



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107635582 B

(45) 授权公告日 2022. 08. 02

(21) 申请号 201680021504.9

(22) 申请日 2016.02.12

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107635582 A

(43) 申请公布日 2018.01.26

(30) 优先权数据
62/115,414 2015.02.12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.10.12

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/017697 2016.02.12

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/130889 EN 2016.08.18

(73) 专利权人 约翰·霍普金斯大学
地址 美国马里兰州

(72) 发明人 F·潘 D·潘 D·M·帕多略
J·巴尔比 B·帕克

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

专利代理师 程伟

(51) Int.Cl.
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/409 (2006.01)
A61K 31/366 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 101466391 A, 2009.06.24
WO 2013188138 A1, 2013.12.19
H.Sadeghi-Aliabadi等.Cytotoxic evaluation of doxorubicin in combination with simvastatin against human cancer cells.《Research in Pharmaceutical Sciences》.2010,第5卷(第2期),第127-133页.

审查员 刘慧

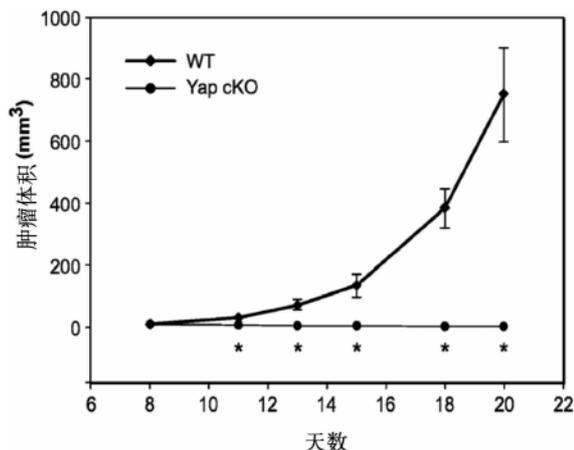
权利要求书1页 说明书34页 附图15页

(54) 发明名称

用于阻断肿瘤免疫耐受性的YAP抑制

(57) 摘要

Yes相关蛋白(Yap),Hippo通路的下游共激活因子,在Treg细胞子集中高度表达,且对于维持其阻抑活性是关键。最初在黑腹果蝇体内发现,该Hippo信号通路是哺乳动物体内细胞生长和增殖的主要调节子。Treg细胞中Yap表达的丧失可造成杰出的抗肿瘤免疫应答,因此,Yap是重要的癌症免疫治疗靶标。



1. 一种YAP的抑制剂和免疫治疗剂在制备用于治疗受试者的癌症的药物的用途，其中，所述YAP的抑制剂是维替泊芬，以及其中，所述免疫治疗剂为免疫检查点抑制剂和GVAX抗肿瘤疫苗，且其中，所述免疫检查点抑制剂是抗PD-1抗体。
2. 如权利要求1所述的用途，其中，所述GVAX抗肿瘤疫苗选自由GVAX肺癌、GVAX胰腺癌、GVAX白血病、GVAX乳癌、GVAX肉瘤、GVAX黑素瘤、及GVAX肾细胞癌所组成的群组。
3. 一种治疗组合物，包含：YAP的抑制剂、及免疫治疗剂，其中，所述YAP的抑制剂是维替泊芬，且所述免疫治疗剂为免疫检查点抑制剂和GVAX抗肿瘤疫苗，且其中，所述免疫检查点抑制剂是抗PD-1抗体。
4. 如权利要求3所述的治疗组合物，其中，所述GVAX抗肿瘤疫苗选自由GVAX肺癌、GVAX胰腺癌、GVAX白血病、GVAX乳癌、GVAX肉瘤、GVAX黑素瘤、及GVAX肾细胞癌所组成的群组。
5. 一种用于治疗受试者的癌症的试剂盒，包含：YAP的抑制剂、及免疫治疗剂，其中，所述YAP的抑制剂是维替泊芬，且所述免疫治疗剂为免疫检查点抑制剂和GVAX抗肿瘤疫苗，且其中，所述免疫检查点抑制剂是抗PD-1抗体。
6. 如权利要求5所述的试剂盒，其中，所述GVAX抗肿瘤疫苗自由GVAX肺癌、GVAX胰腺癌、GVAX白血病、GVAX乳癌、GVAX肉瘤、GVAX黑素瘤、及GVAX肾细胞癌所组成的群组。

用于阻断肿瘤免疫耐受性的YAP抑制

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是国际专利申请案,根据35U.S.C.§119(e),主张2015年2月12日提交的题为《用于阻断肿瘤免疫耐受性的YAP抑制》(Inhibition of YAP for Breaking Tumor Immune Tolerance)的美国临时申请案US 62/115,414的优先权,该临时申请通过引用而以其整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及癌症治疗领域。特别地,本发明涉及癌症的免疫治疗。

背景技术

[0004] 调节性T细胞(Treg)在维持免疫细胞的自身耐受性和体内平衡中扮演关键角色。同时,Treg是研发对抗肿瘤的有效免疫应答的阻碍。Treg的损耗一直是有希望的癌症治疗通路,且Treg浸润的程度与从几种癌症幸存的患者的预后有关联。Foxp3是在Treg中表达的典型转录因子,但Foxp3表达并不足以对Treg的阻抑能力施加影响。有人已提议,Foxp3需要与其它辅助因子以介导其阻抑功能。该领域中,对于鉴别可造成对癌症的免疫耐受性的阻抑的关键介质并以该介质为靶标存在持续需求。因此,对新治疗策略以基于Treg调整而治疗癌症的需求尚未得以满足。

发明内容

[0005] 本发明至少部分地基于,通过以Yes相关蛋白(YAP)信号传导以调整Treg细胞功能、活性或增殖而治疗癌症的方法的发展。如下文中详述,对YAP信号传导的抑制阻抑了肿瘤的生长。此外,如本文中所述,当两者组合使用时,对YAP信号传导的抑制改善了基于细胞的抗肿瘤疫苗的有效性。

[0006] 根据本发明的一方面,治疗患有癌症的受试者。将YAP的抑制剂和免疫治疗剂给药至该受试者。根据本发明的另一方面,提供一种治疗组合物,其包含YAP的抑制剂和免疫治疗剂。根据本发明的另一方面,提供一种用于治疗受试者癌症的试剂盒。该试剂盒包含YAP的抑制剂和免疫治疗剂。这些实施方式和该领域技术人员在阅读本说明书后将会了解的其它实施方式,向该领域提供了用于治疗癌症的新工具。

[0007] 一些例子中,增加的Treg功能、活性、或增殖可造成不希望的免疫抑制,从而防止对癌细胞的免疫细胞介导的抑制。如本文中所提供,通过向受试者给药有效量的包含YAP信号传导调节子的组合物,如药学有效的组合物,进行降低受试者体内调节性T细胞(Treg)功能、活性、或增殖的方法,从而减少受试者体内Treg功能、活性、或增殖。一些例子中,该方法进一步包含将该受试者鉴别为具有增加的Treg功能、活性、或增殖或具有发展出增加的Treg功能、活性、或增殖风险的受试者。例如,Treg功能或活性包含免疫应答阻抑,即,对将会反而增强对抗诸如癌细胞的免疫应答的免疫细胞的阻抑。一方面,Treg功能或活性,如,免疫应答阻抑,减少1%至100%,如,Treg功能或活性减少至少5%、至少10%、至少20%、至

少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或100%。同样，Treg增殖减少1%至100%，如，Treg增殖被减少至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或100%。一些例子中，将该抑制剂给药至受试者体内的Treg群落中。优选地，抑制Treg的发育。

[0008] 该受试者优选为需要此治疗的哺乳动物，如具有增加的Treg功能或其倾向的受试者。该哺乳动物是任何哺乳动物，如，人、灵长类、小鼠、大鼠、狗、猫、马、以及家畜或驯养以供食用的动物，如，牛、绵羊、猪、鸡和山羊。优选的具体实施例中，该哺乳动物是人。

[0009] 一方面，该YAP信号传导调节子包含YAP拮抗剂，如抑制YAP的功能或活性的剂。例如，该YAP拮抗剂包含YAP抑制剂。或者，该YAP拮抗剂包括下游YAP靶标分子的拮抗剂。适当的YAP拮抗剂包括抗体或其片段、结合蛋白、多肽、及其任何组合。一些例子中，该YAP拮抗剂包含核酸分子。适当的核酸分子包括双链核糖核酸(dsRNA)、小发夹RNA或短发夹RNA(shRNA)、小干扰RNA(siRNA)、或反义RNA，或其任何部分。另一方面，该YAP拮抗剂包含优化的单克隆抗YAP抗体。另一方面，该YAP拮抗剂包含维替泊芬(verteporfin)。另一方面，该YAP拮抗剂包含他汀类药物。另一方面，该YAP拮抗剂包含辛伐他汀。另一方面，例示性YAP拮抗剂包括β-肾上腺素能受体拮抗剂、多巴酚丁胺、拉春库林(Latrunculin) A、拉春库林B、细胞松弛素D、肌动蛋白抑制剂、作用于细胞骨架上的药物、Blebbistatinin、肉毒毒素C3、及RHO激酶靶向药物(如，Y27632)。

[0010] 一些例子中，该拮抗剂包含小分子。小分子是质量小于2000道尔顿的化合物。该小分子的分子量优选为小于1000道尔顿，更优选为小于600道尔顿，如，该化合物小于500道尔顿、小于400道尔顿、小于300道尔顿、小于200道尔顿、或小于100道尔顿。

[0011] 小分子是有机的或无机的。例示性有机小分子包括，但不限于，脂肪族烃、醇、醛、酮、有机酸、酯、单糖、二糖、芳香族烃、氨基酸、和脂质。例示性无机小分子包含微量元素、离子、自由基、及代谢物。或者，小分子可合成性加工为由片段、或小的部分、或较长的氨基酸链组成，以填充酶的结合袋。典型地，小分子的分子量小于一千道尔顿。

[0012] 有效量的拮抗剂(或激动剂)是0.001mg/kg至250mg/kg体重，如，0.001mg/kg、0.05mg/kg、0.01mg/kg、0.05mg/kg、1mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、25mg/kg、50mg/kg、75mg/kg、100mg/kg、125mg/kg、150mg/kg、175mg/kg、200mg/kg、225mg/kg、或250mg/kg特征。最后，主治医生或兽医决定了适宜的量和剂量方案。

[0013] 一些例子中，该拮抗剂(或激动剂)每天给药至少一次，每周给药至少一次，或每月给药至少一次。该拮抗剂(或激动剂)的给药持续时间为一天、一周、一个月、两个月、三个月、六个月、九个月、或一年。一些例子中，该拮抗剂(或激动剂)每天给药，如每24小时。或者，该拮抗剂(或激动剂)连续给药或每天给药几次，如每1小时、每2小时、每3小时、每4小时、每5小时、每6小时、每7小时、每8小时、每9小时、每10小时、每11小时、每12小时。

[0014] 一方面，该剂口服给药、静脉给药、肌肉给药、全身给药、皮下给药或吸入给药，或通过本文中揭示或技术人员已知的其它任何方法给药。

[0015] 视需要，该受试者患有肿瘤，且该肿瘤在给药后被抑制或体积减小，如肿瘤体积下降至少1%、至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或100%。

[0016] 还提供治疗或预防受试者体内癌症的方法，该方法包含鉴别正在遭受癌症或处于

发展出癌症风险下的受试者,以及向该受试者给药有效量的含有YAP信号传导调节子的组合物,从而治疗或治疗受试者体内的癌症。例如,该YAP信号传导调节子包含YAP拮抗剂,如抑制YAP的功能或活性的剂。例如,该YAP拮抗剂包含YAP抑制剂。该YAP抑制剂可包括抗体(如,抗YAP多克隆抗体及/或单克隆抗体)和RNAi寡核苷酸(如,用于抑制YAP表达的siRNA、shRNA、及dsRNA寡核苷酸)。或者,该YAP拮抗剂包括下游YAP靶标分子的拮抗剂。

[0017] 例示性癌症选自由下列所组成的群组:癌、肉瘤、肿瘤、实体肿瘤、血癌、白血病、淋巴瘤、皮肤癌、黑素瘤、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、前列腺癌、睾丸癌、结直肠癌、胃癌、肠癌、膀胱癌、肺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、肾细胞癌、肾癌、肝脏癌、肝癌、脑癌、头颈癌、视网膜癌、胶质瘤、脂肪瘤、喉癌、甲状腺癌、成神经细胞瘤、子宫内膜癌、骨髓瘤、及食道癌。使用本文中揭示的方法治疗的一种适用类型的癌症是黑素瘤。

[0018] 一些例子中,该方法进一步包含给药基于细胞的抗肿瘤疫苗。一方面,该方法进一步包含给药另外的抗癌剂。适用的另外的抗癌剂选自由下列所组成的群组:抗癌疫苗如基于细胞的抗肿瘤疫苗、免疫疗法、放射疗法、光动力疗法(PDT)、区域性或局部过高热疗法、及化疗剂。适用的免疫疗法包括抗体、细胞因子、和免疫检查点抑制剂。视需要,该化疗剂选自由下列所组成的群组:烷基化剂、抗代谢物、抗微管剂、拓扑异构酶抑制剂、细胞毒性抑制剂、及抗体药物缀合物。

[0019] 本文揭示的组合物经由口服给药、静脉给药、外用给药、肠道外给药、腹膜给药、肌肉给药、鞘内给药、病灶内给药、颅内给药、鼻腔给药、眼内给药、心内给药、玻璃体内给药、骨内给药、脑内给药、动脉内给药、关节内给药、皮内给药、透皮给药、经粘膜给药、舌下给药、肠内给药、唇下部给药、吹入给药、栓塞给药、吸入给药、或皮下给药而给药。

[0020] 优选地,Treg介导的免疫抑制减少如至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或100%。另一例子中,该癌症包含肿瘤且该肿瘤在给药后被抑制或尺寸减小,如肿瘤尺寸减少至少1%、至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或100%。

[0021] 还提供治疗或预防自身免疫障碍或炎性疾病的方法,该方法包含:鉴别正在遭受自身免疫障碍或炎性疾病或处于发展出自身免疫障碍或炎性疾病风险下的受试者,以及向该受试者给药有效量的包含YAP信号传导调节子的组合物,从而治疗或预防该受试者体内的自身免疫障碍或炎性疾病。例如,该YAP信号传导调节子包含YAP激动剂。优选地,免疫耐受性得以增加。例示性YAP激动剂包括溶血磷脂酸(LPA)、鞘氨醇-1-磷酸酯(S1P)、凝血酶、神经调节蛋白1(NRG1)、受体酪氨酸激酶ERBB4的配体(如,通过DLG4编码的突触后密集区蛋白(PSD-95)、神经调节蛋白2 β 、上皮调节蛋白、 β 细胞素、肝素结合EGF样生长因子、及转录本5A的信号转导子和活化子(STAT5A))、以及表皮生长因子受体(EGFR)的配体(如,双调蛋白(AREG))。

[0022] 通过向受试者给药有效量的包含YAP激动剂且增加Treg功能、活性或增殖的组合物,实现增加该受试者免疫耐受性的方法,从而增加受试者的免疫耐受性。视需要,该激动剂在对受试者进行过继性细胞疗法之前、同时、或之后给药至该受试者,以治疗移植物/移植排异或移植物抗宿主疾病。

[0023] 定义

[0024] 除非具体指明或从语境中明显可见,本文中,术语“约”理解为处于该领域中正常公差范围内,如,处于平均值的2标准偏差内。“约”可理解为处于所指定值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、或0.01%内。除非从语境中明确排除,本文中提供的全部数值可由术语“约”修饰。

[0025] 本文中揭示的抗体及其片段包括,但不限于,多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、dAb(域抗体)、单链抗体、Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fv、scFvs。抗体的片段拥有其各自抗体的免疫学活性。一些具体实施例中,抗体的片段含有1500或更少、1250或更少、1000或更少、900或更少、800或更少、700或更少、600或更少、500或更少、400或更少、300或更少、200或更少的氨基酸。例如,蛋白质或肽抑制剂含有1500或更少、1250或更少、1000或更少、900或更少、800或更少、700或更少、600或更少、500或更少、400或更少、300或更少、200或更少、100或更少、80或更少、70或更少、60或更少、50或更少、40或更少、30或更少、25或更少、20或更少、10或更少的氨基酸。例如,本发明的核酸抑制剂含有400或更少、300或更少、200或更少、150或更少、100或更少、90或更少、80或更少、70或更少、60或更少、50或更少、40或更少、35或更少、30或更少、28或更少、26或更少、24或更少、22或更少、20或更少、18或更少、16或更少、14或更少、12或更少、10或更少的核苷酸。

[0026] 本文中使用的术语“抗体”(Ab)包括单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(如,双特异性抗体)、及抗体片段,只要它们展现所希望的生物学活性即可。本文中,术语“免疫球蛋白”(Ig)与“抗体”可互换使用。

[0027] “分离的抗体”是已经从其天然环境中分隔及/或回收的抗体。其天然环境的污染物组分是将会干扰该抗体诊断和治疗用途的材料,且可包括酶、激素、及其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶解物。优选的具体实施例中,将抗体纯化为:(1)通过Lowry方法测定,抗体含量大于95重量%,最优选大于99重量%;(2)通过使用旋转杯测序仪测定,足以含有至少15个N端或内部氨基酸序列的程度;或(3)使用考马斯亮蓝或优选银染色的还原性或非还原性条件下,通过SDS-PAGE测定的同质性。分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体,这是因为抗体天然环境中的至少一种组分将不复存在。然而,一般通过至少一种纯化步骤制备分离的抗体。

[0028] 本文中,术语“单克隆抗体”指代从基本上同质抗体的群落获得的抗体,即,包含该群落的个体抗体除了可能少量存在的天然出现的突变外是一致的。单克隆抗体具有高度特异性,指向单一的抗原位点。再者,与包括指向不同决定子(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂形成对比,每一单克隆抗体指向抗原上的单一决定子。除了它们的特异性之外,单克隆抗体的优势还在于它们可合成而不被其它抗体污染。修饰词“单克隆”并非解释为需要通过任何特定方法生产抗体。例如,可用于本发明的单克隆抗体可通过首次揭示于Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)中的杂交瘤方法制备,或可使用重组DNA方法在细菌、真核动物或植物细胞中制作(见,如,US 4,816,567)。术语“单克隆抗体”也可使用揭示于例如Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)和Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)中的技术从噬菌体抗体库中分离。

[0029] 术语“拮抗剂抗体”以其最广泛意义使用,且包括部分或完全地阻断、抑制、或抵消其特异性结合的表位、多肽或细胞的生物学活性的抗体。鉴别拮抗剂抗体的方法可包含令特异性结合有备选拮抗剂抗体的多肽或细胞与该备选拮抗剂抗体接触,以及测量正常情况

下与该多肽或细胞相关的一种或多种生物学活性的可检测的变化。

[0030] “剂”意为任何小化合物、抗体、核酸分子或多肽,或其片段。

[0031] 本文中,术语“抗肿瘤剂”指代具有抑制人体内赘生物尤其是恶性(癌性)病变如癌、肉瘤、淋巴瘤或白血病发展或进展的功能特性的剂。对新陈代谢的抑制一般是抗肿瘤剂的特性。

[0032] “改变”意为,通过标准方法如本文中揭示的方法检测的基因或多肽的表达水平或活性的变化(增加或降低)。本文中,改变包括表达水平的至少1%的变化,如表达水平的至少2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或100%的变化。例如,改变包括表达水平的至少5%至10%的变化,优选25%的变化,更优选40%的变化,最优选表达水平的50%或更高的变化。

[0033] “缓解”意为降低、阻抑、削弱、缩小、阻止、或稳定化疾病的发展或进展。缓解指代,例如,出现于受试者体内或至少出现于少数受试者体内的可检测的改善或可检测的与改善一致的变化,如至少约2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、100%或这些值任意两者之间的范围内。与未使用剂治疗的受试者相比,在经治疗的受试者体内观察到了这一改善或变化,其中,该为治疗的受试者罹患或令其发展出相同或相似的损伤/病症、疾病或症状。损伤/病症、疾病、症状或检验参数的缓解可主观地或客观地确定,如通过受试者的自我评估、通过临床医生的评估或通过实施适当的检验或测量,包括,例如生活质量评估、疾病或病症的进展减缓、疾病或病症的严重性下降、或对生物分子、细胞的水平或活性的适当检验、通过对受试者体内病变的检测、及/或通过例如但不限于摄像、录像、数码成像和生理学功能测试的方式。缓解可以是暂时的、延长的或永久的,或其在将剂给药至受试者或该剂用于本文或所引参考文献揭示的检验或其它方法的过程中或之后的相关时间内可变,如在以下揭示的时间段内可变,或给药或使用该剂后约12小时至24至48小时至受试者接受这一治疗后约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、21、28天或1、3、6、9个月内可变。

[0034] “结合至”分子意为对该分子具有物理化学亲和性。

[0035] 转折术语“包含”,与“包括”、“含有”或“特征在于”同义,是包容性的或开放性的,且并不排除额外的、未引用的元件或方法步骤。相反,转折短语“由…构成”排除该主张中未指定的任何元件、步骤或成分。转折短语“主要由…组成”将该主张的范畴限制为指定的材料或步骤“以及那些并不在材料上影响所主张方面的基本特征或新颖特征的材料或步骤”。

[0036] “对照”或“参考”意为比较的标准。如本文中所使用,“与对照相比变化的”样品或受试者理解为具有统计学不同于来自正常、未治疗、或对照样品的水平。对照样品包括,例如,培养物中的细胞、一种或多种实验室测试动物、或一个或多个人类受试者。选择和测试对照样品的方法处于该领域技术人员的能力范围内。分析质可以是天然出现的该细胞或生物体特征性地表达或生产的物质(如,抗体、蛋白质)或由报告基因架构(reporter construct)生产的物质(如, β -半乳糖苷酶或荧光素酶)。依据所使用的检测方法,该变化的测量值可能改变。统计学显著性的测定处于该领域技术人员的能力范围内,如从构建阳性结果的平均值的标准偏差数字。

[0037] “检测”指代鉴别待检测分析质的存在、不存在、或量。

[0038] 本文中,术语“诊断”指代将病理或症状分类、确定病理学的严重型(如,级别或阶

段)、监控病理学进展、预测病理学结局、及/或确定恢复的前景。

[0039] 术语“有效量”和“治疗有效量”的配方或配意为足以提供所希望效果的单独或组合使用的配方或组分的量。例如，“有效量”意为相对于未治疗的患者缓解疾病如癌症的症状所需的单独或组合使用的化合物的量。用来实践本发明对疾病的治疗性治疗的活性化合物的有效量，依据给药模式和该受试者的体重和通常健康情况而变。最后，主治医师或兽医将决定适宜的量和剂量方案。这一量被指代为“有效”量。

[0040] “片段”意为多肽或核酸分子的一部分。这一部分优选含有该参考核酸分子或多肽整体长度的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、或90%。片段可含有10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、或1000个核苷酸或氨基酸。

[0041] 术语“分离的”、“纯化的”、或“生物学纯的”指代，不同程度上不含有其天然状态下发现的其正常伴随组分材料。“分离”表示从原始来源或环绕无分隔的程度。“纯的”表示高于分离的分隔程度。

[0042] “标记物”意为具有与疾病或病变相关的表达水平或活性改变的任何蛋白质或多核苷酸。

[0043] “调整”意为改变(增加或降低)。这些改变通过该领域已知的标准方法如本文中揭示的那些方法检测。例如症状、分子的水平或生物学活性的调整指代，例如，可检测地增加或降低该症状或活性。于未经该剂治疗的受试者相比，在经治疗的受试者体内观察到这一增加或降低，其中，该未经治疗的受试者罹患或令其发展出相同或相似的疾病、病症、症状。这一增加或降低可以是至少约2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、100%、150%、200%、250%、300%、400%、500%、1000%或更高，或这些值的任意两者之间的范围内。调整可主观或客观地确定，如通过受试者的自我评估、通过临床医生的评估、或通过实施事宜的检验或测量，包括，例如，生活质量的评估、对受试者体内分子、细胞或细胞迁移的水平或活性的适当检验、及/或通过例如但不限于摄像、录像、数码成像和生理学功能测试的方式。调整可以是暂时的、延长的或永久的，或其在于给药一剂至受试者或将该剂用于本文或所引参考文献中揭示的检验或方法的过程中或之后的相关时间内可变，如，在下述的时间内可变，或在给药或使用一剂后约12小时至24或48小时至受试者接受这一治疗后约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、21、28天或1、3、6、9个月内可变。

[0044] “癌症”(亦称瘤形成、过度增殖性病变、异型增生、恶性肿瘤、及/或恶性瘤形成)意为一组疾病，牵涉具有侵袭或扩散至身体其它部位的潜力的非正常细胞生长。并非全部肿瘤均为癌性的；良性肿瘤并不扩散至身体其它部位。已知存在超过100种影响人类的不同癌症。

[0045] 术语“自身免疫”指代生物体对抗其自身细胞和组织的一系列免疫应答。“免疫疾病”是由异常的免疫应答造成的任何疾病。自身免疫疾病包括但不限于：爱迪生氏病、强直性脊柱炎、乳糜泻、变应性肉芽肿性血管炎(Churg-Strauss Syndrome)、皮炎(DM)、1型糖尿病、格雷福斯氏病、桥本氏甲状腺炎、特发性血小板减少性紫癜、多肌炎(PM)、类风湿性关节炎(RA)、类肉状瘤病、肖格伦综合征(Sjögren's syndrome)、和全身性红斑狼疮(SLE)。

[0046] 术语“炎症”指代生物体组织对有害刺激如刺激物、受损细胞、或病原体的一系列

生物学应答。炎症是保护性应答,其牵涉免疫系统细胞以及分子介质(例如,细胞因子)和循环系统(血管)。炎症的主要角色是消除细胞损伤的初始肇因,清除坏死细胞和受损组织,以及启动组织的修复。

[0047] 术语“正常量”指代复合体在已知未被诊断患有疾病或病变的个体中的正常量。该分子的量可在测试样品中测量,并使用诸如参考限、测定限、或定义截留点和异常值(如,用于定义胰腺炎)的风险定义阈值的技术与“正常对照水平”比较。“正常对照水平”意为典型发现于已知未罹患前列腺癌的受试者体内的一种或多种蛋白质(或核酸)或组合蛋白指数(或组合核算指数)的水平。此类正常对照水平和截留点可基于分子是单独使用或与其它蛋白质以配方公式使用而变。或者,该正常对照水平可以是来自临床相关时间层内并未转化为疾病或病变的先前测试受试者蛋白质概况的数据库。

[0048] 所测得的水平可以与对照水平或截留水平或阈值水平相同,或可相对于对照水平或截留水平或阈值水平增加或下降。一些方面中,该对照受试者是相同物种、性别、种族、年龄段、吸烟状态、体质指数(BMI)、当前治疗方案状态、医疗史、或其组合的匹配对照,但与被诊断的受试者的不同之处在于该对照并未罹患所讨论的疾病或尚无罹患该疾病的风险。

[0049] 相对于对照水平,所测得的水平可以是增加的水平。本文中,相对于一水平(如,表达水平、生物学活性水平等)“增加”指代相对于对照水平增加任意百分比。该增加的水平可以是,相对于对照水平,至少或约1%的增加、至少或约5%的增加、至少或约10%的增加、至少或约15%的增加、至少或约20%的增加、至少或约25%的增加、至少或约30%的增加、至少或约35%的增加、至少或约40%的增加、至少或约45%的增加、至少或约50%的增加、至少或约55%的增加、至少或约60%的增加、至少或约65%的增加、至少或约70%的增加、至少或约75%的增加、至少或约80%的增加、至少或约85%的增加、至少或约90%的增加、或至少或约95%的增加。

[0050] 相对于对照水平,所测得的水平可以是下降的水平。本文中,相对于一水平(如,表达水平、生物学活性水平等)“下降”指代相对于对照水平下降任意百分比。该降低的水平可以是,相对于对照水平,至少或约1%的降低、至少或约5%的降低、至少或约10%的降低、至少或约15%的降低、至少或约20%的降低、至少或约25%的降低、至少或约30%的降低、至少或约35%的降低、至少或约40%的降低、至少或约45%的降低、至少或约50%的降低、至少或约55%的降低、至少或约60%的降低、至少或约65%的降低、至少或约70%的降低、至少或约75%的降低、至少或约80%的降低、至少或约85%的降低、至少或约90%的降低、或至少或约95%的降低。

[0051] 短语“药学可接受的载体”是该领域公认的,且包括药学可接受的适用于给药本发明化合物至哺乳动物的材料、组合物或运载剂。该载体包括液体或固体填料、稀释剂、赋形剂、溶剂或封装材料,牵涉入将该受试剂从一个器官或身体部位携带或运输至另一器官或身体部位中。就与该配方其它成分且不损伤患者层面而言,每一载体必须是“可接受的”。可用作药学可接受载体的材料的一些实例包括:糖类,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉类,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物类,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;黄芪胶粉;麦芽;明胶;滑石;赋形剂类,如可可油和栓蜡;油类,如花生油、棉籽油、葵花籽油、芝麻油、橄榄油、玉米油和豆油;二醇类,如丙二醇;多元醇类,如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;酯类,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂类,如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻

酸;无热原的水;等渗盐水;林格溶液;乙醇;磷酸盐缓冲溶液;及其它用于药学配方中的无毒的可相容物质。

[0052] “蛋白质”或“多肽”或“肽”意为超过两个天然或非天然氨基酸的构建天然出现或飞天出现的多肽或肽的全部或一部分的任何链,无论其是否为翻译后修饰(如,糖基化或磷酸化),如本文中所示。

[0053] “纯化的”或“生物学纯的”核酸或蛋白质含有足够少的其它材料,故任何杂质并不在材料商影响该蛋白质的生物学性质或造成其它不良后果。换言之,若本发明的核酸或肽通过重组DNA技术生产时实质上不含细胞性材料、病毒性材料、或培养基,或者通过化学合成时不含化学前体,则该核酸或肽是纯化的。典型使用分析化学技术,例如,聚丙烯酰胺电泳或高效液相色谱,来测得纯的和均质性。术语“纯化的”可表示,核酸或蛋白质在电泳凝胶中给出实质上的一个条带。对于可进行修饰如磷酸化或糖基化的蛋白质,不同的修饰可给出不同的分离的蛋白质,该蛋白质可分别为纯化的。

[0054] “实质上纯的”意为核苷酸或多肽已经与其天然伴随组分分隔。典型地,以重量计,当核苷酸和多肽为至少60%、70%、80%、90%、95%、甚或99%且不含与其天然相关的蛋白质和天然出现的有机分子时,则该核苷酸和多肽是实质上纯的。

[0055] 本文中提供的范围理解为该范围内全部值的简写。例如,1至50的范围理解为包括由1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、或50以及前述整数之间的全部中间小数的值如1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、及1.9所组成组的任何数字、或数字的组合、或子范围。至于子范围,具体预期从该范围任一端点延伸的“嵌套子范围(nested sub-range)”。例如,例示性范围1至50的嵌套子范围可包含一个方向的1至10、1至20、1至30、和1至40,或另一方向的50至40、50至30、50至20、和50至10。

[0056] “降低”意指至少1%,如至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少99%的负向改变。

[0057] “参考”意为标准或对照条件。

[0058] “参考序列”是用作序列比较或基因表达比较的基础的定义序列。参考序列可以是特定序列的子集或整体;例如,全长度cDNA或基因序列的一个节段、或完整的cDNA或基因序列。对于多肽,参考多肽序列的长度通常为至少约16个氨基酸,优选至少约20个氨基酸,更优选至少约25个氨基酸,甚至更优选约35个氨基酸、约50个氨基酸、或约100个氨基酸。对于何时,参考核酸序列的长度通常为至少约40个核苷酸,优选至少约60个核苷酸,更优选至少约75个核苷酸,甚至更优选约100个核苷酸或约300或约500个核苷酸,或其附近或之间的任何整数个核苷酸。

[0059] 本文中所使用,“获得一剂”中的“获得”包括合成、购买或以其它方式获取该剂。

[0060] 本文中所使用,术语“受试者”包括倾向罹患(prone to)所标注病变的动物王国中的全部成员。在一些方面,该受试者是哺乳动物,包括但不存在于,人或非人哺乳动物,如牛、马、犬、羊或猫。该受试者优选为需要进行治疗的哺乳动物,如已经被诊断患有疾病或由罹患该疾病倾向的受试者。该哺乳动物是任何哺乳动物,如人、灵长类、小鼠、大鼠、狗、猫、马、以及家畜或驯养用于食用的动物如牛、绵羊、猪、鸡和山羊。优选的具体实施例中,该哺

乳动物是人。

[0061] “实质上—致”意为多肽或核酸分子展现与参考氨基酸序列(例如,本文中揭示的任一氨基酸序列)或核酸序列(例如,本文中揭示的任一核酸序列)具有至少50%的一致性。优选地,此核酸在氨基酸水平或核酸水平上与用于比较的序列具有至少60%,更优选80%或85%,甚至更优选90%、95%或甚至99%的一致性。

[0062] 本文中所使用,术语“样品”指代为了进行体外评估而获得的生物样品。关于本文中揭露的方法,该样品或患者样品优选可包含任何体液或组织。一些具体实施例中,该体液包括但不限于,从该受试者获得的血液、血浆、血清、淋巴液、乳汁、唾液、黏液、精液、阴道分泌物、细胞萃取物、炎性液、脑脊液、粪便、玻璃体液、或尿液。在一些方面,该样品是血液样品、血浆样品、血清样品、及尿液样品的至少两者的复合组。在例示性方面,该样品包含血液或其组分(如,血浆、血清、经由白细胞去除法而获得的组分)。优选的样品是全血、血清、血浆、或尿液。样品也可以是组织或体液的部分纯化组分。

[0063] 参考样品可以是来自未罹患该疾病或病症的供体体液或来自罹患该疾病或病症的受试者的正常组织的“正常”样品。参考样品也可来自未经治疗的供体或未经活性剂治疗的细胞培养物(如,未经治疗或仅给药运载剂)。参考样品也可在令该细胞或受试者与待测试剂或治疗性干预手段接触之前的“0时间点”或在前瞻性研究开始时取得。

[0064] “特异性结合”意为化合物或抗体识别并结合本发明的多肽,但该化合物或抗体基本上不识别并结合样品如天然地包括本发明多肽的生物样品中的其它分子。

[0065] “罹患或疑似罹患”特定疾病、病症或症状的受试者,具有足够数目的风险因子或显示具有租后数目或组合的疾病、病症或症状的迹象或症状,因此,有能力的个体将会诊断或坏也该受试者罹患该疾病、病症或症状。鉴别受试者罹患或疑似罹患与免疫阻抑增加相关的病症的方法处于该领域技术人员的能力范围内。罹患或疑似罹患特定疾病、病症或症候的受试者未必是两个截然不同的组。

[0066] 本文中所使用,对于特定疾病或病症为“易感”或“有倾向”或“易受感染”或“处于发展风险下”是指,基于遗传学、环境、健康、及/或其它风险因子,该个体比一般群体更容易发展出疾病或病症。发展出疾病的可能性的增加幅度可能是约10%、20%、50%、100%、150%、200%、或更高。

[0067] “实质上—致”意为多肽或核酸分子展现与参考氨基酸序列(例如,本文中揭示的任一氨基酸序列)或核酸序列(例如,本文中揭示的任一核酸序列)具有至少50%的一致性。优选地,此核酸在氨基酸水平或核酸水平上与用于比较的序列具有至少60%,更优选80%或85%,甚至更优选90%、95%或甚至99%的一致性。

[0068] 本文中使用的术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”是指,将剂或配方给药至受苦于有害病症、病变或疾病的临床有症状的个体,以造成症状的严重性及/或发病频率下降的效果、消除该症状及/或其基本病因、及/或促进损害的改善或补救。应了解,尽管未排除,但治疗病变或病症并不需要完全消除预期相关的病变、病症或症状。

[0069] 术语“预防(prevent)”、“预防(preventing)”、“预防(prevention)”、“预防性治疗”等是指,将剂或组合物给药至处于发展、易感、或倾向罹患特定的不良状况、异常(disorder)或疾病风险下的临床无症状的个体,并因此涉及对症状及/或其基本病因出现

的预防。

[0070] 一些例子中,本发明的组合物口服给药或全身给药。其它给药模式包括直肠、外用、眼内、颊内、阴道内、脑池内、脑室内、气管内、鼻腔、透皮、植入物内/上、或非肠道通路。术语“非肠道”包括皮下、鞘内、静脉内、肌肉内、腹膜内、或输液。静脉通路或肌肉通路并不特别适用于长期治疗和预防。然而,它们在紧急情况下是优选通路。可将包含本发明组成的组合物加入生理流体如血液中。对于预防性治疗,口服给药可能是优选,盖因其对于患者以及给药方案的便利性。对于更多急病或对于由于胃肠耐受性、肠梗阻或其它临床病的并发症而不能忍受肠内给药的患者的治疗,对非肠道方式(皮下或静脉)是优选。对于肺血管疾病(如,肺动脉高血压),吸入疗法可能是最适宜的。

[0071] 药物组合物可组装在试剂盒内或药物系统内,用于阻止快速分化细胞如癌细胞的细胞循环。根据本发明这一方面的试剂盒或药物系统包含载体,如其内部严格限制有一种或多种容器如小瓶、管、安瓿、瓶子、注射器、或袋子的盒子、纸箱、管。本发明的试剂盒或药物系统还可包含相关的试剂盒使用说明书。

[0072] 除非具体指明或从语境明显可见,本文中所使用,术语“或”理解为包容性的。除非具体指明或从语境明显可见,本文中,术语“一(a)”、“一(an)”和“该”理解为单数或复数。

[0073] 除非具体指明或从语境明显可见,本文中所使用,术语“约”理解为该领域的正常公差范围内,例如,平均值的2标准偏差内。“约”可理解为指定值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、或0.01%内。除非从语境中明确排除,本文中提供的全部数值均以术语“约”修饰。

[0074] 本文中任何变量的定义中对所列举化学基团的引述,包括该变量作为任何单一基团或所列基团组合的定义。对于本文中变量或方面的具体实施例的引述,包括该具体实施例作为任何单一具体实施例或与任何其它具体实施例或其一部分组合的定义。

[0075] “治疗有效量”是足以产生有益或所希望的结果包括临床结果的量。有效量可在一次或多次给药中实现。

[0076] 本文中提供的任何组合物或方法可与本文中提供的任何其它组合物和方法的一者或多者合用。

[0077] 从下述说明和优选具体实施例以及权利要求书,可明了本发明的其它特征和优点。除非明确界定排除,本文所用的全部科技术语具有与本发明所属领域技术人员所通常理解者相同的意义。尽管可使用与本文中揭示的那些类似或等效的方法和材料来实践或测试本发明,仍将适当的方法和材料揭示如下。本文所引的全部已公开的外国专利和专利申请案通过引用而并入本文。本文所引的以登录号表明的Genbank和NCBI文件通过引用而并入本文。本文所引的全部其它已出版参考文献、文档、手稿和科学论文通过引用而并入本文。包括定义在内,若有冲突,以本发明为准。此外,材料、方法和实施例仅用于例示性说明而非限制。

附图说明

[0078] 图1A至图1C显示说明YAP mRNA和蛋白质通过辅助型T细胞子集表达的图。从野生型(WT)小鼠分离出CD4+T细胞(CD4+CD25-CD62L+),并在极化条件下活化以生成所标注的辅助型T细胞(Th)子集。图1A显示,在不同时间点收获细胞,以及通过qRT-PCR评估YAP的

mRNA或蛋白质水平。图1B是说明在刺激Th17细胞后的YAP转录本水平的图。图1C显示,在不同时间点收获细胞,以及通过西方印迹法评估YAP的mRNA或蛋白质水平。

[0079] 图2A至图2F说明YAP缺失对CD4+T细胞子集的效果。图2A、图2B、图2C、图2D、和图2E显示,从野生型(WT)或YAP f/f;CD4-cre(YAP cKO)小鼠分离出CD4+T细胞(CD4+CD25-CD62L+),且在标注的极化条件下活化。收获该细胞,并通过流式细胞仪和qRT-PCR评估用于每一Th子集的签名细胞因子和转录因子。图2D和图2E显示在Treg极化条件下的结果。图2E显示Foxp3在Treg下不同时间点的相对表达。图2F显示,使用体外阻抑分析测定WT或Yap cKO Treg(CD4+CD25High)的阻抑功能。CFSE-染色的WT CD4+T细胞(应答子)与来自WT和YAP cKO的Treg在所标注比率下共同培养。以抗CD3/抗CD28缀合微珠以1:1的细胞与微珠比来活化应答子细胞(培养物)。图2G显示,WT和Foxp3Cre驱动YAP基因剔除小鼠(Foxp3Cre+/YAPf1/f1)在IL-2存在下的iTreg分化,且通过对Foxp3的细胞内染色和流式细胞分析来评估TGF-β的变化浓度。

[0080] 图3A至图3C说明T细胞限制性和Treg限制性的YAP缺失对抗肿瘤应答的影响。图3A和3B显示,令野生型(WT)或YAP f/f;CD4-cre(YAP cKO)小鼠体内荷有 5×10^5 B16黑素瘤细胞(s.c.) (在第0天),每2天测量一次肿瘤尺寸并计算肿瘤体积。图3C显示,在第21天对小鼠施行安乐死,从切出的肿瘤中分离出肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。令TIL与CD4+和CD8+T细胞导通,并通过流式细胞仪测量效应子细胞因子INF-γ和TNF-α水平。对于图3A,显示了各组平均肿瘤体积+/-SD。图3D至3E说明,如上述进行Foxp3Cre+/YAPf1/f1小鼠和WT对照的肿瘤挑战。

[0081] 图4是说明靶向YAP改善免疫疗法的抗肿瘤效应的图。令C57BL/6小鼠荷有B16黑素瘤细胞,如图3所示监控肿瘤进展。各组小鼠在注射肿瘤后第1天开始,以VP、GVAX、抗PD1抗体、VP与抗PD-1、或VP与GVAX进行注射治疗。对照小鼠不进行治疗(n=5/组)。所显示的是各组平均肿瘤体积+/-SD。

[0082] 图5A和图5B显示YAP在CD4+T细胞子集中的表达和活化。图5A显示,从野生型(WT)小鼠分离CD4+T细胞(CD4+CD25-CD62L+),并在Th17极化条件下活化。在所标注时间点收获细胞,进行YAP mRNA的qRT-PCR评估。图5B显示,在所标注的辅助型T细胞子集中评估YAP上游的Hippo通路参与者。在进行YAP信息的qRT-PCR分析之前,如上所述进行T细胞的分离和极化。

[0083] 图6A至图6C显示T细胞特异性YAP缺失小鼠的基线免疫概况的表征及在最优TGF-β浓度下对iTreg生成的效果。图6A和图6B显示,YAPf1/f1CD4Cre+(YAPcKO)和野生型(WT)小鼠在外周淋巴组织中展现可比较的T细胞群落。收获所标注的组织,如标注制备单一细胞悬浮液用于免疫染色和流式细胞分析。图6C显示,测试源自YAPcKO和WT的CD4+T细胞分化为iTreg的能力。在进行对Foxp3的细胞内细胞因子染色之前,如上文所述活化所分离的CD4+T细胞。

具体实施方式

[0084] 本发明至少部分地基于,通过以Yes-相关蛋白(YAP)信号传导为靶向来调节Treg细胞功能、活性、或增殖而治疗癌症的方法的发展。如下文所揭示,对YAP信号传导的抑制阻抑了肿瘤的生长。此外,如本文中所揭示,当组合使用两种基于细胞的抗肿瘤疫苗时,对YAP

信号传导的抑制改善了该疫苗的有效性。

[0085] 调节性T细胞 (Treg) 在维持免疫细胞的自体耐受性和自体稳态中扮演关键角色。同时, Treg是发展出对抗肿瘤的有效免疫应答的障碍。Foxp3是在Treg中表达且为其功能所需的典型转录因子。但是, 该通路和微环境对Foxp3表达和Treg功能的影响尚未完全理解。Yes-相关蛋白 (YAP), Hippo通路的下游共活化子, 在Treg子集中高度表达且在对细胞因子TGF β 的应答中得以上调。YAP $^{-/-}$ -Treg具有受损的体内外阻抑活性和CD4 $^{+}$ T细胞或Treg中YAP的删除, 或者, 对YAP的抑制导致抗肿瘤免疫性提升。因此, YAP增强了Treg促进信号的前馈环路扩增。YAP的丧失可能导致杰出的抗肿瘤免疫性。

[0086] 在其从造血干细胞分化的过程中, 发育中的T细胞经历对其世系潜能的渐进限制。在胸腺中进行CD4/CD8世系选择后, 前往CD4世系细胞的细胞采取以转录因子Foxp3的上调为标记的调节性T细胞 (Treg) 命运或呈现CD4 $^{+}$ T细胞表型。后者种群因其分化为一定范围的功能上特异性的辅助型T细胞 (Th) 世系的能力而广为人知。或者, CD4 $^{+}$ T细胞可当于周边组织内活化时呈现调节性T细胞特质 (包括Foxp3表达)。

[0087] 调节性T细胞 (Treg) 通过阻抑将引发自身免疫疾病的异常或过度免疫应答而在促进免疫学自身耐受性和免疫自身稳定中扮演关键角色 (Sakaguchi, S., et al., Cell, 2008.133:775-87)。但是, 它们也是有效的抗肿瘤免疫性和对慢性感染的消除性免疫的主要障碍 (Whiteside, T.L., Semin Cancer Biol, 2012.22:327-34)。签名叉形头家族转录因子Foxp3锁定了可响应Treg的特征性阻抑功能的基因表达概况。明确地证明其重要性, 编码Foxp3的基因中的突变导致鳞屑病 (Scurfy) 小鼠和类似的人类IPEX患者等体内的自身免疫失调 (Bennett, C.L., et al., Nat Genet, 2001.27:20-1; Brunkow, M.E., et al., Nat Genet, 2001.27:68-73)。一般来说, Treg已经被归类为两种不同的子类型, 何种子类型由其发育处的组织所决定。源于胸腺的Treg或“正常的”Treg (tTreg) 构建循环Foxp3 $^{+}$ Treg的主体, 且对于预防自身免疫性至关重要。被引入周边组织的Treg (pTreg) 或间接体内的Treg (iTreg) 由周边组织中摄取Foxp3表达和阻抑功能的T细胞引起。这出现在TGF- β /IL-2信号传导通路活化的整个过程中 (Josefowicz, S.Z., et al., Annu Rev Immunol, 2012.30:531-64)。TGF- β 是体内外Foxp3表达的潜在诱导物, 是用作TGF- β 发起的信号传导事件和下游基因活化的关键促进子和调节子的信号传导分子的SMAD家族成员 (Zheng, Y., et al., Nature, 2010.463:808-12)。

[0088] 也已经有报导, TGF- β 信号传导是维持Foxp3表达和Treg功能的关键 (Marie, J.C., et al., J Exp Med, 2005.201:1061-7; Liu, Y., et al., Nat Immunol, 2008.9:632-40)。同样, SMAD2和SMAD3显然也为Treg的最优稳定性所需 (Takimoto, T., et al., J Immunol, 2010.185:842-55)。在多种微环境生态中, Treg中TGF- β /SMAD增大或扩增的机制可稳定或提升这些细胞的阻抑功能 (Wu C., et al., Immunity, 2014.41:270-82)。已知这一关键抗炎细胞因子除了有助于Treg的发育和功能外, 还具有对其它免疫细胞的直接阻抑效果。

[0089] YAP (Yes相关蛋白) 是发展性地调节器官尺寸的转录辅激活因子。YAP时常在其作为强力肿瘤促进剂而作用的许多癌症类型如肺癌、结直肠癌、卵巢癌、肝癌和前列腺癌中得以提高, 且其活化在该肿瘤进展中是常见事件。Hippo通路据信是YAP核内定位、活性和致瘤潜能的主要调节子。YAP及其果蝇内副本Yorkie (YKI) 通过调节包括TEAD和SMAD的不同转录因子的活性而促进组织生长和细胞生存。

[0090] 出乎意料,如本文中揭示的,YAP被Treg高度表达。YAP的角色的特征在于免疫对照的这些重要的细胞介质。缺少YAP时,Treg无法阻抑体内外的免疫活化。因此,CD4-和Foxp3-限制方式的YAP基因删除导致小鼠高度抗拒所植入的与促炎性细胞因子过度生产相关的肿瘤。化学靶向性YAP亦提升多种免疫治疗方案的抗肿瘤功效。

[0091] 这些发现表明,YAP及其下游靶标基因在Foxp3表达和Treg-耐受的维持中扮演重要角色,且它们将这些因子明确鉴别为治疗操作的有前途的靶标。

[0092] 用于治疗癌症的方法和产品

[0093] 本发明人已经研发出来用于治疗癌症的方法和产品。该方法打破免疫耐受性,并令该受试者建立强健的抗肿瘤免疫应答。使用一组剂来产生对肿瘤生长的强烈阻抑。

[0094] 该剂可通过该领域已知的任何适当手段给药。如果适宜,该剂可全身性给药。可使用的给药方法包括而限于,肌肉给药、静脉给药、脊柱给药、口服、舌下给药、颅内给药、腹膜给药、吸入盖因、透皮给药、皮下给药和肿瘤内给药。

[0095] 可使用的YAP抑制剂包括该领域已知的任意YAP抑制剂,包括维替泊芬及其药学可接受的盐和活性衍生物。亦见WO 2013188138 A(9H-苄-9-酮,药药效团(pharmacore),如2,7-双(哌啶-1-基-磺酰基)-9H-苄-9-酮);Zhang et al.,ACS Med.Chem.Lett.,2014,5(9),pp 993-998(环状肽抑制剂)。可使用任何YAP抑制剂,尤其是结合至TEAD或Taz的YAP抑制剂。他汀类药物如辛伐他汀也可用作YAP抑制剂。

[0096] YAP的抗体可用作YAP抑制剂。可从圣克鲁兹生物技术公司(Santa Cruz Biotechnology)购买的例示性YAP抗体包括:YAP(B-8)(产品目录号sc-398182)、YAP(G-6)(产品目录号sc-376830)、YAP(H-9)(产品目录号sc-271134)、YAP(C-20)(产品目录号sc-17141)、YAP(S-20)(产品目录号sc-17140)、YAP(H-125)(产品目录号sc-15407)、和YAP(63.7)(产品目录号sc-101199)。可从细胞信号传导技术公司(Cell Signaling Technology)购买的YAP抗体的实例包括:YAP(D8H1X)XP兔mAB(产品目录号14074)、YAP抗体(产品目录号4912)、和磷-YAP(Ser127)抗体(产品目录号4911)。可赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher Scientific)购买的YAP抗体的实例包括:YAP抗体(产品目录号PA5-17609)、YAP1抗体(1A12)(产品目录号MA5-17200)、YAP抗体(产品目录号PA5-17609)、YAP抗体(产品目录号PA1-46189)、YAP1抗体(产品目录号PA5-19677)、YAP1抗体(产品目录号PA5-13504)、磷-YAP pSer127抗体(产品目录号PA5-17481)、和磷-YAP1pSer127抗体(产品目录号PA5-35481)。可从艾博抗公司(Abcam)购买的YAP抗体的实例包括:抗YAP1抗体(产品目录号ab56701)、抗YAP1抗体(EP1674Y)(产品目录号ab52771)、抗YAP1(磷光体S127)抗体(EP1675Y)(产品目录号ab76252)、抗YAP1(磷光体Y357)抗体(产品目录号ab62751)、和抗YAP1抗体(产品目录号ab81183)。

[0097] 免疫治疗剂是通过免疫系统工作的任何剂。其包括抗体和疫苗。刺激特异性T细胞或B细胞应答形成的剂包括疫苗。抗体可通过结合至靶标抗原并吸收该免疫系统其它成员如补体以降解该靶标抗原及/或表达该抗原的细胞而起作用。吸引双特异性T细胞的分子令T细胞吸收靶标抗原。细胞因子可活化或抑制免疫系统的一部分。较佳可与本发明合用的具体免疫治疗剂包括用于肺癌、胰腺癌、白血病、乳腺癌、胃癌、黑素瘤和肾癌的免疫检查点抑制剂、抗PD1抗体、抗CTLA4抗体、抗肿瘤疫苗、GVAX疫苗。也可使用其它疫苗和抗体,如肿瘤抗原肽疫苗和肿瘤抗原的抗体。

[0098] 给药至受试者的两种或多种剂可同步给药,但无需给药。若同步给药,它们可作为混合物或不作为混合物而给药。该两种或更多种剂也可彼此相隔2天内分开给药,彼此相隔1周内分开给药,或彼此相隔1个月内分开给药。

[0099] 组合物可包含作为混合物的两种或更多种剂、YAP抑制剂和免疫治疗剂。它们可由制造商、药剂师、临床医生混合。当给药时间足够接近时,可在身体内形成该组合物,因此,在第二剂给药之前,第一剂尚未从身体清除。该两种或更多种剂可一前一后地制作为融合物或缀合分子。

[0100] 试剂盒是用于船运、储存或销售多剂的包装。该剂可分开包含于该试剂盒内,或该剂可混合。试剂盒中也可包括其它组分,如混合容器或工具、稀释剂、载体、赋形剂、输送装置如注射器、吸入器或雾化器。试剂盒亦可含有配方和开药信息、安全和副作用信息、以及废弃处理信息。

[0101] 可通过本发明的方法和组合物治疗的癌症包括而限于,肺癌、胰腺癌、乳腺癌、结肠癌、甲状腺癌、直肠癌、胶质瘤、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫癌、黑素瘤、肾癌、胃癌、小肠癌、食道癌、成神经细胞瘤、子宫内膜癌、胆管癌、头颈癌、脑癌、胶质瘤、脂肪癌、皮肤癌、肝癌、膀胱癌、视网膜癌、口腔癌、舌癌、肠癌、和星形细胞瘤。可治疗黑素瘤。也可治疗血液癌症如白血病和淋巴瘤。

[0102] 哺乳动物的Hippo通路由多个信号传导网络组成,该网络收敛于Yes-相关蛋白(Yap)的磷酸化及Yes-相关蛋白(Yap)迁移入细胞质内并由E3泛素连接酶降解。哺乳动物的STE20样蛋白激酶(Mst1/2)和大肿瘤阻抑剂同系物(Lats 1/2)激酶是修饰Yap的上游丝氨酸/苏氨酸激酶,且这些激酶由CRB、肌动蛋白细胞骨架介导G蛋白偶合受体、及黏附链接调节。如其细胞角色所表明的,Hippo通路在多种不同癌症中一般被异常调节,并促进肿瘤发生和上皮间质转化(EMT) [15]。当Hippo通路被阻断时,其导致YAP的高度磷酸化及其核内移位/与PDZ结合基序(Taz)助活化子的关联。这一复合体进一步与含有TEA域的序列特异性转录因子(TEAD)关联,且它们一起调节靶标基因表达。在多数实体肿瘤内,YAP和TAZ一般被高度定位在细胞核内,并导致与细胞增殖和死亡相关的基因的异常表达。因此,对于控制肿瘤来说,活性Hippo通路的维持非常重要。

[0103] 对于Hippo通路在免疫细胞内的角色所知甚少。已知CD8+T细胞的活化导致Yap表达,并调节CD8+T细胞的终末分化[16]。与之一致,我们发现,Yap表达在CD4+T细胞内是可诱导的,且牵涉入Treg阻抑功能中。这导致在缺少T细胞来源的Yap时抗重力免疫应答的提升和对侵略性肿瘤生长的有效控制。

[0104] Yap抑制剂对体外肿瘤细胞生长具有直接的负面效果,但药物VP被证实需要解决的问题是它可限制生物应用性及其显著影响体内肿瘤生长的能力[17]。这得到我们的下述发现的支持:在小鼠黑素瘤进展过程中对小鼠进行VP治疗并未改变肿瘤生长进程(图4)。然而,由炎性细胞因子生产的升高所证明的Yap靶向的免疫调节方面(图3C),似乎急剧提升其它剂的抗肿瘤效果,暗示其作为组合免疫治疗策略的可观价值。

[0105] 调节性T细胞(Treg)

[0106] 调节性T细胞(Treg),是T细胞的亚群,其调整免疫系统、维持对自身抗原的耐受性、并消除自身免疫疾病。这些细胞通常阻抑或下调效应子T细胞的感应和增殖。最近,已经鉴别了作为Treg17细胞而为人所知的其它调节性T细胞。鼠模型已经暗示,Treg的调整作用

可治疗自身免疫疾病和癌症,并有助于器官移植。

[0107] 调节性T细胞是免疫系统的组成部分,其阻抑其它细胞的免疫应答。这是构建到免疫系统内以防止过度反应的重要抑制。调节性T细胞有多种形式,最为人理解的是表达CD4、CD25和Foxp3的调节性T细胞(CD4+CD25+调节性T细胞)。这些“Treg”不同于辅助型T细胞。另一调节性T细胞子集是Treg17细胞。调节性T细胞牵涉入在它们成功消除入侵的生物体后关闭免疫应答,也牵涉入防止自身免疫性中。

[0108] CD4+Foxp3+调节性T细胞已经被称为“天然出现的”调节性T细胞,以将它们与体外生成的“阻抑剂”T细胞群体区分开来。另外的调节性T细胞群体包括Tr1、Th3、CD8+CD28-、和Qa-1限制性T细胞。这些群体对自身耐受性和免疫自稳态的贡献较少得以良好地定义。FOXP3可用作CD4+CD25+T细胞的良好标记物,但最近的研究也已经显示FOXP3在CD4+CD25-T细胞内表达的证据。人体内,FoxP3也有最近活化的传统T细胞表达,因此未特异性地鉴别别人T-reg。

[0109] 全部T细胞均来自于源自骨髓的祖细胞,在胸腺内融入其世系。全部T细胞均以DN(双阴性)阶段的CD4-CD8-TCR-细胞开始,在该阶段,个体细胞将重排其T细胞受体基因以形成独特的功能性分子,它们随后对胸腺皮质内用于与自身MHC进行最小水平相互作用的细胞进行测试。如果它们接收到这些信号,则它们增殖并表达CD4和CD8两者,称为双阳性细胞。对Treg的选择出现于胸腺内髓质或Hassal小体内表达II型抗放射性造血源性MHC的细胞中。在DP(双阳性)阶段,它们通过与胸腺内细胞的相互作用而被选择,开始Foxp3的转录,并变为Treg细胞,但直至单阳性阶段为止,它们可能均不开始表达Foxp3,在该单阳性点,它们是功能性Treg。Treg并不具有NKT或 γ δ T细胞的受限的TCR表达;Treg具有比效应子T细胞大的TCR多样性,偏向于自体肽。

[0110] 通过Treg与自体肽MHC复合体的相互作用的亲和性确定Treg选择的过程。接收非常强信号的T细胞将经受凋亡;而接收若信号的细胞将存活,并被选择以变为效应子细胞。如果T细胞接收中等强度的信号,则它将变为调节性细胞。由于T细胞活化过程的随机特性,具有给定TCR的全部T细胞将以Teff与Treg的混合物而告终,而Teff与Treg是由T细胞对于自体肽MHC的亲和性决定的相对比例。甚至在荷有对分泌特异性抗原的基质进行选择TCR转基因细胞的小鼠模型中,删除或转化仍不完全。

[0111] Foxp3+Treg在胸腺内的生成比Teff细胞推迟数天,且直到产后约三周为止,在该胸腺或外周内仍为达到成人水平。Treg细胞需要CD28共刺激而B7.2表达极大受限于髓质,且其发育似乎与Foxp3+细胞的发育并行。已经暗示该两者被链接,当仍未显示两种过程之间的明确链接。在胸腺中,TGF- β 不为Treg功能性所需,盖因来自TGF- β 不敏感TGF β R11-DN小鼠的胸腺是功能性的。

[0112] 免疫系统必需能区分自身的与非自身的。当自身/非自身的区分失败时,免疫系统摧毁身体的细胞和组织,且作为结果,造成自身免疫疾病。调节性T细胞主动地阻抑免疫系统的活化,并预防病理学自体反应性,即自身免疫疾病。调节性T细胞在免疫系统内扮演的关键角色,被调节性T细胞中基因缺陷造成的若干自身免疫症状(IPEX症状)证实。

[0113] 调节性T细胞借以发挥其阻抑剂/调节活性的的分子机制尚未被明确提出,且是亟待研究的课题。体外实验已经给出关于细胞被阻抑时是否需要细胞与细胞接触的复杂结果。免疫阻抑细胞因子TGF- β 和白介素10(IL-10)也已经被卷入调节性T细胞功能中。

[0114] 诱导调节性T (iTreg) 细胞 (CD4+CD25+FoXP3+) 是牵涉入耐受性的阻抑性细胞。已经显示, iTreg细胞阻抑T细胞增殖和实验性自身免疫疾病。这些细胞包括Treg17细胞。诱导Treg细胞从胸腺外的成熟的CD4+传统T细胞发育而来, 这是天然调节性T (nTreg) 细胞与iTreg细胞的决定性差别。尽管iTreg和nTreg细胞分担相似的功能, 但最近已经显示, iTreg细胞是“本质上非冗余的调节性子集, 其部分地通过在调节性应答内扩展TCR多样性而补充nTreg细胞”。小鼠模型中iTreg细胞池的严重急剧消耗已经导致炎症和体重损失。nTreg细胞和iTreg细胞在维持耐受性中的贡献占比不明, 但两者都重要。已经观察到nTreg与iTreg细胞之间的表观遗传差异, 前者具有更稳定的FoXP3表达和更广泛的脱甲基作用。

[0115] 在人和小鼠动物模型中, CD4+调节性T细胞一般均与实体肿瘤相关。乳腺癌、结直肠癌和卵巢癌中调节性T细胞数目的增加与较差的预后相关。CD70+非霍奇金淋巴瘤B细胞诱导瘤内CD4+CD25-T细胞中的FoXP3表达和调节性功能。近期研究显示, 脑缺血可经由来自交感神经系统的信号增加骨髓CD4 (+) CD25 (+) FoXP3 (+) 调节性T细胞。

[0116] 与其它T细胞相似, 调节性T细胞也在胸腺中发育。最新研究表明, 调节性T细胞由叉形头家族转录因子FOXP3 (叉头框p3) 的表达所界定。FOXP3的表达是调节性T细胞发育所必需的, 且似乎控制指定这一细胞命运的遗传程序。绝大多数表达FoXP3的调节性T细胞在表达II型主要组织相容性复合体 (MHC) 限制性CD4 (CD4+) 的群体中被发现, 且表达高水平的白介素-2受体 α 链 (CD25)。除了表达FoXP3的CD4+CD25+之外, 似乎还存在表达I型MHC限制性CD8+FoXP3的调节性T细胞。这些表达FoXP3的CD8+T细胞在健康个体中似乎并非是功能性的, 但在自身免疫疾病状态下被T细胞受体诱导, 以阻抑IL-17介导的免疫应答。不同于传统的T细胞, 调节性T细胞并不生产IL-2且因此在基线上无变应性。

[0117] 采用一些不同的方法来鉴别和监控Treg细胞。最初, 使用CD25和CD4表面标记物的高度表达 (CD4+CD25+细胞)。由于CD25在免疫活化设定如对病原体的免疫应答过程中也被表达在非调节性T细胞上, 这是一个问题。如CD4和CD25表达所界定的, 调节性T细胞包含小鼠和人体内约5至10%的成熟的CD4+T细胞亚群, 而约1至2%的Treg可在全血中测量。FoXP3蛋白的细胞表达的其它测量值允许对Treg细胞 (CD4+CD25+FoXP3+细胞) 进行更具体的分析。但是, FoXP3也瞬时地表达在活化的人效应子T细胞中, 从而令人体内使用D4、CD25和FoXP3作为标记物的正确Treg分析复杂化。因此, 一些使用另一标记物, 表面蛋白CD127的缺失或低水平表达与CD4和CD25的存在组合使用。已经揭示了若干另外的标记物, 如高水平的CTLA-4 (细胞毒性T淋巴细胞相关分子-4) 和GITR (糖皮质激素诱导TNF受体) 也表达在调节性T细胞上, 但是这一表达的功能性意义仍待界定。对鉴别独特且特异性表达在全部表达FoXP3的调节性T细胞上的细胞表面标记物存在极大兴趣。然而, 迄今为止, 仍未见此类分子被鉴别。

[0118] 基于由这些突变造成的遗传性疾病, 已经在人和小鼠体内鉴别出编码FoXP3的基因中的基因突变。这一疾病提供了调节性T细胞在维持正常免疫系统功能中扮演关键角色的最突出证据。具有FoXP3中突变的人类苦于严重且快速的致命性自身免疫障碍, 被称为X-连锁多内分泌腺病、肠病伴免疫失调 (Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy X-linked (IPEX)) 综合征。

[0119] IPEX综合征的特征是, 在生命的第一年中, 压倒性全身自身免疫的发展, 导致一般观察到的濡泻、湿疹性皮炎、和内分泌病三位一体, 最常见于胰岛素依赖型糖尿病。大多数

个体具有其它自身免疫现象,包括Coombs阳性溶血性贫血、自身免疫性血小板减少症、自身免疫性嗜中性白血球减少症、和肾小管性肾病。绝大多数受到影响的男性在生命第一年中死于代谢紊乱或败血症。自发Foxp3突变小鼠体内也观察到已知为“鳞屑病(scurfy)的类似疾病。

[0120] 调节性T细胞(Treg)通过阻抑将会引发自身免疫疾病的不正常或过度的免疫应答,而在促进免疫学自身耐受性和免疫自稳态中扮演关键角色(Sakaguchi,S.,et al.,Cell,2008.133:775-87)。但是,它们也是有效的抗肿瘤免疫性和对慢性感染的消除性免疫的主要障碍(Whiteside,T.L.,Semin Cancer Biol,2012.22:327-34)。签名叉形头家族转录因子Foxp3锁定了可响应Treg的特征性阻抑功能的基因表达概况。明确地证明其重要性,编码Foxp3的基因中的突变导致鳞屑病(Scurfy)小鼠和类似的人类IPEX患者等体内的自身免疫失调(Bennett,C.L.,et al.,NatGenet,2001.27:20-1;Brunkow,M.E.,et al.,NatGenet,2001.27:68-73)。

[0121] 一般来说,Treg已经被归类为两种不同的子类型,何种子类型由其发育处的组织所决定。源于胸腺的Treg或“正常的”Treg(tTreg)构建循环Foxp3+Treg的主体,且对于预防自身免疫性至关重要。被引入周边组织的Treg(pTreg)或间接体内的Treg(iTreg)由周边组织中撷取Foxp3表达和阻抑功能的T细胞引起。这出现在TGF- β /IL-2信号传导通路活化的整个过程中(Josefowicz,S.Z.,et al.,Annu Rev Immunol,2012.30:531-64)。TGF- β 是体内外Foxp3表达的潜在诱导物,是用作TGF- β 发起的信号传导事件和下游基因活化的关键促进子和调节子的信号传导分子的SMAD家族成员(Zheng,Y.,et al.,Nature,2010.463:808-12)。

[0122] 也已经有报导,TGF- β 信号传导是维持Foxp3表达和Treg功能的关键(Marie,J.C.,et al.,J Exp Med,2005.201:1061-7;Liu,Y.,et al.,Nat Immunol,2008.9:632-40)。同样,SMAD2和SMAD3显然也为Treg的最优稳定性所需(Takimoto,T.,et al.,J Immunol,2010.185:842-55)。在多种微环境生态中,Treg中TGF- β /SMAD增大或扩增的机制可稳定或提升这些细胞的阻抑功能(Wu C.,et al.,Immunity,2014.41:270-82)。已知这抗炎细胞因子除了有助于Treg的发育和功能外,众所周知地还具有对其它免疫细胞的直接阻抑效果。

[0123] Foxp3

[0124] FOXP3(叉头框P3),亦称为scurfin,是一种牵涉入免疫系统应答的蛋白质。作为FOX蛋白质家族的成员,FOXP3似乎作为主要调节子(转录因子)而在调节性T细胞的发育和功能中起作用。调节性T细胞通常关闭免疫应答。在癌症中,过量的调节性T细胞活性可防止免疫系统摧毁癌细胞。在自身免疫疾病中,调节性T细胞活性的缺失可令其它自身免疫细胞供给身体自身的组织。

[0125] 尽管仍为建立精确的控制机制,FOX蛋白属于叉形头/翼形螺旋家族的转录调节子,且被假定经由与转录过程中类似的DNA结合相互作用而发挥控制作用。在调节性T细胞模型系统中,FOXP3转录因子占据了用于牵涉入调节性T细胞功能的基因的促进子,且可镇压关键基因在刺激T细胞受体后的转录。

[0126] 人类FOXP3基因含有11个编码外显子。跨越小鼠基因和人基因的编码区域的外显子-内含子边界完全相同。通过基因序列分析,FOXP3基因映射到X染色体的p臂(具体而言,Xp11.23)。

[0127] 对Foxp3作为天然调节性T细胞 (nTreg, T细胞的一个世系) 和适应性/诱导调节性T细胞 (a/iTreg) 的特异性标记物的发现, 给出了对先前通过非特异性标记物如CD25或CD45RB鉴别的调节性T细胞 (Treg) 群体的分子锚。

[0128] 动物研究中, 表达Foxp3的Treg在免疫耐受性尤其是自身耐受性的转译中至关重要。动物研究中, 引入或给药Foxp3阳性T细胞已经导致糖尿病、多发性硬化、哮喘、炎症肠病、甲状腺炎和肾病模型的 (自身免疫) 疾病严重性的明显下降。人体试验已经产生了较弱结果。

[0129] 辅助型T17 (Th17) 细胞是促炎的, 且在与a/iTreg类似的环境中产生。Th17细胞在TGF- β 和IL-6 (或IL-21) 的影响下产生, 而a/iTreg在仅有TGF- β 的影响下产生, 因此, 促炎性方案和促调节性方案之间的差别是单一白介素的存在。免疫实验室正在争论IL-6或IL-21的哪一个才是决定性的信号传导分子。鼠科动物研究指出IL-6是, 而人类研究则显示IL-21才是决定性的信号传导分子。

[0130] 人类疾病中, 在大量病态中发现了调节性T细胞数目的改变, 尤其是表达Foxp3的调节性T细胞数目的改变。例如, 患有肿瘤的患者具有局部相对过量的Foxp3阳性T细胞, 该细胞抑制身体阻抑癌细胞形成的能力。相反, 患有自身免疫疾病如全身性红斑狼疮 (SLE) 的患者具有相对功能紊乱的Foxp3阳性细胞。Foxp3基因在X连锁IPEX综合征 (Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, and Enteropathy, X-linked) 中也产生突变。这些突变时FOXP3的叉形头域中的突变, 表明该突变可中断关键的DNA相互作用。

[0131] 小鼠中, Foxp3突变 (导致叉形头域缺乏的移码突变) 对“鳞屑病”负责, 导致X连锁隐性鼠突变, 将出生16至25天后的半合子雄性致死的。这些小鼠具有过度增殖的CD4+T淋巴细胞、广泛性多器官浸润、和大量细胞因子的提高。这一表型与缺乏CTLA-4、TGF- β 、人疾病IPEX的表达或删除小鼠中Foxp3基因 (“鳞屑病小鼠”) 的那些表型类似。在鳞屑病小鼠中观察到的病理好像是没有适当调节CD4+T细胞活性的能力的结果。在过表达Foxp3基因的小鼠中, 观察到了较少的T细胞。剩余的T细胞具有极差的增殖性和细胞溶解性应答以及极差的白介素-2生产, 但胸腺发育表现为正常。组织学分析表明, 周边淋巴器官, 特别是淋巴结, 缺乏该适宜数量的细胞。

[0132] 除了FoxP3在调节性T细胞分化中的角色之外, 多个证据已经表明, FoxP3在癌症发展中扮演重要角色。已报导了在源自乳腺癌、前列腺癌、和卵巢癌患者的肿瘤试样中FoxP3表达的下调, 表明FoxP3是潜在的肿瘤阻抑因子基因。在源自其它癌症类型, 包括胰腺癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌、甲状腺癌、宫颈癌的肿瘤试样中, 也检测到了FoxP3的表达。但是, 这些报导中未分析响应的正常组织, 因此, 仍未明了FoxP3究竟是这些肿瘤的致瘤分子或抗瘤分子。

[0133] 两个功能性证据强烈支持, FoxP3在癌症发展中用作肿瘤阻抑性转录因子。首先, FoxP3镇压HER2、Skp2、SATB1和MYC致癌基因的表达, 并诱导乳腺癌和前列腺癌细胞中肿瘤阻抑因子基因P21和LATS2的表达。其次, FoxP3在黑色素瘤、胶质瘤、乳腺癌、前列腺癌和卵巢癌细胞系中的过度表达, 在体内外诱发了意义深远的生长抑制效果。然而, 这一假设需要在进一步的研究中得以进一步调查。

[0134] Hippo信号传导通路

[0135] Hippo信号传导通路, 也称为Salvador/Warts/Hippo (SWH通路, 通过细胞增殖和调

亡的调节而控制动物体内的器官尺寸。该通路以其关键信号传导成分之一——蛋白激酶 Hippo (Hpo) 而得名。这一基因中的突变导致组织过度生长,或“河马 (hippopotamus)”样表型。

[0136] 发育中的生物的一个根本问题是器官如何知道在达到特定尺寸后停止生长。器官生长依赖于在细胞水平上出现的若干过程,包括细胞分化和程序性细胞死亡(或凋亡)。Hippo信号传导通路牵涉入遏制细胞增殖和促进细胞凋亡中。由于多数癌症以未加以抑制的细胞分化为标记,这一信号传导通路在人类癌症的严重中已经变得日益重要。

[0137] Hippo信号传导通路表现为高度保守。使用嵌合体遗传学筛查鉴别了果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 体内的大部分Hippo通路组分,随后在哺乳动物体内发现了这些组分的同源序列(在不同物种中起类似功能的基因)。因此,对果蝇中该通路的描述帮助鉴别哺乳动物体内起致癌基因或肿瘤阻抑因子功能的众多基因。

[0138] Hippo通路由核心激酶链 (core kinase cascade) 组成,于该通路中,Hpo令蛋白激酶 Warts (Wts) 磷酸化。Hpo (MST1/2,哺乳动物体内) 是Ste-20家族蛋白激酶的成员。这一高度保守组的丝氨酸/苏氨酸激酶调节若干细胞过程,包括细胞增殖、细胞凋亡、及各种应激应答。一旦被磷酸化,Wts (LATS1/2,哺乳动物体内) 变为活跃。Misshapen (Msn,MAP4K4/6/7,哺乳动物体内) 和Happyhour (Hppy,MAP4K1/2/3/5,哺乳动物体内) 与Hpo同时作用以活化Wts。Wts是细胞核DBF-2相关激酶。这些激酶是细胞周期进程、生长和发育的已知调节子。已知有两种蛋白质促进Wts的活化:Salvador (Sav) 和作为肿瘤阻抑因子的Mob (Mats)。Sav (WW45,哺乳动物体内) 是含有WW域的蛋白质,意为这一蛋白质含有一氨基酸序列,在该序列中,色氨酸和不变的脯氨酸高度保守。Hpo可结合至Sav并将其磷酸化,因为这一Hpo-Sav相互作用促进了Wts的磷酸化,该Sav可作为牺牲蛋白而发挥功能。Hpo亦可磷酸化并活化Mats (MOBKL1A/B,哺乳动物体内),这使得Mats与Wts的激酶活性相关并强化Wts的激酶活性。

[0139] 随后,被激活的Wts继续磷酸化转录共活化因子Yorkie (Yki) 并使之失活。Yki自身不能结合DNA。在其活化状态,Yki结合至转录因子Scalloped (Sd),且该Yki-Sd复合体变为被定位在细胞核内。这容许若干促进器官生长的基因的表达,该基因例如促进细胞周期进程的细胞周期素E、及其名称所示而预防细胞凋亡的diap1(细胞凋亡蛋白-1的抑制剂,果蝇体内)。Yki也活化bantam microRNA的表达,该bantam microRNA是特异性影响细胞数目的正生长调节子。因此,通过Wts令Yki失活,通过这些促生长调节子的转录阻遏而抑制生长。通过在丝氨酸168磷酸化Yki,Wts促进Yki与14-3-3蛋白质的关联,这有助于将Yki锁定在细胞质中并防止其运输至细胞核。哺乳动物体内,两种Yki同源序列是Yes-相关蛋白 (YAP) 和具有PDZ结合基序 (TAZ) 的转录共活化因子。当被活化时,YAP和TAZ可结合至若干转录因子,包括p73、Runx2和若干TEAD。YAP在体内外调节Hoxa1和Hoxc13在小鼠和人上皮细胞中的表达。

[0140] 该核心Hpo/Wts激酶链的上游调节子包括跨膜蛋白Fat和若干膜关联蛋白。作为非典型的钙粘蛋白,Fat (FAT1-4,哺乳动物体内) 可作为受体而发挥功能,但尚未明确鉴别细胞外配体。尽管已知Fat在组织成形过程中结合至另一非典型钙粘蛋白Dachsous (Ds),仍不了解Ds在调节组织生长中扮演何种角色。尽管如此,Fat仍被认为是Hpo通路的上游调节子。Fat通过顶端蛋白质Expanded (Ex;FRMD6/Willin,哺乳动物体内) 而活化Hpo。Ex与两种其它位于顶端的蛋白质 (KIBRA,哺乳动物体内) 和Merlin (Mer;NF2,哺乳动物体内) 相互作用,以

形成Kibra-Ex-Mer (KEM) 复合体。Ex和Mer均为含有FERM域的蛋白质,而Kibra,如Sav,则是含有WW域的蛋白质。KEM复合体与Hpo激酶链进行物理上的相互作用,从而将该核心激酶链定位于浆膜上进行活化。Fat亦可通过对非传统肌浆球蛋白Dachs的抑制而不依赖Ex/Hpo地调节Wts。正常情况下,Dachs可结合至Wts并促进其降解。

[0141] 在果蝇体内,Hippo信号传导通路包括牵涉Salvador (Sav)、Warts (Wts) 和Hippo (Hpo) 蛋白激酶的激酶链。牵涉入Hippo信号传导通路中的多数基因被认为是肿瘤阻抑因子,而Yki/YAP/TAZ被鉴定为致癌基因。事实上,已经发现,一些人类癌症包括乳腺癌、结直肠癌和肝癌中的YAP升高。这可以通过最近定义的YAP在克服接触抑制中所扮演的角色做出解释,接触抑制是正常细胞培养中的基本生长控制性质,该培养中,在达到细胞覆盖后,细胞停止增殖。典型地,这一性质在癌变细胞中丢失,令该细胞以不可控的方式增殖。事实上,YAP过度表达拮抗接触抑制。被认为是肿瘤阻抑因子的多种通路组分在人类癌症中产生突变。例如,已经在乳腺癌中发现Fat4中的突变,而NF2则在家族性或散发性神经鞘瘤中突变。此外,若干人类癌细胞系引起WW45蛋白和MOBK1B蛋白的突变。

[0142] 心脏是哺乳动物发育过程中最先形成的器官。适宜尺寸和功能的心脏在整个生命期限内至关重要。由于损伤或疾病造成的心肌细胞损失导致心力衰竭,这是人类发病率和死亡率的主要肇因。不幸的是,成年人心脏的再生潜力有限。Hippo通路是最近鉴别出的信号传导链,其通过限制细胞增殖、促进细胞凋亡、调节肝细胞/祖细胞的命运,以及,在一些情况下,限制细胞尺寸,在器官尺寸控制中扮演进化上保守的角色。有趣的是,研究表明,这一通路在心肌细胞增殖和心脏尺寸的调节中扮演关键角色。Hippo通路的失活或其下游效应子(即,Yes-相关蛋白转录共活化因子)的活化,改善了心脏再生功能。已知,若干已知的Hippo通路上游信号如机械应力、G蛋白偶合受体信号传导、及氧化应力在心脏生理学中扮演关键角色。此外,已经显示,Yes-相关蛋白通过多种转录机制来调节心肌细胞命运。

[0143] Yes-相关蛋白 (YAP)

[0144] YAP1 (Yes-相关蛋白1),也称为YAP或YAP65,由于其与Yes和Src蛋白质酪氨酸激酶的SH3域关联的能力而最先被鉴别。YAP1是潜在的致癌基因,其在多种人类癌症中被扩增,它也是Hippo肿瘤阻抑通路的两种主要效应子之一。

[0145] 对YAP1基因的克隆促进了对被称为WW域的模块化蛋白域的鉴别。最初,鉴别出YAP1基因产品的两种拼接亚型,命名为YAP1-1和YAP1-2,它们的区别在于编码该WW域的额外38个氨基酸的存在。除了该WW域外,YAP1的模块结构在每一氨基端含有富脯氨酸的区域,该区域之后是TID (TEAD转录因子相互作用域)。然后,在存在于YAP1-1亚型中的单一WW域之后,以及存在于YAP1-2亚型中的两个WW域之后,存在SH3-BM (Src Homology 3结合基序)。在该SH3-BM之后是TAD (转录活化域) 和PDZ域结合基序 (PDZ-BM)。

[0146] YAP1是转录共活化因子,且致癌活性由其与TEAD家族转录因子的关联驱动,该转录因子上调促进细胞生长和抑制细胞凋亡的基因。鉴别了YAP1的几种其它功能性伙伴,包括RUNX、SMADs、p73、ErbB4、TP53BP、LATS1/2、PTPN14、AMOTs、和ZO1/2。YAP1及其近同源系TAZ (WWTR1),是Hippo肿瘤阻抑通路的主要效应子。当该通路被活化时,YAP1和TAZ在丝氨酸残基上被活化且通过14-3-3蛋白质被隐匿在细胞质中。当Hippo通路未被活化时,YAP1/TAZ进入细胞核并调节基因表达。若干基因由YAP1调节,包括Birc2、Birc5、结缔组织生长因子 (CTGF)、双调蛋白 (AREG)、Cyr61、Hoxa1和Hoxc13。

[0147] YAP1致癌基因用作发展新癌症药物的靶标。已经鉴别,小化合物破坏YAP1-TEAD复合体或阻断WW域的结合功能。这些小分子代表用于癌症患者治疗费发展的先导化合物,其中,该患者具有扩增或过度表达的YAP致癌基因。杂合的功能丧失性突变已在患有具有或不具有眼外特征如听力丧失、唇裂、智力障碍和肾病的主要眼部畸形的两个家族中鉴别。

[0148] YAP信号传导在Treg中扮演的用以治疗癌症的角色

[0149] Treg对于遏制对抗正常情况下无害的共生微生物(IBD)的潜在致死性自主(自身免疫)应答或过剩应答是必不可少的(Sakaguchi, S., et al., Cell, 2008. 133:775-87)。但是,在癌症患者体内,Treg可极大富集在肿瘤内,并散布在患者全身(Miller, A.M., et al., J Immunol, 2006. 177:7398-405)。这一环境中,这些细胞的阻抑功能阻遏了指向肿瘤的免疫的有效性,且是发展有效的抗癌免疫疗法的主要障碍(Klages, K., et al., Cancer Res, 2010. 70:7788-99)。在本文中揭示的本发明之前,对Treg借以发挥功能以及这些重要的细胞如何与微环境曲线配合的精确机制的理解对尚不完全。

[0150] 持续进行尝试,以鉴别癌症情境中Treg生成、维持和发挥功能的精确机制。令人惊奇的是,如下文详述的,发现,YAP,一种在器官尺寸的发育调节中起关键作用的转录因子,是Treg的生成和发挥功能中的重要因子。T细胞中YAP的删除或多或少提升了Th1和Th17的发展,但非常令人印象深刻地减少了在限制TGF- β 的条件下iTreg的再生以及Treg的阻抑功能。如本文中所述,Treg没有阻抑体内免疫性的能力,这一无能力通过甚至没有令极差的免疫原性肿瘤在Treg特异性YAP删除的小鼠体内生长的能力而得以显著表明。尽管具有适度YAP抑制活性的药物略微减少的肿瘤生长,当将该药物与肿瘤疫苗合用时,观察到抗肿瘤活性的强烈增效;而单独使用该药物则具有相对小的效果。

[0151] 由于如此依赖于TGF- β 和SMAD信号传导,it stands to reason that Treg采用机制以优化或扩增下游信号传导事件并导致由这一通路所触发的基因调节是理所当然的。此等机制的文献实例包括潜伏性TGF- β 至其活性形式的酶促转变(Worthington, J.J., et al., Immunity, 2015. 42:903-15)和通过半乳凝素和CD44触发SMAD的活化(Wu, C., et al., Immunity, 2014. 41:270-82)。

[0152] 他汀类药物

[0153] 他汀类药物(或HMG-CoA还原酶抑制剂)是一类降低胆固醇的药物,它们抑制在胆固醇生产中扮演中心角色的HMG-CoA还原酶。他汀类药物通过竞争性抑制HMG-CoA还原酶而起作用,HMG-CoA还原酶是甲羟戊酸途径(mevalonate pathway)的第一个作用酶。因为他汀类药物分子水平上具有与HMG-CoA类似的结构,它们将填充入酶的活性部位内并与天然底物(HMG-CoA)竞争。这一竞争降低了HMG-CoA还原酶借以能生产甲羟戊酸的速率,而甲羟戊酸是最终生产胆固醇的链条中的下一个分子。他汀类药物已经牵涉于降低癌症风险中。他汀类药物可降低食道癌、结直肠癌、胃癌、肝细胞癌的风险,也有可能降低胰腺癌的风险。

[0154] 癌症

[0155] 癌症是一大族涉及不正常细胞生长的疾病,具有侵入或扩散至身体其它部分的潜力。它们形成赘生物的子集。赘生物或肿瘤是一组细胞,它们已经历未经调节的生长,且一般会形成团块或肿块,但可以是弥散性分布。已经提出癌症的六种特征:生长信号传导的自给自足;对抗生长信号不敏感;逃避细胞凋亡;能无限制复制的潜力;诱发和支持血管生成;以及,对组织的转移性入侵的活化。正常细胞进展为能形成可辨团块直至癌症的细胞,包括

被称为恶性进展的多个步骤。

[0156] 例如,本文中揭示的方法可用于治疗各种类型的恶性肿瘤及/或肿瘤,如非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性髓细胞性白血病(CML)、多发性骨髓瘤(MM)、乳腺癌、卵巢癌、头颈癌、膀胱癌、黑素瘤、结直肠癌、胰腺癌、肺癌、平滑肌瘤、平滑肌肉瘤、胶质瘤、及恶性胶质瘤。实体肿瘤包括,如乳腺肿瘤、卵巢肿瘤、肺肿瘤、胰腺肿瘤、前列腺肿瘤、黑素瘤肿瘤、结直肠肿瘤、肺肿瘤、头颈肿瘤、膀胱肿瘤、食道肿瘤、肝肿瘤、及肾肿瘤。

[0157] 癌细胞、瘤形成细胞或过度增殖性细胞具有自主生长的能力,即以快速增殖的细胞生长为特征的不正常状态或情况。过度增殖和瘤形成的疾病状态可归类为病理性的,即表征或构建疾病状态;或可归类为非病理性的,即偏离正常状态但与疾病状态无关。该术语意为包括全部类型的癌生长或致瘤过程以及转移性组织或恶性转化的细胞、组织、或器官,而不考虑组织病理学类型或侵入阶段。癌症,或赘生物,包括各种器官系统的恶性肿瘤,如那些影响肺、乳腺、甲状腺、胃肠道、及泌尿生殖道的恶性肿瘤;以及包括恶性肿瘤的腺癌,如大多数结肠癌、肾细胞癌、胰腺癌及/或睾丸肿瘤、肺的非小细胞癌、小肠癌和食道癌。

[0158] 造血性瘤形成病变包括牵涉造血起源的造血/瘤形成细胞的疾病,如由骨髓世系、淋巴世系、红血球世系、或其前体细胞引起的疾病。典型地,该疾病由低分化的急性白血病如成红细胞性白血病和急性巨核细胞性白血病所引起。另外的骨髓病变包括,但不限于,急性早幼粒细胞白血病(APML)、急性骨髓性白血病(AML)和慢性髓细胞性白血病(CML);淋巴恶性肿瘤包括,不限于,包括B世系ALL和T世系ALL的急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、幼淋巴细胞白血病(PLL)、毛细胞性白血病(HLL)和Waldenstrom氏巨球蛋白血症(WM)。其它形式的恶性淋巴瘤包括,但不限于,非霍奇金淋巴瘤及其变种、外周T细胞淋巴瘤、成年T细胞白血病/淋巴瘤(ATL)、皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)、大颗粒淋巴细胞白血病(LGL)、霍奇金氏症(Hodgkin's disease)和李德-斯滕伯格氏症(Reed-Sternberg disease)。

[0159] 治疗疾病的方法

[0160] 本文提供治疗与癌细胞-基质细胞网络相关的疾病、病变或病症的方法。通过将免疫系统暴露于涂覆有源自癌细胞的浆膜的纳米颗粒,本文中揭示的组合物用来刺激并活化对癌细胞的免疫应答。再者,将免疫系统预暴露于涂覆有源自癌细胞的浆膜的纳米颗粒,作为对抗那些类型的癌症的疫苗而起作用。

[0161] 本发明的组合物包括作为输送剂的纳米颗粒。组合物用来输送:疗法、药剂、药物组合物、同位素、及其任意组合。

[0162] 本发明的组合物以各种途径给药至受试者,该途径包括但不限于:口服给药、静脉给药、外用给药、非肠道给药、腹膜给药、肌肉给药、鞘内给药、病灶内给药、颅内给药、鼻腔给药、眼内给药、心内给药、玻璃体内给药、骨内给药、脑内给药、动脉给药、关节内给药、皮内给药、透皮给药、经粘膜给药、舌下给药、肠内给药、唇下部给药、吹入给药、栓塞给药、吸入给药、或皮下给药。

[0163] 本发明的组合物以多种形式给药至受试者,该形式包括但不限于:丸剂、胶囊、片剂、颗粒、粉末、盐、晶体、液体、血清、糖浆、溶液、乳液、悬浮液、凝胶、乳霜、糊剂、膜剂、贴剂、和蒸汽。

[0164] 免疫疗法

[0165] 一些具体实施例中,本发明提供基于免疫疗法的治疗癌症的方法。免疫疗法时通过诱导、提升、或阻抑免疫应答来治疗疾病。设计用以引起或扩增免疫应答的免疫疗法分类为活性免疫疗法,而降低或阻抑免疫应答的免疫疗法则分类为阻抑免疫疗法。

[0166] 癌症免疫疗法(免疫肿瘤学)是免疫系统治疗癌症的用途。免疫疗法分为三个主要的组:细胞疗法、抗体疗法和细胞因子疗法。它们利用了下述事实:癌细胞一般在其表面上具有能被免疫系统检测到的细微差异的分子。这些被称为癌抗原的分子最通常是蛋白质,但也包括诸如碳水化合物的分子。免疫疗法用来驱使免疫系统使用这些抗原作为靶标而攻击肿瘤细胞。

[0167] 抗体疗法时最成功的免疫疗法,用来治疗广范围的癌症。抗体是由免疫系统生产的结合细胞表面上靶标抗原的蛋白。正常生理条件下,免疫系统使用抗体与病原体战斗。每一抗体对一种或多种蛋白质是特异性的。结合至癌抗原的那些被用来治疗癌症。细胞表面受体如CD20、CD274、和CD279,是抗体疗法的常见靶标。一旦抗体结合至癌抗原,抗体可诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性、活化该补体系统、或防止受体与其配体相互作用,这些全部可导致细胞死亡。多种抗体被核准用于治疗癌症,包括阿仑单抗(Alemtuzumab)、伊匹单抗(Ipilimumab)、纳武单抗(Nivolumab)、奥法木单抗(Ofatumumab)、和利妥昔单抗(Rituximab)。

[0168] 细胞疗法,也称为癌症疫苗,一般包括从血液或肿瘤移除免疫细胞。将对肿瘤特异性的免疫细胞活化、培养并送回患者体内,该免疫细胞在患者体内攻击癌症。这一方法中可使用的细胞类型是天然杀手细胞、淋巴因子活化的杀手细胞、细胞毒性T细胞和树突细胞。

[0169] 白介素-2和干扰素- α 是细胞因子的实例,是调节且协调免疫系统行为的蛋白质。它们具有提升抗肿瘤活性的能力并因此可用于癌症治疗。干扰素- α 用于毛细胞白血病、AIDS相关的卡波济氏肉瘤、滤泡性淋巴瘤、慢性骨髓白血病和恶性黑素瘤的治疗中。白介素-2用于恶性黑素瘤和肾细胞癌的治疗中。

[0170] 免疫疗法亦可包括以免疫检查点为靶向而治疗疾病。免疫检查点是免疫系统中发出信号的分子(共刺激分子)或熄灭信号的分子。多种癌症保护它们自身不被免疫系统通过T细胞信号而抑制。由于最初表明用于晚期黑素瘤的两种检查点抑制剂药物的有效性,抑制性检查点分子越来越多地被认为是用于癌症免疫疗法的新靶标。

[0171] 代表免疫疗法靶标的刺激性检查点分子包括,但不限于:CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40、ICOS、和GITR。四种刺激性检查点分子是肿瘤坏死因子(TNF)受体超家族的成员:CD27、CD40、OX40、GITR和CD137。另两种刺激性检查点分子属于B7-CD28超家族:CD28自身和ICOS。CD27支持T细胞的抗原特异性扩展,且在T细胞记忆的再生中至关重要。CD27也是B细胞的记忆标记物。CD27的活性取决于其在淋巴细胞和树突细胞上的配体CD70的瞬时可用性。已知CD27共刺激可阻抑Th17效应子细胞功能。CD28构成性地表达在几乎全部人类CD4+T细胞上和将近半数的CD8T细胞上。与其结合的表达在树突细胞上的两种配体是CD80和CD86,促进T细胞扩展。CD28是TGN1412“超兴奋剂”的靶标,该超兴奋剂在第一次人体研究中造成严重的炎症反应。CD40发现于包括抗原呈递细胞的多种免疫系统细胞上,且具有CD40L(在其它方面称为CD154,且短暂地表达在经活化的CD4+T细胞表面上)作为其配体。已知CD40信号传导造成树突细胞成熟并因此触发T细胞的活化和分化。CD122是白介素-2受体

β 亚单位,且已知其增加CD8+效应子T细胞的增殖。当通过CD137配体结合亦称4-1BB的CD137时,结果是T细胞增殖。也已知,CD137介导的信号传导保护T细胞,且特别地,保护CD8+T细胞不会经受活化诱导的细胞死亡。OX40(亦称CD134)具有OX40L或CD252作为其配体。与CD27类似,OX40促进效应子和记忆T细胞的扩展,但也应注意其阻抑调节性T细胞的分化和活性的能力,还应注意其对细胞因子生产的调节作用。OX40作为药物靶标的价值首先在于下述事实:由于在T细胞受体参与后被短暂表达,OX40仅在炎性损害内最新的抗原活化的T细胞上调。已经显示,抗OX40单克隆抗体在晚期癌症中具有临床应用性。GITR(糖皮质激素诱导的TNFR家族相关基因)促进T细胞扩展,包括Treg扩展。GITR的配体主要表达在抗原呈递细胞上。已经显示,GITR的抗体通过Treg世系稳定性的丧失而促进抗肿瘤应答。ICOS(可诱导的共刺激性T细胞,亦称CD278)表达在经活化的T细胞上。其配体是ICOSL,主要表达在B细胞和树突细胞上。该分子在T细胞效应子功能中似乎是重要的。

[0172] 代表免疫疗法靶标的抑制性检查点分子包括,但不限于:A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、和VISTA。因为免疫微环境中的导致A2a受体活化的腺苷是免疫负反馈回路且肿瘤微环境具有相对高浓度的腺苷,A2AR(腺苷A2A受体)被认为是癌症疗法中重要的免疫检查点。B7-H3(亦称CD276)被认为是共抑制性的。B7-H4(亦称VTCN1)被肿瘤细胞和肿瘤关联的巨噬细胞表达,且在肿瘤逃逸中扮演重要角色。BTLA(B和T淋巴细胞弱化子,亦称CD272)具有HVEM(疱疹病毒进入介质)作为其配体。在人CD8+T细胞从稚细胞分化为效应子细胞表型的过程中,BTLA的表面表达被逐步下调,但肿瘤特异性人CD8+T细胞表达高水平的BTLA。CTLA-4(细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4,亦称CD152)在Treg细胞上的表达用以控制T细胞增殖。IDO(吲哚胺2,3-双加氧酶)是具有免疫抑制性质的色氨酸分解代谢酶。另一重要分子是TDO,吲哚胺2,3-双加氧酶。已知IDO阻抑T细胞和NK细胞,生成并活化Treg和骨髓源性抑制子细胞,并促进肿瘤血管发生。KIR(杀手细胞免疫球蛋白样受体)是天然杀手细胞上I型MHC分子的受体。LAG3(淋巴细胞活化基因-3)做功以经由Treg阻抑免疫应答以及通过对CD8+T细胞的影响而直接阻抑免疫应答。PD-1(程序性死亡1(PD-1)受体)具有两种配体:PD-L1和PD-L2。以PD-1为靶向的优势为,它能在肿瘤微环境中恢复免疫功能。TIM-3(T细胞免疫球蛋白域和粘蛋白域3)表达在经活化的CD4+T细胞上,并调节Th1和Th17细胞因子。通过在与其配体半乳凝素-9相互作用时触发细胞死亡,TIM-3担当Th1/Tc1功能的负调节子。VISTA(T细胞活化的V域Ig阻抑子)基本表达在造血细胞上,因此,VISTA在肿瘤内白血球上的一贯表达可以令VISTA阻滞对宽范围的实体肿瘤有效。

[0173] 联合疗法

[0174] 本发明的组合物可与具有抗增殖性质或可用于治疗过度增殖性病变(如癌症)的第二化合物组合在药物组合配方或剂量方案中,作为联合疗法。该药物组合配方或剂量方案的第二化合物具有对本发明化合物的补充活性,因此,它们并不对其它化合物产生负面影响。此类分子以对所希望目的有效的量适当地存在于组合中。

[0175] 联合疗法可同步进行或依序进行。当依序进行时,可以两次或更多次给药进行该联合疗法。该联合给药包括使用分开的制剂或单一药物制剂同时给药,以及以任意次序连续给药,其中,优选存在两种(或全部)活性剂同时发挥其生物学活性的一段时间。对于任何上述共同给药的剂的适当剂量是目前所使用的量,且可由于新近鉴别的剂与其它化疗剂或治疗方法联合作用(协同增效)而降低用量。

[0176] 联合疗法可提供“增效”并证明是“协同增效”，例如，当活性成分一起使用时实现的效果大于单独使用该化合物时结果的总和时。当该活性成分是下列时可获得协同效应：(1) 共同配制的以及以联合的、单位剂量制剂同步给药或输送的；(2) 通过作为单独配方而交替或并行输送的；或(3) 一些其它方案。当以交替疗法输送时，当例如通过以单独的注射器进行差别注射而依序给药或输送该化合物时，可获得协同效应。通常，在交替疗法过程中，依序如连续给药有效剂量的每一活性成分，但在联合疗法中，将有效剂量的两种或更多种活性成分一起给药。

[0177] 作为实例，该剂的给药可与手术联合执行，以移除不正常的增殖性细胞团块。本文中，“与手术联合”意为，该剂可在手术过程之前、过程中或之后给药。用于治疗上皮细胞肿瘤病症的手术方法包括腹内手术，如右侧或左侧半结肠切除术；乙状结肠、次全结肠和全结肠切除术；根治性或部分乳房切除术；前列腺切除术和子宫切除术。这些具体实施例中，该剂可通过连续输液或快速灌注方式给药。手术过程中或术后立即进行的给药可包括使用该剂在药物可接受载体内的药物制剂进行肿瘤切除部位的灌注、浸泡、或预灌注。一些具体实施例中，为了抑制转移病灶的形成和发展，在手术时和手术后的时间给药该剂。该剂的给药也可在手术过程后持续几小时、几天、几周、或一些情况想为几个月，以移除肿瘤团块。

[0178] 该剂可与非手术性抗增殖(如，抗癌)药物治疗法联合给药至受试者。一种具体实施例中，该剂可与疫苗(如抗癌疫苗)疗法同步给药。一种具体实施例中，该剂可与抗癌化合物如抑制细胞生长的化合物联合给药。抑制细胞生长的化合物是阻抑细胞生长及/或增殖的化合物(如，核酸、蛋白质)。一些具体实施例中，该抑制细胞生长的化合物针对肿瘤的恶性细胞。又一具体实施例中，该抑制细胞生长的化合物是抑制血管平滑肌细胞或纤维母细胞的生长及/或增殖的化合物。

[0179] 待与本发明的剂合用的适当的抗增殖性药物或抑制细胞生长的化合物包括抗癌药物。抗癌药物是广为人知的且包括：阿西维辛(Acivicin)；阿柔比星(Aclarubicin)；盐酸阿可达佐(Acodazole Hydrochloride)；阿克罗宁(Acronine)；阿多来新(Adozelesin)；阿地白介素(Aldesleukin)；六甲蜜胺(Altretamine)；安波霉素(Ambomycin)；醋酸阿美蒽醌(Ametantrone Acetate)；氨鲁米特(Aminoglutethimide)；安吡啶(Amsacrine)；阿那曲唑(Anastrozole)；安曲霉素(Anthramycin)；天冬酰胺酶(Asparaginase)；曲林菌素(Asperlin)；阿扎胞苷(Azacitidine)；阿扎替派(Azetepa)；阿佐霉素(Azotomycin)；巴马司他(Batimastat)；苄替哌(Benzodepa)；比卡鲁胺(Bicalutamide)；盐酸比生群(Bisantrene Hydrochloride)；双奈法德(Bisnafide Dimesylate)；比折来新(Bizelesin)；硫酸博来霉素(Bleomycin Sulfate)；布喹那钠(Brequinar Sodium)；溴匹立明(Bropirimine)；白消安(Busulfan)；放线菌素(Cactinomycin)；卡普睾酮(Calusterone)；卡醋胺(Caracemide)；卡贝替姆(Carbetimer)；卡铂(Carboplatin)；卡氮芥(Carmustine)；盐酸卡米诺霉素(Carubicin Hydrochloride)；卡折来新(Carzelesin)；西地芬戈(Cedefingol)；苯丁酸氮芥(Chlorambucil)；西罗霉素(Cirolemycin)；顺铂(Cisplatin)；克拉屈滨(Cladribine)；甲磺酸克雷斯特托(Crisnatol Mesylate)；环磷酰胺(Cyclophosphamide)；阿糖胞苷(Cytarabine)；达卡巴嗪(Dacarbazine)；更生霉素(Dactinomycin)；盐酸道诺霉素(Daunorubicin Hydrochloride)；地西他滨(Decitabine)；右奥马铂(Dexormaplatin)；地扎胍宁(Dezaguanine)；甲磺酸地扎胍宁(Dezaguanine)

Mesylate);地吡醌(Diaziquone);多西他赛(Docetaxel);阿霉素(Doxorubicin);盐酸阿霉素(Doxorubicin Hydrochloride);屈洛昔芬(Droloxifene);枸橼酸屈洛昔芬(Droloxifene Citrate);丙酸屈他雄酮(Dromostanolone Propionate);达佐霉素(Duazomycin);依达曲沙(Edatrexate);盐酸依洛尼塞(Eflornithine Hydrochloride);依沙芦星(Elsamitrucin);恩洛铂(Enloplatin);恩普氨酯(Enpromate);依匹哌啉(Epipropidine);盐酸表柔比星(Epirubicin Hydrochloride);厄布洛唑(Erbulozole);盐酸依索比星(Esorubicin Hydrochloride);雌氮芥(Estramustine);雌氮芥磷酸钠(Estramustine Phosphate Sodium);依他硝唑(Etanidazole);依托泊苷(Etoposide);磷酸依托泊苷(Etoposide Phosphate);艾托卜宁(Etoprine);盐酸法倔唑(Fadrozole Hydrochloride);法扎拉滨(Fazarabine);芬维A胺(Fenretinide);氟尿苷(Flouxuridine);磷酸氟达拉滨(Fludarabine Phosphate);氟尿嘧啶;氟西他宾(Fluorocitabine);磷喹酮(Fosquidone);福司曲星钠(Fostriecin Sodium);吉西他滨(Gemcitabine);盐酸吉西他滨(Gemcitabine Hydrochloride);羟基脲;盐酸伊达比星(Idarubicin Hydrochloride);异环磷酰胺(Ifosfamide);伊莫福新(ilmofosine);干扰素 α -2a;干扰素 α -2b;干扰素 α -n1;干扰素 α -n3;干扰素 β -1a;干扰素 γ -1b;异丙铂(Iproplatin);盐酸伊立替康(Irinotecan Hydrochloride);醋酸兰瑞肽(Lanreotide Acetate);来曲唑(Letrozole);醋酸亮丙瑞林(Leuprolide Acetate);盐酸利阿唑(Liarozole Hydrochloride);洛美曲索钠(Lometrexol Sodium);环己亚硝脲(Lomustine);盐酸洛索蒽醌(Losoxantrone Hydrochloride);马索罗酚(Masoprocol);美登素(Maytansine);盐酸氮芥(Mechlorethamine Hydrochloride);醋酸甲地孕酮(Megestrol Acetate);醋酸美仑孕酮(Melengestrol Acetate);美法仑(Melphalan);美诺利尔(Menogaril);巯嘌呤(Mercaptopurine);甲氨蝶呤(Methotrexate);甲氨蝶呤钠(Methotrexate Sodium);氯苯氨啉(Metoprine);美妥替哌(Meturedopa);米丁度胺(Mitindomide);Mitocarcin;丝裂红素(Mitocromin);米妥杰林(Mitogillin);米托马星(Mitomalcin);丝裂霉素(Mitomycin);米托司培(Mitosper);米托坦(Mitotane);盐酸米托蒽醌(Mitoxantrone Hydrochloride);霉酚酸(Mycophenolic Acid);诺考达唑(Nocodazole);诺加霉素(Nogalamycin);奥马铂(Ormaplatin);奥昔舒仑(Oxisuran);紫杉酚(Paclitaxel);培门冬酶(Pegaspargase);佩里霉素(Peliomycin);戊氮芥(Pentamustine);硫酸培洛霉素(Peplomycin Sulfate);培磷酰胺(Perfosfamide);哌泊溴烷(Pipobroman);噻消安(Piposulfan);盐酸吡罗蒽醌(Piroxantrone Hydrochloride);普卡霉素(Plicamycin);普洛美坦(Plomestane);卜菲尔钠(Porfimer Sodium);泊非霉素(Porfiromycin);泼尼氮芥(Prednimustine);盐酸甲基苄胍(Procarbazine Hydrochloride);嘌呤霉素(Puromycin);盐酸嘌呤霉素(Puromycin Hydrochloride);吡唑霉素(Pyrazofurin);利波腺苷(Riboprime);罗谷亚胺(Rogletimide);沙芬戈(Safingol);盐酸沙芬戈(Safingol Hydrochloride);司莫司汀(Semustine);辛曲秦(Simtrazene);斯帕磷酸钠(Sparfosate Sodium);司帕索霉素(Sparsomycin);盐酸螺旋锗(Spirogermanium Hydrochloride);螺莫司汀(Spiromustine);螺铂(Spiroplatin);链黑霉素(Streptonigrin);链脲霉素(Streptozocin);磺氯苯脲(Sulofenur);他利霉素(Talisomycin);紫杉醇(Taxol);泰素帝(Taxotere);替可加兰钠(Tecogalan Sodium);喃

氟啶 (Tegafur); 盐酸替洛萘醌 (Teloxantrone Hydrochloride); 替莫泊芬 (Temoporfin); 替尼泊苷 (Teniposide); 替罗昔隆 (Teroxirone); 睾内酯 (Testolactone); 硫脒嘌呤 (Thiamiprine); 硫鸟嘌呤 (Thioguanine); 噻替哌 (Thiotepa); 噻唑扶林 (Tiazofurin); 替拉扎明 (Tirapazamine); 盐酸拓扑替康 (Topotecan Hydrochloride); 枸橼酸托瑞米芬 (Toremifene Citrate); 醋酸曲托龙 (Trestolone Acetate); 磷酸曲西立滨 (Triciribine Phosphate); 三甲曲沙 (Trimetrexate); 三甲曲沙葡萄糖醛酸酯 (Trimetrexate Glucuronate); 曲普瑞林 (Triptorelin); 盐酸妥布氯唑 (Tubulazole Hydrochloride); 尿嘧啶氮芥 (Uracil Mustard); 乌瑞替派 (Uredepa); 伐普肽 (Vapreotide); 维替泊芬 (Verteporfin); 溴酸长春碱 (Vinblastine Sulfate); 硫酸长春新碱 (Vincristine Sulfate); 长春地辛 (Vindesine); 硫酸长春地辛 (Vindesine Sulfate); 硫酸长春砒啶 (Vinepidine Sulfate); 长春氟宁 (Vinflunine); 硫酸长春苷酯 (Vinglycinate Sulfate); 硫酸长春罗新 (Vinleurosine Sulfate); 酒石酸长春瑞滨 (Vinorelbine Tartrate); 硫酸长春罗定 (Vinrosidine Sulfate); 硫酸长春氮芥 (Vinzolidine Sulfate); 伏罗唑 (Vorozole); 折尼铂 (Zeniplatein); 净司他汀 (Zinostatin); 盐酸佐柔比星 (Zorubicin Hydrochloride)。

[0180] 根据本发明的方法, 本发明的剂可在给药其它抗癌化合物或疗法之前、同时或之后给药。给药时间表可包括以交替方式给药不同的剂。其它具体实施例中, 可在使用其它疗法治疗之前和过程中、或过程中和之后、或之前和之后输送该剂。一些情况下, 该剂在执行其它抗增殖疗法前24小时以上的时间给药。其它具体实施例中, 可对受试者执行超过一种抗增殖疗法。例如, 该受试者可接受与手术和至少一种其它抗增殖化合物联合的本发明的剂。或者, 该剂可与超过一种抗癌药物联合给药。

[0181] 药物组合物

[0182] 某些具体实施例中, 本发明提供药物组合物, 其包含本发明中采用的剂。该剂可适当配制, 并通过公认用于此类输送的任何手段引入受试者或细胞环境内。

[0183] 此类组合物典型包括该剂和药学可接受的载体。本文中使用的短语“药学可接受的载体”包括与药物给药相容的盐水、溶剂、分散介质、涂层、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。补偿性活性化合物也可并入该组合物中。

[0184] 药物组合物被配制为与其预期的给药路径相容。给药路径的实例包括非肠道给药, 如静脉给药、皮内给药、皮下给药、口服 (如, 吸入) 给药、透皮 (外用) 给药、经粘膜给药、和直肠给药。用于肠道外、皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可包括下述组分: 无菌稀释剂, 如注射用水、盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂; 抗菌剂, 如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯; 抗氧化剂, 如抗坏血酸或亚硫酸氢钠; 螯合剂, 如乙二胺四乙酸; 缓冲剂, 如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐; 以及用于调节渗透压的剂, 如氯化钠或葡萄糖。可使用酸或碱如盐酸或氢氧化钠调节pH。该非肠道制剂可密封在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂小瓶内。

[0185] 适用于注射用途的药物组合物包括无菌水溶液 (水溶性情况) 或用于临时制备无菌注射溶液或分散液的分散体和无菌粉末。对于静脉给药, 适当的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL.TM. (BASF, Parsippany, N.J.) 或磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。在所有情况下, 该组合物必须是无菌的, 且应是容易通过注射器注射的液体。它应在制造和储存条件下稳

定,且必须防止微生物如细菌和真菌的污染活动。该载体可以是溶解或分散介质,含有诸如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇、和液体聚乙二醇等)、及其适当的混合物。例如,可通过使用涂层如卵磷脂、通过维持分散体情况下的颗粒尺寸、和通过使用表面活性剂,来维持适宜的流动性。可通过多种抗细菌剂和抗真菌剂如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等实现对微生物活动的阻止。多数情况下,该组合物中优选包括等渗剂,例如,糖类;多元醇类,如甘露醇、山梨醇;氯化钠。可通过在该组合物中包括延迟吸收的剂如单硬脂酸铝和明胶而令对该可注射组合物的吸收时间延长。

[0186] 可通过将所需量的活性化合物并入具有上文枚举的一种惩罚或成分组合的溶剂中,之后如需要,则进行无菌化,从而制备无菌的可注射溶液。通常,通过将该活性化合物并入无菌运载剂中而制备分散体,该运载剂含有基础分散介质和来自所枚举的那些的所需其它成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,该方法从其预先无菌过滤的溶液获得活性成分加上其它任何所需成分的粉末。

[0187] 口服组合物通常包括惰性稀释剂或可食用载体。对于口服治疗性给药的目的,可将该活性化合物与赋形剂合并,且以片剂、锭剂或胶囊如明胶胶囊的形式使用。口服组合物也可使用流体载体制备,作为漱口水使用。可包括药学相容的结合剂、及/或佐剂材料作为该组合物的一部分。片剂、丸剂、胶囊、锭剂等可含有任意下述成分或相似特性化合物:粘合剂,如微晶纤维素、黄芪胶或明胶;赋形剂,如淀粉或乳糖;崩解剂,如藻酸、Primogel、或玉米淀粉;润滑剂,如硬脂酸镁或Sterotes;助流剂,如胶体二氧化硅;甜味剂,如蔗糖或糖精;或芳香剂,如薄荷油、水杨酸甲酯、或橙味芳香剂。

[0188] 本发明的组合物也可配制为纳米颗粒制剂。可给药本发明的化合物用于立即释放、延迟释放、缓和释放、持续释放、脉冲释放及/或控制释放用途。每单位体积的本发明的药物组合物中,可含有从0.01至99重量%的活性材料。对于吸入给药,该化合物以从含有适当推进剂如气体如二氧化碳的碳加压容器或分散器、或喷雾器的气溶胶喷雾的形式输送。此类方法包括US 6,468,798中揭示的那些。

[0189] 亦可通过经粘膜给药或透皮给药手段进行全身给药。对于肌肉给药和透皮给药,在配方中使用适用于待穿透的屏障的渗透剂。此类渗透剂是该领域通常所知的,且包括,例如,对于经粘膜给药,使用洗涤剂、胆盐和梭链孢酸衍生物。可通过使用鼻腔配伍或栓剂实施经粘膜给药。对于透皮给药,将该活性化合物配制为该领域通常所知的油膏、敷剂、凝胶、或乳霜。该化合物也可制备为用于直肠输送的栓剂(如,具有传统栓剂基质,如可可油和其它甘油酯)或保留灌肠剂。

[0190] 一种具体实施例中,将该活性化合物制备为具有保护该化合物不会从身体快速消除的载体,如控制释放配方,包括移植物和微胶囊输送系统。可使用生物可降解、生物相容的聚合物,如乙烯-醋酸乙烯酯共聚物、聚酸酐类、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯、及聚乳酸。可使用标准技术制备此类配方。该材料亦可从阿尔扎公司(Alza Corporation)和诺华制药(Nova Pharmaceuticals, Inc.)商购。脂质体悬浮液(包括以被感染细胞为靶标的脂质体和病毒抗原的单克隆抗体)也可用作药学可接受的载体。这些可根据该领域技术人员已知的方法如US 4,522,811中揭示的方法制备。

[0191] 可通过标准药学过程在细胞培养物或实验动物中测定这些化合物的毒性和疗效,如测定LD50(将群体的50%致死的剂量)和ED50(对群体的50%治疗性有效的剂量)。毒性与

疗效之间的剂量比是治疗指数,且可表达为LD50/ED50比。优选展现高治疗指数的化合物。尽管可使用展现毒副作用的化合物,但应谨慎设计令此类化合物亦被影响的组织部位为靶向的输送系统,以最小化对未被感染的细胞的潜在性损害,从而降低副作用。

[0192] 从细胞培养检验和动物研究中获得的数据可用来制订人体中使用的剂量范围。这些化合物的剂量优选处于包括具有低毒性或无毒性的ED50的循环浓度范围内。依据所采用的剂型和所使用的给药路径,该剂量可在这一范围内改变。对于在本发明方法中使用的化合物,最初可从细胞培养检验中评估该治疗有效剂量。可在动物模型中制订剂量以实现包括如在细胞培养中测得的IC50(即,达到最大症状抑制的一半的测试化合物浓度)的循环血浆浓度范围。这些信息可用来更准确地测定人体中的有用剂量。例如,可通过高效液相色谱测量血浆中的水平。

[0193] 如本文中界定,剂的治疗有效量(即,有效剂量)取决于所选择的剂。例如,可给药约1pg至1000mg范围内的单一剂量的剂;一些具体实施例中,可给药10、30、100、或1000pg,或10、30、100、或1000ng,或10、30、100、或1000 μ g,或10、30、100、或1000mg。一些具体实施例中,可给药1至5g的该组合物。

[0194] 可通过该领域已知方法测定本发明化合物的治疗有效量。除了取决于所使用的剂和所选择的药学配方外,本发明药物组合物的治疗有效数量还将取决于患者的年龄和通常生理条件以及给药路径。某些具体实施例中,该治疗剂量通常为约10与2000mg/天之间,优选约30与1500mg/天之间。可使用其它范围,包括,例如,50至500mg/天、50至300mg/天、100至200mg/天。

[0195] 给药频率可以是每天一次、每天两次或更频繁,且可在疾病或病变的维持期降低频率,如每两天或三天一次而非每天移除或每天两次。该剂量和给药频率将取决于临床体征,其确认为维持缓解期,且该领域技术人员已知的急性期的至少一种或多种优选超过一种临床体征减少或消失。熟练的医师将意识到,某些因素可影响有效治疗受试者所需的剂量和时机,该因素包括但不限于,疾病或病变的严重性、先前的治疗、该受试者的通常健康状况及/或年龄、以及患有的其它疾病。此外,使用治疗有效量的剂治疗受试者包括单一治疗,或视情况可包括一系列治疗。

[0196] 令意识到,将剂引入细胞环境的方法将取决于细胞类型及其环境的组成。必须引入适当量的剂,且这些量可使用标准方法经验性地确定。细胞环境中个体剂的例示性有效浓度可以是500毫摩尔或更少、50毫摩尔或更少、10毫摩尔或更少、1毫摩尔或更少、500纳摩尔或更少、50纳摩尔或更少、10纳摩尔或更少,甚至可使用该剂浓度为1纳摩尔或更少的组合物。

[0197] 该药物组合物可与给药说明书一起包括在试剂盒、容器、包装或分配器内。

[0198] 通过下述实施例进一步例示性说明本发明,该实施例不应视为限制。本申请通篇以及附图所引用的全部参考文献、专利和已公开的专利申请通过引用而并入本文。

[0199] [实施例]

[0200] 实施例1:方法和材料

[0201] 小鼠品系

[0202] C57/BL6Yap f/f小鼠是潘多加博士(Dr. Duo jia Pan)慷慨赠予的礼物。C57/BL6CD4-cre小鼠和Foxp3-Cre小鼠购自杰克逊实验室(Jackson Laboratory)。全部动物实

验遵照《约翰霍普金斯动物护理和使用政策》(Johns Hopkins Animal Care and Use Policy) 实施。

[0203] 体外T细胞分化

[0204] 将CD4⁺T细胞(CD4⁺CD25⁻CD62L^{Hi}) 在FACS Aria高速分类器上分类。使用结合有αCD3 (10ug/ml) 和可溶性αCD28 (2ug/ml) 的24孔板在下述极化条件下活化经分类的细胞: Th1 (IL-12 (10ng/ml)、αIL-4 (10ug/ml)、Th2 (IL-4 (10ng/ml)、αIFN-γ (10ug/ml)、αIL-12 (10ug/ml)、Th17 (IL-6 (10ng/ml)、TGF-β1 (1.25ng/ml)、IL-23 (10ng/ml)、IL-1β (10ng/ml)、αIFN-γ (10ug/ml)、αIL-4 (10ug/ml)、Treg (TGFβ1 (5ng/ml)、IL-2 (100IU/ml)。

[0205] 体外抑制检验

[0206] 使用CFSE标记 0.1×10^6 个WT CD4⁺T细胞,并在其孔中具有αCD3/αCD28缀合微珠的96孔底板中培养,其中,细胞与微珠的比为1:1。将逐级稀释的Treg细胞(CD4⁺CD25^{Hi}) 共培养72小时,通过流式细胞术测量由CFSE造成的细胞增殖。

[0207] RNASeq分析

[0208] 从YAP^{+/+};Foxp3-Cre-YFP+野生型(WT)小鼠和YAP flox/flox (f/f);Foxp3-cre-YFP+小鼠(YAP cKO) (n=5/组) 收获脾脏和外周淋巴结。磁性富集CD4⁺T细胞,将各组的(CD4⁺CD62L⁺YFP⁻) 细胞和天然Treg (nTreg, CD4⁺CD62L⁺/-YFP⁺) 细胞流动分类。对于活化条件,使用2μg/ml的板涂覆αCD3和2μg/ml的可溶性αCD28以及TGF-β1 (5ng/ml) 和IL-2 (100U/ml) 进一步将经分类的nTreg细胞活化24小时。收获来自WT小鼠和YAP cKO小鼠的 2×10^6 个细胞或nTreg (无刺激或刺激),以1X PBS洗涤两次,立即速冻,直至进一步的RNA-seq分析为止。

[0209] RNA-seq库的构建

[0210] 借由TRIZOL从野生型或YAP KO CD4⁺T细胞、或经或未经48小时抗CD3/CD28刺激的YFP-Foxp3⁺天然Treg细胞分离总RNA。在生物分析仪上监控RNA品质。通过下述制造商协议,使用TruSeq链式总RNA库制备试剂盒(TruSeq Stranded Total RNALT Sample Prep Kit) (具有Ribo-Zero Gold, RS-122-2301, Illumina) 从322ng的总RNA中制备链特异性RNA-seq库。简而言之,使用与Ribo-Zero rRNA移除微珠联合的生物素化的、靶标特异性的寡核苷酸消耗细胞质和线粒体两者中的核糖体RNA (rRNA)。纯化之后,使用二价阳离子在高温下将该RNA破碎成小段,使用逆转录酶和随机引物将该小段RNA转录至第一链cDNA内,之后使用DNA聚合酶I和RNase H进行第二链cDNA的合成。将单个“A”碱基加至这些cDNA片段中,随后以转接子结扎。以12次循环的PCR富集产物。如在Qubit 2.0上所测得的,最终的cDNA库在30ul ddH₂O中的浓度达到了24至27ng/ul。

[0211] 流式细胞术

[0212] 对于细胞外染色,洗涤所收获的细胞,并将其在含有具下述荧光染料缀合抗体的1%FBS的PBS中在U形底96孔板上孵化。对于细胞内细胞因子染色,在Golgi-Plug (BD Biosciences) 的存在下在PMA和离子霉素中再次刺激所收获的细胞。孵化5小时后,将该细胞固定/穿孔(eBioscience),并使用抗体IFN-γ PE、IFN-γ APC、IL-13PE、IL-17APC (BD Bioscience)、IL-2APC (BD Pharmingen)、Foxp3PE (eBioscience) 孵化。根据制造手册使用细胞追踪CFSE细胞扩增试剂盒(Invitrogen) 进行细胞内增殖。

[0213] 定量实时PCR

[0214] 使用Trizol (Invitrogen) 提取RNA,之后使用SuperScript III (Invitrogen) 以20ul反应/孔进行cDNA合成反应。每一cDNA合成反应中,使用通过超微量分光光度计 (NanoDrop Spectrophotometer) (ThermoScientific) 测量的相同量的RNA。使用SYBR Green (Pierce) 和所指定的引物制备相同体积的cDNA样品,进行实时PCR分析,以评估每一基因的转录水平。

[0215] B16黑素瘤生长实验

[0216] 在DMEM加上10%热灭活的胎牛血清中进行B16黑素瘤细胞的体外培养,以胰蛋白酶化方式取下细胞,洗涤该细胞,之后将其皮下注射入C57BL/6小鼠 (NCI) 的足垫内。对每只小鼠,将1至5x 10⁴个B16黑素瘤细胞注射入足垫内。一些情况下,注射10⁵个B16细胞。一旦可触知肿瘤 (7至10天),即将100ml的1x10⁶个经致死辐射 (150Gy) 的B16GM疫苗细胞皮下注射入对侧肢体内。对于全部这些实验,每组使用5至10只小鼠。从查尔斯·德雷克博士 (Dr.Charles Drake (JHH)) 处获得表达阻断性抗PD-1抗体 (无性系G4) 的杂交瘤细胞系。每周两次腹腔内注射100μg/小鼠/次注射的抗PD-1 (G4),一旦可触知肿瘤 (7至10天),即同时进行使用疫苗与维替泊芬 (USP,产品目录号为USP-1711461) 的治疗。维替泊芬以2mg/小鼠的剂量使用PBS稀释为200μl,并每两天进行一次腹腔内注射。在整个实验过程中,通过数显卡尺测定肿瘤体积。通过下式计算相对肿瘤体积:长度 (mm) x宽度 (mm) x高度 (mm) x 0.5326x 0.01。对小鼠实施人道的安乐死,通过以2,000rpm进行20min的Percoll离心处理 (40%/80%梯度) 而分离TIL。通过细胞内流式细胞术测量细胞因子和Foxp3。

[0217] 实施例2:TCR信号传导诱发YAP表达并在CD4+Treg子集中高度表达YAP

[0218] YAP是由于其在Hippo信号传导通路中扮演的角色而为人所知的转录共活化子。就其本身而言,YAP在肿瘤形成和器官尺寸确定中是重要的。但是,在本文中揭示的发明之前,对Hippo通路和YAP在免疫细胞中扮演的角色所知甚少。Hippo通路与TGF-β信号传导之间的串扰报告导致下述推测:前者的元件可能在统御免疫活化和免疫耐受性的机制中扮演角色。

[0219] 为了评估Hippo信号传导在CD4+T细胞中的角色,在不同子集的CD4+T细胞中筛查YAP表达。在CD4+T稚细胞中检测到极少甚至没有YAP mRNA,但在iTreg分化的早期过程中,独特地诱发了YAP表达。其它T效应子的子集 (Th0、Th1、和Th2) 未能上调YAP mRNA (图1A)。有趣的是,YAP消息确实在Th17扭曲的早期过程中瞬时积累,但是,在刺激后12小时,YAP转录本水平回归至基线 (图5A)。YAP蛋白质的可观表达也与iTreg子集完全不同 (图1B)。由于YAP是Hippo通路的主要组分,评估了T细胞子集中YAP上游的Hippo信号传导因子的水平。有趣的是,与YAP不同,MST1/2、LATS1/2、和NF2在iTreg扭曲情况下并未被上调 (图5B),暗示,就整体通路方面而言,相对于其发育生物学,YAP调节不同于Treg。

[0220] 实施例3:消除CD4+T细胞中的YAP表达导致Th17表型的提升和Treg阻抑的受损

[0221] 由于Yap表达在Treg子集中得以高度上调,这保证了对其功能角色的进一步调研。为了剖析YAP在CD4+T细胞包括Treg中的潜在角色,将YAPf1/f1小鼠杂交为CD4-cre转基因学,以生成YAP的T细胞特异性被消除的小鼠。这些条件性基因敲除 (knockout) 小鼠正常发育,其T细胞发育或外周免疫细胞群体 (图6A和图6B) 没有明显缺陷。从这些条件性敲除Yap f/f;CD4-cre (YAP cKO) 和野生型 (WT) 小鼠分离出CD4+T稚细胞,在不同的辅助型CD4+T细胞 (Th) 极化条件下活化72小时。在Th0条件下,YAP cKO CD4+T细胞表达更高水平的IL-2和

IFN- γ (图2A)。在Th17极化条件下, YAP cKO CD4+T细胞也表达比WT CD4+T细胞更大量的IL-17A (图2B), 且与之一致, Yap cKO CD4+T细胞表达比WT细胞更高水平的*il17a* mRNA (图2C)。在Th17条件下培养的源自YAP cKO的T细胞中, 观察到Foxp3+细胞的中等程度的减少 (图2B)。这与iTreg中YAP上调的发现结合, 暗示YAP缺陷可能对体外iTreg生产造成负面影响。

[0222] 已知, Foxp3可拮抗Ror γ t并因此抑制Th17分化 [13]。因此, Yap可能通过对Foxp3诱导的效应而影响Th17分化。有趣的是, 在Treg极化条件下, 通过YAP cKO T细胞进行的Foxp3诱导与在WT CD4+T细胞中所见者相当 (图6C, 图2D至2E)。这暗示是Foxp3活性而非诱导可能是这些观察到的表型的原因。然而, 在不同浓度TGF β 的存在下活化来自YAP cKO小鼠的CD4+T细胞显示, 在有限TGF β 的存在下, 这些细胞上调Foxp3的能力小于野生型对照 (数据未显示)。这一缺陷也见于从Foxp3Cre+YAPf1/f1小鼠分离的CD4+T细胞内 (图2G), 其中, YAP缺陷局限于具有已经“启动”其Foxp3表达的细胞内。合并考虑, 这些发现暗示YAP确实在Treg分化中扮演角色, 而这一贡献对于维持而非诱导Foxp3表达可能是关键。

[0223] 考虑到Treg表达Yap的差异性, 我们假定Yap cKO CD4+T细胞比其WT CD4+T细胞副本在功能上的能力更差。基于这一点, 以及iTreg对YAP的表达, YAP可能对Treg的阻抑功能有所贡献。体外阻抑检验显示, 与WT Treg相比, YAP cKO Treg对T细胞增殖的阻抑确实被显著降低 (图2F)。总而言之, 这些发现暗示, YAP作为Treg关联因子且在这些细胞的生成和功能中都扮演角色。因此, YAP的损失导致细胞增殖的提升和Treg阻抑性的恢复。

[0224] 实施例4: YAP cKO小鼠中的YAP缺陷导致杰出的抗肿瘤免疫应答和对B16黑素瘤生长的杰出免疫控制

[0225] 尽管Treg对于维持免疫体内平衡是必需的, 但它们形成对建立有效抗肿瘤免疫应答的阻碍, 且其阻抑功能压抑了抗癌免疫疗法的效力。Treg在肿瘤进展中扮演重要角色 [14]。检查了Yap cKO Treg造成的阻抑丧失能否提升抗肿瘤免疫应答。由于这些原因, 针对抑制Treg活性的疗法是对癌症免疫疗法“军火库 (arsenal)”的有力补充 (Klages, K., et al., *Cancer Res*, 2010. 70: 7788-99)。YAP不存在的情况下, 阻抑功能的明显丧失将会提升抗肿瘤免疫应答。为了测试这一点, 令WT小鼠和YAP cKO小鼠挑战一种侵略性的“非免疫原性”肿瘤 (即, B16黑素瘤), 且跟踪其肿瘤生长曲线至第21天。引人注目的是, YAP cKO小鼠控制侵略性、低免疫原性B16黑素瘤的皮下生长 (图3A至3B)。与本文中揭示的体外发现一致, WT小鼠于Yap cKO小鼠的肿瘤浸润性CD4+T细胞中的Foxp3表达相当。另一方面, 来自YAP cKO小鼠的CD4+和CD8+肿瘤浸润性淋巴细胞 (TILs) 表达显著更高水平的IFN- γ 和TNF- α (图3C), 表明更不受限的瘤内免疫应答。这些结果暗示, T细胞中不存在YAP时, 建立了更强健的抗肿瘤免疫应答。具有Treg限制性YAP缺陷的小鼠对肿瘤的挑战获得了类似结果。野生型对照容许强健的肿瘤生长, 而Foxp3Cre+/YAPf1/f1小鼠维持小肿瘤, 但被升高的产生炎性细胞因子的白血球的群落浸润 (图3D至3E)。这些实验有力地证明, YAP作为低免疫原性癌症中对内源性抗肿瘤免疫性的Treg强迫性抑制的驱动器的角色。

[0226] 当一齐给药 (Curran, M.A., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107: 4275-80) 或与肿瘤疫苗策略并行 (Duraiswamy, J., et al., *Cancer Res*, 2013. 73: 3591-603) 时, 一些最有应用前景的免疫治疗剂 (即, PD-1和CTLA-4拮抗剂抗体) 显示甚至更高的抗肿瘤效应。测试了YAP靶向作为免疫治疗途径以与癌症战斗的治疗性潜能。将YAP抑制剂维替泊芬

(VP) 给药至荷有黑素瘤的小鼠, 导致肿瘤尺寸的中等程度的减小(Klages, K., et al., *Cancer Res*, 2010.70:7788-99)。还检查了将这一YAP靶向药物与经证实的免疫治疗剂(即, 抗PD1抗体和GVAX(经辐照的生产GMCSF的B16细胞))联合的价值。的确, 与VP和抗PD1中和抗体的联合治疗对肿瘤进展的阻抑程度比任何所测试的单一疗法更高。VP与GVAX的协同效应甚至更强烈, 它们阻止肿瘤发育超过勉强可检测的尺寸(图4)。维替泊芬与GVAX在降低B16黑素瘤生长方面具有协同效应。对于包括YAP靶向在内的潜在的免疫治疗途径, 这些发现是强有力的证据。

[0227] 这些结果支持下述结论: 沿着YAP通路传导信号可支持Treg生成和TGF β /SMAD通路的其它广泛的免疫阻抑效应。重要的是, 它们也暗示, 以此通路为靶向, 或单独产生作用, 或与其它有效的免疫治疗剂(如, 免疫检查点阻断抗体、抗癌疫苗)联合, 逐渐破坏癌症背景中TGF β 和Foxp3+Treg细胞的免疫阻抑属性。

[0228] 参考文献

[0229] 所引的每一参考文献所公开的内容明确并入本文。

[0230] 1. Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. & Ono, M. Regulatory T Cells and immune tolerance. *Cell* 133, 775-787, doi:10.1016/j.cell.2008.05.009 (2008).

[0231] 2. Nishikawa, H. & Sakaguchi, S. Regulatory T Cells in tumor immunity. *Int J Cancer* 127, 759-767, doi:10.1002/ijc.25429 (2010).

[0232] 3. Jacobs, J.F.M. et al. Prognostic significance and mechanism of Treg infiltration in human brain tumors. *Journal of Neuroimmunology* 225, 195-199, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.05.020 (2010).

[0233] 4. Curiel, T.J. et al. Specific recruitment of regulatory T Cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10, 942-949, doi:http://www.nature.com/nm/journal/v10/n9/supinfo/nm1093_S1.html (2004).

[0234] 5. Hiraoka, N., Onozato, K., Kosuge, T. & Hirohashi, S. Prevalence of FOXP3+ regulatory T Cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res* 12, 5423-5434, doi:10.1158/1078-0432.ccr-06-0369 (2006).

[0235] 6. Kobayashi, N. et al. FOXP3+ regulatory T Cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis. *Clin Cancer Res* 13, 902-911, doi:10.1158/1078-0432.ccr-06-2363 (2007).

[0236] 7. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061, doi:10.1126/science.1079490 (2003).

[0237] 8. Pan, F. et al. Eos mediates Foxp3-dependent gene silencing in CD4+ regulatory T Cells. *Science* 325, 1142-1146, doi:10.1126/science.1176077 (2009).

[0238] 9. van Loosdregt, J. et al. Canonical Wnt Signaling Negatively Modulates Regulatory T Cell Function. *Immunity* 39, 298-310, doi:10.1016/j.immuni.2013.07.019.

[0239] 10. Ono, M. et al. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature* 446, 685-689, doi:10.1038/nature05673 (2007).

[0240] 11. Pan, D. The Hippo Signaling Pathway in Development and Cancer. *Developmental Cell* 19, 491-505, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2010.09.011 (2010).

[0241] 12. Hao, Y., Chun, A., Cheung, K., Rashidi, B. & Yang, X. Tumor suppressor LATS1 is a negative regulator of oncogene YAP. *J Biol Chem* 283, 5496-5509, doi:10.1074/jbc.M709037200 (2008).

[0242] 13. Zhou, L. et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature* 453, 236-240, doi:10.1038/nature06878 (2008).

[0243] 14. Marabelle, A. et al. Depleting tumor-specific Tregs at a single site eradicates disseminated tumors. *The Journal of Clinical Investigation* 123, 2447-2463, doi:10.1172/JCI64859 (2013).

[0244] 15. Johnson, R. & Halder, G. The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov* 13, 63-79, doi:10.1038/nrd4161 (2014).

[0245] 16. Thaventhiran, J. E. D. et al. Activation of the Hippo pathway by CTLA-4 regulates the expression of Blimp-1 in the CD8+ T cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, E2223-E2229 (2012).

[0246] 17. Liu-Chittenden, Y., Huang, B., Shim, J. S. et al. Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes and Development* 26:1300-1305 (2012).

[0247] 等效

[0248] 该领域技术人员应认识到或使用不超过常规实验而获知本文中揭示的本发明具体实施例的多种等效物。这些等效物倾向于为权利要求书所涵盖。

[0249] 其它具体实施例

[0250] 尽管已经连同其详细说明一起揭露本发明，前述说明书仅为示例性说明用而非限制本发明的范畴，该范畴由权利要求书的范畴所界定。其它方面、优点和修改也处于权利要求书范畴内。

[0251] 本文中提及的专利和科学文献构建了该领域技术人员可使用的知识。本文所引的全部美国专利和已公开或未公开的美国专利申请案通过引用而并入本文。本文所引的全部已公开的外国专利和专利申请案通过引用而并入本文。本文所引的以登录号表明的 Genbank 和 NCBI 文件通过引用而并入本文。本文所引的全部其它已出版参考文献、文档、手稿和科学论文通过引用而并入本文。

[0252] 尽管已经参考优选具体实施例具体显示和揭示本发明，但该领域技术人员应理解，可对形式和细节做出多种改变而不悖离由随附的权利要求书所界定的本发明的范畴。

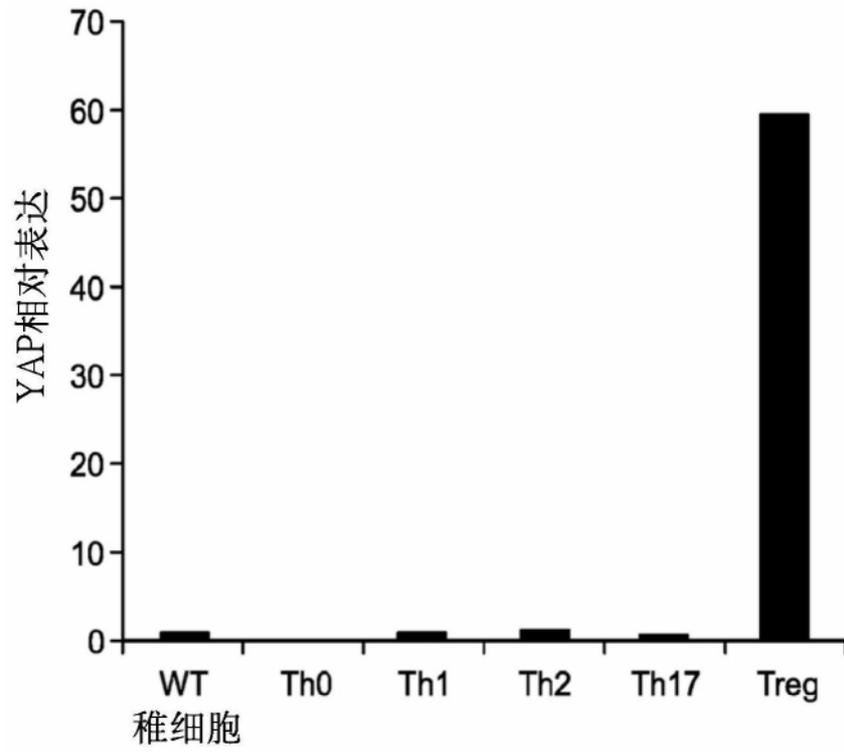


图1A

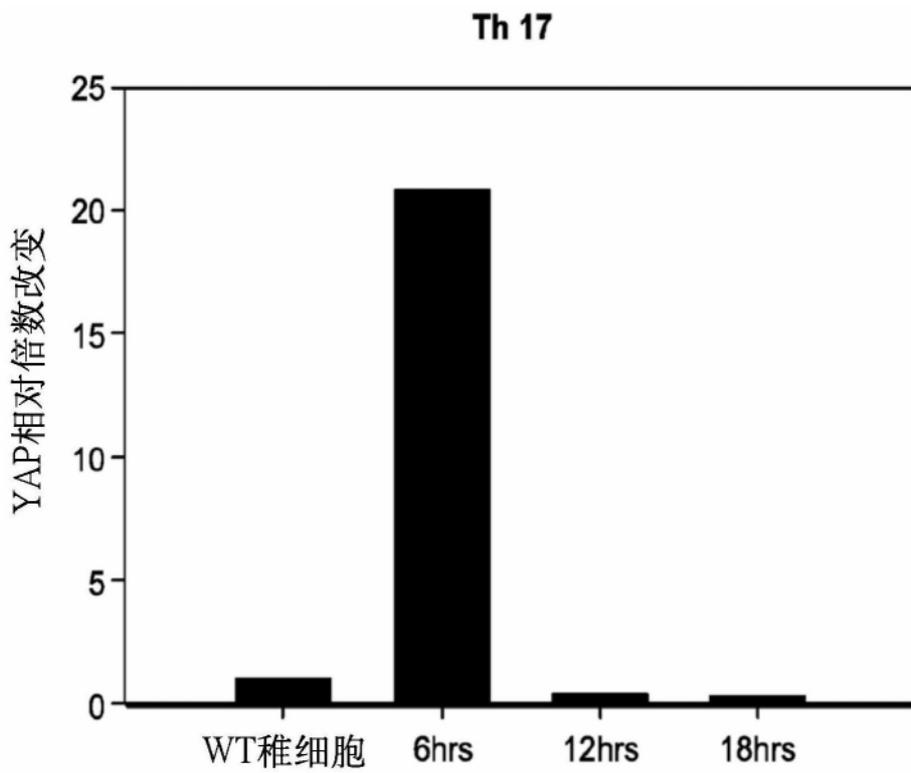


图1B

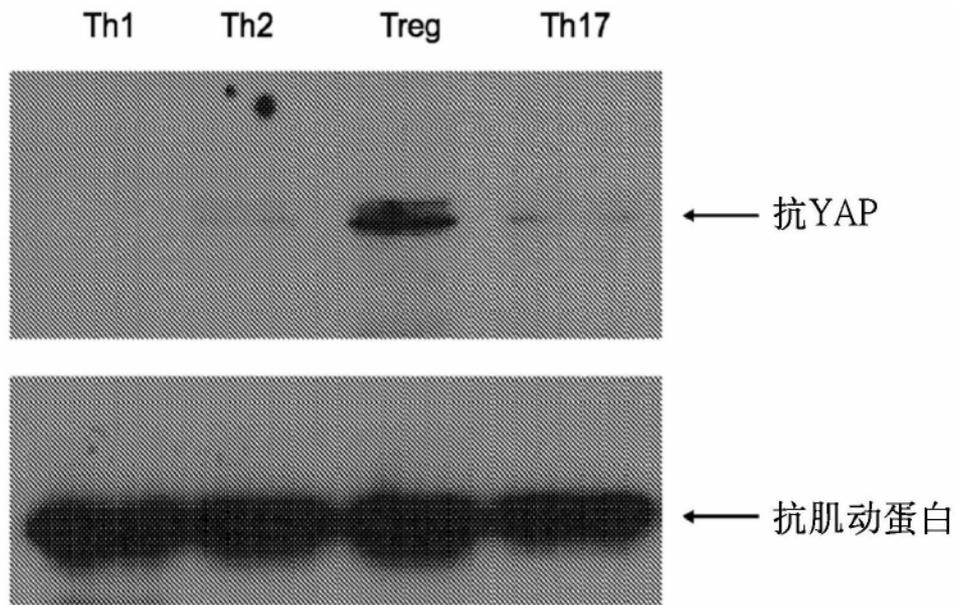


图1C

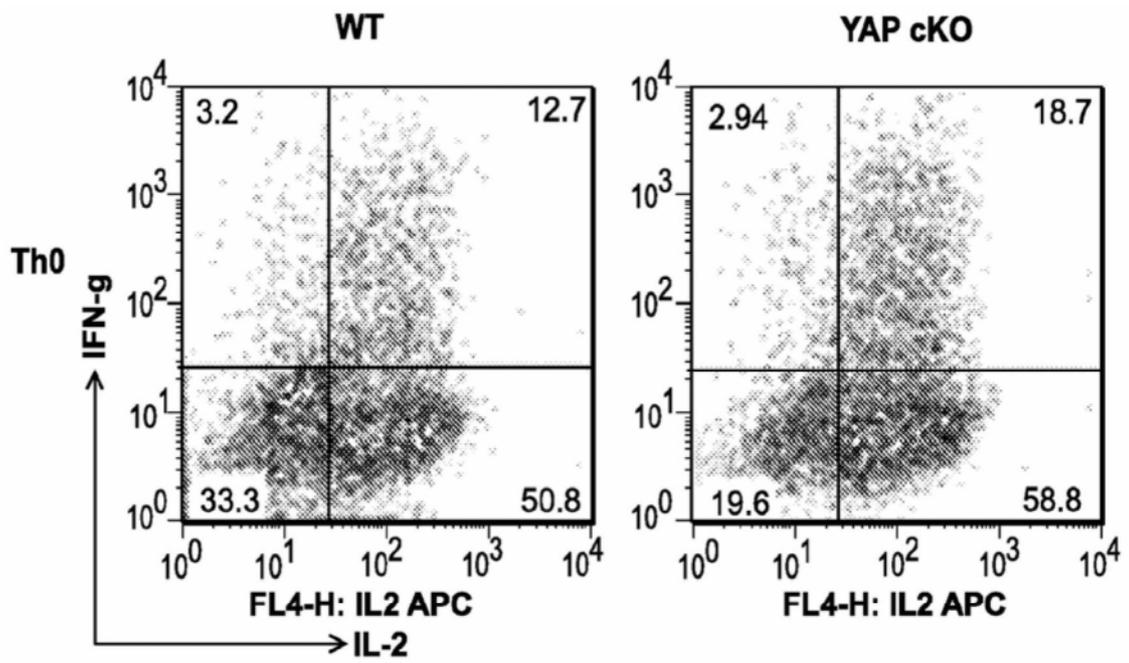


图2A

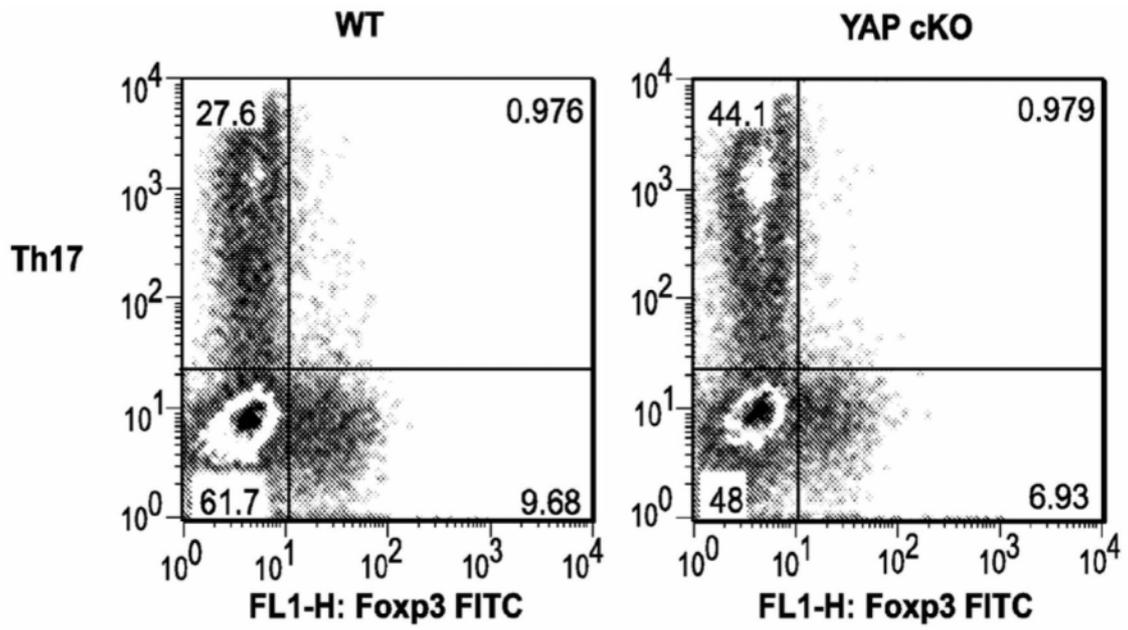


图2B

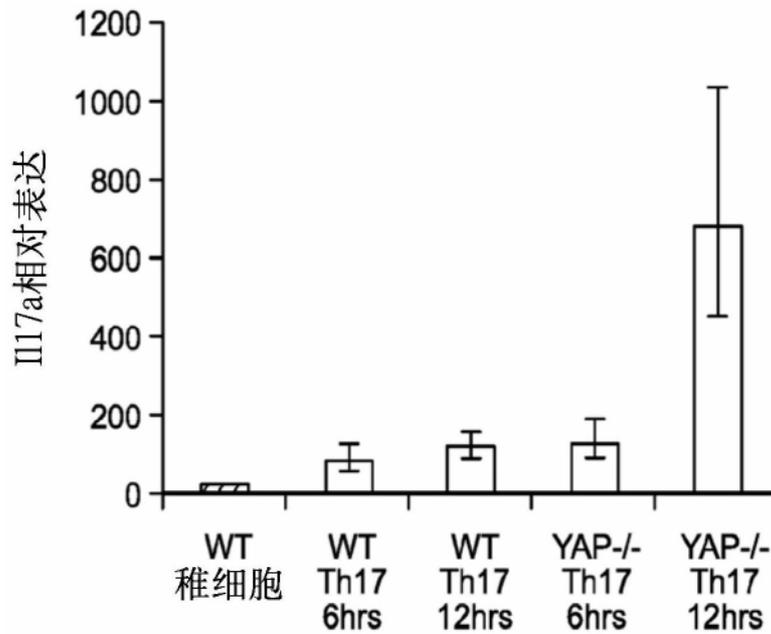


图2C

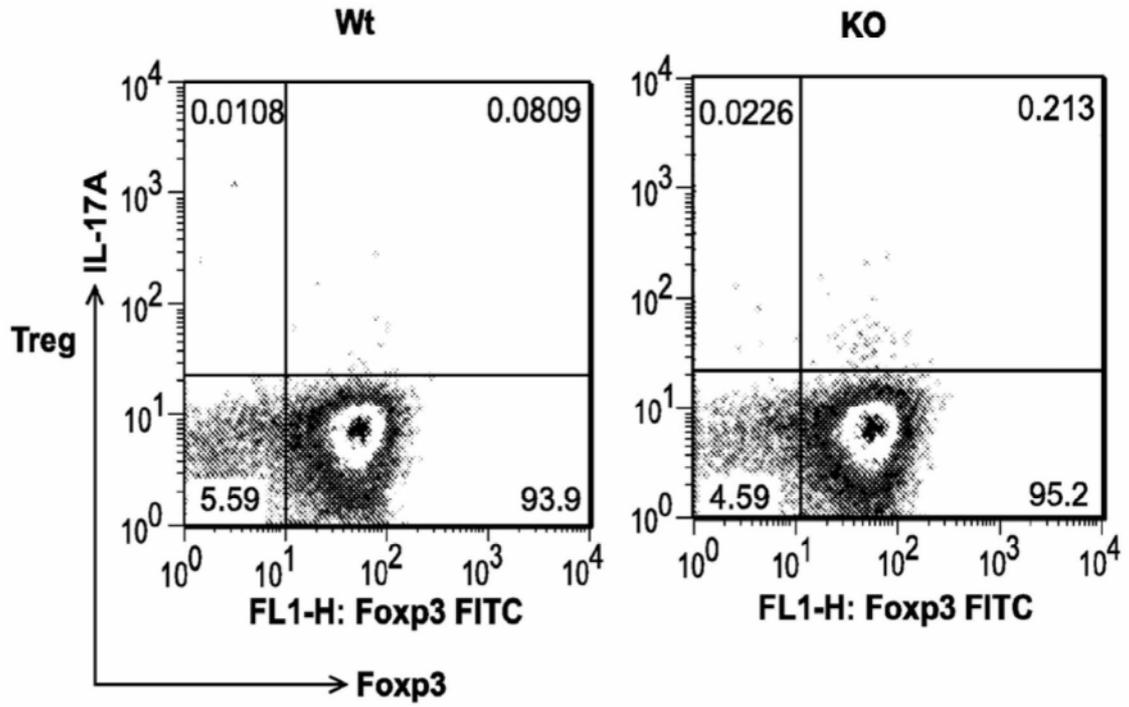


图2D

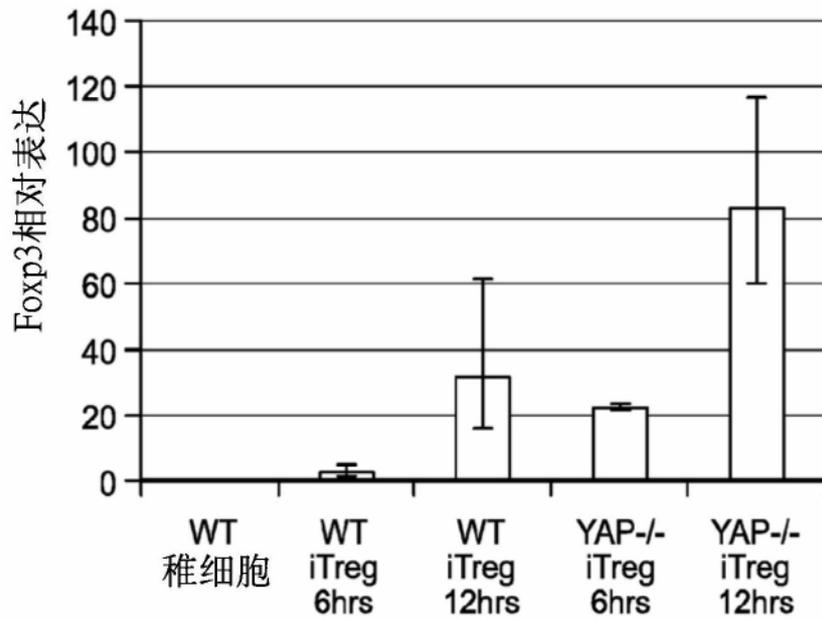


图2E

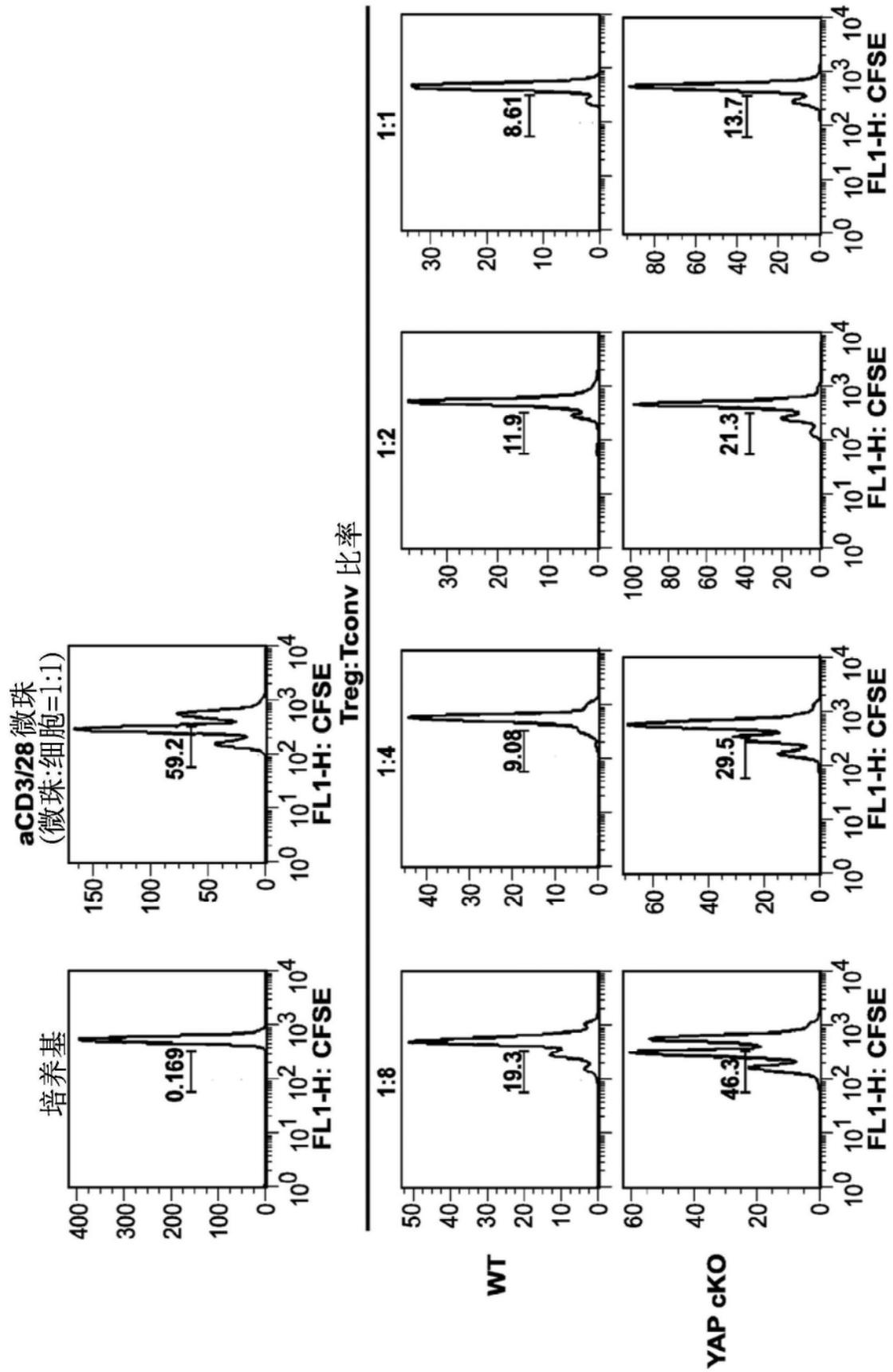


图2F

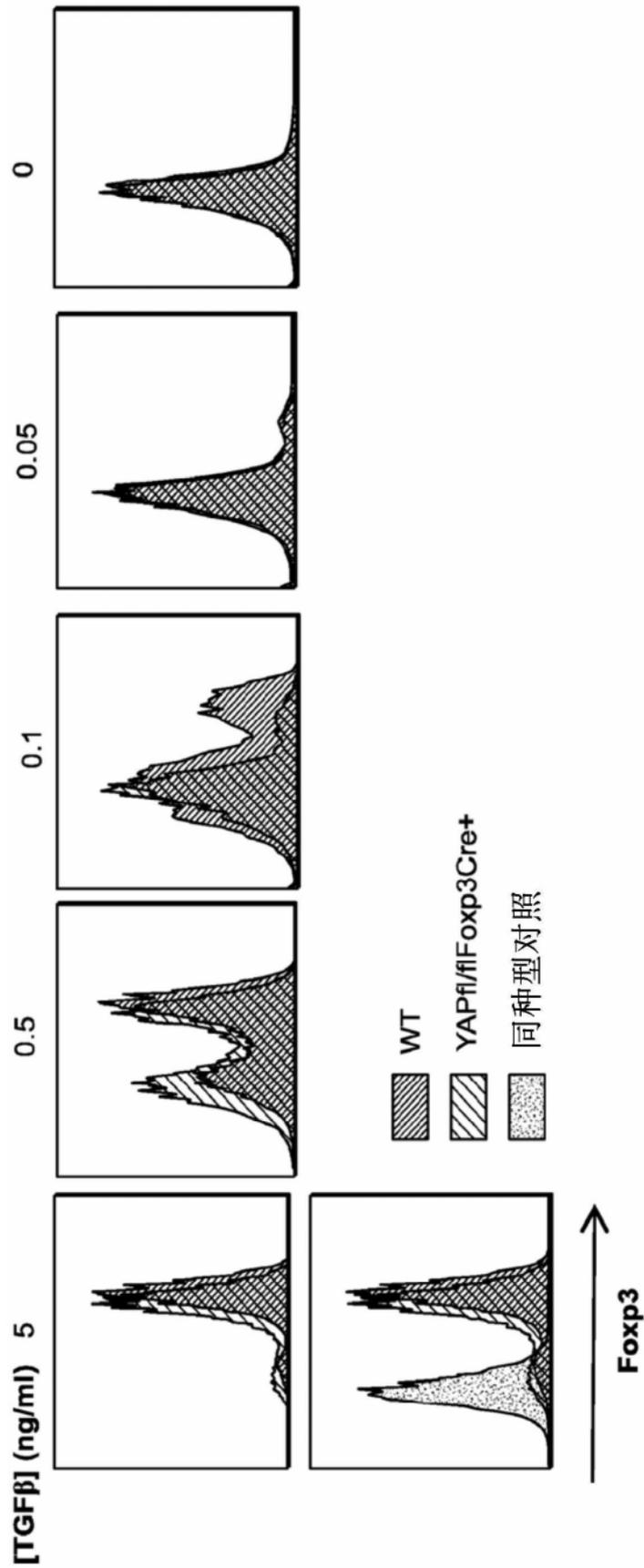


图2G

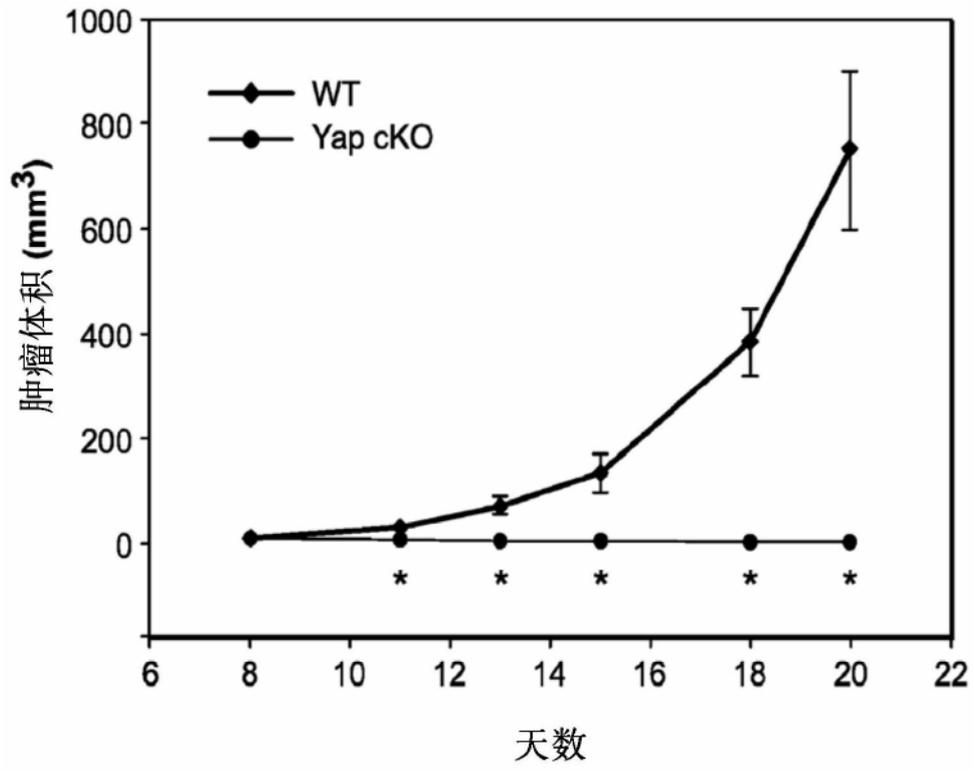


图3A

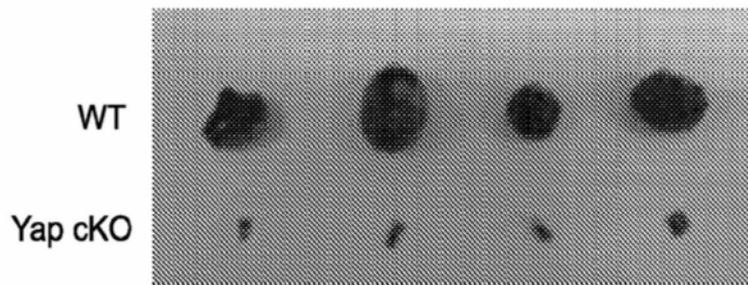


图3B

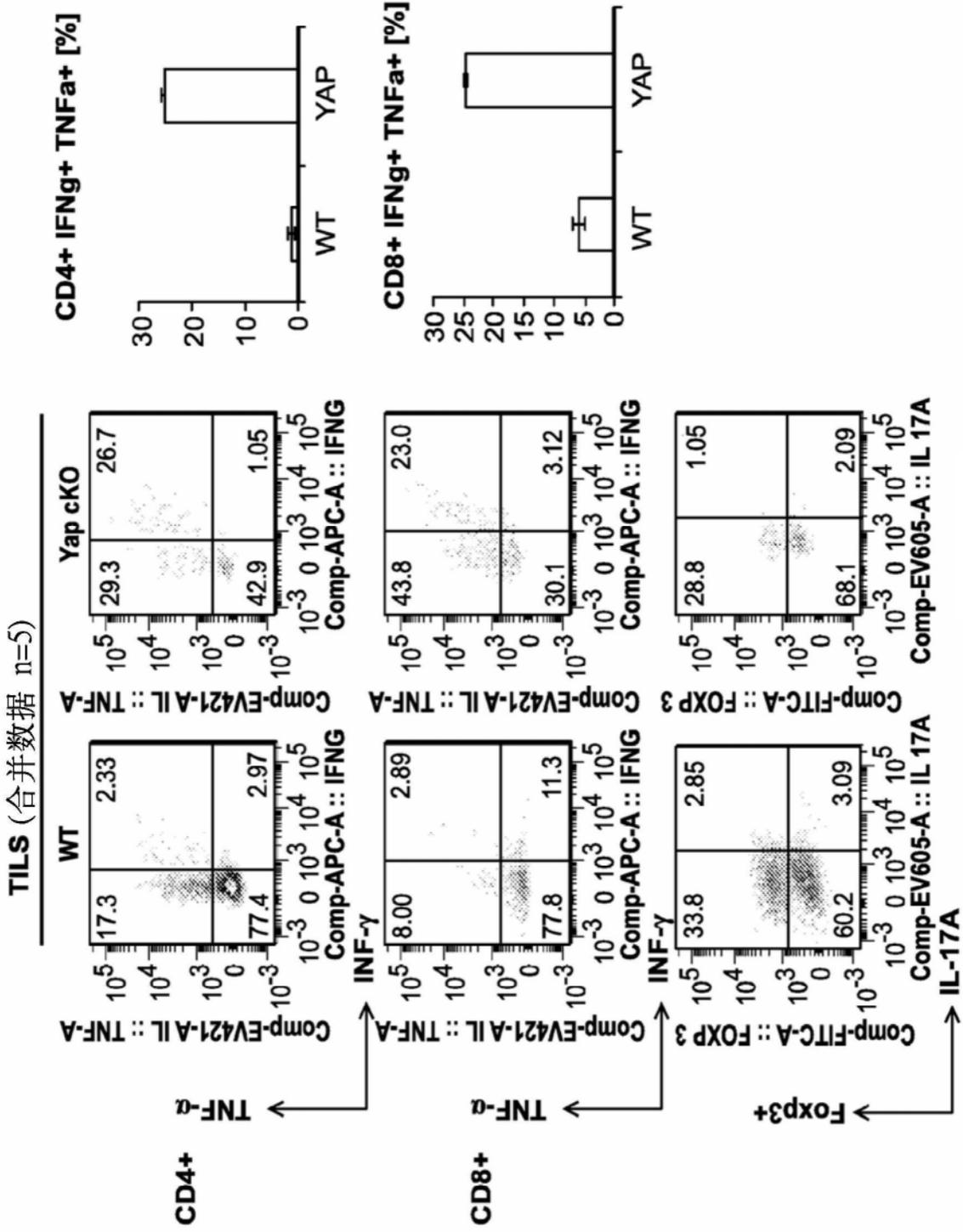


图3C

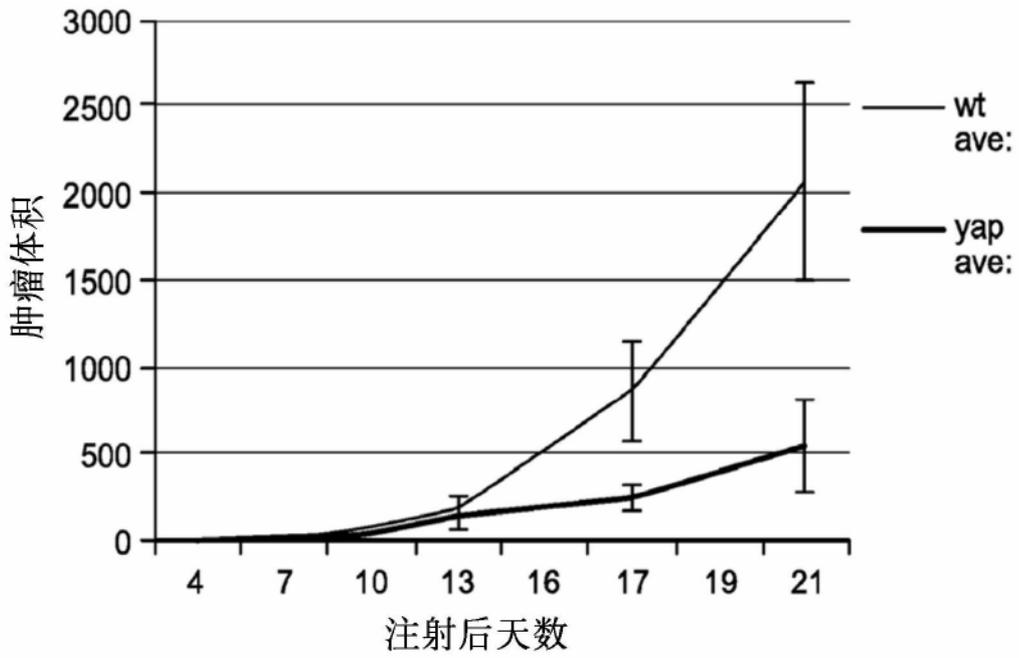


图3D

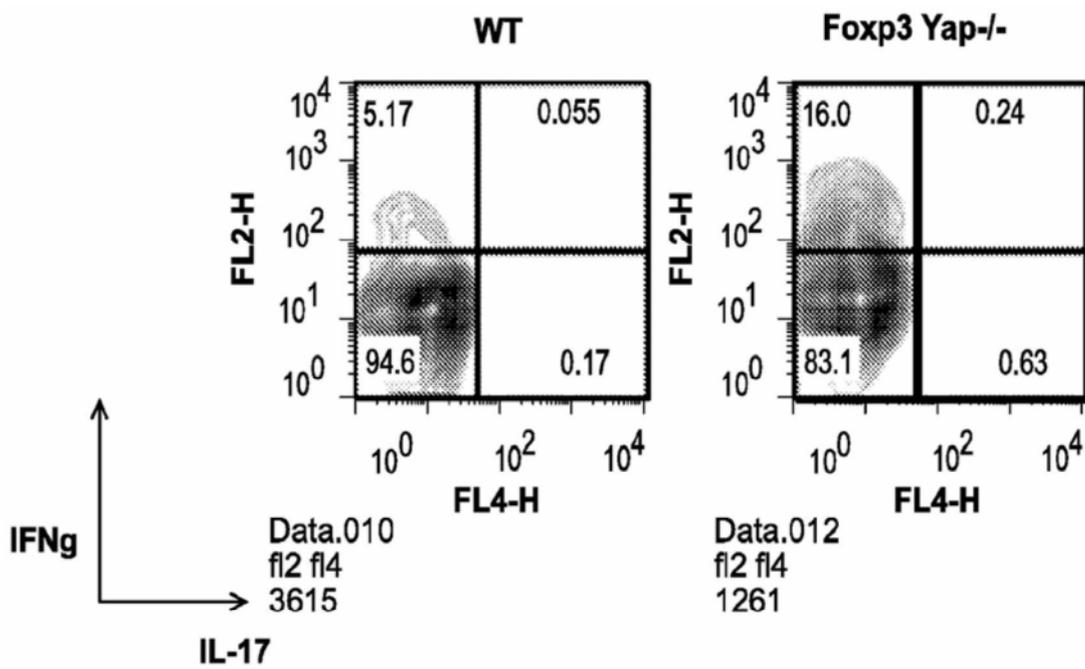


图3E

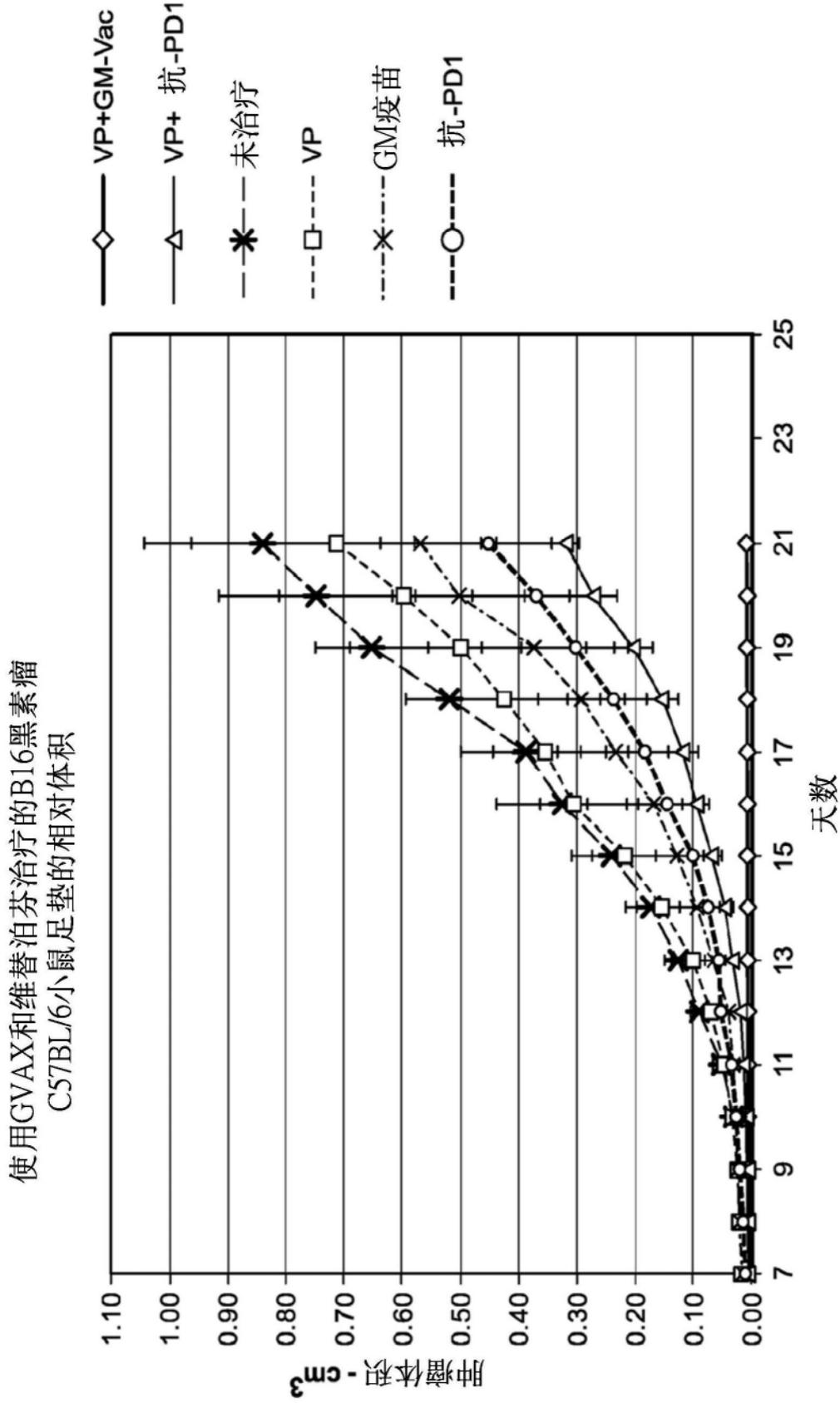


图4

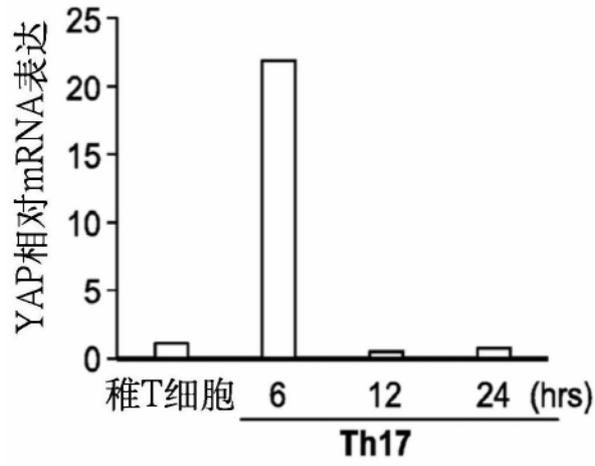


图5A

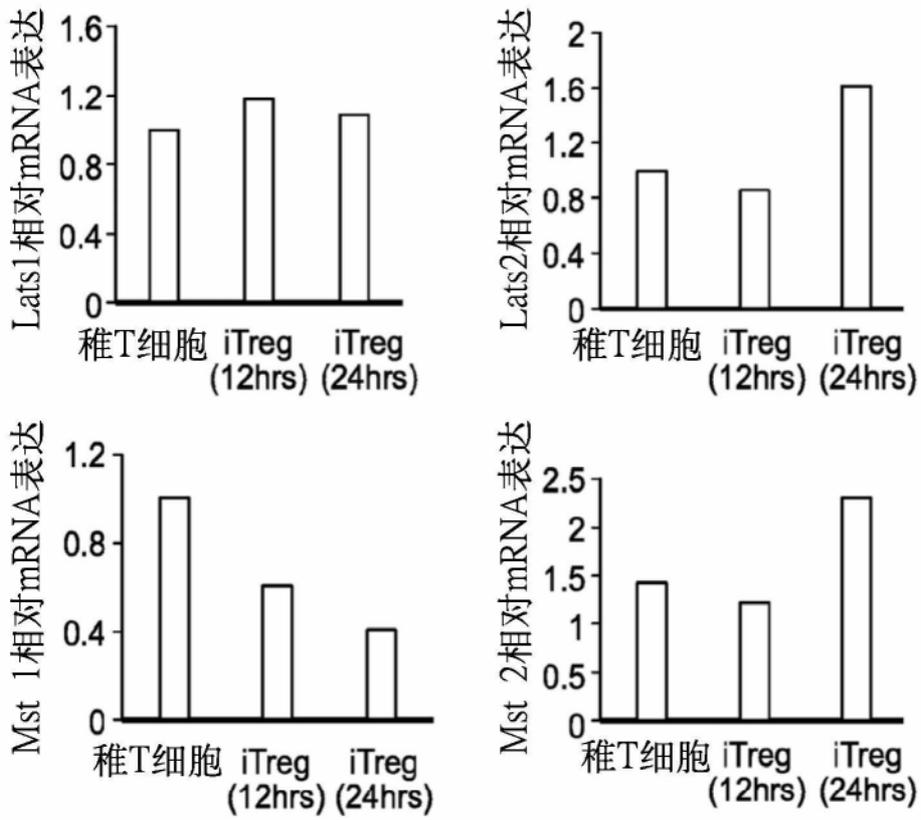


图5B

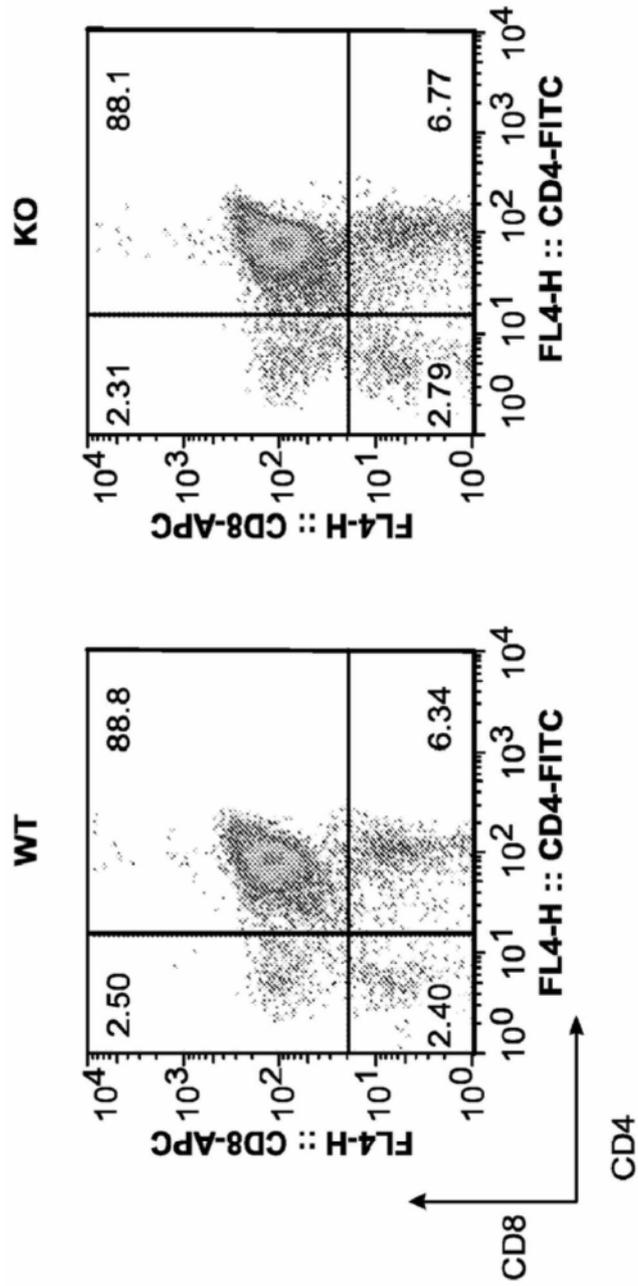


图6A

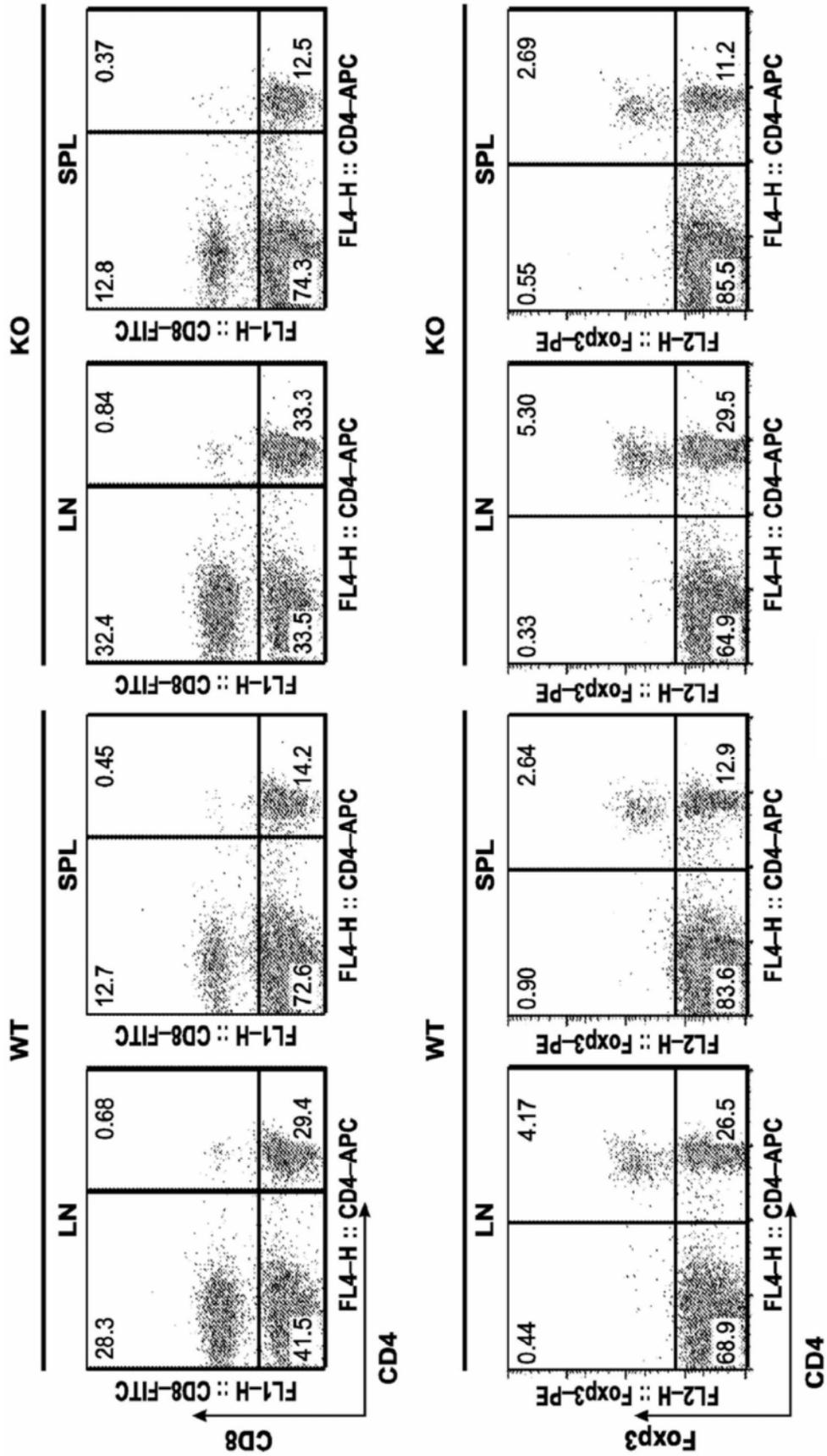


图6B

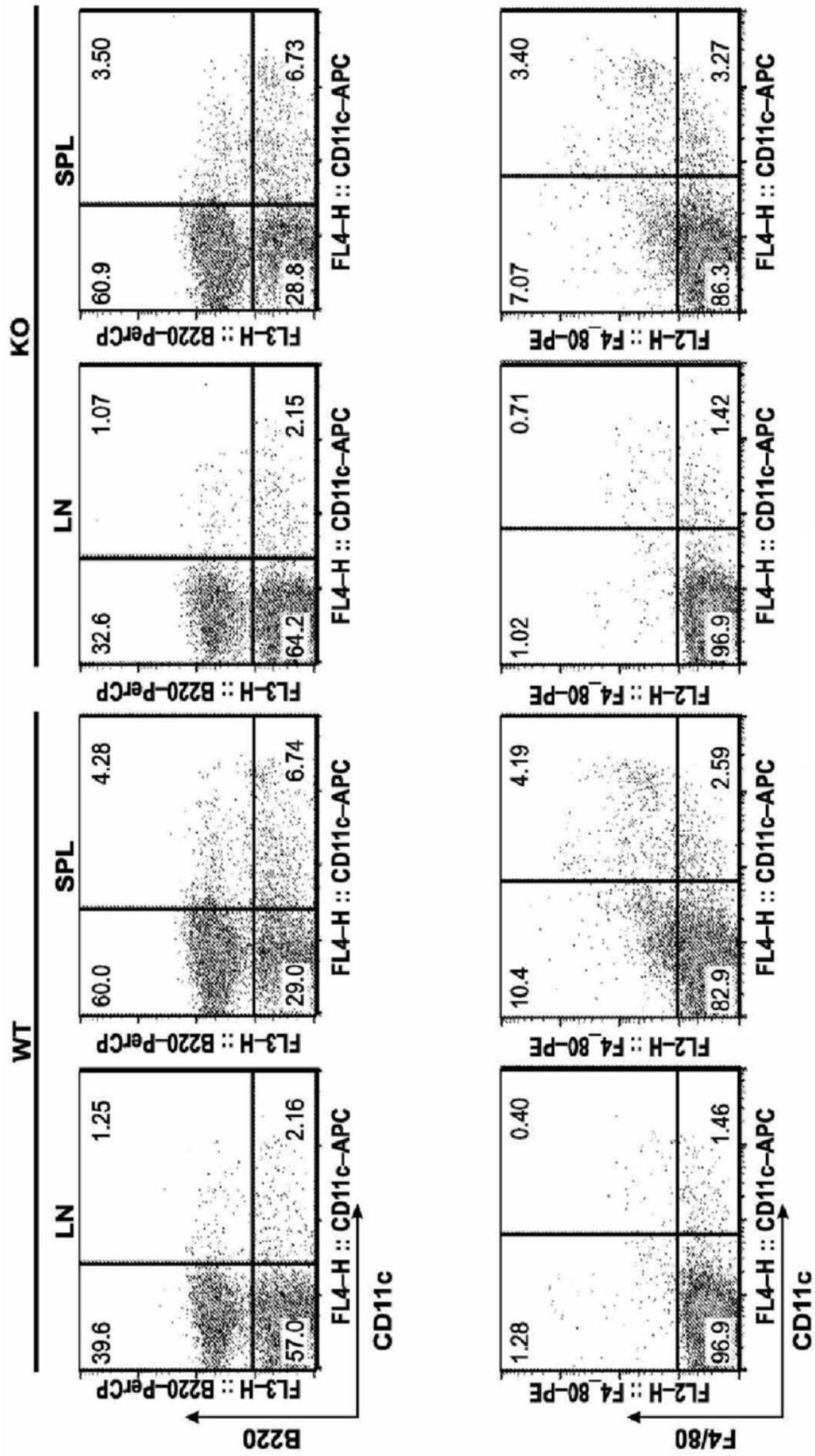


图6B(续)

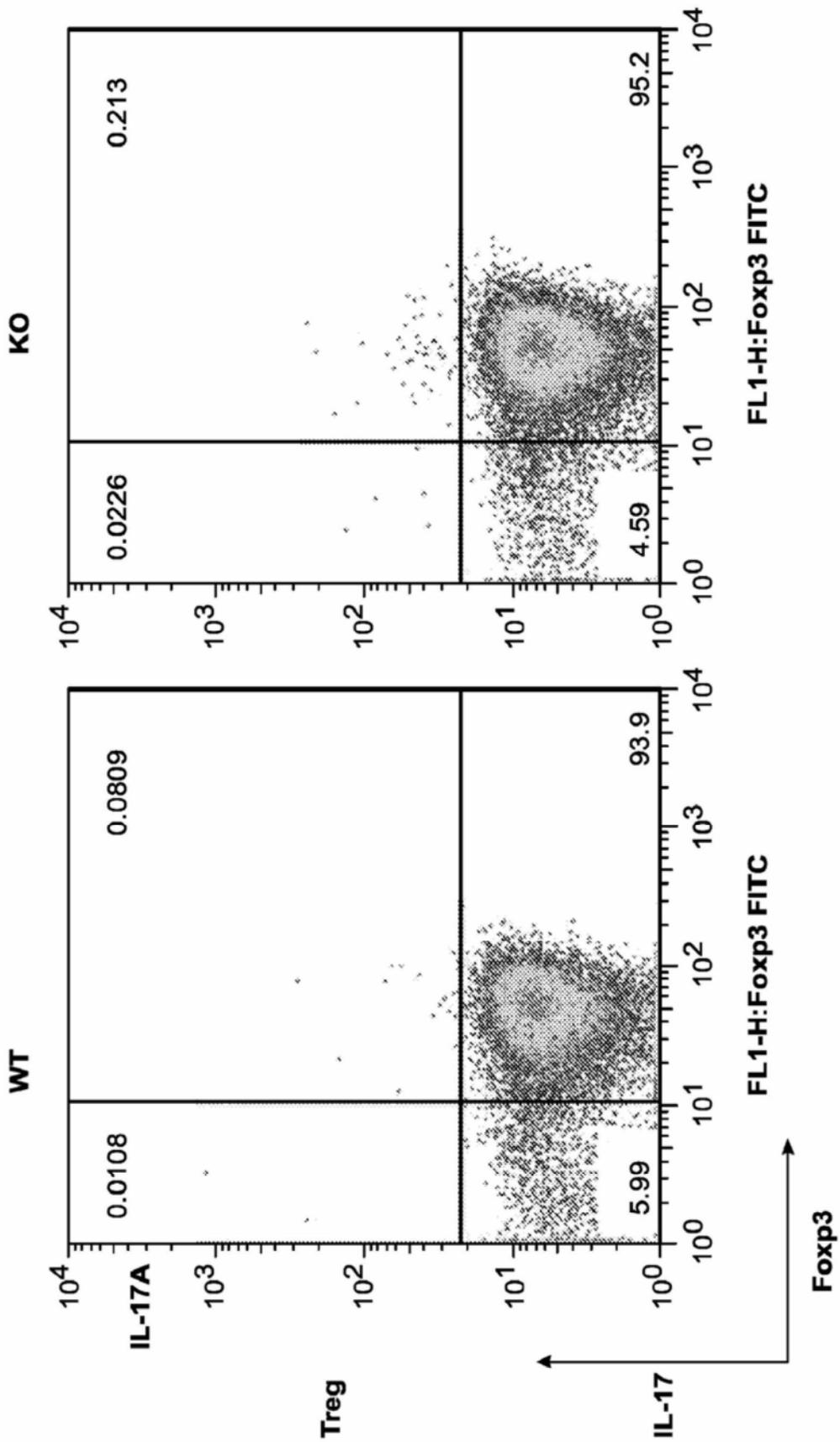


图6C