

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020年11月19日 (19.11.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/228828 A1

(51) 国际专利分类号:
A61P 35/00 (2006.01) *A61K 35/763* (2015.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 39/39* (2006.01)

南省郑州市五龙口南路16号5号楼36号, Henan 450000 (CN)。万娜(WAN, Na); 中国河南省许昌市襄城县颍阳镇, Henan 461000 (CN)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/090631

(74) 代理人: 北京安信方达知识产权代理有限公司(AFD CHINA INTELLECTUAL PROPERTY LAW OFFICE); 中国北京市海淀区学清路8号B座1601A, Beijing 100192 (CN)。

(22) 国际申请日: 2020年5月15日 (15.05.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
PCT/CN2019/087096
2019年5月15日 (15.05.2019) CN

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

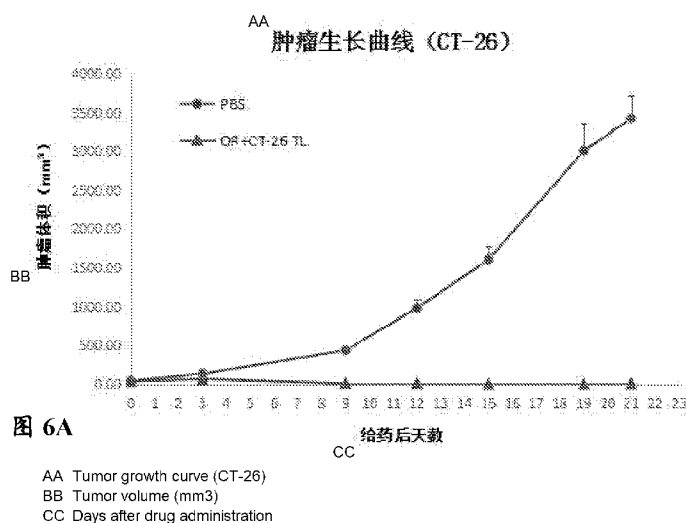
(71) 申请人: 郑州威瑞生物技术有限公司(ZHENGZHOU WEIRUI BIOTECHNOLOGY COMPANY LIMITED) [CN/CN]; 中国河南省郑州市高新区国槐街8号火炬大厦A座1201, Henan 450001 (CN)。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,

(72) 发明人: 韩志强(HAN, Zhiqiang); 中国河南省郑州市二七区中原东路78号院41号楼28号, Henan 450000 (CN)。李文(LI, Wen); 中国河南省郑州市高新区祝福红城三号院7号楼2单元268, Henan 450000 (CN)。邢风云(XING, Fengyun); 中国河

(54) Title: COMPOSITION FOR INDUCING IMMUNE CELL ACTIVITY AND METHOD FOR TREATING DISEASE USING SAME

(54) 发明名称: 诱导免疫细胞活性的组合物及使用该组合物治疗疾病的方法



(57) Abstract: A composition for inducing immune cell activity in a subject in need thereof, comprising a tumor cell lysate which is autologous to the subject, an OX40 agonist, and a TLR agonist. Also provided is a method for treating a condition in a subject by using the composition.

(57) 摘要: 一种在有需要的受试者中诱导免疫细胞活性的组合物, 其包含与所述受试者自体同源的肿瘤细胞裂解物、OX40激动剂和TLR激动剂。使用所述组合物用于治疗受试者病症的方法。



WO 2020/228828 A1

AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布：

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

诱导免疫细胞活性的组合物及使用该组合物治疗疾病的方法

5 背景技术

[0001] 免疫疗法(Immunotherapy)是通过调节免疫系统来治疗疾病的方法，其包括激活免疫疗法和抑制免疫疗法。近年来，免疫疗法已经获得越来越多的关注，特别是针对肿瘤治疗所开发的各种免疫疗法。相比常规方法如化疗或放疗等，免疫疗法通常具有更少的副作用。

10 [0002] 在一些针对肿瘤的免疫疗法中，通过诱导或调节免疫细胞如淋巴细胞、巨噬细胞、树突细胞、天然杀伤细胞(NK 细胞)、细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)等的活性来靶向肿瘤细胞，进而达到治疗肿瘤的效果。然而，患者与患者间的免疫响应经常会有较大的区别，使用一般性免疫调节剂在很多个体中经常不能达到预期效果。

15

发明内容

[0003] 目前，本领域对开发有效的抗肿瘤免疫疗法仍存在需求，尤其是针对患者的个体化的肿瘤免疫疗法。本发明所提供的组合物和方法解决了上述需求。本发明提供了一种用于诱导受试者体内免疫细胞活性的组合物、方法和试剂盒。

20

[0004] 一方面，本申请提供一种在有需要的受试者中诱导免疫细胞活性的组合物，其包含：与所述受试者自体同源的肿瘤细胞的裂解物，OX40 激动剂，和 TLR 激动剂。

[0005] 在一些实施方案中，所述免疫细胞活性选自：免疫细胞的增殖；免疫细胞的分化、去分化或转分化；免疫细胞细胞因子的释放；免疫细胞的细胞毒性；免疫细胞的运动和/或运输；免疫细胞的衰竭及其组合。

25

[0006] 在一些实施方案中，所述免疫细胞为淋巴细胞。在一些实施方案中，所述淋巴细胞为 T 细胞。在一些实施方案中，所述淋巴细胞为

NK 细胞。在一些实施方案中，所述免疫细胞为巨噬细胞。

[0007] 在一些实施方案中，所述受试者自体同源的肿瘤细胞裂解物源自所述受试者的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述受试者自体同源的肿瘤细胞裂解物源自所述受试者的实体瘤的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述受试者自体同源的肿瘤细胞裂解物源自所述受试者的一个或多个病灶的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述受试者自体同源的肿瘤细胞裂解物源自所述受试者的一个或多个器官的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述受试者自体同源的肿瘤细胞裂解物源自所述受试者的一处或多处组织的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述受试者自体同源的肿瘤细胞裂解物源自丧失增殖能力的肿瘤细胞。在一些实施方案中，所述受试者自体同源的肿瘤细胞裂解物源自新鲜的肿瘤组织、冷冻的或经固定液固定的肿瘤组织。在一些实施方案中，所述固定液包含福尔马林、甲醛、多聚甲醛、戊二醛、乙醇及其任意组合。

[0008] 在一些实施方案中，所述组合物中的所述肿瘤细胞的裂解物通过选自下组的方法获得：匀浆、超声或二者的组合。在一些实施方案中，所述组合物中的所述肿瘤细胞的裂解物通过首先匀浆随后超声的过程获得。

[0009] 在一些实施方案中，所述肿瘤细胞的裂解物由 1×10^4 - 1×10^8 数目的肿瘤细胞获得。在一些实施方案中，所述肿瘤细胞的裂解物由 1×10^5 - 1×10^7 数目的肿瘤细胞获得。

[0010] 在一些实施方案中，所述 OX40 激动剂包括 OX40 抗体或 OX40 配体融合蛋白（OX40L）。

[0011] 在一些实施方案中，所述 TLR 激动剂包括 CpG 寡核苷酸（oligodeoxynucleotides, CpG ODN）、瑞喹莫德（Resiquimod, R848）、咪喹莫特（Imiquimod, R 837）、dsRNA 及其组合。

[0012] 在一些实施方案中，所述组合物进一步包含其他免疫激活剂。在一些实施方案中，所述其他免疫激活剂是选自下组的一种或多种分

子的激动剂：CD27、CD28、CD40、CD122、CD137 和 GITR。在一些实施方案中，所述免疫激活剂是选自下组的一种或多种分子的拮抗剂：A2AR、CD276、VTCN1、BTLA、CTLA-4、IDO、LAG3、KIR、NOX2、PD-1、TIM-3、VISTA、SIGLEC7 和 SIGLEC9。在一些实施方案中，所述其他免疫激活剂是选自与下组的分子的表位特异性结合的抗体：CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40、GITR、A2AR、CD276、VTCN1、BTLA、CTLA-4、IDO、LAG3、KIR、NOX2、PD-1、TIM-3、VISTA、SIGLEC7、CD47 和 SIGLEC9。在一些实施方案中，所述其他免疫激活剂是选自下组的一种或多种细胞因子：IL-2、IL-12、IL15、IL6、IL18、IFN- α 、TNF- β 、IFN- γ 、GM-CSF、M-CSF 及其任意组合。

[0013] 在一些实施方案中，所述组合物原位或非原位施用至所述受试者。在一些实施方案中，所述原位施用包括瘤内注射、瘤周注射及其组合。在一些实施方案中，所述非原位施用包括皮下注射、肌肉注射、腹腔注射、胸腔注射、静脉注射、动脉注射及其组合。在一些实施方案中，所述组合物通过单点或多点皮下注射施用至所述受试者。

[0014] 另一方面，本公开提供一种在有需要的受试者中通过诱导免疫细胞活性治疗肿瘤的方法，其包括对所述受试者施用包含以下的组合物：与所述受试者自体同源的肿瘤细胞的裂解物、OX40 激动剂和 TLR 激动剂。

[0015] 在一些实施方案中，所述治疗包括使肿瘤衰退、抑制肿瘤进展和/或转移、预防其复发和/或转移。在一些实施方案中，所述方法用于治疗所述受试者选自下组的病症：肺癌、膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、食道癌、胃癌、胶质瘤、头颈癌、肾癌、白血病、淋巴细胞白血病、髓细胞白血病、混合细胞白血病、多发性骨髓瘤、肝癌、胆囊癌、淋巴瘤、黑色素瘤、间皮瘤、成神经管细胞瘤、口腔癌、鼻咽癌、喉癌、甲状腺癌、纵膈肿瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、睾丸癌、气管癌和外阴癌。

[0016] 在一些实施方案中，所述免疫细胞活性选自：免疫细胞的增殖；

免疫细胞的分化、去分化或转分化；免疫细胞细胞因子的释放；免疫细胞的细胞毒性；免疫细胞的运动和/或运输；免疫细胞的衰竭及其组合。

[0017] 另一方面，本公开提供一种在有需要的受试者中诱导免疫细胞活性的试剂盒，其包含 OX40 激动剂，TLR 激动剂和说明书，其中所述说明书指示从所述受试者体内获得和/或制备自体同源的肿瘤细胞，制备所述肿瘤细胞的裂解物，并将所述肿瘤细胞的裂解物与 OX40 激动剂和 TLR 激动剂共同施用至所述受试者的方法。

[0018] 另一方面，本公开提供一种在有需要的受试者中诱导免疫细胞活性的组合物，其包含：溶瘤病毒、OX40 激动剂和 TLR 激动剂，或表达 OX40 激动剂的溶瘤病毒和 TLR 激动剂。

[0019] 在一些实施方案中，所述免疫细胞活性选自：免疫细胞的增殖；免疫细胞的分化、去分化或转分化；免疫细胞细胞因子的释放；免疫细胞的细胞毒性；免疫细胞的运动和/或运输；免疫细胞的衰竭及其组合。

[0020] 在一些实施方案中，所述免疫细胞为淋巴细胞。在一些实施方案中，所述淋巴细胞为 T 细胞。在一些实施方案中，所述淋巴细胞为 NK 细胞。在一些实施方案中，所述免疫细胞为巨噬细胞。

[0021] 在一些实施方案中，所述溶瘤病毒为经修饰的病毒。在一些实施方案中，所述溶瘤病毒是经修饰减毒的病毒。在一些实施方案中，所述溶瘤病毒选自下组：疱疹病毒（Herpesvirus）、腺病毒（Adenovirus）、呼肠孤病毒（Reovirus）、牛痘病毒（Vaccinia Virus）、柯萨基病毒（Coxsackievirus）、麻疹病毒（Measles Virus）、脊髓灰质炎病毒（Poliovirus）、逆转录酶病毒（Retrovirus）、细小病毒 H1（Parvovirus H1）、水疱性口炎病毒（Vesicular Stomatitis Virus）、新城疫病毒（Newcastle Disease Virus）和 M1 溶瘤病毒（Oncolytic virus M1）。在一些实施方案中，所述疱疹病毒为单纯疱疹病毒（Herpes simplex virus）。在一些实施方案中，所述单纯疱疹病毒选自 HSV-1 或 HSV-2。在一些实施方案中，所述溶瘤病毒为经修饰以缺失 γ 34.5

功能的单纯疱疹病毒 HSV-1。在一些实施方案中，所述溶瘤病毒经修饰以编码所述 OX40 激动剂。

[0022] 在一些实施方案中，所述组合物中溶瘤病毒的量为 1×10^5 - 1×10^9 pfu。在一些实施方案中，所述组合物中溶瘤病毒的量为 1×10^7 - 1×10^8 pfu。

[0023] 在一些实施方案中，所述 OX40 激动剂包括 OX40 抗体或 OX40 配体融合蛋白（OX40L）。

[0024] 在一些实施方案中，所述 TLR 激动剂包括 CpG 寡核苷酸（oligodeoxynucleotides, CpG ODN）、瑞喹莫德（Resiquimod, R848）、咪喹莫特（Imiquimod, R837）、dsRNA 及其组合。

[0025] 在一些实施方案中，所述 OX40 激动剂和/或所述 TLR 激动剂通过所述溶瘤病毒作为载体表达。

[0026] 在一些实施方案中，所述组合物进一步包含其他免疫激活剂。在一些实施方案中，所述其他免疫激活剂是选自下组的一种或多种分子的激动剂：CD27、CD28、CD40、CD122、CD137 和 GITR。在一些实施方案中，所述免疫激活剂是选自下组的一种或多种分子的拮抗剂：A2AR、CD276、VTCN1、BTLA、CTLA-4、IDO、LAG3、KIR、NOX2、PD-1、TIM-3、VISTA、SIGLEC7 和 SIGLEC9。在一些实施方案中，所述其他免疫激活剂是选自与下组的分子的表位特异性结合的抗体：CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40、GITR、A2AR、CD276、VTCN1、BTLA、CTLA-4、IDO、LAG3、KIR、NOX2、PD-1、TIM-3、VISTA、SIGLEC7、CD47 和 SIGLEC9。在一些实施方案中，所述其他免疫激活剂是选自下组的一种或多种细胞因子：IL-2、IL-12、IL15、IL6、IL18、IFN- α 、TNF- β 、IFN- γ 、GM-CSF、M-CSF 及其任意组合。

[0027] 在一些实施方案中，所述组合物原位或非原位施用至所述受试者。在一些实施方案中，所述原位施用包括瘤内注射、瘤周注射及其组合。在一些实施方案中，所述非原位施用包括皮下注射、肌肉注射、腹腔注射、胸腔注射、静脉注射、动脉注射及其组合。在一些实施方

案中，所述组合物通过单点或多点皮下注射施用至所述受试者。

[0028] 另一方面，本公开提供一种在有需要的受试者中通过诱导免疫细胞活性治疗肿瘤的方法，其包括对所述受试者施用包含以下的组合物：溶瘤病毒、OX40 激动剂和 TLR 激动剂，或表达 OX40 激动剂的溶瘤病毒和 TLR 激动剂。

[0029] 在一些实施方案中，所述治疗包括使肿瘤衰退、抑制肿瘤进展和/或转移、预防其复发和/或转移。在一些实施方案中，所述方法用于治疗所述受试者选自下组的病症：肺癌、膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、食道癌、胃癌、胶质瘤、头颈癌、肾癌、白血病、淋巴细胞白血病、髓细胞白血病、混合细胞白血病、多发性骨髓瘤、肝癌、胆囊癌、淋巴瘤、黑色素瘤、间皮瘤、成神经管细胞瘤、口腔癌、鼻咽癌、喉癌、甲状腺癌、纵膈肿瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、睾丸癌、气管癌和外阴癌。

[0030] 在一些实施方案中，所述免疫细胞活性选自：免疫细胞的增殖；免疫细胞的分化、去分化或转分化；免疫细胞细胞因子的释放；免疫细胞的细胞毒性；免疫细胞的运动和/或运输；免疫细胞的衰竭及其组合。

[0031] 另一方面，本公开提供一种在有需要的受试者中诱导免疫细胞活性的试剂盒，其包含溶瘤病毒、OX40 激动剂和 TLR 激动剂，或表达 OX40 激动剂的溶瘤病毒和 TLR 激动剂，和说明书。

[0032] 另一方面，本公开提供一种在有需要的受试者中诱导免疫细胞活性的组合物，其包含与所述受试者自体同源的肿瘤细胞，溶瘤病毒，和一种或多种免疫激活剂。

[0033] 在一些实施方案中，所述免疫细胞活性选自：免疫细胞的增殖；免疫细胞的分化、去分化或转分化；免疫细胞细胞因子的释放；免疫细胞的细胞毒性；免疫细胞的运动和/或运输；免疫细胞的衰竭及其组合。

[0034] 在一些实施方案中，所述免疫细胞为淋巴细胞。在一些实施方案中，所述淋巴细胞为 T 细胞。在一些实施方案中，所述淋巴细胞为

NK 细胞。在一些实施方案中，所述免疫细胞为巨噬细胞。

[0035] 在一些实施方案中，所述溶瘤病毒为经修饰的病毒。在一些实施方案中，所述溶瘤病毒是经修饰减毒的病毒。在一些实施方案中，所述溶瘤病毒选自下组：疱疹病毒（Herpesvirus）、腺病毒（Adenovirus）、呼肠孤病毒（Reovirus）、牛痘病毒（Vaccinia Virus）、柯萨基病毒（Coxsackievirus）、麻疹病毒（Measles Virus）、脊髓灰质炎病毒（Poliovirus）、逆转录酶病毒（Retrovirus）、细小病毒 H1（Parvovirus H1）、水疱性口炎病毒（Vesicular Stomatitis Virus）、新城疫病毒（Newcastle Disease Virus）和 M1 溶瘤病毒（Oncolytic virus M1）。在一些实施方案中，所述疱疹病毒为单纯疱疹病毒（Herpes simplex virus）。在一些实施方案中，所述单纯疱疹病毒选自 HSV-1 或 HSV-2。在一些实施方案中，所述溶瘤病毒为经修饰以缺失 γ 34.5 功能的单纯疱疹病毒 HSV-1。在一些实施方案中，所述溶瘤病毒经修饰以编码所述一种或多种免疫激活剂的基因。

15 [0036] 在一些实施方案中，所述免疫激活剂是选自下组的一种或多种分子的激动剂：CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40 和 GITR。在一些实施方案中，所述免疫激活剂为 OX40 激动剂。在一些实施方案中，所述免疫激活剂是选自下组的一种或多种分子的拮抗剂：A2AR、CD276、VTCN1、BTLA、CTLA-4、IDO、LAG3、KIR、NOX2、PD-1、TIM-3、VISTA、SIGLEC7 和 SIGLEC9。

[0037] 在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含与选自下组的分子的表位特异性结合的抗体：CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40、GITR、A2AR、CD276、VTCN1、BTLA、CTLA-4、IDO、LAG3、KIR、NOX2、PD-1、TIM-3、VISTA、SIGLEC7、CD47 和 SIGLEC9。

25 在一些实施方案中，所述抗体选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、单链抗体(scFv)、单链抗体(scFv-FC)、微抗体、双抗体、单域抗体、全长抗体。

[0038] 在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含抗 OX40 抗体。在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含重组的 OX40 配体融合蛋白。

[0039] 在一些实施方案中，所述免疫激活剂进一步包含 Toll 样受体 (Toll-Like Receptor, TLR) 的配体。在一些实施方案中，所述 TLR 的配体为 TLR 激动剂。在一些实施方案中，所述 TLR 激动剂包括 CpG 寡核苷酸 (oligodeoxynucleotides, CpG ODN)、瑞喹莫德 (Resiquimod, R848)、咪喹莫特 (Imiquimod, R 837)、dsRNA 及其组合。

[0040] 在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含抗 OX40 抗体和 CpG ODN。

[0041] 在一些实施方案中，所述免疫激活剂进一步包含一种或多种细胞因子。在一些实施方案中，所述细胞因子选自下组：IL-2、IL-12、IL15、IL6、IL18、IFN- α 、TNF- β 、IFN- γ 、GM-CSF、M-CSF 及其任意组合。

[0042] 在一些实施方案中，所述组合物中溶瘤病毒的量 5 为 1×10^5 - 1×10^9 pfu。在一些实施方案中，所述组合物中溶瘤病毒的量 10 为 1×10^7 - 1×10^8 pfu。

[0043] 在一些实施方案中，所述肿瘤细胞为分离自所述受试者的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述肿瘤细胞为分离自所述受试者的实体瘤的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述肿瘤细胞为分离自所述受试者的一个或多个病灶的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述肿瘤细胞 20 为分离自所述受试者的一个或多个器官的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述肿瘤细胞为分离自所述受试者的一处或多处组织的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述肿瘤细胞是丧失增殖能力的肿瘤细胞。

[0044] 在一些实施方案中，所述组合物中肿瘤细胞的数目为 25 1×10^4 - 1×10^8 。在一些实施方案中，所述组合物中肿瘤细胞的数目为 1×10^5 - 1×10^7 。

[0045] 在一些实施方案中，所述组合物原位或非原位施用至所述受试者。在一些实施方案中，所述原位施用包括瘤内注射、瘤周注射及其组合。在一些实施方案中，所述非原位施用包括皮下注射、肌肉注射、

腹腔注射、胸腔注射、静脉注射、动脉注射及其组合。在一些实施方案中，所述组合物通过单点或多点皮下注射施用至所述受试者。

[0046] 另一方面，本公开提供一种在有需要的受试者中通过诱导免疫细胞活性治疗肿瘤的方法，其包括对所述受试者施用包含以下的组合物：与所述受试者自体同源的肿瘤细胞、溶瘤病毒和一种或多种免疫激活剂。

[0047] 在一些实施方案中，所述治疗包括使肿瘤衰退、抑制肿瘤进展和/或转移、预防其复发和/或转移。在一些实施方案中，所述方法用于治疗所述受试者选自下组的病症：肺癌、膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、食道癌、胃癌、胶质瘤、头颈癌、肾癌、白血病、淋巴细胞白血病、髓细胞白血病、混合细胞白血病、多发性骨髓瘤、肝癌、胆囊癌、淋巴瘤、黑色素瘤、间皮瘤、成神经管细胞瘤、口腔癌、鼻咽癌、喉癌、甲状腺癌、纵膈肿瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、睾丸癌、气管癌和外阴癌。

15 在一些实施方案中，所述免疫细胞活性选自：免疫细胞的增殖；免疫细胞的分化、去分化或转分化；免疫细胞细胞因子的释放；免疫细胞的细胞毒性；免疫细胞的运动和/或运输；免疫细胞的衰竭及其组合。

[0048] 在一些实施方案中，所述免疫细胞为淋巴细胞。在一些实施方案中，所述淋巴细胞为 T 细胞。在一些实施方案中，所述淋巴细胞为 NK 细胞。在一些实施方案中，所述免疫细胞为巨噬细胞。

[0049] 在一些实施方案中，所述溶瘤病毒为经修饰的病毒。在一些实施方案中，所述溶瘤病毒是经修饰减毒的病毒。在一些实施方案中，所述溶瘤病毒选自下组：疱疹病毒（Herpesvirus）、腺病毒（Adenovirus）、呼肠孤病毒（Reovirus）、牛痘病毒（Vaccinia Virus）、柯萨基病毒（Coxsackievirus）、麻疹病毒（Measles Virus）、脊髓灰质炎病毒（Poliovirus）、逆转录酶病毒（Retrovirus）、细小病毒 H1（Parvovirus H1）、水疱性口炎病毒（Vesicular Stomatitis Virus）、新城疫病毒（Newcastle Disease Virus）和 M1 溶瘤病毒。在一些实施方案中，所述疱疹病毒为单纯疱疹病毒（Herpes simplex virus）。

[0050] 在一些实施方案中，所述单纯疱疹病毒选自 HSV-1 或 HSV-2。在一些实施方案中，所述溶瘤病毒为经修饰以缺失 γ 34.5 功能的单纯疱疹病毒 HSV-1。在一些实施方案中，所述溶瘤病毒经修饰以编码所述一种或多种免疫激活剂的基因。

- 5 [0051] 在一些实施方案中，免疫激活剂是选自下组的一种或多种分子的激动剂：CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40 和 GITR。在一些实施方案中，所述免疫激活剂为 OX40 激动剂。在一些实施方案中，所述免疫激活剂是选自下组的一种或多种分子的拮抗剂：A2AR、CD276、VTCN1、BTLA、CTLA-4、IDO、LAG3、KIR、NOX2、
10 PD-1、TIM-3、VISTA、SIGLEC7 和 SIGLEC9。在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含与选自下组的分子的表位特异性结合的抗体：CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40、GITR、A2AR、CD276、VTCN1、BTLA、CTLA-4、IDO、LAG3、KIR、NOX2、PD-1、TIM-3、VISTA、SIGLEC7、CD47 和 SIGLEC9。在一些实施方案中，所述抗
15 体选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、单链抗体 scFv、单链抗体 scFv-FC、微抗体、双抗体、单域抗体、全长抗体。

[0052] 在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含 OX40 抗体。在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含重组的 OX40 配体融合蛋白 OX40L。

- 20 [0053] 在一些实施方案中，所述免疫激活剂进一步包含 Toll 样受体 (Toll-Like Receptor, TLR) 的配体。在一些实施方案中，所述 TLR 的配体为 TLR 激动剂。在一些实施方案中，所述 TLR 激动剂包括 CpG 寡核苷酸 (oligodeoxynucleotides, CpG ODN)、瑞喹莫德 (Resiquimod, R848)、咪喹莫特 (Imiquimod, R 837)、dsRNA 及其组合。

- 25 [0054] 在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含抗 OX40 抗体和 CpG ODN。

[0055] 在一些实施方案中，所述免疫激活剂进一步包含一种或多种细胞因子。在一些实施方案中，所述细胞因子选自下组：IL-2、IL-12、IL15、IL6、IL18、IFN- α 、TNF- β 、IFN- γ 、GM-CSF、M-CSF 及其

任意组合。

[0056] 在一些实施方案中，所述组合物中溶瘤病毒的量为 1×10^5 - 1×10^9 pfu。在一些实施方案中，所述组合物中溶瘤病毒的量为 1×10^7 - 1×10^8 pfu。

5 [0057] 在一些实施方案中，所述肿瘤细胞为分离自所述受试者的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述肿瘤细胞为分离自所述受试者的实体瘤的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述肿瘤细胞为分离自所述受试者的一个或多个病灶的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述肿瘤细胞
10 为分离自所述受试者的一个或多个器官的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述肿瘤细胞为分离自所述受试者的一处或多处组织的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述肿瘤细胞是丧失增殖能力的肿瘤细胞。

[0058] 在一些实施方案中，所述组合物中肿瘤细胞的数目为
15 1×10^4 - 1×10^8 。在一些实施方案中，所述组合物中肿瘤细胞的数目为 1×10^5 - 1×10^7 。

[0059] 在一些实施方案中，所述所述方法包括将所述组合物原位或非原位施用至所述受试者。在一些实施方案中，所述原位施用包括瘤内注射、瘤周注射及其组合。在一些实施方案中，所述非原位施用包括
20 皮下注射、肌肉注射、腹腔注射、胸腔注射、静脉注射、动脉注射及其组合。在一些实施方案中，所述方法包括将所述组合物通过单点或多点皮下注射施用至所述受试者。

[0060] 在一些实施方案中，所述方法进一步包括将所述组合物施用至所述受试者前，在体外使用所述溶瘤病毒预处理所述肿瘤细胞。在一
25 些实施方案中，所述预处理的时间小于 12 小时。在一些实施方案中，所述预处理的时间小于 2 小时。

[0061] 另一方面，本公开提供一种在有需要的受试者中诱导免疫细胞活性的试剂盒，其包含溶瘤病毒，一种或多种免疫激活剂，和说明书，其中所述说明书指示从所述受试者体内获得和/或制备自体同源的肿

瘤细胞，并将所述肿瘤细胞与所述溶瘤病毒和一种或多种免疫激活剂共同施用至所述受试者的方法。

附图说明

5 [0062] 本发明的实施方案可以参照附图加以说明。

[0063] 图 1 示例性展示了本发明中使用的重组载体的构建。图 1A 示例性展示了删除双拷贝 γ 34.5 基因的溶瘤病毒载体 H1。图 1B 示例性展示了溶瘤病毒载体 H1 重组入 DsRed 报告基因表达盒 H1-DsRed。图 1C 示例性展示了溶瘤病毒载体 H1 重组入免疫激活剂 IAA 基因表
10 达盒 H1-IAA。图 1D 示例性展示了 OX40 单链抗体 scFv-FC 的基因表达盒。图 1E 示例性展示了 OX40 全长抗体的基因表达盒。图 1F 示例性展示了 OX40 配体 OX40L 的 FC 融合蛋白的基因表达盒。

[0064] 图 2 示例性展示了本发明中使用的溶瘤病毒对肿瘤细胞的感染和杀伤效应。图 2A 示例性展示了 H1-DsRed 感染不同小鼠肿瘤细胞
15 荧光观察。图 2B 示例性展示了 H1-DsRed 感染不同人肿瘤细胞荧光观察。图 2C 示例性展示了溶瘤病毒 H1-DsRed 对小鼠肿瘤细胞的杀伤效果。2D 示例性展示了溶瘤病毒 H1-DsRed 对人肿瘤细胞的杀伤效果。

[0065] 图 3 示例性展示了瘤内施用 H1 和 TLR 激动剂（HG
20 （H1+GM-CSF），HR（H1+R848），HC（H1+CpG ODN））对小鼠体内肿瘤的抑制作用。图 3A 示例性展示了施用 H1 与不同 TLR 激动剂的组合物后小鼠体内肿瘤的生长曲线图。图 3B 示例性展示了施用 H1 与不同 TLR 激动剂的组合物后小鼠和肿瘤及其体内肿瘤的图片。图 3C 示例性展示了施用 H1 与不同 TLR 激动剂的组合物后小鼠体内
25 肿瘤的平均重量。

[0066] 图 4 示例性展示了皮下施用本发明的组合物 HOC(H1+OX40mab+自体同源肿瘤细胞)对小鼠体内肿瘤的抑制作用。图 4A 示例性展示了小鼠体内肿瘤模型的构建以及皮下施用方法的示意图。4B 示例性展示了皮下注射 H1+CT-26 肿瘤细胞+OX40mab 后小

鼠体内肿瘤的生长曲线，图 4C 展示了皮下注射 H1+CT-26 肿瘤细胞+OX40mab 后小鼠体内肿瘤的平均重量。

[0067] 图 5 示例性展示了瘤内施用本发明的组合物 HOR (H1+OX40mab+R848) 对小鼠体内肿瘤的抑制作用。图 5A 示例性展示了 HOR (H1+OX40mab+R848) 瘤内注射后小鼠体内肿瘤的生长曲线。图 5B 示例性展示了 HOR (H1+OX40mab+R848) 瘤内注射后小鼠肿瘤整体图片。图 5C 示例性展示了 HOR (H1+OX40mab+R848) 瘤内注射后小鼠肿瘤大小图片。图 5D 示例性展示了 HOR (H1+OX40mab+R848) 瘤内注射后小鼠体内肿瘤的平均重量。

10 [0068] 图 6 示例性展示了皮下施用本发明的组合物 OR (OX40mab+R848)+CT-26 自体同源肿瘤组织裂解物 (CT-26 TL) 对小鼠体内肿瘤的抑制作用。图 6A 示例性展示了皮下注射 OR+ CT-26 TL 后小鼠体内的肿瘤生长曲线，图 6B 示例性展示了皮下注射 OR+ CT-26 TL 后小鼠的肿瘤整体图片，图 6C 示例性展示了皮下注射 OR+ CT-26 TL 后小鼠肿瘤大小图片，图 6D 展示了皮下注射 OR+ CT-26 TL 后小鼠体内肿瘤的平均重量。

15 [0069] 图 7 示例性展示了皮下施用本发明的组合物 OR (OX40mab+R848)+A20 自体同源肿瘤组织裂解物 (A20 TL) 对小鼠体内淋巴瘤的治疗效果。图 7A 示例性展示了皮下注射 OR+ A20 TL 后小鼠体内的肿瘤生长曲线，图 7B 示例性展示了皮下注射 OR+ A20 TL 后小鼠的肿瘤整体图片，图 7C 示例性展示了皮下注射 OR+ A20 TL 后小鼠肿瘤大小图片，图 7D 示例性展示了皮下注射 OR+ A20 TL 后小鼠体内肿瘤的平均重量。

20 [0070] 图 8 示例性展示了皮下施用本发明的组合物 OR (OX40mab+R848)+LLC 自体同源肿瘤组织裂解物 (LLC TL) 小鼠体内肺癌的治疗效果。图 8A 示例性展示了皮下注射 OR+LLC TL 后小鼠体内的肿瘤生长曲线。图 8B 示例性展示了皮下注射 OR+ LLC TL 后小鼠的肿瘤整体图片。图 8C 示例性展示了皮下注射 OR+ LLC TL 后小鼠肿瘤大小图片。图 8D 示例性展示了皮下注射 OR+ LLC TL 后

小鼠体内肿瘤的平均重量。

[0071] 图 9 示例性展示了本发明的组合物 OR (OX40mab+R848)+CT-26 TL 皮下共注射后在小鼠体内的长效抗肿瘤免疫记忆。

- 5 [0072] 图 10 示例性展示了 OR 分别与新鲜的自体同源的肿瘤组织匀浆 (CT-26 TL) 和福尔马林固定的自体同源的肿瘤组织匀浆 (CT-26 FTL) 的组合物皮下注射后抗肿瘤效果的比较。

发明详述

- 10 [0073] 虽然本文已经显示和描述了本发明的各种实施方案，但是对于本领域技术人员显而易见的是，这些实施方案仅以示例性的方式提供。在不脱离本发明的情况下，本领域技术人员可以想到许多变化、改变和替换。应该理解，可以采用本文所述的本发明实施方案的各种替代方案。
- 15 [0074] 除非另有说明，本文公开的一些实施方案的实践采用免疫学、生物化学、化学、分子生物学、微生物学、细胞生物学、基因组学和重组 DNA 的常规技术。参见例如 Sambrook 和 Green, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th Edition (2012); the series *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, et al. eds.); the series
- 20 *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc.), PC 2: *A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, and *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 6th Edition (R.I. Freshney, ed. (2010))。

25

定义

[0075] 如说明书和权利要求书中所用，单数形式“一”，“一个”和“所述”包括复数指代，除非上下文另有明确说明。例如，术语“免疫激活剂”包括一种或多种免疫激活剂。

[0076] 术语“约”或“近似”指在本领域普通技术人员确定的特定值的可接受误差范围内，这将部分取决于如何测量或确定该值，即，测量系统的局限性。例如，根据本领域的实践，“约”可以表示在 1 或大于 1 的标准偏差内。或者，“约”可表示给定值的最多 20%，最多 10%，最多 5% 或最多 1% 的范围。或者，特别是对于生物系统或过程，该术语可以表示数值的一个数量级，优选地在 5 倍内，更优选地在 2 倍内。在申请和权利要求中描述了特定值的情况下，除非另有说明，否则应当假定术语“约”意味着在特定值的可接受误差范围内。

[0077] 如本文所使用的术语“免疫细胞”指存在于受试者体内免疫系统的细胞。免疫细胞进一步包括淋巴细胞、嗜中性粒细胞和单核细胞/巨噬细胞。如本文所使用的术语“淋巴细胞”指存在于受试者免疫系统内的白细胞的一类亚型。淋巴细胞包括 T 细胞、天然杀伤细胞、和 B 细胞。

[0078] 如本文所使用的术语“T 细胞”是在胸腺中发育的淋巴细胞，其在免疫应答中起重要作用。T 细胞表面存在 T 细胞受体，通过所述 T 细胞受体可将 T 细胞与其他淋巴细胞区分开。

[0079] 如本文所使用的术语“辅助 T 细胞”（T helper cell, Th cell），也称为 CD4 + T 细胞，其通过释放细胞因子以帮助其他免疫细胞活化。此外，辅助 T 细胞在 B 细胞抗体类别转换、细胞毒性 T 细胞的活化和生长以及吞噬细胞如巨噬细胞的活性最大化中也是必需的。

[0080] 如本文所使用的术语“细胞毒性 T 细胞”（Cytotoxic T cell, CTL）也称为杀伤性 T 细胞或 CD8 + T 细胞，其破坏病毒感染的细胞和肿瘤细胞，还参与移植排斥。细胞毒性 T 细胞还产生细胞因子如 IL-2 和 IFN γ 进而影响其他细胞特别是巨噬细胞和 NK 细胞的效应功能。

[0081] 如本文所使用的术语“自然杀伤 T 细胞”（Nature Killer T cell）是异质性 T 细胞，其共有 T 细胞和天然杀伤细胞的特性。激活后，自然杀伤 T 细胞能够产生大量的干扰素 γ 、IL-4 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子，以及多种其他细胞因子和趋化因子如 IL-2、IL-13、IL-17、IL-21 和 TNF- α 等。

[0082] 本文使用的术语“免疫细胞活性”指免疫细胞从静止状态转变为活性状态的过程。免疫细胞活性可包括但不限于：免疫细胞的增殖；免疫细胞的分化、去分化或转分化；免疫细胞细胞因子的释放；免疫细胞的细胞毒性；免疫细胞的运动和/或运输；免疫细胞的衰竭及其组合

[0083] 本文使用的术语“自体同源”指从供体取出并且施用于受体的细胞，其中供体和受体是相同个体。

[0084] 本文使用的术语“肿瘤”指所有赘生性细胞及所有癌前和癌性细胞和组织，无论是恶性的还是良性的。术语“癌症”和“癌性”指细胞生长不受调节的病症。本文使用的术语“肿瘤细胞”或“癌细胞”指经历恶性转化使得其对宿主生物是病理性的细胞。如本文使用的癌细胞的定义不仅包括原发性癌细胞，还包括源自癌细胞的任何细胞如转移的癌细胞，以及源自癌细胞的体外培养物和细胞系。

[0085] 本文使用的术语“溶瘤病毒”是一种优先感染和杀伤癌细胞的病毒。受感染的癌细胞被溶瘤病毒破坏后会释放新的感染性病毒颗粒或病毒体，以破坏剩余的肿瘤。溶瘤病毒不仅导致肿瘤细胞的直接破坏，还会刺激宿主的抗肿瘤免疫系统响应。

[0086] 本文使用的术语“免疫激活剂”（Immune activation agent, IAA）指能够提高或加强机体免疫响应的任何物质，例如，免疫细胞表面分子的配体如激动剂或拮抗剂。所述免疫激活剂既可以为天然免疫激活剂，也可以是与天然免疫激活剂具有相当程度的同源性的通过基因工程制备的分子。

[0087] 本文使用的术语“激动剂”指直接或间接与受体结合并激活受体或活化其生物反应的配体。本文使用的术语“拮抗剂”是直接或间接与受体结合并阻断受体或抑制其生物反应的配体。

[0088] 术语“抗体”在本文中以最广义使用且涵盖各种抗体结构，包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体和抗体片段，只要其能够呈现抗原结合活性。可用于本公开的抗体包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体及抗体片段。所述抗体片段包括但不限于：Fab、

Fab'、F(ab')₂、Fv、单链抗体 scFv、单链抗体 scFv-FC、微抗体、双抗体、单域抗体、全长抗体。

[0089] 本文所用的术语“细胞因子”指影响免疫细胞的一类生物分子。用于实施本发明的示例性细胞因子包括但不限于干扰素- α (IFN- α)，
5 干扰素- β (IFN- β) 和干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素 (如 IL-2)、肿瘤坏死因子 (例如，TNF- α 和 TNF- β)、巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 等。

[0090] 如本文中使用的“治疗”指试图改变治疗个体中疾病的自然进
10 程，并且可以是为了预防或在临床病理学的过程期间实施的临床干预。治疗的期望效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、缓解症状、降低疾病的任何直接或间接病理学后果、预防转移、减缓疾病进展率、改善或减轻疾病状态和/或改善预后。

[0091] 如本文中使用的“有效量”指至少实现特定病症的可测量改善或
15 预防所需要的最小量。本文中的有效量可以随患者的疾病状态、年龄、性别和体重等因素变化。有效量也是治疗有益效果超过治疗的任何毒性或不利效果的量。在癌症或肿瘤的治疗中，药物的有效量可以具有以下效果：减少癌细胞的数目、降低肿瘤大小、抑制癌细胞浸润入外周器官、抑制肿瘤转移、在一定程度上抑制肿瘤生长和/或在一定程度上减轻一种或多种与病症有关的症状。可以在一次或多次施用中施用
20 有效量。

[0092] 如本文中使用的“受试者”、“个体”和“患者”在本文中可互换使用，指脊椎动物，优选哺乳动物，例如人。哺乳动物包括但不限于鼠类、猿猴、人类、农场动物、运动动物和宠物。

[0093] 如本文所用的术语“试剂盒”是指经包装以共同使用或市售的组合。
25 例如，本公开的试剂盒可包含本公开的组合物，以及使用组合物或试剂盒的说明。术语“说明书”指治疗产品的商业化包装中通常含有的说明性插页，其含有关于适应症、使用、剂量、施用、组合疗法、禁忌症的信息和/或关于使用这类治疗产品的警告。

组合物

[0094] 一方面，本申请提供一种在有需要的受试者中诱导免疫细胞活性的组合物，其包含：与所述受试者自体同源的肿瘤细胞的裂解物，OX40 激动剂和 TLR 激动剂。

- 5 [0095] 另一方面，本公开提供一种在有需要的受试者中诱导免疫细胞活性的组合物，其包含：溶瘤病毒、OX40 激动剂和 TLR 激动剂，或表达 OX40 激动剂的溶瘤病毒和 TLR 激动剂。

[0096] 另一方面，本公开提供一种在有需要的受试者中诱导免疫细胞活性的组合物，其包含与所述受试者自体同源的肿瘤细胞、溶瘤病毒
10 和一种或多种免疫激活剂。

[0097] 在一些实施方案中，所述免疫细胞活性选自：免疫细胞的增殖；免疫细胞的分化、去分化或转分化；免疫细胞细胞因子的释放；免疫细胞的细胞毒性；免疫细胞的运动和/或运输；免疫细胞的衰竭及其组合。

- 15 [0098] 在一些实施方案中，所述免疫细胞的活性包括免疫细胞的增殖。在一些实施方案中，所述增殖指免疫细胞数目的增加。在一些实施方案中，所述免疫细胞的数目通过例如流式细胞术和/或血细胞计数等方法定量。在一些实施方案中，本公开中的组合物使受试者体内免疫细胞的增殖高于施用所述组合物前该受试者体内免疫细胞的增殖。在
20 一些实施方案中，本公开中的组合物使受试者体内免疫细胞的增殖高于未施用所述组合物的另一受试者体内免疫细胞的增殖。

[0099] 在一些实施方案中，所述免疫细胞的活性包括所述免疫细胞对细胞因子的释放。在一些实施方案中，所述细胞因子包括但不限于 TNF α 、TGF β 、IFN γ 、CSF、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-13、
25 IL-17、IL-21、IL-22、GM-CSF 等。在一些实施方案中，所述细胞因子可使用如 ELISA、流式细胞术和/或蛋白免疫印迹等量化。在一些实施方案中，本公开中的组合物使受试者体内免疫细胞释放的细胞因子的量高于施用所述组合物前该受试者体内免疫细胞释放的细胞因子的量。在一些实施方案中，本公开中的组合物使受试者体内免疫细

胞释放的细胞因子的量高于未施用所述组合物的另一受试者体内免疫细胞释放的细胞因子的量。

[00100] 在一些实施方案中，所述免疫细胞的活性包括所述免疫细胞的细胞毒性。在一些实施方案中，所述细胞毒性用于杀伤肿瘤细胞。在
5 一些实施方案中，所述细胞毒性可诱导肿瘤细胞发生细胞凋亡。在一些实施方案中，所述细胞毒性还包括释放细胞毒性细胞因子如 IFN γ 。在一些实施方案中，所述细胞毒性可通过细胞毒性测定法如 ELISPOT 等量化。在一些实施方案中，本公开中的组合物使受试者体内免疫细胞的细胞毒性的量高于施用所述组合物前该受试者体内免疫细胞的
10 细胞毒性的量。在一些实施方案中，本公开中的组合物使受试者体内免疫的细胞毒性的量高于未施用所述组合物的另一受试者体内免疫细胞释放的细胞毒性的量。

[00101] 在一些实施方案中，所述免疫细胞的活性包括所述免疫细胞的分化、去分化和转分化。所述分化、去分化或转分化可由所述免疫细
15 胞表面相关标志物的表达通过流式细胞术评估确定。在一些实施方案中，本公开中的组合物使受试者体内免疫细胞的分化能力高于施用所述组合物前该受试者体内免疫细胞的分化能力。在一些实施方案中，本公开中的组合物使受试者体内免疫细胞的分化能力高于未施用所
20 述组合物的另一受试者体内免疫细胞的分化能力。在一些实施方案中，本公开中的组合物使受试者体内免疫细胞的去分化能力高于施用所述组合物前该受试者体内免疫细胞的去分化能力。在一些实施方案中，本公开中的组合物使受试者体内免疫细胞的去分化能力高于未施用所
25 述组合物的另一受试者体内免疫细胞的去分化能力。在一些实施方案中，本公开中的组合物使受试者体内免疫细胞的转分化能力高于施用所述组合物前该受试者体内免疫细胞的转分化能力。在一些实施方案中，本公开中的组合物使受试者体内免疫细胞的转分化能力高于未施用所
述组合物的另一受试者体内免疫细胞的转分化能力。

[00102] 在一些实施方案中，所述免疫细胞的活性包括免疫细胞的运动和/或运输能力。在一些实施方案中，所述运动和/或运输能力可通过

测定所述免疫细胞向靶位点的转移确定。在一些实施方案中，所述测定可通过确定病灶内免疫细胞如肿瘤浸润淋巴细胞（Tumor Infiltrating Lymphocyte, TIL）的数目进行。在一些实施方案中，本公开中的组合物使受试者体内免疫细胞的运动和/或运输能力高于施用
5 所述组合物前该受试者体内免疫细胞的运动和/或运输能力。在一些实施方案中，本公开中的组合物使受试者体内免疫细胞的运动和/或运输能力高于未施用所述组合物的另一受试者体内免疫细胞的运动和/或运输能力。

[00103] 在一些实施方案中，所述免疫细胞的活性包括免疫细胞的衰竭。

10 在一些实施方案中，所述衰竭通过流式细胞术分析。在一些实施方案中，所述衰竭通过免疫细胞标志物的表达水平确定。在一些实施方案中，所述标志物包括但不限于 PD1、2B4、LAG3、CD160、IFN γ 等。在一些实施方案中，本公开中的组合物使受试者体内免疫细胞的衰竭能力高于施用所述组合物前该受试者体内免疫细胞的衰竭能力。在
15 一些实施方案中，本公开中的组合物使受试者体内免疫细胞的衰竭能力高于未施用所述组合物的另一受试者体内免疫细胞的衰竭能力。

[00104] 在一些实施方案中，本公开中所述免疫细胞为淋巴细胞。在一些实施方案中，所述淋巴细胞包括但不限于 T 细胞、天然杀伤细胞、和 B 细胞。在一些实施方案中，所述 T 细胞包括但不限于辅助 T 细
20 胞、细胞毒性 T 细胞和自然杀伤 T 细胞。在一些实施方案中，本公开中所述免疫细胞为巨噬细胞。

[00105] 在一些实施方案中，本公开的组合物中使用的溶瘤病毒可以为任何适用于本申请组合物的溶瘤病毒。在一些实施方案中，所述溶瘤病毒选自粘病毒科(myoviridae)、疱疹病毒科(herpesviridae)、反转录
25 病毒科(retroviridae)、腺病毒科(adenoviridae)、杆状 RNA 病毒科(barnaviridae)细小病毒科(parvoviridae)、杆状病毒科(baculoviridae)、微小病毒科(microviridae)、长尾病毒科(siphoviridae)、短尾病毒科(podpviridae)、被盖病毒科(corticoviridae)、芽生病毒科(plasmaviridae)、脂毛病毒科(lipothrixviridae)、痘病毒科(poxviridae)、虹彩病毒科

(iridoviridae)、藻 DNA 病毒科(phycodnaviridae)、乳多空病毒科(papovaviridae)、多 DNA 病毒科(polydnviridae)、丝状病毒科(inoviridae)、双生病毒科(geminiviridae)、圆环病毒科(circoviridae)、嗜肝 DNA 病毒科(hepadnaviridae)、呼肠孤病毒科(reoviridae)、双 RNA 病毒科(bimaviridae)、副黏病毒科(paramyxoviridae)、弹状病毒科(rhabdoviridae)、线状病毒科(filoviridae)、正黏病毒科(orthomyxoviridae)、布尼亚病毒科(bunyaviridae)、沙粒病毒科(arenaviridae)、轻小病毒科(leviviridae)、小 RNA 病毒科(picornaviridae)、杯状病毒科(caliciviridae)、星状病毒科(astroviridae)、诺达病毒科(nodaviridae)、四病毒科(tetraviridae)、冠状病毒科(coronaviridae)或披膜病毒科(togaviridae)中的成员。

[00106] 在一些实施方案中，可用于本公开的组合物的溶瘤病毒包括但不限于疱疹病毒 (Herpesvirus)、腺病毒 (Adenovirus)、呼肠孤病毒 (Reovirus)、牛痘病毒 (Vaccinia Virus)、柯萨基病毒 (Coxsackievirus)、麻疹病毒 (Measles Virus)、脊髓灰质炎病毒 (Polio Virus)、逆转录酶病毒 (Retrovirus)、细小病毒 H1 (Parvovirus H1)、水疱性口炎病毒 (Vesicular Stomatitis Virus)、新城疫病毒 (Newcastle Disease Virus) 和 M1 溶瘤病毒。

[00107] 在一些实施方案中，本公开中所述溶瘤病毒可以是天然存在的或者是经修饰的溶瘤病毒。在一些实施方案中，所述“天然存在的”溶瘤病毒指从天然来源中分离且在实验室中未被有意修饰的溶瘤病毒。例如，溶瘤病毒可来自“天然来源”，即来自感染了溶瘤病毒的受试者。

[00108] 在一些实施方案中，所述溶瘤病毒可以是经修饰的溶瘤病毒。在一些实施方案中，所述经修饰的溶瘤病毒其保持其感染肿瘤细胞的能力。在一些实施方案中，所述溶瘤病毒在一个或多个基因组区段中包含突变、插入和/或缺失，或经设计编码的工程化的基因，如编码本公开中所述一种或多种免疫激活剂的基因。在一些实施方案中，所述经修饰的溶瘤病毒是减毒的溶瘤病毒。在一些实施方案中，所述溶瘤病毒是重组的溶瘤病毒。在一些实施方案中，所述重组溶瘤病毒其通

过两个或多个不同溶瘤病毒的基因组区段的重组/重排产生。

[00109] 在一些实施方案中，所述溶瘤病毒为单纯疱疹病毒。在一些实施方案中，所述单纯疱疹病毒选自 HSV-1 或 HSV-2。在一些实施方案中，所述溶瘤病毒为经修饰以缺失 γ 34.5 功能的单纯疱疹病毒
5 HSV-1。在一些实施方案中，所述经修饰以缺失 γ 34.5 功能的单纯疱疹病毒包括但不限于在 γ 34.5 基因中包含突变、插入和/或缺失的单纯疱疹病毒。

[00110] 在一些实施方案中，本发明的组合物中包含 OX40 激动剂和 TLR 激动剂。在一些实施方案中，本发明组合物中包含的 OX40 激动
10 剂包括 OX40 抗体、OX40 配体融合蛋白 (OX40L)。在一些实施方案中，所述 OX40 激动剂包括 OX40 抗体。所述 OX40 抗体包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体。在一些实施方案中，所述 OX40 抗体为全长抗体。在一些实施方案中，所述 OX40 抗体为抗体片段。在一些实施方案中，所述 OX40 抗体选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、
15 Fv、单链抗体 scFv、单链抗体 scFv-FC、微抗体、双抗体、单域抗体、全长抗体。在一些实施方案中，所述 OX40 激动剂包括 OX40 配体融合蛋白。在一些实施方案中，所述 OX40 配体融合蛋白为 Fc 融合蛋白。

[00111] 在一些实施方案中，本发明组合物中包含的 TLR 激动剂包括所
20 述 TLR 激动剂包括但不限于 TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TLR11、TLR12 和/或 TLR13 的配体。在一些实施方案中，所述 TLR 的配体为 TLR 激动剂。在一些实施方案中，所述 TLR 的配体包括但不限于 TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TLR11、TLR12
25 和/或 TLR13 的激动剂。在一些实施方案中，所述 TLR 激动剂包括 CpG 寡核苷酸 (oligodeoxynucleotides, CpG ODN)，瑞喹莫德 (Resiquimod, R848)、咪喹莫特 (Imiquimod, R 837)、dsRNA 及其组合。在一些实施方案中，所述 CpG ODN 是非甲基化的 CpG ODN。
[00112] 在一些实施方案中，本公开的组合物包含一种或多种免疫激活

剂。在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含能够与免疫细胞表面受体结合并激活所述免疫细胞下游信号通路的分子。在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含为能够与免疫细胞表面受体结合并激活所述免疫细胞下游信号通路的所述表面受体的配体。

5 [00113] 在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含免疫细胞表面受体的一种多种激动剂。在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含选自下组的一种或多种分子的激动剂：CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40 和 GITR。在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含 OX40 的激动剂。

10 [00114] 在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含免疫细胞表面受体的一种多种拮抗剂。在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含选自下组的一种或多种分子的拮抗剂：A2AR、CD276、VTCN1、BTLA、CTLA-4、IDO、LAG3、KIR、NOX2、PD-1、TIM-3、VISTA、SIGLEC7 和 SIGLEC9。

15 [00115] 在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含选自下组的分子的配体：CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40、GITR、A2AR、CD276、VTCN1、BTLA、CTLA-4、IDO、LAG3、KIR、NOX2、PD-1、TIM-3、VISTA、SIGLEC7、CD47 和 SIGLEC9。在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含 OX40 配体的融合蛋白（OX40L）。

20 [00116] 在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含选自下组的分子的配体的融合蛋白：CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40、GITR、A2AR、CD276、VTCN1、BTLA、CTLA-4、IDO、LAG3、KIR、NOX2、PD-1、TIM-3、VISTA、SIGLEC7、CD47 和 SIGLEC9。在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含 OX40 配体的融合蛋白（OX40L）。

25 [00117] 在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含与选自下组的分子的表位特异性结合的抗体：CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40、GITR、A2AR、CD276、VTCN1、BTLA、CTLA-4、IDO、LAG3、KIR、NOX2、PD-1、TIM-3、VISTA、SIGLEC7、CD47 和 SIGLEC9。在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含 OX40 的抗体。

[00118] 在一些实施方案中，所述抗体包括但不限于单克隆抗体、多克

隆抗体、多特异性抗体。在一些实施方案中，所述抗体为全长抗体。在一些实施方案中，所述抗体为抗体片段。在一些实施方案中，所述抗体选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、单链抗体 scFv、单链抗体 scFv-FC、微抗体、双抗体、单域抗体、全长抗体。。

5 [00119] 在一些实施方案中，本公开所述免疫激活剂进一步包含 Toll 样受体(Toll-Like Receptor, TLR)的配体。在一些实施方案中，所述 TLR 的配体包括但不限于 TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TLR11、TLR12 和/或 TLR13 的配体。在一些实施方案中，所述 TLR 的配体为 TLR 激动剂。在
10 一些实施方案中，所述 TLR 的配体包括但不限于 TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TLR11、TLR12 和/或 TLR13 的激动剂。

[00120] 在一些实施方案中，所述 TLR 激动剂包括 CpG 寡核苷酸(oligodeoxynucleotides, CpG ODN)，瑞喹莫德(Resiquimod, R848)、
15 咪喹莫特(Imiquimod, R 837)、dsRNA 及其组合。在一些实施方案中，所述 CpG ODN 是非甲基化的 CpG ODN。

[00121] 在一些实施方案中，所述免疫激活剂进一步包含单链或双链的核酸分子。在一些实施方案中，所述单链或双链的核酸分子可以是任何能够直接和/或间接调节免疫细胞的免疫响应的核酸分子。在
20 一些实施方案中，所述核酸的长度为 2-100 个碱基。在一些实施方案中，所述核酸的长度为 6-100 个核酸。在一些实施方案中，所述核酸的长度为 8-100 个核酸。在一些实施方案中，所述核酸的长度为 2-50 个碱基。在一些实施方案中，所述核酸的长度为 6-50 个核酸。在一些实施方案中，所述核酸的长度为 8-50 个核酸。

25 [00122] 在一些实施方案中，所述免疫激活剂进一步包含一种或多种细胞因子。在一些实施方案中，所述细胞因子包括但不限于：IL-1、IL-2、IL-5、IL-6、IL-12、IL-13、IL15、IL16、IL-17、IL18、IL-21、IL-22、IFN- α 、TNF- β 、IFN- γ 、GM-CSF、M-CSF 及其任意组合。在一些实施方案中，所述所述细胞因子选自下组：IL-2、IL-12、IL15、IL6、IL18、

IFN- α 、TNF- β 、IFN- γ 、GM-CSF、M-CSF 及其任意组合。

[00123]

[00124] 在一些实施方案中，本公开组合物中的一种或多种免疫激活剂的基因由所述溶瘤病毒编码并表达。在一些实施方案中，本公开组合物中的 OX40 激动剂的基因由溶瘤病毒编码并表达。在一些实施方案中，本公开组合物中的 TLR 激动剂的基因由溶瘤病毒编码并表达。在一些实施方案中，本公开组合物中的 OX40 激动剂和 TLR 激动剂的基因由溶瘤病毒编码并表达。在一些实施方案中，本公开组合物中的一种或多种免疫激活剂不由所述溶瘤病毒编码或表达。在一些实施方案中，本公开组合物中的免疫激活剂中部分由所述溶瘤病毒编码和表达。

[00125] 在一些实施方案中，所述组合物中溶瘤病毒的量为 1×10^5 - 1×10^9 pfu。在一些实施方案中，所述组合物中溶瘤病毒的量为 1×10^7 - 1×10^8 pfu。在一些实施方案中，所述溶瘤病毒的量可以为约 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 或 5×10^8 pfu。

[00126] 在一些实施方案中，本公开所述组合物包含与所述受试者自体同源的肿瘤细胞。在一些实施方案中，所述肿瘤细胞为分离自所述受试者的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述肿瘤细胞为分离自所述受试者的实体瘤的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述肿瘤细胞为分离自所述受试者的一个或多个病灶的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述肿瘤细胞为分离自所述受试者的一个或多个器官的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述肿瘤细胞为分离自所述受试者的一处或多处组织的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述病灶包括但不限于：肺癌、膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、食道癌、胃癌、胶质瘤、头颈癌、肾癌、多发性骨髓瘤、淋巴细胞白血病、髓细胞白血病、混合细胞白血病、肝癌、胆囊癌、淋巴瘤、黑色素瘤、间皮瘤、成神经管细胞瘤、口腔癌、鼻咽癌、喉癌、甲状腺癌、纵膈肿瘤、卵

巢癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、睾丸癌、气管癌和外阴癌。在一些实施方案中，所述肿瘤细胞为分离自所述受试者体液的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述体液包括但不限于：全血、血浆、积液、腹水、脑脊液、宫颈分泌物、阴道分泌物、子宫
5 内膜分泌物、胃肠道分泌物、支气管分泌物包括痰液和乳房液。

[00127] 在一些实施方案中，所述组合物中使用的肿瘤细胞源自新鲜的肿瘤组织。在一些实施方案中，所述组合物中使用的肿瘤细胞源自冷冻的肿瘤组织。在一些实施方案中，所述肿瘤细胞源自经固定液固定的肿瘤组织。在一些实施方案中，所述固定液包含福尔马林、甲醛、
10 多聚甲醛、戊二醛、乙醇或其任意组合。

[00128] 在一些实施方案中，所述肿瘤细胞是丧失增殖能力的肿瘤细胞。在一些实施方案中，所述肿瘤细胞是经遗传修饰丧失增殖能力的肿瘤细胞。在一些实施方案中，所述肿瘤细胞是在基因水平具有突变、缺失和/或插入以丧失增殖能力的肿瘤细胞。在一些实施方案中，所述肿
15 瘤细胞是经处理如辐射丧失增殖能力的肿瘤细胞。

[00129] 在一些实施方案中，所述组合物中使用的肿瘤细胞的数目为 1×10^4 - 1×10^8 。在一些实施方案中，所述组合物中肿瘤细胞的数目为 1×10^5 - 1×10^7 。在一些实施方案中，所述组合物中肿瘤细胞的数目为 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 。

[00130] 在一些实施方案中，本公开所述组合物包含与所述受试者自体同源的肿瘤细胞裂解物。在一些实施方案中，本公开组合物中使用的肿瘤细胞裂解物源自与所述受试者自体同源的肿瘤细胞。在一些实施方案中，本公开组合物中使用的肿瘤细胞裂解物源自分离自所述受试者的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。
20

[00131] 在一些实施方案中，本公开组合物中使用的肿瘤细胞裂解物源自所述受试者的实体瘤的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，本公开组合物中使用的肿瘤细胞裂解物源自所述受试者的一个或多个病灶的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，本公开组合物中使用的肿瘤细胞裂解物源自所述受试者的一个或
25

多个器官的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，本公开组合物中使用的肿瘤细胞裂解物源自所述受试者的一处或多处组织的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述病灶包括但不限于：肺癌、膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、食道癌、胃癌、胶质瘤、头颈癌、肾癌、5 多发性骨髓瘤、淋巴细胞白血病、髓细胞白血病、混合细胞白血病、肝癌、胆囊癌、淋巴瘤、黑色素瘤、间皮瘤、成神经管细胞瘤、口腔癌、鼻咽癌、喉癌、甲状腺癌、纵膈肿瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、睾丸癌、气管癌和外阴癌。在一些实施方案中，本公开组合物中使用的肿瘤细胞裂解物源自所述受试者体液的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述体液包括但不限于：10 全血、血浆、积液、腹水、脑脊液、宫颈分泌物、阴道分泌物、子宫内膜分泌物、胃肠道分泌物、支气管分泌物包括痰液和乳房液。

[00132] 在一些实施方案中，本公开组合物中使用的肿瘤细胞裂解物源自源自新鲜的肿瘤组织。在一些实施方案中，本公开组合物中使用的肿瘤细胞裂解物源自源自冷冻的肿瘤组织。在一些实施方案中，本公开组合物中使用的肿瘤细胞裂解物源自经固定液固定的肿瘤组织。在一些实施方案中，所述固定液包含福尔马林、甲醛、多聚甲醛、戊二醛、乙醇或其任意组合。

20 [00133] 在一些实施方案中，本公开组合物中使用的肿瘤细胞裂解物源自丧失增殖能力的肿瘤细胞。在一些实施方案中，本公开组合物中使用的肿瘤细胞裂解物源自经遗传修饰丧失增殖能力的肿瘤细胞。在一些实施方案中，本公开组合物中使用的肿瘤细胞裂解物源自基因水平具有突变、缺失和/或插入以丧失增殖能力的肿瘤细胞。在一些实施方案中，本公开组合物中使用的肿瘤细胞裂解物源自经处理如辐射丧失增殖能力的肿瘤细胞。

[00134] 在一些实施方案中，本申请的组合物中使用的肿瘤细胞裂解物源自 1×10^4 - 1×10^8 数目的肿瘤细胞。在一些实施方案中，本申请的组合物中使用的肿瘤细胞裂解物源自 1×10^5 - 1×10^7 数目的肿瘤细胞。在

一些实施方案中，本申请的组合物中使用的肿瘤细胞裂解物源自 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 数目的肿瘤细胞。

[00135] 在一些实施方案中，本申请的组合物中使用的肿瘤细胞裂解物
5 通过选自下组的方法获得：匀浆、超声或二者的组合。在一些实施方案中，本申请的组合物中使用的肿瘤细胞裂解物通过匀浆获得。在一些实施方案中，本申请的组合物中使用的肿瘤细胞裂解物通过超声获得。在一些实施方案中，所述所述组合物中的所述肿瘤细胞的裂解物通过先匀浆随后超声的方式过程获得。在一些实施方案中，所述匀浆
10 的时间不超过 30 秒。在一些实施方案中，所述匀浆的时间不超过 1 分钟。在一些实施方案中，所述匀浆的时间不超过 2 分钟。在一些实施方案中，所述匀浆的时间不超过 3 分钟。在一些实施方案中，所述匀浆的时间不超过 4 分钟。在一些实施方案中，所述匀浆的时间不超过 5 分钟。在一些实施方案中，所述匀浆的时间不超过 6 分钟。在一
15 些实施方案中，所述匀浆的时间不超过 7 分钟。在一些实施方案中，所述匀浆的时间不超过 8 分钟。在一些实施方案中，所述匀浆的时间不超过 9 分钟。

[00136] 在一些实施方案中，所述匀浆包括多次匀浆，其中每次匀浆的时间不超过 30 秒、不超过 1 分钟、不超过 2 分钟、不超过 3 分钟、
20 不超过 4 分钟、不超过 5 分钟、不超过 6 分钟、不超过 7 分钟、不超过 8 分钟、不超过 9 分钟、不超过 10 分钟。在一些实施方案中，所述匀浆包括多次匀浆，其中每次匀浆的间隔时间不超过 30 秒、不超过 1 分钟、不超过 2 分钟、不超过 3 分钟、不超过 4 分钟、不超过 5 分钟、不超过 6 分钟、不超过 7 分钟、不超过 8 分钟、不超过 9 分钟、
25 不超过 10 分钟。

[00137] 在一些实施方案中，所述超声的工作时间不超过 0.5 秒。在一些实施方案中，所述超声的工作时间不超过 1 秒。在一些实施方案中，所述超声的工作时间不超过 1.5 秒。在一些实施方案中，所述超声的工作时间不超过 2 秒。在一些实施方案中，所述超声的工作时间不超

过 2.5 秒。在一些实施方案中，所述超声的工作时间不超过 3 秒。在一些实施方案中，所述超声的工作时间不超过 3.5 秒。在一些实施方案中，所述超声的工作时间不超过 4 秒。在一些实施方案中，所述超声的工作时间不超过 4.5 秒。在一些实施方案中，所述超声的工作时间不超过 5 秒。

[00138] 在一些实施方案中，所述超声每次工作的间歇时间不少于 0.5 秒。在一些实施方案中，所述超声每次工作的间歇时间不少于 1 秒。在一些实施方案中，所述超声每次工作的间歇时间不少于 1.5 秒。在一些实施方案中，所述超声每次工作的间歇时间不少于 2 秒。在一些实施方案中，所述超声每次工作的间歇时间不少于 2.5 秒。在一些实施方案中，所述超声每次工作的间歇时间不少于 3 秒。在一些实施方案中，所述超声每次工作的间歇时间不少于 3.5 秒。在一些实施方案中，所述超声每次工作的间歇时间不少于 4 秒。在一些实施方案中，所述超声每次工作的间歇时间不少于 4.5 秒。在一些实施方案中，所述超声每次工作的间歇时间不少于 5 秒。

[00139] 在一些实施方案中，所述超声的工作次数为至少 1 次、至少 2 次、至少 3 次、至少 4 次、至少 5 次、至少 6 次、至少 7 次、至少 8 次、至少 9 次、至少 10 次、至少 11 次、至少 12 次、至少 13 次、至少 14 次、至少 15 次、至少 16 次、至少 17 次、至少 18 次、至少 19 次、至少 20 次。

方法

[00140] 另一方面，本公开提供一种在有需要的受试者中通过诱导免疫细胞活性治疗肿瘤的方法，其包括对所述受试者施用有效量的本申请的组合物。在一些实施方案中，所述组合物包含与所述受试者自体同源的肿瘤细胞的裂解物、OX40 激动剂和 TLR 激动剂。在一些实施方案中，所述组合物包含溶瘤病毒、OX40 激动剂和 TLR 激动剂，或表达 OX40 激动剂的溶瘤病毒和 TLR 激动剂。在一些实施方案中，所述组合物包含与所述受试者自体同源的肿瘤细胞、溶瘤病毒和一种或多种免疫激活剂。在一些实施方案中，所述治疗包括使肿瘤衰退、抑制

肿瘤进展和/或转移、预防其复发和/或转移。

[00141] 在一些实施方案中，所述方法用于治疗所述受试者的实体瘤。

在一些实施方案中，所述方法用于治疗所述受试者的血液肿瘤。在

一些实施方案中，所述方法用于治疗所述受试者选自下组的病症：肺癌、

5 膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、食道癌、胃癌、胶质瘤、头颈癌、肾癌、白血病、淋巴细胞白血病、髓细胞白血病、混合细胞白血病、多发性骨髓瘤、肝癌、胆囊癌、淋巴瘤、黑色素瘤、间皮瘤、成神经管细胞瘤、口腔癌、鼻咽癌、喉癌、甲状腺癌、纵膈肿瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、辜丸癌、气管癌和外阴癌。

[00142] 在所述方法的一些实施方案中，所述免疫细胞为淋巴细胞。在

一些实施方案中，所述淋巴细胞包括但不限于 T 细胞、天然杀伤细胞、

和 B 细胞。在一些实施方案中，所述 T 细胞包括但不限于辅助 T 细

胞、细胞毒性 T 细胞和自然杀伤 T 细胞。在一些实施方案中，本公开

15 中所述免疫细胞为巨噬细胞。

[00143] 在所述方法的一些实施方案中，所述方法中使用的溶瘤病毒可

以为任何适用的溶瘤病毒。在一些实施方案中，所述方法中使用的溶

瘤病毒选自粘病毒科(myoviridae)、疱疹病毒科(herpesviridae)、反转

录病毒科(retroviridae)、腺病毒科(adenoviridae)、杆状 RNA 病毒科

20 (barnaviridae)细小病毒科(parvoviridae)、杆状病毒科(baculoviridae)、

微小病毒科(microviridae)、长尾病毒科(siphoviridae)、短尾病毒科

(podpviridae)、被盖病毒科(corticoviridae)、芽生病毒科(plasmavifidae)、

脂毛病毒科(lipothrixviridae)、痘病毒科(poxviridae)、虹彩病毒科

(iridoviridae)、藻 DNA 病毒科(phycodnaviridae)、乳多空病毒科

25 (papovaviridae)、多 DNA 病毒科(polydnaviridae)、丝状病毒科

(inoviridae)、双生病毒科(geminiviridae)、圆环病毒科(circoviridae)、

嗜肝 DNA 病毒科(hepadnaviridae)、呼肠孤病毒科(reoviridae)、双 RNA

病毒科(bimaviridae)、副黏病毒科(paramyxoviridae)、弹状病毒科

(rhabdoviridae)、线状病毒科(filoviridae)、正黏病毒科

(orthomyxoviridae)、布尼亚病毒科(bunyaviridae)、沙粒病毒科(arenaviridae)、轻小病毒科(leviviridae)、小 RNA 病毒科(picornaviridae)、杯状病毒科(caliciviridae)、星状病毒科(astroviridae)、诺达病毒科(nodaviridae)、四病毒科(tetraviridae)、冠状病毒科(5 coronaviridae)、披膜病毒科(togaviridae)或者中的成员。在一些实施方案中,所述方法中使用的溶瘤病毒选自疱疹病毒(Herpesvirus)、腺病毒(Adenovirus)、呼肠孤病毒(Reovirus)、牛痘病毒(Vaccinia Virus)、柯萨基病毒(Coxsackievirus)、麻疹病毒(Measles Virus)、脊髓灰质炎病毒(Poliovirus)、逆转录酶病毒(Retrovirus)、细小病毒 H1 (Parvovirus H1)、水疱性口炎病毒(Vesicular Stomatitis Virus)、新城疫病毒(Newcastle Disease Virus)和 M1 溶瘤病毒。

[00144]在所述方法的一些实施方案中,本公开方法中所使用的溶瘤病毒可以是天然存在的或者是经修饰的溶瘤病毒。在所述方法的一些实施方案中,所述经修饰的溶瘤病毒其保持其感染肿瘤细胞的能力。在15 一些实施方案中,所述经修饰的溶瘤病毒是减毒的溶瘤病毒。在一些实施方案中,本公开方法中所使用的溶瘤病毒是重组的溶瘤病毒。在一些实施方案中,所述重组溶瘤病毒通过两个或多个不同溶瘤病毒的基因组区段重组/重排产生。在一些实施方案中,所述溶瘤病毒在一个或多个基因组区段中包含突变、插入和/或缺失,或经设计编码的工程20 化的基因,如编码本公开中所述一种或多种免疫激活剂的基因。

[00145]在所述方法的一些实施方案中,本公开方法中所使用的溶瘤病毒为单纯疱疹病毒。在一些实施方案中,所述单纯疱疹病毒包括但不限于 HSV-1 和 HSV-2。在一些实施方案中,本公开方法中所使用的溶瘤病毒为经修饰以缺失 γ 34.5 功能的单纯疱疹病毒。在一些实施方案25 中,所述经修饰以缺失 γ 34.5 功能的单纯疱疹病毒包括但不限于在 γ 34.5 基因中包含突变、插入和/或缺失的单纯疱疹病毒。

[00146]在一些实施方案中,所述方法中使用的组合物包含 OX40 激动剂和 TLR 激动剂。在一些实施方案中,所述 OX40 激动剂包括 OX40 抗体或 OX40 配体融合蛋白 OX40L。在一些实施方案中,所述 OX40

激动剂包括 OX40 抗体。所述 OX40 抗体包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体。在一些实施方案中，所述 OX40 抗体为全长抗体。在一些实施方案中，所述 OX40 抗体为抗体片段。在一些实施方案中，所述 OX40 抗体选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、单链抗体
5 scFv、单链抗体 scFv-FC、微抗体、双抗体、单域抗体、全长抗体。在一些实施方案中，所述 OX40 激动剂包括 OX40 配体融合蛋白 OX40L。在一些实施方案中，所述 OX40 配体融合蛋白为 Fc 融合蛋白 OX40L。

[00147] 在一些实施方案中，所述 TLR 激动剂包括所述 TLR 激动剂包
10 括但不限于 TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TLR11、TLR12 和/或 TLR13 的配体。在一些实施方案中，所述 TLR 的配体为 TLR 激动剂。在一些实施方案中，所述 TLR 的配体包括但不限于 TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、
15 TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TLR11、TLR12 和/或 TLR13 的激动剂。在一些实施方案中，所述 TLR 激动剂包括 CpG 寡核苷酸 (oligodeoxynucleotides, CpG ODN)，瑞喹莫德 (Resiquimod, R848)、咪喹莫特 (Imiquimod, R 837)、dsRNA 及其组合。在一些实施方案中，所述 CpG ODN 是非甲基化的 CpG ODN。

[00148] 在所述方法的一些实施方案中，所述方法中使用的组合物包含
20 一种或多种免疫激活剂。在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含能够与免疫细胞表面受体结合并激活所述免疫细胞下游信号通路的分子。在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含为能够与免疫细胞表面受体结合并激活所述免疫细胞下游信号通路的所述表面受体的配体。在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含免疫细胞表面受体的一种多
25 种激动剂。在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含选自下组的一种或多种分子的激动剂：CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40 和 GITR。在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含 OX40 的激动剂。在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含免疫细胞表面受体的一种多种拮抗剂。在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含选自下组的一种

或多种分子的拮抗剂：A2AR、CD276、VTCN1、BTLA、CTLA-4、IDO、LAG3、KIR、NOX2、PD-1、TIM-3、VISTA、SIGLEC7 和 SIGLEC9。

[00149] 在一些实施方案中，在本公开方法中所使用的免疫激活剂剂包
含选自下组的分子的配体：CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、

5 OX40、GITR、A2AR、CD276、VTCN1、BTLA、CTLA-4、IDO、LAG3、
KIR、NOX2、PD-1、TIM-3、VISTA、SIGLEC7、CD47 和 SIGLEC9。

在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含 OX40 的配体。在一些实施
方案中，所述免疫激活剂包含选自下组的分子的配体的融合蛋白：

10 CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40、GITR、A2AR、CD276、
VTCN1、BTLA、CTLA-4、IDO、LAG3、KIR、NOX2、PD-1、TIM-3、
VISTA、SIGLEC7、CD47 和 SIGLEC9。在一些实施方案中，所述免
疫激活剂包含 OX40 配体的融合蛋白。

[00150] 在一些实施方案中，在本公开方法中所使用的免疫激活剂包含
与选自下组的分子的表位特异性结合的抗体：CD27、CD28、CD40、

15 CD122、CD137、OX40、GITR、A2AR、CD276、VTCN1、BTLA、
CTLA-4、IDO、LAG3、KIR、NOX2、PD-1、TIM-3、VISTA、SIGLEC7、
CD47 和 SIGLEC9。在一些实施方案中，所述免疫激活剂包含 OX40
的抗体。

[00151] 在一些实施方案中，所述抗体包括但不限于单克隆抗体、多克

20 隆抗体、多特异性抗体。在一些实施方案中，所述抗体为全长抗体。

在一些实施方案中，所述抗体为抗体片段。在一些实施方案中，所述
抗体选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、单链抗体 scFv、单链抗体 scFv-FC、
微抗体、双抗体、单域抗体、全长抗体。。

[00152] 在一些实施方案中，在本公开方法中所使用的免疫激活剂进一
25 步包含 Toll 样受体(Toll-Like Receptor, TLR)的配体。在一些实施方
案中，所述 TLR 的配体包括但不限于 TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、

TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TLR11、TLR12 和/
或 TLR13 的配体。在一些实施方案中，所述 TLR 的配体为 TLR 激动

剂。在一些实施方案中，所述 TLR 的配体包括但不限于 TLR1、TLR2、

TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TLR11、TLR12 和/或 TLR13 的激动剂。

[00153] 在一些实施方案中，所述 TLR 激动剂包括 CpG 寡核苷酸 (oligodeoxynucleotides, CpG ODN)，瑞喹莫德 (Resiquimod, R848)、咪喹莫特 (Imiquimod, R 837)、dsRNA 及其组合。在一些实施方案中，所述 CpG ODN 是非甲基化的 CpG ODN。

[00154] 在一些实施方案中，所述免疫激活剂进一步包含单链或双链的核酸分子。在一些实施方案中，所述单链或双链的核酸分子可以是任何能够直接和/或间接调节免疫细胞的免疫响应的核酸分子。在一些实施方案中，所述核酸的长度为 2-100 个碱基。在一些实施方案中，所述核酸的长度为 6-100 个核酸。在一些实施方案中，所述核酸的长度为 8-100 个核酸。在一些实施方案中，所述核酸的长度为 2-50 个碱基。在一些实施方案中，所述核酸的长度为 6-50 个核酸。在一些实施方案中，所述核酸的长度为 8-50 个核酸。

[00155] 在一些实施方案中，所述免疫激活剂进一步包含一种或多种细胞因子。在一些实施方案中，所述细胞因子包括但不限于：IL-1、IL-2、IL-5、IL-6、IL-12、IL-13、IL15、IL16、IL-17、IL18、IL-21、IL-22、IFN- α 、TNF- β 、IFN- γ 、GM-CSF、M-CSF 及其任意组合。在一些实施方案中，所述所述细胞因子选自下组：IL-2、IL-12、IL15、IL6、IL18、IFN- α 、TNF- β 、IFN- γ 、GM-CSF、M-CSF 及其任意组合。

[00156] 在一些实施方案中，本公开方法中所使用的一种或多种细胞因子由所述溶瘤病毒编码并表达。在一些实施方案中，本公开方法中所使用的 OX40 激动剂的基因由溶瘤病毒编码并表达。在一些实施方案中，本公开方法中所使用的 TLR 激动剂的基因由溶瘤病毒编码并表达。在一些实施方案中，本公开方法中所使用的 OX40 激动剂和 TLR 激动剂的基因由溶瘤病毒编码并表达。在一些实施方案中，本公开方法中所使用的一种或多种细胞因子不由所述溶瘤病毒编码并表达。在一些实施方案中，本公开方法中所使用的一种或多种细胞因子部分由所述溶瘤病毒编码并表达。

[00157] 在一些实施方案中，所述方法中使用的溶瘤病毒的量为 1×10^5 - 1×10^9 pfu。在一些实施方案中，所述组合物中溶瘤病毒的量为 1×10^7 - 1×10^8 pfu。在一些实施方案中，所述溶瘤病毒的量可以为约 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 或 5×10^8 pfu。

5 [00158] 在所述方法的一些实施方案中，所述方法中使用的肿瘤细胞为受试者自体同源的肿瘤细胞。在一些实施方案中，所述肿瘤细胞为分离自所述受试者的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。

[00159] 在一些实施方案中，所述方法中使用的肿瘤细胞为分离自所述受试者的实体瘤的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述肿瘤细胞为分离自所述受试者的一个或多个病灶的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述肿瘤细胞为分离自所述受试者的一个或多个器官的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述肿瘤细胞为分离自所述受试者的一处或多处组织的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述病灶
10 包括但不限于：肺癌、膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、食道癌、胃癌、胶质瘤、头颈癌、肾癌、多发性骨髓瘤、淋巴细胞白血病、髓细胞白血病、混合细胞白血病、肝癌、胆囊癌、淋巴瘤、黑色素瘤、间皮瘤、成神经管细胞瘤、口腔癌、鼻咽癌、喉癌、甲状腺癌、纵膈肿瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺
15 癌、皮肤癌、睾丸癌、气管癌和外阴癌。在一些实施方案中，所述肿瘤细胞为分离自所述受试者体液的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述体液包括但不限于：全血、血浆、积液、腹水、脑脊液、宫颈分泌物、阴道分泌物、子宫内膜分泌物、胃肠道分泌物、支气管分泌物包括痰液和乳房液。

25 [00160] 在一些实施方案中，所述方法中使用的肿瘤细胞源自新鲜的肿瘤组织。在一些实施方案中，所述方法中使用的肿瘤细胞源自冷冻的肿瘤组织。在一些实施方案中，所述肿瘤细胞源自经固定液固定的肿瘤组织。在一些实施方案中，所述固定液选自福尔马林、甲醛、多聚甲醛、戊二醛、乙醇或其任意组合。

[00161] 在所述方法的一些实施方案中，所述方法中使用的肿瘤细胞是丧失增殖能力的肿瘤细胞。在一些实施方案中，所述肿瘤细胞是经遗传修饰丧失增殖能力的肿瘤细胞。在一些实施方案中，所述肿瘤细胞是在基因水平具有突变、缺失和/或插入以丧失增殖能力的肿瘤细胞。

5 在一些实施方案中，所述肿瘤细胞是经处理如辐射丧失增殖能力的肿瘤细胞。

[00162] 在一些实施方案中，所述方法中使用的肿瘤细胞的数目为 1×10^4 - 1×10^8 。在一些实施方案中，所述组合物中肿瘤细胞的数目为 1×10^5 - 1×10^7 。在一些实施方案中，所述组合物中肿瘤细胞的数目为 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 。

[00163] 在一些实施方案中，所述方法中使用的组合物包含与所述受试者自体同源的肿瘤细胞裂解物。在一些实施方案中，所述方法中使用的肿瘤细胞裂解物源自与所述受试者自体同源的肿瘤细胞。在一些实施方案中，所述方法中使用的肿瘤细胞裂解物源自分离自所述受试者的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。

[00164] 在一些实施方案中，所述方法中使用的肿瘤细胞裂解物源自所述受试者的实体瘤的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述方法中使用的肿瘤细胞裂解物源自所述受试者的一个或多个病灶的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述方法中使用的肿瘤细胞裂解物源自所述受试者的一个或多个器官的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述方法中使用的肿瘤细胞裂解物源自所述受试者的一处或多处组织的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述病灶包括但不限于：肺癌、膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、食道癌、胃癌、胶质瘤、头颈癌、肾癌、多发性骨髓瘤、淋巴细胞白血病、髓细胞白血病、混合细胞白血病、肝癌、胆囊癌、淋巴瘤、黑色素瘤、间皮瘤、成神经管细胞瘤、口腔癌、鼻咽癌、喉癌、甲状腺癌、纵膈肿瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、睾丸癌、气管癌和外阴癌。在一些实施方案中，所述方法中使用的肿瘤

细胞裂解物源自所述受试者体液的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。在一些实施方案中，所述体液包括但不限于：全血、血浆、积液、腹水、脑脊液、宫颈分泌物、阴道分泌物、子宫内膜分泌物、胃肠道分泌物、支气管分泌物包括痰液和乳房液。

5 [00165] 在一些实施方案中，所述方法中使用的肿瘤细胞裂解物源自源自新鲜的肿瘤组织。在一些实施方案中，所述方法中使用的肿瘤细胞裂解物源自源自冷冻的肿瘤组织。在一些实施方案中，所述方法中使用的肿瘤细胞裂解物源自经固定液固定的肿瘤组织。在一些实施方案中，所述固定液包含福尔马林、甲醛、多聚甲醛、戊二醛、乙醇或其
10 任意组合。

[00166] 在一些实施方案中，所述方法中使用的肿瘤细胞裂解物源自丧失增殖能力的肿瘤细胞。在一些实施方案中，所述方法中使用的肿瘤细胞裂解物源自经遗传修饰丧失增殖能力的肿瘤细胞。在一些实施方案中，所述方法中使用的肿瘤细胞裂解物源自基因水平具有突变、缺失和/或插入以丧失增殖能力的肿瘤细胞。在一些实施方案中，所述方法中使用的肿瘤细胞裂解物源自经处理如辐射丧失增殖能力的肿瘤
15 细胞。

[00167] 在一些实施方案中，所述方法中使用的肿瘤细胞裂解物源自 1×10^4 - 1×10^8 数目的肿瘤细胞。在一些实施方案中，所述方法中使用的
20 肿瘤细胞裂解物源自 1×10^5 - 1×10^7 数目的肿瘤细胞。在一些实施方案中，所述方法中使用的肿瘤细胞裂解物源自 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 数目的肿瘤细胞。

[00168] 在一些实施方案中，所述方法中使用的肿瘤细胞裂解物通过选自下组的方法获得：匀浆、超声或二者的组合。在一些实施方案中，
25 本申请的组合物中使用的肿瘤细胞裂解物通过匀浆获得。在一些实施方案中，所述方法中使用的肿瘤细胞裂解物通过超声获得。在一些实施方案中，所述方法中使用的所述肿瘤细胞的裂解物通过先匀浆随后超声的方式过程获得。

[00169] 在一些实施方案中，所述匀浆的时间不超过 30 秒。在一些实施

方案中，所述匀浆的时间不超过 1 分钟。在一些实施方案中，所述匀浆的时间不超过 2 分钟。在一些实施方案中，所述匀浆的时间不超过 3 分钟。在一些实施方案中，所述匀浆的时间不超过 4 分钟。在一些实施方案中，所述匀浆的时间不超过 5 分钟。在一些实施方案中，所述匀浆的时间不超过 6 分钟。在一些实施方案中，所述匀浆的时间不超过 7 分钟。在一些实施方案中，所述匀浆的时间不超过 8 分钟。在一些实施方案中，所述匀浆的时间不超过 9 分钟。

[00170] 在一些实施方案中，所述匀浆包括多次匀浆，其中每次匀浆的时间不超过 30 秒、不超过 1 分钟、不超过 2 分钟、不超过 3 分钟、不超过 4 分钟、不超过 5 分钟、不超过 6 分钟、不超过 7 分钟、不超过 8 分钟、不超过 9 分钟、不超过 10 分钟。在一些实施方案中，所述匀浆包括多次匀浆，其中每次匀浆的间隔时间不超过 30 秒、不超过 1 分钟、不超过 2 分钟、不超过 3 分钟、不超过 4 分钟、不超过 5 分钟、不超过 6 分钟、不超过 7 分钟、不超过 8 分钟、不超过 9 分钟、不超过 10 分钟。

[00171] 在一些实施方案中，所述超声的工作时间不超过 0.5 秒。在一些实施方案中，所述超声的工作时间不超过 1 秒。在一些实施方案中，所述超声的工作时间不超过 1.5 秒。在一些实施方案中，所述超声的工作时间不超过 2 秒。在一些实施方案中，所述超声的工作时间不超过 2.5 秒。在一些实施方案中，所述超声的工作时间不超过 3 秒。在一些实施方案中，所述超声的工作时间不超过 3.5 秒。在一些实施方案中，所述超声的工作时间不超过 4 秒。在一些实施方案中，所述超声的工作时间不超过 4.5 秒。在一些实施方案中，所述超声的工作时间不超过 5 秒。

[00172] 在一些实施方案中，所述超声每次工作的间歇时间不少于 0.5 秒。在一些实施方案中，所述超声每次工作的间歇时间不少于 1 秒。在一些实施方案中，所述超声每次工作的间歇时间不少于 1.5 秒。在一些实施方案中，所述超声每次工作的间歇时间不少于 2 秒。在一些实施方案中，所述超声每次工作的间歇时间不少于 2.5 秒。在一些实

实施方案中，所述超声每次工作的间歇时间不少于 3 秒。在一些实施方案中，所述超声每次工作的间歇时间不少于 3.5 秒。在一些实施方案中，所述超声每次工作的间歇时间不少于 4 秒。在一些实施方案中，所述超声每次工作的间歇时间不少于 4.5 秒。在一些实施方案中，所述超声每次工作的间歇时间不少于 5 秒。

[00173] 在一些实施方案中，所述超声的工作次数为至少 1 次、至少 2 次、至少 3 次、至少 4 次、至少 5 次、至少 6 次、至少 7 次、至少 8 次、至少 9 次、至少 10 次、至少 11 次、至少 12 次、至少 13 次、至少 14 次、至少 15 次、至少 16 次、至少 17 次、至少 18 次、至少 19 次、至少 20 次。

[00174] 在一些实施方案中，本申请的所述所述方法包括将所述组合物原位或非原位施用至所述受试者。在一些实施方案中，所述原位施用包括瘤内注射、瘤周注射及其组合。在一些实施方案中，所述非原位施用包括皮下注射、肌肉注射、腹腔注射、胸腔注射、静脉注射、动脉注射及其组合。

[00175] 在一些实施方案中，所述方法包括对所述受试者单次施用本公开的组合物以对所述受试者进行治疗。在一些实施方案中，所述方法包括对所述受试者多次施用本公开的组合物以对所述受试者进行治疗。在一些实施方案中，所述多次施用中每次的时间间隔为 1 天至 3 个月，例如所述时间间隔可以为 1 天、2 天、3 天、5 天、1 周、2 周、3 周、1 个月、2 个月或 3 个月。

[00176] 在一些实施方案中，所述方法包括将所述组合物通过单点或多点注射施用至所述受试者。在一些实施方案中，所述方法包括将所述组合物通过单点或多点皮下注射施用至所述受试者。在一些在实施方案中，所述多点注射可在相同时间进行或所述多点注射的每个间可具有一定的时间间隔。在一些实施方案中，所述时间间隔为 1 天至 3 个月，例如所述时间间隔可以为 1 天、2 天、3 天、5 天、1 周、2 周、3 周、1 个月、2 个月或 3 个月。在一些实施方案中，所述方法进一步包括在将所述组合物施用至所述受试者前，在体外使用所述溶瘤

病毒预处理所述肿瘤细胞。在一些实施方案中，所述预处理时间为 15 分钟至 12 小时。在一些实施方案中，所述预处理时间小于或等于 12 小时。在一些实施方案中，所述预处理时间小于或等于 11 小时。根据权利要求 79 的方法，其中所述预处理的时间小于 10 小时。在一些
5 实施方案中，所述预处理时间小于或等于 9 小时。在一些实施方案中，所述预处理时间小于或等于 8 小时。在一些实施方案中，所述预处理时间小于或等于 7 小时。在一些实施方案中，所述预处理时间小于或等于 6 小时。在一些实施方案中，所述预处理时间小于或等于 5 小时。在一些实施方案中，所述预处理时间小于或等于 4 小时。在一些实施
10 方案中，所述预处理时间小于或等于 3 小时。在一些实施方案中，所述预处理时间小于或等于 2 小时。在一些实施方案中，所述预处理时间小于或等于 1 小时。在一些实施方案中，所述预处理时间小于或等于 0.5 小时。

[00177] 在一些实施方案中，所述方法还包括将所述组合物与自体肿瘤
15 细胞直接混合施用至所述受试者。在一些实施方案中，所述方法还包括将所述组合物与自体肿瘤细胞的裂解物直接混合施用至所述受试者。

试剂盒

20 [00178] 另一方面，本公开提供一种在有需要的受试者中诱导免疫细胞活性的试剂盒，其包含本申请中的组合物以及说明书。在一些实施方案中，所述组合物包含 OX40 激动剂和 TLR 激动剂。在一些实施方案中，所述组合物包含溶瘤病毒、OX40 激动剂和 TLR 激动剂，或表达
25 OX40 激动剂的溶瘤病毒和 TLR 激动剂。在一些实施方案中，所述组合物包含溶瘤病毒和一种或多种免疫激活剂。

[00179] 在一些实施方案中，所述说明书指示从所述受试者体内获得和/或制备自体同源的肿瘤细胞，制备所述肿瘤细胞的裂解物，并将所述肿瘤细胞裂解物、OX40 激动剂和 TLR 激动剂共同施用至所述受试者的方法。在一些实施方案中，所述说明书指示将溶瘤病毒、OX40 激

动剂和 TLR 激动剂共同施用至所述受试者的方法。在一些实施方案中,所述说明书指示从所述受试者体内获得和/或制备自体同源的肿瘤细胞,并将所述肿瘤细胞与所述溶瘤病毒和一种或多种免疫激活剂共同施用至所述受试者的方法。

5 [00180] 在一些实施方案中,所述试剂盒包含 HSV-1 或 HSV-2 溶瘤病毒。

[00181] 在一些实施方案中,所述试剂盒包含一种或多种免疫激活剂。在一些实施方案中,所述试剂盒中的免疫激活剂包含选自下组的分子的配体的融合蛋白: CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40、
10 GITR、A2AR、CD276、VTCN1、BTLA、CTLA-4、IDO、LAG3、KIR、NOX2、PD-1、TIM-3、VISTA、SIGLEC7、CD47 和 SIGLEC9。在一些实施方案中,所述免疫激活剂包含 OX40 配体的融合蛋白。

[00182] 在一些实施方案中,所述试剂盒中的免疫激活剂包含与选自下组的分子的表位特异性结合的抗体: CD27、CD28、CD40、CD122、
15 CD137、OX40、GITR、A2AR、CD276、VTCN1、BTLA、CTLA-4、IDO、LAG3、KIR、NOX2、PD-1、TIM-3、VISTA、SIGLEC7、CD47 和 SIGLEC9。

[00183] 在一些实施方案中,所述试剂盒中的免疫激活剂进一步包含 TLR 激动剂如非甲基化的 CpG ODN。

20 [00184] 在一些实施方案中,所述试剂盒包含 OX40 激动剂和 TLR 激动剂。在一些实施方案中,所述 OX40 激动剂包括 OX40 抗体、OX40 配体融合蛋白。在一些实施方案中,所述 OX40 激动剂包括 OX40 抗体。所述 OX40 抗体包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体。在一些实施方案中,所述 OX40 抗体为全长抗体。在一些实
25 施方案中,所述 OX40 抗体为抗体片段。在一些实施方案中,所述 OX40 抗体选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、单链抗体 scFv、单链抗体 scFv-FC、微抗体、双抗体、单域抗体、全长抗体。。在一些实施方案中,所述 OX40 激动剂包括 OX40 配体融合蛋白。在一些实施方案中,所述 OX40 配体融合蛋白为 Fc 融合蛋白。

[00185] 在一些实施方案中，所述 TLR 激动剂包括所述 TLR 激动剂包括但不限于 TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TLR11、TLR12 和/或 TLR13 的配体。在一些实施方案中，所述 TLR 的配体为 TLR 激动剂。在一些实施方案中，所述 TLR 的配体包括但不限于 TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TLR11、TLR12 和/或 TLR13 的激动剂。在一些实施方案中，所述 TLR 激动剂包括 CpG 寡核苷酸 (oligodeoxynucleotides, CpG ODN)，瑞喹莫德 (Resiquimod, R848)、咪喹莫特 (Imiquimod, R 837)、dsRNA 或其组合。在一些实施方案中，所述 CpG ODN 是非甲基化的 CpG ODN。

[00186] 在一些实施方案中，所述试剂盒进一步包含用于从受试者体内获得肿瘤细胞和/或肿瘤细胞裂解物的试剂和/或元件。在一些实施方案中，所述试剂包括缓冲液。在一些实施方案中，所述缓冲液包括细胞裂解物。在一些实施方案中，所述元件可用于从受试者身体的不同器官或组织获得肿瘤细胞。在一些实施方案中，所述试剂盒进一步包含用于收集获得的肿瘤细胞的容器。在一些实施方案中所述试剂盒进一步包括用于向受试者施用试剂盒中各组分的装置。在一些实施方案中，所述使用装置为包括注射器和针头等。

20 实施例

[00187] 下列实施例进一步阐述了本发明。这些实施例仅旨在说明本发明，而不应被解释为对本发明的限制。

实施例 1 本发明中使用的溶瘤病毒的构建和制备

[00188] 实施例 1 中所使用的材料如表 1-1 所示：

25 表 1-1

项目	来源
HSV-1 病毒株	临床分离株
2 × Phanta Max Master Mix	南京诺唯赞生物科技有限公司
pRedTKI、PMDISI、PMDIAI	Addgene

DMEM 培养基	北京索莱宝科技有限公司
胎牛血清	浙江天杭生物科技股份有限公司
胰蛋白胨	OxOid 公司
酵母粉	OxOid 公司
低熔点琼脂糖	北京索莱宝科技有限公司
琼脂糖	西班牙 BIOWEST 公司
IPIG	北京索莱宝科技有限公司
L-阿拉伯糖	北京索莱宝科技有限公司
75cm ² 塑料培养瓶	广州洁特生物过滤股份有限公司
182cm ² 塑料培养瓶	广州洁特生物过滤股份有限公司
1900cm ² 塑料培养转瓶	广州洁特生物过滤股份有限公司
96 孔细胞培养板	广州洁特生物过滤股份有限公司
DMEM 培养基	北京索莱宝科技有限公司
磷酸盐缓冲液 (PBS) 干粉	北京索来宝生物科技有限公司
甘油	天津是凯通化学试剂有限公司
0.65μm 囊式滤器	德国赛多利斯公司
0.1μm 中空纤维柱	美国 GE 公司
蠕动泵	保定雷弗流体科技有限公司
荧光倒置显微镜	日本奥林巴斯公司
二氧化碳培养箱	日本三洋仪器公司
生物安全柜	上海力申科学仪器有限公司

[00189] 实施例 1 中所使用的引物序列如表 1-2 所示：

表 1-2

引物名称	引物序列
UL22-1-F	GTCTGGTAGTTAGGAATTTAAATGCTGTCGTGCATGGATAT
UL22-2-R	CGCGTCTAGATATTTATAACTTCGTATAGCATAACATTATACG AAGTTATGGTGTGGGTCGTTTGT
UL24-2-F	CGCTTATTATCATTGTACGTCGGTTGCTATGG
UL24-1-R	TCCTAACTACCAGACCTTGT

AmpR-LR-1-F	AATAAATACCTGTGACGGAAGATCACTTCGCAGAATAAATA AATCCTGGTCCC GCCAGCCTCGCAGA
ApmR-LR-1-R	AAGTTATATCGTCGATGTAGGCTGGAGCTGCTT
Red23-F	ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTTATGAAC AAACGACCCAACACC
TK1f	GAAACTCCC GCACCTCTT
34.5-F1	CCGGAATTCATTTAAATTTAATTAAGGTGTAACGTTAGACCG AGTTC
34.5-R1	GCAGTCTAGAGCATGCGGCACGCTCTCTGTCTCC
34.5-F2	CATCTCTAGAGAGCTCGATATCAGGCGGCCTGGGTCTT
34.5-R2	CGCCAAGCTTATTTAAATTTAATTACTGCGTCTCGCTCCGAG TG

[00190] 实施例中所使用的单纯疱疹病毒 HSV-1 病毒株来源于临床分离株。具体而言，将 HSV-1 的基因组重组到细菌人工染色体 (BAC) 上，构建出了可在原核细胞和真核细胞中穿梭的质粒 BAC-HSV-1，并且通过对 BAC-HSV-1 的基因进行改造，快速获得了重组的 HSV-1 病毒株。

1.1 BAC-HSV-1 质粒的构建

[00191] 以 HSV-1 病毒基因组为模板 PCR 扩增同源臂片段，并将扩增片段进行连接克隆于带有红色报告基因 DsRed 的细菌人工染色体 BAC C223 质粒。随后将该质粒与 HSV-1 病毒株的基因组 DNA 利用脂质体转染法共转染于 Vero 细胞进行同源重组，通过荧光报告基因筛选纯化出 BAC-HSV-1 重组病毒，采用 Hirt 法提取病毒环形 DNA 并电转至 DH10B 感受态细胞，通过摇菌提取质粒获得 BAC-HSV-1 质粒。

1.2 重组 HSV-1 病毒的构建

[00192] 在得到 BAC-HSV-1 质粒后，利用 RED 重组技术删除了两个拷贝的 γ 34.5 基因，得到 BAC-HSV-1-del34.5 质粒。利用脂质体转染法将 BAC-HSV-1-del34.5 质粒转染至 Vero 细胞，待细胞出现病变后，利用 Cre/loxP 重组系统删除 BAC 序列，经过噬斑纯化，得到纯化的删除两个拷贝 γ 34.5 基因的病毒株。

[00193] 本发明实施例中使用的溶瘤病毒为通过上述方法获得的溶瘤病毒或在其基础上重组加入不同外源基因表达盒的溶瘤病毒。具体而言，本发明，本发明实施例中使用的溶瘤病毒包括：

5 [00194] (1) 溶瘤病毒 H1，删除了双拷贝 γ 34.5 基因的人单纯疱疹病毒 HSV-1 的重组病毒，其结构如图 1A 所示。

[00195] (2) 溶瘤病毒 H1-DsRed，在 H1 溶瘤病毒基因组中重组进去红色荧光报告基因 DsRed 表达盒，重组病毒的结构如图 1B 所示。可利用该病毒在感染的细胞内表达红色荧光蛋白，进而检测溶瘤病毒对不同细胞的感染效率。

10 [00196] (3) 溶瘤病毒 H1-IAA，在 H1 溶瘤病毒基因组中可以重组进去任一单一免疫激活剂基因表达盒，该表达盒由 CMV 强启动子、IAA 编码序列、终止子组成。重组病毒结构如图 1C 所示。

[00197] (4) 在 H1 溶瘤病毒基因组中重组进去激动性 OX40scFv-Fc 抗体基因表达盒，得到溶瘤病毒 H1-OX40scFV-Fc。重组病毒结构如图 15 1D 所示，其中箭头右侧为所表达的 OX40scFv-Fc 抗体的结构示意图。

[00198] (5) 在 H1 溶瘤病毒基因组中重组进入 OX40mab 全抗体序列基因表达盒，得到溶瘤病毒 H1-OX40mab。重组病毒结构如图 1E 所示，箭头右侧为所表达的 OX40mab 全抗体的结构示意图，。

20 [00199] (6) 在 H1 溶瘤病毒基因组中重组 OX40L-Fc 融合蛋白基因表达盒，得到溶瘤病毒 H1-OX40L-Fc。重组病毒结构如图 1F 所示，箭头右侧为所表达的 OX40L-Fc 融合蛋白的结构示意图。（OX40L 为 OX40 配体膜外区的多肽序列）

1.3 溶瘤病毒的制备

25 [00200] 将 Vero 细胞用细胞培养转瓶在 37°C 培养箱中进行培养，转速 10rpm。当细胞汇合度达到 80%-90% 时，倒掉培养基，加入无血清的培养基，按 MOI=0.005 接种溶瘤病毒。将培养箱温度调整至 33°C，转速 10rpm，病毒吸附 2 小时后加入终浓度为 2% 的 FBS，继续进行培养。接种溶瘤病毒 48-72 小时后，观察细胞病变效应 (Cytopathic

effect, CPE) 情况。当细胞全部病变且有 1/3 漂浮起来时, 收获病毒上清液。摇晃培养瓶使细胞从培养瓶壁上脱落。将细胞收集于无菌容器中, 并在反复冻融 3 次后保存于-80°C冰箱中。

5 1.4 溶瘤病毒的纯化

[00201] 将离心后的 H1 病毒原液用 0.65 μ m 的滤器进行微滤, 再用 0.1 μ m 的中空纤维柱进行超滤。超滤后, 加入终浓度 10%甘油作为保护剂, 并使用 TCID50 法测定病毒滴度。将 H1 病毒液滴度调整在 1×10^8 pfu/mL 后分装并保存于-80°C。

10

1.5 溶瘤病毒滴度的测定

[00202] 采用 TCID50 法测定溶瘤病毒滴度。具体地, 将 Vero 细胞密度调整为 1×10^5 个/mL, 按照 100 μ L/孔接种于 96 孔细胞培养板, 并在 37°C、5%CO₂ 培养箱内培养过夜。取溶瘤病毒液, 用无血清 DMEM 培养基将病毒做梯度稀释至 10^{-8} 稀释度。待 Vero 细胞长满至 80%左右时 (24 小时), 弃去培养液。选取 10^{-4} 至 10^{-8} 稀释度用于感染细胞, 100 μ L 病毒液/孔, 每个稀释度设置 6 个复孔, 同时设 6 个孔做阴性对照 (不加病毒, 仅加 100 μ L 无血清 DMEM)。将细胞置于 37°C、5%CO₂ 条件继续培养 48-72 小时。在显微镜下观察各孔细胞病变情况, 统计每个稀释度下阳性孔数 (出现 CPE 即为阳性) 的比率, 并计算病毒滴度。

20

实施例 2 溶瘤病毒在体外对不同肿瘤细胞的感染和杀伤效率

[00203] 实施例 2 中所使用的材料如表 2-1 所示:

项目	来源
MTT 溶液	北京索莱宝科技有限公司
台盼蓝染色液	北京索莱宝科技有限公司
24 孔细胞培养板	广州洁特生物过滤股份有限公司
1640 培养基	北京索莱宝科技有限公司

DMEM/F12 培养基	北京索莱宝科技有限公司
MccoY'S5A 培养基	美国 hyclone 公司

[00204] 在 5% CO₂ 浓度，37°C 条件下培养不同的肿瘤细胞：小鼠结肠腺癌细胞 CT-26、小鼠 B 细胞淋巴瘤细胞 A20、小鼠肾癌细胞 Renca、小鼠乳腺癌细胞 4T1、小鼠肺癌细胞 LLC；人卵巢癌细胞 SKOV-3、
5 人胰腺癌细胞 PANC-1、人鼻咽癌细胞 CNE、人前列腺癌细胞 PC-3、人黑色素瘤细胞 A375。同时培养非洲绿猴肾细胞 Vero 作为对照。使用培养基类型如表 2-2 所示。

肿瘤细胞类型	培养条件
小鼠结肠癌 CT-26	DMEM 培养基、10%FBS
小鼠淋巴瘤 A20	1640 培养基、10%FBS
小鼠肾癌 Renca	1640 培养基、10%FBS
小鼠乳腺癌 4T1	1640 培养基、10%FBS
小鼠肺癌 LLC	1640 培养基、10%FBS
人胰腺癌细胞 PANC-1	DMEM 培养基、10%FBS
人卵巢癌细胞 SKOV-3	MccoY'S5A 培养基、10%FBS
人鼻咽癌细胞 CNE	1640 培养基、10%FBS
人黑色素瘤细胞 A375	DMEM 培养基、10%FBS
人前列腺癌细胞 PC-3	DMEM/F12 培养基、10%FBS
非洲绿猴肾细胞 Vero	DMEM 培养基、10%FBS

2.1 溶瘤病毒在体外对不同肿瘤细胞感染情况的测定

10 [00205] 通过荧光法检定溶瘤病毒在体外对不同小鼠和人肿瘤细胞感染效率。将肿瘤细胞接种于 24 孔板，每孔分别接种 5×10^4 个细胞。培养 24 小时，待细胞汇合度达到 90% 时，随机选取每板上三个孔进行细胞计数，将三个孔中细胞计数的平均值作为该板每孔的细胞数。弃去

培养基，分别按照 MOI 值 0、1、5、10 接种 H1-DsRed 病毒。感染 2h 后，每孔补加添加了 2% FBS 的培养基至 500 μ L，并置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养。每个 MOI 值设置 3 个平行，待病毒感染 48 小时时分别观察每种细胞病变及荧光情况，在高倍镜下(200X-400X)进行拍照。

- 5 [00206] 图 2A 和 2B 展示了本发明中使用的溶瘤病毒 H1 对不同小鼠和人的肿瘤细胞的感染效率。根据图 2A 和 2B 可知，该本申请中使用的溶瘤病毒在体外可感染多种肿瘤细胞。

2.2 MTT 法检测溶瘤病毒体外杀伤小鼠肿瘤细胞能力

- 10 [00207] 分别取小鼠肿瘤细胞 CT-26、A20、Renca、ID8、MFC，将细胞接种于 96 孔板中，每孔 10^4 个细胞。细胞培养至基本融合，弃去培养基，H1 病毒以 MOI 值为 5 感染细胞，2 小时后补加 2% FBS 培养基至 100 μ L，每种细胞设置 6 个平行孔。同时设不加病毒的细胞孔作为阴性对照孔，只加培养基不加细胞的培养孔作为空白对照孔。在时
15 间点结束时，每孔加入 20 μ L MTT (5mg/mL)，继续培养 4 小时；弃掉培养上清液，每孔加入 150 μ L DMSO，37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 10 分钟后再用摇床低速振荡 2 分钟，使结晶物充分溶解。使用酶标仪检测各孔在 490nm 处的吸光度值。吸光度值反应活细胞的数量。吸光度值越大，活细胞数量越多，反之活细胞越少，以此来反应溶瘤病毒对细胞的杀
20 伤能力。

[00208] 溶瘤病毒对不同小鼠肿瘤细胞的体外杀伤能力如图 2C 所示。图中表明本发明专利中的溶瘤病毒在体外对上述五种小鼠肿瘤细胞都有极显著 ($P < 0.01$) 的杀伤能力。

25 3.台盼蓝染色法检测溶瘤病毒体外杀伤人肿瘤细胞能力

[00209] 分别取人肿瘤细胞 CNE、SKOV-3、PANC-1、MDA-MB-435S、A549，加入 24 孔细胞培养板中，每孔 8×10^4 个细胞，每种细胞接种 6 个孔。培养约 24 小时，至细胞融合度达 90% 左右时，随机选取板上三个孔消化进行细胞计数，三个孔细胞计数的平均值为每孔的细胞

数。弃去培养基，按照病毒 MOI 为 1 接种细胞，每种细胞接 3 个孔，该种细胞剩余的三个孔为对照孔。病毒感染 2 小时后补加含 2% FBS 的 DMEM 培养基 500μL，置于 37°C，5%CO₂ 条件下继续培养。144h 时消化每孔细胞，吸取 90μL 至新的 EP 管中，加入 10μL 0.4%台盼蓝染液，混匀后用细胞计数板计数。蓝色为死细胞，无色为活细胞。染色计数均在 3 分钟内完成，其中：

[00210] 活细胞比例 = (细胞总数 - 死细胞数) / 细胞总数。

[00211] 溶瘤病毒对不同人肿瘤细胞的体外杀伤能力如图 2D 所示，该图表明本发明的溶瘤病毒对不同的人肿瘤细胞表现不同的体外杀伤能力，对 CNE、SKOV-3、PANC-1、MDA-MB-435S 细胞都有极显著 (P<0.01) 的体外杀伤能力，而对 A549 的体外杀伤能力不明显。

实施例 3 溶瘤病毒 H1 与 TLR7/8 和 9 激动剂组合物裸鼠瘤内注射的抗肿瘤免疫效应

[00212] 材料来源参见表 3：

溶瘤病毒 H1	见实施例 1 和 2
GM-CSF	美国 R&D 公司
R848	Tocris Bioscience
CpG ODN (t*c*g*t*c*g*t*t*t*c*g*g*c*g*c*g*c*g*c*c*g) 参考 Invivogen CpG ODN C-Class ODN 2395	生工生物工程（上海）股份有限公司合成
BALB/c 裸鼠	北京维通利华实验动物技术有限公司
人卵巢癌细胞株 SK-OV-3	中国医学科学院基础医学研究所细胞中心

3.1 实验方法：

[00213] 1) 小鼠实体瘤肿瘤模型建立

[00214] 5-6 周龄的雌性 BALB/c 裸鼠，通过皮下注射建立了小鼠实体瘤肿瘤模型。具体而言，将小鼠右侧腋窝处用 75%酒精消毒后，用

1mL 无菌注射器吸取 SK-OV-3 细胞悬液，皮下注射 200 μ L，注射的细胞数目为 1×10^7 /只。

[00215] 2) 实验分组和给药

[00216] 肿瘤模型建立后，随机分组，选择不同的免疫激活剂进行药效试验，其中以生理盐水 (NS) 作为阴性对照，以溶瘤病毒 H1 与粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 GM-CSF 的组合物作为阳性对照 (因为 GM-CSF 以及表达 GM-CSF 的 HSV-1 溶瘤病毒 T-VEC 已被证明有效激活抗肿瘤免疫)，以溶瘤病毒 H1 与 R848(Resiquimod, TLR7/8 的激动剂) 或与 CPG ODN (TLR9 的激动剂，参考 Invivogen CpG ODN class 3 序列和硫代修饰) 的组合物作为测试品。具体而言，在移植肿瘤细胞 4-6 天后，挑选肿瘤直径约在 5-7mm 的小鼠进行试验，其中每组 6 只小鼠，分为 4 组，并对每组小鼠进行标记。给药前，测量小鼠体重和肿瘤大小。肿瘤大小在 5mm 左右时第 1 次给药。给药途径：瘤内注射，分 3~4 点注射 (注射器通过单一注射点进入病变区域，注射点为瘤组织中心、肿瘤边缘共 3~4 点)。给药频率和时间：隔天 1 次，共 3 次。给药剂量：50 μ L/只。

[00217] 每组中所施用的组合物的组成如表 4 所示：

组别	供试品名称	病毒浓度	药物浓度
1	生理盐水(NS)	—	—
2	H1+GM-CSF(HG)	8.5×10^6 pfu/只	0.1 μ g/只
3	H1+R848 (HR)	8.5×10^6 pfu/只	2 μ g/只
4	H1+CpG ODN (HC)	8.5×10^6 pfu/只	100 μ g/只

[00218] 3) 肿瘤体积测量

[00219] 给药后每 3-4 天，用游标卡尺测量肿瘤的长径 (a) 和短径 (b)，根据 $V = (ab^2) / 2$ 计算瘤体积，并绘制肿瘤生长曲线。相对肿瘤体积 RTV: $RTV = V_t / V_0$ ， V_t : 每天测量肿瘤得到的瘤体积， V_0 : 初始瘤体积 (给药前)。相对肿瘤增殖率 $T/C \% = \text{给药组的 RTV 平均值} / \text{阴性对照组的 RTV 平均值} \times 100\%$ 。

[00220] 4) 药效评估

[00221] 根据肿瘤体积和肿瘤重量进行药效评估。应用 SPSS17.0 统计软件对结果进行统计分析。数据比较用单因素方差分析，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

- 5 [00222] 根据肿瘤体积进行疗效评价的标准为：如果相对肿瘤增殖率 $T/C \% \leq 40\%$ ，且给药组 RTV 与阴性对照组 RTV 经统计学处理 $P < 0.05$ ，则组合物对肿瘤的增殖具有抑制作用；如果 $T/C \% > 40\%$ ，则对肿瘤增殖无抑制作用。

- 10 [00223] 根据肿瘤重量进行疗效评价的标准为：比较各组间肿瘤重量的差异以进一步计算瘤重抑制率 IRTW%，以 $IRTW \% > 60\%$ 为有效性参考指标，计算公式如下：

$$[00224] IRTW (\%) = (W_{\text{阴性对照组}} - W_{\text{给药组}}) / W_{\text{阴性对照组}} \times 100\%$$

3.2 实验结果：

- 15 [00225] 如图 3A-3C 所示，与 PBS 组相比，H1+TLR 激动剂 R848 或 CpG ODN 的组合物显著抑制肿瘤的生长（ p 值分别为 0.002 和 0.002；相对肿瘤增殖分别为 16.97% 和 10.34%；瘤重抑瘤率分别为 82.28% 和 90.90%）。抗肿瘤效应大于阳性对照 H1 和 GM-CSF 的组合物。

20 实施例 4 HOC (溶瘤病毒 H1+OX40mab+同源肿瘤细胞) 组合物小鼠皮下注射的抗肿瘤免疫效应

[00226] 材料来源图表 5 所示：

溶瘤病毒 H1	见实施例 1 和 2
OX40mab 单克隆抗体 OX86	英国 Absolute Antibody 公司
BALB/c 小鼠	河南省实验动物中心
小鼠结肠癌细胞 CT-26	北京昭衍新药研究中心股份有限公司

4.1 实验方法：

- 25 [00227] 本实施例的实验方法与实施例 3 不同的是：小鼠为 BALB/c 小鼠，肿瘤细胞为小鼠结肠癌细胞 CT-26，注射量为 $100\mu\text{L}$ ，注射的细胞数目为 5×10^5 /只。实验分为 2 组，给药部位如图 4A 所示为左腋皮

下，给药剂量为 100 μL /只。其余内容与实施例 3 相同。每组中所施用的组合物的组成为表 6 所示：

组别	供试品名称	细胞浓度	病毒浓度	药物浓度
1	PBS	—	—	—
2	H1+CT-26 (HTC CT-26)	3.6×10^6 /只	1×10^7 pfu/只	—
3	H1+CT-26+OX40(H OTC CT-26)	3.6×10^6 /只	1×10^7 pfu/只	8ug/只

4.2 实验结果：

- 5 [00228] 如图 4A 和 4B 所示，与 PBS 组相比，H1+OX40mab 单克隆抗体的组合物显著抑制肿瘤的生长 ($p < 0.05$)，相对肿瘤增殖率为 21.73%，瘤重抑瘤率为 78.82%。

10 实施例 5 HOR(H1+OX40mab+R848)组合物小鼠瘤内注射的抗肿瘤免疫效应

[00229] 材料来源如表 7 所示：

溶瘤病毒 H1	见实施例 1 和 2
OX40mab 单克隆抗体 OX86	英国 Absolute Antibody 公司
Resiquimod R848	Tocris Bioscience
BALB/c 小鼠	河南省实验动物中心
小鼠结肠癌细胞 CT-26	北京昭衍新药研究中心股份有限公司

5.1 实验方法

- 15 [00230] 本实施例中使用的的小鼠为 BALB/c 小鼠，肿瘤细胞为小鼠结肠癌细胞 CT-26，嫁接部位为左腋皮下和右腋皮下，注射量分别为 100 μL ，注射的细胞数目为 5×10^5 /只。实验分为 2 组，给药部位为左腋瘤内，给药剂量为 100 μL /只。其操作与实施例 3 相同。右腋瘤内注射 PBS 为对照组 PBS (I)，左腋未进行瘤内注射 PBS 为对照组 PBS (N)，右腋瘤内注射 HOR 为实验组 HOR (I)，左腋未进行瘤内注射
- 20 HOR 为实验组 HOR (N)。

[00231] 每组中所施用的组合物的组成为表 8 所示：

组别	供试品名称	病毒浓度	药物浓度
1	PBS	—	—
2	H1+OX40mab+R848 (HOR)	1×10^7 pfu/只	OX40mab 8ug+R848 20ug/ 只

5.2 实验结果

[00232] 如图 5A-5D 所示，与 PBS 组相比，HOR 组合物（溶瘤病毒 H1+OX40mab 单克隆抗体+R848）瘤内注射可以完全清除注射侧肿瘤，并且可以清除对侧未注射给药的肿瘤（p 值=0.000），相对肿瘤增殖率为 0，瘤重抑瘤率为 100%。

实施例 6 OR(OX40mab 单克隆抗体+R848) +同源肿瘤组织裂解物 (TL) 组合物小鼠皮下注射的抗肿瘤免疫效应

10 [00233] 主要材料和仪器来源如表 9 所示：

OX40mab 单克隆抗体 OX86	英国 Absolute Antibody 公司
R848	Tocris Bioscience
BALB/c 小鼠	河南省实验动物中心
小鼠结肠癌细胞 CT-26	北京昭衍新药研究中心股份有限公司
匀浆器	上海净信实业发展有限公司
超声波粉碎仪	宁波新芝生物科技股份有限公司

6.1 实验方法：

[00234] 本实施例中使用了 OR(OX40mab 单克隆抗体+R848) +同源肿瘤组织裂解物组合物，其余操作与实施例 4 相同。

15 [00235] 肿瘤组织裂解物的匀浆器处理方法：所用同源的肿瘤组织裂解物取自小鼠肿瘤细胞 CT-26 移植成功的肿瘤组织通过匀浆器处理而成。具体而言，称取小鼠肿瘤细胞 CT-26 移植成功的肿瘤组织，用手术剪刀剪碎，大小为 1mm^3 左右，按照 3mL/g 的量加入 PBS。将肿瘤组织浆液转移至细菌培养管中，放置在冰浴中 10 分钟。用匀浆器将
20 剪碎的肿瘤组织多次匀浆，转速为 30000rpm，每匀浆 1 分钟停止 2 分钟降温，共计匀浆 5 分钟。

[00236] 肿瘤组织裂解物的超声破碎机处理方法：将上述匀浆器处理的肿瘤组织裂解物加入适量 PBS 按照调整到 5mL/g 的终浓度，用超声波细胞破碎机将定容后的组织匀浆液超声破碎（工作时间 2 秒，间歇 3 秒，共 12 次即 1 分钟，盛有组织浆液的培养管一直放在冰浴中）。

5 细胞破碎完全的肿瘤组织裂解物分装 -80°C 冻存待用。

[00237] 每组中所施用的组合物的组成如表 10 所示：

组别	供试品名称	肿瘤组织裂解物	药物浓度
1	PBS	—	—
2	OX40+R848+CT-26 细胞裂解物 (OR+CT-26 TL)	50 μ L/只	OX40 8ug+R848 20ug/只 (50 μ L)

6.2 实验结果：

10 [00238] 如图 6A-6D 所示，与 PBS 组相比，CT-26 细胞裂解物 +OX40mab+R848 的组合物皮下注射可以完全清除移植的 CT-26 肿瘤（p 值为 0.000， $p < 0.001$ ），抑瘤率可达 100%。

实施例 7. OR(OX40mab+R848)+ 同源小鼠淋巴瘤 A20 裂解物组合物小鼠皮下注射的抗肿瘤免疫效应

15 [00239] 除肿瘤细胞为小鼠 B 细胞淋巴瘤细胞 A20 外，其余同实施例 6，材料和仪器来源如表 11 所示：

OX40mab 单克隆抗体 OX86	英国 Absolute Antibody 公司
R848	Tocris Bioscience
BALB/c 小鼠	河南省实验动物中心
小鼠 B 细胞淋巴瘤细胞 A20	北京昭衍新药研究中心股份有限公司
匀浆器	上海净信实业发展有限公司
超声波粉碎机	宁波新芝生物科技股份有限公司

7.1 实验方法：本实施例的实验方法与实施例 6 不同的是：肿瘤细胞为小鼠 B 细胞淋巴瘤细胞 A20，其他内容与实施例 6 相同。

20 [00240] 每组中所施用的组合物的组成如表 12 所示：

组别	供试品名称	肿瘤组织裂解物	药物浓度
1	PBS	—	—
2	OX40mab+R848+A20 细胞裂解物 (OR+A20 TL)	50 μ L/只	OX40mab 8ug+R848 20ug/只 (50 μ L)

7.2 实验结果:

[00241] 如图 7A-7D 所示, 与 PBS 组相比, A20 细胞裂解物 +OX40mab+R848 的组合物皮下注射显著性抑制肿瘤的生长 (p 值为 0.000, $p < 0.001$), 相对肿瘤增殖率为 10.68%, 瘤重抑瘤率为 88.43%。

实施例 8 OR(OX40mab+R848)和同源小鼠肺癌 LLC 裂解物组合物小鼠皮下注射的抗肿瘤免疫效应

[00242] 除肿瘤细胞为小鼠肺癌 LLC 外其余同实施例 6 和 7, 材料和仪器来源如表 13 所示:

OX40mab 单克隆抗体 OX86	英国 Absolute Antibody 公司
R848	Tocris Bioscience
BALB/c 小鼠	河南省实验动物中心
小鼠肺癌细胞 LLC	北京昭衍新药研究中心股份有限公司
匀浆器	上海净信实业发展有限公司
超声波粉碎仪	宁波新芝生物科技股份有限公司

8.1 实验方法:

[00243] 本实施例的实验方法与实施例 6 不同的是小鼠为 C57BL/6 小鼠, 肿瘤细胞为小鼠肺癌细胞 LLC, 其他与实施例 6 相同。

[00244] 每组中所施用的组合物的组成如表 14 所示:

组别	供试品名称	肿瘤组织裂解物	药物浓度
1	PBS	—	—
2	OX40+R848+LLC 细胞裂解物 (OR+LLC TL)	50 μ L/只	OX40mab 8ug+R848 20ug/只 (50 μ L)

8.2 实验结果:

[00245] 如图 8A-8D 所示, 与 PBS 组相比, LLC 细胞裂解物+OX40mab+R848 的组合物皮下注射显著性抑制肿瘤的生长 (p 值为 0.001), 相对肿瘤增殖率为 30.00%, 瘤重抑瘤率为 90.27%)。

5

实施例 9 OR(OX40mab+R848)+同源肿瘤细胞裂解物组合物皮下注射的长效免疫效应

[00246] 材料和仪器来源: 同实施例 6

9.1 实验方法

10 [00247] 首先采用 3 次免疫将肿瘤完全清除, 随后重新嫁接 CT-26 肿瘤细胞, 5×10^5 细胞/只, 观察移植瘤的成瘤率, 以研究本申请组合物引起的免疫记忆对移植性肿瘤转移的阻止效应。具体操作与实施例 6 相同, 以同样的方法预免疫小鼠 3 次再移植肿瘤。

[00248] 每组中所使用的组合物的组成如表 16 所示:

组别	供试品名称	肿瘤组织裂解物	药物浓度
1	PBS	—	—
2	OX40+R848+CT-26 细胞裂解物 (OR+CT-26 TL)	50 μ L/只	OX40mab 8ug+R848 20ug/只 (50 μ L)

15

9.2 实验结果

如图 9 所示, CT-26 细胞裂解物+OX40mab+R848 的组合物 3 次皮下注射后, 再移植肿瘤的成功率为 28.57%, 而对照组的再移植肿瘤的成功率为 100%。此外, 对正常小鼠预免疫 3 次再嫁接 CT-26 肿瘤细胞仍获得相似的结果 (此处资料未显示)。结果表明, OX40mab+R848+自体肿瘤裂解物免疫后可产生长效抗肿瘤免疫记忆, 从而阻止肿瘤的转移。

20

实施例 10. OR(OX40mab+R848)+新鲜的同源肿瘤细胞裂解物组合物或福尔马林固定的同源肿瘤细胞裂解物组合物小鼠皮下注射的抗肿瘤免疫效应比较

[00249] 材料和仪器同实施例 6。

5 10.1 实验方法：

[00250] 本实施例的实验方法与实施例 6 不同的是，实验分为 3 组，第 3 组使用的细胞裂解物源自福尔马林中固定 24~48 小时的 CT-26 肿瘤组织。具体而言，用手术剪刀将福尔马林中固定的肿瘤组织剪碎为大小为 1mm³ 左右小块，并采用 PBS 洗涤以去除残留的福尔马林。随后进行匀浆器和超声破碎仪处理获得肿瘤细胞裂解物。具体操作内容与实施例 6 相似。每组中所使用的组合物的组成如表 18 所示：

组别	供试品名称	肿瘤组织裂解物	药物浓度
1	PBS	—	—
2	OX40mab+R848+CT-26 肿瘤组织裂解物 (OR+CT-26 TL)	50 μ L/只	OX40mab 8ug+R848 20ug/只 (50 μ L)
3	OX40mab+R848+CT-26 肿瘤组织 (固定) 裂解物 (OR+CT-26 FTL)	50 μ L/只	OX40mab 8ug+R848 20ug/只 (50 μ L)

10.2 实验结果

[00251] 如图 10 所示，与 PBS 对照组相比，OX40mab+R848+福尔马林固定/未固定 CT-26 肿瘤组织的裂解物组合物皮下注射均显著性的抑制肿瘤的生长 ($p < 0.05$)，且二者之间无显著性差异 ($p > 0.05$)。

权 利 要 求 书

1. 一种在有需要的受试者中诱导免疫细胞活性的组合物，其包含：

- 5 (1) 与所述受试者自体同源的肿瘤细胞裂解物，
(2) OX40 激动剂，和
(3) TLR 激动剂。

2. 根据权利要求 1 所述的组合物，其中所述 OX40 激动剂包括 OX40 抗体、OX40 配体融合蛋白及其任意组合。

- 10 3. 根据权利要求 1 或 2 所述的组合物，其中所述 TLR 激动剂包括 CpG 寡核苷酸(oligodeoxynucleotides, CpG ODN)、瑞喹莫德 (Resiquimod, R848)、咪喹莫特 (Imiquimod, R 837)、dsRNA 及其组合。

- 15 4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的组合物，其中所述免疫细胞活性选自：免疫细胞的增殖；免疫细胞的分化、去分化或转分化；免疫细胞细胞因子的释放；免疫细胞的细胞毒性；免疫细胞的运动和/或运输；免疫细胞的衰竭及其组合。

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的组合物，其中所述免疫细胞为淋巴细胞。

- 20 6. 根据权利要求 1-5 任一项所述的组合物，其中所述淋巴细胞包括 T 细胞和 NK 细胞。

7. 根据权利要求 1-6 任一项所述的组合物，其中所述受试者自体同源的肿瘤细胞裂解物源自所述受试者的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。

- 25 8. 根据权利要求 1-6 任一项所述的组合物，其中所述受试者自体同源的肿瘤细胞裂解物源自所述受试者的一个或多个病灶的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。

9. 根据权利要求 1-6 任一项所述的组合物，其中所述受试者自体同源的肿瘤细胞裂解物源自所述受试者的一个或多个病灶的自体

同源肿瘤细胞或其子代细胞。

10. 根据权利要求 1-6 任一项所述的组合物，其中所述受试者自体同源的肿瘤细胞裂解物源自所述受试者的一处或多处组织的自体同源肿瘤细胞或其子代细胞。

5 11. 根据权利要求 1-10 任一项所述的组合物，其中所述受试者自体同源的肿瘤细胞裂解物源自 1×10^4 - 1×10^8 个肿瘤细胞。

12. 根据权利要求 1-11 任一项所述的组合物，其中所述组合物原位或非原位施用至所述受试者。

10 13. 根据权利要求 12 所述的组合物，其中所述非原位施用包括皮下注射、肌肉注射、腹腔注射、胸腔注射、静脉注射、动脉注射及其组合。

14. 根据权利要求 1-13 任一项所述的组合物，其中所述肿瘤细胞的裂解物通过选自下组的方法获得：匀浆（homogizing）、超声（sonication）或二者的组合。

15 15. 根据权利要求 1-14 任一项所述的组合物，其中所述肿瘤细胞的裂解物源自新鲜的肿瘤组织或冷冻的肿瘤组织或经固定液固定的肿瘤组织。

16. 根据权利要求 15 所述的组合物，其中所述固定液包含福尔马林、甲醛、多聚甲醛、戊二醛、乙醇或其任意组合。

20 17. 根据权利要求 1-16 任一项所述的组合物，其中所述组合物进一步包含一种或多种免疫调节剂。

25 18. 根据权利要求 17 所述的组合物，其中所述免疫调节包括 CD27、CD28、CD40、CD122、CD137 和 GITR 的激动剂，A2AR、CD276、VTCN1、BTLA、CTLA-4、IDO、LAG3、KIR、NOX2、PD-1、TIM-3、VISTA、SIGLEC7 和 SIGLEC9 的拮抗剂，细胞因子 IL-2、IL-12、IL15、IL6、IL18、IFN- α 、TNF- β 、IFN- γ 、GM-CSF、M-CSF，及其任意组合。

19. 一种在有需要的受试者中通过诱导免疫细胞活性治疗肿瘤的方法，其包括对所述受试者施用治疗上有效的量的权利要求 1-18

任一项所述的组合物。

20. 根据权利要求 19 的方法，其中所述治疗包括使肿瘤衰退、抑制肿瘤进展和/或转移、预防其复发和/或转移。

21. 根据权利要求 19 或 20 的方法，其中所述方法用于治疗所述
5 受试者选自下组的病症：肺癌、膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、食道癌、胃癌、胶质瘤、头颈癌、肾癌、白血病、淋巴细胞白血病、髓细胞白血病、混合细胞白血病、多发性骨髓瘤、肝癌、胆囊癌、淋巴瘤、黑色素瘤、间皮瘤、成神经管细胞瘤、口腔癌、鼻咽癌、喉癌、甲状腺癌、纵膈肿瘤、卵巢癌、
10 胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、睾丸癌、气管癌和外阴癌。

22. 一种在有需要的受试者中诱导免疫细胞活性的试剂盒，其包含权利要求 1-21 任一项所述的组合物和说明书，其中所述说明书指示从所述受试者体内获得和/或制备自体同源的肿瘤细胞，制备所述肿瘤细胞的裂解物，并将所述肿瘤细胞裂解物与 OX40 激动剂和 TLR
15 激动剂共同施用至所述受试者的方法。

23. 一种在有需要的受试者中诱导免疫细胞活性的组合物，其包含：

- (1) 溶瘤病毒，
- (2) OX40 激动剂，和
- 20 (3) TLR 激动剂；或
- (1) 表达 OX40 激动剂的溶瘤病毒，和
- (2) TLR 激动剂。

24. 根据权利要求 23 所述的组合物，其中所述溶瘤病毒为经修饰的病毒。

25. 根据权利要求 24 所述的组合物，其中所述溶瘤病毒为单纯疱疹病毒（Herpes simplex virus）。

26. 根据权利要求 25 所述的组合物，其中所述单纯疱疹病毒选自 HSV-1 或 HSV-2。

27. 根据权利要求 26 所述的组合物，其中所述溶瘤病毒为经修

饰以缺失 γ 34.5 功能的单纯疱疹病毒 HSV-1。

28. 根据权利要求 23-27 任一项所述的组合物，其中所述溶瘤病毒经修饰编码所述 OX40 激动剂或所述 TLR 激动剂或其组合。

29. 根据权利要求 23-28 任一项所述的组合物，其中所述组合物
5 中溶瘤病毒的量为 1×10^5 - 1×10^9 pfu。

30. 根据权利要求 23-29 任一项所述的组合物，其中所述组合物原位施用至所述受试者。

31. 根据权利要求 30 所述的组合物，其中所述原位施用包括瘤内注射、瘤周注射及其组合。

10 32. 一种在有需要的受试者中诱导免疫细胞活性的组合物，其包含：
含：

(1) 与所述受试者自体同源的肿瘤细胞，

(2) 溶瘤病毒，和

(3) 一种或多种免疫激活剂。

15 33. 一种在有需要的受试者中通过诱导免疫细胞活性治疗肿瘤的方法，其包括对所述受试者施用治疗上有效的量的权利要求 23-32 任一项所述的组合物。

34. 根据权利要求 33 的方法，其中所述治疗包括使肿瘤衰退、抑制肿瘤进展和/或转移、预防其复发和/或转移。

20 35. 一种在有需要的受试者中诱导免疫细胞活性的试剂盒，其包含权利要求 23-32 任一项所述的组合物和说明书，其中所述说明书指示将所述组合物施用至所述受试者以诱导免疫活性。

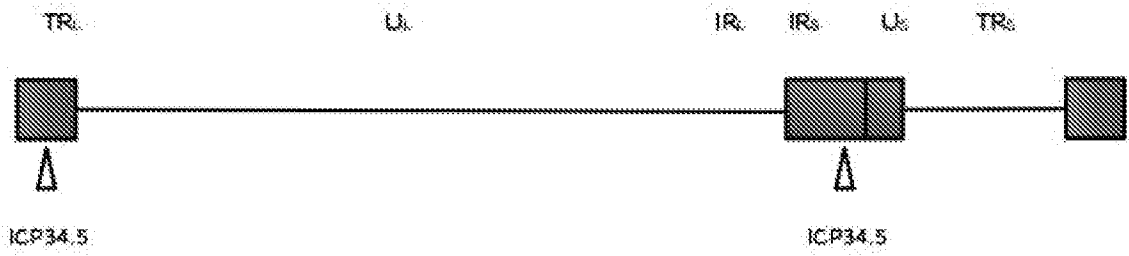


图 1A

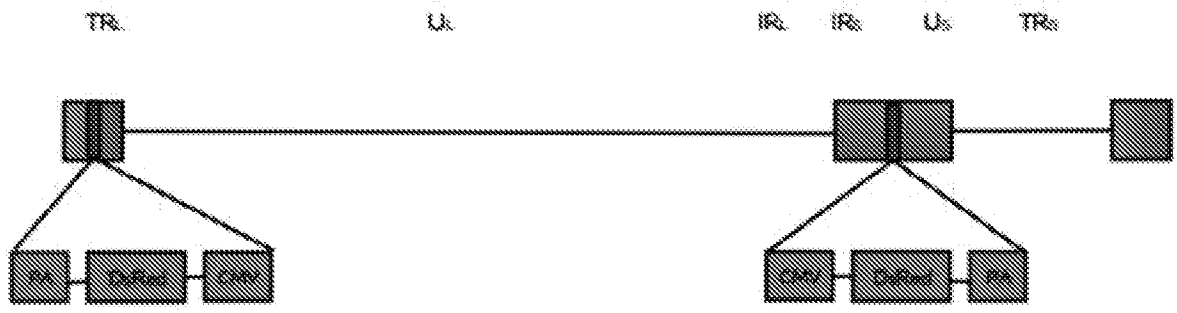


图 1B

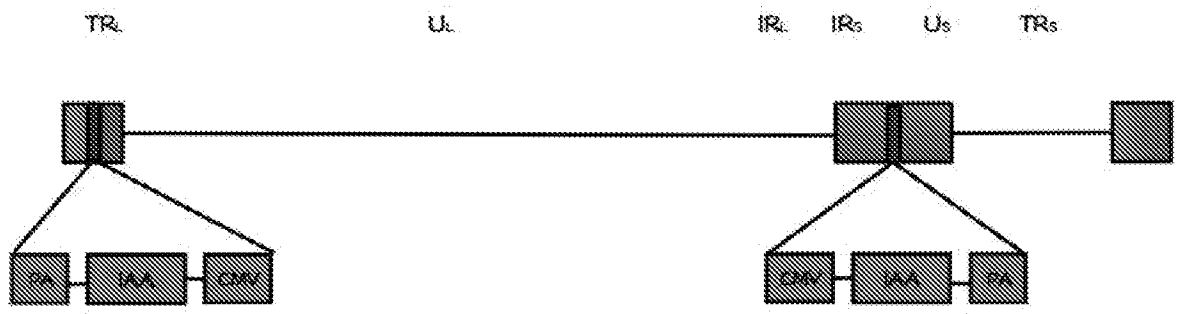


图 1C

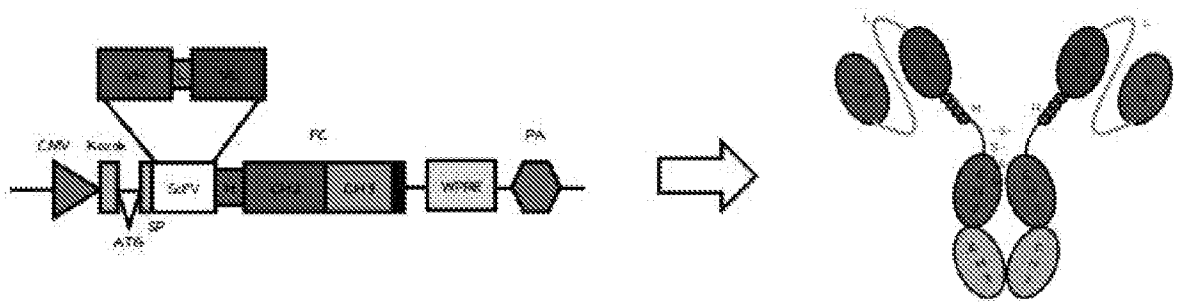


图 1D

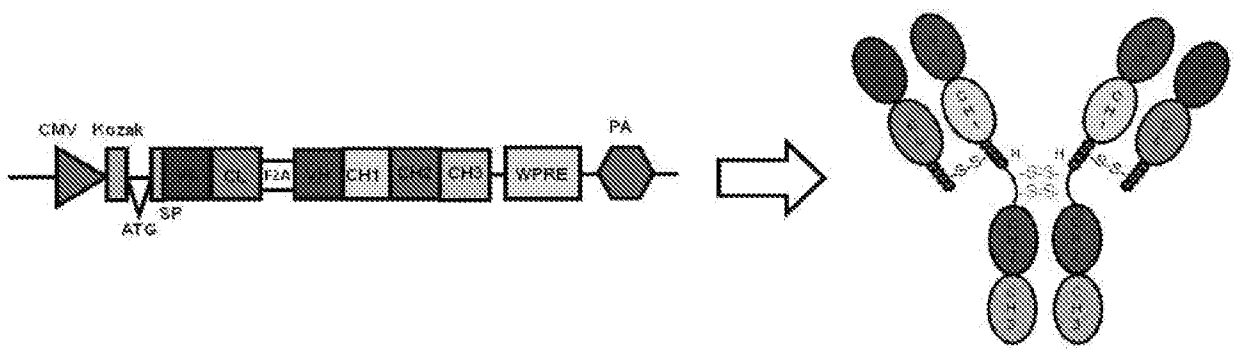


图 1E

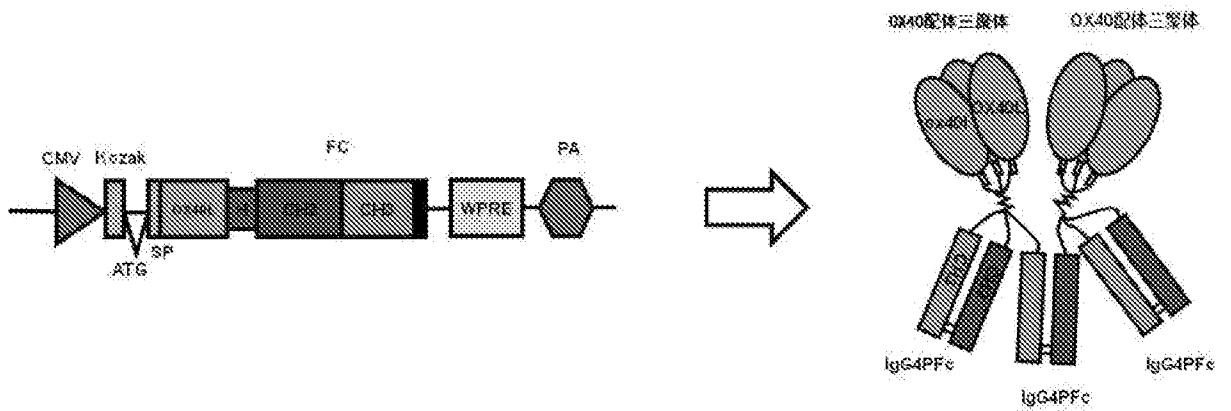


图 1F

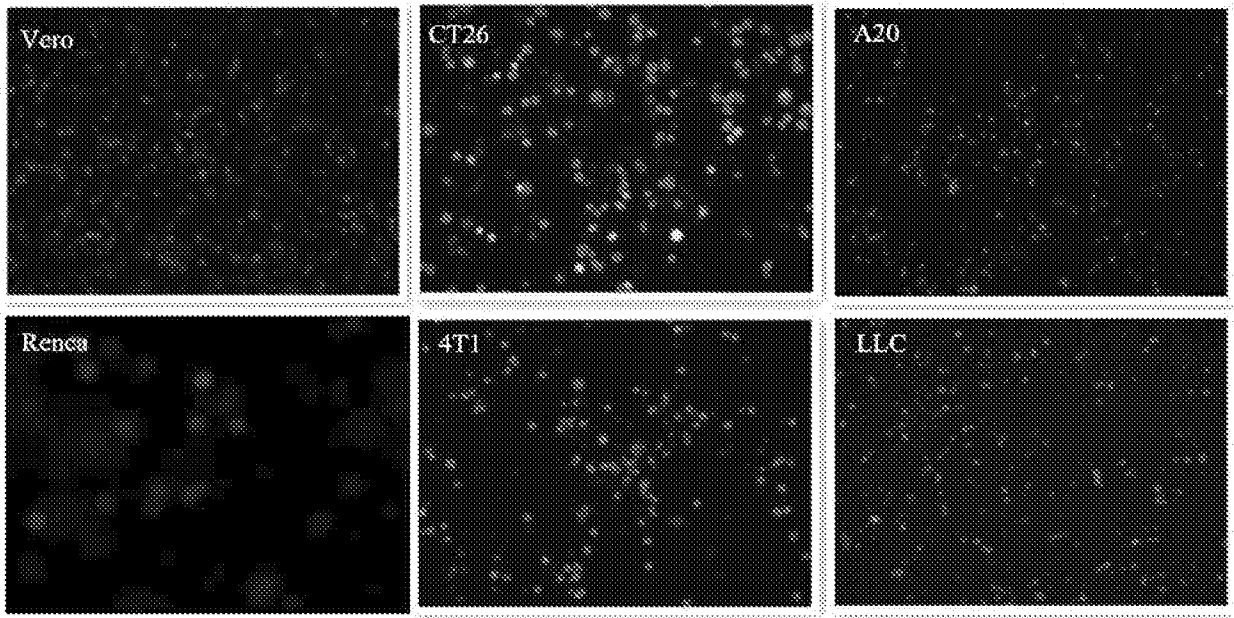


图 2A

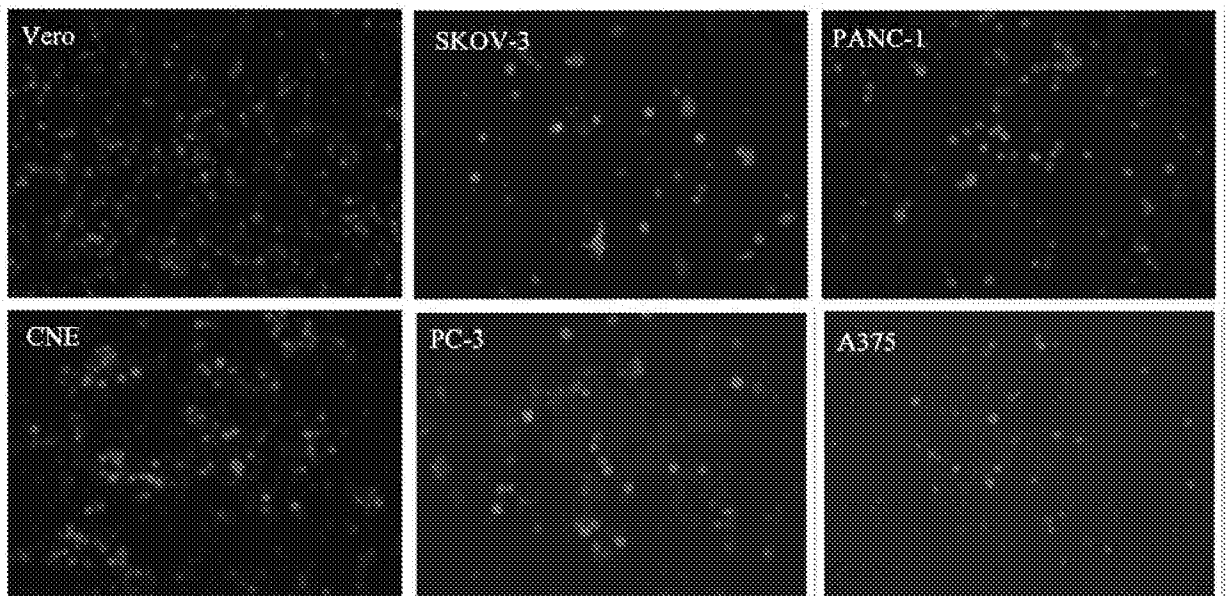
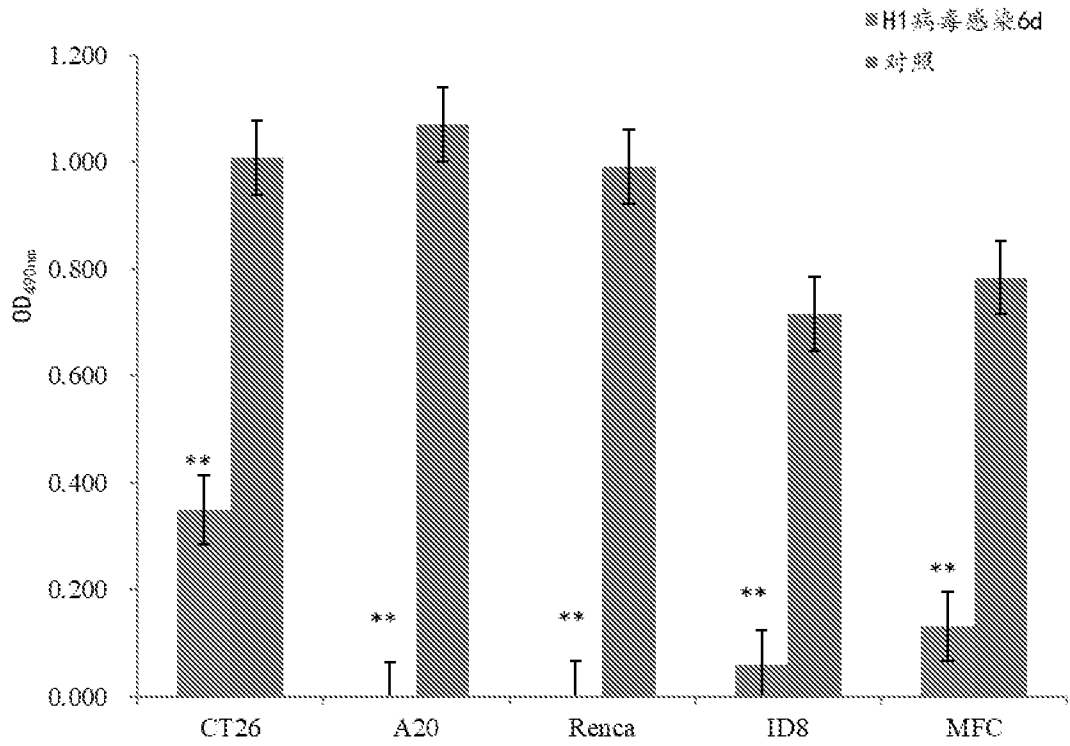
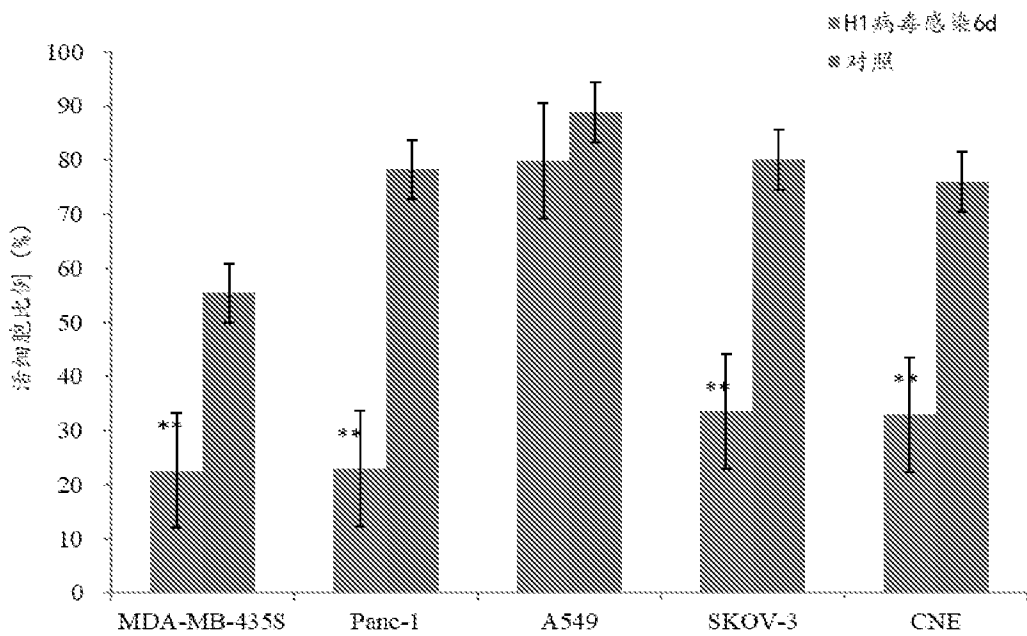


图 2B



MTT法检测H1病毒对不同小鼠肿瘤细胞的体外杀伤能力

图 2C



台盼蓝染色法检测H1病毒对不同人肿瘤细胞的体外杀伤能力

图 2D

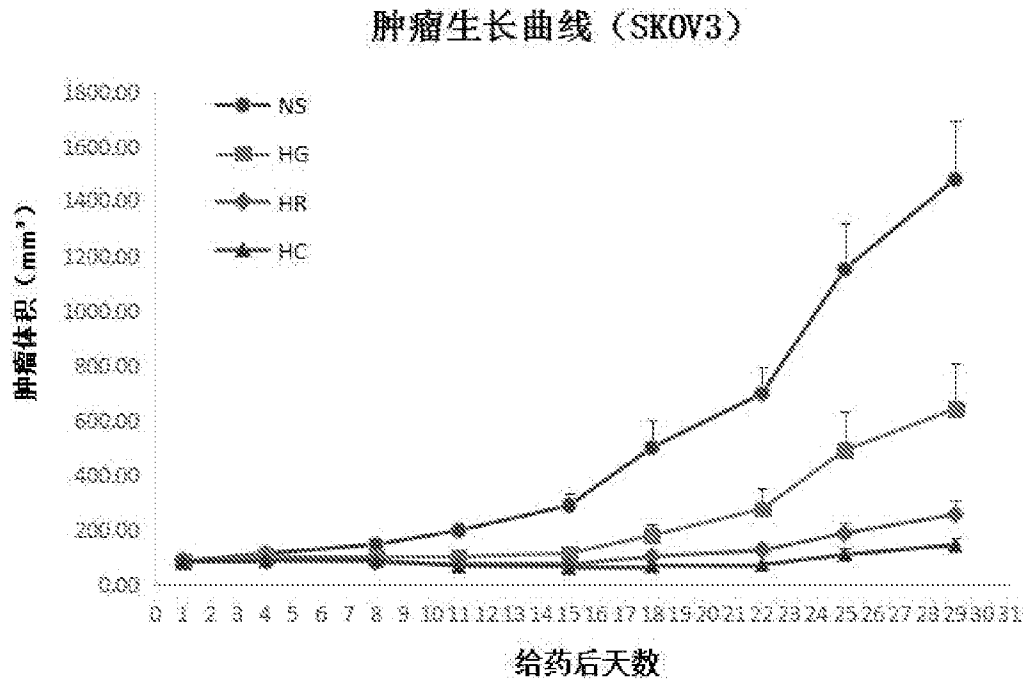


图 3A

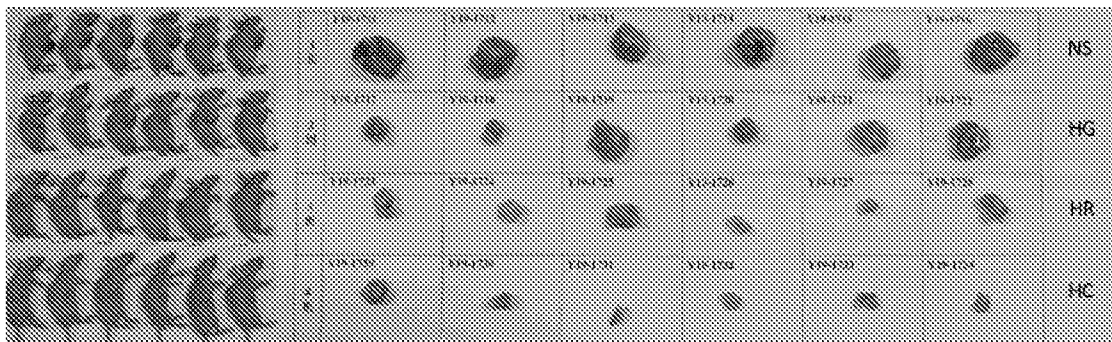


图 3B

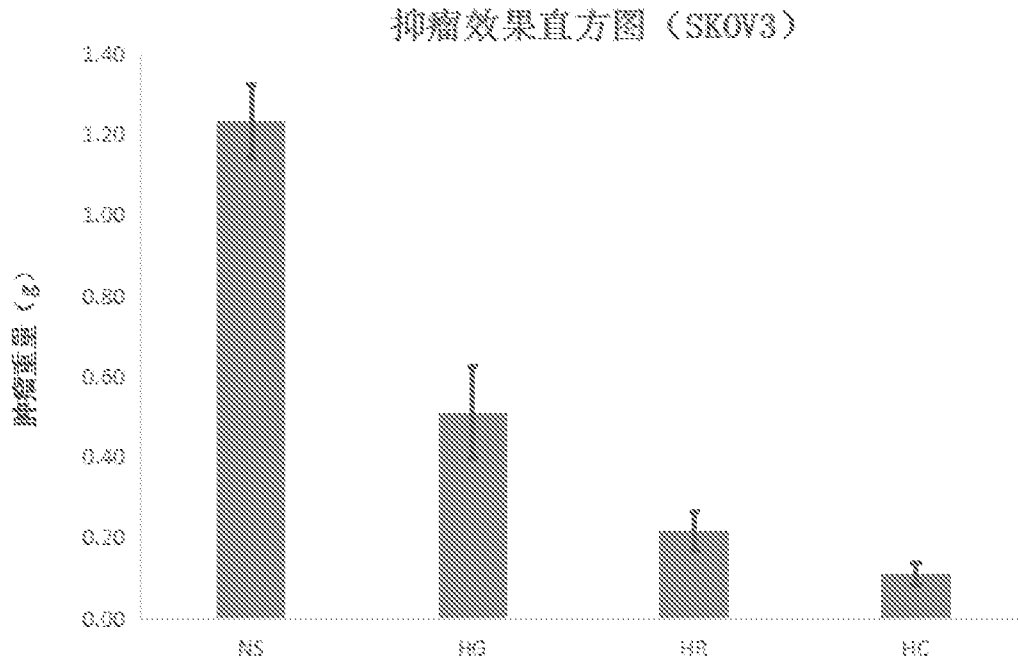


图 3C

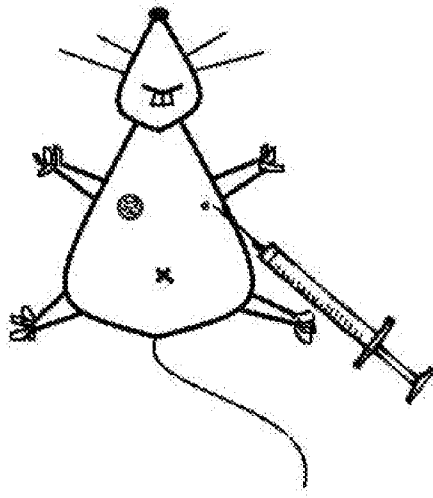


图 4A

肿瘤生长曲线 (CT-26)

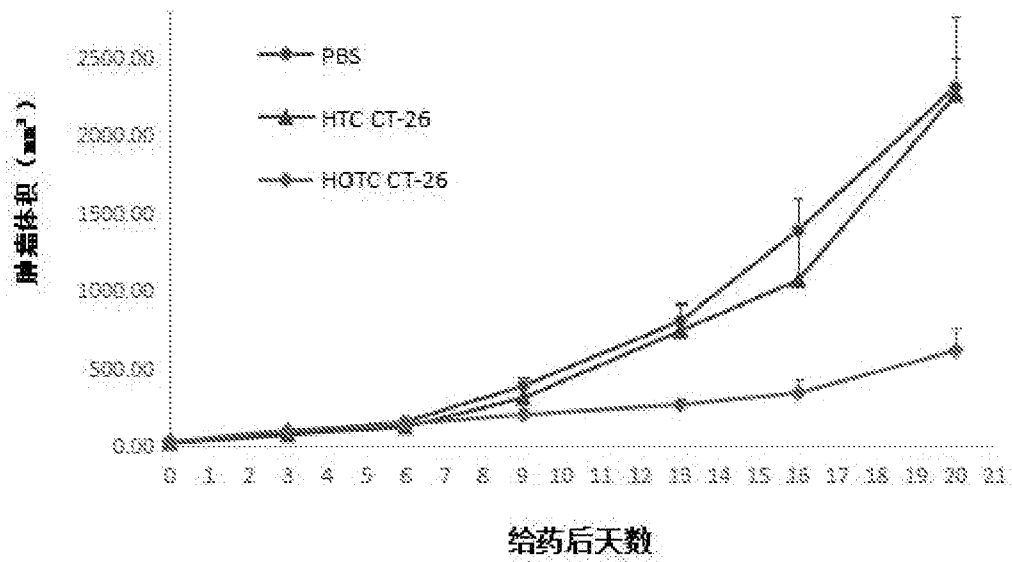


图 4B

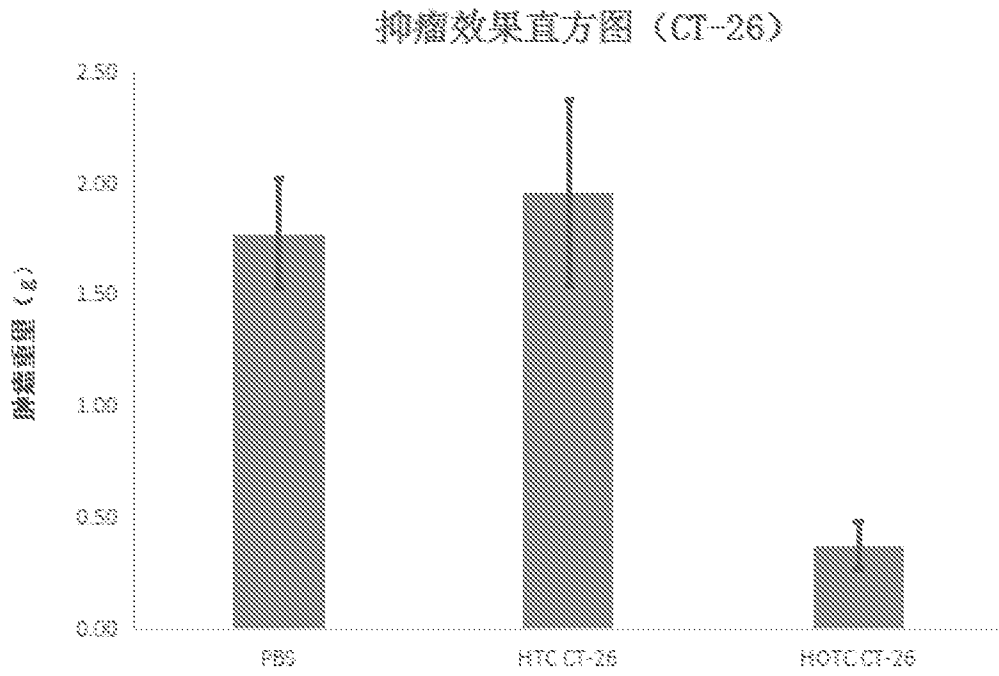


图 4C

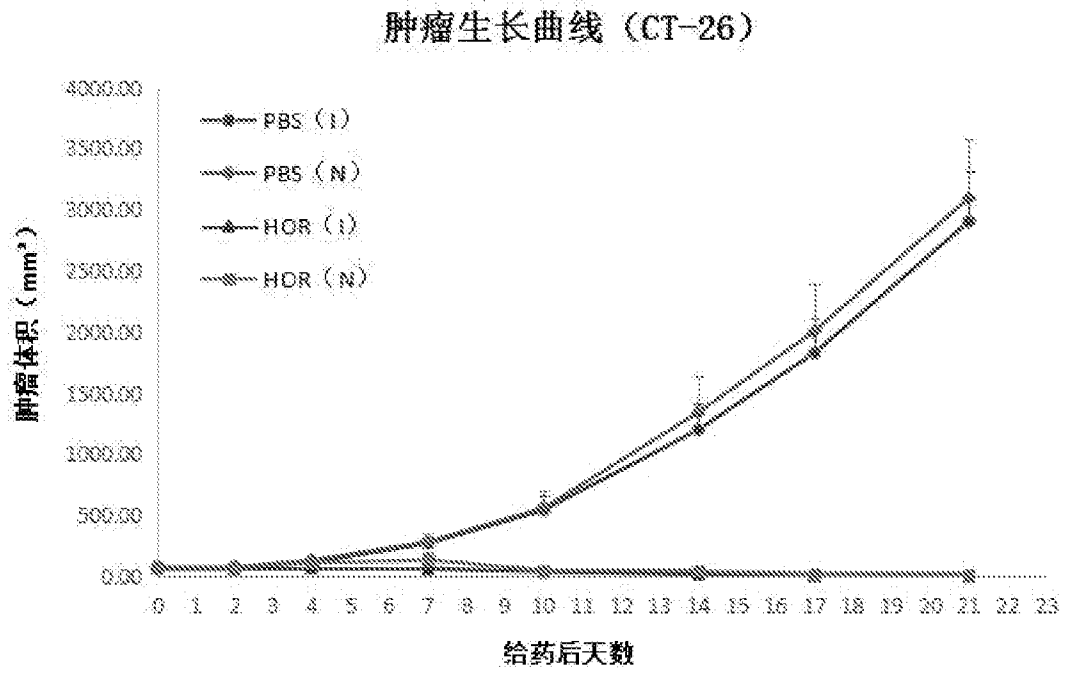


图 5A



图 5B

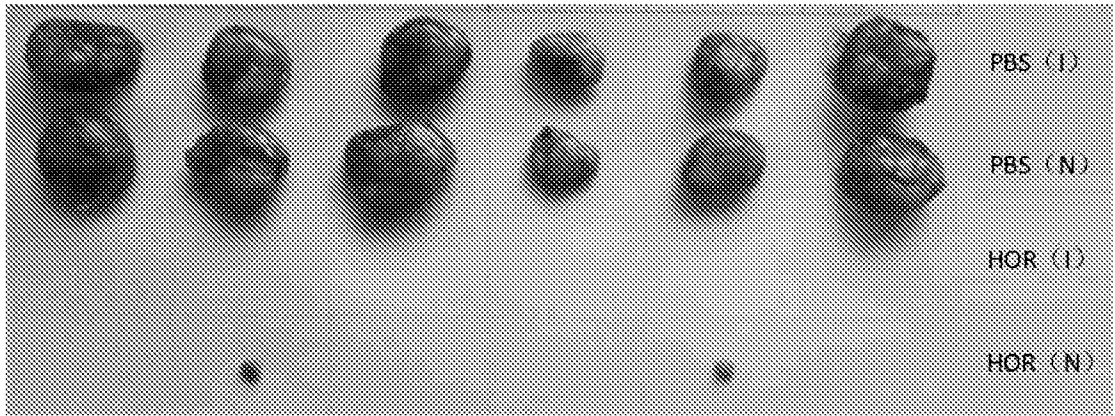


图 5C

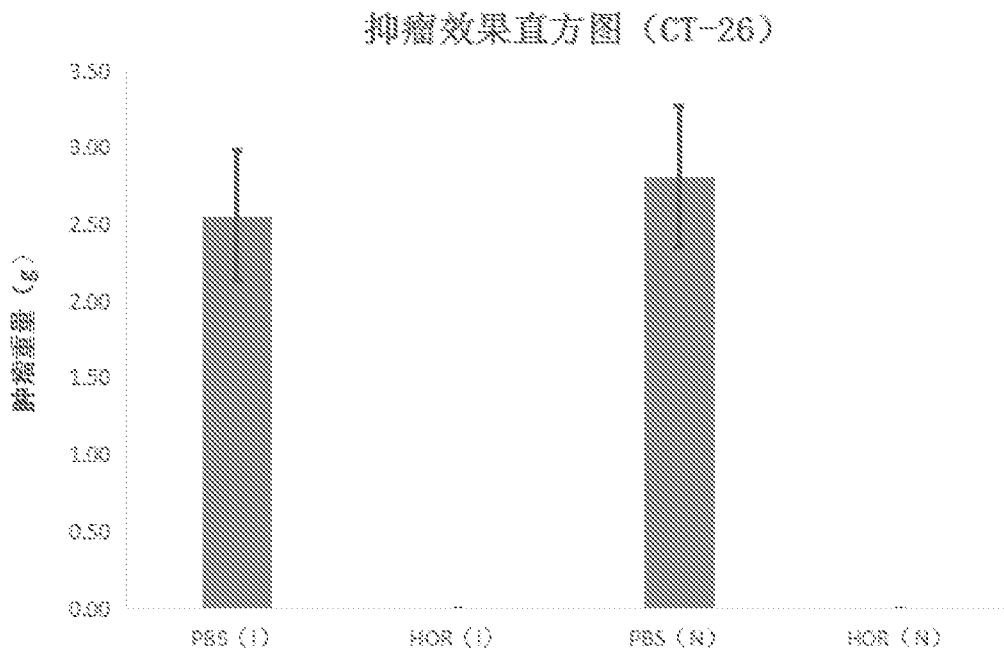


图 5D

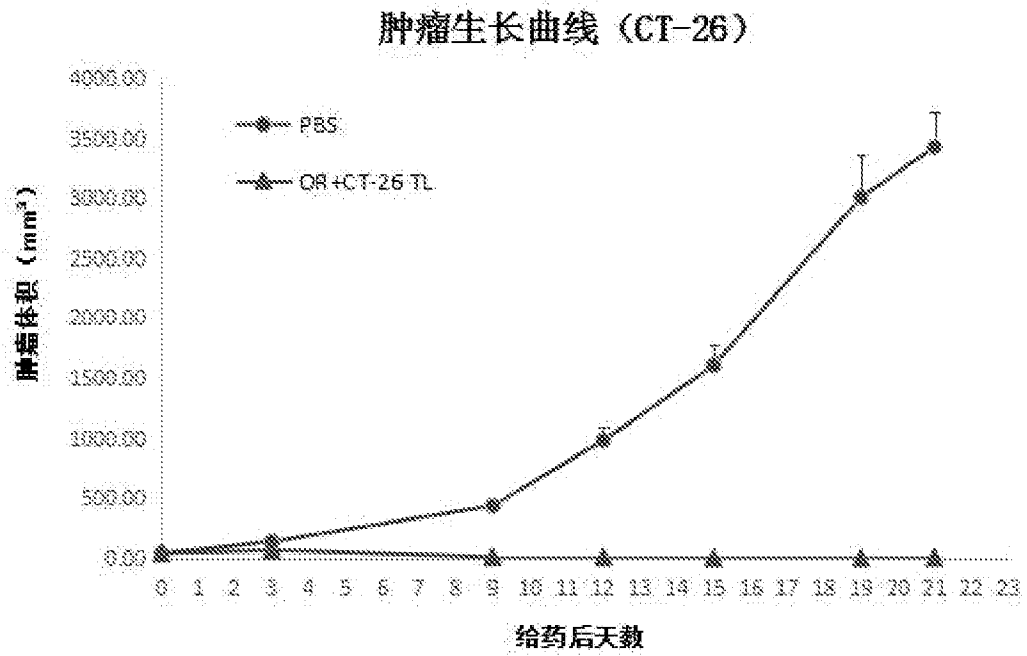


图 6A

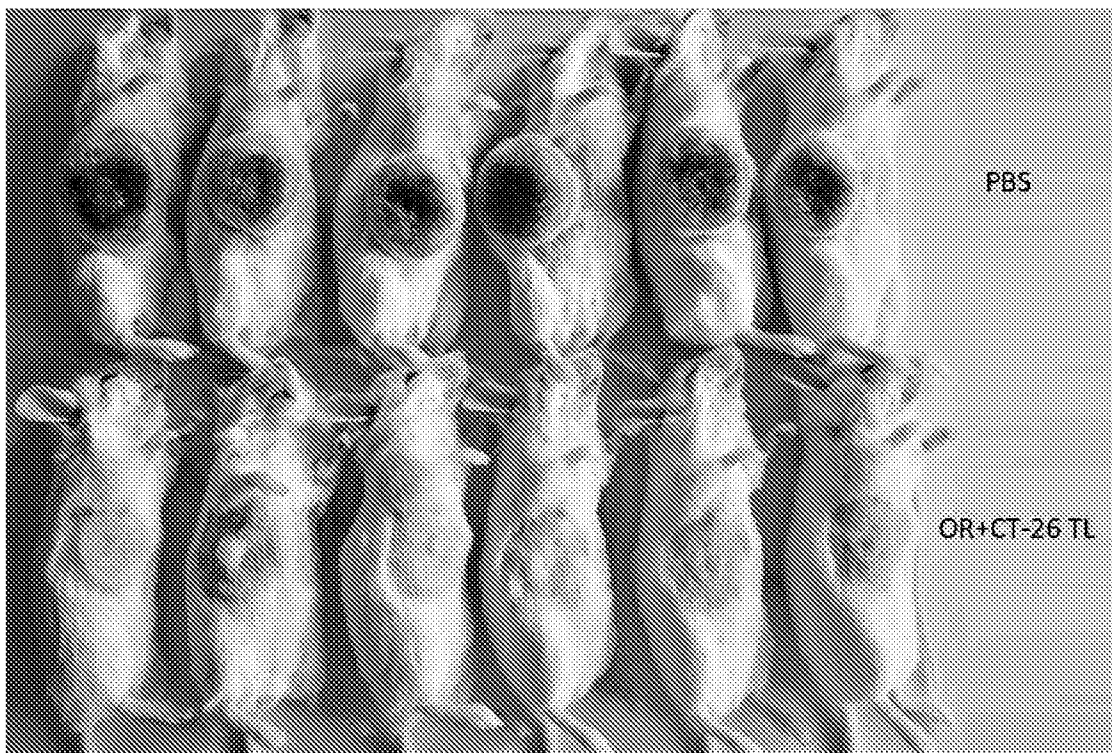


图 6B

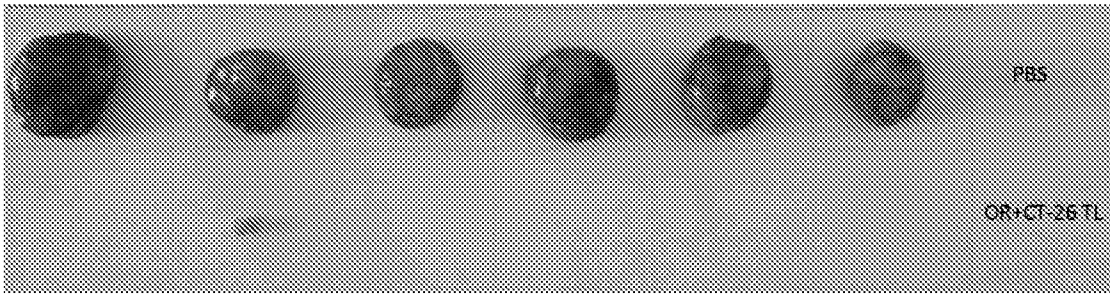


图 6C

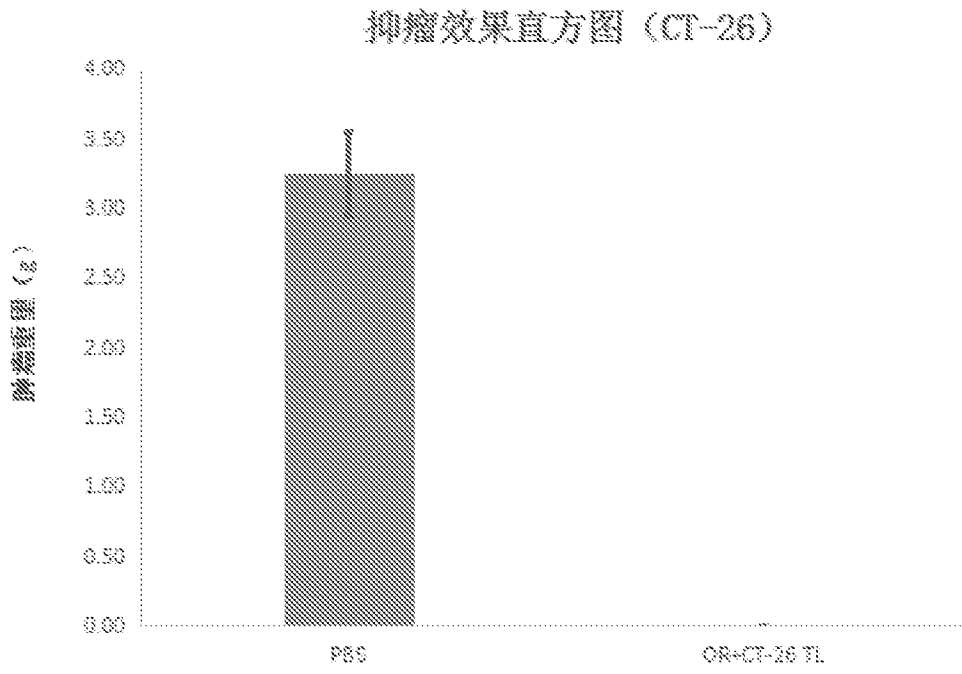


图 6D

肿瘤生长曲线 (A20)

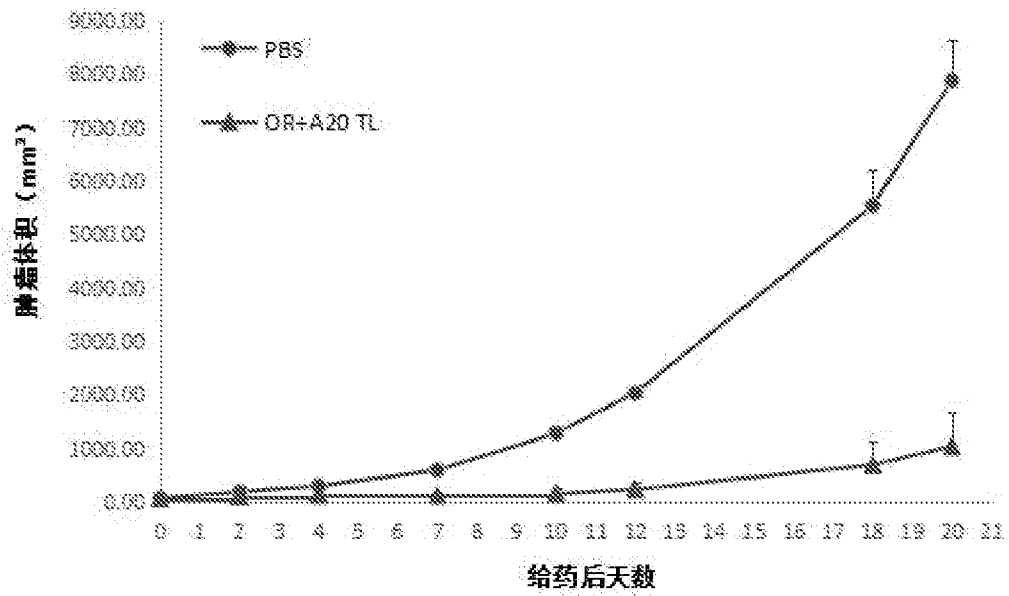


图 7A



图 7B



图 7C

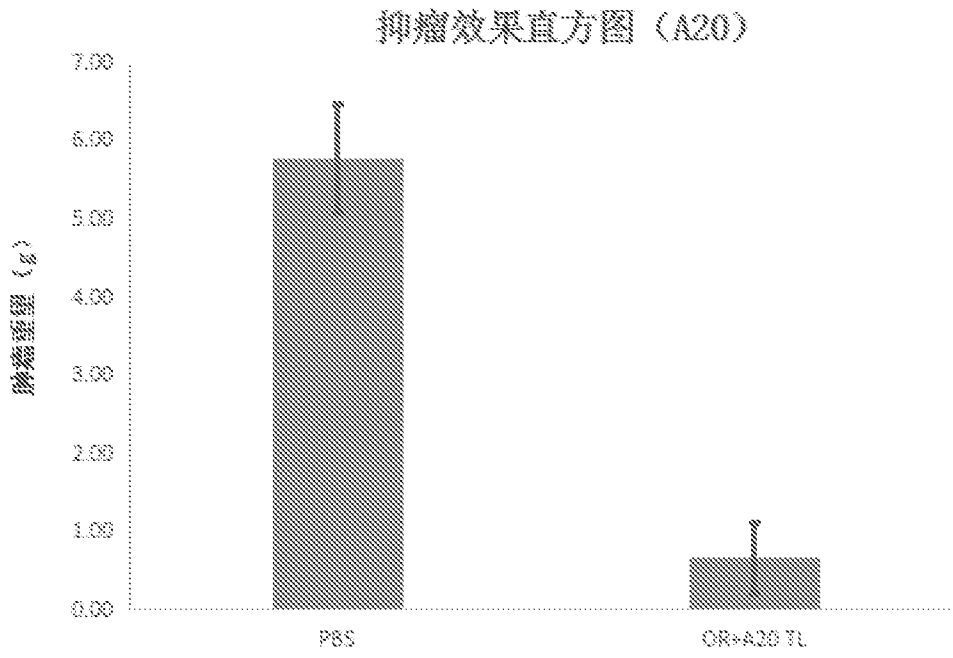


图 7D

肿瘤生长曲线 (LLC)

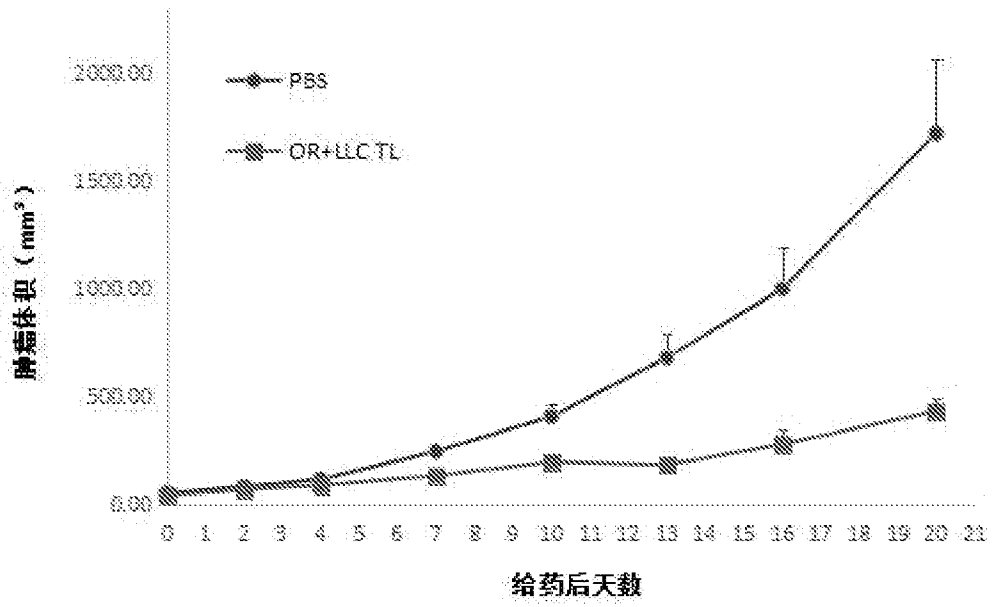


图 8A

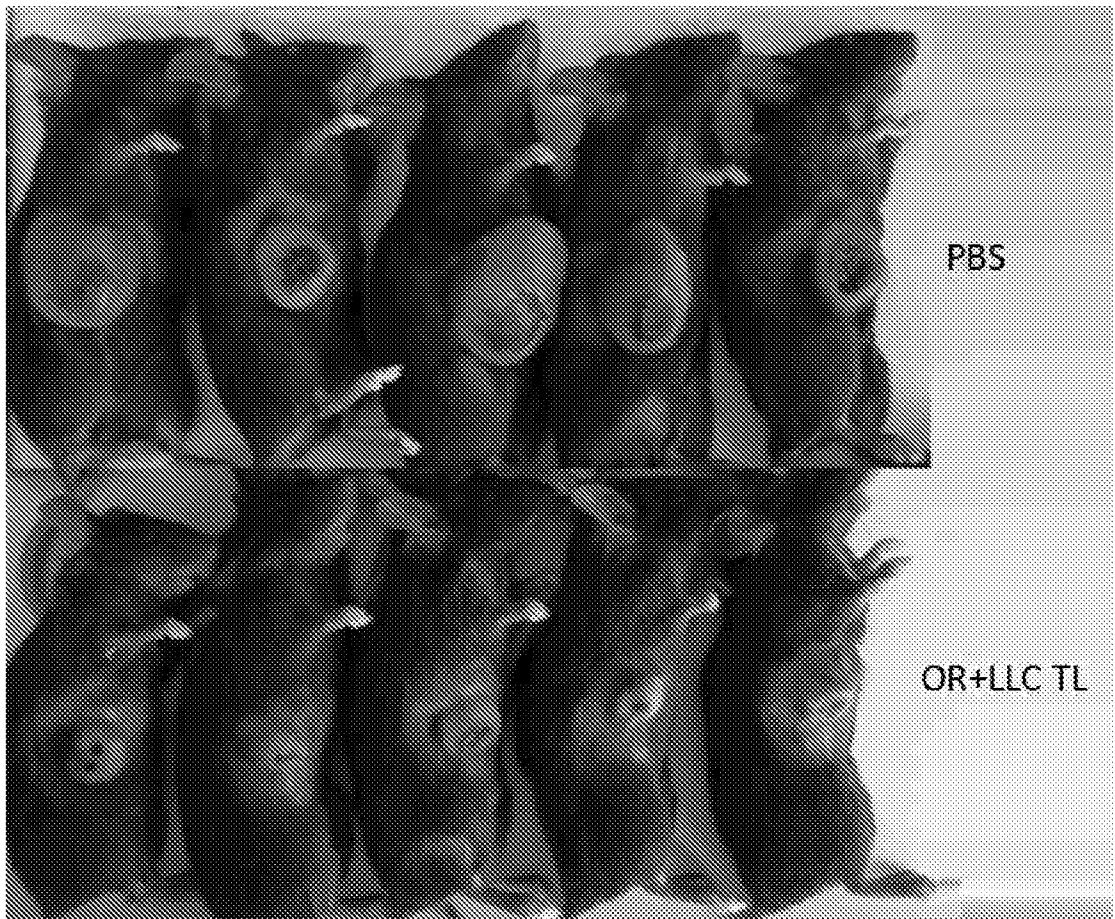


图 8B

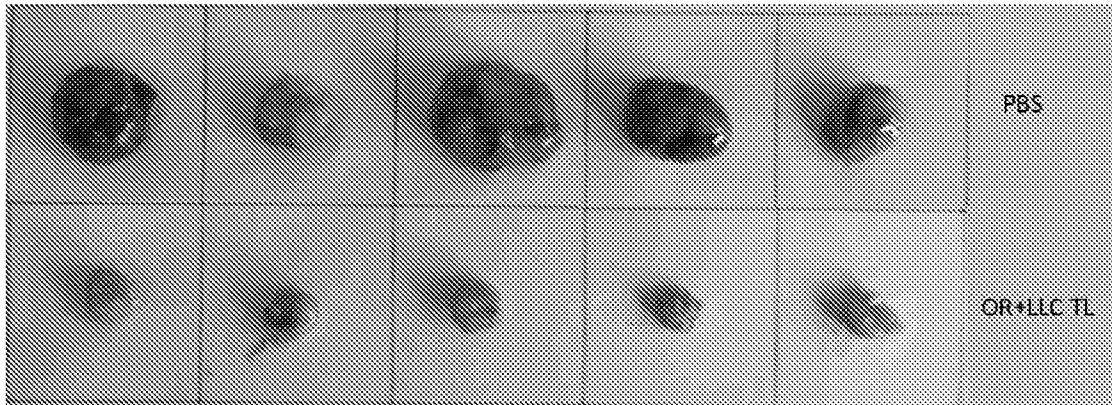


图 8C

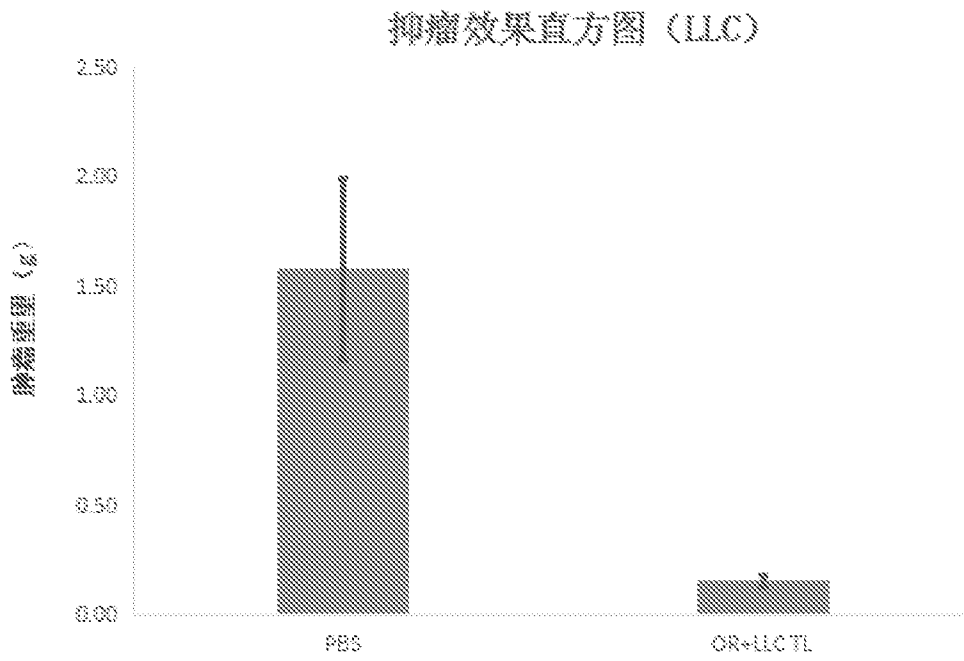


图 8D

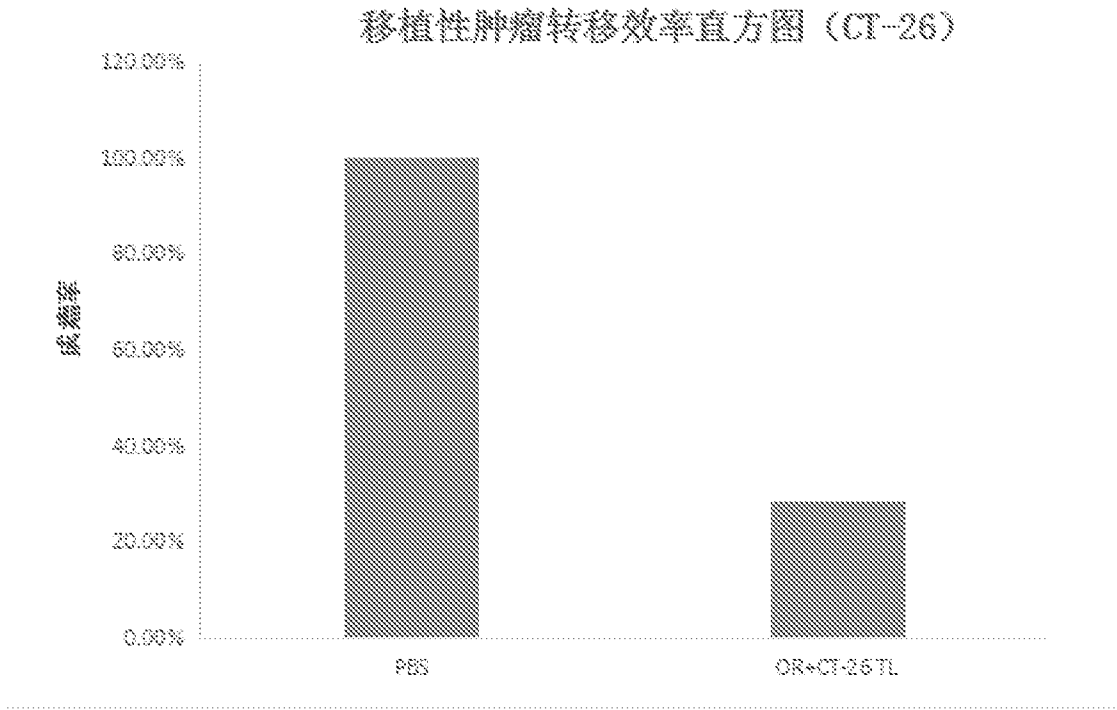


图 9

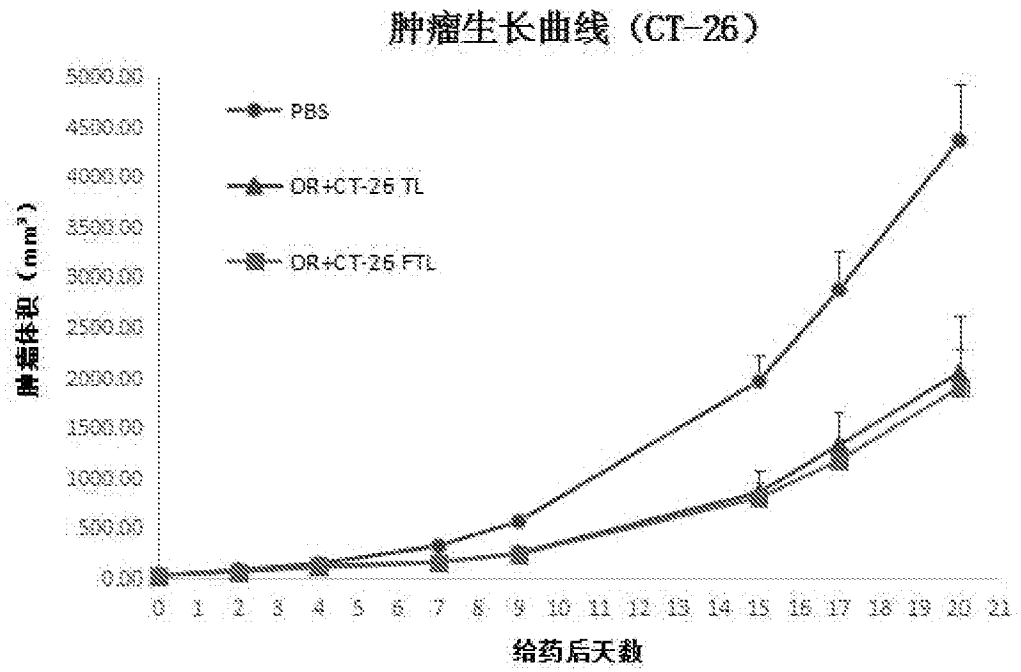


图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/090631

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61P 35/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 35/763(2015.01)i; A61K 39/39(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61P A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNTXT, SIPOABS, DWPI, WOTXT, USTXT, EPTXT, CNKI, 万方数据库, WANFANG DATA, baidu学术, BAIDU XUESHU, PUBMED, ELSEVIER, SPRINGER, ISI web of knowledge, sciencedirect: OX40激动剂, ox40 agonist, OX40抗体, OX40配体融合蛋白, OX40L, CD134, ACT45, TNFRSF4, OX86, anti-ox40, TLR激动剂, TLR agonist, CpG寡核苷酸, oligodeoxynucleotides, CpG ODN, 瑞喹莫德, Resiquimod, R848, 咪喹莫特, Imiquimod, R837, dsRNA, Toll, 免疫调节, 免疫激活, immune activation agent, 溶瘤, oncolytic, 单纯疱疹病毒, Herpes simplex virus, HSV-1, 自体, autologous, 肿瘤细胞裂解物, tumor cell lysate, 郑州威瑞, weirui biotechnology, 韩志强, 李文, 邢风云, 万娜

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 108135934 A (COLD GENESYS, INC.) 08 June 2018 (2018-06-08) claims 1-5, 14-27, 35-37, 41 and 42, and description, paragraphs [0007], [0013], [0038]-[0045], [0084] and [0285]-[0333]	1-35
X	WO 2018/127713 A1 (REPLIMUNE LIMITED) 12 July 2018 (2018-07-12) claims 11, 12, 20-22, 32 and 36, description, page 30, lines 3-12 and 29-31	23-31, 33-35
X	CN 107001478 A (NOVARTIS AG et al.) 01 August 2017 (2017-08-01) claim 141, and description, paragraphs [0198]-[0207], [0219], [0786]-[0791], [0804]-[0814], [0858]-[0882] and [1018]-[1026]	1-35
X	CN 108289942 A (MAXIVAX SA) 17 July 2018 (2018-07-17) claims 1, 28-31, 40, 57-59, 61, 63-69, 72-78, 96-102, 124-131, description, paragraphs [0141]-[0162], and figure 3	1-22
X	WO 2017/021791 A1 (GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY DEVELOPMENT LIMITED) 09 February 2017 (2017-02-09) claims 1-20, and description, pages 22 and 41-58	1-22

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

03 August 2020

Date of mailing of the international search report

18 August 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/090631

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/022138 A2 (YEUNG, A. W. H.) 06 February 2014 (2014-02-06) claims 1, 5 and 9-13	32-35
X	KASIEWICZ, M. J. et al. "Toll-Like Receptor Ligands in Conjunction with Agonist Anti-OX40 Mab Immunotherapy Possess Differential Capacity to Revive Anergic Self-Reactive CD8 T Cells" <i>The Journal of Immunology</i> , Vol. 196, No. 1 Supplement, 01 May 2016 (2016-05-01), the abstract	1-22
X	VOO, K. S. et al. "Selective Targeting of Toll-Like Receptors and OX40 Inhibit Regulatory T-Cell Function in Follicular Lymphoma" <i>International Journal of Cancer</i> , Vol. 135, 26 April 2014 (2014-04-26), the abstract, and pp. 2834-2846	1-22

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **19-21,33-34**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] Claims 19-21, 33 and 34 relate to a method of the treatment of a tumor by inducing immune cell activity and among subjects with a need, that is to say, claims 19-21, 33 and 34 relate to a subject matter which does not warrant an international search by an International Searching Authority as defined by PCT Rule 39.1: (iv) a method for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, as well as a diagnostic method. The international search is made on the basis of the use of effective dose of the composition in the preparation of a medicine for the treatment of a tumor by inducing immune cell activity.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/090631

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 108135934 A	08 June 2018	EP 3365062 A4	17 July 2019
		JP 2018530624 A	18 October 2018
		WO 2017070110 A1	27 April 2017
		US 2018318365 A1	08 November 2018
		TW 201722477 A	01 July 2017
		EP 3365062 A1	29 August 2018
WO 2018/127713 A1	12 July 2018	CA 3049496 A1	12 July 2018
		AU 2018205763 A1	20 June 2019
		IL 267949 D0	26 September 2019
		BR 112019013215 A2	10 December 2019
		KR 20190104055 A	05 September 2019
		US 2019343903 A1	14 November 2019
		EP 3565568 A1	13 November 2019
		JP 2020503871 A	06 February 2020
		CN 110198724 A	03 September 2019
		GB 201700350 D0	22 February 2017
		MX 2019008146 A	09 October 2019
CN 107001478 A	01 August 2017	AU 2015333687 A1	27 April 2017
		TW 201620940 A	16 June 2016
		BR 112017007379 A2	19 December 2017
		CR 20170143 A	19 June 2017
		US 2018186882 A1	05 July 2018
		KR 20170069257 A	20 June 2017
		PE 10672017 A1	24 July 2017
		US 9988452 B2	05 June 2018
		EC SP17029218 A	28 February 2019
		TN 2017000129 A1	19 October 2018
		SG 11201702401 R A	27 April 2017
		CA 2964367 A1	21 April 2016
		PE 20171067 A1	24 July 2017
		PH 12017500692 A1	09 October 2017
		EP 3206711 A1	23 August 2017
		WO 2016061142 A1	21 April 2016
		GT 201700081 A	27 November 2018
		UY 36351 A	01 June 2016
		US 2016108123 A1	21 April 2016
		EA 201790834 A1	31 January 2018
IL 251563 D0	29 May 2017		
CU 20170052 A7	07 November 2017		
MX 2017004810 A	16 October 2017		
CL 2017000888 A1	18 August 2017		
JP 2017536099 A	07 December 2017		
CN 108289942 A	17 July 2018	RU 2018115200 A	28 October 2019
		RU 2018115200 A3	20 February 2020
		WO 2017064571 A1	20 April 2017
		US 2017087234 A1	30 March 2017
		US 2017095546 A1	06 April 2017
		US 9861689 B2	09 January 2018
		JP 2018529706 A	11 October 2018
		AU 2016337411 A1	12 April 2018

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/090631

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
				CA 2998991 A1	20 April 2017
				EP 3352783 A1	01 August 2018
WO	2017/021791	A1	09 February 2017	ZA 201800468 B	31 July 2019
				PH 12018500254 A1	13 August 2018
				BR 112018002530 A2	25 September 2018
				DO P2018000034 A	31 October 2018
				AU 2016304401 B2	16 May 2019
				IL 257067 D0	29 March 2018
				TW 201716084 A	16 May 2017
				JP 2018525378 A	06 September 2018
				EP 3331560 A1	13 June 2018
				CN 108025073 A	11 May 2018
				KR 20180032641 A	30 March 2018
				CA 2994910 A1	09 February 2017
				CL 2018000303 A1	06 July 2018
				CR 20180080 A	02 April 2018
				US 2019338042 A1	07 November 2019
				EA 201890457 A1	28 September 2018
				US 2017275371 A1	28 September 2017
				AU 2016304401 A1	15 February 2018
				MX 2018001515 A	15 March 2018
WO	2014/022138	A2	06 February 2014	US 2020171151 A1	04 June 2020
				AU 2013296919 A1	22 January 2015
				US 2015190505 A1	09 July 2015
				AU 2016203329 A1	09 June 2016
				EP 2879498 A4	30 March 2016
				JP 2015523412 A	13 August 2015
				KR 20170039774 A	11 April 2017
				WO 2014022138 A3	27 March 2014
				KR 20150038066 A	08 April 2015
				EP 2879498 A2	10 June 2015
				CA 2877414 A1	06 February 2014

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/090631

<p>A. 主题的分类</p> <p>A61P 35/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 35/763(2015.01)i; A61K 39/39(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																																
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61P A61K</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS, CNTXT, SIPOABS, DWPI, WOTXT, USTXT, EPTXT, CNKI, 万方数据库, baidu学术, PUBMED, ELSEVIER, SPRINGER, ISI web of knowledge, sciencedirect; OX40激动剂, ox40 agonist, OX40抗体, OX40配体融合蛋白, OX40L, CD134, ACT45, TNFRSF4, OX86, anti-ox40, TLR激动剂, TLR agonist, CpG寡核苷酸, oligodeoxynucleotides, CpG ODN, 瑞喹莫德, Resiquimod, R848, 咪喹莫特, Imiquimod, R837, dsRNA, Toll, 免疫调节, 免疫激活, immune activation agent, 溶瘤, oncolytic, 单纯疱疹病毒, Herpes simplex virus, HSV-1, 自体, autologous, 肿瘤细胞裂解物, tumor cell lysate, 郑州威瑞, weirui biotechnology, 韩志强, 李文, 邢风云, 万娜</p>																																
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 108135934 A (永恒生物科技股份有限公司) 2018年 6月 8日 (2018 - 06 - 08) 权利要求1-5, 14-27, 35-37, 41-42, 说明书第0007, 0013, 0038-0045, 0084, 0285-0333段</td> <td>1-35</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2018/127713 A1 (REPLIMUNE LIMITED) 2018年 7月 12日 (2018 - 07 - 12) 权利要求11-12, 20-22, 32, 36, 说明书第30页第3-12, 29-31行</td> <td>23-31, 33-35</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 107001478 A (诺华股份有限公司 等) 2017年 8月 1日 (2017 - 08 - 01) 权利要求141, 说明书第0198-0207, 0219, 0786-0791, 0804-0814, 0858-0882, 1018-1026段</td> <td>1-35</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 108289942 A (迈斯免疫公司) 2018年 7月 17日 (2018 - 07 - 17) 权利要求1, 28-31, 40, 57-59, 61, 63-69, 72-78, 96-102, 124-131, 说明书第0141-0162段, 图3</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2017/021791 A1 (GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY DEVELOPMENT LIMITED) 2017年 2月 9日 (2017 - 02 - 09) 权利要求1-20, 说明书第22, 41-58页</td> <td>1-22</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <table border="1"> <tr> <td>* 引用文件的具体类型:</td> <td>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</td> </tr> <tr> <td>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</td> <td>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</td> </tr> <tr> <td>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</td> <td>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</td> </tr> <tr> <td>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</td> <td>“&” 同族专利的文件</td> </tr> <tr> <td>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</td> <td></td> </tr> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 108135934 A (永恒生物科技股份有限公司) 2018年 6月 8日 (2018 - 06 - 08) 权利要求1-5, 14-27, 35-37, 41-42, 说明书第0007, 0013, 0038-0045, 0084, 0285-0333段	1-35	X	WO 2018/127713 A1 (REPLIMUNE LIMITED) 2018年 7月 12日 (2018 - 07 - 12) 权利要求11-12, 20-22, 32, 36, 说明书第30页第3-12, 29-31行	23-31, 33-35	X	CN 107001478 A (诺华股份有限公司 等) 2017年 8月 1日 (2017 - 08 - 01) 权利要求141, 说明书第0198-0207, 0219, 0786-0791, 0804-0814, 0858-0882, 1018-1026段	1-35	X	CN 108289942 A (迈斯免疫公司) 2018年 7月 17日 (2018 - 07 - 17) 权利要求1, 28-31, 40, 57-59, 61, 63-69, 72-78, 96-102, 124-131, 说明书第0141-0162段, 图3	1-22	X	WO 2017/021791 A1 (GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY DEVELOPMENT LIMITED) 2017年 2月 9日 (2017 - 02 - 09) 权利要求1-20, 说明书第22, 41-58页	1-22	* 引用文件的具体类型:	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件	“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性	“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性	“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)	“&” 同族专利的文件	“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件		“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																														
X	CN 108135934 A (永恒生物科技股份有限公司) 2018年 6月 8日 (2018 - 06 - 08) 权利要求1-5, 14-27, 35-37, 41-42, 说明书第0007, 0013, 0038-0045, 0084, 0285-0333段	1-35																														
X	WO 2018/127713 A1 (REPLIMUNE LIMITED) 2018年 7月 12日 (2018 - 07 - 12) 权利要求11-12, 20-22, 32, 36, 说明书第30页第3-12, 29-31行	23-31, 33-35																														
X	CN 107001478 A (诺华股份有限公司 等) 2017年 8月 1日 (2017 - 08 - 01) 权利要求141, 说明书第0198-0207, 0219, 0786-0791, 0804-0814, 0858-0882, 1018-1026段	1-35																														
X	CN 108289942 A (迈斯免疫公司) 2018年 7月 17日 (2018 - 07 - 17) 权利要求1, 28-31, 40, 57-59, 61, 63-69, 72-78, 96-102, 124-131, 说明书第0141-0162段, 图3	1-22																														
X	WO 2017/021791 A1 (GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY DEVELOPMENT LIMITED) 2017年 2月 9日 (2017 - 02 - 09) 权利要求1-20, 说明书第22, 41-58页	1-22																														
* 引用文件的具体类型:	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件																															
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性																															
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性																															
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)	“&” 同族专利的文件																															
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件																																
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件																																
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																															
2020年 8月 3日	2020年 8月 18日																															
ISA/CN的名称和邮寄地址	授权官员																															
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	郝佳																															
传真号 (86-10)62019451	电话号码 86-(10)-53961967																															

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 2014/022138 A2 (YEUNG, A.W.H.) 2014年 2月 6日 (2014 - 02 - 06) 权利要求1, 5, 9-13	32-35
X	KASIEWICZ, M.J. 等. "Toll-like receptor ligands in conjunction with agonist anti-OX40 mAb immunotherapy possess differential capacity to revive anergic self-reactive CD8 T cells." The Journal of Immunology, 第196卷, 第1 supplement期, 2016年 5月 1日 (2016 - 05 - 01), 摘要	1-22
X	V00, K.S. 等. "Selective targeting of Toll-like receptors and OX40 inhibit regulatory T-cell function in follicular lymphoma." International Journal of Cancer, 第135卷, 2014年 4月 26日 (2014 - 04 - 26), 摘要, 第2834-2846页	1-22

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求： 19-21, 33-34
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求19-21, 33-34涉及一种在有需要的受试者中通过诱导免疫细胞活性治疗肿瘤的方法，也即权利要求19-21, 33-34涉及PCT细则39.1定义的不要国际检索单位检索的主题：(iv) 处置人体或动物体的外科手术方法或治疗方法，以及诊断方法。国际检索基于有效量的所述组合在制备用于诱导免疫细胞活性治疗肿瘤的药物中的用途作出。
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/090631

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	108135934	A	2018年 6月 8日	EP	3365062	A4	2019年 7月 17日
				JP	2018530624	A	2018年 10月 18日
				WO	2017070110	A1	2017年 4月 27日
				US	2018318365	A1	2018年 11月 8日
				TW	201722477	A	2017年 7月 1日
				EP	3365062	A1	2018年 8月 29日
WO	2018/127713	A1	2018年 7月 12日	CA	3049496	A1	2018年 7月 12日
				AU	2018205763	A1	2019年 6月 20日
				IL	267949	D0	2019年 9月 26日
				BR	112019013215	A2	2019年 12月 10日
				KR	20190104055	A	2019年 9月 5日
				US	2019343903	A1	2019年 11月 14日
				EP	3565568	A1	2019年 11月 13日
				JP	2020503871	A	2020年 2月 6日
				CN	110198724	A	2019年 9月 3日
				GB	201700350	D0	2017年 2月 22日
				MX	2019008146	A	2019年 10月 9日
CN	107001478	A	2017年 8月 1日	AU	2015333687	A1	2017年 4月 27日
				TW	201620940	A	2016年 6月 16日
				BR	112017007379	A2	2017年 12月 19日
				CR	20170143	A	2017年 6月 19日
				US	2018186882	A1	2018年 7月 5日
				KR	20170069257	A	2017年 6月 20日
				PE	10672017	A1	2017年 7月 24日
				US	9988452	B2	2018年 6月 5日
				EC	SP17029218	A	2019年 2月 28日
				TN	2017000129	A1	2018年 10月 19日
				SG	11201702401R	A	2017年 4月 27日
				CA	2964367	A1	2016年 4月 21日
				PE	20171067	A1	2017年 7月 24日
				PH	12017500692	A1	2017年 10月 9日
				EP	3206711	A1	2017年 8月 23日
				WO	2016061142	A1	2016年 4月 21日
				GT	201700081	A	2018年 11月 27日
				UY	36351	A	2016年 6月 1日
				US	2016108123	A1	2016年 4月 21日
				EA	201790834	A1	2018年 1月 31日
IL	251563	D0	2017年 5月 29日				
CU	20170052	A7	2017年 11月 7日				
MX	2017004810	A	2017年 10月 16日				
CL	2017000888	A1	2017年 8月 18日				
JP	2017536099	A	2017年 12月 7日				
CN	108289942	A	2018年 7月 17日	RU	2018115200	A	2019年 10月 28日
				RU	2018115200	A3	2020年 2月 20日
				WO	2017064571	A1	2017年 4月 20日
				US	2017087234	A1	2017年 3月 30日
				US	2017095546	A1	2017年 4月 6日
				US	9861689	B2	2018年 1月 9日
				JP	2018529706	A	2018年 10月 11日
				AU	2016337411	A1	2018年 4月 12日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/090631

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				CA	2998991	A1	2017年 4月 20日
				EP	3352783	A1	2018年 8月 1日
WO	2017/021791	A1	2017年 2月 9日	ZA	201800468	B	2019年 7月 31日
				PH	12018500254	A1	2018年 8月 13日
				BR	112018002530	A2	2018年 9月 25日
				DO	P2018000034	A	2018年 10月 31日
				AU	2016304401	B2	2019年 5月 16日
				IL	257067	D0	2018年 3月 29日
				TW	201716084	A	2017年 5月 16日
				JP	2018525378	A	2018年 9月 6日
				EP	3331560	A1	2018年 6月 13日
				CN	108025073	A	2018年 5月 11日
				KR	20180032641	A	2018年 3月 30日
				CA	2994910	A1	2017年 2月 9日
				CL	2018000303	A1	2018年 7月 6日
				CR	20180080	A	2018年 4月 2日
				US	2019338042	A1	2019年 11月 7日
				EA	201890457	A1	2018年 9月 28日
				US	2017275371	A1	2017年 9月 28日
				AU	2016304401	A1	2018年 2月 15日
				MX	2018001515	A	2018年 3月 15日
WO	2014/022138	A2	2014年 2月 6日	US	2020171151	A1	2020年 6月 4日
				AU	2013296919	A1	2015年 1月 22日
				US	2015190505	A1	2015年 7月 9日
				AU	2016203329	A1	2016年 6月 9日
				EP	2879498	A4	2016年 3月 30日
				JP	2015523412	A	2015年 8月 13日
				KR	20170039774	A	2017年 4月 11日
				WO	2014022138	A3	2014年 3月 27日
				KR	20150038066	A	2015年 4月 8日
				EP	2879498	A2	2015年 6月 10日
				CA	2877414	A1	2014年 2月 6日