预测结果和对TGFβ调节免疫疗法反应相关。

[0353] 此试验中BRCA-wt群体的RFS改善结果进一步支持了TGFβ抑制与免疫应答的关系,从而支持Vigil®在BRCA-wt患者中的应用以及其他组织学类型的其他癌亚群如前列腺癌、肾细胞癌和结直肠癌可能有高TGFβ表达。高水平的弗林蛋白酶mRNA和蛋白也广泛表达于卵巢癌及许多其他人肿瘤,其中基因在恶性(高)和非恶性(低)细胞群体之间差异性表达。作为TGFβ1、TGFβ2转化酶的弗林蛋白酶表达似乎与存活呈负相关且可能显著有助于维持肿瘤定向、TGFβ介导的外周免疫耐受。如此试验所证实,用bi-shRNAi法下调弗林蛋白酶可诱导明显TGFβ1表达减少。显然,相较于非转染的相同患者肿瘤细胞,构建的73% Vigl®疫苗具有≥90%的TGFβ1敲减。

[0354] BRCA-wt和HRD低级别卵巢癌也证明癌微环境中的肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)部分增加、高PD-L1表达、单核细胞中的高1型IFN γ 信号活性以及高穿孔素1表达,其一般表明免疫应答改善。然而,提高检查点抑制剂疗法的一线 and 复发/难治性卵巢反应的数次尝试失败了。如前所述,此假设也能涉及局部肿瘤微环境内的高TGF β 抑制效果。

[0355] 除了阻断催化作用,PARP抑制剂结合并捕获DNA上的PARP蛋白。这导致多个双链DNA断裂和最终的细胞死亡。Lynparza®(奥拉帕尼)是就高级别浆液性卵巢癌患者批准的首批PARP抑制剂之一,所述患者有胚系BRCA突变。之前的研究显示BRCA1/2-mu卵巢癌中的无进展生存增加(HR 0.3, $p < 0.0001$)。铂类敏感、复发卵巢癌患者中关于奥拉帕尼最近的长期跟踪(研究19)显示有利的OS结果,就所有招募的患者而言HR为0.73 ($p = 0.0138$),尽管活性似乎限于BRCA-mu群体HR 0.62 ($p = 0.02140$),与未显示BRCA-wt (82)中有益HR 0.84 ($p = 0.34$)的BRCA-wt群体相反。然而,一些有复发或难治性疾病、具有高同源重组缺陷(HRD)的BRCA-wt患者可受益于PARP抑制剂。近期报告显示一些HRD高级别肿瘤与更好响应尼拉帕利相关。此外,近期研究显示BRCA-wt和HRD-低级别肿瘤具有提高的免疫原性信号,包括TIL丰度增加,证明高IFN γ 1信号传递。这与RFS中用Vigil®益处观察到的一致,其在BRCA-wt群体中得到最显著证明。BRCA-wt卵巢癌中考虑用PARP抑制进一步临床测试Vigil®是合理的。

[0356] 贝伐单抗是一线治疗卵巢癌的所示维持疗法,尽管没有观察到证据显示无复发或总体生存优势,涉及单独贝伐单抗作为维持。血管内皮生长因子(VEGF)抑制剂(即贝伐单抗)靶向多形生长因子VEGF,VEGF不仅是肿瘤血管发生的关键调节因子,而且抑制免疫系统。肿瘤缺氧微环境刺激促血管新生因子VEGF-A(称为VEGF)分泌,其结合受体酪氨酸激酶(VEGFRs)-1(FLT1)和-2(FLK1/KDR)以及VEGFR共受体神经毡蛋白(NRPs)1和2。肿瘤微环境中的该促血管生成开关不仅有利于肿瘤血管生成、肿瘤成熟和转移性播散,而且产生免疫抑制作用如抑制树突细胞(DC)成熟、促进调节T细胞功能以及扩增肿瘤相关巨噬细胞发育、髓样抑制细胞积聚。CD8+T细胞上的PD-1表达也增加。卵巢癌中,VEGF-A和其受体VEGFR1、VEGFR2及NRP1共同上调。

[0357] 贝伐单抗在卵巢癌中的临床疗效仍具有挑战性,不仅涉及有限临床反应和中等毒性,而且在血管生成抑制开始后相对快速激活抗癌耐受性。然而,在抗血管生成抑制剂应用中探索的潜在方向是强化免疫治疗活性。有证据显示贝伐单抗与治疗疫苗的组合可诱导浸润性T淋巴细胞反应且会使免疫抑制平衡从T调节抑制移向CD8⁺T细胞活化,建立在免疫上更响应免疫疗法的T细胞发炎肿瘤微环境(“热肿瘤”)。

[0358] 在BRCA1/2-wt群体中证明优势的结果可能涉及克隆新抗原暴露,这在与修复缺陷增加的关系中相较BRCA1/2-m患者内的亚克隆新抗原暴露可稀释。BRCA-wt卵巢癌证明相较BRCA缺陷型卵巢癌,癌微环境中的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)部分增加、高PD-L1表达、单核细胞中的高1型IFN γ 信号活性以及高穿孔素1表达,这也与克隆新抗原部分更多一致。BRCA1-wt表达还显著影响自我吞噬以及与MHC表达肿瘤抗原的关联。如此,BRCA1-m破坏此过程,这可能限制新抗原可见性和Vigil®活性。

[0359] GM-CSF参与通过树突细胞(DC)增强肿瘤抗原呈递并引发更高水平的共刺激分子,这诱导更有效的T细胞刺激。GM-CSF还通过树突细胞促进脂类抗原呈递,其进而激活自然杀伤T细胞(NKT细胞)。

[0360] 另外,恶性卵巢组织中的TGF β 高于非恶性卵巢组织。在超过1500个卵巢癌患者中

实施的基因表达荟萃分析,基于数个基因表达鉴定高和低风险组并通过IHC或qRT-PCR验证结果。基因标签的路径分析显示不良预后患者中的TGFβ信号传递富集。TGFβ参与非浸润性浆液性卵巢肿瘤发展到浸润性浆液性卵巢癌。此外,TGFβ过表达与肿瘤细胞增殖和转移相关。

[0361] 来自卵巢癌细胞的分泌TGFβ在肿瘤微环境中产生免疫抑制调节T细胞(Treg)(CD4+CD25+)扩增。这显示与一线治疗的高级别浆液性卵巢癌患者中的预后不良相关。TGFβ抑制GM-CSF诱导的骨髓来源DC成熟以及MHC II型和共刺激分子表达。TGFβ还抑制活化的巨噬细胞,包括其抗原呈递功能,以及卵巢癌和肿瘤相关髓细胞PD-L1配体表达,其也与卵巢癌总生存不佳进一步相关。如此试验所证明,敲减TGFβ1可有助于抑制TGFβ效果,这可能在BRCA-wt患者中更相关。

[0362] 考虑到Vigil®耐受良好、施用简单且证明功效有前景,使得其成为卵巢癌患者的理想维持疗法。所示结果优点包括在BRCA-wt患者中从安全性和临床上验证RFS及OS优势。然而,BRCA-wt亚组是二级终点,自体肿瘤收获物用作产品制备组成部分对产品应用产生限制。用贝伐单抗和/或尼拉帕利组合进一步评估是合理的。

[0363] 总之,Vigil®在有BRCA1/2-wt分子谱的一线卵巢(III/IV期)癌患者中显示令人信服的RFS优势和作为单药剂维持疗法的低毒性作用。作为单药剂以及与血管生成抑制剂、PARP抑制剂和检查点抑制剂组合的研究同样合理。

[0364] 实施例2-阿特殊单抗与Vigil®顺序组合在复发卵巢癌中的原理循证研究

[0365] 尽管在许多癌症类型中有令人印象深刻的证据显示检查点抑制剂(CI)疗法的免疫调节优势,但在OC中几乎没有显示优势。针对此无效的理论点可能在于CI缺乏特异性以及OC中的显著异质性和遗传不稳定性。近期报告详细描述了卵巢癌(OC)细胞如何能获得潜在的逃逸机制以经数个免疫抑制因子逃避宿主免疫,包括减少MHC表达和上调免疫抑制因子,包括TGF-β(TGFβ)、吡啶胺2,3-双加氧酶(IDO)和环氧合酶(COX-1和COX-2)。

[0366] Vigil®是自体肿瘤细胞疫苗,其中肿瘤细胞在减积手术的时间收获自患者并经电穿孔转染,电穿孔所用质粒编码GM-CSF基因、免疫刺激细胞因子和特异性敲减弗林蛋白酶表达的双功能短发夹RNA(bi-shRNA),弗林蛋白酶是负责活化2个TGFβ亚型TGFβ-1和TGFβ-2(癌症免疫效应抑制因子)的关键转化酶。通过敲TGFβ表达,癌细胞逃避宿主免疫应答的能力下降。Vigil®是个性化“新抗原教育”免疫疗法,其在多至 2.5×10^7 细胞/注射的剂量下安全施用并在包括OC在内的癌症患者2期测试中显示有益证据。假设克隆肿瘤新抗原表达增加和TGFβ肿瘤抑制效果降低可协同提高检查点抑制剂治疗活性。此外,临床前证据支持了在周期1(C1)前预先施用新抗原教育疗法会提高C1的免疫治疗抗癌活性。研究Vigil®与阿特殊单抗一起或依序的第一临床组合,使用现有临床验证安全剂量水平的单一药剂,比较Vigil®第一(Vigil®-1st) vs.阿特殊单抗第一(Atezo-1st)以评价安全性和初步有益证据。

[0367] 方法

[0368] 试验设计和治疗

[0369] 此1期、2部分、开放性试验在全美国6个中心进行。部分1研究了Vigil®与阿特殊单抗组合的安全性。部分2是Vigil®第一vs.阿特殊单抗第一的随机研究,然后是Vigil®加阿特殊单抗的组合。进入Vigil®疫苗构建操作的患者符合此试验,操作涉及卵巢癌。收集组织

和外周血单核细胞样品并分析BRCA1/2分子谱,使用40的访问质量和最低5的等位基因深度(Ocean Ridge Biosciences,佛罗里达州迪尔菲尔德比奇)。患者每3周一次接受Vigil®(1x10e6-10e7细胞/皮内剂量)和阿特珠单抗(1200mg/静脉输注剂量),持续12剂。在获取前和主要研究登记/随机化前获得知情同意书。在患者能于任何位置注册前,需要完全IRB批准操作和同意文件的书面文档。

[0370] 患者

[0371] 有复发OC、医疗条件稳定且在复发背景或铂类耐药疾病中有至少一个前线系统治疗失败的女性,符合所述试验。对象需要有至少4小瓶制成的Vigil®、ECOG表现状态(PS) ≤ 1,根据方案,要求和限定正常器官和骨髓功能(嗜中性细胞绝对计数-≥1,500/mm³;血小板-≥100,000/mm³;血红蛋白-≥5.59mmol/L;血清胆红素-≤1.5x机构正常值上限;AST/ALT-≤2.5x机构正常值下限;肌酸酐->50mL/min;机构界限内的TSH)。排除有先前免疫疗法和活性免疫疾病的患者。

[0372] 肿瘤获取和制备

[0373] Gradalis公司(得克萨斯州卡罗尔顿)从收获的肿瘤组织制备Vigil®。制备是2天过程。疫苗生产需要“高尔夫球尺寸”的块(10-30g组织,累计)的等价物(通过放射学扫描为3cm)。由于细菌污染风险,排除延伸至肠腔的损伤。

[0374] 研究产品和安慰剂制备

[0375] 在减积手术过程中获得手术切除的肿瘤组织并切成1/4-1/2英寸的段,然后置于多达4个样本容器内,该容器含有无菌0.9%氯化钠(巴克斯特),补充有庆大霉素(费森尤斯卡比)并以湿冰包装从而过夜转运至制备设施。在第1天,测试各容器内运输介质和肿瘤样本的无菌性(BacT/Alert 3D微生物鉴定系统,生物梅里埃)。肿瘤组织通过手术刀修整以去除脂肪、结缔/坏死组织、缝合线/钉书针和机械分离,然后是酶解分离(I型胶原酶溶液)并37℃孵育多至45分钟以形成单细胞悬液。细胞悬液在无菌100um过滤器(康宁(Corning))中过滤以分离细胞与碎片,释放的细胞用补充有1%人血清白蛋白(HSA)(奥克特珐玛)的PlasmaLyte(巴克斯特)洗涤,经血球计(InCyto)手工计数。移出质量控制(QC)样品以保留、免疫监测和预转染培养,其开始用于通过GMCSF(安迪生物(R&D Systems))和TGFβ1(安迪生物)的ELISA以获得基线细胞因子水平。细胞悬液调至4千万细胞/mL浓度,用Gene Pulser XL(伯乐)电穿孔以插入质粒DNA到细胞。转染细胞以1x10e6细胞/mL接种于无菌T-225cm²烧瓶(康宁)的X-VIVO 10培养基(龙沙(Lonza)),所述培养基补充有庆大霉素(费森尤斯卡比),37℃,5%CO₂覆盖(三洋)下孵育过夜(14-22小时),以纳入bi-shRNA弗林蛋白酶和GMCSF mRNA到肿瘤细胞内。

[0376] 在第2天,收获过夜培养物,这是通过从各烧瓶刮细胞、收集含自由浮动细胞的培养基并重悬于新鲜X-VIVO培养基。细胞手动计数以确定最少8000万细胞可用于QC样品和推进前最小4剂。取2个含有细胞的1-mL支原体样品,-80℃冷冻。细胞用伽马射线辐照器辐射4x25Gy周期以阻滞复制/生长。细胞用补充有1%人血清白蛋白(HSA)(奥克特珐玛)的PlasmaLyte(巴克斯特)洗涤,移出QC样品以保留、免疫监测和转染后培养,其开始用于通过ELISA(或用于一个患者的ELLA机器)获得GMCSF和TGFβ1的转染细胞因子水平。细胞置于冷冻介质,该介质由含10%DMSO(二甲亚砷;Cryoserv USP;迈兰公司)、1%人血清白蛋白(奥克特珐玛)的Plasma-Lyte A,pH 7.4(巴克斯特)组成,以1x10e6细胞/mL或1x10e7细胞/mL

无菌等分入无菌2.0mL硼硅玻璃小瓶(加铝惠顿医药包装公司);用包被有Flurotec® barrier file(西氏医药服务公司)的丁基橡胶塞密闭,终填充体积是1.2mL。终产物小瓶用CoolCell®冷冻容器(Biocision)按控制速度冷冻,置于-80℃冰箱(三洋)。冷冻后,细胞保存于液氮罐的汽相,直至释放测试。冷冻产品瓶用于通过凝胶法检查无菌性(USP<71>)和细菌内毒素(鲎变形细胞溶解物,龙沙)。

[0377] 阿特殊单抗由罗氏(Roche)/基因泰克(Genentech)提供,由Gradalis公司分销。阿特殊单抗配制为60mg/mL阿特殊单抗,溶于20mM组氨酸醋酸盐、120mM蔗糖、0.04%聚山梨醇酯20,pH 5.8(III期制剂)。阿特殊单抗无防腐剂且仅提供用于一次性使用。制剂F03中的阿特殊单抗(每小瓶1200mg)在250mL 0.9%NaCl IV输液袋中施用,在无菌条件下制备和稀释。

[0378] 疾病评估

[0379] 对象维持治疗,直至疾病发展或死亡或产生毒性作用。疾病发展通过当地调查人员在放射学上确定,使用实体瘤疗效评价标准1.1版(RECIST 1.1)。在部分1中,疾病发展在基线和之后每三个周期评估。在部分2中,在基线、单一药剂疗法周期2结束时和之后每三个周期评估疾病。

[0380] 终点和统计评估

[0381] 初步分析的数据截止日期是随意的,在2019年12月20日。初级终点是安全性。功效评估和终点包括Vigil®-1st组与Atezo-1st组之间的无进展生存(PFS)和总体生存(OS)。发展的时间从随机化时间开始计算,直至有记载发展或死亡的第一天。PFS和OS在BRCA1/2-wt亚组中依序分析并在Vigil®-1st与Atezo-1st之间作比较。中值随访时间从数据截止日期开始计算,减去治疗开始时间。0.05或更小的单侧p值(对数秩)被认为指示分析中的统计显著性。PFS和OS的危害比(HR)通过Mantel-Haenszel危害模型估计。PFS和OS的分布用Kaplan-Meier预估。毒性用NCI CTCAE v 4.03评价。

[0382] 结果

[0383] 患者

[0384] 从2017年6月2日到2019年2月13日,3名患者进入研究的部分1且21名随机化到研究的部分2(n=11 Vigil®-1st:n=10Atezo-1st)。所有患者在至少一个先前系统治疗上失败(Part1Vigil®1st/Atezo-1st:0/5/2接受一个方案,1/4/3接受两个方案,1/2/4接受三个方案和1/0/1接受四个方案),个体(仅部分2)和所有患者概括的人口统计资料如表5所示。就所有24名患者确定胚系和体细胞BRCA(g/sBRCA)状态。部分1的中值随访时间是29.3个月,部分2的是21.3个月。

[0385] 表5-患者的人口统计资料

研究部分	部分 1	部分 2		部分 2	
	ITT	ITT		BRCA ^{wt}	
特征					
治疗臂	Vigil® + Atezo	Atezo-1 st	Vigil®-1 st	Atezo-1 st	Vigil®-1 st
患者	3	10	11	7	6

[0387]

年龄-岁					
中值	61	59.5	67	63	65
均值	65	59.7	63.9	62.3	63.5
范围	59-75	44-77	50-75	50-77	50-75
人种— 数量 (%)					
白人	3 (100)	8 (80.0)	9 (81.8)	5 (71.4)	6 (100)
亚裔	0 (0)	1 (10.0)	0 (0)	1 (14.3)	0 (0)
黑人或非裔美国人	0 (0)	1 (10.0)	2 (18.2)	1 (14.3)	0 (0)
分期— 数量(%) †					
III	1 (33.3)	9 (90.0)	8 (72.7)	6 (85.7)	4 (66.7)
IV	2 (66.7)	1 (10.0)	3 (27.3)	1 (14.3)	2 (33.3)
ECOG-表现状态-评分— 数量(%) ‡					
0	2 (66.7)	2 (20.0)	7 (63.6)	0 (0)	5 (83.3)
1	1 (33.3)	8 (80.0)	4 (36.4)	7 (100)	1 (16.7)
前线数 — 数量(%)					
中值	3	2.5	2	3	2
均值	3	2.4	1.73	2.6	2
范围	2-4	1-4	1-3	1-4	1-3
收到一线化疗— 数量(%)					
新辅助	2 (66.7)	4 (40.0)	3 (27.3)	4 (57.1)	2 (33.3)
辅助	1 (33.3)	6 (60.0)	8 (72.7)	3 (42.9)	4 (66.7)
BRCA 状态— 数量 (%) §					
BRCA ^{wt}	3 (100)	7 (70.0)	6 (54.5)	7 (100)	6 (100)
g/sBRCA ^{mut}	0 (0)	3 (30.0)	5 (45.5)	0 (0)	0 (0)
疫苗剂量(细胞/剂)					
1x10e6	0	0	1	0	1 (16.7)
1x10e7	3	10	10	7	5 (83.3)

[0388] *由于四舍五入,百分数加起来可能不到100.

[0389] †分期基于国际妇产科联盟 (FIGO) 指南.

[0390] ‡东部肿瘤协作组 (ECOG) 表现状态评分以5分量表评估,评分越高,指示身体障碍越高.

[0391] §有害BRCA突变概括胚系(血液)BRCA1和BRCA2突变及体细胞突变.

[0392] 安全性

[0393] 在部分1中没有观察到3或4级治疗相关毒性。因此,自然增长向部分2开放。在Atezo-1st组中有30个治疗相关不良事件,Vigil®-1st组中有83个事件。30个Atezo-1st事件中的25个是1,2级,大部分归因于阿特珠单抗治疗(24/25)。Vigil®-1st治疗组内,83个事件中的81个(97.6%)是1,2级事件,61.7% (50/81) 归因于阿特珠单抗治疗且38.3% (31/81) 涉及Vigil®治疗。

[0394] 图8显示Vigil®-1st与Atezo-1st组之间所有和3,4级阿特珠单抗相关事件的比较。Atezo-1st臂中的3,4级治疗相关事件vs. Vigil®-1st (5.1%) 更高(17.2%)。Atezo-1st组中的3级阿特珠单抗相关事件包括血液和淋巴紊乱(6.9%)、一般紊乱(3.5%)、损伤(3.5%)、呼吸、胸、纵隔疾病(3.5%)。在Atezo-1st组中没有观察到Vigil®相关3级事件。

Vigil®-1st组中,2个3级事件是泌尿功能障碍(1个涉及阿特珠单抗且1个涉及**Vigil®**)。此外,相较于**Vigil®-1st**组(61.3%),**Atezo-1st**组(96.7%)的阿特珠单抗相关不良事件(任何级别)高许多。

[0395] 产品释放结果

[0396] 来自20个对象的**Vigil®**疫苗(83.3%)符合所有产品释放标准。收获的平均肿瘤质量是51.65g(范围11.52g-114.23g)。4个对象(16.7%)未显示质粒转移后的GMCSF表达增加足够,但在研究中有例外(n=1部分1,n=3部分2)。表6显示关键产品释放结果。显著TGFβ1敲减在23/24(95.8%)患者中可检测。15(62.5%)患者有≥90%TGFβ1敲减,证明涉及弗林蛋白酶的活性稳健。以可检测水平质粒转染所有患者前的基线TGFβ1生成揭示,中值TGFβ1表达为158pg/10e6细胞(平均206,范围93-445)。BRCA1/2-wt TGFβ1表达(n=13部分2)显示**Atezo-1st**和**Vigil®-1st**组的中值为139pg/10e6细胞(平均188,范围93-361),BRCA1/2-m TGFβ1表达(n=8部分2)显示中值223pg/10e6细胞(平均215,范围111-307)。

[0397] 表6-产品释放总结

研究臂	部分 1 (N=3)			
	TGFβ1 敲减(%)	GMCSF 产生 (pg/10e6 细胞)	生存力 (%)	凝胶内毒素(疫苗 <EU/mL)
计数*	3	2^	3	3
均值	84%	479	91%	0.29
标准偏差	11%	291	1%	0.08
中值	79%	479	91%	0.24
最小	74%	188	90%	0.24
最大	100%	769	93%	0.40
范围	74% - 100%	188 - 769	90% - 93%	0.24 - 0.4
研究臂	部分 2 (N=21)			
	TGFβ1 敲减(%)	GMCSF 生成 (pg/10e6 cells)	生存力 (%)	凝胶内毒素 (疫苗 <EU/mL)
计数*	20°	18^	21	21
均值	94%	1382	86%	0.34
标准偏差	8%	1480	6%	0.10
中值	100%	550	87%	0.40
最小	74%	114	72%	0.20
最大	100%	4593	96%	0.50
范围	74% - 100%	114 - 4593	72% - 96%	0.2 - 0.5

[0399] 细胞剂量1x10e6或1x10e7;USP<71>对于所有患者无菌性阴性;对于所有患者支原体DNA阴性

[0400] *计数代表符合产品释放标准规范的患者数。TGFβ1 (%KD) Spec: ≥30%;GMCSF生成 (pg/10⁶cells) Spec: ≥30;生存力Spec: ≥70%。

[0401] °1名患者不符合TGFβ1释放

[0402] ^4名患者不符合GMCSF释放

[0403] 功效

[0404] 中值OS在**Vigil®-1st**组内未达到,**Atezo-1st**组的为10.8个月(HR 0.33;95%置信区

间(CI) [0.064-1.7]; $p=0.097$) (图9A)。就部分2而言,随访的中值持续时间是21.3个月。通过BRCA状态的亚组分析证明 **Vigil®-1st** 中BRCA1/2-wt患者的卵巢癌相较Atezo-1st改善(HR 0.16, 95%CI [0.026-1.03]; $p=0.027$, 图9B)。在**Vigil®-1st**与Atezo-1st组之间,BRCA-m组中没有OS益处。在PFS中没有观察到显著益处(图9C-9D)。

[0405] 讨论

[0406] 尽管大部分卵巢癌患者用初次手术和联合化疗实现了临床完全缓解,绝大多数(75%)的这些患者在16-24个月内不幸复发且最终受制于疾病。治疗这些复发患者很大程度上是基于无复发间隔。在完成基于铂的化疗后6个月或更长时间复发的女性在传统上视作铂类敏感,通常用铂类双重物再治疗且常用贝伐单抗或PARP抑制剂维持治疗。在完成基于铂的疗法后6个月复发的患者(铂耐受)通常用非基于铂的疗法管理,有或没有贝伐单抗。PARP抑制剂显示在初始化疗后和铂敏感复发OC疗法后,在无进展生存(PFS)作为维持疗法方面的改善。发现贝伐单抗在联合初始化疗或复发后的化疗时改善PFS,且常用于复发OC的组合方案。

[0407] 结果证明在复发卵巢癌中**Vigil®**和阿特珠单抗测试的组合是合理的,表明**Vigil®**/阿特珠单抗联合疗法前的依序**Vigil®**,相比Atezo-1st有临床优势。鼓励临床益处的更有利毒性进展研究指示有**Vigil®-1st**递送的优良治疗指数,尤其是BRCA野生型患者。这尤其鼓舞人心,因为涉及卵巢癌的单药剂检查点抑制剂疗法益处有限。

[0408] 卵巢癌组织中TGFβ表达相较许多其他癌增加,特别是涉及复发疾病以及经弗林蛋白酶抑制作用于敲减TGFβ1和TGFβ2的直接**Vigil®**活性,**Vigil®**可直接针对卵巢癌中的抗性机制,其经TGFβ1表达调节。基于这些结果,**Vigil®**可以是改善新抗原暴露和T细胞激活的可行机制,从而使检查点抑制剂疗法的优化功能可行,尽管有TGFβ表达。来自卵巢癌细胞的分泌TGFβ从肿瘤微环境内的外周CD4+CD25-细胞产生免疫抑制Treg细胞(CD4+CD25+)。Treg肿瘤浸润与高级别浆液性卵巢癌患者的预后不良相关,该患者用新辅助化疗治疗。因此,CD8/Treg比例也是预后指标。在此研究开始时假设**Vigil®**+阿特珠单抗组合前的**Vigil®-1st**治疗会聚焦检查点功能活性前相关肿瘤新抗原的免疫效应细胞可视化,从而限制靶毒性和潜在最大化免疫效应分子可用性反应。这些观察到的结果支持该假设和其他人在临床前模型中的工作,包括选择性TGFβ敲减在克服检查点阻断抗性中的证据。

[0409] 为增加有效抗肿瘤免疫应答,需要引导T细胞成为肿瘤的新抗原库。T细胞进一步分化成记忆T细胞,因而提供长期免疫记忆和可能的持久疾病控制。据报道新抗原异质性低的肿瘤可更好响应用派姆单抗的检查点抑制。相同的报道也显示T细胞无法识别亚克隆新抗原,表明识别可见的新抗原丰度重要且可稀释克隆新抗原的可见性。与同种异体肿瘤组织相反,当使用自体肿瘤组织(个体化)时,T细胞识别同一患者疾病的肿瘤特异性克隆新抗原是更有可能的。

[0410] 在临床试验中施用超过1,400剂**Vigil®**。更频繁报告的**Vigil®**工程细胞施用所导致不良反应是注射位点反应,其强度是温和到中等,主要由注射位点的红肿组成,这被认为与注射位点的免疫活化相关。没有**Vigil®**治疗导致的严重或威胁生命(CTC 3或4级)的不良事件。用**Vigil®**与阿特珠单抗组合没有观察到新的或意想不到的毒性作用。

[0411] 总之,个性化自身卵巢癌疫苗组合和之后的检查点抑制剂(阿特珠单抗)显示令人

鼓舞的功效,而毒性低。

[0412] 实施例3-用 **Vigil®**的BRCA1/2野生型一线III/IV期卵巢癌无复发生存优势

[0413] 鉴于晚期卵巢癌的一线治疗选择限制,尤其是高TGFβ表达卵巢癌和涉及BRCA1/2-wt群体(85%卵巢癌患者),实施**Vigil®**的双盲、安慰剂对照研究,在III/IV期卵巢癌患者中作为减积手术和紫杉醇及卡铂组合后的一线维持疗法。

[0414] 1. 材料与方法

[0415] 试验设计和治疗

[0416] 此IIb期、双盲试验在25个位置进行。这是IIIa-c或IV期高级别浆液性、透明细胞或子宫内膜卵巢癌患者中**Vigil®**的安慰剂对照试验,所述患者在手术和涉及卡铂和紫杉醇的巩固性化疗(5-8个周期)后临床完全缓解(cCR),如分为水平1类别,NCCN指南(3.2015版)。肿瘤组织在减积手术时间收获。组织用于疫苗构建和通过当地病理科在组织学上证实疾病。可用时,收集胚系和/或体细胞BRCA1/2分子谱。分析外周血单核细胞样品以胚系测试BRCA1/2,分子谱(Ocean Ridge Biosciences,佛罗里达州迪尔菲尔德比奇)。初次减积手术和铂/紫杉烷辅助化疗后实现cCR的患者1:1随机分到**Vigil®**(**Vigil®**组,VG)或安慰剂(对照组,CG)组。随机化如下分层:i)细胞减积手术程度(完整/微观NED vs.宏观残留病)和ii)新辅助vs.辅助化疗。患者每月一次接受 1×10^7 细胞/皮内注射**Vigil®**或安慰剂(最后一次化疗后8周内),持续多至12剂。持续治疗,直至疾病复发或者患者疫苗或安慰剂供给耗尽。用CTCAE v 4.03评估毒性。药物安全监测委员会在研究开始前到位以维持所有研究患者的安全性。确定没有不可接受的毒性作用。在获取前获得知情同意书。在患者能于任何位点注册前,需要完全IRB批准操作和同意文件的书面文档。

[0417] 患者

[0418] 试验纳入在组织学上证实IIIa-c或IV期高级别乳突性浆液性、透明细胞或子宫内膜卵巢癌的女性。在随机化时间需要cCR,cCR定义为在完成减积手术和化疗后,胸透(CT扫描可接受)、CT扫描或腹部和骨盆的MRI没有恶性肿瘤证据、CA-125抗原水平 ≤ 35 单位/ml,且体检或症状上没有发现提示活性癌。可接受化疗方案包括5-8个周期的标准铂/紫杉烷,分成新辅助和辅助疗法。对象必须在初次减积手术后不超过8周内开始辅助化疗。需要ECOG表现状态(PS)0-1以及正常器官和骨髓功能和按方案定义(嗜中性细胞绝对计数 $\geq 1,500/\text{mm}^3$;淋巴细胞绝对数 $\geq 500/\text{mm}^3$;血小板 $\geq 75,000/\text{mm}^3$;总胆红素 $\leq 2\text{mg/dL}$;AST(SGOT)/ALT(SGPT) $\leq 2 \times$ 机构正常值上限;肌酸酐 $< 1.5\text{mg/dL}$)。所有患者需要具有理解能力且愿意签署书面特定知情同意书。

[0419] 肿瘤获取和制备

[0420] Gradalis公司从收获的肿瘤组织制备**Vigil®**。等剂量安慰剂(冷冻介质)基于**Vigil®**瓶数生产。生产是2天过程。疫苗生产需要“高尔夫球尺寸”质量(10-30g组织,积累的等价物(通过放射学扫描为3cm)。由于细菌污染风险,排除延伸至肠腔的病变。

[0421] 研究产品和安慰剂制备

[0422] 在减积手术过程中获得手术切除的肿瘤组织(均值=55g)并切成1/4英寸的段,然后置于多达4个样本容器内,该容器含有无菌0.9%氯化钠(巴克斯特),补充有庆大霉素(费森尤斯卡比)并以湿冰包装从而过夜转运至制备设施。在第1天,测试各容器内运输介质和

肿瘤样本的无菌性 (BacT/Alert 3D微生物鉴定系统, 生物梅里埃)。肿瘤组织通过手术刀修整以移出脂肪、结缔/坏死组织、缝合线/钉书针和机械分离, 然后是酶解分离 (I型胶原酶溶液) 并37℃孵育多至45分钟以形成单细胞悬液。细胞悬液在无菌100um过滤器 (康宁) 中过滤以分离细胞与碎片, 释放的细胞用补充有1%人血清白蛋白 (HSA) (奥克特珐玛) 的PlasmaLyte (巴克斯特) 洗涤, 用一次性血球计 (InCyto) 手工计数。移出质量控制 (QC) 样品以保留、免疫监测和预转染培养, 其开始用于通过GMCSF (安迪生物)、TGFβ1 (安迪生物) 和TGFβ2 (安迪生物) 的ELISA以获得基线细胞因子水平。细胞悬液调至4千万细胞/mL浓度, 用Gene Pulser XL (伯乐) 电穿孔以插入质粒DNA到细胞。转染细胞以1x10⁶细胞/mL接种于无菌T-225cm²烧瓶 (康宁) 的X-VIVO 10培养基 (龙沙), 所述培养基补充有庆大霉素 (费森尤斯卡比), 37℃, 5%CO₂覆盖 (三洋) 下孵育过夜 (14-22小时), 以纳入bi-shRNA弗林蛋白酶和GMCSF mRNA到肿瘤细胞内。

[0423] 在第2天, 收获过夜培养物, 这是通过从各烧瓶刮细胞、收集含自由浮动细胞的培养基并重悬于新鲜X-VIVO培养基。细胞手动计数以确定最少8000万细胞可用于QC样品和推进前最小4剂。取2个含有细胞的1mL支原体样品, -80℃冷冻。细胞用RS-3400X射线 (RadSource) 辐射4x25Gy周期以阻滞复制/生长。细胞用补充有1%人血清白蛋白 (HSA) (奥克特珐玛) 的PlasmaLyte (巴克斯特) 洗涤, 移出QC样品以保留、免疫监测和转染后培养, 其开始用于获得GMCSF、TGFβ1和TGFβ2的转染细胞因子水平。细胞置于冷冻介质, 该介质由含10%DMSO (二甲亚砜; Cryoserv USP; 迈兰公司)、1%人血清白蛋白 (奥克特珐玛) 的Plasma-Lyte A, pH 7.4 (巴克斯特) 组成, 以1x10⁷细胞/mL无菌等分入无菌2.0mL硼硅玻璃小瓶 (加铝惠顿医药包装公司); 用包被有Flurotec® barrier file (西氏医药服务公司) 的丁基橡胶塞密闭, 终填充体积是1.2mL。终产物小瓶用CoolCell®冷冻容器 (Biocision) 按控制速度冷冻, 置于-80℃冰箱 (三洋)。冷冻后, 细胞保存于液氮罐的汽相, 直至释放测试。冷冻产品瓶用于通过凝胶法检查无菌性 (USP<71>) 和细菌内毒素 (鲎试验, 龙沙)。在研究后完成 (GMCSF, TGFβ1, TGFβ2) 的试验验证, 用合适验证参数计算所示数据。

[0424] 安慰剂由冷冻介质构成, 该介质由含10%DMSO (二甲亚砜; Cryoserv USP; 迈兰公司)、1%人血清白蛋白 (奥克特珐玛) 的Plasma-Lyte A, pH 7.4 (巴克斯特) 组成。缓慢冷冻介质到-80℃后, 小瓶保存于液氮罐的汽相, 直至无菌性和仅内毒素释放测试。安慰剂小瓶生产与就对象制备的可用产物剂量匹配。研究药物 (Vigil®或安慰剂) 通过便携式液氮容器每月分发到位点。取出产品后, 指示位点药房工作人员将捆带附于注射器筒上以维持Vigil®与安慰剂之间盲目、隐藏任何潜在的视觉差异。

[0425] 疾病评估

[0426] 对象维持治疗, 直至疾病复发或者对象 Vigil®或安慰剂供给耗尽。疾病复发通过World Care Clinical (马萨诸塞州波士顿) 评估, 使用实体瘤疗效评价标准1.1版 (RECIST1.1)。必要时, 2个评论者被分到裁定分配的各病例。数据转发到第三方统计员以分析。在QA部门与统计学家之间讨论治疗组分配, 其他部门保持盲。疾病复发定义符合RECIST 1.1, 如2个连续检测中出现任何可测量或可评估损伤或者无症状CA-125水平>35U/ml在, 间隔至少1个月。

[0427] 终点和统计评估

[0428] 初级终点是 Vigil®组相较安慰剂组的无复发生存 (RFS)。肿瘤评估通过World

Care Clinical (马萨诸塞州波士顿) 根据RECIST 1.1在随机化时间(基线)、以操作定义间隔评估,直至疾病复发或死亡。复发时间从1) 随机化日期和2) 减积手术/获取时间开始计算,直至有记载复发或死亡的第一天。RFS在BRCA1/2-wt亚组中依序分析并在Vigil®-1st与安慰剂之间作比较。接受至少一剂Vigil®或安慰剂的所有患者纳入安全性分析。0.05或更低的单侧p值被视作指示分析的统计学显著性。无复发生存的危害比经考克斯比例风险模型估计,没有协变量。RFS分布用Kaplan-Meier法预估。拟合度检验的卡方优度用于评估安慰剂组中复发的患者数是否不同于Vigil®组中复发的患者数。评估BRCA-wt亚组中的患者,确定安慰剂组中复发的患者数相较Vigil®组中复发的患者数是否有显著差异。

[0429] 2. 结果

[0430] 患者

[0431] 从2015年2月到2017年3月,310名卵巢癌患者在22个位点签署同意书,收获组织用于生产Vigil®。由于病理或筛选失败参数(即分期),128名患者被认为不合格。在完整经历生产的剩余181人中,92个对象(56%)成功制成并随机化,17个选择了其他治疗方案,72个不符合产品释放标准(有65人细胞不足)。1名患者出于个人身体健康原因在治疗前、随机化后退出。此患者未纳入分析。分析91个对象的安全性和反应,46名患者随机化到Vigil®且45名患者随机化到安慰剂。通过2019年8月的独立第三方放射学评估(WCC)观察到55个复发事件。人口统计资料如表7所示。在组之间没有检测到显著差异,除了21/46,45.7% Vigil®患者相较于安慰剂(9/45,20.0%; $p=0.0093$)具有较低表现(ECOG 1)。

[0432] 表7-可评估患者的人口统计资料

[0433]

特征	治疗组, 数量 (%)	
	Vigil®	安慰剂
患者数	46	45
年龄, 岁		
中值	62.5	63.0
范围	42 - 84	38 - 79
人种		
亚裔	0 (0%)	2 (4.4%)
黑人或非裔美国人	1 (2.2%)	4 (8.9%)
白人	45 (97.8%)	38 (84.4%)
未报告	0 (0%)	1 (2.2%)
种族		
西班牙裔或拉丁裔	1 (2.2%)	0 (0%)
非西班牙裔或拉丁裔	45 (97.8%)	44 (97.8%)
未报告	0 (0%)	1 (2.2%)
ECOG		
0	25 (54.3%)	36 (80.0%)
1	21 (45.7%)	9 (20.0%)
分期		
III	1 (2.2%)	0
IIIA1	0 (0%)	3 (6.7%)
IIIB	5 (10.9%)	5 (11.1%)
IIIC	31 (67.4%)	32 (71.1%)
IV	9 (19.6%)	5 (11.1%)
化疗		
新辅助	8	7
辅助	38	38
手术后残留病		
宏观	15 (32.6%)	12 (26.7%)
微观/NED	31 (67.4%)	33 (73.3%)
组织学		
子宫内膜癌	1 (2.2%)	0 (0%)
混合浆液/透明细胞	0 (0%)	1 (2.2%)
高级别浆液性癌	45 (97.8%)	44 (97.8%)
<i>BRCAl/2</i>		
突变(阳性)	4	10
野生型(阴性)	24	24
缺失	18	11
随机化前的 CA-125		
≤ 35	46 (100%)	44 (97.8%)
> 35	0 (0)	1 (2.2%)
从最后施用化疗到第一剂 Vigil® / 安慰剂的时间		
均值	50.2	46.8
中值(范围)	49 (29-107)	48 (16-102)
实体瘤重量(g)		
均值(SD)	54 (28)	56 (30)
中值(范围)	51.8 (9.6-136.5)	51.6 (7.8-137.5)

[0434]

特征	治疗组, 数量 (%)	
	Vigil®	安慰剂
每克肿瘤组织收获的细胞(x10e6)		
均值(SD)	6 (4)	7 (7)
中值(范围)	4.8 (0.7-17.0)	4.7 (1.6-33.6)

[0435] 安全性

[0436] 每患者平均施用6次 Vigil® (范围1-12) 或6次安慰剂 (范围3-12) 注射。没有报告由治疗相关毒性作用引起的治疗延迟或退出。Vigil®臂中的1名患者经历3级药物相关毒性作用(恶心呕吐), 安慰剂臂中的2名患者经历3级相关毒性(一人骨痛、全身性肌无力, 另一人是呼吸困难、晕厥和关节痛)。在安慰剂臂vs. Vigil® (18%vs.8%) 中观察到更多2,3级不良事件。7名(4个安慰剂,3个 Vigil®) 患者报告了14个严重不良事件(SAE)。在2名患者中,SAE可能相关(1个安慰剂/1个Vigil®)。另外,SAE事件不太可能与研究治疗相关或不相关。

[0437] 产品释放结果

[0438] 84个(92%) 对象符合所有产品释放标准。收获的平均肿瘤质量是52克(范围8-137gm)。91个中的7个(8%) 未显示质粒转移后的GMCSF表达增加足够。然而,这7个患者的6个(七分之六) 显示有稳健的TGFβ1敲减。表8显示额外产品释放结果。7个患者的TGFβ1敲减结果未确定(6个有适当GMCSF表达释放), 然而,66名(73%) 患者有≥90%TGFβ1敲减, 证明涉及弗林蛋白酶bi-shRNAi敲减的活性稳健。所有患者中以可检测水平质粒转染前的基线TGFβ1生成揭示,中值TGFβ1表达为166pg/10e6细胞(平均241, 范围52-882)。

[0439] BRCA1/2-wt TGFβ1表达显示2个组的中值为212(平均255, 范围71-662) pg/10e6细胞, BRCA1/2-mu TGFβ1表达显示中值122(平均231, 范围52-882) pg/10e6细胞(表9)。

[0440] 表8-数值释放概括

	生存力(%)	GMCSF 生成 (pg/10 ⁶ cells)	TGF-β1 敲减(%)	Gel-clot Endotoxin (Vaccine <EU/mL)
计数	91	91	84	91
均值	86%	1806	96%	0.4
标准偏差	5%	2433	8%	0.4
中值	86%	826	100%	0.4
最小	72%	-1339	66%	0.2
最大	98%	10151	100%	3.2
范围	0	11491	34%	3.0

就所有患者而言细胞剂量 1x10⁷; USP<71> 无菌性阴性的所有患者; 支原体 DNA 阴性的所有患者

[0442] 表9-BRCA 1/2突变状态与TGFβ1的关联性

	Vigil®			安慰剂			总体		
	1/2 wt	1/2 mut	所有	1/2 wt	1/2 mut	所有	1/2 wt	1/2 mut	所有
对象	24	4	46	24	10	45	48	14	91
TGFβ1 Pre									
计数	24	4	43	22	9	41	46	13	84
均值(pg/10 ⁶)	263	131	224	247	275	259	255	231	241
SD (pg/10 ⁶)	161	98	148	150	267	175	154	234	162

	Vigil®			安慰剂			总体		
	1/2 wt	1/2 mut	所有	1/2 wt	1/2 mut	所有	1/2 wt	1/2 mut	所有
中值(pg/10 ⁶)	262	93	164	166	146	168	212	122	166
最小(pg/10 ⁶)	71	65	60	86	52	52	71	52	52
最大(pg/10 ⁶)	662	273	662	561	882	882	662	882	882

[0445] 功效

[0446] 91个可评估患者外,有62个患者在局部位点分析中有BRCA1/2分子谱。BRCA1/2-wt

患者亚组显示Vigil®组相较安慰剂组的RFS益处。结果如图10A-10B所示。在Vigil®组的BRCA-wt卵巢癌患者中未达到从手术/获取时间开始计算的中值RFS,相比之下安慰剂组为14.8个月(HR=0.49,90%CI,0.25-0.97,单侧p=0.038)。类似地,当RFS从随机化时间开始计算时,BRCA-wt亚组的中值RFS在Vigil®中是19.4个月,而安慰剂臂中是8.0个月(HR=0.51,90%CI,0.26-1.01,单侧p=0.050)。

[0447] 38%的Vigil®治疗BRCA1/2-wt患者证实疾病复发,相比之下安慰剂BRCA1/2-wt患者为71%(卡方检验 $\chi^2=0.021$) (图11A)。62%的Vigil®BRCA-wt患者迄今为止继续无复发(10/31/2019)。

[0448] 图10C-10D显示从减积手术时间和随机化时间开始计算的RFS,而无论BRCA1/2状态如何。Vigil®组中从随机化时间开始计算的中值RFS是13.67个月(416天),相比之下安慰剂为8.38个月(255天)(HR=0.69,单侧对数秩p=-.054)。从减积手术时间开始计算的RFS有改善,HR为0.64(单侧p=0.054)。48%的Vigil®治疗患者中报告了复发,相比之下安慰剂为73%(卡方p=0.013)(图11B)。与Vigil®反应趋势优势相关的其他因素是低龄 ≤ 65 (p 0.057)、晚期IIIb-IV(p 0.075)和微残留病($<10\text{mm}$)/无疾病证据(p=0.066)(图12)。

[0449] 3. 讨论

[0450] BRCA1/2-wt患者显示Vigil®相较安慰剂的显著RFS(从减积手术时间开始计算)优势(未达到vs.14.个月;HR=0.49,单侧p=0.038)以及治疗后的较低复发率(38%vs.71%,p=0.021)。这些结果支持了在完全减积手术和辅助或新辅助化疗后,将Vigil®视作BRCA1/2-wt卵巢癌患者中的维持。安全性分析证明Vigil®相较安慰剂没有毒性作用证据。

[0451] 越来越多的证据表明GMCSF参与通过树突细胞(DC)增强肿瘤抗原呈递。显示诱导了优于凋亡肿瘤细胞吞噬作用的DC亚组。其引发高水平的共刺激分子,这是更高功能成熟和更有效T细胞刺激的特征,从而扩宽诱导淋巴细胞效应机制的储库。GMCSF还通过树突细胞促进脂类抗原呈递,其进而激活自然杀伤T细胞(NKT细胞),这是在肿瘤内源性和治疗反应中可能关键的淋巴细胞群体。树突细胞引起抗原特异性免疫应答并表达不同受体,其允许在周边组织如真皮中识别和捕获抗原。它们将此物质有效加工入MHC I和II型呈递通路,在成熟后上调共刺激分子,迁移到次级淋巴组织,在该处其呈递抗原给T细胞。Vigil® GMCSF蛋白以1806/826pg/10e6细胞的稳健均值/中值上调。在91个制备患者中的84个(91%),这与GMCSF质粒转移完全相关。

[0452] 先前显示恶性卵巢组织中TGF β 的卵巢恶性细胞表达比非恶性卵巢组织高许多。在超过1500个OvC患者中实施的基因表达荟萃分析,基于数个基因表达鉴定了高和低风险组并通过IHC或qRT-PCR验证结果。基因标签的路径分析显示不良预后患者中的TGF β 信号传递富集。TGF β 信号通过结合丝氨酸/苏氨酸激酶受体TGF β RI和II来介导,其引起胞内效应物Smad2和Smad3的磷酸化及活化。Smad2/3与Smad4形成转录复合物,易位到核内,调节TGF β 相关基因的基因表达。TGF β 参与非浸润性浆液性卵巢肿瘤发展到浸润性浆液性卵巢癌。其能通过Smad依赖性和Smad非依赖性通路激活并认为促进卵巢癌中的肿瘤转移。在前列腺、结肠和肾细胞癌中还描述了TGF β 过表达以及与肿瘤细胞增殖和转移的相关性。

[0453] 来自卵巢癌细胞的分泌TGF β 在肿瘤微环境中产生免疫抑制Treg细胞(CD4+CD25+)扩增。这显示与高级别浆液性卵巢癌患者的预后不良相关,该患者用一线减积手术/化疗治

疗。TGFβ抑制GM-CSF诱导的骨髓来源树突状细胞 (DC) 成熟以及MHC II型和共刺激分子表达。TGFβ还抑制活化的巨噬细胞, 包括其抗原呈递功能, 以及卵巢癌和肿瘤相关髓细胞PD-L1配体表达, 其也与卵巢癌总生存不佳进一步相关。有证据揭示, 相关抗肿瘤免疫能修复涉及TGFβ的免疫监督。

[0454] TGFβ1还显示下调miR181/BRCA1轴, 从而在携带野生型BRCA基因的乳腺癌中协调DNA修复缺陷和诱导“BRCAness”。术语“BRCAness”用于鉴定零星肿瘤, 其临床病理和分子特征与BRCA1/2胚系突变相关的那些类似 (DNA修复抑制)。另外, 证明HRD低级别肿瘤中TGFβ信号传递升高能诱导NF-κB活化和引起淋巴细胞的抗肿瘤免疫应答。因此, 看来除了BRCA分子信号, 同源重组缺陷 (HRD) 评分也可能与预测结果和对TGFβ调节免疫疗法反应相关。

[0455] 此试验中BRCA-wt群体的RFS改善结果进一步支持了TGFβ抑制与免疫应答的关系, 从而支持Vigil®在BRCA-wt患者中的应用以及其他组织学类型的其他癌亚群如前列腺癌、肾细胞癌和结直肠癌可能有高TGFβ表达。高水平的弗林蛋白酶mRNA和蛋白也广泛表达于卵巢癌及许多其他人肿瘤, 其中基因在恶性 (高) 和非恶性 (低) 细胞群体之间差异性表达。作为TGFβ1, TGFβ2转化酶的弗林蛋白酶表达似乎与存活呈负相关且可能显著有助于维持肿瘤定向、TGFβ介导的外周免疫耐受。如此试验所证实, 用bi-shRNAi法下调弗林蛋白酶可诱导明显TGFβ1表达减少。显然, 相较非转染的相同患者肿瘤细胞, 构建的Vigil®疫苗的73%具有≥90%的TGFβ1敲减。

[0456] BRCA-wt和HRD低级别卵巢癌也证明癌微环境中的肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL) 部分增加、高PD-L1表达、单核细胞中的高I型IFN γ 信号活性以及高穿孔素1表达, 其一般表明免疫应答改善。然而, 提高检查点抑制剂疗法的一线 and 复发/难治性卵巢反应的数次尝试失败了。如前所述, 此假设也能涉及局部肿瘤微环境内的高TGFβ抑制效果。

[0457] 除了阻断催化作用, PARP抑制剂结合并捕获DNA上的PARP蛋白。这导致多个双链DNA断裂和最终的细胞死亡。Lynparza® (奥拉帕尼) 是就高级别浆液性卵巢癌患者批准的首批PARP抑制剂之一, 所述患者有胚系BRCA突变。之前的研究显示BRCA1/2-mu卵巢癌中的无进展生存增加 (HR 0.3, $p < 0.0001$)。铂类敏感、复发卵巢癌患者中关于奥拉帕尼最近的长期跟踪 (研究19) 显示有利的OS结果, 就所有招募的患者而言HR为0.73 ($p = 0.0138$), 尽管活性似乎限于BRCA-mu群体HR 0.62 ($p = 0.02140$), 与未显示BRCA-wt (82) 中有益HR 0.84 ($p = 0.34$) 的BRCA-wt群体相反。然而, 一些有复发或难治性疾病、具有高同源重组缺陷 (HRD) 的BRCA-wt患者可受益于PARP抑制剂。近期报告显示一些HRD高级别肿瘤与更好响应尼拉帕利相关。此外, 近期研究显示BRCA-wt和HRD-低级别肿瘤具有提高的免疫原性信号, 包括TIL丰度增加, 证明高IFN γ 1信号传递。这与RFS中用Vigil®益处观察到的一致, 其在BRCA-wt群体中得到最显著证明。BRCA-wt卵巢癌中考虑用PARP抑制进一步临床测试Vigil®是合理的。

[0458] 贝伐单抗是一线治疗卵巢癌的所示维持疗法, 尽管没有观察到证据显示无复发或总体生存优势, 涉及单独贝伐单抗作为维持。血管内皮生长因子 (VEGF) 抑制剂 (即贝伐单抗) 靶向多形生长因子VEGF, VEGF不仅是肿瘤血管发生的关键调节因子, 而且抑制免疫系统。肿瘤缺氧微环境刺激促血管新生因子VEGF-A (称为VEGF) 分泌, 其结合受体酪氨酸激酶 (VEGFRs) -1 (FLT1) 和-2 (FLK1/KDR) 以及VEGFR共受体神经毡蛋白 (NRPs) 1和2。肿瘤微环境中的该促血管生成开关不仅有利于肿瘤血管生成、肿瘤成熟和转移性播散, 而且产生免疫

抑制作用如抑制树突细胞 (DC) 成熟、促进调节T细胞功能以及扩增肿瘤相关巨噬细胞发育、髓样抑制细胞积聚。CD8+T细胞上的PD-1表达也增加。卵巢癌中,VEGF-A和其受体VEGFR1、VEGFR2及NRP1共同上调。

[0459] 贝伐单抗在卵巢癌中的临床疗效仍具有挑战性,不仅涉及有限临床反应和中等毒性,而且在血管生成抑制开始后相对快速激活抗癌耐受性。然而,在抗血管生成抑制剂应用中探索的潜在方向是强化免疫治疗活性。有证据显示贝伐单抗与治疗疫苗的组合同可诱导浸润性T淋巴细胞反应且会使免疫抑制平衡从T调节抑制移向CD8 T细胞活化,建立在免疫上更响应免疫疗法的T细胞发炎肿瘤微环境(“热肿瘤”)。

[0460] 总之,Vigil®在有BRCA1/2-wt分子谱的一线卵巢(III/IV期)癌患者中显示令人信服的RFS优势和作为单药剂维持疗法的低毒性作用。作为单药剂以及与血管生成抑制剂、PARP抑制剂和检查点抑制剂组合的研究同样合理。

[0461] 实施例4-同源重组成熟(proficient)(HRP)卵巢癌:Gemogenovatumel-T(Vigil®),研究有效维持疗法的选择

[0462] 卵巢癌患者的近期荟萃分析(Xu等,Oncotarget,8(1):285-302,2017)确认BRCA突变(-m)肿瘤中随之而来的低效修复机制预测对铂类化疗的反应速度相较BRCA野生型(-wt)肿瘤改善。与直觉相反,BRCA和其他同源重组(HR)基因中胚系突变引起的遗传不稳定性显著增加发展卵巢癌的可能性。然而,HR缺陷型(HRD)癌症患者(BRCA-m和HR-m)也证实生存改善。这不仅归因于修复化疗诱导DNA损伤的能力受损,而且归因于BRCA调节的自我吞噬中断和对癌干细胞维持及抗药性的后续影响。PARP抑制(PARP-i)的治疗应用,利用HRD癌中通过网络生物分子分析预测的合成致死,代表卵巢癌疗法中的显著积极转变。尽管明显有助于治疗模式,PARP-i优选对HRD癌症患者有益,而在HR成熟(HRP)卵巢癌患者中的生存益处较小(González-Martín等,New England Journal of Medicine,381(25):2391-2402,2019)。问题在于,PARP抑制剂引起中等毒性,缩小了长期维持疗法的治疗指数,一些药剂在多至65%患者中显示3/4级不良事件。另外,观察到71%药物降低率和12%停药率,从而使患者毒性:效益比的治疗指数较不有利,尤其是HRP肿瘤患者(Gonzalez-Martín等,N Engl J Med,381(25):2391-2402,2019)。结果,用较不有效的初次治疗和维持相对生存,HRP肿瘤保持卵巢癌亚组。

[0463] 贝伐单抗还在疾病复发的卵巢癌患者和新诊断可切除III/IV期疾病的患者中显示统计上改善无进展生存(PFS),作为减积手术后的巩固和维持,尽管长期随访无法证明OS益处。有趣的是,关于GOG-0218试验(NCT00262847)中HRD和HRP与贝伐单抗的有限关系意识,BRCA-wt/HRP卵巢癌组证明在巩固和维持疗法中相较BRCA-wt/HRD组降低近20个月的生存,有和没有贝伐单抗,从而也支持贝伐单抗涉及BRCA-wt/HRP卵巢癌的功效限制(Tewari等,J Clin Oncol,37(26):2317-2328,2019)。

[0464] 我们先前描述新型自体肿瘤细胞疫苗在新诊断卵巢癌中作为维持的应用,gemogenovatumel-T(Vigil®)在减积手术中构建自收获组织(Oh等,Gynecol Oncol,143(3):504-510,2016)。Vigil®纳入编码免疫刺激GM-CSF基因和双功能短发夹RNA构建体的多基因质粒,其特异性敲减前蛋白转化酶弗林蛋白酶和其下游靶标TGFβ1及TGFβ2(Maples等,BioProcessing Journal,8:4-14,2010;Senzer等,Mol Ther,20(3):679-86,2012;和

Senzer等, *Journal of Vaccines&Vaccination*, 4(8):209, 2013)。Vigil®设计成经MHC-II上调和树突细胞加工来提高癌相关新抗原表达,从而增强传入的免疫应答,建立全身抗肿瘤免疫反应。

[0465] 在涉及25个位置的2期随机化双盲安慰剂对照维持试验中, Vigil®进一步显示有记载功效的有利治疗指数,而没有任何治疗相关的严重3/4级不良事件(Rocconi等, *Lancet Oncology*, 2020)。就所有接受Vigil®的患者相较安慰剂确定初级终点无进展生存(RFS)的非统计显著改善;分别为11.5vs.8.4个月($n=91$, $HR=0.688$, 90%CI 0.443-1.068; $p=0.078$)。然而,在BRCA-wt患者中预计划确定未来二级终点,确实揭示RFS的假设产生改善,12.7vs.8.0个月($n=67$, $HR=0.514$; 90%CI 0.3-0.88; $p=0.020$)。另外,在BRCA-wt患者的计划亚组分析中未达到中值总体生存(OS),相比之下安慰剂组为41.4个月($n=67$, $HR=0.493$; CI 0.24-1.009; $p=0.049$)。此外,40名BRCA-wt患者中仅21个(52%)在分析时显示Vigil®后疾病复发,相比之下27名安慰剂BRCA-wt患者中有20个(78%) ($p=0.021$, 费希尔精确)。用Vigil® (33%) vs. 安慰剂 (14%) ($p=0.045$, 单侧Z检验) 观察从随机化开始的2年RFS率,还用Vigil® (90%) vs. 安慰剂 (67%) ($p=0.020$, 单侧Z检验) 证明2年OS优势。

[0466] 考虑到BRCA-wt群体中对Vigil®免疫疗法的免疫应答提高和HRP群体中标准护理的优势有限,确定了在近期所发表2期试验(Rocconi等, *Lancet Oncology*, 2020)中进入和治疗的所有患者的同源重组状态(HRD和HRP)。此试验在新诊断可切除III/IV期疾病的患者中评估Vigil® vs. 安慰剂作为维持疗法,该患者经历减积手术和用铂类化疗的辅助治疗,以确定Vigil®对HRP群体的效果。

[0467] 最近, Vigil®显示在III/IV期新诊断卵巢癌患者的预计划亚组分析中产生无进展和总体生存改善的显著临床益处,所述患者有BRCA野生型分子谱。在此我们分析加入2b期VITAL研究的患者的同源重组状态并确定Vigil®在HRP患者中的临床益处

[0468] 1. 方法

[0469] 1.1 患者群体和研究设计

[0470] Vigil®质粒构建、cGMP生产、组织加工和转染如上所述完成(Maples等, *BioProcessing Journal*, 8:4-14, 2010; Senzer等, *Mol Ther*, 20(3):679-86, 2012; 和Oh等, *Gynecologic Oncology*, 143(3):504-510, 2016)。VITAL研究是随机、2b期、双盲、安慰剂对照试验。先前发表了患者群体和研究设计(Rocconi等, *Lancet Oncology*, 2020)。简言之,患者在减积手术和5-8个周期化疗后全响应,有III/IV期高级别浆液性、子宫内膜、透明细胞卵巢癌。在研究开始时,需要患者具有0或1的东部肿瘤协作组(ECOG)表现状态以及合适的器官和骨髓功能。患者每月一次接受 1×10^7 细胞/注射Vigil®或安慰剂,持续最少4剂且最多12剂。持续治疗,直至产品耗尽或疾病复发。记录第一剂治疗后的不良事件并在最后一次治疗后继续30天。通过盲独立检查来评估疾病复发,定义为2次连续检测中任何可测量损伤或高于35U/mL的升高的CA-125水平。

[0471] 1.2 HRP分析

[0472] BRCA1/2突变状态如前所述确定(Rocconi等, *Lancet Oncology*, 2020)。鉴定为BRCA1/2野生型的患者进行同源重组缺陷测试,使用MyChoice® CDx(麦利亚德公司

(Myriad, Inc), 犹他州盐湖城)。根据试验指南, ≥ 42 的评分用于鉴定HRD患者, < 42 是HRP。

[0473] 1.3 统计分析

[0474] VITAL研究的初级终点是才随机化时间开始的无进展生存。事后分析HRP患者中Vigil® vs. 安慰剂的无复发和总体生存是通过Kaplan-Meier分析进行。危害比和置信区间用90%CI计算, p值是单侧的。分层因子包括残留病和化疗方案。限制平均生存时间差异(RMST)分析作为灵敏度分析实施, 使用等于各组最长随访时间最小值的截断点, 并在没有协方差调整情况下进行。

[0475] 2. 结果

[0476] 2.1 基线特征和人口统计

[0477] 在此评估中, 有BRCA-wt肿瘤的67名患者(60%患者在Vigil®臂且40%在安慰剂臂)经历HRD分析。肿瘤组织的HR分析揭示, Vigil®臂中的62.5% (n=25) 和安慰剂臂中的74.1% (n=20) 具有经试验确定[阈值 < 42 (Myriad MyChoice®)]HRP肿瘤。患者人口统计资料如表10所列。人口统计资料揭示更高数目的表现状态不佳(ECOG 1)患者随机接受Vigil®。

[0478] 表10

		BRCA-wt HRP	
特征	Vigil®	安慰剂	
患者数	25	20	
年龄, 岁			
中值	64	64.0	
范围	51-84	46-79	
< 65	52.0%	55.0%	
≥ 65	48.0%	45.0%	
FIGO 期			
III	72.0%	85.0%	
IV	28.0%	15.0%	
*ECOG 评分			
0	48.0%	75.0%	
1	52.0%	25.0%	
一线化疗			
辅助	83.0%	84.1%	
新辅助	17.0%	15.9%	
一线手术残留病状态			
宏观	32.0%	30.0%	
微观/NED	68.0%	70.0%	
*BRCA 突变状态			
BRCA-wt	25	20	
BRCA-m	N/A	N/A	
HRP	25	20	
HRD	N/A	N/A	
N/A = 不可得			

[0481] 2.2 安全性

[0482] 各治疗组的不良事件如表11所示。Vigil®组中没有患者报告3级或更高级别不良事件。也没有治疗相关死亡, 没有患者由于不良事件而移出研究, 没有发生剂量改变。患者

接受平均7.12个Vigil®剂量(范围1.00-12.00),相比之下安慰剂为6.90个剂量(范围3.00-12.00)。

[0483] 表11. 不利影响

器官类别 - AE 术语	Vigil® (n=25)						安慰剂(n=20)					
	1 级		2 级		3 级		1 级		2 级		3 级	
	数量	%	No.	%	数量	%	数量	%	数量	%	数量	%
肠胃失调	4	16%		0%		0%	2	8%		0%		0%
腹痛	1	4%		0%		0%		0%		0%		0%
肿胀	1	4%		0%		0%		0%		0%		0%
腹泻	1	4%		0%		0%		0%		0%		0%
恶心	1	4%		0%		0%	2	8%		0%		0%
全身性紊乱和给药位点情况	16	64%		0%		0%	5	20%	2	8%		0%
发冷	1	4%		0%		0%		0%		0%		0%
四肢浮肿	1	4%		0%		0%		0%		0%		0%
疲劳	2	8%		0%		0%	1	4%	2	8%		0%
注射部位反应	12	48%		0%		0%	3	12%		0%		0%
温度不耐受		0%		0%		0%	1	4%		0%		0%
实验室		0%		0%		0%	2	8%		0%		0%
血小板减少		0%		0%		0%	1	4%		0%		0%

器官类别 - AE 术语	Vigil® (n=25)						安慰剂(n=20)					
	1 级		2 级		3 级		1 级		2 级		3 级	
	数量	%	No.	%	数量	%	数量	%	数量	%	数量	%
WBC 减少		0%		0%		0%	1	4%		0%		0%
肌肉骨骼和结缔组织疾病	1	4%	1	4%		0%	3	12%	1	4%	2	8%
关节痛		0%	1	4%		0%	1	4%		0%		0%
关节炎加重		0%		0%		0%		0%	1	4%		0%
背痛		0%		0%		0%	1	4%		0%		0%
骨痛		0%		0%		0%		0%		0%	1	4%
肋痛		0%		0%		0%	1	4%		0%		0%
全身性肌无力		0%		0%		0%		0%		0%	1	4%
肌肉痛	1	4%		0%		0%		0%		0%		0%
神经系统失调		0%	1	4%		0%	1	4%		0%	1	4%
头晕		0%		0%		0%	1	4%		0%		0%
头痛		0%	1	4%		0%		0%		0%		0%
晕厥		0%		0%		0%		0%		0%	1	4%
精神疾病		0%		0%		0%	1	4%		0%		0%
精神症状 NOS		0%		0%		0%	1	4%		0%		0%
肾脏和泌尿系统疾病	1	4%		0%		0%		0%		0%		0%
尿失禁	1	4%		0%		0%		0%		0%		0%
生殖系统和乳房疾病		0%		0%		0%		0%	1	4%		0%
骨盆痛		0%		0%		0%		0%	1	4%		0%
呼吸、胸、纵隔疾病		0%		0%		0%		0%		0%	1	4%
呼吸困难		0%		0%		0%		0%		0%	1	4%
皮肤和皮下组织紊乱	4	16%	1	4%		0%		0%		0%		0%
面部皮疹	1	4%		0%		0%		0%		0%		0%
瘙痒	1	4%		0%		0%		0%		0%		0%
全身斑状丘疹		0%	1	4%		0%		0%		0%		0%
皮肤色素沉着	1	4%		0%		0%		0%		0%		0%
皮肤硬结	1	4%		0%		0%		0%		0%		0%

[0486] 2.3 终点分析

[0487] Kaplan Meier分析证实在从随机化开始的HRP **Vigil®**治疗亚组中,RFS HR=0.386 (90%CI 0.199-0.750), $p=0.007$ 和OS HR=0.342 (90%CI 0.141-0.832), $p=0.019$ 都有利改善(图22和24)。用RMST进一步评估OS和RFS,提供在指定事件中对比暴露的替代性评价,与比较随着时间变化且基于一些事件的相对风险的危害比相反,也支持**Vigil®**相较安慰剂在RFS($p=0.017$)和OS($p=0.008$)中的有利优势(图25和26)。

[0488] 3. 结果

[0489] 与BRCA-m相反(Morand等,JNCI Cancer Spectrum,2020),恶性组织中BRCA-wt表达的关系与更高克隆新抗原(McGranahan等,Science,351(6280):1463-9,2016)表达相关,且可能提供更合适的新抗原靶鉴定经诱导免疫效应反应,其特征为“热”肿瘤微环境,涉及**Vigil®**诱导免疫活化(Kraya,A.A.,等.Clin Cancer Res,25(14):4363-4374,2019)。在HRD vs.HRP高级别卵巢癌中观察到更高肿瘤突变负担和更高中值新抗原负担,尽管处于泛肿瘤谱的低端。然而,HRD中存在有较大肿瘤内异质性的高亚克隆突变部分(~40%),可能削弱高克隆新抗原肿瘤中所述的免疫原性效果,这与“热”发炎肿瘤微环境和肿瘤浸润细胞增加相关(McGranahan等,Science,351(6280):1463-9,2016),在表达HRP肿瘤的高新抗原/高入白细胞抗原(HLA)情况下尤其如此。这些HRP肿瘤也在效应记忆T细胞中富集且IFN γ 反应增强,而BRCA1突变肿瘤与I/II IFN型反应降低相关(McGranahan等,Science,351(6280):1463-9,2016)。机制评估**Vigil®**支持了循环单核细胞抗肿瘤反应诱导在**Vigil®**治疗后功能升级,与临床益处相关,如ELISPOT试验所评价(Oh等,Gynecol Oncol,143(3):504-510,2016)。此外,循环CD3+/CD8+单核细胞特定显示在**Vigil®**治疗后于一小组治疗患者内全身性上调(Herron等,Cancer Science and Research,2020)。另外,BRCA-m表达癌中的较高亚克隆表达可提供更大比例的恶性细胞“巢”亚群,从而稀释克隆新抗原可视性(可能在BRCA-wt群体中增强)和靶向克隆新抗原的免疫应答效率(McGranahan等,Science,351(6280):1463-9,2016)。还观察到**Vigil®**后ELISPOT活性提高的持续表达,诱导抗肿瘤活性在**Vigil®**中止后数月持续(Senzer等,Journal of Vaccines&Vaccination,4(8):209,2013)。这些结果指示记忆T细胞诱导(Craig等,Vaccines(Basel),8(4),2020)

[0490] 如前所述,在卵巢癌治疗时机中加入PARP-i可产生影响。然而,个体卵巢癌的分子谱不同,在整个癌谱中对RFS,PFS和OS与分子谱的关系进行严密评估,包括卵巢癌。基于此和涉及新诊断及二线卵巢癌治疗进程疗法的其他PARP-i报道,确认了数个治疗适应症,然而,在有BRCA-m或BRCA-wt HRD肿瘤的卵巢癌患者中观察到大部分益处。

[0491] 鉴于抗血管生成剂和PARP-i的临床困难,这由其中等毒性和在BRCA-wt/HRP群体中相较BRCA-m及BRCA-wt/HRD群体功效有限引起,因而在HRP卵巢癌群体中考虑**Vigil®**是合理的。PARP-i与很大一部分3/4级药物相关毒性作用相关联,这可能导致多至75%患者经历剂量中断(Gonzalez-Martin等,N Engl J Med,381(25):2391-2402,2019)。尽管用抗血管生成剂的毒性较低,但毒性可能严重,即使不致命,有出血、高血压、肠穿孔以及静脉和动脉血栓形成的风险。鉴于近期尼拉帕利获批作为“全人群”的维持(Gonzalez-Martin等,N Engl J Med381(25):2391-2402,2019),其包括HRP肿瘤患者且考虑定量和定性毒性限制,针对HRP群体中的有限益处加权,进一步开发**Vigil®**和其他潜在有效更宽治疗指数方法以及其他敏感分子亚组群体是合理的。

[0492] Vigil®免疫疗法代表HRP上皮性卵巢癌中免疫疗法效力的第一随机原理循证研究(Rocconi等,Lancet Oncology,2020)。实现复发疾病的长时间延迟和有广治疗指数的总体生存优势,连同每月皮内注射的方便性,是临床无疾病患者中最优维持疗法的关键组成部分。在原发性HRP卵巢癌中研究Vigil®疫苗维持疗法响应了NRG Oncology的鼓励,以开发和应用靶向该卵巢癌亚组的疗法。因此,Vigil®的3期研究是合理的,尤其是在HRP卵巢癌群体中且可能在有HRP分布的其他实体瘤群体中。

[0493] 实施例5.Gemogenovatucl-T (Vigil®) 免疫疗法作为一线III/IV期卵巢癌(VITAL)中的维持:随机、双盲、安慰剂对照、2b期试验

[0494] 此研究前的证据

[0495] 我们搜索了从1999年1月1日到2020年3月1日的PubMed,用于临床试验、研究,以及以英文发表的学术论文,检索词为“当前护理标准”。

[0496] “卵巢癌维持”、“PARP抑制剂”、“BRCA突变状态卵巢癌”和“同源重组缺陷”。我们的搜索获得了21 159篇论文。文献综述表明数项研究包括聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)抑制剂,其在涉及全身性维持疗法的一线卵巢癌中显示无进展生存改善,但在无复发生存或总体生存中没有优势。晚期一线卵巢癌管理的选择很少。延迟但持续的复发在初次标准护理管理后头2年内以几乎75%的比率发生,所述管理采用初次减积手术然后是辅助化疗或新辅助化疗,有中间性减积手术。与标准管理比较时,巩固或维持治疗未显示在无复发生存或总体生存方面的改善。尽管一些研究显示同源重组成熟患者中的无进展生存益处,ARP抑制剂的生存益处优选涉及有胚系和体细胞BRCA突变或同源重组缺陷分子谱的患者。ARP抑制还显示对总体生存的功效很小,大部分益处是在有BRCA突变或同源重组缺陷的患者中观察到,少部分益处是在同源重组成熟患者中观察到。此外,毒性作用与骨髓抑制相关,且偶尔有治疗相关白血病限制剂量给药。卵巢癌患者的5年存活仍然很弱,表明不符合就医需求。因此,通过稳健1期安全性和免疫应答机制结果以及2a期临床试验的有益重要证据支持,我们开始VITAL试验以在新诊断III/IV期卵巢癌患者中评估gemogenovatucl-T的安全性和功效,所述患者是初次减积手术的候选人。

[0497] 此研究的附加价值

[0498] 据我们所知,VITAL研究首先研究三重机制免疫调节性自体肿瘤疫苗作为卵巢癌一线维持治疗的效果,并显示此群体中免疫疗法益处的第一证据。此研究结果表明gemogenovatucl-T无毒且治疗引起晚期卵巢癌患者的无复发和总体生存改善,所述患者就BRCA1和BRCA2而言是野生型(BRCA)。新诊断卵巢癌的大部分患者是BRCA。

[0499] 所有可用证据的影响

[0500] Gemogenovatucl-T是首创免疫疗法平台技术,具有单药剂活性。未来的gemogenovatucl-T研究与检查点抑制剂、PARP抑制剂和血管生成抑制剂组合是合理的。

[0501] 背景

[0502] Gemogenovatucl-T是从所收获肿瘤组织中生产的自体肿瘤细胞疫苗,其特异性降低弗林蛋白酶和下游TGF-I31及TGF-I32的表达。此研究旨在确定gemogenovatucl-T一线卵巢癌维持的安全性和功效。

[0503] 方法

[0504] 此随机、双盲、安慰剂对照、2b期试验包括美国的25所医院。患有III/IV期高级别浆液性、子宫内膜或透明细胞卵巢癌,在手术与5-8个周期涉及卡铂和紫杉醇的化疗组合后处于临床完全缓解,东部肿瘤协作组表现为0或1的18岁及以上女性,符合纳入研究条件。患者通过成功筛选后的独立第三方互动反馈系统随机分配(1:1)进入gemogenovatucl-T或安慰剂,使用2和4的随机置乱块尺寸并通过细胞减积手术和新辅助相比辅助化疗的程度分层。Gemogenovatucl-T(每注射 1×10^7 细胞)或安慰剂皮内施用(每月一次),持续最少4剂且最多12剂。患者、研究人员和临床人员不知道患者分配,直至统计分析后。初级终点是无复发生存,在符合方案群体中分析。接受至少一剂gemogenovatucl-T的所有患者纳入安全性分析。研究用临床试验NCT02346747登记。

[0505] 发现

[0506] 在2015年2月11日与2017年3月2日之间,310名患者在22个位置签署研究的知情同意书。排除217人。91名患者接受gemogenovatucl-T($n=47$)或安慰剂($n=44$)并分析安全性和功效。来自第一剂gemogenovatucl-T的中值随访是40.0个月(IQR 35.0-44.8)且来自第一剂安慰剂的中值随访是39.8个月(35.5-44.6)。分入gemogenovatucl-T的患者的无复发生存是11.5个月(95%CI 7.5-未达到),相比之下分入安慰剂的患者则是8.4个月(7.9-15.5)(HR 0.69,90%CI 0.44-1.07;单侧 $p=0.078$)。Gemogenovatucl-T没有导致3或4级毒性作用。安慰剂组中的2名患者有5个3级毒性事件,包括关节痛、骨痛、全身性肌无力、晕厥和呼吸困难。7名患者(安慰剂组中的4个和gemogenovatucl-T组中的3个)有11个严重不良事件。任一组中没有报告治疗相关死亡。

[0507] 作为维持理解的一线应用gemogenovatucl-T免疫疗法耐受良好,但未符合初级终点。在通过BRCA突变状态分层的患者中进一步研究gemogenovatucl-T是合理的。

[0508] 大部分诊断有卵巢癌的女性表现为晚期。最优护理标准能实现5年生存率,这随着分期而变化,从41%(IIIA期)到20%(IV期)。用于新诊断卵巢癌(III或IV期)的护理标准涉及初次减积手术,然后用紫杉醇和卡铂的辅助化疗或用中间性减积手术的新辅助化疗。尽管大部分患者用任一方法实现完全缓解,约75%会在2年内复发。

[0509] 数个涉及贝伐单抗和聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)抑制剂的研究尝试改善一线治疗卵巢癌的结果,这是通过在患者实现全响应后施用维持疗法,尽管据我们所知在无进展生存上有益处,但没有研究对无复发生存或总体生存显示显著益处。另外,贝伐单抗和一些PARP抑制剂的中等药物相关毒性作用限制给药。PARP抑制剂为临床医生提供卵巢癌一线维持的新平台,但活性主要在有BRCA胚系和体细胞突变的患者中观察到。PARP抑制剂也批准用于复发铂类敏感维持,无论BRCA状态如何;然而,益处幅度在BRCA突变(BRCAmut)肿瘤患者或证实同源重组缺陷的那些中最大。

[0510] Gemogenovatucl-T是从所收获肿瘤组织中生产的自体肿瘤细胞疫苗,用多基因质粒离体转染,所述质粒编码人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)基因、免疫刺激细胞因子和双功能短发夹RNA(bi-shRNA)构建体,其特异性降低弗林蛋白酶和下游TGF β 1及TGF β 2的表达。4活化TGF β 1和TGF β 2不是弗林蛋白酶的唯一功能。弗林蛋白酶剪切激活数个其他蛋白,包括生长因子、细胞因子、激素和受体。然而,TGF- β 蛋白在恶性卵巢组织中的表达高于非恶性卵巢组织。5基因标签的路径分析显示不良预后卵巢癌患者中的TGF- β 信号传递富集(6)。TGF- β 参与非浸润性浆液性卵巢肿瘤发展到浸润性浆液性卵巢癌。

[0511] 此外,TGF- β 过表达与BRCA胚系和体细胞突变相关。PARP抑制剂也批准用于复发铂类敏感、主要是次最优减灭卵巢癌的患者。

[0512] 早期临床检验TGF- β ,GMCSF DNA产品的,BRCA患者中的益处幅度最大,包括在突变(BRCAmut)肿瘤或证实复发或难治性实体瘤那些中的1期检验gemogenovatucl-T,显示以每个月 1×10^7 细胞/剂安全皮内给药和经酶联免疫斑点试验上调对自身肿瘤细胞抗原的自体外周血单核细胞 γ 干扰素反应。(9-11).2a期研究显示无复发生存益处和关联性治疗相关免疫应答,在III或IV期可切除卵巢癌患者中使用gemogenovatucl-T作为一线维持疗法。考虑到一线治疗对晚期卵巢癌的限制,尤其是BRCA野生型(BRCA)疾病患者,我们开始了VITAL研究。此研究旨在确定gemogenovatucl-T一线卵巢癌维持的安全性和功效。

[0513] 方法

[0514] 研究设计和参与者

[0515] 此随机、2b期、双盲、安慰剂对照试验包括美国的25所医院,其中22所招募患者;剩余3个位点在机构审查委员会批准后不招募患者。患有III或IV期高级别浆液性、子宫内膜或透明细胞卵巢癌,在手术与5-8个周期涉及卡铂和紫杉醇的化疗组合后处于临床完全缓解的18岁及以上女性,符合纳入研究条件。患者必须具有0-1的东部肿瘤协作组(ECOG)表现状态,有正常器官和骨髓功能。同步PARP抑制剂或贝伐单抗维持疗法不允许按照研究操作。如果患者需要慢性类固醇或免疫抑制方案,具有充血性心力衰竭、不稳定型心绞痛、室性或血流动力学意义的房性心律失常、心血管疾病、心肌梗塞、脑转移、HIV、慢性乙肝或丙肝感染、先前实质器官或骨髓移植、或活性自身免疫病史,则他们不符合研究招募。也排除组织学上确认以下疾病的患者:子宫乳头状浆液性腺癌或者涉及子宫肌层或内皮或脑转移的任何疾病。

[0516] 收获肿瘤用于新辅助疗法前的腹腔镜减灭中出现的疫苗生产,或在未接受新辅助疗法的患者的减积手术中。所有肿瘤收获过程在任何化疗前完成。

[0517] 需要化疗后3周、手术后4周以及免疫抑制疗法后14天的洗脱期,所述手术包括全身麻醉、放疗、免疫疗法或试验药物。所有患者在组织获取前提供书面知情同意书。药物安全监测委员会(BSMB)在研究开始前到位以维持所有研究患者的安全性。观察到没有超过或等于3或4级的毒性作用。DSMB推荐是研究如计划继续。在患者能登记前,需要机构审查委员会的书面文件和操作伦理批准以及各位点的书面知情同意书。

[0518] 随机化和掩蔽

[0519] 磷酸铝在中性pH不溶于水,其由于絮凝步骤后存在的剩余铝而形成。为防止磷酸铝形成,决定向透析过滤缓冲液加入螯合剂。根据关于其他血清型柠檬酸钠的工作进行选择。符合要求的研究参与者随机分配(1:1)接受gemogenovatucl-T或安慰剂。患者由Clinipace(美国北卡罗来纳州的莫里斯维尔)通过互动反馈系统(Tempo系统;Clinipace;美国北卡罗来纳州的莫里斯维尔)在研究中随机分配,使用2和4的随机置乱块尺寸,其在化疗完成后3-8周出现。随机化通过细胞减积手术(微观vs宏观)和新辅助相比辅助化疗的程度分层。为确保维持掩蔽,位置上的药剂师需要将捆带环绕于注射器筒,用于治疗给药以预防区分药物与安慰剂的能力。所有试验人员、临床调查员和患者保持对研究分配不知情。赞助研究小组对患者治疗分组不知情,除了质量保证人员。

[0520] 过程

[0521] Gradalis 公司(美国得克萨斯州卡罗尔顿)从收获的肿瘤组织制备 gemogenovatucl-T。收获肿瘤用于在任何化疗前出现的疫苗制备。基于 gemogenovatucl-T 小瓶数量制备等剂量安慰剂。疫苗生产需要 10-30g 肿瘤组织。由于细菌污染风险,排除延伸至肠腔的损伤。安慰剂由冷冻介质组成,该介质无菌等分入无菌 2.0mL 硼硅玻璃瓶到 1.2mL 终填充体积。介质缓慢冷冻到 -80℃ 后,小瓶保存于汽相液氮,直到无菌性和内毒素释放检测。安慰剂小瓶生产与就患者制备的可用产物剂量匹配。在部分质粒提高 GMCSF 表达或降低(敲减) TGF- β 1 表达基础上同意操作招募例外,其适当代表质粒转移证据。进一步细节如下表 12 所提供。

[0522] 表 12 产品释放概括

	生存力(%)	GMCSF 生成 (pg/10 ⁶ cells)	TGF- β 1 敲减 (%)	凝胶内毒素(疫苗 <EU/mL)
计数	91	84	84	91
均值	86%	2334	96%	0.4
标准偏差	5%	4541	8%	0.4
均值	87%	863	100%	0.4
最小	72%	36	66%	0.2
最大	98%	37669	100%	3.2
范围	26%	37633	34%	3.0
就所有患者而言细胞剂量 1×10^7 ; USP<71> 无菌性阴性的所有患者; 支原体 DNA 阴性的所有患者				

[0523] 患者每月一次接受 1×10^7 细胞/皮内注射 gemogenovatucl-T 或安慰剂(最后一次化疗后 8 周内),持续最少 4 剂且最多 12 剂。在下列事件后停止符合方案的治疗:患者有无法接受(3 级或更加严重)、被患者临床医生认为治疗相关的毒性作用,3 或 4 级治疗不相关、在 4 周内未解决的毒性作用,对研究试剂的 3 级或更加严重过敏反应,除非证实益处的 2 级自身免疫反应,3 级或更加严重自身免疫反应,可能影响研究终点评估的任何疾病,包括化疗在内的非程序化疗法,患者不依从,或撤销知情同意书。剂量改变标准包括根据美国国家癌症研究所通用毒性标准的等级或严重毒性作用-排除涉及研究治疗的注射部位反应(2 或 3 级)-在该点的剂量减少 50%。

[0524] 可接受多至 4 周的治疗延迟以恢复。在由其他毒性事件不相关因素引起的治疗延迟事件中,注射在 3 天内施用。如果延迟归因于感染或疾病症状,允许 2 周的延迟。

[0525] 完成基线实验室试验,其由带差异性 C-125 的全血球计数和血清化学组成,连同胸部、腹部和骨盆的 CT。收集所有组织和血样品的胚系或体细胞 BRCA1 及 BRCA2 分子谱数据,用下一代测序集中分析(Ocean Ridge Biosciences,美国佛罗里达州的迪尔菲尔德比奇)。

[0526] 在研究的前三年和治疗或复发结束时,每 3 个月通过胸部、腹部和骨盆的 CT 监测患者的疾病发展。随访期间,每 6 个月完成 CT 扫描并计划多至 5 年。患者维持研究治疗,直至疾病发展,如不知情的独立中央审查委员会所定义(World Care Clinical;美国马萨诸塞州波士顿;使用实体瘤疗效评价标准 1.1 版)或直至 gemogenovatucl-T 或安慰剂供给耗尽(在先前临床免疫应答基础上最小 4 剂)。12 在研究招募期间每月一次完成所有临床评估(有差异性 C-125 的全血球计数和血清化学)。疾病复发或治疗结束后,重复实验室评估,随后在随访期间每 6 个月继续。

[0528] 在第一剂gemogenovatucl-T后记录不良事件,并持续到最后一次研究治疗后30天。不良事件用不良事件通用毒性标准4.03版分级和报告。记录所有不良事件,无论与研究治疗的因果关系如何。

[0529] 效果

[0530] 初级终点是从随机化时间开始的无复发生存。二级终点,按优先顺序是BRCA疾病患者从肿瘤组织获取时间开始的无复发生存,BRCA疾病从随机化时间开始的复发,所有患者从肿瘤组织获取时间开始的无复发生存,所有患者从随机化时间开始的总体生存,所有患者从肿瘤组织获取时间开始的总体生存。获取时间是从收获自体肿瘤细胞的手术以来的时间。从随机化或肿瘤组织获取开始的无复发生存定义为从随机分配或获取日期的时间到患者首先记录为具有疾病复发(即使患者由于毒性作用中止治疗)的日期,或死亡日期,若对象在疾病复发前死于任何原因。疾病复发定义为出现任何可测量或可评估损伤或在2次连续测量中高于35U/mL的无症状CA-125浓度,间隔至少1个月。总体生存定义为从随机分配或肿瘤组织获取日期直至死亡日期的持续时间。

[0531] 统计分析

[0532] 基于样品尺寸计算,90%效力、0.45的推定真实危害比(HR)和0.05的单侧 α 水平需要54个无复发生存事件。初级终点分析后,二级终点用分层测试法根据统计分析计划所列顺序检测。此方法用于多重性调整。初级功效分析是基于符合方案的群体,包括随机分配和接受一个或多个剂量其分配研究治疗、参加至少80%其研究访问且没有主要操作偏差的患者。接受至少一剂gemogenovatucl-T或安慰剂的所有患者纳入安全性分析。作为灵敏度分析,还在意向性治疗群体(随机分配的全部92名患者)中分析从随机化开始的无复发生存和总体生存。无复发生存和总体生存的分布用Kaplan-Meier法估计,并用分层对数秩检验比较。0.05或更低的单侧p值(分层时序检验,通过残留病和化疗方案的随机分层因子进行分层)被视作指示显著性。90%CI显示治疗效果比较且95%CI用于单独统计。HR经考克斯比例风险模型估计,由随机分层因子分层。Grambsch和Therneau检验以双侧0.05显著水平完成,从而检查带有分层的考克斯模型的比例风险推定。

[0533] 1年和2年无复发及总体生存的额外探索事后分析通过Kaplan-Meier法估计,并用渐近Z检验对比,率差方差用Greenwood法预估。受限平均生存时间差异计算为灵敏度分析,截断点等于任一研究组的最长随访时间的最小值。受限平均生存时间差异不用协方差调整计算。患者从随机化或肿瘤组织获取时间开始的无复发生存和总体生存是预先计划的亚组分析,所述患者有胚系和体细胞BRCA1或BRCA2突变以及BRCA(非突变组)。包含2个生存终点的原因是更精确反映纳入组的先前维持疗法,包括有或没有维持疗法的同步治疗。疾病复发的患者百分比通过费希尔精确检验计算。就计划的亚组分析构建森林图(通过年龄、疾病分期、ECOG表现状态、化疗时间、残留病状态、BRCA突变状态、TGF- β 1(%敲减)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子表达、生存力和制备的疫苗数),用于所有患者和BRCA疾病患者。计算相互作用以评估BRCA亚组之间的修改效果。完成BRCA状态与治疗之间相互作用项p值的事后分析,以就无复发生存评价BRCA亚组之间的效应修饰,这是通过在考克斯比例风险模型中纳入相互作用项。

[0534] 在未掩蔽前计划的所有统计分析独立完成(StatBeyond Consulting;美国加利福尼亚州欧文)。所有统计分析用R 4.0.0版完成。研究用ClinicalTrials.gov,NCT02346747

登记。

[0535] 结果

[0536] 从2015年2月11日到2017年3月2日,310名患者在22个位点签署知情同意书;从中309个样品经历制备。排除217名患者(图34)。91名患者接受gemogenovatucl-T (n=47) 或安慰剂 (n=44), 并分析安全性和功效。67名患者是BRCA且24名是BRCAmut (附录p 16)。患者基线特征如表13所示。

[0537] 表13. 基线特征

	Gemogenovatucl-T (n=47)	安慰剂 (n=44)
年龄, 岁		
中值(IQR)	63 (56–71)	63 (53–67)
范围	42–84	38–79
<65	25 (53%)	28 (64%)
≥65	22 (47%)	16 (36%)
人种		
亚裔	0	2 (5%)
黑人或非裔美国人	1 (2%)	4 (9%)
白人	46 (98%)	37 (84%)
未报告	0	1 (2%)
种族		
西班牙裔或拉丁裔	1 (2%)	0
非西班牙裔或非拉丁裔	46 (98%)	43 (98%)
未报告	0	1 (2%)
东部肿瘤协作组表现状态		
0	26 (55%)	35 (80%)
1	21 (45%)	9 (20%)
国际妇产科联盟分期		
III	38 (81%)	39 (89%)
IV	9 (19%)	5 (11%)
一线化疗		
新辅助	8 (17%)	7 (16%)
辅助	39 (83%)	37 (84%)
化疗周期数		
均值(SD)	6.00 (0.30)	6.00 (0.43)
中值(IQR)	6 (6–6)	6 (6–6)
范围	5–7	5–8
一线手术残留病状态		
宏观	16 (34%)	11 (25%)
微观或非可评估疾病	31 (66%)	33 (75%)

[0539] 表13基线特征 (接上页)

[0540]

	Gemogenovatucl-T (n=47)	安慰剂 (n=44)
(接上一栏)		
组织学		
子宫内膜癌	1 (2%)	0
混合性浆液性或透明细胞癌	0	1 (2%)
高级别浆液性癌	46 (98%)	43 (98%)
BRCA 突变状态		
BRCA 野生型	40 (85%)	27 (61%)
BRCA 突变	7 (15%)	17 (39%)
在施用的最后一次化疗与第一剂 gemogenovatucl-T 或安慰剂之间的时间, 天数		
均值(SD)	49 (16)	47 (18)
中值(IQR)	49 (41-55)	47 (35-56)
范围	22-121	16-110
实体瘤重量, g		
均值(SD)	54 (28)	55 (31)
中值(IQR)	51 (29-75)	50 (33-72)
范围	10-137	8-138
每 g 肿瘤组织收获的细胞 ($\times 10^6$)		
均值(SD)	6 (4)	7 (7)
中值(IQR)	5 (3-6)	5 (3-7)
范围	1-17	2-34
从手术到随机化的时间, 天数		
均值(SD)	215 (45)	200 (30)
中值(IQR)	209 (195-223)	199 (178-212)
范围	161-471	156-315
数据是 n (%), 除非另有说明。因为四舍五入, 一些百分数加起来超过 100%。		

[0541] 91名患者中84个(92%)符合所有产品释放标准。收获的平均肿瘤质量是50g (IQR31-75)。产品释放的生存力中值是88% (IQR 83-90;在91名患者中评估)。91名患者中的7个(8%) (5名患者分配到gemogenovatucl-T且2名患者分配到安慰剂)未显示质粒转移后的GMCSF表达增加到高于30pg/mL/10⁶细胞。然而,这7个患者的6个(86%)显示有至少30%的适当TGFβ1敲减。可评估的平均GMCSF生成是860pg/mL每10⁶细胞)是860 (IQR 254-2506,84名患者;7名患者低于阈值),可评估的平均TGFβ1敲减是100% (100-100,84名患者;表12)。7名患者中的TGFβ1敲减结果未确定(6个有适当GMCSF表达释放,4个患者分配到gemogenovatucl-T且3个分配到安慰剂)。91名患者中78个(86%)有至少80%TGF-β1敲减。考虑到TGF-β1信号传递是弗林蛋白酶表达的下游,这些结果支持涉及弗林蛋白酶bi-shRNAi敲减的活性稳健。质粒转染前的基线TGFβ1生成显示,中值TGFβ1表达为164pg/10⁶细胞 (IQR 119-336;均值241[SD 162])。BRCA1和BRCA2野生型 (BRCA) 患者的TGFβ1表达显示中值为181pg/10⁶细胞 (IQR125-350;均值249[154])。BRCA1或BRCA2突变 (BRCAmut) 患者的TGFβ1表达显示中值为146pg/10⁶细胞 (IQR 115-267;均值219[183])。

[0542] 来自第一剂gemogenovatucl-T的中值随访是40.0个月 (IQR 35.0-44.8)且来自第一剂安慰剂的中值随访是39.8个月 (35.5-44.6)。gemogenovatucl-T组中患者从手术到随机分配的中值时间是7.0个月 (IQR 6.5-7.4),安慰剂组中的患者为6.7个月 (5.9-7.1)。gemogenovatucl-T组中患者从先前化疗结束到治疗开始的中值持续时间是1.6个月

(IQR1.4-1.8),安慰剂组中的患者为1.5个月(1.2-1.9)。到2020年1月21日,通过独立第三方放射学评估在试验中观察到59个复发事件。对于分配gemogenovatucl-T的患者,从随机化时间开始计算的无复发生存是11.5个月(95%CI 7.5-未达到),相比之下分配安慰剂的患者是8.4个月(7.9-15.5;HR 0.69,90%CI 0.44-1.07;单侧 $p=0.078$;图2A)。gemogenovatucl-T组中的26名患者相比安慰剂组中的33名患者,有复发事件。

[0543] 比例风险假定在Grambsch和Thernau检验基础上满足。在功效评估时,安慰剂组内44名患者中的33个(75%)复发疾病,相比之下gemogenovatucl-T组是47名患者中的26个(55%)。事后分析中,gemogenovatucl-T组患者的1年无复发生存率是49%(95%CI 36-68),而安慰剂组患者则为39%(27-58)($p=0.18$),从随机化时间开始。事后分析中,gemogenovatucl-T组患者的2年无复发生存率是32%(95%CI 19-53),而安慰剂组患者则为25%(15-44)($p=0.26$),从随机化时间开始。

[0544] 所有患者中,接受gemogenovatucl-T的那些来自组织获取时间的无复发生存长于接受安慰剂的那些(图35B)。

[0545] 从BRCA疾病患者的组织获取时间开始计算无复发生存的二级终点,接受gemogenovatucl-T的那些显著长于接受安慰剂的那些(图35D)。在功效评价时,gemogenovatucl-T组内40名BRCA疾病患者中的21个(52%)显示疾病复发,相比之下安慰剂组是27名BRCA疾病患者中的21个(78%)。事后分析中,gemogenovatucl-T组BRCA患者的1年无复发生存率是81%(95%CI 69-95),而安慰剂组BRCA疾病患者则为63%(47-84),从手术或组织获取时间开始($p=0.056$)。gemogenovatucl-T组BRCA疾病患者的2年无复发生存率是42%(95%CI 28-64),而安慰剂组患者则为24%(11-49),从手术或组织获取时间开始。对于BRCA疾病患者从随机化开始的无复发生存,接受gemogenovatucl-T的那些显著长于接受安慰剂的那些(gemogenovatucl-T组内40名患者中的21个[52%],相比安慰剂内27名患者中的21个[78%],有无复发生存事件;图35C)。或BRCA疾病患者,在事后分析中,gemogenovatucl-T组那些的1年无复发生存率是51%(95%CI 36-71),而安慰剂组则为28%(15-53)($p=0.036$),从随机化时间开始。在事后分析中,gemogenovatucl-T组那些的BRCA疾病患者2年无复发生存率是33%(95%CI 20-57),而安慰剂组则为14%(5-39)($p=0.048$),从随机化时间开始。

[0546] 在事后分析中,BRCA1或BRCA2突变疾病患者中从随机化时间和手术或组织获取时间开始的无复发生存如图41A和图41B所示。预计划的意向性治疗分析无复发生存从随机分配时间和手术或组织获取时间开始计算,显示与符合方案分析类似的结果(图37A-37D)。

[0547] gemogenovatucl-T中从随机化时间或获取时间开始的总体生存不显著长于安慰剂组(图35E,FIG.35F)。gemogenovatucl-T组内47名患者中的13个(28%)死亡,相比之下安慰剂组为44名患者中的17个(39%)。意向性治疗分析总体生存从随机分配时间和手术或组织获取时间开始计算,显示与符合方案分析类似的结果。二级终点分析中的比例风险假定在Grambsch和Thernau检验基础上满足。

[0548] 我们在分配gemogenovatucl-T的BRCA疾病患者预计划子分析的疫苗组中观察到总体生存优势,从随机化开始(未达到中值总体生存,95%CI 35.6-未达到vs 41.4个月,26.9-未达到;HR 0.49,90%CI 0.24-1.01; $p=0.049$)和组织获取时间(未达到中值总体生存,95%CI 41.6-未达到vs 48.3个月,32.3-未达到;0.49,0.24-1.00; $p=0.047$)。在

事后分析中,从随机化时间开始,gemogenovatumel-T组BRCA疾病患者的1年总体生存率是100% (95%CI 100-100),而安慰剂组BRCA疾病患者则为89% (78-100) ($p=0.033$)。在事后分析中,gemogenovatumel-T组BRCA疾病患者从随机化时间开始的2年总体生存率是90% (95%CI 79-100),而安慰剂组BRCA疾病患者则为67% (51-89) ($p=0.021$)。我们在BRCAmut疾病患者中,于gemogenovatumel-T组患者与安慰剂组患者之间观察到总体生存差异(图40A-40D)。患者BRCA状态与治疗之间的 $p_{\text{相互作用}}$ 值用于评价BRCA亚组之间的效应修饰,就从随机化时间开始的无复发生存而言是0.173,就从随机化时间开始的总体生存而言是0.072,就来自组织获取时间的总体生存而言是0.090。涉及疾病效果(计划子分析)的基线人口统计资料包括预鉴定的分层因子和产品释放标准,显示用于BRCA疾病患者和所有患者以用于从随机化时间开始的无复发生存(图36A-36B),以及图38和图39中用于从随机化时间开始的总体生存。

[0549] gemogeno vatucel-T组与安慰剂组之间BRCA^{WT}疾病患者的受限平均生存时间差异,就从随机分配时间开始的无复发生存而言是7.2个月(90%CI 0.8-13.5; $p=0.032$),就从随机分配时间开始的总体生存而言是5.6个月(0 2-11.5; $p=0.057$)。截断点等于任一研究组的最长随访时间的最小值,用于受限平均生存时间分析。

[0550] 每患者平均施用6次(范围1-12,IQR 5-10) gemogenovatumel-T注射或6次(3-12, 6-9) 安慰剂注射。安慰剂组中患者的治疗延迟归因于盆腔炎,记录为可能与研究药物相关。研究期间,gemogenovatumel-T组中发生2起疾病导致的死亡,相比之下安慰剂组中有8起死亡,任一组中没有发生治疗相关死亡。没有报告由于不良事件将患者从研究中排除且没有剂量改变。没有报告影响患者安全的主要操作偏差。

[0551] 各治疗组中按级别的不良事件数如表14所报告。安慰剂组中的2名患者有3级治疗相关毒性(1名患者关节痛,1名患者骨痛、全身性肌无力、晕厥和呼吸困难[这些是严重不良事件])。没有报告gemogenovatumel-T 3级治疗相关不良事件。7名患者(安慰剂组中4个和gemogenovatumel-T组中3个)有11个严重不良事件。除了一个以外,这些事件报告为不太可能与研究治疗相关或不相关。

[0552] 表14不良事件

[0553]

	Gemogenovatulcel-T (n=47)			安慰剂(n=44)		
	1 和 2 级	3 级	4 级	1 和 2 级	3 级	4 级
血液和淋巴系统	1 (2%)	0	0	0	0	0
贫血	1 (2%)	0	0	0	0	0
肠胃失调	4 (9%)	0	0	3 (7%)	0	0
腹痛	1 (2%)	0	0	0	0	0
肿胀	1 (2%)	0	0	0	0	0
腹泻	1 (2%)	0	0	0	0	0
恶心	1 (2%)	0	0	3 (7%)	0	0
全身性紊乱和给药部位情况	22 (47%)	0	0	15 (34%)	0	0
发冷	1 (2%)	0	0	1 (2%)	0	0
四肢浮肿	1 (2%)	0	0	0	0	0
疲劳	3 (6%)	0	0	4 (9%)	0	0
发烧	0	0	0	1 (2%)	0	0
注射部位反应	16 (34%)	0	0	7 (16%)	0	0
疼痛	1 (1%)	0	0	1 (1%)	0	0
温度不耐受	0	0	0	1 (2%)	0	0
感染和虫侵染	1 (2%)	0	0	1 (2%)	0	0
肠道病毒感染	1 (2%)	0	0	0	0	0
腰肌脓疡	0	0	0	1 (2%)	0	0
调查	3 (6%)	0	0	2 (5%)	0	0
丙氨酸转氨酶增加	1 (2%)	0	0	0	0	0
肌酸酐增加	2 (4%)	0	0	0	0	0
血小板减少	0	0	0	1 (2%)	0	0
白细胞减少	0	0	0	1 (2%)	0	0
代谢营养紊乱	1 (2%)	0	0	1 (2%)	0	0
液体滞留	0	0	0	1 (2%)	0	0
高血糖症	1 (2%)	0	0	0	0	0
肌肉骨骼和结缔组织疾病	6 (13%)	0	0	15 (34%)	3 (7%)	0
关节痛	5 (11%)	0	0	6 (14%)	1 (2%)	0
关节炎加重	0	0	0	1 (2%)	0	0
背痛	0	0	0	3 (7%)	0	0
骨痛	0	0	0	3 (7%)	1 (2%)	0
胁痛	0	0	0	1 (2%)	0	0
全身性肌无力	0	0	0	0	1 (2%)	0
肌肉痛	1 (2%)	0	0	0	0	0
肢体疼痛	0	0	0	1 (2%)	0	0
神经系统失调	3 (6%)	0	0	6 (14%)	1 (2%)	0
头晕	0	0	0	1 (2%)	0	0
头痛	2 (4%)	0	0	1 (2%)	0	0
间歇性头痛	1 (2%)	0	0	0	0	0
神经痛	0	0	0	1 (2%)	0	0
手麻	0	0	0	1 (2%)	0	0
外周感觉神经元病变	0	0	0	2 (5%)	0	0
晕厥	0	0	0	0	1 (2%)	0

[0554] 表14不良事件(接上页)

[0555]

	Gemogenovatumel-T (n=47)			安慰剂(n=44)		
	1 和 2 级	3 级	4 级	1 和 2 级	3 级	4 级
(接上页)						
精神疾病	0	0	0	1 (2%)	0	0
未另外指定的精神症状	0	0	0	1 (2%)	0	0
肾脏和泌尿系统疾病	1 (2%)	0	0	0	0	0
尿失禁	1 (2%)	0	0	0	0	0
生殖系统与乳房	0	0	0	1 (2%)	0	0
盆腔痛	0	0	0	1 (2%)	0	0
呼吸、胸、纵隔疾病	0	0	0	0	1 (2%)	0
呼吸困难	0	0	0	0	1 (2%)	0
皮肤和皮下组织紊乱	8 (17%)	0	0	0	0	0
脱发	1 (2%)	0	0	0	0	0
大疱性皮炎	1 (2%)	0	0	0	0	0
面部皮疹	1 (2%)	0	0	0	0	0
瘙痒	2 (4%)	0	0	0	0	0
斑状丘疹	1 (2%)	0	0	0	0	0
皮肤色素沉着	1 (2%)	0	0	0	0	0
皮肤硬结	1 (2%)	0	0	0	0	0
心血管疾病	1 (2%)	0	0	1 (2%)	0	0
热潮红	1 (2%)	0	0	1 (2%)	0	0
数据是 n (%)。没有记录归因于不良事件的死亡。						

[0556] 讨论

[0557] Gemogenovatumel-T未显示无复发生存初级终点的改善。然而,数个二级终点视作假设产生,显示gemogenovatumel-T相较安慰剂在无复发生存和总体生存方面显著改进,特别是BRCA肿瘤患者。这些结果表明BRCA卵巢癌患者对gemogenovatumel-T的敏感性可能高于BRCA突变卵巢癌患者。

[0558] 晚期卵巢癌一线治疗的目前情况在过去25年中未显著改变。尽管有许多努力,加入替代性方法作为联合疗法或维持疗法,很大程度上没有引起所有卵巢癌患者标准护理的总体变化。然而,一个例外是开发PARP抑制剂。例如,尼拉帕利在III或IV期卵巢癌患者中作为维持疗法,显示无进展生存(HR 0.62, 95%CI 0.50-0.76; $p < 0.001$)和2年总体生存相较安慰剂改善(HR 0.70, 95%CI 0.44-1.11)。然而,涉及高比例的3或4级药物相关毒性作用和与毒性相关的剂量中断。

[0559] GMCSF参与通过树突细胞增强肿瘤抗原呈递并促进更高浓度的共刺激分子,这诱导更有效的T细胞刺激。GMCSF还通过树突细胞促进脂类抗原呈递,其进而激活自然杀伤T细胞。来自卵巢癌细胞的分泌TGF β 在肿瘤微环境中产生免疫抑制调节T细胞(Treg) (CD4+CD25+)扩增。(26) 此反应与一线治疗的高级别浆液性卵巢癌患者中的预后不良相关。TGF- β 抑制GMCSF诱导的骨髓来源树突细胞成熟以及MHC II型和共刺激分子表达。TGF- β 还抑制活化的巨噬细胞,包括其抗原呈递功能,以及卵巢癌和肿瘤相关髓细胞PD-L1配体表达,其也与卵巢癌患者总生存不佳进一步相关。如此试验所证明,敲减TGF β 1可有助于抑制TGF β 效果,这可能在BRCA疾病患者中更相关。

[0560] 调查卵巢癌中免疫疗法的研究很少。最近,尽管有病例报告和1/2期试验证据显示卵巢癌中用检查点抑制剂的反应,但在数个试验中没有显示益处,涉及一线和复发卵巢癌中的阿维单抗组合,尽管在另一研究中,38名卵巢癌复发女性中的11个用纳武单抗加贝伐单抗组合实现了目标反应。正在进行其他研究,包括卵巢癌患者中的检查点抑制剂疗法。

[0561] Gemogenovatumel-T耐受良好,容易给药,且显示有前途的功效,可能使其成为卵

巢癌患者的理想维持疗法。研究强度是安全性和临床观察BRCA疾病患者的无复发生存和总体生存优势。然而, BRCA亚组是二级终点, 使用自体肿瘤收获物作为制备产品组分可形成产品应用的时间和生产成功率限制。肿瘤组织不足与生产失败相关, 但没有证据表明所生产疫苗数与施用患者或健康状态的疫苗数相关。随着切除肿瘤组织的重量变低, 细胞不足失败率确实增加。

[0562] 由于仅一小群BRCAmut疾病患者接受gemogenovatucl-T, 关于这类患者中负面影响的结论需要进一步研究。计划用贝伐单抗或其他PARP抑制剂的更多gemogenovatucl-T评估。此外, 联合检查点抑制剂疗法能考虑用于进一步增强gemogenovatucl-T免疫应答。

[0563] 总之, gemogenovatucl-T显示在有BRCA肿瘤分子谱的卵巢癌患者中作为一线维持疗法的益处。此发现需要进一步研究。

[0564] 实施例6. 补充信息

[0565] 研究设计和参与者

[0566] 需要正常器官和骨髓功能并按方案定义(嗜中性细胞绝对计数 $\geq 1,500/\text{mm}^3$; 淋巴细胞绝对数 $\geq 500/\text{mm}^3$; 血小板 $\geq 75,000/\text{mm}^3$; 总胆红素 $\leq 2\text{mg/dL}$; AST (SGOT) /ALT (SGPT) $\leq 2\times$ 机构正常值上限; 肌酸酐 $<1.5\text{mg/dL}$)。所有患者需要具有理解能力且愿意签署书面特定知情同意书。

[0567] 过程

[0568] 获得手术切除的肿瘤组织并切成1/4-1/2英寸的段, 然后置于样本容器内, 该容器补充有庆大霉素(费森尤斯卡比)并以湿冰包装从而过夜转运。在第1天, 测试运输介质和肿瘤样本的无菌性(BacT/Alert 3D微生物鉴定系统, 生物梅里埃)。在第1天, 肿瘤组织通过手术刀修整和分离, 然后是酶解分离(I型胶原酶溶液)并37°C孵育以形成单细胞悬液。细胞悬液在无菌100um过滤器(康宁)中过滤以分离细胞与碎片, 释放的细胞用补充有1%人血清白蛋白(HSA)(奥克特珐玛)的PlasmaLyte(巴克斯特)洗涤, 用一次性血球计(InCyto)手工计数。移出质量控制(QC)样品以保留、免疫监测和预转染培养, 其开始用于通过GMCSF(安迪生物)、TGF β 1(安迪生物)和TGF β 2(安迪生物)的ELISA以获得基线细胞因子水平。悬液调至4千万细胞/mL浓度, 用Gene Pulser XL(伯乐)电穿孔以促进质粒插入。转染细胞以 1×10^6 细胞/mL接种于无菌T-225cm²烧瓶(康宁)的X-VIVO 10培养基(龙沙), 所述培养基补充有庆大霉素(费森尤斯卡比), 37°C, 5%CO₂覆盖(三洋)下孵育过夜(14-22小时), 以纳入bi-shRNA弗林蛋白酶和GMCSF mRNA到肿瘤细胞内。

[0569] 在第2天, 收获过夜培养物并重悬于新鲜X-VIVO培养基。推进前需要QC样品和最小4剂/患者。

[0570] 取2个含有细胞的1-mL支原体样品, -80°C冷冻。细胞用伽马射线辐照器辐射4x25Gy周期以阻滞复制/生长。细胞用补充有1%人血清白蛋白(HSA)(奥克特珐玛)的PlasmaLyte(巴克斯特)洗涤, 移出QC样品。细胞置于冷冻介质, 该介质由含10%DMSO(二甲亚砜; Cryoserv USP; 迈兰公司)、1%HSA(奥克特珐玛)的Plasma-Lyte A, pH7.4(巴克斯特)组成, 以 1×10^7 细胞/mL无菌等分入无菌2.0mL硼硅玻璃小瓶(加铝惠顿医药包装公司); 用包被有Flurotec® barrier file(西氏医药服务公司)的丁基橡胶塞密闭, 终填充体积是1.2mL。终产物小瓶用CoolCell®冷冻容器(Biocision)按控制速度冷冻, 置于-80°C冰箱(三洋)。产品释放测试规范如附录表3所述。冷冻后, 细胞保存于液氮罐的汽相, 直至释放测试。

冷冻产品瓶用于通过凝胶法检查无菌性 (USP<71>) 和细菌内毒素 (鲎试验, 龙沙)。个体患者的产品释放测试规范如上表12所概括。用于 (GMCSF, TGF β 1, TGF β 2) 的试验验证在研究后完成, 所示数据用合适验证的参数计算。因此, TGF β 2敲减不再用作产品释放标准。

[0571] 安慰剂由冷冻介质构成, 该介质由含10%DMSO (Cryoserv USP; 迈兰公司)、1%HSA (奥克特珐玛) 的Plasma-Lyte A, pH 7.4 (巴克斯特) 组成。缓慢冷冻介质到-80℃后, 小瓶保存于汽相液氮, 直到无菌性和内毒素释放检测。安慰剂小瓶生产与就对象制备的可用产物剂量匹配。

[0572] 用于NGS测序的样品加工

[0573] 高分子量 (HMW) DNA分离自冷冻样品, 使用凯杰 (Qiagen) MagAttract HMW DNA试剂盒。HMW DNA分段用靶向200-300nt核酸范围的dsDNA片段化酶进行。片段化HMW DNA用于产生DNA库, 使用SMARTer ThruPLEX DNA-Seq试剂盒, 输入为5ng。所述库组合成5-6重池, 其就某些基因序列杂交和选择, 使用SeqCap EZ人肿瘤组 (981个基因, 2.75Mb外显子区域) 与HyperCap靶富集试剂盒的组合。合并基因选定库并用NextSeq 500Mid Output v2.5 (300个循环) 试剂盒测序。

[0574] 样品在NextSeq 500上运行。用GATK HaplotypeCaller v 4.1.2.0进行变体访问。vcf文档用GATK SelectVariants v 4.1.2.0分成SNP和Indel部分, 各文档用GATK CountVariants v 4.1.2.0计数。从IVA软件导出变体列表后, 进一步过滤变体以基于美国医学遗传学与基因组学学会 (ACMG) 分类指南来保留特定种类的多态性, 如IVA中所实施 (33) 和由ClinVar1补充。ACMG分类指南组将有害变体预测成5个可能的类别: 致病性、可能致病性、意义不明、可能良性和良性。分类是基于错义预测、剪接位点预测、核苷酸保守预测、完善的功能研究和许多其他因素。表IV的预测有害列包含在各17个样品中鉴定的BRCA和非BRCA HRD突变总数, 其属于上述所有5个IVA致病性分类。由ORB分配的最终分类是基于从IVA或ClinVar选择最严重分类, 用于初始由IVA分配作为致病性、可能致病性或意义不明的变体。由IVA称为可能良性或良性的变体如此维持于ORB分类。滤出在大于20%样品 (PBMC和肿瘤样品) 内发现的变体, 以及在等位基因频率社区 (AFC), 1000基因组, EXac或GnomAD数据库内>5%一般群体中出现的那些。变体分类为胚系或体细胞, 这是通过比较肿瘤样品与PBMC样品中各变体的等位基因部分。如果变体的肿瘤样品等位基因部分为0, 则变体分类为胚系。如果变体的肿瘤样品等位基因部分大于0且PBMC样品等位基因部分为0, 则变体分类为体细胞。如果等位基因部分都大于0, 则变体分类为胚系, 除非肿瘤样品等位基因部分比变体分类为体细胞时高超过10倍。

[0575] 表15. BRCA野生型群体的基线特征

[0576]

特征	BRCA1/2-wt	
	Gemogenovatumel-T	安慰剂
患者数	40	27
年龄, 岁		
中值(IQR)	63.5 (56.0-69.2)	64.0 (52.0-69.0)
范围	42-84	38-79
< 65	21 (52.5%)	15 (55.6%)
≥65	19 (47.5%)	12 (44.4%)
人种		
亚裔	0 (0%)	1 (3.7%)
黑人或非裔美国人	0 (0%)	2 (7.4%)
白人	40 (100%)	23 (85.2%)
未报告	0 (0%)	1 (3.7%)
种族		
西班牙裔或拉丁裔	1 (2.5%)	0 (0%)
非西班牙裔或拉丁裔	39 (97.5%)	26 (96.3%)
未报告	0 (0%)	1 (3.7%)
ECOG		
0	22 (55.0%)	21 (77.8%)
1	18 (45.0%)	6 (22.2%)
FIGO 分期		
III	32 (80.0%)	24 (88.9%)
IV	8 (20.0%)	3 (11.1%)
一线化疗		
新辅助	5 (12.5%)	2 (7.4%)

[0577]

特征	BRCA1/2-wt	
	Gemogenovatumel-T	安慰剂
辅助	35 (87.5%)	25 (92.6%)
化疗周期数		
均值(SD)	6 (0.28)	6 (0.28)
中值(IQR)	6 (6-6)	6 (6-6)
范围	5-7	5-7
一线手术残留病状态		
宏观	14 (35.0%)	8 (29.6%)
微观/NED	26 (65.0%)	19 (70.4%)
组织学		
子宫内膜癌	1 (2.5%)	0 (0%)
混合浆液/透明细胞	0 (0%)	1 (3.7%)
高级别浆液性癌	39 (97.5%)	26 (96.3%)
BRCA 突变状态		
BRCA-wt	40 (100%)	27 (100%)
BRCA-m	0 (0%)	0 (0%)
从最后施用化疗到第一剂 gemogenovatumel-T /安慰剂的天数		
均值(SD)	49.5 (16.0)	48.0 (19.0)
中值(IQR)	49 (40.8-54.2)	47 (35.5-49)
范围	22-121 / 0.7 - 4.0	23-110 / 0.8 - 3.6
实体瘤重量(g)		
均值(SD)	55 (27)	58 (28)
中值(IQR)	53 (32-75)	48 (39-74)
范围	10-136	11-114
每克肿瘤组织收获的细胞 (x10e6)		
均值(SD)	5 (3)	6 (5)
中值(IQR)	5 (3.3-6.1)	5 (3.6-6.3)
范围	1-13	2-29
从手术到随机化的天数		
均值(SD)	206.4 (23.7)	200.7 (33.1)
中值(IQR)	204 (193.5-218.5)	197 (179.0-211.5)
范围	161-286	156-315

[0578] 1.Markman M,Liu PY,Wilczynski S等.《全响应铂类和紫杉醇化疗后晚期卵巢癌患者中12相比3个月的维持紫杉醇的III期随机试验:西南肿瘤协作组和妇科肿瘤学组试验》(Phase III randomized trial of 12 versus 3 months of maintenance paclitaxel in patients with advanced ovarian cancer after complete response to platinum and paclitaxel-based chemotherapy:a Southwest Oncology Group and

Gynecologic Oncology Group trial). J Clin Oncol 2003;21:2460-65

[0579] 2. LaFargue CJ, Dal Molin GZ, Sood AK, Coleman RL.《探索 and 比较PARP抑制剂之间的不良事件》(Exploring and comparing adverse events between PARP inhibitors). Lancet Oncol 2019;20:e15-28.

[0580] 3. Coleman RL, Oza AM, Lorusso D等.《响应铂疗法 (ARIEL3) 后用于复发卵巢癌的卢卡帕尼维持治疗: 随机、双盲、安慰剂对照、3期试验》(Rucaparib maintenance treatment for recurrent ovarian carcinoma after response to platinum therapy (ARIEL3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial). Lancet 2017;390:1949-61.

[0581] 4. Maples P, Kumar P, Oxendine I等.《TAG疫苗: 自体肿瘤疫苗, 遗传修饰以表达GM-CSF和阻断TGFB2生成》(TAG vaccine: autologous tumor vaccine genetically modified to express GM-CSF and block production of TGFB2). BioProcess J 2009; 8:38-44.

[0582] 5. Bristow RE, Baldwin RL, Yamada SD, Korc M, Karlan BY.《转化生长因子β配体在原发性和复发卵巢癌中的表达改变》(Altered expression of transforming growth factor-beta ligands and receptors in primary and recurrent ovarian carcinoma). Cancer 1999;85:658-68

[0583] 6. Riester M, Wei W, Waldron L等.《通过荟萃分析1525名患者样品的晚期卵巢癌风险预测》(Risk prediction for late-stage ovarian cancer by meta-analysis of 1525 patient samples). J Natl Cancer Inst 2014;106:dju048

[0584] 7. Kang Y, Massagué J.《上皮间质转化: 发育和转移中的扭转》(Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis). Cell 2004;118:277-79

[0585] 8. Roane BM, Arend RC, Birrer MJ.《综述: 靶向卵巢癌中的转化生长因子β通路》(Review: targeting the transforming growth factor-beta pathway in ovarian cancer). Cancers (Basel) 2019;11:e668

[0586] 9. Senzer N, Barve M, Nemunaitis J等.《长期随访: 晚期癌中的1期试验“bi-shRNA弗林蛋白酶/GM-CSF DNA/自体肿瘤细胞”免疫疗法 (FANGTM)》(Long term follow up: phase 1 trial of “bi-shRNA furin/GM-CSF DNA/autologous tumor cell” immunotherapy (FANGTM) in advanced cancer). J Vaccines Vaccin 2013;4:209

[0587] 10. Olivares J, Kumar P, Yu Y等.《TGF-β2反义GM-CSF基因修饰自体肿瘤细胞 (TAG) 疫苗的1期试验》(Phase 1 trial of TGF-beta 2 antisense GM-CSF gene-modified autologous tumor cell (TAG) vaccine). Clin Cancer Res 2011;17:183-92

[0588] 11. Nemunaitis J, Dillman RO, Schwarzenberger PO等.《belagenpumatucel-L在非小细胞肺癌中的2期研究, belagenpumatucel-L是转化生长因子β-2反义基因修饰同种自体肿瘤细胞疫苗》(Phase 2 study of belagenpumatucel-L, a transforming growth factor beta-2 antisense gene-modified allogeneic tumor cell vaccine in non-small-cell lung cancer). J Clin Oncol 2006;24:4721-30.。

[0589] 12. Oh J, Barve M, Matthews CM等.《Vigil® DNA工程免疫疗法在晚期卵巢癌中的2

期研究》(Phase 2 study of Vigil® DNA engineered immunotherapy as maintenance in advanced stage ovarian cancer). *Gynecol Oncol* 2016;143:504-10.

[0590] 13. González-Martín A, Pothuri B, Vergote I 等.《在新诊断晚期卵巢癌患者中的尼拉帕利》(Niraparib in patients with newly diagnosed advanced ovarian cancer). *N Engl J Med* 2019;381:2391-402.

[0591] 14. Ison G, Howie LJ, Amiri-Kordestani L 等.《FDA批准概况:尼拉帕利用于响应铂类化疗的复发卵巢癌患者维持治疗》(FDA approval summary:niraparib for the maintenance treatment of patients with recurrent ovarian cancer in response to platinum-based chemotherapy). *Clin Cancer Res* 2018;24:4066-71

[0592] 15. Kim G, Ison G, McKee AE 等.《FDA批准概况:有害胚系BRCA-突变晚期卵巢癌、用3种或更多线化疗治疗的患者中的奥拉帕尼单一疗法》(FDA approval summary:olaparib monotherapy in patients with deleterious germline BRCA-mutated advanced ovarian cancer treated with three or more lines of chemotherapy). *Clin Cancer Res* 2015;21:4257-61.

[0593] 16. Konstantinopoulos PA, Caccaldi R, Shapiro GI, D'Andrea AD.《同源重组缺陷:利用卵巢癌的基础易损性》(Homologous recombination deficiency:exploiting the fundamental vulnerability of ovarian cancer). *Cancer Discov* 2015;5:1137-54.

[0594] 17. Thiese MS, Ronna B, Ott U.《P值解释和考虑》(P value interpretations and considerations). *J Thorac Dis* 2016;8:e928-31

[0595] 18. Goodman SN.《多重比较、解释》(Multiple comparisons, explained). *Am J Epidemiol* 1998;147:807-12.

[0596] 19. Drachman D.《调整用于多重比较》(Adjusting for multiple comparisons). *J Clin Res Best Pract* 2012;8:1-3.

[0597] 20. McGranahan N, Furness AJ, Rosenthal R 等.《克隆新抗原引起T细胞对免疫检查点阻断的免疫反应性和敏感性》(Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade). *Science* 2016;351:1463-69

[0598] 21. Kraya AA, Maxwell KN, Wubbenhorst B 等.《基因标签预测BRCA缺陷型乳腺癌的免疫原性》(Genomic signatures predict the immunogenicity of BRCA-deficient breast cancer). *Clin Cancer Res* 2019;25:4363-74.

[0599] 22. Esteve JM, Armengod ME, Knecht E.《BRCA1负调节MCF-7乳腺癌细胞中的自噬泡形成》(BRCA1 negatively regulates formation of autophagic vacuoles in MCF-7 breast cancer cells). *Exp Cell Res* 2010;316:2618-29.

[0600] 23. Folkerts H, Hilgendorf S, Vellenga E, Bremer E, Wiersma VR.《自吞噬在癌和微环境中的多方面作用》(The multifaceted role of autophagy in cancer and the microenvironment). *Med Res Rev* 2019;39:517-60.

[0601] 24. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A 等.《用改造成分泌鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的辐射肿瘤细胞接种可刺激有效、特异和长期抗肿瘤免疫》(Vaccination with

irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity). *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3539-43.

[0602] 25. Smyth MJ, Crowe NY, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Godfrey DI. 《NKT细胞-肿瘤免疫导体?》(NKT cells-conductors of tumor immunity?) *Curr Opin Immunol* 2002;14:165-71.

[0603] 26. Li X, Ye F, Chen H, Lu W, Wan X, Xie X. 《人卵巢癌细胞通过分泌TGF- β 从外周CD4(+)CD25(-)T细胞产生CD4(+)CD25(+)调节T细胞》(Human ovarian carcinoma cells generate CD4(+)CD25(+)regulatory T cells from peripheral CD4(+)CD25(-)T cells through secreting TGF-beta). *Cancer Lett* 2007;253:144-53

[0604] 27. Pölcher M, Braun M, Friedrichs N等. 《Foxp3(+)细胞浸润和颗粒酶B(+)/Foxp3(+)细胞比例与新辅助化疗治疗卵巢癌中的结果相关》(Foxp3(+) cell infiltration and granzyme B(+)/Foxp3(+) cell ratio are associated with outcome in neoadjuvant chemotherapy-treated ovarian carcinoma). *Cancer Immunol Immunother* 2010;59:909-19.

[0605] 28. Geissmann F, Revy P, Regnault A等. 《TGF- β 1防止人树状朗氏细胞的非同源成熟》(TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells). *J Immunol* 1999;162:4567-75

[0606] 29. Curiel TJ, Wei S, Dong H等. 《阻断B7-H1可改善髓样树突状细胞介导的抗肿瘤免疫》(Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity). *Nat Med* 2003;9:562-67

[0607] 30. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M等. 《程序性细胞死亡1配体1和肿瘤浸润CD8+T淋巴细胞是人卵巢癌的预后因子》(Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer). *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:3360-65

[0608] 31. Pujade-Lauraine E, Fujiwara K, Ledermann JA等. 《在铂耐药或难治性上皮性卵巢癌中阿维单抗单独或与聚乙二醇脂质体阿霉素组合相比单独聚乙二醇脂质体阿霉素:3期JAVELIN卵巢200试验的初级和生物标记分析》(Avelumab alone or in combination with pegylated liposomal doxorubicin versus pegylated liposomal doxorubicin alone in platinum-resistant or refractory epithelial ovarian cancer: primary and biomarker analysis of the phase 3 JAVELIN Ovarian 200 trial). *Gynecol Oncol* 2019;154:21-22

[0609] 32. Liu JF, Herold C, Gray KP等. 《在复发卵巢癌中评价纳武单抗与贝伐单抗组合:2期临床试验》(Assessment of combined nivolumab and bevacizumab in relapsed ovarian cancer: a phase 2 clinical trial). *JAMA Oncol* 2019;5:1731-38.

[0610] 33. Richards, S.等. 《解释序列变体的标准和指南:美国医学遗传学和基因组学院及分子病理学协会的共同一致建议》(Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for

Molecular Pathology). Genet Med, 2015. 17 (5) : p. 405-24

[0611] 本文显示和描述了本公开的优选实施方案, 本领域技术人员清楚了解这些实施方案仅通过举例方式提供。本领域技术人员掌握许多变化、改变和替换, 而不偏离本公开。应理解本文所述公开内容实施方案的多个替代方案可用于实施本公开。下列权利要求意在定义本公开范围且这些权利要求范围内的方法和结构及其等价物从而被覆盖。

序列表

<110> 格兰达利斯有限公司

<120> 用编码GM-CSF的多核苷酸和额外药剂治疗癌症的方法

<130> 097999-1225322-000310PC

<140>

<141>

<150> 63/061,634

<151> 2020-08-05

<150> 63/034,868

<151> 2020-06-04

<150> 62/960,583

<151> 2020-01-13

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4180

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Unknown:

mRNA transcript encoding furin sequence"

<400> 1

```
gcggggaagc agcagcggcc aggatgaatc ccaggtgctc tggagctgga tggatgaaggt 60
cggcactctt caccctcccg agccctgccc gtctcggccc catgccccca ccagtcagcc 120
ccgggccaca ggcagtgagc aggcacctgg gagccgaggc cctgtgacca ggccaaggag 180
acgggcgctc cagggtccca gccacctgtc cccccatgg agctgaggcc ctggttgcta 240
tgggtggtag cagcaacagg aaccttggtc ctgctagcag ctgatgtca gggccagaag 300
gtcttcacca acacgtgggc tgtgcgcac cctggaggcc cagcgggtggc caacagtgtg 360
gcacggaagc atgggttcct caacctgggc cagatcttcg gggactatta ccacttctgg 420
catcgaggag tgacgaagcg gtccctgtcg cctcaccgcc cgcggcacag ccggctgcag 480
agggagcctc aagtacagtg gctggaacag caggtggcaa agcgacggac taaacgggac 540
gtgtaccagg agcccacaga cccaagttt cctcagcagt ggtacctgtc tgggtgtcact 600
cagcgggacc tgaatgtgaa ggcggcctgg gcgcagggt acacagggca cggcattgtg 660
gtctccattc tggacgatgg catcgagaag aaccacccgg acttggcagg caattatgat 720
cctggggcca gttttgatgt caatgaccag gacctgacc ccagcctcg gtacacacag 780
atgaatgaca acaggcacgg cacacggtgt gcgggggaag tggctgcggt ggccaacaac 840
ggtgtctgtg gtgtaggtgt ggcctacaac gcccgcatg gaggggtgcg catgctggat 900
```

```

ggcgaggtga cagatgcagt ggaggcacgc tcgctgggcc tgaaccccaa ccacatccac 960
atctacagtg ccagctgggg ccccaggat gacggcaaga cagtggatgg gccagccgc 1020
ctcgccgagg aggccttctt ccgtgggggtt agccagggcc gaggggggct gggctccatc 1080
tttgtctggg cctcggggaa cgggggccgg gaacatgaca gctgcaactg cgacggctac 1140
accaacagta tctacacgct gtccatcagc agcgccacgc agtttggcaa cgtgccgtgg 1200
tacagcgagg cctgctcgtc cactatggcc acgacctaca gcagtggcaa ccagaatgag 1260
aagcagatcg tgacgactga cttgcggcag aagtgcacgg agtctcacac gggcacctca 1320
gcctctgccc ccttagcagc cggcatcatt gctctcacc tggaggccaa taagaacctc 1380
acatggcggg acatgcaaca cctggtggta cagacctcga agccagccca cctcaatgcc 1440
aacgactggg ccaccaatgg tgtgggcccgg aaagtgagcc actcatatgg ctacgggctt 1500
ttggacgcag gcgccatggt ggccctggcc cagaattgga ccacagtggc ccccagcgg 1560
aagtgcata tcgacatcct caccgagccc aaagacatcg ggaaacggct cgaggtgcgg 1620
aagaccgtga ccgctgcct gggcgagccc aaccacatca ctcggtgga gcacgctcag 1680
gcgcggctca ccctgtccta taatcgccgt ggcgacctgg ccatccacct ggtcagcccc 1740
atgggcaccc gctccacct gctggcagcc aggccacatg actactccgc agatgggttt 1800
aatgactggg ccttcatgac aactcattcc tgggatgagg atccctctgg cgagtgggtc 1860
ctagagattg aaaacaccag cgaagccaac aactatggga cgctgaccaa gttcacctc 1920
gtactctatg gcaccgcccc tgaggggctg cccgtacctc cagaaagcag tggctgcaag 1980
accctcacgt ccagtcaggc ctgtgtggtg tgcgaggaag gtttctccct gcaccagaag 2040
agctgtgtcc agcactgccc tccagggttc gcccccaag tcctcgatac gactatagc 2100
accgagaatg acgtggagac catccgggcc agcgtctgcg cccctgcca cgcctcatgt 2160
gccacatgcc aggggcccggc cctgacagac tgctcagct gcccagcca cgcctccttg 2220
gacctgtgg agcagacttg ctcccgcaa agccagagca gccgagagtc cccgccacag 2280
cagcagccac ctcggtgcc cccggagggtg gaggcggggc aacggctgcg ggcagggtg 2340
ctgccctcac acctgcctga ggtggtggcc ggcctcagct gcgccttcat cgtgctggtc 2400
ttcgtcactg tcttcctggt cctgcagctg cgctctggct ttagttttcg ggggtgaag 2460
gtgtacacca tggaccgtgg cctcatctcc tacaaggggc tgccccctga agcctggcag 2520
gaggagtgcc cgtctgactc agaagaggac gagggccggg gcgagaggac cgcctttatc 2580
aaagaccaga gcgcctctg atgagccac tgcccacccc ctcaagccaa tcccctcctt 2640
gggcactttt taattcacca aagtattttt ttatcttggg actgggtttg gacccagct 2700
gggaggcaag aggggtggag actgcttccc atcctaccct cgggcccacc tggccacctg 2760
aggtgggccc aggaccagct ggggcgtggg gagggccgta cccaccctc agcaccctt 2820
ccatgtggag aaaggagtga aacctttagg gcagcttgcc ccggccccgg cccagccag 2880
agttcctgcg gagtgaagag gggcagccct tgcttgttgg gattcctgac ccaggccgca 2940
gctcttgccc ttccctgtcc ctctaaagca ataatgtcc catccaggca gtcgggggct 3000
ggcctaggag atatctgagg gaggaggcca cctctccaag ggcttctgca cctccaccc 3060
tgtccccag ctctggtgag tcttggcggc agcagccatc ataggaagg accaaggcaa 3120
ggcagggtgcc tccaggtgtg cacgtggcat gtggcctgtg gcctgtgtcc catgaccac 3180
ccctgtgctc cgtgcctcca ccaccactgg ccaccaggct ggcgagcca aggccgaagc 3240

```

tctggctgaa ccctgtgctg gtgtcctgac caccctcccc tctcttgacac ccgcctctcc 3300
 cgctcagggcc caagtccctg ttttctgagc ccgggctgcc tgggctgttg gcactcacag 3360
 acctggagcc cctgggtggg tgggtggggag gggcgctggc ccagccggcc tctctggcct 3420
 cccacccgat gctgctttcc cctgtgggga tctcaggggc tgtttgagga tatattttca 3480
 ctttgtgatt atttcacttt agatgctgat gatttgtttt tgtattttta atgggggtag 3540
 cagctggact acccacgttc tcacacccac cgtccgcctt gctcctccct ggctgccctg 3600
 gccctgaggt gtgggggctg cagcatgttg ctgaggagtg aggaatagtt gagccccaag 3660
 tcctgaagag gcgggccagc caggcgggct caaggaaagg ggggtcccagt gggaggggca 3720
 ggctgacatc tgtgtttcaa gtggggctcg ccatgccggg gggttcatagg tcaactggctc 3780
 tccaagtgcc agaggtgggc aggtgggtggc actgagcccc cccaacactg tgccctgggtg 3840
 gagaaagcac tgacctgtca tgccccctc aaacctctc ttctgacgtg ccttttgacac 3900
 ccctccattt aggacaatca gtccccctcc atctgggagt ccccttttct tttctacctt 3960
 agccattcct ggtacccagc catctgccc ggggtgcccc ctctctctcc atccccctgc 4020
 cctcgtggcc agcccggctg gttttgtaag atgctgggtt ggtgcacagt gatTTTTTTC 4080
 ttgtaattta aacaggccca gcattgctgg ttctatttaa tggacatgag ataatgttag 4140
 aggttttaaa gtgattaaac gtgcagacta tgcaaaccag 4180

<210> 2

<211> 203

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 2

ggauccugcu guugacagug agcgcgaggaga aaggagugaa accuuaguga agccacagau 60
 guaagguuuc acuccuuucu ccuugccuac ugccucggag uccugcuguu gacagugagc 120
 gcggagaaaag auaugaaacc uuagugaagc cacagaugua agguuucacu ccuuucuccu 180
 ugccuacugc cucggaagcu uug 203

<210> 3

<211> 5140

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 3

ggccattgca tacgttgtat ccatatcata atatgtacat ttatattggc tcatgtccaa 60

cattaccgcc atgttgacat tgattattga ctagttatta atagtaatca attacggggt 120
 cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggcccg 180
 ctggctgacc gccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag 240
 taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc 300
 acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg 360
 gtaaatggcc cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt atgggacttt cctacttggc 420
 agtacatcta cgtattagtc atcgttatta ccatgggtgat gcggttttgg cagtacatca 480
 atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca 540
 atgggagttt gttttggcac caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg 600
 cccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga ggtctatata agcagagctc 660
 gtttagtgaa ccgtcagatc gcctggagac gccatccacg ctgttttgac ctccatagaa 720
 gacaccggga ccgatccagc ctccgcggcc gggaacggtg cattggaacg cggattcccc 780
 gtgccaagag tgacgtaagt accgcctata gactctatag gcacaccctt ttggctctta 840
 tgcattgctat actgtttttg gcttggggcc tatacacccc cgcttcctta tgctataggt 900
 gatggtatag cttagcctat aggtgtgggt tattgacat tattgaccac tccaacggtg 960
 gagggcagtg tagtctgagc agtactcgtt gctgccgcgc gcgccaccag acataatagc 1020
 tgacagacta acagactgtt cttttccatg ggtcttttct gcagtcaccg tcgtcgacgg 1080
 tatcgataag cttgatatcg aattccgctg gaggatgtgg ctgcagagcc tgctgctctt 1140
 gggcactgtg gcctgcagca tctctgcacc cgcccgtcgc cccagcccca gcacgcagcc 1200
 ctgggagcat gtgaatgcca tccaggaggc ccggcgtctc ctgaacctga gtagagacac 1260
 tgctgctgag atgaatgaaa cagtagaagt catctcagaa atgtttgacc tccaggagcc 1320
 gacctgccta cagaccgcc tggagctgta caagcagggc ctgcggggca gcctcaccaa 1380
 gctcaagggc ccctgacca tgatggccag cactacaag cagcactgcc ctccaacccc 1440
 ggaaacttcc tgtgcaaccc agactatcac ctttgaaagt ttcaaagaga acctgaagga 1500
 ctttctgctt gtcatcccct ttgactgctg ggagccagtc caggagttag accggccaga 1560
 tgaggctggc caagccgggg agctgctctc tcatgaaaca agagctagaa actcaggatg 1620
 gtcattcttg agggaccaag ggtggggcca cagccatggt gggagtggcc tggacctgcc 1680
 ctgggccaca ctgaccctga tacaggcatg gcagaagaat gggaatattt tatactgaca 1740
 gaaatcagta atatttatat atttatattt ttaaaatatt tatttatatta tttatttaag 1800
 ttcatattcc atatttatte aagatgtttt accgtaataa ttattattaa aaatatgctt 1860
 ctaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaacggaa ttcacgtggg cccggtaccg tatactctag 1920
 aagatctggc agcggagagg gcagaggaag tcttctaaca tgcggtgacg tggaggagaa 1980
 tcccggccct aggatgtcta gagcggccgc ggatcctgct gttgacagtg agcgcggaga 2040
 aaggagtga accttagtga agccacagat gtaaggtttc actcctttct ccttgccctac 2100
 tgcctcgga gcagctcact acattactca gctgttgaca gtgagcgcgg agaaagatat 2160
 gaaaccttag tgaagccaca gatgtaaggt ttcactcctt tctccttgcc tactgcctcg 2220
 gaagcttaat aaaggatctt ttattttcat tggatccaga tctttttccc tctgcaaaaa 2280
 attatgggga catcatgaag ccccttgagc atctgacttc tggctaataa aggaaattta 2340
 ttttcattgc aatagtgtgt tggaattttt tgtgtctctc actcggaagg acatatggga 2400

```

gggcaaatca tttaaaacat cagaatgagt atttggttta gagtttggca acatatgccc 2460
attcttccgc ttctctgctc actgactcgc tgcgctcggt cggttcggctg cggcgagcgg 2520
tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa 2580
agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg 2640
cggtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga 2700
ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcggt tccccctgga agctccctcg 2760
tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccgatacct gtccgccttt ctcccttcgg 2820
gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcgggtg taggtcgttc 2880
gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg 2940
gtaactatcg tcttgagtcc aacccggtta gacacgactt atcgccactg gcagcagcca 3000
ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtg tacagagttc ttgaagtggg 3060
ggcctaacta cggtacact agaagaacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag 3120
ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg 3180
gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcaaaa aaaaggatct caagaagatc 3240
ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaaacg aaactcacgt taagggattt 3300
tggtcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt 3360
ttaaatcaat ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga cagttaccaa tgcttaatca 3420
gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcac catagttgcc tgactcgggg 3480
ggggggggcg ctgaggctcg cctcgtgaag aaggtgttgc tgactcatac caggcctgaa 3540
tcgccccatc atccagccag aaagtgagg agccacggtt gatgagagct ttgttgtagg 3600
tggaaccagt ggtgattttg aacttttgct ttgccacgga acggtctgcg ttgtcgggaa 3660
gatgcgtgat ctgatcctc aactcagcaa aagttcgatt tattcaaca agccgccgtc 3720
ccgtcaagtc agcgtaatgc tctgccagt ttacaacaa ttaaccaatt ctgattagaa 3780
aaactcatcg agcatcaa atgaaactgcaa ttattcata tcaggattat caataccata 3840
tttttgaaaa agccgtttct gtaatgaagg agaaaactca ccgaggcagt tccataggat 3900
ggcaagatcc tggatatcgt ctgcgattcc gactcgtcca acatcaatac aacctattaa 3960
tttccccctg tcaaaaaataa ggttatcaag tgagaaatca ccatgagtga cgactgaatc 4020
cggtgagaat ggcaaaagct tatgcatttc tttccagact tgttcaacag gccagccatt 4080
acgctcgtca tcaaaatcac tcgcatcaac caaacggtt ttcattcgtg attgcgcctg 4140
agcgagacga aatacgcgat cgctgttaaa aggacaatta caaacaggaa tcgaatgcaa 4200
ccggcgcagg aacactgcca gcgcatcaac aatattttca cctgaatcag gatattcttc 4260
taataacctg aatgctgttt tcccggggat cgagtggtg agtaaccatg catcatcagg 4320
agtacggata aaatgcttga tggtcggaag aggcataaat tccgtcagcc agtttagtct 4380
gaccatctca tctgtaacat cattggcaac gctacctttg ccatgtttca gaaacaactc 4440
tggcgcacat ggcttcccat acaatcgata gattgtcgca cctgattgcc cgacattatc 4500
gcgagcccat ttatacccat ataaatcagc atccatgttg gaatttaatc gcggcctcga 4560
gcaagacgtt tcccgttgaa tatggctcat aacaccctt gtattactgt ttatgtaagc 4620
agacagtttt attgttcag atgatatatt tttatcttgt gcaatgtaac atcagagatt 4680
ttgagacaca acgtggcttt ccccccccc ccattattga agcatttatc agggttattg 4740

```

tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg 4800
cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt ctaagaaacc attattatca tgacattaac 4860
ctataaaaaat aggcgtatca cgaggccctt tcgtctcgcg cgtttcgggtg atgacgggtga 4920
aaacctctga cacatgcagc tcccggagac ggtcacagct tgtctgtaag cggatgccgg 4980
gagcagacaa gcccgtcagg gcgcgtcagc ggggtgttggc ggggtgtcggg gctggcttaa 5040
ctatgcggca tcagagcaga ttgtactgag agtgcaccat atgcgggtgtg aaataccgca 5100
cagatgcgta aggagaaaaat accgcatcag attggctatt 5140

<210> 4

<211> 245

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 4

gauccugcug uugacaguga gcgcggagaa aggagugaaa ccuagugaa gccacagaug 60
uaagguuuca cuccuuucuc cuugccuacu gccucggaag cagcucacua cauucacag 120
cuguugacag ugagcgcgga gaaagauaug aaaccuuagu gaagccacag auguaagguu 180
ucacuccuuu cuccuugccu acugccucgg aagcuuaaua aaggauuuu uauuuucauu 240
ggauc 245

<210> 5

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 5

ggagaaagga gugaaaccuu a 21

<210> 6

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 6
uaagguuucac cuccuuucuc c 21
<210> 7
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 7
ggagaaagau augaaaccuu a 21
<210> 8
<211> 15
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 8
gugaagccac agaag 15
<210> 9
<211> 222
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"
<400> 9
gauccugcug uugacaguga gcgcggagaa aggagugaaa ccuugugaag ccacagaugu 60
aagguuucac uccuuucucc uugccuacug ccucggaagc agcucacuac auuacucagc 120
uguugacagu gagcgcggag aaagauauga aaccuuagug aagccacaga uguaagguuu 180
cacuccuuuc uccuugccua cugccucgga agcuuaauaa ag 222
<210> 10
<211> 750
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 10

```
atgtggctgc agagcctgct gctcttgggc actgtggcct gcagcatctc tgcacccgcc 60
cgctcgccca gccccagcac gcagccctgg gagcatgtga atgccatcca ggaggcccgg 120
cgtctcctga acctgagtag agacactgct gctgagatga atgaaacagt agaagtcac 180
tcagaaatgt ttgacctcca ggagccgacc tgcctacaga cccgcctgga gctgtacaag 240
cagggcctgc ggggcagcct caccaagctc aagggccctt tgaccatgat ggccagccac 300
tacaagcagc actgccctcc aaccccggaa acttctgtg caaccagac tatcaccttt 360
gaaagtttca aagagaacct gaaggacttt ctgcttgtea tcccccttga ctgctgggag 420
ccagtccagg agtgagaccg gccagatgag gctggccaag ccggggagct gctctctcat 480
gaaacaagag ctagaaactc aggatggtca tcttgaggag accaaggggt gggccacagc 540
catggtggga gtggcctgga cctgccctgg gccacactga ccctgataca ggcatggcag 600
aagaatggga atattttata ctgacagaaa tcagtaatat ttatatattt atatttttaa 660
aatattttatt tatttattta ttttaagttc tattccatat ttattcaaga tgttttaccg 720
taataattat tattaataat atgcttctaa 750
```

<210> 11

<211> 245

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 11

```
gatcctgctg ttgacagtga gcgcggagaa aggagtga aa ccttagtgaa gccacagatg 60
taaggtttca ctcctttctc cttgcctact gcctcggaag cagctcacta cattactcag 120
ctgttgacag tgagcgcgga gaaagatatg aaaccttagt gaagccacag atgtaaggtt 180
tcactccttt ctccttgcct actgcctcgg aagcttaata aaggatcttt tattttcatt 240
ggatc 245
```

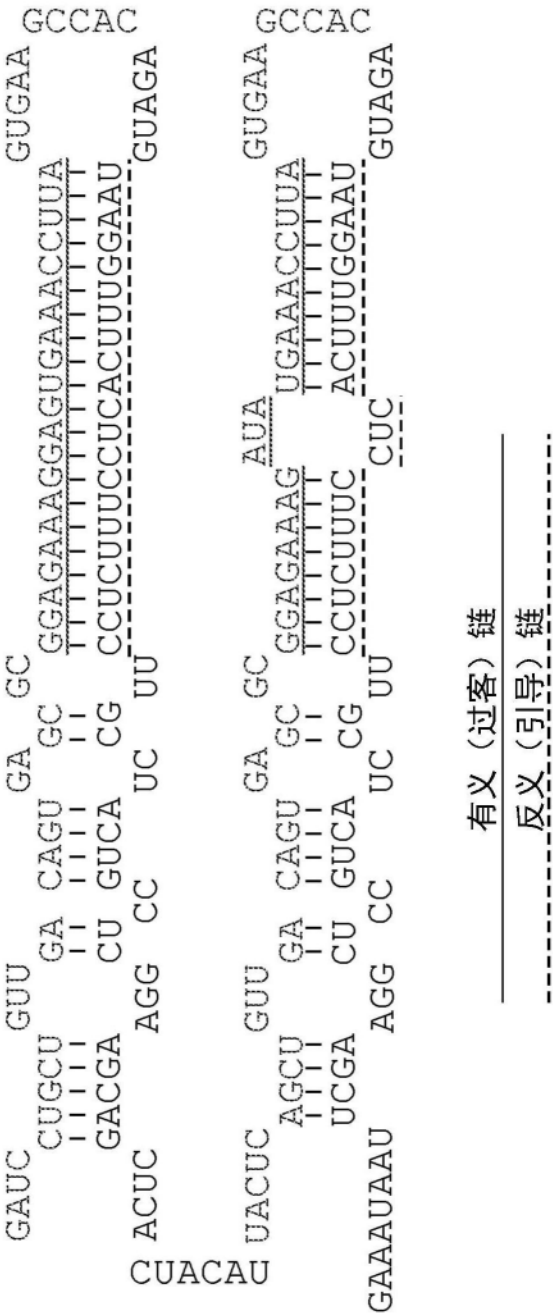


图1

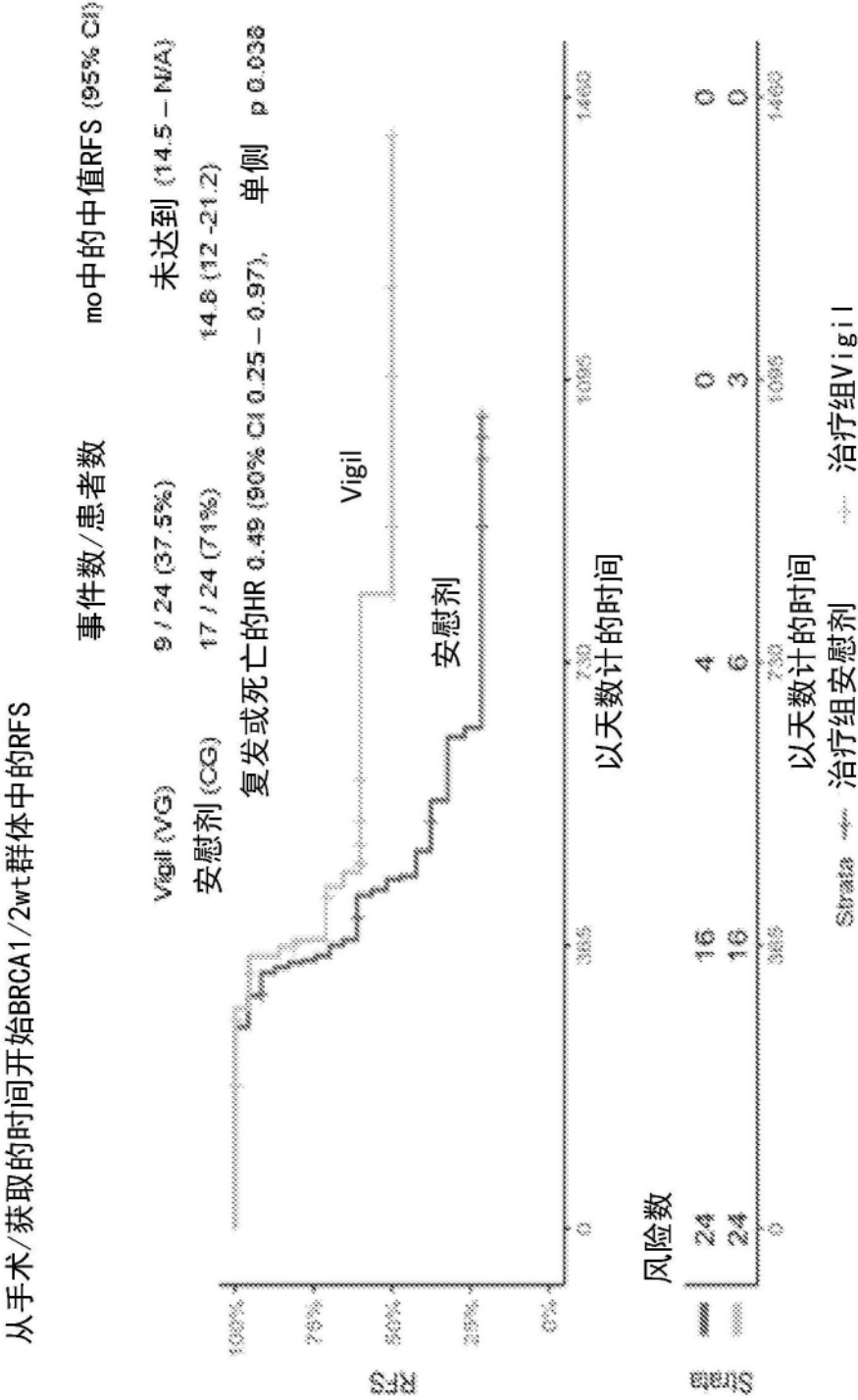


图2A

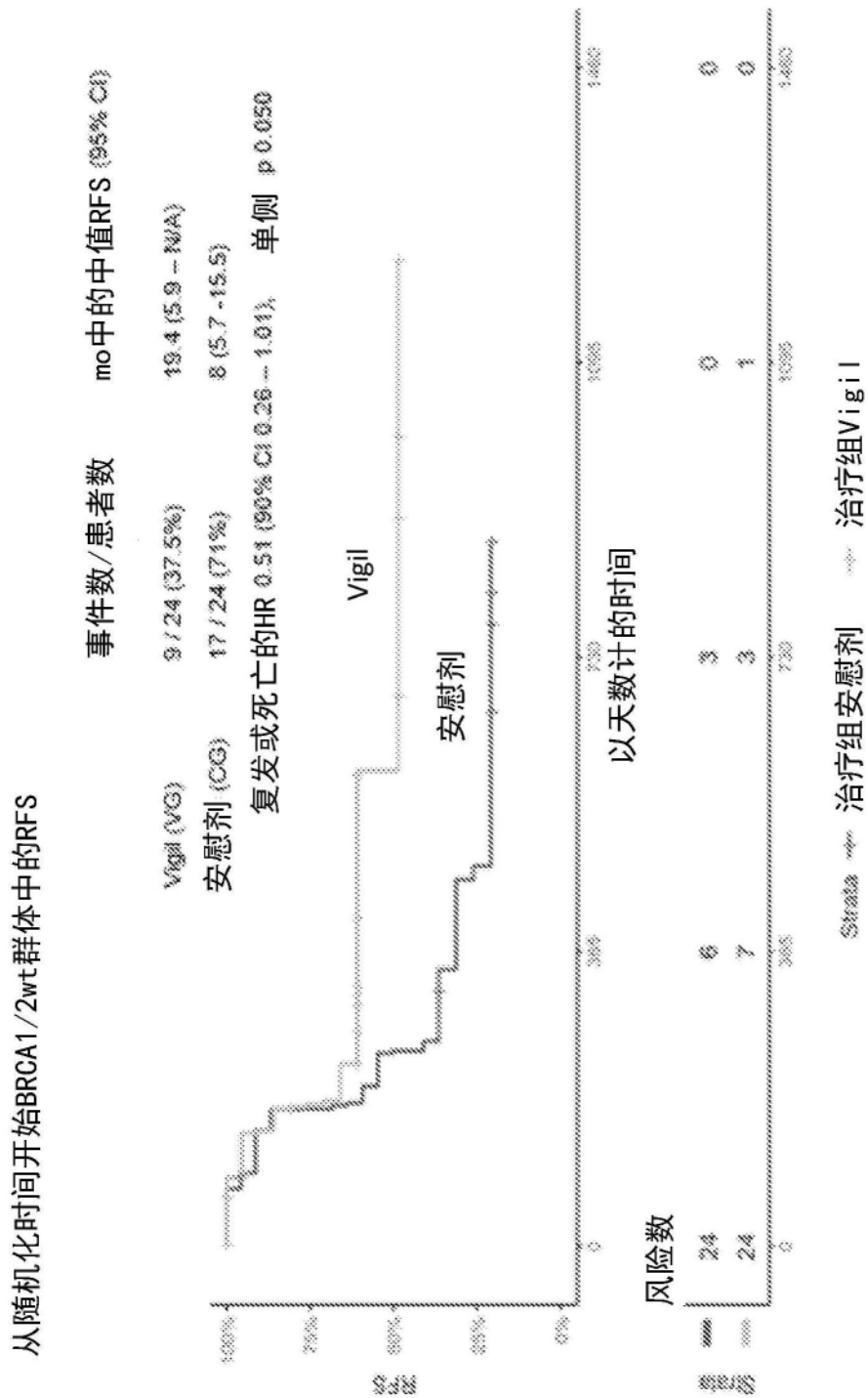


图2B

从手术/获取的时间开始91名0vc患者中的RFS

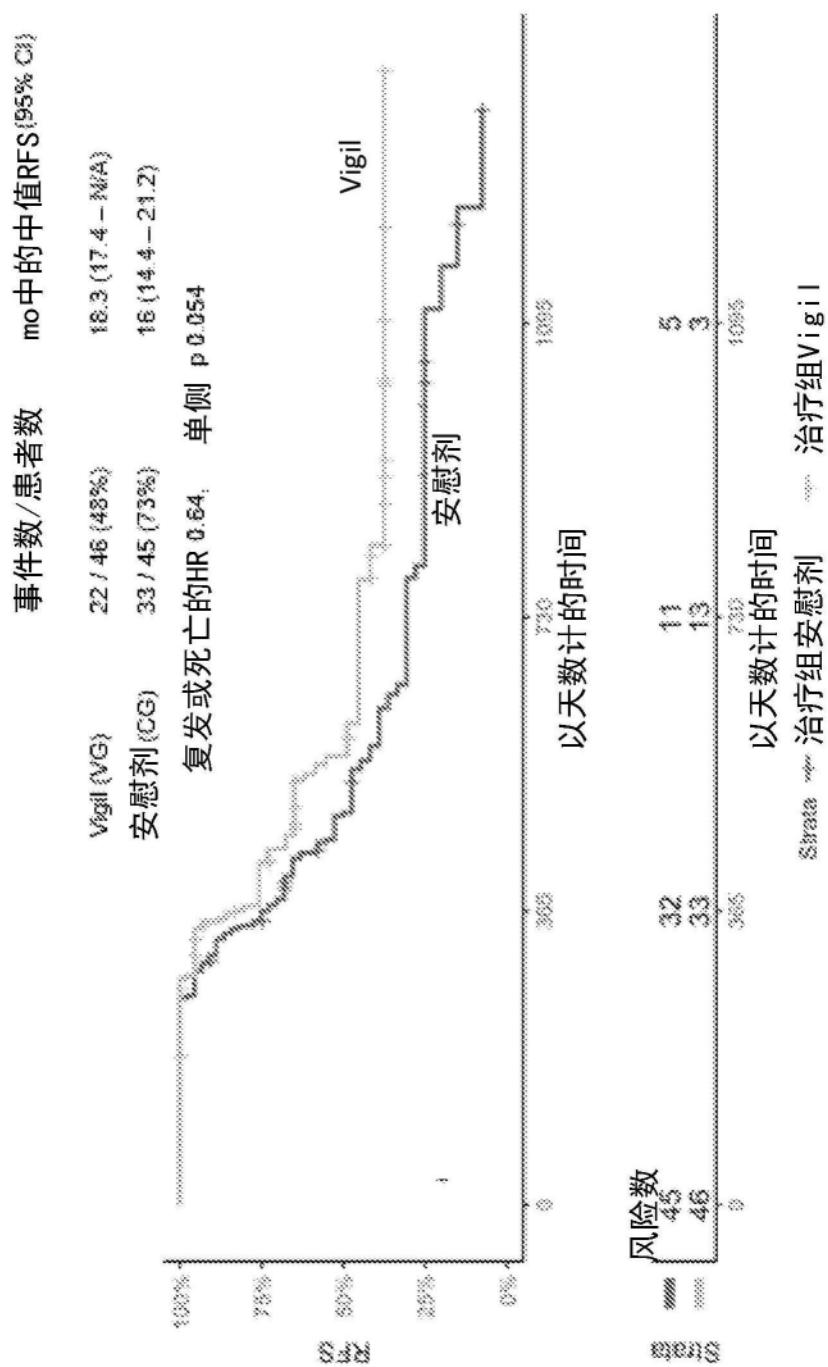


图2C

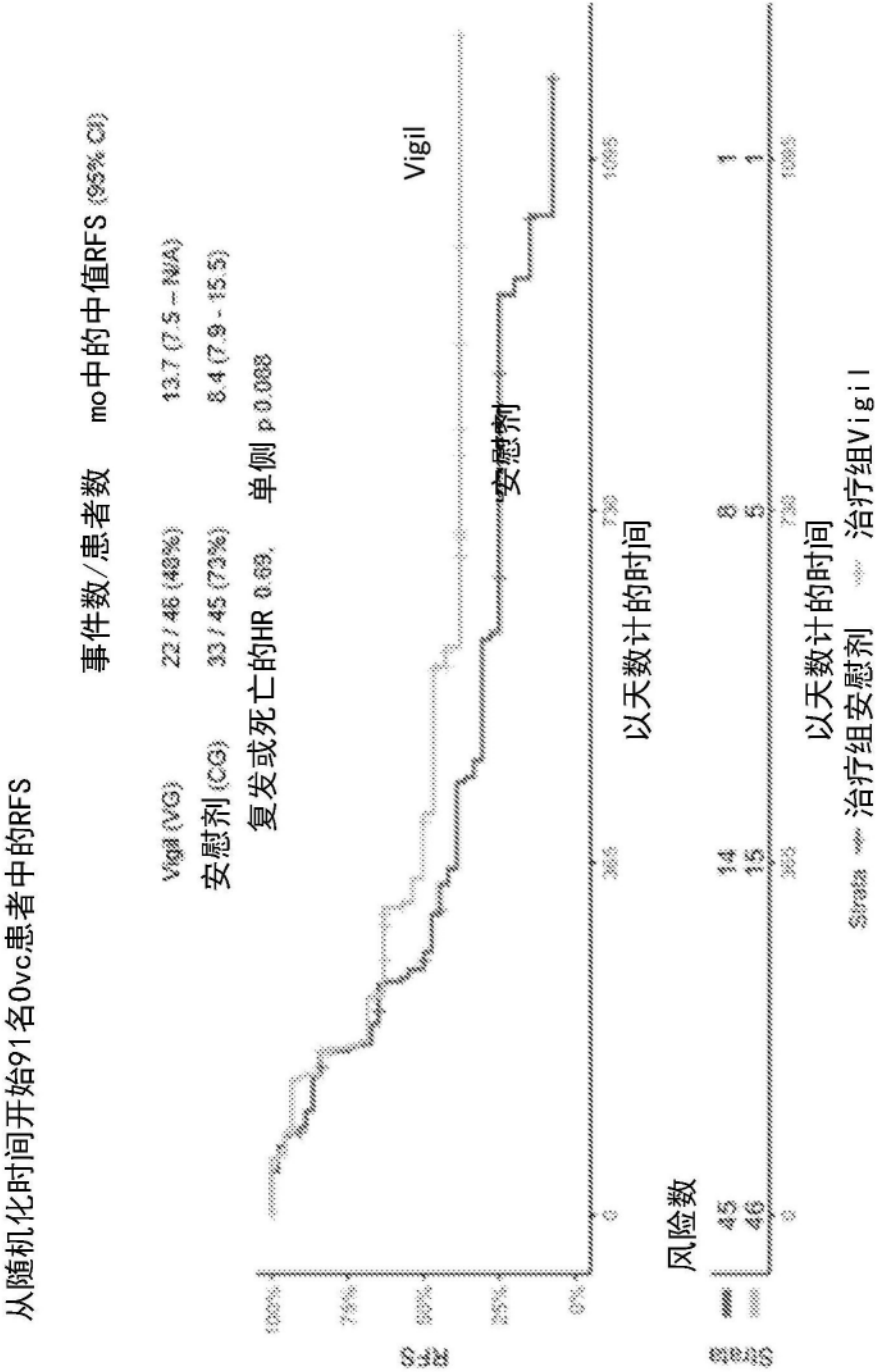


图2D

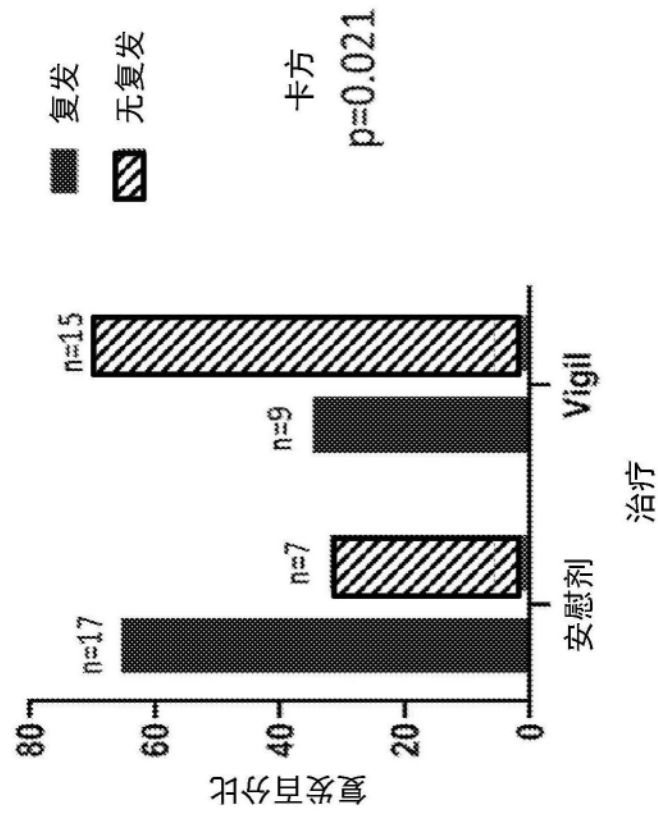


图3A

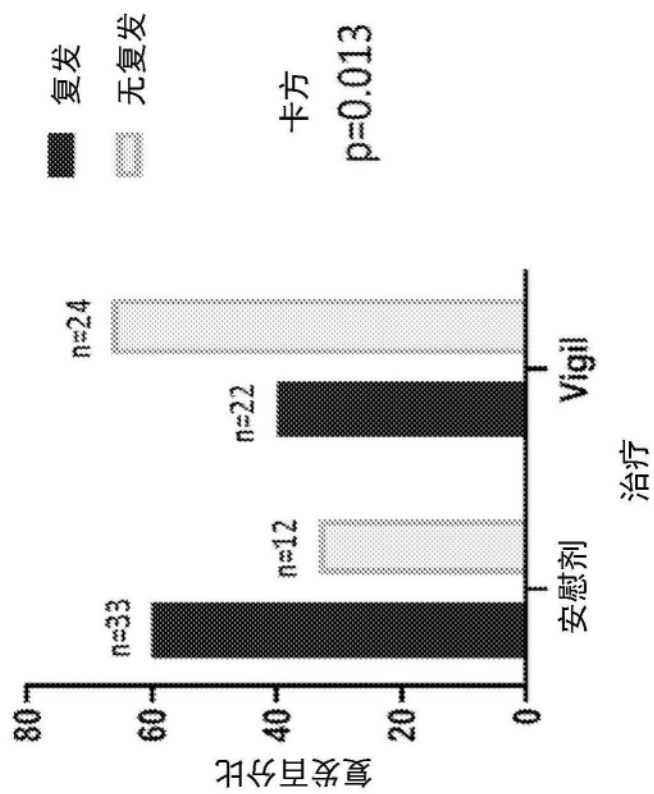


图3B

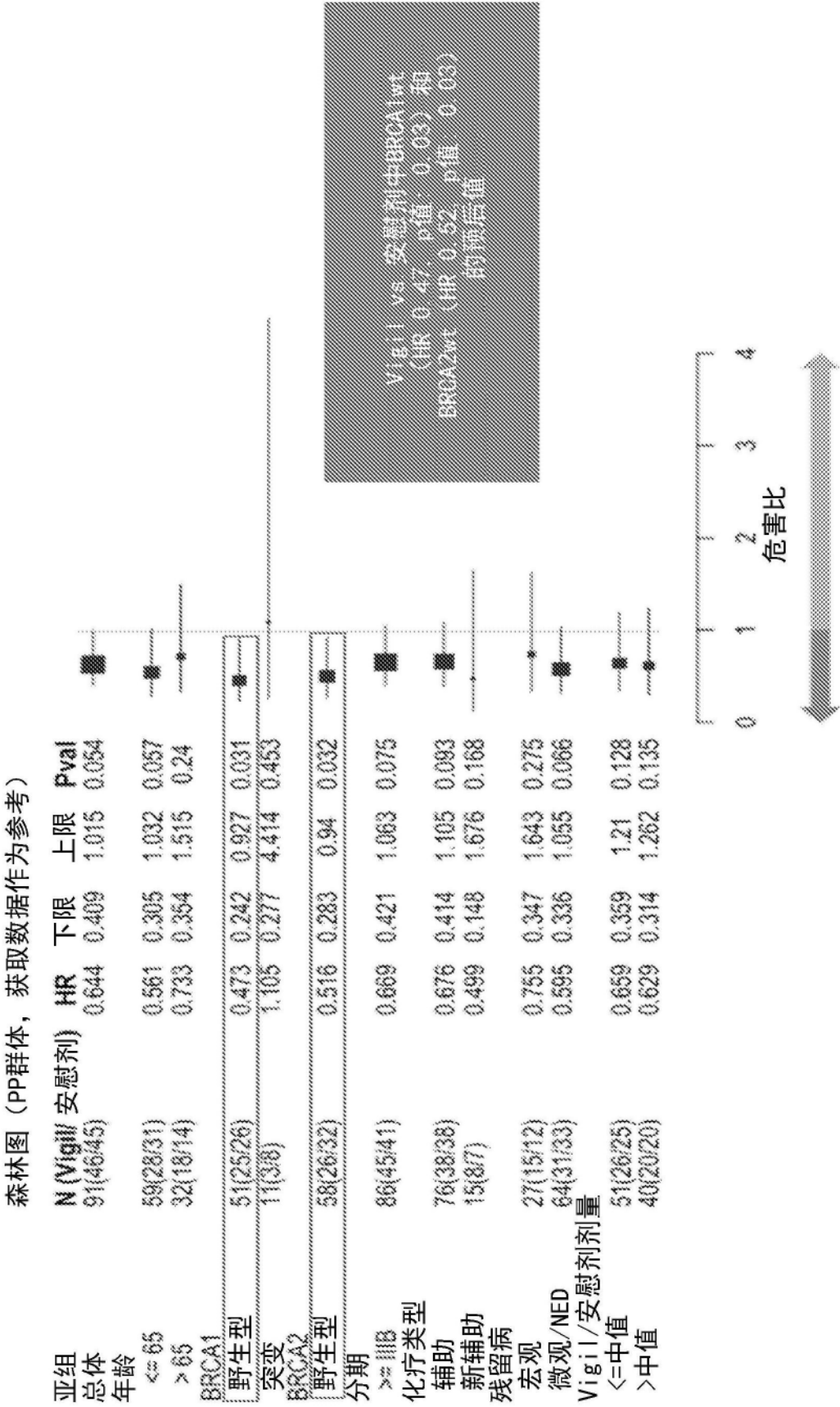


图4

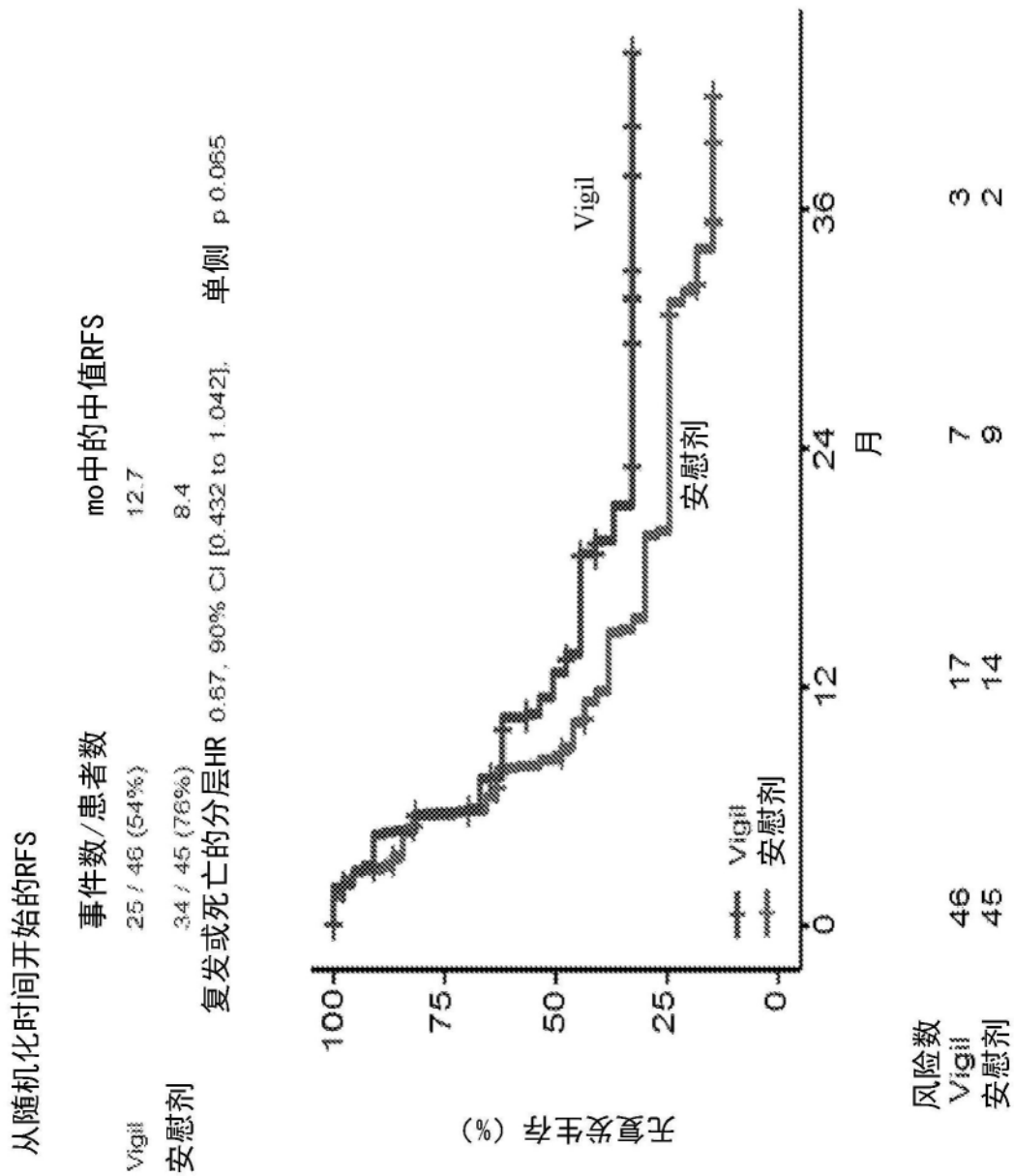


图6A

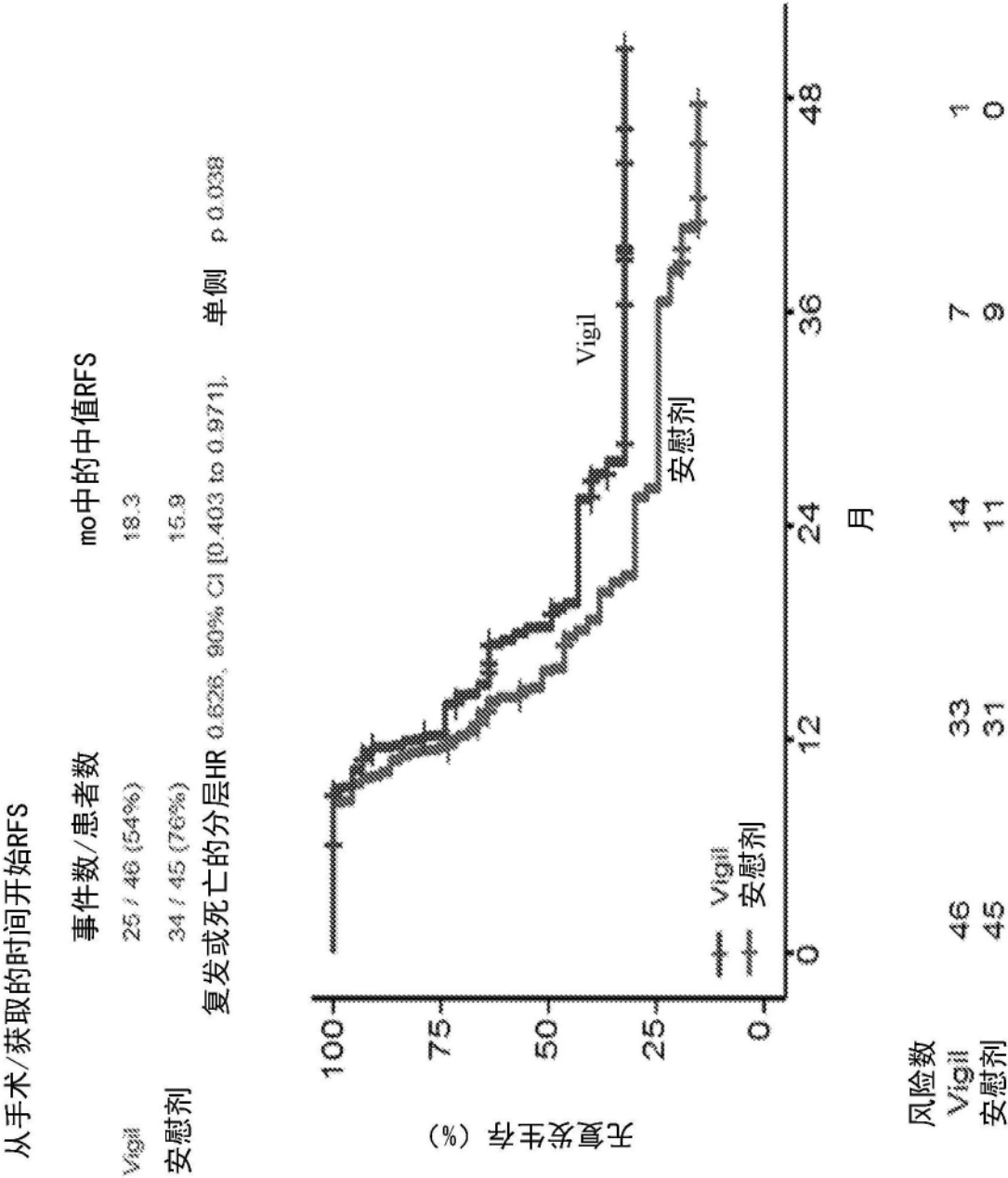


图6B

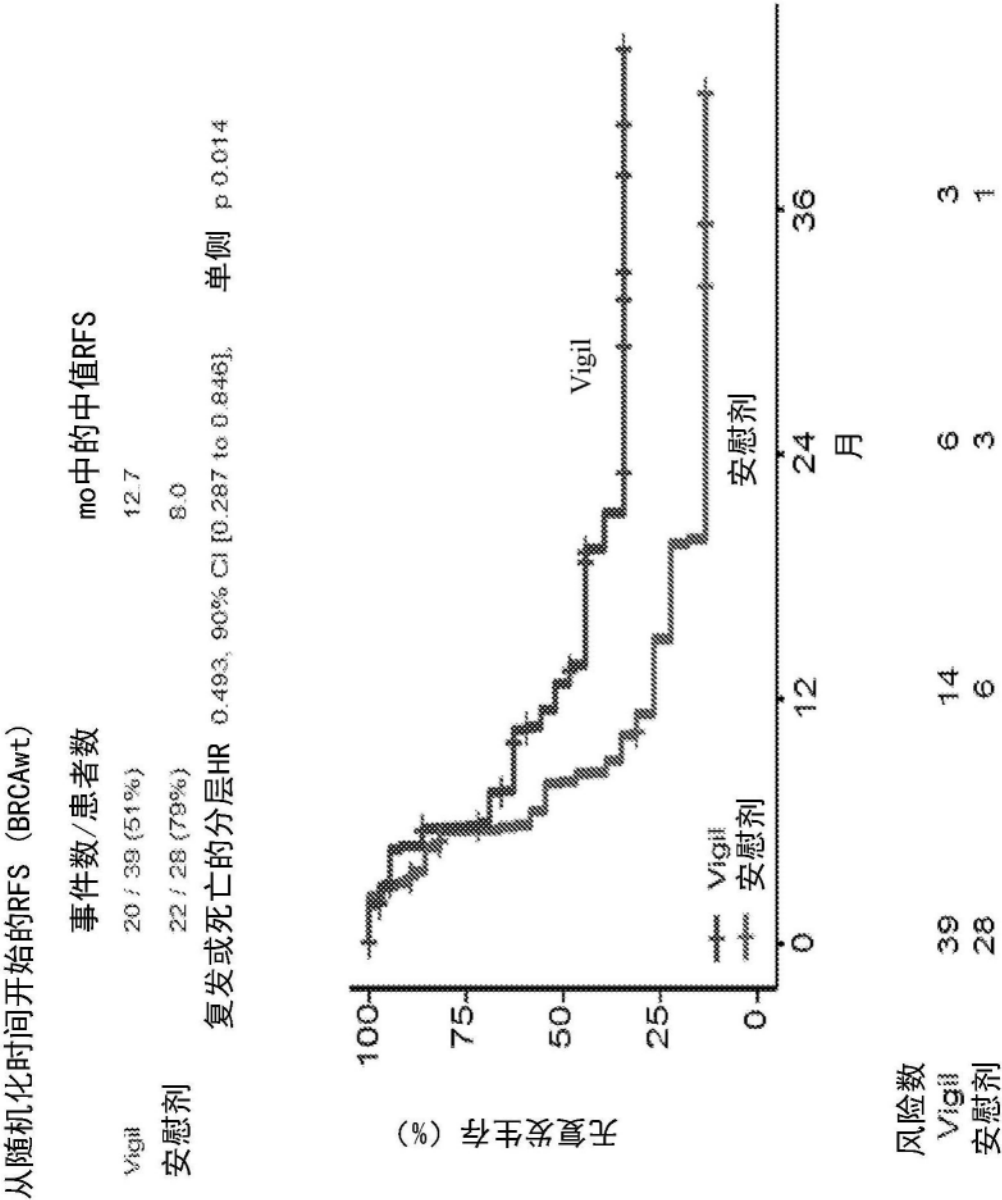


图6C

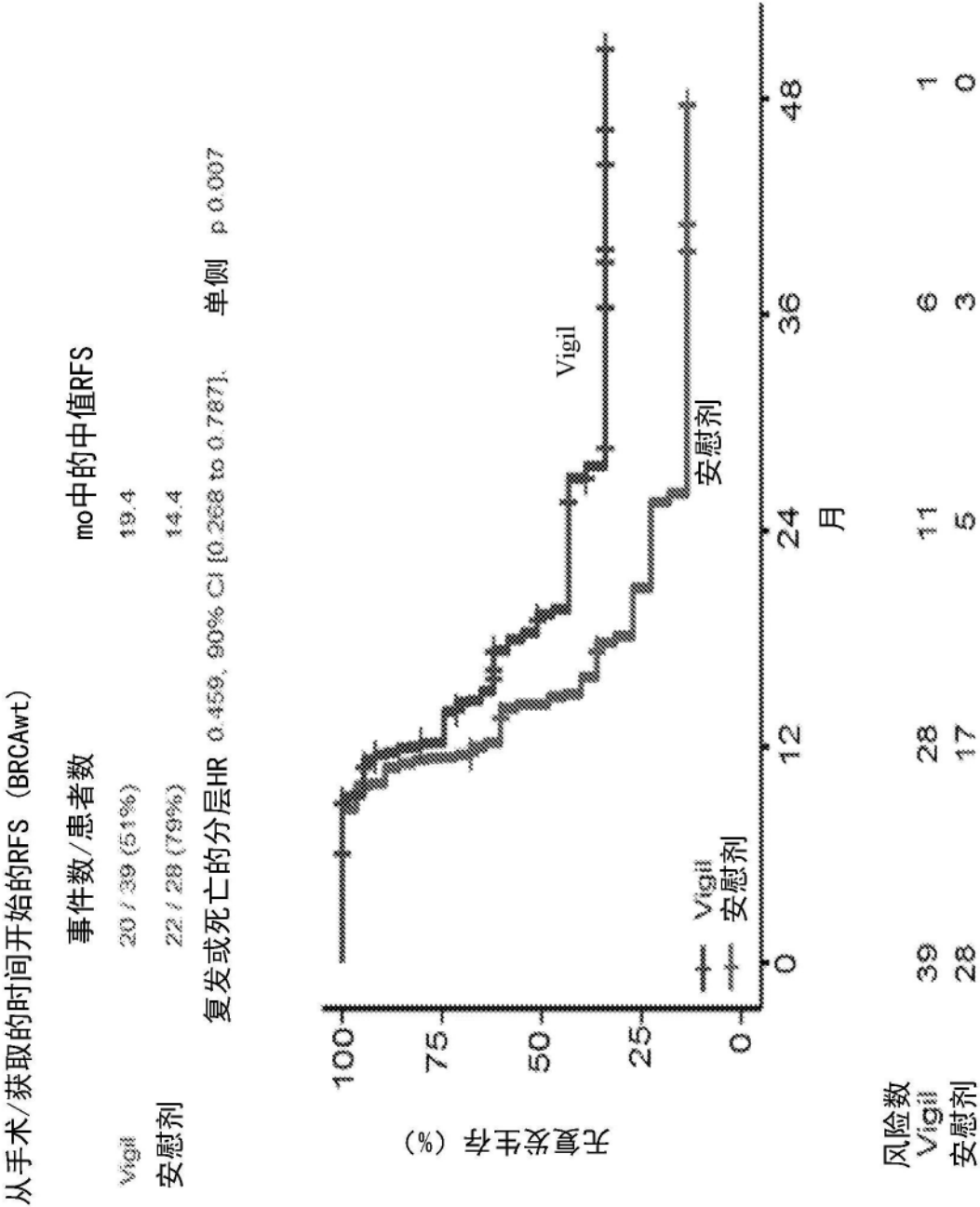


图6D

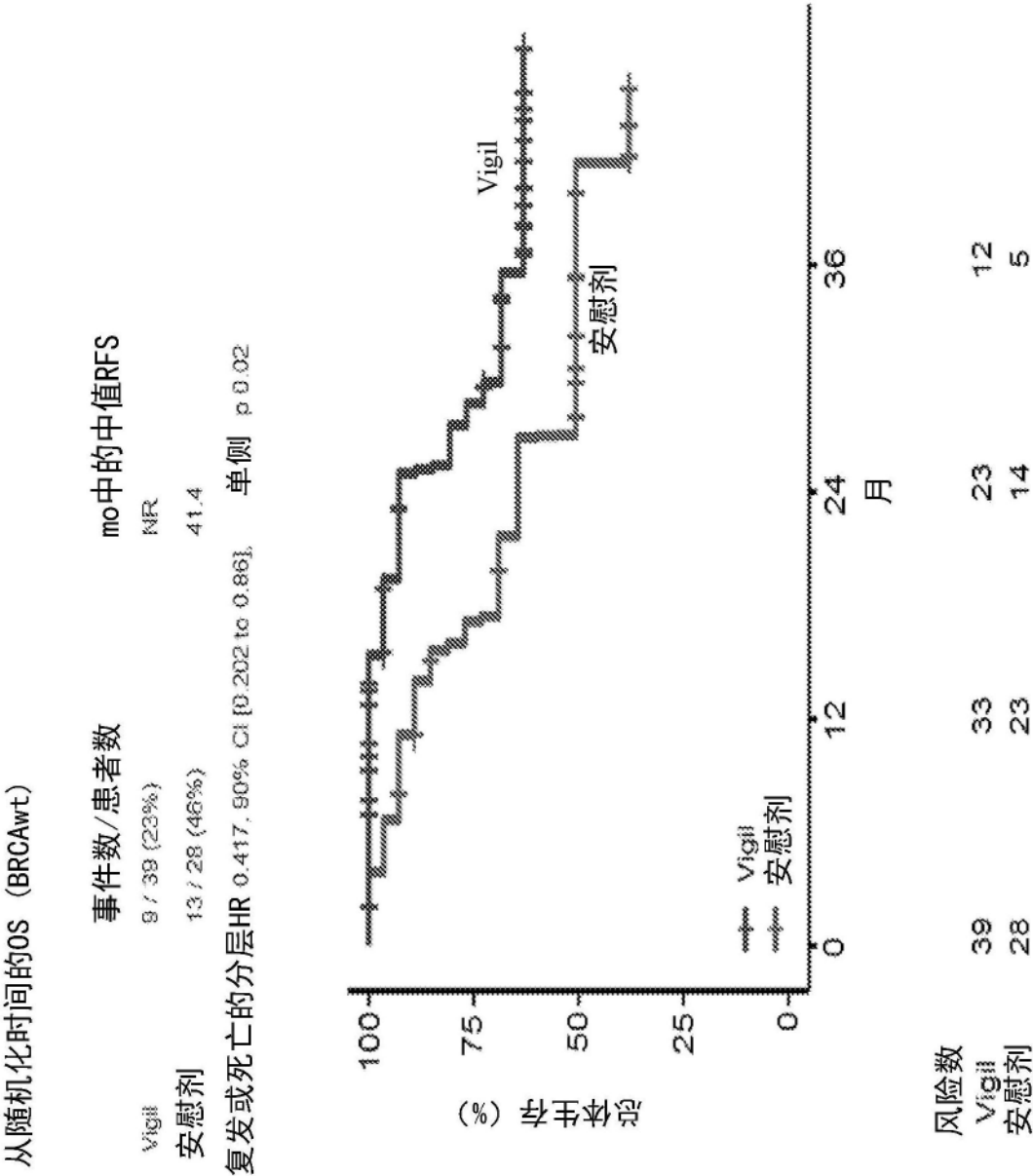


图6E

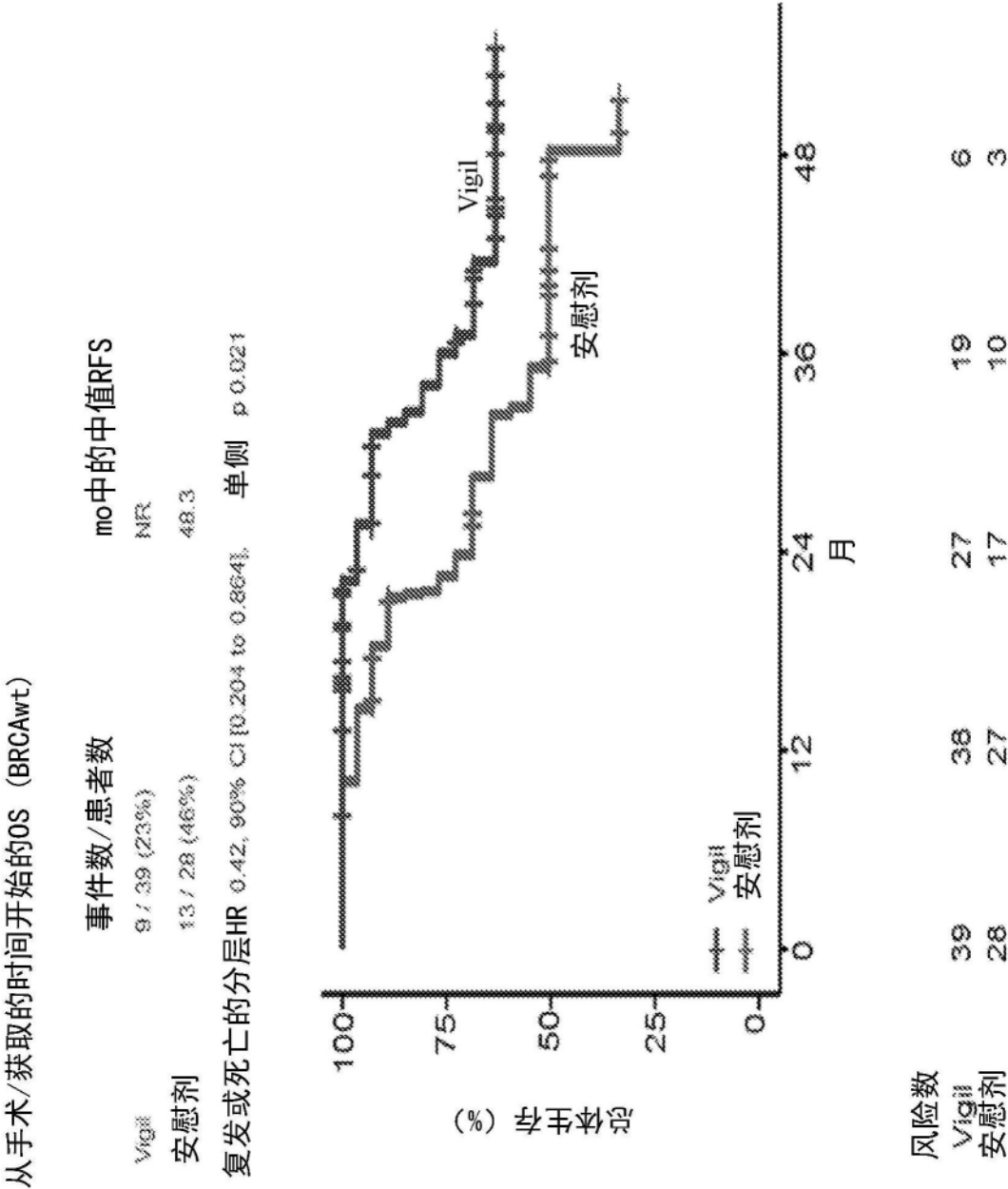


图6F

森林图 (PP群体, 从随机化开始的RFS; 分层的)

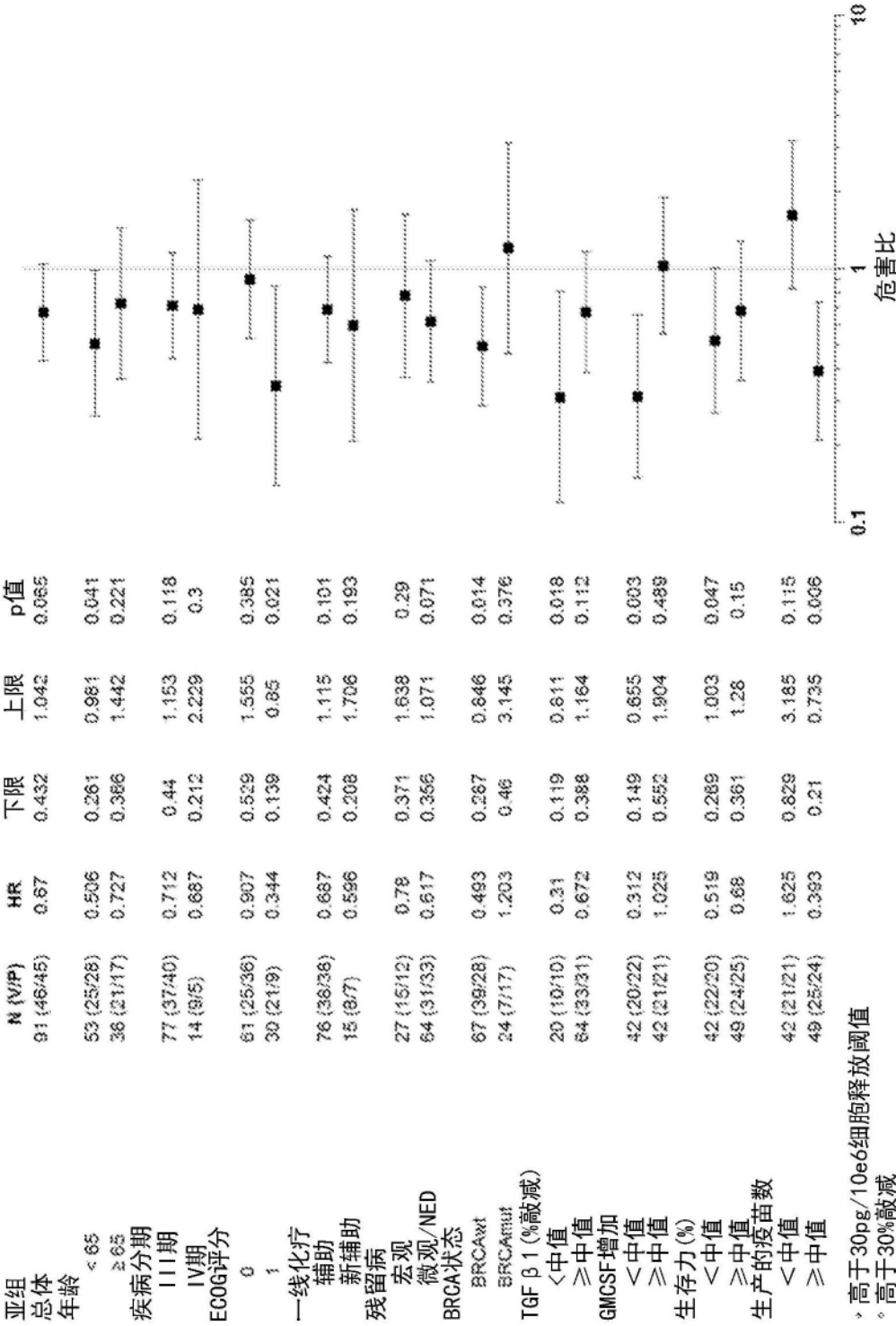


图7A

森林图 (BRCAwt群体, 从随机化开始的RFS, 分层)

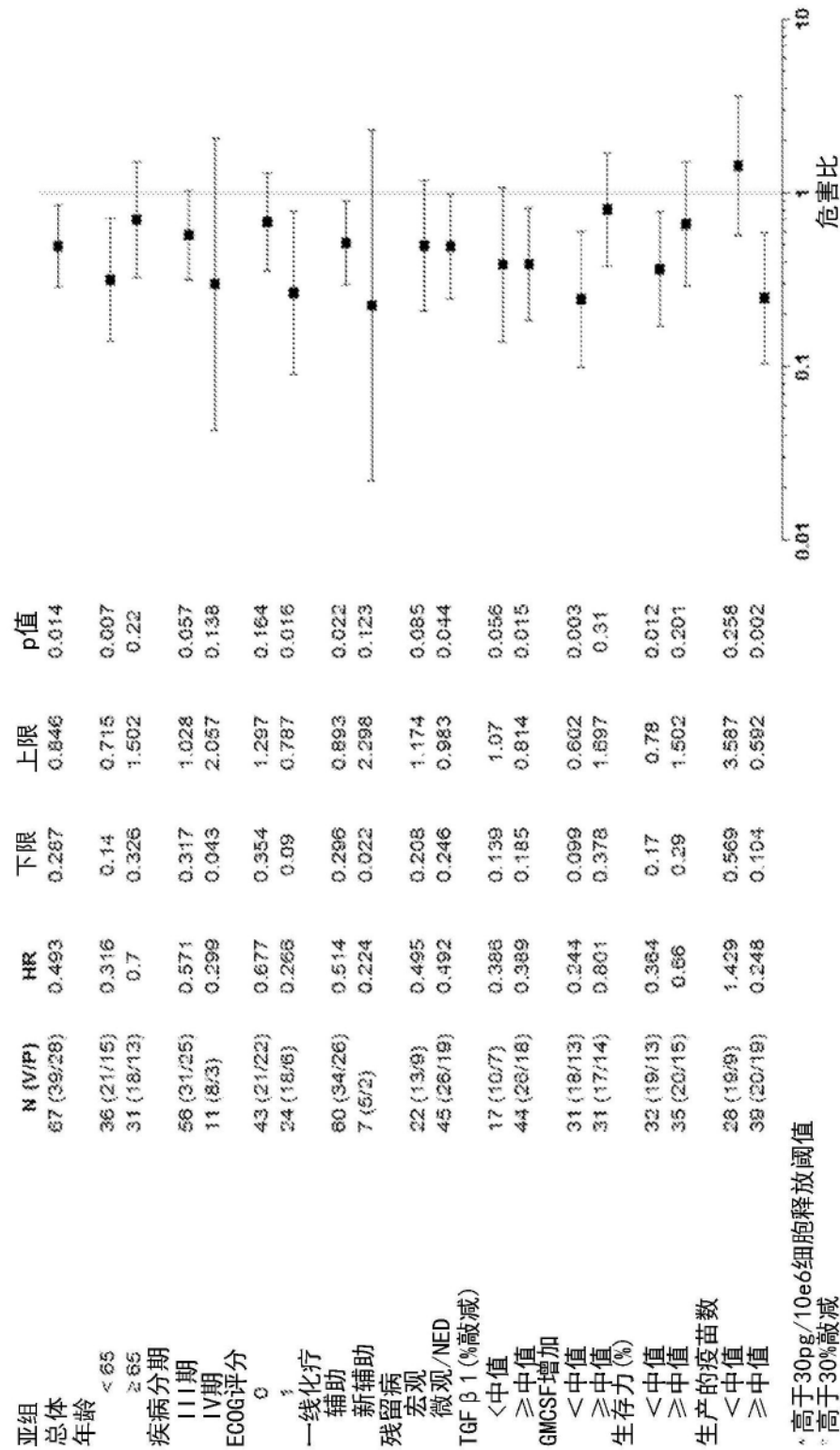


图7B

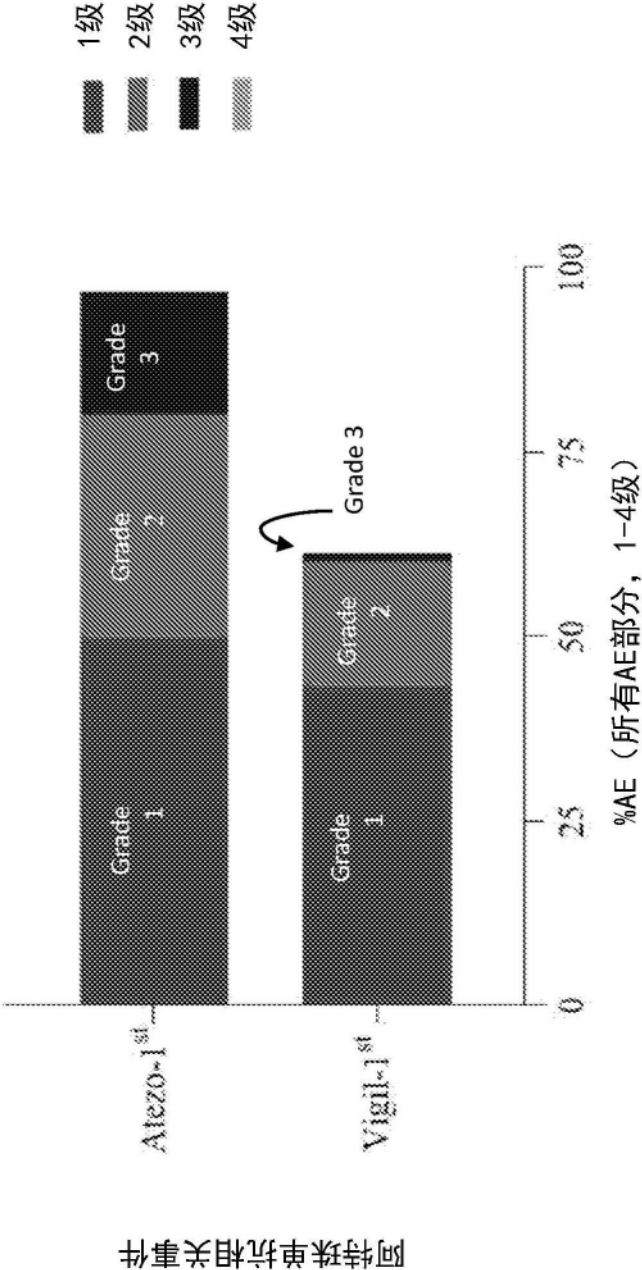


图8

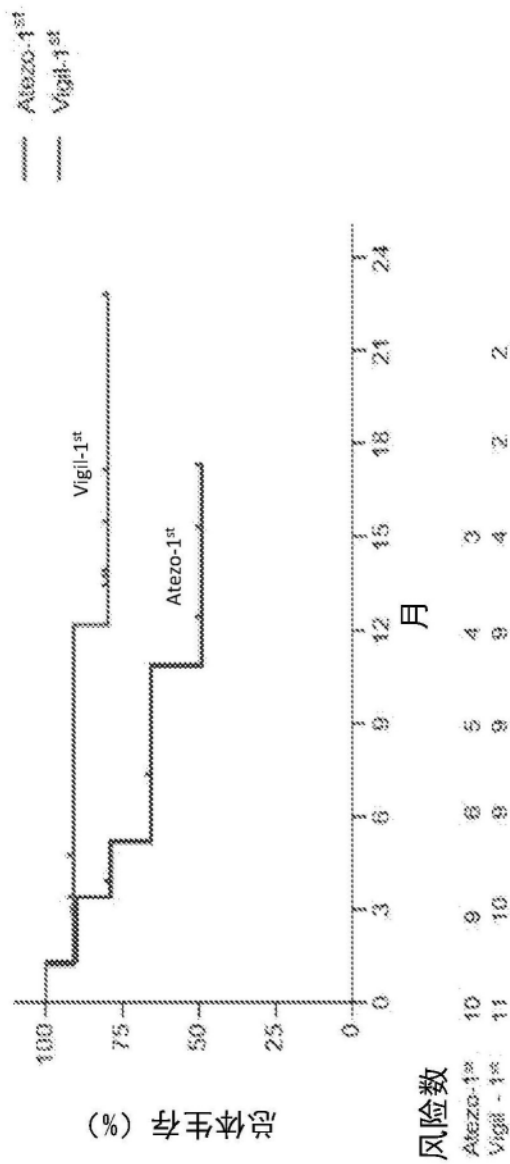


图9A

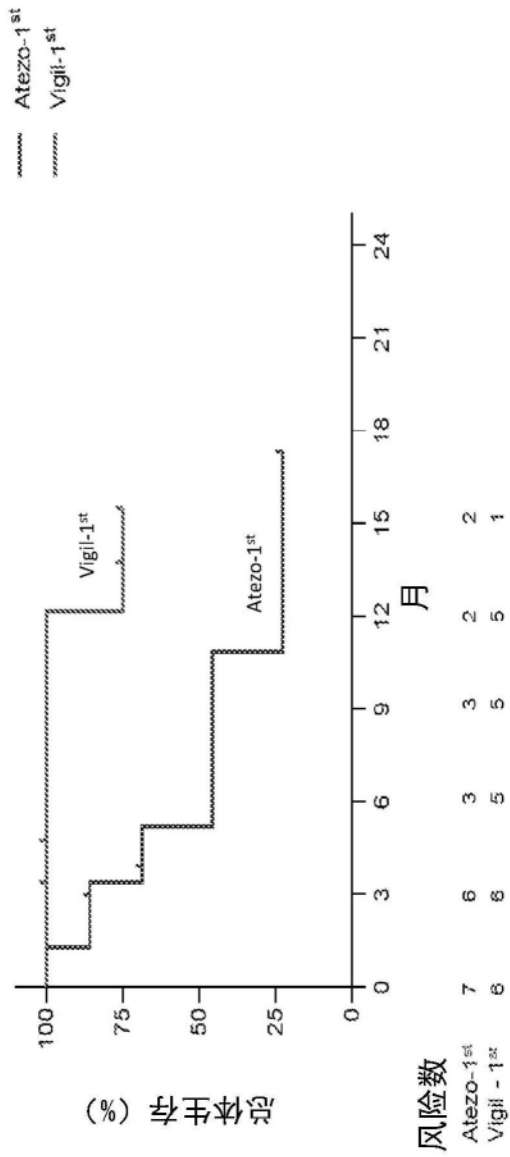


图9B

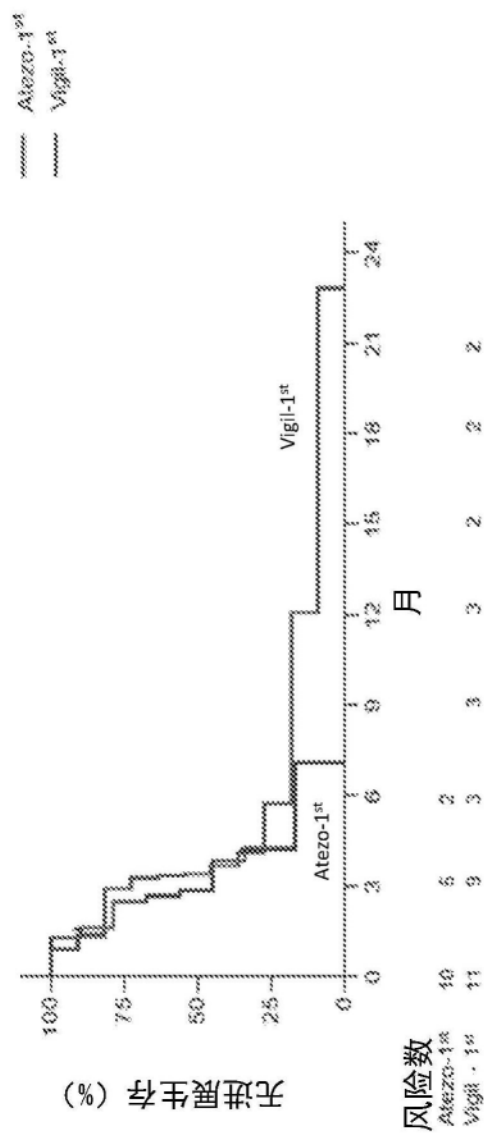


图9C

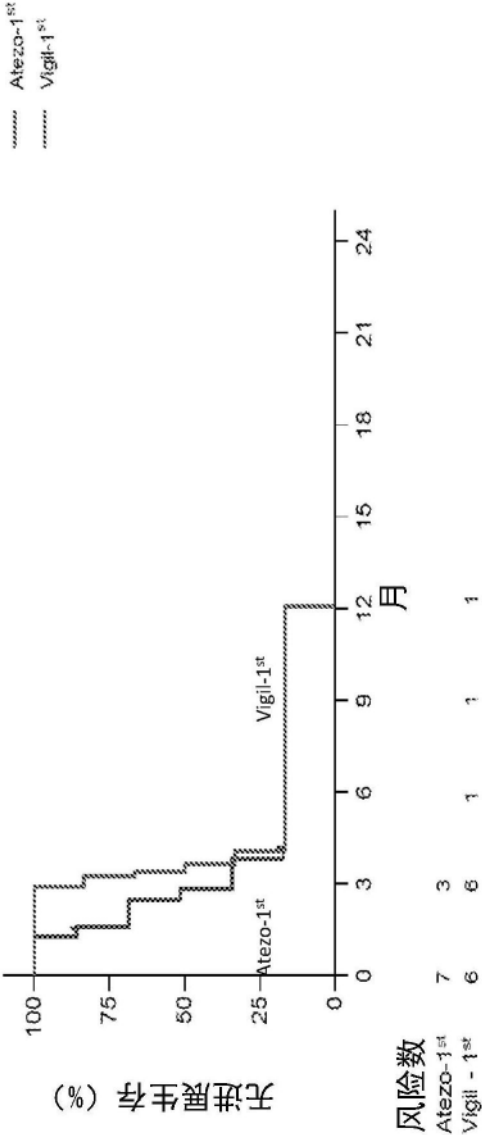


图9D

BRCA1/2wt群体中从手术/获取的时间开始的RFS

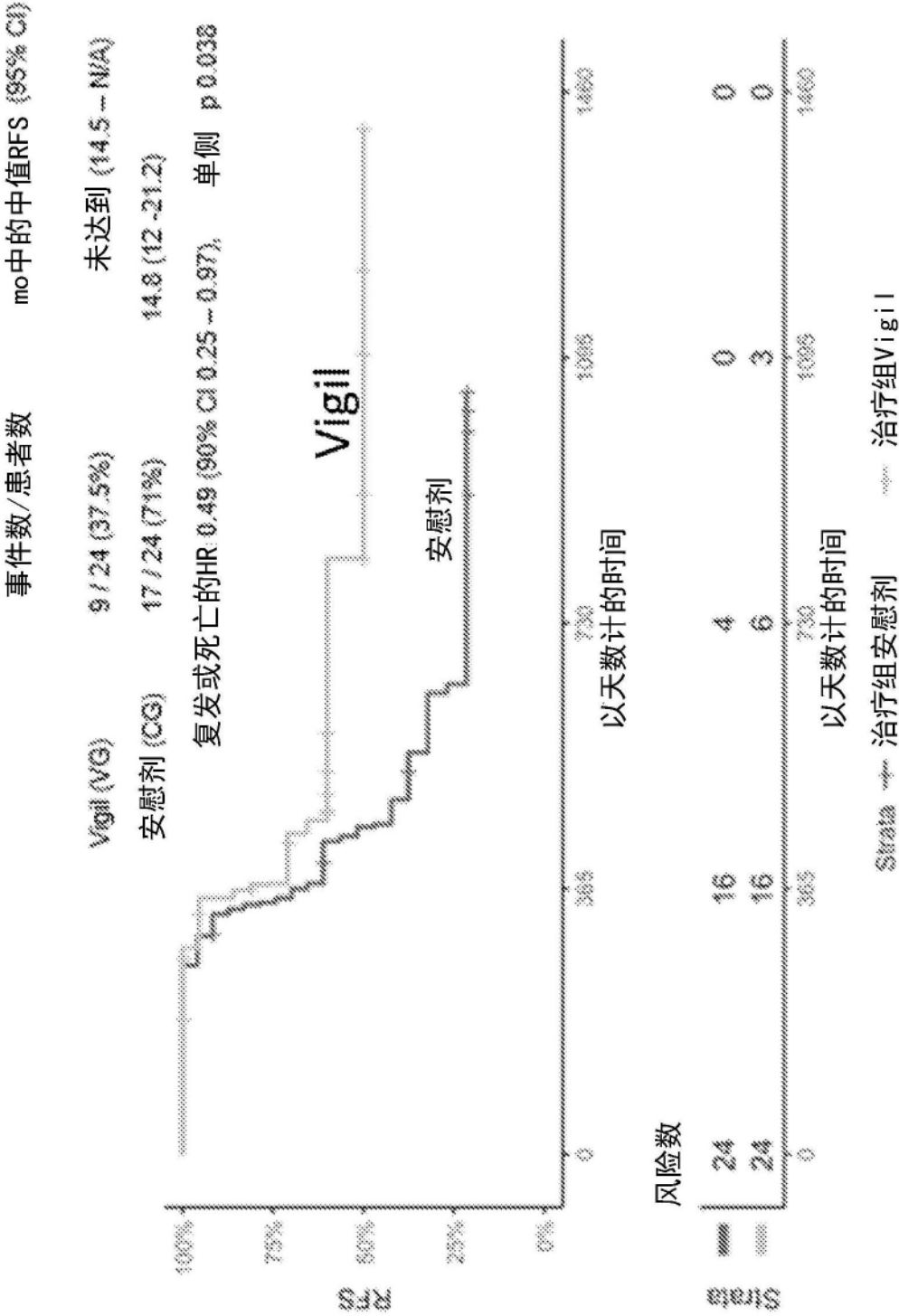


图10A

BRCA1/2wt群体中从随机化时间开始的RFS

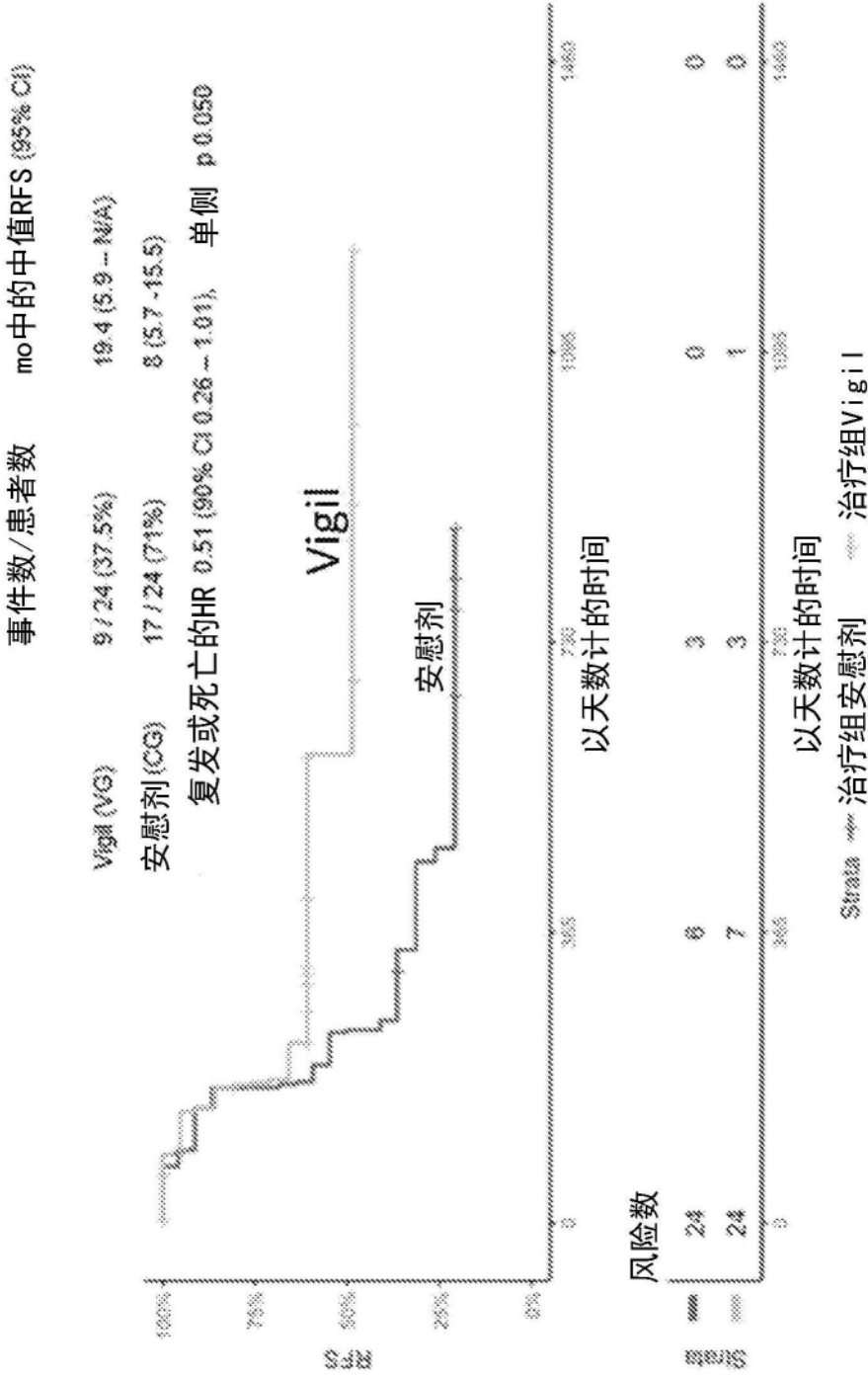


图10B

91名0vc患者中从手术/获取的时间开始的RFS

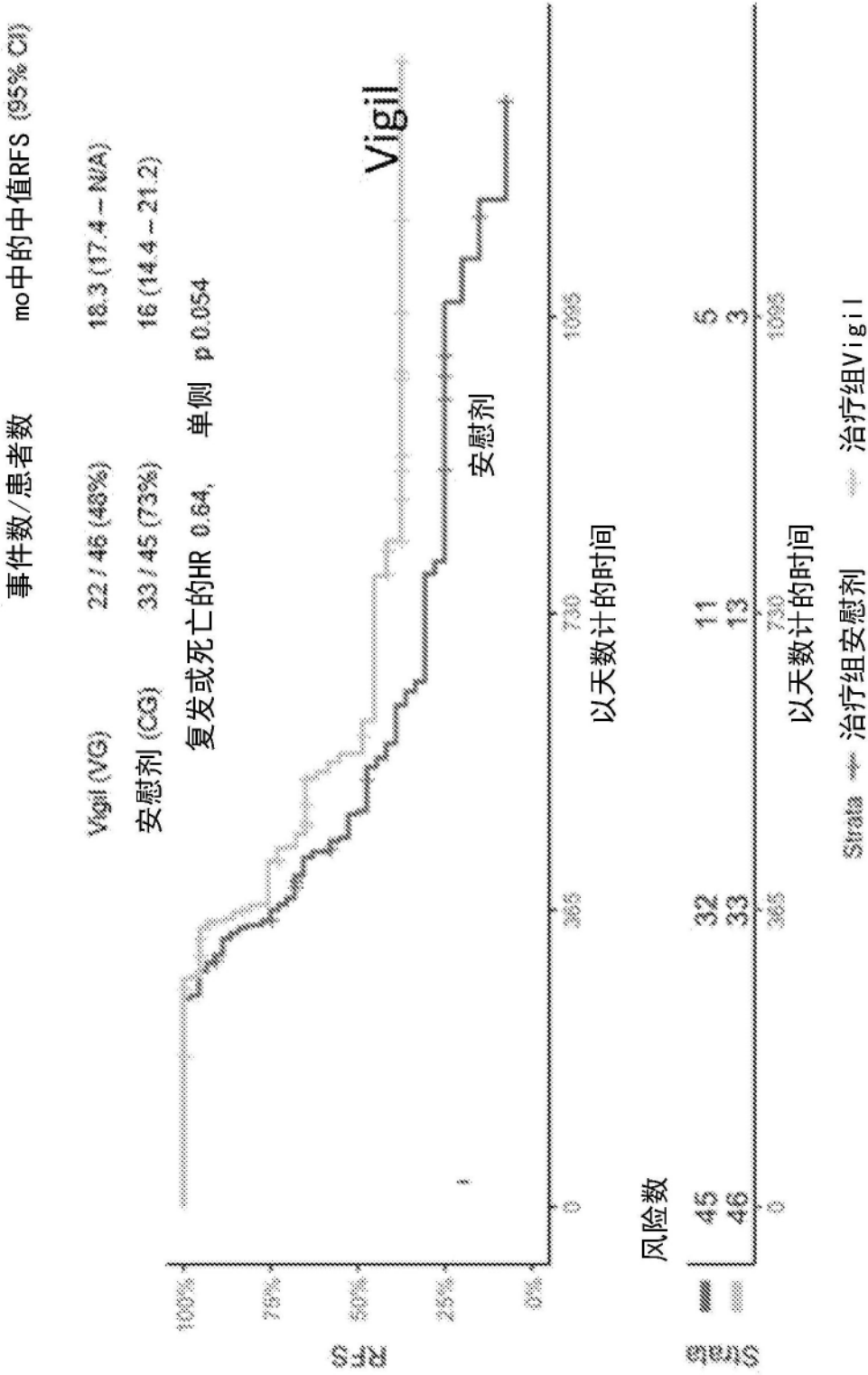


图10C

91名0vc患者中从随机化时间开始的RFS

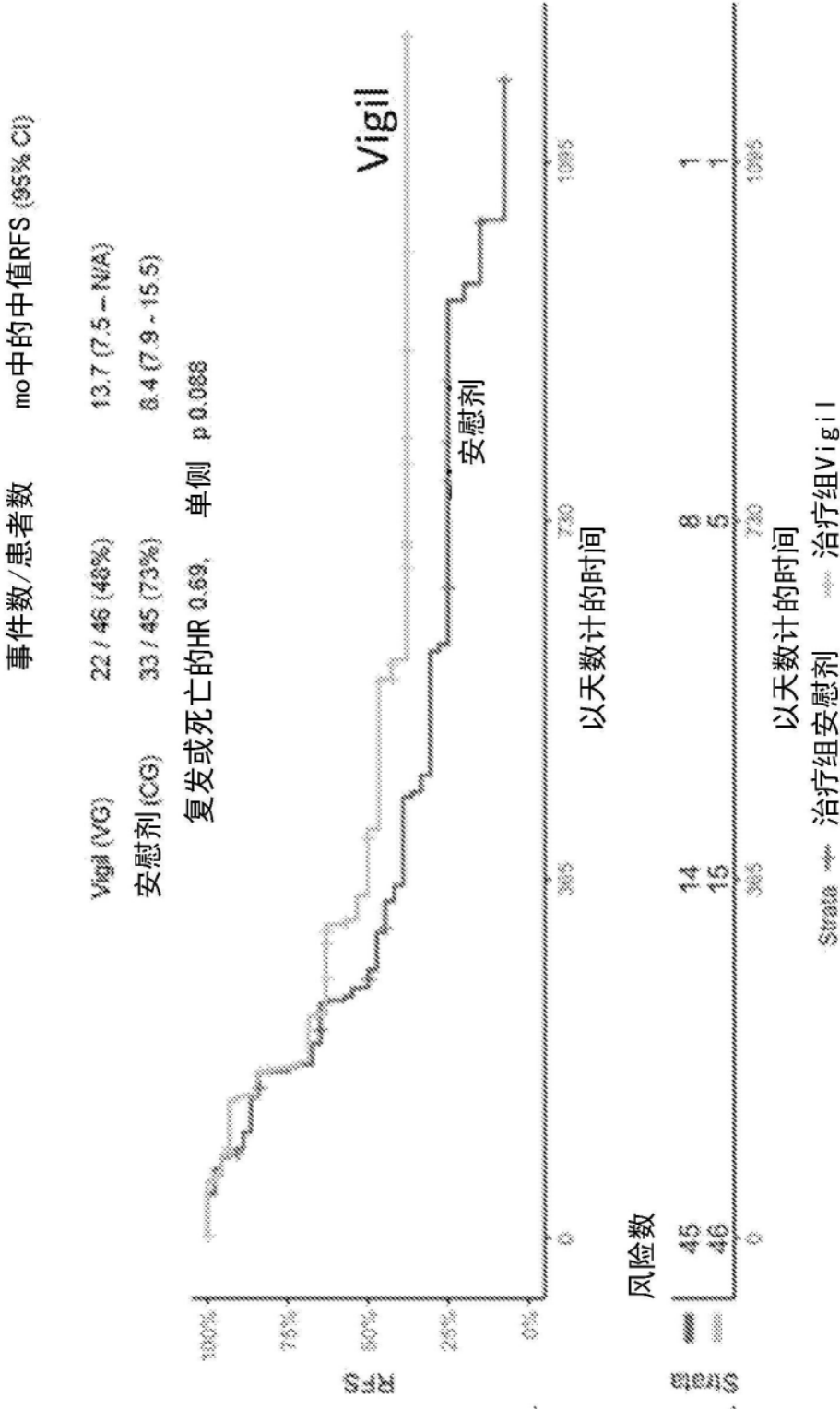


图10D

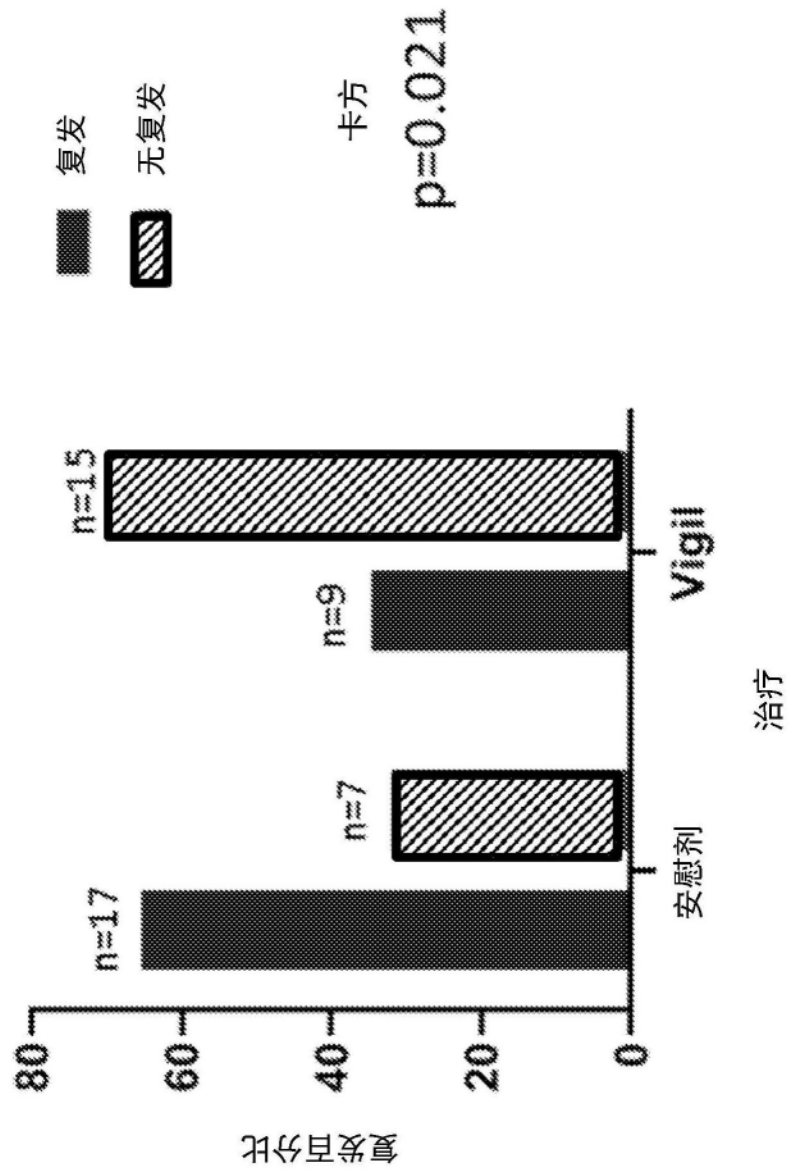


图11A

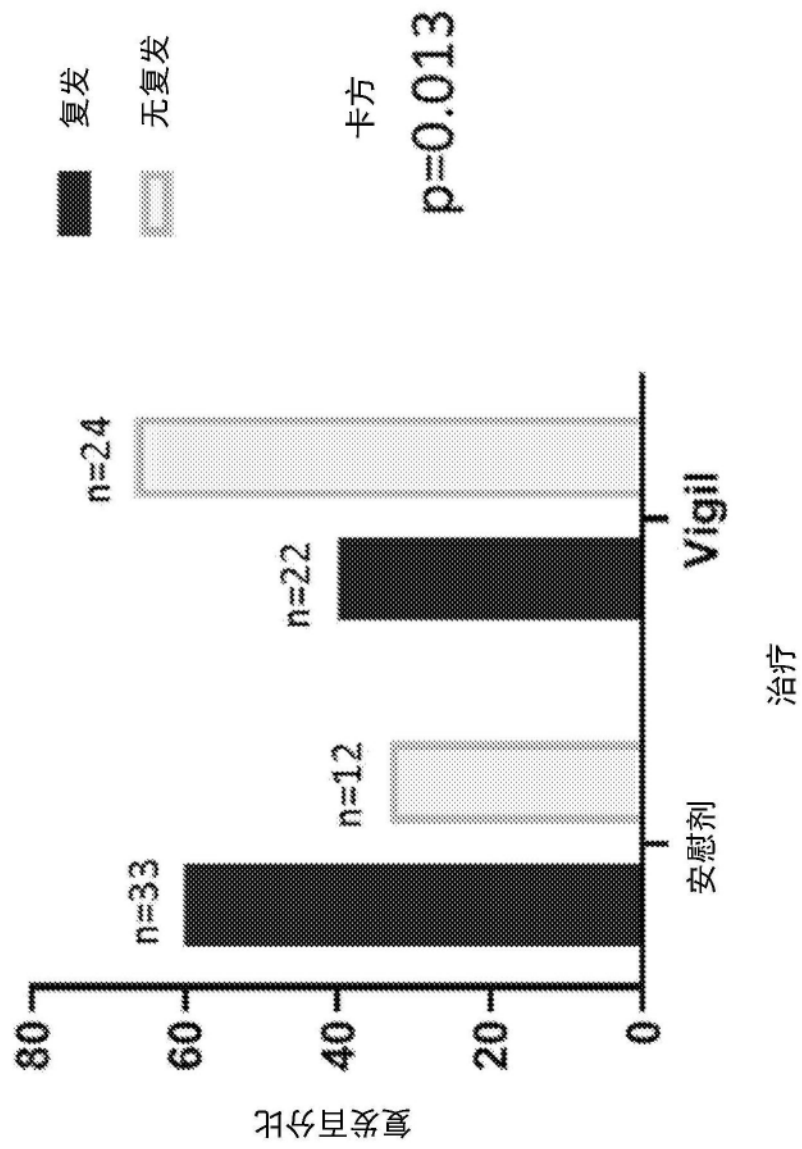


图11B

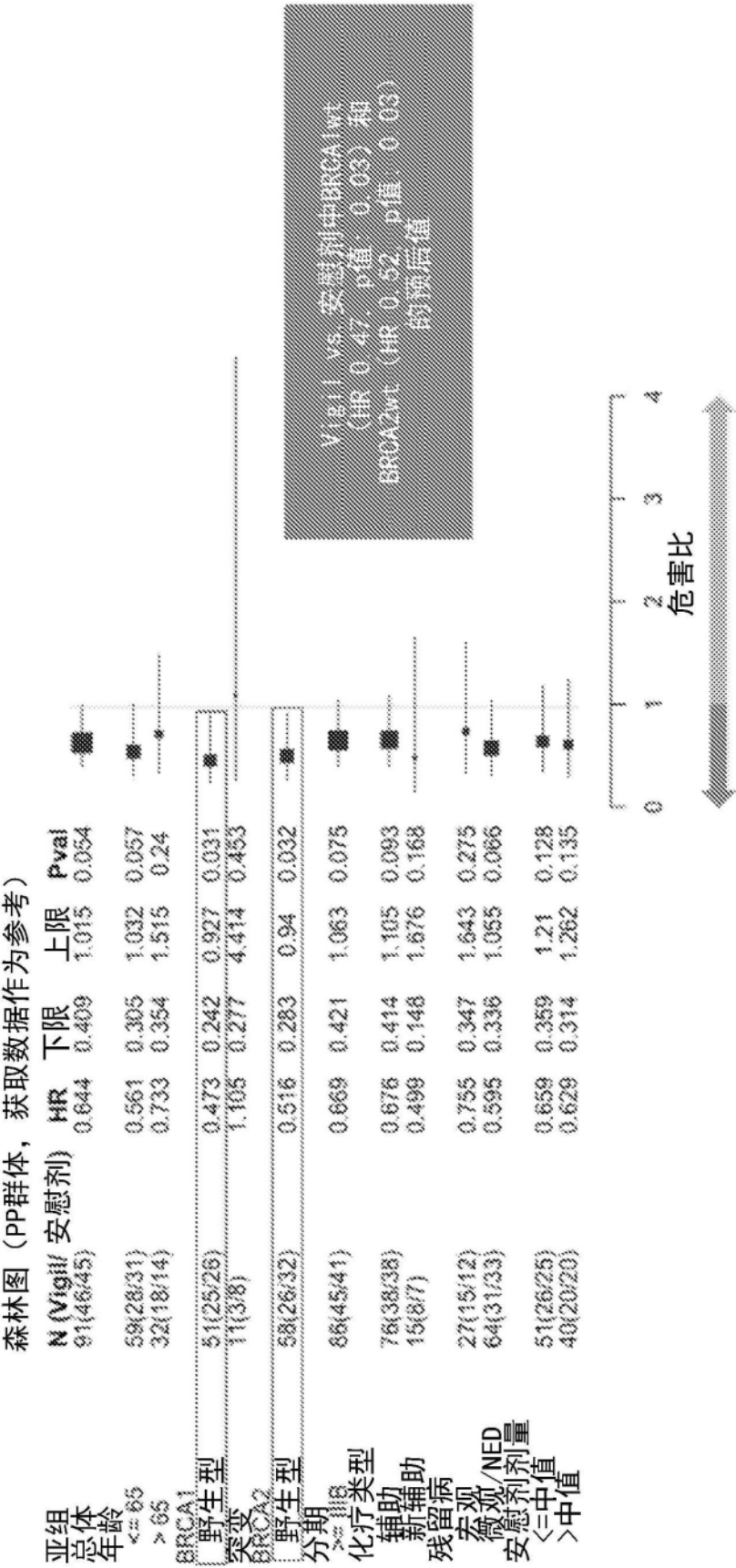


图12

治疗组	BRCA 突变状态	HRD 状态	N
Vigil	BRCAwt	阴性	25
		阳性	14
	BRCAmut	阳性	7
安慰剂	BRCAwt	阴性	18
		阳性	8
	BRCAwt	未知 [*]	2 [*]
		阳性	17
	BRCAmut	阳性	

^{*} 准备中

图13

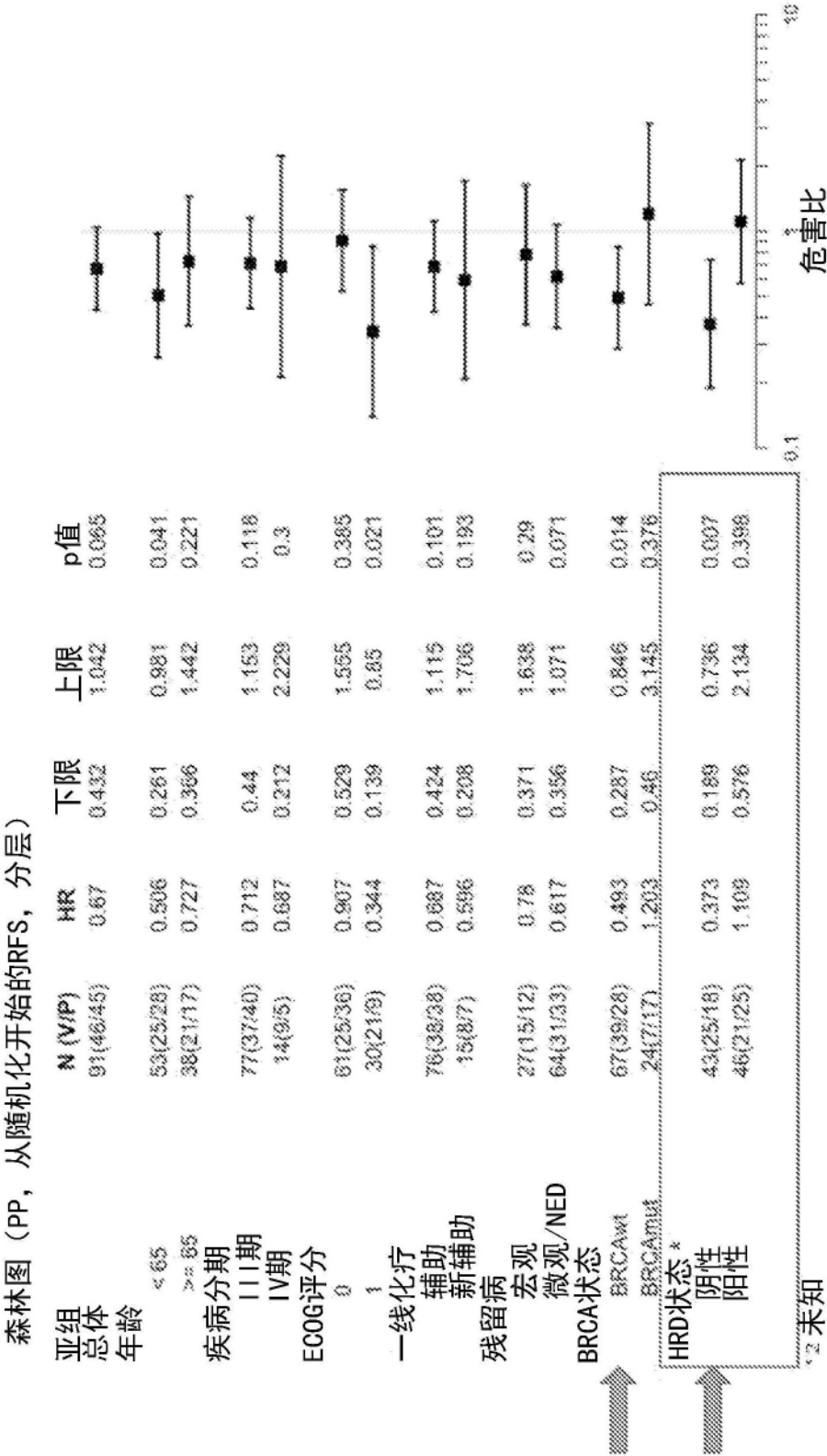


图14

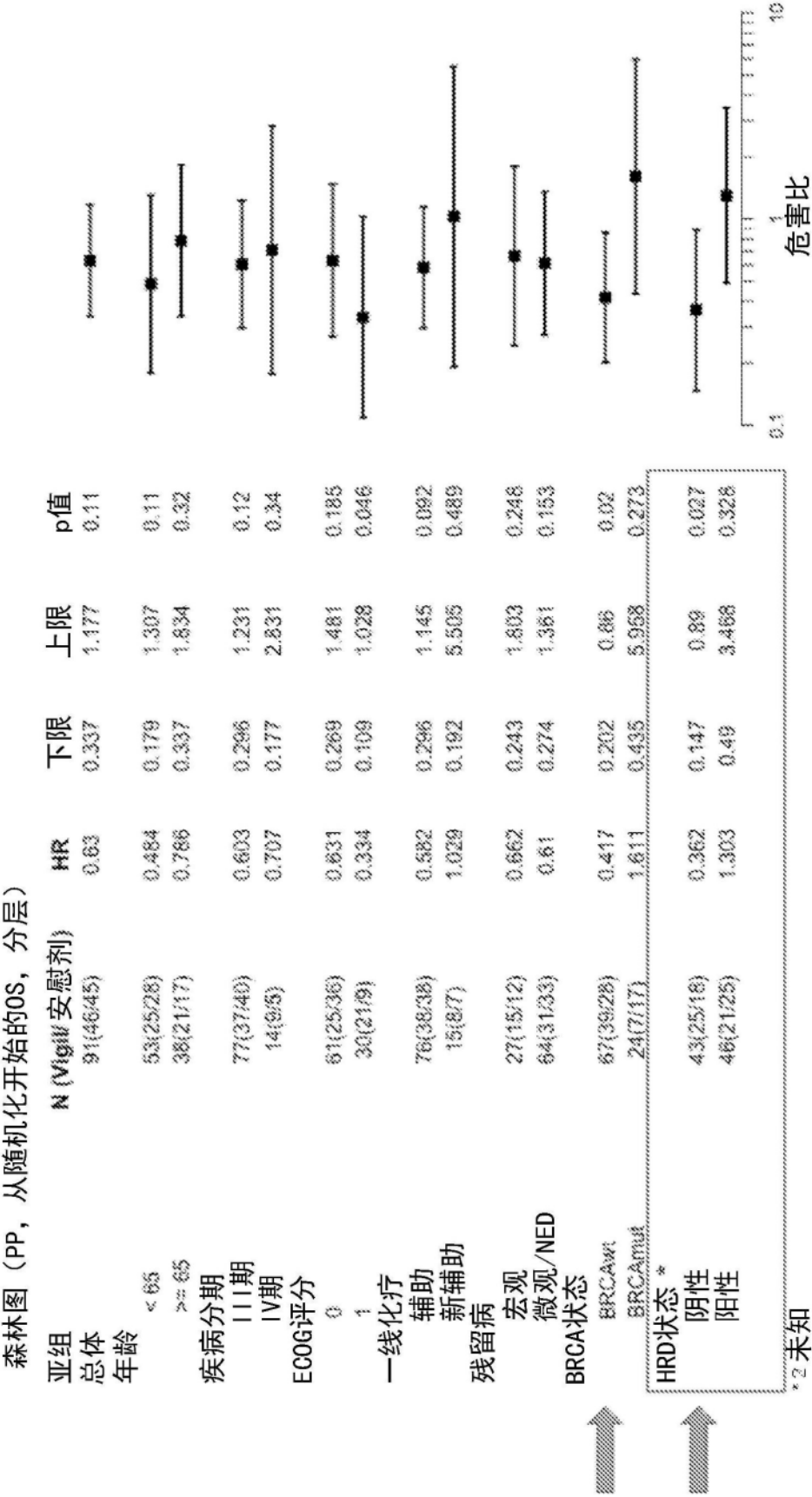


图15

治疗组	BRCA 突变状态	HRD 状态	N
Vigil	BRCAwt	阴性	25
		阳性	14
安慰剂	BRCAwt	阴性	18
		阳性	8
		未知 *	2*

* 准备中

图16

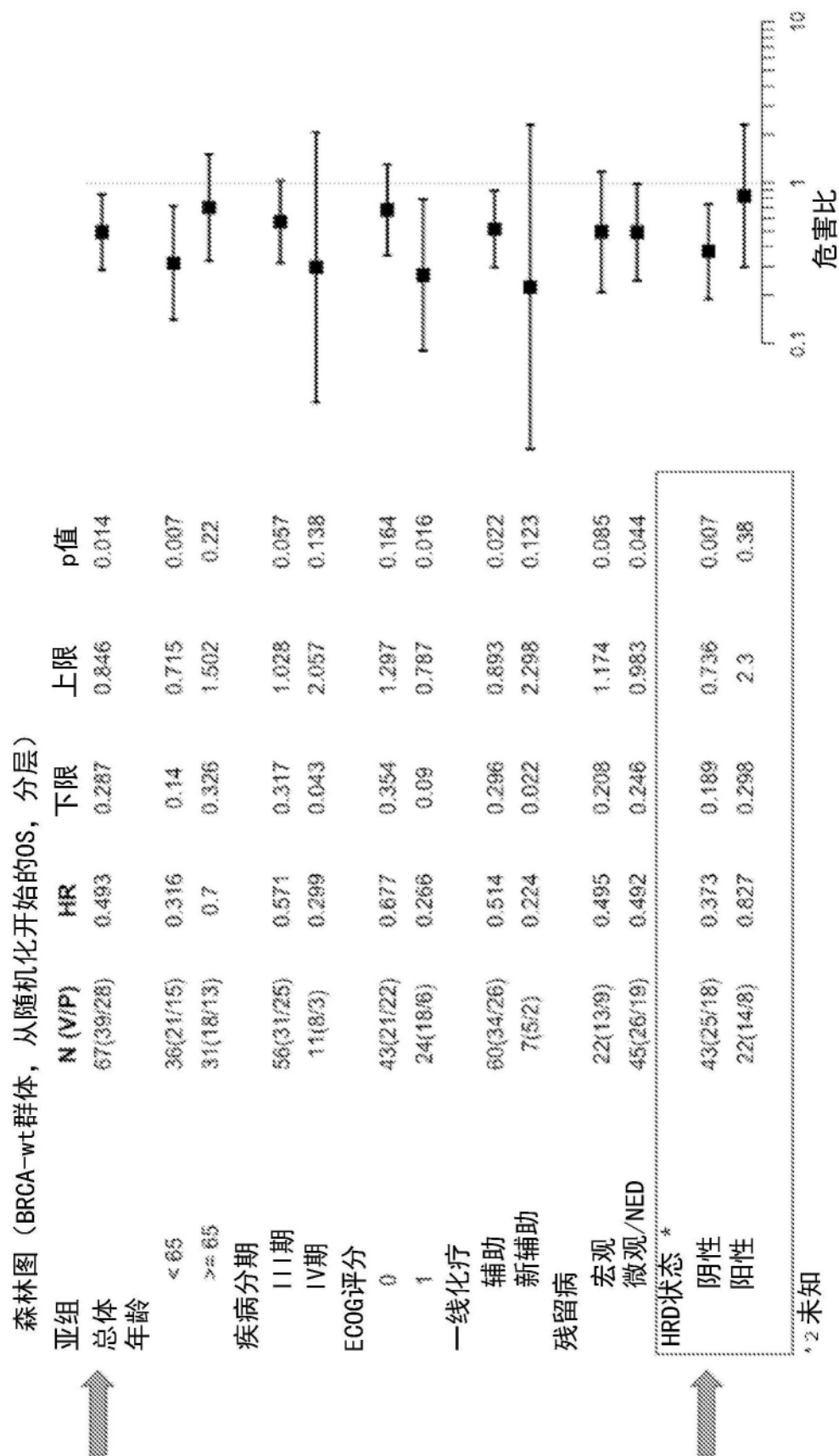


图17

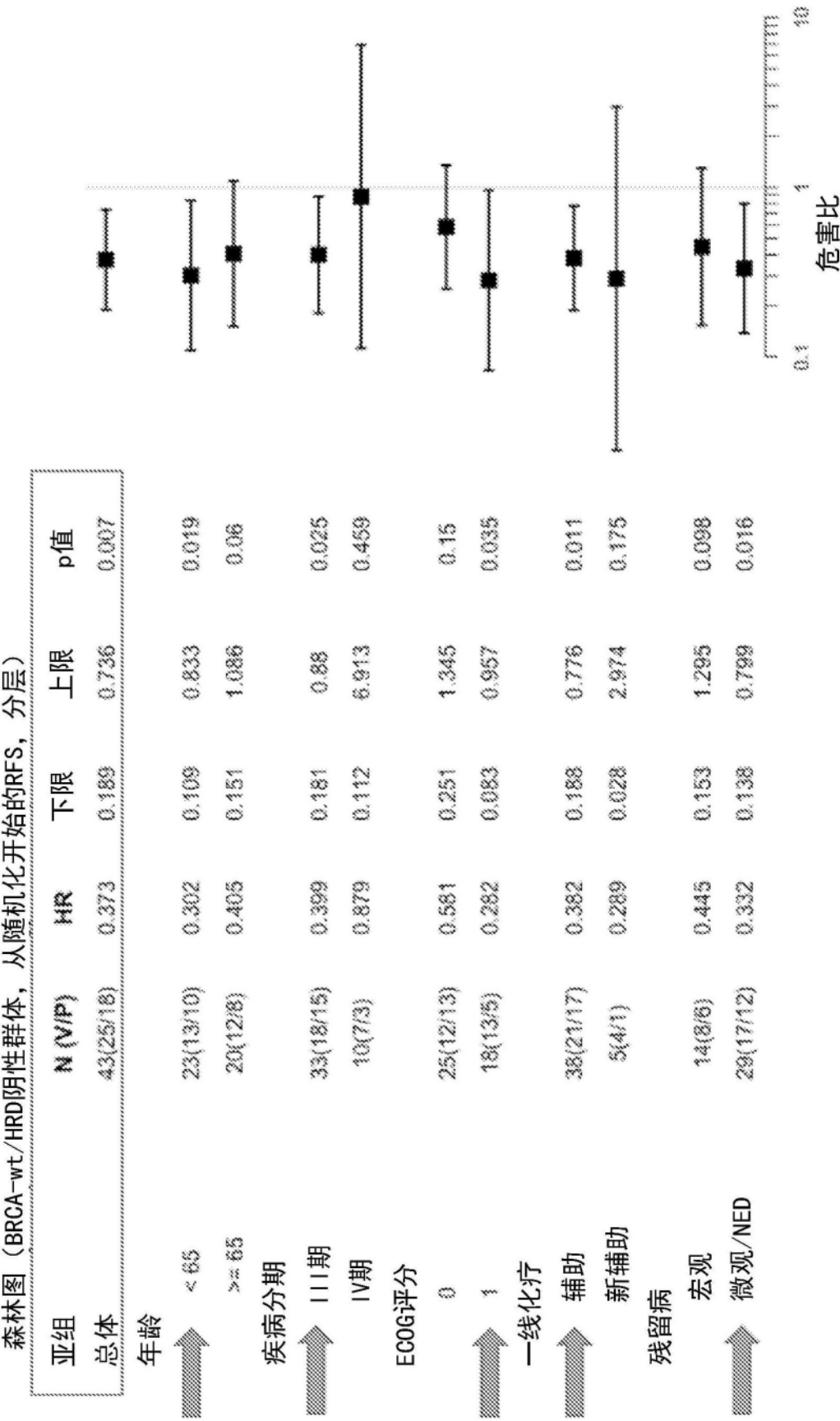


图18

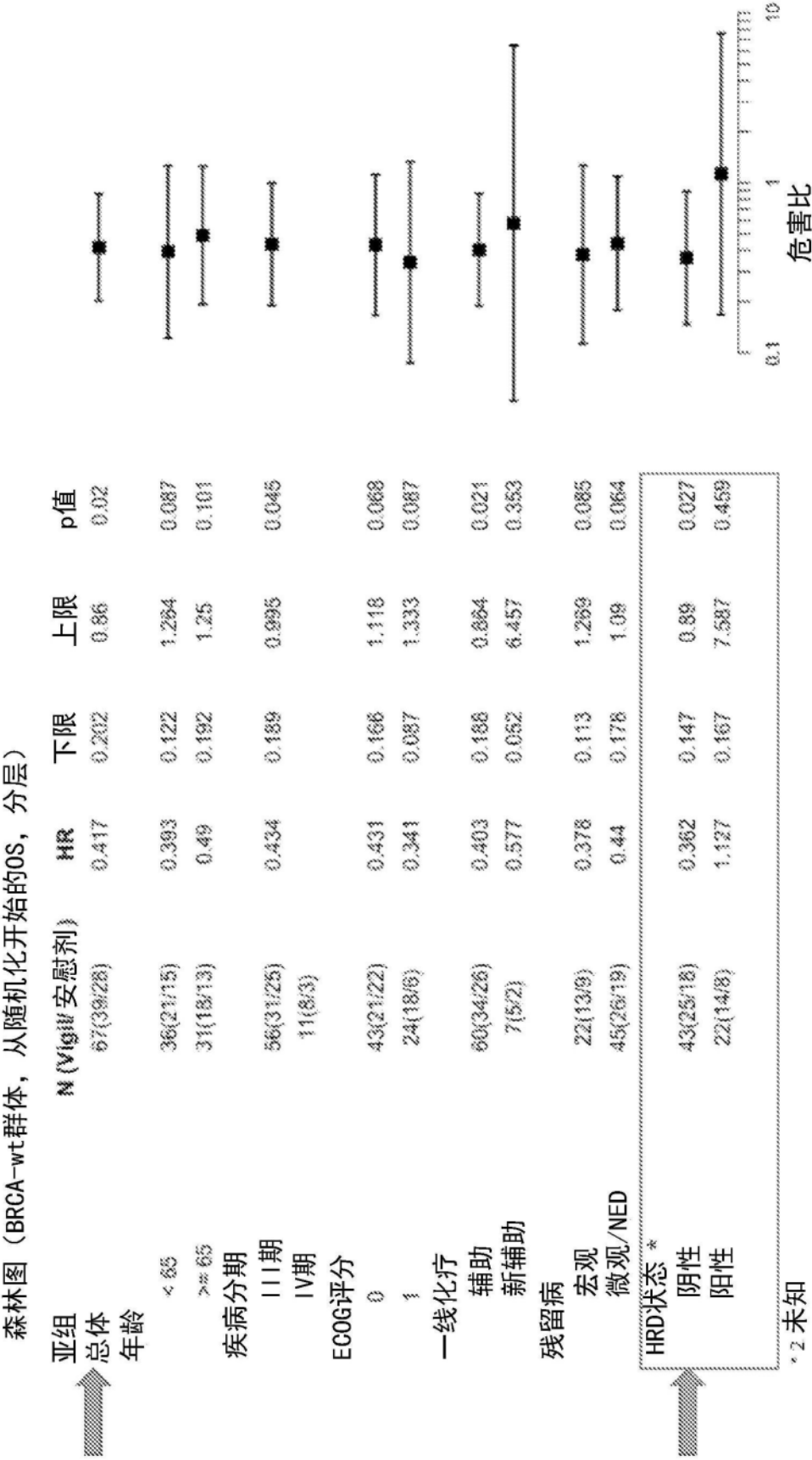


图19

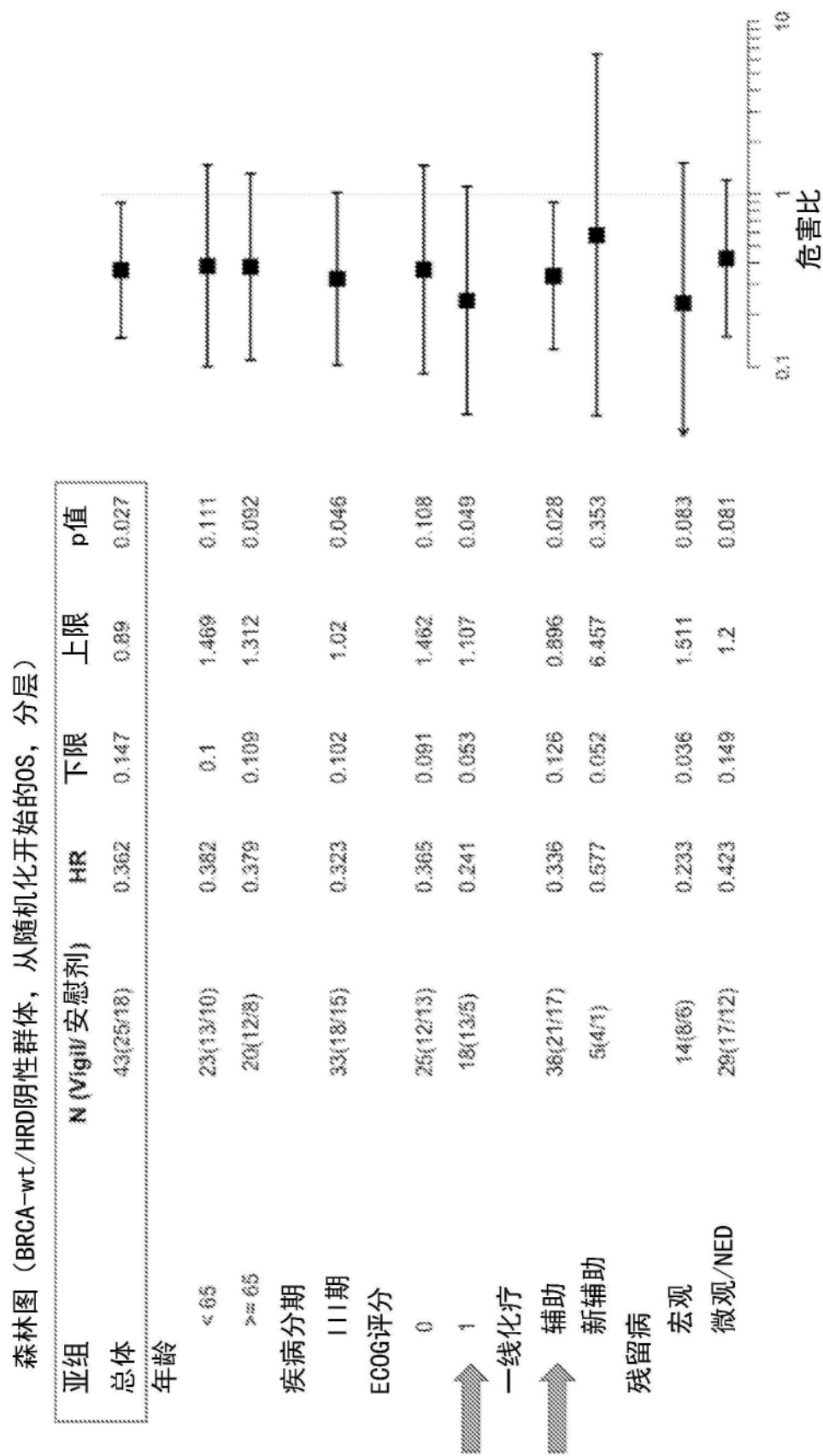
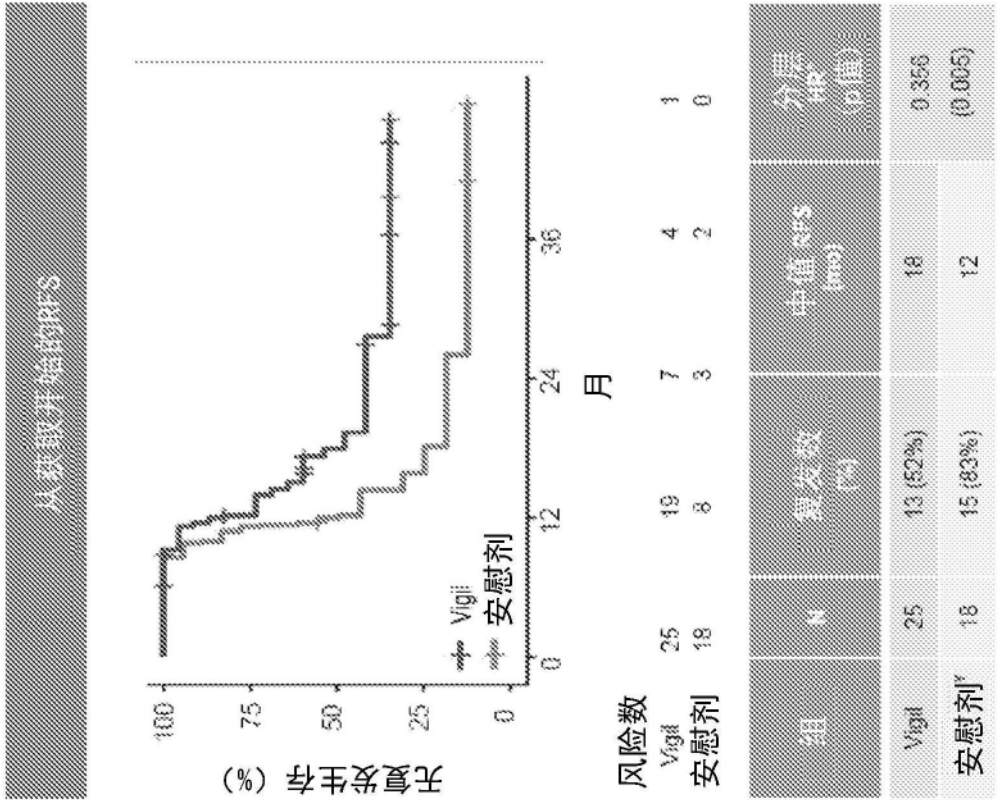
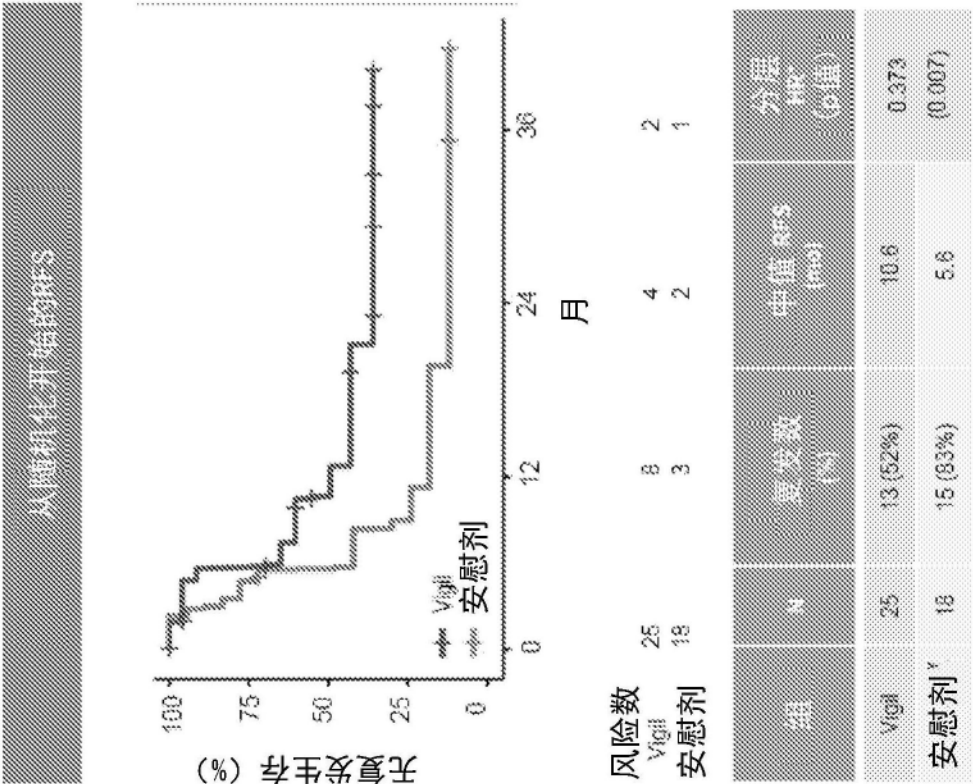


图20



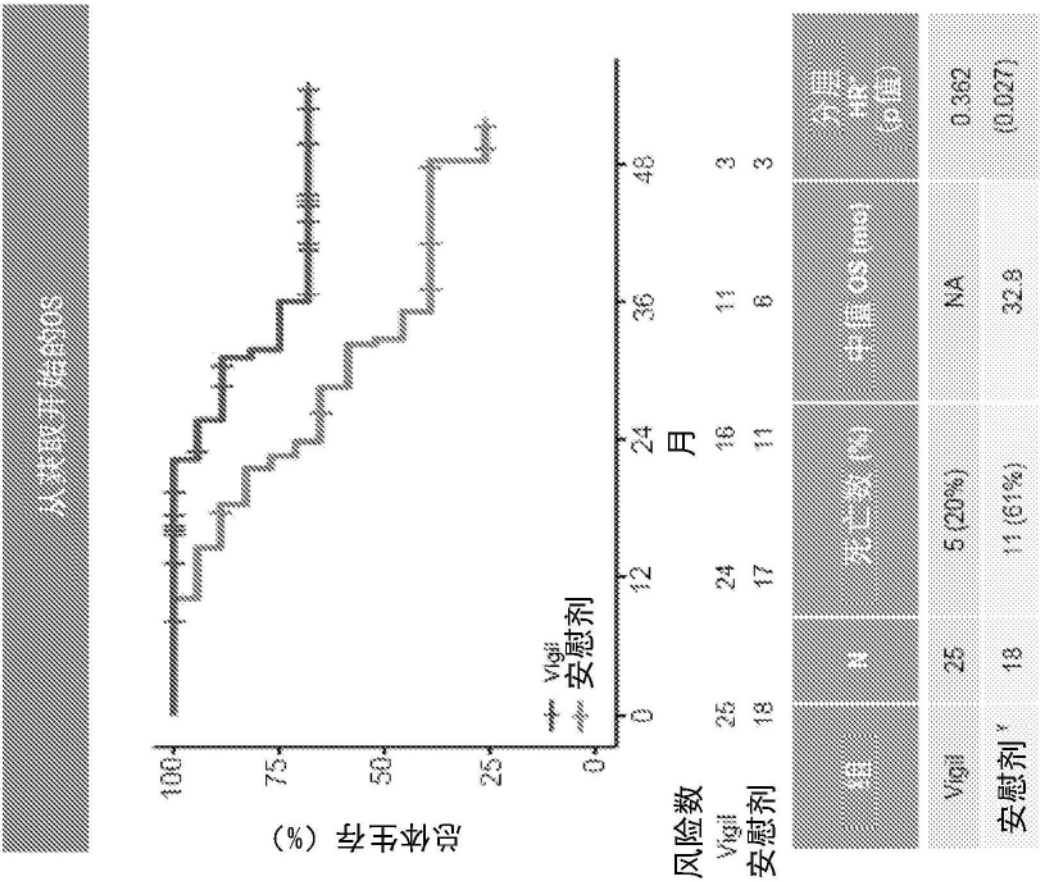
*从获取开始通过随机因子分层，HR=0.0356, 90% CI [0.018-0.703]，
从随机化开始通过随机因子分层，HR=0.373, 90% CI [0.189-0.736]，
分层因子：手术结果（CR/微观vs宏观）
一线化疗（辅助vs新辅助）

图21



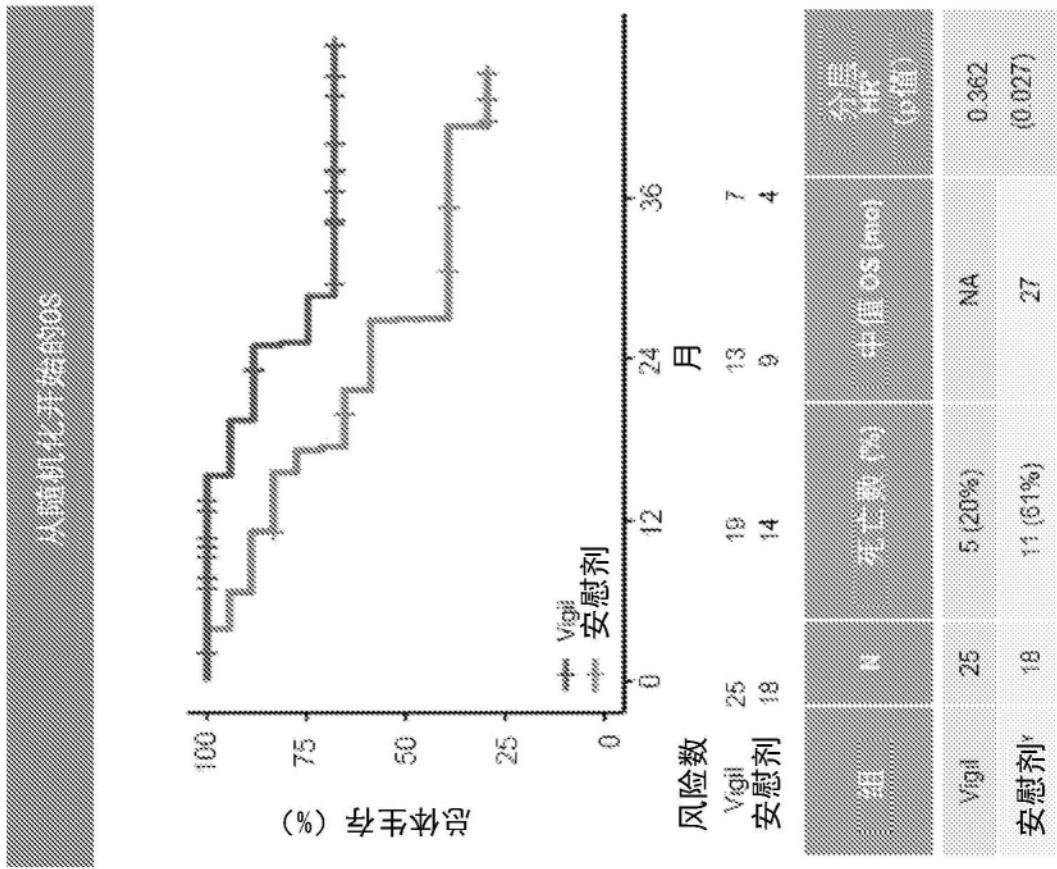
*从获取开始通过随机因子分层, HR=0.0356, 90% CI [0.018-0.703],
从随机化开始通过随机因子分层, HR=0.373, 90% CI [0.189-0.736],
分层因子: 手术结果 (CR/微观vs宏观)
一线化疗 (辅助vs新辅助)

图22



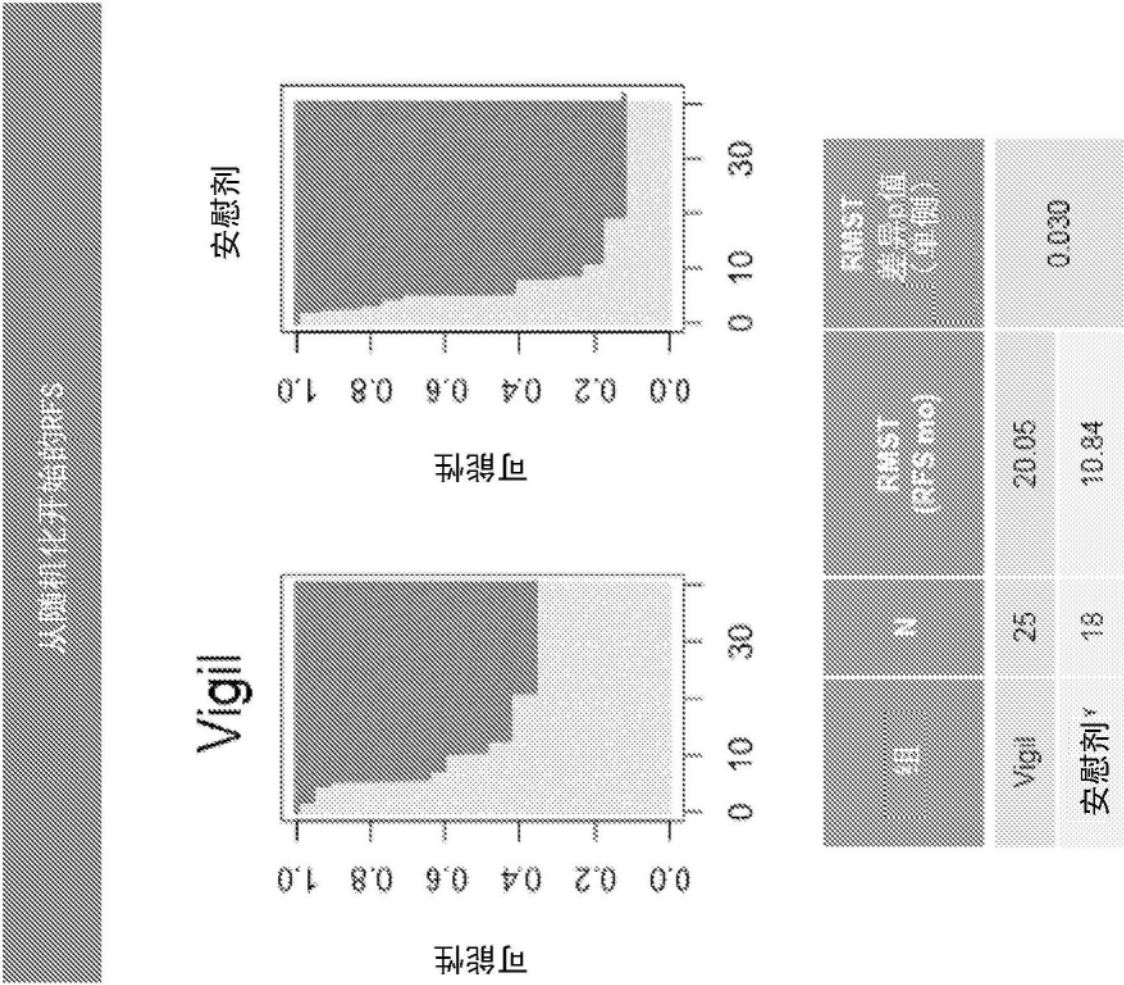
*从手术/获取的时间开始通过随机因子对BRCA-wt进行分层, 0.362 90% CI [0.147-0.89],
从随机化的时间开始通过随机因子对BRCA1/2-wt进行分层, HR=0.362, 90% CI [0.147-0.89],
分层因子: 手术结果 (CR/微观vs宏观)
一线化疗 (辅助vs新辅助)

图23



*才手术/获取的时间开始通过随机因子对BRCA-wt进行分层, 0.362, 90% CI [0.147-0.89];
从随机化时间开始通过随机因子对BRCA1/2-wt进行分层, HR=0.362, 90% CI [0.147-0.89],
分层因子: 手术结果 (CR/微观vs宏观)
一线化疗 (辅助vs新辅助)

图24



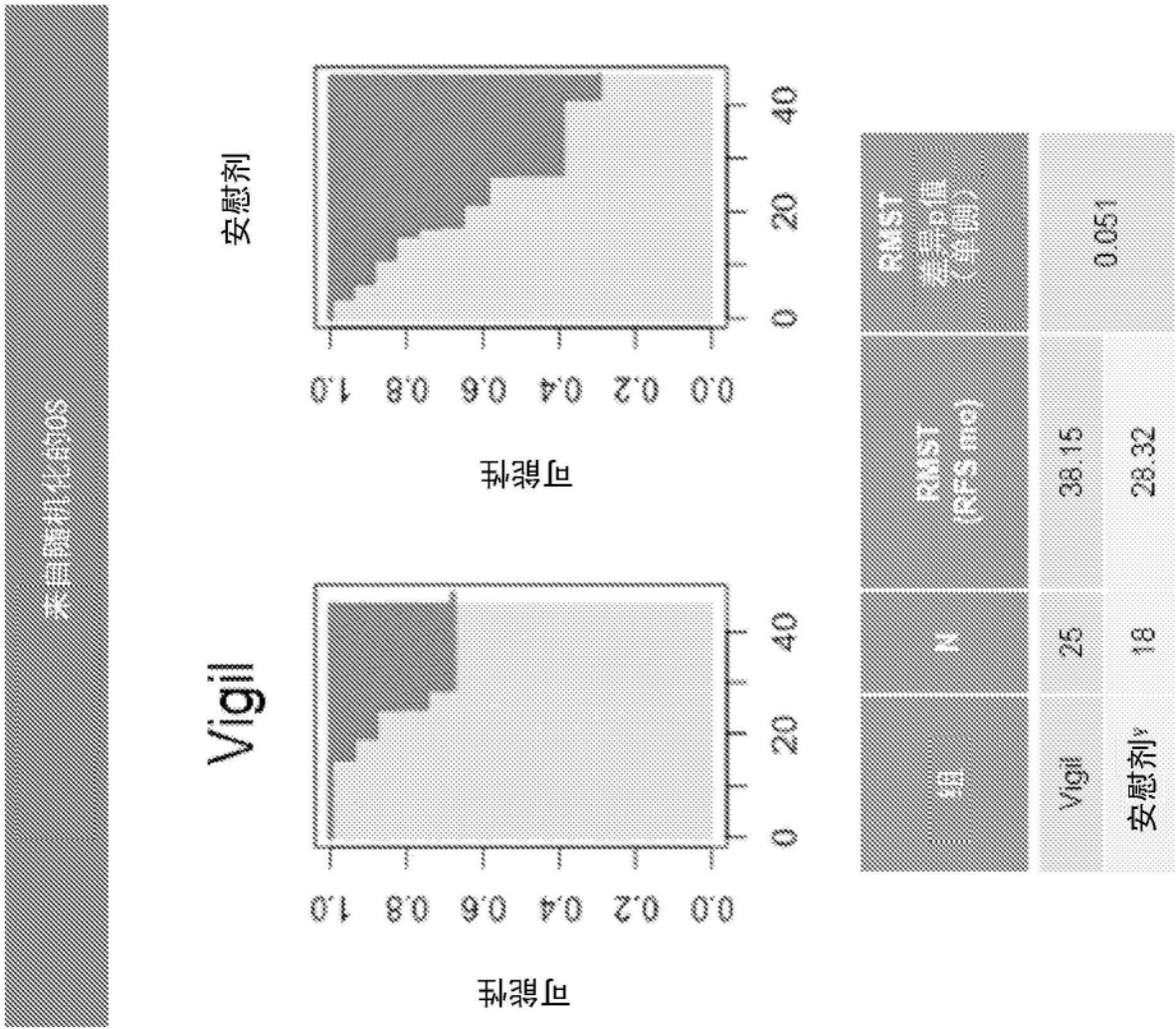


图26

药物	HRD 状态	亚群 / BRCA-wt	PFS / RFS	HR [PFS/RFS] (90/95% CI)	OS
BEV ^{1,2*}	N/A		18.2 vs. 12.0	0.62 (0.52, 0.75)	HR=0.96 [0.85 – 1.09]
奥拉帕尼 / BEV ³	BRCA-wt / HRP		16.6 vs. 16.0 ^Δ	1.0 (0.75, 1.35)	不成熟
尼拉帕利 ⁴	BRCA-wt / HRP		8.1 vs. 5.4 ^Δ	0.68 (0.49, 0.94)	无描述
Vigil	BRCA-wt / HRP	获取	18 vs 12 ^Δ	0.356 (0.18, 0.703)	HR=0.362 [0.147 – 0.89]
		随机化	10.6 vs 5.6 ^Δ	0.373 (0.189, 0.736)	HR=0.362 [0.147-0.89]

^a 巩固加维持
^Δ 纳入PR和CR患者s/p巩固
+ 仅纳入CR患者s/p巩固

图27

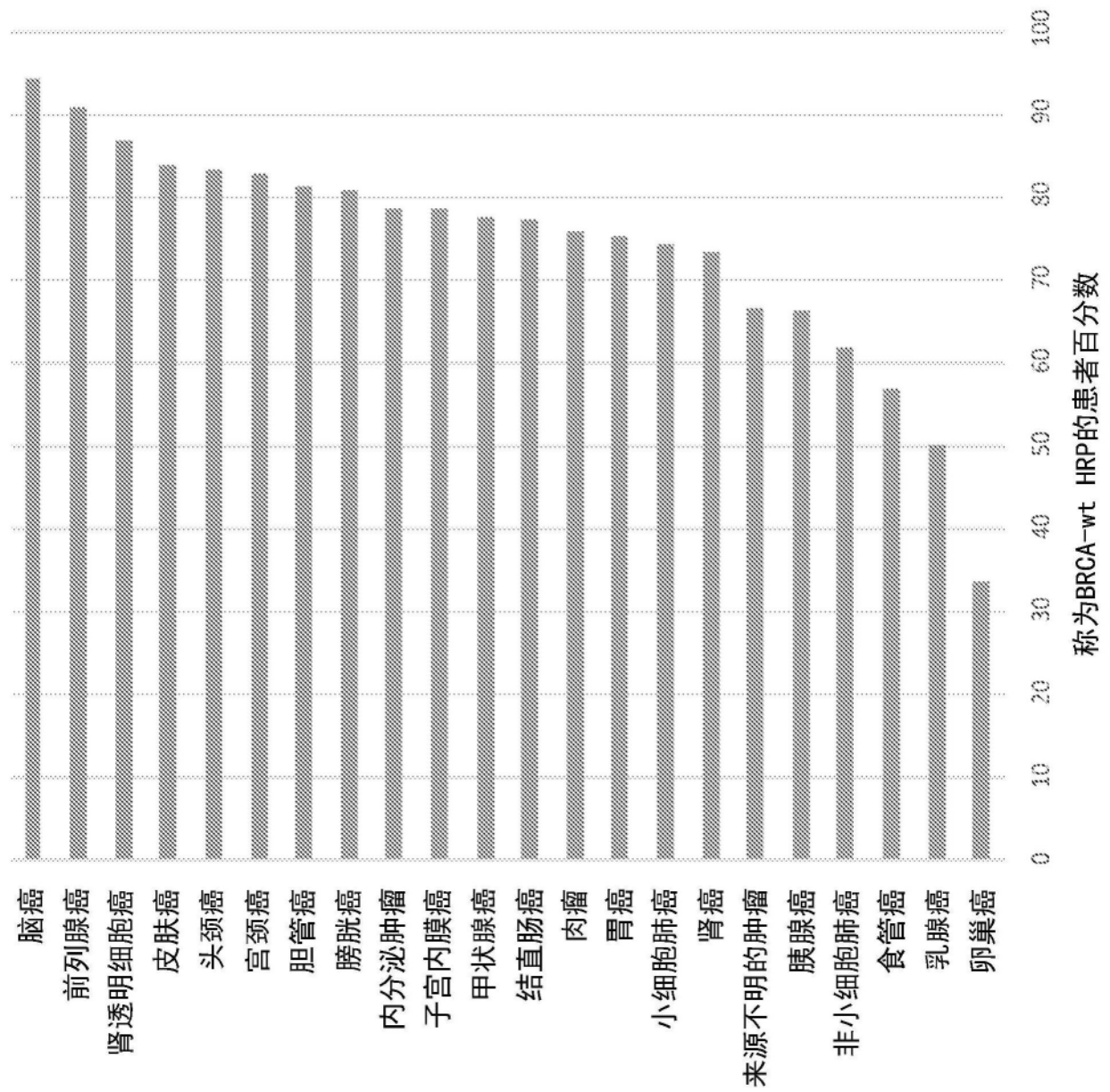
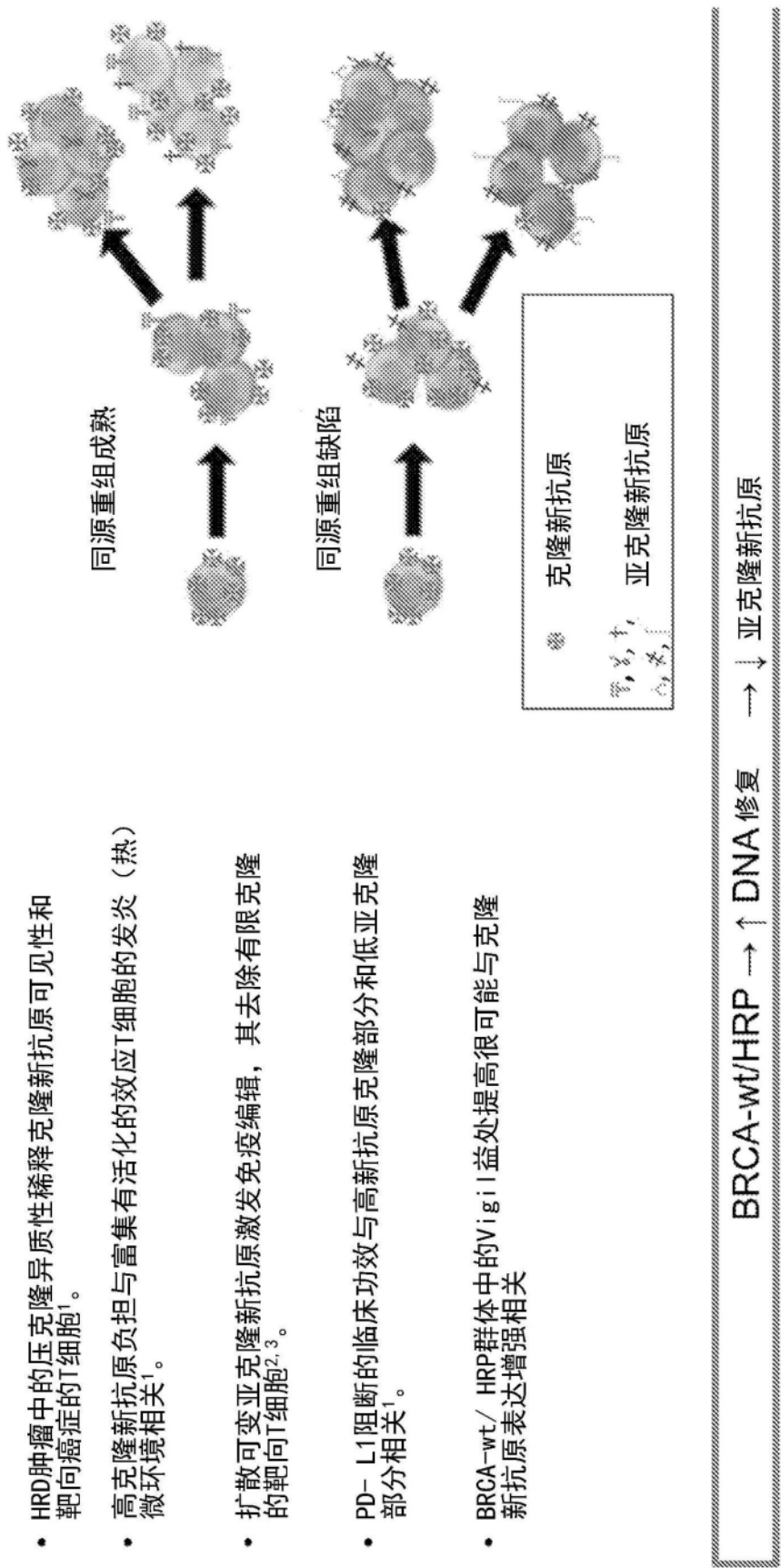


图28



- HRD肿瘤中的压克隆异质性稀释克隆新抗原可见性和靶向癌症的T细胞。
- 高克隆新抗原负担与富集有活化的效应T细胞的发炎（热）微环境相关¹。
- 扩散可变亚克隆新抗原激发免疫编辑，其去除有限克隆的靶向T细胞^{2, 3}。
- PD- L1阻断的临床功效与高新抗原克隆部分和低亚克隆部分相关¹。
- BRCA-wt/ HRP群体中的Vigil益处提高很可能与克隆新抗原表达增强相关

图29

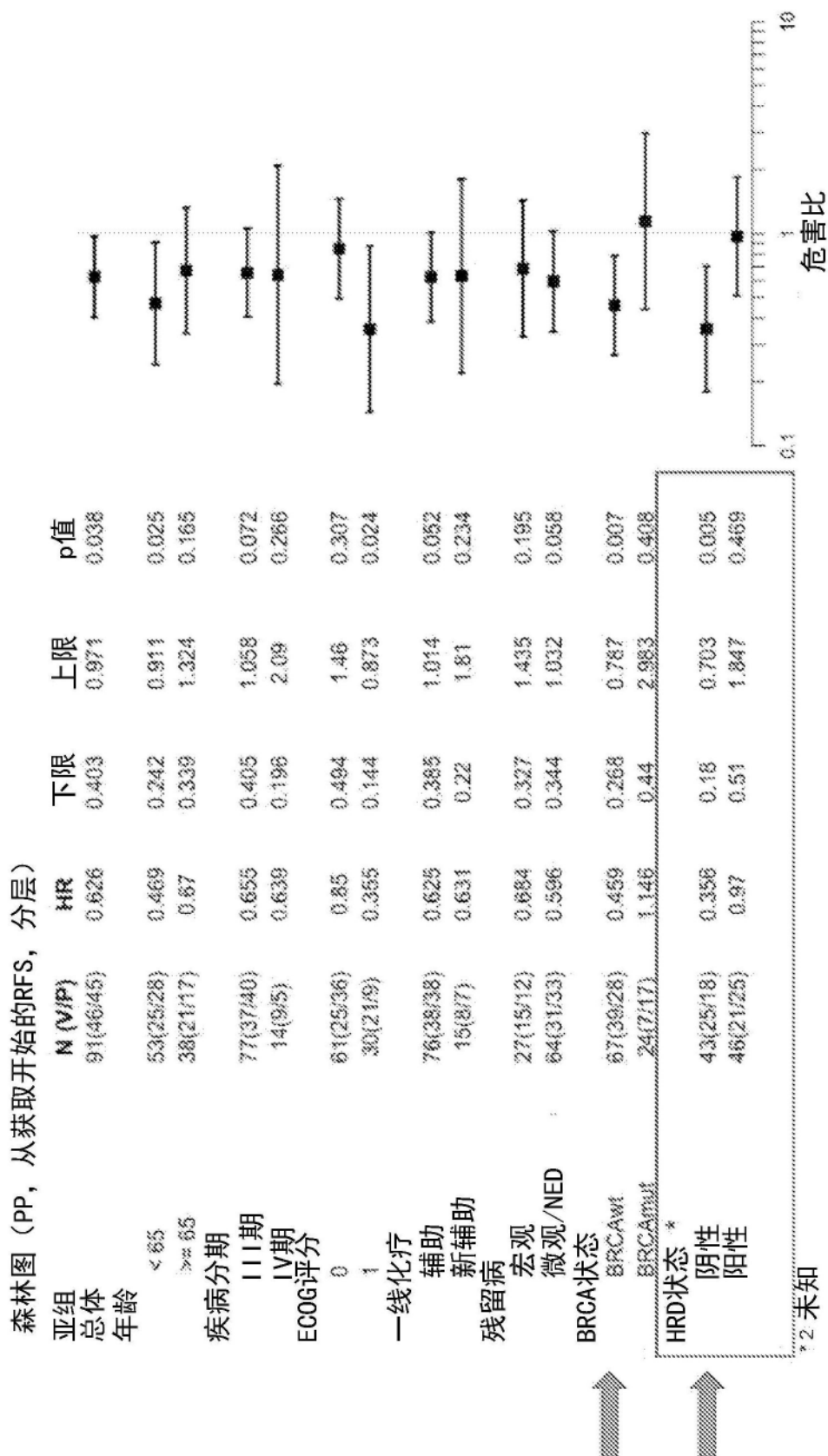


图30

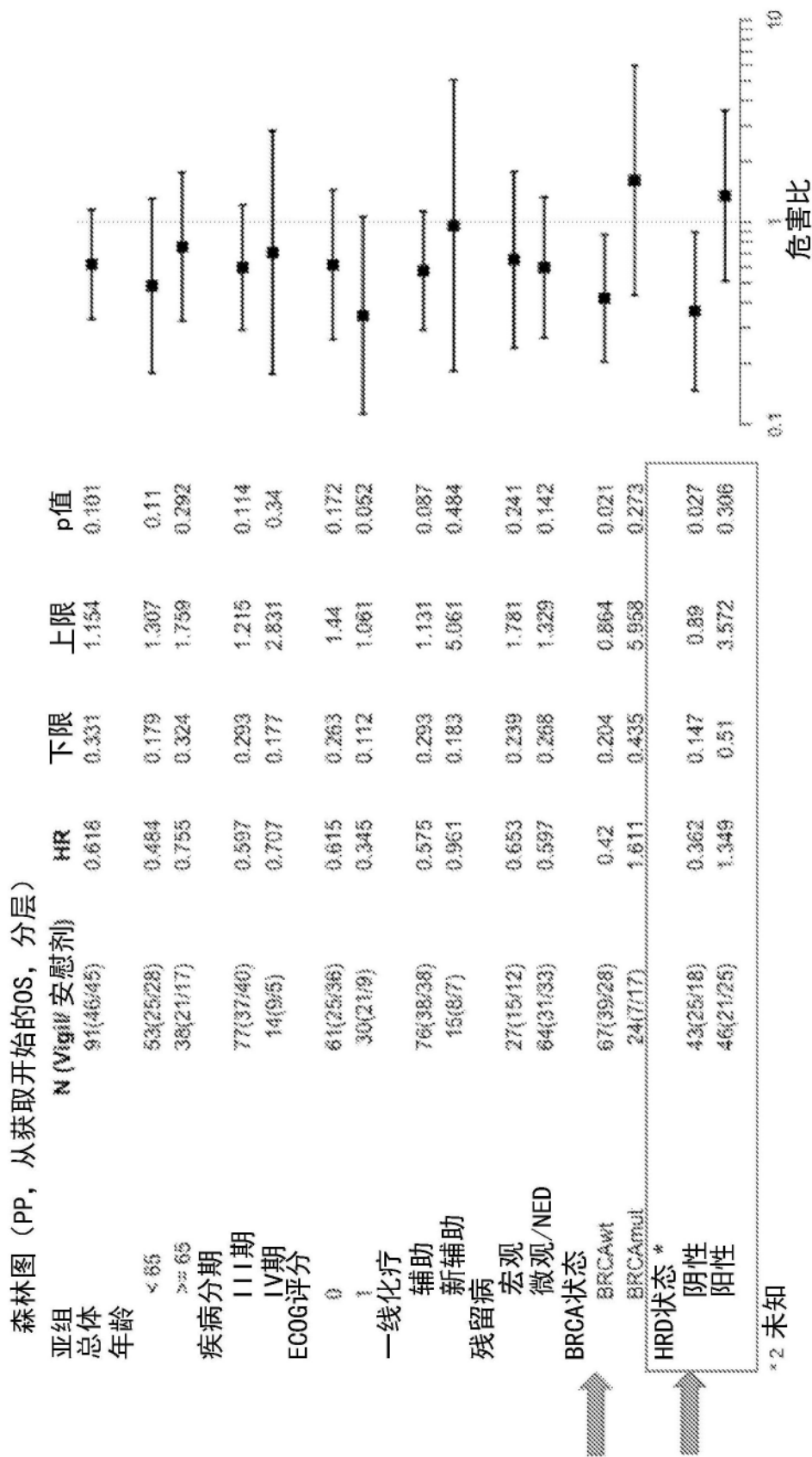


图31

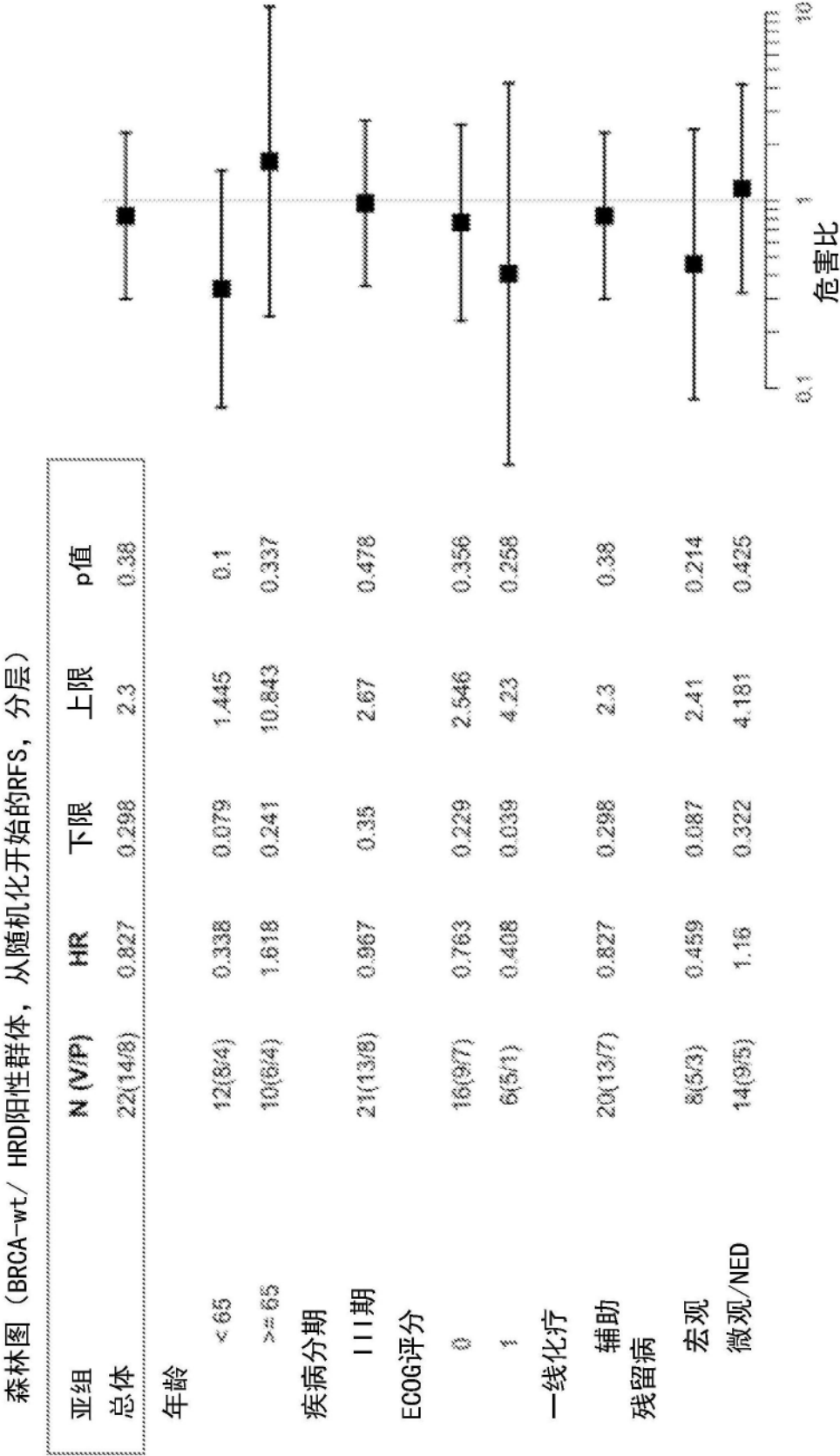


图32

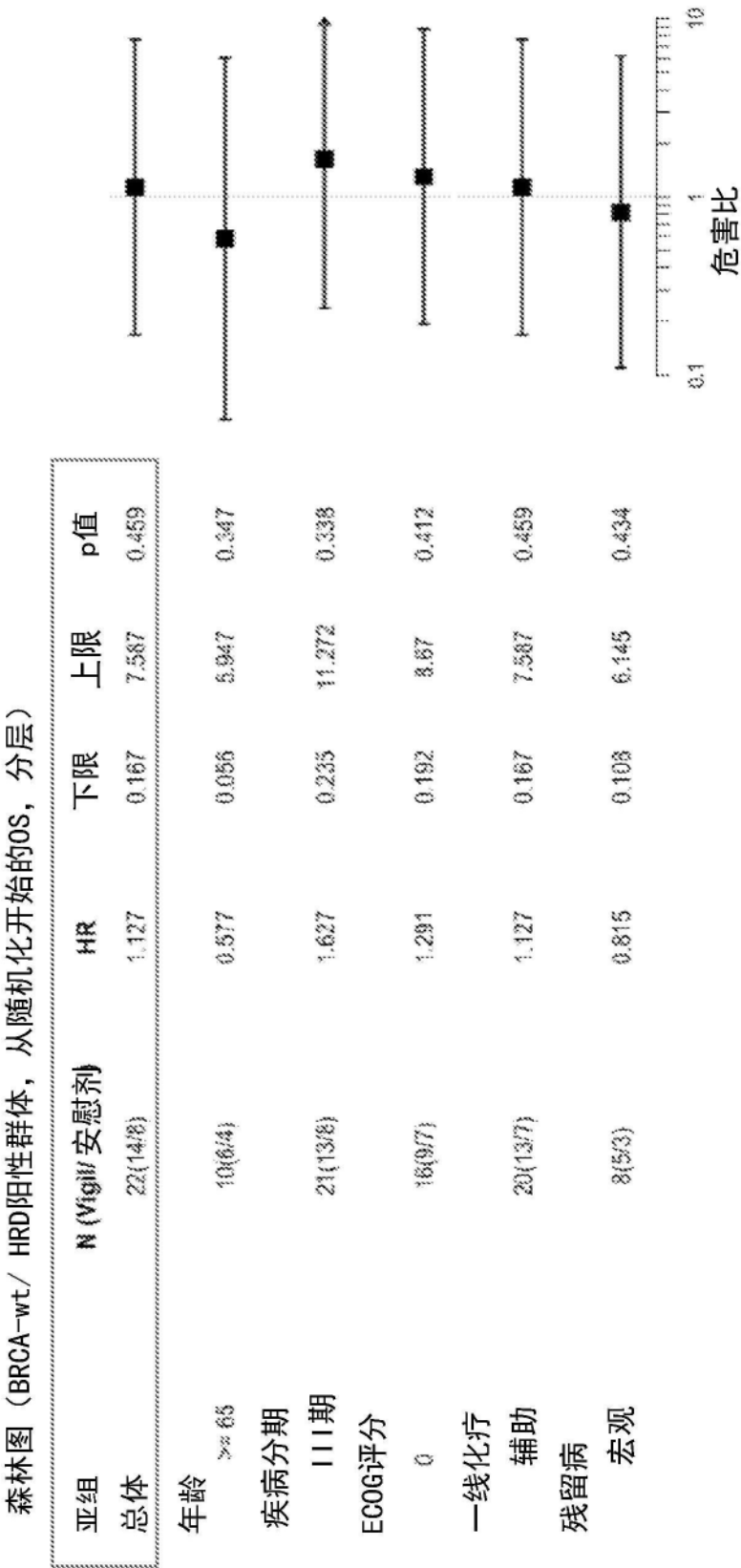


图33

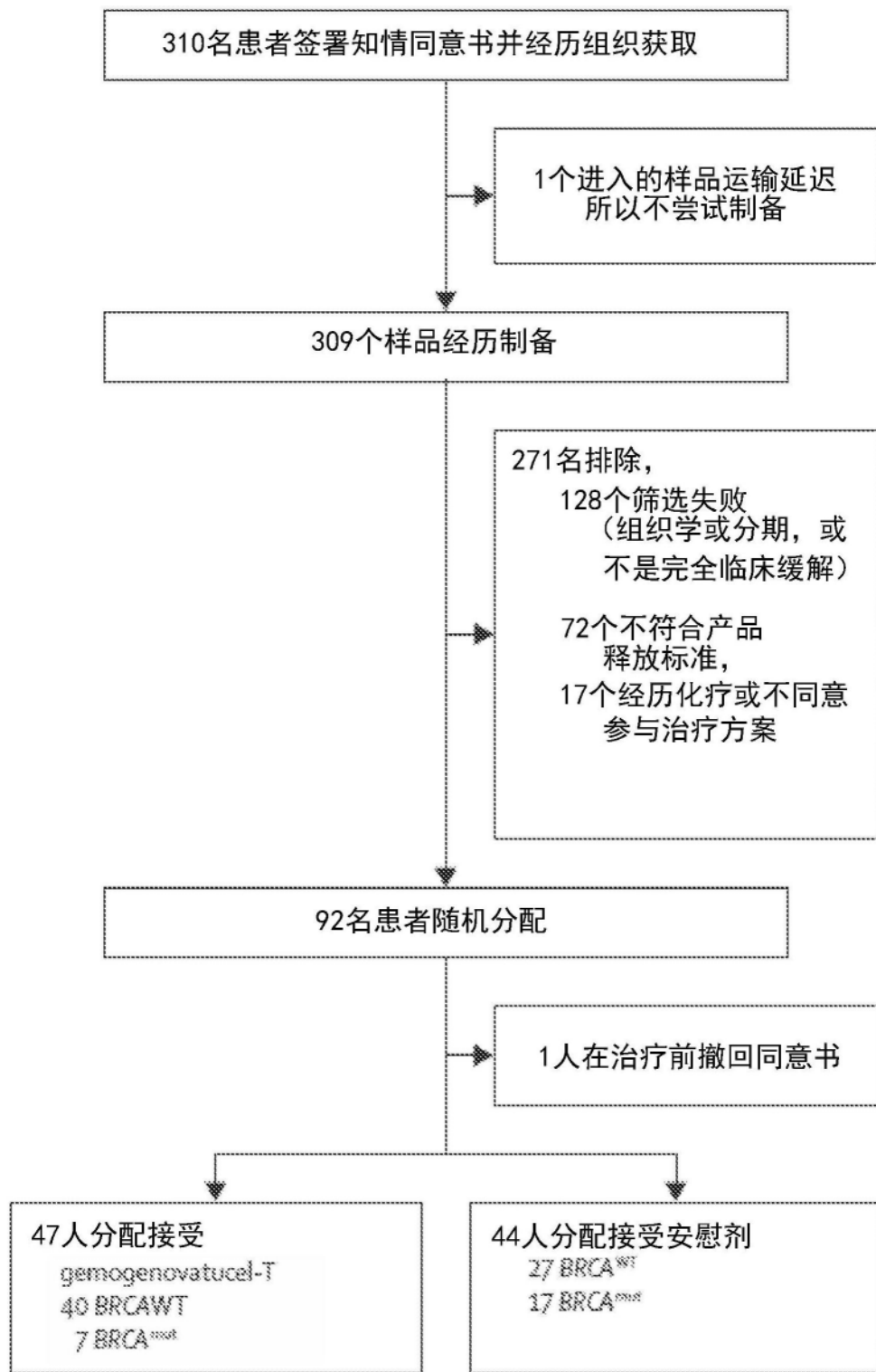


图34

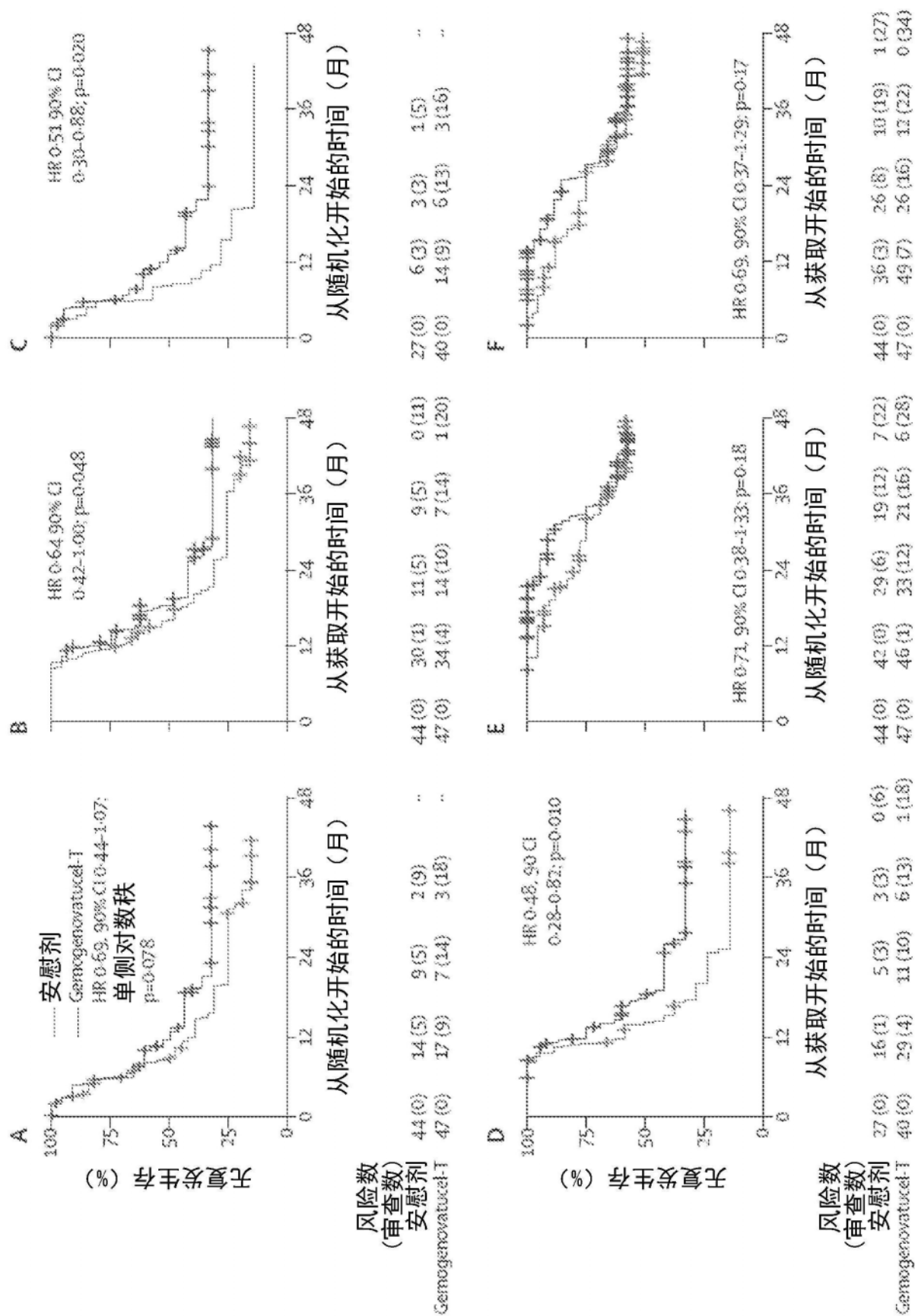


图35A-35F

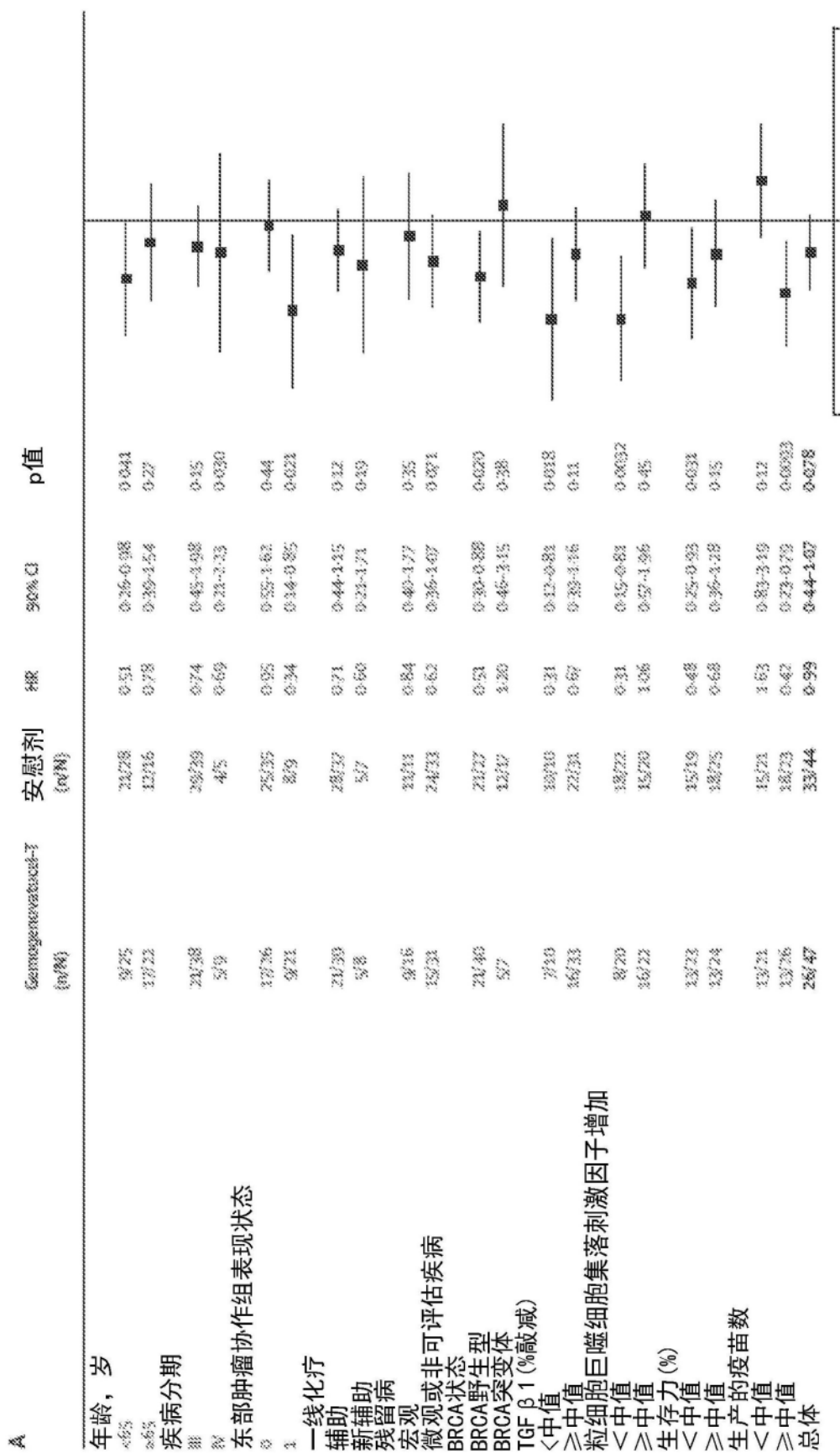


图36A

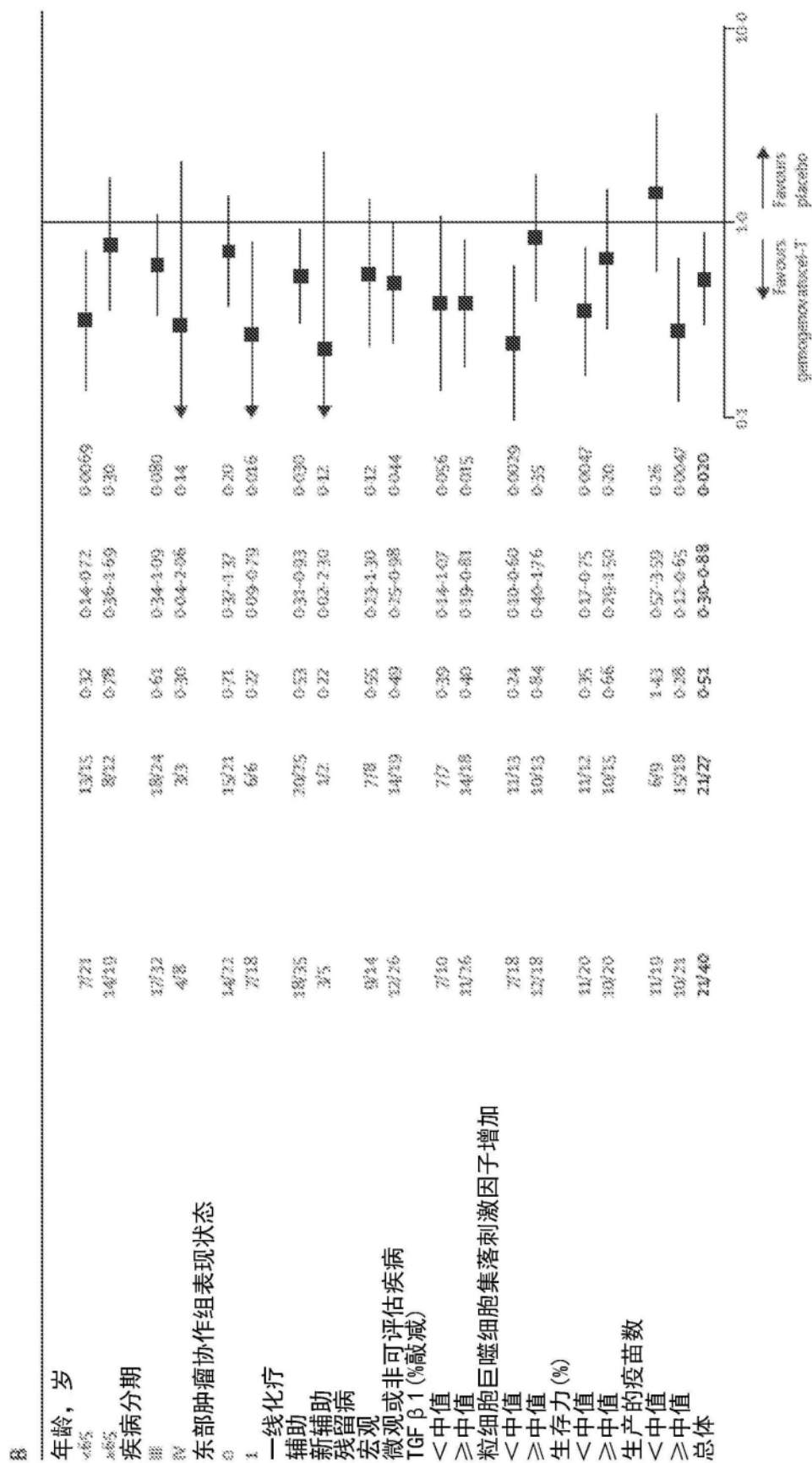


图36B

A 从手术/获取时间开始的RFS (BRCA-wt). ITT

	事件/患者数	中值	95% CI
Genegonavalut-T	21 / 40 (52%)	10.3	
安慰剂	21 / 23 (91%)	14.9	

复发或死亡的分层HR 0.473, 95% CI 0.273 to 0.817, 单侧 p 0.010

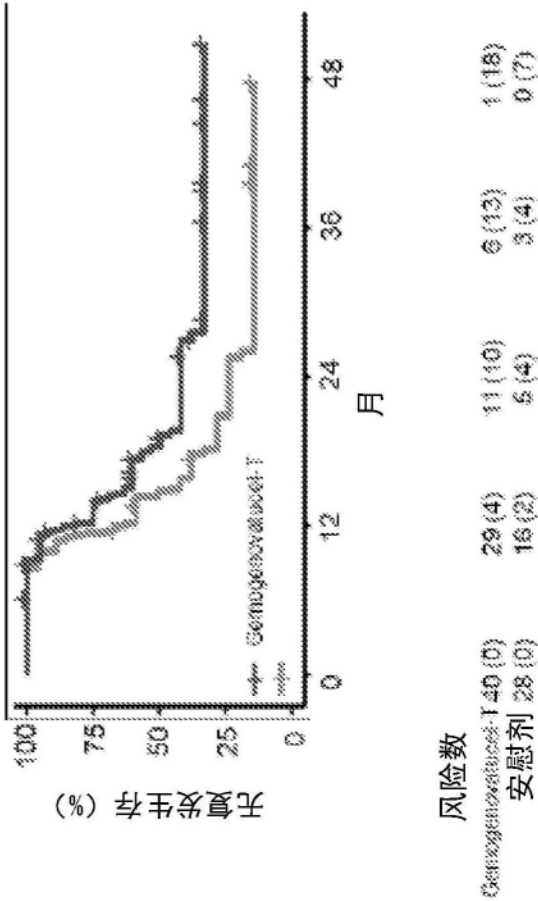


图37A

B 从随机化时间开始的RFS (BRCA-wt), ITT

	事件/患者数	中值 OS (mo)
Genogenerosulfate-T	21 / 48 (52%)	12.7
安慰剂	21 / 38 (75%)	8.0

复发或死亡的分层HR 0.514, 95% CI (0.39 to 0.68), 单侧 p 0.020

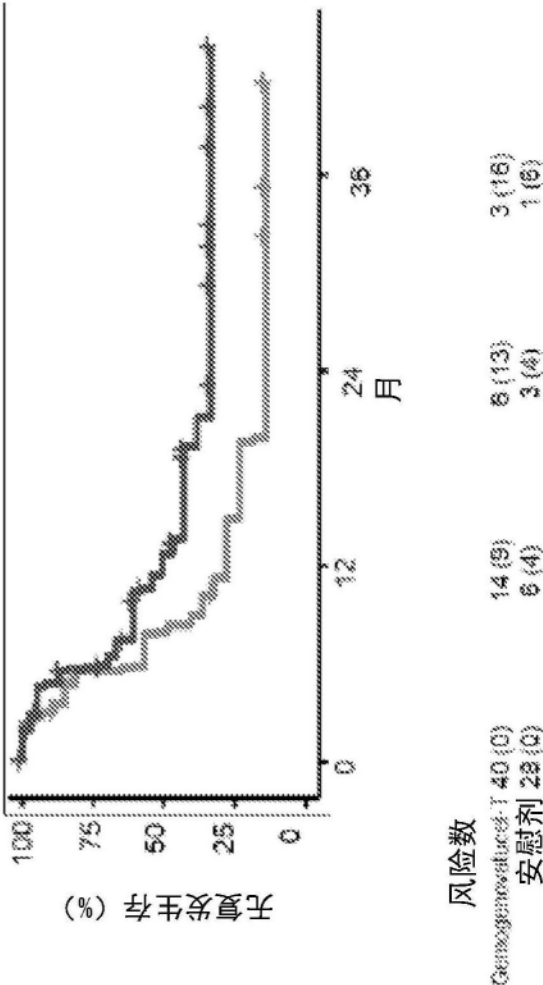


图37B

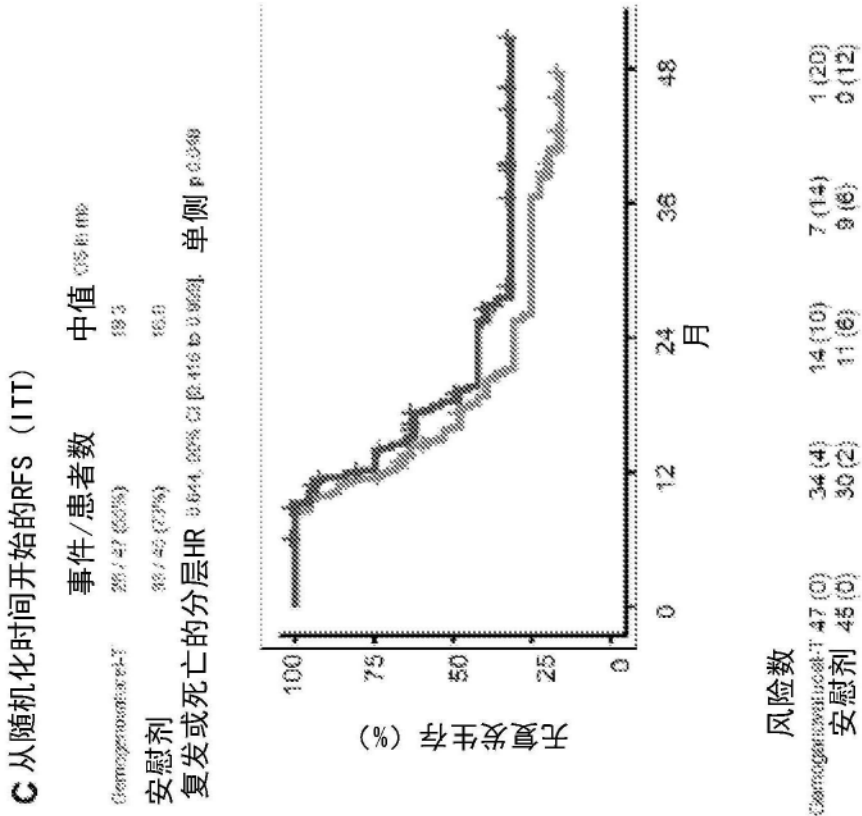
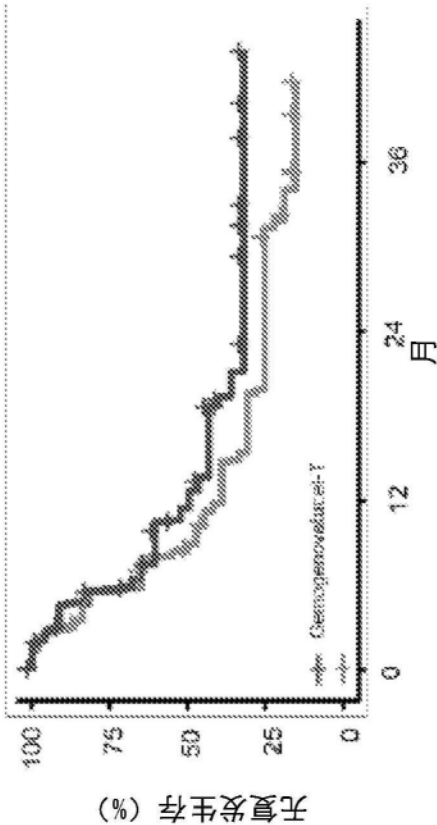


图37C

D 从随机化时间开始的RFS (ITT)

	事件/患者数	中值 OS mo
Gemogenerovabucel-T	26/47 (55%)	11.5
安慰剂	31/45 (73%)	8.2
复发或死亡的分层HR 0.683, 95% CI 0.443 to 1.033, 单侧 p 0.0378		



风险数	17 (9)	7 (14)	3 (18)
Gemogenerovabucel-T	47 (0)	9 (6)	2 (10)
安慰剂	45 (0)		

图37D

森林图 (PP群体, 从随机化开始的OS, 分层)

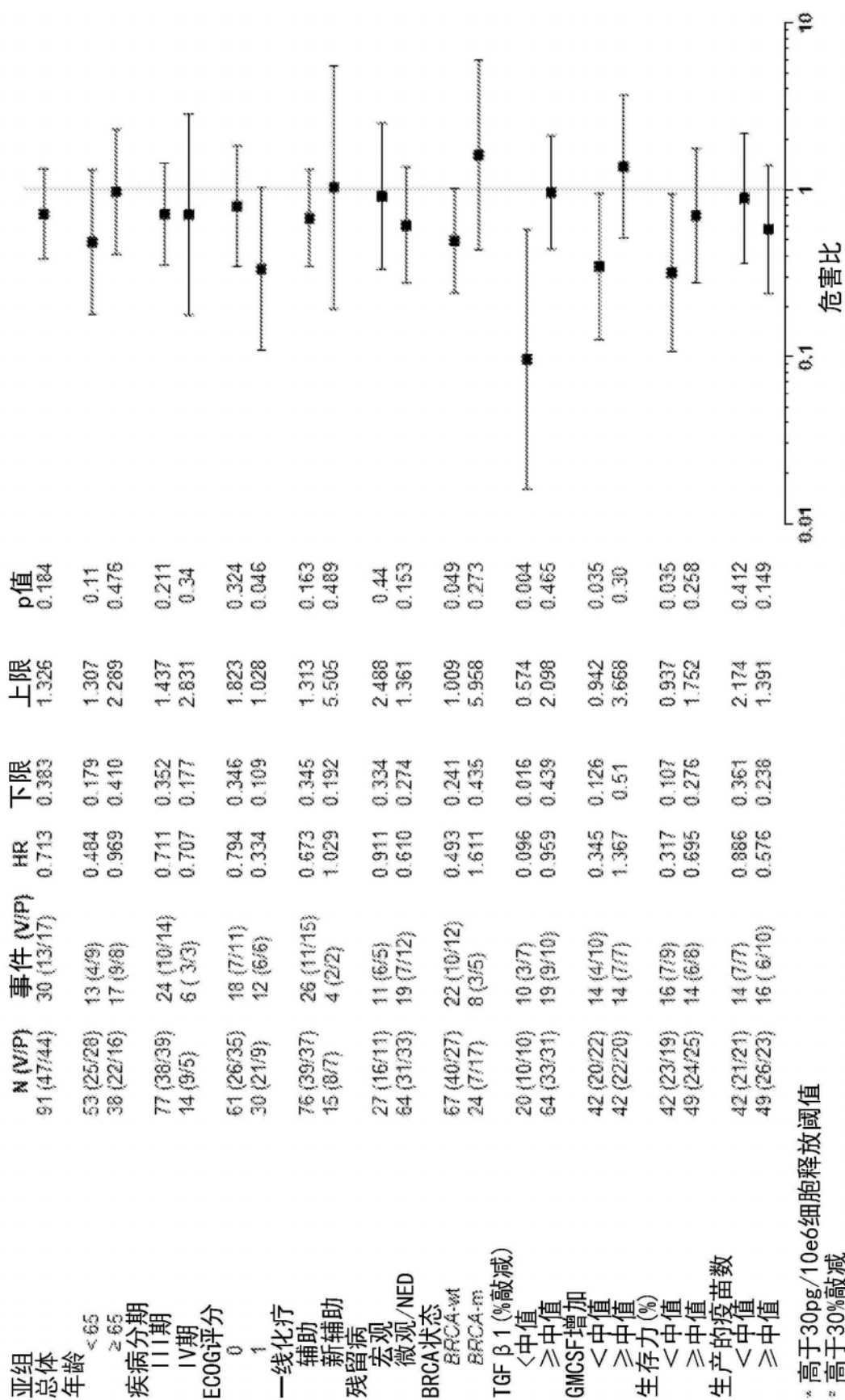


图38

森林图 (BRCA-wt群体, 从随机化开始的OS, 分层)

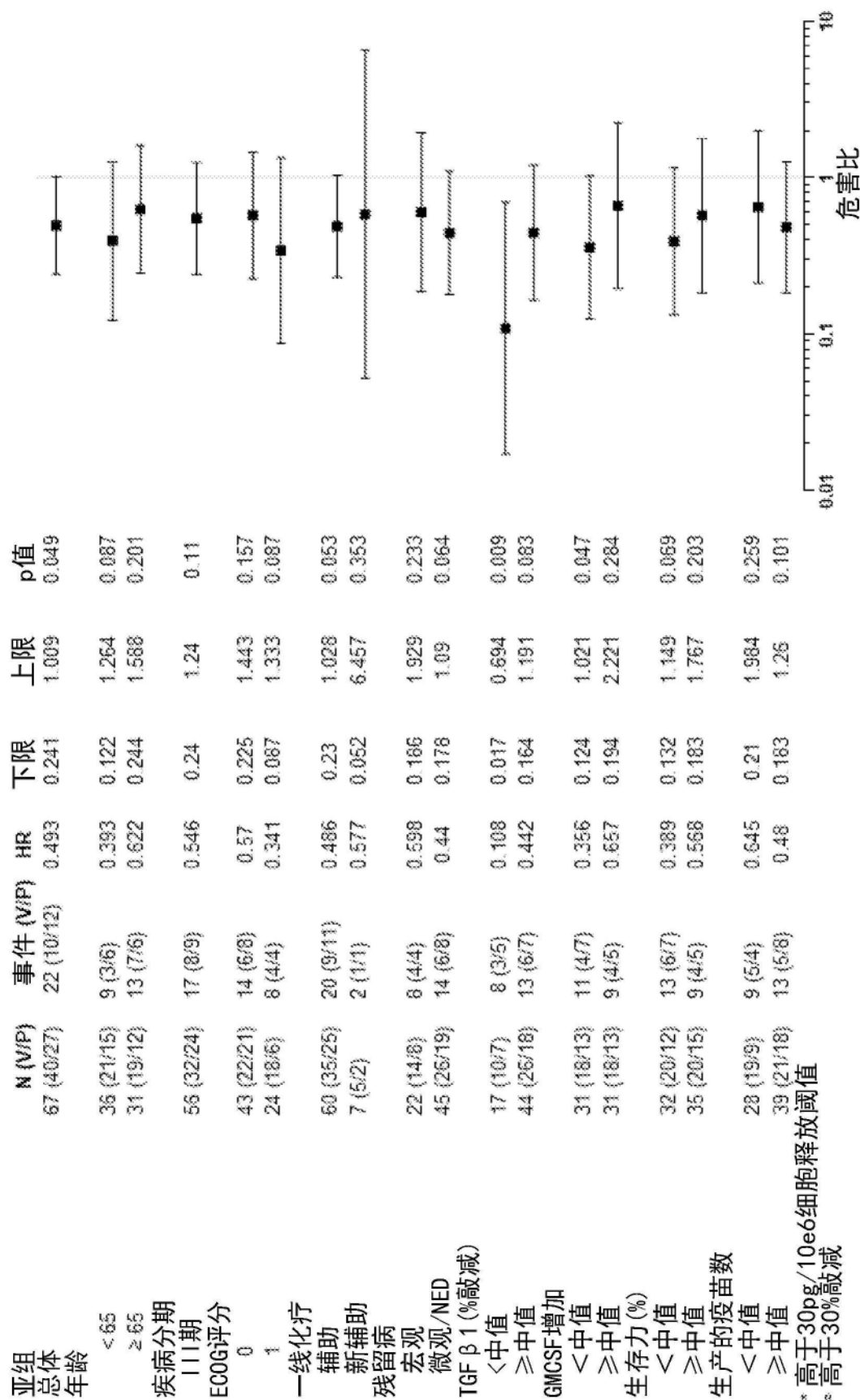
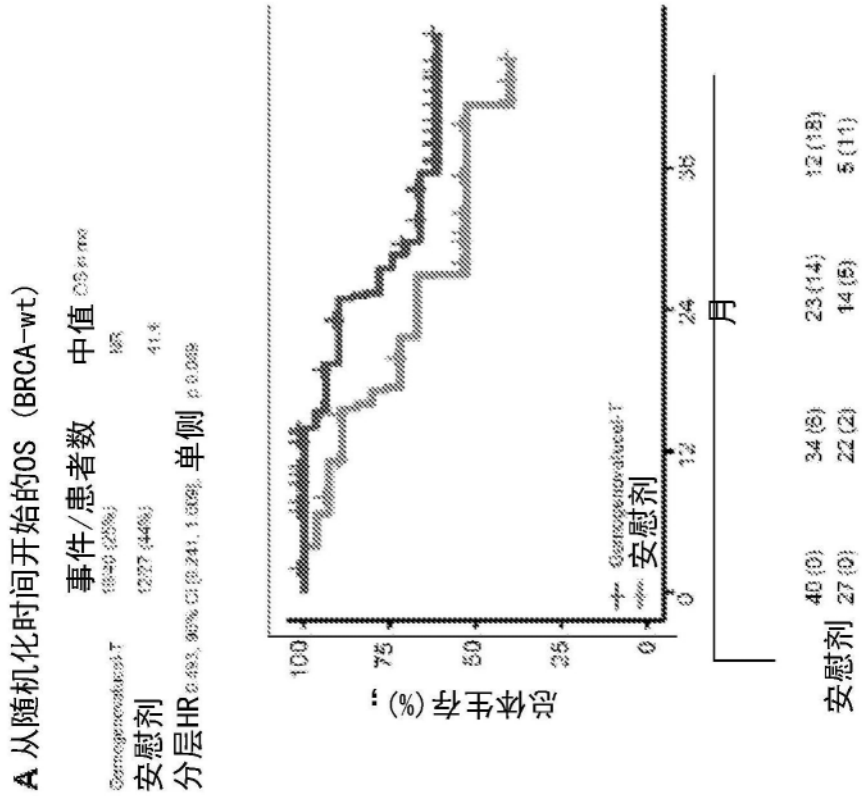


图39



B 才手术/获取时间开始的OS (BRCA-wt)

事件/患者数	中值 OS mo
Genysenonolucel-T	HR
安慰剂	HR
分层HR	0.49, 95% CI 0.24, 0.99, p=0.047

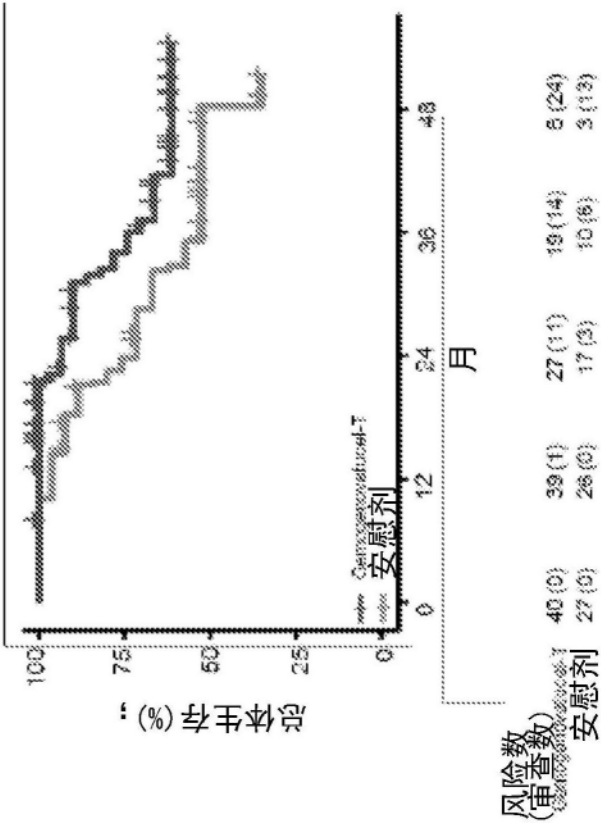


图40B

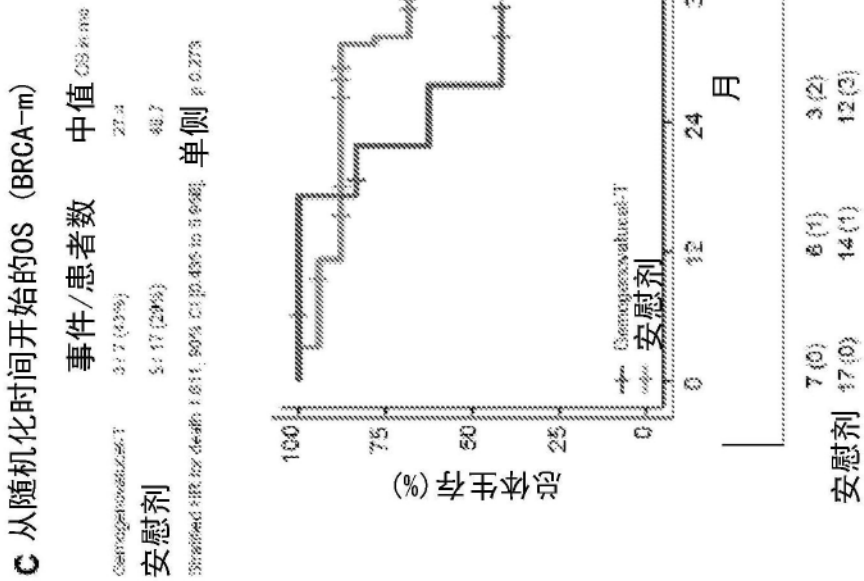


图40C

D 才手术/获取时间开始的OS (BRCA-m)

事件/患者数	中值 OS at mo
Control (n=40)	34.2
安愈剂 (n=39)	56.5

Stratified HR for death: 1.81, 95% CI 0.95 to 3.56, p=0.073

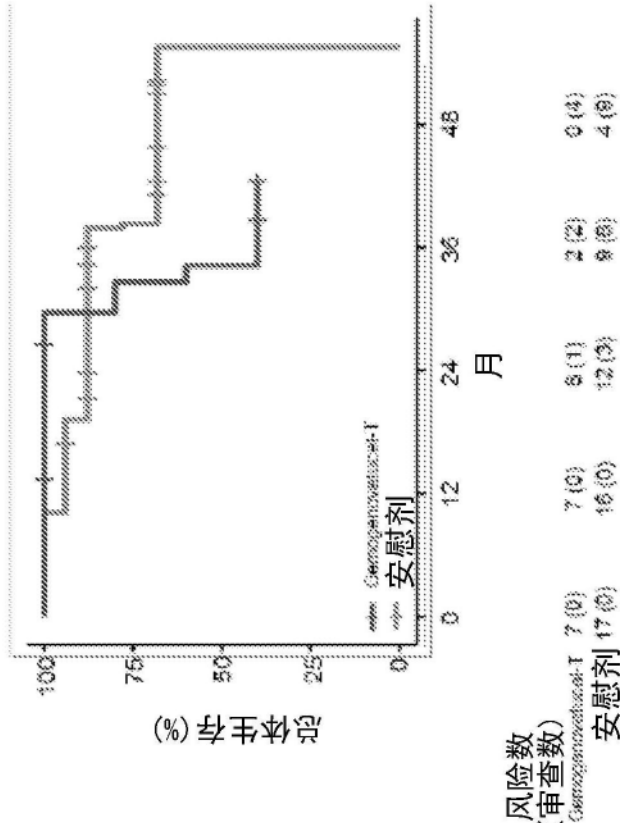


图40D

A 从随机化时间开始的RFS (BRCA-wt)

	事件/患者数	中值 RFS in mo
Gemtogenoxatutal-T	5 / 7 (71%)	10.5
安慰剂	12 / 17 (71%)	14.8

复发或死亡的分层HR 203, 90% CI 10.46 to 3.145%, 单侧 p 0.376

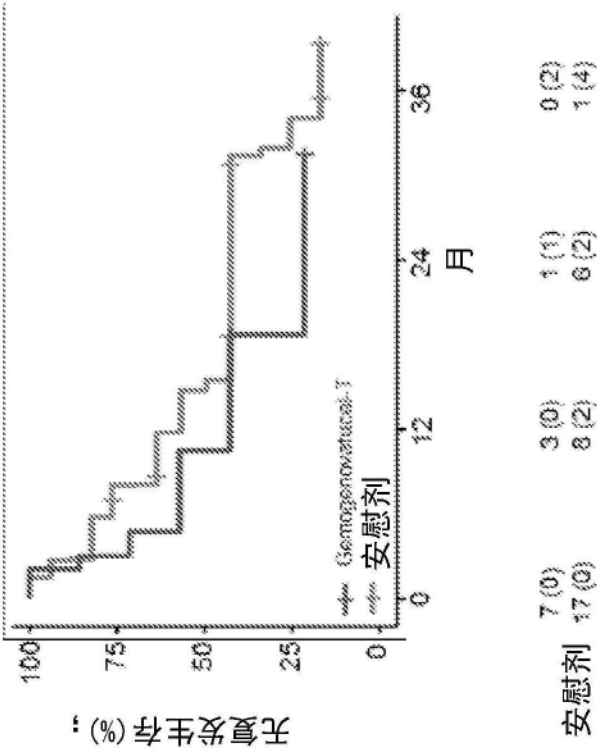


图41A

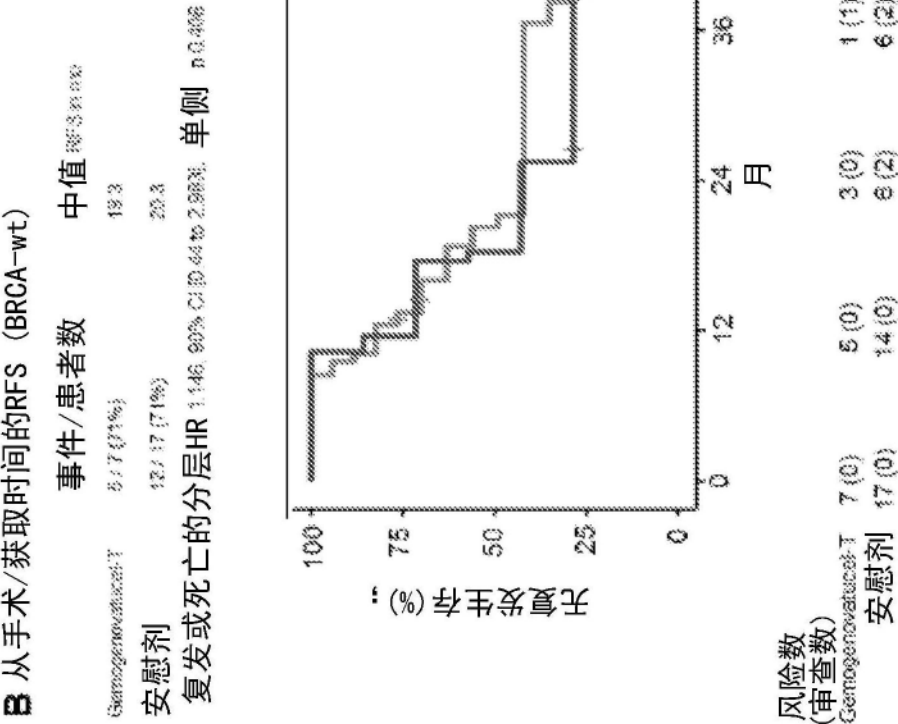


图41B