



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I703214 B

(45)公告日：中華民國 109 (2020) 年 09 月 01 日

(21)申請案號：104124956

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 07 月 31 日

(51)Int. Cl. : **C12N15/115 (2010.01)****A61K31/7088(2006.01)****A61P35/00 (2006.01)****A61P37/04 (2006.01)**

(30)優先權：2014/07/31 美國

62/031,427

(71)申請人：中央研究院(中華民國) ACADEMIA SINICA (TW)

臺北市南港區研究院路 2 段 128 號

國立台灣大學(中華民國) NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY (TW)

臺北市羅斯福路 4 段 1 號

(72)發明人：楊泮池 YANG, PAN CHYR (TW)；張翼中 CHANG, YI CHUNG (TW)；賴薇云 LAI, WEI YUN (TW)

(74)代理人：林秋琴；陳彥希；何愛文

(56)參考文獻：

US 2007/0031890A1

US 2013/0209514A1

WO 2010/103292A2

WO 2011/099857A1

WO 2013/122720A2

WO 2014/071379A1

2013 年 03 月 01 日，Use of Oligonucleotide Aptamer Ligands to Modulate the Function of Immune Receptors, Eli ilboa et al, Clin Cancer Res; 19(5):1054-1062

審查人員：林奕萍

申請專利範圍項數：23 項 圖式數：17 共 73 頁

(54)名稱

具拮抗 PD-1 功能的適體分子於癌症治療相關之應用

(57)摘要

本發明提供結合至 PD-1 並拮抗 PD-1 的適體及其促進 T 細胞增生、治療癌症或諸如 HIV 感染之傳染病的用途。

Aptamers that bind to and antagonize PD-1 and uses thereof in promoting T cell proliferation, treating cancer or infectious diseases such as HIV infection.

I703214

發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※IPC 分類：

【發明名稱】

具拮抗PD-1功能的適體分子於癌症治療相關之應用

AN ANTAGONISTIC PD-1 APTAMER AND ITS APPLICATIONS IN
CANCER THERAPY RELATED APPLICATIONS

【中文】

本發明提供結合至PD-1並拮抗PD-1的適體及其促進T細胞增生、治療癌症或諸如HIV感染之傳染病的用途。

【英文】

Aptamers that bind to and antagonize PD-1 and uses thereof in promoting T cell proliferation, treating cancer or infectious diseases such as HIV infection.

【代表圖】

【本案指定代表圖】： 無

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

具拮抗PD-1功能的適體分子於癌症治療相關之應用

AN ANTAGONISTIC PD-1 APTAMER AND ITS APPLICATIONS IN
CANCER THERAPY RELATED APPLICATIONS

【技術領域】

本申請案依據35 U.S.C. §119(e)請求在2014年7月31日提申之美國臨時申請案第62/031,427號的優先權，該件臨時申請案的全部內容以引用的方式併入本文。

本發明提供結合至PD-1並拮抗PD-1的適體及其促進T細胞增生、治療癌症或諸如HIV感染之傳染病的用途。

【先前技術】

癌細胞可調控宿主免疫系統，以便於躲避免疫監督。已開發出數種方法在腫瘤微環境中重新活化免疫系統並且恢復T細胞消滅癌細胞的能力。這些方法之一是以阻斷通常抑制免疫反應之受體為主的免疫檢核點接受器，該等受體為諸如細胞毒性T-淋巴球抗原蛋白4 (CTLA-4)以及程序性死亡蛋白1 (PD1)。伊匹單抗(ipilimumab)(一種對抗CTLA-4的拮抗性抗體(mAb))在2011年經FDA核准用於治療晚期黑色素瘤。近來，對抗PD-1的抑制性抗體在臨床試驗中經證實有效治療黑色素瘤及非小細胞肺癌(NSCLC)。

PD-1是因為其在將死細胞上高度表現且涉入程序性細胞死亡的過程而命名。PD-1是第I型跨膜蛋白，含有屬於免疫球蛋白超家族的細胞外域以及

含有免疫受體酪胺酸基抑制性模組(ITIM)的細胞內域。與CTLA-4受體相似，PD-1也是抑制T細胞活化的一種強力抑制性受體。但是，信號傳遞路徑分析揭示，PD-1及CTLA-4透過不同機制抑制T細胞活化且CTLA-4及PD-1拮抗性抗體的雙重治療能夠引起協同效用。此外，相比於僅在T細胞上表現的CTLA-4，PD-1主要在活化的T細胞、B細胞及巨噬細胞上表現。PD-1受體分布更為廣闊，這暗示著PD-1在免疫調節中可能涉入更為廣泛的角色。這些研究結果都暗示，阻斷PD-1路徑的分子在抗癌免疫治療中可能擁有極大的潛力。

適體是短的DNA或RNA分子，它們能夠形成二維結構或甚至更為複雜的三維結構。自從在1990年代早期發現適體後，適體技術已有長足進展。適體有幾個優點而使其適合供治療應用，這些優點包括分子量較低而容許其比抗體更容易穿透通過組織、化學合成的費用低廉、多樣的修飾方法且環境中的穩定性高。因此，開發出對目標蛋白具有高度親和力之適體產品將極富市場競爭性。

【發明內容】

本揭示內容是基於開發若干抗-PD-1核酸適體，該等適體在活體外成功地提高T細胞增生並且在活體內壓抑腫瘤生長。

因此，本揭示內容的一個態樣特徵在於一種結合PD-1並且抑制PD-1活性的核酸適體(抗-PD-1適體)。該抗-PD-1適體可包含核酸序列CCATCTCCC (SEQ ID NO：1)、TATATTGTWC (SEQ ID NO：2)、GTACAGTTX (SEQ ID NO：3)、GCACTACA (SEQ ID NO：4)、GTACATCAY (SEQ ID NO：5)、YGCTACTGTZ (SEQ ID NO：6)，或CCATCTCCCGTCC (SEQ ID NO：7)。若適合的話，該等序列的每一者中，W為C或G，X為C、A，或不存在，Y為A、T，或不存在，及/或Z為T、C，或不存在。在一些具體例中，本文

揭示的抗-PD-1適體以低於20 nM的解離常數(K_d)結合至PD-1。

在一些具體例中，該核酸適體與聚乙二醇(PEG)接合。在一些實例中，PEG接合至該核酸適體的3'端。另外或此外，該PEG部分可具有10 kDa至30 kDa的分子量。例如，該PEG部分可具有20 kDa的分子量。

在另一個態樣中，本揭示內容提供一種抗-PD-1適體二聚體，其包含第一抗-PD-1適體、第二抗-PD-1適體，以及連接該第一抗-PD-1適體及該第二抗-PD-1適體的聚合物部分。該第一及第二抗-PD-1適體可為本文提供的任一適體。在一些實例中，該第一及第二抗-PD-1適體可以是相同的。在其他實例中，它們可以是不同的。作為一個實例，該第一及第二抗-PD-1適體均包含SEQ ID NO：1的核酸序列。

在任一本文所述抗-PD-1適體二聚體中，連接該第一及第二抗-PD-1適體的聚合物部分可以是PEG，其可具有範圍自10 kDa至30 kDa的分子量，例如20 kDa。該第一適體、該第二適體或兩者在一些情況下可以經由連接子而連接至該聚合物部分(例如PEG)。在一些實例中，該連接子是聚T片段，其可含有5至20個胸腺嘧啶(T)殘基。

在一些具體例中，該抗-PD-1適體包含與 (i) CTTCCATCTCCCATGCTTAGTCAAACATAC (SEQ ID NO：8)；或(ii) TGATCACAAGAATAACTATCCCATCTCCCT (SEQ ID NO：9)至少85% (例如90%或95%)一致的核酸序列。在一個實例中，該適體包含(i) CTTCCATCTCCCATGCTTAGTCAAACATAC (SEQ ID NO：8)；或(ii) TGATCACAAGAATAACTATCCCATCTCCCT (SEQ ID NO：9)的核酸序列。在另一個實例中，適體為 (i) TCCCTACGGCGCTAACCTTCCATCTCCCATGCTTAGTCAAACATACGC CACCGTGCTACAAC (SEQ ID NO：10)； (ii) TCCCTACGGCGCTAACTGATCACAAGAATAACTATCCCATCTCCCTG

CCACCGTGCTACAAC (SEQ ID NO : 11) ; 或
TCCCTACGGCGCTAACCCTCCCCTAGTATATATTGTCCTCGTCTATGC
CACCGTGCTACAAC (SEQ ID NO : 12)。

本揭示內容的另一個態樣特徵在於一種醫藥組成物，其包含本文所述任一抗-PD-1適體或本文所述任一抗-PD-1適體二聚體及醫藥上可接受載劑。

在又另一個態樣中，本揭示內容提供一種治療癌症(例如黑色素瘤、非小細胞肺癌、結腸直腸癌，或腎細胞癌)的方法。該方法包含向有需要的個體投與有效量之本文所述任一醫藥組成物，該醫藥組成物包含亦如本文所述至少一種抗-PD-1核酸適體。在一些具體例中，該個體為患有癌症、懷疑患有癌症或處於癌症風險下的人類患者。

此外，本揭示內容提供一種在個體中提高免疫活性的方法，該方法包含向有需要的個體投與有效量(例如有效提高T細胞活化)之任一本文所述含有抗-PD-1適體的醫藥組成物。該個體可以是患有癌症(例如黑色素瘤、非小細胞肺癌、結腸直腸癌，或腎細胞癌)、懷疑患有癌症或處於癌症風險下的人類患者。或者，該個體可以是患有HIV感染或懷疑患有HIV感染的人類患者。

下列亦包含於本揭示內容的範疇中：(a)使用於治療癌症(例如肺癌、黑色素瘤、結腸直腸癌，或腎細胞癌)或傳染病(諸如HIV感染)的醫藥組成物，其中該醫藥組成物包含如本文所述抗-PD-1核酸適體、抗-PD-1適體二聚體，或其PEG接合物(例如包含核酸序列CCATCTCCC (SEQ ID NO : 1)或本文所述其他者的核酸)，以及醫藥上可接受之載體，以及(b)抗-PD-1適體、抗-PD-1適體二聚體及/或其PEG接合物供製造用以治療癌症(例如肺癌、黑色素瘤、結腸直腸癌或腎細胞癌)或傳染病(諸如HIV感染)之藥物的用途。

在下面說明中提出本發明一或多個具體例的詳細內容。由以下圖式及數個具體例的詳細說明，還有從隨附申請專利範圍，本發明的其他特點及

優點是明顯的。

【圖式簡單說明】

圖1是顯示經由SELEX篩選結合至PD-1之核酸適體的過程簡圖。簡圖中的「S」表示PD1特異性適體而「NS」表示非特異性適體。

圖2為顯示得自指定不同SELEX篩選回合之適體池的親和力分析圖。

圖3顯示單離自SELEX篩選之PD-1結合核酸適體的序列分析。A區為顯示經單離PD-1結合適體之相關性的樹狀視圖。B區顯示簇集PD-1適體的詳細序列。PD-1適體中的守恆核苷酸CCATCTCCC (SEQ ID NO : 1)以圖文框強調。適體的核苷酸序列提供於圖3，B區中如下：PD1-1 (SEQ ID NO : 16)；PD1-2 (SEQ ID NO : 24)；PD1-3 (SEQ ID NO : 25)；PD1-4 (SEQ ID NO : 24)；PD1-5 (SEQ ID NO : 26)；PD1-6 (SEQ ID NO : 16)；PD1-7 (SEQ ID NO : 10)；PD1-8 (SEQ ID NO : 24)；PD1-9 (SEQ ID NO : 18)；PD1-11 (SEQ ID NO : 27)；PD1-12 (SEQ ID NO : 28)；PD1-13 (SEQ ID NO : 15)；PD1-14 (SEQ ID NO : 10)；PD1-15 (SEQ ID NO : 29)；PD1-16 (SEQ ID NO : 11)；PD1-17 (SEQ ID NO : 31)；PD1-18 (SEQ ID NO : 15)；PD1-19 (SEQ ID NO : 11)；PD1-20 (SEQ ID NO : 11)；PD1-21 (SEQ ID NO : 18)；PD1-22 (SEQ ID NO : 11)；PD1-23 (SEQ ID NO : 11)；PD1-24 (SEQ ID NO : 19)；PD1-25 (SEQ ID NO : 11)；PD1-26 (SEQ ID NO : 32)；PD1-28 (SEQ ID NO : 11)；PD1-29 (SEQ ID NO : 10)；PD1-31 (SEQ ID NO : 11)；PD1-32 (SEQ ID NO : 33)；PD1-33 (SEQ ID NO : 34)；PD1-34 (SEQ ID NO : 35)；PD1-36 (SEQ ID NO : 36)；PD1-37 (SEQ ID NO : 11)；PD1-39 (SEQ ID NO : 11)；PD1-40 (SEQ ID NO : 11)；PD1-41 (SEQ ID NO : 37)；PD1-42 (SEQ ID NO : 38)；PD1-44 (SEQ ID NO : 39)；PD1-45 (SEQ ID NO : 11)；PD1-46 (SEQ ID NO : 40)；PD1-47 (SEQ ID NO : 41)；PD1-48 (SEQ ID NO : 42)。

圖4顯示兩個例示性抗-PD-1適體PD16及PD7的結合活性與預測結構。A區是顯示PD16之PD-1結合親和力的圖，而B區是顯示PD7之PD-1結合親和力的圖。PD7及PD16的解離常數(K_d)分別為9.7 nM及2.1 nM。C區顯示PD-1適體PD16 (SEQ ID NO：11)及PD7 (SEQ ID NO：10)的預測二級結構，如藉由Mfold所測定。守恆CCATCTCCC (SEQ ID NO：1)在點狀框緣中強調。PD7及PD16之預測結構的 ΔG 分別為-1.7及-0.8。

圖5包括顯示例示性抗-PD-1適體PD7促進T細胞增生的圖。PD7適體處理促進T細胞增生且比PD-1拮抗性抗體的處理效果更為明顯。A區是顯示在沒有CD3/CD28刺激下實施之實驗的實驗結果圖。B區是在有CD3/CD28刺激下實施之實驗的實驗結果圖。

圖6是顯示使用核心1、核心1 (最佳化)、核心2、核心3、核心4、核心5與核心6之適體核心核苷酸序列之PDL1競爭分析的結果圖。

圖7是顯示在PDL1競爭分析中使用核心1，PDL1與PD1之間交互作用的劑量依賴性抑制的圖。核心1的 IC_{50} 為31.18 nM，其代表抑制50% PDL1/PD1交互作用所需的核心1核酸數量。

圖8顯示PDL1競爭分析的概要代表圖。A區顯示經組胺酸標誌之PD1蛋白(His標誌-PD1蛋白)固定在經鎳氨基三乙酸(Ni-NTA)塗覆的板上。在PD1拮抗性適體不存在下，經組胺酸標誌之PD1蛋白質結合經生物素標誌之PDL1 (生物素-PDL1)，其可藉由卵白素接合至辣根過氧化酶(HRP)偵測。B區顯示在拮抗性PD1適體存在下，PD1與PDL1之間的交互作用佔優勢且HRP不結合而產生訊號(例如添加ECL之後的化學發光訊號)。

圖9是PD1適體結合分析的概要代表圖。經組胺酸標誌之PD1蛋白(His標誌-PD1蛋白)被固定在經鎳氨基三乙酸(Ni-NTA)塗覆的板上。使用接合卵白素之辣根過氧化酶(卵白素/HRP)，可偵測接合生物素的拮抗性PD1適體(生物素-BD1適體)與PD1蛋白的結合。結合的HRP可以在添加可與其反應並

釋放發光訊號的受質(例如ECL)後被偵測到。

圖10是顯示在(i) PD-1拮抗性抗體、(ii)隨機對照序列、(iii) PD7適體(SEQ ID NO：10)、(iv)核心序列(SEQ ID NO：13)，其包含SEQ ID NO：1中所示核心核酸序列，及(v)顯示於圖11中之聚乙二醇化PD7二聚體(核心序列)存在下，促進淋巴球增生之結果圖。

圖11是二聚體適體分子之非限制性實例的簡圖。簡圖顯示與兩個含有SEQ ID NO：1核心核酸序列的個別適體序列CCATCTCCCATTTTTTTTTTTT (SEQ ID NO：14)接合的線性20 kDa PEG分子，以及在PEG分子各端處的聚T連接子。

圖12是例示性CD4⁺及CD8⁺ T細胞增生分析的概要代表圖。

圖13包括顯示例示性適體PD7及核心1序列對於CD4⁺ (D區)及CD8⁺ (C區) T細胞增生的活性，以及拮抗性PD-1抗體與隨機序列陰性對照對於CD4⁺ (B區)及CD8⁺ (A區) T細胞增生的活性。

圖14是顯示例示性適體(PD7)在同系肺癌小鼠模型中的腫瘤生長抑制活性的圖。

圖15是經例示性適體(PD7)治療之人類化肺癌小鼠模型的治療計畫表的概要代表圖。

圖16顯示用以證明PD-1拮抗性適體PD7在活體內對肺癌生長之抑制活性的人類化肺癌小鼠模型的結果。A區是顯示在對照小鼠239、226與233中隨著時間的腫瘤生長圖，其在第25、32及38天分別描繪於B-D區中。E區是顯示經PD7治療小鼠240、234與235隨著時間的腫瘤生長圖，其在第25、32及38天分別描繪於F-H區中。

圖17是顯示PD-1拮抗性適體PD7相比對照小鼠對於肺癌生長之平均抑制活性的圖。

【實施方式】

本揭示內容是以開發出若干抗-PD-1核酸適體並且藉由例示性抗-PD-1適體成功提高T細胞增生為基礎。結果顯示，適體(例如PD7)處理出乎意料造成(i)對T細胞增生(例如CD⁺ T細胞增生)比PD-1拮抗性抗體有更強的效用，以及(ii)在同系及人類化小鼠腫瘤模型中的腫瘤生長明顯減少。此外，結果顯示，適體處理防止PD-1與PDL-1的結合。因此，抗-PD-1適體(諸如彼等描述於本文中者)將有效提高免疫活性並且防止腫瘤生長，從而有效治療諸如癌症及傳染病(例如HIV感染)的疾病。

因此，本文所述為抗-PD-1適體、包含該適體的醫藥組成物，以及使用本文揭示之抗-PD-1適體來提高免疫活性及/或治療疾病(諸如癌症與HIV感染)的方法。

抗-PD-1適體

本文所述為結合至PD-1並抑制其活性，從而提高免疫活性(諸如T細胞活性)的核酸適體(抗-PD-1適體)。如本文所用的核酸適體意指對特定目標分子(例如PD-1)具有結合活性的核酸分子(DNA或RNA)。適體可藉由結合至該特定目標分子來抑制該特定目標分子的活性。本揭示內容之抗-PD-1適體呈線性或環狀形式，可為RNA、DNA (例如單股DNA)、經修飾核酸或其混合物。抗-PD-1適體可為非天然分子(例如含有不存在於原有基因的核苷酸序列或含有不存在於自然界中的經修飾核苷酸)。另外或此外，抗-PD-1適體可不含具有表現胜肽之核苷酸序列。

PD-1，意指程序性細胞化細胞死亡蛋白1 (也已知為CD279)，是一種在T細胞於原B細胞上表現的細胞表面蛋白。其在T細胞及B細胞死亡與分化中扮演角色。在人類中，PD-1蛋白是由*PDCD1*基因所表現。人類PD-1的胺基酸序列可以依據GenBank登錄編號NP_005009找到。

本文揭示的抗-PD-1核酸適體可包含下列核苷酸序列：CCATCTCCC (SEQ ID NO：1)；TATATTGTWC (SEQ ID NO：2)，其中W為C或G；

GTACAGTTX (SEQ ID NO: 3), 其中X為C、A, 或不存在; GCACTACA (SEQ ID NO: 4); GTACATCAY (SEQ ID NO: 5), 其中Y為A、T, 或不存在; YGCTACTGTZ (SEQ ID NO: 6), 其中Y為A、T或不存在, 且Z為T、C, 或不存在; 或CCATCTCCCGTCC (SEQ ID NO: 7)。抗-PD-1適體的其他實例提供於圖3, B區中。

在一些具體例中, 本文揭示的抗-PD-1核酸適體可包含與5'-CTTCCATCTCCCATGCTTAGTCAAACATAC-3' (SEQ ID NO: 8), 或5'-TGATCACAAGAATAACTATCCCATCTCCCT-3' (SEQ ID NO: 9)至少85% (例如90%、95%, 或98%)一致的核苷酸序列。

兩個核酸的「百分率同一性」是使用Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990的演算法, 經如在Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993中修改來決定。此一演算法併入Altschul, et al. J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990的NBLAST及XBLAST程式(第2.0版)中。BLAST核苷酸研究可以使用NBLAST程式進行, 計分=100, 字長=12, 獲得與本發明核酸分子同源的核苷酸序列。若兩個序列間存在空位, 則可如Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997中所述使用Gapped BLAST。當採用BLAST及Gapped BLAST程式時, 可使用個別程式(例如XBLAST及NBLAST)的預設參數。

在其他具體例中, 相比於5'-CTTCCATCTCCCATGCTTAGTCAAACATAC-3' (SEQ ID NO: 8), 或5'-TGATCACAAGAATAACTATCCCATCTCCCT-3' (SEQ ID NO: 9)的核苷酸序列, 本文所述抗-PD-1-4適體可含有至多8個(例如至多6、5、4、3、2或1個)核苷酸變異。可引入此等變異的位置是可以依據例如PD16 (SEQ ID NO: 11)及PD7 (SEQ ID NO: 10)的二級結構(其包含參考核苷酸序列)來決定(參見圖4B)。

在一些實例中，抗-PD-1適體在5'端、3'端或兩端可包含引子位點。在一個實例中，該抗-PD-1適體具有5'-TCCCTACGGCGCTAACCTTCCATCTCCCATGCTTAGTCAAACATACGCCACCGTGCTACAAC-3' (SEQ ID NO : 10)、5'-TCCCTACGGCGCTAACTGATCACAAGAATAACTATCCCATCTCCCTGCCACCGTGCTACAAC-3' (SEQ ID NO : 11)，或5'-TCCCTACGGCGCTAACCTCCCCTAGTATATATTGTCCTCGTCTATGCCACCGTGCTACAAC-3' (SEQ ID NO : 12)的核苷酸序列，其中底線/斜體側邊序列意指5'及3'引子位點。

本文揭示的任一抗-PD-1適體可含有至多200個核苷酸(nt)，例如150個nt、100個nt、80個nt、70個nt、60個nt、50個nt、40個nt或30個nt。在一些實例中，該抗-PD-1適體可含有範圍自30-150 nt、30-100 nt、30-80 nt、30-70 nt、30-60 nt、30-50 nt或30-40 nt的核苷酸。

在一些具體例中，本文所述的抗-PD-1適體以低於20 nM (例如15 nM、10 nM、5 nM、1 nM，或更低)的解離常數(Kd)結合至PD-1 (例如人類PD-1)。該抗-PD-1適體可特異地結合人類PD-1。或者，該適體可結合至不同物種(例如人類及小鼠)的PD-1分子。當結合至表現在T細胞表面上的PD-1分子時，此一適體可抑制PD-1的活性達至少20% (例如40%、50%、80%、100%、2-倍、5-倍、10-倍、100-倍，或1,000-倍)(因而增加T細胞活性)。抗-PD-1適體對PD-1的抑制活性(以及因而活化提高T細胞活性)可以藉由例如下面實例中所述方式來測定。

在一些具體例中，本文所述抗-PD-1適體可含有非天然核鹼基、糖，或共價核苷間鍵結(骨架)。此一經修飾之寡核苷酸將可能具有細胞攝入提高、對目標核酸的親和力增進，或活體內穩定性增加等特性。

在一個實例中，本文所述適體具有經修飾的骨架，包括彼等保有磷原

子者(參見例如美國專利第3,687,808號；第4,469,863號；第5,321,131號；第5,399,676號；以及第5,625,050號)，與彼等不具有磷原子者(參見例如美國專利第5,034,506號；第5,166,315號；以及第5,792,608號)。含磷經修飾骨架的實例包括，但不限於具有3'-5'鍵接或2'-5'鍵接的硫代磷酸酯、對掌性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、胺基烷基-磷酸三酯、磷酸甲基酯與其他磷酸烷基酯(包括3'-磷酸伸烷基酯、5'-磷酸伸烷基酯與對掌性磷酸酯)、亞磷酸酯、胺基磷酸酯(包括3'-胺基磷酸酯與胺基烷基胺基磷酸酯)、硫羰代胺基磷酸酯、硫羰代烷基磷酸酯、硫羰代烷基磷酸三酯、硒代磷酸酯，以及硼烷磷酸酯。此等骨架也包括彼等具有相反極性者，亦即3'至3'、5'至5'或2'至2'鍵接。不包括磷原子的經修飾骨架是由短鏈烷基或環烷基核苷間鍵接，混合雜原子與烷基或環烷基核苷間鍵接，或一或多個短鏈雜原子或雜環核苷間鍵接所形成。此等骨架包括彼等具有嗎啉基鍵接者(部分由核苷的糖部分所形成)；矽氧烷骨架；硫化物；亞碲和碲骨架；甲醯乙醯基(formacetyl)和硫代甲醯乙醯基骨架；亞甲基甲醯乙醯基和硫代甲醯乙醯基骨架；核糖乙醯基骨架；含烯骨架；胺基磺酸酯骨架；亞甲基亞胺基和亞甲基胍基骨架；磺酸酯和磺醯胺骨架；醯胺骨架；以及其他具有混合的N、O、S和CH₂組成部分的骨架。

在另一個實例中，本文所述適體包括一或多個經置換糖部分。此等經置換糖部分可在其2'位置處包括下列基團之一：OH；F；O-烷基、S-烷基、N-烷基、O-烯基、S-烯基、N-烯基；O-炔基、S-炔基、N-炔基及O-烷基-O-烷基。在這些基團中，烷基、烯基及炔基可以是未經置換或經置換C1至C10烷基或C2至C10烯基與炔基。它們也可以在其2'位置處包括雜環烷基、雜環烷芳基、胺基烷基胺基、聚烷基胺基、經置換矽烷基、RNA切割基團、報導子基團、嵌入劑，或增進寡核苷酸之藥物動力學特性的基團。較佳的經置換糖部分包括彼等具有2'-甲氧基乙氧基、2'-二甲基胺基氧基乙氧基，及

2'-二甲基胺基乙氧基乙氧基者。參見Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504。

另外或此外，本文所述適體包括一或多個經修飾天然核鹼基(亦即腺嘌呤、鳥嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶和尿嘧啶)。經修飾核鹼基包括彼等描述於美國專利第3,687,808號中者。Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990、Englisch et al., *Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613，以及Sanghvi, Y. S., Chapter 15, *Antisense Research and Applications*, pages 289-302, CRC Press, 1993。這些核鹼基中的某一些尤其適用於增加適體分子對其目標位點的結合親和力。這些包括5-經置換的嘧啶、6-氮雜嘧啶及N-2、N-6與O-6經置換嘌呤(例如2-胺基丙基-腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶與5-丙炔基胞嘧啶)。參見Sanghvi, et al., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278)。

本文所述任一適體可藉由習知方法製備，例如化學合成或活體外轉錄。如本文所述，其所期望的生物活性可經例如彼等描述於下面實例中者來進行驗證。用於表現任一抗-PD-1適體的載體也落在本揭示內容的範疇內。

任一本文所述適體可經由共價鍵接、非共價鍵接或兩者接合至一或多個聚醚部分，諸如聚乙二醇(PEG)部分。因此，在一些具體例中，本文所述適體經聚乙二醇化。本揭示內容不是要限制特定分子量的PEG部分。在一些具體例中，聚乙二醇部分具有範圍自5 kDa至100 kDa、10 kDa至80 kDa、20 kDa至70 kDa、20 kDa至60 kDa、20 kDa至50 kDa、10 kDa至40 kDa、10 kDa至30 kDa，或15 kDa至25 kDa的分子量。在一些實例中，PEG部分具有20 kDa的分子量。接合至本文所述抗-PD-1適體的PEG部分可以是線性或具分支。其可接合至核酸適體的5'端、適體的3'端或兩者。若需要的話，PEG部分可

以共價接合至核酸適體的3'端。在一些具體例中，核酸適體包含核苷酸序列CCATCTCCCA (SEQ ID NO：13)或CCATCTCCCATT TTT TTT TTT TTT (SEQ ID NO：14)。SEQ ID NO：14的聚T片段是間隔子，且此片段的長度可能如熟悉技術者所知有所改變。

將PEG部分接合至核酸的方法為技藝中已知且先前已描述於例如PCT公開案第WO 2009/073820 A2號中，其相關教示以引用的方式併入本文中。應理解，本文所述接合PEG的核酸適體以及用於將PEG接合至核酸適體的方法為例示性且無意為限制性。

本揭示內容也提供本文所述任一抗-PD-1核酸適體的二聚體。在一些具體例中，抗-PD-1適體二聚體包含兩個藉由適當聚合物部分連接的抗-P-1適體，適當聚合物部分可為本文所述彼等的PEG部分。在二聚體中，兩個適體中之一者或兩者可包含SEQ ID NO：1-14中任一者的核苷酸序列。兩個抗-PD-1適體可相同或不同。例如，抗-PD-1適體之一者或兩者可包含(SEQ ID NO：13)或(SEQ ID NO：14)。在另一個實例中，如本文所述抗-PD-1適體可具有一個包含(SEQ ID NO：1)的適體以及另一個包含(SEQ ID NO：2)的適體。

在一些具體例中，本文提供之任一抗-PD-1適體二聚體的聚合物部分為PEG，其可具有如本文所述的分子量。

在一些具體例中，本文提供之抗-PD-1適體二聚體包含經由連接子連接至聚合物部分的適體。在一個實例中，第一適體經由連接子連接至聚合物部分。在另一個實例中，第二適體經由連接子連接至聚合物部分。在又另一個實例中，第一適體及第二適體是經由連接子連接至聚合物部分。「連接子」如本文所用，意指連接兩個分子或部分的化學部分。在一些實例中，連接子包含一或多個核苷酸，其可為去氧核糖核苷酸。在一些實例中，核酸連接子長度為1至50個核苷酸。此等連接子長度可為1至5、1至10、1至15、

1至20、1至30、1至40、10至15、10至20、10至30、10至40、10至50、20至30、20至40、20至50、30至40、30至50，或40至50個核苷酸。在一些實例中，連接子長度為11個核苷酸。連接子可包含腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)及/或鳥嘌呤(U)。在一些實例中，連接子包含聚T片段。「聚T片段」意指2個或更多個連續胸腺嘧啶(T)核苷酸殘基的延伸物。例如，聚T連接子可包含2至50個T殘基。在一些實例中，聚T連接子長度為2至40、2至35、2至30、2至25、2至20、5至15，或10至15個核苷酸。在一些具體例中，聚T連接子包含11個連續胸腺嘧啶(T)核苷酸。

醫藥組成物

如本文所述一或多個抗-PD-1適體、適體二聚體或其PEG接合物可與醫藥上可接受之載劑(賦形劑)混合而形成醫藥組成物用來治療目標疾病。「可接受」表示載劑必須是與組成物的活性成分相容(且較佳能夠穩定活性成分)並對待治療個體無害。醫藥上可接受之賦形劑(載劑)包括技藝中所熟知的緩衝劑。參見例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover。

使用於本發明方法中的醫藥組成物可包含醫藥上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑，呈凍乾調配物或水溶液的形式。參見例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover)。可接受的載劑、賦形劑或穩定劑在所用劑量與濃度下對接受者來說是無毒的，且可包含緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽與其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸與甲硫胺酸；防腐劑(諸如十八烷基二甲基苄基氯化銨；氯化六甲雙銨；氯化苄二甲胺銨、氯化本索寧(benzethonium chloride)；苯酚、丁基或苄基醇；對羥苯甲酸烷基酯，諸如對羥苯甲酸甲基酯或對羥苯甲酸丙基酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及m-甲酚)；低分子量(少於約10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、

明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯烷酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺酸、組胺酸、精胺酸，或離胺酸；單糖、雙糖，及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或右旋糖；螯合劑，諸如EDTA；糖，諸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；成鹽相對離子，諸如鈉；金屬複合物(例如Zn-蛋白複合物)；及/或非離子性界面活性劑，諸如TWEENTM、PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。

在一些實例中，本文所述醫藥組成物包含含有PD-1結合適體的脂質體(或用於生成該適體的載體)，其可藉由技藝中所熟知的方法製備，諸如描述於Epstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985)；Hwang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980)；以及U.S.專利第4,485,045號與第4,544,545號中者。具有循環時間提高的脂質體描述於美國專利第5,013,556號中。尤其適用的脂質體可以使用含有磷脂醯膽鹼、膽固醇與PEG衍生之磷脂醯乙醇胺(PEG-PE)的脂質組成物藉由逆相蒸發法來生成。脂質體被擠壓穿過具有有限定孔隙之過濾器，以產生具有期望直徑的脂質體。

如本文所述抗-PD-1適體亦可陷入於製備的微膠囊中(例如分別藉由凝聚技術或藉由介面聚合作用(例如羥甲基纖維素或明膠微膠囊及聚-(甲基甲基丙烯酸酯)微膠囊)、於膠體藥物投遞系統(例如脂質體、白蛋白微球、微乳液、奈米顆粒及奈米膠囊)中或巨乳液(macroemulsion)中。此等技術為技藝中所熟知，參見例如Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000)。

在其他實例中，本文所述醫藥組成物可調配成持續釋放形式。持續釋放製品的適當實例包括含有PD-1結合適體之固體疏水性聚合物的半通透性基質，該基質是呈有形物品的形式(例如薄膜或微膠囊)。持續釋放基質的實例包括聚酯、水凝膠(例如聚(2-羥乙基-甲基丙烯酸酯)，或聚(乙烯基醇))、聚乳酸(美國專利第3,773,919號)、L-麩胺酸與7-麩胺酸乙基酯的共聚物、非

可分解性乙烯-乙酸乙烯酯、可分解性乳酸-乙醇酸共聚物(諸如LUPRON DEPOT™ (乳酸-乙醇酸共聚物和柳菩林組成的可注射微球)、蔗糖乙酸異丁酸酯，及聚-D-(-)-3-羥基丁酸。

使用於活體內投與的醫藥組成物必須是無菌的。這個是透過例如濾過無菌過濾膜而輕易達到。治療性PD-1結合適體組成物可以放置在具有無菌出入口的容器(例如靜脈內溶液袋或具有可被皮下注射針頭穿刺之擋塞的小管)。

本文所述醫藥組成物可以呈諸如錠劑、丸劑、膠囊、粉劑、顆粒、溶液或懸浮液，或栓劑的單位劑型，供用於經口、非經口或直腸投與，或是藉由吸入或吹入投與。

關於製備固體組成物(諸如錠劑)，主要活性成分可與醫藥載劑混合以形成含有本發明化合物之均勻混合物的固體預調配組成物，或其無毒醫藥上可接受之鹽，醫藥載劑為例如習知製錠成分，諸如玉米澱粉、乳糖、蔗糖、山梨糖醇、滑石粉、硬脂酸、硬脂酸鎂、磷酸二鈣或膠，以及其他醫藥稀釋劑，例如水。當提到這些預調配組成物為均勻時，表示活性成分平均分散在組成物中，使得組成物可容易分成等效單位劑型，諸如錠劑、丸劑與膠囊。此固體預調配組成物接而被分成上述類型的單位劑型，含有0.1至約500 mg本發明活性成分。新穎組成物的錠劑或丸劑可經包覆或以其他方式經化合而提供給予延長作用益處的劑型。例如，錠劑或丸劑可包含內劑量以及外劑量組分，後者呈包覆前者的包衣形式。兩種組分可被在胃中耐受崩解並允許內含組分完整通過進入十二指腸或延遲釋放的腸衣層所分隔。此腸衣層或包衣可使用各種材料，諸如包括一些聚合酸及聚合酸與如蟲膠、十六醇及乙酸纖維素之材料的混合物。

適當表面活性劑尤其包括非離子性試劑，諸如聚氧乙烯山梨糖醇(例如Tween™ 20、40、60、80或85)以及其他山梨糖醇(例如Span™ 20、40、60、

80或85)。具有表面活性劑的組成物將習知地包含0.05%與5%表面活性劑，且可介於0.1%與2.5%。應理解，若需要的話可添加其他成分，例如甘露糖醇或其他醫藥上可接受媒劑。

可使用商業可購得脂質溶液來製備適當溶液，脂質溶液為諸如Intralipid™、Liposyn™、Infonutrol™、Lipofundin™及Lipiphysan™。活性成分可溶解於預先混合的溶液組成物中或者其可溶解於油(例如大豆油、葵花油、棉籽油、芝麻油、玉米油或杏仁油)中，在與磷脂(例如蛋磷脂、大豆磷脂或大豆卵磷脂)和水混合之後形成乳液。應理解，可添加其他成分來調整乳液的張力，其他成分為例如甘油或葡萄糖。適當乳液通常含有至多20%油，例如5%與20%之間。脂質乳液可包含脂質小滴，介於0.1與1.0 μm 之間，尤其是0.1與0.5 μm 之間，並具有範圍在5.5至8.0的pH。

乳液組成物可以是彼等透過將抗-PD-1適體與Intralipid™或其組分(例如大豆油、蛋磷脂、甘油與水)混合來製備。

用於吸入或吹入的醫藥組成物包括於醫藥上可接受水性或有機溶劑或其混合物中的溶液及懸浮液，及粉劑。液體或固體組成物可含有上列適當醫藥上可接受之賦形劑。在一些具體例中，用於局部或全身性效用的組成物是藉由經口或鼻呼吸路徑投與。

較佳於無菌醫藥上可接受溶劑中的組成物可以藉由使用氣體而被霧化。可直接從噴霧裝置吸入霧化溶液或可將霧化裝置附接到面罩、遮棚或間歇式正壓呼吸器。溶液、懸浮液或粉劑組成物較佳經口或經鼻自以適當方式遞送調配物的裝置被投與。

治療方法

如本文所述任一抗-PD-1適體、二聚體或其PEG接合物可用來提高免疫活性，尤其是促進T細胞增生，從而有效治療癌症或諸如病毒性(例如HIV)感染或細菌性感染的傳染病。

為實施本文揭示的方法，有效量之含有至少一種抗-PD-1適體的本文所述醫藥組成物可經由適當途徑被投與給有治療需要的個體(例如人類)，適當途徑為諸如靜脈內投與(例如彈丸)或經由連續輸注一段時間、藉由肌肉內、腹膜內、腦脊髓內、皮下、關節內、滑膜內、鞘內、經口、吸入或局部路徑。用於液體調配物的商用噴霧器包括可用於投與的噴射噴霧器以及超音波噴霧器。液體調配物可直接被霧化而凍乾粉末可以在還原之後被霧化。或者，如本文所述含有抗-PD-1適體的組成物可使用氟碳調配物及計量計量吸入器被氣溶膠化，或者如凍乾且研磨粉劑被吸入。

如本文所用，「有效量」意指各個活性劑對個體賦予治療效用所需的數量，不論是單獨或與一或多種其他活性劑組合。在一些具體例中，治療效用為降低腫瘤負荷、減少癌細胞，或增加免疫活性。決定何量PD-1結合適體達到治療效用對於熟悉技術者來說將會是明顯的。如技藝中具有通常技術者所認知，有效量會改變，取決於待治療的特定病況、病況的嚴重性、個別患者參數(包括年齡、身體狀況、身高、性別與體重)、治療持續時間、現有治療(若有的話)的特性、特定投與路徑及健康從業人員知識與專業內的類似因素。這些因素為技藝中彼等具有通常技術者所熟知且可在不超出慣常實驗的情況下獲得處理。通常較佳為使用個別組分或其組合的最大劑量，其依據周全醫學判斷為最高安全劑量。

經驗上的考量(諸如半衰期)通常貢獻劑量的決定。可決定投與頻率並隨著治療過程而調整，且大體上(但非必須)是基於治療及/或抑制及/或改善及/或延遲目標疾病/病症。或者，PD-1結合適體的持續連續釋放調配物可能是適合的。用於達到持續釋放的各種調配物及裝置在技藝中是熟知的。

在一個實例中，如本文所述抗-PD-1適體在個體中的劑量可以按經驗來決定，該等個體經給予一或多次PD-1結合適體投與。給予個體的拮抗劑劑量漸增。為評估拮抗劑的效力，可追蹤疾病/病症的指標。

大體上，關於投與本文所述抗-PD-1適體，初始候選劑量可為約2 mg/kg。就本發明之目的而言，依上述因子，典型日劑量範圍約0.1 μ g/kg至3 μ g/kg至30 μ g/kg至300 μ g/kg至3 mg/kg，至30 mg/kg至100 mg/kg中任一者。就重複投與超過數日或更久，持續治療直到期望發生症狀抑制或直到達到充分治療程度以減輕目標疾病或病症或其症狀為止，端視病況而定。例示性給藥方案包含投與約2 mg/kg的初始劑量，接著每週約1 mg/kg PD-1結合適體的維持劑量，或著接著每隔一週約1 mg/kg的維持劑量。但是，亦可採用其他劑量方案，取決於從業人員希望達到的藥物動力學衰退型態而定。例如，預計一週給藥一至四次。在一些具體例中，可採用範圍自3 μ g/mg至約2 mg/kg (諸如約3 μ g/mg、約10 μ g/mg、約30 μ g/mg、約100 μ g/mg、約300 μ g/mg、約1 mg/kg，及約2 mg/kg)的給藥。在一些具體例中，給藥頻率為每週、每2週、每4週、每5週、每6週、每7週、每8週、每9週，或每10週一次；或每個月、每2個月，或每3個月或更久一次。此治療的進程可簡單地透過習知技術及分析進行監控。給藥方案(包括所用PD-1結合適體)可隨著時間而有所改變。

在一些具體例中，關於具有正常體重的成人患者，可投與範圍自約0.3至5.00 mg/kg的劑量。具體劑量方案(亦即劑量、時間安排及重複)將取決於特定個體以及個體病史，還有個別藥劑的特性(諸如藥劑半衰期，以及其他在技藝中所熟知的考量因素)。

就本揭示內容之目的，如本文所述PD-1結合適體的適當劑量將取決於特定PD-1結合適體、疾病/病症類型與嚴重性、PD-1結合適體是因為預防或治療目的而投與、先前治療、患者的臨床病史以及對拮抗劑的反應，和參與臨床醫師的斟酌而定。臨床人員可投與PD-1結合適體直到達到期望結果之劑量。在一些具體例中，期望結果為腫瘤負荷降低、癌細胞減少或免疫活性增加。決定劑量是否造成期望結果的方法對於熟悉技術者來說是明顯

的。可連續或間歇投與一或多個PD-1結合適體，取決於例如接受者的生理狀況、投與目的為治療或預防，以及其他習於技藝的操作人員所熟知的因素。投與PD-1結合適體基本上可為在預選時間段裡連續或者是呈連續間隔劑量，例如在目標疾病或病症長成之前、期間或之後。

如本文所用，術語「治療」意指對個體施用或投與包括一或多種活性劑的組成物，該個體患有目標疾病或病症、該疾病/病症的症狀，或有罹患該疾病/病症的傾向、目的是要治癒、治療、減輕、緩解、改變、治療、改善、增進或影響病症、疾病症狀，或罹患該疾病或病症的傾向。

減輕目標疾病/病症包括延遲疾病生成或進展，或降低疾病嚴重性。減輕疾病不一定需要治療結果。如本文所用，「延遲」目標疾病或病症生成表示推遲、阻礙、減緩、延遲、穩定/或延緩疾病的進展。這個延遲可以是時間長度的改變，取決於待治療疾病及/或個體的病史而定。「延遲」或減輕疾病長成，或延遲疾病發生的方法是當與未使用該方法相比時，在一個給定時間框內降低生成該疾病的一或多個症狀的可能性及/或在給定時間框內降低症狀程度的方法。此等比對通常是基於臨床研究，使用一些足以提供統計上顯著結果的個體。

疾病的「生成」或「進展」表示疾病的初始病徵及/或之後的進展。可使用如技藝中所熟知的標準臨床技術來偵測並評估疾病的生成。但是，生成也意指不能被偵測到的進展。就本揭示內容之目的，生成或進展意指症狀的生物過程。「生成」包括發生、復發或出現。如本文所用，目標疾病或病狀的「出現」或「發生」包括起初出現及/或復發。

在一些具體例中，本文所述PD-1結合適體呈在活體內足以降低腫瘤負荷或癌細胞生長，或HIV增生達至少5% (例如10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多)的數量被投與給有治療需要的個體。在其他具體例中，PD-1結合適體呈有效降低PD-1活性位準達至少5% (例如10%、

20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多)的數量被投與。在其他具體例中，PD-1結合適體呈有效增加免疫活性達至少5% (例如10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多)的數量被投與。

醫學領域中具有通常技術者所熟知的習知方法可用來將醫藥組成物投與給個體，取決於待治療疾病類型或疾病部位。這個組成物也可以經由其他習知路徑被投與(例如經口、非經口、藉由吸入噴霧、局部、直腸、經鼻、頰內、陰道或經由植入貯器投與)。術語「非經口」如本文所用包括皮下、皮內、靜脈內、肌肉內、關節內、動脈內、滑膜內、胸骨內、鞘內、病灶內及顱內注射或輸注技術。此外，可經由可注射貯器投與路徑投與給個體，諸如使用1-、3-或6-個月貯器可注射或生物分解材料及方法。在一些實例中，醫藥組成物經眼內或經玻璃體內投與。

可注射組成物可含有各種載劑，諸如植物油、二甲基乙醯胺、二甲基甲醯胺、乙酸乙酯、碳酸乙酯、肉豆蔻酸異丙酯、乙醇，及多元醇(甘油、丙二醇、液體聚乙二醇，與類似物)。關於靜脈內注射，可藉由滴注方法投與水溶性PD-1結合適體，從而輸注含有PD-1結合適體及生理學上可接受賦形劑的醫藥調配物。生理學上可接受的賦形劑可包括例如5%右旋糖、0.9%食鹽水、林格氏溶液或其他適當賦形劑。肌肉內製品(例如適當可溶鹽形式之PD-1結合適體的無菌調配物)可溶解於諸如注射用水、0.9%食鹽水或5%葡萄糖溶液的醫藥賦形劑中並在其中投與。

在一個具體例中，經由部位特異性或靶定局部投遞技術來投與PD-1結合適體。部位特異性或靶定局部投遞技術的實例包括具有PD-1結合適體的各種可植入貯器來源或局部投遞導管，諸如輸注導管、留置導管或針頭導管、合成移植物、外包套、分流器及支架或其他可植入裝置、部位特異性載劑、直接注射或直接施用。參見例如PCT公開案第WO 00/53211號及U.S. 專利第5,981,568號。

可以使用含有反義聚核苷酸、表現載體或次基因體聚核苷酸的治療性組成物的靶定遞送。接受體媒介的DNA遞送技術描述於例如Findeis et al., Trends Biotechnol. (1993) 11:202 ; Chiou et al., Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (J. A. Wolff, ed.) (1994) ; Wu et al., J. Biol. Chem. (1988) 263:621 ; Wu et al., J. Biol. Chem. (1994) 269:542; Zenke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:3655 ; Wu et al., J. Biol. Chem. (1991) 266:338中。

含有聚核苷酸(例如本文所述PD-1結合適體或用於生產該結合適體的載體)的治療性組成物可在約100 ng至約200 mg DNA的範圍內在基因治療程序中被投與供局部投與。在一些具體例中，也可用在基因治療程序期間使用濃度範圍約500 ng至約50 mg、約1 µg至約2 mg、約5 µg至約500 µg，及約20 µg至約100 µg或更多的DNA。

要依據本文所述方法治療的個體可以是哺乳動物，諸如農場動物、運動動物、寵物、靈長類、馬、狗、貓、小鼠及大鼠。在一個實例中，該個體為人類。含有抗-PD-1適體的組成物可用於在需要治療的個體中提高免疫活性，例如T細胞活性。在一些實例中，個體可為患有癌症、懷疑患有癌症或處於癌症風險下的人類患者，癌症為諸如肺癌、黑色素瘤、結腸直腸癌，或腎細胞癌。在其他實例中，個體可以是患有或懷疑患有HIV感染的人類患者。此一患者也可以透過慣常醫學實務予以鑑定。

患有目標疾病或病症(例如癌症或諸如HIV感染之病毒性感染或細菌性感染)的個體可以透過慣常醫學檢驗予以鑑定，醫學檢驗為例如實驗室測試、器官功能測試、CT掃描或超音波。懷疑患有此等目標疾病/病症任一者的個體可能表現出該疾病/病症的一或多種症狀。處於該疾病/病症風險下的個體可能是帶有與那個疾病/病症有關之一或多個風險因子的個體。此一個體也可以透過慣常醫學實務予以鑑定。

在本文所述方法中使用的具體劑量方案(亦即劑量、時間安排及重複)將取決於特定個體(例如人類患者)以及個體病史。

在一些具體例中，抗-PD-1適體可與另一種適當治療劑(例如抗癌劑或抗HIV劑)共同使用。另外或此外，抗-PD-1適體也可以與其他用來增強及/或補充藥劑有效性的藥劑組合使用。

目標疾病/病症的治療效力可以透過例如下面實例中所述方法進行評估。

用於減輕目標疾病的套組

本揭示內容亦提供用於提高免疫活性(例如T細胞活性)、減輕癌症(例如肺癌、黑色素瘤、結腸直腸癌，或腎細胞癌)，及/或治療或降低HIV感染風險的套組。此等套組可包括一或多個含有例如本文所述彼等任一種結合PD-1之適體的容器。

在一些具體例中，套組可包含與使用本文所述方法任一者一致的使用說明。所納入的使用說明可包含投與如本文所述那些要治療目標疾病、延遲目標疾病發生，或減輕目標疾病之適體的說明。套組可進一步包含篩選個別適合治療之個體的說明，其是基於鑑別那個個體是否患有目標疾病。在又其他具體例中，使用說明包含向處於目標疾病風險下的個體投與適體。

與使用PD-1結合適體有關的使用說明通常包括期望治療之劑量、給藥計畫表，以及投與路徑的資訊。容器可以是單位劑量、散裝(例如多劑量包裝)或次單位劑量。在本發明套組中所提供的使用說明通常是標籤上的書面說明或包裝插頁(例如套組中所包括的紙張)，但機器可讀說明(例如磁性或光學儲存碟片上所傳達的說明)也是可接受的。

標籤或包裝插頁指明該等組成物是用於治療癌症相關疾病或病症(諸如本文所述彼等癌症)、延遲癌症相關疾病或病症發生及/或減輕癌症相關疾病或病症。可提供使用說明供實施本文所述任一方法。

本發明套組可以以適當包裝呈現。適當包裝包括，但不限於小瓶、瓶、罐、可撓性包裝(例如密封麥拉膜(Mylar)或塑膠袋)，以及類似物。也預期包裝可用於與特定裝置組合，特定裝置為諸如吸入器，鼻投與裝置(例如霧化器)或諸如迷你泵的輸注裝置。套組可具有無菌出入口(例如容器可以是靜脈內溶液袋或具有可被皮下注射針頭穿刺過之擋塞的小瓶)。容器也可以具有無菌出入口(例如容器可以是靜脈內溶液袋或具有可被皮下注射針頭穿刺過之擋塞的小瓶)。組成物中的至少一種活性劑是如本文所述彼等PD-1結合適體。

套組可視情況提供額外組分，諸如緩衝劑或說明資訊。通常，套組包含容器及標籤或包裝插頁在容器上或附接在容器上。在一些具體例中，本發明提供製造包含上述套組內含物的物品。

一般性技術

除非另有說明，否則本發明之實施將採用分子生物學(包括重組技術)、微生物學、細胞生物學、生物化學、免疫學的習知技術，其落在技術技能中。Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook, et al., 1989) Cold Spring Harbor Press ; Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984) ; Methods in Molecular Biology, Humana Press ; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press ; Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed., 1987) ; Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press ; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons ; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.) ; Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.) ; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987) ; Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel, et

al., eds., 1987) ; PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis, et al., eds., 1994) ; Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1991) ; Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999) ; Immunobiology (C. A. Janeway and P. Travers, 1997) ; Antibodies (P. Finch, 1997) ; Antibodies: a practical approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989) ; Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000) ; Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999) ; The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995。在沒有進一步詳細說明的情況下，咸信熟悉技術者能夠基於上述說明利用本發明至其最大程度。因此，下列特定具體例要理解為僅為示範性，且無論如何都不會以任何方式限制本發明的其餘部分。本文引用的所有公開資料就本文參照之目的或主體以引用方式併入本文中。

實例1：經由SELEX鑑別抗-PD-1適體

在篩選時使用PD1蛋白之細胞外域以降低被非特異性適體結合的機會。吾人在此使用的SELEX策略為膜相SELEX，如圖1中所說明。簡言之，PD1蛋白首先與適體庫混和反應並且透過真空抽吸流過硝基纖維素膜。在洗滌數次之後，結合PD1的適體將會被捕獲在膜上並且透過PCR反應進一步擴增。由PCR產物中分離出由單股適體構成的新適體池並且與新一批PD1蛋白重新反應而開始新一回合的SELEX。為了解反應是否成功，將第4、8、12及16回合的PD1篩選所選出之適體池取樣並分析。藉由與RT-qPCR定量後，以結果來測定結合各適體池之親和力及特異性(圖2)。這些數據指出，親和力隨著SELES回合增加而升高。例如，親和力從120.7 nM (第4回合)增加至6.6 nM (第16回合)(圖2)。這些數據暗示，吾人的SELEX程序在篩選高親和

力及特異性適體時充分作用。在16個回合的篩選之後，即將所得之最終適體池定序。

實例2：來自不同SELEX回合之適體池的親和力分析

在第4、8、12及16回合中針對PD-1的適體池經擴增且之後為自500 nM起2倍連續稀釋。透過與PD-1蛋白培育，針對各個選定池分析十個劑量點。藉由纖維素膜結合分離出結合的適體並且藉由RT-qPCR定量。結果以XY圖顯示。黑色圓圈指明第4回合的結果，綠色方塊為第8回合的結果，藍色三角形為第12回合的結果而倒三角形為第16回合的結果。虛線指明各池的擬合曲線。第4、8、12及16回合的解離常數分別為493.7nM、245.7nM、18.5nM及6.8nM。

實例3：PD1適體的序列分析

圖3的A區顯示PD-1適體的樹狀視圖結果。圖3的B區顯示結合至PD-1之簇集PD-1適體的序列詳情。圖文框區指明PD-1適體內的守恆區。第16回合的適體池為TA選殖並選出50個選植株用於定序。藉由簇集軟體分析序列。樹狀視圖結果指明，在第16池中逐漸形成優勢群(圖3，A區)。圖3，B區顯示PD1適體的詳細序列資訊，其包括有9個核苷酸鹼基的守恆區。9個核苷酸鹼基為CCATCTCCC (SEQ ID NO：1)。包含此核心序列的核酸預期結合至PD-1。SEQ ID NO：24-42的核酸序列顯示於下面：

PD1-2

TCCCTACGGCGCTAACGTAATTCCATCTCCCTCACAGATTGCTAACGC
CACCGTGCTACAAC (SEQ ID NO：24)

PD1-3

TCCCTACGGCGCTAACTTCCATCTCCTTGCCACCGTGCTACAAC (SEQ

ID NO : 25)

PD1-5

TCCCTACGGCGCTAACTGCCACCGTGCTACAACATCCCTACGGCGCT
AACTCTCCATCTCCCTTGCCACCGTGCTACAAC (SEQ ID NO : 26)

PD1-11

TCCCTACGGCGCTAACCCTACGCATCCATCTCCCTATGTATGTCCCGC
CACCGTGCTACAAC (SEQ ID NO : 27)

PD1-12

TCCCTACGGCGCTAACATCCATCTCCCTGCCACCGTGCTACAACATCC
CTACGGCGCTAACTGCCACCGTGCTACAAC (SEQ ID NO : 28)

PD1-15

TCCCTACGGCGCTAACTATTCCATCTCCCTCGCCACCGTGCTACAAC
(SEQ ID NO : 29)

PD1-16

TCCCTACGGCGCTAACTGATCACAAGAATAACTATCCCATCTCCCTG
CCACCGTGCTACAAC (SEQ ID NO : 11)

PD1-17

TCTTTCCGCGGGCGGGGGGACTGGGATCTTCTTATTGTGAAATCAACC
CCGTAGGA (SEQ ID NO: 31)

PD1-26

TCCCTACGGCGCTAACTCCTGCATCCATCTCCCTCTGTTAGAAGCTGC
CACCGTGCTACAAC (SEQ ID NO : 32)

PD1-32

TCCCTACGGCGCTAACCTTCCATCTCCCATGCTTGGTCAAACATACGC
CACCGTGCTACAAC (SEQ ID NO : 33)

PD1-33

TCCCTACGGCGCTAACCTTCCATCTCCCATGCTTACTCAAACATACGC
CACCGTGCTACAAC (SEQ ID NO : 34)

PD1-34

TCCCTACGGCGCTAACGAATTCCATCTCCCTCCACTCACAGTCCCGGC
CACCGTGCTACAAC (SEQ ID NO : 35)

PD1-36

TTCCTACGGCGCTAACTCCTGTTCCCCTCACAAACACCCCTGGGCAGGC
CACCGTGCTACAAC (SEQ ID NO : 36)

PD1-41

TCCCTACGGCGCTAACCATCTCCCTGCCACCGTGCTACAAC (SEQ ID
NO : 37)

PD1-42

TCCCTACGGCGCTAACTGTCCTCGCATCCCATCTCCCTACGGCGCTAA
CTGCCACCGTGCTACAAC (SEQ ID NO : 38)

PD1-44

TCCCTACGGCGCTAACGTTGTGATAAGAGGTTACAAGTTTTTCACCG
CCACCGTGCTACAAC (SEQ ID NO : 39)

PD1-46

TCCCTACGGCGCTAACTGCCACCGTGCTACAACATCCCTACGGCGCT
AACCATCTCCCTGCCACCGTGCTACAAC (SEQ ID NO : 40)

PD1-47

TCCCTACGGCGCTAACCTGGCATTTCCTGATTGTTTAACGCGGCCGGC
CATCGTGCTACAAC (SEQ ID NO : 41)

PD1-48

TCCCTACGGCGCTAACAATGGTCCATACTACCGACATCAAGTCCCCG
CCATCGTGCTACAAC (SEQ ID NO : 42)

實例4：抗-PD-1適體PD7及PD16的親和力與結構分析

選出PD7及PD16來呈現PD-1適體池中的兩個主要序列群。總結分析指出，PD7的結合親和力(圖4，B區)及PD16的結合親和力(圖4，A區)分別為9.7nM與2.1nM。使用Mfold軟體來預測PD7及PD16適體的二級結構，結果指明PD7與PD16的二級結構之間沒有明顯相似性(圖4，C區)。此外，PD7及PD16中的守恆區是位在不同部分且涉及柄/環結構(圖4，C區)。這個結果暗示，是體內自行形成之二級結構可能不是負責這些適體結合至PD-1蛋白的主要因素。

實例5：PD-1拮抗性適體的鑑別

選出PD-1適體中的七個用於T細胞增生分析，以代表七個主要序列群。這個研究中所測試的七個PD-1適體為PD16、PD13、PD6、PD7、PD8、PD9及PD24，其核苷酸序列顯示在下面。如相較於對照組，所有這些適體增加T細胞增生。適體之一PD7在誘發T細胞增生中顯示最為強烈的影響，且在CD3/CD28刺激不存在(圖5，A區)或CD3/CD28刺激存在(圖5，B區)的情況下是比PD-1拮抗性抗體更為強烈的T細胞活化劑。結果指出，相比於PD-1拮抗性抗體，PD7的訊號增加超過30%(圖5，A區)。

PD16:

TCCCTACGGCGCTAACTGATCACAAGAATAACTATCCCATCTCCCTG
CCACCGTGCTACAAC (SEQ ID NO : 11)

PD13:

TCCCTACGGCGCTAACCATCATCGATATTGACACAACCATCTCCCTGC

2016 年 11 月 16 日修正

CACCGTGCTACAAC (SEQ ID NO : 15)

PD6:

TCCCTACGGCGCTAACTCCTGCATCCATCTCCCTCTGTTAGTTTTGGC

CACCGTGCTACAAC (SEQ ID NO : 16)

PD7:

TCCCTACGGCGCTAACCTTCCATCTCCCATGCTTAGTCAAACATACGC

CACCGTGCTACAAC (SEQ ID NO : 10)

PD8:

TCCCTACGGCGCTAACGTAATTCCATCTCCCTCACAGATTGCTAACGC

CACCGTGCTACAAC (SEQ ID NO : 17)

PD9:

TCCCTACGGCGCTAACTCCATCTCCCTTGTAACGTTGCTTCCTCTTGC

CACCGTGCTACAAC (SEQ ID NO : 18)

PD24:

TCCCTACGGCGCTAACCGTCATCGTTAATATATTGTCCTCGCATAAGC

CACCGTGCTACAAC (SEQ ID NO : 19)

實例6：抗-PD-1適體序列的拮抗劑活性

如實例1中所述，依據統計分析，使用次世代定序(NGS)數據鑑別經由SELEX分離之抗-PD-1適體的其他適體核苷酸序列：

核心1 – CCATCTCCC (SEQ ID NO : 1)：

最佳化核心1 – CCATCTCCCGTCC (SEQ ID NO : 7)

核心2 – TATATTGTCC (SEQ ID NO : 20)；

核心3 – GTACAGTT (SEQ ID NO : 21)；

核心4 – GCACTACA (SEQ ID NO : 4)；

核心5 – GTACATCA (SEQ ID NO : 22) ; 以及

核心6 – GCTACTGT (SEQ ID NO : 23) 。

使用活體外競爭分析測試每一個上面適體核苷酸序列的PD-1拮抗活性。簡言之，將經200 ng的組胺酸標誌標定的PD-1受體(His標誌-PD1蛋白)塗覆在經鎳-氨基三乙酸(Ni-NTA)塗覆的盤上並且以經Fc標定的PDL-1蛋白/適體混合物處理。蛋白G-HRP及ECL受質用來測定結合訊號。PD-1拮抗性抗體J116用作為陽性對照並在適體或抗體不存在的情況下進行陰性對照。競爭分析的概要代表圖顯示於圖8，A區及B區中。在活體外競爭分析中，以200 nM的濃度測試適體序列(核心1-6及核心1(最佳化))的各者。在競爭分析中，各個適體核苷酸序列抑制PD-1與PDL-1的交互作用，如圖6中所示。此外，使用活體外競爭分析，核心1 CCATCTCCC (SEQ ID NO : 1)拮抗PD-1/PDL-1結合的IC₅₀經測定為31.18 nM (圖7)。這些數據指明，適體核苷酸序列能夠拮抗PD-1結合至PDL-1。

實例7：抗-PD-1適體與不同物種之PD-1的交叉反應

利用活體外PD-1適體結合分析，用適體來證明PD-1與其他物種結合的交叉反應性。簡言之，將200 ng經組胺酸標誌標定的PD-1受體(His標誌-PD1蛋白)塗覆在經鎳-氨基三乙酸(Ni-NTA)塗覆的盤上並且以在其5'端接合至生物素的適體(生物素-PD-1適體)處理。使用卵白素-HRP及ECL受質偵測適體對PD-1的結合。活體外PD-1結合分析的概要代表圖顯示於圖9中。所測試的適體為：

PD7–

TCCCTACGGCGCTAACCTTCCATCTCCCATGCTTAGTCAAACATACG
CCACCGTGCTACAAC (SEQ ID NO : 10 ; 核心序列呈粗體) ;

PD100–

TCCCTACGGCGCTAACCCTCCCCTAGTATATATTGTCCTCGTCTATG
CCACCGTGCTACAAC (SEQ ID NO：12；核心序列呈粗體)。

核心1-CCATCTCCC (SEQ ID NO：1)；以及

核心2-TATATTGTCC (SEQ ID NO：20)。

使用圖9中所示的活體外PD-1結合分析，測試上面適體對人類、小鼠、大鼠、恆河猴及/或犬PD-1的結合。測定適體結合至PD-1 (來自各個物種)的解離常數並顯示於表1中。這些數據指明，此等適體可結合至廣泛不同物種的PD-1 (包括人類、小鼠、大鼠、猴及狗)。

	PD7(包括核心 1)	PD100(包括核心 2)	核心 1	核心 2
人類	+++	+++	+++	+++
小鼠	+++	++	++	+++
大鼠	+++	+++	ND	ND
恆河猴	+++	++	ND	ND
犬	++	+++	++	++

Kd值：+++：低於20 nM ++：20 nM~100 nM ND：非測定

表1：適體PD7、PD100、核心1及核心2對不同物種(人類、小鼠、大鼠、恆河猴及犬)的結合親和力

實例8：抗-PD-1適體引起淋巴球增生以及CD8⁺ T細胞增生

使用淋巴球增生分析來證明抗-PD-1適體促進淋巴球增生的能力，適體包括游離適體以及接合PEG的適體(PEG接合物)。簡言之，藉由Ficoll-paque單離人類周邊血液單核細胞(PBMC)並且培養在完全RPMI培養基中過夜，以使得細胞穩定。以不同濃度的PD-1適體、聚乙二醇化適體、拮抗性PD-1抗

體或隨機對照序列處理經穩定的PBMC歷時48小時。使用來自Promega公司的CellTiter®增生套組評估總細胞數。所測試的適體為PD7 (SEQ ID NO：10)，CCATCTCCCA (SEQ ID NO：13；核心序列)以及聚乙二醇化PD7二聚體(顯示於圖11中)：

以上每一適體增加淋巴球增生達到比PD-1拮抗性抗體更大的程度(圖10)。這些數據指明，該等適體以及PEG-核心序列二聚體可用於提高免疫活性。

此外，使用PD7與核心1作為實例，用流式細胞術來證明抗-PD-1適體促進CD4⁺與CD8⁺ T細胞增生的能力。簡言之，使用磁性珠粒自小鼠脾臟單離出小鼠CD4⁺與CD8⁺ T細胞。以螢光指示染料羧基螢光素琥珀醯亞胺酯(CFSE)將細胞染色。經CFSE染色的細胞與抗原呈現細胞(APC；單離自小鼠PBMC的單核球及巨噬細胞)共培養並以40 nM的PD7或40 nM的適體核苷酸序列CCATCTCCC (SEQ ID NO：1)處理歷時72小時。使用拮抗性PD-1抗體的處理用作為陽性對照而使用隨機DNA序列的處理用作為陰性對照。使用流式細胞術來監控細胞群的螢光強度，其中螢光訊號較弱表示增生增加。分析的概要代表圖顯示於圖12中。結果指出，拮抗性PD-1抗體、PD7適體以及增加CD8⁺ T細胞增生而非CD4⁺ T細胞增生(圖13，A-D區)，而陰性對照對任何細胞類型的細胞增生沒有影響(圖13，A區與B區)。這些數據指出，包含本文所示核心序列的適體可藉由促進CD8⁺ T細胞增生用來提高免疫活性。

實例9：抗-PD-1適體在活體內同系小鼠模型中抑制腫瘤生長

利用PD-1拮抗性適體PD7 (SEQ ID NO：10)作為實例，使用同系肺癌小鼠模型來證明本文所述抗-PD-1適體在活體內對於肺癌生長的抑制活性。簡言之，在第0天將小鼠路易士肺癌細胞(ATCC，CRL1642)皮下植入C57BL/6J

鼠體內(每隻小鼠 2×10^5 個路易士肺細胞)。在腫瘤達到 100 mm^3 之後，將小鼠分成對照、經PBS處理組($n=7$)或經PD-1適體處理組($n=7$)。透過腹膜內注射，經PD-1適體處理的小鼠被投與 40 nmol 之PBS中的PD7而對照小鼠被投與PBS。如圖14中所示，路易士肺細胞同系小鼠在第0天及第5天注射PD-1適體(圖14；箭頭表示注射時間)。在第0、3、5、7、9與11天測量腫瘤尺寸。在腫瘤細胞注射後第11天，在經PD7處理的小鼠中，腫瘤尺寸相比於經對照PBS處理的小鼠腫瘤尺寸減少達約50% (圖14)。這些數據指出，PD7適體可用來治療肺癌。

實例10：抗-PD-1適體在活體內人類化小鼠模型中抑制腫瘤生長

利用PD-1拮抗性適體PD7 (SEQ ID NO：10)作為實例，使用人類化肺癌小鼠模型來證明本文所述抗-PD-1適體在活體內對於肺癌生長的抑制活性。簡言之，在第0天將人類A549肺癌細胞皮下植入NOD小鼠體內(每隻小鼠 1.5×10^6 個A549細胞)。在A549細胞植入小鼠體內後一週，將人類周邊血液白血球(PBL)注射至小鼠中。將小鼠分成對照、經干擾DNA處理組($n=3$ ；小鼠226、233與239)或經PD-1適體處理組($n=3$ ；小鼠234、235與240)。藉由腹膜內注射，小鼠投與 $150 \mu\text{l}$ 的 $8 \mu\text{M}$ PD-1或干擾DNA對照。A549肺細胞人類化小鼠注射PD-1適體或干擾DNA對照每週一次，歷時三週。治療計劃表的概要代表圖顯示於圖15中。在第25、32與38天使用IVIS光譜測量腫瘤尺寸。在腫瘤細胞注射後第38天，經PD7處理的小鼠中，腫瘤尺寸(圖16，A-D區)相比於經干擾DNA對照處理的小鼠腫瘤尺寸(圖16，E-H區)明顯減少。這些數據的平均值揭示，當以PD7處理小鼠時，在第38天相比於經干擾DNA對照處理的小鼠有大於80%腫瘤尺寸減少(圖17)。這些數據指出，抗-PD7適體可用於治療人類肺癌。

其他具體例

此說明書中揭示的所有特徵能以任何組合形式加以組合。此說明書中揭示的個別特徵可被相同、相等或類似特性的替代性特徵所取代。因此，除非他處有清楚說明，否則所揭示的個別特徵僅為具有相等或類似特徵之上位系列實例。

由以上說明，熟悉技術者可容易確定本發明的主要特徵，且在不偏離其精神與範疇的情況下做出本發明的各種變化與修飾，以使其適用於不同用途及情況。因此，其他具體例也落在申請專利範圍內。

【序列表】(請換頁單獨記載)

序列表

<110> 中央研究院
國立台灣大學

<120> 具拮抗PD-1功能的適體分子於癌症治療相關之應用

<130> A0988.70057W000

<150> US 62/031,427
<151> 2014-07-31

<160> 42

<170> PatentIn Version 3.5

<210> 1
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成聚核苷酸

<400> 1
ccatctccc

<210> 2
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成聚核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> n為c或g

<400> 2
tatattgtnc

<210> 3
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成聚核苷酸

9

10

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> n為a、c，或不存在

<400> 3
gtacagttn 9

<210> 4
<211> 8
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成聚核苷酸

<400> 4
gcactaca 8

<210> 5
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成聚核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> n為a、t，或不存在

<400> 5
gtacatcan 9

<210> 6
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成聚核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n為a、t，或不存在

<220>

<221>	misc_feature	
<222>	(10)..(10)	
<223>	n為c、t，或不存在	
<400>	6	
	ngctactgtn	10
<210>	7	
<211>	13	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成聚核苷酸	
<400>	7	
	ccatctcccg tcc	13
<210>	8	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成聚核苷酸	
<400>	8	
	cttccatctc ccatgcttag tcaaacatac	30
<210>	9	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成聚核苷酸	
<400>	9	
	tgatcacaag aataactatc ccatctccct	30
<210>	10	
<211>	62	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成聚核苷酸	
<400>	10	
	tccctacggc gctaaccttc catctcccat gcttagtcaa acatacgcca ccgtgctaca	60

ac	62
<210> 11	
<211> 62	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成聚核苷酸	
<400> 11	
tccctacggc gctaactgat cacaagaata actatcccat ctccctgcca ccgtgctaca	60
ac	62
<210> 12	
<211> 62	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成聚核苷酸	
<400> 12	
tccctacggc gctaaccctc ccctagtata tattgtcctc gtctatgcca ccgtgctaca	60
ac	62
<210> 13	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成聚核苷酸	
<400> 13	
ccatctccca	10
<210> 14	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成聚核苷酸	
<400> 14	
ccatctccca tttttttttt t	21

<210> 15
<211> 62
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成聚核苷酸

<400> 15
tccctacggc gctaaccatc atcgatatig acacaaccat ctccctgcca ccgtgctaca 60
ac 62

<210> 16
<211> 62
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成聚核苷酸

<400> 16
tccctacggc gctaactcct gcatccatct ccctctgtta gttttggcca ccgtgctaca 60
ac 62

<210> 17
<211> 62
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成聚核苷酸

<400> 17
tccctacggc gctaacgtaa ttccatctcc ctcacagatt gctaacgcca ccgtgctaca 60
ac 62

<210> 18
<211> 62
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成聚核苷酸

<400> 18
tccctacggc gctaactcca tctcccttgt aacgttgctt cctcttgcca ccgtgctaca 60
ac 62

<210>	19	
<211>	62	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成聚核苷酸	
<400>	19	
	tccctacggc gctaaccgtc atcgtaaata tattgtcctc gcataagcca ccgtgctaca	60
	ac	62
<210>	20	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成聚核苷酸	
<400>	20	
	tatattgtcc	10
<210>	21	
<211>	8	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成聚核苷酸	
<400>	21	
	gtacagtt	8
<210>	22	
<211>	8	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成聚核苷酸	
<400>	22	
	gtacatca	8
<210>	23	
<211>	8	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>		
<223>	合成聚核苷酸	
<400>	23	
	gctactgt	8
<210>	24	
<211>	62	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成聚核苷酸	
<400>	24	
	tccctacggc gctaacgtaa ttccatctcc ctcacagatt gctaacgcca ccgtgctaca	60
	ac	62
<210>	25	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成聚核苷酸	
<400>	25	
	tccctacggc gctaacttcc atctccttgc caccgtgcta caac	44
<210>	26	
<211>	80	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成聚核苷酸	
<400>	26	
	tccctacggc gctaactgcc accgtgctac aacatcccta cggcgctaac tctccatctc	60
	ccttgccacc gtgctacaac	80
<210>	27	
<211>	62	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成聚核苷酸	

<400> 27
tccctacggc gctaacccta cgcattccatc tccctatgta tgtcccgcca ccgtgctaca 60
ac 62

<210> 28
<211> 78
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成聚核苷酸

<400> 28
tccctacggc gctaacaatcc atctccctgc caccgtgcta caacatccct acggcgctaa 60
ctgccaccgt gctacaac 78

<210> 29
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成聚核苷酸

<400> 29
tccctacggc gctaactatt ccattccct cgccaccgtg ctacaac 47

<210> 30
<211> 62
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成聚核苷酸

<400> 30
tccctacggc gctaactgat cacaagaata actatcccat ctccctgcca ccgtgctaca 60
ac 62

<210> 31
<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成聚核苷酸

<400>	31	
	tctttccgcg gcggggggac tgggatcttc ttattgtgaa atcaaccccg tagga	55
<210>	32	
<211>	62	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成聚核苷酸	
<400>	32	
	tccctacggc gctaactcct gcatccatct ccctctgtta gaagctgcca ccgtgctaca	60
	ac	62
<210>	33	
<211>	62	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成聚核苷酸	
<400>	33	
	tccctacggc gtaaaccttc catctcccat gcttgggtcaa acatacgcca ccgtgctaca	60
	ac	62
<210>	34	
<211>	62	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成聚核苷酸	
<400>	34	
	tccctacggc gtaaaccttc catctcccat gcttactcaa acatacgcca ccgtgctaca	60
	ac	62
<210>	35	
<211>	62	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成聚核苷酸	
<400>	35	

tccctacggc gctaacgaat tccatctccc tccactcaca gtcccggcca ccgtgctaca 60
 ac 62

<210> 36
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成聚核苷酸

<400> 36
 ttcctacggc gctaactcct gttcccctca caacacccct gggcaggcca ccgtgctaca 60
 ac 62

<210> 37
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成聚核苷酸

<400> 37
 tccctacggc gctaaccatc tccctgccac cgtgctacaa c 41

<210> 38
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成聚核苷酸

<400> 38
 tccctacggc gctaactgtc ctgcacccc atctccctac ggcgctaact gccaccgtgc 60
 tacaac 66

<210> 39
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成聚核苷酸

<400> 39
 tccctacggc gtaacgttg tgataagagg ttacaagttt ttaccgcca ccgtgctaca 60

ac	62
<210> 40	
<211> 75	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成聚核苷酸	
<400> 40	
tccctacggc gctaactgcc accgtgctac aacatcccta cggcgctaac catctccctg	60
ccaccgtgct acaac	75
<210> 41	
<211> 62	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成聚核苷酸	
<400> 41	
tccctacggc gctaacctgg catctcctga ttgttttaacg cggccggcca tcgtgctaca	60
ac	62
<210> 42	
<211> 62	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成聚核苷酸	
<400> 42	
tccctacggc gctaacaatg gtccatacta ccgacatcaa gtccccgcca tcgtgctaca	60
ac	62

申請專利範圍

1. 一種能結合程序性細胞死亡蛋白1 (PD-1)的核酸適體，其中該適體包含 SEQ ID NO：10的核酸序列。
2. 如請求項1之核酸適體，其中該適體由SEQ ID NO：10的核酸序列組成。
3. 如請求項1之核酸適體，其中該適體以低於20 nM的解離常數(K_d)結合至 PD-1。
4. 如請求項1之核酸適體，其中該核酸適體與聚乙二醇(PEG)接合。
5. 如請求項4之核酸適體，其中PEG接合至該核酸適體的3'端。
6. 如請求項4之核酸適體，其中PEG具有範圍自10 kDa至30 kDa的分子量。
7. 如請求項6之核酸適體，其中PEG具有20 kDa的分子量。
8. 一種抗-PD-1適體二聚體，其包含第一抗-PD-1適體、第二抗-PD-1適體，及連接該第一抗-PD-1適體與該第二抗-PD-1適體的聚合物部分，其中該第一抗-PD-1與該第二抗-PD-1適體中至少一者為如請求項1的核酸適體。
9. 如請求項8之抗-PD-1適體二聚體，其中該第一抗-PD-1適體與該第二抗-PD-1適體相同。
10. 如請求項8之抗-PD-1適體二聚體，其中該第一抗-PD-1適體與該第二抗-PD-1適體不同。
11. 如請求項8之抗-PD-1適體二聚體，其中該聚合物部分為PEG。
12. 如請求項11之抗-PD-1適體二聚體，其中PEG具有範圍自10 kDa至30 kDa的分子量。
13. 如請求項12之抗-PD-1適體二聚體，其中PEG具有20 kDa的分子量。
14. 如請求項8至13中任一項之抗-PD-1適體二聚體，其中該第一適體、該第二適體或兩者是經由連接子連接至該聚合物部分。
15. 如請求項14之抗-PD-1適體二聚體，其中該連接子包含聚T寡核苷酸片

2020 年 4 月 24 日修正

段。

16. 如請求項15之抗-PD-1適體二聚體，其中該聚T寡核苷酸片段含有5至20個T殘基。
17. 一種醫藥組成物，其包含(i)如請求項1至7中任一項之核酸適體，或如請求項8至16中任一項之抗-PD-1適體二聚體；以及(ii)醫藥上可接受之載劑。
18. 一種用於治療癌症或感染的醫藥組成物，其包含(i)如請求項1至7中任一項之核酸適體，或如請求項8至16中任一項之抗-PD-1適體二聚體；以及(ii)醫藥上可接受之載劑。
19. 一種包含SEQ ID NO：1或SEQ ID NO：10的核酸序列之核酸適體或包含SEQ ID NO：1或SEQ ID NO：10的核酸序列之抗-PD-1適體二聚體供製造用以在個體中治療癌症或感染之藥物的用途。
20. 如請求項19之用途，其中該癌症為黑色素瘤、非小細胞肺癌、結腸直腸癌，或腎細胞癌。
21. 如請求項19之用途，其中該個體為患有或懷疑患有HIV感染的人類患者。
22. 如請求項19之用途，其中該藥物的量有效增加T細胞活化。
23. 如請求項19之用途，其中該藥物的量有效增加CD8陽性T細胞的增生。

圖 1

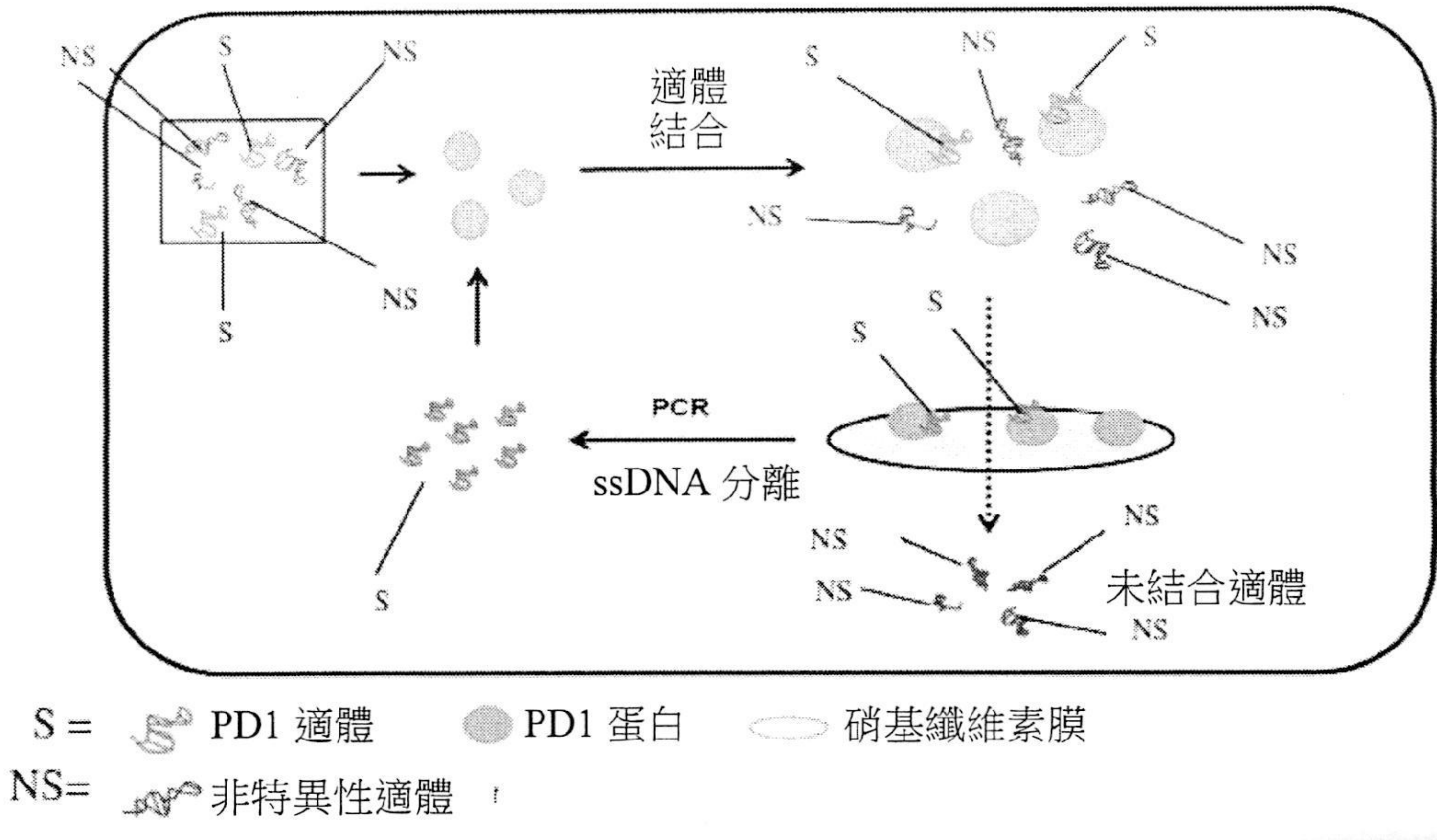


圖 2

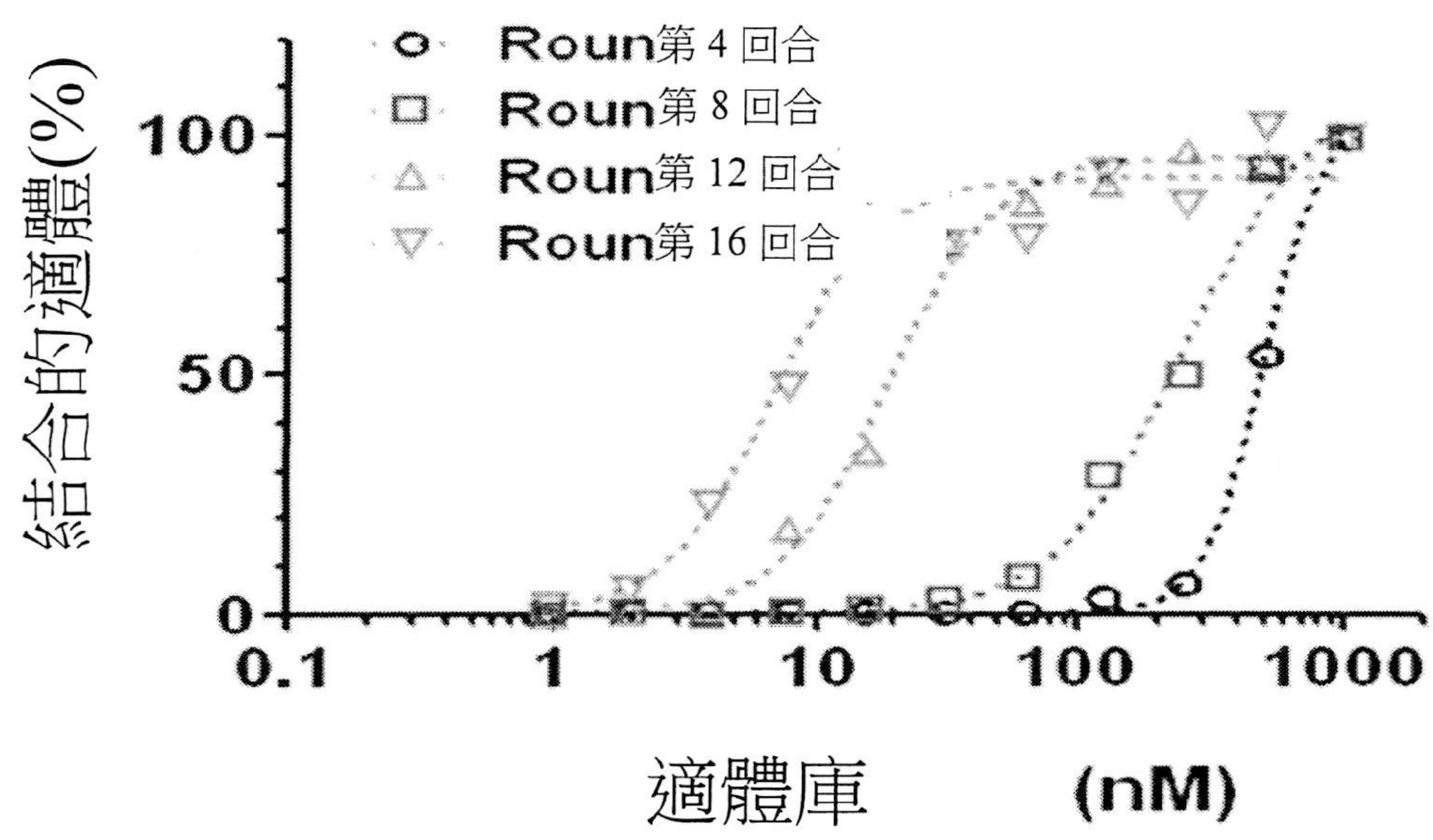


圖 3

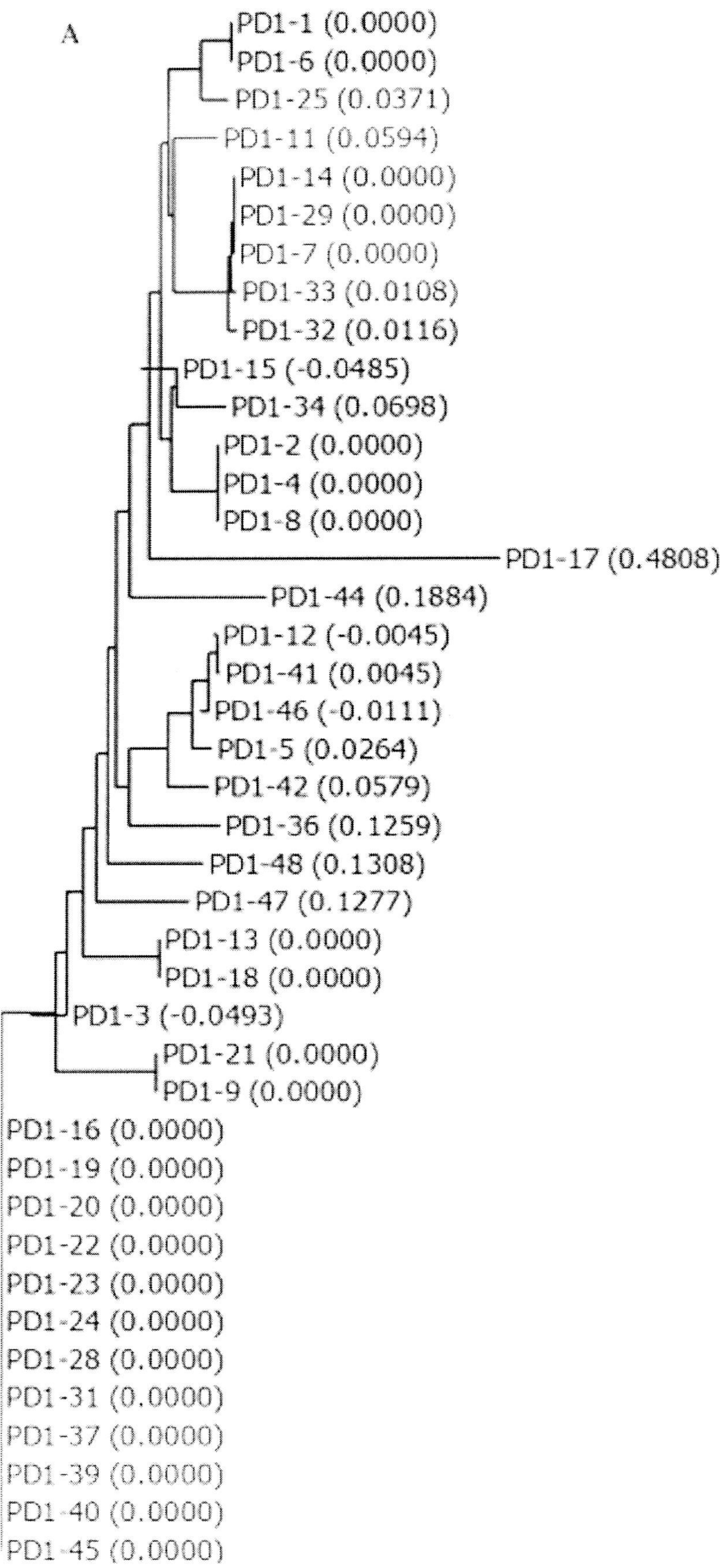


圖 3 (續)

B

PD1-16	1	TCCCTACGGGGCTAACT	ATCACAAGAATAAATAAT	GCATCTCCG	TCCAGCGTCTACAAC
PD1-19	1	TCCCTACGGGGCTAACT	ATCACAAGAATAAATAAT	GCATCTCCG	TCCAGCGTCTACAAC
PD1-20	1	TCCCTACGGGGCTAACT	ATCACAAGAATAAATAAT	GCATCTCCG	TCCAGCGTCTACAAC
PD1-22	1	TCCCTACGGGGCTAACT	ATCACAAGAATAAATAAT	GCATCTCCG	TCCAGCGTCTACAAC
PD1-23	1	TCCCTACGGGGCTAACT	ATCACAAGAATAAATAAT	GCATCTCCG	TCCAGCGTCTACAAC
PD1-24	1	TCCCTACGGGGCTAACT	ATCACAAGAATAAATAAT	GCATCTCCG	TCCAGCGTCTACAAC
PD1-28	1	TCCCTACGGGGCTAACT	ATCACAAGAATAAATAAT	GCATCTCCG	TCCAGCGTCTACAAC
PD1-31	1	TCCCTACGGGGCTAACT	ATCACAAGAATAAATAAT	GCATCTCCG	TCCAGCGTCTACAAC
PD1-37	1	TCCCTACGGGGCTAACT	ATCACAAGAATAAATAAT	GCATCTCCG	TCCAGCGTCTACAAC
PD1-39	1	TCCCTACGGGGCTAACT	ATCACAAGAATAAATAAT	GCATCTCCG	TCCAGCGTCTACAAC
PD1-40	1	TCCCTACGGGGCTAACT	ATCACAAGAATAAATAAT	GCATCTCCG	TCCAGCGTCTACAAC
PD1-45	1	TCCCTACGGGGCTAACT	ATCACAAGAATAAATAAT	GCATCTCCG	TCCAGCGTCTACAAC

PD1-5	1	TCCCTACGGGGCTAACT	GCATCTCCG	GCATCTCCG	TGGGAGCGGTCTACAAC
PD1-6	1	TCCCTACGGGGCTAACT	GCATCTCCG	GCATCTCCG	TGGGAGCGGTCTACAAC
PD1-25	1	TCCCTACGGGGCTAACT	GCATCTCCG	GCATCTCCG	CTGGAGCGGTCTACAAC
PD1-11	1	TCCCTACGGGGCTAACT	GCATCTCCG	GCATCTCCG	CCGGAGCGGTCTACAAC
PD1-14	1	TCCCTACGGGGCTAACT	GCATCTCCG	GCATCTCCG	ACGGAGCGGTCTACAAC
PD1-29	1	TCCCTACGGGGCTAACT	GCATCTCCG	GCATCTCCG	ACGGAGCGGTCTACAAC
PD1-7	1	TCCCTACGGGGCTAACT	GCATCTCCG	GCATCTCCG	ACGGAGCGGTCTACAAC
PD1-33	1	TCCCTACGGGGCTAACT	GCATCTCCG	GCATCTCCG	ACGGAGCGGTCTACAAC
PD1-32	1	TCCCTACGGGGCTAACT	GCATCTCCG	GCATCTCCG	ACGGAGCGGTCTACAAC
PD1-15	1	TCCCTACGGGGCTAACT	GCATCTCCG	GCATCTCCG	ACGGAGCGGTCTACAAC
PD1-34	1	TCCCTACGGGGCTAACT	GCATCTCCG	GCATCTCCG	ACGGAGCGGTCTACAAC
PD1-2	1	TCCCTACGGGGCTAACT	GCATCTCCG	GCATCTCCG	ACGGAGCGGTCTACAAC
PD1-4	1	TCCCTACGGGGCTAACT	GCATCTCCG	GCATCTCCG	ACGGAGCGGTCTACAAC
PD1-8	1	TCCCTACGGGGCTAACT	GCATCTCCG	GCATCTCCG	ACGGAGCGGTCTACAAC

PD1-13	1	TCCCTACGGGGCTAACT	GCATCTCCG	GCATCTCCG	TCCAGCGTCTACAAC
PD1-18	1	TCCCTACGGGGCTAACT	GCATCTCCG	GCATCTCCG	TCCAGCGTCTACAAC
PD1-3	1	TCCCTACGGGGCTAACT	GCATCTCCG	GCATCTCCG	TCCAGCGTCTACAAC
PD1-21	1	TCCCTACGGGGCTAACT	GCATCTCCG	GCATCTCCG	TCCAGCGTCTACAAC
PD1-9	1	TCCCTACGGGGCTAACT	GCATCTCCG	GCATCTCCG	TCCAGCGTCTACAAC

圖 4

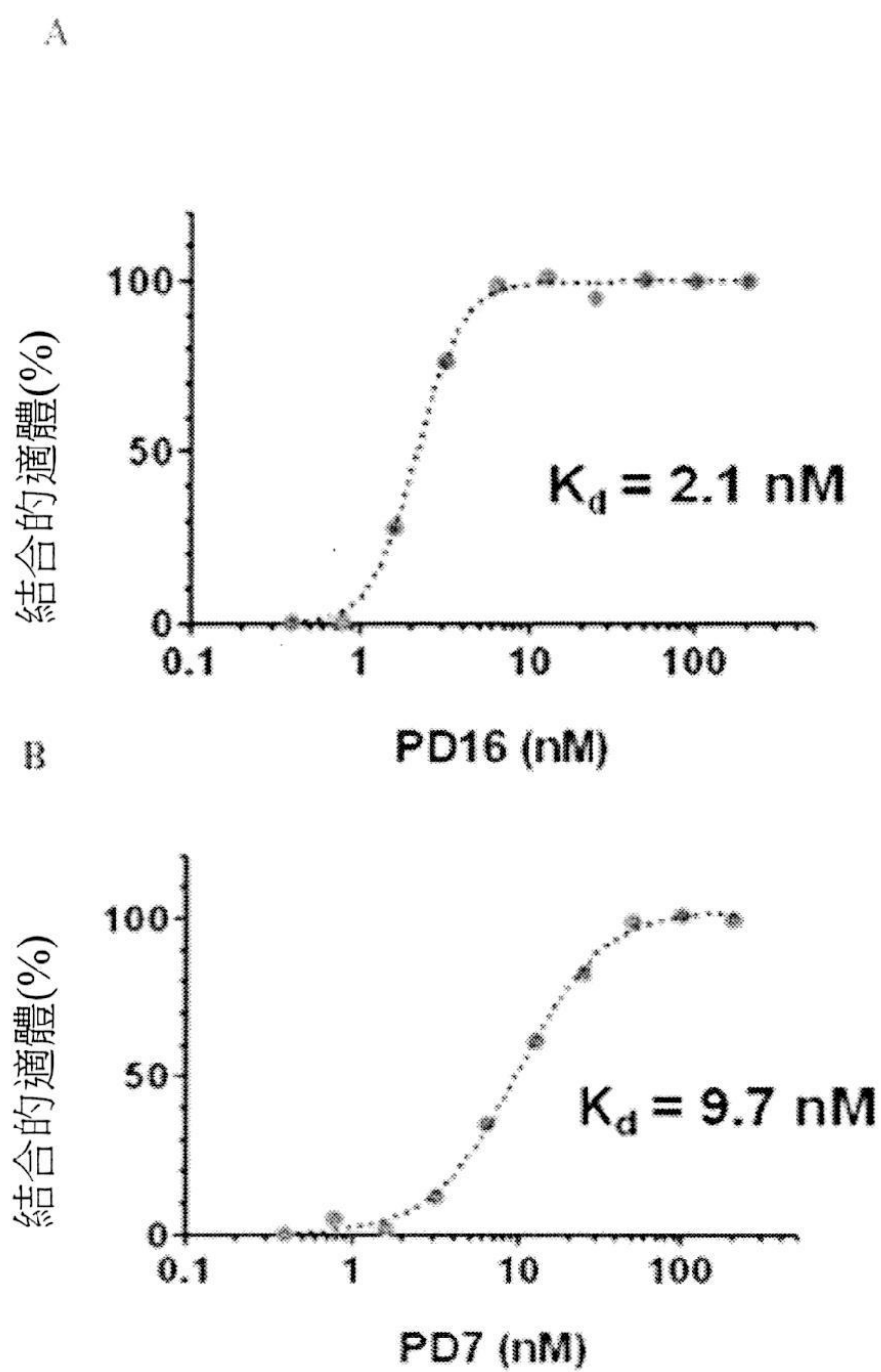


圖 4(續)

C
核心序列：
CCATCTCCC

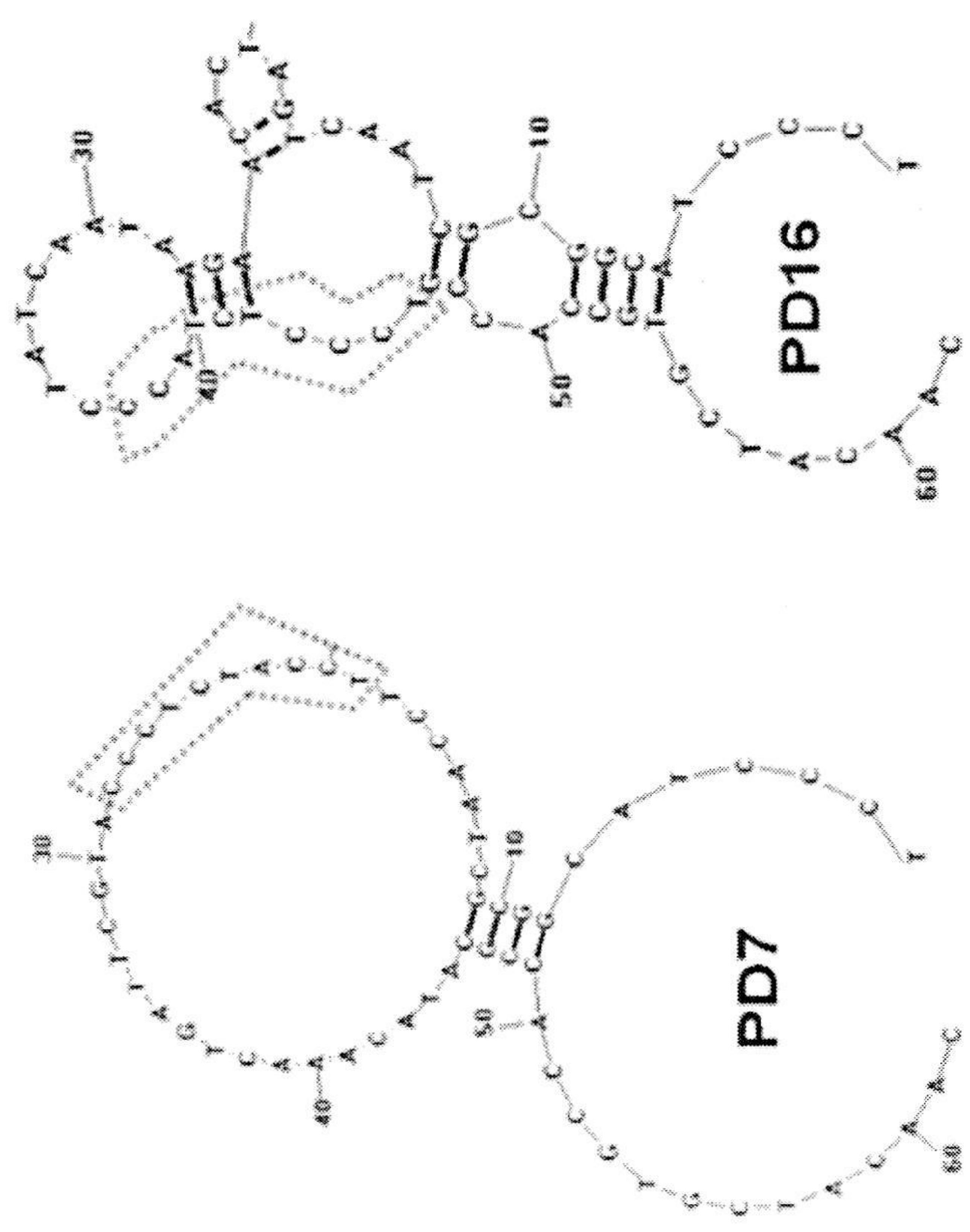


圖 5

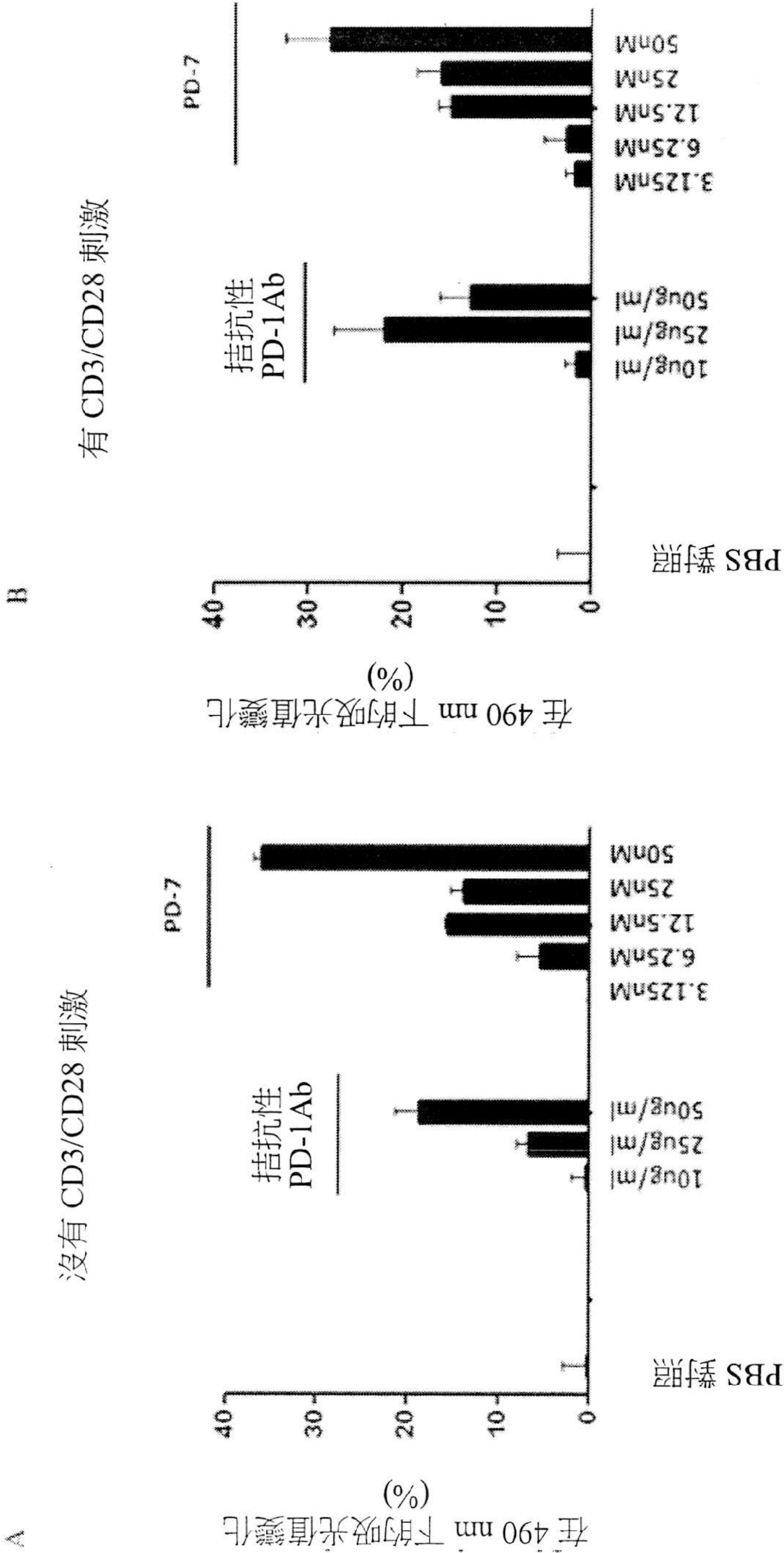


圖 6

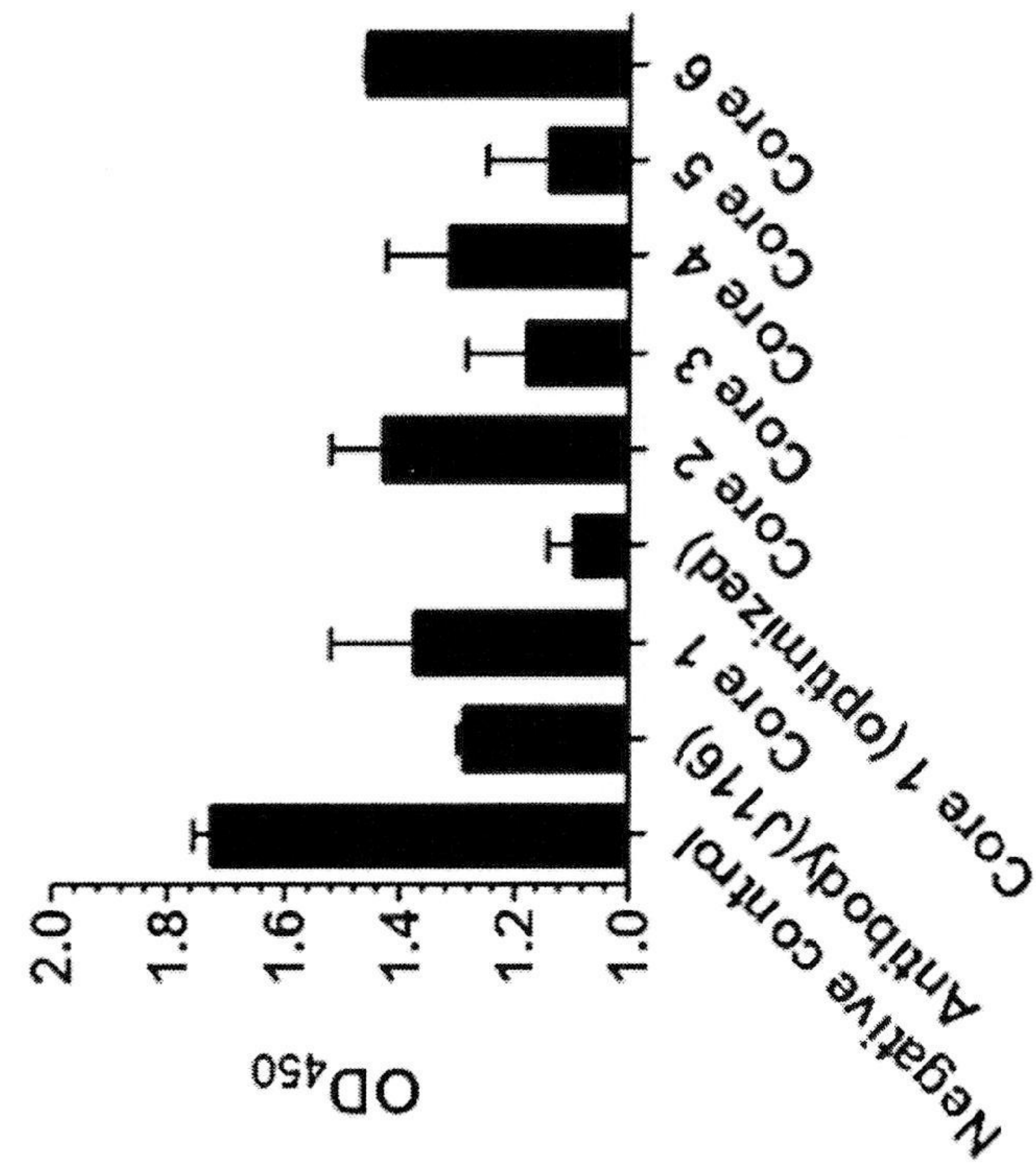


圖 7

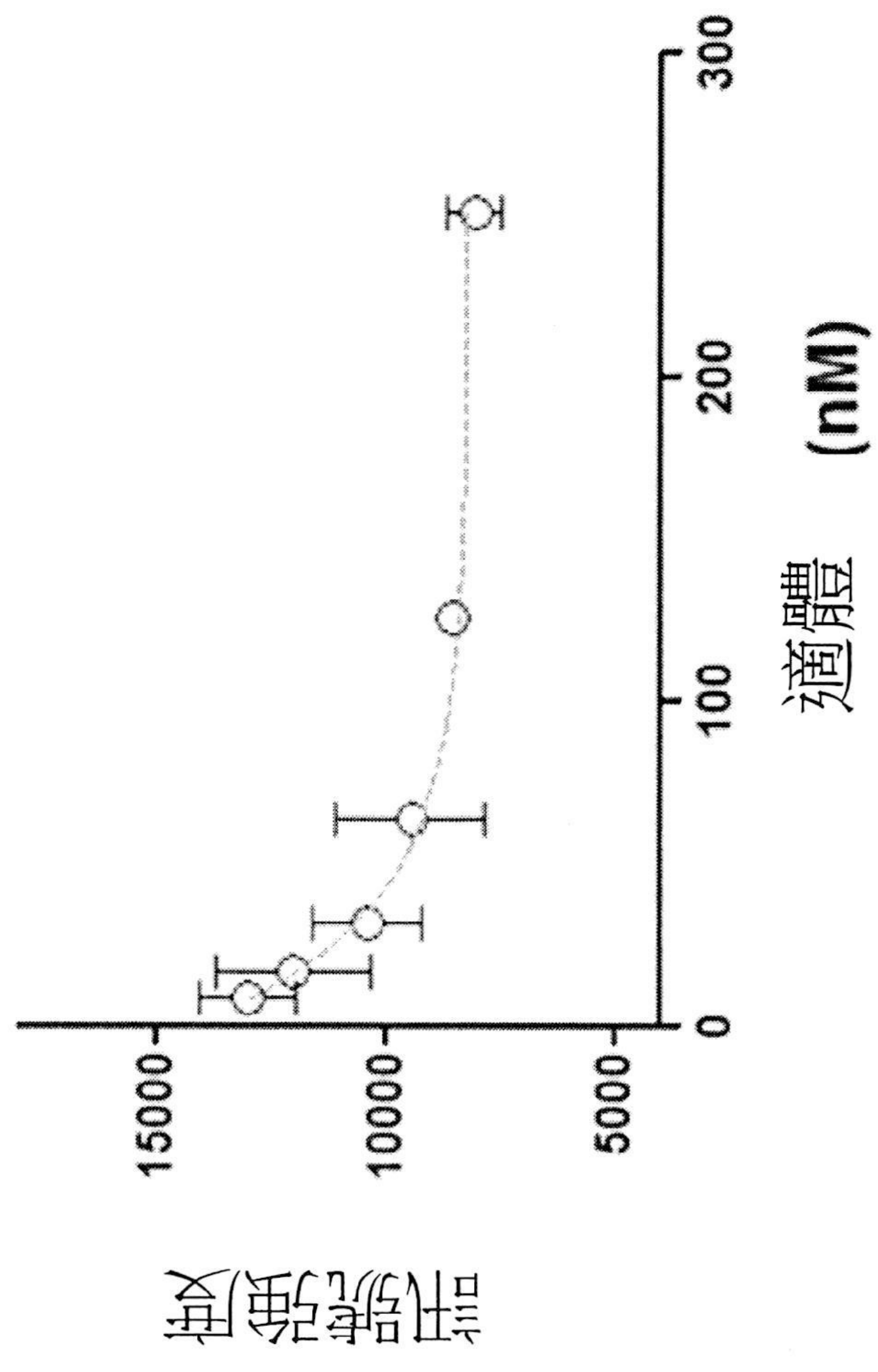
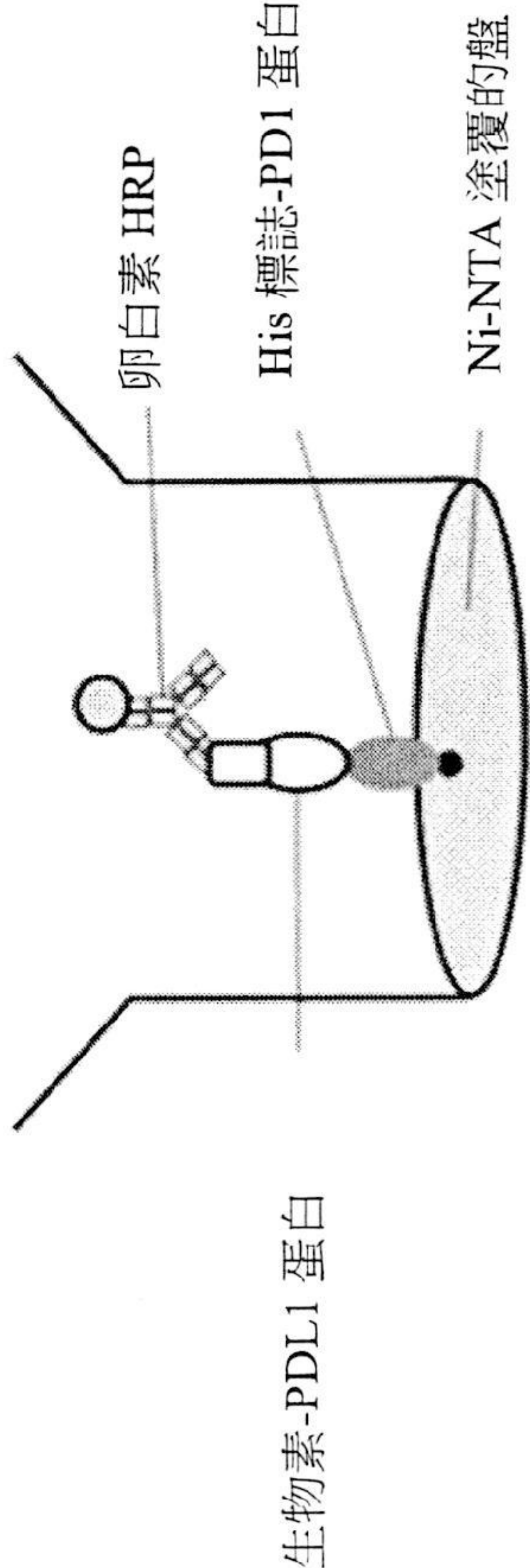


圖 8



B

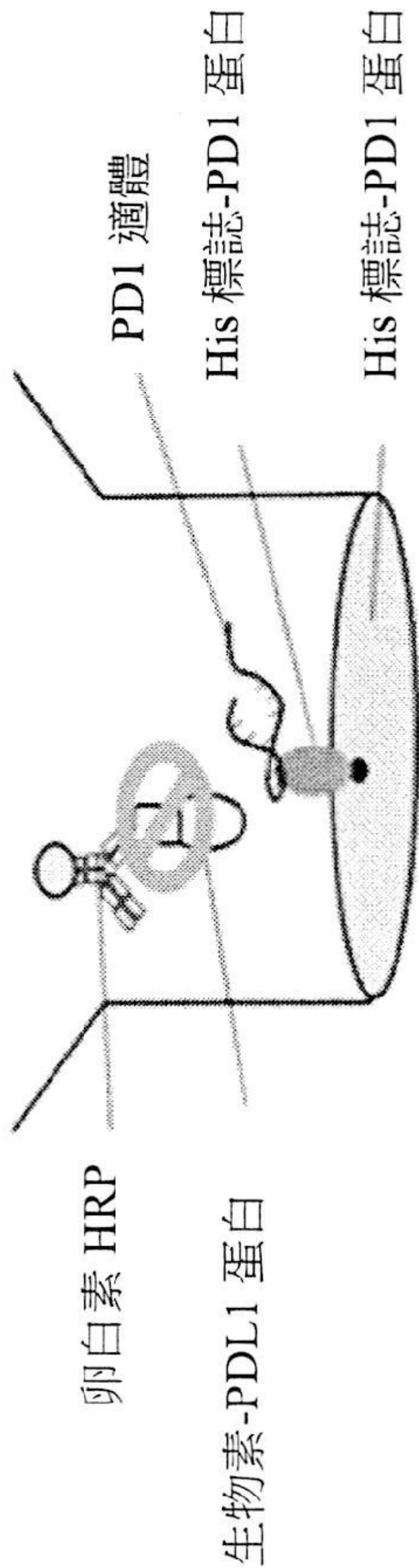


圖 9

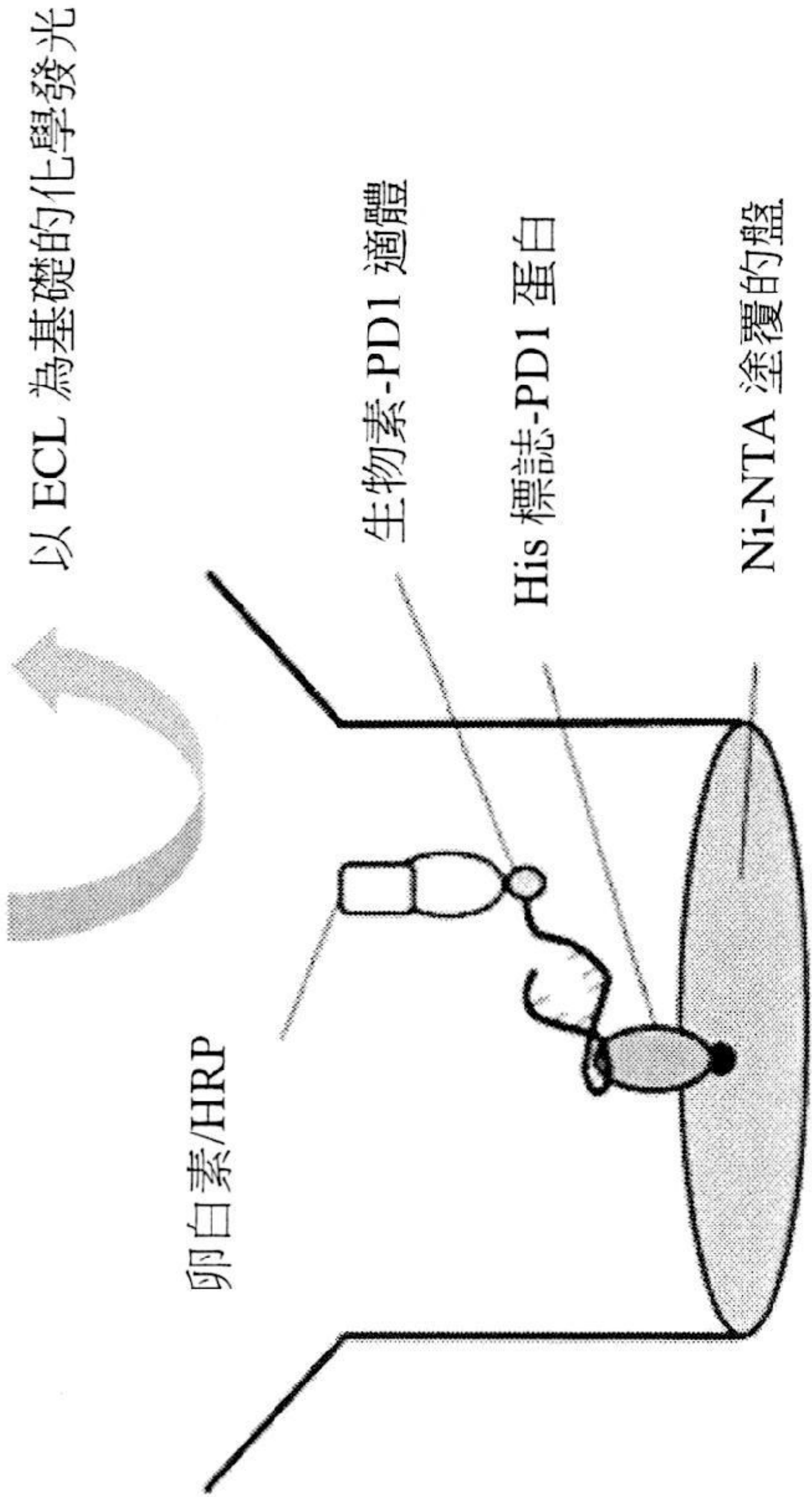


圖 10

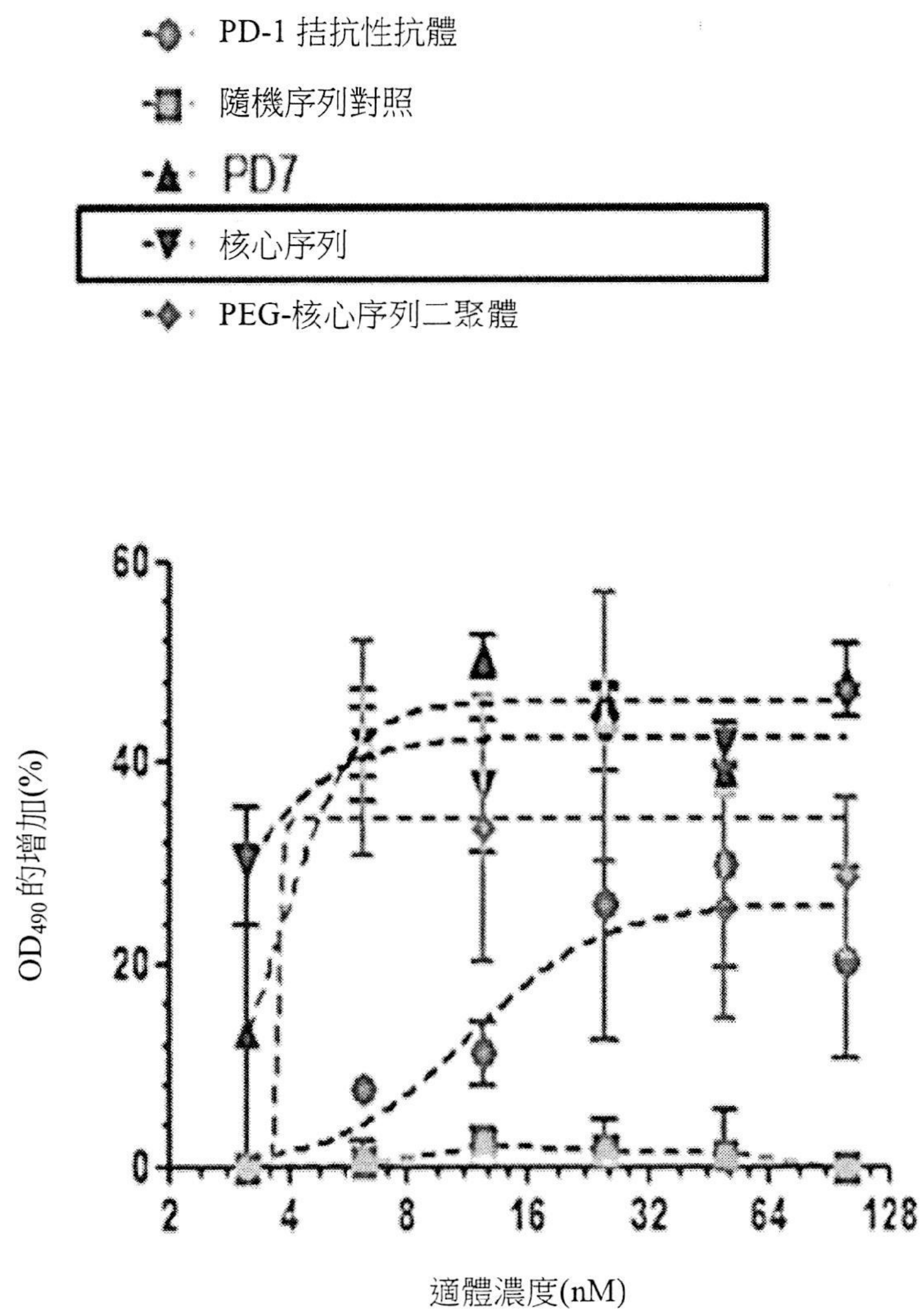


圖 11

PD7 二聚體形成：

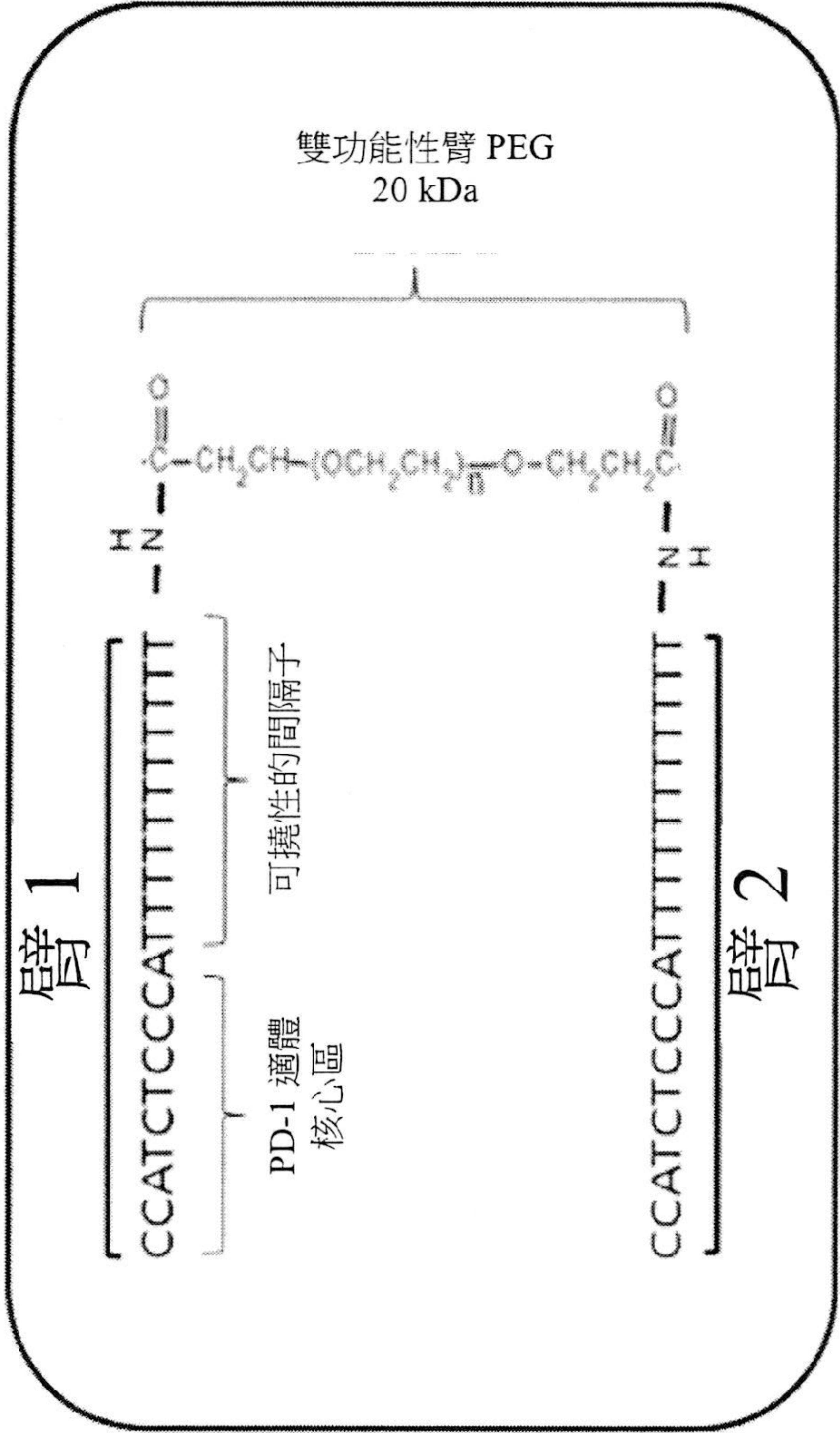


圖 12

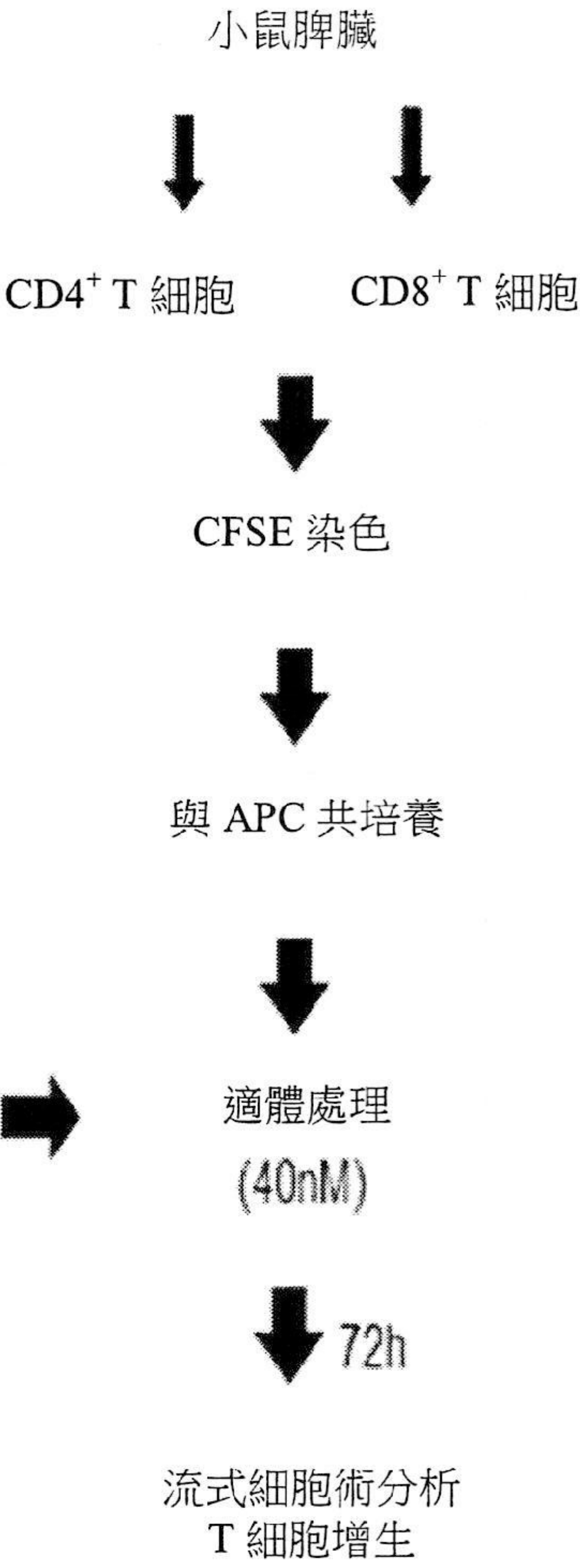


圖 13

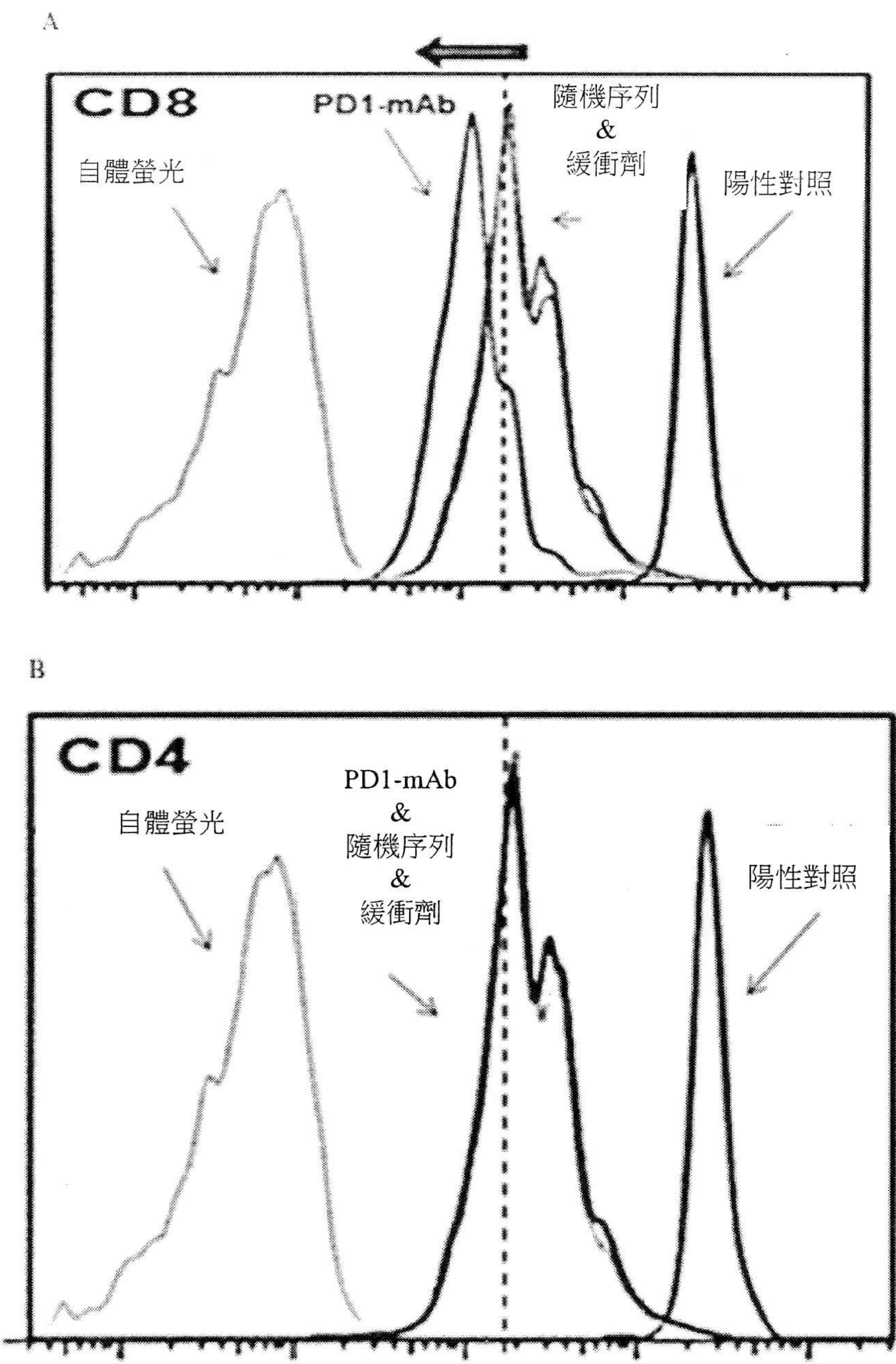


圖 13(續)

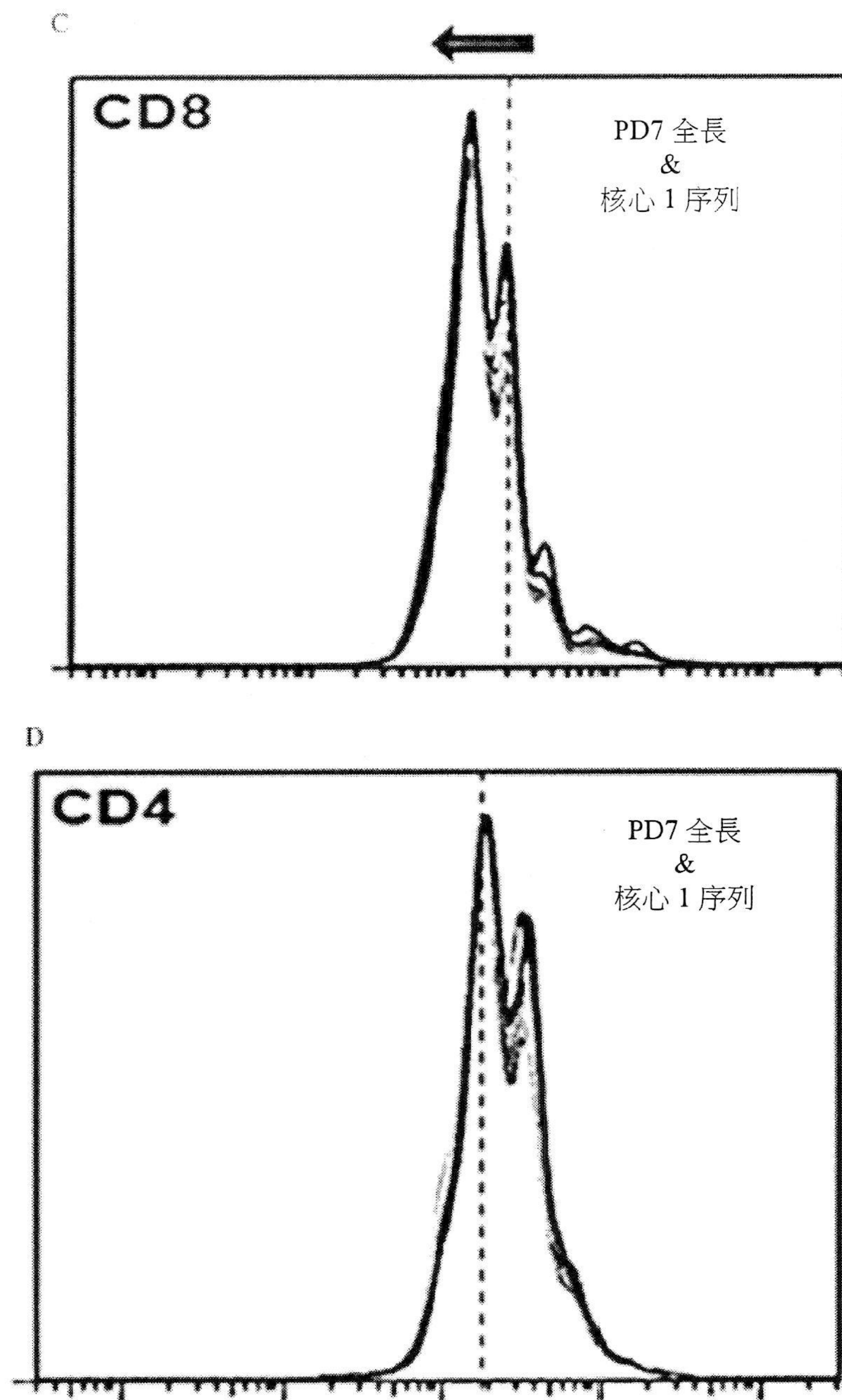


圖 14

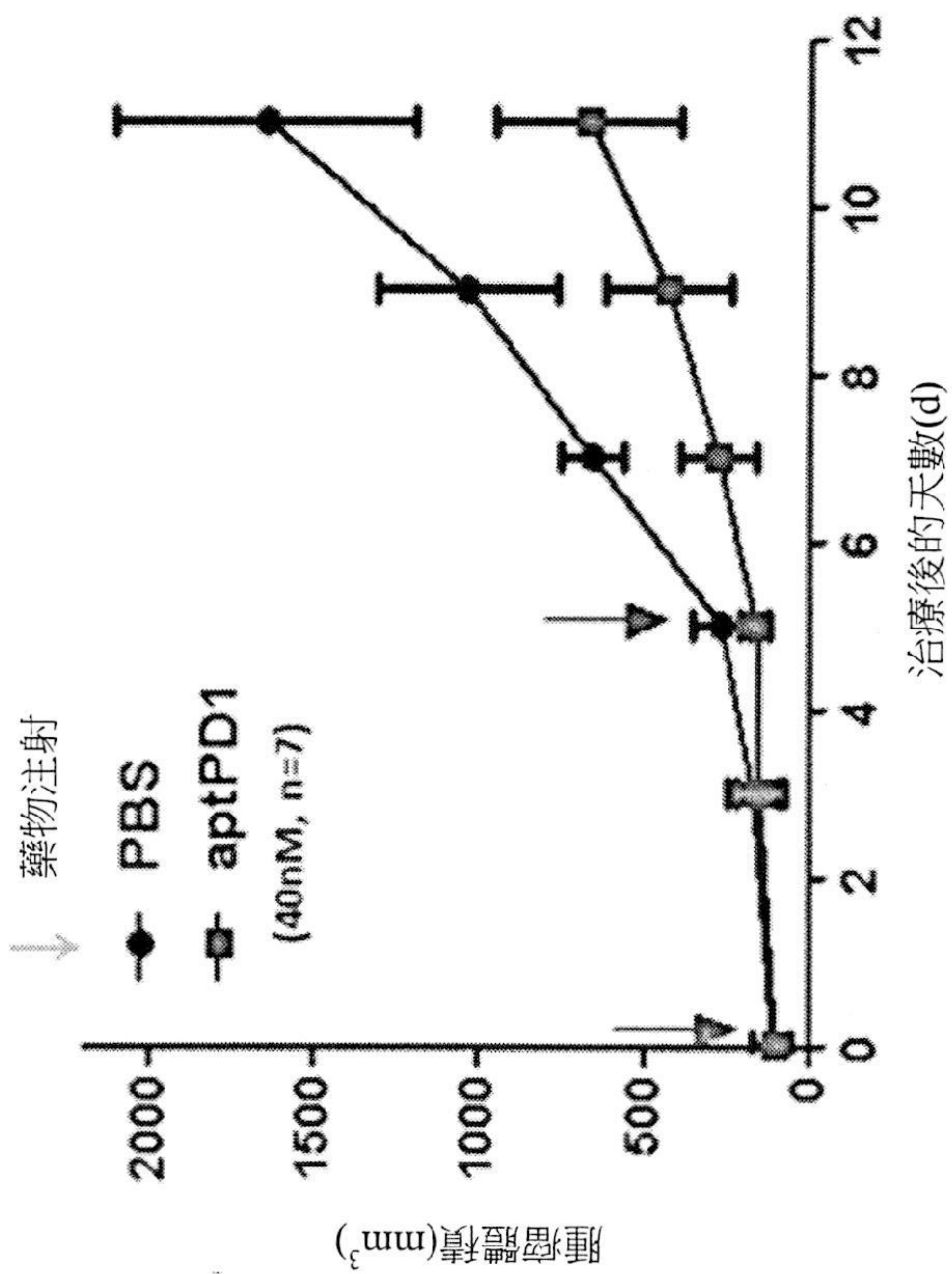


圖 15

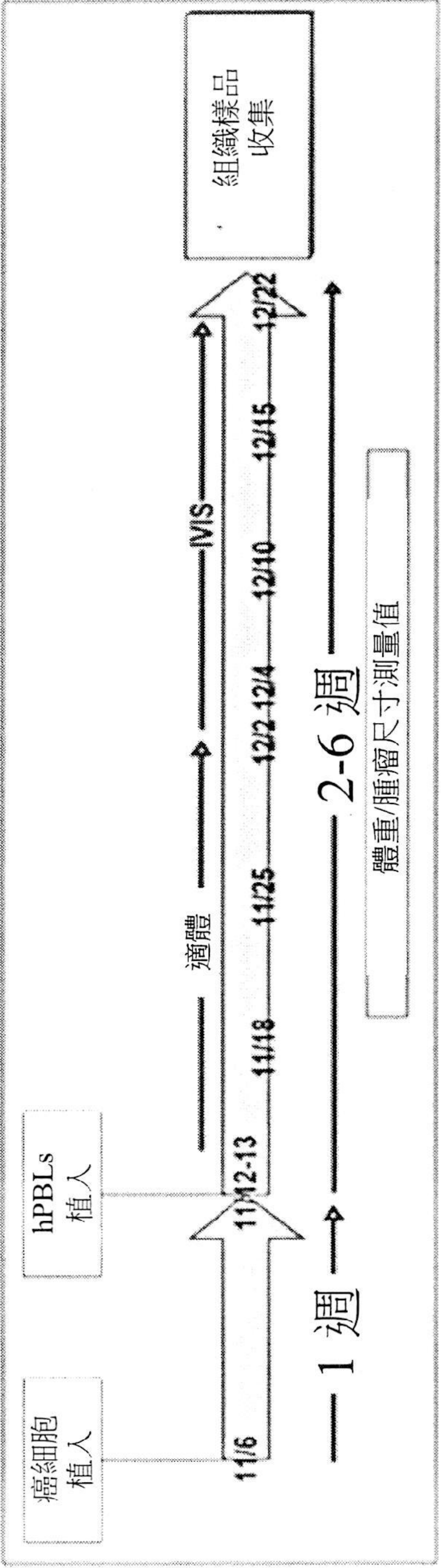
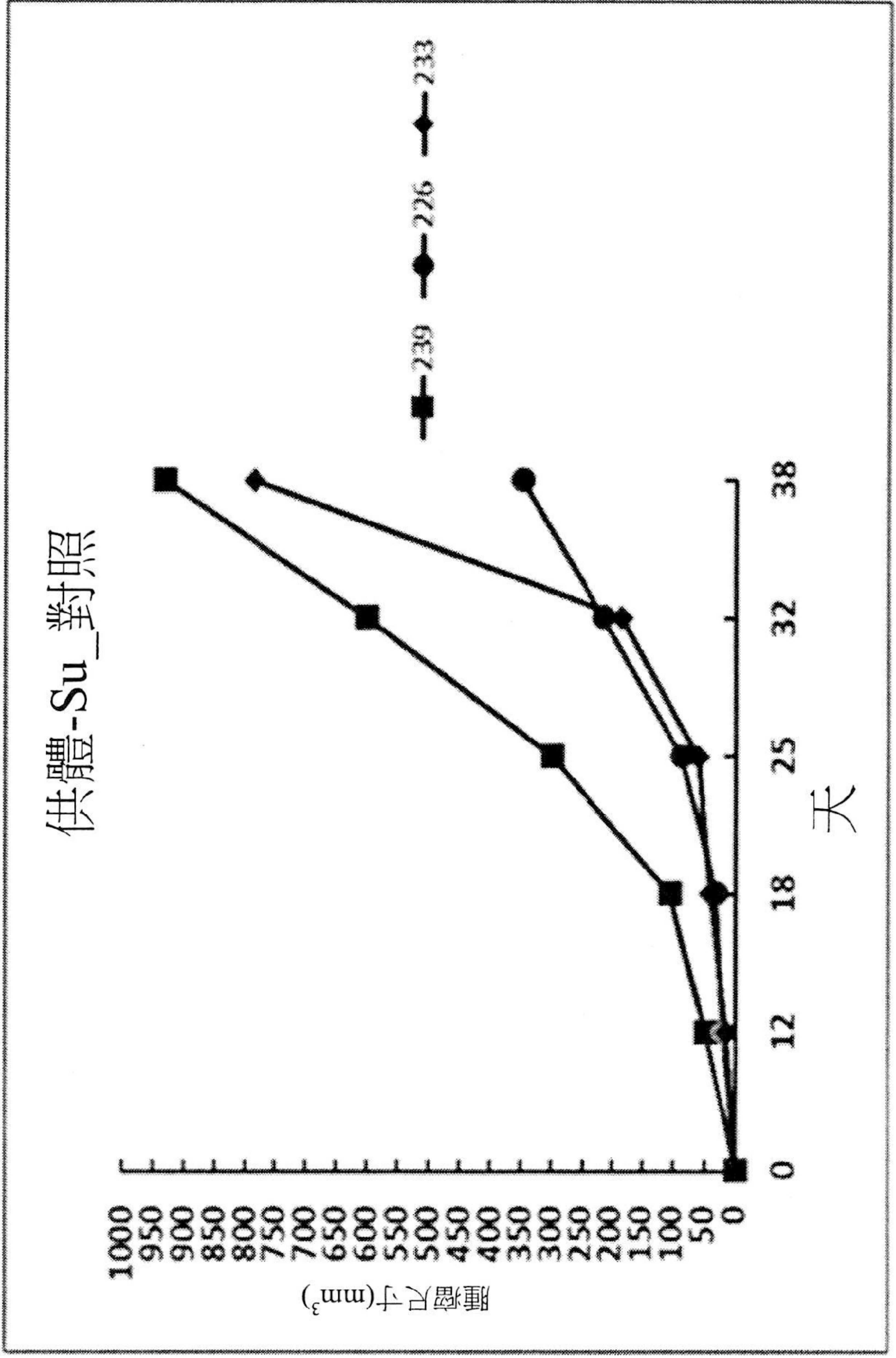


圖 16

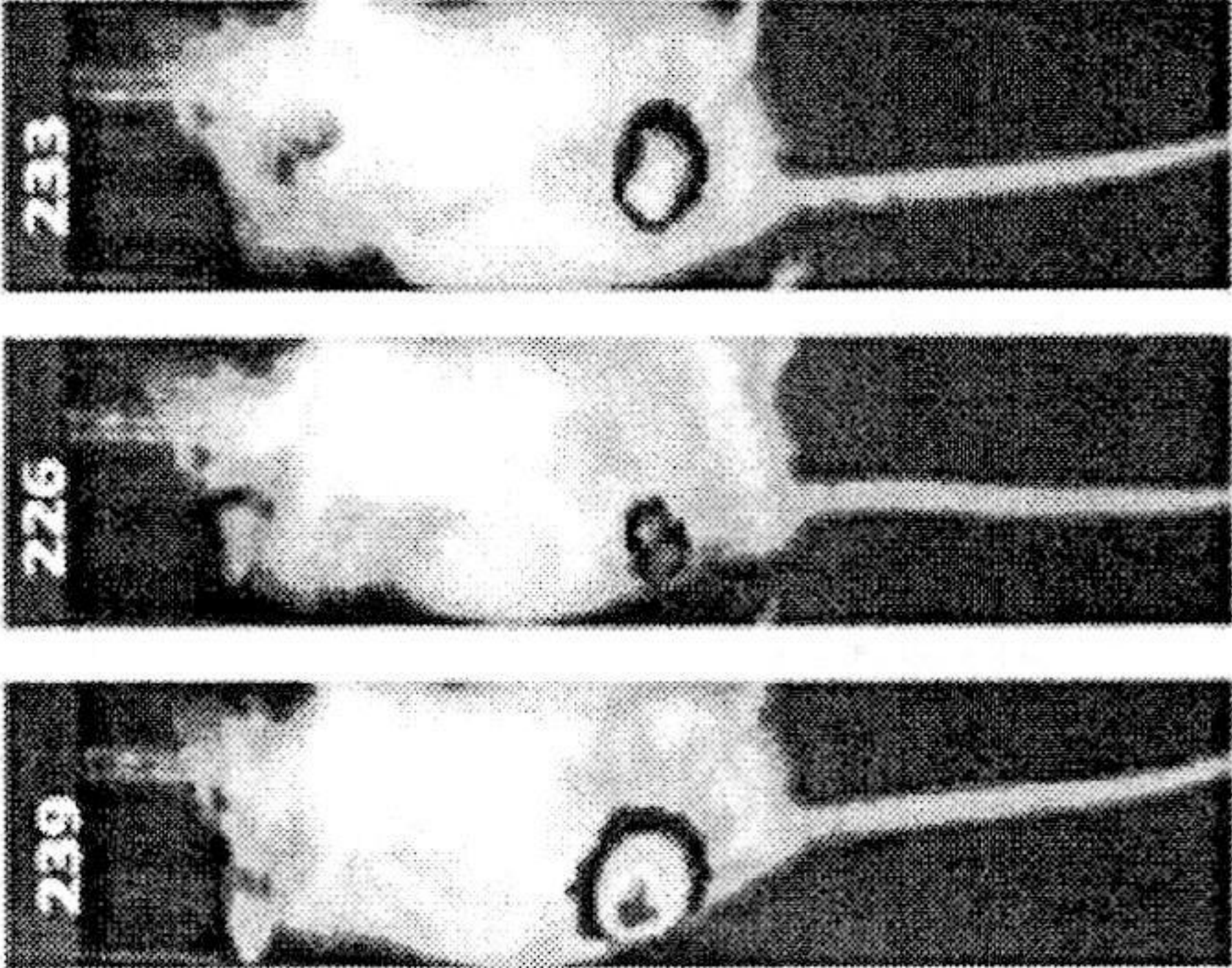


A

圖 16(續)

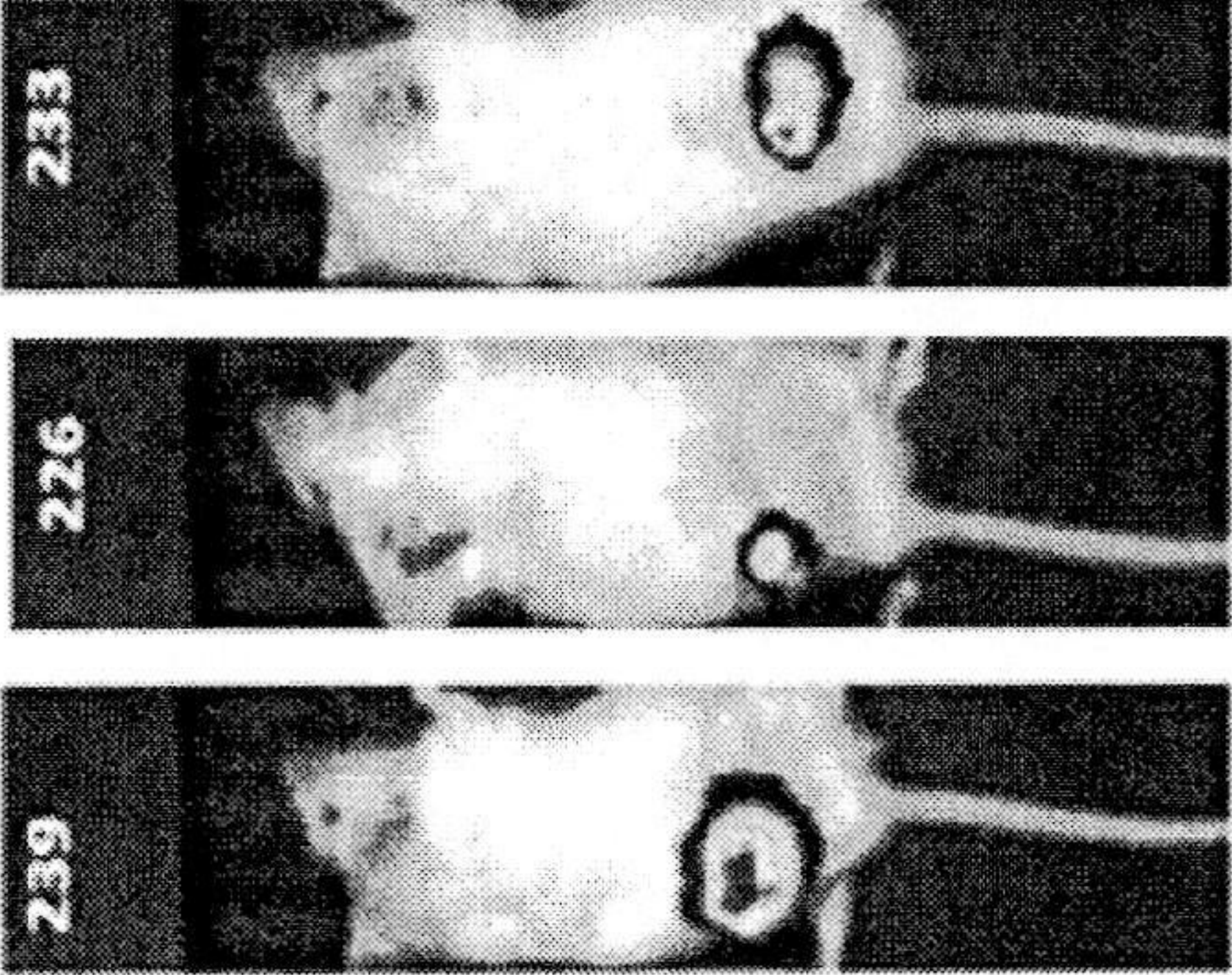
B

25d



C

32d



D

38d

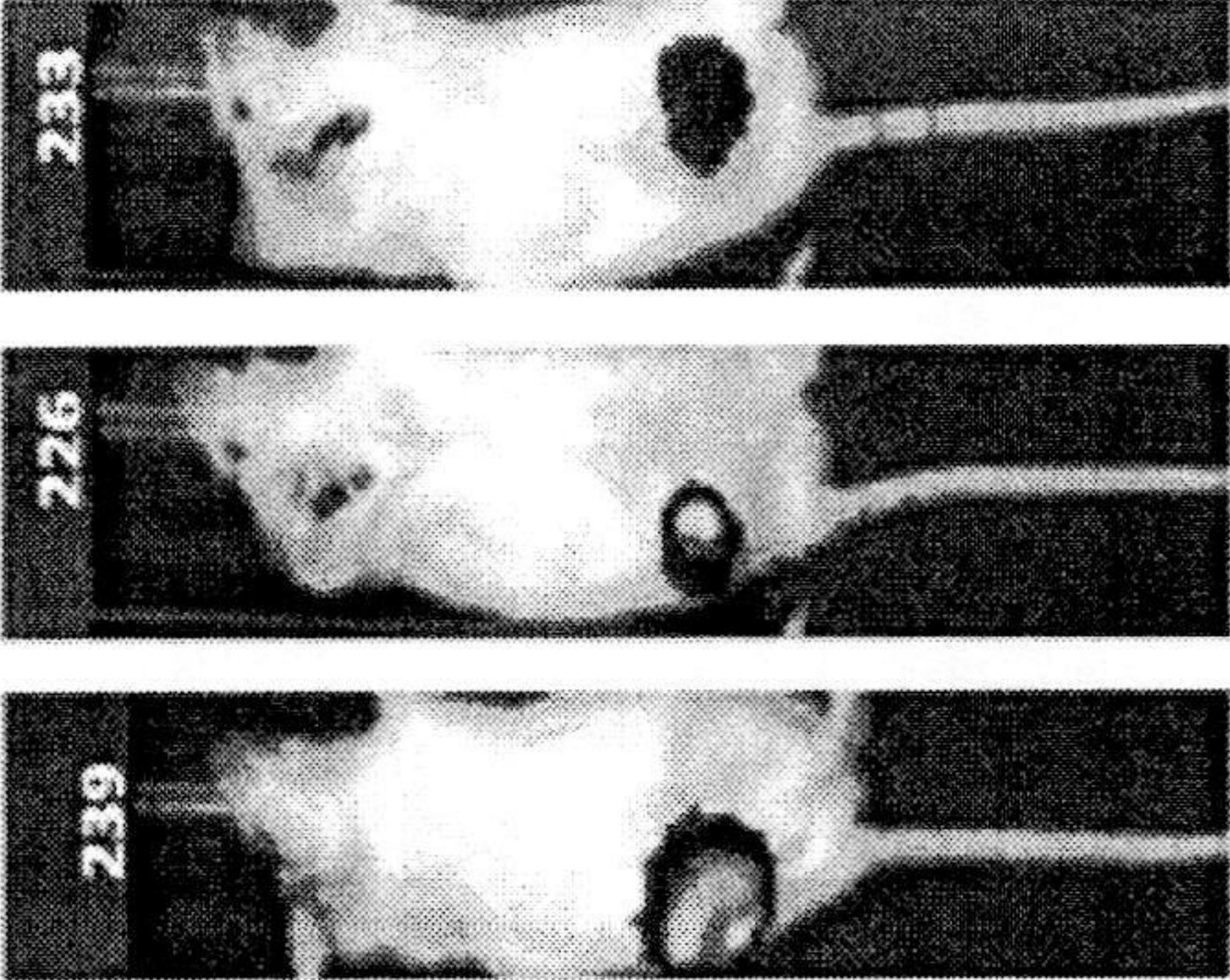


圖 16(續)

E

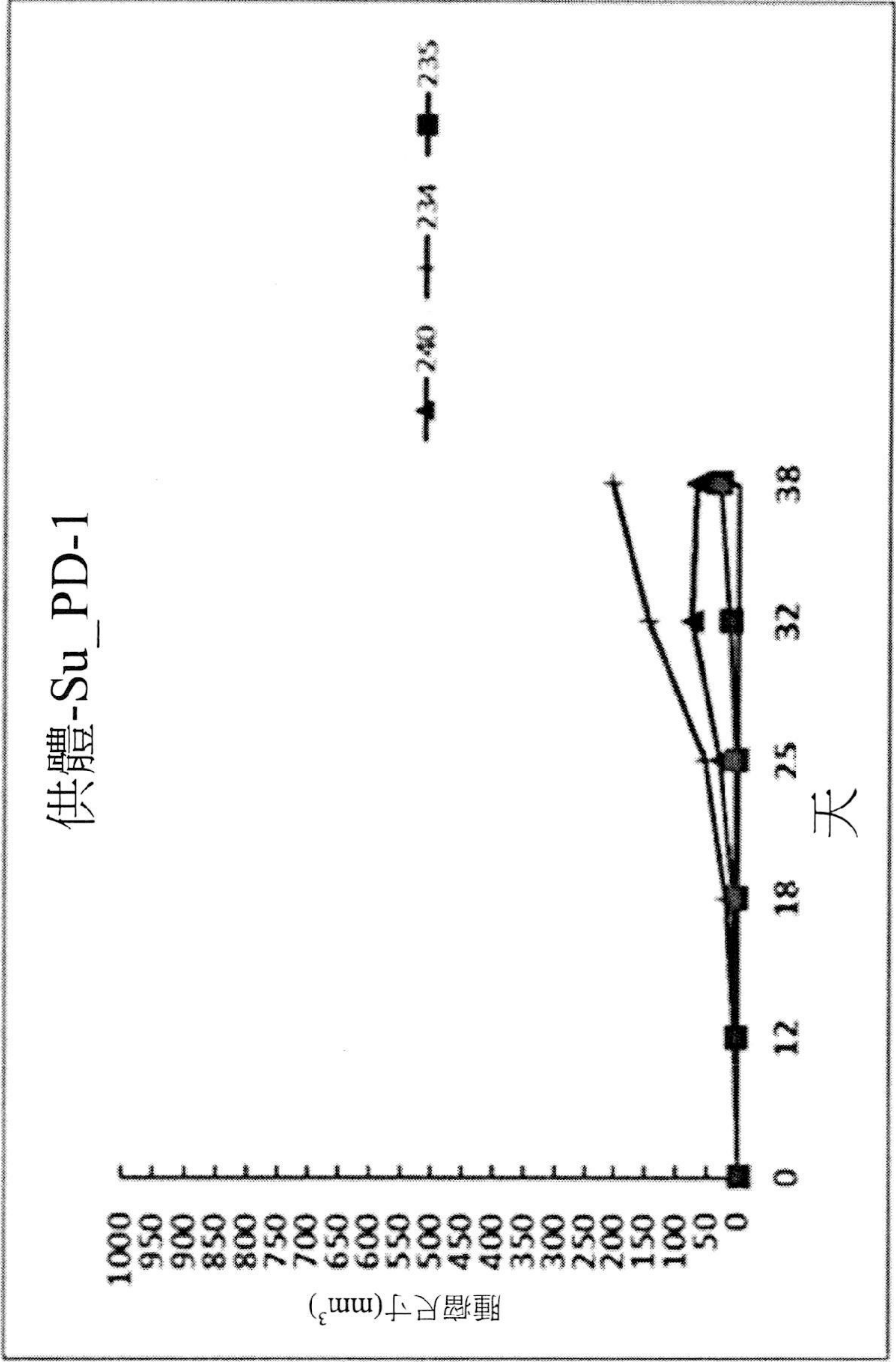


圖 16(續)

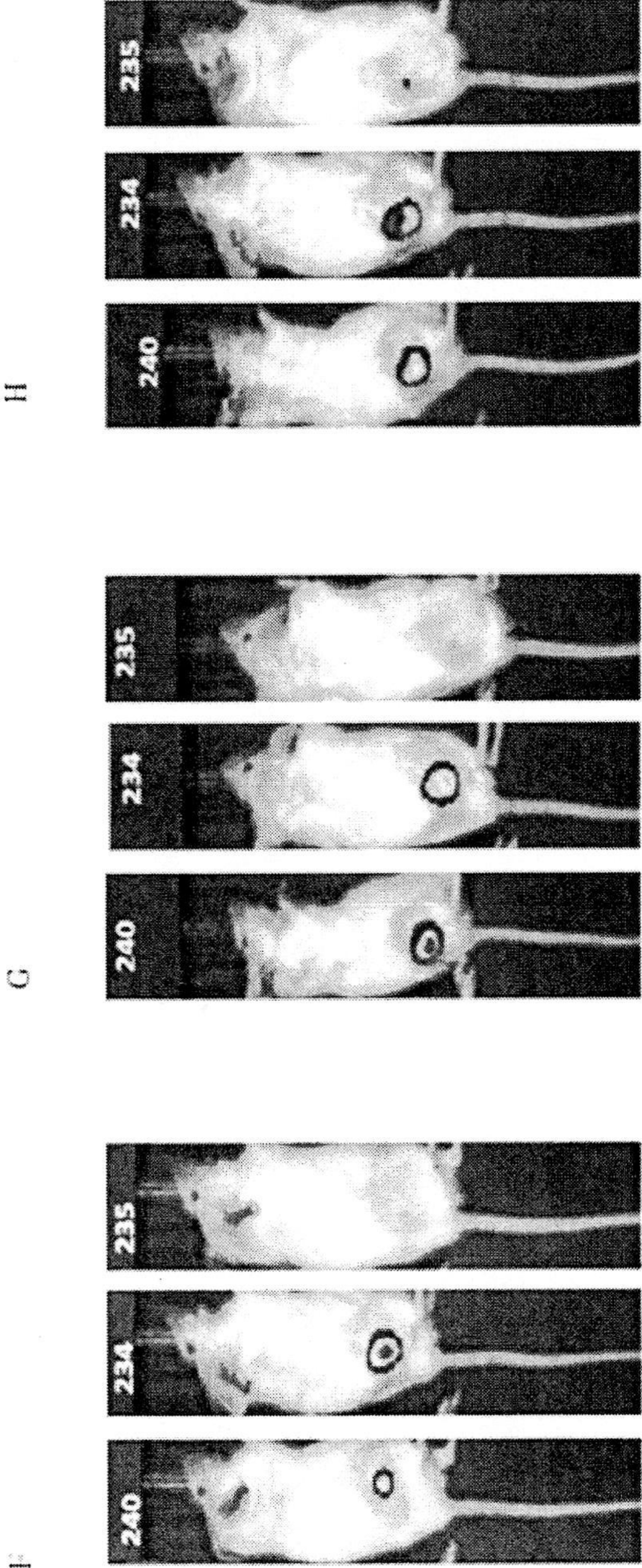


圖 17

對照+PD1

