



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118695868 A

(43) 申请公布日 2024. 09. 24

(21) 申请号 202280091741.8

(22) 申请日 2022.12.16

(30) 优先权数据

63/265,521 2021.12.16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.08.14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/081862 2022.12.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/115033 EN 2023.06.22

(71) 申请人 德卡生物科学公司

地址 美国

(72) 发明人 J·穆姆

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 张莉 黄革生

(51) Int.Cl.

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 35/17 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

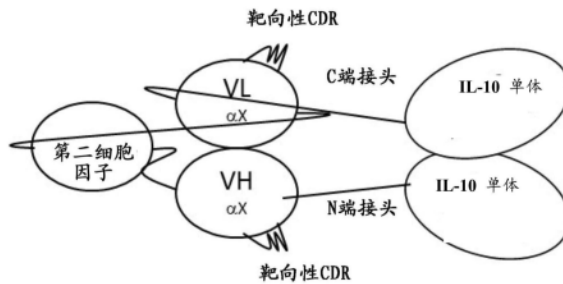
权利要求书4页 说明书38页  
序列表(电子公布) 附图15页

## (54) 发明名称

包含IL-10的双细胞因子融合蛋白与过继细胞疗法或双特异性T细胞衔接器用于治疗癌症

## (57) 摘要

本申请涉及一种治疗癌症或肿瘤的方法,包括与适应性细胞疗法或双特异性T细胞衔接器组合施用双细胞因子融合蛋白组合物、药物组合物和/或其制剂,其中所述双细胞因子融合蛋白包含与单链可变片段支架系统融合的IL-10或IL-10变体分子和第二细胞因子,其中第二细胞因子连接在所述scFv的铰链区中。



1. 一种治疗癌症和/或肿瘤患者的方法,包括向有需要的患者施用治疗有效量的靶向性diakine和表达嵌合抗原受体(CAR)T细胞的基因修饰免疫细胞,

其中靶向性diakine包含IL10、IL2和对第一肿瘤相关抗原(TAA)具有特异性的第一单链可变片段(scFv),所述TAA选自CD3、CD4、CD5、CD7、CD19、CD20、CD22、CD25、CD30、CD33、CD34、CD38、CD40、CD52、CD56、CD70、CD79B、CD117、CD123、CD138、CD147、B细胞成熟抗原(BCMA)、C型凝集素样分子-1(CLL01)、潜伏膜蛋白1(LMP-1)、信号淋巴细胞活化分子F7(SLAMF7)、NY-ESO-1、跨膜激活物和CAML相互作用物(TACI)、CS-1、CXCR4、NKG2D、B7-H3、EGFR、PD-1、PDL-1、HER2、HER3、EpCAM、间皮素、PSCA、MUC1、Lewis-Y、GPC3、AXL、Claudin18.2、GD2、CTLA-4、CEA、PDGFR、VEGFR2、间皮素(MESO)、PSCA、PSA,并且其中所述CAR T细胞包含对第二不同TAA具有特异性的第二scFv。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述癌症是血液癌症。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述血液癌症是淋巴瘤或白血病。

4. 根据权利要求2所述的方法,其中所述血液癌症是B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、多发性骨髓瘤(MM)、B细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、T细胞急性淋巴细胞白血病或非霍奇金淋巴瘤。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述癌症是实体癌症或肿瘤。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述实体癌症是神经母细胞瘤、小细胞肺癌、黑色素瘤、卵巢癌、肾细胞癌、结肠癌、肺癌、黑色素瘤、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、肾细胞癌、卵巢癌、神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤、白血病和淋巴瘤。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中IL10是人IL10、EBV IL10或CMV IL10,或其突变蛋白或变体,其中IL2是野生型IL2,或其变体或突变蛋白。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中diakine包含SEQ ID No:1、3、5或7的IL10。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中diakine和CAR T细胞在分开的时间施用于患者。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中在施用于患者之前,CAR T细胞在一定量的diakine存在下解冻和/或静置。

11. 根据权利要求11所述的方法,其中在施用CAR T细胞之前1-3天将diakine施用于患者。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中diakine和CAR-T细胞同时施用于患者。

13. 根据权利要求11所述的方法,其中diakine在施用CAR-T细胞前1-3天施用于患者,然后在施用CAR-T细胞后1-3天再次施用于患者。

14. 根据权利要求1所述的方法,其中diakine以0.01至0.2mg/kg的剂量浓度施用。

15. 根据权利要求1所述的方法,其中diakine以实现约0.0001至200ng/mL的血清或血浆浓度的剂量施用。

16. 根据权利要求1所述的方法,其中diakine皮下或静脉内施用。

17. 根据权利要求1所述的方法,其中所述基因修饰细胞是免疫细胞。

18. 根据权利要求1所述的方法,其中所述基因修饰细胞是CD8+、CD4+或其组合。

19. 一种引发CAR-T细胞的方法,包括在0.01至200ng/mL的diakine存在下接触CAR-T细胞。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中CAR-T细胞包含CD8+和CD4+T细胞两者。

21. 根据权利要求19所述的方法,其中在向有需要的患者施用之前,在diakine存在下对CAR-T进行1-2天引发。

22. 一种治疗癌症和/或肿瘤患者的方法,包括向有需要的患者施用治疗有效量的靶向性diakine和双特异性T细胞衔接器(BiTE),其中所述diakine

其中所述靶向性diakine包含IL10、IL2和对第一肿瘤相关抗原(TAA)具有特异性的第一单链可变片段(scFv),所述TAA选自CD4、CD5、CD7、CD19、CD20、CD22、CD25、CD30、CD33、CD34、CD38、CD40、CD52、CD56、CD70、CD79B、CD117、CD123、CD138、CD147、B细胞成熟抗原(BCMA)、C型凝集素样分子-1(CLL01)、潜伏膜蛋白1(LMP-1)、信号淋巴细胞活化分子F7(SLAMF7)、NY-ESO-1、跨膜激活物和CAML相互作用物(TACI)、CS-1、CXCR4、NKG2D、B7-H3、EGFR、PD-1、PDL-1、HER2、HER3、EpCAM、间皮素、PSCA、MUC1、Lewis-Y、GPC3、AXL、Claudin18.2、GD2、CTLA-4、CEA、PDGFR、VEGFR2、间皮素(MESO)、PSCA或PSA,

并且其中所述BiTE至少包含针对CD3的第一抗原结合特异性和针对TAA的第二抗原结合特异性,其中所述第二抗原结合特异性与所述diakine的scFv的TAA结合特异性不同。

23. 根据权利要求24所述的方法,其中所述癌症是血液癌症。

24. 根据权利要求25所述的方法,其中所述血液癌症是淋巴瘤或白血病。

25. 根据权利要求25所述的方法,其中所述血液癌症是B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、多发性骨髓瘤(MM)、B细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、T细胞急性淋巴细胞白血病或非霍奇金淋巴瘤。

26. 根据权利要求24所述的方法,其中所述癌症是实体癌症或肿瘤。

27. 根据权利要求28所述的方法,其中所述实体癌症是神经母细胞瘤、小细胞肺癌、黑色素瘤、卵巢癌、肾细胞癌、结肠癌、肺癌、黑色素瘤、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、肾细胞癌、卵巢癌、神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤、白血病和淋巴瘤。

28. 根据权利要求24所述的方法,其中IL10是人IL10、EBV IL10或CMV IL10,或其变体和/或突变蛋白。

29. 根据权利要求24所述的方法,其中diakine包含SEQ ID No:1、3、5或7的IL10。

30. 根据权利要求24所述的方法,其中IL2是人的。

31. 根据权利要求32所述的方法,其中IL2是野生型IL2,或其变体或突变蛋白。

32. 根据权利要求24所述的方法,其中diakine和BiTE在分开的时间施用于患者。

33. 根据权利要求34所述的方法,其中diakine在施用BiTE之前1-3天施用于患者。

34. 根据权利要求34所述的方法,其中diakine和BiTE同时施用于患者。

35. 根据权利要求34所述的方法,其中diakine在施用BiTE之前1-3天施用于患者,然后在施用BiTE之后1-3天再次施用于患者。

36. 根据权利要求24所述的方法,其中diakine以0.001至200mg/kg的剂量浓度施用于患者。

37. 根据权利要求24所述的方法,其中diakine以达到约0.0001至200ng/mL的血清或血浆浓度的剂量施用于患者。

38. 根据权利要求24所述的方法,其中diakine皮下或静脉内施用。

39. 一种治疗患者肿瘤的方法,包括施用式(I)的双细胞因子融合蛋白  
 $\text{NH}_2 - (\text{IL10}) - (\text{X}^1) - (\text{Z}_n) - (\text{X}^2) - (\text{IL10}) - \text{COOH}$  (式I);

其中

“IL-10”是选自SEQ ID Nos:1、3、9、10、11、12、14或16的单体序列;

“X<sup>1</sup>”是从第一单克隆抗体获得的VL或VH区;

“X<sup>2</sup>”是从第一单克隆抗体获得的VH或VL区;

其中当X<sup>1</sup>是VL时,X<sup>2</sup>是VH,或者当X<sup>1</sup>是VH时,X<sup>2</sup>是VL

“Z”是除IL-10之外的细胞因子;

“n”是选自0-2的整数;

以及对所述癌症或肿瘤表达的抗原具有特异性的重组工程化CAR-T或TCR-T细胞。

40. 根据权利要求42所述的方法,其中X<sup>1</sup>和X<sup>2</sup>对以下具有特异性的第一单克隆抗体获得:表皮生长因子受体(EGFR);CD14;CD52;各种免疫检查点靶标,例如但不限于PD-L1、PD-1、TIM3、BTLA、LAG3或CTLA4;CD19、CD20、CD22;CD47;GD-2;VEGFR1、VEGFR2;HER2;PDGFR;EpCAM;ICAM(ICAM-1、-2、-3、-4、-5)、VCAM、FAP $\alpha$ ;5T4;Trop2;EDB-FN;TGF $\beta$ Trap;MAdCAM、 $\beta$ 7整合素亚基; $\alpha$ 4 $\beta$ 7整合素; $\alpha$ 4整合素SR-A1;SR-A3;SR-A4;SR-A5;SR-A6;SR-B;dSR-C1;SR-D1;SR-E1;SR-F1;SR-F2;SR-G;SR-H1;SR-H2;SR-I1;SR-J1;HIV,或埃博拉。

41. 根据权利要求42所述的方法,其中VL和VH是从第一单克隆抗体获得的,所述第一单克隆抗体是抗HIV或抗埃博拉抗体。

42. 根据权利要求44所述的方法,其中来自抗HIV或抗埃博拉单克隆抗体的VL和VH是植入来自第二抗体的6个CDR的框架区。

43. 根据权利要求45所述的方法,其中第二抗体是选自抗表皮生长因子受体(EGFR);CD14;CD52;各种免疫检查点靶标,例如但不限于PD-L1、PD-1、TIM3、BTLA、LAG3或CTLA4;CD20;CD47;GD-2;VEGFR1、VEGFR2;HER2;PDGFR;EpCAM;ICAM(ICAM-1、-2、-3、-4、-5)、VCAM、FAP $\alpha$ ;5T4;Trop2;EDB-FN;TGF $\beta$ Trap;MAdCAM、 $\beta$ 7整合素亚基; $\alpha$ 4 $\beta$ 7整合素; $\alpha$ 4整合素SR-A1;SR-A3;SR-A4;SR-A5;SR-A6;SR-B;dSR-C1;SR-D1;SR-E1;SR-F1;SR-F2;SR-G;SR-H1;SR-H2;SR-I1;或SR-J1的单克隆抗体。

44. 根据权利要求46所述的方法,其中来自第二单克隆抗体的6个移植CDR包括来自抗EGFR抗体、抗HER2抗体、抗VEGFR1抗体或抗VEGFR2抗体的6个CDR,其中所述6个CDR包含来自VL的CDR 1-3和来自VH的CDR 1-3。

45. 根据权利要求42所述的方法,其中Z是选自IL-6、IL-4、IL-1、IL-2、IL-3、IL-5、IL-7、IL-8、IL-9、IL-15、IL-21、IL-17、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、GM-CSF、G-CSF、TSLP、干扰素- $\alpha$ 、- $\beta$ 、- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 或肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、- $\beta$ 、碱性FGF、EGF、PDGF、IL-4、IL-11或IL-13的细胞因子。

46. 根据权利要求42所述的方法,其中Z是IL-2。

47. 根据权利要求42所述的方法,其中Z是1的整数。

48. 根据权利要求42所述的方法,其中双细胞因子融合蛋白还包含接头。

49. 根据权利要求42所述的方法,其中IL-10是SEQ ID No:10的DV07。

50. 根据权利要求42所述的方法,其中VH和VL区从第一抗体获得,该第一抗体是人抗埃博拉抗体;所述VH和VL区移植了来自抗VEGFR2抗体的6个CDR;并且Z是IL-2。

51. 根据权利要求42所述的方法,其中所述重组工程化CAR-T包含对以下具有特异性的EARD:EGFR、VEGFR1、VEGFR2、EGP-2、EGP-4、OEPHa2、ErbB2、3或4、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、

CD22、间皮素、CEA和乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原(PSA)、PSMA、Her2/neu、雌激素受体、孕酮受体、ephrinB2、CD123、CS-1、c-Met、GD-2和MAGE A3、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、ROR1、tEGFR、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚抗原、ROR1、TAG72、FBP、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- $\alpha$ 、IL-13R- $\alpha$ 2、kdr、 $\kappa$ 轻链、Lewis Y、L1-细胞粘附分子、MAGE-AL间皮素、CE7、Wilms肿瘤1(WT-1)或细胞周期蛋白。

## 包含IL-10的双细胞因子融合蛋白与过继细胞疗法或双特异性T细胞衔接器用于治疗癌症

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2021年12月16日提交的美国临时专利申请序列号63/265521的优先权,其内容通过引用整体并入本文。

[0003] 电子序列表的引用

[0004] 电子序列表(039451-00085-Sequence-Listing.xml;大小:107,499字节;创建日期:2022年12月16日)的内容在此通过引用全部并入本文。

### 技术领域

[0005] 本公开内容涉及生物技术领域,更具体地,涉及使用一种包含白介素-10(“IL-10”)和白介素-2(“IL-2”)的称作Diakines的新型双细胞因子融合蛋白与常规过继细胞疗法(Adoptive Cell Therapies,“ACT”)或双特异性T细胞衔接器(Bispecific T-cell Engagers,“BiTE”)疗法联用治疗癌症的用途。

### 背景技术

[0006] IL-10,最初被命名为细胞因子合成抑制因子(Malefyt,白介素10抑制人类单核细胞的细胞因子合成:单核细胞产生的IL-10的自身调节作用,1991),是一种多效性细胞因子,已知能抑制炎症反应(Fedorak,2000),并且近来已知其也能激活CD8<sup>+</sup>T细胞以诱导干扰素 $\gamma$ (“IFN $\gamma$ ”)依赖的抗肿瘤免疫反应(Mumm J.,2011)。IL-10是一种非共价同二聚体细胞因子,结构与IFN $\gamma$ 相似。IL-10与IL-10受体结合,该受体由两个亚基的IL10受体1(IL10R1)和两个亚基的IL-10受体2(IL10R2)组成(Moore,2001)。IL-10受体复合物在大多数造血细胞表面表达,在巨噬细胞和T细胞上的表达最高。据报道,IL-10既是免疫抑制性(Schreiber,2000)又是免疫刺激性细胞因子(Mumm,2011),但对克罗恩病患者的IL-10治疗的临床评估产生了逆剂量反应(Fedorak,2000;Schreiber,2000),而用聚乙二醇化IL-10治疗癌症患者则产生了剂量可滴定的强效抗肿瘤反应(Naing,2018)。聚乙二醇化IL-10抗肿瘤反应需要内源性CD8<sup>+</sup>T细胞和IFN $\gamma$ (Mumm,2011)。用聚乙二醇化IL-10治疗荷瘤动物导致肿瘤内CD8<sup>+</sup>T细胞增加以及每细胞的IFN $\gamma$ 增加。然而,最近,用聚乙二醇化IL-10治疗的癌症患者出现了免疫刺激迹象,但没有表现出增加的抗肿瘤反应(Spiegel,2020)。

[0007] 白介素-2(“IL-2”)是一种四螺旋束多效性细胞因子,已知可诱导抗肿瘤免疫反应(Jiang,2016),但由于会诱导自然杀伤(“NK”)细胞和CD4<sup>+</sup>T细胞不受控制的激活和分泌IFN $\gamma$ 以及T调节细胞的扩增(Chinen,2016),也表现出高毒性。出于这个原因,许多研究小组试图突变IL-2以减少其与高亲和力受体的结合,从而降低IL-2毒性(Chen,2018)。这些突变蛋白尚未取得实质性的临床成功(Bentebibe,2019),这表明需要采用其他机制来降低IL-2的潜在致命毒性。

[0008] 据报道,IL-10可抑制IL-2驱动NK和CD4<sup>+</sup>T细胞分泌产生IFN $\gamma$ (Scott,2006),但也有报道称,IL-10可作为IL-2诱导的CD8<sup>+</sup>T细胞增殖的辅因子(Groux,1998)。因此,尚不清

楚IL-2和IL-10是否会共同激活免疫系统细胞,还是会相互抵消。

[0009] 令人惊讶地发现,在关键的IL-10受体结合结构域区域中具有一个或多个氨基酸取代的Epstein-Barr病毒(“EBV”)IL-10变体(在成熟EBV IL-10氨基酸序列SEQ ID No.3的氨基酸位置31、75或两个位置具有取代),可以改变EBV IL-10结合并激活IL-10受体的能力。这些修饰包括能够增加EBV IL-10对IL-10受体的亲和力的能力。发明人发现EBV IL-10变体分子可作为IL-10受体激动剂,能够治疗免疫疾病、炎症性疾病或病症,以及治疗癌症。高亲和力EBV IL-10变体(其包括位置31和75处的两个氨基酸取代,称为“DV07”),当作为单体并入包含非免疫原性的可变重链(“VH”)和可变轻链(“VL”)区的单链可变区(scFv)支架系统时,产生半衰期延长的分子,该分子正确折叠并保持功能活性。参见美国专利10,858,412;10975,133;10,981,965;10,975,134;和10,981,966,每个专利均通过引用全文并入;另见图1,其为代表性示意图。纳入所述支架系统的EBV IL-10变体在炎症细胞(例如单核细胞/巨噬细胞/树突状细胞)和免疫细胞(例如CD8+T细胞)上均表现出增强的IL-10功能。同上引文。在一次迭代中,scFv支架系统利用了最初从人类抗埃博拉抗体中获得的VH和VL区。单细胞因子融合蛋白被称为DeboDV07。同上引文。发明人还发现,当将识别各种肿瘤相关抗原(“TAA”)的抗体的6个CDR移植入最初来自人类抗埃博拉抗体的所述scFv的VH和VL区的6个互补决定区(“CDR”)中(即,将来自一个抗体的6个CDR替换为来自第二抗体的6个CDR)时,IL-10功能不被破坏,所述TAA包括例如抗EGFR、抗VEGFR1、抗VEGFR2和抗HER2抗体。参见美国专利10,858,412;10975,133;10,981,965;10,975,134;和10,981,966。

[0010] 发明人通过将第二种细胞因子掺入到该单细胞因子融合蛋白中(如上所述;另见于2021年3月11日提交的共同待决美国申请17/199,239,其全部内容通过引用并入),改进了DeboDV07。具体而言,第二种细胞因子被并入到所述scFv的VH和VL区之间的接头区中。参见,例如,同上引文,图2(双细胞因子融合蛋白的代表性示意图)。当植入了来自各种TAA靶向单克隆抗体的CDR时,该双细胞因子融合蛋白能够将IL-10和另一种细胞因子(例如但不限于IL-2)递送至特定TAA处。在本申请中,发明人描述了该双细胞因子融合蛋白(称为Diakines<sup>TM</sup>(“DK”))的新用途,用于支持其他已知的免疫治疗方式,例如过继细胞疗法(“ACT”),包括但不限于嵌合抗原受体T细胞(“CAR-T”)、工程化T细胞受体T细胞(“TCR-T”)、自然杀伤(“NK”)细胞和/或肿瘤浸润淋巴细胞(“TIL”),和双特异性T细胞衔接器(“BiTE”)。如本申请中所使用的,术语“diakine”或“diakines”是一个通用术语,是指一类新型的通过与靶向性和半衰期延长性scFv连接在一起的双细胞因子融合蛋白。

[0011] 关于CAR-T细胞疗法,该疗法在血液系统恶性肿瘤中表现出显著的成功,但在实体组织肿瘤中使用这些CAR-T细胞时,等效例子有限(Ma,2019;Castellarin,2018;Wagner,2020)。

[0012] 当前该方法的挑战看起来与大多数免疫刺激疗法有相似之处。具体而言,挑战包括脱靶毒性(Bonifant,2016;Bianca Santomasso,2019)、CAR-T细胞持久性(Jafarzadeh,2020;Christopher DeRenzo,2019)以及渗透肿瘤微环境(“TME”)的能力(Rodriguez-Garcia,2020;Zou,2019)。

[0013] IL-2(Groux,1998;Ross,2018)和IL-10(Berman,1996;Chan,2015;Naing A.,2018;Naing A.,Safety,Antitumor Activity,and Immune Activation of Pegylated Recombinant Human Interleukin-10(AM0010) in Patients With Advanced Solid

Tumors, 2016; Emmerich, 2012; Mumm J., 2011) 均能特异性地增强抗肿瘤T细胞功能。然而, 尽管据报道聚乙二醇化IL-10可增强CAR-T功能 (McCauley, 2018), 但将IL-2与CAR-T细胞疗法联合使用仍面临诸多挑战, 这主要是由于IL-2的相关毒性 (Tang, 2018) 所致。

[0014] 因此, 在一个方面, 本申请通过使用diakine来克服该问题, 所述diakine包含(1) IL2和IL10 (称为DK2<sup>10</sup>, 用于控制IL-2介导的毒性), (2) IL12和IL10, (3) IL7和IL10, 或(4) IL15和IL-10。通过靶向TAA (仅举几例, 例如EGFR2、HER2或VEGFR2 (Smith, 2010)) 将偶联的IL-2和IL10富集到肿瘤脉管系统, DK2<sup>10</sup>将驱动CAR-T细胞的TME活化, 由此实现CAR-T细胞的激活、浸润和持久性, 同时通过CAR-T的肿瘤特异性活化来限制毒性, 并直接抑制细胞因子释放综合征和由DV07引起的IL-2毒性。同样的设定也被认为对ACT疗法和BiTE是有前景的。

[0015] 发明概述

[0016] 本公开一般涉及使用双细胞因子融合蛋白 (称为diakine) 与常规免疫疗法相结合的方法。

[0017] 因此, 在第一方面, 本公开涉及一种联合使用diakine与常规免疫治疗的方法, 其中所述diakine包含IL-10或各种IL-10变体、延长半衰期的靶向结构域和第二细胞因子, 所述常规免疫治疗包括但不限于工程化免疫细胞 (例如CAR-T细胞、TCR-T细胞、TIL或NK细胞) 或BiTE。在某些实施方案中, 该方法使用包含IL-10的diakine, 例如但不限于人类、小鼠、巨细胞病毒 (“CMV”) 或EBV的IL-10形式或其IL-10变体分子, 其中所述IL-10变体具有影响IL-10受体结合结构域的一个或多个氨基酸取代。在某些实施方案中, 该方法使用包含IL-10、IL-12或IL-27或其变体的diakine。上述 (包含IL-10、IL-12或IL-27的) 每种diakine变型方案还将包括第二细胞因子, 该细胞因子不同于第一细胞因子, 并与IL-10、IL-12或IL-27或其变体联合发挥作用, 由此当第一和第二细胞因子通过diakine的半衰期延长抗原靶向结构域偶联并一起靶向特定抗原时, 将产生加性或协同效应。这样的第二细胞因子包括但不限于IL-6、IL-4、IL-1、IL-2、IL-3、IL-5、IL-7、IL-8、IL-9、IL-15、IL-21、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、GM-CSF、G-CSF、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 、或TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、碱性FGF、EGF、PDGF、IL-4、IL-11或IL-13, 优选为IL-2。diakine的抗原靶向结构域包含选自抗体、抗体片段 (例如, scFv、抗原结合片段) 或抗原结合部分的靶向结构域, 该靶向结构域将diakine引导至由抗体、抗体片段或其抗原结合部分的可变重链 (VH) 和可变轻链 (VL) 区识别的靶抗原。在某些实施方案中, 抗原靶向结构域是scFv。在某些方面, scFv对肿瘤相关抗原 (TAA) 具有特异性, 所述TAA可以选自在实体或血液肿瘤表面上发现的各种抗原靶标。在一个方面, 抗原靶向结构域是scFv, 其包含在scFv的VH中的3个CDR和在scFv的VL中的3个CDR。在另一个方面, scFv可以植入来自另一种抗体的VH的3个CDR以及VL的3个CDR, 但保留原始的VH和VL框架区。在其他实施方案中, 工程化细胞包括重组抗原受体, 例如但不限于CAR、T细胞受体 (“TCR”) 或功能性非TCR, 优选特异性靶向肿瘤相关抗原 (TAA) 的CAR。在某些实施方案中, 工程化细胞是T细胞。

[0018] 在另一方面, 本公开涉及使用式 (I) 的diakine与TAA靶向性工程化免疫细胞或BiTE的组合的方法, 其中式 (I) 为:

[0019]  $\text{NH}_2 - (\text{IL}10) - (\text{X}^1) - (\text{Z}_n) - (\text{X}^2) - (\text{IL}10) - \text{COOH}$  (式 I);

[0020] 其中

[0021] “IL10”是IL-10单体, 其中IL-10是人、小鼠、CMV或EBV IL-10, 或其变体, 更优选

IL10是包含选自SEQ ID Nos:1、3、7、9或10的序列的单体,

[0022] “X<sup>1</sup>”是从第一单克隆抗体获得的VL或VH区;“X<sup>2</sup>”是从第一单克隆抗体获得的VH或VL区;其中当X<sup>1</sup>为VL时,X<sup>2</sup>为VH,或者当X<sup>1</sup>为VH时,X<sup>2</sup>为VL,优选地其中所述VH和VL区是从人抗埃博拉抗体获得的scFv,并且所述VH和VL区植入了来自第二抗体的6个CDR(3个来自VH,3个来自VL);

[0023] “Z”是除IL-10之外的任何细胞因子,优选IL-6、IL-4、IL-1、IL-2、IL-3、IL-5、IL-7、IL-8、IL-9、IL-15、IL-21、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、GM-CSF、G-CSF、IFN- $\alpha$ 、

[0024] IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 或TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、碱性FGF、EGF、PDGF、IL-4、IL-11或IL-13;并且

[0025] “n”是选自1-2的整数,

[0026] 其中第二抗体是VEGFR2,CD3,CD4,CD5,CD7,CD19,CD20,CD22,CD25,CD30,CD33,CD34,CD38,CD40,CD44,CD52,CD56,CD70,CD79B,CD117,CD123,CD138,CD147,IL-22R1, B细胞成熟抗原(BCMA),C型凝集素样分子-1(CLL01),CD5,CD147,潜伏膜蛋白1(LMP-1),信号传导淋巴细胞活化分子F7(SLAMF7),NY-ESO-1,跨膜激活剂和CAML相互作用蛋白(TACI),CS-1,CXCR4,NKG2D,B7-H3,EGFR,PD-1,PDL-1,HER2,HER3,EpCAM,PSCA,MUC1,Lewis-Y,GPC3,AXL,Claudin18.2,GD2,CTLA-4,CEA,PDGFR,间皮素(MESO),PSCA,PSMA,BCMA或PSA。

[0027] 在另一方面,本公开涉及将式(II)的IL-10diakine与TAA靶向性免疫细胞或BiTE组合使用的方法

[0028] NH<sub>2</sub>-(IL10)-(L)-(X<sup>1</sup>)-(L)-(Z<sub>n</sub>)-(L)-(X<sup>2</sup>)-(L)-(IL10)-COOH(式II);

[0029] 其中

[0030] “IL-10”是选自SEQ ID Nos:1、3、7、9或10的单体序列;

[0031] “L”是任何接头,更优选地,该接头选自SEQ ID No:39、40或41;

[0032] “X<sup>1</sup>”是从第一单克隆抗体获得的VL或VH区;“X<sup>2</sup>”是从第一单克隆抗体获得的VH或VL区;其中当X<sup>1</sup>为VL时,X<sup>2</sup>为VH,或者当X<sup>1</sup>为VH时,X<sup>2</sup>为VL,优选地其中所述VH和VL区是从人抗埃博拉抗体获得的scFv,并且所述VH和VL区植入了来自第二抗体的6个CDR(3个来自VH,3个来自VL),其中第二抗体是VEGFR2,CD3,

[0033] CD4,CD5,CD7,CD19,CD20,CD22,CD25,CD30,CD33,CD34,CD38,CD40,CD44,

[0034] CD52,CD56,CD70,CD79B,CD117,CD123,CD138,CD147,IL-22R1,BCMA,CLL01,

[0035] CD5,CD147,LMP-1,SLAMF7,NY-ESO-1,TACI,CS-1,CXCR4,NKG2D,B7-H3,EGFR,PD-1,PDL-1,HER2,HER3,EpCAM,PSCA,MUC1,Lewis-Y,GPC3,AXL,Claudin18.2,GD2,CTLA-4,CEA,PDGFR,MESO,PSCA,PSMA,BCMA或PSA;

[0036] “Z”是选自IL-6、IL-4、IL-1、IL-2、IL-3、IL-5、IL-7、IL-8、IL-9、IL-15、IL-21、IL-26、

[0037] IL-27、IL-28、IL-29、GM-CSF、G-CSF、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 或TNF- $\alpha$ 、

[0038] TNF- $\beta$ 、碱性FGF、EGF、PDGF、IL-4、IL-11或IL-13的细胞因子,优选为IL-2;

[0039] 并且

[0040] “n”是选自1-2的整数。

[0041] 在其他方面,本公开涉及一种治疗癌症的方法,包括向有需要的受试者施用有效量的diakine,优选DK2<sup>10</sup>、DK7<sup>10</sup>、DK12<sup>10</sup>、DK15<sup>10</sup>、DK21<sup>10</sup>、DK27<sup>10</sup>、DKIFNa<sup>10</sup>,与工程化免疫细胞

(优选CAR-T疗法)或BiTE的组合,其中所述DK2<sup>10</sup>、DK7<sup>10</sup>、DK12<sup>10</sup>、DK15<sup>10</sup>、DK21<sup>10</sup>、DK27<sup>10</sup>、DKIFNa<sup>10</sup>包括移植了来自如下抗体的CDR的抗埃博拉支架系统(其包含VH/VL对或scFv),其中所述抗体为特异于VEGFR2,CD3,CD4,CD5,CD7,CD19,CD20,CD22,CD25,CD30,CD33,CD34,CD38,CD40,CD44,CD52,CD56,CD70,CD79B,CD117,CD123,CD138,CD147,IL-22R1,BCMA,CLL01,CD5,CD147,ILMP-1,SLAMF7,NY-ESO-1,TACI,CS-1,CXCR4,NKG2D,B7-H3,EGFR,PD-1,PDL-1,HER2,HER3,EpCAM,PSCA,MUC1,Lewis-Y,GPC3,AXL,Claudin18.2,GD2,CTLA-4,CEA,PDGFR,MESO,PSCA,PSMA,BCMA,或PSA的抗体。

[0042] 在另一个方面,本公开涉及将式(III)的IL-12diakine与TAA靶向工程化免疫细胞或BiTE组合使用的方法

[0043]  $\text{NH}_2 - (\text{R}^1) - (\text{X}^1) - (\text{Z}_n) - (\text{X}^2) - (\text{R}^2) - \text{COOH}$  (Formula IIIa);

[0044]  $\text{NH}_2 - (\text{R}^2) - (\text{X}^1) - (\text{Z}_n) - (\text{X}^2) - (\text{R}^1) - \text{COOH}$  (Formula IIIb);

[0045] 其中

[0046] “R<sup>1</sup>”是来自任何多亚基第一细胞因子的 $\alpha$ 亚基,优选IL-12- $\alpha$ 亚基(p35)或IL-27 $\alpha$ 亚基(p28),更优选SEQ ID No:45或47的亚基

[0047] “R<sup>2</sup>”是来自任何多亚基第一细胞因子的 $\beta$ 亚基,优选IL-12- $\beta$ 亚基(p40)或IL-27 $\beta$ 亚基(EBI3),更优选SEQ ID No:46或48的亚基;

[0048] 其中当R<sup>1</sup>是第一细胞因子的 $\alpha$ 亚基时,R<sup>2</sup>是第一细胞因子的 $\beta$ 亚基;或者当R<sup>1</sup>是p35时,R<sup>2</sup>是p40;或者当R<sup>1</sup>是p28时,R<sup>2</sup>是EBI3;或者当R<sup>1</sup>是SEQ ID No:45或47时,R<sup>2</sup>是SEQ ID No:46或48;或者当R<sup>1</sup>是SEQ ID No:46或48时,R<sup>2</sup>是SEQ ID No:45或47;

[0049] “X<sup>1</sup>”是从第一单克隆抗体获得的VL或VH区;“X<sup>2</sup>”是从第一单克隆抗体获得的VH或VL区;其中当X<sup>1</sup>为VL时,X<sup>2</sup>为VH或当X<sup>1</sup>为VH时,X<sup>2</sup>为VL;

[0050] “Z”为增强所述多亚基细胞因子生物学功能的任何细胞因子,优选IFN $\alpha$ -2a、IL-28、IL-29,且

[0051] “n”是选自1-2的整数,

[0052] 其中第一单克隆抗体是植入了第二抗体的CDR的抗埃博拉抗体,其中所述第二抗体特异于VEGFR2,CD3,CD4,CD5,CD7,CD19,CD20,CD22,CD25,CD30,CD33,CD34,CD38,CD40,CD44,CD52,CD56,CD70,CD79B,CD117,CD123,CD138,CD147,IL-22R1,BCMA,CLL01,CD5,CD147,ILMP-1,SLAMF7,NY-ESO-1,TACI,CS-1,CXCR4,NKG2D,B7-H3,EGFR,PD-1,PDL-1,HER2,HER3,EpCAM,PSCA,MUC1,Lewis-Y,GPC3,AXL,Claudin18.2,GD2,CTLA-4,CEA,PDGFR,MESO,PSCA,PSMA,BCMA,或PSA。

[0053] 在另一方面,本公开涉及一种组合使用式(IV)具有两个多亚基细胞因子(例如IL12、IL-27或IL-10)的diakine与TAA靶向工程化免疫细胞或BiTE的方法,所述diakine具有式(IV):

[0054]  $\text{NH}_2 - (\text{R}^1) - (\text{L}_a) - (\text{X}^1) - (\text{L}_a) - (\text{W}^1) - (\text{L}_b) - (\text{W}^2) - (\text{L}_a) - (\text{X}^2) - (\text{L}_a) - (\text{R}^2) - \text{COOH}$ (式IV);

[0055] 其中

[0056] “R<sup>1</sup>”是第一细胞因子例如IL-12或IL-27的 $\alpha$ 亚基,或是同二聚体细胞因子例如IL-10的第一单体,其中R<sup>1</sup>优选为p40;

[0057] “R<sup>2</sup>”是第一细胞因子例如IL-12或IL-27的 $\beta$ 亚基,或是同二聚体细胞因子例如IL-10的第二单体,其中R<sup>2</sup>优选为p35;

- [0058] “L<sub>a</sub>”是任意接头;优选为SEQ ID No:43-44;
- [0059] “L<sub>b</sub>”是任意接头;优选为GGGSGGG或SEQ ID No.:43;
- [0060] “X<sup>1</sup>”是从第一单克隆抗体获得的VL或VH区;“X<sup>2</sup>”是从第一单克隆抗体获得的VH或VL区;其中当X<sup>1</sup>为VL时,X<sup>2</sup>为VH,或者当X<sup>1</sup>为VH时,X<sup>2</sup>为VL;
- [0061] “W<sup>1</sup>”为第一细胞因子(例如IL-12或IL-27)的α亚基或同二聚体细胞因子(例如IL-10)的第一单体,优选为IL-10的第一单体;
- [0062] “W<sup>2</sup>”是第一细胞因子(例如IL-12或IL-27)的β亚基或同二聚体细胞因子(例如IL-10)的第二单体,优选IL-10的第二单体,
- [0063] 其中第一单克隆抗体植入了对VEGFR2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD19、CD20、CD22、CD25、CD30、CD33、CD34、CD38、CD40、CD44、CD52、CD56、CD70、CD79B、CD117、CD123、CD138、CD147、IL-22R1、BCMA、CLL01、CD5、CD147、1LMP-1、SLAMF7、NY-ESO-1、TACI、CS-1、CXCR4、NKG2D、B7-H3、EGFR、PD-1、PDL-1、HER2、HER3、EpCAM、PSCA、MUC1、Lewis-Y、GPC3、AXL、Claudin18.2、GD2、CTLA-4、CEA、PDGFR、MESO、PSCA、PSMA、BCMA或PSA具有特异性的抗体的CDR。
- [0064] 上述代表性方面的简要概述旨在提供对本公开内容的基本理解。本概述并非对所有考虑方面的全面概述,并非旨在确定所有方面的关键或重要要素,也并非旨在界定本公开内容的任何或所有方面的范围。其唯一目的是以简化形式呈现一个或多个方面,作为随后对本公开内容更详细描述的前言。为实现上述目的,本公开内容的一个或多个方面包括权利要求中描述和示例性指出的特征。
- [0065] 附图简述
- [0066] 图1是第一代IL-10融合蛋白的单个实施方案的示意图,该融合蛋白是先前在美国专利10,858,412中描述的细胞因子融合蛋白。
- [0067] 图2是本公开内容中diakine实施方案的示意图,其中该双细胞因子融合蛋白包含末端连接的IL-10单体(或IL10变体),其中第二细胞因子被掺入到scFv的VH和VL之间的接头中。
- [0068] 图3是本公开内容中diakine实施方案的示意图,其中该双细胞因子融合蛋白包含两个多亚基细胞因子,其中一个(例如,IL-12或IL-27)是末端连接的,另一个(例如,两个IL-10单体或其IL-10变体)融合在scFv的接头区域之间。
- [0069] 图4是利用植入了靶向例如VEGFR2的CDR的DK2<sup>10</sup>的提议机制的示意图。
- [0070] 图5A-5F显示,在来自健康供体的幼稚PBMC中,响应diakine(DK2<sup>10</sup>)、IL10或IL2,细胞因子IL-1β,IFN-γ,TNF-α,IL-12p70,IFNα2a和IL-6的诱导。
- [0071] 图6A-6D显示,在来自健康供体的幼稚PBMC中,响应diakine(DK2<sup>10</sup>)、IL-10或IL-2,细胞因子IL-4、IL-17、IL-8和GM-CSF的诱导。
- [0072] 图7评估了在24、48和72小时,响应于升高的diakine浓度和抗CD3刺激,CD8+T细胞中的颗粒酶B水平。
- [0073] 图8评估了在24、48和72小时,响应于升高的diakine浓度和抗CD3刺激,CD8+T细胞中的IFN-γ水平。
- [0074] 图9评估了在24、48和72小时,响应于升高的diakine浓度和抗CD3刺激,CD8+T细胞中的TNF-α水平。
- [0075] 图10A&10B显示diakine(DK2<sup>10</sup>CD19)与CAR-T细胞(CD20 CAR-T)组合对减少靶肿瘤

细胞(Raji)的影响,其中CD8+T细胞在diakine存在下引发1天。图10A是3:1效靶比,图10B是1:3效靶比。

[0076] 图11A-11F显示diakine(DK2<sup>10</sup>egfr)与BiTE(CD3xCD19 BiTE,0.01ng/mL)组合对减少靶肿瘤细胞(Raji)的影响,其中CD8+T细胞在diakine存在下引发2天。图11A-11D提供在存在DK2<sup>10</sup>和CD19 BiTE的情况下CD8+T细胞的TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、颗粒酶B和穿孔素的细胞因子分泌水平。图11E和11F提供当与DK2<sup>10</sup>和CD19 BiTE组合时CD8+T细胞的细胞溶解曲线。

[0077] 图12A-12F显示了diakine(DK2<sup>10</sup>CD19)与BiTE(CD3xCD20 BiTE,0.1ng/mL)组合对减少靶肿瘤细胞(Raji)的影响,其中CD8+T细胞在diakine存在下引发3天。图12A-12D提供在存在DK2<sup>10</sup>和CD20 BiTE的情况下CD8+T细胞的TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、颗粒酶B和穿孔素的细胞因子分泌水平。图12E和12F提供与DK2<sup>10</sup>和CD20 BiTE组合时CD8+T细胞的细胞溶解曲线。

[0078] 图13显示了diakine(DK7<sup>10</sup>)与CD19 BiTE组合的效果。数据提供了对照(即,无DK7<sup>10</sup>、无CD19 BiTE)、单独的DK7<sup>10</sup>、单独的CD19 BiTE以及DK7<sup>10</sup>与CD19 BiTE组合的比较。数据显示,DK7<sup>10</sup>与CD19 BiTE的组合比CD19 BiTE具有增强的细胞溶解作用。

[0079] 图14显示了diakine(DK12<sup>10</sup>)与CD19 BiTE组合的效果。数据提供了对照(即,无DK12<sup>10</sup>、无CD19 BiTE)、单独的DK12<sup>10</sup>、单独的CD19 BiTE以及DK12<sup>10</sup>与CD19 BiTE组合的比较。数据显示,DK12<sup>10</sup>和CD19 BiTE的组合比CD19 BiTE具有增强的细胞溶解作用。

#### [0080] 发明详述

[0081] 在称为diakine的一类双细胞因子融合蛋白以及治疗癌症的方法上,本文描述了示例性方面,其中所述diakine包含IL-10、IL-12或IL-27,所述方法包括施用包含IL-10和IL-2(DK2<sup>10</sup>)或IL-10和IL-7(DK7<sup>10</sup>)、IL-10和IL-12(DK12<sup>10</sup>)、IL-10和IL-15(DK15<sup>10</sup>)、IL-10和IL-21(DK21<sup>10</sup>)、IL-10和IFN- $\gamma$ (DKIFNa<sup>10</sup>)或IL-10和IL-27(DK27<sup>10</sup>)的diakine与肿瘤相关抗原(TAA)靶向工程化免疫细胞或ACT(例如CAR-T、TCT-T、TIL或NK)或BiTE的组合。本领域的普通技术人员将理解,以下描述仅是举例说明性的,并非旨在以任何方式限制。本领域技术人员从本公开内容中受益,将很容易想到其他方面。现在将详细参考以下公开内容和附图中所示的示例性方面,描述本发明的实现。在整个附图和以下描述中,将尽可能使用相同的指示符来指代相同或相似的项目。

[0082] 尽管在实施各种描述的实施方案时可以使用许多与本文所述相似或等效的方法和材料,但本文描述了优选的材料和方法。

[0083] 除非另有说明,本文描述的实施方案采用本领域技术人员熟知的分子生物学、生物化学、药理学、化学和免疫学的常规方法和技术。用于设计和制造IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、IFN- $\alpha$ 或IL-27变体(包括但不限于IL-10的人类、小鼠、CMV和/或EBV形式)的许多一般技术,以及用于测试IL-10变体、上述每种细胞因子及其变体的无糖基化或去糖基化形式的测定试验,可以通过本领域容易可得和详述的已知方法实现。参见,例如,Sambrook等人,《分子克隆:实验室手册》(第二版,1989年);《酶学方法》(S.Colowick和N.Kaplan编,Academic Press,Inc.);《实验免疫学手册》,第I-IV卷(D.M.Weir和C.C.Blackwell编,Blackwell Scientific Publications);A.L.Lehninger,《生物化学》(Worth Publishers,Inc.,新增)。基于N端醛的PEG化化学也是本领域众所周知的。

#### [0084] 定义

[0085] 以下术语将用于描述本文讨论的各实施方案,并旨在如下所述进行定义。

[0086] 如本文在描述各种实施方案时所用,除非内容另有明确规定,否则单数形式“a”、“an”和“the”包括复数指代物。

[0087] 术语“约”是指与所示数字或数字范围的偏差在0.0001-5%之间。在一个实施方案中,术语“约”是指与所示数字或数字范围的偏差在1-10%之间。在一个实施方案中,术语“约”是指与所示数字或数字范围的偏差不超过25%。在一个更具体的实施方案中,术语“约”是指,就核苷酸序列同源性或氨基酸序列源性而言,与野生型序列相比1-25%的差异。

[0088] 术语“白介素-10”或“IL-10”是指包含两个非共价连接形成同二聚体的相同亚基的蛋白质,其中IL-10是具有两个六螺旋束(螺旋A-F)的嵌插式二聚体。如本文所用,除非另有说明,“白介素-10”和“IL-10”是指人IL-10(“hIL-10”;Genbank登录号NP\_000563;或美国专利号6,217,857)蛋白质(SEQ ID No:1)或核酸(SEQ ID No:2);小鼠IL-10(“mIL-10”;Genbank登录号:M37897;或美国专利号6,217,857)蛋白质(SEQ ID No:7)或核酸(SEQ ID No:8);或病毒IL-10(“vIL-10”)。病毒IL-10同源物可源自EBV或CMV(Genbank登录号分别为NC\_007605和DQ367962)。术语EBV-IL10指IL-10的EBV同源物蛋白(SEQ ID No:3)或核酸(SEQ ID No:4)。术语CMV-IL10指IL-10的CMV同源物蛋白(SEQ ID No:5)或核酸(SEQ ID No:6)。本文所用的术语IL-10的“单体”或IL-10“单体”指IL-10或变体IL-10的单个亚基,当非共价连接时,形成IL-10或变体IL-10的同二聚体。术语“野生型”、“wt”和“天然”在本文中可互换使用,是指,在所讨论的特定IL-10的来源物种中,于自然界中常见的该蛋白质(例如IL-10、CMV-IL10或EBV IL-10)的序列。例如,术语“野生型”或“天然”EBV IL-10因此对应于自然界中最常见的氨基酸序列。

[0089] 术语“白介素-12”或“IL-12”是指包含 $\alpha$ (p35)和 $\beta$ (p40)亚基的蛋白质,所述亚基非共价连接形成异二聚体。如本文所用,除非另有说明,“白介素-12”和“IL-12”是指人类、小鼠或其变体形式。例如,术语“野生型”或“天然”将对应于自然界中最常见的该 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基的氨基酸序列。

[0090] 术语“白介素-27”或“IL-27”是指包含 $\alpha$ (p28)和 $\beta$ (EBI3)亚基的蛋白质,所述亚基非共价连接形成异二聚体。如本文所用,除非另有说明,“白介素-27”和“IL-27”是指人类、小鼠或其变体形式。例如,术语“野生型”或“天然”因此对应于自然界中最常见的该 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基的氨基酸序列。

[0091] 术语“变体”、“类似物”和“突变蛋白”是指参考分子的生物活性衍生物,其保留了所需活性,例如抗炎活性。通常,术语“变体”、“变体的”、“类似物”和“突变蛋白”在涉及多肽时是指,相对于天然多肽分子,在该天然多肽序列和结构中具有一个或多个氨基酸添加、替换(其性质可以是保守的)和/或缺失的化合物。因此,术语“IL-10变体”、“变体IL-10”、“IL-10变体分子”及其语法变体和复数形式为等效术语,旨在指与野生型IL-10在序列同一性或同源性上相差1-25%的IL-10氨基酸(或核酸)序列。因此,例如,EBV IL-10变体分子是与野生型EBV IL-10相差一个或多个氨基酸(或编码该氨基酸的核苷酸序列)添加、替换和/或缺失的分子。因此,在一种形式中,EBV IL-10变体与SEQ ID No.:3的野生型序列不同,序列同源性差异约为1%至25%,相当于约1-42个氨基酸差异。在一个实施方案中,IL-10变体是包含A75I氨基酸突变(内部表示为“DV06”;SEQ ID No:14)或V31L和A75I氨基酸突变(内部表示为“DV07”;SEQ ID No:16)的EBV IL-10。术语“IL-12变体”、“变体IL-12”、“IL-12变体分

子”、“IL-27变体”、“变体IL-27”、“IL-27变体分子”及其语法变体和复数形式为等效术语，旨在指与野生型IL-12或IL-27不同的IL-12或IL-27氨基酸(或核酸)序列。对于IL-12或IL-27，该氨基酸序列差异可以是 $\alpha$ 、 $\beta$ 或两个亚基内的添加、缺失或替换，由此在序列同一性或同源性上使得差异为1-25%。这些变体形式包括修饰为所述蛋白质的糖基化(去糖基化或无糖基化)形式。

[0092] 术语“融合蛋白”是指两种或多种蛋白质或多肽的组合或缀合，其导致通常非天然存在的蛋白质的新排列。融合蛋白是两种或多种蛋白质或多肽共价连接的结果。构成融合蛋白的两种或多种蛋白质可以从氨基末端(“NH<sub>2</sub>”)到羧基末端(“COOH”)以任何构型排列。因此，例如，一种蛋白质的羧基末端可以共价连接到另一种蛋白质的羧基末端或氨基末端。示例性融合蛋白可以包括将单体IL-10或单体变体IL-10分子与一个或多个抗体可变结构域(即VH和/或VL)或单链可变区(“scFv”)组合。

[0093] 术语“同源物”、“同源性”、“同源”或“基本同源”是指至少两个多核苷酸序列或至少两个多肽序列之间的百分比同一性。当序列在分子的规定长度上表现出至少约50%、优选至少约75%、更优选至少约80%-85%、优选至少约90%、最优选至少约95%-98%的序列同一性时，序列彼此同源。

[0094] 术语“序列同一性”是指精确的核苷酸与核苷酸或氨基酸与氨基酸的对应性。序列同一性的范围可以从100%序列同一性到50%序列同一性。可以使用多种方法确定百分比序列同一性，包括但不限于，通过比对，直接比较两个分子之间的序列信息(参考序列和与参考序列具有未知百分比同一性的序列)，计算两个比对序列之间的精确匹配数，除以参考序列的长度，然后将结果乘以100。可以使用易于获得的计算机程序来帮助识别百分比同一性。

[0095] 术语“受试者”、“个体”或“患者”在本文中可互换使用，是指脊椎动物，优选是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于鼠类、啮齿动物、猿类、人类、农场动物、运动动物和某些宠物。

[0096] 术语“施用”包括允许本公开的活性成分发挥其预期功能的施用途径。

[0097] “治疗有效量”或“有效量”，在涉及例如施用本文所述的EBV IL-10变体、融合蛋白、双细胞因子融合蛋白或DK2<sup>10</sup>, DK7<sup>10</sup>, DK12<sup>10</sup>, DK15<sup>10</sup>, DK21<sup>10</sup>, DK27<sup>10</sup>或DKIFNa<sup>10</sup>时，是指足以促进某些生物活性的量，尤其是在与TAA靶向工程化免疫细胞或ACT或BiTES相组合的情况下。这些活性可以包括，例如，抑制髓样细胞功能、增强Kupffer细胞活性、和/或对CD8+T细胞缺少任何影响或增强CD8+T细胞活性、以及阻断肥大细胞Fc受体上调或防止脱粒、或促进或增强联合疗法(例如CAR-T疗法或BiTES)的效果。因此，“有效量”将治疗、改善或预防医学病症的症状或体征。有效量还指足以允许或促进诊断的量。

[0098] 术语“治疗”或“疗法”是指减少疾病或病症的影响的方法。治疗还可以指减少疾病或病症本身的根本原因而不仅仅是症状的方法。治疗可以是天然水平的任何降低，并且可以是但不限于完全消除疾病、病症、或疾病或病症的症状。

[0099] 本申请中使用的术语“diakine”或“DK”是指一大类双细胞因子融合蛋白，所述融合蛋白包含IL-10(IL-10的单体)、IL-12或IL-27或其变体，其与另一种细胞因子一起融合到延长半衰期的抗原靶向结构域上。特别地，diakine采用式I、II、IIIa、IIIb、IV的形式。

[0100] 术语“DK2<sup>10</sup>”是指图2示意性表示的diakine，其包含IL-10或IL-10变体(例如，SEQ ID No.10)以及连接在scFv的VH和VL区之间的IL-2(例如，SEQ ID No:9)，且其中该diakine

可以是靶向型的或非靶向型的。靶向的DK2<sup>10</sup>可以通过使用与特定抗原(例如TAA)结合的scFv,或者将靶向TAA的抗体的CDR移植到scFv支架上,来制成靶向分子。这些分子将被表示为DK2<sup>10</sup>(靶标名称)。例如,靶向EGFR的DK2<sup>10</sup>将被表示为“DK2<sup>10</sup>(egfr)”或“DK2<sup>10</sup>egfr”。在一个实施方案中,DK2<sup>10</sup>egfr是SEQ ID No:19。在另一个例子中,靶向HER2的DK2<sup>10</sup>将表示为“DK2<sup>10</sup>(her2)”或“DK2<sup>10</sup>her2”。在一个实施方案中,DK2<sup>10</sup>her2是SEQ ID No:21、23或25。

[0101] 术语“DK7<sup>10</sup>”是指图2示意性表示的diakine,其包含连接在scFv的VH和VL区之间的IL-7或IL-7变体(例如无糖基化或去糖基化形式)以及IL-10和IL-10变体(例如,SEQ ID No:10,或其无糖基化或去糖基化形式),其中该diakine可以是靶向型的或非靶向型的。靶向的DK7<sup>10</sup>可以通过使用与特定抗原(例如TAA)结合的scFv,或者将靶向TAA的抗体的CDR移植到scFv支架上,来制成靶向分子。这些分子将被表示为DK7<sup>10</sup>(靶标名称)。例如,靶向EGFR的DK7<sup>10</sup>将被表示为“DK7<sup>10</sup>(egfr)”或“DK7<sup>10</sup>egfr”。在一个实施方案中,DK7<sup>10</sup>egfr是SEQ ID No:36。在另一个例子中,靶向(a)HER2的DK7<sup>10</sup>将表示为“DK7<sup>10</sup>(her2)”或“DK12<sup>10</sup>her2”;靶向(b)CD20的DK7<sup>10</sup>将表示为“DK7<sup>10</sup>(CD20)”或“DK12<sup>10</sup>CD20”。在一个实施方案中,DK7<sup>10</sup>her2是SEQ ID No:37,DK7<sup>10</sup>CD20是SEQ ID No:38。

[0102] 术语“DK12<sup>10</sup>”是指图3示意性表示的diakine,其包含IL-12或IL-12变体(例如无糖基化或去糖基化形式)以及连接在scFv的VH和VL区之间的IL-10和IL-10变体(例如,SEQ ID No:10,或其无糖基化或去糖基化形式),其中该diakine可以是靶向型的或非靶向型的。靶向的DK12<sup>10</sup>可以通过使用与特定抗原(例如TAA)结合的scFv,或者将靶向TAA的抗体的CDR移植到scFv支架上,来制成靶向分子。这些分子将被表示为DK12<sup>10</sup>(靶标名称)。例如,靶向EGFR的DK12<sup>10</sup>将被表示为“DK12<sup>10</sup>(egfr)”或“DK12<sup>10</sup>egfr”。在一个实施方案中,DK12<sup>10</sup>egfr是SEQ ID No:26-32。在另一个例子中,靶向(a)HER2的DK12<sup>10</sup>将表示为“DK12<sup>10</sup>(her2)”或“DK12<sup>10</sup>her2”;靶向(b)CD20的DK12<sup>10</sup>将表示为“DK12<sup>10</sup>(CD20)”或“DK12<sup>10</sup>CD20”。在一个实施方案中,DK12<sup>10</sup>CD20是SEQ ID No:34或35。

[0103] 术语“DK15<sup>10</sup>”是指图2示意性表示的diakine,其包含连接在scFv的VH和VL区之间的IL-15或IL-15变体(例如无糖基化或去糖基化形式)以及IL-10和IL-10变体(例如,SEQ ID No:10,或其无糖基化或去糖基化形式),其中该diakine可以是靶向型的或非靶向型的。靶向的DK15<sup>10</sup>可以通过使用与特定抗原(例如TAA)结合的scFv,或者将靶向TAA的抗体的CDR移植到scFv支架上,来制成靶向分子。这些分子将被表示为DK15<sup>10</sup>(靶标名称)。例如,靶向EGFR的DK15<sup>10</sup>将被表示为“DK15<sup>10</sup>(egfr)”或“DK15<sup>10</sup>egfr”。

[0104] 术语“DK21<sup>10</sup>”是指图2示意性表示的diakine,其包含连接在scFv的VH和VL区之间的IL-21或IL-21变体(例如无糖基化或去糖基化形式)以及IL-10和IL-10变体(例如,SEQ ID No:10,或其无糖基化或去糖基化形式),其中该diakine可以是靶向型的或非靶向型的。靶向的DK21<sup>10</sup>可以通过使用与特定抗原(例如TAA)结合的scFv,或者将靶向TAA的抗体的CDR移植到scFv支架上,来制成靶向分子。这些分子将被表示为DK21<sup>10</sup>(靶标名称)。例如,靶向EGFR的DK21<sup>10</sup>将被表示为“DK21<sup>10</sup>(egfr)”或“DK21<sup>10</sup>egfr”。

[0105] 术语“DK27<sup>10</sup>”是指图2示意性表示的diakine,其包含连接在scFv的VH和VL区之间的IL-27或IL-27变体(例如无糖基化或去糖基化形式)以及IL-10和IL-10变体(例如,SEQ ID No:10,或其无糖基化或去糖基化形式),其中该diakine可以是靶向型的或非靶向型的。靶向的DK27<sup>10</sup>可以通过使用与特定抗原(例如TAA)结合的scFv,或者将靶向TAA的抗体的CDR

移植到scFv支架上,来制成靶向分子。这些分子将被表示为DK27<sup>10</sup>(靶标名称)。例如,靶向EGFR的DK27<sup>10</sup>将被表示为“DK27<sup>10</sup>(egfr)”或“DK27<sup>10</sup>egfr”。

[0106] 术语“DKIFNa<sup>10</sup>”是指图2示意性表示的diakine,其包含连接在scFv的VH和VL区之间的IFNa或IFNa变体(例如无糖基化或去糖基化形式)以及IL-10和IL-10变体(例如,SEQ IDNo:10,或其无糖基化或去糖基化形式),其中该diakine可以是靶向型的或非靶向型的。靶向的DKIFNa<sup>10</sup>可以通过使用与特定抗原(例如TAA)结合的scFv,或者将靶向TAA的抗体的CDR移植到scFv支架上,来制成靶向分子。这些分子将被表示为DKIFNa<sup>10</sup>(靶标名称)。例如,靶向EGFR的DKIFNa<sup>10</sup>将被表示为“DKIFNa<sup>10</sup>(egfr)”或“DKIFNa<sup>10</sup>egfr”。

[0107] 术语“DK12<sup>IFNa</sup>”是指图2示意性表示的diakine,其包含连接在scFv的VH和VL区之间的IFNa或IFNa变体(例如无糖基化或去糖基化形式)以及IL-12和IL-12变体(例如,SEQ IDNo:10,或其无糖基化或去糖基化形式),其中该diakine可以是靶向型的或非靶向型的。靶向的DK12<sup>IFNa</sup>可以通过使用与特定抗原(例如TAA)结合的scFv,或者将靶向TAA的抗体的CDR移植到scFv支架上,来制成靶向分子。这些分子将被表示为DK12<sup>IFNa</sup>(靶标名称)。例如,靶向EGFR的DK12<sup>IFNa</sup>将被表示为“DK12<sup>IFNa</sup>(egfr)”或“DK12<sup>IFNa</sup>egfr”。

[0108] 本文所用的术语“肿瘤”是指所有赘生物细胞生长和增殖,无论是恶性还是良性,以及所有癌前和癌性细胞和组织。本文所用的术语“癌症”、“癌性”、“细胞增殖性疾病”、“增殖性疾病”和“肿瘤”并不相互排斥。

[0109] 肿瘤可以是良性的或恶性的。良性肿瘤的特征是不发生转移。恶性细胞是癌细胞,可以发生转移。可以实施本申请方法的肿瘤包括但不限于腺瘤、血管肉瘤、星形细胞瘤、上皮癌、生殖细胞瘤、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、错构瘤、血管内皮瘤、血管瘤、血肿(hematoma)、肝母细胞瘤、白血病、淋巴瘤、髓母细胞瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤、骨肉瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤和畸胎瘤。肿瘤可以选自:肢端雀斑样痣黑色素瘤(acral-lentiginous melanoma)、光化性角化病(actinic keratoses)、腺癌(adenocarcinoma)、腺样囊性癌(adenoid cystic carcinoma)、腺瘤(adenomas)、腺肉瘤(adenosarcoma)、腺鳞状细胞癌(adenosquamous carcinoma)、星形细胞肿瘤(astrocytic tumors)、巴氏腺癌(bartholin gland carcinoma)、基底细胞癌(basal cell carcinoma)、支气管腺癌(bronchial gland carcinomas)、毛细血管、类癌(carcinoids)、癌瘤(carcinoids)、癌肉瘤(carcinoma)、海绵状、软骨肉瘤(chondrosarcoma)、脉络丛乳头状瘤/癌(choroid plexus papilloma/carcinoma)、透明细胞癌(clear cell carcinoma)、囊腺瘤(cystadenoma)、内胚窦瘤(endodermal sinus tumor)、子宫内膜增生(endometrial hyperplasia)、子宫内膜间质肉瘤(endometrial stromal sarcoma)、子宫内膜样腺癌(endometrioid adenocarcinoma)、室管膜(ependymal)、上皮样(epithelioid)、尤文氏肉瘤(Ewing's sarcoma)、纤维板层样(fibrolamellar)、局灶性结节性增生(focal nodular hyperplasia)、胃泌素瘤(gastrinoma)、生殖细胞肿瘤(germ cell tumors)、胶质母细胞瘤(glioblastoma)、胰高血糖素瘤(glucagonoma)、血管母细胞瘤(hemangioblastomas)、血管内皮瘤(hemangioendothelioma)、血管瘤(hemangiomas)、肝腺瘤(hepatic adenoma)、肝腺瘤病(hepatic adenomatosis)、肝细胞癌(hepatocellular carcinoma)、胰岛素瘤(insulinoma)、上皮内赘生物(intaepithelial neoplasia)、上皮间鳞状细胞赘生物(interepithelial squamous cell neoplasia)、侵袭性鳞状细胞癌(invasive squamous

cell carcinoma)、大细胞癌(large cell carcinoma)、平滑肌肉瘤(leiomyo sarcoma)、恶性雀斑样黑色素瘤(lentigo maligna melanomas)、恶性黑色素瘤(malignant melanoma)、恶性间皮肿瘤(malignant mesothelial tumors)、髓母细胞瘤(medulloblastoma)、髓上皮瘤(medulloepithelioma)、黑色素瘤(melanoma)、脑膜、间皮、转移性癌、粘液表皮样癌(mucoepidermoid carcinoma)、神经母细胞瘤(neuroblastoma)、神经上皮腺癌(neuroepithelial adenocarcinoma)、结节性黑色素瘤(nodular melanoma)、燕麦细胞癌(oat cell carcinoma)、少突胶质细胞、骨肉瘤(osteosarcoma)、胰腺、乳头状粘液性腺癌(papillary serous adeno-carcinoma)、松果体细胞、垂体肿瘤、浆细胞瘤(plasmacytoma)、假肉瘤(pseudo-sarcoma)、肺母细胞瘤(pulmonary blastoma)、肾细胞癌(renal cell carcinoma)、视网膜母细胞瘤(retinoblastoma)、横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma)、肉瘤(sarcoma)、浆液性癌(serous carcinoma)、小细胞癌(small cell carcinoma)、软组织癌(soft tissue carcinomas)、生长抑素分泌肿瘤(somatostatin-secreting tumor)、鳞状癌(squamous carcinoma)、鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma)、间皮下、浅表扩散性黑色素瘤、未分化癌(undifferentiated carcinoma)、葡萄膜黑色素瘤(uveal melanoma)、疣状癌(verrucous carcinoma)、血管活性肠肽瘤(vipoma)、高分化癌(well differentiated carcinoma)和威尔姆斯肿瘤(Wilm's tumor)。

[0110] 术语“癌症”和“癌性”用于指或描述,哺乳动物中通常以不受控制的细胞生长/增殖为特征的生理状况。癌症的例子包括但不限于癌瘤、淋巴瘤(例如,霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)、母细胞瘤、肉瘤和白血病。此类癌症的更具体例子包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠道癌、胰腺癌、神经胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、白血病和其他淋巴增生性疾病,以及各种类型的头颈癌。

[0111] 双细胞因子融合蛋白结构

[0112] 本公开涉及使用diakine来增强或增强已知免疫疗法(例如靶向TAA的工程化免疫细胞或BiTE疗法)的功能,该diakine先前在美国申请17/199,239(于2021年3月11日提交,并通过引用整体并入本文)中进行了描述。简而言之,本申请方法中使用的diakine,作为对先前在美国专利10,858,412和10,975,133(通过引用整体并入)中描述的IL-10融合蛋白的早期版本的改进,包含IL-10或IL-10变体分子的两个单体和连接在scFv铰链区中的第二细胞因子分子。本发明的diakine建立在美国专利10,858,412和10,975,133中描述的第一代IL-10融合分子(图1)上。简而言之,第一代IL-10融合蛋白构建在VH和VL scFv支架上,其中两个IL-10单体分别在支架的一个末端上(即,第一IL-10单体在氨基末端以及第二IL-10单体在羧基末端)。该支架系统包含从人单克隆抗埃博拉抗体获得的scFv,具有6个互补决定区(“CDR”),VH中有CDR 1-3,VL中有CDR 1-3。通过将所述VH和VL对的6个CDR区(VH中的3个CDR和VL中的3个CDR)替换为来自靶向受体或抗原的抗体或其抗原结合片段的VH和VL的6个CDR区,所述VH和VL区能够将IL-10融合蛋白靶向特定抗原。替换和优化scFv的6个CDR和框架区以及将CDR植入本文所述的scFv支架的能力,是本领域技术人员所熟知和可实践的。

[0113] 在第一方面,本申请涉及双细胞因子融合蛋白,称为diakine,其包含IL-10或IL-

10变体和至少一种其他细胞因子,由此该双细胞因子融合蛋白与先前在美国专利10,858,412中描述的IL-10融合蛋白相比具有组合或协同功能。图2是包含IL-10的diakine的代表示意图。具体而言,diakine利用由包含VH和VL的scFv组成的支架系统,其中IL-10的两个单体分别位于该双细胞因子融合蛋白的氨基和羧基末端。第二细胞因子通过融合在scFv的VH和VL区域之间(即,scFv的铰链区)而与单体IL-10(或IL-10变体)缀合。diakine能够形成功能性蛋白质复合物,其中IL-10(或IL-10变体)单体同源二聚化为功能性IL-10分子,并且VH和VL区形成一对,它们结合在一起形成允许抗原结合和识别的scFv复合物。

[0114] 在某些方面,包含IL-10的diakine或双细胞因子融合蛋白具有式I的结构

[0115]  $\text{NH}_2 - (\text{IL}-10) - (\text{X}^1) - (\text{Z}_n) - (\text{X}^2) - (\text{IL}-10) - \text{COOH}$

[0116] 其中

[0117] “IL10”是IL-10的单体,其中IL-10是人、小鼠、CMV或EBV IL-10,或其变体,更优选IL10是包含选自SEQ ID Nos:1、3、7、9或10的序列的单体,

[0118] “X<sup>1</sup>”是从第一单克隆抗体获得的VL或VH区;“X<sup>2</sup>”是从第一单克隆抗体获得的VH或VL区;其中当X<sup>1</sup>是VL时,X<sup>2</sup>是VH,或者当X<sup>1</sup>是VH时,X<sup>2</sup>是VL,优选地其中VH和VL区是从人抗埃博拉抗体获得的scFv,并且VH和VL区中植入了来自第二抗体的6个CDR(3个来自VH,3个来自VL);

[0119] “Z”是除IL-10之外的任何细胞因子,优选为IL-6、IL-4、IL-1、IL-2、IL-3、IL-5、IL-7、IL-8、IL-9、IL-15、IL-21、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、GM-CSF、G-CSF、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 或TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、碱性FGF、EGF、PDGF、IL-4、IL-11或IL-13;并且

[0120] “n”是选自1-2的整数。

[0121] 在一个优选实施方案中,IL-10是称为DV07的高亲和力变体,其包含SEQ ID No:10的氨基酸位置31和75处的取代。在另一个实施方案中,VH和VL区是从能够结合实体或血液肿瘤表面上的TAA的任何单克隆抗体获得的scFv。在另一个方面,scFv从针对VEGFR2的抗体获得。在一个方面,scFv从人单克隆抗埃博拉抗体获得,其中抗埃博拉抗体的6个CDR(VH中3个,VL中3个)可选地被来自能够结合TAA的任何单克隆抗体的6个CDR替换。在另一个方面,scFv包含来自人单克隆抗埃博拉抗体的VH和VL框架区,并且其中已移植了对实体或血液肿瘤相关TAA具有特异性的CDR。在一个方面,scFv的VH和VL区植入了来自抗VEGFR2抗体的6个CDR(3个来自VH,3个来自VL)。在另一个优选实施方案中,第二细胞因子是IL-2,更优选SEQ ID No:9。

[0122] 在另一个方面,包含IL-10的diakine或双细胞因子融合蛋白具有式II的结构

[0123]  $\text{NH}_2 - (\text{IL}10) - (\text{L}) - (\text{X}^1) - (\text{L}) - (\text{Z}_n) - (\text{L}) - (\text{X}^2) - (\text{L}) - (\text{IL}10) - \text{COOH}$

[0124] 其中

[0125] “IL-10”是IL-10单体,例如但不限于人、小鼠、CMV、EBV IL-10,或其变体;

[0126] “L”是接头,优选是SEQ ID NO.:39、40或41的接头;

[0127] “X<sup>1</sup>”是从第一单克隆抗体获得的VL或VH区;

[0128] “X<sup>2</sup>”是从第一单克隆抗体获得的VH或VL区;

[0129] 其中当X<sup>1</sup>是VL时,X<sup>2</sup>是VH,或者当X<sup>1</sup>是VH时,X<sup>2</sup>是VL,并且X<sup>1</sup>和X<sup>2</sup>一起形成scFv;

[0130] “Z”是第二细胞因子,其中第二细胞因子是除IL-10之外的细胞因子;并且

[0131] “n”是选自1-2的整数。

[0132] 在一个优选方面,IL-10是称为DV07的高亲和力变体,其在SEQ ID No:10的氨基酸位置31和75处包含取代。在另一个实施方案中,VH和VL区是从能够结合实体或血液肿瘤表面上的TAA的任何单克隆抗体获得的scFv。在另一个方面,scFv是从针对VEGFR2的抗体获得的。在一个方面,scFv是从人单克隆抗埃博拉抗体获得的,其中抗埃博拉抗体的6个CDR(VH中3个,VL中3个)可选地被来自能够结合TAA的任何单克隆抗体的6个CDR替换。在另一个方面,scFv包括来自人单克隆抗埃博拉抗体的VH和VL框架区,其中已植入了对实体或血液肿瘤相关TAA具有特异性的CDR。在一个方面,scFv的VH和VL区被移植了来自抗VEGFR2抗体的6个CDR(3个来自VH,3个来自VL)。在另一个优选实施方案中,第二细胞因子是IL-2,更优选SEQ ID No:9。

[0133] 在一个实施方案中,IL-10单体包括任何形式的IL-10,包括人的(SEQ ID NO.:1)、CMV的(SEQ ID NO.:5)、EBV的(SEQ ID NO.:3)或小鼠的(SEQ ID No:7)。在另一个实施方案中,IL-10单体是EBV IL-10(SEQ ID NO.:3)的修饰或变体形式,包括美国专利10,858,412中描述的那些。在一个优选实施方案中,EBV IL-10在SEQ ID No.3中氨基酸位置31和75包含两个取代(“DV07”)。在又一个实施方案中,IL-10单体是SEQ ID No:1、3、7或10的序列。IL-10或IL-10变体分子的第一和第二单体各自位于融合蛋白的一个末端(即,第一单体位于氨基末端,第二单体位于羧基末端),如图2所示。

[0134] 在另一个方面,本公开涉及组合使用式(III)的IL-12diakine与TAA靶向工程化免疫细胞或BiTE的方法

[0135]  $\text{NH}_2 - (\text{R}^1) - (\text{X}^1) - (\text{Z}_n) - (\text{X}^2) - (\text{R}^2) - \text{COOH}$  (式IIIa);

[0136]  $\text{NH}_2 - (\text{R}^2) - (\text{X}^1) - (\text{Z}_n) - (\text{X}^2) - (\text{R}^1) - \text{COOH}$  (式IIIb);

[0137] 其中

[0138] “R<sup>1</sup>”是来自任何多亚基第一细胞因子的 $\alpha$ 亚基,优选为IL-12- $\alpha$ 亚基(p35)或IL-27 $\alpha$ 亚基(p28),更优选为SEQ ID No:45或47的亚基;

[0139] “R<sup>2</sup>”是来自任何多亚基第一细胞因子的 $\beta$ 亚基,优选为IL-12- $\beta$ 亚基(p40)或IL-27 $\beta$ 亚基(EBI3),更优选为SEQ ID No:46或48的亚基;

[0140] 其中当R<sup>1</sup>是第一细胞因子的 $\alpha$ 亚基时,R<sup>2</sup>是第一细胞因子的 $\beta$ 亚基;或者当R<sup>1</sup>是p35时,R<sup>2</sup>是p40;或者当R<sup>1</sup>是p28时,R<sup>2</sup>是EBI3;或者当R<sup>1</sup>为SEQ ID No:45或47时,R<sup>2</sup>为SEQ ID No:46或48;或者当R<sup>1</sup>为SEQ ID No:46或48时,R<sup>2</sup>为SEQ ID No:45或47;

[0141] “X<sup>1</sup>”为从第一单克隆抗体获得的VL或VH区;“X<sup>2</sup>”为从第一单克隆抗体获得的VH或VL区;其中当X<sup>1</sup>为VL时,X<sup>2</sup>为VH,或者当X<sup>1</sup>为VH时,X<sup>2</sup>为VL;

[0142] “Z”为增强所述多亚基细胞因子的生物学功能的任何细胞因子,优选IFN $\alpha$ -2a、IL-28、IL-29,并且

[0143] “n”为选自1-2的整数,

[0144] 其中第一单克隆抗体为抗埃博拉抗体,其中植入了来自第二抗体的CDR,其中所述第二抗体特异于VEGFR2,CD3,CD4,CD5,CD7,CD19,CD20,CD22,CD25,CD30,CD33,CD34,CD38,CD40,CD44,CD52,CD56,CD70,CD79B,CD117,CD123,CD138,CD147,IL-22R1,BCMA,CLL01,CD5,CD147,1LMP-1,SLAMF7,NY-ESO-1,TACI,CS-1,CXCR4,NKG2D,B7-H3,EGFR,PD-1,PDL-1,HER2,HER3,EpCAM,PSCA,MUC1,Lewis-Y,GPC3,AXL,Claudin18.2,GD2,CTLA-4,CEA,PDGFR,MESO,PSCA,PSMA,BCMA或PSA。

[0145] 在另一方面,本公开涉及组合使用式(IV)具有两个多亚基细胞因子(例如IL12、IL-27或IL-10)的diakine与TAA靶向工程化免疫细胞或BiTE的方法,所述diakine具有式(IV):

[0146]  $\text{NH}_2 - (\text{R}^1) - (\text{L}_a) - (\text{X}^1) - (\text{L}_a) - (\text{W}^1) - (\text{L}_b) - (\text{W}^2) - (\text{L}_a) - (\text{X}^2) - (\text{L}_a) - (\text{R}^2) - \text{COOH}$ (式IV);

[0147] 其中

[0148] “R<sup>1</sup>”是第一细胞因子例如IL-12或IL-27的 $\alpha$ 亚基,或同二聚体细胞因子例如IL-10的第一单体,其中R<sup>1</sup>优选为p40;

[0149] “R<sup>2</sup>”是第一细胞因子例如IL-12或IL-27的 $\beta\alpha$ 亚基,或同二聚体细胞因子例如IL-10的第二单体,其中R<sup>2</sup>优选为p35;

[0150] “L<sub>a</sub>”是任意接头;优选为SEQ ID No.:43或44;

[0151] “L<sub>b</sub>”是任意接头;优选为SEQ ID No.:GGSGGG或SEQ ID No.:42;

[0152] “X<sup>1</sup>”为从第一单克隆抗体获得的VL或VH区;“X<sup>2</sup>”为从第一单克隆抗体获得的VH或VL区;其中当X<sup>1</sup>为VL时,X<sup>2</sup>为VH,或者当X<sup>1</sup>为VH时,X<sup>2</sup>为VL;

[0153] “W<sup>1</sup>”是第一细胞因子(例如IL-12或IL-27)的 $\alpha$ 亚基或同二聚体细胞因子(例如IL-10)的第一单体,优选IL-10的第一单体;

[0154] “W<sup>2</sup>”是第一细胞因子(例如IL-12或IL-27)的 $\beta\alpha$ 亚基或同二聚体细胞因子(例如IL-10)的第二单体,优选IL-10的第二单体,

[0155] 其中第一单克隆抗体中植入了来自如下抗体的CDR,所述抗体对VEGFR2,CD3,CD4,CD5,CD7,CD19,CD20,CD22,CD25,CD30,CD33,CD34,CD38,CD40,CD44,CD52,CD56,CD70,CD79B,CD117,CD123,CD138,CD147,IL-22R1,BCMA,CLL01,CD5,CD147,1LMP-1,SLAMF7,NY-ESO-1,TACI,CS-1,CXCR4,NKG2D,B7-H3,EGFR,PD-1,PDL-1,HER2,HER3,EpCAM,PSCA,MUC1,Lewis-Y,GPC3,AXL,Claudin18.2,GD2,CTLA-4,CEA,PDGFR,MESO,PSCA,PSMA,BCMA或PSA具有特异性。

[0156] VH和VL区可以来自抗体、抗体片段或其抗原结合片段。抗原结合片段包括但不限于scFv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、V-NAR、diabody或纳米抗体。优选地,VH和VL来自单链可变片段(“scFv”)。在一个方面,scFv来自人单克隆抗埃博拉抗体。在另一个方面,scFv包含来自抗埃博拉抗体的框架区和来自特异性针对实体或血液肿瘤表面上表达的任何TAA的单克隆抗体的6个CDR(3个VH和3个VL)。scFv抗体或可植入的CDR可以从选自以下抗体的单克隆抗体获得:特异性针对VEGFR2,CD3,CD4,CD5,CD7,CD19,CD20,CD22,CD25,CD30,CD33,CD34,CD38,CD40,CD44,CD52,CD56,CD70,CD79B,CD117,CD123,CD138,CD147,IL-22R1,BCMA,CLL01,CD5,CD147,1LMP-1,SLAMF7,NY-ESO-1,TACI,CS-1,CXCR4,NKG2D,B7-H3,EGFR,PD-1,PDL-1,HER2,HER3,EpCAM,PSCA,MUC1,Lewis-Y,GPC3,AXL,Claudin18.2,GD2,CTLA-4,CEA,PDGFR,MESO,PSCA,PSMA,BCMA或PSA的抗体,或其多靶向形式。

[0157] 在另一个方面,包含IL-10、IL-12或IL-27的diakine包括来自单个抗体的VH和VL对。该VH和VL对充当支架,IL-10或其变体的单体可以附着于其上,使得IL-10或其变体的单体能够同源二聚化为功能性IL-10分子。因此,本领域技术人员将理解,融合蛋白中使用的VH和VL支架可以根据IL-10单体或IL-10单体变体的正确同源二聚化所需的期望物理属性和/或保持VH和VL靶向能力的期望来选择。同样,本领域技术人员还应理解,VH和VL对内的6个CDR(3个来自VH的CDR和3个来自VL的CDR)也可被来自其他抗体的6个CDR取代,以获得特

异性靶向的融合蛋白。在一个实施方案中,任何单克隆抗体的来自VH的3个CDR和来自VL的3个CDR(即,VH和VL对)可移植到包含SEQ No:12或15的支架系统中。当SEQ IDNo:12或15中描述的支架系统被制造为diakine时,其还将包括连接在分子的VH和VL部分的铰链区内的第二细胞因子。还设想,如果双细胞因子融合蛋白不旨在靶向任何特定抗原,则可以选择不靶向任何特定抗原(或靶向体内低丰度的抗原)的VH和VL对作为支架,例如来自抗HIV和/或抗埃博拉抗体的VH和VL对。因此,在一个实施方案中,本申请的IL-10融合蛋白可以包括来自人抗埃博拉抗体的VH和VL对,更优选地是SEQ ID No:12或15中的VH和VL序列。所述融合蛋白可以包含1-4个可变区。在另一个实施方案中,所述可变区可以来自相同抗体或来自至少两种不同的抗体。

[0158] 在另一个方面,抗体可变链或VH和VL对或VH和VL对的6个CDR的靶特异性可以包括但不限于,靶向蛋白质、细胞受体和/或肿瘤相关抗原。在另一个实施方案中,可以将来自任何VH和VL对的CDR区移植到上述支架系统中,这种支架优选包括称为Debo的系统(图1中示意性地表示),其中IL-10单体连接到包含人抗埃博拉抗体的VH和VL区的scFv,并且第二细胞因子连接到scFv的铰链区(图2中示意性地表示)。更优选地,在Debo支架系统中的植入发生在包含SEQ ID No:12或15序列的支架中。在另一实施方案中,可变区或VH和VL对或VH和VL对的6个CDR是从靶向与各种疾病(例如,癌症)相关的抗原或在健康受试者的血清中通常不会存在或很少存在的抗原的抗体获得的,例如来自针对EGFR、PDGFR、VEGFR1、VEGFR2、Her2Neu、FGFR、GPC3或其他肿瘤相关抗原、MAdCAM、ICAM、VCAM、CD14或其他炎症相关细胞表面蛋白、HIV和/或埃博拉的抗体的可变区。因此,在一个实施方案中,可变区从抗EGFR、抗MAdCAM、抗HIV(Chan et al, J. Virol, 2018, 92(18):e006411-19)、抗ICAM、抗VCAM、抗CD14或抗埃博拉(美国公开申请2018/0180614,通过引用整体并入,尤其是表2、3和4中描述的mAb)抗体获得或衍生。在另一个实施方案中,可变区从能够将细胞因子(例如IL-10和IL-2)的浓度富集到特定靶区域的抗体获得或衍生,从而使IL-10和IL-2能够引发其生物学效应。这种抗体可包括靶向某些患病区域中过表达或上调的受体或抗原的抗体、或在某些受影响区域中特异性表达的抗体。例如,可变区可来自对以下抗原有特异性的抗体:表皮生长因子受体(EGFR);CD52;CD14;各种免疫检查点靶标,例如但不限于PD-L1、PD-1、TIM3、BTLA、LAG3或CTLA4;CD20;CD47;GD-2;VEGFR1;VEGFR2;HER2;PDGFR;EpCAM;ICAM(ICAM-1、-2、-3、-4、-5)、VCAM、FAP $\alpha$ ;5T4;Trop2;EDB-FN;TGF $\beta$ Trap;MAdCAM; $\beta$ 7整合素亚基; $\alpha$ 4 $\beta$ 7整合素; $\alpha$ 4整合素;SR-A1;SR-A3;SR-A4;SR-A5;SR-A6;SR-B;dSR-C1;SR-D1;SR-E1;SR-F1;SR-F2;SR-G;SR-H1;SR-H2;SR-I1;以及SR-J1等等。其他可变区可包括从对以下具有特异性的抗体获得的可变区:CD3、CD4、CD5、CD7、CD19、CD22、CD25、CD30、CD33、CD34、CD38、CD40、CD56、CD70、CD79B、CD117、CD123、CD138、CD147、B细胞成熟抗原(BCMA)、 $\beta$ 型凝集素样分子-1(CLL01)、潜伏膜蛋白1(LMP-1)、信号淋巴活化分子F7(SLAMF7)、NY-ESO-1、跨膜激活剂和CAML相互作用物(TACI)、CS-1、CXCR4、NKG2D、B7-H3、EGFR、HER3、EpCAM、间皮素、PSCA、MUC1、Lewis-Y、GPC3、AXL、Claudin18.2、GD2、CTLA-4、CEA PDGFR、间皮素(MESO)、PSCA、PSA。IL-10单体(例如,人类、CMV或EBV)或变体IL-10分子(本文所述)与可变区(VH或VL)的氨基末端或羧基末端缀合,使得单体IL-10或变体IL-10分子能够彼此二聚化。在一个优选实施方案中,IL-10(或变体IL-10)的单体根据式I或II与VH和VL对融合,其中IL-10单体是EBV IL-10、DV05、DV06或DV07形式的IL-10。

[0159] diakine、双细胞因子融合蛋白或双细胞因子融合蛋白复合物还可具有抗原靶向功能。diakine或双细胞因子融合蛋白或双细胞因子融合蛋白复合物将包含能够结合在一起形成抗原结合位点或ABS的VH和VL对。在一些构型中,IL-10单体或其IL-10变体单体将共价连接到包含该抗原结合位点的末端。可变区可通过改变一个或多个氨基酸以降低受试者中的抗原性,来进一步修饰(例如,通过添加、减去或替换)。对可变区的其他修饰可包括氨基酸替换、缺失或添加,这些修饰位于VH和VL区的6个CDR区之外,用于增加scFv的VH和VL区的稳定性和表达。例如,修饰可以包括这样的修饰,其中CDR区是从抗EGFR或抗VEGFR1或抗VEGFR2抗体的VH和VL区获得的,并且CDR之外的区域被优化以稳定scFv和/或被优化以增加表达,这可以用作将第二细胞因子连接在scFv的VH和VL区之间的基础。为了证明这些类型的修饰在本领域技术人员的范围内,在包含DV07并靶向人HER2的DK2<sup>10</sup>形式分子(即DK2<sup>10</sup>her2)中,对CDR区和CDR之外的区域进行了类似的修饰,例如在SEQ ID No:52-54或55中描述的那些,更优选地是SEQ ID No:21(变体4)或23(变体5)。还可以对包含DV07并靶向人类VEGFR1或VEGFR2A的DK2<sup>10</sup>形式的分子进行这些和其他修饰,并且本领域技术人员能够确定可以稳定scFv和/或优化序列以用于表达的其他修饰。

[0160] VH和VL对形成支架,可以将从多种抗体获得的CDR区移植或植入到该支架上。此类抗体CDR区包括已知和上述的那些抗体。上述VH和VL支架中的CDR区将包括以下可用于CDR植入/插入的氨基酸位置数:

[0161]	重链CDR1	3-7个氨基酸
	重链CDR2	7-11个氨基酸
	重链CDR3	7-11个氨基酸
	轻链CDR1	9-14个氨基酸
	轻链CDR2	5-9个氨基酸
	轻链CDR3	7-11个氨基酸

[0162] 在一个优选的实施方案中,包含IL-10的双细胞因子融合蛋白将包括先前描述的支架IL-10融合蛋白,其中VH和VL对源自抗埃博拉抗体(例如SEQ ID No:19中描述的那些),其中来自该抗埃博拉抗体的6个CDR区被移除并且植入特定靶向抗体的VH和VL对,所述靶向抗体例如但不限于靶向如下抗原的抗体:EGFR;CD52;CD14;各种免疫检查点靶标,例如但不限于PD-L1、PD-1、TIM3、BTLA、LAG3或CTLA4;CD19、CD20;CD22、CD47;GD-2;VEGFR1;VEGFR2;HER2;PDGFR;EpCAM;ICAM(ICAM-1、-2、-3、-4、-5)、VCAM、CD14、FAP $\alpha$ ;5T4;Trop2;EDB-FN;TGF $\beta$ Trap;MAdCAM、 $\beta$ 7整合素亚基; $\alpha$ 4 $\beta$ 7整合素; $\alpha$ 4整合素SR-A1;SR-A3;SR-A4;SR-A5;SR-A6;SR-B;dSR-C1;SR-D1;SR-E1;SR-F1;SR-F2;SR-G;SR-H1;SR-H2;SR-I1;以及SR-J1。在一个实施方案中,6个抗埃博拉CDR区被来自抗EGFR、抗MAdCAM、抗VEGFR1、抗VEGFR2、抗PDGFR或抗CD14、抗CD19、抗CD20、抗CD22、更优选抗VEGFR2抗体的6个CDR区取代。

[0163] 在另一个方面,第二细胞因子融合在scFv的VH和VL之间,如图2所示。第二细胞因子缀合、融合或连接在scFv的VH或VL区域之间,使得第二细胞因子保留其功能特性。在一个实施方案中,第二细胞因子不同于IL-10单体。在另一个实施方案中,第二细胞因子是IL-10。在一个实施方案中,第二细胞因子是IL-6、IL-4、IL-1、IL-2、IL-3、IL-5、IL-7、IL-8、IL-9、IL-15、IL-17、IL-21、IL-26、IL-27、IL-28a、IL28b、IL-29、TSLP、GM-CSF、G-CSF、干扰素- $\alpha$ 、- $\beta$ 、- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 、或肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、- $\beta$ 、碱性FGF、EGF、PDGF、IL-4、IL-11或IL-13,或其变

体或突变蛋白,例如但不限于高、中和低受体亲和力变体。在一个优选实施方案中,包含IL-10的diakine中的第二细胞因子是IL-2。在一个更优选的实施方案中,diakine或双细胞因子融合蛋白为DK2<sup>10</sup>形式,其中IL-10单体为DV07;该IL-10变体分子连接至包含来自人抗埃博拉抗体(即Debo)的VH和VL框架区的支架系统,其中该支架系统还包含植入的从选自以下的抗体获得的CDR:抗EGFR、抗HER2、抗CD14、抗VEGFR1、抗VEGFR2、抗MAdCAM或抗PDGFR、抗Cd19、抗Cd20、抗CD22、抗CD3、抗CD4、抗CD5、抗CD7、抗CD25、抗CD30、抗CD33、抗CD34、抗CD38、抗CD40、抗CD52、抗CD56、抗CD70、抗CD79B、抗CD117、抗CD123、抗CD138、抗CD147、抗B细胞成熟抗原(BCMA),抗C型凝集素样分子-1(CLL01)、抗CD5、抗CD147、抗潜伏膜蛋白1(LMP-1)、抗信号淋巴细胞活化分子F7(SLAMF7)、抗NY-ESO-1、抗跨膜激活物和CAML相互作用物(TACI)、抗CS-1、抗CXCR4、抗NKG2D、抗B7-H3、抗PD-1、抗PDL-1、抗HER3、抗EpCAM、抗间皮素、抗PSCA、抗MUC1、抗Lewis-Y、抗GPC3、抗AXL、抗Claudin18.2、抗GD2、抗CTLA-4、抗CEA、抗间皮素(MESO)、抗PSCA或抗PSA,以及包含连接在VH和VL对的铰链区中的选自IFN $\alpha$ 、IL2、IL7、IL15、IL21、IL28、IL29、或其高、中、低亲和力变体的第二细胞因子。在一个最优选的实施方案中,diakine或双细胞因子融合蛋白是包含DV07并植入了来自抗VEGFR2抗体的6个CDR的DK2<sup>10</sup>形式的融合蛋白。

[0164] 在另一个方面,diakine是第一细胞因子(或其高亲和力变体)、第二细胞因子(或其高亲和力变体)和靶向性scFv(或从单克隆抗体获得并移植到从抗埃博拉抗体获得的框架区中的CDR)的组合,如下表1所示:

[0165]

表 1		
第一细胞因子	第二细胞因子	抗体, scFv 或 CDRs 源自特异于以下的抗体
IL10	IL2	VEGFR2
IL10	IL2	Ebola
IL10	IFN $\alpha$ , IL2, IL7, IL15, IL21, IL28, IL29	CD19
		CD20
		CD22
IL10	IFN $\alpha$ , IL2, IL7, IL15, IL21, IL28, IL29	PDGFR
IL10	IFN $\alpha$ , IL2, IL7, IL15, IL21, IL28, IL29	CD3, CD4, CD5, CD7, CD25, CD30, CD33, CD34, CD38, CD40, CD52, CD56, CD70, CD79B, CD117, CD123, CD138, CD147, B 细胞成熟抗原 (BCMA)、C 型凝集素样分子-1 (CLL01)、CD5、CD147、潜伏膜蛋白 1 (LMP-1)、信号淋巴细胞活化分子 F7 (SLAMF7)、NY-ESO-1、跨膜激活物和 CAML 相互作用蛋白 (TACI)、CS-1、CXCR4、NKG2D、B7-H3、EGFR、PD-1、PDL-1、HER2、HER3、EpCAM、间皮素、PSCA、MUC1、Lewis-Y、GPC3、AXL、Claudin18.2、GD2、CTLA-4、CEA、间皮素 (MESO)、PSCA 或 PSA
IL12	IL-10, IL-28, IL-29, IFN $\alpha$	VEGFR2, Ebola, CD19, CD20, CD22, PDGFR, CD3, CD4, CD5, CD7, CD25, CD30, CD33, CD34, CD38,

[0166]		CD40, CD52, CD56, CD70, CD79B, CD117, CD123, CD138, CD147, B 细胞成熟抗原 (BCMA)、C 型凝集素样分子-1 (CLL01)、CD5、CD147、潜伏膜蛋白 1 (LMP-1)、信号淋巴细胞活化分子 F7 (SLAMF7)、NY-ESO-1、跨膜激活物和 CAML 相互作用蛋白 (TACI)、CS-1、CXCR4、NKG2D、B7-H3、EGFR、PD-1、PDL-1、HER2、HER3、EpCAM、间皮素、PSCA、MUC1、Lewis-Y、GPC3、AXL、Claudin18.2、GD2、CTLA-4、CEA、间皮素 (MESO)、PSCA 或 PSA
	IL-27	IL-10, IL-28, IL-29, IFN $\alpha$ VEGFR2, Ebola, CD19, CD20, CD22, PDGFR, CD3, CD4, CD5, CD7, CD25, CD30, CD33, CD34, CD38, CD40, CD52, CD56, CD70, CD79B, CD117, CD123, CD138, CD147, BCMA, CLL01, CD5, CD147, LMP-1, SLAMF7, NY-ESO-1, TACI, CS-1, CXCR4, NKG2D, B7-H3, EGFR, PD-1, PDL-1, HER2, HER3, EpCAM, 间皮素、PSCA、MUC1、Lewis-Y、GPC3、AXL、Claudin18.2、GD2、CTLA-4、CEA、间皮素 (MESO)、PSCA 或 PSA

[0167] 在其他方面,可能的diakine或使用至少一种diakine和TAA靶向工程化免疫细胞、ACT或BiTE组合的方法包括下表2a-2e)中所列之一。

[0168]

表 2a		
第一细胞因子	scFv	第二细胞因子
hIL10 (SEQ ID No. 1)	CD19	IL2 (SEQ ID No. 9)
	CD20	
	CD22	
	CD3	
	CD38	
	CD44	
	BCMA	
	HER3	
	PSCA	
	PSMA	
	PSA	
	GPC3	
	IL22R	
	CD70	
	CD33	
	CXCR4	
	CEA	
DV07 (SEQ ID No. 3)	CD19	
	CD20	
	CD22	
	CD3	
	CD38	
	CD44	
	BCMA	
	HER3	
	PSCA	
	PSMA	
	PSA	
	GPC3	
	IL22R	
	CD70	
	CD33	
	CXCR4	
	CEA	

[0169]

表 2b		
第一细胞因子	scFv	第二细胞因子
hIL10 (SEQ ID No. 1)	CD19	IL7 (SEQ ID No. 50)
	CD20	

[0170]

	CD22	
	CD3	
	CD38	
	CD44	
	BCMA	
	HER3	
	PSCA	
	PSMA	
	PSA	
	GPC3	
	IL22R	
	CD70	
	CD33	
	CXCR4	
	CEA	
DV07 (SEQ ID No. 3)	CD19	
	CD20	
	CD22	
	CD3	
	CD38	
	CD44	
	BCMA	
	HER3	
	PSCA	
	PSMA	
	PSA	
	GPC3	
	IL22R	
	CD70	
	CD33	
	CXCR4	
	CEA	

[0171]

第一细胞因子	scFv	第二细胞因子
hIL10 (SEQ ID No. 1)	CD19	IL15 (SEQ ID No. 51)
	CD20	
	CD22	
	CD3	
	CD38	
	CD44	

[0172]	DV07 (SEQ ID No. 3)	BCMA	
		HER3	
		PSCA	
		PSMA	
		PSA	
		GPC3	
		IL22R	
		CD70	
		CD33	
		CXCR4	
		CEA	
		CD19	
		CD20	
	CD22		
	CD3		
	CD38		
	CD44		
	BCMA		
	HER3		
	PSCA		
PSMA			
PSA			
GPC3			
IL22R			
CD70			
CD33			
CXCR4			
CEA			

第一细胞因子	scFv	第二细胞因子
[0173] hIL10 (SEQ ID No. 1)	CD19	IFN- $\alpha$ (SEQ ID No: 49)
	CD20	
	CD22	
	CD3	
	CD38	
	CD44	
	BCMA	
	HER3	
	PSCA	
	PSMA	

[0174]

DV07 (SEQ ID No. 3)	PSA	
	GPC3	
	IL22R	
	CD70	
	CD33	
	CXCR4	
	CEA	
	CD19	
	CD20	
	CD22	
	CD3	
	CD38	
	CD44	
	BCMA	
	HER3	
	PSCA	
	PSMA	
	PSA	
	GPC3	
	IL22R	
CD70		
CD33		
CXCR4		
CEA		

[0175]

表 2e		
第一细胞因子	scFv	第二细胞因子
hIL10 (SEQ ID No. 1)	CD19	IL21 (SEQ ID No: 49)
	CD20	
	CD22	
	CD3	
	CD38	
	CD44	
	BCMA	
	HER3	
	PSCA	
	PSMA	
	PSA	
	GPC3	
	IL22R	
CD70		

[0176]	DV07 (SEQ ID No. 3)	CD33
		CXCR4
		CEA
		CD19
		CD20
		CD22
		CD3
		CD38
		CD44
		BCMA
		HER3
		PSCA
		PSMA
		PSA
		GPC3
		IL22R
		CD70
		CD33
		CXCR4
		CEA

[0177] 在其他方面,包含IL-10、IL-12或IL-27的diakine或双细胞因子融合蛋白包含接头。本领域技术人员知晓,接头或间隔子可用于实现各种融合蛋白部分的正确空间配置,因此可以选择适当的接头用于形成包含IL-10的双细胞因子融合蛋白。在一个更优选的实施方案中,接头或间隔子可以是随机氨基酸序列(例如SEQ ID No:39-44)或抗体的恒定区。所述恒定区可以源自但不限于IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgD或IgE。在一个实施方案中,接头或间隔子是恒定重链(“CH”)区1、CH2或CH3。在另一个方面,接头或间隔子还可以包含至少两个链间二硫键。

[0178] 在其他方面,本公开涉及编码包含IL-10、IL-12或IL-27和第二细胞因子的diakine或双细胞因子融合蛋白的核酸分子。这些核酸分子在美国申请号17/110,104中描述。编码包含IL-10和第二细胞因子的diakine或双细胞因子融合蛋白的多核苷酸序列还可以包括不改变所述双细胞因子融合蛋白的功能特性的修饰。此类修饰将采用常规重组DNA技术和方法。例如,可以使用采用合成寡核苷酸的定点诱变方法在核酸(DNA)水平上将特定氨基酸序列的添加或替换引入IL-10序列中,这些方法也是本领域众所周知的。在一个优选实施方案中,编码包含IL-10和第二细胞因子的双细胞因子融合蛋白的核酸分子可以包括不会改变IL-10变体分子功能性的插入、缺失或替换(例如,简并密码)。编码本文所述的IL-10、IL-12、IL-27变体和/或整个融合蛋白的核苷酸序列可由于遗传密码的简并性而具有不同序列,并且可以与上述序列具有70-99%的同源性,优选70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同源性。因此,本公开的一个实施方案包括编码SEQ ID Nos:35、46-58或59的蛋白质但是由于遗传密码简并性而有70-99%差异的核酸序列。

[0179] 编码本文所述的diakine或双细胞因子融合蛋白的核苷酸序列还可以包含有助于例如蛋白质的表达、产生或分泌的公知序列。此类序列可以包括例如前导序列、信号肽和/或翻译起始位点/序列(例如Kozak共有序列)。本文所述的核苷酸序列还可以包括一个或多个限制酶位点,由此允许插入各种表达系统/载体中。

[0180] 在另一个方面,编码双细胞因子融合蛋白的核苷酸序列可以直接用于基因治疗。在一个实施方案中,本申请的变体IL-10、IL-12或IL-27分子或融合蛋白可以通过本领域已知的任何方法递送,包括直接施用突变体IL-10、IL-12或IL-27蛋白和用编码突变体IL-10蛋白的载体进行基因治疗。基因治疗可以使用质粒DNA或病毒载体来实现,例如腺相关病毒载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体等。在一些实施方案中,本申请的病毒载体作为病毒颗粒施用,而在其他实施方案中,它们作为质粒(例如作为“裸露”DNA)施用。

[0181] 用于递送核苷酸序列的其他方法包括本领域中已知的方法。这些将包括通过细胞穿透肽、疏水部分、静电复合物、脂质体、配体、脂质体纳米颗粒、脂蛋白(优选HDL或LDL)、叶酸靶向脂质体、抗体(例如叶酸受体、转铁蛋白受体)、靶向肽或适体递送编码IL-10或IL-10变体分子的核苷酸序列(例如但不限于DNA、RNA、siRNA、mRNA、寡核苷酸或其变体)。编码IL-10、IL-12或IL-27变体分子的核苷酸序列可以通过直接注射、输注、贴片、绷带、雾或气溶胶或通过薄膜递送方式,递送至受试者。核苷酸(或蛋白质)可以指向期望靶向递送细胞因子刺激的任何区域。这些区域将包括,例如,肺、胃肠道、皮肤、肝脏、通过颅内注射到脑、通过超声引导注射到深部转移性肿瘤病变。

[0182] 在另一个方面,本公开涉及制备和纯化包含IL-10、IL-12或IL-27的diakine或双细胞因子融合蛋白的方法。例如,编码本文所述的diakine或双细胞因子融合蛋白的核酸序列可用于重组产生融合蛋白。例如,使用常规分子生物学和蛋白质表达技术,可以从哺乳动物细胞系统中表达和纯化本文所述的diakine或双细胞因子融合蛋白。这些系统包括众所周知的真核细胞表达载体系统和宿主细胞。可以使用多种合适的表达载体,这些载体是本领域技术人员所熟知的,它们可用于表达和引入变体IL-10、IL-12或IL-27分子和融合蛋白。这些载体包括,例如,pUC型载体、pBR型载体、pBI型载体、pGA型、pBin19、pBI121、pGreen系列、pCAMBRIA系列、pPZP系列、pPCV001、pGA482、pCLD04541、pBIBAC系列、pYLTAC系列、pSB11、pSB1、pGPTV系列和病毒载体等。众所周知的宿主细胞系统包括但不限于在CHO细胞中的表达。

[0183] 含有diakine或双细胞因子融合蛋白的表达载体还可以包括载体功能所需的其他载体元件。例如,载体可以包括信号序列、标签序列、蛋白酶识别序列、选择标记、和双细胞因子融合蛋白正确复制和表达所必需的其他序列调控序列,例如启动子。载体中使用的特定启动子不受特别限制,只要它们可以驱动双细胞因子融合蛋白在各种宿主细胞类型中的表达即可。同样,标签的类型不受限制,只要标签序列使得表达的变体IL-10分子的纯化更简单或更容易。这些可能包括,例如,可以使用6-组氨酸、GST、MBP、HAT、HN、S、TF、Trx、Nus、生物素、FLAG、myc、RCFP、GFP等。蛋白酶识别序列不受特别限制,例如,可以使用诸如因子Xa、凝血酶、HRV、3C蛋白酶之类的识别序列。选择标记没有特别限制,只要能够检测出转化的水稻植物细胞即可,例如可以使用新霉素抗性基因、卡那霉素抗性基因、潮霉素抗性基因等。

[0184] 上述diakine或双细胞因子融合蛋白还可包括额外的氨基酸序列,其有助于在制造过程中回收或纯化融合蛋白。这些可包括各种序列修饰或亲和标签,例如但不限于蛋白A、白蛋白结合蛋白、碱性磷酸酶、FLAG表位、半乳糖结合蛋白、组氨酸标签和本领域中众所周知的任何其他标签。参见例如Kimple等人(Curr. Protoc. Protein Sci., 2013, 73: Unit 9.9, 表9.91, 以引用的方式全文并入)。在一个方面,亲和标签是具有6个组氨酸的氨基酸序

列的组氨酸标签。组氨酸标签可从最终产品中去除或保持完整。在另一个实施方案中,亲和标签是掺入融合蛋白中的蛋白质A修饰(例如,掺入本文所述融合蛋白的VH区中)。本领域技术人员将理解,本文所述的任何双细胞因子融合蛋白序列都可以通过在抗体框架区内插入氨基酸点取代来修饰以掺入蛋白质A修饰,如本领域所述。

[0185] 在另一个方面,所述的蛋白质和编码双细胞因子融合蛋白的核酸分子可以配制成药物组合物,所述药物组合物包含治疗有效量的双细胞因子融合蛋白和药物载体和/或药学上可接受的赋形剂。药物组合物可以使用常用的缓冲液、赋形剂、防腐剂、稳定剂来配制。包含双细胞因子融合蛋白的药物组合物与药学上可接受的载体或赋形剂混合。各种药物载体是本领域已知的,并且可以用于药物组合物中。例如,载体可以是任何适合于将本申请的双细胞因子融合蛋白组合物递送至患者的相容、无毒物质。合适的载体的例子包括生理盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液和汉克氏溶液。载体还可以包括本领域技术人员通常已知的任何泊洛沙姆,包括但不限于分子量为2900(L64)、3400(P65)、4200(P84)、4600(P85)、11,400(F88)、4950(P103)、5900(P104)、6500(P105)、14,600(F108)、5750(P123)和12,600(F127)的泊洛沙姆。载体还可以包括乳化剂,包括但不限于聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯60和聚山梨醇酯80等。还可以使用非水性载体,例如固定油和油酸乙酯。载体还可以包括添加剂,例如增强等渗性和化学稳定性的物质,例如缓冲剂和防腐剂,参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences和U.S.Pharmacopeia:National Formulary,Mack Publishing Company,Easton,Pa.(1984)。治疗剂和诊断剂的制剂可以通过与生理上可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合来制备,例如以冻干粉、浆液、水溶液或悬浮液的形式。

[0186] 药物组合物将配制成以足以提供所需治疗结果的治疗有效量施用于患者。优选地,这种量具有最小的负面副作用。在一个实施方案中,施用的双细胞因子融合蛋白的量将足以治疗或预防炎症性疾病或病症。在另一个实施方案中,施用的双细胞因子融合蛋白的量将足以治疗或预防免疫疾病或病症。在另一个实施方案中,施用的diakine或双细胞因子融合蛋白的量将足以治疗或预防癌症。施用的量可能因患者而异,并且需要通过考虑受试者或患者的疾病或病症、患者的整体健康状况、施用方法、副作用的严重程度等来确定。

[0187] 对于特定患者的有效量可能因诸如所治疗的病症、患者的整体健康状况、施用方法途径和剂量以及副作用的严重程度等因素而变化。施用给患者的适当剂量通常由临床医生使用本领域已知会或可能会影响治疗或预测会影响治疗的参数或因素来确定。通常,剂量开始时略低于最佳剂量,然后小幅逐渐增加,直到相对于任何负面副作用达到期望的或最佳的效果。重要的诊断措施包括症状,例如炎症,或产生的炎症细胞因子水平等。

[0188] 确定目前描述的双细胞因子融合蛋白的剂量的方法与美国专利10,858,412中描述的方法基本相似。通常,目前描述的双细胞因子融合蛋白的剂量范围为0.5微克/千克至100微克/千克。双细胞因子融合蛋白可以每日、每周三次、每周两次、每周、每两个月或每月施用。有效量的治疗剂将通过缓解症状来影响炎症或疾病或病症的程度。例如,影响可能包括至少10%、至少20%、至少约30%、至少40%、至少50%或更高的影响水平,从而减轻或完全治疗疾病或病症。

[0189] 本申请的组合物可以口服或注射到体内。口服制剂还可以包括进一步保护变体IL-10分子免受胃肠道蛋白酶侵害的化合物。注射通常是肌肉内、皮下、皮内或静脉内注射。或者,在适当的情况下可以使用关节内注射或其他途径。肠胃外施用的双细胞因子融合蛋

白优选与药用载体和/或药学上可接受的赋形剂一起配制成单位剂量可注射形式(溶液、悬浮液、乳液)。在其他实施方案中,可以通过可植入或可注射的药物递送系统将本申请的组合物引入患者体内。

[0190] 测试Diakine或双细胞因子融合蛋白

[0191] 本领域技术人员已知并可以使用多种筛选试验来测试所需的生物功能。在一个实施方案中,期望的生物学功能包括但不限于降低抗炎反应、降低T细胞刺激、增强T细胞功能、增强Kupffer细胞功能和减少肥大细胞脱粒。

[0192] 例如,已知IL-10暴露可以引发T细胞,以在T细胞受体刺激后产生和分泌更多的IFN  $\gamma$ 。同时,IL-10暴露阻止响应LPS从单核细胞/巨噬细胞分泌TNF $\alpha$ 、IL-6和其他促炎细胞因子。IL-10还抑制FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Treg增殖。在一个实施方案中,正向选择最大化单核细胞/巨噬细胞抑制但缺乏T细胞效应(包括刺激和抑制反应)的双细胞因子融合蛋白。在一个实施方案中,正向选择具有增强的抗炎作用的双细胞因子融合蛋白,用于治疗自身免疫、抗炎疾病或两者。在另一个实施方案中,选择最大化T细胞生物学(包括刺激和抑制反应)并且还具具有增强的Kupffer细胞清除的双细胞因子融合蛋白,以开发用于治疗癌症。先前在共同待决的美国专利10,858,412中描述了筛选双细胞因子融合蛋白的各种测定试验和方法,该专利以引用的方式全文并入。参见美国申请16/811,718说明书第39-42页。

[0193] 重组工程化细胞或ACT

[0194] 在一个方面,本文公开的方法将包括diakine与ACT疗法的组合,例如但不限于,包含嵌合抗原受体(CAR)、TCR或功能性非TCR形式的重组抗原受体的重组工程化细胞、TIL、NK细胞,优选靶向与实体瘤相关的TAA的CAR-T。在一些实施方案中,抗原受体包括特异性结合TAA抗原的细胞外抗原识别结构域和细胞内信号传导结构域。

[0195] 典型的重组表达的CAR或TCR将包括细胞外抗原识别结构域(“EARD”)、跨膜结构域和细胞内结构域。

[0196] EARD可对蛋白质、多肽或碳水化合物具有特异性。特别适用于治疗癌症的是靶向TAA的EARD。例如,EARD可靶向TAA,例如但不限于EGFR、VEGFR1、VEGFR2、EGP-2、EGP-4、OEPHa2、ErbB2、3或4、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA、乙肝表面抗原、抗叶酸受体、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原(PSA)、PSMA、Her2/neu、雌激素受体、孕酮受体、ephrinB2、CD123、CS-1、c-Met、GD-2和IMAGE A3、CD3、CD4、CD5、CD7、CD23、CD24、CD30、CD33、CD34、CD38、CD40、CD44、CD52、CD56、CD70、CD79B、CD117、CD123、CD138、CD147、BCMA、CLL01、LMP-1、SLAMF7、NY-ESO-1、TCAI、CS-1、CCR4、ROR1、tEGFR、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、MART-1、gp100、癌胚抗原、ROR1、TAG72、FBP、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- $\alpha$ 、IL-13R- $\alpha$ 2、kdr、 $\kappa$ 轻链、Lewis Y、L1细胞粘附分子、MAGE-AL间皮素、CE7、Wilms肿瘤1(WT-1)或细胞周期蛋白。本领域技术人员将认识到,包含EARD的重组工程化细胞将取决于待治疗的肿瘤或癌症。因此,本领域技术人员将能够选择具有适当EARD的适当CAR-T或TCR-T来靶向癌症。

[0197] CAR或TCR的跨膜结构域可以是人工疏水区或通常与EARD相关的区域或通常已知的跨膜结构域。这些包括但不限于来自CD28、CD3 $\epsilon$ 、CD45、CD4、CD5、CDS、CD9、CD 16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD 134、CD137、CD 154或TCR的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链的结构域。

[0198] 本领域技术人员通常还认识到,CAR-T或TCR-T细胞的胞内结构域将包括以下胞内

信号传导结构域中的一个或多个:ITAM(例如,CD3-zeta“CD3 $\zeta$ ”),共刺激结构域I(“CM1”) (例如,CD28,CD134,CD137/4-1BB或ICOS),和/或共刺激结构域II(“CMII”) (例如,CD134或CD137/4-1BB)。

[0199] 重组工程化细胞可以是T细胞,包括CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>T细胞。在其他方面,T细胞是自体或同种异体细胞,优选是自体的。在一些实施方案中,CD4<sup>+</sup>细胞与CD8<sup>+</sup>细胞的比例在约1:5至约5:1之间。在一些实施方案中,CD4<sup>+</sup>细胞与CD8<sup>+</sup>细胞的比例在约1:2和约2:1之间。在一些实施方案中,细胞剂量包括约0.2 $\times 10^6$ 细胞/kg受试者体重和约6 $\times 10^6$ 细胞/kg受试者体重之间、约0.5 $\times 10^6$ 细胞/kg受试者体重和约3 $\times 10^6$ 细胞/kg受试者体重之间、约0.75 $\times 10^6$ 细胞/kg和约2.5 $\times 10^6$ 细胞/kg之间、或约1 $\times 10^6$ 细胞/kg和约2 $\times 10^6$ 细胞/kg之间(包括每个值)。

[0200] 双特异性单克隆抗体

[0201] 在一个方面,本文公开的方法将包括Diakine与双特异性单克隆抗体(BSMab)的组合。BSMab在本领域中是众所周知的,包括但不限于双特异性T细胞衔接器(BiTE)、串联单链可变片段(taFvs)、diabody(Dbs)、单链diabody(scDbs)、triple bodies或三价抗体或其片段、双亲和力重定向抗体(DART)或Trident技术。BSMab的代表性示例包括BiTE,其被广泛描述为能够结合两个不同抗原决定簇或靶标的双特异性单克隆抗体。传统上,BiTE由两个scFv分子组成,其中第一scFv能够识别多克隆免疫细胞(例如CD8<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>T细胞或NK细胞),而第二scFv能够识别肿瘤抗原靶标或TAA。这通常是通过使第一scFv识别T细胞(或NK细胞)表面上的CD3而使第二scFv识别TAA(例如CD20)来实现的。

[0202] 在一个方面,BiTE将包括对CD3具有特异性的scFv,而第二scFv可以对血液肿瘤和实体肿瘤表面上发现的多种TAA具有特异性。在一个实施方式中,对CD3具有特异性的第一scFv可以与对以下具有特异性的第二scFv组合:EGFR、VEGFR1、VEGFR2、EGP-2、EGP-4、OEPHa2、ErbB2、3或4、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA和乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原(PSA)、PSMA、Her2/neu、HER3、雌激素受体、孕酮受体、ephrinB2、CD123、CS-1、c-Met、GD-2和MAGE A3、CD3、CD4、CD5、CD7、CD23、CD24、CD30、CD33、CD34、CD38、CD40、CD44、CD52、CD56、CD70、CD79B、CD117、CD123、CD138、CD147、BCMA、CLL01、LMP-1、SLAMF7、NY-ESO-1、TCAI、CS-1、CCR4、ROR1、tEGFR、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、B7-H3、PD-1、PD-L1、EpCAM、PSCA、GPC3、AXL、Claudin 18.2、CTLA-4、CEA、PSA、MART-1、gp100、癌胚抗原、ROR1、TAG72、FBP、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- $\alpha$ 、IL-13R- $\alpha$ 2、kdr、 $\kappa$ 轻链、Lewis Y、L1细胞粘附分子、MAGE-AL间皮素、CE7、Wilms肿瘤1(WT-1)或细胞周期蛋白。在一个方面,BSMab(更具体地说是BiTE)将对TAA具有一种特异性,而diakine将对不同的TAA具有特异性。例如,BiTE可以是对CD3和CD20具有特异性的BSMab,而diakine为DK2<sup>10</sup>形式,且具有对CD19具有特异性的VH和VL scFv。

[0203] 联合使用Diakine与ACT或BiTE的治疗和/或预防方法

[0204] 不受任何特定理论的束缚,发明人认为,将IL-10和IL-2同时靶向肿瘤血管,例如通过将Diakine靶向VEGFR2,将允许实现激活、浸润和持久性,同时通过肿瘤特异性激活CAR-T细胞以及通过DV07(IL-10的高亲和力形式)直接抑制细胞因子释放综合征和IL-2毒性来限制毒性。发明人还认为,使用Dvegfr2DV07中融合蛋白的单细胞因子版本将IL-10单独靶向肿瘤血管,如美国专利10,858,412中所述(另见图1的代表性示例结构),也将有效地

肿瘤特异性激活CAR-T细胞。在另一个实施方案中,基于类似的理论,diakine包含IL-10和IL-7、或IL-12和IL-10、或IL-10和IL-15、或IL-10和IFN- $\alpha$ 、或IL-10和IL-21、或IL-10和IL-27的组合。在另一个理论中,发明人认为DK2<sup>10</sup>形式的diakine能够引发免疫系统以增强或加强常规ACT或BiTE疗法的功能。

[0205] 因此,在一个方面,本公开涉及治疗和/或预防恶性疾病或病症或癌症的方法,包括向有需要的受试者组合施用治疗有效量的diakine或双细胞因子融合蛋白与ACT(例如CAR-T细胞或TCR-T细胞)或BSMab(例如BiTE),其中所述diakine或双细胞因子融合蛋白包含IL-10、IL-12或IL-27和第二细胞因子。如上所述,这种双细胞因子融合蛋白可以优选为DK2<sup>10</sup>、DK7<sup>10</sup>、DK12<sup>10</sup>、DK15<sup>10</sup>、DKIFNa<sup>10</sup>、DK21<sup>10</sup>或DK27<sup>10</sup>形式,具有DV07单体并且植入来自靶向肿瘤相关抗原(“TAA”)的任何抗体的CDR。在一个优选实施方案中,双细胞因子融合蛋白为包含DV07的DK2<sup>10</sup>形式。本领域技术人员能够理解,本文所述的diakine或双细胞因子融合蛋白的剂量可以根据需要或取决于期望的结果进行调整。在一个方面,diakine以约0.001至0.25mg/kg的剂量施用于有需要的患者,优选剂量0.01至0.2mg/kg。在另一个方面,施用于有需要的患者的剂量足以实现0.0005至250ng/mL的血清或血浆浓度,优选在0.001至200ng/mL的范围内。

[0206] 本领域技术人员将认识到,过继细胞疗法(例如过继T细胞疗法)是已知的,并且可以根据先前描述的程序进行。参见例如美国专利号4,690,915。这些方法可以包括自体转移(即,来源于患者)或同种异体转移(即,来源于待治疗患者之外的另一受试者)。

[0207] CAR-T或TCR-T细胞可以采用熟知适应性细胞疗法的技术人员已知和常规使用的方法来施用。在一个实施方案中,施用方法包括但不限于推注(bolus infusion)、静脉或皮下注射、眼内注射、眼周注射、视网膜下注射、玻璃体内注射、经隔膜注射、巩膜下注射、脉络膜内注射、前房内注射(intracameral injection)、subconjunctival注射、结膜下注射、Tenon膜下注射、眼球后注射、眼球周注射或近巩膜后(posterior juxtасlеral)递送。在一些实施方案中,通过肠胃外、肺内和鼻内、或病灶内或肿瘤内施用来施用。胃肠外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。在某些实施方案中,重组工程化CAR-T或TCR-T以单次推注给药、多次推注或连续输注的方式给药。

[0208] 在一个实施方式中,双细胞因子融合蛋白和CAR-T在分开的相继时间段内施用,其中,例如,在施用重组工程化CAR-T细胞之前施用diakine(例如DK2<sup>10</sup>vegfr2)。在其他实施方式中,同时施用双细胞因子融合蛋白和CAR-T。在其他实施方式中,diakine在CAR-T治疗前1-3天施用,然后与CAR-T同时施用,和/或在CAR-T施用后1-7天施用。diakine可以每天或每周一次、或每周2-3次,与CAR-T组合或结合施用。在另一个方面,在施用之前,diakine在CAR-T细胞的扩增和/或解冻过程中使用。从冷冻保存的原液重构CAR-T细胞后,CAR-T典型地在有益CAR-T的细胞因子(例如,低剂量IL-2)的存在下静置。在一个方面,CAR-T细胞可以在diakine的存在下从冷冻保存的原液进行引发或扩增。在一个方面,在0.001至300ng/mL diakine存在下,更优选地在0.01至200ng/mL diakine存在下,扩增或引发CAR-T。

[0209] 同样地,diakine和BiTE可以在分开的相继时间段内施用,其中diakine(例如,DK2<sup>10</sup>CD20)在施用BiTE(例如,CD3xCD19 BiTE)之前1-3天施用。在其他实施方案中,diakine在BiTE前1-3天施用,然后与BiTE同时施用,和/或在BiTE施用后1-7天施用。diakine可以每天或每周一次、或每周2-3次,与BiTE组合或结合施用。

[0210] 在其他实施方案中,本公开还考虑,与第三治疗剂(例如细胞因子、类固醇、化疗剂、抗生素、抗炎剂或放射线)共施用或治疗的方法,这些第三治疗剂是本领域熟知的。这些可以包括与其他治疗剂,例如但不限于以下一种或多种的联合治疗:化疗剂、干扰素- $\beta$ ,例如IFN $\beta$ -1 $\alpha$ 和IFN- $\beta$ -1 $\beta$ ;模拟髓鞘碱性蛋白的蛋白质;皮质类固醇;IL-1抑制剂;TNF抑制剂;抗TNF $\alpha$ 抗体、抗IL-6抗体、IL-1 $\beta$ -Ig融合、抗IL-23抗体、抗CD40配体和CD80抗体;IL-12和IL-23拮抗剂,例如IL-12和IL-23的p40亚基拮抗剂(例如针对p40亚基的抑制性抗体);IL-22拮抗剂;小分子抑制剂,例如甲氨蝶呤、来氟米特、西罗莫司(雷帕霉素)及其类似物,例如CCI-779;Cox-2和cPLA2抑制剂;NSAID;p38抑制剂;TPL-2;Mk-2;NF $\kappa$ B抑制剂;RAGE或可溶性RAGE;P-选择素或PSGL-1抑制剂(例如小分子抑制剂、其抗体,例如P-选择素抗体);雌激素受体 $\beta$ (ERB)激动剂或ERB-NF $\kappa$ B拮抗剂。

[0211] 另外,用于与双细胞因子融合蛋白一起施用的联合治疗可以包括TNF抑制剂,包括例如与TNF结合的嵌合、人源化、有效人源、人源或体外产生的抗体或其抗原结合片段;TNF受体的可溶性片段,例如p55或p75人TNF受体或其衍生物,例如75kd TNFR-IgG(75kd TNF受体-IgG融合蛋白,ENBREL™)、p55kd TNF受体-IgG融合蛋白;和TNF酶拮抗剂,例如TNF $\alpha$ 转换酶(TACE)抑制剂。与抗炎剂/药物的其他联合治疗包括但不限于标准非甾体抗炎药(NSAID)和环加氧酶-2抑制剂。NSAID可以包括阿司匹林(aspirin)、塞来昔布(celecoxib)、双氯芬酸(diclofenac)、二氟尼柳(diflunisal)、依托度酸(etodolac)、布洛芬(ibuprofen)、吲哚美辛(indomethacin)、酮洛芬(ketoprofen)、酮咯酸(ketorolac)、萘丁美酮(nabumetone)、萘普生(naproxen)、奥沙普秦(oxaprozin)、吡罗昔康(piroxicam)、双水杨酸(salsalate)、舒林酸(sulindac)和/或托美丁(tolmetin)。根据本申请的组合物中使用的环加氧酶-2抑制剂可以是例如塞来昔布或罗非昔布(rofecoxib)。

[0212] 可以与双细胞因子融合蛋白共同施用和/或共同配制的其它治疗剂包括以下一种或多种:干扰素- $\beta$ ,例如IFN $\beta$ -1 $\alpha$ 和IFN $\beta$ -1 $\beta$ ;COPAXONE®;皮质类固醇;IL-1抑制剂;TNF拮抗剂(例如,TNF受体的可溶性片段,例如,p55或p75人TNF受体或其衍生物,例如,75kdTNFR-IgG;CD40配体和CD80的抗体;以及IL-12和/或IL-23的拮抗剂,例如,IL-12和IL-23的p40亚基的拮抗剂(例如,与IL-12和IL-23的p40亚基结合的抑制性抗体);甲氨蝶呤(methotrexate)、来氟米特(leflunomide)和西罗莫司(sirolimus)(雷帕霉素)或其类似物,例如,CCI-779。其他治疗剂可以包括Imfimzi或Atezolizumb。

[0213] 可以与本文描述的双细胞因子融合蛋白共施用的代表性化疗剂可以包括以下非详尽列表:烷化剂类,例如噻替派(thiotepa)和环磷酰胺(cyclophosphamide,CYTOXAN™);烷基磺酸盐类,例如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶类(aziridines),例如苯佐替哌(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替哌(uredopa);乙烯亚胺类(ethylenimines)和甲基蜜胺类(methylamelamines),包括六甲蜜胺(altretamine)、三乙烯三聚氰胺(triethylenemelamine)、三乙烯磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、三乙烯硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamine);氮芥类(nitrogen mustards),例如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、氯萘啉(chloronaphazine)、氯磷酰胺(chlorophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、盐酸氧化氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法

仑(melphalan)、新恩比兴(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷酰胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard);亚硝基脲类(nitrosureas),例如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)、雷莫司汀(ranimustine);抗生素(antibiotics),如阿克拉霉素(aclacinomysins)、放线菌素(actinomycin)、金霉素(authramycin)、重氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycins)、放线菌素c(cactinomycin)、卡奇霉素(calicheamicin)、卡比星(carabycin)、洋红霉素(carminomycin)、carzinophilin、色霉素(chromomycins)、放线菌素D(dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸(6-diazo-5-oxo-L-norleucine)、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、marcellomycin、丝裂霉素(mitomycins)、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺拉霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycins)、培洛霉素(peplomycin)、potfiromycin、嘌呤霉素(puromycin)、quelamycin、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素(streptonigrin)、链脲佐菌素(streptozocin)、结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、齐诺他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin);抗代谢药(anti-metabolites),例如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,例如denopterin、甲氨蝶呤(methotrexate)、蝶罗呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate);嘌呤类似物(purine analogs),例如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤(6-mercaptopurine)、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤(thioguanine);嘧啶类似物,例如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮扎尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)、5-FU;雄激素类,例如卡鲁睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitio stanol)、美比司坦(mepitio stanol)、睾内酯(testolactone);抗肾上腺素药(anti-adrenals),例如氨基鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane);叶酸补充剂(folic acid replenisher),例如frolinic acid;醋葡萄糖内酯(aceglatone);醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside);氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid);安吡啶(amsacrine);bestrabucil;比生群(bisantrene);依达曲沙(edatraxate);defofamine;秋水仙胺(demecolcine);亚丝醌(diaziquone);依氟鸟氨酸(elfornithine);依利醋铵(elliptinium acetate);依托格鲁(etoglucid);硝酸镓(gallium nitrate);羟基脲(hydroxyurea);香菇多糖(lentinan);氯尼达明(lonidamine);米托胍脲(mitoguanzone);米托蒽醌(mitoxantrone);莫哌达醇(mopidamol);二胺硝吡啶(nitracrine);喷司他丁(pentostatin);苯来美特(phenamet);吡柔比星(pirarubicin);鬼臼酸(podophyllinic acid);2-乙基酰肼(2-ethylhydrazide);丙卡巴肼(procarbazine);PSK®;雷佐生(razoxane);西佐喃(sizofiran);锗螺胺(spirogermanium);细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid);三亚胺醌(triaziquone);2,2',2''-三氯三乙胺;乌拉坦(urethan);长春地辛(vindesine);达卡巴嗪(dacarbazine);甘露莫司汀(mannomustine);二溴甘露醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);哌泊溴烷(pipobroman);gacytosine;阿糖胞苷(Ara-C);环磷酰胺;噻替派;

紫杉醇类 (taxoids), 例如紫杉醇 (paclitaxel, TAXOL® Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) 和多西他赛 (Taxotere™, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, 法国); 苯丁酸氮芥 (chlorambucil); 吉西他滨 (gemcitabine); 6-硫鸟嘌呤 (6-thioguanine); 巯基嘌呤 (mercaptopurine); 甲氨蝶呤 (methotrexate); 铂类似物例如顺铂和卡铂; 长春花碱 (vinblastine); 铂; 依托泊苷 (etoposide, VP-16); 异环磷酰胺 (ifosfamide); 丝裂霉素C (mitomycin C); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 长春新碱 (vincristine); 长春瑞滨 (vinorelbine); 去甲长春花碱 (navelbine); 二羟基蒽醌 (novantrone); 替尼泊苷 (teniposide); 柔红霉素 (daunomycin); 氨基蝶呤 (aminopterin); Xeloda® Roche, 瑞士; 伊班膦酸盐 (ibandronate); CPT11; 拓扑异构酶抑制剂 RFS2000; 二氟甲基鸟氨酸 (DMFO); 维甲酸 (retinoic acid); 埃斯培霉素 (esperamicins); 卡培他滨 (capecitabine); 以及上述任何药物的药学上可接受的盐、酸或衍生物。该定义还包括用于调节或抑制激素对肿瘤作用的抗激素药物, 例如抗雌激素药, 包括例如他莫昔芬 (tamoxifen)、雷洛昔芬 (raloxifene)、芳香酶抑制4(5)-咪唑类、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬 (trioxifene)、keoxifene、LY117018、奥那司酮 (onapristone) 和托瑞米芬 (toremifene, Fareston); 以及抗雄激素药, 例如氟他胺 (flutamide)、尼鲁米特 (nilutamide)、比卡鲁胺 (bicalutamide)、亮丙瑞林 (leuprolide) 和戈舍瑞林 (goserelin); 以及上述任何药物的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0214] 实施例1: Diakine和CAR-T的组合

[0215] 检查CAR-T与肿瘤细胞的各种效靶 (E:T) 比, 以确定将Diakine与CAR-T组合是否会增强CAR-T的细胞毒性作用。简而言之, 在0、10或100ng/mL的Diakine (DK2<sup>10</sup>CD19) 存在下, 对CAR-T细胞 (Promab) 进行1-3天的引发。使用稳定转染了组成型表达GFP的Raji细胞作为模型肿瘤细胞系来检查CAR-T功能。引发后, 将CAR-T细胞以3比1或1比3的E:T比混合, 并允许其与Raji-GFP细胞相互作用, 并在IncuCyte S3系统 (Sartorius) 上进行监测。CAR-T细胞的细胞溶解效果, 通过大约48小时内GFP的消失来测量。

[0216] 测量随时间的肿瘤细胞生长百分比 (即, GFP的消失是靶细胞被细胞溶解的量度)。24小时后, 与单独的CAR-T细胞相比, 按照CD20 CAR-T细胞与Raji细胞的效靶比为3:1, 组合使用diakine (10ng/mL或100ng/mL), 表现出肿瘤细胞生长减少约6.5倍。参见图9A。类似地, 在24小时, 按照CD20 CAR-T细胞与Raji细胞的效靶比为1:3, 组合使用diakine (10ng/mL或100ng/mL), 表现出肿瘤细胞生长减少约2倍。参见图10B。这些数据表明, 在施用前使用diakine来引发CAR-T细胞时, CAR-T具有增强的、更有效的细胞毒性功能。

[0217] 实施例2: 用Diakine联合CAR-T治疗实体瘤

[0218] 在这种癌症治疗方法中, 向受试者施用有效量的diakine (例如, DK2<sup>10</sup>vegfr2), 其能够将IL-10和IL-2靶向过度表达TAA (例如VEGFR2) 的肿瘤微环境。随后, 使用过继细胞疗法的标准方案, 施用表达EARD的CAR-T细胞, 该EARD靶向肿瘤细胞上过度表达的抗原, 例如her2/neu或PSA。在向患者施用之前, 可选地在diakine存在下, 扩增CAR-T细胞。在制备工程化细胞时, 选择CAR, 使得其EARD特异性地结合待治疗的肿瘤的特异性抗原表位。

[0219] 实施例3: Diakine和BiTE的组合

[0220] 启动测定Diakine是否对当前的BiTE疗法有益的根据原因, 来源于对Diakine在暴露于PBMC后的行为方式的了解。使用模型系统确定T细胞反应 (参见美国专利10,858,412,

第29-30栏),将PBMC暴露于不同浓度的Diakine(0ng/mL至10ug/mL的DK2<sup>10</sup>egfr),然后检查细胞因子诱导情况。图5A-5F分别提供了针对IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12p70, IFN $\alpha$ 2a和IL6的幼稚PBMC细胞因子反应曲线;图6A-6D分别提供了针对IL-4、IL-17、IL-8和GM-CSF的幼稚PBMC细胞因子反应曲线。这些数据表明,配置为DK2<sup>10</sup>的diakine(将IL-10(DV07)和IL-2结合在一起)显著抑制了与IL-2单独相关的细胞因子诱导,从而为能够增强细胞毒性功能但不等地增加炎症细胞因子爆发的分子提供了道路。

[0221] 接下来,评估了CD8+T细胞对diakine(DK2<sup>10</sup>)引发的反应。简而言之,磁性分选CD8+T细胞,并用抗CD3/抗CD28激活3天。激活后,允许CD8+T细胞静息和在diakine存在下引发24、48和72小时。在静息和引发期(即24、48或72小时)之后,评估抗CD3刺激期4、20、48和72小时后颗粒酶B、IFN- $\gamma$ 和TNF- $\beta$ 的水平。用低至1ng/mL的DK2<sup>10</sup>形式的diakine引发CD8+T细胞,结果显示颗粒酶B水平升高(图7),同时IFN- $\gamma$ 水平也升高(图8),而TNF- $\beta$ 水平(图9)受到抑制。总之,这些数据表明,当用DK2<sup>10</sup>形式的diakine引发细胞毒性T细胞时,炎症细胞因子的诱导被相对地抑制,而一旦受到刺激,CD8+T细胞可以对靶标产生强效活性。

[0222] 利用上述原理,分别测试了市售的BiTE,抗CD3x抗CD19和抗CD3x抗CD20,与diakine DK2<sup>10</sup>egfr和DK2<sup>10</sup>CD19的组合。简而言之,评估了从健康供体中新分离的CD8+T细胞对稳定转染了组成型表达GFP的Raji细胞的细胞溶解能力。先前确定了Raji细胞表面表达EGFR、CD19和CD20(如FACS所示,数据未显示)。在0至100ng/mL diakine(DK2<sup>10</sup>egfr和DK2<sup>10</sup>CD19)存在下,对CD8+T细胞进行1-2天引发。通过大约48小时内GFP的消失,在IncuCyte S3系统(Sartorius)上测量和监测BiTE溶解Raji细胞的有效性。同时,评估IFN- $\gamma$ 、TNF- $\beta$ 、颗粒酶B和穿孔素的分析物水平,这些是对细胞毒性功能重要的细胞因子、蛋白酶和蛋白质。

[0223] 图11E-11F提供了,在48小时时间点,对DK2<sup>10</sup>egfr形式的diakine与最低功能性CD3xCD19 BiTE浓度(0.01ng/mL)组合的评估。图12E-12F提供了,在48小时时间点,对DK2<sup>10</sup>CD19形式的diakine与最低功能性CD3xCD20 BiTE浓度(0.1ng/mL)组合的评估。这些数据表明,将diakine(DK2<sup>10</sup>egfr或DK2<sup>10</sup>CD19)分别与BiTE(CD3xCD19或CD3xCD20)组合,可显著增强安全性(即降低炎性细胞因子诱导,或增强细胞溶解功能)(见图11A-D和12A-12D)。

[0224] 还使用上述相同的测定法,评估了与BiTE组合的包含IL-7和IL-10(DK7<sup>10</sup>)或IL12和IL-10(DK12<sup>10</sup>)的其他diakine。参见图13和14。这些数据表明,将不同类的diakine与BiTE组合可有效增强细胞溶解功能。

[0225] 实施例4:用Diakine联合BiTE治疗肿瘤

[0226] 在该癌症治疗方法中,在施用BiTE前1-3天,向受试者施用有效量的DK2<sup>10</sup>形式的Diakine,所述Diakine能够将IL-10和IL-2靶向过度表达TAA的血液肿瘤或肿瘤微环境。随后,使用与BiTE施用相关的标准方案,将Diakine与BiTE同时施用给有需要的患者。

[0227] 本说明书使用实施例来公开本公开的方面,包括优选实施方案,并且还使本领域技术人员能够实践其方面,包括制造和使用任何设备或系统以及执行任何合并的方法。这些方面的可专利范围由权利要求定义,并且可以包括本领域技术人员想到的其他示例。如果这些其他示例具有与权利要求的字面语言无异的结构元素,或者包括与权利要求的字面语言无实质性差异的等效结构元素,则这些其他示例旨在属于权利要求的范围。本领域的普通技术人员可以混合和匹配所述各种实施例的方面以及每个此类方面的其他已知等效

物,以根据本申请的原理构建其他实施例和技术。

[0228] 参考文献

[0229] Assier,E. (2004) .NK Cells and Polymorphonuclear Neutrophils Are Both Critical for IL-2-Induced Pulmonary Vascular Leak Syndrome.Journal of Immunology.

[0230] Balce,D.R. (2011) .Alternative activation of macrophages by IL-4enhances the proteolytic capacity of their phagosomes through synergistic mechanisms.Blood.

[0231] Baluna,R. (1997) .Vascular leak syndrome a side effect of immunotherapy.Immunopharmacology.

[0232] Bentebibe,S.-E. (2019) .A First-in-Human Study and Biomarker Analysis of NKTR-214,a Novel IL2Raf Biased Cytokine,in Patients with Advanced or Metastatic Solid Tumors.Cancer Discovery.

[0233] Berman,R. (1996) .Systemic administration of cellular IL-10induces an effective specific and long lived immune response against established tumors in mice.Journal of Immunology.

[0234] Bianca Santomaso. (2019) .The Other Side of CAR T-Cell Therapy: Cytokine Release Syndrome,Neurologic Toxicity,and Financial Burden.ASCO Publications.

[0235] Bonifant,C.L. (2016) .Toxicity and management in CAR T-cell therapy.Molecular Therapy.

[0236] Buchbinder,E.I. (2019) .Therapy with high-dose Interleukin-2(HD IL-2) in metastatic melanoma and renal cell carcinoma following PD1 or PDL1 inhibition.Journal of Immunotherapy for Cancer.

[0237] Castellarin,M. (2018) .Driving cars to the clinic for solid tumors.Gene Therapy.

[0238] Chan,I.H. (2015) .The Potentiation of IFN $\gamma$  and Induction of Cytotoxic Proteins by Pegylated IL-10in Human CD8 T cells.Journal of Interferon and Cytokine Research.

[0239] Chen,X. (2018) .A novel human IL-2mteuin with minimal systemic toxicity exerts greater antitumor efficacy than wild-type IL-2.Cell Death and Disease.

[0240] Chinen,T. (2016) .An essential role for IL-2receptor in regulatory T cell function.Nature Immunology.

[0241] Christopher DeRenzo. (2019) .Genetic Modification Strategies to Enhance CART Cell Persistence for Patients With Solid Tumors.

[0242] Davis,I.D. (2009) .A Phase I and Pharmacokinetic Study of Subcutaneously-Administered Recombinant Human Interleukin-4(rhuIL-4) in Patients with Advanced Cancer.Growth Factors.

[0243] Emmerich,J. (2012) .IL-10Directly Activates and Expands Tumor-Resident

CD8<sup>+</sup>T Cells without De Novo Infiltration from Secondary Lymphoid Organs. *Cancer Research*, 3570-3581.

[0244] Fedorak, R. (2000). Recombinant Human Interleukin 10 in the Treatment of Patients with Mild to Moderately Active Crohn's Disease. *Gastroenterology*, 1473-1482.

[0245] Gooch, J.L. (1998). Interleukin 4 Inhibits Growth and Induces Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *Cancer Research*.

[0246] Greve, J.M. (2000). USA Patent No. 6028176.

[0247] Groux, H. (1998). Inhibitory and Stimulatory Effects of IL-10 on Human CD8<sup>+</sup>T cells. *The Journal of Immunology*.

[0248] Guan, H. (2007). Blockade of Hyaluronan Inhibits IL-2 Induced Vascular Leak Syndrome and Maintains Effectiveness of IL-2 Treatment in Metastatic Melanoma. *Journal of Immunology*.

[0249] Hart, P.H. (1989). Potential anti-inflammatory effects of interleukin 4: Suppression of human monocyte tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin 1, and prostaglandin E<sub>2</sub>. *PNAS*.

[0250] Hart, P.H. (1991). IL-4 suppresses IL-1, TNF- $\alpha$  and PGE<sub>2</sub> production by human peritoneal macrophages. *Immunology*.

[0251] Jafarzadeh, L. (2020). Prolonged Persistence of Chimeric Antigen Receptor CAR T Cell in Adoptive Cancer Immunotherapy Challenges and Ways Forward. *Frontiers in Immunology*.

[0252] Jiang, T. (2016). Role of IL-2 in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*.

[0253] Kirchner, G.I. (1998). Pharmacokinetics of human Interleukin-2 in advanced renal cell carcinoma patients following subcutaneous application. *British Journal Clinical Pharmacology*.

[0254] Lee, H.L. (2016). Tumor growth suppressive effect of IL-4 through p21-mediated activation of STAT6 in IL-4R $\alpha$  overexpressed melanoma models. *Oncotarget*.

[0255] Li, R. (2013). Expression of recombinant human IL-4 in *Pichia pastoris* and relationship between its glycosylation and biological function. *Protein Expression and Purification*.

[0256] Ma, S. (2019). Current Progress in CAR-T Cell Therapy for Solid Tumors. *International Journal of Biological Sciences*.

[0257] Malefyt, R.d. (1991). Interleukin 10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *JEM*.

[0258] Malefyt, R.d. (1991). Interleukin 10 Inhibits Cytokine Synthesis by Human Monocytes: An Autoregulatory Role of IL-10 Produced by Monocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 1209-1220.

[0259] McCauley, S. (2018). Pegilodecakin, a Pegylated Human IL-10 (AM0010),

Enhances the Cytotoxicity of CAR-T Cells in Vitro and In Vivo. Blood (p.703). American Society of Hematology.

[0260] McGuirk, P. (2000). A Regulatory Role for Interleukin 4 in Differential Inflammatory Responses in the Lung following Infection of Mice Primed with Th1- or Th2-Inducing Pertussis Vaccines. Infection and Immunity.

[0261] Moore, K. W. (2001). Interleukin 10 and the Interleukin 10 Receptor. Annual Reviews Immunology.

[0262] Mumm, J. (2011). IL-10 induces IFN $\gamma$ -Mediated Tumor Immunity. Cancer Cell.

[0263] Mumm, J. B. (2011). IL-10 Elicits IFN $\gamma$ -Dependent Tumor Immune Surveillance. Cancer Cell.

[0264] Naing, A. (2016). Safety, Antitumor Activity, and Immune Activation of Pegylated Recombinant Human Interleukin-10 (AM0010) in Patients With Advanced Solid Tumors. Journal of Clinical Oncology.

[0265] Naing, A. (2016). Safety, Antitumor Activity, and Immune Activation of Pegylated Recombinant Human Interleukin-10 (AM0010) in Patients With Advanced Solid Tumors. Journal of Clinical Oncology.

[0266] Naing, A. (2018). PEGylated IL-10 (Pegilodecakin) Induces Systemic Immune Activation, CD8+ T cell Invigoration and Polyclonal T cell Expansion in Cancer Patients. Cancer Cell.

[0267] Rodriguez-Garcia, A. (2020). CART Cells Hit the Tumor Microenvironment Strategies to Overcome Tumor Escape. Frontiers in Immunology.

[0268] Ross, S. H. (2018). Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. Annual Review Immunology.

[0269] Ryan, J. J. (1997). Interleukin-4 and its receptor: Essential mediators of the allergic response. The Journal of Allergy and Clinical Immunology.

[0270] Schreiber, S. (2000). Safety and Efficacy of Recombinant Human Interleukin 10 in Chronic Active Crohn's Disease. Gastroenterology, 1461-1472.

[0271] Scott, M. J. (2006). Interleukin-10 suppresses natural killer cell but not natural killer T cell activation during bacterial infection. Cytokine.

[0272] Sivakumar, P. V. (2013). Comparison of Vascular Leak Syndrome in Mice Treated with IL21 or IL2. Comparative Medicine.

[0273] Smith, N. R. (2010). Vascular Endothelial Growth Factor Receptors VEGFR2 and VEGFR-3 Are Localized Primarily to the Vasculature in Human Primary Solid Cancers. Human Cancer Biology.

[0274] Spigel, D. R. (2020). Randomized phase II study of pembrolizumab (P) alone versus pegilodecakin (PEG) in combination with P as first-line (1L) therapy in patients (pts) with stage IV non-small cell lung cancer (NSCLC) with high PD-L1 expression (CYPRESS 1). ASCO, (p.9563).

[0275] Steinke, J. W. (2001). Th2 cytokines and asthma Interleukin-4: its role in

the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respiratory Research*.

[0276] Tang, A. (2018). The challenges and molecular approaches surrounding interleukin-2-based therapeutics in cancer. *Cytokine*.

[0277] Varin, A. (2010). Alternative activation of macrophages by IL-4 impairs phagocytosis of pathogens but potentiates microbial-induced signalling and cytokine secretion. *Blood*.

[0278] Wagner, J. (2020). CAR T Cell Therapy for Solid Tumors: Bright Future or Dark Reality? *Molecular Therapy*.

[0279] Woodward, E. A. (2012). The anti-inflammatory actions of IL-4 in human monocytes are not mediated by IL-10, RP105 or the kinase activity of RIPK2. *Cytokine*.

[0280] Zou, F. (2019). Engineered triple inhibitory receptor resistance improves anti-tumor CAR-T cell performance via CD56. *Nature Communications*.

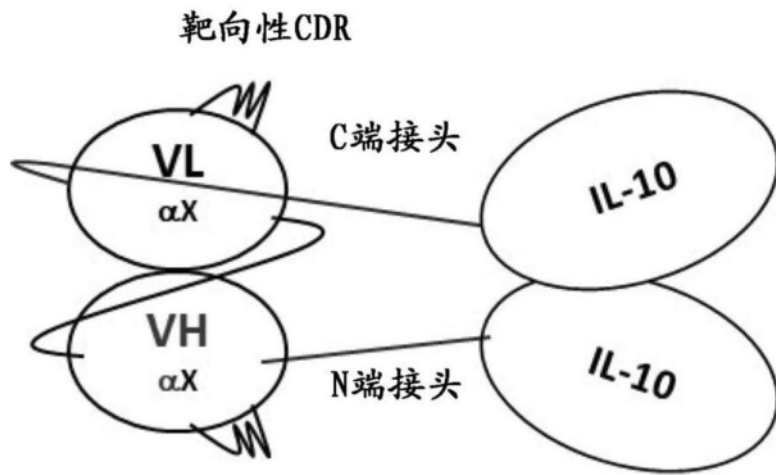


图1

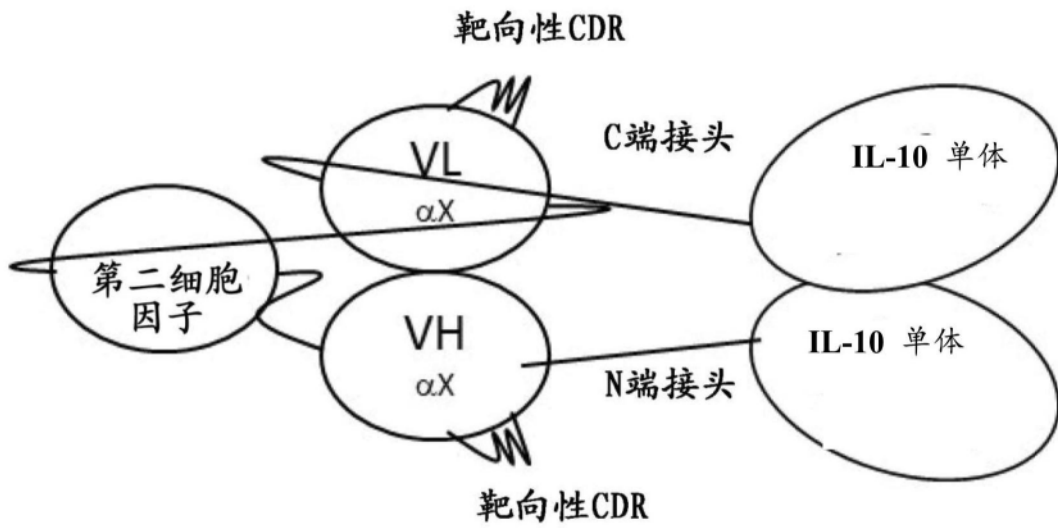


图2

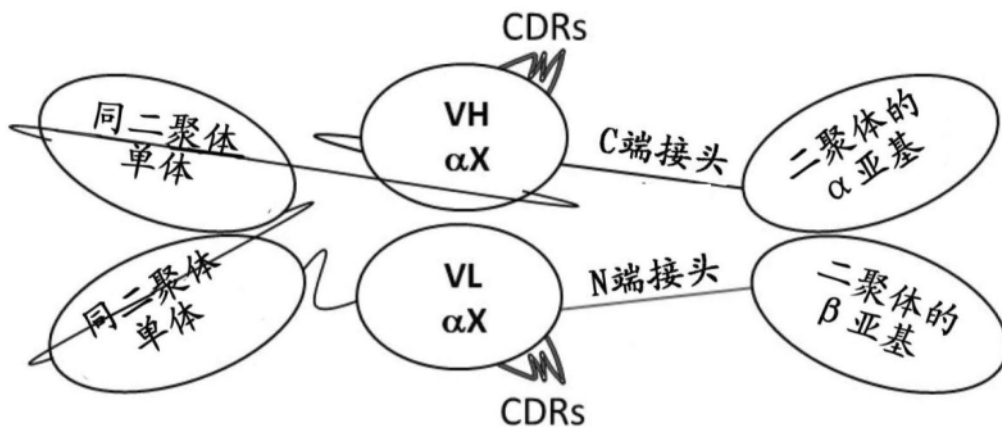


图3

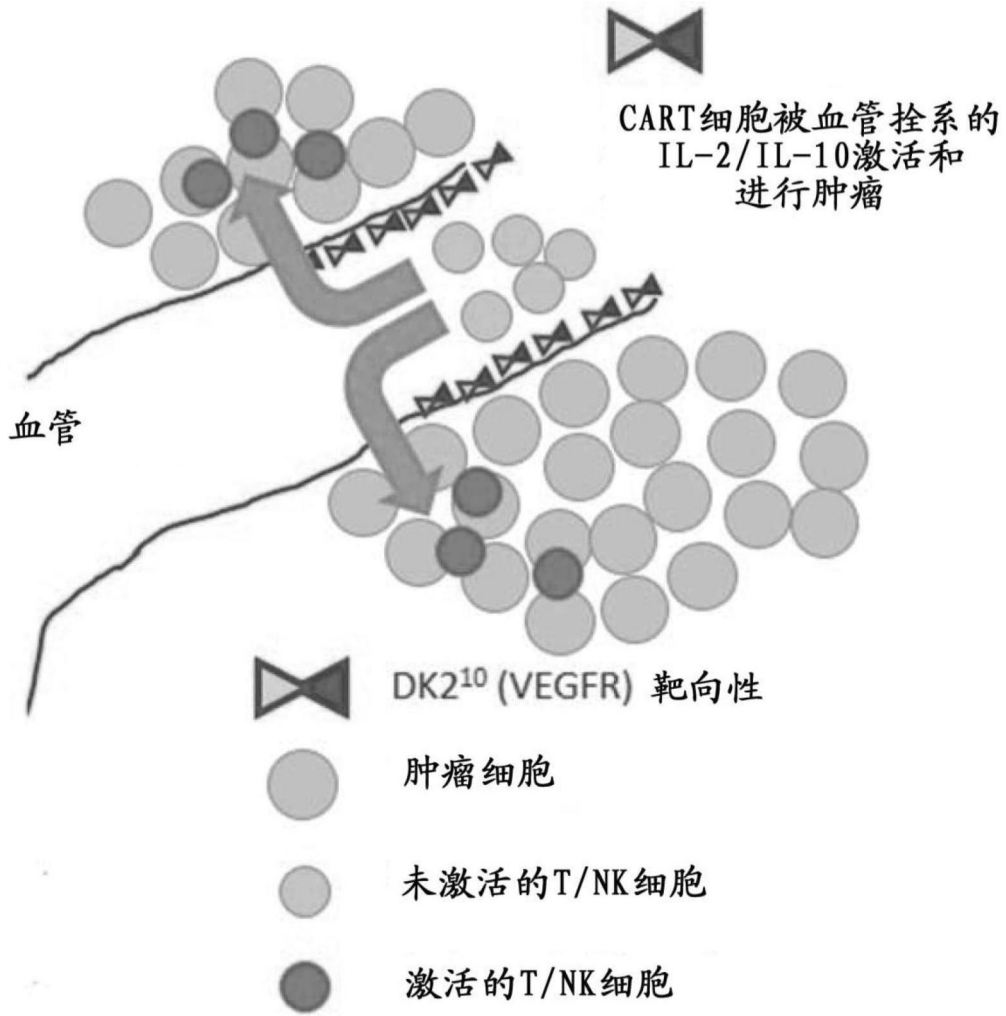


图4

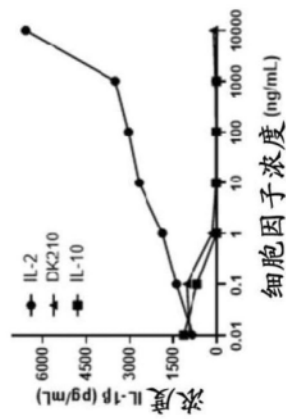


图5A

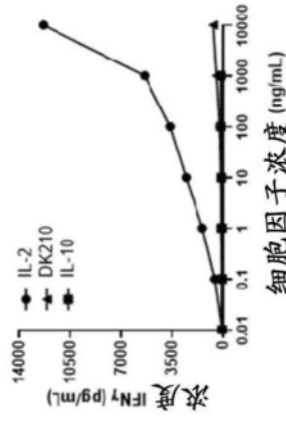


图5B

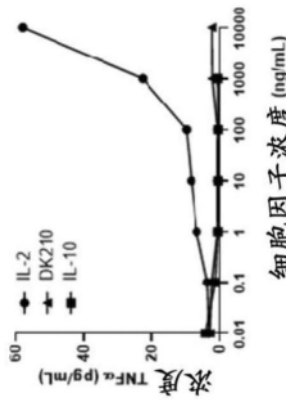


图5C

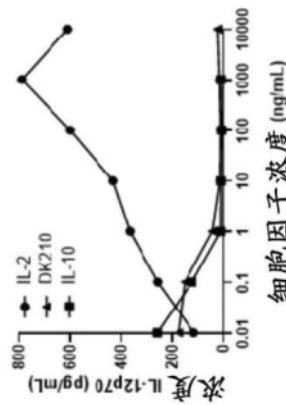


图5D

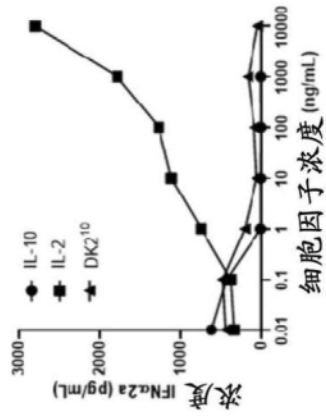


图5E

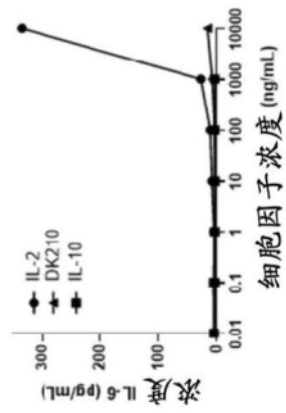


图5F

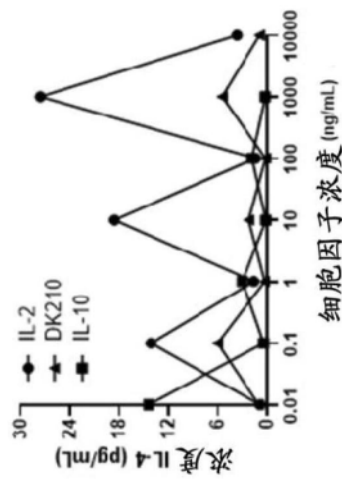


图6A

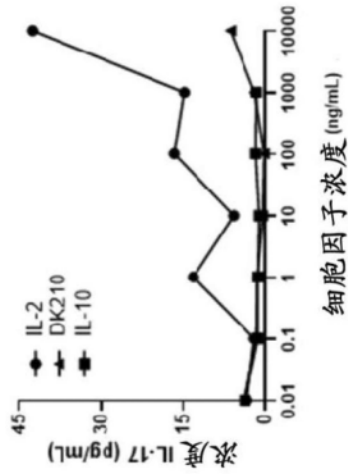


图6B

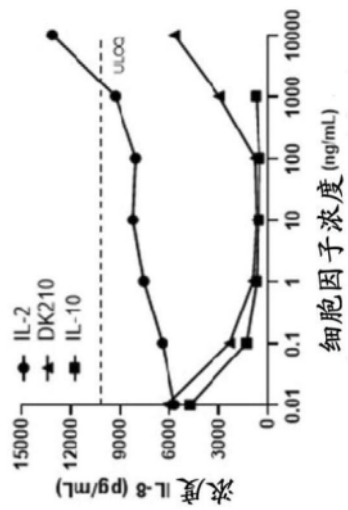


图6C

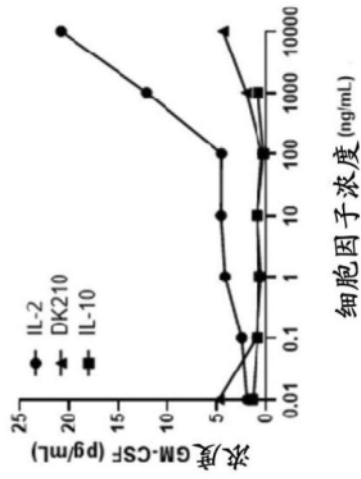


图6D

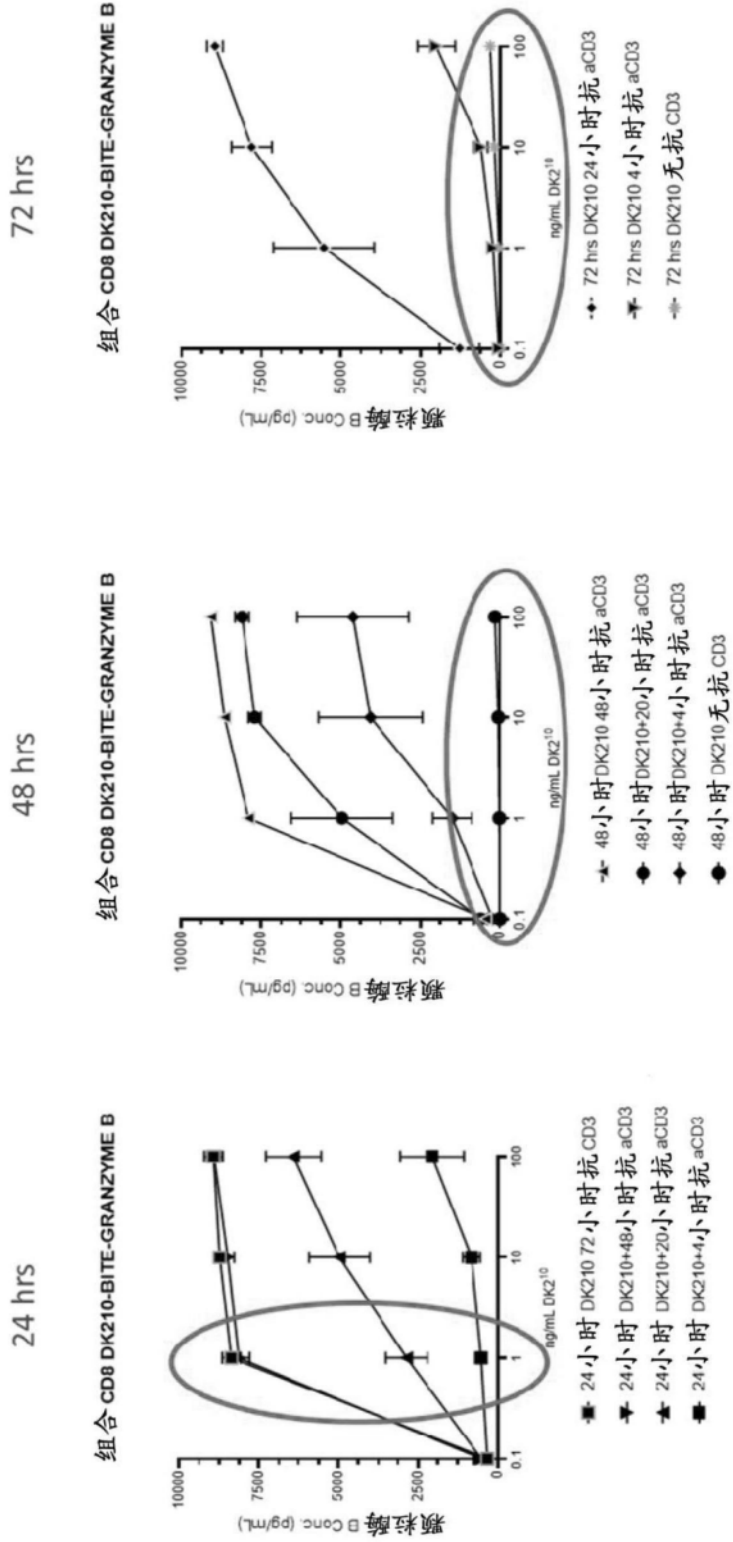


图7

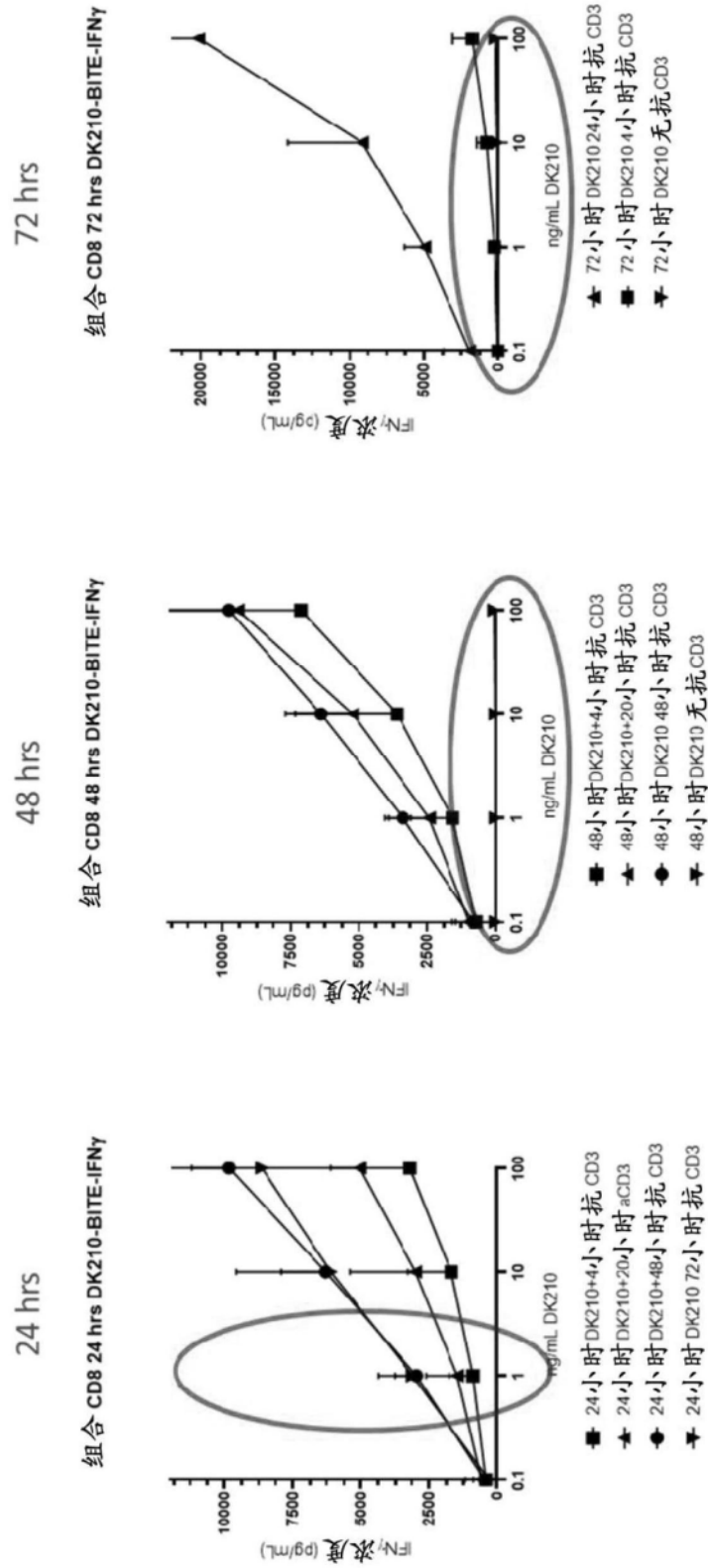


图8

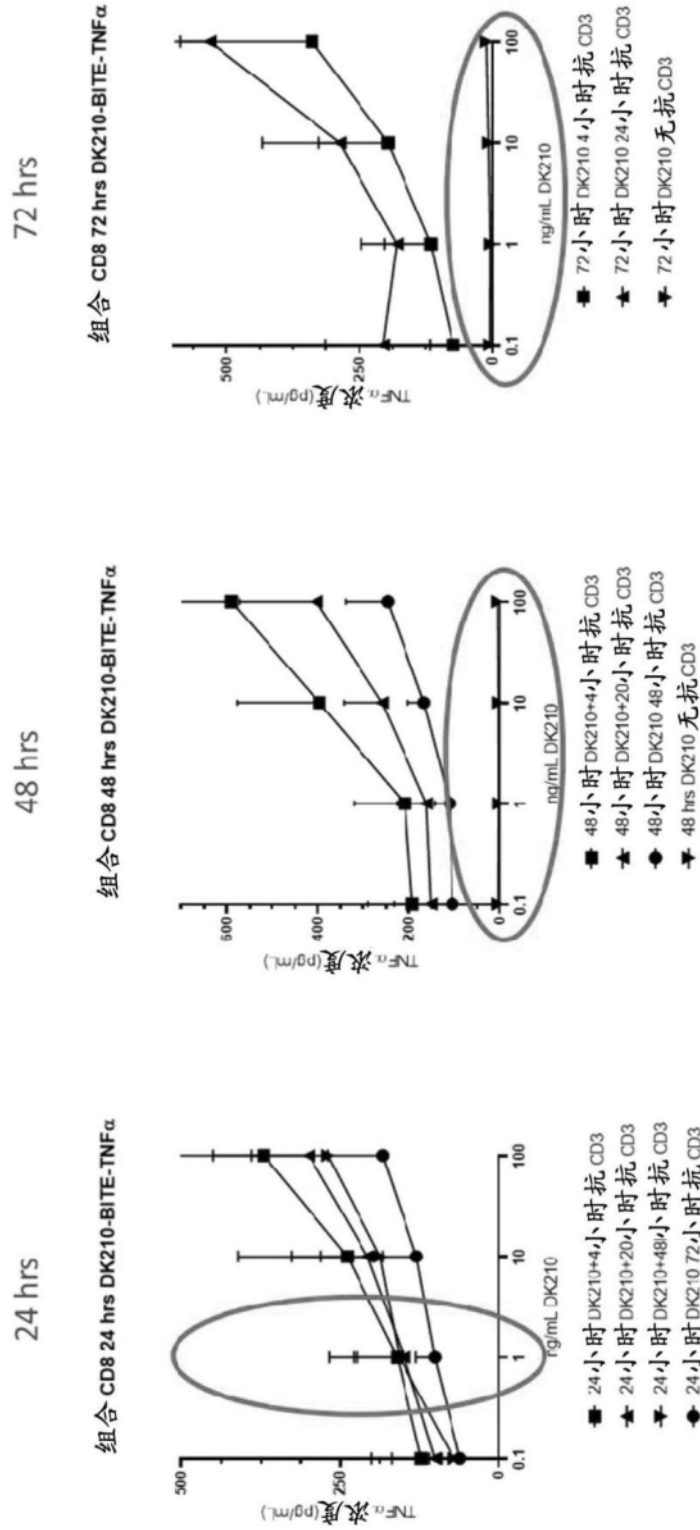


图9

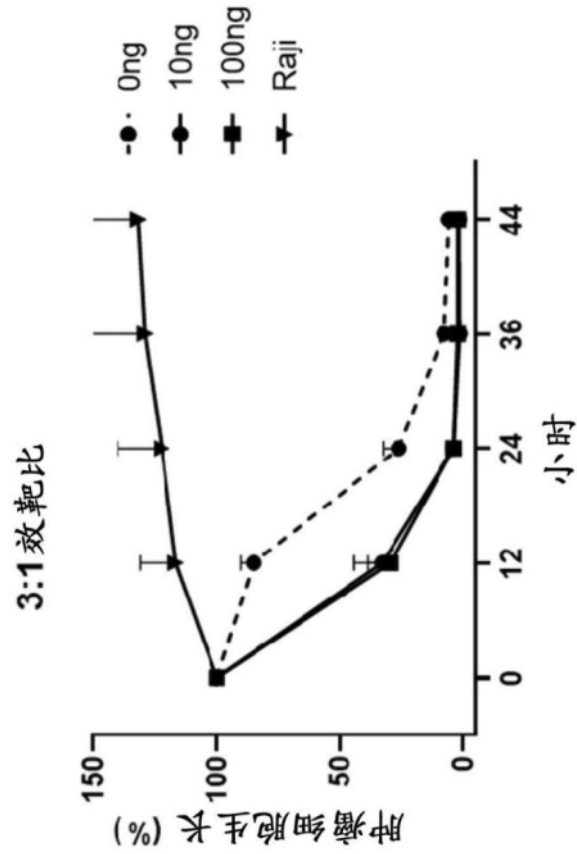


图10A

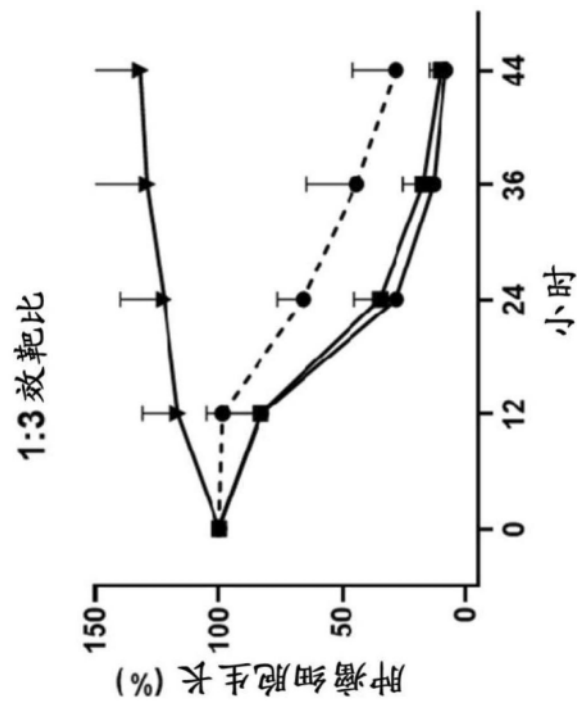


图10B

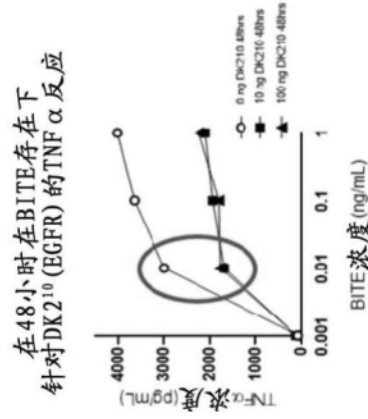


图11A

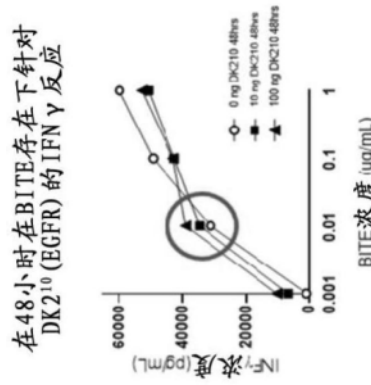


图11B

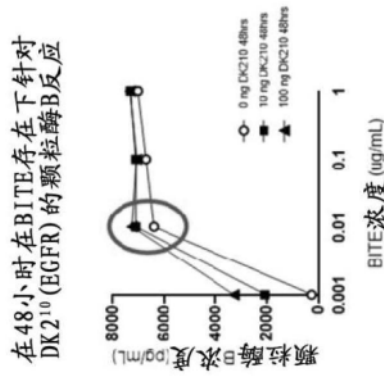


图11C

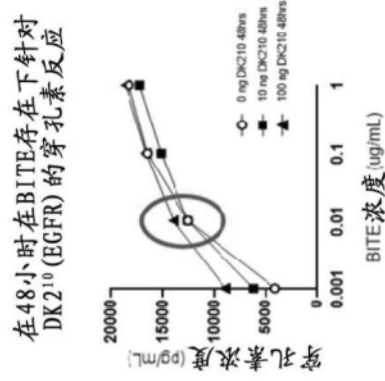


图11D

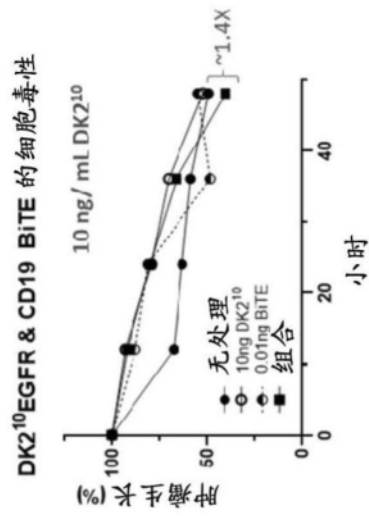


图11E

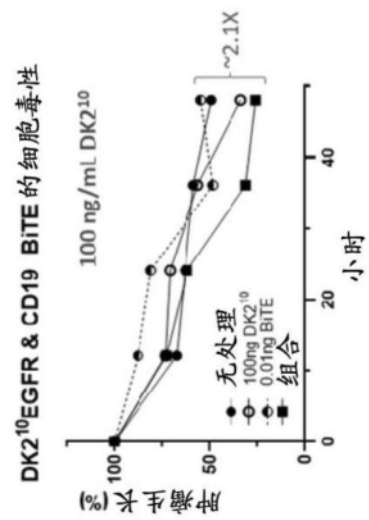


图11F

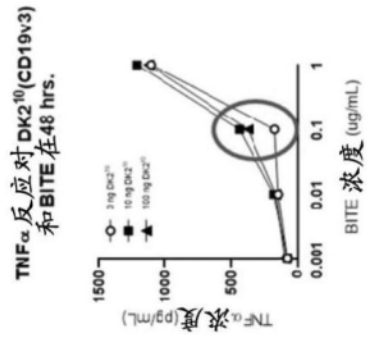


图12A

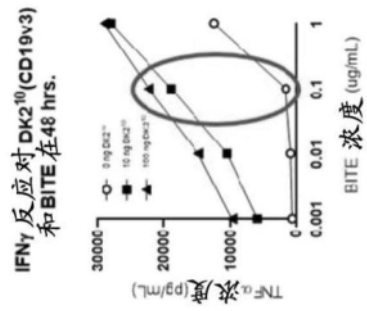


图12B

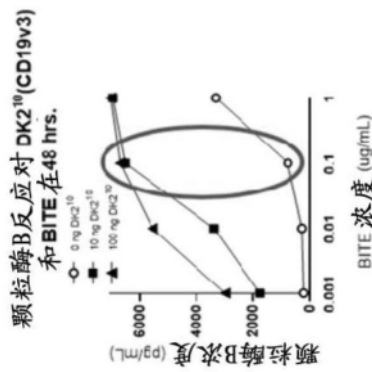


图12C

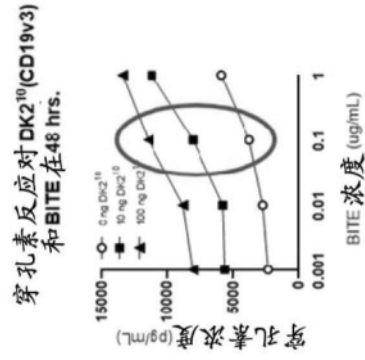


图12D

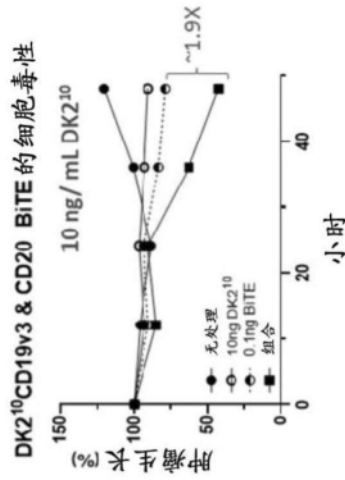


图12E

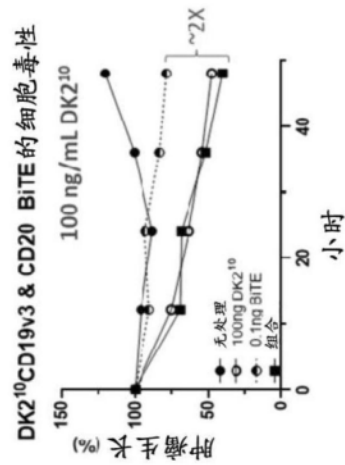


图12F

### DK7<sup>10</sup>EGFR & CD19xCD3 BiTE

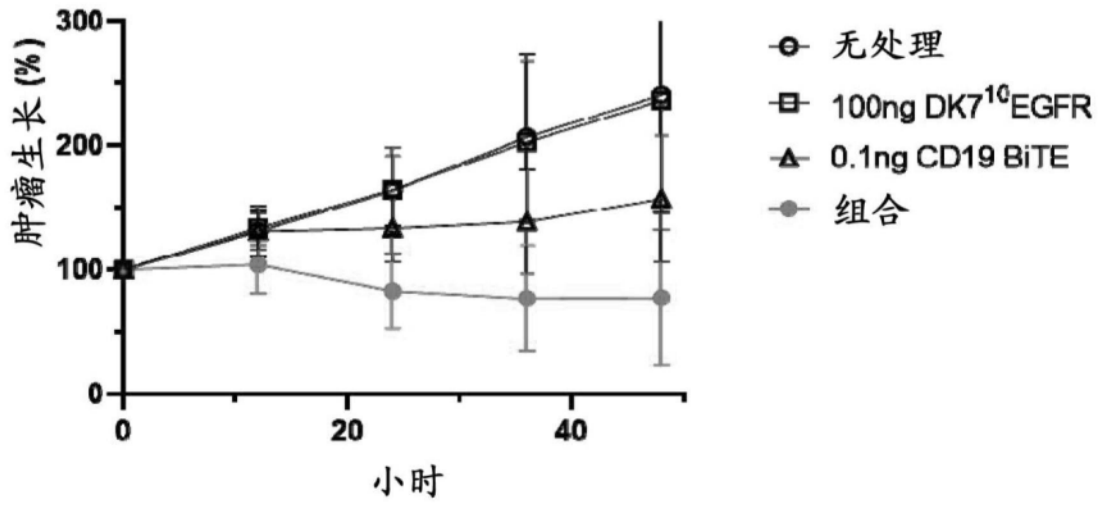


图13

### DK12<sup>10</sup>EGFR 和 CD19 BiTE

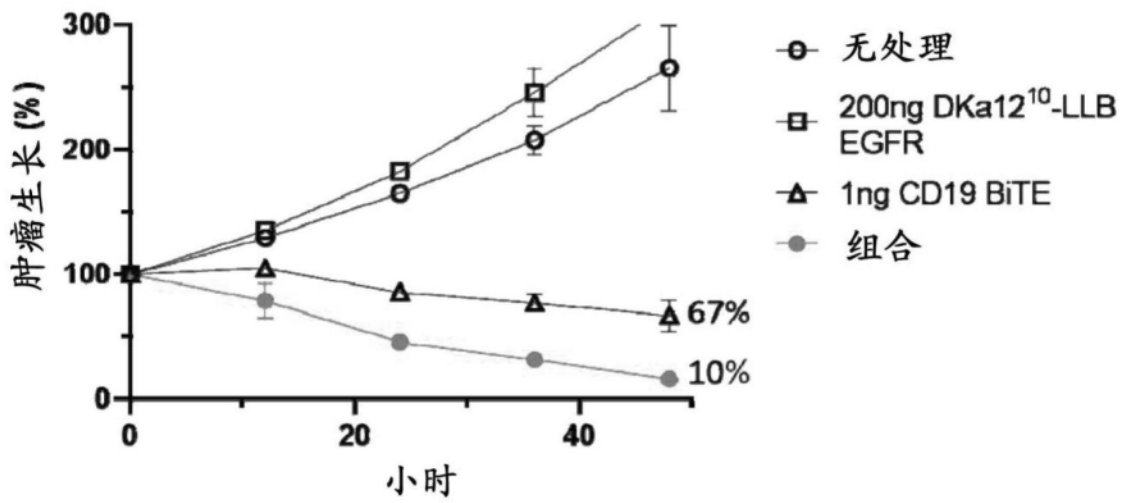


图14