



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117425493 A

(43) 申请公布日 2024. 01. 19

(21) 申请号 202280037041.0

(22) 申请日 2022.05.24

(30) 优先权数据

63/192217 2021.05.24 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.11.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/064061 2022.05.24

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2022/248478 EN 2022.12.01

(71) 申请人 阿斯利康(瑞典)有限公司

地址 瑞典南泰利耶

(72) 发明人 A·雅科夫斯基三世 P·丹尼斯

L·特拉尼 M·牛顿 N·夏尔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

专利代理师 李波 杨思捷

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 33/243 (2019.01)

A61K 31/555 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

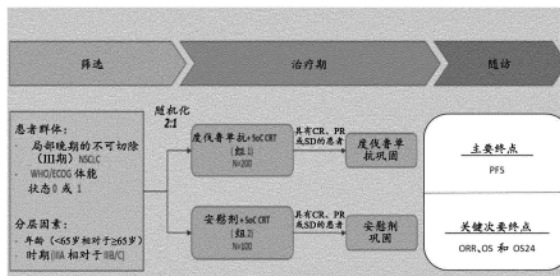
权利要求书3页 说明书24页
序列表6页 附图20页

(54) 发明名称

用于治疗肺癌的组合物和方法

(57) 摘要

本发明披露了同时用抑制PD-1/PD-L1活性的抗体与放化疗(cCRT)治疗局部晚期(III期)的不可切除的非小细胞肺癌(NSCLC)的方法。



1. 一种延长患有不可切除的非小细胞肺癌 (NSCLC) 的患者的无进展生存期 (PFS) 的方法, 该方法包括同时用抗PD-L1抗体和放化疗来治疗该患者。

2. 如权利要求1所述的方法, 其中该抗PD-L1抗体是人的。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的方法, 其中该放化疗是基于铂的。

4. 如权利要求2或权利要求3所述的方法, 其中该人抗PD-L1抗体包含轻链可变结构域和重链可变结构域, 该轻链可变结构域包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列, 该重链可变结构域包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

5. 如权利要求2或权利要求3所述的方法, 其中该人抗PD-L1抗体包含:

具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VH CDR1; 和

具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VH CDR2; 和

具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VH CDR3; 和

具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VL CDR1; 和

具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL CDR2; 和

具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VL CDR3。

6. 如权利要求2或权利要求3所述的方法, 其中该人抗PD-L1抗体是度伐鲁单抗、阿维鲁单抗、阿特殊单抗或舒格利单抗。

7. 如任一项前述权利要求所述的方法, 其中用该抗PD-L1抗体治疗包括每四周 (Q4W) 向该患者静脉内施用1500mg该抗PD-L1抗体。

8. 如任一项前述权利要求所述的方法, 其中该不可切除的NSCLC是III期的。

9. 如任一项前述权利要求所述的方法, 其中该不可切除的NSCLC是局部晚期的。

10. 如任一项前述权利要求所述的方法, 其中该抗PD-L1抗体在放化疗的第一天施用。

11. 一种增加患有不可切除的非小细胞肺癌 (NSCLC) 的患者的总应答率 (ORR) 的方法, 该方法包括同时用抗PD-L1抗体和放化疗来治疗该患者。

12. 如权利要求11所述的方法, 其中该抗PD-L1抗体是人的。

13. 如权利要求11或权利要求12所述的方法, 其中该放化疗是基于铂的。

14. 如权利要求12或权利要求13所述的方法, 其中该人抗PD-L1抗体包含轻链可变结构域和重链可变结构域, 该轻链可变结构域包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列, 该重链可变结构域包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

15. 如权利要求12或权利要求13所述的方法, 其中该人抗PD-L1抗体包含:

具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VH CDR1; 和

具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VH CDR2; 和

具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VH CDR3; 和

具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VL CDR1; 和

具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL CDR2; 和

具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VL CDR3。

16. 如权利要求12或权利要求13所述的方法, 其中该人抗PD-L1抗体是度伐鲁单抗、阿维鲁单抗、阿特殊单抗或舒格利单抗。

17. 如权利要求11至16中任一项所述的方法, 其中用该抗PD-L1抗体治疗包括每四周 (Q4W) 向该患者静脉内施用1500mg该抗PD-L1抗体。

18. 如权利要求11至17中任一项所述的方法,其中该不可切除的NSCLC是III期的。
19. 如权利要求11至18中任一项所述的方法,其中该不可切除的NSCLC是局部晚期的。
20. 如权利要求11至19中任一项所述的方法,其中该抗PD-L1抗体在放化疗的第一天施用。
21. 一种治疗患有III期不可切除的非小细胞肺癌(NSCLC)的患者的方法,该方法包括同时用抗PD-L1抗体和放化疗来治疗该患者。
22. 如权利要求21所述的方法,其中该抗PD-L1抗体是人的。
23. 如权利要求21或权利要求22所述的方法,其中该放化疗是基于铂的。
24. 如权利要求22或权利要求23所述的方法,其中该人抗PD-L1抗体包含轻链可变结构域和重链可变结构域,该轻链可变结构域包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,该重链可变结构域包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。
25. 如权利要求22或权利要求23所述的方法,其中该人抗PD-L1抗体包含:
 - 具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VH CDR1;和
 - 具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VH CDR2;和
 - 具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VH CDR3;和
 - 具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VL CDR1;和
 - 具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL CDR2;和
 - 具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VL CDR3。
26. 如权利要求22或权利要求23所述的方法,其中该抗PD-L1抗体是度伐鲁单抗、阿维鲁单抗、阿特殊单抗或舒格利单抗。
27. 如权利要求21至26中任一项所述的方法,其中用该抗PD-L1抗体治疗包括每四周(Q4W)向该患者静脉内施用1500mg该抗PD-L1抗体。
28. 如权利要求21至27中任一项所述的方法,其中该抗PD-L1抗体在放化疗的第一天施用。
29. 一种同时包含抗PD-L1抗体和放化疗的组合,该组合在延长患有不可切除的非小细胞肺癌(NSCLC)的患者的无进展生存期(PFS)的方法中使用。
30. 一种同时包含抗PD-L1抗体和放化疗的组合,该组合在增加患有不可切除的非小细胞肺癌(NSCLC)的患者的总应答率(ORR)的方法中使用。
31. 一种同时包含抗PD-L1抗体和放化疗的组合,该组合在治疗III期不可切除的非小细胞肺癌(NSCLC)中使用。
32. 如权利要求29至31中任一项所述使用的组合,其中该抗PD-L1抗体是人的。
33. 如权利要求29至32中任一项所述使用的组合,其中该放化疗是基于铂的。
34. 如权利要求32或权利要求33所述使用的组合,其中该人抗PD-L1抗体包含轻链可变结构域和重链可变结构域,该轻链可变结构域包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,该重链可变结构域包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。
35. 如权利要求32或权利要求33所述使用的组合,其中该人抗PD-L1抗体包含:
 - 具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VH CDR1;和
 - 具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VH CDR2;和
 - 具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VH CDR3;和

具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VL CDR1;和
具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL CDR2;和
具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VL CDR3。

36. 如权利要求32至35中任一项所述使用的组合,其中该人抗PD-L1抗体是度伐鲁单抗、阿维鲁单抗、阿特珠单抗或舒格利单抗。

37. 如权利要求31至36中任一项所述使用的组合,其中用该人抗PD-L1抗体治疗包括每四周(Q4W)向该患者静脉内施用1500mg该抗PD-L1抗体。

38. 如权利要求31至37中任一项所述使用的组合,其中该不可切除的NSCLC是III期的。

39. 如权利要求31至38中任一项所述使用的组合,其中该不可切除的NSCLC是局部晚期的。

40. 如权利要求31至39中任一项所述使用的组合,其中该抗PD-L1抗体在放化疗的第一天施用。

41. 同时包含抗PD-L1抗体和放化疗的组合在制造药物中的用途,该药物在延长患有不可切除的非小细胞肺癌(NSCLC)的患者的无进展生存期(PFS)的方法中使用。

42. 同时包含抗PD-L1抗体和放化疗的组合在制造药物中的用途,该药物在增加患有不可切除的非小细胞肺癌(NSCLC)的患者的总应答率(ORR)的方法中使用。

43. 同时包含抗PD-L1抗体和放化疗的组合在制造药物中的用途,该药物在治疗III期不可切除的非小细胞肺癌(NSCLC)中使用。

用于治疗肺癌的组合物和方法

背景技术

[0001] 肺癌是世界上数几十年来最常见的癌症,到2012年,估计有180万新病例,占有新发癌症的12.9%。它也是癌症死亡的最常见原因,造成了159万人死亡(占总数的19.4%)。非小细胞肺癌(NSCLC)占有肺癌的大约80%至85%,30%的患者为III期疾病。对具有良好体能状态(PS)和不可切除的III期NSCLC患者的标准治疗是以治愈为目的的同时施用的基于铂的双重化疗和放疗(cCRT)。一项同时与序贯CRT的荟萃分析表明同时疗法的结果更好,但即使是cCRT,5年总生存率(OS)的范围也在15%与32%之间。因此,除了cCRT之外,对于提高患者生存率的新治疗方法仍存在显著未满足的需求。

[0002] 肿瘤微环境中的肿瘤细胞和骨髓细胞上的程序性细胞死亡配体-1(PD-L1)与激活的T细胞上的免疫检查点蛋白PD-1结合,从而抑制T细胞活性。度伐鲁单抗(durvalumab)是一种选择性、高亲和力的人IgG1单克隆抗体,其阻断PD-L1与PD-1和CD80的结合,从而允许T细胞识别并杀死肿瘤细胞。度伐鲁单抗已在早期临床研究中证明对多种晚期实体瘤具有鼓舞人心的抗肿瘤活性,并且已被批准用于铂类药物后、局部晚期或转移性尿路上皮癌。

[0003] 为了解决对用于局部晚期癌症的临床管理的改进方法的需要,本披露提供了包括向患有晚期、局部晚期、不可切除NSCLC的患者同时施用度伐鲁单抗和放化疗(cCRT)的方法。

发明内容

[0004] 本披露总体上涉及同时用抑制PD-1/PD-L1活性的抗体和放化疗(cCRT)治疗局部晚期(III期)的不可切除的非小细胞肺癌(NSCLC)的方法。

[0005] 本文提供了一种延长患有不可切除的非小细胞肺癌(NSCLC)的患者的无进展生存期(PFS)的方法,该方法包括同时用抗PD-L1抗体和放化疗来治疗患者。

[0006] 本文还提供了一种增加患有不可切除NSCLC的患者的总应答率(ORR)的方法,该方法包括同时用抗PD-L1抗体和放化疗来治疗患者。本文还提供了一种同时包含抗PD-L1抗体和放化疗的组合,该组合在延长患有不可切除的非小细胞肺癌(NSCLC)的患者的无进展生存期(PFS)的方法中使用。

[0007] 本文还提供了一种同时包含抗PD-L1抗体和放化疗的组合,该组合在增加患有不可切除的非小细胞肺癌(NSCLC)的患者的总应答率(ORR)的方法中使用。

[0008] 本文还提供了一种同时包含抗PD-L1抗体和放化疗的组合,该组合在治疗III期不可切除的非小细胞肺癌(NSCLC)中使用。

[0009] 还提供了同时包含人抗PD-L1抗体和放化疗的组合在制造药物中的用途,该药物在延长患有不可切除的非小细胞肺癌(NSCLC)的患者的无进展生存期(PFS)的方法中使用。

[0010] 还提供了同时包含人抗PD-L1抗体和放化疗的组合在制造药物中的用途,该药物在增加患有不可切除的非小细胞肺癌(NSCLC)的患者的总应答率(ORR)的方法中使用。

[0011] 还提供了同时包含人抗PD-L1抗体和放化疗的组合在制造药物中的用途,该药物在治疗III期不可切除的非小细胞肺癌(NSCLC)中使用。

附图说明

[0012] 图1示出了本文披露的方法的一般研究设计。

[0013] 图2A是说明治疗计划和定义的终点的示意图。每组含有6只小鼠。当肿瘤大约为 $100-200\text{mm}^3$ 时进行放疗(RT),并且用于测定的时间点如图所示。图2B示出了纵向途径分析气泡图(来自表4)。Y轴上列出了途径并且X轴上列出了时间点。气泡的大小示出了每个途径的表达值的绝对倍数变化。图2C示出了切除时的肿瘤体积。数据表示为平均值 \pm SEM。每组含有6只小鼠。 $*P<0.05$,曼-惠特尼检验。

[0014] 图3A至图3C示出了网络图,其示出了在每个时间点NT与RT肿瘤之间差异调节的基因和上游调节子。在用RT治疗后的第1天(图3A)、第3天(图3B)和第7天(图3C),将基因和上游调节子分离到它们的细胞区室中。图3D示出了纵向途径分析气泡图(来自表3中的数据)。Y轴上列出了途径并且X轴上列出了时间点。气泡的颜色指示基因调节的方向。气泡的大小示出了该途径的表达值的绝对倍数变化。途径缩写:树突细胞(DC)与自然杀伤(NK)细胞之间的串扰;细菌和病毒的识别-模式识别受体在细菌和病毒识别中的作用;先天和适应性免疫系统-先天和适应性免疫细胞之间的通讯。

[0015] 图4A至图4F示出了RT导致肿瘤浸润性骨髓细胞群体的变化。从未治疗的肿瘤(NT)(黑色条)或RT后1、3或7天的RT治疗肿瘤(7Gy)(灰色条)(或时间匹配的NT对照)中分离细胞。图4A示出了通过流式细胞术分析的肿瘤样品中F4/80⁺细胞的存在。图4B和图4C示出了CD86和CD206在F4/80⁺细胞上的表达(MFI)。代表性直方图显示在同型对照(黑线)、NT(黑色填充部分)和RT(灰线)的对应条形图上方。图4D示出了为F4/80⁺的CD86⁺和CD206⁺细胞的百分比,并且盒须图示出了NT肿瘤(黑色)或RT治疗肿瘤(灰色)的CD86⁺/CD206⁺比率。图4E和图4F示出了肿瘤组织中CD11b⁺Gr1^{lo}和CD11b⁺Gr1^{hi}细胞的频率。绘制为平均值 \pm SEM。每组含有6只小鼠。当将NT与辐照组比较时, $*P<0.05$ 并且 $**P<0.01$ 。

[0016] 图5A至图5F示出了RT影响肿瘤浸润性淋巴细胞的频率和表型。从未治疗的肿瘤(NT)(黑色条)或RT后1、3或7天的RT治疗肿瘤(7Gy)(灰色条)(或时间匹配的NT对照)中分离细胞。图5A和图5B示出了CD4⁺和CD8⁺肿瘤浸润性T细胞的频率。图5C和图5D示出了CD4⁺和CD8⁺T细胞上的CD69表达。图5E示出了肿瘤浸润性CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺(T_{reg})细胞,表示为占CD4⁺群体的百分比。图5F示出了CD8⁺与T_{reg}细胞的比率。绘制为平均值 \pm SEM。每组含有6只小鼠。当将NT与辐照组比较时, $*P<0.05$ 并且 $**P<0.01$ 。

[0017] 图6A至图6G示出了RT导致肿瘤中PD-1和PD-L1的表达升高,这减弱了治疗的功效。从未治疗的肿瘤(NT)(黑色条)或RT后1、3或7天的RT治疗肿瘤(7Gy)(灰色条)(或时间匹配的NT对照)中分离细胞。图6A和图6B示出了CD4⁺和CD8⁺T细胞上的PD-1表达。图6C和图6D示出了CD4⁺和CD8⁺T细胞上的PD-L1表达。图6E示出了CD45⁺肿瘤细胞上的PD-L1表达。绘制为平均值 \pm SEM。当将NT与辐照组比较时, $*P<0.05$ 并且 $**P<0.01$ 。图6F和图6G示出了单独用7GyRT治疗或与以10mg/kg 3qw给药的 α PD-L1 mAb组合治疗1周后携带已形成肿瘤的小鼠的肿瘤生长曲线和卡普兰-迈耶曲线。实验组含有至少6只小鼠并且代表2项独立研究。 $**P<0.01$,相对于单独的7GyRT。 $**P<0.01$ 并且 $***P<0.001$,相对于NT对照。

[0018] 图7A至图7B示出了热图,其示出了来自在7Gy RT后第1、3和7天取出的辐照肿瘤组织的谱系(图7A)和表型(图7B)标志物的倍数变化,作为时间匹配的未治疗对照肿瘤的百分比。粗框值是相对于未治疗的时间匹配样品具有统计学显著性的那些。每组含有6只小鼠。

(曼-惠特尼U检验, $P < 0.05$)。

[0019] 图8A至图8D示出了用于分析肿瘤细胞群体的门控策略。图8A示出了对分离自脾的活白细胞的门控,用于绘制白细胞门控。图8B示出了肿瘤组织中的 $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ 细胞。图8C示出了脾和肿瘤组织中的 $CD11b^+Gr1^{lo}$ 和 hi 群体。图8D示出了 $CD45^-$ 肿瘤细胞。

[0020] 图9示出了在NT(黑色)或7Gy(灰色)RT后1、3或7天分离的肿瘤组织中 $CD45^+$ 细胞的百分比。 $P < 0.01$,曼-惠特尼U检验。每组含有6只小鼠。 $**P < 0.01$,曼-惠特尼检验。

[0021] 图10A至图10B示出了来自NT和RT治疗的肿瘤组织的 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 细胞中CD69(图10A)和PD-1(图10B)表达的代表性直方图。图10A示出了未填充的直方图是同型对照。图10B示出了图案化的直方图是同型对照,黑线是NT,灰线是7GyRT。

具体实施方式

[0022] 除非另外说明,否则本文使用的所有技术和科学术语均具有本披露所属领域的技术人员通常理解的含义。以下的参考文献为技术人员提供了本披露所用的多个术语的通用定义:Singleton等人,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology[微生物学和分子生物学词典](第2版1994);The Cambridge Dictionary of Science and Technology[剑桥科技词典](Walker编著,1988);The Glossary of Genetics[遗传学词汇],第5版,R.Rieger等人(编辑),SpringerVerlag[斯普林格出版社](1991);以及Hale和Marham,The Harper Collins Dictionary of Biology[哈珀科林斯生物学词典](1991)。除非另有指明,否则如本文所用的以下术语具有以下赋予它们的含义。

[0023] 在本披露中,“包含(comprises、comprising)”、“含有(containing)”和“具有(having)”等可以具有美国专利法赋予它们的意义并且可以意指“包括(includes、including)”等;“基本上由……组成(consisting essentially of或consists essentially)”同样具有美国专利法赋予的含义并且是开放性的,允许超出所叙述的存在,只要所叙述的基本或新颖特征不被超过叙述的存在改变,但是排除现有技术方面。

[0024] 除非明确说明或从上下文显而易见,否则如本文所用的术语“或”被理解为包括在内。除非明确说明或从上下文显而易见,否则如本文所用的术语“一种”、“一个”和“该”被理解为单数或复数。

[0025] 除非明确说明或从上下文显而易见,否则如本文所用的术语“约”被理解为在本领域的正常公差范围内,例如在平均数的2个标准偏差之内。约可以被理解为在声明值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、或0.01%之内。除非从上下文显而易见,否则本文提供的所有数值被该术语约修饰。

[0026] 可以将本文提供的任何组合物或方法与本文提供的任何其他组合物和方法中的一种或多种进行组合。

[0027] 本文提供的范围被理解为对该范围内的所有值的简写。例如,1到50的范围应当理解为包括来自下组的任何数字、数字的组合或子范围,该组由以下组成:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50。

[0028] 如本文所用,“抗PD-L1抗体”是指选择性结合PD-L1多肽的抗体或其抗原结合片段。示例性抗PD-L1抗体描述于例如美国专利号8,779,108和9,493,565中,这些专利通过援

引并入本文。

[0029] 如本文所用,术语“度伐鲁单抗”是指选择性结合PD-L1并阻断PD-L1与PD-1和CD80受体结合的抗体,如在美国专利号9,493,565(其中度伐鲁单抗被称为“2.14H90PT”)中披露的,该专利通过援引以其全文并入本文。度伐鲁单抗的片段可结晶(Fc)结构域在IgG1重链的恒定结构域中含有三重突变,该三重突变减少与负责介导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的补体组分C1q和Fc γ 受体的结合。度伐鲁单抗可以在体外解除PD-L1介导的对人T细胞激活的抑制,并且经由T细胞依赖性机制在异种移植物模型中抑制肿瘤生长。

[0030] “完全应答”(CR)是指所有病灶(无论是可测量的或不可测量的)消失,并且没有新的病灶。可以使用自第一次记载日期起不小于四周的重复连续评估来获得确认。新的不可测量的病灶排除在CR外。

[0031] “部分应答”(PR)是指相对于基线,肿瘤负荷减小 $\geq 50\%$ 。可以使用自第一次记载之日起至少四周的连续重复评估来获得确认。

[0032] “进行性疾病”(PD)是指相对于所记录的最小值(最低点),肿瘤负荷增加 $\geq 25\%$ 。可以通过自第一次记载日期起至少四周的连续重复评估来获得确认。新的不可测量的病灶没有定义PD。

[0033] “疾病稳定”(SD)是指不满足CR、PR或PD的标准。SD是指相对于基线无法建立50%的肿瘤负荷的减小,并且无法建立与最低点相比25%的增加。

[0034] 非小细胞肺癌(NSCLC)可指NSCLC的以下三种主要亚型中的任一种:鳞状细胞癌、腺癌和大细胞(未分化)癌。其他亚型包括腺鳞癌和肉瘤样癌。

[0035] 如本文所用,“PD-L1”可以指与PD-L1序列具有至少约85%、95%或100%序列同一性的多肽或多核苷酸序列或其片段。PD-L1在本领域中也称为B7-H1。在一些实施例中,PD-L1多肽或其片段与NCBI登录号NP_001254635具有至少约85%、95%或100%序列同一性,并且具有PD-1和CD80结合活性。

[0036] PD-L1多肽序列

[0037] NCBI登录号NP_001254635

```

1 mrifavfifm tywhllnapy nkinqrilvv dpvtsehelt cqaegyphae viwtssdhqv
[0038] 61 lsgkttttns kreeklfnvt stlrnttttn eifyctfrrl dpeenhtael vipelplahp
121 pnerthlvil gaillclgva ltfifrlrkg rmmdvkkcqi qdtnskkqsd thleet

```

[0039] 在一些实施例中,“PD-L1核酸分子”包含编码PD-L1多肽的多核苷酸。示例性PD-L1核酸分子序列以NCBI登录号NM_001267706提供。

[0040] PD-L1核酸序列

[0041] NCBI登录号NM_001267706 mRNA

1 ggcgcaacgc tgagcagctg ggcggtcccg cgcggcccca gttctgcgca gcttcccag
61 gctccgcacc agccgcgctt ctgtccgcct gcagggcatt ccagaaagat gaggatattt
121 gctgtcttta tattcatgac ctactggcat ttgtgaacg cccatacaa caaatcaac
181 caaagaattt tggttgtgga tccagtcacc tctgaacatg aactgacatg tcaggctgag
241 ggctacccca aggccgaagt catctggaca agcagtgacc atcaagtcct gagtggtgag
301 accaccacca ccaattccaa gagagaggag aagcttttca atgtgaccag cacactgaga
361 atcaacacaa caactaatga gattttctac tgcactttta ggagattaga tcttgaggaa
421 aaccatacag ctgaattggt catcccagaa ctacctctgg cacatcctcc aaatgaaagg
481 actcacttgg taattctggg agccatctta ttatgccttg gtgtagcact gacattcatc
541 ttccgtttta gaaaaggag aatgatggat gtgaaaaaat gtggcatcca agatacaaac
601 tcaaagaagc aaagtgatac acatttgag gagacgtaat ccagcattgg aacttctgat
661 cttcaagcag ggattctcaa cctgtggttt aggggttcat cgggctgag cgtgacaaga
721 ggaaggaatg ggcccgtggg atgcaggcaa tgtgggactt aaaaggccca agcactgaaa
781 atggaacctg gcgaaagcag aggaggagaa tgaagaaaga tggagtcaaa cagggagcct
841 ggaggagac cttgatactt tcaaatgcct gaggggctca tcgacgcctg tgacagggag
901 aaaggatact tctgaacaag gaggcctcaa gcaaatcatc cattgctcat cctaggaaga
961 cgggttgaga atccctaatt tgagggtcag ttctgcaga agtgccttt gcctccactc
1021 aatgcctcaa tttgttttct gcatgactga gagtctcagt gttggaacgg gacagtattt
1081 atgtatgagt ttttctatt tttttgagt ctgtgaggtc ttcttgcac gtgagtgtgg
1141 ttgtgaatga tttcttttga agatataatt tagtagatgt tacaattttg tcgcaaact
[0042] 1201 aaacttgctg cttaatgatt tgctcacatc tagtaaaaca tggagtattt gtaaggtgct
1261 tggctcctc tataactaca agtatacatt ggaagcataa agatcaaacc gttggttgca
1321 taggatgtca cttttattta accattaat actctggttg acctaattctt attctcagac
1381 ctcaagtgtc tgtgcagtat ctgttccatt taaatatcag ctttacaatt atgtggtagc
1441 ctacacacat aatctcattt catcgtgta accaccctgt tgtgataacc actattattt
1501 taccatcgt acagctgagg aagcaaacag attaagtaac ttgcccaaac cagtaaatag
1561 cagacctcag actgccacc actgtccttt tataatacaa ttacagcta tattttactt
1621 taagcaattc ttttattcaa aaaccattta ttaagtgcc ttgcaatc aatcgtctgt
1681 ccaggcattg aatctacaga tgtgagcaag acaaagtacc tgtcctcaag gagctcatag
1741 tataatgagg agattaacaa gaaaatgtat tattacaatt tagtccagtg tcatagcata
1801 aggatgatgc gaggggaaaa cccgagcagt gttgccaaga ggaggaaata ggccaatgtg
1861 gtctgggacg gttggatata cttaaacatc ttaataatca gagtaatttt catttaciaa
1921 gagaggtcgg tacttaaaat aaccctgaaa aataaactg gaattccttt tctagcatta
1981 tatttattcc tgatttgcct ttgcatata atctaagtct tgtttatata gtgtctggta
2041 ttgtttaaca gttctgtctt ttctatttaa atgccactaa attttaaatt catacctttc
2101 catgattcaa aattcaaaag atcccatggg agatggttgg aaaatctcca cttcatcctc
2161 caagccattc aagtttctt tccagaagca actgctactg ctttcatc atagtctt
2221 ctaaagatag tctacatttg gaaatgtatg ttaaaagcac gtatttttaa aatttttttc
2281 ctaaatagta acacattgta tgtctgctgt gtactttgct atttttattt attttagtgt
2341 ttcttatata gcagatggaa tgaatttgaa gttcccaggg ctgaggatcc atgccttctt
2401 tgtttctaag ttatctttcc catagctttt cattatcttt catatgatcc agtatatggt

```

2461 aaatatgtcc tacatataca tttagacaac caccatttgt taagtatttg ctctaggaca
2521 gagtttggat ttgtttatgt ttgctcaaaa ggagacccat gggctctcca ggggtgactg
2581 agtcaatcta gtcctaaaaa gcaatcttat tattaactct gtatgacaga atcatgtctg
2641 gaacttttgt tttctgcttt ctgtcaagta taaacttcac tttgatgctg tacttgcaaa
2701 atcacatttt ctttctggaa attccggcag tgtaccttga ctgctagcta ccctgtgcca
2761 gaaaagcctc attcgttctg cttgaaccct tgaatgccac cagctgtcat cactacacag
2821 ccctcctaag aggcttctctg gaggtttcga gattcagatg ccctgggaga tcccagagtt
[0043] 2881 tcctttccct cttggccata ttctgggtgc aatgacaagg agtaccttgg ctttgccaca
2941 tgtcaaggct gaagaaacag tgtctccaac agagctcctt gtgttatctg tttgtacatg
3001 tgcatttcta cagtaattgg tgtgacagtg ttctttgtgt gaattacagg caagaattgt
3061 ggctgagcaa ggcacatagt ctactcagtc tattcctaag tcctaactcc tccttgtggt
3121 gttggatttg taaggcactt tatccctttt gtctcatggt tcatcgtaaa tggcataggc
3181 agagatgata cctaattctg catttgattg tcactttttg tacctgcatt aatttaataa
3241 aatattctta tttattttgt tacttggtac accagcatgt ccattttctt gtttattttg
3301 tgtttaataa aatgttcagt ttaacatccc agtggagaaa gttaaaaaa

```

[0044] 程序性死亡-1 (“PD-1”)是T细胞调节子的扩展的CD28/CTLA4家族的大约31kD I型膜蛋白成员(参见Ishida等人,“Induced Expression of PD-1,A Novel Member of the Immunoglobulin Gene Superfamily,Upon Programmed Cell Death[程序性细胞死亡诱导的PD-1(免疫球蛋白基因超家族的新成员)的表达],”EMBOJ.[欧洲分子生物学组织杂志]11:3887-95(1992))。

[0045] PD-1在激活的T细胞、B细胞和单核细胞上表达(Agata等人,“Expression of the PD-1 Antigen on the Surface of Stimulated Mouse T and B Lymphocytes[PD-1抗原在经刺激的小鼠T和B淋巴细胞表面上的表达],”Int.Immunol.[国际免疫学]8(5):765-72(1996);Yamazaki等人,“Expression of Programmed Death 1 Ligands by Murine T Cells and APC[鼠T细胞和APC对程序性死亡1配体的表达],”J.Immunol.[免疫学杂志]169:5538-45(2002))以及在自然杀伤(NK)T细胞中低水平表达(Nishimura等人,“Facilitation of Beta Selection and Modification of Positive Selection in the Thymus of PD-1-Deficient Mice[PD-1缺陷小鼠的胸腺中 β 选择的易化和阳性选择的修饰],”J.Exp.Med.[实验医学杂志]191:891-98(2000);Martin-Orozco等人,“Inhibitory Costimulation and Anti-Tumor Immunity[抑制性共刺激和抗肿瘤免疫],”Semin.Cancer Biol.[癌症生物学研讨会]17(4):288-98(2007))。PD-1是负责在通过结合PDL-1或PDL-2进行激活后下调免疫系统的受体(Martin-Orozco等人(2007))并作为细胞死亡诱导剂起作用(Ishida等人(1992);Subudhi等人,“The Balance of Immune Responses:Costimulation Versus Coinhibition[免疫应答的平衡:共刺激与共抑制],”J.Molec.Med.[分子医学杂志]83:193-202(2005);Lazar-Molnar等人,“Crystal Structure of the Complex Between Programmed Death-1(PD-1)and Its Ligand PD-L2[程序性死亡1(PD-1)与其配体PD-L2之间的复合物的晶体结构],”Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.[美国国家科学院院刊]105(30):10483-88(2008))。经由PD-L1的过表达在许多肿瘤中利用该过程,导致免疫应答受到抑制。

[0046] PD-1是肿瘤学中免疫介导疗法的充分验证的靶标,其中临床试验在治疗黑色素瘤和非小细胞肺癌(NSCLC)等其他方面具有阳性。拮抗性抑制PD-1/PDL-1相互作用增加T细胞激活,增强宿主免疫系统对肿瘤细胞的识别和消除。已经提出使用抗PD-1抗体来治疗感染

和肿瘤并上调适应性免疫应答。

[0047] 如本文所用,术语“抗体”是指免疫球蛋白或其片段或衍生物,并且涵盖包含抗原结合位点的任何多肽,无论其是在体外还是在体内产生。该术语包括但不限于:多克隆、单克隆、单特异性、多特异性、非特异性、人源化、人单链、嵌合、合成、重组、杂交、突变、以及接枝抗体。除非用术语“完整”另外修饰,如在“完整抗体”中,否则出于本披露内容的目的,术语“抗体”还包括抗体片段例如Fab、F(ab')₂、Fv、scFv、Fd、dAb以及保留抗原结合功能(即,特异性结合PD-L1的能力)的其他抗体片段。典型地,此类片段将包含抗原结合结构域。

[0048] 如本文所用的术语“人抗体”包括具有实质上对应于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。

[0049] 如本文所用,术语“抗原结合结构域”、“抗原结合片段”和“结合片段”是指抗体分子的包含负责抗体和抗原之间特异性结合的氨基酸的一部分。在抗原很大的一些情况下,抗原结合结构域可以仅结合到该抗原的一部分。抗原分子的负责与抗原结合结构域特异性相互作用的一部分被称为“表位”或“抗原决定簇”。抗原结合结构域典型地包含抗体轻链可变区(V_L)和抗体重链可变区(V_H);但是,它不一定必须包含两者。例如,所谓的Fd抗体片段仅由V_H结构域组成,但是仍然保留完整抗体的一定抗原结合功能。

[0050] 抗体的结合片段通过重组DNA技术或通过完整抗体的酶促或化学裂解来产生。结合片段包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv以及单链抗体。除了“双特异性”或“双功能”抗体以外,抗体应理解为其每个结合位点是相同的抗体。用酶(木瓜蛋白酶)消化抗体产生两个同一的抗原结合片段,又称为“Fab”片段和“Fc”片段,它们不具有抗原结合活性但具有结晶的能力。用酶(胃蛋白酶)来消化抗体的结果是F(ab')₂片段,其中该抗体分子的两个臂保持连接并且包含两个抗原结合位点。F(ab')₂片段具有交联抗原的能力。如本文所用,术语“Fv”是指保留了抗原识别和抗原结合位点两者的抗体的最小片段。如本文所用,术语“Fab”是指抗体的包含轻链的恒定结构域和重链的CHI结构域的片段。

[0051] 如本文所用,术语“mAb”是指单克隆抗体。本披露的抗体包括但不限于:全天然抗体、双特异性抗体;嵌合抗体;Fab、Fab'、单链V区片段(scFv)、融合多肽、和非常规抗体。

[0052] 如本文所用,术语“分离的”、“纯化的”或“生物学上纯的”是指在不同程度上不含在其天然状态下发现的通常伴随其的组分材料。“分离”表示与初始来源或环境的分开程度。“纯化”表示高于分离的分开程度。“纯化的”或“生物学上纯的”蛋白质最大限度地不含其他材料,这样使得任何杂质不实质上影响蛋白质的生物特性或导致其他不利后果。

[0053] 如本文所用,术语“特异性结合”意指识别并结合一种分子(例如,多肽),但是基本上不识别和不结合样品(例如,生物样品)中的其他分子的化合物(例如,抗体)。例如,特异性结合的两个分子形成在生理条件下相对稳定的复合物。特异性结合的特征在于区别于非特异性结合的高亲和力和低等至中等容量,非特异性结合通常具有低亲和力以及中等至高容量。典型地,当亲和力常数K_A高于10⁶M⁻¹,或更优选地高于10⁸M⁻¹时,结合被认为是特异的。如果需要的话,可以通过改变结合条件来减少非特异性结合,基本上不影响特异性结合。适当的结合条件,诸如抗体浓度、溶液的离子强度、温度、结合允许的时间、阻断剂(例如,血清白蛋白、乳清酪蛋白)的浓度等,可以由熟练技术人员使用常规技术优化。

[0054] 如本文通常所用的,术语“治疗(treat、treating、treatment等)”是指减少、改善或减缓障碍或疾病的进展和/或与障碍或疾病相关的症状。将被理解的是,尽管不能排除,

但是治疗障碍、疾病或病症并不要求完全地消除该障碍、疾病或病症或与其相关的症状。在与NSCLC有关的特定实施例中，“治疗(treat、treating、treatment)”可以指实现主要或次要临床终点中的任一个或组合。

[0055] 本文提供了一种延长患有不可切除的非小细胞肺癌(NSCLC)的患者的无进展生存期(PFS)的方法,该方法包括同时用人抗PD-L1抗体和放化疗来治疗患者。

[0056] 本文还提供了一种增加患有不可切除NSCLC的患者的总应答率(ORR)的方法,该方法包括同时用人抗PD-L1抗体和放化疗来治疗患者。

[0057] 本文还提供了治疗患有III期不可切除NSCLC的患者的方法,该方法包括同时用人抗PD-L1抗体和放化疗来治疗患者。

[0058] 在一些实施例中,人抗PD-L1抗体是度伐鲁单抗、阿维鲁单抗(avelumab)、阿特珠单抗(atezolizumab)或舒格利单抗(sugemalimab)。在一些实施例中,人抗PD-L1抗体是度伐鲁单抗、阿维鲁单抗或阿特珠单抗。在一些实施例中,人抗PD-L1抗体是度伐鲁单抗。

[0059] 用于在本文提供的方法中使用的度伐鲁单抗和其抗原结合片段包含重链和轻链或重链可变区和轻链可变区。度伐鲁单抗轻链可变区的氨基酸序列以SEQ ID NO:1提供,并且度伐鲁单抗重链可变区的氨基酸序列以SEQ ID NO:2提供。度伐鲁单抗重链可变区互补决定区(CDR)的氨基酸序列分别以SEQ ID NO:3(CDR1)、SEQ ID NO:4(CDR2)和SEQ ID NO:5(CDR3)提供,并且度伐鲁单抗轻链可变区CDR的氨基酸序列分别以SEQ ID NO:6(CDR1)、SEQ ID NO:7(CDR2)和SEQ ID NO:8(CDR3)提供。

[0060] 在一些实施例中,用于在本文提供的方法中使用的度伐鲁单抗或其抗原结合片段包含轻链可变区和重链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,该重链可变区包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。在一些实施例中,用于在本文提供的方法中使用的度伐鲁单抗或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,其中该重链可变区包含SEQ ID NO:3-5的卡巴特(Kabat)定义的CDR1、CDR2和CDR3序列,并且其中该轻链可变区包含SEQ ID NO:6-8的卡巴特定义的CDR1、CDR2和CDR3序列。本领域普通技术人员将能够容易地鉴定本领域普通技术人员已知的乔西亚定义的、Abm定义的或其他的CDR定义。在一些实施例中,用于在本文提供的方法中使用的度伐鲁单抗或其抗原结合片段包含如在美国专利号8,779,108和9,493,565(其通过援引以其全文并入本文)中披露的2.14H90PT抗体的可变重链和可变轻链CDR序列。

[0061] 度伐鲁单抗或其抗原结合片段可每四周施用一次,同时为患者提供益处。在另外的实施例中,向患者施用另外的后续剂量。可以取决于患者的年龄、体重、临床评估、肿瘤负荷和/或其他因素(包括主治医师的判断),以不同时间间隔施用后继剂量。

[0062] 在一些实施例中,向患者施用多剂量的度伐鲁单抗或其抗原结合片段。在一些实施例中,可向患者施用至少三个剂量、至少四个剂量、至少五个剂量、至少六个剂量、至少七个剂量、至少八个剂量、至少九个剂量、至少十个剂量、至少十五个剂量、至少二十六个剂量或多于至少二十个剂量。在一些实施例中,每两周、在两周时段内、在四周治疗期内、在六周治疗期内、在八周治疗期内、在十二周治疗期内、在二十四周治疗期内、在一年治疗期内或超过一年治疗期内施用度伐鲁单抗或其抗原结合片段。

[0063] 在一些实施例中,剂量之间的间隔可以是每三周。在一些实施例中,剂量之间的间隔可以是每四周(Q4W)。在一些实施例中,剂量之间的间隔可以是每两个月(例如,在维持阶

段期间)。

[0064] 在一些实施例中,向患者施用一个或多个剂量的抗PD-L1或其抗原结合片段,其中该剂量是1500mg的固定剂量。在一些实施例中,每四周向患者施用1500mg人抗PD-L1。在一些实施例中,向患者施用一个或多个剂量的抗PD-L1,其中该剂量是约20mg/kg。在一些实施例中,每四周(Q4W)向患者静脉内施用1500mg人抗PD-L1抗体。

[0065] 在一些实施例中,向患者施用一个或多个剂量的度伐鲁单抗或其抗原结合片段,其中该剂量是1500mg的固定剂量。在一些实施例中,每四周向患者施用1500mg的度伐鲁单抗。在一些实施例中,向患者施用一个或多个剂量的度伐鲁单抗,其中该剂量是约20mg/kg。

[0066] 有待向患者施用的度伐鲁单抗或其抗原结合片段的量可作调整并可取决于不同参数,如患者的年龄、体重、临床评估、肿瘤负荷和/或其他因素(包括主治医师的判断)。在一些实施例中,剂量是固定剂量。

[0067] 在一些实施例中,根据本文提供的方法施用度伐鲁单抗或其抗原结合片段是通过肠胃外施用。例如,可以通过静脉内输注或通过皮下注射来施用度伐鲁单抗或其抗原结合片段。在一些实施例中,施用通过静脉内输注进行。

[0068] 在一些实施例中,度伐鲁单抗或其抗原结合片段与放化疗同时施用。如本文所用,术语“同时”是指度伐鲁单抗或其抗原结合片段的施用和放化疗的施用彼此在约三天内。在一些实施例中,度伐鲁单抗或其抗原结合片段在放化疗的约两天内施用。在一些实施例中,度伐鲁单抗或其抗原结合片段在放化疗的约一天内施用。在一些实施例中,度伐鲁单抗或其抗原结合片段在放化疗的第1周期第1天施用。

[0069] 在一些实施例中,抗PD-L1抗体在放化疗的第一天施用。

[0070] 在一些实施例中,放化疗包含基于铂的治疗剂。

[0071] 在一些实施例中,同时放化疗包括用于晚期NSCLC患者的任何公认的标准一线治疗。在一些实施例中,标准一线治疗可包括化疗、放疗或两者(放化疗)。在一些实施例中,疗法可包含一种或多种基于铂的化学治疗剂。在一些实施例中,放化疗是基于铂的。在一些实施例中,该一种或多种基于铂的化疗剂可选自卡铂、顺铂、奥沙利铂或它们的组合。如本文所述,基于铂的疗法可包括单重或双重方案,诸如例如,与另一种抗癌剂诸如紫杉醇、多西他赛、依托泊苷、吉西他滨、长春瑞滨等一起施用顺铂或卡铂。

[0072] 本披露涉及治疗患有不可切除的局部晚期非小细胞肺癌(NSCLC)的患者的方法,该方法包括向该患者同时施用人抗PD-L1抗体和放化疗。所披露的治疗方法可在患者的无进展生存期(PFS)、总应答率(ORR)、总生存期(OS)和自随机化起24个月时存活的患者比例(OS24)方面提供实质性改善。

[0073] 在一些实施例中,该方法提供了相对于安慰剂的PFS增加。在一些实施例中,该方法提供相对于安慰剂的ORR增加。在一些实施例中,该方法提供了相对于安慰剂的OS增加。

[0074] 在一些实施例中,提供了一种同时包含人抗PD-L1抗体和放化疗的组合,该组合在延长患有不可切除的非小细胞肺癌(NSCLC)的患者的无进展生存期(PFS)的方法中使用。在一些实施例中,提供了一种同时包含人抗PD-L1抗体和放化疗的组合,该组合在增加患有不可切除的非小细胞肺癌(NSCLC)的患者的总应答率(ORR)的方法中使用。在一些实施例中,提供了一种同时包含人抗PD-L1抗体和放化疗的组合,该组合在治疗III期不可切除的非小细胞肺癌(NSCLC)中使用。

[0075] 在一些实施例中,提供了同时包含人抗PD-L1抗体和放化疗的组合在制造药物中的用途,还药物在延长患有不可切除的非小细胞肺癌(NSCLC)的患者的无进展生存期(PFS)的方法中使用。在一些实施例中,提供了同时包含人抗PD-L1抗体和放化疗的组合在制造药物中的用途,该药物在增加患有不可切除的非小细胞肺癌(NSCLC)的患者的总应答率(ORR)的方法中使用。在一些实施例中,提供了同时包含人抗PD-L1抗体和放化疗的组合在制造药物中的用途,该药物在治疗III期不可切除的非小细胞肺癌(NSCLC)中使用。

[0076] 总生存期(OS)与从治疗日期到(因任何原因导致的)死亡日期的时间段有关。OS可以指一段时间(例如12个月、18个月、24个月等)内的总生存期。此类时间段可以被识别为例如“OS24”,其是指根据24个月总生存期的卡普兰-迈耶估计,在治疗开始后24个月还存活的患者人数(%)。

[0077] 无进展生存期(PFS)与从治疗日期到客观疾病进展(RECIST 1.1)或(无进展情况下因任何原因导致的)死亡日期的时间段有关。在一些实施例中,本披露的方法提供了PFS的增加。在一些实施例中,该方法提供了至少9个月至至少约24个月(例如,至少9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或超过24个月,且至多约5年)的PFS。

[0078] 客观应答率(ORR)是指至少一次访视完全应答(CR)或部分应答(PR)(根据RECIST 1.1)的患者数(%)。

[0079] 如本文所述,并通过实例举例说明的,该方法提供了局部晚期的不可切除的NSCLC的治疗。在一些实施例中,不可切除的癌症包括由于几个医学原因中的至少一种而不能通过手术完全去除的癌症。癌症为何不可切除的原因包括例如肿瘤大小(例如,太大而不能安全地去除和/或可能需要广泛地去除一部分重要器官)、肿瘤位置(例如,肿瘤与重要结构诸如血管或神经物理地缠绕)、肿瘤转移(其中去除肿瘤将不能有效控制所有癌症)、或将手术风险提高到不可接受水平的其他医学病症(例如,心脏病、肺病、糖尿病)。此外,不可切除的NSCLC在侵袭性治疗后可能不是永久不可切除的,侵袭性治疗可有效地将肿瘤大小减小至允许可能的手术切除的程度。此外,不可切除的NSCLC还可以指不能通过手术完全去除但可通过一种或多种手术部分去除的NSCLC(或远端转移)。实例包括减积手术和去除部分肺癌以及部分转移性病灶的手术。

[0080] 在某些实施例中,本文披露的方法可用于可切除的癌症。

[0081] 如本文所描述和说明的,本披露的方法可用于治疗患有晚期(例如,III期)局部晚期的不可切除的NSCLC的患者。可以使用本领域通常已知和接受的任何测试来进行癌症分期。在一些实施例中,癌症分期可包括美国癌症联合委员会(AJCC)的TNM系统。通常,TNM系统提供来自各种测试和扫描的结果,以确定原发性肿瘤(肿瘤,T)的大小和位置;癌症是否已经扩散到淋巴结,并且如果已经扩散,受影响的淋巴结的位置和数量(淋巴结,N);以及癌症是否已经扩散到身体的其他部分,并且如果已经扩散,则还包括远程癌症的程度和位置(转移,M)。尽管每种类型的癌症都有其特定系统,但TNM分期系统通常使用每个字母的量表分数。

[0082] 在一些实施例中,不可切除的NSCLC是III期的。在一些实施例中,不可切除的NSCLC是局部晚期的。在一些实施例中,不可切除的NSCLC是III期且局部晚期的。

[0083] 对于肿瘤,“T”与数字(例如,0至4)相关联以描述肿瘤的总体大小、位置以及是否侵入附近组织。更大或更多的侵入性肿瘤的编号更高,根据癌症的不同,可以添加小写字

母,诸如“a”、“b”或“m”(表示多个)以提供更多细节。

[0084] 类似地,对于淋巴结,“N”与数字(例如,0至3)相关联以描述是否在淋巴结中发现了癌症,并且还可以指示含有癌症的淋巴结的数目。当癌症累及更多的淋巴结时,分配的數字更大。

[0085] 对于转移,“M”指示癌症是否已扩散到身体的其他部位,并标记为M0表示未扩散,或标记为M1(如果扩散)。

[0086] 将T、N和M结果结合起来以确定癌症的分期,通常是以下四个分期之一:I期(一)至IV期(四)。一些癌症也具有0期(零)。0期描述保留在原始组织局部而没有扩散到附近组织的原位癌。这一分期的癌症通常是高度可治愈的,通常可以通过手术切除整个肿瘤。I期或早期癌症通常用于描述尚未深入附近组织并且尚未扩散到淋巴结或身体其他部位的较小的癌症或肿瘤。II期和III期描述了已深入生长到附近组织、并且可能已经扩散到淋巴结但未转移到其他组织的较大的癌症或肿瘤。IV期描述了已经扩散到身体其他器官或部位的癌症,并且通常被确定为晚期癌症或转移性癌症。

[0087] 分期可以包括对预后因素进行选择分析,以提供恢复的机会和推荐的疗法。预后因素可包括:基于癌细胞的外观对癌症进行分级;肿瘤标志物表达分析;以及肿瘤遗传学分析。

[0088] 为了确定治疗的功效或获得关于复发性癌症的更多信息,可使用相同的初始系统对癌症再分期。

[0089] NSCLC的分期:NSCLC具有5个分期:0期(零)和I至IV(1至4)期。0期NSCLC表明癌症尚未生长到附近组织中或扩散到肺外。

[0090] I期NSCLC表明癌症是没有扩散到任何淋巴结的小肿瘤。根据肿瘤的大小,I期分为2个亚期:IA期肿瘤宽度小于3厘米(cm),IB期肿瘤宽度大于3cm但小于5cm。I期NSCLC可允许癌症的完全手术去除。

[0091] II期分为2个亚期(IIA和IIB)。IIA期可以是没有扩散到附近的淋巴结的宽度大于5cm但小于7cm的肿瘤,或者是已经扩散到附近的淋巴结的宽度小于5cm的小肿瘤。IIB期可描述已经扩散到淋巴结的宽度大于5cm但小于7cm的肿瘤,或可能已经或可能没有生长到肺的附近结构中但没有扩散到淋巴结的宽度大于7cm的肿瘤。尽管II期NSCLC可允许手术治疗,但治疗该阶段的NSCLC通常需要其他疗法。

[0092] III期包括IIIA或IIIB亚期。手术在许多IIIA期癌症和几乎所有IIIB期癌症中是困难或不可能的,因为癌症扩散到淋巴结或因为其生长到肺中的附近结构中。任一情况下的手术通常需要部分去除癌症。

[0093] IV期NSCLC与向另一个肺中多于一个区域的扩散、肺或心脏周围的流体或体内远处转移相关。NSCLC更可能扩散至脑、骨、肝和肾上腺。IV期NSCLC包括IVA(在胸腔内扩散)和IVB(在胸腔外扩散)亚期。对于大多数III或IV期NSCLC,手术很少成功,并且如果其已经扩散到锁骨上方的淋巴结,或扩散到胸部内的重要结构(例如,心脏、大血管、或主要肺结构),则可能不可能去除。在某些实施例中,本文披露的患者是IV期NSCLC患者。

[0094] 在治疗过程后检测到复发性NSCLC。

[0095] 除非另外指明,否则本文披露的方法的实施采用很好地处在于普通技术人员能力范围内的分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技

术。此类技术在文献中被充分阐明,诸如,“Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册]”,第二版(Sambrook,1989);“Oligonucleotide Synthesis[寡核苷酸合成]”(Gait,1984);“Animal Cell Culture[动物细胞培养]”(Freshney,1987);“Methods in Enzymology[酶学方法]”;“Handbook of Experimental Immunology[实验免疫学手册]”(Weir,1996);“Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells[用于哺乳动物细胞的基因转移载体]”(Miller and Calos,1987);“Current Protocols in Molecular Biology[分子生物学现代方法]”(Ausubel,1987);“PCR:The Polymerase Chain Reaction[PCR:聚合酶链式反应]”,(Mullis,1994);和“Current Protocols in Immunology[免疫学现代方法]”(Coligan,1991)。

[0096] 实例

[0097] 实例1:度伐鲁单抗与基于铂的放化疗组合在患有局部晚期的不可切除的非小细胞肺癌(III期)的患者中的功效

[0098] 这是一项评估与基于铂的放化疗(CRT)同时给予的度伐鲁单抗(度伐鲁单抗+标准护理[SoC]CRT)在患有局部晚期的不可切除NSCLC(III期)的患者中的功效和安全性的III期、随机、双盲、安慰剂对照、多中心、国际研究。

[0099] 将招募约390名患有局部晚期的不可切除NSCLC(III期)的患者,并将300名患者以2:1比率随机分组到度伐鲁单抗+SoC CRT或安慰剂+SoC CRT。将按年龄(<65岁相对于≥65岁)和分期(IIIA相对于IIIB/C)对患者进行分层。

[0100] 本研究中的受试者包括患有组织学或细胞学记录的NSCLC的≥18岁的成年受试者,其呈现出局部晚期的不可切除(III期)的疾病。要求所有受试者具有足够的器官和骨髓功能。

[0101] 如果受试者先前接受过或当前在接受NSCLC治疗,包括但不限于放疗、试验药、化疗和mAb,则排除参与本研究。

[0102] 所有患者除了放疗外,还将接受一种以下基于铂的SoC化疗选择:顺铂/依托泊苷、卡铂/紫杉醇、培美曲塞/顺铂或培美曲塞/卡铂。

[0103] 化疗治疗方案概述于表1中。

[0104]

表 1: 研究治疗

	度伐鲁单抗	安慰剂	标准护理 ^a	卡铂/紫杉醇	培美曲塞/ 顺铂 ^b	培美曲塞/ 卡铂 ^b	放射
研究治疗名称:	度伐鲁单抗 (MEDI4736)	盐水溶液	顺铂/依托泊苷	卡铂/紫杉醇	培美曲塞/ 顺铂 ^b	培美曲塞/ 卡铂 ^b	放射
剂量	稀释后用于输注的 500 mg 小瓶溶液,	注射用 0.9% (w/v) 氯化钠无菌溶液	本地提供	本地提供	本地提供	本地提供	本地提供
配方: ^c	50 mg/mL						
施用途径	IV	IV	IV	IV	IV	IV	体外放射
给药说明: ^d	1500 mg IV q4w ^e	盐水体积匹配度抗鲁单抗	第 1 天和第 8 天顺铂 50 mg/m ² 第 1-5 天依托泊苷 50 mg/m ² , q28 天 × 2 个周期 + 1 个可选的额外诱导周期 同步胸部放疗	第 1 天卡铂 AUC 2 和紫杉醇 40-50 mg/m ² , 每周一次, 持续 6 周-同时胸部放疗 可选: 紫杉醇 175-200 mg/m ² 和卡铂 AUC 5-6 q 21 天, 作为放疗开始前的 1 个诱导周期或作为放疗完成后的 1-2 个巩固周期给予	在每个 21 天周期的第 1 天培美曲塞 500 mg/m ² 和顺铂 75 mg/m ² , 持续 3 个周期 + 1 个可选的额外诱导周期	在每个 21 天周期的第 1 天培美曲塞 500 mg/m ² 和卡铂 AUC 5, 持续 4 个周期	5 次/周, 持续约 6 周 (± 3 天) (总计 60 Gy)
包装和标签	在 500 mg 小瓶中提供, 按照 GMP 附录 I3 和国家法规要求标注 ^f	由研究中心本地提供	由研究中心本地提供	由研究中心本地提供	由研究中心本地提供	由研究中心本地提供	由研究中心本地提供

[0105]

提供商	度伐鲁单抗 阿斯利康公司 (AstraZeneca)	安慰剂	标准护理 ^a	由研究中心 本地提供 ^g	由研究中心 本地提供 ^g	由研究中心 本地提供 ^g	由研究中心 本地提供 ^g	由研究中心 本地提供 ^g
-----	----------------------------------	-----	-------------------	----------------------------	----------------------------	----------------------------	----------------------------	----------------------------

[0106] 患者还将每四周经由静脉输注同时接受度伐鲁单抗1500mg或安慰剂与SoC CRT (即,从第1周期第1天[±3天]开始)。在完成SoC CRT后的第16周肿瘤评价时具有完全应答

(CR)、部分应答(PR)或稳定疾病(SD)的患者将继续接受度伐鲁单抗/安慰剂作为巩固治疗(1500mg q4w IV)。在完成SoC CRT后的第16周肿瘤评价时具有RECIST 1.1定义的放射学进行性疾病的患者将继续进行随访。基于75kg的平均体重,1500mg的度伐鲁单抗q4w的固定剂量相当于20mg/kg q4w。

[0107] 本研究的主要目的是评估度伐鲁单抗+SoC CRT与安慰剂+SoC CRT相比在根据实体瘤1.1版(RECIST 1.1)中的应答评价标准的无进展生存期方面的功效,如通过盲态独立中心审查(BICR)所评估。关键次要终点(即,被包括在多个测试过程中的那些)是通过BICR评估的根据RECIST 1.1的客观应答率、总生存期、和在随机化后24个月时存活的患者比例(OS24)。

[0108] 实例2:在展示放疗的免疫学后果的同系鼠肿瘤模型中的基因表达

[0109] 材料和方法

[0110] 鼠肿瘤模型。在无特定病原体的条件下将小鼠圈养在Tecniplast1284IVC笼中,该笼最多容纳6只动物并带有aspenchips-2垫料、sizzlenest筑巢材料和纸板通道。将小鼠以12/12光/暗循环圈养,并给予过滤水并随意喂食Teklad Global 19%蛋白质挤出啮齿动物饮食。

[0111] 将CT26结肠腺癌细胞系(2011年购自美国典型培养物保藏中心(ATCC))在补充有10%(v/v)胎牛血清和1%(v/v)L-谷氨酰胺(体内基因公司(Invivogen))的达尔伯克氏改良伊格尔培养基中培养。将细胞传代不超过3个月,并定期筛选以证实没有支原体(mycoplasma)感染(PlasmoTest,英国生物生命科学资源公司(Source BioScience LifeSciences,U.K.))。将 1×10^5 个CT26细胞皮下(s.c.)注射到Balb/c小鼠(英国哈兰实验室(Harlan Laboratories,U.K.))的背部,距离尾巴根部1cm。用卡尺测量肿瘤体积,即长x宽x深,以 mm^3 为单位,并且每天监测重量。

[0112] 肿瘤疗法。当肿瘤达到 $100-200\text{mm}^3$ 时递送局部放射。将小鼠限制在铅护罩中,仅暴露肿瘤以允许局部暴露于使用12mA和2Gy/min剂量率的250kV x-射线(MXR-320/36x-射线管,瑞士彗星公司(Comet AG,Switzerland))的7Gy单剂量的IR。在辐照后1、3和7天将小鼠与时间匹配的未治疗对照一起处死。收获肿瘤并新鲜用于流式细胞术分析,其中将来自每个肿瘤的至少20mg组织速冻用于基因微阵列分析。对于组合研究,小鼠接受RT,然后接受10mg/kg α PD-L1单克隆抗体(mAb)(克隆10F.9G2,英国百进生技公司(Biolegend,U.K.)),3qw给药1周并在RT的第1天开始。当肿瘤达到 1000mm^3 体积时处死小鼠,或在疗法后100天处死长期存活(LTS)的小鼠。流式细胞术表型研究和组合研究代表两个独立的实验。

[0113] 外显子微阵列分析。对于微阵列评估,在每个时间点对来自每个治疗组的5个不同肿瘤取样进行单一研究。使用RNStat 60(英国阿姆斯特比奥公司(Amsbio,U.K.))进行新鲜冷冻的RNA提取,并使用2100生物分析仪(英国安捷伦公司(Agilent,U.K.))进行总RNA的质量控制测试。使用Ovation Pico WTA系统v2(荷兰努根科技公司(NuGEN Technologies,Netherlands))扩增样品。在QC测试后,使用Encore生物素模块(荷兰努根科技公司)将cDNA片段化并标记,然后根据用于Affymetrix GeneChip®阵列的努根指南将其与小鼠外显子阵列杂交。使用小鼠外显子1.0ST阵列(英国昂飞公司(Affymetrix,U.K.))进行微阵列分析。所有微阵列数据已被存入GEO(登录号GSE74875)。

[0114] 数据分析。原始微阵列数据经历了对核心转录物探针进行预处理/标准化的稳健

多芯片算法 (RMA) (Bolstad等人, *Bioinformatics* [生物资讯学] 19 (2) :185-93 (2003))。然后进行质量控制, 排除数据完整性评估后的三个异常值 (一个来自第1天的每个治疗组, 一个来自第3天的放射治疗组)。去除Affy AFFX对照转录物以及非信息转录物 (\log_2 表达阈值 < 3.6473 并且方差阈值 < 0.0088)。8500个可靠检测的转录物Id (Affymetrix转录物聚类Id) 仍待分析。

[0115] 在每个时间点对治疗组 (未治疗对辐照) 进行比较, 并使用0.05的截止p值 (ANOVA) 鉴定差异表达的转录物Id (上调或下调)。对于未治疗的肿瘤组计算每个时间点每个转录物Id的中值 \log_2 强度值, 然后从在它们的等同时间点的治疗样品中减去, 得到每个时间点的对照标准化转录物表达强度。分层聚类分析 (HCA); 进行非标准化、连锁 = Ward和距离 = 非中心相关 (OmicsoftArrayStudio) 以将每个样品的对照标准化转录物表达数据和转录物Id聚类。将途径分类的差异调节的基因集数据在每个时间点绘制为气泡图 (MatLab), 其中气泡的颜色指示基因调节的方向。气泡的大小表示每个途径的表达值的绝对倍数变化。使用BioMart (小家鼠基因GRCm38.p2) 和IDconverter将小鼠基因注释分配给转录物Id (Alibes等人, *BMC Bioinformatics* [BMC生物资讯学] 8:9. doi:10.1186/1471-2105-8-9 (2007))。使用Ingenuity途径分析 (IPA, Ingenuity® 系统) 进行功能富集和网络分析。上调或下调至少1.5倍的转录物被映射到途径和上游调节子。用g:Profiler中的g:GOST函数进行基因本体富集分析 (Reimand等人, (2011更新), *NucleicAcidsRes.* [核酸研究] 39 (Web服务器出版): W307-15. doi:10.1093/nar/gkr378 (2011))。

[0116] 流式细胞术。将肿瘤切成 1mm^3 片, 并在PBS中的 2U/mL DNase (英国西格玛公司 (Sigma, U.K.))、 300CDU/mL 胶原酶I (英国生命科技公司 (Life Technologies, U.K.)) 和 0.9mg/mL 分散酶II (英国西格玛公司) 中在 37°C 下温育40分钟, 并用FACS缓冲液 (具有10% FCS的PBS) 推动通过 $100\mu\text{m}$ 细胞过滤器。CD4、CD8 (英国碧迪生物科学公司 (BD Biosciences, U.K.))、CD11b、CD11c、CD45、CD69、CD86、CD206 (英国百进生技公司 (Biolegend, U.K.))、MHC-II、F4/80、Gr1、NKp46、B220、PD-1和CTLA-4 (除非另有说明, 否则均来自英国电子生物科学公司 (eBiosciences, U.K.)) 的表达在与CD16/CD32 Fc阻断抗体 (英国生命科技公司) 一起孵育后通过流式细胞术进行分析。包括活力染色 (英国生命科技公司) 以排除死细胞。使用小鼠调节性T细胞染色试剂盒#3 (英国电子生物科学公司) 分析调节性T细胞。

[0117] 统计分析。使用曼-惠特尼U检验比较两组之间的流式细胞术数据和肿瘤体积。如上所述评估基因表达谱数据。对生存期数据进行对数秩Mantel-Cox测试。如果 $P < 0.05$, 则认为数据显著不同。

[0118] RT导致先天和适应性免疫的激活。携带已形成的CT26肿瘤的免疫活性Ba1b/c小鼠接受单次 7Gy 剂量的RT并且在治疗后1、3和7天切除肿瘤 (图2A和图2C) 用于外显子微阵列分析以鉴定早期转录变化。将辐照肿瘤的转录组与未治疗 (NT) 时间匹配对照的转录组进行比较, 导致鉴定出对于这些时间点中的至少一个时间点显著差异表达 (上调或下调) 的757个基因 (± 1.5 倍变化, 并且 $p \leq 0.05$) (表2)。除了预期的p53激活途径 (放射依赖性DNA损伤和细胞死亡) 之外, 对数据的IPA功能富集分析强调了对先天和适应性免疫功能的强烈偏倚。这些包括抗原呈递、T细胞激活和细胞毒性以及趋化因子产生 (图2B和图3, 以及表3和表4)。值得注意的是, 差异调节基因的数目从第1天到第7天明显增加 (表2)。

[0119] 表2: 在不同时间点满足截止阈值 ($\geq \pm 1.5$ 倍变化并且 $p \leq 0.05$, ANOVA) 的上调或

下调基因的数目。

[0120]		第1天	第3天	第7天
	≥ 1.5 倍变化	205	275	503
	≤ -1.5 倍变化	185	242	205
	每日差异调节基因总数	390	517	708

[0121] 表3:在7Gy IR后CT26肿瘤中在三个时间点(第1、3和7天)与差异表达基因(倍数变化 $=\pm 1.5$ 并且 $p \leq 0.05$)相关的关键主要免疫途径(通过IPA软件分析)。*在多个时间点涉及的途径。突出显示了具有最显著p值的前10个中存在的非疾病相关免疫途径。

	途径	小鼠基因	-log (p值)
[0122]	第1天		
	抗原呈递途径	Psmb9、Ifng、H2-Q4、H2-Aa、Psmb8、Cd74、Tap1、H2-DMa、H2-DMb1、H2-DMb2、Tapbp、H2-Eb1	18.6
	先天和适应性免疫细胞之间的通讯*	Ifng、Cd40lg、H2-Q4、Il15、Cd8a、Cd8b1、Cxcl10、Ccl4、Ccl3、Il1b、Tnf、H2-Eb1	14.4
	树突细胞成熟*	Cd40lg、H2-Q4、Il15、H2-Aa、H2-Ab1、H2-DMa、H2-DMb1、H2-DMb2、Il1b、Stat2、Stat1、Tnf、H2-Eb1、Fcgr4	9.36
	辅助性T细胞分化	Ifng、Cd40lg、H2-DMa、H2-DMb1、H2-DMb2、H2-Aa、H2-Ab1、Stat1、Tnf、H2-Eb1	9.11
[0122]	第3天		
	粒细胞粘附和血细胞渗出*	Il1a、VCAM1、Cxcl11、Ppbp、Il1rl1、Cxcl12、Ccl17、Mmp13、Ccl5、Cldn6、Cxcl10、Cxcl16、Cxcl3、Ccl4、Il1rn、Ccl3、Ccl2、Cxcl14、Cxcl1、Ccl7	11.9
	无粒细胞粘附和血细胞渗出*	Il1a、Vcam1、Cxcl11、Ppbp、Cxcl12、Ccl17、Mmp13、Ccl5、Cldn6、Cxcl10、Cxcl16、Cxcl3、Ccl4、Il1rn、Ccl3、Ccl2、Cxcl14、Cxcl1、Ccl7	10.5
	先天和适应性免疫细胞之间的通讯*	Cxcl10、Il1a、Ccl4、Cd80、Il1rn、Ccl3、Il15、Ccl5、Tlr3、H2-Eb1	8.5
	树突细胞成熟*	Il1a、Il15、H2-Aa、Col10a1、H2-Ab1、Cd80、H2-DMa、Il1rn、Pik3cg、H2-DMb1、H2-DMb2、Stat2、Tlr3、Stat1、H2-Eb1、Col3a1	7.63

[0123]	第7天		
	粒细胞粘附和血细胞渗出*	Sell、Sele、Cxcl11、Cxcl12、Thy1、Mmp2、Ccl5、Ccl11、Cldn6、Itgal、Ccl9、Selplg、Il1r2、Cxcl10、Ccl4、Selp、Il1rn、Ccl3、Ccl2、Tnf、Ccl6、Ccl7、Mmp19、Itga4	11.9
	先天和适应性免疫细胞之间的通讯*	Ifng、Il15、Ccl5、Cd8a、Tlr9、Cd8b1、Ccl9、Cxcl10、Cd28、Ccl4、Il1rn、Ccl3、Tlr3、Tnf	8.98
	无粒细胞粘附和血细胞渗出*	Sell、Sele、Cxcl11、Cxcl12、Mmp2、Ccl5、Ccl11、Cldn6、Ccl9、Selplg、Cxcl10、Ccl4、Selp、Il1rn、Ccl3、Ccl2、Tnf、Ccl6、Ccl7、Mmp19、Itga4	8.92
	T细胞受体信号传导	Camk4、Prkcg、Cd3e、Cd8a、Cd8b1、Cd3d、Ctla4、Ptprc、Cd28、Cd3g、Lck、Txk、Card11、Grap2、Lat、Itk	8.54
	模式识别受体在细菌和病毒识别中的作用	Ifng、Oas1a、Oas1g、Prkcg、C3、Oas2、Ccl5、Oas3、Tlr9、Ifih1、Irf7、Ddx58、Casp1、Prkch、Eif2ak2、Tlr3、Tnf	7.24
	树突状细胞与自然杀伤细胞之间的串扰	Ifng、Cd28、Prfl、Klrd1、Il15、Cd226、Ltb、Tnfsf10、Tlr3、Tlr9、Tnf、Itgal	6.68
干扰素信号传导	Ifit3、Ifng、Oas1a、Oas1g、Ifi35、Stat2、Irf9、Psm8、Stat1	6.33	

[0124] 表4:将来自热图(图2)的每个聚类(A-E)中的关键基因分类为具有免疫或放射调节关联的功能组。示出了在每个时间点(放射治疗的与未治疗的肿瘤相比)的基因表达倍数变化,显著性p值用星号显示($p \leq 0.05^*$; $p \leq 0.01^{**}$; $p \leq 0.005^{***}$)。功能分类由Nanostring nCounter小鼠PanCancer免疫谱分析组和作者的知识指导。

[0125]

	基因名称	聚类	第1天 (倍数变化)	第3天 (倍数变化)	第7天 (倍数变化)
T细胞和 细胞毒性	Cd3d	A	1.84	-2.47**	3.97***
	Cd3g	A	1.37	-1.94	3.35***
	Cd3e	A	1.46	-1.72	3.09***
	Cd8a	A	2.16*	-1.69	3.38***
	Cd28	A	-1.05	-1.24	3.39***
	Pdcd1 (Pd1)	A	-1.05	-1.25	1.95***
	Ctla4	A	1.07	-1.09	2.54***
	Icos	A	1.03	-1.17	1.78***
	Lag3	A	1.01	1.04	2.24***
	Entpd1 (Cd39)	A	1.38	-1.09	1.63***
	Havcr2 (Tim3)	A	-1.05	1.04	2.54***
	Ifng	A	1.67**	1.24	1.99***
	Il15	B	1.61***	2.65***	2.14***
	Tnfsf9 (Cd137)	B	1.15	1.5*	1.12
	Cd274 (Pd-I1)	C	2.41	2.29***	2.11***
	Tnf	C	1.53*	1.1	1.71**
	Sell (Cd62l)	C	1.48	1.39	-1.6**
Cd40lg	C	1.7**	-1.17	-1.47	
Gzmb	C	2.58*	3.75***	4.04***	
先天免疫 应答	Tlr9	A	1.24	1.16	1.68***
	C2	A	1.32	1.1	1.84***
	Stat4	A	1.05	-1.36	2.25***
	Tlr3	B	1.21	2.21***	2.24***
	Nos2	B	1.46	1.82***	1.79***
	Cfb	B	1.35	1.44	2.66***
	Irf7	B	1.27	2.77***	4.39***
	Irf9	B	1.22	1.39	1.71***
	Mx1	B	1.53	3.68***	5.41***
	Oas1a/Oas1g	B	1.42	1.92***	2.82***
	Oas2	B	1.27	2.15**	2.54***
	Irf1	C	2.14***	1.41	1.49
Stat1	C	2.08***	1.61*	1.85***	

[0126]

	Stat2	C	1.64*	2.05***	2.38***
	C3	C	1.98***	1.42	2.24***
	C1ra	C	1.37	1.48	1.87***
	C1rb	C	1.37	1.48	1.87***
	Cd74	D	2.21**	-2.02**	-1.19
	Retnla	D	-1.55	-6.93***	2.54
	Mrc1	E	-1.34	-1.89***	-1.41
	Cd163	E	-1.58**	-1.96***	1.09
放射依赖性DNA损伤修复和细胞死亡	Tnfsf10 (Trail)	A	1.22	1.62*	1.63***
	Casp4	B	1.54***	2.09***	1.85***
	Parp11	B	1.24	1.79***	2.01***
	Cdkn1a	C	1.46	1.7***	1.24
	Fas	C	1.8***	1.52*	1.31
	Parp14	C	1.53	1.8*	2.51***
	Parp12	C	1.32	1.76**	2.06***
	Parp9	C	1.44	1.72***	1.97***
	Brca1	E	-1.07	-1.2	-1.59***
	Brca2	E	-1.04	-1.18	-1.59***
	Ercc1	E	-1.02	-1.13	-1.77***
	Lig4	E	-1.83*	-1.59	-1.33
	Pola1	E	-1.09	-1.32	-1.56***
	Gadd45a	E	-2.13***	-1.53*	-1.2
Parpbp	E	1.33	-1.11	-1.56*	
Hist1h4h	E	-1.87***	-1.81***	-1.35	
Hist2h4	E	-1.72*	-1.83**	-1.06	
抗原呈递和B细胞	Cd80	B	1.26	1.87***	1.37
	Psmb8	C	1.84***	1.4	1.52*
	Psmb9	C	2.03***	1.43	1.4
	Psmb10	C	1.59*	1.55*	1.51*
	Tap1	C	1.85***	1.37	1.48
	Tapbp	C	1.51**	1.6***	1.6***
	H2-DMa	D	1.6**	-1.54**	-1.05
	H2-DMb1	D	1.61*	-1.9***	-1.24
	H2-DMb2	D	1.61*	-1.9***	-1.24
	H2-Aa	D	1.95*	-2.28***	1.02

[0127]		H2-Ab1	D	1.66*	-1.72*	1.01
		H2-Eb1	D	2.08*	-2.43***	-1.02
		Prkcb	D	-1.26	-2.48***	1.32
		Cd24a	D	1.02	-2.32*	1.31
		Cd93	D	-1.03	-1.73***	-1.13
		Cd38	D	1.59**	-1.09	1.26
		Cd209d	D	-1.18	-2.02***	1.12
		Cd209c	D	-1.08	-1.96***	-1.04
	趋化因子	Cxcl10	B	2.12*	3.04***	2.58***
		Ccl2	B	1.38	1.9***	1.51**
		Ccl5	B	1.44	1.75*	4.17***
		Ccl6	B	1.08	1.33	1.51*
		Ccl7	B	1.25	1.63**	1.97***
		Cxcl1	C	2.58***	2.41***	1.26
		Cxcl2	C	1.59	3.63***	1.15
		Cxcl11	C	2.7**	3.1***	2.72***
		Ccl3	C	2.4**	2.28**	2.63***
Ccl4		C	2.37***	2.48***	3.45***	
Ccl11	D	1.04	-1.29	3.24***		
Ccr2	D	1.22	-1.56*	1.3		
Cxcl9	D	4.25***	-1.02	1		
Cxcl12	D	1.38	-1.64*	1.77*		
Cxcl14	D	-1.07	-2.26***	1.38		
Cxcl16	D	1.37	-1.57***	-1.11		
Ccl17	E	-1.21	-1.56**	-1.18		

[0128] 在由在每个时间点显著差异调节的最高免疫相关上游调节子构建的网络图中,应答模式也是明显的(图3)。此外,途径分析强调30.8%的上调和下调基因与免疫系统过程相关(GO:0002376),给出了用该基因集观察到的 $4.35E-72$ 的最显著富集p值,强调了在辐照后的7天中免疫过程的优势。然而,仅超过5%的基因在所有3个时间点显示出相似的行为(38个上调/3个下调),因此强调了在所评估的3个时间点的放射应答中的不同阶段。

[0129] 差异表达基因的详细分级聚类分析(HCA)鉴定出5个聚类,每个聚类含有在不同时间点共同调节的基因(图2B)。当与对照肿瘤中的表达相比时,聚类A中的基因在第7天显著上调。途径分析证明这些基因中的绝大多数与适应性免疫细胞应答相关,包括T细胞受体信号传导和CD28信号传导。说明这一点是Cd3d/e/g、Cd8a和Cd28表达增加,提示 $CD3^+/CD8^+$ T细胞的浸润或扩增增加。Ifn γ 的上调也提示有活性抗肿瘤免疫应答的迹象。另一个上调的目的基因是Tnfsf10,其编码细胞死亡受体TRAIL。已知放射诱导肿瘤细胞表面表达细胞死亡受体及其配体,并且T细胞上TRAIL的上调可经由激活TRAIL受体帮助直接杀伤肿瘤细胞。有

有趣的是,观察到的抑制性免疫检查点诸如Pd-1、Lag3和Ctla4的同时表达提示该适应性免疫应答可能是短暂的。这种免疫抑制性肿瘤微环境的发展也通过Cd39/Entpd1的上调而加强,已知其与Cd73的酶活性相关,有助于腺苷依赖性免疫细胞抑制。

[0130] 第二聚类(B)不仅富集了与先天免疫相关的基因,而且富集了编码参与免疫系统的先天和适应性组之间的通讯的蛋白质的基因。在实验过程期间这些基因被连续上调。一些基因在第1天显著上调,但大多数基因的表达从第3天显著上调。这种表达模式提示先天免疫应答在早期开始,并且在单次剂量RT后的第一周内保持相对恒定。该聚类中的相关基因包括Cd80,它是APC上表达的共刺激受体,以及IL15,它是单核细胞和树突细胞表达的细胞因子,作为天然杀伤细胞和T细胞的有效诱导物/激活物。此外,聚类B含有Nos2(由激活巨噬细胞上的IFN γ 诱导的酶)、Cfb(补体因子B,其中催化亚基Bb可激活C3转化酶以随后激活B细胞)和tol1样受体3(Tlr3)。此外,在该聚类中富集了I型和II型干扰素调节基因,包括Irf7、Irf9、Mx1、Oas1a/g和Oas2,以及趋化因子基因Cxc110、Cc12/5/6和7。

[0131] 聚类C的分布在时间点上更一致,并且在按时间响应方面可被认为是“第一基因聚类”。它包含在较早时间点(第1天和第3天)显著上调的一大组基因,其中较小的亚组在较晚时间点(第3天至第7天)上调。先天免疫应答、放射依赖性DNA损伤修复和细胞死亡以及趋化因子是该聚类中的主要功能富集,但也存在与T细胞和细胞毒性以及抗原呈递和B细胞相关的几个基因。与先天免疫相关的基因包括编码补体的基因,诸如C3、C1ra和C1rb,以及干扰素调节基因,包括Stat1。有趣的是,在所有三个时间点的IPA功能富集分析中,Stat1作为上游调节子是突出的(图3和表4)。趋化因子诸如Cc14(与巨噬细胞和NK细胞的募集相关的趋化因子)在第1天也强烈上调;与抗原加工相关的基因也是如此(Psmb8/9/10、Tap1和Tapbp)。放射依赖性DNA损伤修复和细胞死亡以及T细胞和细胞毒性是该聚类中的主要功能富集。值得注意并验证的数据集是与p53信号传导相关的基因的表达,其与IR的直接作用有关。由IR引起的细胞应激诸如DNA损伤激活p53、抑制细胞增殖并引发肿瘤细胞凋亡。例如,p53激活诱导细胞周期进展基因Cdkn1a的抑制剂的表达(在第3天上调1.7倍, $p < 0.01$)。类似地,已知死亡受体Fas(在第1天上调1.8倍, $p < 0.01$)被激活的p53诱导并使细胞对表达FAS配体的免疫效应细胞敏感。与适应性免疫相关的上调基因包括Cd401g(通常在激活的CD4⁺ T细胞上表达);免疫检查点蛋白Pd-11(Cd274),其从第3天起显著上调;以及Gzmb(粒酶B),其除了其在靶细胞杀伤中的功能之外,还参与基底膜重塑和淋巴细胞迁移,并且从第1天起显著上调。

[0132] 在第3天显著下调之前,聚类D中的基因在第1天瞬时上调。途径分析表明与抗原呈递(H2基因、Cd74、Cd209d和Cd209c)和B细胞激活(Cd24a)以及趋化因子表达(Cxc19和Cxc112)相关的基因的富集。到第7天,抗原呈递和B细胞相关基因中没有一个是被显著差异地调节,这提示效应级联进一步沿免疫功能途径向下发展。

[0133] 最后鉴定的聚类(聚类E)是最大的聚类,含有180个基因。放射依赖性DNA损伤修复是关键的功能富集,某些基因早在第1天就明显下调(第1天Lig4;第1天和第3天Gadd45a或第7天Brca1、Brca2、Ercc1、Pola1和Parbp)。该数据支持先前的研究,这些研究揭示了在辐照后24小时内DNA的快速修复。最后,鉴定出胆固醇生物合成下调与放射之间的强关联。

[0134] 总之,转录组学分析证实对CT26肿瘤的单剂量放射触发p53依赖性细胞死亡。触发细胞死亡可能是在辐照肿瘤中引发先天和适应性免疫应答的限速步骤。实际上,基因表达

谱提示RT诱导的肿瘤细胞死亡导致先天免疫的募集和激活 (IFN α 表达、抗原加工/呈递、巨噬细胞募集和树突细胞成熟),随后激活适应性免疫应答 (IFN γ 信号传导、T细胞毒性、T细胞受体信号传导和B细胞激活)。然而,对于任何生理系统,如通过几个免疫抑制分子的表达增加所证明的,这种生物免疫应答预计是短暂的。

[0135] 为了验证基因微阵列数据并进一步研究在蛋白质水平上IR后免疫组分的表型变化,通过流式细胞术平行分析相同的组织。显示来自匹配肿瘤组织的谱系和表型标志物的倍数变化的热图总结于图7中。

[0136] RT改变肿瘤浸润性骨髓细胞群体的表型。巨噬细胞显示高度的谱系可塑性,然而肿瘤相关巨噬细胞 (TAM) 在许多癌症类型中主要偏向M2表型。M2细胞表达CD206 (也称为甘露糖受体或MRC1),是不良的APC,并且可通过释放促血管生成和免疫抑制因子而促进免疫逃逸和疾病进展。相比之下,M1分化的巨噬细胞共表达共刺激分子诸如CD86,从而能够有效激活淋巴细胞。分析了RT治疗的和时间匹配的NT对照肿瘤中TAM的频率和分化状态。虽然F4/80⁺ TAM的总数在RT后没有显著改变 (图4A),但调节了CD86和CD206的表达。在RT七天后,相对于NT时间匹配的对照,F4/80⁺细胞具有降低的CD86表达 (NT组的MFI为695.0 \pm 46.6,而辐照组的MFI为494.7 \pm 13.9, $P < 0.05$;图4B)。此外,在RT 3天后,肿瘤浸润性F4/80⁺细胞上的CD206表达显著降低 (NT中的MFI为263.7 \pm 23.8,而辐照肿瘤中的MFI为99.5 \pm 8.1, $P < 0.001$;图4C)。在RT后第7天也观察到这种表达的降低。在转录组学分析中也观察到相似的应答模式 (表4)。相对于时间匹配的NT对照,CD86⁺与CD206⁺阳性F4/80⁺细胞的比率在第3天增加 (1.8 \pm 0.05NT相对于2.7 \pm 0.12辐照, $P < 0.01$) (图4D)。除了CD86和CD206表达的变化外,辐照后基因谱数据中观察到的Nos2和Stat1表达的增加也提示巨噬细胞表型的改变 (图3和表4)。此外,还在RT 3天后鉴定出与M2样表型相关的抵抗素样 α (Retn1a) 和Cd163的基因表达的降低 (分别为6.9倍和2倍) (图3和表4)。鉴于没有发现总TAM数的变化,这些数据提示RT导致巨噬细胞向M1表型的瞬时极化。

[0137] 髓源性抑制细胞 (MDSC) 具有抑制抗肿瘤免疫应答的能力,因此可能影响RT的免疫原性。虽然在RT后的任何时间点均未观察到肿瘤浸润性CD11b⁺Gr1^{lo}细胞的频率变化 (图4E和图8的门控策略),但在RT治疗的肿瘤中在第3天观察到CD11b⁺Gr1^{hi}细胞 (表型定义为MDSC) 增加2.7倍 (图4F)。由于到第7天,在NT和RT治疗组之间没有观察到CD11b⁺Gr1^{hi}细胞频率的显著差异,这种增加表现为短暂的。

[0138] RT导致T细胞激活并改变肿瘤中的CD8:Treg比率。尽管RT导致浸润肿瘤的CD45⁺细胞的比例总体增加 (图9),但发现当与时间匹配的对照相比时,在RT 3天后CD4⁺和CD8⁺ T细胞数分别减少52%和63% (图5A和5B)。虽然CD4⁺ T细胞数在治疗7天后保持耗尽,但CD8⁺ T细胞数已经恢复并且在RT治疗的肿瘤中存在强烈的扩增趋势 (15.9 \pm 3.0%至25.9 \pm 3.8%。 $P = 0.06$)。有趣的是,相对于时间匹配的对照 (图5C和图5D以及图10A),在剩余的肿瘤浸润性CD4⁺ (在RT后第3天和第7天) 和CD8⁺ (在RT后第1天和第3天) T细胞上观察到早期激活标志物CD69的表达升高,提示RT已诱导了T细胞激活。

[0139] 甚至在NT肿瘤中,具有Treg表型的CD4⁺细胞的比例从第1天至第7天增加3.3倍 (图5E),表明了肿瘤微环境随时间变化的方式。然而,时间匹配的肿瘤的比较揭示,当在治疗7天后评估时,RT进一步使Treg的频率额外增加32%。尽管如此,CD8:Treg细胞比率 (通常被报道与癌症中更好的预后相关) 当与第7天NT对照相比时在RT治疗的肿瘤中高2.5倍 (图

5F)。

[0140] RT导致PD-1和PD-L1在肿瘤微环境中的表达,这限制了抗肿瘤功效。基因谱数据揭示RT导致肿瘤中几个共抑制性免疫检查点的表达增加。考虑到RT后在mRNA水平上观察到的Pd-11的一致上调和第7天Pdc1 (PD-1) 的表达(图3和表4),最初的研究集中于PD-1/PD-L1途径。流式细胞术允许进一步了解mRNA数据的来龙去脉,并揭示了RT 7天后CD4⁺和CD8⁺ T细胞上PD-1和PD-L1的表达增加(图6A至图6D和图10B)。此外,RT还导致在所有测试时间点肿瘤细胞上PD-L1的表达增加(图6E)。该数据与在mRNA水平上观察到的表达模式非常相似(图3和表4)。

[0141] 进行治疗性研究以确定PD-1/PD-L1轴的阻断是否会影响RT的抗肿瘤功效。小鼠接受单独的或与 α PD-L1 mAb组合的RT(7Gy作为单剂量)。NT队列中的中位生存期为15.5天, α PD-L1 mAb作为单一疗法3qw递送时中位生存期未显著改善(中位生存期=18天;图6F和图6G)。然而,当与单独的任一单一疗法相比时,当与 α PD-L1mAb组合递送时,RT导致生存期显著改善,其中>70%的小鼠经历了完全治疗应答。

序列表

SEQ ID NO: 1

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFS
GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIK

[0142]

SEQ ID NO: 2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSV
KGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGLTQVTS

SEQ ID NO: 3 - VH CDR1

GFTFSRYWMS

SEQ ID NO: 4 - VH CDR2

NIKQDGSEKYYVDSVKG

SEQ ID NO: 5 - VH CDR3

EGGWFGELAFDY

[0143]

SEQ ID NO: 6 - VL CDR1

RASQRVSSSYLA

SEQ ID NO: 7 - VL CDR2

DASSRAT

SEQ ID NO: 8 - VL CDR3

QQYGSLPWT

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 3

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Trp Met Ser
 1 5 10

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 4

Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 5

Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 6

Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 7

Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 8

Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 9

<211> 176

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 9

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu

1 5 10 15

Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro

20 25 30

Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys			
35	40	45	
Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys			
50	55	60	
Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr			
65	70	75	80
Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr			
85	90	95	
Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile			
100	105	110	
Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His Leu Val			
115	120	125	
Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile			
130	135	140	
Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile			
145	150	155	160
Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu Glu Thr			
165	170	175	

<210> 10

<211> 3349

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 10

ggcgcaacgc tgagcagctg gcgctccccg cgcggcccca gttctgcgca gcttcccag	60
gctccgcacc agccgcgctt ctgtccgcct gcagggcatt ccagaaagat gaggatattt	120
gctgtcttta tattcatgac ctactggcat ttgctgaacg cccatacaa caaatcaac	180
caaagaattt tggttgtgga tccagtcacc tctgaacatg aactgacatg tcaggctgag	240
ggctacccca aggccgaagt catctggaca agcagtgacc atcaagtcct gactggtgtaag	300
accaccacca ccaattccaa gagagaggag aagcttttca atgtgaccag cacactgaga	360
atcaacacaa caactaatga gattttctac tgcactttta ggagattaga tcttgaggaa	420
aaccatacag ctgaattggt catcccagaa ctacctctgg cacatcctcc aatgaaagg	480
actcacttgg taattctggg agccatctta ttatgcttg gtgtagcact gacattcatc	540
ttccgtttaa gaaaaggag aatgatggat gtgaaaaat gtggcatcca agatacaaac	600
tcaaagaagc aaagtgatac acatttggag gagacgtaat ccagcattgg aacttctgat	660
cttcaagcag ggattctcaa cctgtggttt aggggttcat cggggctgag cgtgacaaga	720
ggaaggaatg ggcccgtggg atgcaggcaa tgtgggactt aaaaggccca agcactgaaa	780
atggaacctg gcgaaagcag aggaggagaa tgaagaaaga tggagtcaaa caggagcct	840
ggagggagac cttgatactt tcaaatgcct gaggggtca tcgacgctg tgacagggag	900
aaaggatact tctgaacaag gagcctccaa gcaaatcatc cattgctcat cctaggaaga	960

cgggttgaga	atccctaatt	tgagggtcag	ttcctgcaga	agtgcccttt	gcctccactc	1020
aatgcctcaa	tttgttttct	gcatgactga	gagtctcagt	gttggaacgg	gacagtattt	1080
atgtatgagt	ttttcctatt	tattttgagt	ctgtgaggtc	ttcttgatcat	gtgagtgtgg	1140
ttgtgaatga	tttcttttga	agatatattg	tagtagatgt	tacaattttg	tcgccaaact	1200
aaacttgctg	cttaatgatt	tgctcacatc	tagtaaaaca	tggagtattd	gtaaggtgct	1260
tggctcctc	tataactaca	agtatacatt	ggaagcataa	agatcaaacc	gttggttgca	1320
taggatgtca	cctttattta	accattaat	actctggttg	acctaactct	attctcagac	1380
ctcaagtgtc	tgtgcagtat	ctgttccatt	taaatatcag	ctttacaatt	atgtggtagc	1440
ctacacacat	aatctcattt	catcgtgta	accacctgt	tgtgataacc	actattattd	1500
tacccatcgt	acagctgagg	aagcaaacag	attaagtaac	ttgcccaaac	cagtaaatag	1560
cagacctcag	actgccacc	actgtccttt	tataatacaa	tttacagcta	tattdtactt	1620
taagcaattc	ttttattcaa	aaaccattta	ttaagtgcc	ttgcaatata	aatcgtctgt	1680
ccaggcattg	aatctacaga	tgtgagcaag	acaagtacc	tgtctcaag	gagctcatag	1740
tataatgagg	agattaacaa	gaaaatgtat	tattacaatt	tagtccagt	tcatagcata	1800
aggatgatgc	gaggggaaaa	cccagcagt	gttgccaaga	ggaggaaata	ggccaatgtg	1860
gtctgggacg	gttgatata	cttaaacatc	ttaataatca	gagtaattd	catttaciaa	1920
gagaggtcgg	tacttaaaat	aacctgaaa	aataaacctg	gaattccttd	tctagcatta	1980
tattdattcc	tgatttgctt	ttgcatata	atctaagtct	tgtttatata	gtgtctggta	2040
ttgtttaaca	gttctgtctt	ttctatttaa	atgccactaa	attdtaatt	cataccttd	2100
catgattcaa	aattcaaaag	atcccatggg	agatggttg	aaaatctcca	cttcatctc	2160
caagccattc	aagtttcctt	tccagaagca	actgctactg	ccttdcattc	atatgttctt	2220
ctaaagatag	tctacatttg	gaaatgtatg	ttaaagcac	gtattdttaa	aattdtdttd	2280
ctaaatagta	acacattgta	tgtctgctgt	gtactttgct	attdtdattd	attdtagtgt	2340
ttcttatata	gcagatggaa	tgaatttgaa	gttcccagg	ctgaggatcc	atgccttdttd	2400
tgttdtctaag	ttatcttdcc	catagcttd	cattatcttd	catatgatcc	agtatatgtd	2460
aaatatgtcc	tacatataca	tttagacaac	caccatttgt	taagtatttg	ctctaggaca	2520
gagtdtgat	ttgttdatgt	ttgctcaaaa	ggagaccat	gggtctcca	gggtgcactg	2580
agtcaatcta	gtcctaaaaa	gcaatcttat	tattaactct	gtatgacaga	atcatgtctg	2640
gaacttdtgt	tttctgcttd	ctgtcaagta	taaacttca	tttgatgctg	tacttgcaaa	2700
atcacattd	cttdctggaa	attccggcag	tgtacctga	ctgctagcta	ccctgtgcca	2760
gaaaagcctc	attcgttdtg	cttgaacct	tgaatgccac	cagctgtcat	cactacacag	2820
ccctcctaag	aggttdctg	gaggttdcga	gattcagatg	ccctgggaga	tcccagagtd	2880
tccttdccct	cttdggcata	ttctggtgtc	aatgacaagg	agtacctg	cttdgccaca	2940
tgtcaaggct	gaagaaacag	tgtctccaac	agagctcttd	gtgttatctg	ttgtacatg	3000
tgcatttdgta	cagtaattgg	tgtgacagt	ttcttdgtgt	gaattacagg	caagaattgt	3060
ggctgagcaa	ggcacatagt	ctactcagtc	tattdctaag	tdctaactcc	tccttdgtgtd	3120
gttdgatttd	taaggcactt	tatcccttd	gtctcatgtd	tcctcgtaaa	tggcataggc	3180
agagatgata	cctaattctg	catttdgatt	tcacttdtd	tacctgcatt	aattdtaata	3240
aatattctta	ttattdtdgt	tacttdgtac	accagcatgt	ccattdtdtd	gttdattdtd	3300

tgtttaataa aatgttcagt ttaacatccc agtggagaaa gttaaaaaa

3349

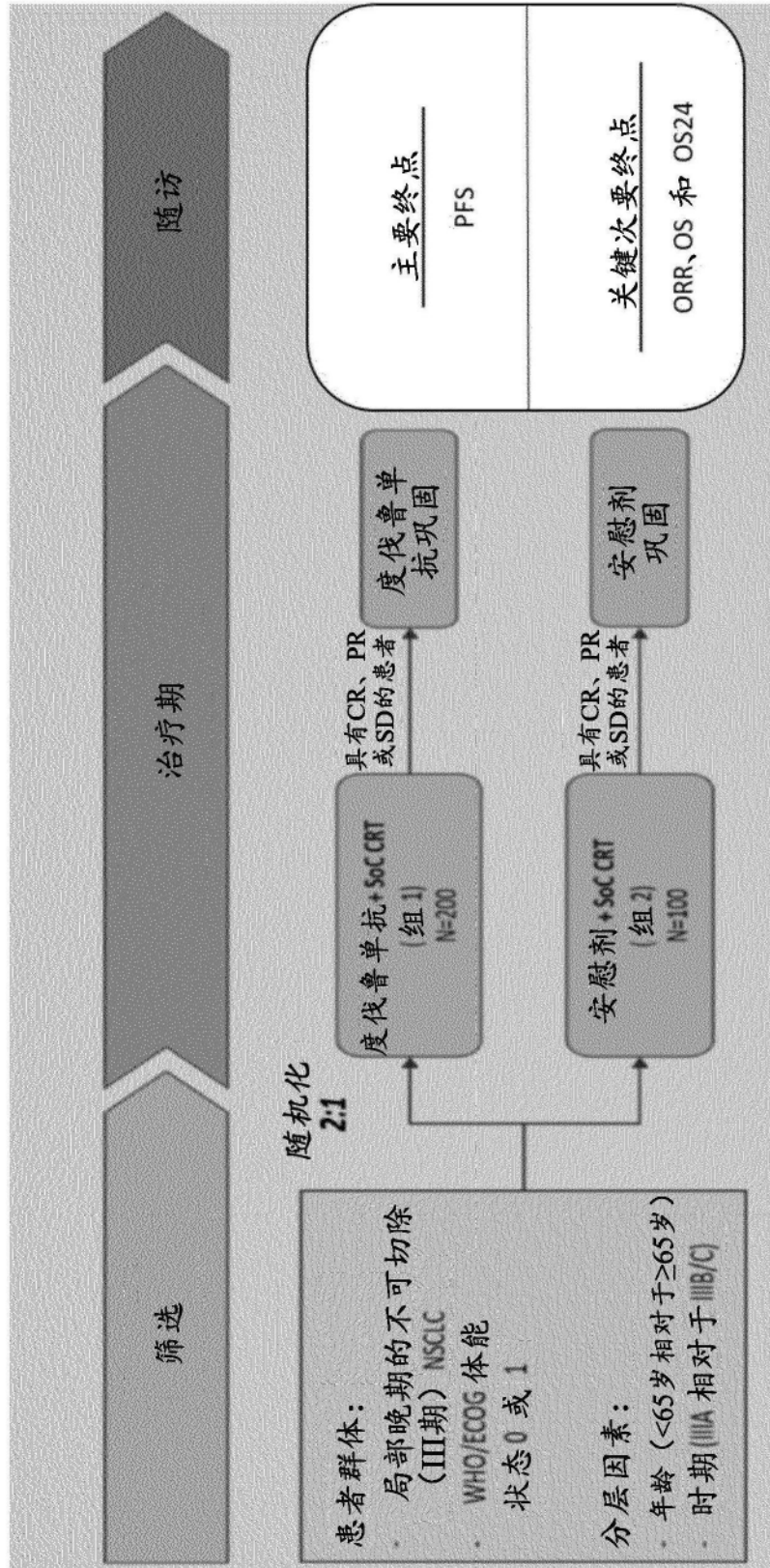
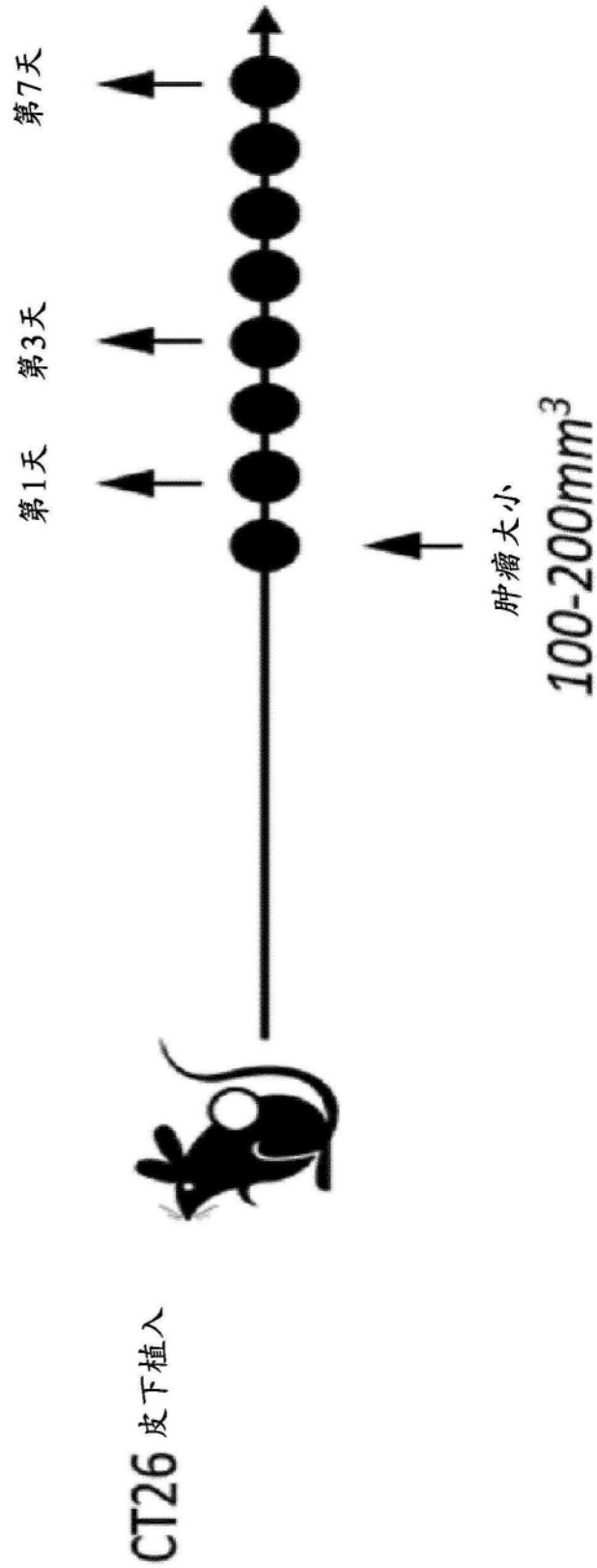


图1

A



CT26 皮下植入

图2

B

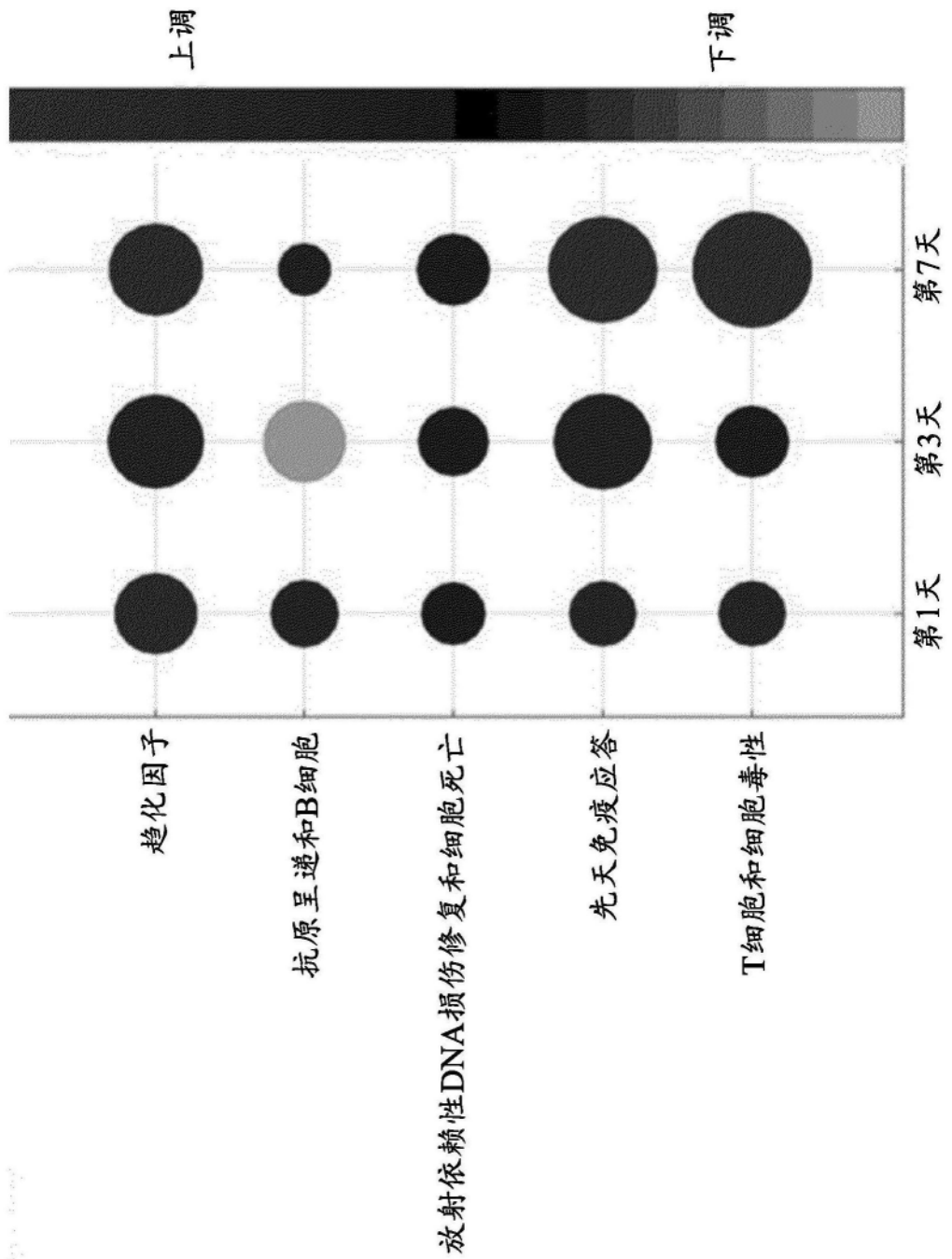


图2(续)

C

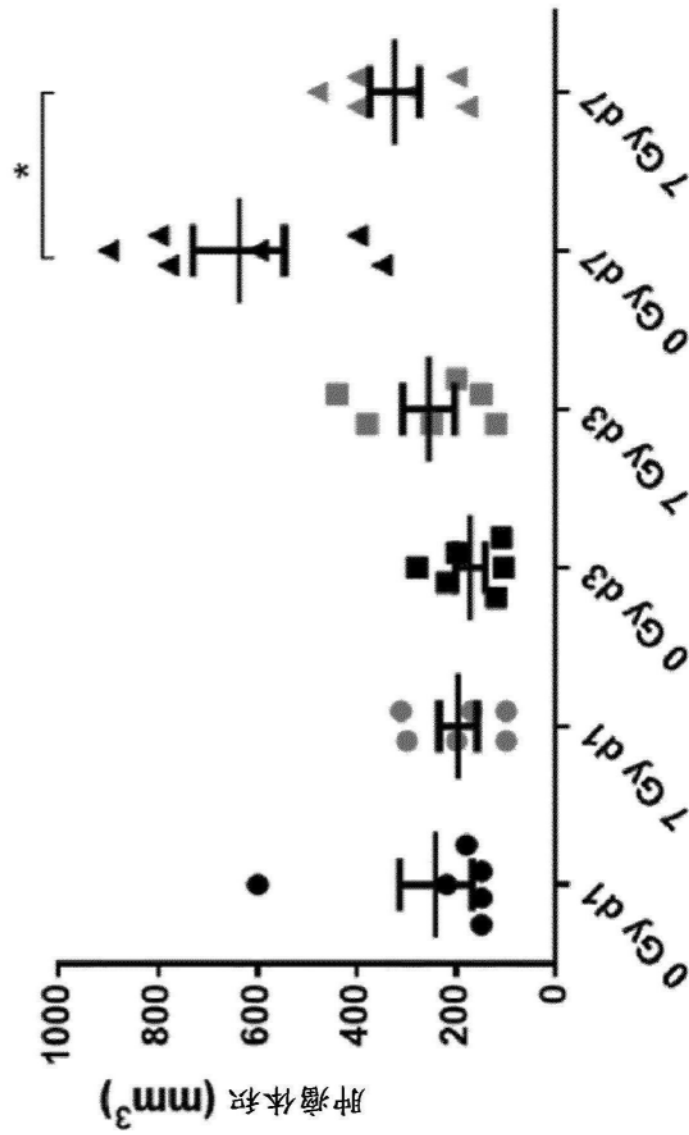


图2(续)

A

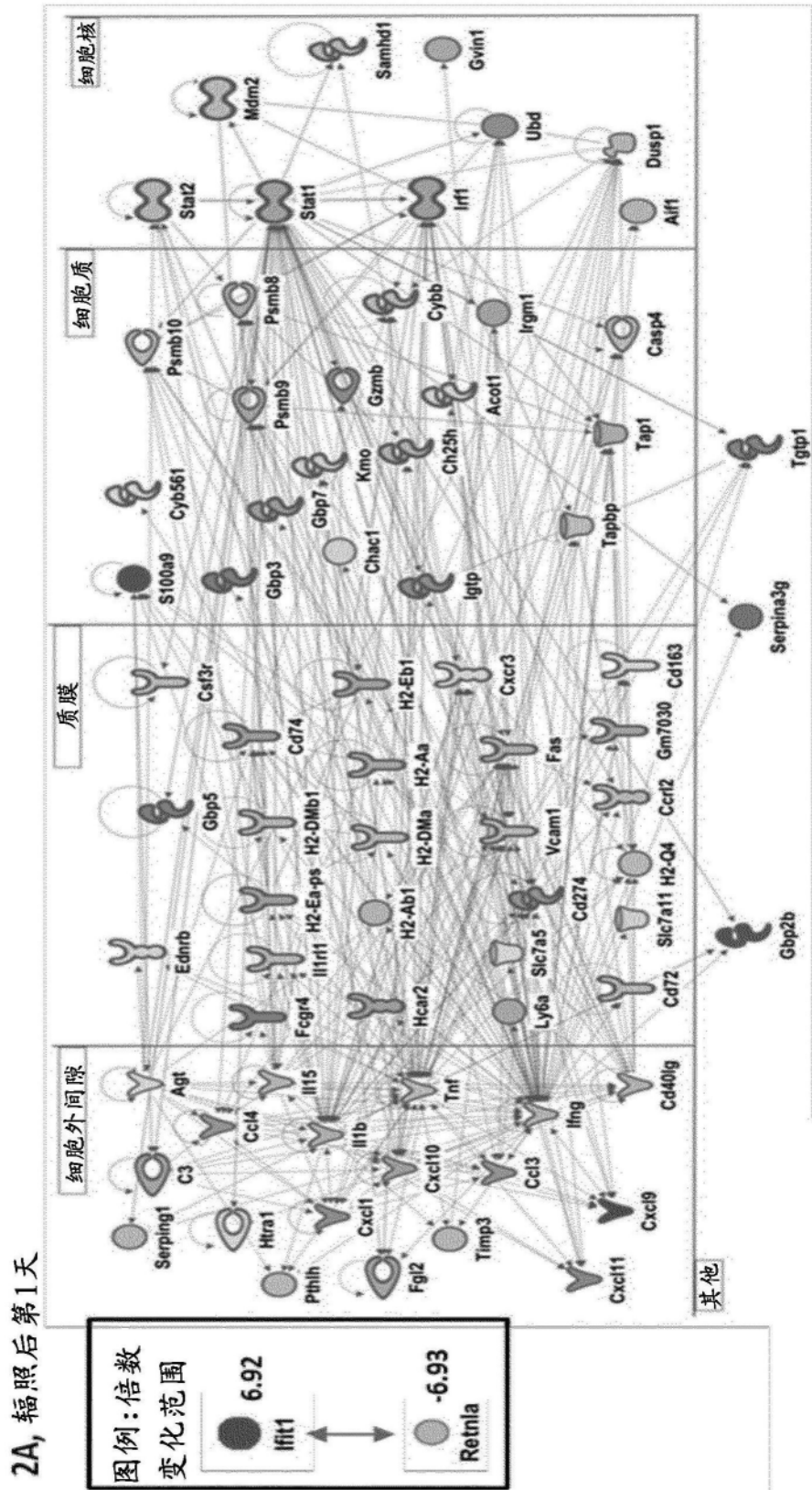


图3

B

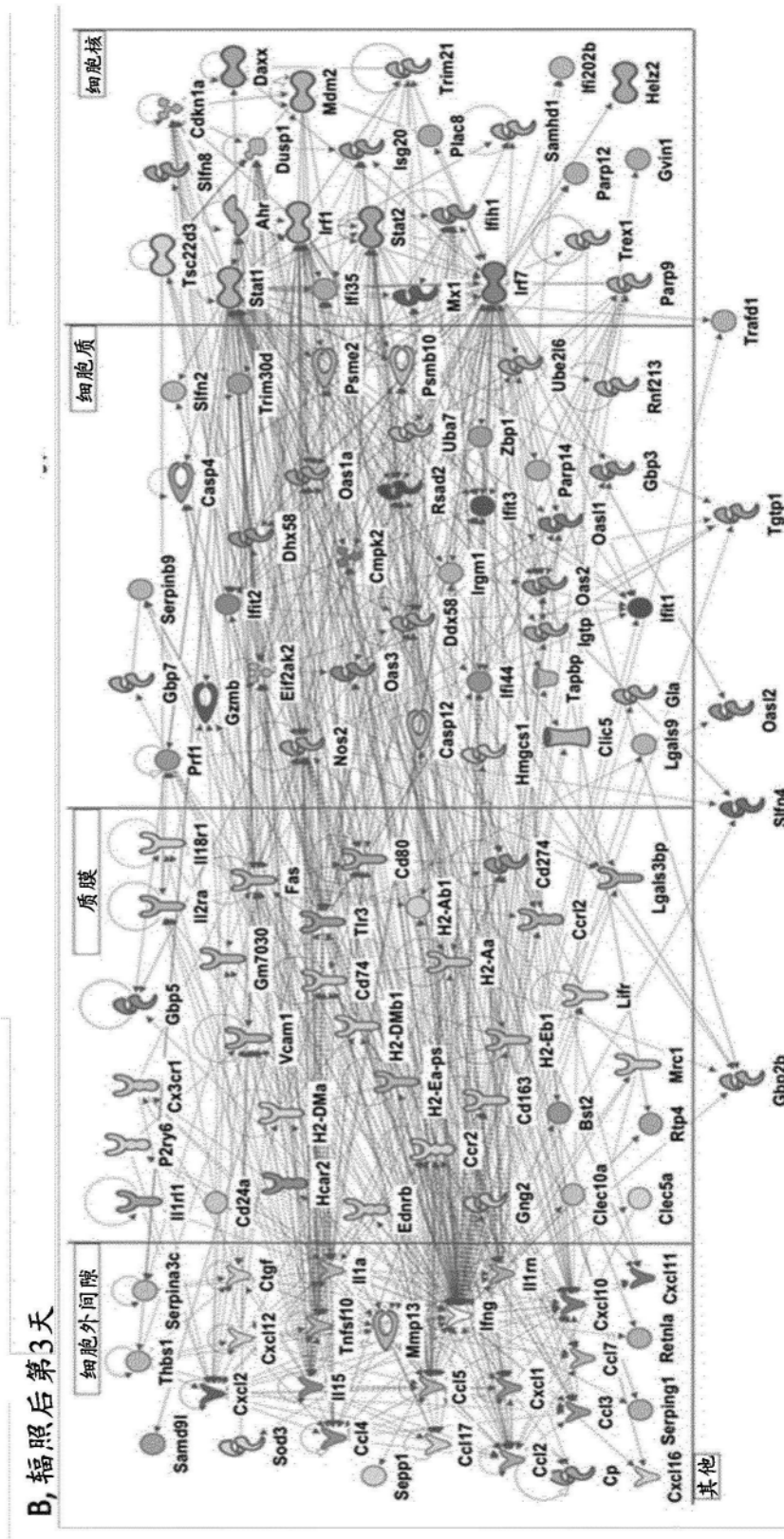


图3(续)

D

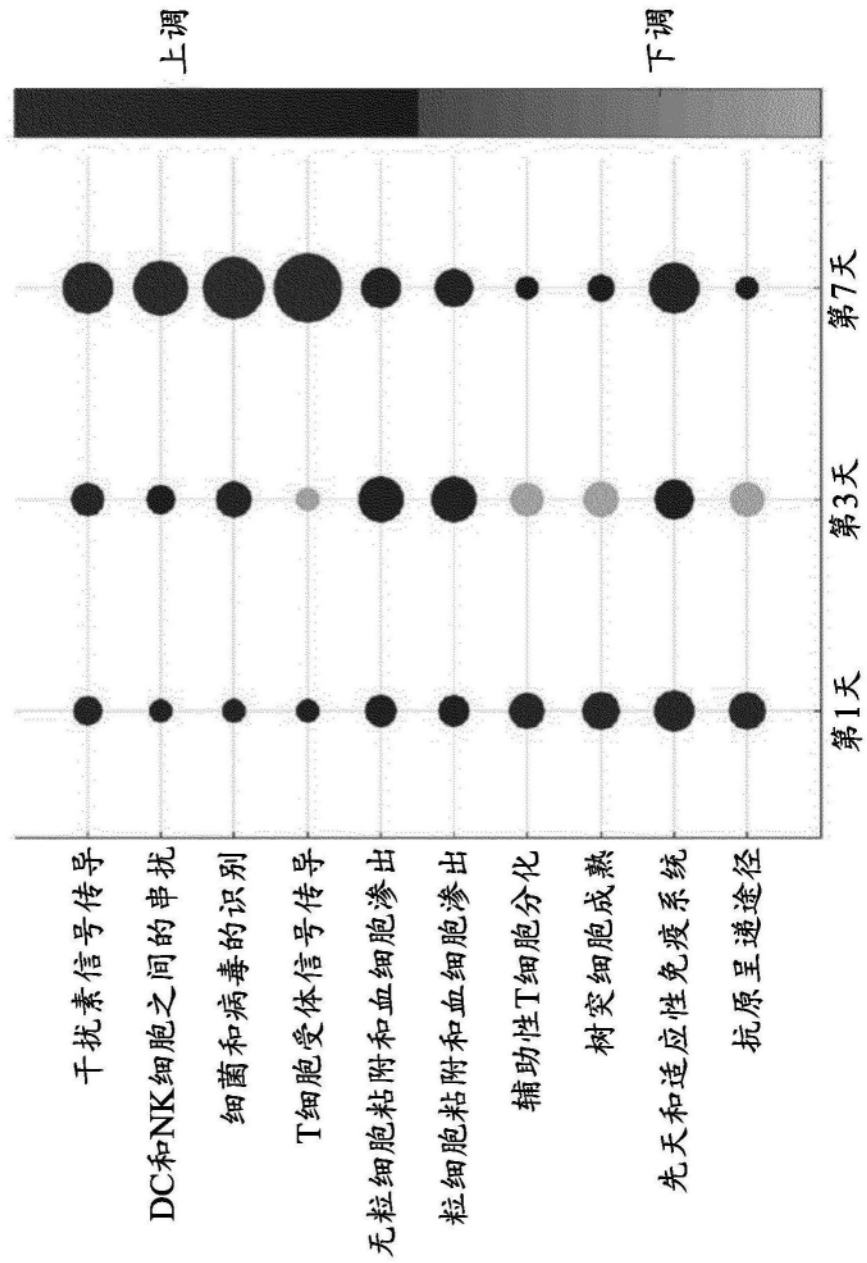


图3 (续)

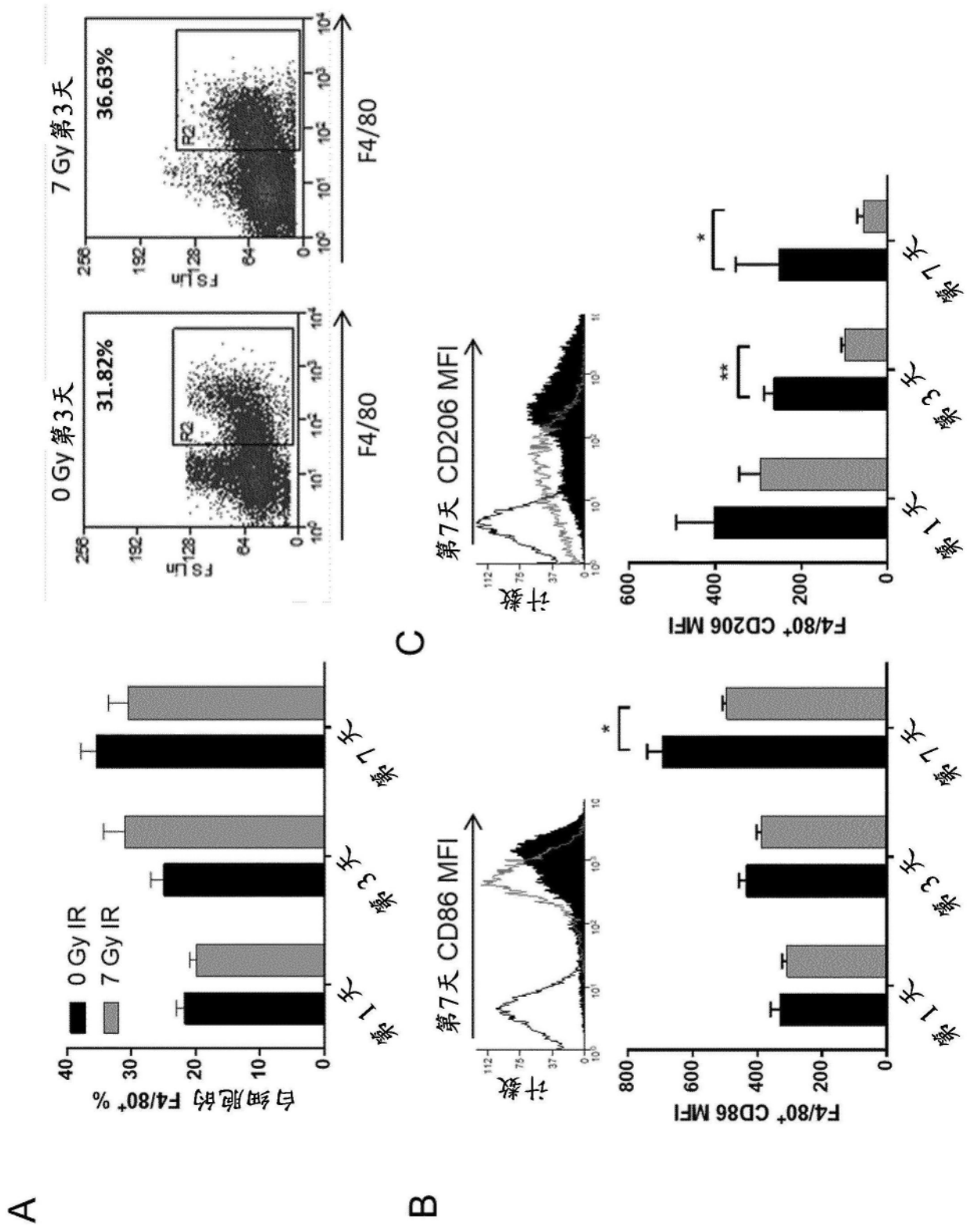


图4

D

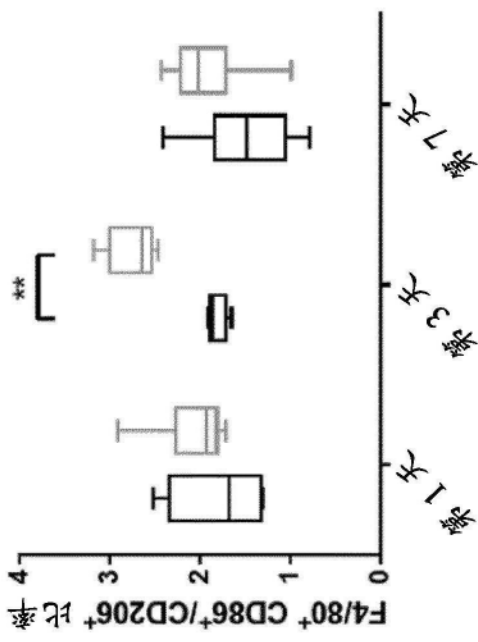
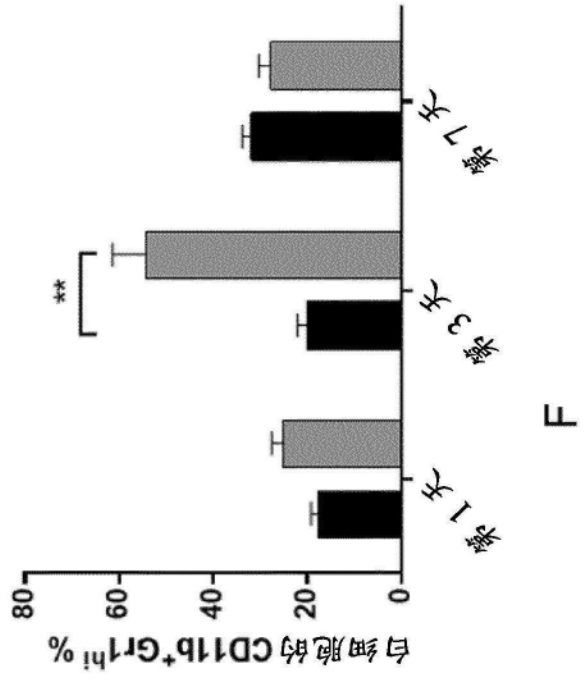
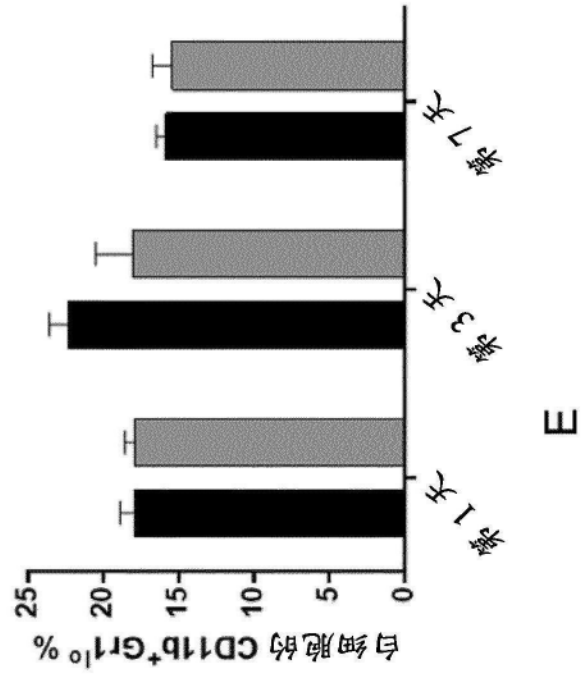


图4 (续)



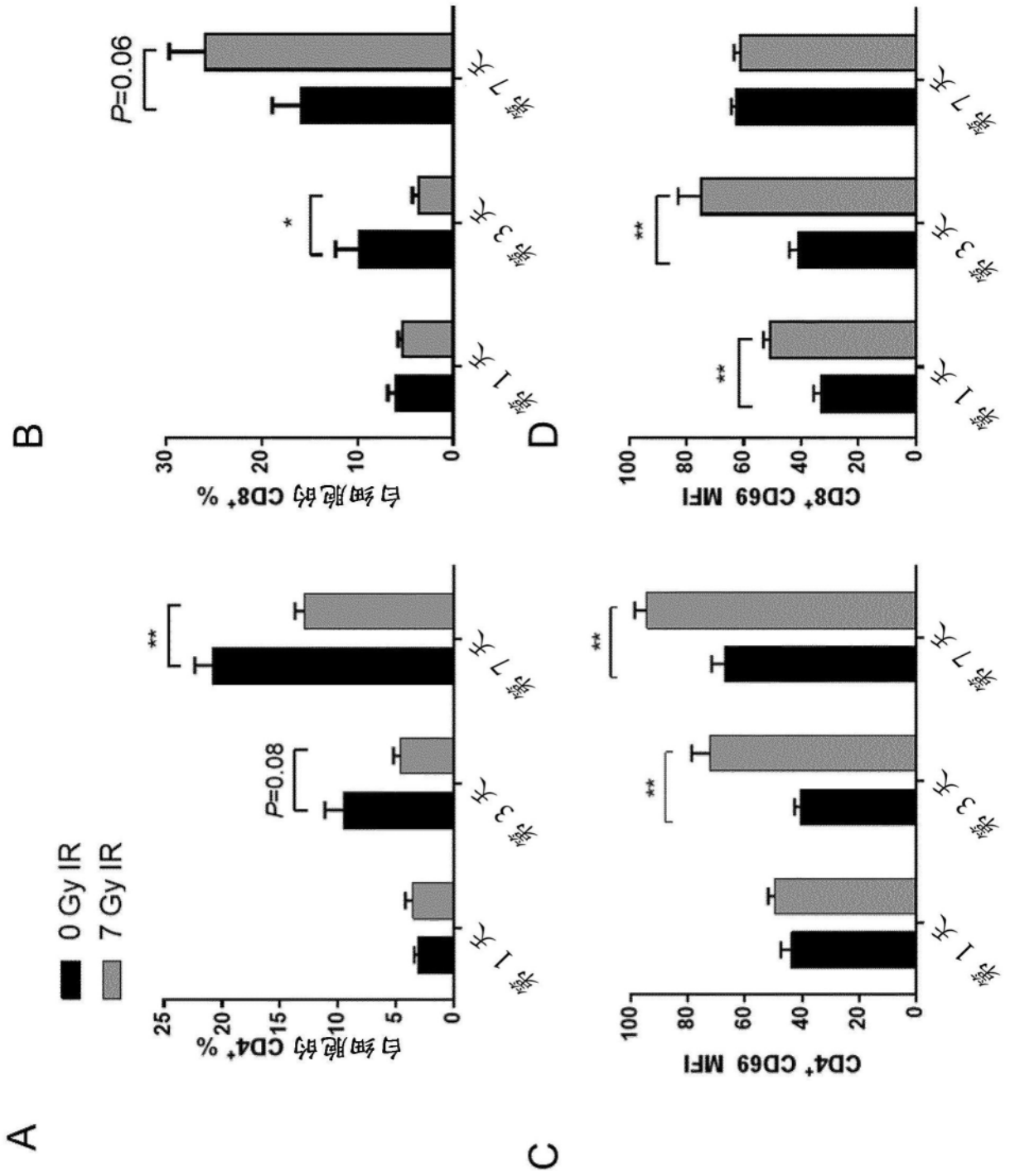


图5

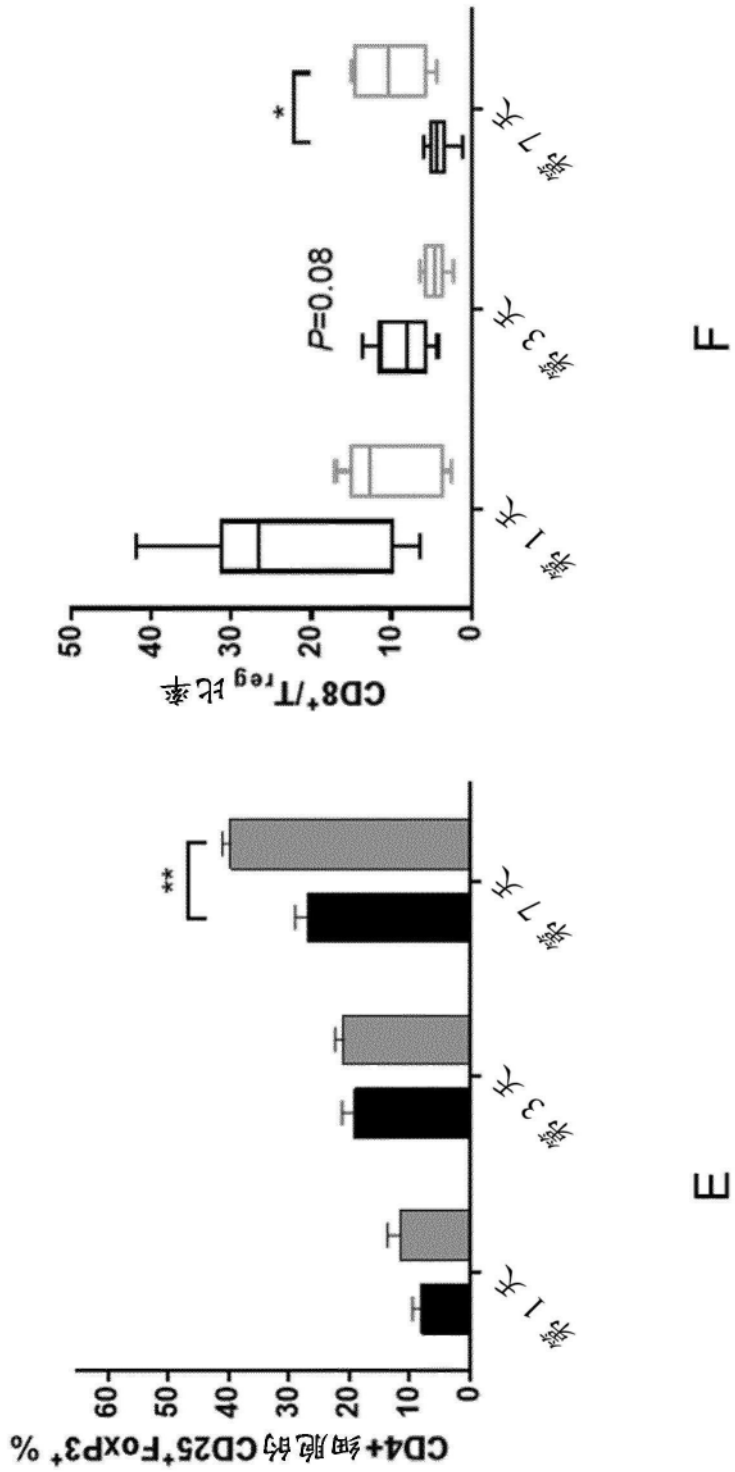


图5(续)

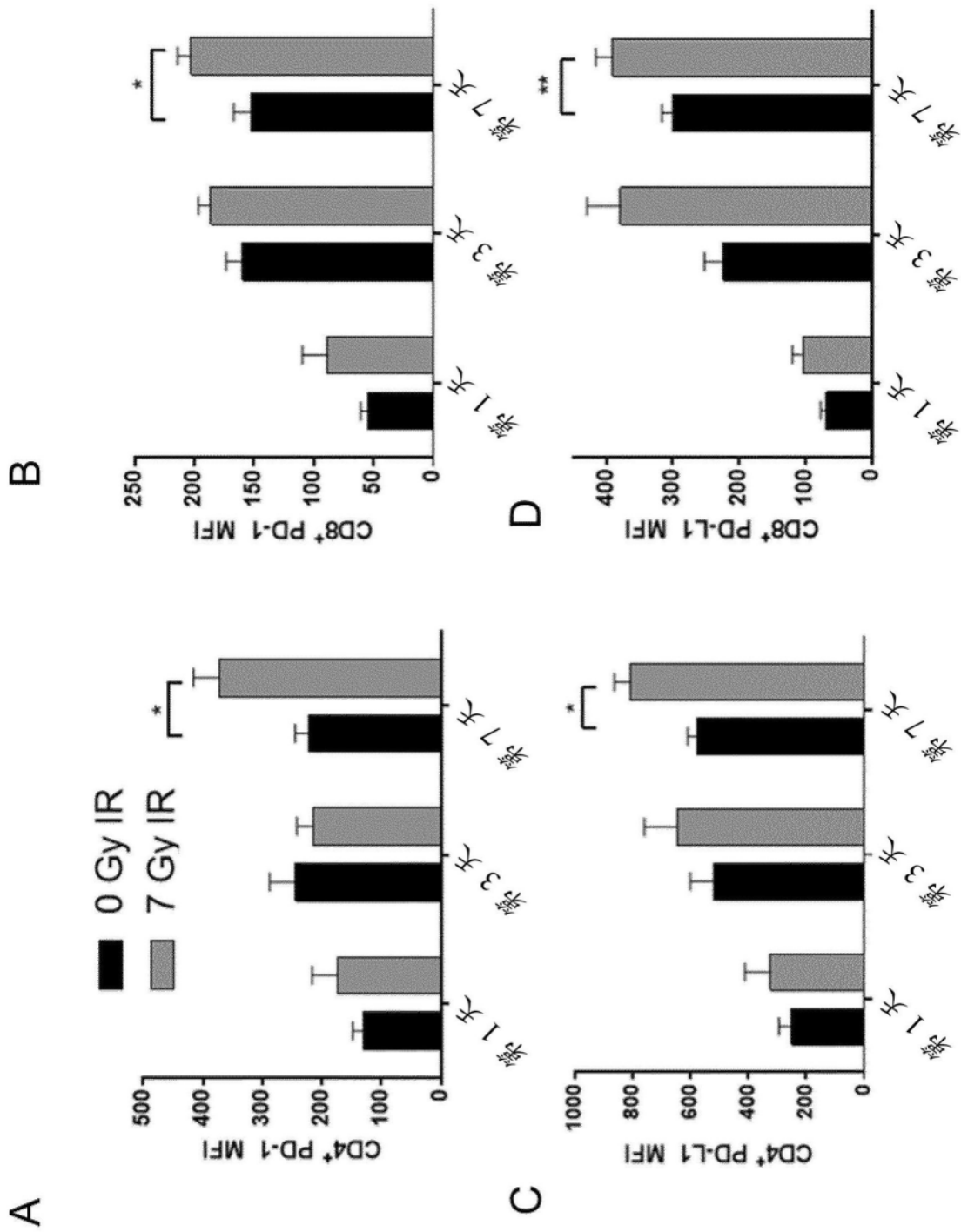


图6

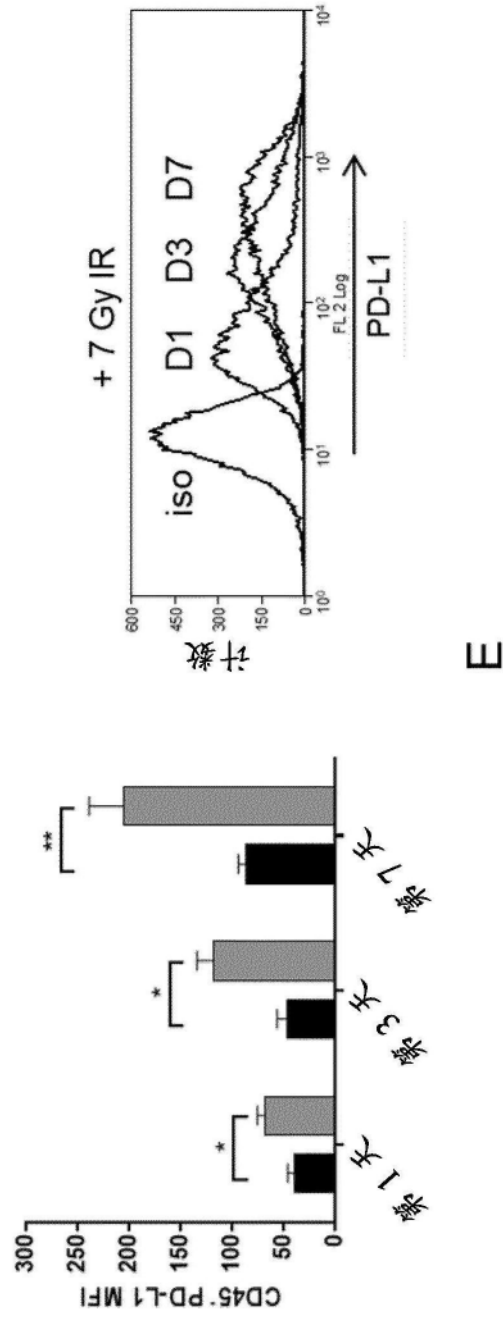


图6(续)

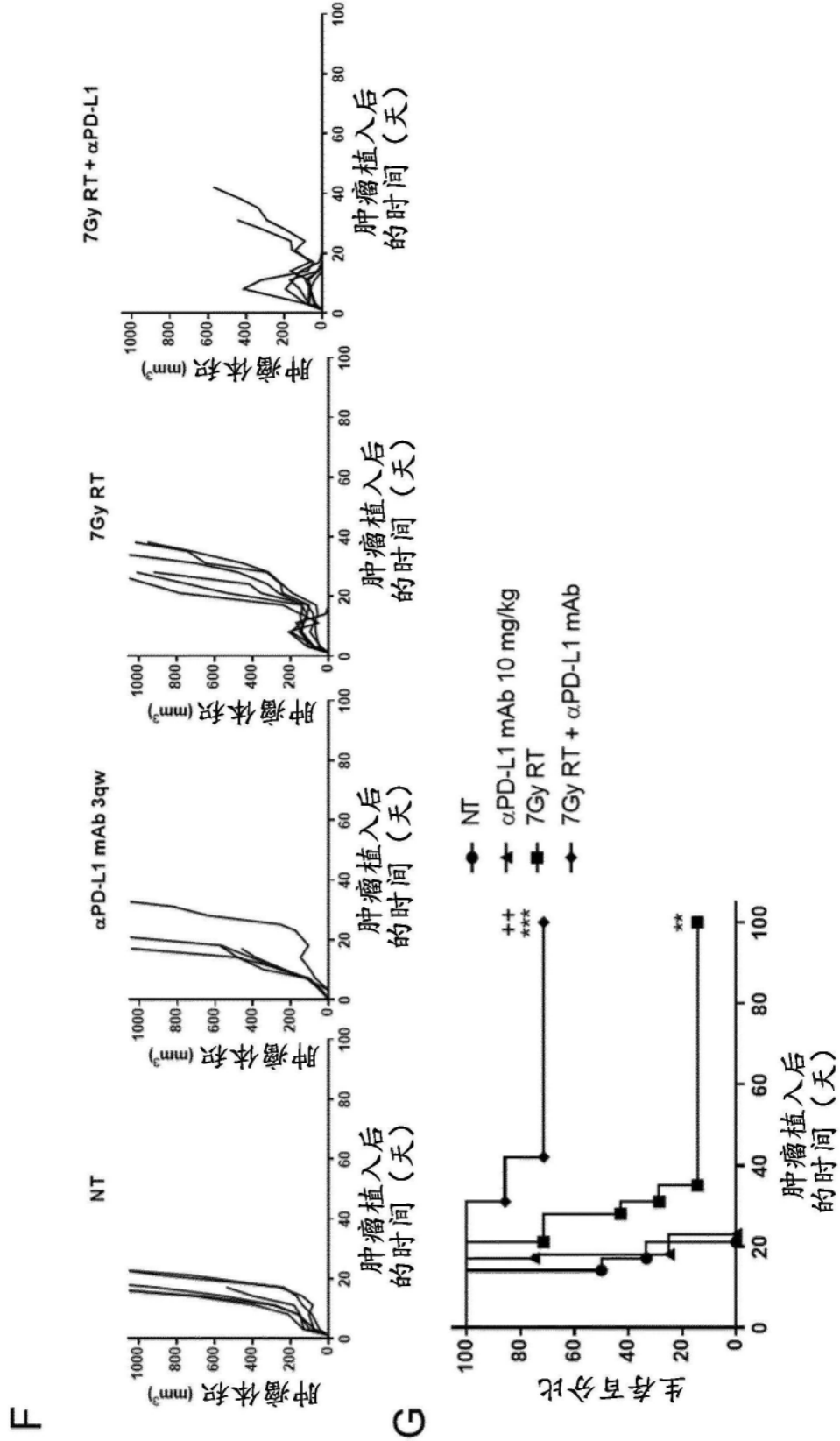


图6 (续)

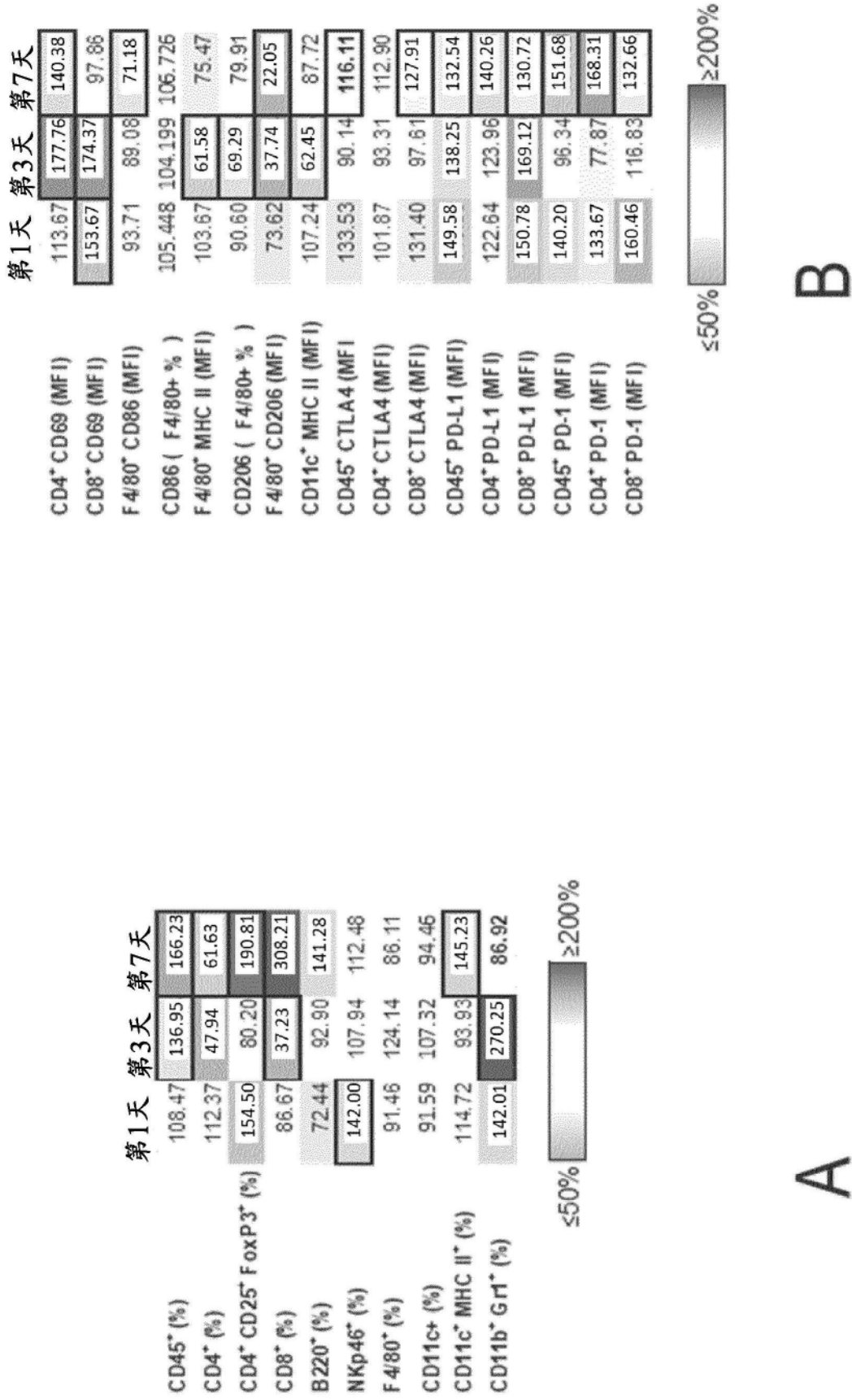
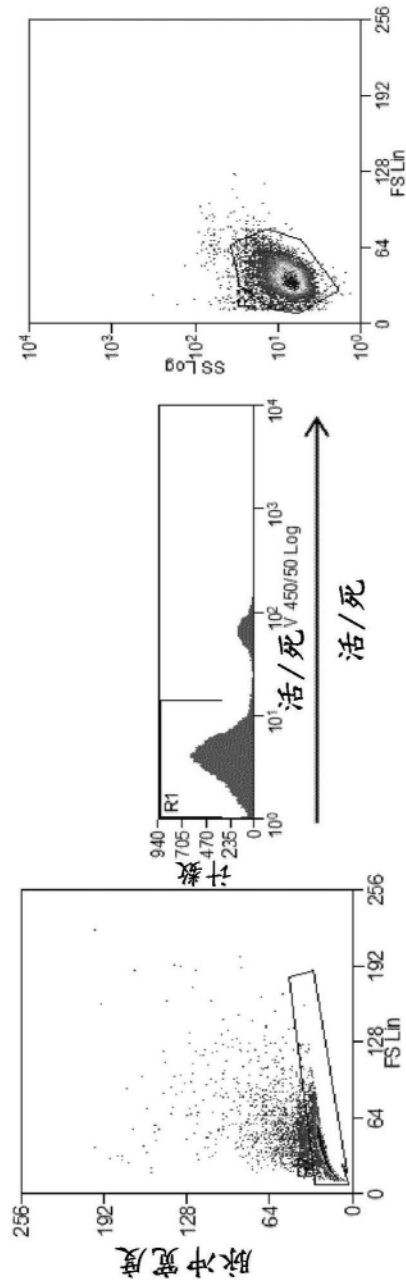


图7

A



B

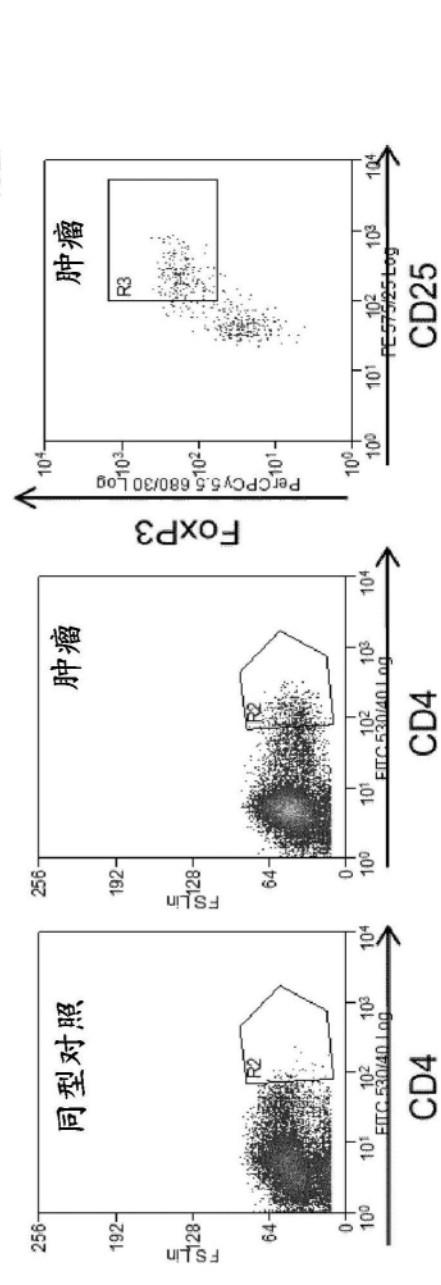


图8

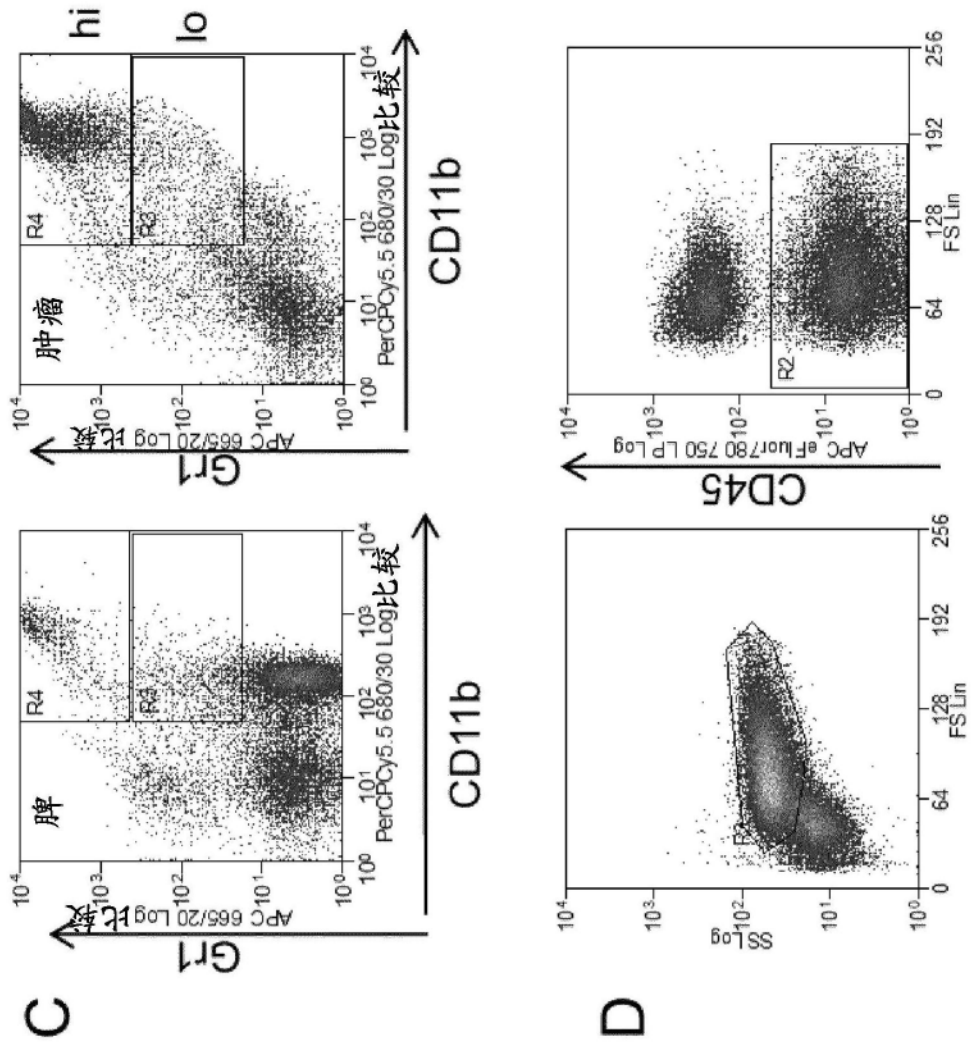


图8 (续)

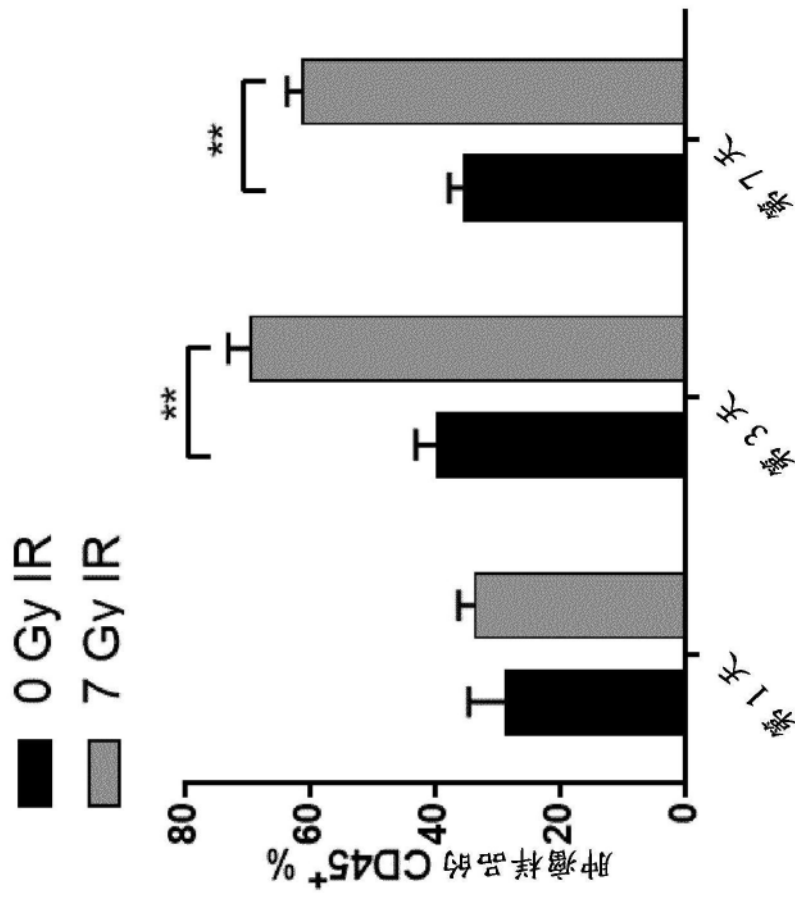


图9

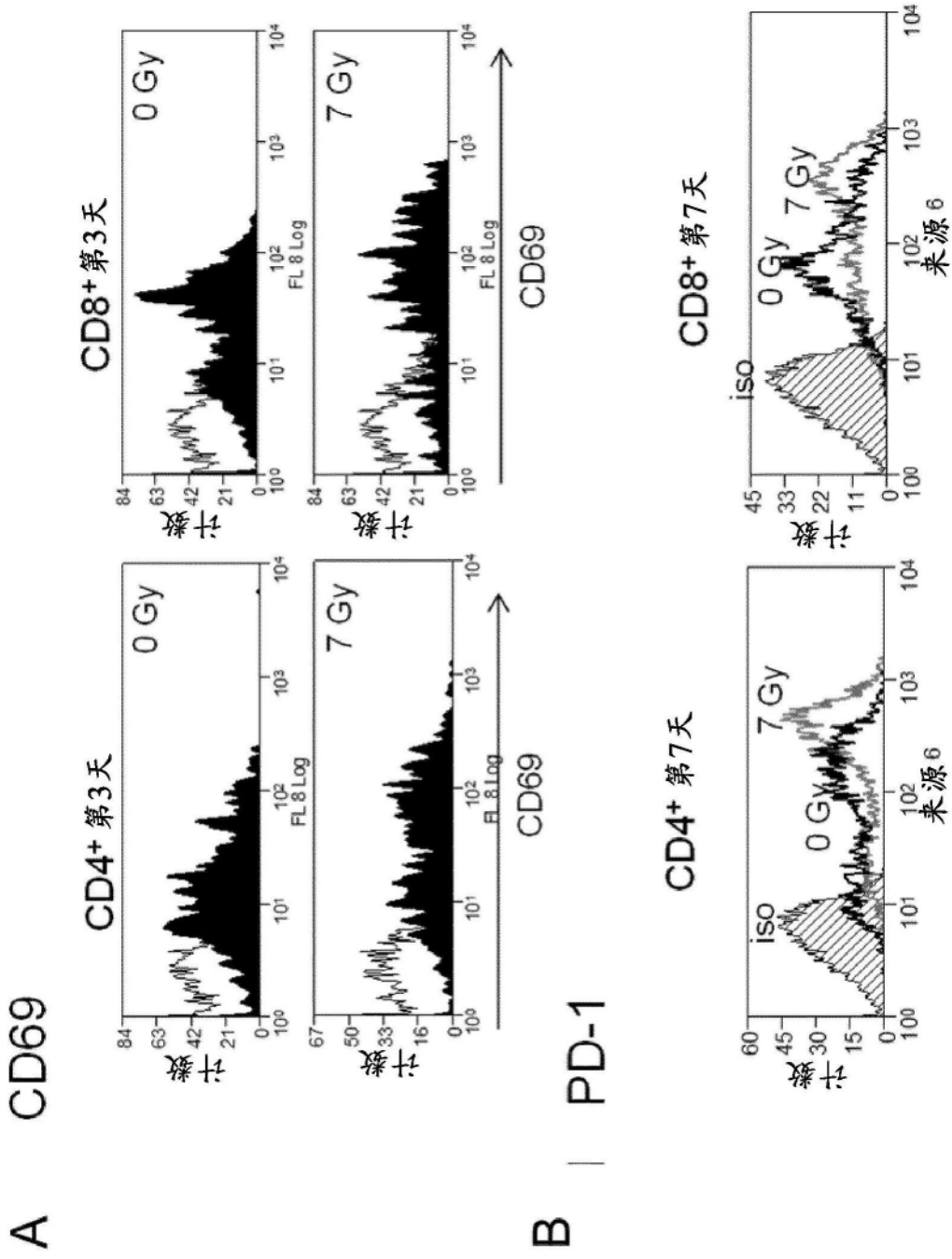


图10