

發明專利說明書

(填寫本書件時請先行詳閱申請書後之申請須知，作※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 91134176 ※IPC 分類： A61K 39/395
A61P 35/60
※ 申請日期： 91. 11. 25

壹、發明名稱

(中文) 治療癌症之方法

(英文) METHODS FOR TREATING CANCER

貳、發明人 (共 2 人)

發明人 1 (如發明人超過一人，請填說明書發明人續頁)

姓名：(中文) 艾倫 P. 菲卡利

(英文) ALAIN P. VICARI

住居所地址：(中文) 法國拉杜迪沙法尼市迪里昂路 45 號

(英文) 45 ROUTE DE LYON, LA TOUR DE

SALVAGNY, FRANCE 69890

國籍：(中文) 法國

(英文) FRANCE

參、申請人 (共 1 人)

申請人 1 (如申請人超過一人，請填說明書申請人續頁)

姓名或名稱：(中文) 美國先靈大藥廠

(英文) SCHERING CORPORATION

住居所或營業所地址：(中文) 美國新澤西州凱利佛市格羅賓希爾路

2000 號

(英文) 2000 GALLOPING HILL ROAD,

KENILWORTH, NEW JERSEY 07033,

U.S.A

國籍：(中文) 美國

(英文) U.S.A

代表人：(中文) 艾德華 H. 梅哲

(英文) EDWARD H. MAZER

發明人 2

姓名：(中文) 克里斯多夫 卡克斯

(英文) CHRISTOPHE CAUX

住居所地址：(中文) 法國布萊沙利斯市里奧迪萊拉特區安西尼艾可爾路

(英文) ANCIENNE ECOLE, LIEU DIT LE PAILLOT,

BRESSOLLES, FRANCE 01360

國籍：(中文) 法國

(英文) FRANCE

捌、聲明事項

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項 ☐ 第一款但書或 ☐ 第二款但書規定之期間，其日期為：_____

☒ 本案已向下列國家（地區）申請專利，申請日期及案號資料如下：

【格式請依：申請國家（地區）；申請日期；申請案號 順序註記】

1. 美國；2001 年 11 月 27 日；60/333,434

2. _____

3. _____

☒ 主張專利法第二十四條第一項優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；日期；案號 順序註記】

1. 美國；2001 年 11 月 27 日；60/333,434

2. _____

3. _____

4. _____

5. _____

6. _____

7. _____

8. _____

9. _____

10. _____

☐ 主張專利法第二十五條之一第一項優先權：

【格式請依：申請日；申請案號 順序註記】

1. _____

2. _____

3. _____

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

1. _____

2. _____

3. _____

☐ 國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

1. _____

2. _____

3. _____

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

(1)

玖、發明說明

(發明說明應敘明：發明所屬之技術領域、先前技術、內容、實施方式及圖式簡單說明)

技術領域

本發明係關於在治療疾病狀態，特別是癌症中操作及活化樹突狀細胞(DC)之方法。

先前技術

樹突狀細胞(DC)在啟動及調節先天性及適應性免疫反應上扮演重要角色(Banchereau等人，1998，Nature 392：245-252)。關於癌症，樹突狀細胞可取樣並呈現腫瘤抗原及原始腫瘤專一性細胞毒殺性T細胞(Chiodoni等人，1999，J. Exp. Med. 190：125-133)。此外，樹突狀細胞可為細胞激素間白素-12(IL-12)之重要來源。腫瘤壞死因子 α (TNF α)，及干擾素 α (IFN α)於抗腫瘤免疫反應中扮演角色(Banchereau等人，1998，Nature 392：245-252)。因此，近年來，研究者已嘗試將DC活性運用於癌症治療中(參見，例如：Mehta-Damani等人，1994，J. Immunology 153：996-1003；Hsu等人，1996，Nature Medicine 2：52；Murphy等人，1996，The Prostate 29：371；Mehta-Damani等人，1994，J. Immunology 153：996-1003；Dallal等人，2000，Curr. Opin. Immunol. 12：583-588；Zeid等人，1993，Pathology 25：338；Furihaton等人，1992，61：409；Tsujitani等人，1990，Cancer 66：2012；Gianni等人，1991，Pathol. Res. Pract. 187：496；Murphy等人，1993，J. Inv. Dermatol. 100：3358)。

要誘發適當之免疫反應必需於抗原表現位置補充樹突狀細胞，攝入抗原，並於接收病原體傳遞之活化信號時遷移至二級淋巴器官，殺死細胞及/或T細胞。數個研究已提出

DC於人類腫瘤中之情況並已發表腫瘤或癌症患者內減弱之DC功能(Bell等人, 1999, J. Exp. Med. 190: 1417-1426; Scarpino等人, 2000, Am. J. Pathol. 156: 831-837; Lespagnard等人, 1999, Int. J. Cancer 84: 309-314; Enk等人, 1997, Int. J. Cancer 73: 309-316)。再者, 一些研究中觀察到之活化DC係為正預後因子(Enk等人, 1997, Int. J. Cancer 73: 309-316)。因此, 提高腫瘤中之樹突狀細胞活性可能為治療癌症之有效方法。

腫瘤可藉由干擾DC之運行或藉由不提供必需之活化信號而逃過免疫系統(Vicari等人, 2001, Seminars in Cancer Biology, 付印中)。特定言之, 腫瘤似乎不會表現許多病原體相關性分子型式(PAMPs)(Medzhitov等人, 2000, Sem. Immunol. 12: 185-188), 其可引發DC活化(Reis等人, 2001, Immunity 14: 495-498)。

近年來, 通行費樣受體(TLR)分子已被確認為PAMPs之受體之一種重要種類。通行費樣受體(TLRs)可辨識微生物病原體之特定分子型式(Aderem等人, 2000, Nature 406: 782-787)。已有十種不同於人類中之TLR分子被說明。1999年11月12日公開之世界專利WO 98/50547中揭示TLRs 2-10。值得注意的是現行公開之命名包括十種人類中之TLRs, 其中九種相當於WO 98/50547之TLR-2至TLR-10, 但其編號不吻合(Kadowaki等人, 2001, J. Exp. Med. 194: 863-869)。

透過微生物分子引發之TLRs之傳訊可強烈活化DCs以上升調節協同刺激分子(CD80及CD86)(Hertz等人, 2001, J. Immunol. 166: 2444-2450)並產生前發炎細胞激素(TNF- α , IL-

6 及 IL-12)(Thoma-Uszynski 等人，2001，J. Immunol. 154：3804-3810)。許多研究目前已鑑別出廣泛種類之化學變異性細菌產物，其可作為 TLR 蛋白質之配體，包括細菌性脂聚醣 (TLR-4)，鞭毛素 (TLR-5)，脂壁酸 (TLR-2) 及聚 I:C (TLR-3)。更特定言之，TLR-9 已顯示可為免疫刺激性細菌 CpG DNA 之配體 (Hemmi 等人，2000，Nature 408：740-745；Wagner，2001，Immunity 14：499-502)。

此外，腫瘤會啟動可抑制 DC 分化或功能之因子之分泌。其中一種可於癌症中抑制 DC 功能之腫瘤相關性因子為 IL-10。已有報告指出多種人類原發性腫瘤或轉移癌會分泌間白素 -10 (IL-10) (Chouaib 等人，1997，Immunol. Today 18：493-497)。此因子已被指明為一種 DC 功能之強調節劑。實際上，IL-10 可負向調節 IL-12 生產並抑制 DC 之 T-細胞共同刺激潛力 (DeSmedt 等人，1997，Eur. J. Immunol. 27：1229-1235；Caux 等人，1994，Int. Immunol. 6：1177-1185)。然而，拮抗性 DC 抑制信號，例如：IL-10 對於改善 DC 活化及因而產生之宿主對抗癌症之免疫反應之影響仍為未知。

目前已有之癌症療法例如：外科療法，放射療法，化療法及免疫生物法若非成功率有限即是會產生嚴重且不欲之副作用。在許多臨床診斷之固體腫瘤中 (其中該腫瘤係局部生長)，外科切除被認為是首選治療方式。然而，常常在手術後及一段時間後，又發現原始腫瘤已轉移，使得第二部位之癌侵襲已遍佈全身且患者隨後即死於二次癌症生長。雖然化療廣泛用於癌症治療，其係為一種通常基於預防細

胞增生之系統性療法。據此，化療係為非專一性治療型式，其影響所有增生性細胞，包括正常細胞，導致不欲且常為嚴重之副作用。

因此，頃需要新方法以治療被認為導因於異常免疫反應之疾病，特別是癌症。特定言之，解釋促進腫瘤-浸潤性樹突狀細胞活化之因子有助於操作樹突狀細胞以提高腫瘤專一性免疫反應。透過操作樹突狀細胞而調節免疫反應之方法及療法將可應用於此等疾病之治療。

發明內容

本發明藉由提供應用於疾病，例如：癌症之免疫療法之材料及方法，藉由促進腫瘤-浸潤性樹突狀細胞之活化而實現上述需求。頃已發現合併投予IL-10拮抗劑及TLR-9協同劑係一種有效之癌症療法。本發明因而提供一種治療癌症之方法，其包含對需要之個體投予有效量之腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑合併有效量之TLR協同劑。

於較佳實施例中，腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑可為下列任一種已知可抑制樹突狀細胞功能之腫瘤相關因子之拮抗劑：IL-6，VEGF，CTLA-4，OX-40，TGF- β ，前列腺素，神經節糖苷，M-CSF及IL-10。更佳者，該腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑係為一種IL-10拮抗劑。最佳者，該IL-10拮抗劑係為IL-10細胞激素之直接拮抗劑或為IL-10受體之拮抗劑。於某些具體實施例中，腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑係為一種抗體或抗體片段，一種小分子或反義核苷酸序列。最佳者，該腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑係為一種

抗-IL-10受體抗體。

於某些具體實施例中，TLR協同劑係為一種小分子，重組蛋白質，抗體或抗體片段，核苷酸序列或蛋白質-核酸序列。於較佳具體實施例中，TLR協同劑係為TLR-9之協同劑。較佳者，該TLR協同劑係為免疫刺激性核苷酸序列。再較佳者，該免疫刺激性核苷酸序列含有一個CpG基序(motif)。最佳者，該免疫刺激性核苷酸序列係選自由下列組成之群組：CpG 2006(表2及SEQ ID NO: 1)；CpG 2216(表2及SEQ ID NO: 2)；AAC-30(表2及SEQ ID NO: 3)；及GAC-30(表2及SEQ ID NO: 4)。該免疫刺激性核苷酸序列之穩定可藉由構造修飾，例如：硫代磷酸酯修飾或可裝入陽離子微脂體膠囊中以改善活體內藥物動力學及腫瘤導向。

於某些具體實施例中，腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑及/或TLR協同劑係靜脈內、腫瘤內、皮內、肌內、皮下或局部投予。

於一些具體實施例中，腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑及TLR協同劑係以融合蛋白質或其他彼此連結之形式投予。

本發明之方法可進一步包含投予至少一種腫瘤相關性抗原。該腫瘤抗原可以融合蛋白質之形式傳送或可連結於TLR協同劑及/或腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑。

本發明之再另一方面中，亦投予活化劑，例如：TNF- α ，IFN- α ，RANK-L或RANK之協同劑，CD40-L或CD40之協同劑，41BBL或41BB之協同劑或其他TNF/CD40受體家族成員之推測

性配體/協同劑。

本發明之再另一方面中，細胞激素係於之前或同時與腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑及/或TLR協同劑合併投予。於一較佳方面中，細胞激素係為GM-CSF或G-CSF或FLT-3L，其可作為重組蛋白質或重組融合蛋白質或傳送載體。投予此等因子會刺激某些DC之子集自前驅物生產，因而增加由腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑及TLR協同劑組合活化之腫瘤-浸潤性樹突狀細胞數目。

本發明之再另一方面中，選用之驅化因子係於之前或同時與腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑及/或TLR協同劑一起投予。於一較佳方面中，驅化因子係選自CCL13，CCL16，CCL7，CCL19，CCL20，CCL21，CXCL9，CXCL10，CXCL11，CXCL12之群組，其可作為重組蛋白質或重組融合蛋白質或傳送載體。於一最佳方面，驅化因子係於腫瘤類注射後直接，或經由導向構築體，例如：重組抗體，或經由膠囊化於特定可優先傳送至腫瘤內之媒介物傳送至腫瘤。投予驅化因子可促進某些DC子集補充至腫瘤內，因而增加由腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑及TLR協同劑組合活化之腫瘤-浸潤性樹突狀細胞數目。

發明之詳細說明

本文中所列之參考文獻均整體併列參考。

本發明係部分基於驚奇發現合併投予一種腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑與一種TLR協同劑在數種活體內模型中，對於腫瘤發展，包括C26-6CK，C26及B16F0具有強療效。

項已發現 IL-10 拮抗劑及 TLR-9 協同劑之合併投予可使腫瘤-浸潤性樹突狀細胞反而可反挫活化、生產 IL-12 及 $\text{TNF}\alpha$ 並誘導改善之腫瘤抗原專一性免疫反應。再者，項已發現對帶有腫瘤之動物投予 IL-10 拮抗劑及 TLR-9 協同劑可誘發腫瘤之排斥作用。

許多報告已提出腫瘤內部 DC 之活化狀態。於其中一篇報告中，經轉導以表現 GM-CSF 及 CD40L 之老鼠 C26 直腸癌腫瘤可被具成熟表型之 DC 重度滲透，且一部分腫瘤於開始生長後回復 (Chiodoni 等人，1999，J. Exp. Med. 190：125-133)。相同之 C26 細胞經工程以表現 6Ckine 可被未成熟 DC 滲透 (Vicari 等人，2000，J. Immunol. 165：1992-2000)。因為 DC 之活化及隨後之成熟係為使免疫反應起動之重要活動，咸認 C26-6CK 腫瘤-浸潤性樹突狀細胞之活化可導致腫瘤排斥作用。不期然地，已發現彼等腫瘤-浸潤性 DC 無法藉由抗-CD40 協同劑抗體透過 CD40 加以刺激，可用來讀出共同刺激分子之上升調節，於混合白血球反應中刺激 T 細胞之能力及生產 IL-12 及 $\text{TNF}\alpha$ 之能力。其對於細菌刺激物 LPS——一種 TLR-4 之配體，對於細菌因子 $\text{TNF}\gamma$ 及對於任何 LPS、 $\text{TNF}\gamma$ 與抗-CD40 抗體之組合均無反應。

因此，本發明群假設腫瘤-衍生性分子可於考慮其所使用之特定刺激時誘發腫瘤-浸潤性 DC 之反挫狀態。因而說明可抑制此反挫狀態之因子可導致有效之癌症治療。由 IL-10 之報告觀之，DC 抑制信號係由許多人類腫瘤所分泌 (Chouaib 等人，1997，Immunol. Today 18：493-497；De Smedt 等人，1997，

Eur. J. Immunol. 27: 1229-1235; Caux 等人, 1994, Int. Immunol. 6: 1177-1185), 本發明群測試拮抗性 IL-10 是否可改善 DC 活化並因而改善宿主抵抗癌症之免疫反應。然而, 結果發現以抗體阻斷性 IL-10 受體 (抗 -IL 10R) 治療小鼠對於 C26 直腸癌腫瘤或其 C26-6CK 變體之發展效果小 (後者係如 Vicari 等人, 2000, J. Immunol. 165: 1992-2000 之說明經基因工程以表現趨化因子 CCL21/SLC/6CKine: (參見實例 IV 及圖 5))。實際上, 如實例 II 及 III 之顯示, 抗 -IL 10R 抗體與 LPS+ IFN γ + 抗 -CD40 對於腫瘤-浸潤性 DC 之活化無效或效果很小。

接著, 本發明群假設其他活化因子, 特別是經由異於 TLR-4 之通行費樣家族之病原體相關性分子形式受體調節之信號, 可於腫瘤-浸潤性樹突狀細胞中運作。特定言之, 其研究 CpG 1668, 一種 TLR-9 之配體於老鼠中之作用 (Hemmi 等人, 2000, Nature 408: 740-745)。然而, 其觀察到 CpG 1668 於腫瘤-浸潤性樹突狀細胞 (實例 II 及 III) 或小鼠內之建立性皮下腫瘤 (實例 V 至 VII) 之治療中具有微小效果。

然而, 明顯對比之下, 本發明群驚喜發現合併 CpG 1668 與抗 -IL10R 可誘導藉由 C26-6CK 腫瘤-浸潤性 DC 生產 IL-12p70 及 TNF α 並大幅提高彼等 DC 於 MLR 中之刺激能力 (參見實例 II 及 III)。接著, 併用 CpG 1668 加抗 -IL10R 抗體於帶有 C26-6CK 腫瘤之小鼠中顯示顯著之抗腫瘤效果 (實例 V)。再者, 併用 CpG 1668 及抗 -IL10R 抗體而非併用 LPS+IFN γ + 抗 -CD40 抗體同樣可於來自親代 C26 腫瘤及來自其他病史起源之腫瘤: B16 黑色素瘤及 LL2 肺癌之腫瘤-浸潤性 DC 中誘發 IL-12 生產 (參

見實例 IV)。併用 CpG 1668 加抗 -IL10R 亦可於 C26 及 B16F0 腫瘤模型中顯示抗腫瘤活性(實例 VI 及 VII)。

本發明因而提供於哺乳類中治療癌症之方法，其包含對該哺乳類投予有效量之腫瘤-衍生性 DC 抑制因子拮抗劑合併有效量之 TLR 協同劑，透過腫瘤-浸潤性樹突狀細胞之活化。

本文中定義之"腫瘤-衍生性樹突狀細胞(DC)抑制因子拮抗劑"係為一種試劑，其於結合性或功能性分析中顯示可阻斷腫瘤細胞分泌劑之作用並已知可抑制樹突狀細胞功能。

本文中定義之"TLR 協同劑"係為任何可活化通行費樣受體("TLR")之分子，如說明於 Bauer 等人，2001，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98：9237-9242 中者。於一特別較佳之具體實施例中，TLR 協同劑係為 TLR9，例如說明於 Hemmi 等人，2000，Nature 408：740-745 及 Bauer 等人，2001，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98：9237-9242 中者。

1. 腫瘤-衍生性 DC 抑制因子拮抗劑

"腫瘤-衍生性 DC 抑制因子拮抗劑"一辭包括任何可阻斷於腫瘤-浸潤性 DC 內誘導反挫狀態之腫瘤-衍生性因子之作用者。此等腫瘤-衍生性因子包括，但不限於：IL-6、VEGF、CTLA-4、OX-40、TGF- β 、前列腺素、神經節糖苷、M-CSF 及 IL-10(Chouaib 等人，1997，Immunol. Today 18：493-497)。

腫瘤-衍生性 DC 抑制因子拮抗劑之鑑定可藉由分析其於活化刺激物存在下對於腫瘤樹突狀細胞之影響。於有效量之腫瘤-衍生性 DC 抑制因子拮抗劑存在時，腫瘤-樹突狀細

胞可進行熟化程序，可隨後測定細胞激素，例如：IL-12、TNF α 、INF α 之生產，或典型藉由成熟樹突狀細胞，例如：CD80、CD86、CD83及DC-Lamp表現之分子之表現。或者，腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑之效果可於分析非分離自腫瘤，於被發表可抑制樹突狀細胞成熟之腫瘤來源之經純化或未純化因子存在下活化之人類樹突狀細胞之活化時觀察之。

腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑可作用於DC抑制因子本身，例如：抗-IL-10單株抗體可阻斷IL-10之作用，或藉由其他可避免DC抑制因子具有其對腫瘤-浸潤性DC之正常效用之方式，例如：抗-IL-10R單株抗體可避免IL-10透過其於DC上之受體而發出信號。

腫瘤-衍生性DC抑制劑之拮抗劑可衍生自抗體或含有抗體片斷。此外，於結合或功能性分析中顯現可抑制受體活化之任何小分子拮抗劑、反義核苷酸序列、包含於基因傳送載體，例如：腺病毒或逆轉錄病毒載體之核苷酸片斷均符合此定義。此項技藝中已熟知如何篩選專一性結合於特定標的物，例如：腫瘤相關性分子，例如：受體之小分子。參見例如：高流量篩選會議，國際商業通訊，Southborough，MA 01772-1749。同樣地，可使用缺乏膜穿透功能區域之可溶型受體。最後，可使用突變拮抗劑型式之腫瘤-衍生性DC抑制因子，其可強力結合於相對應受體，但實質缺乏生物活性。

於本發明之特別較佳具體實施例中，該腫瘤-衍生性DC

抑制因子拮抗劑係為IL-10拮抗劑。"IL-10拮抗劑"一辭係包括可抑制IL-10之活性之IL-10本身之拮抗劑及IL-10受體之拮抗劑。可使用於本發明之IL-10拮抗劑之實例包括，但不限於彼等說明於美國專利第5,231,012號，1993年7月27日申請(針對IL-10及IL-10拮抗劑)及美國專利第5,863,796號，1999年1月26日申請者(針對IL-10受體及IL-10受體拮抗劑)，二者均特別併列為本文之參考。

2. TLR協同劑

數種衍生自微生物之TLR協同劑已被說明，例如：脂聚多醣、肽聚醣、鞭毛素及脂胞壁酸(Aderem等人，2000，Nature 406：782-787；Akira等人，2001，Nat. Immunol. 2：675-680)。部分之此等配體可活化不同之樹突狀細胞子集，其可表現不同型式之TLRs(Kadowaki等人，2001，J. Exp. Med. 194：863-869)。因此，TLR拮抗劑可為具有TLR協同劑性質之任一種微生物製劑。舉例言之，盤尼西林毒殺性鏈球菌劑OK-432含有脂胞壁酸，其可藉由TLR結合而誘導Th1細胞激素之生產(Okamoto等人，2000，Immunopharmacology 49：363-376)。表1列出數種已知TLR配體：

表 1

已知之 TLR 配體

TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9	TLR10
	LTA PG		LPS	纖毛素				CpG	
TLR1+TLR6	TLR2+TLR6								
脂蛋白	脂蛋白								

LTA：脂胞壁酸

LPS：脂聚糖

PG：肽聚糖

某些型式之未轉譯 DNA 已顯示可藉由活化 TLRs 來刺激免疫反應。特定言之，含 CpG 基序 (motif) 之免疫刺激性寡核苷酸已被廣泛揭示及發表為可活化淋巴球 (參見美國專利第 6,194,388 號)。本文所使用之 "CpG 基序" 係定義為未甲基化胞嘧啶-鳥糞嘌呤 (CpG) 雙核苷酸。含 CpG 基序之免疫刺激性寡核苷酸亦可根據本發明之方法作為 TLR 協同劑使用。

許多免疫刺激性寡核苷酸已說明於此項技藝中並已可利用可指明各方面之免疫反應，例如：細胞激素分泌、抗體生產、NK 細胞活化及 T 細胞增殖之標準分析鑑別之。參見例如：美國專利第 6,194,388 及 6,207,646 號；WO 98/52962；WO 98/55495；WO 97/28259；WO 99/11275；Krieg 等人，1995，Nature 374：546-549；Yamamoto 等人，1992 J. Immunol. 148：4072-4076；Ballas 等人，1996，J. Immunol. 157(5) 1840-1845；Klinman 等人，

1997, PNAS 93(7): 2879-83; Shimada 等人, 1986, Jpn. J. Cancer Res. 77: 808-816; Cowdery 等人, 1996, J. Immunol. 156: 4570-75; Hartmann 等人, 2000, J. Immunol. 164(3): 1617-24。

免疫刺激性核苷酸序列可為大於6個鹼基或鹼基對之任意長度。任何免疫刺激性核苷酸序列均可包含修飾, 例如: 3' OH或5' OH基之修飾, 核苷酸鹼基之修飾, 糖成份之修飾及磷酸酯環之修飾。免疫刺激性核苷酸序列可為單股或雙股DNA, 以及單股或雙股RNA或其它經修飾聚核苷酸。免疫刺激性核苷酸序列可包括或不包括一或多個迴文區段。

免疫刺激性核苷酸序列之分離可利用慣用之聚核苷酸分離步驟, 或可利用此項技藝中已熟知之技術及核酸合成設備合成, 其包括但不限於: 酵素法、化學法及較大寡核苷酸序列之降解。(參見, 例如: Ausubel等人, 1987及Sambrook等人, 1989)。

可使用於本發明方法中之免疫刺激性核苷酸序列之實例包括但不限於彼等揭示於美國專利第6,218,371號; 美國專利第6,194,388號; 美國專利第6,207,646號; 美國專利第6,239,116號及PCT公開號WO 00/06588(洛瓦(Iowa)大學); PCT公開號WO 01/62909; PCT公開號WO 01/62910; PCT公開號WO 01/12223; PCT公開號WO 98/55495; 及PCT公開號WO 99/62923(Dynavax Technologies Corporation), 其均併列為本文之參考。

特別言之, 美國專利第6,194,388號(洛瓦大學)揭示免疫刺激核酸, 其包含一段寡核苷酸序列, 其至少包括下式:



其中 C 和 G 為未甲基化者，其中 X_1X_2 係選自由 GpT、GpG、GpA、ApA、ApT、ApG、CpT、CpA、CpG、TpA、TpT 及 TpG 所組成之群組之雙核苷酸，且 X_3X_4 係選自由 TpT、CpT、ApT、TpG、ApG、CpG、TpC、ApC、CpC、TpA、ApA 及 CpA 所組成之群組之雙核苷酸且其中至少一個核苷酸具有磷酸酯骨架修飾。為要促進細胞攝入，已發表之較佳含 CpG 之免疫刺激性寡核苷酸大小範圍為 8 至 40 個鹼基對。符合此式之免疫刺激性寡核苷酸可使用於本申請專利之方法中。

WO 99/62923 揭示可與本發明合併使用之免疫刺激性核苷酸序列之其他實例。特定言之，經修飾之免疫刺激性核苷酸序列包含六體序列或六核苷酸，其含有一個中心 CG 序列，其中揭示該 C 殘基之修飾係藉由 C-5 及 / 或 C-6 加入一個拉電子部份。

免疫刺激性寡核苷酸可藉由構造修飾而安定，其可使之相對性抗生體內降解。安定化修飾之實例包括硫代磷酸酯修飾（即：將至少一個磷酸酯氧以硫取代）、非離子性 DNA 類似物，例如：烷基或芳基膦酸鹽（其中帶電之膦酸鹽氧以烷基或芳基取代）、磷酸雙酯及烷基磷酸三酯，其中該帶電性氧部分係經烷基化。於兩端含有二醇，例如：四乙二醇或六乙二醇之寡核苷酸亦顯示可實質抗核酸酶降解（參見美國專利第 6,194,388 號（洛瓦大學））。

免疫刺激性核苷酸序列亦可包埋或結合於傳送複合物內，其可造成對標的細胞表面之更高親和力及 / 或提高標的

細胞之細胞性攝入。免疫刺激性核苷酸序列傳送複合物之實例包括連接於固醇(例如：膽固醇)、脂質(例如：陽離子性脂質、病毒顆粒(virosome)或微脂體)，或標的細胞專一性結合劑(例如：可由標的細胞特定受體辨識之配體)。較佳之複合物必需於活體內足夠安定以避免於標的細胞內化前顯著解偶(uncoupling)。然而，該複合物應可於適當之細胞內條件下切割以使寡核苷酸以具功能之型式釋出(美國專利第 6,194,388 號；WO 99/62923)。

於一特別較佳之具體實施例中，TLR 協同劑係為 TLR9 之協同劑，例如說明於 Hemmi 等人，2000，Nature 408：740-745 及 Bauer 等人，2001，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98：9237-9242 者。目前已知之 TLR-9 配體為含 CpG 基序之未甲基化寡核苷酸序列，例如：老鼠中之 CpG 1668(TCCATGACGTTCTGATGCT)(SEQ ID NO：5)及人類中之 CpG 2006(TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT)(SEQ ID NO：1)(Bauer 等人，2001，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98：9237-9242)。表 2 列出較佳之 TLR9 協同劑：

表 2

對人類 DC 有效之 CpG 實例：
CpG 2006：TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO：1)
CPG 2216：GGGGGACGATCGTCGGGGGG (SEQ ID NO：2)
AAC-30：ACCGATAACGTTGCCGGTGACGGCACCACG (SEQ ID NO：3)
GAC-30：ACCGATGACGTCGCCGGTGACGGCACCACG (SEQ ID NO：4)

除上述者之外，可利用 TLRs 或其片段進行配體篩選以鑑別其他分子，包括對受體具結合親和力之小分子。參見例如：高流量篩選會議，國際商業通訊，Southborough，MA 01772-1749。隨後之生物分析可再用以測定假定之協同劑是否可提供活性。倘若一化合物具有內在之刺激活性，則其可活化受體且其因而為刺激配體活性，例如：誘導發出信號之協同劑。

本文所使用之 TLR 協同劑之 "有效量" 係為可誘發所欲生物效應之量。特定言之，有效量係為與有效量之腫瘤-衍生性 DC 抑制因子拮抗劑併用時，足以啟動腫瘤-浸潤性 DC 活化之量。

"有效量" 之腫瘤-衍生性 DC 抑制因子拮抗劑係為可誘發所欲生物效應之量。特定言之，有效量係為與有效量之 TLR 協同劑併用時，足以啟動腫瘤-浸潤性 DC 活化之量。

"合併" 投予係指同時及先後投予。腫瘤-衍生性 DC 抑制因子拮抗劑可傳送或投予於同一位置或不同位置且可同時或延遲不超過 48 小時後投予。本文所使用之同時或合併投予意謂將腫瘤-衍生性 DC 抑制因子拮抗劑及 / 或 TLR 協同劑及 / 或抗原於一般治療計畫療程期間內之 (a) 同時，或 (b) 不同時間投予個體。於後者之情況，兩化合物係於足夠接近以達所欲效果之時間內投予。

用以實施本發明之腫瘤-衍生性 DC 抑制因子拮抗劑及 / 或 TLR 協同劑可為具與天然產物相同之胺基酸序列之重組蛋白質，或為一種重組蛋白質，其衍生自天然產物但含有可

改變其藥物動力學特性之修飾及/或增加新穎生物特性但卻保留其原始DC活化或抗腫瘤特性。

傳送腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑及/或TLR協同劑之模式可藉由注射，包括靜脈內、腫瘤內、皮膚內、肌內、皮下或局部。

於本發明之一特別較佳具體實施例中，腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑及TLR協同劑係與腫瘤相關性抗原合併投予。可使用於本發明中之腫瘤相關性抗原包括，但不限於Melan-A，酪胺酸酶、p97、 β -HCG、GalNAc、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-12、MART-1、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC18、CEA、DDC、黑色素瘤抗原gp75、HKer 8、高分子量黑色素瘤抗原、K19、Tyr1及Tyr2、pMel 17基因家族成員、c-Met、PSA、PSM、甲種胎兒蛋白、甲狀腺過氧化酶、gp100、NY-ESO-1、端粒酶(telomerase)及p53。此處並未徹底列舉，其僅為可使用以實施本發明之抗原型式之示例。

其他異於腫瘤相關性抗原之抗原可與腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑及TLR協同劑一起投予以便提高對抗此等抗原之專一性免疫反應。此等抗原包括但不限於細菌、病毒、真菌、寄生蟲表現之原態或經修飾分子。抗原亦可包括過敏原及自體抗原，且於此狀況下，腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑及TLR協同劑之組合可與抗原一同投予以便使免疫反應再度朝向較適合之結果，例如：將Th2型免疫反應轉形至Th1型免疫反應中。

可使用顯示對不同族群、性別、地理分佈及疾病階段具最適功能之不同組合之抗原。於本發明之一具體實施例中，至少二或更多種不同抗原與腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑及TLR協同劑組合物一同投予。

腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑及/或TLR協同劑之投予可彼此及/或與抗原合併或可以各種方式彼此或與抗原連結(參見例如：WO 98/16247；WO 98/55495；WO 99/62823)。例如：TLR協同劑及/或腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑及/或抗原之投予可為空間性彼此相近，或為混合物(即：於溶液中)。連結之達成可藉由許多方法，包括：接合(conjugation)、殼體化(encapsulation)、經由附加至平台或吸附於表面。

要將TLR協同劑接合至腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑及/或抗體，可使用多種方法。其連接可透過共價交互作用及/或透過非共價交互作用，包括高親和力及/或低親和力交互作用。可偶合TLR協同劑與腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑之非共價交互作用之實例包括但不限於：離子鍵、疏水性交互作用、氫鍵及凡得瓦耳力。例如當腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑係為一種蛋白質或抗體且TLR協同劑係為一種免疫刺激性聚核苷酸時，可利用此項技藝中已熟知之方法將接合之胜肽部份透過固態擔體化學連接於免疫刺激性聚核苷酸之3'端(參見例如：Haralambidis等人，1990a，Nucleic Acids Res. 18：493-499及Haralambidis等人，1990b，Nucleic Acids Res. 18：501-505)。或者，可插入具潛在反應功能性之"連接臂"，例如：於胞嘧啶鹼基之C-5處之胺或羧基可提供胜肽

連接之柄 (Ruth, 4th Annual Congress for Recombinant DNA Research, p.123)。免疫刺激性聚核苷酸至胜肽之鍵結亦可透過高親和力，非共價性交互作用形成，例如：生物素-抗生蛋白鏈菌素複合物。生物素基團可例如連接至寡核苷酸之經修飾鹼基 (Roget等人, Nucleic Acids Res. (1989) 17: 7643-7651)。將抗生蛋白鏈菌素部分插入胜肽部分可生成抗生蛋白鏈菌素接合胜肽之非共價結合複合物及生物素化聚核苷酸。

設計以進一步活化或刺激DC成熟化之分子部份可優先投予。此等試劑之實例為TNF- α ，IFN- α ，RANK-L或RANK之協同劑，CD40-L或CD40之協同劑。此等活化劑可提供額外之成熟化信號，其可與TLR協同劑共同參與i)加速來自組織之DC經由引流淋巴遷移至淋巴器官，及ii)活化DC以分泌可提高免疫反應-特別是抗腫瘤反應之分子-例如：IL-12及IFN α (Banchereau等人, 1998, Nature 392: 245-252)。

於本發明方法中，GM-CSF，G-CSF或FLT3-L亦可優先投予。投予GM-CSF，G-CSF或FLT3-L之目的可能為提高循環性DC之數目，其可再局部性於腫瘤內局部補充。此規範可暗示一種使用GM-CSF，G-CSF或FLT3-L至少五至七天之系統性預治療。或者可局部投予GM-CSF，G-CSF或FLT3-L局部分化之DC前驅物(單細胞，DC之類漿細胞前驅物)至DC內，其可再拾起傳送至相同位置之抗原。

此外，驅化因子或多重驅化因子之組合可優先與本發明之腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑及TLR協同劑合併投予。

已知具有利效用之驅化因子包括 CCL21、CCL3、CCL20、CCL16、CCL5、CCL25、CXCL12、CCL7、CCL8、CCL2、CCL13、CXCL9、CXCL10、CXCL11(參見例如：Sozzani 等人，1995，J. Immunol. 155：3292-3295；Sozzani 等人，1997，J. Immunol. 159：1993-2000；Xu 等人，1996，J. Leukoc. Biol. 60：365-371；MacPherson 等人，1995，J. Immunol. 154：1317-1322；Roake 等人，1995，J. Exp. Med 181：2237-2247及歐洲專利申請案 EP 0 974 357 A1，1998 年 7 月 16 日申請且 2000 年 1 月 26 日公開)。一般而言，腫瘤-衍生性 DC 抑制因子拮抗劑、TLR 協同劑及/或活化劑及/或細胞激素係以於醫藥載體中包含有效量之腫瘤-衍生性 DC 抑制因子拮抗劑、TLR 協同劑及/或抗原及/或活化劑及/或細胞激素之醫藥組合物型式投予。此等試劑合併其他活性或惰性成份用於醫療用途，例如：於慣用之醫藥上可接受之載體或稀釋劑，例如：免疫原性佐劑中，伴隨生理無害性安定劑及賦形劑。醫藥載體可為任何適於傳送本發明組合物至患者之相容性、無毒性物質。

細胞激素或驅化因子可視需要利用包含驅化因子或細胞激素或其生物活性片段或變體及導向分子部份之導向構築物傳送至腫瘤。本文所使用之"導向分子部份"(targeting moiety)係指可辨識或鎖定腫瘤相關性抗原或由腫瘤之非癌性成份專一性表現之構造，例如：腫瘤血管。導向分子部份之實例包括但不限於胜肽、蛋白質、小分子、載體、抗體或抗體片段，其可辨識或鎖定腫瘤相關性抗原或由腫瘤之非癌性成份專一性表現之構造。於較佳具體實施例中，

該導向分子部份係為一種胜肽、一種蛋白質、一種小分子、一種載體，例如：病毒載體、一種抗體或一種抗體片段。於較佳具體實施例中，該導向分子部份係為一種抗體或抗體片段。於最佳具體實施例中，導向載體係為 ScFv 片段。

導向分子部份可專一於腫瘤細胞表現之抗原，如已說明於人類者，例如：專一於葉酸鹽受體 (Melani 等人，1998，Cancer Res. 58：4146-4154)，Her2/neu 受體，表皮生長因子受體及 CA125 腫瘤抗原 (Glennie 等人，2000，Immunol. Today 21：403-410)。其他數種抗原可作為標的物且可由腫瘤之惡性細胞優先表現、獨特表現、過度表現或表現為成熟型式 (Boon 等人，1997，Curr. Opin. Immunol. 9：681-683)。其可包括 Melan-A、酪胺酸酶、p97、 β -HCG、GalNAc、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-12、MART-1、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC18、CEA、DDC、黑色素瘤抗原 gp75、HKer 8、高分子量黑色素瘤抗原、K19、Tyr1 及 Tyr2、pMel 17 基因家族成員、c-Met、PSA、PSM、甲種胎兒蛋白、甲狀腺過氧化酶、gp100、類胰島素生長因子受體 (IGF-R)、端粒酶及 p53。此處並未徹底列舉，其僅為可使用以實施本發明之抗原型式之示例。或者，導向分子部份可專一於腫瘤之異於惡性細胞之成份優先表現，並於特定腫瘤血管中之抗原。 α_v 整合素家族、VEGF 受體及蛋白聚糖 NG2 為此等腫瘤血管相關性抗原之實例 (Pasqualini 等人，1997，Nat. Biotechnol. 15：542-546)。

原發及轉移癌均可根據本發明治療。可治療之癌型式包括但不限於：黑色素瘤，胸、胰、結腸、肺、神經膠質瘤、

子宮內膜、胃部、小腸、腎、前列腺、甲狀腺、卵巢、睪丸、肝、頭和頸、結腸直腸、食道、胃、眼、膀胱、膠質母細胞瘤及轉移癌。"癌"一辭係指惡性之上皮或內分泌組織，包括呼吸系統癌、胃腸系統癌、泌尿生殖系統癌、前列腺癌、內分泌系統癌及黑色素瘤。本文所使用之轉移係定義為腫瘤散佈至遠離區淋巴結之位置。

有效治療所需之試劑量係視許多不同因素而定，包括投予方式、鎖定位置、患者之生理狀態及所投予之其他藥物。因此，治療劑量可調整至最適安全性及功效。針對特定癌症之有效治療劑量之動物試驗可供作人類劑量之進一步預測指標。各種考量係說明於，例如：Gilman等人(編著)(1990) Goodman 和 Gilman之：The Pharmacological Bases of Therapeutics，第八版，Pergamon Press；及 Remington's Pharmaceutical Sciences，第17版(1990)，Mack Publishing Co. Easton, PA中者。投予方法係討論於其中及下文，例如：針對靜脈內、腹膜內或肌內投予，經皮膚擴散及其他。醫藥上可接受之載體可包括水、生理鹽水、緩衝液及其他化合物，例如說明於Merck Index，Merck & Co., Rahway, New Jersey中者。緩慢釋放調配物或緩慢釋放裝置可用以連續式投藥。

腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑及/或TLR協同劑之劑量範圍可視協同劑/拮抗劑之型式而定。舉例言之，IL-10受體抗體之有效劑量典型範圍為約0.05至約25微克/公斤/天，較佳為約0.1至約20微克/公斤/天，最佳為約1至約10微克/公斤/天。至於免疫原性組合物。例如：TLR協同劑，其用量

可依 TLR 協同劑之形式、個體、欲治療病症及其他為熟習此項技藝者顯見之因素而變動。需考慮之因素包括抗原性、該 TLR 協同劑是否複合或共價性連接於佐劑或傳送分子、投予路徑及欲投予之免疫劑量數目。此等因素為此項技藝中已知。適當之劑量範圍係為可提供所欲之樹突狀細胞活化者。一般而言，免疫刺激性寡核苷酸之劑量範圍可為例如：約下列任一者：0.1 至 100 微克，0.1 至 50 微克，0.1 至 25 微克，0.1 至 10 微克，1 至 500 微克，100 至 400 微克，200 至 300 微克，1 至 100 微克，100 至 200 微克，300 至 400 微克，400 至 500 微克。或者，劑量可為約下列任一者：0.1 微克，0.25 微克，0.5 微克，1.0 微克，2.0 微克，5.0 微克，10 微克，25 微克，50 微克，75 微克，100 微克。據此，劑量範圍可為彼等下限為約下列任一者：0.1 微克，0.25 微克，0.5 微克及 1.0 微克；及上限為約下列任一者：25 微克，50 微克及 100 微克。於此組合物中，含 ISS 聚核苷酸與抗原之莫耳濃度比可變化。給予各患者之絕對量係視藥理性質，例如：生物利用性、清除速率及投予途徑而定。

一般而言，治療係由低於化合物最適劑量較小劑量開始。其後，小量提高劑量直至達環境中之最適效果為止。適當劑量之決定及特定情況中之投予方法係為此項技藝之技術範圍。

藉由載體投予之腫瘤-衍生性 DC 抑制因子拮抗劑及/或 TLR 協同劑之劑量可主要依所使用之特定載體之效率及患者之病情及受治療患者之體重或表面積而定。劑量大小亦

可藉由伴隨特定載體之投予之任何不良副作用之存在，特性及程度，或於特定患者內之轉導細胞型式決定之。在決定治療中投予之有效量載體時，醫師需評估載體之循環性血漿值、載體毒性、疾病之進展，及抗載體抗體之生產。核酸之典型劑量主要視投予途徑及基因傳送系統而定。依傳送方法，劑量之範圍可大概為約1微克至100毫克或以上。一般對於典型之70公斤患者而言，來自載體之裸核酸劑量當量為約1微克至100微克，且包含病毒粒子之載體之劑量亦加以計算以得到治療性核酸之相當用量。

於本申請專利方法之實施中之GM-CSF、G-CSF或FLT-L之較佳生物活性劑量係為可誘發循環性CD14⁺/CD13⁺前驅細胞數目之最大量增加；於DC前驅物及成熟DC表面之抗原呈現分子之表現；對T細胞之抗原呈現活性；及/或刺激抗原依賴性T細胞反應連同成熟DC功能之劑量組合。皮下投予所使用之GM-CSF量之典型範圍為約0.25微克/公斤/天至約10.0微克/公斤/天，較佳為約1.0-8.0微克/公斤/天，最佳為2.5-5.0微克/公斤/天。對於特定患者之有效量可藉由測定一或多種指明於上文之參數之顯著變化而確立。

實例

本發明可藉由下列非限制性實例之方式說明之。

實例 1

C26-6CK腫瘤-浸潤性樹突狀細胞與骨髓-衍生性樹突狀細胞相較，對LPS+抗-CD40+IFN γ 組合無反應。

於此實例中，發明群已顯明DC浸潤性C26-6CK腫瘤與骨

髓-衍生性 DC 相較，針對混合白血球反應 (MLR) 中之 IL-12 生產或刺激能力而言，對 LPS+IFN γ +抗-CD40 抗體無反應 (圖 1)。所有腫瘤細胞均培養於 DMEM (Gibco-BRL, Life Technologies, Paisley Park, Scotland) 中，其中添加 10% FCS (Gibco-BRL)，1mM hepes (Gibco-BRL)，Gentallin (Schering-Plough, Union, NJ)， 2×10^{-5} M beta-2 巰基乙醇 (Sigma, St. Louis, MO)。所有細胞均培養於 37°C 下，經調濕並具 5% CO $_2$ 之培養箱中。C26 結腸癌及 TSA 乳癌係由 Mario Colombo (Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori, Milano, Italy) 提供。B16F0 黑色素瘤及 LL2 癌係取得自美國菌種保存中心 (LGC, Strasbourg, 法國)。經基因工程改造成可分泌老鼠驅化因子 6Ckine/SLC/CCL21 之 C26-26CK 細胞株已由本發明群先前說明 (Vicari 等人, 2000, J. Immunol. 165: 1992-2000)。使用抗-CD11c 磁珠 (Myltenyi Biotec GmbH, 德國) 將來自 C26-26CK 腫瘤之 TIDC 強化。骨髓-衍生性 DC 之取得係藉由將骨髓前驅物與 GM-CSF (Schering-Plough, Union, NJ) 及 TNF α (R&D Systems, Minneapolis, MN) 一起培養 5 天。活化係藉由於培養基中添加 10 奈克/毫升 LPS (Sigma, St. Louis, MO)，20 奈克/毫升 IFN γ (R&D Systems) 及 20 微克/毫升經純化之抗抗-CD40 抗體之 FKG45.5 (由 AG Rolink, 免疫學基礎研究所, 瑞士贈予) 培養過夜。圖 1A 顯示藉由 FACS (關卡在 CD11c 陽性細胞上) 之 MHC 第二族，CD40 及 CD86 之表面表現之分析。圖 1B 顯示 CD11c $^{+}$ 細胞於 20 小時，包括與佈雷非德菌素 A (Brefeldin A) 培養 2.5 小時後之 IL-12p40 之細胞內表現。圖 1C 中，將混合之白血球反應 TIDC 或

以 LPS+IFN γ +抗 -CD40 刺激之骨髓 - 衍生性 DC 照射並以不同數目於定量之經強化同種異體性 T 細胞 (3×10^5 T 細胞) 存在下培養 5 天。藉由插入放射性胸腺嘧啶測定培養之最後 18 小時期間之增殖。圖 1D 說明以 LPS+IFN γ +抗 -CD40 活化後藉由專一性 ELISA 於培養上清液中測定 IL-12 p70。

此等綜合結果暗示樹突狀細胞浸潤性 C26-6CK 腫瘤並不可經由 LPS+IFN γ +抗 -CD40 之刺激而得到樹突狀細胞之典型功能，亦即：刺激同種異體性 T 細胞之能力及分泌 IL-12 之能力。此等受損之功能似乎為樹突狀細胞與腫瘤交互作用之結果。

實例 II

C26-6CK 腫瘤 - 浸潤性樹突狀細胞中之 CpG 1668+抗 -IL 10R 組合復原之 IL-12 及 TNF α 。

於此實例中，發明群已顯明 CpG 1668 與抗 -IL 10R 抗體合併投予於 C26-6CK 腫瘤 - 浸潤性樹突狀細胞中復原之 IL-12 及 TNF α (圖 2)。

使用抗 -CD11c 磁珠強化來自 C26-6CK 腫瘤之 TIDC。活化係於 GM-CSF 10 奈克/毫升存在下進行過夜。活化劑係使用：10 奈克/毫升 LPS，20 奈克/毫升 IFN γ ，20 奈克/毫升抗 -CD40 抗體之 FKG45.5，5 奈克/毫升 CpG 1668 (序列：TCC-ATG-ACG-TTC-CTG-ATG-CT，經硫代磷酸酯修飾，MWG Biotech，德國) 及 10 奈克/毫升抗 -IL 10R (1B13A 複製體，Castro 等人，2000，J. Exp. Med. 192：1529-1534)。使用專一性 ELISA 於經 24 小時刺激後之培養上清液中測定 IL-12 p70 及 TNF α 含量。

總之，此等結果指出 CpG 1668 本身並不能誘發 C26-6CK 腫瘤-浸潤性 DC 生產 IL-12。抗-IL 10R 本身(未顯示)亦無作用或與 LPS+IFN γ +抗-CD40 合併只有微小作用。只有抗-IL 10R 與 CpG 1668 之組合可誘發顯著之自 C26-6CK 腫瘤-浸潤性 DC 生產具生物活性之 IL-12 及 TNF α 。

實例 III

CpG 1668+抗-IL-10R 組合復原之 C26-6CK 腫瘤-浸潤性樹突狀細胞內之 MLR 刺激能力。

於此實例中，發明群已顯明 CpG 1668+抗-IL-10 受體抗體之合併投予所復原之 MLR 刺激能力。

使用抗-CD11c 磁珠強化來自 C26-6CK 腫瘤之 TIDC 並於 GM-CSF 及各種組合之 LPS、IFN γ 、抗-CD40、抗-IL 10R 及 CpG 1668 存在下培養過夜。再將細胞照射並以不同數目於固定數目之強化同種異體性 T 細胞 (3×10^5 T 細胞) 存在下培養 5 天。藉由在培養之最後 18 小時期間併入放射性胸腺嘧啶核苷測定其增殖。結果顯示腫瘤-浸潤性 DC 於 MLR 分析中為弱刺激子細胞，但其刺激能力可受 CpG 1668 少量提高，可被抗-IL 10R+LPS+IFN γ +抗-CD40 之組合進一步提高，且被抗-IL 10R 與 CpG 1668 之組合提高最多。因此，此實例顯示抗-IL 10R 加 CpG 1668 係為復原 MLR 中之 DC 刺激能力之最適組合。此可解釋成：使用 IL-10 拮抗劑及 TLR9 協同劑治療癌症時，可有較佳之活體內原態 T 細胞品質，並因而有較佳之 T 細胞-調節性抗腫瘤免疫反應。

實例 IV

來自 C26 野生型之腫瘤 - 浸潤性樹突狀細胞及來自其他組織學特性之腫瘤對於 LPS+ IFN γ + 抗 -CD40 組合無反應但對 CpG 1668+ 抗 -IL-10R 反應生產 IL-12。

此實例顯示來自 C26 野生型之腫瘤 - 浸潤性樹突狀細胞及來自其他組織學特性之腫瘤對於 LPS+ IFN γ + 抗 -CD40 組合無反應但對 CpG 1668+ 抗 -IL-10R 反應生產 IL-12。

使用抗 -CD11c 磁珠強化來自均於皮下生長之 C26 結腸癌、B16 黑色素瘤及 LL2 肺癌腫瘤之 TIDC 並於 GM-CSF 及各種組合之 LPS、IFN γ 、抗 -CD40、抗 -IL 10R 及 CpG 1668 存在下培養過夜。以 FACS 分析經 20 小時，包括與布雷非德菌素 A 培養 2.5 小時後之 IL-12p40 之細胞內表現對 CD11c 之表面表現。圖 4 顯示，就 C26-6CK 腫瘤所發現，分離自親代 C26 腫瘤及不同組織學來源之腫瘤之 DC 對於以 LPS、IFN γ 、抗 -CD40 活化均無反應但對於 TLR-9 協同劑 CpG 1668 加抗 -IL 10R 之組合可反應生產 IL-12。因此，此等觀察提示 IL 10 拮抗劑與 TLR-9 協同劑之組合可為許多腫瘤之有效療法。

實例 V

CpG 1668+ 抗 -IL-10R 抗體在 C26-6CK 腫瘤模型中之療效。

- 在第 0 天於七隻 8 週大雌 BALB/c 小鼠群組皮下植入 1×10^5 個 C26-6CK 腫瘤細胞並如下治療：

- 於第 7、14 及 21 天於腫瘤周圍 (若腫瘤太小) 或內部注射 10 微克之 CpG 1668。

- 於第 7 天開始 (第 24 天結束) 一週兩次腹膜注射 250 微克純

化之抗-IL10R抗體。對照抗體為純化之GL113抗體。

每週三次以觸診評估腫瘤發展並使用雙角規形夾(caliper)測定腫瘤，其腫瘤體積 $=I^2 \times L \times 0.4$ ，I為小直徑而L為大直徑。若腫瘤超過1500毫米立方則將小鼠犧牲或人道處理。

圖5顯示所有單獨注射對照抗體或抗-IL10R抗體之小鼠均於7至10天內發展出腫瘤，其終於造成約4週即需犧牲動物。注射TLR-9協同劑及CpG 1668有小效果，因1/7老鼠未發展出腫瘤。此外，CpG 1668組之存活率稍佳且其三週後之腫瘤平均體積較對照組小。反之，以CpG 1668與抗-IL10R組合治療之小鼠雖然發展出可觸摸到之腫瘤，但7隻小鼠中有6隻可排除腫瘤。隨後，於其餘實驗中將此等小鼠歸屬為無腫瘤者。此等結果指出TLR-9協同劑與IL-10拮抗劑之組合於C26-6CK模型中具治療價值，暗示其可用以治療其他腫瘤，包括於人體中。

實例 VI

CpG 1668+抗-IL10R抗體在C26腫瘤模型中之療效。

-在第0天於七隻8週大雌BALB/c小鼠群組皮下植入 5×10^4 個C26腫瘤細胞並如下治療：

-於第7、14及21天於腫瘤內部注射5微克之CpG 1668。

-於第7、14及21天腹膜注射250微克純化之抗-IL10R抗體。

對照抗體為純化之GL113抗體。

每週三次以觸診評估腫瘤發展並使用雙角規形夾(caliper)測定腫瘤，其腫瘤體積 $=I^2 \times L \times 0.4$ ，I為小直徑而L為大直徑。若腫瘤超過1500毫米立方則將小鼠犧牲或人道處理。

圖 6 顯示所有單獨注射對照抗體、CpG 1668 或抗 -IL10R 抗體之小鼠均於 7 天內發展出腫瘤，其終於造成約 3 至 4 週即需犧牲動物。反之，以 CpG 1668 與抗 -IL10R 組合治療之小鼠雖然發展出可觸摸到之腫瘤，但 7 隻小鼠中有 6 隻可排除腫瘤。隨後，於其餘實驗中將此等小鼠歸屬為無腫瘤者。此等結果指出 TLR-9 協同劑與 IL-10 拮抗劑之組合於 C26 模型中具治療價值，暗示其可用以治療其他腫瘤，包括於人體中。

實例 VII

CpG 1668+ 抗 -IL10R 抗體在 B16F0 黑色素瘤模型中之療效。

- 在第 0 天於七隻 8 週大雌 C57BL/6 小鼠群組皮下植入 5×10^4 個 B16F0 腫瘤細胞並如下治療：

- 於第 7、14 及 21 天於腫瘤內部注射 5 微克之 CpG 1668。

- 於第 7、14 及 21 天腹膜注射 250 微克純化之抗 -IL10R 抗體。

對照抗體為純化之 GL113 抗體。

每週三次以觸診評估腫瘤發展並使用雙角規形夾(caliper)測定腫瘤，其腫瘤體積 $= I^2 \times L \times 0.4$ ，I 為小直徑而 L 為大直徑。若腫瘤超過 1500 毫米立方則將小鼠犧牲或人道處理。

圖 7 顯示所有單獨注射對照抗體、CpG 1668 或抗 -IL10R 抗體之小鼠均於 7 天內發展出腫瘤，其終於造成約 3 至 4 週即需犧牲動物。單獨 CpG 1668 對存活率有小效果。反之，以 CpG 1668 與抗 -IL10R 組合治療之小鼠雖然發展出可觸摸到之腫瘤，但 7 隻小鼠中有 6 隻可排除腫瘤。隨後，於其餘實驗中將此等小鼠歸屬為無腫瘤者。此等結果指出 TLR-9 協同劑與 IL-10 拮抗劑之組合於 B16F0 模型中具治療價值，暗示其可用

以治療其他腫瘤，包括於人體中。

實例 VIII

來自 C26-6CK 腫瘤之腫瘤-浸潤性 DC 可對抗 -IL10 抗體及 CpG 1668 之組合反應生產 IL-12。

使用抗 -CD11c 磁珠強化來自 C26-6CK 之 TIDC 並於 GM-CSF 及各種組合之經純化抗 -IL 10 抗體與 CpG 1668 存在下培養過夜。以 FACS 分析經 20 小時，包括與布雷非德菌素 A 培養 2.5 小時後之 IL-12p40 之細胞內表現對 CD11c 之表面表現。

圖 8 顯示 CpG 1668 與抗 -IL10 之組合可於 C26-6CK 腫瘤-浸潤性樹突狀細胞內誘導 IL-12 之生產，此暗示 IL-10 本身之拮抗劑與有效量之 TLR-9 協同劑在一起，可有效治療癌症。

實例 IX

以來自 C26 腫瘤之上清液抑制骨髓-衍生性 DC 活化可被抗 -IL-10R 及 / 或 吲哚美辛 (indomethacin) (為一種環氧化酶抑制劑) 回復。

骨髓-衍生性 DC 之取得係藉由將骨髓前驅物與 GM-CSF 與 TNF α 於 10% 體積比之 C26 腫瘤上清液存在或缺乏之下培養 5 天。腫瘤上清液之製備係將皮下生長於 BALB/c 小鼠之 0.5 公分 C26 腫瘤割下並切碎，再於 10 毫升之 DMEM 中培養 48 小時。將所得上清液以 0.2 微米過濾並冷凍待用。此上清液以專一性 ELISA (R&D Systems) 測定含 0.25 奈克 / 毫升之 IL-10 及 50 奈克 / 毫升之 PGE₂。為了要抑制上清液中之 PGE₂ 合成，於 48 小時培養期間加入 1 微克 / 毫升之環氧化酶吲哚美辛抑制劑 (Sigma)。

5天之後，骨髓DC被不同組合之最適劑量之LPS、IFN γ 及抗-CD40抗體於10微克/毫升之抗-IL10R抗體存在或缺乏之下活化。DC活化之測定係藉由FACS測其共同刺激分子CD40及CD86之表現及藉由胞內染色測其IL-12生產。

圖9顯示C26腫瘤上清液可抑制DC活化。添加吲哚美辛存在下所製得之上清液或抗-IL10R之DC培養物中可部分減輕效用，但二者之組合可完全恢復CD40及CD86之上升調節及IL-12表現。

此等實驗強烈暗示環氧化酶之生產，特別是前列腺素，亦為腫瘤-衍生性DC抑制因子。

實例 X

CpG 1668+吲哚美辛在C26-6CK腫瘤模型中之療效

-在第0天於七隻6週大雌BALB/c小鼠群組皮下植入 5×10^4 個C26-6CK腫瘤細胞並如下治療：

-於第7、14及21天於腫瘤內部注射5微克之CpG 1668。

-於第5天開始至28天止於飲水中隨意添加5微克/毫升吲哚美辛。

每週三次以觸診評估腫瘤發展。若腫瘤超過1500毫米立方則將小鼠犧牲或人道處理。

圖10顯示所有對照小鼠均於7天內發展出腫瘤，其終於造成約3至4週即需犧牲動物。CpG或吲哚美辛組中僅有1/7未發展出腫瘤。反之，4/7以CpG 1668及吲哚美辛之組合治療之小鼠未發展出腫瘤。此等結果指出TLR-9協同劑與環氧化酶抑制劑之組合於C26-6CK模型中具治療價值，暗示其可用

以治療其他腫瘤，包括於人體中。

本發明可於不遠離其精神及範圍下進行許多修飾及變化，其可顯見於熟習此項技藝者。本文中說明之特定具體實施例係僅供作範例，且本發明並不僅限制於附加之申請專利範圍之專有名詞，連同該申請專利範圍所稱之同義語之全部範圍。

圖示簡單說明

圖 1 顯示 C26-6CK 腫瘤 - 浸潤性樹突狀細胞與骨髓 - 衍生性樹突狀細胞相較，對 LPS+ 抗 -CD40+IFN γ 組合無反應。圖 1A 表示藉由 FACS 分析 MHC 第 II 群，CD40 及 CD86 之表面表現之結果 (關卡在 CD11c 陽性細胞)。圖 1B 表示藉由 CD11c+ 細胞於 20 小時，包括與布雷非德菌素 A (Brefeldin A) 培養 2.5 小時後之 IL-12p40 之細胞內表現。圖 1C 表示混合之白血球反應。圖 1D 中，以 LPS+ IFN γ + 抗 -CD40 活化後藉由專一性 ELISA 於培養上清液中測定 IL-12 p70。

圖 2. CpG 1668+ 抗 -IL-10R 於 C26-6CK 腫瘤 - 浸潤性樹突狀細胞內合併復原之 IL-12 及 TNF α 。使用抗 -CD11c 磁珠強化來自 C26-6CK 之 TIDC 並於 GM-CSF 及各種組合之 LPS、IFN γ 、抗 CD40、抗 -IL 10R 及 CpG 1668 存在下培養過夜。藉由專一性 ELISA 於培養上清液中測定 IL-12 p70 及 TNF α 含量。

圖 3. CpG 1668+ 抗 -IL-10R 合併復原之 DC 浸潤性 C26-6CK 腫瘤之 MLR 刺激能力。使用抗 -CD11c 磁珠強化來自 C26-6CK 之 TIDC 並於 GM-CSF 及各種組合之 LPS、IFN γ 、抗 CD40、抗 -IL 10R 及 CpG 1668 存在下培養過夜。再將細胞照射並以不同數目於

固定數目之強化同種異體性T細胞(3×10^5 T細胞)存在下培養5天。藉由在培養之最後18小時期間併入放射性胸腺嘧啶核苷測定其增殖。

圖4來自親代C26腫瘤之腫瘤-浸潤性樹突狀細胞及來自不同組織學起源之腫瘤對於LPS+IFN γ +抗-CD40組合無反應但對CpG 1668+抗-IL-10R反應生產IL-12。將來自指定腫瘤之TIDC以抗-CD11c磁珠強化並於GM-CSF、LPS+ IFN γ +抗-CD40或抗-IL-10R+ CpG 1668存在下培養過夜。圖4表示培養細胞經20小時，包括與布雷非德菌素A培養2.5小時後之IL-12p40之細胞內表現及CD11c之表面表現。

圖5表示C26-6CK腫瘤模型中之CpG 1668+抗-IL10R抗體之療效。將7週大雌BALB/c小鼠之群組皮下注射 5×10^4 個C26-6CK細胞並以每週兩次腹膜內注射250微克純化之抗-IL10R抗體及每週一次於腫瘤內注射10微克CpG 1668之組合於腫瘤接種第7天開始治療三週。

圖6表示C26腫瘤模型中之CpG 1668+抗-IL10R抗體之療效。將7週大雌BALB/c小鼠之群組皮下注射 5×10^4 個C26細胞並以每週一次腹膜內注射250微克純化之抗-IL10R抗體及於腫瘤內注射5微克CpG 1668之組合於腫瘤接種第7天開始治療三週。

圖7表示B1F0黑色素瘤腫瘤模型中之CpG 1668+抗-IL10R抗體之療效。將7週大雌C57BL/6小鼠之群組皮下注射 5×10^4 個B16F0細胞並以每週一次腹膜內注射250微克純化之抗-IL10R抗體及於腫瘤內注射5微克CpG 1668之組合於腫瘤接種第7

天開始治療三週。

圖 8 表示另一種 IL-10 拮抗劑，單株抗 -IL10 抗體，其與 TLR-9 協同劑 CpG 1668 併用，可誘導 DC 浸潤性 C26-6CK 腫瘤生產 IL-12。使用抗 -CD11c 磁珠強化來自 C26-6CK 之 TIDC 並於 GM-CSF 或抗 -IL 10R+CpG 1668 或抗 -IL 10+CpG 1668 存在下培養過夜。圖 8 表示培養細胞經 20 小時，包括與布雷非德菌素 A 培養 2.5 小時後之 IL-12p40 之細胞內表現及 CD11c 之表面表現。

圖 9 表示另一種腫瘤-衍生性 DC 抑制因子， PEG_2 ，其可被拮抗以使 DC 活化。將骨髓-衍生性 DC 培養於含有(經吲哚美辛 (Indomethacin) 處理) PGE_2 之腫瘤上清液存在或缺乏之下。再於不同 DC 經 LPS、 $IFN\gamma$ 及抗 -CD40 抗體之組合於抗 -IL10R 抗體存在或缺乏之下活化後，測定其成熟標示物之表現及 IL-12 生產。

圖 10 表示 C26-6CK 結腸癌腫瘤模型中之 CpG 1668+吲哚美辛之療效。將 8 週大雌 BALB/c 小鼠之群組皮下注射 5×10^4 個 C26-6CK 細胞並以每週一次於腫瘤內注射 5 微克 CpG 1668，於腫瘤接種第 7 天開始三週，及/或自第 5 至第 28 天投予吲哚美辛 5 微克/毫升於飲水中之組合治療之。

序列表

<110> 美國先靈大藥廠

<120> 治療癌症之方法

<140> 中華民國專利申請號第 091134176 號

<141> 2002-11-25

<150> US 60/333,434

<151> 2001-11-27

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> 合成序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 1

tcgtcgtttg tcgtttgtc gtt 23

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 合成序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 2

gggggacgat cgtcgggggg 20

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> 合成序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 3

accgataacg ttgccggtga cggcaccacg 30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> 合成序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 4

accgatgacg tcgccggtga cggcaccacg 30

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 合成序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 5

tccatgacgt tcctgatgct 20

肆、中文發明摘要

樹突狀細胞 (Dendritic cell)(DC)在抗原專一性免疫反應中扮演重要角色。本發明係提供治療疾病狀態，包括癌症之材料及方法，其係藉由活化因疾病而對活化刺激表現低反應之宿主之樹突狀細胞。特定言之，本發明係提供治療哺乳類癌症之方法，其包括對於該哺乳類投予有效量之腫瘤-衍生性 DC 抑制因子拮抗劑合併有效量之通行費樣受體 (Toll-like receptor)(TLR)協同劑。

伍、英文發明摘要

Dendritic cells (DC) play a critical role in antigen-specific immune responses. Materials and methods are provided for treating disease states, including cancer, by activating dendritic cells from the host which are rendered hypo-responsive to activation stimuli by the disease. In particular, methods are provided for treating cancer in a mammal comprising administering to said mammal an effective amount of a tumor-derived DC inhibitory factor antagonist in combination with an effective amount of a Toll-like receptor (TLR) agonist.

拾、申請專利範圍

1. 一種治療癌症之醫藥組合物，其包括有效量之腫瘤-衍生性樹突狀細胞(DC)抑制因子拮抗劑合併有效量之TLR協同劑。
2. 如申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑係選自由下列組成之群組：IL-6拮抗劑，VEGF拮抗劑，CTLA-4拮抗劑，OX-40拮抗劑，TGF-B拮抗劑，前列腺素拮抗劑，神經節糖苷拮抗劑，M-CSF拮抗劑及IL-10拮抗劑。
3. 如申請專利範圍第2項之醫藥組合物，其中該腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑係為IL-10拮抗劑。
4. 如申請專利範圍第3項之醫藥組合物，其中該IL-10拮抗劑係選自由IL-10之拮抗劑及IL-10受體之拮抗劑所組成之群組。
5. 如申請專利範圍第4項之醫藥組合物，其中該IL-10拮抗劑係為：
 - a) 經重組的；
 - b) 一種天然配體；
 - c) 一種小分子；
 - d) 一種抗體或抗體片段；
 - e) 一種反義核苷酸序列；
 - f) 一種可溶性IL-10受體分子。
6. 如申請專利範圍第5項之醫藥組合物，其中該抗體係為一種單株抗體。

7. 如申請專利範圍第6項之醫藥組合物，其中該抗體係為一種抗-IL-10R單株抗體。
8. 如申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該TLR協同劑係為：
 - a) 經重組的；
 - b) 一種天然配體；
 - c) 一種免疫刺激性核苷酸序列；
 - d) 一種小分子；
 - e) 一種經純化之細菌萃取物；
 - f) 一種不活化之細菌製劑。
9. 如申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該TLR協同劑係為TLR-9協同劑。
10. 如申請專利範圍第9項之醫藥組合物，其中該TLR協同劑係為一種免疫刺激性核苷酸序列。
11. 如申請專利範圍第10項之醫藥組合物，其中該免疫刺激性核苷酸序列含有一段CpG基序。
12. 如申請專利範圍第11項之醫藥組合物，其中該免疫刺激性核苷酸序列係選自由CpG 2006(SEQ ID NO: 1)、CpG 2216(SEQ ID NO: 2)、AAC-30(SEQ ID NO: 3)及GAC-30(SEQ ID NO: 4)所組成之群組。
13. 如申請專利範圍第10項之醫藥組合物，其中該免疫刺激性核苷酸序列之安定係藉由結構修飾，例如硫代磷酸酯修飾。
14. 如申請專利範圍第10項之醫藥組合物，其中該免疫刺激

- 性核苷酸序列係包覆於陽離子微脂體內。
15. 如申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑係為一種抗-IL-10R單株抗體且TLR協同劑係為CpG 2006(SEQ ID NO: 1)。
 16. 如申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其進一步包括一種物質，其可使腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑及/或TLR協同劑於傳送位置緩慢釋放。
 17. 如申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該腫瘤-衍生性DC抑制因子拮抗劑及/或TLR協同劑係靜脈內、腫瘤內、皮膚內、肌內、皮下或局部投予。
 18. 如申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其進一步包括至少一種腫瘤相關性抗原。
 19. 如申請專利範圍第18項之醫藥組合物，其中該腫瘤相關性抗原係連接於TLR協同劑。
 20. 如申請專利範圍第18項之醫藥組合物，其中該腫瘤相關性抗原係選自由下列所組成之群組：Melan-A、酪胺酸酶、p97、 β -HCG、GalNAc、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-12、MART-1、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC18、CEA、DDC、黑色素瘤抗原gp75、HKer 8、高分子量黑色素瘤抗原、K19、Tyr1及Tyr2、pMel 17基因家族成員、c-MET、PSA、PSM、甲種胎兒蛋白、甲狀腺過氧化酶、gp100、NY-ESO-1、p53及端粒酶(telomerase)。
 21. 如申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其中該受治療癌症係選自由下列所組成之群組：黑色素瘤，胸、胰、結

- 腸、肺、神經膠質瘤、子宮內膜、胃部、小腸、腎、前列腺、甲狀腺、卵巢、睪丸、肝、頭和頸、結腸直腸、食道、胃、眼、膀胱、膠質母細胞瘤及轉移癌。
22. 如申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其進一步包括一種活化劑。
23. 如申請專利範圍第22項之醫藥組合物，其中該活化劑係選自由下列所組成之群組：IFN α ，TNF α ，RANK配體/協同劑，CD40配體/協同劑，或其他TNF/CD40受體家族成員之配體/協同劑。
24. 如申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其進一步包括一種可提高血液樹突狀細胞數目之細胞激素。
25. 如申請專利範圍第24項之醫藥組合物，其中該樹突狀細胞增殖劑係選自由FLT3-L，GM-CSF及G-CSF所組成之群組。
26. 如申請專利範圍第1項之醫藥組合物，其進一步包括一種活化於樹突狀細胞之驅化因子。
27. 如申請專利範圍第26項之醫藥組合物，其中該驅化因子係選自由下列所組成之群組：CCL21，CCL3，CCL20，CCL16，CCL5，CCL25，CXCL12，CCL7，CCL8，CCL2，CCL13，CXCL9，CXCL10及CXCL11。
28. 如申請專利範圍第26項之醫藥組合物，其中該驅化因子係利用一種導向構築體傳送至腫瘤，其包括一種驅化因子或生物活性片段活其變體與一個導向分子部份。
29. 如申請專利範圍第28項之醫藥組合物，其中該導向分子

部份係選自由下列所組成之群組：

- a) 一種至少有 10 個胺基酸之胜肽；
- b) 一種蛋白質；
- c) 一種小分子；
- d) 一種載體；及
- e) 一種抗體或抗體片段。

30. 如申請專利範圍第 1 項之醫藥組合物，其中該腫瘤-衍生性 DC 抑制因子拮抗劑及/或 TLR 協同劑係彼此連結。

31. 如申請專利範圍第 30 項之醫藥組合物，其中該腫瘤-衍生性 DC 抑制因子拮抗劑及/或 TLR 協同劑係進一步連結於腫瘤相關性抗原。

拾壹、圖式

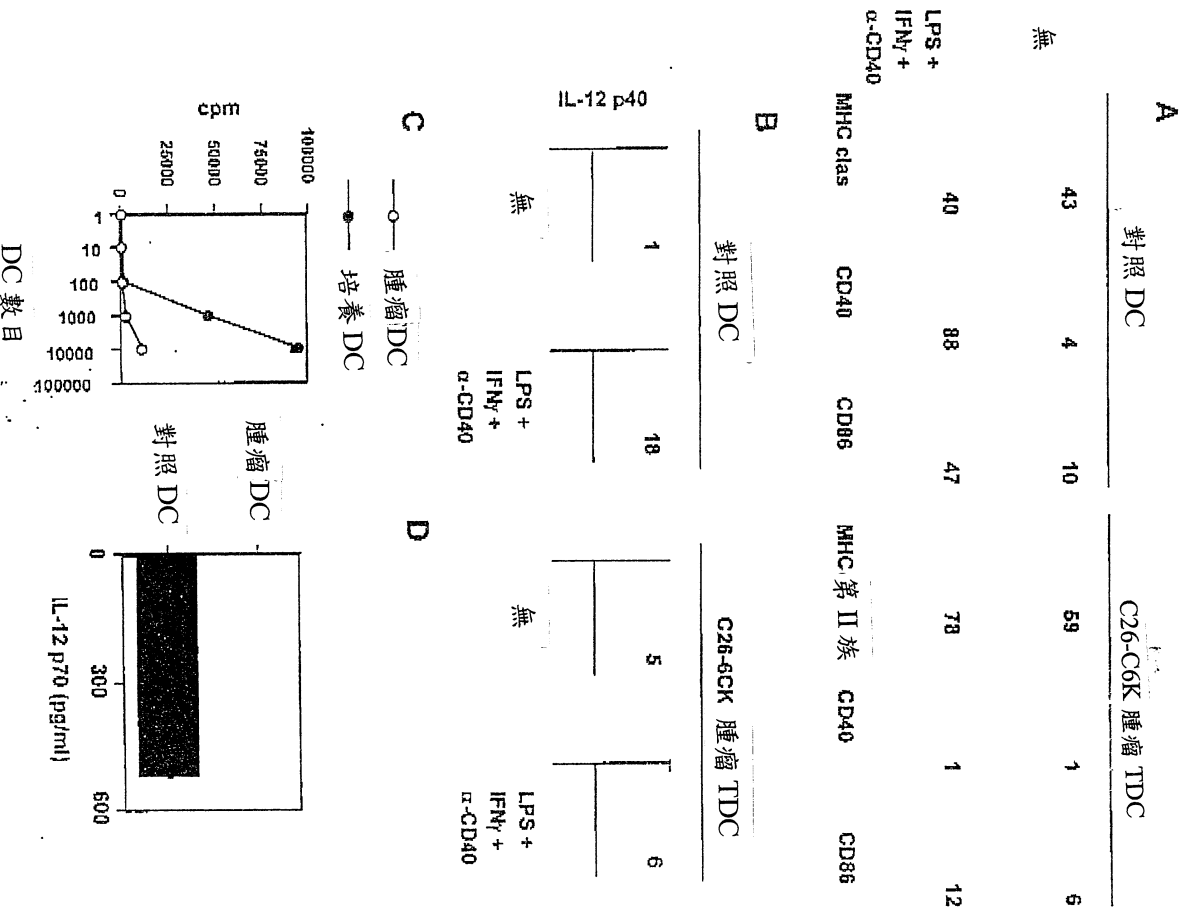


圖 1

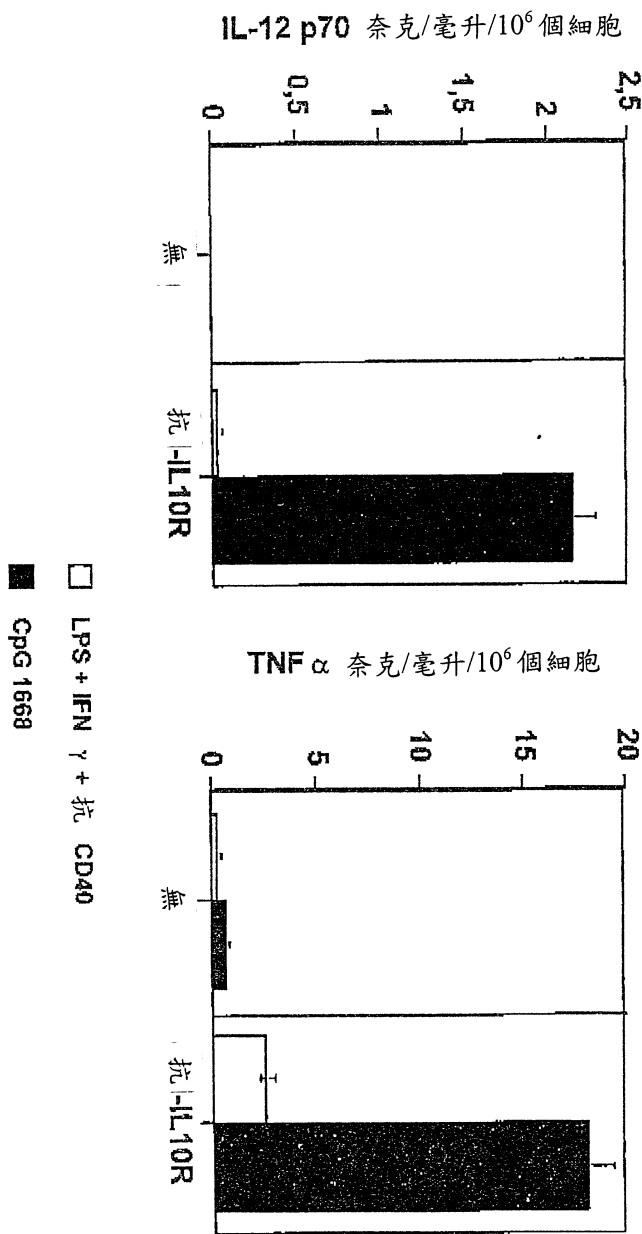


圖 2

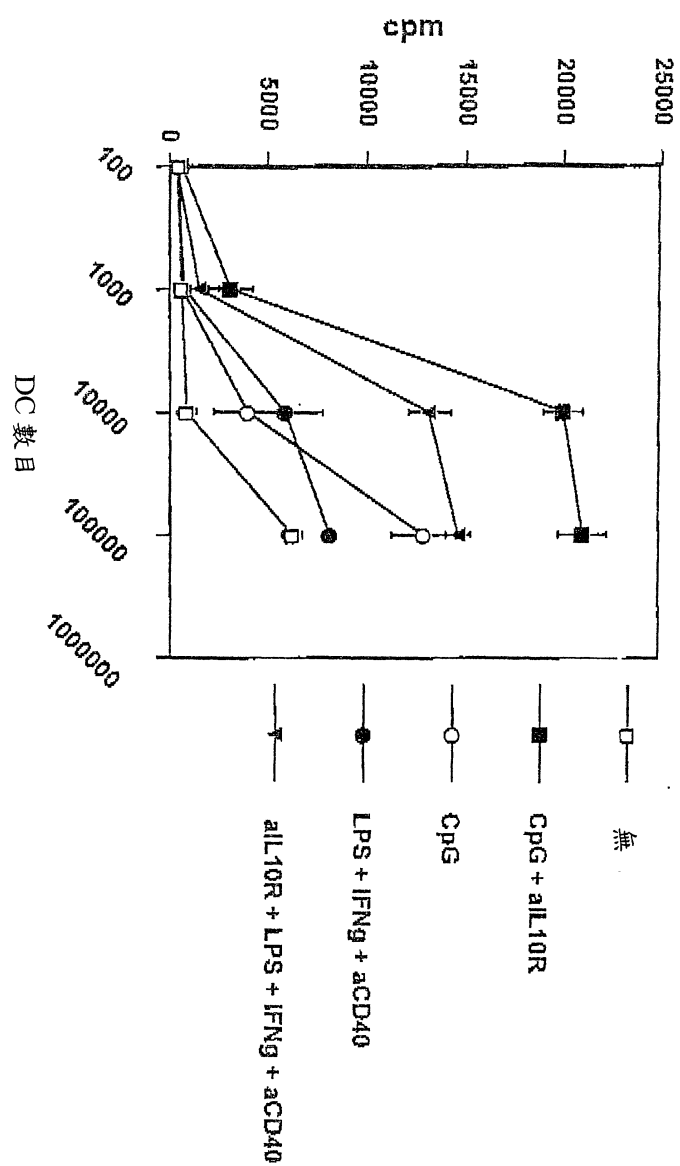


圖 3

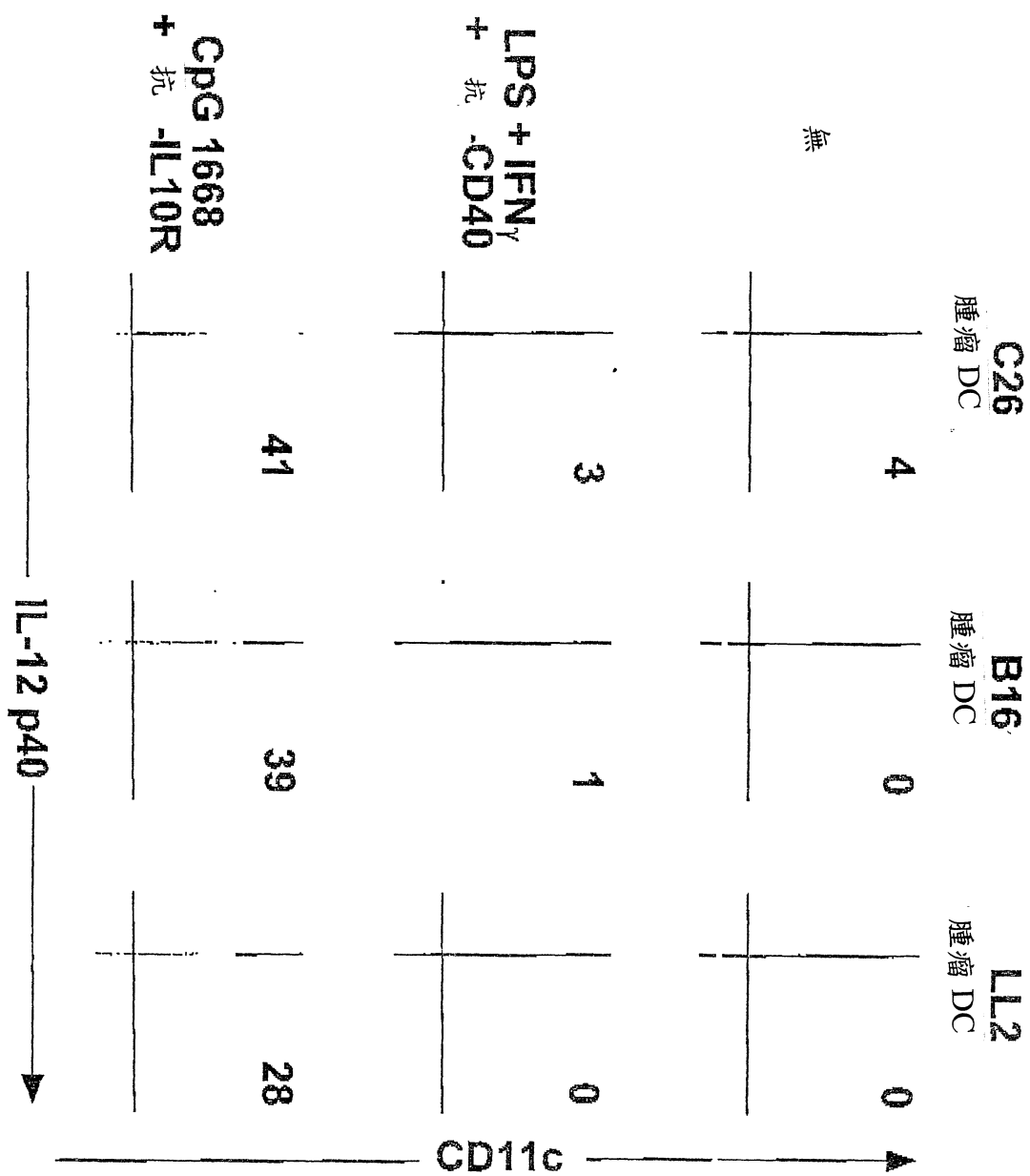
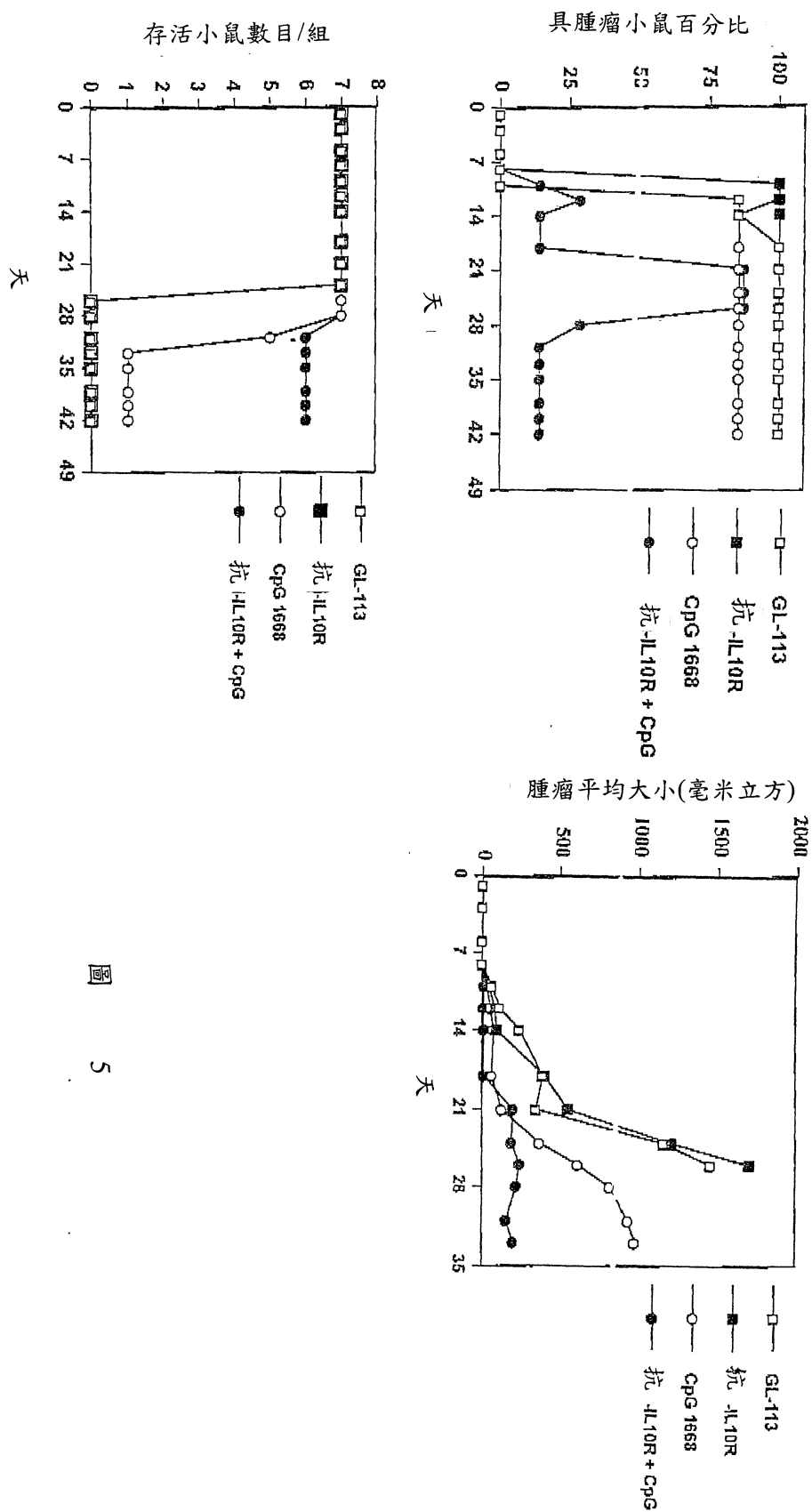
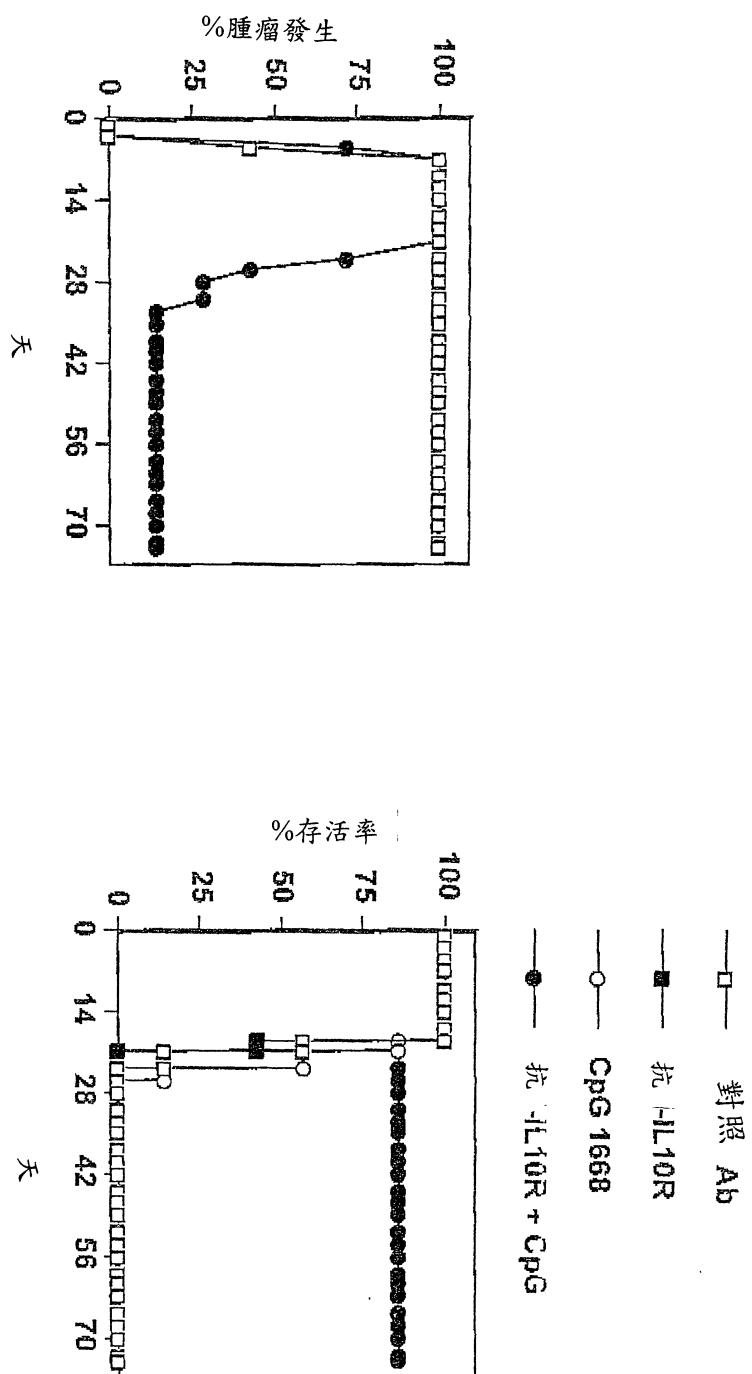


圖 4

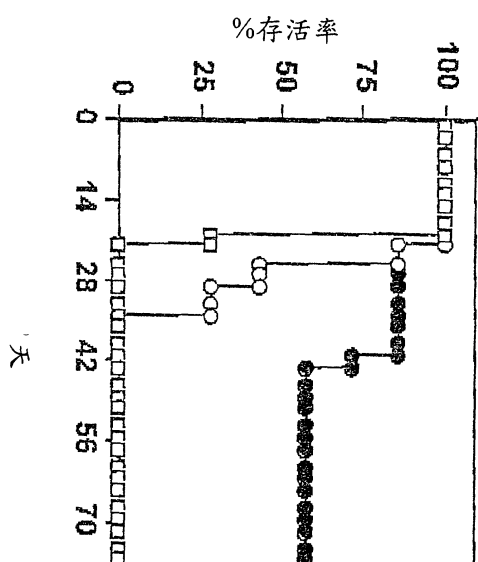
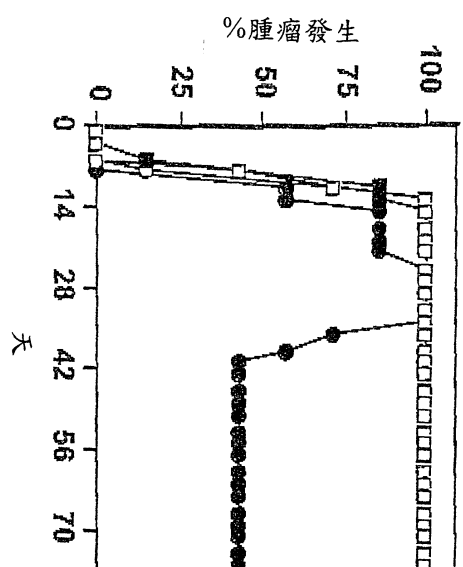


圖

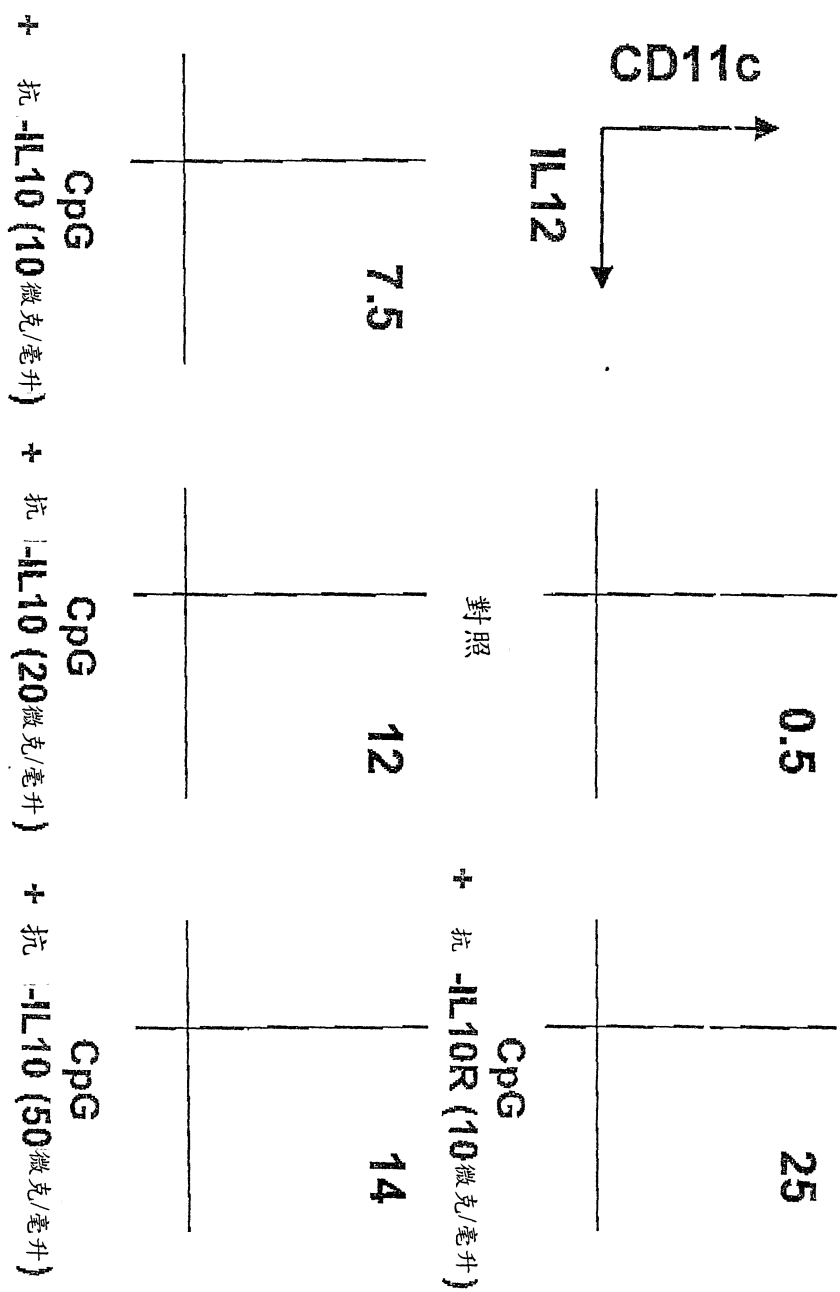
CpG 1668 + 抗-IL10R 抗體在 C26 模型中之療效



CpG 1668 + 抗-IL10R 抗體在 B16F0 模型中之療效



中性化抗-IL10 抗體與 CpG 1668 併用可恢復來自 C26-6CK 腫瘤之 TIDC 之 IL-12 生產



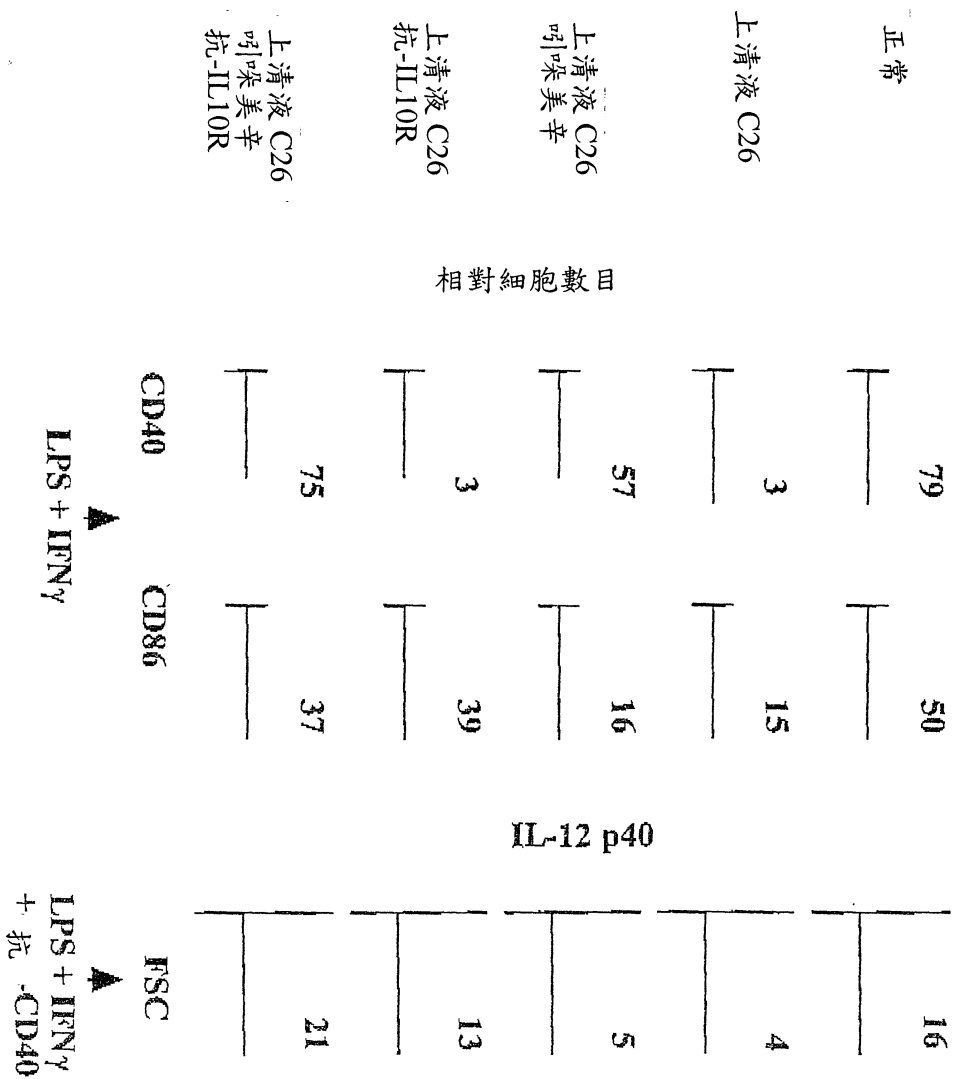
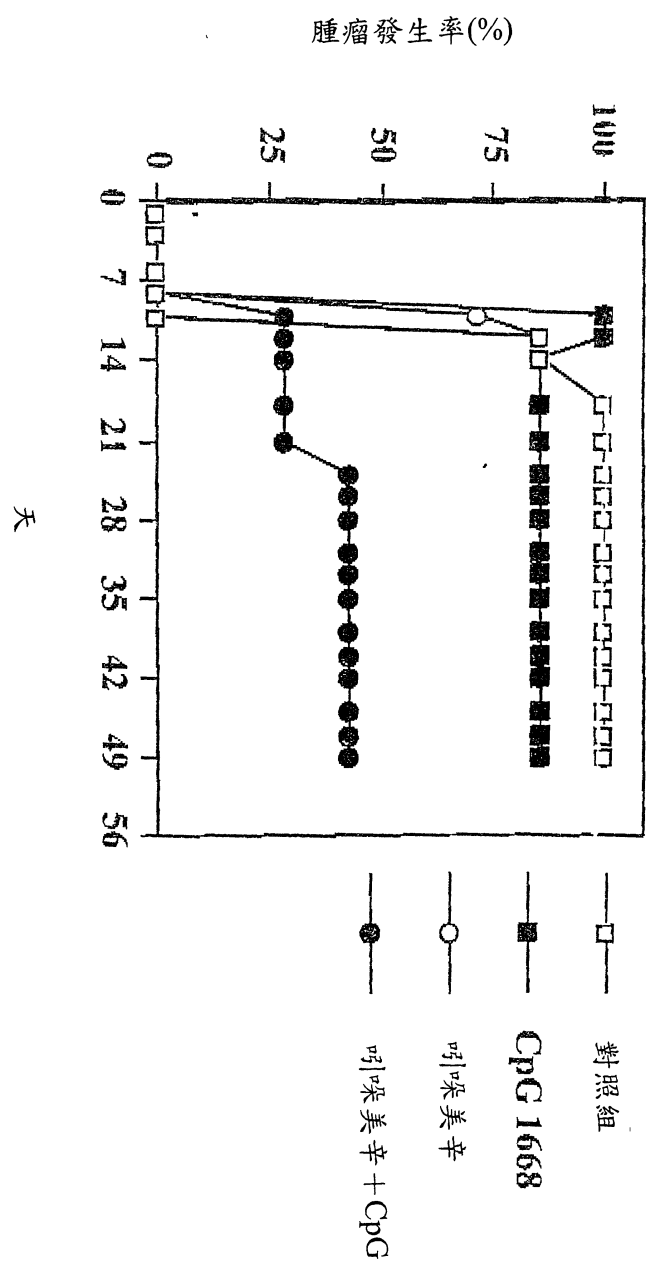


圖 9



陸、(一)、本案指定代表圖為：第2圖

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：

柒、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：