



(43)申请公布日 2018.10.23

序列表11页 附图8页

Figure 1 is a bar chart titled "外周T细胞克隆增殖和抑制" (Proliferation and Inhibition of Peripheral T Cell Clones). The Y-axis is labeled "克隆数" (Number of Clones) and ranges from 1 to 1000 on a logarithmic scale. The X-axis shows treatment groups categorized by concentration (1, 2.5, 5, 10, 20, 30 μg/kg) and treatment type (Control, PD1 inhibitor). The legend indicates that black bars represent proliferation (增殖) and white bars represent inhibition (抑制). The chart shows that the PD1 inhibitor significantly increases proliferation across all concentrations compared to the control, while inhibition remains relatively low.

Concentration (μg/kg)	Treatment	Proliferation (增殖)	Inhibition (抑制)
1	Control	~7	~2
	PD1 inhibitor	~2	~2
2.5	Control	~15	~18
	PD1 inhibitor	~14	~8
5	Control	~6	~13
	PD1 inhibitor	~2	~2
10	Control	~6	~4
	PD1 inhibitor	~11	~12
20	Control	~19	~19
	PD1 inhibitor	~850	~19
30	Control	~20	~20
	PD1 inhibitor	~650	~20

Figure 1 caption: 图1 外周T细胞克隆增殖和抑制

1. 一种鉴定疾病抗原特异性T细胞的TCR的可变 α (V α) T细胞受体 (TCR) 多肽和/或可变 β (V β) TCR多肽的方法,所述方法包括:

向患有适于IL-10试剂疗法的疾病的受试者施用IL-10试剂;

对来自获自所述受试者的含有一个或多个CD8+T细胞的样品的核酸进行测序,其中所述测序包括对编码可变 α (V α) TCR多肽的核酸和/或编码可变 β (V β) TCR多肽的核酸进行测序;以及

将编码所述V α TCR多肽的所述核酸和/或编码所述V β TCR多肽的所述核酸的丰度与参考样品中编码所述V α TCR多肽的所述核酸和/或编码V β TCR多肽的核酸的丰度进行比较,所述参考样品在IL-10试剂疗法之前或在IL-10试剂疗法期间的较早时间点从患有所述适于IL-10试剂疗法的疾病的一名或多名患者获得;

其中以丰度大于所述参考样品中的丰度存在于所述样品中的所述V α 和/或V β TCR多肽表示对疾病抗原特异性CD8+T细胞特异的V α /V β TCR多肽对。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述受试者展现出至少稳定疾病或对IL-10试剂疗法的至少部分响应。

3. 如权利要求2所述的方法,其中所述受试者展现出对IL-10试剂疗法的至少部分响应。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述样品富集PD1+、CD8+T细胞。

5. 如权利要求4所述的方法,其中所述PD1+、CD8+T细胞以至少PD1+中等水平表达细胞表面PD1。

6. 如权利要求4所述的方法,其中所述PD1+、CD8+T细胞以至少PD1+高水平表达细胞表面PD1。

7. 如权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述样品富集CD45RO+、CD8+T细胞。

8. 如权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述样品富集IFN γ +、CD8+T细胞。

9. 如权利要求8所述的方法,其中所述方法包括使所述CD8+T细胞与CD3激动剂接触以刺激IFN γ 表达。

10. 如权利要求9所述的方法,其中所述CD3激动剂是抗CD3抗体。

11. 如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述样品富集为PD1+、IFN γ +、CD45RO+、粒酶B+和/或穿孔蛋白+的CD8+T细胞。

12. 如权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述一名或多名患者包括所述受试者。

13. 如权利要求1至12中任一项所述的方法,其中所述受试者患有肿瘤,并且所述CD8+T细胞对肿瘤抗原是特异的。

14. 如权利要求1至12中任一项所述的方法,其中所述受试者患有肿瘤,并且所述CD8+T细胞是肿瘤浸润淋巴细胞。

15. 如权利要求13或14所述的方法,其中所述肿瘤是实体肿瘤。

16. 如权利要求13或14所述的方法,其中所述肿瘤是选自以下癌症的肿瘤:子宫癌、子宫颈癌、乳腺癌、前列腺癌、睾丸癌、胃肠道癌、肾癌、肾细胞癌、膀胱癌、骨癌、骨髓癌、皮肤癌、头或颈癌、肝癌、胆囊癌、心脏癌症、肺癌、胰腺癌、唾液腺癌、肾上腺癌、甲状腺癌、脑癌、神经节癌、中枢神经系统 (CNS) 和周围神经系统 (PNS) 癌症、或造血系统、脾或胸腺的癌症。

17. 如权利要求13或14所述的方法,其中所述肿瘤是以下癌症的肿瘤:食管癌、口咽癌、胃癌、小肠癌、大肠癌、结肠癌或直肠癌。

18. 如权利要求13或14所述的方法,其中所述肿瘤是黑素瘤、结直肠癌或肾癌。

19. 如权利要求1至12中任一项所述的方法,其中所述受试者患有病毒感染,并且所述CD8+T细胞对感染病毒的抗原是特异的。

20. 如权利要求19所述的方法,其中所述病毒是嗜肝DNA病毒、黄病毒、逆转录病毒、疱疹病毒。

21. 如权利要求20所述的方法,其中所述病毒是乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、巨细胞病毒(CMV)或人免疫缺陷病毒(HIV)。

22. 如权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述IL-10试剂是人IL-10。

23. 如权利要求1至22中任一项所述的方法,其中所述IL-10试剂是聚乙二醇化的IL-10(PEG-IL-10)。

24. 如权利要求23所述的方法,其中所述PEG-IL-10包含共价连接到IL-10的至少一个单体的N-末端氨基酸残基的至少一个PEG分子。

25. 如权利要求23所述的方法,其中所述PEG-IL-10包括单聚乙二醇化的IL-10和二聚乙二醇化的IL-10的混合物。

26. 如权利要求23至25中任一项所述的方法,其中所述PEG-IL-10的所述PEG组分具有5kDa至30kDa的分子质量。

27. 如权利要求1至26中任一项所述的方法,其中向所述受试者皮下施用所述IL-10试剂。

28. 如权利要求1至27中任一项所述的方法,其中所述受试者是人受试者。

29. 如权利要求1至28中任一项所述的方法,其中所述方法包括:

对编码所述V α TCR多肽的核酸和/或编码所述V β TCR多肽的核酸进行测序;以及

确定所述V α TCR多肽和/或所述V β TCR多肽的至少互补决定区(CDR)的氨基酸序列;

将所述V α TCR多肽的所述氨基酸序列和/或所述V β TCR多肽的氨基酸序列的丰度与参考样品中的所述V α TCR多肽的所述氨基酸序列和/或所述V β TCR多肽的所述氨基酸序列的丰度进行比较,所述参考样品在IL-10试剂疗法之前或在IL10试剂疗法期间的较早时间点从患有所述适于IL-10试剂疗法的疾病的一名或多名患者获得。

30. 如权利要求1至29中任一项所述的方法,其中所述方法包括:

通过将所述V α 和/或V β TCR多肽的氨基酸序列与所述参考样品中的V α 和/或V β TCR多肽的氨基酸序列进行比较来评定根据如权利要求1至29中任一项所述的方法分离的CD8+T细胞上表达的TCR的抗原特异性。

31. 一种产生编码疾病抗原特异性T细胞的TCR的可变 α (V α)T细胞受体(TCR)多肽和可变 β (V β)TCR多肽的载体的方法,所述方法包括:

对来自含有一个或多个CD8+T细胞的样品的核酸进行测序,所述CD8+T细胞从因为疾病适于IL-10试剂治疗而已施用IL-10试剂疗法的受试者获得,其中所述CD8+T细胞表达疾病抗原特异性T细胞受体(TCR),所述TCR包含可变 α (V α)TCR多肽和编码可变 β (V β)TCR多肽的核酸;以及

将编码疾病抗原特异性CD8+T细胞的TCR的V α 和V β TCR多肽对的核酸克隆到一个或多个

构建体中,以产生编码疾病抗原特异性TCR的V α 和V β TCR多肽中一者或两者的载体,其中以丰度大于参考样品中的丰度存在于所述样品中的V α 和/或V β TCR多肽表示疾病抗原特异性CD8+T细胞的所述V α /V β TCR多肽对,所述参考样品在IL-10试剂疗法之前或在IL10试剂疗法期间的较早时间点从患有所述适于IL-10试剂疗法的疾病的一名或多名患者获得。

32.如权利要求31所述的方法,其中所述载体适合于稳定转染CD8+T细胞,从而有助于所述V α 和V β TCR多肽对的表达。

33.如权利要求31或32所述的方法,其中所述受试者展现出至少稳定疾病或对IL-10试剂疗法的至少部分响应。

34.如权利要求33所述的方法,其中所述受试者展现出对IL-10试剂疗法的至少部分响应。

35.如权利要求31至34中任一项所述的方法,其中所述样品富集PD1+、CD8+T细胞。

36.如权利要求35所述的方法,其中所述PD1+、CD8+T细胞以至少PD1+中等水平表达细胞表面PD1。

37.如权利要求35所述的方法,其中所述PD1+、CD8+T细胞以至少PD1+高水平表达细胞表面PD1。

38.如权利要求31至37中任一项所述的方法,其中所述样品富集CD45RO+、CD8+T细胞。

39.如权利要求31至38中任一项所述的方法,其中所述样品富集IFN γ +、CD8+T细胞。

40.如权利要求39所述的方法,其中所述方法包括使所述CD8+T细胞与CD3激动剂接触以刺激IFN γ 表达。

41.如权利要求40所述的方法,其中所述CD3激动剂是抗CD3抗体。

42.如权利要求31至34中任一项所述的方法,其中所述样品富集为PD1+、IFN γ +、CD45RO+、粒酶B+和/或穿孔蛋白+的CD8+T细胞。

43.如权利要求31至42中任一项所述的方法,其中所述一名或多名患者包括所述受试者。

44.如权利要求31至43中任一项所述的方法,其中所述受试者患有肿瘤,并且所述CD8+T细胞对肿瘤抗原是特异的。

45.如权利要求31至43中任一项所述的方法,其中所述受试者患有肿瘤,并且所述CD8+T细胞是肿瘤浸润淋巴细胞。

46.如权利要求44或45所述的方法,其中所述肿瘤是实体肿瘤。

47.如权利要求44或45所述的方法,其中所述肿瘤是选自以下癌症的肿瘤:子宫癌、子宫颈癌、乳腺癌、前列腺癌、睾丸癌、胃肠道癌、肾癌、肾细胞癌、膀胱癌、骨癌、骨髓癌、皮肤癌、头或颈癌、肝癌、胆囊癌、心脏癌症、肺癌、胰腺癌、唾液腺癌、肾上腺癌、甲状腺癌、脑癌、神经节癌、中枢神经系统(CNS)和周围神经系统(PNS)癌症、或造血系统、脾或胸腺的癌症。

48.如权利要求44或45所述的方法,其中所述肿瘤是以下癌症的肿瘤:食管癌、口咽癌、胃癌、小肠癌、大肠癌、结肠癌或直肠癌。

49.如权利要求44或45所述的方法,其中所述肿瘤是黑素瘤、结直肠癌或肾癌。

50.如权利要求31至43中任一项所述的方法,其中所述受试者患有病毒感染,并且所述PD1+、CD8+T细胞对感染病毒的抗原是特异的。

51.如权利要求50所述的方法,其中所述病毒是嗜肝DNA病毒、黄病毒、逆转录病毒、疱

疹病毒。

52. 如权利要求51所述的方法,其中所述病毒是乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、巨细胞病毒(CMV)或人免疫缺陷病毒(HIV)。

53. 如权利要求31至52中任一项所述的方法,其中所述IL-10试剂是人IL-10。

54. 如权利要求31至52中任一项所述的方法,其中所述IL-10试剂是聚乙二醇化的IL-10。

55. 如权利要求54所述的方法,其中所述PEG-IL-10包含共价连接到IL-10的至少一个单体的N-末端氨基酸残基的至少一个PEG分子。

56. 如权利要求54所述的方法,其中所述PEG-IL-10包括单聚乙二醇化的IL-10和二聚乙二醇化的IL-10的混合物。

57. 如权利要求54至56中任一项所述的方法,其中所述PEG-IL-10的PEG组分具有5kDa至30kDa的分子质量。

58. 如权利要求31至57中任一项所述的方法,其中向所述受试者皮下施用所述IL-10试剂。

59. 如权利要求31至58中任一项所述的方法,其中所述受试者是人受试者。

60. 如权利要求31至59中任一项所述的方法,其中将编码所述CD8+T细胞的TCR的多个V α /V β TCR对的所述V α 和V β TCR多肽的多种核酸克隆到多个载体中,以产生编码所述CD8+T细胞的所述疾病抗原特异性TCR的V α 和V β TCR多肽对的构建体的文库。

61. 如权利要求31至59中任一项所述的方法,其中将所述V α TCR多肽和所述V β TCR多肽克隆到相同的载体中。

62. 如权利要求61所述的方法,其中将所述V α TCR多肽和所述V β TCR多肽克隆到载体中,以便于提供编码全长 α TCR多肽并编码全长 β TCR多肽的核酸。

63. 如权利要求61所述的方法,其中将所述V α TCR多肽和所述V β TCR多肽克隆到载体中,以便于提供编码单链T细胞受体(scTv)的核酸。

64. 如权利要求63所述的方法,其中所述scTv从N-末端到C-末端包含所述V β TCR多肽、接头和所述V α TCR多肽。

65. 如权利要求31至64中任一项所述的方法,其中所述载体是表达载体。

66. 一种核酸载体的文库,其通过如权利要求60所述的方法来产生。

67. 一种产生经遗传修饰的T细胞的方法,所述方法包括:

将通过如权利要求31至59中任一项所述的方法获得的构建体引入到CD8+T细胞中,以产生表达疾病抗原特异性TCR的所述V α 和V β TCR多肽对的经遗传修饰的T细胞。

68. 如权利要求67所述的方法,其中所述V α TCR多肽和所述V β TCR多肽由相同或不同的表达构建体上的单独的表达盒编码。

69. 如权利要求67或68所述的方法,其中由所述构建体编码的所述V α TCR多肽在其C-末端处可操作地连接到恒定 α TCR多肽。

70. 如权利要求67或68所述的方法,其中由所述构建体编码的所述V β TCR多肽在其C-末端处可操作地连接到 β 恒定TCR多肽。

71. 如权利要求67所述的方法,其中所述构建体包含编码单链TCR(scTv)的核酸,所述scTv包含所述V β TCR多肽和所述V α TCR多肽。

72. 如权利要求71所述的方法,其中所述scTv从N-末端到C-末端包含所述VBTCR多肽、接头和所述VaTCR多肽。

73. 一种经遗传修饰的CD8+T细胞的群体,其通过如权利要求67至72中任一项所述的方法来产生。

74. 一种治疗患有适于CD8+T细胞疗法的疾病的受试者的方法,所述方法包括:

向所述受试者施用经遗传修饰的CD8+T细胞,其中所述T细胞经遗传修饰来表达重组TCR,所述重组TCR包含对所述受试者的所述疾病的抗原特异的疾病抗原特异性TCR的Va/Vβ对的VaTCR多肽和VBTCR多肽;

其中所述施用能有效治疗所述受试者的所述疾病。

75. 如权利要求74所述的方法,其中根据如权利要求1至26中任一项所述的方法来鉴定所述VaTCR多肽的所述CDR和所述VBTCR多肽的所述CDR的所述氨基酸序列。

76. 如权利要求74所述的方法,其中根据如权利要求25所述的方法来鉴定所述VaTCR多肽和所述VBTCR多肽的所述氨基酸序列。

77. 如权利要求74至76中任一项所述的方法,其中所述经遗传修饰的T细胞的所述VaTCR多肽和所述VBTCR多肽由相同或不同的表达构建体的单独的表达盒编码。

78. 如权利要求74至77中任一项所述的方法,其中由所述构建体编码的所述经遗传修饰的T细胞的所述VaTCR多肽在其C-末端处可操作地连接到恒定αTCR多肽。

79. 如权利要求74至78中任一项所述的方法,其中由所述构建体编码的所述经遗传修饰的T细胞的所述VBTCR多肽在其C-末端处可操作地连接到β恒定TCR多肽。

80. 如权利要求74至76中任一项所述的方法,其中所述经遗传修饰的T细胞的所述VBTCR多肽和所述VaTCR多肽由包含核酸的构建体编码,所述核酸编码包含所述VBTCR多肽和所述VaTCR多肽的单链TCR(scTv)。

81. 如权利要求80所述的方法,其中所述scTv从N-末端到C-末端包含所述VBTCR多肽、接头和所述VaTCR多肽。

82. 如权利要求74至81中任一项所述的方法,其中所述适于CD8+T细胞疗法的疾病是癌症,并且所述经遗传修饰的CD8+T细胞的所述疾病抗原特异性TCR对所述癌症的抗原是特异的。

83. 如权利要求82所述的方法,其中所述癌症是实体肿瘤。

84. 如权利要求82或83所述的方法,其中所述肿瘤是选自以下癌症的肿瘤:子宫癌、子宫颈癌、乳腺癌、前列腺癌、睾丸癌、胃肠道癌、肾癌、肾细胞癌、膀胱癌、骨癌、骨髓癌、皮肤癌、头或颈癌、肝癌、胆囊癌、心脏癌症、肺癌、胰腺癌、唾液腺癌、肾上腺癌、甲状腺癌、脑癌、神经节癌、中枢神经系统(CNS)和周围神经系统(PNS)癌症、或造血系统、脾或胸腺的癌症。

85. 如权利要求82或83所述的方法,其中所述癌症是以下癌症:食管癌、口咽癌、胃癌、小肠癌、大肠癌、结肠癌或直肠癌。

86. 如权利要求82或83所述的方法,其中所述癌症是黑素瘤、结直肠癌或肾癌。

87. 如权利要求74至81中任一项所述的方法,其中所述适于CD8+T细胞疗法的疾病是病毒感染,并且所述经遗传修饰的CD8+T细胞的所述疾病抗原特异性TCR对病毒的抗原是特异的。

88. 如权利要求87所述的方法,其中所述病毒是嗜肝DNA病毒、黄病毒、逆转录病毒、疱

疹病毒。

89. 如权利要求87所述的方法,其中所述病毒是乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、巨细胞病毒(CMV)或人免疫缺陷病毒(HIV)。

90. 如权利要求74至89中任一项所述的方法,其中所述方法包括施用另外的治疗剂。

91. 如权利要求90所述的方法,其中所述治疗剂是IL-10试剂。

92. 如权利要求90或91所述的方法,其中所述适于CD8+T细胞疗法的疾病是癌症,并且所述治疗剂是化学治疗剂。

93. 如权利要求90或91所述的方法,其中所述适于CD8+T细胞疗法的疾病是病毒感染,并且所述治疗剂是抗病毒剂。

94. 如权利要求74至93中任一项所述的方法,其中所述施用包括施用多个经遗传修饰的CD8+T细胞,其中所述多个经遗传修饰的CD8+T细胞包括含有不同疾病抗原特异性TCR的经遗传修饰的CD8+T细胞。

95. 如权利要求74至94中任一项所述的方法,其中所述经遗传修饰的CD8+T细胞是所述受试者自体的。

在产生抗原特异性CD8+T细胞中的白介素-10及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2016年1月11日提交的美国临时申请序列号62/277,442的优先权权益,所述申请以引用的方式整体并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及使用IL-10试剂来诱发抗原特异性CD8+T细胞的方法。

[0004] 简介

[0005] 细胞因子白介素-10 (IL-10) 是一种多效性细胞因子,其通过对T细胞、B细胞、巨噬细胞和抗原呈递细胞(APC)的作用来调控多个免疫反应。IL-10可以通过抑制活化的单核细胞和活化的巨噬细胞中的IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 、GM-CSF和G-CSF的表达来遏制免疫反应,并且它还通过NK细胞来遏制IFN- γ 产生。虽然IL-10主要在巨噬细胞中表达,但是在活化的T细胞、B细胞、肥大细胞和单核细胞中也已经检测到表达。除了遏制免疫反应以外,IL-10还展现出免疫刺激性质,包括刺激经过IL-2和IL-4处理的胸腺细胞的增殖、增强B细胞的活力和刺激MHC II类的表达。

[0006] 人IL-10是在破坏两个单体亚基之间的非共价相互作用后变得不具有生物活性的同二聚体。从公布的IL-10的晶体结构获得的数据指示功能性二聚体相对于IFN- γ 展现出某些相似性(Zdanov等,(1995) Structure (Lond) 3:591-601)。

[0007] IL-10已被经典地定义为免疫抑制性细胞因子(de Waal Malefyt等,J Exp Med, 1991.174(5):1209-20页;de Waal Malefyt等,J Exp Med,1991.174(4):915-24页)。最近的证据明确显示:这个细胞因子的聚乙二醇化形式在免疫肿瘤学背景下能发挥免疫刺激作用(Emmerich等,Cancer Res,2012.72(14):3570-81页;Mumm等,Cancer Cell,2011.20(6):781-96页)。已显示这种抗肿瘤作用的特定机制需要CD8+T细胞和内源性IFN γ 两者(Mumm等,同上)。确切地说,CD8+T细胞暴露于IL-10/PEG-IL-10导致IFN γ 、粒酶B和穿孔蛋白分泌的增强。IFN γ 和粒酶B两者的分泌取决于T细胞受体与同源MHC I/抗原复合物的接合(Chan等,J Interferon Cytokine Res,2015,35(12):948-955)。

[0008] 由于其多效性活性,IL-10已与广泛的疾病、病症和病状关联,包括炎性病状、免疫相关病症、纤维化病症、代谢障碍和癌症。使用IL-10进行的关于许多这类疾病、病症和病状的临床和临床前评估已经巩固了其治疗潜力。

[0009] 用PEG-rHuIL-10 (AM0010) 单一疗法治疗人癌症患者带来明显的抗肿瘤响应,所述抗肿瘤响应的特征为粒酶B+瘤内CD8+T细胞浸润的显著增加。伴随着这种活化的CD8+瘤内T细胞浸润的是血清细胞因子IFN γ 、IL-18、IL-7、IL-4、GM-CSF和活化的T细胞标志物FasL的再现性增加(Infante等,ASCO Meeting Abstracts,2015.33(增刊15):3017页)。这些细胞因子是广谱免疫活化的标志。

发明概要

[0010] 本公开提供了与表达疾病抗原特异性T细胞受体的分离的CD8+T细胞相关的方法

和组合物,以及编码这类疾病抗原特异性T细胞的T细胞受体(TCR)的Va和VB多肽对的核酸。这类疾病抗原特异性CD8+T细胞可获自患有适于用IL-10试剂的治疗的疾病的受试者的外周(例如,血液)。本公开还涵盖了与向受试者施用分离的疾病抗原特异性CD8+T细胞相关的治疗方法和组合物,以及与经遗传修饰来表达疾病抗原特异性TCR和/或嵌合抗原受体的CD8+T细胞相关的治疗方法和组合物。

[0011] 本文提供了一种鉴定疾病抗原特异性T细胞的T细胞受体(TCR)的可变 α (Va) TCR多肽和/或可变 β (Vb) TCR多肽的方法,所述方法包括:向患有适于IL-10试剂疗法的疾病的受试者施用IL-10试剂;对来自获自受试者的含有一个或多个CD8+T细胞的样品的核酸进行测序,其中所述测序包括对编码可变 α (Va) TCR多肽的核酸和/或编码可变 β (Vb) TCR多肽的核酸进行测序;以及将编码VaTCR多肽的核酸和/或编码VbTCR多肽的核酸的丰度与参考样品中的编码VaTCR多肽的核酸和/或编码VbTCR多肽的核酸的丰度进行比较,所述参考样品在IL-10试剂疗法之前或在IL10试剂疗法期间的较早时间点从患有适于IL-10试剂疗法的疾病的一名或多名患者获得;其中以丰度大于所述参考样品中的丰度存在于所述样品中的所述Va和/或VbTCR多肽表示对疾病抗原特异性CD8+T细胞特异的Va/VbTCR多肽对。

[0012] 本文还提供了一种产生编码疾病抗原特异性T细胞的T细胞受体(TCR)的可变 α (Va) TCR多肽和可变 β (Vb) TCR多肽的载体的方法,所述方法包括:对来自含有一个或多个CD8+T细胞的样品的核酸进行测序,所述CD8+T细胞从因为疾病适于IL-10试剂治疗而已施用IL-10试剂疗法的受试者获得,其中CD8+T细胞表达疾病抗原特异性T细胞受体(TCR),所述TCR包含可变 α (Va) TCR多肽和编码可变 β (Vb) TCR多肽的核酸;以及将编码疾病抗原特异性CD8+T细胞的TCR的Va和VbTCR多肽对的核酸克隆到一个或多个构建体中,以产生编码疾病抗原特异性TCR的Va和VbTCR多肽中一者或两者的载体,其中以丰度大于参考样品中的丰度存在于样品中的Va和/或VbTCR多肽表示疾病抗原特异性CD8+T细胞的Va/VbTCR多肽对,所述参考样品在IL-10试剂疗法之前或在IL10试剂疗法期间的较早时间点从患有适于IL-10试剂疗法的疾病的一名或多名患者获得。

[0013] 在任何实施方案中,受试者可能展现出至少稳定疾病或对IL-10试剂疗法的至少部分响应。在一些实施方案中,受试者展现出对IL-10试剂疗法的至少部分响应。

[0014] 在任何实施方案中,样品可以富集PD1+、CD8+T细胞。在一些实施方案中,PD1+、CD8+T细胞以至少PD1+中等水平表达细胞表面PD1。在一些实施方案中,PD1+、CD8+T细胞以至少PD1+高水平表达细胞表面PD1。

[0015] 在任何实施方案中,样品可以富集CD45RO+、CD8+T细胞。在任何实施方案中,样品可以富集IFN γ +、CD8+T细胞。在一些实施方案中,样品富集IFN γ +、CD45RO+、CD8+T细胞。在一些实施方案中,样品富集IFN γ +PD1+、CD8+T细胞。在一些实施方案中,样品富集PD1+、CD45RO+、CD8+T细胞。在一些实施方案中,样品富集IFN γ +CD45RO+、PD1+、CD8+T细胞。在一些实施方案中,所述方法包括使CD8+T细胞与CD3激动剂接触以刺激IFN γ 表达。在一些实施方案中,CD3激动剂是抗CD3抗体。

[0016] 在任何实施方案中,样品可以来源于受试者的外周血、淋巴或肿瘤。

[0017] 在任何实施方案中,样品可以富集为PD1+、IFN γ +、CD45RO+、粒酶B+和/或穿孔蛋白+的CD8+T细胞。

[0018] 在任何实施方案中,一名或多名患者可以包括受试者。在一些实施方案中,一名或

多名患者是受试者。

[0019] 在任何实施方案中,所述方法可以包括:对编码VaTCR多肽的核酸和/或编码VBTCR多肽的核酸进行测序;确定VaTCR多肽和/或VBTCR多肽的至少互补决定区的(CDR)的氨基酸序列;以及将VaTCR多肽的氨基酸序列和/或VBTCR多肽的氨基酸序列的丰度与参考样品中的VaTCR多肽的氨基酸序列和/或VBTCR多肽的氨基酸序列的丰度进行比较,所述参考样品在IL-10试剂疗法之前或在IL10试剂疗法期间的较早时间点从患有适于IL-10试剂疗法的疾病的一名或多名患者获得。

[0020] 在任何实施方案中,所述方法可以包括如上所述通过将Va和/或VBTCR多肽的氨基酸序列与参考样品中的Va和/或VBTCR多肽的氨基酸序列进行比较来评定根据鉴定疾病抗原特异性T细胞的T细胞受体(TCR)的可变 α (Va) TCR多肽和/或可变 β (VB) TCR多肽的任一种方法的实施方案分离的CD8+T细胞上表达的TCR的抗原特异性。

[0021] 本文还提供了一种获得疾病抗原特异性T细胞的T细胞受体(TCR)的氨基酸序列的方法,所述方法可以包括:向患有适于IL-10试剂疗法的疾病的受试者施用白细胞介素(IL)-10试剂,其中所述施用能有效提供受试者体内的至少部分响应;从对IL-10试剂疗法具有至少部分响应的受试者获得外周血淋巴细胞(PBL);从PBL分离PD1+、CD8+T细胞;对编码可变 α (Va) TCR多肽的核酸和/或编码可变 β (VB) TCR多肽的核酸进行测序,其中VaTCR多肽和 β TCR多肽是分离的PD1+、CD8+T细胞的表面上表达的TCR的Va/VBTCR对;以及确定由测序的核酸编码的VaTCR多肽和/或VBTCR多肽的氨基酸序列,其中Va和VBTCR多肽表示对疾病的抗原特异的Va/VBTCR多肽对。

[0022] 本文还提供了一种产生编码疾病抗原特异性T细胞的T细胞受体(TCR)的可变 α (Va) TCR多肽和可变 β (VB) TCR多肽的载体的方法,所述方法包括:从来自因为疾病适于IL-10试剂治疗而展现出对IL-10试剂疗法的至少部分响应的受试者的外周血淋巴细胞(PBL)分离PD1+、CD8+T细胞,并且其中PD1+、CD8+T细胞表达含有VaTCR多肽和VBTCR多肽的疾病抗原特异性TCR;以及将编码分离的PD1+、CD8+T细胞的TCR的Va和VBTCR多肽对的核酸克隆到一个或多个构建体中,以产生编码疾病抗原特异性TCR的Va和VBTCR多肽中的一者或两者的载体。在一些实施方案中,载体适合于稳定转染CD8+T细胞,从而有助于Va和VBTCR多肽对的表达。在一些实施方案中,将VaTCR多肽和VBTCR多肽克隆到同一个载体中。在一些实施方案中,将VaTCR多肽和VBTCR多肽克隆到载体中,以便于提供编码全长 α TCR多肽并编码全长 β TCR多肽的核酸。在一些实施方案中,将VaTCR多肽和VBTCR多肽克隆到载体中,以便于提供编码单链T细胞受体(scTv)的核酸。在一些实施方案中,scTv从N-末端到C-末端含有VBTCR多肽、接头和VaTCR多肽。在一些实施方案中,载体是表达载体。在一些实施方案中,将编码分离的PD1+、CD8+T细胞的TCR的多个Va/VBTCR对的Va和VBTCR多肽的多种核酸克隆到多个载体中,以产生编码PD1+、CD8+T细胞的疾病抗原特异性TCR的Va和VBTCR多肽对的构建体的文库。还提供了如本文所述般产生的核酸载体的文库。

[0023] 在任何实施方案中,分离可以包括分离IFN γ +、CD45RO+、PD1+、CD8+T细胞。在一些实施方案中,所述方法包括使PBL或分离的PD1+、CD8+T细胞与CD3激动剂接触以刺激IFN γ 表达。在一些实施方案中,CD3激动剂是抗CD3抗体。

[0024] 在任何实施方案中,分离可以包括分离CD45RO+、PD1+、CD8+T细胞。

[0025] 在任何实施方案中,PD1+、CD8+T细胞可以至少PD1+中等水平表达细胞表面PD1。在

一些实施方案中,PD1+、CD8+T细胞以至少PD1+高水平表达细胞表面PD1。

[0026] 在任何实施方案中,PD1+、CD8+T细胞可以表达IFN γ 、CD45RO、粒酶B和穿孔蛋白中的一者或多者。

[0027] 在任何实施方案中,受试者可能患有肿瘤,并且PD1+、CD8+T细胞对于肿瘤抗原来说可能是特异的。在一些实施方案中,PD1+、CD8+T细胞可以是肿瘤浸润淋巴细胞。在一些实施方案中,肿瘤是实体肿瘤。在一些实施方案中,肿瘤是选自以下癌症的肿瘤:子宫癌、子宫颈癌、乳腺癌、前列腺癌、睾丸癌、胃肠道癌、肾癌、肾细胞癌、膀胱癌、骨癌、骨髓癌、皮肤癌、头或颈癌、肝癌、胆囊癌、心脏癌症、肺癌、胰腺癌、唾液腺癌、肾上腺癌、甲状腺癌、脑癌、神经节癌、中枢神经系统 (CNS) 和周围神经系统 (PNS) 癌症、或造血系统、脾或胸腺的癌症。在一些实施方案中,肿瘤是以下癌症的肿瘤:食管癌、口咽癌、胃癌、小肠癌、大肠癌、结肠癌或直肠癌。在一些实施方案中,肿瘤是黑素瘤、结直肠癌或肾癌。

[0028] 在任何实施方案中,受试者可能具有病毒感染,并且PD1+、CD8+T细胞对于感染病毒的抗原来说可能是特异的。在一些实施方案中,病毒是嗜肝DNA病毒、黄病毒、逆转录病毒、疱疹病毒。在一些实施方案中,病毒是乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、巨细胞病毒 (CMV) 或人免疫缺陷病毒 (HIV)。

[0029] 在任何实施方案中,IL-10试剂可以是人IL-10。

[0030] 在任何实施方案中,IL-10试剂可以是聚乙二醇化的IL-10 (PEG-IL-10)。在一些实施方案中,PEG-IL-10包含共价连接到IL-10的至少一个单体的N-末端氨基酸残基的至少一个PEG分子。在一些实施方案中,PEG-IL-10包括单聚乙二醇化的IL-10和二聚乙二醇化的IL-10的混合物。在一些实施方案中,PEG-IL-10的PEG组分具有5kDa至30kDa的分子质量。

[0031] 在任何实施方案中,可以向受试者皮下施用IL-10试剂。

[0032] 在任何实施方案中,受试者可以是人受试者。

[0033] 在任何实施方案中,所述方法可以包括:对编码VaTCR多肽的核酸和/或编码VBTCR多肽的核酸进行测序;确定VaTCR多肽和/或VBTCR多肽的氨基酸序列;以及分析VaTCR多肽和/或VBTCR多肽的氨基酸序列以鉴定VaTCR多肽和/或VBTCR多肽的互补决定区 (CDR)。

[0034] 在任何实施方案中,所述方法可以包括:通过将Va和/或VBTCR多肽的氨基酸序列与施用IL-10试剂之前存在于患病组织中的T细胞上表达的TCR的Va和/或VBTCR多肽的氨基酸序列进行比较来评定分离的PD1+、CD8+T细胞上表达的TCR的抗原特异性。

[0035] 本文还提供了一种产生经遗传修饰的T细胞的方法,所述方法包括:将如上所述通过产生编码疾病抗原特异性T细胞的T细胞受体 (TCR) 的可变 α (Va) TCR多肽和可变 β (V β) TCR多肽的载体的方法的任何实施方案获得的构建体引入到CD8+T细胞中,以产生表达疾病抗原特异性TCR的Va和VBTCR多肽对的经遗传修饰的T细胞。在一些实施方案中,VaTCR多肽和VBTCR多肽由相同或不同的表达构建体上的单独的表达盒编码。在一些实施方案中,由构建体编码的VaTCR多肽在其C-末端处可操作地连接到恒定 α TCR多肽。在一些实施方案中,由构建体编码的VBTCR多肽在其C-末端处可操作地连接到 β 恒定TCR多肽。在一些实施方案中,构建体包括编码含有VBTCR多肽和VaTCR多肽的单链TCR (scTv) 的核酸。在一些实施方案中,scTv从N-末端到C-末端包括VBTCR多肽、接头和VaTCR多肽。还提供了通过如本文所述的方法产生的经遗传修饰的CD8+T细胞群。

[0036] 本文还提供了一种治疗患有适于CD8+T细胞疗法的疾病的受试者的方法,所述方

法包括：向受试者施用经遗传修饰的CD8+T细胞，其中T细胞经遗传修饰来表达含有对受试者的疾病的抗原特异的疾病抗原特异性TCR的V α /V β 对的V α TCR多肽和V β TCR多肽的重组TCR；其中所述施用能有效治疗受试者的疾病。在一些实施方案中，根据如上所述获得疾病抗原特异性T细胞的T细胞受体 (TCR) 的氨基酸序列的方法的任何实施方案来鉴定V α TCR多肽的CDR和V β TCR多肽的CDR的氨基酸序列。在一些实施方案中，根据一种方法来鉴定V α TCR多肽和V β TCR多肽的氨基酸序列，所述方法包括：对编码V α TCR多肽的核酸和/或编码V β TCR多肽的核酸进行测序；确定V α TCR多肽和/或V β TCR多肽的氨基酸序列；以及分析V α TCR多肽和/或V β TCR多肽的氨基酸序列以鉴定V α TCR多肽和/或V β TCR多肽的互补决定区 (CDR)。

[0037] 在任何实施方案中，经遗传修饰的T细胞的V α TCR多肽和V β TCR多肽可以由相同或不同的表达构建体的单独的表达盒编码。在一些实施方案中，由构建体编码的经遗传修饰的T细胞的V α TCR多肽在其C-末端处可操作地连接到恒定 α TCR多肽。在一些实施方案中，由构建体编码的经遗传修饰的T细胞的V β TCR多肽在其C-末端处可操作地连接到 β 恒定TCR多肽。在一些实施方案中，经遗传修饰的T细胞的V β TCR多肽和V α TCR多肽由含有核酸的构建体编码，所述核酸编码含有V β TCR多肽和V α TCR多肽的单链TCR (scTv)。在一些实施方案中，scTv从N-末端到C-末端含有V β TCR多肽、接头和V α TCR多肽。

[0038] 在任何实施方案中，适于CD8+T细胞疗法的疾病可以是癌症，并且经遗传修饰的CD8+T细胞的疾病抗原特异性TCR对于癌症的抗原来说可能是特异的。在一些实施方案中，癌症是实体肿瘤。在一些实施方案中，肿瘤是选自以下癌症的肿瘤：子宫癌、子宫颈癌、乳腺癌、前列腺癌、睾丸癌、胃肠道癌、肾癌、肾细胞癌、膀胱癌、骨癌、骨髓癌、皮肤癌、头或颈癌、肝癌、胆囊癌、心脏癌症、肺癌、胰腺癌、唾液腺癌、肾上腺癌、甲状腺癌、脑癌、神经节癌、中枢神经系统 (CNS) 和周围神经系统 (PNS) 癌症、或造血系统、脾或胸腺的癌症。在一些实施方案中，癌症是以下癌症：食管癌、口咽癌、胃癌、小肠癌、大肠癌、结肠癌或直肠癌。在一些实施方案中，癌症是黑素瘤、结直肠癌或肾癌。

[0039] 在任何实施方案中，适于CD8+T细胞疗法的疾病可以是病毒感染，并且经遗传修饰的CD8+T细胞的疾病抗原特异性TCR对于病毒的抗原来说可能是特异的。在一些实施方案中，病毒是嗜肝DNA病毒、黄病毒、逆转录病毒、疱疹病毒。在一些实施方案中，病毒是乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、巨细胞病毒 (CMV) 或人免疫缺陷病毒 (HIV)。

[0040] 在任何实施方案中，所述方法可以包括施用另一治疗剂。在一些实施方案中，治疗剂是IL-10试剂。在一些实施方案中，适于CD8+T细胞疗法的疾病是癌症，并且治疗剂是化学治疗剂。在一些实施方案中，适于CD8+T细胞疗法的疾病是病毒感染，并且治疗剂是抗病毒剂。

[0041] 在任何实施方案中，施用可以包括施用多个经遗传修饰的CD8+T细胞，其中所述多个经遗传修饰的CD8+T细胞包括含有不同疾病抗原特异性TCR的经遗传修饰的CD8+T细胞。在一些实施方案中，经遗传修饰的CD8+T细胞是受试者自体的。

[0042] 基于本公开的教义，其他实施方案对于技术人员来说将是显而易见的。

[0043] 附图简述

[0044] 图1 (图A-D) 示出了如在体外测试的IL-10对鼠CD8+T细胞功能 (图A-B) 和人CD8+T细胞功能 (图C-D) 的影响。

[0045] 图2示出了对荷瘤小鼠进行6天 (图A)、10天 (图B) 或15天 (图C) 治疗对肿瘤抗原特

异性瘤内CD8+T细胞(又被称为肿瘤浸润淋巴细胞或“TIL”)的影响。

[0046] 图3示出了对荷瘤小鼠的延长的IL-10治疗(21-28天)对呈PD1阳性的IFN γ 阳性CD8+T细胞的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL的)的比率的影响。

[0047] 图4示出了CD45RO在以下细胞上的表达:从对IL-10单一疗法展现出部分响应的黑素瘤患者的外周获得的PD1+CD8+T细胞(图A);以及从对IL-10单一疗法展现出部分响应的RCC患者的外周获得的PD1+CD8+T细胞(图B)。

[0048] 图5示出了在施用指定的日剂量的AM0010之后的患者肿瘤响应以及癌症患者的外周血中扩增和缩减的T细胞克隆的相对数目。在括号内指示的治疗后天数分析患者肿瘤响应。通过比较第1天在施用AM0010之前与所指示的治疗后天数存在的T细胞克隆来分析扩增和缩减的T细胞克隆的数目。Mel=黑素瘤;CRC=结直肠癌;RCC=肾细胞癌;PD=进行性疾病;SD=稳定疾病;PR=部分响应;“抗PD1mAb”=抗PD1单克隆抗体。

[0049] 图6示出了在PEG-rHuIL-10单一疗法之后展现出进行性疾病(图A)或展现出至少部分响应(图B)的肾细胞癌患者体内的外周T细胞的评定结果。

[0050] 图7是从用IL-10试剂治疗的受试者获得的PD1+,CD8+疾病抗原特异性T细胞的产生的示意图。

具体实施方式

[0051] 在进一步描述本公开之前,应理解,本公开不限于本文阐述的具体实施方案,并且还理解,本文使用的术语仅用于描述具体实施方案的目的,并且不意图进行限制。

[0052] 在提供值的范围的情况下,应理解,本发明内涵盖这一范围的上限与下限之间的各介入值,准确到下限的单位的十分之一(除非上下文另外明确指明),以及这一所述范围内的任何其他所述值或介入值。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在更小的范围内,并且也涵盖在本发明内,服从于所述范围内任何明确排除在外的限值。在所述范围包括所述限值中的一者或两者的情况下,本发明中还包括排除那些所包括的限值中的任一者或两者的范围。除非另外定义,否则本文所使用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域中的普通技术人员通常所理解相同的含义。

[0053] 必须注意到,如在本文中和在所附权利要求书中所使用,除非上下文另外明确指明,否则单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数个指示物。应进一步注意到,权利要求书可以经拟订以排除任何任选的要素。因此,这些陈述意图作为结合权利要求要素的复述一起使用这类排他性术语,诸如“单独地”、“仅”等等,或使用“负”限制的先前基础。

[0054] 本文中论述的出版物仅提供用于其在本申请的提交日期之前的公开内容。另外,所提供的出版日期可能不同于实际出版日期,这可能需要单独证实。

[0055] 综述

[0056] 使用经遗传修饰的CD8+T细胞的疗法,诸如CAR-T T细胞疗法是治疗例如癌症相关(例如,B和T细胞淋巴瘤)和免疫相关恶性肿瘤的治疗方法。CAR-T T细胞通常包括患者来源的记忆CD8+T细胞,所述细胞经遗传修饰来表达对存在于例如感兴趣的肿瘤上的已知抗原特异的重组T细胞受体。虽然本公开大体是在使用CAR-T细胞疗法来治疗癌症的背景下描述,但是应理解,这种疗法还可用于治疗其他适应症,诸如病毒感染(例如,HBV、HCV、HIV、CMV)。

[0057] 开发CAR-T T细胞疗法的一个挑战是要鉴定用于CAR-T多肽中的V α /V β TCR对的合适的可变 α (V α) 和可变 β (V β) TCR多肽,以便于提供经遗传修饰的CD8+T细胞的希望的抗原特异性。

[0058] 如本文所述,用PEG-IL-10治疗癌症患者导致肿瘤抗原特异性PD1+CD8+T细胞在外周血中的积聚。这种现象伴随着粒酶B+、CD8+肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 的增加。用PEG-IL-10治疗癌症患者导致细胞毒性肿瘤抗原特异性CD8+T细胞的积聚。在这个群体中,PD1+中等至PD1+高的外周CD8+T细胞表示识别肿瘤相关和特异性抗原的独特的 $\alpha\beta$ TCR序列。响应于用PEG-IL-10的治疗而从癌症患者分离的这些细胞提供了对肿瘤(例如,实体肿瘤)高亲和力的选择性成熟的TCR序列,经由鼠肿瘤模型的建模无法实现所述TCR序列。对由用PEG-IL-10(作为单一疗法或与免疫检查点疗法和/或化疗联合)的治疗产生的序列在相同的肿瘤适应症和相同的MHC单倍型中的研究将提供对当前未知的肿瘤抗原特异的并可能能够引发生产性抗肿瘤免疫反应的V α /V β TCR对。

[0059] 本公开提供了从用IL-10试剂的治疗之后的患者产生和分离疾病抗原特异性CD8+T细胞的方法,以及鉴定这类疾病抗原特异性CD8+T细胞的TCR的V α /V β TCR对的可变 α (V α) 和可变 β (V β) TCR多肽的氨基酸序列,和/或可变 α (V α) 和可变 β (V β) TCR多肽的CDR的方法。在一些实施方案中,抗原特异性CD8+T细胞是外周CD8+T细胞,所述外周CD8+T细胞也是PD1+。编码核酸和/或自其获得的信息可以用于产生编码这类V α /V β TCR对的个别构建体和/或构建体文库。这类核酸和/或自其获得的信息可以用于产生表达重组TCR的经遗传修饰的CD8+T细胞,所述重组TCR包含这种V α /V β TCR多肽对(或至少这类V α /V β TCR多肽的CDR),其中重组TCR可以是包含单链T细胞受体(scTv)的CAR-T,所述scTv包含例如通过接头可操作地连接到V α 多肽的V β 多肽。本公开进一步涵盖了治疗癌症患者和患有适于CD8+T细胞疗法的疾病的患者,诸如慢性病毒感染患者(例如,HBV感染患者)的方法。

[0060] 定义

[0061] 除非另有指示,否则下列术语意图具有以下阐述的含义。其他术语在整个说明书的其他地方进行定义。

[0062] 术语“患者”或“受试者”可互换使用来指人或非人动物(例如,哺乳动物)。

[0063] 术语“施用(administration)”、“施用(administer)”等等在其应用于例如受试者、细胞、组织、器官或生物流体时指接触例如IL-10或PEG-IL-10)、核酸(例如,编码天然人IL-10的核酸);包含前述各项的药物组合物、或施用于受试者、细胞、组织、器官或生物流体的诊断剂。在细胞的情况下,施用包括使试剂与细胞(例如,体外或离体)接触,以及使试剂与流体接触,其中流体与细胞接触。

[0064] 术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”等等指在已诊断、观察和以类似方式发现疾病、病症或病状、或其症状之后为了暂时地或永久地消除、减少、遏制、减轻或改善折磨着受试者的疾病、病症或病状的潜在病因的至少一种,或与折磨着受试者的疾病、病症或病状相关联的症状中的至少一种而启动的行动步骤(诸如施用IL-10或包含IL-10的药物组合物)。因此,治疗包括抑制(例如,遏制疾病、病症或病状或与之相关联的临床症状的发展或进一步发展)活动性疾病。所述术语也可以用于其他情况中,诸如IL-10或PEG-IL-10以例如流体相或胶体相接触IL-10受体的情形。

[0065] 如本文所使用的术语“需要治疗”指由医师或其他护理人员作出的受试者需要治

疗或将从中受益的判断。这种判断是基于在医师或护理人员的专业知识领域中的各种因素而作出的。

[0066] 术语“预防 (prevent)”、“预防 (preventing)”、“预防 (prevention)”等等指为了暂时地或永久地预防、遏制、抑制疾病、病症、病状等等或降低受试者发展为疾病、病症、病状等等(如通过例如临床症状的缺乏所确定)的风险,或通常在受试者易患特定疾病、病症或病状的情况下延迟其发作而以一种方式(例如,在疾病、病症、病状或其症状发作之前)启动的行动步骤(诸如施用IL-10或包含IL-10的药物组合物)。在某些情况下,所述术语还指减缓疾病、病症或病状的进展、或抑制它们发展到有害的或其他不希望的状态。

[0067] 如本文所使用的术语“需要预防”指由医师或其他护理人员作出的受试者需要预防护理或将从中受益的判断。这种判断是基于在医师或护理人员的专业知识领域中的各种因素而作出的。

[0068] 短语“治疗有效量”指单独地或作为药物组合物的一部分并以单次剂量或作为一系列剂量的一部分按照在向受试者施用时能够对疾病、病症或病状的任何症状、方面或特性具有任何可检测的积极效果的量向受试者施用试剂。治疗有效量可以通过测量相关生理效应来确定,并且所述治疗有效量可以结合给药方案和对受试者的病状的诊断分析等等来调整。举例来说,对施用后产生的炎性细胞因子的量的测量可以指示是否已使用治疗有效量。

[0069] 短语“以足以产生变化的量”意指在施用特定疗法之前(例如,基线水平)和之后测量的指标水平之间存在可检测的差异。指标包括任何客观参数(例如,IL-10的血清浓度)或主观参数(例如,受试者的良好感觉)。

[0070] 在一些实施方案中,本公开涉及使用流式细胞术来分析标志物,例如,细胞表面标志物的表达。如由流式细胞术所评定,基于用标志物特异性试剂(例如,荧光标记的抗体)染色之后可检测标记(例如,荧光)的相对强度,可以将细胞分类为“阳性”或“阴性”。一般而言,基于双峰分布的标志物,例如CD8、PD1、IFN γ 、CD45RO、粒酶B、穿孔蛋白等等的染色过程中的易于辨别的差异,根据细胞的表达水平来区分所述细胞。在一些实施方案中,对所有细胞获得标志物染色的频率分布,并且群体曲线符合较高染色和较低染色群体,并且将细胞分配到鉴于相应的群体分布的统计分析它们最可能从属的群体。在一些实施方案中,对所有细胞获得标志物染色的频率分布,并且群体曲线符合较高染色、中等水平染色和较低染色群体,并且将细胞分配到鉴于相应的群体分布的统计分析它们最可能从属的“高”、“中等”和/或“低”群体。将T细胞分到+和-类别以及“高”、“中等”和/或“低”类别的方法是本领域的普通技术人员已知的。

[0071] 因此,例如,本公开涵盖了对T细胞上的PD1表达的分析。T细胞展现出PD1(又称为CD279)细胞表面表达的基本上呈双峰的分布,其中PD1细胞表面表达的高峰周围的细胞可以被分类为“PD1高”(或“PD1+”),并且PD1细胞表面表达的低峰周围的细胞可以被分类为“PD1低”(或“PD1-”)。包括活化的CD8+T细胞的CD8+T细胞的群体还可以包括在PD1高与PD1低细胞之间的中间细胞群体(“PD1中等”),其中PD1中等细胞具有高于PD1低细胞,但是低于PD1高细胞的PD1细胞表面表达水平。因此,感兴趣的活化的CD8+T细胞可以包括中等(“中等”)到高细胞表面表达水平的PD1(“PD1中等-高”)。换句话说,活化的CD8+T细胞可以是在细胞表面上不具有低PD1表达(即,不是“PD1低”)的CD8+T细胞的群体。

[0072] 如本文所使用,“PD1中等”指约为(“PD1低”)细胞群中的PD1表达的最低水平的至少100-150倍,且小于约(“PD1高”)细胞群中的PD1表达的最高水平的1/3的PD1的细胞表面表达水平,其中细胞表面PD1表达通过流式细胞术来检测。例如,“PD1中等”细胞可以表达通过流式细胞术实现大约3000的平均通道荧光检测的细胞表面PD1的水平,而低PD1表达(“PD1低”)由大约200的平均通道荧光检测表示,并且“PD1高”表达由大约9000的平均通道荧光检测表示。应注意到,当将细胞表征为PD1+或PD1时,“PD1低”细胞被视为是PD1阴性(“PD1-”)。

[0073] 术语“小分子”指分子量小于约10kDa、小于约2kDa或小于约1kDa的化学化合物。小分子包括但不限于:无机分子、有机分子、含有无机组分的有机分子、包含放射性原子的分子以及合成分子。在治疗上,相较于大分子,小分子可能对细胞更具渗透性、更不易降解,且更不易引发免疫反应。

[0074] 术语“配体”指可以充当受体的激动剂或拮抗剂的分子或其复合物。术语“配体”涵盖天然和合成的配体,例如细胞因子、细胞因子变体、类似物、突变蛋白以及衍生自抗体的结合组合物。术语“配体”还涵盖小分子,例如细胞因子的肽模拟物和抗体的肽模拟物。所述术语还涵盖既不是激动剂也不是拮抗剂,但是可以结合到受体而不显著影响其生物学性质,例如信号传导或粘附的试剂。术语“配体”还包括已例如通过化学或重组方法改变为可溶的膜结合配体形式的膜结合配体。受体可以是细胞内的,也就是说,它可以停留在细胞质、细胞核或一些其他细胞内区室中,或与细胞膜相结合并可能穿越所述细胞膜,但是在细胞膜的细胞内表面上具有配体结合位点。配体和受体的复合物被称为“配体-受体复合物”。

[0075] 术语“抑制剂”和“拮抗剂”、或“活化剂”和“激动剂”分别指抑制或活化分子,例如配体、受体、辅因子、基因、细胞、组织或器官。抑制剂是减少、阻断、阻止、延迟活化、失活、去敏化或下调生物分子,例如基因、蛋白质、配体、受体或细胞的活性的分子。活化剂是增加、活化、促进、增强活化、敏化或上调生物分子,例如基因、蛋白质、配体、受体或细胞的活性的分子。抑制剂还可以被定义为降低、阻断组成型活性或使之失活的分子。“激动剂”是与靶标相互作用以引起或促成靶标的活性增加的分子。“拮抗剂”是对抗激动剂的作用的分子。拮抗剂阻止、降低、抑制或中和激动剂的活性,并且即使没有鉴定的激动剂,拮抗剂仍可以阻止、抑制或降低靶标,例如靶受体的组成型活性。

[0076] 术语“调节(modulate)”、“调节(modulation)”等等指分子单独或与其他因子组合来直接或间接地调控、增加或降低另一种生物分子的功能或活性的能力。术语“调节剂”意在广义地指可以调控上述活性的分子。举例来说,例如基因、受体、配体或细胞的调节剂是改变基因、受体、配体或细胞的活性的分子,其中可以就其调控性质方面活化、抑制、或改变活性。调节剂可以单独作用,或它可以使用辅因子,例如蛋白质、金属离子或小分子。

[0077] 分子的“活性”可以描述为或指,例如:(a) 分子与配体或受体的结合;(b) 配体在结合至其受体时对催化活性的响应水平;(c) 刺激基因表达或细胞信号传导、分化或成熟的能力;(d) 抗原活性;和/或(e) 对其他分子的活性的调节。所述术语还可以指调节或维持细胞与细胞的相互作用(例如,粘附)的活性,或维持细胞(例如,细胞膜)的结构活性。“活性”也可以意指特异性活性,例如[催化活性]/[mg蛋白质]、或[免疫活性]/[mg蛋白质]、生物区室中的浓度等等。术语“增殖活性”涵盖促进例如细胞分裂,对其而言必要的或与之明确相关联的活性。

[0078] 如本文所使用,“相当的”、“相当的活性”、“与…相当的活性”、“相当的效果”、“与…相当的效果”、“类似的”和“基本上类似的”是可以定量和/或定性看待的相对术语。所述术语的含义往往取决于它们的使用背景。举例来说,均活化受体的两种试剂从定性角度来看可以被视为具有相当的效果,但是如果一种试剂如在本领域接受的测定(例如,剂量-反应测定)中或在本领域接受的动物模型中所确定仅能够实现另一种试剂的20%的活性,则所述两种试剂从定量角度来看可以被视为缺乏相当的效果。当将一个结果与另一个结果(例如,将一个结果与参考标准)进行比较时,“相当的”往往意指一个结果与参考标准的偏差小于35%、小于30%、小于25%、小于20%、小于15%、小于10%、小于7%、小于5%、小于4%、小于3%、小于2%、或小于1%。在具体实施方案中,如果一个结果与参考标准的偏差小于15%、小于10%或小于5%,则所述结果与参考标准相当。举例来说,但不带限制性,活性或效果可以指功效、稳定性、溶解度或免疫原性。

[0079] 术语例如细胞、组织、器官或生物体的“反应”涵盖生物化学或生理行为,例如生物区室内的浓度、密度、粘附或迁移,基因表达率或分化状态的变化,其中所述变化与活化、刺激或治疗相关,或与诸如遗传编程的内在机制相关。在某些情况下,术语“活化”、“刺激”等等指如由内在机制、以及通过外部或环境因素调控的细胞活化;而术语“抑制”、“下调”等等指相反效果。

[0080] 在本文可互换使用的术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”指具有任何长度的氨基酸的聚合形式。多肽可以包括经遗传编码和未经遗传编码的氨基酸、经化学修饰的氨基酸以及具有经修饰的多肽主链的多肽。多肽的实例包括但不限于:融合蛋白,所述融合蛋白包括:具有异源氨基酸序列的融合蛋白;具有异源和同源前导序列的融合蛋白;具有或不具有N-末端甲硫氨酸残基的融合蛋白;具有免疫标记的蛋白的融合蛋白等等。

[0081] 将了解,贯穿本公开,根据单字母或三字母代码来参考经遗传编码的L-氨基酸。为了方便读者,以下提供了单字母和三字母氨基酸代码:

[0082]	G	甘氨酸	Gly	P	脯氨酸	Pro
	A	丙氨酸	Ala	V	缬氨酸	Val
	L	亮氨酸	Leu	I	异亮氨酸	Ile
	M	甲硫氨酸	Met	C	半胱氨酸	Cys
	F	苯丙氨酸	Phe	Y	酪氨酸	Tyr
	W	色氨酸	Trp	H	组氨酸	His
	K	赖氨酸	Lys	R	精氨酸	Arg
	Q	谷氨酰胺	Gln	N	天冬酰胺	Asn
	E	谷氨酸	Glu	D	天冬氨酸	Asp
	S	丝氨酸	Ser	T	苏氨酸	Thr

[0083] 如本文所使用,术语“变体”涵盖天然存在的变体和非天然存在的变体。天然存在的变体包括同系物(在各个物种之间氨基酸或核苷酸序列分别存在差异的多肽和核酸)以及等位基因变体(在同一物种内的不同个体之间氨基酸或核苷酸序列分别存在差异的多肽和核酸)。非天然存在的变体包括分别包含氨基酸或核苷酸序列的变化多肽和核酸,其中人为地引入序列的变化(例如,突变蛋白);例如,在实验室中通过人为干预(“人的手”)而产生所述变化。术语“突变蛋白”指通过单个或多个氨基酸取代来修饰的蛋白质。突变蛋白往

往来源于已经受定点或随机诱变的克隆基因,或来自完全合成的基因。

[0084] 术语“DNA”、“核酸”、“核酸分子”、“多肽”等等可互换使用来指任何长度的无论是脱氧核苷酸或核糖核苷酸还是其类似物的核苷酸的聚合形式。多核苷酸的非限制性实例包括线性和环状核酸、信使RNA (mRNA)、互补DNA (cDNA)、重组多核苷酸、载体、探针、引物等等。

[0085] 如本文在多肽的结构背景下所使用,“N-末端”(或“氨基端”)和“C-末端”(或“羧基端”)分别指多肽的最边上的氨基和羧基端,同时术语“N-末端”和“C-末端”分别指多肽的氨基酸序列中朝向N-末端和C-末端的相对位置,并且可以分别包括在N-末端和C-末端处的残基。“紧挨N-末端”或“紧挨C-末端”指第一氨基酸残基相对于第二氨基酸残基的位置,其中第一和第二氨基酸残基共价地结合来提供连续的氨基酸序列。

[0086] 如相对于多肽和核酸所使用,术语“衍生自”指多肽或核酸包含衍生自参考多肽或核酸(例如,天然存在的多肽或核酸)的氨基酸或核苷酸序列,并且不限于参考分子的来源或修饰参考分子的方法。举例来说,术语“衍生自”包括参考氨基酸或DNA序列的同系物或变体。

[0087] 在多肽或核酸的背景下,术语“分离的”指感兴趣的多肽或核酸如果天然存在则处于不同于其可能天然地存在所处环境的环境中。“分离的”意在包括大量富集感兴趣的多肽和/或其中感兴趣的多肽被部分或基本上纯化的样品内的多肽或核酸。在多肽不是天然存在的情况下,“分离的”指示多肽已从通过合成或重组手段制备所述多肽所处的环境中分离出来。

[0088] “富集的”意指样品受到非天然操控(例如,由科学家操控),使得感兴趣的分子以如下浓度存在:a)大于初始样品中的感兴趣的分子的浓度的浓度(例如,大至少3倍、大至少4倍、大至少8倍、大至少64倍或更大)。起始样品可以是生物学样品(例如,其中感兴趣的分子天然存在或其中感兴趣的分子在施用后才存在的样品),或来自其中感兴趣的分子的浓度大于环境的来源(例如,来自其中表达多肽的重组细菌细胞)。

[0089] 术语“基本上纯的”指含有感兴趣的组分的组合物,其中感兴趣的组分(例如,多肽)构成组合物的总含量的大于约50%,并且通常构成组合物的总含量的大于约60%。更典型地,“基本上纯的”指其中全部组合物的至少75%、至少85%、至少90%或更多是感兴趣的组分的组合物。在一些情况下,感兴趣的组分将构成组合物的总含量的大于约90%或大于约95%。

[0090] 如本文所使用,术语“特异地结合”或“选择性地结合”指配体与其受体、抗体与其抗原或其他结合对的相互作用。选择性结合可以用于指示异质混合物中配体的存在。因此,在指定条件下,配体被视为选择性地结合至其受体,其中所述配体结合到所述受体并且不会显著结合到异质混合物的其他组分。关于免疫球蛋白,选择性地结合到抗原的免疫球蛋白以一定亲和力结合至其抗原、或其变体或突变蛋白,其中亲和力比对任何其他抗原的亲和力大至少两倍、大至少十倍、大至少20倍或大至少100倍。在一个具体实施方案中,特异地结合到抗原的免疫球蛋白将具有如通过例如Scatchard分析所测定大于约 10^9 升/摩尔的亲和力(Munsen等,1980Analyt.Biochem.107:220-239)。

[0091] 应注意到,结合本公开的多肽和核酸分子对“人”的任何提及并不意在限制获得多肽或核酸的方式或来源,而是仅仅参考所述序列,因为它可能对应于天然存在的人多肽或核酸分子(包括天然存在的同种型)的序列。

[0092] 如本文所使用,“表达于”可以用于描述存在于细胞表面上的细胞部分(例如,蛋白质或其复合物),通常归因于细胞中产生细胞部分或其前体,以及细胞部分或其前体易位到细胞的质膜的细胞外表面。

[0093] “程序性细胞死亡蛋白1”或“PD1”指从属于表达在淋巴细胞的亚群上的免疫球蛋白超家族,且又被称为CD279的细胞表面受体。人PD1(基因ID:5133)由PDCD1基因编码。

[0094] “CD45R0”指CD45的表达在淋巴细胞的亚群上的同种型,即一种受体型蛋白质酪氨酸磷酸酶家族成员。CD45的其他同种型包括CD45RA、CD45RB、CD45RC、CD45RAB、CD45RAC、CD45RBC以及CD45R(ABC)。CD45R0是CD45的同种型,其比其他同种型短并且缺乏已知为RA、RB和RC的CD45外显子。人CD45(基因ID:5788)由PRPRC基因编码。

[0095] 如本文所使用,“抗原特异性T细胞”和“对抗原特异的T细胞”指在其细胞表面上表达T细胞受体(TCR)的T细胞,所述TCR借助于TCR多肽的含有可变区的结构,诸如 α 和 β 多肽链来特异地结合到抗原。TCR对抗原特异的T细胞在成熟期间可能已经历了TCR基因组的基因座的重组,和/或可能已经过遗传修饰以表达一种或多种TCR多肽或工程改造的TCR样受体(诸如嵌合抗原受体)。

[0096] “疾病抗原”或“疾病相关抗原”指引发免疫反应,诸如T细胞介导的免疫反应的表位(例如,抗原肽、脂质、多糖、核酸等)。在疾病是肿瘤的情况下,肿瘤抗原或肿瘤相关抗原可以是表达在肿瘤细胞上的表位。肿瘤抗原对于肿瘤细胞可能是独特的,并且通常不会表达在身体的特别是同一谱系的其他细胞上。在一些情况下,肿瘤抗原可能是通常表达在身体的其他细胞中,但是在非肿瘤背景下不会诱导免疫反应的表位。当免疫系统不成熟并且无法反应时,肿瘤抗原可能具有在胚胎发育期间通常表达在正常细胞上的一个或多个表位。肿瘤抗体可以具有通常以极低水平存在于正常细胞上,但是以明显较高的水平表达在肿瘤细胞上的一个或多个表位。

[0097] 产生疾病抗原特异性CD8+T细胞的方法的综述

[0098] 在一个实施方案中,本公开提供了一种诱导疾病抗原特异性CD8+T细胞扩增到患有可用IL-10试剂治疗的疾病的患者的外周中的方法,所述方法包括:以能有效诱发这类疾病抗原特异性CD8+T细胞的诱导的量向患者施用IL-10试剂,从而从患者获得疾病抗原特异性CD8+T细胞(例如,患者的诸如外周血样品的组织样品中的CD8+T细胞)。因此,本公开提供了IL-10试剂,产生IL-10试剂的方法,用于产生疾病抗原特异性CD8+T细胞和用于IL-10试剂疗法的剂量方案,用于产生疾病抗原特异性CD8+T细胞的方法,对这类T细胞的TCR的分析,TCR α 和 β 序列和核酸的文库的产生,对这类T细胞的TCR的抗原特异性的分析,表达包含这类T细胞的疾病抗原特异性TCR的TCR α 和 β 序列的重组TCR(例如,CAR-T)的经遗传修饰的T细胞的产生,经遗传修饰的T细胞组合物以及其产生方法和在疗法中的用途,以及药物组合物和试剂盒。在一些实施方案中,抗原特异性CD8+T细胞是外周CD8+T细胞,所述外周CD8+T细胞也是PD1+。下文描述了本公开的这些特征。

[0099] IL-10试剂(例如,PEG-IL-10)

[0100] 抗炎细胞因子IL-10(又称为人细胞因子合成抑制因子(CSIF))被分类为2型(类)细胞因子,即包括以下的一组细胞因子:IL-19、IL-20、IL-22、IL-24(Mda-7)和IL-26、干扰素(IFN- α 、- β 、- γ 、- δ 、- ϵ 、- κ 、- Ω 和- τ)以及干扰素样分子(limitin、IL-28A、IL-28B和IL-29)。

[0101] IL-10是在免疫调控和炎症反应中具有多效性作用的细胞因子。它由肥大细胞产生,抵消了这些细胞在过敏反应的部位处所具有的炎症效应。虽然IL-10能够抑制促炎性细胞因子,诸如IFN- γ 、IL-2、IL-3、TNF α 和GM-CSF的合成,但是它对某些T细胞和肥大细胞也有刺激作用,并且会刺激B-细胞成熟、增殖和抗体产生。IL-10会封闭NF- κ B活性并且参与JAK-STAT信号传导途径的调控。它还会诱导CD8+T细胞的细胞毒活性和B-细胞的抗体产生,并且它会遏制巨噬细胞活性和促肿瘤炎症。对CD8+T细胞的调控是具有剂量依赖性,其中较高剂量诱导更强的细胞毒性反应。

[0102] 人IL-10是分子质量为37kDa的同二聚体,其中每个18.5kDa单体包含178个氨基酸,其中前18个氨基酸组成信号肽;以及形成两个分子内二硫键的两个半胱氨酸残基。IL-10二聚体在破坏两个单体亚基之间的非共价相互作用后变得不具有生物活性。

[0103] 本公开涵盖了展现出80%同源性的人IL-10(NP_000563)和鼠IL-10(NP_034678)及其用途。此外,本公开的范围包括来自包括以下各项的其他哺乳动物物种的IL-10直系同源物及其修饰形式:大鼠(登录号NP_036986.2;GI 148747382);牛(登录号NP_776513.1;GI 41386772);绵羊(登录号NP_001009327.1;GI 57164347);狗(登录号ABY86619.1;GI 166244598);以及兔(登录号AAC23839.1;GI 3242896)。

[0104] 术语“IL-10”、“IL-10多肽”、“IL-10分子”、“IL-10试剂”等等意图广义地解释,并且包括例如人和非人IL-10相关多肽,包括同系物、变体(包括突变蛋白)及其片段、以及具有例如前导序列(例如,信号肽)的IL-10多肽,以及前述各项的修饰形式。在另外的具体实施方案中,IL-10、IL-10多肽和IL-10试剂是激动剂。

[0105] IL-10受体(II型细胞因子受体)由 α 和 β 亚基组成,所述亚基分别又被称为R1和R2。受体活化需要结合到 α 和 β 。IL-10多肽的一种同二聚体结合到 α ,并且同一IL-10多肽的另一种同二聚体结合到 β 。

[0106] 重组人IL-10的效用往往受其相对较短的血清半衰期限制,这可能归因于例如肾清除率、蛋白降解和血流中的单体化。因此,已探索各种方法来改进IL-10的药物代谢动力学特征,而不会破坏其二聚体结构并因此不利地影响其活性。IL-10的聚乙二醇化带来某些药物代谢动力学参数(例如,血清半衰期)的改进和/或活性的增强。

[0107] 如本文所使用,术语“聚乙二醇化的IL-10”和“PEG-IL-10”指以下IL-10分子:其中有一个或多个聚乙二醇分子通常经由接头共价连接到IL-10蛋白的至少一个氨基酸残基,使得连接是稳定的。术语“单聚乙二醇化的IL-10”和“单-PEG-IL-10”指示一个聚乙二醇分子通常经由接头共价连接到IL-10二聚体的一个亚基上的单一氨基酸残基。如本文所使用,术语“二聚乙二醇化的IL-10”和“二-PEG-IL-10”指示至少一个聚乙二醇分子通常经由接头连接到IL-10二聚体的每个亚基上的单一残基。

[0108] 在某些实施方案中,本公开中使用的PEG-IL-10是单-PEG-IL-10,其中1至9个PEG分子经由接头共价连接到IL-10二聚体的一个亚基的N-末端处的氨基酸残基的 α 氨基。由于亚基混排,一个IL-10亚基上的单聚乙二醇化通常会产生未聚乙二醇化、单聚乙二醇化和二聚乙二醇化的IL-10的非同质的混合物。此外,允许聚乙二醇化反应进行到完成通常会产生非特异性的和多聚乙二醇化的IL-10,从而降低其生物活性。因此,本公开的具体实施方案包括施用通过本文描述的方法产生的单和二聚乙二醇化的IL-10的混合物。

[0109] 在具体实施方案中,PEG部分的平均分子量是在约5kDa与约50kDa之间。尽管PEG连

接到IL-10的方法或位点不是关键的,但是在某些实施方案中,聚乙二醇化不会改变或仅最低限度改变IL-10试剂的活性。在某些实施方案中,半衰期的增加大于生物活性的任何降低。PEG-IL-10的生物活性通常通过评定受到细菌抗原(脂多糖(LPS))攻击且用PEG-IL-10治疗的受试者的血清中的炎性细胞因子(例如,TNF- α 或IFN- γ)的水平来测量,就像在美国专利号7,052,686中描述的一样。

[0110] 可以考虑到各种目的来制备IL-10变体,包括增加血清半衰期、减少针对IL-10的免疫反应、促进纯化或制备、减少IL-10至其单体亚基的转化、提高治疗功效以及减轻治疗应用期间副作用的严重程度或发生。氨基酸序列变体通常是自然界未发现的预先设定的变体,但是一些也可以是翻译后变体,例如糖基化变体。可以使用IL-10的任何变体,前提是它能保留合适的IL-10活性水平。

[0111] 短语“保守性氨基酸取代”指通过用具有类似酸性、碱性、电荷、极性 or 侧链大小的侧链的氨基酸替换蛋白质中的氨基酸来保存蛋白质的活性的取代。保守性氨基酸取代通常需要下组内的氨基酸残基的取代:1) L、I、M、V、F; 2) R、K; 3) F、Y、H、W、R; 4) G、A、T、S; 5) Q、N; 以及6) D、E。对取代、插入或缺失的指导可以是基于来自不同物种的不同变体蛋白质或蛋白质的氨基酸序列的比对。因此,除了任何天然存在的IL-10多肽以外,本公开还涵盖具有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个,通常不超过20、10或5个氨基酸取代,其中取代通常是保守性氨基酸取代。

[0112] 本公开还涵盖了成熟的IL-10中含有衍生自成熟的IL-10的连续的氨基酸残基的活性片段(例如,子序列)。肽或多肽子序列的连续的氨基酸残基的长度根据衍生子序列的特定的天然存在的氨基酸序列而变化。一般而言,肽和多肽可以为约20个氨基酸至约40个氨基酸、约40个氨基酸至约60个氨基酸、约60个氨基酸至约80个氨基酸、约80个氨基酸至约100个氨基酸、约100个氨基酸至约120个氨基酸、约120个氨基酸至约140个氨基酸、约140个氨基酸至约150个氨基酸、约150个氨基酸至约155个氨基酸、约155个氨基酸直至全长肽或多肽。

[0113] 此外,IL-10多肽在限定长度的连续氨基酸(例如,“比较窗口”)内相较于参考序列可以具有限定的序列同一性。比对序列以供比较的方法是本领域中熟知的。供比较的最优的序列比对可以例如通过以下各项来实施:Smith&Waterman,Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)的局部同源性算法;Needleman&Wunsch,J. Mol. Biol. 48:443 (1970)的同源性比对算法;Pearson&Lipman,Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)的相似性搜索方法;这些算法的计算机化实现方式(Wisconsin Genetics Software Package中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA, Madison, Wis.);或人工比对和目视检查(参见例如Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel等编著,1995增刊))。

[0114] 作为实例,合适的IL-10多肽可以包含与某一连续片段具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或至少约99%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列,所述连续片段具有约20个氨基酸至约40个氨基酸、约40个氨基酸至约60个氨基酸、约60个氨基酸至约80个氨基酸、约80个氨基酸至约100个氨基酸、约100个氨基酸至约120个氨基酸、约120个氨基酸至约140个氨基酸、约140个氨基酸至约150个氨基酸、约150个氨基酸至约155个氨基酸、约155个氨基酸直至全长肽或多肽。

[0115] 如下文进一步所论述,IL-10多肽可以从天然来源分离(例如,除了其天然存在的

环境以外的环境),并且还可以(例如,在经遗传修饰的宿主细胞,诸如细菌、酵母、毕赤酵母属、昆虫细胞等等中)重组制备,其中经遗传修饰的宿主细胞用包含编码多肽的核苷酸序列的核酸进行修饰。IL-10多肽也可以合成产生(例如,通过无细胞的化学合成产生)。

[0116] 本公开涵盖编码IL-10试剂的核酸分子,包括其天然存在的和非天然存在的同种型、等位基因变体和剪接变体。本公开还涵盖有一个或多个碱基不同于天然存在的DNA序列,但是由于遗传密码的简并性仍能翻译成对应于IL-10多肽的氨基酸序列的核酸序列。

[0117] 产生IL-10的方法

[0118] 本公开的多肽可以通过任何合适的方法来产生,包括非重组(例如,化学合成)和重组方法。

[0119] 化学合成

[0120] 在化学合成多肽的情况下,合成可以经由液相或固相进行。固相肽合成(SPPS)允许并入非天然氨基酸和/或肽/蛋白质主链修饰。各种形式的SPPS,诸如9-苄基甲氧基羰基(Fmoc)和叔丁氧基羰基(Boc)可用于合成本公开的多肽。化学合成的细节是本领域中已知的(例如,Ganesan A. (2006) Mini Rev. Med. Chem. 6:3-10;以及Camarero J. A. 等, (2005) Protein Pept Lett. 12:723-8)。

[0121] 可以如下所述进行固相肽合成。 α 功能(Na)和任何反应性侧链都受到酸不稳定或碱不稳定基团的保护。保护基在连接酰胺键的条件下是稳定的,但是可以容易地切割而不会损害已经形成的肽链。适用于 α -氨基功能的保护基包括但不限于以下各项:Boc、苄氧基羰基(Z)、0-氯苄氧基羰基、双-苄基异丙氧基羰基、叔-戊氧基羰基(Amoc)、 α , α -二甲基-3,5-二甲氧基-苄氧基羰基、邻-硝基亚氧硫基、2-氰-叔丁氧-羰基、Fmoc、1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己-1-亚基)乙基(Dde)等等。

[0122] 合适的侧链保护基包括但不限于:乙酰基、烯丙基(A11)、烯丙基氧基羰基(Alloc)、苄基(Bzl)、苄氧基羰基(Z)、叔丁基氧基羰基(Boc)、苄氧基甲基(Bom)、邻-溴苄氧基羰基、叔丁基(tBu)、叔丁基二甲基甲硅烷基、2-氯苄基、2-氯苄基氧基羰基、2,6-二氯苄基、环己基、环戊基、1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己-1-亚基)乙基(Dde)、异丙基、4-甲氧基-2,3,6-三甲基苄基磺酰基(Mtr)、2,3,5,7,8-五甲基色满-6-磺酰基(Pmc)、新戊酰基、四氢吡喃-2-基、对甲苯磺酰基(Tos)、2,4,6-三甲氧基苄基、三甲基甲硅烷基和三苯甲基(Trt)。

[0123] 在固相合成中,将C-末端氨基酸偶联到合适的支撑材料。合适的支撑材料是对用于合成过程的逐步缩合和切割反应的试剂和反应条件是惰性的且不溶于正使用的反应介质中的那些材料。可商购的支撑材料的实例包括已用反应性基团和/或聚乙二醇修饰的苯乙烯/二乙烯基苯共聚物;氯甲基化的苯乙烯/二乙烯基苯共聚物;羟甲基化或氨甲基化的苯乙烯/二乙烯基苯共聚物等等。当希望制备肽酸时,可以使用用4-苄氧基苄基-醇(Wang-锚)或2-氯三苄基氯甲烷衍生的聚苯乙烯(1%)-二乙烯基苯或TentaGel®。在肽酰胺的情况下,可以使用用5-(4'-氨基甲基)-3',5'-二甲氧基苄氧基)戊酸(PAL-锚)或对-(2,4-二甲氧基苄基-氨基甲基)-苄氧基(Rink酰胺锚)衍生的聚苯乙烯(1%)二乙烯基苯或TentaGel®。

[0124] 通过经由在室温或高温(例如,在40°C与60°C之间)下在乙醇、乙腈、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、二氯甲烷、四氢呋喃、N-甲基吡咯烷酮或类似溶剂中加入活化试剂来使C-末端

Fmoc-保护的氨基酸与支撑材料发生反应并且持续例如2至72小时的反应时间而实现与聚合支撑物的连接。

[0125] Na-保护的氨基酸(例如,Fmoc氨基酸)与PAL、Wang或Rink锚的偶联可以例如在存在或不存在1-羟基苯并三唑或1-羟基-7-氮杂苯并三唑的情况下借助于偶联剂,诸如N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)、N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)或其他碳二亚胺、2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸盐(TBTU)或其他脲盐、O-酰基脲、苯并三唑-1-基-三-吡咯烷基-六氟磷酸磷(PyBOP)或其他磷盐、N-羟基琥珀酰亚胺、其他N-羟基酰亚胺或酐,例如借助于TBTU通过加入HOBt,在添加或不添加碱,例如像二异丙基乙胺(DIEA)、三乙胺或N-甲基吗啉,例如二异丙基乙胺的情况下,以2至72小时的反应时间(例如,在1.5至3倍过量的氨基酸和偶联剂中,例如以2倍过量并以约10℃与50℃之间的温度,例如25℃,在诸如二甲基甲酰胺、N-甲基吡咯烷酮或二氯甲烷,例如二甲基甲酰胺的溶剂中持续3小时)执行。

[0126] 代替偶联剂,也可以在上述条件下使用活性酯(例如,五氟苯基、对-硝基苯基等等),Na-Fmoc-氨基酸的对称酸酐、其酸性氯化物或酸性氟化物。

[0127] Na-保护的氨基酸(例如,Fmoc氨基酸)可以通过加入DIEA偶联到二氯甲烷中的2-氯三苯甲基树脂,反应时间为10至120分钟,例如20分钟,但是不限于使用这种溶剂和这种碱。

[0128] 受保护的氨基酸的连续偶联可以根据肽合成中的常规方法,通常在自动化肽合成仪中执行。在通过用例如二甲基甲酰胺中的哌啶(10%至50%)处理5至20分钟,例如用DMF中的50%哌啶处理2x 2分钟和用DMF中的20%哌啶处理1x 15分钟切割固相上的偶联的氨基酸的Na-Fmoc保护基之后,在惰性的非水性极性溶剂,诸如二氯甲烷、DMF或两者的混合物中并在约10℃与50℃之间,例如在25℃的温度下将3至10倍过量,例如10倍过量的接着受保护的氨基酸偶联到先前的氨基酸。先前提及的用于将第一Na-Fmoc氨基酸偶联到PAL、Wang或Rink锚的试剂适合作为偶联剂。也可以使用受保护的氨基酸的活性酯,或其氯化物或氟化物或其对称酸酐作为备选。

[0129] 在固相合成结束时,从支撑材料中切割肽,同时切割侧链保护基。可以用三氟乙酸或其他强酸性介质,在添加5%至20%V/V的清除剂,诸如二甲基硫醚、乙基甲基硫醚、茴香硫醚、硫代甲酚、间甲酚、苯甲醚乙二硫醇、酚或水,例如15%v/v二甲基硫醚/乙二硫醇/间甲酚1:1:1的情况下在0.5至3小时,例如2小时内执行切割。通过用冰醋酸/三氟乙醇/二氯甲烷2:2:6切割2-氯三苯甲基锚来获得具有完全受保护的侧链的肽。可以通过硅胶色谱法来纯化受保护的肽。如果肽经由Wang锚连接到固相,并且如果意图获得具有C-末端烷基酰胺化的肽,则可以用烷基胺或氟代烷基胺进行氨解来执行切割。氨解在约-10℃与50℃之间(例如,约25℃)的温度下执行,并且反应时间是在约12与24小时之间(例如,约18小时)。此外,可以通过例如用甲醇再酯化来从支撑物切割肽。

[0130] 可以将获得的酸性溶液与3至20倍量的冷乙醚或正己烷,例如10倍过量的乙醚混合,以便于使肽沉淀,并且因此分离保留在乙醚中的清除剂和切割的保护基。可以通过使肽在冰醋酸中再沉淀数次来执行后续纯化。可以将获得的沉淀物溶于水或叔丁醇或两种溶剂的混合物,例如叔丁醇/水的1:1混合物中,并且冷冻干燥。

[0131] 可以通过各种色谱方法纯化获得的肽,包括以乙酸盐形式在弱碱性树脂上进行离

子交换;非衍生化的聚苯乙烯/二乙烯基苯共聚物(例如,Amberlite® XAD)上进行疏水吸附色谱法;在硅胶上进行吸附色谱法;例如在羧甲基纤维素上进行离子交换色谱法;例如在Sephadex® G-25上进行分配色谱法;反流分配色谱法;或高压液相色谱法(HPLC),例如在辛基或十八烷基甲硅烷基二氧化硅(ODS)相上进行的反相HPLC。

[0132] B. 重组生产

[0133] 描述制备人和小鼠IL-10的方法可以参见例如美国专利号5,231,012,所述专利教导了用于产生具有IL-10活性的蛋白质的方法,包括重组和其他合成技术。IL-10可以是病毒来源,并且Moore等,(1990) Science 248:1230中公开了来自EB病毒的病毒IL-10(BCRF1蛋白)的克隆和表达。可以使用本领域中已知的标准技术,诸如本文描述的那些以多种方式获得IL-10。重组人IL-10也可例如从PeproTech, Inc., Rocky Hill, N.J.商购。

[0134] 在使用重组技术产生多肽的情况下,可以使用任何合适的构建体和任何合适的宿主细胞将多肽产生为细胞内蛋白或分泌蛋白,所述宿主细胞可以相应地是原核或真核细胞,诸如细菌(例如,大肠杆菌)或酵母宿主细胞。可以用作宿主细胞的真核细胞的其他实例包括昆虫细胞、哺乳动物细胞和/或植物细胞。在使用哺乳动物宿主细胞的情况下,它们可以包括人细胞(例如,HeLa、293、H9和Jurkat细胞);小鼠细胞(例如,NIH3T3、L细胞和C127细胞);灵长类动物细胞(例如,Cos 1、Cos 7和CV1);以及仓鼠细胞(例如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞)。

[0135] 可以根据本领域中已知的标准程序来采用适合于多肽的表达的多种宿主载体系统。参见例如Sambrook等,1989Current Protocols in Molecular Biology Cold Spring Harbor Press, New York;以及Ausubel等,1995Current Protocols in Molecular Biology, Wiley and Sons编著。用于将遗传物质引入到宿主细胞中的方法包括例如转化、电穿孔、缀合、磷酸钙方法等等。可以对用于转移的方法进行选择,以便于提供对引入的编码多肽的核酸的稳定表达。编码多肽的核酸可以作为可遗传的附加体元件(例如,质粒)提供,或可以是基因组整合的。用于产生感兴趣的多肽的各种合适的载体是可商购的。

[0136] 载体可以在宿主细胞中提供染色体外维持,或可以提供用于整合到宿主细胞基因组中。表达载体提供转录和翻译调控序列,并且可以提供用于诱导型或组成型表达,其中编码区在转录启动区,以及转录和翻译终止区的转录控制下可操作地连接。一般而言,转录和翻译调控序列可以包括但不限于:启动子序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列以及增强子或活化因子序列。启动子可以是组成型或诱导型,并且可以是强的组成型启动子(例如,T7)。

[0137] 表达构建体通常具有位于启动子序列附近的方便的限制性位点,以提供用于编码感兴趣的蛋白质的核酸序列的插入。可以存在在表达宿主中操作的可选择标记,以有助于选择含有载体的细胞。此外,表达构建体可以包括额外的元件。例如,表达载体可以具有一个或两个复制系统,从而允许其保持在生物体中,例如在哺乳动物或昆虫细胞中以供表达和在原核宿主中以供克隆和扩增。此外,表达构建体可以含有可选择比较级基因以允许选择经转化的宿主细胞。可选择的基因是本领域中熟知的,并且将随所使用的宿主细胞而变化。

[0138] 可以根据本领域中已知的方法来实现蛋白质的分离和纯化。例如,可以从遗传修饰为组成型地和/或在诱导时表达蛋白质的细胞的裂解物中,或从合成反应混合物中通过

免疫亲和纯化分离出蛋白质,所述免疫亲和纯化通常包括使样品与抗蛋白质抗体接触、洗涤以除去非特异性结合的物质,以及洗脱特异性结合的蛋白质。可以通过透析和通常用于蛋白质纯化中的其他方法来进一步纯化分离的蛋白质。在一个实施方案中,可以使用金属螯合色谱法来分离蛋白质。蛋白质可以含有修饰以有助于分离。

[0139] 可以基本上纯的或分离的形式(例如,不含其他多肽)制备多肽。多肽可以存在于相对于可能存在的其他组分(例如,其他多肽或其他宿主细胞组分)富集多肽的组合物中。例如,可以提供纯化的多肽,使得多肽存在于基本上不含其他表达蛋白,例如小于约90%、小于约60%、小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%、小于约10%、小于约5%或小于约1%的组合物中。

[0140] 可以使用重组技术产生IL-10多肽来操控本领域中已知的不同的IL-10相关核酸以提供能够编码IL-10多肽的构建体。应理解,当提供特定的氨基酸序列时,普通技术人员鉴于她在例如分子生物学方面的背景和经验将认识到编码这种氨基酸序列的各种不同核酸分子。

[0141] 酰胺键取代

[0142] 在一些情况下,IL-10包括除了肽键以外的一种或多种键,例如至少两个相邻的氨基酸经由除了酰胺键以外的键连接。例如,为了减少或消除不希望的蛋白酶解或其他降解手段,和/或提高血清稳定性,和/或限制或增加构象柔性,可以取代IL-10主链内的一个或多个酰胺键。

[0143] 在另一个实例中,IL-10中的一个或多个酰胺键(-CO-NH-)可以用作为酰胺键的电子等排体的键替换,诸如-CH₂NH-、-CH₂S-、-CH₂CH₂-、-CH=CH- (顺式和反式)、-COCH₂-、-CH(OH)CH₂-或-CH₂SO-。IL-10中的一个或多个酰胺键也可以由例如还原的电子等排体假肽键替换。参见Couder等,(1993) Int. J. Peptide Protein Res. 41:181-184。这类替换以及如何实现所述替换是本领域的普通技术人员已知的。

[0144] 氨基酸取代

[0145] 可以在IL-10多肽中进行一个或多个氨基酸取代。以下是非限制性实例:

[0146] a) 取代烷基取代的疏水性氨基酸,包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、正亮氨酸、(S)-2-氨基丁酸、(S)-环己基丙氨酸或由C₁-C₁₀碳的脂肪族侧链取代的其他简单的 α -氨基酸,包括支链、环状和直链的烷基、烯基或炔基取代;

[0147] b) 取代芳香族取代的疏水性氨基酸,包括苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸、磺基酪氨酸、联苯基丙氨酸、1-萘基丙氨酸、2-萘基丙氨酸、2-苯并噻吩丙氨酸、3-苯并噻吩丙氨酸、组氨酸,包括氨基、烷基氨基、二烷基氨基、氮杂、卤代(氟、氯、溴或碘)或(来自C₁-C₄)的烷氧基-取代形式的上文列出的芳香族氨基酸,其示例性实例是:2-、3-或4-氨基苯丙氨酸、2-、3-或4-氯苯丙氨酸、2-、3-或4-甲基苯丙氨酸、2-、3-或4-甲氧基苯丙氨酸、5-氨基-、5-氯-、5-甲基-或5-甲氧基色氨酸、2'-、3'-或4'-氨基-、2'-、3'-或4'-氯-、2-、3-或4-联苯基丙氨酸、2'-、3'-或4'-甲基-、2-、3-或4-联苯基丙氨酸,以及2-或3-吡啶基丙氨酸;

[0148] c) 取代含有碱性侧链的氨基酸,包括精氨酸、赖氨酸、组氨酸、鸟氨酸、2,3-二氨基丙氨酸、高精氨酸,包括先前氨基酸的烷基、烯基或芳基取代的(来自C₁-C₁₀的分支、线性或环状)衍生物,无论取代基是在杂原子(诸如 α 氮,或一个或多个远端氮)上,还是在 α 碳上,例如在前-R位上。作为说明性实例的化合物包括:N- ϵ -异丙基-赖氨酸、3-(4-四氢吡啶基)-甘氨酸

酸、3-(4-四氢吡啶基)-丙氨酸、N,N- γ 、 γ' -二乙基-高精氨酸。还包括化合物,诸如 α -甲基-精氨酸、 α -甲基-2,3-二氨基丙酸、 α -甲基-组氨酸、 α -甲基-鸟氨酸,其中烷基占据 α -碳的前-R位。还包括由烷基、芳香族、杂芳香族(其中杂芳香族基团单独或组合具有一个或多个氮、氧或硫原子)、羧酸或许多熟知的活化衍生物,诸如酰基氯、活性酯、活性杂环酰胺(azolides)和相关衍生物以及赖氨酸、鸟氨酸或2,3-二氨基丙酸中的任一种形成的酰胺;

[0149] d) 取代酸性氨基酸,包括天冬氨酸、谷氨酸、高谷氨酸、酪氨酸、2,4-二氨基丙酸的烷基、芳基、芳烷基和杂芳基磺酰胺、鸟氨酸或赖氨酸以及四唑取代的烷基氨基酸;

[0150] e) 取代侧链酰胺残基,包括天冬酰胺、谷氨酰胺和天冬酰胺或谷氨酰胺的烷基或芳香族取代的衍生物;以及

[0151] f) 取代含羟基的氨基酸,包括丝氨酸、苏氨酸、高丝氨酸、2,3-二氨基丙酸以及丝氨酸或苏氨酸的烷基或芳香族取代的衍生物。

[0152] 在一些情况下,IL-10包含一种或多种天然存在的非遗传编码的L-氨基酸、合成的L-氨基酸或氨基酸的D-对映异构体。例如,IL-10可以仅包含D-氨基酸。例如,IL-10多肽可以包含以下残基中的一个或多个:羟脯氨酸、 β -丙氨酸、邻-氨基苯甲酸、间-氨基苯甲酸、对-氨基苯甲酸、间-氨基甲基苯甲酸、2,3-二氨基丙酸、 α -氨基异丁酸、N-甲基甘氨酸(肌氨酸)、鸟氨酸、瓜氨酸、叔丁基丙氨酸、叔丁基甘氨酸、N-甲基异亮氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、正亮氨酸、萘基丙氨酸、吡啶基丙氨酸、3-苯并噻吩丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、2-氟苯丙氨酸、3-氟苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸、青霉胺、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸、 β -2-噻吩丙氨酸、甲硫氨酸亚砷、高精氨酸、N-乙酰基赖氨酸、2,4-二氨基丁酸、 p -氨基苯丙氨酸、N-甲基缬氨酸、高半胱氨酸、高丝氨酸、 ϵ -氨基己酸、 ω -氨基己酸、 ω -氨基庚酸、 ω -氨基辛酸、 ω -氨基癸酸、 ω -氨基十四烷酸、环己基丙氨酸、 α , γ -二氨基丁酸、 α , β -二氨基丙酸、 δ -氨基戊酸以及2,3-二氨基丁酸。

[0153] 另外的修饰

[0154] 可以将半胱氨酸残基或半胱氨酸类似物引入到IL-10多肽中以提供用于经由二硫键连接到另一个肽或提供用于IL-10多肽的环化。引入半胱氨酸或半胱氨酸类似物的方法是本领域中已知的;参见例如美国专利号8,067,532。

[0155] IL-10多肽可以被环化。可以将一种或多种半胱氨酸或半胱氨酸类似物引入到IL-10多肽中,其中所引入的半胱氨酸或半胱氨酸类似物可以与第二种引入的半胱氨酸或半胱氨酸类似物形成二硫键。其他环化手段包括引入胍接头或羊毛硫氨酸接头;参见例如美国专利号8,044,175。可以使用和/或引入可以形成环化键的氨基酸(或非氨基酸部分)的任何组合。可以用氨基酸与允许引入桥的官能团的任何组合(或用氨基酸和 $-(CH_2)_n-CO-$ 或 $-(CH_2)_n-C_6H_4-CO-$)产生环化键。一些实例是二硫化物、二硫化物模拟物,诸如 $-(CH_2)_n$ -碳桥、缩硫醛、硫醚桥(胱硫醚或羊毛硫氨酸)以及含有酯和醚的桥。在这些实例中,n可以是任何整数,但是往往小于10。

[0156] 其他修饰包括例如N-烷基(或芳基)($\psi[CONR]$)或主链交联以构建内酰胺和其他环状结构。其他衍生物包括C-末端羟甲基衍生物、 o -修饰的衍生物(例如,C-末端羟甲基苄基醚)、N-端修饰的衍生物,包括取代的酰胺,诸如烷基酰胺和酰肼。

[0157] 在一些情况下,用一种或多种D-氨基酸替换IL-10多肽中的一种或多种L-氨基酸。

[0158] 在一些情况下,IL-10多肽是颠倒位(retroinverso)类似物(参见例如Sela和

Zisman (1997) FASEB J. 11:449)。反倒位肽类似物是线性多肽的异构体,其中氨基酸序列的方向是反向(反)的,并且其中一个或多个氨基酸的手性D-或L-是倒置的(倒位),例如使用D-氨基酸而不是L-氨基酸。[参见例如Jameson等,(1994) Nature 368:744;以及Brady等,(1994) Nature 368:692]。

[0159] IL-10多肽可以包括“蛋白转导结构域”(PTD),其指有助于穿越脂质双层、胶束、细胞膜、细胞器膜或囊泡膜的多肽、多核苷酸、糖类或有机或无机分子。连接到另一个分子的PTD有助于分子穿越膜,例如从细胞外空间到细胞内空间或细胞质到细胞器内。在一些实施方案中,PTD共价连接到IL-10多肽的氨基端,而在其他实施方案中,PTD共价连接到IL-10多肽的羧基端。示例性蛋白转导结构域包括但不限于:最小的十一肽蛋白转导结构域(对应于包含YGRKKRRQRRR的HIV-1TAT的残基47-57;SEQ ID NO:1);包含数目足以直接进入细胞中的精氨酸残基(例如,3、4、5、6、7、8、9、1或10至50个精氨酸)的聚精氨酸序列;VP22结构域(Zender等,(2002) Cancer Gene Ther. 9(6):489-96);果蝇触足蛋白转导结构域(Noguchi等,(2003) Diabetes 52(7):1732-1737);截短的人降钙素肽(Trehin等,(2004) Pharm. Research 21:1248-1256);聚赖氨酸(Wender等,(2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:13003-13008);RRQRRTSKLMKR (SEQ ID NO:2);转运蛋白GWTLSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO:3);KALAEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKCEA (SEQ ID NO:4);以及RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:5)。示例性PTD包括但不限于:YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:6)、RKKRRQRRR (SEQ ID NO:7);3个精氨酸残基至50个精氨酸残基的精氨酸均聚物;示例性PTD结构域氨基酸序列包括但不限于以下任一种:YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:8);RKKRRQRR (SEQ ID NO:9);YARAAARQARA (SEQ ID NO:10);THRLPRRRRRR (SEQ ID NO:11);以及GGRRARRRRRR (SEQ ID NO:12)。

[0160] IL-10多肽的C-末端处的氨基酸的羧基COR₃以游离形式(R₃=OH)或以生理学上可耐受的碱性或碱土金属盐,例如像钠、钾或钙盐的形式存在。羧基也可以用伯、仲或叔醇,例如像甲醇、分支或不分支的C₁-C₆-烷基醇,例如乙醇或叔丁醇进行酯化。羧基也可以用伯或仲胺,诸如氨、分支或不分支的C₁-C₆-烷基胺或C₁-C₆二烷基胺,例如甲胺或二甲胺进行酰胺化。

[0161] IL-10多肽的N-末端处的氨基酸NR₁R₂的氨基以游离形式(R₁=H和R₂=H)或以生理学上可耐受的盐,例如像氯化物或乙酸盐的形式存在。氨基还可以用酸乙酰化,使得R₁=H并且R₂=乙酰基、三氟乙酰基或金刚烷基。氨基可以受到通常用于肽化学中的氨基保护基,诸如上文提供的那些(例如,Fmoc、苄氧基-羰基(Z)、Boc和Alloc)保护的形式存在。氨基可以是N-烷基化的,其中R₁和/或R₂=C₁-C₆烷基或C₂-C₈烷基或C₇-C₉芳烷基。烷基残基可以是直链、分支或环状的(例如,分别是乙基、异丙基和环己基)。

[0162] 用于增强和/或模拟IL-10功能的特定修饰

[0163] 改进本文公开的治疗方式(例如,IL-10)的多种物理性质之一和/或其施用的方式往往是有益的,并且有时是必要的。物理性质的改进包括例如调节免疫原性;增加水溶性、生物利用度、血清半衰期和/或治疗半衰期的方法;和/或调节生物活性。某些修饰还可以用于例如产生抗体(例如,表位标签)以供检测测定使用并且为蛋白质纯化提供便利。通常必须在不会不利地影响治疗方式的生物活性和/或增加其免疫原性的情况下赋予这类改进。

[0164] IL-10的聚乙二醇化是本公开所涵盖的一种特定修饰,而其他修饰包括但不限于:

糖基化(N-和O-连接);聚唾液酸化;包含血清白蛋白(例如,人血清白蛋白(HSA)、猕猴血清白蛋白或牛血清白蛋白(BSA))的白蛋白融合分子;通过例如缀合的脂肪酸链(酰化)结合的白蛋白;以及Fc-融合蛋白。

[0165] **聚乙二醇化**:蛋白质治疗剂的临床效果往往因短血浆半衰期和蛋白酶降解易感性而受限制。对各种治疗蛋白(例如,非格司亭)的研究已经显示,这类困难可以通过各种修饰来克服,所述修饰包括将多肽序列缀合或连接到多种非蛋白质聚合物中的任一种,例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚氧化烯。这常常通过共价地结合到蛋白质和非蛋白质聚合物,例如PEG两者的连接部分来实现。已经显示这类PEG缀合的生物分子具有临床上有用的性质,包括更好的物理和热稳定性、针对酶促降解易感性的保护、增加的溶解度、更长的体内循环半衰期和降低的清除率、减弱的免疫原性和抗原性以及降低的毒性。

[0166] 除了聚乙二醇化对药物代谢动力学参数的有益作用以外,聚乙二醇化本身还可以增强活性。例如,已经显示PEG-IL-10比未聚乙二醇化的IL-10能更有效地对抗某些癌症(参见例如EP 206636A2)。

[0167] 适合于缀合到多肽序列的PEG通常在室温下可溶于水中,并且具有通式 $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$,其中R为氢或保护基,诸如烷基或烷醇基,并且其中n是1至1000的整数。当R是保护基时,它通常具有1至8个碳。缀合到多肽序列的PEG可以是线性或分支的。本公开涵盖了分支的PEG衍生物、“星形-PEG”和多臂PEG。本公开中使用的PEG的分子量不限于任何特定范围,并且在本文中的其他地方阐述了诸多实例;举例来说,某些实施方案具有在5kDa与20kDa之间的分子量,而其他实施方案具有在4kDa与10kDa之间的分子量。

[0168] 本公开还涵盖了含缀合物的组合物,其中PEG具有不同的n值,并且因此各种不同的PEG以特定比率存在。例如,一些组合物包含其中n=1、2、3和4的缀合物的混合物。在一些组合物中,其中n=1的缀合物的百分比为18%至25%,其中n=2的缀合物的百分比为50%至66%,其中n=3的缀合物的百分比为12%至16%,并且其中n=4的缀合物的百分比至多5%。这类组合物可以通过本领域中已知的反应条件和纯化方法来产生。整个说明书中描述了示例性反应条件。可以使用阳离子交换色谱法来分离缀合物,并且之后鉴定含有缀合物的级份,所述缀合物具有例如希望数目的附接的PEG,经纯化而不含未经修饰的蛋白质序列和具有其他数目的附接的PEG的缀合物。

[0169] 聚乙二醇化最常发生于多肽的N-末端处的 α 氨基、赖氨酸残基的侧链上的 ϵ 氨基和组氨酸残基的侧链上的咪唑基。由于大多数重组多肽具有单个 α 和多个 ϵ 氨基和咪唑基,可以根据接头化学性质来产生许多位置异构体。可以在本文中应用本领域中已知的通用聚乙二醇化策略。

[0170] 两种广泛使用的第一代活化的单甲氧基PEG(mPEG)是琥珀酰亚胺碳酸酯PEG(SC-PEG;参见例如Zalipsky等,(1992)Biotechnol.Appl.Biochem 15:100-114;以及Miron和Wilcheck(1993)Bio-conjug.Chem.4:568-569)和苯并三唑碳酸酯PEG(BTC-PEG;参见例如Dolence等,美国专利号5,650,234),它们优先与赖氨酸残基发生反应以形成氨基甲酸酯键,但是也已知其会与组氨酸和酪氨酸残基发生反应。至某些分子(例如,IFN α)上的组氨酸残基的键已经显示是水解不稳定的咪唑氨基甲酸酯键(参见例如Lee和McNemar,美国专利号5,985,263)。第二代聚乙二醇化技术已被设计来避免这些不稳定的键以及残基反应中选择性的缺乏。PEG-醛接头的使用通过还原胺化反应靶向多肽的N-末端上的单个位点。

[0171] PEG可以经由介导多肽序列中的一个或多个的游离氨基或羧基与聚乙二醇之间的键的末端反应性基团(“间隔基”)结合到本公开的多肽。具有可以结合到游离氨基的间隔基的PEG包括N-羟基琥珀酰亚胺聚乙二醇,其可以通过用N-羟基琥珀酰亚胺活化聚乙二醇的琥珀酸酯来制备。可以结合到游离氨基的另一种活化的聚乙二醇是2,4-双(0-甲氧基聚乙二醇)-6-氯-s-三嗪,其可以通过使聚乙二醇单甲醚与氰尿酸氯发生反应来制备。结合到游离羧基的活化的聚乙二醇包括聚氧乙烯二胺。

[0172] 本公开的多肽序列中的一个或多个与具有间隔基的PEG的缀合可以通过各种常规方法来执行。例如,利用试剂与蛋白质的摩尔比4:1至30:1,可以在5至10的pH,在4℃至室温的温度下在溶液中执行缀合反应,持续30分钟至20小时。可以对反应条件进行选择以将反应引向主要产生希望的取代度。一般而言,低温、低pH(例如,pH=5)和短反应时间倾向于减少所附接的PEG的数目,而高温、中性至高pH(例如,pH≥7)和较长反应时间倾向于增加所附接的PEG的数目。可以使用本领域中已知的各种手段来终止反应。在一些实施方案中,通过使反应混合物酸化并在例如-20℃下冷冻来终止反应。在例如美国专利号5,252,714;5,643,575;5,919,455;5,932,462;以及5,985,263中论述了各种分子的聚乙二醇化。在例如美国专利号7,052,686中描述了PEG-IL-10。实验部分中阐述了所涵盖的用于本文中的特定反应条件。

[0173] 本公开还涵盖了PEG模拟物的使用。已经开发出重组PEG模拟物,其保留了PEG的属性(例如,增强的血清半衰期),同时赋予若干额外的有利性质。举例来说,可以重组地产生已经融合到感兴趣的肽或蛋白质药物的能够形成类似于PEG的扩展构象的简单多肽链(包括例如Ala、Glu、Gly、Pro、Ser和Thr)(例如,Amunix's XTEN technology;Mountain View, CA)。这消除了制造过程中对额外的缀合步骤的需要。此外,已建立的分子生物学技术实现了对多肽链的侧链组成的控制,从而优化免疫原性和制造性质。

[0174] 糖基化:出于本公开的目的,“糖基化”意在泛指将聚糖连接到蛋白质、脂质或其他有机分子的酶促过程。术语“糖基化”在结合本公开使用时一般意图表示添加或缺失一个或多个碳水化合物部分(或通过去除潜在糖基化位点或通过以化学和/或酶促手段使糖基化缺失)和/或添加天然序列中可能存在或不存在的一个或多个糖基化位点。另外,所述短语包括天然蛋白质的糖基化的定性变化,涉及所存在的各种碳水化合物部分的性质和例的变化。

[0175] 糖基化会显著地影响多肽,诸如IL-10的物理性质(例如,溶解度),并且可能在蛋白质稳定性、分泌和亚细胞定位方面也很重要。糖基化的多肽还会展现出增强的稳定性,或者会改进一种或多种药物代谢动力学性质,诸如半衰期。此外,溶解度改进可以例如使得能够产生比包含非糖基化多肽的制剂更适合用于药物施用的制剂。

[0176] 糖基化位点的添加可以通过改变氨基酸序列来实现。对多肽的改变可以例如通过添加一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基(对于O-连接的糖基化位点)或天冬酰胺残基(对于N-连接的糖基化位点)或用所述残基进行取代来进行。N-连接和O-连接的寡糖和每一种类型中发现的糖残基的结构可以是不同的。在两者方面常常发现的一种糖类型是N-乙酰神经氨酸(在下文中称为唾液酸)。唾液酸通常是N-连接和O-连接的寡糖的末端残基,并且借助于其负电荷,可以赋予糖蛋白酸性性质。本公开的一个具体实施方案包括N-糖基化变体的产生和用途。

[0177] 可以任选地通过核酸水平上的改变,特别是通过使编码多肽的核酸在预先选定的碱基处突变,使得产生将翻译成所希望的氨基酸的密码子来改变本公开的多肽序列。

[0178] 聚唾液酸化:本公开还涵盖了聚唾液酸化,即多肽与天然存在的可生物降解的 α -(2 $\rightarrow$ 8)连接的聚唾液酸(“PSA”)缀合,以便于改进多肽的稳定性和体内药物代谢动力学性质的用途。PSA是可生物降解的无毒的天然聚合物,其具有高亲水性,使得其在血液中具有高表观分子量,这增加其血清半衰期。另外,一系列肽和蛋白质治疗剂的聚唾液酸化已带来了明显减少的蛋白酶解、体内活性的活性保持以及免疫原性和抗原性的降低(参见例如G.Gregoriadis等,Int.J.Pharmaceutics 300 (1-2):125-30)。可获得用于位点特异性聚唾液酸化的各种技术(参见例如T.Lindhout等,PNAS 108 (18) 7397-7402 (2011))。

[0179] 白蛋白融合:用于缀合的其他合适的组分和分子包括白蛋白,诸如人血清白蛋白(HSA)、猕猴血清白蛋白和牛血清白蛋白(BSA)。

[0180] 根据本公开,可以使白蛋白在羧基末端、氨基末端、羧基末端与氨基末端两者处以及在内部缀合到药物分子(例如,本文描述的多肽)(参见例如USP 5,876,969和USP 7,056,701)。

[0181] 在本公开所涵盖的HSA-药物分子缀合物中,可以使用各种形式的白蛋白,诸如白蛋白分泌前序列及其变体、其片段和变体以及HSA变体。这类形式通常具有一种或多种所希望的白蛋白活性。在另外的实施方案中,本公开涉及融合蛋白,其包含直接或间接地融合到白蛋白、白蛋白片段和白蛋白变体等的多肽药物分子,其中融合蛋白具有比未融合的药物分子更高的血浆稳定性和/或融合蛋白保留未融合的药物分子的治疗活性。在一些实施方案中,通过诸如肽接头或其修饰形式的接头来实现间接融合。

[0182] 如上文所提及,可以例如通过基因操控来实现白蛋白与本公开的一种或多种多肽的融合,使得将编码HSA的核酸或其片段连接到编码一个或多个多肽序列的核酸。

[0183] 替代的白蛋白结合策略:已经开发出若干种白蛋白-结合策略作为指导融合的替代方案,并且所述策略可以与本文描述的IL-10试剂一起使用。举例来说,本公开涵盖了通过缀合的脂肪酸链(酰化)和包含白蛋白结合结构域(ABD)多肽序列和本文描述的一种或多种多肽的序列的融合蛋白来进行白蛋白结合。

[0184] 与其他分子缀合:用于缀合的其他合适的组分和分子包括例如甲状腺球蛋白;破伤风类毒素;白喉类毒素;聚氨基酸,诸如聚(D-赖氨酸:D-谷氨酸);轮状病毒的VP6多肽;流感病毒血凝素、流感病毒核蛋白;钥孔虫戚血兰素(KLH);以及乙型肝炎病毒核心蛋白和表面抗原;或前述各项的任何组合。

[0185] 因此,本公开涵盖了一种或多种其他组分或分子在多肽序列的N-末端和/或C-末端处的缀合,所述多肽序列为诸如另一种多肽(例如,具有与标的多肽异源的氨基酸序列的多肽)或载体分子。因此,示例性多肽序列可以提供为与另一种组分或分子形成的缀合物。

[0186] 还可以使IL-10多肽缀合到大型缓慢代谢的大分子,诸如蛋白质;多糖,诸如琼脂糖凝胶、琼脂糖、纤维素或纤维素珠粒;聚合氨基酸,诸如聚谷氨酸或聚赖氨酸;氨基酸共聚物;已灭活的病毒颗粒;已灭活的细菌毒素,诸如来自白喉、破伤风、霍乱的一类毒素或白细胞毒素分子;已灭活的细菌;以及树突细胞。这类缀合形式在需要时可以用于产生针对本公开的多肽的抗体。

[0187] 用于缀合的其他候选组分和分子包括适合用于分离或纯化的那些。具体的非限制

性实例包括结合分子,诸如生物素(生物素-亲和素特异性结合对)、抗体、受体、配体、凝集素、或包含固体载体(包括例如塑料或聚苯乙烯珠粒、板或珠粒、磁性珠粒、测试条和膜)的分子。

[0188] Fc-融合分子:在某些实施方案中,可以使本公开的多肽序列的氨基末端或羧基末端与免疫球蛋白Fc区(例如,人Fc)融合,以形成融合缀合物(或融合分子)。已经显示Fc融合缀合物会增加生物药物的系统半衰期,并且因此生物药物产品可以需要不太频繁的施用。

[0189] Fc结合到作为血管内衬的内皮细胞中的新生Fc受体(FcRn),而且在结合后,Fc融合分子能被保护免于降解,并且被重新释放到循环中,从而使所述分子在循环中保持更久。据信这种Fc结合是内源性IgG借以保持其长血浆半衰期的机制。更近的Fc融合技术将单份生物药物连接到抗体的Fc区以便相较于传统的Fc融合缀合物,使生物药物的药物代谢动力学和药效学性质得到优化。

[0190] 其他修饰:本公开涵盖了当前已知或将来要开发的其他IL-10修饰用于改进一种或多种性质的用途。实例包括羟乙基淀粉化(hesylation),其各方面描述于例如美国专利申请号2007/0134197和2006/0258607中;以及包含作为融合标签的SUMO的融合分子(LifeSensors, Inc.; Malvern, PA)。

[0191] 接头:上文已描述了接头及其使用。用于修饰本公开的多肽序列的任何前述组分和分子可以任选地经由接头缀合。合适的接头包括“柔性接头”,所述柔性接头通常具有足够长度以允许经修饰的多肽序列与连接的组分和分子之间的一些移动。接头分子的长度通常为约6-50个原子。接头分子也可以是例如芳基乙炔、含有2-10个单体单元的乙二醇低聚物、二胺、二酸、氨基酸或其组合。合适的接头可以容易地选择并且可以是任何合适的长度,诸如1个氨基酸(例如,Gly)、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10-20、20-30、30-50或超过50个氨基酸。

[0192] 柔性接头的实例包括甘氨酸聚合物(G)_n、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物、甘氨酸-丝氨酸聚合物(例如,(G_mS_o)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:13)、(G_mS_oG_m)_n(SEQ ID NO:14)、(G_mS_oG_mS_oG_m)_n(SEQ ID NO:15)、(GSGGS_m)_n(SEQ ID NO:16)、(GSGS_mG)_n(SEQ ID NO:17)和(GGG_m)_n(SEQ ID NO:18)及其组合,其中m、n和o各自独立地选自至少1至20,例如1-18、2-16、3-14、4-12、5-10、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10的整数),以及其他柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是相对非结构化的,并且因此可以充当组分之间的中性系链。柔性接头的实例包括但不限于:GGSG(SEQ ID NO:19)、GGSGG(SEQ ID NO:20)、GSGSG(SEQ ID NO:21)、GSGGG(SEQ ID NO:22)、GGGSG(SEQ ID NO:23)以及GSSSG(SEQ ID NO:24)。

[0193] 柔性接头的其他实例包括甘氨酸聚合物(G)_n或甘氨酸-丝氨酸聚合物(例如,(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:25)、(GGGS)_n(SEQ ID NO:26)和(GGGGS)_n(SEQ ID NO:27),其中n=1至50,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10-20、20-30、30-50)。示例性柔性接头包括但不限于:GGGS(SEQ ID NO://)、GGGGS(SEQ ID NO:28)、GGSG(SEQ ID NO:29)、GGSGG(SEQ ID NO:30)、GSGSG(SEQ ID NO:31)、GSGGG(SEQ ID NO:32)、GGGSG(SEQ ID NO:33)以及GSSSG(SEQ ID NO:34)。这些接头序列的多聚体(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10-20、20-30或30-50)可以连接在一起提供柔性接头,所述柔性接头可以用于将异源氨基酸序列缀合到本文公开的IL-10试剂。如本文所述,异源氨基酸序列可以是信号序列和/或融合伴侣,诸如白蛋白、Fc序列等等。

[0194] 用于产生PD1+、CD8+T细胞和用于疗法的IL-10试剂施用

[0195] 为了诱发外周PD1+,CD8+、疾病抗原特异性T细胞,以治疗有效剂量向受试者施用IL-10试剂(例如,PEG-IL-10)。治疗有效剂量可以由熟练的执业医师考虑诸如以下的因素来容易地确定:有待治疗的疾病、通过疗法将要实现的目标、施用于受试者的其他治疗剂、以及各种有待治疗的受试者的通常评估的性质,诸如对其施用IL-10制剂的受试者的年龄、重量、性别以及健康和身体状况以及施用途径。IL-10试剂的治疗有效剂量可以容易地根据例如安全性和剂量递增试验、体内研究(例如,动物模型)以及技术人员已知的其他方法来确定。

[0196] 如在其他地方详细地所论述,本公开涵盖了多个实施方案,其中施用IL-10来实现一定的血清谷浓度和/或维持一定的平均血清谷浓度。

[0197] 一般而言,给药参数决定了治疗有效剂量的量小于会对受试者不可逆地产生毒性的量(即,最大耐受剂量“MTD”),并且不小于对受试者产生可测量的效果所需的量。考虑到施用途径和其他因素,这些量通过例如与ADME相关联的药物代谢动力学和药效学参数来确定。

[0198] 治疗有效剂量(ED)是在一定分数的服用试剂的受试者中产生治疗响应或希望的效果的所述试剂的剂量或量。试剂的“中值有效剂量”或ED50是在接受其施用的群体的50%中产生治疗响应或希望的效果的试剂的剂量或量。虽然ED50通常用作对试剂效果的合理预期的量度,但是并不一定是考虑到所有相关因素,临床医生都可能认为适宜的剂量。因此,在一些情况下,有效量可以超过计算的ED50,在其他情况下,有效量可以小于计算的ED50,而在其他情况下,有效量可以与计算的ED50相同。

[0199] 治疗有效剂量的PEG-IL-10的实例的范围可以为约0.01至约100μg PEG-IL-10/kg体重/天、约0.1至20μg PEG-IL-10/kg体重/天、约0.5至10μg PEG-IL-10/kg体重/天、或约1至4μg PEG-IL-10/kg体重/天。在一些实施方案中,PEG-IL-10通过连续输注以递送约50至800μg蛋白质/kg体重/天(例如,约1至16μg蛋白质/kg体重/天的PEG-IL-10)来施用。输注率可以基于对例如不良反应和血细胞计数的评估而变化。IL-10试剂的其他具体给药参数在本文的其他地方进行描述。

[0200] 在某些实施方案中,IL-10试剂的剂量以“单位剂型”呈现。短语“单位剂型”指物理上离散的单位,每个单位单独或结合一种或多种另外的试剂一起含有预定量的足以产生希望的效果的IL-10多肽。将了解,单位剂型的参数将取决于具体试剂和有待实现的效果。

[0201] IL-10试剂的系统水平可以用若干方式表征,包括:(1)高于某一指定水平或在一定水平范围内的平均IL-10血清谷浓度;(2)持续某一时间量高于某一指定水平的平均IL-10血清谷浓度;(3)高于或低于某一指定水平或在一定水平范围内的稳态IL-10血清浓度水平;或(4)高于或低于某一指定水平或在某一水平范围内的浓度分布的C_{最大值}。如本文所阐述,已经发现在施用IL-10试剂的时段内维持平均血清谷IL-10浓度对于某些疾病状态的治疗是特别有益的。

[0202] 在本公开的一些实施方案中,在IL-10试剂疗法的过程内有用的血浆和/或IL-10试剂的血清水平浓度分布包括:以下的平均IL-10血浆和/或血清谷浓度:大于约1.0pg/mL、大于约10.0pg/mL、大于约20.0pg/mL、大于约30pg/mL、大于约40pg/mL、大于约50.0pg/mL、大于约60.0pg/mL、大于约70.0pg/mL、大于约80.0pg/mL、大于约90pg/mL、大于约0.1ng/mL、大于约0.2ng/mL、大于约0.3ng/mL、大于约0.4ng/mL、大于约0.5ng/mL、大于约0.6ng/mL、大

于约0.7ng/mL、大于约0.8ng/mL、大于约0.9ng/mL、大于约1.0ng/mL、大于约1.5ng/mL、大于约2.0ng/mL、大于约2.5ng/mL、大于约3.0ng/mL、大于约3.5ng/mL、大于约4.0ng/mL、大于约4.5ng/mL、大于约5.0ng/mL、大于约5.5ng/mL、大于约6.0ng/mL、大于约6.5ng/mL、大于约7.0ng/mL、大于约7.5ng/mL、大于约8.0ng/mL、大于约8.5ng/mL、大于约9.0ng/mL、大于约9.5ng/mL或大于约10.0ng/mL。

[0203] 在本公开的具体实施方案中,向受试者施用IL-10试剂以在IL-10治疗的过程内实现以下平均IL-10血清谷浓度:1.0pg/mL至10ng/mL的范围内、可替代地1.0pg/mL至100pg/mL的范围内、可替代地0.1ng/mL至1.0ng/mL的范围内、可替代地1.0ng/mL至10ng/mL的范围内。应理解,本公开涵盖并入由本文阐述的那些涵盖的任何浓度的范围,即使这类范围并未明确陈述。举例来说,在一个实施方案中,平均血清IL-10浓度可以是在0.5ng/mL至5ng/mL的范围内。进一步举例来说,本公开的具体实施方案包括以下范围的平均IL-10血清谷浓度:约0.5ng/mL至约10.5ng/mL、约1.0ng/mL至约10.0ng/mL、约1.0ng/mL至约9.0ng/mL、约1.0ng/mL至约8.0ng/mL、约1.0ng/mL至约7.0ng/mL、约1.5ng/mL至约10.0ng/mL、约1.5ng/mL至约9.0ng/mL、约1.5ng/mL至约8.0ng/mL、约1.5ng/mL至约7.0ng/mL、约2.0ng/mL至约10.0ng/mL、约2.0ng/mL至约9.0ng/mL、约2.0ng/mL至约8.0ng/mL以及约2.0ng/mL至约7.0ng/mL。在具体实施方案中,在治疗持续时间内维持1-2ng/mL的平均IL-10血清谷浓度。

[0204] 本公开还涵盖了多个实施方案,其中平均IL-10血清峰浓度在IL-10试剂治疗的持续时间内小于或等于约10.0ng/mL。另外的实施方案涵盖大于或等于约1.0pg/mL的平均IL-10血清谷浓度。最优平均血清浓度通常是实现所希望的治疗效果而不会引入不希望的不良反应时所处的浓度。

[0205] 本公开的某些实施方案提供了一种用于监测接受IL-10疗法的受试者以预测并因此潜在地避免不良反应的方法,所述方法包括:(1)测量受试者的IL-10的峰浓度;(2)测量受试者的IL-10的谷浓度;(3)计算峰-谷波动;以及(4)使用所计算的峰-谷波动来预测受试者体内的潜在不良反应。在特定的受试者群体中,较小的峰-谷波动指示受试者将经历IL-10相关的不良反应的可能性较低。另外,在一些实施方案中,峰-谷波动尤其是在使用特定给药参数治疗特定疾病、病症和病状的过程中确定,并且所述波动被用作参考标准。

[0206] 对于大多数药物,血浆药物浓度以多指数方式下降。在静脉内施用之后接着的是,药物迅速分布在整个初始空间(最低程度定义为血浆体积),并且然后进行到血管外空间(例如,某些组织)的更缓慢的均衡的分布。静脉内IL-10施用与这种二区室动力学模型相关联(参见Rachmawati,H.等,(2004) Pharm. Res. 21 (11):2072-78)。还研究了皮下重组hIL-10的药物代谢动力学性质(Radwanski,E.等,(1998) Pharm. Res. 15 (12):1895-1901)。因此,在评定适当的IL-10给药相关参数时,分布体积考虑是恰当的。此外,已经探索了将IL-10试剂靶向特定细胞类型的工作(参见例如Rachmawati,H. (2007年5月) Drug Met. Dist. 35 (5):814-21)。

[0207] 本公开涵盖使得能够如上文所阐述般维持正在治疗的受试者体内的任何IL-10血清谷浓度的IL-10试剂的任何剂量和给药方案的施用。举例来说,但不带限制性,当受试者为人时,未聚乙二醇化的hIL-10可以按以下剂量施用:大于0.5μg/kg/天、大于1.0μg/kg/天、大于2.5μg/kg/天、大于5μg/kg/天、大于7.5μg/kg、大于10.0μg/kg、大于12.5μg/kg、大于15μg/kg/天、大于17.5μg/kg/天、大于20μg/kg/天、大于22.5μg/kg/天、大于25μg/kg/天、

大于30 μ g/kg/day或大于35 μ g/kg/天。另外,举例来说,但不带限制性,当受试者为人时,包含相对较小PEG的聚乙二醇化的hIL-10(例如,5kDa单-、二-PEG-hIL-10)可以按以下剂量施用:大于0.5 μ g/kg/天、大于0.75 μ g/kg/天、大于1.0 μ g/kg/天、大于1.25 μ g/kg/天、大于1.5 μ g/kg/天、大于1.75 μ g/kg/天、大于2.0 μ g/kg/天、大于2.25 μ g/kg/天、大于2.5 μ g/kg/天、大于2.75 μ g/kg/天、大于3.0 μ g/kg/天、大于3.25 μ g/kg/天、大于3.5 μ g/kg/天、大于3.75 μ g/kg/天、大于4.0 μ g/kg/天、大于4.25 μ g/kg/天、大于4.5 μ g/kg/天、大于4.75 μ g/kg/天或大于5.0 μ g/kg/天。

[0208] 尽管先前关于IL-10血清浓度、实现特定IL-10血清浓度所需的剂量和治疗方案等的论述都涉及用IL-10试剂(例如,PEG-IL-10)的单一疗法,但是当IL-10试剂(例如,PEG-IL-10)与一种或多种附加治疗组合施用时,熟练的技术人员(例如,药理学家)能够确定最优给药方案。

[0209] 施用途径

[0210] 本公开涵盖以任何适当的方式施用IL-10试剂(例如,PEG-IL-10)及其组合物。合适的施用途径包括肠胃外(例如,肌肉内、静脉内、皮下(例如,注射或植入物)、腹膜内、脑池内、关节内、腹膜内、脑内(实质内)和脑室内)、口服、鼻、阴道、舌下、眼内、直肠、局部(例如,经皮)、舌下和吸入。也可以利用通常皮下或肌肉内施用的积存注射以在限定的时间段内释放本文公开的IL-10试剂。

[0211] 用于产生疾病抗原特异性PD1+CD8+外周T细胞的方法

[0212] 如上所述,在一个实施方案中,本公开提供了一种通过向患者施用治疗有效量的IL-10试剂来诱导疾病抗原特异性CD8+T细胞扩增到患有可用IL-10试剂疗法治病的疾病的受试者的外周中的方法。此外,疾病抗原特异性CD8+T细胞可以在向受试者施用治疗有效剂量的IL-10试剂之后通过从受试者获得组织样品来分离。在一个实施方案中,抗原特异性CD8+T细胞是PD1+ (例如,PD1中等-高),CD8+T细胞从用治疗有效剂量的IL-10试剂治疗的受试者通过从受试者获得外周血的样品来获得。

[0213] 参考图7,本公开的方法的一般实现方式的实例可以包括向患有适于通过IL-10试剂治疗的疾病的患者施用IL-10试剂疗法,例如PEG-IL-10疗法710。在患者已接受IL-10试剂疗法预定时间量之后,从患者收集含有淋巴细胞的组织样品(例如,含有外周血淋巴细胞(PBL)的外周血样品)720。任选地,可以监测患者对IL-10试剂疗法的响应。在一些情况下,如果患者表现出至少稳定疾病状态或对IL-10试剂疗法的至少部分响应,则从患者收集组织样品。在一些情况下,如果患者并未显示出至少稳定疾病或至少部分响应,则继续IL-10试剂疗法而不收集组织样品。

[0214] 在从患者收集组织样品720之后,通过核酸测序分析组织样品中的核酸以获得TCR序列(例如,编码可变 α (V α)TCR多肽的核酸和/或编码可变 β (V β)TCR多肽的核酸)740。可以分析序列来获得针对CD8+T细胞上表达的TCR编码V α TCR多肽的核酸和/或编码V β TCR多肽的核酸的[相对]丰度的估计。通过在IL-10试剂疗法之前或在IL-10试剂疗法期间的较早时间点将针对样品中的CD8+T细胞上表达的TCR编码V α TCR多肽的核酸和/或编码V β TCR多肽的核酸的丰度与从患有适于IL-10试剂疗法的疾病的一名或多名患者获得的参考样品中编码V α TCR多肽的核酸和/或编码V β TCR多肽的核酸的丰度进行比较,有可能确定表达抗原特异性TCR的特定T细胞群(由 α 链和 β 链TCR对序列界定)是已克隆扩增,克隆缩减还是响应于IL-10

试剂疗法已新产生所述细胞群。

[0215] 样品中编码V α TCR多肽的核酸和/或编码V β TCR多肽的核酸的丰度可以使用任何合适的措施来测定。在一些情况下,丰度是编码V α TCR多肽的核酸和/或编码V β TCR多肽的核酸相对于参考核酸的频率。在一些情况下,丰度是编码V α TCR多肽的核酸和/或编码V β TCR多肽的核酸相对于参考核酸的数目或其以生物信息学方式获得的估计。

[0216] 扩增可以包括来自受试者的样品中的V α TCR多肽和/或编码V β TCR多肽的核酸相较于参考样品呈3倍或更大,例如5倍或更大、10倍或更大、20倍或更大或30倍或更大的丰度变化。

[0217] 在一些情况下,样品含有PBL,其可以基于细胞表面标志物表达而分级,以分离感兴趣的抗原特异性CD8⁺T细胞。感兴趣的CD8⁺T细胞可以包括基于细胞表面标志物的升高的表达而鉴定的活化的疾病抗原特异性CD8⁺T细胞,诸如PD1 (CD279) 和/或LAG3。在一些实施方案中,所述方法可以任选地包括从外周血样品鉴定和分离PD1⁺CD8⁺T细胞和/或PD-1⁺Lag3⁺CD8⁺T细胞。在一个实施方案中,T细胞被鉴定和分离为PD1中等-高、CD8⁺以及IFN γ 、CD45RO、粒酶B和穿孔蛋白中的一者或多者的表达阳性。分离的CD8⁺T细胞,例如PD1⁺CD8⁺T细胞可以富集于对疾病相关抗原特异的活化的T细胞中,所述细胞的疾病抗原特异性进而由 α 链和 β 链TCR对序列控制。

[0218] 这些TCR对氨基酸序列可以包括赋予T细胞疾病抗原特异性的序列。因此,在一些实施方案中,本公开的一种方法包括通过转导编码全长 α 链和 β 链TCR对氨基酸序列的核酸构建体、或含有 α 链和 β 链TCR对氨基酸序列的可变区的嵌合抗原受体来产生重组的疾病抗原特异性T细胞750,其中 α 链和 β 链TCR对氨基酸序列来源于从用IL-10试剂治疗的患者获得的含有疾病抗原特异性T细胞的组织样品。这些工程改造的疾病抗原特异性T细胞然后可以施用于需要治疗疾病的合适的患者,所述疾病的特征为由工程改造的疾病抗原特异性T细胞上表达的TCR特异地结合的抗原的表达。

[0219] 本公开的一种方法可以包括从已对其施用IL-10试剂来治疗病状的患者获得疾病抗原特异性CD8⁺T细胞的群体。患者可以是患有对IL-10试剂疗法有响应的病状,例如疾病,即CD8⁺T细胞的抗原反应的细胞毒活性带来病状的改善的病状的任何个体。

[0220] 患者可以患有对IL-10试剂疗法有响应的任何病状,包括但不限于:癌症;胆固醇相关疾病;以及由病原体,诸如病毒、细菌、真菌、原生动物和具有细胞内生命周期的寄生虫引起的疾病。

[0221] 根据本文描述的方法,病状或疾病可以是增殖性病状,诸如癌症或癌症相关病症。尽管不限于特定癌症,但是癌症可以是实体肿瘤,包括与结肠癌、黑素瘤和鳞状细胞癌相关的肿瘤,或所述癌症可以是血液病。患者可以患有增殖性病状或疾病,包括但不限于:子宫癌、宫颈癌、乳腺癌、前列腺癌、睾丸癌、胃肠道癌(例如,食管癌、口咽癌、胃癌、小肠癌或大肠癌、结肠癌或直肠癌)、肾癌、肾细胞癌、膀胱癌、骨癌、骨髓癌、皮肤癌、头或颈癌、皮肤癌、肝癌、胆囊癌、心脏癌、肺癌、胰腺癌、唾液腺癌、肾上腺癌、甲状腺癌、脑癌(例如,胶质瘤)、神经节癌、中枢神经系统(CNS)和周围神经系统(PNS)癌症;以及造血系统和免疫系统(例如,脾或胸腺)的癌症。在具体实施方案中,肿瘤或癌症是结肠癌、卵巢癌、乳腺癌、黑素瘤、肺癌、成胶质细胞瘤或白血病。术语癌症相关疾病、病症和病状的使用意在广义地指直接或间接地与癌症相关联的病状,并且包括例如血管生成和癌前病状,诸如发育不良。在一

些实施方案中,癌症是转移性的。

[0222] 病毒病原体包括单链DNA (ssDNA)、双链DNA (dsDNA) 和RNA病毒。在一些实施方案中,病毒是嗜肝DNA病毒、黄病毒、逆转录病毒或疱疹病毒。在一些情况下,患者患有由不限于以下各项引起的病毒性感染:甲型肝炎、乙型肝炎 (HBV)、丙型肝炎 (HCV)、流感、水痘带状疱疹病毒 (VZV)、腺病毒、EB病毒 (EBV)、I型单纯疱疹病毒 (HSV-I)、II型单纯疱疹病毒 (HSV-II)、鼻病毒、埃可病毒 (echovirus)、轮状病毒、呼吸道合胞病毒、人乳头瘤病毒 (HPV)、乳多空病毒、巨细胞病毒 (CMV)、棘状病毒 (echinovirus)、虫媒病毒、汉坦病毒 (hantavirus)、柯萨奇病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、风疹病毒、脊髓灰质炎病毒、I型人免疫缺陷病毒 (HIV-I) 和II型人免疫缺陷病毒 (HIV-II)、人T淋巴细胞病毒 (HTLV-1和HTLV-2)、冠状病毒、脊髓灰质炎病毒、6型人类疱疹病毒 (HHV-6) 等。

[0223] 在一些实施方案中,患者是以下这样的受试者:如下文进一步所描述已对其施用IL-10试剂,并且其病状对IL-10试剂治疗显示出至少部分临床响应。对治疗的临床响应可以使用任何合适的方法来测量,并且将随着所治疗的病状而变化。

[0224] 例如,在病状是肿瘤的情况下,受试者对IL-10试剂治疗的响应通过在治疗前后测量例如肿瘤负荷 (例如,肿瘤质量、肿瘤体积、肿瘤生物标志物的量等) 和/或肿瘤分布来获得。患有癌症的受试者对IL-10试剂治疗的“部分临床响应”通常指肿瘤大小、或癌症在患者体内的分布范围的减小,并且可以包括相较于治疗前治疗后10%或更大,例如20%或更大、30%或更大、40%或更大,包括50%或更大和99%或更小,例如90%或更小、80%或更小、70%或更小,包括60%或更小的测量的临床变量 (例如,肿瘤体积和/或肿瘤质量) 的降低,其中100%降低可以表示所测量的临床变量降低到不可检测的水平和/或背景水平。病状的背景水平可以是在已知未患有所述病状的个体中获得的关于所述病状的临床变量的平均测量值。相比之下,癌症受试者在IL-10试剂疗法之后被称为展现出“稳定疾病”,其中如由选定临床变量 (例如像,肿瘤体积和/或肿瘤质量) 所测量,癌症的程度或严重性既未降低也未增加。癌症受试者在IL-10试剂疗法之后被分类为疗法的“无响应者”,其中如由选定临床变量 (例如像,肿瘤体积和/或肿瘤质量) 所测量,癌症的程度或严重性增加。

[0225] 在一些实施方案中,病毒感染性疾病对IL-10试剂治疗的响应通过比较IL-10试剂治疗前后的相关临床测量值,例如 (例如,在血液中的) 病毒滴度、(例如,在血液中的) 抗病毒抗体、(例如,在血液或组织中,例如,如由PCR所检测的) 病毒来源的核酸的水平来获得。病毒性感染对IL-10试剂治疗的“部分临床响应”可以包括相较于治疗前治疗后10%或更大,例如20%或更大、30%或更大、40%或更大,包括50%或更大和99%或更小,例如90%或更小、80%或更小、70%或更小,包括60%或更小的测量的临床变量 (例如,病毒效价、病毒特异性抗体滴度和/或病毒蛋白滴度) 的降低,其中100%降低可以表示所测量的临床变量降低到不可检测的水平和/或背景水平。例如,在一些实施方案中,对IL-10试剂疗法的至少部分临床响应可以是在以下一者或多者:在血液或血液级分 (血清/血浆) 中可由qPCR检测的病毒核酸的至少90%降低;已知病毒抗原的抗体滴度的至少90%降低;血清中 (例如,如由ELISA所检测的) 病毒蛋白的至少90%降低。病状的背景水平可以是在已知并未患有所述病状的个体中获得的关于所述病状的临床变量的平均测量值。

[0226] IL-10试剂疗法可以是如上所述用于治疗病状的任何合适的IL-10试剂疗法,并且包括向患者施用治疗有效量的IL-10试剂。合适的IL-10试剂包括重组人IL-10和聚乙二醇

化的IL-10,并且描述于例如US 6,217,857;US 2008/0317707;以及US 8,691,205中。在一些实施方案中,IL-10试剂是例如,如US 8,691,205中所描述的聚乙二醇化的IL-10,诸如单聚乙二醇化的IL-10和二聚乙二醇化的IL-10的混合物。施用方案可以包括任何合适的剂量、给药间隔和给药周期以对例如癌症或感染性疾病的病状实现治疗效果。在一些情况下,施用方案包括以下剂量的IL-10试剂:0.1 μ g/Kg或更多,例如0.5 μ g/Kg或更多、1.0 μ g/Kg或更多、2.0 μ g/Kg或更多、5.0 μ g/Kg或更多,包括10 μ g/Kg或更多;以及50 μ g/Kg或更少,例如40 μ g/Kg或更少、30 μ g/Kg或更少,包括20 μ g/Kg或更少。在一些情况下,施用方案包括以下范围内的剂量的IL-10试剂:0.1至50 μ g/Kg、0.5至40 μ g/Kg、1.0至40 μ g/Kg,包括10至40 μ g/Kg。

[0227] 在一些情况下,IL-10试剂的施用方案包括按以下间隔给药:每周一次或更短,例如每三天一次或更短、每两天一次或更短,包括每天一次或更短的间隔;以及一天三次或更长,例如一天两次或更长,包括一天一次或更长的间隔。在一些情况下,施用方案包括按以下范围内的间隔给药:一天三次至一周一次,例如一天两次至每三天一次,包括一天两次至每两天一次。在一些情况下,IL-10疗法已向患者施用至少1-150天、至少5-100天、至少10-50天、至少15-45天、至少20-40天、至少30天或更多,并且可能已施用1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、或29天或更多。在一些情况下,IL-10试剂将持续施用几周,例如3周或更多、4周或更多、5周或更多、6周或更多、2个月或更多,包括3个月或更多,并且施用5年或更少,例如1年或更少、9个月或更少、6个月或更少,包括3个月或更少后从患者获得。在一些实施方案中,IL-10疗法已向患者施用2周至5年,例如3周至1年、4周至9个月,包括4周至6个月。

[0228] 如上所述,从用IL-10试剂疗法治疗的患者获得的组织样品可以是含有CD8+T细胞的任何合适的组织样品。在一些情况下,组织样品是肿瘤样品,诸如来自原发性肿瘤或其转移的样品。在一些实施方案中,样品是外周血样品。在一些实施方案中,外周CD8+T细胞从获自患者的样品,例如外周血样品分离。如本文所使用,“外周血”指在个体的循环系统内循环的血液。外周血样品可以直接获自循环血池(circulating pool of blood)。根据本公开的多个方面,可以如上所述使用任何合适的方法从用IL-10试剂治疗的患者获得外周CD8+T细胞的群体(参见例如Fuss等,(2009)Current Protocols in Immunology,单元7.1,John Wiley,Inc.NY)。在一些实施方案中,样品是淋巴结样品、或淋巴样品。

[0229] 可以在任何合适的时间从患者获得含有CD8+T细胞的患者测试样品以及任何合适的患者参考样品。在一些实施方案中,可能有兴趣在开始IL-10试剂疗法之前获得参考样品并且在开始疗法之后获得测试样品。在患者的病状至少是稳定的(稳定疾病)或对IL-10试剂疗法展现出至少部分临床响应(PR)之后的时间点获得测试样品。获得测试样品(和/或参考样品,其中对继续的IL-10试剂疗法对T细胞扩增的影响的分析是感兴趣的)的时间点包括但不限于:在开始疗法的1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天或29天或更多之内或之后的时间点,并且可以是例如在开始疗法之后的1-200天、10-190天、20-180天。在一些情况下,含有CD8+T细胞的样品可以在IL-10试剂施用几周,例如3周或更多、4周或更多、5周或更多、6周或更多、2个月或更多,包括3个月或更多,以及施用5年或更少,例如1年或更少、9个月或更少、6个月或更少,包括3个月或更少后从患者获得。在一些

实施方案中,在获得含有CD8+T细胞的样品之前,IL-10疗法已向患者施用2周至5年,例如3周至1年、4周至9个月,包括4周至6个月。

[0230] 在一些情况下,可以任何方便的方式处理获自患者的样品以分离CD8+T细胞,例如外周CD8+T细胞。在一些情况下,对样品中的淋巴细胞,例如外周血淋巴细胞(PBL)进行分选或分级,以基于淋巴细胞上,例如PBL上细胞表面标志物的表达而提供含有CD8+T细胞的群体的一个或多个样品,所述细胞富集了特定CD8+T细胞亚型(例如,PD1中等-高、CD8+T细胞)。分选或分级可以使用任何合适的方法来完成,例如荧光活化细胞分选(FACS)、基于磁珠的分离等。

[0231] 包含在样品中和/或从获自患者的样品分离的CD8+T细胞的群体可以富集被活化且具有抗原特异性的任何合适的CD8+T细胞。如上所述,T细胞可以展现出细胞表面标志物表达,例如PD1(又称为CD279)细胞表面表达的基本上呈双峰的分布。因此,在基于PD1的表面表达而鉴定活化的T细胞的情况下,PD1细胞表面表达的高峰周围的细胞可以被分类为“PD1高”,并且PD1细胞表面表达的低峰周围的细胞可以被分类为“PD1低”。包括活化的CD8+T细胞的CD8+T细胞的群体还可以包括在PD1高与PD1低细胞之间的中间细胞群体(PD1中等),其中PD1中等细胞具有高于PD1低细胞,但是低于PD1高细胞的PD1细胞表面表达水平。因此,感兴趣的活化的抗原特异性CD8+T细胞可以包括中等到高细胞表面表达水平的PD1(“PD1中等-高”)。换句话说,活化的抗原特异性CD8+T细胞可以是在细胞表面上不具有低PD1表达(即,不是“PD1低”)的CD8+T细胞的群体。

[0232] 可以测量细胞表面标志物,例如PD1的表达水平,并且可以使用任何合适的方法来分离细胞表面标志物的表达水平落入所希望的范围内的细胞,诸如但不限于:用针对细胞表面标志物的荧光可检测的抗体标记细胞,之后进行FACS;或基于磁珠的分离等。

[0233] 抗原特异性CD8+T细胞可以由抗原特异性CD8+T细胞的任何其他合适的标志物来界定。在一些实施方案中,抗原特异性CD8+T细胞展现出CD45RO的升高的细胞表面表达(“CD45RO+”)。在一些实施方案中,抗原特异性CD8+T细胞具有高水平的干扰素(IFN) γ (“IFN γ +”)表达。在一些实施方案中,抗原特异性CD8+T细胞展现出作为T细胞活化标志物的粒酶B和/或穿孔蛋白的升高的表达。因此,本公开涵盖富集PD1和CD8细胞表面表达的样品,以及其他标记物的任何组合,例如:

[0234] 1) PD1+(例如,PD1中等-高)、CD8+、CD45RO+;

[0235] 2) PD1+(例如,PD1中等-高)、CD8+、IFN γ +;

[0236] 3) PD1+(例如,PD1中等-高)、CD8+、CD45RO+、粒酶B+;

[0237] 4) PD1+(例如,PD1中等-高)、CD8+、CD45RO+、穿孔蛋白+;

[0238] 5) PD1+(例如,PD1中等-高)、CD8+、CD45RO+、粒酶B+、穿孔蛋白+;

[0239] 6) PD1+(例如,PD1中等-高)、CD8+、IFN γ +、粒酶B+;

[0240] 7) PD1+(例如,PD1中等-高)、CD8+、IFN γ +、穿孔蛋白+;

[0241] 8) PD1+(例如,PD1中等-高)、CD8+、IFN γ +、粒酶B+、穿孔蛋白+;

[0242] 9) PD1+(例如,PD1中等-高)、CD8+、粒酶B+;

[0243] 10) PD1+(例如,PD1中等-高)、CD8+、粒酶B+、穿孔蛋白+;

[0244] 11) PD1+(例如,PD1中等-高)、CD8+、穿孔蛋白+;或

[0245] 12) PD1+(例如,PD1中等-高)、CD8+、IFN γ +、CD45RO+、粒酶B+、穿孔蛋白+。

- [0246] 13) LAG3+ (例如, LAG3中等-高)、CD8+、CD45RO+;
- [0247] 14) LAG3+ (例如, LAG3中等-高)、CD8+、IFN γ +;
- [0248] 15) LAG3+ (例如, LAG3中等-高)、CD8+、CD45RO+、粒酶B+;
- [0249] 16) LAG3+ (例如, LAG3中等-高)、CD8+、CD45RO+、穿孔蛋白+;
- [0250] 17) LAG3+ (例如, LAG3中等-高)、CD8+、CD45RO+、粒酶B+、穿孔蛋白+;
- [0251] 18) LAG3+ (例如, LAG3中等-高)、CD8+、IFN γ +、粒酶B+;
- [0252] 19) LAG3+ (例如, LAG3中等-高)、CD8+、IFN γ +、穿孔蛋白+;
- [0253] 20) LAG3+ (例如, LAG3中等-高)、CD8+、IFN γ +、粒酶B+、穿孔蛋白+;
- [0254] 21) LAG3+ (例如, LAG3中等-高)、CD8+、粒酶B+;
- [0255] 22) PD1+ (例如, PD1中等-高)、CD8+、粒酶B+、穿孔蛋白+;
- [0256] 23) PD1+ (例如, PD1中等-高)、CD8+、穿孔蛋白+; 或
- [0257] 24) PD1+ (例如, PD1中等-高)、CD8+、IFN γ +、CD45RO+、粒酶B+;
- [0258] 25) PD1+、LAG3+、CD8+、CD45RO+;
- [0259] 26) PD1+、LAG3+、CD8+、IFN γ +;
- [0260] 27) PD1+、LAG3+、CD8+、CD45RO+、粒酶B+;
- [0261] 28) PD1+、LAG3+、CD8+、CD45RO+、穿孔蛋白+;
- [0262] 29) PD1+、LAG3+、CD8+、CD45RO+、粒酶B+、穿孔蛋白+;
- [0263] 30) PD1+、LAG3+、CD8+、IFN γ +、粒酶B+;
- [0264] 31) PD1+、LAG3+、CD8+、IFN γ +、穿孔蛋白+;
- [0265] 32) PD1+、LAG3+、CD8+、IFN γ +、粒酶B+、穿孔蛋白+;
- [0266] 33) PD1+、LAG3+、CD8+、粒酶B+;
- [0267] 34) PD1+、LAG3+、CD8+、粒酶B+、穿孔蛋白+;
- [0268] 35) PD1+、LAG3+、CD8+、穿孔蛋白+; 或
- [0269] 36) PD1+、LAG3+、CD8+、IFN γ +、CD45RO+、粒酶B+。
- [0270] 其表达可以用于分选和富集活化的和/或抗原特异性CD8+T细胞的其他合适的细胞表面标志物包括但不限于: LAG-3、TIM-3、4-1BB、CTLA-4和ICOS中的一种或多种(参见例如Gros等, J Clin Invest. 2014年5月; 124(5): 2246-59)。
- [0271] 对疾病抗原特异性CD8+T细胞的TCR的分析和文库的产生
- [0272] 测序。另一方面, 本公开的一种方法包括对含有核苷酸序列的核酸进行测序, 所述核苷酸序列编码来自含有抗原特异性(例如, PD1+和/或LAG3+) CD8+T细胞的样品的T细胞受体(TCR)的 α 和 β 链。测序可以使用任何合适的方法来执行, 所述方法可以确定构成含有CD8+T细胞, 例如分离的CD8+T细胞的样品中表达的功能性抗原特异性TCR的 α 和 β 链对的可变区中的至少互补决定区(CDR)的氨基酸序列。例如, US 20140322716、US 20130273647、US 20150031043中描述了合适的方法。(还参见例如Howie等, "High-throughput pairing of T cell receptor α and β sequences." Science translational medicine 7.301(2015): 301ra131-301ra131.)
- [0273] 在一些实施方案中, 测序可以包括使用高通量测序平台(诸如Roche 454(例如, Roche 454GS FLX); Applied Biosystems的SOLiD®系统(例如, SOLiD® v4); Illumina的GAIIx、HiSeq® 2000和MiSeq®测序仪; Life Technologies的Ion Torrent®半导体测

序平台、Pacific Biosciences的PacBio RS和Sanger的3730xl);被设计来扩增不同TCR序列的合适的引物对;以及用于确定个别CD8+T细胞,例如分离的CD8+T细胞上表达的 α 和 β 链对的合适的计算算法。在例如US 20140322716、US 20150031043中描述了合适的方法,所述专利中的每一个以引用的方式并入本文。

[0274] 在一些实施方案中,测序可以包括分选CD8+T细胞的群体的个别细胞,例如分离的CD8+T细胞;以及确定编码个别分选的CD8+T细胞,例如分离的CD8+T细胞中表达的TCR的 α 和 β 链的核苷酸序列的序列(参见例如US 20130273647;Kobayashi等,Nat Med.2013年11月;19(11):1542-6)。

[0275] 在一些实施方案中,在对来自T细胞的核酸进行测序之前,可以体外培养CD8+T细胞,例如分离的PD1+CD8+T细胞以扩增和/或选择获自患者的分离的CD8+T细胞的群体。可以使用任何合适的方法来扩增和/或选择培养的分离的抗原特异性CD8+T细胞的群体。

[0276] 在对编码CD8+T细胞,例如分离的CD8+T细胞的表面上表达的TCR的成对的 α 和 β 链的核酸进行测序之后,可以确定包括每个链的CDR区的 α 和 β 链的氨基酸序列。

[0277] 在一些实施方案中,本公开的一种方法可以包括分析如上所述通过一种方法确定的CD8+T细胞,例如分离的CD8+T细胞的表面上表达的TCR的成对的 α 和 β 链的氨基酸序列。在一些实施方案中,分析可以包括将来源于经过IL-10试剂治疗的患者的外周血的TCR序列的成对的 α 和 β 链与来源于IL-10试剂治疗之前的患者体内的病理部位的TCR序列的类似的成对的 α 和 β 链进行比较。这种分析可以揭示T细胞上表达的因IL-10试剂治疗而优先扩增的一种或多种抗原特异性TCR。病理部位可以是例如肿瘤或感染部位,并且浸润病理部位的T细胞可以在IL-10试剂治疗之前从患者的活检标本中获得。

[0278] 在一些情况下,分析可以包括将来自一名或多名患者的多个克隆的 α 和/或 β 链氨基酸序列进行比较,并且产生对已知的或未知的疾病相关抗原特异的TCR的 α 和/或 β 链的共有一级结构。共有一级结构可以包括根据一级结构中的氨基酸位置而变化的氨基酸序列的任何特征,其中特征可能与抗原特异性相关。感兴趣的共有一级结构包括但不限于:沿着 α 和/或 β 链的长度的共有电荷分布,以及 α 和/或 β 链的共有氨基酸序列。

[0279] 在一些情况下,分析CD8+T细胞,例如分离的CD8+T细胞的表面上表达的TCR的成对的 α 和 β 链的氨基酸序列可以包括将来自多名患者的多个克隆的 α 和/或 β 链氨基酸序列进行比较,并且基于样品的一个或多个参数而产生TCR的 α 和/或 β 链的共有一级结构。参数可以是样品的任何合适的参数,包括但不限于:患者的单倍型、患者所患疾病的类型(例如,癌症类型、感染类型)等。例如,在一些情况下,分析氨基酸序列可以揭示患者具有所述患者独有的疾病或疾病抗原的克隆的 α 和/或 β 链氨基酸序列(即,“私有”T细胞反应(“private”T cell response))。在一些情况下,分析氨基酸序列可以揭示两名或更多名患者各自具有类似的疾病或疾病抗原的克隆的 α 和/或 β 链氨基酸序列(即,“公有”T细胞反应(“public”T cell response))。

[0280] 可以使用任何方便的方法来完成对CD8+T细胞,例如分离的CD8+T细胞的表面上表达的TCR的成对的 α 和 β 链的氨基酸序列中的共有序列的分析。在例如Khan等,Journal of Infectious Diseases 185.8(2002):1025-1034;Trautmann等,European journal of immunology 32.11(2002):3181-3190中描述了合适的方法。通常,在TCR的促成TCR的抗原特异性的 α 和 β 链的区域上执行对氨基酸序列的分析。在一些情况下,关于TCR的 α 链和 β 链(V

α 和 $V\beta$)中的一者或两者的可变区的一个或多个互补决定区(CDR,诸如CDR1、CDR2和/或CDR3)执行分析。在一些情况下,关于TCR的 α 和 β 链的可变区执行分析。在一些情况下,关于包括可变区和恒定区(即,全长 α 和 β 链TCR多肽)的TCR的 α 和 β 链的区域执行分析。在一些情况下,相对于TCR的全长 α 和 β 链执行分析。

[0281] 抗原特异性分析。在一些实施方案中,可以对CD8+T细胞,例如分离的CD8+T细胞进行进一步分选,以鉴定和分离对已知抗原,例如已知的疾病抗原特异或对存在于从中获得T细胞的患者的患病组织中的新抗原特异的那些细胞。

[0282] 在一些实施方案中,本公开的方法可以用于鉴定新的疾病抗原特异性TCR α/β 对和/或新的疾病特异性抗原。在这类实施方案中,疾病抗原特异性可以通过在IL-10试剂治疗之前从患者获得含有患者CD8+T细胞的患病组织(例如,实体肿瘤活检标本)的样品来评定。这种预处理样品可以用作存档样品。这种预处理样品可以进行与如本文所述的处理后样品相同的处理和分析,并且获得预处理样品中的TCR α 和 β 序列。然后将存在于预处理样品中的TCR序列与处理后样品的TCR序列(例如,在开始IL-10试剂疗法之后的不同时间点获取)进行比较,以鉴定在IL-10试剂疗法之前和在IL-10试剂疗法之后存在于患病组织的T细胞中的TCR α 和 β 序列(例如,在不同时间点,例如将第1天与第1天、第5天、第10天、第15天、第20天、第30天等等中的一者或多者进行比较)。在IL-10试剂疗法之后频率增加的TCR α 和/或 β 序列被鉴定为CD8+T细胞的TCR,所述TCR响应于IL-10试剂疗法而扩增并且对患病组织的抗原是特异的(例如肿瘤抗原特异的)。

[0283] 疾病抗原结合特异性可以通过例如鉴定存在于患者体内的T细胞上的在IL-10试剂疗法之后扩增的TCR来分析。例如,在IL-10试剂治疗之前从患者获得含有患者CD8+T细胞的患病组织或疾病相关组织(例如,实体肿瘤活检标本、病毒感染的组织等等)的样品中存在的 $V\alpha$ 和/或 $V\beta$ TCR多肽的氨基酸序列或编码核酸序列。这种预处理样品可以用作存档样品。应注意到,由于预处理样品被用作TCR相关序列的来源,不需要对这种样品进行T细胞选择。

[0284] 可以确定存在于预处理和处理后样品中的 $V\alpha$ 和/或 $V\beta$ TCR多肽的编码核酸序列或氨基酸序列。由于 $V\beta$ TCR多肽序列在TCR之间通常展现出比 $V\alpha$ TCR多肽更多的可变性,这个阶段的序列分析可以仅对预处理和处理后样品中的 $V\beta$ TCR多肽(包括其片段,诸如 $V\beta$ TCR的CDR3)的氨基酸序列或编码核酸执行。然后可以比较TCR α 和/或 β 序列来确定哪些存在于IL-10试剂疗法之前的患病组织中的T细胞中,以及这些序列中哪些在IL-10试剂疗法之后频率出现增加。在IL-10试剂疗法之后频率增加到高于选定背景水平的TCR序列被鉴定为与对患病组织的抗原特异(例如,肿瘤抗原特异、病毒抗原特异)的TCR相关联,并且表示存在于通过IL-10试剂疗法扩增的T细胞克隆中的TCR。

[0285] 所鉴定的疾病抗原特异性TCR的 $V\alpha$ 和/或 $V\beta$ TCR多肽(例如, $V\alpha$ 和/或 $V\beta$ TCR多肽,包括TCR的 $V\alpha/V\beta$ 多肽对)的氨基酸序列、编码核酸序列以及含有这类编码核酸的构建体就纳入核酸和/或克隆文库中,以及核酸序列和/或氨基酸序列信息的数据库中而言特别受关注。类似地,本公开提供针对至少 $V\beta$ 多肽构建核酸和/或氨基酸序列信息的数据库,并且可以任选地包括 $V\alpha$ 多肽序列信息,以及存在于预处理样品中的T细胞的 $V\alpha/V\beta$ 多肽对的序列信息。

[0286] 疾病抗原结合特异性可以通过以下方式来分析:评定与患者的预处理患病组织的

特异性结合,例如测试经遗传修饰来表达重组TCR(例如,CAR-T)的CD8+T细胞的特异性结合,所述重组TCR包含因响应于IL-10试剂疗法而上调或诱导的所鉴定的TCR α / β 对。由这类重组TCR结合的疾病抗原和/或这类抗原的T细胞表位可以根据本领域中已知的方法来鉴定。

[0287] 在抗原是已知抗原的情况下,本发明方法可以用于鉴定例如结合已知抗原的表位的新的T细胞表位和/或新的 α / β TCR多肽对。在一些情况下,可以将对已知抗原特异的CD8+T细胞,例如分离的CD8+T细胞与缀合到例如磁珠、柱等的支撑物的已知抗原接触,从而将对已知抗原特异的细胞与对已知抗原并不特异的那些分离。在一些情况下,可以将对已知抗原特异的CD8+T细胞,例如分离的CD8+T细胞与缀合到荧光部分的已知抗原接触,并且基于荧光水平例如通过FACS来分选细胞,以分离抗原特异性T细胞。例如US 2006013470中描述了合适的方法,所述专利以引用的方式并入本文。可以使用任何合适的已知抗原。在一些情况下,在已对其施用IL-10试剂疗法的患者患有癌症的情况下,诱导的CD8+T细胞所针对的抗原是已知的肿瘤相关抗原。各种各样的肿瘤相关抗原在本领域中是已知的,包括但不限于:CBX2、PLAC1、CLDN6、SPANX、MAGEA3、TPTE、ACTL8、ANKRD30A、CDKN2A、MAD2L1、CTAG1B、MAGEA4、MAGEA5、SUNC1、MAGEA10、LRRN1、MAGEA9、WT1、癌胚抗原(CEA)、 α -胎甲球蛋白(AFP)、CA19-9、CA125、PSA、CA72-4、SCC、MK-1、MUC-1、p53、HER2、G250、gp-100、黑素瘤相关抗原(MAGE)-1、-2和-3、BAGE、SART、MART、MYCN、BCR-ABL、TRP、LAGE、GAGE、酪氨酸酶、上皮肿瘤抗原(ETA)、Her-2/Neu、血清前列腺特异性抗原(PSA)以及NY-ESO1。在一些实施方案中,在已对其施用IL-10试剂疗法的患者患有感染性疾病时,已知抗原是病毒抗原,诸如CMV pp65、HIV gp120等,或如上所述来自细胞内病原体的任何其他已知的抗原肽。

[0288] 文库。本文还提供了核酸构建体,例如载体的文库,其中文库表示使用如本文所述的方法获得的多个抗原特异性TCR α 和 β 链对序列、或其可变区中的至少一个或多个。在一些情况下,文库的每个构建体可以含有抗原特异性TCR α 和 β 链对序列,或其可变区中的至少一个或多个,例如像多顺反子构建体或CAR。

[0289] 经遗传修饰的T细胞的产生。CD8+T细胞,例如分离的CD8+T细胞的表面上表达的TCR的成对的 α 和 β 链的患者特定序列和/或共有序列可用于产生转基因的CD8+T细胞的群体,所述转基因的CD8+T细胞如下文进一步所描述靶向疾病特异的抗原,并且当施用于有需要的个体(包括但不限于:从其分离诱导的CD8+T细胞的患者)时提供治疗效果。

[0290] 本发明方法的多个方面可以包括将含有编码疾病抗原特异性V α 和V β TCR对中的每一者的核苷酸序列的核酸克隆到一个或多个载体中,所述载体被配置来表达T细胞中的TCR、或TCR样受体(如下文进一步所描述,诸如嵌合抗原受体(CAR))。克隆核酸可以使用任何合适的方法来完成。载体可以是用于克隆和/或表达T细胞中的TCR亚基、或TCR样受体,例如CAR的任何合适的载体。在一些实施方案中,载体是表达载体。表达载体可以通过许多已知的基因转移系统(例如,天然感受态转化、化学介导的转化、原生质体转化、电穿孔、生物弹射击转化、转染或缀合)中的任一种引入到宿主细胞中。选择的基因转移系统取决于使用的宿主细胞和载体系统。在一些情况下,载体是病毒载体,例如逆转录病毒或慢病毒载体(参见例如Jones等,Hum Gene Ther. 2009年6月;20(6):630-40)。

[0291] 在一些情况下,单一载体被配置来表达含有TCR的 α 和 β 链两者、或至少其可变区,例如像全长TCR,或如下文进一步所描述含有单链T细胞受体(scTv)的嵌合抗原受体的基因

产物。

[0292] 经遗传修饰的T细胞、其生产以及疗法中的使用方法

[0293] 本公开涵盖了表达重组的疾病抗原特异性TCR的经遗传修饰的T细胞的重新生成、鉴定、扩增、产生和使用,以及疗法中的使用方法。

[0294] 经遗传修饰的T细胞的产生。

[0295] 本公开提供了经遗传修饰的T细胞,所述T细胞被修饰来表达重组的T细胞受体(TCR),所述TCR包含V α /V β TCR对的可变 α (V α) T细胞受体(TCR)多肽的一个、两个和/或三个互补决定区(CDR)以及可变 β (V β) TCR多肽的一个、两个和/或三个CDR,所述V α /V β TCR对来源于响应于IL-10试剂的施用而在哺乳动物体内诱导的PD1⁺,CD8⁺外周T细胞的疾病抗原特异性TCR。在一个实施方案中,经遗传修饰的T细胞上表达的TCR可以包含V α /V β TCR对的全长V α 和V β 多肽,所述TCR对来源于响应于IL-10试剂的施用而在哺乳动物体内诱导的CD8⁺外周T细胞的疾病抗原特异性TCR。

[0296] 在一个实施方案中,经遗传修饰的T细胞是嵌合抗原受体T细胞。嵌合抗原受体T细胞(CAR;又称为人工T细胞受体、嵌合T细胞受体和嵌合免疫受体)代表了用于癌症(例如,B和T细胞淋巴瘤的治疗)和其他恶性肿瘤的新兴疗法。CAR T细胞可以包含经修饰来表达对已知疾病抗原(例如,存在于例如感兴趣的肿瘤上的抗原)特异的重组T细胞受体的自体(患者来源)或同基因供体记忆CD8⁺T细胞(例如,CD45RO⁺、CD8⁺T细胞)。应注意,在使用同基因供体T细胞的情况下,T细胞可以被进一步遗传修饰来破坏内源TCR的表达(例如,敲除)。本文涵盖的其他类型的T细胞包括原初T细胞、中心记忆T细胞、效应记忆T细胞或其组合。虽然在使用CAR T细胞疗法治疗癌症的背景下大体描述了本公开,但是应理解,这种疗法并不限于此。CAR T细胞疗法可用于治疗适于CD8⁺T细胞疗法,例如病毒感染的任何疾病。

[0297] CAR T细胞疗法可以涉及使用过继细胞转移(ACT)。利用患者自身的培养的T细胞的ACT已显示有希望作为患者特定癌症疗法(Snook和Waldman (2013) Discov Med 15 (81): 120-25)。使用基因工程方法将具有限定的特异性的抗原靶向受体插入到T细胞中已大大扩展了ACT的潜在能力。在大多数情况下,这些工程改造的嵌合抗原受体用于将单克隆抗体的特异性移植到T细胞上。

[0298] 开始CAR T细胞疗法包括从患者或从与患者具有足够的MHC相容性的供体移除T细胞。然后将T细胞基因工程改造来表达指向对已知癌症(例如,肿瘤)特异的抗原的CAR。在离体扩增到足够数目之后,将自体细胞往回输注到患者体内,从而导致对癌症的抗原特异性破坏。

[0299] CAR是一类由通常融合到细胞外抗原结合部分(最常见的是来自单克隆抗体的单链可变片段(scFv))的细胞内T细胞信号传导结构域组成的抗原靶向受体。CAR独立于MHC介导的呈递直接识别细胞表面抗原,从而允许在多名患者体内使用对任何给定抗原特异的单一受体构建体。

[0300] 嵌合抗原受体通常包含几种主要组分,其中一些在下文中进行描述。其中抗原结合特异性由V α /V β TCR对的可变 α (V α) T细胞受体(TCR)多肽的互补决定区(CDR)和可变 β (V β) TCR多肽的CDR提供的嵌合抗原受体在本文中被称为CAR-T,并且经遗传修饰的T细胞如同CAR-T T细胞包含这类CAR-T构建体。这类CAR-T构建体的抗原结合部分在本文中可以被称作单链T细胞受体或“scTv”。

[0301] 如本文所使用,短语“抗原特异性靶向区”(ASTR)指将CAR引导到特定抗原的区域。CAR的靶向区域是细胞外的。在本公开的具体实施方案中,CAR包含靶向至少两个不同抗原的至少两个靶向区。在另外的实施方案中,CAR包含靶向至少三个或更多个不同抗原的三个或更多个靶向区。

[0302] 在本公开的上下文中,CAR-T的ASTR包含一个、两个或三个CDR,所述CDR具有对应于响应于IL-10试剂的施用而在哺乳动物体内诱导的CD8+外周T细胞的疾病抗原特异性TCR的V α /V β TCR对的可变 α (V α) T细胞受体(TCR)多肽的CDR的序列;以及一个、两个或三个CDR,所述CDR具有对应于所述TCR对的可变 β (V β) TCR多肽的CDR的序列。在一个实施方案中,CAR-T的ASTR包含V α /V β TCR对的全长V α 和V β 多肽,所述TCR对来源于响应于IL-10试剂的施用而在哺乳动物体内诱导的CD8+外周T细胞的疾病抗原特异性TCR。在另一个实施方案中,CAR-T的ASTR包含与V α /V β TCR对具有90%或更大的序列同源性的V α 和V β 多肽,所述TCR对来源于响应于IL-10试剂的施用而在哺乳动物体内诱导的CD8+外周T细胞的疾病抗原特异性TCR。

[0303] 一般而言,ASTR包含单链多肽,所述单链多肽包含(例如,通过肽接头)可操作地连接到V β 多肽的V α 多肽以提供单链TCR(scTv)的ASTR。例如,scTv的ASTR从N-末端到C-末端可以具有V β 多肽-接头-V α 多肽的一般结构。scTv的ASTR的V α 多肽的C-末端可操作地融合到scTv的另外组分,例如从N-末端到C-末端为细胞外间隔区结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,下文提供了其中每一个的实例。本领域中描述了用于产生scTv的方法,参见例如US 2012/0252742。本公开还涵盖了包含scTv的ASTR的可溶性多肽(“可溶性scTv”)。在这类情况下,这些多肽包括有利于溶解度的多肽,例如融合到scTv的ASTR的V β 多肽的N-末端的人血清白蛋白。

[0304] 如本文所使用,术语“细胞外间隔区结构域”(ESD)指抗原特异性靶向区与跨膜结构域之间的CAR的亲水区。本公开涵盖了其中CAR-T包含ESD的实施方案,其实例包括CD8的铰链区和如在例如US 2012/0252742中所描述的其他结构域;人工间隔区序列,包括IgG(诸如人IgG4)的Gly3或CH1和CH3结构域;或前述各项的组合。本领域的普通技术人员了解本文涵盖的其他ESD。

[0305] 如本文所使用,术语“跨膜结构域”(TMD)指穿越质膜的CAR的区域。在一些实施方案中,跨膜区是跨膜蛋白(例如,I型跨膜蛋白)、人工疏水序列或其组合。技术人员了解可以结合本公开的教义使用的其他跨膜结构域。

[0306] 如本文所使用,术语“细胞内信号传导结构域”(ISD)和“胞浆区”指转导效应功能信号并指导细胞执行其专有功能的CAR的部分。ISD的实例包括T细胞受体复合物或其任何同系物的 ζ 链(例如, η 链、Fc ϵ R1 γ 和 β 链、MB1(Ig α)链、B29(Ig β)链等)、人CD3 ζ 链、CD3多肽(δ 、 Δ 和 ϵ)、syk家族酪氨酸激酶(Syk、ZAP 70等)、src家族酪氨酸激酶(Lck、Fyn、Lyn等)以及T-细胞转导中涉及的其他分子,诸如CD2、CD5和CD28。技术人员了解可以结合本公开的教导使用的其他ISD。

[0307] 术语“共刺激结构域”(CSD)指增强记忆细胞的增殖、存活或发育的CAR的部分。如本文其他地方所指出,本公开的CAR可以包含一个或多个共刺激结构域。在本公开的一些实施方案中,CSD包含以下一者或多者:TNFR超家族的成员、CD28、CD137(4-1BB)、CD134(OX40)、Dap10、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40或其组合。普通技术人员了解可以结合本公开的教义使用的其他共刺激结构域。

[0308] 在结合本文描述的CAR-T T细胞技术一起使用时,术语“接头”、“接头结构域”和“接头区”指长度为约1至100个氨基酸的寡肽或多肽区域,所述寡肽或多肽区域将本公开的CAR的任何结构域/区域连接在一起。接头可以由类似甘氨酸和丝氨酸的柔性残基组成,使得相邻的蛋白质结构域能相对于彼此自由移动。某些实施方案包括当希望确保两个相邻的结构域在空间上不会干扰彼此时使用具有较长长度的接头。在一些实施方案中,接头是不可裂解的,而在另一些中,它们是可裂解的(例如,2A接头(例如,T2A))、2A样接头或其功能等同物以及前述各项的组合。涵盖了本公开的多个实施方案,其中接头包括小核糖核酸病毒2A样接头、猪轮状病毒(P2A)、明脉扁刺蛾病毒(T2A)或组合的CHYSEL序列、其变体和功能等同物。在另外的实施方案中,接头序列包含Asp-Val/Ile-Glu-X-Asn-Pro-Gly^(2A)-pro^(2B)基序,其导致2A甘氨酸与2B脯氨酸之间的裂解。其他接头对于技术人员而言将是显而易见的,并且考虑与本公开的教义一起使用。

[0309] 经遗传修饰的T细胞在疗法中的使用方法

[0310] 所描述的经遗传修饰的T细胞(例如,CAR-T T细胞)可单独或结合其他治疗剂一起用于治疗适于CD8+细胞疗法的疾病。一般而言,根据有待治疗的疾病来选择经遗传修饰的T细胞(例如,CAR-T T细胞)。

[0311] 本公开的方法涵盖向患有适于CD8+细胞疗法的治疗的疾病的哺乳动物受试者施用一种或多种选定的经遗传修饰的CD8+T细胞。

[0312] 在一个实施方案中,向患有适于CD8+细胞疗法的治疗的疾病的哺乳动物受试者施用的经遗传修饰的CD8+T细胞是表达相同的重组TCR的经遗传修饰的CD8+T细胞的群体。在另一个实施方案中,向患有适于CD8+细胞疗法的治疗的疾病的哺乳动物受试者施用的经遗传修饰的CD8+T细胞对于细胞表面上表达的疾病抗原特异性TCR是异质的。在后一种方法中,可以对群体中的经遗传修饰的CD8+T细胞的不同Vα/VβTCR对进行选择,以便于结合到相同的疾病抗原(例如,相同抗原的不同表位)或不同疾病抗原。

[0313] 包括任选地在联合疗法中施用本公开所涵盖的经遗传修饰的T细胞(例如,CAR-T T细胞)的治疗包括治疗或预防增殖性疾病、病症或病状,包括癌症,例如子宫癌、宫颈癌、乳腺癌、前列腺癌、睾丸癌、胃肠道癌(例如,食管癌、口咽癌、胃癌、小肠癌或大肠癌、结肠癌或直肠癌)、肾癌、肾细胞癌、膀胱癌、骨癌、骨髓癌、皮肤癌、头或颈癌、肝癌、胆囊癌、心脏癌、肺癌、胰腺癌、唾液腺癌、肾上腺癌、甲状腺癌、脑癌(例如,胶质瘤)、神经节癌、中枢神经系统(CNS)和周围神经系统(PNS)癌症以及造血系统和免疫系统(例如,脾或胸腺)的癌症。本公开还提供了治疗或预防其他癌症相关疾病、病症或病状的方法,包括例如免疫原性肿瘤、非免疫原性肿瘤、休眠性肿瘤、病毒诱导的癌症(例如,上皮细胞癌、内皮细胞癌、鳞状细胞癌和乳头瘤病毒)、腺癌、淋巴瘤、癌、黑素瘤、白血病、骨髓瘤、肉瘤、畸胎瘤、化学诱导的癌症、转移和血管生成。本公开涵盖例如通过调节调控性T-细胞和/或CD8+T-细胞的活性来降低对肿瘤细胞或癌细胞抗原的耐受性(参见例如Ramirez-Montagut等,(2003)Oncogene 22:3180-87;以及Sawaya等,(2003)New Engl.J.Med.349:1501-09)。在具体实施方案中,肿瘤或癌症是结肠癌、卵巢癌、乳腺癌、黑素瘤、肺癌、成胶质细胞瘤或白血病。术语癌症相关疾病、病症和病状的使用意在广义地指直接或间接地与癌症相关联的病状,并且包括例如血管生成和癌前病状,诸如发育不良。

[0314] 本公开还涵盖任选地在联合疗法中使用如本文所述的经遗传修饰的T细胞疗法

(诸如CAR-T细胞疗法)来用于治疗或预防由病毒感染引起的疾病。示例病毒病原体包括单链DNA(ssDNA)、双链DNA(dsDNA)和RNA病毒。在一些实施方案中,病毒是嗜肝DNA病毒、黄病毒、逆转录病毒或疱疹病毒。在一些情况下,疾病可能由以下各项(不带限制性)引起:甲型肝炎、乙型肝炎(HBV)、丙型肝炎(HCV)、流感、水痘带状疱疹病毒(VZV)、腺病毒、EB病毒(EBV)、I型单纯疱疹病毒(HSV-I)、II型单纯疱疹病毒(HSV-II)、鼻病毒、埃可病毒、轮状病毒、呼吸道合胞病毒、人乳头瘤病毒(HPV)、乳多空病毒、巨细胞病毒(CMV)、棘状病毒、虫媒病毒、汉坦病毒、柯萨奇病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、风疹病毒、脊髓灰质炎病毒、I型人免疫缺陷病毒(HIV-I)和II型人免疫缺陷病毒(HIV-II)、人T淋巴细胞病毒(HTLV-1和HTLV-2)、冠状病毒、脊髓灰质炎病毒、6型人疱疹病毒(HHV-6)等。

[0315] 联合疗法

[0316] 本公开还涵盖了经遗传修饰的T细胞单一疗法以联合疗法两者。例如,可以单独或结合一种或多种活性剂(例如,化学治疗剂)或在联合疗法中可以与经遗传修饰的T细胞一起使用的其他预防性或治疗性非药理学形式(例如,局部放射疗法或全身放射疗法)向哺乳动物受试者施用本发明的经遗传修饰的T细胞。举例来说,本公开涵盖了如下治疗方案,其中放射阶段先于或紧跟着一种或多种附加疗法(例如,CAR-T T细胞疗法和任选地IL-10试剂的施用)或如本文所述的试剂的治疗。在一些实施方案中,本公开还涵盖结合骨髓移植、外周血干细胞移植或其他类型的移植疗法一起使用CAR-T T细胞疗法和IL-10试剂(例如,PEG-IL-10)。

[0317] 如本文所使用,“联合疗法”意在包括可以分开施用或引入,例如分开配制用于分开施用(例如,就像可以在试剂盒中提供一样)的疗法,以及可以一起施用或引入的疗法。在某些实施方案中,经遗传修饰的T细胞(例如,CAR-T T细胞)和/或其他试剂依次施用或施加,例如其中一种试剂在一种或多种其他试剂之前施用。在其他实施方案中,同时施用经遗传修饰的T细胞(例如,CAR-T T细胞)和其他试剂,例如其中两种或更多种试剂同时或大约同时施用;两种或更多种试剂可以在两种或更多种分开的制剂中存在或组合成单一制剂(即,共制剂)。不管试剂是依次还是同时施用,出于本公开的目的,它们都被认为是联合施用。

[0318] 本公开的经遗传修饰的T细胞(例如,CAR-T T细胞)可以在各种情况下适当的任何方式结合至少一种其他活性剂一起使用。在一个实施方案中,将经遗传修饰的T细胞(例如,CAR-T T细胞),任选地与IL-10试剂和/或其他试剂的治疗维持一段时间。在另一个实施方案中,(例如,当受试者稳定时)减少或中断用至少一种其他试剂的治疗,同时按恒定的给药方案维持用经遗传修饰的T细胞(例如,CAR-T T细胞),任选地与IL-10试剂(例如,PEG-IL-10)的治疗。在另一实施方案中,(例如,当受试者稳定时)减少或中断用其他试剂的治疗,同时减少用经遗传修饰的T细胞(例如,CAR-T T细胞),以及任选地IL-10试剂的治疗(例如,更低剂量、更不频繁的给药或更短的治疗方案)。在另一个实施方案中,(例如,当受试者稳定时)减少或中断用其他试剂的治疗,并且增加用经遗传修饰的T细胞(例如,CAR-T T细胞),任选地与IL-10试剂的治疗(例如,更高剂量、更频繁的给药或更长的治疗方案)。在另一个实施方案中,维持用其他试剂的治疗,并且减少或中断用经遗传修饰的T细胞(例如,CAR-T T细胞),以及任选地IL-10试剂的治疗(例如,更低剂量、更不频繁的给药或更短的治疗方案)。在另一个实施方案中,减少或中断用其他试剂的治疗和用本公开的IL-10试剂(例如,

PEG-IL-10)的治疗(例如,更低剂量、更不频繁的给药或更短的治疗方案),并且维持用经遗传修饰的T细胞(例如,CAR-T T细胞)的治疗。

[0319] 结合如本文所述的经遗传修饰的T细胞疗法(诸如CAR-T T细胞疗法),本公开提供了用以下各项治疗和/或预防增殖性病状、癌症、肿瘤或癌前疾病、病症或病状的方法:经遗传修饰的T细胞(例如,CAR-T T细胞),所述细胞具有对增殖性病状、癌症、肿瘤或癌前疾病、病症或病状的抗原特异的TCR;以及任选地IL-10试剂(例如,PEG-IL-10);以及任选地至少一种展现出所希望的活性的附加治疗剂或预防剂或诊断剂。本公开的一些实施方案涵盖使用传统化学治疗剂(例如,烷化剂、氮芥、亚硝基脲、抗生素、抗代谢物、叶酸类似物、嘌呤类似物、嘧啶类似物、抗激素剂和紫杉烷类)。本公开的其他实施方案涵盖了用于肿瘤遏制或肿瘤生长的方法,所述方法包括结合信号转导抑制剂(例如,GLEEVEC或HERCEPTIN)或免疫调节剂一起施用本文描述的IL-10试剂以实现肿瘤生长的相加或协同遏制。

[0320] 结合作为本文描述的CAR-T T细胞疗法的经遗传修饰的T细胞疗法(诸如CAR-T T细胞疗法),本公开还提供了用于通过施用具有对感染病毒的抗原特异的TCR的经遗传修饰的T细胞(例如,CAR-T T细胞)来治疗病毒感染的方法。这类疗法可以包括施用IL-10试剂(例如,PEG-IL-10)和/或抗病毒剂。

[0321] 药物组合物

[0322] 当向受试者施用治疗剂,诸如经遗传修饰的T细胞(例如,CAR-T T细胞)或IL-10试剂时,本公开涵盖使用适合于施用于受试者的任何形式的组合物。一般而言,这类组合物是包含治疗剂(例如,经遗传修饰的T细胞(例如,CAR-T T细胞)或IL-10)和一种或多种药学上可接受或生理学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂的“药物组合物”。药物组合物可以用于本公开的方法中;因此,例如,药物组合物可以离体或体内的方式向受试者施用,以便于实施本文描述的治疗和预防方法和用途。

[0323] 本公开的药物组合物可以配制为与预期施用方法或途径相容;本文阐述了示例性施用途径。此外,药物组合物可以结合本文描述的其他治疗活性剂或化合物一起使用,以便于治疗或预防如本公开所涵盖的疾病、病症和病状。

[0324] 药物组合物通常包含治疗有效量的由本公开涵盖的治疗剂(例如,经遗传修饰的T细胞(例如,CAR-T T细胞)或IL-10试剂)和一种或多种药学上和生理学上可接受的配制剂。合适的药学上可接受或生理学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂包括但不限于:抗氧化剂(例如,抗坏血酸和硫酸氢钠)、防腐剂(例如,苯甲醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯)、乳化剂、悬浮剂、分散剂、溶剂、填充剂、增量剂、洗涤剂、缓冲剂、媒介物、稀释剂和/或佐剂。例如,合适的媒介物可以是生理盐水溶液或柠檬酸盐缓冲盐水,可能补充有用于肠胃外施用的药物组合物中常见的其他材料。中性缓冲盐水或与血清白蛋白混合的盐水是其他示例性媒介物。本领域技术人员将容易地认识到可用于药物组合物和本文涵盖的剂型的各种缓冲液。典型的缓冲剂包括但不限于:药学上可接受的弱酸、弱碱或其混合物。作为实例,缓冲组分可以是水溶性物质,诸如磷酸、酒石酸、乳酸、琥珀酸、柠檬酸、乙酸、抗坏血酸、天冬氨酸、谷氨酸及其盐。可接受的缓冲剂包括例如Tris缓冲液、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)(HEPES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸钠盐(MES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)和N-三[羟甲基]甲基-3-氨基丙磺酸(TAPS)。

[0325] 在已经配制好药物组合物后,可以将其储存在无菌容器,诸如小瓶或注射器中。在

一些实施方案中,且在适当时,在一次性容器(例如,一次性小瓶、安瓿、注射器或自动注射器(类似于例如EpiPen®))中提供药物组合物,而在其他实施方案中提供多次使用容器(例如,多次使用小瓶)。对于IL-10试剂,可以使用任何药物递送设备来递送IL-10,包括植入物(例如,可植入泵)和导管系统、缓慢注射泵和装置,所有这些都是技术人员熟知的。也可以利用通常皮下或肌肉内施用的积存注射以在限定的时间段内释放本文公开的多肽。积存注射通常是基于固体的或基于油的,并且通常包括本文阐述的制剂组分中的至少一种。本领域的普通技术人员很熟悉积存注射的可能配方和用途。

[0326] 药物组合物可以是呈无菌可注射水性悬浮液或油性混悬液形式。这种悬浮液可以根据已知技术使用本文提及的那些合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂配制。无菌可注射制剂也可以是无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液,例如作为1,3-丁二醇中的溶液。可以采用的可接受的稀释剂、溶剂和分散介质包括水、林格氏溶液、等渗氯化钠溶液、Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) 或磷酸盐缓冲盐水(PBS)、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)及其合适的混合物。此外,无菌的不挥发的油通常用作溶剂或悬浮介质。为此目的,可以采用任何温和的不挥发的油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外,脂肪酸诸如油酸可以用于制备注射剂。可以通过包括延迟吸收的试剂(例如,单硬脂酸铝或明胶)来实现特定可注射制剂的延长吸收。

[0327] 制剂还可以包括保护组合物免于从身体快速降解或消除的载体,诸如受控释放制剂,包括植入物、脂质体、水凝胶、前药和微囊化递送系统。

[0328] 试剂盒

[0329] 本公开还涵盖了包括具有对目标疾病的抗原特异的TCR的经遗传修饰的T细胞(例如,CAR-T T细胞),任选地与IL-10试剂(例如,PEG-IL-10)以及其药物组合物的试剂盒。试剂盒如下所述通常是呈容纳各种组分的物理结构的形式,并且可以用于例如实施上文描述的方法。

[0330] 试剂盒可以包括经遗传修饰的T细胞(例如,CAR-T T细胞),和/或编码如本文所公开用于产生经遗传修饰的T细胞(提供于例如无菌容器中)的所希望的疾病抗原特异性TCR的构建体,所述构建体可以是呈适合于施用于受试者的药物组合物的形式。如果提供的话,则IL-10试剂可以随时可用的形式,或以施用前需要例如重构或稀释的形式提供。当IL-10试剂是需要由使用者重构的形式时,试剂盒还可以包括与IL-10试剂一起或分开包装的缓冲液、药学上可接受的赋形剂等等。试剂盒还可以含有IL-10试剂和/或有待使用的特定CAR-T T细胞疗法的组分两者;试剂盒可以单独含有几种试剂,或它们可以已在试剂盒中进行组合。可以针对适当维持容纳在其中的组分所需的条件(例如,冷藏或冷冻)设计本公开的试剂盒。

[0331] 试剂盒可以含有标签或包装插页,包括有关其中组分的鉴定信息及其使用说明(例如,给药参数、活性成分的临床药理学,包括作用机制、药物代谢动力学和药效学、不良反应、禁忌症等)。试剂盒的每种组分可以封闭在单独的容器内,并且各种容器全部可以在单个包装内。标签或插页可以包括制造商信息,诸如批号和失效期。标签或包装插页可以例如整合到容纳组分的物理结构中、单独包含于物理结构内,或附连到试剂盒的部件(例如,安瓿、注射器或小瓶)。

[0332] 标签或插页可以另外包括或并入计算机可读介质,诸如盘(例如,硬盘、卡、存储

盘)、光盘诸如CD-或DVD-ROM/RAM、DVD、MP3、磁带或电存储介质,诸如RAM和ROM或这些介质的杂合物,诸如磁/光存储介质、FLASH介质或存储器型卡。在一些实施方案中,实际指令不存在于试剂盒中,而是提供用于例如经由互联网站点从远程源获得指令的手段。

[0333] 实验

[0334] 提出了以下实施例,以便于为本领域的普通技术人员提供对如何产生和使用本发明的完整公开和描述,而不意图限制发明人视为其发明的范围,也不意图表示以下实验是执行的,并且是可以执行的所有实验。应理解,以现在式书写的示例性描述不一定是执行的,而是可以实施所述描述来产生其中描述的数据等等。已经努力确保使用的数字(例如,量、温度等)的准确性,但是应该考虑一些实验误差和偏差。

[0335] 除非另外指明,否则份为重量份,分子量为重均分子量,温度为摄氏度(°C),并且压力为或接近大气压。使用标准缩写,包括以下各项:s或sec=秒;min=分钟;h或hr=小时;aa=氨基酸;bp=碱基对;kb=千碱基;nt=核苷酸;ng=纳克;μg=微克;mg=毫克;g=克;kg=千克;dL或dL=分升;μl或μL=微升;ml或mL=毫升;l或L=升;nM=纳摩尔;μM=微摩尔;mM=毫摩尔;M=摩尔;kDa=千道尔顿;i.m.=肌内;i.p.=腹膜内;SC或SQ=皮下;HPLC=高效液相色谱;BW=体重;U=单位;ns=统计学不显著;PMA=佛波醇肉豆蔻酸乙酯;PBS=磷酸盐缓冲盐水;DMEM=Dulbeco改良的伊格尔培养基;PBMC=原代外周血单核细胞;FBS=胎牛血清;FCS=小牛血清;HEPES=4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸;LPS=脂多糖;RPMI=Roswell Park Memorial Institute培养基;APC=抗原呈递细胞;FACS=荧光活化细胞分选。

[0336] 材料和方法。

[0337] 以下通用材料和方法在指明处使用,或可以在以下实施例中使用:

[0338] 分子生物学程序。在科学文献中描述了分子生物学中的标准方法(参见例如 Sambrook和Russell (2001) Molecular Cloning,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.;以及Ausubel等,(2001) Current Protocols in Molecular Biology,第1-4卷,John Wiley and Sons,Inc.New York,N.Y.,其描述了在细菌细胞中的克隆和DNA诱变(第1卷)、在哺乳动物细胞和酵母中的克隆(第2卷)、糖缀合物和蛋白质表达(第3卷)以及生物信息学(第4卷))。

[0339] 描述了多克隆和单克隆抗体的产生、纯化和片段化(例如,Harlow和Lane (1999) Using Antibodies,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY);用于表征配体/受体相互作用的标准技术是可用的(参见例如Coligan等,(2001) Current Protocols in Immunology,第4卷,John Wiley,Inc.,NY);用于流式细胞术,包括荧光活化细胞分选(FACS)的方法是可行的(参见例如Shapiro (2003) Practical Flow Cytometry, John Wiley and Sons,Hoboken,NJ);以及适合于修饰核酸,包括核酸引物和探针、多肽和抗体的荧光试剂(例如像用作诊断试剂)是可用的(Molecular Probes (2003) Catalogue, Molecular Probes,Inc.,Eugene,OR.;Sigma-Aldrich (2003) Catalogue,St.Louis,MO.)。对抗体的进一步论述出现于本文中其他地方。

[0340] 软件。用于确定例如抗原片段、前导序列、蛋白质折叠、功能结构域、糖基化位点和序列比对的软件包和数据库是可用的(参见例如GCG Wisconsin Package (Accelrys,Inc., San Diego,CA);以及DeCypher™ (TimeLogic Corp.,Crystal Bay,NV))。

[0341] 聚乙二醇化。如本文所述的聚乙二醇化的IL-10可以通过技术人员已知的任何手段合成。已经描述了用于产生单-PEG-IL-10和单-/二-PEG-IL-10的混合物的示例性合成方案(参见例如美国专利号7,052,686;美国专利公布号2011/0250163;WO 2010/077853)。本公开的具体实施方案包括选择性聚乙二醇化的单-PEG-IL-10和二-PEG-IL-10的混合物。除了利用其自身的在本公开的实践中合适的技术来生产和使用PEG(以及其他药物递送技术)之外,技术人员也很熟悉PEG相关技术的许多商业供应商(例如,NOF America Corp (Irvine,CA)和Parchem(New Rochelle,NY))。

[0342] 动物。技术人员已知的各种小鼠和其他动物品系可以结合本公开的教义一起使用。例如,具有免疫能力的Balb/C或B-细胞-缺陷型Balb/C小鼠可以从The Jackson Lab., Bar Harbor,ME获得,并且按照标准程序(参见例如Martin等,(2001) Infect.Immun.,69(11):7067-73和Compton等,(2004) Comp.Med.54(6):681-89)使用。

[0343] IL-10浓度。血清IL-10浓度水平和暴露水平可以通过本领域中使用的标准方法来测定。例如,当实验受试者是小鼠时,可以通过以下方式来执行血清暴露水平测定:将来自小鼠剪尾的全血(约50 μ L/小鼠)收集到普通毛细管中,通过离心分离血清和血细胞,并且通过标准ELISA试剂盒和技术来测定IL-10暴露水平。

[0344] FACS分析。用于FACS分析的许多方案、材料和试剂是可商购的并且可以结合本文的教义一起使用(例如,Becton-Dickinson, Franklin Lakes,NJ;Cell Signaling Technologies,Danford,MA;Abcam,Cambridge,MA;Affymetrix,Santa Clara,CA)。可以使用直接流式细胞术(即,使用缀合的一抗)和间接流式细胞术(即,使用一抗和缀合的二抗)。示例性的直接流动方案如下:洗涤收获的细胞,并且在冰冷的PBS,10%FCS,1%叠氮化钠中将细胞悬浮液调整到 $1-5 \times 10^6$ 个细胞/mL的浓度。可以在聚苯乙烯圆底的12x 75mm²Falcon管中将细胞染色。可以将细胞充分离心,使得可以在几乎没有细胞损失,但是也并未达到细胞难以重新悬浮的程度的情况下去除上清液。可以添加标记的一抗(0.1-10 μ g/mL),并且如果需要,则可以在3%BSA/PBS中制备稀释液。在4 $^{\circ}$ C下孵育至少30分钟之后,可以通过以400g离心5分钟来将细胞洗涤3次,并且之后可以将所述细胞重新悬浮在0.5-1mL冰冷的PBS,10%FCS,1%叠氮化钠中。可以在冰上在黑暗中维持细胞直到分析(优选在同一天内)。也可以使用标准方法来固定细胞,以将它们保存若干天;不同抗原的固定可能需要抗原特异性优化。

[0345] 下文描述的测定是代表性的,而不是排他性的。

[0346] 重组鼠IL-10(rMuIL-10)、聚乙二醇化-rMuIL-10(PEG-rMuIL-10)、聚乙二醇化rHuIL-10(PEG-rHuIL-10)。以下实施例中使用的聚乙二醇化IL-10是如专利文献(例如,US 8,691,205)中所描述的单-/二-PEG-IL-10混合物的混合物。以下提供了用于产生单/二-PEG-IL-10混合物的合成方案的两个实例:

[0347] 聚乙二醇化IL-10合成方案1。用50mM磷酸钠、pH范围为5-7.4的100mM氯化钠透析IL-10(例如,鼠或人)。在存在0.75-30mM氰基硼氢化钠的情况下,使摩尔比为1:1-1:7的5kDa PEG-丙醛与浓度为1-12mg/mL的IL-10发生反应。可替代地,可以类似方式用甲基吡啶甲硼烷活化反应。在5 $^{\circ}$ C至30 $^{\circ}$ C下将反应孵育3-24小时。将聚乙二醇化反应的pH调整到6.3,并且使7.5mg/mL的hIL-10与PEG发生反应以使IL-10与PEG接头的比率变为1:3.5。氰基硼氢化钠的最终浓度为约25mM,并且在15 $^{\circ}$ C下将反应进行12-15小时。单-和二-PEG IL-10是反

应的最大产物,其中终止时各自的浓度占约50%。可以使用氨基酸,诸如甘氨酸或赖氨酸或可替代地Tris缓冲液来淬灭反应。可以采用多种纯化方法,诸如凝胶过滤、阴离子和阳离子交换色谱法以及尺寸排阻HPLC (SE-HPLC) 来分离所希望的聚乙二醇化IL-10分子。

[0348] 聚乙二醇化IL-10合成方案2。用pH 7.0的10mM磷酸钠、100mM氯化钠透析IL-10 (例如,鼠或人)。使用透析缓冲液将透析的IL-10稀释3.2倍而达到约0.5至12mg/mL的浓度。在添加接头之前,将SC-PEG-12kDa (Delmar Scientific Laboratories, Maywood, Ill.) 和1体积的pH 9.1的100mM四硼酸钠添加到9体积的稀释的IL-10中以使IL-10溶液的pH上升到8.6。将SC-PEG-12K接头溶解于透析缓冲液中,并且将适当体积的接头溶液(每摩尔IL-10为1.8至3.6摩尔接头)添加到稀释的IL-10溶液中以开始聚乙二醇化反应。在5℃下进行反应,以便于控制速率,并且轻微搅拌反应溶液。当如由尺寸排阻HPLC (SE-HPLC) 所测定的单-PEG-IL-10产率接近40%时,通过添加1M甘氨酸溶液达到30mM的最终浓度来停止反应。使用HCl溶液将反应溶液的pH缓慢地调整到7.0,并且对反应液进行0.2微米过滤并在-80℃下储存所述反应液。在pH 6.5的10mM HEPES、含有0.05%MSA的100mM NaCl中以0.75-1.0mg/mL配制PEG-IL-10。

[0349] 本文使用的单-和二-聚乙二醇化的rHuIL-10的混合物可以被称为AM0010,并且使用5kDa PEG和PPA接头来合成,并且可以如以上方案1中所阐述般合成。

[0350] 鼠CD8+T细胞的分离和IL-10处理:从OT1小鼠 (C56Bl/6-Tg (Tcratcrb) 1100Mjb/J, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) 磁性分离 (Miltenyi, Auburn, CA) 鼠CD8+T细胞,并且在100-1000IU/mL rMuIL-2, (R&D Systems, Minneapolis, MN) 培养7-10天。用由1μg/mL LPS (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) 活化的自体骨髓细胞将OT1 T细胞再刺激3天,并且用SIINFEKL (SEQ ID NO:35) 肽 (InvivoGen, San Diego, CA) 对所述OT1T细胞施加外源脉冲。再刺激之后三天,将细胞暴露于所述浓度的rMuIL-10持续5天。然后洗涤细胞并且将其暴露于用SIINFEKL肽 (Merck Research Labs, Palo Alto, CA) 脉冲过的PDV6细胞。根据制造商的说明书用CellTiter Glo, (Promega, Madison, WI) 来测定细胞裂解百分比。

[0351] 人CD8+T细胞的分离和IL-10处理:从正常的“健康”人黑素瘤肿瘤活检标本磁性分离 (Miltenyi) 人CD8+T细胞。在6孔板 (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 中培养肿瘤细胞,并且在24孔板 (Nunc) 中单独培养T细胞。在补充有100-1000IU/mL IL-2 (Chiron, Emeryville, CA) 的完全RPMI (Hyclone, GE Healthcare Life Sciences, Logan, UT) 中培养CD8+T细胞并且每5-7天再次进料。每10-12天用外源添加到TT细胞的热裂解的肿瘤细胞抗原 (ATCC CRL-1803, Manassas, VA) 再刺激T细胞,以充当抗原呈递细胞。再刺激之后三天,洗涤CD8+T细胞并且将所述细胞暴露于所述浓度的rHuIL-10持续5天。洗涤细胞,并且在所述靶标的效应物处将所述细胞添加到标记的同源肿瘤细胞Cr51 (Perkin Elmer, Waltham, MA)、A375肿瘤细胞 (ATCC CRL-1619, Manassas, VA) 或K562细胞 (ATCC CCL-243), 并且执行标准的4小时铬释放测定。

[0352] ELISPOT:通过磁珠分离 (Miltenyi) 从接受所述PEG-rMuIL-10 (Merck Research Labs) 给药之后的携带CT26 (ATCC CRL-2638) 肿瘤的小鼠分离鼠CD8+T细胞。洗涤细胞,并且以每次ELISPOT (R&D systems, Minneapolis, MN) 1000-5000个细胞铺板,重复三次。由于孔中不含任何东西,将1μg/mL抗CD3 (eBioscience, San Diego, CA)、100-500CT26或100-500 4T1 (ATCC CRL-2539) 预暴露于10ng/mL IFNγ (R&D Systems, Minneapolis, MN) 中持续1小

时。在37℃下用5%CO₂将板孵育24小时,并且根据制造商的说明书进行显色。使用CTL (Shaker Heights,OH)免疫斑点分析仪来捕获板图像,并且使用免疫斑点ELISPOT分析软件来对斑点进行定量。

[0353] qPCR:按照制造商的说明书,分别使用Qiagen的RNeasy试剂盒和RT²First Strand 试剂盒来从分离的CD8+T细胞提取RNA并从中合成cDNA。根据制造商的方案,使用来自Qiagen的RT²SYBR Green qPCR Mastermix和引物对cDNA模板执行定量PCR。Ct值被归一化为看家基因即GUSB和GAPDH的平均Ct值。

[0354] CT26肿瘤模型:在动物的右下侧腹上对4至6周龄的雌性C57BL/6J小鼠(Jackson Laboratory)小鼠皮下植入100μL体积的1x10⁵个CT26细胞(CRL-2638;ATCC)。一旦可触知,就每周两次测量肿瘤的生长。使用公式(宽度²x长度/2)计算肿瘤体积,其中长度是较长的尺寸。当肿瘤达到75mm³的平均体积时,将动物分组。每天对5只小鼠/组皮下施用媒介物或聚乙二醇化的重组IL-10(Schering-Plough,Palo Alto,CA),持续28天。在28天给药之后,将每组的小鼠处死以进行组织和肿瘤分析。

[0355] 4T1肿瘤模型:在动物的右下侧腹上对4至6周龄的雌性BALB/c(Jackson Laboratory)小鼠皮下植入100μL体积的1x10⁴个4T1细胞(CRL-2539;ATCC)。一旦可触知,就每周两次测量肿瘤的生长。使用公式(宽度²x长度/2)计算肿瘤体积,其中长度是较长的尺寸。当肿瘤达到75mm³的平均体积时,将动物分组。每天对5只小鼠/组皮下施用媒介物或聚乙二醇化的重组IL-10(ARMO Biosciences,Redwood City,CA),持续28天。在28天给药之后,将每组的小鼠处死以进行组织和肿瘤分析。

[0356] 肿瘤浸润淋巴细胞的分离:为了分离肿瘤浸润淋巴细胞(TIL),用5mL消化缓冲液(RPMI (Life Technologies)、10%胎牛血清(Hyclone Thermo Fisher Scientific)、10mM HEPES (Life Technologies)、2mg/mL I型胶原酶(Worthington Biochemical,Lakewood, NJ)、30U/mL DNaseI(Worthington Biochemical)切碎肿瘤并且用消化缓冲液达到35mL的最终体积。在37℃下将肿瘤浆液旋转45分钟。然后通过迫使材料通过70微米的细胞过滤网(cell strainer)来机械地破坏肿瘤浆液。用RPMI将细胞洗涤两次,并且之后用25mL HBSS (Life Technologies)使所述细胞重新悬浮。用15mL Histopaque (Sigma-Aldrich, St.Louis,MO)给细胞悬浮液衬底,并且在制动器关闭的情况下在室温下以1000rpm离心30分钟。在离心之后,收集含有TIL的细胞界面,并且用完全RPMI洗涤两次。然后按照制造商的方案使用MACS细胞分离技术(Miltenyi Biotec)分离CD8+T细胞。在抗体染色和流式细胞术分析之前,每毫升细胞用1μg/mL抗-CD3和1μL GolgiPlug (BD Biosciences, San Jose,CA)将分离的CD8+T细胞处理10小时。

[0357] 活化诱导的细胞死亡测定:示例性的活化诱导的细胞死亡测定可以使用以下方案来执行。根据标准方案(参见例如Fuss等,(2009)Current Protocols in Immunology,第7.1单元,John Wiley,Inc.,NY)分离人原代外周血单核细胞(PBMC)。根据制造商的方案(Miltenyi Biotec),使用Miltenyi Biotec的抗CD45RO MACS珠粒和MACS细胞分离技术来分离CD45RO+CD8T细胞。CD45RO是记忆T细胞的标志物。为了活化细胞,在标准的24孔板(BD; Franklin Lakes,NJ)中,将1mL分离的细胞(处于3x10⁶个细胞/mL的密度)在AIM V培养基(Life Technologies)中培养3天,所述板预先涂布有抗CD3和抗CD28抗体(Affymetrix eBioscience, San Diego,CA)。为了对24孔板预先涂布抗CD3和抗CD28抗体,在37℃下将含

有10 μ g/mL抗CD3和2 μ g/mL抗CD28抗体的300 μ L碳酸盐缓冲液(0.1M NaHCO₃ (Sigma-Aldrich), 0.5M NaCl (Sigma-Aldrich), pH 8.3)在每个孔中孵育2小时,并且之后用AIM V培养基洗涤每个孔。在3天活化之后,收集细胞,对所述细胞进行计数,用1mL AIM V培养基(处于2 $\times$ 10⁶个细胞/mL的密度)将所述细胞重新铺板在标准24孔板中,并且用100ng/mL人聚乙二醇化IL-10将其处理3天。接着,重复上述活化和用人聚乙二醇化IL-10的处理,在此之后按照制造商的程序(Life Technologies)通过台盼蓝拒染法对活细胞计数,或对所述活细胞进行染色以进行流式细胞术分析。

[0358] 流式细胞术:根据制造商的方案使用BD Cytofix/Cytoperm Plus Fixation/Permeabilization试剂盒(BD Biosciences)用抗小鼠IFN γ (BioLegend, San Diego, CA, USA)、CD8 (BioLegend) 和PD1 (BioLegend) 抗体来对分离的小鼠肿瘤浸润CD8+T细胞进行染色。出于以下实验中的分析的目的,“PD1+中等”细胞通常表达通过流式细胞术实现的大约3000的平均通道荧光检测的细胞表面PD1的水平,而低PD1表达(“PD1+低”)由大约200的平均通道荧光检测表示,并且“PD1+高”表达由大约9000的平均通道荧光检测表示。

[0359] PEG-rHuIL-10疗法和肿瘤响应的评定。用PEG-rHuIL-10 (AM0010) 经由腹部的每日皮下自我注射来治疗人黑素瘤患者。治疗有效剂量的范围是5-20 μ g/kg/天。通过计算机化断层成像(CT)扫描来评定进行性疾病(PD)、稳定疾病(SD)和部分响应(PR)。在第1天在施用AM0010之前并按开始给药后6-7周间隔对患者进行扫描。使用全身CT扫描来评定肿瘤位置和肿瘤大小的变化。确定靶病变,并且在每个扫描时间点测量肿瘤块的最大截面。靶病变由放射科医师和治疗肿瘤医师两者评定。靶病变的最大截面总体体积(二维测量)从一次扫描到下一次扫描增加超过25%的患者被赋予进行性疾病的认定。靶病变的最大截面总体体积(二维测量)从一次扫描到下一次扫描既未增加超过25%也未减少超过50%的患者被赋予稳定疾病的认定。靶病变的最大截面总体体积(二维测量)从一次扫描到下一次扫描减少超过50%的患者被赋予部分响应疾病的认定。

[0360] 实施例1:鼠CD8+细胞的IL-10处理带来了增强的功能。

[0361] 在体外评定IL-10对分离的鼠CD8+T细胞功能的影响。在存在如上所述的重组的鼠IL-10(rMuIL-1)的情况下或在没有rMuIL-10作为对照的情况下分离和处理鼠CD8+T细胞。通过对细胞毒性标志物粒酶A、粒酶B、穿孔蛋白和细胞因子IFN γ 的基因表达的qPCR分析来评定T细胞活化。通过经过IL-10处理的由SIINFEKL致敏的CD8+T细胞裂解如上所述用SIINFEKL(SEQ ID NO:35)脉冲过的PDV6细胞的能力来评定T细胞的细胞毒性。

[0362] 如图1的图A所示,在体外用鼠IL-10刺激的鼠CD8+细胞展现出细胞毒性标志物粒酶A、粒酶B、穿孔蛋白和细胞因子IFN γ 的增强的表达。如图1的图B所示,对鼠OT1CD8+T细胞的处理带来了经过SIINFEKL脉冲的肿瘤细胞靶标的增强的细胞毒性。

[0363] 实施例2:从肿瘤活检标本分离的人CD8+细胞的IL-10处理带来了增强的功能

[0364] 从黑素瘤肿瘤的患者活检标本获得人CD8+T细胞,所述黑素瘤肿瘤在培养中扩增,用热裂解的肿瘤细胞抗原再刺激,并且之后在不存在IL-10的情况下或在存在如上所述的所述浓度的重组人IL-10(rHuIL-10)的情况下培养。通过对细胞毒性标志物粒酶A、粒酶B、穿孔蛋白和细胞因子IFN γ 的基因表达的qPCR分析来评定T细胞活化。通过裂解同源黑素瘤肿瘤细胞,即A375细胞(人无色性黑素瘤细胞系)或K562细胞(人骨髓性白血病细胞系)的能力来评定T细胞的细胞毒性。

[0365] 如图1的图C所示,受刺激的瘤内人来源CD8+T细胞的体外rHuIL-10处理增强了粒酶A、粒酶B、穿孔蛋白和IFN γ 的表达。另外,如所示,rHuIL-10处理还会带来同源肿瘤细胞靶标的增强的细胞毒性。对人CD8+T细胞的rHuIL-10处理并未导致对抗A375细胞或K562细胞的细胞毒性的显著增加,这指示增加的细胞毒性是抗原特异性的。

[0366] 实施例3:对携带肿瘤的小鼠的持续处理导致肿瘤抗原特异性瘤内CD8+T细胞的增加

[0367] 每天用1mg/kg PEG-rMuIL-10或用媒介物作为对照处理携带CT26肿瘤的小鼠,持续6、10或15天,并且分离CD8+瘤内T细胞。通过对来自PBMC或经过机械破坏和酶消化的CT26(ATCC)肿瘤的1,000个CD8+T细胞进行磁珠分离(Miltenyi)来产生ELISPOT(R&D Systems)。将CD8+T细胞在无次级刺激(w/o)的1 μ g/mL可溶的抗CD3(eBiosciences)、100CT26细胞(ATCC,小鼠鳞状肿瘤)或4T1细胞(ATCC,小鼠乳腺肿瘤)(作为阴性对照)肿瘤细胞中暴露24小时。用ImmunoSpot软件将斑点量化。

[0368] 在暴露于抗CD3时分泌IFN γ 的CD8+T细胞在经过PEG-rMuIL-10处理的组中出现增加(图2,图A)。这指示PEG-rMuIL-10处理加强了CD8+T细胞对TCR连接的响应。类似地,在暴露于同源CT26肿瘤细胞时分泌IFN γ 的CD8+T细胞也随时间增加(图2,图B),使得截止治疗的第15天,在抗CD3情况下在TCR连接后分泌IFN γ 的所有细胞在暴露于同源肿瘤细胞后也会分泌IFN γ (图2,图C)。

[0369] 这些结果指示通过PEG-rMuIL-10处理活化且能够分泌IFN γ 的CD8+T细胞对肿瘤抗原是特异的。肿瘤抗原特异性CD8+T细胞随时间增加的观察指示用PEG-rIL-10的持续处理会带来肿瘤抗原特异性CD8+T细胞的逐渐积累,所述CD8+T细胞的 α BTCT序列表示对实体肿瘤组织特异的新型CART TCR构建体。

[0370] 实施例4:持续的IL-10处理调节CD8+T细胞上的PD1表达

[0371] 评定如实施例3中所描述的用PEG-rMuIL-10的15天处理对PD1和IFN γ 表达水平的影响。PD1是CD8+T细胞活化的标志物(Agata等,Int Immunol,1996.8(5):p.765-72)。PD1的表达也与活化诱导的细胞死亡(Fang等,Mol Vis,2015.21:p.901-10)和T细胞耗竭(Jiang等,Cell Death Dis,2015.6:p.e1792)相关联。

[0372] 如实施例3中所描述用PEG-rMuIL-10的持续处理改变活化的CD8+T细胞TIL上的PD1的表达水平。在鼠中,与经过媒介物处理的小鼠相比较,用PEG-rMuIL-10的持续处理下调PD1表达,以便于维持CD8+T细胞处于PD1+中等水平表达状态。经过媒介物处理的小鼠体内的PD1+高CD8+T细胞TIL的百分比为51.6%;在用PEG-rMuIL-10处理15天的小鼠体内,PD1+高CD8+T细胞TIL仅为9.78%。相比之下,PD1+中等CD8+T细胞的百分比在经过媒介物处理的小鼠体内为17.9%,但是在用PEG-rMuIL-10处理15天的小鼠体内增加到31.2%。

[0373] 另外,延长处理也会改变呈PD1阳性的IFN γ 阳性CD8+TIL的比率。如以上图2所示,IFN γ 阳性CD8+TIL代表肿瘤内的肿瘤抗原特异性CD8+T细胞。这些IFN γ 阳性、PD1阳性细胞因此代表肿瘤抗原特异性CD8+T细胞的集合。图3的图A示出了来自用媒介物处理的小鼠的TIL的集合和呈IFN γ 阳性的PD1+/-、CD8+的量。经过媒介物处理的小鼠体内的PD1-、CD8+、IFN γ +百分比为约2.41%,而用PEG-rMuIL-10处理15天的小鼠体内的PD1+、CD8+、IFN γ +百分比为约3.7%。图3的图B示出了用PEG-rMuIL-10的延长处理将这些百分比分别改变为15.1%和12.8%。

[0374] 因此,这些数据指示这些IFN γ 阳性、PD1阳性细胞代表自其中可以获得抗原特异性TCR序列(例如, α 和 β TCR序列)的肿瘤抗原特异性CD8+T细胞的集合。

[0375] 实施例5:由IL-10疗法诱导的PD1+CD8+外周T细胞是CD45RO+T细胞(记忆T细胞)

[0376] 进一步分析来自正常的健康供体的PD1+CD8+外周T细胞以评定其表型。使用活化诱导的细胞死亡的模型来评定这些T细胞,其中外周CD8+T细胞暴露于多轮抗CD3/抗CD28再刺激,并且活化细胞在休止期期间暴露于PEG-rHuIL-10 (AM0010)或媒介物(对照)。然后分析细胞的PD1和CD45RO (T记忆细胞的标志物)两者的表面表达。如图4所示,以此方式用IL-10处理CD8+T细胞导致PD1+记忆CD8+T细胞的积累。

[0377] 图4的图A和图B表示使用获自两个不同供体的外周T细胞的结果。图A提供了来自正常的健康供体的外周CD8+T细胞的分析结果。分离CD8+T细胞,将其活化3天,并且暴露于AM00103天。在3天休止期之后,通过流式细胞术分析细胞以确定其PD1和CD45RO细胞表面表达(图B末端)。然后将这些细胞再刺激3天,并且之后暴露于AM0010三天。在3天休止期之后,通过流式细胞术分析细胞以确定其PD1和CD45RO细胞表面表达(图D末端)。在多次再刺激之后,这些细胞暴露于AM0010产生了更有活力的PD1+细胞,这表明AM0010可防止活化诱导的细胞死亡。鉴于其记忆表型(CD45RO+),这些细胞是抗原特异的,并且鉴于其PD1表达水平,所述细胞是活化的。相同的细胞可能是由Chan等描述的IFN γ 阳性细胞(J Interferon Cytokine Res (2015) 35 (12):948-955),因为刺激条件相似。

[0378] 这些数据指示由IL-10疗法诱导的PD1+,CD8+外周CD8+T细胞代表这些患者体内活化的肿瘤抗原特异性CD8+T细胞。

[0379] 实施例6:对经过IL-10治疗的患者体内的外周T细胞扩增的评定

[0380] 评定患者的IL-10治疗对其外周PD1+CD8+T细胞的影响(图5)。从癌症患者获得PBMC,所述癌症患者患有黑素瘤(Mel)、肾细胞癌(RCC)或结直肠癌(CRC)并且已接受如上所述的PEG-IL-10 (AM0010)单一疗法或结合抗PD1单克隆抗体的PEG-IL-10 (AM0010)疗法。在开始PEG-IL-10疗法之前获得的外周血样品用作参考样品。在图5中的括号内指示的日子从患者获得样品;在图5的X轴上指示施用的PEG-IL-10 (AM0010)的剂量。患者被分类为具有进行性疾病(PD)、疾病稳定(SD)或至少部分响应(PR)。在测试样品中和在参考样品中对编码至少VBTCR多肽的核酸进行测序,并且将测试样品中编码至少VBTCR多肽序列的核酸的频率与参考样品中编码相同的VBTCR的核酸的频率进行比较。如果测试样品中的频率相对于参考样品出现增加,则序列被分类为由“扩增的”T细胞克隆表达。如果测试样品中的频率相对于参考样品出现减少,则序列被分类为由“缩减的”T细胞克隆表达。“扩增的”克隆表示疾病抗原特异性T细胞。结果示出于图5中。

[0381] 在用PEG-rHuIL-10 (AM0010)治疗的患者中评定外周T细胞的扩增。图6提供了在用每日皮下施用的10 μ g/kg PEG-rHuIL-10 (AM0010) (图A)或每日皮下施用的20 μ g/kg PEG-rHuIL-10 (AM0010) (图B)治疗的两名肾细胞癌患者体内的扩增的相对于缩减的外周T细胞的代表性分析。“图A”患者展现出进行性疾病(RCC PD),而“图B”展现出肿瘤块缩小93%,并且因此展现出至少部分响应(RCC PR)。在第1天在施用第一剂量的PEG-rHuIL-10之前和在治疗的第29天均获得外周T细胞。图6中的黑色圆圈表示从第1天到治疗当天的扩增的克隆,并且白色圆圈表示缩减的克隆。图6中的灰色圆圈表示既未扩增也未缩减的外周中的克隆。

[0382] 图A中评定的RCC PD患者在29天治疗后相较于第1天显示出两个扩增的外周克隆

和四个缩减的克隆。图B中的RCC PR患者在113天治疗后相较于第1天显示出899个扩增的克隆对比47个缩减的克隆。

[0383] 这些实验数据指示对用IL-10试剂的治疗具有至少部分响应的患病患者的外周是疾病抗原特异性PD1+、CD8+T细胞的丰富来源,其可以用于帮助产生抗原特异性CD8+T细胞的克隆群体。可以分离、体外扩增这类克隆群体,并且将其用作基于细胞的治疗(例如,施用于患有同一类型疾病(例如,同一类型肿瘤)的癌症患者)。可以从对用IL-10试剂的治疗具有至少部分响应的患病患者的外周获得PD1+、CD8+外周T细胞,获得的T细胞受体(TCR)的序列以及用于产生 α TCR和 β TCR序列的文库的那些序列适合用于产生经遗传修饰的T细胞,例如具有嵌合抗原受体的T细胞(CAR-T细胞)。

[0384] 实施例7:从获自对IL-10试剂疗法有响应的患者的外周的PD1+、CD8+T细胞产生TCR α 和/或 β 序列的文库

[0385] 如上所述,患有适于用IL-10试剂的治疗的疾病并已接受IL-10试剂疗法的患者的组织样品(例如,来自外周血)提供了抗原特异性CD8+T细胞的来源。图7提供了可以如何使用这个来源来获得这类抗原特异性CD8+T细胞的TCR的序列的示意图。

[0386] 首先,鉴定或获得CD8+T细胞的来源以用作患者测试样品。这个来源可以是例如获自患者的血液样品(或血液样品的级分)。这类患者通常患有适于IL-10疗法的任何疾病,所述疾病包括但不限于:癌症(例如,实体肿瘤,诸如黑素瘤、RCC或淋巴瘤)和由病毒感染(例如HBV、HCV、HIV)引起的疾病。IL-10试剂治疗方案将随许多因素而变化,诸如有待治疗的疾病、有待施用的IL-10试剂(例如,rHuIL-10、聚乙二醇化的-rHuIL-10)等等。治疗方案可以是IL-10试剂单一疗法或可以伴有对病状的其他治疗(例如,像在联合疗法中一样)。在用IL-10试剂单一疗法治疗之后有至少部分响应的患者可能特别受到关注。

[0387] 在对患者测试样品进行可能希望的任何合适的处理之后,获得编码存在于样品中的至少V β TCR多肽序列的核酸并且对所述核酸进行测序。任选地,可以在这类核酸处理和测序之前处理样品以使其富集T细胞。例如,可以通过FACS对样品中的细胞进行分选以获得PD1+CD8+T细胞的群体。可以任选地针对PD1-中等表达水平选择这类细胞和/或可以任选地针对CD45RO+和/或细胞内IFN γ +和/或粒酶B+和/或穿孔蛋白+选择所述细胞。对细胞内IFN γ +和/或粒酶B+和/或穿孔蛋白+的选择有助于选择活化的抗原特异性细胞。如果感兴趣的话,可以在这种选择之前通过用1-10 μ g/ml可溶的抗CD3孵育2-4小时来诱导IFN γ 。可以任选地分选PD1+、CD8+T细胞(或例如,PD1-中等、CD8+T细胞;CD45RO+PD1+、CD8+T细胞;CD45RO+、PD1-中等+、CD8+T细胞)以提供单一细胞群。可以使用任何合适的方法(参见例如US 20060134704;US 20150275296)基于其抗原特异性而任选地分选PD1+、CD8+T细胞以提供具有限定的抗原特异性的T细胞的群体。如果感兴趣的话,则可以任选地根据本领域中熟知的方法将PD1+CD8+T细胞的单一群体扩增培养。

[0388] 可以使用例如由诸如Adaptive Biotechnologies的商业服务提供的方法论或类似方法论来分离 α 和/或 β TCR基因或对其进行测序。(参见例如US 20140322716;US 20150275296;US 9043160)。

[0389] 然后分析获自患者测试样品的TCR序列,以相较于参考样品中的V β 和/或V α 序列的频率确定存在于患者测试样品中的这些相同的V β 和/或V α 序列的频率。参考样品可以是IL-10试剂疗法之前来自患者的相同组织类型的样品。可替代地或另外,参考样品可以是在开

始疗法之后在分析样品的时间点之前的时间点来自同一名患者的相同组织类型的样品。应理解,这类参考样品的序列数据可以提供在计算机数据库中,并且在计算机上进行序列比较。相较于参考样品,患者测试样品中频率增加的VB和/或V α TCR序列表示响应于IL-10试剂疗法和/或持续的IL-10试剂疗法而扩增的克隆的TCR。

[0390] 可以任选地分析VB和/或V α 序列,以鉴定任何氨基酸共有序列,并且在患者单倍型和疾病类型(例如,癌症类型)两者的背景下鉴定氨基酸共有序列。这些 α BTCT基因表示内源产生的新的疾病抗原特异性T细胞受体序列,所述序列通过IL-10试剂的长期给药特异地诱发并且带来强有力的抗疾病细胞功能。

[0391] 所获得的TCR核酸可以用于产生含有多个构建体(例如,逆转录病毒构建体)的文库,所述构建体编码所有 α 和/或 β TCR序列。这类构建体用于转导具有一个或多个TCR编码构建体的自体患者外周CD8⁺T细胞的集合,以便于诱发单克隆或多克隆CD8⁺T细胞群。可以分离这类单克隆或多克隆CD8⁺T细胞群,并且往回将其输注到患者体内以进行治疗。

[0392] 在一些实施方案中,在IL-10试剂治疗之前从患者获得含有患者CD8⁺T细胞的患病组织(例如,实体肿瘤活检标本)的样品。这种预处理样品可以用作存档样品。这种预处理样品经受与如上所述的处理后样品相同的处理。提取核酸(例如,DNA)并且确定预处理和处理后样品中的TCR α 和/或 β 序列。由于VBTCR多肽序列在TCR之间通常展现出比V α TCR多肽更多的可变性,这个阶段的序列分析可以仅对编码VBTCR多肽的核酸执行。然后可以比较TCR α 和/或 β 序列来确定哪些存在于IL-10试剂疗法之前的患病组织中的T细胞中,以及这些序列中哪些在IL-10试剂疗法之后频率出现增加。在IL-10试剂疗法之后频率增加的TCR序列被鉴定为对患病组织的抗原可能是特异的(例如,肿瘤抗原特异的),并且表示存在于通过IL-10试剂疗法扩增的T细胞克隆中的TCR。这类TCR序列就纳入核酸和/或克隆的文库中而言特别受关注。

[0393] 实施例8.用PEG-rhIL-10治疗人癌症受试者诱导与抗肿瘤作用相关的CD8⁺T细胞克隆的增殖:

[0394] 为了评估经过PEG-rhIL10 (AM0010) 治疗的患者体内的免疫反应并鉴定与客观肿瘤反应的免疫相互关系,在每日用20 μ g/kg AM0010治疗,持续28天的30名人受试者体内重复测量83种免疫相关细胞因子、趋化因子和血清蛋白。

[0395] AM0010诱导了偏向Th1和Th2调控和CD8⁺T细胞活化的免疫活化。Th1型细胞因子(IFN γ 、IL-18、TNF α)以及为活化的Th2CD4⁺和CD8⁺T细胞的产物的IL-3和IL-4持续增加。同样显著诱导了IL-7。AM0010还增加了细胞毒性效应分子(FasL,淋巴毒素B)并且降低了免疫遏制细胞因子TGF β 和Th17相关细胞因子,所述细胞因子介导慢性炎症和肿瘤相关炎症。IL-23、IL-17和同二聚体IL-12p40减少了大约40%,而IL-6并未持续改变。血清中的免疫刺激细胞因子的增加在整个治疗持续时间内持续并且持续高达至少400天的时段。AM0010诱导IL-18的相同的一致变化,而不管肿瘤类型或放射肿瘤反应如何。

[0396] 由于观察到的细胞因子特征指示了经过AM0010治疗的患者体内CD8⁺T细胞的活化,因此分析血液中的CD8⁺和CD4⁺T细胞。免疫检查点,诸如PD-1、Lag-3或Tim-3是可诱导的并且在其活化之后表达在T细胞上。另外,具有增加的免疫检查点表达的CD8⁺T细胞表示识别肿瘤抗原的T细胞库。相对于来自外周血的T细胞中的检查点表达评估响应于AM0010治疗的表型变化。AM0010治疗增加了具有持久的肿瘤反应的肾细胞患者的血液中的Lag-3⁺CD8⁺

T细胞。显著比例的Lag-3⁺CD8⁺T细胞还表达PD-1。在所评估的所有患者中,在整个治疗期内,总的PD-1⁺T细胞和增殖的(KI-67⁺)PD-1⁺CD8⁺T细胞的百分比一直增加,从而证实由血清细胞因子指示的持续免疫活化。

[0397] T细胞的增加的活化导致多个检查点的上调。表达Lag-3的CD8⁺T细胞和增殖的Lag-3⁺CD8⁺T细胞的数目显著地且可持续地增加。然而,Lag-3⁺CD4⁺T细胞并未增加,从而指示免疫活化聚焦于CD8⁺T细胞反应。另一个免疫检查点Tim-3诱导T细胞凋亡,并且与癌症患者中耗尽的T细胞相关联。Tim-3(或CTLA-4)仅在小比例的CD8⁺T细胞上表达,并且未被显著上调。PD-1⁺Lag-3⁺双阳性CD8⁺T细胞及其增殖在AM0010治疗期间持续增加,从而指示所述细胞的持续活化而不是耗尽。

[0398] 这种活化特征与临床反应相关。在具有延迟响应的RCC患者中,PD-1⁺Lag-3⁺CD8⁺T细胞的增殖与客观肿瘤响应相符,从而表明其参与响应。事实上,治疗2个月之后患者体内Lag-3⁺PD-1⁺CD8⁺T细胞的普遍性及其增殖与客观肿瘤响应相关。除了导致血液中活化的CD8⁺T细胞的普遍性提高之外,AM0010还增加了患者的肿瘤中活化的CD8⁺T细胞的数目和粒酶B⁺CD8⁺T细胞的数目。

[0399] 实施例9:扩增的T细胞克隆的序列鉴定和表征

[0400] 患者体内的Lag-3⁺PD-1⁺CD8⁺T细胞的增加的增殖和扩增指示不同的攻击抗原的克隆T细胞群的扩增和/或外周T细胞的现有亚组的功能成熟。为了评估每个群体的贡献,我们通对外周血进行TCR深度测序来分析经过AM0010治疗的患者的T细胞库的组成。使用DNeasy试剂盒(Qiagen)从EDTA血液样品分离DNA,并且执行TCR深度测序。扩增和缩减的克隆被定义为在预处理样品与正处理样品之间存在超过10倍的变化了的T细胞克隆。

[0401] 处理前后的克隆T细胞库的比较揭示施用AM0010的患者具有强的T细胞克隆的扩增。测序指示存在2,952个独特的TCR CDR3Vβ扩增序列。T细胞扩增包括在预处理或预先存在的库中可检测的克隆以及在治疗之前在患者体内不可检测的克隆(新克隆)。在患有各种各样的癌症类型的患者中观察到从头扩增。

[0402] 分析相对于基线改变超过十倍的克隆。AM0010导致每名患者平均有240个T细胞克隆(范围17-786)扩增超过10倍,而每名患者平均仅仅18个T细胞克隆(0-150)缩减超过10倍。平均而言,占治疗前患者的T细胞库的0.06%的T细胞克隆扩增到总外周T细胞库的6%。血液中扩增的T细胞的百分比与响应相关。具有客观肿瘤响应的患者平均具有15%的扩增的T细胞克隆(范围4.3%至43%;>10倍扩增/克隆),而患有稳定疾病的患者仅为2.9%(0.99-4.3),并且患有进行性疾病的患者为1.8%(0.78-3.1)。此外,具有客观肿瘤响应的患者平均具有761(524-786)个扩增的个别克隆,而患有稳定疾病的患者为194个克隆(81-519),并且患有进行性疾病的患者为164个克隆(17-328)。

[0403] 肿瘤对抗PD-1的响应与肿瘤中的高度突变负荷相关,从而表明预先存在的T细胞对所得新抗原的响应可以有助于肿瘤响应。在所有肿瘤类型-在肿瘤组织中具有高或低的预测突变负荷和具有高或低的预先存在的CD8⁺T细胞中观察到罕见或新的T细胞的克隆扩增。虽然从头T细胞扩增的幅度与施用AM0010单一疗法的患者体内的肿瘤响应相关,但是并未观察到免疫相关AE。在接受抗CTLA-4疗法的前列腺癌患者中,每名患者有超过55个CD8⁺T细胞克隆的扩增先于严重的免疫相关不良事件(irAE),从而表明这些扩增的T细胞克隆的自行反应性(Subudhi, S.K.等, (2016) PNAS (USA) 113 (42):11919-11924)。

[0404] 本文描述了本发明的具体实施方案,包括诸位发明人已知用于执行本发明的最佳模式。在阅读前述说明后,所公开的实施方案的变型对于本领域技术人员而言可能会变得显而易见,并且预期那些技术人员可以适当地采用这类变型。因此,本发明意图以不同于本文具体描述的其他方式来实施,并且本发明包括适用法律允许的所附权利要求书中叙述的主题的所有修改和等效形式。此外,除非本文另外指明或另外与上下文明显矛盾,否则本发明涵盖上述元素呈其所有可能变型的任何组合。

[0405] 本说明书中引用的所有出版物、专利申请、登录号和其他参考文献以引用的方式并入本文,就如同具体地且单独地指出每个单独出版物或专利申请以引用方式并入一样。

序列表

<110> J·B·穆姆

I·H·陈

S·麦考利

S·奥格

M·奥夫特

<120> 在产生抗原特异性CD8+ T细胞中的白介素-10及其使用方法

<130> ARM0-023W0

<140> US 17/012882

<141> 2017-01-10

<160> 36

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 1

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 2

Arg Arg Gln Arg Arg Thr Ser Lys Leu Met Lys Arg

1 5 10

<210> 3

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 3

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu

1	5	10	15
Lys	Ala	Leu	Ala
Ala	Leu	Ala	Lys
Lys	Lys	Ile	Leu

20	25
----	----

<210> 4

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 4

Lys Ala Leu Ala Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala

1	5	10	15
---	---	----	----

Leu Ala Lys His Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Lys Cys Glu

20	25	30
----	----	----

Ala

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 5

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 6

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1	5	10
---	---	----

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 7

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 8

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 9

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg

1 5

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 10

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala

1 5 10

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 11

Thr His Arg Leu Pro Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 12
Gly Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10
<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (5)
<223> 该序列重复n次,其中n是选自至少1至20的整数。
<400> 13
Gly Ser Gly Gly Ser
1 5
<210> 14
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> 该氨基酸重复m次,其中m是选自至少1至20的整数。
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (3)
<223> 该序列重复n次,其中n是选自至少1至20的整数。
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)

<223> 该氨基酸重复o次,其中o是选自至少1至20的整数。
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3) .. (3)
<223> 该氨基酸重复m次,其中m是选自至少1至20的整数。
<400> 14
Gly Ser Gly
1
<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> 该氨基酸重复m次,其中m是选自至少1至20的整数。
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (5)
<223> 该序列重复n次,其中n是选自至少1至20的整数。
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> 该氨基酸重复o次,其中o是选自至少1至20的整数。
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3) .. (3)
<223> 该氨基酸重复m次,其中m是选自至少1至20的整数。
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4) .. (4)
<223> 该氨基酸重复o次,其中o是选自至少1至20的整数。
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5) .. (5)
<223> 该氨基酸重复m次,其中m是选自至少1至20的整数。
<400> 15

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (5)

<223> 该序列重复n次,其中n是选自至少1至20的整数。

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5) .. (5)

<223> 该氨基酸重复m次,其中m是选自至少1至20的整数。

<400> 16

Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (5)

<223> 该序列重复n次,其中n是选自至少1至20的整数。

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4) .. (4)

<223> 该氨基酸重复m次,其中m是选自至少1至20的整数。

<400> 17

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 18

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (4)
<223> 该序列重复n次,其中n是选自至少1至20的整数。
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4) .. (4)
<223> 该氨基酸重复m次,其中m是选自至少1至20的整数。
<400> 18
Gly Gly Gly Ser
1
<210> 19
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 19
Gly Gly Ser Gly
1
<210> 20
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 20
Gly Gly Ser Gly Gly
1 5
<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 21

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 22

Gly Ser Gly Gly Gly

1 5

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 23

Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 24

Gly Ser Ser Ser Gly

1 5

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (5)

<223> 该序列重复n次,其中n是选自至少1至50的整数

<400> 25

Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 26

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (4)

<223> 该序列重复n次,其中n是选自至少1至50的整数

<400> 26

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (5)

<223> 该序列重复n次,其中n是选自至少1至50的整数

<400> 27

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 28

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 29

<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 29
Gly Gly Ser Gly
1
<210> 30
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 30
Gly Gly Ser Gly Gly
1 5
<210> 31
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 31
Gly Ser Gly Ser Gly
1 5
<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 32
Gly Ser Gly Gly Gly
1 5
<210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 33

Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 34

Gly Ser Ser Ser Gly

1 5

<210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 35

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

1 5

<210> 36

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 36

Gly Gly Gly Ser

1

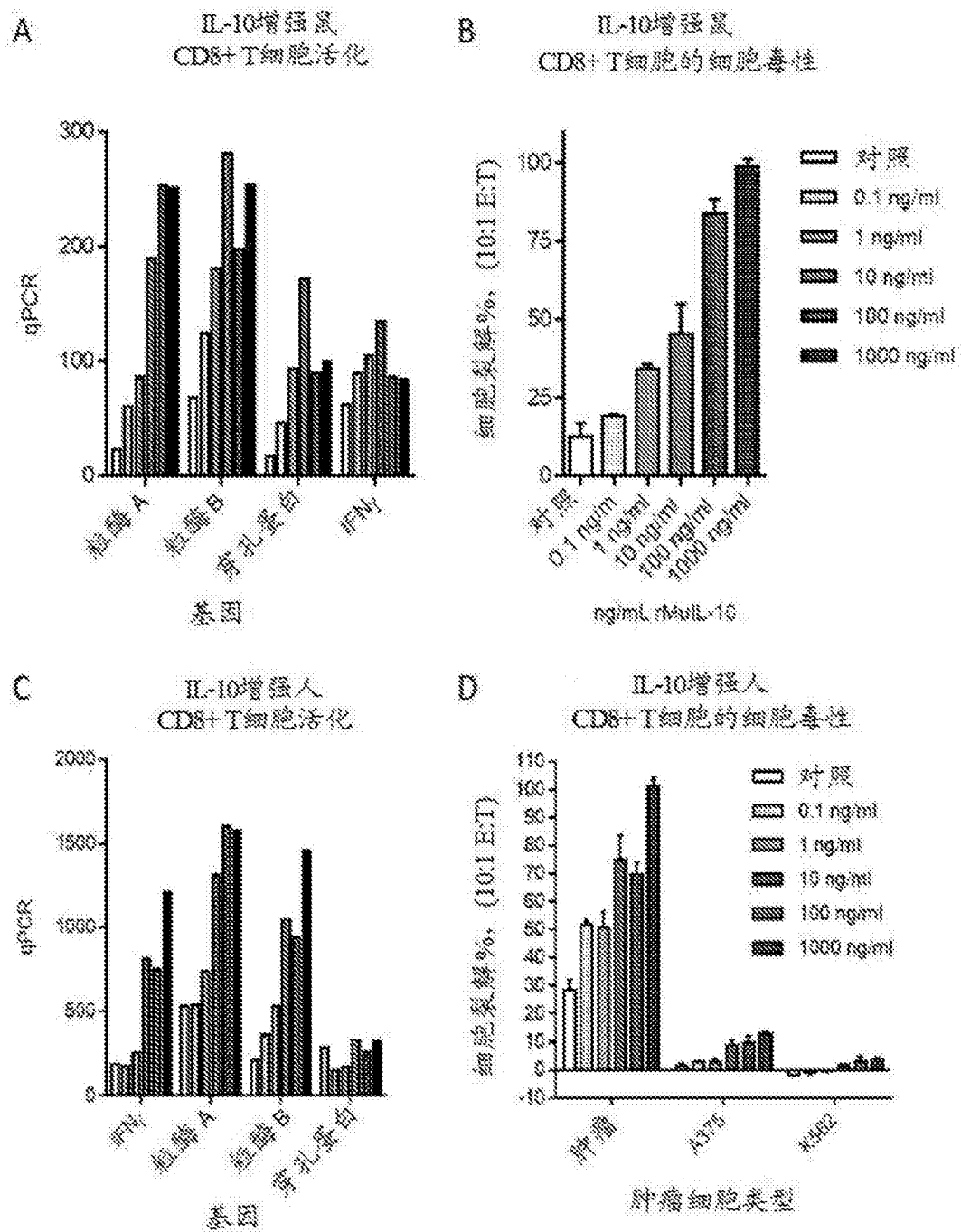


图1

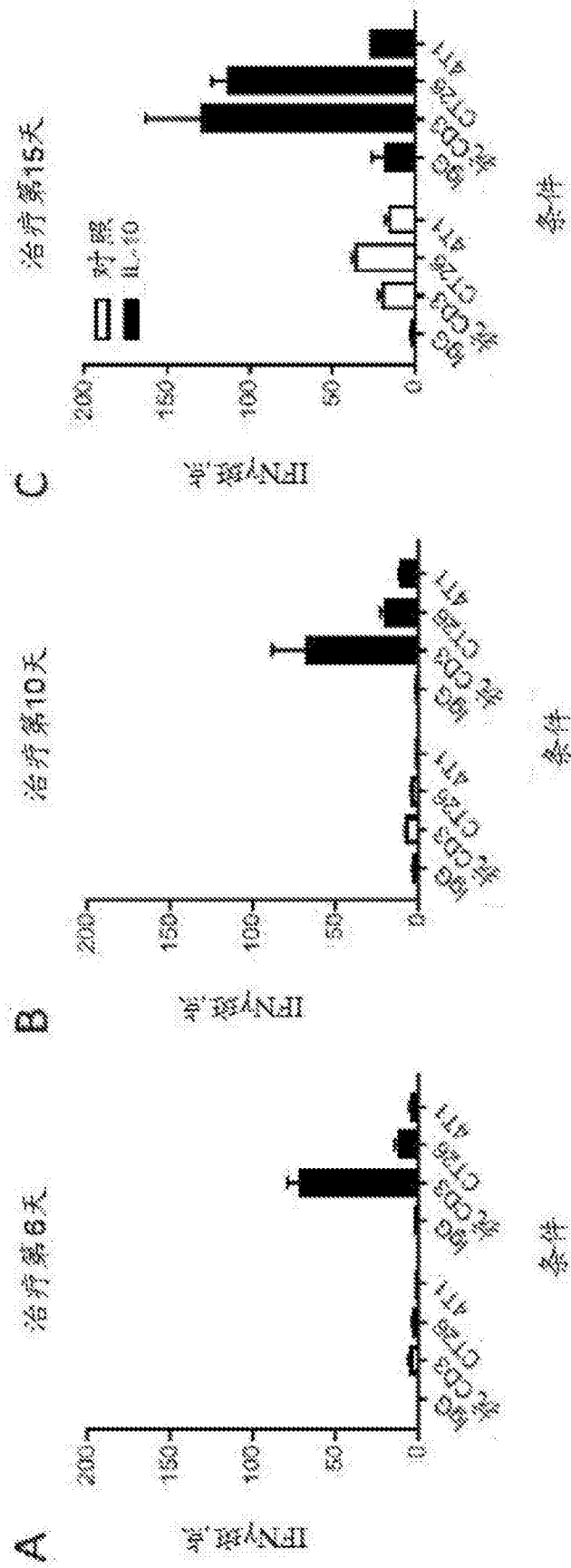


图2

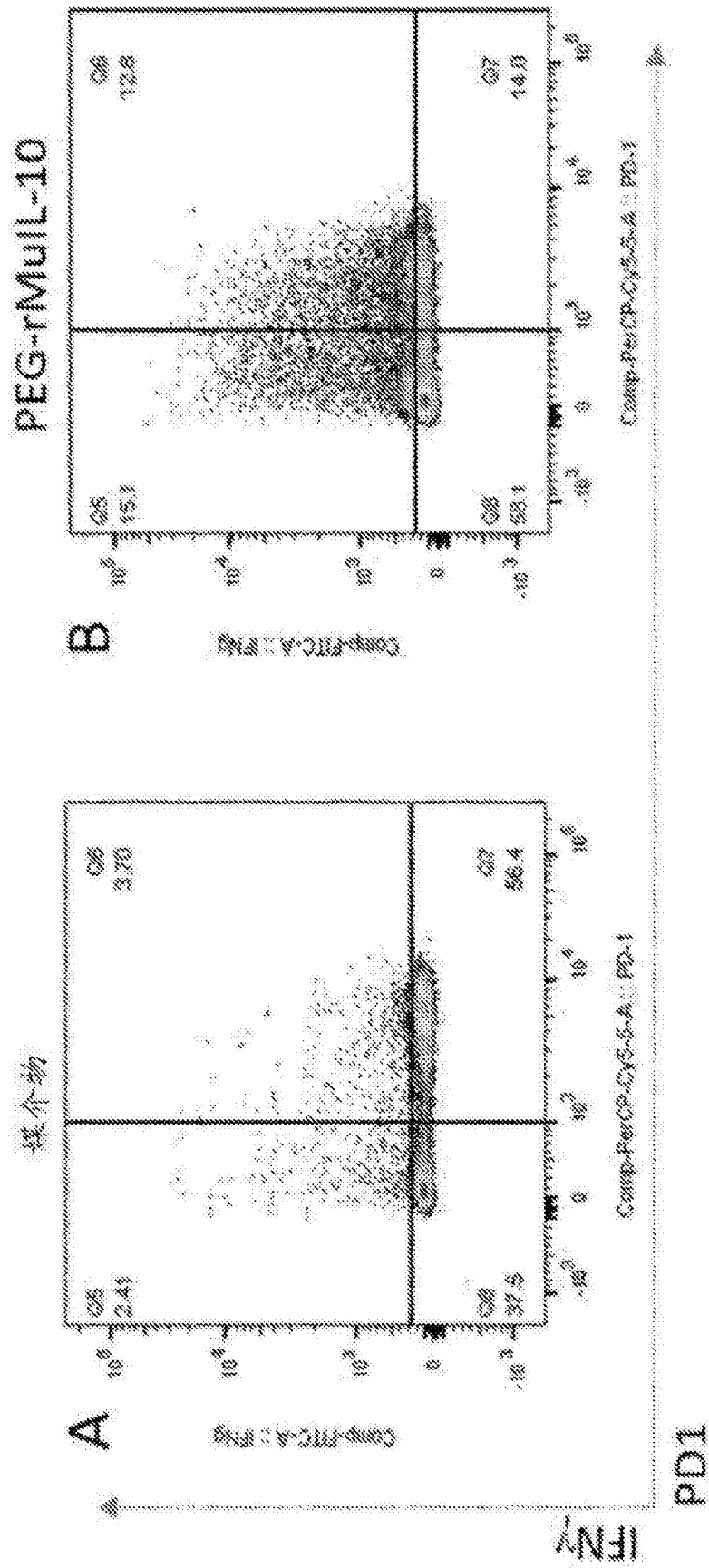


图3

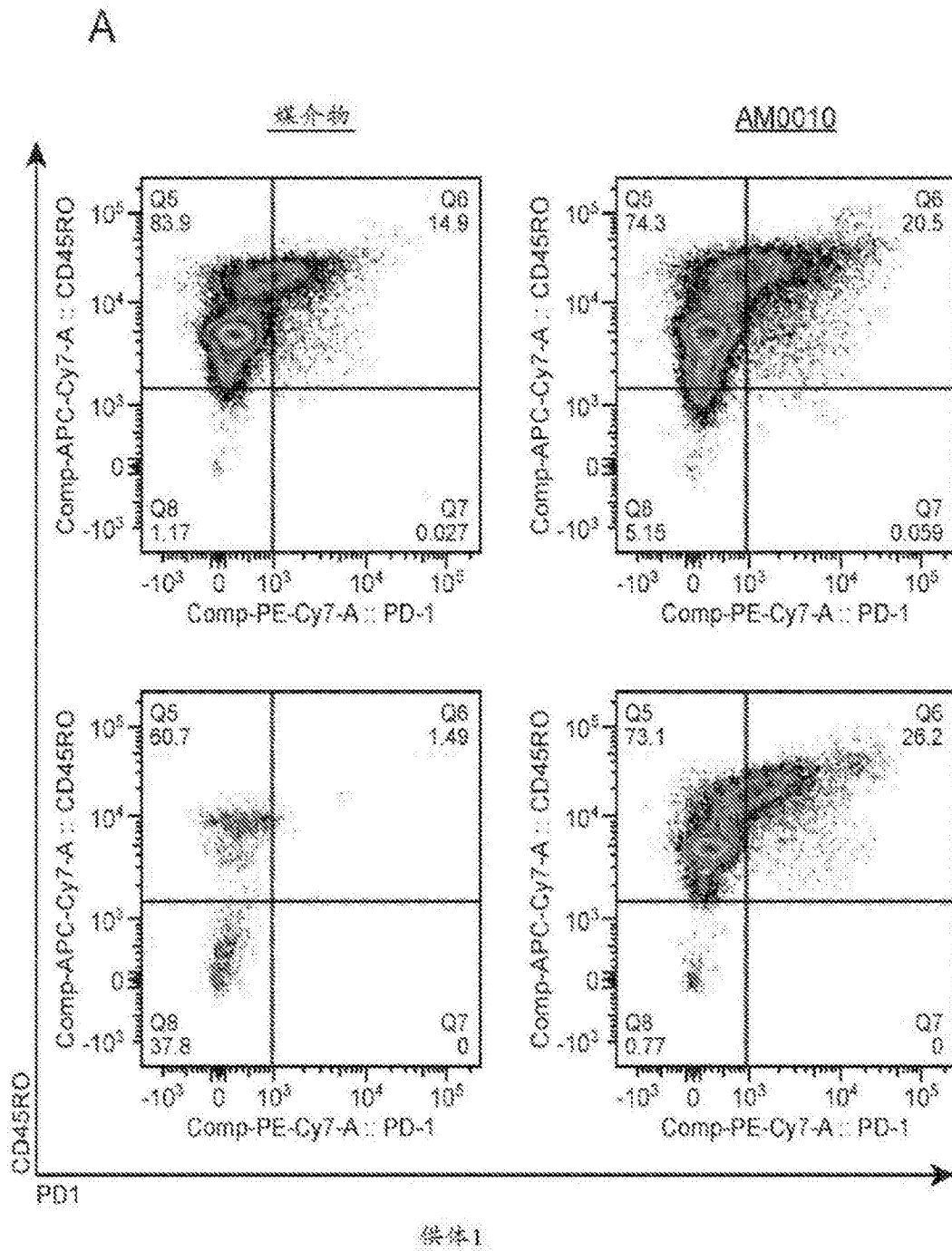


图4

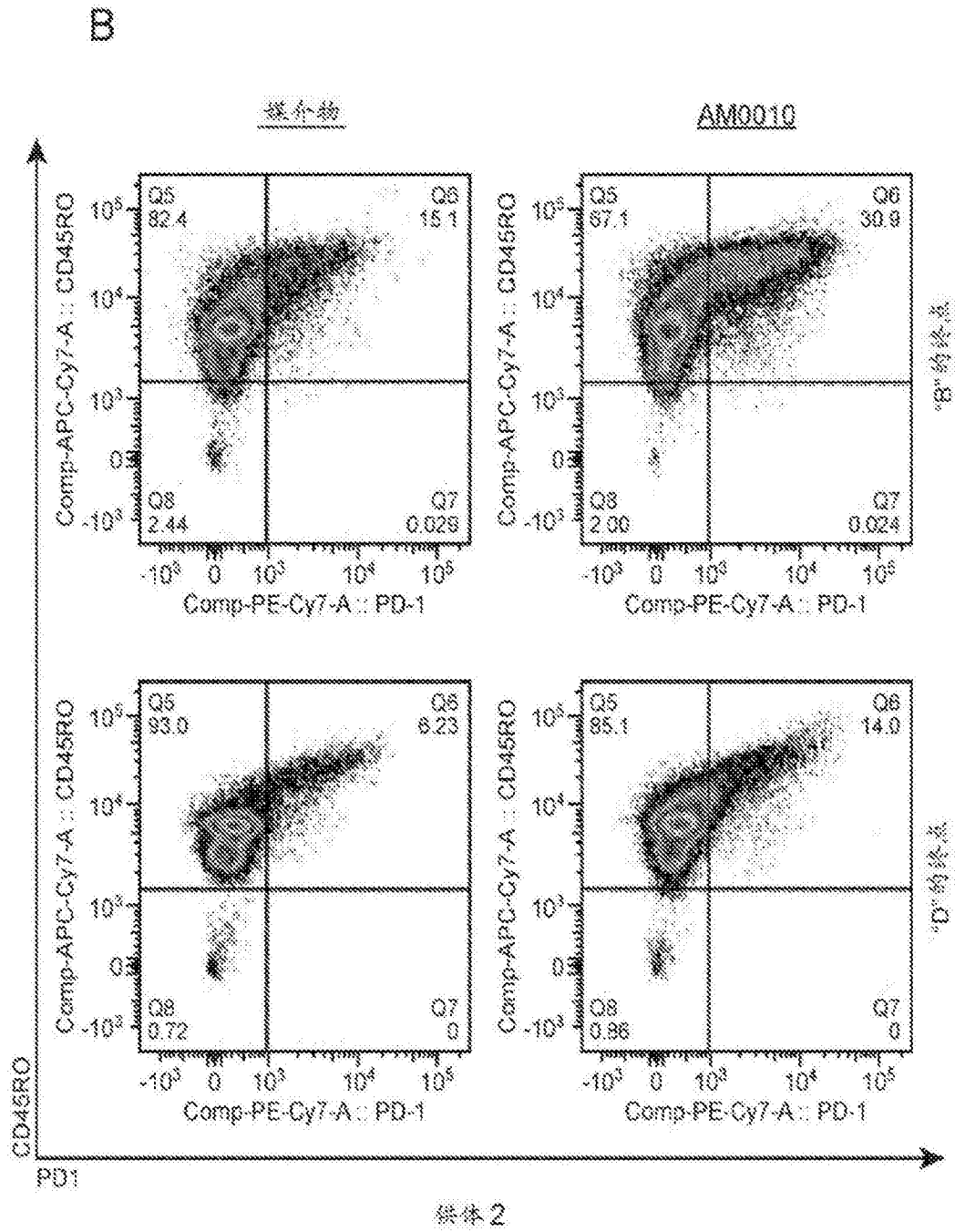


图4(续)

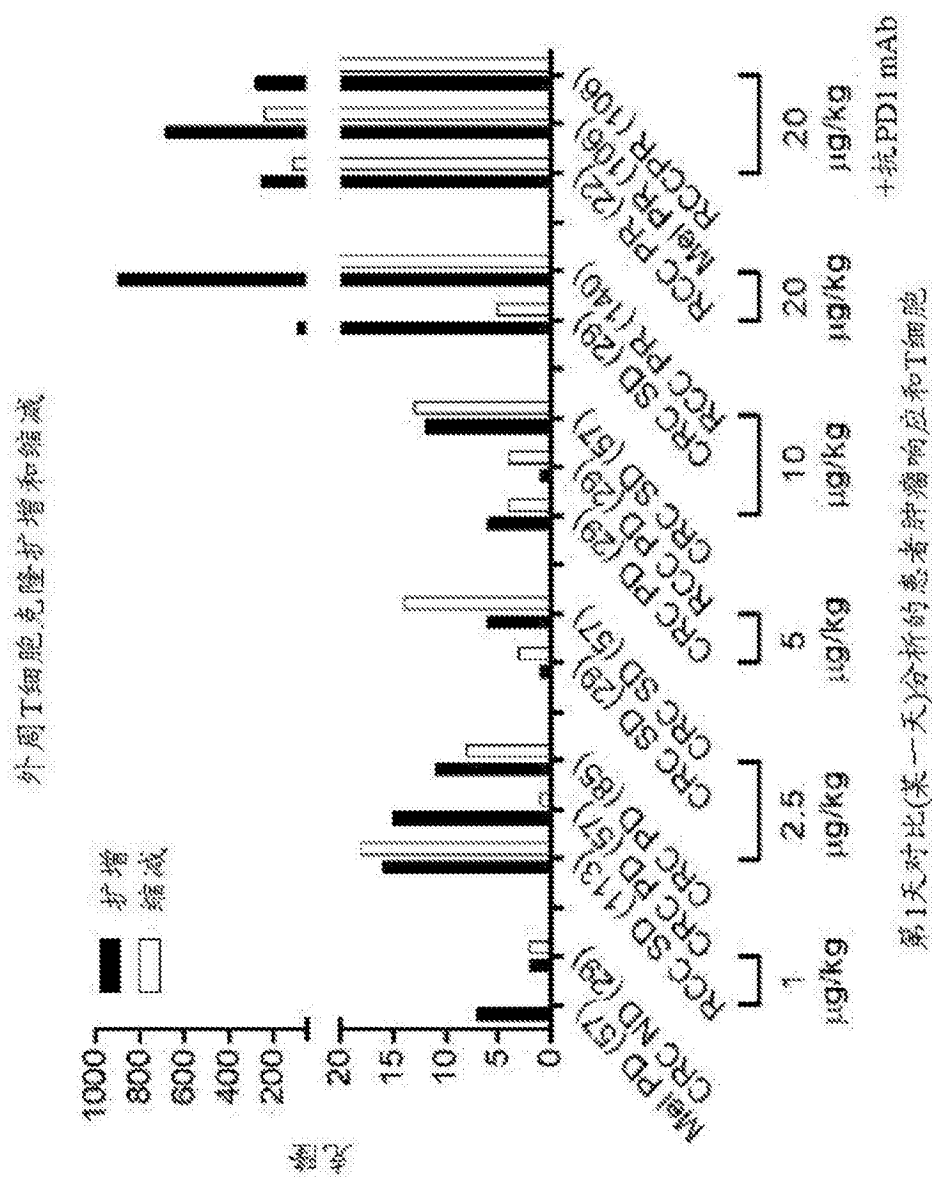


图5

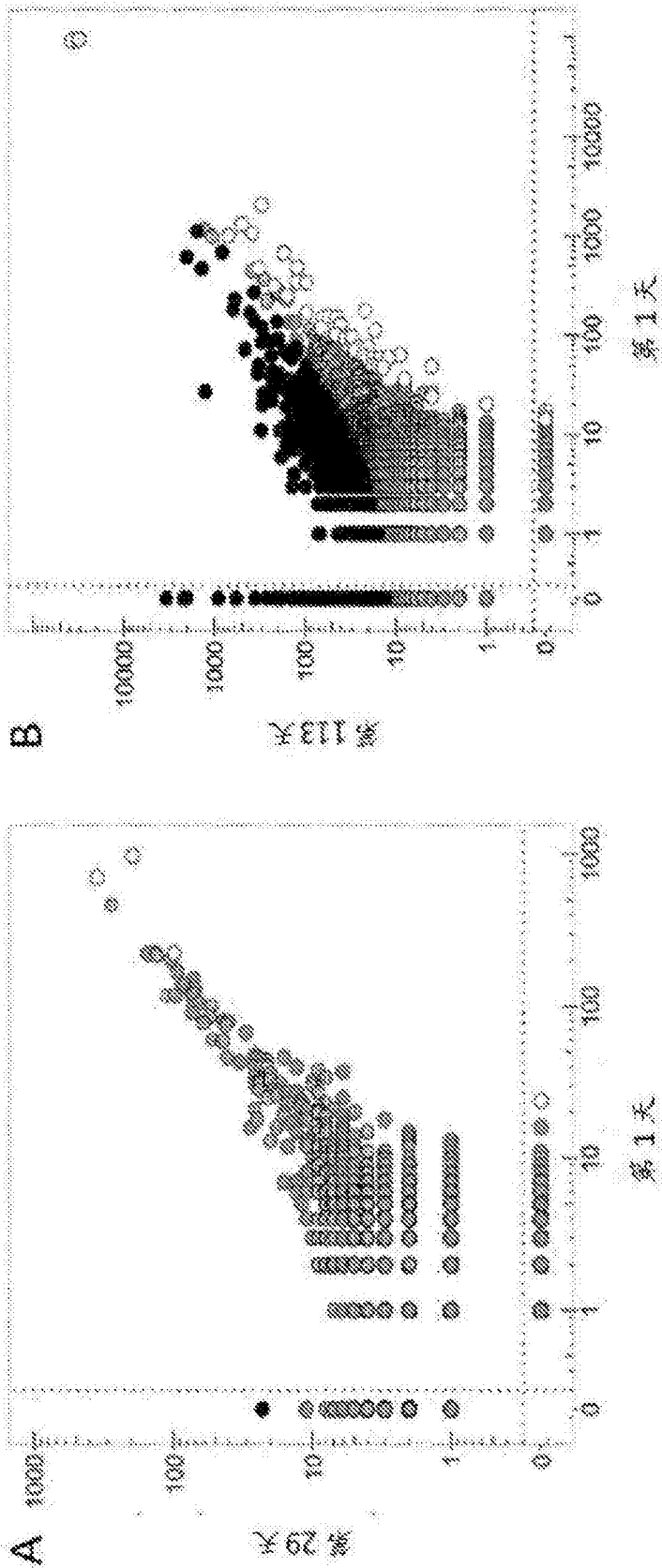


图6

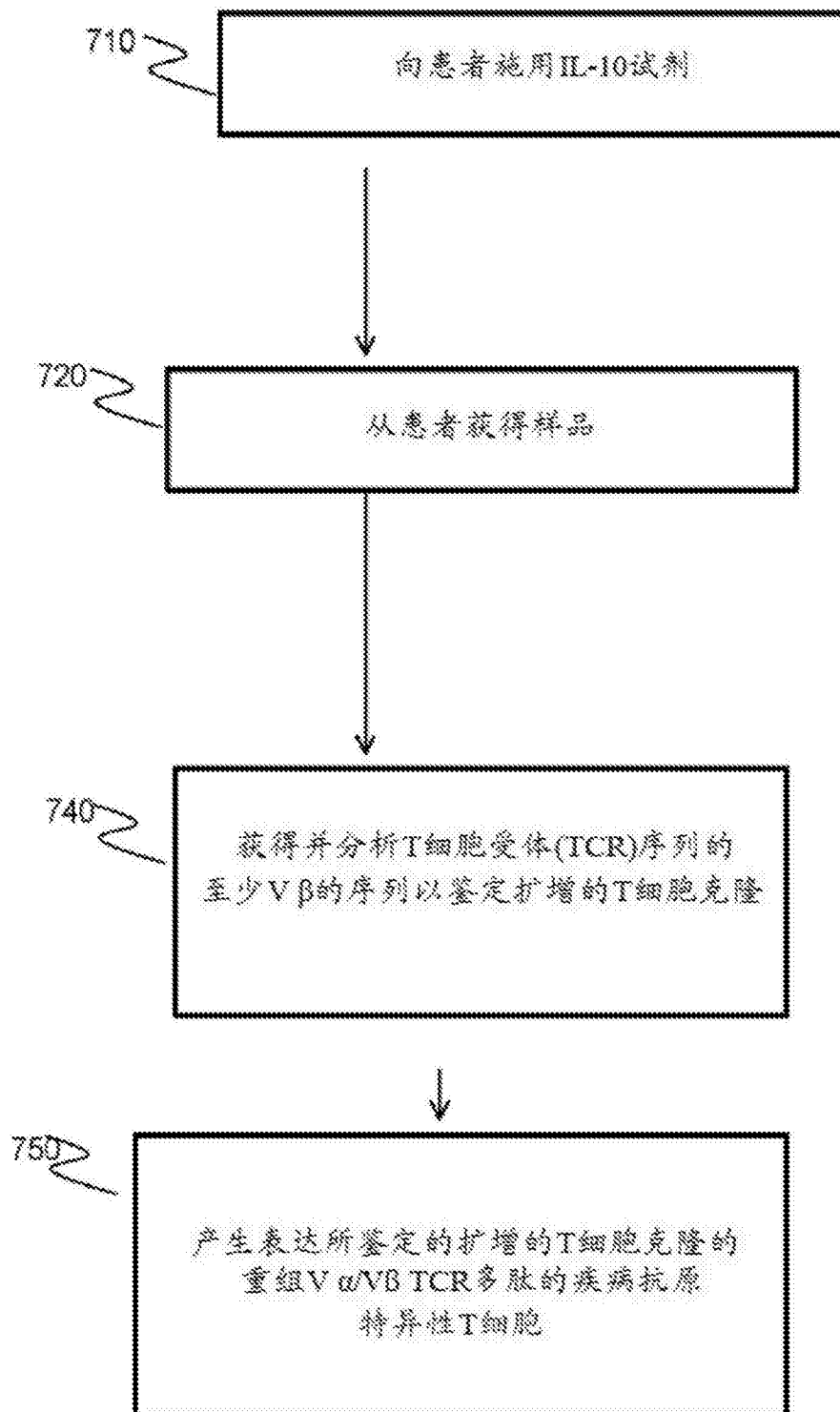


图7