



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202227611 A

(43)公開日：中華民國 111 (2022) 年 07 月 16 日

(21)申請案號：110136270

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 09 月 29 日

(51)Int. Cl. : *C12N1/20 (2006.01)* *A61K39/395 (2006.01)*
A61K35/74 (2015.01) *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2020/09/30 日本 2020-165470

(71)申請人：日本國立癌症研究中心 (日本) NATIONAL CANCER CENTER (JP)

日本

國立研究開發法人理化學研究所 (日本) RIKEN (JP)

日本

(72)發明人：西川博嘉 NISHIKAWA, HIROYOSHI (JP)；福岡聖大 FUKUOKA, SHOTA (JP)；

辨野義己 BENNO, YOSHIMI (JP)；重野佑布子 SHIGENO, YUKO (JP)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：37 項 圖式數：19 共 73 頁

(54)名稱

瘤胃球菌科腸內細菌的單離方法、製造方法、醫藥組成物、誘導方法、及第 1 型樹狀細胞

(57)摘要

本發明之課題為提供一種醫藥組成物，其可增強免疫檢查點抑制劑對於對象中之腫瘤或癌的效果。本發明之解決手段為提供一種醫藥組成物，其包含與免疫檢查點抑制劑組合投與之瘤胃球菌科腸內細菌的菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物。

The purpose of the present invention is to provide a pharmaceutical composition being able to enhance the effect of immune checkpoint inhibitors against to the tumor or cancer in a subject.

The solution of the present invention is to provide a pharmaceutical composition, which comprises bacteria body, culture supernatant, metabolites and/or bacteria extracts of Ruminococcaceae enteric bacteria administrating combined with immune checkpoint inhibitors.

指定代表圖：



【發明摘要】

【中文發明名稱】 瘤胃球菌科腸內細菌的單離方法、製造方法、醫藥組成物、誘導方法、及第1型樹狀細胞

【英文發明名稱】 ISOLATING METHOD, MANUFACTURING METHOD, PHARMACEUTICAL COMPOSITION, INDUCTION METHOD AND TYPE 1 DENDRITIC CELLS OF RUMINOCOCCACEAE ENTERIC BACTERIA

【中文】

本發明之課題為提供一種醫藥組成物，其可增強免疫檢查點抑制劑對於對象中之腫瘤或癌的效果。

本發明之解決手段為提供一種醫藥組成物，其包含與免疫檢查點抑制劑組合投與之瘤胃球菌科腸內細菌的菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物。

【英文】

The purpose of the present invention is to provide a pharmaceutical composition being able to enhance the effect of immune checkpoint inhibitors against to the tumor or cancer in a subject.

The solution of the present invention is to provide a pharmaceutical composition, which comprises bacteria body, culture supernatant, metabolites and/or bacteria extracts of Ruminococcaceae enteric bacteria administrating combined with immune checkpoint inhibitors.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 瘤胃球菌科腸內細菌的單離方法、製造方法、醫藥組成物、誘導方法、及第1型樹狀細胞

【英文發明名稱】 ISOLATING METHOD, MANUFACTURING METHOD, PHARMACEUTICAL COMPOSITION, INDUCTION METHOD AND TYPE 1 DENDRITIC CELLS OF RUMINOCOCCACEAE ENTERIC BACTERIA

【技術領域】

【0001】 本發明係有關用於增強免疫檢查點抑制劑對於對象之腫瘤或癌之效果的醫藥組成物。尤其，本發明係關於與免疫檢查點抑制劑組合投與的包含瘤胃球菌科(Ruminococcaceae)腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物的醫藥組成物。

【先前技術】

【0002】 藉由以免疫抑制機構作為標的之治療在複數種癌腫瘤中帶來顯著之臨床效果者，為免疫檢查點抑制劑。免疫檢查點抑制劑被批准用在所謂「惡性黑素瘤、肺癌、腎細胞癌、頭頸部癌、胃癌」之複數種癌腫瘤上。然而，就免疫檢查點抑制劑單劑而言，至今稱不上得到充分的治療效果。

【0003】 亦提倡嘗試藉由相異之免疫抑制阻礙療法藥的併用或與現有認可藥之併用，同時解除複數種免疫抑制機構，將抗腫瘤免疫進一步激活，使有

效性增強(專利文獻 1)，正進行數種臨床試驗。然而，就現況而言，可說難以得到充分之效果。

【0004】 已知以免疫檢查點分子及控制性 T 細胞為中心之免疫抑制網絡，在癌微小環境中被構築，而引起免疫寬容(非專利文獻 1)。相繼報導腸內常在細菌會影響此等免疫回應(非專利文獻 2、非專利文獻 3)。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0005】

[專利文獻 1] 日本特表 2015-518826

[非專利文獻]

【0006】

[非專利文獻 1] Nature Reviews Cancer, 12, 252-264 (2012)

[非專利文獻 2] Science, 359, 91-97 (2018)

[非專利文獻 3] Science, 359, 97-103 (2018)

【發明內容】

[發明所欲解決之課題]

【0007】 本發明之目的為提供一種醫藥組成物，其可增強免疫檢查點抑制劑對於對象中之腫瘤或癌的效果。

[用於解決課題之手段]

【0008】 本發明人等發現在解析接受免疫檢查點抑制劑之治療的胃癌・肺癌患者之腸內細菌時，發現免疫檢查點抑制劑之奏效案例，多具有瘤胃球菌

科之未分類屬細菌。再者，本發明人等為了檢討有關特定細菌對於抗腫瘤免疫的影響，進行來自奏效案例之腸內容物之細菌的單離培養。將單離之細菌投與至藉由抗菌藥投與而使固有之腸內細菌減少的小鼠，檢討與免疫檢查點抑制劑之併用效果時，發現具有 16S rRNA 基因的瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)，能使免疫檢查點抑制劑之抗腫瘤效果增強，其中該 16S rRNA 基因具有序列編號 1 所示之鹼基序列，於是完成本發明。

【0009】亦即，本發明係關於下列項目，然而不以此等為限。

【0010】 [1]

一種單離方法，其為瘤胃球菌科腸內細菌之單離方法，其包含：

【0011】 (i)將從哺乳動物得到之腸內容物用厭氧性稀釋液進行階段稀釋，生成腸內容物稀釋液的步驟，其中該哺乳動物為投與免疫檢查點抑制劑之哺乳動物，且投與後之 CT 影像評價得到 PR(部分奏效)以上之評價，或經過半年以上，得到 SD(病情穩定)之評價；

【0012】 (ii)將該腸內容物稀釋液之一部分接種於固體培養基，在厭氧性條件下培養，於固體培養基上生成源自腸內容物稀釋液所含之微生物之單一殖株(clone)的菌落(可為複數)的步驟；

【0013】 (iii)確認該菌落所含之細菌是否為具有與序列編號 1 所示之鹼基序列具有 95%以上的序列相同性之 16S rRNA 基因者的步驟；及

【0014】 (iv)取得確認具有與序列編號 1 所示之鹼基序列具有 95%以上的序列相同性之 16S rRNA 基因之細菌的步驟。

【0015】 [2]

如[1]記載之單離方法，其中免疫檢查點抑制劑為針對選自 PD-1、CTLA-4、TIM-3、BTLA、LAG-3、A2aR、KIR、VISTA、TIGIT、PD-L1、PD-L2、CD80、CD86、GAL-9、HVEM、CD160、MHC 第 II 型、B7-H3、B7-H4、B7-H5、B7-H6、及 B7-H7 構成之群組的任一種免疫檢查點分子之抑制劑或該等抑制劑之 2 種以上的組合。

【0016】 [3]

如[2]記載之單離方法，其中免疫檢查點抑制劑係選自針對前述免疫檢查點分子的抗體、抗體之抗原結合性斷片、及該等之組合。

【0017】 [4]

如[3]記載之單離方法，其中免疫檢查點抑制劑係選自保疾伏(nivolumab)、吉舒達(pembrolizumab)、西米普利單抗(cemiplimab)、百穩益(avelumab)、癌自禦(atezolizumab)、及度伐魯單抗(durvalumab)所構成之群組。

【0018】 [5]

如[1]至[4]中任一項記載之單離方法，其中哺乳動物為人類。

【0019】 [6]

一種製造方法，其為醫藥組成物之製造方法，其包含將藉由[1]至[5]中任一項記載之單離方法所單離的瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物摻合，形成醫藥組成物的步驟。

【0020】 [7]

如[6]記載之製造方法，其中醫藥組成物為與免疫檢查點抑制劑組合投與的醫藥組成物。

【0021】 [8]

一種醫藥組成物，其係藉由[6]或[7]記載之製造方法所製造者。

【0022】 [9]

一種醫藥組成物，其包含與免疫檢查點抑制劑組合投與的瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物。

【0023】 [10]

如[9]記載之醫藥組成物，其包含瘤胃球菌科腸內細菌之活菌體。

【0024】 [11]

如[9]或[10]記載之醫藥組成物，其中瘤胃球菌科腸內細菌為具有 16S rRNA 基因的細菌，該 16S rRNA 基因具有與序列編號 1 所示之鹼基序列 95%以上的相同性。

【0025】 [12]

如[8]至[11]中任一項記載之醫藥組成物，其中免疫檢查點抑制劑為針對選自 PD-1、CTLA-4、TIM-3、BTLA、LAG-3、A2aR、KIR、VISTA、TIGIT、PD-L1、PD-L2、CD80、CD86、GAL-9、HVEM、CD160、MHC 第 II 型、B7-H3、B7-H4、B7-H5、B7-H6、及 B7-H7 所構成之群組中的任一種免疫檢查點分子之抑制劑或 2 種以上此等抑制劑的組合。

【0026】 [13]

如[12]記載之醫藥組成物，其中免疫檢查點抑制劑為選自針對前述免疫檢查點分子的抗體、抗體之抗原結合性斷片、及此等之組合。

【0027】 [14]

如[13]記載之醫藥組成物，其中免疫檢查點抑制劑係選自保疾伏(nivolumab)、吉舒達(pembrolizumab)、西米普利單抗(cemiplimab)、百穩益(avelumab)、癌自禦(atezolizumab)、及度伐魯單抗(durvalumab)所構成之群組。

【0028】 [15]

如[8]至[14]中任一項記載之醫藥組成物，其係藉由經口投與、經管投與、或灌腸投與而投與。

【0029】 [16]

如[8]至[15]中任一項記載之醫藥組成物，其中將免疫檢查點抑制劑與瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物同時投與。

【0030】 [17]

如[16]記載之醫藥組成物，其包含免疫檢查點抑制劑、及瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物。

【0031】 [18]

如[8]至[15]中任一項記載之醫藥組成物，其中將免疫檢查點抑制劑、與瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物分別投與。

【0032】 [19]

如[18]記載之醫藥組成物，其中在投與免疫檢查點抑制劑之前，投與瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物。

【0033】 [20]

如[18]記載之醫藥組成物，其中在投與免疫檢查點抑制劑之後，投與瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物。

【0034】 [21]

如[8]至[20]中任一項記載之醫藥組成物，其係用於在對象中，將 CD8 陽性 T 細胞活化。

【0035】 [22]

如[8]至[21]中任一項記載之醫藥組成物，其係用於在具有腫瘤或癌之對象中，增強對腫瘤或癌的免疫回應。

【0036】 [23]

如[22]記載之醫藥組成物，其在與單獨投與前述免疫檢查點抑制劑的情況相比，對腫瘤或癌之免疫回應的增強效果大。

【0037】 [24]

如[8]至[23]中任一項記載之醫藥組成物，其係用於治療對象中之腫瘤或癌。

【0038】 [25]

如[24]記載之醫藥組成物，其中前述治療使腫瘤或癌消失、縮小、或穩定。

【0039】 [26]

如[25]記載之醫藥組成物，其和單獨投與前述免疫檢查點抑制劑的情況相比，使腫瘤或癌消失、縮小、或穩定之效果較大。

【0040】 [27]

如[8]至[25]中任一項記載之醫藥組成物，其係用於抑制對象中的腫瘤或癌之復發或轉移。

【0041】 [28]

如[27]記載之醫藥組成物，其中和單獨投與前述免疫檢查點抑制劑的情況相比，腫瘤或癌之復發或轉移的抑制效果較大。

【0042】 [29]

如[22]至[28]中任一項記載之醫藥組成物，其係進一步與選自手術療法、化學療法、及放射線療法所構成之群組中的 1 種以上療法組合投與。

【0043】 [30]

如[22]至[29]中任一項記載之醫藥組成物，其中腫瘤或癌係選自惡性胸膜中皮瘤、惡性腹膜中皮瘤、惡性黑素瘤、惡性淋巴瘤、腦腫瘤、神經膠瘤、神經母細胞瘤、胸腺瘤、消化道間質腫瘤、神經內分泌腫瘤、睪丸腫瘤、軟部肉瘤、腎母細胞瘤、肝母細胞瘤、胚細胞腫瘤、網膜母細胞瘤、骨肉瘤、尤因氏肉瘤(Ewing's sarcoma)、橫紋肌肉瘤、急性骨髓性白血病、急性淋巴性白血病、慢性骨髓性白血病、慢性淋巴性白血病、骨髓異形成症候群、成人 T 細胞白血病、多發性骨髓瘤、口腔咽頭癌、喉頭癌、舌癌、鼻腔癌、副鼻腔癌、甲狀腺癌、耳下腺癌、顎下腺癌、聽器癌、肺癌、乳癌、胸腺癌、食道癌、胃癌、大腸癌、小腸癌、肝細胞癌、膽管癌、膽囊癌、胰臟癌、腎細胞癌、腎盂癌、輸尿管癌、膀胱癌、尿膜管癌、副腎癌、腹膜癌、前列腺癌、子宮頸癌、子宮體癌、卵巢癌、陰道癌、外陰癌、基底細胞癌、有棘細胞癌、神經內分泌癌、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、及原發不明癌所構成之群組。

【0044】 [31]

如[8]至[20]中任一項記載之醫藥組成物，其係用於使哺乳動物之腸內常在菌的多樣性比其投與前增加。

【0045】 [32]

一種增強對腫瘤或癌之免疫回應的方法，其包含將免疫檢查點抑制劑之有效量，與包含瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物的醫藥組成物之有效量組合投與至具有腫瘤或癌之對象。

【0046】 [33]

如[32]記載之方法，其中和單獨投與前述免疫檢查點抑制劑的情況相比，對腫瘤或癌之免疫回應的增強效果較大。

【0047】 [34]

一種腫瘤或癌之治療方法，其包含將免疫檢查點抑制劑之有效量，及包含瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物的醫藥組成物之有效量，組合投與至具有腫瘤或癌之對象。

【0048】 [35]

如[34]記載之方法，其中前述治療使腫瘤或癌消失、縮小、或穩定。

【0049】 [36]

如[35]記載之方法，其中和單獨投與前述免疫檢查點抑制劑的情況相比，使腫瘤或癌消失、縮小、或穩定之效果較大。

【0050】 [37]

一種抑制對象中之腫瘤或癌之復發或轉移的方法，其包含將免疫檢查點抑制劑之有效量，與包含瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物的醫藥組成物之有效量組合投與至具有腫瘤或癌的對象。

【0051】 [38]

如[37]記載之方法，其中與前述免疫檢查點抑制劑之單獨投與的情況相比，腫瘤或癌之復發或轉移的抑制效果較大。

【0052】 [39]

如[32]至[38]中任一項記載之方法，其中係將免疫檢查點抑制劑，與瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物同時投與。

【0053】 [40]

如[32]至[38]中任一項記載之方法，其中係將免疫檢查點抑制劑，與瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物分別投與。

【0054】 [41]

如[40]記載之方法，其中在免疫檢查點抑制劑之投與前，將瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物投與。

【0055】 [42]

如[40]記載之醫藥組成物，其中在免疫檢查點抑制劑之投與後，將瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物投與。

【0056】 [43]

如[32]至[42]中任一項記載之方法，其係進一步與選自手術療法、化學療法、及放射線療法所構成之群組中的 1 種以上之療法組合而實施。

【0057】 [44]

如[32]至[43]中任一項記載之方法，其中腫瘤或癌係選自惡性胸膜中皮瘤、惡性腹膜中皮瘤、惡性黑素瘤、惡性淋巴瘤、腦腫瘤、神經膠瘤、神經母細胞瘤、胸腺瘤、消化管間質腫瘤、神經內分泌腫瘤、睪丸腫瘤、軟部肉瘤、腎母細胞瘤、肝母細胞瘤、胚細胞腫瘤、網膜母細胞瘤、骨肉瘤、尤因氏肉瘤(Ewing's sarcoma)、橫紋肌肉瘤、急性骨髓性白血病、急性淋巴性白血病、慢性骨髓性白血病、慢性淋巴性白血病、骨髓異形成症候群、成人 T 細胞白血

病、多發性骨髓瘤、口腔咽頭癌、喉頭癌、舌癌、鼻腔癌、副鼻腔癌、甲狀腺癌、耳下腺癌、顎下腺癌、聽器癌、肺癌、乳癌、胸腺癌、食道癌、胃癌、大腸癌、小腸癌、肝細胞癌、膽管癌、膽囊癌、胰臟癌、腎細胞癌、腎盂・尿管癌、膀胱癌、尿膜管癌、副腎癌、腹膜癌、前列腺癌、子宮頸癌、子宮體癌、卵巢癌、陰道癌、外陰癌、基底細胞癌、有棘細胞癌、神經內分泌癌、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、及原發不明癌構成之群組。

【0058】 [45]

一種使哺乳動物之腸內常在菌與投與前相比較為增加的方法，其包含對該哺乳動物投與包含瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物之醫藥組成物的有效量。

【0059】 [46]

一種醫藥組成物，其為用於誘導樹狀細胞前驅細胞生成第 1 型樹狀細胞之醫藥組成物，其包含 TLR4 以外的複數種 TLR 之促效劑(agonist)。

【0060】 [47]

如[46]記載之醫藥組成物，其中前述複數種 TLR 為 TLR1、TLR3、TLR5、TLR7、及 TLR9。

【0061】 [48]

如[47]記載之醫藥組成物，其中前述複數種 TLR 為 TLR5、TLR7、及 TLR9。

【0062】 [49]

如[48]記載之醫藥組成物，其中前述促效劑為鞭毛蛋白(flagellin)、R848(雷西莫特(resiquimod))、及 CpG-ODN 之組合。

【0063】 [50]

如[46]至[48]中任一項記載之醫藥組成物，其中前述促效劑為瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物。

【0064】 [51]

如[46]至[50]中任一項記載之醫藥組成物，其係用於在對象中，治療腫瘤或癌。

【0065】 [52]

一種誘導樹狀細胞前驅細胞生成第 1 型樹狀細胞之方法，其包含使 TLR4 以外的複數種 TLR 之促效劑與樹狀細胞前驅細胞接觸。

【0066】 [53]

如[52]記載之方法，其係於試管內(in vitro)進行。

【0067】 [54]

如[52]或[53]記載之方法，其中前述複數之 TLR 為 TLR5、TLR7、及 TLR9。

【0068】 [55]

如[54]記載之方法，其中前述促效劑為鞭毛蛋白(flagellin)、R848(雷西莫特(resiquimod))、及 CpG-ODN 之組合。

【0069】 [56]

如[52]至[55]中任一項記載之方法，其中前述促效劑為瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物。

【0070】 [57]

一種第 1 型樹狀細胞，其係藉由[52]至[56]中任一項記載之方法而被誘導生成。

【0071】 [58]

一種包含如[57]記載之第 1 型樹狀細胞的醫藥組成物，其係用於在對象中，治療腫瘤或癌。

【0072】 [59]

一種包含如[57]記載之第 1 型樹狀細胞的醫藥組成物，其係用於在具有腫瘤或癌之對象中，增強對腫瘤或癌之免疫回應。

[發明之效果]

【0073】 藉由本發明，可增強對於對象之腫瘤或癌的免疫檢查點抑制劑之效果。

【圖式簡單說明】

【0074】 [圖 1]圖 1 為免疫檢查點抑制劑之奏效案例及非奏效案例中，比較腸內常在菌的 LEfSe 解析之結果。

【0075】 [圖 2]圖 2 為對於腸內常在菌中各種細菌群之比率之中央值高的患者群及低的患者群，比較無惡化生存期間之結果。

【0076】 [圖 3]圖 3 為檢討在移植有源自免疫檢查點抑制劑之奏效案例的腸內容物，或源自非奏效案例之腸內容物的小鼠腫瘤模型中，免疫檢查點抑制劑之效果的結果。

【0077】 [圖 4]圖 4 為在經抗生素處理之小鼠腫瘤模型中，檢討對於移植有源自免疫檢查點抑制劑之奏效案的腸內容物者，免疫檢查點抑制劑之效果的結果。

【0078】 [圖 5]圖 5 為源自免疫檢查點抑制劑之奏效案例的腸內容物中細菌之 16S rRNA 基因序列的系統解析結果。

【0079】 [圖 6]圖 6 為將各種細菌移植至經抗生素處理的小鼠腫瘤模型中，檢討免疫檢查點抑制劑之效果的結果。

【0080】 [圖 7]圖 7 為將普通擬桿菌(普通擬桿菌(*B. vulgatus*))或瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)移植至經抗生物質處理之小鼠腫瘤模型中，檢討免疫檢查點抑制劑之效果的結果。

【0081】 [圖 8]圖 8 為在與瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)或普通擬桿菌(普通擬桿菌(*B. vulgatus*))或媒液(vehicle)進行共培養之樹狀細胞中，測定樹狀細胞成熟化標記之流式細胞分析(flow cytometry)的結果。

【0082】 [圖 9]圖 9 為將與細菌共培養後之樹狀細胞與源自 OT-I 小鼠之 CD8⁺T 細胞共培養，並以 1nM 或 100nM 之 N4 肽刺激之情況下，CD8⁺T 細胞之活化標記(IFN- γ)的測定結果。

【0083】 [圖 10]圖 10 為將與細菌共培養後之樹狀細胞，與源自 OT-I 小鼠之 CD8⁺T 細胞共培養，並以 N4 肽或 Q4H7 肽刺激之情況下，TCR 信號(ZAP70)及 CD28 信號(Erk)的測定結果。

【0084】 [圖 11]圖 11 為分別在將與瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)共培養之樹狀細胞和 CD8⁺T 細胞共培養的情況，及將與普通擬桿菌(普通擬桿菌(*B. vulgatus*))共培養之樹狀細胞和 CD8⁺T 細胞共培養的情況，調查相

異濃度之 N4 肽刺激 (0nM、1nM、10nM、100nM) 對於 TCR 信號 (ZAP70(pZAP70))及 CD28 信號(Erk(pErk)、Akt(pAkt)、S6(pS6)) 之效果的結果。

【0085】 [圖 12]圖 12 為在將源自免疫檢查點抑制劑之奏效案例的腸內容物或源自非奏效案例之腸內容物移植至經抗生素處理的小鼠腫瘤模型中，檢討對於經口投與瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)單菌或普通擬桿菌(普通擬桿菌(*B. vulgatus*))單菌者，免疫檢查點抑制劑之效果的結果。

【0086】 [圖 13]圖 13 為分別在移植腸內容物後及投與單菌後，對於回收的小鼠腸內容物進行基於 16S rRNA 基因的整合解析(meta-analysis)，並比較各個腸內容物之細菌叢之多樣性的結果。

【0087】 [圖 14]圖 14 表示將源自小鼠骨髓之樹狀細胞，及瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)或普通擬桿菌(普通擬桿菌(*B. vulgatus*))或 LPS 或媒液(PBS)共培養後，從樹狀細胞萃取 RNA，進行轉錄組(transcriptome)解析的結果。

【0088】 [圖 15]圖 15 表示皮下移植 MC38 培養細胞株後，從經口投與瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)或普通擬桿菌(普通擬桿菌(*B. vulgatus*))之小鼠採集的各組織(腫瘤附近淋巴節、黏膜固有層、腸管膜淋巴節)之 FACS 解析結果。

【0089】 [圖 16]圖 16 表示將 MC38 培養細胞株皮下移植後，從經口投與瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)或普通擬桿菌(普通擬桿菌(*B. vulgatus*))之小鼠採集的腫瘤之 FACS 解析結果。

【0090】 [圖 17]圖 17 表示將源自骨髓之樹狀細胞前驅細胞，與 FLT3L、及瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)或普通擬桿菌(普通擬桿菌(*B. vulgatus*))或 LPS 或 PBS 共培養後，對於 IRF8 之表現進行 FACS 解析的結果。

【0091】 [圖 18]圖 18 表示將源自小鼠骨髓之樹狀細胞，與瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)或普通擬桿菌(普通擬桿菌(*B. vulgatus*))或 LPS 或 PBS 共培養後，對於 p-S6K 及 p-STAT3 之表現進行 FACS 解析的結果。

【0092】 [圖 19]圖 19 表示藉由 TLR 複合刺激，而誘導樹狀細胞前驅細胞生成第 1 型樹狀細胞。A 表示以瘤胃球菌 YB328 刺激之樹狀細胞，及以普通擬桿菌(*B. vulgatus*)刺激之樹狀細胞中，著眼於各種 TLR 的轉錄組(transcriptome)解析結果。B 表示將從 MyD88 基因剔除(knock-out)小鼠採集的源自骨髓之樹狀細胞，藉由瘤胃球菌 YB328 或媒液刺激，對於 CD103 陽性 CD11b 陰性樹狀細胞之比率進行 FACS 解析的結果。C 表示藉由 TLR5、7、及 9 之各種促效劑的各種混合物，刺激源自小鼠骨髓之樹狀細胞，對於 CD103 陽性 CD11b 陰性樹狀細胞之比率進行 FACS 解析的結果。

【實施方式】

[用於實施發明之型態]

【0093】 若藉由本發明之一個面向，可提供瘤胃球菌科腸內細菌之單離方法。

【0094】 本發明之瘤胃球菌科腸內細菌之單離方法，包含：

【0095】 (i)在投與免疫檢查點抑制劑之哺乳動物，將從藉由投與後之 CT 影像評價得到 PR(部分奏效)以上之評價，或經過半年以上，得到 SD(病情穩定)

之評價的該哺乳動物所得到之腸內容物，使用厭氧性稀釋液，進行階段稀釋，生成腸內容物稀釋液的步驟；

【0096】 (ii)將該腸內容物稀釋液之一部分接種於固體培養基，在厭氧性條件下培養，於固體培養基上生成源自腸內容物稀釋液所含之微生物的單一殖株(clon)之菌落(可為複數)的步驟；

【0097】 (iii)確認該菌落所含之細菌，是否為具有與序列編號 1 所示之鹼基序列具有 95%以上的序列相同性之 16S rRNA 基因者的步驟；及

【0098】 (iv)取得確認具有與序列編號 1 所示之鹼基序列具有 95%以上的序列相同性之 16S rRNA 基因之細菌的步驟。

【0099】 <瘤胃球菌科腸內細菌之單離方法>

【0100】 本發明之瘤胃球菌科腸內細菌，藉由與免疫檢查點抑制劑組合投與，可增強對象中對於腫瘤或癌的免疫檢查點抑制劑之效果。本發明人等驚奇地發現可將此種瘤胃球菌科腸內細菌，從免疫檢查點抑制劑之奏效案例的人類單離。

【0101】 <生成腸內容物稀釋液之步驟>

【0102】 本發明之瘤胃球菌科腸內細菌之單離方法，包含(i)在投與免疫檢查點抑制劑之哺乳動物，將從藉由投與後之 CT 影像評價得到 PR(部分奏效)以上之評價，或經過半年以上，得到 SD(病情穩定)之評價的該哺乳動物所得到之腸內容物，使用厭氧性稀釋液，進行階段稀釋，生成腸內容物稀釋液的步驟。

【0103】 CR(Complete Response，完全奏效)、PR(Partial Response，部分奏效)、SD(Stable Disease，病情穩定)、PD(Progressive Disease，進行)係作為腫

瘤或癌之消失、縮小、或穩定的指標，為本技術領域的一般評價基準。CR 意指腫瘤完全消失之狀態，PR 意指腫瘤之尺寸合計減少 30%以上的狀態，SD 意指腫瘤之尺寸無變化的狀態，PD 意指腫瘤之尺寸合計增加 20%以上，且絕對值亦增加 5mm 以上的狀態、或者出現新病變的狀態。腫瘤之尺寸可藉由 CT 影像評價而評價。就 CT 影像評價而言，例如可使用 RECIST ver1.1。

【0104】 在本發明之瘤胃球菌科腸內細菌之單離方法中，使用從哺乳動物得到之腸內容物，該哺乳動物係已投與免疫檢查點抑制劑之哺乳動物，且藉由投與後之 CT 影像評價得到 PR(部分奏效)以上之評價，或經半年以上，得到 SD(病情穩定)之評價者。其中，PR(部分奏效)以上之評價，意指 PR(部分奏效)或 CR(完全奏效)。

【0105】 本發明之瘤胃球菌科腸內細菌的單離方法，包含將上述腸內容物，使用厭氧性稀釋液進行階段稀釋，生成腸內容物稀釋液的步驟。就厭氧性稀釋液而言，只要對厭氧性細菌之生存不造成不良影響的稀釋液，可使用任一種，例如，可依照『腸內細菌之世界』光岡知足(1990)，朝倉書店之記載，使用該書中之厭氧性稀釋液(B)。稀釋倍率可適宜調整，然而為了固體培養基上的菌落生成，可於例如 10^{-6} 至 10^{-10} 之範圍製作 10 倍稀釋系列，選擇最適合菌落生成的稀釋倍率。

【0106】 <生成菌落之步驟>

【0107】 本發明之瘤胃球菌科腸內細菌的單離方法，包含將上述腸內容物稀釋液之一部分接種於固體培養基，在厭氧性條件下培養，於固體培養基上生成源自腸內容物稀釋液所含之微生物的單一殖株(clone)之菌落(可為複數)的步驟。

【0108】 就固體培養基而言，例如可使用 EG 瓊脂培養基。EG 瓊脂培養基之標準組成如下列所示。

【0109】 [表 1]

Lab-Lemco 粉末(Oxoid 公司)	2.4 g
朊蛋白胰 No.3 (BD-Difco 公司)	10.0 g
酵母萃取物(BD-Difco 公司)	5.0 g
Na ₂ HPO ₄	4.0 g
葡萄糖	1.5 g
可溶性澱粉	0.5 g
L-胱胺酸	0.2 g
洋菜膠	15.0 g
L-半胱胺酸鹽酸鹽	0.5 g
馬血液	50.0 mL
蒸餾水	950.0 mL

【0110】 厭氧條件意指氧不存在，就氣相而言，經氮氣、氫氣及二氧化碳置換的環境。實質上氧不存在之環境，可在能維持瘤胃球菌科腸內細菌可增殖之程度的氧分壓低之氛圍，於厭氧性槽室等密閉環境中達成。

【0111】 <確認細菌之 16S rRNA 基因之鹼基序列的步驟>

【0112】 本發明之瘤胃球菌科腸內細菌的單離方法，包含確認上述生成之菌落所含之細菌，是否為具有與序列編號 1 所示之鹼基序列具有 95%以上的序列相同性之 16S rRNA 基因者的步驟。

【0113】 本發明中之瘤胃球菌科腸內細菌，意指被歸類為厚壁菌門 (Firmicutes)梭菌綱(Clostridia)梭菌目(Clostridiales)瘤胃球菌科的絕對厭氧性細

菌，尤其意指與序列編號 1 所示之鹼基序列具有 95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、或 99%以上之序列相同性之 16S rRNA 基因的細菌。

【0114】 2個基因鹼基序列之相同性%，可藉由視覺檢查及數學的計算而決定，或者更佳而言，此比較可藉由使用電腦程式，比較序列資料而達成。代表性之較佳電腦程式，為遺傳學電腦組(Computer Group)(GCG；美國威斯康辛州麥迪遜)之Wisconsin Package 版本10.0程式「GAP」(Devereux, et al., 1984, Nucl. Acids Res., 12: 387)。依照本技術領域通常知識者所使用的其他序列比較程式，例如，藉由使用美國國立醫學圖書館之網址：

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bls.html>可利用的BLASTN程式，版本2.2.7，或者可使用UW-BLAST2.0運算(Algorithm)。關於UW-BLAST 2.0之標準預設參數之設定，記載於以下之網路位址：<http://blast.wustl.edu>。

【0115】 就確認上述生成之菌落所含的細菌，是否為與序列編號 1 所示之鹼基序列具有 95%以上的序列相同性之 16S rRNA 基因者的方法，例如，可列舉決定形成各菌落之細菌之 16S rRNA 基因的鹼基序列，與序列編號 1 之鹼基序列比較的方法。細菌之 16S rRNA 基因，可藉由使用周知之引子之 PCR 等而擴增，藉由標準定序(sequencing)方法而決定序列。

【0116】 <取得細菌之步驟>

【0117】 本發明之瘤胃球菌科腸內細菌的單離方法，包含(iv)取得被確認具有與序列編號 1 所示之鹼基序列具有 95%以上的序列相同性之 16S rRNA 基因之細菌的步驟。

【0118】 依照上述方法，確認具有與序列編號 1 所示之鹼基序列具有 95%以上的序列相同性之 16S rRNA 基因的瘤胃球菌科腸內細菌，可從菌落接

種於液體培養基，進一步大量培養而利用。就液體培養基而言，例如可使用上述 EG 瓊脂培養基組成之內，不含瓊脂的液體培養基(以下，亦簡稱為 EG 培養基)。

【0119】 <確認增強免疫檢查點抑制劑對腫瘤或癌之效果的步驟>

【0120】 本發明之瘤胃球菌科腸內細菌的單離方法，可視需要包含關於所取得之瘤胃球菌科腸內細菌，確認具有增強免疫檢查點抑制劑對腫瘤或癌之效果的步驟。例如，將所得之瘤胃球菌科腸內細菌與免疫檢查點抑制劑組合，投與至具有腫瘤或癌之小鼠、大鼠、人類等哺乳動物，並與免疫檢查點抑制劑單獨投與的情況比較，可確認免疫檢查點抑制劑之效果增強。具體而言，例如，與單獨投與免疫檢查點抑制劑的情況相比，將所得之瘤胃球菌科腸內細菌與免疫檢查點抑制劑組合投與的情況，若腫瘤或癌消失，或其尺寸縮小，或其尺寸無變化而穩定，可被評價為免疫檢查點抑制劑之效果增強。

【0121】 <用於醫藥組成物之瘤胃球菌科腸內細菌>

【0122】 若依照本發明之一個面向，可提供包含瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物的醫藥組成物及其製造方法。

【0123】 就本發明之醫藥組成物所用之瘤胃球菌科腸內細菌而言，以使用具有與序列編號 1 所示之鹼基序列有 95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、或 99%以上之序列相同性之 16S rRNA 基因者為較佳。就此種細菌而言，較佳可使用藉由上述單離方法單離的細菌。

【0124】 就本發明之醫藥組成物中所用的瘤胃球菌科腸內細菌而言，可例示本發明人等所單離之瘤胃球菌 YB328 (Ruminococcaceae YB328)。瘤胃球菌 YB328 (Ruminococcaceae YB328)，具有序列編號 1 所示之鹼基序列之 16S

rRNA 基因。本申請人自行將瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328) 寄存於日本國立研究開發法人理化學研究所內，進行維持・保存。本申請人保證在適用日本國專利法施行規則第 27 條之 3 各號的情況，在遵守各法令之條件下，將瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328) 出售給第三者。

【0125】 瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)，例如，可適合使用上述 EG 培養基，於厭氧性槽室內，在 37°C 培養。

【0126】 本發明之醫藥組成物可為包含複數種瘤胃球菌科腸內細菌者，亦可為包含單一種瘤胃球菌科腸內細菌者。就以單一種即可發揮效果之瘤胃球菌科腸內細菌而言，可列舉如瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)。若將包含如腸內容物之極多種多樣細菌的組成物移植至人體，有產生感染症或過敏反應等副作用的風險，然而藉由使用本發明之複數種瘤胃球菌科腸內細菌或單一種瘤胃球菌科腸內細菌，可避免此種風險。

【0127】 本發明提供包含摻合上述瘤胃球菌科腸內細菌之步驟的醫藥組成物之製造方法。本發明之醫藥組成物的製造方法，可包含將藉由上述瘤胃球菌科腸內細菌之單離方法所單離之瘤胃球菌科腸內細菌摻合的步驟。

【0128】 <瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物>

【0129】 本發明之醫藥組成物包含上述瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物。在使用菌體之情況，以活菌體為佳。活菌體可為包含瘤胃球菌科腸內細菌之培養用培養基的培養物型態，亦可為菌體之凍結乾燥物型態。本發明所用的瘤胃球菌科腸內細菌之培養上清液，意指藉由離心等手法，從細菌之培養物去除細菌後的液體部分。本發明所用的瘤胃球

菌科腸內細菌之代謝產物，可從上述培養物或培養上清液等適宜地精製而得。本發明所用的瘤胃球菌科腸內細菌之菌體萃取物，意指藉由粉碎、超音波處理、以鹼處理而溶解等方法，將菌體破壞，視需要進行適宜分取及/或精製而得到之萃取物，可適當使用菌體內容物、細胞膜成分、該等之精製物、或該等之組合等。

【0130】 <免疫檢查點抑制劑>

【0131】 本發明之醫藥組成物，可與免疫檢查點抑制劑組合投與。在本說明書中，免疫檢查點抑制劑意指可抑制免疫檢查點分子之功能，而具有解除T細胞回應之抑制之功能的藥劑。就本發明所用的免疫檢查點抑制劑而言，以針對人類之免疫檢查點抑制劑為較佳，例如可適合使用針對選自 PD-1、CTLA-4、TIM-3、BTLA、LAG-3、A2aR、KIR、VISTA、TIGIT、PD-L1、PD-L2、CD80、CD86、GAL-9、HVEM、CD160、MHC 第 II 型、B7-H3、B7-H4、B7-H5、B7-H6、及 B7-H7 所構成之群組中的任一種免疫檢查點分子之抑制劑或 2 種以上該等抑制劑的組合。本發明所用的免疫檢查點抑制劑，較佳而言，為針對前述免疫檢查點分子之抗體、抗體之抗原結合性斷片、及該等之組合，例如可選自保疾伏(nivolumab)、吉舒達(pembrolizumab)、西米普利單抗(cemiplimab)、百穩益(avelumab)、癌自禦(atezolizumab)、及度伐魯單抗(durvalumab)構成之群組。

【0132】 <醫藥組成物>

【0133】 本發明之醫藥組成物的型態，無特別限定，可依據目的，適宜選擇錠劑、散劑、顆粒劑、膠囊劑、腸溶膠囊劑、栓劑、液劑、懸浮劑、凝膠劑等型態。本發明之醫藥組成物，可直接使用瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培

養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物，亦可使用除了用瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物之外，亦用藥學上可容許之載劑、稀釋劑、及/或賦形劑而製劑化者。

【0134】本發明之醫藥組成物的投與方法，無特別限定，可考慮製劑之劑型、患者之年齡或性別、疾病之程度等而適宜設定。例如，可適合使用經口投與、經管投與、灌腸投與等投與方法。

【0135】本發明之醫藥組成物，可與免疫檢查點抑制劑組合投與。具體而言，可將包含瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物的醫藥組成物，與免疫檢查點抑制劑之投與同時，或與免疫檢查點抑制劑之投與分開，而在免疫檢查點抑制劑之投與前，或在免疫檢查點抑制劑之投與後，進行投與。亦可將瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物，與免疫檢查點抑制劑摻合於1個製劑中而成為摻合劑之型態者，作為本發明之醫藥組成物使用。

【0136】本發明之醫藥組成物的投與法(regimen)，可考慮製劑之劑型、患者之年齡或性別、疾病之程度等而適宜設定，通常，將瘤胃球菌科腸內細菌以每1日，患者每1人約 1×10^8 個至 1×10^{11} 個投與為較佳，以患者每1人約 1×10^9 個至 1×10^{10} 個投與為更佳。

【0137】若依照本發明之其他面向，可提供用於在對象中，將CD8陽性T細胞活化的包含瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物的醫藥組成物。

【0138】如後述，本發明之瘤胃球菌科腸內細菌，與投與普通擬桿菌(*B. vulgatus*)等其他細菌或者PBS或生理食鹽水等媒液的情況相比，具有經由使樹

狀細胞成熟化而使 CD8 陽性 T 細胞(CD8⁺T 細胞)活化的效果。CD8⁺T 細胞之活化，可藉由例如測定 IFN- γ 蛋白質或編碼其之多核苷酸的表現量而解析。蛋白質或多核苷酸之表現量，可適宜使用流式細胞術(flow cytometry)、西方墨點法等定量蛋白質表現解析；或轉錄組(transcriptome)解析、即時(real time)定量 PCR 等定量基因表現解析等周知的方法進行解析。若依照本發明之其他面向，可提供在具有腫瘤或癌之對象中，增強對腫瘤或癌之免疫回應用的醫藥組成物，該醫藥組成物包含瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物，並與免疫檢查點抑制劑組合投與。

【0139】 <腫瘤或癌>

【0140】 在本說明書中，腫瘤或癌意指例如惡性胸膜中皮瘤、惡性腹膜中皮瘤、惡性黑素瘤、惡性淋巴瘤、腦腫瘤、神經膠瘤、神經母細胞瘤、胸腺瘤、消化道間質腫瘤、神經內分泌腫瘤、睪丸腫瘤、軟部肉瘤、腎母細胞瘤、肝母細胞瘤、胚細胞腫瘤、網膜母細胞瘤、骨肉瘤、尤因氏肉瘤(Ewing's sarcoma)、橫紋肌肉瘤、急性骨髓性白血病、急性淋巴性白血病、慢性骨髓性白血病、慢性淋巴性白血病、骨髓異形成症候群、成人 T 細胞白血病、多發性骨髓瘤、口腔咽頭癌、喉頭癌、舌癌、鼻腔癌、副鼻腔癌、甲狀腺癌、耳下腺癌、顎下腺癌、聽器癌、肺癌、乳癌、胸腺癌、食道癌、胃癌、大腸癌、小腸癌、肝細胞癌、膽管癌、膽囊癌、胰臟癌、腎細胞癌、腎盂・尿管癌、膀胱癌、尿膜管癌、副腎癌、腹膜癌、前列腺癌、子宮頸癌、子宮體癌、卵巢癌、陰道癌、外陰癌、基底細胞癌、有棘細胞癌、神經內分泌癌、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、及原發不明癌，然而不以此等為限。

【0141】 <免疫回應之增強效果>

【0142】若將在對象中，單獨投與免疫檢查點抑制劑之情況，與本發明之將醫藥組成物與免疫檢查點抑制劑組合投與的情況相比，基於顯示免疫回應活化之指標，可評價對腫瘤或癌的免疫回應是否增強。就顯示免疫回應活化之指標而言，例如，可採用傷害性 T 細胞或為其前驅細胞之 CD8⁺T 細胞的增殖及/或活化，CD8⁺T 細胞中的 CD62L-CD44⁺細胞比率之增加，CD8⁺T 細胞中的 TNF- α ⁺IFN- γ ⁺細胞比率之增加，控制性 T 細胞(Treg、CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺細胞)數之減少，CD4⁺細胞數對 FoxP3⁺細胞數之比的上升，樹狀細胞之成熟化標記(CD80、CD86、MHC 第 I 類等)的表現上升、CD8⁺T 細胞之活化標記(IFN- γ 等)的表現上升，TCR 信號(ZAP70 等)之表現上升，及 CD28 信號(Erk(pErk)、Akt(pAkt)、S6(pS6)等)之表現上升等，然而不以此等為限。

【0143】若依照本發明之其他面向，可提供用於治療對象之腫瘤或癌的醫藥組成物，該醫藥組合物包含瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物，且與免疫檢查點抑制劑組合投與。

【0144】<腫瘤或癌之治療效果>

【0145】與單獨投與免疫檢查點抑制劑之情況相比，將本發明之醫藥組成物與免疫檢查點抑制劑組合投與的情況，若腫瘤或癌消失，或其尺寸縮小，或其尺寸無變化而穩定，可評價為藉由將本發明之醫藥組成物與免疫檢查點抑制劑組合投與，顯示腫瘤或癌之治療效果。

【0146】就腫瘤或癌之消失、縮小、或穩定之指標而言，可採用為本技術領域之一般評價基準的 CR(完全奏效(Complete Response))、PR(部分奏效(Partial Response))、SD(病情穩定(Stable Disease))、PD(病情持續進行(Progressive Disease))。CR 意指腫瘤完全消失之狀態，PR 意指腫瘤之尺寸之合

計減少 30%以上的狀態，SD 意指腫瘤之尺寸無變化之狀態，PD 意指腫瘤之尺寸之合計增加 20%以上，且絕對值亦增加 5mm 以上之狀態，或者新病變出現的狀態。在本說明書中，評價為 CR、PR、或 SD 之情況，判斷為對腫瘤或癌的治療效果。

【0147】 若依照本發明之其他面向，可提供用於抑制對象之腫瘤或癌之復發或轉移的醫藥組成物，該醫藥組成物包含瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物，且與免疫檢查點抑制劑組合投與。

【0148】 <腫瘤或癌之復發或轉移的抑制效果>

【0149】 在本說明書中，腫瘤或癌之復發意指腫瘤或癌之治療後 1 個月以內、6 個月以內、1 年以內、3 年以內、5 年以內、或 10 年以內，於所治療之腫瘤或癌的附近，再度出現腫瘤或癌。又，在本說明書中，腫瘤或癌之轉移意指腫瘤或癌之治療後 1 個月以內、6 個月以內、1 年以內、3 年以內、5 年以內、或 10 年以內，從離開所治療之腫瘤或癌的位置有腫瘤或癌發生。

【0150】 與將免疫檢查點抑制劑單獨投與之情況相比，在將本發明之醫藥組成物與免疫檢查點抑制劑組合投與的情況中，腫瘤或癌之治療後 1 個月以內、6 個月以內、1 年以內、3 年以內、5 年以內、或 10 年以內，若腫瘤或癌之復發或轉移完全不發生，或發生之時程延遲，或者發生數減少，可評價為藉由將本發明之醫藥組成物與免疫檢查點抑制劑組合投與，顯示腫瘤或癌之復發或轉移的抑制效果。

【0151】 本發明之醫藥組成物，可與選自手術療法、化學療法、及放射線療法所構成之群組中的 1 種以上療法進一步組合投與。

【0152】 <手術療法、化學療法、及放射線療法>

【0153】可與本發明之醫藥組成物組合之手術療法，包含以腫瘤或癌之病灶的切除，具有腫瘤或癌之臟器的切除、腫瘤或癌之周邊淋巴節的切除等為目的之直視手術及內視鏡手術等，然而不以此等為限。可與本發明之醫藥組成物組合的化學療法，意指藉由阻礙腫瘤或癌細胞之生殖或生長，或促進其死亡之藥物的處置，可包含荷爾蒙療法及分子標靶療法，然而不以此等為限。可與本發明之醫藥組成物組合的放射線療法，意指以使腫瘤或癌之細胞死亡，使腫瘤或癌縮小，預防腫瘤或癌之復發或轉移，及緩和腫瘤或癌之症狀為目的之放射線照射處置，包含外部照射及內部照射，然而不以此等為限。

【0154】<增強免疫回應之方法、腫瘤或癌之治療方法、抑制腫瘤或癌之復發或轉移的方法>

【0155】若依照本發明之其他面向，可提供一種增強對腫瘤或癌之免疫回應的方法，其包含將免疫檢查點抑制劑之有效量，與包含瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物之醫藥組成物的有效量組合，投與至具有腫瘤或癌之對象。

【0156】若依照本發明之其他面向，可提供一種腫瘤或癌之治療方法，其包含將免疫檢查點抑制劑之有效量，及包含瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物的醫藥組成物之有效量組合，投與至具有腫瘤或癌之對象。

【0157】若依照本發明之其他面向，可提供一種抑制對象之腫瘤或癌之復發或轉移的方法，其包含將免疫檢查點抑制劑之有效量，及包含瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物的醫藥組成物之有效量組合，投與至具有腫瘤或癌的對象。

【0158】 上述方法亦可與選自手術療法、化學療法、及放射線療法所構成之群組中的 1 種以上療法進一步組合而實施。

【0159】 <用於使腸內常在菌之多樣性增加之醫藥組成物或方法>

【0160】 上述瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物，藉由投與至哺乳動物，可使該哺乳動物之腸內常在菌之多樣性比投與前增加。因此，從某種面向而言，本發明係關於一種醫藥組成物，其為包含瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物的醫藥組成物，其係用於使哺乳動物之腸內常在菌之多樣性比投與前增加。從其他面向而言，本發明亦關於一種使哺乳動物之腸內常在菌比投與前增加的方法，其包含將含有瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物之醫藥組成物的有效量投與至該哺乳動物。

【0161】 腸內常在菌之多樣性，可使用例如香農-維納(Shannon-Wiener)指數(以下，簡稱為「香農指數」)。香農指數係以下列公式表示。

【數 1】

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

【0162】 其中，S 表示種數、 p_i 表示第 i 號之種類的個體數(n_i)所佔總個體數 N 之比率， $p_i = n_i/N$ 。

【0163】 本發明之包含瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物的醫藥組成物，藉由投與至哺乳動物，可使投與後之腸內

常在菌的香農指數 H' ，比投與前之腸內常在菌的香農指數 H' 增加，較佳為顯著地增加。已知在免疫檢查點抑制劑之非奏效案例中，腸內常在菌之多樣性低。本發明之瘤胃球菌科腸內細菌，與其他細菌相比，具有使腸內常在菌之多樣性增加的效果。雖不欲被局限於特定之理論，不過本發明之瘤胃球菌科腸內細菌引起抗腫瘤免疫回應的機構之一，可能有助於使腸內常在菌之多樣性增加。

【0164】 為使哺乳動物之腸內常在菌之多樣性增加，本發明之醫藥組成物亦可與免疫檢查點抑制劑組合投與。

【0165】 <用於誘導樹狀細胞前驅細胞生成第 1 型樹狀細胞之醫藥組成物及方法>

【0166】 如後述，本發明人等發現瘤胃球菌科腸內細菌可誘導樹狀細胞前驅細胞生成第 1 型樹狀細胞。再者，發現在從誘導樹狀細胞前驅細胞生成第 1 型樹狀細胞上，同時用 TLR4 以外之複數種 TLR 刺激很重要。

【0167】 因此，本發明亦關於一種醫藥組成物，其為用於誘導樹狀細胞前驅細胞生成第 1 型樹狀細胞之醫藥組成物，其包含 TLR4 以外之複數種 TLR 的促效劑。

【0168】 樹狀細胞前驅細胞意指樹狀細胞成熟化標記之表現，比成熟樹狀細胞低者。就樹狀細胞成熟化標記之例而言，可列舉 CD80、CD86、MHC 第 I 類等，然而不以此等為限。本發明中之樹狀細胞前驅細胞，以源自骨髓的樹狀細胞殘區細胞為較佳。樹狀細胞前驅細胞視各種刺激而分化，最後分化成為第 1 型樹狀細胞(亦稱為標準型第 1 型樹狀細胞，cDC1)、第 2 型樹狀細胞(亦

稱為標準型第 2 型樹狀細胞，cDC2)、或形質細胞樣樹狀細胞(pDC)。在本發明中，將第 1 型樹狀細胞稱為 CD103 陽性 CD11b 陰性樹狀細胞。

【0169】 用於誘導本發明之樹狀細胞前驅細胞生成第 1 型樹狀細胞之醫藥組成物，包含 TLR4 以外之複數種 TLR 的促效劑。TLR4 以外之複數種 TLR，可列舉選自 TLR1、TLR2、TLR3、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、及 TLR9 所構成之群組中的複數種 TLR，然而不以此等為限。就 TLR1/TLR2 之促效劑之例而言，可列舉 Pam3CSK4；就 TLR2 之促效劑之例而言，可列舉組蛋白(histone)；就 TLR2/TLR6 之促效劑之例而言，可列舉酵母聚醣(zymosan)、MALP-2；就 TLR3 之促效劑之例而言，可列舉 Poly(I)/Poly(C)；就 TLR4 之促效劑之例而言，可列舉 LPS；就 TLR5 之促效劑之例而言，可列舉鞭毛蛋白(flagellin)；就 TLR7 之促效劑之例而言，可列舉 R837(咪唑莫特(imiquimod))；就 TLR7/8 之促效劑之例而言，可列舉 R848(雷西莫特(resiquimod))；就 TLR9 之促效劑之例而言，可列舉 ODN1826 等 CpG 寡去氧核苷酸(CpG-ODN)，然而不以此等為限。亦可使用瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物，作為用於誘導本發明之樹狀細胞前驅細胞生成第 1 型樹狀細胞之醫藥組成物中所含的促效劑。

【0170】 本發明之誘導樹狀細胞前驅細胞生成第 1 型樹狀細胞用的醫藥組成物，可用於治療對象中的腫瘤或癌。又，本發明之誘導樹狀細胞前驅細胞生成第 1 型樹狀細胞用的醫藥組成物，在具有腫瘤或癌之對象中，可用於增強對腫瘤或癌的免疫回應。

【0171】 又，本發明亦關於一種誘導樹狀細胞前驅細胞生成第 1 型樹狀細胞之方法，其包含使 TLR4 以外之複數種 TLR 之促效劑，與樹狀細胞前驅細胞接觸。

【0172】 本發明之誘導樹狀細胞前驅細胞生成第 1 型樹狀細胞的方法，可在活體中(invivo)進行，亦可在試管中(invitro)進行。

【0173】 本發明之誘導樹狀細胞前驅細胞生成第 1 型樹狀細胞的方法中所用之樹狀細胞前驅細胞的來源無限定，然而較佳為源自人類。

【0174】 再者，本發明亦藉由誘導上述樹狀細胞前驅細胞生成第 1 型樹狀細胞之方法所誘導生成的第 1 型樹狀細胞。

【0175】 本發明之藉由誘導樹狀細胞前驅細胞生成第 1 型樹狀細胞之方法所誘導生成的第 1 型樹狀細胞，可用於在對象中治療腫瘤或癌。又，本發明之藉由誘導樹狀細胞前驅細胞生成第 1 型樹狀細胞之方法所誘導生成的第 1 型樹狀細胞，在具有腫瘤或癌之對象中，可用於增強對腫瘤或癌的免疫回應。

【0176】 因此，本發明亦關於一種用於治療對象中之腫瘤或癌的醫藥組成物，其包含藉由誘導樹狀細胞前驅細胞生成第 1 型樹狀細胞之方法所誘導生成的第 1 型樹狀細胞。又，本發明亦關於一種用於增強對腫瘤或癌之免疫回應的醫藥組成物，其包含藉由誘導樹狀細胞前驅細胞生成第 1 型樹狀細胞之方法所誘導生成的第 1 型樹狀細胞。

【0177】 以下，針對實施例加以說明，然而並非藉此限定本發明之範圍。本技術領域通常知識者可將本發明進行各種變更、修飾而使用，此等亦被包含於本發明之範圍內。

[實施例]

【0178】 <免疫檢查點抑制劑奏效案例及非奏效案例中的腸內常在菌之總體基因體學(metagenomics)解析>

【0179】 使用投與屬於免疫檢查點抑制劑之保疾伏(nivolumab)或吉舒達(pembrolizumab)的人類患者(胃癌 43 例、肺癌 18 例)之腸內容物樣本，進行免疫檢查點抑制劑之奏效案例及非奏效案例中的腸內常在菌之總體基因體學(metagenomics)解析。將以使用 CT 影像評價並使用 RECIST ver1.1 之評價，得到 PR(部分奏效)以上之評價，或得到半年以上 SD(病情穩定)的患者，被定義為奏效案例，其以外之病例則被定義為非奏效案例。

【0180】 將比較奏效案例及非奏效案例之腸內常在菌之 LEfSe 解析的結果示於圖 1。藉此，鑑定出瘤胃球菌科腸內細菌群為奏效案例中較多的細菌群，進一步鑑定出瘤胃球菌科所屬的瘤胃球菌屬細菌群及瘤胃球菌未分類屬細菌群。

【0181】 繼而，調查腸內常在菌中各細菌群所佔之比率的差異，與患者之無惡化生存期間(Progression Free Survival: PFS)之相關性。具體而言，針對腸內常在菌中的瘤胃球菌科腸內細菌群之比率之中央值高的患者群(高瘤胃球菌科腸內細菌群)，與腸內常在菌中的瘤胃球菌科腸內細菌群之比率之中央值低的患者群(低瘤胃球菌科腸內細菌群)，比較無惡化生存期間。關於瘤胃球菌未分類屬細菌群、瘤胃球菌屬細菌群、及擬桿菌屬細菌群，亦分別同樣地針對腸內常在菌中的各細菌群之比率之中央值高的患者群及低的患者群，比較無惡化生存期間。將結果示於圖 2。在高瘤胃球菌科腸內細菌群、高瘤胃球菌未分類屬細菌群、及高瘤胃球菌屬細菌群中，有無惡化生存期間長的傾向，在高擬桿菌屬細菌群中，有無惡化生存期間短的傾向。

【0182】 <免疫檢查點抑制劑奏效案例腸內容物對小鼠之移植>

【0183】 製作源自上述奏效案例及非奏效案例之腸內容物懸浮於等張液的懸浮液，並投與至無菌 BALB/cAJcl 小鼠，調查對於免疫檢查點抑制劑(屬於抗 PD-1 抗體之 Ultra-LEAF 純化之抗小鼠 CD279 (PD-1)(RMP1-14)；從 BioLegend 公司購入)之效果的影響。將小鼠分組為奏效案例之腸內容物移植群的免疫檢查點抑制劑治療群及非治療群，以及非奏效案例之腸內容物移植群的免疫檢查點抑制劑治療群及非治療群等 4 群。在腸內容物投與之 14 日後，將 MC38 培養細胞移植至小鼠皮下，製成免疫回應性小鼠腫瘤模型。在 MC38 培養細胞移植之 5 日後、8 日後、11 日後，將免疫檢查點抑制劑腹腔內投與至治療群，將 PBS 腹腔內投與至非治療群。然後，對於各小鼠，觀察腫瘤徑及生存期間，並進行比較。腫瘤體積係基於所計測的腫瘤徑，藉由下列之計算式算出。

【數 2】

$$\text{長徑} \times \text{短徑} \times \text{短徑} \times \frac{1}{2}$$

【0184】 將結果示於圖 3。奏效案例腸內容物移植群之免疫檢查點抑制劑治療群(奏效案例治療群)，與奏效案例腸內容物移植群之免疫檢查點抑制劑非治療群(奏效案例非治療群)、非奏效案例腸內容物移植群之免疫檢查點抑制劑治療群(非奏效案例治療群)及非奏效案例腸內容物移植群之免疫檢查點抑制劑非治療群(非奏效案例非治療群)之任一者相比，呈現顯著的腫瘤體積減少效果及生存期間延長效果。亦即，奏效案例腸內容物移植，顯示有使免疫檢查點抑制劑對腫瘤之效果增強的效果，亦即具有增強對腫瘤之免疫回應的效果。又，

奏效案例非治療群，與非奏效案例非治療群相比，顯示腫瘤體積減少效果及生存期間延長效果。因此，奏效案例腸內容物移植，即使單獨使用亦具有抗腫瘤效果，而在與免疫檢查點抑制劑治療組合之情況，顯示相乘的抗腫瘤效果。

【0185】 <源自免疫檢查點抑制劑奏效案例之腸內容物，對抗生素投與小鼠的移植>

【0186】 上述之腸內容物移植實驗，係使用事先進行抗生素投與的 SPF 小鼠進行。

【0187】 將源自上述奏效案例及非奏效案例之腸內容物懸浮於等張液中，製成懸浮液，將其投與至已投與抗生素(安比西林(ampicillin)、萬古黴素(vancomycin)、新黴素、甲硝唑(metronidazole)) 6 日的無菌 BALB/cAJcl 小鼠，調查對免疫檢查點抑制劑(屬於抗 PD-1 抗體的 Ultra-LEAF 純化之抗小鼠 CD279 (PD-1)(RMP1-14)；從 BioLegend 公司購入)之效果的影響。將小鼠分組為奏效案例之腸內容物移植群之免疫檢查點抑制劑治療群(奏效案例腸內容物移植+、抗 PD-1 抗體(Anti PD-1 mAb)+)及非治療群(奏效案例腸內容物移植+、同型對照(isotype control)+)、以及非奏效案例之腸內容物移植群之免疫檢查點抑制劑治療群(非奏效案例腸內容物移植+、抗 PD-1 抗體+)及非治療群(非奏效案例腸內容物移植+、同型對照(isotype control)+)等 4 群。在腸內容物投與之 14 日後，將 MC38 培養細胞移植至小鼠皮下，製成免疫回應性小鼠腫瘤模型。於 MC38 培養細胞移植之 5 日後、8 日後、11 日後，對於治療群，投與免疫檢查點抑制劑；對於非治療群，腹腔內投與同型對照(isotype control)抗體(Ultra-LEAF 純化大鼠 IgG2a, κ 同型 Ctrl (RTK2758)；從 BioLegend 公司購入)。於其 14 日後，使小鼠安樂死，然後從回收之腫瘤單離淋巴球，使用流式細胞術(flow

cytometry)，進行腫瘤浸潤 T 細胞之解析。將結果示於圖 4。奏效案例治療群之 CD8⁺細胞中的 CD62L⁻CD44⁺細胞部分之比率，與奏效案例非治療群、非奏效案例治療群、及非奏效案例非治療群之任一者相比，均顯示顯著地較高。再者，奏效案例治療群之 CD8⁺細胞中的 TNF- α ⁺IFN- γ ⁺細胞部分之比率，與奏效案例非治療群、非奏效案例治療群、及非奏效案例非治療群之任一者相比，亦顯示顯著地較高。亦即，於奏效案例治療群中，與奏效案例非治療群、非奏效案例治療群、及非奏效案例非治療群相比，顯示 CD8⁺細胞中的效應細胞 (effector cell) 之比率顯著較高，CD8⁺細胞產生細胞激素(cytokine)較多。此種情形，顯示奏效案例腸內容物移植，即使單獨使用，亦具有顯著之免疫回應增強效果，在進一步與免疫檢查點抑制劑組合的情況，具有相乘之免疫回應增強效果。

【0188】 <來自免疫檢查點抑制劑奏效案例腸內容物之瘤胃球菌科腸內細菌的單離>

【0189】 將源自上述奏效案例之腸內容物，依據『腸內細菌之世界』光岡知足(1990)，朝倉書店之記載，於該書之厭氧性稀釋液(B)稀釋，生成腸內容物稀釋液。將稀釋至 10⁻⁷至 10⁻⁸、及 10⁻⁹之腸內容物稀釋液，分別接種於 EG 瓊脂培養基，藉由在厭氧性槽室內，37°C 下培養 3 日至 4 日，生成菌落。

【0190】 關於所生成之各菌落的細菌，決定 16S rRNA 基因序列，依照常法，進行系統解析。將結果示於圖 5。將具有序列編號 1 所示之鹼基序列之 16S rRNA 基因的細菌，命名為瘤胃球菌 YB328 (Ruminococcaceae YB328)。

【0191】 <對於投與有免疫檢查點抑制劑的腫瘤小鼠，各種細菌之移植>

【0192】 將 MC38 培養細胞皮下移植至已投與 6 日抗生素(安比西林(ampicillin)、萬古黴素(vancomycin)、新黴素、甲硝唑(metronidazole))之無菌 BALB/cAJcl 小鼠，於 5 日後、8 日後、11 日後投與免疫檢查點抑制劑(抗 PD-1 抗體)。在對照群方面，投與同型對照(isotype control)。在單菌移植群方面，與免疫檢查點抑制劑或同型對照(isotype control)之投與同時，經口投與各種細菌(嗜黏蛋白阿克曼菌(*Akkermansia muchiniphilliam*)、緩慢愛格士氏菌(*Eggerhella lenta*)、狗腸梭菌(*Clostridium colicanis*)、普通擬桿菌(*Bacteroides vulgatus* (B. vulgatus))、多枝莢膜菌(*Erysipelatoclostridium ramosum*)、瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328))。然後，測量各小鼠中之腫瘤徑，並將根據腫瘤徑所算出的腫瘤體積作圖，示於圖 6。投與瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)之群，與只用免疫檢查點抑制劑處置之群相比，進一步與移植其他細菌之群相比，皆呈現顯著的腫瘤體積之減少。亦即，源自奏效案例腸內容物之屬於瘤胃球菌科腸內細菌的瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)，與免疫檢查點抑制劑組合的情況，顯示相乘之抗腫瘤效果。

【0193】 對於普通擬桿菌(*B. vulgatus*)及瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)，進行同樣之實驗，在皮下移植 MC38 培養細胞的 14 日後，使小鼠安樂死，從回收之腫瘤單離淋巴球，使用流式細胞術(flow cytometry)，進行腫瘤浸潤 T 細胞之解析。將結果示於圖 7。瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)投與群之 CD8⁺細胞中的 CD62L⁺CD44⁺細胞部分之比率，與普通擬桿菌(*B. vulgatus*)投與群及免疫檢查點抑制劑單獨處置群相比，顯示顯著地較高。再者，瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)投與群之 CD8⁺細胞中的 TNF- α ⁺IFN- γ ⁺細胞部分之比率，與普通擬桿菌(*B. vulgatus*)投

與群及免疫檢查點抑制劑單獨處置群相比，亦顯示顯著地較高。亦即，瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)投與群，與普通擬桿菌(*B. vulgatus*)投與群及免疫檢查點抑制劑單獨處置群相比，顯示 CD8⁺細胞中的效應細胞之比率，顯著地較高，CD8⁺細胞產生細胞激素較多。此係顯示在瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)與免疫檢查點抑制劑組合之情況，具有相乘的免疫回應增強效果。

【0194】 <瘤胃球菌科腸內細菌對 T 細胞之活化的影響>

【0195】 將源自小鼠骨髓樹狀細胞(與樹狀細胞前驅細胞同義)、瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)或普通擬桿菌(*B. vulgatus*)或媒液進行共培養後，使用流式細胞術(flow cytometry)，進行樹狀細胞成熟化標記(CD80、CD86、MHC 第 I 類)之測定。將結果示於圖 8。關於所測定之所有樹狀細胞成熟化標記，在與瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)共培養的情況，與在與普通擬桿菌(*B. vulgatus*)或媒液共培養之情況相比，可確認顯著的表現增強。亦即，瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)，與普通擬桿菌(*B. vulgatus*)或媒液相比，顯示顯著較高的樹狀細胞之成熟化效果。

【0196】 繼而，回收上述共培養後之樹狀細胞，與源自 OT-I 小鼠之 CD8⁺T 細胞共培養，使用對 TCR 之親和性相異的周知 OVA 抗原肽，即 N4 肽(1nM、10nM 或 100nM)或 Q4H7 肽(1nM、10nM 或 100nM)刺激。再者，可知 Q4H7 肽，與 N4 肽相比，對 TCR 具有較低之親和性。然後，使用 ELISA 進行 CD8⁺T 細胞之活化標記(IFN- γ)的測定，及使用流式細胞術(flow cytometry)進行 TCR 信號(ZAP70(pZAP70))及 CD28 信號(Erk(pErk)、Akt(pAkt)、S6(pS6))的測定。

【0197】 將以 1nM 或 100nM 之 N4 肽賦予刺激之情況的 CD8⁺T 細胞之活化標記(IFN- γ)的測定結果示於圖 9。將與瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)共培養之樹狀細胞，和 CD8⁺T 細胞共培養的情況，與將與普通擬桿菌 (*B. vulgatus*)共培養之樹狀細胞，和 CD8⁺T 細胞共培養的情況相比，顯示回應 N4 肽的刺激，而產生顯著較大量的 IFN- γ 。亦即，與瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)共培養之樹狀細胞，和與普通擬桿菌(*B. vulgatus*)共培養之樹狀細胞相比，顯示具有顯著較高的 CD8⁺T 細胞活化效果。令人驚訝地，該效果即使藉由 1nM 之低濃度之 N4 肽亦可顯示。此暗示瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)有較高的免疫回應增強效果。

【0198】 將以 N4 肽或 Q4H7 肽賦予刺激之情況的 TCR 信號(ZAP70)及 CD28 信號(Erk)的測定結果示於圖 10。在將與瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)共培養之樹狀細胞，和 CD8⁺T 細胞共培養的情況，與在將與普通擬桿菌(*B. vulgatus*)共培養之樹狀細胞，和 CD8⁺T 細胞共培養的情況，或在將通常之樹狀細胞與 CD8⁺T 細胞共培養的情況相比，顯示回應 N4 肽刺激或 Q4H7 肽刺激，而產生顯著較高的 TCR 信號(ZAP70)及 CD28 信號(Erk)。亦即，與瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)共培養之樹狀細胞，和與普通擬桿菌(*B. vulgatus*)共培養的樹狀細胞相比，顯示對於 TCR 信號及 CD28 信號兩者，具有顯著較高之活化效果。令人驚奇地，通常被認為對 T 細胞活化之貢獻低、TCR 親和性低之 Q4H7 肽，亦可顯示此效果。

【0199】 再者，對於 TCR 信號(ZAP70(pZAP70))及 CD28 信號(Erk(pErk)、Akt(pAkt)、S6(pS6))以相異濃度之 N4 肽刺激的效果(0nM、1nM、10nM、100nM)，在將與瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)共培養之樹

狀細胞，和 CD8⁺T 細胞進行共培養的情況，及在將與普通擬桿菌(*B. vulgatus*) 共培養之樹狀細胞，和 CD8⁺T 細胞進行共培養的情況，分別調查的結果示於圖 11。對於任一種信號，將與瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)共培養之樹狀細胞，和 CD8⁺T 細胞共培養的情況，與將與普通擬桿菌(*B. vulgatus*)共培養之樹狀細胞，和 CD8⁺T 細胞共培養的情況相比，顯示對調查之所有濃度之 N4 肽刺激，皆產生顯著較高的回應。亦即，與瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)共培養之樹狀細胞，和與普通擬桿菌(*B. vulgatus*)共培養之樹狀細胞相比，對於 TCR 信號及 CD28 信號兩者，顯示即使以低濃度之 N4 肽刺激，亦具有顯著較高的活化效果。

【0200】從以上之說明，顯示瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)，可使屬於抗原呈現細胞(*antigen-presenting cell*)之樹狀細胞成熟化，藉此，即使在使用低濃度之抗原刺激的情況，或即使在使用親和性低之抗原刺激的情況，仍顯示對於 T 細胞活化所需的 2 個途徑(TCR 及 CD28)，具有高活化效果。此暗示在活體內，如瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)之瘤胃球菌科腸內細菌，具有高免疫回應增強效果。

【0201】<在腸內容物移植腫瘤小鼠中，瘤胃球菌科腸內細菌之效果>

【0202】對已投與 6 日之抗生素(安比西林(*ampicillin*)、萬古黴素(*vancomycin*)、新黴素、甲硝唑(*metronidazole*))的無菌 BALB/cAJcl 小鼠，投與源自上述免疫檢查點抑制劑奏效案例之腸內容物的懸浮液及源自非奏效案例之腸內容物的懸浮液，進行腸內常在菌移植。然後，將 MC38 培養細胞皮下移植至小鼠，於 5 日後、8 日後、11 日後，腹腔內投與免疫檢查點抑制劑(屬於抗 PD-1 抗體，Ultra-LEAF 純化抗小鼠 CD279 (PD-1)(RMP1-14)；從 BioLegend 公

司購入)，並進一步經口投與瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)單菌或普通擬桿菌(*B. vulgatus*)單菌。然後，測定各小鼠的腫瘤徑，分別將根據該腫瘤徑所算出之腫瘤體積作圖，並示於圖 12。又，關於分別在腸內容物移植後、單菌投與後所回收的小鼠之腸內容物，基於 16S rRNA 基因，進行整合解析(meta-analysis)，將比較各個腸內容物之細菌叢之多樣性的結果示於圖 13。

【0203】在圖 12 中，瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)單菌投與群，在移植源自奏效案例之腸內容物及源自非奏效案例腸內容物之任一者的小鼠中，均有意義地抑制腫瘤增殖。另一方面，普通擬桿菌(*B. vulgatus*)單菌投與群，在移植源自奏效案例之腸內容物及源自非奏效案例之腸內容物之任一者的小鼠中，均無法抑制腫瘤增殖。

【0204】在圖 13 中，於瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)單菌投與後之腸內容物中，顯示細菌叢之多樣性，與投與前相比，顯著地增加。在免疫檢查點抑制劑之非奏效案例中，可知腸內常在菌之多樣性較低。藉由此實驗，本發明之瘤胃球菌科腸內細菌，與其他細菌相比，明顯地具有使腸內常在菌之多樣性增加的較高效果。不侷限於特定之理論，然而本發明之瘤胃球菌科腸內細菌，為引起抗腫瘤免疫回應的機構之一，可能有助於使腸內常在菌之多樣性增加。

【0205】<對於樹狀細胞之分化，瘤胃球菌科腸內細菌的效果(試管內)>

【0206】將源自小鼠骨髓之樹狀細胞，與瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)或普通擬桿菌(*B. vulgatus*)或 LPS 或媒液(PBS)共培養之後，從樹狀細胞萃取 RNA，進行轉錄組(transcriptome)解析。其結果，發現藉由瘤胃球菌 YB328 刺激之樹狀細胞，與藉由普通擬桿菌(*B. vulgatus*)或 LPS

或媒液(PBS)刺激之樹狀細胞相比，第 1 型樹狀細胞(cDC1)特徵的基因，即 batf3、Irf8、FLT3，之表現較高(圖 14)。

【0207】 <瘤胃球菌科腸內細菌對於樹狀細胞之分化的效果(活體內)之 1>

【0208】 將 MC38 培養細胞皮下移植至已投與 6 日之抗生素(安比西林(ampicillin)、萬古黴素(vancomycin)、新黴素、甲硝唑(metronidazole))的無菌 BALB/cAJcl 小鼠，5 日後，經口投與瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)或普通擬桿菌(*B. vulgatus*)，8 日後採集各組織(腫瘤附近淋巴節、黏膜固有層、腸管膜淋巴節)。

【0209】 FACS 解析之結果，在腫瘤附近淋巴節之 CD103 陽性移動性樹狀細胞、在黏膜固有層之 CD103 陽性 CD11b 陰性樹狀細胞之比率，於瘤胃球菌 YB328 投與群中顯著較高。又，判定在腸間膜淋巴節，CCR7 之表現在瘤胃球菌 YB328 投與群中較高(圖 15)。由此，暗示藉由 YB328 之投與，在活體內，可誘導生成遊走能力高、cDC1 之比率高的樹狀細胞。

【0210】 <對於樹狀細胞之分化，瘤胃球菌科腸內細菌之效果(在活體內)之 2>

【0211】 將 MC38 培養細胞皮下移植至已投與 6 日之抗生素(安比西林(ampicillin)、萬古黴素(vancomycin)、新黴素、甲硝唑(metronidazole))的無菌 BALB/cAJcl 小鼠，並將免疫檢查點抑制劑(抗 PD-1 抗體，RMP1-14，BioLegend 公司，美國)或同型對照(isotype control)抗體(RTK2758，BioLegend 公司，美國)，以 3 日間隔，藉由靜脈注射投與 2 次。從皮下移植 MC38 培養細胞之 5、8、11 日後，經口投與瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)或普通擬桿菌(*B. vulgatus*)或 LPS 或媒液(PBS)，於 13 日後採集腫瘤。

【0212】 FACS 解析之結果，腫瘤內的 CD103 陽性樹狀細胞之比率，在瘤胃球菌科 TB328 投與群中顯著較高(圖 16)。

【0213】 <藉由瘤胃球菌科腸內細菌誘導樹狀細胞分化的機構>

【0214】 將源自小鼠骨髓之細胞的樹狀細胞之前驅細胞(源自骨髓之樹狀細胞)單離，與分化成 cDC1 所必要的 FLT3 配體(FLT3L)、瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)或普通擬桿菌(*B. vulgatus*)、或 LPS 或媒液(PBS)共培養後，針對 IRF8 之表現進行 FACS 解析。在投與高濃度(100ng/ml)之 FLT3L 的情況，任一者皆可見到較高的 IRF8 之表現，在投與低濃度(1ng/ml)之 FLT3L 的情況，僅瘤胃球菌科 YBS328 投與群維持 IRF8 的表現 (圖 17)。由此，暗示瘤胃球菌 YB328 可能以非依存於 FLT3L 的方式誘導 cDC1 的分化。

【0215】 再者，將源自骨髓之樹狀細胞，及瘤胃球菌 YB328 (*Ruminococcaceae* YB328)或普通擬桿菌(*B. vulgatus*)或 LPS 或媒液(PBS)，進行 4 小時共培養後，針對 p-S6 激酶(p-S6K)及 p-STAT3 之表現進行 FACS 解析。判定僅在瘤胃球菌 YB328 投與群中，p-S6K 及 p-STAT3 之量子分子的表現高 (圖 18)。

【0216】 研判 FLT3L 係通過使 PI3K-mTOR 途徑活化，而參與樹狀細胞之分化。從上述之結果，研判瘤胃球菌 YB328 係代替 FLT3L，藉由使 PI3K-mTOR 途徑活化，參與 cDC1 之分化的誘導。

【0217】 <藉由 TLR 複合刺激而使樹狀細胞前驅細胞生成第 1 型樹狀細胞的誘導>

【0218】如上述，已明白瘤胃球菌 YB328 參與和樹狀細胞之分化相關的各種分子表現。因此，為了解明藉由瘤胃球菌 YB328 而分化成 cDC1 的誘導途徑的更上游，著眼於 TLR，進行如下列之檢討。

【0219】首先，在圖 14 所示之轉錄組(transcriptome)解析中，進行著眼於 TLR 之解析的結果，以瘤胃球菌 YB328 刺激之樹狀細胞前驅細胞，與以普通擬桿菌(*B. vulgatus*)刺激之樹狀細胞前驅細胞相比，關於多樣之 TLR，顯示較高之表現(圖 19，A)。其中，TLR1、TLR3、TLR5、TLR7、及 TLR9 之表現較高。

【0220】再者，將從 MyD88 基因剔除(knock-out)小鼠(MyD88^{-/-})採集之源自骨髓樹狀細胞以瘤胃球菌 YB328 刺激後，進行 FACS 解析。其結果，未誘導 CD103 陽性 CD11b 陰性樹狀細胞，此為與藉由媒液刺激之情況相同的結果(圖 19，B)。此係暗示藉由瘤胃球菌 YB328 誘導的 CD103 陽性樹狀細胞之分化，依存於 MyD88-TLR 信號，TLR 信號傳達擔任重要角色。

【0221】上述轉錄組(transcriptome)解析中，顯示 TLR5、7、9 在瘤胃球菌 YB328 群中顯示特別高的表現。所以，藉由 TLR5、7、9 之促效劑(分別為鞭毛蛋白(flagellin)、R848(雷西莫特(resiquimod))、ODN-1826)的各種混合物，處理源自小鼠骨髓之樹狀細胞(未受到細菌之刺激等完整無傷的樹狀細胞前驅細胞)時，完全使用 TLR5、7、9 之促效劑處理的樹狀細胞，與藉由 LPS 或對照群處理的情況相比，可顯著地誘導生成 CD103 陽性 CD11b 陰性樹狀細胞，亦即第 1 型樹狀細胞(圖 19，C)。又，亦可知此實驗中，若在 TLR5、7、及 9 之促效劑的混合物中，添加屬於 TLR4 之促效劑的 LPS，則被誘導生成 CD103 陽性 CD11b 陰性樹狀細胞，亦即第 1 型樹狀細胞的作用將顯著降低(圖 19，C)。由

此暗示藉由同時刺激 TLR4 以外之複數種 TLR，可誘導樹狀細胞前驅細胞生成第 1 型樹狀細胞。再者，暗示瘤胃球菌 YB328 可刺激參與誘導生成此等第 1 型樹狀細胞的複數種 TLR。

【符號說明】

無。

【序列表】

- <110> 日本國立癌症研究中心 (NATIONAL CANCER CENTER)
國立研究開發法人理化學研究所 (RIKEN)
- <120> 瘤胃球菌科腸內細菌的單離方法、製造方法、醫藥組成物、誘導方法、及第 1 型樹狀細胞
- <130> FA4009-21166
- <140> 110136270
- <141> 1100929
- <150> JP2020-165470
- <151> 2020-09-30
- <160> 1
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 1478
- <212> DNA
- <213> Ruminococcaceae unclassified genus
- <400> 1
- agagtttgat cctggetcag gacgaacgct ggcggcgtgc ctaacacatg caagtcgaac60

ggagttgaaa ggagcttgct tttttcaact tagtggcgga cgggtgagta acgcgtgagt120

aacctgcctt tcagaggggg ataacgttct gaaaagaacg ctaataccgc ataagattgt180

agcttcgcat ggagcagcaa tcaaaggagc aatccgctga aagatggact cgcgtccgat240

tagatagttg gcggggtaac ggcccaccaa gtgcacgac ggtagccgga ctgagaggtt300

gatcggccac attgggactg agacacggcc cagactccta cgggaggcag cagtgaggga360

tattgggcaa tgggggaaac cctgaccag caacgccgcg tgagggatga cggttttcgg420

attgtaaacc tctgtcctct gtgaagatag tgacggtagc agaggaggaa gctccggcta480

actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta gggagcaagc gttgtccgga tttactgggt540

gtaaagggtg cgtaggcgga ttggcaagtc agaagtgaat tccatgggct taacctatga600

actgcttttg aaactgtag tcttgagtga agtagaggta ggcggaattc ccggtgtagc660

ggtgaaatgc gtagagatcg ggaggaacac cagtggcgaa ggcggcctac tgggctttaa720

ctgacgctga ggcacgaaag tgtgggtagc aaacaggatt agataccctg gtagtcacaa780

ctgtaaacga tgattactag gtgtgggggg tetaaccccc tccgtgccgg agttaacaca840

ataagtaatc cacctgggga gtacgaccgc aaggttgaat ctcaaaggaa ttgacggggg900

ccgcacaaag cagtggagta tgtggtttta ttcgacgcaa cgcaagaac cttaccaggt960

cttgacatcc aactaacgaa gcagagatgc attaggtgcc cttcggggaa agttgagaca1020

ggtggtgcat ggttgctgtc agctcgtgtc gtgagatggt gggtaaagtc ccgcaacgag	1080
cgcaaccctt gtgattagtt gctacgcaag agcactctaa tcagactgcc gttgacaaaa	1140
cggaggaagg tggggacgac gtcaaatacat catgcccttt atgacctggg ctacacacgt	1200
actacaatgg tcgttaacag agggaagcaa taccgcgagg tggagcaaaa ccctaaaaac	1260
ggtctcagtt cagattgtag gctgcaactc gcctacatga agttggaatt gctagtaatc	1320
gcggatcagc atgccgcggt gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc ccgtcacacc	1380
atgggagccg gtaatacccg aagtcagtag tttaaccgta aggagaacgc tgccgaaggt	1440
aggattggcg actgggggtga agtcgtaaca aggtaacc	1478

【發明申請專利範圍】

【請求項 1】一種單離方法，其為瘤胃球菌科腸內細菌之單離方法，其包含：

(i)將從哺乳動物得到之腸內容物用厭氧性稀釋液進行階段稀釋，生成腸內容物稀釋液的步驟，其中該哺乳動物為投與免疫檢查點抑制劑之哺乳動物，且投與後之 CT 影像評價得到 PR(部分奏效)以上之評價，或經過半年以上，得到 SD(病情穩定)之評價；

(ii)將該腸內容物稀釋液之一部分接種於固體培養基，在厭氧性條件下培養，於固體培養基上生成源自腸內容物稀釋液所含之微生物之單一殖株(clone)的菌落(可為複數)的步驟；

(iii)確認該菌落所含之細菌是否為具有與序列編號 1 所示之鹼基序列具有 95%以上的序列相同性之 16S rRNA 基因者的步驟；及

(iv)取得確認具有與序列編號 1 所示之鹼基序列具有 95%以上的序列相同性之 16S rRNA 基因之細菌的步驟。

【請求項 2】如請求項 1 所述之單離方法，其中免疫檢查點抑制劑為針對選自 PD-1、CTLA-4、TIM-3、BTLA、LAG-3、A2aR、KIR、VISTA、TIGIT、PD-L1、PD-L2、CD80、CD86、GAL-9、HVEM、CD160、MHC 第 II 型、B7-H3、B7-H4、B7-H5、B7-H6、及 B7-H7 所構成之群組中的任一種免疫檢查點分子之抑制劑或該等抑制劑之 2 種以上的組合。

【請求項 3】如請求項 2 所述之單離方法，其中免疫檢查點抑制劑為選自針對前述免疫檢查點分子之抗體、抗體之抗原結合性斷片、及該等的組合。

【請求項 4】如請求項 3 所述之單離方法，其中免疫檢查點抑制劑係選自保疾伏(nivolumab)、吉舒達(pembrolizumab)、西米普利單抗(cemiplimab)、百穩益(avelumab)、癌自禦(atezolizumab)、及度伐魯單抗(durvalumab)所構成之群組。

【請求項 5】如請求項 1 至 4 中任一項所述之單離方法，其中哺乳動物為人類。

【請求項 6】一種製造方法，其為醫藥組成物之製造方法，該方法包含將藉由請求項 1 至 5 中任一項所述之單離方法所單離的瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物摻合，形成醫藥組成物的步驟。

【請求項 7】如請求項 6 所述之製造方法，其中醫藥組成物為與免疫檢查點抑制劑組合投與的醫藥組成物。

【請求項 8】一種醫藥組成物，其係藉由請求項 6 或 7 所述之製造方法所製造者。

【請求項 9】一種醫藥組成物，其包含與免疫檢查點抑制劑組合投與的瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物。

【請求項 10】如請求項 9 所述之醫藥組成物，其中瘤胃球菌科腸內細菌之菌體為活菌體。

【請求項 11】如請求項 9 或 10 所述之醫藥組成物，其中瘤胃球菌科腸內細菌為具有 16S rRNA 基因之細菌，該 16S rRNA 基因具有與序列編號 1 所示之鹼基序列 95%以上的相同性。

【請求項 12】如請求項 8 至 11 中任一項所述之醫藥組成物，其中免疫檢查點抑制劑為針對選自 PD-1、CTLA-4、TIM-3、BTLA、LAG-3、A2aR、

KIR、VISTA、TIGIT、PD-L1、PD-L2、CD80、CD86、GAL-9、HVEM、CD160、MHC 第 II 型、B7-H3、B7-H4、B7-H5、B7-H6、及 B7-H7 所構成之群組中的任一種免疫檢查點分子的抑制劑或 2 種以上此等抑制劑的組合。

【請求項 13】如請求項 12 所述之醫藥組成物，其中免疫檢查點抑制劑，係選自針對前述免疫檢查點分子的抗體、抗體之抗原結合性斷片、及此等的組合。

【請求項 14】如請求項 8 至 13 中任一項所述之醫藥組成物，其係藉由經口投與、經管投與、或灌腸投與而投與。

【請求項 15】如請求項 8 至 14 中任一項所述之醫藥組成物，其中免疫檢查點抑制劑係與瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物同時投與。

【請求項 16】如請求項 15 所述之醫藥組成物，其包含免疫檢查點抑制劑，及瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物。

【請求項 17】如請求項 8 至 14 中任一項所述之醫藥組成物，其中將免疫檢查點抑制劑，及瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物分別投與。

【請求項 18】如請求項 17 所述之醫藥組成物，其中在投與免疫檢查點抑制劑之前，投與瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物。

【請求項 19】如請求項 17 所述之醫藥組成物，其中在投與免疫檢查點抑制劑之後，投與瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物。

【請求項 20】如請求項 8 至 19 中任一項所述之醫藥組成物，其係用於在對象中，將 CD8 陽性 T 細胞活化。

【請求項 21】如請求項 8 至 19 中任一項所述之醫藥組成物，其係用於在具有腫瘤或癌之對象中，增強對腫瘤或癌的免疫回應。

【請求項 22】如請求項 21 所述之醫藥組成物，其和單獨投與前述免疫檢查點抑制劑的情況相比，對腫瘤或癌之免疫回應的增強效果較大。

【請求項 23】如請求項 8 至 22 中任一項所述之醫藥組成物，其係用於治療對象的腫瘤或癌。

【請求項 24】如請求項 23 所述之醫藥組成物，其中前述治療係使腫瘤或癌消失、縮小，或穩定。

【請求項 25】如請求項 24 所述之醫藥組成物，其和單獨投與前述免疫檢查點抑制劑的情況相比，使腫瘤或癌消失、縮小、或穩定的效果較大。

【請求項 26】如請求項 8 至 22 中任一項所述之醫藥組成物，其係用於抑制對象中的腫瘤或癌之復發或轉移。

【請求項 27】如請求項 26 所述之醫藥組成物，其中和單獨投與前述免疫檢查點抑制劑的情況相比，腫瘤或癌之復發或轉移的抑制效果較大。

【請求項 28】如請求項 21 至 27 中任一項所述之醫藥組成物，其進一步與選自手術療法、化學療法、及放射線療法所構成之群組中的 1 種以上療法組合投與。

【請求項 29】如請求項 8 至 19 中任一項所述之醫藥組成物，其係用於使哺乳動物之腸內常在菌的多樣性比其投與前增加。

【請求項 30】一種醫藥組成物，其係用於誘導樹狀細胞前驅細胞生成第 1 型樹狀細胞之醫藥組成物，該醫藥組成物包含 TLR4 以外的複數種 TLR 之促效劑(agonist)。

【請求項 31】如請求項 30 所述之醫藥組成物，其中前述複數種 TLR 為 TLR5、TLR7、及 TLR9。

【請求項 32】如請求項 31 所述之醫藥組成物，其中前述促效劑為鞭毛蛋白(flagellin)、R848(雷西莫特(resiquimod))、及 ODN1826 之組合。

【請求項 33】如請求項 30 或 31 所述之醫藥組成物，其中前述促效劑為瘤胃球菌科腸內細菌之菌體、培養上清液、代謝產物及/或菌體萃取物。

【請求項 34】如請求項 30 至 33 中任一項所述之醫藥組成物，其係用於在對象中，治療腫瘤或癌。

【請求項 35】一種誘導樹狀細胞前驅細胞生成第 1 型樹狀細胞之方法，其包含使 TLR4 以外的複數種 TLR 之促效劑與樹狀細胞前驅細胞接觸。

【請求項 36】一種第 1 型樹狀細胞，其係藉由請求項 35 所述之方法而被誘導生成。

【請求項 37】一種醫藥組成物，其係用於在對象中治療腫瘤或癌，該醫藥組成物包含請求項 36 所述之第 1 型樹狀細胞。

【發明圖式】

表 1 係本發明之實施例中較多之陽極電壓
表 2 係本發明之實施例中較多之陽極電壓

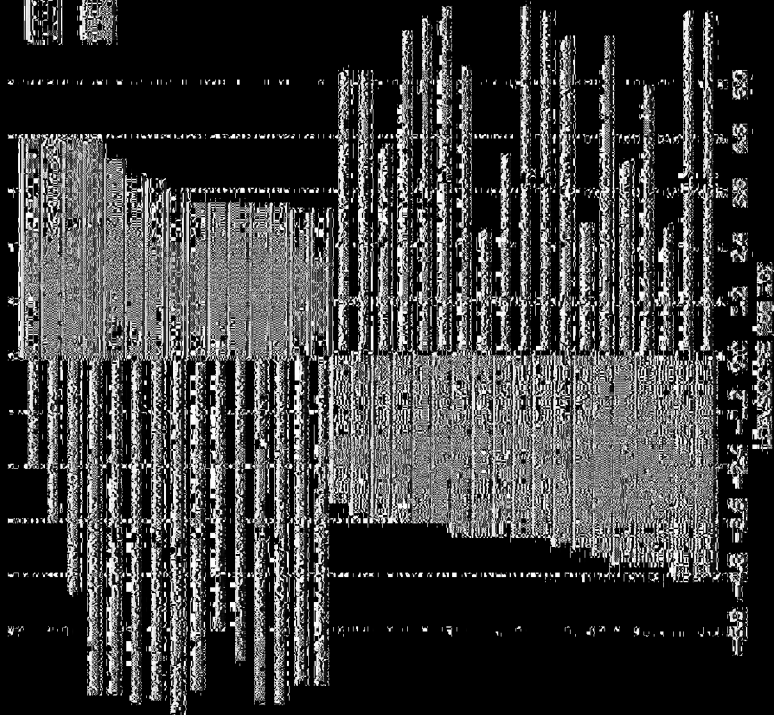
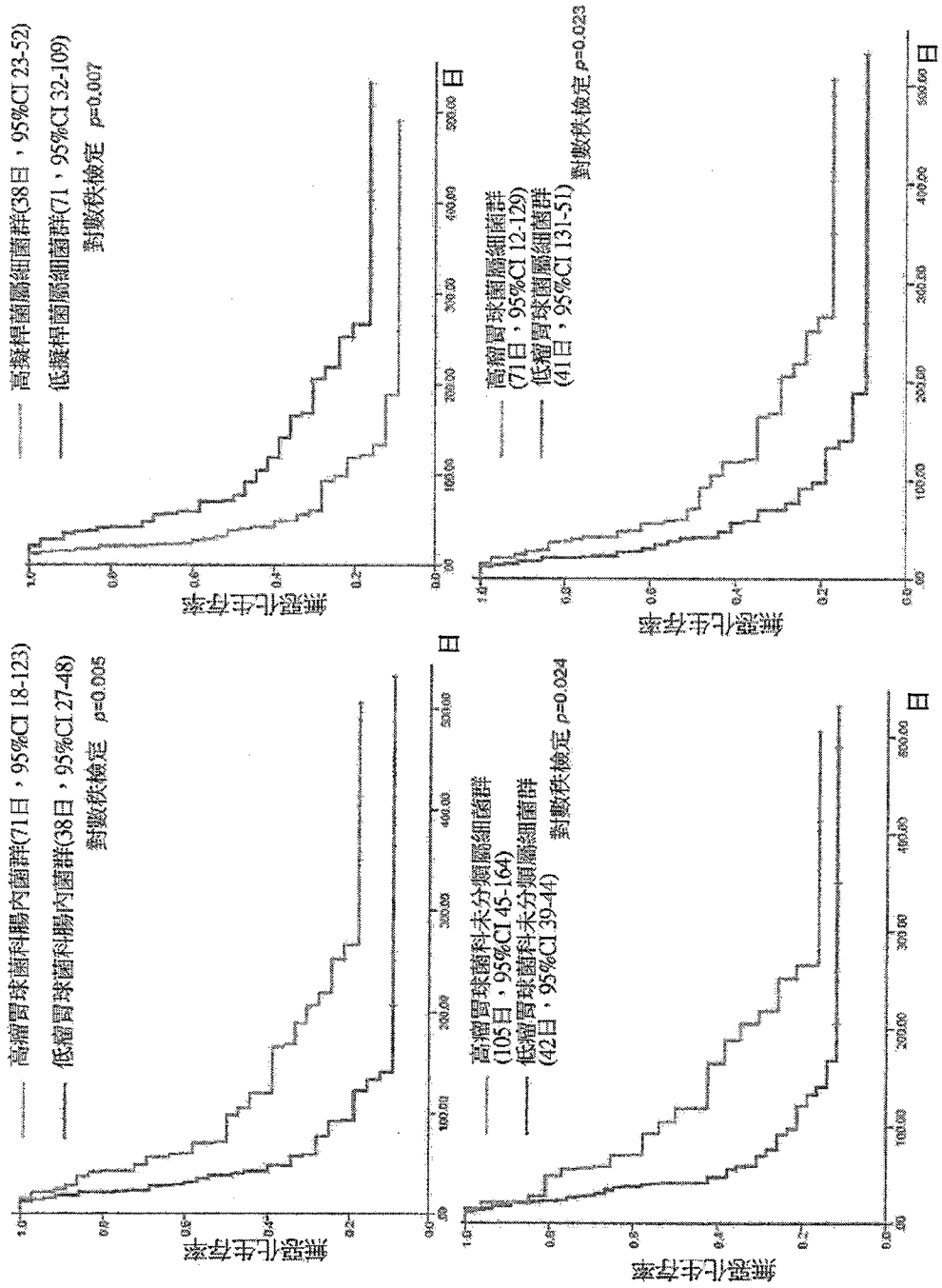
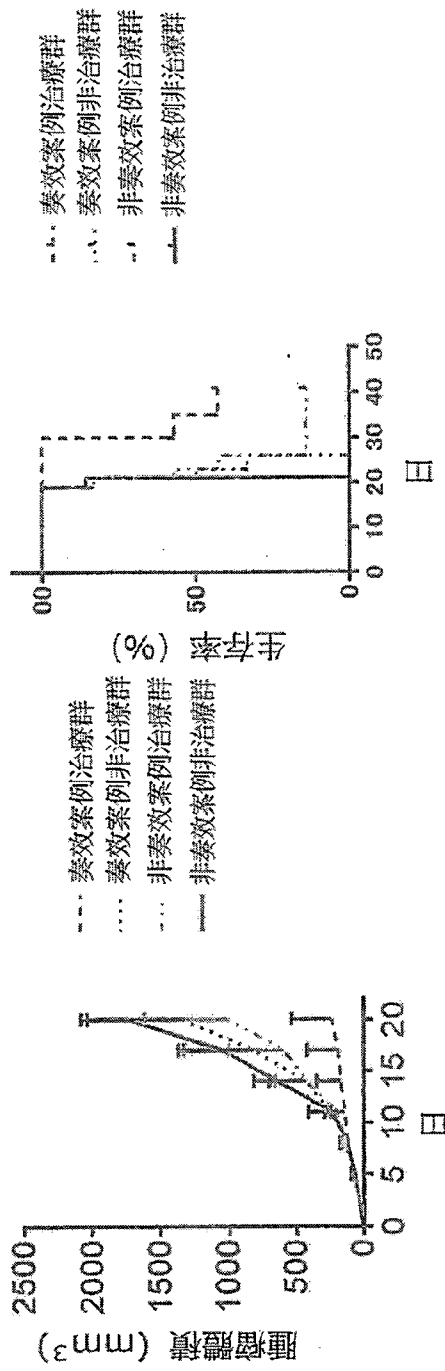


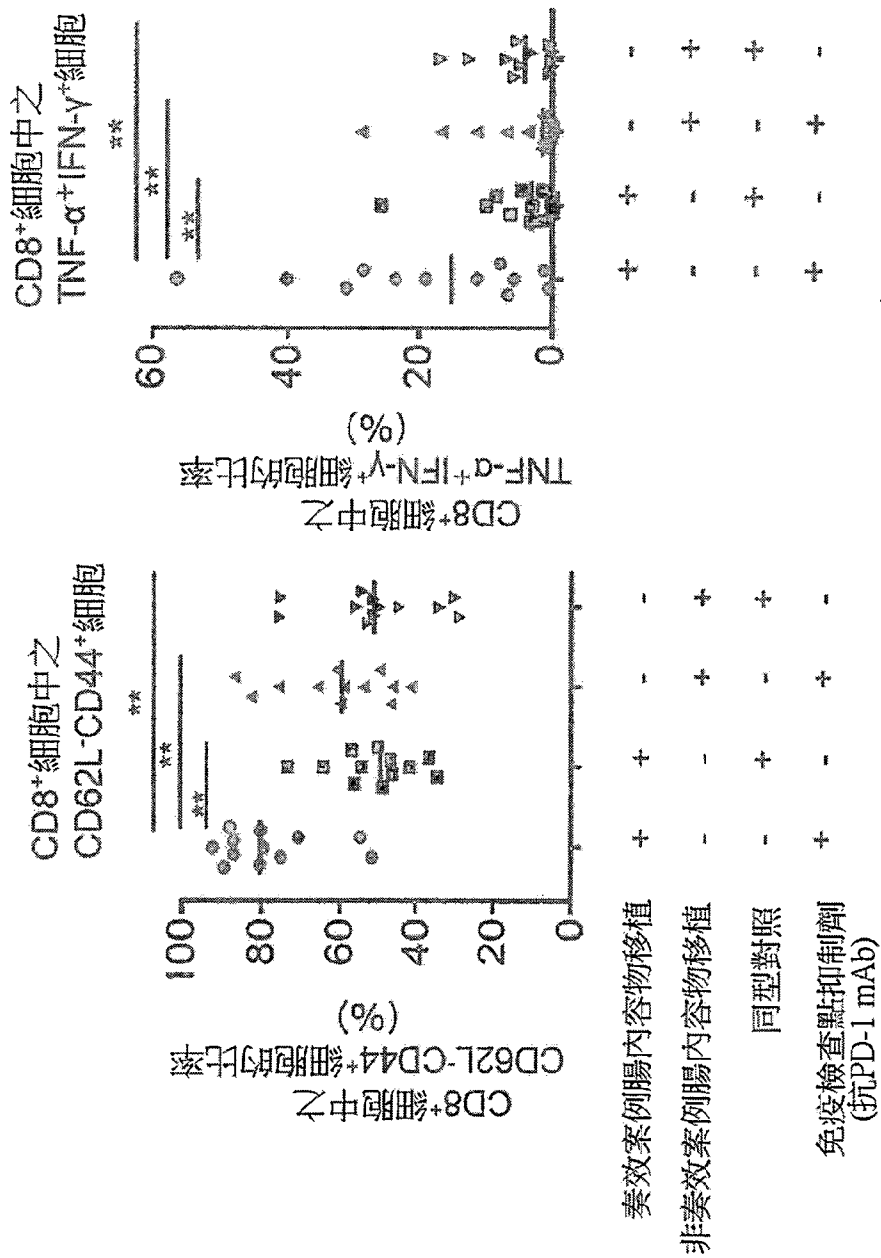
圖 1



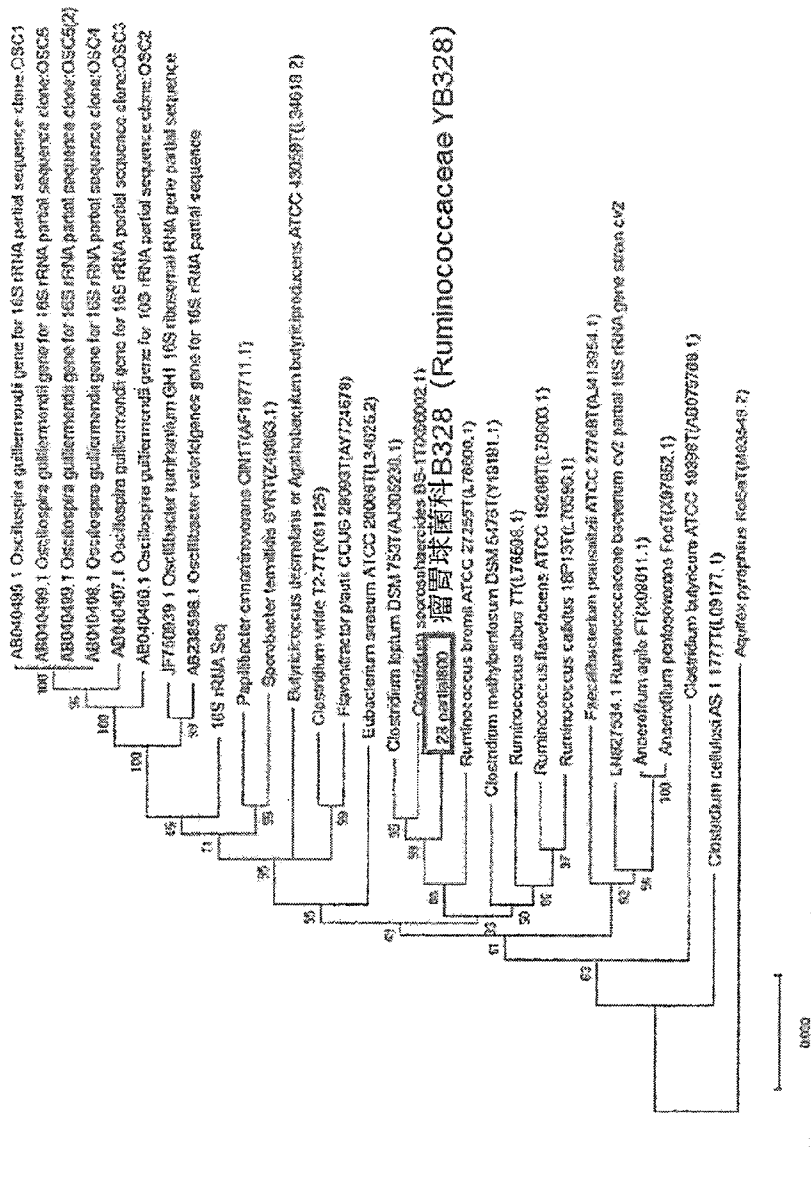
【圖2】



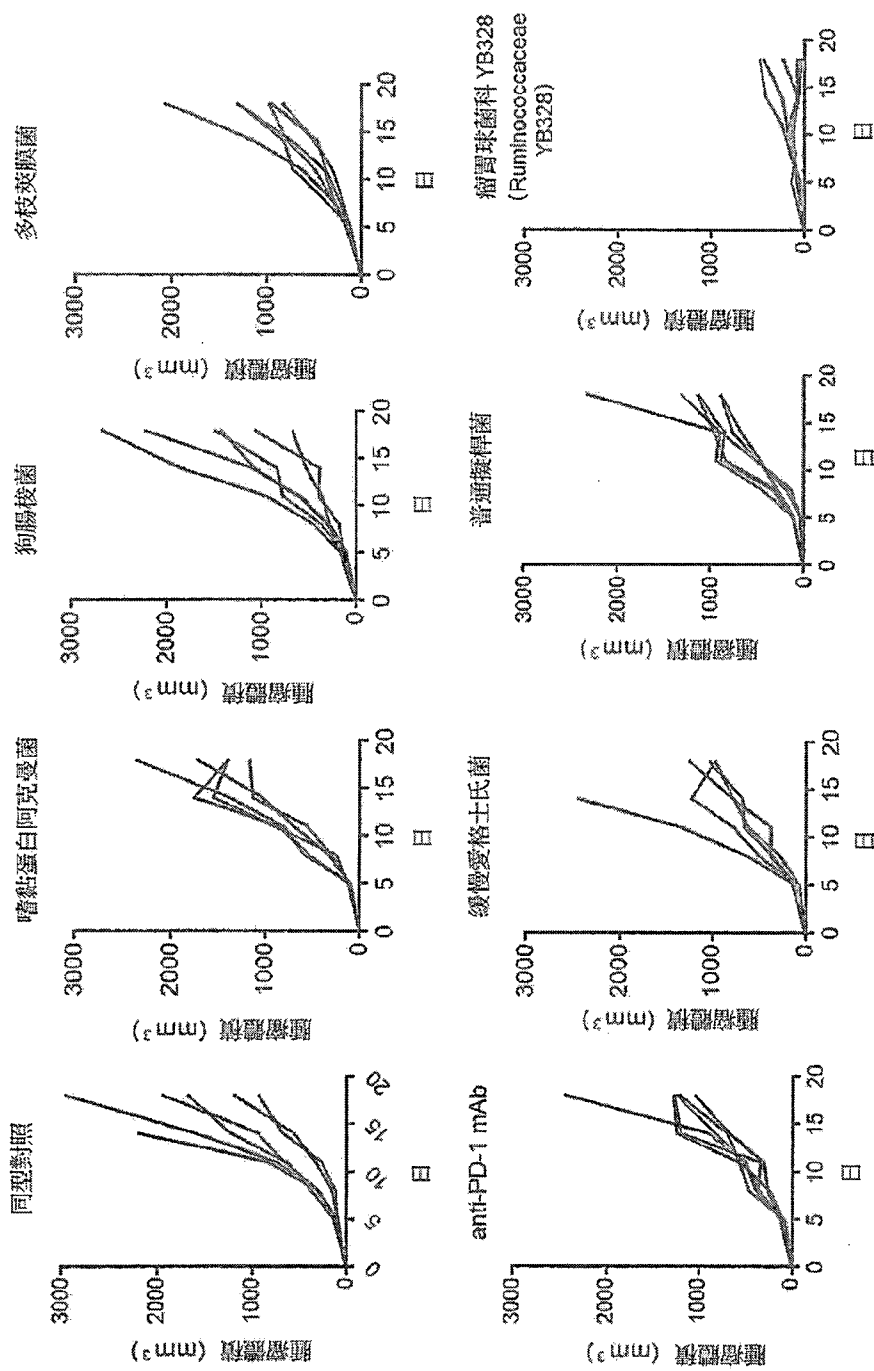
【圖3】



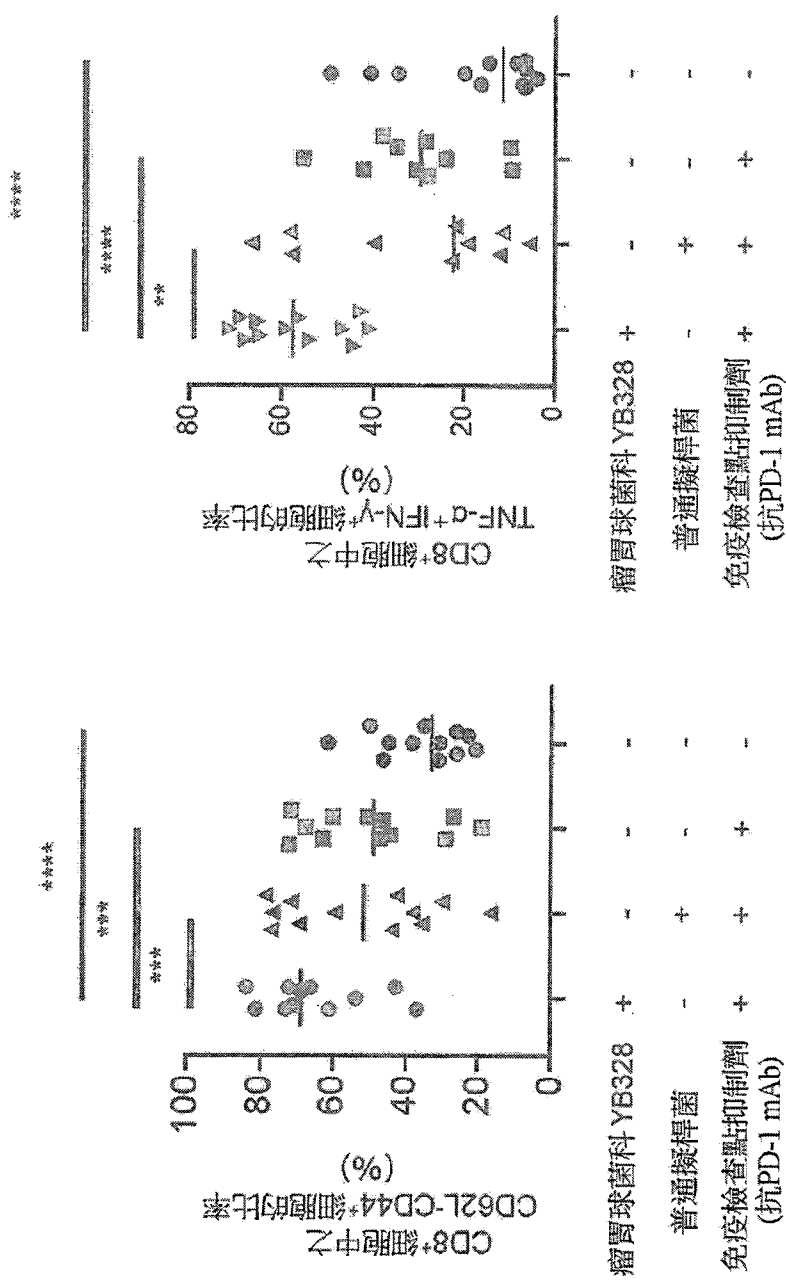
【圖4】



【圖5】

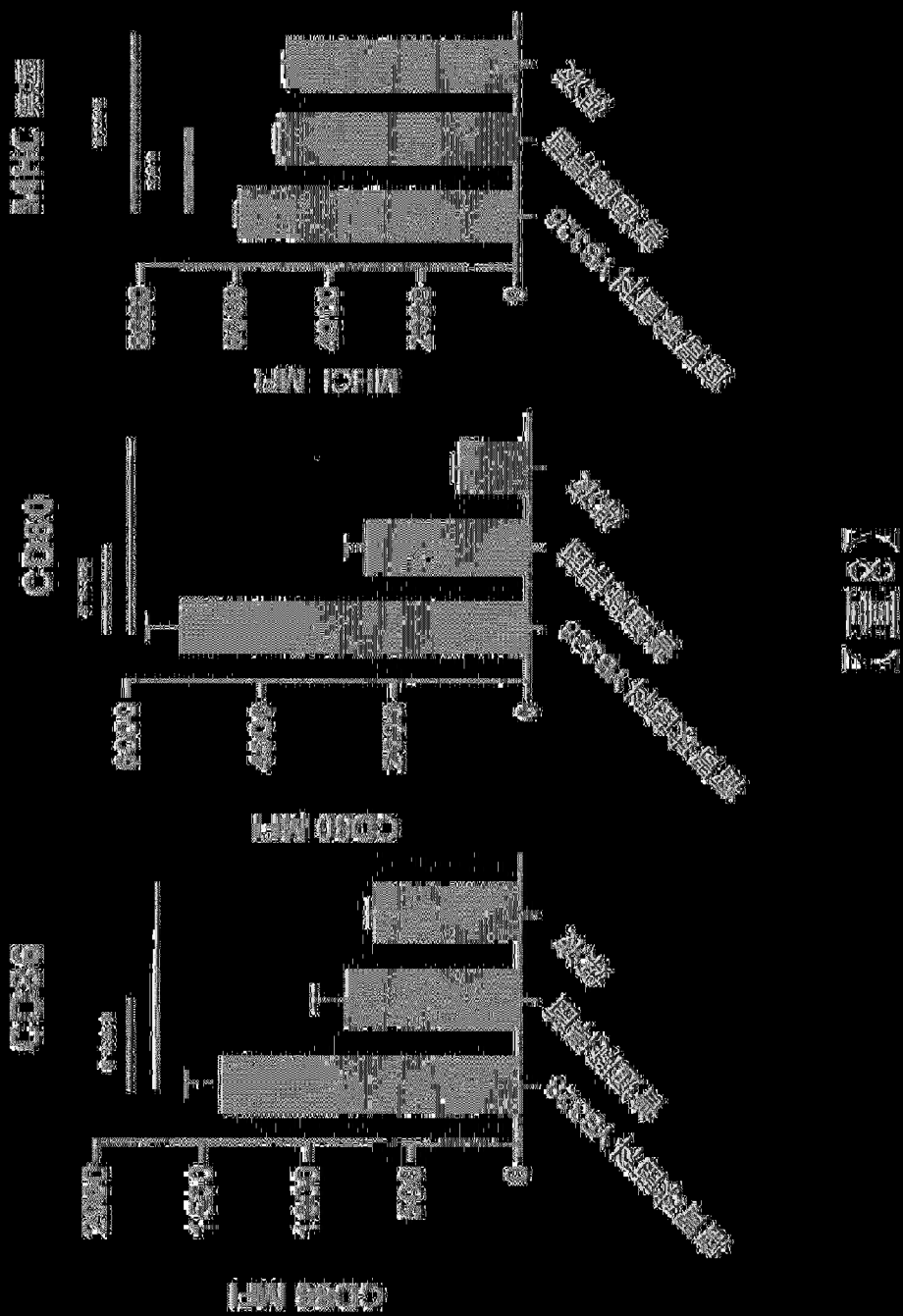


【圖6】

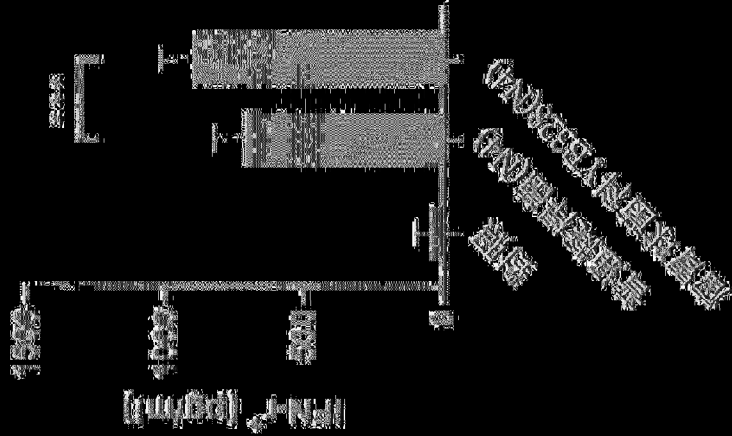


【圖7】

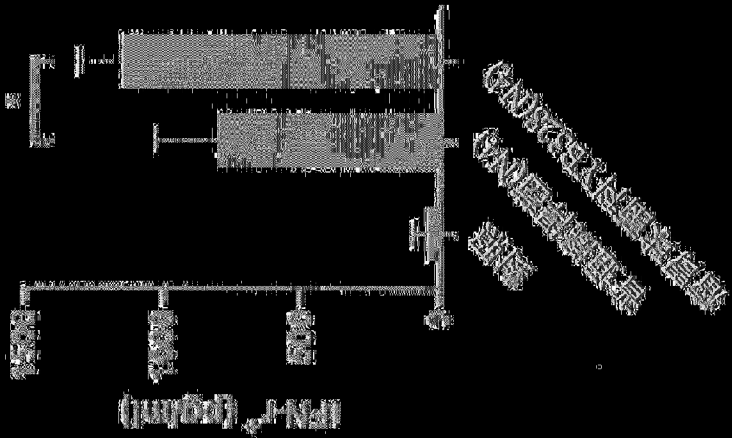
202227611



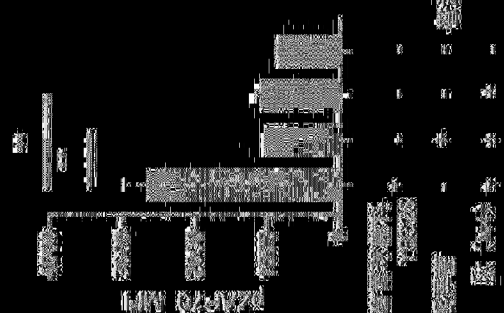
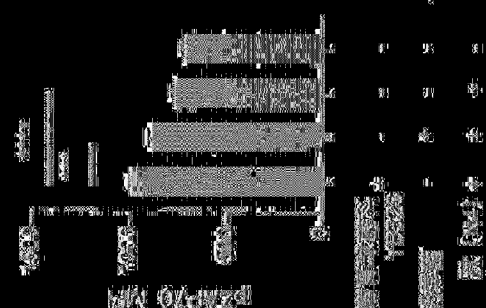
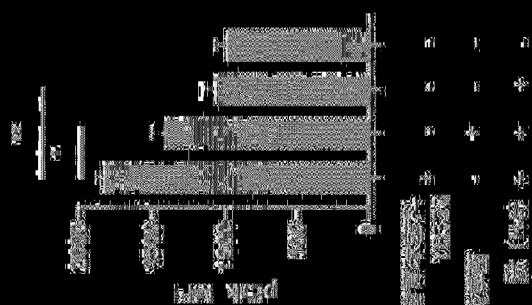
100nM N4 达

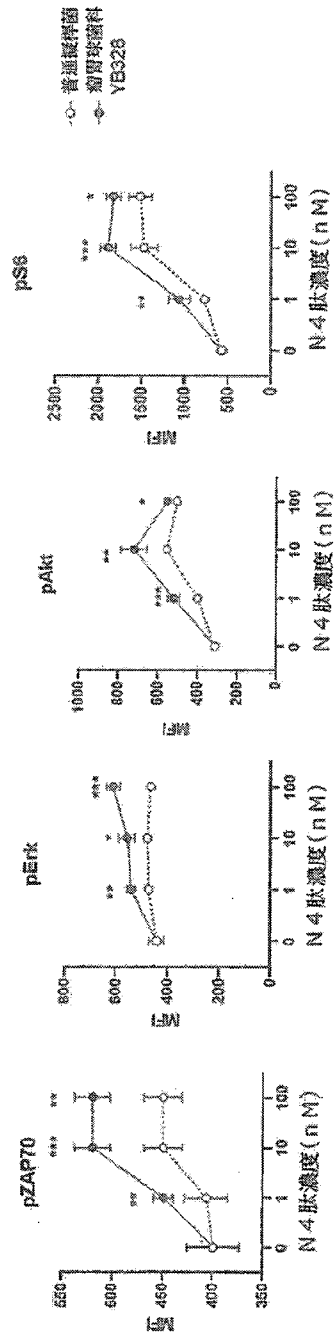


1nM N4 达

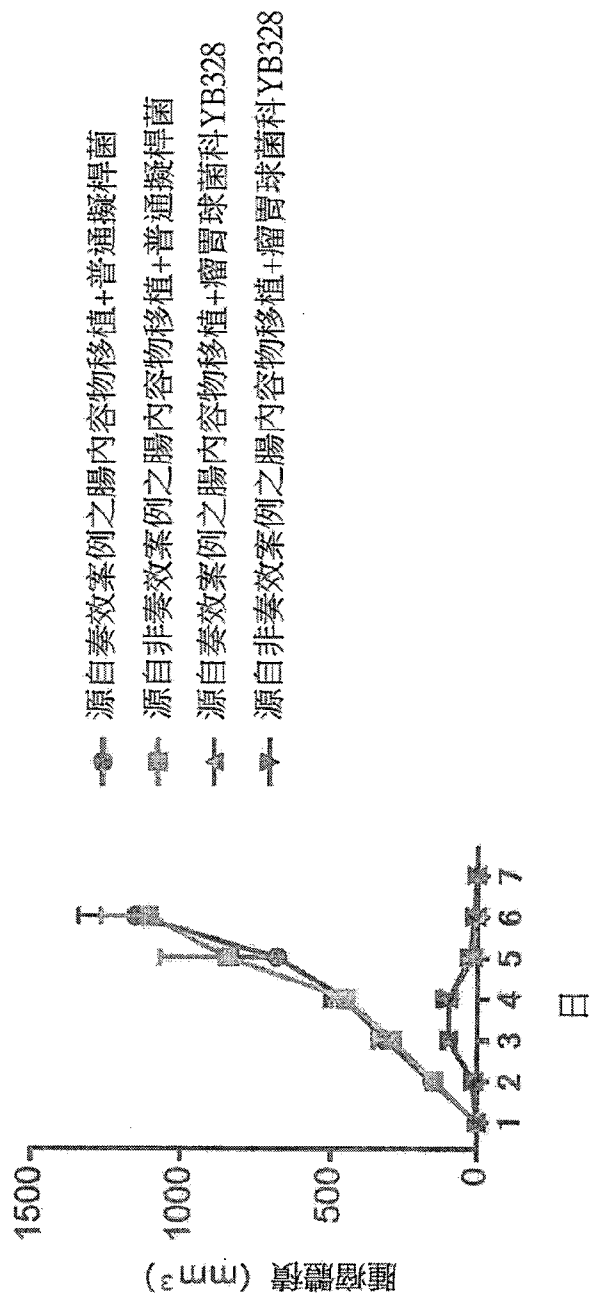


[69]

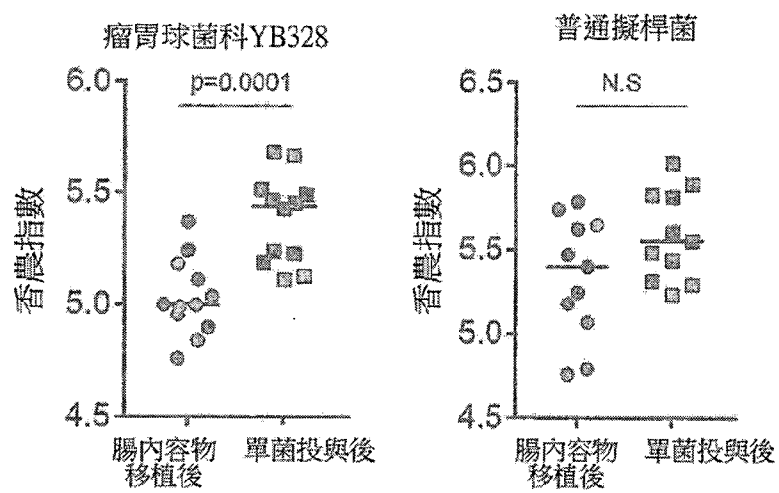




【圖11】

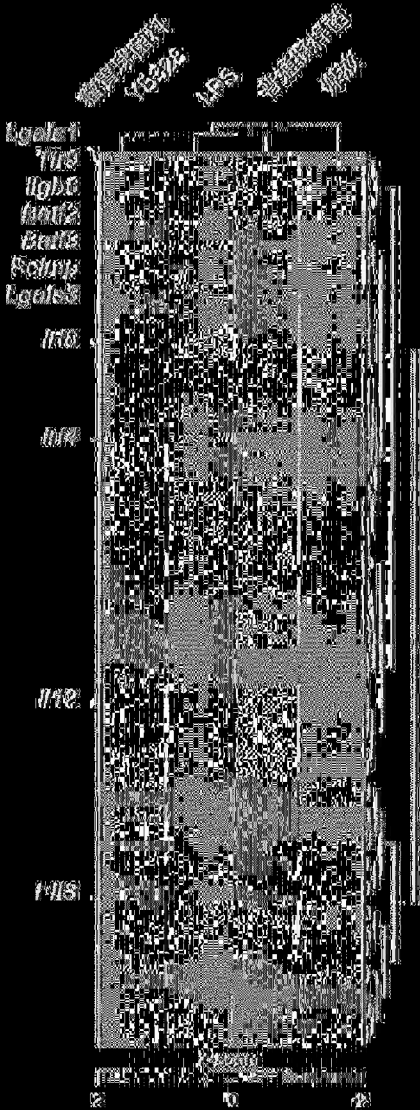


【圖12】



【圖13】

4 6



[14]

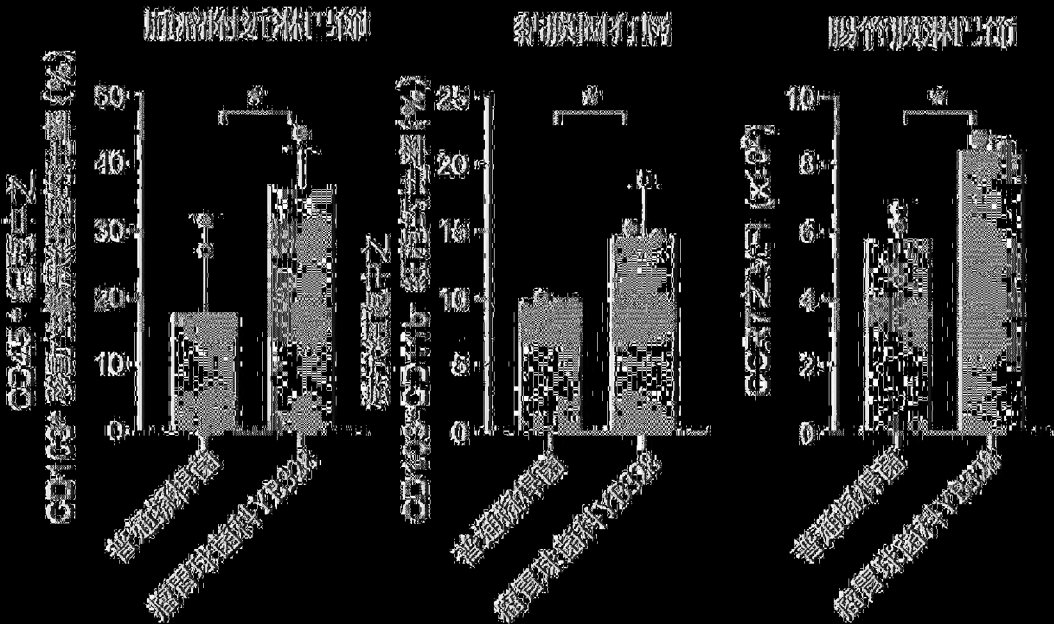
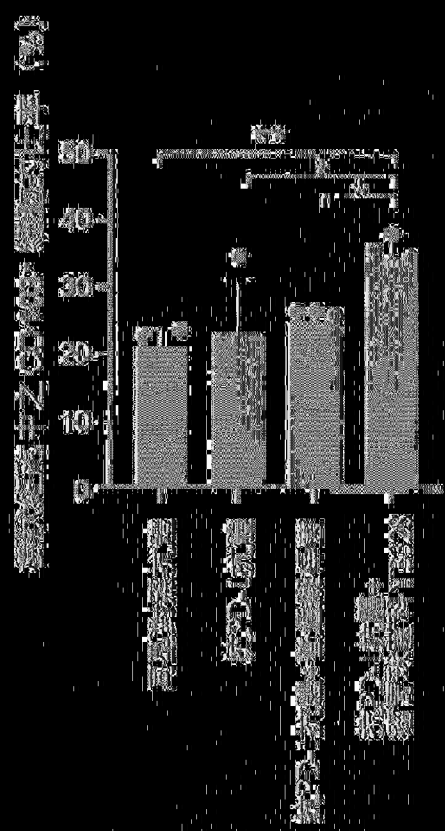
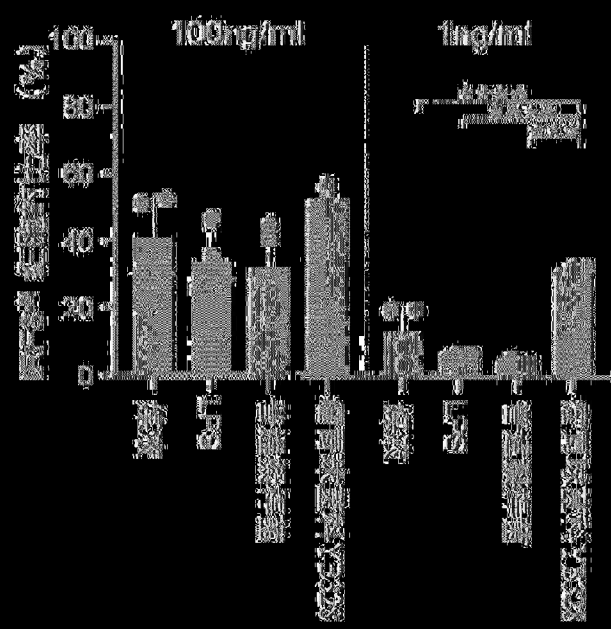


图 15

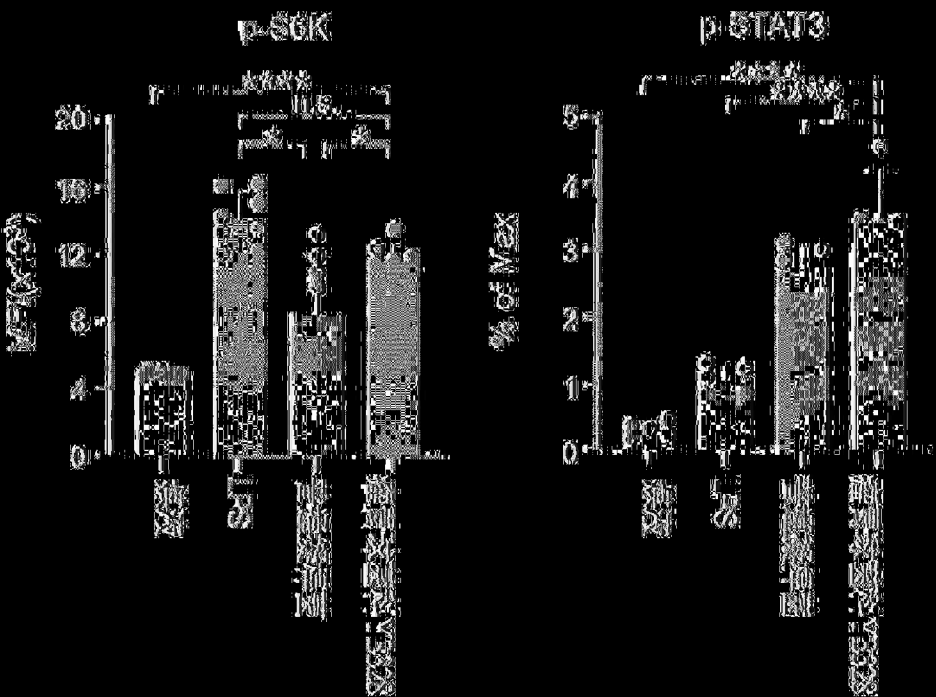
第 11 卷第 2 期



【图16】



【図17】



【圖18】

