



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113728232 A

(43) 申请公布日 2021. 11. 30

(21) 申请号 202080024878.2

(22) 申请日 2020.02.07

(30) 优先权数据

62/802,652 2019.02.07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.09.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2020/000013 2020.02.07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/160639 EN 2020.08.13

(71) 申请人 梅迪塞纳医疗股份有限公司

地址 加拿大安大略省多伦多

(72) 发明人 法赫尔·麦钱特

罗斯米娜·麦钱特

(74) 专利代理机构 北京三环同创知识产权代理有限公司 11349

代理人 邵毓琴

(51) Int.Cl.

G01N 33/48 (2006.01)

A61K 47/68 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/195 (2006.01)

C07K 14/21 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

权利要求书4页 说明书108页 附图44页

(54) 发明名称

作为癌症中的生物标志物的IL-4R

(57) 摘要

用于使用人白细胞介素4受体 (IL-4) 作为生物标志物以用于确定要治疗的患者群体、预测疾病治疗功效、以及预测多种癌症特别是成胶质细胞瘤和复发性成胶质细胞瘤的疾病治疗预后的方法。

1. 一种用于确定要用靶向IL-4的货物蛋白治疗的癌症患者群体的方法,所述方法包括:

a) 测量从所述癌症患者中的癌症或肿瘤获得的生物样品中IL-4受体(IL-4R)的表达水平,

b) 对所述生物样品中所述IL-4R的表达水平的测量进行定量,以及

c) 当所述IL-4R的表达水平为中等或高时,用靶向IL-4的货物蛋白治疗所述癌症患者。

2. 一种用于预测或确定用靶向IL-4的货物蛋白治疗的功效的方法,所述方法包括:

a) 测量从所述癌症患者中的癌症或肿瘤获得的生物中IL-4受体(IL-4R)的表达水平,

b) 对所述生物样品中所述IL-4R的表达水平的测量进行定量,以及

c) 将IL-4R的水平与治疗功效相关联,其中,中等或高水平的IL-4R表达表示用靶向IL-4的货物蛋白治疗具有治疗功效。

3. 一种用于改变癌症患者的治疗方案的方法,所述方法包括:

a) 测量从所述癌症患者中的癌症或肿瘤获得的生物中IL-4受体(IL-4R)的表达水平,

b) 对所述生物样品中所述IL-4R的表达水平的测量进行定量,其中,中等或高水平的IL-4R表达表示具有治疗功效,

c) 将所述IL-4R的表达水平与治疗功效相关联,其中,高水平的IL-4R表达表示改变用靶向IL-4的货物蛋白治疗的治疗方案,以及

d) 当测量到中等或高水平的IL-4R表达时,改变所述治疗方案以包括靶向IL-4的货物蛋白。

4. 一种用于预测或确定癌症疾病预后和/或进展的方法,所述方法包括:

a) 测量来自癌症患者中的肿瘤的生物样品中IL-4受体(IL-4R)的表达水平,

b) 对所述生物样品中所述IL-4R表达水平的测量进行定量,其中,中等或高水平的IL-4R表达表示所述疾病预后和/或进展,以及

c) 将所述IL-4R表达水平与所述疾病预后和/或进展相关联,其中,中等或高水平的IL-4R表达表示严重的疾病预后和/或进展。

5. 如权利要求4所述的方法,其中,当测量到高水平的IL-4R表达时,所述方法还包括用靶向IL-4的货物蛋白治疗所述癌症患者。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述IL-4R的表达水平为高水平的IL-4R表达。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,高水平的IL-4R表达由 $\geq 2+$ 的百分比评分表示。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,高水平的IL-4R表达由 $\geq 3+$ 的百分比评分表示。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,中等水平的IL-4R表达由 $\geq 1+$ 但 < 2 的百分比评分表示。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,中等水平的IL-4R表达由76至150的H-评分表示。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,高水平的IL-4R表达由151至225的H-评分表示。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 高水平的IL-4R表达由226至300的H-评分表示。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 通过测量IL-4R α 的表达水平来测量所述IL-4R的表达水平。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述IL-4R的表达水平为2型IL-4R (II型IL-R4, 包括IL-4R α 和IL13R α 1) 表达水平。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 使用针对包括IL-4R α 表达的IL-4R的免疫组织化学 (IHC) 染色来测量所述IL-4R的表达水平。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述癌症或肿瘤选自由以下组成的组: 前列腺癌、卵巢癌、乳腺癌、子宫内膜癌、多发性骨髓瘤、黑色素瘤、淋巴瘤、包括小细胞肺癌的肺癌、肾癌、肝癌、结肠癌、结肠直肠癌、胰腺癌、胃癌和脑癌 (包括CNS肿瘤)。

17. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述CNS肿瘤选自由以下组成的组: 胶质瘤、成胶质细胞瘤 (包括多形性成胶质细胞瘤GBM和难治性多形性成胶质细胞瘤rGBM)、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质、脑血管瘤、脑膜瘤、成神经细胞瘤、成视网膜细胞瘤、成神经管细胞瘤和成人垂体腺瘤。

18. 根据权利要求16至17中任一项所述的方法, 其中, 所述CNS肿瘤是成胶质细胞瘤。

19. 根据权利要求16至18中任一项所述的方法, 其中, 所述CNS肿瘤是复发性或难治性成胶质细胞瘤 (包括例如rGBM)。

20. 根据权利要求16至19中任一项所述的方法, 其中, 受试者患有O6-甲基鸟嘌呤-甲基转移酶 (MGMT) 阳性或阴性CNS肿瘤。

21. 根据权利要求16至20中任一项所述的方法, 其中, 所述受试者患有弗林蛋白酶阳性CNS肿瘤。

22. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述靶向IL-4的货物蛋白包含一个或多个货物部分。

23. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述靶向IL-4的货物蛋白包含毒素。

24. 根据权利要求23所述的方法, 其中, 所述毒素包括细菌毒素、动物毒素或植物毒素。

25. 如权利要求24所述的方法, 其中, 所述毒素包括成孔毒素。

26. 如权利要求25所述的方法, 其中, 所述成孔毒素包括气溶素或气溶素原。

27. 如权利要求24所述的方法, 其中, 所述植物毒素包括三角梅核糖体失活蛋白或蓖麻毒素。

28. 根据权利要求24所述的方法, 其中, 所述细菌毒素包括选自由以下组成的组中的毒素: 假单胞菌外毒素、霍乱毒素或白喉毒素。

29. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述靶向IL-4的货物蛋白包括选自由以下组成的组中的BCL-2家族的促细胞凋亡成员: BAX、BAD、BAT、BAK、BIK、BOK、BID、BIM、BMF和BOK。

30. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述靶向IL-4的货物蛋白包括MDNA55 (SEQ ID NO: 65) 或其衍生物或变体。

31. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述靶向 IL-4 的货物蛋白是 MDNA55。

32. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述靶向 IL-4 的货物蛋白包含 IL-4R 抗体作为靶向部分。

33. 如权利要求 32 所述的方法, 其中, 所述 IL-4R 抗体是人源化抗体。

34. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述靶向 IL-4 的货物蛋白包括融合蛋白。

35. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述靶向 IL-4 的货物蛋白是瘤内给药的。

36. 根据权利要求 34 所述的方法, 其中, 所述瘤内给药包括颅内给药。

37. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述靶向 IL-4 的货物蛋白是人工脑脊液 (CSF) 溶液和白蛋白中的制剂, 其中, 所述制剂与替代示踪剂共同给药于有此需要的受试者。

38. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述替代示踪剂是磁共振成像 (MRI) 造影剂。

39. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述替代示踪剂是钆结合示踪剂。

40. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述替代示踪剂选自由以下组成的组: 钆-二亚乙基三胺五乙酸 (Gd-DTPA) 和钆结合白蛋白 (Gd-白蛋白)。

41. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述白蛋白是人血清白蛋白。

42. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述人工 CSF 溶液是 Elliotts B® 溶液。

43. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述靶向 IL-4 的货物蛋白是经由颅内导管给药的。

44. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述靶向 IL-4 的货物蛋白是通过对流增强递送 (CED) 给药的。

45. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述靶向 IL-4 的货物蛋白是经由对流增强递送 (CED) 以单剂量给药的。

46. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述靶向 IL-4 的货物蛋白是以单剂量给药的。

47. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述靶向 IL-4 的货物蛋白是以约 90 μg (60mL 中 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、约 240 μg (40mL 中 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 或约 300 μg (100mL 中 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的单剂量给药的。

48. 如权利要求 47 所述的方法, 其中, 所述靶向 IL-4 的货物蛋白是以 60mL 中 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的剂量给药的。

49. 如权利要求 47 所述的方法, 其中, 所述靶向 IL-4 的货物蛋白是以 40mL 中 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的剂量给药的。

50. 如权利要求 47 所述的方法, 其中, 所述靶向 IL-4 的货物蛋白是以 100mL 中 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的剂量给药的。

51. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述靶向 IL-4 的货物蛋白是以约 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至约 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的单剂量给药的。

52. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述靶向IL-4的货物蛋白以单剂量给药1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天。

53. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述靶向IL-4的货物蛋白是以1次、2次、3次、4次或5次输注给药的。

54. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 根据前述权利要求中任一项所述给药所述靶向IL-4的货物蛋白, 然后停止所述给药约1天至约8天, 任选地停止所述给药1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天, 随后根据前述权利要求中任一项所述进行给药, 并且只要治疗所述CNS肿瘤需要则重复这种给药和停止给药的模式。

55. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述靶向IL-4的货物蛋白是经由包括1至3个导管的一个或多个颅内导管给药的。

56. 根据权利要求55所述的方法, 其中, 所述靶向IL-4的货物蛋白是通过所述导管以约5 μ L/min/导管至约20 μ L/min/导管的流速或约15 μ L/min/导管的流速给药的。

57. 根据权利要求56所述的方法, 其中, 所述靶向IL-4的货物蛋白是通过所述导管以1.5 μ g/mL的浓度和约15 μ L/min/导管的流速给药的。

58. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 类固醇与靶向IL-4的货物蛋白组合使用。

59. 根据权利要求58所述的方法, 其中, 所述类固醇以等于或低于4mg/天的剂量给药。

60. 一种试剂盒, 其包含如前述权利要求中任一项所述的靶向IL-4的货物蛋白, 其中, 所述试剂盒包含: IL-4R抗体; 关于在基于免疫组织化学(IHC)的测定中使用所述IL-4R抗体的说明书; 以及关于确定百分比评分或H-评分的说明书。

作为癌症中的生物标志物的 IL-4R

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年02月07日提交的美国临时申请第62/802,652号的优先权,该美国临时申请以全文引用的方式并入本文中。

背景技术

[0003] 原发性GB的一线治疗包括在与神经保护一致的情况下尽可能最大程度地手术切除大块肿瘤,然后是Stupp方案,该方案被确立为新诊断GB的护理标准(Stupp等人,2005)。在Stupp疗程中,患者在放疗的同时接受替莫唑胺(**Temodar®**)治疗,然后在放疗完成后再次接受替莫唑胺治疗。替莫唑胺被批准用于新诊断GB伴随放疗,然后作为维持治疗(新药申请号021029;批准日期:08/11/1999)。

[0004] 新诊断的GB患者也可以接受替代化疗,诸如亚硝基脲疗程或插入卡莫司汀晶片(**Gliadel®**)。**Gliadel®**是一种用卡莫司汀饱和的可生物降解聚合物晶片。可以通过在颅骨内局部植入来降低通常与细胞毒性治疗相关的全身毒性(Westphal等人,2006)。**Gliadel®**适用于新诊断的高级别恶性胶质瘤作为手术和放疗的辅助手段,并且适用于复发性GB作为手术的辅助手段(新药申请号020637;批准日期:02/25/2003)。在完全切除肿瘤后将其植入术后腔内。**Gliadel**提供了大约4-8周的边际增加存活率(Westphal等人,2003)。

[0005] 使用当前的治疗范例,大多数GB患者在标准一线治疗后会经历肿瘤复发/进展。复发性GB患者的治疗选择非常有限,并且结果通常不令人满意。具体地,复发性或进展性GB的化疗疗程不成功,产生毒性而无益处(Weller等人,2013)。这主要是由于缺乏组织特异性,对正常组织产生毒性,因此治疗指数较窄。由于总存活率仍然很低,因此需要具有更高的肿瘤特异性、更强大的细胞毒性机制和新型递送技术的新型抗癌方式来治疗复发性GB。

[0006] 复发性或进展性GB患者的治疗选择非常有限,并且长期阳性结果很少见。目前在美国批准用于治疗复发性GB的药物有**Gliadel®**(如上所述用于一线治疗)和贝伐单抗(**Avastin®**)。在第3期研究中,在手术切除肿瘤后将**Gliadel**植入物直接放入肿瘤腔中,56%的复发性GB治疗受试者存活6个月,并且中位存活期为26周(Brem等人,1995)。然而,大多数复发性GB患者不适合进行额外手术,导致该患者群体大量的需求未得到满足(Weller等人,2013)。

[0007] **Avastin®**是一种靶向血管内皮生长因子受体(VEGF)的抗血管生成抗体。它被指定为成人复发性GB患者的单一药剂(新药申请号125085;批准日期:02/26/2004),但未显示出改善疾病相关症状或存活率。**Avastin®**的批准是基于客观应答率(ORR为26%)终点(Genentech2016;Cohen等人,2009;Freidman等人,2009)。2013年,**Avastin®**在新诊断的GB患者中完成了其验证性试验,但未达到其总存活期的主要终点。基于本次试验的结果,对于新诊断的GB,Genentech未获得欧盟(EU)批准;然而,**Avastin®**在美国和日本仍然适用于复发性GB。此后,多项研究比较了**Avastin®**的疗效或评估了联合方法。

[0008] MDNA55是一种靶向免疫毒素,由白细胞介素-4(cpIL-4)的生物工程循环排列版本(结合结构域)与有效细菌毒素的截短版本——铜绿假单胞菌外毒素(PE)A(催化结构域)融

合而组成 (Kreitman 等人, 1994)。MDNA55 与细胞表面表达的白细胞介素-4 受体 (IL-4R) 结合, 然后整个复合物被内吞。在通过癌细胞核内体中发现的高浓度弗林蛋白酶样蛋白酶进行切割和活化后, 截短的 PE 的催化结构域被释放到细胞溶质中, 在细胞溶质中其经由延伸因子-2 的 ADP 核糖基化和通过半胱天冬酶活化诱导细胞凋亡而诱导细胞死亡 (Wedekind 等人, 2001)。不表达 IL-4R 靶标的细胞不会与 MDNA55 结合, 因此不会发生 PE 介导的细胞死亡。PE 部分被工程改造为保留催化结构域, 但不保留细胞结合结构域。

[0009] 成胶质细胞瘤是一种进展迅速且几乎普遍致命的癌症, 对患者来说是毁灭性的。这种侵袭性脑癌的发病率很高, 通常表现为认知和精神运动功能迅速恶化, 一线治疗失败后的 1 年存活率大约为 25% (Lamborn 等人, 2008)。目前没有有效的治疗方法。MDNA55 代表了潜在的治疗进展。MDNA55 是一种设计合理的靶向疗法, 有可能延长 GB 患者的存活期。与 MDNA55 给药和输注相关的不良事件虽然严重, 但与疾病进展本身的影响相似。

[0010] MDNA55 是一种新型疗法, 它提供了一种靶向治疗方法, 使肿瘤细胞比正常细胞对药物的毒性作用更敏感。靶标 IL-4R 是开发癌症疗法的理想但未充分利用的靶标, 因为它在各种人类癌症中频繁且强烈地表达。IL-4R 在健康和正常细胞的表面的表达水平很低, 但在癌细胞上却增加了数倍。大多数来自成人和小儿中枢神经系统 (CNS) 肿瘤的癌症活检和尸检样品 (包括复发性 GB 活检) 已显示出过度表达 IL-4R。在正常成人和小儿脑组织中几乎没有或完全没有 IL-4R 表达 (Joshi 等人, 2001; 参见参考文献的表 2)。IL-4R 的这种差异表达为 MDNA55 提供了广泛的治疗窗口 (IC_{50} 数据参见参考文献的表 4)。靶向 IL-4 的货物蛋白 (包括例如 MDNA55) 可用于治疗过度表达 IL-4R 的肿瘤 (包括复发性 GB) 和其他过度表达 IL-4R 的 CNS 肿瘤。不表达 IL-4R 靶标的细胞不与 MDNA55 结合, 因此不受 PE 介导的影响。

[0011] GBM 中 3 期试验失败的药剂列表不断扩大, 凸显了鉴定与药物作用机制特别相关的生物标志物的必要性。特别地, 对于复发性 GBM (rGBM) 来说, 这是最常见且一致致死的脑癌形式。GBM 药物开发人员面临的一个严峻挑战是鉴定最有可能对其候选药物治疗产生反应的特定患者亚型, 从而增加临床成功的可能性。例如, 研究表明, 缺乏 MGMT 启动子甲基化的 GBM 患者对替莫唑胺 (TMZ) 治疗反应不佳并且预后较差 (Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T 等人.《新英格兰医学杂志 (N Engl J Med.)》《MGMT 基因沉默并受益于替莫唑胺治疗成胶质细胞瘤 (MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma)》. 2005 年 3 月 10 日; 352 (10))。据报道, 这是脑肿瘤的第一个预测性生物标志物, 并可能允许选择可从 TMZ 治疗和放疗中受益的患者。然而, 目前 MGMT 启动子高甲基化并不能指导 GBM 患者的治疗策略。另一种可影响 GBM 预后的生物标志物是表皮生长因子受体变体 III (EGFRvIII), 它是 EGFR 的突变版本。大约 25-33% 的 GBM 患者被认为在他们的肿瘤中含有这种基因变体 (Johnson H, Del Rosario AM, Bryson BD 等人.《人类成胶质细胞瘤肿瘤异种移植中 EGFR 和 EGFRvIII 信号传导网络的分子特征 (Molecular characterization of EGFR and EGFRvIII signaling networks in human glioblastoma tumor xenografts)》.《分子与细胞蛋白质组学 (Mol Cell Proteomics)》. 2012 年 12 月; 11 (12): 1724-40)。在存在 EGFR 扩增的情况下, EGFRvIII 过表达在增强致瘤性方面起着重要作用, 并且已被证明是 GBM 患者存活不良的有力指标 (Ushio Y, Tada K, Shiraishi S 等人,《p53、MDM2、p16、PTEN 和 EGFR 的分子遗传分析与间变性星形细胞瘤和成胶质细胞瘤患者存活率的相关性 (Correlation of molecular genetic analysis of p53, MDM2, p16, PTEN, and EGFR and survival of

patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma)》.《生物科学前沿 (Front Biosci.)》2003年5月1日;8:e281-8)。这种变体正被研究作为新疗法的一个有希望的靶标,其中最好的例子是Celldex Therapeutics的癌症疫苗rindopepimut,目前正在新诊断的GBM的3期试验以及复发性GBM的2期试验中对该癌症疫苗进行研究。

[0012] 类似地,GBM中的IL-4R α 过度表达 (Husain SR等人,《癌症研究 (Cancer Res.)》1998;58:3649-3653;Joshi BH等人《癌症研究 (Cancer Res.)》2001;61:8058-8061;Puri RK等人,《癌症研究 (Cancer Res.)》56:5631-5637,1999;以及Puri RK等人《国际癌症杂志 (Int J Cancer)》.1994年8月15日;58 (4):574-81) 及其胶质瘤微环境中的上调 (Kohanbash G.等人《癌症研究 (Cancer Res.)》2013;73 (21):6413-23)。Burt等人发现IL-4R α 在人类恶性胸膜间皮瘤 (MPM) 中通过肿瘤细胞原位高度表达,并且观察到高度IL-4R α 表达的间皮瘤肿瘤在临床上更具侵袭性,手术切除后的结果更差 (Burt BM等人,《临床癌症研究 (Clin.Cancer Res.)》2012年3月15日;18 (6):1568-77)。MDNA55的IL-4R靶标是中枢神经系统 (“CNS”) 肿瘤 (包括成胶质细胞瘤 (“GBM”)) 的理想但未充分利用的药物靶标。大多数来自成人和小儿CNS肿瘤 (包括复发性GBM) 的癌症活检样品过度表达IL-4R,而在正常成人和小儿脑组织中几乎没有或完全没有IL-4R表达。4在GBM2、3患者的临床研究中,IL-4R的表达与小鼠模型中的致瘤性增加和长期存活率较低相关。此外,已知IL-4R由髓系来源抑制性细胞和肿瘤相关巨噬细胞表达,已知这些细胞是可将肿瘤隐藏于杀死癌症的免疫细胞中的免疫抑制性肿瘤微环境 (TME) 的关键组成部分。(Roth F,De La Fuente AC,Vella JL等人《适体介导的IL-4R α 阻断触发MDSC细胞凋亡并限制肿瘤进展 (Aptamer-mediated blockade of IL-4R α triggers apoptosis of MDSCs and limits tumor progression)》.《癌症研究 (Cancer Res.)》2012;72 (6):1373-83;以及Bankaitis KV和Fingleton B.《靶向IL-4/IL-4R用于治疗上皮癌转移 (Targeting IL-4/IL-4R for the treatment of epithelial cancer metastasis)》.《临床与实验转移 (Clin Exp Metastasis)》.2015年12月;32 (8):847-56)。

[0013] 迄今为止,这些观察结果的预测和预后价值在癌症 (诸如GBM) 中尚未确定。确定IL-4R阳性患者是否对MDNA55 (或其他靶向IL-4的货物蛋白) 有较好的反应并通过鉴定最有可能有反应的特定患者亚型 (如本发明中所提供的) 将有助于解决这些悬而未决的问题,并且可能带来患者的进一步改善的临床结果。总之,本领域仍然需要用于治疗这些表达IL-4R的肿瘤的进一步有效的方法,并且如本发明所述使用IL-4R表达水平作为确定和/或预测治疗疗程的预测和/或诊断标志物满足了这种需要。

发明内容

[0014] 本发明提供了在癌症治疗中使用IL-4R表达水平作为生物标志物和/或伴随诊断的方法。

[0015] 在一些实施方案中,本发明提供了一种用于确定要用靶向IL-4的货物蛋白治疗的癌症患者群体的方法,所述方法包括:

[0016] a) 测量从所述癌症患者中的癌症或肿瘤获得的生物样品中IL-4受体 (IL-4R) 的表达水平,

[0017] b) 对所述生物样品中所述IL-4R的表达水平的测量进行定量,以及

[0018] c) 当所述IL-4R的表达水平为中等或高时,用靶向IL-4的货物蛋白治疗所述癌症患者。

[0019] 在一些实施方案中,本发明提供了一种用于预测或确定用靶向IL-4的货物蛋白治疗的功效的方法,所述方法包括:

[0020] a) 测量从癌症患者中的癌症或肿瘤获得的生物中IL-4受体(IL-4R)的表达水平,

[0021] b) 对所述生物样品中所述IL-4R的表达水平的测量进行定量,以及

[0022] c) 将IL-4R的水平与治疗功效相关联,其中,中等或高水平的IL-4R表达表示用靶向IL-4的货物蛋白治疗具有治疗功效。

[0023] 在一些实施方案中,本发明提供了一种用于改变癌症患者的治疗方案的方法,所述方法包括:

[0024] a) 测量从所述癌症患者中的癌症或肿瘤获得的生物中IL-4受体(IL-4R)的表达水平,

[0025] b) 对所述生物样品中所述IL-4R的表达水平的测量进行定量,其中,中等或高水平的IL-4R表达表示具有治疗功效,

[0026] c) 将所述IL-4R的表达水平与治疗功效相关联,其中,高水平的IL-4R表达表示改变用靶向IL-4的货物蛋白治疗的治疗方案,以及

[0027] d) 当测量到中等或高水平的IL-4R表达时,改变所述治疗方案以包括靶向IL-4的货物蛋白。

[0028] 在一些实施方案中,本发明提供了一种用于预测或确定癌症疾病预后和/或进展的方法,所述方法包括:

[0029] a) 测量来自癌症患者中的肿瘤的生物样品中IL-4受体(IL-4R)的表达水平,

[0030] b) 对所述生物样品中所述IL-4R表达水平的测量进行定量,其中,中等或高水平的IL-4R表达表示所述疾病预后和/或进展,以及

[0031] c) 将所述IL-4R表达水平与所述疾病预后和/或进展相关联,其中,中等或高水平的IL-4R表达表示严重的疾病预后和/或进展。

[0032] 在一些实施方案中,当测量到高水平的IL-4R表达时,所述方法还包括用靶向IL-4的货物蛋白治疗所述癌症患者。

[0033] 在一些实施方案中,所述IL-4R的表达水平为高水平的IL-4R表达。

[0034] 在一些实施方案中,高水平的IL-4R表达由 $\geq 2+$ 的百分比评分表示。

[0035] 在一些实施方案中,高水平的IL-4R表达由 $\geq 3+$ 的百分比评分表示。

[0036] 在一些实施方案中,中等水平的IL-4R表达由 $\geq 1+$ 但 < 2 的百分比评分表示。

[0037] 在一些实施方案中,中等水平的IL-4R表达由76至150的H-评分表示。

[0038] 在一些实施方案中,高水平的IL-4R表达由151至225的H-评分表示。

[0039] 在一些实施方案中,高水平的IL-4R表达由226至300的H-评分表示。

[0040] 在一些实施方案中,通过测量IL-4R α 的表达水平来测量所述IL-4R的表达水平。

[0041] 在一些实施方案中,所述IL-4R的表达水平为2型IL-4R(II型IL-4R,包括IL-4R α 和IL13R $\alpha 1$)表达水平。

[0042] 在一些实施方案中,使用针对包括IL-4R α 表达的IL-4R的免疫组织化学(IHC)染色来测量所述IL-4R的表达水平。

[0043] 在一些实施方案中,所述癌症或肿瘤选自由以下组成的组:前列腺癌、卵巢癌、乳腺癌、子宫内膜癌、多发性骨髓瘤、黑色素瘤、淋巴瘤、包括小细胞肺癌的肺癌、肾癌、肝癌、结肠癌、结肠直肠癌、胰腺癌、胃癌和脑癌(包括CNS肿瘤)。

[0044] 在一些实施方案中,所述CNS肿瘤选自由以下组成的组:胶质瘤、成胶质细胞瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质、脑血管瘤、脑膜瘤、成神经细胞瘤、成视网膜细胞瘤、成神经管细胞瘤和成人垂体腺瘤。

[0045] 在一些实施方案中,所述CNS肿瘤是成胶质细胞瘤。

[0046] 在一些实施方案中,所述CNS肿瘤是复发性或难治性成胶质细胞瘤。

[0047] 在一些实施方案中,受试者患有O6-甲基鸟嘌呤-甲基转移酶(MGMT)阳性或阴性CNS肿瘤。

[0048] 在一些实施方案中,所述受试者患有弗林蛋白酶阳性CNS肿瘤。

[0049] 在一些实施方案中,所述靶向IL-4的货物蛋白包含一个或多个货物部分。

[0050] 在一些实施方案中,所述靶向IL-4的货物蛋白包含毒素。

[0051] 在一些实施方案中,所述毒素包括细菌毒素、动物毒素或植物毒素。

[0052] 在一些实施方案中,所述毒素包括成孔毒素。

[0053] 在一些实施方案中,所述成孔毒素包括气溶素或气溶素原。

[0054] 在一些实施方案中,所述植物毒素包括三角梅核糖体失活蛋白或蓖麻毒素。

[0055] 在一些实施方案中,所述细菌毒素包括选自由以下组成的组中的毒素:假单胞菌外毒素、霍乱毒素或白喉毒素。

[0056] 在一些实施方案中,所述靶向IL-4的货物蛋白包括选自由以下组成的组中的BCL-2家族的促细胞凋亡成员:BAX、BAD、BAT、BAK、BIK、BOK、BID、BIM、BMF和BOK。

[0057] 在一些实施方案中,所述靶向IL-4的货物蛋白包括MDNA55(SEQ ID NO:65)或其衍生物或变体。

[0058] 在一些实施方案中,所述靶向IL-4的货物蛋白是MDNA55。

[0059] 在一些实施方案中,所述靶向IL-4的货物蛋白包含IL-4R抗体作为靶向部分。

[0060] 在一些实施方案中,所述IL-4R抗体是人源化抗体。

[0061] 在一些实施方案中,所述靶向IL-4的货物蛋白包括融合蛋白。

[0062] 在一些实施方案中,所述靶向IL-4的货物蛋白是瘤内给药的。

[0063] 在一些实施方案中,所述瘤内给药包括颅内给药。

[0064] 在一些实施方案中,所述靶向IL-4的货物蛋白是人工脑脊液(CSF)溶液和白蛋白中的调配物,其中,所述调配物与替代示踪剂共同给药于有此需要的受试者。

[0065] 在一些实施方案中,所述替代示踪剂是磁共振成像(MRI)造影剂。

[0066] 在一些实施方案中,所述替代示踪剂是钆结合示踪剂。

[0067] 在一些实施方案中,所述替代示踪剂选自由以下组成的组:钆-二亚乙基三胺五乙酸(Gd-DTPA)和钆结合白蛋白(Gd-白蛋白)。

[0068] 在一些实施方案中,所述白蛋白是人血清白蛋白。

[0069] 在一些实施方案中,所述人工CSF溶液是Elliotts B®溶液。

[0070] 在一些实施方案中,所述靶向IL-4的货物蛋白是经由颅内导管给药的。

- [0071] 在一些实施方案中,所述靶向IL-4的货物蛋白是通过对流增强递送(CED)给药的。
- [0072] 在一些实施方案中,所述靶向IL-4的货物蛋白是经由对流增强递送(CED)以单剂量给药的。
- [0073] 在一些实施方案中,所述靶向IL-4的货物蛋白是以单剂量给药的。
- [0074] 在一些实施方案中,所述靶向IL-4的货物蛋白是以约90 μ g (60mL中1.5 μ g/mL)、约240 μ g (40mL中6 μ g/mL)或约300 μ g (100mL中3 μ g/mL)的单剂量给药的。
- [0075] 在一些实施方案中,所述靶向IL-4的货物蛋白是以60mL中1.5 μ g/mL的剂量给药的。
- [0076] 在一些实施方案中,所述靶向IL-4的货物蛋白是以40mL中6 μ g/mL的剂量给药的。
- [0077] 在一些实施方案中,所述靶向IL-4的货物蛋白是以100mL中3 μ g/mL的剂量给药的。
- [0078] 在一些实施方案中,所述靶向IL-4的货物蛋白是以约1.5 μ g/mL至约3 μ g/mL的单剂量给药的。
- [0079] 在一些实施方案中,所述靶向IL-4的货物蛋白以单剂量给药1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天。
- [0080] 在一些实施方案中,所述靶向IL-4的货物蛋白是以1次、2次、3次、4次或5次输注给药的。
- [0081] 在一些实施方案中,根据前述权利要求中任一项所述给药所述靶向IL-4的货物蛋白,然后停止所述给药约1天至约8天,任选地停止所述给药1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天,随后根据前述权利要求中任一项所述进行给药,并且只要治疗所述CNS肿瘤需要则重复这种给药和停止给药的模式。
- [0082] 在一些实施方案中,所述靶向IL-4的货物蛋白是经由包括1至3个导管的一个或多个颅内导管给药的。
- [0083] 在一些实施方案中,所述靶向IL-4的货物蛋白是通过所述导管以约5 μ L/min/导管至约20 μ L/min/导管的流速或约15 μ L/min/导管的流速给药的。
- [0084] 在一些实施方案中,所述靶向IL-4的货物蛋白是通过所述导管以1.5 μ g/mL的浓度和约15 μ L/min/导管的流速给药的。
- [0085] 在一些实施方案中,所述靶向IL-4的货物蛋白与类固醇组合使用。
- [0086] 在一些实施方案中,所述靶向IL-4的货物蛋白与以等于或低于4mg/天的剂量给药的类固醇组合使用。
- [0087] 在一些实施方案中,本发明提供了一种试剂盒,其包含如前述权利要求中任一项所述的靶向IL-4的货物蛋白,其中,所述试剂盒包含:IL-4R抗体;关于在基于免疫组织化学(IHC)的测定中使用所述IL-4R抗体的说明书;以及关于确定百分比评分或H-评分的说明书。

附图说明

- [0088] 图1. IL-13R α 1和IL-13R α 2选择性IL-13变体的比较分析。针对所示残基数给出人类IL-13和IL-13R α 1和IL-13R α 2选择性变体序列。通过表面等离子共振确定动力学和亲和力参数。
- [0089] 图2A至图2B. 提供了IgG1、IgG2、IgG3和IgG4序列的实例。

- [0090] 图3A至图3C.与本发明的组合一起使用的示例性抗PD-1抗体。
- [0091] 图4A至图4F.与本发明的组合一起使用的示例性抗PD-L1抗体。
- [0092] 图5A至图5B.示例性溶瘤病毒。
- [0093] 图6.数据显示IL-4R α 的测定转移一致性。
- [0094] 图7.数据显示成胶质细胞瘤中用于CAP/CLIA敏感性测试的IL-4R α 评分。
- [0095] 图8A至图8D.8A) IL-4R α 阳性阈值由GBM中的H评分值确定。8B) IL-4R α 阳性阈值由GBM中 $\geq 1+$ 强度的染色百分比确定。8C) IL-4R α 阳性阈值由GBM中 $\geq 2+$ 强度的染色百分比确定。8D) IL-4R α 阳性阈值由GBM中 $\geq 3+$ 强度的染色百分比确定。
- [0096] 图9A至图9B.9A) IHC程序-TechMate协议。9B) 抗体规格和测定条件。
- [0097] 图10.GBM中的IL-4R α 和兔IgG染色。GBM组织中各种水平的IL-4R α 反应性的代表性图像。该图还包括对应的代表性兔IgG阴性对照。所有兔IgG同种型阴性对照在所测试的GBM肿瘤的敏感性面板中均无反应。
- [0098] 图11.GBM中IL-4R α 的CAP/CLIA精度和再现性。
- [0099] 图12A至图12B.用于特异性测试的多正常人类组织中的IL-4R α 评分。
- [0100] 图13.GBM治疗途径的示意图。
- [0101] 图14.图像数据显示高流量图像引导的CED改善了分布。
- [0102] 图15.图像数据显示MDNA55轨迹规划和分布分析(使用BrainlabiPlan®Flow软件)。
- [0103] 图16.数据显示与已批准的rGBM(复发性GBM)疗法相比在低剂量MDNA55下有希望的存活率。
- [0104] 图17.图像数据显示首次诊断时获得的GBM组织中的IL-4R表达。通过免疫组织化学(IHC)对首次诊断GBM时获得的存档组织进行IL-4R α 表达分析。使用H-评分法对GBM样品的细胞质IL-4R α 反应性进行评分:H-评分从0到75=无表达到低表达;H-评分从76到150=中等表达;H-评分从151到225=高表达;以及H评分从226到300=极高表达。IL-4R阴性=H-评分 ≤ 75 。IL-4R阳性=H-评分 > 75 。
- [0105] 图18.IL-4R阳性与更具侵袭性的疾病(从初次诊断到复发的时间较短)有关。接受MDNA55治疗的受试者从初次诊断到首次复发的时间(n=24)。Kaplan-Meier图显示与中等至高H-评分(H-评分 > 75)受试者相比低H-评分(H-评分 ≤ 75)受试者中从初次诊断到首次复发的时间。H-评分 ≤ 75 与H-评分 > 75 的受试者到第1次复发的中位时间分别为16.7个月与10.3个月。对数秩(Mantel-Cox)测试p-值=0.2123。
- [0106] 图19.IL-4R+受试者在用MDNA55治疗后显示出更好的存活结果。根据IL-4R H-评分(n=24),当前研究中受试者的存活率。Kaplan-Meier图显示与当前研究中的中等到高H-评分(H-评分 > 75)受试者的存活率相比低H-评分(H-评分 ≤ 75)受试者的存活率。H-评分 ≤ 75 与H-评分 > 75 的受试者的中位OS分别为8.5个月与15.2个月。对数秩(Mantel-Cox)测试p-值=0.0909。数据截止日期为2019年1月16日。
- [0107] 图20.成像数据显示IL-4R+受试者在MDNA55治疗后出现肿瘤反应。
- [0108] 图21.MDNA55呈现出有希望的收益-风险概况,尤其是在IL-4R+复发性GBM中。顶部黑色矩形:IL-4R+与更具侵袭性的疾病有关。底部黑色矩形:MDNA55改善了IL-4R+rGBM的存活结果。

[0109] 图22.根据IL-4R H-评分(n=24),当前研究中受试者的无进展存活期。Kaplan-Meier图显示与当前研究中的中等到高H-评分(H-评分>75)受试者的PFS相比低H-评分(H-评分≤75)受试者的PFS。H-评分≤75与H-评分>75的受试者的中位PFS分别为1.9个月与3.7个月。对数秩(Mantel-Cox)测试p-值=0.1156。

[0110] 图23A例示了MDNA55临床研究设计的总结。图23B总结了患者人口统计数据。KPS是Karnofsky性能评分。

[0111] 图24A显示了临床研究中登记的前40名受试者的存活百分比。图24B显示了具有高或低IL-4R表达的受试者中的存活百分比。对40名受试者中的36名进行了IL-4R表达评估。显示了中等总存活率(mOS)和12个月存活率(OS-12)。

[0112] 图25A显示了MDNA55治疗后具有或不具有甲基化MGMT基因启动子的受试者中的存活百分比。图25B显示了MDNA55治疗后两组受试者中的存活百分比。一组具有未甲基化的MGMT基因启动子和高水平的IL-4R表达,而另一组具有未甲基化的MGMT基因启动子和低水平的IL-4R表达。

[0113] 图26A显示了在MDNA55治疗后类固醇使用量高或低的受试者中的存活百分比。图26B显示了在MDNA55治疗后两组受试者的存活百分比。一组受试者的类固醇使用量低IL-4R表达水平高,而另一组受试者的类固醇使用量低IL-4R表达水平低。

[0114] 图27显示了在MDNA55治疗后表现出早期发作反应的受试者的脑部MRI图像。该患者具有野生型异柠檬酸脱氢酶(IDH)、未甲基化的MGMT基因启动子、高IL-4R表达和2次既往复发。

[0115] 图28显示了在MDNA55治疗后表现出假性进展后延迟发作反应的受试者的脑部MRI图像。该患者具有野生型异柠檬酸脱氢酶(IDH)、甲基化的MGMT基因启动子、高IL-4R表达和1次既往复发。

[0116] 图29显示了在MDNA55治疗后表现出假性进展后延迟发作反应的受试者的脑部MRI图像。该患者具有野生型异柠檬酸脱氢酶(IDH)、甲基化的MGMT基因启动子、高IL-4R表达和1次既往复发。箭头指示活动性肿瘤块。

[0117] 图30显示了用MDNA55治疗的受试者中肿瘤体积变化的分布。通过MRI测量肿瘤体积变化,并根据基线评估结果。治疗后肿瘤体积缩小、稳定或进展。基于肿瘤大小缩小或稳定的受试者的百分比计算肿瘤控制率。

[0118] 图31显示了用MDNA55治疗后受试者中肿瘤体积变化的分布。通过MRI测量肿瘤体积变化,并根据最低点评估结果。治疗后肿瘤体积缩小、稳定或进展。基于肿瘤大小缩小或稳定的受试者的百分比计算肿瘤控制率。

[0119] 图32A和图32B显示了MDNA55治疗后受试者的存活百分比,其中,受试者分为两组,一组受试者在治疗后肿瘤体积缩小或稳定,而另一组受试者在治疗后肿瘤体积进展。

[0120] 图33A显示了在用癌症药物(包括替莫唑胺(TMZ)、卡莫司汀(商品名为Gliadel®)、洛莫司汀(LOM)、贝伐单抗(商品名为Avastin®)或MDNA55)治疗后受试者的中等总存活期(月)。图33B显示了用癌症药物(包括替莫唑胺(TMZ)、卡莫司汀(商品名为Gliadel®)、洛莫司汀(LOM)、贝伐单抗(商品名为Avastin®)或MDNA55)治疗后受试者的12个月百分比存活率。n表示测试的受试者的数量。

具体实施方式

[0121] 为了更容易理解本公开,下文以及整个说明书中定义了某些术语和表述。

[0122] 已使用对流增强递送 (CED) 将MDNA55与示踪剂(一种MRI造影剂)一起共同给药,从而允许实时监测肿瘤内部和周围的药物分布。MDNA55是一种靶向免疫毒素,由白细胞介素-4 (cpIL-4) 的生物工程循环排列版本(结合结构域)与有效细菌毒素的截短版本——铜绿假单胞菌外毒素 (PE) A (催化结构域) 融合而组成 (Kreitman等人,1994)。MDNA55与细胞表面表达的白细胞介素-4受体 (IL-4R) 结合,然后整个复合物被内吞。在通过癌细胞核内体中发现的高浓度弗林蛋白酶样蛋白酶进行切割和活化后,截短的PE的催化结构域被释放到细胞溶质中,在细胞溶质中其经由延伸因子-2的ADP核糖基化和通过半胱天冬酶活化诱导细胞凋亡而诱导细胞死亡 (Wedekind等人,2001)。不表达IL-4R靶标的细胞不会与MDNA55结合,因此不会发生PE介导的细胞死亡。作用机制如图1所示。值得注意的是,PE部分被工程改造为保留催化结构域,但不保留细胞结合结构域;这种方法背后的基本原理是具有内置的安全机制,借由该安全机制,在PE无意中从IL-4上被切割下来的情况下,它不会有毒,因为PE的结合结构域被去除,因此它无法内化到细胞中并阻止蛋白质合成。然而,仍然需要用于确定患者群体、患者群体中的治疗效果和治疗结果的生物标志物。本发明满足了这种需要。

[0123] A. 定义

[0124] 本文引用的所有参考文献均如同完整阐述一样通过引用其整体并入本文。除非另外定义,否则本文中所使用的技术术语和科学术语的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同。Singleton等人,《微生物学和分子生物学词典第3版 (Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3rd ed.)》,J.Wiley&Sons (纽约,纽约州2001);March,《高级有机化学反应、机理和结构第5版 (Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 5th ed.)》,J.Wiley&Sons (纽约,纽约州2001);以及Sambrook和Russell,《分子克隆:实验室手册第3版 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed.)》,冷泉港实验室出版社 (Cold Spring harbor Laboratory Press) (冷泉港,纽约州2001)为本领域技术人员提供了本公开中使用的许多术语的一般指南。在适当的情况下,除非另有说明,否则通常根据制造商定义的方案和/或参数实施涉及使用市售试剂盒和试剂的程序。

[0125] 如本文所使用的,在本公开方法中使用的遗传编码的L-对映体氨基酸的缩写是常规的,并且如下表1所示。

[0126] 表1:氨基酸缩写

[0127]

氨基酸	单字母符号	常用缩写
丙氨酸	A	Ala
精氨酸	R	Arg
天冬酰胺	N	Asn
天冬氨酸	D	Asp
半胱氨酸	C	Cys
谷氨酰胺	Q	Gln
谷氨酸	E	Glu
甘氨酸	G	Gly

组氨酸	H	His
异亮氨酸	I	Ile
亮氨酸	L	Leu
赖氨酸	K	Lys
蛋氨酸	M	Met
苯丙氨酸	F	Phe
脯氨酸	P	Pro
丝氨酸	S	Ser
苏氨酸	T	Thr
色氨酸	W	Trp
酪氨酸	Y	Tyr
缬氨酸	V	Val

[0128] “亲水性氨基酸”是指根据归一化的一致疏水性标度 (Eisenberg等人, 1984,《分子生物学杂志 (J.Mol.Biol.)》179:125-142) 表现出小于零的疏水性的氨基酸。遗传编码的亲水性氨基酸包括Thr (T)、Ser (S)、His (H)、Glu (E)、Asn (N)、Gln (Q)、Asp (D)、Lys (K) 和Arg (R)。

[0129] 表2中提供了各种术语和缩写。

[0130] 表2:缩写和术语:

[0131]

PA	气溶素原
BAD	BCL2相关的细胞死亡激动剂
BAX	BCL2相关的X蛋白
EGF	表皮生长因子
EpCAM	上皮蛋白细胞粘附分子
GM-CSF	粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子
IL-4	白细胞介素-4 (也称为IL4)
IL-13	白细胞介素-13 (也称为IL13)
PSMA	前列腺特异性膜抗原

[0132] 提供以下术语和方法的解释以更好地描述本公开并指导本领域普通技术人员实践本公开。除非上下文另有明确规定, 否则单数形式的“一个(a)”、“一个(an)”和“该(the)”是指一个或多于一个。例如, 术语“包含靶向IL-4的货物蛋白”包括单个或多个靶向IL-4的货物蛋白, 并且被认为等同于表述“包含至少约一个靶向IL-4的货物蛋白”。除非上下文另有明确指示, 否则术语“或”是指所述替代元素中的单个元素或者两个或更多个元素的组合。如本文所使用的, “包含”是指“包括”。因此, “包含A或B”是指“包括A、B或A和B”, 但不排除附加元素。

[0133] 除非另外说明, 否则本文中所使用的所有技术术语和科学术语的含义与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同。

[0134] 登录号: 分配给美国国立卫生研究院维护的NCBI数据库 (国家生物技术信息中心) 中各种核酸和氨基酸序列的参考号。本说明书中列出的登录号如提交本申请之日的数据库中所提供的通过引用并入本文。

[0135] 给药:向受试者提供或给予药剂,诸如包含靶向IL-4的货物蛋白的组合物。示例性给药途径包括但不限于口服、注射(诸如皮下、肌肉、皮内、腹膜内、瘤内和静脉内)、舌下、直肠或经直肠、经皮、鼻内、阴道、宫颈和吸入途径。在具体实例中,瘤内包括局部性递送、区域性递送、病灶性递送或对流增强递送。在其他具体实例中,给药包括经尿道或经会阴给药。在一个实例中,替代磁共振成像示踪剂(例如钆结合白蛋白(Gd-白蛋白))能与靶向IL-4的货物蛋白组合给药以确定靶向IL-4的货物蛋白是否以治疗剂量被安全地递送至肿瘤,诸如脑肿瘤,同时实时监测其分布(参见例如Murad等人,《临床癌症研究(Clin.Cancer Res.)》12(10):3145-51 2006)。

[0136] 抗体:免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即含有抗原结合位点的分子,该抗原结合位点与表位特异性结合(与表位发生免疫反应),诸如癌细胞和/或癌症干细胞所展示的表位。抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体以及人源化抗体。抗体还包括亲和体。亲和体在功能上模拟单克隆抗体,但基于蛋白A。亲和体可以被工程改造为高亲和力配体,用于与靶向部分结合。

[0137] 天然存在的抗体(例如,IgG、IgM、IgD)包括通过二硫键互连的四个多肽链、两个重(H)链和两个轻(L)链。然而,已证明能够通过天然存在的抗体的片段执行抗体的抗原结合功能。因此,这些抗原结合片段也旨在由术语“抗体”指定。术语“抗体”中所涵盖的结合片段的具体的非限制性实例包括:(i)由VL、VH、CL和CH1结构域组成的Fab片段;(ii)由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iii)由抗体(scFv)和scFv分子的单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段,这些结构域彼此联接以形成二价二聚体(双链抗体)或三价三聚体(三链抗体);(iv)由VH结构域组成的dAb片段(Ward等人,《自然(Nature)》341:544-546,1989);(v)分离的互补决定区(CDR);以及(vi)F(ab')₂片段,该片段是包含在铰链区处通过二硫桥联接的两个Fab片段的二价片段。

[0138] 生产多克隆和单克隆抗体的方法是本领域普通技术人员已知的,并且可获得许多抗体。参见,例如,Coligan,《免疫学实验指南(Current Protocols in Immunology)》Wiley/Greene,纽约州,1991;以及Harlow和Lane,《抗体:实验室手册(Antibodies: A Laboratory Manual)》冷泉港实验室出版社,纽约州,1989;Stites等人,(编辑)《基础与临床免疫学(Basic and Clinical Immunology)》(第4版)Lange Medical Publications,洛斯阿图斯,加利福尼亚州及其中引用的参考文献;Goding,《单克隆抗体:原理与实践(Monoclonal Antibodies:Principles and Practice)》(第2版)学术出版社,纽约,纽约州,1986;以及Kohler和Milstein,《自然(Nature)》256:495-497,1975。其他合适的抗体制备技术包括选择噬菌体或类似载体中的重组抗体文库。参见Huse等人,《自然(Science)》246:1275-1281,1989;以及Ward等人,《自然(Nature)》341:544-546,1989。

[0139] 免疫球蛋白及其某些变体是已知的,并且有很多已在重组细胞培养物中被制备出来(例如,参见美国专利第4,745,055号;美国专利第4,444,487号;WO 88/03565;EP 256,654;EP 120,694;EP 125,023;Faoukner等人,《自然(Nature)》298:286,1982;Morrison,《免疫学杂志(J.Immunol.)》123:793,1979;Morrison等人,《免疫学年度评论(Ann Rev.Immunol)》2:239,1984)。用于制备嵌合(人源化)抗体的详细方法可见于美国专利第5,482,856号。关于人源化和其他抗体生产和工程技术的更多细节可见于Borrebäck(编辑),《抗体工程(Antibody Engineering)》,第2版Freeman and Company,纽约州,1995;

McCafferty等人,《抗体工程,一种实用方法(Antibody Engineering, A Practical Approach)》, IRL牛津出版社, 牛津, 英格兰, 1996以及Paul《抗体工程方案(Antibody Engineering Protocols)》Humana出版社, Towata, 新泽西州, 1995。

[0140] 在一些实例中, 样品中抗体以比其他分子的结合常数至少大 10^3M^{-1} 、大 10^4M^{-1} 或大 10^5M^{-1} 的结合常数与靶蛋白(例如, 细胞表面受体, 诸如IL4受体)特异性结合。在一些实例中, 特异性结合试剂(诸如抗体(例如, 单克隆抗体)或其片段)具有1nM或更小的平衡常数(K_d)。例如, 特异性结合剂可以以至少约 $0.1 \times 10^{-8}\text{M}$ 、至少约 $0.3 \times 10^{-8}\text{M}$ 、至少约 $0.5 \times 10^{-8}\text{M}$ 、至少约 $0.75 \times 10^{-8}\text{M}$ 、至少约 $1.0 \times 10^{-8}\text{M}$ 、至少约 $1.3 \times 10^{-8}\text{M}$ 、至少约 $1.5 \times 10^{-8}\text{M}$ 或至少约 $2.0 \times 10^{-8}\text{M}$ 的结合亲和力与靶蛋白结合。 K_d 值可以例如通过竞争性ELISA(酶联免疫吸附测定)或使用表面等离子体共振装置(诸如Biacore T100, 可从新泽西州皮斯卡塔韦的Biacore, Inc. 获得)来确定。

[0141] 结合(binds)或结合(binding): 两个或更多个分子之间的缔合(其中, 该两个或更多个分子在物理距离上彼此非常接近), 诸如复合物的形成。示例性复合物有受体-配体对或抗体-抗原对。通常, 复合物中分子的结合越强, 它们的解离速率就越慢。特异性结合是指药剂与特异性靶标之间的优先结合。例如, 特异性结合是指这样的情况: 包含对癌症干细胞抗原具有特异性的靶向部分的靶向IL-4的货物蛋白与癌症干细胞结合, 但不与癌症干细胞附近不展示靶标的其他细胞显著结合。这种结合可以是配体与受体之间的特异性非共价分子相互作用。在特定实例中, 在靶向IL-4的货物蛋白与癌症干细胞接触后, 通过使用本文所述的方法之一检测癌症干细胞生长抑制来评估结合。

[0142] 这种相互作用由结合配偶体之间(或通常在每个结合配偶体的特定区域或部分之间)的一个或通常多个非共价键介导。与非特异性结合位点相比, 特异性结合位点是可饱和的。因此, 表征特异性结合的一种示例性方式是借助于特异性结合曲线。特异性结合曲线可显示例如随第一结合配偶体浓度变化的一个结合配偶体(第一结合配偶体)与固定量的另一结合配偶体结合的量。在这些条件下, 随着第一结合配偶体浓度增加, 第一结合配偶体的结合量将饱和。另与非特异性结合位点相比, 参与相互直接缔合(例如, 蛋白质-蛋白质相互作用)的特异性结合配偶体能够通过过量的任一特异性结合配偶体从这种缔合(例如, 蛋白质复合物)中被竞争性地去除(或置换)。此类竞争测定(或置换测定)在本领域中是众所周知的。

[0143] 癌症: 发生特征性退行性变化、分化丧失、生长速度加快、侵袭周围组织并具有转移能力的恶性肿瘤。残留癌症是在给予受试者以减少或根除癌症的任何形式的治疗后仍留在受试者中的癌症, 而复发性癌症是在这种治疗后复发的癌症。转移性癌症是身体中除原始(原发)癌症的起源部位之外转移性癌症起源的一个或多个部位处的癌症。在转移性癌症源自实体瘤的情况下, 一个或多个(例如, 许多个)另外的肿瘤块可能存在于原始肿瘤部位附近或远处的部位处。表述“播散性转移性结节”或“播散性转移性肿瘤”是指分散到一个或多个解剖学部位的多个(通常为许多个)转移性肿瘤。例如, 腹膜内的播散性转移性结节(即播散性腹膜内癌)可由位于腹膜内或腹膜外的器官的肿瘤产生, 并且可位于腹膜内的多个部位处。此类转移性肿瘤本身可离散地位于器官表面, 或者可侵入潜在的组织。

[0144] 货物部分: 肽(例如, 蛋白质片段或全长蛋白质)或其他分子, 其可以起到显著减少或抑制癌症干细胞生长的作用。在一些实例中, 货物部分可触发细胞死亡(例如, 细胞凋

亡)。示例性货物部分包括毒素,诸如源自植物、微生物和动物的毒素。在其他实例中,货物部分是通常有助于控制细胞生命周期的蛋白质,例如货物部分可以是触发细胞死亡的任何蛋白质,诸如经由细胞凋亡途径或非细胞凋亡途径。在一些实例中,货物部分不是蛋白质,而是可以起到显著降低或抑制癌症干细胞生长的作用的另一种分子,诸如毒胡萝卜素。在一些实例中,货物部分由肿瘤相关蛋白酶诸如PSA活化。下表3中提供了示例性货物部分和示例性GenBank登录号。除了天然货物序列之外,还可以使用变体序列,诸如比天然序列具有更大生物活性的突变体序列。

[0145] 表3:示例性货物部分序列

货物部分	登录号*
气溶素	ABR14715.1; ABR14714.1
气溶素原	AAA21938.1; P09167.2; 美国专利第 7,282,476 号(其中的气溶素原序列通过引用并入本文)
三角梅核糖体失活蛋白	AAL35962 和美国专利第 6,737,511 号中的 SEQ ID NO: 9, 以及美国专利第 7,339,031 号和 WO 2005/090579 中提供的变体序列(其中的三角梅核糖体失活蛋白序列通过引用并入本文)
假单胞菌外毒素	1IKPA; AAB59097.1; AAF90003.1 (也请参见美国专利第 6,011,002 号的 SEQ ID NO: 1)
[0146] Bcl-2 促细胞凋亡蛋白诸如 BAD 和 BAX	BAD: CAG46757; AAH01901.1; CAG46733.1; 以及美国专利第 6,737,511 号中提供的序列
	BAX: CAE52909.1; AAO22992.1; EAW52418.1
霍乱毒素	BAA06291.1; ACF35010.1; BAA06288.1; 以及美国专利申请序列号 61/058,872 中提供的变体序列(其中的变体霍乱毒素序列通过引用并入本文)
核糖核酸酶 A	BAA05124.1 ; NP_937877.1 ; NP_115961.2 ; Q5GAN4.1; 以及 PCT 申请号 WO2007/041361 中提供的序列(其中的 rapLR1 序列通过引用并入本文)

[0147] *GenBank编号及其相应的核酸序列通过引用并入本文。

[0148] 接触(contact)或接触(contacting):是指一个物体与另一个物体的物理距离相对较近。通常,接触涉及将两个或更多个物体放置成在物理距离上彼此非常接近,以赋予物体相互作用的机会。例如,可以通过将靶向IL-4的货物蛋白(其可以在溶液中)放置在细胞附近(例如通过将靶向IL-4的货物蛋白注射到患有癌症的受试者中)来实现靶向IL-4的货

物蛋白与癌症干细胞相接触。类似地,靶向IL-4的货物蛋白可以在体外与细胞接触,例如通过将靶向IL-4的货物蛋白添加到细胞在其中生长的培养基中。

[0149] 减少:降低某物的质量、量或强度。在一个实例中,疗法(诸如用靶向IL-4的货物蛋白治疗)可减少癌症干细胞群体(诸如通过减少肿瘤的大小、肿瘤的体积、肿瘤的转移、癌细胞和/或癌症干细胞的数量或它们的组合)或与癌症相关的一种或多种症状(例如与不存在该疗法时的反应相比)。在特定实例中,疗法在治疗后可减少肿瘤的大小、肿瘤的体积、癌细胞和/或癌症干细胞的数量、或癌症的转移或它们的组合,诸如减少至少约10%、至少约20%、至少约50%或甚至至少约90%。可使用本文公开的方法来测量此类减少。

[0150] 诊断:鉴定医疗病症或疾病的过程,例如根据一个或多个诊断程序的结果来鉴定。在特定实例中,包括确定受试者的预后(例如,一段时间内存活的可能性,诸如在6个月、1年或5内存活的可能性)。在具体实例中,通过使用癌症干细胞表面上的一个或多个靶标检测样品中癌症干细胞的存在来诊断癌症。例如,诊断可包括确定癌症的特定阶段或转移部位的存在。

[0151] 接头:用于将一种或多种试剂连接到一种或多种其他试剂的分子。例如,接头可用于将一个或多个货物部分连接到一个或多个靶向部分。接头的特定非限制性实例包括树状聚合物,诸如合成聚合物、肽、蛋白质和碳水化合物。接头还可含有一个或多个蛋白酶切割位点或可经由氧化和/或还原对切割敏感。

[0152] 药学上可接受的载剂:术语“药学上可接受的载剂”是指在本公开中有用的药学上可接受的载剂(媒剂)是常规的。《雷明顿氏药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,E.W.Martin著,Mack Publishing Co.,伊斯顿,宾夕法尼亚州,第15版(1975)描述了适用于一种或多种治疗剂或诊断剂(诸如本文提供的靶向IL-4的货物蛋白分子中的一种或多种)的药物递送的组合物和调配物。

[0153] 一般而言,载剂的性质将取决于所采用的特定给药模式。例如,肠胃外调配物可包括作为媒剂的可注射流体,该可注射流体包括药学和生理学上可接受的流体,诸如水、生理盐水、平衡盐溶液、右旋糖水溶液、甘油等。除生物中性载剂之外,待给药的药物组合物可含有少数量的无毒辅助物质,诸如润湿剂或乳化剂、防腐剂和pH缓冲剂等,例如乙酸钠或去水山梨糖醇单月桂酸酯、乳酸钠、氯化钾、氯化钙和油酸三乙醇胺。

[0154] 药剂或药物:当单独地或与其他治疗剂或药学上可接受的载剂组合地给药于受试者时能够引起期望治疗效果的化学化合物或组合物。在特定实例中,药剂(诸如包含靶向IL-4的货物蛋白的药剂)可治疗癌症,例如通过减小肿瘤的大小(诸如体积或减少癌细胞和/或癌症干细胞的数量)、减少癌症的转移或它们的组合来治疗。

[0155] 重组:重组分子(诸如重组核酸分子或蛋白质)具有非天然存在的序列或具有通过两个原本分开的序列片段的人工组合制成的序列。这种人工组合通常通过化学合成来实现,或者更常见的是通过对分离的核酸片段进行人工操纵(例如通过基因工程技术)来实现。重组蛋白质是由表达编码该蛋白质的重组核酸产生的蛋白质。本公开的靶向IL-4的货物蛋白通常是重组的。

[0156] 样品:生物试样,诸如含有生物分子(诸如核酸分子、蛋白质或两者)的样品。示例性样品是含有来自受试者的细胞或细胞裂解物的样品,诸如存在于外周血(或其一部分,诸如血清)、尿液、唾液、组织活检、面颊拭子、手术试样、细针抽吸物、宫颈样品和尸检材料中

的细胞或细胞裂解物。在具体实例中,从肿瘤(例如来自活检的组织切片)中获得样品,其可包括作为非癌细胞和/或非癌症干细胞以及癌细胞和/或癌症干细胞两者的肿瘤细胞。在一些实施方案中,肿瘤样品来自中枢神经系统(CNS)肿瘤。

[0157] 序列同一性:两个或更多个核酸序列之间或者两个或更多个氨基酸序列之间的同一性/相似性,以序列之间的同一性或相似性表示。序列同一性可以用百分比同一性来衡量;百分比越高,则序列同一性越高。序列相似性可以用百分比相似性来衡量(其考虑了保守氨基酸取代);百分比越高,则序列相似性越高。当使用标准方法比对时,核酸或氨基酸序列的同源物或直向同源物具有相对较高程度的序列同一性/相似性。

[0158] 用于进行比较的序列比对方法是本领域公知的。各种程序和比对算法描述于:Smith和Waterman,《应用数学进展(Adv. Appl. Math.)》2:482,1981;Needleman和Wunsch,《分子生物学杂志(J. Mol. Biol.)》48:443,1970;Pearson和Lipman,《美国国家科学院学报(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)》85:2444,1988;Higgins和Sharp,《基因(Gene)》,73:237-44,1988;Higgins和Sharp, CABIOS 5:151-3,1989;Corpet等人,《核酸研究(Nuc. Acids Res.)》16:10881-90,1988;Huang等人《生物科学中的计算机应用(Computer Appls. in the Biosciences)》8,155-65,1992;以及Pearson等人,《分子生物学方法(Meth. Mol. Bio.)》24:307-31,1994。Altschul等人,《分子生物学杂志(J. Mol. Biol.)》215:403-10,1990详细介绍了序列比对方法和同源性计算。

[0159] NCBI基本局部比对搜索工具(BLAST)(Altschul等人,《分子生物学杂志(J. Mol. Biol.)》215:403-10,1990)可从多个来源获得,包括国家生物信息中心(NCBI,国家医学图书馆,38A楼,8N805室,贝塞斯达,马里兰州20894)和英特网,用于与序列分析程序blastp、blastn、blastx、tblastn和tblastx结合使用。更多信息可在NCBI网站上查找。

[0160] BLASTN可用于比较核酸序列,而BLASTP可用于比较氨基酸序列。要比较两个核酸序列,可将选项设置如下:将-i设置为含有第一个待比较核酸序列的文件(诸如C:\seq1.txt);将-j设置为含有第二个待比较核酸序列的文件(诸如C:\seq2.txt);将-p设置为blastn;将-o设置为任何期望的文件名(诸如C:\output.txt);将-q设置为-l;将-r设置为2;并且所有其他选项都保留其默认设置。例如,以下命令可用于生成含有两个序列之间的比较的输出文件:C:\B12seq-i c:\seq1.txt-j c:\seq2.txt-p blastn-o c:\output.txt-q -l-r 2。

[0161] 要比较两个氨基酸序列,可将B12seq的选项设置如下:将-i设置为含有第一个待比较氨基酸序列的文件(诸如C:\seq1.txt);将-j设置为含有第二个待比较氨基酸序列的文件(诸如C:\seq2.txt);将-p设置为blastp;将-o设置为任何期望的文件名(诸如C:\output.txt);并且所有其他选项都保留其默认设置。例如,以下命令可用于生成含有两个氨基酸序列之间的比较的输出文件:C:\B12seq-i c:\seq1.txt-j c:\seq2.txt-p blastp-o c:\output.txt。如果这两个被比较的序列共享同源性,则指定的输出文件会将这些同源性区域呈现为对齐的序列。如果这两个被比较的序列不共享同源性,则指定的输出文件将不会呈现对齐的序列。

[0162] 一旦对齐,则通过计算两个序列中均出现相同的核苷酸或氨基酸残基的位置的数量来确定匹配数。百分比序列同一性是通过将匹配数除以已鉴定序列中列出的序列的长度或除以较接长度(诸如来自自己鉴定序列中列出的序列的100个连续核苷酸或氨基酸残基)然

后将所得值乘以100来确定的。例如,与具有1154个核苷酸的测试序列比对时具有1166个匹配的核酸序列与测试序列有75.0%的同一性($1166/1554 \times 100 = 75.0$)。百分比序列同一性值四舍五入到最接近的十分位。例如,75.11、75.12、75.13和75.14下舍入为75.1,而75.15、75.16、75.17、75.18和75.19上舍入为75.2。长度值将始终是整数。

[0163] 对于大于约30个氨基酸的氨基酸序列的比较,使用设置为默认参数的默认BLOSUM62矩阵来采用Blast 2序列函数(空位存在成本(gap existence cost)为11,并且每个残基空位成本为1)。同源物的典型特征是具有在使用NCBI Basic Blast 2.0(具有数据库诸如nr或swissprot数据库的空位的blastp)与氨基酸序列进行全长比对中计数的至少70%的序列同一性。将利用blastn程序搜索的查询结果用DUST进行过滤(Hancock和Armstrong,1994,《生物科学中的计算机应用(Comput.Appl.Biosci.)》10:67-70)。其他程序使用SEG。此外,还可进行手动比对。当通过这种方法评估时,具有甚至更大相似性的蛋白质将显示与本文提供的货物蛋白或靶向部分的增加的百分比同一性,诸如至少约75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%的序列同一性。

[0164] 当比对短肽(少于大约30个氨基酸)时,采用设置为默认参数(开放空位9,延伸空位1罚分)的PAM30矩阵使用Blast 2序列函数进行比对。当通过这种方法评估时,与参考序列具有甚至更大相似性的蛋白质将显示与本文提供的货物部分或靶向部分的增加的百分比同一性,诸如至少约60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%的序列同一性。当比较少于整个序列的序列同一性时,同源物通常会在10-20个氨基酸的短窗口内具有至少75%的序列同一性,并且可能具有至少85%、90%、95%或98%的序列同一性,具体取决于同源物与参考序列的同一性。在NCBI网站上描述了用于在此类短窗口内确定序列同一性的方法。

[0165] 受试者:活的多细胞脊椎动物生物体,该类别包括人类和非人类哺乳动物(诸如实验室或兽医学受试者)。

[0166] 靶向IL-4的货物蛋白:任何与癌症干细胞特异性结合并降低或抑制癌症干细胞生长或者杀死癌细胞和/或癌症干细胞的蛋白质。在一些实例中,靶向IL-4的货物蛋白可以靶向癌细胞和/或癌症干细胞及不是癌细胞和/或癌症干细胞的肿瘤(例如,癌症)细胞两者。靶向IL-4的货物蛋白包括靶向部分和货物部分,靶向部分与癌症干细胞特异性结合并且货物部分显著降低或抑制癌症干细胞的生长或杀死癌症干细胞。在一些实例中,货物部分引起与其相关的癌症干细胞死亡。因为在一些实例中,货物部分不是蛋白质,诸如化疗剂,并且在一些实例中,靶向部分不是蛋白质,所以在一些实例中,靶向IL-4的货物蛋白实际上不是蛋白质。

[0167] 靶向部分:任何与由癌症干细胞展示分子(本文称为靶标)结合的化合物,例如靶向部分可以是与靶标(例如受体)结合的抗体、与受体结合的配体(例如细胞因子或生长因子)、与受体结合的排列配体或对肿瘤相关蛋白酶切割敏感的肽序列。在一些实例中,靶向部分由肿瘤相关蛋白酶诸如PSA活化。通常,靶向部分比其结合其他类型的不展示靶标的细胞更有效地选择性地结合一种类型的展示靶标的细胞。可以选择靶向部分以选择性地结合肿瘤细胞(诸如癌细胞和/或癌症干细胞)的亚群。靶向部分包括特异性结合剂,诸如抗体、干细胞上靶标的天然配体(诸如IL-4)、此类天然配体的衍生物和免疫球蛋白A。在一些实例中,靶向部分没有生物活性(例如,不能活化受体),但保留与靶标结合的能力,从而将

靶向IL-4的货物蛋白引导至适当的细胞。

[0168] 表2提供了与示例性天然配体以及可用作靶向部分的其他抗原的序列有关的信息。在一些实例中,环状排列的配体(诸如环状排列的IL-4)可用于结合癌细胞和/或癌症干细胞。随着进一步研究的进行,将鉴定新的癌症干细胞特异性靶标。这些额外的标志物可用作结合靶向部分的靶标,并且可以制备靶向IL-4的货物蛋白以抑制展示此类配体的癌细胞和/或癌症干细胞的生长(或杀死展示此类配体的癌细胞和/或癌症干细胞)。本领域普通技术人员将理解,一旦已知标志物,就可以使用制备针对所鉴定的标志物的抗体的标准方法来制备对癌症干细胞标志物具有特异性的靶向部分,从而允许开发特异性靶向IL-4的货物蛋白。

[0169] 表4:示例性靶向部分序列

[0170]	待靶向的受体或抗原	登录号*
	IL-4	AAH70123; CAA57444.1; AAH67515.1 (还请参见美国专利第 6,011,002 号中描述的 SEQ ID NO: 2 和各种循环排列的配体)
	MDNA55	SEQ ID NO: 65
	IL-13	AAH96141.2; AAH96138.1; AAH96139.1

[0171] *GenBank编号及其相应的核酸序列通过引用并入本文。

[0172] 癌细胞上的靶标和/或癌细胞和/或癌症干细胞包括癌细胞和/或癌症干细胞的表面上所展示的小分子。针对此类靶标的抗体可用作靶向部分以及靶标及其衍生物的天然配体。

[0173] 治疗有效量:单独地或与药学上可接受的载剂或一种或多种另外的治疗剂一起诱导期望应答的药剂的量。以刺激期望反应(例如减轻已知患有癌症(包括癌细胞和/或癌症干细胞)的受试者的癌症症状)的治疗有效量给药治疗剂(诸如靶向IL-4的货物蛋白)。

[0174] 治疗剂的有效量可以通过许多不同的方式确定,诸如测定患有癌症的受试者的生理状况的改善。有效量也可以通过各种体外、体内或原位测定来确定。

[0175] 在治疗过程中,治疗剂可以单剂量或以多剂量给药,例如每周、每月或每两个月。然而,有效量可取决于所应用的来源、治疗的受试者、所治疗的病症的严重程度和类型以及给药的方式。

[0176] 在一个实例中,该量足以部分或完全减轻受试者中的癌症症状。治疗可能仅涉及暂时减缓癌症的进展,但也可能包括永久停止或逆转癌症的进展。例如,药物制剂可减少癌症的一种或多种症状(诸如肿瘤的大小或肿瘤的数量或癌细胞和/或癌症干细胞的数量),例如与不存在治疗制剂时的量相比将症状减少至少约20%、至少约50%、至少约70%、至少约90%、至少约98%或甚至至少约100%。

[0177] 治疗疾病:改善疾病或病理状况的体征或症状(诸如癌症的体征或症状)的治疗干预。治疗还可以引起病症(诸如癌症,特别是中枢神经系统(CNS)癌症或肿瘤)的缓解或治愈。在特定实例中,治疗包括预防疾病,例如通过抑制疾病的完全发展来预防,诸如预防肿瘤转移的发展。预防疾病未要求完全不存在异型增生或癌症。例如,减少至少约50%就足够了。

[0178] 肿瘤:是一种赘生物或非炎性异常组织块,由先前存在的组织的细胞产生。肿瘤可

以是良性(非癌性)的或恶性(癌性)的。血液肿瘤的例子包括但不限于:中枢神经系统(CNS)癌症或肿瘤。实体瘤(诸如肉瘤和癌)的例子包括但不限于脑肿瘤和CNS肿瘤(诸如神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、星形细胞瘤、成髓细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突胶质细胞瘤、脑血管瘤、脑膜瘤、成神经细胞瘤和成视网膜细胞瘤)。肿瘤包括复发性和/或难治性CNS肿瘤。

[0179] 难治性:对尝试的治疗形式无反应的疾病或病症,例如对标准治疗方法无反应的肿瘤。

[0180] 在充分条件下:用于描述任何允许期望活性的环境的表述。在一个实例中,包括在允许靶向IL-4的货物蛋白与样品中的癌症干细胞特异性结合的条件下将靶向IL-4的货物蛋白与肿瘤干细胞一起温育。在另一个实例中,包括将一种或多种靶向IL-4的货物蛋白与受试者中的一种或多种癌细胞和/或癌症干细胞接触而足以产生期望活性。在特定实例中,期望活性是减少此类癌细胞和/或癌症干细胞的生长或增殖或者杀死癌细胞和/或癌症干细胞。

[0181] 单位剂量:为了单独或共同产生期望效果(诸如治疗效果)而计算出的含有预定量的活性材料(诸如靶向IL-4的货物蛋白)的物理上离散的单位。可以使用单个单位剂量或多个单位剂量来提供期望效果,诸如治疗效果。

[0182] 如本文所使用的,术语“药学上可接受的载剂”包括但不限于与药物给药相容的盐水、溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。也可以将补充性活性化合物(例如抗生素)掺入到组合物中。

[0183] 如本文所使用的,术语“抗PD-1抗体”是指任何与PD-1结合的抗体,包括抑制性抗体。“抗PD-1抑制剂”是指结合并抑制PD-1的抑制剂。此类抗PD-1抗体和/或抑制剂包括但不限于纳武单抗、BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538、AMP224、CT-011和MK-3475等。

[0184] 如本文所使用的,术语“癌症”(或“癌性”)、“过度增殖性”和“赘生性”是指具有自主生长能力的细胞(即,以快速增殖的细胞生长为特征的异常状态或病症)。过度增殖性和赘生性疾病状态可以归类为病理性的(即,表征或构成疾病状态),或者可以将其归类为非病理性的(即,偏离正常但与疾病状态无关)。该术语意在包括所有类型的癌性生长或致癌过程、转移性组织或恶性转化的细胞、组织或器官,而不管组织病理学类型或侵袭阶段如何。“病理性过度增殖性”细胞出现在以恶性肿瘤生长为特征的疾病状态中。非病理性过度增殖性细胞的例子包括与伤口修复相关的细胞增殖。术语“癌症”或“赘生物”用于指各种器官系统的恶性肿瘤,包括影响肺、乳腺、甲状腺、淋巴腺和淋巴组织、生殖系统、胃肠器官和泌尿生殖道的恶性肿瘤,以及通常被认为包括恶性肿瘤的腺癌,诸如大多数结肠癌、肾细胞癌、前列腺癌和/或睾丸肿瘤、非小细胞肺癌、小肠癌和食道癌。癌症通常可包括前列腺癌、卵巢癌、乳腺癌、子宫内膜癌、多发性骨髓瘤、黑色素瘤、淋巴瘤、包括小细胞肺癌的肺癌、肾癌、结肠直肠癌、胰腺癌、胃癌和脑癌。

[0185] 术语“癌”是本领域公认的并且指上皮或内分泌组织的恶性肿瘤,包括呼吸系统癌、胃肠系统癌、泌尿生殖系统癌、睾丸癌、乳腺癌、前列腺癌、内分泌系统癌和黑色素瘤。“腺癌”是指源自腺组织或其中肿瘤细胞形成可识别的腺结构的癌。

[0186] 如本文所使用的,术语“造血赘生性病状”是指涉及造血起源的增生性/赘生性细胞(例如源自髓系、淋巴系或红细胞系)或其前体细胞的疾病。优选地,该疾病源自低分化的

急性白血病(例如,成红细胞白血病和急性巨核细胞白血病)。其他示例性骨髓病状包括但不限于急性早幼粒细胞白血病(APML)、急性骨髓性白血病(AML)和慢性骨髓性白血病(CML)(综述于Vaickus,L.(1991)《肿瘤学/血液学评论(Crit Rev.in Oncol./Hematol.)》11:267-97);淋巴恶性肿瘤包括但不限于急性淋巴细胞白血病(ALL),其包括B系ALL和T系ALL、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、幼淋巴细胞白血病(PLL)、毛细胞白血病(HLL)和华氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia,WM)。其他形式的恶性淋巴瘤包括但不限于非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)及其变体、外周T细胞淋巴瘤、成人T细胞白血病/淋巴瘤(ATL)、皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)、大颗粒淋巴细胞白血病(LGF)、霍奇金氏病(Hodgkin's disease)和Reed-Stenberg病。

[0187] 如本文所使用的,术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”等是指获得期望药理学和/或生理学效果。就完全或部分预防疾病或其症状而言,所述效果可以是预防性的,和/或就部分或完全治愈疾病和/或可归因于疾病的副作用而言可以是治疗性的。如本文所使用的,“治疗”涵盖哺乳动物,特别是人类的疾病的任何治疗,并且包括:(a)防止疾病在易患疾病或具有患病风险但尚未被诊断为患有疾病的受试者中发生;(b)抑制疾病,即,阻止其发展;以及(c)缓解疾病,即,使疾病消退。治疗有效量可以是减少肿瘤数量、肿瘤大小和/或增加存活率的量。

[0188] 术语“个体”、“受试者”和“患者”在本文中可互换地使用,并且是指哺乳动物,包括但不限于人类和非人类灵长类动物,包括猿猴和人类;哺乳类运动动物(例如,马);哺乳类农场动物(例如,绵羊、山羊等);哺乳类宠物(狗、猫等);以及啮齿动物(例如,小鼠、大鼠等)。

[0189] 术语“药学上可接受的”和“生理上可接受的”意指适用于一种或多种体内递送或接触给药途径的生物学上可接受的调配物,该调配物呈气体、液体或固体或其混合物的形式。“药学上可接受的”或“生理上可接受的”组合物是在生物学上或其它方面并非不合期望的材料,例如,可以将该材料给药于受试者而不会引起实质性的不合期望的生物学作用。因此,此类药物组合物可用于例如向受试者给药IL-4突变蛋白。

[0190] 如本文所使用的,短语“单位剂型”是指适合作为待治疗受试者的单一剂量的物理上离散的单位;每个单位含有预定的量,任选地与药物载剂(赋形剂、稀释剂、媒剂或填充剂)结合,该药物载剂以一个或多个剂量被给药时会产生期望的效果(例如,预防或治疗效果)。在一些实施方案中,治疗效果是减少肿瘤数量。在一些实施方案中,治疗效果是减小肿瘤大小。在一些实施方案中,治疗效果是增加存活率。

[0191] 在一些实施方案中,单位剂型可以在例如安瓿和小瓶内,包含液体组合物或处于冷冻干燥或冻干状态的组合物;例如,可以在体内给药或递送之前添加无菌液体载剂。单独的单位剂型可以被包含在多剂量试剂盒或容器中。与抗PD-1抗体组合的IL-4突变蛋白及其药物组合物可以按单个或多个单位剂型进行包装,以便于给药和剂量均匀。

[0192] “治疗有效量”将落入可通过实验和/或临床试验确定的相对较宽的范围内。例如,对于体内注射,例如直接注射到受试者的组织或脉管系统中(例如,肝组织或静脉)。通过建立剂量应答曲线的常规试验,本领域普通技术人员可以容易地确立其它有效剂量。

[0193] “有效量”或“足够量”是指以单个剂量或多个剂量单独地或与一种或多种其它组合物(诸如药物等治疗剂)、治疗、方案或治疗疗程药剂(包括例如疫苗疗程)组合地提供任

何持续时间(长期或短期)的可检测应答、任何可测量或可检测程度或任何持续时间(例如,数分钟、数小时、数天、数月、数年或治愈)的对受试者的预期或期望结果或益处的量。

[0194] 用于治疗(例如,改善或提供治疗益处或改进)的“有效量”或“足够量”的剂量通常在可测量的程度上有效地对疾病的一种、多种或所有不良症状、后果或并发症(例如由疾病引起或与疾病相关的一种或多种不良症状、病状、疾病、病理或并发症)提供反应,但是降低、减少、抑制、压抑、限制或控制疾病的进展或恶化也是令人满意的结果。在一些实施方案中,有效量是足以减少肿瘤数量的量。在一些实施方案中,有效量是足以减小肿瘤大小的量。在一些实施方案中,有效量是足以提高存活率的量。

[0195] “预防”及其语法变化意指在疾病发生之前接触、给药或体内递送到受试者的方法。可以在由疾病引起或与疾病相关的不良症状、病症、并发症等发展之前对受试者执行给药或体内递送。例如,可以使用筛选(例如,遗传的)来鉴定此类受试者作为所述方法和用途的候选物,但是受试者可能没有表现出疾病。因此,此类受试者包括那些因功能性基因产物(蛋白质)数量不足或缺乏,或产生引发疾病的畸变、部分功能性或非功能性基因产物(蛋白质)而被筛选为阳性的受试者;以及因引发疾病的畸变或缺陷(突变)基因产物(蛋白质)而被筛选为阳性的受试者,即使此类受试者没有表现出疾病症状。

[0196] II. IL-4和IL-13融合

[0197] 本文描述了靶向癌细胞和/或癌症干细胞并抑制癌细胞和/或癌症干细胞的生长和/或杀死癌细胞和/或癌症干细胞的IL-4和/或IL-13融合蛋白,包括例如MDNA55。这些分子(下文统称为靶向IL-4的货物蛋白)包括与癌症干细胞展示的靶标(例如,在一些实施方案中为IL-4R)结合的靶向部分以及提供细胞生长抑制(或细胞杀伤)活性的货物部分。靶向部分可直接地或通过本文进一步描述的多种接头中的一种或多种与货物部分结合。癌细胞和/或癌症干细胞通常具有自我更新的能力,从而产生与自身特性相似的后代。在一些实例中,所公开的靶向IL-4的货物蛋白可以靶向癌细胞和/或癌症干细胞及不是癌细胞和/或癌症干细胞的肿瘤(例如,癌症)细胞两者。因此,在一些实例中,靶向IL-4的货物蛋白可以杀死或抑制癌细胞和/或癌症干细胞及不是癌细胞和/或癌症干细胞的肿瘤(例如,癌症)细胞的生长。在其他实例中,诸如在针对CD 133的靶向部分的情况下,靶向IL-4的货物蛋白杀死或抑制肿瘤中癌细胞和/或癌症干细胞的生长,但不会杀死不是癌细胞和/或癌症干细胞的肿瘤细胞。

[0198] 靶向部分包括蛋白质和其他试剂,其功能是与癌症干细胞上的靶标特异性结合(但在一些实例中,靶标也可能存在于其他癌细胞上)。靶向部分包括特异性结合剂,诸如抗体、亲和体或受体配体。在一些实例中,靶向部分源自癌症干细胞展示的靶标(例如,细胞表面受体)的天然配体。源自天然配体的靶向部分可包括配体的完整氨基酸序列(例如,如果配体是从自然界中分离出来的,则该配体具有相同的序列),或者靶向部分的氨基酸序列可与天然配体共享至少约95%、至少约90%、至少约80%、至少约70%、至少约60%、至少约50%或至少约40%的序列同一性(例如,与表2中列出的GenBank登录号至少有大约该量的序列同一性),只要变体保留或具有增强的天然配体的生物活性。在一些实例中,相对于天然配体,此类变体对其靶标具有增加的结合亲和力。源自天然配体的靶向部分也可以是能够与癌症干细胞展示的靶标结合的天然序列的片段。在一些实例中,配体是天然配体的循环排列版本(例如,参见美国专利第6,011,002号)。循环排列的分子包括这样的分子,其中,

线性分子(例如配体)的末端直接地或经由接头接合在一起以产生环状分子,然后环状分子在另一个位置打开以产生新的线性分子,该新的线性分子的末端与原始分子中的末端不同。在一些实例中,靶向部分具有一个或多个氨基酸突变(相对于天然序列),其改变与靶标的结合,诸如增加配体与其靶标的结合的突变。

[0199] 货物部分可减少、抑制癌细胞和/或癌症干细胞的生长和/或杀死癌细胞和/或癌症干细胞,并且在一些实例中还抑制大量癌细胞(例如,非癌症干细胞)的生长和/或杀死大量癌细胞。这些分子可以是天然蛋白质,或工程改造的蛋白质,以及抑制癌细胞和/或癌症干细胞的生长和/或杀死癌细胞和/或癌症干细胞的其他分子,并且在一些实例中还抑制大量癌细胞(例如,非癌症干细胞)的生长和/或杀死大量癌细胞。这种分子的一个例子是化疗剂,诸如毒胡萝卜素。货物部分可以联接到与癌细胞和/或癌症干细胞结合的靶向部分(联接的货物部分和靶向部分在本文中称为靶向IL-4的货物蛋白)。因此,与靶向部分联接的货物部分将与癌症干细胞结合并抑制癌症干细胞的生长(或杀死癌症干细胞)。在一些实例中,货物部分可引起癌症干细胞死亡,并且在一些实例中,癌症干细胞死亡是由细胞凋亡引起的。在一些实例中,货物部分是毒素(包括植物或微生物衍生的毒素)、毒素的活性片段或毒素的衍生物,其与天然毒素共享至少约95%、至少约90%、至少约80%、至少约70%、至少约60%、至少约50%或至少约40%的序列同一性并且保留或具有增强的天然毒素的生物活性,例如在表1中提供的货物部分的情况下。在其他实例中,货物部分衍生自调节细胞生命周期的蛋白质,或者是动物天然免疫应答的一部分。例如,一些货物部分衍生自已知诱导细胞凋亡的蛋白质。在一些实例中,货物部分衍生自促细胞凋亡蛋白、此类蛋白质的活性片段或此类蛋白质的衍生物,其与天然部分共享至少约95%、至少约90%、至少约80%、至少约70%、至少约60%、至少约50%或至少约40%的序列同一性(序列登录号见表1),只要变体保留或具有增强的天然部分的生物活性。在另外的实例中,货物部分作为靶向IL-4的货物蛋白的一部分被给药时可以是无活性的,然后在与受试者中的另一分子接触时变得有活性。本文提供了货物部分的更详细描述。

[0200] 该描述还包括用靶向IL-4的货物蛋白治疗患有(或曾患有)癌症的受试者的方法。例如,该方法可包括向受试者给药一种或多种所公开的靶向IL-4的货物蛋白,从而治疗受试者中的癌细胞和/或癌症干细胞(例如,减少干细胞的数量或体积)。例如,靶向IL-4的货物蛋白可用于治疗患有复发性癌症或难治性癌症的受试者。在此类实例中,用传统的抗癌疗法(例如放射、手术或化疗)治疗受试者,然后测试受试者以确定治疗的有效性。如果传统疗法没有以期望的方式改变癌症,则可以用靶向IL-4的货物蛋白治疗受试者。

[0201] 在一些实例中,可以向受试者给药包括靶向IL-4的货物蛋白和另外的抗癌治疗剂的治疗疗程。靶向IL-4的货物蛋白和另外的抗癌治疗剂将取决于靶向的癌症干细胞的类型而有所不同。

[0202] 在具体实例中,受试者被给药一种或多种以下特定的靶向IL-4的货物蛋白以治疗癌细胞和/或癌症干细胞:循环排列的IL-4假单胞菌外毒素(参见美国专利第6,011,002号)、IL-4-BAD以及MDNA55。

[0203] A. IL-4和/或IL-13突变蛋白融合蛋白

[0204] 可将IL-4和/或IL-13突变蛋白制备为融合或嵌合多肽,其包括受试者IL-4和/或IL-13突变蛋白和异源多肽(即,非IL-4和/或IL-13的多肽或其突变体)(参见例如美国专利

第6,451,308号)。示例性异源多肽可以增加嵌合多肽在体内的循环半衰期,并因此可以进一步增强突变型IL-4和/或IL-13多肽的特性。在各个实施方案中,增加循环半衰期的多肽可以是血清白蛋白,诸如人类血清白蛋白、PEG、PEG衍生物或缺少IgG重链可变区的抗体的IgG亚类的Fc区。示例性Fc区可以包括抑制补体固定和Fc受体结合的突变,或者其可以是裂解的,即能够经由另一种机制(诸如抗体依赖性补体裂解(ADCC;于1994年12月12日提交的USSN08/355,502))结合补体或裂解细胞。

[0205] “Fc区”可以是天然存在的或合成的多肽,其与通过用木瓜蛋白酶消化IgG而产生的IgG C端结构域同源。IgG Fc的分子量为大约50kDa。突变型IL-4和/或IL-13多肽可以包括整个Fc区或较小部分,该较小部分保留了延长其所在的嵌合多肽的循环半衰期的能力。另外,全长或片段化的Fc区可以是野生型分子的变体。在一些实施方案中,IL-4和/或IL-13突变蛋白融合蛋白(例如,如本文所述的IL-4和/或IL-13突变蛋白)包括IgG1、IgG2、IgG3或IgG4Fc区(参见例如图2A-2B中的序列)。在一些实施方案中,Fc区包含取代N297A。

[0206] 在一些实施方案中,IL-4和/或IL-13突变蛋白直接或间接地与异源融合多肽联接。

[0207] 在一些实施方案中,IL-4和/或IL-13突变蛋白直接与Fc区连接。在一些实施方案中,IL-4和/或IL-13突变蛋白经由接头肽(诸如GGGS)与Fc区联接。在一些实施方案中,接头是(GGGS)_n,其中n是介于1和10之间的整数。在一些实施方案中,接头是GGGS。在一些实施方案中,接头是GGGSGGGGS(SEQ ID NO:70)。在一些实施方案中,接头是GGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:71)。在一些实施方案中,接头是GGGSGGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:72)。在一些实施方案中,接头是GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:73)。

[0208] Fc区可以是“裂解的”或“非裂解的”,但是通常是非裂解的。非裂解性Fc区通常缺乏高亲和力Fc受体结合位点和C'1q结合位点。鼠IgG Fc的高亲和力Fc受体结合位点在IgG Fc的位置235处包括Leu残基。因此,可以通过突变或缺失Leu 235来破坏Fc受体结合位点。例如,用Glu取代Leu 235可抑制Fc区结合高亲和力Fc受体的能力。可以通过突变或缺失IgG的Glu 318、Lys 320和Lys 322残基在功能上破坏鼠C'1q结合位点。例如,用Ala残基取代Glu 318、Lys 320和Lys 322使IgG1 Fc无法引导抗体依赖性补体裂解。相反,裂解性IgG Fc区具有高亲和力Fc受体结合位点和C'1q结合位点。高亲和力Fc受体结合位点在IgG Fc的位置235处包括Leu残基,而C'1q结合位点包括IgG1的Glu 318、Lys 320和Lys 322残基。裂解性IgG Fc在这些位点处具有野生型残基或保守氨基酸取代。裂解性IgG Fc可以靶向细胞以产生抗体依赖性细胞毒性或补体引导的细胞溶解(CDC)。还已知人类IgG的适当突变(参见例如Morrison等人,《免疫学家(The Immunologist)》2:119-124,1994;和Brekke等人,《免疫学家》2:125,1994)。

[0209] 在其它实施方案中,嵌合多肽可以包括受试者IL-4和/或IL-13突变蛋白和充当抗原标签(诸如FLAG序列)的多肽。如本文所述,FLAG序列被生物素化的高度特异性的抗FLAG抗体识别(还请参见Blonar等人,《科学(Science)》256:1014,1992;LeClair等人,《美国国家科学院学报(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》89:8145,1992)。在一些实施方案中,嵌合多肽进一步包括C端c-myc表位标签。

[0210] 在其它实施方案中,嵌合多肽包括突变型IL-4和/或IL-13多肽以及具有增强突变型IL-4和/或IL-13多肽的表达或直接细胞定位的功能的异源多肽,诸如Aga2p凝集素亚基

(参见例如Boder和Witttrup,《自然生物技术(Nature Biotechnol.)》15:553-7,1997)。

[0211] 在其它实施方案中,可以产生包括突变型IL-4和/或IL-13以及抗体或其抗原结合部分的嵌合多肽。嵌合蛋白的抗体或抗原结合性组分可以充当靶向部分。例如,其可以用于将嵌合蛋白定位至细胞或靶分子的特定子集。产生细胞因子-抗体嵌合多肽的方法描述于例如美国专利第6,617,135号中。

[0212] 在一些实施方案中,嵌合多肽包含与抗体或其抗原结合部分的融合体,该融合体破坏PD-1受体与其配体PD-L1之间的相互作用,或者是针对PD-1/PD-L1信号传导通路的组分的抗体。结合PD-1并破坏PD-1与其配体PD-L1之间的相互作用并刺激抗肿瘤免疫应答的本领域已知的抗体适用于本文公开的嵌合多肽。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合部分与PD-1特异性结合。例如,靶向PD-1并且可以在本发明中使用的抗体包括但不限于例如纳武单抗(BMS-936558,百时美施贵宝公司(Bristol-Myers Squibb))、派姆单抗(lambrolizumab,MK03475或MK-3475,默克公司(Merck))、人源化抗PD-1抗体JS001(上海君士公司(ShangHai JunShi))、单克隆抗PD-1抗体TSR-042(Tesaro公司)、匹地利珠单抗(Pidilizumab,抗PD-1mAb CT-011,麦迪韦逊医疗公司(Medivation))、抗PD-1单克隆抗体BGB-A317(百济神州公司(BeiGene))和/或抗PD-1抗体SHR-1210(上海恒瑞公司(ShangHai HengRui))、人类单克隆抗体REGN2810(西米普利单抗,再生元制药公司(Regeneron))、人类单克隆抗体MDX-1106(百时美施贵宝公司)和/或人源化抗PD-1IgG4抗体PDR001(诺华公司(Novartis))。在一些实施方案中,PD-1抗体来自克隆:RMP1-14(大鼠IgG)-BioXcell目录号BP0146。其它合适的抗体包括在美国专利第8,008,449号中公开的抗PD-1抗体,该美国专利通过引用并入本文。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合部分与PD-L1特异性结合并抑制其与PD-1的相互作用,从而增加免疫活性。结合PD-L1并破坏PD-1与PD-L1之间的相互作用并刺激抗肿瘤免疫应答的本领域已知的任何抗体均适用于本文公开的嵌合多肽。例如,靶向PD-L1并处于临床试验中的抗体包括BMS-936559(百时美施贵宝公司)和MPDL3280A(基因泰克公司(Genentech))。靶向PD-L1的其它合适的抗体公开于美国专利第7,943,743号中,该美国专利通过引用并入本文。普通技术人员将理解,任何与PD-1或PD-L1结合、破坏PD-1/PD-L1相互作用并刺激抗肿瘤免疫应答的抗体均适用于本文公开的嵌合多肽。在一些实施方案中,嵌合多肽包含与抗PD-1抗体的融合体。在一些实施方案中,嵌合多肽包含与抗PD-L1抗体的融合体。

[0213] 在一些实施方案中,嵌合多肽包含与靶向CTLA-4并破坏其与CD80和CD86的相互作用的抗体或其抗原结合部分的融合体。靶向CTLA-4的示例性抗体包括FDA批准的伊匹单抗(MDX-010、MDX-101,百时美施贵宝公司)和曲美木单抗(ticilimumab,CP-675,206,辉瑞公司(Pfizer)),二者目前正在进行人体试验。靶向CTLA-4的其它合适的抗体公开于W02012/120125、美国专利第6,984,720号、美国专利第6,682,736号以及美国专利申请2002/0039581、2002/0086014和2005/0201994中,上述文献均通过引用并入本文。普通技术人员将理解,任何与CTLA-4结合、破坏其与CD80和CD86的相互作用并刺激抗肿瘤免疫应答的抗体均适用于本文公开的嵌合多肽。在一些实施方案中,嵌合多肽包含与抗CTLA-4抗体的融合体。

[0214] 在一些实施方案中,嵌合多肽包含与靶向LAG-3并破坏其与MHC II类分子的相互作用的抗体或其抗原结合部分的融合体。靶向LAG-3的示例性抗体有IMP321(Immutep公

司),其目前正在进行人体试验。靶向LAG-3的其它合适的抗体公开于美国专利申请2011/0150892中,该美国专利申请通过引用并入本文。普通技术人员将理解,任何与LAG-3结合、破坏其与MHC II类分子的相互作用并刺激抗肿瘤免疫应答的抗体均适用于本文公开的嵌合多肽。在一些实施方案中,嵌合多肽包含与抗LAG-3抗体的融合体。

[0215] 在一些实施方案中,嵌合多肽包含与靶向B7-H3或B7-H4的抗体或其抗原结合部分的融合体。B7家族没有任何定义的受体,但是这些配体在肿瘤细胞或肿瘤浸润细胞上被上调。靶向B7-H3的示例性抗体有MGA271 (Macrogenics公司),其目前正在进行人体试验。靶向B7家族成员的其它合适的抗体公开于美国专利申请2013/0149236中,该美国专利申请通过引用并入本文。普通技术人员将理解,任何与B7-H3或H4结合并刺激抗肿瘤免疫应答的抗体均适用于本文公开的嵌合多肽。在一些实施方案中,嵌合多肽包含与抗B7-H3抗体或抗B7-H4抗体的融合体。

[0216] 在一些实施方案中,嵌合多肽包含与靶向TIM-3并破坏其与半乳糖凝集素9的相互作用的抗体或其抗原结合部分的融合体。靶向TIM-3的合适的抗体公开于美国专利申请2013/0022623中,该美国专利申请通过引用并入本文。普通技术人员将理解,任何与TIM-3结合、破坏其与半乳糖凝集素9的相互作用并刺激抗肿瘤免疫应答的抗体均适用于本文公开的嵌合多肽。在一些实施方案中,嵌合多肽包含与抗TIM-3抗体的融合体。

[0217] 在一些实施方案中,嵌合多肽包含与靶向4-1BB/CD137并破坏其与CD137L的相互作用的抗体或其抗原结合部分的融合体。普通技术人员将理解,任何与4-1BB/CD137结合、破坏其与CD137L或其它配体的相互作用并刺激产生总体抗肿瘤活性的抗肿瘤免疫应答或免疫刺激应答的抗体均适用于本文公开的嵌合多肽。在一些实施方案中,嵌合多肽包含与抗4-1BB/CD137抗体的融合体。

[0218] 在一些实施方案中,嵌合多肽包含与靶向GITR并破坏其与其配体的相互作用的抗体或其抗原结合部分的融合体。普通技术人员将理解,任何与GITR结合、破坏其与GITRL或另一种配体的相互作用并刺激产生总体抗肿瘤活性的抗肿瘤免疫应答或免疫刺激应答的抗体均适用于本文公开的嵌合多肽。在一些实施方案中,嵌合多肽包含与抗GITR抗体的融合体。

[0219] 在一些实施方案中,嵌合多肽包含与靶向OX40并破坏其与其配体的相互作用的抗体或其抗原结合部分的融合体。普通技术人员将理解,任何与OX40结合、破坏其与OX40L或另一种配体的相互作用并刺激产生总体抗肿瘤活性的抗肿瘤免疫应答或免疫刺激应答的抗体均适用于本文公开的嵌合多肽。在一些实施方案中,嵌合多肽包含与抗OX40抗体的融合体。

[0220] 在一些实施方案中,嵌合多肽包含与靶向CD40并破坏其与其配体的相互作用的抗体或其抗原结合部分的融合体。普通技术人员将理解,任何与CD40结合、破坏其与其配体的相互作用并刺激产生总体抗肿瘤活性的抗肿瘤免疫应答或免疫刺激应答的抗体均适用于本文公开的嵌合多肽。在一些实施方案中,嵌合多肽包含与抗CD40抗体的融合体。

[0221] 在一些实施方案中,嵌合多肽包含与靶向ICOS并破坏其与其配体的相互作用的抗体或其抗原结合部分的融合体。普通技术人员将理解,任何与ICOS结合、破坏其与其配体的相互作用并刺激产生总体抗肿瘤活性的抗肿瘤免疫应答或免疫刺激应答的抗体均适用于本文公开的嵌合多肽。在一些实施方案中,嵌合多肽包含与抗ICOS抗体的融合体。

[0222] 在一些实施方案中,嵌合多肽包含与靶向CD28并破坏其与其配体的相互作用的抗体或其抗原结合部分的融合体。普通技术人员将理解,任何与CD28结合、破坏其与其配体的相互作用并刺激产生总体抗肿瘤活性的抗肿瘤免疫应答或免疫刺激应答的抗体均适用于本文公开的嵌合多肽。在一些实施方案中,嵌合多肽包含与抗CD28抗体的融合体。

[0223] 在一些实施方案中,嵌合多肽包含与靶向IFN α 并破坏其与其配体的相互作用的抗体或其抗原结合部分的融合体。普通技术人员将理解,任何与IFN α 结合、破坏其与其配体的相互作用并刺激产生总体抗肿瘤活性的抗肿瘤免疫应答或免疫刺激应答的抗体均适用于本文公开的嵌合多肽。在一些实施方案中,嵌合多肽包含与抗IFN α 抗体的融合体。

[0224] 在一些实施方案中,嵌合多肽包含与肿瘤抗原或靶向肿瘤抗原的多肽的融合体。通常,肿瘤抗原允许将肿瘤细胞与其正常细胞对应物区分开,并且可以包括例如肿瘤特异性抗原(TSA)以及肿瘤相关性抗原(TAA)。在一些实施方案中,肿瘤抗原是原癌基因和/或肿瘤抑制物,以及过表达或异常表达的细胞蛋白,由致癌病毒产生的肿瘤抗原、癌胚抗原、改变的细胞表面糖脂和糖蛋白和/或细胞类型特异性分化抗原。此类肿瘤抗原可以包括黑色素瘤抗原、癌症-睾丸抗原、上皮肿瘤抗原、细胞周期调节蛋白、前列腺特异性抗原(包括前列腺癌抗原,诸如例如在美国专利第5,538,866中所公开的前列腺癌抗原)、淋巴瘤(美国专利第4,816,249号、第5,068,177号和第5,227,159号)。肿瘤抗原可以包括但不限于例如与2G3和369F10结合的HMW粘蛋白、与c-erbB-2相关的肿瘤抗原(大约42kD或55kD糖蛋白)、大约40、60、100和200kD与113F1、9-O-乙酰基GD3、p97、 α 甲胎蛋白(AFP)结合的抗原(例如,针对生殖细胞肿瘤和/或肝细胞癌)、癌胚抗原(CEA)(例如,针对肠癌、偶发性肺癌或乳腺癌)、CA-125(例如,针对卵巢癌)、MUC-1(例如,针对乳腺癌)、上皮肿瘤抗原(ETA)(例如,针对乳腺癌)、酪氨酸酶(例如,针对恶性黑色素瘤)、黑色素瘤相关性抗原(MAGE)(例如,针对恶性黑色素瘤)、癌症/睾丸抗原1(CTAG1B)、黑色素瘤相关性抗原1(MAGEA1)、异常Ras产物、异常p53产物、细胞周期蛋白(包括例如细胞周期蛋白B1)的过表达、纤连蛋白的突变、MUC1糖蛋白的翻译后改变、分泌的肿瘤抗原(包括例如神经节苷脂)。

[0225] B. 靶向IL-4的货物蛋白

[0226] 靶向IL-4的货物蛋白是包括与货物部分联接的靶向部分的蛋白质。靶向IL-4的货物蛋白的功能是特异性结合癌细胞和/或癌症干细胞并减少或抑制癌症干细胞生长,以及靶向肿瘤微环境(TME)中的免疫抑制细胞。在一些实施方案中,靶向IL-4的货物蛋白包含IL-4R靶向部分。在一些实施方案中,靶向IL-4的货物蛋白包含IL-4R靶向部分,该部分包含本文所述的IL-4或其变体。在一些实施方案中,靶向IL-4的货物蛋白包含IL-4R靶向部分,该部分包含如本文所述的IL-13或其变体。在一些实施方案中,靶向IL-4的货物蛋白包含MDNA55(SEQ ID NO:65)或其变体。在一些实施方案中,靶向IL-4的货物蛋白是MDNA55(SEQ ID NO:65)。

[0227] IL-4R靶向部分可包含IL-4序列或其变体。SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:58-SEQ ID NO:62和SEQ ID NO:64-SEQ ID NO:69中提供了示例性多肽序列。在一些实施方案中,多肽序列如SEQ ID NO:51到SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:58到SEQ ID NO:62和/或SEQ ID NO:64到SEQ ID NO:66中的任何一个所提供。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:51。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:52。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:53。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:54。在一些实施方案中,多肽序

列是SEQ ID NO:55。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:58。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:59。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:60。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:61。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:62。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:64。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:65。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:66。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:67。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:68。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:69。在一些实施方案中,多肽序列与SEQ ID NO:51到SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:58到SEQ ID NO:62和/或SEQ ID NO:64到SEQ ID NO:66中的任何一个具有98%同一性。在一些实施方案中,多肽序列与SEQ ID NO:51到SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:58到SEQ ID NO:62和/或SEQ ID NO:64到SEQ ID NO:66中的任何一个具有99%同一性。在一些实施方案中,SEQ ID NO:51到SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:58到SEQ ID NO:62和/或SEQ ID NO:64到SEQ ID NO:66中的任何一个为IL-4R靶向部分的一部分。在一些实施方案中,SEQ ID NO:51是IL-4R靶向部分的一部分。在一些实施方案中,SEQ ID NO:52是IL-4R靶向部分的一部分。在一些实施方案中,SEQ ID NO:53是IL-4R靶向部分的一部分。在一些实施方案中,SEQ ID NO:54是IL-4R靶向部分的一部分。在一些实施方案中,SEQ ID NO:55是IL-4R靶向部分的一部分。在一些实施方案中,SEQ ID NO:58是IL-4R靶向部分的一部分。在一些实施方案中,SEQ ID NO:59是IL-4R靶向部分的一部分。在一些实施方案中,SEQ ID NO:60是IL-4R靶向部分的一部分。在一些实施方案中,SEQ ID NO:61是IL-4R靶向部分的一部分。在一些实施方案中,SEQ ID NO:62是IL-4R靶向部分的一部分。在一些实施方案中,SEQ ID NO:64是IL-4R靶向部分的一部分。在一些实施方案中,SEQ ID NO:65是IL-4R靶向部分的一部分。在一些实施方案中,SEQ ID NO:66是IL-4R靶向部分的一部分。在一些实施方案中,SEQ ID NO:67是IL-4R靶向部分的一部分。在一些实施方案中,SEQ ID NO:68是IL-4R靶向部分的一部分。在一些实施方案中,SEQ ID NO:69是IL-4R靶向部分的一部分。

[0228] 构建体的IL-13超级因子(superkine)组分的长度可以为至少约50个氨基酸、至少约75个氨基酸、至少约100个氨基酸、至少约110个氨基酸、至少约115个氨基酸,直至跨膜结构域处的野生型蛋白的全长,即长度为约116个氨基酸。例如,超级因子可以与CAR的铰链结构域、跨膜结构域或信号传导结构域融合。SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57和SEQ ID NO:63中提供了示例性多肽序列。在一些实施方案中,多肽序列如SEQ ID NO:2到SEQ ID NO:38中的任何一个中所提供。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:2。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:2。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:3。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:4。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:5。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:6。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:7。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:8。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:9。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:10。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:11。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:12。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:13。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:14。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:15。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:16。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:17。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:18。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:19。在一些实施方案中,多肽序列是SEQ ID NO:20。在一些实施

[illegible]

SEQ ID NO:37是IL-4R靶向部分的一部分。在一些实施方案中,SEQ ID NO:38是IL-4R靶向部分的一部分。在一些实施方案中,SEQ ID NO:40是IL-4R靶向部分的一部分。在一些实施方案中,SEQ ID NO:41是IL-4R靶向部分的一部分。在一些实施方案中,SEQ ID NO:43是IL-4R靶向部分的一部分。在一些实施方案中,SEQ ID NO:44是IL-4R靶向部分的一部分。在一些实施方案中,SEQ ID NO:45是IL-4R靶向部分的一部分。在一些实施方案中,SEQ ID NO:46是IL-4R靶向部分的一部分。在一些实施方案中,SEQ ID NO:47是IL-4R靶向部分的一部分。在一些实施方案中,SEQ ID NO:48是IL-4R靶向部分的一部分。

[0229] 下面提供了IL-13序列的表。

[0230] 表5:IL-13氨基酸序列的列表

[0231]

SEQ ID NO: (信息)	氨基酸序列
SEQ ID NO:1 (IL-13 野生型)	PGPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKT QRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVA QFVKDLLHLKCLFREGQFN
SEQ ID NO:2	PGPVPPSTAVRALIEELINITQNQKAPLCNGS MVWSINRTAGMYCAALESINVSGCSAIEK TQDMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRSSKIEVA QFVKDLLFHLRTLFRREGQFN
SEQ ID NO:3	PGPVPPSTAIRELIEELINITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKT QRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRGSKIEVA QFVKDLLHHLRALFRREGQFN
SEQ ID NO:4	PGPVPPSTAVRELIEELINITQNQKAPLCNGS MVWSINRTAGMYCAALESINVSGCSAIEK TQRMMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRSSKIEVA QFVKDLLFHLRTLFRREGQFN
SEQ ID NO:5	PGPVPPSTALIELIEELINITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGIYCAALESINVSGCSAIEKT QRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVKGSKIEVA QFVKDLLHHLRALMREGQFN
SEQ ID NO:6	PGPVPPSTAIRELIEELNITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKT QRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVMKSKIEVA QFVKDLLHHLRALFRREGQFN
SEQ ID NO:7	PGPVPPSTAIRELIEELINITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKT QRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRSSRIEVAQ FVKDLLHHLRTLFRREGQFN
SEQ ID NO:8	PGPVPPSTALRELIEELINITQNEKAPLCNGS MVWSINLTAGIYCAALESINVSGCSAIEKT QRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVTGSKIEVA QFVKDLLYHLRALFRREGQFN
SEQ ID NO:9	PGPVPPSTALSELIEELINITQNQKAPLCNGS MVWSINPTAGMYCAALESINVSGCSAIEKT QRMLSGFCPHKVAAGQFSSLHDKGSMIEVA QFVKDLLYHLRTLFRREGQFN
SEQ ID NO:10	PGPVPPSTATRELIEELINITQNQKAPLCNGS MVWSINLTADMYCAALESINVSGCSAIEKT QRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRGSKIEVA QFVKDLLYHLRTLFRREGQFN
SEQ ID NO:11	PGPVPPSTADIELIAELINITQNQKAPLCNGS MVWSINLTADMYCAALESINVSGCSAIEKT QRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVKKTRIEVA QFVKDLLHLKCLFKEGQFN

[0232]

SEQ ID NO: (信息)	氨基酸序列
SEQ ID NO:12	PGPVPPSTAARELIEELVNITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKT QRMLSGFCPHKVSAGQLSSLHVTGKRIEVA QFVKDLLNHLRALFKEGQFN
SEQ ID NO:13	PGPVPPSTAVRELIEELVNITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKT QRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTRIEVA QFVKDLLNHLKELFTEGQFN
SEQ ID NO:14	PGPVPPSTALSELMEELVNITQNQKAPLCNG SMVWSINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEK TQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDSKIEVA QFVKDLLNHLKALFKEGQFN
SEQ ID NO:15	GPVPPSTAFRELIEELVNITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKT QRMLSGFCPHKVSPGQFSSLHVTNSRIEVAQ FVKDLLNHLKALFKEGQYN
SEQ ID NO:16	GPVPPSTAHLELIEELINITQNQKAPLCNGSM VWSINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQ RMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVKETRIEVAQF VKDLLNHLKTLFKEGQFN
SEQ ID NO:17	PGPVPPSTAHLELIEELINITQNQKAPLCNGS MVWSINPTAGMYCAALESINVSGCSAIEKT QRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVMMDTRIEVA QFVKDLLHHLKKL FKEGQFN
SEQ ID NO:18	PGPVPPSTAHRELIEELVNITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKT QRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVTGRKIEVA QFVKDLLHHLKKL FKEGQFN
SEQ ID NO:19	PGPVPPSTAHRELIEELVNITQNQKAPLCNGS MVWRINRTAGMYCAALESINVSGCSAIEK TQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVMDSRIEV AQFVKDLLNHLRALFKEGQFN
SEQ ID NO:20	PGPVPPSTAARELIEELFNITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKT KRMLSGFCPHKVSAGQFPSLHVKKTRIEVA QFVKDLLIHLRKL FKEGQFN
SEQ ID NO:21 (包含 R11I、V18I、R86K、D87G、 T88S、L101H、K104R、K105A、 F107M 的示例性序列, 在本文中称 为 A5)	PGPVPPSTALIELIEELINITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKT QRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVKGSKIEVA QFVKDLLHHLRALMREGQFN
SEQ ID NO:22 (包含 L10I、V18L、R86M、D87K、 T88S、L101H、K104R、K105A 的 示例性序列, 在本文中称为 A6)	PGPVPPSTAIARELIEELNITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKT QRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVMKSKIEVA QFVKDLLHHLRALFREGQFN

[0233]

SEQ ID NO: (信息)	氨基酸序列
SEQ ID NO:23 (包含 L10I、V18I、D87G、T88S、L101H、K104R、K105A 的示例性序列，在本文中称为 A7)	PGPVPPSTAI ~~REL~~ IEELINITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGMYCAALES ~~LI~~ NVSGCSAIEKT QRMLSGFC ~~PH~~ KVSAGQFSS ~~LH~~ VRGSKIEVA QFVKDLLHHLRALFREGQFN
SEQ ID NO:24 (包含 L10I、V18I、D87S、T88S、K89R、L101H、K104R、K105T 的示例性序列；在本文中称为 A8)	PGPVPPSTAI ~~REL~~ IEELINITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGMYCAALES ~~LI~~ NVSGCSAIEKT QRMLSGFC ~~PH~~ KVSAGQFSS ~~LH~~ VRSSRIEVAQ FVKDLLHHLR ~~TL~~ LFREGQFN
SEQ ID NO:25 (包含 L10V、V18I、D87S、T88S、L101F、K104R、K105T 的示例性序列，在本文中称为 A11 变体 1)	PGPVPPSTAV ~~REL~~ IEELINITQNQKAPLCNGS MVWSIN ~~L~~ TAGMYCAALES ~~LI~~ NVSGCSAIEKT QRMLSGFC ~~PH~~ KVSAGQFSS ~~LH~~ VRSSKIEVAQ FVKDLLFHLR ~~TL~~ LFREGQFN
SEQ ID NO:25 (包含 L10V、V18I、D87S、T88S、L101F、K104R、K105T 的示例性序列，在本文中称为 A11 变体 2)	PGPVPPSTAV ~~REL~~ IEELINITQNQKAPLCNGS MVWSIN ~~R~~ TAGMYCAALES ~~LI~~ NVSGCSAIEK TQRMLSGFC ~~PH~~ KVSAGQFSS ~~LH~~ VRSSKIEVA QFVKDLLFHLR ~~TL~~ LFREGQFN
SEQ ID NO:26 (包含 V18I、R86T、D87G、T88S、L101Y、K104R、K105A 的示例性序列，在本文中称为 B2)	PGPVPPSTAL ~~REL~~ IEELINITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGMYCAALES ~~LI~~ NVSGCSAIEKT QRMLSGFC ~~PH~~ KVSAGQFSS ~~LH~~ VTGSKIEVA QFVKDLLYHLRALFREGQFN
SEQ ID NO:27 (包含 R11S、V18I、R86K、D87G、T88S、K89M、L101Y、K104R、K105T 的示例性序列，在本文中称为 B4)	PGPVPPSTAL ~~SEL~~ IEELINITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGMYCAALES ~~LI~~ NVSGCSAIEKT QRMLSGFC ~~PH~~ KVSAGQFSS ~~LH~~ VKGSMIEVA QFVKDLLYHLR ~~TL~~ LFREGQFN
SEQ ID NO:28 (包含 L10T、V18I、D87G、T88S、K89K、L10Y1、K104R、K105T 的示例性序列，在本文中称为 B6)	PGPVPPSTAT ~~REL~~ IEELINITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGMYCAALES ~~LI~~ NVSGCSAIEKT QRMLSGFC ~~PH~~ KVSAGQFSS ~~LH~~ VRGSKIEVA QFVKDLLYHLR ~~TL~~ LFREGQFN
SEQ ID NO:29 (包含 L10D、R11I、V18I、R86K、D87K、K89R、R108K 的示例性序列，在本文中称为 C2)	PGPVPPSTAD ~~IEL~~ IEELINITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGMYCAALES ~~LI~~ NVSGCSAIEKT QRMLSGFC ~~PH~~ KVSAGQFSS ~~LH~~ VKKTRIEVA QFVKDLLLHLK ~~KL~~ FKEGQFN
SEQ ID NO:30 (包含 L10A、R86T、D87G、T88K、K89R、L101N、K104R、K105A、R108K 的示例性序列，在本文中称为 C3)	PGPVPPSTA ~~ARE~~ IEELVNITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGMYCAALES ~~LI~~ NVSGCSAIEKT QRMLSGFC ~~PH~~ KVSAGQFSS ~~LH~~ VTGKRIEVA QFVKDLLNHLRALF ~~KE~~ GQFN
SEQ ID NO:31 (包含 L10V、K89R、L101N、K105E、R108T 的示例性序列，在本文中称为 C4)	PGPVPPSTAV ~~REL~~ IEELVNITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGMYCAALES ~~LI~~ NVSGCSAIEKT QRMLSGFC ~~PH~~ KVSAGQFSS ~~LH~~ VRDTRIEVA QFVKDLLNHLKELF ~~TE~~ GQFN

[0234]

SEQ ID NO: (信息)	氨基酸序列
SEQ ID NO:32 (包含 R11S、I14M、T88S、L101N、K105A、R108K 的示例性序列，在本文中称为 C7)	PGPVPPSTALSELMEELVNITQNQKAPLCNG SMVWSINLTAGMYCAALES LINVSGCSAIEK TQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDSKIEVA QFVKDLLNHLKALFKEGQFN
SEQ ID NO:33 (包含 L10H、R11L、V18I、R86K、D87E、K89R、L101N、K105T、R108K 的示例性序列，在本文中称为 C9)	PGPVPPSTAHLELIEELINITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGMYCAALES LINVSGCSAIEKT QRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVKETRIEVA QFVKDLLNHLKTLFKEGQFN
SEQ ID NO:34 (包含 L10H、R11L、V18I、R86M、K89R、R108K 的示例性序列，在本文中称为 C10)	PGPVPPSTAHLELIEELINITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGMYCAALES LINVSGCSAIEKT QRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVM DTRIEVA QFVKDLLHLK KLFKEGQFN
SEQ ID NO:35 (包含 L10H、R86T、D87G、T88R、R108K 的示例性序列，在本文中称为 C11)	PGPVPPSTAHRELIEELVNITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGMYCAALES LINVSGCSAIEKT QRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVTGRKIEVA QFVKDLLHLK KLFKEGQFN
SEQ ID NO:36 (包含 L10H、R86M、T88S、K89R、L101N、K104R、K105A、R108K 的示例性序列，在本文中称为 C12)	PGPVPPSTAHRELIEELVNITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGMYCAALES LINVSGCSAIEKT QRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVM DSRIEVA QFVKDLLNHLRALFKEGQFN
SEQ ID NO:37 (包含 L10A、V18F、R86F、D87F、K89R、L101I、K104R、R108K 的示例性序列，在本文中称为 D7)	PGPVPPSTAARELIEELFNITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGMYCAALES LINVSGCSAIEKT QRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVKKTRIEVA QFVKDLLIHLRKL FKEGQFN
SEQ ID NO:38 (包含 L10V、E12A、V18I、R65D、D87S、T88S、L101F、K104R、K105T 的示例性序列，在本文中称为 IL-13dn)	PGPVPPSTAVRALIEELINITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGMYCAALES LINVSGCSAIEKT QDMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRSSKIEVAQ FVKDLLFHLRTL FREGQFN
SEQ ID NO:39 **信号肽**	<u>MHPLLNPLLLALGLMALLTTVIALTCLGGF</u> <u>ASPGVPPSTAHRELIEELVNITQNQKAPLCN</u> GSMVWSINLTAGMYCAALES LINVSGCSAIE KTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVTGRKIE VAQFVKDLLHLK KLFKEGQFN
SEQ ID NO:40 (包含 L10V、E12A、V18I、R65D、D87S、T88S、L101F、K104R、K105T 的示例性序列，在本文中称为 IL-13DN 变体 1)	PGPVPPSTAVRALIEELINITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGMYCAALES LINVSGCSAIEK TQDMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRSSKIEVA QFVKDLLFHLRTL FREGQFN

[0235]

SEQ ID NO: (信息)	氨基酸序列
SEQ ID NO:41 (包含 L10V、E12A、V18I、R65D、D87S、T88S、L101F、K104R、K105T 的示例性序列，在本文中称为 IL-13DN 变体 2)	PGPVPPSTAVRALIEELINITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKT QDMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRSSKIEVAQ FVKDLLFHLRTLRFREGQFN
SEQ ID NO:42 在 N 端处包括额外的蛋氨酸的野生型 IL-13	MPGPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCN GSMVWSINLTAGMYCAALESINVSGCSAIE KTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIE VAQFVKDLLLHLKKLFREGQFN
SEQ ID NO:43 循环排列的 IL-13	MYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPH KVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLHL KKLFREGQFNNGSGMPGPVPPSTALRELIEEL VNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAG
SEQ ID NO:44 循环排列的 IL-13	MYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPH KVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLHL KKLFREGQFNNGSGMPGPVPPSTALRELIEE LVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAG
SEQ ID NO:45 循环排列的 IL-13“A11”变体	MYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPH KVSAGQFSSLHVRSSKIEVAQFVKDLLFHLR TLFREGQFNNGSGMPGPVPPSTAVRELIEELINI TQNQKAPLCNGSMVWSINRTAG
SEQ ID NO:46 循环排列的 IL-13	MYCAALESINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPH KVSAGQFSSLHVRSSKIEVAQFVKDLLFHLR TLFREGQFNNGSGMPGPVPPSTAVRELIEELI NITQNQKAPLCNGSMVWSINRTAG
SEQ ID NO:47 循环排列的 IL-13“DN”变体	MYCAALESINVSGCSAIEKTQDMLSGFCP HKVSAGQFSSLHVRSSKIEVAQFVKDLLFHL RTLRFREGQFNNGSGMPGPVPPSTAVRALIEELI NITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAG
SEQ ID NO:48 循环排列的 IL-13	MYCAALESINVSGCSAIEKTQDMLSGFCP HKVSAGQFSSLHVRSSKIEVAQFVKDLLFHL RTLRFREGQFNNGSGMPGPVPPSTAVRALIEE LINITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAG

[0236] 下面提供了IL-4序列的表。

[0237] 表6: IL-4氨基酸序列的列表

[0238]

SEQ ID NO: (信息)	氨基酸序列
SEQ ID NO:49 (具有信号肽的 IL-4 野生型)	<u>MGLTSQLLPPLFFLLACAGNFVHGHKCDITL</u> QEIIKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAASKNT TEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGAT AQGFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSC PVKEANQSTLENFLERLKTIMREKYSKCSS
SEQ ID NO:50 在N端"处包括额外的蛋氨酸的 IL-4 起始	MHKCDITLQEIIKTLNSLTEQKTLCTELTVTD IFAASKDTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKD TRCLGATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWG LAGLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMRE KYSKCSS
SEQ ID NO:51 KFR	KCDITLQEIIKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFA ASKNTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTR CLGATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLA GLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMKEKFR KCSS
SEQ ID NO:52 RGA	MDTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCL GATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGL NSCPVKEANQSTLENFLERLRVIMQSKWFK CGAGGNGGHKCDITLQEIIKTLNSLTEQKTL CTELTVTDIFAAS
SEQ ID NO:53 循环排列的野生型 IL-4	MDTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCL GATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGL NSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMREKYSK CSSGGNGGHKCDITLQEIIKTLNSLTEQKTLCT ELTVTDIFAAS
SEQ ID NO:54 循环排列的“KFR”IL-4 变体	MDTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCL GATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGL NSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMKEKFRK CSSGGNGGHKCDITLQEIIKTLNSLTEQKTLCT ELTVTDIFAASRQFYSHHEKDTRCLGATAQ QFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPV KEANQSTLENFLERLRVIMQSKWFKCGAGG NGGHKCDITLQEIIKTLNSLTEQKTLCTELTV TDIFAAS
SEQ ID NO:55 循环排列的“KF”IL-4 变体	MDTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCL GATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGL NSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMKEKFKCS SGGNGGHKCDITLQEIIKTLNSLTEQKTLCTE LTVTDIFAAS

[0239] 下面提供了含有IL-4序列或IL-13序列的细胞因子融合体的表。

[0240] 表7:氨基酸序列的列表

[0241]

SEQ ID NO: (信息)	氨基酸序列
SEQ ID NO:56 IL13-BAD (靶向 IL13Ra2; 被称为 C11; GGGGS 接头)	PGPVPPSTAHRELIEELVNITQNQKAPLCNGS MVWSINLTAGMYCAALESLINVSGCSAIEKT QRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVTGRKIEVA QFVKDLLLHLKKLFKEGQFNGGGGSMFQIP EFEPSEQEDSSSAERGLGPS PAGDGPSGSGKHHRQAPGLLWDASHQQEQ PTSSSHHGGAGAVEIRSRHSAYPAGTEDDEG MGEEPSFPRGRSRAAPPNLWAAQRYGRELR RMSDEFVDSFKKGLPRPKSAGTATQMRQSS SWTRVFQSWWDRNLGRGSSAPSQ
SEQ ID NO:57 A11-BAD (A11 是 IL13Ra1 激动剂; GGGGS 接头)	PGPVPPSTAVRELIEELINITQNQKAPLCNGS MVWSINRTAGMYCAALESLINVSGCSAIEK TQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRSSKIEVA QFVKDLLFHLRTLFRGQFNGGGGSMFQIPE FEPSEQEDSSSAERGLGPS PAGDGPSGSGKHHRQAPGLLWDASHQQEQ PTSSSHHGGAGAVEIRSRHSAYPAGTEDDEG MGEEPSFPRGRSRAAPPNLWAAQRYGRELR RMSDEFVDSFKKGLPRPKSAGTATQMRQSS SWTRVFQSWWDRNLGRGSSAPSQ
SEQ ID NO:58 KFR-BAD (KFR 靶向 2 型 IL-4R; GGGGS 接头)	KCD ITLQEIIKTL NSLTEQKTLC TELTVDIFA ASKNTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTR CLGATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLA GLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMKEKFR KCSSGGGGSMFQIPEFEPSEQEDSSSAERGL GPSPAGDGPSGSGKHHRQAPGLLWDASHQ QEQTSSSHHGGAGAVEIRSRHSAYPAGTED DEGMGEEPSFPRGRSRAAPPNLWAAQRYGR ELRRMSDEFVDSFKKGLPRPKSAGTATQMR QSSSWTRVFQSWWDRNLGRGSSAPSQ
SEQ ID NO:59 pKFR4-Bad-H6	MDTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCL GATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGL NSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMKEKFRK CSSGGNGGCHKDITLQEIIKTLNSLTEQKTLC TELTVDIFAASGSFQIPEFEPSEQEDSSSAER GLGPSPAGDGPSGSGKHHRQAPGLL WDASHQQEQPTSSSHHGGAGAVEIRSRHSA YPAGTEDDEGMGEEPSFPRGRSRAAPPNLW AAQRYGRELRRMSDEFVDSFKKGLPRPKSA GTATQMRQSSSWTRVFQSWWDRNLGRGSS APSQH HHHHH

[0242]

SEQ ID NO: (信息)	氨基酸序列
SEQ ID NO:60 cpKFR4-Bad 融合体; GS 接头	MDTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCL GATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGL NSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMKEKFRK CSSGGNGGCHKDITLQEIITLNSLTEQKTLCT TELTVDIFAASGSFQIPEFEPSEQEDSSSAER GLGPSPAGDGPSSGSGKHHRQAPGLL WDASHQQEQPTSSSHHGGAGAVEIRSRHSA YPAGTEDDEGMGEESPFRGRSRAAPPNLW AAQRYGRELRRMSDEFVDSFKKGLPRPKSA GTATQMRQSSSWTRVFQSWWDRNLGRGSS APSQ
SEQ ID NO:61 cpIL4-BAD; GS 接头	MDTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCL GAT AQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSC PVKEANQSTLENFLERLKTIMREKYSKCSSG GNGGCHKDITLQEIITLNSLTEQKTLCTELT VTDIFAASGSFQIPEFEPSEQEDSSSAERGLG PSPAGDGPSSGSGKHHRQAPGLLWDASHQQE QPTSSSHHGGAGAVEIRSRHSAYPAGTEDDE GMGEESPFRGRSRAAPPNLWAAQRYGREL RRMSDEFVDSFKKGLPRPKSAGTATQMRQS SSWTRVFQSWWDRNLGRGSSAPSQ
SEQ ID NO:62 cpIL-4-BAD H6; GS 接头	MDTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCL GATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGL NSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMREKYSK CSSGGNGGCHKDITLQEIITLNSLTEQKTLCT TELTVDIFAASGSFQIPEFEPSEQEDSSSAER GLGPSPAGDGPSSGSGKHHRQAPGLL WDASHQQEQPTSSSHHGGAGAVEIRSRHSA YPAGTEDDEGMGEESPFRGRSRAAPPNLW AAQRYGRELRRMSDEFVDSFKKGLPRPKSA GTATQMRQSSSWTRVFQSWWDRNLGRGSS APSQH H H H H
SEQ ID NO:63 IL13-BAD(靶向 IL13Ra1 并且被称为 IL13DN)	PGPVPPSTAVRALIEELINITQNQKAPLCNGS MVWSINRTAGMYCAALESINVS GC SAIEK TQDMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRSSKIEVA QFVKDLLFHLRTLRFREGQFN G G G S G G G S G G G S F Q I P E F E P S E Q E D S S S A E R G L G P S P A G D G P S G S G K H H R Q A P G L L W D A S H Q Q E Q P T S S S H H G G A G A V E I R S R H S A Y P A G T E D D E G M G E E P S P F R G R S R A A P P N L W A A Q R Y G R E L R R M S D E F V D S F K K G L P R P K S A G T A T Q M R Q S S S W T R V F Q S W W D R N L G R G S S A P S Q

[0243]

SEQ ID NO: (信息)	氨基酸序列
SEQ ID NO:64 IL-4-BclxL; GGGGS 接头	KCDITLQEIIKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFA ASKNTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTR CLGATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLA GLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMREKYS KCSSGGGGSMSQSNRELVV DFLSYKLSQKGYSWSQFSDVEENRTEAPEG TESEMETPSAINGNPSWHLADSPAVNGATG HSSSLDAREVIPMAAVKQALREAGDEFELR YRRAFSDLTSQLHITPGTAYQSFEQVVNELF RDGVNWGRIVAFFSFGGALCVESVDKEMQ VLVSRIAAMATYLNHDHLEPWIQENGWD T FVELYGNNAAESRKQGERFNRWFLTGMT VAGVVLLGSLFSRK
SEQ ID NO:65 MDNA55	MDTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCL GATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGL NSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMREKYSK CSSGGNGGCHKDITLQEIIKTLNSLTEQKTL CTELTVTDIFAASKASGGPEGGLAALTAHQ CHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRL VALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGD LGEAIREQPEQARLALTAAAESERFVRQGT GNDEAGAANGPADSGDALLERNYPTGAEFL GDGGDVSFSTRGTQNWTVRLLQAHQLE ERGYVFGYHGTFLAAQSIVFGGVRARSQ DLDAIWGRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDAR GRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTAAAP EAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRL ETILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDL PSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPKDEL
SEQ ID NO:66 cpS4-Bad-H6	MDTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCL GATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGL NSCPVKEANQSTLENFLERLRVIMQSKWFK CGAGGNGGCHKDITLQEIIKTLNSLTEQKTL CTELTVTDIFAASGSFQIPEFEPSEQEDSSAE RGLGSPAGDGPSGSGKHHRQAPGLL WDASHQQEQPTSSSHHGAGAVEIRSRHSA YPAGTEDDEGMGEESPFRGRSRAAPPNLW AAQRYGRELRRMSDEFVDSFKKGLPRPKSA GTATQMRQSSSWTRVFQSWWDRNLGRGSS APSQHHHHHH

[0244]

SEQ ID NO: (信息)	氨基酸序列
SEQ ID NO:67 cpS4-Bad	MDTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCL GATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGL NSCPVKEANQSTLENFLERLRVIMQSKWFK CGAGGNGGHKCDITLQEIIKTLNSLTEQKTL CTELTVTDIFAASGSFQIPEFEPSEQEDSSSAE RGLGPSPAGDGPSGSGKHHRQAPGLL WDASHQQEQPTSSSHHGGAGAVEIRSRHSA YPAGTEDDEGMGEESPFRGRSRAAPPNLW AAQRYGRELRRMSDEFVDSFKKGLPRPKSA GTATQMRQSSSWTRVFQSWWDRNLGRGSS APSQ
SEQ ID NO:68 IL-4-Bad-H6	MHKCDITLQEIIKTLNSLTEQKTLCTELTVTD IFAASKDTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKD TRCLGATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWG LAGLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMRE KYSKCSSGSFQIPEFEPSEQEDSSSAERGLGP SPAGDGPSGSGKHHRQAPGLLWDAS HQQEQPTSSSHHGGAGAVEIRSRHSAYPAGT EDDEGMGEESPFRGRSRAAPPNLWAAQRY GRELRRMSDEFVDSFKKGLPRPKSAGTATQ MRQSSSWTRVFQSWWDRNLGRGSSAPSQH HHHHH
SEQ ID NO:69 IL-4-Bad-H6	MHKCDITLQEIIKTLNSLTEQKTLCTELTVTD IFAASKDTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKD TRCLGATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWG LAGLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMRE KYSKCSSGSFQIPEFEPSEQEDSSSAERGLGP SPAGDGPSGSGKHHRQAPGLLWDAS HQQEQPTSSSHHGGAGAVEIRSRHSAYPAGT EDDEGMGEESPFRGRSRAAPPNLWAAQRY GRELRRMSDEFVDSFKKGLPRPKSAGTATQ MRQSSSWTRVFQSWWDRNLGRGSSAPSQ

[0245] 表4:所选融合配偶体的列表

[0246]

SEQ ID NO: (信息)	氨基酸序列
SEQ ID NO: 38 BAD 氨基酸序列	MFQIP EFEPSEQEDS SSAERGLGPS PAGDGPSGSG KHHRQAPGLL WDASHQQEQP TSSSHHGGAG AVEIRSRHSA YPAGTEDDEG MGEEPSFRG RSRAAPPNLW AAQRYGREL RMSDEFVDSF KKGLPRPKSA GTATQMRQSS SWTRVFQSWW DRNLGRGSSA PSQ
SEQ ID NO: 39 Bcl-2 氨基酸序列	MAHAGRTGYD NREIVMKYIH YKLSQRGYEW DAGDVGAAPP GAAPAPGIFS SQPGHTHPA ASRDPVARTS PLQTPAAPGA AAGPALSPVP PVVHLTLRQA GDDFSRRYRR DFAEMSSQLH LTPFTARGRF ATVVEELFRD GVNWGRIVAF FEFGGVMCVE SVNREMSPLV DNIALWMTEY LNRHLHTWIQ DNGGWDAFVE LYGPSMRPLF DFSWLSLCTL LSLALVGACI TLGAYLGHK
SEQ ID NO: >HsBAD_Q92934-1(UniProtKB)	MFQIPEFEPs EQEDSSSAER GLGPSPAGDG PSGSGKHHRQ APGLLWDASH QQEQPTSSSH HGGAGAVEIR SRHSSYPAGT EDDEGMGEEP SPFRGRSRSR PPNLWAAQRY GRELRRMSDE FVDSFKKGLP RPKSAGTATQ MRQSSSWTRV FQSWWDRNLG RGSSAPSQ
SEQ ID NO: >HsBAX_Q07812-1(UniProtKB)	MDGSGEQPRG GGPTSSEQIM KTGALLLQGF IQDRAGRMGG EAPALALDPV PQDASTKKLS ECLKRIGDEL DSNMELQRM AAVDTDSPRE VFRVAADMF SDGNFNWGRV VALFYFASKL VLKALCTKVP ELIRTIMGWT LDFLRERLLG WIQDQGGWDG LLSYFGTPTW QTVTIFVAGV LTASLTIWKK MG
SEQ ID NO: >HsBAK1_Q16611-1(UniProtKB)	MASGQGPGPP RQECGEPALP SASEEQVAQD TEEVFRSYVF YRHQQEQEAE GVAAPADPEM VTLPLQPSST MGQVGRQLAI IGDDINRRYD SEFQTMLQHL QPTAENAYEY FTKIATSLFE SGINWGRVVA LLGFGYRLAL HVYQHGLTGF LGQVTRFVVD FMLHHCIARW IAQRGGWVAA LNLGNGPILN VLVVLGVVLL GQFVVRFFK S

[0247]	SEQ ID NO: >HsBIK_Q13323-1(UniProtKB)	MSEVRPLSRD ILMETLLYEQ LLEPPTMEVL GMTDSEEDLD PMEDFDSLEC MEGSDALALR LACIGDEMDV SLRAPRLAQL SEVAMHSLGL AFIYDQTEDI RDVLRSFMDG FTTLENIMR FWRSPNPGSW VSCEQVLLAL LLLLALLLPL LSGGLHLLK
	SEQ ID NO: >HsBID_P55957-1(UniProtKB)	MDCEVNNGSS LRDECITNLL VFGFLQSCSD NSFRRELDAL GHELPVLAPQ WEGYDELQTD GNRSSHRLG RIEADSESQE DIIRNIARHL AQVGDSMDRS IPPGLVNGLA LQLRNTSRSE EDRNRDLATA LEQLLQAYPR DMEKEKTMVLV LALLLAKKVA SHTPSLLRDV FHTTVNFINQ NLRTYVRSLA RNGMD

[0248] C. 货物部分

[0249] 货物部分减少或抑制癌症干细胞生长或者杀死癌细胞和/或癌症干细胞。在一些实例中,货物部分不是蛋白质,而是减少或抑制癌症干细胞生长或者杀死癌细胞和/或癌症干细胞的其他分子,诸如化学治疗剂。在一些实例中,货物部分还减少或抑制大量癌细胞生长或者杀死癌细胞。任何起到减少或抑制癌症干细胞生长或者杀死此类细胞的作用的蛋白质或其他试剂都可用作货物部分。例如,具有控制细胞生命周期功能的毒素和蛋白质可用作货物部分。可用作货物部分的毒素包括由微生物、植物或动物产生的毒素以及由人体细胞产生的毒素。类似地,任何天然细胞生长控制蛋白都可用作货物部分。例如,在生物体的正常生命周期中触发细胞死亡的蛋白质可用作货物部分。在一些实例中,溶瘤病毒(例如,参见Allen等人,《分子治疗(Mol.Ther.)》16:1556-64,2008)或携带细胞毒素剂的脂质体(例如,参见Madhankumar等人,《分子癌症治疗(Mol.Cancer.Ther.)》5:3162-9,2006)用作货物蛋白。

[0250] 在一个实例中,货物部分是毒素。可使用的示例性毒素包括成孔毒素和内化后抑制细胞生长的毒素。在其他实例中,货物部分是作为细胞凋亡触发蛋白和细胞生长抑制蛋白的蛋白质。在一些实例中,毒素是修饰的细菌毒素,使得所得毒素的免疫原性低于天然毒素。此类修饰的毒素(诸如修饰的假单胞菌外毒素A)可降低患者的免疫原应答,从而允许重复给药。

[0251] 成孔毒素是在细胞膜中形成孔从而经由细胞裂解杀死细胞的毒素。示例性的成孔毒素包括但不限于人类毒素(诸如穿孔素)或细菌毒素(诸如气溶素)以及衍生自天然存在的成孔蛋白毒素(nPPT)的修饰的成孔蛋白毒素(诸如气溶素或气溶素相关多肽)。合适的气溶素相关nPPT具有以下特征:经由蛋白酶切割通过去除抑制结构域而活化的成孔活性,以及通过一个或多个结合结构域与细胞膜上存在的受体结合的能力。在一些实例中,接头可以被工程改造为对蛋白酶敏感或具有化学敏感性。可用作货物部分的成孔毒素的其他实例包括但不限于:来自嗜水气单胞菌、易损气单胞菌和杀鲑气单胞菌的气溶素原;来自败毒梭菌的 α 毒素;炭疽保护性抗原;霍乱弧菌VCC毒素;来自产气荚膜梭菌的 ϵ 毒素;以及苏云金芽孢杆菌 δ 毒素。气溶素原工程的详细描述可见于美国专利第7,282,476号,该美国专利通过

引用并入本文。可用作货物部分的其他毒素包括在细胞内起作用的毒素。例如,炭疽、白喉、霍乱和肉毒杆菌毒素包括在细胞质中起作用的部分,以及用作与细胞表面结合的部分。这些毒素或其部分可以与靶向部分联接并用于抑制癌症干细胞生长。核糖核酸酶A(RNase A)超家族的精选成员是有效的细胞毒素。这些细胞毒性核糖核酸酶进入胞质溶胶,其在胞质溶胶中降解细胞RNA并引起细胞死亡。

[0252] 在一些实例中,核糖体失活蛋白质可用作毒素。在这些实例中,货物部分是具有核糖体失活活性的多肽,包括但不限于白树毒素、三角梅核糖体失活蛋白、皂草素、蓖麻毒蛋白、蓖麻毒蛋白A链、异株泻根毒蛋白、局限曲菌素及其变体。白喉毒素和假单胞菌外毒素A经由延伸因子2的ADP-核糖基化来抑制蛋白质合成。当货物部分是核糖体失活蛋白或经由延伸因子2的ADP核糖基化抑制蛋白质合成时,靶向IL-4的货物蛋白可在与癌症干细胞结合后被内化。诱导细胞凋亡的货物部分也可用于靶向癌细胞和/或癌症干细胞。诱导细胞凋亡的货物部分的例子包括半胱天冬酶、颗粒酶和BCL-2促细胞凋亡相关蛋白,诸如BAX(例如,登录号:CAE52910)、BAD(例如,登录号:CAG46757)、BAT(例如,登录号:AA107425)、BAK(例如,登录号:AAA74466)、BIK(例如,登录号:CAG30276)、BOK(例如,登录号:AAH06203)、BID(例如,登录号:CAG28531)、BIM(例如,登录号:NP_619527)和BMF(例如,登录号:AAH69328)。这些货物部分可单独使用或组合使用以减少或抑制癌症干细胞生长。

[0253] 气溶素是一种形成通道的毒素,作为无活性的原毒素产生,称为气溶素原(PA)。表1中提供了可用于靶向IL-4的货物蛋白的示例性气溶素和PA序列。PA蛋白含有许多离散官能团,包括结合结构域、毒素结构域以及含有蛋白酶活化位点的C端抑制肽结构域。结合结构域识别并结合糖磷脂酰肌醇(GPI)膜锚(诸如可见于T淋巴细胞上的Thy-1中),可见于红细胞膜中的PIGA基因产物和前列腺干细胞抗原(PSCA)。气溶素原中的活化或蛋白水解位点是六氨基酸序列,其被弗林蛋白酶家族识别为蛋白水解底物。PA在由弗林蛋白酶水解C端抑制片段时被活化。活化的气溶素与细胞膜中的GPI锚定蛋白质结合并形成七聚体,该七聚体插入细胞膜中,产生约17埃的明确定义的通道。通道形成引起细胞快速死亡。野生型气溶素对哺乳动物细胞(包括红细胞)是有毒的,例如在1纳摩尔或更少时。

[0254] 在一些实例中,靶标货物蛋白是天然弗林蛋白酶位点被不同的切割位点(诸如前列腺特异性蛋白酶切割位点(例如,PSA特异性切割位点,其容许变体PA在存在前列腺特异性蛋白酶诸如PSA、PMSA或HK2的情况下活化))替代的PA分子。在一个实例中,将前列腺特异性蛋白酶切割位点插入到PA的天然弗林蛋白酶切割位点中,使得PA在存在前列腺特异性蛋白酶但不存在弗林蛋白酶的情况下被活化。在另一个实例中,变体PA分子还包括功能上缺失的结合结构域(例如,天然PA蛋白序列的约氨基酸1-83)。可以使用本领域已知的任何方法进行功能性缺失,诸如缺失、插入、突变或取代。在一些实例中,靶向IL-4的货物蛋白包括变体PA分子,在该分子中,天然结合结构域在功能上缺失并被前列腺组织或其他组织特异性结合结构域替代。在其他实例中,变体PA分子包括弗林蛋白酶切割位点和被前列腺组织特异性结合结构域替代的功能上缺失的结合结构域。此类变体PA分子经由前列腺组织特异性结合结构域靶向前列腺细胞,并在存在弗林蛋白酶的情况下被活化。

[0255] 三角梅核糖体失活蛋白是最初从Bougainvillea speotabilis分离的核糖体结合蛋白(参见美国专利第6,680,296号)。示例性的修饰的三角梅核糖体失活蛋白描述于WO 2005/090579和美国专利第7,339,031号中。三角梅核糖体失活蛋白会破坏核糖体并引起蛋

白质合成停止和细胞死亡。可用于本公开的靶向IL-4的货物蛋白的示例性三角梅核糖体失活蛋白包括GenBank登录号AAL35962中的那些以及美国专利第6,680,296号、第7,339,031号和PCT申请W0 2005/090579中提供的那些天然和修饰的三角梅核糖体失活蛋白序列(三角梅核糖体失活蛋白序列通过引用并入本文),以及与此类序列具有至少60%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或甚至至少99%的序列同一性的序列。BAD、BCL2相关的细胞死亡激动剂是程序性细胞死亡(细胞凋亡)的调节剂。BAD通过与BCL-xL和BCL-2形成异二聚体并逆转它们的死亡阻遏物活性来正向调节细胞凋亡。BAD的促细胞凋亡活性通过其磷酸化而被调节。可用于本公开的靶向IL-4的货物蛋白的示例性BAD蛋白包括GenBank登录号CAG46757、AAH01901.1和CAG46733.1中的那些;以及美国专利第6,737,511号中提供的那些序列(通过引用并入本文的序列),以及与此类序列具有至少60%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或甚至至少99%的序列同一性的序列,只要变体保留或具有增强的天然BAD蛋白的生物活性。

[0256] BAX、BCL2相关的X蛋白是程序性细胞死亡(细胞凋亡)的调节剂。该蛋白质与BCL2形成异二聚体,并用作细胞凋亡活化剂。BAX与线粒体电压依赖性阴离子通道(VDAC)相互作用并增加该通道的开度,从而引起膜电位损失和细胞色素c的释放。可用于本公开的靶向IL-4的货物蛋白的示例性BAX蛋白包括由GenBank登录号CAE52909.1、AA022992.1、EAW52418.1、美国专利第6,645,490号提供的那些(IL2-Bax构建体中的Bax是可用于本公开中的Bax- α 变体),以及与此类序列具有至少60%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或甚至至少99%的序列同一性的序列,只要变体保留或具有增强的天然BAX蛋白的生物活性。

[0257] 在一些实例中,靶向IL-4的货物蛋白的BAX蛋白可以被修饰,使得C端锚定结构域缺失并被CaaX序列替代。CaaX是具有半胱氨酸- α - α -X序列的肽,其中,“X”是任何氨基酸,而“ α ”是脂肪族氨基酸。因为最佳细胞凋亡活性需要BAX的膜缔合,所以添加膜结合结构域(诸如CaaX)可增强其促细胞凋亡活性。具有CaaX序列的蛋白质被法尼基化。法尼基化的蛋白靶向膜(例如,参见Wright和Philip,《脂质研究杂志(J.Lipid Res.)》,2006,47(5):883-91)。含有CaaX序列的潜在BAX变体可能含有或可能不含C端锚定结构域。

[0258] 假单胞菌外毒素(PE)是由假单胞菌分泌的毒素。天然PE对哺乳动物细胞具有细胞毒性,因为它能够通过受体介导的内吞作用进入细胞,然后在一系列细胞内处理步骤后易位到细胞溶质和ADP核糖基化延伸因子2。这引起蛋白质合成和细胞死亡的抑制。PE具有三个功能结构域:氨基末端受体结合结构域、中间易位结构域和羧基端ADP核糖基化结构域。修饰的PE分子可包括结构域Ia的消除,以及结构域II和III中的缺失。可用于本公开的靶向IL-4的货物蛋白的示例性PE蛋白包括表1中提供的那些,以及与此类序列具有至少60%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或甚至至少99%的序列同一性的序列,只要变体保留或具有增强的天然PE蛋白的生物活性。

[0259] 毒胡萝卜素是一种肉瘤/内质网Ca²⁺ATP酶抑制剂。毒胡萝卜素被归类为倍半萜内酯,它通过阻断细胞将钙泵入肌质网和内质网的能力(这会引发这些储存物被耗尽)来提高细胞溶质钙浓度。储存物耗尽可以二次活化质膜钙通道,从而允许钙流入细胞溶质中。

[0260] 核糖核酸酶A(RNaseA)是一种切割单链RNA的核酸内切酶。RNase A毒素可从哺乳动物和爬行动物获得。可用于本公开的靶向IL-4的货物蛋白的示例性RNase A蛋白包括表1

中提供的那些,以及与此类序列具有至少60%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或甚至至少99%的序列同一性的序列,只要变体保留或具有增强的天然RNaseA毒素的生物活性。

[0261] 所用的货物部分可包括天然序列(诸如GenBank登录号以及表1中引用的专利和上文所列专利中呈现的序列)及其变体,诸如与天然货物部分具有至少98%、至少95%、至少90%、至少80%、至少70%或至少60%的序列同一性的变体,只要变体保留或具有增强的天然货物部分的生物活性(例如,与表1中列出的和上文列出的GenBank登录号至少有大约该量的序列同一性)。在一些实例中,变体序列保留基本上相同量(或甚至更多)的货物部分的天然生物学功能,诸如杀死癌症干细胞或抑制癌症干细胞生长的能力。货物部分也可以是保留大量蛋白质天然生物学功能的天然序列的片段。

[0262] 通过将货物部分联接到靶向部分,将货物部分工程改造为靶向癌细胞和/或癌症干细胞。靶向部分包括可与癌症干细胞表面靶标结合的试剂。

[0263] D. 溶瘤病毒靶向部分

[0264] 在一些实例中,本发明的货物部分可用于靶向溶瘤病毒(例如,参见Allen等人,《分子治疗(Mol. Ther.)》16:1556-64,2008)。许多病毒可用作溶瘤病毒,包括腺病毒以及自我复制的甲病毒,例如图17中提供的那些,以及溶瘤痘苗病毒(参见,例如W02013038066,其通过整体引用并入本文)。

[0265] 其他溶瘤病毒可包括塞内加谷病毒、新城疫病毒(也称为新城病毒)、马拉巴病毒、VSV、疱疹病毒(包括HSV-1)、麻疹病毒、脊髓灰质炎病毒、呼肠孤病毒、柯萨奇病毒、慢病毒、麻疹病毒、流感病毒、辛比斯病毒(Sinbis virus)、粘液瘤病毒和/或逆转录病毒(参见,例如,Twumasi-Boateng等人,《(溶瘤病毒作为联合免疫疗法的工程平台Oncolytic viruses as engineering platforms for combination immunotherapy)》,《癌症自然评论(Nature Reviews Cancer)》,2018以及Kaufman等人,《癌症免疫疗法(Cancer Immunotherapy)》,14:642-662(2015),所有这些文献都通过整体引用并入本文)。在一些实施方案中,溶瘤病毒包括但不限于腺病毒、自我复制的甲病毒、痘苗病毒、塞内加谷病毒、新城疫病毒、马拉巴病毒、水泡性口炎病毒(VSV)、疱疹病毒(包括HSV-1和HSV-2)、麻疹病毒、脊髓灰质炎病毒、呼肠孤病毒、柯萨奇病毒、慢病毒、麻疹病毒、流感病毒、辛比斯病毒、粘液瘤病毒和/或逆转录病毒。其他溶瘤病毒包括,例如,oncoVex/T-VEC,其涉及优先感染癌细胞的复制条件单纯疱疹病毒的肿瘤内注射。该病毒也被工程改造为表达GM-CSF,能够在癌细胞内复制引起其裂解,从而释放新病毒和一系列肿瘤抗原,并在该过程中分泌GM-CSF。此类溶瘤病毒疫苗增强了在肿瘤微环境中的DC功能,以刺激抗肿瘤免疫应答。这些溶瘤病毒可用于将本文所述的IL-4和/或IL-13突变蛋白靶向或递送至肿瘤。在一些实施方案中,IL-4和/或IL-13突变蛋白是本文公开的任何IL-4和/或IL-13突变蛋白或变体。在一些实施方案中,IL-4和/或IL-13突变蛋白序列与SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:48和/或SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:69中的任何一个具有90%的同一性。在一些实施方案中,IL-4和/或IL-13突变蛋白包括SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:48和/或SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:69中的任何一个。在一些实施方案中,溶瘤病毒包含能够表达如本文所述的IL-4和/或IL-13突变蛋白的转基因。在一些实施方案中,溶瘤病毒包含能够表达IL-4和/或IL-13突变蛋白的转基因,该突变蛋白包含SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:48和/或SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:69中的任何一个。在一些实施方案中,

溶瘤病毒包含编码IL-4和/或IL-13突变蛋白的核酸,该突变蛋白包含SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:48和/或SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:69中的任何一个。在一些实施方案中,溶瘤病毒包含表达为治疗有效载荷的转基因。在一些实施方案中,治疗有效载荷是如本文所述的IL-4和/或IL-13。在一些实施方案中,治疗有效载荷是IL-4和/或IL-13突变蛋白,该突变蛋白包含SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:48和/或SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:69中的任何一个。

[0266] 在一些实施方案中,IL-4R靶向部分可包含靶向TME(肿瘤微环境)的免疫抑制性细胞(诸如肿瘤相关巨噬细胞)和MDSC(髓系来源抑制性细胞)的IL-4序列或其变体,以便为溶瘤病毒提供改进的治疗益处。在一些实施方案中,IL-4R靶向部分包含如本文所述的任何IL-13和/或IL-4序列。在一些实施方案中,IL-4R靶向部分包含SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:48和/或SEQ ID NO:51-SEQ ID NO:69中的任何一个。在一些实施方案中,IL-4R靶向部分包含IL-13变体/IL-13超级因子,包括靶向2型IL-4R和/或靶向IL13ra2的那些,其可将溶瘤病毒引导至肿瘤抗原。在一些实施方案中,IL-4R靶向部分包含IL-13变体/IL-13超级因子,包括SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57和/或SEQ ID NO:63中提供的那些,其也可将溶瘤病毒引导至肿瘤抗原。在一些实施方案中,溶瘤病毒被一种细胞因子靶向并表达另一种细胞因子。在一些实施方案中,溶瘤病毒包含被表达为治疗有效载荷的转基因。在一些实施方案中,表达的治疗有效载荷是如本文所述的IL-4序列。在一些实施方案中,表达的治疗有效载荷是如本文所述的IL-13序列。

[0267] 在一些实施方案中,溶瘤病毒是溶瘤痘苗病毒。在一些实施方案中,溶瘤痘苗病毒载体的特征在于病毒颗粒的类型是细胞内成熟病毒(IMV)、细胞内包膜病毒(IEV)、细胞相关包膜病毒(CEV)或细胞外包膜病毒(EEV)。在一些实施方案中,溶瘤痘苗病毒颗粒的类型是EEV或IMV。在一些实施方案中,溶瘤痘苗病毒颗粒的类型是EEV。

[0268] 通常,构建溶瘤痘苗病毒重组体和细胞以及包含所述载体的药物组合物,所述载体优先在肿瘤细胞中复制并表达至少一种转基因以促进抗肿瘤功效和细胞凋亡诱导并调节受试者中的宿主免疫应答。根据本发明,可将溶瘤腺病毒和溶瘤痘苗病毒与如本文所述的IL-4和/或IL-13靶向部分组合以靶向溶瘤痘苗病毒或溶瘤腺病毒。瘤溶解可释放肿瘤抗原并提供共刺激危险信号。然而,武装病毒可进一步提高疗效。例如,已知CD40配体(CD40L、CD154)可诱导肿瘤细胞凋亡,并且还触发多种免疫机制。其中之一是1型T辅助细胞(Th1)应答,其引起细胞毒性T细胞的活化和免疫抑制的减少。本发明提供了用本发明的IL-4和/或IL-13靶向部分靶向(例如,“武装”)的溶瘤病毒。

[0269] 在一些实施方案中,溶瘤病毒是修饰的痘苗病毒载体、病毒颗粒、宿主细胞、药物组合物和包含痘苗病毒基因组的试剂盒,其中,胸苷激酶基因通过胸苷激酶(TK)基因中的取代和/或开放阅读框架消除至少一个核苷酸的缺失提供部分缺失的胸苷激酶基因而失活,痘苗生长因子基因缺失,并且修饰的痘苗病毒载体包含至少一个编码非病毒蛋白的核酸序列(例如,如本文所述的IL-4和/或IL-13靶向部分)。在另一方面,提供了修饰的痘苗病毒载体、病毒颗粒、药物组合物或试剂盒可用于癌症治疗、用于诱发受试者中的免疫应答、用于抑制哺乳动物中恶性细胞增殖的方法、用于治疗或预防癌症、用于检测受试者中修饰的痘苗病毒的存在以及用作原位癌症疫苗,任选地与腺病毒组合。在一些实施方案中,本发明提供了生产包含痘苗病毒基因组的修饰的痘苗病毒的方法,其中,胸苷激酶基因通过胸苷激酶(TK)基因中的取代和/或消除至少一个核苷酸缺失的开放阅读框架提供部分缺失的

胸苷激酶基因而失活,痘苗生长因子基因缺失,并且修饰的痘苗病毒载体包含至少一个编码非病毒蛋白(例如,如本文所述的IL-4和/或IL-13靶向部分)的核酸序列,该方法包括以下步骤:提供能够维持痘苗病毒颗粒的产生并携带修饰的痘苗病毒载体的生产细胞;在适合病毒复制和生产的条件下培养生产细胞;以及收集病毒颗粒。

[0270] 一般地,本发明还提供了给药用如本文所述的IL-4和/或IL-13部分“武装”或靶向的溶瘤病毒的方法。给药途径自然地随肿瘤的位置和性质而变化,并且包括例如皮内、经皮、肠胃外、静脉内、肌肉内、鼻内、皮下、区域性(例如,在肿瘤附近,特别是在脉管系统或肿瘤的邻近脉管系统的情况下)、经皮、气管内、腹膜内、动脉内、膀胱内、瘤内、吸入、灌注、灌注和口服给药。组合物是相对于特定给药途径调配的。

[0271] 1. 溶瘤痘苗病毒

[0272] 痘苗病毒是痘病毒科正痘病毒属的成员。它具有大型双链DNA基因组(约200kb,约200个基因)和复杂的形态发生途径,从每个受感染的细胞中产生不同形式的感染性病毒粒子。病毒颗粒含有围绕核心的脂质膜。病毒核心含有病毒结构蛋白、紧密压缩的病毒DNA基因组和转录酶。痘苗病毒的尺寸为约360x 270x 250nm,并且重量为约5-10fg。基因与少量非编码DNA被紧密包装,并且开放阅读框架(ORF)缺乏内含子。存在三类基因(早期、中期、晚期)。早期基因(约100个基因;立即和延迟)编码主要与免疫调节和病毒DNA复制有关的蛋白质。中期基因编码表达晚期基因(例如转录因子)所需的调节蛋白,而晚期基因编码制造病毒颗粒和包装在新病毒粒子内以启动下一轮感染的酶所需的蛋白质。痘苗病毒在细胞质中复制。

[0273] 已经鉴定了不同的痘苗病毒株(例如:哥本哈根、修饰的病毒安卡拉(MVA)、李斯特、天坛、惠氏(=纽约市卫生局)、西储(WR))。已对WR痘苗的基因组进行了测序(登录号AY243312)。在一些实施方案中,溶瘤痘苗病毒是哥本哈根、修饰的病毒安卡拉(MVA)、李斯特、天坛、惠氏或西储(WR)痘苗病毒。

[0274] 不同形式的病毒颗粒在病毒生命周期中具有不同的作用。存在多种形式的病毒颗粒:细胞内成熟病毒(IMV)、细胞内包膜病毒(IEV)、细胞相关包膜病毒(CEV)、细胞外包膜病毒(EEV)。EEV颗粒具有衍生自跨高尔基网络的额外膜。这种外膜有两个重要作用:a)它可保护内部IMV免受免疫攻击,以及b)它可介导病毒与细胞表面的结合。

[0275] CEV和EEV通过被包裹在宿主衍生的膜中来帮助病毒逃避宿主抗体和补体。IMV和EEV颗粒在其生物学特性上存在一些差异,并且它们在病毒生命周期中具有不同的作用。EEV和IMV与不同的(未知的)受体(1)结合并通过不同的机制进入细胞。EEV颗粒经由内吞作用进入细胞,并且该过程对pH敏感。内化后,EEV的外膜在酸化的核内体中破裂,并且暴露的IMV与核内体膜融合,并且病毒核心被释放到细胞质中。另一方面,IMV通过细胞膜和病毒膜的融合进入细胞中,并且该过程不依赖于pH。除此之外,CEV诱导从细胞表面形成肌动蛋白尾部,肌动蛋白尾部将病毒粒子朝向未受感染的邻近细胞驱动。

[0276] 此外,EEV对抗体(NAb)的中和作用和补体毒性具有抗性,而IMV则不然。因此,EEV介导体外和体内的长距离播散。彗星抑制测试已成为测量EEV特异性抗体的一种方式,因为即使游离的EEV不能被EEV NAb中和,从受感染的细胞释放EEV也会被EEV NAb阻断并且看不到彗星形斑块。与IMV颗粒(较低的颗粒/pfu比率)相比,EEV具有较高的特异性感染性,这使得EEV成为治疗用途的感兴趣候选物。然而,EEV的外膜是一种极其脆弱的结构,并且需要谨

慎处理EEV颗粒,这使得难以获得治疗应用所需数量的EEV颗粒。EEV外膜在低pH值(pH约为6)下破裂。一旦EEV外膜破裂,则包膜内的病毒颗粒将作为IMV保持完整的传染性。

[0277] 一些宿主细胞衍生的蛋白质与EEV制剂共定位,但不与IMV共定位,并且细胞衍生的蛋白质的量取决于宿主细胞系和病毒株。例如,与VV IHD-J株相比,WR EEV含有更多的细胞衍生的蛋白质。宿主细胞衍生的蛋白质可以修饰EEV颗粒的生物效应。例如,将宿主膜蛋白CD55掺入EEV的表面中使其对补体毒性具有抗性。在本发明中,表明EEV颗粒表面中的人类A549细胞衍生的蛋白质可以将病毒靶向人类癌细胞。在人类免疫缺陷病毒1型的研究中也证实了类似的现象,其中,宿主衍生的ICAM-1糖蛋白增加了病毒的传染性。IEV膜含有至少9种蛋白质,其中两种不存在于CEV/EEV中。F12L和A36R蛋白参与IEV运输到细胞表面,在该细胞表面,它们被留下而不是CEV/EEV(9,11)的一部分。(IEV)/CEV/EEV中常见的蛋白质有7种:F13L、A33R、A34R、A56R、B5R、E2、(K2L)。对于痘苗病毒的西储株,最多1%的病毒颗粒通常是EEV,并在生产细胞瘤溶解之前被释放到培养上清液中。国际卫生署(IHD)-J痘苗株释放50倍之多的EEV颗粒。然而,尚未研究IHD用于人类癌症治疗。IHD-W表型主要归因于A34R EEV凝集素样蛋白内的点突变。此外,A34R的缺失会增加释放的EEV的数量。EEV颗粒可在感染后6小时(如CEV)首先在细胞表面被检测到,以及在5小时后在上清液(IHD-J株)中被检测到。与高病毒剂量相比,低感染复数(MOI)感染可引起较高的EEV发生率。CEV与EEV之间的平衡受宿主细胞和病毒株的影响。

[0278] 痘苗已被用于根除天花,并且后来被用作外源基因的表达载体以及用作传染病和癌症的重组活疫苗。痘苗病毒是在人类中使用最广泛的痘病毒,因此人类使用的安全数据非常广泛。在世界范围的天花疫苗接种计划中,成千上万人已安全地接种了修饰的痘苗病毒株,并且仅报告了非常罕见的严重不良事件。那些是全身性牛痘(牛痘在体内系统性传播)、多形性红斑(毒性/过敏性反应)、牛痘性湿疹(皮肤广泛感染)、进行性痘疹(组织破坏)和疫苗接种后脑炎。

[0279] 在1960年代至1990年代,共有44名黑色素瘤患者在早期临床试验中接受了野生型痘苗病毒治疗,并且被注射肿瘤的总体客观应答率为50%。还观察到了一些有益的免疫应答(36)。野生型痘苗病毒也已用于治疗膀胱癌、肺癌和肾癌以及骨髓瘤,并且仅观察到轻微的不良事件。JX-594是一种编码GM-CSF的溶瘤惠氏株痘苗病毒,已在三项I期研究中成功通过评估,并且随机II期试验的初步结果已在科学会议上公布。

[0280] 痘苗病毒由于具有几个特点而对癌症基因治疗很有吸引力。它对癌细胞具有天然的趋向性,并且通过缺失一些病毒基因可以显著提高选择性。本发明涉及使用双缺失痘苗病毒(vvdd),其中,两个病毒基因(病毒胸苷激酶(TK)和痘苗生长因子(VGF))至少部分缺失。病毒在正常细胞而非癌细胞中进行复制需要TK和VGF基因。部分TK缺失可以在赋予活性的TK区中被工程改造。

[0281] TK缺失的痘苗病毒依赖于进行DNA合成和复制的分裂细胞中存在的细胞核苷酸库。在一些实施方案中,TK缺失显著限制了静息细胞中的病毒复制,从而允许高效的病毒复制仅在活跃分裂的细胞(例如癌细胞)中发生。VGF由受感染的细胞分泌,并通过充当有丝分裂原而对周围细胞产生旁分泌启动效应。在静息细胞(非癌细胞)中VGF缺失的痘苗病毒的复制高度减弱。TK和VGF缺失的影响已被证明是协同性的。

[0282] 2. 溶瘤腺病毒

[0283] 通常,腺病毒是36kb线性双链DNA病毒 (Grunhaus和Horwitz,1992)。术语“腺病毒”或“AAV”包括1型AAV (AAV1)、2型AAV (AAV2)、3型AAV (AAV3)、4型AAV (AAV4)、5型AAV (AAV5)、6型AAV (AAV6)、7型AAV (AAV7)、8型AAV (AAV8)、9型AAV (AAV9)、AAV 9_hu14、禽类AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类动物AAV、非灵长类动物AAV和绵羊AAV。“灵长类动物AAV”是指能够感染灵长类动物的AAV,“非灵长类动物AAV”是指能够感染非灵长类哺乳动物的AAV,“牛AAV”是指能够感染牛哺乳动物的AAV,等等。

[0284] 宿主细胞的腺病毒感染引起腺病毒DNA保持游离状态,这降低了与整合载体相关的潜在基因毒性。此外,腺病毒结构稳定,并且在广泛扩增后未检测到基因组重排。腺病毒几乎可以感染所有上皮细胞,无论它们的细胞周期阶段如何。(参见例如US20060147420,该文献通过整体引用并入本文)。此外,腺病毒的E1a和E4区对于人类细胞的高效和生产性感感染是必不可少的。E1a基因是第一个有待在生产性感感染中被转录的病毒基因,并且其转录不依赖于任何其他病毒基因产物的作用。然而,剩余的早期病毒基因的转录需要E1a基因表达。E1a启动子除了调节E1a基因的表达外,还整合用于包装病毒基因组的信号以及启动病毒DNA复制所需的位点。参见Schmid,S.I.和Hearing,P.的《微生物学和免疫学当前论题 (Current Topics in Microbiology and Immunology)》,第199卷:第67-80页 (1995)。

[0285] 在一些实施方案中,溶瘤病毒是溶瘤腺病毒。已经确定天然存在的病毒可以被工程改造为在肿瘤细胞中产生溶瘤作用 (Wildner,2001;Jacotat,1967;Kim,2001;Geoerger等人,2002;Yan等人,2003;Vile等人,2002,上述文献中的每个文献通过引用并入本文)。就腺病毒而言,其腺病毒基因组中的特定缺失可减弱其在正常休眠细胞内复制的能力,同时其保留在肿瘤细胞中复制的能力。一种这样的有条件复制的腺病毒 $\Delta 24$ 已由Fueyo等人 (2000) 进行了描述,还请参见美国专利申请第20030138405号,上述文献中的每个文献通过引用并入本文。 $\Delta 24$ 腺病毒衍生自5型腺病毒 (Ad-5),并且在E1A基因的CR2部分中含有24碱基对缺失。参见例如W02001036650A2 (通过整体引用并入本文)。

[0286] 溶瘤腺病毒包括有条件复制腺病毒 (CRAD),诸如 $\delta 24$,其具有多种特性,使其成为用作生物治疗剂的候选物。一种这样的特性是在受纳细胞或组织中复制的能力,这会放大溶瘤病毒的原始输入剂量并帮助药物扩散到相邻的肿瘤细胞,从而提供直接的抗肿瘤作用。

[0287] 在一些实施方案中, $\delta 24$ 的溶瘤组分用转基因表达方法产生武装的 $\delta 24$ 。武装的 $\delta 24$ 腺病毒可用于在肿瘤内产生或增强旁观者效应和/或产生或增强患者或肿瘤相关组织和/或细胞中溶瘤腺病毒的检测/成像。在一些实施方案中,溶瘤腺病毒与各种转基因策略 (例如,用IL-4和/或IL-13部分靶向) 的组合会提高治疗潜力,包括例如针对各种难治性肿瘤的潜力,以及提供改进的成像能力。在某些实施方案中,溶瘤腺病毒可以与复制缺陷腺病毒、另一种溶瘤病毒、有复制能力的腺病毒和/或野生型腺病毒一起给药。其中的每一种都可以在其他腺病毒之前或之后同时给药。

[0288] 在一些实施方案中,E1a腺病毒载体涉及用表现出肿瘤特异性 (并且优选具有E2F反应性) 的碱性启动子 (并且更优选为人类E2F-1启动子) 替代碱性腺病毒E1a启动子,包括CAAT框、TATA框和用于转录启动的起始位点。因此,这种病毒将在缺乏分子的细胞中被抑制,或者此类分子没有功能性,活化来自E2F反应启动子的转录。正常的非分裂细胞或休眠细胞属于这一类,因为转录因子E2F与pRb或成视网膜细胞瘤蛋白结合,从而使E2F无法结合

并激活E2F反应启动子。相比之下,含有游离E2F的细胞将支持基于E2F的转录。此类细胞的一个例子是缺乏pRb功能的赘生性细胞,允许发生生产性病毒感染。在一些实施方案中,使用如本文所述的IL-4和/或IL-13部分靶向E1a腺病毒载体。

[0289] 保留位于E1a启动子中的增强子序列、包装信号和DNA复制起始位点将确保腺病毒感染在缺乏pRb功能的赘生性细胞中进行到野生型水平。本质上,修饰的E1a启动子赋予肿瘤特异性转录活化,引起大量的肿瘤特异性杀伤,同时在正常细胞中提供增强的安全性。

[0290] 在一些实施方案中,通过用E2F反应启动子取代内源性E1a启动子来制备E1a腺病毒载体,腺病毒5基因组中核苷酸375上游的元素保持完整。核苷酸编号如参见Schmid,S.I.和Hearing,P.《微生物学和免疫学当前论题 (Current Topics in Microbiology and Immunology)》,第199卷:第67-80页(1995)所述。这包括为包装病毒基因组而鉴定的所有七个A重复基序(参见上文Schmid和Hearing的图2)。从核苷酸375到核苷酸536的序列通过BsaAI到BsrBI限制性起始位点缺失,同时仍保留E1A蛋白的翻译启动密码子上游的23个碱基对。使用已知材料和方法将E2F反应启动子(优选人类E2F-1)取代为缺失的内源性E1a启动子序列。可以如实例1中所述分离E2F-1启动子。

[0291] E4区与腺病毒感染晚期发生的许多事件有关,并且是高效的病毒DNA复制、晚期mRNA积累和蛋白质合成、剪接以及宿主细胞蛋白质合成的关闭所必需的。缺乏大部分E4转录单位的腺病毒存在严重的复制缺陷,并且通常必须在E4互补细胞系中增殖以达到高滴度。E4启动子位于病毒基因组的右端附近,并且控制多个开放阅读框架(ORF)的转录。许多调节元素已在该启动子中得到表征,它们对于介导最大转录活性是至关重要的。除了这些序列之外,E4启动子区域还含有病毒DNA复制所需的调节序列。对E4启动子的描述和这些调节序列的位置可见于美国专利第7,001,596号的图2和图3,该专利通过整体引用并入本文。

[0292] 在一些实施方案中,具有E4基本启动子的腺病毒载体被已证明显示肿瘤特异性的启动子取代,优选E2F反应启动子,并且更优选人类E2F-1启动子。优选E2F反应启动子驱动E4表达的原因与上文在具有被E2F反应启动子取代的E1a启动子的E1a腺病毒载体的上下文中所讨论的相同。pRb的肿瘤抑制功能与其抑制E2F反应启动子(诸如E2F-1启动子)的能力相关(Adams,P.D.和W.G.Kaelin,Jr.1995,《癌症生物学(Cancer Biol.)》6:99-108; Sellers,W.R.和W.G.Kaelin.1996,《生物化学与生物物理学报中出现的已发表勘误(published erratum appears in Biochim Biophys Acta)》1996年12月9日;1288(3):E-1,《生物化学与生物物理学报(Biochim Biophys Acta.)》1288:M1-5.Sellers,W.R., J.W.Rodgers和W.G.Kaelin,Jr.1995,《美国国家科学院学报(Proc Natl Acad Sci USA)》.92:11544-8)。人类E2F-1启动子已被广泛表征并显示对pRb信号传导通路有反应,包括pRb/p107、E2F-1/-2/-3和G1细胞周期蛋白/cdk复合物和E1A(Johnson,D.G.,K.Ohtani和J.R.Nevins.1994,《基因与发育(Genes Dev.)》8:1514-25;Neuman,E.,E.K.Flemington,W.R.Sellers和W.G.Kaelin,Jr.1995,《分子与细胞生物学(Mol Cell Biol.)》15:4660; Neuman,E.,W.R.Sellers,J.A.McNeil,J.B.Lawrence和W.G.Kaelin,Jr.1996,《基因(Gene)》.173:163-9)。该调节中的大多数(如果不是全部)已归因于E2F-1启动子内存在多个E2F位点。因此,预计携带这种(这些)修饰的病毒在含有完整(野生型)pRb通路的正常细胞中会减弱,但在pRb抑制功能缺陷的细胞中表现出正常的感染/复制特征。为了维持这种突变病毒的正常感染/复制特征,我们在E4启动子的远端保留了反向末端重复序列(ITR),

因为它含有病毒DNA复制所需的所有调控元素 (Hatfield, L. 和 P. Hearing. 1993, 《病毒学杂志 (J. Virol.)》67:3931-9; Rawlins, D. R., P. J. Rosenfeld, R. J. Wides, M. D. Challberg 和 T. J. Kelly, Jr. 1984, 《细胞 (Cell)》37:309-19; Rosenfeld, P. J., E. A. O'Neill, R. J. Wides 和 T. J. Kelly. 1987, 《分子与细胞生物学 (Mol Cell Biol.)》7:875-86; Wides, R. J., M. D. Challberg, D. R. Rawlins 和 T. J. Kelly. 1987, 《分子与细胞生物学 (Mol Cell Biol.)》7:864-74)。这有助于在感染该病毒的pRb途径缺陷肿瘤细胞中达到野生型病毒水平。

[0293] 在一些实施方案中, E4启动子位于病毒基因组的右端附近, 并且其控制多个开放阅读框架(ORF)的转录 (Freyer, G. A., Y. Katoh 和 R. J. Roberts. 1984, 《核酸研究 (Nucleic Acids Res.)》12:3503-19; Tigges, M. A. 和 H. J. Raskas. 1984, 《腺病毒2早期区域4中的剪接点mRNA: 多个剪接位点产生18到24个RNA (Splice junctions in adenovirus 2 early region 4 mRNAs: multiple splice sites produce 18 to 24 RNAs)》。《病毒学杂志 (J. Virol.)》50:106-17; Virtanen, A. P. Gilardi, A. Naslund, J. M. LeMoullec, U. Pettersson 和 M. Perricaudet. 1984, 《病毒学杂志 (J. Virol.)》51:822-31)。在该启动子中已经表征了许多介导转录活性的调节元素 (Berk, A. J. 1986, 《遗传学年鉴 (Annu Rev Genet.)》20:45-79; Gilardi, P. 和 M. Perricaudet. 1986, 《核酸研究 (Nucleic Acids Res.)》14:9035-49; Gilardi, P. 和 M. Perricaudet. 1984, 《核酸研究 (Nucleic Acids Res.)》12:7877-88; Hanaka, S., T. Nishigaki, P. A. Sharp 和 H. Handa. 1987, 《分子与细胞生物学 (Mol Cell Biol.)》7:2578-87; Jones, C. 和 K. A. Lee. 1991, 《分子与细胞生物学 (Mol Cell Biol.)》11:4297-305; Lee, K. A. 和 M. R. Green. 1987, 《欧洲分子生物学杂志 (Embo J.)》6:1345-53)。除了这些序列之外, E4启动子区域还含有参与病毒DNA复制的元素 (Hatfield, L. 和 P. Hearing. 1993, 《病毒学杂志 (J. Virol.)》67:3931-9; Rawlins, D. R., P. J. Rosenfeld, R. J. Wides, M. D. Challberg 和 T. J. Kelly, Jr. 1984, 《细胞 (Cell)》37:309-19; Rosenfeld, P. J., E. A. O'Neill, R. J. Wides 和 T. J. Kelly. 1987, 《分子与细胞生物学 (Mol Cell Biol.)》7:875-86; Wides, R. J., M. D. Challberg, D. R. Rawlins 和 T. J. Kelly. 1987, 《分子与细胞生物学 (Mol Cell Biol.)》7:864-74)。对E4启动子的描述和这些调节序列的位置可见于图1和图2。还请参见 Jones, C. 和 K. A. Lee. 《分子与细胞生物学 (Mol Cell Biol.)》11:4297-305 (1991)。考虑到这些因素, 通过创建两个新的限制性内切核酸酶位点来设计E4启动子穿梭: 核苷酸35,576处的XhoI位点和核苷酸35,815处的SpeI位点 (参见图3)。用XhoI和SpeI两者消化可去除从35,581到35,817的核苷酸。这有效地消除了相对于E4转录起始位点的碱基-208到+29, 包括已显示对E4转录具有最大影响的所有序列。特别地, 这涵盖已被证明对启动子活化具有最显著影响的E4F结合位点的两个反向重复。然而, 所有三个Sp1结合位点、五个ATF结合位点中的两个以及对病毒DNA复制至关重要的NF1和NFIII/Oct-1结合位点都保留了下来。

[0294] 在一些实施方案中, E2F反应启动子是人类E2F-1启动子。E2F-1启动子中介导pRb通路反应的关键调节元素已经在体外和体内进行了映射 (Johnson, D. G., K. Ohtani 和 J. R. Nevins. 1994, 《基因与发育 (Genes Dev.)》8:1514-25; Neuman, E., E. K. Flemington, W. R. Sellers 和 W. G. Kaelin, Jr. 1995, 《分子与细胞生物学 (Mol Cell Biol.)》15:4660; Parr, M. J., Y. Manome, T. Tanaka, P. Wen, D. W. Kufe, W. G. Kaelin, Jr. 和 H. A. Fine. 1997, 《自然医学 (Nat Med.)》3:1145-9)。因此, 我们通过使用将SpeI和XhoI位点掺入其中的引物进

行PCR,相对于转录起始位点从碱基对-218到+51中分离出人类E2F-1启动子片段。这创建了存在于E4启动子穿梭中的相同位点,并且允许用E2F-1启动子直接取代E4启动子。

[0295] E. 嵌合抗原受体 (CAR)

[0296] 靶向免疫疗法已成为治疗恶性肿瘤的有前景的研究领域,并且近年来受到了广泛的关注。实际上,已经报道了用靶向CD19恶性细胞的经工程改造或基因修饰的T细胞治疗淋巴瘤患者的方法。这就增加了对存在于癌细胞中的抗原作为基因疗法和免疫疗法靶标的关注。这些CAR可用于将本文所述的IL-4突变蛋白靶向或递送至肿瘤,或者甚至允许全身性IL-4突变蛋白表达。在一些实施方案中,IL-4突变蛋白是本文公开的任何IL-4突变蛋白或变体。在一些实施方案中,IL-4突变蛋白序列与本文提供的任何一种IL-4序列具有90%的同一性。

[0297] 对自体或异体T细胞或NK细胞进行基因操纵以特异性地靶向特定肿瘤抗原提供了一种绕过大多数肿瘤细胞的细胞毒性免疫应答诱导失败的策略。在一些实施方案中,这些遗传操纵的T细胞或NK细胞可用于将本文所述的IL-4突变蛋白靶向肿瘤,例如,使得IL-4突变蛋白在肿瘤位置表达。这些技术基于人类免疫细胞的基因修饰,其中可以通过白细胞去除术从患者或供体中提取细胞。纯化并工程改造特定的细胞(通常为T细胞)以表达靶向感兴趣癌症抗原的受体。工程改造可以利用逆转录病毒、慢病毒、转座子、mRNA电穿孔等的转导。可以将免疫细胞扩增至期望剂量,并引入患者中。经工程改造的细胞可以通过细胞介导的毒性(细胞毒性T细胞)特异性地杀死癌细胞和/或通过对肿瘤的免疫识别、细胞因子释放和免疫细胞募集引发对癌细胞的免疫应答。

[0298] 例如,将嵌合抗原受体(CAR)用于恶性肿瘤的免疫基因疗法是一种有前景的策略,其中抗体或配体结合结构域与T细胞受体的 ζ 信号传导链融合。所得的CAR免疫细胞被新特异性重新定向,以攻击表达表面抗原或由经基因修饰的T细胞受体识别的受体的肿瘤,并提供以高度调节的方式通过正常宿主免疫应答攻击肿瘤的治疗方法。这些细胞可在整个大脑和全身循环中自由循环,这使得对共定位和生物利用度的需求减少了。

[0299] 已经开发了许多代的CAR免疫细胞。通过将肿瘤特异性scFv抗体或其它细胞外配体结合结构域与TCR相关性CD3 ζ 信号传导结构域或来自共刺激蛋白受体的另一个细胞内信号传导结构域融合来产生CAR。这种结构使CAR具有针对B细胞抗原受体的肿瘤特异性,并独立于MHC结合而通过T细胞抗原受体活化T细胞。第一代CAR含有一个胞内信号传导结构域,通常带有CD3 ζ 信号传导结构域,以允许TCR信号传导。第二代CAR具有两个细胞内信号传导结构域:包含CD28信号传导结构域或4-1BB信号传导结构域的共刺激结构域,以及CD3 ζ 信号传导结构域。这种布置使得能够在CAR的scFv区识别抗原时实现T细胞活化和增殖。第三代CAR具有两个共刺激结构域和一个CD3 ζ 信号传导结构域。第一共刺激结构域是CD28结构域或4-1BB结构域,而第二共刺激结构域由CD28结构域、4-1BB结构域或OX40结构域组成。第四代“铠装CAR T细胞”结合第二代CAR加上各种基因(包括细胞因子和共刺激配体),以增强CAR T细胞的杀肿瘤作用。参见例如Batlevi等人(2016)《自然评论临床肿瘤学(Nature Reviews Clinical Oncology)》13:25-40。还请参见美国专利第7,741,465号和国际专利公开第W02014127261号;所有上述文献中均通过整体引用并入本文。

[0300] T细胞靶向的替代方法包括T细胞抗原偶联剂,如国际申请W02015/117229中所述,其标题为“三功能T细胞抗原偶联剂及其方法和用途(Trifunctional T cell antigen

Coupler and Methods and Uses thereof)”,所述文献通过引用特别地并入本文。T细胞抗原偶联剂体系包含三个联接的结构域：靶标特异性多肽配体；结合与TCR复合物相关联的蛋白质的配体，例如scFv与CD3 (TCR, T细胞受体) 结合以刺激T细胞活化；以及T细胞受体信号传导结构域，例如CD4跨膜结构域和细胞内结构域，以扩增T细胞活化。通过经由TCR刺激T细胞活化，TAC被工程改造为与T细胞的基本分子机制协同工作。

[0301] 与抗体偶联的T细胞受体是T细胞靶向的另一种方法。ACTR是CAR与已建立的单克隆抗体肿瘤治疗剂的混合方法。ACTR由典型的CAR构建体组成，所述典型的CAR构建体可以通过Fc受体CD16的高亲和力变体结合抗体的重链。ACTR-T细胞可以通过结合靶向特定癌症抗原的配体来靶向肿瘤。T细胞活化由CAR模块执行。

[0302] 双特异性T细胞交换子 (BiTE) 是双特异性抗体，其可以通过两个模块结合T细胞和靶肿瘤细胞的TCR：癌症靶向配体；以及将T细胞桥接至肿瘤的CD3结合性scFv结构域。

[0303] 已开发出针对IL13R α 2 (包括与IL13缀合的细菌毒素、纳米颗粒、溶瘤病毒) 的靶向疗法，以及使用单克隆抗体、IL13R α 2脉冲式树状细胞和靶向IL13R α 2的嵌合抗原受体的免疫疗法 (参见Kahlon等人 (2004) 《癌症研究 (Cancer Research) 》.64 (24) :9160-9166; Kong等人 (2012) 《临床癌症研究 (Clinical Cancer Research) 》.18 (21) :5949-5960; Thaci等人 (2014) 《神经肿瘤学 (Neuro-Oncology) 》；以及临床试验NCT02208362、NCT00730613和NCT01082926)。在一些实施方案中，这些靶向疗法可用于将IL-4突变蛋白递送至肿瘤。

[0304] 对于多种治疗目的 (包括通过对T细胞特异性进行工程改造来治疗某些癌症)，提供可选择性改变IL-13活性的生物制剂是令人感兴趣的。本发明解决了这个问题。

[0305] 提供了用于用靶向组合物增强抗肿瘤免疫效应细胞 (例如T细胞、NK细胞等) 的方法和组合物，所述靶向组合物包括但不限于嵌合抗原受体 (CAR)；T细胞抗原偶联剂 (TAC)；与抗体偶联的T细胞受体 (ACTR)；以及双特异性T细胞交换子 (BiTE)，其中IL-13或IL-4超级因子提供了靶标特异性配体。在进一步的实施方案中，免疫效应细胞表达IL-4突变蛋白。

[0306] 提供了包含IL-4突变蛋白序列的免疫细胞靶向或表达构建体并且其可以包括如本文所述的任何IL-4序列。超级因子可用于将免疫细胞靶向表达至少一个受体的细胞，例如肿瘤细胞。在一些实施方案中，IL-4突变蛋白是本文公开的任何IL-4突变蛋白或变体。在一些实施方案中，IL-4突变蛋白序列与本文提供的任何一种IL-4序列具有90%的同一性。

[0307] 构建体的IL-4或突变蛋白组分的长度可以为至少约50个氨基酸、至少约75个氨基酸、至少约100个氨基酸、至少约110个氨基酸、至少约115个氨基酸，直至跨膜结构域处的野生型蛋白的全长，即长度为约116个氨基酸。例如，超级因子或突变蛋白可以与CAR的铰链结构域、跨膜结构域或信号传导结构域融合。提供了示例性多肽序列。

[0308] 作为超级因子或突变蛋白被包括在内的是与这些序列具有90%、95%、98%或99%同一性的氨基酸和核酸编码序列、包含这些序列但在3'端或5'端还包括另外的核苷酸 (例如任何数量的另外的核苷酸或密码子，诸如3个、6个、9个、12个或更多个核苷酸，或至多约12个、20个、50个或100个另外的核苷酸) 的更长序列以及由于遗传密码的简并性而编码与这些核酸相同的氨基酸序列的任何序列。特别地，经密码子优化 (CO) 以由期望的宿主表达的序列被认为是本发明的一部分。在一些实施方案中，氨基酸序列具有90%的同一性。在一些实施方案中，氨基酸序列具有95%的同一性。在一些实施方案中，氨基酸序列具有98%的同一性。在一些实施方案中，氨基酸序列具有99%的同一性。在一些实施方案中，多肽与

IL-4突变蛋白免疫细胞靶向或表达构建体联接。在一些实施方案中,IL-4突变蛋白免疫细胞靶向或表达构建体包含一个或多个衍生自CD3- ζ 、CD28、DAP10、OX-40、ICOS和CD137的信号传导结构域。在一些实施方案中,IL-4突变蛋白免疫细胞靶向或表达构建体或表达包含一个或多个衍生自CD3- ζ 的信号传导结构域。在一些实施方案中,IL-4突变蛋白免疫细胞靶向或表达构建体包含一个或多个衍生自CD28的信号传导结构域。在一些实施方案中,IL-4突变蛋白免疫细胞靶向或表达构建体包含一个或多个衍生自DAP10的信号传导结构域。在一些实施方案中,IL-4突变蛋白免疫细胞靶向或表达构建体包含一个或多个衍生自OX-40的信号传导结构域。在一些实施方案中,IL-4突变蛋白免疫细胞靶向或表达构建体包含一个或多个衍生自CD137的信号传导结构域。在一些实施方案中,IL-4突变蛋白免疫细胞靶向或表达构建体包含IL-4变体/IL-4突变蛋白,包括本文提供的那些。在一些实施方案中,IL-4突变蛋白免疫细胞靶向或表达构建体包含IL-4变体/IL-4突变蛋白,包括本文提供的那些。

[0309] 1. NK细胞

[0310] 在一些实施方案中,免疫细胞是自然杀伤(NK)细胞。NK细胞通过多种细胞表面受体(包括NKG2D、CD16和自然细胞毒性受体(NCR),诸如NKp44、NKp46和NKp30)识别被感染或转化的细胞。这些受体活化信号传导衔接蛋白,诸如DAP10、DAP12和CD3 ζ ,其含有免疫酪氨酸活化基序(ITAM),所述基序会引发含有穿孔素和颗粒酶的溶细胞性颗粒的释放,并介导细胞因子和趋化因子(诸如IFN- γ 和TNF- α)的产生和释放。重要的是,NK细胞介导的细胞毒性不依赖于自身HLA的表现。因此,由于NK细胞可用于异体环境并有可能提供现成的细胞产物,因此作为基于细胞的癌症疗法,NK细胞具有重要的临床意义。

[0311] 自然杀伤细胞由于不需要HLA匹配,因此可以替代T细胞用于过继免疫疗法,因此可以用作异体效应细胞。过继转移的异体NK细胞的临床试验表明,这些细胞可以在患者中存活数周至数月。另外,与通常对NK细胞更敏感的血液系统恶性肿瘤(尤其是急性骨髓性白血病)相比,NK细胞中CAR的表达使这些细胞能够更有效地杀死通常对NK细胞介导的活性具有抗性的实体瘤。可用于NK细胞靶向的CAR包括例如第一代CAR构建体,所述构建体含有CD3 ζ 作为唯一信号传导结构域。第二代和第三代CAR也可用于NK细胞中。在一些实施方案中,NK细胞活化受体NKG2D的胞外域直接与CD3 ζ 联接。

[0312] 用于修饰的NK细胞包括细胞系或外周血NK细胞,如果需要更大量的细胞,则可以通过简单的抽血或单采血液分离术将其从供体中分离出来。活化的PB-NK细胞表达更广泛的活化受体,诸如CD16、NKp44和NKp46以及KIR,它们在NK细胞许可中发挥重要作用。另外,PB-NK细胞可以在不照射细胞的情况下给予,因此具有体内扩增的能力。适合用于CAR表达的NK细胞的另一个来源是衍生自人类多能干细胞的NK细胞——诱导的多能干细胞(iPSC)或人类胚胎干细胞(hESC)。这些NK细胞表现出与PB-NK细胞相似的表型,并且hESC/iPSC-NK细胞可以在临床规模上生长。

[0313] 2. 嵌合抗原受体(CAR)

[0314] 除超级因子序列外,CAR还含有CD3 ζ 的信号传导结构域和一种或多种共刺激受体的信号传导结构域,所述一种或多种共刺激受体进一步促进表达CAR的免疫细胞的再循环、存活和/或扩增。共刺激受体的信号传导结构域是每种受体蛋白的细胞内部分,所述细胞内部分在细胞中产生活化信号。实例有天然CD28分子的氨基酸180-220和天然4-1BB分子的氨

基酸214-255。

[0315] 将超级因子联接至信号传导区的合适的铰链区和跨膜区的实例可以包括但不限于免疫球蛋白、人类CD8a的恒定(Fc)区,以及用于将靶向部分从细胞表面移走从而改善对靶细胞的访问和结合的人工接头。合适的跨膜结构域的实例包括白细胞CD标志物的跨膜结构域,优选地,CD4或CD28的跨膜结构域。细胞内受体信号传导结构域的实例包括T细胞抗原受体复合物,优选地,CD3的 ζ 链,但是可以使用任何足以将CAR锚定在膜中的跨膜区。技术人员知道许多跨膜区和结构元素(诸如亲脂性氨基酸区域),所述结构元素在许多膜蛋白中产生跨膜结构域,并因此可以取代任何方便的序列。适用于改善表达CAR的细胞的功能和活性的T细胞共刺激信号传导受体包括但不限于CD28、CD137和OX-40。

[0316] IL2的产生和增殖需要经由CD28的信号传导,但该信号传导在维持T细胞功能和活性方面不起主要作用。CD137(在CD28活化后表达的肿瘤坏死因子受体家族成员)和OX-40参与驱动T细胞的长期存活和T细胞的积累。这些受体的配体通常在专业抗原呈递细胞(诸如树状细胞和活化的巨噬细胞)上表达,但在肿瘤细胞上不表达。与表达仅含有CD3 ζ 信号传导结构域的CAR(所述构建体可能被称为第二代或第三代CAR)相比,表达在CD4⁺T细胞中掺入CD28和/或4-1BB信号传导结构域的CAR可增强这些细胞的活性和抗肿瘤能力。

[0317] 作为感兴趣的CAR构建体被包括在内的有串联CAR,例如,参见Hegde等人(2016)《临床研究期刊(J.Clin.Invest)》126(8):3036-3052,该文献通过引用特别地并入本文。在此类构建体中,肿瘤特异性抗原的结合部分与IL-13超级因子串联结合。结合部分可以是例如对肿瘤细胞抗原具有特异性的scFv,包括但不限于本领域已知的HER-2、EGFR、CD20等。

[0318] 在各个实施方案中,抗原结合结构域与靶细胞(例如,癌细胞)上的抗原结合。抗原结合结构域可以结合抗原,诸如但不限于肿瘤靶标抗原。在一些情况下,抗原结合结构域结合一种或多种抗原。示例性的抗原结合结构域可以结合抗原,该抗原包括但不限于:D19;CD123;CD22;CD30;CD171;CS-1(也称为CD2子集1、CRACC、SLAMF7、CD319和19A24);C型凝集素样分子-1(CLL-1或CLECL1);CD33;表皮生长因子受体变体III(EGFRvIII);神经节苷脂GD2(GD2);神经节苷脂GD3;TNF受体家族成员B细胞成熟(BCMA);Tn抗原((Tn Ag)或(GalNAc α Ser/Thr));前列腺特异性膜抗原(PSMA);受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1);Fms样酪氨酸激酶3(FLT3);肿瘤相关糖蛋白72(TAG72);CD38;CD44v6;癌胚抗原(CEA);上皮细胞粘附分子(EPCAM);B7H3(CD276);KIT(CD117);白细胞介素13受体亚基 α -2(IL-13R α 2或CD213A2);间皮素;白细胞介素11受体 α (IL-11Ra);前列腺干细胞抗原(PSCA);蛋白酶丝氨酸21(Testisin或PRSS21);血管内皮生长因子受体2(VEGFR2);路易斯(Y)抗原;CD24;血小板衍生的生长因子受体 β (PDGFR- β);阶段特异性胚胎抗原4(SSEA-4);CD20;叶酸受体 α ;受体酪氨酸蛋白激酶ERBB2(Her2/neu);粘蛋白1,细胞表面缔合(MUC1);表皮生长因子受体(EGFR);神经细胞粘附分子(NCAM);前列腺酶;前列腺酸性磷酸酶(PAP);延伸因子2突变(ELF2M);肝配蛋白B2;成纤维细胞活化蛋白 α (FAP);胰岛素样生长因子1受体(IGF-1受体),碳酸酐酶IX(CAIX);蛋白酶体(Prosome,Macropain)亚基, β 型,9(LMP2);糖蛋白100(gp100);癌基因融合蛋白,由断点簇区(BCR)和Abelson鼠白血病病毒癌基因同源物1(Abl)(bcr-abl)组成;酪氨酸酶;肝配蛋白A型受体2(EphA2);岩藻糖基GM1;唾液酸化的路易斯粘附分子(sLe);神经节苷脂GM3(aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDG1cp(1-1)Cer);转谷氨酰胺酶5(TGS5);高分子量黑色素瘤相关性抗原(HMWMAA);邻乙酰基GD2神经节苷脂(OAcGD2);叶酸

受体 β ;肿瘤内皮标志物1 (TEM1/CD248);肿瘤内皮标志物7相关 (TEM7R);密封蛋白6 (CLDN6);甲状腺刺激激素受体 (TSHR);G蛋白偶联受体C类5组,成员D (GPC5D);X染色体开放阅读框架61 (CXORF61);CD97;CD179a;间变性淋巴瘤激酶 (ALK);聚唾液酸;胎盘特异性1 (PLAC1);globoH糖神经酰胺的己糖部分 (GloboH);乳腺分化抗原 (NY-BR-1);尿路斑块蛋白2 (UPK2);甲型肝炎病毒细胞受体1 (HAVCR1);肾上腺素受体 β 3 (ADRB3);泛连接蛋白3 (PANX3);G蛋白偶联受体20 (GPR20);淋巴细胞抗原6复合物,基因座K9 (LY6K);嗅觉受体51E2 (OR51E2);TCR γ 交替阅读框架蛋白 (TARP);肾母细胞瘤蛋白 (WT1);癌症/睾丸抗原1 (NY-ESO-1);癌症/睾丸抗原2 (LAGE-1a);黑色素瘤相关抗原1 (MAGE-A1);位于12p染色体上的ETS易位变异基因6 (ETV6-AML);精子蛋白17 (SPA17);X抗原家族,成员1A (XAGE1);血管生成素结合细胞表面受体2 (Tie2);黑色素瘤癌睾丸抗原-1 (MAD-CT-1);黑色素瘤癌睾丸抗原-2 (MAD-CT-2);Fos相关抗原1;肿瘤蛋白p53 (p53);p53突变体;prostelin;surviving;端粒酶;前列腺癌肿瘤抗原1 (PCTA-1或半乳糖凝集素8),被T细胞1识别的黑色素瘤抗原 (MelanA或MART 1);大鼠肉瘤 (Ras) 突变体;人类端粒酶逆转录酶 (hTERT);肉瘤易位断点;细胞凋亡的黑色素瘤抑制剂 (ML-IAP);ERG (跨膜蛋白酶,丝氨酸2 (TMPRSS2) ETS融合基因);N-乙酰葡萄糖胺基转移酶V (NA17);配对盒蛋白Pax-3 (PAX3);雄激素受体;细胞周期蛋白B1;V-myc鸟髓细胞瘤病毒癌基因成神经细胞瘤衍生的同源物 (MYCN);Ras同源物家族成员C (RhoC);酪氨酸酶相关蛋白2 (TRP-2);细胞色素P450 1B1 (CYP1B1);CCCTC结合因子 (锌指蛋白) 样 (BORIS或印迹位点的调节剂的兄弟);由T细胞识别的鳞状细胞癌抗原3 (SART3);配对盒蛋白Pax-5 (PAX5);前顶体素结合蛋白sp32 (OY-TES1);淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶 (LCK);A激酶锚定蛋白4 (AKAP-4);滑膜肉瘤,X断点2 (SSX2);高级糖基化终产物受体 (RAGE-1);肾ubiquitous1 (RU1);肾ubiquitous2 (RU2);人类豆荚蛋白;人类乳头瘤病毒E6 (HPV E6);人类乳头瘤病毒E7 (HPV E7);肠羧基酯酶;热激蛋白70-2突变 (mut hsp70-2);CD79a;CD79b;CD72;白细胞相关免疫球蛋白样受体1 (LAIR1);IgA受体的Fc片段 (FCAR或CD89);白细胞免疫球蛋白样受体亚家族成员2 (LILRA2);CD300分子样家族成员f (CD300LF);C型凝集素结构域家族12成员A (CLEC12A);骨髓基质细胞抗原2 (BST2);含有EGF样模块粘蛋白样激素受体样2 (EMR2);淋巴细胞抗原75 (LY75);磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 (GPC3);Fc受体样5 (FCRL5);以及免疫球蛋白 λ 样多肽1 (IGLL1)。

[0319] 在一些实施方案中,抗原结合结构域包含单克隆抗体、多克隆抗体、合成抗体、人类抗体、人源化抗体、非人类抗体、纳米抗体、单链可变片段 (scFv)、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv等。抗原结合结构域可以与CAR的跨膜结构域联接。在一些实施方案中,编码抗原结合结构域的核酸可操作地联接至编码CAR的跨膜结构域的核酸。

[0320] 在一些实施方案中,跨膜结构域可以衍生自膜结合蛋白或跨膜蛋白。在某些实施方案中,该跨膜结构域与膜结合蛋白或跨膜蛋白的跨膜结构域的野生型氨基酸序列相比包含一个或多个(例如,1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或更多个)氨基酸修饰(例如,取代、插入和缺失)。CAR的跨膜结构域的非限制性实例至少包括以下的一个或多个跨膜区:T细胞受体的 α 链、 β 链或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ (CD3 ξ)、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154或促红细胞生成素受体。在一些实施方案中,跨膜结构域包括人类免疫球蛋白 (Ig) 铰链区,例如,IgG4Fc铰链。在其它实施方案中,跨膜结构域是包含疏水性氨基酸残基(例如,亮氨酸和缬氨酸)的重组结构域或合成结构域。在一

些情况下,跨膜结构域在该结构域的一个或两个末端处包括苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸。

[0321] 跨膜结构域将抗原结合结构域联接至CAR的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,编码抗原结合结构域的核酸可操作地联接至编码跨膜结构域的核酸,后者可操作地联接至编码细胞内信号传导结构域的核酸。

[0322] 在一些实施方案中,CAR的细胞内信号传导结构域包含信号活化或信号转导结构域。这样,细胞内信号传导结构域包括蛋白质的细胞内信号传导结构域的任何足以转导或传递信号(例如,活化信号)或介导细胞内的细胞应答的部分。非限制性实例包括TCR、CD2、CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD7、CD27、CD86、常见的FcR γ 、FcR β 、CD79a、CD79b、Fc γ RIIa、DAP10、DAP12、T细胞受体(TCR)、CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、与CD83特异性结合的配体、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、CD127、CD160、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244,2B4)、CD84、CD96(触觉)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A, Ly108)、SLAM(SLAMF1, CD150, IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、其任何衍生物、变体或片段。在某些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含共刺激分子的细胞内结构域,诸如来自CD3、CD27、CD28、CD127、ICOS、4-1BB(CD137)、PD-1、T细胞受体(TCR)、其任何衍生物或其任何变体。在一些实施方案中,CAR的细胞内信号传导结构域选自以下组成的组:MHC I类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白、细胞因子受体、整联蛋白、信号传导性淋巴细胞活化分子(SLAM蛋白)、活化的NK细胞受体、BTLA、To11配体受体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、4-1BB(CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244,2B4)、CD84、CD96(触觉)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A, Ly108)、SLAM(SLAMF1, CD150, IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a以及及与CD83特异性结合的配体。

[0323] 1. BiTES

[0324] 双特异性T细胞衔接子(BiT)是融合蛋白,其包含与特异性结合CD3的抗体可变区融合的IL-13超级因子。在一些实施方案中,单链可变片段(scFv)中的抗体可变区。超级因子可以通过接头融合至可变区。任选地提供Fc区。

[0325] 2. TAC

[0326] TAC构建体包含IL-4突变蛋白,该突变蛋白融合至结合与TCR复合物相关联的蛋白质的配体;融合至T细胞受体信号传导结构域多肽。结构域可以通过接头分隔开。与TCR复合物相关联的蛋白质可以是CD3。结合与TCR复合物相关联的蛋白质的配体可以是单链抗体。

结合与TCR复合物相关联的蛋白质的配体可以是UCHT1或其变体。T细胞受体信号传导结构域多肽可以包含细胞溶质结构域和跨膜结构域。细胞溶质结构域可以是CD4细胞溶质结构域,并且跨膜结构域是CD4跨膜结构域。

[0327] 3. ACTR

[0328] ACTR是CAR与已建立的单克隆抗体肿瘤治疗剂的混合方法。ACTR由典型的CAR构建体组成,所述典型的CAR构建体可以通过Fc受体CD16的高亲和力变体结合抗体的重链。超级因子融合至CAR识别的部分,所述部分可以包括但不限于对CD16具有高亲和力的抗体的Fc区。

[0329] 可以通过本领域已知的任何手段(包括重组DNA技术)产生免疫细胞靶向或表达构建体编码序列。可以通过本领域已知的分子克隆的标准技术(基因组文库筛选、PCR、引物辅助的连接、定点诱变等)来方便地制备编码嵌合受体几个区域的核酸,并将其组装成完整的编码序列。可以将所得的编码区插入表达载体中,并用于转化合适的表达宿主细胞系,例如异体或自体T淋巴细胞、异体或自体NK细胞的群体,包括原代培养物、细胞系、iPSC衍生的细胞等。所述方法可用于体外(例如,无细胞系统中)的细胞、培养物(例如体外或离体)中的细胞。例如,可以在体外培养基中培养和扩增IL-4突变蛋白CAR表达性细胞。

[0330] 非IL-4突变蛋白免疫细胞靶向或表达构建体也可用于特异性引导免疫细胞靶向特定肿瘤细胞。通过将超级因子免疫细胞靶向或表达构建体引入T细胞中,产生抗肿瘤效应细胞(例如CD4⁺或CD8⁺效应T细胞)以进行重新定向,从而识别此类肿瘤细胞,所述构建体包含衍生自CD3- ζ 、CD28、DAP10、OX-40、ICOS和CD137的一个或多个信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞可以进一步包含能够表达如本文所述的IL-4突变蛋白的转基因。IL-4突变蛋白免疫细胞靶向或表达构建体可以特异性引导免疫细胞靶向IL-4R表达细胞,包括肿瘤细胞。通过将IL-4突变蛋白免疫细胞靶向或表达构建体引入T细胞中,产生抗肿瘤效应细胞(例如CD4⁺或CD8⁺效应T细胞)以进行重新定向,从而识别此类肿瘤细胞,所述构建体包含衍生自CD3- ζ 、CD28、DAP10、OX-40、ICOS和CD137的一个或多个信号传导结构域。

[0331] 例如使用如本领域已知的非病毒质粒载体和电穿孔方法、病毒载体和感染方法等将IL-4突变蛋白免疫细胞靶向或表达构建体感染或转染到人类免疫细胞中。包含共刺激性信号传导结构域的CAR可以用能够显著提高过继疗法方案的临床功效的方式来增进抗肿瘤活性的持续时间和/或保留。CD4⁺和CD8⁺T细胞效应子功能以及NK细胞功能可以经由这些受体被触发,因此这些细胞类型被考虑用于本发明。表达本发明的IL13超级因子CAR的CD8⁺T细胞可用于裂解靶细胞以及这些细胞的其它功能。在CD4⁺和CD8⁺T细胞之一或两者中表达适当的共刺激性CAR可为过继免疫疗法提供最有效的细胞群体,因此由表现出增强和/或长期存活能力和抗肿瘤活性的专业辅助性和杀伤性T细胞之一或两者组成。在一些实施方案中,IL-4突变蛋白免疫细胞靶向或表达构建体包含IL-4变体/IL-4突变蛋白,包括图1中提供的那些。在一些实施方案中,IL-4突变蛋白免疫细胞靶向或表达构建体包含IL-4变体/IL-4突变蛋白,包括本文提供的那些。

[0332] 出于各种目的,本发明的多肽可以被进一步修饰,例如,与多种其它寡肽或蛋白质接合。例如,翻译后修饰,例如通过异戊烯化、乙酰化、酰胺化、羧化、糖基化、聚乙二醇化等。此类修饰也可包括糖基化的修饰,例如通过在多肽的合成和处理过程中或在进一步的处理步骤中修饰多肽的糖基化模式而进行的修饰;例如通过使多肽暴露于影响糖基化的酶,诸

如哺乳动物的糖基化或去糖基化酶。

[0333] 本领域技术人员众所周知的方法可用于构建含有编码序列和适当的转录/翻译控制信号的T细胞靶向性构建体表达载体。这些方法包括例如体外重组DNA技术、合成技术和体内重组/遗传重组。可替代地,可以化学合成能够编码感兴趣的多肽的RNA。本领域技术人员可以容易地利用众所周知的密码子使用表和合成方法来为本发明的多肽中的任何一种多肽提供合适的编码序列。可以分离核酸并以相当高的纯度获得。通常,将获得基本上不含其它天然存在的核酸序列的核酸,无论是DNA还是RNA,所述核酸序列通常具有至少约50% (通常至少约90%) 的纯度并且通常是“重组的”,例如,侧翼是天然存在的染色体上通常与其不相关的一个或多个核苷酸。本发明的核酸可以作为线性分子提供或在环状分子内提供,并且可以在自主复制的分子(载体)内提供或在没有复制序列的分子内提供。核酸的表达可以通过其自身或通过本领域已知的其它调节序列来调节。可以使用本领域中可用的多种技术将本发明的核酸引入合适的宿主细胞中。

[0334] 根据本发明,可以在适用于治疗用途(例如用于人类治疗)的药物组合物中提供免疫细胞靶向或表达构建体载体和经免疫细胞靶向或表达构建体修饰的细胞。在一些实施方案中,本发明的药物组合物包括一种或多种本发明的治疗实体或其药学上可接受的盐、酯或溶剂化物。在其它一些实施方案中,本发明的药物组合物包括与另一种治疗剂(例如,另一种抗肿瘤剂)组合的一种或多种本发明的治疗实体。

[0335] 本发明的治疗实体通常以药物组合物的形式给药,所述药物组合物包含活性治疗剂和另一种药学上可接受的赋形剂。此类调配物可以包括一种或多种无毒的药学上可接受的载剂、稀释剂、赋形剂和/或佐剂。优选的形式取决于预期的给药模式和治疗应用。取决于期望的调配物,组合物还可以包括被定义为通常用于调配药物组合物以供动物或人类给药的媒剂的药学上可接受的无毒载剂或稀释剂。选择稀释剂以致于不影响该组合物的生物活性。此类稀释剂的实例有蒸馏水、生理磷酸盐缓冲盐水、林格氏(Ringer's)溶液、右旋糖溶液和汉克氏(Hank's)溶液。另外,药物组合物或调配物还可以包括其它载剂、佐剂、或无毒的、非治疗性的、非免疫原性的稳定剂等。

[0336] 在另一些其它实施方案中,本发明的药物组合物还可以包括大型缓慢代谢的大分子(诸如蛋白质)、多糖(诸如壳聚糖)、聚乳酸、聚乙醇酸和共聚物(诸如乳胶官能化的 Sepharose™、琼脂糖、纤维素等)、聚氨基酸、氨基酸共聚物以及脂质聚集体(诸如油滴或脂质体)。

[0337] 可在临床试验开发过程中确定CAR免疫细胞的最大耐受剂量(MTD),例如至多约 10^4 个T细胞/kg体重、至多约 10^5 个细胞/kg体重、至多约 10^6 个细胞/kg体重、至多约 5×10^6 个细胞/kg体重、至多约 10^7 个细胞/kg体重、至多约 5×10^7 个细胞/kg体重或更多,如根据经验所确定的。在一些实施方案中,CAR免疫细胞的最大耐受剂量(MTD)为至多约 10^4 个T细胞/kg体重。在一些实施方案中,CAR免疫细胞的最大耐受剂量(MTD)为至多约 10^5 个T细胞/kg体重。在一些实施方案中,CAR免疫细胞的最大耐受剂量(MTD)为至多约 10^6 个T细胞/kg体重。在一些实施方案中,CAR免疫细胞的最大耐受剂量(MTD)为至多约 10^7 个T细胞/kg体重。在一些实施方案中,CAR免疫细胞的最大耐受剂量(MTD)为至多约 5×10^6 个T细胞/kg体重。在一些实施方案中,CAR免疫细胞的最大耐受剂量(MTD)为至多约 5×10^7 个T细胞/kg体重。

[0338] 可以通过在细胞培养物或实验用动物中的标准药物程序来确定本文所述的细胞

的毒性,例如通过确定LD₅₀(致死50%的群体的剂量)或LD₁₀₀(致死100%的群体的剂量)。毒性与治疗效果之间的剂量比是治疗指数。从这些细胞培养测定和动物研究中获得的数据可以用于制定对于在人类中使用无毒的剂量范围。本文所述的剂量优选地处于循环浓度的范围内,所述循环浓度包括低毒性或无毒性的有效剂量。取决于所采用的剂型和所利用的给药途径,剂量可以在该范围内变化。确切的调配物、给药途径和剂量可以由个体医师鉴于患者的状况进行选择。

[0339] 在剂量增加阶段之后,用免疫细胞以MTD治疗扩展队列中的患者。示例性治疗疗程需要每两周一次或每月一次或每3到6个月一次给药。通常在多种场合下给药本发明的治疗实体。单一剂量之间的间隔可以是每周、每月或每年。如通过测量患者中治疗实体的血液水平所指示的,间隔也可以是不规律的。

[0340] 在预防性应用中,例如为了维持患者中的缓解,可以在很长一段时间内以相对不频繁的间隔给药相对较低的剂量。一些患者在其余生中继续接受治疗。在其它治疗性应用中,有时需要相对较短的间隔下相对较高的剂量,直到疾病进展减少或终止,并且优选地直到患者显示出疾病症状部分改善或完全改善。此后,可以对患者给药预防疗程。

[0341] 可以与免疫细胞靶向或表达构建体共同给药和/或共同调配的另外的治疗剂的实例包括:抗增殖或细胞还原疗法,其治疗上用于消除宿主中的肿瘤细胞和其它不期望有的细胞,并且包括诸如电离辐射的递送和化学治疗剂的给药等疗法的使用。化学治疗剂是本领域众所周知的,并且以常规剂量和疗程或以减少的剂量或疗程使用,包括例如拓扑异构酶抑制剂,诸如蒽环类,包括化合物柔红霉素、阿霉素(多柔比星)、表柔比星、伊达比星、阿米霉素、MEN10755等。其它拓扑异构酶抑制剂包括鬼臼毒素类似物依托泊苷和替尼泊苷,以及蒽二酮、米托蒽醌和安吡啶。其它抗增殖剂会干扰微管的组装,例如长春花生物碱家族。长春花生物碱的实例包括长春碱、长春新碱;长春瑞滨(NAVELBINE);长春地辛;文朵灵;长春胺等。DNA破坏剂包括核苷酸类似物、烷基化剂等。烷基化剂包括氮芥类,例如氮芥、环磷酰胺、美法仑(L-沙可来新)等;和亚硝基脲,例如卡莫司汀(BCNU)、洛莫司汀(CCNU)、司莫司汀(甲基-CCNU)、链佐星、氯脲霉素等。核苷酸类似物包括嘧啶类,例如阿糖胞苷(CYTOSAR-U)、胞嘧啶阿拉伯糖苷、氟脲嘧啶(5-FU)、氟脲苷(FUdR)等;嘌呤类,例如硫鸟嘌呤(6-硫鸟嘌呤)、巯基嘌呤(6-MP)、喷司他丁、氟脲嘧啶(5-FU)等;以及叶酸类似物,例如甲氨蝶呤、10-炔丙基-5,8-二氮杂叶酸酯(PDDF,CB3717)、5,8-二氮杂四氢叶酸(DDATHF)、亚叶酸钙等。其它感兴趣的化学治疗剂包括金属复合物,例如顺铂(cis-DDP)、卡铂、奥沙利铂等;脲类,例如羟基脲;以及胍类,例如N-甲基胍。

[0342] 例如,电离辐射(IR)通过沉积会损伤或破坏被治疗区域中的细胞的能量而用于治疗约60%的癌症患者,并且出于本发明的目的,可以以常规剂量和疗程进行递送,或以减少的剂量进行递送。细胞的辐射损伤是非特异性的,对DNA具有复杂的作用。治疗的功效取决于对癌细胞的细胞损伤大于对正常细胞的损伤。放射疗法可用于治疗每种类型的癌症。某些类型的放射疗法涉及光子,诸如X射线或 γ 射线。另一种用于将放射线递送至癌细胞的技术是内部放射疗法,所述内部放射疗法将放射性植入物直接置于肿瘤或体腔中,从而使放射剂量集中在较小的区域中。电离辐射的合适剂量可以在至少约2Gy到不大于约10Gy的范围内,通常为约5Gy。紫外线辐射的合适剂量可以在至少约5J/m²到不大于约50J/m²的范围内,通常为约10J/m²。可以在紫外线辐射后至少约4小时且不超过约72小时(通常为约4小

时)收集样品。

[0343] 治疗也可以与免疫调节性调节剂组合,所述免疫调节性调节剂包括激动免疫共刺激分子(例如CD40、OX40等)的试剂;和/或(iii)拮抗免疫抑制分子(例如CTLA-4、PD-1、PD-L1等)的试剂。在一段时间内给药活性剂以对宿主中的癌细胞耗竭产生累加或协同作用。给药方法包括但不限于全身给药、肿瘤内给药等。

[0344] 在一些实施方案中,选择单个癌症用于组合疗法治疗,因为所述癌症是对检查点抑制剂(例如PD-1拮抗剂、PD-L1拮抗剂、CTLA4拮抗剂、TIM-3拮抗剂、BTLA拮抗剂、VISTA拮抗剂、LAG3拮抗剂等)有反应的癌症类型。在一些实施方案中,这种免疫调节剂是CTLA-4、PD1或PDL1拮抗剂,例如阿维单抗、纳武单抗、派姆单抗、伊匹单抗等。在一些此类实施方案中,癌症是(但不限于)黑色素瘤或小细胞肺癌。在一些此类实施方案中,癌症是具有高新抗原或诱变负担的类型(参见Vogelstein等人(2013)《科学(Science)》339(6127):1546-1558,该文献通过引用特别地并入本文)。

[0345] 在一些实施方案中,选择单个癌症用于用本发明的组合疗法治疗,因为所述癌症是对免疫应答激动剂(例如CD28激动剂、OX40激动剂、GITR激动剂、CD137激动剂、CD27激动剂、HVEM激动剂等)有反应的癌症类型。在一些实施方案中,这种免疫调节剂为OX40、CD137或GITR激动剂,例如曲美木单抗等。在一些此类实施方案中,癌症是(但不限于)黑色素瘤或小细胞肺癌。在一些此类实施方案中,癌症是具有高新抗原或诱变负担的类型。

[0346] 在一些实施方案中,组合疗法包括本领域已知的抗体,其结合PD-1并破坏PD-1与其配体PD-L1之间的相互作用,并刺激抗肿瘤免疫应答。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合部分与PD-1特异性结合。例如,靶向PD-1并且可用于本发明中的抗体包括但不限于例如纳武单抗(BMS-936558,百时美施贵宝公司)、派姆单抗(lambrolizumab,MK03475或MK-3475,默克公司)、人源化抗PD-1抗体JS001(上海君士公司)、单克隆抗PD-1抗体TSR-042(Tesaro公司)、匹地利珠单抗(抗PD-1mAb CT-011,麦迪韦逊医疗公司)、抗PD-1单克隆抗体BGB-A317(百济神州公司)和/或抗PD-1抗体SHR-1210(上海恒瑞公司)、人类单克隆抗体REGN2810(再生元制药公司)、人类单克隆抗体MDX-1106(百时美施贵宝公司)和/或人源化抗PD-1IgG4抗体PDR001(诺华公司)。在一些实施方案中,PD-1抗体来自克隆:RMP1-14(大鼠IgG)-BioXcell目录号BP0146。其它合适的抗体包括在美国专利第8,008,449号中公开的抗PD-1抗体,该美国专利通过引用并入本文。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合部分与PD-L1特异性结合并抑制其与PD-1的相互作用,从而增加免疫活性。任何结合PD-L1并破坏PD-1与PD-L1之间的相互作用并刺激抗肿瘤免疫应答的本领域已知的抗体均适用于本文公开的组合治疗方法。例如,靶向PD-L1并处于临床试验中的抗体包括BMS-936559(百时美施贵宝公司)和MPDL3280A(基因泰克公司)。靶向PD-L1的其它合适的抗体公开于美国专利第7,943,743号中,该美国专利通过引用并入本文。普通技术人员将理解,任何与PD-1或PD-L1结合、破坏PD-1/PD-L1相互作用并刺激抗肿瘤免疫应答的抗体均适用于组合治疗方法。

[0347] 在一些实施方案中,组合疗法包括本领域已知的抗体,其结合CTLA-4并破坏其与CD80和CD86的相互作用。靶向CTLA-4的示例性抗体包括FDA批准的伊匹单抗(MDX-010、MDX-101,百时美施贵宝公司)和曲美木单抗(ticilimumab,CP-675、206,辉瑞公司),二者目前正在进行人体试验。靶向CTLA-4的其它合适的抗体公开于WO 2012/120125、美国专利第6,984,720号、美国专利第6,682,736号以及美国专利申请2002/0039581、2002/0086014和

2005/0201994中,上述文献均通过引用并入本文。普通技术人员将理解,任何与CTLA-4结合、破坏其与CD80和CD86的相互作用并刺激抗肿瘤免疫应答的抗体均适用于组合治疗方法。在一些实施方案中,组合疗法包括本领域已知的抗体,其结合LAG-3并破坏其与MHC II类分子的相互作用。靶向LAG-3的示例性抗体有IMP321 (Immutep公司),其目前正在进行人体试验。靶向LAG-3的其它合适的抗体公开于美国专利申请2011/0150892中,该美国专利申请通过引用并入本文。普通技术人员将理解,任何与LAG-3结合、破坏其与MHC II类分子的相互作用并刺激抗肿瘤免疫应答的抗体均适用于组合治疗方法。

[0348] 在一些实施方案中,组合疗法包括本领域已知的抗体,其结合TIM-3并破坏其与半乳糖凝集素9的相互作用。靶向TIM-3的合适的抗体公开于美国专利申请2013/0022623中,该美国专利申请通过引用并入本文。普通技术人员将理解,任何与TIM-3结合、破坏其与半乳糖凝集素9的相互作用并刺激抗肿瘤免疫应答的抗体均适用于组合治疗方法。

[0349] 在一些实施方案中,组合疗法包括本领域已知的抗体,其结合4-1BB/CD137并破坏其与CD137L的相互作用。普通技术人员将理解,任何与4-1BB/CD137结合、破坏其与CD137L或另一种配体的相互作用并刺激产生总体抗肿瘤活性的抗肿瘤免疫应答或免疫刺激应答的抗体均适用于组合治疗方法。

[0350] 在一些实施方案中,组合疗法包括本领域已知的抗体,其结合GITR并破坏其与其配体的相互作用。普通技术人员将理解,任何与GITR结合、破坏其与GITRL或另一种配体的相互作用并刺激产生总体抗肿瘤活性的抗肿瘤免疫应答或免疫刺激应答的抗体均适用于组合治疗方法。

[0351] 在一些实施方案中,组合疗法包括本领域已知的抗体,其结合OX40并破坏其与其配体的相互作用。普通技术人员将理解,任何与OX40结合、破坏其与OX40L或另一种配体的相互作用并刺激产生总体抗肿瘤活性的抗肿瘤免疫应答或免疫刺激应答的抗体均适用于组合治疗方法。

[0352] 在一些实施方案中,组合疗法包括本领域已知的抗体,其结合CD40并破坏其与其配体的相互作用。普通技术人员将理解,任何与CD40结合、破坏其与其配体的相互作用并刺激产生总体抗肿瘤活性的抗肿瘤免疫应答或免疫刺激应答的抗体均适用于组合治疗方法。

[0353] 在一些实施方案中,组合疗法包括本领域已知的抗体,其结合ICOS并破坏其与其配体的相互作用。普通技术人员将理解,任何与ICOS结合、破坏其与其配体的相互作用并刺激产生总体抗肿瘤活性的抗肿瘤免疫应答或免疫刺激应答的抗体均适用于组合治疗方法。

[0354] 在一些实施方案中,组合疗法包括本领域已知的抗体,其结合CD28并破坏其与其配体的相互作用。普通技术人员将理解,任何与CD28结合、破坏其与其配体的相互作用并刺激产生总体抗肿瘤活性的抗肿瘤免疫应答或免疫刺激应答的抗体均适用于组合治疗方法。

[0355] 在一些实施方案中,组合疗法包括本领域已知的抗体,其结合IFN α 并破坏其与其配体的相互作用。普通技术人员将理解,任何与IFN α 结合、破坏其与其配体的相互作用并刺激产生总体抗肿瘤活性的抗肿瘤免疫应答或免疫刺激应答的抗体均适用于组合治疗方法。

[0356] “抗癌治疗”是预防或延迟癌细胞的生长和/或转移的化合物、组合物或治疗(例如,手术)。此类抗癌治疗包括但不限于手术(例如,去除全部或部分肿瘤)、化学治疗药物治疗、放射、基因疗法、激素操纵、免疫疗法(例如,治疗性抗体和癌症疫苗)以及反义或RNAi寡核苷酸疗法。有用的化学治疗药物的实例包括但不限于羟基脲、白消安、顺铂、卡铂、苯丁酸

氮芥、美法仑、环磷酰胺、异环磷酰胺、柔红霉素、多柔比星、表柔比星、米托蒽醌、长春新碱、长春花碱、诺维本、RTM. (长春瑞滨)、依托泊苷、替尼泊苷、紫杉醇、多西紫杉醇、吉西他滨、胞嘧啶、阿糖胞苷、博来霉素、新制癌菌素、苏拉明、他克唑、丝裂霉素C、阿瓦斯汀、赫塞汀、RTM.、氟脲嘧啶和替莫唑胺等。化合物也适用于与采用两种或更多种化学治疗剂的标准组合疗法一起使用。应当理解,抗癌治疗包括未来开发的新型化合物或治疗。

[0357] 上述药物组合物和/或调配物包括达到预期目的的有效量的一种或多种治疗实体。因此,术语“治疗有效剂量”是指可改善癌症症状的治疗实体的量。化合物的治疗有效剂量的确定完全在本领域技术人员的能力范围内。例如,可以在细胞培养测定中或在动物模型(诸如本文所述的动物模型)中初步估计治疗有效剂量。动物模型还可以用于确定适当的浓度范围和给药途径。然后,可以使用本领域普通技术人员已知的标准方法,使用此类信息确定在其它动物(包括人类)中给药的有用剂量和途径。

[0358] 包含本发明的组合物和使用说明书的试剂盒也在本发明的范围内。试剂盒可以进一步含有至少一种另外的试剂,例如化学治疗药物、抗肿瘤抗体等。试剂盒通常包括标明试剂盒内容物的预期用途的标签。术语“标签”包括在试剂盒上或与试剂盒上一起提供的任何书写或记录材料,或者以其它方式随附于试剂盒的书写或记录材料。

[0359] 现在已经充分描述了本发明,对于本领域普通技术人员而言将显而易见的是,可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下对本发明进行各种改变和修改。在一些实施方案中,试剂盒含有包含如本文所述的IL-4变体/IL-4突变蛋白的IL-4突变蛋白免疫细胞靶向或表达构建体。在一些实施方案中,试剂盒含有IL-4超级因子免疫细胞靶向或表达构建体,其包含IL-4变体/IL-4突变蛋白,包括本文提供的那些。在一些实施方案中,IL-4突变蛋白免疫细胞靶向或表达构建体包含IL-4变体/IL-4突变蛋白,包括本文提供的那些。

[0360] F. 癌症干细胞靶向部分

[0361] 靶向部分是靶向IL-4的货物蛋白的一部分,其将靶向IL-4的货物蛋白靶向癌细胞,并且包括癌细胞和/或癌症干细胞和大量癌细胞。靶向部分的功能是与癌症干细胞特异性结合。然而,应当理解,只要容许靶向IL-4的货物蛋白以高度特异性结合癌细胞和/或癌症干细胞(并且在一些实例中还有癌细胞),则靶向部分不需要保留其天然生物活性(例如,活化受体的能力或阻止配体与其受体结合的能力)。在某些实例中,靶向部分是由癌症干细胞展示的靶标的天然配体或天然配体的衍生物。在其他实例中,靶向部分是抗体,诸如人源化抗体或抗体片段,其特异性结合癌症干细胞表面上展示的靶标(例如靶向受体)。可以使用本领域已知的任何方法(例如经由化学或重组技术)将靶向部分联接至货物部分。

[0362] 可用于靶向癌细胞和/或癌症干细胞的化合物的非限制性列表包括与一种或多种癌细胞和/或癌症干细胞结合的抗体、天然配体、工程改造的配体及它们的组合。示例性配体包括细胞因子和生长因子。癌细胞和/或癌症干细胞上的示例性靶标包括例如IL-4R。

[0363] 特别感兴趣的是靶向部分,靶向部分是这样的分子,所述分子是癌细胞和/或癌症干细胞上的靶标的天然配体或天然配体的衍生物。例如,如果癌症干细胞表达IL-4受体(IL-4R),则可以将IL-4配体用作靶向部分。IL-4可以化学地或重组地联接至本文所述的一种或多种货物部分。天然配体的衍生物的例子包括Pastan等人的美国专利第6,011,002号中描述的环状细胞因子配体,该专利通过引用并入本文。除IL-4配体之外,IL-13也可用作配体靶向部分,因为IL-4和IL-13受体共享一些序列和生物学功能。靶向IL-4的货物蛋白包

括那些包含IL-4和IL-13配体及其变体的蛋白。

[0364] 在一些实例中,靶向IL-4R的抗体(包括如上所述的片段、人源化抗体等)。抗体可从各种公司(诸如密理博公司(Millipore)、Bedford、Mass.)商购获得,或者可以从诸如剑桥研究生物化学公司(Cambridge Research Biochemicals)、Billingham、Cleveland等公司订购定制抗体。如果需要,可以使用本领域常规方法来产生此类抗体。此类抗体会与癌细胞和/或癌症干细胞特异性结合(并且也可能与大量癌细胞结合)并起到将货物部分与癌症干细胞接触的作用。

[0365] IL-4是一种由活化的T细胞产生的多效性细胞因子,并且是IL-4受体的配体。IL-4受体还与IL-13结合。因此,IL-13也可用作靶向部分以靶向IL-4受体。IL-4、IL-3、IL-5、IL-13和CSF2在人类染色体5q上形成细胞因子基因簇,其中该基因特别接近IL-13。可用于本公开的靶向IL-4的货物蛋白的示例性IL-4和IL-13蛋白包括表2中提供的那些,以及与此类序列具有至少60%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或甚至至少99%的序列同一性,只要变体保留结合IL-4受体的能力。

[0366] 所使用的靶向部分可以包括天然序列(诸如GenBank登录号和存在于表2中引用和上文列出的专利中的序列)及其变体,诸如与天然靶向部分蛋白质具有至少98%、至少95%、至少90%、至少80%、至少70%或至少60%的序列同一性的变体(例如,与表2中列出和上文列出的GenBank登录号至少有大约该量的序列同一性)。在一些实例中,变体序列保留基本上相同量(或甚至更多)的靶向部分蛋白质的天然生物学功能,诸如活化细胞内信号级联的能力。然而,在一些实例中,变体靶向部分分子可保留很少或不保留天然生物活性,但保留以高特异性结合适当靶标(例如结合适当的细胞表面受体或蛋白质)的能力。

[0367] 在一些实施方案中,癌症干细胞来自选自以下组成的组中的癌症:成胶质细胞瘤、头颈癌、肺癌、乳腺癌、胰腺癌、宫颈癌、前列腺癌和软组织肉瘤。

[0368] G. 接头

[0369] 货物部分与靶向部分的联接可以是直接的,意味着货物部分的一部分直接附接至靶向部分的一部分。例如,货物蛋白的氨基酸序列的一端可以直接附接至靶向部分的氨基酸序列的一端。例如,货物蛋白的C端可以联接至靶向部分的N端,或者靶向部分的C端可以联接至货物蛋白的N端。产生此类融合蛋白的方法是本领域的常规方法,例如使用重组分子生物学方法。

[0370] 在另一个实例中,货物部分通过接头间接联接至靶向部分。例如,接头可以简单地用作联接两个实体的方便的方式,作为空间分离这两个实体的手段,为靶向IL-4的货物蛋白提供额外的功能,或它们的组合。

[0371] 通常,接合靶向部分和货物部分的接头可以被设计为:(1)允许两个分子折叠并相互独立地起作用,(2)不倾向于发展可能干扰两个部分的功能结构域的有序二级结构,(3)具有最小的可与功能性蛋白质结构域相互作用的疏水特性或带电特性,和/或(4)提供两个区域的空间分离。例如,在一些情况下,可能期望在空间上将靶向部分和货物部分分离以防止靶向部分干扰被靶向的货物部分的抑制活性和/或防止货物部分干扰靶向部分的靶向活性。接头还可用于提供例如靶向部分与货物部分之间的连接的不稳定性、酶切割位点(例如蛋白酶的切割位点)、稳定性序列、分子标签、可检测的标签或它们的各种组合。

[0372] 接头可以是双官能的或多官能的,例如含有至少约在接头的第一端处或附近的第

一反应性官能团,其能够结合靶向部分或被修饰以结合靶向部分,以及在接头的另一端处或附近的第二反应性官能团,其能够结合被修饰的货物部分或被修饰以结合被修饰的货物部分。两个或更多个反应性官能团可以相同(即接头是同双官能的)或者它们可以不同(即接头是异双官能的)。多种双官能或多官能交联剂在本领域中是已知的,它们适合用作接头(例如,可从伊利诺伊州罗克福德的皮尔斯化学公司(Pierce Chemical Co.)商购获得的那些),诸如抗生物素蛋白和生物素。可替代地,这些试剂可用于将接头添加到靶向部分和/或货物部分。

[0373] 接头的长度和组成可以大为不同,只要它可以实现其作为分子桥的目的。通常在考虑接头的预期功能以及任选的其他因素(诸如合成的容易性、稳定性、对某些化学和/或温度参数的耐受性以及生物相容性)的情况下选择接头的长度和组成。例如,接头不应显著干扰靶向部分将靶向IL-4的货物蛋白靶向癌症干细胞的能力,或干扰靶向IL-4的货物蛋白与活化相关的活性、成孔能力或毒素活性。

[0374] 适用的接头可以是支链、非支链、饱和或不饱和烃链,以及如上所述的肽。此外,如果接头是肽,则可以使用重组DNA技术将接头附接至靶向部分和/或货物部分。此类方法在本领域中是众所周知的,并且该技术的细节可见于例如上述Sambrook等人。

[0375] 在一个实例中,接头是具有1至100个碳原子的支链或非支链、饱和或不饱和的烃链,其中,一个或多个碳原子任选地被--O--或--NR--替代(其中,R是H或C1-C6烷基),并且其中,该链在碳上任选地被一个或多个选自由以下组成的组中的取代基取代:(C1-C6)烷氧基、(C3-C6)环烷基、(C1-C6)烷酰基、(C1-C6)烷酰氧基、(C1-C6)烷氧基羰基、(C1-C6)烷硫基、酰胺、叠氮基、氰基、硝基、卤代、羟基、氧代(.dbd.O)、羧基、芳基、芳氧基、杂芳基和杂芳氧基。

[0376] 合适的接头的实例包括但不限于链长为1至500个氨基酸残基(诸如1至100个、1至50个、6至30个氨基酸,诸如少于30个氨基酸)的肽。通常,柔性蛋白质区域中的表面氨基酸包括Gly、Asn和Ser。其他中性氨基酸,诸如Thr和Ala,也可用于接头序列中。接头中可包括额外的氨基酸以在接头序列中提供独特的限制性位点以促进融合体的构建。其他示例性接头包括衍生自诸如以下基团的那些接头:乙醇胺、乙二醇、链长为6至100个碳原子的聚乙烯、具有3至30个重复单元的聚乙二醇、苯氧乙醇、丙醇酰胺、丁二醇、丁二醇酰胺、丙基苯基以及乙基、丙基、己基、甾基、鲸蜡基和棕榈酰基烷基链。

[0377] 在一个实例中,接头是支链或非支链、饱和或不饱和的烃链,具有1至50个碳原子,其中,一个或多个碳原子任选地被--O--或--NR--替代(其中,R如上所定义),并且其中,该链任选地在碳上被一个或多个选自由以下组成的组中的取代基取代:(C1-C6)烷氧基、(C1-C6)烷酰基、(C1-C6)烷酰氧基、(C1-C6)烷氧基羰基、(C1-C6)烷硫基、酰胺、羟基、氧代(.dbd.O)、羧基、芳基和芳氧基。

[0378] 在一个具体实例中,接头是链长为1至50个氨基酸残基(诸如1至40个、1至20个或5至10个氨基酸残基)的肽。

[0379] 在一个实例中,可以使用易于被补体体系的酶、尿激酶、组织纤溶酶原激活剂、胰蛋白酶、纤溶酶或另一种具有蛋白水解活性的酶切割的肽接头。根据另一个实例,靶向IL-4的货物蛋白包括经由易于被具有蛋白水解活性的酶(诸如尿激酶、组织纤溶酶原激活剂、纤溶酶、凝血酶或胰蛋白酶)切割的接头附接的靶向部分。此外,靶向部分可以经由二硫键(例

如,半胱氨酸分子上的二硫键) 附接至货物部分。由于许多肿瘤自然释放高水平的谷胱甘肽(一种还原剂), 这可以减少二硫键, 随后在递送位点处释放货物部分。

[0380] 在一个实例中, 靶向IL-4的货物蛋白包括由可切割接头区联接的靶向部分。在另一个实例中, 可切割的接头区是蛋白酶可切割的接头, 但也可以使用例如可被小分子切割的其他接头。蛋白酶切割位点的例子有那些被Xa因子、凝血酶和胶原酶切割的位点。在一个实例中, 蛋白酶切割位点是被与疾病相关的蛋白酶切割的位点。在另一个实例中, 蛋白酶切割位点是通常被上调的或与癌症相关的蛋白酶切割的位点。此类蛋白酶的例子有uPA、基质金属蛋白酶(MMP) 家族、半胱天冬酶、弹性蛋白酶、前列腺特异性抗原(PSA, 丝氨酸蛋白酶) 和纤溶酶原激活剂家族以及成纤维细胞活化蛋白。在又一个实例中, 切割位点被癌症相关细胞分泌的蛋白酶切割。这些蛋白酶的例子包括基质金属蛋白酶、弹性蛋白酶、纤溶酶、凝血酶和uPA。在另一个实例中, 蛋白酶切割位点是上调的或与特定癌症相关的位点。确切的序列在本领域中是可获得的, 并且技术人员在选择合适的切割位点时将不存在困难。举例来说, 因子Xa靶向的蛋白酶切割区是I E G R。肠激酶靶向的蛋白酶切割区是D D D D K。凝血酶靶向的蛋白酶切割区是L V P R G。在一个实例中, 可切割的接头区是被细胞内蛋白酶靶向的区域。

[0381] 如本领域已知的, 接头与货物部分的附接(或接头元件与可切割元件的附接, 或可切割元件与另一个货物部分的附接) 无需是特定的附接或反应模式。

[0382] H. 示例性货物部分/靶向部分组合

[0383] 1. MDNA55

[0384] MDNA55已被开发用于治疗复发性/进展性成胶质细胞瘤(GB)。使用当前的治疗范例, 大多数GB患者在标准一线治疗后会出现肿瘤复发/进展。复发性GB患者的治疗选择非常有限, 并且结果通常不令人满意。具体地, 复发性或进展性GB的化疗疗程不成功, 产生毒性而无益处(Weller等人, 2013)。这主要是由于缺乏组织特异性, 对正常组织产生毒性, 因此治疗指数较窄。由于总存活率仍然很低, 因此需要具有更高的肿瘤特异性、更强大的细胞毒性机制和新型递送技术的新型抗癌方式来治疗复发性GB。

[0385] MDNA55是一种新型疗法, 它提供了一种靶向治疗方法, 使肿瘤细胞比正常细胞对药物的毒性作用更敏感。靶标IL-4R是开发癌症疗法的理想但未充分利用的靶标, 因为它在各种人类癌症中频繁且强烈地表达。IL-4R在健康和正常细胞的表面的表达水平很低, 但在癌细胞上却增加了数倍。大多数来自成人和小儿中枢神经系统(CNS) 肿瘤的癌症活检和尸检样品(包括复发性GB活检) 已显示出过度表达IL-4R。在正常成人和小儿脑组织中几乎没有或完全没有IL-4R表达(Joshi等人, 2001; 参考表2)。IL-4R的这种差异表达为MDNA55提供了广泛的治疗窗口(IC50数据参见参考文献的表4)。仅该特征就可使MDNA55成为治疗复发性GB和其他过度表达IL-4R的CNS肿瘤的理想候选物。不表达IL-4R靶标的细胞不与MDNA55结合, 因此不受PE介导的影响。

[0386] 2. 其他组合

[0387] 根据本发明, 可以采用货物部分和基于IL-4的靶向部分的任何组合。在本节中, 提供了靶向部分和货物部分的示例性组合。在所有实例中, 靶向部分可以是特异性结合靶标的抗体, 诸如完全人源化的抗体。

[0388] IL-4(包括IL-4循环排列配体和其他IL-4受体结合蛋白, 诸如IL-13) 是另一种可

与BCL-2家族蛋白质(诸如BAX、BAD、BAT、BAK、BIK、BOK、BID、BIM、BMF和BOK)或毒素(诸如气溶素、气溶素原、假单胞菌外毒素)或它们的组合联接的靶向部分。IL-4的任何形式或衍生物均可用作靶向部分。例如,可以使用与IL-4受体结合的IL-4或IL-4片段。此外,多个货物部分可以联接到IL-4,或者多个IL-4蛋白可以联接到货物部分。

[0389] IL-4的任何形式或衍生物均可用作靶向部分。例如,可以使用与IL-4受体结合的IL-4或IL-4片段。此外,多个货物部分可联接至IL-4,或者多个IL-4蛋白可联接至货物部分。

[0390] 环状排列配体(例如衍生自IL-4的环状排列配体)可用作靶向部分。假单胞菌外毒素可用作货物部分。环状排列的IL-4配体的任何形式或衍生物均可用作靶向部分。此外,多个货物部分可联接至环状排列配体,或者多个环状排列配体蛋白质可联接至货物部分。

[0391] I. IL-4突变蛋白、表达载体和宿主细胞的重组表达

[0392] 在各种实施方案中,用于本发明实践中的多肽是合成的,或通过重组核酸分子的表达产生。在多肽是嵌合体(例如,至少含有突变型IL-4多肽和异源多肽的融合蛋白)的情况下,它可以由含有一个编码全部或部分IL-4突变蛋白的序列以及编码全部或部分异源多肽的第二序列的杂交核酸分子编码。例如,本文描述的主题IL-4突变蛋白可与六聚组氨酸标签融合以促进细菌表达的蛋白质的纯化,或与血球凝集素标签融合以促进真核细胞中表达的蛋白质的纯化。

[0393] 用于构建编码IL-4突变蛋白的DNA序列并在适当转化的宿主中表达这些序列的方法包括但不限于使用PCR辅助诱变技术。也可以用标准重组技术进行由对IL-4多肽的氨基酸残基的缺失或添加组成的突变。在缺失或添加的情况下,任选地用适当的限制性内切核酸酶消化编码IL-4的核酸分子。所得片段可以直接表达或通过例如将其与第二个片段连接来进一步操纵。如果核酸分子的两端含有彼此重叠的互补核苷酸,则可以促进连接,但也可以连接平端片段。PCR产生的核酸也可用于产生各种突变序列。

[0394] 完整的氨基酸序列可用于构建回译基因。可以合成含有编码IL-4突变蛋白的核苷酸序列的DNA寡聚体。例如,可以合成几个编码期望的多肽部分的小寡核苷酸,然后进行连接。单个的寡核苷酸通常含有用于互补组装的5'或3'突出端。

[0395] 除了经由已通过重组分子生物学技术改变的核酸分子的表达产生突变多肽之外,还可以化学合成主题IL-4突变蛋白。化学合成的多肽通常由本领域技术人员产生。

[0396] 一旦组装(通过合成、定点诱变或其他方法),则编码IL-4突变蛋白的DNA序列将被插入到表达载体中,并与适合在期望的转化宿主中表达IL-4突变蛋白的表达控制序列有效联接。可以通过核苷酸测序、限制性作图和生物活性多肽在合适的宿主中的表达来确认正确的组装。如本领域公知的,为了在宿主中获得转染基因的高表达水平,该基因必须与在所选表达宿主中起作用的转录和翻译表达控制序列有效联接。

[0397] 编码IL-4突变蛋白的DNA序列(无论是通过定点诱变、化学合成还是其他方法制备的)还可包括编码信号序列的DNA序列。这种信号序列(如果存在)应该是由选择用于表达IL-4突变蛋白的细胞识别的信号序列。它可以是原核的、真核的或两者的组合。它也可以是天然IL-4的信号序列。信号序列的包含取决于是否期望从制造它的重组细胞中分泌IL-4突变蛋白。如果选择的细胞是原核细胞,则通常优选DNA序列不编码信号序列。如果选择的细胞是真核细胞,则通常优选编码的信号序列,并且最优选使用野生型IL-4信号序列。

[0398] J. 编码突变IL-4的核酸分子

[0399] 在一些实施方案中,可以通过核酸分子的表达获得单独的或作为嵌合多肽(诸如上述那些)的一部分的主题IL-4突变蛋白。正如IL-4突变蛋白可以根据它们与野生型IL-4多肽的同一性来描述,编码它们的核酸分子必然与那些编码野生型IL-4的核酸分子具有一定的同一性。例如,编码主题IL-4突变蛋白的核酸分子可以与编码野生型IL-4的核酸具有至少50%、至少65%、优选至少75%、更优选至少85%、并且最优选至少95%(例如,99%)的同一性。

[0400] 所提供的核酸分子可含有天然存在的序列,或与天然存在的序列不同但由于遗传密码的简并性而编码相同多肽的序列。这些核酸分子可以由RNA或DNA(例如,基因组DNA、cDNA或合成DNA,诸如通过基于亚磷酰胺的合成产生)或这些类型的核酸内的核苷酸的组合或修饰组成。此外,核酸分子可以是双链或单链的(即有义链或反义链)。

[0401] 核酸分子不限于编码多肽的序列;还可以包括位于编码序列(例如IL-4的编码序列)上游或下游的一些或全部非编码序列。分子生物学领域的普通技术人员熟悉分离核酸分子的常规程序。例如,它们可以通过用限制性内切核酸酶处理基因组DNA或通过聚合酶链反应(PCR)产生。在核酸分子是核糖核酸(RNA)的情况下,分子可以例如通过体外转录产生。

[0402] 本公开的示例性的分离的核酸分子可包括在天然状态中未发现的片段。因此,本公开涵盖了重组分子,诸如其中核酸序列(例如,编码突变IL-4的序列)并入载体(例如,质粒或病毒载体)中或并入异源细胞的基因组(或同源细胞的基因组,位于天然染色体位置以外的位置)中的那些重组分子。

[0403] 如上所述,主题IL-4突变蛋白可以作为嵌合多肽的一部分存在。除了或替代上述异源多肽,主题核酸分子可以含有编码“标志物”或“报告基因”的序列。标志物或报告基因的例子包括 β -内酰胺酶、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、腺苷脱氨酶(ADA)、氨基糖苷磷酸转移酶(neo^r、G418^r)、二氢叶酸还原酶(DHFR)、潮霉素-B-磷酸转移酶(HPH)、胸苷激酶(TK)、lacZ(编码 β -半乳糖苷酶)和黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(XGPRT)。本领域技术人员会知道其他有用的试剂,例如,可以起到标志物或报告基因的功能的其他序列。

[0404] 可以通过将突变引入从任何生物细胞(诸如哺乳动物细胞)获得的编码IL-4的DNA中来获得主题核酸分子。因此,主题核酸(及其编码的多肽)可以是小鼠、大鼠、豚鼠、牛、羊、马、猪、兔、猴、狒狒、狗或猫的核酸。在一个实施方案中,核酸分子将是人类的核酸分子。

[0405] III. 制备靶向IL-4的货物蛋白

[0406] 靶向IL-4的货物蛋白可以通过本领域已知的许多常规方法制备。例如,可以通过使用重组DNA技术或通过肽合成对编码靶向IL-4的货物蛋白的核酸进行工程改造来制备靶向IL-4的货物蛋白及其修饰。可以例如通过使用化学修饰和/或受限的蛋白水解修饰靶向IL-4的货物蛋白多肽本身来对靶向IL-4的货物蛋白进行修饰。这些方法的组合也可用于制备靶向IL-4的货物蛋白。

[0407] 克隆和表达蛋白质的方法是本领域公知的,用于表达重组蛋白质的技术和系统的详细描述可见于例如《蛋白质科学的当前方案(Current Protocols in Protein Science)》(Coligan, J.E. 等人, Wiley&Sons, 纽约)。本领域技术人员将理解可以使用多种表达系统来提供重组蛋白。因此,靶向IL-4的货物蛋白可以在原核宿主(例如,大肠杆菌、杀鲑气单胞菌或枯草芽孢杆菌)或真核宿主(例如,酵母属或毕赤酵母;哺乳动物细胞,例如

COS、NIH 3T3、CHO、BHK、293或HeLa细胞；或昆虫细胞）中产生。靶向IL-4的货物蛋白可以通过本领域已知的标准技术从宿主细胞中纯化。

[0408] 在表1和表2中提供了各种示例性货物部分和靶向部分的序列。如果需要替代序列，则可以使用标准技术克隆这些序列的变体和同源物[参见，例如，Ausubel等人，《分子生物学的当前方案 (Current Protocols in Molecular Biology)》，Wiley&Sons，纽约州（1997年更新）；上述Sambrook等人]。例如，可以通过提取mRNA然后从mRNA模板合成cDNA（例如通过RT-PCR）或通过PCR扩增来自基因组DNA的基因，直接从合适的生物体（诸如嗜水气单胞菌）获得核酸序列。可替代地，编码靶向部分或货物部分的核酸序列可通过标准程序从适当的cDNA文库获得。然后将分离的cDNA插入合适的载体（诸如克隆载体或表达载体）中。

[0409] 可以通过本领域公知的体外定点诱变技术在特定的、预先选择的位置引入突变（如果期望）。可以通过构成编码序列的一种或多种适当的核苷酸的缺失、插入、取代、倒位或它们的组合来引入突变。

[0410] 表达载体可以进一步包括高效转录靶向IL-4的货物蛋白编码序列所需的调节元件，诸如转录元件。可并入载体中的调节元件的实例包括但不限于启动子、增强子、终止子和聚腺苷酸化信号。包括与编码基因工程改造的靶向IL-4的货物蛋白的核酸序列有效联接的调节元件的载体可用于产生靶向IL-4的货物蛋白。

[0411] 表达载体可以另外含有促进表达的靶向IL-4的货物蛋白的纯化的异源核酸序列，诸如亲和标签（例如金属亲和标签、组氨酸标签、抗生物素蛋白/链霉抗生物素蛋白编码序列、谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 编码序列以及生物素编码序列）。在一个实例中，此类标签附接至靶向IL-4的货物蛋白的N端或C端，或者可以位于靶向IL-4的货物蛋白内。根据本领域已知的方法，可以在使用前从表达的靶向IL-4的货物蛋白中去除标签。可替代地，标签可以被保留在靶向IL-4的货物蛋白上，前提是所述标签不干扰靶向IL-4的货物蛋白靶向和杀死癌细胞和/或癌症干细胞（或减少癌细胞和/或癌症干细胞的生长）的能力。

[0412] 作为将突变引入天然存在的成孔蛋白中的定向方法的替代方案，可以通过本领域已知的技术对表达成孔蛋白的克隆基因进行随机诱变。如此产生的蛋白质的突变形式的后续表达和筛选将允许鉴定和分离靶向的货物部分。

[0413] 靶向IL-4的货物蛋白也可以制备为片段或融合蛋白。融合蛋白是一种包括与其他氨基酸序列联接的靶向IL-4的货物蛋白的蛋白质，所述其他氨基酸序列不抑制靶向IL-4的货物蛋白选择性靶向癌细胞和/或癌症干细胞和抑制癌细胞和/或癌症干细胞生长或杀死癌细胞和/或癌症干细胞的能力。在替代实例中，所述其他氨基酸序列是长度为例如至多约5个氨基酸残基、约6个氨基酸残基、约7个氨基酸残基、约8个氨基酸残基、约9个氨基酸残基、约10个氨基酸残基、约20个氨基酸残基、约30个氨基酸残基、约50个氨基酸残基或约100个氨基酸残基的短序列。这些短序列可以是如上所述的接头序列。

[0414] 用于制备融合蛋白的方法是本领域技术人员公知的。例如，美国专利第6,057,133号公开了用于制备由人类白细胞介素3 (hIL-3) 变体或突变蛋白组成的融合分子的方法，其与第二集落刺激因子、细胞因子、淋巴因子、白细胞介素、造血生长因子或IL-3变体功能性接合。Davis等人的美国专利第6,072,041号公开了融合蛋白的产生，该融合蛋白包含与治疗性蛋白共价连接的针对胞吞受体的单链Fv分子。

[0415] 靶向IL-4的货物蛋白可以根据期望包括一个或多个接头以及其他部分。这些可包

括结合区,诸如抗生物素蛋白或表位,或标签,诸如多组氨酸标签,其可用于融合蛋白的纯化和处理。此外,可检测标志物可附接在融合蛋白上,从而可以方便地监测融合蛋白通过身体或细胞的流量。此类标志物包括放射性核素、酶、荧光团、生色团等。

[0416] 本领域普通技术人员将理解,可以以多种方式改变DNA而不影响所编码蛋白质的生物活性。例如,PCR可用于在编码靶向IL-4的货物蛋白的DNA序列中产生变异。编码靶向IL-4的货物蛋白的DNA序列中的此类变异可用于优化用于表达蛋白质的宿主细胞中的密码子偏好,或者可能含有促进表达的其他序列变化。

[0417] 靶向部分直接地或经由接头与货物部分的共价连接可以采用本领域已知的各种形式。例如,共价键可以是二硫键的形式。编码其中一种组分的DNA可以被工程改造为含有独特的半胱氨酸密码子。第二组分可以用可与第一组分的半胱氨酸反应的巯基衍生。可替代地,可以使用固相多肽技术引入巯基本身或作为半胱氨酸残基的一部分。例如,Hiskey(《肽(Peptides)》3:137,1981)描述了将巯基引入肽中。

[0418] 蛋白质也可以通过标准技术进行化学修饰以添加巯基。例如,特劳特氏试剂(Traut's reagent)(2-亚氨基硫杂环戊烷-HCl)(皮尔斯化学公司,罗克福德,伊利诺伊州)可用于在伯胺(诸如赖氨酸残基或N端胺)上引入巯基。用特劳特氏试剂修饰的蛋白质或肽然后可与用试剂(诸如N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)或琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸盐(SMCC)(皮尔斯化学公司,罗克福德,伊利诺伊州))修饰的蛋白质或肽反应。

[0419] 也可以使用聚合物单甲氧基聚乙二醇(mPEG)接合这些组分,如Maiti等人,《国际癌症杂志增刊(Int.J.Cancer Suppl.)》,3:17-22,1988中所述。

[0420] 靶向部分和货物部分也可以通过使用本领域已知的标准缀合化学进行缀合,诸如碳二亚胺介导的偶联(例如,DCC、EDC或活化的EDC),以及使用2-亚氨基硫杂环戊烷将ε氨基转化为硫醇进行交联,并将间马来酰亚胺苯甲酰基-n-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)作为交联剂。

[0421] I. 测试靶向IL-4的货物蛋白

[0422] 可以使用本领域已知的标准技术测试靶向IL-4的货物蛋白。下文和本文包括的实例中提供了测试候选的靶向IL-4的货物蛋白的示例性方法。本领域普通技术人员将理解,测试靶向IL-4的货物蛋白的其他方法是本领域已知的并且也适用于测试候选的靶向IL-4的货物蛋白。例如,可以使用本领域已知的用于测试抗肿瘤活性的方法。最初可以针对一组癌细胞系或癌症干细胞系筛选靶向IL-4的货物蛋白。可以使用细胞增殖测定,诸如罗氏公司(Roche)出售的WST-1试剂盒。在抑制癌细胞或使癌细胞和/或癌症干细胞敏感的药剂存在或不存在的条件下,可以使用不同的药物浓度来评估效力。从最初的癌症干细胞筛选中选出的候选药物可以通过额外的体外测定和相关的异种移植模型来进一步表征,以检查抗肿瘤活性。

[0423] A. 体外

[0424] 可以使用已知方法测试靶向IL-4的货物蛋白杀死癌症干细胞或显著减少或抑制癌细胞和/或癌症干细胞生长的能力。例如,可以使用合适的细胞(通常是表达靶标的细胞系或癌症干细胞)在体外测定靶向IL-4的货物蛋白杀死细胞或抑制细胞生长的能力。一般地,使所选测试细胞系的细胞生长至适当的密度,并添加候选的靶向IL-4的货物蛋白。靶向

IL-4的货物蛋白可以以约至少1ng/mL、至少1μg/mL或至少1mg/mL (诸如约0.01μg/mL至约1mg/mL、约0.10μg/mL至约0.5mg/mL、约1μg/mL至约0.4mg/mL) 添加到培养物中。在一些实例中测试连续稀释。在适当的温育时间 (例如, 约48至72小时) 后, 评估细胞存活或生长。确定细胞存活的方法是本领域公知的, 包括但不限于刃天青还原试验 (参见Fields&Lancaster《美国生物技术实验室 (Am.Biotechnol.Lab.)》, 11:48-50, 1993; O'Brien等人,《欧洲生物化学杂志 (Eur.J.Biochem.)》, 267:5421-5426, 2000以及美国专利第5,501,959号), 磺基罗丹明测定 (Rubinstein等人,《国立癌症研究所杂志 (J.Natl.Cancer Inst.)》, 82:113-118, 1999) 或中性红染料测试 (Kitano等人,《欧洲临床研究杂志 (Euro.J.Clin.Investg.)》, 21:53-58, 1991; West等人,《皮肤病学研究杂志 (J.Investigative Derm.)》, 99:95-100, 1992) 或台盼蓝测定。也可以使用许多市售的试剂盒, 例如CellTiter 96.RTM. 单水溶液细胞增殖试验 (Promega)。通过将处理的培养物中的细胞存活率与一种或多种对照培养物 (例如未处理的培养物和/或用对照化合物 (通常为已知的治疗剂) 或其他适当的对照物预处理的培养物) 中的细胞存活率进行比较来确定细胞毒性。被认为可有效杀死癌细胞和/或癌症干细胞或减少癌细胞和/或癌症干细胞的生长的靶向IL-4的货物蛋白能够降低细胞存活率或生长, 例如降低至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%或至少约50%。

[0425] 在一些实例中, 靶向IL-4的货物蛋白可对非癌细胞和/或非癌症干细胞没有显著毒性。例如, 当在细胞培养物中以大约至少1ng/mL、至少1μg/mL或至少1mg/mL (诸如约0.01μg/mL至约1mg/mL、约0.10μg/mL至约0.5mg/mL、约1μg/mL至约0.4mg/mL) 与不显示靶标 (例如, 不表达IL-4R) 的细胞一起温育时, 靶向IL-4的货物蛋白会杀死小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%或小于约10%的非癌细胞和/或非癌症干细胞。在一些实例中, 当在细胞培养物中以大约至少1ng/mL、至少1μg/mL或至少1mg/mL (诸如约0.01μg/mL至约1mg/mL、约0.10μg/mL至约0.5mg/mL、约1μg/mL至约0.4mg/mL) 与不显示靶标 (例如, 不表达IL-4R) 的细胞一起温育时, 靶向IL-4的货物蛋白会具有对非癌细胞和/或非癌症干细胞至少10倍大的LD₅₀, 诸如对非癌细胞和/或非癌症干细胞至少20倍大、至少50倍大、或至少100倍大的LD₅₀。

[0426] 在一些实例中, 靶向IL-4的货物蛋白包括含有对活化序列的一个或多个修饰的毒素。可以根据本领域已知的方法测试这些可活化的靶向IL-4的货物蛋白被适当的活化剂切割的能力。例如, 如果所述一个或多个修饰引起一个或多个蛋白酶切割位点的添加, 则靶向IL-4的货物蛋白可以与不同浓度的适当的蛋白酶一起温育。温育产物可以在SDS-PAGE凝胶上被电泳, 并且可以通过检查凝胶上多肽的大小来评估靶向IL-4的货物蛋白的切割。

[0427] 为了确定已与蛋白酶一起温育的可活化的靶向IL-4的货物蛋白是否保留成孔活性, 从而保留杀死细胞的能力, 在与蛋白酶一起温育后, 可以在溶血试验中测试反应产物, 如本领域中已知的那样。Howard和Buckley,《细菌学杂志 (J.Bacteriol.)》, 163:336-40, 1985中描述了合适的测定的实例, 该文献通过引用并入本文。

[0428] 可以测试对特定类型的癌症具有选择性的靶向IL-4的货物蛋白靶向该特定癌细胞类型的能力。例如, 包含靶向展示IL-4R的癌细胞和/或癌症干细胞的IL-4的靶向IL-4的货物蛋白可以通过比较靶向IL-4的货物蛋白杀死癌细胞和/或癌症干细胞的能力与其杀死正常细胞或不同类型的癌细胞 (例如, 不表达IL-4R的癌细胞) 的能力来评估其选择性靶向癌细胞和/或癌症干细胞的能力。可替代地, 本领域已知的流式细胞术方法可用于确定包含

IL-4靶向部分的靶向IL-4的货物蛋白是否能够选择性靶向特定类型的癌症干细胞。标记抗体与结合的靶向IL-4的货物蛋白的结合将表明靶向IL-4的货物蛋白与靶标的结合。

[0429] 适用于测试候选的靶向IL-4的货物蛋白的多种癌细胞系是本领域已知的,并且许多是可商购的(例如,来自弗吉尼亚州马纳萨斯的美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection))。在一个实例中,候选化合物的体外测试是在人类癌细胞系中进行的。在另一个实例中,如Stassi等人的美国专利申请第2007/0292389号中所述分离和培养癌细胞和/或癌症干细胞。培养的干细胞用于测试靶向IL-4的货物蛋白的活性。靶向部分的初始测试可以通过 ([0430] 靶向IL-4的货物蛋白的额外体外测试可以使用经过工程改造以表达期望靶标的细胞系来完成。可以使用对靶标特异的抗体来确保靶标被表达。在与表达靶标的细胞结合后,靶向IL-4的货物蛋白可引起细胞裂解,这可使用本领域已知的方法进行检测。

[0431] B. 体内

[0432] 可以使用本领域已知的标准技术在适当的动物模型中确定靶向IL-4的货物蛋白在体内杀死肿瘤细胞的能力(参见例如Enna等人,《药物学的当前方案(Current Protocols in Pharmacology)》,J.Wiley&Sons,Inc.,纽约,纽约州)。

[0433] 目前用于筛选抗肿瘤化合物的动物模型包括异种移植模型,其中人类肿瘤已植入动物体内。使用这些技术可以移植癌细胞和/或癌症干细胞,并且可以评估所得肿瘤的存在、大小和形态。人类癌症的异种移植模型的例子包括但不限于人类实体瘤异种移植,通过皮下注射或植入而被植入并用于肿瘤生长测定;人类实体瘤同种移植物,通过脂肪垫注射植入并用于肿瘤生长测定;人类实体瘤原位异种移植物,直接植入相关组织中并用于肿瘤生长测定;小鼠淋巴瘤和白血病的实验模型,用于存活分析,以及小鼠肺转移的实验模型。除了植入的人类肿瘤细胞外,异种移植模型可以进一步包含移植的人类外周血白细胞,从而允许评估抗癌免疫应答。

[0434] 可替代地,鼠癌症模型可用于筛选抗肿瘤化合物。适当的鼠癌症模型的例子是本领域已知的并且包括但不限于通过静脉内、皮下、脂肪垫或原位注射植入鼠癌细胞的植入模型;鼠转移模型;转基因小鼠模型;以及基因敲除小鼠模型。

[0435] 例如,可以在第0天使用双侧皮下移植30至60mg肿瘤片段或植入适当数量的癌细胞和/或癌症干细胞(例如,至少 10^3 、至少 10^4 或至少 10^6 个癌细胞和/或癌症干细胞,诸如约10至约 10^5 个、约50至约 10^4 个或约75至约 10^3 个癌细胞和/或癌症干细胞)的小鼠在实体瘤上对靶向IL-4的货物蛋白进行体内测试。在进行各种治疗和对照之前,将携带肿瘤的动物随机分组。在治疗晚期肿瘤的情况下,允许肿瘤发展到期望大小,排除未充分发展肿瘤的动物。随机分配选定的动物以进行治疗和对照。未携带肿瘤的动物也可以接受与携带肿瘤的动物相同的治疗,以便能够将毒性作用与对肿瘤的特异性作用分离。化疗一般在移植后3至22天开始,具体取决于肿瘤的类型,并且每天观察动物。可以例如通过腹膜内注射、静脉内注射、直接注射到肿瘤中(或注射到具有肿瘤的器官中)或静脉推注向动物给药靶向IL-4的货物蛋白。可以使用上述体外测试结果确定注射的靶向IL-4的货物蛋白的量。例如,至少约1ng/kg体重、至少1 μ g/kg体重或至少1mg/kg体重,诸如约0.01 μ g/kg体重至约1mg/kg体重、

约0.10μg/kg体重至约1.0g/kg体重、约1mg/kg体重至约4mg/kg体重。对不同的动物分组每周称重约3次或4次,直到达到最大体重减轻,此后对分组至少每周称重一次,直到试验结束。

[0436] 在预先确定的时间段后测量肿瘤,或者可以通过每周测量约2次或3次来对其进行连续监测,直到肿瘤达到预先确定的大小和/或重量,或者直到动物死亡(如果在肿瘤达到预先确定的大小/重量之前发生这种情况)。然后处死动物并评估肿瘤的组织学结构、大小和/或增殖。原位异种移植模型是皮下模型的替代方案,可能更准确地反映癌症的发展过程。在该模型中,肿瘤细胞在起源器官的部位被植入并在内部发展。因此,与皮下模型相比,对肿瘤大小的每日评估更加困难。最近开发的一种在非侵入性全身成像中使用表达肿瘤的绿色荧光蛋白(GFP)的技术可以帮助解决这个问题(Yang等人,《国家科学院学报(Proc.Nat.Aca.Sci.)》,1206-1211,2000)。该技术利用了稳定表达极高水平绿色荧光蛋白(GFP)的人类或鼠类肿瘤。可以借助于外部放置的视频检测器使表达GFP的肿瘤可视化,从而允许监测肿瘤生长、血管生成和转移扩散的细节。可以通过监测肿瘤内的血管密度而随时间变化测量血管生成。因此,该模型的使用允许同时监测与肿瘤进展相关的几个特征,并且具有高度的临床前和临床相关性。

[0437] 为了研究组合物对白血病的影响,将特定数量的细胞移植到动物身上,并且通过被治疗的小鼠相对于对照的存活时间的增加来确定抗肿瘤活性。

[0438] 为了研究特定的靶向IL-4的货物蛋白对肿瘤转移的影响,通常用组合物离体处理肿瘤细胞,然后注射到合适的测试动物中。然后在合适的时间段内监测肿瘤细胞从注射部位的扩散。

[0439] 可以选择在抑制癌症干细胞生长方面足够有效的靶向IL-4的货物蛋白(如通过体外细胞存活分析、转移抑制分析和/或异种移植模型系统所证明的)用于人类。也可以选择靶向IL-4的货物蛋白用于人体试验和最终治疗用途,这取决于其在通过测定指示的潜在治疗剂量范围内的相对毒性。下面进一步描述治疗剂量和毒性。

[0440] II. 调配物/组合物

[0441] 药物组合物可包括一种或多种靶向IL-4的货物蛋白和一种或多种无毒的药学上可接受的载剂、稀释剂、赋形剂和/或佐剂。如果期望,组合物中可以包括其他活性成分。如上所述,此类组合物适用于治疗癌症。术语“药学上可接受的载体”是指不干扰活性成分的生物活性的有效性并且对宿主或患者无毒的载剂介质。下面提供了代表性实例。

[0442] 药物组合物可包含例如约1%至约95%的靶向IL-4的货物蛋白。调配用于以单剂型给药的组合物可包含例如约20%至约90%的靶向IL-4的货物蛋白,而非单剂型的组合物可包含例如约5%至约20%的靶向IL-4的货物蛋白。最终调配物中靶向IL-4的货物蛋白的浓度可以为至少1ng/mL,诸如至少1pg/mL或至少1mg/mL。例如,最终调配物中的浓度可以在约0.01μg/mL至约1,000μg/mL之间。在一个实例中,最终调配物中的浓度在约0.01mg/mL至约100mg/mL之间。

[0443] 该组合物可以是液体溶液、悬浮液、乳液、缓释调配物或粉末。该组合物可以被调配为栓剂,与传统的粘合剂和载剂(诸如甘油三酯)一起使用。

[0444] 靶向IL-4的货物蛋白可以与药学上可接受的媒剂一起递送。在一个实例中,媒剂可以增强稳定性和/或递送特性。因此,本公开还提供了用合适的媒剂(诸如人工膜囊泡(包

括脂质体、类脂质体、纳米体等)、微粒或微胶囊) 调配靶向IL-4的货物蛋白,或调配为包含药学上可接受的聚合物的胶体调配物。使用此类媒剂/聚合物可能有利于实现靶向IL-4的货物蛋白的持续释放。可替代地,或另外,靶向IL-4的货物蛋白调配物可包括添加剂以在体内稳定蛋白质,诸如人类血清白蛋白,或本领域已知的用于蛋白质治疗的其他稳定剂。靶向IL-4的货物蛋白调配物还可包括一种或多种粘度增强剂,其在例如通过注射或经由导管给药时起到防止调配物回流的作用。这种粘度增强剂包括但不限于生物相容性二醇和蔗糖。

[0445] 被调配为水性悬浮液的药物组合物含有与一种或多种合适的赋形剂混合的活性化合物,这些赋形剂例如是悬浮剂,诸如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基- β -环糊精、黄蓍胶和阿拉伯树胶;分散剂或润湿剂,诸如天然存在的磷脂,例如卵磷脂,或环氧烷与脂肪酸的缩合产物,例如聚氧乙烯硬脂酸酯,或环氧乙烷与长链脂族醇的缩合产物,例如十七烷氧基乙醇,或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物,例如聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯,或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇酐的偏酯的缩合产物,例如聚乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯。水性悬浮液还可含有一种或多种防腐剂,例如对羟基苯甲酸乙酯或正丙酯,或一种或多种着色剂。

[0446] 可通过将活性成分悬浮在植物油例如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油中或在矿物油诸如液体石蜡中而将药物组合物调配为油性悬浮液。油性悬浮液可含有增稠剂,例如蜂蜡、硬石蜡或鲸蜡醇。这些组合物可以通过加入抗氧化剂诸如抗坏血酸来保存。

[0447] 药物组合物可调配成可分散的粉剂或颗粒剂,其随后可用于通过加入水制备水性悬浮液。此类可分散的粉剂或颗粒剂提供与一种或多种分散剂或润湿剂、悬浮剂和/或防腐剂混合的活性成分。合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂的例子如上所述。

[0448] 药物组合物也可调配成水包油乳剂。油相可以是植物油,例如橄榄油或花生油,或矿物油,例如液体石蜡,或其可以是这些油的混合物。这些组合物中所包含的合适的乳化剂包括天然存在的树胶,例如阿拉伯树胶或黄蓍胶;天然存在的磷脂,例如大豆、卵磷脂;或衍生自脂肪酸和己糖醇的酯或偏酯;酸酐,例如脱水山梨糖醇单油酸酯;以及所述偏酯与环氧乙烷的缩合产物,例如聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯。

[0449] 根据本领域已知的方法并使用合适的一种或多种分散剂或润湿剂和/或悬浮剂(诸如上述那些),可以将含有一种或多种靶向IL-4的货物蛋白的药物组合物调配成无菌可注射水性悬浮液或油性悬浮液。无菌可注射制剂可以是在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,例如在1,3-丁二醇中的溶液。可以使用的可接受的媒剂和溶剂包括但不限于水、林格氏溶液、乳酸林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。其他实例包括常规用作溶剂或悬浮介质的无菌固定油,以及各种温和的固定油,包括例如合成甘油单酯或甘油二酯。脂肪酸(诸如油酸)也可用于制备注射剂。

[0450] 在一个实例中,靶向IL-4的货物蛋白与水溶性聚合物缀合,例如以增加稳定性或循环半衰期或降低免疫原性。临床上可接受的水溶性聚合物包括但不限于聚乙二醇(PEG)、聚乙二醇丙醛、羧甲基纤维素、右旋糖酐、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚丙二醇均聚物(PPG)、聚氧乙烯化多元醇(POG)(例如甘油)和其他聚氧乙烯化多元醇、聚氧乙烯化山梨糖醇或聚氧乙烯化葡萄糖,以及其他碳水化合物聚合物。用于将多肽与水溶性聚合物(诸如PEG)缀合的方法描述于例如美国专利公开第20050106148号和其中引用的参考文献中。在一个实例中,聚合物是pH敏感性聚合物,其被设计为增强药物从酸性核内体隔室向细

胞质的释放(参见例如Henry等人,《生物大分子(Biomacromolecules)》7(8):2407-14, 2006)。

[0451] 靶向IL-4的货物蛋白也可以治疗有效量与一种或多种抗癌治疗剂一起给药。可以在用抗癌治疗剂治疗之前、期间或之后给药化合物。

[0452] “抗癌治疗”是预防或延迟癌细胞的生长和/或转移的化合物、组合物或治疗(例如,手术)。此类抗癌治疗包括但不限于手术(例如,去除全部或部分肿瘤)、化学治疗药物治疗、放射、基因疗法、激素操纵、免疫疗法(例如,治疗性抗体和癌症疫苗)以及反义或RNAi寡核苷酸疗法。有用的化学治疗药物的实例包括但不限于羟基脲、白消安、顺铂、卡铂、苯丁酸氮芥、美法仑、环磷酰胺、异环磷酰胺、柔红霉素、多柔比星、表柔比星、米托蒽醌、长春新碱、长春花碱、诺维本、RTM.(长春瑞滨)、依托泊苷、替尼泊苷、紫杉醇、多西紫杉醇、吉西他滨、胞嘧啶、阿糖胞苷、博来霉素、新制癌菌素、苏拉明、他克唑、丝裂霉素C、阿瓦斯汀、赫塞汀、RTM.、氟脲嘧啶和替莫唑胺等。化合物也适用于与采用两种或更多种化学治疗剂的标准组合疗法一起使用。应当理解,抗癌治疗包括未来开发的新型化合物或治疗。

[0453] 上述药物组合物包括达到预期目的的有效量的一种或多种靶向IL-4的货物蛋白。因此,术语“治疗有效剂量”是指可改善癌症症状的靶向IL-4的货物蛋白的量。化合物的治疗有效剂量的确定完全在本领域技术人员的能力范围内。例如,可以在细胞培养测定中或在动物模型(诸如本文所述的动物模型)中初步估计治疗有效剂量。动物模型还可以用于确定适当的浓度范围和给药途径。然后,可以使用本领域普通技术人员已知的标准方法,使用此类信息确定在其它动物(包括人类)中给药的有效剂量和途径。

[0454] 治疗功效和毒性也可以通过标准制药程序来确定,诸如例如通过确定中位有效剂量或ED₅₀(即在50%的群体中治疗有效的剂量)和中位致死剂量,或LD₅₀(即对50%的群体致死的剂量)。治疗作用和毒性作用之间的剂量比称为“治疗指数”,可以表示为比率LD₅₀/ED₅₀。从细胞培养试验和动物研究中获得的数据可用于制定一系列供人类或动物使用的剂量。此类组合物中包含的剂量通常在包括ED₅₀的浓度范围内,并且显示出很少毒性或没有毒性。剂量根据所采用的剂型、受试者的敏感性和给药途径等在该范围内变化。可以使用的示例性剂量范围包括至少1ng/g肿瘤、至少1μg/g肿瘤或至少1mg/g肿瘤,诸如剂量范围为约0.01μg/g肿瘤至约50μg/g肿瘤、约0.02μg/g肿瘤至约40μg/g肿瘤,约0.02μg/g肿瘤至约35μg/g肿瘤、0.03μg/g肿瘤至约25μg/g肿瘤、约0.04μg/g肿瘤至约20μg/g肿瘤、约0.04μg/g肿瘤至约10μg/g肿瘤以及约0.5μg/g肿瘤至约2μg/g肿瘤。

[0455] 本领域普通技术人员将理解,剂量将取决于所使用的靶向IL-4的货物蛋白的类型和所治疗的癌症干细胞等的类型等。

[0456] 在一些实施方案中,靶向IL-4的货物蛋白是SEQ ID NO:65的MDNA55:

[0457] MDTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQQFHRHKQLIRFLKLRDRNLWGLAGLNSCPVKEAN
QSTLENFLERLKTIMREKYSKSSGGNGGHKCDITLQEIIKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAASKASGGPEGGLA
ALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPE
QARLALTAAAESEFVRQGTGNDEAGAANGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDGGDVSFSTRGTQNWTVRLLQAHR
QLEERGYVFGYHGTFLAAQSIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVYVP
RSSLPGFYRTSLTAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLETILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGD
LDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPKDEL

[0458] MDNA55也描述于美国专利公开第2016/0271231号中,其出于所有目的通过整体引用并入本文。

[0459] 在一些实施方案中,靶向IL-4的货物蛋白在人工CSF中稀释。在一些实施方案中,MDNA55在人工脑脊液(人工CSF)中稀释。在一些实施方案中,人工CSF包含氯化钙、葡萄糖、硫酸镁、氯化钾、碳酸氢钠、氯化钠、磷酸氢二钠,并在水中稀释。在一些实施方案中,人工CSF是Elliotts B®溶液。在一些实施方案中,人工CSF用于产生最终组成为3μg/mL的MDNA55的输注液。在一些实施方案中,人工CSF用于产生最终组成为3μg/mL的MDNA55的输注液。在一些实施方案中,人工CSF用于产生最终组成为3μg/mL的MDNA55、0.02%的人类血清白蛋白和7mM的钆-二亚乙基三胺五乙酸(Gd-DTPA, Magnevist®)的输注液。

[0460] 在一些实施方案中,本文所述的调配物和给药途径允许成功覆盖约80%、约85%、约90%、约95%或约100%的肿瘤及其周围的1cm边缘(有肿瘤扩散的风险)。在一些实施方案中,本文所述的调配物和给药途径允许成功覆盖约80%至约100%的肿瘤及其周围的1cm边缘(有肿瘤扩散的风险)。在一些实施方案中,本文所述的调配物和给药途径允许成功覆盖约85%至约100%的肿瘤及其周围的1cm边缘(有肿瘤扩散的风险)。在一些实施方案中,本文所述的调配物和给药途径允许成功覆盖约90%至约100%的肿瘤及其周围的1cm边缘(有肿瘤扩散的风险)。在一些实施方案中,本文所述的调配物和给药途径允许成功覆盖约95%至约100%的肿瘤及其周围的1cm边缘(有肿瘤扩散的风险)。在一些实施方案中,本文所述的调配物和给药途径允许成功覆盖约100%的肿瘤及其周围的1cm边缘(有肿瘤扩散的风险)。

[0461] 表7:用于制备输注液的试剂

[0462]	试剂	类型	分级	制造商/分销商
	MDNA55	药品	CGMP, 无菌	Medicenna Therapeutics Inc.
	Elliotts B®溶液	赋形剂	USP, 无菌	Lukare Medical, LLC
	HSA 5% (水性) 溶液	赋形剂	USP, 无菌	Octapharma
	Gd-DTPA , Magnevist® 469.1mg/mL	赋形剂	USP, 无菌	拜耳医疗保健制药公司

[0463] 缩写:CGMP,现行良好生产规范;NDC,国家药品代码;USP,美国药典

[0464] A.MDNA55制剂实施方案

[0465] MDNA55的组成:药品作为MDNA55的无菌冷冻溶液提供,浓度为500μg/mL,包含在0.5mL磷酸盐缓冲盐水(10mM磷酸钠,500mM氯化钠,pH 7.4±0.1)中,填充在无菌的一次性2mL 1型USP脱氢透明玻璃小瓶中,该小瓶用13mm特氟龙面塞密封并标记如下:

[0466] MDNA55小瓶:PRX-321含有0.5mL MDNA55(500μg/m),应在<-70℃下储存。该小瓶标有“经由立体定向放置的导管进行肿瘤内给药的无菌单剂量小瓶”。

[0467] 储存:药品在-70℃+/-10℃下储存在其二级包装中,直到需要制备输注液。必须提

供所有药品小瓶储存期间的医院药房温度监测记录,以供研究监测员审查。

[0468] 处理:将使用无菌技术使用预先灭菌的生物安全(垂直流动)柜制备输注液。制备输注液后,用过的药品小瓶应按照国家药房的标准操作程序丢弃。

[0469] 赋形剂

[0470] 收到货物后,医院药剂师将打开装运容器,他必须检查内容物的状况并确保赋形剂试剂盒无损坏。药剂师必须按照装运中包含的说明下载临时监测数据,并完成/返回随装运到达的收货证明文件,以便记录收货情况。医院药剂师必须使用赋形剂试剂盒库存表(附录3)记录货物库存。如果在接收赋形剂试剂盒装运期间发现问题,医院药房应立即通知本手册第3.0节中指定的联系人。

[0471] 在一些实施方案中,靶向IL-4的货物蛋白作为试剂盒提供。在一些实施方案中,MDNA55作为试剂盒提供。在一些实施方案中,该试剂盒含有4个组件:

[0472] • 人类血清白蛋白(HSA)

[0473] • Elliotts B溶液

[0474] • Magnevist (Gd-DTPA)

[0475] • 空IV袋

[0476] 容器在开口端有一个防拆密封件以确保闭合。一种赋形剂试剂盒用于一种输注液制剂。

[0477] 赋形剂试剂盒组分:

[0478] • 1x250mL瓶HSA 5% (水性) 溶液

[0479] • 1x单位Elliotts B溶液(10x10mL安瓿)

[0480] • 1x5mL小瓶Gd-DTPA

[0481] • 1x空(150mL大小) IV袋

[0482] 赋形剂试剂盒组分将用于本实例中所述的MDNA55输注液制备。该试剂盒提供用于单(1x)MDNA55输注液制备的材料。

[0483] 储存:赋形剂试剂盒在受控室温下储存,直至需要制备输注液。

[0484] 处理:应小心处理赋形剂试剂盒并正面朝上存放(试剂盒标签在顶部)。

[0485] 人类血清白蛋白

[0486] 在一些实施方案中,人类血清白蛋白(HSA)以0.02%的终浓度添加到输注液中,以防止MDNA55吸附到输注组件中使用的注射器、管和导管的内表面。

[0487] 供应:1x250mL瓶(Octapharma HSA 5% (水性) 溶液,NCT#68982-0623-02)

[0488] 储存:在制造商推荐的受控室温下。

[0489] 处理:HSA应在预先消毒的生物安全柜中使用无菌技术处理。一旦打开和/或使用,剩余的HSA应根据医院药房的标准操作程序丢弃。

[0490] 缓冲鞘内电解质/葡萄糖注射液(Elliotts B®溶液)

[0491] MDNA55药品在Elliotts B®溶液中稀释。

[0492] 表8:组成/成分信息:

[0493]

特定化学标识	CAS#	化学式	每mL量
氯化钙	10035-04-8	CaCl_2	0.2mg
右旋糖	50-99-7	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	0.8mg

硫酸镁	10034-99-8	MgSO ₄ 7H ₂ O	0.3mg
氯化钾	7447-40-7	KCl	0.3mg
碳酸氢钠	144-55-8	NaHCO ₃	1.9mg
氯化钠	7647-14-5	NaCl	7.3mg
磷酸氢二钠	7782-85-6	Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	0.2mg
注射用水	7732-18-5	H ₂ O	1mL

[0494] 有关Elliott's B溶液的更多信息。Elliotts B[®]溶液是一种无菌、无热原、等渗溶液,不含抑菌防腐剂。Elliotts B溶液是一种用于甲氨蝶呤钠和阿糖胞苷鞘内给药的稀释剂。每10mL Elliotts B溶液含有:

[0495] 表9:每10mL的组成

[0496]	特定化学标识	每10mL的量
	氯化钠, USP	73mg
	碳酸氢钠, USP	19mg
	右旋糖, USP	8mg
	硫酸镁 • 7H ₂ O, USP	3mg
	氯化钾, USP	3mg
	氯化钙 • 2H ₂ O, USP	2mg
	磷酸氢二钠 • 7H ₂ O, USP	2mg
	注射用水, USP qs 10mL	至10mL

[0497] 表10:电解质浓度:

[0498]	钠	149 毫克当量/升	碳酸氢盐	22.6 毫克当量/升
	钾	4.0 毫克当量/升	氯化物	132 毫克当量/升
	钙	2.7 毫克当量/升	硫酸盐	2.4 毫克当量/升
	镁	2.4 毫克当量/升	磷酸盐	1.5 毫克当量/升

[0499] 表11:各成分的分子式及分子量:

[0500]	成分	分子式	分子量
	氯化钠	NaCl	58.44
	碳酸氢钠	NaHCO ₃	84.01
	右旋糖	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16
	硫酸镁 • 7H ₂ O	Mg ₂ SO ₄ • 7H ₂ O	246.48
	氯化钾	KCl	74.55
	氯化钙 • 2H ₂ O	CaCl ₂ • 2H ₂ O	147.01
	磷酸氢二钠 • 7H ₂ O	Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O	268.07

[0501] Elliotts B溶液的pH为6.0-7.5,渗透压为288毫渗透压摩尔/升(计算值)。

[0502] Elliotts B溶液提供缓冲盐溶液,用作鞘内注射甲氨蝶呤钠和阿糖胞苷的稀释剂。已经证明Elliotts B溶液在pH、电解质组成、葡萄糖含量和渗透压方面与脑脊液相当:

[0503] 表12:Elliotts B溶液和CSF的电解质组成、pH和非电解质成分的比较:

溶液	Na+	K+	Co++	Mg++	HCO ₃ -	Cl-	pH	磷 mg/dL	葡萄糖 mg/dL
	毫克当量/升	毫克当量/升	毫克当量/升	毫克当量/升	毫克当量/升	毫克当量/升			
[0504] 脑脊液	117-137	2.3-4.6	2.2	2.2	22.9	113-127	7.31	1.2-2.1	45-80
Elliotts B 溶液	149	4.0	2.7	2.4	22.6	132	6.0-7.5	2.3	80

[0505] 当挑战溶液为0.01N HCl时,Elliotts B溶液的近似缓冲容量为 1.1×10^{-2} 当量,并且当挑战溶液为0.01N NaOH时为 7.8×10^{-3} 当量。与甲氨蝶呤钠和阿糖胞苷的相容性研究表明这些药物在物理上与Elliotts B溶液相容。

[0506] Elliott's B溶液是用于制备输液的稀释剂;它在pH、电解质组成、葡萄糖含量、渗透压和缓冲能力方面可与脑脊液相当。

[0507] 钆-二亚乙基三胺五乙酸 (Gd-DTPA) **Magnevist®**

[0508] 在一些实施方案中,将Gd-DTPA (稀释至约1:70) 作为造影剂添加到输注液中,因为在输注期间该替代示踪剂的共同输注允许实时监测MDNA55输注液分布。

[0509] 供应:1x5mL一次性Gd-DTPA小瓶 (拜耳医疗保健制药公司**Magnevist®**;469.1mg/mL,NDC#50419-188-05)。

[0510] 储存:根据制造商的说明储存。

[0511] 处理:Gd-DTPA (**Magnevist®**)应在预先消毒的生物安全柜中使用无菌技术进行处理。一旦打开或使用,剩余的应按照处理此类材料的规定和医院药房的标准操作程序丢弃。

[0512] B. 药物组合物和给药方法

[0513] 在一些实施方案中,主题IL-4突变蛋白和核酸可以掺入组合物,包括药物组合物。这样的组合物通常包括多肽或核酸分子和药学上可接受的载剂。此类组合物还可包含抗PD-1抗体。在一些实施方案中,组合物包含IL-4突变蛋白,其为融合蛋白和/或与CAR-T构建体相关和/或由溶瘤病毒表达或与溶瘤病毒相关。

[0514] 抗PD-1抗体和IL-4突变蛋白可以作为共组合物、同时作为两种单独的组合物和/或作为两种单独的组合物依次给药。在一些实施方案中,抗PD-1抗体或抑制剂和IL-4突变蛋白作为单一共组合物(即,共调配的)一起给药。在一些实施方案中,抗PD-1抗体或抑制剂和IL-4突变蛋白作为两种单独的组合物(即,单独的调配物)同时给药。在一些实施方案中,抗PD-1抗体或抑制剂和IL-4突变蛋白作为单独的组合物(即,单独的调配物)依次给药。在一些实施方案中,当抗PD-1抗体或抑制剂和IL-4突变蛋白作为单独的组合物依次给药时,抗PD-1抗体或抑制剂在IL-4突变蛋白之前给药。在一些实施方案中,当抗PD-1抗体或抑制剂和IL-4突变蛋白作为单独的组合物依次给药时,IL-4突变蛋白在抗PD-1抗体或抑制剂之前给药。在一些实施方案中,抗PD-1抗体包括但不限于纳武单抗、BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538、AMP224、CT-011和MK-3475。

[0515] 所描述的其他免疫治疗剂和IL-4突变蛋白可以作为共组合物、同时作为两种单独的组合物和/或作为两种单独的组合物依次给药。在一些实施方案中,其他免疫治疗剂和IL-4突变蛋白作为单一共组合物(即,共调配的)一起给药。在一些实施方案中,其他免疫治

疗剂和IL-4突变蛋白作为两种单独的组合物(即,单独的调配物)同时给药。在一些实施方案中,其他免疫治疗剂和IL-4突变蛋白作为单独的组合物(即,单独的调配物)依次给药。在一些实施方案中,当其他免疫治疗剂和IL-4突变蛋白作为单独的组合物依次给药时,抗PD-1抗体或抑制剂在IL-4突变蛋白之前给药。在一些实施方案中,当其他免疫治疗剂和IL-4突变蛋白作为单独的组合物依次给药时,IL-4突变蛋白在其他免疫治疗剂之前给药。

[0516] 药物组合物被调配成与其预期的给药途径相容。本发明的抗PD-1抗体和/或突变IL-4多肽可以口服给药,但它们更有可能通过肠胃外途径给药,包括例如静脉内给药。肠胃外给药途径的实例包括例如静脉内、皮内、皮下、经皮(局部)、经粘膜和直肠给药。用于肠胃外应用的溶液或悬浮液可包括以下成分:无菌稀释剂,诸如注射用水、盐水溶液、不挥发油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗菌剂,诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,诸如乙二胺四乙酸;缓冲液,诸如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及用于调整张力的试剂,诸如氯化钠或葡萄糖。可以用酸或碱调节pH,诸如磷酸一钠和/或磷酸二氢钠、盐酸或氢氧化钠(例如,pH为约7.2-7.8,例如7.5)。肠胃外制剂可以封装在安瓿、一次性注射器或玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。

[0517] 适用于注射用途的药物组合物包括无菌水溶液(其中水溶性)或分散体和用于临时制备无菌注射溶液或分散体的无菌粉末。对于静脉内给药,合适的载剂包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™。(新泽西州帕西波尼的巴斯夫公司(BASF))或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,组合物应该是无菌的并且应该是流动的,以存在容易注射的程度。它在制造和储存条件下应该是稳定的,并且必须防止微生物如细菌和真菌的污染作用。载剂可以是包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适混合物的溶剂或分散介质。适当的流动性可以例如通过使用诸如卵磷脂的涂层、通过在分散的情况下保持所需的粒度以及通过使用表面活性剂(例如十二烷基硫酸钠)来保持。可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等来防止微生物的作用。在许多情况下,优选在组合物中包括等渗剂,例如糖、多元醇如甘露醇、山梨糖醇、氯化钠。可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中包含延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸铝和明胶来实现。

[0518] 无菌可注射溶液可通过将所需量的活性化合物掺入适当的溶剂中而制备,根据需要,将上述一种或多种成分组合,然后过滤除菌。通常,分散体是通过将活性化合物加入到无菌载体中来制备的,该载体包含基本分散介质和来自上述列举的那些所需的成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,其从其先前无菌过滤的溶液产生活性成分加上任何额外的所需成分的粉末。

[0519] 如果使用,口服组合物通常包括惰性稀释剂或可食用载剂。为了口服治疗给药的目的,活性化合物可以与赋形剂混合并以片剂、锭剂或胶囊剂例如明胶胶囊剂的形式使用。还可以使用用作漱口水的流体载剂来制备口服组合物。药学相容的粘合剂和/或佐剂材料可以作为组合物的一部分被包括在内。片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂等可含有以下成分或类似性质的化合物:粘合剂,诸如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂,诸如淀粉或乳糖;崩解剂,诸如海藻酸、Primogel™或玉米淀粉;润滑剂,诸如硬脂酸镁或Sterotes™;助流剂,诸如胶体二氧化硅;甜味剂,诸如蔗糖或糖精;或调味剂,诸如薄荷、水杨酸甲酯或橙子调味剂。

[0520] 在通过吸入给药的情况下,抗PD-1抗体和/或IL-4突变蛋白,或编码它们的核酸,以气雾剂喷雾的形式从含有合适推进剂(例如气体,诸如二氧化碳)的压力容器或分配器或雾化器中递送。此类方法包括在美国专利第6,468,798号中描述的那些方法。

[0521] 抗PD-1抗体和/或IL-4突变蛋白或核酸的全身给药也可以通过经粘膜或经皮方式进行。对于经粘膜或经皮给药,在调配物中使用适合待渗透屏障的渗透剂。此类渗透剂在本领域中通常是已知的,并且对于经粘膜给药而言包括例如洗涤剂、胆汁盐和夫西地酸(fusidic acid)衍生物。可以通过使用鼻腔喷雾剂或栓剂来完成经粘膜给药。对于经皮给药,可以将活性成分调配成本领域众所周知的软膏剂、油膏剂、凝胶剂或乳膏剂。

[0522] 在一些实施方案中,化合物(抗PD-1抗体和/或突变IL-4多肽或核酸)也可以以栓剂(例如,具有常规栓剂基质,例如可可脂和其他甘油酯)或保留的形式制备用于直肠分娩的灌肠剂。

[0523] 在一些实施方案中,还可以使用本领域已知的方法通过转染或感染来给药化合物(对象IL-4突变蛋白或核酸),包括但不限于McCaffrey等人(《自然(Nature)》418:6893,2002)、Xia等人(《自然生物技术(Nature Biotechnol.)》20:1006-1010,2002)或Putnam(美国卫生系统药理学杂志《Am.J.Health Syst.Pharm.》53:151-160,1996、《美国卫生系统药理学杂志勘误(erratum at Am.J.Health Syst.Pharm.》53:325,1996)描述的方法。

[0524] 在一个实施方案中,抗PD-1抗体和/或IL-4突变蛋白或核酸与保护抗PD-1抗体和/或突变IL-4多肽免于从体内快速消除的载体一起制备,自然控释制剂,包括植入物和微囊化递送系统。可以使用可生物降解的生物相容性聚合物,诸如乙烯醋酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸。此类调配物可以使用标准技术制备。这些材料也可以从西安杨森制药有限公司(Alza Corporation)和新星制药有限公司(Nova Pharmaceuticals, Inc.)商购获得。脂质体悬浮液(包括靶向感染细胞的脂质体,具有针对病毒抗原的单克隆抗体)也可以用作药理学上可接受的载剂。这些可以根据本领域技术人员已知的方法来制备,例如,如美国专利第4,522,811号中所述。

[0525] 此类抗PD-1抗体、IL-4突变蛋白或核酸化合物的剂量、毒性和治疗效果可通过标准药理学程序在细胞培养物或实验动物中确定,例如用于确定LD₅₀(50%群体的致死剂量)和ED₅₀(50%群体的治疗有效剂量)。毒性和治疗效果之间的剂量比是治疗指数,并且它可以表示为比率LD₅₀/ED₅₀。具有高治疗指数的化合物是优选的。虽然可以使用表现出毒副作用的化合物,但应注意设计将此类化合物靶向受影响组织部位的递送系统,以尽量减少对未感染细胞的潜在损害,从而减少副作用。

[0526] 从细胞培养测定和动物研究中获得的数据可用于调配用于人类的一系列剂量。这些化合物的剂量优选在包括ED₅₀的循环浓度范围内,几乎没有或没有毒性。根据所采用的剂型和所利用的给药途径,剂量可以在此范围内变化。对于在本发明的方法中使用的任何化合物,治疗有效剂量可以最初从细胞培养测定来估计。可以在动物模型中调配剂量以达到循环血浆浓度范围,其包括在细胞培养中确定的IC₅₀(即,达到症状的最大抑制的测试化合物的浓度)。这些信息可用于更准确地确定人体中的有用剂量。例如,可以通过高效液相色谱法测量血浆中的水平。

[0527] 如本文所定义,主题IL-4突变蛋白(即,有效剂量)和/或抗PD-1抗体或抑制剂的治疗有效量取决于所选择的多肽或抗体。在一些实施方案中,可以给药的IL-4突变蛋白的单

剂量可以在大约0.001mg/kg至0.1mg/kg患者体重的范围内。在一些实施方案中,可以给药的抗PD-1抗体或抑制剂的单剂量可以在大约1mg/kg至20mg/kg、或约5mg/kg至约15mg/kg、或约10mg/kg患者体重的范围内。在一些实施方案中,可以给药的抗PD-1抗体或抑制剂和/或IL-4突变蛋白的剂量为约0.005mg/kg、0.01mg/kg、0.025mg/kg、0.05mg/kg、0.1mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg、5.0mg/kg、10.0mg/kg。在一些实施方案中,给药600,000IU/kg (IU可以通过淋巴细胞增殖生物测定确定并且以由世界卫生组织第1个白细胞介素2(人类)国际标准所建立的国际单位(IU)表示)。剂量可与PROLEUKIN®规定的剂量相似,但预计会低于该剂量。组合物可以从每天一次或多次到每周一次或多次给药;包括每隔一天一次。技术人员会理解,某些因素可能会影响有效治疗受试者所需的剂量和时间,包括但不限于疾病或病症的严重程度、先前的治疗、受试者的总体健康状况和/或年龄,以及其他存在的疾病。此外,用治疗有效量的受试者IL-4突变蛋白治疗受试者可包括单次治疗或可包括一系列治疗。在一个实施方案中,组合物每8小时给药一次,持续五天,然后是2至14天的休息期,例如9天,然后每8小时再给药五天。在一些实施方案中,给药是每4天给药3个剂量。

[0528] 药物组合物可与给药说明一起包含在容器、包装或分配器中。

[0529] 提供以下实例来描述本文所提供的本发明的某些实施方案并且不应被解释为限制性的。

[0530] C. 给药和配量

[0531] 靶向IL-4的货物蛋白可用于治疗、稳定或预防CNS癌症,包括例如靶向IL-4的货物蛋白MDNA55。靶向IL-4的货物蛋白还可用于治疗惰性癌症、复发性癌症,包括局部复发性、远处复发性、或/和难治性癌症(即对其他抗癌治疗没有反应的癌症)、转移性癌症、局部晚期癌症和侵袭性癌症。在这些情况下,靶向IL-4的货物蛋白可以发挥细胞毒性或细胞抑制作用,导致例如癌细胞和/或癌症干细胞的数量或生长减少,肿瘤大小减小,减缓或防止肿瘤大小的增加,增加从肿瘤消失或切除到再次出现之间的无病存活时间,预防肿瘤的初始或后续发生(例如转移)、进展时间的增加,与肿瘤相关的一种或多种不良症状的减少,或患有癌症的受试者的总体存活时间的增加。

[0532] 通常,在癌症的治疗中,靶向IL-4的货物蛋白被系统地给药于患者,例如,通过推注或连续输注到患者的血流中。可替代地,靶向IL-4的货物蛋白可以在肿瘤部位(瘤内)局部给药。当肿瘤内给药靶向IL-4的货物蛋白时,给药可以经由任何途径,例如局部、区域、局部、全身、对流增强递送或它们的组合。

[0533] 当与一种或多种已知的化学治疗剂联合使用时,化合物可以在化学治疗剂给药之前或之后给药,或者它们可以同时给药。一种或多种化学治疗剂可以全身给药,例如通过推注或连续输注,或者它们可以口服给药。

[0534] 为了向动物给药,可以调配药物组合物以通过多种途径给药。例如,组合物可以调配用于局部、直肠或肠胃外给药或通过吸入或喷雾给药。本文使用的术语肠胃外包括皮下注射、静脉内、肌肉内、鞘内、胸骨内注射或输注技术。也考虑直接注射或输注到肿瘤中。对流增强递送也可用于给药靶向IL-4的货物蛋白。

[0535] 在一个实例中,可以使用类似于近距离放射治疗的多次注射方法的给药方法将靶向IL-4的货物蛋白注射到患有癌症的受试者中。例如,可以使用针头注射呈药物组合物或

制剂形式和适当剂量单位的纯化的靶向IL-4的货物蛋白的多个等分试样。靶向IL-4的货物蛋白的替代给药方法对于本领域普通技术人员是显而易见的。此类方法包括,例如,使用导管或可植入泵向需要治疗的受试者提供靶向IL-4的货物蛋白的连续输注。

[0536] 如本领域中已知的,软件规划程序可以与近距离放射治疗和超声结合使用,例如,用于放置导管以输注靶向IL-4的货物蛋白以治疗例如脑肿瘤或其他局部肿瘤。例如,针的定位和放置一般可以在超声引导下实现。例如,可以根据待治疗器官的体积或面积来调节总体积,并因此调整给药于患者的注射和沉积物的次数。合适的软件规划程序的例子有近距离放射治疗规划程序Variseed 7.1(加利福尼亚州帕洛阿尔托的瓦里安医疗系统公司(Varian Medical Systems))。此类方法已成功用于治疗前列腺癌等。

[0537] 如果需要减少对靶向IL-4的货物蛋白的全身免疫应答,可以与靶向IL-4的货物蛋白联合给药免疫抑制疗法。免疫抑制疗法的例子包括但不限于全身或局部皮质类固醇(Suga等人,《胸外科年鉴(Ann.Thorac.Surg.)》,73:1092-7,2002)、环孢菌素A(Fang等人,《人类基因治疗(Hum.Gene Ther.)》,6:1039-44,1995)、环磷酰胺(Smith等人,《基因治疗(Gene Ther.)》,3:496-502,1996)、脱氧精胍菌素(Kaplan等人,《人类基因治疗(Hum.Gene Ther.)》,8:1095-1104,1997)以及T细胞和/或B细胞抗体[例如,抗CD40配体、抗CD4抗体、抗CD20抗体(利妥昔单抗)](Manning等人,《人类基因治疗(Hum.Gene Ther.)》,9:477-85,1998)。此类药剂可以在给药靶向IL-4的货物蛋白之前、期间或之后给药。此类药剂可以以约10mg/周至约1000mg/周、约40mg/周至约700mg/周、或约200mg/周至约500mg/周给药,持续2、3、4、5、6或7周。如果受试者仍然有反应(例如,癌症的症状是静止的或减少的),可以根据需要重复治疗过程。

[0538] 靶向IL-4的货物蛋白也可以与敏化剂(诸如放射敏化剂)联合给药(参见例如Diehn等人,《国立癌症研究所杂志(J.Natl.Cancer Inst.)》98:1755-7,2006)。通常,敏化剂是增加靶向IL-4的货物蛋白活性的任何试剂。例如,敏化剂将增加靶向IL-4的货物蛋白抑制癌症干细胞生长或杀死癌细胞和/或癌症干细胞的能力。示例性的敏化剂包括IL-10的抗体、骨形态发生蛋白和HDAC抑制剂(参见例如Sakariassen等人,《瘤形成(Neoplasia)》9(11):882-92,2007)。这些敏化剂可以在用靶向IL-4的货物蛋白治疗之前或期间给药。这种敏化剂的示例性剂量包括至少1 μ g/mL,诸如至少10 μ g/mL、至少100 μ g/mL,例如5-100 μ g/mL或10-90 μ g/mL。敏化剂可以每天、每周三次、每周两次、每周一次或每两周一次给药。也可以在用靶向IL-4的货物蛋白处理完成后给药敏化剂。

[0539] 靶向IL-4的货物蛋白可用作新辅助治疗(初级治疗)的一部分,作为辅助治疗方案的一部分,目的是治愈受试者的癌症。靶向IL-4的货物蛋白也可以在肿瘤发展和进展的各个阶段给药,包括治疗晚期和/或侵袭性瘤形成(例如,不能通过局部治疗方式治愈的受试者的明显疾病,诸如手术或放疗)、转移性疾病、局部晚期疾病和/或难治性肿瘤(例如,对治疗没有反应的癌症或肿瘤)。

[0540] “初级疗法”是指在受试者中初步诊断出癌症时的第一线治疗。示例性的主要疗法可以涉及手术、广泛的化学疗法和放射疗法。“辅助疗法”是指在主要疗法之后并且给药于有复发风险的受试者的疗法。辅助全身治疗在主要治疗后不久开始,例如在最后一次初级疗法治疗后2、3、4、5或6周开始以延迟复发、延长存活或治愈受试者。如上所述,预期靶向IL-4的货物蛋白可以单独使用或与一种或多种其他化疗剂组合使用作为辅助治疗的一部

分。靶向IL-4的货物蛋白和标准化疗药物的组合可用于提高化疗药物的疗效,因此可用于改进标准癌症治疗。这种应用在对标准治疗没有反应的耐药性癌症的治疗中可能特别重要。给药剂量不受限定的限制,但通常是有效量。组合物可以配制成单位剂型。术语“单位剂型”是指适合作为人类受试者和其他哺乳动物的单位剂量的物理离散单位,每个单位包含经计算以产生所需治疗效果的预定量的活性物质以及合适的药物赋形剂。单位剂型可给药一次或可给药多个单位剂量,例如遍及器官或实体瘤。每个剂量单位中靶向IL-4的货物蛋白的范围实例为约0.0005至约100mg,或更通常为约1.0至约1000mg。靶向IL-4的货物蛋白的日剂量通常为至少1ng/kg体重、至少1 μ g/kg体重、至少1mg/kg体重,例如落入约0.01至约100mg/kg体重的范围内,单次或分次给药。然而,应当理解,待给药的化合物的实际量将由医生根据相关情况确定,包括待治疗的病症、选择的给药途径、实际化合物给药、个体患者的年龄、体重和反应以及患者症状的严重程度。上述剂量范围仅作为示例给出,并不旨在以任何方式限制范围。在某些情况下,低于上述范围下限的剂量水平可能绰绰有余,而在其他情况下,可以使用更大的剂量而不会引起有害的副作用,例如,首先将较大的剂量分成几个较小的剂量用于全天给药。

[0541] 靶向IL-4的货物蛋白可用于治疗和/或控制癌症,所述方法包括向有需要的受试者给药预防或治疗有效的方案,所述方案包括向所述受试者给药一种或多种疗法,其中所述方案导致癌症干细胞群的稳定或减少,并且不会导致循环内皮细胞群和/或循环内皮祖细胞群的减少或仅导致少量减少。在一个实例中,该方案实现了癌症干细胞群的5%-40%、10%-60%或20%至99%的减少和/或循环内皮细胞群小于25%、小于15%或小于10%的减少。在另一个实例中,该方案实现了癌症干细胞群的5%-40%、10%-60%或20%至99%的减少和/或循环内皮祖细胞群小于25%、小于15%或小于10%的减少。在另一个实例中,该方案实现了癌症干细胞群的5%-40%、10%-60%或20%至99%的减少和/或循环内皮细胞群和循环内皮祖细胞群小于25%、小于15%或小于10%的减少。在一个具体实例中,在一种或多种疗法的给药两周、一个月、两个月、三个月、四个月、六个月、九个月、1年、2年、3年、4年或更长时间后实现癌症干细胞群的稳定或减少。在特定实例中,可以使用本领域已知的任何方法确定癌症干细胞群的稳定或减少。在某些实例中,根据该疗程,循环癌症干细胞群体、循环内皮细胞群体和/或循环内皮祖细胞群体被定期监测(例如,在2、5、10、20、30或更多剂量的一种或多种疗法或在接受一种或多种疗法2周、1个月、2个月、6个月、1年或更长时间后)。

[0542] 在一些实施方案中,靶向IL-4的货物蛋白诸如MDNA55的单次输注以1.5 μ g/mL的浓度给药(并且高达3 μ g/mL)(参见,例如,实例1和实例2)。在一些实施方案中,可以针对每个受试者/患者个性化输注体积和参数以最大可能地实现目标覆盖。在一些实施方案中,输注体积将在约7mL(最小肿瘤)至60mL(最大肿瘤)的范围内。在一些实施方案中,取决于肿瘤体积、流速和导管数量,输注持续时间将是大约6至32小时。在一些实施方案中,最大递送剂量将为90 μ g。在一些实施方案中,该剂量是颅内给药。在一些实施方案中,靶向IL-4的货物蛋白以约90 μ g(60mL中1.5 μ g/mL)、约240 μ g(40mL中6 μ g/mL)或约300 μ g(100mL中3 μ g/mL)的单剂量给药。在一些实施方案中,靶向IL-4的货物蛋白以约1.5 μ g/mL至约3 μ g/mL的单剂量给药。

[0543] 在一些实施方案中,配量为每位受试者180 μ g或3 μ g/mL x 60mL的MDNA55。在一些

实施方案中,配量为约1.5 μ g/mL至约3.0 μ g/mL。在一些实施方案中,剂量为约1.5 μ g/mL、2 μ g/mL、2.5 μ g/mL、约3.0 μ g/mL或约3.5 μ g/mL。在一些实施方案中,剂量针对本文所述的任何靶向IL-4的货物蛋白。在一些实施方案中,剂量是针对MDNA55的。

[0544] 在一些实施方案中,给药流速为约5 μ L/分钟/导管至约20 μ L/分钟/导管。在一些实施方案中,给药流速为约10 μ L/分钟/导管至约15 μ L/分钟/导管。在一些实施方案中,给药流速为约15 μ L/分钟/导管。在一些实施方案中,采用1-4个导管。在一些实施方案中,采用1-3个导管。在一些实施方案中,采用1-3个导管并且流速高达15 μ L/分钟/导管。在一些实施方案中,经由1-3个导管和高达15 μ L/分钟/导管的流速给药1.5 μ g/mL。在一些实施方案中,经由1-3个导管和高达15 μ L/分钟/导管的流速给药1.5 μ g/mL,其中总剂量为90 μ g的MDNA55。

[0545] III. 治疗用途

[0546] 本文所述的靶向IL-4的货物蛋白可用于多种治疗目的。在出于治疗目的给药之前,可能需要针对特定目的修改或调整靶向IL-4的货物蛋白,例如全身给药所需的靶向IL-4的货物蛋白的浓度可能与局部给药所用的浓度不同。类似地,治疗剂的毒性可能会根据给药方式和所使用的整体组合物(例如,缓冲液、稀释剂、额外的化学治疗剂等)而变化。

[0547] A. 毒性

[0548] 治疗性蛋白质在给药于受试者时可能引起一定水平的抗体反应,这在某些情况下可能导致不希望的副作用。因此,如果有必要,靶向IL-4的货物蛋白的抗原性可以如本领域已知的和下文描述的那样进行评估。此外,还描述了降低潜在抗原性的方法。

[0549] 靶向IL-4的货物蛋白的体内毒性作用可以通过测量它们在治疗期间对动物体重的影响以及在动物被处死后进行血液学特征和肝酶分析来评估。靶向IL-4的货物蛋白的一般毒性可以根据本领域已知的方法进行测试。例如,可以通过确定单次静脉注射后杀死100%小鼠的剂量(即LD100)来测试靶向IL-4的货物蛋白的整体全身毒性。可选择比LD100或LD50小至少约2、5或10倍的剂量以给药于其他哺乳动物,诸如人类。

[0550] 对本文所述的靶向IL-4的货物蛋白的抗体反应的动力学和大小可以在例如具有免疫活性的小鼠中确定,并且可以用于促进可用于具有免疫活性的人的给药方案的开发。免疫活性小鼠,如C57-BL6品系,静脉注射靶向IL-4的货物蛋白。在不同的时间间隔处死小鼠(例如单次给药后、多次给药后)并获得血清。基于ELISA的测定可用于检测靶向抗IL-4的货物蛋白抗体的存在。

[0551] 为了降低靶向IL-4的货物蛋白的抗原性,用作货物部分的毒素的天然结合结构域可以在功能上被缺失和替换,例如用靶向部分来制造靶向IL-4的货物蛋白。此类靶向IL-4的货物蛋白的抗原性可在暴露于缺乏天然结合结构域部分的靶向IL-4的货物蛋白的不同时间表后使用上述方法确定。利用完全人源化抗体的靶向IL-4的货物蛋白也可用于最小化抗原性。

[0552] 可用于允许用靶向IL-4的货物蛋白继续治疗的另一种方法是使用依次给药的替代性靶向IL-4的货物蛋白,这些蛋白质源自具有非重叠抗原性的其他货物蛋白。例如,源自气溶素原的靶向IL-4的货物蛋白可以与源自败血症梭菌 α 毒素或苏云金芽孢杆菌 δ 毒素的靶向IL-4的货物蛋白交替使用。所有这些靶向IL-4的货物蛋白都将靶向癌细胞和/或癌症干细胞,但不会被相同的抗体识别或中和。

[0553] 如本领域已知的,可以评估来自这些小鼠的血清样品中靶向抗IL-4的货物蛋白抗

体的存在。作为另一个例子,表位作图也可用于确定蛋白质的抗原性,如Stickler等人,《免疫学期刊(J.Immunotherapy)》,23:654-660,2000中所述。简而言之,称为树状细胞和CD4+T细胞的免疫细胞是从未接触过目标蛋白质的社区捐赠者的血液中分离出来的。然后将跨越蛋白质长度的小合成肽添加到培养细胞中。响应于特定肽的存在而增殖表明T细胞表位包含在该序列中。随后可以在靶向IL-4的货物蛋白中缺失或修饰该肽序列,从而降低其抗原性。

[0554] B.成胶质细胞瘤的治疗

[0555] 在一些实施方案中,靶向IL-4的货物蛋白用于治疗脑肿瘤。在一些实施方案中,脑肿瘤是成胶质细胞瘤(GB)。成胶质细胞瘤(GB)是一种侵袭性脑肿瘤,其特征是未分化细胞快速增殖、广泛浸润和高复发倾向(Hamstra等人,2005)。它是一种进展迅速且普遍致命的癌症。对于同时接受替莫唑胺(Termodar®)和放疗治疗的成人,中位存活期为14.6个月,两年存活率约为30%,五年存活率约为10%。临床影响定义为神经系统快速恶化,影响执行日常功能的能力,例如进食、行走和说话。也可能存在人格和身份的扭曲,例如情绪、记忆、情感和智力。GB通常不会转移到CNS之外,并且死亡通常是由于颅内压升高和颅内压升高以及肿瘤在骨包裹的脑腔内不受控制的生长引起的。在资源丰富的国家,全球原发性GB的年发病率约为27,500(《决策资源(Decision Recourses)》,2013)。

[0556] 在一些实施方案中,靶向IL-4的货物蛋白用于治疗过度表达IL-4R的脑肿瘤,例如混合型成人神经胶质瘤、混合型儿科神经胶质瘤、弥漫性内在性脑桥神经胶质瘤(DIPG)、成神经管细胞瘤、成人垂体腺瘤、脑膜瘤。

[0557] C.生物标志物和患者群体

[0558] 本发明的靶向IL-4的货物蛋白,包括例如MDNA55,可用于治疗特定患者群体中的GBM,包括复发性GBM、脑转移、新诊断的GBM和弥漫性内源性脑桥神经胶质瘤。

[0559] 在一些实施方案中,癌症活检和尸检样品来自成人和小儿CNS肿瘤(例如,脑肿瘤)。在一些实施方案中,患者患有成胶质细胞瘤(也称为多形性成胶质细胞瘤-GBM)。在一些实施方案中,患者患有复发性GBM。在一些实施方案中,患者患有来自GBM的脑转移。在一些实施方案中,患者患有新诊断的GBM。在一些实施方案中,患者患有弥漫性内在性脑桥神经胶质瘤。在一些实施方案中,与正常成人和小儿脑组织中很少或没有IL-4R表达相比,患者肿瘤样品已显示过度表达IL-4R(Puri等人,1994a;Kawakami等人,2002a;Joshi等人,2001;Konanbash等人,2013)。虽然不受理论约束,但不表达IL-4R靶标的细胞不与MDNA55结合,因此不受PE介导的影响(Kawakami等人,2002)。

[0560] 在一些实施方案中,靶向IL-4的货物蛋白,包括例如MDNA55,诱导非生长速率依赖性的肿瘤生长杀伤(Li和Hall,2010)。在一些实施方案中,肿瘤微环境(TME)的静止癌细胞和/或癌症干细胞和生长较慢的非恶性细胞对MDNA55可能与快速分裂的肿瘤细胞一样敏感。

[0561] 在一些实施方案中,癌细胞是O⁶-甲基鸟嘌呤-甲基转移酶(MGMT)阳性。在一些实施方案中,癌细胞是O⁶-甲基鸟嘌呤-甲基转移酶(MGMT)阴性。在一些实施方案中,癌细胞具有甲基化的MGMT基因启动子。在一些实施方案中,癌细胞具有未甲基化的MGMT基因启动子。在一些实施方案中,O⁶-甲基鸟嘌呤-甲基转移酶(MGMT)阳性癌细胞(携带未甲基化的MGMT启动子并因此对替莫唑胺具有抗性)对MDNA55敏感。示例性敏感的CNS癌细胞系包括T98G

(成胶质细胞瘤), 并已显示过度表达MGMT。此类细胞系对诸如替莫唑胺等烷化剂具有抗性 (Huang等人, 2012; Kuo等人, 2007; Kokkinakis等人, 2003), 但可能对MDNA55敏感。在一些实施方案中, 携带甲基化MGMT基因启动子的癌细胞对MDNA55敏感。

[0562] 在一些实施方案中, 表达IL-4R的细胞系显示对MDNA55的皮摩尔敏感性。参见, 例如, Puri等人, 1996b; Kreitman等人, 1995; 岛村等人, 2007。在一些实施方案中, 表达IL-4R的肿瘤表现出对本发明的靶向IL-4的货物蛋白的皮摩尔敏感性。在一些实施方案中, 表达IL-4R的肿瘤表现出对MDNA55的皮摩尔敏感性。在一些实施方案中, 表达MGMT的肿瘤表现出对本发明的靶向IL-4的货物蛋白的敏感性。在一些实施方案中, 表达IL-4R的成胶质细胞瘤表现出对MDNA55的敏感性。在一些实施方案中, 表达MGMT的肿瘤表现出对MDNA55的敏感性。在一些实施方案中, 表达MGMT的成胶质细胞瘤表现出对MDNA55的敏感性。

[0563] 弗林蛋白酶样蛋白酶裂解MDNA55并导致PE毒素的活化 (Chironi等人, 1997; Shapira和Benhar, 2010), 成胶质细胞瘤经常表达弗林蛋白酶 (Mercapide等人, 2002; Wick等人, 2004)。与正常细胞相比, 神经胶质瘤细胞中弗林蛋白酶的更高表达水平提供了额外的肿瘤特异性, 并且也是导致癌细胞对MDNA55具有异常皮摩尔敏感性的因素。在一些实施方案中, 肿瘤表达弗林蛋白酶。在一些实施方案中, 表达弗林蛋白酶的肿瘤比正常的非肿瘤细胞对靶向IL-4的货物蛋白 (诸如MDNA55) 更敏感。

[0564] IL-4R不仅被CNS肿瘤过度表达, 而且被免疫抑制性TME的非恶性细胞 (MDSC和TAM) 过度表达。在一些实施方案中, 靶向IL-4R IL-4的货物蛋白, 包括MDNA55, 可用于治疗患有侵袭性原发性和转移性脑癌的成人和小儿患者。

[0565] GBM具有强大的免疫抑制性TME, 可能占肿瘤质量的40% (Kennedy等人, 2013)。最近, 已经表明恶性神经胶质瘤具有2型T辅助细胞 (Th2) 偏向性, 并且被髓源性抑制细胞 (MDSC) 和肿瘤相关巨噬细胞 (TAM) 严重浸润, 并且IL4/IL-4R偏向性介导它们的免疫抑制功能 (Harshyne等人, 2016)。此外, IL-4R在胶质瘤浸润的骨髓细胞上上调, 但在外周或正常大脑中没有上调 (Kohanbash等人, 2013)。在一些实施方案中, 使用本发明的靶向IL-4的货物蛋白 (包括MDNA55) 清除Th2细胞、MDSC和TAM可以减轻与癌症相关的免疫阻滞。在一些实施方案中, 免疫阻断的缓解促进抗肿瘤免疫并有助于长期疾病控制和/或疾病治疗。

[0566] D. IL-4R作为生物标志物或伴随诊断

[0567] 在一些实施方案中, IL-4R (也称为“IL4R”) 表达水平可作用于确定治疗方案以及预测或确定治疗功效的生物标志物或伴随诊断。在一些实施方案中, 2型IL-4R (II型IL-R4, 包括IL-4R α 和IL-13R α 1) 表达水平可用作生物标志物或伴随诊断, 用于确定治疗方案以及预测或确定治疗效果。在一些实施方案中, IL-4R α 在肿瘤细胞的细胞质中具有反应性。然而, IL-4R α 也在血清中观察到, 偶尔在正常细胞和正常组织成分的细胞质中也观察到。

[0568] 在一些实施方案中, IL-4R表达水平通过测量IL-4R α 表达来确定。在一些实施方案中, IL-4R表达水平, 包括IL-4R α 表达水平, 由委员会认证的病理学家评分。在一些实施方案中, 2型IL-4R (II型IL-R4, 包含IL-4R α 和IL-13R α 1) 的表达水平通过测量IL-4R α 表达来确定。在一些实施方案中, 2型IL-4R (II型IL-R4, 包括IL-4R α 和IL-13R α 1) 的表达水平由委员会认证的病理学家评分。

[0569] 对恶性肿瘤细胞进行评分有两个主要组成部分, 包括百分比分数和H-评分 (源自以不同强度记录的百分比), 如下所述。在一些实施方案中, 可以排除在明显非肿瘤

中观察到的任何IL-4R α 染色。在一些实施方案中,如果识别出细胞质肿瘤细胞染色,则认为恶性细胞表达IL-4R α 。

[0570] 百分比评分法

[0571] 百分比评分是通过将 $\geq 1+$ 、 $\geq 2+$ 或 $\geq 3+$ 的肿瘤细胞中的强度百分比相加来计算的。因此,分数范围从0到100。

[0572] • 百分比分数 $\geq 1+ = (1+\text{下的}\%) + (2+\text{下的}\%) + (3+\text{下的}\%)$

[0573] • 百分比分数 $\geq 2+ = (2+\text{下的}\%) + (3+\text{下的}\%)$

[0574] • 百分比分数 $\geq 3+ = (3+\text{下的}\%)$

[0575] 在一些实施方案中,高水平的IL-4R表达由 $\geq 2+$ 的百分比评分表示。在一些实施方案中,高水平的IL-4R表达由 $\geq 3+$ 的百分比评分表示。

[0576] 在一些实施方案中,中等水平的IL-4R表达由 $\geq 1+$ 但 < 2 的百分比评分表示。

[0577] 在一些实施方案中,没有可检测的IL-4R表达水平由0的百分比评分表示。在一些实施方案中,低水平的IL-4R表达由 $\geq 1+$ 的百分比评分表示。

[0578] H-评分法

[0579] H-评分是通过将具有表达强度(棕色染色)的肿瘤细胞百分比乘以其相应强度的四点半定量量表(0、1+、2+、3+)来计算的。因此,分数范围从0到300。

[0580] $H\text{-评分} = [(<1\text{下的}\%) \times 0] + [(1+\text{下的}\%) \times 1] + [(2+\text{下的}\%) \times 2] + [(3+\text{下的}\%) \times 3]$

[0581] 对于百分比评分和H-评分方法,四点半定量强度量表描述如下:0-无效,阴性或非特异性染色,1+-低或弱染色,2+-中等或中等染色,和3+-高染色或强染色。每个强度的百分比是直接估计的,通常报告为以下之一,但也可以使用其他增量:0、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99或100%。

[0582] 在一些实施方案中,无IL-4R表达水平至低水平IL-4R表达由0到75的H-评分表示(例如,无至低表达)。

[0583] 在一些实施方案中,中等水平的IL-4R表达由76至150的H-评分表示(例如,中等表达)。

[0584] 在一些实施方案中,高水平的IL-4R表达由151至225的H-评分表示(例如,高表达)。

[0585] 在一些实施方案中,高水平的IL-4R表达由226至300的H-评分表示(例如,极高表达)。

[0586] 在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由H-评分 > 75 表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由76至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由80至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由90至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由95至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由100至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由105至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由110至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由115至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由120至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由125至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由130至300的H-评分表示。在一些实施

方案中,中等或高水平的IL-4R表达由135至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由140至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由145至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由150至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由155至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由160至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由165至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由170至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由175至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由180至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由185至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由190至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由195至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由200至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由205至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由210至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由215至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由220至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由225至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由230至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由235至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由240至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由245至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由250至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由255至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由265至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由270至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由275至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由280至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由285至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由290至300的H-评分表示。在一些实施方案中,中等或高水平的IL-4R表达由295至300的H-评分表示。

[0587] 偶尔,癌症样品,包括GBM样品,包括整个良性组织的背景IL-4R α 染色。当存在时,这种间质染色以1+、2+或3+的平均强度评分被捕获,以记录存在于肿瘤细胞周围的背景细胞质染色水平。当不存在时,该值被记录为NA(不适用)。在一些实施方案中,高背景反应性可有助于肿瘤细胞中更高的IL-4R α 表达。因此,在一些实施方案中,在评估恶性肿瘤细胞的反应性评分时应考虑间质染色评分。

[0588] E. 试剂盒

[0589] 可以使用IHC或RT-PCR分析检测IL-4R表达。在一些实施方案中,可以采用基于RT-PCR的方法和相关试剂盒。在一些实施方案中,可以采用基于IL-4R抗体的检测方法和相关试剂盒。可用于此类试剂盒的IL-4R抗体可包括市售以及其他已知或开发的IL-4R抗体。在一些实施方案中,IL-4R抗体可用于基于(IHC)的免疫组织化学测定来检测IL-4R表达。在一些实施方案中,IL-4R是IL-4R α 链的单克隆抗体,Joshi等人,(Joshi BH等人,《白细胞介素4(IL-4)受体在人脑肿瘤中的原位表达和重组IL-4细胞毒素在原代胶质母细胞瘤细胞培养

物中的细胞毒性(In situ expression of interleukin-4(IL-4)receptors in human brain tumors and cytotoxicity of a recombinant IL-4cytotoxin in primary glioblastoma cell cultures)》.《癌症研究(Cancer Res.)》2001;61:8058-8061)通过IHC评估在脑肿瘤组织的手术/活检样品中的表达。83% (Ichinose,M.等人,《癌症研究(Cancer Res.)》2002,以及Johnson H等人,《分子和细胞蛋白质组学(Mol.Cell Proteomics.)》2012年12月;11(12):1724-40)的GBM肿瘤对IL-4R α 呈中度至强阳性(Joshi BH等人《白细胞介素4(IL-4)受体在人脑肿瘤中的原位表达和重组IL-4细胞毒素在原代胶质母细胞瘤细胞培养物中的细胞毒性(In situ expression of interleukin-4(IL-4)receptors in human brain tumors and cytotoxicity of a recombinant IL-4cytotoxin in primary glioblastoma cell cultures)》.《癌症研究(Cancer Res.)》2001;61:8058-8061),而11个正常脑样品中的11个显示没有可检测的IL-4R染色,表明肿瘤特异性。

[0590] 在一些实施方案中,IL-4R的水平可用作伴随诊断和/或预测标志物来选择IL-4R阳性患者以用本发明的靶向IL-4的货物蛋白进行治疗性治疗。在一些实施方案中,2型IL-4R(II型IL-R4,包括IL-4R α 和IL-13R α 1)的水平可用作伴随诊断和/或预测标志物来选择用于用本发明的靶向IL-4的货物蛋白进行治疗性治疗的IL-4R阳性患者。

[0591] 在一些实施方案中,本发明提供用于检测IL-4R表达的试剂盒。在一些实施方案中,本发明提供了一种用于检测2型IL-4R(II型IL-R4,包含IL-4R α 和IL-13R α 1)表达的试剂盒。在一些实施方案中,该试剂盒提供用于基于RT-PCR检测IL-4R mRNA表达水平的组分。在一些实施方案中,该试剂盒为基于免疫组织化学(IHC)的检测提供了用于检测或测量IL-4R表达的组分。在一些实施方案中,该试剂盒包含IL-4R抗体和在基于免疫组织化学(IHC)的检测中使用IL-4R抗体的说明。在一些实施方案中,该试剂盒进一步包括用于确定百分比评分的说明。在一些实施方案中,该试剂盒进一步包括用于确定H-评分的说明。在一些实施方案中,该试剂盒包含IL-4R抗体、在基于免疫组织化学(IHC)的测定中使用IL-4R抗体的说明以及确定百分比评分的说明。在一些实施方案中,该试剂盒包含IL-4R抗体、在基于免疫组织化学(IHC)的测定中使用IL-4R抗体的说明以及确定H-评分的说明。在一些实施方案中,该试剂盒包含IL-4R α 抗体、在基于免疫组织化学(IHC)的测定中使用IL-4R α 抗体的说明以及确定百分比分数的说明。在一些实施方案中,该试剂盒包含IL-4R α 抗体、在基于免疫组织化学(IHC)的测定中使用IL-4R α 抗体的说明以及确定H-评分的说明。

[0592] F. 对流增强递送(CED)

[0593] 本发明考虑使用CED将治疗剂直接递送到肿瘤中。CED已在Patel等人,《神经外科(Neurosurgery)》56:1243-52,2005中进行了描述(该文献通过整体引用并入本文)。这能够在限制全身毒性的同时实现高局部药物浓度。该程序已用于从早期临床开发到3期临床试验治疗复发性GBM和其他CNS疾病,具有良好的安全性。在一些实施方案中,MDNA55通过对流增强递送(CED)瘤内递送。在一些实施方案中,CED通过在恒定压力下通过颅内导管(1个或多个,取决于肿瘤的大小)直接输注来进行。在一些实施方案中,这在1至7天的时间段内。MDNA55的总剂量约为90-100 μ g。在一些实施方案中,剂量可在5 μ g至1mg的范围内调整。在一些实施方案中,在输注之前、期间和之后的MRI成像用于监测药物分布和肿瘤反应。在一些实施方案中,受试者/患者在治疗后通过临床评估和MRI持续监测。

[0594] 在一些实施方案中,CED将用于向CNS肿瘤给药靶向IL-4的货物蛋白。在一些实施

方案中,CED将用于给药MDNA55用于治疗CNS肿瘤。在一些实施方案中,将使用CED来给药MDNA55以治疗GBM。在一些实施方案中,将使用CED来给药MDNA55以治疗进行性和/或复发性GBM。

[0595] 在一些实施方案中,CED过程将使用规划高精度规划软件(例如iPlan®Flow Infusion版本3.0.6,Brainlab AG)来确定导管放置。在一些实施方案中,CED过程将采用专为大脑使用而设计的导管。在一些实施方案中,CED过程将不使用大直径心室导管,其可能易于从预期递送部位泄漏药物(参见例如3)。

[0596] 在一些实施方案中,CED过程将包括替代示踪剂的共同注入,例如磁共振成像(MRI)造影剂,将允许实时监测MDNA55分布,确保充分覆盖肿瘤和浸润边缘。

[0597] 在一些实施方案中,替代示踪剂分子可包括但不限于任何磁共振成像示踪剂。在一些实施方案中,替代示踪剂是钆结合示踪剂。在一些实施方案中,替代示踪剂选自钆-二亚乙基三胺五乙酸[Magnevist®][Gd-DTPA](购自拜耳医疗保健制药公司)和钆结合白蛋白(Gd-白蛋白)。在一些实施方案中,在CED期间使用的替代示踪剂将能够有效地实时监测药物分布。在一些实施方案中,实时监测允许确保用靶向IL-4的货物蛋白(包括例如MDNA55)充分覆盖肿瘤和瘤周浸润边缘。在一些实施方案中,替代示踪剂可以与靶向货物蛋白质组合给药以确定靶向货物蛋白质是否以治疗剂量安全地递送至肿瘤,例如脑肿瘤,同时实时监测其分布。

[0598] 有关CED和替代示踪剂的更多信息,请参见例如,Chittiboina等人,2014; Jahangiri等人,2016;和Murad等人,《临床癌症研究(Clin.Cancer Res.)》12(10):3145-51,2006),所有上述文献通过整体引用并入本文。

[0599] G. 监测治疗

[0600] 本领域普通技术人员已知的可检测和/或量化癌细胞和/或癌症干细胞的任何体外或体内(离体)测定可用于监测癌细胞和/或癌症干细胞评估利用靶向IL-4的货物蛋白进行治疗的影响。这些方法可用于评估研究环境和临床环境中的影响。然后这些测定的结果可用于改变靶向部分、货物蛋白或改变受试者的治疗。Stassi等人的美国专利申请第2007/0292389号中提供了用于鉴定癌细胞和/或癌症干细胞的测定(通过引用并入本文)。

[0601] 癌细胞和/或癌症干细胞通常是肿瘤细胞的一个亚群。癌细胞和/或癌症干细胞可以在源自细胞培养物或受试者的生物样品(例如肿瘤样品)中找到。可以向样品中添加各种化合物,诸如水、盐、甘油、葡萄糖、抗微生物剂、石蜡、化学稳定剂、肝素、抗凝剂或缓冲剂。样品可以包括血液、血清、尿液、骨髓或组织液。在另一个实例中,样品是组织样品。在特定实例中,组织样品是乳房、脑、皮肤、结肠、肺、肝、卵巢、胰腺、前列腺、肾、骨或皮肤组织。在一个具体实例中,组织样品是正常或肿瘤组织的活检。取自受试者的生物样品的量将根据生物样品的类型和所采用的检测方法而变化。在特定实例中,生物样品是血液、血清、尿液或骨髓,并且从受试者采集的血液、血清、尿液或骨髓的量是0.1mL、0.5mL、1mL、5mL、8mL、10mL或更多。在另一个实例中,生物样品是组织并且从受试者取得的组织量小于10毫克、小于25毫克、小于50毫克、小于1克、小于5克、小于10克、小于50克或小于100克。

[0602] 测试样品可以是来自自己用靶向IL-4的货物蛋白处理的受试者的样品。测试样品还可以包括对照样品。在一些实例中,对照样品来自用靶向IL-4的货物蛋白治疗之前的受试者,而在其他实例中,测试样品可取自自己用靶向IL-4的货物蛋白治疗的受试者体内的不同

位置。对照样品也可以来自人工培养的细胞。在检测和/或测量样品中的癌症干细胞群之前,样品可以经历一个或多个预处理步骤。在某些实例中,生物流体通过离心、过滤、沉淀、透析或色谱法,或通过这预处理步骤的组合进行预处理。在其他实例中,组织样品通过冷冻、化学固定、石蜡包埋、脱水、透化或匀浆然后离心、过滤、沉淀、透析或层析或通过这预处理步骤的组合进行预处理。在某些实例中,在确定样品中的癌细胞和/或癌症干细胞的量之前,通过从样品中去除干细胞或癌细胞和/或癌症干细胞以外的细胞,或从样品中去除碎片来预处理样品。

[0603] 在某些实例中,在治疗或方案之前评估受试者或来自受试者的样品中癌细胞和/或癌症干细胞的量以建立基线。在其他实施例中,样品来源于使用靶向IL-4的货物蛋白治疗的受试者。在一些实例中,样品在受试者开始或终止治疗后至少约1、2、4、6、7、8、10、12、14、15、16、18、20、30、60、90天、6个月、9个月、12个月或>12个月取自受试者。在某些实例中,癌细胞和/或癌症干细胞的量在一定数量的剂量后(例如,在2、5、10、20、30或更多剂量的治疗后)进行评估。在其他实例中,在接受一种或多种疗法后1周、2周、1个月、2个月、1年、2年、3年、4年或更长时间后评估癌细胞和/或癌症干细胞的量。

[0604] 癌细胞和/或癌症干细胞的靶标也在正常的非癌细胞上表达。因此,在一些实例中,癌细胞和/或癌症干细胞的鉴定可以通过比较对照样品中靶结合产生的信号的相对量并将其与存在或不存在正在被确定的癌细胞和/或癌症干细胞的测试样品进行比较来进行。在此类实例中,样品中癌细胞和/或癌症干细胞的数目、数量、量或相对量可以表示为例如样品中总细胞、总癌细胞或总干细胞的百分比。

[0605] 测试样品中癌细胞和/或癌症干细胞的存在和/或癌细胞和/或癌症干细胞的存在量的结果可用于改变治疗方案,包括改变使用的靶向IL-4的货物蛋白质的种类。例如,如果治疗前后的测试显示癌细胞和/或癌症干细胞的数量增加和/或没有减少,则可以改变治疗。例如,治疗剂的剂量可以改变和/或设计成靶向不同靶标的靶向IL-4的货物蛋白可以替代或添加到治疗疗程中。

[0606] 可以使用本领域普通技术人员已知的标准技术监测/评估癌细胞和/或癌症干细胞的量。可以通过获取样品并检测样品中的癌细胞和/或癌症干细胞来监测癌细胞和/或癌症干细胞。可以通过检测癌细胞和/或癌症干细胞上抗原的表达来评估样品中癌细胞和/或癌症干细胞的量(其可以表示为例如总体细胞或总体癌细胞的百分比)。本领域技术人员已知的任何技术均可用于评估癌细胞和/或癌症干细胞的群体。抗原表达可以通过例如免疫分析进行分析,包括但不限于蛋白质印迹、免疫组织化学、放射免疫分析、ELISA(酶联免疫吸附分析)、“夹心”免疫分析、免疫沉淀分析、沉淀反应、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散测定、凝集测定、补体固定测定、免疫放射测定、荧光免疫测定、免疫荧光、蛋白A免疫测定、流式细胞术和FACS分析。在这样的情况下,来自受试者的测试样品中癌细胞和/或癌症干细胞的量可以通过以下方式来确定:将结果与参考样品(例如,来自没有可检测到的癌症的受试者的样品)中干细胞的量、或于与确定的参考范围、或于在较早时间点时(例如,治疗之前、期间)的患者自身进行比较。出于免疫测定的目的,癌症干细胞展示的一种或多种靶标可用作免疫测定的靶标。

[0607] 例如,可以使用CD133+靶以及已知在脑癌细胞和/或癌症干细胞上表达的其他靶来鉴定脑癌细胞和/或癌症干细胞。另外的示例性标志物可见于Sakariassen等人,《瘤形成

(Neoplasia)》9(11):882-92,2007和Vermeulen等人,《细胞死亡与分化(Cell.Death Differ.)》15(6):947-58,2008以及美国专利申请2008/0118518,上述文献通过引用并入本文。

[0608] 在一些实施方案中,治疗可以使用IL-4R生物标志物表达水平进行监测,如下文下一节所述。

[0609] H. 治疗变化

[0610] 本领域普通技术人员将理解,癌细胞和/或癌症干细胞上的靶标也可以在正常健康细胞上表达。例如,CD133最初显示在原始造血干细胞和祖细胞以及成视网膜细胞瘤上表达,然后显示为在癌细胞和/或癌症干细胞上表达。因此,在癌症干细胞靶标在一类非癌细胞治疗上表达的一些实例中,可以涉及去除非癌细胞群,然后进行针对感兴趣的癌症干细胞的靶向IL-4的货物蛋白治疗,然后重新引入表达靶标的非癌细胞。

[0611] 在另一个实例中,通过使用两种或多种靶向IL-4的货物蛋白来保护表达与癌症干细胞群体相同靶标的健康细胞群体。第一个靶向IL-4的货物蛋白被设计为靶向第一个癌症干细胞靶标(例如,CD133)。包含在第一个靶向IL-4的货物蛋白中的货物蛋白可以是无活性形式的毒素。第二个靶向IL-4的货物蛋白被设计为靶向癌症干细胞上的第二个靶标(例如,CD24)。该第二个靶向IL-4的货物蛋白包括能够活化第一个靶向IL-4的货物蛋白的蛋白质序列。因此,只有表达第一个靶向IL-4的货物蛋白和第二个货物蛋白的靶标的癌症干细胞才会获得货物部分的治疗活性。

[0612] 在另一个治疗变化中,受试者用针对展示在癌症干细胞上的靶标的激动剂进行治疗。然后癌细胞和/或癌症干细胞显示出增加的靶标水平。然后可以在给药靶向IL-4的货物蛋白之前、期间或之后给药激动剂的治疗。本领域普通技术人员将理解,给药的确切时间将取决于所选的特定激动剂和特定的靶向IL-4的货物蛋白。

[0613] I. IL-4基因突变产物的表达

[0614] 上述核酸分子可包含在载体内,该载体能够指导它们在例如已用载体转导的细胞中的表达。因此,除了主题IL-4突变蛋白之外,包含编码主题IL-4突变蛋白的核酸分子的表达载体和用这些载体转染的细胞属于优选实施方案。

[0615] 当然应该理解,并不是所有的载体和表达控制序列在表达本文所述的DNA序列方面都具有同样好的功能。对于相同的表达系统,所有宿主也不会同样发挥作用。然而,本领域技术人员无需过度实验即可在这些载体、表达控制序列和宿主中进行选择。例如,在选择载体时,必须考虑宿主,因为载体必须在其中复制。还应考虑载体的拷贝数、控制该拷贝数的能力以及载体编码的任何其他蛋白质(如抗生素标志物)的表达。例如,可以使用的载体包括允许编码IL-4突变蛋白的DNA以拷贝数扩增的那些载体。这样的可扩增载体是本领域公知的。其包括例如能够通过DHFR扩增(参见,例如,Kaufman,美国专利第4,470,461号,Kaufman和Sharp,《模块化二氢叶酸还原酶cDNA基因的构建:用于有效表达的信号分析(Construction of a Modular Dihydrofolate Reductase cDNA Gene:Analysis of Signals Utilized for Efficient Expression)》,《分子细胞生物学(Mol.Cell.Biol.)》,2,第1304-19页(1982))或谷氨酰胺合成酶(“GS”)扩增(参见,例如,美国专利第5,122,464号和欧洲申请338,841)被扩增的载体。

[0616] 在一些实施方案中,本公开的人类IL-4突变蛋白将从载体,优选表达载体表达。载

体可用于宿主细胞中的自主复制,或者可以在引入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中,从而与宿主基因组一起复制(例如,非附加体哺乳动物载体)。表达载体能够指导与它们有效连接的编码序列的表达。通常,在重组DNA技术中有用的表达载体通常是质粒(载体)的形式。然而,也包括其他形式的表达载体,诸如病毒载体(例如,复制缺陷逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0617] 示例性的重组表达载体可以包括一种或多种基于待用于表达的宿主细胞选择的调节序列,可操作地联接至待表达的核酸序列。

[0618] 可以设计表达构建体或载体以在原核或真核宿主细胞中表达IL-4突变蛋白或其变体。

[0619] 可以通过常规转化或转染技术将载体DNA导入原核或真核细胞。转化或转染宿主细胞的合适方法可见于Sambrook等人(1989)《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)》(第2版,冷泉港实验室出版社,普莱恩维尤,纽约州)和其他标准分子生物学实验室手册。

[0620] 蛋白质在原核生物中的表达最常在大肠杆菌中用含有组成型或诱导型启动子的载体进行。在大肠杆菌中最大化重组蛋白表达的策略可见于例如Gottesman(1990)《基因表达技术:酶学方法(Gene Expression Technology:Methods in Enzymology)》185(学术出版社,圣地亚哥,加利福尼亚州)第119-128页和Wada等人(1992)《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》20:2111-2118。从细胞中培养、收获、破坏或提取IL-4突变蛋白或其变体的方法在例如美国专利号4,604,377、4,738,927、4,656,132、4,569,790、4,748,234、4,530,787、4,572,798、4,748,234和4,931,543中进行了充分描述,上述专利通过整体引用并入本文。

[0621] 在一些实施方案中,重组IL-4突变蛋白或其生物活性变体也可以在真核生物中制备,诸如酵母或人类细胞。合适的真核宿主细胞包括:昆虫细胞(可用于在培养的昆虫细胞(例如Sf9细胞)中表达蛋白质的杆状病毒载体的实例包括pAc系列(Smith等人(1983)《分子细胞生物学(Mol.Cell Biol.)》3:2156-2165)和pVL系列(Lucklow和Summers(1989)《病毒学(Virology)》170:31-39));酵母细胞(用于在酿酒酵母中表达的载体的例子包括pYepSec1(Baldari等人(1987)《欧洲分子生物学学报(EMBO J.)》6:229-234)、pMFa(Kurjan和Herskowitz(1982)《细胞(Cell)》30:933-943)、pJRY88(Schultz等人(1987)《基因(Gene)》54:113-123)、pYES2(英杰公司(Invitrogen Corporation),圣地亚哥,加利福尼亚州)和pPicZ(英杰公司,圣地亚哥,加利福尼亚州);或哺乳动物细胞(哺乳动物表达载体包括pCDM8(《种子(Seed)》(1987)《自然(Nature)》329:840))和pMT2PC(Kaufman等人(1987)《欧洲分子生物学学报(EMBO J.)》6:187:195))。合适的哺乳动物细胞包括中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或COS细胞。在哺乳动物细胞中,表达载体的控制功能通常由病毒调控元件提供。例如,常用的启动子来自多瘤、腺病毒2、巨细胞病毒和猿猴病毒40。对于其他适用于原核和真核细胞的表达系统,请参见Sambrook等人(1989)《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》的第16章和第17章(第2版,冷泉港实验室出版社,普莱恩维尤,纽约州)。参见Goeddel(1990)《基因表达技术:酶学方法(Gene Expression Technology:Methods in Enzymology)》185(学术出版社,圣地亚哥,加利福尼亚州)。

[0622] 可以优化编码本公开的人类IL-4突变蛋白的序列以在感兴趣的宿主细胞中表达。可以将序列的GC含量调整到给定细胞宿主的平均水平,如参考宿主细胞中表达的已知基因

计算。密码子优化的方法是本领域众所周知的。可以优化IL-4突变蛋白编码序列内的密码子以增强宿主细胞中的表达,使得约1%、约5%、约10%、约25%、约50%、约75%或高达100%的编码序列内密码子已针对在特定宿主细胞中的表达进行了优化。

[0623] 适用的载体包括用于细菌的基于T7的载体(参见,例如Rosenberg等人,《基因(Gene)》56:125,1987)、用于哺乳动物细胞的pMSXND表达载体(Lee和Nathans,《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》263:3521,1988)和杆状病毒衍生载体(例如,来自Clontech,帕洛阿尔托,加利福尼亚州的表达载体pBacPAK9)用于昆虫细胞。

[0624] 在一些实施方案中,在此类载体中编码主题IL-4突变蛋白的核酸插入物可以可操作地联接至启动子,该启动子基于例如寻求表达的细胞类型来选择。

[0625] 在选择表达控制序列时,还应考虑多种因素。这些包括,例如,序列的相对强度、其可控性以及编码主题IL-4突变蛋白的实际DNA序列的相容性,特别是在潜在的二级结构方面。应考虑宿主与所选载体的相容性、本发明DNA序列编码的产物的毒性、它们的分泌特征、正确折叠多肽的能力、它们的发酵或培养要求以及易于纯化由DNA序列编码的产物。

[0626] 在这些参数内,本领域技术人员可以选择各种载体/表达控制序列/宿主组合,这些组合将在发酵或大规模动物培养中表达所需的DNA序列,例如,使用CHO细胞或COS 7细胞。

[0627] 在一些实施方案中,表达控制序列和表达载体的选择将取决于宿主的选择。可以采用多种表达宿主/载体组合。用于真核宿主的有用表达载体包括例如具有来自SV40、牛乳头瘤病毒、腺病毒和巨细胞病毒的表达控制序列的载体。用于细菌宿主的有用表达载体包括已知的细菌质粒,诸如来自大肠杆菌的质粒,包括col E1、pCRI、pER32z、pMB9及其衍生物,更广泛的宿主范围质粒,诸如RP4,噬菌体DNA,例如,噬菌体λ的众多衍生物,例如, NM989,以及其他DNA噬菌体,诸如M13和丝状单链DNA噬菌体。酵母细胞的有用表达载体包括2μ质粒及其衍生物。昆虫细胞的有用载体包括pVL 941和pFastBacTM1 (GibcoBRL,盖瑟斯堡,马里兰州)。Cate等人,《牛和人类基因的缪氏抑制物质的分离和人类基因在动物细胞中的表达(Isolation Of The Bovine And Human Genes For Mullerian Inhibiting Substance And Expression Of The Human Gene In Animal Cells)》,《细胞(Cell)》,45,第685-98页(1986)。

[0628] 此外,在这些载体中可以使用多种表达控制序列中的任一种。这种有用的表达控制序列包括与上述表达载体的结构基因相关的表达控制序列。有用的表达控制序列的例子包括,例如,SV40或腺病毒的早期和晚期启动子、lac系统、trp系统、TAC或TRC系统、噬菌体λ的主要操纵子和启动子区域(例如PL、fd外壳蛋白的控制区域)、3-磷酸甘油酸激酶或其他糖酵解酶的启动子、酸性磷酸酶的启动子(例如PhoA)、酵母a交配系统的启动子、杆状病毒的多面体启动子以及已知控制原核或真核细胞或其病毒的基因表达的其他序列以及它们的各种组合。

[0629] T7启动子可用于细菌,多角体蛋白启动子可用于昆虫细胞,巨细胞病毒或金属硫蛋白启动子可用于哺乳动物细胞。此外,在高等真核生物的情况下,组织特异性和细胞类型特异性启动子是广泛可用的。这些启动子因其在体内特定组织或细胞类型中指导核酸分子表达的能力而得名。技术人员熟知可用于指导核酸表达的多种启动子和其他调控元件。

[0630] 除了促进插入的核酸分子转录的序列之外,载体可以包含复制起点和编码选择标

记的其他基因。例如,新霉素抗性(neo^r)基因赋予表达它的细胞G418抗性,从而允许对转染细胞进行表型选择。本领域技术人员可以容易地确定给定的调控元件或选择标记是否适用于特定的实验环境。

[0631] 可用于本发明的病毒载体包括,例如,逆转录病毒、腺病毒和腺相关载体、疱疹病毒、猿猴病毒40(SV40)和牛乳头状瘤病毒载体(参见,例如,Gluzman(编辑),《真核病毒载体(Eukaryotic Viral Vectors)》,CSH实验室出版社,冷泉港,纽约)。

[0632] 含有并表达编码本文公开的主题IL-4突变蛋白的核酸分子的原核或真核细胞也是本发明的特征。本发明的细胞是转染的细胞,即核酸分子,例如编码突变IL-4多肽的核酸分子,已经通过重组DNA技术导入其中的细胞。这种细胞的后代也被认为在本发明的范围内。

[0633] 表达系统的精确成分并不重要。例如,IL-4突变蛋白可以在原核宿主中产生,例如细菌大肠杆菌,或在真核宿主中产生,例如昆虫细胞(例如,Sf21细胞),或哺乳动物细胞(例如,CHO、HEK293、COS细胞、NIH 3T3细胞或HeLa细胞)。这些细胞可从许多来源获得,包括美国菌种保藏中心(马纳萨斯,弗吉尼亚州)。在选择表达系统时,重要的是组分彼此相容。技术人员或普通技术人员能够做出这样的决定。此外,如果在选择表达系统时需要指导,技术人员可以查阅Ausubel等人(《分子生物学的当前方案(Current Protocols in Molecular Biology)》,John Wiley和Sons,纽约,纽约州,1993)和Pouwels等人(《克隆载体:实验室手册(Cloning Vectors:A Laboratory Manual)》,1985增刊1987)。

[0634] 表达的多肽可以使用常规生化程序从表达系统中纯化,并且可以用作例如治疗剂,如本文所述。

[0635] 在一些实施方案中,获得的IL-4突变蛋白将是糖基化或未糖基化的,具体取决于用于产生突变蛋白的宿主生物。如果选择细菌作为宿主,那么产生的IL-4突变蛋白将是未糖基化的。另一方面,真核细胞将糖基化IL-4突变蛋白,虽然可能以与天然IL-4不同的方式糖基化。转化宿主产生的IL-4突变蛋白可以根据任何合适的方法进行纯化。已知多种纯化IL-4的方法。参见,例如《蛋白质科学中的当前方案(Current Protocols in Protein Science)》,第2卷.编辑:John E.Coligan,Ben M.Dunn,HiddeL.Ploehg,David W.Speicher,Paul T.Wingfield,第6.5单元(版权1997,John Wiley and Sons,Inc.IL-4突变蛋白可以使用阳离子交换、凝胶过滤产生给定的突变蛋白和/或反相液相色谱从大肠杆菌中产生的包涵体中分离,或者从哺乳动物或酵母培养物的条件培养基中分离。

[0636] 构建编码IL-4突变蛋白的DNA序列的另一种示例性方法是通过化学合成。这包括通过化学方法直接合成肽,该蛋白质序列编码表现出所述特性的IL-4突变蛋白。这种方法可以在影响IL-4与IL-4R α 和/或IL-13R α 1相互作用的位置加入天然和非天然氨基酸。可替代地,可以使用寡核苷酸合成仪通过化学方法合成编码所需IL-4突变蛋白的基因。此类寡核苷酸是基于所需IL-4突变蛋白的氨基酸序列设计的,并且优选选择在将产生重组突变蛋白的宿主细胞中有利的那些密码子。在这方面,众所周知,遗传密码是简并的——一个氨基酸可能由多于一个的密码子编码。例如,Phe(F)由两个密码子TTC或TTT编码,Tyr(Y)由TAC或TAT编码,而his(H)由CAC或CAT编码.Trp(W)由单个密码子TGG编码。因此,应当理解,对于编码特定IL-4突变蛋白的给定DNA序列,将有许多编码该IL-4突变蛋白的DNA简并序列。例如,应当理解,除了突变蛋白H9的优选DNA序列之外,还有许多编码所示IL-4突变蛋白的简

并DNA序列。这些简并DNA序列被认为在本公开的范围内。因此,本发明上下文中的“其简并变体”是指编码特定突变蛋白并因此能够表达特定突变蛋白的所有DNA序列。

[0637] IL-4突变蛋白的生物学活性可以通过本领域已知的任何合适的方法进行测定。此类测定包括PHA-blast增殖和NK细胞增殖。

[0638] J. 抗PD-1抗体和组合

[0639] 根据本发明和本文所述方法使用的抗PD-1抗体包括但不限于纳武单抗、BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538、AMP224、CT-011和MK-3475(派姆单抗)、西米普利单抗(REGN2810)、SHR-1210(CTR20160175和CTR20170090)、SHR-1210(CTR20170299和CTR20170322)、JS-001(CTR20160274)、IBI308(CTR20160735)、BGB-A317(CTR20160872)和/或PD-1抗体,如美国专利第2017/0081409号中所引用的。有两种已获批准的抗PD-1抗体帕博利珠单抗(**Keytruda®**;MK-3475-033)和纳武单抗(**Opdivo®**;CheckMate078)以及更多研发中的抗体,其可与本文所述的组合使用。例示性的抗PD-1抗体序列在图10中示出,并且这些中的任一种可以与本文所述的利用IL-4突变蛋白的组合方法一起使用。

[0640] K. 抗PD-L1抗体和组合

[0641] 在一些实施方案中,本文所述的任何IL-4突变蛋白可与抗PD-1抗体组合使用。有三种已获批准的抗PD-L1抗体:阿特珠单抗(**TECENTRIQ®**;MPDL3280A)、阿维鲁单抗(**BAVENCIO®**;MSB001071 8C)和度伐单抗(MEDI4736)以及其它研发中的抗PD-L1抗体。可获得多种抗PD-L1抗体以及更多研发中的抗体,其可如本所述与IL-4突变蛋白组合使用。在一些实施方案中,PD-L1抗体是美国专利公开第2017/0281764号以及国际专利公开第W0 2013/079174号(阿维鲁单抗)和第W0 2010/077634号(或美国专利申请第20160222117号或美国专利第8,217,149号;阿特珠单抗)中所述的抗体。在一些实施方案中,PD-L1抗体包含SEQ ID NO:34的重链序列和SEQ ID NO:36的轻链序列(来自US 2017/281764)。在一些实施方案中,PD-L1抗体是阿特珠单抗(**TECENTRIQ®**;MPDL3280A;IMpower110)。在一些实施方案中,PD-L1抗体是阿维鲁单抗(**BAVENCIO®**;MSB001071 8C)。在一些实施方案中,PD-L1抗体是德瓦鲁单抗(MEDI4736)。在一些实施方案中,PD-L1抗体包括例如阿特珠单抗(IMpower133)、BMS-936559/MDX-1105和/或RG-7446/MPDL3280A和/或YW243.55.S70以及本文在图11中提供的抗PD-L1抗体中的任一种。

[0642] 与本文公开的IL-4突变蛋白组合用于治疗方法的抗PD-1抗体包括但不限于纳武单抗、BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538、AMP224、CT-011和MK-3475。

[0643] L. 其他免疫疗法组合

[0644] 根据本发明的方法使用的其他抗体和/或免疫疗法包括但不限于抗CTLA4 mAb,诸如伊匹单抗、曲美木单抗;抗PD-L1拮抗抗体,诸如BMS-936559/MDX-1105、MEDI4736、RG-7446/MPDL3280A;抗LAG-3,诸如IMP-321;靶向免疫刺激蛋白的激动性抗体,包括抗CD40mAb,诸如CP-870,893、卢卡木单抗、达西组单抗;抗CD137 mAb(抗4-1-BB抗体),诸如BMS-663513乌瑞芦单抗(抗4-1BB抗体;参见,例如,美国专利第7,288,638号和第8,962,804号,其通过整体引用并入本文);lirilumab(抗KIR mAb;IPH2102/BMS-986015;阻断NK细胞抑制性受体)和PF-05082566(utomilumab;参见,例如,美国专利第8,821,867号、第8,337,850号和第9,468,678号以及国际专利申请第W0 2012/032433号,其通过整体引用并入本文);抗OX40 mAb(参见,例如,W0 2006/029879或W0 2010/096418,其通过整体引用并入本

文);抗GITR mAb,诸如TRX518(参见,例如,美国专利第7,812,135号,其通过整体引用并入本文);抗CD27 mAb,诸如伐立鲁单抗CDX-1127(参见,例如,WO 2016/145085和美国专利公开第US 2011/0274685号和第US 2012/0213771号,其通过整体引用并入本文);抗ICOS mAb(例如,MEDI-570、JTX-2011和抗TIM-3抗体(参见,例如,WO 2013/006490或美国专利公开第US 2016/0257758号,其通过整体引用并入本文)。

[0645] 其他抗体还可包括针对前列腺癌、卵巢癌、乳腺癌、子宫内膜癌、多发性骨髓瘤、黑色素瘤、淋巴瘤、包括小细胞肺癌的肺癌、肾癌、结肠直肠癌、胰腺癌、胃癌、脑癌的单克隆抗体(一般地参见www.clinicaltrials.gov)。

[0646] 抗体还可包括抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的抗体。

[0647] M. 治疗方法

[0648] 在一些实施方案中,可以向受试者给药主题IL-4突变蛋白和/或表达它们的核酸以治疗与异常细胞凋亡或分化过程相关的病症(例如,细胞增殖病状或细胞分化病状,诸如癌症,例如,通过产生主动或被动免疫)。在这些疾病的治疗中,所公开的IL-4突变蛋白可能具有有利的特性,例如减少血管渗漏综合征。在一些实施方案中,IL-4突变蛋白是本文公开的任何IL-4突变蛋白或变体。在一些实施方案中,IL-4突变蛋白序列与本文公开的任一序列具有90%的同一性。

[0649] 细胞增殖性和/或分化性病症的实例包括癌症(例如,癌、肉瘤、转移性病症或造血性肿瘤性病症,例如白血病)。转移性肿瘤可由多种原发肿瘤类型产生,包括但不限于前列腺癌、卵巢癌、乳腺癌、子宫内膜癌、多发性骨髓瘤、黑色素瘤、淋巴瘤、包括小细胞肺癌的肺癌、肾癌、肝癌、结肠癌、结肠直肠癌、胰腺癌、胃癌和脑癌。

[0650] 突变的IL-4多肽可用于治疗患有、怀疑患有或可能处于发展任何类型癌症(包括肾癌或黑色素瘤)或任何病毒性疾病的高风险中的患者。示例性癌包括由子宫颈、肺、前列腺、乳房、头颈、结肠和卵巢的组织形成的那些。该术语还包括癌肉瘤,其包括由癌性和肉瘤性组织组成的恶性肿瘤。

[0651] 增殖性疾病的其他例子包括造血肿瘤疾病。

[0652] 实例

[0653] 实例1:IL-4R α 测定和数据

[0654] 材料与方法

[0655] IL-4R α 的免疫组织化学(IHC)染色使用来自Abcam的兔多克隆抗体(目录号ab203398)(表2),其能够检测福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)的标本中白细胞介素4受体蛋白(IL-4R α)的 α 链。IHC程序有四个步骤,简要概述如下。

[0656] 第1步:将FFPE组织块切成4-5 μ m的厚度,并将切片安装在带正电荷的毛细管间隙载玻片上。载玻片在使用前经过烘烤(60 $^{\circ}$ C,干热)。

[0657] 第2步:使用有机溶剂(100%二甲苯,四次变化)和酒精系列(100%、70%、30%乙醇)对组织切片进行脱蜡,降到蒸馏水中以充分水合组织并允许正确结合一抗和其他检测试剂。需要时,在使用SHIER(蒸汽热诱导表位恢复)溶液脱蜡和加热后进行抗原修复。对于IL-4R α ,不使用加热和SHIER溶液进行抗原修复(称为NO SHIER),因为它不会有助于抗原暴露,也不需要暴露表位以进行结合。

[0658] 第3步:将样品与空白显微镜载玻片配对以形成毛细管间隙,并根据表1中概述的

一般程序使用TechMate仪器平台和MIP程序(不包括用蛋白酶K进行酶消化)通过IHC进行测试。在IHC期间使用对抗原或一抗具有高度特异性的抗体的顺序检测。通过应用比色色原(DAB),在存在辣根过氧化物酶(HRP)的情况下,在抗原部位沉淀不连续的不溶性反应产物,最终可以看到一抗的位置。使用苏木精(蓝色染色)对细胞核进行复染,以评估细胞和组织形态。

[0659] 第4步:将载玻片拆开,用蒸馏水冲洗,在酒精系列(70%、95%、100%乙醇)和有机溶剂(100%二甲苯,四次变化)中脱水,然后使用CytoSeal(或同等产品)永久盖玻片,用于解释和储存。在显微镜下检查载玻片以评估染色。

[0660] 脱蜡后,使用运行QML workmate软件v3.96的TechMate仪器(罗氏诊断公司(Roche Diagnostics))自动化处理步骤。该自动化平台对所有试剂更换使用毛细管间隙过程,包括复染和中间缓冲液清洗。所有步骤均在室温(RT)即25℃下进行。

[0661] 含有山羊血清的试剂制造缓冲液(RMB)用于制备IL-4Rα一抗、物种匹配阳性对照(兔CD3)和同种型匹配阴性对照(兔IgG)的工作稀释液。FFPE切片中抗原-一抗相互作用位点的IL-4Rα靶标识别使用来自GBI实验室的Polink-2 Plus HRP试剂盒的检测试剂,该试剂盒专为检测兔一抗而设计。有关抗体规格和IHC检测条件,请参阅表2。

[0662] 控制细胞系/组织和内部过程控制

[0663] IL-4Rα表达的阳性对照包括先前测试的福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)SW480细胞系和来自QualTek组织库的人类多形性成胶质细胞瘤(GBM)组织(Q1360-3)。这些样品在QML项目号1397中测试时显示出IL-4Rα的高表达,因此被包括在当前研究(QML项目号1421)中作为阳性对照。

[0664] IL-4Rα表达的阴性对照包括先前测试的FFPE HUVEC细胞系(P1397Q0001)和来自QualTek组织库的正常人类皮层组织(Q2908)。这些样品在测试时没有反应性或显示出非常低的IL-4Rα染色,因此在当前研究中作为阴性对照被包括在内。

[0665] 在每次运行中使用在对照组织中具有确定信号强度的物种匹配阳性对照(标准抗体)以确认适当的检测试剂性能。在整个项目期间使用的标准阳性对照是CD3(源自兔),在来自QualTek组织库的FFPE对照扁桃体组织上运行。

[0666] 兔IgG同种型匹配阴性对照用于确定检测试剂或组织中固有的任何非特异性染色,以帮助确定这些来源的任何可能的背景反应性。对于IL-4Rα测定,不需要对组织进行预处理。在这项研究中,阴性对照也可用于区分色素与DAB染色。兔IgG同种型匹配阴性对照染色的代表性图像可以在本报告结果部分的图中观察到。

[0667] 人类测试组织

[0668] 对于灵敏度测试,QualTek筛选了42个福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)样品的IL-4Rα表达。所有组织均为人类标本。一个样品(1713-rgbm,05220643C##S)无法确认为多形性成胶质细胞瘤(GBM)。因此,它没有包含在汇总数据表中。共有41个样品被确定为可评估的GBM标本。图6提供了这些样品的一般描述。每个GBM样品的详细信息包含在结果部分的敏感性评分表中。这些样品的子集(Q1360-3、Q3362、Q9467、Q9462、Q9464、Q1351-5、Q1348-1)用于测定转移和/或验证测试。

[0669] 对于IL-4Rα特异性测试,FDA多正常人类组织微阵列(TMA)载玻片购自Pantomics, Inc(目录号MN0961)。TMA(指定为P1421Q0001)包含来自35个不同器官或部位的96个不同样

品。

[0670] 评分方案

[0671] IL-4R α 在肿瘤细胞的细胞质中具有反应性。然而,它也可以在血清中观察到,偶尔也可以在正常细胞和正常组织成分的细胞质中观察到。用于对肿瘤细胞中观察到的细胞质IL-4R α 染色以及通过IHC在福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 多形性成胶质细胞瘤 (GBM) 样品中观察到的良性组织的间质背景进行评分的指南如下:

[0672] IL-4R α 表达由董事会认证的病理学家评分。对恶性肿瘤细胞进行评分的主要成分包括百分比分数和H-评分(源自以不同强度记录的百分比),如下所述。

[0673] 尽可能使用百分比评分和H-评分方法仅对明显的恶性肿瘤细胞(大的多形性细胞)进行IL-4R α 阳性评分。也就是说,排除在明显非肿瘤细胞中观察到的任何IL-4R α 染色。在形态学上,很难区分GBM样品中的肿瘤细胞和非肿瘤细胞。

[0674] 如果识别出细胞质肿瘤细胞染色,则认为恶性细胞表达IL-4R α 。

[0675] 当存在时,在肿瘤细胞周围的良性组织中观察到的细胞质背景染色被捕获为如本文所述的间质信号的平均强度。

[0676] 为了全面了解GBM样品中的IL-4R α 表达并帮助对患者群体进行分层,使用标准百分比评分和H-评分方法来捕获在明显恶性肿瘤细胞中观察到的染色模式。这些方法描述如下。

[0677] 百分比评分法

[0678] 百分比评分是通过将 $\geq 1+$ 、 $\geq 2+$ 或 $\geq 3+$ 的肿瘤细胞中的强度百分比相加来计算的。因此,分数范围从0到100。

[0679] • 百分比分数 $\geq 1+ = (1+\text{下的}\%) + (2+\text{下的}\%) + (3+\text{下的}\%)$

[0680] • 百分比分数 $\geq 2+ = (2+\text{下的}\%) + (3+\text{下的}\%)$

[0681] • 百分比分数 $\geq 3+ = (3+\text{下的}\%)$

[0682] H-评分法

[0683] H-评分是通过将具有表达强度(棕色染色)的肿瘤细胞百分比乘以其相应强度的四点半定量量表(0、1+、2+、3+)来计算的。因此,分数范围从0到300。

[0684] • $H\text{-评分} = [(<1+\text{下的}\%) \times 0] + [(1+\text{下的}\%) \times 1] + [(2+\text{下的}\%) \times 2] + [(3+\text{下的}\%) \times 3]$

[0685] 对于百分比评分和H-评分方法,四点半定量强度量表描述如下:0-无效,阴性或非特异性染色,1+-低或弱染色,2+-中等或中等染色,和3+-高染色或强染色。每个强度的百分比是直接估计的,通常报告为以下之一,但也可以使用其他增量:0、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99或100%。

[0686] 偶尔,GBM样品包括整个良性组织的背景IL-4R α 染色。当存在时,这种间质染色以1+、2+或3+的平均强度评分被捕获,以记录存在于肿瘤细胞周围的背景细胞质染色水平。当不存在时,该值被记录为NA(不适用)。高背景反应性可能有助于肿瘤细胞中更高的IL-4R α 表达。因此,在评估恶性肿瘤细胞的反应性评分时,应考虑间质染色评分。

[0687] 结果

[0688] 测定转移至CLIA实验室

[0689] 来自QualTek组织库的福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 多形性成胶质细胞瘤 (GBM) 样品用于实验室之间的CAP/CLIA一致性测试。选择了四个样品(Q1360-3、Q3362、Q9467、

Q9462) 来代表一系列IL-4R α 染色(低、中和高)。该样品集使用IL-4R α IHC测定进行染色,作为初始精度和重现性测试的一部分,包括由多个操作员进行的重复测试。

[0690] 使用H-评分和百分比评分方法对载玻片进行评分,这些方法记录了不同强度(0-3+) 下肿瘤细胞染色的百分比。该评分是在审查大敏感性GBM肿瘤集之前和GBM适应症的最终评分方案之前进行的。

[0691] 比较在QML-Newtown(非CLIA, GLP) 和QML-Santa Barbara (CAP/CLIA) 染色的GBM样品的评分数据如图7所示。该表包括GBM肿瘤细胞的H-评分和 $\geq 1+$ 强度的百分比评分。

[0692] 成胶质细胞瘤的CAP/CLIA敏感性筛查

[0693] 使用上述IHC测定法筛选了总共42个福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 多形性成胶质细胞瘤 (GBM) 样品的IL-4R α 敏感性。一份样品无法确认为多形性成胶质细胞瘤 (GBM)。因此,共有41个样品被确定为可评估的GBM标本。

[0694] 进行敏感性筛选以了解来自GBM适应症的代表性样品集的染色强度范围和IL-4R α 反应性模式。所有样品都用H&E染色进行形态学评估,并通过IHC进行测试,使用对应于IL-4R α 测定条件的兔IgG同种型匹配阴性对照。

[0695] 上述评分方案用于评估当前CAP/CLIA IL-4R α 敏感性筛选中的42个样品。评分方法还包括半定量百分比分数[通过将强度 $\geq 1+$ 、 $\geq 2+$ 和 $\geq 3+$ 的百分比与值范围从0到100相加计算]和H-评分[计算为每个百分比的总分和分数(0-100%) 乘以其相应的强度分数(0、1+、2+、3+), 值范围从0到300]。图7显示了42个组织面板中IL-4R α 反应性的完整评分结果。

[0696] 图1显示了GBM适应症中各种水平的IL-4R α 反应性的代表性图像。该图还包括用于生物标志物检测的相应代表性兔IgG阴性对照。所有兔IgG同种型阴性对照在所测试的GBM肿瘤的敏感性面板中均无反应。

[0697] 按潜在反应性阈值分组的41个可评估GBM样品中IL-4R α 表达的总结结果显示在图8A顶部面板中,对于H-评分值,图8B第二面板用于 $\geq 1+$ 强度的染色百分比,图8C第三面板用于 $\geq 2+$ 强度的染色百分比,而图8D第四面板用于 $\geq 3+$ 强度的染色百分比。这些表格旨在根据阳性的理论阈值划分数据,以帮助对患者群体进行分层。

[0698] 大多数测试的GBM样品在肿瘤细胞中显示出中度至高度的IL-4R α 细胞质反应性。根据H-评分分析(表6),在95%的GBM病例(39/41)中观察到H-评分 ≥ 50 ,在51% (21/41) 的GBM病例中观察到H-评分 ≥ 200 ,并且在24%的GBM病例(10/41)中观察到H-评分 ≥ 250 。表6包括按H-评分划分的其他细分,也可以考虑其他阈值。

[0699] 根据百分比评分分析,95%的GBM病例(39/41)在 $\geq 50\%$ 的肿瘤细胞中具有 $\geq 1+$ 强度(表7),71%的GBM病例(29/41)在 $\geq 50\%$ 的肿瘤细胞中具有 $\geq 2+$ 强度(表8),而49%的GBM病例(20/41)在 $\geq 50\%$ 的肿瘤细胞中具有 $\geq 3+$ 强度(图8D)。图8B至图8D中包含了按百分比分列的其他细分,也可以考虑其他阈值。

[0700] 本实例中显示的IL-4R α 反应性的潜在阈值有助于确定GBM中IL-4R α 阳性的适当临界值,用于临床测试。

[0701] 成胶质细胞瘤中的CAP/CLIA精度和再现性(C部分)

[0702] 敏感性筛选的结果有助于确定合适的组织,以测试GBM中IL-4R α IHC测定的精度和再现性。对于该验证,选择使用显示高(Q9464)、中度(Q1351-5)和低(Q1348-1、Q3362) IL-4R α 表达的4个肿瘤样品。

[0703] 根据图9中的IHC测定,在一次运行中针对IL-4R α (精度) 运行所选的每个GBM样品一式三份。在非连续天进行的两次独立运行中,使用IL-4R α 重复运行相同的样品三次。每次染色运行中都包括适当的阳性和阴性对照。(例如,参见图10。)

[0704] 使用IL-4R α 的百分比评分方法对验证样品进行评分,其中确定了差异强度染色。为了在GBM中进行这种精确度和可重复性测试,使用了IL-4R α 阳性的临界值,即在 $\geq 25\%$ 的肿瘤细胞中染色强度 $\geq 2+$ 。也就是说,如果样品在 25% 或更多的肿瘤细胞中显示 $2+$ 或 $3+$ 强度的染色,则称为阳性(POS)。如果不存在染色、存在于少于 25% 的肿瘤细胞中或仅以 $1+$ 的强度存在,则样品被称为阴性(NEG)。

[0705] 每个重复显示每个GBM组织的细胞质IL-4R α 染色一致且可重复(数据未显示)。包括相应兔IgG阴性对照(非反应性)的图像(数据未显示)。

[0706] 通过评估染色模式的一致性、半定量分数的统计分析和一致/一致估计的百分比来确定对IL-4R α 的IHC检测验证的接受/拒绝。

[0707] 完整的验证评分结果(图10)反映了在所有GBM重复中观察到的IL-4R α 反应性的等效细胞模式。

[0708] 用于IL-4R α 阳性测定的参考点是用于本实例的 $\geq 25\%$ 肿瘤中 $\geq 2+$ 染色的截止点。

[0709] 正常组织的特异性测试

[0710] IL-4R α 对其靶标的特异性通过使用FDA推荐的多种正常人体组织的组织微阵列(TMA)描述的IHC方法进行测试。用于特异性测试的TMA(指定为P1421Q0001)购自Pantomics, Inc(目录号MN0961,多种正常人体组织,FDA,96个样品,3个个体的35个器官/部位,1.5mm)。TMA切片用苏木精和伊红(H&E)进行组织学染色,并用IL-4R α 和兔IgG进行IHC染色。

[0711] 使用上述百分比评分和H-评分方法评估多正常TMA的所有染色载玻片以评估正常组织成分(与肿瘤相反)。来自此特异性测试的评分数据包括差异强度、H-评分和IL-4R α 染色 $\geq 1+$ 的细胞总百分比(图11A至图11B)。还获得了一组代表性图像,显示了正常人组织中的IL-4R α 和兔IgG(相应的同种型对照)染色(数据未显示)。

[0712] 总体而言,IL-4R α 在正常人体组织成分中呈阴性(无反应性)或低染色。当存在时,染色通常处于背景水平,强度为 $1+$ (H-评分 ≤ 50)。在正常乳腺和正常食道(包括肌肉)的导管中观察到低染色。在一些正常组织成分中观察到一些升高的IL-4R α 染色,包括与 $2+$ 强度的反应性(H-评分 ≥ 90),例如心脏中的心肌、肝脏中的肝细胞和胃中的腺泡细胞。这种染色可以反映IL-4R α 反应性的基础水平。兔IgG同种型匹配阴性对照在多正常TMA上运行,在所有测试的正常人体组织中均无反应。(数据未显示。)

[0713] 这种特异性测试表明IL-4R α 抗体和IHC检测主要对高于背景阈值的肿瘤细胞中的靶标具有特异性。在正常和肿瘤组织成分中,IL-4R α 偶尔会发生反应,通常处于低水平。

[0714] 实例2: IL-4受体作为成胶质细胞瘤的生物标志物和免疫治疗靶点:MDNA55(一种局部给药的IL-4引导的毒素)的初步证据

[0715] 该实例描述了使用IL-4受体(IL-4R)作为生物标志物来治疗IL-4引导的毒素。IL-4引导的毒素含有包含循环排列的白细胞介素4(cpIL-4)的肿瘤靶向结构域和包含假单胞菌外毒素A(PE)的催化结构域的肿瘤杀伤“细胞毒性”结构域;该构建体也称为MDNA55。

[0716] 该实例进一步描述了一项对52名复发性GBM患者的研究。研究分为四个阶段:

[0717] • 诊断:回顾性IL-4R表达分析;第1次或第2次复发时的GBM;KPS $\geq$ 70。

[0718] • 计划:MRI——肿瘤大小和位置;最佳导管轨迹。

[0719] • 治疗:影像引导置管;MDNA55分布实时监测;低剂量和高剂量队列。

[0720] • 随访:患者安全;存活;肿瘤反应;生活质量;功效与IL-4R表达的相关性。

[0721] 在当前的研究中没有归因于MDNA55的死亡。18-180 μ g剂量后无全身毒性。无临床显著的实验室异常。与药物相关的不良事件主要是神经系统/GBM特征的预先存在的神经功能缺损的恶化,并且通常可以通过标准措施进行控制。没有证据表明本研究中先前使用的两种MDNA55浓度(即1.5 μ g/mL x 60mL与3.0 μ g/mL x 60mL)和之前研究中探索的一系列更高浓度(高达15 μ g/mL)。如实例1和下文进一步详细描述,通过免疫组织化学(IHC)分析在首次诊断GBM时获得的存档组织的IL-4R α 表达。

[0722] 介绍

[0723] MDNA55正在开发用于治疗复发性/进行性多形性成胶质细胞瘤(GBM)。使用当前的治疗范例,大多数GBM患者在标准一线治疗后会出现肿瘤复发/进展。复发性GBM患者的治疗选择非常有限,结果通常不令人满意。具体而言,复发性或进展性GBM的化疗方案不成功,产生无益的毒性(Weller等人,2013)。这主要是由于缺乏组织特异性,对正常组织产生毒性,因此治疗指数较窄。由于总体存活率仍然很低,因此需要具有更高肿瘤特异性、更强大的细胞毒性机制和新型递送技术的新型抗癌方式来治疗复发性GBM。

[0724] MDNA55就是这样一种新型疗法,它提供了一种靶向治疗方法,通过这种方法,肿瘤细胞比正常细胞对药物的毒性作用更敏感。靶标IL-4R是开发癌症疗法的理想但未充分利用的靶标,因为它在各种人类癌症中频繁且强烈地表达。IL-4R在健康和正常细胞的表面的表达水平很低,但在癌细胞上却增加了数倍。大多数来自成人和小儿中枢神经系统(CNS)肿瘤的癌症活检和尸检样品,包括复发性GBM活检,已被证明过度表达IL-4R。在正常成人和小儿脑组织中几乎没有或没有IL-4R表达(Joshi等人,2001;表1)。

[0725] IL-4R的这种差异表达为MDNA55提供了广泛的治疗窗口。仅该特征就可使MDNA55成为治疗复发性GB和其他过度表达IL-4R的CNS肿瘤的理想候选物。不表达IL-4R靶标的细胞不与MDNA55结合,因此不受PE介导的影响。

[0726] 表13:成人和小儿脑肿瘤和正常脑中IL-4R表达的总结

[0727]

癌症类型	方法	活检样品 (N)	结果 (%阳性)	参考文献
脑肿瘤				
成人复发性 GB	IHC	25	96%	Merchant 等人(未发表的数据)
新诊断的 GB/复发性 GB (配对)	IHC	13 /14	93% / 93%	Merchant 等人(未发表的数据)
混合型成人胶质瘤	IHC	32	83% (GBM) 86% (星形细胞瘤)	Joshi 等人, 2001
成人 GBM	RT-PCR	21	76%	Puri 等人, 1996
混合型小儿胶质瘤	IHC	58	76%	Kawakami 等人, 2004
小儿 DIPG	IHC	17	71%	Berlow 等人, 2018
成髓细胞瘤	RT-PCR	5	100%	Joshi 等人, 2002
成人垂体腺瘤	RT-PCR	30	100%	Chen 等人, 2007
脑膜瘤	RT-PCR	35	77%	Puri 等人, 2005
正常大脑				
正常脑组织	IHC	3	0%	Joshi 等人, 2001
正常脑组织	RT-PCR	6	0%	Puri 等人, 1996a

[0728] MDNA55临床试验中的IL-4R分析

[0729] 作为MDNA55 2b期临床研究中生物标志物评估的一部分,正在对首次诊断GBM时获得的存档组织中的IL4受体(IL-4R)表达进行回顾性分析,以确定IL-4R生物标志物在治疗中的作用反应和患者结果,并帮助指导未来临床研究的潜在患者选择策略。为此,开发了一种基于免疫组织化学(IHC)的检测方法来检测存档的切除肿瘤组织/活检样品上的IL-4R α 生物标志物表达。该检测方法已经过验证,可在符合CLIA标准的单站点参考实验室(QualTek分子实验室,圣巴巴拉,加利福尼亚州)中使用。另请参见实例1。

[0730] 该测定使用针对IL-4R α 的兔多克隆抗体(Abcam, ab203398)。使用连续稀释的抗IL-4R α 对GBM组织和正常皮质(阴性对照)染色,评估抗体的范围和线性测试。测试了六种不同的抗体浓度以确定用于该测定的最佳浓度。使用一组正常人体组织以及来自组织库的GBM病例进行特异性和敏感性测试。

[0731] 基于验证测试,确定了评分方法:使用H-评分方法对每个GBM样品的IL-4R α 表达进行评分,该方法通过将肿瘤细胞的百分比与表达强度相加(3,3'-二氨基联苯胺的棕色染色,DAB)乘以其四点半定量量表(0、1+、2+、3+)上的相应强度来计算:

[0732] 使用H-评分方法对GBM样品的细胞质IL-4R α 反应性进行评分:H-评分=[(<1下的%)x0]+[(1+下的%)x1]+[(2+下的%)x2]+[(3+下的%)x3]。使用这种方法,H-评分范围从0到300,IL-4R表达水平分类如下:

[0733] • H-评分从0到75=不表达到低表达

[0734] • H-评分从76到150=中等表达

[0735] • H-评分从151到225=高表达

[0736] • H-评分从226到300=极高表达

[0737] IL-4R阴性=H-评分 $\leq$ 75;IL-4R阳性=H-评分>75

[0738] 图10显示了GBM组织中不同水平的IL-4R表达的代表性图像。

[0739] 在当前的研究中,中高H-评分(H-评分>75)与低H-评分(H-评分≤75)受试者之间基线参数的比较通常是匹配良好的,除了中等/高H-评分与较短的复发时间相关(图17)。

[0740] 由于IL-4R表达与更具侵袭性的疾病和较差的临床结果相关(Kohanbash等人,2013;Han和Puri,2018),因此在具有中/高H-评分的受试者中观察到的从初始诊断到复发的时间较短在我们的研究与已发表的研究结果一致。

[0741] IL-4R状态的总体存活率

[0742] 当评估IL-4R H-评分与总存活率时,中/高H-评分(H-评分>75)的受试者显示出比低H-评分(H-评分≤75;mOS=8.5个月)的受试者更长的存活期趋势(mOS=15.2个月)(图19)。与具有低H-评分的受试者相比,具有中至高H-评分的受试者在6、9和12个月时的存活率也更高(表14)。

[0743] 表14.根据IL-4R H-评分当前研究中受试者的存活率

[0744]	IL-4R H-评分(范围 0-300)	mOS (n=24)	OS-6 (n=24)	OS-9 (n=24)	OS-12 (N=21)
	0 - 75	8.5 个月	73%	36%	30%
	> 75	15.2 个月	100%	69%	55%

[0745] IL4-R状态的无进展存活期

[0746] 当评估具有PFS的IL-4R H-评分时,具有中/高H-评分的受试者比具有低H-评分(mPFS=1.9个月)的受试者显示出更长PFS(mPFS=3.7个月)的趋势(图22)。具有中至高H-评分的受试者在6、9和12个月时的PFS率也更高(表15)。

[0747] 表15.根据IL-4R H-评分当前研究中受试者的PFS率

[0748]	IL-4R H-评分(范围 0-300)	mPFS (n=24)	PFS-6 (n=24)	PFS-9 (n=24)	PFS-12 (n=21)
	0 - 75	1.9 个月	36% (n=11)	0% (n=11)	0% (n=10)
	> 75	3.7 个月	44% (n=13)	35% (n=13)	27% (n=11)

[0749] 总结和结论

[0750] 复发性GBM患者的治疗选择非常有限,并且阳性结果仍然非常罕见。IL-4R在多种人类癌症(包括GBM)上频繁且强烈表达,并且与侵袭性疾病和较差的存活结果相关。MDNA55是一种新型的靶向IL-4R的融合毒素,经由MRI引导的对流增强递送进行瘤内给药,作为复发性GBM的单一治疗方法。有早期证据表明低剂量MDNA55具有临床益处,尤其是在MDNA55治疗后显示出令人印象深刻的存活结果的IL-4R阳性受试者中。作为最初的方法,H-评分截止点是根据实际情况确定的,随着治疗数据集的扩展和成熟,可能需要进行调整以最好地与MDNA55治疗的治疗益处相关联。因此,IL-4R可作为复发性GBM的合理生物标志物和免疫治疗靶点。

[0751] 它对肿瘤细胞有很强的毒性,同时清除肿瘤微环境(TME),并经由对流增强递送(CED)绕过BBB。

[0752] >200例患者活检分析显示IL-4R过度表达(Joshi BH等人《癌症研究(Cancer

Res)》2001;61:8058-8061;Puri RK等人,《癌症研究 (Cancer Res)》1996;56:5631-5637; Kawakami M等人,《癌症 (Cancer)》.2004年9月1日;101 (5):1036-42;Berlow NE等人.PLoS One.2018年4月5日;13 (4):e0193565;Joshi BH等人《英国癌症杂志 (British J of Cancer)》(2002) 86,285-291;Chen L等人,《神经科学通讯 (Neurosci Lett.)》2007年4月24日;417 (1):30-5;以及Puri S等人,《癌症 (Cancer)》.2005年5月15日;103 (10):2132-42)。76%的成胶质细胞瘤;>83%的混合型成人神经胶质瘤,76%的混合型小儿神经胶质瘤;71%小儿DIPG;100%成神经管细胞瘤;100%成人垂体腺瘤;77%的脑膜瘤;以及0%的正常脑组织。

[0753] IL-4R的存在预示着GBM(成胶质细胞瘤)的存活率低,例如参见Han J.和Puri R.J的《神经肿瘤学 (Neuro-Oncology)》(2018) 136:463-47。

[0754] TME浸润的MDSC表达IL-4R并预测GBM中的不良存活率,例如,参见Kamran N等人,(2017).《分子治疗 (Mol Ther)》25:232-248和Otvos B等人,(2016).《干细胞 (Stem Cells)》34:2026-2039。

[0755] 目前用于GBM和其他表达IL-4R的肿瘤的疗法没有解决关键挑战,例如下面提供的那些,并且解决了本实例中提供的IL-4构建体。

[0756] 表16:挑战

[0757]	治疗挑战	MDNA55 的基本原理
	55%的 GBM 具有 Temodar 抗性 1	MDNA55 靶向 Temodar 抗性肿瘤 3
	免疫抑制性肿瘤微环境 (TME) 占 GBM 肿瘤块的 40% ²	IL-4R 在 GBM 及其 TME (骨髓源性抑制细胞) 中过度表达, 但不在正常大脑中过度表达 4
	血脑屏障 (BBB) 阻止治疗药物向肿瘤的转运	通过 CED 输注 MDNA55 递送绕过 BBB
	由于 BBB 会引起全身毒性, 因此需要高剂量	精准给药无需全身暴露即可实现高剂量

[0758] 1.Hegi ME (2005).《新英格兰医学杂志 (N Engl J Med)》;352 (10):997-1003。

[0759] 2.Kennedy B等人 (2013).《肿瘤学杂志 (J Oncol.)》Vo;2013:486912。

[0760] 3.Shimamura等人 (2007).《癌症研究 (Cancer Res)》;67:9903-9912。

[0761] 4.Kohanbash等人 (2013).《癌症研究 (Cancer Res.)》;73 (21):6413-23。

[0762] 复发性GBM患者的治疗选择非常有限,并且阳性结果仍然非常罕见。

[0763] IL-4R在多种人类癌症(包括GBM)上频繁且强烈表达,并且与侵袭性疾病和较差的存活结果相关。

[0764] MDNA55是一种新型的靶向IL-4R的融合毒素,通过MRI引导的对流增强递送进行瘤内给药,作为复发性GBM的单一治疗方法。

[0765] 有早期证据表明低剂量MDNA55的临床益处和存活率提高。

[0766] IL-4R+受试者在MDNA55治疗后显示出令人印象深刻的存活结果。

[0767] IL-4R可作为复发性GBM的生物标志物和免疫治疗靶点。

[0768] 参考文献:

[0769] Berlow NE,Svalina MN,Quist MJ,Settelmeyer TP,Zherebitskiy V,Kogiso M,Qi L,Du Y,Hawkins CE,Hulleman E,Li XN,Gultekin SH,Keller C.《IL-13受体作为弥漫性内源性脑桥胶质瘤的可能治疗靶点。(IL-13 receptors as possible therapeutic

targets in diffuse intrinsic pontine glioma.)》PLOS One.2018年4月5日;13(4):e0193565。

[0770] Chen L,Liu Y,Hou Y,Kato Y,Sano H,Kanno T.《白细胞介素4受体(IL-4R)复合物在侵袭性垂体腺瘤中的表达和结构(Expression and structure of interleukin 4 receptor(IL-4R) complex in human invasive pituitary adenomas.)》《神经科学通讯(Neurosci Lett.)》2007年4月24日;417(1):30-5.电子版2007年3月2日。

[0771] Han J和Puri RK.《对癌症基因组图谱(TCGA)数据库的分析确定了白细胞介素13受体 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 基因表达与多形性成胶质细胞瘤患者预后不良和耐药性之间的反比关系(Analysis of the cancer genome atlas(TCGA) database identifies an inverse relationship between interleukin-13 receptor $\alpha 1$ and $\alpha 2$ gene expression and poor prognosis and drug resistance in subjects with glioblastoma multiforme.)》《神经肿瘤学杂志(J Neurooncol.)》2018年2月;136(3):463-474。

[0772] Joshi BH,Leland P,Asher A,Prayson RA,Varricchio F,Puri RK.《白细胞介素4(IL-4)受体在人类脑肿瘤中的原位表达和重组IL-4细胞毒素在原代成胶质细胞瘤细胞培养中的细胞毒性(In situ expression of interleukin-4(IL-4) receptors in human brain tumors and cytotoxicity of a recombinant IL-4 cytotoxin in primary glioblastoma cell cultures.)》《癌症研究(Cancer Res)》2001;61:8058-8061。

[0773] Joshi BH,Leland P,Silber J,Kreitman RJ,Pastan I,Berger M,Puri RK.《人类成神经管细胞瘤上的IL-4受体作为环状排列的IL-4假单胞菌外毒素融合蛋白的敏感靶标(IL-4 receptors on human medulloblastoma tumours serve as a sensitive target for a circularly permuted IL-4-Pseudomonas exotoxin fusion protein.)》《英国癌症杂志(British Journal of Cancer)》(2002) 86,285-291。

[0774] Kawakami M,Kawakami K,Puri RK.《白细胞介素4假单胞菌外毒素嵌合融合蛋白用于恶性胶质瘤治疗(Interleukin-4-Pseudomonas exotoxin chimeric fusion protein for malignant glioma therapy.)》《神经肿瘤学杂志(J Neurooncol.)》2003年10月;65(1):15-25。

[0775] Kohanbash G,McKaveney K,Sakaki M,Ueda R,Mintz AH,Amankulor N,Fujita M,Ohlfest JR,Okada H.《GM-CSF通过IL-4受体 α 促进胶质瘤浸润髓细胞的免疫抑制活性(GM-CSF promotes the immunosuppressive activity of glioma-infiltrating myeloid cells through interleukin-4 receptor- α .)》《癌症研究(Cancer Res.)》2013年11月1日;73(21):6413-23。

[0776] Lewis O,Woolley M,Johnson D等人《慢性、间歇性对流增强递送装置(Chronic, intermittent convection-enhanced delivery devices.)》《神经科学方法杂志(J Neurosci Methods.)》2016年2月1日;259:47-56。

[0777] Puri RK,Hoon DS,Leland P,Snoy P,Rand RW,Pastan I和Kreitman RJ.《用于治疗恶性星形细胞瘤的含有循环排列的白细胞介素4和截短假单胞菌外毒素的重组毒素的临床前开发(Preclinical development of a recombinant toxin containing circularly permuted interleukin 4 and truncated Pseudomonas exotoxin for therapy of malignant astrocytoma.)》《癌症研究(Cancer Res)》1996;56:5631-5637。

[0778] Puri S, Joshi BH, Sarkar C, Mahapatra AK, Hussain E, Sinha S.《白细胞介素4受体在原发性脑膜肿瘤中的表达及结构 (Expression and structure of interleukin 4 receptors in primary meningeal tumors.)》《癌症 (Cancer.)》2005年5月15日;103(10):2132-42。

[0779] Vogelbaum MA, Brewer C, Barnett GH等人《克利夫兰多端口导管在复发性高级别胶质瘤中对流增强递送拓扑替康的首次人体评估:试点试验1的结果 (First-in-human evaluation of the Cleveland Multiport Catheter for convection-enhanced delivery of topotecan in recurrent high-grade glioma: results of pilot trial 1.)》《神经外科杂志 (J Neurosurg.)》2018年4月1:1-10。

[0780] Weller M, Cloughesy T, Perry J, Wick W.《治疗复发性胶质细胞瘤的护理标准——我们达到了吗? (Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma—are we there yet?)》《神经肿瘤学 (Neuro-Oncology)》15(1):4-27, 2013。

[0781] 实例3:来自MDNA55的2B期复发性胶质细胞瘤试验的临床数据——IL-4R阳性患者出现强烈的中期存活趋势 (15.2个月对8.5个月)

[0782] 本实例描述了其正在进行的MDNA55治疗复发性胶质细胞瘤 (“rGBM”) 的2b期试验的中期数据。MDNA55是一种融合蛋白,旨在靶向II型白细胞介素4受体 (由IL-4R α 和IL-13R α 1组成),这是一种在大多数GBM患者中过度表达但在健康大脑中不表达的生物标志物。具有阳性2型IL-4R特征的GBM患者的预后通常比总体胶质细胞瘤群体更差,包括长期存活率差。结果显示了临床获益的有希望的迹象,特别是在具有侵袭性GBM的复发患者中。

[0783] MDNA55提供了令人印象深刻的延长存活期,尤其是在IL-4R阳性肿瘤中,这是一种在脑癌和肿瘤微环境中高度表达的标志物,并且已知与侵袭性疾病有关。鉴于该人群总体预后不佳和对当前治疗的反应,目前使用低剂量MDNA55治疗的试验参与者的临床获益证据为rGBM患者提供了希望。

[0784] 结果总结

[0785] 在低剂量MDNA55治疗后,IL-4R阳性组的中位总存活期 (“mOS”) 显著增加,为15.2个月,而IL-4R阴性组为8.5个月。在IL-4R阳性组和阴性组中,6、9和12个月的存活率分别为100%、67%和55%对73%、40%和30%。

[0786] 不考虑IL-4R表达,所有患者在低剂量MDNA55单次治疗后mOS为11.8个月,6个月时的总存活率为89%,9个月时为59%,12个月时为46%,显著超过rGBM获批药物的标志性的mOS和存活率 (阿瓦斯汀和洛莫司汀的mOS为8个月,并且6、9和12个月的存活率分别为62%、38%、26%和65%、43%、30%)。(Taal等人,《柳叶刀肿瘤学 (Lancet Oncol)》2014年8月;15(9):943-53)。

[0787] 在上述参与者中,与IL-4R低表达或无表达 (16.7个月) 的患者相比,IL-4R阳性肿瘤患者在初步诊断为GBM后显示出更快的复发时间 (10.3个月),支持了已发表的研究表明2型IL-4R是更具侵袭性的GBM形式的关键生物标志物。(Kohanbash G, McKaveney K, Sakaki M, Ueda R, Mintz AH, Amankulor N, Fujita M, Ohlfest JR, Okada H.《GM-CSF通过IL-4受体- α 促进胶质瘤浸润髓细胞的免疫抑制活性 (GM-CSF promotes the immunosuppressive activity of glioma-infiltrating myeloid cells through interleukin-4 receptor- α .)》《癌症研究 (Cancer Res.)》2013年11月1日;73(21):6413-23;以及Han J和Puri RK.

《对癌症基因组图谱 (TCGA) 数据库的分析确定了白细胞介素13受体 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 基因表达与多形性成胶质细胞瘤患者预后不良和耐药性之间的反比关系 (Analysis of the cancer genome atlas (TCGA) database identifies an inverse relationship between interleukin-13 receptor $\alpha 1$ and $\alpha 2$ gene expression and poor prognosis and drug resistance in subjects with glioblastoma multiforme.)》《神经肿瘤学杂志 (J Neurooncol.)》2018年2月;136 (3):463-474)。

[0788] 这些初步数据显示, IL-4R阳性表达的MDNA55治疗受试者的中位存活期更长, 这非常令人鼓舞, 可以帮助确定哪些受试者将从MDNA55治疗中获得最佳治疗益处。随着我们试验的后半部分继续以更高剂量的MDNA55招募, 预计将有更多数据支持IL-4R作为rGBM的重要生物标志物和免疫治疗靶点, 并改善接受MDNA55治疗的受试者的获益-风险状况获得。MDNA55的安全性和耐受性通常保持在先前研究中确定的范围内。

[0789] MDNA55-05临床试验

[0790] MDNA55-05是一项针对MDNA55 (一种IL-4R定向毒素) 的46名受试者开放标签研究, 用于在化疗或没有化疗的情况下并且在停止任何先前的标准或研究治疗线之后治疗 (包括手术和放疗) 后首次或第二次复发/复发 (包括本次复发) 的原发性 (新发) GBM患者。在这项研究中, 研究人员使用一种称为对流增强递送 (CED) 的技术将MDNA55直接注入脑肿瘤一次。CED允许将MDNA55直接精确递送到含有浸润性肿瘤细胞的肿瘤组织和周围的健康大脑中, 同时避免暴露于身体的其他部位。通过免疫组织化学对首次诊断时获得的GBM组织进行回顾性分析, 以确定IL-4R α 的表达。活检样品根据IL-4R α 表达水平 (高或低) 进行分类, 并与存活结果进行比较。研究设计概要如图23A所示。参加临床研究的患者人口统计显示在图23B中。

[0791] MDNA55给药剂量范围为18-240 μ g。在患者中评估了MDNA55的安全性, 最大耐受剂量确定为240 μ g。没有死亡归因于MDNA55; 未发现全身毒性; 未发现有临床意义的实验室异常; 并且MDNA55相关的不良事件主要是神经系统/GBM特征的预先存在的神经功能缺损的恶化, 并且通常可以通过标准措施进行控制。

[0792] 在给药MDNA55后测量患者存活率。如图24A所示, 前40名登记患者的中位总存活期 (mOS) 为11.6个月。12个月存活率 (OS-12) 为45%。还评估了40名患者中的36名的IL-4R表达。如图24B中所示, 与具有低IL-4R表达的患者相比, 具有高IL-4R表达的患者存活率提高。高IL-4R患者的mOS为15个月, 并且OS-12为52%。低IL-4R患者的mOS为8.4个月, 并且OS-12为33%。数据截点为2019年10月31日。

[0793] O6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶 (MGMT) 基因启动子甲基化状态也在前40名入组患者中的36名中进行了评估。发现MGMT基因启动子甲基化18例, MGMT基因启动子未甲基化20例。MGMT基因启动子甲基化状态对MDNA55处理后的存活率没有显著影响 (图25A)。此外, 在具有未甲基化MGMT基因启动子的20名患者中的18名中评估了IL-4R表达水平。如图25B所示, 与具有未甲基化MGMT和低IL-4R表达水平的患者相比, 具有未甲基化MGMT但具有高IL-4R表达水平的患者显示出显著提高的存活率。

[0794] 一些参加临床试验的患者在MDNA55治疗期间使用了类固醇。在39名患者中, 19名使用高于4mg/天的类固醇, 20名使用低于或等于4mg/天的类固醇。如图26A所示, 在MDNA55治疗后, 较低的类固醇使用 (例如, $<$ 或 $=$ 4mg/天) 与较长的存活期相关。在使用 $<$ 或 $=$ 4mg/天

的类固醇的20名患者中,与具有低IL-4R表达水平的患者相比,具有高IL-4R表达水平的患者显示出提高的存活率(图26B)。

[0795] MDNA55治疗后的反应时间线因患者而异。图27、图28和图29显示了在用MDNA55治疗后示例性的早起或晚起反应。50%-82%的用MDNA55治疗的患者显示出缩小或稳定的肿瘤体积(图30至图31)。此外,肿瘤体积缩小和稳定与更高的存活率相关(图32A至图32B)。

[0796] 总体而言,与包括替莫唑胺(TMZ)、卡莫司汀(商品名Gliadel®)、洛莫司汀(LOM)、贝伐珠单抗(商品名Avastin®)在内的现有疗法相比,MDNA55在治疗GBM(包括复发性GBM)患者方面具有更好的疗效,尤其是对表达高水平的IL-4R的GBM患者而言(图33A至图33B)。此外,MDNA55与低剂量类固醇联合使用可有效治疗GBM(包括复发性GBM)患者。

[0797] 提供上述实例以向本领域中的技术人员给出如何实施和使用本发明的组合物、系统和方法的实施方案的完整公开和说明,并非意图限制发明人对于他们的发明的主张范围。用于实施本发明的上述模式的修改为熟练的技术人员所显见,并且意图属于以下权利要求范围之内。本说明书中所提及的所有专利和出版物指示本发明所属领域的技术人员的水平。本公开中引用的所有参考文献通过引用并入,其程度如同每个参考文献已经以全文引用的方式单独地并入。

[0798] 使用所有标题和章节命名仅仅是出于清楚和参考的目的并且不应当被认为是以任何方式进行限制。举例而言,本领域中的技术人员应了解根据本文所述的本发明的精神和范围按需要组合来自不同标题和章节的各种方面的有用性。

[0799] 本文所引证的所有参考文献都以引用的方式且出于所有目的完整并入本文中,犹如个别公布或专利或专利申请特别且个别明示出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0800] 如本领域中的技术人员显而易见,在不背离本申请的精神和范围的情况下可对其进行许多修改和变化。本文所述的特定实施方案和实例仅以示例方式提供,并且本申请仅由随附权利要求的术语以及权利要求有权主张的等效物的全部范围限制。

a	IL-13Rα1 结合常数															IL-13Rα2 结合常数						
	10	11	14	18	86	87	88	89	101	104	105	107	108	K1 (M-1s-1)	K-1 (s-1)	KD (动力学)	KD (eq)	K1 (M-1s-1)	K-1 (s-1)	KD (动力学)	KD (eq)	
IL-13	L	R	I	V	I	K	G	T	K	L	H	R	A	M	5.21E+06	2.20E-02	4.38 nM	-	5.00E+07	8.40E-05	0.001 nM	-
A5		I		I	K	G	S								2.80E+06	8.20E-03	2.94 nM	-	-	-	50 nM	
A6	I		L	L	M	K	S			H	R	A			1.77E+06	3.30E-03	1.9 nM	-	1.07E+07	2.80E-03	0.267 nM	-
A7	I		I	I		G	S			H	R	A			2.90E+06	3.40E-03	1.18nM	-	1.80E+07	4.10E-03	0.218 nM	-
A8	I		I	I		S	S	R		H	R	T			1.64E+06	3.30E-03	2.061 nM	-	1.01E+07	2.60E-03	0.263 nM	-
A11	V			I		S	S			F	R	T			1.64E+07	1.30E-03	0.084 nM	-	1.62E+07	6.00E-03	0.391 nM	-
B2			I	T	G	S				Y	R	A			6.30E+06	1.70E-03	0.275 nM	-	7.80E+06	1.00E-02	1.5 nM	-
B4		S		I	K	G	S	M		Y	R	T			1.36E+06	2.40E-02	18 nM	-	-	-	108 nM	53 nM
B6	T		I			G	S	K	Y	R	T			1.40E+06	8.20E-03	5.9 nM	-	-	-	-	-	-
C2	D	I		I	K	K		R					K		-	-	-	4000 nM	6.60E+06	1.50E-04	0.025 nM	-
C3	A				T	G	K	R	N	R	A		K		-	-	-	15000 nM	6.00E+06	2.00E-03	0.379 nM	-
C4	V							R	N		E		T		-	-	-	35000 nM	1.94E+06	7.64E-04	0.393 nM	-
C7		S	M				S		N		A	K			-	-	-	35000 nM	2.10E+06	5.70E-04	0.272 nM	-
C9	H	L	I	I	K	E		R	N		T		K		-	-	-	31000 nM	2.03E+06	5.29E-04	0.259 nM	-
C10	H	L		I	M			R					K		-	-	-	264 nM	1.19E+06	6.10E-03	5 nM	-
C11	H				T	G	R						K		-	-	-	3600 nM	6.41E+06	9.18E-07	0.0001 nM	-
C12	H				M		S	R	N	R	A		K		-	-	-	15000 nM	7.61E+06	4.04E-04	0.053 nM	-
D7	A		F	K	K			R	I	R			K		-	-	-	4100 nM	1.77E+07	5.37E-05	0.003 nM	-

IL-13Rα1 特异性

IL-13Rα2 特异性

图1

图2A

CH2																																				
EU 指数	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257															
IgG1	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P															
IgG2	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P															
IgG3	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P															
IgG4	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P															
EU 指数	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278															
IgG1	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	V	Y															
IgG2	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	Q	F	N	V	Y															
IgG3	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	Q	F	N	V	Y															
IgG4	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	Q	E	D	P	E	V	Q	F	N	V	Y															
EU 指数	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299															
IgG1	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T															
IgG2	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	F	N	S	T															
IgG3	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T															
IgG4	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	F	N	S	T															
EU 指数	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320															
IgG1	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	V	L	N	G	K	E	Y	K															
IgG2	F	R	V	V	S	V	L	T	V	Y	H	Q	D	V	L	N	G	K	E	Y	K															
IgG3	F	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	V	L	N	G	K	E	Y	K															
IgG4	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	V	L	N	G	K	E	Y	K															
EU 指数	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340																
IgG1	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K																
IgG2	C	K	V	S	N	K	Q	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	T	K																
IgG3	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	T	K																
IgG4	C	K	V	S	N	K	Q	L	P	S	S	I	E	K	T	I	S	K	A	K																
CH3																																				
EU 指数	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361															
IgG1	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	D	E	L	T	K	N															
IgG2	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N															
IgG3	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N															
IgG4	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	Q	E	E	M	T	K	N															
EU 指数	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382															
IgG1	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	V	E															
IgG2	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	V	E															
IgG3	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	V	E															
IgG4	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	V	E															
EU 指数	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403															
IgG1	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S															
IgG2	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	M	L	D	S	D	G	S															
IgG3	S	S	G	Q	P	E	N	N	Y	N	T	T	P	P	M	L	D	S	D	G	S															
IgG4	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S															
EU 指数	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424															
IgG1	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	V	Q	Q	G	N	V	F	S															
IgG2	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	V	Q	Q	G	N	V	F	S															
IgG3	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	V	Q	Q	G	N	I	F	S															
IgG4	F	F	L	Y	S	R	L	T	V	D	K	S	R	V	Q	E	G	N	V	F	S															
EU 指数	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445															
IgG1	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P															
IgG2	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P															
IgG3	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	R	F	T	Q	K	S	L	S	L	S	P															
IgG4	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	L															
EU 指数	446	447																																		
IgG1	Q	K																																		
IgG2	Q	K																																		
IgG3	Q	K																																		
IgG4	Q	K																																		

派姆单抗（抗PD1 hlgG4） 类别 可变更 （vh）结构域 全长 HC	序列	SEQ ID NO:
	EVQLVSGGGFVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQNPERRLVWATITGGGRNTYYPDVSVKGRFTIS RDNAKNTLYLQMSSLRSEDTAMYYCTRQYDGYTWFAWGGQTLTVSS	
	EVQLVSGGGFVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQNPERRLVWATITGGGRNTYYPDVSVKGRFTIS RDNAKNTLYLQMSSLRSEDTAMYYCTRQYDGYTWFAWGGQTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKV DKRVESKYGPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSEQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	DIVLTQSPSTSLAVSLGQRATISCRASEVDNSGISFMNWFQQKPGQPPKLLIYAASNPGSGVPARFSGSGGT DFSLNIHPMEEDDTAMFYCQQSKKEVPWTFGGGTELEIKR	
	DIVLTQSPSTSLAVSLGQRATISCRASEVDNSGISFMNWFQQKPGQPPKLLIYAASNPGSGVPARFSGSGGT DFSLNIHPMEEDDTAMFYCQQSKKEVPWTFGGGTELEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
派姆单抗（来自 WO2016028656 的抗PD1） 类别 全长 HC （来自 WO2016028656 的SEQ ID NO:33） 全长轻链 （来自 WO2016028656 的SEQ ID NO:34）	序列	SEQ ID NO:
	QVQLVQSGVEVKPGASVKVSKCASGYFTFTNYMYWVRQAPGQGLEWMGINPSNGGTNFKNKRVTL TTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTK VDKRVESKYGPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSEQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEE E	
	MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYASYLESGVPARFSGSGSGT DFTLTISLLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	

图3A

纳武单抗（抗PD1 hlgG4）	
类别	序列
可变量	QVQLVESGGGVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTI
(vh) 结构域	SRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATND ~~DD~~ YWGQGLTVTSS
	QVQLVESGGGVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTI
全长 HC	SRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATND ~~DD~~ YWGQGLTVTSSASTKGPSVFFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
	KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGTKTYTCNV ~~DK~~ PSNTKVDKRVESK
可变量	YGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
	EQFNSTYRVVSVLT ~~VL~~ HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL
(vl) 结构域	TCLVKGYFSPDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY
	TQKSLSLSLGK
全长轻链	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASN ~~RAT~~ GIPARFSGSGSGTDFTL
	TISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKR
可变量	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASN ~~RAT~~ GIPARFSGSGSGTDFTL
	TISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN ~~NF~~ YPREAKV
的SEQ ID NO:35	QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS ~~TY~~ SLSS ~~TL~~ TL ~~SKAD~~ YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
纳武单抗（来自 WO2016028656 的抗PD1）	
类别	序列
全长重链	QVQLVESGGGVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTI
(来自 WO2016028656 的SEQ ID NO:35)	SRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATND ~~DD~~ YWGQGLTVTSSASTKGPSVFFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
	KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGTKTYTCNV ~~DK~~ PSNTKVDKRVESK
全长轻链	YGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
	EQFNSTYRVVSVLT ~~VL~~ HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL
(来自 WO2016028656 的SEQ ID NO:36)	TCLVKGYFSPDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY
	TQKSLSLSLGK
全长轻链	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASN ~~RAT~~ GIPARFSGSGSGTDFTL
	TISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN ~~NF~~ YPREAKV
的SEQ ID NO:36)	QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS ~~TY~~ SLSS ~~TL~~ TL ~~SKAD~~ YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图3B

西米普利单抗 (REGN2810; 抗PD1)		SEQ ID NO:
类别	序列	
可变速 (vh)	EVQLLESGGVLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFGMTWVRQAPGKGLEWVSGISGGGRDITYF	
结构域	ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKGEDTAVYYCVKWNIGNIYFDYWGGGTLVTVSS	
(来自 US20170174779)		
的SEQ ID NO:1)		SEQ ID NO:
可变速 (vl) 结构域	DIQMTQSPSSLSASVGDSTITTCRASLSINTFLNWIYQQKPGKAPNLLIYAASSLHGGVPS	
(来自 US20170174779)	RFSGSGGTDFLTIRTLQPEDFATYYCQQSSNTPFTFGPGTVVDFR	
的SEQ ID NO:2)		
西米普利单抗 (REGN2810; 抗PD1)		SEQ ID NO:
类别	序列	
全长重链	EVQLLESGGVLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFGMTWVRQAPGKGLEWVSGISGGGRDITYFADSVKGRFTIS	
(来自 US20170174779)	RDNSKNTLYLQMNSLKGEDTAVYYCVKWNIGNIYFDYWGGGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAAL	
的SEQ ID NO:9)	GCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPVSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKR	
	VESKYGPPCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSEQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT	SEQ ID NO:
	KPREEQFNSTYRWVSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN	
	QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL	
	HNHYTQKSLSLGLK	
	DIQMTQSPSSLSASVGDSTITTCRASLSINTFLNWIYQQKPGKAPNLLIYAASSLHGGVPSRFGSGGTDFTLTI	
全长轻链	RTLQPEDFATYYCQQSSNTPFTFGPGTVVDFRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQ	SEQ ID NO:
(来自 US20170174779)	WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
的SEQ ID NO:10)		

图3C

来自 W02017100541 (Medimmune, LLC; 以及US20170306025; 德瓦鲁单抗)	
类别	序列
重链	SEQ ID NO: 1
(来自 W02017100541 的SEQ ID NO:2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDQSEKYYVDSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGLTVTVSS
轻链	SEQ ID NO: 2
(来自 W02017100541 的SEQ ID NO:1)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPEDFAVYYCQYQYGSPLPWTFGGQGTKVEIK
来自 US20170281764 (JN Biosciences)	
类别	序列
重链	SEQ ID NO: 3
(来自 US2017281764 的SEQ ID NO:34)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWAWISPYGGSTYYADSVKGR FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCSMHEALHNYHTQKSLSPG DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCQYLFPTPTFGGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEHKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
轻链	SEQ ID NO: 4
(来自 US2017281764 的SEQ ID NO:36)	

图4A

来自 WO2015009856 (GENENTECH, INC和IF. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 类别 重链 (来自 WO2015009856 的SEQ ID NO:23)	SEQ ID NO: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGR FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTSA
轻链 (来自 WO2015009856 的SEQ ID NO:24)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCQQLYHPATFGGQTKVEIKR
来自 WO2015009856 (GENENTECH, INC和IF. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 类别 重链 (来自 WO2015009856 的SEQ ID NO:40)	SEQ ID NO: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWV A WISPYGG STYY ADSVKGRFTISADTSKNTA YLQMNSLRAEDTA VYYCARRHWPGGFDYWGQG TLTVTSSASTK
轻链 (来自 WO2015009856 的SEQ ID NO:24)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTA VA WYQQKPGKAPKLLIYSASF L YSG VPSRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDF ATYYCQQL YHPATFGGQTKVEIKR
来自 WO2015009856 (GENENTECH, INC和IF. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 类别 重链 (来自 WO2015009856 的SEQ ID NO:41)	SEQ ID NO: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGG STYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARRHWPGGFDYWGQG TLTVTSS
轻链 (来自 WO2015009856 的SEQ ID NO:24)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCQQLYHPATFGGQTKVEIKR

图4B

来自 US20160222117 (GENENTECH, INC.) 类别 重链 (来自 US20160222117 的SEQ ID NO:20)	SEQ ID NO: EVQLVESCGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGR FTISRDTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLVTVSA
重链 (来自 US20160222117 的SEQ ID NO:23)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGR FTISRDTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLVTVSA
重链 (来自 US20160222117 的SEQ ID NO:24)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGSWIHWRQAPGKGLEWVAWILPYGGSSYYADSVKGR FTISRDTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLVTVSA
来自 US20160222117 (GENENTECH, INC.) 类别 轻链 (来自 US20160222117 的SEQ ID NO:21)	SEQ ID NO: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLHPATFGQGTKVEIKR
轻链 (来自 US20160222117 的SEQ ID NO:26)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQYINVPWTFGQGTKVEIKR
轻链 (来自 US20160222117 的SEQ ID NO:27)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQYAPPWTFGQGTKVEIKR

图4C

来自 US20160222117 (GENENTECH, INC.)		SEQ ID NO:
类别	序列	
轻链		
(来自 US20160222117		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGT
的SEQ ID NO:28)		DFTLTISLQPEDFATYCCQQYTVPTFGGQGTKVEIKR
轻链		
(来自 US20160222117		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVINTFLAWYQQKPGKAPKLLIYSASTLASGVPSRFSGSGSGTD
的SEQ ID NO:29)		FTLTISLQPEDFATYCCQQYTVPTFGGQGTKVEIKR
轻链		
(来自 US20160222117		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGT
的SEQ ID NO:30)		DFTLTISLQPEDFATYCCQQYGVPTFGGQGTKVEIKR
轻链		
(来自 US20160222117		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGT
的SEQ ID NO:31)		DFTLTISLQPEDFATYCCQYLFPTPTFGGQGTKVEIKR
轻链		
(来自 US20160222117		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGT
的SEQ ID NO:32)		DFTLTISLQPEDFATYCCQQYFPTPTFGGQGTKVEIKR
轻链		
(来自 US20160222117		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGT
的SEQ ID NO:33)		DFTLTISLQPEDFATYCCQQYTPPTFGGQGTKVEIKR
轻链		
(来自 US20160222117		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGT
的SEQ ID NO:34)		DFTLTISLQPEDFATYCCQFFYTPPTFGGQGTKVEIKR
来自 WO2013079174 (Merck; 阿维单抗或A09-246-2)		SEQ ID NO:
类别	序列	
重链		
(来自 WO2013079174		EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFT
的SEQ ID NO:32)		ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCARIKLGTVTVDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
		GGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
		PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVDVSHEDPEVKF
		NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
		EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFFLYSKLTVDK
		SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
轻链		
(来自 WO2013079174		QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSK
的SEQ ID NO:33)		SGNTASLTISGLQAEADYYCSSYTSSTRVFGTGKTVTLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVC
		LISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKNKYAASSYLSTPEQWKSHRSYSQCQVTHEGSTV
		EKTVAPTES

图4D

来自 US20160222117 (GENENTECH, INC.) 类别		SEQ ID NO:
轻链		
(来自 US20160222117 的SEQ ID NO:35)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYCCQSLFTPPTFGQGTKVEIKR	
轻链		
(来自 US20160222117 的SEQ ID NO:36)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYCCQSLYTPPTFGQGTKVEIKR	
轻链		
(来自 US20160222117 的SEQ ID NO:37)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYCCQSWYHPPTFGQGTKVEIKR	
轻链		
(来自 US20160222117 的SEQ ID NO:38)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYCCQYFYIPPTFGQGTKVEIKR	
轻链		
(来自 US20160222117 的SEQ ID NO:39)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYCCQYWYTPYTFGQGTKVEIKR	
轻链		
(来自 US20160222117 的SEQ ID NO:40)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYCCQSYFIPPTFGQGTKVEIKR	

图4E

来自 US8217149 (Hoffman La Roche; 阿特殊单抗)	SEQ ID NO:
类别	
重链 (VH)	
(来自 US8217149 的SEQ ID NO:20)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGR FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYVCARRHWPGGFDYWGQGLVTVSA
轻链 (VL)	
(来自 US8217149 的SEQ ID NO:21)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKGKAPKWKYSASFLYSGVPSRFSGSGGTD FTLTISLQPEDFATYYC QQYL YH PATFGQGTKVEIKR
阿特殊单抗 (交替序列)	
类别	
重链	
(来自 IMGT数据库或 DrugBank数据库)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGR FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYVCARRHWPGGFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
轻链	
(来自 IMGT数据库或 DrugBank数据库)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGGT DFTLTISLQPEDFATYYCQQYL YHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVWCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

图4F

用作溶瘤剂的腺病毒		
名称 (血清型)	肿瘤选择性增殖的基础	治疗性状
Ad 野生型	无	瘤溶解
(各种血清型)		
Ad5/IFN (Ad5)	无	瘤溶解及免疫刺激基因治疗
A1520	E1b55kDa-delek>n消除p53结合	瘤溶解
或Onyx015 (< Ad2/5)		
AdTK ^{RC}	E1bSSkDa缺失消除p53结合	瘤溶解及自杀基因治疗 (TK)
Ad-5-CD-TKrep	E1bSSkDa缺失消除p53结合	瘤溶解及自杀基因治疗 (CD + TK)
或FGR (ad5)		
AdvE1AdB-F/K20 (Ad5)	E1bSSkDa缺失消除p53结合	具有增强的感染性的瘤溶解
AxE1AdB (Ad5)	E1bSSkDa缺失消除p53结合	瘤溶解及免疫刺激基因治疗
及AdCAhIL-2 (Ad5)		
AdD24 (Ad5)	E1a缺失消除Rb结合	瘤溶解
CN706 (Ad5)	在PSA启动子下调节ELa	瘤溶解
CN763 (Ad5)	在激肽释放酶2启动子下调节ELa	瘤溶解
CN764 (Ad5)	在PSA启动子下调节ELa和在激肽释放酶2启动子下调节ELb	瘤溶解
CV739	在大鼠probasin启动子下调节ELa和在人类PSA启动子下调节ELb	瘤溶解
用作溶瘤剂的腺病毒		
名称 (血清型)	肿瘤选择性增殖的基础	治疗性状
CV787	在大鼠probasin启动子下调节ELa和在人类PSA启动子下调节ELa	瘤溶解 (由于E的存在, 与CV739相比增强)
AvE1a041	在AFP启动子下调节ELa	瘤溶解
GT5610 (Ad5) +	在AFP启动子下调节ELa	瘤溶解
AdHB (Ad5)		
D1337 (Ad5)	无	瘤溶解 (由于E1b-19 kDa 缺失而增强)
D1316(Ad5)	E1a的完全缺失使该突变体依赖于Nrnsic或ML-6诱导的E1a样活性	瘤溶解
D1118 (Ad5)	E1b的完全缺失消除p53结合; 然而, E1a诱导的细胞凋亡不受E1b-19 kDa的抑制	瘤溶解

图5A

临床试验中的复制选择性病毒					
亲代菌株	药剂	临床阶段	临床试验中的肿瘤靶标	基因改变	允许选择性复制的细胞表型
工程化					
腺病毒 (2/5嵌合体)			SCCHN 结肠直肠 卵巢胰腺	E1B-55-kD 基因缺失	缺乏p53功能（例如，缺失、突变）的有争议的细胞，其他？
腺病毒 (血清型5)	CN706 CN787	I I	前列腺	E3-10.4/14.5缺失 由PSE元素驱动的表达 由大鼠probasin启动子驱动的表达 由PSE/启动子/增强子驱动的表达 E1B-55-kD基因缺失	前列腺细胞（恶性、正常）
腺病毒 (2/5嵌合体)	Ad5-CD/tk-rep	I	前列腺	HSV-tk/CD融合基因的插入	缺乏p53功能（例如，缺失、突变）的有争议的细胞，其他？
单纯疱疹病毒-1	G207	I-II	GBM	核糖核苷酸还原酶破坏 (locZ插入ICP6基因中) 神经发病机理基因突变 (γ -34.5基因) --两个拷贝	增殖细胞
单纯疱疹病毒-1	NV1020	I	结肠直肠	神经发病机理基因突变 (γ -34.5基因) --单拷贝	增殖细胞
牛痘病毒	野生型 ± GM-CSF	I	黑色素瘤	选择性：无或缺失免疫刺激 基因 (GM-CSF) 插入	未知
非工程化					
新城疫病毒	73-T	I	膀胱 SCCHN 卵巢	未知 (在肿瘤细胞上连续传代)	肿瘤细胞中IFN反应丧失
自主细小病毒	H-I	I		无	转化细胞 增殖 分化
呼肠孤病毒	Reolysin	I	SCCHN	无	ras, p53突变 Ras-通路活化 (例如, ras突变、EGFR 信号传导)

图5B

IL-4Ra 测定转移一致性								
组织类型	Q #	肿瘤差异强度				肿瘤百分比 评分 ≥1+	肿瘤 H-评分	注释
		0	1+	2+	3+			
GBM	Q1360-3	99	0	1	0	1	2	肿瘤呈红色染色
GBM	Q1360-3	0	90	10	0	100	110	
GBM	Q1360-3	0	89	10	1	100	112	
GBM	Q3362	100	0	0	0	0	0	
GBM	Q3362	100	0	0	0	0	0	肿瘤呈红色染色
GBM	Q3362	80	20	0	0	20	20	
GBM	Q9467	0	80	10	10	100	130	边界线1+
GBM	Q9467	0	90	5	5	100	115	
GBM	Q9467	0	30	20	50	100	220	
GBM	Q9462	0	60	20	20	100	160	难以区分肿瘤与反应性正常
GBM	Q9462	0	40	30	30	100	190	难以区分肿瘤与反应性正常
GBM	Q9462	10	30	30	30	90	180	难以区分肿瘤与反应性正常

图6

病理诊断	肿瘤细胞质差异强度				肿瘤 百分比 评分 ≥1+	肿瘤 百分比 评分 ≥2+	肿瘤 百分比 评分 ≥3+	肿瘤 H-评分	良性组织 细胞质染色	注释
	0	1+	2+	3+						
多形性成胶质细胞瘤	10	40	40	10	90	50	10	150	NA	
多形性成胶质细胞瘤	10	20	20	50	90	70	50	210	NA	
多形性成胶质细胞瘤	0	50	20	30	100	50	30	180	1+	
多形性成胶质细胞瘤	20	40	30	10	80	40	10	130	NA	
多形性成胶质细胞瘤	10	20	20	50	90	70	50	210	2+	
多形性成胶质细胞瘤	0	20	30	50	100	80	50	230	NA	
多形性成胶质细胞瘤	10	10	10	70	90	80	70	240	1+	
多形性成胶质细胞瘤	0	0	0	100	100	100	100	300	1-2+	<10个活的肿瘤细胞
多形性成胶质细胞瘤	80	5	5	10	20	15	10	45	NA	表现为星形细胞瘤
多形性成胶质细胞瘤	45	40	10	5	55	15	5	75	NA	
多形性成胶质细胞瘤	20	50	10	20	80	30	20	130	NA	
多形性成胶质细胞瘤	0	20	30	50	100	80	50	230	1+	
多形性成胶质细胞瘤	10	30	30	30	90	60	30	180	NA	
多形性成胶质细胞瘤	0	85	5	10	100	15	10	125	1+	表现为星形细胞瘤
多形性成胶质细胞瘤	0	60	30	10	100	40	10	150	NA	
多形性成胶质细胞瘤	0	65	30	5	100	35	5	140	1-2+	
多形性成胶质细胞瘤	0	30	20	50	100	70	50	220	1+	
多形性成胶质细胞瘤	0	80	20	0	100	20	0	120	NA	
多形性成胶质细胞瘤	0	50	30	20	100	50	20	170	1+	
多形性成胶质细胞瘤	0	30	20	50	100	70	50	220	1+	
多形性成胶质细胞瘤	0	20	50	30	100	80	30	210	1+	
多形性成胶质细胞瘤	0	10	20	70	100	90	70	260	1+	
多形性成胶质细胞瘤	0	80	10	10	100	20	10	130	1+	
包括出血	0	75	20	5	100	25	5	130	NA	
具有海绵组织的巨细胞 变体, 星形细胞瘤, 49 F	0	90	10	0	100	10	0	110	1+	
巨细胞变体星形细胞瘤, 50 M	10	30	30	30	90	60	30	180	NA	
胖细胞型, 星形细胞瘤, M	0	50	50	0	100	50	0	150	0-1+	
星形细胞瘤	0	20	20	60	100	80	60	240	NA	
星形细胞瘤	80	10	10	0	20	10	0	30	NA	
胖细胞型, 星形细胞瘤	0	20	30	50	100	80	50	230	NA	
多形性成胶质细胞瘤	5	5	20	70	95	90	70	255	NA	
包括假性栅栏坏死	0	50	30	20	100	50	20	170	NA	阴性区域(由于气泡)未评分
多形性成胶质细胞瘤	0	0	0	100	100	100	100	300	1+	
多形性成胶质细胞瘤	0	50	0	50	100	50	50	200	NA	<100个活的肿瘤细胞
多形性成胶质细胞瘤	0	0	0	100	100	100	100	300	2+	
多形性成胶质细胞瘤	0	0	0	100	100	100	100	300	NA	
多形性成胶质细胞瘤	0	0	0	100	100	100	100	300	NA	
多形性成胶质细胞瘤	0	0	50	50	100	100	50	250	NA	
多形性成胶质细胞瘤	0	0	0	100	100	100	100	300	2+	
多形性成胶质细胞瘤	0	40	40	20	100	60	20	180	2+	
多形性成胶质细胞瘤	0	0	50	50	100	100	50	250	NA	
多形性成胶质细胞瘤	20	30	40	10	80	50	10	140	NA	无法确认GBM, 可能是专门类型

图7

8A. GBM中通过H-评分值衡量的IL-4Rα阳性的阈值

可评估的 案例	H-评分 >0		H-评分 ≥50		H-评分 ≥100		H-评分 ≥150		H-评分 ≥200		H-评分 ≥250	
	编号	百分比	编号	百分比	编号	百分比	编号	百分比	编号	百分比	编号	百分比
41	41	100%	39	95%	38	93%	30	73%	21	51%	10	24%

8B. GBM中通过≥1+强度的百分比染色衡量的IL-4Rα阳性的阈值

可评估的 案例	>0%的肿瘤细胞 中≥1+染色		≥10%的肿瘤细胞 中≥1+染色		≥25%的肿瘤细胞 中≥1+染色		≥50%的肿瘤细胞 中≥1+染色		≥75%的肿瘤细胞 中≥1+染色		≥90%的肿瘤细胞 中≥1+染色	
	编号	百分比	编号	百分比	编号	百分比	编号	百分比	编号	百分比	编号	百分比
41	41	100%	41	100%	39	95%	39	95%	38	93%	36	88%

8C. GBM中通过≥2+强度的百分比染色衡量的IL-4Rα阳性的阈值

可评估的 案例	>0%的肿瘤细胞 中≥2+染色		≥10%的肿瘤细胞 中≥2+染色		≥25%的肿瘤细胞 中≥2+染色		≥50%的肿瘤细胞 中≥2+染色		≥75%的肿瘤细胞 中≥2+染色		≥90%的肿瘤细胞 中≥2+染色	
	编号	百分比	编号	百分比	编号	百分比	编号	百分比	编号	百分比	编号	百分比
41	41	100%	41	100%	34	83%	29	71%	16	39%	10	24%

8D. GBM中通过≥3+强度的百分比染色衡量的IL-4Rα阳性的阈值

可评估的 案例	>0%的肿瘤细胞 中≥3+染色		≥10%的肿瘤细胞 中≥3+染色		≥25%的肿瘤细胞 中≥3+染色		≥50%的肿瘤细胞 中≥3+染色		≥75%的肿瘤细胞 中≥3+染色		≥90%的肿瘤细胞 中≥3+染色	
	编号	百分比	编号	百分比	编号	百分比	编号	百分比	编号	百分比	编号	百分比
41	37	90%	34	83%	24	59%	20	49%	6	15%	6	15%

图8

9A.IHC程序-TechMate方案

Tech Mate 序列	试剂
1	阻断剂-15分钟
2	一抗-1小时
3	Polink-2加二抗-25分钟
4	过氧化氢阻断液-3 × 2.5分钟
5	Polink-2加辣根过氧化物酶（HRP）-25分钟
6	DAB色原-3 x 5分钟
7	苏木精复染液-1分钟

9B.抗体规格及测定条件

抗体	IL-4Rα
供应商	Abcam
目录号	ab203398
供应商批号	316106
QualTek批号	NT2513
来源/同种型	兔 IgG
克隆	多克隆
免疫原	人类IL-4R aa 200-232中与 Keyhole Limpet血蓝蛋白（KLH） 缀合的合成肽
稀释度	2.5 ug/mL
温育时间	1小时
预处理	无（无SHIER）
方案	MIP
检测系统	Polink-2加HRP兔
色原	DAB

图9

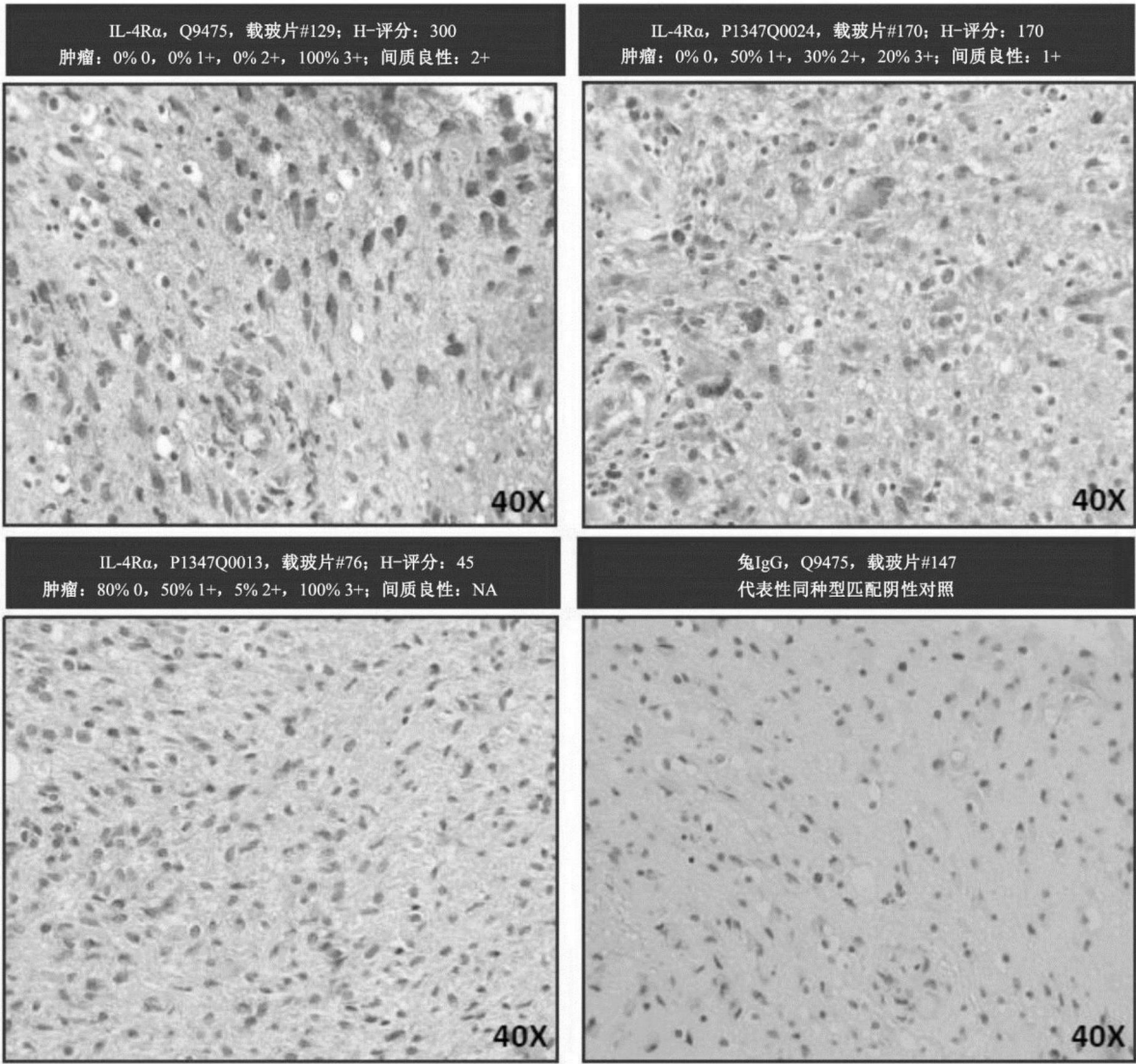


图10

肿瘤差异强度				百分比 评分≥2+	IL-4Rα POS/NEG
0	1+	2+	3+		
0	0	0	100	100	POS
0	0	0	100	100	POS
0	0	0	100	100	POS
0	0	0	100	100	POS
0	0	0	100	100	POS
0	0	0	100	100	POS
0	0	0	100	100	POS
0	0	0	100	100	POS
0	0	0	100	100	POS
10	30	30	30	60	POS
10	30	30	30	60	POS
10	30	30	30	60	POS
10	30	30	30	60	POS
10	30	30	30	60	POS
10	30	30	30	60	POS
10	30	30	30	60	POS
10	30	30	30	60	POS
10	30	30	30	60	POS
0	90	10	0	10	NEG
0	90	10	0	10	NEG
0	90	10	0	10	NEG
0	90	10	0	10	NEG
0	90	10	0	10	NEG
0	90	10	0	10	NEG
0	90	10	0	10	NEG
0	90	10	0	10	NEG
0	90	10	0	10	NEG
80	10	10	0	10	NEG
80	10	10	0	10	NEG
80	10	10	0	10	NEG
80	10	10	0	10	NEG
80	10	10	0	10	NEG
80	10	10	0	10	NEG
80	10	10	0	10	NEG
80	10	10	0	10	NEG
80	10	10	0	10	NEG

图11

独特类型	差异强度				百分比 评分 $\geq 1+$	H-评分	注释
	0	1+	2+	3+			
肾上腺	80	20	0	0	20	20	核染色
肾上腺	100	0	0	0	0	0	红色染色
肾上腺	100	0	0	0	0	0	
膀胱、泌尿							无组织
膀胱、泌尿	100	0	0	0	0	0	红色染色
膀胱、泌尿	100	0	0	0	0	0	红色染色
骨骼、骨髓	95	5	0	0	5	5	
眼部							无组织
眼部	100	0	0	0	0	0	
胸部	100	0	0	0	0	0	
胸部	100	0	0	0	0	0	
胸部	50	50	0	0	50	50	导管染色阳性
大脑、小脑	100	0	0	0	0	0	
大脑、小脑	100	0	0	0	0	0	
大脑、小脑	100	0	0	0	0	0	
大脑、大脑皮层	100	0	0	0	0	0	
大脑、大脑皮层	100	0	0	0	0	0	
大脑、大脑皮层	100	0	0	0	0	0	
输卵管	100	0	0	0	0	0	非输卵管
输卵管	100	0	0	0	0	0	
输卵管	100	0	0	0	0	0	红色染色
食道	50	50	0	0	50	50	
食道	50	50	0	0	50	50	仅肌肉
食道	50	50	0	0	50	50	
腹部	0	50	50	0	100	150	腺泡细胞阳性
腹部	25	0	75	0	75	150	组织撕裂
腹部	10	30	30	30	90	180	
肠、小肠	100	0	0	0	0	0	仅肌肉
肠、小肠	50	50	0	0	50	50	
肠、小肠	100	0	0	0	0	0	
肠、结肠	100	0	0	0	0	0	
肠、结肠	100	0	0	0	0	0	
肠、结肠	100	0	0	0	0	0	
肠、直肠	100	0	0	0	0	0	
肠、直肠	100	0	0	0	0	0	
肠、直肠	100	0	0	0	0	0	
心脏	20	80	0	0	80	80	
心脏	100	0	0	0	0	0	
心脏	20	50	30	0	80	110	
肾脏	100	0	0	0	0	0	
肾脏	100	0	0	0	0	0	红色染色
肾脏	100	0	0	0	0	0	红色染色
肾脏	100	0	0	0	0	0	
肾脏	100	0	0	0	0	0	
肝脏	100	0	0	0	0	0	
肝脏	100	0	0	0	0	0	
肝脏	30	50	20	0	70	90	
肺部	100	0	0	0	0	0	
肺部	100	0	0	0	0	0	
肺部	100	0	0	0	0	0	

图12A

独特类型	差异强度				百分比 评分 $\geq 1+$	H-评分	注释
	0	1+	2+	3+			
卵巢	100	0	0	0	0	0	
卵巢	100	0	0	0	0	0	
卵巢	100	0	0	0	0	0	
胰腺	100	0	0	0	0	0	
胰腺	100	0	0	0	0	0	
胰腺	70	20	10	0	30	40	
甲状旁腺	100	0	0	0	0	0	
脑下垂体	100	0	0	0	0	0	红色染色
脑下垂体	50	50	0	0	50	50	红色染色
胎盘	100	0	0	0	0	0	
胎盘	100	0	0	0	0	0	
胎盘	100	0	0	0	0	0	
前列腺	100	0	0	0	0	0	
前列腺	100	0	0	0	0	0	
前列腺	100	0	0	0	0	0	
皮肤	100	0	0	0	0	0	
皮肤	100	0	0	0	0	0	红色染色
脊髓	100	0	0	0	0	0	
脊髓	100	0	0	0	0	0	
脾脏	100	0	0	0	0	0	
脾脏	100	0	0	0	0	0	红色染色
骨骼肌	100	0	0	0	0	0	红色染色
骨骼肌	95	3	2	0	5	7	
骨骼肌	100	0	0	0	0	0	红色染色
睾丸	100	0	0	0	0	0	
睾丸	100	0	0	0	0	0	红色染色
睾丸	100	0	0	0	0	0	红色染色
胸腺	100	0	0	0	0	0	红色染色
胸腺	100	0	0	0	0	0	红色染色
胸腺	100	0	0	0	0	0	红色染色
甲状腺	90	10	0	0	10	10	
甲状腺	100	0	0	0	0	0	红色染色
甲状腺	95	5	0	0	5	5	
扁桃体	100	0	0	0	0	0	
扁桃体	100	0	0	0	0	0	
扁桃体	100	0	0	0	0	0	
输尿管	100	0	0	0	0	0	
输尿管	95	5	0	0	5	5	红色染色
输尿管	100	0	0	0	0	0	
子宫、宫颈	100	0	0	0	0	0	红色染色
子宫、宫颈	100	0	0	0	0	0	
子宫、宫颈	100	0	0	0	0	0	
子宫内膜	100	0	0	0	0	0	红色染色
子宫内膜	100	0	0	0	0	0	
子宫内膜	80	20	0	0	20	20	

图12B

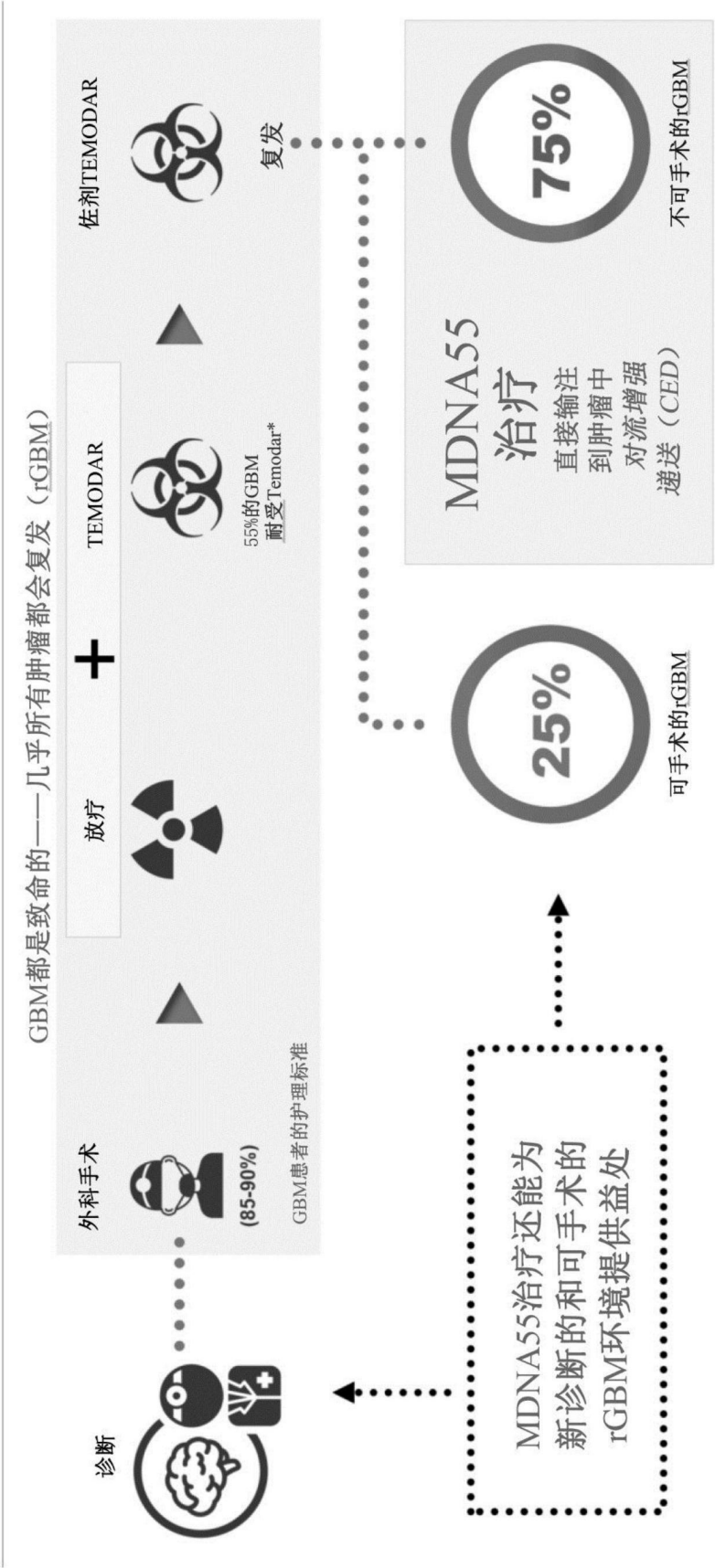


图13

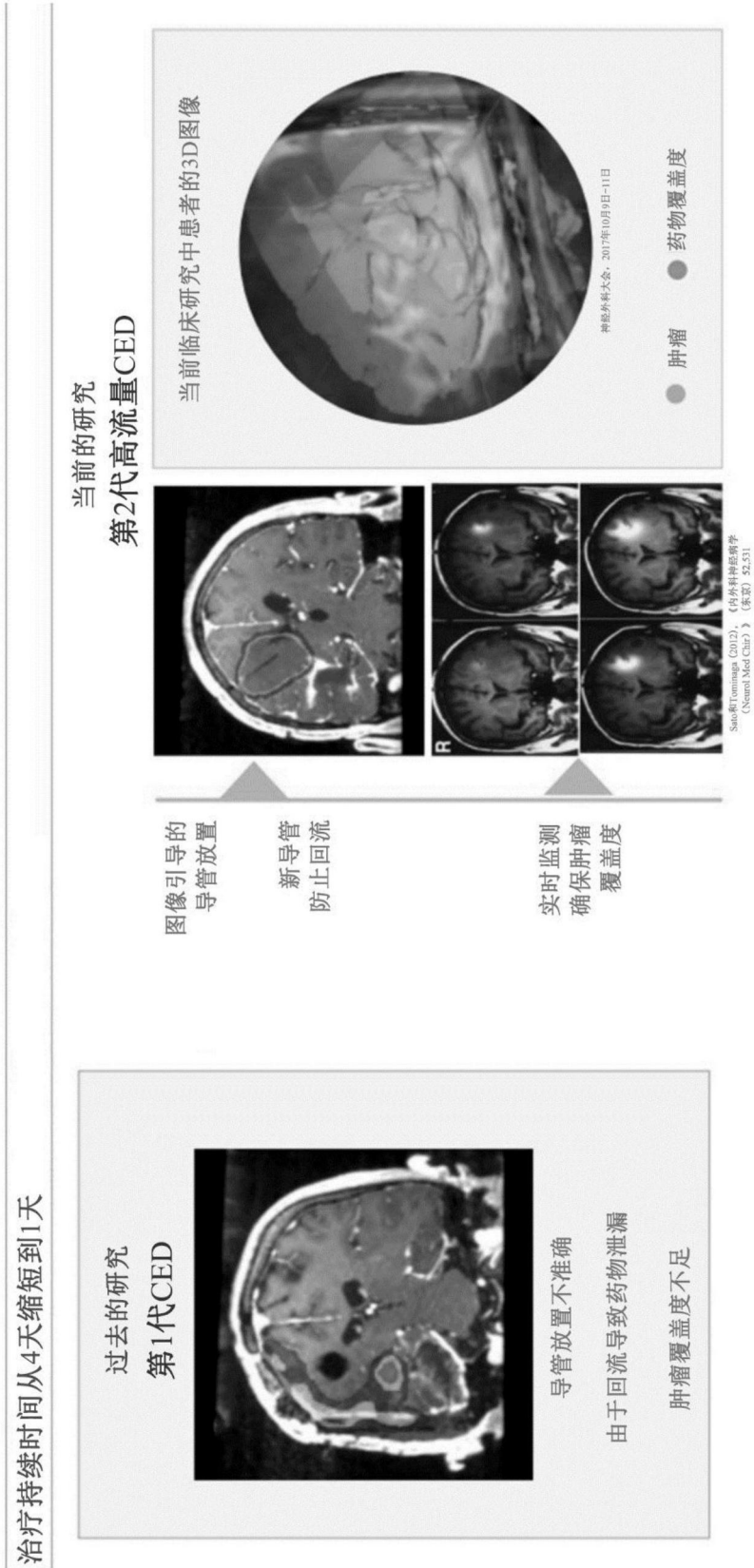


图14

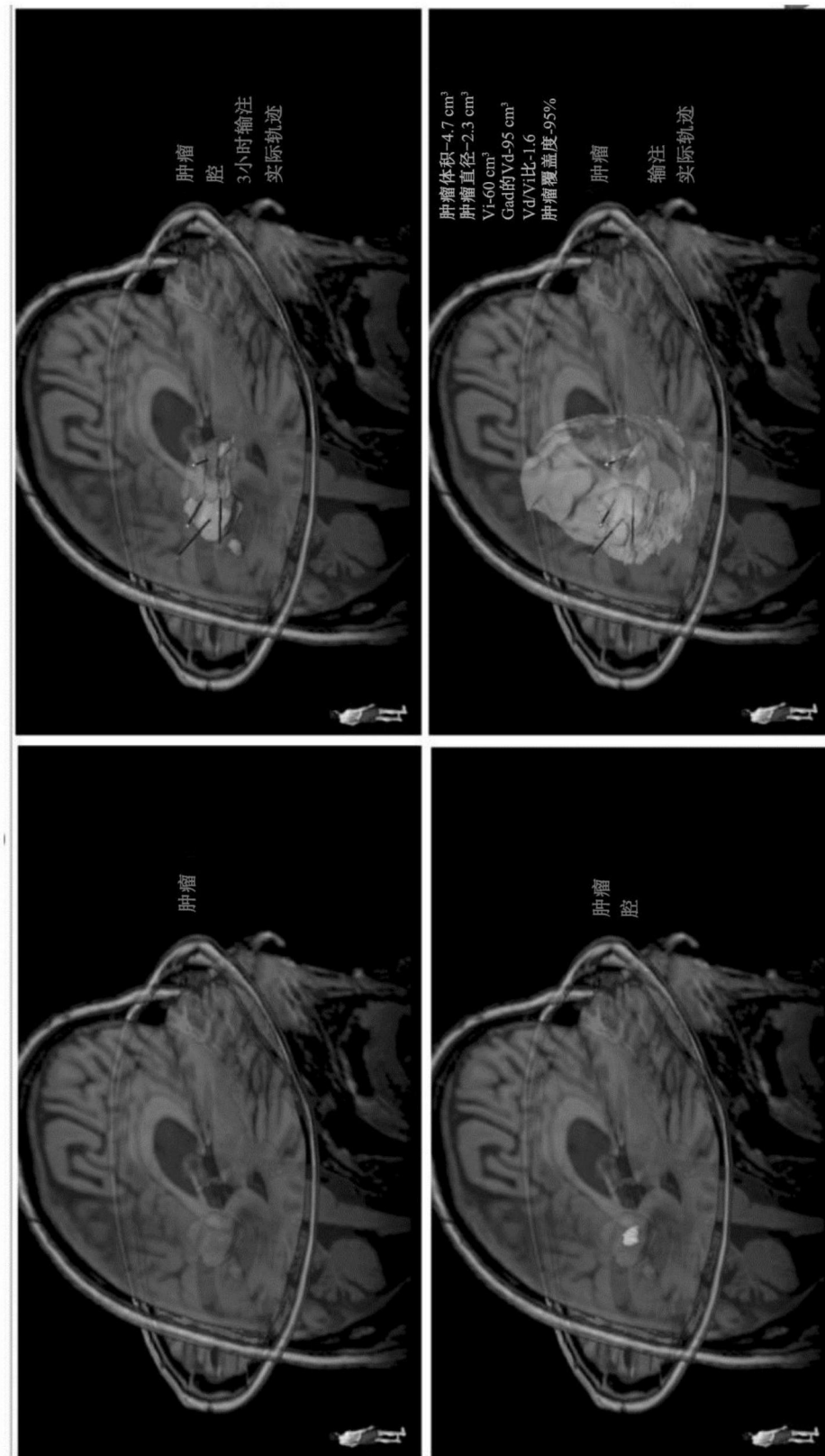


图15

单一疗法	群体 (n)	生存率			
		mOS (月)	OS-6	OS-9	OS-12
MDNA55-05 低剂量队列*	rGBM (n=27)	11.8	89%	59%	46%
Avastin ¹	rGBM (n=85)	9.2	63%	NA	2%
Avastin ²	rGBM (n=50)	8.0	62%	38%	26%
洛莫司汀 ²	rGBM (n=46)	8.0	65%	43%	30%
替莫唑胺 ³	rGBM (n=31)	5.6	NA	NA	NA
替莫唑胺 ⁴	rGBM (n=792)	NA	65%	NA	36.4%
MDNA55-05 高剂量队列		目前登记中			

1 Friedman等人,《单独地及与伊立替康组合地使用贝伐单抗治疗复发性和胶质细胞瘤 (Bevacizumab Alone and in Combination With Irinotecan in Recurrent Glioblastoma)》,《临床肿瘤学杂志 (J Clin Oncol.)》2009年10月1日:27(28):4733-40。

2 Taal等人,《单药贝伐单抗或洛莫司汀对比贝伐单抗加洛莫司汀的组合治疗复发性和胶质细胞瘤患者 (BELOB试验):一项随机对照2期试验 (Single-agent bevacizumab or lomustine versus a combination of bevacizumab plus lomustine in patients with recurrent glioblastoma (BELOB trial): a randomised controlled phase 2 trial)》,《柳叶刀肿瘤学 (Lancet Oncol)》2014年8月:15(9):943-53。

3 Kim等人,《复发性和胶质细胞瘤的挽救治疗结果 (Outcome of salvage treatment for recurrent glioblastoma)》,《临床神经科学杂志 (J Clin Neuroscience)》22(2015)468-473,2015。

4 Chen等人,《替莫唑胺对复发性和胶质细胞瘤的疗效 (Meta分析) (The efficacy of temozolomide for recurrent glioblastoma multiforme (Meta-analysis))》,《欧洲神经病学杂志 (Eur J Neurol)》,2013年2月;20(2):223-30。

图16

138

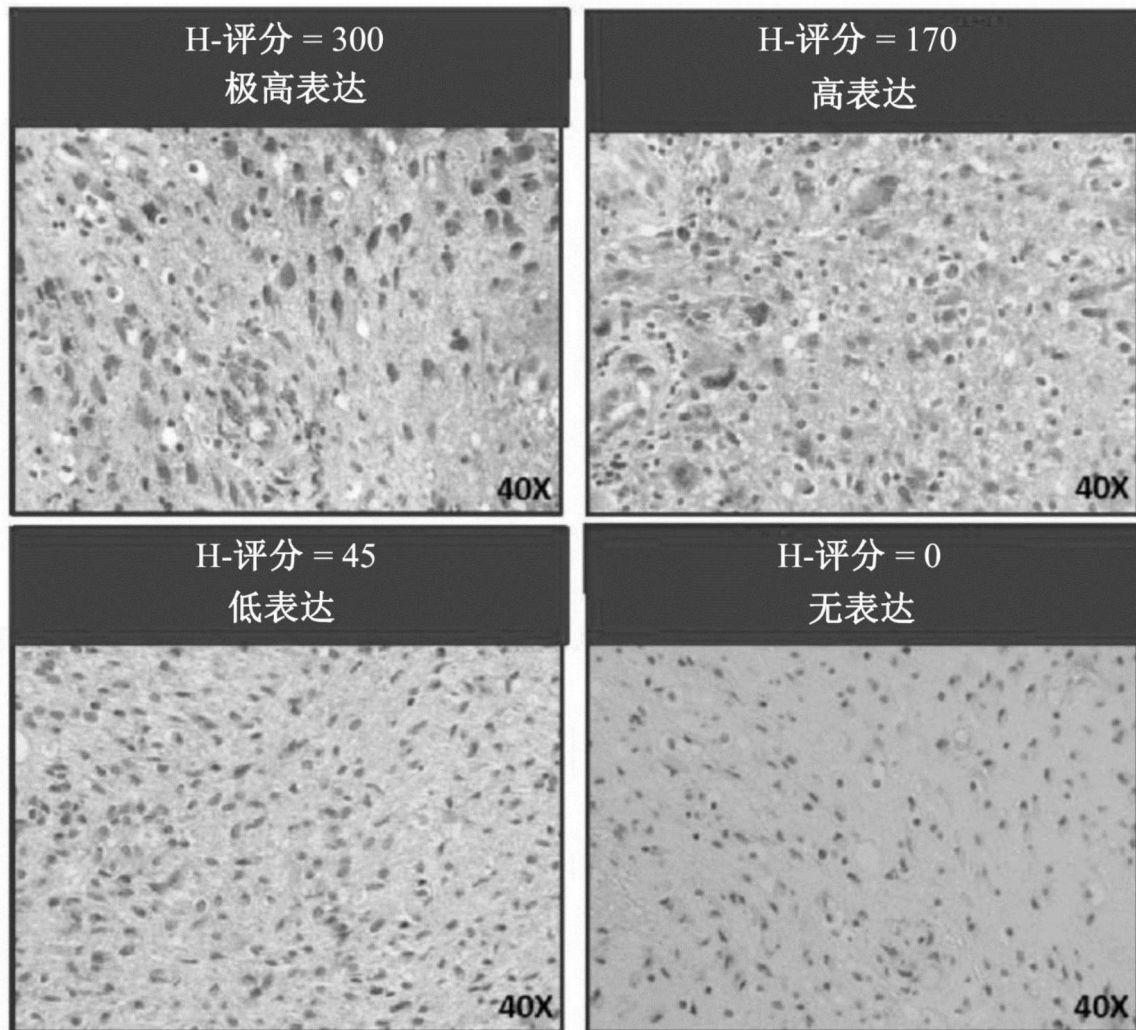


图17

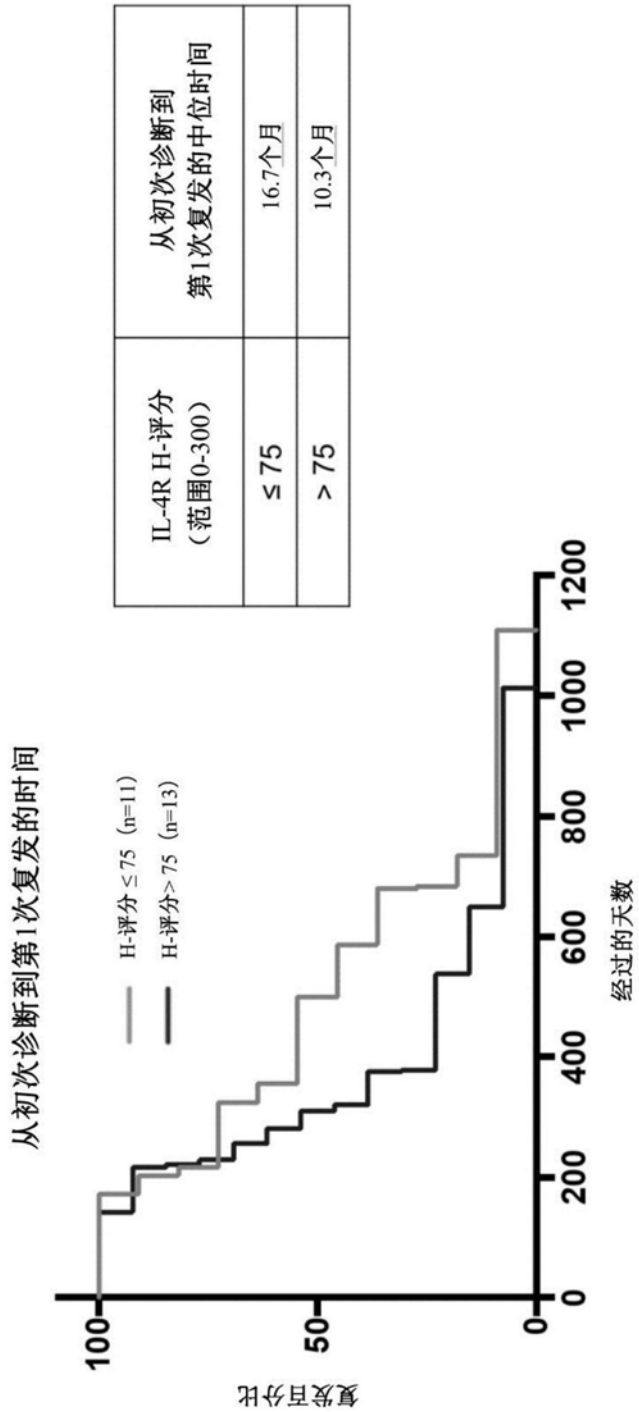


图18

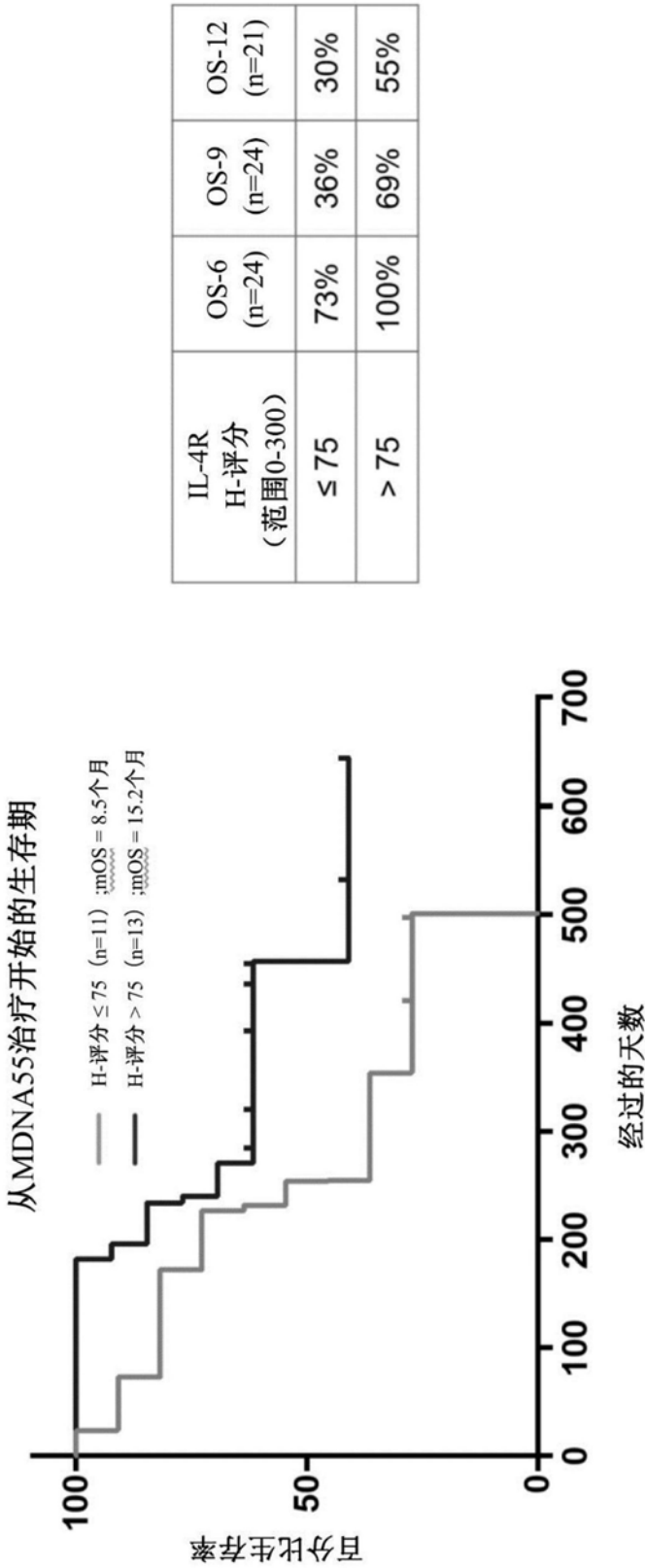


图19

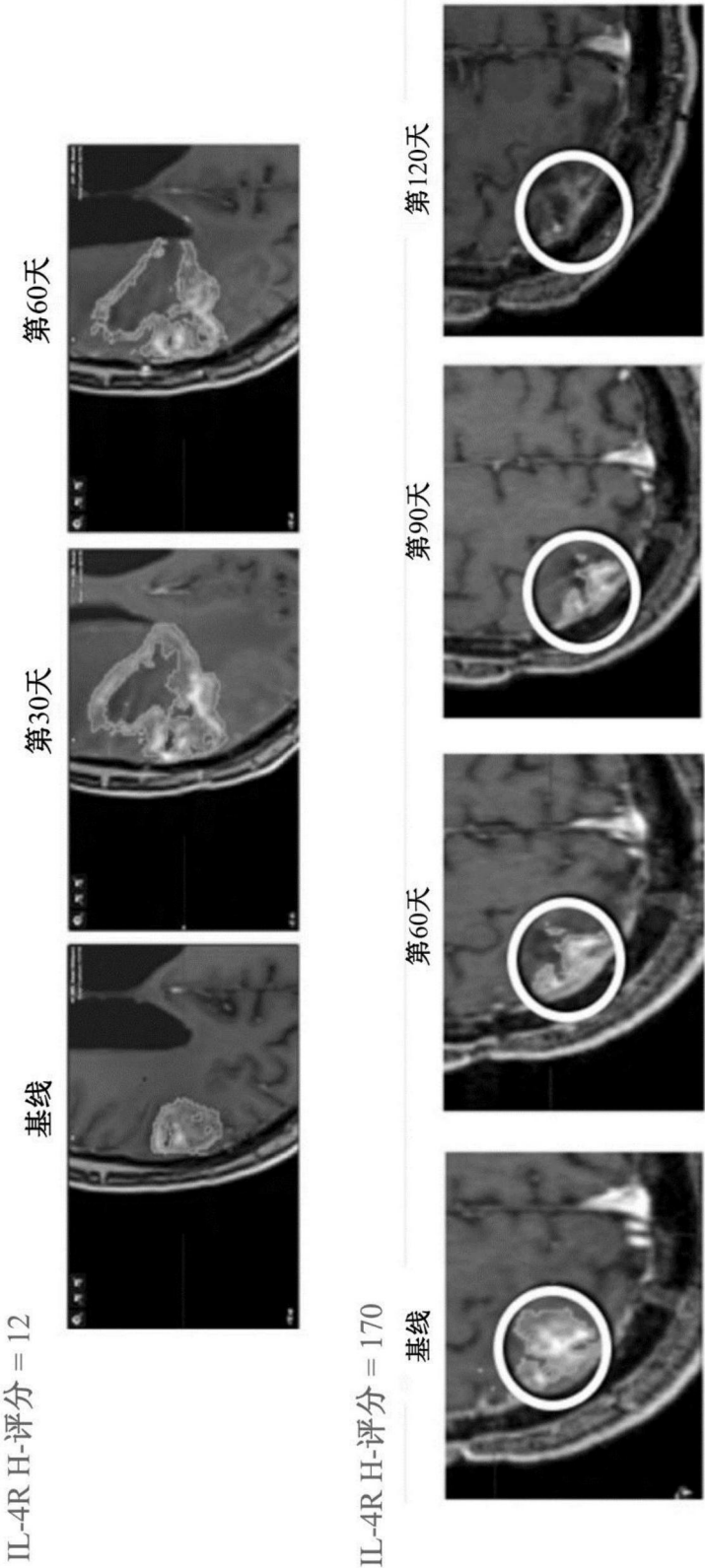


图20

从初次Dx到第1次复发的时间（中位数）				
所有受试者	11.3个月			
IL-4R ⁺ 受试者	10.3个月			
IL-4R ⁻ 受试者	16.7个月			
用MDNA55治疗后的生存率				
	mOS（月）	OS-6	OS-9	OS-12
所有受试者	11.8	89%	59%	46%
IL-4R ⁺ 受试者	15.2	100%	69%	55%
IL-4R ⁻ 受试者	8.5	73%	36%	30%

图21

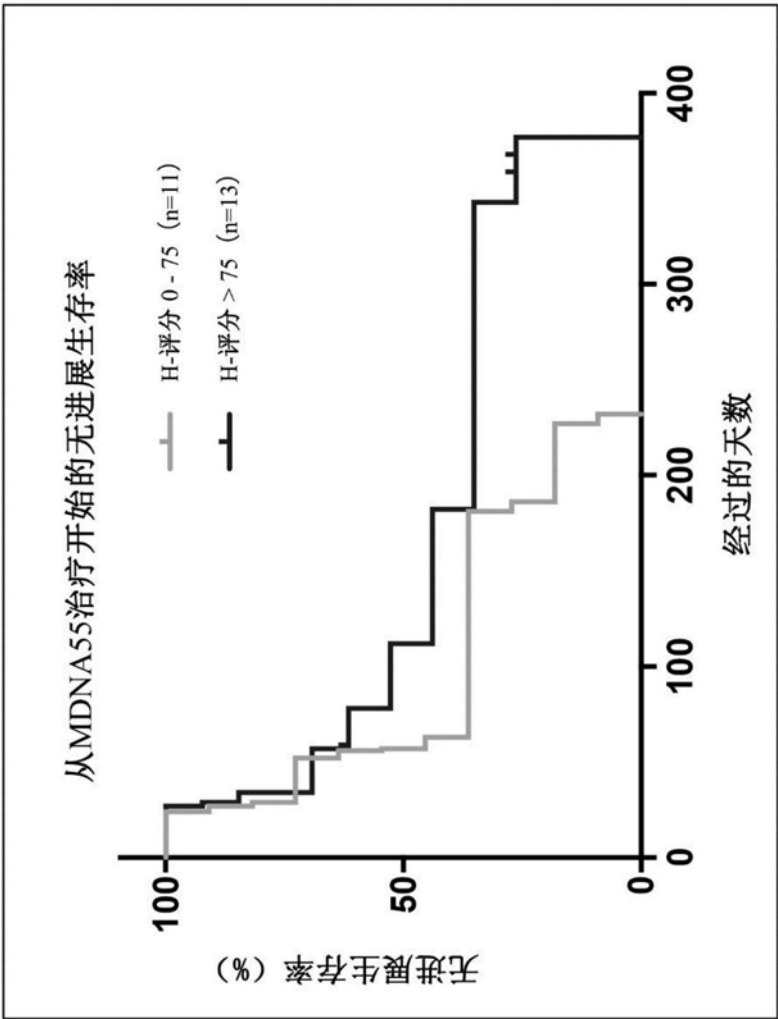


图22



图23A

变量	值
总患者数	46
年龄	56岁(35 – 78)
性别（男）	29 / 46 (63%)
登记时的KPS: 70, 80 90, 100	22 / 46 (48%) 24 / 46 (52%)
新发GBM	46 / 46 (100%)
重复外科手术的不良候选者	46 / 46 (100%)
IDH野生型	37 / 37 (100%)
未甲基化的MGMT	24 / 42 (57%)
IL4R过度表达	23 / 42 (55%)
研究期间类固醇用量 > 4 mg/天	25 / 45 (56%)
最大肿瘤直径	28 mm (10 – 64)
# 既往复发: 1, 2	37 (80%), 9 (20%)

图23B

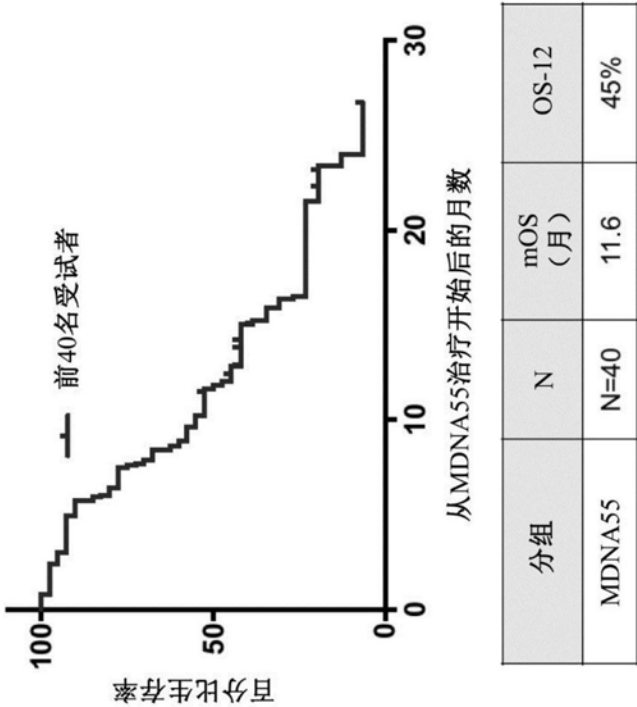


图24A

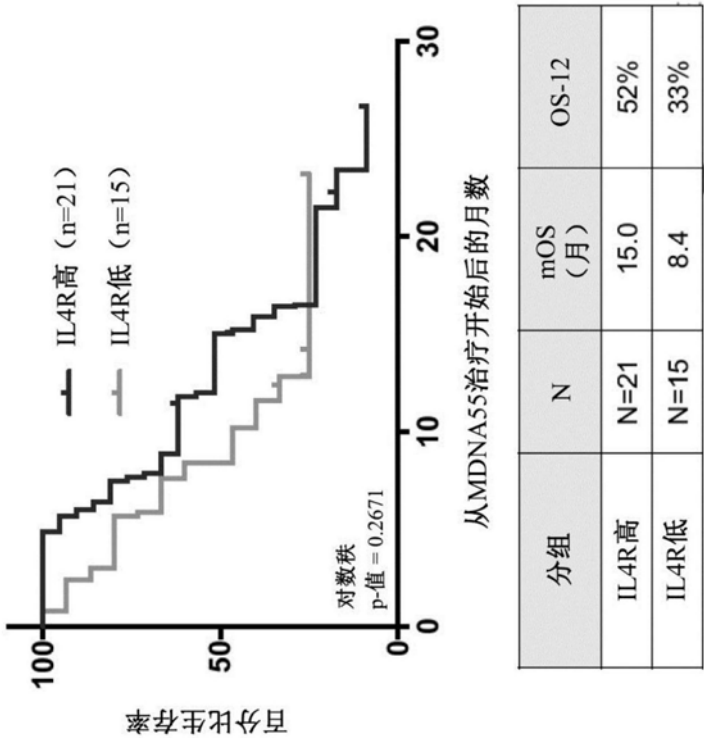


图24B

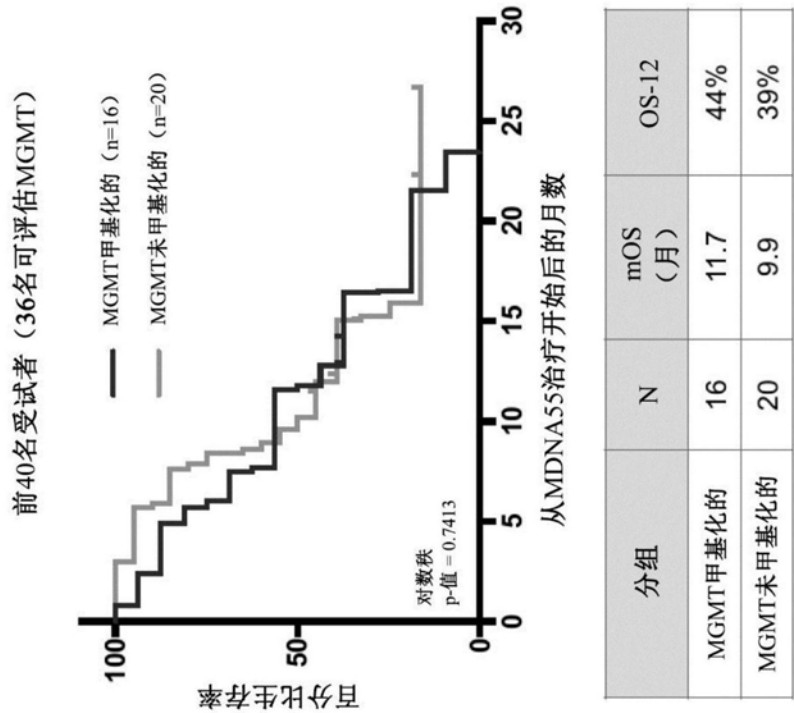


图25A

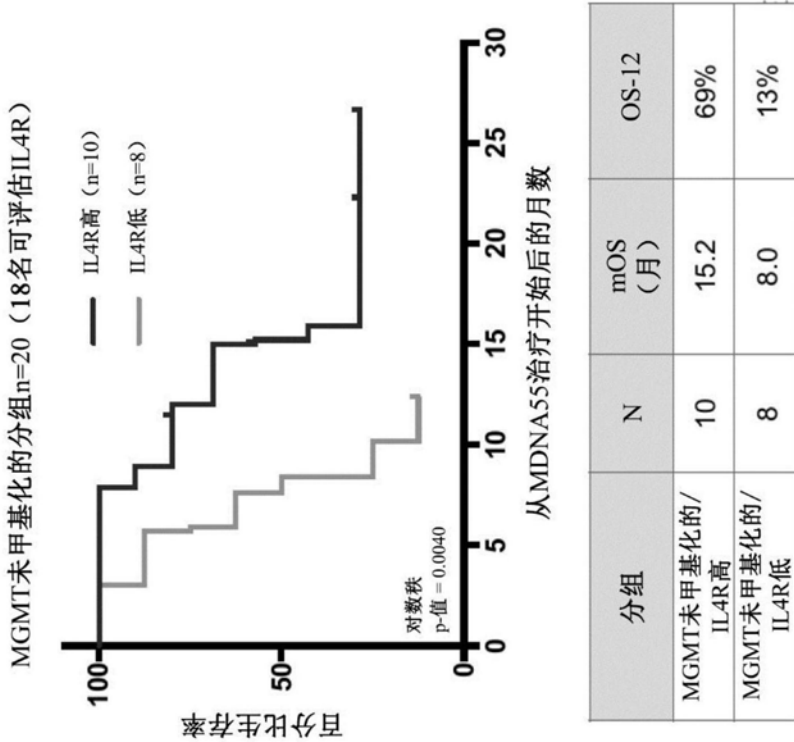


图25B

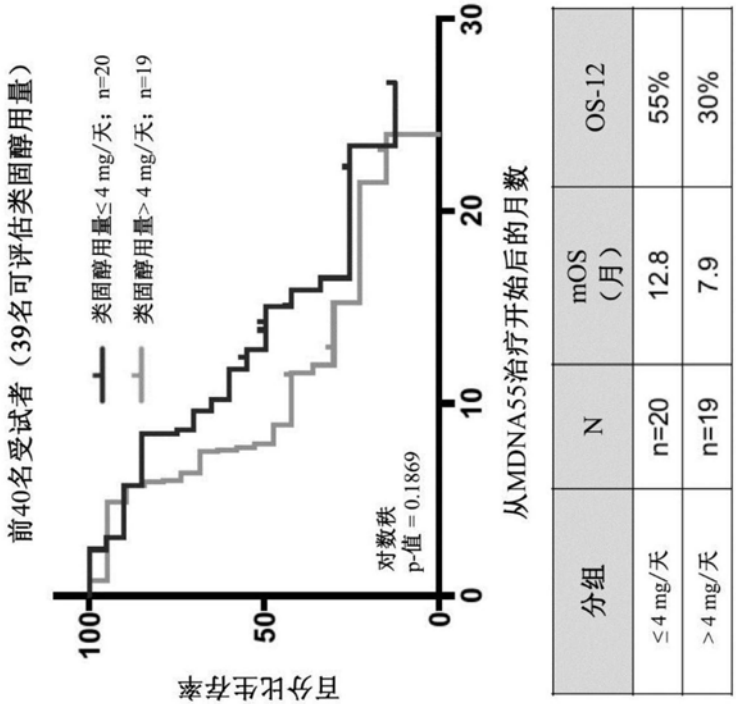


图26A

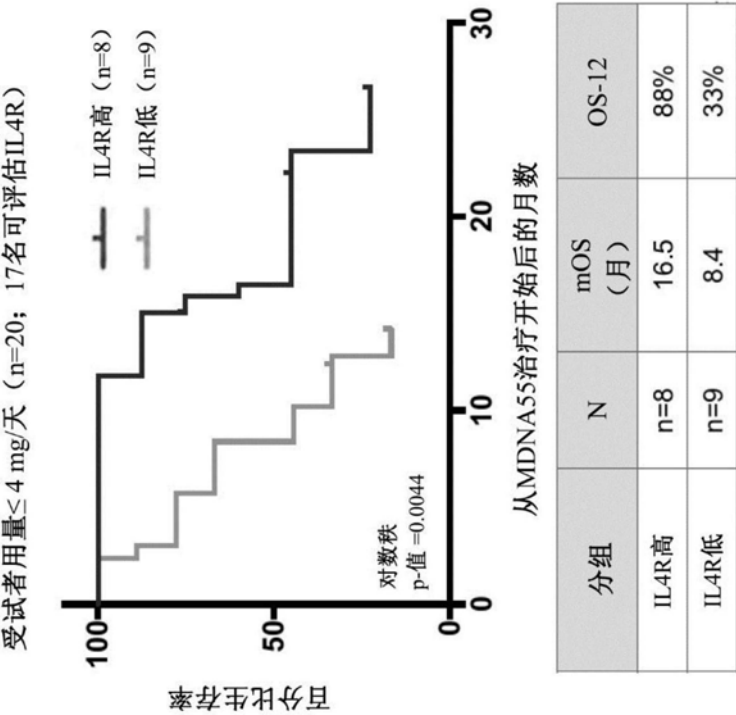


图26B

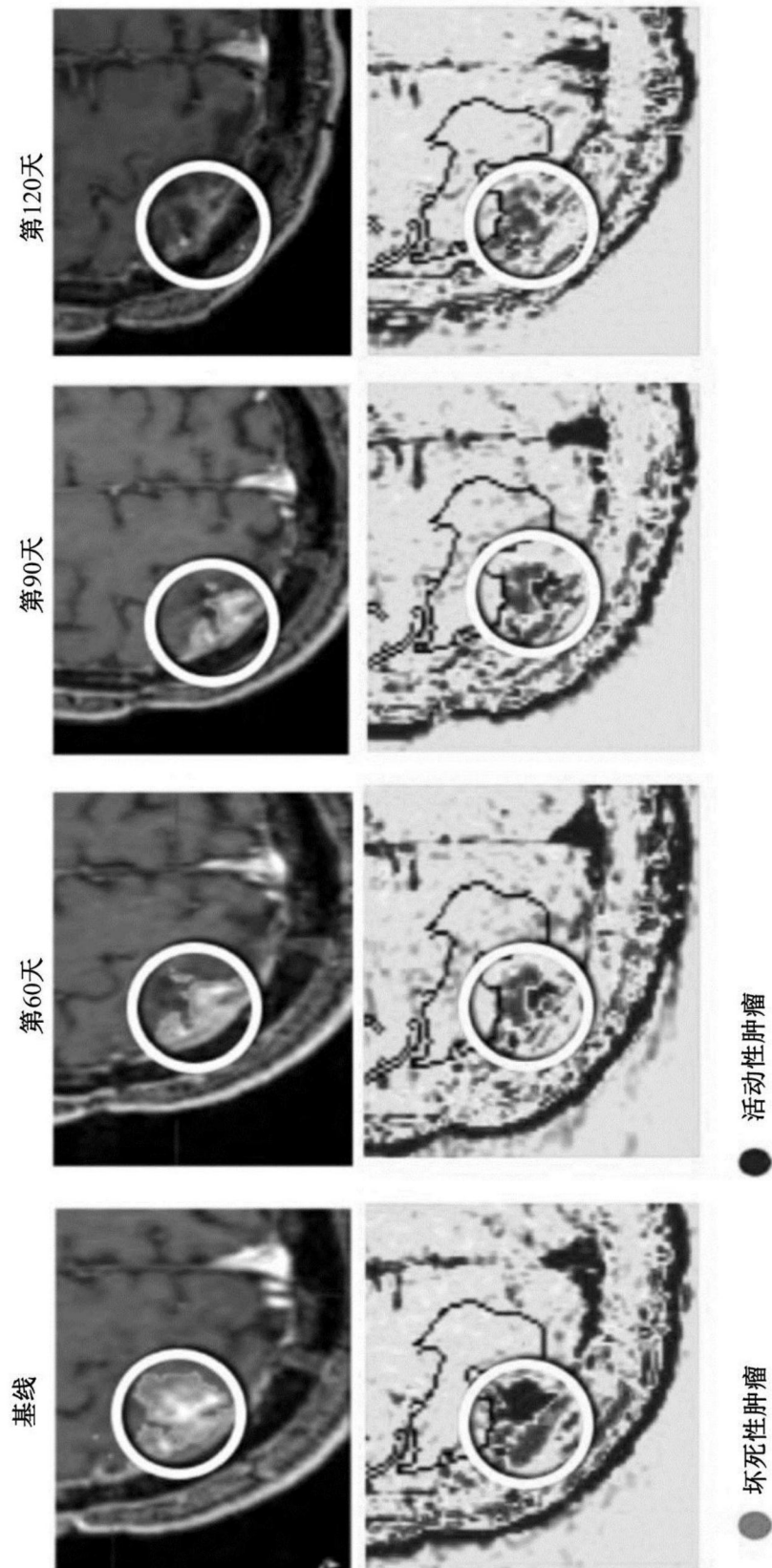


图27

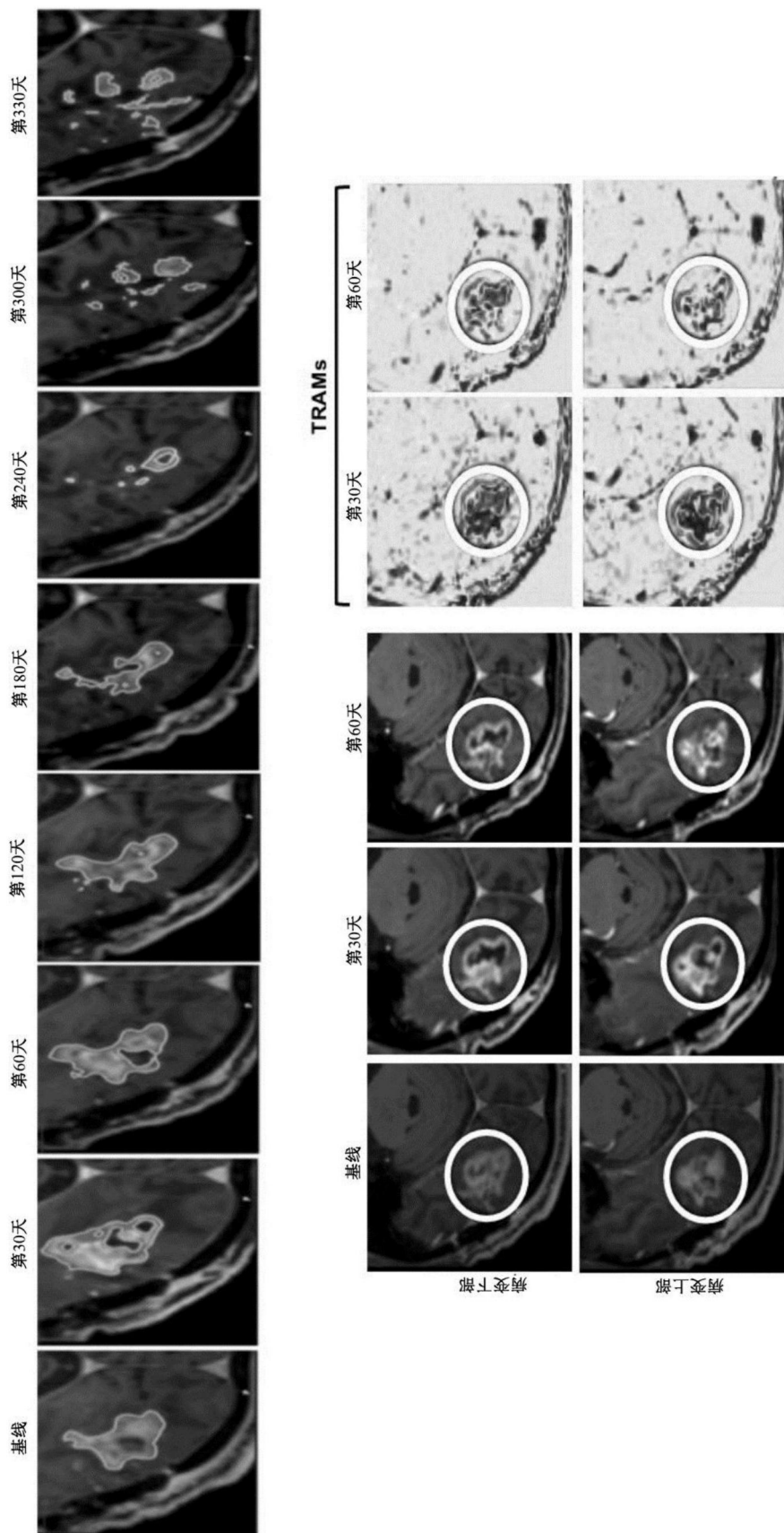


图28

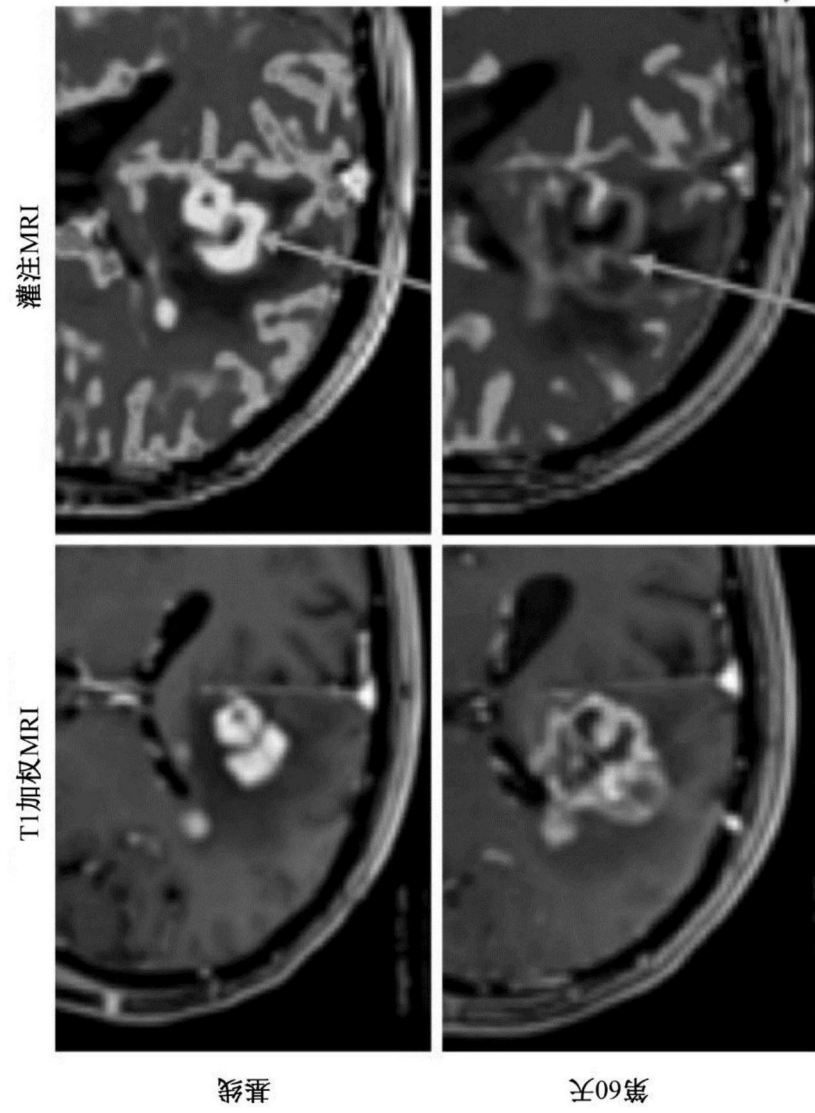


图29

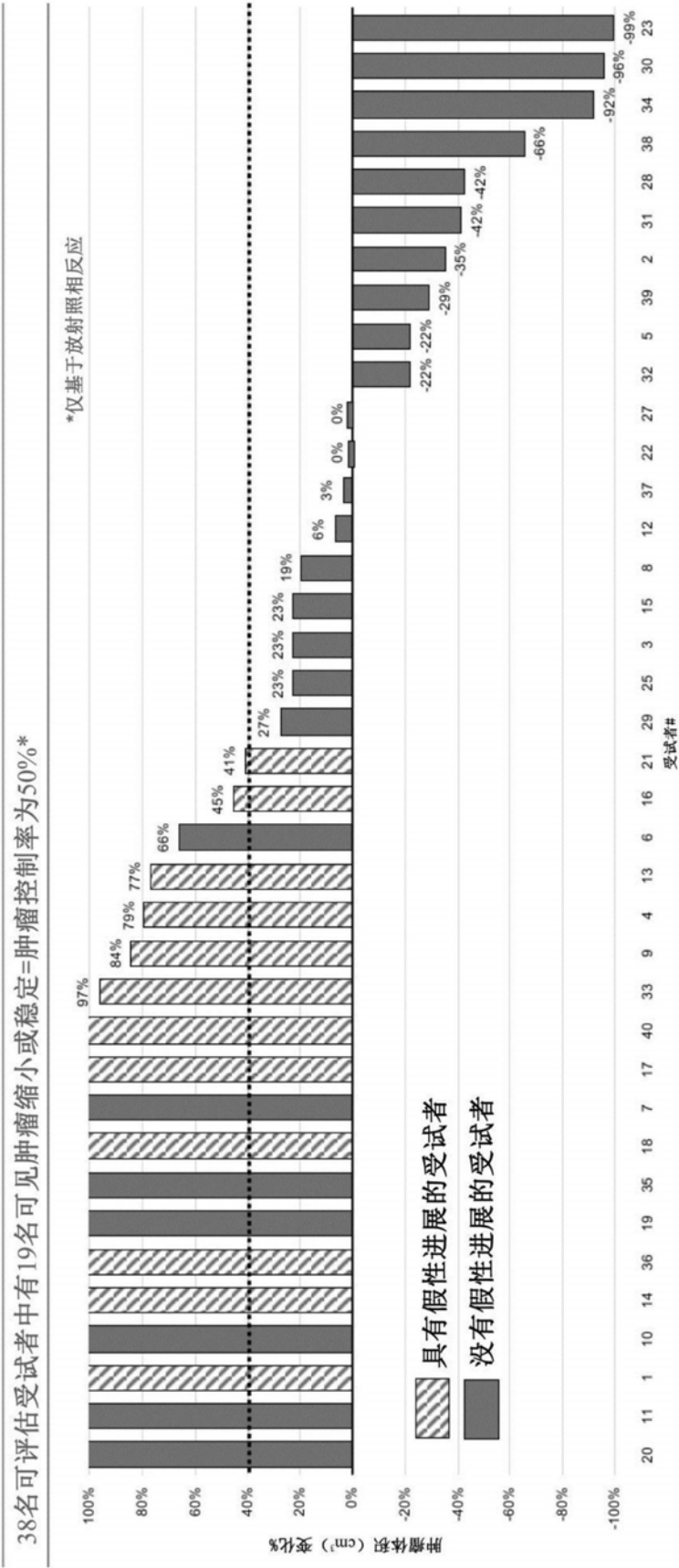


图30

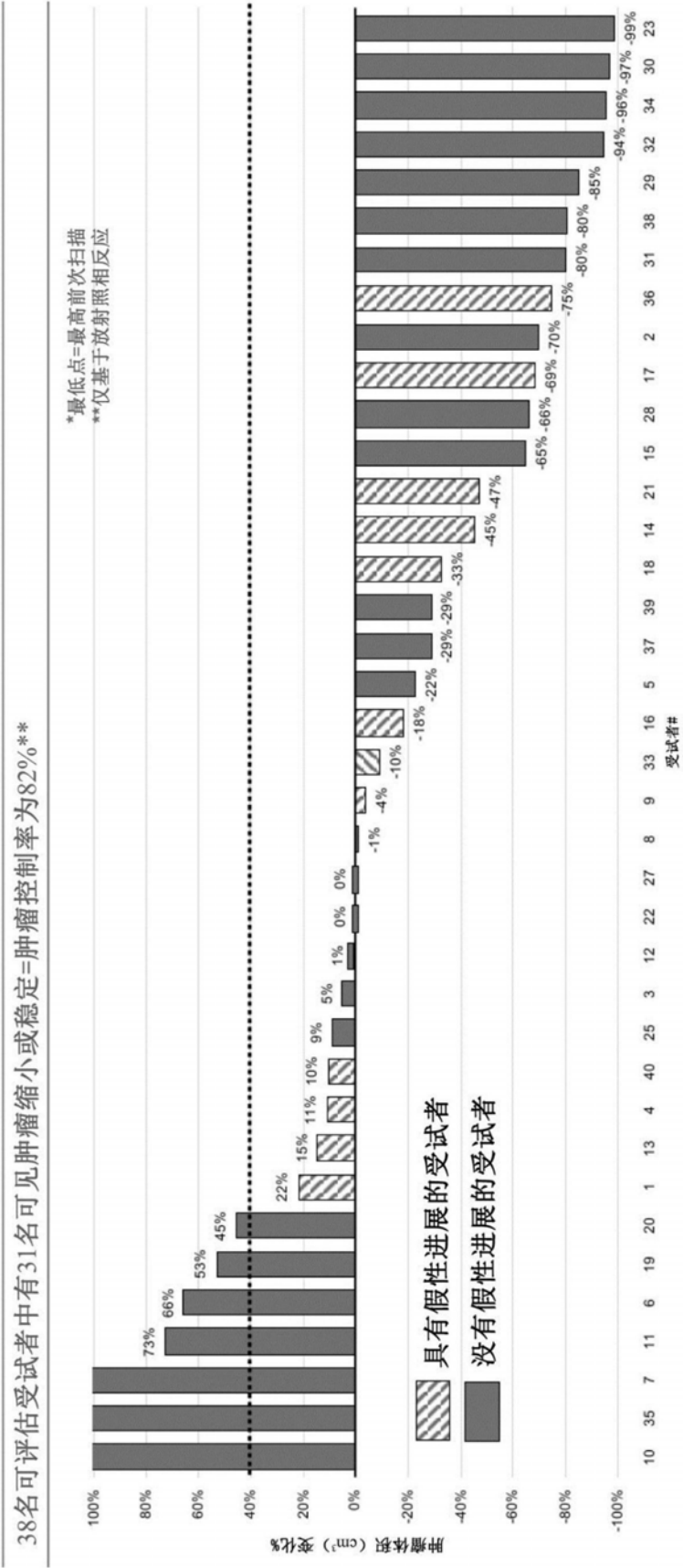


图31

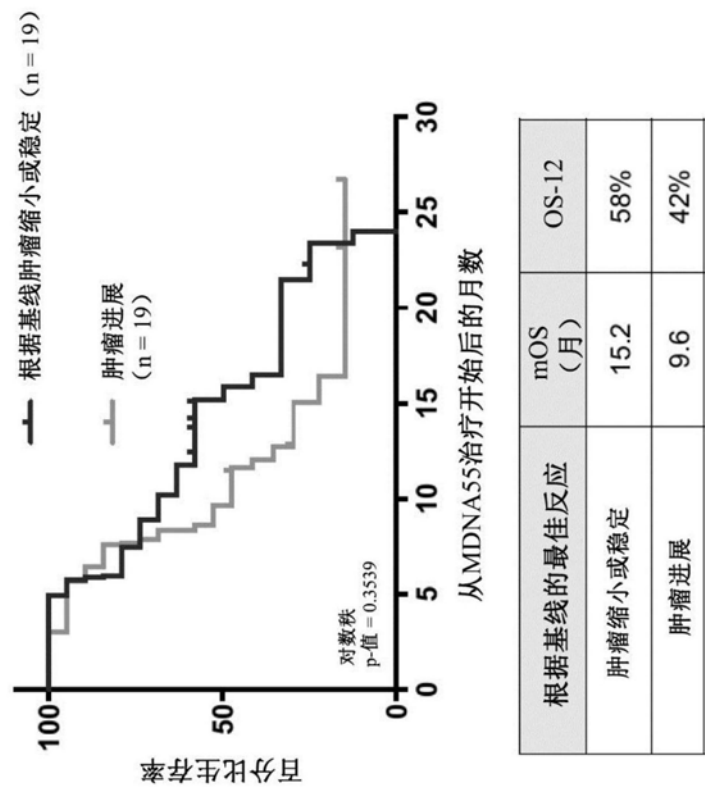


图32A

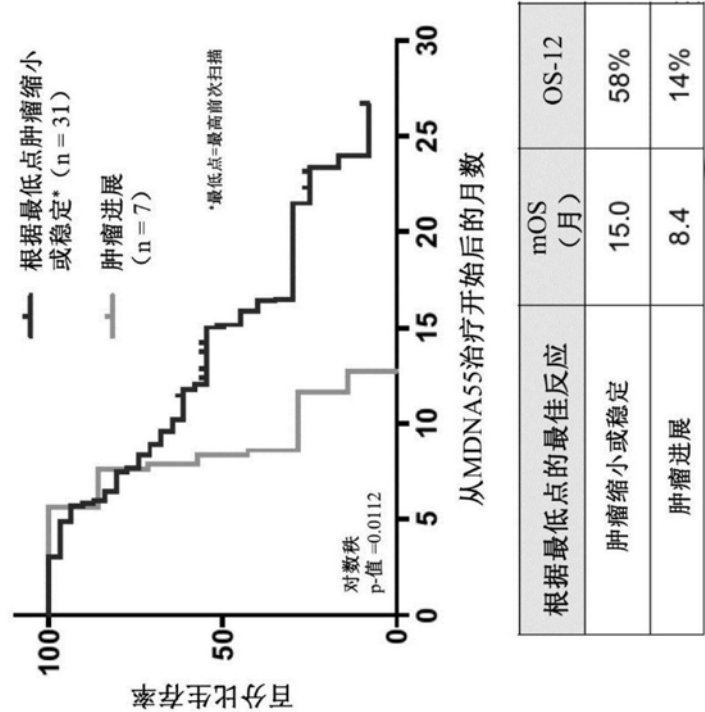


图32B

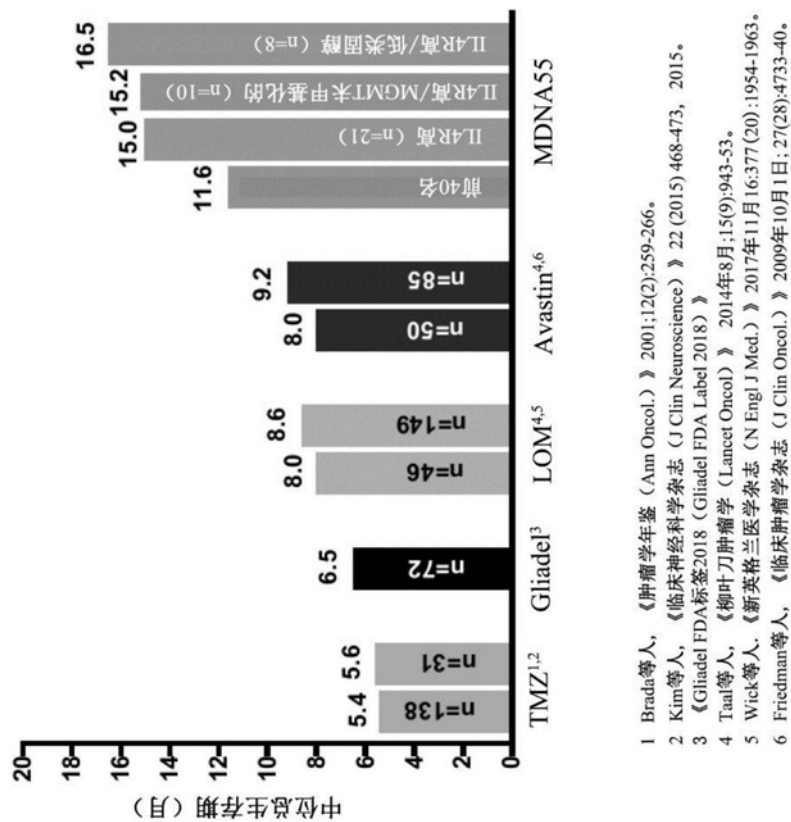


图33A

1 Brada等人,《肿瘤学年鉴 (Ann Oncol.)》2001;12(2):259-266。
2 Kim等人,《临床神经科学杂志 (J Clin Neuroscience)》22 (2015) 468-473, 2015。
3《Gliadel FDA标签2018 (Gliadel FDA Label 2018)》
4 Taal等人,《柳叶刀肿瘤学 (Lancet Oncol)》2014年8月;15(9):943-53。
5 Wick等人,《新英格兰医学杂志 (N Engl J Med.)》2017年11月16;377(20):1954-1963。
6 Friedman等人,《临床肿瘤学杂志 (J Clin Oncol.)》2009年10月1日;27(28):4733-40。

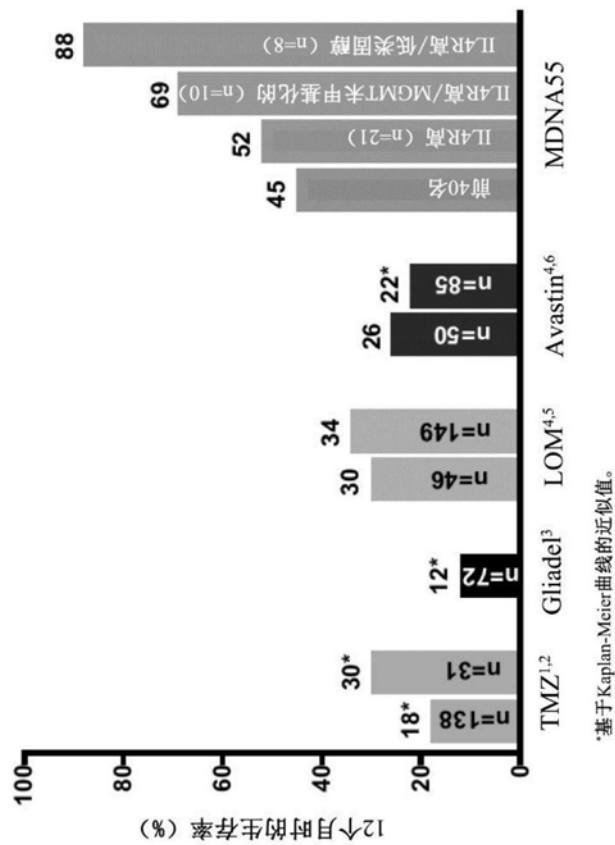


图33B