(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111050803 A
(43)申请公布日 2020.04.21

(21)申请号 201880053451.8
(22)申请日 2018.06.18
(30)优先权数据
62/522,564 2017.06.20 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.02.17
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/037982 2018.06.18
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/236701 EN 2018.12.27
(71)申请人 德克萨斯大学系统董事会
地址 美国得克萨斯州
(72)发明人 傅阳新 曹学智
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 郑斌 尹玉峰
(51)Int.Cl.
A61K 47/65(2006.01)
C07K 14/47(2006.01)
C07K 14/56(2006.01)
C07K 14/565(2006.01)
C07K 14/71(2006.01)

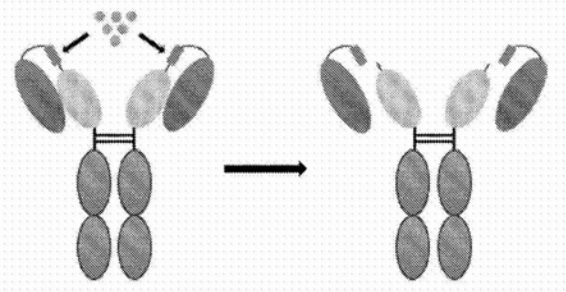
权利要求书3页 说明书35页 附图6页

(54)发明名称

用于治疗癌症的干扰素前药

(57)摘要

本公开内容涉及干扰素前药及其在治疗癌症中的用途。这样的构建体的一个特别优点是其在体内发挥强大的抗肿瘤活性降低与干扰素治疗相关的许多显著毒性的能力。



CN 111050803 A

1.干扰素前药,其包含:

(a)干扰素α和β受体(IFNAR)结构域,其保留IFN结合活性;

(b)1型干扰素(IFN)结构域,其在未被所述IFNAR结构域接合时保留1型干扰素活性;

(c)免疫球蛋白(Ig)Fc结构域;

(d)第一接头,其在一端与所述IFN的N端融合并且在另一端与所述IFNAR融合,其中所述第一接头能够被蛋白酶切割;以及

(e)第二接头,其在一端与所述IFN的C端融合并且在另一端与所述Ig Fc结构域的N端融合。

2.权利要求1所述的融合蛋白,其中所述Ig是IgG,例如IgG1或IgG2。

3.权利要求1至2所述的融合蛋白,其中所述干扰素前药包含两个拷贝的所述1型IFN结构域。

4.权利要求1至3所述的融合蛋白,其中所述干扰素前药包含多于两个拷贝的所述1型IFN结构域。

5.权利要求1至4所述的融合蛋白,其中所述第一接头能够被一种或更多种基质金属蛋白酶例如MMP1、MMP3、MMP9、MMP10、MMP11、MMP12、MMP13或MMP14切割。

6.权利要求1至5所述的融合蛋白,其中所述第一接头能够被UPA、FAPa和/或组织蛋白酶B切割。

7.权利要求1至4所述的融合蛋白,其中所述接头是G4S-SUB1-G4S-SUB2-G4S-SUB3-G4S,其中SUB1至3是不同的酶切割位点。

8.权利要求1至7所述的融合蛋白,其中所述IFNAR是IFNAR1。

9.权利要求1至7所述的融合蛋白,其中所述IFNAR是IFNAR2。

10.权利要求1至9所述的融合蛋白,其中所述IFN是IFN-α、IFN-β、IFN-κ、IFN-δ、IFN-ε、IFN-τ、IFN-ω或IFN-ζ。

11.编码干扰素前药的核酸构建体,其包含:

(a)干扰素α和β受体(IFNAR)结构域,其保留IFN结合活性;

(b)1型干扰素(IFN)结构域,其在未被所述IFNAR结构域接合时保留1型干扰素活性;

(c)免疫球蛋白(Ig)Fc结构域;

(d)第一接头,其在一端与所述IFN的N端融合并且在另一端与所述IFNAR融合,其中所述第一接头能够被蛋白酶切割;

(e)第二接头,其在一端与所述IFN的C端融合并且在另一端与所述Ig Fc结构域的N端融合;以及

(f)启动子,其位于所述IFNα结构域5'端的5'方向。

12.权利要求11所述的核酸构建体,其中所述Ig是IgG,例如IgG1或IgG2。

13.权利要求11至12所述的核酸构建体,其中所述干扰素前药包含两个拷贝的所述1型IFN结构域。

14.权利要求11至13所述的核酸构建体,其中所述干扰素前药包含多于两个拷贝的所述1型IFN结构域。

15.权利要求11至14所述的核酸构建体,其中所述第一接头能够被基质金属蛋白酶例如MMP1、MMP3、MMP9、MMP10、MMP11、MMP12、MMP13和/或MMP14切割。

16.权利要求11至15所述的核酸构建体，其中所述第一接头能够被UPA、FAPa和/或组织蛋白酶B切割。

17.权利要求11至14所述的核酸构建体，其中所述接头是G4S-SUB1-G4S-SUB2-G4S-SUB3-G4S，其中SUB1至3是不同的酶切割位点。

18.权利要求11至17所述的核酸构建体，其中所述IFNAR是IFNAR1。

19.权利要求11至17所述的核酸构建体，其中所述IFNAR是IFNAR2。

20.权利要求11至19所述的核酸构建体，其中所述IFN是IFN-α、IFN-β、IFN-κ、IFN-δ、IFN-ε、IFN-τ、IFN-ω或IFN-ζ。

21.重组细胞，其表达根据权利要求1至10所述的干扰素前药。

22.重组细胞，其包含根据权利要求11至20所述的核酸构建体。

23.表达干扰素前药的方法，其包括培养权利要求21所述的细胞。

24.表达干扰素前药的方法，其包括培养权利要求22所述的细胞。

25.根据权利要求1至10所述的干扰素前药的以下用途：

(a)制备用于治疗癌症的药物；或者

(b)用于治疗癌症。

26.治疗癌症的方法，其包括向有此需要的对象施用根据权利要求1至10所述的干扰素前药。

27.权利要求26所述的方法，其还包括评估在获自所述对象的癌细胞中的蛋白酶表达的步骤。

28.权利要求27所述的方法，其中所述癌细胞从活检获得。

29.权利要求27所述的方法，其中所述癌细胞是循环肿瘤细胞。

30.权利要求26至29所述的方法，其中所述癌症是肺癌、乳腺癌、脑癌、口腔癌、食管癌、头颈癌、皮肤癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、肾癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、结肠癌、睾丸癌、子宫癌、宫颈癌、淋巴瘤或白血病。

31.权利要求26至30所述的方法，其中所述癌症是原发性的、复发性的、转移性的或多重抗药性的。

32.权利要求26至30所述的方法，其中所述患者先前已接受手术治疗、化学治疗、放射治疗、激素治疗或免疫治疗。

33.权利要求26至32所述的方法，其还包括用第二癌症治疗对所述对象进行治疗。

34.权利要求33所述的方法，其中所述第二癌症治疗是手术治疗、化学治疗、放射治疗、激素治疗或免疫治疗。

35.权利要求26至34所述的方法，其中所述对象是人或非人哺乳动物。

36.权利要求26至35所述的方法，其还包括将所述干扰素前药施用多于一次。

37.权利要求36所述的方法，其中将所述干扰素前药每天、每隔一天、每周、每隔一周或每月施用。

38.权利要求26至37所述的方法，其中将所述干扰素前药全身性施用。

39.权利要求26至37所述的方法，其中将所述干扰素前药瘤内施用、局部施用到肿瘤或区域性施用到肿瘤。

40.权利要求26至39所述的方法，其中治疗包括以下中的一种或更多种：减慢肿瘤生

长、使肿瘤生长停止、减小肿瘤尺寸或负荷、与未经治疗对象相比提高存活、诱导癌症缓解、诱导肿瘤细胞凋亡或诱导肿瘤坏死。

用于治疗癌症的干扰素前药

[0001] 优先权要求

[0002] 本申请要求2017年6月20日提交的美国临时申请序列号62/522,564的优先权权益,其全部内容在此通过引用并入。

背景技术

1.技术领域

[0003] 本公开内容一般地涉及医学、肿瘤学和免疫治疗剂领域。更特别地,其涉及免疫试剂在癌症治疗中的开发和用途。

[0004] 2.背景技术

[0005] I型干扰素(interferon,IFN)被认为直接抑制肿瘤细胞增殖。其已成功用于治疗多种类型的癌症,包括血液肿瘤(慢性髓性白血病、毛细胞白血病、多发性骨髓瘤和非霍奇金淋巴瘤(Non-Hodgkin lymphoma))和实体瘤(黑素瘤、肾癌和卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma))(Ferrantini et al.,2007;Moschos&Kirkwood,2007;Zitvogel et al.,2015和Antonelli et al.,2015)。事实上,不断增加的证据表明,内源性I型IFN在教育DC以提高针对肿瘤抗原的交叉致敏从而增强化学治疗、放射治疗、靶向治疗和免疫治疗的抗肿瘤活性方面发挥关键作用(Schiavoni et al.,2011;Bumette et al.,2011;Stagg et al.,2011和Woo et al.,2014)。

[0006] I型IFN治疗的一个特别优势是由于其能够在抗肿瘤免疫应答的产生中的多个点进行干预,包括刺激固有和适应性细胞毒性淋巴细胞群,负调节抑制性细胞类型,因此其通过抑制增殖以及通过调节凋亡、分化、迁移和细胞表面抗原表达而对肿瘤细胞产生影响(Parker et al.,2016)。重要的是,这些作用中的一些可代表使用I型IFN来克服癌症对免疫治疗的抗性的潜在策略。癌症患者中复发的机制之一是由于用于肿瘤抗原呈递的MHC I类分子和肽转运蛋白基因的表达的下调而引起的T细胞识别缺乏(Sharma et al.,2017)。I型IFN可用于诱导肿瘤细胞中的MHC I类表达以及LMP2/7和TAP-1/2的表达,一起成为对抗针对免疫治疗的治疗抗性的理想组合策略(Khanna,1998)。另外,I型IFN可通过负调节Treg的增殖(Pace et al.,2010和Srivastava et al.,2014)以及降低MDSC的积聚和抑制功能(Zoglmeier et al.,2011)(这二者均直接抑制细胞毒性T淋巴细胞活性)来抑制Treg和MDSC(Schmidt et al.,2012和Gabrilovich et al.,2009)。这些多重抗肿瘤作用使得I型IFN在单一治疗中和与其他治疗组合二者中均成为吸引人的抗癌药物。

[0007] 然而,在临床中使用I型IFN的最大障碍之一是与这样的治疗相关的严重副作用。最频繁遇到的副作用是流感样症状、血液毒性、转氨酶升高、恶心、疲劳和精神后遗症。这些副作用妨碍达到并维持最大治疗作用所需的剂量,并且其发生可完全超过I型IFN治疗的临床益处(Kreutzer et al.,2004;Sleijfer et al.,2005和Lotrich,2009)。因此,将I型IFN特异性地递送至肿瘤微环境的能力对于继续临床使用I型IFN至关重要。需要修饰I型IFN以获得仅在肿瘤中和肿瘤处发挥其活性的新的药物形式并且还实现避免在肿瘤外的严重不

良作用的策略。

发明内容

[0008] 因此，根据本公开内容，提供了干扰素前药，其包含：(a)干扰素α和β受体(interferon alpha and beta receptor，IFNAR)结构域，其保留IFN结合活性；(b)1型干扰素(IFN)结构域，其在未被所述IFNAR结构域接合时保留1型干扰素活性；(c)免疫球蛋白(immunoglobulin，Ig)Fc结构域；(d)第一接头，其在一端与所述IFN的N端融合并且在另一端与所述IFNAR融合，其中所述第一接头可被蛋白酶切割；以及(e)第二接头，其在一端与所述IFN的C端融合并且在另一端与所述Ig Fc结构域的N端融合。Ig可以是IgG，例如IgG1或IgG2。干扰素前药可包含两个拷贝的所述1型IFN结构域。干扰素前药可包含多于两个拷贝的所述1型IFN结构域。第一接头可被一种或更多种基质金属蛋白酶例如MMP1、MMP3、MMP9、MMP10、MMP11、MMP12、MMP13或MMP14切割。第一接头可被UPA、FAPa和/或组织蛋白酶B切割。接头可以是G4S-SUB1-G4S-SUB2-G4S-SUB3-G4S，其中SUB1至3是不同的酶切割位点。IFNAR可以是IFNAR1或IFNAR2。IFN可以是IFN-α、IFN-β、IFN-κ、IFN-δ、IFN-ε、IFN-τ、IFN-ω或IFN-ζ。

[0009] 在另一个实施方案中，提供了编码干扰素前药的核酸构建体，其包含：(a)干扰素α和β受体(IFNAR)结构域，其保留IFN结合活性；(b)1型干扰素(IFN)结构域，其在未被所述IFNAR结构域接合时保留1型干扰素活性；(c)免疫球蛋白(Ig)Fc结构域；(d)第一接头，其在一端与所述IFN的N端融合并且在另一端与所述IFNAR融合，其中所述第一接头可被蛋白酶切割；(e)第二接头，其在一端与所述IFN的C端融合并且在另一端与所述Ig Fc结构域的N端融合；以及(f)启动子，其位于所述IFNα结构域5'端的5'方向。Ig可以是IgG，例如IgG1或IgG2。干扰素前药包含两个拷贝的所述1型IFN结构域。干扰素前药可包含多于两个拷贝的所述1型IFN结构域。第一接头可被基质金属蛋白酶例如MMP1、MMP3、MMP9、MMP10、MMP11、MMP12、MMP13和/或MMP14切割。第一接头可被UPA、FAPa和/或组织蛋白酶B切割。接头可以是G4S-SUB1-G4S-SUB2-G4S-SUB3-G4S，其中SUB1至3是不同的酶切割位点。IFNAR可以是IFNAR1或IFNAR2。IFN可以是IFN-α、IFN-β、IFN-κ、IFN-δ、IFN-ε、IFN-τ、IFN-ω或IFN-ζ。

[0010] 还提供了：重组细胞，其表达如以上限定的干扰素前药；重组细胞，其包含如以上限定的核酸构建体；表达干扰素前药的方法，其包括培养以上限定的细胞；表达干扰素前药的方法，其包括培养以上限定的细胞；以及如以上限定的干扰素前药的以下用途：(a)制备用于治疗癌症的药物，或者(b)用于治疗癌症。

[0011] 在另一个实施方案中，提供了治疗癌症的方法，其包括向有此需要的对象施用如以上限定的干扰素前药。所述方法还可包括评估在获自所述对象的癌细胞中的蛋白酶表达的步骤。癌细胞可从活检获得，或者可以是循环肿瘤细胞。癌症可以是肺癌、乳腺癌、脑癌、口腔癌、食管癌、头颈癌、皮肤癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、肾癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、结肠癌、睾丸癌、子宫癌、宫颈癌、淋巴瘤或白血病。癌症可以是原发性的、复发性的、转移性的或多重抗药性的。患者可先前已接受手术治疗、化学治疗、放射治疗、激素治疗或免疫治疗。

[0012] 所述方法还可包括用第二癌症治疗例如手术治疗、化学治疗、放射治疗、激素治疗或免疫治疗对所述对象进行治疗。对象可以是人或非人哺乳动物。所述方法还可包括将所述干扰素前药多于一次例如每天、每隔一天、每周、每隔一周或每月施用。前药可全身性地

施用、或瘤内施用、局部施用到肿瘤或区域性施用到肿瘤。治疗可包括以下中的一种或更多种：减慢肿瘤生长、使肿瘤生长停止、减小肿瘤尺寸或负荷、与未经治疗对象相比提高存活、诱导癌症缓解、诱导肿瘤细胞凋亡或诱导肿瘤坏死。

[0013] 考虑到本文中所述的任何方法或组合物可针对本文中所述的任何其他方法或组合物来实施。

[0014] 当在权利要求书和/或说明书中与术语“包含/包括”结合使用时，没有数量词修饰的名词可意指“一个/种”，但其也与“一个/种或更多个/种”、“至少一个/种”和“一个/种或多于一个/种”的含义一致。词语“约”意指加上或减去所述数字的5％。

[0015] 通过以下详细描述，本公开内容的其他目的、特征和优点将变得明显。然而，应当理解的是，详细描述和具体实施例尽管指出了本公开内容的一些具体实施方案，但是其仅以举例说明的方式给出，因为通过该详细描述，本公开内容的精神和范围内的多个变化和修改对于本领域技术人员将变得明显。

[0016] 附图简述

[0017] 以下附图构成本说明书的一部分，并且被包括在内以进一步说明本公开内容的某些方面。通过参照这些附图中的一个或更多个结合本文中给出的具体实施方案的详细描述组合，可以更好地理解本公开内容。

[0018] 图1：IFN-前药的示意性结构。IFNAR-ECD(蓝色)、底物接头(红色)、IFN(黄色)、肿瘤特异性酶(绿色)、IgG Fc(灰色)。左N端臂表示完整的IFN-前药形式，其中IFNAR-ECD与IFN融合并结合，然而右N端臂表示活化的IFN-前药，IFNAR-ECD已从其解离。

[0019] 图2A至2C：IFN-前药的活化形式显示出IFN活性提高而不是恢复。(图2A)将hIg、IFNa4-Fc、基于IFNAR1的IFN-前药和基于IFNAR2的IFN-前药从20nM以5倍进行连续稀释。(图2B至2C)将IFN-前药在测定缓冲液(50mM Tris、10mM CaCl2、150mM NaCl、0.05％Brij-35(w/v)，pH 7.5(TCNB))中稀释至1μM。添加rmMMP-9至终浓度为1ng/μL，并在37℃下孵育6小时。(图2B)将IFNa4-Fc、未经或经rmMMP-9处理的R1-NSUB以及未经或经rmMMP-9处理的R1-SUB(MMP-2/9底物)从20nM以5倍进行连续稀释。(图2C)将IFNa4-Fc、未经或经rmMMP-9处理的R2-NSUB(MMP-2/9底物)以及未经或经rmMMP-9处理的R2-SUB从20nM以5倍进行连续稀释。将稀释的融合蛋白溶液添加到RAW-Lucia-ISG报道细胞中以刺激萤光素酶分泌。在刺激之后24小时时收获条件上清液用于萤光素酶测定。误差棒表示一式三份的平均值±s.e.m.。

[0020] 图3：基于IFNAR2的IFN-前药显示出比基于IFNAR1的IFN-前药更好的抗肿瘤作用。将C57BL/6小鼠(每组n＝5)用5×10^5个B16细胞进行s.c.注射，并且在第11、第15和第21天时用1nmol的hIg、IFNa4-Fc、R1-SUB(MMP2/9底物)或R2-SUB(MMP2/9底物)进行腹膜内处理。一周两次监测肿瘤生长，并报道为随时间的平均肿瘤尺寸±s.e.m.。

[0021] 图4A至4D：小鼠正常和肿瘤组织中的酶表达。用1×10^6个MC38细胞或5×10^5个B16细胞对C57BL/6小鼠(n＝4)进行s.c.注射。在第11天时收获指定的正常组织和肿瘤。提取胞内RNA用于RT-qPCR测定以确定(图4A)uPA、(图4B)MMP-2、(图4C)MMP-9和(图4D)MMP-14的mRNA丰度。将结果表示为相对于18sr的百分比。误差棒表示一式三份的平均值±s.e.m.。

[0022] 图5A至5E：IFN-前药提高安全性而不损害效力。将C57BL/6小鼠(每组n＝3)用5×10^5个B16细胞进行s.c.注射，并且在第10、第13和第16天时用1mM的hIg、IFNa4-Fc或R2-SUB

(MMP-14底物)进行腹膜内处理。在第17天时给小鼠放血并收集血清。(图5A)通过小鼠炎症细胞计数珠阵列(cytometric bead array,CBA)测量血清中炎性细胞因子IL-6、TNF、MCP-1和IFN-g的浓度。(图5B)通过Reflotron Plus®系统测量血清中ALT的活性。一周两次监测(图5C)肿瘤生长和(图5D)体重。(图5E)由于毒性的存活曲线。体重减轻超过30％的小鼠被认为死亡。误差棒表示平均值±s.e.m.。

[0023] 图6A至6H:肿瘤与邻近正常组织之间的人蛋白酶表达水平。TIMER(肿瘤免疫评估资源(Tumor IMmune Estimation Resource))网站的DiffExp模块对来自TCGA(癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas))的所有样品的基因表达水平的比较的在线分析。(图6A)MMP-1、(图6B)MMP-3、(图6C)MMP-9、(图6D)MMP-10、(图6E)MMP-11、(图6F)MMP-12、(图6G)MMP-13和(图6H)MMP-14。

[0024] 图7A至7C:人ProIFN在体外的活化。(图7A)将hIFNa2-Fc、基于hIFNAR1的ProIFN和基于hIFNAR2的ProIFN从50μM以10倍进行连续稀释。通过293T-Dual™ hSTING-R232报道细胞测量IFN活性。(图7B)将具有底物的基于人hIFNAR2的ProIFN(hProIFN-Sub)或不具有底物的基于人hIFNAR2的ProIFN(hProIFN-Nsub)在测定缓冲液(50mM Tris、10mM $CaCl_2$、150mM NaCl、0.05％Brij-35(w/v)、pH7.5(TCNB))中稀释至1μM。添加rmMMP-9至终浓度为1ng/μL,并在37℃下孵育6小时。通过293T-Dual™ hSTING-R232报道细胞测量IFN活性。(图7C)将基于人hIFNAR2的hProIFN-Sub或hProIFN-Nsub在测定缓冲液(50mM Tris、10mM $CaCl_2$、150mM NaCl、0.05％Brij-35(w/v)、pH 7.5(TCNB))中稀释至1μM。添加rmMMP-9至终浓度为1ng/μL,并在37℃下孵育0、0.5、2或6小时。将经消化的样品在Stain Free™凝胶上进行分离。凝胶用实现免染的成像仪(stain-free enabled imager)进行成像。误差棒表示一式三份的平均值±s.e.m.。

具体实施方式

[0025] 前药是药物的药理无活性的化学衍生物,其需要在身体内进行转化以变得有活性。它们旨在克服与母体药物相关的基于药学和/或药代动力学的问题,否则这些问题会限制药物的临床有用性(Stella et al.,1985)。最近,通过基质金属蛋白酶(MMP)易感接头将结合位点掩蔽肽与抗体栓系(tether),构建靶向血管细胞黏附分子1(vascular cell adhesion molecule 1,VCAM-1)(动脉粥样硬化斑块的标志物)的蛋白酶活化抗体(原抗体(pro-antibody))。可利用这样的疾病相关蛋白酶的活性以在体内位点特异性地靶向抗体活性(Erster et al.,2012)。在一个癌症治疗实例中,将可阻断抗EGFR与EGFR靶标结合的经筛选鉴定的肽与抗EGFR抗体连接。所得表皮生长因子受体(EGFR)导向的原抗体显著提高安全性,同时提高在非人灵长类中的半衰期,使其能够以比西妥昔单抗高得多的水平安全地给药(Desnoyers et al.,2013)。然而,这样的肽通常具有导致药物蛋白质的不完全阻断的弱亲和力,以及防止较长时间治疗的强免疫原性。因此,本发明人基于具有适当亲和力且缺乏免疫原性宿主的天然受体设计了新策略,以阻断其受体在非肿瘤组织中的药物接合。特别地,他们专注于I型干扰素,因为其在对许多癌症的抗肿瘤免疫应答中发挥重要作用[8]。

[0026] 本发明人使用免疫球蛋白(IgG)恒定区和在IFN的N端处融合的作为IFN活性阻断剂的IFNAR(IFNAR1或IFNAR2)胞外结构域设计了IFN-前药。IFNAR与特异性接头连接,所述接头可被在肿瘤微环境中过表达的蛋白酶选择性地切割。这掩蔽了IFN结构域的毒性活性

直至其到达肿瘤处为止，但是在IFN的C端上融合的Fc片段提高了其在体内的半衰期。该IFN-前药在接头切割之前显示出显著降低的IFN活性，但是在酶切割之后恢复了其活性。本发明人还证明了在小鼠B16-OVA黑素瘤模型中IFN-前药在体内的效力和增强的安全性。

[0027] 因此，使用该IFN-前药作为癌症治疗剂的优点是：1)低毒性；2)与母体IFN-Fc相比，活化形式具有出人意料地更高IFN活性；3)易于以高产率产生和纯化；4)特异性靶向肿瘤组织；5)使用非免疫原性阻断试剂；6)以及根据不同的肿瘤酶表达个性化的IFN-前药设计。因此，这样的IFN-前药可提高干扰素的安全谱而不损害效力，并且因此可使得先进的干扰素治疗形式例如抗体-细胞因子双特异性融合蛋白能够得到广泛使用。以下更详细地描述本公开内容的这些和其他方面。

[0028] I.1型干扰素

[0029] A.干扰素类型

[0030] 人I型干扰素(IFN)是有助于调节免疫系统活性的干扰素蛋白的大亚组。干扰素与干扰素受体结合。所有I型IFN均与称为IFN-α受体(IFNAR)的特定细胞表面受体复合物结合，所述IFN-α受体(IFNAR)由IFNAR1和IFNAR2链组成。在所有哺乳动物中均发现了I型IFN，并且已在鸟类、爬行动物、两栖动物和鱼物种中发现了同源(相似)分子。哺乳动物类型命名为IFN-α(alpha)、IFN-β(beta)、IFN-κ(kappa)、IFN-δ(delta)、IFN-ε(epsilon)、IFN-τ(tau)、IFN-ω(omega)和IFN-ζ(zeta，也称为限制素(limitin))。

[0031] IFN-α蛋白由白细胞产生。它们主要参与针对病毒感染的固有免疫应答。负责其合成的基因以被称为以下的13种亚型出现：IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNA5、IFNA6、IFNA7、IFNA8、IFNA10、IFNA13、IFNA14、IFNA16、IFNA17、IFNA21。这些基因在9号染色体上的簇中一起被发现。

[0032] IFN-α也可合成地制备为毛细胞白血病中的药物。产物的国际非专有药名(INN)为干扰素α。重组体类型是干扰素α-1。聚乙二醇化类型是聚乙二醇化干扰素α-2a和聚乙二醇化干扰素α-2b。

[0033] IFN-β蛋白由成纤维细胞大量产生。它们具有抗病毒活性，主要参与固有免疫应答。已经描述了IFN-β的两种类型，IFN-β1(IFNB1)和IFN-β3(IFNB3)(命名为IFN-β2的基因实际上是IL-6)。IFN-β1用作用于多发性硬化的治疗，因为其降低复发率。对于患有进行性、非复发性形式的多发性硬化的患者，IFN-β1不是合适的治疗。

[0034] 此时，IFN-ε、-κ、-τ和-ζ在人中显示出以单一同工型出现(IFNK)。仅反刍动物编码IFN-ω的变体IFN-τ。迄今为止，IFN-ζ仅在小鼠中被发现，而结构同源物IFN-δ在多种非灵长类和非啮齿动物胎盘哺乳动物中被发现。大多数但不是所有的胎盘哺乳动物编码功能性IFN-ε和IFN-κ基因。

[0035] IFN-ω尽管仅具有迄今为止描述的一种功能形式(IFNW1)，但在人中具有数种假基因：IFNWP2、IFNWP4、IFNWP5、IFNWP9、IFNWP15、IFNWP18和IFNWP19。许多非灵长类胎盘哺乳动物表达多种IFN-ω亚型。

[0036] IFN-v最近被描述为在人中的假基因，但在家猫(domestic cat)基因组中可能具有功能。在非猫科胎盘哺乳动物的所有其他基因组中，IFN-v是假基因；在一些物种中，假基因保存良好，而在另一些物种中，假基因则被严重损坏或检测不到。此外，在猫基因组中，IFN-v启动子有害地突变。在哺乳动物多样化之前，IFN-v基因家族可能变得无用。在哺乳动

物中，其在I型IFN基因座边缘的存在可保护其免于消失，从而允许对其进行检测。

[0037] IFN-α和IFN-β由许多细胞类型分泌，包括淋巴细胞(NK细胞、B细胞和T细胞)、巨噬细胞、成纤维细胞、内皮细胞、成骨细胞等。它们刺激巨噬细胞和NK细胞二者以引起抗病毒应答，并且还针对肿瘤具有活性。浆细胞样树突细胞已被鉴定为响应于抗原的I型IFN的最有效产生者，并且因此被称为天然IFN产生细胞。当前的研究结果表明，通过迫使肿瘤浸润巨噬细胞中的IFN-α表达，可以引发更有效的树突细胞活化和免疫效应细胞细胞毒性。

[0038] IFN-m由白细胞在病毒感染或肿瘤的部位释放。IFN-α通过改变下丘脑中热敏神经元的活性从而引起发热而用作致热因子。它通过与阿片受体结合并引发前列腺素-E_2(prostaglandin-E_2,PGE_2)的释放来实现这一点。IFN-α使用类似的机制来减轻疼痛；IFN-α与u阿片受体相互作用以用作镇痛药。

[0039] 在小鼠中，IFN-β抑制免疫细胞产生生长因子，从而使肿瘤生长减缓，并抑制其他细胞产生血管产生生长因子，从而阻断肿瘤血管生成并阻碍肿瘤连接到血管系统中。

[0040] B.干扰素受体

[0041] 干扰素-α/β受体(IFNAR)是结合I型干扰素(包括干扰素-α和-β)的受体。它是由具有称为IFNAR1和IFNAR2的两个亚基的一条链构成的异聚细胞表面受体。在结合I型IFN之后，IFNAR激活JAK-STAT信号传导途径。干扰素刺激通常导致抗病毒免疫应答。

[0042] 使用NMR获得结构。最初计算了35个构象异构体。以低能量为标准将其缩小至22个。这是在溶液中确定的第一螺旋细胞因子受体的结构。该分子具有一种聚合物。结构揭示结合的性质。IFNAR2的模型揭示受体上的以疏水性为主的片，其与IFN-α上的匹配疏水性表面相互作用。然后，带电侧链的邻近基序将蛋白质引导成紧密的复合物。结合界面可解释受体的交叉反应性和配体特异性。实验的来源是人，但在大肠杆菌(Escherichia coli)中表达。

[0043] 基于IFNAR的二级结构含量将其聚类为β蛋白组。IFNAR的折叠显示出与免疫球蛋白β-夹层的明显进化关系。基于显示出可能的共同进化的结构和功能相似性将其分组为超家族和家族III型纤连蛋白。结构域或自然中观察到的进化单位是干扰素-α/β受体β链。物种是人。

[0044] II.干扰素前药

[0045] A.一般性描述

[0046] 前药通常定义为这样的分子，其包含作为治疗剂的能力但其形式需要进行一些修饰以真正成为治疗剂。当活性药物形式的递送具有一些固有的限制性，例如毒性或缺乏稳定性时，这样的试剂特别有用。通过产生前药形式，可既避免这些缺点，又同时允许在合适的时间和/或部位进行有效的体内活化。

[0047] 本公开内容的前药具有五种不同的组分。第一组分是干扰素。第二组分是掩蔽结构域，其在接合时阻断干扰素发挥其正常活性的能力。第三组分是稳定的特征，例如抗体上的恒定结构域。这三种组分通过接头连接，其中例如通过由癌细胞或在肿瘤环境中表达的蛋白酶对设置在干扰素与掩蔽结构域之间的接头进行选择性切割。

[0048] 如上所讨论的，1型干扰素是IFN-α(alpha)、IFN-β(beta)、IFN-κ(kappa)、IFN-δ(delta)、IFN-ε(epsilon)、IFN-τ(tau)、IFN-ω(omega)和IFN-ζ(zeta)。这些分子中的任何一种都可包含在本文中所述的构建体中。也可以用两个或甚至四个不同的1型干扰素来制

备异二聚体构建体。申请人用来产生此处公开的数据的干扰素是全长的但缺乏信号肽的蛋白质。

[0049] 构建体的一个重要部分当然是掩蔽结构域。为此目的，本发明人选择利用1型干扰素的天然受体而不是选择非天然序列。使用基于天然受体结构的掩蔽结构域的优点包括以下二者：(a)1型干扰素的高亲和力，以及(b)针对序列的免疫应答的可能性更低。所述序列为以下：

[0050] 小鼠IFNAR1-ECD：

[0051]
```
  1 mlavvgaaal vlvagapwvl psaaggenlk ppenidvyii ddnytlkwss hgesmgsvtf
 61 saeyrtkdea kwlkvpecqh ttttkcefsl ldtnvyiktq frvraeegns tsswnevdpf
121 ipfytahmsp pevrleaedk ailvhisppg qdgnmwalek psfsytiriw qksssdkkti
181 nstyyvekip ellpettycl evkaihpslk khsnystvqc isttvankmp vpgnlqvdaq
241 gksyvlkwdy iasadvlfra qwlpgyskss sgsrsdkwkp iptcanvqtt hcvfsqdtvy
301 tgtfflhvqa segnhtsfws eekfidsqkh ilppppvitv tamsdtllvy vncqdstcdg
361 lnyeiifwen tsntkismek dgpeftlknl qpltvycvqa rvlfrallnk tsnfseklce
421 ktrpgsfst
```

[0052] 小鼠IFNAR2-ECD：

[0053]
```
  1 mrsrctvsav gllslclvvs asletitpsa fdgypdepct initirnsrl ilswelenks
 61 gppanytlwy tvmskdenlt kvkncsdttk sscdvtdkwl egmesyvvai vivhrgdltv
121 crcsdyivpa napleppefe ivgftdhinv tmefppvtsk iiqekmkttp fvikeqigds
181 vrkkhepkvn nvtgnftfvl rdllpktnyc vslyfdddpa iksplkcivl qpgqesglse
241 sa
```

[0054] 人IFNAR1-ECD：

[0055]
```
  1 mmvvllgatt lvlvavapwv lsaaaggknl kspqkvevdi iddnfilrwn rsdesvgnvt
 61 fsfdyqktgm dnwiklsgcq nitstkcnfs slklnvyeei klriraeken tsswyevdsf
121 tpfrkaqigp pevhleaedk aivihispgt kdsvmwaldg lsftyslviw knssgveeri
181 eniysrhkiy klspettycl kvkaalltsw kigvyspvhc ikttvenelp ppenievsvq
241 nqnyvlkwdy tyanmtfqvq wlhaflkrnp gnhlykwkqi pdcenvkttq cvfpqnvfqk
301 giyllrvqas dgnntsfwse eikfdteiqa fllppvfnir slsdsfhiyi gapkqsgntp
361 viqdypliye iifwentsna erkiiekktd vtvpnlkplt vycvkaraht mdeklnkssv
421 fsdavcektk pgntsk
```

[0056] 人IFNAR2-ECD：

[0057]
```
  1 mllsqnafif rslnlvlmvy islvfgisyd spdytdesct fkislrnfrs ilswelknhs
 61 ivpthytlly timskpedlk vvkncanttr sfcdltdewr stheayvtvl egfsgnttlf
121 scshnfwlai dmsfeppefe ivgftnhinv mvkfpsivee elqfdlslvi eeqsegivkk
181 hkpeikgnms gnftyiidkl ipntnycvsv ylehsdeqav iksplkctll ppgqesesae
241 sak
```

[0058] 接下来，构建体包含例如将提高体内半衰期的稳定结构域。本发明人选择使用Ig恒定结构域。虽然使用IgG1 Fc结构域，但也可使用其他Fc结构域。使用IgA Fc结构域的一个特别优势是其二聚化能力，这意味着在这样的构建体中可包含多至四个不同的干扰素。为了产生多种干扰素构建体，一个实例是使用IgG1的FcA-FcB异二聚体，其中一个阻断受体和一个干扰素与FcA或FcB融合，同时使用分别对插入在FcA和FcB的接头中的不同酶具有特异性的不同切割底物。也可使用其他稳定蛋白质，包括人血清白蛋白和运铁蛋白。

[0059] 最后，以上结构域通过短肽段(peptide stretch)或“接头”连接在一起。当前药到达或接近其靶标-肿瘤或癌细胞时，这些接头中的一个(设置在干扰素分子与掩蔽结构域之间的一个接头)经受切割。在一个具体实施方案中，接头包含蛋白酶靶位点，以使得当前药暴露于包含蛋白酶的环境时，接头被切割并且掩蔽剂从前药释放，从而激活干扰素分子。理想地，接头可针对在癌细胞中或肿瘤部位处过表达的蛋白酶进行选择，并且甚至可通过事先测试针对特定个体的癌症/肿瘤蛋白酶谱进行定制。以下是在癌症或肿瘤环境中选择性表达或过表达的酶的一些实例。

[0060] 表2-蛋白酶底物

[0061]

酶	底物氨基酸序列
MMP2,MMP9	PVGLIG
MMP11	GGYAELRMGG
MMP13	GPRPFNYL
MMP13	GGALGLSL
MMP13	GPMSYNAL
MMP14	SGRSENIRTA
FAPa	TSGPNQEQK
组织蛋白酶B	GFLG

[0062] 接头的一个示例性形式是GGGGS-底物-GGGGS。另外的两个实例是$(GGGGS)_n$-底物-$(GGGGS)_n$和G_n-底物-G_n(n可以是任何数字)。

[0063] B.核酸构建体的改造和表达

[0064] 可获得包含上述干扰素前药组分的多种遗传构建体，并且可将这些引入到载体中用于表达。编码前药分子的根据本公开内容的核酸可任选地与其他蛋白质序列连接。在本申请通篇，术语“表达构建体”意在包括包含编码基因产物的核酸的任何类型的遗传构建体，其中部分或全部的核酸编码序列能够被转录。转录物可以翻译成蛋白质，但不是必须的。在某些实施方案中，表达包括基因转录和mRNA翻译成基因产物二者。在另一些实施方案中，表达仅包括编码目的基因的核酸的转录。

[0065] 术语“载体”用于指载体核酸分子，其中可插入核酸序列以引入到其可在那里进行复制的细胞中。核酸序列可以是“外源的”，这意味着其对引入载体的细胞是外来的，或者该序列与细胞中的序列同源但处于宿主细胞核酸内该序列通常不存在的位置中。载体包括质粒、黏粒、病毒(噬菌体、动物病毒和植物病毒)以及人工染色体(例如，YAC)。本领域技术人员通过标准重组技术将很熟练地构建载体，所述技术描述于Sambrook et al.(1989)和Ausubel et al.(1994)中，二者均通过引用并入本文。

[0066] 术语“表达载体”是指包含编码能够被转录的基因产物的至少一部分之核酸序列的载体。在一些情况下，随后将RNA分子翻译成蛋白质、多肽或肽。在另一些情况下，这些序列不翻译，例如在反义分子或核酶的产生中。表达载体可包含多种“控制序列”，其是指在特定宿主生物体中转录并可以翻译有效地连接的编码序列所需的核酸序列。除控制转录和翻译的控制序列之外，载体和表达载体还可包含用于其他功能的核酸序列，并且在下文中进行描述。

[0067] 1.调控元件

[0068] “启动子”是控制序列,其是控制转录的起始和速率的核酸序列的区域。启动子可包含可结合调节蛋白和分子(例如RNA聚合酶和其他转录因子)的基因元件。短语“有效地定位”、“有效地连接”、“在控制下”和“在转录控制下”意指启动子处于相对于核酸序列的正确的功能位置和/或取向以控制该序列的转录起始和/或表达。启动子可与或可不与“增强子”结合使用,“增强子”是指参与核酸序列的转录激活的顺式作用调控序列。

[0069] 启动子可以是与基因或序列自然缔合的启动子,因为其可通过分离位于编码区段和/或外显子上游的5’非编码序列获得。这样的启动子可被称为“内源性”的。类似地,增强子可以是与核酸序列自然缔合、位于该序列的上游或下游的增强子。或者,通过将编码核酸区段定位在重组或异源启动子的控制下将获得某些优势,所述启动子指在其自然环境中通常不与核酸序列缔合的启动子。

[0070] 重组或异源增强子也是指在其自然环境中通常不与核酸序列缔合的增强子。这样的启动子或增强子可包括其他基因的启动子或增强子,从任何其他原核、病毒或真核细胞中分离的启动子或增强子以及非“天然存在”的启动子或增强子(即包含不同转录调节区的不同元件和/或改变表达的突变)。除了合成地产生启动子和增强子的核酸序列之外,可结合本文中公开的组合物使用重组克隆和/或核酸扩增技术(包括PCR™)产生序列(参见美国专利4,683,202、美国专利5,928,906,各自通过引用并入本文)。此外,考虑到也可以使用指导在非核细胞器(例如线粒体、叶绿体等)内的序列转录和/或表达的控制序列。

[0071] 当然,利用有效指导DNA区段在选择用于表达的细胞类型、细胞器和生物体中进行表达的启动子和/或增强子将是非常重要的。分子生物学领域的技术人员通常知道使用启动子、增强子和细胞类型组合来进行蛋白质表达,例如参见Sambrook et al.(1989),通过引用并入本文。所使用的启动子可以是组成型、组织特异性、诱导型和/或在合适的条件下有用的以指导引入的DNA区段的高水平表达,例如有利于大规模生产重组蛋白和/或肽。启动子可以是异源的或内源的。

[0072] 组织特异性启动子或元件的特性以及表征其活性的测定是本领域技术人员公知的。这样的区域的一些实例包括:人LIMK2基因(Nomoto et al.1999)、生长抑素受体2基因(Kraus et al.,1998)、鼠附睾视黄酸结合基因(Lareyre et al.,1999)、人CD4(Zhao-Emonet et al.,1998)、小鼠α2(XI)胶原蛋白(Tsumaki,et al.,1998)、D1A多巴胺受体基因(Lee,et al.,1997)、胰岛素样生长因子II(Wu et al.,1997)、人血小板内皮细胞黏附分子-1(Almendro et al.,1996)。发现肿瘤特异性启动子也可用于本公开内容中。

[0073] 编码序列的有效翻译也可需要特定的起始信号。这些信号包括ATG起始密码子或邻近序列。可能需要提供包括ATG起始密码子的外源翻译控制信号。本领域普通技术人员将能够容易地对此进行确定并提供所需信号。众所周知,起始密码子必须与期望的编码序列的阅读框“同框”以确保整个插入物的翻译。外源翻译控制信号和起始密码子可以是天然的或合成的。通过包含合适的转录增强子元件可增强表达效率。

[0074] 2.IRES

[0075] 在本公开内容的某些实施方案中,使用内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site,IRES)元件用来产生多基因或多顺反子信息(message)。IRES元件能够绕过5’甲基化Cap依赖性翻译的核糖体扫描模型并在内部位点开始翻译(Pelletier和Sonenberg,1988)。已经描述了来自小核糖核酸病毒科的两个成员(脊髓灰质炎和脑心肌炎)的IRES元

件(Pelletier和Sonenberg,1988),以及来自哺乳动物信息的IRES(Macejak和Sarnow,1991)。IRES元件可与异源开放阅读框连接。多个开放阅读框架可以一起转录,每个由IRES分隔开,从而产生多顺反子信息。凭借IRES元件,每个开放阅读框是核糖体可及的以进行有效翻译。使用单个启动子/增强子转录单个信息,多基因可以有效表达(参见美国专利5,925,565和5,935,819,通过引用并入本文)。

[0076] 3.多用途克隆位点

[0077] 载体可包含多克隆位点(multiple cloning site,MCS),其是包含多个限制酶位点的核酸区域,其中任一个可与标准重组技术结合使用来消化载体。参见Carbonelli et al.,1999;Levenson et al.,1998;和Cocea,1997,通过引用并入本文。“限制酶消化”是指用仅在核酸分子中的特定位置发挥功能的酶对核酸分子进行催化切割。这些限制酶中的许多是可商购的。这样的酶的使用是本领域技术人员广泛理解的。通常,使用在MCS内切割的限制酶将载体线性化或片段化,以使外源序列能够连接至载体。“连接”是指在两个核酸片段之间形成磷酸二酯键的过程,所述两个核酸片段可彼此连续或可不连续。涉及限制酶和连接反应的技术是重组技术领域技术人员公知的。

[0078] 4.剪接位点

[0079] 大多数转录的真核生物RNA分子将经历RNA剪接以从初级转录物除去内含子。包含基因组真核序列的载体可需要供体和/或接受体剪接位点以确保转录物的正确加工用于蛋白质表达(参见Chandler et al.,1997,通过引用并入本文)。

[0080] 5.终止信号

[0081] 本公开内容的载体或构建体将通常包含至少一种终止信号。“终止信号”或“终止子”由通过RNA聚合酶参与RNA转录物的特异性终止的DNA序列构成。因此,在某些实施方案中,考虑了结束RNA转录物产生的终止信号。终止子可能是在体内达到期望信使水平所必需的。

[0082] 在真核生物系统中,终止子区域还可包含特异性DNA序列,该序列允许新转录物的位点特异性切割以暴露多腺苷酸化位点。其发出信号使特化的内源聚合酶将一段约200个A残基(polyA)添加至转录物的3’端。用这种polyA尾修饰的RNA分子显示出更稳定并且更有效地翻译。因此,在涉及真核生物的另一些实施方案中,优选地,终止子包含用于RNA切割的信号,并且更优选地,终止子信号促进信使的多腺苷酸化。终止子和/或多腺苷酸化位点元件可用来提高信使水平和/或使从该盒通读到其他序列中减至最小。

[0083] 考虑用于本公开内容的终止子包括本文中所述或本领域普通技术人员已知的任何已知的转录终止子,包括但不限于例如基因的终止序列,例如牛生长激素终止子或病毒终止序列,例如SV40终止子。在某些实施方案中,终止信号可缺少可转录或可翻译的序列,例如由于序列截短。

[0084] 6.多腺苷酸化信号

[0085] 在表达中,特别是在真核生物表达中,通常将包含多腺苷酸化信号以实现转录物合适的多腺苷酸化。不认为多腺苷酸化信号的性质是成功实践本公开内容的关键,和/或可采用任何这样的序列。一些优选实施方案包括SV40多腺苷酸化信号和/或牛生长激素多腺苷酸化信号,其在多种靶细胞中是方便的和/或已知能发挥良好的功能。多腺苷酸化可提高转录物的稳定性或可促进胞质运输。

[0086] 7.复制的起始

[0087] 为了在宿主细胞中增殖载体，其可包含一个或更多个复制起始位点(一般称为“ori”)，其是在此处起始复制的特异性核酸序列。或者，如果宿主细胞是酵母，则可以使用自主复制序列(autonomously replicating sequence，ARS)。

[0088] 8.选择标志物和筛选标志物

[0089] 在本公开内容的某些实施方案中，可通过在表达载体中包含标志物来体外或体内鉴定包含本公开内容的核酸构建体的细胞。这样的标志物将赋予细胞可鉴定的变化，从而允许容易地鉴定包含表达载体的细胞。一般来说，选择标志物是赋予允许选择的特性的标志物。阳性选择标志物是其中标志物的存在允许其选择的标志物，而阴性选择标志物是其中标志物的存在阻止其选择的标志物。阳性选择标志物的一个实例是抗药性标志物。

[0090] 通常包含药物选择标志物有助于转化体的克隆和鉴定，例如赋予针对新霉素、嘌呤霉素、潮霉素、DHFR、GPT、博来霉素(zeocin)和组氨醇之抗性的基因是有用的选择标志物。除赋予允许基于条件实施来区分转化体之表型的标志物之外，还考虑了其他类型的标志物，包括筛选标志物，例如GFP，其基础是比色分析。或者，可利用筛选酶，例如单纯疱疹病毒胸苷激酶(herpes simplex virus thymidine kinase，tk)或氯霉素乙酰转移酶(chloramphenicol acetyltransferase，CAT)。本领域技术人员还知晓如何使用免疫标志物，可能与FACS分析结合。认为所使用的标志物不重要，只要其能够与编码基因产物的核酸同时表达即可。选择标志物和筛选标志物的另外的实例是本领域技术人员公知的。

[0091] 9.病毒载体

[0092] 某些病毒载体有效感染或进入细胞、整合到宿主细胞基因组中并稳定表达病毒基因的能力已导致许多不同病毒载体系统的开发和应用(Robbins et al.，1998)。目前正在开发的病毒系统用作离体和体内基因转移的载体。例如，目前正在评价腺病毒、单纯疱疹病毒、逆转录病毒和腺相关病毒载体用于治疗疾病，例如癌症、囊性纤维化、戈谢病(Gaucher's disease)、肾病和关节炎(Robbins和Ghivizzani，1998；Imai et al.，1998；美国专利5,670,488)。根据具体的基因治疗应用，以下描述的多种病毒载体呈现特定的优点和缺点。

[0093] 10.非病毒转化

[0094] 认为用于转化用于本公开内容的细胞器、细胞、组织或生物体的核酸递送的合适方法实际上包括可将核酸(例如DNA)引入到细胞器、细胞、组织或生物体中的任何方法，如本文中所述或本领域普通技术人员已知的。这样的方法包括但不限于直接递送DNA，例如通过注射(美国专利5,994,624、5,981,274、5,945,100、5,780,448、5,736,524、5,702,932、5,656,610、5,589,466和5,580,859，各自通过引用并入本文)，包括显微注射(Harland和Weintraub，1985；美国专利5,789,215，通过引用并入本文)；通过电穿孔(美国专利5,384,253，通过引用并入本文)；通过磷酸钙沉淀(Graham和Van Der Eb，1973；Chen和Okayama，1987；Rippe et al.，1990)；通过使用DEAE-葡聚糖，随后使用聚乙二醇(Gopal，1985)；通过直接声波加载(Fechheimer et al.，1987)；通过脂质体介导的转染(Nicolau和Sene，1982；Fraley et al.，1979；Nicolau et al.，1987；Wong et al.，1980；Kaneda et al.，1989；Kato et al.，1991)；通过微粒轰击(PCT申请号WO 94/09699和95/06128；美国专利5,610,042；5,322,783、5,563,055、5,550,318、5,538,877和5,538,880，并且各自通过引用并入本文)；通过与碳化硅纤维一起搅拌(Kaeppler et al.，1990；美国专利5,302,523和5,464,

765,各自通过引用并入本文);或者通过PEG介导的原生质体的转化(Omirulleh et al.,1993;美国专利4,684,611和4,952,500,各自通过引用并入本文);通过干燥/抑制介导的DNA摄取(Potrykus et al.,1985)。通过应用诸如这些的技术,细胞器、细胞、组织或生物体可被稳定或瞬时转化。

[0095] 注射。在某些实施方案中,可通过一次或更多次例如皮下、皮内、肌内、静脉内或腹膜内注射(即针注射)将核酸递送至细胞器、细胞、组织或生物体。注射疫苗的方法是本领域普通技术人员公知的(例如,注射包含盐水溶液的组合物)。本公开内容的另一些实施方案包括通过直接显微注射引入核酸。已经使用直接显微注射将核酸构建体引入到非洲爪蟾卵母细胞中(Harland和Weintraub,1985)。

[0096] 电穿孔。在本公开内容的某些实施方案中,通过电穿孔将核酸引入到细胞器、细胞、组织或生物体中。电穿孔涉及将细胞和DNA的混悬液暴露于高压放电。在该方法的一些变化中,使用某些细胞壁降解酶(例如果胶降解酶)使靶接受者细胞比未经处理的细胞更易于通过电穿孔转化(美国专利5,384,253,通过引用并入本文)。或者,可以使接受者细胞更易受通过机械伤害的转化的影响。

[0097] 使用电穿孔转染真核细胞已经相当成功。已经以这种方式用人κ免疫球蛋白基因转染了小鼠前B淋巴细胞(Potter et al.,1984),并且用氯霉素乙酰转移酶基因转染了大鼠肝细胞(Tur-Kaspa et al.,1986)。

[0098] 为了通过电穿孔在细胞(例如植物细胞)中进行转化,可以使用易碎组织,例如细胞混悬培养物或胚性愈伤组织,或者可以直接转化未成熟胚胎或其他有机组织。在该技术中,通过将所选细胞暴露于果胶降解酶(果胶酶)或以受控的方式进行机械伤害,可部分降解所选细胞的细胞壁。已通过对完整细胞的电穿孔进行转化的一些物种的实例包括玉米(美国专利5,384,253;Rhodes et al.,1995;D'Halluin et al.,1992)、小麦(Zhou et al.,1993)、番茄(Hou和Lin,1996)、大豆(Christou et al.,1987)和烟草(Lee et al.,1989)。

[0099] 还可使用原生质体进行植物细胞的电穿孔转化(Bates,1994;Lazzeri,1995)。例如,Dhir和Widholm在国际专利申请号WO 92/17598(通过引用并入本文)中描述了通过对子叶来源的原生质体进行电穿孔来产生转基因大豆植物。已经描述了原生质体转化的物种的另一些实例,包括大麦(Lazerri,1995)、高粱(Battraw et al.,1991)、玉米(Bhattacharjee et al.,1997)、小麦(He et al.,1994)和番茄(Tsukada,1989)。

[0100] 磷酸钙。在本公开内容的另一些实施方案中,使用磷酸钙沉淀将核酸引入细胞。已经使用该技术用腺病毒5DNA转染了人KB细胞(Graham和Van Der Eb,1973)。同样以这种方式,用新霉素标志物基因转染了小鼠L(A9)、小鼠C127、CHO、CV-1、BHK、NIH3T3和HeLa细胞(Chen和Okayama,1987),并用多种标志物基因转染了大鼠肝细胞(Rippe et al.,1990)。

[0101] DEAE-葡聚糖。在另一个实施方案中,使用DEAE-葡聚糖随后使用聚乙二醇将核酸递送至细胞中。以这种方式,将报道质粒引入到小鼠骨髓瘤和红白血病细胞中(Gopal,1985)。

[0102] 超声加载。本公开内容的另外一些实施方案包括通过直接声波加载引入核酸。已经通过超声加载用胸苷激酶基因转染LTK-成纤维细胞(Fechheimer et al.,1987)。

[0103] 脂质体介导的转染。在本公开内容的另一个实施方案中,核酸可包载在脂质复合

物(例如脂质体)中。脂质体是以磷脂双层膜和内部水性介质为特征的囊泡结构。多层脂质体具有由水性介质分离的多个脂质层。当磷脂悬浮在过量的水溶液中时,它们自发形成。脂质组分在形成封闭结构之前经历自身重排并包载脂双层之间的水和溶解的溶质(Ghosh和Bachhawat,1991)。还考虑了与Lipofectamine(Gibco BRL)或Superfect(Qiagen)复合的核酸。

[0104] 脂质体介导的核酸递送和外来DNA的体外表达是非常成功的(Nicolau和Sene,1982;Fraley et al.,1979;Nicolau et al.,1987)。还已经证明了培养的鸡胚胎、HeLa和肝癌细胞中外来DNA之脂质体介导的递送和表达的可行性(Wong et al.,1980)。

[0105] 在本公开内容的某些实施方案中,脂质体可与血凝病毒(hemagglutinating virus,HVJ)复合。已显示这有助于与细胞膜融合并促进脂质体包封的DNA进入细胞(Kaneda et al.,1989)。在另一些实施方案中,脂质体可与核非组蛋白染色体蛋白(HMG-1)复合或结合使用(Kato et al.,1991)。在另一些实施方案中,脂质体可与HVJ和HMG 1二者复合或结合使用。在另一些实施方案中,递送载剂可包含配体和脂质体。

[0106] 受体介导的转染。更进一步地,核酸可通过受体介导的递送载剂递送至靶细胞。这些利用大分子的选择摄取,其通过将在靶细胞中发生的受体介导的内吞作用进行。鉴于不同受体的细胞类型特异性分布,该递送方法为本公开内容补充了另一程度的特异性。

[0107] 某些受体介导的基因靶向的载剂包含细胞受体特异性配体和核酸结合剂。另一些包含已与待递送的核酸有效地连接的细胞受体特异性配体。已经将数种配体用于受体介导的基因转移(Wu和Wu,1987;Wagner et al.,1990;Perales et al.,1994;Myers,EPO 0273085),其确立了该技术的可操作性。已经描述了在另一哺乳动物细胞类型的背景下的特异性递送(Wu和Wu,1993;通过引用并入本文)。在本公开内容的某些方面中,将选择配体以对应于在靶细胞群上特异性表达的受体。

[0108] 在另一些实施方案中,细胞特异性核酸靶向的载剂的核酸递送载剂组分可包含与脂质体组合的特异性结合配体。待递送的核酸容纳在脂质体内,并且特异性结合配体功能性地并入脂质体膜中。因此,脂质体将与靶细胞的受体特异性结合并将内容物递送至细胞。已经显示这样的系统是功能性使用的系统,其中例如表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)用于受体介导地将核酸递送至表现出EGF受体上调的细胞。

[0109] 在另一些实施方案中,靶向递送载剂的核酸递送载剂组分可以是脂质体本身,其将优选地包含指导细胞特异性结合的一种或更多种脂质或糖蛋白。例如,乳糖基神经酰胺(一种半乳糖末端脱唾液酸神经节苷脂),已并入到脂质体中,并观察到肝细胞对胰岛素基因的摄取提高(Nicolau et al.,1987)。考虑到本公开内容的组织特异性转化构建体可以以相似的方式特异性地递送到靶细胞中。

[0110] 11.表达系统

[0111] 存在许多表达系统,其包含以上所讨论组合物的至少部分或全部。基于原核生物和/或真核生物的系统可用于与本公开内容一起使用以产生核酸序列或其同源多肽、蛋白质和肽。许多这样的系统是可商购的并且可广泛获得的。

[0112] 昆虫细胞/杆状病毒系统可产生高水平的异源核酸区段的蛋白表达,例如在美国专利5,871,986和4,879,236中所述,二者均通过引用并入本文,并且其可例如从Invitrogen® 以名称MaxBac® 2.0和从Clontech® 以BacPack™ Baculovirus

Expression System购买。

[0113] 表达系统的另一些实例包括Stratagene®的Complete Control™诱导型哺乳动物表达系统，其涉及合成的蜕皮激素诱导型受体，或其pET表达系统，该系统是大肠杆菌(E.coli)表达系统。诱导型表达系统的另一个实例可从Invitrogen®获得，其携带T-Rex™(四环素调节的表达)系统，该系统是使用全长CMV启动子的诱导型哺乳动物表达系统。Invitrogen®还提供了称为甲醇毕赤酵母(Pichia methanolica)表达系统的酵母表达系统，其设计用于在甲基营养型酵母甲醇毕赤酵母中高水平产生重组蛋白。pGEM-T Easy载体、pCon Vectors™、Lonza pConIgG1或pConK2质粒载体以及293Freestyle细胞或Lonza CHO细胞也可用于表达所公开的前药构建体。

[0114] 原代哺乳动物细胞培养物可以以多种方式制备。为了使细胞在体外并与表达构建体接触时保持活力，必需确保细胞维持与正确比例的氧气和二氧化碳和营养物接触，但要保护其免受微生物污染。细胞培养技术已有充分地文献记载。

[0115] 前述的一个实施方案涉及使用基因转移使细胞永生化以用于产生蛋白质。可如上所述将目的蛋白质的基因转移到合适的宿主细胞中，随后在合适的条件下培养细胞。实际上，任何多肽的基因都可以以该方式使用。以上讨论了重组表达载体的产生以及其中包含的元件。或者，待产生的蛋白质可以是通常由所讨论细胞合成的内源性蛋白质。

[0116] 可用哺乳动物宿主细胞系的一些实例是Vero和HeLa细胞以及中国仓鼠卵巢细胞系、W138、BHK、COS-7、293、HepG2、NIH3T3、RIN和MDCK细胞。另外，可选择调节插入序列的表达或以所期望方式修饰和加工基因产物的宿主细胞株。蛋白质产物的这样的修饰(例如，糖基化)和加工(例如，切割)对于蛋白质的功能可以是重要的。不同的宿主细胞具有用于蛋白质的翻译后加工和修饰的特征性和特定机制。可选择合适的细胞系或宿主系统以确保表达的外来蛋白质的正确修饰和加工。

[0117] 可使用许多选择系统，包括但不限于分别在th-、hgprt-或aprt-细胞中的HSV胸苷激酶、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶基因。同样，抗代谢物抗性可用作选择以下的基础：dhfr，其赋予抗性；gpt，其赋予对霉酚酸的抗性；neo，其赋予对氨基糖苷G418的抗性；和hygro，其赋予对潮霉素的抗性。

[0118] E.纯化

[0119] 在某些实施方案中，本公开内容的干扰素前药可以是纯化的。本文中使用的术语“纯化的”旨在是指可与其他组分分离的组合物，其中蛋白质被纯化至相对于其可天然获得状态的任何程度。因此，纯化的蛋白质还指从其可天然存在的环境中脱离的蛋白质。当使用术语“基本上纯化的”时，该指定将指这样的组合物，其中蛋白质或肽形成组合物的主要组分，例如构成组合物中所述蛋白质的约50％、约60％、约70％、约80％、约90％、约95％或更多。

[0120] 蛋白质纯化技术是本领域技术人员公知的。这些技术在一个水平上包括细胞环境粗分级至多肽和非多肽级分。将多肽与其他蛋白质分离后，可使用色谱和电泳技术进一步纯化目的多肽以实现部分或完全纯化(或纯化至均质)。特别适合于制备纯肽的分析方法是离子交换色谱法、排阻色谱法；聚丙烯酰胺凝胶电泳；等电聚焦。用于蛋白质纯化的另一些方法包括：用硫酸铵、PEG、抗体等或通过热变性沉淀，随后离心；凝胶过滤、反相、羟基磷灰

石和亲和色谱法;以及这样的技术和其他技术的组合。

[0121] 在本公开内容的干扰素前药的纯化中,可能期望在原核或真核表达系统中表达多肽并且使用变性条件提取蛋白质。可使用与多肽的标记部分结合的亲和柱从其他细胞组分对多肽进行纯化。如本领域中通常已知的,认为可改变进行多个纯化步骤的顺序,或者可省略某些步骤,并且仍然得到用于制备基本上纯化的蛋白质或肽的合适方法。通常,利用与抗体的Fc部分结合的试剂(即蛋白A)来对抗体进行分级。在干扰素前药包含这样的结构域的情况下,可使用该方法。

[0122] 根据本公开内容,本领域技术人员将知晓用于量化蛋白质或肽的纯化程度的多种方法。这些包括例如确定活性级分的比活性,或通过SDS/PAGE分析评估级分内的多肽量。用于评估级分纯度的另一种方法是计算级分的比活性,将其与初始提取物的比活性进行比较,并且因此计算纯度。当然,用于表示活性量的实际单位取决于根据纯化而选择的特定测定技术以及所表达蛋白质或肽是否表现出可检出的活性。

[0123] 已知多肽的迁移可随着不同的SDS/PAGE条件而改变,有时显著地改变(Capaldi et al.,1977)。因此,应当理解,在不同的电泳条件下,纯化的或部分纯化的表达产物的表观分子量可改变。

[0124] III.药物制剂和癌症治疗

[0125] A.癌症

[0126] 癌症由来自组织的细胞的克隆群的外生长所致。癌症的发生(称为致癌作用)可以以多种方式进行建模和表征。早已认识到癌症的发生与炎症之间的关联。炎性应答涉及宿主针对微生物感染的防御,并且还驱动组织修复和再生。相当多的证据表明炎症与癌症发生风险之间存在联系,即,慢性炎症可导致发育异常。

[0127] 可应用本公开内容的方法的癌细胞通常包括选择性地表达蛋白酶的任何细胞,并且更特别地,与正常细胞相比,过表达这样的蛋白酶的任何细胞。合适的癌细胞可以是乳腺癌细胞、肺癌细胞、结肠癌细胞、胰腺癌细胞、肾癌细胞、胃癌细胞、肝癌细胞、骨癌细胞、血液癌细胞(例如白血病细胞或淋巴瘤细胞)、神经组织癌细胞、黑素瘤细胞、卵巢癌细胞、睾丸癌细胞、前列腺癌细胞、宫颈癌细胞、阴道癌细胞或膀胱癌细胞。另外,本公开内容的方法可应用于多种物种,例如人、非人灵长类(例如猴、狒狒或黑猩猩)、马、牛、猪、绵羊、山羊、狗、猫、兔、豚鼠、沙鼠、仓鼠、大鼠和小鼠。癌症还可以是复发性的、转移性的和/或多重抗药性的,并且本公开内容的方法可特别地应用于这样的癌症以使其可切除、延长或重新诱导缓解、抑制血管生成、预防或限制转移,和/或治疗多重抗药性癌症。在细胞水平上,这可转化为杀伤癌细胞、抑制癌细胞生长或以其他方式逆转或减少肿瘤细胞的恶性表型。

[0128] B.制剂和施用

[0129] 本公开内容提供了药物组合物,其包含干扰素前药。在一个具体实施方案中,术语“可药用”意指由联邦或州政府的监管机构批准或者在美国药典或其他公认的药典中列出用于动物并且更特别是用于人。术语“载体”是指借助其施用治疗剂的稀释剂、赋形剂或载剂。这样的药用载体可以是无菌液体,例如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,例如花生油、豆油、矿物油、芝麻油等。另一些合适的药用赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、盐水、右旋糖、明胶、麦芽、稻、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂乳粉、甘油、丙二醇、水、乙醇等。

[0130] 所述组合物可以配制为中性或盐形式。可药用盐包括与阴离子形成的那些，所述阴离子例如来源于盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的那些；以及与阳离子形成的那些，所述阳离子例如来源于钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙基氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的那些。

[0131] 本公开内容的抗体可包括经典药物制剂。根据本公开内容的这些组合物的施用将通过任何常见途径进行，只要靶组织通过该途径可及即可。这包括经口、经鼻、含服、经直肠、经阴道或表面。或者，施用可通过皮内、皮下、肌内、腹膜内或静脉内注射来进行。这样的组合物通常作为上述的可药用组合物施用。特别感兴趣的是直接瘤内施用、肿瘤输注或者局部或区域性施用到肿瘤，例如在局部或区域性脉管系统或淋巴系统中，或者在切除的肿瘤床中。

[0132] 活性化合物还可肠胃外或腹膜内施用。作为游离碱或者药理学上可接受的盐的活性化合物的溶液可在与表面活性剂(例如羟丙基纤维素)适当混合的水中制备。也可在甘油、液体聚乙二醇、及其混合物中和在油中制备分散体。在普通储存和使用条件下，这些制剂包含防腐剂以防止微生物的生长。

[0133] C.组合治疗

[0134] 在本公开内容的上下文中，还考虑了本文中所述的干扰素前药可类似地与免疫、化学或放射治疗干预或其他治疗结合使用。特别是将干扰素前药与靶向癌细胞功能不同方面的其他治疗组合也可被证明是有效的。

[0135] 为了使用本公开内容的方法和组合物杀伤细胞、抑制细胞生长、抑制转移、抑制血管生成或以其他方式逆转或减少肿瘤细胞的恶性表型，通常使“靶”细胞与根据本公开内容的干扰素前药和至少一种其他药剂接触。这些组合物将以有效杀伤或抑制细胞增殖的组合量提供。该过程可包括使细胞与根据本公开内容的干扰素前药和其他药剂或因素同时接触。这可通过使细胞与包含这两种药剂的单一组合物或药理制剂接触，或者通过使细胞与两种不同的组合物或制剂同时接触来实现，其中一种组合物包含根据本公开内容的干扰素前药并且另一种包含其他药剂。

[0136] 或者，干扰素前药治疗可以在其他药剂治疗之前或之后间隔数分钟至数周进行。在其中向细胞单独施加其他药剂和干扰素前药的一些实施方案中，通常应确保每次递送之间的重要时间段没有期满，以使得两种药剂仍将能够对细胞发挥有利的组合作用。在这样的情况下，考虑在彼此约12至24小时内使细胞与这两种形式接触，并且该时间更优选地在彼此约6至12小时内，并且最优选的是延迟时间为仅约12小时。然而，在一些情况下，可期望显著延长治疗期，其中各施用之间的时间相隔数天(2、3、4、5、6或7天)至数周(1、2、3、4、5、6、7或8周)。

[0137] 还可以想到，干扰素前药或另一种药剂的多于一次施用是期望的。可采用多种组合，其中根据本公开内容的干扰素前药为“A”，并且另一种治疗为“B”，如下所示：

[0138] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B

[0139] A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A

[0140] A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B。

[0141] 考虑其他组合。再次，为了实现细胞杀伤，将这两种药剂以有效杀伤细胞的组合量递送至细胞。

[0142] 适合于癌症治疗的药剂或因素包括在向细胞施加时诱导DNA损伤的任何化学化合物或治疗方法。这样的药剂和因素包括诱导DNA损伤的辐射和波，例如辐照、微波、电子发射等。可使用多种化学化合物，其也描述为“化学治疗剂”或“遗传毒性剂”。这可通过照射局部肿瘤部位来实现；或者，可通过向对象施用治疗有效量的药物组合物来使肿瘤细胞与药剂接触。

[0143] 考虑将多个种类的化学治疗剂与本公开内容一起使用。例如，选择性雌激素受体拮抗剂(selective estrogen receptor antagonist，“SERM”)，例如他莫昔芬、4-羟基他莫昔芬(Afimoxfene)、Falsodex、雷洛昔芬、巴多昔芬(Bazedoxifene)、氯米芬、Femarelle、拉索昔芬(Lasofoxifene)、奥美昔芬和托瑞米芬。

[0144] 考虑使用的化学治疗剂包括，例如喜树碱、放线菌素D、丝裂霉素C。本公开内容还涵盖使用一种或更多种DNA损伤剂(无论是基于辐射还是真实的化合物)的组合，例如使用X射线与顺铂或使用顺铂与依托泊苷。所述药剂可被制备并用作组合的治疗组合物。

[0145] 热休克蛋白90是在许多真核细胞中发现的调节蛋白。已经显示出HSP90抑制剂可用于癌症的治疗。这样的抑制剂包括格尔德霉素、17-(烯丙基氨基)-17-去甲氧基格尔德霉素、PU-H71和利福布汀。

[0146] 还设想了直接交联DNA或形成加合物的药剂。可使用诸如顺铂的药剂和其他DNA烷化剂。顺铂已广泛用于治疗癌症，其中临床应用中使用的有效剂量为每三周20mg/m^2，持续5天，总共三个疗程。顺铂经口不吸收，并且因此必须通过静脉内、皮下、瘤内或腹膜内注射来递送。

[0147] 损伤DNA的药剂还包括干扰DNA复制、有丝分裂和染色体分离的化合物。这样的化学治疗化合物包括阿霉素(也称为多柔比星)、依托泊苷、维拉帕米、鬼臼毒素(podophyllotoxin)等。在治疗赘生物的临床环境中广泛使用时，这些化合物通过以下施用：对于多柔比星，以21天为间隔，以25至75mg/m^2的剂量静脉内快速推注(bolus injection)施用；对于依托泊苷，以35至50mg/m^2静脉内或以双倍静脉内剂量经口施用。还考虑了微管抑制剂，例如紫杉烷。这些分子是由红豆杉(Taxus)属植物产生的二萜，并且包括紫杉醇和多西他赛。

[0148] 表皮生长因子受体抑制剂，例如易瑞沙、mTOR，其是哺乳动物雷帕霉素靶标，也称为FK506结合蛋白12-雷帕霉素相关蛋白1(FK506-binding protein 12-rapamycin associated protein 1，FRAP1)，是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，其调节细胞生长、细胞增殖、细胞运动性、细胞存活、蛋白质合成和转录。因此，根据本公开内容，考虑将雷帕霉素及其类似物(“rapalogs”)用于癌症治疗。

[0149] 另一种可能的治疗是TNF-α(肿瘤坏死因子-α)，其是参与全身炎症的细胞因子并且是刺激急性期反应的一组细胞因子的成员。TNF的主要作用是调节免疫细胞。TNF还能够诱导凋亡细胞死亡、诱导炎症以及抑制肿瘤发生和病毒复制。

[0150] 破坏核酸前体和亚单位的合成和保真度的药剂也导致DNA损伤。因此，已经开发了许多核酸前体。特别有用的是经历过广泛测试并且容易获得的药剂。因此，一些药剂，例如5-氟尿嘧啶(5-FU)优先被赘生性组织使用，使得该药剂特别可用于靶向赘生性细胞。尽管5-FU具有相当大的毒性，但仍可适用于多种载体，包括表面，然而通常使用的是以3至15mg/kg/天的剂量静脉内施用。

[0151] 引起DNA损伤并已被广泛使用的其他因素包括通常已知的γ射线、x射线和/或向肿瘤细胞直接递送的放射性同位素。还考虑了其他形式的DNA损伤因素，例如微波和UV辐照。最可能的是所有这些因素对DNA、DNA的前体、DNA的复制和修复以及染色体的组装和维持造成广泛的损伤。X射线的剂量范围为从50至200伦琴的日剂量持续延长的一段时间(3至4周)到2000至6000伦琴的单剂量。放射性同位素的剂量范围变化很大，并且取决于同位素的半衰期、所发射的放射的强度和类型以及赘生性细胞的摄取。

[0152] 另外，还考虑可使用免疫治疗、激素治疗、毒素治疗和手术。特别地，可使用靶向治疗，例如阿瓦斯汀(Avastin)、爱必妥(Erbitux)、格列卫(Gleevec)、赫赛汀(Herceptin)和利妥昔单抗(Rituxan)。

[0153] 技术人员受“Remington's Pharmaceutical Sciences”第15版，第33章，特别是第624-652页的指导。根据所治疗对象的病症，有必要对剂量进行一些改变。在任何情况下，负责施用的人将决定用于个体对象的合适剂量。此外，对于人施用，制剂应满足FDA生物学标准办公室(FDA Office of Biologics standards)所要求的无菌性、热原性、一般安全性和纯度标准。

[0154] IV.蛋白酶检测方法

[0155] 在另一些实施方案中，将期望鉴定在靶癌细胞或肿瘤中蛋白酶表达的性质和量，从而允许定制特定的干扰素前药，所述干扰素前药将具有高的可能性被患者的肿瘤活化。一般来说，存在三种针对这样的检测的方法-免疫检测(例如用蛋白酶特异性抗体)、mRNA检测和蛋白酶活性测定。

[0156] A.免疫检测

[0157] 用于鉴定和量化蛋白酶的免疫检测方法可包括酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay，ELISA)、放射免疫测定(radioimmunoassay，RIA)、免疫放射测定、荧光免疫测定、化学发光测定、生物发光测定和Western印迹，且举数个实例。多种可用的免疫检测方法的步骤已描述于以下科学文献中：例如如Doolittle和Ben-Zeev(1999)、Gulbis和Galand(1993)、De Jager et al.(1993)和Nakamura et al.(1987)。一般来说，免疫结合方法包括获得样品并根据本文中所讨论的一些实施方案使样品与第一抗体接触，视情况而定，在有效允许免疫复合物形成的条件下。

[0158] 在有效条件下使所选生物样品与抗体接触并持续足以允许形成免疫复合物(初级免疫复合物)的一段时间通常是简单地将抗体组合物添加至样品并将混合物孵育足够长的时间用于使抗体与存在的蛋白酶形成免疫复合物(即结合)的问题。在该时间之后，通常将洗涤样品-抗体组合物(例如组织切片、ELISA板、斑点印迹或Western印迹)以去除任何非特异性结合的抗体种类，仅允许那些特异性结合在初级免疫复合物内的抗体被检测出来。

[0159] 一般来说，免疫复合物形成的检测是本领域中公知的，并且可通过应用多种方法来实现。这些方法通常基于标记或标志物(例如那些放射性标签、荧光标签、生物标签和酶标签中的任一种)的检测。有关使用这样的标记的专利包括美国专利3,817,837、3,850,752、3,939,350、3,996,345、4,277,437、4,275,149和4,366,241。当然，如本领域中已知的，通过使用第二结合配体例如第二抗体和/或生物素/抗生物素蛋白配体结合排列，可以发现另外的优点。

[0160] 用于检测的抗体可以本身与可检测标记连接，其中随后可简单地检测该标记，从

而允许确定组合物中初级免疫复合物的量。或者，可通过对抗体具有结合亲和力的第二结合配体来检测在初级免疫复合物内结合的第一抗体。在这些情况下，第二结合配体可与可检测标记连接。第二结合配体本身通常是抗体，其因此可称为“第二”抗体。在有效条件下使初级免疫复合物与经标记的第二结合配体或抗体接触并持续足以允许形成次级免疫复合物的一段时间。然后通常洗涤次级免疫复合物以去除任何经非特异性结合的经标记的第二抗体或配体，并且然后检测次级免疫复合物中的剩余标记。

[0161] 另一些方法包括通过两步法检测初级免疫复合物。如上所述，将对抗体具有结合亲和力的第二结合配体(例如抗体)用于形成次级免疫复合物。在洗涤之后，再次在有效条件下使次级免疫复合物与对第二抗体具有结合亲和力的第三结合配体或抗体接触并持续足以允许形成免疫复合物(三级免疫复合物)的一段时间。第三配体或抗体与可检测标记连接，允许检测由此形成的三级免疫复合物。如果期望的话，该系统可提供信号放大。

[0162] 一种免疫检测方法使用两种不同的抗体。将第一生物素化抗体用于检测靶抗原，并且然后将第二抗体用于检测与复合生物素连接的生物素。在该方法中，首先将待测试样品在包含第一步抗体的溶液中孵育。如果存在靶抗原，则一些抗体与抗原结合形成生物素化的抗体/抗原复合物。然后通过在链霉抗生物素蛋白(或抗生物素蛋白)、生物素化的DNA和/或互补的生物素化DNA的连续溶液中孵育来扩增抗体/抗原复合物，其中每个步骤向抗体/抗原复合物添加另外的生物素位点。重复扩增步骤直至达到合适的扩增水平，此时将样品在包含针对生物素的第二步抗体的溶液中孵育。对该第二步抗体进行标记，如例如用酶一样，所述酶可用于通过使用色原底物的组织酶学来检测抗体/抗原复合物的存在。通过合适的扩增，可产生宏观可见的缀合物。

[0163] 另一种已知的免疫检测方法利用免疫PCR(聚合酶链式反应)方法。PCR方法类似于Cantor方法直至与生物素化DNA一起孵育，然而，DNA/生物素/链霉抗生物素蛋白/抗体复合物用释放抗体的低pH或高盐缓冲液洗掉，而不是不使用多轮的链霉抗生物素蛋白和生物素化DNA孵育。然后，将所得洗涤溶液用合适的对照与合适的引物进行PCR反应。至少在理论上，PCR的巨大扩增能力和特异性可用于检测单个抗原分子。

[0164] 在一个示例性ELISA中，将本公开内容的抗体固定在表现出蛋白质亲和性的所选表面上，例如在聚苯乙烯微量滴定板中的孔。然后，向孔添加怀疑包含蛋白酶的测试组合物。在结合并洗涤以去除非特异性结合的免疫复合物之后，可检测结合的抗原。检测可通过添加与可检测标记连接的另一种抗蛋白酶抗体来实现。这种类型的ELISA是简单的“夹心ELISA”。检测也可通过添加第二抗蛋白酶抗体，随后添加对第二抗体具有结合亲和力的第三抗体来实现，其中第三抗体与可检测标记连接。

[0165] 在另一个示例性ELISA中，将怀疑包含蛋白酶的样品固定在孔表面上，并随后使其与抗蛋白酶抗体接触。在结合并洗涤以去除非特异性结合的免疫复合物之后，检测结合的抗蛋白酶抗体。当初始蛋白酶抗体与可检测标记连接时，可直接检测免疫复合物。同样，可使用对第一抗蛋白酶抗体具有结合亲和力的第二抗体来检测免疫复合物，其中第二抗体与可检测标记连接。

[0166] 不论使用何种格式，ELISA都具有某些共同特征，例如包被、孵育和结合、洗涤以去除非特异性结合的物质以及检测结合的免疫复合物。以下对这些进行描述。

[0167] 在用抗原或抗体包被板中，通常将用抗原或抗体的溶液孵育板的孔过夜或持续指

定的一段时间。然后将对板的孔进行洗涤以去除不完全吸附的物质。然后，将孔的任何剩余可用表面用相对于测试抗血清为抗原中性的非特异性蛋白质“包被”。这些包括牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)、酪蛋白或乳粉溶液。所述包被允许封闭固定表面上的非特异性吸附位点，并且因此降低了由抗血清非特异性结合在表面上引起的背景。

[0168] 在ELISA中，可能更习惯使用二级或三级检测方法而不是直接操作。因此，在蛋白质或抗体与孔结合，用非反应性物质包被以降低背景，并洗涤以去除未结合的物质之后，使固定表面与待测试的生物样品在有效允许免疫复合物(抗原/抗体)形成的条件下接触。然后，免疫复合物的检测需要经标记的第二结合配体或抗体，以及与经标记的第三抗体或第三结合配体结合的第二结合配体或抗体。

[0169] “在有效允许免疫复合物(抗原/抗体)形成的条件下”意指所述条件优选包括用溶液(例如BSA、牛丙种球蛋白(bovine gamma globulin,BGG)或磷酸缓冲盐水(phosphate buffered saline,PBS)/吐温)来对抗原和/或抗体进行稀释。这些添加的试剂还倾向于有助于降低非特异性背景。

[0170] “合适的”条件还意味着孵育在足以允许有效结合的温度下或一段时间内进行。孵育步骤通常在优选约25℃至27℃的温度下进行约1至2至4小时左右，或者可以在约4℃左右下过夜。

[0171] 在ELISA中所有孵育步骤之后，洗涤接触的表面以去除未复合的物质。一个优选的洗涤过程包括用溶液例如PBS/吐温或硼酸盐缓冲液进行洗涤。在测试样品与最初结合的物质之间形成特异性免疫复合物并随后进行洗涤之后，可确定甚至是微量的免疫复合物的出现。

[0172] 为了提供检测方法，第二或第三抗体将具有相关的标记以允许检测。优选地，这将是这样的酶，其在与合适的显色底物一起孵育之后将产生显色。因此，例如，将期望第一和第二免疫复合物与脲酶、葡糖氧化酶、碱性磷酸酶或过氧化氢酶缀合的抗体接触或一起孵育一段时间，并且是在有利于发生进一步的免疫复合物形成的条件下(例如，在室温下在含PBS的溶液(例如PBS-吐温)中孵育2小时)。

[0173] 与经标记的抗体孵育并随后洗涤以去除未结合的物质之后，量化标记的量，例如通过与显色底物(例如尿素或溴甲酚紫或2,2’-联氮基-二-(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)或H_2O_2(在过氧化物酶作为酶标记的情况下))一起孵育。然后通过例如使用可见光谱分光光度计测量产生的颜色程度来实现量化。

[0174] B.mRNA检测

[0175] mRNA检测可用于评估癌细胞或肿瘤中的蛋白酶活性。一般来说，mRNA检测依赖于一种核酸-探针或引物-与另一种核酸(靶标)的杂交。

[0176] 使用长度为13至100个核苷酸，优选17至100个核苷酸，或者在某些方面长度多至1至2千碱基或更多的探针或引物，允许形成兼具稳定和选择性二者的双链体分子。通常优选的是具有跨过长度大于20个碱基的连续段的互补序列的分子，以提高所获得杂交分子的稳定性和/或选择性。通常优选设计用于杂交的核酸分子，所述核酸分子具有20至30个核苷酸(或者在期望的情况下甚至更长)的一个或更多个互补序列。这样的片段可容易地制备，例如通过化学方法直接合成所述片段或者通过将所选序列引入到重组载体中以重组产生。

[0177] 因此，可因核苷酸序列选择性地形成具有互补段mRNA的双链体分子或提供引物用

于从样品扩增mRNA的能力而使用该核苷酸序列。取决于预期的应用，将期望使用不同的杂交条件以实现针对靶序列的探针或引物的不同程度的选择性。

[0178] 对于要求高选择性的应用，通常将期望使用相对高的严格条件以形成杂交体。例如，相对低的盐和/或高温条件，例如在约50℃至约70℃的温度下由约0.02M至约0.10M的NaCl提供。这样的高严格条件几乎不(如果有的话)容许探针或引物与模板或靶链之间的错配，并且将特别适合于分离特定基因或适合于检测特定mRNA转录物。通常认识到，通过添加提高量的甲酰胺可使条件变得更加严格。

[0179] 对于某些应用，应当理解的是，较低的严格条件是优选的。在这些条件下，即使杂交链的序列不是完美互补的，而是在一个或更多个位置处发生错配，也可以发生杂交。可通过提高盐浓度和/或降低温度使条件变得较不严格。例如，可通过在约37℃至约55℃的温度下约0.1至0.25M的NaCl提供中等严格条件，而可通过在约20℃至约55℃的温度下约0.15M至约0.9M的盐提供低严格条件。可根据所期望的结果容易地操纵杂交条件。

[0180] 在另一些实施方案中，杂交可在例如约20℃至约37℃的温度下在50mM Tris-HCl(pH 8.3)、75mM KCl、3mM $MgCl_2$、1.0mM二硫苏糖醇的条件下实现。利用的另一些杂交条件可包括在约40℃至约72℃的温度下约10mM Tris-HCl(pH 8.3)、50mM KCl、1.5mM $MgCl_2$。

[0181] 在某些实施方案中，有利的是使用本发明的限定序列的核酸与合适的方式例如标记组合用于确定杂交。本领域中已知多种合适的指示手段，包括能够被检测到的荧光配体、放射性配体、酶配体或其他配体，例如抗生物素蛋白/生物素。在一些优选实施方案中，可期望使用荧光标记或酶标签，例如脲酶、碱性磷酸酶或过氧化物酶，而不是放射性或其他不合环境需要的试剂。在酶标签的情况下，可用于提供可见或分光光度法可检测以鉴定与包含互补核酸的样品的特异性杂交的检测方式的比色指示物质是已知的。

[0182] 一般来说，预想除使用固相的一些实施方案中之外，本文中所述的探针或引物还可用作液相杂交中的试剂，如在PCR™中那样，用于检测相应基因的表达。在涉及固相的一些实施方案中，受试mRNA被吸附或以其他方式固定至所选基质或表面。然后使该固定的单链核酸在期望条件下与所选探针进行杂交。所选条件将取决于特定的情况(例如，取决于G+C含量、靶核酸的类型、核酸的来源、杂交探针的尺寸等)。针对特定目的应用的杂交条件的优化是本领域技术人员公知的。在洗涤经杂交分子以去除非特异性结合的探针分子之后，检测杂交，和/或通过确定结合的标记的量来对杂交进行量化。在美国专利5,843,663、5,900,481和5,919,626中公开了代表性的固相杂交方法。在美国专利5,849,481、5,849,486和5,851,772以及美国专利公布2008/0009439中公开了可用于实践本发明的另一些杂交方法。在说明书的该部分中认定的这些参考文献和其他参考文献的相关部分通过引用并入本文。

[0183] 可根据标准方法从细胞、组织或其他样品分离靶核酸(Sambrook et al.,2001)。在某些实施方案中，对全细胞或组织匀浆或生物流体样品进行分析，而无需大量纯化模板核酸。在另一些情况下，可需要纯化和/或扩增。

[0184] 扩增通常涉及设计成在允许选择性杂交的条件下与对应于靶标的核酸选择性杂交的引物对。根据期望的应用，可选择仅允许与和引物完全互补的序列杂交的高严格杂交条件。在另一些实施方案中，杂交可在降低的严格性下发生，以允许对包含与引物序列的一个或更多个错配的核酸进行扩增。杂交后，使模板-引物复合物与促进模板依赖性核酸合成的一种或更多种酶接触。进行多轮扩增，也称为“循环”，直至产生足够量的扩增产物。

[0185] 可检测扩增产物或对其进行量化。在某些应用中，可通过视觉手段进行检测。或者，检测可包括通过化学发光、并入的放射性标记或荧光标记的放射性闪烁扫描或甚至通过使用电和/或热脉冲信号的系统间接鉴定产物(Bellus，1994)。

[0186] 许多模板依赖性过程可用于对给定模板样品中存在的寡核苷酸序列进行扩增。最众所周知的扩增方法之一是聚合酶链式反应(称为PCR™)，其在美国专利4,683,195、4,683,202和4,800,159以及在Innis et al.，1988中被详细描述，其各自通过引用整体并入本文。

[0187] 可进行逆转录酶PCR™扩增程序以量化扩增的mRNA的量。将RNA逆转录为cDNA的方法是公知的(参见Sambrook et al.，2001)。用于逆转录的替代方法利用热稳定的DNA聚合酶。这些方法描述于WO 90/07641中。聚合酶链式反应方法是本领域中公知的。RT-PCR的代表性方法描述于美国专利5,882,864中。

[0188] 将RNA逆转录(RT)为cDNA，随后进行定量PCR(RT-PCR)，可用于确定从细胞分离的特定mRNA物质的相对浓度。通过确定特定mRNA物质的浓度变化，表明编码特定mRNA物质的基因是差异表达的。如果绘制其中循环数在X轴上并且扩增的靶DNA的浓度的对数在Y轴上的图，则通过连接所绘制的点形成特征形状的曲线。从第一循环开始，线的斜率为正且恒定。认为这是曲线的线性部分。在试剂受到限制之后，线的斜率开始减小并且最终变为零。此时，扩增的靶DNA的浓度将变为渐近于一些固定值。认为这是曲线的平台部分。

[0189] PCR扩增的线性部分中靶DNA的浓度与反应开始之前靶标的起始浓度成正比。通过确定已完成相同数目的循环并在其线性范围内的PCR反应中靶DNA扩增产物的浓度，可确定原始DNA混合物中特定靶序列的相对浓度。如果DNA混合物是由从不同组织或细胞分离的RNA合成的cDNA，则可针对各组织或细胞确定从中获得靶序列的特定mRNA的相对丰度。PCR产物的浓度与相对mRNA丰度之间的这种正比关系仅在PCR反应的线性范围内才是正确的。

[0190] 曲线平台部分中靶DNA的最终浓度由反应混合物中试剂的可用性决定并且不依赖于靶DNA的原始浓度。因此，在可通过RT-PCR确定RNA群的集合的mRNA物质的相对丰度之前，必须满足的第一条件是当PCR反应在其曲线的线性部分中时，必须对扩增的PCR产物的浓度进行采样。

[0191] RT-PCR实验的第二条件是确定特定mRNA物质的相对丰度。通常来说，将可扩增cDNA的相对浓度相对于一些独立的标准归一化。RT-PCR实验的目的是确定相对于样品中所有mRNA物质的平均丰度的特定mRNA物质的丰度。

[0192] 用于竞争性PCR的大多数方案使用大约与靶标一样丰富的内部PCR标准物。如果在PCR扩增的产物的线性阶段对其进行采样，则这些策略是有效的。如果在反应接近平台阶段时对产物进行采样，则较不丰富的产物会变的相对过剩。对许多不同的RNA样品进行的相对丰度比较(例如在检查RNA样品的差异表达时的情况就是这样)以使得RNA的相对丰度差异显示出小于其实际差异的方式变得失真。如果内部标准物比靶标丰富的多，则这不是重大问题。如果内部标准物比靶标更丰富，则可在RNA样品之间进行直接线性比较。

[0193] 可使用内部标准物将RT-PCR作为相对定量的RT-PCR进行，其内部标准物是比靶cDNA片段更大的可扩增cDNA片段，并且其中编码内部标准物的mRNA的丰度比编码靶标的mRNA高约5至100倍。该测定测量各mRNA物质的相对丰度，而不是绝对丰度。

[0194] 扩增的另一种方法是连接酶链式反应(ligase chain reaction，“LCR”)，其在通过引用整体并入本文的欧洲申请No.320308中公开。美国专利4,883,750描述了与用于使探

针对与靶序列结合的LCR类似的方法。还可使用在美国专利5,912,148中公开的基于PCR™和寡核苷酸连接酶测定(oligonucleotide ligase assay,OLA)的方法。

[0195] 可用于实践本发明的用于扩增靶核酸序列的替代方法在以下中公开:美国专利5,843,650、5,846,709、5,846,783、5,849,546、5,849,497、5,849,547、5,858,652、5,866,366、5,916,776、5,922,574、5,928,905、5,928,906、5,932,451、5,935,825、5,939,291和5,942,391,GB申请号2 202 328,以及PCT申请号PCT/US89/01025,其各自通过引用整体并入本文。

[0196] PCT申请号PCT/US87/00880中描述的Qβ复制酶也可用作本发明中的扩增方法。在该方法中,在存在RNA聚合酶的情况下,向样品添加具有与靶标互补的区域之RNA的复制序列。聚合酶将复制可随后被检测的复制序列。

[0197] 等温扩增方法也可用于本发明中核酸的扩增,在所述等温扩增方法中使用限制性内切核酸酶和连接酶来实现在限制性位点的一条链中包含核苷酸5'-[α-硫代]-三磷酸的靶分子的扩增(Walker et al.,1992)。美国专利5,916,779中公开的链置换扩增(Strand Displacement Amplification,SDA)是进行核酸等温扩增的另一种方法,其涉及多轮的链置换和合成,即切口平移。

[0198] 其他核酸扩增程序包括基于转录的扩增系统(transcription-based amplification system,TAS),该系统包括基于核酸序列的扩增(nucleic acid sequence based amplification,NASBA)和3SR(Kwoh et al.,1989;PCT申请WO 88/10315,其通过引用整体并入本文)。欧洲申请No.329 822公开了涉及循环合成单链RNA("ssRNA")、ssDNA和双链DNA(dsDNA)的核酸扩增方法,其可根据本发明使用。

[0199] PCT申请WO 89/06700(其通过引用整体并入本文)公开了基于启动子区/引物序列与靶单链DNA("ssDNA")的杂交随后转录该序列的许多RNA拷贝的核酸序列扩增方案。该方案不是循环性的,即新的模板不是由所得RNA转录物产生。其他扩增方法包括"RACE"和"单边PCR"(Frohman,1990;Ohara et al.,1989)。

[0200] 在任何扩增之后,可期望将扩增产物与模板和/或过多的引物分离。在一个实施方案中,使用标准方法通过琼脂糖、琼脂糖-丙烯酰胺或聚丙烯酰胺凝胶电泳来分离扩增产物(Sambrook et al.,2001)。可切下分离的扩增产物并从凝胶洗脱以进一步处理。使用低熔点琼脂糖凝胶,可通过对凝胶进行加热去除分离的条带,随后提取核酸。

[0201] 核酸的分离也可通过本领域中已知的色谱技术来实现。存在可用于本发明实践的许多种类的色谱法,包括吸附色法谱、分配色谱法、离子交换色谱法、羟基磷灰石色谱法、分子筛色谱法、反相色谱法、柱色谱法、纸色谱法、薄层色谱法和气相色谱法以及HPLC。

[0202] 在某些实施方案中,扩增产物是可视化的。典型的可视化方法涉及用溴化乙锭对凝胶进行染色并在UV光下观察条带。或者,如果将扩增产物用放射性或荧光标记的核苷酸整体标记,则分离的扩增产物可暴露于X射线胶片或在合适的激发性光谱下可视化。

[0203] 在一个实施方案中,在分离扩增产物之后,使经标记的核酸探针与扩增的标志物序列接触。探针优选地与发色团缀合,但可以被放射性标记。在另一个实施方案中,使探针与结合配偶体(例如抗体或生物素),或者携带可检测部分的另一结合配偶体缀合。

[0204] 在一些具体实施方案中,通过Southern印迹和与经标记的探针的杂交进行检测。涉及Southern印迹的技术是本领域技术人员公知的(参见Sambrook et al.,2001)。前述的

一个实例描述于美国专利5,279,721中，其通过引用并入本文，所述专利公开了用于核酸的自动化电泳和转移的装置和方法。所述装置允许无需凝胶的外部操作即可进行电泳和印迹，并且理想地适合于进行根据本发明的方法。

[0205] 本领域中已知的多种核酸检测方法在以下美国专利中公开：5,840,873、5,843,640、5,843,651、5,846,708、5,846,717、5,846,726、5,846,729、5,849,487、5,853,990、5,853,992、5,853,993、5,856,092、5,861,244、5,863,732、5,863,753、5,866,331、5,905,024、5,910,407、5,912,124、5,912,145、5,919,630、5,925,517、5,928,862、5,928,869、5,929,227、5,932,413和5,935,791，其各自通过引用并入本文。

[0206] 蛋白酶mRNA检测可包括使用阵列或从阵列产生的数据。阵列通常是指核酸分子(探针)的有序的大阵列或微阵列，所述核酸分子(探针)与多个mRNA分子或cDNA分子完全或几乎互补或者相同并且位于空间上分离的组织中的支持材料上。大阵列通常是硝化纤维素或尼龙的片，其上已经点印探针。微阵列将核酸探针更密集地定位以使得多至10,000个核酸分子可装配至通常为1至4平方厘米的区域中。微阵列可通过将核酸分子例如基因、寡核苷酸等点印在基底上或在基底上原位制造寡核苷酸序列来制造。点印或所制造的核酸分子可以以每平方厘米多至约30个不相同核酸分子或更高，例如每平方厘米多至约100或甚至1000个的高密度矩阵模式施加。与基于硝化纤维素材料的过滤器阵列形成对比，微阵列通常使用镀膜玻璃作为固体支持物。通过具有互补核酸样品的有序阵列，可跟踪每个样品的位置并将其与原始样品连接。其中多个不同的核酸探针与固体支持物表面稳定缔合的多种不同的阵列装置是本领域技术人员已知的。用于阵列的可用基底包括尼龙、玻璃和硅。这样的阵列可以以许多不同的方式变化，包括平均探针长度、探针的序列或类型、探针与阵列表面之间的键的性质，例如共价的或非共价的等。除探针检测表达水平之外，本发明的标记和筛选方法以及阵列对于任何参数均不受其效用限制；因此，方法和组合物可与多种不同类型的基因一起使用。

[0207] 用于制备微阵列的代表性方法和装置已例如在以下中进行描述：

[0208] 美国专利5,143,854;5,202,231;5,242,974;5,288,644;5,324,633;5,384,261;5,405,783;5,412,087;5,424,186;5,429,807;5,432,049;5,436,327;5,445,934;5,468,613;5,470,710;5,472,672;5,492,806;5,503,980;5,510,270;5,525,464;5,527,681;5,529,756;5,532,128;5,545,531;5,547,839;5,554,501;5,556,752;5,561,071;5,571,639;5,580,726;5,580,732;5,593,839;5,599,695;5,599,672;5,610,287;5,624,711;5,631,134;5,639,603;5,654,413;5,658,734;5,661,028;5,665,547;5,667,972;5,695,940;5,700,637;5,744,305;5,800,992;5,807,522;5,830,645;5,837,196;5,871,928;5,847,219;5,876,932;5,919,626;6,004,755;6,087,102;6,368,799;6,383,749;6,617,112;6,638,717;6,720,138，

[0209] 以及WO 93/17126;WO 95/11995;WO 95/21265;WO 95/21944;WO 95/35505;WO 96/31622;WO 97/10365;WO 97/27317;WO 99/35505;WO 09923256;WO 09936760;WO00138580;WO 0168255;WO 03020898;WO 03040410;WO 03053586;WO 03087297;WO 03091426;WO03100012;WO 04020085;WO 04027093;EP 373 203;EP 785 280;EP 799 897和UK 8 803 000;

[0210] 其公开内容均通过引用并入本文。

[0211] 考虑到阵列可以是高密度阵列，以使得其包含100或更多个不同的探针。考虑到其可包含1000、16,000、65,000、250,000或1,000,000或更多个不同探针。探针可针对一种或更多种不同生物体中的靶标。在一些实施方案中，寡核苷酸探针的长度为5至50、5至45、10至40或15至40个核苷酸。在某些实施方案中，寡核苷酸探针的长度为20至25个核苷酸。

[0212] 阵列中每个不同探针序列的位置和序列是众所周知的。此外，大量不同的探针可占据相对小的区域，从而提供高密度阵列，所述高密度阵列的探针密度通常大于每cm^2约60、100、600、1000、5,000、10,000、40,000、100,000或400,000个不同的寡核苷酸探针。阵列的表面积可以为约或小于约1、1.6、2、3、4、5、6、7、8、9或10cm^2。

[0213] 此外，本领域普通技术人员可容易地分析使用阵列产生的数据。这样的方案在以上公开，并且包括在以下中发现的信息：WO 9743450；WO 03023058；WO 03022421；WO 03029485；WO 03067217；WO 03066906；WO 03076928；WO 03093810；WO 03100448A1，所有这些通过引用特别地并入。

[0214] V.实施例

[0215] 包括以下实施例来说明一些优选实施方案。本领域技术人员应该理解，以下实施例中公开的技术代表本发明人发现的在一些实施方案的实践中很好地发挥作用的技术，并且因此其可被认为是构成其实践的一些优选模式。然而，根据本公开内容，本领域技术人员应理解，在不脱离本公开内容的精神和范围的情况下，可对所公开的具体实施方案进行多种改变并仍然获得相同或相似的结果。

[0216] 实施例1

[0217] 基于干扰素α和β受体(IFNAR)的IFN-前药。本发明人基于人免疫球蛋白G1(IgG1)的结构改造了IFN-前药(图1)。阻断试剂是天然IFNAR1或IFNAR2的胞外结构域(ECD)，并且通过可切割的底物接头与干扰素α的N端连接。以该形式，IFNAR阻断了与细胞表面IFNAR1/IFNAR2异二聚体的结合。为了提高稳定性和半衰期，本发明人将IgG1 Fc结构域与干扰素α的C端融合(图1)。

[0218] 为了确定IFNAR1或IFNAR2的ECD是否能够阻断干扰素α活性，本发明人对IFNa4-Fc、R1-IFNa4-Fc和R2-IFNa4-Fc进行了纯化。R1-IFNa4-Fc或R2-IFNa4-Fc的接头是15个氨基酸的三联Gly-Gly-Gly-Gly-Ser肽，其是允许结构域之间相互作用的柔性接头[23]。他们使用了RAW-Lucia ISG细胞，所述细胞在与五个IFN刺激的应答元件结合的ISG54最小启动子的控制下表达Lucia萤光素酶基因。RAW-Lucia ISG细胞响应于鼠IFN-α和IFN-β。将hIg、IFNa4-Fc、R1-IFNa4-Fc和R2-IFNa4-Fc从20nM以5倍进行连续稀释用于萤光素酶报道测定。相对于IFNa4-Fc，R1-IFNa4-Fc和R2-IFNa4-Fc二者均显示出IFN活性显著降低了至少125倍(图2A)。

[0219] 为了确定活化的IFN-前药的活性是否与IFNa4-Fc的活性相当，本发明人对R1-NSUB、R1-SUB、R2-NSUB和R2-SUB进行了纯化。R1-SUB或R2-SUB的接头是携带6个残基的蛋白酶可切割底物(PVGLIG)的16个氨基酸的肽[24]，其可被MMP-2或MMP-9切割，在两侧的侧翼是柔性的Gly-Gly-Gly-Gly-Ser肽。将不具有蛋白酶可切割底物的R1-NSUB和R2-NSUB用作对照构建体。将R1-NSUB、R1-SUB、R2-NSUB或R2-SUB与rmMMP-9在37℃下孵育6小时用于活化。相对于IFNa4-Fc的活性，活化的R1-SUB显示出IFN活性提高了25倍，而酶接种之后R1-NSUB的活性没有改变(图2B)。用R2-NSUB和R2-SUB观察到类似的结果，而活化的R2-SUB显示出甚至

更大的IFN活性提高，相对于IFNa4-Fc的活性提高了超过25倍(图2C)。

[0220] 因此，以基于IFNA1形式或基于IFNAR2形式二者的蛋白酶活化的IFN-前药的生物活性均提高，而不是预期的恢复至与母体IFNa4-Fc的生物活性等价。此外，IFN-前药显示出在蛋白酶切割之前其生物活性显著降低，表明IFN-前药将在体内保持安全直至被切割，并且此后在局部肿瘤微环境下的治疗活性提高。

[0221] 基于IFNAR1和基于IFNAR2的IFN-前药在体内显示出不同的抗肿瘤作用。接下来，本发明人使用小鼠中的B16黑素瘤模型研究了IFN-前药的局部活化是否会在体内转化为抗肿瘤效力。在未筛选小鼠肿瘤模型中酶表达的情况下，他们最初从携带MMP-2和MMP-9的可切割底物的IFN-前药开始。将患有已建立的B16黑素瘤肿瘤的小鼠用R1-SUB、R2-SUB、IFNa4-Fc或hIg对照进行处理。在剂量为1nmol(每三天注射三次)时，R1-SUB、R2-SUB和IFNa4-Fc在该模型中显现出不同的抑制肿瘤生长效力。在处理之后10天的时间点，相对于经hIg处理的对照组，R1-SUB已将肿瘤生长抑制了24％，R2-SUB抑制了57％，并且IFNa4-Fc抑制了72％(图3)。

[0222] 因此，基于IFNAR2的IFN-前药在体内显示出比基于IFNAR1的IFN-前药更好的抗肿瘤作用，从而使得本发明人在以下研究中专注于R2-SUB。然而，相对于IFNa4-Fc的效力，携带MMP-2和MMP-9的可切割底物的R2-SUB具有在抑制肿瘤生长方面受损的效力。本发明人假设，IFN-前药的效力提高将通过在小鼠肿瘤模型中选择合适的可切割底物接头来实现。

[0223] 基于IFNAR2的IFN-前药具有提高的效力和降低的副作用。为了选择更有利的可切割底物接头，本发明人在小鼠肿瘤模型中筛选了已知在多种人癌症中上调的研究最多的蛋白酶。该底物选择过程包括针对在正常健康组织中表达的蛋白酶的反选择以降低IFN-前药的全身性(非特异性)活化的可能性。将患有已建立的B16黑素瘤肿瘤或MC38结肠肿瘤的小鼠处死，并使用肿瘤组织和正常组织(包括脾、心脏、肝、肺和肾)确定以下蛋白酶基因的mRNA表达水平：uPA、MMP-2、MMP-9和MMP-14。UPA仅在肾中高表达，而不在两个肿瘤组织中高表达(图4A)。MMP-2在MC38肿瘤中高表达，而不在B16肿瘤中高表达；然而，其在心脏和肺中具有高背景(图4B)。MMP-9的表达水平在所有正常和肿瘤组织中非常低(图4C)。最后，MC38和B16肿瘤二者均具有高的MMP-14表达，而相比之下，正常组织中的MMP-14表达最低(图4D)。小鼠肿瘤模型中的筛选数据表明，对MMP-14敏感的可切割底物接头将有助于在体内形成强效IFN-前药。

[0224] 本发明人还对肿瘤与邻近正常组织之间的人蛋白酶表达水平进行了分析。TIMER(肿瘤免疫评估资源(Tumor IMmune Estimation Resource))的DiffExp模块提供对来自TCGA(癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas))的所有样品的基因表达水平的比较。评估了大多数与肿瘤相关的酶，并且发现MMP-1、MMP-3、MMP-9、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13和MMP-14是在大多数肿瘤中显著上调同时在正常组织中具有相对低的背景的这些蛋白酶(图6A至6H)。这些蛋白酶是人IFN-前药设计的良好候选物以实现对正常组织的最大抗肿瘤作用和最小副作用。有趣的是，小鼠和人样品二者中MMP-14表达水平的一致数据增强了本发明人对在IFN-前药中使用MMP-14底物的信心。

[0225] 因此，本发明人对基于IFNAR2和MMP-14底物(SGRSENIRTA)的IFN-前药进行了改造和纯化[25]。他们研究了在体内潜在的安全性益处和抗肿瘤效力。将患有已建立的B16-OVA黑素瘤肿瘤的小鼠用R2-SUB、IFNa4-Fc或hIg对照以1mM的剂量每三天注射三次进行处理。本

发明人对IFN-前药与IFNa4-Fc的相对安全性进行了比较。在第三次处理之后的当天，在IFNa4-Fc组中观察到高水平的血清中炎症细胞因子，包括IL-6、TNF、MCP-1和IFN-g。相反地，用R2-SUB处理的小鼠显示出非常低水平的这些炎症细胞因子(图5A)。指示肝毒性的ALT水平也显示出类似的结果(图5B)。

[0226] 本发明人继续监测肿瘤生长和体重。在处理之后12天的时间点，相对于经hIg处理的对照组，R2-SUB已将肿瘤生长抑制了76％，并且IFNa4-Fc抑制了67％(图5C)。然而，在此时间点，来自经IFNa4-Fc处理的组的小鼠患病(似新生的(hatched)、不活跃和瘦)，这可能是由于IFN的严重副作用所致。接下来，他们对体重动力学进行了比较。数据表明，来自IFNa4-Fc组的小鼠在第三次处理之后开始快速减轻体重，然而，来自R2-SUB组的小鼠的体重在三次处理之后没有显著变化(图5D)。最后，本发明人在基于毒性的存活曲线中表明，经R2-SUB处理的组具有100％的存活，而经IFNa4-Fc处理的组显示出33％的存活(图5E)。

[0227] 基于干扰素α和β受体(IFNAR)的人IFN-前药

[0228] 为了确定人IFNAR1或IFNAR2的ECD是否能够阻断人干扰素α2活性，本发明人对人IFNa2-Fc、R1-IFNa2-Fc和R2-IFNa2-Fc进行了纯化。R1-IFNa2-Fc或R2-IFNa2-Fc的接头是15个氨基酸的三联Gly-Gly-Gly-Gly-Ser肽，其是允许结构域之间相互作用的柔性接头[23]。他们使用了293T-Dual™ hSTING-R232报道细胞，所述细胞在与5个NF-κB和AP-1结合位点融合的IFN-β最小启动子的控制下表达SEAP(分泌性胚胎碱性磷酸酶(secreted embryonic alkaline phosphatase))报道基因。293T-Dual™ hSTING-R232细胞响应于人IFN-α和IFN-β。将人IFNa2-Fc、R1-IFNa2-Fc和R2-IFNa2-Fc从50nM以10倍进行连续稀释用于SEAP报道测定。与人IFNa2-Fc相比，R1-IFNa2-Fc显示出将IFN活性降低了10倍，而R2-IFNa2-Fc显示出将IFN活性降低了100倍(图7A)。因此，IFNAR2是针对人IFN的更好的阻断试剂。

[0229] 为了确定活化的人IFN-前药的活性是否与IFNa2-Fc的活性相当，本发明人对人R2-NSUB和R2-SUB进行了纯化。R2-SUB的接头是携带6个残基的蛋白酶可切割底物(PVGLIG)的16个氨基酸的肽[24]，其可被MMP-2或MMP-9切割，在两侧的侧翼是柔性的Gly-Gly-Gly-Gly-Ser肽。将不含有蛋白酶可切割底物的R2-NSUB用作对照构建体。将R2-NSUB或R2-SUB与rmMMP-9在37℃下一起孵育0、0.5、2或6小时。通过rmMMP-9以时间依赖性方式切割人R2-SUB。在6小时之后，切割效力为100％(图7C)。相对于人IFNa2-Fc的活性，活化的人R2-SUB显示出相当的IFN活性，而酶接种之后R2-NSUB的活性没有改变(图7B)。

[0230] 因此，蛋白酶活化的人IFN-前药的生物活性以基于IFNAR2的形式完全恢复至母体IFNa4-Fc的生物活性。此外，基于人IFNAR2的IFN-前药显示出在蛋白酶切割之前其生物活性显著降低，表明人IFN-前药将在体内保持安全直至被切割，并且此后在人中的局部肿瘤微环境下的治疗活性提高。

[0231] 因此，在此所研究的IFN-前药可通过在正常组织中降低毒性来使得I型干扰素对肿瘤组织的靶向性增强。可基于每种肿瘤中的蛋白酶活性来定制IFN-前药的抗肿瘤效力，从而使得IFN-前药成为在特定情况下具有所选可切割底物接头的个性化药物，从而获得最好结果。另外，可使用对不同蛋白酶敏感的不同接头将IFN-前药设计成携带多个IFN结构域，从而显著提高其治疗作用。

[0232] **********

[0233] 根据本公开内容，无需过度实验即可制备和实施本文中公开和要求保护的所有组

合物和方法。尽管已根据一些优选实施方案描述了本公开内容的组合物和方法，但是对于本领域技术人员而言明显的是，在不脱离本公开内容的概念、精神和范围的情况下，可对本文中描述的组合物和方法以及方法的步骤或步骤顺序进行变化。更具体地，明显的是，可用化学和生理学二者相关的某些试剂替代本文中描述的试剂，同时将获得相同或相似的结果。对于本领域技术人员明显的所有这样的类似替代和修改被认为是在如所附权利要求书限定的本公开内容的精神、范围和概念内。

[0234] VII.参考文献

[0235] 以下参考文献就其提供补充本文中阐述内容的示例性操作或其他细节而言特别地通过引用并入本文。

[0236] Almendro et al,J.hmmunol.,157(12):5411-5421,1996.

[0237] Antonelli et al.,Cytokine Growth Factor Rev 26,121-131,2015.

[0238] Ausubel et al.,Current Protocols in Molecular Biology,Greene Publishing Associates and Wiley Interscience,N.Y.,1994.

[0239] Bates,Mol.Biotechnol.,2(2):135-145,1994.

[0240] Battraw and Hall,Theor.App.Genet.,82(2):161-168,1991.

[0241] Bellus,J.Macromol.Sci.Pure Appl.Chem.,A31(1):1355-1376,1994.

[0242] Bhattacharjee et al.,J.Plant Bioch.Biotech.,6(2):69-73.1997.

[0243] Burnette et al.,Cancer Res 71,2488-2496,2011.

[0244] Capaldi et al.,Biochem.Biophys.Res.Comm.,74(2):425-433,1977.

[0245] Carbonelli et al.,FEMS Microbiol.Lett.,177(1):75-82,1999.

[0246] Chen and Okayama,Mol,Cell Biol.,7(8):2745-2752,1987.

[0247] Chistou et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,84(12):3962-3966,1987.

[0248] Cocea,Biotechniques,23(5):814-816,1997.

[0249] D'Halluin et al.,Plant Cell,4(12):1495-1505,1992.

[0250] De Jager et al.,,Semin.Nucl,Med.,23(2):165-179,1993.

[0251] Desnoyers et al.,Sci Transl Med 5,207ra144,2013,

[0252] Doolittle and Ben-Zeev,Methods Mol,Biol.,109,:215-237,1999.

[0253] EP00273085

[0254] Erstet,et al.,JControl Release 161,804-812,2012,

[0255] Feehheimer et al.,Proc Natl.Acad.Sci.USA,84:8463-8467,1987.

[0256] Ferrantini et al.,Biochimie 89,884-893,2007.

[0257] Fraley et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,76:3348-3352,1979.

[0258] Frohman,In:PCRProtocols:A Guide To Methods And Applications,Academic Press,N.Y.,1990.

[0259] Gabrilovich&Nagaraj,Nat Rev Immunol 9,162-174,2009.

[0260] GB申请No.2 202 328

[0261] Ghosh and Bachhawat,In:Liver Diseases,Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands,Wu et al.(Eds.),Marcel Dekker,NY,87-104,1991.

[0262] Gopal,Mol.CellBiol.,5:1188-1190,1985.

[0263] Graham and Van Der Eb,Virology,52:456-467,1973.

[0264] Greene et al.,Immunology Today,10:272,1989.

[0265] Harland and Weintraub,J.Cell Biol.,101(3):1094-1099,i985.

[0266] He et al.,Plant Cell Reports,14(2-3):i92-196,1994.

[0267] Hou and Lin,Plant Physiology,111:166,1996.

[0268] Imai et al.,Nephrologie,19(7):397-402,1998.

[0269] Kaeppler et al.,Plant Cell Rep.,8:415-418,1990.

[0270] Kaneda et al.,Science,243:375-378,1989.

[0271] Kato et al.,J.Biol.Chem.,266:33613364,1991,

[0272] Kato et al.,N Engl J Med.350:1713-21,2004.

[0273] Khanna,Immunol Cell Biol 76,20-26,1998.

[0274] Kraus et al.,FEBS Lett.,428(3):165-170,1998.

[0275] Kreutzer et al.,J Dtsch Dermatol Ges 2,689-694,2004.

[0276] Kwoh et al,Proc.Natl.Acad,Sci,USA,86:1173,1989.

[0277] Lareyre et al.,J.Biol.Chem.,274(12):8282-8290,1999.

[0278] Lazzeri,Methods Mol.Biol.,49:95-106,1995.

[0279] Lee et al.,Clin Cancer Res,14:7397-404,2008,

[0280] Lee et al.,Environ.Mol.Mutagen.,13(1):54-59,1989.

[0281] Levenson et al,Hum.Gene Ther.,9(8):1233-1236,1998.

[0282] Lotrich,Dialogues Clin Neurosci 11,417-425,2009.

[0283] Macejak and Sarnow,Nature,353:90-94,1991.

[0284] Moschos&Kirkwood,Cytokine Growth Factor Rev 18,451-458,2007.

[0285] Nakamura et al.,In:Handbook of Experimental Immunology(4thEd.),Weir et al.(Eds),1:27,Blackwell Scientific Publ.,Oxford,1987,

[0286] Nicolau and Sene,Biochim.Biophys.Acta,721:185-190,1982.

[0287] Nicolau et al.,Methods Enzymol.,149:157-176,1987.

[0288] Nomoto et al.,Gene,236(2):259-271,1999.

[0289] Ohara et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,86:5673-5677,1989.

[0290] Olaussen et al.,Curr Opin Pulm Med,13:284-9,2007.

[0291] Olaussen et al.,N Engl J Med.355:983-91,2006.

[0292] Omirulleh et al.,Plant Mol.Biol.,21(3):415-428,1993.

[0293] Pace et al.,J Immunol 184,5969-5979,2010.

[0294] Parker et al.,Nat Rev Cancer 16,131-144,2016.

[0295] PCT申请WO 92/17598

[0296] PCT申请WO 94/09699

[0297] Pelletier and Sonenberg,Nature,334(6180):320-325,1988.

[0298] Perales et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,91:4086 4090,1994.

[0299] Potrykus et al.,Mol.Gen.Genet.,199(2):169-177,1985.

[0300] Potter et al,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:7161-7165,1984.

[0301] Remington's Pharmaeeutieal Sciences,15th Ed.,33:624-652,1990.

[0302] Rhodes et al.,Methods Mol.Biol.,55:121 131,1995.

[0303] Rippe,et al.,Mol.Cell Biol.,10:689-695,1990.

[0304] Roepman et al.,Clin Cancer Res.15:284-90,2009.

[0305] Sambrook et al.,In:Moleeular Cloning:A Laboratory Manual,2nd Ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY,1989.

[0306] Schiavoni et al.,Cancer Res 71,768-778,2011.

[0307] Schmidt et al.,Front Immunol 3,51,2012.

[0308] Sharma et al.,Cell 168,707-723,2017.

[0309] Sleijfer et al,Pharm World Sci 27,423-431,2005.

[0310] Srivastava et al.,J Exp Med 211,961-974,2014.

[0311] Stagg et al.,Proc Nat'l Acad Sci USA 108,7142-7147,2011.

[0312] Stella et al.,Drugs 29,455-473,1985.

[0313] Taukada et al.,Plant Cell Physiol.,30(4)599-604,1989.

[0314] Tsumaki et al.,J.Biol.Chem.,273(36):22861-22864,1998.

[0315] Tur-Kaspa et al.,Mol.Cell Biol.,6:716-718,1986.

[0316] 美国专利3,817,837

[0317] 美国专利3,850,752

[0318] 美国专利3,939,350

[0319] 美国专利3,939,350

[0320] 美国专利3,996,345

[0321] 美国专利4,275,149

[0322] 美国专利4,277,437

[0323] 美国专利4,366,241

[0324] 美国专利4,415,723

[0325] 美国专利4,458,066

[0326] 美国专利4,683,195

[0327] 美国专利4,683,202

[0328] 美国专利4,684,611

[0329] 美国专利4,800,159

[0330] 美国专利4,879,236

[0331] 美国专利4,883,750

[0332] 美国专利4,952,500

[0333] 美国专利5,143,854

[0334] 美国专利5,202,231

[0335] 美国专利5,242,974

[0336] 美国专利5,279,721

[0337] 美国专利5,288,644

[0338] 美国专利5,302,523

[0339] 美国专利5,322,783

[0340] 美国专利5,324,633

[0341] 美国专利5,384,253

[0342] 美国专利5,384,261

[0343] 美国专利5,405,783

[0344] 美国专利5,412,087

[0345] 美国专利5,424,186

[0346] 美国专利5,429,807

[0347] 美国专利5,432,049

[0348] 美国专利5,436,327

[0349] 美国专利5,445,934

[0350] 美国专利5,464,765

[0351] 美国专利5,468,613

[0352] 美国专利5,470,710

[0353] 美国专利5,472,672

[0354] 美国专利5,492,806

[0355] 美国专利5,503,980

[0356] 美国专利5,510,270

[0357] 美国专利5,525,464

[0358] 美国专利5,527,681

[0359] 美国专利5,529,756

[0360] 美国专利5,532,128

[0361] 美国专利5,538,877

[0362] 美国专利5,538,880

[0363] 美国专利5,545,531

[0364] 美国专利5,547,839

[0365] 美国专利5,550,318

[0366] 美国专利5,554,501

[0367] 美国专利5,556,752

[0368] 美国专利5,561,071

[0369] 美国专利5,563,055

[0370] 美国专利5,571,639

[0371] 美国专利5,580,726

[0372] 美国专利5,580,732

[0373] 美国专利5,580,859

[0374] 美国专利5,589,466

[0375] 美国专利5,593,839

[0376] 美国专利5,599,672

[0377] 美国专利5,599,695

[0378] 美国专利5,610,042

[0379] 美国专利5,610,287

[0380] 美国专利5,624,711

[0381] 美国专利5,631,134

[0382] 美国专利5,639,603

[0383] 美国专利5,654,413

[0384] 美国专利5,656,610

[0385] 美国专利5,658,734

[0386] 美国专利5,661,028

[0387] 美国专利5,665,547

[0388] 美国专利5,667,972

[0389] 美国专利5,670,488

[0390] 美国专利5,695,940

[0391] 美国专利5,700,637

[0392] 美国专利5,702,932

[0393] 美国专利5,736,524

[0394] 美国专利5,739,018

[0395] 美国专利5,739,169

[0396] 美国专利5,744,305

[0397] 美国专利5,780,448

[0398] 美国专利5,789,215

[0399] 美国专利5,795,715

[0400] 美国专利5,800,992

[0401] 美国专利5,801,005

[0402] 美国专利5,807,522

[0403] 美国专利5,824,311

[0404] 美国专利5,830,645

[0405] 美国专利5,830,880

[0406] 美国专利5,837,196

[0407] 美国专利5,840,873

[0408] 美国专利5,843,640

[0409] 美国专利5,843,650

[0410] 美国专利5,843,651

[0411] 美国专利5,843,663

[0412] 美国专利5,846,708

[0413] 美国专利5,846,709

[0414] 美国专利5,846,717

[0415] 美国专利5,846,726

[0416] 美国专利5,846,729

[0417] 美国专利5,846,783

[0418] 美国专利5,846,945

[0419] 美国专利5,847,219

[0420] 美国专利5,849,481

[0421] 美国专利5,849,486

[0422] 美国专利5,849,487

[0423] 美国专利5,849,497

[0424] 美国专利5,849,546

[0425] 美国专利5,849,547

[0426] 美国专利5,851,772

[0427] 美国专利5,853,990

[0428] 美国专利5,853,992

[0429] 美国专利5,853,993

[0430] 美国专利5,856,092

[0431] 美国专利5,858,652

[0432] 美国专利5,861,244

[0433] 美国专利5,863,732

[0434] 美国专利5,863,753

[0435] 美国专利5,866,331

[0436] 美国专利5,866,366

[0437] 美国专利5,871,928

[0438] 美国专利5,871,986

[0439] 美国专利5,876,932

[0440] 美国专利5,882,864

[0441] 美国专利5,889,136

[0442] 美国专利5,900,481

[0443] 美国专利5,905,024

[0444] 美国专利5,910,407

[0445] 美国专利5,912,124

[0446] 美国专利5,912,145

[0447] 美国专利5,912,148

[0448] 美国专利5,916,776

[0449] 美国专利5,916,779

[0450] 美国专利5,919,626

[0451] 美国专利5,919,630

[0452] 美国专利5,922,574

[0453] 美国专利5,925,517

[0454] 美国专利5,925,565

[0455] 美国专利5,928,862
[0456] 美国专利5,928,869
[0457] 美国专利5,928,905
[0458] 美国专利5,928,906
[0459] 美国专利5,928,906
[0460] 美国专利5,929,227
[0461] 美国专利5,932,413
[0462] 美国专利5,932,451
[0463] 美国专利5,935,791
[0464] 美国专利5,935,819
[0465] 美国专利5,935,825
[0466] 美国专利5,939,291
[0467] 美国专利5,942,391
[0468] 美国专利5,945,100
[0469] 美国专利5,981,274
[0470] 美国专利5,994,624
[0471] 美国专利6,004,755
[0472] 美国专利6,087,102
[0473] 美国专利6,368,799
[0474] 美国专利6,383,749
[0475] 美国专利6,506,559
[0476] 美国专利6,573,099
[0477] 美国专利6,617,112
[0478] 美国专利6,638,717
[0479] 美国专利6,720,138
[0480] 美国专利公布2002/0168707
[0481] 美国专利公布2003/0051263
[0482] 美国专利公布2003/0055020
[0483] 美国专利公布2003/0159161
[0484] 美国专利公布2004/0064842
[0485] 美国专利公布2004/0265839
[0486] 美国专利公布2008/0009439
[0487] Wagner et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87(9):3410-3414,1990.
[0488] Walker et al.,Nucleic Acids Res.20(7):1691-1696,1992.
[0489] Weir et al.,Nature,450:893-8,2007.
[0490] Woo et al.,Immunity 41,830-842,2014.
[0491] Wu and Wu,Ady.Drug Delivery Rev.,12:159167,1993.
[0492] Wu and Wu,J.Biol.Chem.,262:44294432,1987.
[0493] Wu et al.,Biochem.Biophys.Res.Commun.,233(1):221-226,1997.

[0494] Wu et al.,Cancer Res.,58(8):1605-8,1998.

[0495] Zhao-Emonet et al.,Biochim.Biophys.Acta,1442(2-3):109-119,1998.

[0496] Zhou et al.,Nature,361(6412):543-547,1993.

[0497] Zitvogel et al.,Nat Rev Immunol 15,405-414,2015.

[0498] Zoglmeier et al.,Clin Cancer Res 17,1765-1775,2011.

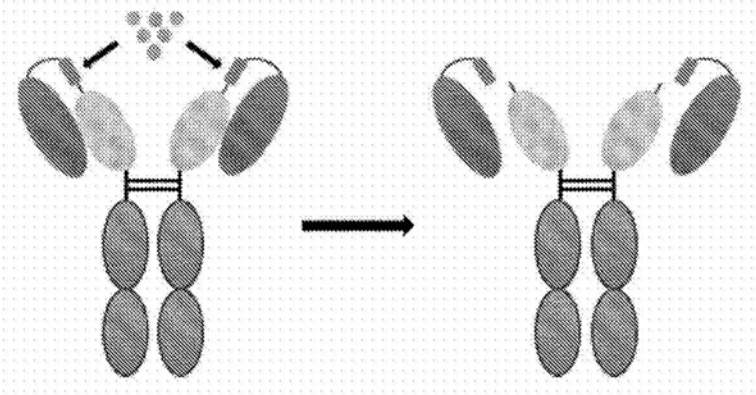


图1

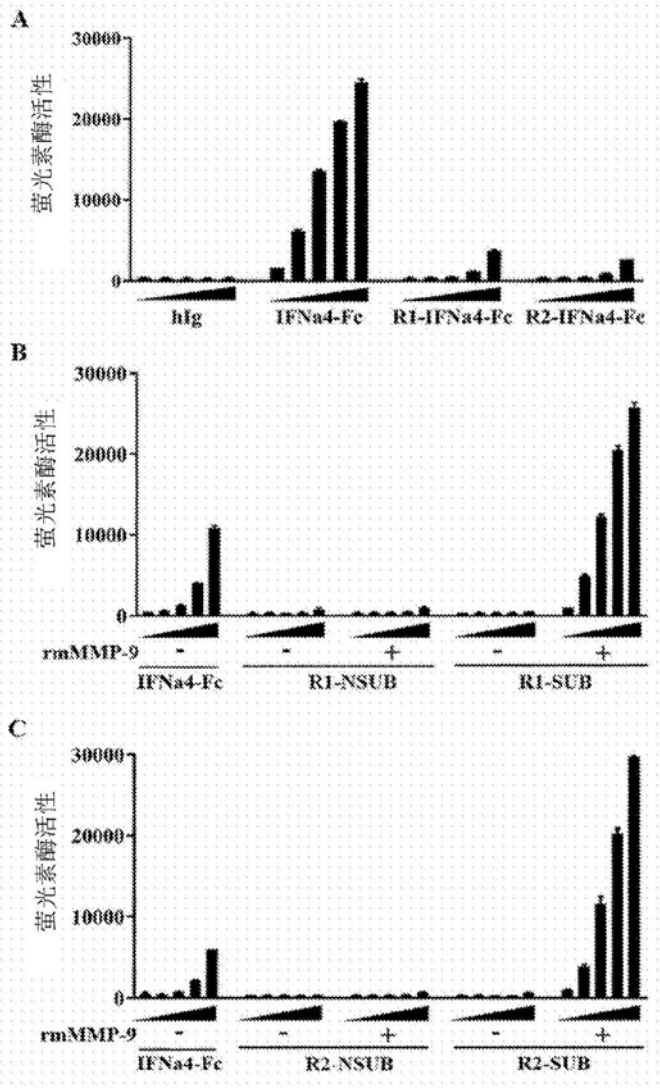

A
30000
20000
10000
0
萤光素酶活性
hIg
IFNa4-Fc
R1-IFNa4-Fc
R2-IFNa4-Fc
B
30000
20000
10000
0
萤光素酶活性
rmMMP-9
-
-
+
-
+
IFNa4-Fc
R1-NSUB
R1-SUB
C
30000
20000
10000
0
萤光素酶活性
rmMMP-9
-
-
+
-
+
IFNa4-Fc
R2-NSUB
R2-SUB

图2A-C

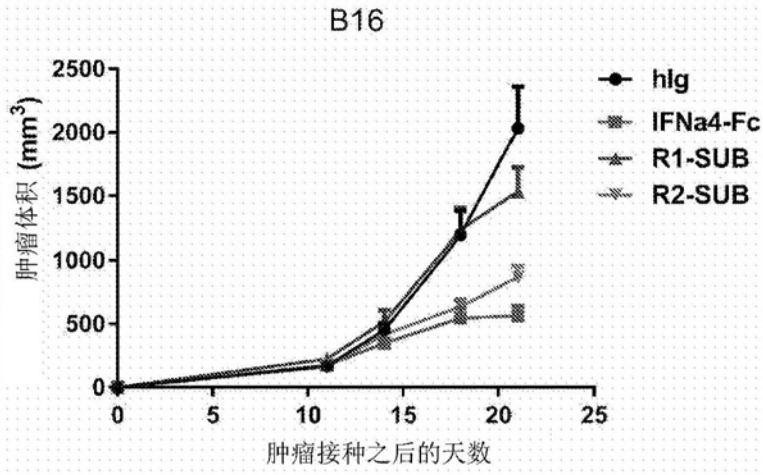

B16
肿瘤体积 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
肿瘤接种之后的天数
hIg
IFNa4-Fc
R1-SUB
R2-SUB

图3

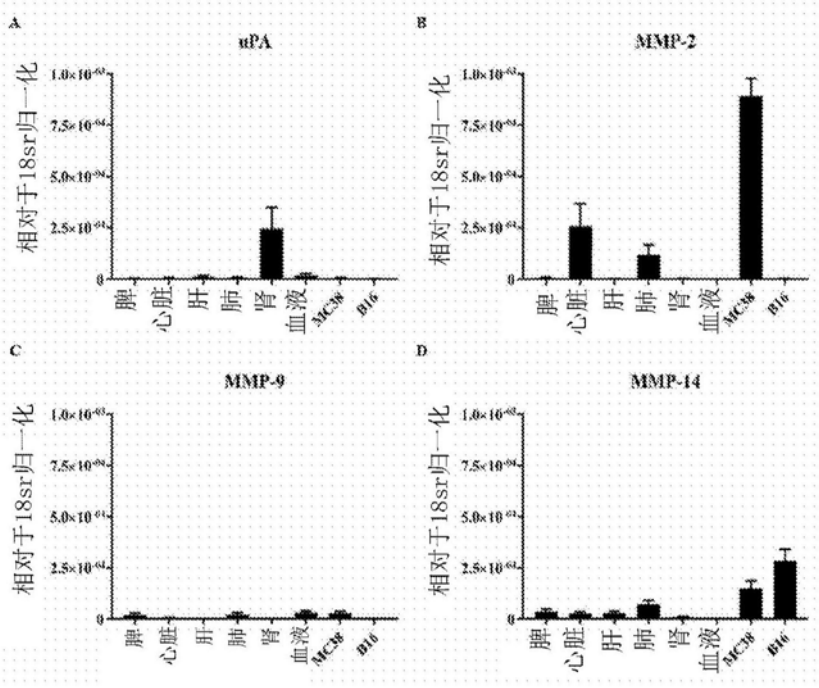

A
uPA
B
MMP-2
C
MMP-9
D
MMP-14
相对于18sr归一化
脾
心脏
肝
肺
肾
血液
MC38
B16

图4A-D

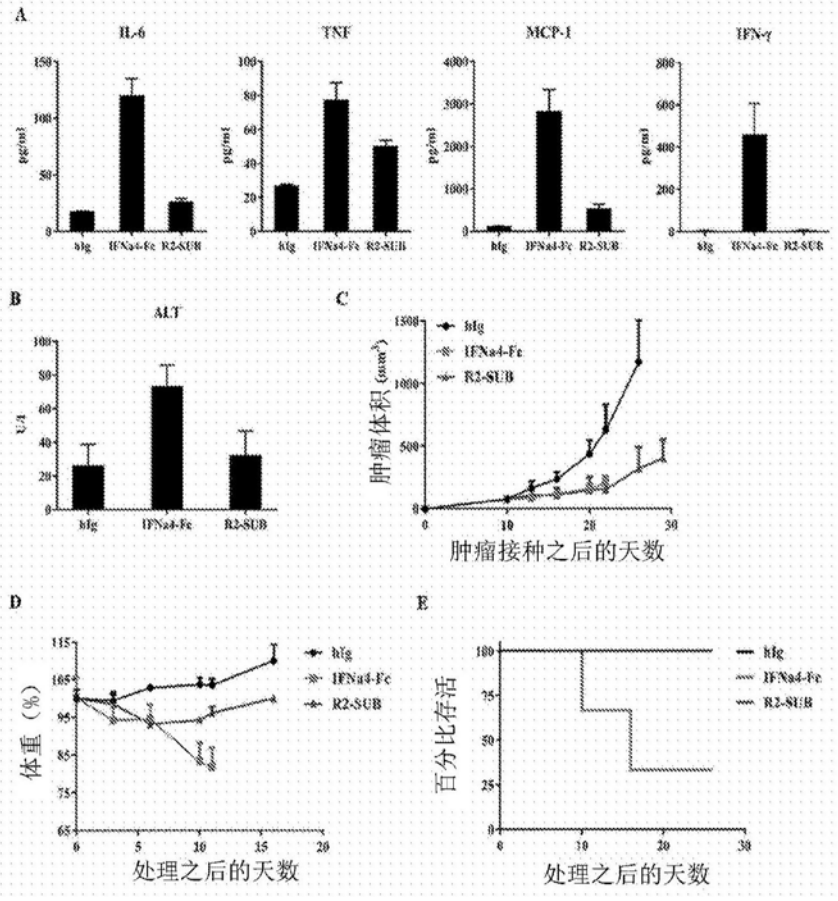

A
IL-6
TNF
MCP-1
IFN-γ
pg/ml
hIg
IFNα4-Fc
R2-SUB
B
ALT
U/l
C
肿瘤体积
hIg
IFNα4-Fc
R2-SUB
肿瘤接种之后的天数
D
体重（%）
处理之后的天数
E
百分比存活
处理之后的天数

图5A-E

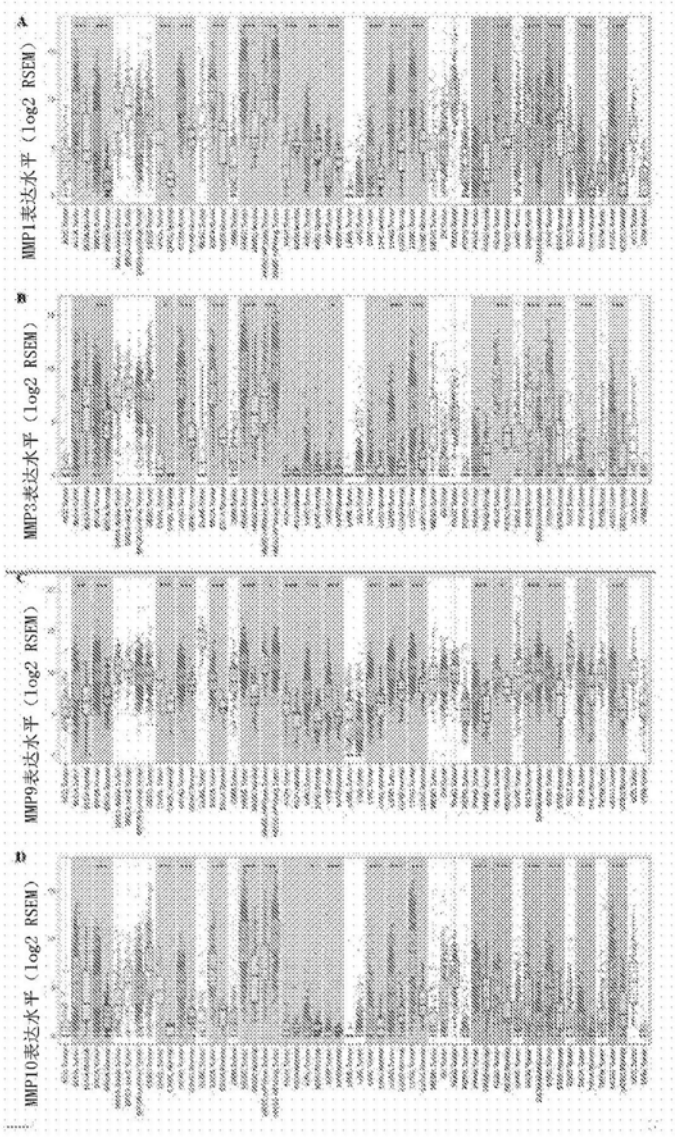

A
MMP1表达水平（log2 RSEM）
B
MMP3表达水平（log2 RSEM）
C
MMP9表达水平（log2 RSEM）
D
MMP10表达水平（log2 RSEM）

图6A-D

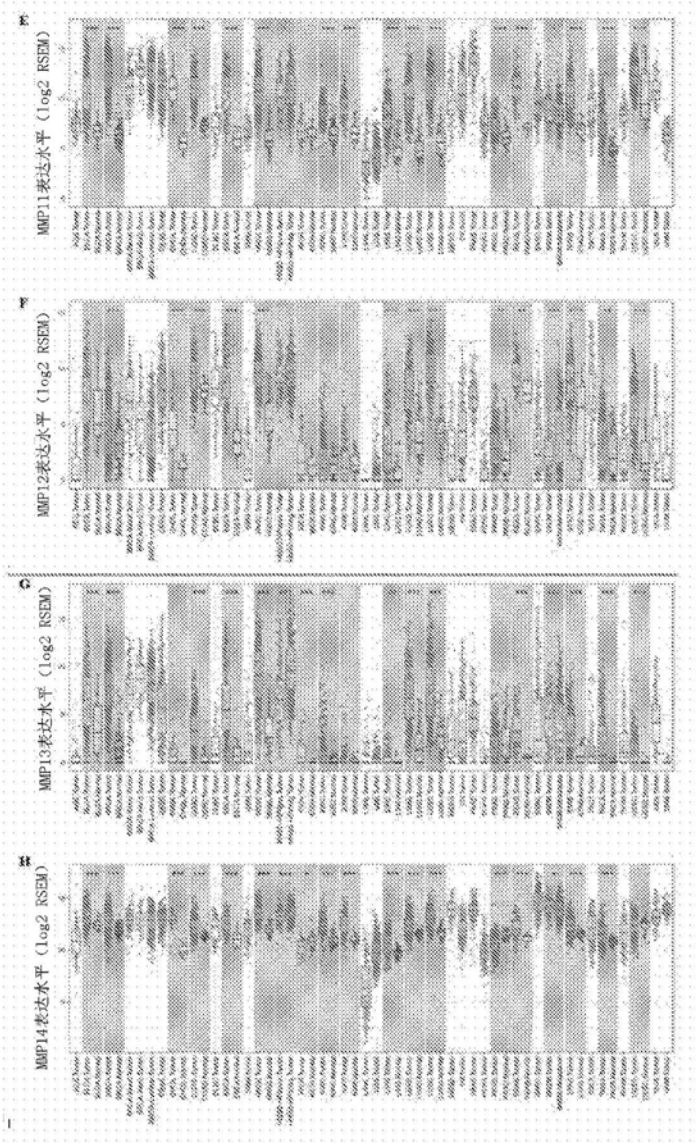

E
MMP11表达水平 (log2 RSEM)
F
MMP12表达水平 (log2 RSEM)
G
MMP13表达水平 (log2 RSEM)
H
MMP14表达水平 (log2 RSEM)

图6E-H

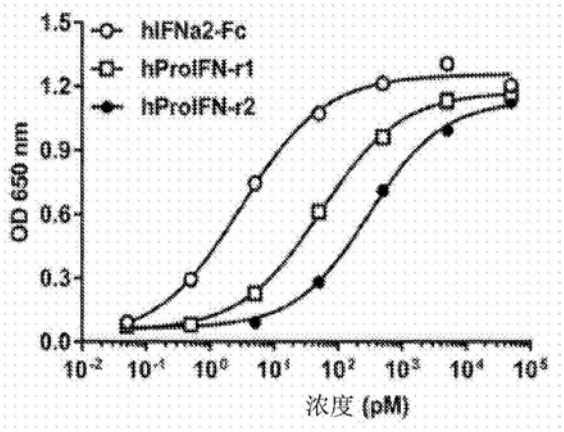

hIFNa2-Fc
hProIFN-r1
hProIFN-r2
OD 650 nm
1.5
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
10⁻²
10⁻¹
10⁰
10¹
10²
10³
10⁴
10⁵
浓度 (pM)

图7A

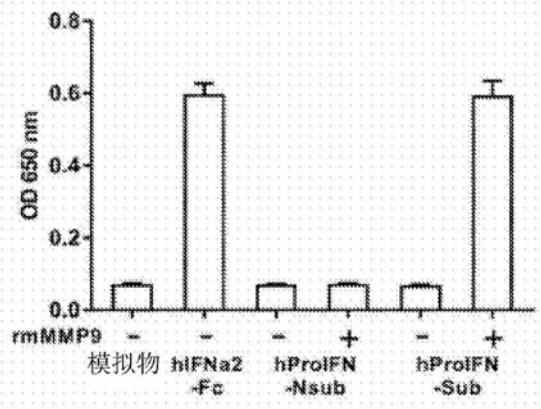

0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
OD 650 nm
rmMMP9 - - - + - +
模拟物
hIFNa2 -Fc
hProIFN -Nsub
hProIFN -Sub

图7B

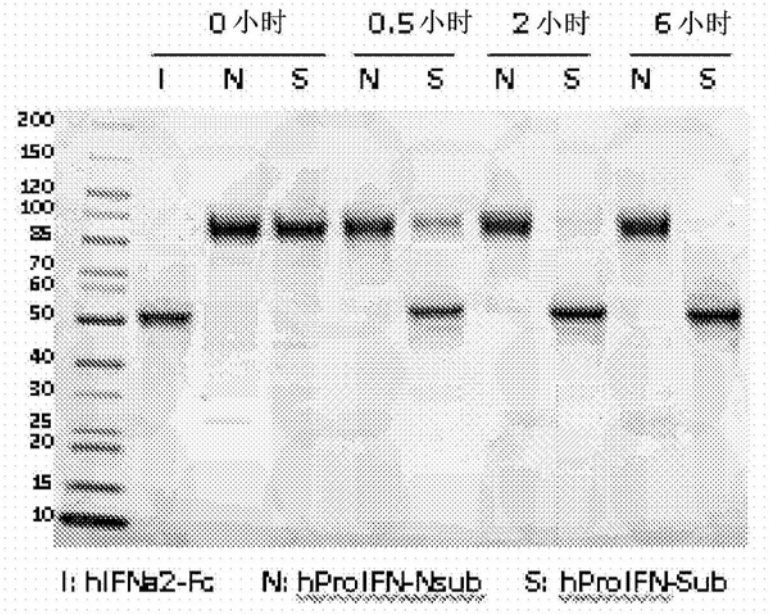

0 小时
0.5 小时
2 小时
6 小时
I N S N S N S N S
200
150
120
100
85
70
60
50
40
30
25
20
15
10
I: hIFNa2-Fc
N: hProIFN-Nsub
S: hProIFN-Sub

图7C