



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202128203 A

(43)公開日：中華民國 110 (2021) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：109143276

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 12 月 08 日

(51)Int. Cl. : *A61K36/53 (2006.01)* *A61K36/484 (2006.01)*
A61K36/65 (2006.01) *A61K36/725 (2006.01)*
C12N1/20 (2006.01) *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2019/12/09 美國 62/945,464

(71)申請人：耶魯大學(美國) YALE UNIVERSITY (US)
 美國

(72)發明人：鄭 永齊 CHENG, YUNGCHI (US)；林 嶸 LAM, WING (US)

(74)代理人：邱珍元

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：18 項 圖式數：12 共 79 頁

(54)名稱

預防癌症復發的組成物及方法

(57)摘要

本揭示係關於用於在哺乳動物中預防癌症復發並增強癌症免疫療法功效的方法和組成物，該方法中所使用的組成物包括草藥提取物 YIV-906，其包含黃芩（*Scutellaria baicalensis*）（S）、甘草（*Glycyrrhiza uralensis*）（G）、芍藥（*Paeonia lactiflora*）（P）及棗（*Ziziphus jujuba*）（Z）之草藥萃取物或經 β -葡萄糖醛酸甘酶處理的 YIV-906（YIV-906GU）。

The present disclosure relates the methods and compositions for preventing the recurrence of a cancer in mammals and enhance efficacy of cancer immunotherapies. The compositions used in the method include an herbal extract YIV-906, which comprises herbal extracts of *Scutellaria baicalensis*(S), *Glycyrrhiza uralensis* (G), *Paeonia lactiflora* (P), and *Ziziphus jujuba* (Z), or β -glucuronidase treated YIV-906 (YIV-906GU).

指定代表圖：

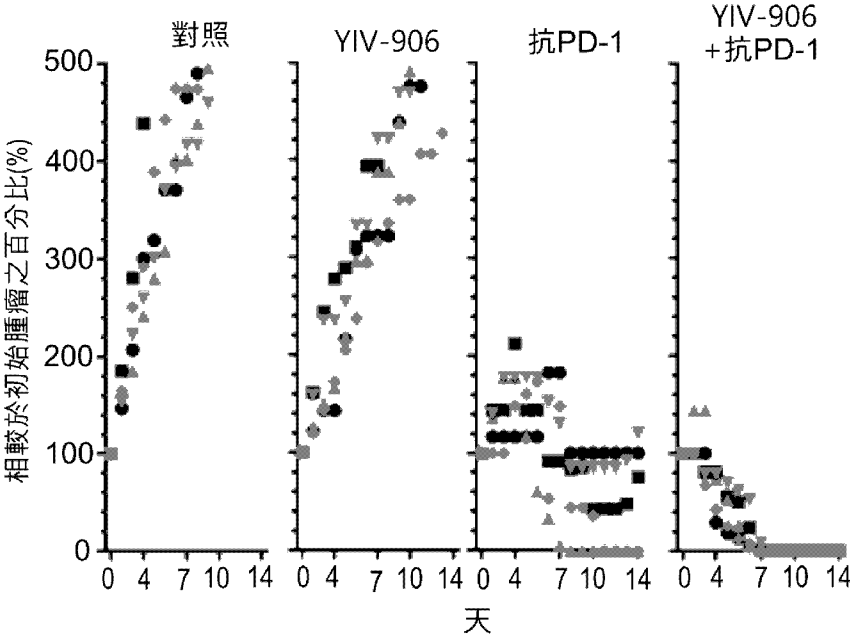


圖 1A



202128203

【發明摘要】

【中文發明名稱】 預防癌症復發的組成物及方法

【英文發明名稱】 COMPOSITIONS AND METHODS FOR
PREVENTING RECURRENCE OF CANCER

【中文】

本揭示係關於用於在哺乳動物中預防癌症復發並增強癌症免疫療法功效的方法和組成物，該方法中所使用的組成物包括草藥提取物 YIV-906，其包含黃芩 (*Scutellaria baicalensis*) (S)、甘草 (*Glycyrrhiza uralensis*) (G)、芍藥 (*Paeonia lactiflora*) (P) 及棗 (*Ziziphus jujuba*) (Z) 之草藥萃取物或經 β -葡萄糖醛酸苷酶處理的 YIV-906 (YIV-906GU)。

【英文】

The present disclosure relates the methods and compositions for preventing the recurrence of a cancer in mammals and enhance efficacy of cancer immunotherapies. The compositions used in the method include an herbal extract YIV-906, which comprises herbal extracts of *Scutellaria baicalensis* (S), *Glycyrrhiza uralensis* (G), *Paeonia lactiflora* (P), and *Ziziphus jujuba* (Z), or β -glucuronidase treated YIV-906 (YIV-906GU).

【指定代表圖】圖1A

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 預防癌症復發的組成物及方法

【英文發明名稱】 COMPOSITIONS AND METHODS FOR
PREVENTING RECURRENCE OF CANCER

【技術領域】

【0001】 本申請案主張美國臨時申請案第 62/945,464 號發明名稱為「預防癌症復發的組成物及方法」（2019 年 12 月 9 日申請）之優先權利益，本揭示藉由引用將其等整體併入。

【0002】 本案係關於一種預防癌症復發的組成物及方法。

【先前技術】

【0003】 免疫檢查點阻斷療法被認為是癌症治療的突破。目前，美國 FDA 已批准伊匹單抗（ipilimumab）（抗 CTLA4）、派姆單抗（pembrolizumab）（抗 PD1）、納武單抗（nivolumab）（抗 PD1）及阿特朱單抗（Atezolizumab）（抗 PDL1）用於治療多種類型的癌症。這些抗體的基本作用機制是藉由中斷 CTLA4-CD80/CD86、PD1-PDL1/PDL2 之間的相互作用來抑制共抑制途徑，從而恢復細胞毒性 T 細胞功能。然而，並非所有病患都對這些免疫療法有反應。這些免疫療法亦取決於腫瘤類型，例如，在胰臟癌、結腸癌及肝癌病患中已發現沒有或低的反應率。因此，為了提高免疫治療反應率，正研發用於免疫抑制或激動劑以刺激免疫反應的特異性標靶導向抑制劑。然而，許多這些單一標靶導向免疫增強劑在臨床試驗中失敗。這可能是由於腫瘤環境的複雜性所致，其中癌細胞高度異質，免疫細胞由處於不同發育階段的許多細胞類型組成。

【0004】 考慮到上述情況，本領域需要研發用於癌症免疫療法的多標靶導向的免疫增強劑，本發明滿足了此一需求。

【發明內容】

【0005】 本揭示提供在哺乳動物中預防癌症復發的方法，該方法包括向該哺乳動物受試者投予草藥萃取物，其包含黃芩 (*Scutellaria baicalensis*) (S)、甘草 (*Glycyrrhiza uralensis*) (G)、芍藥 (*Paeonia lactiflora*) (P) 及棗 (*Ziziphus jujuba*) (Z) 之草藥萃取物、其等之滷分或存在於草藥萃取物或其滷分中之任何活性化學物質，及/或(b) β -葡萄糖醛酸酶處理的 YIV-906 (YIV-906GU) 或其之滷分，或存在於 YIV-906 或其之滷分中之任何活性化學物質。進一步投予哺乳動物有效量的至少一種免疫治療劑，適當的免疫治療劑包括免疫檢查點抑制劑及抗體。

【圖式簡單說明】

【0006】 當結合後附圖式閱讀時，將更好地理解以下本發明的具體實施方式的詳細描述。為了說明本發明的目的，在圖式中顯示特定實施方式。然而，應當理解，本發明並不限於圖式中所顯示的實施方式的精確佈置和手段。

【0007】 圖 1A-1B 說明對於 C57BL6 小鼠之 Hepa 1-6 腫瘤生長，YIV-906 在抗 PD1 之抗腫瘤活性的影響 (YIV-906, 500 mg/kg p.o. bid x 7; 抗-PD-1 抗體, 200 μ g/小鼠 i.p. qd)。圖 1A 為一環斑圖 (spot plot)，顯示各治療組在第 0 至 14 天期間個別的腫瘤生長。圖 1B 為顯示在第 0 至 20 天期間各治療組的平均 ($\pm$ SD) 腫瘤生長的圖，最初的腫瘤大小約為 180 mm³。

【0008】 圖 2A-2F 說明 YIV-906 及/或抗 PD1 對於巨噬細胞和 Hepa 1-6 腫瘤之 M1/M2 標誌基因表現的影響。圖 2A 是顯示治療 4 天後巨噬細胞浸潤到 Hepa 1-6 腫瘤中的 F4/80 之免疫組織化學染色的影像。圖 2B 顯示治療 4 天後腫瘤切片的巨噬細胞的定量。圖 2C 及 2D 顯示治療 4 天後 Hepa 1-6 腫瘤的 MCP1 及 iNOS 蛋白質表現。圖 2E 為一熱圖 (顯著上調：紅色，顯著下調：綠色)，用於指示第 4 天治療

後藉由 RT-qPCR 測定的 mRNA 表現。圖 2F 為基於圖 2E 所示之特徵基因表現，顯示處於 M1 狀態的可能性的表，從 T 檢驗分析獲得 P 值。

【0009】 圖 3 說明 YIV-906 對於 IFN γ 或 IL4 將骨髓源性巨噬細胞 (bone marrow derived macrophage, BMDM) 極化為 M1 或 M2 樣巨噬細胞之作用的影響。圖 3 顯示在使用或不使用 YIV-906 或 YIV-906GU 處理的 IFN γ 或 IL14 後，BMDM 的 mRNA 表現水平的熱圖，對於每一行 (基因)，mRNA 的上調均以 (紅色) 突顯，而下調則以 (綠色) 突顯。表格中的數字表示對各治療條件的相對倍數變化的基因表現 (三個獨立實驗的平均值；所有基因表現均以肌動蛋白標準化)。骨髓細胞在鼠類 M-CSF (10 ng/mL) 存在下培養 7 天，然後在 IFN γ 10 ng/mL 存在下培養以誘導極化成 M1 樣巨噬細胞的，而 M2 樣巨噬細胞則以 IL-4 20 ng/mL 誘導 24 小時。將 YIV-906 或 YIV-906GU 與 IFN γ 或 IL4 同時添加。在第 8 天處理後，藉由 qRT-PCR 測定 M1 或 M2 相關基因的 mRNA 表現。

【0010】 圖 4A-4D 說明 YIV-906GU 對於 BMDMs 的 IFN γ 傳訊途徑蛋白的影響。圖 4A 為顯示 YIV-906GU 對於 BMDMs 的 IFN γ 分泌之作用的直方圖。在鼠類 M-CSF (10 ng / mL) 存在下培養骨髓細胞 7 天，然後將 YIV-906 添加至細胞中 24 小時，藉由 ELISA 檢測培養基中的 IFN γ 。圖 4B 顯示單獨的 YIV-906GU 對於 BMDMs 的 IFN γ 傳訊之作用的西方墨點法分析。圖 4C 顯示 CYIV-906GU 對於 BMDMs 的 IFN γ 傳訊之作用的西方墨點法分析。圖 4D 顯示 YIV-906GU 在 IL4 對 BMDMs 的 IL4 傳訊之作用的影響的西方墨點法分析。骨髓細胞在鼠類 M-CSF (10 ng/mL) 存在下培養 7 天，然後添加 IFN γ 10 ng/mL 以誘導極化成 M1 樣巨噬細胞的，而 M2 樣巨噬細胞則以 IL-4 20 ng/mL 在具有或不具有 YIV-906 下誘導 24 小時。蛋白質表現或磷酸化以西方墨點檢測，組蛋白 H3 用於標準化蛋白質負載。

【0011】 圖 5A-5C 說明 YIV-906 對於 IFN γ 傳訊途徑中蛋白質的影響。圖 5A 顯示單獨的 YIV-906 對於 BMDMs 的 IFN γ 傳訊之影響的

西方墨點法分析。**圖 5B** 顯示 YIV-906 在 IFN γ 對於 BMDMs 的 IFN γ 傳訊之作用的影響的西方墨點法分析。**圖 5C** 顯示 YIV-906 在 IL4 對於 BMDMs 的 IL4 傳訊之作用的影響的西方墨點法分析。骨髓細胞在鼠類 M-CSF (10 ng/mL) 存在下培養 7 天，然後添加 IFN γ 10 ng/mL 以誘導極化成 M1 樣巨噬細胞的，而 M2 樣巨噬細胞則以 IL-4 20 ng/mL 在具有或不具有 YIV-906 下誘導 24 小時。蛋白質表現或磷酸化以西方墨點檢測，組蛋白 H3 用於標準化蛋白質負載。

【0012】 圖 6 說明 YIV-906 或 YIV-906GU 對 IFN γ 使 Raw 細胞 264.7 極化為 M1 樣巨噬細胞的影響。YIV-906 或 YIV-906GU 可增強 IFN γ 誘導 MCP1、TNFa 和 iNOS (M1 相關基因)。Raw 細胞在鼠類 M-CSF (10 ng/mL) 存在下培養 3 天，然後在 IFN γ 10 ng/mL 存在下培養以誘導極化成 M1 樣巨噬細胞 24 小時。在第 8 天處理後，藉由 RT-PCR 測定 mRNA 表現。

【0013】 圖 7A-7B 說明說明 YIV-906 及/或抗 PD1 對於 Hepa 1-6 腫瘤之 PD1 (**圖 7A**) 及 PDL1 (**圖 7B**) 蛋白質表現的影響。為了進行 Hepa 1-6 腫瘤之 PD1 和 PDL1 蛋白質表現的西方墨點法分析，在抗 PD1-/ + YIV-906 處理 4 天後，將 β -肌動蛋白用於標準化蛋白質負載，將各樣品標準化為主要混合物樣品 (MIX)，並為各凝膠重複一致上樣。圖中顯示 T 檢驗的 P 值。

【0014】 圖 8A-8C 說明 YIV-906 及/或抗 PD1 對 BD1 小鼠中之 T 細胞及裸鼠中 Hepa 1-6 腫瘤生長的影響。**圖 8A** 說明 YIV-906 及/或抗 PD1 對於 Hepa 1-6 腫瘤之活化 T 細胞的影響，如 GranzymeB 和 CD3 染色所示。**圖 8B** 說明如 CD3+/FOX3P+ 所示，YIV-906 及/或抗 PD1 對於 Hepa 1-6 腫瘤之 Treg 細胞的影響。處理 4 天後，藉由分散酶 (dispase) 消化腫瘤組織，隨後以螢光標記的抗 FOX3P 或抗顆粒酶 B (GranzymeB) 以及 CD3 (T 細胞) 和 CD45 (血球) 染色。流式細胞儀分析用於確定總 T 細胞的 Treg 或顆粒酶 B+ve 細胞百分比。**圖 8C** 說明使用 qRT-PCR，YIV-906 及/或抗 PD1 對於 Hepa 1-6 腫瘤之 T 細

胞相關之 mRNA 表現的影響。

【0015】 圖 9A-9C 說明 YIV-906 對於 IDO 活體外及 *in vivo* 活性的影響。圖 9A 為說明 YIV-906、經大腸桿菌葡萄糖醛酸酶處理的 YIV906 (YIV906GU) 及其類黃酮對於培養物中經 IDO 轉染的 HEK293 細胞之 IDO 活性的影響的圖。HEK293 細胞以小鼠 IDO 表達質體轉染，然後接種培養隔夜。將帶有或不帶有 YIV906、YIV906GU 或其類黃酮的 L-色胺酸 125 μ M 添加至孔中 24 小時。使用基於比色的測定法測量培養基的犬尿胺酸 (kynurenine) 濃度，將結果標準化為每個孔中的蛋白質濃度。圖 9B 顯示不同處理對 Hepa 1-6 腫瘤的犬尿胺酸/色胺酸的影響。圖 9C 顯示不同處理對 Hepa 1-6 腫瘤的單核球 MDSC 的影響。來自 T-試驗的 P 值顯示於圖 9B 和 9C。

【0016】 圖 10A-10B 顯示在沒有向細胞中添加 YIV-906(圖 10A) 或 YIV-906GU (圖 10B) (以重組大腸桿菌 β -葡萄糖醛酸酶預處理以模擬腸道條件) 的情況下 BMDM (以 20 ng/mL MCSF 預處理 7 天) 的 IRF3-P 蛋白質表現再進行 24 小時的西方墨點法分析。組蛋白 3 用於標準化蛋白質負載。

【0017】 圖 10C 是顯示藉由 ELISA 測定法檢測培養基 (48 小時) 中的 IFN β 的圖。

【0018】 圖 11 說明 YIV-906 或 YIV-906GU (以大腸桿菌葡萄糖醛酸酶預處理) 對 CD73 酶活性的影響。在 AMP (100 μ M) 存在做為基質下，具有或不具有 YIV-906 或 YIV-906GU 的條件下，使用重組人類 CD73 酶 2 小時，以 HPLC 檢測腺苷的形成。將 YIV-906 或 YIV-906GU 存在下的相對面積腺苷峰值與對照組進行比較。

【0019】 圖 12A-12C 顯示各種 YIV-906 製劑對於 M1/M2 mRNA 表現的影響。圖 12A 顯示 YIV906GU、單一草藥 (G、P、S 和 Z: GU 處理) 或刪去一種草藥的調配物 (-G、-P、-S 和 -Z: GU 處理) 對於巨噬細胞之 iNOS/Arg 的 mRNA 表現的影響。圖 12B 顯示貝加因 (baicalein)、黃芩素 (wogonin)，金黃酮 (chrysin)，木蝴蝶素 A

(oroxylin A)和貝加靈(baicalin)對巨噬細胞之 iNOS/Arg 的 mRNA 表現的影響。Raw 細胞在鼠類 M-CSF (10 ng/mL) 存在下培養 3 天，然後在 IFN γ 10 ng/mL 單獨或伴隨 YIV-906GU/其之成分存在下培養以誘導極化成 M1 樣巨噬細胞 24 小時。在第 8 天處理後，藉由 RT-PCR 測定 mRNA 表現。圖 12C 說明使用如本文所述的 LC-MS，在具有或不具有抗 PD1 的情況下，口服投予 YIV-906 後對於 Hepa 1-6 腫瘤的 YIV-906 化合物的檢測。

【實施方式】

【0020】 現在將詳細參考所揭示的標的之某些實施方式。儘管將結合所列舉的申請專利範圍來序述所揭示的標的，但應理解的是，所例示的標的並非意圖將申請專利範圍限制為所揭示的標的。

定義

【0021】 如本文所使用，以下各術語在本章節中具有與其相關的含義。

【0022】 除另有定義外，否則所有本文使用的技術和科學術語具有與本揭示所屬技術領域中具有通常知識者所能理解的涵義相同。儘管與本文描述者類似或等同的任何方法和材料都可以用於本揭示的實施或測試中，但仍描述例示的方法和材料。

【0023】 一般而言，本文使用的命名法與藥理學、天然產物化學及有機化學中的實驗室程序是本領域公知且常用的。

【0024】 如本文所使用，術語「約」可以允許數值或範圍內的可變程度，例如，在指定值或指定之範圍極限的 10% 以內、5% 以內或 1% 以內，並包括該確切的指定值或範圍。

【0025】 如本文所使用，術語「實質上」係指至少約 50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、99.99% 或至少約 99.999% 或更高或 100% 的主要部分或大部分。如本文所使用，術語「實質上無」可表示不具有或具有少量，使得存在物質

的量不影響包括該物質之組成物的物質特性，從而該組成物為約 0 wt% 至約 5 wt% 的該物質，或約 0 wt% 至約 1 wt%、或約 5 wt% 或更少，或小於、等於或大於約 4.5 wt%、4、3.5、3、2.5、2、1.5、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.01 或約 0.001 wt% 或更少。術語「實質上無」可意指具有少量的，使得組成物為約 0 wt% 至約 5 wt% 的該物質，或約 0 wt% 至約 1 wt%，或約 5 wt% 或更少，或小於、等於或大於約 4.5 wt%、4、3.5、3、2.5、2、1.5、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.01 或約 0.001 wt% 或更少、或約 0 wt%。

【0026】 如本文所使用，術語「癌症」定義為特徵在於異常細胞的快速且不受控制地生長的疾病，癌細胞可局部擴散或通過血流和淋巴系統擴散到身體的其他部位。各種癌症的實例包括但不限於骨癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宮頸癌、皮膚癌、胰腺癌、結腸直腸癌、腎癌、肝癌、腦癌、淋巴瘤、白血病、肺癌等等。

【0027】 在一方面，與受試者有關的術語「共同投予的 (co-administered)」和「共同投予 (co-administration)」係指對受試者投予本揭示的化合物和/或組成物以及亦可治療或預防本文考慮的疾病或病症的化合物和/或組成物。在某些實施方式中，共同給予的化合物和/或組合物分別投予，或作為單一治療方法的一部分以任何種類的組合投予。共同投予的化合物及/或組成物在各種固體、凝膠及液體調配物下可以各種組合調配成固體及液體的混合物，及調配成溶液。

【0028】 如本文所使用，術語「治愈」係指減輕受試者的特定疾病或病症，例如特定類型的癌症。

【0029】 如本文所使用，術語「萃取物」係指源自例如草藥或其他植物材料的天然存在來源的化合物或藥物的濃縮製劑或溶液。萃取物可藉由許多方法製備，包括將草藥浸泡在溶液中，或將草藥乾燥和研磨成粉末並將粉末溶解在溶液中。在將一定量所需之化合物溶解於溶液後，藉由除去一部分溶劑可進一步濃縮萃取物。亦可對萃取物進行過濾或離

心以從溶液中除去任何固體物質。

【0030】 如本文所使用，短語「抑制」意指以可測量之量減少或完全防止分子、反應、相互作用、基因及/或蛋白質的表現、穩定性、功能或活性。抑制劑是例如部分結合或完全阻斷刺激、減少、防止、延遲活化、去活化、脫敏或下調蛋白質或基因穩定性、表現、功能及活性的化合物，例如激動劑。

【0031】 如本文所使用，術語「醫藥組成物」或「組成物」係指至少一種可用於本揭示中的化合物與醫藥上可接受的載劑的混合物，該醫藥組成物有助於將化合物投予受試者。

【0032】 如本文所使用，術語「醫藥上可接受」係指一種物質，例如載劑或稀釋劑，其不會消除本揭示中 useful 之化合物的生物活性或性質，且相對是無毒的，即該物質可投予個體而不引起非所欲的生物學效果，或以有害的方式與包含其之組成物中的任何組分相互作用。

【0033】 如本文所使用，術語「醫藥上可接受的載劑」意指醫藥上可接受物質、組成物或載劑，例如液體或固體填充劑、穩定劑、分散劑、懸浮劑、稀釋劑、賦形劑、增稠劑、溶劑或包封材料，涉及在病患體內攜帶或運輸本揭示中有用的化合物，或將其攜帶或運輸至受試者，使其可進行其預期的功能。通常，這種構造體從一個器官或身體的一部分被攜帶或輸送到另一器官或身體的一部分，在與調配物的其他成分相容的意義上，每種載劑必須是「可接受的」，包括在本揭示中有用的化合物，且對受試者無害。可作為醫藥上可接受的載劑的物質的一些實例包括：糖類，例如乳糖、葡萄糖和蔗糖；澱粉類，例如玉米澱粉和馬鈴薯澱粉；纖維素及其衍生物，例如羧甲基纖維素鈉、乙基纖維素和纖維素乙酸酯；粉末黃耆膠；麥芽；明膠；滑石粉；賦形劑，例如可可脂和栓劑蠟；油類，例如花生油、棉籽油、紅花油、芝麻油、橄欖油、玉米油和大豆油；二醇類，例如丙二醇；多元醇，例如甘油、山梨糖醇、甘露醇和聚乙二醇；酯類，例如油酸乙酯和月桂酸乙酯；瓊脂；緩沖劑，例如氫氧化鎂和氫氧化鋁；界面活性劑；褐藻糖酸；無熱原水；等滲鹽水；林格氏

(Ringer) 液；乙醇；磷酸鹽緩衝液溶液；和醫藥調配物中所使用的其他無毒相容物質。如本文所使用的，術語「醫藥上可接受載劑」亦包含任何及所有的塗層、抗細菌及抗真菌劑以及吸收延遲劑等，其與本揭示中可用的化合物的活性相容，並對於受試者是生理上可接受的。補充活性化合物亦可以納入組成物中。「醫藥上可接受載劑」可進一步包括可用於本揭示之化合物的醫藥上可接受的鹽類。可以包含於用於實施本發明醫藥組成物的其它額外成分在本領域中是已知的，例如在 Remington's Pharmaceutical Sciences (Genaro, Ed., Mack Publishing Co., 1985, Easton, PA) 中所述，其藉由引用併入本文所揭露之一部分。

【0034】如本文所使用，術語「醫藥上可接受的鹽類」係指所施用的化合物的鹽類，其由醫藥上可接受的無毒酸及鹼所製備，包括無機酸、無機鹼、有機酸、有機鹼、溶劑合物、水合物及其籠合物 (clathrate)。適當的醫藥上可接受的酸加成鹽類可由無機酸或有機酸製備。無機酸的實例包括硫酸鹽、硫酸氫鹽、鹽酸、氫溴酸、氫碘酸、硝酸、碳酸、硫酸和磷酸 (包括磷酸氫鹽和磷酸二氫鹽)。適當的有機酸可選自脂肪族、脂環族、芳香族、芳脂族、雜環、羧酸及磺酸類有機酸，其實例包括甲酸、乙酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、葡萄糖酸、乳酸、蘋果酸、酒石酸、檸檬酸、抗壞血酸、葡萄糖醛酸、馬來酸、富馬酸、丙酮酸、天冬胺酸、麩胺酸、苯甲酸、鄰胺苯甲酸、4-羥基苯甲酸、苯乙酸、杏仁酸、撲酸 (embonic) (或撲酸 (pamoic))、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、泛酸、三氟甲磺酸、2-羥基乙磺酸、對甲苯磺酸、對胺基苯磺酸、環己基胺基磺酸、硬脂酸、藻酸、 β -羥基丁酸、水楊酸、半乳糖二酸及半乳糖醛酸。本揭示化合物適當的醫藥上可接受的鹼加成鹽包括例如金屬鹽類，包括鹼金屬鹽、鹼土金屬鹽及過渡金屬鹽等金屬鹽，例如鈣鹽、鎂鹽、鉀鹽、鈉鹽及鋅鹽。醫藥上可接受的鹼加成鹽亦包括由鹼性胺製成的有機鹽類，例如 N,N'-二苄基乙烯基-二胺基、氯普魯卡因 (chlorprocaine)、膽鹼、二乙醇胺、乙二胺、葡胺 (meglumine) (N-甲基葡萄糖胺) 及普

魯卡因。所有這些鹽類可由對應的化合物藉由例如使適當的酸或鹼與化合物反應來製備。

【0035】 術語「藥學有效量」和「有效量」係指提供所需生物學結果的藥劑之無毒但足夠的量。該結果可能是減輕及/或緩和體徵、徵狀或疾病或病症的病因，或生物系統的任何其他所需改變。在任何個體的情況中，本技術領域中具有通常知識者可使用常規實驗確定適當的有效量。「醫藥調配物」進一步意指載劑、溶劑、賦形劑及/或鹽必須與調配物（例如本揭示的化合物）的活性成分相容。本技術領域中具有通常知識者應理解，術語「醫藥調配物」和「醫藥組成物」通常是可互換的，且它們被用於本案的目的。

【0036】 如本文所使用，術語「YIV-906」係指包含甘草（*Glycyrrhiza uralensis Fisch*）（G）、芍藥（*Paeonia lactiflora Pall*）（P）、黃芩（*Scutellaria baicalensis Georgi*）（S）及棗（*Ziziphus jujuba Mill*）（Z）的草藥組成物。YIV-906可指，例如，包含在標準操作程序下製備的3：2：2：2比例的S、G、P和Z的特定組成物，在一些實施方式中，包括S、P、G和Z的熱水萃取。

【0037】 如本文所使用，術語「預防（prevent）」、「預防（prevention）」或「預防（preventing）」係指部分或完全預防、延遲或減緩疾病、病症和/或狀況（例如，癌症）的一種或多種症狀或特徵之發作的任何方法。預防導致疾病狀態的臨床症狀在可能暴露於或易患疾病狀態但尚未經歷或顯示疾病狀態症狀的受試者中不發展，即，抑制疾病發作。可對沒有表現出疾病、病症及/或症狀跡象的受試者進行預防給藥。在一些實施方式中，減緩一種或多種疾病或病證的症狀或特徵的發作意指如果發生該疾病或病症的複發，或疾病或病症的一種或多種症狀的複發，則該疾病或病症的複發，或疾病或病症的一種或多種症狀的複發至少比在不使用YIV-906或YIV-906GU的情況下會復發該疾病或病症，或疾病或病症的一種或多種症狀還慢約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%。

【0038】 如本文所用，預期被投予的術語「受試者」、「病患」或「個體」包括但不限於人（即，任何年齡組別的男性或女性，例如兒科受試者（例如，嬰兒、兒童、青少年）或成人受試者（例如，青年、中年或老年人））及/或其他靈長類動物（例如，食蟹猴、恒河猴）；哺乳動物，包括商業上相關的哺乳動物如牛、豬、馬、綿羊、山羊、貓和/或狗；和/或鳥類，包括商業上相關的鳥類如雞、鴨、鵝、鵪鶉和/或火雞。

【0039】 如本文所使用，術語「治療有效量」為本揭示之的化合物的量，當向患者給予時，其治療、最小化及/或減輕疾病或病症的症狀。構成「治療有效量」的本揭示之化合物的量將根據化合物、疾病狀態及其嚴重性、待治療病患的年齡等而變化。治療有效量可由本技術領域中具有通常知識者根據其自身的知識和本揭示常規地確定。

【0040】 如本文所用，術語「治療」或「處理」定義為治療劑（即，本揭示中有用的化合物（單獨或與另一種藥劑組合））對受試者的施用或投予，或治療劑對來自受試者的分離組織或細胞系的施用或投予（例如，用於診斷或離體應用），該受試者具有癌症、癌症的症狀或發展成癌症的可能性，目的是治療、治癒、減輕、緩解、改變、補救、減輕、改善或影響癌症、癌症的症狀或發展成癌症的可能性。基於從藥物基因組學領域獲得的知識，此類治療可特定地定製或修改。

【0041】 範圍：貫穿本揭示內容，本揭示的各個態樣可以範圍的形式呈現。應理解的是，範圍形式的描述僅是為了方便及簡潔，且不應被解釋為對本揭示範圍的不靈活限制。因此，範圍的描述應被視為已具體揭示所有可能的子範圍以及該範圍內的單一數值。例如，從 1 至 6 的範圍描述應被認為已特定揭示子範圍，例如從 1 至 3、1 至 4、1 至 5、2 至 4、2 至 6、3 至 6 等，以及在該範圍內的個別及部分數字，例如 1、2、2.7、3、4、5、5.3 及 6。無論範圍的寬度如何皆適用。

【0042】 此外，在整個文件中，應以靈活的方式來解釋以範圍方式表示的值，不僅包括明確列舉為範圍限制的數值，還包括範圍內包含的所有個別數值或子範圍，如同每個數值和子範圍都被明確敘述一樣。例

如，「約 0.1%至約 5%」或「約 0.1%至 5%」的範圍應解釋為不僅包括約 0.1%至約 5%，而且包括各個值（例如 1%、2%、3%及 4%）以及在指定範圍內的子範圍（例如 0.1%至 0.5%、1.1%至 2.2%、3.3%至 4.4%）。除非另有說明，否則「約 X 至 Y」的含義與「約 X 至約 Y」的含義相同。同樣地，除非另有說明，否則「約 X，Y 或約 Z」與「約 X，約 Y 或約 Z」具有相同的含義。

【0043】 在本文中，除非上下文另外明確指出，否則術語「一」，「一種」或「該」用於包括一個或多個。除非另有說明，否則術語「或」用於表示非排他性的「或」。表達方式「A 及 B 中至少一者」或「A 或 B 中至少一者」具有與「A、B 或 A 及 B」相同之含義。此外，應理解，本文中採用的，沒有另外定義的措詞或術語僅是出於描述的目的而非限制。任何章節標題的使用均意在幫助閱讀文件，而不應理解為限制性的；與章節標題相關的信息可能出現在該特定章節內部或外部。此文件中引用的所有出版物、專利及專利文件皆藉由引用整體併入本文，如同藉由引用將其個別併入一樣。

【0044】 在本文描述的方法中，可以任何順序進行動作，除非明確陳述時間或操作序列。此外，特定的動作可同時進行，除非明確的申請專利範圍語句陳述它們是分開執行的。例如，可在單一操作中同時進行所主張的 X 行為及所主張的 Y 行為，並且所產生的過程將落入所主張方法的文義範圍內。

【0045】 在本文中使用以下縮寫：

BMDM = 骨髓來源的單核球；

GU = β -葡萄糖醛酸酶；

IFN γ = γ 干擾素；

IL4= 介白素 4；

MDSC = 骨髓來源的抑制細胞；

STING = 干擾素基因的刺激劑；及

YIV-906GU = 經 β -葡萄糖醛酸酶處理的 YIV-906 或不含葡萄糖苷酸的 YIV-906。

【0046】 在一方面，本揭示係關於不可預期的發現包含草藥萃取物 YIV-906 或葡萄糖醛酸共軛的 YIV-906 或 YIV-906GU（經 β -葡萄糖醛酸酶處理的 YIV-906 或不含葡萄糖醛酸的 YIV-906）的組成物可預防癌症的複發。在某些實施方式中，可將其中的草藥萃取物或其分離的濾分或活性化學物質與免疫檢查點抑制劑或用於治療癌症的任何其他治療劑共投予至療罹患癌症的哺乳動物，以預防癌症的複發。

【0047】 當前許多針對癌症的免疫療法試圖將「冷腫瘤」轉化為「熱腫瘤」，從而恢復免疫細胞能夠攻擊腫瘤細胞。免疫檢查點抗體（抑制劑），例如抗 PD1、抗 PDL1、抗 CTLA4，在治療許多類型的腫瘤方面取得了突破。然而，例如 HCC（肝細胞癌）、胰腺癌和結腸癌等腫瘤類型對這些抗體的反應率相對較低。這些治療藥物中有許多被設計為針對免疫週期的特定目標（相對於多個目標）。本揭示敘述 YIV-906 或 YIV-906GU，一種具有全身生物學效應的植物來源免疫調節劑，其可藉由促進適應性及先天性免疫來增強針對 Hepa 1-6 腫瘤生長的抗 PD1 作用。

【0048】 關於適應性免疫，不可預期地發現 YIV-906 與抗 PD1 劑組合可顯著減少 PD1 腫瘤蛋白質並抑制經抗 PD1 誘導的 PDL-1 表現。此外，YIV-906 可調節 IDO 活性並導致 Hepa 1-6 腫瘤的 MDSC 降低。

【0049】 另外，據報導，IDO 抑制劑可增強抗 PD1、抗 PD-L1、抗 CTLA4 對不同類型之動物腫瘤的作用。在臨床試驗中，已經進行許多嘗試將 IDO 抑制劑與免疫檢查點抑制劑聯合使用，包括艾卡噪司他（epacadostat）（IDO 抑制劑）和派姆單抗（ECHO-301/KN-252）。然而，這種組合在晚期實體腫瘤的第三期臨床試驗中未顯示出足夠的療效，且還具有嚴重的不良反應，這種挫折並未阻止使用 IDO 抑制劑治療癌症的臨床試驗。例如，BMS-986205 仍與納武單抗組合作為肝癌的

第一線或第二線療法而正在接受測試[NCT03695250]。

【0050】 不受理論的束縛，單一目標定向抑制劑，例如作為單獨的 IDO 抑制劑，可能不足以增強針對免疫檢查點抗體的抗腫瘤活性。相反地，YIV-906 不僅增強了適應性免疫反應，還增強先天性免疫反應。關於先天免疫，不可預期地發現 YIV-906 加上抗 PD1 藥物可吸引更多的 M1 巨噬細胞浸潤，這可能部分是由於在腫瘤中誘導 MCP1。有趣的是，當與伊立替康（irinotecan）（CPT-11）或索拉非尼（sorafenib）聯合使用時，YIV-906 亦增加 M1 巨噬細胞的腫瘤浸潤。

【0051】 最近，在了解巨噬細胞在免疫檢查點阻斷療法中的重要作用方面取得了進展。越來越多的證據支持腫瘤中 M1 巨噬細胞的存在可增強化學療法和標靶療法的療效。

【0052】 M1 巨噬細胞可藉由產生 NO（一氧化氮）直接殺死腫瘤細胞，或藉由活化 T 細胞間接殺死腫瘤細胞。另一方面，具有高 PD1 表現和低吞噬活性的 M2 巨噬細胞促進腫瘤生長並且不利於免疫療法。低的 PD1 表現有利於具有高吞噬活性的 M1 巨噬細胞，並可能增加免疫檢查點阻斷療法的作用。最近的報告證實，抗 PD1 藥物可幫助肺癌中巨噬細胞之極性狀態從 M2 切換成 M1 表型。單獨使用抗 PD1 藥物可使腫瘤微環境中 M1 巨噬細胞的機率增加約 40%。在一些實施方式中，令人驚訝的是，YIV-906 與抗 PD1 試劑組合可進一步增強 M1 巨噬細胞和腫瘤微環境中的先天性免疫反應。

【0053】 在各種實施方式中，YIV-906 與抗 PD1 試劑組合甚至可進一步減少腫瘤組織中的 PD1 蛋白質，此可隨既為具有高吞噬能力的 M1 巨噬細胞增殖提供有利的條件。如本文他處所詳述，YIV-906 加上抗 PD1 的組別中，PD1 蛋白質水平的降低亦可解釋，在不受理論束縛的情況下，如此低之劑量（相較於單獨的抗 PD1，至少約 1/3）的抗 PD1 與 YIV-906 組合可達到與單獨使用更高劑量的抗 PD1 藥劑的相同抗腫瘤活性。

【0054】 藉由投予 YIV-906 來增加 M1 巨噬細胞以增強先天性和

適應性免疫力，並藉由組合抗 PD1 藥劑來重新活化適應性免疫力，可在活體內對 Hepa 1-6 腫瘤生長產生不可預期的強大協同效應。這種組合不僅消除每隻小鼠的 Hepa 1-6 腫瘤，而且還模仿腫瘤特異性的疫苗樣行為，如藉由再植入之 Hepa 1-6 腫瘤的選擇性排斥以及植入的 CMT167 或 Pan02 腫瘤的生長所證實。

【0055】 IFN γ 在巨噬細胞 M1 極化中扮演重要角色。不受理論的束縛，YIV-906 可增強 IFN γ 的活性，以增強傳訊轉導反應至更高的水平；因為單獨的抗 PD1 可活化腫瘤中釋放 IFN γ 的 T 細胞，添加 YIV-906 可進一步放大 IFN γ 信號並增強 M1 巨噬細胞極化。這些 M1 巨噬細胞具有高水平的 iNOS 蛋白質，用於代謝 L-精胺酸成為瓜胺酸及 NO，從而殺死癌細胞。

【0056】 YIV-906 的另一個令人驚訝的特性是通過下調 IFR4 對 M2 誘導物 IL4 表現出抑制活性。當以 YIV-906 和抗 PD1 的組合治療時，促進 M1 極性同時抑制 M2 狀態的雙重作用確保腫瘤組織中 M1 巨噬細胞的優勢。

【0057】 在一些實施方式中，黃芩 (S) 可促進 M1 巨噬細胞極化。在一些實施方式中，一種或多種類黃酮是 S 中促進 M1 巨噬細胞極化的醫藥活性化合物。在 Hepa 1-6 腫瘤中檢測到貝加因、黃芩素和木蝴蝶素 A 的存在，且這些類黃酮可增強腫瘤中的 IFN γ ，使巨噬細胞極化為 M1。應注意的是，類黃酮並非簡單地穿過腸道進入腫瘤部位。口服後，YIV-906 的大多數類黃酮將被來自腸道微生物體組（例如大腸桿菌）的 β -葡萄糖醛酸酶進行去葡萄糖醛酸化，例如，貝加靈（含葡萄糖醛酸）將被轉化為貝加因（無葡萄糖醛酸）。糖苷配基類黃酮在通過腸道時，將被不同的 UDP-葡萄糖醛酸糖基轉移酶（UGT）同工酶進行葡萄糖醛酸化，以形成不同的葡萄糖醛酸化類黃酮代謝產物。腫瘤 β -葡萄糖醛酸酶亦可將葡萄糖醛酸化的類黃酮代謝產物轉化為糖苷配基類黃酮，例如黃芩素。UGT 與 β -葡萄糖醛酸酶的比例可能會影響葡萄糖醛酸化類黃酮的存在，並在腫瘤或其他組織中將其轉化成糖苷配基類黃酮。YIV-906 加上

抗 PD1 的組別中的腫瘤比 YIV-906 組別具有更多的黃芩素和木蝴蝶素 A，但不具有貝加因。

方法

【0058】 在一實施方式中，本揭示包括在哺乳動物中預防癌症復發的方法，其中該方法包含向所需的哺乳動物投予治療有效量的至少一種選自下列所組成群組的草藥組成物：a) 草藥萃取物 YIV-906 或其滷分或存在於該草藥萃取物或其滷分中的任何活性化學物質，(b) 葡萄糖醛酸共軛的 YIV-906 或其滷分，或葡萄糖醛酸共軛的 YIV-906 或其滷分中所存在的任何活性化學物質，(c) YIV-906GU (經 β -葡萄糖醛酸酶處理的 YIV-906 或不含葡萄糖醛酸的 YIV-906) 或其滷分，或 YIV-906GU 或其滷分中所存在的任何活性化學物質。在某些實施方式中，草藥萃取物 YIV-906 包含黃芩 (S)、甘草 (G)、芍藥 (P) 及棗 (Z) 之草藥萃取物。在某些實施方式中，進一步投予哺乳動物至少一種免疫治療劑。

【0059】 在另一種實施方式中，本發明包括減緩哺乳動物中癌症復發的方法，其中該方法包含對所需的哺乳動物投予治療有效量的本文所述之至少一種草藥組成物，及在某些實施方式中，至少一種免疫治療劑。

【0060】 在某些實施方式中，癌症包括實性瘤。在某些實施方式中，該癌症係選自黑素瘤、非小細胞肺癌、腎細胞癌、肝癌、結腸癌、尿路上皮膀胱癌及胰臟癌中的至少一種。

【0061】 在某些實施方式中，至少一種免疫治療劑係選自抗 PD1、抗 PD-L1 及抗 CTLA4 所組成之群組的免疫檢查點抑制劑。在某些實施方式中，至少一種免疫檢查點抑制劑選自依伊匹木單抗 (Ipilimumab)、派姆單抗、納武單抗、度伐利尤單抗 (Durvalumab) 及阿特朱單抗 (Atezolizumab) 所組成之群組。

【0062】 在某些實施方式中，至少一種免疫治療劑是選自下列所組成群組之抗體：Siglec 15 抗體、抗磷脂絲胺酸、抗 OX40、抗 CD73、

抗 TIM3、抗 CD24、抗 CD47、抗 PD1、抗 PDL1、抗 CTLA4、抗 GITR、抗 CD27、抗 CD28、抗 CD122、抗 TIGIT、抗 VISTA、抗 ICOS 及抗 LAG3。

【0063】 在某些實施方式中，投予草藥組成物可增強至少一種免疫治療劑的反應。

【0064】 在某些實施方式中，將草藥組成物口服投予哺乳動物。在某些實施方式中，將草藥組成物以選自藥丸、錠劑、膠囊、湯劑、茶劑、濃縮物、糖衣錠、液體、滴劑和明膠衣錠（gelcap）所組成群組之形式投予哺乳動物。

【0065】 在某些實施方式中，草藥組成物的治療有效量約為 20 毫克/天至約 2000 毫克/天。在某些實施方式中，治療有效量的草藥組成物（YIV-906 或 YIV-906GU）約為 20、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500、1550、1600、1650、1700、1750、1800、1850、1900、1950 或約 2000 mg/天。

【0066】 在一特定的實施方式中，草藥組成物的治療有效量為例如約 1600 mg/天。

【0067】 在某些實施方式中，草藥組成物每天投予兩次。在某些實施方式中，將該草藥組成物投予約一兩週，然後暫停治療至少一週。

【0068】 在某些實施方式中，其中在施用化學療法或放射療法之前投予草藥組成物每天兩次，約 30 分鐘。在某些實施方式中，給藥持續約 4 天。

【0069】 在某些實施方式中，在選自投予一種或多種免疫治療劑之前、同時和之後的時間，投予該草藥組合物至該哺乳動物。

【0070】 在某些實施方式中，投予組成物可增強 IFN γ 作用在極化巨噬細胞成為 M1（或腫瘤排斥）表現。在某些實施方式中，投予該組成物抑制 IL4 作用於極化巨噬細胞成為 M2（或腫瘤促進）表現型。在

某些實施方式中，投予組成物促進 STING 激動劑作用。在某些實施方式中，投予組成物降低或抑制 CD73 活性。在某些實施方式中，投予組成物對吲哚胺 2,3-二氧酶（IDO）活性具有抑制作用。

【0071】 在某些實施方式中，該哺乳動物是人類。

給藥/劑量/調配物

【0072】 治療方案可影響有效量的組成。治療調配物可在本揭示所考量之疾病或失調發作之前或之後投予受試者。此外，可以每日或依序投予若干分開的劑量以及交錯的劑量，或該劑量可被連續輸注，或可為快速推注（bolus injection）。此外，可視治療或預防情況的緊急程度，按比例增加或減少治療調配物的劑量。

【0073】 可使用已知的程序、劑量及時間期間投予本揭示之組成物於病患，較佳為哺乳動物，更佳為人類，以有效治療本揭示所考量之疾病或病症。達到治療效果所必需的治療化合物有效量可根據許多因素而變化，例如被治療之病患的疾病或病症的狀態、年齡、性別及體重；以及治療化合物治療本揭示所考量的疾病或病症的能力。可調整劑量方案以提供優化的治療反應。例如，可每日投予若干分開的劑量，或劑量可該視如治療情況的緊急程度而按比例減少。本發明治療化合物的有效劑量範圍的非限制性實例為約為每日 1 至 1,000 mg/kg 體重。可用於實施本揭示之藥物組成物可投予以遞送 1 ng/kg/天至 100 mg/kg/天之劑量。本領域中具有通常知識者將能研究相關因素，並在不進行過度實驗的情況下確定治療化合物的有效量。

【0074】 特別是，所選擇的劑量水平取決於多種因素，包括所使用特定化合物的活性、給藥時間、化合物的排泄速率、治療持續時間、與化合物組合使用的其他藥物、化合物或物質、年齡、性別、體重，症狀、所治療病患的一般健康狀況和既往病史，以及醫學領域中所熟知的類似因素。

【0075】 本技術領域中具有通常知識的醫師，例如，內科醫師或獸

醫師可容易地確定及囑咐所需醫藥組成物的有效量。例如，內科醫師或獸醫師可從低於欲達到治療效果所需之劑量水平的用於醫藥物組成物的本揭示之化合物劑量開始，並逐漸增加劑量，直到達到所需的效果。

【0076】 在特定實施方式中，為了便於投予及劑量的一致性，以單位劑型配製化合物是有利的。如本文所使用的單位劑型是指適合作為欲治療病患的統一劑量的物理上獨立的單位；含有預定量的治療化合物的每個單位經計算與所需的藥物媒劑聯合產生所需的治療效果。本揭示的單位劑型取決於(a)治療化合物的獨特特徵和欲達到的特定治療效果，及(b)混合/調配此類治療化合物用於治療本揭示中所考慮的疾病或病症的治療性化合物領域中固有的限制。

【0077】 在某些實施方式中，使用一或多種醫藥上可接受的賦形劑或載劑來調配本揭示之組成物。在其他實施方式中，本揭示之醫藥組成物包含治療有效量的本揭示化合物及醫藥上可接受的載劑。在另外其他實施方式中，本揭示的化合物為組成物中唯一的生物活性劑（即，能夠治療癌症）。在另外其他實施方式中，本揭示的化合物為治療有效量之組成物中唯一的生物活性劑（即，能夠治療癌症）。

【0078】 載劑可為溶劑或是含有例如水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇及液體聚乙二醇等）、其適合的混合物及植物油等之分散介質。可例如藉由使用如卵磷脂的包覆、藉由在分散的情況下維持所需的粒徑及藉由使用界面活性劑來維持適當的流動性。可藉由各種抗菌劑及抗真菌劑，例如對羥苯甲酸酯類（**parabens**）、氯丁醇、苯酚、抗壞血酸、乙汞硫柳酸鈉等來防止微生物的作用。在許多情況下，在組成物中較佳可包括等滲劑，例如糖類、氯化鈉或多元醇（如甘露醇及山梨醇）。藉由在組成物中包括延遲吸收的藥劑，例如，單硬脂酸鋁或明膠，可實現可注射組成物的延長吸收。

【0079】 在某些實施方式中，以每天投予病患 1 至 5 次或更多次之劑量的本揭示之組成物。在其他實施方式中，本揭示之組成物以一劑量範圍投予病患，包括，但不限於每天一次、每兩天、每三天至每週一次

及每兩週一次。對於本領域技術人員而言顯而易見的是，本揭示組成物的各種組合的給藥頻率因個體而異，取決於許多因素，包括但不限於年齡、疾病或待治療的疾病、性別、整體健康狀況和其他因素。因此，本揭示不應被解釋為限於任何特定的劑量方案，且要投予任何病患的精確劑量和組成物是由主治醫師在考慮病患所有其他因素的情況下確定的。

【0080】 本揭示之化合物可在下列範圍內投予：約 1 mg 至約 10,000 mg、約 20 mg 至約 9,500 mg、約 40 mg 至約 9,000 mg、約 75 mg 至約 8,500 mg、約 150 mg 至約 7,500 mg、約 200 mg 至約 7,000 mg、約 400 mg 至約 6,000 mg、約 500 mg 至約 5,000 mg、約 750 mg 至約 4,000 mg、約 1,000 mg 至約 3,000 mg、約 1,000 mg 至約 2,500 mg、約 20 mg 至約 2,000 mg，及其等之間的所有或部分或全部增加量。在某些實施方式中，本揭示之化合物及/或組成物的劑量約 800 mg。

【0081】 在某些實施方式中，本揭示涉及經包裝的醫藥組成物，其包含容納治療有效量的本揭示化合物的容器，該化合物單獨或與第二藥劑組合；及使用該化合物治療、預防或減輕本揭示所考量之疾病或病症的一或多種徵狀的說明書。

【0082】 調配物可與習知賦形劑混合使用，賦形劑即為適用於本領域已知的口服、經腸胃外、經鼻、靜脈內、皮下、腸內或其他任何適當給藥模式的醫藥上可接受之有機或無機載劑物質。醫藥製劑可經滅菌，且如果需要可與輔助劑混合，例如潤滑劑、防腐劑、穩定劑、濕潤劑、乳化劑、用於影響滲透壓緩衝液的鹽類、著色劑、調味劑及/或芳香物質等。如果需要，其等亦可與其它活性劑組合。

【0083】 任何本揭示之組成物的給藥途徑包括口服、經鼻、經直腸、陰道內、經腸胃外、經頰、舌下或局部給藥。可調配用於本揭示的化合物以用於經任何合適途徑投予，例如用於經口或非經腸胃道，例如，經皮或經黏膜（例如，舌下、舌側、（經）口頰、（經）尿道、陰道（例如，經陰道及經陰道周圍）、鼻腔（內）及（經）直腸）、膀胱內、肺

內、十二指腸內、胃內、鞘內、皮下、肌肉內、皮內、腹膜內、動脈內、靜脈內、支氣管內、吸入及局部投予。

【0084】 適合的組成物及劑型包括例如錠劑、膠囊、膠囊型錠劑、丸劑、軟膠囊 (gel caps)、口含劑、分散劑、懸浮劑、溶液、糖漿、顆粒、珠劑、經皮貼劑、凝膠、粉末、粒劑、乳漿劑、菱形錠、乳霜、膏劑、硬膏劑 (plasters)、洗劑、盤劑 (discs)、栓劑、用於鼻或口服投予之液體噴霧劑、用於吸入的乾粉或霧化調配物、用於膀胱內投予的組成物及調配物等。應理解，可用於本揭示之調配物及組成物不限於本文所述的特定調配物及組成物。

口服投予

【0085】 關於口服投予，特別適合的為湯劑、茶劑、濃縮物、錠劑、糖衣錠、液體、滴劑、栓劑、或膠囊、膠囊型錠劑及軟膠囊。用於口服的組成物可根據本技術領域已知的任何方法製備，且該組成物可包含一或多種選自由惰性、無毒的醫藥賦形劑所組成群組的藥劑，其適於製造錠劑。此類賦形劑包括例如惰性稀釋劑，如乳糖；粒化劑及崩解劑，如玉米澱粉；黏合劑，如澱粉；及潤滑劑，如硬脂酸鎂。錠劑可為未經塗覆的，或其可藉由已知技術塗覆，以提高美觀度或延緩活性成分的釋放。口服用途的調配物亦可以硬明膠膠囊形式存在，其中活性成分與惰性稀釋劑混合。

【0086】 關於口服投予，本揭示之化合物可為錠劑或膠囊形式，其與醫藥上可接受的賦形劑藉由習知方法製備，該賦形劑例如為黏合劑（例如，聚乙烯吡咯啉酮、羥丙基纖維素或羥丙基甲基纖維素）；填充劑（例如，玉米澱粉、乳糖、微晶纖維素或磷酸鈣）；潤滑劑（例如，硬脂酸鎂、滑石或二氧化矽）；崩解劑（例如，澱粉乙醇酸鈉）；或濕潤劑（例如，月桂基硫酸鈉）。如果需要，可使用適合的方法和塗布材料塗布錠劑，例如 OPADRY™ 薄膜塗布系統（可從 Colorcon, West Point, Pa. 取得）（例如 OPADRY™ OY Type、OYC Type、Organic

Enteric OY-P Type、Aqueous Enteric OY-A Type、OY-PM Type 及 OPADRY™ White、32K18400)。用於口服投予的液體製劑可為溶液、糖漿或懸浮液形式。液體製劑可與醫藥上可接受的添加劑藉由習知方法製備，該添加劑可例如為懸浮劑（例如，山梨糖醇糖漿、甲基纖維素或氫化食用脂肪）；乳化劑（例如，卵磷脂或阿拉伯膠）；非水性媒劑（例如，杏仁油、油性酯類或乙醇）；及防腐劑（例如，對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯或山梨酸）。

【0087】 造粒技術在製藥技術中熟知的，用於修改活性成分的起始粉末或其他顆粒材料。粉末通常與黏合劑材料混合成較大的永久自由流動的黏聚物或顆粒，稱為「造粒」。例如，使用溶劑的「濕」造粒方法的一般特徵在於將粉末與黏合劑材料混合並在一定條件下用水或有機溶劑潤濕，從而形成濕的顆粒狀物質，然後溶劑必須由此形成蒸發。

【0088】 熔體造粒通常在於使用在室溫下為固體或半固體的材料（即，具有相對低的軟化或熔點範圍）以促進粉末或其他材料的造粒，基本上在沒有添加水或其他液體溶劑的情況下。當加熱至熔點範圍內的溫度時，低熔化固體液化以充當黏合劑或造粒介質。液化的固體在與其接觸的粉末材料的表面之上擴散液化的固體自身，並且在冷卻時形成固體顆粒狀物質，其中初始材料結合在一起。然後可將所產生的熔體造粒提供給壓錠機或包封以製備口服劑型。熔體造粒通過形成固體分散體或固體溶液來改善活性物質（即，藥物）的溶解速率和生物利用度。

【0089】 美國專利號 5,169,645 揭示具有改進的流動性能的可直接壓縮之含蠟顆粒。當蠟在熔體中與某些流動改進添加劑摻合，然後冷卻和造粒摻合物時，得到顆粒。在某些實施方式中，只有蠟本身在蠟和添加劑的熔體組合中熔化，並且在其他情況下，蠟和添加劑都熔化。

【0090】 本揭示亦包括多層錠劑，其包含提供用於一種或多種本揭示的化合物的延遲釋放的層，和提供用於治療本揭示所考慮的疾病或病症的藥物的立即釋放的另一層。使用蠟/pH 敏感性聚合物混合物，可以獲得胃不溶性組成物，其中捕獲活性成分，確保其延遲釋放。

非經腸胃道投予

【0091】 如本文所使用，醫藥組成物的「非腸胃道投予」包括任何投予途徑，其特徵在於對受試者組織的物理破壞及透過組織中的裂口投予醫藥組成物。因此，非腸胃道投予包括，但不限於經由注射組成物、透過手術切口施用組成物、透過穿透組織的非手術傷口施用組成物來投予醫藥組成物等。具體而言，非腸胃道投予包括，但不限於皮下、靜脈內、腹膜內、肌內、胸骨內注射及腎臟透析輸注技術。

【0092】 適於非腸胃道投予的醫藥組成物的調配物包含與醫藥上可接受的載劑（例如無菌水或無菌等滲鹽水）組合的活性成分，此類調配物可以適於推注投予或連續投予的形式製備、包裝或銷售。可注射調配物可以單位劑型製備、包裝或銷售，例如以含有防腐劑的安瓿或多-劑量容器形式。用於非腸胃道投予的調配物包括，但不限於懸浮液、溶液、在油性或水性媒劑中的乳劑、膏劑及可植入性緩釋或生物可降解調配物。此類調配物可進一步包含一或多種額外成分，包括，但不限於懸浮劑、穩定劑或分散劑。-在用於非腸胃道投予之調配物的一實施方式中，活性成分以乾燥形式（即粉末或顆粒）提供，並在非腸胃道投予之前以適當媒劑（例如無菌無熱原水）回溶組成物。

【0093】 藥物組成物可以無菌可注射水性或油性懸浮液或溶液的形式製備、包裝或銷售。此懸浮液或溶液可根據已知技術調配，且除活性成分外，亦可包含另外成分如本文所述的分散劑、潤濕劑或懸浮劑。此類無菌可注射製劑可使用無毒的腸胃道外可接受的稀釋劑或溶劑製備，舉例而言，如水或 1,3-丁二醇。其他可接受的稀釋劑和溶劑包括但不限於林格氏（**Ringer**）溶液、等滲氯化鈉溶液和固定油如合成的甘油單酯或甘油二酯。其它可用於腸胃外給予的製劑包括含有微晶形式、在脂質體製劑中或作為可生物降解的聚合物系統的組分的活性成分的那些製劑。用於緩釋或植入的組成物可包含藥學上可接受的聚合或疏水材料如乳液、離子交換樹脂、微溶聚合物或微溶鹽。

控制釋放調配物及藥物遞送系統

【0094】 在某些實施方式中，本揭示的調配物可為短期、快速補充及受控制的，例如緩釋、延遲釋放及脈衝釋放（**pulsatile release**）調配物，但不以此為限。

【0095】 術語持續釋放以其習知含義使用，係指在延長的時間區段內提供藥物的逐漸釋放的藥物調配物，且雖非必要，但可在延長的時間區段期間造成藥物在血中濃度基本上恆定。這段期可長達一個月或更長，且其應為一種比以推注形式投予相同量之藥劑更長的釋放。

【0096】 為了持續釋放，該化合物可與提供持續釋放性質於化合物的適當聚合物或疏水性材料配製。因此，用於本揭示之方法的化合物可以微粒的形式投予，例如藉由注射或藉由植入晶片（**wafers**）或盤劑（**discs**）的形式投予。

【0097】 在本揭示之一實施方式中，本揭示之化合物單獨或與另一種藥劑組合，使用緩釋調配物投予至病患。

【0098】 術語延遲釋放在本文中以其習知含義使用，係指在藥物投予後延遲一段時間後才提供藥物的初始釋放的藥物調配物，且雖非必要，但包括約 10 分鐘至最多約 12 個小時的延遲。

【0099】 術語脈衝釋放在本文中以其習知含義使用，係指一種提供藥物釋放以便在藥物投予後產生藥物的脈衝式血漿輪廓的藥物調配物。

【0100】 術語立即釋放以其習知含義使用，係指在藥物投予後立即提供藥物釋放的藥物調配物。

【0101】 如本文所使用，短期係指在藥物施用後直至包括約 8 小時、約 7 小時、約 6 小時、約 5 小時、約 4 小時、約 3 小時、約 2 小時、約 1 小時、約 40 分鐘、約 20 分鐘、約 10 分鐘或約 1 分鐘，以及其任何、全部或部分時間增加量的任何期間。

【0102】 如本文所使用，快速補充係指在藥物施用後直至包括約 8 小時、約 7 小時、約 6 小時、約 5 小時、約 4 小時、約 3 小時、約 2 小

時、約 1 小時、約 40 分鐘、約 20 分鐘、約 10 分鐘或約 1 分鐘，以及其任何、全部或部分時間增加量的任何期間。

給藥

【0103】 本揭示之化合物的治療有效量或劑量取決於病患的年齡和體重，病患的當前醫療狀況及本揭示中所考量之疾病或病症的進展。技術人員能夠依據這些及其他因素決定合適的劑量。

【0104】 本發明之化合物、組成物或萃取物的適當劑量可在每日約 0.01 mg 至約 5,000 mg 的範圍內，例如每日約 0.1 mg 至約 1,000 mg，例如約 1 mg 至約 500 mg，例如約 5 mg 至約 250 mg。劑量可單劑量或多劑量投予，例如每日 1 至 5 次或更多次。當使用多劑量時，每種劑量的量可相同或不同，例如，每天 1 mg 的劑量可作為兩個 0.5 mg 劑量以約 12 小時之間隔投予。

【0105】 在各種實施方式中，投予的 YIV-906 或 YIV-906GU 草藥萃取物的量或劑量可約為 0.5 mg/kg 至約 5000 mg/kg、約 1 mg/kg 至約 2500 mg/kg、約 5 mg/kg 至約 1000 mg/kg 或約 10 mg/kg 至約 1000 mg/kg。在各種實施方式中，投予的 YIV-906 或 YIV-906GU 草藥萃取物的量或劑量可約為 0.01、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380、400、420、440、460、480、500、520、540、560、580、600、620、640、660、680、700、720、740、760、780、800、820、840、860、880、900、920、940、960、980、1000、1020、1040、1060、1080、1100、1120、1140、1160、1180、1200、1220、1240、1260、1280、1300、1320、1340、1360、1380、1400、1420、1440、1460、1480、1500、1520、1540、1560、1580、1600、1620、1640、1660、1680、1700、1720、1740、1760、1780、1800、1820、1840、1860、1880、1900、1920、1940、1960、1980、2000、2500、3000、3500、4000、4500

或約 5000 mg/kg。YIV-906 或 YIV-906GU 草藥萃取物的這些量可使用本文所述的任何給藥方案投予。

【0106】 在各種實施方式中，本文所述之任何免疫檢查點抑制劑或免疫治療劑的量或劑量可約為 0.01 mg/kg 至約 50 mg/kg、約 0.05 mg/kg 至約 30 mg/kg 或約 1 mg/kg 至約 20 mg/kg。在各種實施方式中，本文所述之任何免疫檢查點抑制劑或免疫治療劑的量或劑量可為 0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.2、1.4、1.6、1.8、2、2.2、2.4、2.6、2.8、3、3.2、3.4、3.6、3.8、4、4.2、4.4、4.6、4.8、5、5.2、5.4、5.6、5.8、6、6.2、6.4、6.6、6.8、7、7.2、7.4、7.6、7.8、8、8.2、8.4、8.6、8.8、9、9.2、9.4、9.6、9.8、10、10.2、10.4、10.6、10.8、11、11.2、11.4、11.6、11.8、12、12.2、12.4、12.6、12.8、13、13.2、13.4、13.6、13.8、14、14.2、14.4、14.6、14.8、15、15.2、15.4、15.6、15.8、16、16.2、16.4、16.6、16.8、17、17.2、17.4、17.6、17.8、18、18.2、18.4、18.6、18.8、19、19.2、19.4、19.6、19.8 或約 20 mg/kg。在一些實施方式中，本文所述之任何免疫檢查點抑制劑或免疫治療劑的每日最大投予量或劑量可約為 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380、400、420、440、460、480、500、520、540、560、580、600、620、640、660、680、700、720、740、760、780、800、820、840、860、880、900、920、940、960、980、1000、1020、1040、1060、1080、1100、1120、1140、1160、1180、1200、1220、1240、1260、1280、1300、1320、1340、1360、1380、1400、1420、1440、1460、1480、1500、1520、1540、1560、1580、1600、1620、1640、1660、1680、1700、1720、1740、1760、1780、1800、1820、1840、1860、1880、1900、1920、1940、1960、1980 或約 2000 mg。

【0107】 在一些實施方式中，YIV-906 和單一免疫治療劑是醫藥組成物中唯一的治療活性劑。在一些實施方式中，YIV-906GU 和單一

免疫治療劑是醫藥組成物中唯一的治療活性劑。在一些實施方式中，YIV-906 或 YIV-906GU 與抗 PD1 檢查點抑制劑是投予受試者的醫藥組成物中唯一的治療活性劑。在一些實施方式中，YIV-906 或 YIV-906GU 與抗 PD-L1 檢查點抑制劑是投予受試者的醫藥組成物中唯一的治療活性劑。在一些實施方式中，YIV-906 或 YIV-906GU 與抗 CTLA4 檢查點抑制劑是投予受試者的醫藥組成物中唯一的治療活性劑。YIV-906 或 YIV-906GU 可與本文所述的任何免疫治療劑同時或依次投予。在一些實施方式中，相較於單獨投予抗 PD1、抗 PDL1 及/或抗 CTLA4 藥劑相比，當與 YIV-906 或 YIV-906GU 一起給藥時，只需更少量的抗 PD1、抗 PDL1 及/或抗 CTLA4 藥劑來產生治療效果。抗 PD1、相較於單獨投予抗 PD1、抗 PDL1 及/或抗 CTLA4 藥劑相比，當與 YIV-906 或 YIV-906GU 投予時，抗 PDL1 及/或抗 CTLA4 藥劑的較少量可為一劑量，約為 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、33、35、40、45、50、55、60、65 或約 70% 的較少量。

【0108】 可理解的是，可以每日投予化合物的量來給藥，在非限制性實例中可為每天、每隔一日、每 2 日、每 3 日、每 4 日或每 5 日給藥。例如，每隔一日投予一次，可在星期一開始施用一日 5 毫克的劑量，在星期三再施用一日 5 毫克的劑量，然後再於星期五繼續施用一日 5 毫克的劑量，依此類推。

【0109】 在病患狀態確實有所改善的情形中，根據醫生的判斷，本揭示的抑制劑可選擇地持續給予；或者，被投予的藥物之劑量暫時減少或暫時停止一段時間（即「停藥期」）。停藥期的長度可選擇地在 2 天到 1 年之間變化，僅以舉例之方式包括 2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、7 日、10 日、12 日、15 日、20 日、28 日、35 日、50 日、70 日、100 日、120 日、150 日、180 日、200 日、250 日、280 日、300 日、320 日、350 日或 365 日。停藥期期間的劑量減少包括 10%-100%，僅以舉例之方式包括 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、

55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

【0110】 一旦病患病情得到改善，必要時投予維持劑量。隨後，劑量或給藥頻率或兩者皆以疾病或病症的函數降低至保持改善疾病的水平。在某些實施方式中，病患在任何徵候及/或感染復發時需要長期間歇性治療。

【0111】 用於本揭示之方法的化合物可調配成單位劑型。術語「單位劑型」係指物理上離散的單位，適合作為接受治療之病患的統一劑量，每個單位均包含經計算可產生所欲之治療效果的預定量活性物質，可選擇地與適當醫藥載劑結合使用。單位劑型可用於單次日劑量或多次日劑量（例如每日約1至5次或更多次）中的一劑。當使用多次日劑量時，單位劑型對於每一劑量可為相同或不同。

【0112】 此類治療方案的毒性和治療功效可選擇地在實驗動物中確定，包括，但不限於測定LD₅₀（對50%的群體致死之劑量）及ED₅₀（對50%的群體治療有效之劑量）。毒性和治療效果之間的劑量比是治療指數，其表示為LD₅₀和ED₅₀之間的比率。從動物研究所獲得的數據可選擇地用於調配用於人類的劑量範圍。此類化合物的劑量較佳位於循環濃度範圍內，包括具有最小毒性的ED₅₀。劑量可選擇地在此範圍內變化，這取決於所用的劑型和所用的給藥途徑。

【0113】 除非另有說明，否則本揭示的實施採用分子生物學（包括重組技術）、微生物學、細胞生物學、生物化學和免疫學的習知技術，其等皆在技術人員的能力範圍內。此類技術已在文獻中得到充分說明，例如，“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, second edition (Sambrook, 1989)；“Oligonucleotide Synthesis” (Gait, 1984)；“Animal Cell Culture” (Freshney, 1987)；“Methods in Enzymology” “Handbook of Experimental Immunology” (Weir, 1996)；“Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells” (Miller and Calos, 1987)；“Current Protocols in Molecular Biology” (Ausubel, 1987)；“PCR: The Polymerase Chain Reaction”, (Mullis, 1994)；

“Current Protocols in Immunology” (Coligan, 1991)。這些技術適用於本揭示的多核苷酸和多肽的製造，且因此可在進行及實施本揭示時考慮。在以下章節中將討論用於特定實施方式的特別有用的技術。

【0114】 本領域熟悉技術者將認識到或能使用不超過常規實驗來判明本文所述的具體程序、實施方式、申請專利範圍和實施例的許多等效物，這些等效物被認為在本揭示之範圍內，且由後附之申請專利範圍所涵蓋。舉例而言，應當理解，以本領域公認的替代方案並且僅使用常規實驗修改反應條件，包括但不限於反應時間、反應尺寸/體積和實驗試劑都在本案的範圍內。

【0115】 應理解的是，無論在本文何處提供的值和範圍，範圍形式的描述僅是為了方便及簡潔，且不應被解釋為對本揭示範圍的不靈活限制。因此，這些數值及範圍所涵蓋的所有數值及範圍皆包括在本揭示的範圍內。此外，落入這些範圍內的所有數值以及數值範圍的上限或下限亦被本申請案所預期。範圍的描述應被視為已具體揭示所有可能的子範圍以及該範圍內的單一數值，在適當的情況下，數值的部分整數應在範圍內。例如，從 1 至 6 的範圍描述應被認為已特定揭示子範圍，例如從 1 至 3、1 至 4、1 至 5、2 至 4、2 至 6、3 至 6 等，以及在該範圍內的個別數字，例如 1、2、2.7、3、4、5、5.3 及 6。無論範圍的寬度如何皆適用。

實施例

【0116】 參照以下實驗實施例進一步詳細描述本揭示。提供這些實施例僅為說明之目的，除非另有說明，否則並不意圖構成限制。因此，本揭示決不應被解釋為受限於以下實施例，而是應解釋為涵蓋由本文所提供之教示而變得顯而易見的任何及所有變化態樣。

【0117】 無需進一步敘述，相信本領域具有普通知識的技術人員可使用先前的描述及以下的說明性實施例來製造和利用本揭示的化合物並實施所請之方法。因此，以下實施例具體指出本發明的較佳實施方式，

且不應被解釋為以任何方式限制本揭示內容的其餘部分。

材料及方法

動物研究

【0118】 將 Hepa 1-6 細胞（在 100 μ L 磷酸鹽緩衝食鹽水中約 2×10^6 個細胞）皮下移植到 4 至 6 週齡的雌性 C57BL6 小鼠（Charles River Laboratories, Wilmington, MA）中，每天監測體重、腫瘤大小和小鼠死亡率。10-14 天後，選擇腫瘤大小為 180 mm³ 的小鼠，使用公式長度 $\times$ 寬度² $\times \pi/6$ 檢查腫瘤體積。每組由七隻小鼠組成，YIV-906 口服投予 4 天（口服 500 mg/kg，每天兩次），而抗 PD1 腹膜內給藥 7 天（200 μ g/小鼠，每天一次）。在對照組中，小鼠口服投予水。在第 0 天，在投予抗 PD1 前 30 分鐘，投予 YIV-906。

【0119】 在各種實施方式中，在本文所述的實驗及圖式中使用的抗 PD1 藥劑是小鼠抗 PD1 單株抗體，殖株 G4，倉鼠 IgG。

免疫組織化學

【0120】 治療 4 天後，小鼠在藥物治療開始 2 天或 4 天後藉由頸脫位而終結。去除腸和結腸組織，固定在福馬林中，包埋在石蠟中，並切成 10 μ m。將切片安裝在 Superfrost 載玻片上，以二甲苯脫蠟，並逐漸水合。藉由在蒸汽下蒸 30 分鐘，以具有 0.02% Tween-20 的 10 mM 檸檬酸鈉 pH 6.0 達成抗原修復。使用含有 1% BSA 及 0.5% Tween-20 的 Tris-HCl 緩衝液稀釋初級抗體，並在室溫溫育 1 小時。作為陰性對照，進行一組不含初級抗體的載玻片，使用 Super-picture 免疫組織化學檢測套組（Invitrogen, Inc.）進行檢測，載玻片以蘇木精複染並固定。所使用的抗體為：經裂解的半胱天冬酶-3（#9664, Cell Signaling Technology, Inc.）、經裂解的半胱天冬酶-8（#9496, Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA）、經裂解的半胱天冬酶-9（#ab52298, Abcam, Cambridge, England）、F4/80（#ab16911, Abcam）。

流式細胞儀分析

【0121】 將腫瘤組織（200 mg）在 0.5 ml RPMI 640 培養基中切成小塊，加入 Liberase 在室溫下分類連接的腫瘤細胞 15 分鐘，將經分類的細胞通過細胞濾器（70 μ m）。在 1000g 離心 10 分鐘離下細胞後，將紅血球以 1 mL BD Pharm Lyse 於冰上裂解。在 1000 g 離心 10 分鐘收集細胞，每個染色樣品使用 2×10^6 個細胞，將細胞再懸浮於具有 3% FBS 的 RPMI 640 中。使用抗小鼠 CD16/CD32 植株 2.4G2（BD Pharmingen，#553142）阻斷細胞上的 Fc 受體。將總 T 細胞在冰上以抗 CD3-PE（BD pharmingen，植株 145-2c11，#553064）染色 30 分鐘。固定/透化（eBioscience）用於固定和透化細胞。活化的細胞毒性 T 細胞進一步以抗顆粒酶 B-Pacific Blue（BioLegend，植株 GB11，#515408）染色，並將 T 調節細胞以抗 FOX3P-APC 染色（eBioscience，植株 FJK16s，#17-5773-83）。洗滌經染色的細胞，並藉由流式細胞儀 LSR II（BD Canto II，New Jersey，USA）分析。

西方墨點法

【0122】 將 BMDM 或 RAW264.7 細胞（American Type Culture Collection）在具有 5% CO₂ 的培養箱中，於 37 °C 培養在補充有 5% FBS 的 RPMI 中，將 2×10^6 個細胞接種至 12 孔盤中。藥物處理後，將細胞溶解在 0.3 ml 蛋白質上樣緩衝液（loading buffer）中（對於 20 ml 緩衝液，4 mL 10% SDS、0.75 mL Tris-HCl（pH 6.8）、5 mL 10% 甘油、0.5 mL β -巰基乙醇和溴酚藍），並以超音波處理 30 秒以破壞 DNA。細胞萃取物通過 Mini PROTEAN® TGX Precast 凝膠（12%，15 孔齒梳（comb），15 μ L/孔 Cat. #456-1046）在電泳緩衝液（10 $\times$ ，Tris 30 g，甘胺酸 144 g，SDS 10 g，與二次蒸餾 H₂O）中電泳，並在轉移緩衝液（Tris 30 g，甘胺酸 144 g，SDS 0.5 g）中轉移到硝酸纖維素膜（Bio-Rad Laboratories，Inc）。將膜阻斷，並在含有 1:5000

脫脂牛奶 (Blotting-Grade Blocker , Cat. #170-0604 Nonfat dry milk) 的 TBS-T 緩衝液 (TBST + 1% Tween , AB14330-01000 , American Bionanalytical) 中以探針探測。

【0123】 初級抗體 (PD-1 (D7D5W) XP® Rabbit mAb # 84651S Mouse Specific lot : 1 Ref : 08/2017) 以 1 : 1000 在 TBS-T 緩衝液 (TBST + 1% Tween , AB14330-01000 , American Bionanalytical) 中與膜在 4℃ 下震盪溫育隔夜，組蛋白 H3 用作標準化內部對照，並以 1 : 1000 稀釋的單株肌動蛋白抗體 (H3 (D1H2) XP® Rabbit mAb #4499S Ref : 06/2017) 檢測。以 TBS-T 洗滌 3 次後，每次 5 分鐘，然後將膜與山羊抗兔 IgG-HRP SC-2004 , lot #B1711 HRP 1 : 5000 共軛進一步溫育，並在室溫下溫育 1 小時，然後將膜再次以 TBS-T 洗滌 3 次。使用 1 mL 穩定的過氧化物溶液 (SuperSignal™ West Pico PLUS , Prod # 1863097) 及 1 mL 發光胺/增強劑溶液 (SuperSignal™ West Pico PLUS , Prod # 1863096) 進行光密度計的可視化及掃描。抗體名單：PD-1 (D7D5W) XP® Rabbit mAb #84651S Mouse Specific lot:1 Ref : 08/2017 (Cell Signaling) 、抗 PD-L1 抗體 [EPR20529]ab213480 、 Arginase-1 (D4E3MTM) XP® Rabbit mAb#93668 (Cell Signaling) 、 iNOS Antibody (Mouse Specific) #2982 (Cell Signaling) 、 Jak1 (6G4) Rabbit mAb#3344 (Cell Signaling) 、 P-Jak1 (Y1034/1035) (D7N4Z) Rabbit mAb#74129 (Cell Signaling) 、 Jak2 (D2E12) XP® Rabbit mAb #3230 (Cell Signaling) 、 P-Jak2 (Y1008) (D4A8) Rabbit mAb #8082 (Cell Signaling) 、 Stat1 Antibody#9172 (Cell Signaling) 、 Phospho-Stat 1 (Tyr701) (D4A7) Rabbit mAb#7649 (Cell Signaling) 、 Stat2 (D9J7L) Rabbit mAb#72604 (Cell Signaling) 、 Phospho-Stat2 (Tyr690) -R sc-21689 #K1609 (SantaCruz) 、 Stat6 (D3H4) Rabbit mAb#5397 (Cell Signaling) 、 Phospho-Stat6 (Tyr641) (D8S9Y) Rabbit mAb#56554 (Cell Signaling) 、 IRF-1 (D5E4) XP® Rabbit

mAb #8478 (Cell Signaling) 、IRF-4 (D9P5H) Rabbit mAb#15106 (Cell Signaling) 。

定量即時 PCR (qRT-PCR)

【0124】 以 TRIzol 試劑 (Invitrogen, California, USA) 萃取總 RNA，收集水相，然後依據製造商的說明添加一體積的乙醇。離心之前，將此漿液添加至管柱 (miRNeasy，Qiagen，Venlo，Limburg) 中，以進一步萃取並同時進行 DNA 消化 (RNase-Free DNase set，Qiagen)。使用隨機引子和反轉錄酶 MMLV (New England Biolabs，Ipswich，MA) 合成 cDNA。使用 iTaq™ SYBR® Green Supermix 和 CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 執行 qPCR 測定。針對 β -肌動蛋白的目標基因的相對表現表示為 $2^{-\Delta C_t}$ ，並以經 YIV-906 及/或抗 PD1 處理之樣品相對於未處理之樣品的表現 mRNA 計算倍數差異。引子序列顯示於表 1。

表 1：qRT-PCR 中使用的引子序列：

基因	SEQ ID NO:	正向 (F) 反向 (R)	DNA 序列
mIFNg	1	F	ggcaaaaggatggtgacatgaaa
	2	R	tagtaatcagggtgtgattcaatg
mIFNb	3	F	tgtctttcttgtcttcagaaa
	4	R	tttctgaagacaagaaagaca
mgrB	5	F	cactctcgaccctacatggcctt
	6	R	gtgacatttattatacttccttcac
mperf	7	F	gtgtcgcacgtacagtttcgcctg
	8	R	ccgtgataaagtgcgtgccatag
mPDL1	9	F	cacttgctacgggcgtttactatca
	10	R	gaatcacttgctcatcttccttttc
mPDI	11	F	gccaggatggttcttagactccccag
	12	R	taccagtttagcacgaagctctccg
mIL17a	13	F	tcacctggactctccaccgcaatg
	14	R	acagaattcatgtgggtggccagc
mCTLA4	15	F	tcactgctgtttctttgagca
	16	R	ggctgaaattgcttttcacat
TIMS	17	F	ctactacttgcaaggtcattgg
	18	R	ccagggtgtagatagagtgtaac
ICOS	19	F	tcagacttttaacaggagaaatc
	20	R	tctcagggtattttacaagaaatc
dectin1	21	F	agtgctgggtgccctagcattttg
	22	R	aggctgagaaaaacctcctgtagt
Oasla	23	F	gcctttgatgtcctgggtcatg
	24	R	ccagcttctccttacacagttg
Prkra	25	F	gaatcattcatggaaactggaaag
	26	R	atgtccaaccacgttcgtagag
illSra	27	F	ggagaggtatgtctgtaac
	28	R	gaggggtctctgatgcacttga

藉由磁珠陣列術（cytometric bead array）進行細胞因子分析

【0125】 處理後 96 小時，收集經 YIV-906 及/或抗 PD-1 處理的小鼠和對照小鼠的動物血漿和腫瘤組織。暴露 24 小時後，收集未處理

及經 YIV-906 處理的 BMDM 的培養基。使用磁珠陣列術 Flex Set 套組以流式細胞術 (BD Canto II, New Jersey, USA), 根據製造商的說明 (BD biosciences, UK) 執行確定細胞因子的表現 (IL-6、MIP-1a、IL-5, IL-17A, IL-12p70、TNFa、IL-1B、IL-10、MIG、IFN γ 、MCP-1、G-CSF)。

骨髓衍生之單核球 (BMDM) 的單離和巨噬細胞分化

【0126】 從 10 週齡 C57B1/6 小鼠之脛骨和股骨收集骨髓細胞, 並在鼠類 M-CSF (10 ng/mL) 存在下以完整的 RPMI-1640 培養基 (補充 5% 胎牛血清及 1% Penn/Strep) 培養 7 天, 以使單核球分化為巨噬細胞。將巨噬細胞在含 IFN γ (10 ng/mL) 的 5% FBS RPMI-1640 培養基中培養, 以誘導對 M1 樣巨噬細胞的極化, 而 M2 樣巨噬細胞以 IL4 (20 ng/mL) 誘導。

IDO 活性分析

【0127】 將 2×10^6 個 HEK293 細胞以小鼠 IDO (2 μ g/10 cm 平盤) 轉染 48 小時, 對於一平盤, 使用 1 mL PBS 將細胞收集到 2 ml 管中。將細胞在 3,500 rpm 下離心 1 分鐘, 然後在冰冷的 PB 緩衝液 (1 mL, pH 6.5) 中對細胞進行超音波處理。藉由在 4°C 以 12,000 rpm 離心 5 分鐘將細胞裂解澄清, 將 25 μ L 細胞裂解液與所需濃度的 YIV906 或 YIV906GU (25 μ L) 混合。反應緩衝液包含 50 μ L PB 緩衝液 (100 mM, pH 6.5)、10 μ L 亞甲藍 (2.5%)、100 μ L 過氧化氫酶 (20 mg/mL)、250 μ L L-色胺酸 (500 mM), 及每 10 mL 總溶液中含 70 mg 維生素 C, 然後將反應緩衝液添加至細胞裂解液中。使溶液在 37°C 下反應 1.5 小時, 加入 30% (25 μ L) 的三氯乙酸, 並在 50°C 下溫育 1 小時。添加 0.8% 艾利希試劑 [Ehrlich's reagent, 4- (二甲基氨基) 苯甲醛, 80 mg/10 mL 於乙酸中, 100 μ L, 得自 Sigma Aldrich]。使用 UV-vis 光譜儀測量 540 nm 處的吸光度以確定犬尿胺酸濃度, 發現 540 nm (黃

色)處的吸光度與樣品中犬尿胺酸的含量呈正相關。

CD73 活性分析

【0128】 藉由 CD73 隨著時間從 AMP 形成腺苷確定 CD73 核苷酸酶活性。反應在 37°C 的 200 μ L 緩衝液中進行 3 小時，該緩衝液包含 50 mM Tris-HCl (pH 7)、100 mM NaCl、1 mM $MgCl_2$ 、1 mM $CaCl_2$ 、100 μ g/mL BSA、10 mM AMP 及 200 ng 人類重組 CD73。反應以 15% 三氯乙酸萃取。以 45/55 比例的三辛胺及 1,1,2-三氯三氟乙烷萃取含有核苷及其磷酸化形式的上清液。使用 Partisil SAX 管柱 (Whatman, Clifton, NJ) 及 10 mM 磷酸鹽緩衝液作為流動相，藉由高壓液相層析 (Shimadzu, Braintree, MA) 分析腺苷。

LC-MS 檢測

【0129】 將每個腫瘤樣品在 200 μ L 乙腈/甲醇/水 (2/2/1, v/v/v) 及 1 mm 玻璃珠 (BioSpec Products, Bartlesville, OK) 中以 3500 rpm 勻質化 30 秒兩次。然後將勻質物在 4°C 下以 12000 rpm 離心 15 分鐘。將上清液在 Speedvac 中乾燥，將每個腫瘤樣品的殘餘物重新溶解在 100 μ L 乙腈中，並以 3000 rpm 渦旋 3 分鐘。然後將溶液在 4°C 以 12000 rpm 離心 15 分鐘，然後將 2 μ L 上清液注入 UPLC-QTOF 系統進行分析。在 ACQUITY 超高效液相層析 (ultra-performance liquid chromatography, UPLC) 系統結合四極桿飛行時間 (quadrupole-time of flight, Q-TOF) MS 儀器 (UPLC Xevo G2-XS QTOF MS, Waters Corp., Milford, MA, USA) 與電噴霧電離 (ESI) 源執行所有樣品的分析。在具有保護管柱的 Waters ACQUITY BEH C18 管柱 (2.1 mm x 100 mm id, 1.7 μ m) (Waters ACQUITY BEH C18 column (2.1 mm x 5 mm id, 1.7 μ m)) 上進行分離。

【0130】 移動相由乙腈 (A) 和含 0.1% 甲酸的水 (B) 組成，使用 0-2 分鐘的 5% 的 A，2-3 分鐘 5-10% 的 A，3-10 分鐘 10-17% 的 A，

10–15 分鐘 17–30%的 A，15–20 分鐘 30–40%的 A，20–25 分鐘 40–80%的 A，25–30 分鐘 80%的 A，30–31 分鐘 80–5%的 A 及 31–35 分鐘 5%的 A 的梯度洗提，流速為 0.3 mL/分鐘。在 Water Xevo G2-XS QTOF 上執行質譜分析，掃描範圍是 50 至 1000 Da。對於負電噴塗模式，毛細管電壓和錐電壓分別設置為 2.5 kV 和 60 V。在 500°C 的溫度下將溶媒揮散氣體(desolvation gas)設置為 800 L/小時，錐氣體(cone gas)在 120°C 的溫度下設置為 50 L/小時。使用 MS^E 完成數據採集，且碰撞能量為 15–60 V。

統計分析

【0131】 藉由單因子或貳因子變異數分析(ANOVA)(GraphPad Prism 7)、相關性分析(GraphPad Prism 7)及司徒頓(Student)t 檢驗(Microsoft Office Excel)分析數據。當 $P < 0.05$ 時，差異具有統計學上意義。

【0132】 實施例 1：YIV-906 增強抗 PD1 在活體內抑制 Hepa1-6 腫瘤生長的作用，並證實腫瘤特異性疫苗樣作用。

【0133】 為了研究 YIV-906 及抗 PD1 對於 NCR 裸鼠中 Hepa 1-6 腫瘤生長的影響，將 Hepa 1-6 細胞(10^6 個細胞)皮下植入 NCR 裸鼠中 10 天。當初始腫瘤大小達到約 180 mm^3 時，從第 0 天到第 7 天每天兩次投予 YIV-906(500 mg/kg，口服)並投予或不投予抗 PD1(200 μg /小鼠 ip qd)至攜帶 Hepa1-6 腫瘤的小鼠。Hepa1-6 腫瘤的生長並不受 YIV-906 治療的影響($P > 0.05$)(圖 1A 及 1B)。治療 4 天後，抗 PD1 開始減慢 Hepa 1-6 的腫瘤生長(圖 1A 及 1B)。在第 8 天觀察到一些腫瘤縮小，且到實驗結束時，約 40%的腫瘤低於檢測極限(圖 1A 及 1B)。

【0134】 在 YIV-906 加上抗 PD1 免疫檢查點抑制劑組別中觀察到最強的抗腫瘤活性，在短短 2 天內，腫瘤對 YIV-906 與抗 PD1 的組合

產生反應，所有腫瘤在治療 7 天後均消失 ($P < 0.001$) (圖 1A 及 1B)。在不經進一步治療的情況下，直到 21 天後，YIV-906 加上抗 PD1 組合組別均未出現腫瘤，此表明在這些小鼠中已預防腫瘤的形成並得以治愈 (圖 1A 及 1B)。當 Hepa 1-6 細胞被重新植入治愈的小鼠時，並未發現腫瘤的生長，而單純的小鼠卻有腫瘤的生長 (數據未顯示)。當將 CMT167 細胞 (小細胞肺癌) 或 Pan02 細胞植入治愈的小鼠中後，再次以 Hepa 1-6、CMT167 或 Pan02 挑戰，觀察到腫瘤生長。這種行為表明，YIV-906 結合抗 PD1 檢查點抑制劑，或與其他免疫檢查點抑制劑療法結合，在一些實施方式中可產生腫瘤特異性疫苗樣作用，以防止腫瘤復發。在各種實施方式中，以 YIV 906 與抗 PD1 的組合治療並不影響小鼠的體重。

【0135】 實施例 2：在 Hepa 1-6 腫瘤中 YIV-906/抗 PD1 治療誘導更多的巨噬細胞浸潤，並帶有更高的 M1 類巨噬細胞標記。

【0136】 免疫組織化學研究顯示，在治療 4 天後，YIV-906 與抗 PD1 檢查點抑制劑之組合 (非單獨的 YIV906 或單獨的抗 PD1) 顯著誘導 Hepa 1-6 腫瘤中的巨噬細胞浸潤 (圖 2A 及 2B)。不受理論的束縛，此可歸因於在 YIV-906 加上抗 PD1 之治療組別的腫瘤中，單核球趨化蛋白 MCP1 (CCL2) 的增加，其中 MCP1 高於僅抗 PD1 之組別 ($P < 0.05$) (圖 2C)。

【0137】 依據組織的微環境和呈現刺激之活化途徑，巨噬細胞可分為兩種不同的表現型：M1 (腫瘤排斥) 和 M2 (腫瘤促進)，在 YIV-906 加上抗 PD1 處理後，對 M1 和 M2 樣巨噬細胞標籤基因的 mRNA 表現進行生物統計學分析，表明 M1 樣巨噬細胞是腫瘤中的顯性表現型 (圖 2E 及 2F)。西方墨點法分析進一步證實，在 YIV-906 加上抗 PD1 治療後，iNOS 蛋白 (一種 M1 標記) 顯著增加 (圖 2D)。此結果亦表明經 YIV-906 加上抗 PD1 治療的腫瘤高度發炎。因此，不受理論的束縛，由 YIV-906 與抗 PD1 組合誘導的 M1 樣巨噬細胞的增強浸潤可協助對抗 Hepa 1-6 腫瘤生長的機制。

【0138】 實施例 3：YIV-906 增強在極化巨噬細胞成為 M1 表現型中 IFN γ 的作用，同時抑制在極化巨噬細胞極化成為 M2 型中 IL4 的作用。

【0139】 研究 YIV-906 對於在培養物中將 BMDM 極化成為 M1 型或 M2 型表現型的任何影響。 β -葡萄糖醛酸酶（GU）處理可催化 β -D-葡萄糖醛酸殘基從 YIV-906 的某些組分中水解，並影響 YIV-906 的巨噬細胞極化活性。結果表明，與單獨使用 YIV-906 相比，BMDM 的 YIV-906GU 對 IFN γ 、IL1 α 、TNF mRNA 表現具有更強的誘導作用（圖 3）。此外，YIV-906 可增強 IFN- γ 以極化 BMDM 成為 M1 巨噬細胞，並增加 iNOS、MCP-1、CXCL9、CXCL11、COXII、IL1 α 、TNF- α 和 CD86 的表現信號（圖 3）。GU 處理進一步增強 YIV-906 對於 iNOS、IL1 α 、CXCL11 的增強活性（圖 3）。

【0140】 相反地，YIV906 可藉由降低 Arg1、CD206 和 IRF4 的 mRNA 表現水平所呈現的抑制 IL4 對於 M2 巨噬細胞的極化作用。GU 處理可在 IL4 存在下進一步提高 YIV-906 對於 Arg、IL10 及 IRF4 mRNA 表現的抑制活性（圖 3）。總體而言，YIV906 可增強 IFN γ 誘導某些 M1 相關的標籤基因表現，同時抑制 IL4 誘導 BMDM 某些 M2 標籤基因表現。不受理論的束縛，以上活性的免疫調節作用可藉由 YIV-906 中存在的化學物質的糖基部分來解釋，特別是糖苷配基，其似乎是最具活性的。

【0141】 實施例 4：YIV-906 誘導 IFN γ 分泌並活化 BMDM 的干擾素誘導級聯反應。

【0142】 YIV-906 及 YIV-906GU（效力更高）可刺激 BMDM 分泌 IFN γ 蛋白質（圖 4A-4D）。此結果顯示，YIV-906GU 對於 BMDM 的 IFN γ mRNA 具有更強的誘導作用（圖 3）。培養基中 IFN γ 的增加觸發 IFN γ 誘導級聯反應的活化，如在 YIV-906GU 處理下檢測到較高的 P-JAK1/2、P-stat1/2 及 IRF1 水平，（圖 4A-4D 及圖 5A-5C）。YIV-906GU 對 IFN β 的刺激提供促進 M1 巨噬細胞極化的其他機制。

【0143】 在存在 IFN γ 時，YIV-906GU 可在 30 分鐘之內進一步增強 P-Jak1/2 及 P-Stat2 蛋白質。在 BMDM 中存在 IFN γ 時，其可在 24 小時維持較高的 P-Stat2。在第 24 小時，YIV-906 或 YIV-906GU 增強 IFN γ 誘導 iNOS 蛋白質表現，但不增強 BMDM 的 IFR1 蛋白質表現（圖 4A-4d）。不受理論的束縛，這可能是因為在給定的 IFN γ 濃度下 IFR1 可能已經達到其最大水平。此外，在 BMDM 中存在 IFN γ 時，YIV-906GU 亦可上調 IL15RA 及 ICAM mRNA。YIV-906 或 YIV-906GU 增強的 IFN γ 作用並不限於 BMDM，在經 GM-CSF 處理的 Raw 細胞 264.7（巨噬細胞）中，其等亦可增強 IFN γ 誘導 MCP1、TNFa、iNOS mRNA（圖 6）。

【0144】 與 IFN γ 相反，YIV-906 或 YIV-906GU 藉由抑制 IRF4 表現（IL4 傳訊途徑的關鍵轉錄因子）來抑制 IL4 的作用（圖 4A-4D 及圖 5A-5C）。在 YIV-906 或 YIV-906GU 處理 24 小時後，IL4 的抑制亦導致 BMDM 中 Arg 蛋白質的下調（圖 4A-4D 及圖 5A-5C）。不受理論的束縛，IFR4 和 Arg 蛋白質的減少可歸因於在 IL4 存在下 YIV-906 或 YIV-906GU 對其 mRNA 的下調（圖 3）。

【0145】 這些結果證實，YIV-906 或 YIV-906GU 本身可誘導 IFN γ 和 IFN β 分泌。其兩者都可藉由刺激 P-Jak1/2 和 P-Stat2 磷酸化來增強 IFN γ 的作用，同時藉由下調 BMDM 的 FR4 蛋白質來抑制 IL4 的作用。這種方式可解釋 YIV-906 的多種機制如何能夠使巨噬細胞極化為 M1 表現型。

【0146】 **實施例 5：YIV-906 及抗 PD1 藥物的組合降低 PD1，並使 Hepa 1-6 腫瘤的 PDL1 蛋白質表現正常化。**

【0147】 當與抗 PD1 藥物組合使用時，檢測 YIV-906 對於 Hepa 1-6 腫瘤之 PD1 和 PDL1 的蛋白質表現的影響，抗 PD1 或 YIV-906 處理並未顯著改變 PD1 腫瘤蛋白質。相較於對照組，YIV-906 加上抗 PD1 藥劑可在治療 4 天後顯著降低 PD1 腫瘤蛋白質（P = 0.02）或抗 PD1 組（P = 0.003）（圖 7）。不受理論的束縛，該結果至少可部分解釋為

什麼與具有更高劑量的單獨抗 PD1 相比，只需較少量的抗 PD1 與 YIV-906 組合即具有相似的抗腫瘤活性。此外，抗 PD1 而非僅 YIV-906 的治療顯著增加了 PDL-1 腫瘤蛋白質（ $P = 0.01$ ），但可藉由組合 YIV-906 與抗 PD1 來克服這種增加（ $P = 0.008$ ）（圖 7）。總體而言，這些結果進一步表明，YIV-906 可促進抗 PD1 作用，克服腫瘤對免疫監視的抗性。

【0148】 實施例 6：YIV-906/抗-PD1 處理誘導 Hepa 1-6 腫瘤中與 T 細胞活化相關之基因表現。

【0149】 抗 PD1 的關鍵功能是藉由抑制 T 細胞的共抑制途徑來恢復細胞毒性 T 細胞功能。正如預期，抗 PD1 藥劑誘導 Hepa 1-6 腫瘤中活化的 T 細胞（GranzymeB+/CD3+）數量（圖 8A），抗 PD1 處理後活化的 T 細胞和 Treg 的數目不受 YIV-906 的共同處理的影響（圖 8A 及 8B）。然而，組合治療確實在 Hepa 1-6 腫瘤中誘導更多的 T 細胞活化相關基因（圖 8C），並暗示 T 細胞的功能可被增強。

【0150】 目前的結果表明，抗 PD1 或 YIV-906 單一療法並不會顯著改變 PD1 腫瘤蛋白質（圖 7A）。相較於對照組或單獨的抗 PD1 組，YIV-906 加上抗 PD1 可在 4 天的治療後顯著降低 PD1 腫瘤蛋白質（分別為 $P = 0.02$ 或 0.003 ）（圖 7A）。此結果部分地幫助解釋為什麼與具有更高劑量的單獨抗 PD1 相比，只需較少量的抗 PD1 與 YIV-906 組合即具有相似的抗腫瘤活性。此外，抗 PD1 而非僅 YIV-906 的治療確實顯著增加了 PDL-1 腫瘤蛋白質（ $P = 0.01$ ），但藉由組合 YIV-906 與抗 PD1 可抵消這種增加（ $P = 0.008$ ）（圖 7B）。這些結果表明，YIV-906 可促進抗 PD1 作用，克服腫瘤對免疫監視的抗性，並產生更強的抗腫瘤作用。

【0151】 實施例 7：YIV-906 可調節在免疫檢查點抗體的活性上扮演重要角色的吡啶胺 2,3-二氧酶（IDO）的活性。

【0152】 IDO 是一種負責將 L-色胺酸代謝為犬尿胺酸的酶，其可為一種抗 PD1、抗 CTLA4 治療的關鍵抗藥性因子。據報導，IDO 抑制

劑可增強抗 PD1、抗 PD-L1、抗 CTLA4 藥劑對不同類型之動物腫瘤的作用。IDO 表現抑制效應 T 細胞 (Teff) 的活化和 Foxp3+調節性 T 細胞 (Tregs) 的活化，其等有助於將 CD11b + Gr1int 骨髓來源之抑制細胞 (MDSC) 招募至腫瘤中以抑制 T 細胞增殖。此外，發現單核球 IDO 的高表現有利於 M2 樣巨噬細胞極化，而單核球中 IDO 的低表現則有利於 M1 樣巨噬細胞極化。

【0153】 IDO 測定結果顯示，YIV-906 可調節細胞培養物中的 IDO 酶 (圖 9A)。在使用純化的大腸桿菌葡萄糖醛酸酶 (GU) 去除化學物質中的葡萄糖醛酸來模擬下消化道條件後，YIV-906GU 比 YIV-906 具有更強的 IDO 抑制作用 (圖 9A)。貝加因在類黃酮化合物中顯示出是最有效的化合物 (圖 9A)。YIV-906 或 YIV-906/抗 PD1 具有降低 Hepa 1-6 腫瘤的犬尿胺酸/色胺酸比例的趨勢 (圖 9B)，這表明 YIV-906 可在活體內調節 IDO 活性。此外，發現抗 PD1 加上 YIV-906 處理可降低 Hepa 1-6 腫瘤的單核球 MDSC (圖 9C)，YIV-906 對 IDO 的調節可能是降低免疫耐受和促進抗 PD1 作用的另一種機制。

【0154】 實施例 8：YIV906 增加磷酸化的 IRF3 蛋白質水平及 IFN β ，其為 STING 傳訊的關鍵介質。

【0155】 STING 的活化是癌症免疫治療的最新方法，STING (stimulator of interferon gene，干擾素基因的刺激物) 為一種與內質網 (ER) 相關的傳訊分子，且對於控制多種宿主防禦基因的轉錄非常重要。STING 傳訊可因與 cGAS 結合的細胞死亡雙股 DNA (dsDNA) 而被觸發，dsDNA/cGAS 複合物會將 ATP 和 GTP 轉換成 cGAMP，從而將 STING 活化為磷酸化 TBK。最後，磷酸化的 TBK 將磷酸化 IRF3 以轉錄 IFN β ，該 IFN β 可活化樹突狀細胞以招募和活化對抗腫瘤的 T 細胞。STING 傳訊亦可扮演腫瘤疫苗的重要角色。如圖 10A 及 10B 所示，YIV-906 或 YIV-906GU (以重組大腸桿菌 β -葡萄糖醛酸酶預處理以模擬腸道條件) 可觸發 BMDM (小鼠骨髓衍生的巨噬細胞) 的 IRF3 磷酸化。YIV-906 或 YIV-906GU 處理 (48 小時) 亦可誘導 BMDM 分

泌 IFN β (圖 10C)。

【0156】 實施例 9：YIV-906 調節 CD73 酶的活性。

【0157】 CD73 (5'-核苷酸酶 (5'-NT) 或 ecto-5'-核苷酸酶) 為一種膜核苷酸酶，負責將細胞外 AMP 轉化為與 A2AR 結合的腺苷。高水平的細胞外腺苷可藉由降低 IL2/IFN γ 表現來抑制 T 效應細胞的功能和增殖。腺苷亦可抑制樹突狀細胞和自然殺手細胞的活性。如圖 11 所示，在活體外測定中，YIV-906 及 YIV-906GU 以各種劑量抑制曲線抑制 CD73 酶活性。YIV-906 在 200 $\mu\text{g/mL}$ 時對 CD73 的抑制作用比 YIV-906GU 強，YIV-906 在 400 $\mu\text{g/mL}$ 至 800 $\mu\text{g/mL}$ 的範圍內可抑制 CD73 最多 60%，而 YIV-906GU 具有更佳的效力，並以 200 $\mu\text{g/mL}$ 至 800 $\mu\text{g/mL}$ 的劑量依賴性抑制 CD73。這些結果表明，YIV-906 的葡萄糖醛酸共軛化合物可調節 CD73 活性，而 YIV-906 的糖苷配基化合物對 CD73 具有真正的抑制作用。

【0158】 實施例 10：YIV-906 中的類黃酮在增強 IFN γ 作用以極化巨噬細胞成為 M1 樣表現型上扮演重要的角色。

【0159】 在 YIV-906GU 中的四種草藥成分：G、P、S 和 Z 中，結果表明，在 IFN γ 存在下，S 在增加 iNOS/Arg 比例方面具有最高的生物活性 (圖 12A)。一致地，不含 S (-S) 的調配物失去 IFN γ 的增強特性 (圖 12A)。類黃酮貝加因、黃芩素，金黃酮、木蝴蝶素 A 和貝加靈為在以 GU 處理的 S 中主要的標記化合物，因此隨後比較其等對 IFN γ 的增強作用。結果指出，所有測試的類黃酮均可能對 IFN γ 作用於增加 iNOS/Arg 比例上產生積極的影響 (圖 12B)。在一些實施方式中，從 YIV-906 中刪除任何一種草藥都可以降低 IFN γ 的作用 (圖 12A)。這些結果指出，G、P、Z 亦可在 IFN γ 增強或與 S 相互作用以增強 IFN γ 作用中起作用。

【0160】 執行分析以確定在給藥後 Hepa 1-6 中存在哪些 YIV-906 的代謝產物。結果指出，貝加因、黃芩素和木蝴蝶素 A，它們均能增強 IFN γ 作用 (圖 12B)，其等在腫瘤塊中檢出 (圖 12C)。重要的是需

注意，相較於單獨的 YIV-906 組別，YIV-906 加上抗 PD1 組的腫瘤中的黃芩素和木蝴蝶素 A 的含量更高（圖 12C）。因此，在一些實施方式中，在 YIV-906 與抗 PD1 組合中的組分 S 中所存在的這些類黃酮化合物可能是活性成分，與其他成分一起，有助於 IFN γ 的增強，使巨噬細胞在 Hepa 1-6 腫瘤中極化為 M1 表現型。

列舉的實施方式

【0161】 提供下列列舉的實施方式，其編號不應解釋為指定重要性程度：

【0162】 實施方式 1 提供一種在哺乳動物中預防癌症復發的方法，該方法包含對所需之哺乳動物投予治療有效量的選自下列所組成群組之至少一種草藥組成物：

（a）一種草藥萃取物 YIV-906，其包含黃芩（S）、甘草（G）、芍藥（P）及棗（Z）之草藥萃取物、其等之滷分或存在於該草藥萃取物或其滷分中之任何活性化學物質，及

（b） β -葡萄糖醛酸酶處理的 YIV-906（YIV-906GU）或其之滷分，或存在於該 YIV-906GU 或其之滷分中的任何活性化學物質；

其中進一步投予哺乳動物有效量的至少一種免疫治療劑，

【0163】 實施方式 2 提供實施方式 1 的方法，其中該癌症包含實質性腫瘤。

【0164】 實施方式 3 提供任一實施方式 1 至 2 的方法，其中該癌症係選自黑素瘤、非小細胞肺癌、腎細胞癌、肝癌、結腸癌、尿路上皮膀胱癌及胰臟癌中的至少一種。

【0165】 實施方式 4 提供任一實施方式 1 至 3 的方法，其中至少一種免疫治療劑係選自抗 PD1、抗 PD-L1 及抗 CTLA4 抑制劑所組成群組的免疫檢查點抑制劑。

【0166】 實施方式 5 提供任一實施方式 1 至 4 的方法，其中至少一種免疫檢查點抑制劑選自依伊匹木單抗、派姆單抗、納武單抗、度伐

利尤單抗及阿特朱單抗所組成之群組。

【0167】 實施方式 6 提供任一實施方式 1 至 5 的方法，其中至少一種免疫治療劑是選自下列所組成群組之抗體：Siglec 15 抗體、抗磷脂絲胺酸、抗 OX40、抗 CD73、抗 TIM3、抗 CD24、抗 CD47、抗 PD1、抗 PDL1、抗 CTLA4、抗 GITR、抗 CD27、抗 CD28、抗 CD122、抗 TIGIT、抗 VISTA、抗 ICOS 及抗 LAG3。

【0168】 實施方式 7 提供任一實施方式 1 至 6 的方法，其中投予該草藥組成物增強至少一種免疫治療劑的反應。

【0169】 實施方式 8 提供任一實施方式 1 至 7 的方法，其中口服投予該草藥組成物至該哺乳動物。

【0170】 實施方式 9 提供任一實施方式 1 至 8 的方法，其中投予該草藥組成物促進刺激干擾素基因（STING）激動劑的作用。

【0171】 實施方式 10 提供任一實施方式 1 至 9 的方法，其中將草藥組成物以選自藥丸、錠劑、膠囊、湯劑、茶劑、濃縮物、糖衣錠、液體、滴劑和明膠衣錠所組成群組之形式口服投予該哺乳動物。

【0172】 實施方式 11 提供任一實施方式 1 至 10 的方法，其中該治療有效量的草藥組成物為約 20 mg/天至約 2000 mg/天。

【0173】 實施方式 12 提供任一實施方式 1 至 11 的方法，其中該治療有效量的草藥組成物為約 1600 mg/天。

【0174】 實施方式 13 提供任一實施方式 1 至 12 的方法，其中每日投予二次該草藥組成物。

【0175】 實施方式 14 提供任一實施方式 1 至 12 的方法，其中將該草藥組成物投予約一至二週，然後暫停治療至少一週。

【0176】 實施方式 15 提供任一實施方式 1 至 14 的方法，其中在投予化學療法或放射線療法約 30 分鐘之前，投予該草藥組成物。

【0177】 實施方式 16 提供任一實施方式 1 至 14 的方法，其中該給藥持續約 4 天。

【0178】 實施方式 17 提供任一實施方式 1 至 16 的方法，其中在

選自投予一種或多種免疫治療劑之前、同時和之後的時間，投予該草藥組合物至該哺乳動物。

【0179】 實施方式 18 提供任一實施方式 1 至 17 的方法，其中該哺乳動物為人類。

【0180】 在本文變量的任何定義中，成分列表的列舉包括將該變量定義為所列成分的任何單一成分或組合（或次組合）。本文實施方式的列舉包括以任何單一實施方式或與任何其他實施方式或其部分之組合的實施方式。

【0181】 本文中所引用之每一個及各個專利案、專利申請案及公開文獻的揭示內容藉由引用其全文而併入本文中。本揭示雖已參照特定實施方式，但對於其他本發明所屬技術領域具有通常知識者而言，很明顯地在不背離本發明真實精神與範圍之下，可設計出其他實施方式與變形。後附之申請專利範圍意在被解釋為包括所有此類實施方式及等效的變形。

【符號說明】

無

序列表

<110> 耶魯大學

<120> 預防癌症復發的組成物及方法

<130> 047162-7270TW1(01265)

<150> 美國專利臨時案第62/945,464號

<151> 2019-12-09

<160> 28

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> mIFNg正向

<400> 1

ggcaaaagga tggtgacatg aaa 23

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> mIFNg反向

<400> 2

tagtaatcag gtgtgattca atg 23

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> mIFNb正向

<400> 3

tgtctttctt gtcttcagaa a 21

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> mIFNb反向

<400> 4
tttctgaaga caagaaagac a 21

<210> 5
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> mgrB正向

<400> 5
cactctcgac cctacatggc ctt 23

<210> 6
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> mgrB反向

<400> 6
gtgacattta ttataacttcc ttcac 25

<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> mperf正向

<400> 7
gtgtcgcatg tacagttttc gcctg 25

<210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> mperf反向

<400> 8
ccgtgataaa gtgcgtgcc tag 23

<210> 9
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> mPDL1正向

<400> 9
cacttgctac gggcgtttac tatca 25

<210> 10
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> mPDLI反向

<400> 10
gaatcacttg ctcactttcc ttttc 25

<210> 11
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> mPDI正向

<400> 11
gccaggatgg ttcttagact ccccag 26

<210> 12
<211> 25

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> mPDI反向

<400> 12
taccagttta gcacgaagct ctccg 25

<210> 13
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> mIL17a正向

<400> 13
tcacctgga ctctccaccg caatg 25

<210> 14
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> mIL17a反向

<400> 14
acagaattca tgtgtgggtc cagc 24

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> mCTLA4正向

<400> 15
tcactgctgt ttctttgagc a 21

<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> mCTLA4反向

<400> 16
ggctgaaatt gcttttcaca t 21

<210> 17
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TIMS正向

<400> 17
ctactacttg caaggtcatt gg 22

<210> 18
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TIMS反向

<400> 18
ccaggtgtag atagagtgta ac 22

<210> 19
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ICOS正向

<400> 19
tcagactttt aacaggagaa atc 23

<210> 20
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223>	ICOS反向	
<400>	20	
tctcagggt	tttacaagaa	atc
		23
<210>	21	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	dectinl正向	
<400>	21	
agtgc	tgggt gccctagcat	tttg
		24
<210>	22	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	dectinl反向	
<400>	22	
aggctgagaa	aaacctcctg	tagt
		24
<210>	23	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Oas1a正向	
<400>	23	
gcctttgatg	tcctgggtca	tg
		22
<210>	24	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Oas1a反向	

<400> 24
ccagcttctc cttacacagt tg 22

<210> 25
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Prkra正向

<400> 25
gaatcattca tggaaactgg aaag 24

<210> 26
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Prkra反向

<400> 26
atgtccaacc acgttcgtta gag 23

<210> 27
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> illSra正向

<400> 27
ggagaggtat gtctgtaac 19

<210> 28
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> illSra反向

<400> 28
gaggggtctc tgatgcactt ga 22

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種在哺乳動物中預防癌症復發的方法，該方法包含對該所需之哺乳動物投予治療有效量的選自下列所組成群組之至少一種草藥組成物：

(a) 一種草藥萃取物 YIV-906，其包含黃芩 (*Scutellaria baicalensis*)(S)、甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)(G)、芍藥(*Paeonia lactiflora*)(P)及棗(*Ziziphus jujuba*)(Z)之草藥萃取物、其等之滷分或存在於該草藥萃取物或其滷分中之任何活性化學物質，及

(b) β -葡萄糖醛酸酶處理的 YIV-906 (YIV-906GU) 或其之滷分，或存在於該 YIV-906GU 或其之滷分中的任何活性化學物質；

其中進一步投予哺乳動物有效量的至少一種免疫治療劑。

【請求項2】 如請求項1所述的方法，其中該癌症包含實性瘤。

【請求項3】 如請求項1至2中任一項所述的方法，其中該癌症係選自黑素瘤、非小細胞肺癌、腎細胞癌、肝癌、結腸癌、尿路上皮膀胱癌及胰臟癌中的至少一種。

【請求項4】 如請求項1至3中任一項所述的方法，其中該至少一種免疫治療劑係選自抗 PD1、抗 PD-L1 及抗 CTLA4 抑制劑所組成群組的免疫檢查點抑制劑。

【請求項5】 如請求項1至4中任一項所述的方法，其中該至少一種免疫檢查點抑制劑選自依伊匹木單抗 (Ipilimumab)、派姆單抗 (Pembrolizumab)、納武單抗 (Nivolumab)、度伐利尤單抗 (Durvalumab) 及阿特朱單抗 (Atezolizumab) 所組成之群組。

【請求項6】 如請求項1至5中任一項所述的方法，其中至少一種免疫治療劑是選自下列所組成群組之抗體：Siglec 15 抗體、抗磷脂絲胺酸、抗 OX40、抗 CD73、抗 TIM3、抗 CD24、抗 CD47、抗 PD1、抗 PDL1、抗 CTLA4、抗 GITR、抗 CD27、抗 CD28、抗 CD122、抗 TIGIT、抗 VISTA、抗 ICOS 及抗 LAG3。

【請求項7】 如請求項 1 至 6 中任一項所述的方法，其中投予該草藥組成物增強至少一種免疫治療劑的反應。

【請求項8】 如請求項 1 至 7 中任一項所述的方法，其中口服投予該草藥組成物至該哺乳動物。

【請求項9】 如請求項 1 至 8 中任一項所述的方法，其中投予該草藥組成物促進刺激干擾素基因（STING）激動劑的作用。

【請求項10】 如請求項 1 至 9 中任一項所述的方法，其中將草藥組成物以選自藥丸、錠劑、膠囊、湯劑、茶劑、濃縮物、糖衣錠、液體、滴劑和明膠衣錠所組成群組之形式口服投予該哺乳動物。

【請求項11】 如請求項 1 至 10 中任一項所述的方法，其中該治療有效量的草藥組成物為約 20 mg/天至約 2000 mg/天。

【請求項12】 如請求項 1 至 11 中任一項所述的方法，其中該治療有效量的草藥組成物為約 1600 mg/天。

【請求項13】 如請求項 1 至 12 中任一項所述的方法，其中每日投予二次該草藥組成物。

【請求項14】 如請求項 1 至 12 中任一項所述的方法，其中將該草藥組成物投予約一至約二週，然後暫停治療至少一週。

【請求項15】 如請求項 1 至 14 中任一項所述的方法，其中在投予化學療法或放射線療法約 30 分鐘之前，投予該草藥組成物。

【請求項16】 如請求項 1 至 15 中任一項所述的方法，其中該給藥持續約 4 天。

【請求項17】 如請求項 1 至 16 中任一項所述的方法，其中在選自投予一種或多種免疫治療劑之前、同時和之後的時間，投予該草藥組合物至該哺乳動物。

【請求項18】 如請求項 1 至 17 中任一項所述的方法，其中該哺乳動物為人類。

【發明圖式】

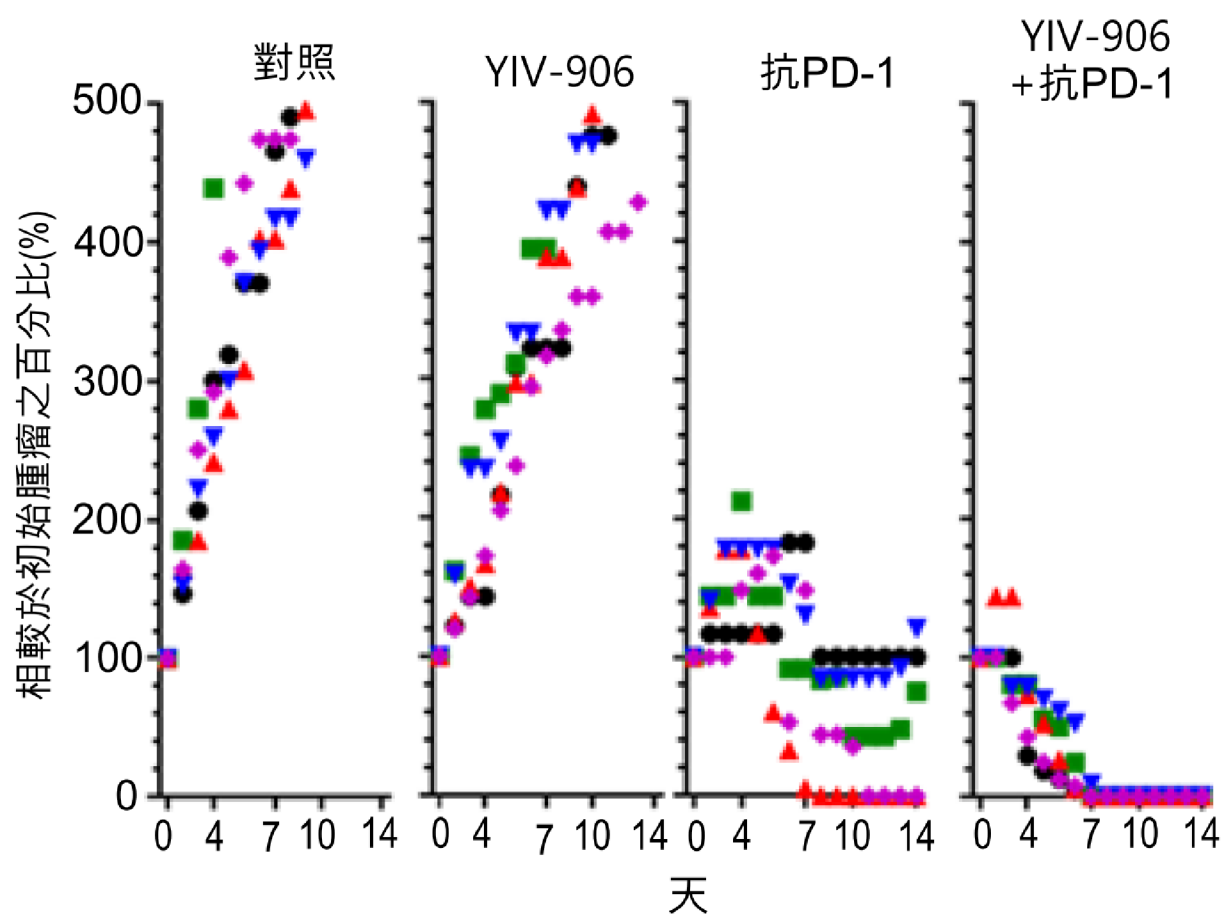


圖 1A

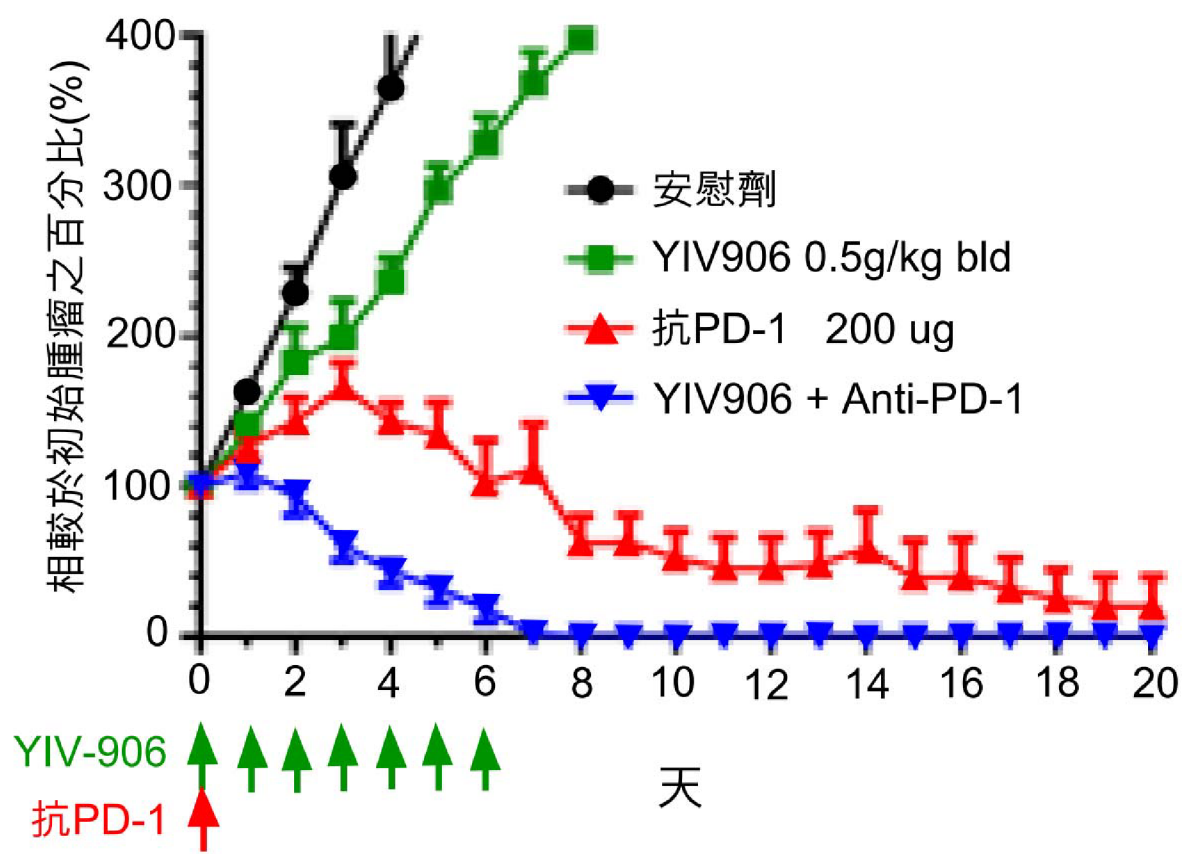


圖 1B

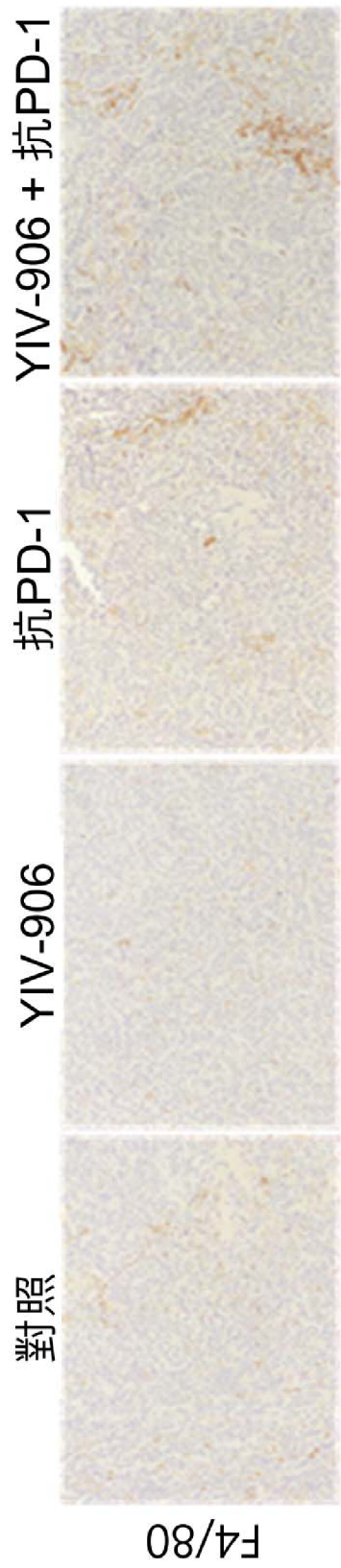


圖 2A

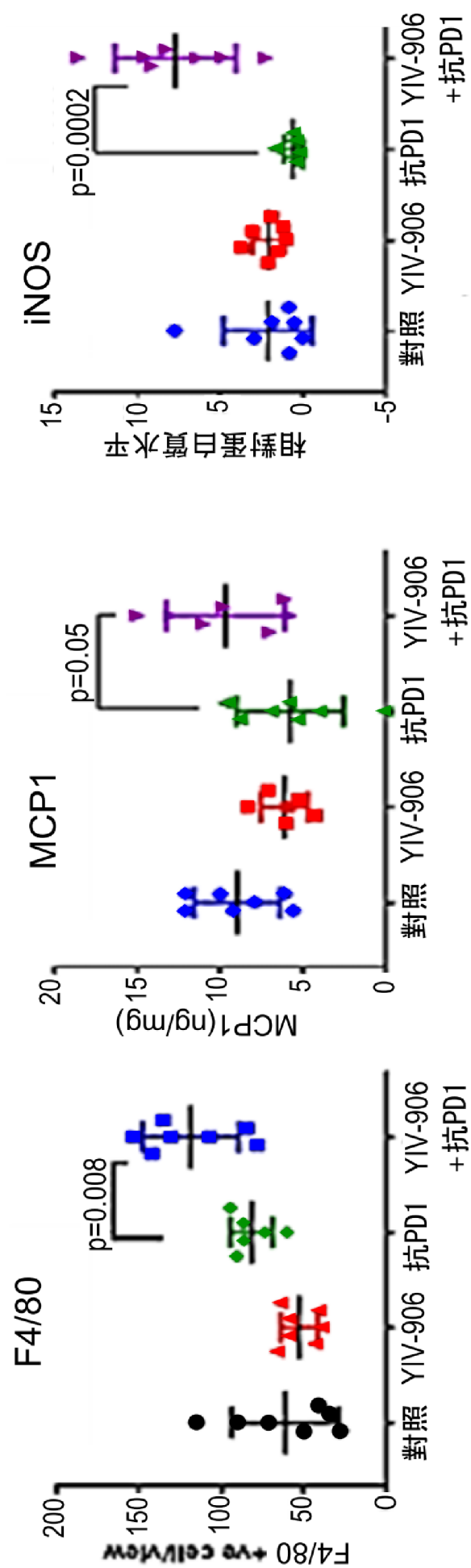


圖 2D

圖 2C

圖 2B

mRNA		YIV906 vs con	aPD1vs con	YIV906 /aPD1vs con
巨噬細胞	CD 11b			
	F4/80			
M1相關	CXCL11			
	IFNg			
	IFR1			
	CD38			
	MHCII			
	IFR5			
	iNos			
	TNF			
	IL12A			
	IL6			
	dcctin1			
	cxcl9			
	Trail			
	IL1a			
	CD80			
	CDXII			
	APO3L			
	CD86			
	Il1b			
	MCP1			
	GMCSF			
	MIP1a			
M2相關	ARG1			
	CD14			
	CD163			
	IFR4			
	TGFb			
	EGR2			
	CD206			
	MCSFa			
	IL10			

上調 P<0.05

下調 P<0.05

圖 2E

處理	處於M1狀態的可能性
對照	0.14
YIV-906	0.14
抗PD1	0.57
YIV-906 + 抗PD-1	1.00

圖 2F

基因	Basal				IFNg				IL4							
	YIV-906		YIV-906GU		YIV-906		YIV-906GU		YIV-906		YIV-906GU					
	•	80ug/ml	160ug/ml	80ug/ml	160ug/ml	80ug/ml	160ug/ml	80ug/ml	160ug/ml	•	80ug/ml	160ug/ml	80ug/ml			
M1樣	IFNg	1	0.2	1.5	1.5	7.0	1.4	1.7	2.2	4.9	1.8	10.5	7.0	6.0	4.5	10.2
	iNOS	1	0.4	0.8	1.8	3.7	83	252	255	433	381	2.6	2.6	1.4	4.0	4.2
	IL1a	1	1.0	1.3	5.1	6.4	0.7	1.9	5.5	8.9	15.9	0.5	0.4	0.5	3.3	9.3
	COXII	1	0.4	0.4	1.3	2.4	5.1	15.5	22.6	18.6	18.4	1.3	0.7	1.3	3.6	9.8
	CD86	1	1.8	2.0	2.6	3.1	8.5	9.0	11.4	10.1	8.1	1.1	0.6	0.6	0.7	1.0
	TNFa	1	3.0	3.2	3.8	5.8	3.3	12.6	17.1	13.7	16.8	0.8	1.3	1.6	2.9	5.6
	CXCL9	1	1.1	1.5	0.9	0.6	14.9	34.3	16.7	28.2	14.9	1.0	1.6	1.9	0.0	1.3
	CXCL11	1	1.7	1.3	0.8	0.5	12.8	29.3	22.1	44.6	30.6	0.6	0.8	1.2	0.0	0.5
	MCP-1	1	0.7	0.4	0.2	0.2	3.9	6.1	6.6	6.8	3.1	7.8	7.4	7.5	2.1	3.4
M2樣	IRF1	1	2.1	1.7	1.7	1.7	17.0	22.8	26.8	21.6	17.7	1.1	1.3	1.8	1.9	2.7
	IRF5	1	2.6	1.3	1.2	1.0	1.1	1.8	2.1	1.7	1.1	1.2	1.3	1.0	0.8	0.8
	Arg	1	2.1	1.4	1.4	4.3	2.1	1.0	1.5	1.9	0.8	254.2	145.5	91.1	44.1	13.4
	CD206	1	1.5	1.0	1.6	1.7	1.0	0.7	0.7	1.4	0.4	1.9	1.3	1.0	0.7	1.7
	IL10	1	3.0	2.2	1.1	0.7	1.3	2.6	2.1	1.6	0.7	1.1	1.2	1.7	0.6	0.3
TGFb	1	2.5	1.9	1.5	1.8	0.7	0.8	0.9	0.8	0.7	1.0	1.1	1.2	1.1	1.4	
IRF4	1	0.5	0.4	0.5	0.9	0.9	0.4	0.4	0.7	0.4	2.9	2.2	1.5	1.4	0.9	

圖 3

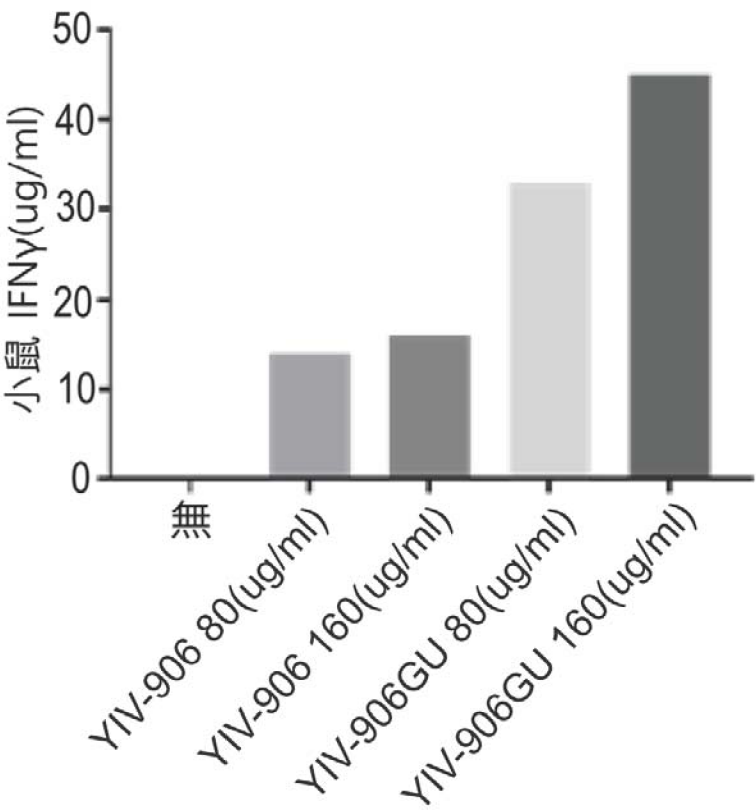


圖 4A

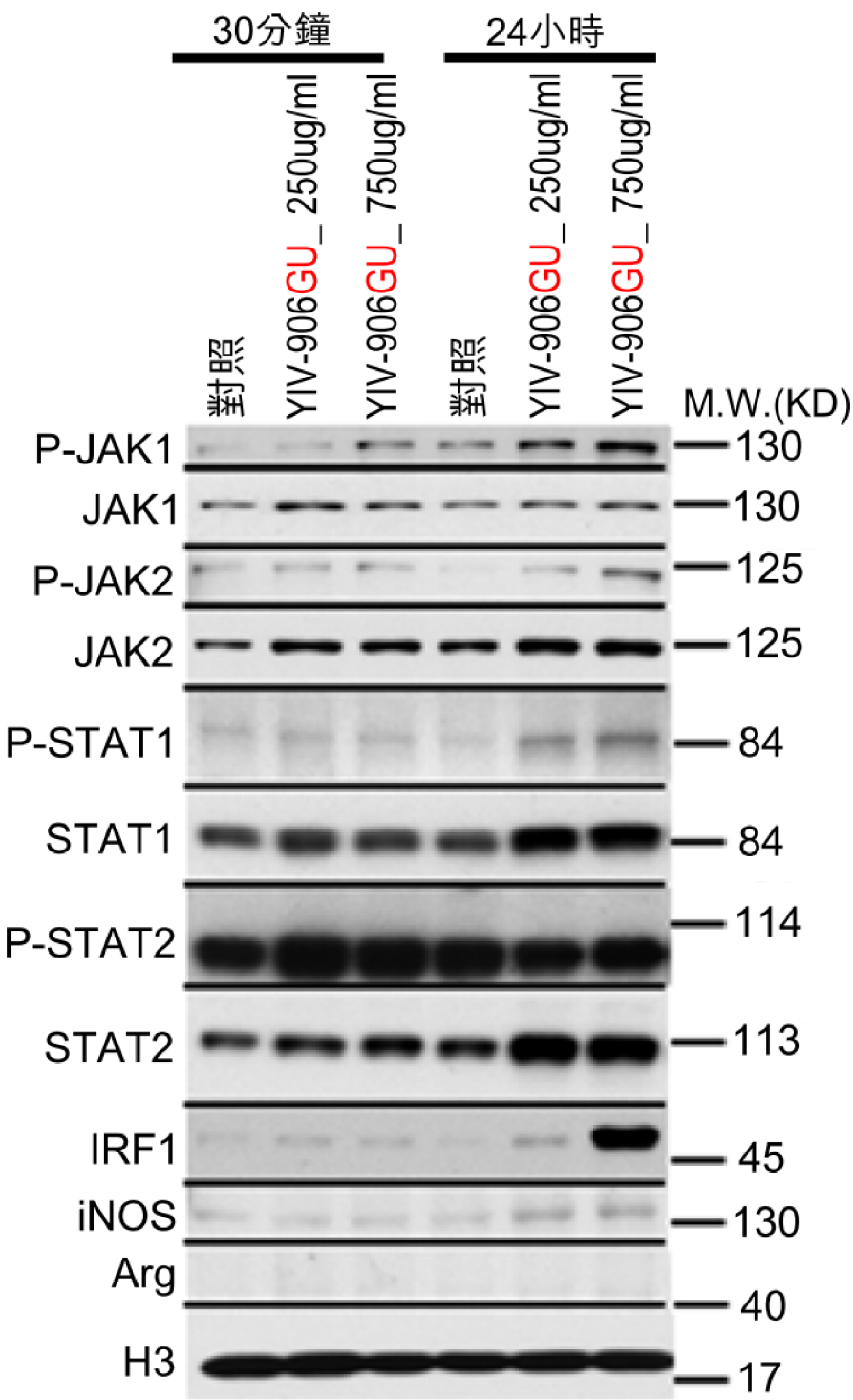


圖 4B

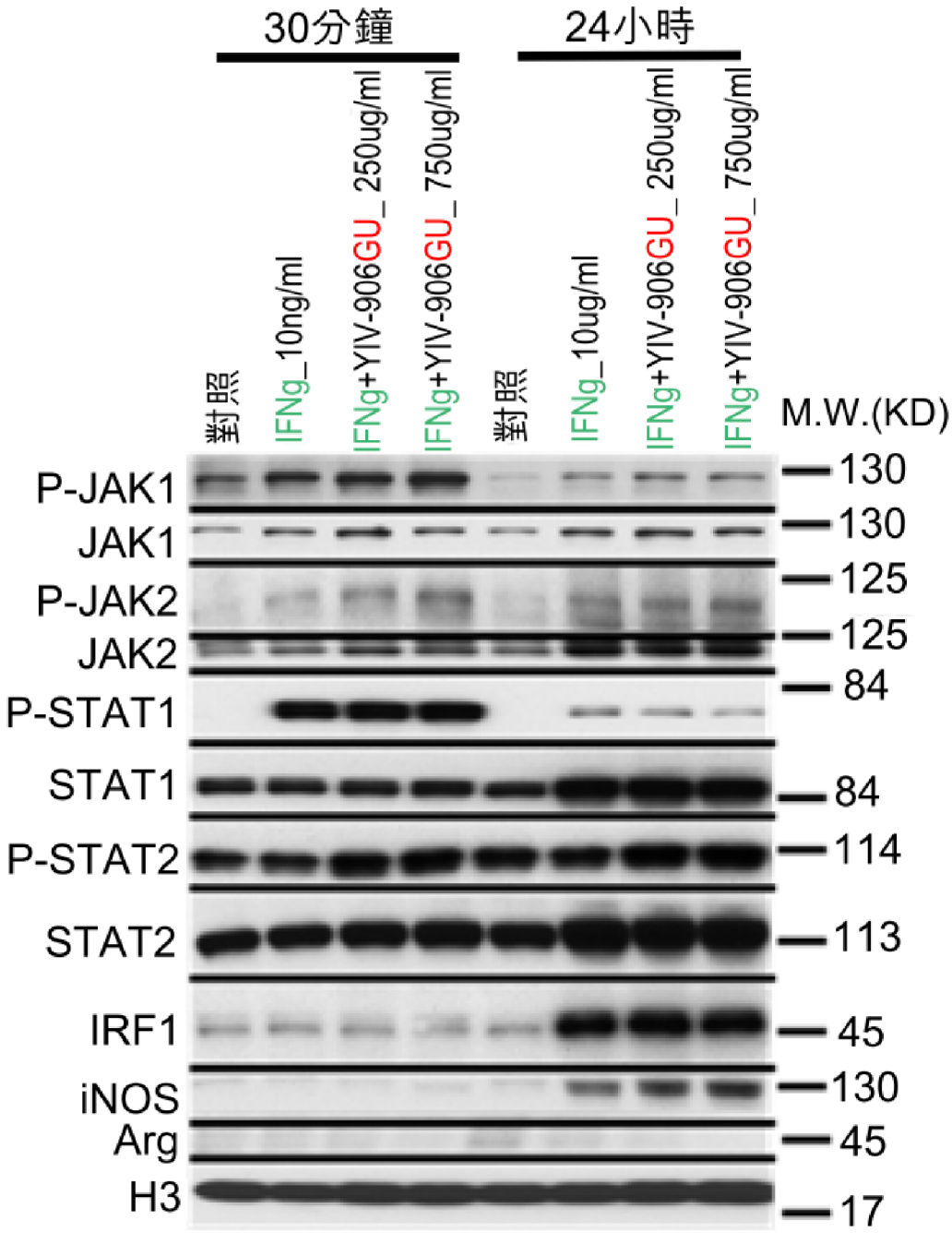


圖 4C

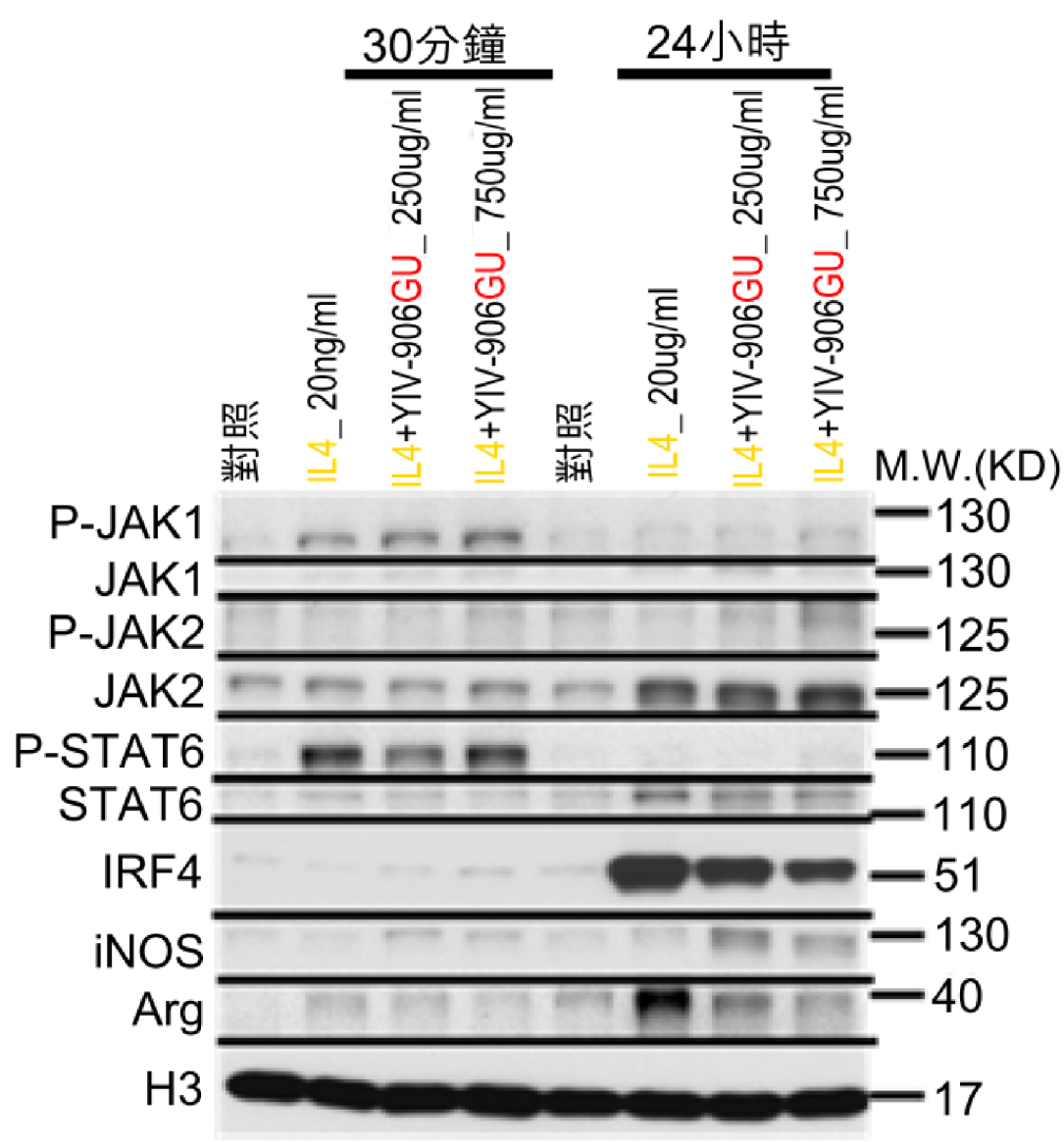


圖 4D

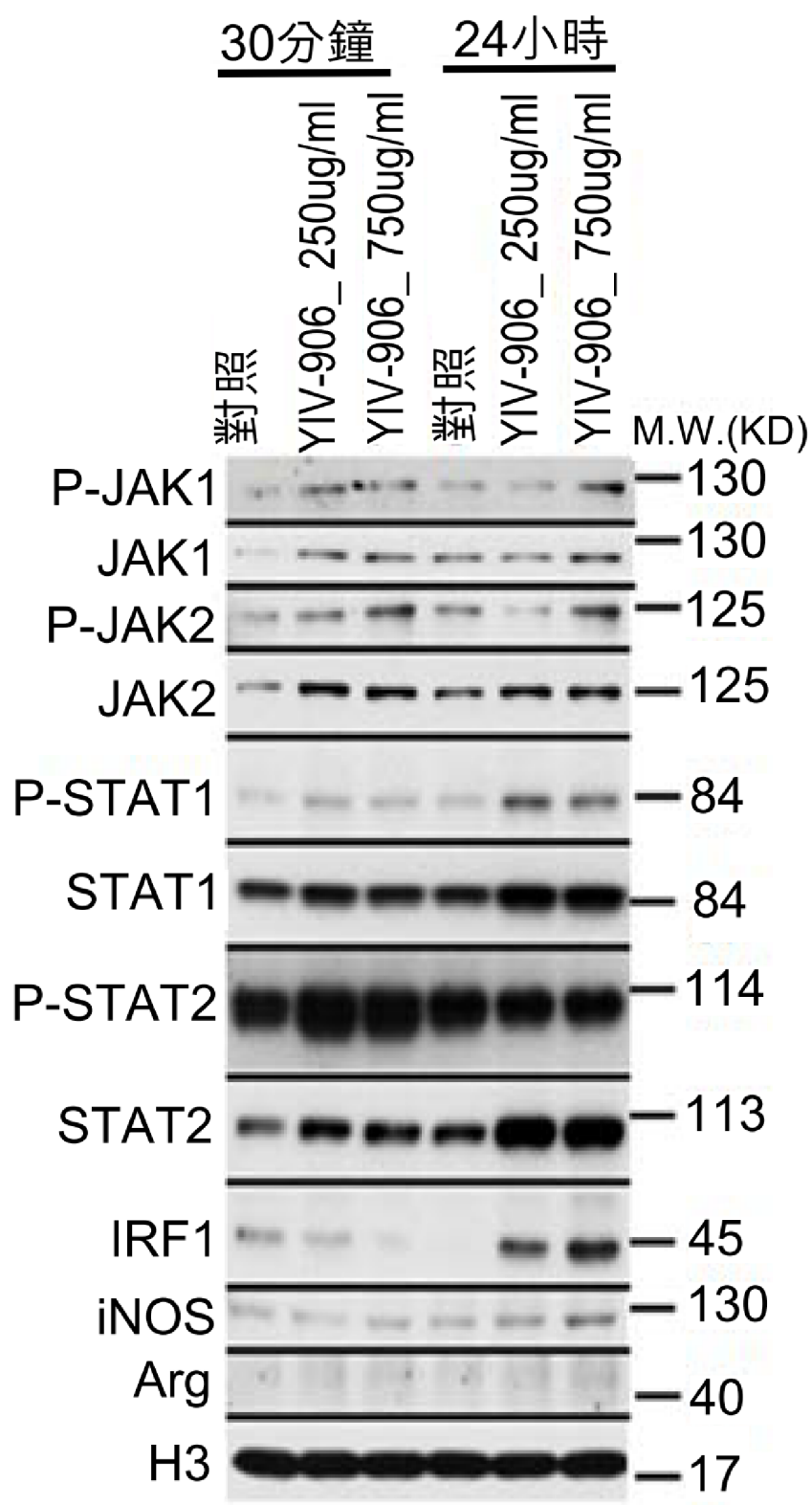


圖 5A

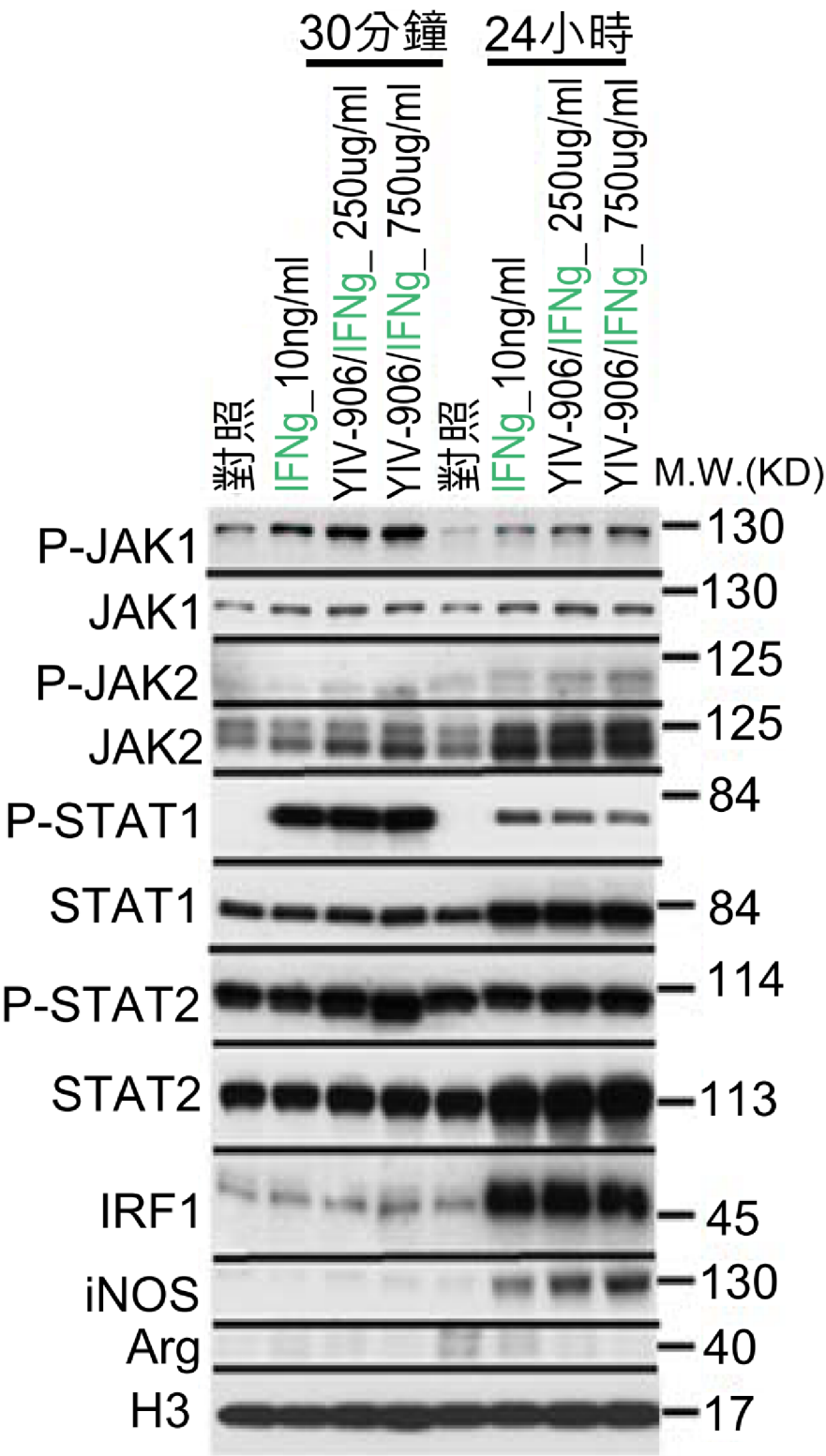


圖 5B

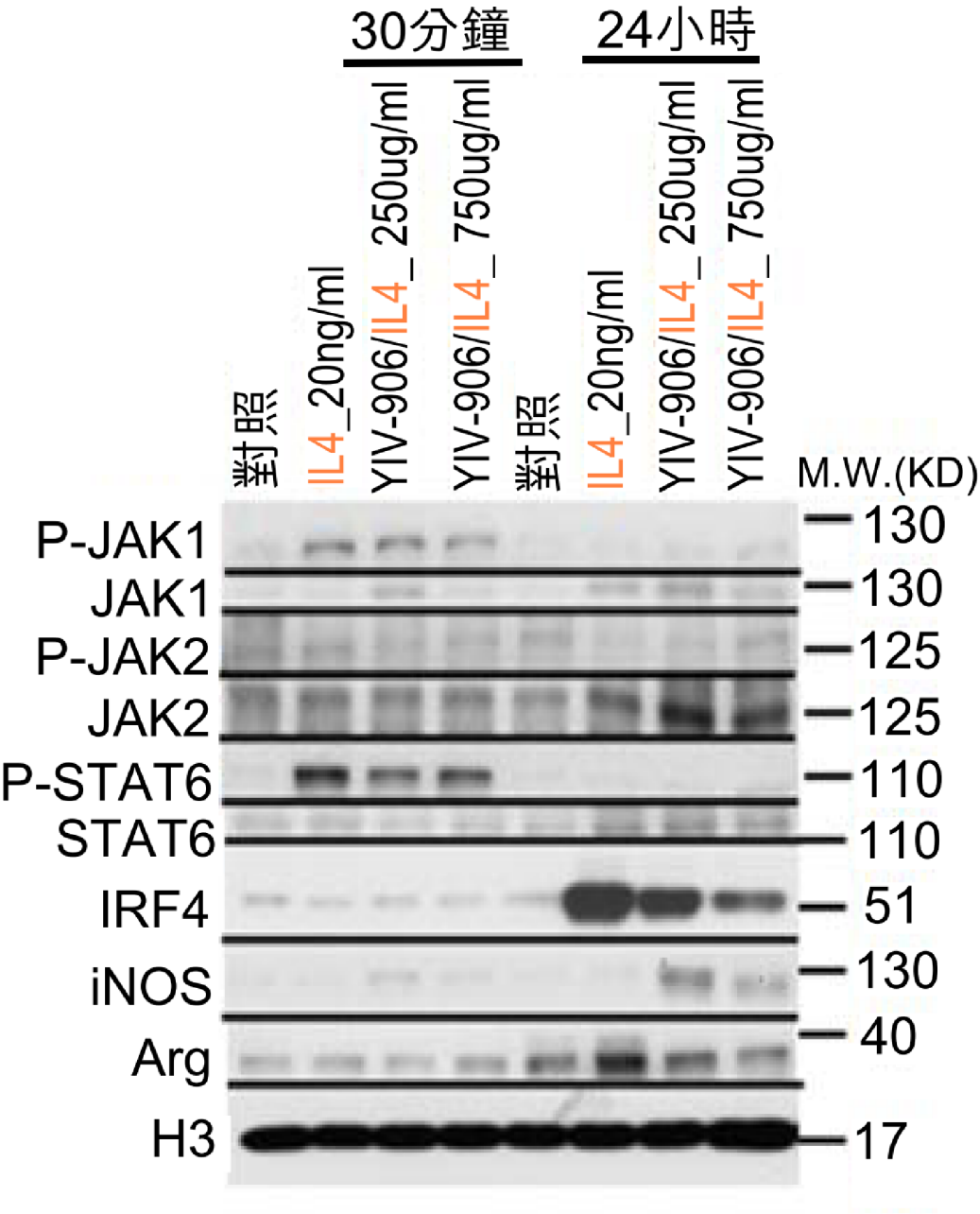


圖 5C

Raw 細胞 264.7		IFNg 10ng/ml							
		YIV-906		YIV-906GU		YIV-906		YIV-906GU	
		250ug/ml	750ug/ml	250ug/ml	750ug/ml	250ug/ml	750ug/ml	250ug/ml	750ug/ml
MCP1	1	9.4	14.3	17.7	20.3	1.4	23.4	25.6	27.7
TNFa	1	4.8	13.7	5.8	20.1	1.2	28.3	70.1	22.3
iNOS	1	9.5	10.6	9	7.3	34.6	1334.7	1162.3	1503.8
									1424.5

圖 6

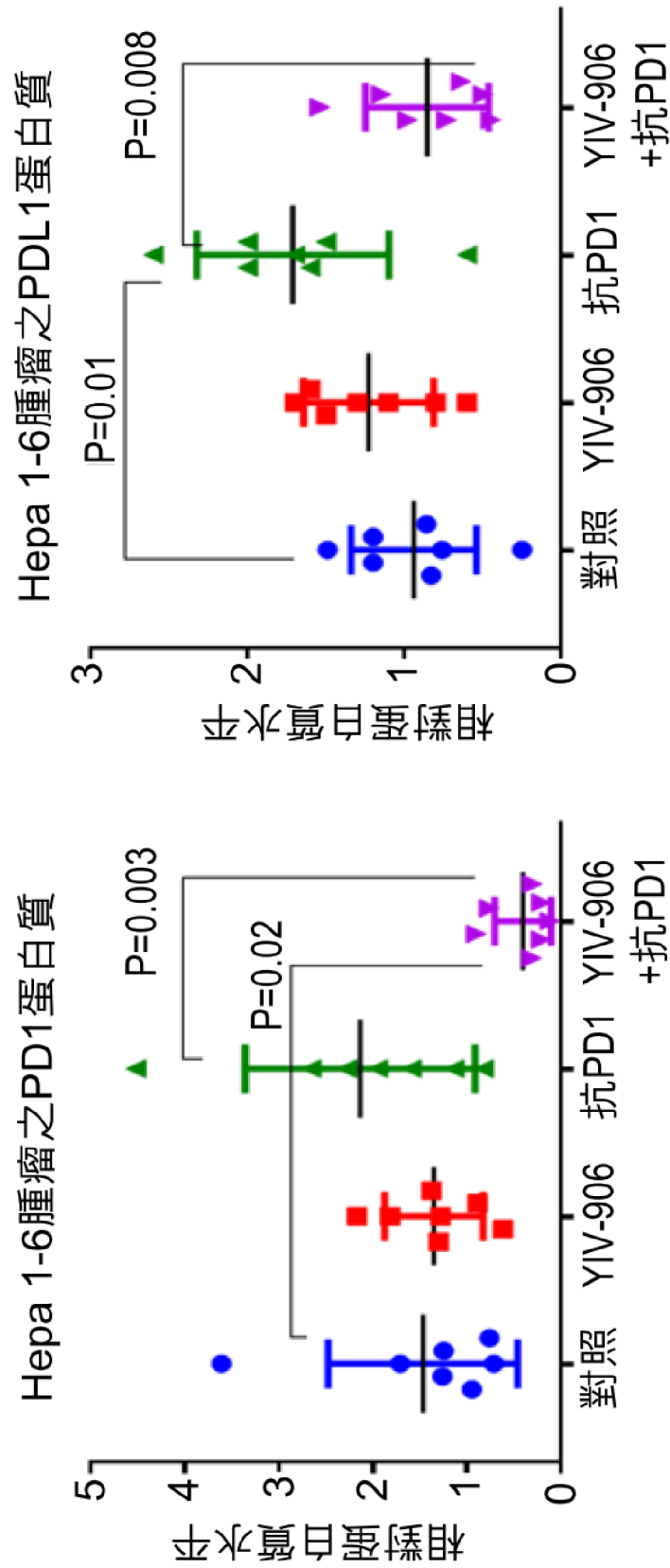


圖 7A

圖 7B

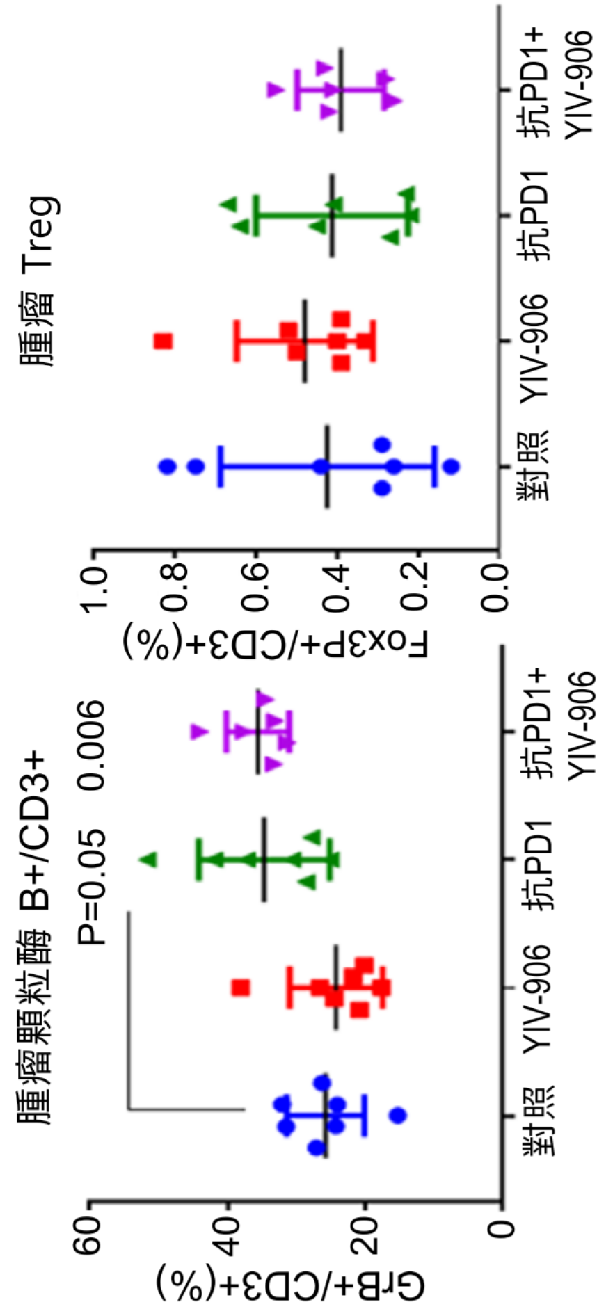


圖 8A

圖 8B

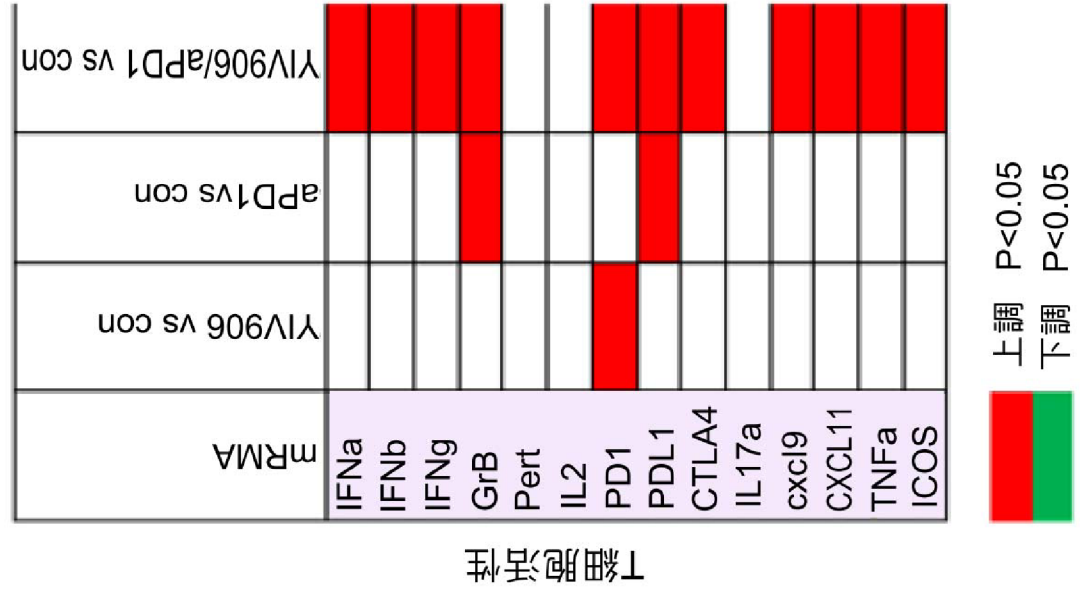


圖 8C

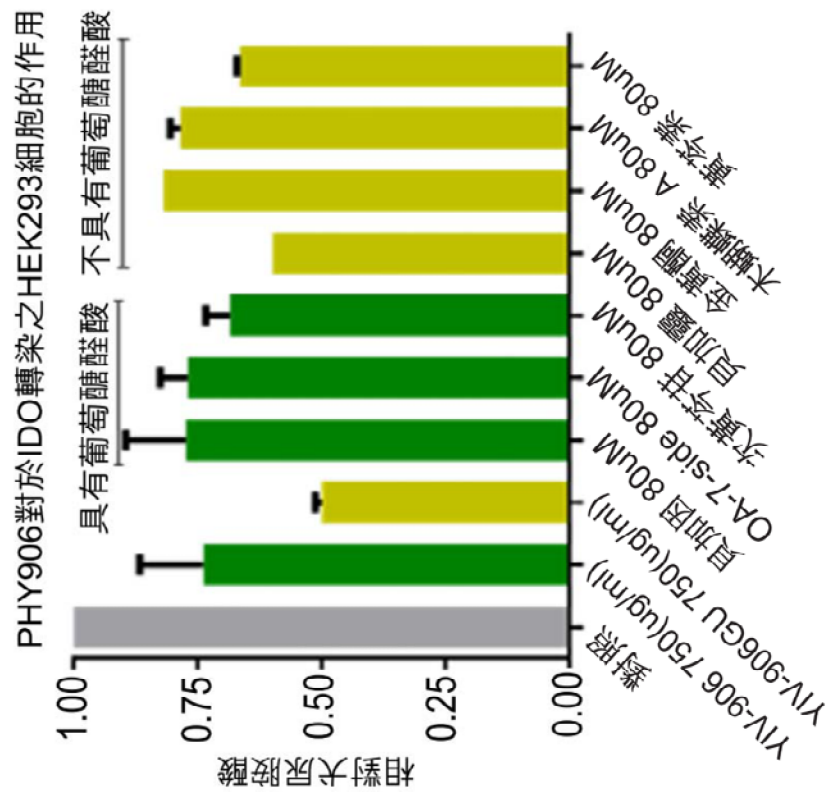


圖 9A

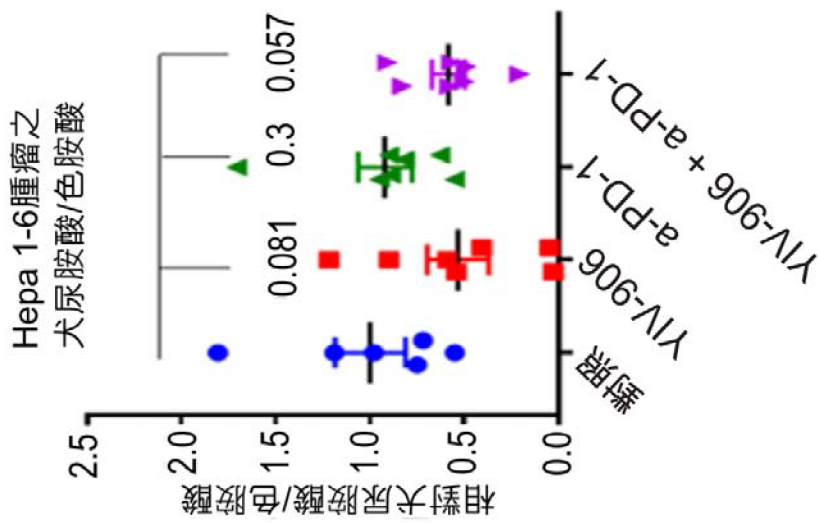


圖 9B

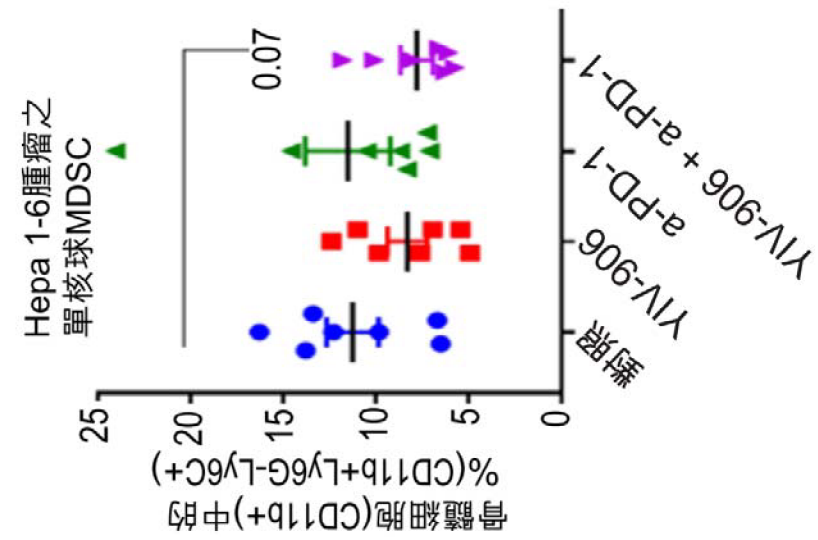


圖 9C

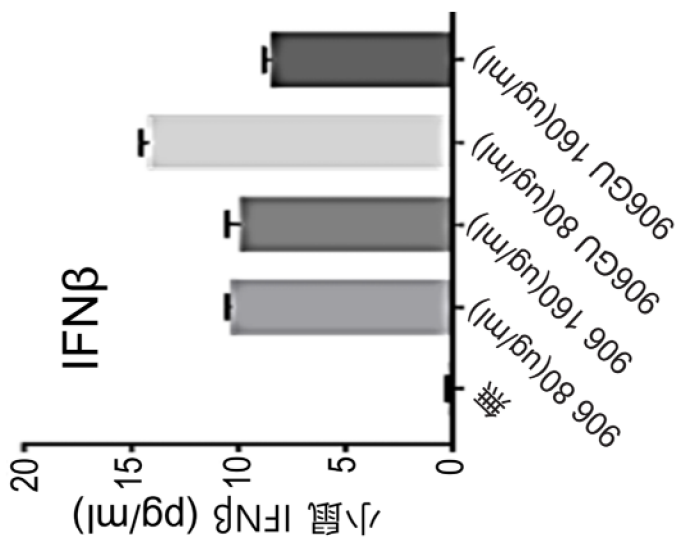


圖 10C

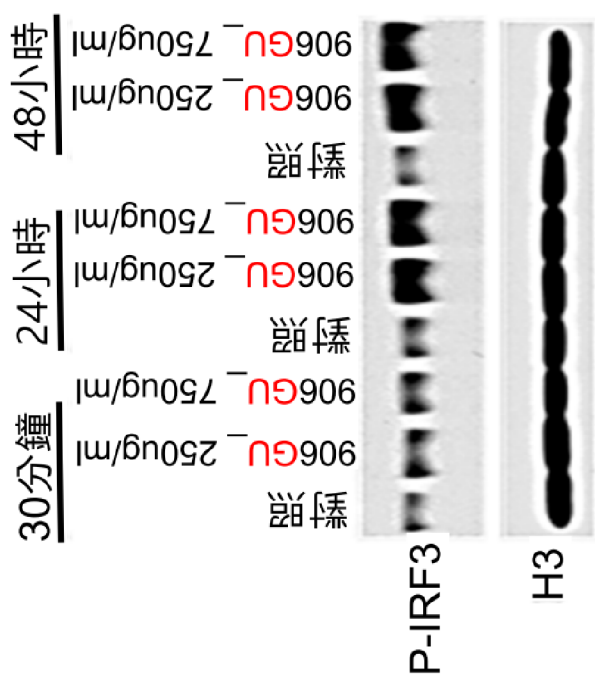


圖 10B

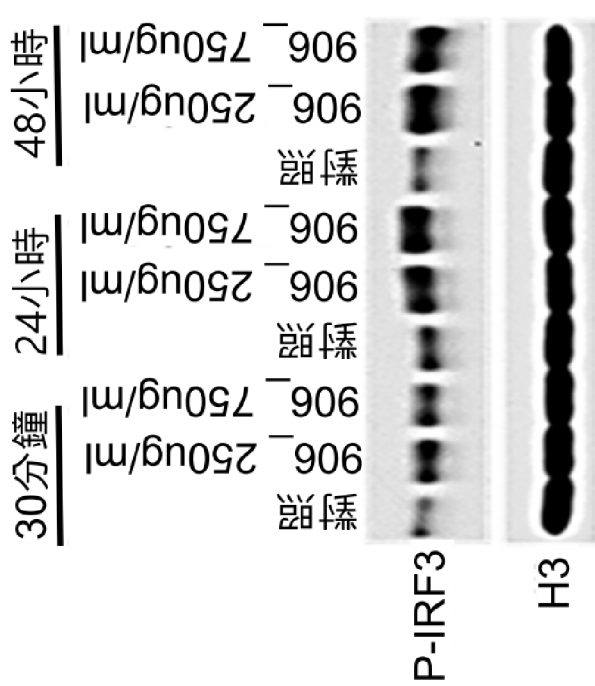


圖 10A

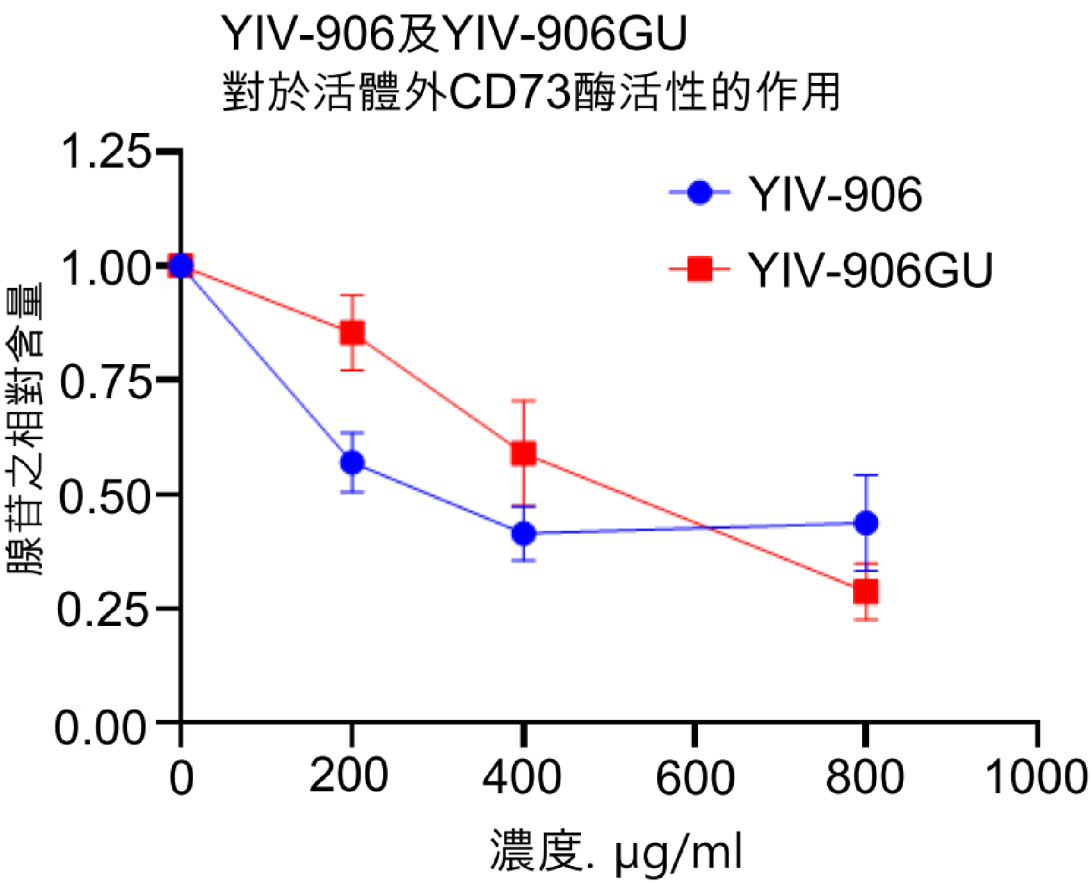


圖 11

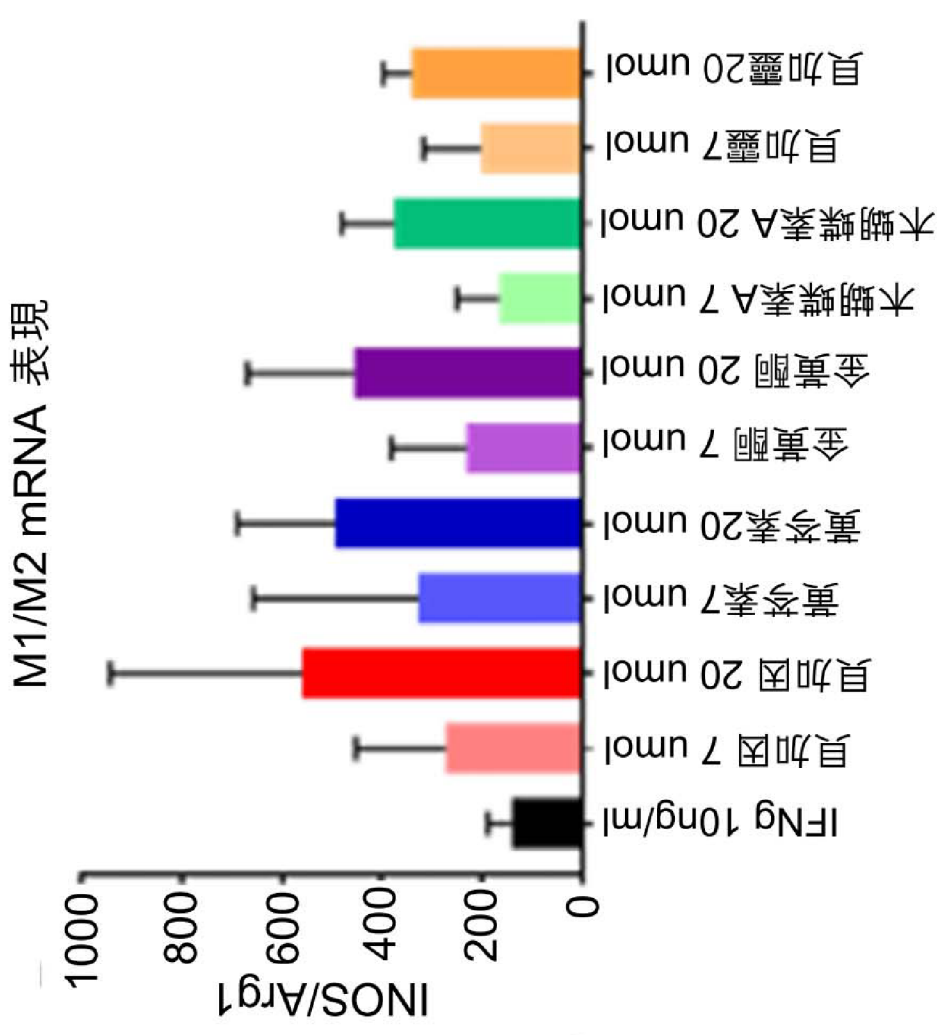


圖 12B

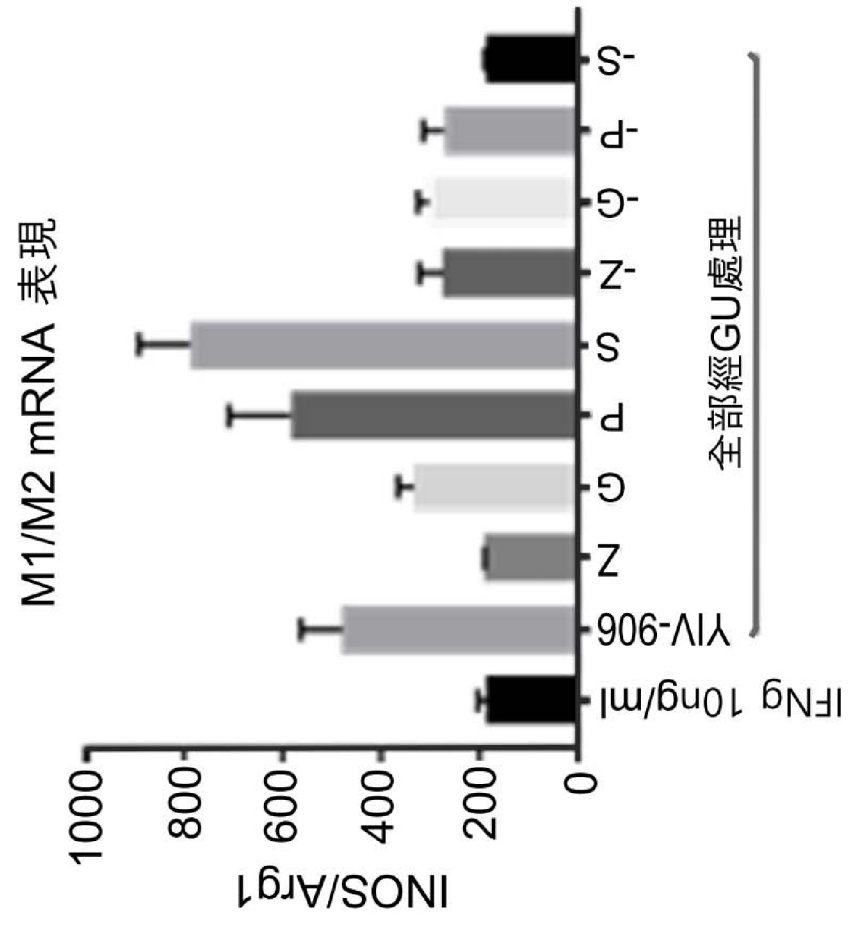


圖 12A

化合物	化學式	m/z [M-H] ⁻	Hepa 1-6 腫瘤	
			YIV-906	YIV-906+抗PD1
貝加因	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.0458	+	+
黃芩素	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.0615	+	++
金黃酮	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	253.0549	-	-
木蝴蝶素 A	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.0601	+	++
貝加靈	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	445.0756	-	-

- :未檢測， + :已檢測， ++ :檢測出比+更高量

圖 12C