(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118946288 A
(43)申请公布日 2024.11.12

(21)申请号 202280051550.9
(22)申请日 2022.05.20
(30)优先权数据
63/191,551 2021.05.21 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.01.22
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/030168 2022.05.20
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/246139 EN 2022.11.24
(71)申请人 D·D·金基恩
地址 俄罗斯联邦圣彼得堡
申请人 G·V·泰茨 V·V·泰茨
(72)发明人 D·D·金基恩 G·V·泰茨
V·V·泰茨
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 张晨 郑霞
(51)Int.Cl.
A47G 19/12(2006.01)

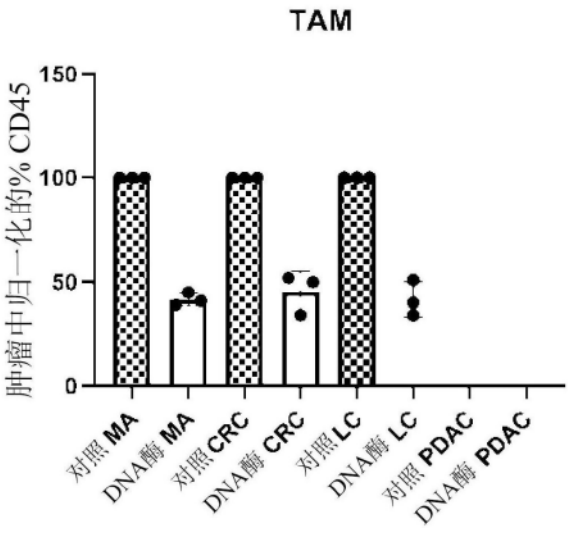
权利要求书7页 说明书25页
序列表（电子公布） 附图5页

(54)发明名称

肿瘤微环境的免疫调节

(57)摘要

本发明涉及用DNA酶疗法通过多种途径免疫调节免疫抑制性肿瘤细胞微环境和预防肿瘤微生物组效应的方法。免疫调节免疫抑制性肿瘤细胞微环境的方法包括施用有效量的单独的或与其他免疫调节剂组合的脱氧核糖核酸酶(DNA酶)。



CN 118946288 A

1.一种在具有癌症的受试者中免疫调节免疫抑制性肿瘤细胞微环境的方法,包括向所述受试者施用有效量的脱氧核糖核酸酶(DNA酶)。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述免疫调节包括免疫抑制性肿瘤细胞微环境中细胞毒性CD8 T细胞和/或NK细胞和/或CAR-T细胞对肿瘤细胞的杀伤增加。

3.一种在具有癌症的受试者中调节肿瘤相关微生物组的方法,包括向所述受试者施用有效量的脱氧核糖核酸酶(DNA酶)。

4.一种治疗有相应需要的受试者的癌症的方法,包括向所述受试者施用有效量的脱氧核糖核酸酶(DNA酶)和第二免疫调节剂。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述DNA酶的施用有效地减少免疫抑制性肿瘤细胞微环境中肿瘤相关巨噬细胞(TAM)和/或肿瘤浸润性中性粒细胞(TIN)的数量和/或活性。

6.根据权利要求4或权利要求5所述的方法,其中所述第二免疫调节剂是免疫检查点调节剂。

7.根据权利要求6所述的方法,其中所述免疫检查点调节剂是选自以下的免疫检查点分子的调节剂:PD-1、CD28、CTLA-4、CD137、CD40、CD134(OX-40)、ICOS、KIR、LAGS、CD27、TIM-3、BTLA、GITR、TCR、4-1BB、TIGIT、CD96、CD226、KIR2DL、VISTA、HLLA2、TLIA、DNAM-1、CEACAM1、CD155、IDO、TGF-β、IL-10、IL-2、IL-15、CSF-1、IL-6、腺苷A2A受体(A2AR)及其配体。

8.根据权利要求6或权利要求7所述的方法,其中所述免疫检查点调节剂是免疫检查点抑制剂。

9.根据权利要求8所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂是特异性地结合CTLA-4、PD-1、OX-40、PD-L1或PD-L2的抗体。

10.根据权利要求8所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂是特异性地结合CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、IDO、KIR、LAG 3、NOX2、TIM-3、VISTA或SIGLEC7的抗体。

11.根据权利要求8所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂选自伊匹木单抗、曲美木单抗、纳武利尤单抗、帕博利珠单抗、匹地利珠单抗、MEDI0680、阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、度伐利尤单抗、西米普利单抗及其任何组合。

12.根据权利要求11所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂是帕博利珠单抗。

13.根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述DNA酶选自人类DNA酶I、人类DNA酶-1-样3(D1L3)、人类DNA酶-1-样2(D1L2)、人类DNA酶-1-样1(D1L1)、DNA酶X、DNA酶γ、DNA酶II、DNA酶IIα、DNA酶IIβ和胱天蛋白酶激活的DNA酶(CAD)。

14.根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述DNA酶包含与人类DNA酶I酶具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

15.根据权利要求14所述的方法,其中所述DNA酶包含与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

16.根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述DNA酶包含与DNA酶1-样3(D1L3)酶的氨基酸21至305具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

17.根据权利要求16所述的方法,其中所述DNA酶包含与SEQ ID NO:3的氨基酸21至305

具有至少90％序列同一性的氨基酸序列。

18.根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述DNA酶包含氨基酸序列SEQ ID NO:2。

19.根据权利要求1-18中任一项所述的方法,其中所述DNA酶作为DNA酶蛋白施用。

20.根据权利要求19所述的方法,其中静脉内施用所述DNA酶蛋白持续至少2天。

21.根据权利要求20所述的方法,其中静脉内施用所述DNA酶蛋白持续至少7天。

22.根据权利要求21所述的方法,其中静脉内施用所述DNA酶蛋白持续至少14天。

23.根据权利要求22所述的方法,其中静脉内施用所述DNA酶蛋白持续至少16天。

24.根据权利要求19所述的方法,其中所述DNA酶蛋白每2周或3周或4周静脉内施用1天至2天,其中治疗的总长度是2周至50年。

25.根据权利要求19所述的方法,其中所述DNA酶蛋白每2周或3周或4周静脉内施用2天至5天,其中治疗的总长度是2周至50年。

26.根据权利要求19所述的方法,其中所述DNA酶蛋白每2周或3周或4周静脉内施用7天至14天,其中治疗的总长度是2周至50年。

27.根据权利要求19所述的方法,包括在施用所述第二免疫调节剂之前120小时至1小时向所述受试者施用所述DNA酶蛋白。

28.根据权利要求19所述的方法,包括在施用所述第二免疫调节剂之后30分钟至2小时向所述受试者施用所述DNA酶蛋白。

29.根据权利要求19所述的方法,包括在施用所述第二免疫调节剂之后2小时至360小时向所述受试者施用所述DNA酶蛋白。

30.根据权利要求19-29中任一项所述的方法,其中所述DNA酶蛋白以125μg/kg/天-250μg/kg/天施用。

31.根据权利要求1-18中任一项所述的方法,其中所述DNA酶由基因疗法载体编码。

32.根据权利要求31所述的方法,其中将所述基因疗法载体施用至所述受试者。

33.根据权利要求31或权利要求32所述的方法,其中所述基因疗法载体是重组腺相关病毒(rAAV)表达载体,包含(i)衣壳蛋白和(ii)核酸,所述核酸包含可操作地连接到编码所述DNA酶的核苷酸序列的启动子。

34.根据权利要求32所述的方法,其中所述启动子选自肝特异性启动子、神经系统特异性启动子、肠特异性启动子、肝特异性/神经系统特异性串联启动子和肝特异性/肠特异性串联启动子。

35.根据权利要求33所述的方法,其中所述启动子对于肿瘤起源组织或转移靶组织是特异性的。

36.根据权利要求33-35中任一项所述的方法,其中所述AAV选自血清型1(AAV1)、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh10、AAVLK03、AAVLK06、AAVLK12、AAV-KP1、AAV-F、AAVDJ、AAVhu37、AAVrh64R1和Anc 80。

37.根据权利要求1-18中任一项所述的方法,其中所述DNA酶由包含嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)的细胞表达,并且其中将所述细胞施用至所述受试者。

38.根据权利要求37所述的方法,其中将CAR表达细胞或TCR表达细胞直接施用至肿瘤部位。

39.根据权利要求37或权利要求38所述的方法,其中CAR表达细胞或TCR表达细胞是单靶或多靶的。

40.根据权利要求37-39中任一项所述的方法,其中所述CAR包含能够特异性结合一种或更多种肿瘤抗原的抗原结合结构域。

41.根据权利要求4-40中任一项所述的方法,其中施用所述DNA酶有效降低与使用所述第二免疫调节剂相关的一种或更多种免疫相关不良事件的严重程度。

42.根据权利要求41所述的方法,其中所述免疫相关不良事件是细胞因子释放综合征(CRS)。

43.根据权利要求41所述的方法,其中所述一种或更多种免疫相关不良事件选自葡萄膜炎、Sjögren综合征、结膜炎、睑缘炎、巩膜外层炎、巩膜炎、视网膜炎、肺炎、胸膜炎、肉瘤样肉芽肿病、肝炎、胰腺炎、自身免疫性糖尿病、间质性肾炎、肾小球肾炎、急性肾脏损伤(AKI)、皮疹、瘙痒、白癜风、DRESS、银屑病、史-约综合征、关节痛、关节炎、肌炎、皮肌炎、贫血、中性粒细胞减少症、血小板减少症、血栓形成性微血管病、获得性血友病、血管炎、结肠炎、肠炎、胃炎、心肌炎、心包炎、垂体炎、甲状腺炎、肾上腺炎、脑炎、脑膜炎、多发性神经病、吉兰-巴雷综合征和亚急性炎性神经病。

44.根据权利要求1-43中任一项所述的方法,其中所述DNA酶的施用导致所述受试者中肿瘤微生物组的内含物和/或活性的改变。

45.根据权利要求44所述的方法,其中所述肿瘤微生物组包括一种或更多种选自以下的细菌分类群:酸杆菌门(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、衣原体门(Chlamydiae)、产金菌门(Chrysiogenetes)、蓝细菌(Cyanobacteria)、纤维杆菌门(Fibrobacteres)、厚壁菌门(Firmicutes)、梭杆菌门(Fusobacteria)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、黏胶球形菌门(Lentisphaerae)、变形菌门(Proteobacteria)、螺旋体门(Spirochaetes)、互养菌门(Synergistetes)、软壁菌门(Tenericutes)和疣微菌门(Verrucomicrobia)。

46.根据权利要求1-45中任一项所述的方法,其中所述DNA酶在细胞疗法之前、与细胞疗法一起或在细胞疗法之后施用。

47.根据权利要求46所述的方法,其中所述细胞疗法包括施用(i)包含嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)的细胞,和/或(ii)NK细胞,和/或(iii)CD8 T细胞。

48.根据权利要求1-47中任一项所述的方法,其中所述受试者是人类。

49.一种药物组合物,包含脱氧核糖核酸酶(DNA酶)、第二免疫调节剂和药学上可接受的载体或赋形剂。

50.根据权利要求49所述的药物组合物,其中所述第二免疫调节剂是免疫检查点调节剂。

51.根据权利要求50所述的药物组合物,其中所述免疫检查点调节剂是选自以下的免疫检查点分子的调节剂:PD-1、CD28、CTLA-4、CD137、CD40、CD134(OX-40)、ICOS、KIR、LAGS、CD27、TIM-3、BTLA、GITR、TCR、4-1BB、TIGIT、CD96、CD226、KIR2DL、VISTA、HLLA2、TLIA、DNAM-1、CEACAM1、CD155、IDO、TGF-β、IL-10、IL-2、IL-15、CSF-1、IL-6、腺苷A2A受体(A2AR)及其配体。

52.根据权利要求50或权利要求51所述的药物组合物,其中所述免疫检查点调节剂是

免疫检查点抑制剂。

53.根据权利要求52所述的药物组合物,其中所述免疫检查点抑制剂是特异性地结合CTLA-4、PD-1、OX-40、PD-L1或PD-L2的抗体。

54.根据权利要求52所述的药物组合物,其中所述免疫检查点抑制剂是特异性地结合CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、IDO、KIR、LAG 3、NOX2、TIM-3、VISTA或SIGLEC7的抗体。

55.根据权利要求52所述的药物组合物,其中所述免疫检查点抑制剂选自伊匹木单抗、曲美木单抗、纳武利尤单抗、帕博利珠单抗、匹地利珠单抗、MEDI0680、阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、度伐利尤单抗、西米普利单抗及其任何组合。

56.根据权利要求55所述的药物组合物,其中所述免疫检查点抑制剂是帕博利珠单抗。

57.根据权利要求49-56中任一项所述的药物组合物,其中所述DNA酶选自人类DNA酶I、人类DNA酶-1-样3(D1L3)、人类DNA酶-1-样2(D1L2)、人类DNA酶-1-样1(D1L1)、DNA酶X、DNA酶γ、DNA酶II、DNA酶IIα、DNA酶IIβ和胱天蛋白酶激活的DNA酶(CAD)。

58.根据权利要求49-56中任一项所述的药物组合物,其中所述DNA酶包含与人类DNA酶I酶具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

59.根据权利要求58所述的药物组合物,其中所述DNA酶包含与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

60.根据权利要求49-56中任一项所述的药物组合物,其中所述DNA酶包含与DNA酶1-样3(D1L3)酶的氨基酸21至305具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

61.根据权利要求60所述的药物组合物,其中所述DNA酶包含与SEQ ID NO:3的氨基酸21至305具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

62.根据权利要求49-56中任一项所述的药物组合物,其中所述DNA酶包含氨基酸序列SEQ ID NO:2。

63.根据权利要求49-62中任一项所述的药物组合物,其中所述DNA酶以DNA酶蛋白的形式存在于所述组合物中。

64.根据权利要求49-62中任一项所述的药物组合物,其中所述DNA酶以编码所述DNA酶的基因疗法载体的形式存在于所述组合物中。

65.根据权利要求64所述的药物组合物,其中所述基因疗法载体是重组腺相关病毒(rAAV)表达载体,包含(i)衣壳蛋白和(ii)核酸,所述核酸包含可操作地连接到编码所述DNA酶的核苷酸序列的启动子。

66.根据权利要求65所述的药物组合物,其中所述启动子选自肝特异性启动子、神经系统特异性启动子、肠特异性启动子、肝特异性/神经系统特异性串联启动子和肝特异性/肠特异性串联启动子。

67.根据权利要求65所述的药物组合物,其中所述启动子对于肿瘤起源组织或转移靶组织是特异性的。

68.根据权利要求65-67中任一项所述的药物组合物,其中所述AAV选自血清型1(AAV1)、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh10、AAVLK03、AAVLK06、AAVLK12、AAV-KP1、AAV-F、AAVDJ、AAVhu37、AAVrh64R1和Anc 80。

69.根据权利要求49-62中任一项所述的药物组合物,其中所述DNA酶以表达所述DNA酶

并且还包含嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)的细胞的形式存在于所述组合物中。

70.根据权利要求69所述的药物组合物,其中CAR表达细胞或TCR表达细胞是单靶或多靶的。

71.根据权利要求69或权利要求70所述的药物组合物,其中所述CAR包含能够特异性结合一种或更多种肿瘤抗原的抗原结合结构域。

72.一种药物剂型,包含脱氧核糖核酸酶(DNA酶)和第二免疫调节剂。

73.根据权利要求72所述的药物剂型,其中所述第二免疫调节剂是免疫检查点调节剂。

74.根据权利要求73所述的药物剂型,其中所述免疫检查点调节剂是选自以下的免疫检查点分子的调节剂:PD-1、CD28、CTLA-4、CD137、CD40、CD134(OX-40)、ICOS、KIR、LAGS、CD27、TIM-3、BTLA、GITR、TCR、4-1BB、TIGIT、CD96、CD226、KIR2DL、VISTA、HLLA2、TLIA、DNAM-1、CEACAM1、CD155、IDO、TGF-β、IL-10、IL-2、IL-15、CSF-1、IL-6、腺苷A2A受体(A2AR)及其配体。

75.根据权利要求73或权利要求74所述的药物剂型,其中所述免疫检查点调节剂是免疫检查点抑制剂。

76.根据权利要求75所述的药物剂型,其中所述免疫检查点抑制剂是特异性地结合CTLA-4、PD-1、OX-40、PD-L1或PD-L2的抗体。

77.根据权利要求75所述的药物剂型,其中所述免疫检查点抑制剂是特异性地结合CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、IDO、KIR、LAG 3、NOX2、TIM-3、VISTA或SIGLEC7的抗体。

78.根据权利要求75所述的药物剂型,其中所述免疫检查点抑制剂选自伊匹木单抗、曲美木单抗、纳武利尤单抗、帕博利珠单抗、匹地利珠单抗、MEDI0680、阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、度伐利尤单抗、西米普利单抗及其任何组合。

79.根据权利要求78所述的药物剂型,其中所述免疫检查点抑制剂是帕博利珠单抗。

80.根据权利要求72-79中任一项所述的药物剂型,其中所述DNA酶选自人类DNA酶I、人类DNA酶-1-样3(D1L3)、人类DNA酶-1-样2(D1L2)、人类DNA酶-1-样1(D1L1)、DNA酶X、DNA酶γ、DNA酶II、DNA酶IIα、DNA酶IIβ和胱天蛋白酶激活的DNA酶(CAD)。

81.根据权利要求72-79中任一项所述的药物剂型,其中所述DNA酶包含与人类DNA酶I酶具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

82.根据权利要求81所述的药物剂型,其中所述DNA酶包含与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

83.根据权利要求72-79中任一项所述的药物剂型,其中所述DNA酶包含与DNA酶1-样3(D1L3)酶的氨基酸21至305具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

84.根据权利要求83所述的药物剂型,其中所述DNA酶包含与SEQ ID NO:3的氨基酸21至305具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

85.根据权利要求72-79中任一项所述的药物剂型,其中所述DNA酶包含氨基酸序列SEQ ID NO:2。

86.根据权利要求72-85中任一项所述的药物剂型,其中所述DNA酶以DNA酶蛋白的形式存在于所述剂型中。

87.根据权利要求72-85中任一项所述的药物剂型,其中所述DNA酶以编码所述DNA酶的

基因疗法载体的形式存在于所述剂型中。

88.根据权利要求87所述的药物剂型,其中所述基因疗法载体是重组腺相关病毒(rAAV)表达载体,包含(i)衣壳蛋白和(ii)核酸,所述核酸包含可操作地连接到编码所述DNA酶的核苷酸序列的启动子。

89.根据权利要求88所述的药物剂型,其中所述启动子选自肝特异性启动子、神经系统特异性启动子、肠特异性启动子、肝特异性/神经系统特异性串联启动子和肝特异性/肠特异性串联启动子。

90.根据权利要求88所述的药物剂型,其中所述启动子对于肿瘤起源组织或转移靶组织是特异性的。

91.根据权利要求88-90中任一项所述的药物剂型,其中所述AAV选自血清型1(AAV1)、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh10、AAVLK03、AAVLK06、AAVLK12、AAV-KP1、AAV-F、AAVDJ、AAVhu37、AAVrh64R1和Anc 80。

92.根据权利要求72-85中任一项所述的药物剂型,其中所述DNA酶以表达所述DNA酶并且还包含嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)的细胞的形式存在于所述剂型中。

93.根据权利要求92所述的药物剂型,其中CAR表达细胞或TCR表达细胞是单靶或多靶的。

94.根据权利要求92或权利要求93所述的药物剂型,其中所述CAR包含能够特异性结合一种或更多种肿瘤抗原的抗原结合结构域。

95.一种试剂盒,包括脱氧核糖核酸酶(DNA酶)、第二免疫调节剂和任选的使用说明。

96.根据权利要求95所述的试剂盒,其中所述第二免疫调节剂是免疫检查点调节剂。

97.根据权利要求96所述的试剂盒,其中所述免疫检查点调节剂是选自以下的免疫检查点分子的调节剂:PD-1、CD28、CTLA-4、CD137、CD40、CD134(OX-40)、ICOS、KIR、LAGS、CD27、TIM-3、BTLA、GITR、TCR、4-1BB、TIGIT、CD96、CD226、KIR2DL、VISTA、HLLA2、TLIA、DNAM-1、CEACAM1、CD155、IDO、TGF-β、IL-10、IL-2、IL-15、CSF-1、IL-6、腺苷A2A受体(A2AR)及其配体。

98.根据权利要求96或权利要求97所述的试剂盒,其中所述免疫检查点调节剂是免疫检查点抑制剂。

99.根据权利要求98所述的试剂盒,其中所述免疫检查点抑制剂是特异性地结合CTLA-4、PD-1、OX-40、PD-L1或PD-L2的抗体。

100.根据权利要求98所述的试剂盒,其中所述免疫检查点抑制剂是特异性地结合CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、IDO、KIR、LAG 3、NOX2、TIM-3、VISTA或SIGLEC7的抗体。

101.根据权利要求98所述的试剂盒,其中所述免疫检查点抑制剂选自伊匹木单抗、曲美木单抗、纳武利尤单抗、帕博利珠单抗、匹地利珠单抗、MEDI0680、阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、度伐利尤单抗、西米普利单抗及其任何组合。

102.根据权利要求101所述的试剂盒,其中所述免疫检查点抑制剂是帕博利珠单抗。

103.根据权利要求95-102中任一项所述的试剂盒,其中所述DNA酶选自人类DNA酶I、人类DNA酶-1-样3(D1L3)、人类DNA酶-1-样2(D1L2)、人类DNA酶-1-样1(D1L1)、DNA酶X、DNA酶γ、DNA酶II、DNA酶IIα、DNA酶IIβ和胱天蛋白酶激活的DNA酶(CAD)。

104.根据权利要求95-102中任一项所述的试剂盒,其中所述DNA酶包含与人类DNA酶I酶具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

105.根据权利要求104所述的试剂盒,其中所述DNA酶包含与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

106.根据权利要求95-102中任一项所述的试剂盒,其中所述DNA酶包含与DNA酶1-样3(D1L3)酶的氨基酸21至305具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

107.根据权利要求106所述的试剂盒,其中所述DNA酶包含与SEQ ID NO:3的氨基酸21至305具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

108.根据权利要求95-102中任一项所述的试剂盒,其中所述DNA酶包含氨基酸序列SEQ ID NO:2。

109.根据权利要求95-108中任一项所述的试剂盒,其中所述DNA酶以DNA酶蛋白的形式存在于所述试剂盒中。

110.根据权利要求95-108中任一项所述的试剂盒,其中所述DNA酶以编码所述DNA酶的基因疗法载体的形式存在于所述试剂盒中。

111.根据权利要求110所述的试剂盒,其中所述基因疗法载体是重组腺相关病毒(rAAV)表达载体,包含(i)衣壳蛋白和(ii)核酸,所述核酸包含可操作地连接到编码所述DNA酶的核苷酸序列的启动子。

112.根据权利要求111所述的试剂盒,其中所述启动子选自肝特异性启动子、神经系统特异性启动子、肠特异性启动子、肝特异性/神经系统特异性串联启动子和肝特异性/肠特异性串联启动子。

113.根据权利要求111所述的试剂盒,其中所述启动子对于肿瘤起源组织或转移靶组织是特异性的。

114.根据权利要求111-113中任一项所述的试剂盒,其中所述AAV选自血清型1(AAV1)、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh10、AAVLK03、AAVLK06、AAVLK12、AAV-KP1、AAV-F、AAVDJ、AAVhu37、AAVrh64R1和Anc 80。

115.根据权利要求95-108中任一项所述的试剂盒,其中所述DNA酶以表达所述DNA酶并且还包含嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)的细胞的形式存在于所述试剂盒中。

116.根据权利要求115所述的试剂盒,其中CAR表达细胞或TCR表达细胞是单靶或多靶的。

117.根据权利要求115或权利要求116所述的试剂盒,其中所述CAR包含能够特异性结合一种或更多种肿瘤抗原的抗原结合结构域。

肿瘤微环境的免疫调节

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2021年5月21日提交的美国临时申请第63/191,551号的优先权,该美国临时申请的公开内容通过引用以其整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包括序列表,所述序列表已经以ASCII格式电子提交并且特此通过引用以其整体并入。于2022年5月19日创建的所述ASCII副本被命名为252732_000038_SL.txt并且大小为14,097字节。

发明领域

[0005] 本发明涉及利用脱氧核糖核酸酶(DNA酶)在患有不同癌症的患者中免疫调节免疫抑制性肿瘤细胞微环境和预防肿瘤微生物组效应的新方法。

[0006] 发明背景

[0007] 与健康个体相比,患有恶性肿瘤的患者在其血浆和血清中具有循环无细胞DNA(cfDNA)的升高的水平(Fleischhacker,2007)。在癌症患者中,循环cfDNA来源于垂死的非肿瘤细胞、肿瘤细胞和中性粒细胞。肿瘤使中性粒细胞倾向于释放细胞外DNA陷阱(NET),这促进癌症患者中的促血栓形成状态建立、恶病质和器官衰竭(Demmers,2012)。肿瘤来源的cfDNA可以促进转移和化疗耐药的发展(García-Olmo,2013)。循环cfDNA的量随着肿瘤进展而增加(Sawyers,2008),在患有晚期疾病和转移性疾病的患者中达到最大水平(Butt,2008)。已经表明,较高量的循环cfDNA与较差的患者存活率显著相关(Schwarzenbach,2008)。

[0008] 本发明人先前已经证明,将高剂量的DNA酶蛋白全身施用到患者的循环中可用于治疗与血液中cfDNA的水平升高相关的许多疾病和状况,包括癌症(例如,上皮癌(carcinoma)、肉瘤、淋巴瘤、黑色素瘤;参见例如美国专利第7,612,032号;第8,710,012号;第9,248,166号),体细胞嵌合的发展(参见例如美国专利申请公布第US20170056482号),以及与化疗或放疗相关的副作用(参见例如美国专利申请公布第US20170100463号)。所有这些专利和申请通过引用以其整体并入本文。其他人之后证明了类似的效果。(Wen,2013;Cederval,2015;Tohme,2016;Patutina,2011;Li,2015)。

[0009] 免疫检查点抑制剂(ICI)目前被批准用于许多癌症。然而,报告的单一疗法的客观响应率在28%-52%之间的范围内(Darvin等人,2018)。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明解决了本领域对于新的且更有效的癌症治疗的巨大需求,特别是那些不能用免疫检查点调节剂单一疗法有效治疗的癌症。

[0012] 在一个方面中,本发明提供了一种在具有癌症的受试者中免疫调节免疫抑制性肿瘤细胞微环境的方法,该方法包括向受试者施用有效量的脱氧核糖核酸酶(DNA酶)。在一些实施方案中,免疫调节包括免疫抑制性肿瘤细胞微环境内的细胞毒性CD8 T细胞和/或NK细胞和/或CAR-T细胞对肿瘤细胞的杀伤增加。

[0013] 在另一个方面中,本发明提供了一种在具有癌症的受试者中调节肿瘤相关微生物组的方法,该方法包括向受试者施用有效量的脱氧核糖核酸酶(DNA酶)。

[0014] 在另外的方面中,本发明提供了一种治疗有相应需要的受试者的癌症的方法,该方法包括向受试者施用有效量的脱氧核糖核酸酶(DNA酶)和第二免疫调节剂。

[0015] 在任何上述方法的一些实施方案中,施用DNA酶有效减少免疫抑制性肿瘤细胞微环境中肿瘤相关巨噬细胞(TAM)和/或肿瘤浸润性中性粒细胞(TIN)的数量和/或活性。

[0016] 在涉及施用第二免疫调节剂的上述方法的一些实施方案中,第二免疫调节剂是免疫检查点调节剂。在一些实施方案中,免疫检查点调节剂是选自以下的免疫检查点分子的调节剂:PD-1、CD28、CTLA-4、CD137、CD40、CD134(OX-40)、ICOS、KIR、LAGS、CD27、TIM-3、BTLA、GITR、TCR、4-1BB、TIGIT、CD96、CD226、KIR2DL、VISTA、HLLA2、TLIA、DNAM-1、CEACAM1、CD155、IDO、TGF-β、IL-10、IL-2、IL-15、CSF-1、IL-6、腺苷A2A受体(A2AR)及其配体。在一些实施方案中,免疫检查点调节剂是免疫检查点抑制剂。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是特异性地结合CTLA-4、PD-1、OX-40、PD-L1或PD-L2的抗体。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是特异性地结合CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、IDO、KIR、LAG 3、NOX2、TIM-3、VISTA或SIGLEC7的抗体。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂选自伊匹木单抗(ipilimumab)、曲美木单抗(tremelimumab)、纳武利尤单抗(nivolumab)、帕博利珠单抗(pembrolizumab)、匹地利珠单抗(pidilizumab)、MEDI0680、阿替利珠单抗(atezolizumab)、阿维鲁单抗(avelumab)、度伐利尤单抗(durvalumab)、西米普利单抗(cemiplimab)及其任何组合。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是帕博利珠单抗。

[0017] 在本发明的任何上述方法的一些实施方案中,DNA酶选自人类DNA酶I、人类DNA酶-1-样3(D1L3)、人类DNA酶-1-样2(D1L2)、人类DNA酶-1-样1(D1L1)、DNA酶X、DNA酶γ、DNA酶II、DNA酶IIα、DNA酶IIβ和胱天蛋白酶激活的DNA酶(CAD)。在一些实施方案中,DNA酶包含与人类DNA酶I酶具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,DNA酶包含与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,DNA酶包含与DNA酶1-样3(D1L3)酶的氨基酸21至305具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,DNA酶包含与SEQ ID NO:3的氨基酸21至305具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,DNA酶包含氨基酸序列SEQ ID NO:2。

[0018] 在本发明的任何上述方法的一些实施方案中,DNA酶作为DNA酶蛋白施用。在一些实施方案中,静脉内施用DNA酶蛋白持续至少2天。在一些实施方案中,静脉内施用DNA酶蛋白持续至少7天。在一些实施方案中,静脉内施用DNA酶蛋白持续至少14天。在一些实施方案中,静脉内施用DNA酶蛋白持续至少16天。在一些实施方案中,DNA酶蛋白每2周或3周或4周静脉内施用1天至2天,其中治疗的总长度是2周至50年。在一些实施方案中,DNA酶蛋白每2周或3周或4周静脉内施用2天至5天,其中治疗的总长度是2周至50年。在一些实施方案中,DNA酶蛋白每2周或3周或4周静脉内施用7天至14天,其中治疗的总长度是2周至50年。在一些实施方案中,DNA酶蛋白以125μg/kg/天-250μg/kg/天施用。

[0019] 在涉及施用第二免疫调节剂的任何方法的一些实施方案中,在施用第二免疫调节剂之前120小时至1小时施用DNA酶蛋白。在一些实施方案中,在施用第二免疫调节剂之后30分钟至2小时施用DNA酶蛋白。在一些实施方案中,在施用第二免疫调节剂之后2小时至360小时施用DNA酶蛋白。

[0020] 在本发明的任何上述方法的一些实施方案中,DNA酶由基因疗法载体编码。在一些实施方案中,将所述基因疗法载体施用至受试者。在一些实施方案中,基因疗法载体是重组腺相关病毒(rAAV)表达载体,包含(i)衣壳蛋白和(ii)核酸,所述核酸包含可操作地连接到编码DNA酶的核苷酸序列的启动子。在一些实施方案中,启动子选自肝特异性启动子、神经系统特异性启动子、肠特异性启动子、肝特异性/神经系统特异性串联启动子和肝特异性/肠特异性串联启动子。在一些实施方案中,启动子对于肿瘤起源组织或转移靶组织是特异性的。在一些实施方案中,AAV选自血清型1(AAV1)、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh10、AAVLK03、AAVLK06、AAVLK12、AAV-KP1、AAV-F、AAVDJ、AAVhu37、AAVrh64R1和Anc 80。

[0021] 在本发明的任何上述方法的一些实施方案中,DNA酶由包含嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)的细胞表达,并且其中所述细胞被施用至受试者。在一些实施方案中,将CAR表达细胞或TCR表达细胞直接施用至肿瘤部位。在一些实施方案中,CAR表达细胞或TCR表达细胞是单靶或多靶的。在一些实施方案中,CAR包含能够特异性结合一种或更多种肿瘤抗原的抗原结合结构域。

[0022] 在涉及使用第二免疫调节剂的本发明的任何上述方法的一些实施方案中,施用DNA酶有效降低与使用所述第二免疫调节剂相关的一种或更多种免疫相关不良事件的严重程度。在一些实施方案中,这样的免疫相关不良事件是细胞因子释放综合征(CRS)。在一些实施方案中,一种或更多种免疫相关不良事件选自葡萄膜炎、Sjögren综合征、结膜炎、睑缘炎、巩膜外层炎、巩膜炎、视网膜炎、肺炎、胸膜炎、肉瘤样肉芽肿病、肝炎、胰腺炎、自身免疫性糖尿病、间质性肾炎、肾小球肾炎、急性肾脏损伤(AKI)、皮疹、瘙痒、白癜风、DRESS、银屑病、史-约综合征(Stevens-Johnson syndrome)、关节痛、关节炎、肌炎、皮肌炎、贫血、中性粒细胞减少症、血小板减少症、血栓形成性微血管病、获得性血友病、血管炎、结肠炎、肠炎、胃炎、心肌炎、心包炎、垂体炎、甲状腺炎、肾上腺炎、脑炎、脑膜炎、多发性神经病、吉兰-巴雷综合征(Guillain-Barrésyndrome)和亚急性炎性神经病。

[0023] 在本发明的任何上述方法的一些实施方案中,DNA酶的施用导致受试者中肿瘤微生物组的内含物(content)和/或活性的改变。在一些实施方案中,肿瘤微生物组包括一种或更多种选自以下的细菌分类群:酸杆菌门(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、衣原体门(Chlamydiae)、产金菌门(Chrysiogenetes)、蓝细菌(Cyanobacteria)、纤维杆菌门(Fibrobacteres)、厚壁菌门(Firmicutes)、梭杆菌门(Fusobacteria)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、黏胶球形菌门(Lentisphaerae)、变形菌门(Proteobacteria)、螺旋体门(Spirochaetes)、互养菌门(Synergistetes)、软壁菌门(Tenericutes)和疣微菌门(Verrucomicrobia)。

[0024] 在本发明的任何上述方法的一些实施方案中,DNA酶在细胞疗法之前、与细胞疗法一起或在细胞疗法之后施用。在一些实施方案中,细胞疗法包括施用(i)包含嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)的细胞,和/或(ii)NK细胞,和/或(iii)CD8 T细胞。

[0025] 在本发明的任何上述方法的一些实施方案中,受试者是人类。

[0026] 在另一个方面中,本发明提供了一种药物组合物,该药物组合物包含脱氧核糖核酸酶(DNA酶)、第二免疫调节剂和药学上可接受的载体或赋形剂。

[0027] 在相关方面中,本发明提供了一种药物剂型,该药物剂型包含脱氧核糖核酸酶

(DNA酶)和第二免疫调节剂。

[0028] 在另外的方面中,本发明提供了一种试剂盒,该试剂盒包括脱氧核糖核酸酶(DNA酶)、第二免疫调节剂和任选的使用说明。

[0029] 在任何上述药物组合物、剂型和试剂盒的一些实施方案中,第二免疫调节剂是免疫检查点调节剂。在一些实施方案中,免疫检查点调节剂是选自以下的免疫检查点分子的调节剂:PD-1、CD28、CTLA-4、CD137、CD40、CD134(OX-40)、ICOS、KIR、LAGS、CD27、TIM-3、BTLA、GITR、TCR、4-1BB、TIGIT、CD96、CD226、KIR2DL、VISTA、HLLA2、TLIA、DNAM-1、CEACAM1、CD155、IDO、TGF-β、IL-10、IL-2、IL-15、CSF-1、IL-6、腺苷A2A受体(A2AR)及其配体。在一些实施方案中,免疫检查点调节剂是免疫检查点抑制剂。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是特异性地结合CTLA-4、PD-1、OX-40、PD-L1或PD-L2的抗体。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是特异性地结合CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、IDO、KIR、LAG 3、NOX2、TIM-3、VISTA或SIGLEC7的抗体。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂选自伊匹木单抗、曲美木单抗、纳武利尤单抗、帕博利珠单抗、匹地利珠单抗、MEDI0680、阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、度伐利尤单抗、西米普利单抗及其任何组合。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是帕博利珠单抗。

[0030] 在任何上述药物组合物、剂型和试剂盒的一些实施方案中,DNA酶选自人类DNA酶I、人类DNA酶-1-样3(D1L3)、人类DNA酶-1-样2(D1L2)、人类DNA酶-1-样1(D1L1)、DNA酶X、DNA酶γ、DNA酶II、DNA酶IIα、DNA酶IIβ和胱天蛋白酶激活的DNA酶(CAD)。在一些实施方案中,DNA酶包含与人类DNA酶I酶具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,DNA酶包含与SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,DNA酶包含与DNA酶1-样3(D1L3)酶的氨基酸21至305具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,DNA酶包含与SEQ ID NO:3的氨基酸21至305具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,DNA酶包含氨基酸序列SEQ ID NO:2。

[0031] 在任何上述药物组合物、剂型和试剂盒的一些实施方案中,DNA酶以DNA酶蛋白的形式存在。

[0032] 在任何上述药物组合物、剂型和试剂盒的一些实施方案中,DNA酶以编码所述DNA酶的基因疗法载体的形式存在。在一些实施方案中,基因疗法载体是重组腺相关病毒(rAAV)表达载体,包含(i)衣壳蛋白和(ii)核酸,所述核酸包含可操作地连接到编码DNA酶的核苷酸序列的启动子。在一些实施方案中,启动子选自肝特异性启动子、神经系统特异性启动子、肠特异性启动子、肝特异性/神经系统特异性串联启动子和肝特异性/肠特异性串联启动子。在一些实施方案中,启动子对于肿瘤起源组织或转移靶组织是特异性的。在一些实施方案中,AAV选自血清型1(AAV1)、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh10、AAVLK03、AAVLK06、AAVLK12、AAV-KP1、AAV-F、AAVDJ、AAVhu37、AAVrh64R1和Anc 80。

[0033] 在任何上述药物组合物、剂型和试剂盒的一些实施方案中,DNA酶以表达所述DNA酶并且还包含嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)的细胞的形式存在。在一些实施方案中,CAR表达细胞或TCR表达细胞是单靶或多靶的。在一些实施方案中,CAR包含能够特异性结合一种或更多种肿瘤抗原的抗原结合结构域。

[0034] 通过以下描述、权利要求和附图,本文描述的这些和其他方面对于本领域普通技

术人员来说将是明显的。

[0035] 附图简述

[0036] 图1DNA酶对乳腺腺癌(MA)、结肠直肠癌(CRC)、肺癌(LC)、胰腺腺癌(PDAC)的模型的(A)TAM和(B)TIN的作用。在每个实验中,TAM和TIN的量被归一化为与PBS组(对照,在肿瘤中设置为100％ CD45)中的平均TAM和TIN相比的百分比。

[0037] 图2DNA酶施用的不同的治疗方案对(A)TAM和(B)TIN的作用。在每个实验中,TAM和TIN的量被归一化为与PBS组(对照,在肿瘤中设置为100％ CD45)中的平均TAM和TIN相比的百分比。

[0038] 图3在肿瘤植入后的不同时间段,DNA酶施用对(A)TAM和(B)TIN的作用。在每个实验中,TAM和TIN的量被归一化为与PBS组(对照,在肿瘤中设置为100％ CD45)中的平均TAM和TIN相比的百分比。

[0039] 图4在肿瘤植入后的不同时间段,DNA酶施用与检查点抑制剂组合对TAM的作用。在每个实验中,TAM的量被归一化为与PBS组(对照,在肿瘤中设置为100％ CD45)中的平均TAM相比的百分比。

[0040] 图5DNA酶在调节肿瘤微生物组的促肿瘤生成作用中的作用。在每个实验中,肿瘤尺寸被归一化为与组1(对照,设置为100％)中的平均尺寸相比的百分比。

[0041] 图6DNA酶防止肿瘤微环境对检查点抑制剂活性的抑制。在每个实验中,肿瘤尺寸被归一化为与组1(对照,设置为100％)中的平均尺寸相比的百分比。

[0042] 图7DNA酶防止与检查点抑制剂治疗相关的毒性。图示出了向携带AT3肿瘤的C57BL/6小鼠施用测试项目之后的体重。数据点代表组平均体重。误差棒代表平均值的标准误差(SEM)。施用抗CTLA4抗体和具核梭杆菌(F.nucleatum)阻止了经治疗的动物的体重增长。CTLA4抗体和具核梭杆菌的组合导致强烈的体重损失。DNA酶I治疗防止抗CTLA4和/或具核梭杆菌诱导的毒性并且挽救体重增加。

[0043] 发明详述

[0044] 本发明基于发明人的假设,即靶向中性粒细胞细胞外陷阱(NET),一种由中性粒细胞排出到肿瘤微环境中的DNA和蛋白质的细胞外网络,可以改善对免疫检查点疗法的响应率。具体地,本发明人决定将免疫检查点疗法与DNA酶(一种NET耗尽剂)的治疗相结合。

[0045] 定义

[0046] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0047] 除非上下文另外明确规定,否则单数形式“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”包括复数指代物。因此,例如,提及“一种(a)方法”包括一种或更多种方法、和/或本文描述的类型的步骤,和/或其对本领域技术人员而言在阅读本公开内容后将变得明显。

[0048] 术语“约(about)”或“约(approximately)”包括在统计上有意义的值的范围内。这样的范围可以在给定值或范围的一定数量级内,优选地在50％内,更优选地在20％内,还更优选地在10％内,并且甚至更优选地在5％内。术语“约(about)”或“约(approximately)”所涵盖的允许的变化取决于所研究的特定系统,并且可以被本领域普通技术人员容易地理解。

[0049] 术语“免疫抑制性肿瘤细胞微环境”指的是肿瘤组织内的非癌性驻留和浸润宿主

细胞、分泌的因子和细胞外基质蛋白,它们共同防止细胞毒性CD8 T细胞、NK细胞和/或CAR-T细胞杀死肿瘤细胞。

[0050] 术语“肿瘤相关微生物组”指的是位于肿瘤内的微生物、其亚细胞部分及其代谢物。

[0051] 术语“细胞外DNA”、“无细胞DNA”和“cfDNA”可互换地使用,以指细胞外DNA(例如,真核、病毒、古细菌、原核的细胞内或细胞外寄生虫来源的DNA),包括在任何体液和组织中发现的细胞外囊泡(例如,外来体和微囊泡)中的DNA。cfDNA可以在血液、淋巴、肝、神经组织、脑脊液(CSF)和/或肠中发现,包括在这些体液和组织中发现的细胞外囊泡(例如,外来体和微囊泡)中的DNA。

[0052] 术语状态、紊乱或状况的“治疗(treat)”或“治疗(treatment)”包括:(1)预防、延迟或减少状态、紊乱或状况的至少一种临床或亚临床症状在可能罹患或易患该状态、紊乱或状况但尚未经历或表现出该状态、紊乱或状况的临床或亚临床症状的受试者中发展的发生率和/或出现的可能性;或(2)抑制该状态、紊乱或状况,即,阻止、减少或延迟疾病或其复发症或其至少一种临床或亚临床症状的发展;或(3)缓解疾病,即引起该状态、紊乱或状况或其临床或亚临床症状中的至少一种的消退。对待治疗的受试者的益处为在统计学上显著的或至少对患者或对医师为可感知的。

[0053] 术语“个体”、“受试者”、“动物”、“患者”和“哺乳动物”可互换地使用,以指哺乳动物,包括人类、兽医动物(例如,猫、狗、牛、马、绵羊、猪等)和疾病的实验动物模型(例如,小鼠、大鼠)。

[0054] 适用于剂量或量的术语“有效”指的是在施用至有相应需要的受试者后足以产生期望的活性的化合物或药物组合物的量。注意,当施用活性成分的组合时,组合的有效量可以包括或可以不包括如果单独施用时将有效的每一种成分的量。所需的确切量将取决于物种、受试者的年龄和一般状况、被治疗的状况的严重程度、所使用的一种或更多种特定药物、施用的模式等等,在受试者之间变化。

[0055] 如本文使用的,适用于剂量或量的术语“治疗有效”指的是在施用至有相应需要的受试者后足以产生期望的活性的化合物或药物组合物的量。注意,当施用活性成分的组合(例如,DNA酶和另一种化合物的组合)时,组合的有效量可以包括或可以不包括如果单独施用时将有效的每一种成分的量。

[0056] 如本文使用的,术语“启动子”指的是核酸片段,该核酸片段的功能是控制一个或更多个编码序列的转录,并且位于编码序列的转录起始位点的转录方向的上游,并且通过DNA依赖性RNA聚合酶的结合位点、转录起始位点和任何其他DNA序列的存在被结构上鉴定,所述任何其他DNA序列包括但不限于转录因子结合位点、阻遏蛋白和激活蛋白结合位点,以及本领域技术人员已知的直接或间接地用于调节启动子转录量的任何其他核苷酸序列。“组织特异性”启动子可以优先地在特定类型的组织或细胞中具有活性。

[0057] 如本文使用的术语“肝特异性表达”指的是主要的或排他性的在肝中的表达,即比在其他组织和器官中大得多的程度的表达。

[0058] 术语“肝特异性启动子”在本文中用于指这样的启动子:主要地或排他性地在肝细胞(liver cell)(例如,肝实质细胞(hepatocyte))中具有活性,并且在肝中指导/启动比在其他组织和器官中大得多的程度的转录。在这种情况下,术语“主要地”意味着至少50%的

所述启动子驱动的表达,更典型地至少90％的所述启动子驱动的表达(诸如100％的所述启动子驱动的表达)发生在肝细胞中。肝表达与非肝表达的比率在不同的肝特异性启动子之间可以不同。在一些实施方案中,肝特异性启动子可以优先指导/启动特定肝细胞类型(例如,肝实质细胞、库普弗细胞(Kupffer cell)、内皮细胞等)中的转录。在本发明的表达盒中有用的一些肝特异性启动子包括至少一个,通常是若干个肝核因子结合位点。在本发明的表达盒中有用的肝特异性启动子可以是组成型或诱导型启动子。在本发明的表达盒中有用的肝启动子的一些非限制性实例包括:白蛋白启动子(Alb)、人类α-1抗胰蛋白酶(hAAT)启动子、甲状腺素结合球蛋白(TBG)、载脂蛋白E肝控制区启动子、载脂蛋白A-II(APOA2)启动子、丝氨酸蛋白酶抑制剂肽酶抑制剂分支A成员1(SERPINA1)(hAAT)启动子、细胞色素P450家族3亚家族A多肽4(CYP3A4)启动子、微RNA122(miR-122)启动子、肝特异性IGF-II启动子P1、鼠甲状腺素转运蛋白(MTTR)启动子、甲胎蛋白(AFP)启动子、卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)启动子、载脂蛋白H(ApoH)启动子和小鼠前白蛋白基因启动子。

[0059] 肝特异性启动子的非限制性实例包括例如白蛋白启动子(Alb)、人类α-1抗胰蛋白酶(hAAT)启动子、甲状腺素结合球蛋白(TBG)启动子、载脂蛋白E肝控制区启动子、载脂蛋白A-II(APOA2)启动子、丝氨酸蛋白酶抑制剂肽酶抑制剂分支A成员1(SERPINA1)(hAAT)启动子、细胞色素P450家族3亚家族A多肽4(CYP3A4)启动子、微RNA122(miR-122)启动子、肝特异性IGF-II启动子P1、鼠甲状腺素转运蛋白(MTTR)启动子、甲胎蛋白(AFP)启动子、甲状腺激素结合球蛋白启动子、醇脱氢酶启动子、因子VIII(FVIII)启动子、HBV基本核心启动子(BCP)和PreS2启动子、磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(PEPCK)启动子、肝控制区(HCR)-ApoCII杂合启动子、与小鼠白蛋白基因增强子(Ealb)元件组合的AAT启动子、低密度脂蛋白启动子、丙酮酸激酶启动子、磷酸烯醇丙酮酸羧激酶启动子、卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)启动子、载脂蛋白H(ApoH)启动子、转铁蛋白启动子、甲状腺素转运蛋白启动子、α-纤维蛋白原和β-纤维蛋白原启动子、α1-抗胰凝乳蛋白酶启动子、α2-HS糖蛋白启动子、触珠蛋白启动子、铜蓝蛋白启动子、纤溶酶原启动子、补体蛋白(例如,C1q、C1r、C2、C3、C4、C5、C6、C8、C9、补体因子I和因子H)启动子、C3补体激活子和[α]1-酸性糖蛋白启动子。另外的组织特异性启动子可见于组织特异性启动子数据库(Tissue-Specific Promoter Database,TiProD)(Nucleic Acids Research,J4:D104-D107(2006))。

[0060] 术语“神经系统特异性启动子”在本文中用于指这样的启动子:主要地或排他性地在神经系统细胞中具有活性,并且在神经系统(例如,中枢神经系统(CNS),包括脑和/或肠神经系统(ENS))中指导/启动比在其他组织和器官中大得多的程度的转录。在这种情况下,术语“主要地”意味着至少50％的所述启动子驱动的表达,更典型地至少90％的所述启动子驱动的表达(诸如100％的所述启动子驱动的表达)发生在神经系统的细胞中。神经系统表达与非神经系统表达的比率在不同的神经系统特异性启动子之间可以不同。在一些实施方案中,神经系统特异性启动子可以优先指导/启动特定的CNS和/或ENS细胞类型(例如,神经元、神经胶质细胞[例如,少突胶质细胞、星形胶质细胞、室管膜细胞、小胶质细胞、施万细胞(Schwann cell)、卫星细胞]、肠神经元、内在初级传入神经元、中间神经元、运动神经元等)中的转录。在本发明的表达盒中有用的神经系统特异性启动子可以是组成型或诱导型启动子。在本发明的表达盒中有用的神经系统启动子的一些非限制性实例包括小胶质细胞特异性启动子(例如,F4/80、CD68、TMEM119、CX3CR1、CMV和Iba1启动子)、髓细胞特异性启动子

(例如,TTR、CD11b和c-fes启动子)、神经元特异性启动子(例如,CMV、NSE、突触蛋白[SynI,SynII]、CamKII、α-CaMKII和VGLUT1启动子)以及其他神经细胞和神经胶质细胞(例如,少突胶质细胞、星形胶质细胞)类型特异性启动子(例如,神经胶质纤维酸性蛋白[GFAP]启动子)。

[0061] 术语"肠特异性启动子"在本文中用于指这样的启动子:主要地或排他性地在肠细胞中具有活性,并且在肠中指导/启动比在其他组织和器官中大得多的程度的转录。在这种情况下,术语"主要地"意味着至少50%的所述启动子驱动的表达,更典型地至少90%的所述启动子驱动的表达(诸如100%的所述启动子驱动的表达)发生在肠细胞中。肠表达与非肠表达的比率在不同的肠特异性启动子之间可以不同。在一些实施方案中,肠特异性启动子可以优先指导/启动特定肠细胞类型(例如,肠细胞、杯状细胞、肠内分泌细胞等)中的转录。在本发明的表达盒中有用的肠特异性启动子可以是组成型或诱导型启动子。在本发明的表达盒中有用的肠启动子的一些非限制性实例包括CB/CMV、GFAP、miCMV、CMV+I、tetO-CMV、β-acti-CMV、MUC2、绒毛蛋白和$T3^b$启动子。

[0062] 在一些实施方案中,例如,当组织靶向通过病毒衣壳蛋白介导时,编码DNA酶的核酸可以可操作地连接至允许高效系统表达的启动子(例如,CMV启动子,鸡β-肌动蛋白启动子(CBA),或EF1a启动子)。

[0063] 如与本发明的组合物结合使用的措辞"药学上可接受的"指的是在生理上为可耐受的并且当被施用至受试者(例如,哺乳动物诸如人类)时通常不产生不良反应的这样的组合物的分子实体和其他成分。如本文使用的,术语"药学上可接受的"意指联邦或州政府的管理机构所批准的或在美国药典或其他一般公认的药典中列出的用于哺乳动物并且更特别地用于人类。

[0064] 如本文使用的,术语"病毒载体"和"病毒构建体"指的是包含一个或更多个异源核苷酸序列(例如,编码DNA酶的核苷酸序列)的重组病毒构建体。在一些实施方案中,病毒载体是复制缺陷型的。在一些实施方案中,病毒结构编码序列和非结构编码序列不存在于病毒载体中,并且在病毒载体产生期间由载体诸如质粒反式提供,或者通过将序列稳定地整合到包装细胞系中来提供。取决于病毒,病毒载体可以被包装在衣壳(例如,AAV载体)和/或脂质包膜(例如,慢病毒载体)内。

[0065] 根据本发明,可以采用本领域技术范围内的常规药理学和分子生物学技术。这样的技术在文献中被充分地解释。参见,例如,Sambrook,Fritsch&Maniatis,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版(1989)Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York(本文中称为"Sambrook等人,1989");DNA Cloning:A Practical Approach,第I卷和第II卷(D.N.Glover编辑,1985);Oligonucleotide Synthesis(MJ.Gait编辑,1984);Nucleic Acid Hybridization(B.D.Hames和S.J.Higgins编辑(1985));Transcription and Translation(B.D.Hames和S.J.Higgins编辑(1984));Animal Cell Culture(R.I.Freshney编辑(1986);Immobilized Cells and Enzymes(IRL Press,(1986));B.Perbal,A Practical Guide To Molecular Cloning(1984);F.M.Ausubel等人(编辑),Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,Inc.(1994);以及其他。

[0066] 本发明的方法

[0067] 在一个方面中,本发明提供了一种在有相应需要的受试者中免疫调节肿瘤微环境和/或预防肿瘤微生物组效应的方法,该方法包括向受试者施用脱氧核糖核酸酶(DNA酶)。在另一个方面中,本发明提供了一种经由免疫调节肿瘤微环境和预防肿瘤微生物组效应来降低不良事件的强度的方法,所述不良事件包括免疫检查点调节剂疗法的免疫相关不良事件。

[0068] 在一个方面中,本发明提供了一种在具有癌症的受试者中免疫调节免疫抑制性肿瘤细胞微环境的方法,该方法包括向受试者施用有效量的DNA酶。

[0069] 在另一个方面中,本发明提供了一种在具有癌症的受试者中调节肿瘤相关微生物组的方法,该方法包括向受试者施用有效量的DNA酶。

[0070] 在另外的方面中,本发明提供了一种治疗有相应需要的受试者的癌症的方法,该方法包括向受试者施用有效量的DNA酶和第二免疫调节剂。在一些实施方案中,第二免疫调节剂是免疫检查点调节剂。在一些实施方案中,免疫检查点调节剂是选自以下的免疫检查点分子的调节剂:PD-1、CD28、CTLA-4、CD137、CD40、CD134(OX-40)、ICOS、KIR、LAGS、CD27、TIM-3、BTLA、GITR、TCR、4-1BB、TIGIT、CD96、CD226、KIR2DL、VISTA、HLLA2、TLIA、DNAM-1、CEACAM1、CD155、IDO、TGF-β、IL-10、IL-2、IL-15、CSF-1、IL-6、腺苷A2A受体(A2AR)及其配体。在一些实施方案中,免疫检查点调节剂是免疫检查点抑制剂。有用的免疫检查点抑制剂的非限制性实例包括例如特异性地结合CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、OX-40、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、IDO、KIR、LAG 3、NOX2、TIM-3、VISTA或SIGLEC7的抗体。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂选自伊匹木单抗、曲美木单抗、纳武利尤单抗、帕博利珠单抗、匹地利珠单抗、MEDI0680、阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、度伐利尤单抗、西米普利单抗及其任何组合。在一些实施方案中,施用DNA酶有效降低与使用第二免疫调节剂相关的一种或更多种免疫相关不良事件的严重程度。在一些实施方案中,免疫相关不良事件是细胞因子释放综合征(CRS)。免疫相关不良事件的其他非限制性实例包括,例如,葡萄膜炎、Sjögren综合征、结膜炎、睑缘炎、巩膜外层炎、巩膜炎、视网膜炎、肺炎、胸膜炎、肉瘤样肉芽肿病、肝炎、胰腺炎、自身免疫性糖尿病、间质性肾炎、肾小球肾炎、急性肾脏损伤(AKI)、皮疹、瘙痒、白癜风、DRESS、银屑病、史-约综合征、关节痛、关节炎、肌炎、皮肌炎、贫血、中性粒细胞减少症、血小板减少症、血栓形成性微血管病、获得性血友病、血管炎、结肠炎、肠炎、胃炎、心肌炎、心包炎、垂体炎、甲状腺炎、肾上腺炎、脑炎、脑膜炎、多发性神经病、吉兰-巴雷综合征和亚急性炎性神经病。

[0071] 在本发明的任何方法的一些实施方案中,DNA酶的施用导致受试者中肿瘤微生物组的内含物和/或活性的改变。在一些实施方案中,肿瘤微生物组包括一种或更多种选自以下的细菌分类群:酸杆菌门(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、衣原体门(Chlamydiae)、产金菌门(Chrysiogenetes)、蓝细菌(Cyanobacteria)、纤维杆菌门(Fibrobacteres)、厚壁菌门(Firmicutes)、梭杆菌门(Fusobacteria)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、黏胶球形菌门(Lentisphaerae)、变形菌门(Proteobacteria)、螺旋体门(Spirochaetes)、互养菌门(Synergistetes)、软壁菌门(Tenericutes)和疣微菌门(Verrucomicrobia)。

[0072] 在一个方面中,本发明提供了一种在有相应需要的受试者中免疫调节肿瘤微环境和预防肿瘤微生物组效应的方法,其中所述肿瘤微生物组由细菌、真菌、病毒代表。

[0073] 在一个方面中,本发明提供了一种经由免疫调节肿瘤微环境和预防肿瘤微生物组效应来降低不良事件的强度的方法,所述不良事件包括免疫检查点调节剂疗法的免疫相关不良事件。

[0074] 在一个方面中,本发明提供了一种在有相应需要的受试者中免疫调节肿瘤微环境和预防肿瘤微生物组效应的方法,其中肿瘤微生物组的细菌来自酸杆菌门(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、衣原体门(Chlamydiae)、产金菌门(Chrysiogenetes)、蓝细菌(Cyanobacteria)、纤维杆菌门(Fibrobacteres)、厚壁菌门(Firmicutes)、梭杆菌门(Fusobacteria)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、黏胶球形菌门(Lentisphaerae)、变形菌门(Proteobacteria)、螺旋体门(Spirochaetes)、互养菌门(Synergistetes)、软壁菌门(Tenericutes)和/或疣微菌门(Verrucomicrobia)。

[0075] 在一个方面中,本发明提供了一种在有相应需要的受试者中免疫调节肿瘤微环境和预防肿瘤微生物组效应的方法,其中肿瘤微生物组的细菌代表梭杆菌目(Fusobacteriales)、肠杆菌目(Enterobacterales)和/或芽孢杆菌目(Bacillales)。

[0076] 在任何上述方法的一些实施方案中,施用DNA酶有效减少免疫抑制性肿瘤细胞微环境中肿瘤相关巨噬细胞(TAM)和/或肿瘤浸润性中性粒细胞(TIN)的数量和/或活性。

[0077] 在任何上述方法的一些实施方案中,DNA酶选自DNA酶I、DNA酶X、DNA酶γ、DNA酶1L1、DNA酶1L2、DNA酶1L3、DNA酶II、DNA酶IIα、DNA酶IIβ、胱天蛋白酶激活的DNA酶(CAD)、内切核酸酶G(ENDOG)、颗粒酶B(GZMB)及其突变体或衍生物。

[0078] 在任何上述方法的一些实施方案中,DNA酶作为DNA酶蛋白施用。在一些实施方案中,DNA酶蛋白肠胃外施用。

[0079] 在任何上述方法的一些实施方案中,DNA酶是DNA酶I或其突变体或衍生物。

[0080] 在一些实施方案中,DNA酶I突变体包含肌动蛋白结合位点中的一种或更多种突变。在一些实施方案中,肌动蛋白结合位点中的一种或更多种突变选自Gln-9、Glu-13、Thr-14、His-44、Asp-53、Tyr-65、Val-66、Val-67、Glu-69、Asn-74、Ala-114处的突变及其任何组合。在一些实施方案中,肌动蛋白结合位点中的突变之一是Ala-114处的突变。在一些实施方案中,DNA酶I突变体包含一种或更多种增加DNA酶活性的突变。在一些实施方案中,增加DNA酶活性的一种或更多种突变选自由以下组成的组:Q9R、E13R、E13K、T14R、T14K、H44R、H44K、N74K、A114F及其任何组合。在一些实施方案中,增加DNA酶活性的一种或更多种突变选自由以下组成的组:Q9R、E13R、N74K和A114F及其任何组合。在一些实施方案中,DNA酶I突变体包含突变Q9R、E13R、N74K和A114F。在一些实施方案中,DNA酶I突变体包含一种或更多种选自由以下组成的组的突变:H44C、H44N、L45C、V48C、G49C、L52C、D53C、D53R、D53K、D53Y、D53A、N56C、D58S、D58T、Y65A、Y65E、Y65R、Y65C、V66N、V67E、V67K、V67C、E69R、E69C、A114C、A114R、H44N:T46S、D53R:Y65A、D53R:E69R、H44A:D53R:Y65A、H44A:Y65A:E69R、H64N:V66S、H64N:V66T、Y65N:V67S、Y65N:V67T、V66N:S68T、V67N:E69S、V67N:E69T、S68N:P70S、S68N:P70T、S94N:Y96S、S94N:Y96T及其任何组合。在一些实施方案中,DNA酶包含与人类DNA酶I酶具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,DNA酶包含与DNA酶1-样3(D1L3)酶(SEQ ID NO:3)的氨基酸21至305具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

[0081] 在使用DNA酶蛋白的任何上述方法的一些实施方案中,在输注免疫检查点调节剂

后,静脉内注射DNA酶蛋白持续至少14天。在一些实施方案中,在输注免疫检查点调节剂后,静脉内注射DNA酶蛋白持续至少16天。在一些实施方案中,在输注免疫检查点调节剂之前,与输注免疫检查点调节剂一起或在输注免疫检查点调节剂后,静脉内注射DNA酶蛋白持续至少2天。在一些实施方案中,在输注免疫检查点调节剂之前或在输注免疫检查点调节剂后,静脉内注射DNA酶蛋白持续至少1天。在一些实施方案中,在输注免疫检查点调节剂后,静脉内注射DNA酶蛋白持续至少7天。在一些实施方案中,在输注免疫检查点调节剂之前,静脉内注射DNA酶蛋白持续至少7天。在一些实施方案中,在输注免疫检查点调节剂之前或在输注免疫检查点调节剂后,每隔一天静脉内注射DNA酶蛋白持续至少2天。在一些实施方案中,在输注免疫检查点调节剂之前或在输注免疫检查点调节剂后,每隔一天静脉内注射DNA酶蛋白持续至少5天。在一些实施方案中,在输注免疫检查点调节剂之前或在输注免疫检查点调节剂后,每隔一天静脉内注射DNA酶蛋白持续至少7天。在一些实施方案中,在输注免疫检查点调节剂之前或在输注免疫检查点调节剂后,每隔一天静脉内注射DNA酶蛋白持续至少14天。在一些实施方案中,在输注免疫检查点调节剂之前或在输注免疫检查点调节剂后2天至7天,通过总计2天至7天的间歇过程静脉内注射DNA酶蛋白。

[0082] 根据本发明的方法的DNA酶蛋白的施用可以通过任何合适的途径进行,包括全身施用以及直接施用到疾病部位(例如,施用到原发性肿瘤)。有用的施用途径的具体非限制性实例包括静脉内(IV)、皮下(SC)、腹膜内(IP)、口服和肌肉内。

[0083] 在某些实施方案中,DNA酶蛋白被配制成含有药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物。

[0084] 在任何上述方法的一些实施方案中,DNA酶由基因疗法载体编码。在一些实施方案中,将基因疗法载体施用至受试者。在一些实施方案中,基因疗法载体是病毒载体。有用的病毒载体的非限制性实例包括例如腺相关病毒(AAV)载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体(例如,慢病毒载体)和嗜肝病毒载体(例如,乙型肝炎病毒(HBV)载体)。

[0085] 在使用基因疗法载体的任何上述方法的一些实施方案中,基因疗法载体是重组腺相关病毒(rAAV)表达载体,该重组腺相关病毒(rAAV)表达载体包含(i)衣壳蛋白和(ii)核酸,所述核酸包含可操作地连接到编码DNA酶的核苷酸序列的启动子。可以用于开发本发明的AAV表达载体的AAV血清型的非限制性实例包括例如AAV血清型1(AAV1)、AAV2、AAV3(包括3A型和3B型)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh10、AAV-LK03、AAV-LK06、AAV-LK-01-19、AAV-LK12、AAV-KP1、AAVKP2-KP11、AAV-F、AAVrh64R1、AAVhu37、Anc80、Anc80L65、AAV-DJ、禽AAV、牛科动物AAV、犬科动物AAV、马科动物AAV、绵羊(ovine)AAV及其嵌合体。在一些实施方案中,启动子对于肿瘤起源组织或转移靶组织是特异性的。在一些实施方案中,启动子选自肝特异性启动子、神经系统特异性启动子、肠特异性启动子、肝特异性/神经系统特异性串联启动子和肝特异性/肠特异性串联启动子。

[0086] 在任何上述方法的一些实施方案中,DNA酶由包含嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)的细胞表达,并且所述细胞被施用至受试者。在一些实施方案中,将CAR表达细胞或TCR表达细胞直接施用至肿瘤部位。在一些实施方案中,CAR表达细胞或TCR表达细胞是单靶或多靶的。在一些实施方案中,CAR包含能够特异性结合一种或更多种肿瘤抗原的抗原结合结构域。在任何上述方法的一些实施方案中,CAR表达细胞或TCR表达细胞被进一步修饰以表达免疫检查点抑制剂分子。在一些实施方案中,CAR表达细胞是CAR T细胞。在一些实施方

案中,CAR包含能够特异性结合选自以下的一种或更多种抗原的抗原结合结构域:(i)肿瘤抗原,所述肿瘤抗原选自CD5、CD7、CD19、CD28、间皮素、CD123、CD30、CD171、CS-1、CLL-1、CD33、EGFRvIII、GD2、GD3、BCMA、Tn Ag、PSMA、ROR1、FLT3、FAP、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、IL-13Ra2、IL-11Ra、PSCA、PRSS21、VEGFR2、LewisY、CD24、PDGFR-β、SSEA-4、CD20、叶酸受体α、FR-1、c-MET、EGFR/CD133、IL13Ra2、HER2、ERBB2(Her2/neu)、MUC1、EGFR、NCAM、前列腺酶、PAP、ELF2M、肝配蛋白B2、IGF-I受体、CAIX、LMP2、gp100、bcr-abl、酪氨酸酶、EphA2、岩藻糖基GM1、sLe、GM3、TGS5、HMWMAA、o-乙酰基-GD2、叶酸受体β、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、TSHR、GPRC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、聚唾液酸、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARP、WT1、NY-ESO-1、LAGE-1a、MAGE-A1、豆荚蛋白、HPV E6,E7、MAGE A1、ETV6-AML、精子蛋白17、XAGE1、Tie 2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、Fos相关抗原1、p53、p53突变体、prostein、存活蛋白、端粒酶、PCTA-1/半乳凝素8、MelanA/MART1、Ras突变体、hTERT、肉瘤易位断点、ML-IAP、ERG(TMPRSS2 ETS融合基因)、NAI7、PAX3、雄激素受体、细胞周期蛋白B1、MYCN、RhoC、TRP-2、CYPIB1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、人类端粒酶逆转录酶、RU1、RU2、肠羧基酯酶和mut hsp70-2;(ii)与实体瘤相关的抗原;(iii)实体瘤相关抗原,所述实体瘤相关抗原选自间皮素、EGFRvIII、GD2、CLDN6、Tn Ag、PSMA、CD97、TAG72、CD44v6、CEA、EPCAM、KIT、IL-13Ra2、豆荚蛋白、CD171、PSCA、TARP、MAD-CT-1、Lewis Y、CD24、叶酸受体α、叶酸受体β、ERBBs、MUC1、EGFR、NCAM、PDGFR-β、MAD-CT-2、Fos相关抗原、SSEA-4、中性粒细胞弹性蛋白酶、CAIX、HPV E6 E7、ML-IAP、NA17、ALK、雄激素受体、聚唾液酸、TRP-2、CYP1B 1、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、精子蛋白17、HMWMAA、β人类绒毛膜促性腺激素、AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CA IX、人类端粒酶逆转录酶、肠羧基酯酶和mut hsp 70-2;(iv)存在于间皮瘤、肺癌、胰腺癌、食管腺癌、卵巢癌、乳腺癌、结肠直肠癌、膀胱癌或其任何组合中/上的实体瘤相关抗原;(v)与血液学癌症相关的肿瘤抗原;(vi)存在于选自以下的疾病中的肿瘤抗原:急性白血病,包括但不限于B细胞急性淋巴细胞白血病(“BALL”)、T细胞急性淋巴细胞白血病(“TALL”)和急性淋巴细胞白血病(ALL);或一种或更多种慢性白血病,包括慢性髓性白血病(CIVIL)和慢性淋巴细胞白血病(CLL);以及(vii)存在于抗治疗性癌症中的肿瘤抗原。

[0087] DNA酶

[0088] 如本文使用的,术语“脱氧核糖核酸酶”和“DNA酶”用于指催化DNA主链中磷酸二酯键的水解裂解的任何酶。多种脱氧核糖核酸酶是已知的,并且可以用于本发明的方法。在本发明的方法中有用的DNA酶的非限制性实例包括,例如,DNA酶I(例如,重组人类DNA酶I(rhDNA酶I)或牛科动物胰腺DNA酶I)、DNA酶I的类似物(诸如,例如,DNA酶X、DNA酶γ、DNA酶1L1、DNA酶1L2、DNA酶1L3)、DNA酶II(例如,DNA酶IIα、DNA酶IIβ)、胱天蛋白酶激活的DNA酶(CAD)、内切核酸酶G(ENDOG)、颗粒酶B(GZMB)、磷酸二酯酶I、乳铁蛋白、乙酰胆碱酯酶及其突变体或衍生物。本发明还涵盖具有延长的半衰期的DNA酶(例如,白蛋白和/或Fc融合蛋白,或通过修饰肌动蛋白结合位点而保护以避免与肌动蛋白结合;参见,例如,Gibson等人,(1992)J.Immunol.Methods,155,249-256)。DNA酶I的肌动蛋白结合位点可以突变,例如在以下残基处突变:重组人类DNA酶I(SEQ ID NO:1)的Gln-9、Glu-13、Thr-14、His-44、Asp-53、Tyr-65、Val-66、Val-67、Glu-69、Asn-74、Ala-114。例如,一种人类DNA酶I超活性变体包含突变的Ala-114残基。其他示例性突变包括,例如,H44C、H44N、L45C、V48C、G49C、L52C、

D53C、D53R、D53K、D53Y、D53A、N56C、D58S、D58T、Y65A、Y65E、Y65R、Y65C、V66N、V67E、V67K、V67C、E69R、E69C、A114C、H44N:T46S、D53R:Y65A、D53R:E69R、H44A:D53R:Y65A、H44A:Y65A:E69R、H64N:V66S、H64N:V66T、Y65N:V67S、Y65N:V67T、V66N:S68T、V67N:E69S、V67N:E69T、S68N:P70S、S68N:P70T、S94N:Y96S、S94N:Y96T(在SEQ ID NO:1的序列中)。还涵盖具有增加的DNA酶I活性的DNA酶I的突变。这样的突变的非限制性实例是例如,重组人类DNA酶I(SEQ ID NO:1)的Q9R、E13R、E13K、T14R、T14K、H44R、H44K、N74K和A114F。例如,一个超活性DNA酶I突变体包含Q9R、E13R、N74K和A114F突变的组合。DNA酶I优先在邻近嘧啶核苷酸的磷酸二酯键处裂解DNA,产生在3'位具有游离羟基基团的5'-磷酸封端的多核苷酸,平均产生四核苷酸。DNA酶I作用于单链DNA、双链DNA和染色质。

[0089] 在一些实施方案中,DNA酶可以是DNA酶I或其突变体或衍生物。

[0090] 在一些实施方案中,DNA酶I可以是人类DNA酶I或其突变体或衍生物。在一些实施方案中,DNA酶I可以是非人类DNA酶I或其突变体或衍生物,诸如但不限于啮齿动物(例如,小鼠)DNA酶I或其突变体或衍生物。

[0091] 在一些实施方案中,DNA酶包含与人类DNA酶I酶具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,DNA酶包含与人类DNA酶I酶(SEQ ID NO:1)具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,DNA酶包含与人类DNA酶I酶突变体(SEQ ID NO:2)具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

[0092] 在一些实施方案中,DNA酶包含与DNA酶1-样3(D1L3)酶的氨基酸21至305具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,DNA酶包含与人类DNA酶1-样3(D1L3)酶(SEQ ID NO:3)的氨基酸21至305具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

[0093] 在一些实施方案中,DNA酶包含与DNA酶1-样2(D1L2)酶的氨基酸21至305具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,DNA酶包含与人类DNA酶1-样2(D1L2)酶(SEQ ID NO:4)的氨基酸21至305具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

[0094] 在一些实施方案中,DNA酶包含与DNA酶1-样1(D1L1)酶的氨基酸21至305具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,DNA酶包含与人类DNA酶1-样1(D1L1)酶(SEQ ID NO:5)的氨基酸21至305具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

[0095] 在一些实施方案中,DNA酶是包含肌动蛋白结合位点中的一种或更多种突变的DNA酶I突变体。在一些实施方案中,肌动蛋白结合位点中的一种或更多种突变选自Gln-9、Glu-13、Thr-14、His-44、Asp-53、Tyr-65、Val-66、Val-67、Glu-69、Asn-74、Ala-114处的突变及其任何组合。在一些实施方案中,肌动蛋白结合位点中的突变之一是Ala-114处的突变。

[0096] 在一些实施方案中,DNA酶是包含一种或更多种增加DNA酶活性的突变的DNA酶I突变体。在一些实施方案中,增加DNA酶活性的一种或更多种突变选自由以下组成的组:Q9R、

E13R、E13K、T14R、T14K、H44R、H44K、N74K、A114F及其任何组合。在一些实施方案中,增加DNA酶活性的一种或更多种突变选自由以下组成的组:Q9R、E13R、N74K和A114F。

[0097] 在一些实施方案中,DNA酶是包含一种或更多种选自由以下组成的组的突变的DNA酶I突变体:H44C、H44N、L45C、V48C、G49C、L52C、D53C、D53R、D53K、D53Y、D53A、N56C、D58S、D58T、Y65A、Y65E、Y65R、Y65C、V66N、V67E、V67K、V67C、E69R、E69C、A114C、A114R、H44N:T46S、D53R:Y65A、D53R:E69R、H44A:D53R:Y65A、H44A:Y65A:E69R、H64N:V66S、H64N:V66T、Y65N:V67S、Y65N:V67T、V66N:S68T、V67N:E69S、V67N:E69T、S68N:P70S、S68N:P70T、S94N:Y96S、S94N:Y96T及其任何组合。在一些实施方案中,DNA酶I突变体是DNA酶的长效形式。在一些实施方案中,DNA酶I突变体是DNA酶的超活性变体形式。在一些实施方案中,DNA酶I突变体包含氨基酸序列SEQ ID NO:2。

[0098] 在一些实施方案中,DNA酶I突变体包含突变Q9R、E13R、N74K和A114F。

[0099] 在一些实施方案中,DNA酶I突变体包含突变Q9R、E13R、N74K和A114F。

[0100] 在本发明的任何方法的一些实施方案中,编码DNA酶的序列包含分泌信号序列。在一些实施方案中,其中DNA酶作为重组载体施用,所述分泌信号序列在向受试者施用载体时介导酶有效分泌到肝门窦循环中。在一些实施方案中,分泌信号序列选自由以下组成的组:DNA酶I分泌信号序列、IL2分泌信号序列、白蛋白分泌信号序列、β-葡糖苷酸酶分泌信号序列、碱性蛋白酶分泌信号序列和纤连蛋白分泌信号序列。在一些实施方案中,分泌信号序列包含与序列MRGMKLLGALLALAALLQGAVS(SEQ ID NO:6)具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,分泌信号序列包含序列MRGMKLLGALLALAALLQGAVS(SEQ ID NO:6)。在一些实施方案中,分泌信号序列由序列MRGMKLLGALLALAALLQGAVS(SEQ ID NO:6)组成。在一些实施方案中,分泌信号序列包含与序列MYRMQLLSCIALSLALVTNS(SEQ ID NO:7)具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。在一些实施方案中,分泌信号序列包含序列MYRMQLLSCIALSLALVTNS(SEQ ID NO:7)。在一些实施方案中,分泌信号序列由序列MYRMQLLSCIALSLALVTNS(SEQ ID NO:7)组成。

[0101] 在一些实施方案中,DNA酶选自由以下组成的组:DNA酶I、DNA酶X、DNA酶γ、DNA酶1L1、DNA酶1L2、DNA酶1L3、DNA酶II、DNA酶IIα、DNA酶IIβ、胱天蛋白酶激活的DNA酶(CAD)、内切核酸酶G(ENDOG)、颗粒酶B(GZMB)、磷酸二酯酶I、乳铁蛋白、乙酰胆碱酯酶及其突变体或衍生物。在一些实施方案中,具有DNA酶活性的酶是DNA酶I或其突变体或衍生物。在一些实施方案中,DNA酶I是人类DNA酶I或其突变体或衍生物。在一些实施方案中,DNA酶I突变体包含肌动蛋白结合位点中的一种或更多种突变。在一些实施方案中,肌动蛋白结合位点中的一种或更多种突变选自Gln-9、Glu-13、Thr-14、His-44、Asp-53、Tyr-65、Val-66、Val-67、Glu-69、Asn-74、Ala-114处的突变及其任何组合。在一些实施方案中,肌动蛋白结合位点中的突变之一是Ala-114处的突变。在一些实施方案中,DNA酶I突变体包含一种或更多种增加DNA酶活性的突变。在一些实施方案中,增加DNA酶活性的一种或更多种突变选自由以下组成的组:Q9R、E13R、E13K、T14R、T14K、H44R、H44K、N74K、A114F及其任何组合。在一些实施方案中,增加DNA酶活性的一种或更多种突变选自由以下组成的组:Q9R、E13R、N74K和A114F及其任何组合。在一些实施方案中,DNA酶I突变体包含与SEQ ID NO:2的序列具有至少80%或

至少85％或至少90％或至少95％序列同一性的序列。在一些实施方案中,DNA酶I突变体包含突变Q9R、E13R、N74K和A114F。在一些实施方案中,DNA酶I突变体包含SEQ ID NO:2的序列。在一些实施方案中,DNA酶I突变体由SEQ ID NO:2的序列组成。在一些实施方案中,DNA酶I突变体包含一种或更多种选自由以下组成的组的突变:H44C、H44N、L45C、V48C、G49C、L52C、D53C、D53R、D53K、D53Y、D53A、N56C、D58S、D58T、Y65A、Y65E、Y65R、Y65C、V66N、V67E、V67K、V67C、E69R、E69C、A114C、A114R、H44N:T46S、D53R:Y65A、D53R:E69R、H44A:D53R:Y65A、H44A:Y65A:E69R、H64N:V66S、H64N:V66T、Y65N:V67S、Y65N:V67T、V66N:S68T、V67N:E69S、V67N:E69T、S68N:P70S、S68N:P70T、S94N:Y96S、S94N:Y96T及其任何组合。在一些实施方案中,具有DNA酶活性的酶是融合蛋白,该融合蛋白包含与(ii)白蛋白或Fc或其片段连接的(i)DNA酶或其片段。在一些实施方案中,编码具有DNA酶活性的酶的序列包含编码分泌信号序列的序列,其中所述分泌信号序列介导酶的有效分泌。在一些实施方案中,分泌信号序列选自由以下组成的组:DNA酶I分泌信号序列、IL2分泌信号序列、白蛋白分泌信号序列、β-葡糖苷酸酶分泌信号序列、碱性蛋白酶分泌信号序列和纤连蛋白分泌信号序列。在一些实施方案中,分泌信号序列包含序列MRGMKLLGALLALAALLQGAVS(SEQ ID NO:6)或MYRMQLLSCIALSLALVTNS(SEQ ID NO:7)。在一些实施方案中,分泌信号序列由序列MRGMKLLGALLALAALLQGAVS(SEQ ID NO:6)或MYRMQLLSCIALSLALVTNS(SEQ ID NO:7)组成。在一些实施方案中,分泌信号序列包含与MRGMKLLGALLALAALLQGAVS(SEQ ID NO:6)的序列具有至少80％或至少85％或至少90％或至少95％序列同一性的序列或与MYRMQLLSCIALSLALVTNS(SEQ ID NO:7)的序列具有至少85％或至少90％或至少95％序列同一性的序列。在一些实施方案中,分泌信号序列由序列MRYTGLMGTLLTLVNLLQLAGT(SEQ ID NO:8)组成。在一些实施方案中,分泌信号序列包含与MRYTGLMGTLLTLVNLLQLAGT(SEQ ID NO:8)的序列具有至少80％或至少85％或至少90％或至少95％序列同一性的序列。

[0102] 根据本发明的方法的DNA酶的施用可以通过任何合适的途径进行,包括全身施用以及直接施用到疾病部位(例如,施用到原发性肿瘤)。有用的施用途径的具体非限制性实例包括静脉内(IV)、皮下(SC)、腹膜内(IP)、口服和肌肉内。

[0103] 在本发明的方法中有用的DNA酶蛋白剂量取决于另外的疗法的类型、患者的临床病史和对DNA酶的响应,以及主治医师的判断。有用剂量范围的非限制性实例包括从0.005mg/kg/天至100mg/kg/天,或从10KU/kg/天至200000KU/kg/天,优选地从0.05mg/kg/天至50mg/kg/天,或从1000Kunitz单位(KU)/kg/天至100000Kunitz单位(KU)/kg/天,更优选地从1.5mg/kg/天至50mg/kg/天,或从3000KU/kg/天至100000KU/kg/天,最优选地从10mg/kg/天至50mg/kg/天,或从20000KU/kg/天至100000KU/kg/天。

[0104] 在一些实施方案中,以250μg/kg/天静脉内注射DNA酶蛋白。在一些实施方案中,以250μg/kg/天静脉内注射脱氧核糖核酸酶蛋白持续至少14天。

[0105] DNA酶组合物和制剂

[0106] 在某些实施方案中,DNA酶蛋白、DNA酶编码载体或DNA酶表达细胞被配制成具有药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物。在某些实施方案中,这样的组合物还包含第二免疫调节剂。

[0107] 本发明方法中使用的制剂可以方便地以单位剂型呈现,并且可以通过本领域已知的方法制备。可以与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量将取决于所治疗的宿主

和特定的施用模式而变化。可以与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量通常将是产生治疗效果的化合物的量。

[0108] 一般来说,制剂可以用液体载体或精细分离的固体载体(finely divided solid carrier)或两者来制备,并且然后,如果有必要,使产品成形。

[0109] 适用于肠胃外施用的药物组合物可以包含一种或更多种活性成分((i)DNA酶蛋白、DNA酶编码载体或DNA酶表达细胞,以及任选的(ii)另一种化合物[例如,第二免疫调节剂或另一种抗癌化合物]),与一种或更多种药学上可接受的无菌等渗水性或非水性的溶液、分散体、悬浮液或乳液或无菌粉末组合,所述无菌粉末可以在临使用前重构成无菌可注射溶液或分散体,所述溶液、分散体、悬浮液或乳液或无菌粉末可以包含抗氧化剂、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。可以被用于本发明的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、多元醇(诸如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)以及其合适的混合物、植物油(诸如橄榄油)、和可注射的有机酯(诸如油酸乙酯)。例如,通过使用包衣材料诸如卵磷脂、在分散体的情况下通过维持所需要的粒度以及通过使用表面活性剂,可以维持合适的流动性。

[0110] 这些组合物还可以包含防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。防止微生物的作用可以通过多种抗细菌剂和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等的包含来确保。还可以合意的是,在组合物中包含等渗剂,诸如糖、氯化钠等。此外,可注射的药物形式的延长的吸收可以通过包含延迟吸收的剂诸如单硬脂酸铝和明胶来引起。

[0111] 可注射贮库形式可以通过在可生物降解的聚合物诸如聚丙交酯-聚乙交酯中形成一种或更多种活性成分的微胶囊基质来制备。取决于活性成分与聚合物的比率以及所采用的特定聚合物的性质,可以控制活性成分的释放的速率。其他可生物降解的聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。贮库可注射制剂还通过将活性成分包封在与身体组织相容的脂质体或微乳液中来制备。

[0112] 用于口服施用的制剂可以呈胶囊、扁囊、丸剂、片剂、粉末、颗粒的形式,或者作为在水性或非水性液体中的溶液或悬浮液(例如,作为漱口水、作为待吞咽的组合物或作为灌肠剂),或者作为水包油或油包水液体乳液等,各自包含预定量的一种或更多种活性成分。

[0113] 在用于口服施用的固体剂型(胶囊、片剂、丸剂、糖衣丸、粉末、颗粒等)中,一种或更多种活性成分可以与一种或更多种药学上可接受的载体混合,所述载体诸如柠檬酸钠或磷酸二钙,和/或以下中的任一种:(1)填充剂或增量剂,诸如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇和/或硅酸;(2)粘合剂,诸如例如羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯树胶;(3)保湿剂,诸如甘油;(4)崩解剂,诸如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠;(5)溶液阻滞剂,诸如石蜡;(6)吸收加速剂,诸如季铵化合物;(7)润湿剂,诸如例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯;(8)吸收剂,诸如高岭土和膨润土;(9)润滑剂,诸如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠及其混合物;以及(10)着色剂。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,药物组合物还可以包含缓冲剂。还可以采用相似类型的固体组合物,其使用诸如乳糖(lactose)或乳糖(milk sugar)以及高分子量聚乙二醇等的赋形剂作为软填充和硬填充的明胶胶囊中的填充剂。

[0114] 除了一种或更多种活性成分之外,悬浮液还可以包含悬浮剂,诸如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇和脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄蓍

胶及其混合物。

[0115] 除了一种或更多种活性成分之外,粉末和喷雾剂还可以包含赋形剂诸如乳糖、滑石、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉末,或者这些物质的混合物。喷雾剂可以另外包含常规喷射剂,诸如氟氯烃和挥发性未被取代的烃,诸如丁烷和丙烷。

[0116] 癌症和其他治疗

[0117] 本发明的方法可以用于患有多种癌症的受试者。相关癌症的非限制性实例包括例如乳腺癌、前列腺癌、多发性骨髓瘤、移行细胞癌、肺癌(例如,非小细胞肺癌(NSCLC))、肾癌、甲状腺癌、白血病(例如,慢性髓系白血病、急性髓系白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病)、淋巴瘤(例如,B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤)、头颈癌、食管癌、胃癌、结肠癌、肠癌、结肠直肠癌、直肠癌、胰腺癌、肝癌、胆管癌、胆囊癌、卵巢癌、子宫内膜癌、阴道癌、宫颈癌、膀胱癌、神经母细胞瘤、肉瘤、骨肉瘤、恶性黑色素瘤、鳞状细胞癌、骨癌(包括原发性骨癌(例如,骨肉瘤、软骨肉瘤、尤文氏肉瘤、纤维肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、釉质瘤、巨细胞瘤和脊索瘤)和继发性(转移性)骨癌两者)、软组织肉瘤、基底细胞癌、血管肉瘤(angiosarcoma)、血管肉瘤(hemangiosarcoma)、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、成骨肉瘤、血管肉瘤(angiosarcoma)、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、睾丸癌、子宫癌、胃肠癌、间皮瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、华氏巨球蛋白血症(Waldenstroom's macroglobulinemia)、乳头状腺癌、囊腺癌、支气管肺癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、肾母细胞瘤(Wilms' tumor)、上皮癌、胶质瘤、胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突胶质细胞瘤、脑膜瘤、视网膜母细胞瘤、髓样癌、胸腺瘤、肉瘤等。

[0118] 在一些实施方案中,除了施用DNA酶和第二免疫调节剂之外,本发明的治疗方法还可以包括施用另外的抗癌剂和/或疗法,包括但不限于化疗剂、放射疗法、细胞疗法(例如,包含嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)的细胞、NK细胞、CD8 T细胞等),及其任何组合。

[0119] 在本发明的任何方法的一些实施方案中,受试者是人类。

实施例

[0120] 本发明还通过以下实施例进行描述和体现。然而,在说明书中的任何地方使用这些和其他实施例仅是说明性的,并且绝不限制本发明或任何示例性术语的范围和含义。同样地,本发明不限于本文描述的任何特定的优选实施方案。事实上,在阅读本说明书后,本发明的许多修改和变化对本领域技术人员可以是明显的,并且可以进行这样的变化而在精神上或在范围上不偏离本发明。因此,本发明仅受所附权利要求的条款连同这些权利要求所赋予的等效物的全部范围的限制。

[0121] 实施例1.脱氧核糖核酸酶减少肿瘤组织内肿瘤相关巨噬细胞(TAM)和肿瘤浸润性中性粒细胞(TIN)的数量。

[0122] 基于内部环境的状况,循环单核细胞产生成熟的巨噬细胞,并且当它们被募集到肿瘤微环境中时,它们被转化为肿瘤相关巨噬细胞(TAM)。TAM不仅缺乏吞噬肿瘤细胞的功能,而且帮助这些肿瘤细胞逃避被杀死,并且帮助它们扩散到其他组织和器官。肿瘤浸润性中性粒细胞(TIN)通过细胞因子和趋化因子参与肿瘤微环境。TIN通过DNA不稳定性或通过细胞因子和/或趋化因子的释放刺激免疫抑制、肿瘤生长、血管生成和转移。

[0123] 使用BALB/c乳腺腺癌、MC38结肠癌、Lewis肺癌(LL2)和鼠胰腺腺癌(Panc2)癌细胞系。将在100μl RPMI中的3×10e6的乳腺腺癌细胞、1×10e6的MC38细胞、3×10e5的LL2细胞或2×10e5的Panc2细胞通过皮下注射施用到6周龄至8周龄同系Balb/c或C57Bl/6雌性小鼠的乳腺脂肪垫中。

[0124] 在肿瘤植入后6天,将动物随机分配至组(N=3),并且每天通过每小鼠以75μg IV注射人类重组DNA酶I(Kevelt AS;SEQ ID NO:1)来治疗,对照组接受相同量的PBS。为了分离TAM和TIN,将肿瘤提取,并且用12U/mL胶原酶I(Sigma)、450U/mL胶原酶IV(Sigma)和50U/mL DNA酶I(Kevelt)处理。用密度梯度去除碎片和死亡细胞。为了纯化TAM,将F4/80细胞另外MACS-富集(使用抗CD11b微珠)(Sigma)。

[0125] 用DNA酶治疗后的TAM和TIN的量分别在图1A和图1B中示出,作为相对对照(取为100%)的%。数据清楚地展示,每天IV注射DNA酶I酶提供了统计学上显著的($p<0.05$)的TAM和TIN的减少。

[0126] 实施例2.脱氧核糖核酸酶的不同的施用方案对肿瘤组织内TAM和TIN丰度的影响。

[0127] 将100μl RPMI中的1×10e5 Panc2细胞皮下注射到6周龄至8周龄同系C57Bl/6雌性小鼠中。

[0128] 在肿瘤植入后6天,将动物随机分配至组(N=3):

[0129] 组1:未治疗的对照;

[0130] 组2:每天以1mg/kg剂量IV注射人类重组DNA酶I酶(Kevelt AS;SEQ ID NO:1),持续7天;

[0131] 组3:每天以2mg/kg剂量IV注射人类重组DNA酶I酶(Kevelt AS;SEQ ID NO:1),持续14天;

[0132] 组4:每天以2mg/kg剂量IV注射人类重组DNA酶I酶(Kevelt AS;SEQ ID NO:1),持续7天;

[0133] 组5:每天以2mg/kg剂量IV注射人类重组DNA酶I酶(Kevelt AS;SEQ ID NO:1),持续2天;

[0134] 组6:每周以2mg/kg剂量IV注射人类重组DNA酶I酶(Kevelt AS;SEQ ID NO:1)持续2天,持续3周;

[0135] 组7:在第1周和第3周以2mg/kg剂量IV注射人类重组DNA酶I酶(Kevelt AS;SEQ ID NO:1)持续2天,持续3周。

[0136] 为了分离TAM和TIN,将肿瘤提取,并且用12U/mL胶原酶I、450U/mL胶原酶IV和50U/mL DNA酶I处理。用密度梯度去除碎片和死亡细胞。为了纯化TAM,将F4/80细胞另外MACS-富集(使用抗CD11b微珠)。

[0137] TAM和TIN的量分别在图2A和图2B中示出。

[0138] 令人惊讶地,所有使用的DNA酶I施用的方案提供了统计学上显著的($p<0.05$)的TAM和TIN的减少。

[0139] 实施例3.脱氧核糖核酸酶疗法开始的不同时间对肿瘤组织内TAM和TIN丰度的影响。

[0140] 将100μl RPMI中的3×10e6的乳腺腺癌细胞注射到6周龄至8周龄同系Balb/c雌性小鼠中。

[0141] 将动物随机分配至组(N＝3)：

[0142] 组1:未治疗的对照；

[0143] 组2:从肿瘤植入后第2天开始,每3天以2mg/kg剂量IV注射人类重组DNA酶I酶(Kevelt AS;SEQ ID NO:1),持续共21天；

[0144] 组3:从肿瘤植入后第6天开始,每3天以2mg/kg剂量IV注射人类重组DNA酶I酶(Kevelt AS;SEQ ID NO:1),持续共21天；

[0145] 组4:从肿瘤植入后第10天开始,每3天以2mg/kg剂量IV注射人类重组DNA酶I酶(Kevelt AS;SEQ ID NO:1),持续共21天；

[0146] 组5:从肿瘤植入后第14天开始,每3天以2mg/kg剂量IV注射人类重组DNA酶I酶(Kevelt AS;SEQ ID NO:1),持续共21天；

[0147] 组6:从肿瘤植入后第18天开始,每3天以2mg/kg剂量IV注射人类重组DNA酶I酶(Kevelt AS;SEQ ID NO:1),持续共21天。

[0148] 为了分离TAM和TIN,将肿瘤提取,并且用12U/mL胶原酶I、450U/mL胶原酶IV和50U/mL DNA酶I处理。用密度梯度去除碎片和死亡细胞。为了纯化TAM,将F4/80细胞另外MACS-富集(使用抗CD11b微珠)。

[0149] TAM和TIN的量分别在图3A和图3B中示出。

[0150] 出乎意料地,即使在肿瘤发展的晚期,施用DNA酶I也提供了统计学上显著的($p<0.05$)的TAM和TIN的减少。

[0151] 实施例4.脱氧核糖核酸酶疗法与免疫检查点抑制剂的组合对肿瘤组织内TAM和TIN丰度的影响。

[0152] 将100μl RPMI中的1×10e6 CT26细胞或MC38细胞注射到6周龄至8周龄雌性小鼠中。

[0153] 自肿瘤植入后第3天或第10天开始治疗。

[0154] 将动物随机分配至组(N＝3)：

[0155] 组1:未治疗的对照；

[0156] 组2:从肿瘤植入后第3天开始,每3天以2mg/kg剂量IV注射人类重组DNA酶I酶(Kevelt AS;SEQ ID NO:1)；

[0157] 组3:从肿瘤植入后第10天开始,每3天以2mg/kg剂量IV注射人类重组DNA酶I酶(Kevelt AS;SEQ ID NO:1),持续共21天；

[0158] 组4:从肿瘤植入后第3天开始,每3天IV注射抗小鼠CTLA4抗体(BE0164,InVivoMAb,200μg/剂),持续共21天；

[0159] 组5:从肿瘤植入后第10天开始,每3天IV注射抗小鼠CTLA4抗体(BE0164,InVivoMAb,200μg/剂),持续共21天；

[0160] 组6:从肿瘤植入后第3天开始,每3天IV注射抗小鼠CTLA4抗体(BE0164,InVivoMAb,200μg/剂)+从肿瘤植入后第3天开始,每3天以2mg/kg剂量IV注射人类重组DNA酶I酶(Kevelt AS;SEQ ID NO:1),持续共21天；

[0161] 组7:从肿瘤植入后第10天开始,每3天IV注射抗小鼠CTLA4抗体(BE0146,InVivoMAb,200μg/剂)+从肿瘤植入后第10天开始,每3天以2mg/kg剂量IV注射人类重组DNA酶I酶(Kevelt AS;SEQ ID NO:1),持续共21天；

[0162] 组8:从肿瘤植入后第3天开始,每3天IV注射抗小鼠CTLA4抗体(BE0146,InVivoMAb,200μg/剂),持续共21天;

[0163] 组9:从肿瘤植入后第10天开始,每3天IV注射抗小鼠CTLA4抗体(BE0146,InVivoMAb,200μg/剂),持续共21天;

[0164] 组10:从肿瘤植入后第3天开始,每3天IV注射抗小鼠CTLA4抗体(BE0146,InVivoMAb,200μg/剂)+从肿瘤植入后第3天开始,每3天以2mg/kg剂量IV注射人类重组DNA酶I酶(Kevelt AS;SEQ ID NO:1),持续共21天;

[0165] 组11:从肿瘤植入后第10天开始,每3天IV注射抗小鼠CTLA4抗体(BE0146,InVivoMAb,200μg/剂)+从肿瘤植入后第10天开始,每3天以2mg/kg剂量IV注射人类重组DNA酶I酶(Kevelt AS;SEQ ID NO:1),持续共21天;

[0166] 组12:从肿瘤植入后第3天开始,每3天IV注射抗小鼠OX-40抗体(BE0031,InVivoMAb,200μg/剂),持续共21天;

[0167] 组13:从肿瘤植入后第3天开始,每3天IV注射抗小鼠OX-40抗体(BE0031,InVivoMAb,200μg/剂)+从肿瘤植入后第3天开始,每3天以2mg/kg剂量IV注射人类重组DNA酶I酶(Kevelt AS;SEQ ID NO:1),持续共21天;

[0168] 组14:从肿瘤植入后第10天开始,每3天IV注射抗小鼠OX-40抗体(BE0031,InVivoMAb,200μg/剂),持续共21天;

[0169] 组15:从肿瘤植入后第10天开始,每3天IV注射抗小鼠OX-40抗体(BE0031,InVivoMAb,200μg/剂)+从肿瘤植入后第10天开始,每3天以2mg/kg剂量IV注射人类重组DNA酶I酶(Kevelt AS;SEQ ID NO:1),持续共21天。

[0170] 如先前描述的,从肿瘤中提取TAM。TAM和TIN的量在图4中示出。

[0171] 当单独使用时,检查点抑制剂在肿瘤进展的早期统计学上显著地降低了肿瘤部位处的TAM丰度,但一旦在疾病的更晚期使用它们(当在肿瘤植入后10天之后用于动物时),就不能做到这一点。出乎意料地,当与DNA酶I组合时,免疫检查点抑制剂继续显著地($p<0.05$)减少TAM。

[0172] 实施例5.不同类型的DNA酶对肿瘤微生物组的影响。

[0173] 具核梭杆菌(F.nucleatum)是一种口腔厌氧菌,最近被发现在人类结肠直肠癌(CRC)、乳腺癌和一些其他癌症中普遍存在,其中它与不良的治疗结果和肿瘤免疫抑制环境相关。接种具核梭杆菌导致肿瘤定植,抑制肿瘤浸润性T细胞的积聚,并且促进肿瘤生长和转移进展。参见,例如,Kostic等人,Cell host&microbe,2013,14(2):207-15;Van der Merwe等人,Immunology Letters,2021,232:60-66。

[0174] 具核梭杆菌(ATCC 25586)在补充有5%绵羊红细胞的哥伦比亚琼脂上在37℃在5% CO_2中厌氧培养。将乳腺癌细胞系AT3(ATCC)注射到6周龄至8周龄C57BL/6的乳腺脂肪垫中。将动物随机分配至组(N=3)。研究终止日24。

[0175] 组1:未治疗的对照;

[0176] 组2:注射7.5×10e7具核梭杆菌ATCC 23726;

[0177] 组3:注射7.5×10e7具核梭杆菌ATCC 23726,并且在细菌注射后2天、3天、4天、5天、6天和7天,用甲硝唑10mg/kg治疗动物;

[0178] 组4:注射7.5×10e7具核梭杆菌ATCC 23726,并且从细菌注射后第1天开始,每3天

以2mg/kg给定剂量用人类重组DNA酶I酶(Kevelt AS;SEQ ID NO:1)治疗;

[0179] 组5:注射7.5×10e7具核梭杆菌ATCC 23726,并且从细菌注射后第1天开始,每3天以2mg/kg给定剂量用mut DNA酶I酶(Kevelt AS)(SEQ ID NO:2)治疗;

[0180] 组6:注射7.5×10e7具核梭杆菌ATCC 23726,并且从细菌注射后第1天开始,每3天以2mg/kg给定剂量用DNA酶-1-样3(Human Microbiology Institute,NY,USA)(SEQ ID NO:3)治疗;

[0181] 组7:注射7.5×10e7具核梭杆菌ATCC 23726,并且在细菌注射后1天和4天以2mg/kg给定剂量用DNA酶-1-样3(SEQ ID NO:3)治疗;

[0182] 组8:注射7.5×10e7具核梭杆菌ATCC 23726,并且从细菌注射后第1天开始,每3天以2mg/kg给定剂量用DNA酶-1-样2(Human Microbiology Institute,NY,USA)(SEQ ID NO:4)治疗;

[0183] 组9:注射7.5×10e7具核梭杆菌ATCC 23726,并且从细菌注射后第1天开始,每3天以2mg/kg给定剂量用DNA酶-1-样1(Kevelt AS)(SEQ ID NO:5)治疗。

[0184] 肿瘤体积用卡尺测量并使用椭球体公式估算。数据在图5中示出。数据清楚地表明,IV注射不同类型的人类重组DNA酶I酶提供了对具核梭杆菌触发的肿瘤生长的统计学上显著($p<0.05$)的预防,并且防止了具核梭杆菌的促肿瘤生成作用。

[0185] 在研究终止之日,具核梭杆菌在肿瘤组织中的存在通过在营养培养基上铺板肿瘤匀浆,在37℃在厌氧条件下孵育持续48小时来证实。对产生生长的肿瘤组织和菌落进行另外的PCR分析。数据在表1中示出。

[0186] 表1.具核梭杆菌在肿瘤组织处的定量

[0187]

组	具核梭杆菌生长	1 g肿瘤组织内的具核梭杆菌的归一化*量
1	-	0
2	+	100%
3	-	0
4	+	99% ± 5.568
5	+	100% ± 12.767
6	+	107.3% ± 14.012
7	+	92.33% ± 3.786
8	+	98.33% ± 6.807
9	+	107% ± 25.515

[0188] *具核梭杆菌的量被归一化为每个实验中与组2中的平均具核梭杆菌(阳性对照设置为100%)相比的百分比。数据示出为±SD。

[0189] 数据清楚地表明,DNA酶不改变肿瘤处具核梭杆菌的量并且在这些环境中不具有抗细菌活性。出乎意料地,DNA酶I显著地抑制了具核梭杆菌的促肿瘤生成作用。在这项研究中,DNA酶施用方案对结果几乎没有影响,并且多种类型的DNA酶同样有效。

[0190] 实施例6.肿瘤微生物组对免疫检查点抑制剂的抗肿瘤活性的影响。

[0191] 具核梭杆菌ATCC 25586在补充有5%绵羊红细胞的哥伦比亚琼脂上在37℃在5%

CO_2中厌氧培养。将乳腺癌细胞系AT3注射到6周龄至8周龄的体重18g-22g的C57BL/6小鼠的乳腺脂肪垫中。将动物随机分配至组(N＝5)。研究在第21天终止。

[0192] 组1:未治疗的对照;

[0193] 组2:注射7.5×10e7具核梭杆菌ATCC 23726;

[0194] 组3:注射7.5×10e7具核梭杆菌ATCC 23726,并且在细菌注射后2天、3天、4天、5天、6天、7天,用甲硝唑10mg/kg(Sigma)治疗动物;

[0195] 组4:注射7.5×10e7具核梭杆菌ATCC 23726,并且从细菌注射后第1天开始,每3天以2mg/kg给定剂量用人类重组DNA酶I(Kevelt AS;SEQ ID NO:1)治疗;

[0196] 组5:每2天注射抗小鼠CTLA4抗体(BE0164,InVivoMAb,200μg/剂);

[0197] 组6:注射7.5×10e7具核梭杆菌ATCC 23726,并且从细菌注射开始每2天用抗小鼠CTLA4抗体(BE0164,InVivoMAb,200μg/剂)治疗;

[0198] 组7:注射7.5×10e7具核梭杆菌ATCC 23726,并且从细菌注射后第1天开始,每3天以2mg/kg剂量用人类重组DNA酶I(Kevelt AS;SEQ ID NO:1)治疗;并且从细菌注射开始,每2天给予抗小鼠CTLA4抗体(BE0164,InVivoMAb,200μg/剂);

[0199] 组8:注射7.5×10e7具核梭杆菌ATCC 23726,并且从细菌注射后第1天开始,每3天以2mg/kg给定剂量用人类重组DNA酶I(Kevelt AS;SEQ ID NO:1)治疗;并且从细菌注射开始,每2天给予抗小鼠CTLA4抗体(BE0164,InVivoMAb,200μg/剂)。

[0200] 肿瘤体积用卡尺测量并使用椭球体公式估算。数据在图6中示出。

[0201] 在最后一天,具核梭杆菌在肿瘤组织中的存在通过在营养培养基上铺板肿瘤匀浆,在37℃在厌氧条件下孵育持续48小时来证实。对产生生长的肿瘤组织和菌落进行另外的PCR分析。数据在表2中示出。

[0202] 表2.肿瘤组织中具核梭杆菌的定量

[0203]

组	具核梭杆菌生长	1 g肿瘤组织内的具核梭杆菌的归一化*量
1	-	0
2	+	100%
3	-	0
4	-	0
5	-	0
6	+	100.67% ± 13.503
7	-	0
8	+	108% ± 25.120

[0204]

[0205] *具核梭杆菌的量被归一化为每个实验中与组2中的平均具核梭杆菌(阳性对照设置为100%)相比的百分比。数据示出为±SD。

[0206] 数据清楚地表明,具核梭杆菌显著地抑制了免疫检查点抑制剂抗CTLA4抗体的抗癌活性。出乎意料地,用检查点抑制剂和DNA酶I酶的组合的治疗改善了具核梭杆菌的促癌和抗免疫肿瘤活性($p<0.05$),同时不影响该微生物的生存力。

[0207] 这项研究的另一个出乎意料的发现是,具核梭杆菌增加了抗CTLA4抗体检查点抑

制剂治疗的毒性作用,并且该检查点抑制剂和DNA酶I的组合的治疗改善了具核梭杆菌诱导的毒性以及抗CTLA4抗体诱导的毒性。具体地,如图7中示出的,单独地施用抗CTLA4抗体(以3mg/kg)或具核梭杆菌(7.5×10e7)停止了经治疗的动物的体重增长,抗CTLA4抗体和具核梭杆菌的组合导致严重的体重损失,并且DNA酶I治疗(以2mg/kg)防止了抗CTLA4抗体和/或具核梭杆菌诱导的毒性并且导致体重增加。

[0208] 序列

[0209] SEQ ID NO:1-成熟野生型(WT)人类DNA酶I(无分泌信号序列;Genbank登录号4AWN_A):

[0210] LKIAAFNIQTFGETKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAP DTYHYVVSEPLGRNSYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREPAIVRFF SRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYV RPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNF QAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

[0211] SEQ ID NO:2-成熟人类DNA酶I突变体(无分泌信号序列);与SEQ ID NO:1相比的突变残基以粗体和下划线表示:

[0212] LKIAAFNI**R**TFG**R**TKMSNATLVSYIVQILSRYDIALVQEVRDSHLTAVGKLLDNLNQDAP DTYHYVVSEPLGR**K**SYKERYLFVYRPDQVSAVDSYYYDDGCEPCGNDTFNREP**F**IVRFF SRFTEVREFAIVPLHAAPGDAVAEIDALYDVYLDVQEKWGLEDVMLMGDFNAGCSYV RPSQWSSIRLWTSPTFQWLIPDSADTTATPTHCAYDRIVVAGMLLRGAVVPDSALPFNF QAAYGLSDQLAQAISDHYPVEVMLK

[0213] SEQ ID NO:3-人类DNA酶-1-样3

[0214] MSRELAPLLLLLLSIHSALAMRICSFNVRSFGESKQEDKNAMDVIVKVIKRCDIILVMEIK DSNNRICPILMEKLNRNSRRGITYNYVISSRLGRNTYKEQYAFLYKEKLVSVKRSYHYH DYQDGDADVFSREPFVVWFQSPHTAVKDFVIIPLHTTPETSVKEIDELVEVYTDVKHRW KAENFIFMGDFNAGCSYVPKKAWKNIRLRTDPRFVWLIGDQEDTTVKKSTNCAYDRIV LRGQEIVSSVVPKSNSVFDFQKAYKLTEEEALDVSDHFPVEFKLQSSRAFTNSKKSVTLR KKTKSKRS

[0215] SEQ ID NO:4-人类DNA酶-1-样2

[0216] MGGPRALLAALWALEAAGTAALRIGAFNIQSFGDSKVSDPACGSIIAKILAGYDLALVQ EVRDPDLSAVSALMEQINSVSEHEYSFVSSQPLGRDQYKEMYLFVYRKDAVSVVDTYL YPDPEDVFSREPFVVKFSAPGTGERAPPLPSRRALTPPPLPAAAQNLVLIPLHAAPHQAV AEIDALYDVYLDVIDKWGTDDMLFLGDFNADCSYVRAQDWAAIRLRSSEVFKWLIPDS ADTTVGNSDCAYDRIVACGARLRRSLKPQSATVHDFQEEFGLDQTQALAISDHFPVEVT LKFHR

[0217] SEQ ID NO:5-人类DNA酶-1-样1

[0218] MHYPTALLFLILANGAQAFRICAFNAQRLTLAKVAREQVMDTLVRILARCDIMVLQEVV DSSGSAIPLLLRELNRFDGSGPYSTLSSPQLGRSTYMETYVYFYRSHKTQVLSSYVYNDE DDVFAREPFVAQFSLPSNVLPSLVLVPLHTTPKAVEKELNALYDVFLEVSQHWQSKDVI LLGDFNADCASLTKKRLDKLELRTEPGFHWVIADGEDTTVRASTHCTYDRVVLHGERC RSLLHTAAAFDFPTSFQLTEEEALNISDHYPVEVELKLSQAHSVQPLSLTVLLLLSLLSPQ LCPAA

[0219] 参考文献:

[0220] Song,L.et al.,“NLRP3 Inflammasome in Neurological Diseases,from Functions to Therapies”Front.Cell.Neurosci.,2017,Vol.11,No.63.

[0221] Fleischhacker M.et al.,“Circulating nucleic acids(CNAs)and cancer:a survey”Biochim Biophys Acta,2007,1775(1):181-232.

[0222] Demers,M.at al.,“Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis”PNAS,2012,109(32):13076-13081.

[0223] García-Olmo D.C.and García-Olmo,D.“Biological role of cell-free nucleic acids in cancer:the theory of genometastasi s”Crit Rev Oncolog,2013,18:153-161.

[0224] Sawyers 2008C.L.,“The cancer biomarker problem”Nature,2008,452(7187):548-552.

[0225] Butt AN.et al.Overview of circulating nucleic acids in plasma/serum Ann.NY.Acad.Sci.,2008,1137:236-242.

[0226] Schwarzenbach H.et al.,“Detection and monitoring of cell-free DNA in blood of patients with colorectal cancer”Ann.N.Y.Acad.Sci.,2008,1137:190-196.

[0227] Zenaro E,et al.,Neutrophils promote Alzheimer’s disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin.Nat Rev Nephrol.,2015,Author manuscript;available in PMC 2017Jul 14.

[0228] Fushi,W.et al.,“Extracellular DNA in Pancreatic Cancer Promotes Cell Invasion and Metastasis”Cancer Res.,2013,73:4256-4266.

[0229] Tohme,S.et al.,“Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development and Progression of Liver Metastases after Surgical Stress”Cancer Res.,2016,76(6):1367-1380.

[0230] Patutina,O.et al.,Inhibition of metastasis development by daily administration of ultralow doses of RNase A and DNase I.Biochimie.,2011,93(4):689-96.

[0231] Dan Li,DNase I Treatment Reduces GVHD in Mice.Biology of Blood and Marrow Transplantation,Volume 21,Issue 2,Page S339.

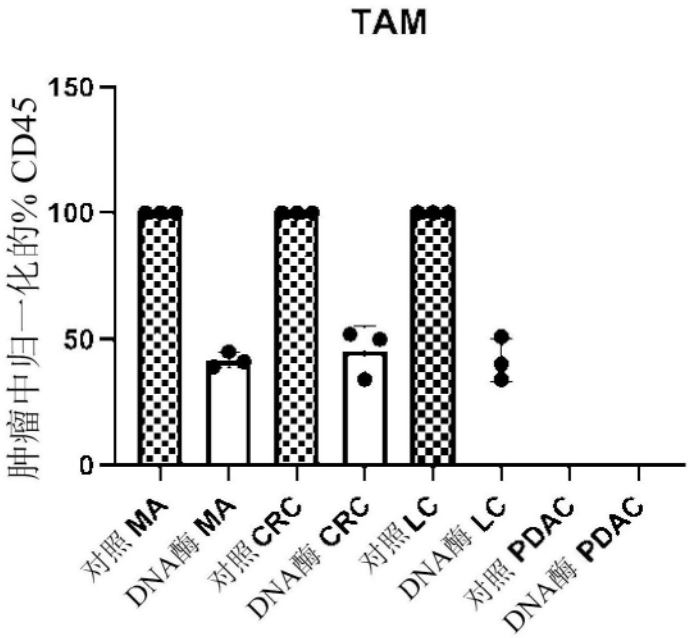
[0232] Darvin,P.et al.,“Immune checkpoint inhibitors:recent progress and potential biomarkers”Experimental&molecular medicine,2018,50(12):1-1.

[0233] ***

[0234] 本发明的范围不受本文描述的具体实施方案的限制。事实上,除了本文描述的那些之外,本发明的各种修改对于本领域技术人员而言从前述描述将变得明显。这样的修改预期落入所附权利要求的范围之内。

[0235] 本文引用的所有专利、申请、出版物、测试方法、文献和其他材料通过引用以其整体特此并入,就像物理上存在于本说明书中一样。

A.


TAM
肿瘤中归一化的% CD45
150
100
50
0
对照 MA
DNA酶 MA
对照 CRC
DNA酶 CRC
对照 LC
DNA酶 LC
对照 PDAC
DNA酶 PDAC

B.

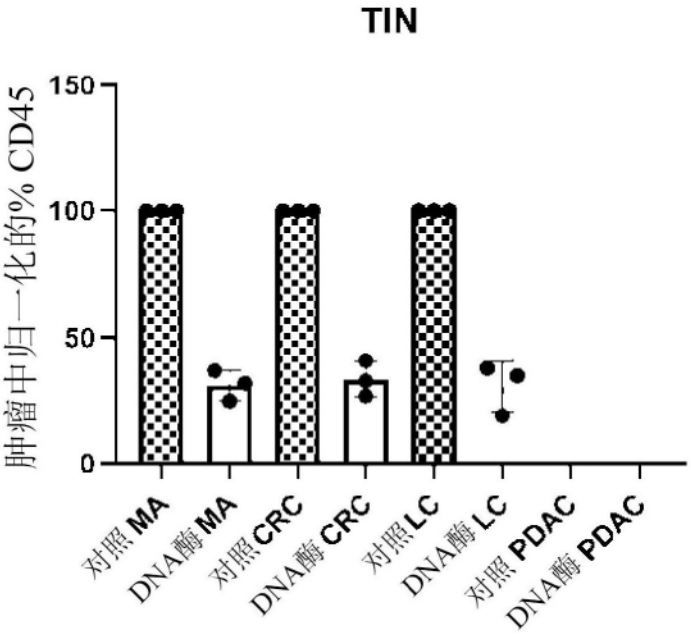

TIN
肿瘤中归一化的% CD45
150
100
50
0
对照 MA
DNA酶 MA
对照 CRC
DNA酶 CRC
对照 LC
DNA酶 LC
对照 PDAC
DNA酶 PDAC

图1

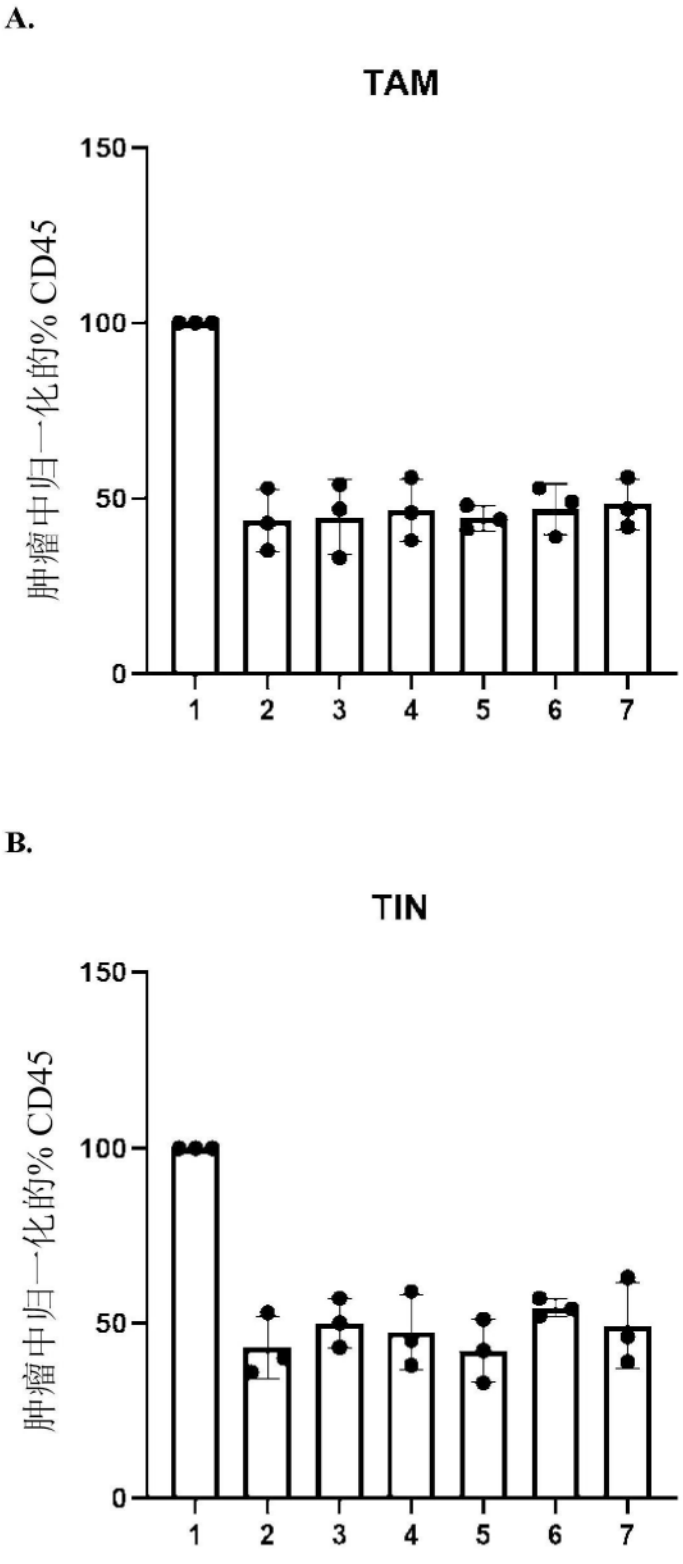

A.
TAM
肿瘤中归一化的% CD45
150
100
50
0
1
2
3
4
5
6
7
B.
TIN
肿瘤中归一化的% CD45
150
100
50
0
1
2
3
4
5
6
7

图2

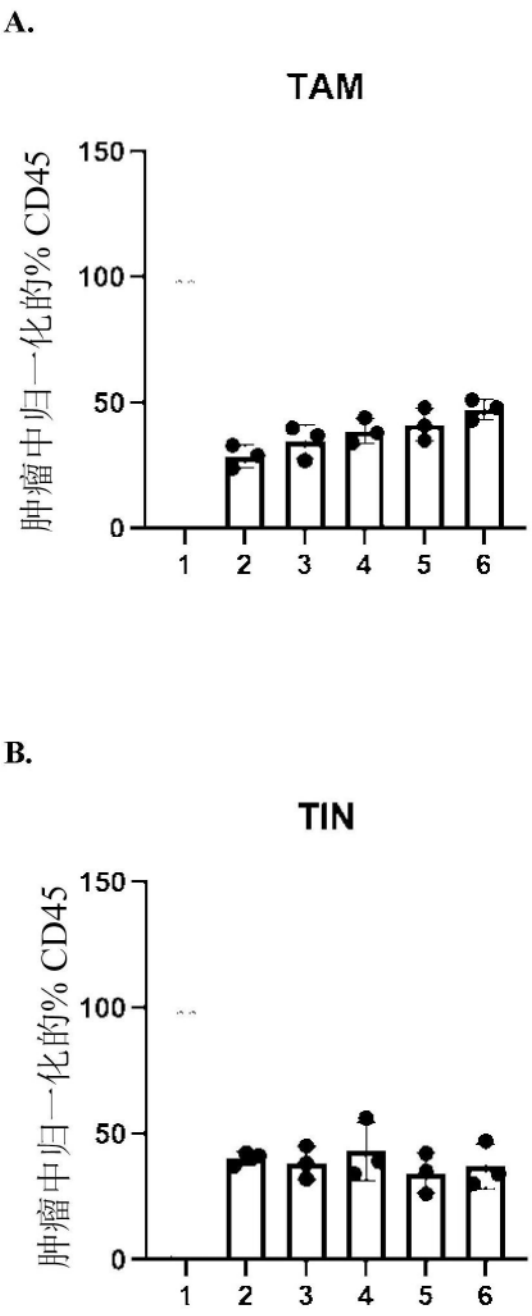

A.
TAM
肿瘤中归一化的% CD45
150
100
50
0
1
2
3
4
5
6
B.
TIN
肿瘤中归一化的% CD45
150
100
50
0
1
2
3
4
5
6

图3

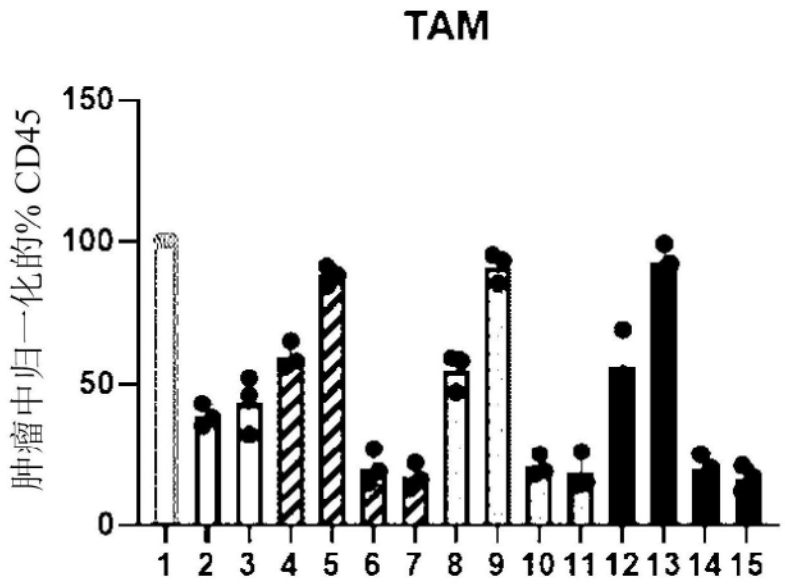

TAM
肿瘤中归一化的% CD45
150
100
50
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

图4

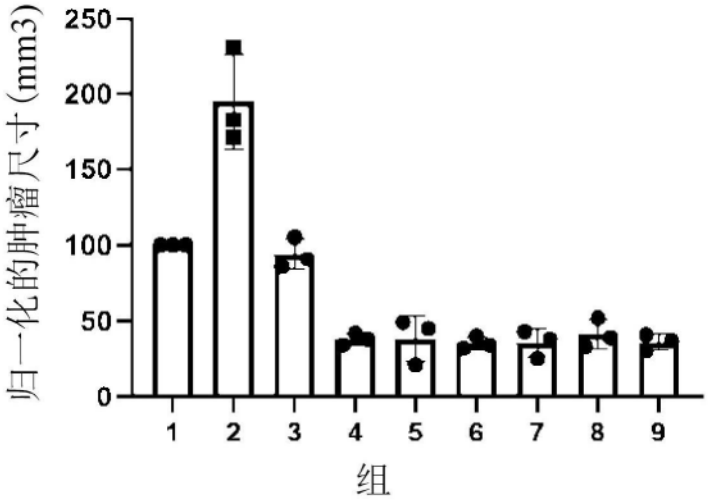

归一化的肿瘤尺寸(mm3)
250
200
150
100
50
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9
组

图5

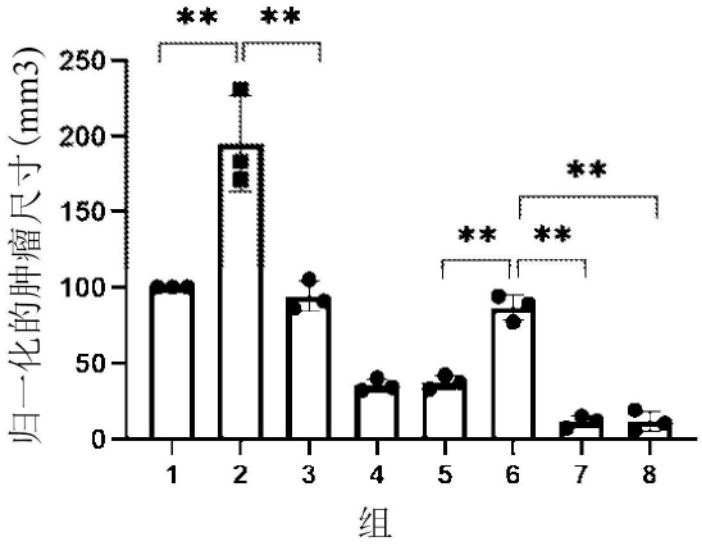

**
**
**
**
250
200
150
100
50
0
归一化的肿瘤尺寸(mm3)
1
2
3
4
5
6
7
8
组

图6

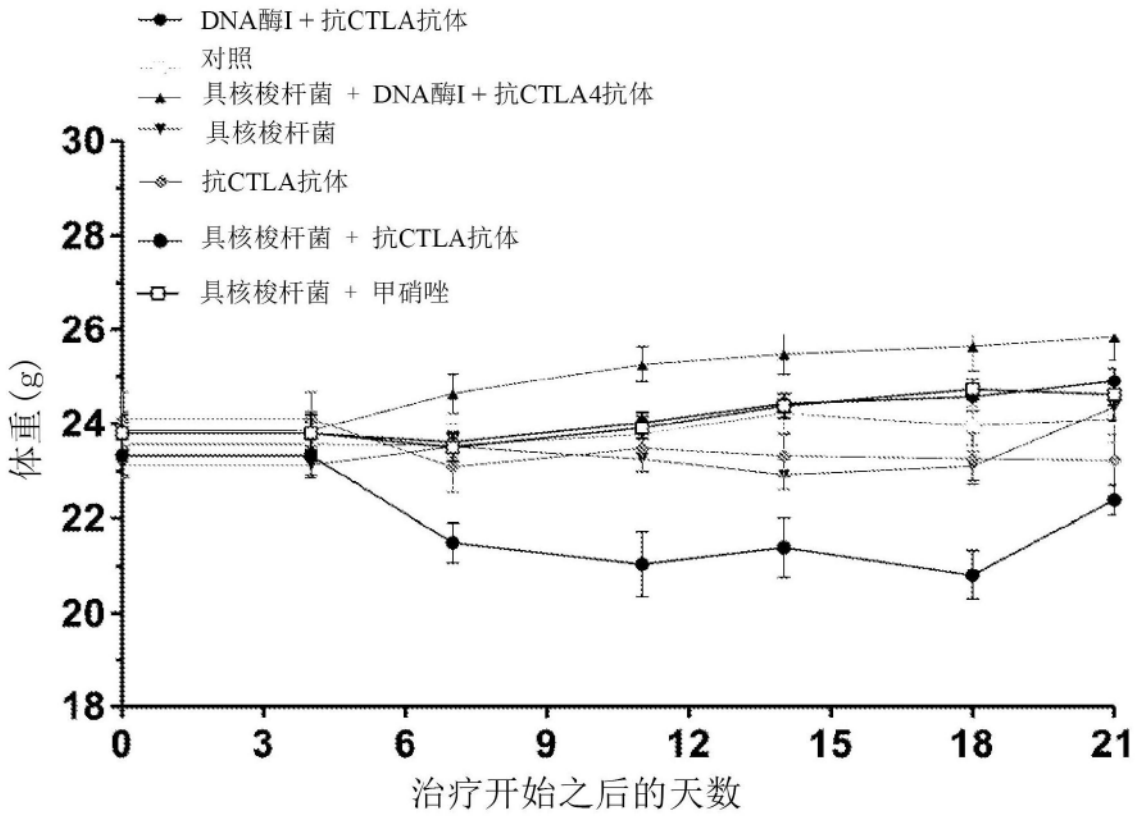

DNA酶I＋抗CTLA抗体
对照
具核梭杆菌 ＋ DNA酶I＋抗CTLA4抗体
具核梭杆菌
抗CTLA抗体
具核梭杆菌 ＋ 抗CTLA抗体
具核梭杆菌 ＋ 甲硝唑
30
28
26
24
22
20
18
体重(g)
0
3
6
9
12
15
18
21
治疗开始之后的天数

图7