



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114040799 A

(43) 申请公布日 2022.02.11

(21) 申请号 202080035079.5

(22) 申请日 2020.03.12

(30) 优先权数据

62/817,231 2019.03.12 US

62/963,742 2020.01.21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.11.10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/022384 2020.03.12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/186053 EN 2020.09.17

(71) 申请人 哈佛大学校长及研究员协会

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 F·S·加扎尼加 J·S·朴

A·H·夏普 D·卡斯帕

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所
11517

代理人 黄遵玲 顾云峰

(51) Int.Cl.

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

权利要求书7页 说明书23页 附图7页

(54) 发明名称

治疗癌症的方法和组合物

(57) 摘要

本发明提供了用于通过向对象施用第一试剂和第二试剂在所述对象中治疗癌症或肿瘤的方法和组合物,所述第一试剂破坏PD-L2/RGMb之间的相互作用,所述第二试剂破坏PD-1/PD-L1之间的相互作用。所述对象可能具有微生态失调(dysbiosis)和/或对免疫检查点疗法无应答。

1. 一种在对象中治疗或预防癌症的方法,其包括向所述对象联合施用第一试剂和第二试剂,所述第一试剂特异性结合PD-L2,所述第二试剂特异性结合PD-1或PD-L1。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一试剂是抗体。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述第一试剂是阻断或破坏PD-L2的抗体。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述阻断或破坏PD-L2的抗体是单克隆抗体。

5. 根据权利要求3所述的方法,其中所述阻断或破坏PD-L2的抗体是人源化抗体。

6. 根据权利要求3所述的方法,其中所述阻断或破坏PD-L2的抗体是双特异性抗体。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述第二试剂是抗体。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述第二试剂是阻断PD-1的抗体。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述阻断PD-1的抗体是单克隆抗体。

10. 根据权利要求8所述的方法,其中所述阻断PD-1的抗体是人源化抗体。

11. 根据权利要求8所述的方法,其中所述阻断PD-1的抗体是双特异性抗体。

12. 根据权利要求8所述的方法,其中所述阻断PD-1的抗体选自下组:西米普利单抗(REGN2810)、纳武单抗(BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538)、派姆单抗(MK-3475、SCH 900475)、SHR1210、信利迪单抗(ABI308)、斯巴达珠单抗(PDR001)、替雷利珠单抗(BGB-A317)、匹地利珠单抗、BCD-100、特瑞普利单抗(JS001)、PF-06801591、AB122、AK105、AMG 404、BCD-100、BI 754091、F520、HLX10、HX008、JTX-4014、LZM009、MEDI0680、MGA012、Sym021、TSR-042、PSB205、MGD019、MGD013、AK104、XmAb20717、R07121661和CX-188。

13. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述第二试剂是阻断PD-L1的抗体。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述阻断PD-L1的抗体是单克隆抗体。

15. 根据权利要求13所述的方法,其中所述阻断PD-L1的抗体是人源化抗体。

16. 根据权利要求13所述的方法,其中所述阻断PD-L1的抗体是双特异性抗体。

17. 根据权利要求13所述的方法,其中所述阻断PD-L1的抗体选自下组:阿特殊单抗(MPDL3280A、RG7446、R05541267)、德瓦鲁单抗(MEDI4736、MEDI-4736)、阿维单抗(MSB0010718C)、FS118、BCD-135、BGB-A333、CBT-502、CK-301、CS1001、FAZ053、HLX20、KN035、MDX-1105、MSB2311、SHR-1316、TG-1501、ZKAB001、INBRX-105、MCLA-145、KN046、M7824和LY3415244。

18. 根据权利要求1至17中任一项所述的方法,其中所述对象对免疫检查点抑制剂疗法无应答。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的方法,其中所述对象对抗PD-1疗法或抗PD-L1疗法无应答。

20. 根据权利要求1至19中任一项所述的方法,其中在施用所述第一试剂之前的一段时间内向所述对象施用至少一种抗生素。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述至少一种抗生素是万古霉素。

22. 根据权利要求20所述的方法,其中所述至少一种抗生素是新霉素。

23. 根据权利要求20所述的方法,其中所述至少一种抗生素是甲硝唑。

24. 根据权利要求20所述的方法,其中所述至少一种抗生素是氨苄西林。

25. 根据权利要求20至24中任一项所述的方法,其中在施用所述第一试剂之前的一段

时间内向患者施用至少两种抗生素。

26. 根据权利要求20至24中任一项所述的方法,其中在施用所述第一试剂之前的一段时间内向所述患者施用至少三种抗生素。

27. 根据权利要求20至24中任一项所述的方法,其中在施用所述第一试剂之前的一段时间内向所述患者施用至少四种抗生素。

28. 根据权利要求20至27中任一项所述的方法,其中所述一段时间是1周。

29. 根据权利要求20至27中任一项所述的方法,其中所述一段时间是3周。

30. 根据权利要求20至27中任一项所述的方法,其中所述一段时间是1个月。

31. 根据权利要求20至27中任一项所述的方法,其中所述一段时间是3个月。

32. 根据权利要求20至27中任一项所述的方法,其中所述一段时间是6个月。

33. 根据前述任一项权利要求所述的方法,其中所述对象具有微生态失调。

34. 根据前述任一项权利要求所述的方法,其中所述对象的胃肠道微生物群包含高水平的大肠杆菌或者来自并非拟杆菌门和厚壁菌门的门的细菌。

35. 根据前述任一项权利要求所述的方法,其中向所述对象全身性施用所述第一试剂。

36. 根据权利要求1至35中任一项所述的方法,其中口服施用所述第一试剂。

37. 根据权利要求1至35中任一项所述的方法,其中胃肠外施用所述第一试剂。

38. 根据权利要求37所述的方法,其中静脉内施用所述第一试剂。

39. 根据前述任一项权利要求所述的方法,其中向所述对象全身性施用所述第二试剂。

40. 根据权利要求1至38中任一项所述的方法,其中口服施用所述第二试剂。

41. 根据权利要求1至38中任一项所述的方法,其中胃肠外施用所述第二试剂。

42. 根据权利要求41所述的方法,其中静脉内施用所述第二试剂。

43. 根据权利要求1至42中任一项所述的方法,其中所述癌症是肺癌、乳腺癌、结肠癌、宫颈癌、胰腺癌、肾癌、胃癌、胃肠道癌、肝癌、骨癌、血液系统癌症、神经组织癌、黑色素瘤、甲状腺癌、卵巢癌、睾丸癌、前列腺癌、宫颈癌、阴道癌或膀胱癌。

44. 根据权利要求1至43中任一项所述的方法,其中所述癌症包括肿瘤。

45. 根据权利要求44所述的方法,其中所述肿瘤是腺癌、肾上腺肿瘤、肛门肿瘤、胆管肿瘤、膀胱肿瘤、骨肿瘤、脑/CNS肿瘤、乳腺肿瘤、宫颈肿瘤、结直肠肿瘤、子宫内膜肿瘤、食管肿瘤、尤文肿瘤、眼肿瘤、胆囊肿瘤、胃肠道肿瘤、肾肿瘤、喉或下咽肿瘤、肝肿瘤、肺肿瘤、间皮瘤肿瘤、多发性骨髓瘤肿瘤、肌肉肿瘤、鼻咽肿瘤、神经母细胞瘤、口腔肿瘤、骨肉瘤、卵巢肿瘤、胰腺肿瘤、阴茎肿瘤、垂体肿瘤、原发性肿瘤、前列腺肿瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺肿瘤、软组织肉瘤、黑色素瘤、转移性肿瘤、基底细胞癌、梅克尔细胞肿瘤、睾丸肿瘤、胸腺肿瘤、甲状腺肿瘤、子宫肿瘤、阴道肿瘤、外阴肿瘤或Wilms肿瘤。

46. 根据权利要求1至45中任一项所述的方法,其中施用另外的试剂。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中所述另外的试剂是化学治疗剂。

48. 根据权利要求46所述的方法,其中所述另外的试剂是另外的免疫检查点抑制剂。

49. 根据权利要求48所述的方法,其中所述另外的免疫检查点抑制剂包含特异性针对选自以下的免疫检查点蛋白的抗体或试剂:CTLA-4、VISTA、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、ICOS、HVEM、CD160、gp49B、PIR-B、KIR家族受体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、BTLA、SIRP α (CD47)、CD48、2B4 (CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、HHLA2、丁酰蛋白和A2aR。

50. 一种在对象中治疗或预防癌症的方法,其包括向所述对象联合施用第一试剂和第二试剂,所述第一试剂特异性结合RGMB,所述第二试剂特异性结合PD-1或PD-L1。

51. 根据权利要求50所述的方法,其中所述第一试剂是抗体。

52. 根据权利要求50或权利要求51所述的方法,其中所述第一试剂是破坏RGMB的抗体。

53. 根据权利要求52所述的方法,其中所述破坏RGMB的抗体是单克隆抗体。

54. 根据权利要求52所述的方法,其中所述破坏RGMB的抗体是人源化抗体。

55. 根据权利要求52所述的方法,其中所述破坏RGMB的抗体是双特异性抗体。

56. 根据权利要求50至55中任一项所述的方法,其中所述第二试剂是抗体。

57. 根据权利要求50至56中任一项所述的方法,其中所述第二试剂是阻断PD-1的抗体。

58. 根据权利要求57所述的方法,其中所述阻断PD-1的抗体是单克隆抗体。

59. 根据权利要求57所述的方法,其中所述阻断PD-1的抗体是人源化抗体。

60. 根据权利要求57所述的方法,其中所述阻断PD-1的抗体是双特异性抗体。

61. 根据权利要求57所述的方法,其中所述阻断PD-1的抗体选自下组:西米普利单抗(REGN2810)、纳武单抗(BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538)、派姆单抗(MK-3475、SCH 900475)、SHR1210、信利迪单抗(IBM308)、斯巴达珠单抗(PDR001)、替雷利珠单抗(BGB-A317)、匹地利珠单抗、BCD-100、特瑞普利单抗(JS001)、PF-06801591、AB122、AK105、AMG 404、BCD-100、BI 754091、F520、HLX10、HX008、JTX-4014、LZM009、MEDI0680、MGA012、Sym021、TSR-042、PSB205、MGD019、MGD013、AK104、XmAb20717、R07121661和CX-188。

62. 根据权利要求50至56中任一项所述的方法,其中所述第二试剂是阻断PD-L1的抗体。

63. 根据权利要求62所述的方法,其中所述阻断PD-L1的抗体是单克隆抗体。

64. 根据权利要求62所述的方法,其中所述阻断PD-L1的抗体是人源化抗体。

65. 根据权利要求62所述的方法,其中所述阻断PD-L1的抗体是双特异性抗体。

66. 根据权利要求62所述的方法,其中所述阻断PD-L1的抗体选自下组:阿特殊单抗(MPDL3280A、RG7446、R05541267)、德瓦鲁单抗(MEDI4736、MEDI-4736)、阿维单抗(MSB0010718C)、FS118、BCD-135、BGB-A333、CBT-502、CK-301、CS1001、FAZ053、HLX20、KN035、MDX-1105、MSB2311、SHR-1316、TG-1501、ZKAB001、INBRX-105、MCLA-145、KN046、M7824和LY3415244。

67. 根据权利要求50至66中任一项所述的方法,其中所述对象对免疫检查点抑制剂疗法无应答。

68. 根据权利要求50至66中任一项所述的方法,其中所述对象对抗PD-1疗法或抗PD-L1疗法无应答。

69. 根据权利要求50至68中任一项所述的方法,其中在施用所述第一试剂之前的一段时间内向所述对象施用至少一种抗生素。

70. 根据权利要求69所述的方法,其中所述至少一种抗生素是万古霉素。

71. 根据权利要求69所述的方法,其中所述至少一种抗生素是新霉素。

72. 根据权利要求69所述的方法,其中所述至少一种抗生素是甲硝唑。

73. 根据权利要求69所述的方法,其中所述至少一种抗生素是氨苄西林。

74. 根据权利要求69至73中任一项所述的方法,其中在施用所述第一试剂之前的一段

时间内向患者施用至少两种抗生素。

75. 根据权利要求69至73中任一项所述的方法,其中在施用所述第一试剂之前的一段时间内向患者施用至少三种抗生素。

76. 根据权利要求69至73中任一项所述的方法,其中在施用所述第一试剂之前的一段时间内向患者施用至少四种抗生素。

77. 根据权利要求69至76中任一项所述的方法,其中所述一段时间是1周。

78. 根据权利要求69至76中任一项所述的方法,其中所述一段时间是3周。

79. 根据权利要求69至76中任一项所述的方法,其中所述一段时间是1个月。

80. 根据权利要求69至76中任一项所述的方法,其中所述一段时间是3个月。

81. 根据权利要求69至76中任一项所述的方法,其中所述一段时间是6个月。

82. 根据权利要求50至81中任一项所述的方法,其中所述对象具有微生态失调。

83. 根据权利要求50至82中任一项所述的方法,其中所述对象的胃肠道微生物群包含高水平的大肠杆菌或者来自并非拟杆菌门和厚壁菌门的门的细菌。

84. 根据权利要求50至83中任一项所述的方法,其中向所述对象全身性施用所述第一试剂。

85. 根据权利要求50至83中任一项所述的方法,其中口服施用所述第一试剂。

86. 根据权利要求50至83中任一项所述的方法,其中胃肠外施用所述第一试剂。

87. 根据权利要求86所述的方法,其中静脉内施用所述第一试剂。

88. 根据权利要求50至87中任一项所述的方法,其中向所述对象全身性施用所述第二试剂。

89. 根据权利要求50至87中任一项所述的方法,其中口服施用所述第二试剂。

90. 根据权利要求50至87中任一项所述的方法,其中胃肠外施用所述第二试剂。

91. 根据权利要求90所述的方法,其中静脉内施用所述第二试剂。

92. 根据权利要求50至91中任一项所述的方法,其中所述癌症是肺癌、乳腺癌、结肠癌、宫颈癌、胰腺癌、肾癌、胃癌、胃肠道癌、肝癌、骨癌、血液系统癌症、神经组织癌、黑色素瘤、甲状腺癌、卵巢癌、睾丸癌、前列腺癌、宫颈癌、阴道癌或膀胱癌。

93. 根据权利要求50至92中任一项所述的方法,其中所述癌症包括肿瘤。

94. 根据权利要求44所述的方法,其中所述肿瘤是腺癌、肾上腺肿瘤、肛门肿瘤、胆管肿瘤、膀胱肿瘤、骨肿瘤、脑/CNS肿瘤、乳腺肿瘤、宫颈肿瘤、结直肠肿瘤、子宫内膜肿瘤、食管肿瘤、尤文肿瘤、眼肿瘤、胆囊肿瘤、胃肠道肿瘤、肾肿瘤、喉或下咽肿瘤、肝肿瘤、肺肿瘤、间皮瘤肿瘤、多发性骨髓瘤肿瘤、肌肉肿瘤、鼻咽肿瘤、神经母细胞瘤、口腔肿瘤、骨肉瘤、卵巢肿瘤、胰腺肿瘤、阴茎肿瘤、垂体肿瘤、原发性肿瘤、前列腺肿瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺肿瘤、软组织肉瘤、黑色素瘤、转移性肿瘤、基底细胞癌、梅克尔细胞肿瘤、睾丸肿瘤、胸腺肿瘤、甲状腺肿瘤、子宫肿瘤、阴道肿瘤、外阴肿瘤或Wilms肿瘤。

95. 根据权利要求50至94中任一项所述的方法,其中施用另外的试剂。

96. 根据权利要求95所述的方法,其中所述另外的试剂是化学治疗剂。

97. 根据权利要求95所述的方法,其中所述另外的试剂是另外的免疫检查点抑制剂。

98. 根据权利要求97所述的方法,其中所述另外的免疫检查点抑制剂包括特异性针对选自以下的免疫检查点蛋白的抗体:CTLA-4、VISTA、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、ICOS、

HVEM、CD160、gp49B、PIR-B、KIR家族受体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、BTLA、SIRP α (CD47)、CD48、2B4 (CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、HHLA2、丁酰蛋白和A2aR。

99. 一种在对象中治疗或预防癌症的方法，其包括向所述对象施用第一试剂和第二试剂，所述第一试剂破坏PD-L2/RGMb之间的相互作用，所述第二试剂破坏PD-1/PD-L1之间的相互作用。

100. 根据权利要求99所述的方法，其中所述第一试剂是抗体。

101. 根据权利要求99或权利要求100所述的方法，其中所述第一试剂是阻断或破坏PD-L2的抗体。

102. 根据权利要求101所述的方法，其中所述阻断或破坏PD-L2的抗体是单克隆抗体。

103. 根据权利要求101所述的方法，其中所述阻断或破坏PD-L2的抗体是人源化抗体。

104. 根据权利要求101所述的方法，其中所述阻断或破坏PD-L2的抗体是双特异性抗体。

105. 根据权利要求99或权利要求100所述的方法，其中所述第一试剂是破坏RGMb的抗体。

106. 根据权利要求105所述的方法，其中所述破坏RGMb的抗体是单克隆抗体。

107. 根据权利要求105所述的方法，其中所述破坏RGMb的抗体是人源化抗体。

108. 根据权利要求105所述的方法，其中所述破坏RGMb的抗体是双特异性抗体。

109. 根据权利要求100至108中任一项所述的方法，其中所述第二试剂是抗体。

110. 根据权利要求100至109中任一项所述的方法，其中所述第二试剂是阻断PD-1的抗体。

111. 根据权利要求110所述的方法，其中所述阻断PD-1的抗体是单克隆抗体。

112. 根据权利要求110所述的方法，其中所述阻断PD-1的抗体是人源化抗体。

113. 根据权利要求110所述的方法，其中所述阻断PD-1的抗体是双特异性抗体。

114. 根据权利要求113所述的方法，其中阻断PD-1的所述抗体选自下组：西米普利单抗 (REGN2810)、纳武单抗 (BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538)、派姆单抗 (MK-3475、SCH 900475)、SHR1210、信利迪单抗 (IBI308)、斯巴达珠单抗 (PDR001)、替雷利珠单抗 (BGB-A317)、匹地利珠单抗、BCD-100、特瑞普利单抗 (JS001)、PF-06801591、AB122、AK105、AMG 404、BCD-100、BI 754091、F520、HLX10、HX008、JTX-4014、LZM009、MEDI0680、MGA012、Sym021、TSR-042、PSB205、MGD019、MGD013、AK104、XmAb20717、R07121661和CX-188。

115. 根据权利要求99至109中任一项所述的方法，其中所述第二试剂是阻断PD-L1的抗体。

116. 根据权利要求115所述的方法，其中所述阻断PD-L1的抗体是单克隆抗体。

117. 根据权利要求115所述的方法，其中所述阻断PD-L1的抗体是人源化抗体。

118. 根据权利要求115所述的方法，其中所述阻断PD-L1的抗体是双特异性抗体。

119. 根据权利要求115所述的方法，其中阻断PD-L1的所述抗体选自下组：阿特殊单抗 (MPDL3280A、RG7446、R05541267)、德瓦鲁单抗 (MEDI4736、MEDI-4736)、阿维单抗 (MSB0010718C)、FS118、BCD-135、BGB-A333、CBT-502、CK-301、CS1001、FAZ053、HLX20、KN035、MDX-1105、MSB2311、SHR-1316、TG-1501、ZKAB001、INBRX-105、MCLA-145、KN046、M7824和LY3415244。

120. 根据权利要求99至119中任一项所述的方法,其中所述对象对免疫检查点抑制剂疗法无应答。

121. 根据权利要求99至120中任一项所述的方法,其中所述对象对抗PD-1疗法或抗PD-L1疗法无应答。

122. 根据权利要求99至121中任一项所述的方法,其中在施用所述第一试剂之前的一段时间内向所述对象施用至少一种抗生素。

123. 根据权利要求122所述的方法,其中所述至少一种抗生素是万古霉素。

124. 根据权利要求122所述的方法,其中所述至少一种抗生素是新霉素。

125. 根据权利要求122所述的方法,其中所述至少一种抗生素是甲硝唑。

126. 根据权利要求122所述的方法,其中所述至少一种抗生素是氨苄西林。

127. 根据权利要求122至126中任一项所述的方法,其中在施用所述第一试剂之前的一段时间内向所述对象施用至少两种抗生素。

128. 根据权利要求122至126中任一项所述的方法,其中在施用所述第一试剂之前的一段时间内向所述对象施用至少三种抗生素。

129. 根据权利要求122至126中任一项所述的方法,其中在施用所述第一试剂之前的一段时间内向所述对象施用至少四种抗生素。

130. 根据权利要求122至129中任一项所述的方法,其中所述一段时间是1周。

131. 根据权利要求122至129中任一项所述的方法,其中所述一段时间是3周。

132. 根据权利要求122至129中任一项所述的方法,其中所述一段时间是1个月。

133. 根据权利要求122至129中任一项所述的方法,其中所述一段时间是3个月。

134. 根据权利要求122至129中任一项所述的方法,其中所述一段时间是6个月。

135. 根据权利要求99至134中任一项所述的方法,其中所述对象具有微生态失调。

136. 根据权利要求99至135中任一项所述的方法,其中所述对象的胃肠道微生物群包含高水平的大肠杆菌或者来自并非拟杆菌门和厚壁菌门的门的细菌。

137. 根据权利要求99至136中任一项所述的方法,其中向所述对象全身性施用所述第一试剂。

138. 根据权利要求99至136中任一项所述的方法,其中口服施用所述第一试剂。

139. 根据权利要求99至136中任一项所述的方法,其中胃肠外施用所述第一试剂。

140. 根据权利要求139所述的方法,其中静脉内施用所述第一试剂。

141. 根据权利要求99至140中任一项所述的方法,其中向所述对象全身性施用所述第二试剂。

142. 根据权利要求99至140中任一项所述的方法,其中口服施用所述第二试剂。

143. 根据权利要求99至140中任一项所述的方法,其中胃肠外施用所述第二试剂。

144. 根据权利要求143所述的方法,其中静脉内施用所述第二试剂。

145. 根据权利要求99至144中任一项所述的方法,其中所述癌症是肺癌、乳腺癌、结肠癌、宫颈癌、胰腺癌、肾癌、胃癌、胃肠道癌、肝癌、骨癌、血液系统癌症、神经组织癌、黑色素瘤、甲状腺癌、卵巢癌、睾丸癌、前列腺癌、宫颈癌、阴道癌或膀胱癌。

146. 根据权利要求99至145中任一项所述的方法,其中所述癌症包括肿瘤。

147. 根据权利要求146所述的方法,其中所述肿瘤是腺癌、肾上腺肿瘤、肛门肿瘤、胆管

肿瘤、膀胱肿瘤、骨肿瘤、脑/CNS肿瘤、乳腺肿瘤、宫颈肿瘤、结直肠肿瘤、子宫内膜肿瘤、食管肿瘤、尤文肿瘤、眼肿瘤、胆囊肿瘤、胃肠道肿瘤、肾肿瘤、喉或下咽肿瘤、肝肿瘤、肺肿瘤、间皮瘤肿瘤、多发性骨髓瘤肿瘤、肌肉肿瘤、鼻咽肿瘤、神经母细胞瘤、口腔肿瘤、骨肉瘤、卵巢肿瘤、胰腺肿瘤、阴茎肿瘤、垂体肿瘤、原发性肿瘤、前列腺肿瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺肿瘤、软组织肉瘤、黑色素瘤、转移性肿瘤、基底细胞癌、梅克尔细胞肿瘤、睾丸肿瘤、胸腺肿瘤、甲状腺肿瘤、子宫肿瘤、阴道肿瘤、外阴肿瘤或Wilms肿瘤。

148. 根据权利要求99至147中任一项所述的方法,其中施用另外的试剂。

149. 根据权利要求148所述的方法,其中所述另外的试剂是化学治疗剂。

150. 根据权利要求148所述的方法,其中所述另外的试剂是另外的免疫检查点抑制剂。

151. 根据权利要求150所述的方法,其中所述另外的免疫检查点抑制剂包含特异性针对选自以下的免疫检查点蛋白的抗体或试剂:CTLA-4、VISTA、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、ICOS、HVEM、CD160、gp49B、PIR-B、KIR家族受体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、BTLA、SIRP α (CD47)、CD48、2B4 (CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、HHLA2、丁酰蛋白和A2aR。

治疗癌症的方法和组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2019年03月12日提交的美国临时申请62/817231和2020年01月21日提交的美国临时申请62/963742的优先权,将其内容以引用的方式整体并入本文。

[0003] 政府支持

[0004] 本发明是在美国国立卫生研究院授予的基金号5T32HD55148-10政府支持下作出的。美国政府对本发明享有一定权利。

背景技术

[0005] 免疫检查点阻断或免疫疗法是一种新的治疗方法,通过阻断包括CTLA-4和PD-1在内的T细胞中的抑制途径,重振肿瘤特异性T细胞以有效杀死癌细胞。近年来,针对免疫检查点分子的抗体作为新的癌症治疗剂引起了人们的关注。免疫检查点抑制剂通过抑制T细胞活化和功能的分子的抑制来促进T细胞的活化,并增强T细胞的抗肿瘤反应。在使用免疫检查点抑制剂进行治疗时,通过激活活体的免疫状态来消除癌症。

[0006] 尽管基于免疫检查点阻断的药物在临床上取得了成功,但仍有很大一部分癌症患者对该疗法没有应答。因此,了解调节检查点阻断功效的要素对于开发更有效的疗法至关重要。

发明内容

[0007] 本文描述了一种治疗方法,通过使用抗PD-L1和PD-L2抑制剂的联合疗法,将抗PD-L1治疗的无应答者转化为应答者。本公开还显示了通过使用PD-1和PD-L2抑制剂的联合疗法,将抗PD-1治疗的无应答者转化为应答者的方法。本公开进一步证明微生物群调节PD-L2表达,并显示PD-L2在抑制抗肿瘤免疫中的功能性意义。本公开还证明了破坏PD-L2/RGMb相互作用增强了PD-1或PD-L1阻断的功效。

[0008] 本文提供了用于在对象中治疗或预防癌症的方法和组合物。本文所述的方法包括向对象联合施用特异性结合PD-L2的第一试剂和特异性结合PD-1或PD-L1的第二试剂。在一些实施方式中,本文所述的方法包括向对象联合施用特异性结合RGMb的第一试剂和特异性结合PD-1或PD-L1的第二试剂。

[0009] 在一些实施方式中,本文所述的方法包括向对象施用第一试剂,其破坏RGMb、破坏PD-L2或者破坏RGMb和PD-L2之间的相互作用。在一些实施方式中,所述第一试剂与第二试剂联合施用。所述第二试剂可以是破坏PD-1、破坏PD-L1或者破坏PD-1和PD-L1之间的相互作用的试剂。试剂可以是抗体或其抗原结合片段、肽、小分子或者抑制性核酸。例如,所述第一试剂可以是抗体,并且所述抗体破坏RGMb、破坏PD-L2或者破坏RGMb和PD-L2之间的相互作用。

[0010] 在一些实施方式中,所述方法包括向所述对象施用破坏PD-L2/RGMb之间的相互作用的第一试剂和破坏PD-1/PD-L1之间的相互作用的第二试剂。在其他实施方式中,所述方法包括使用破坏PD-L2/RGMb之间相互作用的试剂治疗微生态失调的患者。在进一步的实施

方式中,所述方法包括使用破坏PD-L2/RGMb之间相互作用的试剂来治疗对PD-1/PD-L1阻断疗法无应答的患者。

[0011] 第一试剂和第二试剂可以是本文所述的任何试剂(例如,抗体)。所述第一试剂可以是破坏RGMb的抗体、破坏PD-L2的抗体或者破坏RGMb和PD-L2之间相互作用的抗体。所述抗体可以是单克隆抗体、人源化抗体和/或双特异性抗体。

[0012] 如本文所用,“破坏”分子的试剂包括降低分子水平、耗竭表达分子的细胞或者阻断或降低分子活性的任何试剂。破坏分子还包括破坏分子和其配体之间的相互作用。破坏两个分子之间(例如,PD-L2/RGMb或PD-1/PD-L1之间)的相互作用包括将一个或多个靶分子或者表达所述一个或多个靶分子的细胞与调节、改变或阻断这两个分子之间相互作用的试剂接触。破坏两个分子之间的相互作用包括将表达所述分子之一的细胞与耗竭表达所述分子的细胞的试剂接触。例如,破坏两个分子与抗体之间的相互作用包括将表达至少一个所述分子的靶细胞与阻断抗体、中和抗体或耗竭抗体接触。破坏RGMb和PD-L2之间的相互作用包括将靶细胞与阻断所述相互作用的试剂或者耗竭表达RGMb的细胞的试剂接触。

[0013] 第二试剂可以是抗体,如阻断PD-1的抗体、阻断PD-L1的抗体、破坏PD-1与其配体之间的相互作用的抗体或者破坏PD-L1与其配体之间的相互作用的抗体。所述抗体可以是单克隆抗体、人源化抗体和/或双特异性抗体。

[0014] 阻断PD-1的抗体选自西米普利单抗(cemiplimab、REGN2810)、纳武单抗(nivolumab、BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538)、派姆单抗(pembrolizumab、MK-3475、SCH 900475)、SHR1210、信利迪单抗(sintilimab、IBI308)、斯巴达珠单抗(spartalizumab、PDR001)、替雷利珠单抗(tislelizumab、BGB-A317)、匹地利珠单抗(pidilizumab)、BCD-100、特瑞普利单抗(toripalimab、JS001)、PF-06801591、AB122、AK105、AMG 404、BCD-100、BI 754091、F520、HLX10、HX008、JTX-4014、LZM009、MEDI0680、MGA012、Sym021、TSR-042、PSB205、MGD019、MGD013、AK104、XmAb20717、R07121661和CX-188。

[0015] 阻断PD-L1的抗体选自下组:阿特殊单抗(atezolizumab、MPDL3280A、RG7446、R05541267)、德瓦鲁单抗(durvalumab、MEDI4736、MEDI-4736)、阿维单抗(avelumab、MSB0010718C)、FS118、BCD-135、BGB-A333、CBT-502、CK-301、CS1001、FAZ053、HLX20、KN035、MDX-1105、MSB2311、SHR-1316、TG-1501、ZKAB001、INBRX-105、MCLA-145、KN046、M7824和LY3415244。

[0016] 第一和/或第二试剂可以全身、口服、胃肠外或静脉内施用。

[0017] 在一些实施方式中,所述对象对免疫检查点抑制剂疗法无应答。在其他实施方式中,所述对象对抗PD-1或抗PD-L1疗法无应答。在一些实施方式中,在施用第一试剂之前的一段时间内向所述对象施用至少一种抗生素(例如,至少两种、至少三种、至少四种、至少五种、至少六种、至少七种、至少八种、至少九种或至少十种抗生素)。所述至少一种抗生素可以是万古霉素、新霉素、甲硝唑和/或氨苄西林。所述一段时间可以是一天、一周、两周、三周、一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、九个月、一年、两年、三年、四年或五年。

[0018] 在一些实施方式中,所述对象具有微生态失调(dysbiosis)。微生态失调指胃肠(GI)道微生物群的任何改变状态。如本文所用,“微生态失调”包括接受过抗生素治疗、接受过化疗或者患有或曾经患有已知会改变微生物群的疾病的患者,如:肠道感染、溃疡性结肠

炎、克罗恩病、肠易激综合征、结肠癌、在饮食方面的剧烈变化或显著变化(例如,延长住院时间)。在肠道菌群的正常分布中,拟杆菌门(Bacteroidetes)和厚壁菌门(Firmicutes)占优势。在一些实施方式中,如果对象的胃肠道微生物群主要由大肠杆菌或来自其他门的细菌组成,而不是主要由拟杆菌门和/或厚壁菌门组成,则患者具有微生态失调。此外,如果患者在不同时间点对其微生物群进行测序,并且微生物群构成发生变化,则患者会出现微生态失调。例如,对象的胃肠道微生物群可以包含至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%的大肠杆菌或来自非拟杆菌门和/或厚壁菌门的其他门的其他细菌。对象的胃肠道微生物群可能具有肠道内细菌门正常分布的不平衡。微生物失调包括癌症患者任何典型的微生物群特征,和/或通常不会在未患癌症患者中出现的微生物群特征。例如,与未患癌症的对象胃肠道中非拟杆菌门和厚壁菌门的其他门的水平相比,或者与未患癌症的对象胃肠道中除拟杆菌门和厚壁菌门外的其他门的平均或中值水平相比,具有微生态失调的对象胃肠道中的失衡包括对象胃肠道中包含更高水平的非拟杆菌门和厚壁菌门的细菌。微生态失调还可以指胃肠道中缺乏微生物群多样性。微生态失调包括通常在服用抗生素后在个体中发现的改变的胃肠道微生物群。例如,可以通过微生态失调的症状,例如腹泻、便秘、腹部绞痛、稀便和/或异常量的气体或腹胀来鉴定微生态失调的患者。一些患者可能被认为是微生态失调的,因为之前施用过已知会导致微生态失调的癌症或抗生素治疗。

[0019] 应当意识到的是,本文公开的联合疗法将有效治疗多种癌症和肿瘤。例如,所述癌症可以是肺癌、乳腺癌、结肠癌、宫颈癌、胰腺癌、肾癌、胃癌、胃肠道癌、肝癌、骨癌、血液系统癌症、神经组织癌、黑色素瘤、甲状腺癌、卵巢癌、睾丸癌、前列腺癌、宫颈癌、阴道癌或膀胱癌。

[0020] 所述癌症包括肿瘤,并且所述肿瘤是腺癌、肾上腺肿瘤、肛门肿瘤、胆管肿瘤、膀胱肿瘤、骨肿瘤、脑/CNS肿瘤、乳腺肿瘤、宫颈肿瘤、结直肠肿瘤、子宫内膜肿瘤、食管肿瘤、尤文因肿瘤、眼肿瘤、胆囊肿瘤、胃肠道肿瘤、肾肿瘤、喉或下咽肿瘤、肝肿瘤、肺肿瘤、间皮瘤肿瘤、多发性骨髓瘤肿瘤、肌肉肿瘤、鼻咽肿瘤、神经母细胞瘤、口腔肿瘤、骨肉瘤、卵巢肿瘤、胰腺肿瘤、阴茎肿瘤、垂体肿瘤、原发性肿瘤、前列腺肿瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺肿瘤、软组织肉瘤、黑色素瘤、转移性肿瘤、基底细胞癌、梅克尔细胞肿瘤、睾丸肿瘤、胸腺肿瘤、甲状腺肿瘤、子宫肿瘤、阴道肿瘤、外阴肿瘤或Wilms肿瘤。

[0021] 在一些实施方式中,施用另外的试剂,如化学治疗剂或另外的免疫检查点抑制剂。所述另外的免疫检查点抑制剂包含特异性针对选自以下的免疫检查点蛋白的抗体或试剂:CTLA-4、VISTA、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、ICOS、HVEM、CD160、gp49B、PIR-B、KIR家族受体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、BTLA、SIRP α (CD47)、CD48、2B4 (CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、HHLA2、丁酰蛋白(butyrophilin)和A2aR。

[0022] 附图简述

[0023] 本专利或申请文件至少包含一幅彩色附图。本专利或专利申请公开文件的带有彩色附图的副本将在请求和支付必要费用后由专利局提供。

[0024] 图1显示了用广谱抗生素(VNMA)治疗17天的小鼠的微生物群发生了改变,称为微生态失调。该微生物群主要由变形杆菌(Proteobacteria)、大肠杆菌组成。用VNMA治疗但随后口服健康人类微生物群(Hmb)的小鼠具有更加多样化的微生物群。每种颜色代表由16S测序定义的不同物种。黄色代表大肠杆菌。

[0025] 图2显示用VNMA治疗的小鼠对抗PD-L1疗法没有应答,而口服Hmb的小鼠能够通过抗PD-L1疗法清除肿瘤,表明VNMA治疗引起的微生态失调阻断了抗PD-L1疗法的抗肿瘤作用。

[0026] 图3由A-B两部分组成,并且显示了在肿瘤植入后10天(A)和13天(B),在肿瘤引流淋巴结中,Hmb小鼠比VNMA小鼠在巨噬细胞和树突细胞上表达的抗PD-L2水平显著更低。

[0027] 图4显示了VNMA治疗的小鼠对单独的抗PD-L1或抗PD-L2没有应答。然而,当联合使用时,抗PD-L1和抗PD-L2疗法可逆转微生态失调的影响并促进抗肿瘤应答。

[0028] 图5显示了鉴定通过有益细菌促进抗肿瘤免疫的机制的过程。在肿瘤植入前4天,在饮用水中给予小鼠抗生素(0.5mg/ml万古霉素、1mg/ml新霉素、1mg/ml甲硝唑、1mg/ml氨苄西林)。在第0天,将 2.5×10^5 个MC38肿瘤细胞皮下植入6周龄雌性小鼠的腹部。在第7、10、13、16天,通过腹腔内注射用100 μ g同种型对照或抗PD-L1治疗小鼠。在第7天,一半小鼠口服灌胃给予Hmb粪便浆液,并从饮用水中去除抗生素;另一半小鼠不接受Hmb粪便,并在实验的剩余时间内继续在饮用水中使用抗生素。在第7、10、13、16、20、23天测量肿瘤。

[0029] 图6显示了PD-L1和PD-L2联合阻断协同促进无菌(GF)小鼠的抗肿瘤应答。

[0030] 图7显示了阻断PD-L2介导的信号转导通路增强了无菌小鼠中 α PD-1诱导的抗肿瘤应答。

[0031] 图8显示了 α PD-1和 α RGMb协同促进无菌小鼠对免疫疗法的抗肿瘤应答。

[0032] 图9显示了 α PD-L1和 α RGMb协同促进无菌小鼠对免疫疗法的抗肿瘤应答。

具体实施方式

[0033] 本文提供了用于在对象中治疗或预防癌症的方法和组合物。本文所述的方法包括向所述对象联合施用特异性结合PD-L2的第一试剂和特异性结合PD-1或PD-L1的第二试剂。在一些实施方式中,本文所述的方法包括向所述对象联合施用特异性结合RGMb的第一试剂和特异性结合PD-1或PD-L1的第二试剂。在一些实施方式中,本文所述的方法包括向所述对象施用破坏RGMb、破坏PD-L2或者破坏RGMb和PD-L2之间的相互作用的第一试剂。

[0034] 所述对象具有微生态失调。在一些实施方式中,所述对象对抗PD-1或抗PD-L1疗法无应答。在一些实施方式中,所述对象具有微生态失调且对抗PD-1或抗PD-L2疗法无应答。

[0035] 如本文所用,“抗PD-1疗法”或“抗PD-L1疗法”包括不施用破坏RGMb和PD-L2之间相互作用或特异性结合和阻断RGMb或PD-L2的试剂的癌症治疗方案。例如,接受抗PD-1疗法或抗PD-L1疗法的患者可能正在接受其他癌症治疗,这些其他癌症治疗不包括破坏RGMb和PD-L2之间相互作用或特异性结合和阻断RGMb或PD-L2的试剂。

[0036] 如本文所用,术语“无应答”或“无应答者”包括对此前的治疗难治或耐药的患者(例如,对PD-1和/或PD-L1免疫检查点阻断难治或耐药)。无应答患者包括任何接受PD-1或PD-L1阻断治疗且未表现出癌症消退或肿瘤进展减缓参数的患者。无应答患者包括任何被认为对PD-1或PD-L1阻断剂临床无应答或对PD-1或PD-L1阻断剂表现出较差临床应答的患者。在一些实施方式中,无应答患者包括最初对PD-1或PD-L1阻断疗法有应答但对此类疗法产生耐药的患者。本文还提供了通过向对象施用破坏RGMb和PD-L2之间的相互作用或特异性结合和阻断RGMb或PD-L2的试剂来预防或治疗对象的抗PD-1/抗PD-L1耐药的方法。

[0037] 在一个方面中,本文提供的方法包括通过向对象施用第一试剂和第二试剂在所述

对象中治疗或预防癌症的方法,所述第一试剂破坏RGMb和PD-L2之间的相互作用或者特异性结合并阻断RGMb或PD-L2,所述第二试剂特异性结合PD-1或PD-L1。

[0038] 本文所述的发明部分基于以下发现:微生态失调患者表现出抗PD-L2的高表达水平,并且阻断PD-L2可以克服对抗PD-1或抗PD-L1疗法的耐药性。本文所述的发明进一步部分地基于PD-L2与RGMb结合的发现。本文提供了通过向受试者联合施用第一试剂和第二试剂在受试者中治疗或预防癌症的方法,所述第一试剂特异性结合PD-L2或RGMb,以使得PD-L2和RGMb之间的相互作用被破坏,所述第二试剂特异性结合PD-1或PD-L1,以使得PD-1和PD-L1之间的相互作用被破坏。在其他方面,本文提供的方法包括通过向受试者联合施用第一试剂和第二试剂在受试者中治疗或预防癌症的方法,所述第一试剂破坏RGMb和PD-L2之间的相互作用,所述第二试剂特异性结合PD-1或PD-L1,以使得PD-1和PD-L1之间的相互作用被破坏。所述试剂可以是抗体,如单克隆抗体或人源化抗体。

[0039] 定义

[0040] 为方便起见,此处收集了说明书、实施例和所附权利要求中使用的某些术语。

[0041] 如本文所用,术语“施用”指向对象提供试剂或组合物,包括但不限于由医学专业人员施用和自我施用。

[0042] 术语“试剂”在本文中用于表示化合物、小分子、化合物的混合物和/或生物大分子(如抗体、核酸、蛋白或肽)。可以通过下文所述的筛选试验鉴定具有特定活性的试剂。此类试剂的活性可以使其适合作为“治疗剂”,其是在对象中局部或全身作用的生物学、生理学或药理学活性物质(或多种物质)。

[0043] 术语“氨基酸”旨在包括所有分子,无论是天然的还是合成的,其包含氨基官能团和酸官能团并且能够包含在天然存在的氨基酸的聚合物中。示例性氨基酸包括天然存在的氨基酸;其类似物、衍生物和同源物;具有变体侧链的氨基酸类似物;以及前述任何一项的所有立体异构体。

[0044] 如本文所用,术语“抗体”可以指完整抗体及其抗原结合片段。完整抗体是糖蛋白,其包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链。每条重链包含重链可变区(本文中缩写为 V_H)和重链恒定区。每条轻链包含轻链可变区(本文中缩写为 V_L)和轻链恒定区。 V_H 和 V_L 区可以进一步细分为高变区,称为互补性决定区(CDR),散布着更保守的区域,称为框架区(FR)。每个 V_H 和 V_L 由三个CDR和四个FR组成,从氨基端到羧基端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。术语“抗体”包括,例如,单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、单链抗体和抗原结合抗体片段。如本文所用,“分离的抗体”指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体。然而,分离的抗体可能与其他相关抗原有一些交叉反应性。

[0045] 如本文所用,术语抗体的“抗原结合片段”和“抗原结合部分”指保留结合抗原的能力的抗体的一个或多个片段。包含在术语抗体的“抗原结合片段”中的结合片段的实例包括Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 、Fv、scFv、二硫键连接的Fv、Fd、双体(diabody)、单链抗体、NANOBODIES®、分离的CDRH3以及保留完整抗体的至少一部分可变区的其他抗体片段。可以使用常规重组和/或酶促技术获得这些抗体片段,并且可以以与完整抗体相同的方式

筛选这些抗体片段的抗原结合。

[0046] 术语“CDR”及其复数“CDRs”是指抗体或抗体片段的互补决定区(CDR),其决定抗体或抗体片段的结合特性。在大多数情况下,轻链可变区中存在三个CDR(CDRL1、CDRL2和CDRL3),重链可变区中存在三个CDR(CDRH1、CDRH2和CDRH3)。CDR有助于抗体分子的功能活性,并由包含支架或框架区的氨基酸序列分隔。在各种CDR中,CDR3序列,尤其是CDRH3,最为多样化,因此对抗体特异性的贡献最大。至少有两种确定CDR的技术:(1)基于跨物种序列变异性的方法(即,Kabat等,免疫相关的蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest),美国国立卫生研究院(National Institute of Health), Bethesda, Md. (1987),其全部内容通过引用并入);和(2)基于抗原-抗体复合物的晶体学研究的方法(Chothia等,Nature, 342:877 (1989),其全部内容通过引用并入)。

[0047] 如本文所用,术语“人源化抗体”指具有至少一个来自除人以外的哺乳动物的CDR以及人抗体的FR区和恒定区的抗体。由于人源化抗体在人体内的抗原性降低,因而人源化抗体可用作治疗剂中的有效成分。

[0048] 如本文所用,术语“单克隆抗体”指从与相同表位特异性结合的基本上同质的抗体群体中获得的抗体,即,除了可能以少量存在的天然发生的突变之外,构成该群体的个体抗体是相同的。修饰语“单克隆”表示从基本上同质的抗体群体中获得的抗体的特征,不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。

[0049] 术语“多核苷酸”和“核酸”可以互换使用。其指任何长度的核苷酸(脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸)或其类似物的聚合形式。多核苷酸可以具有任何三维结构,并且可以执行任何已知或未知的功能。以下是多核苷酸的非限制性实例:基因或基因片段的编码或非编码区、由连锁分析定义的基因座(基因座)、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转移RNA、核糖体RNA、核酶、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的DNA、任何序列的分离的RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸,例如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物。如果存在,可以在聚合物组装之前或之后对核苷酸结构进行修饰。核苷酸序列可能被非核苷酸组分打断。可以进一步修饰多核苷酸,例如通过与标记组分缀合。术语“重组”多核苷酸指基因组、cDNA、半合成或合成来源的多核苷酸,其要么在自然界中不存在,要么以非天然排列与另一个多核苷酸连接。

[0050] 如本文所用,短语“药学上可接受的载体”指药学上可接受的材料、组合物或载剂,如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂或溶剂包封材料,其参与从一个器官或身体的一部分携带或运输目标化合物到另一个器官或身体的一部分。

[0051] 如本文所用,“预防”病症或病况的治疗剂是指这样的化合物,当在病症或病况发作之前给予统计样本时,相对于未治疗的对照样本,在治疗样本中减少病症或病况的发生,或相对于未治疗的对照样本延迟病症或病况的一种或多种症状的发作或降低其严重性。

[0052] 如本文所用,“特异性结合”是指抗体结合预定抗原的能力或多肽与其预定结合配偶体结合的能力。通常,抗体或多肽以对应于约 10^{-7} M或更小的亲和性与其预定抗原或结合配偶体特异性结合,并且以比其结合非特异性和无关抗原/结合配偶体(例如,BSA、酪蛋白)的亲和性低至少10倍、至少100倍或至少1000倍的亲和性(以 K_D 表示)结合预定的抗原/结合配偶体。

[0053] 术语“小分子”是本领域的术语,包括小于约1000的分子量或小于约500的分子量

的分子。在一个实施方式中,小分子不仅包含肽键。在另一个实施方式中,小分子不是寡聚体。可以筛选活性的示例性小分子化合物包括但不限于肽、肽模拟物、核酸、碳水化合物、有机小分子(例如,聚酮化合物)(Cane等,(1998) Science 282:63)和天然产物提取物库。在另一个实施方式中,化合物是小的有机非肽化合物。在进一步的实施方式中,小分子不是生物合成的。

[0054] 如本文所用,术语“对象”是指选择用于治疗或疗法的人或非人动物。

[0055] “肿瘤微环境”是本领域公认的术语,指肿瘤存在的细胞环境,包括例如肿瘤周围、血管周围、免疫细胞、其他细胞、成纤维细胞、信号转导分子和细胞外基质的间质液。

[0056] 如本文所用,短语“治疗有效量”和“有效量”指在适用于任何医学治疗的合理获益/风险比下,在对象的至少一个细胞亚群中有效产生所需治疗效果的试剂的量。

[0057] “治疗”对象的疾病或“治疗”患有疾病的对象指对患者进行药物治疗,例如,施用药物,以使得所述疾病的至少一种症状减轻或防止其恶化。

[0058] 治疗方法

[0059] 本文提供了在对象中治疗或预防癌症的方法,包括向所述对象施用破坏PD-L2/RGMb相互作用的第一试剂和破坏PD-1/PD-L1相互作用的第二试剂。在一个方面中,本文提供的方法包括在对象中治疗或预防癌症的方法,包括向所述对象联合施用特异性结合PD-L2的第一试剂和特异性结合PD-1或PD-L1的第二试剂。在其他方面中,本文提供的方法包括在对象中治疗或预防癌症的方法,其通过向对象联合施用特异性结合RGMb的第一试剂和特异性结合PD-1或PD-L1的第二试剂。

[0060] 在一些实施方式中,所述对象对免疫检查点抑制剂疗法(例如,抗PD-1和/或抗PD-L1疗法)无应答。

[0061] 在一些实施方式中,所述对象在施用第一试剂之前的一段时间内已施用至少一种抗生素。所述至少一种抗生素可以是在向患者施用(例如,自我施用或由他人施用)时引起胃肠道微生态失调的任何抗生素。抗生素可以通过破坏胃肠道中正常微生物群的平衡而导致微生态失调的任何抗生素。抗生素可以是但不限于万古霉素、新霉素、甲硝唑或氨苄西林。抗生素施用期可能发生在1天、1周、3周、1个月、3个月、6个月、9个月、1年、2年、3年、4年或5年前。如本文所用,微生态失调不仅限于接受抗生素治疗的患者。也可以通过微生态失调的症状,如腹泻、便秘、腹部绞痛、稀便和/或异常量的气体或腹胀来鉴定微生态失调患者。一些患者可能被认为是微生态失调的,因为之前施用过已知会导致微生态失调的癌症治疗。

[0062] 本文所述的试剂(例如,第一和/或第二试剂,或任何另外的试剂)和/或组合物可以全身、静脉内、肌内、口服或局部(例如,局部递送至肿瘤)施用。本文公开的组合物和/或试剂可以通过任何适宜的施用途径递送,包括口服、鼻腔(例如通过喷雾)、直肠、阴道内、肠胃外、脑池内和局部(如通过粉剂、软膏或滴剂,包括口腔和舌下)。在某些实施方式中,试剂和/或组合物一般地递送(例如,通过口服或胃肠外施用)。在某些其他实施方式中,组合物和/或试剂通过注射局部递送。本文所述的治疗剂可以通过联合疗法施用。联合疗法包括组合物和/或试剂的顺序、同时和分开和/或共同施用,以这样一种方式,即在施用随后的试剂时,施用的第一试剂的治疗效果并未完全消失。在某些实施方式中,另外的试剂可以与第一和/或第二试剂共同配制或配制在单独的药物组合物中。在一些实施方式中,组合物和另外

的试剂在同时或在不同时间施用(例如,组合物和另外的试剂顺序施用)。

[0063] 典型的治疗对象包括患有或怀疑患有或易患本文公开的疾病的人,或者易患、患有或已经患有本文公开的疾病的人。对象可以具有或者可以不具有本文公开的疾病的遗传易感性。如本文所用,短语“联合施用”指两种或更多种不同试剂(例如,两种不同抗体)的任何施用形式,使得在先施用的试剂在体内仍然有效的同时施用第二试剂。例如,本文公开的组合物可以以相同制剂或以单独制剂同时或顺序施用。

[0064] 本文公开的药物组合物可以通过任何适宜施用途径递送,包括口服、局部和胃肠外。在某些实施方式中,药物组合物一般地递送(例如,口服或胃肠外施用)。

[0065] 在某些方面中,本文公开的试剂和/或组合物可以足以达到所需结果的剂量施用。

[0066] 在某些实施方式中,所述方法可以包括向对象施用约1 μ g至约1克试剂或组合物,如约1 μ g至约1mg、约2 μ g至约2mg、约3 μ g至约3mg、约4 μ g至约4mg、约100 μ g至约2mg、约200 μ g至约2mg、约300 μ g至约3mg、约400 μ g至约4mg、约250 μ g至约1mg或约250 μ g至约750 μ g试剂或组合物。在一些实施方式中,所述方法可以包括施用约25 μ g、约50 μ g、约75 μ g/kg、约100 μ g/kg、约125 μ g/kg、约150 μ g/kg、约175 μ g/kg、约200 μ g/kg、约225 μ g/kg、约250 μ g/kg、约275 μ g/kg、约300 μ g/kg、约325 μ g/kg、约350 μ g/kg、约375 μ g/kg、约400 μ g/kg、约425 μ g/kg、约450 μ g/kg、约475 μ g/kg、约500 μ g/kg、约600 μ g/kg、约650 μ g/kg、约700 μ g/kg、约750 μ g/kg、约800 μ g/kg、约850 μ g/kg、约900 μ g/kg、约950 μ g/kg、约1000 μ g/kg、约1200 μ g/kg、约1250 μ g/kg、约1300 μ g/kg、约1333 μ g/kg、约1350 μ g/kg、约1400 μ g/kg、约1500 μ g/kg、约1600 μ g/kg、约1750 μ g/kg、约1800 μ g/kg、约2000 μ g/kg、约2200 μ g/kg、约2250 μ g/kg、约2300 μ g/kg、约2333 μ g/kg、约2350 μ g/kg、约2400 μ g/kg、约2500 μ g/kg、约2667 μ g/kg、约2750 μ g/kg、约2800 μ g/kg、约3mg/kg、约3.5mg/kg、约3.5mg/kg、约4mg/kg、约4.5mg/kg、约5mg/kg、约6mg/kg、约7mg/kg、约8mg/kg、约9mg/kg、约10mg/kg、约15mg/kg、约20mg/kg、约25mg/kg、约30mg/kg、约35mg/kg、约40mg/kg、约45mg/kg、约50mg/kg、约55mg/kg、约60mg/kg、约65mg/kg、约70mg/kg、约75mg/kg、约80mg/kg、约85mg/kg、约90mg/kg或约100mg/kg。在一些实施方式中,所述方法可以包括施用约1mg/kg至约10mg/kg、约10mg/kg至约20mg/kg、约20mg/kg至约50mg/kg、约50mg/kg至约100mg/kg试剂或组合物。在初始施用至任何有效剂量后,剂量可逐渐增加或减少。

[0067] 免疫检查点抑制剂给药可以遵循本领域已知的任何给药方案或时间表。例如,剂量可以通过癌症类型或癌症疾病阶段,以及患病患者的特征,例如体重、性别、种族和/或对药物的敏感性来确定。示例性给药方案和时间表可以参见

[0068] https://packageinserts.bms.com/pi/pi_opdivo.pdf;

[0069] https://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/k/keytruda/keytruda_pi.pdf;

[0070] https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/761069s0021b1.pdf;或者

[0071] https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/761049s0001b1.pdf。

[0072] 在一些实施方式中,向对象施用试剂(例如,第一和/或第二试剂)或组合物包括施用一剂组合物。所述方法可以包括将组合物至少每月一次、每月两次、每月三次给予对象。

在某些实施方式中,所述方法可以包括每周至少一次、每两周至少一次或每三周至少一次施用组合物。在一些实施方式中,所述方法可以包括每周1、2、3、4、5、6或7次向对象施用组合物。

[0073] 抗体试剂

[0074] 在某些实施方式中,本文提供的方法和组合物涉及特异性结合PD-L2(例如,第一试剂)、RGMb(例如,第一试剂)、PD-1(例如,第二试剂)或PD-L1(例如,第二试剂)的抗体及其抗原结合片段。在一些实施方式中,抗体破坏本文公开的分子。此类抗体可以是多克隆的或单克隆的,并且可以是例如小鼠的、嵌合的、人源化的或全人的。抗体可以是双特异性的(例如,对PD-L2和RGMb是双特异性的)。示例性PD-L2抗体可以在专利和公开申请中找到,例如:美国专利号9,845,356、美国专利号10,370,448、美国专利公开号2018/0002422、WO专利公开号W02002000730和US专利公开号2018/0258171,特此通过引用将其整体并入。示例性PD-L1或PD-1抗体包括但不限于西米普利单抗(cemiplimab、REGN2810)、纳武单抗(nivolumab、BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538)、派姆单抗(pembrolizumab、MK-3475、SCH 900475)、SHR1210、信利迪单抗(sintilimab、IBI308)、斯巴达珠单抗(spartalizumab、PDR001)、替雷利珠单抗(tislelizumab、BGB-A317)、匹地利珠单抗(pidilizumab)、BCD-100、特瑞普利单抗(toripalimab、JS001)、PF-06801591、AB122、AK105、AMG 404、BCD-100、BI 754091、F520、HLX10、HX008、JTX-4014、LZM009、MEDI0680、MGA012、Sym021、TSR-042、PSB205、MGD019、MGD013、AK104、XmAb20717、R07121661、CX-188、阿特珠单抗(atezolizumab、MPDL3280A、RG7446、R05541267)、德瓦鲁单抗(durvalumab、MEDI4736、MEDI-4736)、阿维单抗(avelumab、MSB0010718C)、FS118、BCD-135、BGB-A333、CBT-502、CK-301、CS1001、FAZ053、HLX20、KN035、MDX-1105、MSB2311、SHR-1316、TG-1501、ZKAB001、INBRX-105、MCLA-145、KN046、M7824和LY3415244。

[0075] 可以通过用多肽抗原(例如,具有PD-L2、RGMb或其片段的序列的多肽)免疫适宜受试者(例如,小鼠)来制备多克隆抗体。可以通过标准技术,如使用固化多肽的酶联免疫吸附测定(ELISA)随时监测免疫对象中的多肽抗体效价。如果需要,可以从哺乳动物(例如,从血液中)分离针对抗原的抗体,并通过众所周知的技术进一步纯化,例如蛋白A层析以获得IgG级分。

[0076] 在免疫后的适当时间,例如,当抗体效价最高时,可以从对象获得产生抗体的细胞,并使用标准技术用于制备单克隆抗体,如最初由Kohler和Milstein(1975) Nature 256: 495-497描述的杂交瘤技术(亦参见Brown等,(1981) J. Immunol. 127: 539-46; Brown等,(1980) J. Biol. Chem. 255: 4980-83; Yeh等,(1976) Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 2927-31; 和Yeh等,(1982) Int. J. Cancer 29: 269-75),最近的人B细胞杂交瘤技术(Kozbor等,(1983) Immunol. Today 4: 72),EBV-杂交瘤技术(Cole等,(1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)或三源杂交瘤技术。生产单克隆抗体杂交瘤的技术是众所周知的(一般参见Kenneth, R. H. 单克隆抗体:生物学分析的新维度(Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses), 普林汉诺出版公司(Plenum Publishing Corp.), New York, New York (1980); Lerner, E. A. (1981) Yale J. Biol. Med. 54: 387-402; Gefter, M. L. 等,(1977) Somatic Cell Genet. 3: 231-36)。简言之,将永生化细胞系(通常是骨髓瘤)与如上所述的使用免疫原免疫的哺乳动物的淋巴细胞

(通常是脾细胞)融合,并筛选所得杂交瘤细胞的培养上清液以鉴定产生与多肽抗原结合(优选地,特异性结合)的单克隆抗体的杂交瘤。

[0077] 作为制备单克隆抗体分泌杂交瘤的替代方案,可以通过施用适当多肽筛选重组组合免疫球蛋白文库(例如,抗体噬菌体展示文库或抗体酵母展示文库)来鉴定和分离本文提供的受体或配体的单克隆抗体,从而分离结合所述多肽的免疫球蛋白文库成员。

[0078] 另外,可以使用标准重组DNA技术制备本文提供的受体或配体特异性的重组抗体,如嵌合或人源化单克隆抗体。此类嵌合和人源化单克隆抗体可以通过本领域公知的重组DNA技术制备,例如,使用以下描述的方法:美国专利号4,816,567;美国专利号5,565,332; Better等,(1988) *Science* 240:1041-1043;Liu等,(1987) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*84:3439-3443;Liu等,(1987) *J.Immunol.*139:3521-3526;Sun等,(1987) *Proc.Natl.Acad.Sci.*84:214-218;Nishimura等,(1987) *Cancer Res.*47:999-1005;Wood等,(1985) *Nature*314:446-449;和Shaw等,(1988) *J.Natl.Cancer Inst.*80:1553-1559; Morrison,S.L.(1985) *Science* 229:1202-1207;Oi等,(1986) *Biotechniques* 4:214; Winter美国专利号5,225,539;Jones等,(1986) *Nature* 321:552-525;Verhoeyan等,(1988) *Science* 239:1534;和Beidler等,(1988) *J.Immunol.*141:4053-4060。

[0079] 可以使用携带人免疫系统而不是小鼠系统的一部分的转基因或转染色体小鼠产生本文提供的受体或配体特异的人单克隆抗体。例如,包含人免疫球蛋白基因微基因座的“HuMAb小鼠”,其编码未重排的人重链(μ 和 γ)和 κ 轻链免疫球蛋白序列,以及灭活内源性 μ 和 κ 链基因座的靶向突变(Lonberg,N.等,(1994) *Nature* 368(6474):856-859)。因此,小鼠表现出小鼠IgM或 κ 的表达降低,并且响应于免疫,引入的人重链和轻链转基因经历经典转换和体细胞突变以产生高亲和性人IgG κ 单克隆抗体(Lonberg,N.等,(1994),同上;综述Lonberg,N.(1994) *实验药理学手册(Handbook of Experimental Pharmacology)*113:49-101;Lonberg,N.和Huszar,D.(1995) *Intern.Rev.Immunol.Vol.13*:65-93,以及Harding,F.和Lonberg,N.(1995) *Ann.N.Y.Acad.Sci* 764:536-546)。在以下中描述了HuMAb小鼠的制备:Taylor,L.等,(1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295;Chen,J.等,(1993) *International Immunology* 5:647-656;Tuailon等,(1993) *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 90:37203724;Choi等,(1993) *Nature Genetics* 4:117-123;Chen,J.等,(1993) *EMBO J.*12:821-830;Tuailon等,(1994) *J.Immunol.*152:2912-2920;Lonberg等,(1994) *Nature* 368(6474):856-859;Lonberg,N.(1994) *实验药理学手册(Handbook of Experimental Pharmacology)*113:49-101;Taylor,L.等,(1994) *International Immunology* 6:579-591;Lonberg,N.和Huszar,D.(1995) *Intern.Rev.Immunol.Vol.13*:65-93;Harding,F.和Lonberg,N.(1995) *Ann.N.Y.Acad.Sci*764:536-546;Fishwild,D.等,(1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851。进一步参见美国专利号5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,789,650;5,877,397;5,661,016;5,814,318;5,874,299;5,770,429;和5,545,807。

[0080] 蛋白

[0081] 在某些实施方式中,本文提供的组合物和方法涉及特异性结合PD-L2、RGMb、PD-1或PD-L1的多肽。多肽可以破坏PD-L2、RGMb、PD-1或PD-L1。多肽可以破坏PD-L2和RGMb之间的相互作用或者PD-1和PD-L1之间的相互作用。

[0082] 在一些实施方式中,本文所述的多肽和蛋白可以通过使用标准蛋白纯化技术通过适当的纯化方案与细胞或组织来源分离。在另一个实施方式中,本文所述的多肽和蛋白由重组DNA技术生产。或者,本文所述的多肽可以使用标准肽合成技术进行化学合成。

[0083] 在一些实施方式中,本文提供了嵌合或融合蛋白。如本文所用,“嵌合蛋白”或“融合蛋白”包含与其在自然界中未连接的不同多肽连接的本文所述的多肽或蛋白。例如,不同的多肽可以直接通过肽键或间接通过化学接头直接融合到多肽的N-末端或C-末端。在一些实施方式中,本文所述的肽连接至免疫球蛋白恒定结构域(例如,IgG恒定结构域,如人IgG恒定结构域)。

[0084] 本文所述的嵌合或融合多肽可以由标准重组DNA技术生产。例如,编码不同多肽序列的DNA片段根据常规技术在框架内连接在一起,例如通过施用平末端或错位末端进行连接,限制性酶消化以提供适当的末端,酌情填入粘性末端,使用碱性磷酸酶处理以避免不需要的连接和酶促连接。在另一个实施方式中,可以通过常规技术合成所述融合基因,包括自动DNA合成仪。或者,可以使用锚定引物进行基因片段的PCR扩增,其在两个连续的基因片段之间产生互补的悬垂,其随后可以被退火和重扩增以产生嵌合基因序列(参见例如,Current Protocols in Molecular Biology,Ausubel等编著,John Wiley&Sons:1992)。而且,多种已经编码融合部分的表达载体是市售的。

[0085] 可以在原核或真核宿主细胞中通过编码本文所述的多肽的多核苷酸的表达生产本文所述的多肽和蛋白。或者,可以采用化学方法合成此类多肽。在重组宿主中表达异源性多肽、化学合成多肽和体外翻译的方法均是本领域所熟知的并且在Maniatis等,分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)(1989),第二次出版.,Cold Spring Harbor,N.Y.;Berger和Kimmel,酶学方法(Methods in Enzymology),第152卷,分子克隆技术指南(Guide to Molecular Cloning Techniques)(1987),Academic Press, Inc.,San Diego,Calif.;Merrifield,J.(1969)J.Am.Chem.Soc.91:501;Chaiken I.M.(1981)CRC Crit.Rev.Biochem.11:255;Kaiser等,(1989)Science 243:187;Merrifield,B.(1986)Science232:342;Kent,S.B.H.(1988)Annu.Rev.Biochem.57:957;和Offord,R.E.(1980)半合成蛋白质(Semisynthetic Proteins),威利出版社(Wiley Publishing)中进行了进一步描述,其通过引用并入本申请。

[0086] 小分子试剂

[0087] 本文公开的某些实施方式涉及在对象中治疗或预防病况(例如,本文公开的任何病况、疾病、病症或适应证)的试剂和方法,其包括施用特异性结合和破坏PD-L2、RGMB、PD-1或PD-L1的试剂(例如,小分子)。所述试剂可以是破坏PD-L2/RGMB或PD-1/PD-L1之间的相互作用的小分子。

[0088] 可用于本文公开的方法的试剂可以从任何可用的来源获得,包括天然和/或合成化合物的系统文库。试剂也可以通过本领域公知的组合文库方法中的任何一种方法获得,包括:生物文库;类肽文库(具有肽功能,但使用新的非肽骨架的分子文库,其对酶促降解具有抗性,但是仍存在生物活性;参见,例如,Zuckermann等,1994,J.Med.Chem.37:2678-85);空间可寻址的平行固相或溶液相文库;需要解卷积的合成文库法;“一珠一化合物”文库法;以及使用亲和层析选择的合成文库法。生物文库和类肽文库法仅限于肽文库,而另外四种方法适用于肽、非肽寡聚物或化合物的小分子文库(Lam,1997,Anticancer Drug Des.12:

145)。

[0089] 可以在本领域中找到合成分子文库的方法的实例,例如:DeWitt等,(1993) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90:6909;Erb等,(1994) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:11422; Zuckermann等,(1994) .J.Med.Chem.37:2678;Cho等,(1993) Science 261:1303;Carrell等,(1994) Angew.Chem.Int.Ed.Engl.33:2059;Carrell等,(1994) Angew.Chem.Int.Ed.Engl.33:2061;和Gallop等,(1994) J.Med.Chem.37:1233。

[0090] 试剂的文库可以存在于溶液中(例如,Houghten,1992,Biotechniques 13:412-421),或者小珠(Lam,1991,Nature 354:82-84)、芯片(Fodor,1993,Nature 364:555-556)、细菌和/或芽孢(Ladner,USP 5,223,409)、质粒(Cull等,1992,Proc Natl Acad Sci USA89:1865-1869)上,或者噬菌体(Scott和Smith,1990,Science 249:386-390;Devlin,1990,Science 249:404-406;Cwirla等,1990,Proc.Natl.Acad.Sci.87:6378-6382; Felici,1991,J.Mol.Biol.222:301-310;Ladner,同上)上。

[0091] 干扰核酸试剂

[0092] 本文公开的某些实施方式涉及在对象中治疗或预防病况(例如,本文公开的任何病况、疾病、病症或适应证)的试剂和方法,其包括施用破坏PD-L2、RGMB、PD-1或PD-L1的试剂(例如,干扰核酸试剂)。所述试剂可以是破坏PD-L2/RGMB或PD-1/PD-L1之间的相互作用的干扰核酸试剂。

[0093] 在某些实施方式中,干扰核酸分子选择性靶向编码PD-L2或RGMB的基因产物。干扰核酸通常包含一系列环状亚基,各自承载基部配对部分,通过亚基内键连接,这使得碱配对部分通过Watson-Crick碱基配对将碱基配对与核酸(通常是RNA)中的靶序列杂交,以便在靶序列内形成核酸:寡聚物异双螺旋。干扰RNA分子包括但不限于反义分子、siRNA分子、单链siRNA分子、miRNA分子和shRNA分子。

[0094] 通常至少17、18、19、20、21、22或23个靶mRNA序列的互补核苷酸足以介导靶转录物的抑制。无需完美的互补性。在一些实施方式中,干扰核酸是双链RNA。双链RNA分子可以具有2个核苷酸3'悬突。在一些实施方式中,两个RNA链通过发夹结构连接,形成shRNA分子。shRNA分子可以包含来源于微RNA分子的发夹。例如,通过将干扰RNA序列克隆到含有MiR30 miRNA的发夹的pCAG-MiR30构建体中,可以构建RNAi载体。RNA干扰分子可以包含DNA残基,以及RNA残基。

[0095] 本文提供的干扰核酸分子可含有RNA碱基、非RNA碱基或RNA碱基和非RNA碱基的混合物。例如,本文提供的干扰核酸分子主要由RNA碱基组成,但也含有DNA碱基或非天然存在的核苷酸。

[0096] 干扰核酸可以使用多种寡核苷酸化学物质。寡核苷酸化学物质的实例包括但不限于肽核酸(PNA)、连接核酸(LNA)、硫代磷酸酯、2' O-Me修饰的寡核苷酸和吗啉代化学物质,包括任何上述物质的组合。在通常情况下,PNA和LNA化学物质可以利用较短的靶向序列,因为其相对于2' O-Me寡核苷酸具有相对较高的靶点结合强度。硫代磷酸酯和2' O-Me修饰的化学物质通常结合起来生成具有硫代磷酸酯骨架的2' O-Me修饰的寡核苷酸。参见,例如,PCT公开号W0/2013/112053和W0/2009/008725,其全部内容通过引用并入。

[0097] 肽核酸(PNA)是DNA的类似物,其中骨架与脱氧核糖骨架在结构上是同形的,由连接有嘧啶或嘌呤碱基的N-(2-氨基乙基)甘氨酸单元组成。含有天然嘧啶和嘌呤碱基的PNA

与遵循Watson-Crick碱基配对规则的互补寡核苷酸杂交,并在碱基对识别方面模拟DNA (Egholm, Buchardt等, 1993)。PNA的骨架由肽键而不是磷酸二酯键形成,使其非常适合反义应用(参见下面的结构)。骨架不带电,导致PNA/DNA或PNA/RNA双螺旋表现出高于正常热稳定性。PNA不被核酸酶或蛋白酶识别。

[0098] 尽管天然结构发生了根本性的结构变化,但PNA能够以螺旋形式与DNA或RNA进行序列特异性结合。PNA的特征包括对互补DNA或RNA的高结合亲和力、由单碱基错配引起的不稳定效应、对核酸酶和蛋白酶的抗性、与DNA或RNA的杂交不受盐浓度的影响以及和高嘌呤DNA形成三螺旋。PANAGENETM已开发了其专利Bts PNA单体(Bts: 苯并噻唑-2-磺酰基)和专利寡聚工艺。使用Bts PNA单体的PNA寡聚反应由脱保护、偶联和加帽的重复循环组成。PNA可以使用本领域公知的任何技术合成生产。参见,例如,美国专利号6,969,766、7,211,668、7,022,851、7,125,994、7,145,006和7,179,896。针对PNA的制备,亦参见美国专利号5,539,082; 5,714,331; 和5,719,262。RNA化合物的进一步的技术可以参见Nielsen等, *Science*, 254:1497-1500, 1991。前述的每一个均通过引用整体并入。

[0099] 干扰核酸还可以包含“锁定核酸”亚基(LNA)。“LNA”是称为桥接核酸(BNA)的一类修饰的成员。BNA的特点是通过共价键锁定C3'-内(northern)糖褶皱中核糖环的构象。对于LNA,桥由2'-O和4'-C位置之间的亚甲基组成。LNA增强骨架预组织和碱基堆叠,以增加杂交和热稳定性。

[0100] LNA的结构可以参见例如Wengel,等, *Chemical Communications* (1998) 455; *Tetrahedron* (1998) 54:3607, 和 *Accounts of Chem. Research* (1999) 32:301; Obika,等, *Tetrahedron Letters* (1997) 38:8735; (1998) 39:5401, 以及 *生物有机药物化学 (Bioorganic Medicinal Chemistry)* (2008) 16:9230。本文提供的化合物可以引入一个或多个LNA; 在一些情况下,这些化合物可能完全由LNA组成。合成单个LNA亚基并将其引入寡核苷酸的方法描述在例如美国专利号7,572,582、7,569,575、7,084,125、7,060,809、7,053,207、7,034,133、6,794,499和6,670,461中,其全部内容以引用方式并入。典型的亚基间接头包括磷酸二酯和硫代磷酸酯部分; 或者,可以使用不含磷的接头。一个实施方式是含有LNA的化合物,其中每个LNA亚基被DNA亚基隔开。某些化合物由交替的LNA和DNA亚基组成,其中亚基间接头是硫代磷酸酯。

[0101] “硫代磷酸酯”(或S-oligo)是正常DNA的一种变体,其中一个非桥连氧被硫取代。核苷间键的硫化降低了核酸内切酶和核酸外切酶的作用,包括5'到3'和3'到5' DNA POL 1核酸外切酶、核酸酶S1和P1、RNases、血清核酸酶和蛇毒磷酸二酯酶。硫代磷酸酯通过两种主要途径制备:通过二硫化碳中的元素硫溶液对磷酸氢酯的作用,或通过用四乙基秋兰姆二硫化物(TETD)或3H-1,2-苯并二硫醇-3-酮1,1-二氧化物(BDTD)硫化亚磷酸三酯的方法(参见,例如, Iyer等, *J. Org. Chem.* 55, 4693-4699, 1990)。后一种方法避免了元素硫在大多数有机溶剂中的不溶性和二硫化碳的毒性问题。TETD和BDTD方法还可以产生更高纯度的硫代磷酸酯。

[0102] “2'-O-Me寡核苷酸”分子在核糖分子的2'-OH残基上带有一个甲基。2'-O-Me-RNA表现出与DNA相同(或相似)的行为,但受到保护以不被核酸酶降解。2'-O-Me-RNA也可以与硫代磷酸酯寡核苷酸(PTO)结合以进一步稳定。可以根据本领域的常规技术合成2'-O-Me寡核苷酸(磷酸二酯或硫代磷酸酯)(参见,例如, Yoo等, *Nucleic Acids Res.* 32:2008-16,

2004)。

[0103] 本文所述的干扰核酸可以与细胞接触或施用于生物体(例如,人)。或者,编码干扰RNA分子的构建体和/或载体可以与细胞或生物体接触或引入细胞或生物体。在某些实施方式中,施用病毒、逆转录病毒或慢病毒载体。在一些实施方式中,载体是腺相关病毒。

[0104] 通常至少17、18、19、20、21、22或23个靶mRNA序列的互补核苷酸足以介导靶转录物的抑制。无需完美的互补性。在一些实施方式中,干扰核酸含有与靶序列的1、2或3个核苷酸错配。干扰核酸分子可以具有2个核苷酸3'悬突。如果干扰核酸分子在细胞中由构建体表达,例如来自发夹分子或来自所需序列的反向重复序列,则内源性细胞机制将产生悬突。shRNA分子可以包含来源于微RNA分子的发夹。例如,通过将干扰RNA序列克隆到含有MiR30 miRNA的发夹的PCAG-MiR30构建体中,可以构建RNAi载体。RNA干扰分子可以包含DNA残基,以及RNA残基。

[0105] 在一些实施方式中,干扰核酸分子是siRNA分子。此类siRNA分子应包括与靶区域具有足够同源性的区域,并且就核苷酸而言具有足够长度,使得siRNA分子下调靶RNA。在修饰的RNA或核苷酸替代物的情况下,术语“核糖核苷酸”或“核苷酸”还可指在一个或多个位置处的修饰的核苷酸或替代物替代部分。siRNA分子和靶点之间不必存在完美的互补性,但对对应关系必须足以使siRNA分子能够指导序列特异性沉默,如通过靶RNA的RNAi裂解。在一些实施方式中,有义链仅需要与反义链充分互补以维持分子的整体双链特征。

[0106] 此外,siRNA分子可以被修饰或包含核苷替代物。siRNA分子的单链区域可以被修饰或包括核苷替代物,例如,发夹结构的一个或多个未配对区域,例如,连接两个互补区域的区域,可以具有修饰或核苷替代物。修饰以稳定siRNA分子的一个或多个3'-或5'-末端,例如,抵抗核酸外切酶,或有利于反义siRNA试剂进入RISC也是有用的。修饰可以包括C3(或C6、C7、C12)氨基接头、硫醇接头、羧基接头、非核苷酸间隔区(C3、C6、C9、C12、无碱基、三甘醇、六甘醇)、特殊的生物素或荧光素试剂作为亚磷酰胺,并且具有另一个受DMT保护的羟基,允许在RNA合成过程中进行多次偶联。

[0107] siRNA分子每条链的长度可以等于或少于35、30、25、24、23、22、21或20个核苷酸。在一些实施方式中,链的长度是至少19个核苷酸。例如,每条链的长度在21至25个核苷酸之间。在一些实施方式中,siRNA试剂具有17、18、19、20、21、22、23、24或25个核苷酸对的双螺旋区域,以及一个或多个2-3个核苷酸的悬突,如一个或两个3'悬突。

[0108] “小发夹RNA”或“短发夹RNA”或“shRNA”包括产生紧密发夹转弯的短RNA序列,可用于通过RNA干扰使基因表达沉默。本文提供的shRNA可以化学合成或从DNA质粒中的转录盒转录。shRNA发夹结构被细胞机器切割成siRNA,然后与RNA诱导的沉默复合物(RISC)结合。

[0109] 在一些实施方式中,shRNA的长度约为15-60、15-50或15-40个(双螺旋)核苷酸、长度约为15-30、15-25或19-25个(双螺旋)核苷酸或者长度约为20-24、21-22或21-23个(双螺旋)核苷酸(例如,双链shRNA的每个互补序列的长度为15-60、15-50、15-40、15-30、15-25或19-25个核苷酸,或长度为约20-24、21-22或21-23个核苷酸,以及双链shRNA的长度为约15-60、15-50、15-40、15-30、15-25或19-25个碱基对或长度约为18-22、19-20或19-21个碱基对)。shRNA双螺旋可以包含在反义链上的约1至约4个核苷酸或约2至约3个核苷酸的3'悬突和/或在有义链上的5'磷酸末端。在一些实施方式中,shRNA包含有义链和/或反义链序列,其长度从约15至约60个核苷酸(例如,长度为约15-60、15-55、15-50、15-45、15-40、15-

35、15-30或15-25个核苷酸),或长度从约19至约40个核苷酸(例如,长度为约9-40、19-35、19-30或19-25个核苷酸),或长度从约19至约23个核苷酸(例如,长度为19、20、21、22或23个核苷酸)。

[0110] shRNA的非限制性实例包括由单链分子组装的双链多核苷酸分子,其中有意义和反义区通过基于核酸或非基于核酸的接头连接;以及具有自互补有意义和反义区的发夹二级结构的双链多核苷酸分子。在一些实施方式中,通过环结构连接的shRNA的有意义链和反义链包含约1至约25个核苷酸,约2至约20个核苷酸,约4至约15个核苷酸,约5至约12个核苷酸,或者1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25个或更多个核苷酸。

[0111] 在美国专利申请公开号2011/0071208中描述了与shRNA相关的其他实施方式,以及设计和合成此类shRNA的方法,出于所有目的,其公开内容通过引用整体并入本文。

[0112] 在一些实施方式中,本文提供了微RNA(miRNA)。miRNA代表生物体中自然产生的一大群小RNA,其中一些调节靶基因的表达。miRNA代表生物体中自然产生的一大群小RNA,其中一些调节靶基因的表达。miRNA通过Dicer从大约70个核苷酸的单链发夹前体转录物形成。miRNA不会被翻译成蛋白,而是与特定的信使RNA结合,从而阻止翻译。在一些情况下,miRNA与其靶点不精确地碱基配对以抑制翻译。

[0113] 在一些实施方式中,本文提供了反义寡核苷酸化合物。在某些实施方式中,靶序列和反义靶向序列之间的互补程度足以形成稳定的双螺旋。反义寡核苷酸与靶RNA序列的互补区可以短至8-11个碱基,但可以是12-15个碱基或更多,例如,10-40个碱基、12-30个碱基、12-25个碱基、15-25个碱基、12-20个碱基或15-20个碱基,包括这些范围之间的所有整数。大约14-15个碱基的反义寡核苷酸通常足够长以具有独特的互补序列。

[0114] 在某些实施方式中,反义寡核苷酸可以与靶序列100%互补,或者可以包含错配,例如,以提高对含有疾病相关突变的等位基因的选择性靶向,只要在寡核苷酸和靶序列之间形成的异源双螺旋足够稳定以承受细胞核酸酶的作用和体内可能发生的其他降解方式。因此,某些寡核苷酸在寡核苷酸与靶序列之间可以具有约或至少约70%序列互补性,例如,70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列互补性。本文讨论了不易被核酸酶切割的寡核苷酸骨架。错配(如果存在)通常对混合双螺旋末端区域的不稳定程度低于中间区域。根据众所周知的双链稳定性原理,允许的错配数量取决于寡核苷酸的长度、双链中G:C碱基对的百分比以及错配在双链中的位置。

[0115] 例如,可以通过化学合成、体外转录或用Rnase III或Dicer消化长dsRNA来制备干扰核酸分子。这些可通过转染、电穿孔或本领域公知的其他方法引入细胞。参见Hannon,GJ,2002,RNA干扰(RNA Interference),Nature 418:244-251;Bernstein E等,2002,剩下的是沉默的(The rest is silence.)RNA 7:1509-1521;Hutvagner G等,RNAi:大自然讨厌双链(RNAi:Nature abhors a double-strand.)Curr.Opin.Genetics&Development 12:225-232;Brummelkamp,2002,哺乳动物细胞中稳定表达短干扰RNA的系统(A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells.)Science 296:550-553;Lee NS,Dohjima T,Bauer G,Li H,Li M-J,Ehsani A,Salvaterra P和Rossi J.(2002).针对HIV-1 rev 转录物的小干扰RNA在人类细胞中的表达(Expression of small

interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells.) Nature Biotechnol. 20:500-505; Miyagishi M 和 Taira K. (2002). U6 启动子驱动的 siRNA 具有四个尿苷 3' 悬置, 可有效抑制哺乳动物细胞中的靶向基因表达 (U6-promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells.) Nature Biotechnol. 20:497-500; Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ 和 Conklin DS. (2002). 短发夹 RNA (shRNA) 在哺乳动物细胞中诱导序列特异性沉默 (Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells.) Genes & Dev. 16:948-958; Paul CP, Good PD, Winer I 和 Engelke DR. (2002). 小干扰 RNA 在人细胞中的有效表达 (Effective expression of small interfering RNA in human cells.) Nature Biotechnol. 20:505-508; Sui G, Soohoo C, Affar E-B, Gay F, Shi Y, Forrester WC 和 Shi Y. (2002). 一种基于 DNA 载体的 RNA 干扰技术, 用于抑制哺乳动物细胞中的基因表达 (A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells.) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (6): 5515-5520; Yu J-Y, DeRuiter SL 和 Turner DL. (2002). 通过短干扰 RNA 和发夹 RNA 在哺乳动物细胞中的表达的 RNA 干扰 (RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells.) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (9): 6047-6052.

[0116] 在本方法中, 干扰核酸分子或干扰核酸编码多核苷酸可以例如作为裸核酸与递送试剂组合和/或作为包含表达干扰核酸分子的序列的核酸向对象施用。在一些实施方式中, 包含表达干扰核酸分子的序列的核酸在载体 (例如, 质粒、病毒和病毒载体) 内递送。可以将本领域公知的任何核酸递送方法用于本文所述的方法中。适宜的递送试剂包括但不限于例如 Mirus Transit TKO 亲脂性试剂; 脂质体 (lipofectin); 脂质体 (lipofectamine); 细胞转染素; 聚阳离子 (例如, 聚赖氨酸)、去端肽胶原、纳米复合物和脂质体。在 Minakuchi 等, Nucleic Acids Res., 32 (13): e109 (2004); Hanai 等, Ann NY Acad Sci., 1082: 9-17 (2006); 和 Kawata 等, Mol Cancer Ther., 7 (9): 2904-12 (2008) 中描述了去端胶原肽作为核酸分子的递送载体的用途; 其每一个的全部内容并入本文。在美国专利号 8,283,461、8,313,772、8,501,930、8,426,554、8,268,798 和 8,324,366 中提供了示例性的干扰核酸递送系统, 其每一个都通过引用整体并入本文。

[0117] 在本文所述方法的一些实施方式中, 将脂质体用于向对象递送抑制性寡核苷酸。适用于本文所述方法的脂质体可由标准成囊脂质形成, 其通常包括中性或带负电荷的磷脂和甾醇, 例如胆固醇。脂质的选择通常是通过考虑诸如所需脂质体大小和脂质体在血流中的半衰期等因素来指导的。已知多种制备脂质体的方法, 例如, 如在 Szoka 等, (1980), Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467; 和美国专利号 4,235,871、4,501,728、4,837,028 和 5,019,369 中描述的, 其全部公开内容以引用方式并入本文。

[0118] 还可以修饰用于本方法的脂质体以避免被单核巨噬细胞系统 (“MMS”) 和网状内皮系统 (“RES”) 清除。此类修饰的脂质体在表面具有调理作用抑制部分或结合到脂质体结构中。

[0119] 用于制备本文所述脂质体的调理作用抑制部分通常是与脂质体膜结合的大亲水聚合物。如本文所用, 当调理作用抑制部分以化学或物理方式附着到膜上时, 例如通过将脂

溶性锚插入到膜本身中,或通过直接结合到膜脂的活性基团,调理抑制部分“结合”到脂质体膜上。这些抑制调理作用的亲水聚合物形成保护性表面层,显著降低MMS和RES对脂质体的摄取;例如,如在美国专利号4,920,016中描述的,其全部公开内容以引用方式并入本文。

[0120] 在一些实施方式中,适用于修饰脂质体的调理作用抑制部分是数均分子量为约500至约40,000道尔顿或者约2,000至约20,000道尔顿的水溶性聚合物。此类聚合物包括聚乙二醇(PEG)或聚丙二醇(PPG)衍生物;例如,甲氧基PEG或PPG,和PEG或PPG硬脂酸酯;合成聚合物,如聚丙烯酰胺或聚N乙基吡咯烷酮;线性、支链或树枝状聚酰胺型胺类;聚丙烯酸;多元醇,例如,与羟基或氨基化学连接的聚乙烯醇和聚木糖醇,以及神经节苷酯,如神经节苷酯GM1。PEG、甲氧基PEG或甲氧基PPG的共聚物或其衍生物也是合适的。此外,调理作用抑制聚合物可以是PEG与聚氨基酸、多糖、聚酰胺型胺类、聚乙烯胺或多核苷酸的嵌段共聚物。调理作用抑制聚合物还可以是含有以下的天然多糖:氨基酸或羧酸,例如,半乳糖醛酸、葡糖醛酸、甘露糖醛酸、透明质酸、果胶酸、神经氨酸、海藻酸、角叉菜胶;胺化多糖或寡糖(直链或支链);或羧化多糖或寡糖,例如,与碳酸衍生物反应产生羧基连接的。在一些实施方式中,调理作用抑制部分是PEG、PPG或其衍生物。用PEG或PEG衍生物修饰的脂质体有时称为“聚乙二醇化脂质体”。

[0121] CRISPR/基因编辑

[0122] 本文公开的某些实施方式涉及在对象中治疗或预防病况(例如,本文公开的任何病况、疾病、病症或适应证)的试剂和方法,其包括施用破坏PD-L2、RGMb、PD-1或PD-L1的试剂(例如,基因编辑剂)。所述试剂可以是破坏PD-L2/RGMb或PD-1/PD-L1之间的相互作用的基因编辑剂。

[0123] 在一些实施方式中,本文公开的试剂是用于基因组编辑的试剂(例如,用于缺失编码PD-L2或RGMb肽的基因的至少一部分的试剂)。可以使用基因疗法敲除或破坏靶基因来缺失DNA。如本文所用,“敲除”可以是基因敲低或可以通过本领域已知的技术通过突变(如点突变、插入、缺失、移码或错义突变)敲除基因,包括但不限于逆转录病毒基因转移。在一些实施方式中,试剂是核酸酶(例如,锌指核酸酶或TALEN)。锌指核酸酶(ZFN)是通过将锌指DNA结合结构域与DNA切割结构域融合而生成的人工限制性酶。锌指结构域可以设计为靶向所需的DNA序列,这使锌指核酸酶能够靶向复杂基因组中的独特序列。通过利用内源性DNA修复机制,这些试剂可用于精确改变高等生物的基因组。可用于敲除基因的其他基因组定制技术是大范围核酸酶和TAL效应核酸酶(TALEN)。TALEN由用于序列特异性识别的TALE DNA结合结构域组成,该结构域与引入双链断裂(DSB)的核酸内切酶的催化结构域融合。TALEN的DNA结合结构域能够以高精度靶向大型识别位点(例如,17bp)。大范围核酸酶是序列特异性核酸内切酶,是天然存在的“DNA剪刀”,起源于各种单细胞生物,如细菌、酵母、藻类和一些植物细胞器。大范围核酸酶具有12到30个碱基对之间的长识别位点。可以修饰天然大范围核酸酶的识别位点,以靶向天然基因组DNA序列(如内源基因)。

[0124] 在另一个实施方式中,所述试剂包含CRISPR-Cas9引导的核酸酶和/或sgRNA(Wiedenheft等,“RNA引导的细菌和古细菌基因沉默系统(RNA-Guided Genetic Silencing Systems in Bacteria and Archaea),”*Nature* 482:331-338(2012);Zhang等,“利用CRISPR/Cas系统进行多重基因组工程(Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems),”*Science* 339(6121):819-23(2013);和Gaj等,“基于ZFN、TALEN和CRISPR/

Cas的基因组工程方法(ZFN,TALEN,and CRISPR/Cas-based Methods for Genome Engineering),”Cell31(7):397-405(2013),其全部内容通过引用并入本文呢)。与TALEN和ZFN一样,CRISPR-Cas9干扰是一种遗传技术,其允许通过引导核酸酶双链DNA切割对原核和真核细胞中的基因表达进行序列特异性控制。其基于细菌免疫系统-衍生的CRISPR(成簇规则间隔回文重复序列)途径。在一些实施方式中,所述试剂是sgRNA.sgRNA将tracrRNA和crRNA(天然CRISPR/Cas9系统中的独立分子)组合成单个RNA构建体,简化了使用CRISPR/Cas9进行基因组编辑所需的组件。在一些实施方式中,sgRNA的crRNA与编码PD-L2或RGMB(或其片段)的基因的至少一部分具有互补性。在一些实施方式中,sgRNA可以靶向编码PD-L2或RGMB蛋白的基因的至少一部分。

[0125] 药物组合物

[0126] 在某些实施方式中,本文提供的是组合物,例如,药物组合物,其包含至少一种本文所述的试剂以及药学上可接受的载体。在一个实施方式中,所述组合物包含本文所述的多重(例如,两种或更多种)试剂的组合。

[0127] 在一些实施方式中,所述组合物包含破坏PD-L2/RGMB相互作用的试剂(例如,抗体)。示例性抗体可以在专利和公开申请中找到,例如:美国专利号9,845,356、美国专利号10,370,448、美国专利公开号2018/0002422、WO专利公开号W02002000730和美国专利公开号2018/0258171,其通过引用整体并入本文。

[0128] 在一些实施方式中,所述组合物包含破坏PD-L1或PD-1的试剂,例如,西米普利单抗(cemiplimab、REGN2810)、纳武单抗(nivolumab、BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538)、派姆单抗(pembrolizumab、MK-3475、SCH 900475)、SHR1210、信利迪单抗(sintilimab、IBI308)、斯巴达珠单抗(spartalizumab、PDR001)、替雷利珠单抗(tislelizumab、BGB-A317)、匹地利珠单抗(pidilizumab)、BCD-100、特瑞普利单抗(toripalimab、JS001)、PF-06801591、AB122、AK105、AMG 404、BCD-100、BI 754091、F520、HLX10、HX008、JTX-4014、LZM009、MEDI0680、MGA012、Sym021、TSR-042、PSB205、MGD019、MGD013、AK104、XmAb20717、R07121661、CX-188、阿特珠单抗(atezolizumab、MPDL3280A、RG7446、R05541267)、德瓦鲁单抗(durvalumab、MEDI4736、MEDI-4736)、阿维单抗(avelumab、MSB0010718C)、FS118、BCD-135、BGB-A333、CBT-502、CK-301、CS1001、FAZ053、HLX20、KN035、MDX-1105、MSB2311、SHR-1316、TG-1501、ZKAB001、INBRX-105、MCLA-145、KN046、M7824或LY3415244。

[0129] 如下文详细描述,本文公开的药物组合物可以专门配制用于以固体或液体形式给药,包括适用于以下的那些:(1)口服施用,例如,浸液(水溶液或非水溶液或混悬液)、片剂,例如,用于口腔、舌下和全身吸收的片剂,丸剂、粉剂、颗粒剂、用于舌的糊剂;或(2)胃肠外施用,例如,通过皮下、肌内、静脉内、鞘内、脑内或硬膜外注射,例如,无菌溶液或混悬液,或缓释制剂。

[0130] 制备这些制剂或组合物的方法包括将本文所述的试剂与载体和任选的一种或多种辅助成分结合的步骤。通常,通过将本文所述的试剂与液体载体或细碎的固体载体或两者均匀且紧密地结合,然后如果需要,使产品成型来制备制剂。

[0131] 适合肠胃外施用的药物组合物包含一种或多种本文所述的试剂与一种或多种药学上可接受的无菌等渗水性或非水性溶液、分散体、悬浮液或乳液,或无菌粉末(其可以在使用前重新配制为无菌可注射溶液或分散液)的组合,其可以含有糖、醇、抗氧化剂、缓冲

剂、抑菌剂、使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质或悬浮剂或增稠剂。

[0132] 可用于药物组合物的合适的水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、二甲亚砜(DMSO)、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油,如橄榄油和可注射的有机酯,如油酸乙酯。可以保持适当的流动性,例如,通过使用包衣材料,例如卵磷脂,通过在分散体的情况下保持所需的粒度,以及通过使用表面活性剂。

[0133] 不管选择的施用途径如何,可以适宜水合形式使用的本文提供的试剂和/或本文公开的药物组合物通过本领域技术人员公知的常规方法配制成药学上可接受的剂型。

[0134] 如下文详细描述,本文公开的药物组合物可以专门配制用于以固体或液体形式给药,包括适用于以下的那些:(1)口服施用,例如,浸液(水溶液或非水溶液或混悬液)、片剂,例如,用于口腔、舌下和全身吸收的片剂、丸剂、粉剂、颗粒剂、用于舌的糊剂;或(2)胃肠外施用,例如,通过皮下、肌内、静脉内、鞘内、脑内或硬膜外注射,例如,无菌溶液或混悬液,或缓释制剂。制备这些制剂或组合物的方法包括将本文所述的试剂与载体和任选的一种或多种辅助成分结合的步骤。通常,通过将本文所述的试剂与液体载体或细碎的固体载体或两者均匀且紧密地结合,然后如果需要,使产品成型来制备制剂。

[0135] 适合肠胃外施用的药物组合物包含一种或多种本文所述的试剂与一种或多种药学上可接受的无菌等渗水性或非水性溶液、分散体、悬浮液或乳液,或无菌粉末(其可以在使用前重新配制为无菌可注射溶液或分散液)的组合,其可以含有糖、醇、抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质或悬浮剂或增稠剂。

[0136] 可用于药物组合物的合适的水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、二甲亚砜(DMSO)、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油,如橄榄油和可注射的有机酯,如油酸乙酯。可以保持适当的流动性,例如,通过使用包衣材料,例如卵磷脂,通过在分散体的情况下保持所需的粒度,以及通过使用表面活性剂。

[0137] 另外的方法

[0138] 试剂(例如,第一和/或第二试剂,或者任何其他试剂)和/或组合物(例如,药物组合物)可以全身性或局部向对象中存在的肿瘤施用。在一些实施方式中,试剂或药物组合物与另外的治疗剂一起施用。在一些实施方式中,另外的治疗剂是化学治疗剂。示例性化学治疗剂包括烷基化剂诸如塞替派和环磷酰胺(CYTOXAN[®]);烷基磺酸盐,诸如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶,诸如苯佐替派、卡波醌、美妥替哌和乌瑞替哌;乙撑亚胺和甲基蜜胺,包括六甲蜜胺、三乙撑蜜胺、三乙撑磷酰胺、三乙撑硫代磷酰胺和三羟甲蜜胺;多聚乙酰(尤其是布拉它辛和布拉它辛酮);喜树碱(包括合成类似物拓扑替康);苔藓抑素;凯利他汀;CC-1065(包括其阿多来新、卡折来新和比折来新合成类似物);念珠藻素(特别是念珠藻素1和念珠藻素8);多拉司他丁;倍癌霉素(包括合成类似物KW-2189和CBI-TMI);软珊瑚醇;水鬼蕉碱;肉毒杆菌素A;海绵抑素;氮芥,诸如苯丁酸氮芥、氯氮芥、胆磷酰胺、雌莫司汀、异环磷酰胺、甲氯乙胺、甲氯乙胺氧化物盐酸盐、美法仑、新恩比兴、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲磷胺、尿嘧啶氮芥;亚硝基脲,诸如卡莫司汀、氯脲菌素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀和雷莫司汀;抗生素,诸如烯二炔抗生素(例如卡里奇霉素,尤其是卡奇霉素 γ II和卡奇霉素 ϕ II);达内霉素,包括达内霉素A;二磷酸盐,诸如氯膦酸盐;埃斯培拉霉素;新抑癌菌素发色团和相关色蛋白烯二炔类抗生素发色团)、阿克拉霉素、放线菌素、安曲霉素、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、卡拉比星、洋红霉素、嗜癌菌素、色霉素、放线菌素D、柔红霉素、地

托比星、6-重氨基-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星 (AdramycinTM) (包括吗啉代-多柔比星、氰基吗啉代-多柔比星、2-吡咯啉并-多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素诸如丝裂霉素C、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑菌素、链脉霉素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁和佐柔比星;抗代谢物,诸如甲氨喋呤和5-氟尿嘧啶 (5-FU);叶酸类似物,诸如去甲喋呤 (demopterin)、甲氨喋呤、蝶罗呤和三甲曲沙;嘌呤类似物,诸如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤和硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,诸如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿啶、依诺他滨和氟尿苷;雄激素,诸如卡鲁睾酮、屈他雄酮丙酸盐、环硫雄醇、美雄烷和睾内酯;抗肾上腺剂,诸如氨鲁米特、米托坦和曲洛司坦;叶酸补充剂,诸如亚叶酸;乙酰葡醛酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;恩尿嘧啶;安吡啶;海斯特拉布西尔 (hestrabucil);比生群;依达曲沙;地佛法明;地美可辛;地吡醌;依洛尼塞;依利醋铵;埃博霉素;依托格鲁;硝酸镓;羟脲;香菇多糖;甲酰四氢叶酸;氯尼达明;美登木素生物碱,诸如美登素和安丝菌素;米托胍脲;米托蒽醌;莫哌达醇;二胺硝吡啶;喷司他丁;蛋氨酸芥;吡柔比星;洛索蒽醌;鬼臼酸;2-乙基酰肼;丙卡巴肼;PSKTM;雷佐生;根霉素;西佐喃;锗螺胺;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2',2''-三氯三乙胺;单端孢霉烯 (尤其是T-2毒素、藜芦素A、杆孢菌素A和蛇形菌素);氨基甲酸乙酯;长春花碱;达卡巴嗪;甘露醇氮芥;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;gacytosine;阿拉伯糖苷 (“Ara-C”);环磷酰胺;噻替派;紫杉烷,例如紫杉醇 (TAXOLTM, Bristol Meyers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) 和多西他赛 (TaxoteretTM, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France);苯丁酸氮芥;吉西他滨 (GemzarTM);6-巯鸟嘌呤;硫嘌呤;甲氨喋呤;铂类似物,如顺铂和卡铂;长春碱;铂;依托泊苷 (VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞宾 (NavelbineTM);诺消林;替尼泊苷;依达曲沙;道诺霉素;氨基喋呤;希罗达;伊班膦酸盐;CPT-11;拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸 (DMFO);类维生素A,诸如视黄酸;卡培他滨;以及上述任何物质的药物上可接受的盐、酸或衍生物。“化学治疗剂”的定义中还包括抗激素药物,其作用是调节或抑制激素对肿瘤的作用,如抗雌激素和选择性雌激素受体调节剂 (SERM),包括例如他莫昔芬 (包括 NolvadexTM)、雷洛昔芬、屈洛昔芬、4-羟基他莫昔芬、三昔芬、酮昔芬、LY117018、奥那司酮和托瑞米芬 (FarestonTM);芳香化酶抑制剂,其调节肾上腺中雌激素的产生,例如,4(5)-咪唑、氨基鲁米唑、醋酸甲地孕酮 (MegaceTM)、依西美坦、福美坦、法卓唑、伏洛唑 (RivisorTM)、来曲唑 (FemaraTM) 和阿那曲唑 (ArimidexTM);和抗雄激素,如氟他胺、尼鲁他胺、比卡鲁胺、亮丙瑞德和戈舍瑞林;以及上述任何物质的药物上可接受的盐、酸或衍生物。在一些实施方式中,其他治疗剂是免疫检查点抑制剂。检查点抑制广义上是指抑制癌细胞可以产生的检查点,以防止或下调免疫应答。免疫检查点蛋白的实例是CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIR家族受体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、BTLA、SIRP α (CD47)、CD48、2B4 (CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、HHLA2、丁酰蛋白 (butyrophilin)、A2aR及其组合。

[0139] 适应症

[0140] 在一些方面中,本文提供了通过向对象 (例如,向对象中存在的肿瘤或口服向对象) 施用本文所述的试剂 (例如,第一和/或第二试剂,或者任何其他试剂) 治疗癌症的方法。

[0141] 在一些实施方式中,本文所述的方法可用于治疗任何癌性或癌前肿瘤。在一些实

施方式中,所述癌症包括实体瘤。可以通过本文提供的方法和组合物治疗的癌症包括但不限于来自膀胱、血液、骨骼、骨髓、脑、乳腺癌(例如,雌激素受体(ER)阳性乳腺癌、三阴性乳腺癌或HER2阳性乳腺癌)、结肠、食道、胃肠道、牙龈、头部、肾、肝、肺、鼻咽、颈部、卵巢、前列腺、皮肤、胃、睾丸、舌或子宫的癌细胞。此外,癌症可能具体具有以下组织学类型,但不限于这些:赘生物,恶性;癌瘤;癌瘤,未分化的;巨细胞和梭形细胞癌;小细胞癌;乳头状癌;鳞状细胞癌;淋巴上皮癌;基底细胞癌;毛母基质癌;移行细胞癌;乳头状移行细胞癌;腺癌;胃泌素瘤,恶性;胆管癌;肝细胞癌;合并的肝细胞癌和胆管癌;小梁腺癌;腺样囊性癌;腺瘤性息肉中的腺癌;腺癌,家族性结肠息肉病;实体癌瘤;类癌瘤,恶性;细支气管-肺泡腺癌;乳头状腺癌;嫌色细胞癌;嗜酸细胞癌;嗜氧性腺癌;嗜碱性粒细胞癌;透明细胞腺癌;颗粒细胞癌;滤泡性腺癌;乳头状和滤泡状腺癌;非包膜硬化性癌;肾上腺皮质癌;子宫内膜样癌;皮肤附件癌;大汗腺癌;皮脂腺癌;蜡样腺癌;粘液表皮样癌;囊腺癌;乳头状囊腺癌;乳头状浆液性囊腺癌;粘液性囊腺癌;粘液腺癌;印戒细胞癌;浸润性导管癌;髓样癌;小叶癌;炎性癌;乳腺佩吉特氏病;腺泡细胞癌;腺鳞癌;腺癌伴鳞状上皮化生;恶性胸腺瘤;恶性卵巢间质瘤;恶性卵泡膜瘤;恶性颗粒细胞瘤;和恶性肉母细胞瘤;支持细胞瘤;恶性莱迪格细胞瘤;恶性脂质细胞瘤;恶性副神经节瘤;恶性乳腺外副神经节瘤;嗜铬细胞瘤;肾血管肉瘤;恶性黑色素瘤;无色素黑色素瘤;浅表扩散黑色素瘤;巨大色素痣中的恶性黑色素瘤;上皮样细胞黑色素瘤;恶性蓝痣;肉瘤;纤维肉瘤;恶性纤维组织细胞瘤;粘液肉瘤;脂肪肉瘤;平滑肌肉瘤;横纹肌肉瘤;胚胎横纹肌肉瘤;肺泡横纹肌肉瘤;间质肉瘤;恶性混合瘤;苗勒管混合瘤;肾母细胞瘤;肝母细胞瘤;癌肉瘤;恶性间质瘤;恶性布伦纳瘤;恶性叶状肿瘤;滑膜肉瘤;恶性间皮瘤;无性细胞瘤;胚胎癌;恶性畸胎瘤;恶性卵巢瘤;绒癌;恶性中肾瘤;血管肉瘤;恶性血管内皮瘤;卡波西氏肉瘤;恶性血管外皮细胞瘤;淋巴管肉瘤;骨肉瘤;近皮质骨肉瘤;软骨肉瘤;恶性软骨母细胞瘤;间充质软骨肉瘤;骨巨细胞瘤;尤因氏肉瘤;恶性牙源性肿瘤;成釉细胞性牙肉瘤;恶性成釉细胞瘤;成釉细胞纤维肉瘤;恶性松果体瘤;脊索瘤;恶性胶质瘤;室管膜瘤;星形细胞瘤;原生质星形细胞瘤;纤维状星形细胞瘤;星形母细胞瘤;胶质母细胞瘤;少突胶质细胞瘤;少突胶质母细胞瘤;原始神经外胚层肿瘤;小脑肉瘤;神经节神经母细胞瘤;神经母细胞瘤;视网膜母细胞瘤;嗅神经源性肿瘤;恶性脑膜瘤;神经纤维肉瘤;恶性神经鞘瘤;恶性颗粒细胞瘤;恶性淋巴瘤;霍奇金氏病;霍奇金氏淋巴瘤;副肉芽肿;小淋巴细胞恶性淋巴瘤;弥漫性大细胞恶性淋巴瘤;滤泡性恶性淋巴瘤;真菌病;其他特定的非霍奇金淋巴瘤;恶性组织细胞增生症;多发性骨髓瘤;肥大细胞肉瘤;免疫增殖性小肠疾病;白血病;淋巴细胞白血病;浆细胞白血病;红白血病;淋巴肉瘤细胞白血病;髓系白血病;嗜碱性白血病;嗜酸性粒细胞白血病;单核细胞白血病;肥大细胞白血病;巨核细胞白血病;髓系肉瘤;和毛细胞白血病。

[0142] 在一些实施方式中,所述对象患有癌症。在一些实施方式中,所述癌症包括实体瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤是腺癌、肾上腺肿瘤、肛门肿瘤、胆管肿瘤、膀胱肿瘤、骨肿瘤、血液骨肿瘤、脑/CNS肿瘤、乳腺肿瘤、宫颈肿瘤、结直肠肿瘤、子宫内膜肿瘤、食管肿瘤、尤因肿瘤、眼肿瘤、胆囊肿瘤、胃肠道肿瘤、肾肿瘤、喉或下咽肿瘤、肝肿瘤、肺肿瘤、间皮瘤肿瘤、多发性骨髓瘤肿瘤、肌肉肿瘤、鼻咽肿瘤、神经母细胞瘤、口腔肿瘤、骨肉瘤、卵巢肿瘤、胰腺肿瘤、阴茎肿瘤、垂体肿瘤、原发性肿瘤、前列腺肿瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺肿瘤、软组织肉瘤、黑色素瘤、转移性肿瘤、基底细胞癌、梅克尔细胞肿瘤、睾丸肿

瘤、胸腺肿瘤、甲状腺肿瘤、子宫肿瘤、阴道肿瘤、外阴肿瘤或Wilms肿瘤。

[0143] 实施例

[0144] 图1-4是显示用广谱抗生素(万古霉素、新霉素、甲硝唑和氨苄西林或“VNMA”)治疗的小鼠存在微生态失调(一种不健康的微生物群)的数据图。

[0145] 图1显示了用广谱抗生素(VNMA)治疗17天的小鼠的微生物群发生了改变,即微生态失调。这种微生物群主要由变形杆菌(Proteobacteria)和大肠杆菌组成。给予一定剂量的健康人类微生物群(Hmb)的小鼠具有更加多样化的微生物群。

[0146] 图2显示了给予VNMA的小鼠对抗PD-L1疗法没有应答,而给予口服剂量的Hmb的小鼠可以清除或具有明显较小的肿瘤,表明微生态失调抑制了抗PD-L1疗法的抗肿瘤作用。为了确定微生态失调如何消除抗PD-L1疗法的抗肿瘤作用,比较了VNMA与Hmb小鼠肿瘤引流淋巴结中免疫细胞上表面标志物的表达。结果发现,Hmb小鼠的巨噬细胞和树突状细胞中PD-L2的表达显著降低,但在VNMA小鼠中的表达更高(图3)。

[0147] 为了确定破坏VNMA小鼠中的PD-L2是否会逆转微生态失调对抗肿瘤免疫的影响,在VNMA治疗的小鼠中组合了抗PD-L1和抗PD-L2疗法。图4显示了虽然抗PD-L1和抗PD-L2单独不促进VNMA治疗小鼠的抗肿瘤应答,但其协同促进抗肿瘤应答。这些数据表明,抗PD-L1和抗PD-L2联合疗法能够逆转微生态失调的影像并促进抗肿瘤应答。这些数据表明,在临床上,微生态失调和抗PD-L1治疗应答不佳的患者可以从抗PD-L1和抗PD-L2联合疗法中获益。

[0148] 图5显示了图1-4的实验时间轴。在肿瘤植入前4天,在饮用水中给予小鼠抗生素(0.5mg/ml万古霉素、1mg/ml新霉素、1mg/ml甲硝唑、1mg/ml氨苄西林)。在第0天,将 2.5×10^5 个MC38肿瘤细胞皮下植入6周龄雌性小鼠的腹部。在第7、10、13、16天,通过腹腔内注射用100 μ g同种型或抗PD-L1治疗小鼠。在第7天,一半小鼠口服灌胃给予Hmb粪便浆液,并从饮用水中去除抗生素;另一半小鼠不接受Hmb粪便,并在实验的剩余时间内继续在饮用水中使用抗生素。在第7、10、13、16、20、23天测量肿瘤。

[0149] 图6-9显示了在无菌小鼠中,单独使用抗PD-1或抗PD-L1疗法并不能促进肿瘤应答,但是如果与抗PD-L2或抗RGMb联用,则协同促进抗肿瘤应答。将 2.5×10^5 个MC38肿瘤细胞皮下植入无菌隔离器中的6周龄雌性无菌小鼠的腹部。在第7、10、13、16天通过腹腔内注射施用抗体治疗。在整个实验过程中,所有试剂和用品都进行了消毒,并将小鼠饲养在无菌隔离器中。

[0150] 图6显示了抗PD-L1和抗PD-L2的联合疗法,而非抗PD-L1或抗PD-L2疗法,在无菌小鼠中促进抗肿瘤应答。

[0151] 图7显示了抗PD-1和抗PD-L2的联合疗法,而非抗PD-1或抗PD-L2疗法,在无菌小鼠中促进抗肿瘤应答。

[0152] 特别是,图6和图7显示抗PD-1疗法不会促进GF小鼠的抗肿瘤应答,但抗PD-1疗法与靶向PD-L2/PD-1和PD-L2/RGMb(mAb克隆3.2)的抗体两者之一的组合或仅PD-L2/RGMb(mAb克隆GF17.2C9)能够促进抗肿瘤应答。这些数据表明,靶向PD-L2介导的信号通路(包括PD-L2/RGMb通路)对于接受抗PD-1疗法的患者的抗肿瘤应答很重要。

[0153] 因为抗PD-L2 mAb克隆GF17.2C9(2C9)(其破坏PD-L2和RGMb之间的相互作用,但不破坏PD-L2和PD-1的相互作用)促进在使用抗PD-L1或抗PD-1治疗的GF小鼠中的抗肿瘤应答,我们测试了靶向RGMb而非PD-L2是否也能促进抗PD-1或抗PD-L1治疗的GF小鼠的抗肿瘤

应答。结果发现,抗RGMb和抗PD-1(图8)或抗PD-L1(图9)的组合促进了GF小鼠的抗肿瘤应答,表明通过靶向PD-L2或靶向RGMb来破坏PD-L2/RGMb应答可以促进接受抗PD-1或抗PD-L1治疗的患者的抗肿瘤应答。

[0154] 本文提供的联合疗法对多种肿瘤类型和癌症有效。本文提供了在对象中治疗或预防黑色素瘤的方法,包括向所述对象联合施用特异性结合PD-L2的第一试剂和特异性结合PD-1或PD-L1的第二试剂。本文还提供了在对象中治疗或预防结肠癌的方法,包括向所述对象联合施用特异性结合PD-L2的第一试剂和特异性结合PD-1或PD-L2的第二试剂。

[0155] 通过引用并入

[0156] 本申请中提及的所有出版物、专利和专利申请均通过引用整体并入本申请,就如同各出版物、专利或专利申请明确特别地和单独地通过引用并入。在出现矛盾的情况下,以本申请包括本申请中的任何定义为准。

[0157] 等同物

[0158] 本领域技术人员将意识到或者能够确定使用不超过常规的实验就能够得到本申请所述发明特定实施方式的多种等同物。此类等同物旨在包括在权利要求中。

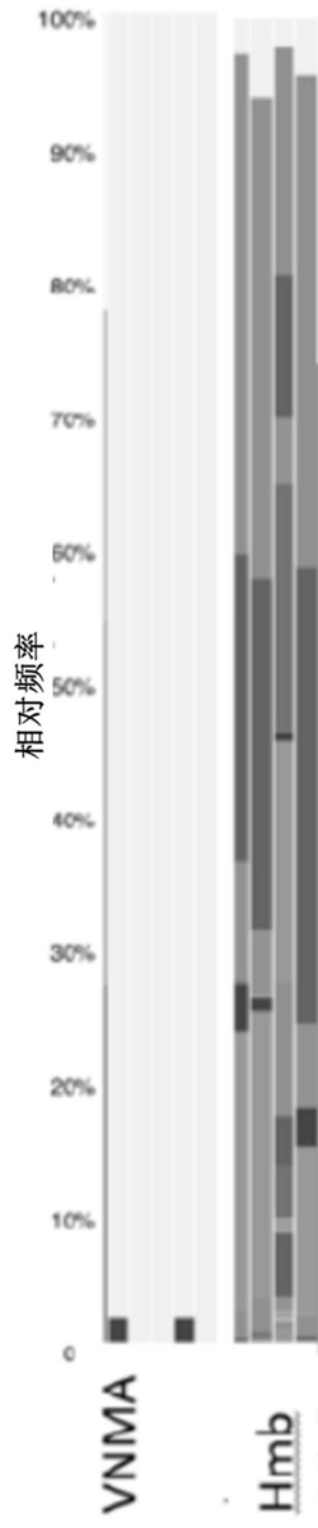


图1

- < Bacteria:p Protobacteria:c Gammaproteobacteria:o Enterobacteriales:f Enterobacteriaceae:g Escherichia:s coli
- < Bacteria:p Bacteroidetes:c Bacteroidia:o Bacteroidales:f Bacteroidaceae:g Bacteroides;
- < Bacteria:p Verrucomicrobia:c Verrucomicrobia:o Verrucomicrobiales:f Verrucomicrobiaceae:g Akkermansia:s muciniphila
- < Bacteria:p Protobacteria:c Betaproteobacteria:o Burkholderiales:f Alkaligenaceae:g Sutterella;s
- < Bacteria:p Firmicutes:c Clostridia:c Clostridiales:f ;g :s
- < Bacteria:p Firmicutes:c Bacilli:o Lactobacillales:f Lactobacillaceae:g Lactobacillus:s salivarius
- < Bacteria:p Bacteroidetes:c Bacteroidia:o Bacteroidales:f Porphyromonadaceae:g Parabacteroides:s distasonis
- < Bacteria:p Protobacteria:c Gammaproteobacteria:o Enterobacteriales:f Enterobacteriaceae: ;
- < Bacteria:p Bacteroidetes:c Bacteroidia:o Bacteroidales:f Bacteroidaceae:g Bacteroides:s ovatus
- < Bacteria:p Bacteroidetes:c Bacteroidia:o Bacteroidales:f Bacteroidaceae:g Bacteroides:s fragilis
- < Bacteria:p Bacteroidetes:c Bacteroidia:o Bacteroidales:f Rikenellaceae:g :s
- < Bacteria:p Firmicutes:c Clostridia:c Clostridiales:f Ruminococcaceae:g Oscillospira:s
- < Bacteria:p Protobacteria:c Gammaproteobacteria:o Enterobacteriales:f Enterobacteriaceae:g Proteus:s
- < Bacteria:p Firmicutes:c Clostridia:c Clostridiales:f Lachnospiraceae: ;
- < Bacteria:p Bacteroidetes:c Bacteroidia:o Bacteroidales:f [Paraprevotellaceae]g Paraprevotella;s
- < Bacteria:p Protobacteria:c Gammaproteobacteria:o Enterobacteriales:f Enterobacteriaceae:g Citrobacter:s
- < Bacteria:p Firmicutes:c Clostridia:c Clostridiales:f Lachnospiraceae:g :s
- < Bacteria:p Firmicutes:c Clostridia:c Clostridiales: ; : :
- < Bacteria:p Bacteroidetes:c Bacteroidia:o Bacteroidales:f Bacteroidaceae:g Bacteroides;s
- < Bacteria:p Firmicutes:c Bacilli:o Lactobacillales:f Enterococcaceae:g Enterococcus:s
- < Bacteria:p Firmicutes:c Clostridia:c Clostridiales:f Lachnospiraceae:g Coprococcus;s
- < Bacteria:p Firmicutes:c Clostridia:c Clostridiales:f Ruminococcaceae:g Ruminococcus:s
- < Bacteria:p Firmicutes:c Clostridia:c Clostridiales:f Lachnospiraceae:g [Ruminococcus]s gnavus
- < Bacteria:p Protobacteria:c Deltaproteobacteria:c Desulfovibrionales:f Desulfovibrionaceae:g Bilophila;s
- < Bacteria:p Firmicutes:c Bacilli:o Turicibacterales:f Turicibacteraceae:g Turicibacter:s
- < Bacteria:p Firmicutes:c Clostridia:c Clostridiales:f Ruminococcaceae:g :s
- < Bacteria:p Tenericutes:c Mollicutes:o Anaeroplasmatales:f Anaeroplasmataceae:g Anaeroplasma:s
- < Bacteria:p Firmicutes:c Crysipelotrichi:o Crysipelotrichales:f Crysipelotrichaceae:g [Cubacterium]s dolichum
- < Bacteria:p Bacteroidetes:c Bacteroidia:o Bacteroidales:f Bacteroidaceae:g Bacteroides:s uniformis
- < Bacteria:p Tenericutes:c Mollicutes:o RF39:f ;g :s
- < Bacteria:p Firmicutes:c Clostridia:c Clostridiales:f Ruminococcaceae:g Anaerotruncus;s
- < Bacteria:p Firmicutes:c Clostridia:c Clostridiales:f Veillonellaceae:g Phascolarctobacterium:s
- < Bacteria:p Bacteroidetes:c Bacteroidia:o Bacteroidales:f Porphyromonadaceae:g Parabacteroides;s
- < Bacteria:p Firmicutes:c Clostridia:c Clostridiales:f Lachnospiraceae:g Dorea:s

图1 (续)

- < Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Blaustia;s_producta
- k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Blaustia;s_
- k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Erysipelotrichi;o_Erysipelotrichales;f_Erysipelotrichaceae;g_Coprobacillus;s_
- k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Clostridium;s_piliforme
- k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Clostridium;s_hathewayi
- k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales;f_Streptococcaceae;g_Streptococcus;s_
- k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_[Ruminococcus];s_
- k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Clostridiaceae;g_Clostridium;s_
- k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_[Mogibacteriaceae];g_;s_
- k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Erysipelotrichi;o_Erysipelotrichales;f_Erysipelotrichaceae;g_Holdemania;s_
- k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Clostridiaceae;g_;s_
- k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_[Odoribacteraceae];g_Odoribacter;s_
- k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Blaustia;_
- k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Bacillales;f_Staphylococcaceae;g_Staphylococcus;s_
- k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Bifidobacteriales;f_Bifidobacteriaceae;g_Bifidobacterium;s_
- k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Epsilonproteobacteria;o_Campylobacteriales;f_Helicobacteraceae;_:_
- k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Christensenellaceae;g_;s_

图1 (续)

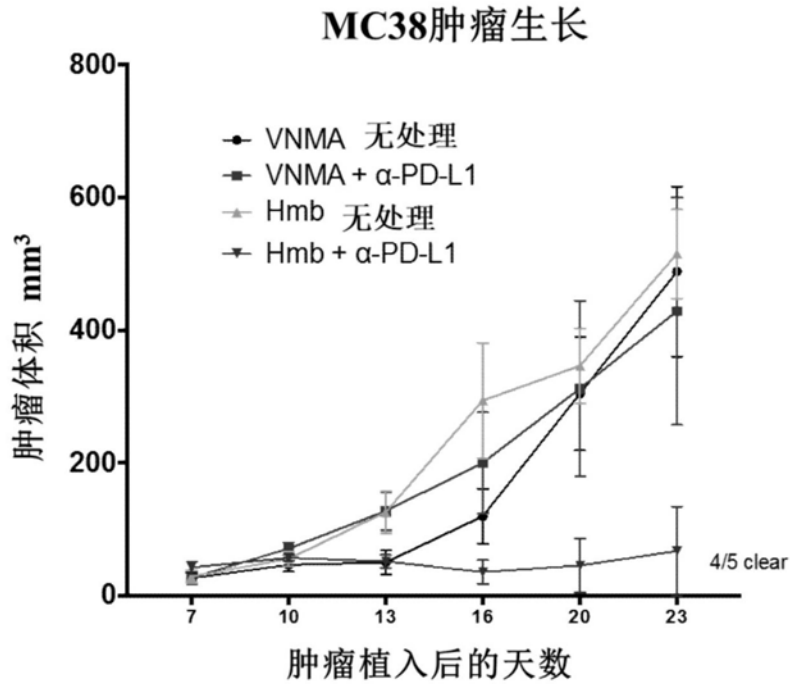


图2

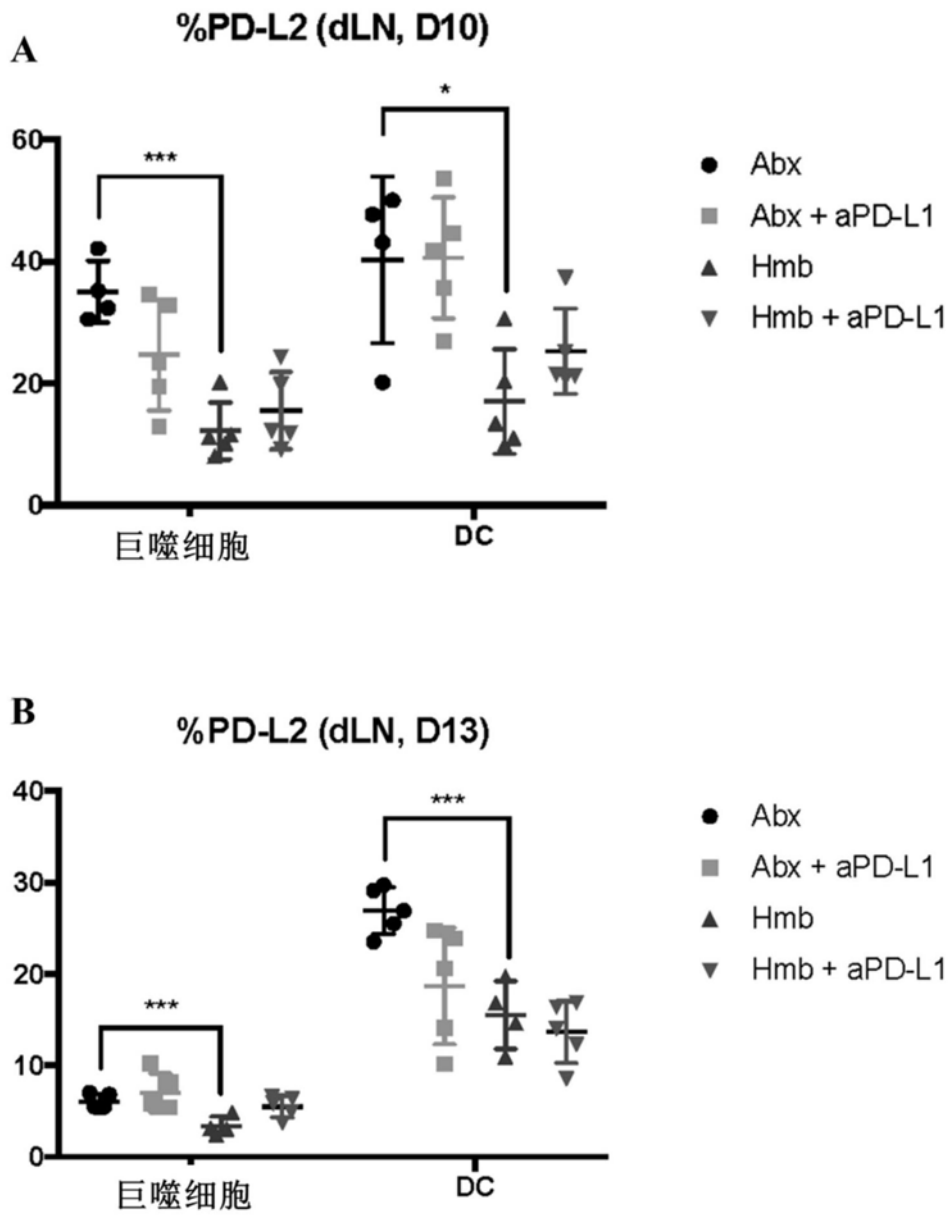


图3

经抗生素处理的小鼠中的MC38肿瘤生长

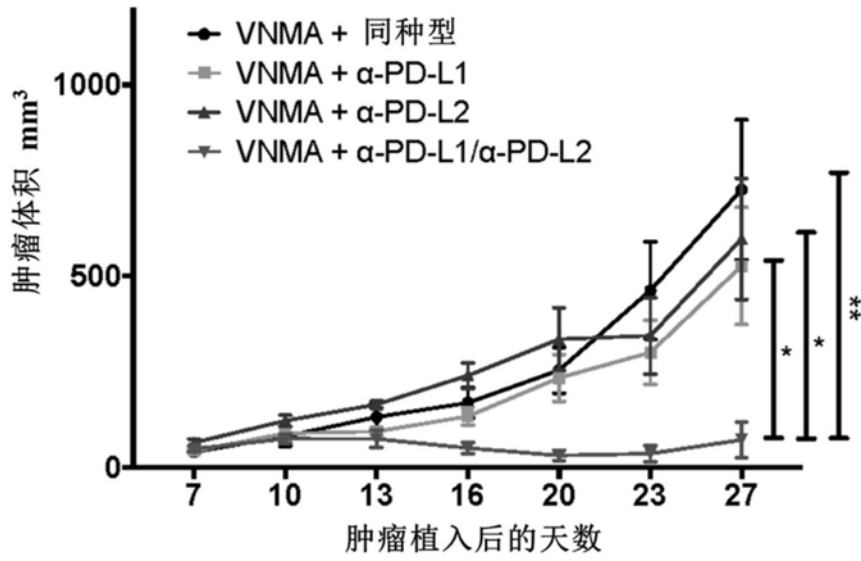


图4

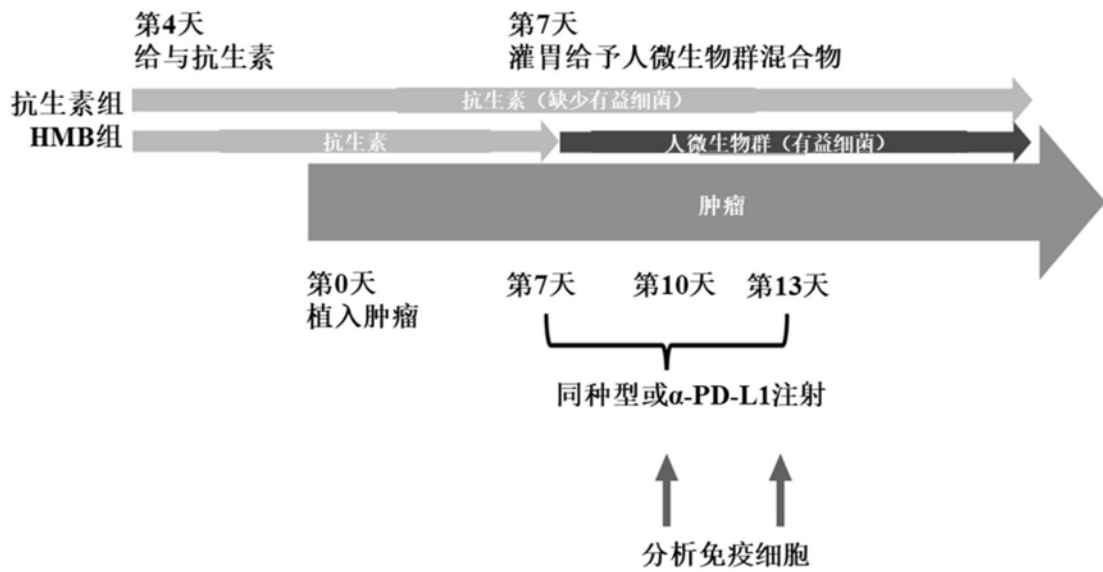


图5

在GF小鼠中的MC38肿瘤生长

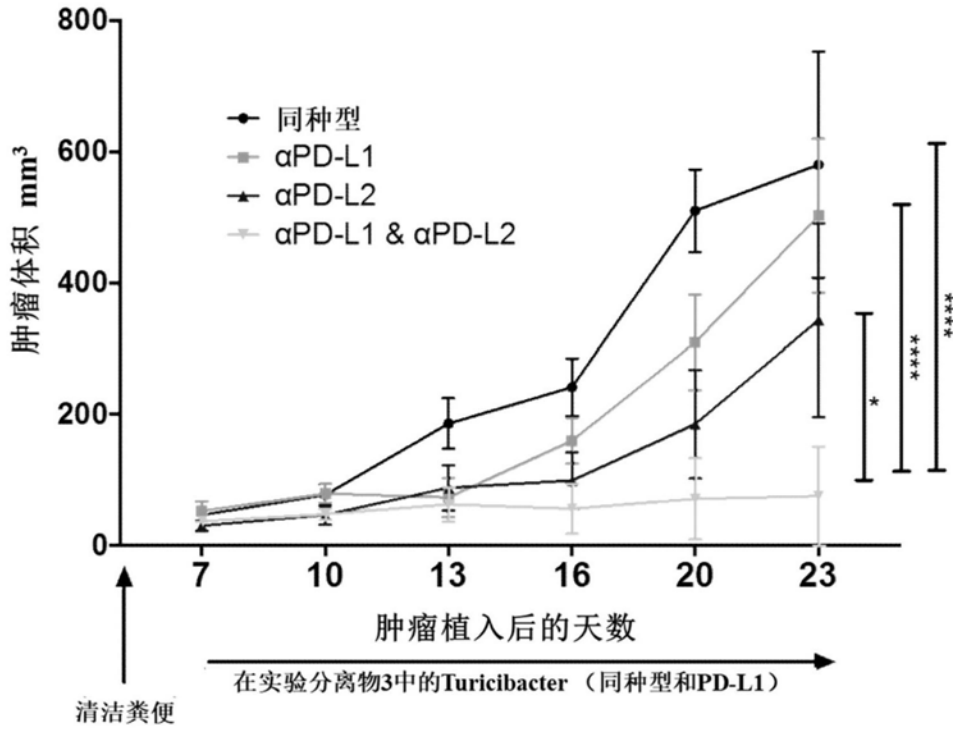


图6

在GF小鼠中的MC38肿瘤生长

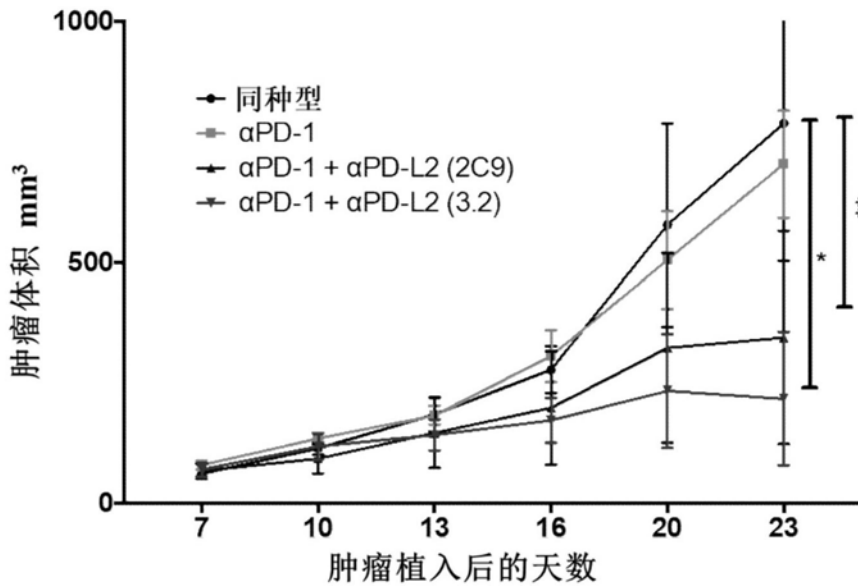


图7

在无菌小鼠中的MC38肿瘤生长

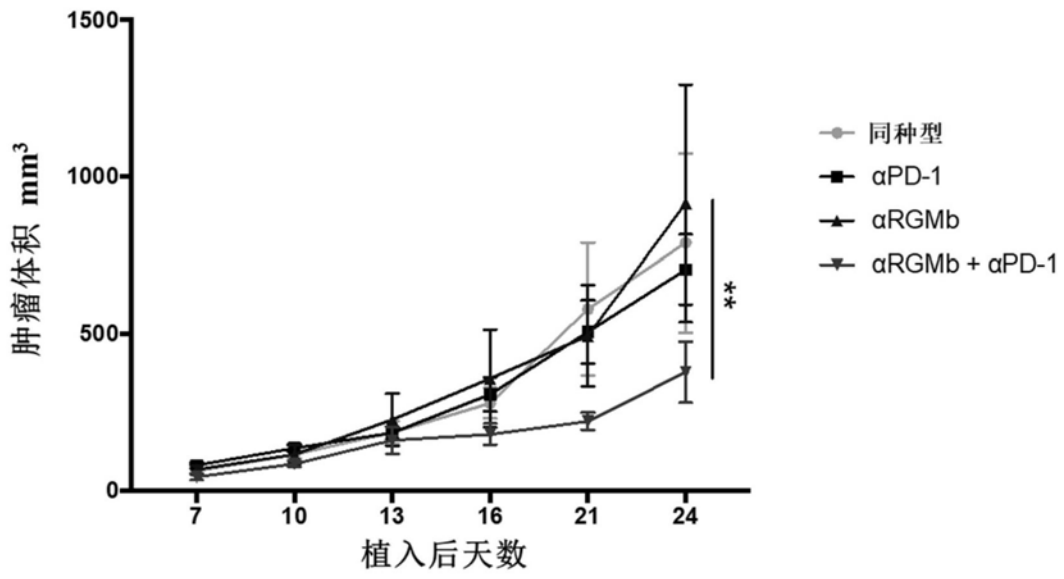


图8

在无菌小鼠中的MC38肿瘤生长

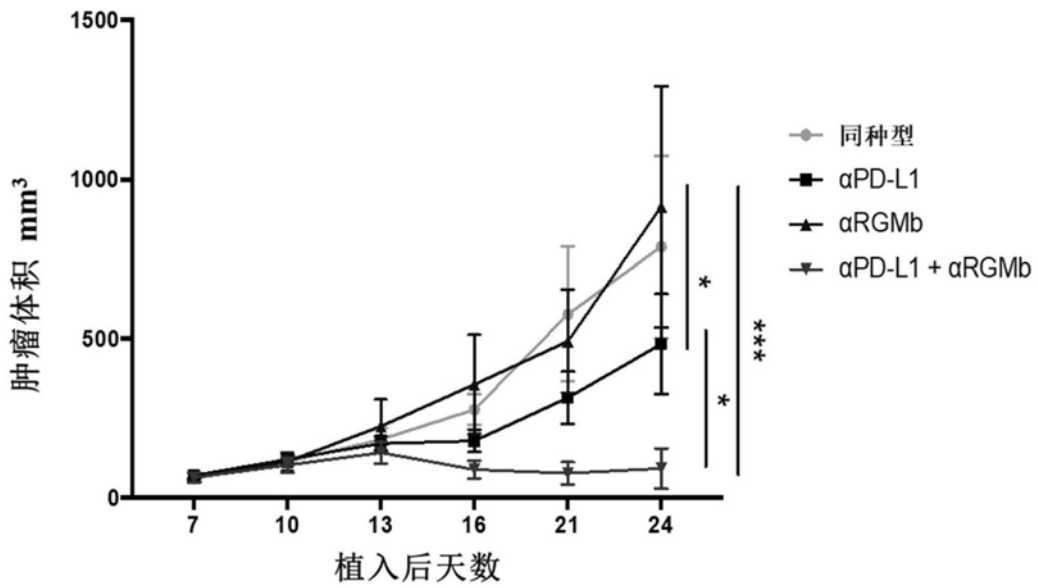


图9