



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113230384 A

(43) 申请公布日 2021.08.10

(21) 申请号 202110564807.8

A61P 37/06 (2006.01)

(22) 申请日 2015.10.07

(30) 优先权数据

62/061,952 2014.10.09 US

(62) 分案原申请数据

201580067147.5 2015.10.07

(71) 申请人 丹娜法伯癌症研究院

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 J·克乐斯 R·J·索伊福尔

J·里茨

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

代理人 赵昊 孙倩

(51) Int. Cl.

A61K 38/20 (2006.01)

权利要求书1页 说明书88页

序列表7页 附图6页

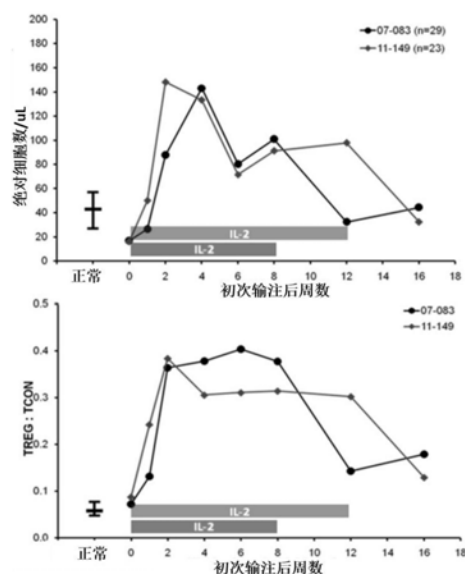
(54) 发明名称

用于治疗免疫失调的多次-可变IL-2剂量方

案

(57) 摘要

本发明(部分)基于识别了使用多次-可变IL-2剂量的用于识别、评估、预防和治疗免疫失调的方法。



1. 一种用于治疗罹患免疫失调的受试者的多次-可变IL-2剂量方法,其包括:
  - a) 给予所述受试者诱导方案,所述诱导方案包括以增加所述受试者的血浆白细胞介素-2 (IL-2) 水平并增加所述受试者的调节性T淋巴细胞 (Tregs) 与常规T淋巴细胞 (Tcons) 的比率 (Tregs:Tcons) 的剂量持续给予所述受试者IL-2;以及
  - b) 随后给予所述受试者至少一个维持方案,所述维持方案包括持续给予所述受试者IL-2维持剂量,所述IL-2维持剂量高于所述诱导方案剂量并且i) 进一步增加所述受试者的血浆IL-2水平和ii) 进一步增加所述Tregs:Tcons比率,从而治疗所述受试者。
2. 权利要求1所述的方法,其中所述IL-2维持方案使所述受试者的血浆IL-2水平增加至超过由所述诱导方案所诱导的血浆IL-2峰值水平。
3. 权利要求1或2所述的方法,其中所述血浆IL-2水平是通过在IL-2给予后分析一次或多次如下指标来确定的:IL-2蛋白水平、IL-2蛋白活性、IL-2核酸水平、Tregs增殖、Tregs活性、Tregs磷酸化STAT5水平、Tregs FOXP3水平和Tregs凋亡。
4. 权利要求1-3任一项所述的方法,其中所述诱导方案剂量为约 $0.3 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>/天至约 $3.0 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>/天。
5. 权利要求1-4任一项所述的方法,其中所述诱导方案剂量小于约 $6.0 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>/天。
6. 权利要求1-5任一项所述的方法,其中所述诱导方案的持续给予包括每天给予一次,且只要所述患者持续产生临床受益即可无限期持续。
7. 权利要求6所述的方法,其中所述诱导方案的持续给予包括在至少1-14个连续日期间每天给予一次。
8. 权利要求1-7任一项所述的方法,其中所述维持方案中的Tregs:Tcons比在所述诱导方案期间的最大Tregs:Tcons增加至少20%。
9. 权利要求1-8任一项所述的方法,其中所述维持方案剂量比所述诱导方案剂量高至少约20%。
10. 权利要求1-9任一项所述的方法,其中所述维持方案剂量为约 $0.3 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>/天至约 $3.0 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>/天。

## 用于治疗免疫失调的多次-可变IL-2剂量方案

### [0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是申请号为201580067147.5、申请日为2015年10月7日、发明名称为“用于治疗免疫失调的多次-可变IL-2剂量方案”的中国发明专利申请的分案申请,原申请为国际申请号为PCT/US2015/054466的国家阶段申请,该国际申请要求申请日为2014年10月9日,申请号为62/061,952的美国临时专利申请的优先权。

### [0003] 发明背景

[0004] 调节性T细胞(Tregs)是免疫耐受所需的并作为适应性和先天性免疫效应细胞的主要抑制物发挥作用。基于Tregs的疗法提供了体内平衡机制用以控制在免疫失调,例如实体器官移植排斥和移植物抗宿主病(GVHD),以及越来越多涉及Tregs功能紊乱的其它受损外周耐受紊乱(例如,系统性自身免疫疾病包括血管炎、系统性红斑狼疮(SLE)、1型糖尿病(T1D)、多发性硬化症(MS)、银屑病、类风湿性关节炎(RA)、炎症性肠病(IBD)和过敏性哮喘)中关注到的适应不良的免疫活化(Saadoun等人,(2011)N.Engl.J.Med.365:2067-2077; Hartemann等人,(2013)Lancet Diabetes Endocrinol.1:295-305;Humrich等人,(2014)Ann.Rheum.Dis.73:A46;Lambrecht等人,(2013)Eur.J.Immunol.43:3125-3137)。然而,基于输注离体扩增的Tregs的治疗途径难以实现并且不能满足长期的炎症控制对维持过继转移细胞的功能的需求(Brunstein等人,(2011)Blood 117:1061-1070)。此外,虽然低剂量IL-2可提高Tregs,但半数cGVHD参与者未获得临床受益(Koreth等人,(2011)N.Engl.J.Med.365:2055-2066)。因此,现有技术中存在针对用于提高Tregs稳定性以改善不想要的免疫反应的组合物和方法的巨大需求。特别地,cGVHD治疗的进展是迫切需求的,尤其是对于儿童,其有多年的生活伴随着cGVHD的致人衰弱化后果,例如皮肤硬化、关节挛缩或肺纤维化。

### [0005] 发明概述

[0006] 本发明(至少部分)基于发现了多次-可变剂量IL-2可在体内显著增加Treg的数目和活性以治疗免疫失调,例如GVHD(例如,发作的、慢性GVHD)。此种治疗的效果可以通过与一种或多种附加抗免疫失调治疗(诸如,给予ECP和/或Tregs)相结合以进一步增加。

[0007] 在一个方面中,提供了用于治疗罹患免疫失调的受试者的多次-可变IL-2剂量方法,其包括:a)给予所述受试者诱导方案,所述诱导方案包括以增加所述受试者的血浆白细胞介素-2(IL-2)水平并增加所述受试者的调节性T淋巴细胞(Tregs)与常规T淋巴细胞(Tcons)的比率(Tregs:Tcons)的剂量持续给予所述受试者IL-2;以及b)随后给予所述受试者至少一个维持方案,所述维持方案包括持续给予所述受试者IL-2维持剂量,所述IL-2维持剂量高于所述诱导方案剂量并且i)进一步增加所述受试者的血浆IL-2水平和ii)进一步增加所述Tregs:Tcons比率,从而治疗所述受试者。

[0008] 某些实施方式可适用于本文所述的任何方法。例如,在一个实施方式中,所述IL-2维持方案使所述受试者的血浆IL-2水平增加至超过由所述诱导方案所诱导的血浆IL-2峰值水平。在另一实施方式中,所述血浆IL-2水平是通过在IL-2给予后分析一次或多次如下指标来确定的:IL-2蛋白水平、IL-2蛋白活性、IL-2核酸水平、Tregs增殖、Tregs活性、Tregs

磷酸化STAT5水平、Tregs FOXP3水平和Tregs凋亡。在又一实施方式中,所述诱导方案剂量为约 $0.3 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>/天至约 $3.0 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>/天。在又一实施方式中,所述诱导方案剂量小于约 $6.0 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>/天。在另一实施方式中,所述诱导方案的持续给予包括每天给予一次,且只要所述患者持续产生临床获益即可无限期持续。在又一实施方式中,所述诱导方案的持续给予包括至少在连续的1-14天期间每天给予一次。在又一实施方式中,所述维持方案中的Tregs:Tcons比率比在所述诱导方案期间的最大Tregs:Tcons增加至少20%。在另一实施方式中,所述维持方案剂量比所述诱导方案剂量高至少约20%。在又一实施方式中,所述维持方案剂量为约 $0.3 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>/天至约 $3.0 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>/天。在又一实施方式中,所述维持方案剂量小于约 $6.0 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>/天。在另一实施方式中,所述维持方案的持续给予包括只要所述患者持续产生临床获益即可无限期给予。在又一实施方式中,所述维持方案的持续给予包括至少在连续的1-42天期间每天给予一次。

[0009] 在又一实施方式中,以药学上可接受的制剂形式给予所述IL-2。在另一实施方式中,通过选自下组的给予途径给予所述IL-2:皮下、静脉内、腹膜内和肌肉内。在又一实施方式中,通过皮下给予所述IL-2。在又一实施方式中,所述免疫失调选自下组:移植物抗宿主病(GVHD)、实体器官移植排斥、血管炎、系统性红斑狼疮(SLE)、1型糖尿病(T1D)、多发性硬化症(MS)、银屑病、类风湿性关节炎(RA)、炎症性肠病(IBD)和过敏性哮喘。在另一实施方式中,所述免疫失调是cGVHD。在又一实施方式中,所述受试者已对系统性类固醇响应不足。在又一实施方式中,所述受试者尽管接受了包括类固醇在内的至少两种在先系统性治疗但仍具有顽固性或复发性慢性GVHD。在另一实施方式中,所述受试者在IL-2给予之前已接受了体外光分离置换法(ECP)治疗。在又一实施方式中,所述诱导方案和/或所述维持方案进一步包括给予一种或多种附加治疗以治疗所述免疫失调。在又一实施方式中,所述一种或多种附加治疗选自下组:ECP和Tregs。在另一实施方式中,以包含除了Tregs以外的T细胞的组合物的形式给予所述Tregs。在又一实施方式中,所述组合物具有至少1:2的Tregs:Tcons比率。在又一实施方式中,通过对包含T细胞的生物材料的CD8<sup>+</sup>和CD19<sup>+</sup>细胞共排除以及CD25<sup>+</sup>阳性细胞选择获得所述组合物。在另一实施方式中,所述Tregs以约 $0.1 \times 10^6$  细胞/kg体重至 $1.0 \times 10^6$  细胞/kg体重之间的剂量给予。在又一实施方式中,将所述受试者自身的Treg给予所述受试者。在又一实施方式中,使用与造血干细胞移植物来自相同的造血干细胞供体的Tregs。在另一实施方式中,所述Tregs组合物具有>70%总细胞活率、革兰氏染色阴性、≥90%CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>细胞和/或≥50%FoxP3<sup>+</sup>细胞。在又一实施方式中,所述Tregs以输液形式给予。在又一实施方式中,在IL-2给予之前、同时或之后给予所述Tregs。在另一实施方式中,在IL-2给予之前给予所述Tregs。在又一实施方式中,所述受试者是哺乳动物,例如免疫失调的人类或动物模型。

[0010] 在另一方面中,提供了一种根据从固定每日IL-2剂量的治疗方法中的获益情况将罹患免疫失调的受试者分层的方法,包括从受试者处获得包含T淋巴细胞的生物样本并测定所述受试者样本中调节性T淋巴细胞(Tregs)与常规T淋巴细胞(Tcons)的比率(Tregs:Tcons),其中大于或等于约0.07的Tregs:Tcons比率表明所述受试者将会受益于所述固定每日IL-2剂量的治疗方法,而其中小于约0.07的Tregs:Tcons比率则表明所述受试者将不会受益于所述固定每日IL-2剂量的治疗方法。在一个实施方式中,所述方法进一步包括若确定所述免疫失调会受益于固定每日IL-2剂量的治疗方法则推荐、开具处方或给予固定每

日IL-2剂量的方法或本文所描述的治疗方法。在另一实施方式中,所述方法进一步包括若确定所述免疫失调不会受益于固定每日IL-2剂量的治疗方法则推荐、开具处方或给予固定每日IL-2剂量的治疗方法以外的抗免疫失调疗法。

[0011] 在又一方面中,提供了一种根据从固定每日IL-2剂量的治疗方法中的获益将罹患免疫失调的受试者分层的方法,包括从诱导方案之后的受试者处获得包含T淋巴细胞的生物样本并测定所述受试者样本中调节性T淋巴细胞(Tregs)与常规T淋巴细胞(Tcons)的比率(Tregs:Tcons),其中大于或等于约0.20的Tregs:Tcons比率表明所述受试者将会受益于所述固定每日IL-2剂量的治疗方法,而其中小于约0.20的Tregs:Tcons比率则表明所述受试者将不会受益于所述固定每日IL-2剂量的治疗方法。在一个实施方式中,所述方法进一步包括若确定所述免疫失调会受益于所述固定每日IL-2剂量的治疗方法则推荐、开具处方或给予固定每日IL-2剂量的方法或本文所述的治疗方法。在另一实施方式中,所述方法进一步包括若确定所述免疫失调不会受益于固定每日IL-2剂量的治疗方法则推荐、开具处方或给予固定每日IL-2剂量的治疗方法以外的抗免疫失调疗法。

[0012] 附图简述

[0013] 图1采用每日低剂量IL-2治疗期间CD4<sup>+</sup> Treg的体内扩增。示出了基于CD3+CD4<sup>+</sup> T进行门控的细胞分选分析结果。Tregs被定义为CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>,而Tcons被定义为CD25<sup>-</sup>CD127<sup>+</sup>。CD4门内的Tregs%在各图中显示。图1描述了使用剂量水平B的代表性患者。

[0014] 图2显示了进行IL-2治疗的中位数Tregs:Tcons比率。其在开始IL-2治疗的数周内具有快速的升高和持续的平台期,以及8周时停止IL-2治疗后的下降。显示了中位数及其四分差。

[0015] 图3显示IL-2水平随着Tregs绝对数量的增加而下降。左图显示了IL-2治疗期间的Treg细胞计数和IL-2水平。显示了在一个8周的IL-2治疗方案期间Treg计数/ $\mu$ L(方格)对比以pg/ $\mu$ L为单位的血浆IL-2水平(三角)。右图显示了IL-2受体 $\alpha$ (CD25; IL-2R)的细胞表面表达。低剂量IL-2期间,在Tregs中发现了IL-2R表达的持续增加(顶线)但在Tcons中则未发现(底线)。

[0016] 图4显示了IL-2介导的Treg作用在1期对比2期研究中的结果。左图显示了1期(圆圈)对比2期试验(方块)中的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>Tregs计数/ $\mu$ L。右图显示了1期(圆圈)对比2期试验(方块)的Tregs:Tcons比率。条形指示1期的IL-2治疗持续时间(8周,下方的条形)对比2期的IL-2治疗持续时间(12周,上方的条形)。

[0017] 图5显示了使用CyTOF对Treg亚群的FoxP3表达进行SPADE分析的结果。在进行12周低剂量IL-2研究的代表性患者中,RTE/初始和记忆Treg群体在SPADE树形图中分别集群并在各组内进一步描绘出活化Treg亚群。气泡大小反映细胞数目且FoxP3表达水平强度被示出。在左上图中,在IL-2治疗前基线时,记忆Treg群体具有较高的FoxP3表达。在右上图中,在1周时,IL-2在所有Treg亚群中诱导FoxP3。在左下图中,在IL-2治疗的12周时,记忆Treg具有较高的FoxP3表达。在右下图中,停止IL-2治疗后,Treg群体大幅耗尽,在记忆Treg亚群中具有有限的残留FoxP3表达。

[0018] 图6显示了采用低剂量IL-2的Tregs和Tcons库多样性的T细胞受体(TCR)序列分析结果。Treg熵(E)在8周IL-2后的cGVHD患者中增加,Tcon熵无变化。Tcons在上方的图中示出且Tregs在下方的图中示出。各图的熵(E)被示出。右下图对比左下图,尽管Y-轴的标度增加

了(1K→5K),但其中额外的高产的Treg TCR序列还是明显的。

[0019] 图7使用Tregs:Tcons比率示出了IL-2治疗的反应预测值。示出了临床响应者(PR)对比无响应者(SD/MR/PD)在基线时和1周时的Tregs:Tcons比率。所有数据均来源于固定剂量IL-2给予实验。

[0020] 图8显示了CD4+DLI±IL-2后FOXP3表达的结果。在来自接受CD4+DLI(底部的线)、低剂量IL-2(中部的线)或CD4+DLI+低剂量IL-2(顶部的线)的患者的PBMC中通过实时PCR评估FOXP3表达。借鉴自Zorn等人,(2009) Biol.Blood Marrow Transplant.15:382-388。

#### [0021] 发明详述

[0022] 已确定在固定剂量IL-2治疗期间血浆IL-2水平快速上升(例如,经1周),然后,尽管每日给予IL-2,血浆IL-2水平下降而Tregs计数上升(Matsuoka等人,(2013) Sci.Transl.Med.5:179ra43),且据信该结果是因为IL-2与在Tregs上组成性表达的高亲和力IL-2受体(CD25)结合而增加的IL-2截留。其后,随着Treg绝对数的增加,Tregs上的CD25表达在IL-2治疗期间进一步的增加(Matsuoka等人,(2013) Sci.Transl.Med.5:179ra43)。本文已确定在所有Treg亚群中开始IL-2诱导方案后1周,伴随Tregs群体规模的增加发生Tregs增殖的峰值。然而,Tregs增殖在2周后减弱,在IL-2治疗的12周时,在扩大的Treg亚群得到保留的同时Ki-67表达(增殖)下降。使用pSTAT5和FoxP3标记物观测到相似的Tregs活化时间分布模式,其在各Treg亚群具有最初早期普遍的增强,之后在IL-2治疗期间尽管继续保持了增大的Treg群体规模但Tregs的活化减弱。然后在IL-2停止后4周观测到Treg活化标记物的表达的下降和Treg群体的大幅耗尽。因此,涉及个体患者IL-2剂量增加(例如,在诱导方案的峰值血浆IL-2水平后)的维持方案恢复血浆IL-2水平并进一步扩大Treg增殖、活化和新生,而不诱导Tcon活化或过度不良事件。以这种方式,IL-2诱导的Treg增强在体内发生,且避免了IL-2在被增加数目的具有较高CD25表达的循环Treg结合后其血浆水平减小所导致的快速耐受。因此,本发明的方法提供了使用IL-2出乎预料地增强了免疫失调的治疗,并允许将Tregs和Tcons直接或间接用作在治疗此类免疫失调中IL-2功效的生物标志物。

#### [0023] I. 定义

[0024] 本文所用的冠词“一(a)”和“一个(an)”是指一个或超过一个(即,至少一个)所述冠词的语法对象。举例而言,“一个要素”意指一个要素或者超过一个要素。

[0025] 术语“改变的量”或“改变的水平”是指升高或降低的生物标志物核酸的拷贝数(例如,种系和/或体系),例如,相比于对照样本中生物标志物核酸的表达水平或拷贝数,生物样本中升高或降低的表达水平。术语生物标志物的“改变的量”还包括相比于正常、对照样本中的相应蛋白水平,样本(例如,免疫失调样本)中升高或降低的生物标志物蛋白的蛋白水平。此外,可通过检测可影响生物标志物蛋白的表达或活性的翻译后修饰(例如,标记物的甲基化状态),来测定生物标志物蛋白的改变的量。

[0026] 若生物标志物的量以超过用于评估量的试验的标准误差的量分别高于或低于正常水平,且优选至少超过该量20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、350%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%或更多,则受试者中生物标志物的量“显著”高于或低于该生物标志物的正常量。或者,若受试者中生物标志物的量分别高于或低于该生物标志物的正常量至少约两倍,且优选至少约三倍、四倍或五倍,

则受试者中生物标志物的量可视为“显著”高于或低于该正常量。

[0027] 术语生物标志物的“改变的表达水平”是指测试样本(例如,来源于罹患免疫失调的患者的样本)中生物标志物的表达水平或拷贝数大于或小于用于评估表达或拷贝数的试验的标准误差,且优选为对照样本(例如,来自未患相关疾病的健康受试者的样本)中生物标志物的表达水平或拷贝数(且优选为若干对照样本中生物标志物的平均表达水平或拷贝数)的至少两倍,且更优选为三倍、四倍、五倍或十倍或更多倍。改变的表达水平大于或小于用于评估表达或拷贝数的试验标准误差,且优选为对照样本(例如,来自未患相关疾病的健康受试者的样本)中生物标志物的表达水平或拷贝数(且优选为若干对照样本中生物标志物的平均表达水平或拷贝数)的至少两倍,且更优选为三倍、四倍、五倍或十倍或更多倍。

[0028] 术语生物标志物的“改变的活性”是指相比于正常、对照样本中生物标志物的活性,在疾病状态下(例如,在免疫失调样本中)生物标志物升高或降低的活性。生物标志物的改变的活性可为例如以下的结果:生物标志物的改变的表达、生物标志物的改变的蛋白水平、生物标志物的改变的结构,或者,例如,其与涉及相同或不同通路的其它蛋白的改变的相互作用或者与转录激活剂或抑制剂的改变的相互作用。

[0029] 术语生物标志物的“改变的结构”是指与正常或野生型基因或蛋白相比,在生物标志物的核酸或蛋白中存在突变或等位基因变体,例如影响生物标志物核酸或蛋白的表达或活性的突变。例如,突变包括但不限于取代、缺失或插入突变。突变可存在于生物标志物核酸的编码区或非编码区。

[0030] 除非本文中另有指明,否则术语“抗体”(“antibody”和“antibodies”)广泛包括天然形式的抗体(例如IgG、IgA、IgM、IgE)和重组抗体(例如单链抗体、嵌合和人源化抗体和多特异性抗体),以及所有前述的片段和衍生物,该片段和衍生物具有至少一个抗原结合位点。抗体衍生物可包括偶联至抗体的蛋白或化学部分。

[0031] 如本文所用的术语“抗体”还包括抗体的“抗原结合部分”(或简称“抗体部分”)。如本文所用的术语“抗原结合部分”是指抗体的一个或多个保留了与抗原(例如,生物标志物多肽或其片段)特异性地结合能力的片段。已发现抗体的抗原结合功能能够由全长抗体的片段实现。术语抗体的“抗原结合部分”中包含的结合片段的实例包括(i) Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')<sub>2</sub>片段,包含通过二硫键在铰链区连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体单一臂的VL和VH结构域组成的Fv片段,(v) dAb片段(Ward等人,(1989) Nature 341:544-546),其由VH结构域组成;和(vi) 分离的互补性决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由不同的基因编码,可以使用重组的方法通过合成的接头将其连接在一起,所述合成的接头使其能够被制成单一的蛋白链,在其中VL和VH区域配对形成单价多肽(称为单链Fv(scFv);参见例如,Bird等人,(1988) Science 242:423-426;和Huston等人,(1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;和Osborn等人,1998,Nature Biotechnology 16:778)。此类单链抗体也旨在被包括在术语抗体的“抗原结合部分”中。特定scFv的任何VH和VL序列可连接至人免疫球蛋白恒定区cDNA或基因组序列,以生成编码完整IgG多肽或其它同种型的表达载体。还可使用蛋白质化学或重组DNA技术将VH和VL用于生成Fab、Fv或其它免疫球蛋白片段。还包括其它单链抗体形式,例如双价抗体。双价抗体是二价的双特异性抗体,其中VH和VL域在单一多肽链上表达,但使用由于太短而无法使在相同结构链上的两

个域之间进行配对的接头,从而迫使各结构域与另一条链的互补结构域配对并生成两个抗原结合位点(参见例如,Holliger等人,(1993) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90:6444-6448; Poljak等人,(1994) *Structure* 2:1121-1123)。

[0032] 更进一步地,抗体或其抗原结合部分可为较大的免疫粘附多肽的部分,其通过将抗体或抗体部分与一个或多个其它蛋白或肽的共价或非共价连接形成。此类免疫粘附多肽的实例包括使用链霉亲和素核心区以制备四聚scFv多肽(Kipriyanov等人,(1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101)以及使用半胱氨酸残基、生物标志物肽和C-末端聚组氨酸标签以制备二价的和生物素化的scFv多肽(Kipriyanov等人,(1994) *Mol.Immunol.* 31:1047-1058)。可使用常规技术,例如分别用木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化完整抗体而由完整抗体制备抗体部分,例如Fab和F(ab')<sub>2</sub>片段。此外,可使用如本文所述的标准重组DNA技术获得抗体、抗体部分和免疫粘附多肽。

[0033] 抗体可以是多克隆的或单克隆的;异种的、同种异体的或同基因的;或其经修饰的形式(例如人源化的、嵌合的等)。抗体还可以是全人的。优选地,本发明的抗体特异性地或基本上特异性地与生物标志物多肽或其片段结合。本文所用的术语“单克隆抗体”和“单克隆抗体组合物”是指仅包含一种能够与特定抗原表位免疫反应的抗原结合位点的抗体多肽群体,而术语“多克隆抗体”和“多克隆抗体组合物”是指包含多种能够与特定抗原反应的抗原结合位点的抗体多肽群体。单克隆抗体组合物通常显示出对于与其免疫反应的特定抗原的单一结合亲和力。

[0034] 抗体还可为“人源化的”,其旨在包括通过非人细胞制得的具有已经改变的可变和恒定区结构域以更类似于由人类细胞制得的抗体的抗体。例如,通过改变非人抗体氨基酸序列以并入在人种系免疫球蛋白序列中发现的氨基酸。本发明的人源化抗体可包括不由人种系免疫球蛋白序列所编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或定点突变或者通过体内体细胞突变所引入的突变),例如在CDR中。本文所用的术语“人源化抗体”还包括其中来源于另一哺乳动物物种(例如,小鼠)的种系的CDR序列已被接枝到人框架序列上的抗体。

[0035] 术语“指定分数”是指当在患者样本中进行测量后为各生物标志物指定的数值。该指定分数与样本中生物标志物的缺失、存在或推测的量相关连。指定分数可人工生成(例如,通过目测)或借助于用于图像采集和分析的仪器。在某些实施方式中,指定分数是通过定性评估(例如,在分级量表上检测荧光读数)或定量评估来确定的。在一个实施方式中,测定“累积分数”,其是指来自多个经测量生物标志物的指定分数的组合。在一个实施方式中,累积分数是指定分数的总和。在另一实施方式中,指定分数的组合包括在将指定分数组合入累积分数之前对其进行数学运算。在某些实施方式中,累积分数在本文中还可称作预测分数。

[0036] 术语“生物标志物”是指已被确定为可对抗免疫失调疗法和/或抗免疫失调有效治疗(例如,多次-可变剂量IL-2疗法单独使用或与一种或多种其它抗免疫失调疗法组合使用)进行预测的本发明的可测量实体。生物标志物可包括(不限于)细胞类型(例如,Tregs和/或Tcons)、细胞比率(例如Tregs:Tcons比率)、核酸(例如,基因组核酸和/或转录核酸)和蛋白,特别是表1中显示涉及的那些。生物标志物可进一步包括免疫学靶标或试剂,其下调不希望的免疫反应以治疗如本文进一步描述的感兴趣的免疫失调。

[0037] “阻断”抗体或抗体“拮抗剂”是抑制或减少其结合的抗原的至少一种生物活性的

抗体。在某些实施方式中,本文所述的阻断抗体或拮抗剂抗体或其片段基本上或完全地抑制抗原的给定生物活性。

[0038] 术语“体液”指由机体排泄或分泌的液体以及正常情况下机体不排泄或不分泌的液体(例如,羊水、眼房水、胆汁、血液和血浆、脑脊液、泪液和耳垢、考珀液或预射精液、乳糜、食糜、粪便、女性射液、间质液、细胞内液、淋巴液、月经、乳汁、黏液、胸膜液、脓、唾液、皮脂、精液、血清、汗液、滑液、泪液、尿液、阴道润滑液、玻璃体液和呕吐物)。在某些实施方式中,使用包含淋巴细胞(例如,T淋巴细胞及其亚群)的体液。

[0039] 术语“编码区”是指包含翻译成氨基酸残基的密码子的核苷酸序列区域,而术语“非编码区”是指不翻译成氨基酸的核苷酸序列区域(例如,5'和3'非翻译区)。

[0040] 术语“互补的”是指两条核酸链的区域之间或者相同核酸链的两个区域之间的广义序列互补性。已知第一核酸区域的腺嘌呤残基能够与反向平行于该第一区域的第二核酸区域的胸腺嘧啶或尿嘧啶残基形成特定氢键(“碱基配对”)。类似地,已知第一核酸链的胞嘧啶残基能够与反向平行于第一链的第二核酸链的鸟嘌呤残基碱基配对。若当核酸的第一区域与相同或不同核酸的第二区域以反向平行方式排列时第一区域的至少一个核苷酸残基能够与第二区域的残基形成碱基配对,则两个区域是互补的。优选地,第一区域包含第一部分且第二区域包含第二部分,由此当第一和第二部分以反向平行方式排列时,至少约50%,且优选至少约75%、至少约90%或至少约95%的第一部分的核苷酸残基能够与第二部分中的核苷酸残基形成碱基配对。更优选地,第一部分的所有核苷酸残基能够与第二部分中的核苷酸残基形成碱基配对。

[0041] 术语“对照”是指适于与测试样本中的表达产物进行比较的任何参照标准。在一个实施方式中,对照包括获得“对照样本”,检测其中的表达产物水平并与来自测试样本的表达产物水平进行比较。此对照样本可包括任何适当的样本,包括但不限于具有已知结果的来自对照免疫失调患者的样本(可为贮存样本或之前样本的测量值);分离自受试者(例如,正常患者或免疫失调患者)的正常组织或细胞、分离自受试者(例如,正常受试者或免疫失调患者)的经培养原代细胞/组织、获得自免疫失调患者的相同器官或身体位置的邻近的正常细胞/组织、分离自正常受试者的组织或细胞样本、或者获得自贮藏库的原代细胞/组织。在另一优选实施方式中,对照可包括来自任何适当来源的参照标准表达产物水平,其包括但不限于管家基因,来自正常组织(或其它之前分析的对照样本)的表达产物水平范围,来自患者群或者来自具有某种结果(例如,存活一年、两年、三年、四年等)或接受某种治疗(例如,免疫失调疗法标准护理)的患者组的测试样本内的之前测定的表达产物水平范围。本领域技术人员将会理解,此类对照样本以及参照标准表达产物水平可组合用作本发明方法中的对照。在一个实施方式中,对照可包括正常或非免疫失调细胞/组织样本。在另一优选实施方式中,对照可包括一组患者(例如,一组免疫失调患者)的表达水平,或者一组接受某种治疗的免疫失调患者的表达水平,或者一组具有结果与另一结果比较的患者的表达水平。在前述情况下,各患者的具体表达产物水平可被指定为表达的百分数水平,或表示为高于或低于参照标准表达水平的中值或平均值。在另一优选实施方式中,对照可包括正常细胞、来自采用联合化疗治疗的患者的细胞、以及来自对感兴趣的治疗产生响应的患有免疫失调的患者的细胞。在另一实施方式中,对照还可包括测量值例如,群体中特定基因的平均表达水平相比于相同群体中管家基因的表达水平。此群体可包括正常受试者、未经历任何治疗

(即,未经治疗)的免疫失调患者、正经历标准护理治疗的免疫失调患者、或者已响应感兴趣的治疗的患有免疫失调的患者。在另一优选实施方式中,对照包括表达产物水平的比率转化,其包括但不限于测定测试样本中两种细胞类型和/或基因的表达产物水平比率并将其与参照标准中相同两种细胞类型和/或基因的任何适当比率进行比较;测定测试样本中两种或多种细胞类型和/或基因的表达产物水平并且测定在任何适当对照中表达产物水平的差异;以及测定测试样本中两种或多种细胞类型和/或基因的表达产物水平,以测试样本中管家细胞类型和/或管家基因的表达来将其归一化,以及将其与任何适当的对照进行比较。在特别优选实施方式中,对照包括与测试样本为相同谱系和/或类型的对照样本。在另一实施方式中,对照可包括以在一组患者样本中或基于一组患者样本的百分数(例如,所有患者均患有免疫失调)来分组的表达产物水平。在一个实施方式中,确立对照表达产物水平,其中相对于例如特定百分数的较高或较低的表达产物水平被用作预测结果的基础。在另一优选实施方式中,使用来自具有已知结果的免疫失调对照患者的表达产物水平来确立对照表达产物水平,并将来自测试样本的表达产物水平与对照表达产物水平进行比较作为用于预测结果的基础。如通过以下数据所证实的,本发明的方法不限于在将测试样本中表达产物水平与对照中的进行比较时使用特定分割点。

[0042] 生物标志物核酸的“拷贝数”是指细胞(例如,种系和/或体系的)中编码特定基因产物的DNA序列的数目。通常,对于给定基因,哺乳动物具有两拷贝的各基因。然而,拷贝数可通过基因扩增或复制而增加,或者通过删除而减少。例如,种系拷贝数改变包括一个或多个基因座处的改变,其中所述一个或多个基因座不能被解释成对照中种系拷贝的正常补体中的拷贝数(例如,与确定特定种系DNA和相应拷贝数的物种相同的物种的种系DNA中的正常拷贝数)。体系拷贝数改变包括一个或多个基因座处的改变,其中所述一个或多个基因座不能被解释成对照的种系DNA中的拷贝数(例如,与确定体系DNA和相应拷贝数的受试者相同的受试者种系DNA中的拷贝数)。

[0043] 生物标志物核酸的“正常”拷贝数(例如,种系和/或体系的)或者生物标志物核酸或蛋白的“正常”表达水平是生物样本(例如,包含组织、全血、血清、血浆、口腔拭子、唾液、脑脊液、尿液、粪便和骨髓的样本)中的活性/表达水平或拷贝数,所述生物样本来自受试者(例如,未罹患免疫失调的人)或来自患有免疫失调的相同受试者中的相应非免疫失调组织。

[0044] 采用术语“确定用于受试者的适当治疗方案”以表示用于受试者的治疗方案(即,用于预防和/或治疗受试者中免疫失调的单一疗法或者不同疗法的组合)的确定,其开始、修改和/或结束是基于或基本上基于或至少部分基于根据本发明的分析的结果。一个实例是确定是否提供针对免疫失调的靶向治疗以提供抗免疫失调疗法(例如,多次-可变剂量IL-2疗法单独使用或与一种或多种其它抗免疫失调疗法组合)。除了根据本发明的分析的结果以外,该确定可基于待治疗受试者的个人特质。在大部分情况下,将由主治医师或医生实际确定用于受试者的适当治疗方案。

[0045] 术语“表达特征”或“特征”是指一组两种或多种协同表达的生物标志物。例如,组成该特征的基因、蛋白等可在特定细胞谱系、分化阶段或在特定生物反应期间表达。生物标志物可反映表达其的细胞类型的生物学特性。表达数据和基因表达水平可贮存在计算机可读介质上,例如与微阵列或芯片阅读装置结合使用的计算机可读介质。可处理此表达数据

以生成表达特征。

[0046] 如果分子或细胞共价或非共价地与基底结合从而可采用流体(例如,标准柠檬酸盐溶液,pH 7.4)冲洗基底而无相当大的一部分分子或细胞与基底解离,则该分子或细胞“固定”或“附着”于基底。

[0047] 术语“同源的”是指相同核酸链的两个区域之间或者两个不同核酸链的区域之间的核苷酸序列相似性。当两个区域中的核苷酸残基位置被相同核苷酸残基占据时,则所述区域在该位置是同源的。若第一区域与第二区域各区域的至少一个核苷酸残基位置被相同的残基占据,则第一区域与第二区域是同源的。两个区域间的同源性以两个区域的核苷酸残基位置被相同核苷酸残基占据的比例来表达。举例而言,具有核苷酸序列5'-ATTGCC-3'的区域和具有核苷酸序列5'-TATGGC-3'的区域具有50%同源性。优选地,第一区域包含第一部分且第二区域包含第二部分,由此,各部分至少约50%,且优选至少约75%、至少约90%或至少约95%的核苷酸残基位置被相同的核苷酸残基占据。更优选地,各部分的所有核苷酸残基位置均被相同的核苷酸残基占据。

[0048] 术语“免疫失调”是指以不想要的免疫反应为特征的病况,从而期望的抗免疫失调反应抑制此类免疫反应。期望下调免疫反应的此类病况是本领域中公知的且包括但不限于,如本文所进一步描述的,在移植物抗宿主病(GVHD)中、炎症或自身免疫疾病中的组织、皮肤和器官移植状况,例如系统性红斑狼疮、多发性硬化症、过敏、超敏反应、寄生性和病毒性感染、需要增加CD4+ T细胞产生或功能的失调、需要改进的疫苗接种功效的失调以及需要增加调节性T细胞产生或功能的失调。

[0049] 术语“抑制”包括降低、限制或阻断例如特定的作用、功能或相互作用。在一些实施方式中,若免疫失调的至少一种症状被缓解、终止、延缓或预防,则所述免疫失调“被抑制”。如本文所用的,若免疫失调的复发或扩散被减少、减缓、延迟或预防,则所述免疫失调也“被抑制”。

[0050] 术语“相互作用”当涉及两个分子之间的相互作用时是指分子彼此之间的物理接触(例如,结合)。通常,此相互作用的结果使得所述分子中的一个或全部两个活化(其产生生物效应)。

[0051] “分离的蛋白”是指当分离自细胞或通过重组DNA技术产生时,基本上不含其它蛋白、细胞物质、分离介质和培养基,或者当化学合成时基本上不含化学前体或其它化学品的蛋白。“分离的”或“纯化的”蛋白或其生物活性部分基本上不含来自于抗体、多肽、肽或融合蛋白所来源的细胞或组织源的细胞物质或其它污染蛋白,或者当化学合成时基本上不含化学前体或其它化学品。用语“基本上不含细胞物质”包括生物标志物多肽或其片段的制备物,其中将蛋白与其被分离或重组产生自细胞的细胞组分分离。在一个实施方式中,用语“基本上不含细胞物质”包括生物标志物蛋白或其片段的制备物,其具有少于约30%(以干重计)的非生物标志物蛋白(本文也称作“污染蛋白”),更优选少于约20%的非生物标志物蛋白,又更优选少于约10%的非生物标志物蛋白,且最优选少于约5%的非生物标志物蛋白。当重组产生抗体、多肽、肽或融合蛋白或其片段(例如,其生物活性片段)时,还优选基本上不含培养基,即,培养基占蛋白制品的体积少于约20%,更优选少于约10%,且最优选少于约5%。

[0052] “试剂盒”是包含至少一种试剂(例如,治疗剂、探针、小分子等)的用于特异性检测

和/或治疗性影响本发明标记物的表达的任何产品(例如,包装或容器)。可以以单位形式推广、分发或销售试剂盒以进行本发明的方法。试剂盒可包含一种或多种表达用于本发明方法的组合物所需的试剂。在某些实施方式中,试剂盒可进一步包含参照标准物,例如编码不会影响或调节控制免疫反应、细胞生长、分裂、迁移、存活或凋亡的信号通路的蛋白的核酸。本领域技术人员可预想很多此类对照蛋白,包括但不限于,常见分子标记(例如,绿色荧光蛋白和 $\beta$ -半乳糖苷酶)、经过GeneOntology参考未被分类在任何包含细胞生长、分裂、迁移、存活或凋亡的通路蛋白、或普遍存在的管家蛋白。试剂盒中的试剂可在单独容器中提供或以在单一容器中两种或多种试剂的混合物的形式提供。此外,可包含描述如何使用试剂盒内组分的指导材料。

[0053] 生物标志物的“正常”表达水平是受试者(例如,未罹患免疫失调的人类患者)的细胞中生物标志物的表达水平。生物标志物的“过表达”或“显著较高的表达水平”是指测试样本中表达水平大于用于评估表达的试验的标准误差,且优选地比对照样本(例如,来自不患有生物标志物相关疾病的健康受试者的样本)中生物标志物的表达活性或水平,且优选地比若干对照样本中生物标志物的平均表达水平高至少10%,且更优选高1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20倍或更多。生物标志物的“显著较低的表达水平”是指测试样本中表达水平比对照样本(例如,来自不患有生物标志物相关疾病的健康受试者的样本)中生物标志物的表达活性或水平,且优选地比若干对照样本中生物标志物的平均表达水平低至少10%,且更优选低1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20倍或更多。该“显著”水平还可应用于本文所述的任意其它测量参数,例如用于表达、抑制、细胞毒性、细胞生长等的那些。

[0054] 术语“预测性”包括生物标志物用于确定免疫失调对抗免疫失调疗法(例如,多次-可变剂量IL-2疗法单独使用或与一种或多种其它抗免疫失调疗法组合)产生响应的可能性的用途。此种生物标志物的预测性用途可通过例如以下证实:(1)增加或减少的拷贝数(例如,通过FISH、FISH+SKY、例如如在本领域至少J.Biotechnol.,86:289-301中所描述的单分子测序、或qPCR)、生物标志物核酸的过表达或弱表达(例如,通过ISH、Northern杂交或qPCR)、增加或减少的生物标志物细胞或细胞比率(例如,通过细胞分选和/或计数)、蛋白(例如,通过IHC)和/或生物标志物靶标、或增加或减少的活性,例如在超过约5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%,或更多的经分析免疫失调样本中;(2)经调节后在生物样本中生物标志物绝对或相对的存在或缺失,生物样本是例如来自受试者(例如,罹患免疫失调的人)的生物样本例如包含组织、全血、血清、血浆、口腔拭子、唾液、脑脊液、尿液、粪便或骨髓的样本;(3)经调节后在免疫失调患者的临床亚群(例如,那些响应特定抗免疫失调疗法(例如,多次-可变剂量IL-2疗法单独使用或与一种或多种其它抗免疫失调疗法组合)或那些对其产生抗性的)中生物标志物绝对或相对的存在或缺失。

[0055] 术语“防止(prevent)”、“防治(preventing)”、“预防(prevention)”、“预防性治疗”等是指在受试者中减少疾病、失调或病况发展的可能性,所述受试者不患有所述疾病、

失调或病况,但有发展所述疾病、失调或病况的风险或对其易感。

[0056] 术语“探针”是指能够选择性结合特别预定的靶分子的任何分子,特别预定的靶分子是例如由生物标志物核酸编码或与之对应的核苷酸转录本或蛋白。探针可由本领域技术人员合成,或来源于适当的生物制品。如本文所述,为了检测靶分子的目的,可将探针特别设计为经标记的。可用作探针的分子实例包括但不限于RNA、DNA、蛋白、抗体和有机分子。

[0057] 术语“预后”包括预测免疫失调可能的进程和结果或者从疾病中恢复的可能性。在一些实施方式中,使用统计算法提供对个体中免疫失调的预后。例如,预后可为外科手术、免疫失调的临床亚型(例如,GVHD亚型如慢性GVHD)的发展、一种或多种临床因子的发展、或从疾病中恢复。

[0058] 术语“响应抗免疫失调疗法(例如,多次-可变剂量IL-2疗法单独使用或其一种或多种其它抗免疫失调疗法组合)”涉及免疫失调(例如,GVHD)对抗免疫失调疗法(例如,多次-可变剂量IL-2疗法单独使用或其一种或多种其它抗免疫失调疗法组合)的任何响应。可根据本领域公知的方法评估抗免疫失调响应,包括实施例中描述的那些标准。可以以定量方式如百分数改变或以定性方式如“病理完全缓解”(pCR)、“临床完全缓解”(cCR)、“临床部分缓解”(cPR)、“临床病情稳定”(cSD)、“临床进行性疾病”(cPD)或其它定性标准来记录响应。响应的评估可在开始新辅助(“neoadjuvant”)或辅助疗法开始后的早期进行,例如数小时、数天、数周后或者优选数月后。在一些实施方式中,可通过测量临床受益率(CBR)来确定本文所述的治疗处理的临床疗效。临床受益率的测定是通过在治疗结束后起至少6个月的时间点测定完全缓解(CR)的患者百分数、部分缓解(PR)的患者数目和具有稳定病情(SD)的患者数目的总和。该公式的简写为 $CBR = \text{超过6个月的CR} + PR + SD$ 。在一些实施方式中,特定抗免疫失调治疗方案的CBR为至少25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或更多。用于评估响应抗免疫失调疗法的附加标准涉及“生存期”,其包括以下所有:至死亡的生存期,又称总体生存期(其中所述死亡可为不论原因的或肿瘤相关的);“无复发生存期”(其中术语复发应包括局部复发和远端复发二者);无疾病生存期(其中术语疾病应包括免疫失调和与之相关的疾病)。所述生存期的长度可通过参考经定义的起始点(例如,诊断或开始治疗的时间)和终末点(例如,死亡或复发)来计算。此外,治疗功效的标准可扩展至包括给定时期内的生存期可能性、复发可能性等。例如,为了确定适当的阈值,可将特定治疗方案给予一群受试者并可将结果与在给予任何治疗之前确定的生物标志物测量值相关联。结果测量值可为对根据新辅助设定(neoadjuvant setting)所给予的治疗的病理反应。或者,可通过对已知生物标志物测量值的接受治疗后的受试者进行一段时间的监测获得结果测量值,例如总体生存期和无病生存期。监测受试者的时段可不同。例如,可监测受试者至少0.25、0.5、0.75、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55或60个月。可使用本领域公知的方法,例如实施例部分中所述的那些,来确定与抗免疫失调疗法结果相关联的生物标志物的测量阈值。

[0059] 该术语还可涉及改善的预后,例如如通过以下所反映的:增加的复发时间,其为首次复发的周期,不包括作为首次事件的第二独立免疫失调或者无复发证据的死亡;或增加的总存活期,所述总存活期为从治疗至任何原因导致的死亡的时期。反应或具有反应是指当暴露于刺激时获得了有益的终点。或者当暴露于刺激时消极或有害症状被最小化、缓和或减弱。将会理解的是,对肿瘤或受试者将呈现有利反应的可能性的评估等同于对所述肿

瘤或受试者将不呈现有利反应(即,将呈现缺乏反应或为无反应的)的可能性的评估。如本文所用的“RNA干扰剂”被定义为通过RNA干扰(RNAi)干扰或抑制目标生物标志物基因表达的任何试剂。此类RNA干扰剂包括但不限于,包括与本发明的目标生物标志物基因同源的RNA分子在内的核酸分子或其片段、短干扰RNA(siRNA)、以及通过RNA干扰(RNAi)干扰或抑制目标生物标志物核酸表达的小分子。

[0060] “RNA干扰(RNAi)”是一种进化保守的过程,凭借表达或引入与目标生物标志物核酸相同或高度相似的RNA序列导致转录自目标基因的信使RNA(mRNA)的序列特异性降解或特异性转录后基因沉默(PTGS)(参见Coburn,G.和Cullen,B.(2002)J.of Virology 76(18):9225),从而抑制目标生物标志物核酸的表达。在一个实施方式中,该RNA是双链RNA(dsRNA)。已在植物、无脊椎动物和哺乳动物细胞中描述了该过程。在自然界,RNAi由dsRNA特异性核酸内切酶Dicer所启动,其促进将长dsRNA切割为称作siRNA的双链片段。siRNA并入识别和切割目标mRNA的蛋白复合物。RNAi的启动还可通过引入核酸分子例如合成siRNA、shRNA或其它RNA干扰剂,以抑制或沉默目标生物标志物核酸的表达。如本文所用的,“抑制目标生物标志物核酸表达”或“抑制标记物基因表达”包括目标生物标志物核酸或由目标生物标志物核酸编码的蛋白的表达或蛋白活性或水平的任何降低。相比于尚未被RNA干扰剂所靶向的目标生物标志物核酸的表达或者由目标生物标志物核酸编码的蛋白的活性或水平,所述降低可为至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%或更多。

[0061] 用于检测或确定至少一种生物标志物的存在或水平的术语“样本”通常是全血、血浆、血清、唾液、尿液、粪便(例如,粪)、泪液和任意其他体液(例如,如上文在“体液”的定义项下所描述的),或者组织样本(例如,活检组织)如小肠、结肠样本,或手术切除组织。在某些情况下,本发明的方法进一步包括在样本中检测或确定至少一种标记的存在或水平之前从个体获得所述样本。在一些实施方式中,根据本发明,包含T淋巴细胞或其亚群的任何样本都是有用的。

[0062] 术语“协同效应”是指两种或多种抗免疫失调试剂或疗法的组合效应可大于单独的每种此类试剂或疗法的各自效应的总和。

[0063] 术语“受试者”是指任何动物、哺乳动物或人,或者罹患免疫失调的任何动物、哺乳动物或人。术语“受试者”与“患者”可互换。

[0064] 术语“生存期”包括以下所有:至死亡的生存期,又称总体生存(其中所述死亡可为不论原因的或肿瘤相关的);“无复发生存期”(其中术语复发包括局部复发和远端复发二者);无疾病生存期(其中术语疾病应包括免疫失调和与之相关的疾病)。所述生存期的长度可通过参考经定义的起始点(例如,诊断或开始治疗的时间)和终末点(例如,死亡、复发或转移)来计算。此外,治疗功效的标准可扩展至包括给定时期内的治疗响应、生存可能性、复发可能性等。

[0065] 术语“治疗效应”是指在动物特别是哺乳动物,且更特别是人中由药理学活性物质所引起的局部或全身效应。因此,该术语表示在动物或人中旨在用于诊断、治愈、减轻、治疗或预防疾病或者增强期望的身体或心理发展和状况的任何物质。短语“治疗有效量”是指疗法或物质的量,其以适用于任何治疗的合理收益/风险比产生一些期望的局部或全身效应。在某些实施方式中,化合物的治疗有效量将取决于其治疗指数、溶解度等。例如,通过本发明方法发现的某些化合物可以以足以产生适用于此治疗的合理的收益/风险比的剂量给

予。

[0066] “转录多核苷酸”或“核苷酸转录物”是与成熟mRNA的全部或部分互补或同源的多核苷酸(例如,mRNA、hnRNA、cDNA,或此RNA或cDNA的类似物),其通过转录生物标志物核酸并正常进行RNA转录本的转录后处理(例如,剪接)(若有的话),以及逆转录RNA转录本而制得。

[0067] I. Tregs、Tcons、Tregs/Tcons比率

[0068] 调节性T细胞(Tregs)是自然存在的CD4+CD25+FOXP3+ T淋巴细胞,其包含~5-10%的循环CD4+ T细胞群体,用于主要抑制自体反应性淋巴细胞,以及控制先天性和适应性免疫反应(Piccirillo和Shevach(2004) *Semin. Immunol.* 16:81-88;Fehervari和Sakaguchi(2004) *Curr. Opin. Immunol.* 16:203-208;Azuma等人,(2003) *Cancer Res.* 63:4516-4520;Cederbom等人,(2000) *Eur. J. Immunol.* 30:1538-1543;Maloy等人,(2003) *J. Exp. Med.* 197:111-119;Serra等人,(2003) *Immunity* 19:877-889;Thornton和Shevach(1998) *J. Exp. Med.* 188:287-296;Janssens等人,(2003) *J. Immunol.* 171:4604-4612;Gasteiger等人,(2013) *J. Exp. Med.* 210:1167-1178;Sitrin等人,(2013) *J. Exp. Med.* 210:1153-1165)。Tregs至少部分是通过抑制常规T细胞(Tcons)的增殖、扩张和效应活性来实现该抑制的。它们还通过抑制T细胞帮助和活化的细胞-细胞接触,或通过释放免疫抑制性细胞因子(例如,IL-10或TGF- $\beta$ ),来抑制效应T细胞破坏其(自-)靶标。Treg细胞的损耗显示出增强IL-2诱导的抗肿瘤免疫(Imai等人,(2007) *Cancer Sci.* 98:416-23)。

[0069] Tcons是常规T细胞,又称Tconv,其具有效应功能(例如,细胞因子分泌、细胞毒活性等),其凭借表达一种或多种T细胞受体而增加免疫应答。Tcons被定义为不是Treg的任何T细胞群体,且包括例如,初始T细胞、活化T细胞、记忆T细胞、静息Tcons、或具有分化趋向的Tcons(例如,Th1或Th2系)。“初始Tcons”是已在骨髓中分化的CD4+ T细胞,并成功经历了胸腺中中枢选择的阴性和阳性选择过程,但尚未通过暴露于抗原而被活化。初始Tcons的通常特征在于表面表达L-选择素(CD62L),不存在活化标志物(例如,CD25、CD44或CD69),并且不存在记忆标志物(例如,CD45RO)。因此,据信初始Tcons是静息且不分裂的,其需要白细胞介素-7(IL-7)和白细胞介素-15(IL-15)来实现体内平衡存活(参见至少W02010/101870)。此类细胞的存在和活性在抑制免疫反应的背景下是不希望的。不同于Tregs,Tcons不是无能的(anergic),并且其可响应于基于抗原的T细胞受体活化而增殖(Lechler等人,(2001) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 356:625-637)。

[0070] 因此,增加的Tregs数目、增加的Treg活性、和/或减少的Treg细胞死亡(例如,凋亡)对于抑制与一系列免疫失调(例如,cGVHD)相关的不想要的免疫反应而言是有用的。例如,在小鼠模型中将CD4+CD25+ Tregs和CD25-效应T细胞的1:1混合物加至供体骨髓干细胞抑制了同种免疫活化和GVHD,而未增加移植后的恶性肿瘤复发(Edinger等人,(2003) *Nat. Med.* 9:1144-1150)。在人类中,在HSCT接受者中重建受损的Treg会伴有cGVHD的活化(Zorn等人,(2005) *Blood* 106:2903-2911)。在具有活化cGVHD的参与者中,据信受损的Tregs重建、低端粒酶水平和缩短的端粒促成了Tregs存活的减少(Zorn等人,(2005) *Blood* 106:2903-2911;Matsuoka等人,(2010) *J. Clin. Invest.* 120:1479-1493;Kawano等人,(2011) *Blood* 118:5021-5030)。据信IL-2在Tregs体内平衡和功能中的作用导致了其作为抗免疫失调疗法的有限的功效,并部分解释了如下发现:体内给予IL-2加上同基因T细胞耗尽的供体骨髓在MHC-错配的小鼠异体干细胞移植(allo-SCT)后预防GVHD而未影响移植物抗白血病

(GVL) 反应 (Sykes 等人 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:5633-5647; Sykes 等人, (1990) J. Exp. Med. 171:645-658)。在小鼠异体 HSCT 模型中, 共输注离体扩增的 Treg 和 IL-2 也导致了 GVHD 的抑制, 以及改善的免疫重建和维持的 GVL 反应 (Taylor 等人 (2002) Blood 99: 3493-3499; Trenado 等人 (2003) J. Clin. Invest. 112:1688-1696)。

[0071] 此外, Tregs 在炎症抑制中也是重要的。在持续炎症的背景下, 治疗优先增强 Tregs 而不活化常规 T 细胞 (Tcons) 或其它可能恶化 GVHD 的效应细胞是至关重要的。Tregs 在体内的有效增强还与其它受损的外周耐受的失调 (例如, 自身免疫疾病如 SLE、T1D、MS、银屑病、RA、IBD、血管炎) 直接相关, 其中 Treg 功能失调被越来越多地被认为牵涉其中 (Grinberg-Bleyer 等人, (2010) J. Exp. Med. 207:1871-1878; Buckner (2010) Nat. Rev. Immunol. 10:849-859; Humrich 等人, (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107:204-209; Carbone 等人, (2014) Nat. Med. 20:69-74)。

## [0072] II. 白细胞介素-2 (IL-2)

[0073] 术语“白细胞介素-2 (IL-2)”或“T 细胞生长因子 (TCGF)”是指在淋巴细胞产生、存活和体内平衡中发挥核心作用的一种 15.5kDa 球状糖蛋白。该术语包括具有免疫抑制作用 (例如, 通过增加 Tregs、增加 Tregs:Tcons 比率、增加 Treg 增殖、增加 Treg 功能等) 的任何纯化或重组 IL-2 分子, 包括但不限于, 经修饰天然 IL-2 分子、截短的 IL-2 分子、变体 IL-2 分子和共价修饰的 IL-2 分子 (例如, 糖基化或融合蛋白形式)。

[0074] IL-2 由四条反向平行、两亲性  $\alpha$ -螺旋构成, 它们形成对于其功能而言重要的四元结构 (Smith (1988) Science 240:1169-1176; Bazan (1992) Science 257:410-413)。人 IL-2 的核酸和多肽序列是本领域中公知的。例如, 由美国国家生物技术信息中心维护的 GenBank 数据库上可获得的 NM\_000586.3 的 cDNA 序列编码前体 IL-2 蛋白 (NP\_000577.2), 其中残基 1-20 代表信号肽而其余残基代表成熟的细胞因子。在一些实施方式中, 可将最初的 20、21、22 或更多个氨基酸作为信号肽移除以产生成熟的细胞因子。除人以外的物种中 IL-2 直系同源的核酸和前多肽序列也是公知的, 并且包括例如, 黑猩猩 IL-2 (XM\_517425.3 和 XP\_517425.1)、猴 IL-2 (NM\_001047130.1 和 NP\_001040595.1)、狗 IL-2 (NM\_001003305.1 和 NP\_001003305.1)、小鼠 IL-2 (NM\_008366.3 和 NP\_032392.1) 和大鼠 IL-2 (NM\_053836.1 和 NP\_446288.1)。各前多肽的残基 1-20 代表信号肽而其余残基代表成熟的细胞因子。

[0075] IL-2 直系同源的代表性序列在下表 1 中呈现。值得注意的是, 该术语可进一步用于表示本文中所描述的关于 IL-2 分子的特征的任意组合。例如, 可使用序列组成、百分数一致性、序列长度、域结构、功能活性等的任意组合来描述本发明的 IL-2 分子。

[0076] 又在其它实施方式中, 术语“IL-2”包括脱丙氨酰-1 (des-alanyl-1)、丝氨酸-125 人 IL-2 (Proleukin® (阿地白介素); Novartis 公司 & Prometheus Laboratories 公司) 和/或酵母中产生的重组人 IL-2 (Roncoleukin®)。阿地白介素以包含 22MIU 阿地白介素的一次性药瓶中的无菌、白色至灰白色冻干饼的形式提供。对于 22 百万国际单位 (MIU) 药瓶, 当用 1.2mL 无菌注射用水 (SWFI) 重构时, 每 mL 包含 18MIU (1.1mg) IL-2、50mg 甘露醇和 ~180mcg 十二烷基硫酸钠, 用 ~170mcg 磷酸二氢钠和 890mcg 磷酸氢二钠缓冲至 pH 7.5 (范围: 7.2-7.8)。相比于天然 IL-2, 重组 IL-2 是非糖基化的且在两个氨基酸位点处不同。IL-2 的天然和重组形式之间不具有可辨别的功能差异。

[0077] 示例性 IL-2 变体、重组 IL-2、产生 IL-2 的方法, 纯化 IL-2 的方法、配制方法等是本

领域中公知的且可见于例如至少在美国专利号4,530,787、4,569,790、4,572,798、4,604,377、4,748,234、4,853,332、4,959,314、5,464,939、RE33,653、5,229,109、7,514,073和7,569,215中,其各自在此通过引用整体并入本文以用于所有目的。

[0078] 例如,考虑到了生物标志物的核酸分子,其由于遗传密码的简并性而不同于编码对应于生物标志物的蛋白的核酸分子的核苷酸序列。如通过遗传密码(下示)所定义的,在特定蛋白的氨基酸序列和能够编码该蛋白的核苷酸序列之间存在已知且明确的对应关系。同样地,如通过遗传密码所定义的,在特定核酸的核苷酸序列和由该核酸编码的氨基酸序列之间存在已知且明确的对应关系。

[0079] 遗传密码

|        |              |                         |
|--------|--------------|-------------------------|
| [0080] | 丙氨酸 (Ala,A)  | GCA,GCC,GCG,GCT         |
| [0081] | 精氨酸 (Arg,R)  | AGA,ACG,CGA,CGC,CGG,CGT |
| [0082] | 天冬酰胺 (Asn,N) | AAC,AAT                 |
| [0083] | 天冬氨酸 (Asp,D) | GAC,GAT                 |
| [0084] | 半胱氨酸 (Cys,C) | TGC,TGT                 |
| [0085] | 谷氨酸 (Glu,E)  | GAA,GAG                 |
| [0086] | 谷氨酰胺 (Gln,Q) | CAA,CAG                 |
| [0087] | 甘氨酸 (Gly,G)  | GGA,GGC,GGG,GGT         |
| [0088] | 组氨酸 (His,H)  | CAC,CAT                 |
| [0089] | 异亮氨酸 (Ile,I) | ATA,ATC,ATT             |
| [0090] | 亮氨酸 (Leu,L)  | CTA,CTC,CTG,CTT,TTA,TTG |
| [0091] | 赖氨酸 (Lys,K)  | AAA,AAG                 |
| [0092] | 甲硫氨酸 (Met,M) | ATG                     |
| [0093] | 苯丙氨酸 (Phe,F) | TTC,TTT                 |
| [0094] | 脯氨酸 (Pro,P)  | CCA,CCC,CCG,CCT         |
| [0095] | 丝氨酸 (Ser,S)  | AGC,AGT,TCA,TCC,TCG,TCT |
| [0096] | 苏氨酸 (Thr,T)  | ACA,ACC,ACG,ACT         |
| [0097] | 色氨酸 (Trp,W)  | TGG                     |
| [0098] | 酪氨酸 (Tyr,Y)  | TAC,TAT                 |
| [0099] | 缬氨酸 (Val,V)  | GTA,GTC,GTG,GTT         |
| [0100] | 终止信号 (end)   | TAA,TAG,TGA             |

[0101] 遗传密码的一个重要且公知的特性是其具有简并性,因此对于用于制备蛋白的大部分氨基酸而言,可以使用一个以上的编码核苷酸三联体(如上所示)。因此,多个不同的核苷酸序列可编码一个给定的氨基酸序列。认为此类核苷酸序列是功能上的等效物,因为其导致在所有生物体内产生了相同的氨基酸序列(尽管某些生物体可以相比于其他的序列更有效率地翻译一些序列)。此外,有时,在给定的核苷酸序列中可以存在嘌呤或嘧啶的甲基化变体。此类甲基化不会影响三核苷酸密码子与相应氨基酸之间的编码关系。

[0102] 考虑到前述内容,可以使用编码生物标志物核酸(或其任意部分)的DNA或RNA的核苷酸序列来获得多肽氨基酸序列,其使用遗传密码将DNA或RNA翻译成氨基酸序列。同样地,对于多肽氨基酸序列而言,可以从遗传密码推断出能够编码多肽的相应核苷酸序列(由于

其冗余性,针对任意给定的氨基酸序列将产生多种核酸序列)。因此,应将本文对编码多肽的核苷酸序列的描述和/或披露考虑为还包括对由所述核苷酸序列编码的氨基酸序列的描述和/或披露。类似地,应对本文中多肽氨基酸序列的描述和/或披露考虑为还包括对能够编码所述氨基酸序列的所有可能的核苷酸序列的描述和/或披露。

[0103] 此外,本领域技术人员将会理解,种群(例如,人类种群)内可存在导致氨基酸序列改变的DNA序列多态性。此遗传多态性可因天然等位基因变异而在种群内的个体间存在。等位基因是在给定的基因位置交替出现的一组基因。此外,将会理解的是,影响RNA表达水平的DNA多态性也可存在,其可影响该基因的总体表达水平(例如,通过影响调节或降解)。

[0104] 本文中“等位基因变体”可互换使用的术语“等位基因”是指基因或其部分的替代形式。等位基因占据同源染色体的相同位点或位置。当受试者具有两个相同的等位基因时,则称受试者对于该基因或等位基因是纯合的。当受试者具有两个不同的等位基因时,则称受试者对于该基因或等位基因是杂合的。例如,生物标志物的等位基因可在单一核苷酸或几个核苷酸中彼此不同,并可包括核苷酸的取代、插入和缺失。一个基因的等位基因还可为包含一个或多个突变的基因形式。

[0105] 本文中可互换使用的术语“基因多态性区域的等位基因变体”或“等位基因变体”是指在种群该基因区域中发现的具有几种可能的核苷酸序列中的一种基因的替代形式。如本文所用的,等位基因变体旨在包括功能性等位基因变体、非功能性等位基因变体、SNP、突变和多态性。

[0106] 术语“单核苷酸多态性”(SNP)是指由单核苷酸占据的多态性位点,其为等位基因序列之间的变异位点。所述位点通常前接和后接高度保守的等位基因序列(例如,再小于1/100或1/1000群体成员中变化的序列)。SNP的出现通常是由于在多态性位点处将一个核苷酸替代为另一核苷酸。SNP还可起因于相对于参考等位基因缺失一个核苷酸或插入一个核苷酸。通常,多态性位点是由不同于参考碱基的碱基所占据。例如,参考等位基因在多态性位点处包含碱基“T”(胸苷)的情况下,改变的等位基因在多态性位点处可包含“C”(胞苷)、“G”(鸟嘌呤)或“A”(腺嘌呤)。SNP可出现在编码蛋白的核酸序列中,在该情况下它们可能导致缺陷性或其它变体蛋白,或遗传疾病。此SNP可能改变基因的编码序列并因此指定另一氨基酸(“错义”SNP)或SNP可能引入终止密码子(“无义”SNP)。当SNP未改变蛋白的氨基酸序列时,该SNP称为“沉默的”。SNP还可出现在核苷酸序列的非编码区中。这可能导致缺陷性蛋白表达(例如,替代剪切的结果),或者其可能对蛋白的功能没有影响。

[0107] 如本文所用的,术语“基因”和“重组基因”是指包含开放阅读框的核酸分子,所述开放阅读框编码对应于本发明标记的多肽。此自然等位基因变异会通常导致给定基因核苷酸序列的1-5%的变异。可通过在多个不同个体中测序感兴趣的基因来识别替代等位基因。这可很容易地通过使用杂交探针以在多个个体中识别相同的基因位置来进行。任意和所有此类核苷酸变异和产生的氨基酸多态性或者由天然等位基因变异所导致的以及不改变功能活性的变异均意欲落入本发明的范围内。

[0108] 在另一实施方式中,生物标志物核酸分子的长度至少为7、15、20、25、30、40、60、80、100、150、200、250、300、350、400、450、550、650、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2200、2400、2600、2800、3000、3500、4000、4500或更多个核苷酸,并在严谨条件下与对应于本发明标志物的核酸分子或者编码对应于本发明

标志物的蛋白的核酸分子杂交。如本文所用的术语“在严谨条件下杂交”旨在描述杂交和洗涤条件,在该条件下彼此具有至少60% (65%、70%、75%、80%,优选85%)一致性的核苷酸序列彼此之间通常保持杂交。此类严谨条件是本领域技术人员已知的并且能够在Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, N.Y. (1989) 的6.3.1-6.3.6节中找到。严谨杂交条件的优选、非限制性实例是在6X氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中在约45℃下杂交,随后在0.2X SSC、0.1% SDS中,在50-65℃下洗涤一次或多次。

[0109] 除了可在种群中存在的本发明核酸分子的天然产生的等位变体以外,本领域技术人员将进一步意识到可通过突变引入序列改变,从而导致被编码蛋白的氨基酸序列的改变,但不因此改变编码蛋白的生物活性。例如,可以进行导致在“非必需”氨基酸残基处的氨基酸取代的核苷酸取代。“非必需”氨基酸残基是可从野生型序列改变、但不改变生物活性的残基,而“必需”氨基酸残基是生物活性所需要的。例如,在各种物种的同源物间非保守或仅半保守的氨基酸残基可能是活性所非必需的,并且因此将可能是改变的靶标。或者,各种物种(例如,鼠类和人类)的同源物间保守的氨基酸残基可能是活性所必需的,并且因此将不大可能是改变的靶标。

[0110] 因此,本发明的另一方面涉及编码本发明的多肽的核酸分子,所述多肽含有不是活性所必需的氨基酸残基的改变。此类多肽的氨基酸序列与对应于本发明标记的天然产生蛋白不同,但仍保持生物活性。在一个实施方式中,生物标志物蛋白具有与本文所述的生物标志物蛋白的氨基酸序列至少约40%一致性,50%、60%、70%、75%、80%、83%、85%、87.5%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或相同的氨基酸序列。

[0111] 可通过将一个或多个核苷酸取代、插入或缺失引入本发明核酸的核苷酸序列生成编码变体蛋白的分离的核酸分子,从而将一个或多个氨基酸取代、插入或缺失引入所编码的蛋白中。可以通过标准技术,例如定点诱变和PCR介导的诱变引入突变。优选地,在一个或多个预测的非必需氨基酸残基处进行保守性氨基酸取代。“保守性氨基酸取代”是氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基取代的取代。具有相似侧链的氨基酸残基家族已在现有技术中定义。这些家族包括具有碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 $\beta$ 支链侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。或者,可以沿着全部或部分编码序列随机引入突变,如通过饱和突变,并且可以对所得到的突变体的生物活性进行筛选以鉴定仍保留活性的突变。诱变后,可以重组表达所编码的蛋白并且可以确定所述蛋白的活性。

[0112] 本发明的另一方面涉及生物标志物蛋白及其生物活性部分的应用。在一个实施方式中,可通过使用标准蛋白纯化技术的适当纯化方案从细胞或组织来源分离对应于标记的天然多肽。在另一实施方式中,通过重组DNA技术产生对应于本发明标记的多肽。替代重组表达,可使用标准肽合成技术化学合成对应于本发明标记的多肽。

[0113] 生物标志物多肽的生物活性部分包括含有足够一致于或来源于本文所述的生物标志物蛋白氨基酸序列的氨基酸序列的多肽,但其包含少于全长蛋白的氨基酸,且呈现出相应全长蛋白的至少一种活性。通常,生物活性部分包含具有相应蛋白的至少一种活性的结构域或基序。本发明的蛋白的生物活性部分可为多肽,其长度例如50、55、60、65、70、

75、80、85、90、95、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130或更多个氨基酸。此外,可通过重组技术制备其它生物活性部分(其中蛋白的其它区域被删除),并评估其是否具有本发明多肽的天然形式的一种或多种功能活性。

[0114] 优选的多肽具有由本文所述的核酸分子编码的生物标志物蛋白的氨基酸序列。其它有用的蛋白与这些序列中的一种基本上一致(例如,至少约40%,优选50%,60%,70%,75%,80%,83%,85%,88%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%)并保持相应的天然产生蛋白的蛋白功能活性,但由于天然等位变异或诱变而具有不同的氨基酸序列。

[0115] 为确定两个氨基酸序列或两个核酸的一致性百分率,依据最佳比较目的对序列进行比对(例如,可以在第一氨基酸或核酸序列的序列中引入缺口用于与第二氨基酸或核酸序列进行最佳比对)。然后比较相应氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的某一位置被与第二序列中相应位置相同的氨基酸残基或核苷酸所占据时,则所述分子在该位置是相同的。两条序列之间的一致性百分率是所述序列共有的相同位点的数量的函数(即, $\% \text{一致性} = \text{相同位点的\#} / \text{位点总\#}$ (例如,重叠位点)  $\times 100$ )。在一个实施方式中,两条序列的长度相同。

[0116] 可使用数学算法完成两个序列间一致性百分率的确定。用于比较两个序列的数学算法的一个优选的、非限制性实例是如Karlin和Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877中所改进的Karlin和Altschul的算法(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268。此算法被整合入了Altschul等人(1990) J. Mol. Biol. 215:403-410的NBLAST和XBLAST程序中。可以采用NBLAST程序进行BLAST核苷酸检索,设置评分(score) = 100,字长(wordlength) = 12,以获得与本发明的核酸分子同源的核苷酸序列。可以采用XBLAST程序进行BLAST蛋白检索,设置评分 = 50,字长 = 3,以获得与本发明的蛋白分子同源的氨基酸序列。为获得用于比较目的的具有缺口的比对,可以利用Altschul等人, (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402中描述的具有缺口的BLAST。或者,可使用PSI-Blast以进行检测分子间远近关系的迭代检索。当利用BLAST、具有缺口的BLAST和PSI-Blast程序时,可以使用各程序(例如XBLAST和NBLAST)的缺省参数。参见国家生物技术信息中心(NCBI)网站ncbi.nlm.nih.gov。用于序列比较的数学算法的另一优选的、非限制性实例是Myers和Miller算法, (1988) Comput Appl Biosci, 4:11-7。此算法整合入了ALIGN程序(2.0版)中,其为GCG序列比对软件包的一部分。当将ALIGN程序用于比较氨基酸序列时,可使用PAM120权重残基表、缺口长度罚分为12和缺口罚分为4。用于识别局部序列相似性的区域和比对的另一有用算法是如Pearson和Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448中所述的FASTA算法。当将FASTA算法用于比较核苷酸或氨基酸序列时,可使用例如PAM120权重残基表,k-tuple值为2。

[0117] 可使用与上述那些相似的技术(允许或不允许缺口)确定两个序列之间的一致性百分率。在计算一致性百分率时,仅计数准确匹配。

[0118] 本发明还提供了对应于生物标志物蛋白的嵌合或融合蛋白。如本文所用的,“嵌合蛋白”或“融合蛋白”包含与异源性多肽(即,除对应于标记的多肽以外的多肽)可操作地连接的对应用于本发明标记的多肽的全部或部分(优选生物活性部分)。在融合蛋白中,术语“可

操作地连接”旨在指本发明的多肽和异源性多肽彼此之间框内融合。异源性多肽可融合至本发明的多肽的氨基末端或羧基末端。

[0119] 一种有用的融合蛋白是GST融合蛋白,其中对应于本发明标志物的多肽融合至GST序列的羧基末端。此类融合蛋白可以便于本发明的重组多肽的纯化。

[0120] 在另一实施方式中,融合蛋白包含异源性信号序列、免疫球蛋白融合蛋白、毒素、或其它有用的蛋白序列。可以通过标准重组DNA技术生产本发明的嵌合和融合蛋白。在另一个实施方式中,可以通过包括自动DNA合成仪的常规技术合成融合基因。或者,可以通过锚定引物进行基因片段的PCR扩增,其在两个连续的基因片段之间产生互补的悬臂,该互补的悬臂随后可以被退火和重扩增以产生嵌合基因序列(参见例如Ausubel等人,见上)。此外,多种已经编码融合部分(例如GST多肽)的表达载体是市售的。可将编码本发明多肽的核酸克隆入此表达载体以使融合部分框内连接至本发明的多肽。

[0121] 可使用信号序列以促进分泌蛋白或其它目标蛋白的分泌和分离。信号序列的典型特征在于疏水性氨基酸核心,其通常在分泌期间在一个或多个剪切事件中被从成熟蛋白切除。此类信号肽包含随着成熟蛋白经过分泌通路时允许从成熟蛋白处剪切去除信号序列的加工位点。因此,本发明涉及具有信号序列的多肽以及信号序列已被蛋白水解剪切的多肽(即,剪切产物)。在一个实施方式中,编码信号序列的核酸序列可在表达载体中可操作地连接至目标蛋白,例如通常不被分泌的蛋白或者原本难以分离的蛋白。信号序列指导蛋白,例如从转染了表达载体的真核宿主处,的分泌,并且所述信号序列随后或同时被剪切。然后可轻易地通过现有技术认识到的方法从胞外基质中纯化蛋白。或者,可使用促进纯化的序列(例如,具有GST域的序列)将信号序列连接至目标蛋白。

[0122] 本发明还涉及本文所述的生物标志物多肽的变体。此类变体具有改变的氨基酸序列,其可用作激动剂(模拟的)或用作拮抗剂。变体的生成可通过诱变,例如离散点突变或截断。激动剂可保留同蛋白天然存在形式基本上相同的生物活性或其子集。蛋白拮抗剂可通过例如竞争性结合至包含了目标蛋白的细胞信号通路的下游或上游成员来抑制蛋白的天然存在形式的一种或多种活性。因此,通过采用具有有限功能的变体的治疗可引起特定的生物效应。相对于采用蛋白天然存在形式的治疗,在受试者中采用具有蛋白天然存在形式的生物活性子集的变体治疗受试者可具有较少的副作用。

[0123] 本发明的另一方面涉及引入了本发明的重组表达载体的宿主细胞。术语“宿主细胞”和“重组的宿主细胞”在本文中可互换使用。应当理解的是,此类术语不仅指特定的细胞主体还指此细胞的后代或潜在后代。由于在后续传代过程中因突变或环境的影响可能发生某些修饰,因而此后代实际上可能与其亲代细胞并不相同,但是仍将其包括在如本文所用的术语的范围内。

[0124] 宿主细胞可为任何原核(例如,大肠杆菌)或真核细胞(例如,昆虫细胞、酵母或哺乳动物细胞)。

[0125] 可以通过常规的转化或转染技术将载体DNA引入原核或真核细胞中。如本文所用的,术语“转化”和“转染”旨在指用于将外源性核酸引入宿主细胞的多种本领域公认的技术,包括磷酸钙或氯化钙共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂质体转染或电穿孔。用于转化或转染宿主细胞的适当方法可以见于Sambrook等人(见上),和其他实验室手册。

[0126] 就哺乳动物细胞的稳定转染而言,已知依赖于所使用的表达载体和转染技术,仅

少数细胞可以将外源性DNA整合至其基因组。为了识别和选择这些整合体,通常将编码选择性标记(例如,对抗生素具有抗性)的基因与感兴趣的基因一起引入宿主细胞。优选的选择性标记包括对药物具有抗性的那些,例如G418、潮霉素和甲氨蝶呤。可以通过药物选择识别具有所引入核酸的稳定转染的细胞(例如,已并入选择性标记基因的细胞将存活,而其他细胞死亡)。

[0127] 表1

[0128] SEQ ID NO:1 人IL-2cDNA序列

1 atgtacagga tgcaactcct gtcttgcat gactaagtc ttgcacttgt cacaacagc  
61 gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat  
121 ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaactcac caggatgctc  
181 acattttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa  
[0129] 241 gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttactta  
301 agaccaggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa  
361 acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga  
421 tggattacct tttgtcaaag catcatctca aactgactt ga

[0130] SEQ ID NO:2 人IL-2氨基酸序列

1 myrmqlisci alsalvtns aptssstkkk qlqlehlld lqmilnginn yknpkltrml  
[0131] 61 tfkfypkka telkhlqcle eelkpleevl nlaqsknfhl rprdlisnin vivlelkgse  
121 ttfmceyade tativeflnr witfcqsiis tlt

[0132] SEQ ID NO:3 黑猩猩IL-2cDNA序列

1 atgtacagga tgcaactcct gtcttgcat gactaagtc ttgcacttgt cacaacagc  
61 gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat  
121 ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaactcac caggatgctc  
181 acattttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa  
[0134] 241 gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttactta  
301 agaccaggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa  
361 acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga  
421 tggattacct tttgtcaaag catcatctca aactgactt ga

[0135] SEQ ID NO:4 黑猩猩IL-2氨基酸序列

1 myrmqlisci alsalvtns aptssstkkk qlqlehlld lqmilnginn yknpkltrml  
[0136] 61 tfkfypkka telkhlqcle eelkpleevl nlaqsknfhl rprdlisnin vivlelkgse  
121 ttfmceyade tativeflnr witfcqsiis tlt

[0137] SEQ ID NO:5 猴IL-2cDNA序列

1 atgtacagga tgcaactcct gtcttgcat gactaagtc ttgcacttgt cacaacagc  
61 gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat  
121 ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaactcac caggatgctc  
181 acattttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaattga aacatcttca gtgtctagaa  
[0138] 241 gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttactta  
301 agagatacca aggacttaat cagcaatata aacgtaatag ttctggaact aaagggatct  
361 gaaacaacac tgatgtgtga atatgctgat gagacagcaa ccattgtaga atttctgaac  
421 agatggatta ccttttgtca aagcatcatc tcaactga cctga

[0139] SEQ ID NO:6 猴IL-2氨基酸序列

- 1 myrmqllsci alsalavtns aptssstkk t qlqlehllld lqmilnginn yknpkltrml  
 [0140] 61 tfkfymppkka telkhlqcle eelkpleevl nlaqsknfhl rdtkdlnisni nvivlelkgs  
 121 ettlmceyad etativefln rwitfcqsii stlt
- [0141] SEQ ID NO:7 狗IL-2cDNA序列
- 1 atgtacaaaa tgcaactctt gtcttgcatc gcaactgacgc ttgtacttgt cgcaaacagt  
 61 gcacctatta cttcaagctc tacaaggaa acagagcaac agatggagca attactgctg  
 121 gatttacagt tgcttttgaa tggagttaat aattatgaga accccaact ctccaggatg  
 [0142] 181 ctcacattta agttttacac gcccaagaag gccacagaat ttacacacct tcaatgtcta  
 241 gcagaagaac tcaaaaacct ggaggaagtg ctaggtttac ctcaaagcaa aaacgttcac  
 301 ttgacagaca ccaaggaatt aatcagcaat atgaatgtaa cactttctgaa actaaaggga  
 361 tctgaaacaa gttacaactg tgaatatgat gacgagacag caaccattac agaatttctg  
 421 aacaaatgga ttaccttttg tcaaagcatc ttctcaacac tgacttga
- [0143] SEQ ID NO:8 狗IL-2氨基酸序列
- 1 mykmqllsci altlrvlans apitssstke teqqmeqlll dlqlllmgvn nyenpqslrm  
 [0144] 61 ltfkfytpkk atefthlqcl aeelkneev lglpqsknvh ltdtkelish mnvtllklkg  
 121 setsynceyd detatitefl nkwtfcqsi fstlt
- [0145] SEQ ID NO:9 小鼠IL-2cDNA序列
- 1 atgtacagca tgcagctcgc atcctgtgtc acattgacac ttgtgctcct tgtcaacagc  
 [0146] 61 gcacccactt caagctccac ttcaagctct acagcggaag cacagcagca gcagcagcag  
 121 cagcagcagc agcagcagca cctggagcag ctgttgatgg acctacagga gctcctgagc  
 181 aggatggaga attacaggaa cctgaaactc cccaggatgc tcacctcaa attttacttg  
 241 cccaagcagg ccacagaatt gaaagatctt cagtgcctag aagatgaact tggacctctg  
 301 cggcatgttc tggatttgac tcaaagcaaa agctttcaat tggaagatgc tgagaatttc  
 [0147] 361 atcagcaata tcagagtaac tgttgtaaaa ctaaagggtc ctgacaacac atttgagtgc  
 421 caattcgatg atgagtcagc aactgtggtg gactttctga ggagatggat agccttctgt  
 481 caaagcatca tctcaacaag cctcaataa
- [0148] SEQ ID NO:10 小鼠IL-2氨基酸序列
- 1 mysmqlascv tltlrvllvns aptssstsss taeaqqqqqq qqqqqqhleq llmdlqells  
 [0149] 61 rmenyrnlkl prmltfkfyl pkqatelkdl qcledelgpl rhvldltqsk sfqledaenf  
 121 isnirvtvkv lkgsdntfec qfddesatvv dflrrwiafc qsiistspq
- [0150] SEQ ID NO:11 大鼠IL-2cDNA序列
- 1 atgtacagca tgcagctcgc atcctgtgtt gcaactgacgc ttgtcctcct tgtcaacagc  
 61 gcacccactt caagccctgc aaaggaaaca cagcagcacc tggagcagct gttgctggac  
 121 ttacaggatg tcttgagagg gatcgataat tacaagaatc tgaaactccc catgatgctc  
 [0151] 181 acgtttaaat tttacttgcc caagcaggcc acagaattga aacatcttca gtgcctggaa  
 241 aatgaactcg gagctctgca gcgtgtgttg gatttgactc aaagcaaaag ctttcaactg  
 301 gaagacgctg gaaatttcat cagcaatata agagtaactg ttgtaaaact aaagggtctc  
 361 gaaaacaaat ttgagtgcga attcgatgat gagccagcaa ctgtggtgga atttctgagg  
 421 agatggatag ccatctgtca aagcatcatc tcaacaatga ctcatgaa
- [0152] SEQ ID NO:12 大鼠IL-2氨基酸序列
- 1 mysmqlascv altlrvllvns aptsspaket qqhleqlllld lqvllrgidn yknklpmmml  
 [0153] 61 tfkfylpkqa telkhlqcle nelgalqrvl dltqsksfhl edagnfisni rvtvvlklgs  
 121 enkfecqfdd epatvveflr rwiaicqsii stmtq
- [0154] \*表1中包含的是RNA核酸分子(例如,用尿苷替换胸腺嘧啶)、编码所编码蛋白的直

系同源的核酸分子、以及其全长中包含与表1中所列的任何SEQ ID NO的核酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或更多的同一性的核酸序列的DNA或RNA核酸序列,或其部分。此类核酸分子可具有如本文进一步描述的全长核酸的功能。

[0155] \*表1中包含的是蛋白的直系同源物,以及其全长中包含与表1中所列的任何SEQ ID NO的氨基酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或更多的同一性的氨基酸序列的多肽分子,或其部分。此类多肽可具有如本文进一步描述的全长多肽的功能。

[0156] IL-2通过结合IL-2受体(IL-2R)介导其作用,所述IL-2受体由多达三个单独的亚基构成,其不同的联合可产生与IL-2亲和力不同的受体形式。 $\alpha$  (CD25)、 $\beta$  (CD122) 和  $\gamma$  ( $\gamma$  c, CD132) 亚基的联合得到针对IL-2的三聚、高亲和力受体。由 $\beta$ 和 $\gamma$ 亚基构成的二聚IL-2受体被称为中度亲和力IL-2R。 $\alpha$ 亚基形成单体低亲和力IL-2受体。虽然二聚中度亲和力IL-2受体结合IL-2的亲和力比三聚高亲和力受体低约100倍,但二聚和三聚IL-2受体变体均能够在结合IL-2后传输信号(Minami等人,(1993) Annu.Rev.Immunol.11:245-268)。因此, $\alpha$ -亚基CD25对于IL-2的信号转导不是必需的。其赋予与其受体的高亲和力结合,而 $\beta$ 亚基CD122和 $\gamma$ -亚基对于信号转导是关键的(Krieg等人,(2010) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.107:11906-11911)。包括CD25的三聚IL-2受体由(静息的)CD4<sup>+</sup>叉头框P3(FoxP3)<sup>+</sup>的调节性T细胞(Tregs)表达。它们还在常规活化T细胞上被瞬时诱导,然而在静息状态下这些细胞仅表达二聚IL-2受体。在体内Tregs始终表达最高水平的CD25(Fontenot等人,(2005) Nat.Immunol.6:1142-1151)。

[0157] 天然IL-2首先于1976年作为T淋巴细胞的生长因子被识别。其由人命名集群(CD)4<sup>+</sup>和一些CD8<sup>+</sup> T细胞产生并主要由活化T细胞,特别是CD4<sup>+</sup>辅助T细胞合成。其刺激T细胞的增殖和分化、诱导细胞毒性T淋巴细胞(CTLs)的生成以及外周血淋巴细胞到细胞毒性细胞和淋巴因子活化杀伤(LAK)细胞的分化、促进T细胞的细胞因子和溶细胞分子表达、促进B细胞的增殖和分化以及B细胞的免疫球蛋白合成、并刺激自然杀伤(NK)细胞的生成、增殖和活化(参见例如,Waldmann(2009) Nat.Rev.Immunol.6:595-601;Olejniczak和Kasprzak(2008) Med.Sci.Monit.14:ra179-189;Malek(2008) Annu.Rev.Immunol.26:453-479)。

[0158] 已知IL-2在产生免疫应答中发挥核心作用。在癌症临床试验中,高剂量重组IL-2(例如,高达14剂的600,000国际单位(IU)/kg/8小时的IV单次推注剂量)在转移性肾细胞癌(RCC)和转移性黑素瘤中显示了抗肿瘤活性。因此,欧洲在1989年且美国在1992年批准将此高剂量IL-2用于治疗转移性RCC。在1998年,获批用于治疗转移性黑素瘤患者。当前重组人IL-2(阿地白介素)(Proleukin®-Novartis公司&Prometheus Labs公司)已获美国食品药品监督管理局(US FDA)的批准。

[0159] 然而,IL-2在免疫反应中具有双重作用,因为其不但介导效应细胞的扩增和活性,还关键性涉及维持外周免疫耐受。外周自身耐受的主要机制是IL-2诱导的T细胞中活化诱导的细胞死亡(AICD)。AICD是通过其完全活化的T细胞经由与细胞表面表达的死亡受体例如,CD95(又称Fas)或TNF受体的接合而经历程序性细胞死亡的过程。当在增殖期间,表达高亲和力IL-2受体(在预先暴露于IL-2后)的抗原活化了的T细胞被抗原通过T细胞受体(TCR)/CD3复合物再刺激时,诱导了Fas配体(FasL)和/或肿瘤坏死因子(TNF)的表达,造成

细胞敏感于Fas介导的凋亡。该过程是IL-2依赖性的 (Lenardo (1991) Nature 353:858-861) 并经由STAT5介导。通过T淋巴细胞中的AICD过程,不但可针对自身抗原建立耐受,还可针对明显不是宿主组成部分的持久性抗原 (例如,肿瘤抗原) 建立耐受。

[0160] 此外,IL-2还参与维持外周Tregs (Fontenot等人, (2005) Nat. Immunol. 6:1142-1151; D'Cruz和Klein (2005) Nat. Immunol. 6:1152-1159; Maloy和Powrie (2005) Nat. Immunol. 6:1171-1172)。在体内生理浓度下,IL-2对于Tregs发育、扩增和存活是必需的 (Malek和Bayer (2004) Nat. Rev. Immunol. 4:665-674; Nelson (2004) J. Immunol. 172:3983-3988)。事实上,为了刺激免疫效应细胞,HSCT后早期给予低剂量IL-2,而实际上相比通常表达低和中亲和力受体的Tcons,由于Tregs上表达较高亲和力IL-2受体 $\alpha$  (CD25) 而被优先扩增了 (Zorn等人, (2006) Blood 108:1571-1579)。在人类中,IL-2调节Tregs中的FOXP3表达并诱导体内Treg扩张 (Zorn等人, (2006) Blood 108:1571-1579)。具有类固醇顽固性cGVHD的患者通过优先增加体内功能性Treg (例如,Tregs计数增加>7倍而未影响CD4<sup>+</sup>Tcons计数,Tregs:Tcons中位数比率自基线起增加>5倍 ( $p<0.001$ )) 而响应低剂量IL-2,且~50%的可评估患者在包括皮肤、关节/筋膜/肌肉、肝脏和外周神经的cGVHD累及部位按照NIH标准具有客观的部分缓解 (PR) (Koreth等人, (2011) N. Engl. J. Med. 365:2055-2066; Pavletic等人, (2006) Biol. Blood Marrow Transplant. 12:252-266)。例如,15名患者中具有PR或病情稳定 (SD) 的和轻微响应的12名,继续接受延长的IL-2治疗,且12名接受长期IL-2治疗的患者中的10名在中位数13个月的随访中在平均60%糖皮质激素减量 (范围,25-100%) 期间具有持续的临床响应。Tregs计数和Tregs:Tcons比率在8周时维持提高 (二者对比基线均 $p<0.001$ ),然后在停止IL-2后下降。此外,IL-2增强表达高水平FoxP3的Tregs,并在功能上能够抑制自体Tcons。Tregs免疫反应在延长的IL-2治疗期间得到维持 (Koreth等人, (2011) N. Engl. J. Med. 365:2055-2066)。

[0161] 血浆IL-2水平在第1周时迅速上升,然后尽管继续每日给予IL-2,血浆IL-2水平下降,而Tregs计数上升 (Matsuoka等人, (2013) Sci. Transl. Med. 5:179ra43)。随着Treg的绝对数增加,且随着IL-2治疗期间Tregs上的CD25表达进一步增加,IL-2水平下降。Treg体内平衡大幅增强,在开始IL-2治疗的1周内快速诱导Treg增殖;胸腺Treg新生增加在4-6周时达到峰值;且Treg中细胞存活标志物Bcl-2从4周起上升,当在8周停止IL-2时逆转 (Matsuoka等人, (2013) Sci. Transl. Med. 5:179ra43)。相比而言,其对于Tcons体内平衡的影响是有限的。免疫功能检查显示cGVHD的特征在于由提高的IL-7和IL-15水平导致的CD4<sup>+</sup>Tcons的组成性Stat5活化,具有相对功能缺失的IL-2和Treg pSTAT5活化 (Matsuoka等人, (2013) Sci. Transl. Med. 5:179ra43)。低剂量IL-2疗法在开始IL-2治疗的1周内优先增强cGVHD患者中的Treg Stat5磷酸化。Tregs:Tcons pSTAT5活化比率经2周恢复至正常范围,其在IL-2疗法持续期间得到维持。通过自发的和Fas诱导的试验评估的凋亡抵抗也在Tregs中相比于在Tcons中被优先诱导。低剂量IL-2可恢复有利于Treg对Tcon的稳态平衡,并促进免疫耐受 (Matsuoka等人, (2013) Sci. Transl. Med. 5:179ra43)。

[0162] 在HCV诱导的血管炎中也记录了相似的Treg增强和临床受益 (Saadoun等人, (2011) N. Engl. J. Med. 365:2067-2077)。虽然低剂量IL-2尚未用于治疗儿童中的GVHD,但其已安全用于同种异体和自体HSCT二者之后儿童中的其它适应症。进行了两项研究,在具有高风险白血病和/或复发转移性尤文氏肉瘤的移植后患者中使用 $1-2 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>/d范围剂量

的SC IL-2作为策略以通过诱导自然杀伤(NK)细胞而预防复发(Liu等人,(2008) Bone Marrow Transplant 42:535-539; Schlegel等人,(2011) Best Pract.Res.Clin.Haematol.24:443-452)。在一项研究中,患者的中位数年龄为11岁(范围为4-16岁)且治疗持续时间范围为15-250天(Schlegel等人,(2011) Best Pract.Res.Clin.Haematol.24:443-452)。类似地,在成神经细胞瘤患者中的一项剂量递增研究在每2周一次的六个5日循环中以3、6和 $9 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>/d的剂量给予SC IL-2以增加NK细胞数(Ladenstein等人,(2011) J.Clin.Oncol.29:441-448)。在该项研究中,患者中位数年龄为4.1岁(范围为1.8-7.4岁)。在全部3项研究中,主要不良反应是发烧和注射位点处的局部炎症。

[0163] 术语“IL-2免疫疗法”或“IL-2疗法”包括通过任何已知途径(例如,静脉内给予,例如,以推注输液或在一段时间内持续输液,通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内(intracerebrospinal)、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部、吸入和其它已知途径)向有此需要的受试者给予IL-2。通常,IL-2的药代动力学在人、小鼠、大鼠、兔、羊、猪和食蟹猴间似乎是线性的。皮下给予后,IL-2的吸收相对较慢且平均停留时间相比于IV给予延长。

[0164] 在大鼠中的若干多次剂量的研究已对通过皮下(SC)途径给予IL-2(长达13周的每日给予)进行了评估。其证实大鼠中的SC高剂量毒性概况与IV给予后的高剂量毒性概况是相当的。IL-2相关发现(findings)包括淋巴球增多、嗜酸性粒细胞增多、轻度贫血、骨髓外造血、淋巴样增生、肝肿大和脾肿大。在包括肝、肺、淋巴结、肾、脾和骨髓的许多器官中发现了浸润性和增生性改变。在兔SC耐受性研究中,给药7天后注射位点处的局部炎症反应与IL-2的已知作用相一致,且与人类试验中报道的注射位点反应相一致。

[0165] 因此,已证明IL-2在动物中的毒性是剂量和持续时间相关的,其中所有毒性作用直接或间接与IL-2药理活性相关。在所有物种中,治疗相关作用在2-4周的无治疗期后全部或部分逆转。重复IV或SC给予IL-2后的发现是可比的。靶器官毒性的严重性与炎症细胞浸润入这些器官的程度相关。动物中的生物效应基本上与临床试验中报道的效应相似。然而,这些MTD研究涉及用于治疗转移性RCC和黑素瘤的高剂量IL-2,而不是拟用于增强体内Treg的低剂量IL-2。

[0166] 已在患有癌症和患有HIV的患者中评估了IL-2药代动力学。短期IV输液后,IL-2的药代动力学概况表征为高血浆浓度、快速分布入血管外空间、以及以1-2小时的半衰期从机体消除。SC给予后,IL-2吸收缓慢且平均停留时间相比于IV给予延长。HIV患者中的最大IL-2血浆浓度在SC给药后的2-5小时内出现,且终端相半衰期估计为5小时,提示延长的吸收。

[0167] 推注输液和持续IV输液的清除率近似相同。如根据其短半衰期所预期的,预计在输液后约6小时达到稳态。关于SC IL-2给予的数据提示约35%被吸收入血流,在涉及HIV感染研究的参与者中报道了较高的生物利用度(>60%)。在癌症或HIV患者中通过SC或持续IV给予治疗五天导致了时间依赖性的IL-2清除增加。这与可溶IL-2受体血清水平的增加相关。给药循环之间的无药日恢复IL-2清除至其初始值。

[0168] IL-2的系统性消除至少有3种机制:肾小球滤过、管周提取和可诱导的受体介导的机制(在人类中)。自肾小球后毛细血管管周提取小肽和蛋白进入肾小管以及随后的细胞内分解代谢是独立于肾小球滤过而发生的一种肾消除机制。受体介导的清除主要是IL-2与其在应答细胞上的特异性细胞受体对接的功能。虽然其它细胞类型(例如,B细胞)也具有功能

性IL-2受体,大部分IL-2受体是在T细胞和自然杀伤(NK)细胞上。

[0169] 在采用高剂量推注IL-2治疗的转移性黑素瘤或肾细胞癌中,观测到CD4+CD25+ Treg细胞增加了将近6倍,循环CD4+FOXP3+ Treg细胞频率增加了4倍(Ahmadzadeh和Rosenberg (2006) Blood 107:2409-2414)。经过过去二十年已累积了关于转移癌患者中IL-2作用的可观的临床数据。在大部分使用高剂量IL-2的癌症试验中,记录了可观的毒性,仅有偶尔的肿瘤反应。发烧、低血压、黄疸和氮血症是常见的并发症,经常迫使收入特护病房。造血干细胞移植(HSCT)患者不大可能耐受高剂量IL-2。

[0170] 已在患有HIV感染和癌症的患者中评估了延长了时间的低剂量SC IL-2疗法。在一项‘超低剂量’IL-2的研究中,七名患有HIV和非霍奇金淋巴瘤的患者在首次缓解中接受了 $1 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>/d的IL-2(Chiron) (Shah等人, (2006) Clin.Cancer Res.12:3993-3996)。在~8周治疗后,单药IL-2疗法导致统计学上显著的、成比例的NK细胞(1.6倍)和Tregs(9倍)的增加。其它淋巴细胞亚群未显著改变。毒性是轻微的(疲劳、局部瘙痒、肌痛、转氨酶增加等),没有3级不良事件。

[0171] 低剂量IL-2还已在同种异体HSCT后使用。在一项研究中,通过以 $2-6 \times 10^5$  IU/m<sup>2</sup>/d ( $\approx 0.6-1.8 \times 10^6$  U/m<sup>2</sup>/d的IL-2(Chiron))范围的剂量向CD6+ T细胞耗尽(TCD)的移植后的29名无症状的恶性血液病患者持续IV输液给予IL-2(Amgen,Roche)达3个月的时间以增强免疫移植植物抗白血病(GVL)效应(Soiffer等人(1994) Blood 84:964-971)。低剂量IL-2被良好耐受,仅有4名参加者因毒性而提前退出。29名参加者中仅有1名产生了急性GVHD。8名评估者中的7名,除了预期的NK细胞扩增以外,还出现了CD4+CD25+ T淋巴细胞(可能代表Treg)的45%的中值增加。另外,发现了FOXP3表达中值增加了~8.5倍,表明实质性Treg增强(Zorn等人, (2006) Blood 108:1571-1579)。低剂量IL-2显示出了良好耐受,伴有在同种异体HSCT后具有显著的Treg扩增。

[0172] IL-2免疫疗法的非限制性实例是本领域中众所周知的并至少可见于例如Rosenberg等人, (1993) J.Natl.Cancer Inst.85:622-632;Guirguis等人, (2002) J.Immunother.25:82-87;Griffiths和Mellon (2004) Postgrad Med.J.80:320-327;Yang等人, (2003) J.Clin.Oncol.21:3127-2132;McDermott等人, (2005) J.Clin.Oncol.23:133-141;Negrier等人, (2007) Cancer 110:2468-2477;McDermott (2009) Med.Oncol.26:13-17;美国专利号5,419,900、5,696,079、6,045,788和6,548,055中,其各自在此通过引用整体并入本文以用于所有目的。

### [0173] III. 受试者

[0174] 在一个实施方式中,确定给予抗免疫失调治疗或者预测其有效响应抗免疫失调疗法(例如,多次-可变剂量IL-2单独使用或与一种或多种其它抗免疫失调疗法组合)的受试者,是哺乳动物(例如,小鼠、大鼠、灵长类、非人哺乳动物、家畜例如狗、猫、牛、马),且优选是人。成人受试者以及小儿受试者在考虑之中。可如本文所述治疗小儿受试者,并且可使用高至用于成人受试者的治疗剂剂量。

[0175] 在本发明方法的另一实施方式中,受试者尚未经历治疗,例如抗免疫失调疗法(例如,多次-可变剂量IL-2单独使用或与一种或多种其它抗免疫失调疗法组合)。在又一实施方式中,受试者已经历了此治疗,例如采用类固醇的治疗。

[0176] 本发明方法可用于治疗期望抑制或下调免疫反应的多种不同免疫失调和/或确定

其对抗免疫失调疗法(例如,多次-可变剂量IL-2单独使用或与一种或多种其它抗免疫失调疗法组合)的响应性。可通过下调免疫细胞反应、通过在免疫细胞中诱导特异性失能(anergy)或二者以抑制活化免疫细胞的功能。

[0177] 例如,通过共同给予抗原以及本发明方法的治疗组合物可将此类方法用于诱导针对特异性抗原的耐受。可诱导针对特异性蛋白的耐受。在一个实施方式中,可抑制不期望产生的对过敏原(例如,食物过敏原)或外源蛋白的免疫应答/反应。例如,接受因子VIII的患者时常产生针对该凝血因子的抗体。本发明方法中共同给予重组因子VIII(或通过物理连接至因子VIII,例如通过交联)可导致免疫反应下调。以相似的方式,可诱导减少的克隆缺失和/或增加的耗尽(例如,T细胞耗尽)。

[0178] 下调免疫反应可用于治疗根据本发明的多种其它“免疫失调”,其包括但不限于,组织、皮肤和其它实体器官移植(例如,肾脏、肝脏、心脏和血管化复合物异体移植体移植)的状况,在造血干细胞移植排斥(例如,移植物抗宿主病(GVHD))中,在自身免疫疾病例如系统性红斑狼疮、多发性硬化、过敏、移植、超敏反应中,在需要增加CD4<sup>+</sup> T细胞产生或功能的失调中、在需要改进的疫苗接种功效的紊乱中以及需要增加调节性T细胞产生或功能的失调中。例如,阻断免疫细胞功能使得组织移植中组织破坏减少。通常,在组织移植中,移植物排斥的起始是该移植物被免疫细胞识别为外源物,随后免疫反应破坏该移植物。在移植之前或移植之时给予本文所述的试剂可促进生成抑制性信号。此外,抑制还可足以使免疫细胞失能(anergize),从而诱导受试者中的耐受。诱导长期耐受避免了重复给予这些阻断剂的必要性。

[0179] 下调免疫反应还可用于治疗自身免疫疾病,例如1型糖尿病(T1D)和多发性硬化。许多自身免疫失调是针对自身组织产生响应的免疫细胞被不适当的活化以及促进产生涉及疾病病理的细胞因子和自身抗体的结果。预防自身反应性免疫细胞的活化可减少或消除疾病症状。给予本文所述的试剂可用于预防产生疾病发展中可能涉及的自身抗体或细胞因子。此外,本发明方法可诱导自反应性免疫细胞的抗原特异性耐受,其可导致长期减轻疾病。可使用多种良好表征的人类自身免疫疾病的动物模型来确定试剂在预防或缓解自身免疫失调中的功效。实例包括鼠类试验性自身免疫性脑炎、MRL/lpr/lpr小鼠或NZB杂交小鼠中的系统性红斑狼疮,鼠类自身免疫性胶原蛋白关节炎、NOD小鼠和BB大鼠中的糖尿病、以及鼠类试验性重症肌无力(参见例如,Paul编,Fundamental Immunology,Raven Press,New York,1993第三版,第30章)。

[0180] 抑制免疫细胞活化还可用于治疗性治疗过敏和过敏反应,例如通过抑制IgE产生。过敏反应性质上可为全身或局部的,这取决于过敏原的进入途径以及肥大细胞或嗜碱性粒细胞上IgE的沉积模式。因此,根据本发明方法局部或全身抑制免疫细胞介导的过敏反应(例如,针对食物)。在一个实施方式中,过敏是过敏性哮喘。

[0181] 抑制免疫细胞活化在治疗免疫细胞的寄生性和病毒性感染中也可能是重要的。例如,在获得性免疫缺陷综合症(AIDS)中,病毒复制是由免疫细胞活化所刺激的。对这些相互作用的调节可导致病毒复制的抑制并因此改善AIDS发展。对这些相互作用的调节还可用于促进妊娠维持。可采用调节这些相互作用的试剂治疗由于对胚胎或胎儿的免疫排斥而具有自发性流产风险的女性(例如,之前已自发性流产过的那些或者之前受孕困难的那些)。

[0182] 根据本发明方法下调免疫反应还可用于治疗对自体组织的自身免疫进攻。因此,

对因自身免疫进攻(例如,自身免疫失调)而加重的病况以及诸如心脏病、心肌梗塞和动脉粥样硬化的病况的调节也在本发明的范围内。

[0183] 在一个优选实施方式中,免疫失调是移植物抗宿主病(例如,慢性GVHD)。对于许多具有恶性血液病的患者,同种异体造血干细胞移植(HSCT)提供了仅有的治愈机会。不幸的是,仍存在明显的障碍,最突出的是疾病的复发和GVHD。超过40%的患者经历HSCT复发而超过50%的将发展出cGVHD,一种与可观的发病率和死亡率相关的具有多系统免疫表现的虚弱化病况(Kahl等人,(2007) Blood 110:2744-2748;Perez-Simon等人(2008) Biol. Blood Marrow Transplant. 14:1163-1171)。虽然小儿群体中的发生率较低,但cGVHD仍为用于恶性疾病的同种异体HSCT后非复发发病率和死亡率的主要原因,其在20-50%的HSCT后存活大于100天的儿童中发生(Baird等人(2010) Pediatr. Clin. North Am. 57:297-322)。供体细胞介导的免疫反应是GVL和GVHD反应的原因。新移植的供体免疫系统对残留肿瘤细胞的识别和破坏不足使得患者恶性肿瘤复发,而针对宿主抗原的失控响应则导致GVHD(Antin(1993) Blood 82:2273-2277;Ferrara等人(2009) Lancet 373:1550-1561)。慢性GVHD发病机理涉及炎性T-和B-细胞对同种异体(供体/接受者多态)和自体(供体/接受者非多态)抗原的响应,并且在同种异体HSCT后其仍为常见问题和主要治疗挑战,而长期幸存者通常经历生活质量受损和增加的远期死亡(Subramaniam等人(2007) Leukemia 21:853-859)。使用经动员外周血祖细胞而非骨髓作为用于HCT的干细胞来源的增加已导致了cGVHD发生率的明显增加(Cutler等人(2001) J. Clin. Oncol. 19:3685-3691;Lee等人(2007) Blood 110:4576-4583)。随着使用同种异体HSCT用于治疗非恶性适应症(例如,镰状细胞贫血、免疫缺陷和先天性代谢疾病)的增多,预期小儿患者中cGVHD的发生率会上升。在成人和儿童二者中,与cGVHD相关的炎性或纤维化变化最常涉及皮肤、眼睛、嘴、肝脏和呼吸道。

[0184] 系统性类固醇常规用于治疗cGVHD,但具有有限的功效和相当的毒性。长期类固醇治疗对于生长和骨密度的影响在儿童中特别显著(Canalís等人,(2002) J. Pediatr. Endocrinol. Metab. 15:1341-1345)。在儿童中,大部分补救剂(salvage agents)的使用是由成人经验外推得到的,且仅有包括吗替麦考酚酯(MMF)、体外光分离置换法(ECP)和喷司他丁在内的少数疗法已在儿科试验中进行了测试(Busca等人(2000) Bone Marrow Transplant 25:1067-1071;Berger等人(2007) J. Pediatr. Hematol. Oncol. 29:678-687;Jacobsohn等人,(2009) Blood 114:4354-4360)。没有确立的cGVHD二线疗法。经常将附加的免疫抑制剂用于类固醇难治性cGVHD,尽管其功效有限。因此,二线治疗选择有限并且类固醇难治性cGVHD成为主要的治疗挑战。

#### [0185] IV. 抗免疫失调疗法

[0186] 可向期望的受试者或已经显示为可能响应此疗法的受试者施予本发明方法(例如,多次-可变剂量IL-2单独使用或与一种或多种其它抗免疫失调疗法组合)。在另一实施方式中,若受试者显示为不大可能响应所述疗法则避免使用本发明的治疗方法,并可给予替代的治疗方案,例如靶向和/或非靶向抗免疫疗法。

[0187] 在一个实施方式中,提供了一种用于治疗罹患免疫失调的受试者的多次-可变IL-2剂量方法,其包括:a)给予所述受试者诱导方案,所述诱导方案包括以增加所述受试者的血浆白细胞介素-2(IL-2)水平并增加所述受试者的调节性T淋巴细胞(Tregs)与常规T淋巴细胞(Tcons)的比率(Tregs:Tcons)的剂量持续给予所述受试者IL-2;以及b)随后给予所述

受试者至少一个维持方案,所述维持方案包括持续给予所述受试者IL-2维持剂量,所述IL-2维持剂量高于所述诱导方案剂量并且i) 进一步增加所述受试者的血浆IL-2水平和ii) 进一步增加所述Tregs:Tcons比率,从而治疗所述受试者。在一个实施方式中,将源自诱导方案的血浆IL-2水平耗尽至低于诱导方案之前的先前血浆IL-2峰值水平。在某些实施方式中,所述IL-2维持方案可使所述受试者的血浆IL-2水平增加至超过由所述诱导方案所诱导的血浆IL-2峰值水平。术语“多次-可变IL-2剂量方法”是指包括多于一次的IL-2给予的治疗性干预,其中所述多于一次的IL-2给予使用多于一种的IL-2剂量。此方法与“固定”剂量方法相对,其中所述“固定”剂量方法以预定的方式(例如,每天)给予固定量的IL-2。

[0188] 术语“诱导方案”是指以增加受试者的血浆IL-2水平并增加受试者的Tregs:Tcons比率的剂量持续给予IL-2。在一些实施方式中,使用该方案直至达到血浆IL-2峰值水平。受试者的血浆IL-2水平和/或Tregs:Tcons比率相对于治疗起始之前的基线比率增加至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%或更多。

[0189] 在根据FDA批准应用的某些剂量和方法下,Tcons相比于Tregs被优先活化,从而使得Tregs:Tcons比率实际上减小。相比之下,本发明方法通过在本文确定的范围内使用“低剂量IL-2”以优先提升Tregs而非Tcons,从而增加Tregs:Tcons比率,并且在患有免疫失调的受试者中是安全和有效的。术语“低剂量IL-2”是指其中相比于Tcons优先增强Tregs的剂量范围。在一个实施方式中,低剂量IL-2是指小于或等于用于抗癌免疫疗法的“高剂量IL-2”剂量(例如,1800万IU/m<sup>2</sup>/天至2000万IU/m<sup>2</sup>/天,或更多)的50%的IL-2剂量。“低剂量IL-2”的上限可进一步受限于治疗引起的不良反应,例如发烧、发冷、虚弱和疲劳。IL-2通常根据以在给定时间单位内相比于体表面积(BSA)给予的以国际单位(IU)计量的量进行给药。可通过直接测量或通过任意多种公知的方法(例如,Dubois&Dubois公式)如实施例中描述的那些来计算BSA。通常,IL-2是以IU/m<sup>2</sup> BSA/天的单位给予。根据本发明方法的示例性低剂量IL-2剂量包括,以10<sup>6</sup>IU/m<sup>2</sup>/天为单位的,0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9和3.0x10<sup>6</sup>IU/m<sup>2</sup>/天中的任意一种,包括其间的任何值和/或其间的任何范围。例如,诱导方案剂量可为0.3x10<sup>6</sup>IU/m<sup>2</sup>/天和3.0x10<sup>6</sup>IU/m<sup>2</sup>/天之间的范围,及其间的任何值或范围。

[0190] 术语“持续给予”是指以给定时间间隔给予IL-2,其间没有任何间歇性中断。因此,未出现IL-2中断。例如,诱导剂量可为在至少1-14个连续日或其间的任何范围(例如,至少4-7个连续日)期间每日给予(例如,每日一次或多次)。如本文所述的,通过除皮下给予以外的途径给予的更长效的IL-2试剂和/或IL-2试剂也列入考虑范围。现有技术中所述的IL-2间歇性静脉给与导致短的IL-2半衰期,这与根据本发明的增加的血浆IL-2水平和增加的Tregs:Tcons比率无法相比。然而,为了实现持续的稳态IL-2水平也考虑每日一次皮下IL-2给药、持续IV输液、长效皮下IL-2制剂等。

[0191] 可直接或间接评估血浆IL-2水平及其峰值。例如,可使用本领域公知的方法和试剂直接分析IL-2核酸和蛋白水平和/或活性,例如通过使用核酸探针、ELISA试剂盒、IL-2受体活化试验等(参见例如,Sigma-Aldrich人IL-2ELISA试剂盒RAB-0286以及美国专利号4,530,787、4,569,790、4,572,798、4,604,377、4,748,234、4,853,332、4,959,314、5,464,

939、RE33,653、5,229,109、5,419,900、5,696,079、6,045,788、6,548,055、7,514,073和7,569,215,其各自在此通过引用整体并入本文并用于所有目的)。

[0192] 在另一实施方式中,可通过分析IL-2的效用(例如,其对Tregs增殖、Tregs活性、Tregs凋亡等的效用)间接分析血浆IL-2水平和/或活性。用于确定Tregs增殖、Tregs活性和/或Tregs凋亡的方法是本领域公知的且如本文所述实施例中所示例。例如,可分析Tregs和/或Tcons细胞分化和/或活化的生物标志物,例如通过分析CD25、磷酸化STAT5 (pSTAT5)、FOXP3、KI67、TUNEL等的状态。此外,可如本文进一步所述的进行淋巴细胞亚型的表型分析、导致免疫反应降低的免疫调节的功能分析、血浆细胞因子分析等。

[0193] 在又一实施方式中,可根据诱导方案起始后的时间间接确定血浆IL-2水平和/或活性。例如,本文已确定在诱导方案起始后的约7天内达到血浆IL-2峰值水平。在本发明的一些实施方式中,根据诱导方案起始后的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或更多天来确定血浆IL-2水平,例如血浆IL-2峰值水平。

[0194] 维持方案可起始于诱导方案之后的任何点,例如血浆IL-2峰值水平和/或活性峰值之后,但是优选尽可能接近达到血浆IL-2峰值水平和/或活性的时间。术语“维持方案”是指以高于诱导方案剂量和i) 进一步增加受试者的血浆IL-2水平及ii) 进一步增加Tregs:Tcons比率的剂量持续给予受试者IL-2。在一个实施方式中,在源自诱导方案的血浆IL-2水平被耗尽至低于诱导方案之前的先前血浆IL-2峰值水平的时间点或之后开始维持方案。如上所述,这可以以诱导方案起始后的天数为单位进行计量,例如诱导方案起始后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或更多天。

[0195] 为增加血浆IL-2水平,以高于诱导方案剂量的剂量向受试者给予IL-2。在一个实施方式中,以 $10^6$  IU/m<sup>2</sup>/天为单位,剂量为0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9和 $3.0 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>/天中的任意一种,包括其间的任何值和/或其间的任何范围。例如,诱导方案剂量可为 $0.3 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>/天和 $3.0 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>/天之间的范围和其间的任何值或范围。维持方案剂量可为至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或更多,或其间的任何值和/或其间的任何范围。相对于诱导方案的Tregs:Tcons,增加的血浆IL-2水平还增加了Tregs:Tcons比率,例如比率增加至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或更多,或其间的任何值和/或其间的任何范围。

[0196] 与诱导方案相一致,术语“持续给予”是指以定期间隔给予IL-2,其间没有任何间歇性中断。因此,未出现IL-2中断。虽然这可通过使用没有间歇性中断的IL-2给予方案实现,但还可通过使用提供稳态血浆IL-2水平的IL-2试剂实现IL-2持续给予。例如,可基于长期治疗(例如,无限期)每日给予维持剂量(例如,每日一次或多次)。在一些实施方式中,期间为至少1-42个连续日或其间任何范围(例如,至少14-42个连续日)。

[0197] 如上所述,可以以药学上可接受的制剂形式给予并通过任何适当的给予途径给予IL-2,例如通过皮下、静脉内、腹膜内、口服、经鼻、经皮或肌肉内给予。在一个实施方式中,本发明提供了药学上可接受的组合物,其包含与一种或多种药学上可接受的载体(添加剂)和/或稀释剂一起配制的治疗有效量的IL-2。本发明的药物组合物可特别配制用于以固体

或液体形式给予,包括适合于以下的那些:(1)口服给与,例如,浸液(drenches)(水性或非水性溶液或悬浮液)、片剂、大丸剂、粉末、颗粒、糊剂;(2)肠胃外给予,例如,以例如无菌溶液或悬浮液通过皮下、肌肉内或静脉内注射;(3)局部应用,例如应用于皮肤的乳膏、软膏或喷雾;(4)阴道内或直肠内,例如子宫托、乳膏或泡沫;或(5)气溶胶,例如水溶胶,脂质体制品或固体颗粒,其包含所述化合物。

[0198] 本文所用的短语“药学上可接受的”是指在合理医学判断的范围内,适用于与人类和动物组织接触而无过多毒性、刺激性、过敏反应或其它问题或并发症,与合理的收益/风险比相称的那些试剂、材料、组合物和/或剂型。

[0199] 如本文所用的短语“药学上可接受的载体”是指涉及将主体化学品从机体的一个器官或部分运载或运输到机体的另一器官或部分的药学上可接受的材料、组合物或媒介物,例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封材料。从与制剂的其它成分相容以及不会有害于受试者的角度上说,各载体必须是“可接受的”。可用作药学上可接受的载体的一些材料实例包括:(1)糖类,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;(4)黄芪胶粉;(5)麦芽;(6)明胶;(7)滑石;(8)赋形剂,例如可可油和栓剂蜡;(9)油类,例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;(10)二醇类,例如丙二醇;(11)多元醇类,例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;(12)酯类,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)海藻酸;(16)无热原水;(17)等渗盐水;(18)林格氏溶液;(19)乙醇;(20)磷酸盐缓冲溶液;和(21)用于药物制剂中的其它无毒相容性物质。

[0200] 可用于本发明方法的制剂包括适用于口服、鼻用、局部(包括口腔和舌下)、直肠、阴道、气溶胶和/或肠胃外给予的那些。制剂可便利地以单位剂型形式存在并可通过药学领域公知的任何方法制备。根据所治的宿主、特定给药模式的不同,可与载体材料联合以产生单一剂型的活性成分的量不同。可与载体材料联合以产生单一剂型的活性成分的量将通常为产生治疗效应的化合物的量。通常,自100%计,该量的范围将为从约1%至约99%的活性成分,优选从约5%至约70%,最优选从约10%至约30%。

[0201] 适用于体内给予的IL-2制剂是本领域公知的(参见例如,美国专利号4,530,787, 4,569,790, 4,572,798, 4,604,377, 4,748,234, 4,853,332, 4,959,314, 5,464,939, RE33, 653, 5,229,109, 5,419,900, 5,696,079, 6,045,788, 6,548,055, 7,514,073和7,569,215,其各自在此通过引用整体并入本文以用于所有目的)。

[0202] 在一些实施方式中,IL-2或其它有用的生物标志物的核酸分子是有用的,并可插入载体并用作基因治疗载体。可通过例如静脉内注射、局部给予(参见美国专利号5,328,470)或通过立体定向注射(参见例如Chen等人,(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:3054-3057)将基因治疗载体递送至受试者。基因治疗载体的药物制品可包括在可接受的稀释剂中的基因治疗载体,或可包括其中嵌埋基因运载工具的缓释基质。或者,当在重组细胞可完整产生完整基因递送载体(例如,逆转录病毒载体)的情况下,药物制品可包括一种或多种产生基因递送系统的细胞。

[0203] 用于将多核苷酸引入哺乳动物、人类、非人类或其细胞的任何手段均可用于本发明的实施,用于将本发明的各种构建体递送入预定的接受者。在本发明的一个实施方式中,

通过转染将DNA构建体递送至细胞,即,通过递送“裸”DNA或在与胶态分散体系的复合物中的DNA。胶态体系包括高分子复合物、纳米胶囊、微球、珠和基于脂质的系统,其包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体。本发明优选的胶态体系是脂质复合的或脂质体制配的DNA。在前述途径中,在将DNA制剂(例如,与脂质一起制剂)之前,可首先通过实验优化包含承载期望DNA构建体的转基因的质粒的表达(例如,在5'非翻译区中引入内含子以及去除不必要的序列(Felgner等人,Ann NY Acad Sci 126-139,1995)。然后可使用已知的方法和材料实现DNA的制剂(例如,与各种脂质或脂质体材料的制剂)并将其递送至作为接受者的哺乳动物。参见例如,Canonico等人,Am J Respir Cell Mol Biol 10:24-29,1994;Tsan等人,Am J Physiol 268;Alton等人,Nat Genet.5:135-142,1993和Carson等人申请的美国专利号5,679,647。

[0204] 可基于解剖和机械因素将脂质体的靶向分类。解剖分类是基于选择性的层面,例如,器官特异性、细胞特异性和细胞器特异性的。可基于其是否是被动或主动的区分机械靶向。被动靶向利用脂质体分布至器官中网状内皮系统(RES)细胞(其包含窦状毛细血管)的自然趋势。另一方面,主动靶向涉及通过将脂质体偶联至特异性配体(例如,单克隆抗体、糖、糖脂或蛋白),或通过改变脂质体的组成或大小而改变脂质体,以便实现靶向不同于自然发生的定位位点的器官和细胞类型。

[0205] 可以以各种方式修饰靶向递送系统的表面。在脂质体靶向递送系统的情况下,可将脂质基团并入脂质体的脂质双层以维持靶向配体与脂质体双层的稳定连接。可使用各种连接基团将脂质链连接至靶向配体。与运载工具(例如,脂质体)相连的裸DNA或DNA可给予至受试者中的若干位点(见下文)。

[0206] 可在任何期望的载体中递送核酸。这些包括病毒或非病毒载体,包括腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体和质粒载体。示例性病毒类型包括HSV(单纯疱疹病毒)、AAV(腺相关病毒)、HIV(人类免疫缺陷病毒)、BIV(牛免疫缺陷病毒)和MLV(鼠白血病病毒)。可以以提供充分有效的递送水平的任何期望形式给予核酸,包括在病毒颗粒中、在脂质体中、在纳米颗粒中以及与聚合物复合。

[0207] 编码蛋白的核酸或感兴趣的核酸可在质粒或病毒载体中,或在如本领域已知的其它载体中。此类载体是公知的并可选择任意载体用于特定应用。在本发明的一个实施方式中,基因运载工具包含启动子和脱甲基酶编码序列。优选的启动子是组织特异性启动子和通过细胞增殖活化的启动子,例如胸苷激酶和胸苷酸合成酶启动子。其它优选的启动子包括通过病毒感染可活化的启动子,例如 $\alpha$ -和 $\beta$ -干扰素启动子,以及通过激素(例如,雌激素)可活化的启动子。可使用的其它启动子包括莫洛尼病毒LTR、CMV启动子和小鼠白蛋白启动子。启动子可以是组成型的或可诱导的。

[0208] 在另一实施方式中,如WO 90/1109和美国专利5,580,859中所述,使用裸多核苷酸分子作为基因运载工具。此类基因运载工具可以是生长因子DNA或RNA且在某些实施方式中连接至灭活的腺病毒。Curiel等人,Hum.Gene.Ther.3:147-154,1992。可任选使用的其它媒介物包括DNA-配体(Wu等人,J.Biol.Chem.264:16985-16987,1989)、脂质-DNA组合(Felgner等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:7413-7417,1989)、脂质体(Wang等人,Proc.Natl.Acad.Sci.84:7851-7855,1987)和微弹(Williams等人,Proc.Natl.Acad.Sci.88:2726-2730,1991)。

[0209] 基因运载工具可任选包含病毒序列,例如病毒来源的复制或包装信号。这些病毒序列可选自诸如以下的病毒:星状病毒、冠状病毒、正粘病毒、乳多空病毒、副粘病毒、细小病毒、小核糖核酸病毒、痘病毒、逆转录病毒、披盖病毒或腺病毒。在一个优选实施方式中,生长因子基因运载工具是重组的逆转录病毒载体。重组逆转录病毒及其各种用途已描述在多篇参考文献中,包括例如,Mann等人,Cell 133:153,1983,Cane和Mulligan,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 81:6349,1984,Miller等人,Human Gene Therapy 1:5-14,1990,美国专利号4,405,712、4,861,719和4,980,289,以及PCT申请号WO 89/02,468、WO 89/05,349和WO 90/02,806。多种逆转录病毒基因运载工具可用于本发明中,包括例如EP 0,415,731;WO 90/07936;WO 94/03622;WO 93/25698;WO 93/25234;美国专利号5,219,740;WO 9311230;WO 9310218;Vile和Hart,Cancer Res.53:3860-3864,1993;Vile和Hart,Cancer Res.53:962-967,1993;Ram等人,Cancer Res.53:83-88,1993;Takamiya等人,J.Neurosci.Res.33:493-503,1992;Baba等人,J.Neurosurg.79:729-735,1993(美国专利号4,777,127、GB 2,200,651、EP 0,345,242和WO91/02805)中描述的那些。

[0210] 可用于递送本发明多核苷酸的其它病毒载体系统来源于疱疹病毒,例如单纯疱疹病毒(由Woo等人于1997年5月20日提交的美国专利号5,631,236以及由Neurovex提交的WO 00/08191)、牛痘病毒(Ridgeway(1988)Ridgeway,“Mammalian expression vectors,”In:Rodriguez R L,Denhardt D T编Vectors:A survey of molecular cloning vectors and their uses.Stoneham:Butterworth,;Baichwal和Sugden(1986)“Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses:Transient and stable expression of transferred genes,”In:Kucherlapati R编Gene transfer.New York:Plenum Press;Coupar等人(1988)Gene,68:1-10)和若干RNA病毒。优选的病毒包括甲病毒、痘病毒、沙状病毒、牛痘病毒、脊髓灰质炎病毒等。它们对于各种哺乳动物细胞提供了若干有吸引力的特性(Friedmann(1989)Science,244:1275-1281;Ridgeway,1988,见上;Baichwal和Sugden,1986,见上;Coupar等人,1988;Horwich等人,(1990)J.Virol.,64:642-650)。

[0211] 在其它实施方式中,可使用本领域公知的方法操作基因组中的目标DNA。这可有用于在输入受试者之前离体重组工程化受试者T细胞群。例如,可通过缺失、插入、和/或突变操作基因组中的目标DNA,方法可以是逆转录病毒插入、人工染色体技术、基因插入、带有组织特异性启动子的随机插入、基因靶向、转位因子和/或用于引入外源DNA或产生经修饰的DNA/经修饰的核DNA的任何其它方法。其它修饰技术包括从基因组删除DNA序列和/或改变核DNA序列。例如,可通过定点诱变改变核DNA序列。

[0212] 在其它实施方式中,可将重组生物标志物多肽及其片段给予受试者。在一些实施方式中,可构建并给予具有增强的生物学特性的融合蛋白。此外,可根据本领域中公知的药理学方法(例如,聚乙二醇化、糖基化、寡聚化等)修饰生物标志物多肽及其片段,以便进一步增强期望的生物活性,例如增加的生物利用度和减少的蛋白水解降解。

[0213] 在一些方面中,多次-可变剂量IL-2疗法可与一种或多种其它抗免疫失调疗法组合。

[0214] 在一个实施方式中,体外光分离置换法(ECP)是有用的。ECP是一种由以下构成的清血过程:UVA照射清血法采集的、采用8-甲氧补骨脂素(8-MOP)敏化的自体白细胞,并随后再回输以增加Tregs(Gatza等人,(2008)Blood 112:1515-1521;Capitini等人,(2011)

Biol.Blood Marrow Transplant.17:790-799;Maeda等人,(2008) J.Immunol.181:5956-5962),并在此类Treg增加之前通过凋亡T细胞诱导不成熟和浆细胞样树突状细胞(DCs)(Perez等人,(1991) Transplantation 51:1283-1289;Stenger等人,(2012) Blood 119:5088-5103;Albert等人,(1998) Nature 392:86-89;Yoo等人(1996) J.Invest.Dermatol.107:235-242)。关于ECP机制的人类数据选择性地报导了Tregs(Schmitt等人,(2009) Transplantation 88:411-416;Biagi等人,(2007) Transplantation 84:31-39)或DC表型(Shiue等人,(2013) J.Invest.Dermatol.133:2098-2100),但其在异质群体中,经常没有收入标准或ECP前基线数据。ECP是常规推荐的且CMS批准的cGVHD二线治疗(Dignan等人,(2012) Br.J.Haematol.158:62-78)。虽然在实践中是安全的,但单独的ECP仅提供有限的临床受益。约半数治疗患者没有临床响应;部分响应对响应者而言是惯例;且长期ECP期间的免疫抑制剂递减缓慢且经常不完全。

[0215] 在另一实施方式中,调节性T细胞输注是有用的。在HSCT背景下输注Tregs已是良好耐受的。一项在23名双脐带血(DUCB) HSCT接受者中的试验评价了输注使用IL-2离体扩增的UCB Treg的安全性。未体内给予IL-2。患者在移植后接受 $0.1-30 \times 10^5$  Treg细胞/kg的剂量。未观测到输注毒性。相比于未进行UCB Treg输注的同等治疗的108名历史对照,有较低的II-IV级急性GVHD发生率(43%对比61%, $P=.05$ ),对于感染、复发或早期死亡不具有有害影响(Brunstein等人,(2011) Blood 117:1061-1070)。然而,仅能在14天内于体内检测到输注的UCB Tregs。在另一项28名经历高风险HLA-单倍体相合HSCT的恶性血液病患者的试验中,输注移植围(peritransplant)供体Treg富集细胞,随后输注Tcon,即便没有移植后的免疫抑制也预防了GVHD、促进了淋巴重建、提高了对条件致病菌的免疫力、且未减弱移植抗白血病效应(Di Ianni等人(2011) Blood 117:3921-3928)。该研究利用经由CliniMACS(Miltenyi Biotec)免疫磁珠分离的2步供体Treg细胞富集:a)临床级CD8+/CD19+共耗尽(2.1耗尽程序,CliniMACS)以及然后是b) CD25+阳性选择(3.1富集程序,CliniMACS)。在体外1:2的Treg:Tcon比率下Treg富集细胞产物是被抑制的。在输注高达 $4 \times 10^6$ 的Treg富集细胞/kg后未报道毒性,尽管随后输注高达 $2 \times 10^6$  Tcon细胞/kg(CliniMACS CD19+耗尽供体淋巴细胞)。

[0216] 不同于已知的涉及繁琐和昂贵的Treg扩增和纯化过程的调节性T细胞输注方法,本文已确定直接采集和输注HSCT供体或受试者的自身Tregs而无需在实验室中扩增细胞,这提供了简单、有效且持久的免疫失调治疗手段。该效应的出现是因为与低剂量IL-2组合在体内建立了直接在机体内扩增输注的Tregs的条件,以便持久地增强患者中的Tregs以用于免疫失调的持久控制。

[0217] Tregs可被纯化或富集。“富集的Tregs”是指除其它T细胞以外以下述比例包含Tregs的组合物,其中组合物具有至少1:2、1:1.9、1:1.8、1:1.7、1:1.6、1:1.5、1:1.4、1:1.3、1:1.2、1:1.1、1:1、1:0.9、1:0.8、1:0.7、1:0.6、1:0.5、1:0.4、1:0.3、1:0.2、1:0.1或更高,或其间任何值或其间任何范围的Tregs:Tcons比率。此类比率的实现可通过纯化包含CD8+和CD19+共耗尽的T细胞的组合物联合阳性选择CD25+细胞。可以 $0.1 \times 10^6$ 、 $0.2 \times 10^6$ 、 $0.3 \times 10^6$ 、 $0.4 \times 10^6$ 、 $0.5 \times 10^6$ 、 $0.6 \times 10^6$ 、 $0.7 \times 10^6$ 、 $0.8 \times 10^6$ 、 $0.9 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^6$ 细胞/千克受试者体重或更多,或其间任何值或其间任何范围给予包含富集的Tregs的细胞群。此类富集的Tregs可进一步依据细胞标记和/或存活率进行定义。例如,富集的Tregs细胞组合物可具有

大于40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更高,或其间任何值或其间任何范围的总细胞存活率。其可具有革兰氏阴性染色。其可包含大于40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多,或其间任何值或其间任何范围的CD4+CD25+细胞。其可包含大于40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多,或其间任何值或其间任何范围的FoxP3+细胞。可以以如本文所述的任何适当途径(例如,通过输液)给予Tregs。Tregs还可在IL-2给予之前、同时或之后给予。

[0218] 在又一实施方式中,治疗方法可进一步使用阻断共刺激通路活性的试剂,例如其它B淋巴细胞抗原(如,B7-1、B7-2或B7-3)以进一步下调免疫反应。两种下调免疫反应的单独的试剂可组合为单一组合物或单独给予(同时或先后)以更有效地下调受试者中免疫细胞介导的免疫反应。此外,治疗活性量的一种或多种主体试剂可与其它下调试剂联同使用以影响免疫反应。其它免疫调节试剂的实例包括但不限于,阻断共刺激信号的抗体(例如,针对CD28或ICOS)、用作CTLA4激动剂的抗体、和/或针对其它免疫细胞标记的抗体(例如,针对CD40、针对CD40配体、或针对细胞因子)、融合蛋白(例如,CTLA4-Fc)和免疫抑制药物(例如,雷帕霉素、环孢菌素A或FK506)。

[0219] 此外,促进免疫检查点蛋白活性的试剂也是有用的。术语“免疫检查点蛋白”是指CD4+和/或CD8+ T细胞细胞表面上的一组分子,其通过下调或抑制抗肿瘤免疫反应而微调免疫反应。免疫检查点蛋白是本领域公知的且包括但不限于,如上所述的CTLA-4,以及PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、2B4、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIR家族受体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、BTLA、SIRP $\alpha$  (CD47)、CD48、2B4 (CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT和A2aR(参见例如,WO 2012/177624)。可用于促进免疫检查点蛋白水平和活性的试剂是本领域公知的。

[0220] 在又一实施方式中,任何一线或二线免疫失调治疗可与本发明的方法组合。代表性实例包括但不限于,唑体、吗替麦考酚酯(MMF)和喷司他丁(参见例如,Busca等人,(2000) Bone Marrow Transplant 25:1067-1071; Berger等人,(2007) J. Pediatr. Hematol. Oncol. 29:678-687; Jacobsohn等人,(2009) Blood 114:4354-4360)。

#### [0221] V. 临床疗效

[0222] 可通过任何本领域已知的方法测量临床疗效。例如,可以定量的方式如在感染区域的百分数改变或使用半定量方法以定性方式如“病理完全缓解”(pCR)、“临床完全缓解”(cCR)、“临床部分缓解”(cPR)、“临床病情稳定”(cSD)、“临床进行性疾病”(cPD)或其它定性标准来记录响应。对肿瘤响应的评估可在治疗开始后的任何时间进行,例如数小时、数天、数周后或者优选数月后。

[0223] 在一些实施方式中,可通过测量临床受益率(CBR)来确定本文所述的治疗处理的临床疗效。临床受益率的测量是通过在治疗结束后起至少6个月的时间点测定完全缓解(CR)的患者百分数、部分缓解(PR)的患者数目和具有稳定病情(SD)的患者数目的总和。该公式的简写为 $CBR = \text{超过6个月的CR} + \text{PR} + \text{SD}$ 。在一些实施方式中,特定治疗方案的CBR为至少25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或更多。

[0224] 用于评估响应的附加标准涉及“生存期”,其包括以下所有:至死亡的生存期,又称总体生存期(其中所述死亡可为不论原因的);“无复发生存期”(其中术语复发应包括局部

复发和远端复发二者)；无疾病生存期(其中术语疾病应包括免疫失调和与之相关的疾病)。所述生存期的长度可通过参考经定义的起始点(例如,诊断或开始治疗的时间)和终末点(例如,死亡或复发)来计算。

[0225] 例如,为了确定适当的阈值,可将特定治疗方案给予一群受试者并可将结果与在给予任何治疗之前确定的生物标志物测量值相关联。结果测量值可为对根据新辅助设定(neoadjuvant setting)所给予的治疗的病理反应。或者,可通过对已知生物标志物测量值的接受抗免疫失调治疗后的受试者进行一段时间的监测以获得结果测量值,例如总体生存期和无病生存期。在某些实施方式中,给予各受试者相同剂量的活性剂。监测受试者的时段可不同。例如,可监测受试者至少2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55或60个月。可使用诸如实施例部分中所述的那些方法来确定与抗免疫失调疗法结果相关联的生物标志物测量阈值。

#### [0226] V. 本发明进一步的方法

[0227] 可根据本文所述的方法和技术人员已知的技术来分析生物标志物核酸和/或生物标志物多肽以识别用于诊断和预后目的的此类基因改变或表达改变。例如,可检测识别Tregs和/或Tcons的生物标志物,以及其活性细胞生物标志物。此类方法包括但不限于,1)生物标志物转录本或多肽水平的改变,2)生物标志物基因的一个或多个核苷酸的缺失或插入,4)生物标志物基因的一个或多个核苷酸的替代,5)生物标志物基因(例如,表达调节区)的异常修饰,等等。

#### [0228] a. 样本采集、制备和分离

[0229] 在一些实施方式中,将来自受试者的样本中的生物标志物的存在、缺失、量和/或活性测量值与预定对照(标准)样本相比较。来自受试者的样本通常来自患病组织,例如免疫失调细胞或组织。对照样本可来自相同受试者或来自不同受试者。对照样本通常是正常、非患病样本。然而,在一些实施方式中,例如用于将疾病分期或用于评估治疗功效,对照样本可来自患病组织。对照样本可为来自若干不同受试者的样本的组合。在一些实施方式中,将来自受试者的生物标志物量和/或活性测量值与预定水平进行比较。该预定水平通常获得自正常样本,例如来自与测试样本获得自的物种相同的物种成员的细胞或组织中,或者来自测试样本获得自的受试者的非患病细胞或组织中的生物标志物的正常拷贝数、量或活性。如本文所述的,“预定的”生物标志物量和/或活性测量值可为用于(仅举例来说)评估可能被选择接受治疗的受试者、评估对抗免疫失调疗法(例如,多次-可变剂量IL-2疗法单独使用或与一种或多种其它抗免疫失调疗法组合)的响应的生物标志物量和/或活性测量值。可在患有或不患有免疫失调的患者群体中确定预定的生物标志物量和/或活性测量。预定的生物标志物量和/或活性测量可为单一数值,对每个患者可同等适用,或者预定的生物标志物量和/或活性测量值可根据患者的特定亚群而变化。受试者的年龄、体重、身高和其它因素可能影响个体的预定的生物标志物量和/或活性测量值。此外,可针对各个体受试者确定预定的生物标志物量和/或活性。在一个实施方式中,本文所述方法中确定和/或比较的量是基于绝对测量值的。在另一实施方式中,本文所述方法中确定和/或比较的量是基于相对测量值,例如比率(例如,生物标志物表达,其归一化至管家基因表达,或不同时间点的基因表达)的。

[0230] 预定的生物标志物量和/或活性测量值可为任何适当的标准。例如,预定的生物标

志物量和/或活性测量值可获得自正对其进行患者筛选评估的相同或不同的人。在一个实施方式中,预定的生物标志物量和/或活性测量值可获得自相同患者的先前评估。在此方式下,可在一段时间监测患者筛选的进展。此外,若受试者是人,则对照可获得自对另一人或多人(例如选定的人组)评估。以这种形式,正对其进行筛选评估的人的筛选程度可与其他适当的人(例如,与感兴趣的人患有相似或相同病况的其他人和/或与感兴趣的人属于同一种族的那些人)是可比较的。

[0231] 在本发明的一些实施方式中,生物标志物量和/或活性测量值和/或比率自预定水平的改变为约0.5倍、约1.0倍、约1.5倍、约2.0倍、约2.5倍、约3.0倍、约3.5倍、约4.0倍、约4.5倍、或约5.0倍或更高。在一些实施方式中,倍数改变为小于约1、小于约5、小于约10、小于约20、小于约30、小于约40、或小于约50。在其它实施方式中,生物标志物量和/或活性测量值相比于预定水平的倍数改变为大于约1、大于约5、大于约10、大于约20、大于约30、大于约40、或大于约50。

[0232] 生物样本可采集自来自患者的各种来源,包括含有核酸和/或蛋白的体液样本、细胞样本或组织样本。“体液”是指由机体排泄或分泌的液体以及正常情况下机体不排泄或不分泌的液体(例如,羊水、眼房水、胆汁、血液和血浆、脑脊液、泪液和耳垢、考珀液或预射精液、乳糜、食糜、粪便、女性射液、间质液、细胞内液、淋巴液、月经、乳汁、黏液、胸膜液、脓、唾液、皮脂、精液、血清、汗液、滑液、泪液、尿液、阴道润滑液、玻璃体液、呕吐物)。在一优选实施方式中,受试者和/或对照样本选自下组:细胞、细胞系、组织切片、石蜡包埋组织、活检组织、全血、乳头抽吸液、血清、血浆、口腔拭子、唾液、脑脊液、尿液、粪便和骨髓。在一个实施方式中,样本是血清、血浆或尿液。在另一实施方式中,样本是血清。又在其它实施方式中,包含T淋巴细胞的有用的生物样本包括但不限于,全血、纯化后的血、脾脏组织、淋巴液、淋巴结组织等。

[0233] 可在一纵向时间段内从个体重复(例如,以日、周、月、每年、每半年等的顺序一次或多次)采集样本。在一段时间内从个体获得许多样本可用于验证来自早期检测的结果和/或用于识别由于例如疾病进展、药物治疗等产生的生物特征改变。例如,可每个月、每两个月、或根据本发明的一个、两个或三个月间隔的组合来采集和监测受试者的样本。此外,经一段时间获得的受试者的生物标志物量和/或活性测量量在监测期间可便利地相互比较,以及与正常对照的那些进行比较,从而提供用作长期监测的内部或个人对照的受试者的自身值。

[0234] 样本制备和分离可涉及任何程序,这取决于采集样本的类型和/或对生物标志物测量值的分析。此类程序包括,仅举例而言,浓缩、稀释、pH调节、高丰度多肽(例如,白蛋白,丙种球蛋白和转铁蛋白等)的去除、防腐剂和校准物的添加、蛋白酶抑制剂的加入、变性剂的加入、样本的脱盐、样本蛋白的浓缩、脂质的提取和纯化。

[0235] 样本的制备还可分离在非共价复合物中与其它蛋白(例如,载体蛋白)结合的分子。该过程可分离结合于特定载体蛋白(例如,白蛋白)的那些分子,或使用更通用的方法,例如通过蛋白变性(例如使用酸)从所有载体蛋白释放结合分子,然后除去载体蛋白。

[0236] 可使用高亲和力试剂、高分子量滤器、超速离心和/或电渗析来实现从样本除去不期望的蛋白(例如、高丰度、不提供信息或不能检测的蛋白)。高亲和力试剂包括选择性结合于高丰度蛋白的抗体或其它试剂(例如,适体)。样本制备还可包括离子交换色谱、金属离子

亲和层析、凝胶过滤、疏水层析、聚焦层析、吸附色谱、等电点聚焦和相关技术。分子量滤器包括基于尺寸和分子量大小来分离分子的膜。此类滤器可进一步使用反渗透、纳米过滤、超滤和微量过滤。

[0237] 超速离心是一种从样本中除去不期望多肽的方法。超速离心是约15,000-60,000rpm下的样本离心,同时用光学系统监测颗粒的沉降(或其沉降的缺乏)。电渗析是在过程中使用电膜或半透膜的程序,其中在上述过程中在电势梯度的影响下将离子从一种溶液运送通过半透膜至另一种溶液。因为电渗析中使用的膜可具有选择性运送具有正电荷或负电荷的离子、排斥相反电荷的离子、或基于尺寸和电荷可允许某些种类迁移通过半透膜的能力,其使得电渗析可用于浓缩、除去或分离电解质。

[0238] 本发明中的分离和纯化可包括本领域任何已知的程序,例如毛细管电泳(例如,在毛细管中或芯片上)或层析(例如,在毛细管、柱中或芯片上)。电泳是用于在电场的影响下分离离子型分子的方法。电泳可在凝胶、毛细管中,或在芯片上的微通道中进行。用于电泳的凝胶实例包括淀粉、丙烯酰胺、聚氧化乙烯、琼脂糖或其组合。可通过其交联、加入清洁剂或变性剂、固定酶或抗体(亲和电泳)或底物(酶谱)以及引入pH梯度对凝胶进行修饰。用于电泳的毛细管实例包括与电喷射配合的毛细管。

[0239] 优选使用毛细管电泳(CE)来分离复合亲水分子和高电荷溶质。还可在微流体芯片上实施CE技术。根据所用的毛细管和缓冲液类型,CE可进一步分成不同的分离技术,诸如毛细管区带电泳(CZE)、毛细管等电聚焦(CIEF)、毛细管等速电泳(cITP)和毛细管电色谱(CEC)。CE技术与电喷雾离子化结合的一个实施方式涉及使用挥发性溶液,例如,包含挥发性酸和/或碱以及有机溶剂(例如,乙醇或乙腈)的水性混合物。

[0240] 毛细管等速电泳(cITP)是其中分析物以恒速移动通过毛细管但却通过其各自的迁移率而被分离的技术。毛细管区带电泳(CZE),又称自由溶液CE(FSCE),是基于种类的电泳迁移率的差异,种类的电泳迁移率是由分子上的电荷以及分子迁移期间遭遇的摩擦阻力(其通常直接与所述分子的大小成比例)决定的。毛细管等电聚焦(CIEF)允许通过pH梯度中的电泳分离弱电离两性分子。CEC是传统高效液相色谱(HPLC)和CE两者之间的杂合技术。

[0241] 本发明中使用的分离和纯化技术包括本领域已知的任何色谱程序。色谱可基于某些分析物的差别吸附和洗脱或者分析物在流动相和固定相之间的分配。色谱的不同实例包括但不限于,液相色谱(LC),气相色谱(GC),高效液相色谱(HPLC)等。

[0242] b. 用于检测拷贝数和/或基因组核酸突变的方法

[0243] 评估生物标志物核酸的拷贝数和/或基因组核酸状态(例如,突变)的方法是本领域技术人员公知的。可通过确定本文识别的区域或标志物的拷贝数来简单评估染色体获得或缺失的存在与否。

[0244] 在一个实施方式中,检测生物样本中包含基因组标志物的基因座中是否存在拷贝数改变。

[0245] 评估生物标志物基因座的拷贝数的方法包括但不限于,基于杂交的试验。基于杂交的试验包括但不限于,传统“直接探针”法,例如Southern印迹,原位杂交(例如,FISH和FISH+SKY)法,和“比较探针”法,例如比较基因组杂交(CGH),例如基于cDNA或基于寡核苷酸的CGH。该方法可以各种形式使用,其包括但不限于,底物(例如,膜或玻璃)结合法或基于阵列的途径。

[0246] 在一个实施方式中,评估样本中的生物标志物基因拷贝数涉及Southern印迹(Southern Blot)。在Southern印迹中,将基因组DNA(通常在电泳凝胶上是片段化的和分离的)杂交至目标区域特异性探针。比较来自目标区域探针的杂交信号与来自正常基因组DNA(例如,相同或相关细胞、组织、器官等的非扩增部分)分析的对照探针信号的强度提供了对目标核酸相对拷贝数的评估。或者可利用Northern印迹(Northern blot)评估样本中编码核酸的拷贝数。在Northern印迹中,将mRNA杂交至目标区域特异性探针。比较来自目标区域探针的杂交信号与来自正常RNA(例如,相同或相关细胞、组织、器官等的非扩增部分)分析的对照探针信号的强度提供了对目标核酸相对拷贝数的评估。或者,可使用其它本领域众所周知的检测RNA的方法,从而使得相对于适当对照(例如,相同或相关细胞、组织、器官等的非扩增部分)的较高或较低表达提供了对目标核酸相对拷贝数的评估。

[0247] 用于确定基因组拷贝数的一个替代手段是原位杂交(例如,Angerer(1987)Meth.Enzymol 152:649)。通常,原位杂交包括以下步骤:(1)固定待分析的组织或生物结构;(2)预杂交处理所述生物结构以增加目标DNA可接触性,以及减少非特异性结合;(3)将核酸混合物杂交至所述生物结构或组织中的核酸;(4)杂交后洗涤以除去杂交中未结合的核酸片段;和(5)检测杂交的核酸片段。每种这些步骤中使用的试剂以及使用条件根据特定应用而改变。在一个典型的原位杂交试验中,将细胞固定至固相支持体,通常是载玻片。若探测核酸,则通常用热或碱将细胞变性。然后将细胞与杂交溶液在中等温度下接触以允许退火针对编码蛋白的核酸序列的经标记的探针。然后通常在预设的严格度或增加的严格度下洗涤目标(例如,细胞)直至获得适当的信噪比。探针通常是经标记的,例如,采用放射性同位素或荧光报告物。在一个实施方式中,探针足够长以便与目标核酸在严格条件下特异性杂交。探针的长度范围通常从约200个碱基至约1000个碱基。在一些应用中,必须阻断重复序列的杂交能力。因此,在一些实施方式中,使用tRNA、人基因组DNA或Cot-I DNA以阻断非特异性杂交。

[0248] 用于确定基因组拷贝数的一种替代手段是比较基因组杂交。通常,基因组DNA分离自正常参照细胞,以及分离自测试细胞(例如,肿瘤细胞),若必要的话,并且进行扩增。将两个核酸差异化标记并接着原位杂交至参照细胞的中期染色体。参照和测试DNA二者中的重复序列或者被除去,或者通过一些手段减小其杂交能力,例如通过与适当的阻断核酸预杂交和/或在所述杂交期间引入针对所述重复序列的此类阻断核酸序列。然后以可视化形式渲染结合的、标记的DNA序列(若必须的话)。通过检测来自两个DNA的信号比率被改变的区域可识别测试细胞中具有增加或减少的拷贝数的染色体区域。例如,相比于基因组的其它区域,在测试细胞中具有减少的拷贝数的那些区域将显示出相对低于对照的来自测试DNA的信号。在测试细胞中具有增加的拷贝数的区域将显示相对较高的来自测试DNA的信号。在具有染色体缺失或增加的情况中,将检测到来自两种标记的信号比率的差异,且所述比率将提供拷贝数的测量。在CGH的另一实施方式(阵列CGH(aCGH))中,固定化的染色体成分被在阵列上结合目标核酸的固相载体集所取代,允许大或完全百分数的基因组呈现在结合目标的固相载体集中。目标核酸可包括cDNA、基因组DNA、寡核苷酸(例如,用于检测单核苷酸多态性)等。基于阵列的CGH还可采用单色标记进行(这与如下的方法相反,采用两种不同染料标记对照和可能的肿瘤样本并且在杂交前将它们混合,其将由于阵列上探针的竞争性杂交而产生比率)。在单色CGH中,标记对照、将其杂交至一个阵列并阅读绝对信号,并且标记

可能的肿瘤样本、将其杂交至第二阵列(具有等同内容物)并阅读绝对信号。基于来自两个阵列的绝对信号来计算拷贝数差异。制备固定化染色体或阵列以及进行比较基因组杂交的方法是本领域中众所周知的(参见例如,美国专利号:6,335,167;6,197,501;5,830,645;和5,665,549以及Albertson(1984)EMBO J.3:1227-1234;Pinkel(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:9138-9142;EP0公开号430,402;Methods in Molecular Biology,Vol.33:In situ Hybridization Protocols,Choo编,Humana Press,Totowa,N.J.(1994)等)。在另一实施方式中,使用Pinkel等人,(1998)Nature Genetics 20:207-211,或Kallioniemi(1992)Proc.Natl Acad Sci USA 89:5321-5325(1992)的杂交试验方案。

[0249] 在又一实施方式中,可使用基于扩增的试验以测量拷贝数。在此类基于扩增的试验中,核酸序列用作扩增反应(例如,聚合酶链反应(PCR))中的模板。在定量扩增中,扩增产物的量将与原始样本中模板的量成比例。与适当对照(例如,健康组织)的比较提供了拷贝数的测量。

[0250] “定量”扩增的方法是本领域技术人员众所周知的。例如,定量PCR涉及使用相同引物同时共扩增已知量的对照序列。这提供了可用于校准PCR反应的内部标准。定量PCR的详细试验方案提供在Innis等人,(1990)PCR Protocols,A Guide to Methods and Applications,Academic Press,Inc.N.Y.)中。Ginzonger等人,2000Cancer Research 60:5405-5409中描述了使用定量PCR分析来测量微卫星基因座处的DNA拷贝数。基因的已知核酸序列足以使得本领域技术人员能够常规选择引物以扩增基因的任何部分。本发明的方法中还可使用荧光定量PCR。在荧光定量PCR中,定量是基于荧光信号(例如,TaqMan和SYBR绿)的量。

[0251] 其它适当的扩增方法包括但不限于,连接酶链反应(LCR)(参见Wu和Wallace(1989)Genomics 4:560,Landegren等人,(1988)Science 241:1077,和Barringer等人,(1990)Gene 89:117)、转录扩增(Kwoh等人,(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:1173)、自我持续序列复制(Guatelli等人,(1990)Proc.Nat.Acad.Sci.USA 87:1874)、点PCR和接头引物PCR等。

[0252] 还可使用杂合性丢失(LOH)和主要复制比例(MCP)绘图(Wang,Z.C.等人,(2004)Cancer Res 64(1):64-71;Seymour,A.B.等人,(1994)Cancer Res54,2761-4;Hahn,S.A.等人,(1995)Cancer Res 55,4670-5;Kimura,M.等人,(1996)Genes Chromosomes Cancer 17,88-93;Li等人,(2008)MBC Bioinform.9,204-219)以识别扩增或缺失区域。

[0253] c.用于检测生物标志物核酸表达的方法

[0254] 可通过用于检测转录分子或蛋白表达的众所周知的各种方法来评估生物标志物的表达。此类方法的非限制性实例包括用于检测分泌的、细胞表面、细胞质或核蛋白的免疫方法、蛋白纯化方法、蛋白功能或活性分析、核酸杂交方法、核酸逆转录方法、和核酸扩增方法。

[0255] 在优选实施方式中,通过测量基因转录(例如,mRNA)、通过测量翻译蛋白的量、或通过测量基因产物活性表征特定基因的活性。可以以各种方法监测生物标志物表达,包括通过检测mRNA水平、蛋白水平或蛋白活性,任意其均可使用标准技术来测量。检测可以涉及定量基因表达的水平(例如,基因组DNA、cDNA、mRNA、蛋白、或酶活性),或者,检测可为对基

因表达水平的定性评估,特别是与对照水平相比较。可以通过上下文明确检测到的水平的类型。

[0256] 在另一实施方式中,检测或确定生物标志物及其功能类似同源物(包括其片段或基因变异(例如,在其调节区或启动子区中))的表达水平包括检测或确定感兴趣的标记的RNA水平。在一个实施方式中,从测试受试者获得一种或多种细胞并从所述细胞分离RNA。在一个优选实施方式中,从受试者获得乳腺组织细胞样本。

[0257] 在一个实施方式中,RNA获得自单一细胞。例如,可通过激光捕获显微切割(LCM)从组织样本分离一个细胞。使用该技术,可从组织切片(包括染色组织切片)分离一个细胞,从而确保期望的细胞被分离(参见例如,Bonner等人,(1997) *Science* 278:1481;Emmert-Buck等人,(1996) *Science* 274:998;Fend等人,(1999) *Am. J. Path.* 154:61和Murakami等人,(2000) *Kidney Int.* 58:1346)。例如,Murakami等人,见上,描述了从先前免疫染色的组织切片分离细胞。

[0258] 还有可能从受试者获得细胞并在体外培养细胞,以便获得更大群体的可自其提取RNA的细胞。用于建立非转换细胞(即,原代细胞培养)的方法是现有技术中已知的。

[0259] 当从来自个体的组织样本或细胞分离RNA时,在组织或细胞已从受试者移出后阻止基因表达的进一步改变可能是重要的。表达水平的改变已知在扰动(例如,热休克或采用脂多糖(LPS)或其它试剂活化)后迅速改变。此外,组织和细胞中的RNA可能很快变成降解的。因此,在一个优选实施方式中,尽快速冻获得自受试者的组织或细胞。

[0260] 可通过各种方法从组织样本提取RNA,例如,硫氰酸胍溶解细胞后CsCl离心(Chirgwin等人,1979, *Biochemistry* 18:5294-5299)。可如在从单一细胞制备cDNA文库的方法中所描述的从单一细胞获得RNA,例如Dulac, C. (1998) *Curr. Top. Dev. Biol.* 36, 245和Jena等人,(1996) *J. Immunol. Methods* 190:199中描述的那些。必须注意避免RNA降解,例如通过包含RNA酶抑制剂(RNasin)。

[0261] 然后可以基于特定种类富集RNA样本。在一个实施方式中,从RNA样本分离聚(A)+RNA。通常,此纯化利用mRNA上的聚-A尾。特别且如上所关注到的,可将聚-T寡核苷酸固定在固相载体内以用作mRNA的亲配体。用于该目的的试剂盒是市售的,例如,MessageMaker试剂盒(Life Technologies, Grand Island, NY)。

[0262] 在一个优选实施方式中,可以基于标记序列富集RNA群体。富集的进行可通过例如引物特异性cDNA合成、或基于cDNA合成的多回合线性扩增以及模板导向的体外转录(参见例如,Wang等人,(1989) *PNAS* 86,9717;Dulac等人,见上,和Jena等人,见上)。

[0263] 可进一步扩增富集的或不在特定种类或序列中的RNA群体。如本文所定义的,“扩增程序”旨在增强、增加或增大RNA内的分子。例如,在RNA是mRNA的情况下,可利用扩增程序(例如,RT-PCR)以扩增mRNA,以使得信号可被检测或者增强检测。当生物、组织或肿瘤样本是小尺寸或体积时,此扩增程序是特别有益的。

[0264] 可使用各种扩增和检测方法。例如,以下是在本发明的范围内:将mRNA逆转录为cDNA,然后进行聚合酶链反应(RT-PCR);或者,如美国专利号5,322,770中所述两个步骤中使用单一酶,或者将mRNA逆转录为cDNA,然后进行对称间隙连接酶链反应(RT-AGLCR),如R.L.Marshall等人, *PCR Methods and Applications* 4:80-84 (1994) 所述。还可使用实时PCR。

[0265] 本文可利用的其它已知扩增方法包括但不限于在PNAS USA 87:1874-1878 (1990) 中描述并还在Nature 350 (No.6313):91-92 (1991) 中描述的所谓的“NASBA”或“3SR”技术;如在公开的欧洲专利申请 (EPA) 号4544610中描述的Q-β扩增;链置换扩增 (如G.T.Walker等人, Clin.Chem.42:9-13 (1996) 和欧洲专利申请号684315中所述;目标介导扩增,如通过PCT公开W09322461所述;PCR;连接酶链反应 (LCR) (参见例如, Wu和Wallace, Genomics 4,560 (1989), Landegren等人, Science 241,1077 (1988));自我持续序列复制 (SSR) (参见例如, Guatelli等人, Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 87,1874 (1990));和转录扩增 (参见例如, Kwoh等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86,1173 (1989))。

[0266] 现有技术状态中已知许多用于确定基因表达的绝对和相对水平的技术,适用于本发明的通用技术包括Northern分析、核糖核酸酶保护试验 (RPA)、基于微阵列和PCR的技术,例如定量PCR和差异显示PCR。例如,Northern印迹法涉及在变性琼脂糖凝胶上运行RNA制品,并将其转移至适当的支持体,例如活化的纤维素、硝酸纤维素或者玻璃或尼龙膜。然后将放射性标记的cDNA或RNA杂交至制品、洗涤并通过放射自显影进行分析。

[0267] 还可使用原位杂交可视化技术,其中使放射性标记的反义RNA探针与活检样本的薄片杂交、洗涤、用核糖核酸酶切割并暴露于感光乳胶用于放射自显影。还可使用苏木精染色样本以证实样本的组织学组成,且采用适当滤光器的暗场成像显示显影的乳胶。还可使用非放射性标记 (例如,地高辛)。

[0268] 或者,可在DNA阵列、芯片或微芯片上检测mRNA表达。可将获得自受试者的测试样本的经标记核酸杂交至包含生物标志物DNA的固体表面。含有生物标志物转录物的样本获得阳性杂交信号。制备DNA阵列的方法以及它们的应用是本领域众所周知的 (参见例如,美国专利号:6,618,679;6,379,897;6,664,377;6,451,536;548,257;U.S.20030157485和Schena等人, (1995) Science 20,467-470;Gerhold等人, (1999) Trends In Biochem.Sci.24,168-173;和Lennon等人, (2000) Drug Discovery Today 5,59-65,其在此通过参照整体并入本文)。还可进行基因表达系列分析 (SAGE) (参见例如美国专利申请20030215858)。

[0269] 例如,为监测mRNA水平,从待检测的生物样本提取mRNA、逆转录、并生成荧光标记的cDNA探针。然后用标记的cDNA探针探测能够杂交于标记cDNA的微阵列,扫描样片并测量荧光强度。该强度与杂交强度和表达水平相关。

[0270] 可用于本文所述方法中的探针类型包括cDNA、核糖核酸探针、合成寡核苷酸和基因组探针。通常特定的情形将决定所用探针的类型,例如核糖核酸探针用于原位杂交,而cDNA用于Northern印迹法。在一个实施方式中,探针是针对RNA特有的核苷酸区域。探针可短至差异识别标记mRNA转录物所需的长度,并可短至例如,15个碱基;然而,可使用至少17、18、19或20或更多个碱基的探针。在一个实施方式中,引物和探针在严格条件下特异杂交至具有对应于标记的核苷酸序列的DNA片段。如本文所用的,术语“严格条件”是指杂交将仅在具有至少95%核苷酸序列同一性的情况下发生。在另一实施方式中,当序列之间具有至少97%同一性时发生“严格条件”下的杂交。

[0271] 探针的标记形式可以是任意适当的形式,例如使用放射性同位素 (例如,<sup>32</sup>P和<sup>35</sup>S)。通过使用适当标记的碱基可实现放射性同位素标记,无论探针是化学还是生物合成的。

[0272] 在一个实施方式中,生物样本包含来自测试受试者的多肽分子。或者,生物样本可包含来自测试受试者的mRNA分子或者来自测试受试者的基因组DNA分子。

[0273] 在另一实施方式中,该方法进一步涉及从对照受试者获得对照生物样本,将对照样本与能够检测标记多肽、mRNA、基因组DNA,或其片段的化合物或试剂接触,从而在生物样本中检测标记多肽、mRNA、基因组DNA,或其片段的存在,并将对照样本中标记多肽、mRNA、基因组DNA,或其片段的存在与测试样本中标记多肽、mRNA、基因组DNA,或其片段的存在进行比较。

[0274] d. 用于检测生物标志物蛋白表达的方法

[0275] 可通过检测或定量表达的多肽来检测和/或定量生物标志物蛋白的活性或水平。多肽的检测和定量可通过本领域技术人员众所周知的任意各种手段。由生物标志物核酸及其功能类似同源物,包括其片段或基因变异(例如,在其调节区或启动子区中)编码的多肽的多肽表达异常水平与免疫失调响应抗免疫失调疗法(例如,多次-可变剂量IL-2疗法单独使用或与一种或多种其它抗免疫失调疗法组合)的可能性相关。可使用用于检测多肽的任何现有技术的已知方法。此类方法包括但不限于,免疫扩散、免疫电泳、放射免疫分析(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISAs)、免疫荧光试验、Western印迹法、粘合剂-配体(binder-ligand)试验、免疫组织化学技术、凝集、补体检测、高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱(TLC)、超扩散色谱等(例如,Basic and Clinical Immunology,Sites和Terr编,Appleton and Lange,Norwalk,Conn.pp 217-262,1991,其通过引用并入)。优选的是粘合剂-配体免疫测定法,其包括将抗体与一个或多个表位反应,并竞争性置换经标记的多肽或其衍生物。

[0276] 例如,可进行ELISA和RIA程序以标记期望的生物标志物蛋白标准(采用放射性同位素例如<sup>125</sup>I或<sup>35</sup>S,或可分析酶,例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶),并且使其与未标记的样本一起与相应的抗体接触,其上使用第二抗体以结合第一抗体,并测定放射性或固定化酶(竞争性试验)。或者,样本中的生物标志物蛋白可与相应的固定化抗体反应,放射性同位素或酶标记的抗生物标志物蛋白抗体可与体系反应,并测定放射性或酶(ELISA-三明治试验)。还可在适当时使用其它常规方法。

[0277] 以上技术基本上可以“一步”或“两步”试验的形式进行。“一步”试验涉及将抗原与固定化抗体接触,且未经洗涤将混合物与经标记抗体接触。“两步”试验涉及在将混合物与经标记抗体接触之前进行洗涤。如果适合的话,还可使用其它常规方法。

[0278] 在一个实施方式中,用于测量生物标志物蛋白水平的方法包括以下步骤:将生物标本与选择性结合生物标志物蛋白的抗体或其变体(例如,片段)接触,并检测所述抗体或其变体是否结合于所述样本并由此测量生物标志物蛋白的水平。

[0279] 可通过常规手段实现生物标志物蛋白和/或抗体的酶标记和放射性标记。此类手段将通常包括将酶共价连接(例如,通过戊二醛)至考虑中的抗原或抗体,特别地只要不会不利地影响酶的活性,这是指酶必须仍然能够与其底物相互作用,虽然不需要所有的酶都是有活性的,但条件是足够的酶仍具有活性从而允许实现测定。事实上,一些酶结合技术是非特异性的(例如,使用甲醛),且将仅产生一定比例的活性酶。

[0280] 通常期望将测定体系的一个组分固定在支持物上,从而允许体系的其它组分与该组分接触并易于除去而无需费力和费时的劳动。有可能在远离第一相处固定第二相,但一个相通常是足够的。

[0281] 有可能将酶自身固定在支持物上,但如果需要固相酶,则通常最好通过将其与抗体结合并将所述抗体贴附在支持物上而实现,用于其的模型和体系是本领域公知的。简单的聚乙烯可提供适当的支持物。

[0282] 可用于标记的酶没有特别限制,但可选自例如氧化酶组成员。这些通过与其底物反应催化产生过氧化氢,并且因为其良好的稳定性、容易获得和低廉价格、以及其底物(葡萄糖)的即时可获得性,因此经常使用葡糖氧化酶。氧化酶活性的测定可通过测量酶标抗体与底物在本领域众所周知的受控条件下反应后形成的过氧化氢的浓度。

[0283] 基于本公开,可根据从业者的倾向使用其它技术以检测生物标志物蛋白。一种此类技术是Western印迹法(Towbin等人,Proc.Nat.Acad.Sci.76:4350(1979)),其中在被转移至固相支持体(例如,硝酸纤维素滤器)之前,在SDS-PAGE凝胶上运行经适当处理的样本。然后使抗生物标志物蛋白抗体(未标记)与所述支持体接触并通过第二免疫试剂例如标记的蛋白A或抗免疫球蛋白(适当的标记包括<sup>125</sup>I、辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶)进行测定。还可使用色谱检测。

[0284] 免疫组织化学可用于检测例如活检样本中的生物标志物蛋白的表达。使适当的抗体与例如细胞薄层接触,洗涤,然后与第二经标记的抗体接触。标记可以是荧光标记、酶,例如过氧化物酶、亲和素、或放射性标记。使用显微镜检查对试验进行视觉评分。

[0285] 还可将抗生物标志物蛋白抗体(例如,胞内抗体)用于成像目的,例如,为了检测受试者细胞和组织中生物标志物蛋白的存在。适当的标记包括放射性同位素,碘(<sup>125</sup>I, <sup>121</sup>I)、碳(<sup>14</sup>C)、硫(<sup>35</sup>S)、氚(<sup>3</sup>H)、铟(<sup>112</sup>In)和锝(<sup>99m</sup>Tc),荧光标记(例如,荧光素和罗丹明),以及生物素。

[0286] 就体内成像目的而言,在此情况下不能从体外检测到抗体,因此必须标记、或在其它方面修饰抗体以允许检测。用于该目的的标记可为实质上不会干扰抗体结合,但允许外部检测的任何标记。适当的标记可包括可被X射线照相术、NMR或MRI检测的那些。对于X射线照相技术,适当的标记包括发出可检测的辐射但不会明显有害于受试者的任何放射性同位素,例如钨或铯。用于NMR和MRI的适当的标记通常包括具有可检测的特征性自旋的那些,例如氘,其可通过适当的例如相关杂交瘤的营养素标记并入抗体。

[0287] 受试者的尺寸和所用的成像系统将决定产生诊断图像所需的成像部分的量。对于放射性同位素部分,对于人类受试者的放射性的注射量范围将通常为约5至20毫居里的锝-99。然后,经标记的抗体或抗体片段将优先蓄积在包含生物标志物蛋白的细胞位点。随后可使用已知技术检测经标记的抗体或抗体片段。

[0288] 可用于检测生物标志物蛋白的抗体包括足够强力并特异性结合于待检测的生物标志物蛋白的任何抗体,无论是天然或合成的、全长的或其片段、单克隆或多克隆的。抗体可具有至多不超过约 $10^{-6}$ M、 $10^{-7}$ M、 $10^{-8}$ M、 $10^{-9}$ M、 $10^{-10}$ M、 $10^{-11}$ M或 $10^{-12}$ M的 $K_d$ 。短语“特异性结合”是指例如抗体以如下方式结合于表位或抗原或抗原决定簇:结合可被结合相同或相似表位、抗原或抗原决定簇的第二制品所取代或竞争。抗体可相对于其他蛋白(例如,相关蛋白)优先与生物标志物蛋白结合。

[0289] 抗体是市售的或可根据本领域已知的方法来制备。

[0290] 可使用的抗体及其衍生物包含多克隆或单克隆抗体、嵌合、人类、人源化、灵长类化(CDR-接枝)、饰面或单链抗体以及功能片段,即,抗体的生物标志物蛋白结合片段。例如,

可使用能够与生物标志物蛋白或其部分结合的抗体片段,其包括但不限于Fv、Fab、Fab'和F(ab')<sub>2</sub>片段。可通过酶切或通过重组技术产生此类片段。例如,木瓜蛋白酶或胃蛋白酶切割可分别生成Fab或F(ab')<sub>2</sub>片段。还可使用其它具有所需底物特异性的蛋白酶来生成Fab或F(ab')<sub>2</sub>片段。还可使用其中已在天然终止位点上游引入一个或多个终止密码子的抗体基因产生各种截短形式的抗体。例如,可设计编码F(ab')<sub>2</sub>重链部分的嵌合基因以包含编码重链CH<sub>1</sub>域和铰链区的DNA序列。

[0291] 合成和工程化抗体描述在例如Cabilly等人,美国专利号4,816,567;Cabilly等人,欧洲专利号0,125,023 B1;Boss等人,美国专利号4,816,397;Boss等人,欧洲专利号0,120,694B1;Neuberger,M.S.等人,WO 86/01533;Neuberger,M.S.等人,欧洲专利号0,194,276 B1;Winter,美国专利号5,225,539;Winter,欧洲专利号0,239,400B1;Queen等人,欧洲专利号0451216 B1;和Padlan,E.A.等人,EP 0519596 A1中。还参见Newman,R.等人,BioTechnology,10:1455-1460 (1992),关于灵长类抗体,和Ladner等人,美国专利号4,946,778和Bird,R.E.等人,Science,242:423-426 (1988))关于单链抗体。还可使用产生自文库(例如,噬菌体展示库)的抗体。

[0292] 在一些实施方式中,除抗体以外,可以使用与生物标志物蛋白特异性结合的其它试剂,例如肽。可通过现有技术已知的任何手段来识别与生物标志物蛋白特异性结合的肽。例如,可使用肽噬菌体展示库筛选生物标志物蛋白的特异性肽结合物。

[0293] e. 用于检测生物标志物结构改变的方法

[0294] 以下说明性方法可用于识别生物标志物核酸和/或生物标志物多肽分子中结构改变的存在,以便例如识别影响Tregs、Tcons和/或Tregs:Tcons比率的序列或试剂。

[0295] 在某些实施方式中,改变的检测涉及使用聚合酶链反应(PCR)(参见例如,美国专利号4,683,195和4,683,202),例如锚定PCR或RACE PCR,或者,连接酶链反应(LCR)(参见例如,Landegran等人,(1988) Science 241:1077-1080;和Nakazawa等人,(1994) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:360-364)中的探针/引物,后者可特别有用于检测生物标志物核酸例如生物标志物基因中的点突变(参见Abravaya等人,(1995) Nucleic Acids Res.23:675-682)。该方法可包括以下步骤:从受试者采集细胞样本,从样本细胞分离核酸(例如,基因组核酸、mRNA或二者),将核酸样本与在条件下特异性杂交至生物标志物基因的一种或多种引物接触,从而发生生物标志物基因(若存在的话)的杂交和扩增,以及检测扩增产物的存在与否,或检测扩增产物的大小并与对照样本比较长度。预期PCR和/或LCR可令人满意地用作初步扩增步骤,并与本文所述的任何用于检测突变的技术联合使用。

[0296] 替代的扩增方法包括:自我持续序列复制(Guatelli,J.C.等人,(1990) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:1874-1878)、转录扩增体系(Kwoh,D.Y.等人,(1989) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:1173-1177)、Q-β复制酶(Lizardi,P.M.等人,(1988) Bio-Technology 6:1197)、或任何其它核酸扩增方法,然后使用本领域技术人员众所周知的技术检测扩增分子。如果核酸分子以非常低的数目存在,则这些检测方案在检测此类分子时特别有用。

[0297] 在一替代实施方式中,可通过限制性内切酶切割模式的改变来识别来自样本细胞的生物标志物核酸中的突变。例如,将样本和对照DNA分离、扩增(任选地)、用一种或多种限制性内切酶消化、通过凝胶电泳确定片段长度尺寸并进行比较。样本和对照DNA之间片段长

度尺寸的差异指示样本DNA中的突变。此外,使用序列特异性核酶(参见例如,美国专利号5,498,531)可用于通过发展或缺失核酶切割位点来对特定突变的存在进行评分。

[0298] 在其它实施方式中,可通过将样本和对照核酸(例如,DNA或RNA)杂交至包含成百上千个寡核苷酸探针的高密度阵列来识别生物标志物核酸中的基因突变(Cronin,M.T.等人,(1996) Hum. Mutat. 7:244-255;Kozal,M.J.等人,(1996) Nat. Med. 2:753-759)。例如,可如“Cronin等人,(1996) 见上”中所述在包含光生成DNA探针的二维阵列中识别生物标志物基因突变。简而言之,可使用第一杂交探针阵列扫描样本和对照中DNA的长延伸,以通过制作连续、重叠探针的线性阵列识别序列之间的碱基改变。该步骤允许识别点突变。该步骤之后是第二杂交阵列,其通过使用互补于所有检测的变体或突变的较小的、特化的探针阵列,从而能够对特定突变进行表征。各突变阵列是由平行的探针集构成,一个互补于野生型基因且另一个互补于突变基因。可在各种背景中识别此类生物标志物基因突变,其包括例如,种系和体系突变。

[0299] 在又一实施方式中,可使用本领域已知的任意各种测序反应来直接测序生物标志物基因并检测突变,其是通过比较样本生物标志物的序列以及相应的野生型(对照)序列。测序反应的实例包括基于由Maxam和Gilbert (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:560或Sanger (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463开发的技术的那些。还预期当进行诊断分析时可利用任意各种自动测序程序(Naeve (1995) Biotechniques 19:448-53),包括通过质谱测序(参见例如,PCT国际公开号WO 94/16101;Cohen等人,(1996) Adv. Chromatogr. 36:127-162;和Griffin等人,(1993) Appl. Biochem. Biotechnol. 38:147-159)。

[0300] 用于检测生物标志物基因中突变的其它方法包括其中使用剪切阻止来检测RNA/RNA或RNA/DNA异源双链中的错配碱基的方法(Myers等人,(1985) Science 230:1242)。通常,技术“错配剪切”开始自提供异源双链,其通过包含野生型生物标志物序列的RNA或DNA(经标记)与获得自组织样本的潜在突变RNA或DNA的杂交所形成。采用剪切双链的单链区域的试剂处理双链体,所述区域例如将由于对照和样本链之间的碱基对错配而存在。例如,可用核糖核酸酶处理RNA/DNA双链并用SI核酸酶处理DNA/DNA杂交体以酶促消化错配区域。在其它实施方式中,可用羟胺或四氧化锇并用哌啶处理DNA/DNA或RNA/DNA双链以消化错配区域。消化错配区域后,接着在变性聚丙烯酰胺凝胶上按大小分离所得材料以确定突变位点。参见例如,Cotton等人,(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4397和Saleeba等人,(1992) Methods Enzymol. 217:286-295。在一个优选实施方式中,可标记对照DNA或RNA以用于检测。

[0301] 在又一实施方式中,错配剪切反应使用一种或多种蛋白(所谓的“DNA错配修复”酶),其用于在检测和映射获得自细胞样本的生物标志物cDNA中的点突变的经定义系统中识别双链DNA中的错配碱基对。例如,大肠杆菌的mutY酶剪切G/A错配处的A,并且来自HeLa细胞的胸苷DNA糖基化酶剪切G/T错配处的T(Hsu等人,(1994) Carcinogenesis 15:1657-1662)。根据一个示例性实施方式,可自电泳实验方案等检测基于生物标志物序列的探针,例如采用DNA错配修复酶处理的野生型生物标志物,以及剪切产物(若有的话)(例如,美国专利号5,459,039)。

[0302] 在其它实施方式中,可使用电泳迁移率的改变来识别生物标志物基因中的突变。例如,可使用单链构象多态性(SSCP)来检测突变体和野生型核酸之间电泳迁移率的差异

(Orita等人, (1989) Proc Natl. Acad. Sci USA 86:2766; 还参见Cotton (1993) Mutat. Res. 285:125-144和Hayashi (1992) Genet. Anal. Tech. Appl. 9:73-79)。样本的单链DNA片段和对照生物标志物核酸将被变性并允许复性。单链核酸的二级结构根据序列而变化,产生的电泳迁移率改变使得能够检测甚至单一碱基改变。可用标记探针标记或检测DNA片段。可使用RNA (而不是DNA) 提高试验的敏感性,在RNA中二级结构对序列的改变更敏感。在一个优选实施方式中,主体方法利用异源双链分析来基于电泳迁移率的改变分离双链的异源双链分子(Keen等人, (1991) Trends Genet. 7:5)。

[0303] 在又一实施方式中,使用变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析突变体或野生型片段在包含变性剂梯度的聚丙烯酰胺凝胶的移动(Myers等人, (1985) Nature 313:495)。当将DGGE用作分析方法时,将修饰DNA以确保其不会完全变性,例如通过用PCR加入的约40bp的高熔点GC-富集DNA的GC夹钳。在进一步的实施方式中,使用温度梯度代替变性梯度来识别对照和样本DNA迁移率的差异(Rosenbaum和Reissner (1987) Biophys. Chem. 265:12753)。

[0304] 用于检测点突变的其它技术的实例包括但不限于,选择性寡核苷酸杂交、选择性扩增、或选择性引物延伸。例如,可制备寡核苷酸引物,其中将已知突变放置于中心,并接着在只当发现完美匹配才允许杂交的条件下将其杂交至目标DNA(Saiki等人, (1986) Nature 324:163; Saiki等人, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6230)。当寡核苷酸连接于杂交膜并用经标记的目的DNA杂交时,此类等位基因特异性寡核苷酸杂交至PCR扩增的目标DNA或多种不同的突变。

[0305] 或者,基于选择性PCR扩增的等位基因特异性扩增技术可与本发明联用。用作特异性扩增引物的寡核苷酸可在分子中心携带感兴趣的突变(以便进行基于差异杂交的扩增)(Gibbs等人, (1989) Nucleic Acids Res. 17:2437-2448), 或在一个引物的3'最末端处携带感兴趣的突变,其中在适当条件下可预防错配,或减少聚合酶延伸(Prossner (1993) Tibtech 11:238)。此外,期望在突变区域中引入新限制位点以创建基于剪切的检测(Gasparini等人, (1992) Mol. Cell Probes 6:1)。预期在某些实施方式中扩增还可使用用于扩增的Taq连接酶进行(Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci USA 88:189)。在此类情况下,仅当5'序列的3'末端处具有完美匹配时才将发生连接,使得有可能通过寻找扩增的存在与否来检测特定位置处已知突变的存在。

[0306] 本文所述的组合物可用于各种与本文所述生物标志物相关的诊断、预后和治疗应用。

[0307] f. 预测医学

[0308] 本发明还涉及预测医学领域,其中使用诊断分析、预后分析和监测临床试验用于预后(预测性)目的,从而预防性治疗个体和/或确定疗效的可能性。因此,本发明的一个方面涉及诊断分析,其用于在生物样本(例如,血液、血清、细胞或组织)背景下确定本文所述的生物标志物(例如,表1中所列的那些)的存在、缺失、量和/或活性水平,从而确定罹患免疫失调的个体是否可能响应抗免疫失调疗法(例如,多次-可变剂量IL-2疗法单独使用或与一种或多种其它抗免疫失调疗法组合),无论是在原发或复发免疫失调中。此类分析可用于预后或预测目的,从而在失调开始之前或复发之后预防性治疗个体,所述失调以生物标志物多肽、核酸表达或活性为特征,或与之相关。技术人员将会理解,任何方法可使用一种或多种(例如,组合)本文所述的生物标志物,例如表1中所列的那些。

[0309] 本发明的另一方面涉及监测试剂(例如,药物、化合物和基于小核酸的分子)对生物标志物的表达或活性(例如,Tregs增殖、Tregs数目、Tregs活性、Tregs:Tcons比率等)的影响。

[0310] 技术人员还将会理解,在某些实施方式中,本发明的方法实施计算机程序和计算机系统。例如,可使用计算机程序来进行本文所述的算法。计算机系统还可储存和操作由本发明的方法生成的数据,其包括多个生物标志物信号的改变/配置文件,其可被计算机系统用于实施本发明的方法。在某些实施方式中,计算机系统接收生物标志物表达数据;(ii)储存所述数据;以及(iii)以本文所述的许多种方法比较数据(例如,相对于适当对照进行分析)以确定获自受免疫失调影响的组织的提供信息的生物标志物的状态。在其它实施方式中,计算机系统(i)将确定的生物标志物表达水平与阈值进行比较;以及(ii)输出所述生物标志物水平是否被显著调节(例如,高于或低于)阈值的指标,或基于所述指标的表型。

[0311] 在某些实施方式中,此类计算机系统也是本发明考虑到的部分。可使用多种类型的计算机系统以根据生物信息学和/或计算机领域技术人员所具有的知识来实施本发明的分析方法。操作此计算机系统期间可将若干软件构件载入内存。软件构件可既包括本领域标准的软件构件又包括本发明特别的构件(例如,Lin等人,(2004) *Bioinformatics* 20, 1233-1240中描述的dCHIP软件;现有技术已知的径向基机器学习算法(RBM))。

[0312] 本发明的方法还可被编程或建模在数学软件包中,所述数学软件包允许方程的符号输入和处理的高级说明(包括所使用的特定算法),从而无需使用者程序编程个体方程和算法。此类软件包包括例如,来自Mathworks的Matlab(Natick,Mass)、来自Wolfram Research的Mathematica(Champaign,Ill)或来自MathSoft的S-Plus(Seattle,Wash)。

[0313] 在某些实施方式中,计算机包括用于储存生物标志物数据的数据库。在之后的时间点可进入和使用此类储存的概况(profiles)以进行感兴趣的比较。例如,可储存来源于未受免疫失调影响的受试者组织的样本的生物标志物表达概况和/或生成自相同物种的相关群体中提供信息的目标基因座的基于群体分布的概况并在之后与来源于受到免疫失调影响的受试者组织或怀疑正受到免疫失调影响的受试者组织的样本的概况进行比较。

[0314] 除了本文所述的示例性程序结构和计算机系统以外,其它替代的程序结构和计算机系统对技术人员而言将会是显而易见的。因此,在精神上或范围上未脱离上述的计算机系统和程序结构的此类替代系统也意图被包含在随附的权利要求内。

#### [0315] c. 诊断分析

[0316] 本发明(部分)提供了用于对生物样本是否与可能响应抗免疫失调疗法(例如,多次-可变剂量IL-2疗法单独使用或与一种或多种其它抗免疫失调疗法组合)的免疫失调相关进行准确分类的方法、系统和代码。在一些实施方式中,本发明用于使用统计算法和/或经验数据(例如,本文所述的生物标志物的量或活性)对与免疫失调相关或处于其风险之中的样本(例如,来自受试者)响应或不响应抗免疫失调疗法(例如,多次-可变剂量IL-2疗法单独使用或与一种或多种其它抗免疫失调疗法组合)进行分类。

[0317] 用于检测生物标志物的量或活性,并因此可用于对样本是否可能或不可能响应于抗免疫失调疗法(例如,多次-可变剂量IL-2疗法单独使用或与一种或多种其它抗免疫失调疗法组合)进行分类的一种示例性方法涉及从测试受试者获得生物样本,并将所述生物样本与能够检测生物样本中生物标志物的量或活性的试剂接触,所述试剂例如蛋白结合剂

(如,抗体或其抗原结合片段),或核酸结合剂(如,寡核苷酸)。在一些实施方式中,使用至少一种抗体或其抗原结合片段,其中两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种或更多种此类抗体或抗体片段可组合(例如,在三明治ELISA中)或相继使用。在某些情况下,统计算法是单一学习统计分类系统。例如,可使用单一学习统计分类系统来基于预测或概率值以及生物标志物的存在或水平对样品进行分类。使用单一学习统计分类系统通常以至少约75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的灵敏度、特异性、阳性预测值、阴性预测值和/或总体准确度将样本分类为例如可能的抗免疫失调疗法(例如,多次-可变剂量IL-2疗法单独使用或与一种或多种其它抗免疫失调疗法组合)响应者或进展者的样本。

[0318] 其它适合的统计算法是本领域技术人员公知的。例如,学习统计分类系统包括能够适用于复杂数据集(例如,感兴趣标记物嵌板)并且基于此类数据集做出决策的机器学习算法技术。在一些实施方式中,使用单一学习统计分类系统例如分类树(例如,随机森林)。在其它实施方式中,使用2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多学习统计分类系统的组合,优选以串联方式。学习统计分类系统的实例包括但不限于使用归纳学习(例如,决策/分类树如随机森林,分类和回归树(C&RT)、加速树等)、概率近似正确(PAC)学习、连接学习(例如,神经网络(NN)、人工神经网络(ANN)、模糊神经网络(NFN)、网络结构、感知器如多层感知器、多层前反馈网络、神经网络的应用、在信念网络中的贝叶斯学习等)、强化学习(例如,在已知环境中的被动学习如天然学习、自适应动态学习和即时差分学习、在未知环境中的被动学习、在未知环境中的主动学习、学习动作值函数、强化学习的应用等)和遗传算法以及进化编程的那些。其他学习统计分类系统包括支持向量机(例如,核方法)、多元自适应回归样条(MARS)、列文博格-马夸特算法、高斯-牛顿算法、高斯混合模型、梯度下降算法和学习向量量化(LVQ)。在某些实施方式中,本发明的方法进一步包括将样本分类结果发送至临床医师,例如肿瘤医师。

[0319] 在另一实施方式中,诊断受试者后基于所述诊断给予个体治疗有效量的经定义治疗。

[0320] 在一个实施方式中,该方法进一步涉及获得对照生物样本(例如,来自不患有免疫失调的受试者或者来自其免疫失调敏感于抗免疫失调疗法(例如,多次-可变剂量IL-2疗法单独使用或与一种或多种其它抗免疫失调疗法组合)的受试者的生物样本、来自缓解期间受试者的生物样本、或来自治疗期间尽管接受抗免疫失调疗法(例如,多次-可变剂量IL-2疗法单独使用或与一种或多种其它抗免疫失调疗法组合)但仍发展进展免疫失调的受试者的生物样本。

[0321] d. 预后分析

[0322] 可进一步利用本文所述的诊断方法来识别患有有可能或不可能响应抗免疫失调疗法(例如,多次-可变剂量IL-2疗法单独使用或与一种或多种其它抗免疫失调疗法组合)的免疫失调或处于发展其的风险中的受试者。可利用本文所述的分析(例如,在前诊断分析或随后分析),来识别具有与本发明的至少一种生物标志物的量或活性的错调相关的失调(例如,在免疫失调中)或处于发展其的风险中的受试者。或者,可利用预后分析来识别具有与本发明的至少一种生物标志物的错调相关的失调(例如,在免疫失调中)或处于发展其的风

险中的受试者。此外,本文所述的预后分析可用于确定是否可给予受试者试剂(例如,激动剂、拮抗剂、拟肽、多肽、肽、核酸、小分子、或其它候选药物)以治疗与异常生物标志物表达或活性相关的疾病或失调。

[0323] e. 治疗方法

[0324] 本发明的另一方面涉及用于治疗目的的调节本文所述的一种或多种生物标志物(例如,Treg增殖、Treg数目、Treg活性、Treg凋亡、Tregs:Tcons比率、表1和实施例中所列的生物标志物或其片段,等等)的表达或活性的方法。本发明的生物标志物已被证实与免疫失调的治疗相关联。因此,可调节生物标志物的活性和/或表达,以及一种或多种生物标志物或其片段和其天然结合伴侣或其片段之间的相互作用来治疗免疫失调。

[0325] 如上所述,本发明的调节方法涉及使细胞接触本发明的一种或多种生物标志物,其包括表1和实施例中所列的一种或多种生物标志物或其片段,或调节与所述细胞相关的生物标志物活性的一种或多种活性的试剂。调节生物标志物活性的试剂可为如本文所述的试剂,例如核酸或多肽、自然存在的生物标志物的结合伴侣、针对生物标志物的抗体、针对生物标志物的抗体和针对其它免疫相关目标的抗体的组合、一种或多种生物标志物激动剂或拮抗剂、一种或多种生物标志物激动剂或拮抗剂的拟肽、一种或多种生物标志物拟肽、其它小分子、或针对或模拟一种或多种生物标志物核酸基因表达产物的小RNA。

[0326] 调节本发明的一种或多种生物标志物(包括本发明的一种或多种生物标志物,包括表1和实施例中所列的一种或多种生物标志物或其片段)的表达的试剂是例如,反义核酸分子、RNAi分子、shRNA、成熟miRNA、pre-miRNA、pri-miRNA、miRNA\*,anti-miRNA、或miRNA结合位点、或其变体、或其它小RNA分子、三寡核苷酸、核酶、或用于表达一种或多种生物标志物多肽的重组载体。例如,可合成互补于一个或多个生物标志物多肽翻译起始位点周围区域的寡核苷酸。可将一种或多种反义寡核苷酸加至细胞培养基(通常为200 $\mu$ g/ml浓度)或给予患者来阻止一种或多种生物标志物多肽的合成。反义寡核苷酸被细胞摄取并杂交至一种或多种生物标志物的mRNA以阻止翻译。或者,可使用结合双链DNA的寡核苷酸,其形成三体构造来阻止DNA的解旋和转录。作为任一的结果,生物标志物多肽的合成被阻断。当调节生物标志物表达时,优选地,此类调节以不同于敲除生物标志物基因的方式发生。

[0327] 由于事实上控制细胞中生物标志物的量而调节表达的试剂也调节细胞中生物标志物活性的总量。

[0328] 在一个实施方式中,试剂刺激本发明的一种或多种生物标志物的一种或多种活性,所述生物标志物包括表1和实施例中所列的一种或多种生物标志物或其片段。此类刺激性试剂的实例包括活性生物标志物多肽或其片段以及已引入细胞的编码生物标志物或其片段的核酸分子(例如,cDNA、mRNA、shRNAs、siRNAs、小RNAs、成熟miRNA、pre-miRNA、pri-miRNA、miRNA\*,anti-miRNA、或miRNA结合位点、或其变体、或技术人员已知的其它功能等价分子)。在另一实施方式中,试剂抑制一种生物标志物活性。在一个实施方式中,试剂抑制或增强生物标志物与自然结合伴侣(一种或多种)的相互作用。此类抑制性试剂的实例包括反义核酸分子、抗生物标志物抗体、生物标志物抑制剂、和本文所述筛选实验中识别的化合物。

[0329] 这些调节方法可在体外进行(例如,通过将细胞与试剂接触)或者通过将试剂与细胞在体内接触(例如,通过将试剂给予受试者)。在一个实施方式中,该方法涉及给予调节

(例如,上调或下调)生物标志物表达或活性的试剂(例如,通过本文所述的筛选实验识别的试剂)或试剂的组合。在另一实施方式中,该方法涉及给予一种或多种生物标志物多肽或核酸分子作为治疗,以补偿减小、异常或不想要的生物标志物表达或活性。

[0330] 在其中生物标志物被异常下调和/或增加的生物标志物活性可能具有有益作用的情况下,期望刺激生物标志物的活性。同样地,在其中生物标志物被异常上调和/或减小的生物标志物活性可能具有有益作用的情况下,期望抑制生物标志物的活性。

[0331] 此外,还可在与例如化疗剂、激素、抗血管发生剂(antiangiogens)、放射性标记的、化合物、或与外科手术、冷冻疗法、和/或放射疗法的组合疗法中给予调节性试剂。前述治疗方法的给予可连同其它形式的常规疗法(例如,技术人员众所周知的用于免疫失调的标准照护治疗),与常规疗法一起或在其之前或之后连续给予。例如,这些调节性试剂可与治疗有效剂量的免疫抑制剂或治疗一起给予。

[0332] 本发明还包括用于检测和/或调节本文所述的生物标志物的试剂盒。本发明的试剂盒还可以包括说明性材料,所述说明性材料披露或描述了如本文提供的在本发明公开的方法中使用本发明公开的试剂盒或抗体。试剂盒还可以包括附加的组分以便于实施所述试剂盒设计的特定应用。例如,试剂盒可另外含有检测标记的工具(例如,用于酶标的酶底物、检测荧光标记的滤光镜套件、适合的第二标记如绵羊抗-小鼠-HRP等)和对照所需的试剂(例如,对照生物样本或标准)。试剂盒可另外包括缓冲剂和其它被认为可用于本发明公开的方法的试剂。非限制性实例包括降低非特异性结合的试剂,例如运载体蛋白或清洁剂。

[0333] 以下实施例中描述了本发明的其它实施方式。通过以下实施例进一步说明本发明,其不应被解释为进一步的限制。

## 实施例

[0334] 实施例1:低剂量IL-2增加Tregs和Tregs:Tcons比率

[0335] 临床上,低剂量IL-2可增强Treg。在类固醇难治性cGVHD的1期研究中,8-周每日皮下IL-2 ( $1 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>) 疗法是安全和可耐受的(剂量高至 $3 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>) (Koreth等人, (2011) N.Engl. J. Med. 365:2055-2066)。资格包括未响应4周的至少0.25mg/kg强的松的cGVHD、不存在感染、和先前稳定剂量的免疫抑制4周。所述研究具有1期3个剂量水平(0.3、1和 $3 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>/天,8天)的剂量递增设计。

[0336] 累积29名参与者:28名可用于评价毒性;23名可用于评价响应。确定MTD是 $1 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>/天的IL-2。2名参与者发展出了剂量限制性毒性(血栓性微血管病)。无人经历GVHD发作。无恶性疾病复发。23名参与者中的12名具有客观的临床响应。低剂量IL-2选择性增加体内Treg计数(图1)而未影响常规CD4<sup>+</sup> T(Tcon)计数。Tregs:Tcons比率也上升(图2)。NK细胞计数以较小的程度上升。低剂量IL-2未影响CD8<sup>+</sup> T、B或NKT计数。Tregs计数和Tregs:Tcons比率在IL-2治疗8周时保持提高,然后在停止IL-2后下降。IL-2-诱导的Tregs表达FOXP3<sup>+</sup>并在Tcons抑制试验中是有功能的。重要的是,在12周之外的延长期限的IL-2治疗中临床和免疫响应在响应者中得到了维持,使得伴随产生的免疫抑制能够递减。

[0337] 然而,尽管在所有人中优先体内增强Treg,但仅有半数的可评估参与者具有临床响应(部分缓解,PR) (Koreth等人, (2011) N.Engl. J. Med. 365:2055-2066)。即便采用每日皮下(SC)低剂量IL-2疗法,也有半数参与者未获得临床受益(Koreth等人, (2011))

N.Engl.J.Med.365:2055-2066)。这些数据表明低剂量IL-2在cGVHD中是安全的且优先增加Treg。

[0338] 血浆IL-2水平在固定剂量IL-2治疗期间迅速上升(例如,在1周时),然后,尽管每日给予IL-2,血浆IL-2水平下降而Tregs计数上升(Matsuoka等人,(2013) Sci.Transl.Med.5:179ra43),且据信该结果是因为IL-2与在Tregs上组成性表达的高亲和力IL-2受体(CD25)结合而增加的IL-2截留。此后,随着Treg绝对数的增加,Tregs上的CD25表达在IL-2治疗期间具有进一步的增加(Matsuoka等人,(2013) Sci.Transl.Med.5:179ra43)(图3)。

[0339] 之前进行了相似的分析以分析在cGVHD病程早期,在开始不可逆的实质组织、皮肤和肌肉骨骼改变之前起始的低剂量IL-2的作用。在该2期研究中,用12周程的每日SC IL-2以 $1 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>/天(即,以上所述的MTD)治疗先前接受 $\leq 2$ 线程的cGVHD疗法的患者。间断4周后,经历临床受益的患者可接受延长期限的IL-2治疗,在此期间允许伴随的免疫抑制递减。主要目标是确定cGVHD临床响应率。患者在研究的基线、6、12和16周时以及1年时按照NIH标准进行cGVHD评估(Filipovich等人,(2005) Biol.Blood Marrow Transplant.11:945-956)。次要目标包括在1年时评估毒性、免疫影响、免疫作用与临床响应的相关性和皮质类固醇的使用。招募具有中位数4处cGVHD涉及位点和中位数1项在先cGVHD疗法的35名患者。如上所述,低剂量IL-2治疗通常是良好耐受的且无患者恶性肿瘤复发。在12周时,在33名可评价的患者中的20名中记录了cGVHD客观反应(PR)且2名患者具有cGVHD进展。cGVHD反应位点包括皮肤(n=9);关节/筋膜/肌肉(n=3);肝(n=7);胃肠道(n=3);泌尿生殖道(n=1);和肺(n=5)。具有临床受益(PR或有轻度响应的SD)的23名患者在16周后开始延长的IL-2治疗,截至12/31/2013,在中位数5.8个月(范围,0.4-26.1)的延长期限的IL-2治疗期间具有平均50%的类固醇剂量递减(范围,0-100)。14名仍然处于延长期限的IL-2治疗中。

[0340] 在免疫学上,与上述结果相似,低剂量IL-2诱导相似的Tregs计数上升而不影响Tcons,且中位Treg:Tcon比率上升(图4)。Treg计数和Treg:Tcon比率在12周时仍然提高且在停止IL-2后下降。该2期试验证实了低剂量IL-2在cGVHD中的临床影响以及其对Treg和Tcon体内平衡的功能效应。进行中的实验室研究将确定免疫效应是否可与临床响应相关联以及它们在低剂量IL-2疗法后持续的程度。

[0341] 本文已进一步确定在所有Treg亚群中开始IL-2诱导方案后1周伴随Tregs群体规模的增加发生Tregs峰值增殖。选择使用SPADE(密度归一化事件的生成树级数分析(spanning-tree progression analysis of density-normalized events))的飞行时间质谱(CyTOF),因为CyTOF避免了荧光细胞计数法中由于光谱重叠和自发荧光而固有的背景噪声,并提供了高达37种镧系元素同位素同时用于以高敏感性测量抗原结合抗体或其它探针。关于Tregs增殖,在基线处观测到局限于活化记忆和初始Treg的小亚群的有限Ki-67增殖。开始IL-2后1周,在所有Treg亚群中发生Tregs增殖峰值同时伴随Tregs群体规模的增加(图5)。然而,Tregs增殖在2周后平息,在IL-2治疗的第12周,在扩大的Treg亚群得到保留的同时Ki-67表达(增殖)下降。然而,IL-2停止后4周,Ki-67 Treg增殖水平和Treg群体耗尽。使用pSTAT5和FoxP3标志物观测到相似的Tregs活化时间分布模式,其各Treg亚群具有最初早期普遍的增加,之后在IL-2治疗期间,尽管继续保持了增大的Treg群体规模但Tregs的活化平息(图5)。然后在IL-2停止后4周观测到Treg活化标志物表达的下降和Treg群体的大

量耗尽。

[0342] 并非所有患者均响应且响应者中的受益经常是部分的。在1期数据中,cGVHD临床响应似乎与研究进入时较高的Treg:Tcon比率相关,但不与循环Treg计数或Treg:Tcon比率的上升相关。在一些患者中尽管增强了体内Treg却缺乏临床响应,这也与我们记录晚期cGVHD中Treg细胞内在缺陷(例如,缩短的端粒)的数据相一致(Kawano等人,(2011) Blood 118:5021-5030)。此外,一旦停止IL-2则Treg的增强快速减弱,表明具有深厚Treg缺陷的晚期cGVHD患者需要附加的干预以进一步增加Treg数目和功能并延迟或阻止其下降。

[0343] 本文已确定此类附加的干预包括维持方案,其涉及在诱导血浆IL-2水平后进行个体患者IL-2剂量递增以更充分地恢复血浆IL-2水平并进一步扩大Treg增殖、活化和新生,而不诱导Tcon活化或过度不良事件。据信因为Treg细胞组成性表达有助于形成高亲和力IL-2受体的CD25,所以尽管持续每日IL-2给药但IL-2的截留增加且血浆IL-2水平下降。此外,IL-2诱导Treg上增加的CD25表达,其进一步增加IL-2摄取。IL-2诱导Treg增殖、pSTAT5和FoxP3 Treg活化。事实上,RTE Treg的生成在IL-2疗程的后期下降,这与血浆IL-2水平的下降相一致。以这种方式,IL-2诱导的Treg增强在体内发生,并且避免了被增加数目的具有较高CD25表达的循环Treg结合后血浆IL-2水平减小所导致的快速耐受。这些方法克服了尽管采用低剂量IL-2在体内增加Treg却观察到的部分临床cGVHD响应。在预期血浆IL-2水平下降的时候进行个体患者IL-2剂量递增提供了一种用以恢复IL-2水平并进一步扩大Treg的增殖和活化,而不诱导Tcon活化或全身性不良事件(constitutional AE)的机制。

[0344] 此外,本文已确定Treg库的显著增强是各机制中的一种,通过该机制低剂量IL-2增强T细胞耐受和抑制免疫介导的体内炎症,并进一步证明低剂量IL-2对体内Tregs的选择性作用。特别地,使用T细胞受体(TCR)测序(Adaptive Biotechnologies,Seattle,WA;在万维网immunoseq.com上可获得)来查文库的多样性(Robins等人,(2012) J.Immunol.Methods 375:14-19;Robins等人,(2009) Blood 114:4099-4107;Robins等人,(2010) Sci.Transl.Med.2:47ra64)。该分析利用针对45个V $\beta$ 和所有13个J $\beta$ 片段的引物,采用多重PCR来扩增TCR的重排CDR3区,其跨越经由连接V、D和J片段及其相关的无模板插入而形成的可变区。使用TCR序列的数目和频率来表征如通过熵所测量的T细胞库的多样性,其中较高的熵分值反映出各样本的TCR频率内较大的对数多样性。TCR序列分析还能够在这段时间内的系列患者样本中追踪个体T细胞克隆。cGVHD患者中的结果表明在低剂量IL-2治疗后Treg TCR多样性具有2-3个对数增加且Tcon多样性无改变(图6)。当将数据结合时,图7显示了响应性的预测,因此根据Tregs:Tcons的基线或1周时的比率将预测的响应分层。

[0345] 本文还确定了在BH-3概况分析中,IL-2治疗将Tregs的外源性和内源性通路程序性凋亡敏感性恢复至更生理学的水平。

[0346] 实施例2:代表性的多次-可变剂量IL-2治疗方案

[0347] 以下提供了本发明的多次-可变剂量IL-2治疗方法的代表性、非限制性实施方式。

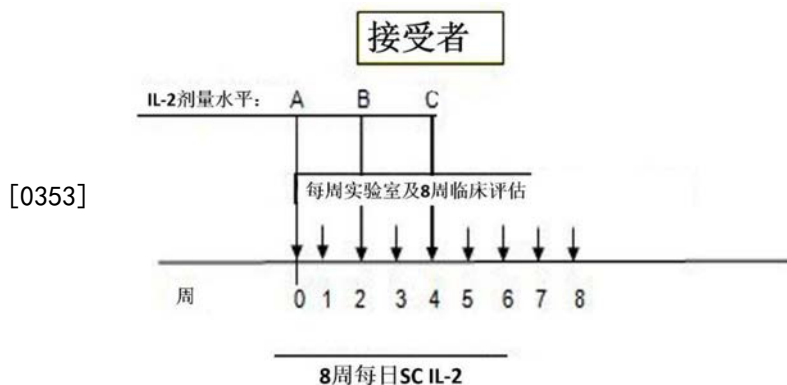
[0348] 使用以下患者群体标准:1)具有慢性GVHD且对系统性类固醇响应不足的成人和儿童参与者;2)尽管接受至少2种在前系统性治疗(包括类固醇)的持续或复发性慢性GVHD;3)无不受控制的活动性感染;4)无恶性疾病复发;和5)卡氏行为状态评分(Karnofsky PS)  $\geq$  60。

[0349] 以下详述了特定的入选和排除标准:

[0350] 1) 参与者数目:20 (10名成人;10名小儿);

[0351] 2) 研究设计和方法学:具有难治性cGVHD的成人 (n=10) 和小儿 (n=10) 患者将接受在每名患者中每2周递增的每日SC IL-2剂量,共3个剂量水平 (在不存在DLT或严重的非DLT AE的情况下),并在他们的个体MTD下维持6周。

[0352] 3) I期



[0354] 安全性和有效性分析如下:主要终点是个体患者剂量递增的IL-2的安全性、毒性和MTD。次要终点是个体患者剂量递增的IL-2的临床和免疫影响,其包括1) 在难治性cGVHD中免疫影响的评估;2) 临床cGVHD响应的评估;和3) 免疫效应与临床响应的相关性,以及与固定剂量IL-2治疗患者的免疫和临床响应的比较。

[0355] 评估(8周时)如下:1) 评估严重血液毒性;2) 评估3级或更高级非血液毒性;3) 评估危及生命的感染;4) 评估免疫影响;和5) 评估GVHD响应或进展。

[0356] 参与者在8周研究期间可继续先前开始的cGVHD治疗。这些试剂的特定剂量和日程对于所述研究的目标而言是不重要的,且允许按照机构标准进行剂量调整(例如,基于药物水平进行调整)。虽然在8周研究期间通常无意于递减伴随的cGVHD治疗,但如果经治疗医师认定是临床必需的,则允许进行此类改变。在研究进入和8周时记录类固醇的剂量。

[0357] 利用治疗之前、期间和之后获得的外周血样来评估治疗的免疫效应。此类研究包括:

[0358] 1) 淋巴细胞亚群的表型分析:用特异性识别淋巴细胞标志物的单克隆抗体与外周血的共孵育物来识别功能不同的淋巴细胞亚群。在用直接缀合荧光染料单克隆抗体培养外周血细胞后,通过流式细胞术计数个体亚群。产生针对CD4<sup>+</sup> Tregs、以及其它CD4和CD8<sup>+</sup> T细胞亚群、B细胞和自然杀伤细胞的抗体面板。该表型分析提供了一种定量评估胸腺再生以及表型上定义明确的T细胞亚群的增殖和程序性凋亡敏感性的方法。这些允许测量响应剂量递增IL-2疗法的各T细胞群体的稳态平衡。在结合ECP的研究中,这些改变与ECP处理细胞的剂量相关,其是通过流式细胞术细胞计数来自各ECP程序的回输血沉棕黄层来确定的。

[0359] 2) 血浆细胞因子:使用ELISA试验以测量血浆样本中的IL-2水平。如果需要的话,也可在这些样本中测量在T细胞体内平衡中发挥作用的其它细胞因子,例如IL-7、IL-10和IL-15。

[0360] 3) 功能分析:为评估针对治疗产生响应而体内扩张的Treg细胞的功能容量,使用选定的样本以评估它们的免疫抑制能力。在这些实验中,通过高速细胞分选纯化Tregs,并随后测试其抑制自体T细胞增殖的能力。

[0361] 4) DNA分析:可考虑附加的基因分析(例如,TCR测序)以评估免疫细胞重建,且可就

此类分析评估库存的DNA和细胞样本。

[0362] 这些试验合起来量化个体患者IL-2剂量递增对参与者免疫细胞的影响。

[0363] 根据以下合格标准选择参与者:1) 7-8/8HLA-匹配的 (HLA-A,-B,-C,-DRB1) 同种异体造血干细胞移植的接受者;和2) 参与者必须是尽管使用2种或多种治疗却具有类固醇难治性的cGVHD。类固醇难治性cGVHD被定义为尽管使用 $\geq 0.25\text{mg/kg/天}$  (或每隔一日 $0.5\text{mg/kg}$ ) 的强的松至少4周 (或等价剂量的替代糖皮质激素) 却具有持续的cGVHD体征和症状 (表2和3), 没有完全消退体征和症状。患有需要系统治疗的广泛或有限的慢性GVHD的参与者是适合的。

[0364] 表2明确的和可能的cGVHD临床表现

| 器官系统      | 慢性 GVHD 明确的临床表现                         | 慢性 GVHD 可能的临床表现               |
|-----------|-----------------------------------------|-------------------------------|
| [0365] 皮肤 | 硬皮病 (表面的或筋膜的), 扁平苔藓, 白癜风, 瘢痕性脱发, 毛发角化过度 | 湿疹样皮疹, 干性皮肤, 斑状丘疹, 脱发, 色素沉着过度 |
|           | 度, 皮肤固定 (immobility) 引起的挛缩, 甲床发育不良      |                               |
| [0366] 粘膜 | 扁平苔藓, 非感染性溃疡, 角膜糜烂/非感染性结膜炎              | 口腔干燥, 干燥性角膜结膜炎                |
| 胃肠道       | 食管狭窄, 脂肪痢                               | 厌食, 吸收不良, 体重减轻, 腹泻, 腹痛        |
| 肝         | 无                                       | 碱性磷酸酶升高, 转氨酶升高, 胆管炎, 高胆红素学    |
| 泌尿生殖道     | 阴道狭窄, 扁平苔藓                              | 非感染性阴道炎, 阴道挛缩                 |
| 肌肉骨骼 / 浆膜 | 非-化脓性关节炎, 肌炎, 肌无力, 多浆膜炎, 关节固定导致的挛缩      | 关节痛                           |
| 血液系统      | 无                                       | 血小板减少, 嗜酸性粒细胞增多, 自身免疫血球减少     |
| 肺         | 闭塞性细支气管炎                                | 闭塞性细支气管炎伴随机化性肺炎, 间质性肺炎        |

[0367] 表3慢性GVHD症状评分量表你在过去2周是否具有任意以下问题?

[0368]

|                 | 完全没有 | 轻微 | 适度 | 相当多 | 极度 |
|-----------------|------|----|----|-----|----|
| <b>皮肤:</b>      |      |    |    |     |    |
| a. 异常皮肤颜色       | 0    | 1  | 2  | 3   | 4  |
| b. 皮疹           | 0    | 1  | 2  | 3   | 4  |
| c. 皮肤增厚         | 0    | 1  | 2  | 3   | 4  |
| d. 皮肤溃疡         | 0    | 1  | 2  | 3   | 4  |
| e. 皮肤瘙痒         | 0    | 1  | 2  | 3   | 4  |
|                 |      |    |    |     |    |
| <b>眼和嘴:</b>     |      |    |    |     |    |
| f. 干眼症          | 0    | 1  | 2  | 3   | 4  |
| g. 需要频繁使用滴眼液    | 0    | 1  | 2  | 3   | 4  |
| h. 看清楚困难        | 0    | 1  | 2  | 3   | 4  |
| i. 由于嘴痛需要避免某些食物 | 0    | 1  | 2  | 3   | 4  |
| j. 口腔溃疡         | 0    | 1  | 2  | 3   | 4  |
| k. 从静脉通道或饲管接受营养 | 0    | 1  | 2  | 3   | 4  |
|                 |      |    |    |     |    |
| <b>呼吸:</b>      |      |    |    |     |    |
| l. 频繁咳嗽         | 0    | 1  | 2  | 3   | 4  |
| m. 有色痰          | 0    | 1  | 2  | 3   | 4  |
| n. 锻炼时呼吸短促      | 0    | 1  | 2  | 3   | 4  |

[0369]

|               |             |           |           |            |           |
|---------------|-------------|-----------|-----------|------------|-----------|
| o. 静息时呼吸短促    | 0           | 1         | 2         | 3          | 4         |
| p. 需要用氧       | 0           | 1         | 2         | 3          | 4         |
| <b>饮食和消化:</b> |             |           |           |            |           |
| q. 吞咽固体食物困难   | 0           | 1         | 2         | 3          | 4         |
| r. 吞咽液体困难     | 0           | 1         | 2         | 3          | 4         |
| s. 呕吐         | 0           | 1         | 2         | 3          | 4         |
| t. 体重减轻       | 0           | 1         | 2         | 3          | 4         |
|               | <b>完全没有</b> | <b>轻微</b> | <b>适度</b> | <b>相当多</b> | <b>极度</b> |
| <b>肌肉和关节:</b> |             |           |           |            |           |
| u. 关节和肌肉痛     | 0           | 1         | 2         | 3          | 4         |
| v. 关节运动受限     | 0           | 1         | 2         | 3          | 4         |
| w. 肌肉痉挛       | 0           | 1         | 2         | 3          | 4         |
| x. 肌肉无力       | 0           | 1         | 2         | 3          | 4         |
| <b>能量:</b>    |             |           |           |            |           |
| y. 能量损失       | 0           | 1         | 2         | 3          | 4         |
| z. 需要更多睡眠/小睡  | 0           | 1         | 2         | 3          | 4         |
| Aa. 发烧        | 0           | 1         | 2         | 3          | 4         |
| <b>精神和情绪:</b> |             |           |           |            |           |
| Bb. 沮丧        | 0           | 1         | 2         | 3          | 4         |
| Cc. 焦虑        | 0           | 1         | 2         | 3          | 4         |
| Dd. 睡眠困难      | 0           | 1         | 2         | 3          | 4         |

[0370] 招募之前接受4周稳定剂量的糖皮质激素。

[0371] 招募之前4周末加入或减去其他免疫抑制药物(例如,钙调磷酸酶-抑制剂、西罗莫司、吗替麦考酚酯)。免疫抑制药物的剂量可基于该药物的治疗范围进行调整。

[0372] 参与者必须具有如下定义的足够的器官功能:

[0373] 1) 肝:足够的肝功能(总胆红素 $\leq 2.0\text{mg/dl}$ -在患有Gilbert综合征的参与者中允许例外;AST(SGOT)/ALT(SGPT) $\leq 2\times$ 机构(institutional)ULN),除非肝功能缺陷是推测的cGVHD的表现。对于将具有异常的肝功能检查(LFTs)作为cGVHD的唯一表现的参与者,将需要在招募之前在肝活检组织上有记录在案的GVHD。若治疗医师将异常LFTs记录为与肝cGVHD相符,则涉及其他器官系统的活性cGVHD背景下的异常LFTs也是允许的,且在该情况下不强制进行肝活检;

[0374] 2) 肺:FEV1 $\geq 50\%$ 或DLCO(Hb) $\geq 40\%$ 预测值,除非肺功能障碍被认为是由于慢性GVHD;

[0375] 3) 肾:血清肌酐 $\leq$ 机构ULN或对于肌酐水平在机构正常值之上的参与者肌酐清除率 $>60\text{mL/min/1.73m}^2$ ;

[0376] 4) 无论其血清肌酐水平如何,小儿患者必须具有 $\geq 60\text{mL/min/1.73m}^2$ 的肌酐清除率;

[0377] 5) 通过以下指示的足够的骨髓功能:嗜中性粒细胞绝对计数(ANC) $\geq 1000/\text{mcL}$ 和

血小板 $\geq 50,000/\text{mL}$ ,无生长因子或输血;

[0378] 6) 心脏:招募之前6个月内无心肌梗死或NYHA III或IV级心力衰竭、不受控制的心绞痛、严重不受控制的室性心律失常、或急性缺血或主动传导系统异常的心电图证据。研究进入之前,筛查时的任何ECG异常必须是研究者记录为非医学相关的;

[0379] 7) Karnofsky/Lansky表现状态 $\geq 60\%$  (表4);

[0380] 表4

[0381] 表现状态标准

[0382] Karnofsky和Lansky表现评分预期为10的倍数

|        | ECOG (Zubrod) |                                              | Karnofsky |                        | Lansky* |                                      |
|--------|---------------|----------------------------------------------|-----------|------------------------|---------|--------------------------------------|
|        | 分数            | 描述                                           | 分数        | 描述                     | 分数      | 描述                                   |
| [0383] | 0             | 完全活动,能够无限制进行所有疾病前表现。                         | 100       | 正常,无抱怨,无疾病证据           | 100     | 完全活动,正常。                             |
|        |               |                                              | 90        | 能够进行正常活动,较少的疾病体征或症状。   | 90      | 耗费体力的活动稍微受限。                         |
|        |               |                                              | 80        | 通过努力可正常活动;一些疾病体征或症状。   | 80      | 活动的,但更快疲倦                            |
|        | 1             | 耗费体力的活动受限,但能走动并能进行轻的或久坐性质的工作,例如,轻家务劳动,办公室工作。 | 70        | 自我照顾,不能进行正常活动或活动性的工作。  | 70      | 在游戏活动中有更大限制同时更少花时间在游戏活动中。            |
|        |               |                                              | 60        | 偶尔需要帮助,但能够照顾他/她的大部分所需。 | 60      | 起床走动,但进行很少活动;忙于更安静的活动。               |
|        | 2             | 能走动并能全部自我照顾,但不能进行任何工作活动。起床走动超过50%的清醒时间       | 50        | 需要相当大的帮助和频繁的医疗护理。      | 50      | 穿衣服,但一天的很多时间躺着;无主动活动,能够参与所有安静的游戏和活动。 |
|        |               |                                              | 40        | 残疾的,需要特别的照顾和帮助。        | 40      | 主要卧床;参与安静活动。                         |
|        | 3             | 仅能有限的自我照顾,超过50%的清醒时间局限于床或椅子。                 | 30        | 重度残疾的,指示住院。死亡非迫近。      | 30      | 卧床;甚至安静活动也需要帮助。                      |
|        |               |                                              | 20        | 病得很重,指示住院。死亡非迫近。       | 20      | 经常睡眠;完全受限于进行非常被动的活动。                 |
|        | 4             | 完全残疾。不能进行任何自我照顾。完全局限于床或椅子。                   | 10        | 濒死,致命过程快速进展。           | 10      | 不活动;不下床。                             |

[0385] \*将Lansky转换为ECOG量度仅是用于NCI报告目的。

[0386] 8) 年龄 $\geq 2$ 岁。根据机构经验和公开的报道,cGVHD在年龄小于2岁的儿童中的发生率是非常低的(Zecca等人,(2002) Blood 100:1192-1200)。每日SC注射低剂量IL-2已用于低至2岁的小儿HSCT后患者(Ladenstein等人,(2011) J.Clin.Oncol.29:441-448)。在年轻小儿群体中,伴随Insuflon<sup>®</sup>内置SC导管的使用,长期每日SC注射其它药物例如低分子量肝

素和胰岛素是通常给予的并良好耐受；

[0387] 9) IL-2对发育中的人类胎儿的作用是未知的。因为该原因且因为已知化疗剂是致畸的,具有怀胎和称为孩子父亲的可能性的(有生育能力的)参与者必须同意在研究进入之前和参与研究期间使用充分避孕(激素或屏障的生育控制方法;禁欲)。当女性或她的伴侣参与该研究时若其受孕或疑似受孕,则应当立即告知其治疗医师。在该试验方案中治疗或招募的男性也必须同意在研究之前、在研究参与期间和在完成IL-2给予后4个月使用充分避孕;以及

[0388] 10) 参与者或他们的父母/法律授权代表对签署书面知情同意书具有理解能力和/或意愿。

[0389] 根据以下排除标准排除参与者:1) 具有>1mg/kg/天(或等价物)的持续强的松(等价物)剂量需求的参与者;2) 同时使用钙调磷酸酶-抑制剂加上西罗莫司的参与者(单独的任一试剂是可接受的);3) 之前4周内开始新的免疫抑制药物、体外光分离置换或利妥昔单抗治疗的参与者;4) 之前100天内移植后暴露于供体淋巴细胞输注(DLI),或者T细胞或IL-2靶向药物治疗(例如,ATG、阿伦单抗、巴利昔单抗、地尼白介素-白喉毒素连接物(denileukin diftitox))的参与者;5) 招募之前4周内其它研究药物,除非被项目负责人放行了的(cleared)。4周前停止的先前固定剂量的IL-2治疗是允许的;6) 具有活性恶性肿瘤复发或他们的在先血液紊乱复发的参与者;7) 不能遵从IL-2治疗方案的参与者;8) 器官移植(同种异体移植)接受者;9) 处于联合抗逆转录病毒治疗的HIV-阳性个体是不适合的,因为与同种异体HSCT后使用的试剂有药代动力学相互作用的可能性。此外,这些个体处于增加的致命感染的风险中。当指示时在接受联合抗逆转录病毒治疗的参与者中进行适当的研究;10) 与IL-2具有相似的化学或生物组成的化合物的严重过敏反应史;11) 不受控制的并发症,其包括但不限于,进行性或活动性感染、有症状的充血性心力衰竭、不稳定性心绞痛、心律失常,或将限制遵守研究需求的精神疾病/社会环境;12) 具有活动性不受控制的乙型肝炎或丙型肝炎的个体是不适合的,因为他们处于HSCT后致命的治疗相关的肝毒性的高风险中;和13) 因为致畸或堕胎作用的可能性而从该研究排除孕妇。因为在乳儿中具有承继于接受治疗的母亲的未知但潜在的不良事件风险,所以应停止母乳喂养。

[0390] 根据以下治疗方案治疗受试者:

[0391] 各参与者接受每日皮下IL-2用于自我给药共8周。对于各参与者的初始招募,成人或小儿剂量酌情是在IL-2剂量水平A。按照以下计划(表5),在不存在DLT或严重非DLT AE的情况下,各成人和小儿参与者(各自n=10)在第2周逐步增加每日SC IL-2剂量(至剂量水平B)和4周时逐步增加每日SC IL-2剂量(至剂量水平C),并以MTD IL-2持续共4周。预期儿童相比于成人具有增加的IL-2诱导的胸腺Treg生成,且因此可能需要较少的IL-2。在基线处和IL-2治疗期间获得系列的患者PBMC样本以监测治疗效应。简而言之,它们包括测量Treg、Tcon、CD8、B、NK和DC,以及血浆细胞因子水平(例如IL-2、IL-7、IL-10、IL-15)。IL-2的免疫影响的详细评估集中于Treg和Tcon的体内平衡。等分的Treg富集产品和患者PBMC经TCR测序。

[0392] 表5

|        |              |                                 |
|--------|--------------|---------------------------------|
| [0393] | 成人团体 (n=10)  | IL-2剂量水平 (IU/m <sup>2</sup> /天) |
|        | 剂量水平A (起始剂量) | 0.67x10 <sup>6</sup>            |

|        |              |                                 |
|--------|--------------|---------------------------------|
| [0394] | 剂量水平B        | $1.35 \times 10^6$              |
|        | 剂量水平C        | $2 \times 10^6$                 |
|        | 小儿群体 (n=10)  | IL-2剂量水平 (IU/m <sup>2</sup> /天) |
|        | 剂量水平A (起始剂量) | $0.33 \times 10^6$              |
|        | 剂量水平B        | $0.67 \times 10^6$              |
|        | 剂量水平C        | $1 \times 10^6$                 |

[0395] 伴随IL-2继续给予强的松(或等价类固醇)和其它cGVHD试剂,通常无剂量递减。然而,若认为符合参与者的利益(例如类固醇毒性),则在治疗医师的裁量下允许递减强的松。若必须在8周前递减强的松,则在递减时进行‘8周等价’cGVHD评估以记录反应。值得注意的是,8周之前cGVHD的进展若是在其它免疫抑制疗法递减期间,则不认为其是毒性或缺乏功效的证据。

[0396] 延长期限的治疗:完成研究期(8周IL-2研究治疗)后,允许经历临床受益(完全或部分反应;以及不符合NIH部分反应标准的微反应)并具有可接受的毒性概况的参与者在治疗医师的裁量下继续延长期限的IL-2治疗。每6个月的延长IL-2治疗后再评估参与者以确定是否应在治疗医师的裁量下继续IL-2治疗,该治疗医师记录继续IL-2治疗的理由。

[0397] 进行延长期限的IL-2治疗的参与者可评估I期毒性终点。延长期限的IL-2期间其它免疫抑制药物的递减是由治疗医师裁量。在治疗医师的裁量下,继续进行延长期限的治疗的参与者允许加入其它cGVHD治疗以增强反应。在可归因于IL-2的毒性事件中,在治疗医师的裁量下允许进行剂量改变。在进行延长期限的IL-2治疗时的以下日程评估参与者:

[0398] 1) 每4周(±2周)门诊随访和实验室(CBC、肌酐、ALT、AST、总胆红素)评估IL-2的毒性和临床受益。

[0399] 2) 每8周(±2周)免疫试验,其包括定量血清免疫球蛋白;血浆储存入库;和其他单核细胞的储存。

[0400] 3) 每16周(±4周)cGVHD评估(11.1节)和cGVHD症状记分表直至开始IL-2治疗1年或参与者停止IL-2治疗,取其先到期者。

[0401] 在小儿患者中采血用于研究目的:对于小儿患者中的免疫学研究,各次抽血时采集的血液体积不超过30ml或3ml/kg,取较小值。该体积是在用于研究目的的最大可允许总抽血体积之内。按照机构指南,用于研究目的的抽血每周发生频率不超过2次。此外,基于患者的体重,遵从机构指南关于28日周期内用于研究目的的可抽血体积的限制。

[0402] 在治疗所有参与者之前2周内进行以下评估:1) 病史和治疗患者疾病的基本原理的文档(包括类固醇剂量);2) 体格检查,包括生命体征、体重、表现状况;3) cGVHD评估;4) 生育潜能女性的妊娠试验;5) 传染性标记测试;6) 血液学:具有分类的全血细胞计数(CBC);7) 血清化学:葡萄糖、BUN、肌酐、总胆红素、尿酸、碱性磷酸酶、LDH、总蛋白、白蛋白、AST、ALT、和钙;8) 小儿患者必须具有通过24小时尿采集或核医学肾小球滤过率(GFR)研究所测量的基线肌酐清除率;9) 甲状腺功能测试(TSH,T<sub>4</sub>,游离-T<sub>4</sub>);10) CMV病毒载量;和11) 免疫学:定量血清免疫球蛋白;血浆存储入库;和其他单核细胞储存。

[0403] 除非另有指明,否则在治疗具有涉及特定器官系统的cGVHD的参与者之前2周内需要以下评估:1) 采用希曼试验(Schirmer's test)的眼部检查,对于具有眼部cGVHD的参与者(可选的);2) 皮肤病学评估(±成人活检),对于具有皮肤cGVHD的参与者;3) 口腔检查(±

成人活检),对于具有口腔cGVHD的参与者(可选的);4)肺功能测试,对于具有肺部cGVHD临床表现的参与者;5)受影响关节的屈曲评估,对于具有与cGVHD相关的挛缩或肌肉骨骼涉及的个体;6)治疗期间评估(结束1、2、3、4、5、6、8周);7)病史和临床检查;8)与病史和临床检查同日进行的毒性评估;9)血液学:具有分类的CBC;10)血清化学:葡萄糖、BUN、肌酐、尿酸、总胆红素、碱性磷酸酶、LDH、总蛋白、白蛋白、AST、ALT、和钙;11)CMV病毒载量;12)免疫学:定量免疫球蛋白;血浆存银;和附加单核细胞储存;和13)甲状腺功能测试(TSH、T4、游离-T4)(8周)。

[0404] 对于具有涉及特定器官的cGVHD的参与者,除非另有指明,否则在结束8周的研究治疗时以及在类固醇递减时(若更早的话)需要以下评估(除了cGVHD症状评分以外):1)类固醇剂量;2)采用希曼试验的眼部检查,对于具有眼部cGVHD的参与者(可选的);3)皮肤病学评估(±成人活检),对于具有皮肤cGVHD的参与者;4)口腔检查(±成人活检),对于具有口腔cGVHD的参与者(可选的);5)肺功能测试,对于具有肺部cGVHD临床表现的参与者;和6)受影响关节的屈曲评估,对于具有与cGVHD相关的挛缩或肌肉骨骼涉及的个体。

[0405] 以下是IL-2给予的细节:

[0406] 重组人IL-2(阿地白介素)(Proleukin®-Novartis 公司&Prometheus Labs公司)是由Prometheus Laboratories公司提供。重组人IL-2(Proleukin®)是以意图用于静脉内(IV)给予的包含22MIU阿地白介素的一次性药瓶中的无菌、白色至灰白色冻干饼的形式提供。对于22百万国际单位(MIU)药瓶,当用1.2mL无菌注射用水(SWFI)重构时,每mL包含18MIU(1.1mg)IL-2、50mg甘露醇和~180mcg十二烷基硫酸钠,用~170mcg磷酸二氢钠和890mcg磷酸氢二钠缓冲至pH 7.5(范围:7.2-7.8)。重构后,所得溶液应为澄清、无色至淡黄色液体。不同于所述的那些的重构和稀释程序可能改变IL-2的递送和/或药理学并且是不推荐的。

[0407] Proleukin是未防腐的无菌制品。在2-8°C(36-46°F)下冷藏库中储存冻干IL-2的药瓶。不要在标签上所印的有效期外使用。药瓶应仅被进入一次用于重构以最小化污染的机会。若不立即使用,使用中储存时间应正常不长于2-8°C下24小时,除非重构已在层流气流罩中受控和确认的无菌条件下进行。当根据指示重构和稀释时,IL-2当储存在冷藏和室温[2-25°C(36-77°F)]下时,在塑料袋(例如,PVC袋)中稳定达48小时。经重构和稀释的溶液应储存在2-8°C下的冷藏库中。不要冷冻。应目视检查产品的微粒物质或变色并在给予前将其带至室温。当合格的医护专业人员在无菌条件下制备用于日常使用的一次性注射器(按照Proleukin®研究者的手册(Chiron Corporation,2003年9月10日,113页)时,数据支持经重构稀释IL-2制品(用SWFI重构并进一步用D5W稀释)的稳定性和无菌性以及用SWFI重构但未进一步稀释的产品的稳定性和无菌性直至2-8°C(36-46°F)下14天。因此,若在受控和确认的条件下使用层流气流罩进行重构和稀释,制备并在2-8°C(36-46°F)下储存的一个或多个剂量需在14天内使用。

[0408] 应采用无菌注射用水(SWFI)加上D5W重构IL-2。由于增加的聚集,应避免采用抑菌注射用水或0.9%注射用氯化钠重构或稀释。包含经重构和稀释溶液的单一日用注射器应储存在2-8°C下的冷藏库中。不要冷冻。应目视检查产品的微粒物质或变色并在给予前将其带至室温。

[0409] 在用1.2ml SWFI和4.8ml D5W稀释22MIU IL-2药瓶(最终IL-2浓度=3.6MIU/mL)后,应同时在药房中制备用于日常SC门诊使用的全部IL-2注射器,并应立即丢弃任何剩余

的产品。重构期间应使SWFI沿药瓶侧面以避免起泡,并应温和旋动药瓶的内容物。应不振摇药瓶。重构后,将在一次性注射器中(若需要的话在冷袋中)提供达2周的IL-2供应,用于家用冰箱2-8℃下储存。在家SC自我给药期间将每日使用一个一次性注射器,并将其丢弃在提供的利器容器中。

[0410] 在家、门诊或住院背景下可通过每日皮下注射自我给药IL-2。参与者将被推荐轮换注射部位。药剂师(或药剂师监督下的指派人员)在无菌条件下制备药物。基于体表面积(BSA)确定给予的药物量(以IU为单位)。使用DuBois公式(表3)或等价的小儿替代公式基于体重计算BSA。应基于研究进入时的体重计算剂量。本文描述了随后的剂量改变(若有的话)。未给予静脉推注或团注(bolus)。在首次IL-2剂量或之后剂量之前无需前用药。

[0411] 表6:体表面积(BSA)和肌酐清除率

[0412] 应使用获得以下以平方米(m<sup>2</sup>)为单位的结果的Dubois公式计算体表面积(BSA):

[0413]  $BSA = (W^{0.425} \times H^{0.725}) \times 0.007184$

[0414] 其中重量是以千克为单位而高度是以厘米为单位。可使用如下的Cockcroft-Gault方程式计算肌酐清除率(CrCl):

[0415] 
$$CrCl \text{ (ml/min)} = \frac{(140 - \text{年龄}) \text{ (以 kg 为单位的实际 wt)}}{72 \times \text{血清肌酐 (mg/dl)}}$$

[0416] 对于女性,使用85%的经计算CrCl值。

[0417] 注意:在明显肥胖的参与者中,所述Cockcroft-Gault公式将倾向于高估肌酐清除率(脂肪组织倾向于贡献很少的需要肾清除的肌酐)。

[0418] 对于小儿使用,允许BSA(Mosteller)和CrCl(Schwartz)的替代公式。

[0419] 应遵循用于cGVHD管理的机构实践,如按照HSCT标准操作规程(SOP)来进行抗病毒、抗真菌和抗菌预防和监测。这些通常包括:在较高风险的参与者中,每日阿昔洛韦(或等价物)用于HSV预防、复方新诺明(或等价物)用于PCP预防,IV丙种球蛋白用于低丙球蛋白血症、唑类用于真菌预防;以及在较高风险的参与者中监测β-葡聚糖和半乳甘露聚糖水平。

[0420] 治疗的持续时间是按照上述计划。在不存在由于不良事件的治疗延迟的情况下,可继续治疗直至适用以下标准中的一个:1)受试者撤回同意;2)不顺从;3)管理原因;4)不可接受的不良事件;5)威胁生命的过敏反应;6)其它4级毒性事件;7)复发或不解决的3级毒性事件;8)持续或复发的严重血液毒性(6.2节);9)治疗医师裁量下的关于IL-2的威胁生命的感染;10)恶性血液病复发;11)按照治疗医师的判断,8周前需要加入新的免疫抑制药物的GVHD临床恶化。皮质类固醇剂量的增加将被考虑为恶化GVHD的证据。改变其它免疫抑制药物的剂量以维持单独的治疗水平不是移除的标准;或12)参与者状况的一般或具体改变,使得参与者在治疗研究者看来不能接受进一步的治疗。

[0421] 自治疗开始跟随参与者1年,或直至死亡,以先发生者为准。跟随因为不能接受的不良事件而移除的参与者直至所述不良事件的解决或稳定。参与者还被要求允许长期随访以致也能识别后期毒性(若它们发生)。对于受益于延长期限的治疗的参与者的随访(包括不良事件)可继续超过1年。若参与者在本地居住,则在DFCI进行随访,若参与者在远方居住,则由当地肿瘤学提供者提供随访。对于远方居住的参与者,可以每6个月为基础与他们的当地肿瘤学提供者进行电话沟通。

[0422] 当适用任何所列标准时移除参与者。在研究特定的病例报告表 (CRF) 中记录研究移除的原因以及参与者移除的日期。与参与者讨论替代的治疗选项。在病例报告表 (CRF) 中记录将参与者移除研究的原因以及参与者移除的日期。当参与者被移除时填写QACT治疗结束/停止研究表。

[0423] 使用以下建议进行8周IL-2治疗期间的剂量延迟和改变。毒性评估的进行是使用NCI常见不良事件评价标准 (CTCAE) 的CTEP4.0版, 其被识别并位于万维网上CTEP网站: [ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic\\_applications/ctc.htm](http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/ctc.htm)。如有可能, 从症状学上管理症状。在毒性的情况下, 使用适当的药物治疗 (包括止吐剂、止泻剂等)。从研究治疗首次剂量的时间、贯穿研究并直至最后的研究随访收集参与者所经历的所有CTCAE 3级和更高级别不良事件。联系在研究停止随访时继续经历毒性的参与者以额外评估直至毒性已消退或被认为不可逆。对于进行延长期限的IL-2的参与者, 剂量改变是推荐的但不是强制的。

[0424] 与经给予试剂相关的不良事件和潜在风险的列表出现在下面并确定是否进行剂量延迟和改变或者事件是否除常规报告以外还需要速报。

[0425] IL-2 (Proleukin) 是一种商业试剂。以下描述了HSCT参与者中低剂量IL-2的相关副作用。主要涉及高剂量IL-2的额外的详细毒性信息可见于Proleukin药品说明书 (package insert) 中。

[0426] 局部反应: 接受SC低剂量IL-2的大部分HSCT参与者报告注射部位反应, 典型为数日内消退的局灶性红斑; 以及2-3周后消退的硬结。在具有更显著硬结 (CTC3级) 的参与者中偶尔需要剂量中断。长期剂量中断可能导致参与者不可评估反应。

[0427] 全身症状: 一些接受低剂量IL-2的HSCT参与者在开始IL-2的72小时内发展发烧、恶心、疲劳和关节痛。治疗中断导致3天症状消退。参与者耐受以更低的剂量再引入IL-2。长期剂量中断可能导致参与者不可评估反应。

[0428] 甲状腺功能失调: 在一些接受低剂量IL-2的HSCT参与者中观察到甲状腺功能测试异常。两名参与者发展了在接受IL-2时需要治疗的临床甲状腺功能减退。停止IL-2后, 甲状腺功能回到正常。因此, 在研究进入和研究8周时将检查甲状腺组 (TSH、T4、游离T4) 的水平。具有甲状腺功能减退证据的参与者将被激动 (抗微粒体、抗甲状腺球蛋白抗体) 和根据临床指示给予替代甲状腺素。

[0429] 造血作用: HSCT后早期, 低剂量IL-2在治疗1周后的大部分参与者中引起绝对淋巴细胞计数的初始减少。此后, 伴随继续输液, 在所有参与者中出现淋巴细胞计数的稳定增加。低剂量IL-2还引起嗜酸性粒细胞计数的初始增加 (3周时峰值), 然后逐步下降。未观测到单核细胞或中性粒细胞计数的改变。在一些接受低剂量IL-2的HSCT参与者中血小板计数减少>20%。在接受IL-2的前2周内关注到该减少, 且继续治疗与血小板计数的进一步降低不相关。没有参与者需要血小板输注或发生流血事件。未关注到低剂量IL-2对血红蛋白水平或网织红细胞 (reticulocyte) 计数的显著影响。

[0430] 血栓性微血管病 (TMA): 两名接受每日SC低剂量IL-2的参与者发展了被认为可能涉及IL-2的血栓性微血管病SAE (血小板减少、微血管病性溶血性贫血伴随裂细胞症、肾功能不全)。TMA还是钙调磷酸酶抑制剂 (CNI) 和西罗莫司 (参与者均接受这两者治疗) 的已知并发症, 但IL-2可能也对其有贡献。一名患者已需要长期血液透析。在不允许组合使用CNI

加上西罗莫司后,没有患者随后发展TMA。.

[0431] 具有与cGVHD相关以及与其研究中使用的免疫抑制药物相关的毒性。这些毒性被研究者常规管理。对于不良反应的综合列表,参照个体免疫抑制剂的药品说明书。

[0432] 根据NCI常见不良事件毒性标准 (CTCAE), 4.0版评估毒性。

[0433] 对于任意以下情形移除参与者并应放弃IL-2治疗:

[0434] 过敏反应:涉及IL-2的威胁生命的过敏反应需要停止IL-2,并被认为是DLT;

[0435] 血栓性微血管病 (TMA):需要血液透析/ CVVH、或需要住院的TMA伴随CNS功能失调、肾功能不全需要停止IL-2,并被认为是DLT;

[0436] CTC 4级毒性:涉及IL-2的4级非血液学毒性需要停止IL-2,并被认为是DLT,除非其单独表现无症状的可校正实验值(例如,尿酸);

[0437] CTC 3级毒性:对于意料之外的3级非血液学毒性保留IL-2,除非其单独表现无症状的可校正实验值(例如,尿酸)。若该毒性在2周内消退至1级或低于1级,可以以50%剂量(若毒性在剂量水平A期间)或之前的较低剂量水平(若毒性在剂量水平B或C期间)重新开始IL-2,并将不再递增剂量。若该毒性未在2周内消退至1级或低于1级,或在以较低剂量重新开始IL-2后复发至3级或以上,则其将停止,并被认为是DLT;

[0438] 严重血液学毒性:对于不涉及恶性疾病复发、感染或其它病因学的严重外周计数下降 ( $ANC < 500$ ,  $Plts < 10,000$ ) 保留IL-2。若计数在2周内改善 ( $ANC > 1000$ ,  $Plts > 20,000$ ), 则以50%剂量(若毒性在剂量水平A期间)或之前较低剂量水平(若毒性在剂量水平B或C期间)重新开始IL-2,并将不再递增剂量。若外周计数未在2周内改善,或在重新开始IL-2后再次下降 ( $ANC < 500$ ,  $Plts < 10,000$ ), 则停止IL-2,并将其认为是DLT;

[0439] 死亡:治疗相关的死亡被认为是DLT。

[0440] 以下是附加考虑:

[0441] 感染:值得注意的是,感染不被认为是治疗相关的,因为cGVHD和同时的免疫抑制药物二者均是感染的已知风险因素。感染被认为是cGVHD的预期并发症。然而,在完成8周IL-2治疗之前发展CTC 3级或更高感染的参与者可能具有IL-2保留(withheld)。若IL-2保留,在治疗医师的裁量下,他们可以被考虑在控制感染后重新开始IL-2。IL-2剂量是:对于治疗中断 $\leq 1$ 周或剂量水平A:以相同剂量重新开始;对于治疗中断 $> 1$ 周和剂量水平B或C:以低于2周的剂量水平重新开始并按照计划递增);

[0442] 复发:同样地,恶性血液病复发也不被认为是治疗相关的,因为cGVHD患者具有已知的复发发生率。然而,所有复发情形将被记录,并将具有IL-2保留;

[0443] 治疗中断: $> 4$ 周的IL-2治疗中断导致参与者被认为不可评估反应,除非伴随较短疗程的IL-2记录了cGVHD的客观改善;

[0444] 预期的非血液学毒性:为了患者耐受性的利益并在治疗医师的裁量下,对于小于CTCAE 3级毒性(例如,持续全身症状),IL-2可被保留和/或以50%剂量(若毒性在剂量水平A期间)或之前剂量水平(若毒性在剂量水平B或C期间)重新开始,并不再递增剂量;

[0445] cGVHD的恶化:8周IL-2治疗期间需要加入新的免疫抑制药物(在治疗医师的裁量下)的GVHD恶化是IL-2停止的一个标准。8周以前皮质类固醇剂量增加高于基线被认为是cGVHD恶化的证据。改变其它免疫抑制药物剂量以维持单独的治疗水平不是IL-2停止的标准或不被认为是cGVHD恶化的证据。

[0446] 下表是用于记录的数据的汇总：

[0447] 表7

[0448]

|                                      | IL-2 之前 2<br>周内 | IL-2 治疗期间<br>(1、2、3、4、5、6 周的结束) <sup>a</sup> | 8 周的结<br>束 <sup>a</sup> |
|--------------------------------------|-----------------|----------------------------------------------|-------------------------|
| 病史                                   | X               | X                                            | X                       |
| 体格检查                                 | X               | X                                            | X                       |
| 毒性评估                                 |                 | X                                            | X                       |
| cGVHD 症状评分                           | X               |                                              | X                       |
| 传染性疾病标记                              | X               |                                              |                         |
| EKG                                  | X               |                                              |                         |
| 妊娠试验 <sup>†</sup>                    | X               |                                              |                         |
| 肺功能                                  | o               |                                              | o                       |
| 皮肤病学评估 <sup>b</sup>                  | o               |                                              | o                       |
| 口腔评估                                 | o               |                                              | o                       |
| 屈曲评估                                 | o               |                                              | o                       |
| 眼部评估                                 | o               |                                              | o                       |
| 具有分类的 CBC                            | X               | X*                                           | X                       |
| 血清化学                                 | X               | X*                                           | X                       |
| 24 小时 CrCl 或核<br>医学 GFR <sup>#</sup> | X               |                                              |                         |
| 免疫学 <sup>1</sup>                     | X               | X                                            | X                       |
| 类固醇评估 <sup>2</sup>                   | X               |                                              | X                       |
| CMV 病毒载量                             | X               | X                                            | X                       |
| 甲状腺功能                                | X               |                                              | X                       |
| 药物日志 <sup>+</sup>                    |                 | X                                            | X                       |

[0449] X-需要评估

[0450] o-具有这些器官系统的临床牵连的参与者需要(口腔和眼部评估是可选的)。

[0451] 1免疫学:定量免疫球蛋白;血浆存储;其他单核细胞的储存

[0452] 2在8周之前不应递减全身性类固醇,除非认为医疗需要(例如类固醇毒性),且若在早期递减,在递减时进行‘8周等价’cGVHD评估以记录反应

[0453] a 1、2、3、4、5、6、8周的测试将±4天进行,以考虑到周末、假日等附近的时间安排和管理灵活性。

[0454] b对于成人参与者,皮肤活检是可选但强烈建议的。

[0455] \*在IL-2开始后还将进行4天(±1天)CBC/手动分类、血清肌酐和LDH的附加实验室测试,以评估与血栓性微血管病相关的贫血、血小板减少、裂细胞和/或肾功能不全。

[0456] ¶对于具有妊娠可能的女性。

[0457] #仅对小儿患者

[0458] +对于开始的8周IL-2,至少每2周完成并回到临床;且对于延长期限的IL-2,至少每8周。

[0459] 评估毒性和反应二者。接受IL-2的参与者可评估毒性。已接受至少4周IL-2的参与者被认为可评估反应的缺乏。参与者在基线和研究8周时(以及在8周之前早期类固醇递减的时间,如果必要的话)按照NIH指南(可在万维网`asbmt.affiniscape.com/associations/11741/files/ResponseCriteriaAPPENDIXAFormA.pdf`上获得)经历标准化cGVHD评估(Flipovich等人,(2005) *Biol.Blood Marrow Transplant*.11:945-956)。按照NIH一致标准评估cGVHD响应(Pavletic等人,(2006) *Biol.Blood Marrow Transplant*.12:252-266)。在反应确定中不包括口腔和眼部位置,因为对于那些部位允许附加的局部治疗。参与者具有根据以下定义分类的他们的反应:

[0460] 完全反应:器官反应:在特定器官中消退所有涉及cGVHD的可逆临床表现;总体反应:在涉及cGVHD的各器官和部位消退所有可逆临床表现。取决于涉及的相关器官系统,参与者经历眼部、口腔、皮肤、肌肉骨骼和肺部系统的重复详细评估;

[0461] 部分反应:器官反应:用于测量涉及cGVHD的疾病临床表现的量级中至少50%的改善(例如,从80%BSA至40%BSA的皮肤皮疹50%的减少),单独相对于起始值的百分数在全量级中具有最小25%的改善(表8);总体反应:测量中至少一个器官或部位的改善,测量中没有任何其它器官或部位的进展。值得注意的是,对于全球评级和分类量表,3-或7-分量表中的1-分改变或者0至10分量表中的2-至3-分的改变(0.5SD改变)被认为是临床上有意义的。此外,闭塞性细支气管炎综合征(BOS) 响应治疗的标志是肺功能的稳定化,在3个月期间内没有FEV1的进一步减小。无反应者(例如,轻微反应、病情稳定)不具有符合NIH关于部分反应或疾病进展标准的cGVHD改变。

[0462] 表8 cGVHD响应标准

[0463] 用于cGVHD中部分器官反应的建议计算。或者,可使用分类的器官特异性和全球评分以确定反应。

| 器官和起始分数或值                                                                                                                                                                                                                                                      | 部分反应标准*                                                               |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| 皮肤（体表百分数）<br>$> 50\%$<br>$25 - 50\%$<br>$< 25\%$                                                                                                                                                                                                               | $e/s \leq 0.5$ 和 $e > 0$<br>$s - e \geq 25$ 和 $e > 0$<br>仅 CR；无 PR 可能 |
| 血小板计数                                                                                                                                                                                                                                                          | $e - s \geq 100,000/uL$ 和 $e < LLN$                                   |
| [0464] 肠胃（和其它 0-3 量级）<br>3<br>2<br>1                                                                                                                                                                                                                           | $e = 1$ 或 $2$<br>$e = 1$<br>仅 CR；无 PR 可能                              |
| 肝功能试验（ALT、碱性磷酸酶和胆红素）<br>$\geq 3x$ ULN<br>$< 3x$ ULN                                                                                                                                                                                                            | $e/s \leq 0.5$ 和 $e > ULN$<br>仅 CR；无 PR 可能                            |
| [0465] *s, 起始分数或值; e, 结束分数或值; ULN, 正常上限; LLN, 正常下限                                                                                                                                                                                                             |                                                                       |
| [0466] 实例                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                       |
| [0467] 1. 皮肤: 起始分数=85, 结束分数=30; $e/s = 30/85 = 0.35 = PR$                                                                                                                                                                                                      |                                                                       |
| [0468] 2. 皮肤: 起始分数=65, 结束分数=45; $e/s = 45/65 = 0.75 = \text{非}PR$                                                                                                                                                                                              |                                                                       |
| [0469] 3. 皮肤: 起始分数=45, 结束分数=15; $s - e = 30 = PR$                                                                                                                                                                                                              |                                                                       |
| [0470] 4. 皮肤: 起始分数=30, 结束分数=15; $s - e = 15 = \text{非}PR$                                                                                                                                                                                                      |                                                                       |
| [0471] 进行性疾病: 器官进展: 用于测量涉及cGVHD的疾病临床表现的量级中至少25%的绝对增加(表9)。值得注意的是, 对于全球评级和分类量表, 3-或7-分量表中的1-分改变或者0-至10-分量表中的2-至3-分改变(0.5SD改变)被认为是临床上有意义的。此外, ‘cGVHD的临床恶化’与根据NIH标准的进展性cGVHD不是同义的, 因为参与者可能经历不符合客观NIH进展标准的恶化症状。如果这样, 在治疗医师的判断下, 他们仍具有因缺乏IL-2功效而停止IL-2并开始附加的免疫抑制的选项。 |                                                                       |
| [0472] 表9心脏病的NYHA分类                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                       |
| [0473] 下表呈现了纽约心脏协会心脏疾病分类.                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                       |

|        | 分类 功能能力                                                             | 客观评估             |
|--------|---------------------------------------------------------------------|------------------|
| [0474] | I 患者具有心脏疾病但不具有导致的体力活动限制。普通体力活动不会引起过度疲劳、心悸、呼吸困难或心绞痛。                 | 无心血管疾病的客观证据。     |
|        | II 患者具有导致体力活动轻微限制的心脏疾病。他们在休息时是舒适的。普通体力活动导致疲劳、心悸、呼吸困难或心绞痛。           | 最小心血管疾病的客观证据。    |
|        | III 患者具有导致体力活动显著限制的心脏疾病。他们在休息时是舒适的。小于普通活动引起疲劳、心悸、呼吸困难或心绞痛。          | 中度严重的心血管疾病的客观证据。 |
|        | IV 患者具有导致不能无不适进行任何体力活动的心脏疾病。心力衰竭或心绞痛综合征的症状甚至可在休息时呈现。若进行任何体力活动，不适增加。 | 严重的心血管疾病的客观证据。   |

[0475] 来源：纽约心脏协会标准委员会。用于诊断心脏和大血管疾病的术语和标准 (Nomenclature and Criteria for Diagnosis of Diseases of the Heart and Great Vessels). 第9版. Boston, MA: Little, Brown & Co; 1994: 253-256。

[0476] 参与者使用经确认的慢性GVHD症状量表(表10)自我报告cGVHD的症状和体征。在基线和8周的结束时(以及如果必要的话在8周之前早期类固醇递减的时间)获得自我报告的症状量表。

[0477] 表10 cGVHD进展标准

[0478] cGVHD中器官进展的建议计算

|        | 器官和起始分数或值                    | 进展标准*                                                |
|--------|------------------------------|------------------------------------------------------|
| [0479] | 皮肤(体表百分数)                    | $e - s \geq 25$                                      |
|        | 血小板计数                        | $s - e \geq 50,000/\mu\text{L}$ and $e < \text{LLN}$ |
|        | 肠胃(和其它0-3量级)                 | $e - s \geq 1$                                       |
|        | 肝(ALT、碱性磷酸酶和胆红素)             |                                                      |
|        | $s \geq 3 \times \text{ULN}$ | $e - s \geq 3 \times \text{ULN}$                     |
|        | $s < 3 \times \text{ULN}$    | $e - s \geq 2 \times \text{ULN}$                     |
|        | 肺(12分肺功能量表) <sup>†</sup>     | $e - s \geq 3^{\dagger}$                             |

[0480] \*s, 起始分数或值; e, 结束分数或值; ULN, 正常上限

[0481] <sup>†</sup>肺功能量表是FEV1和DLC0(校正Hb)分数的总和, 各自计算为:  $> \text{预测的} 80\% = 1$ ;  $70-79\% = 2$ ;  $60-69\% = 3$ ;  $50-59\% = 4$ ;  $40-49\% = 5$ ;  $< 40\% = 6$ 。

[0482] <sup>†</sup>若起始肺功能分数 $\geq 10$ , 进展被定义为至少相距2周测量的两次测试中FEV1的减小 $\geq 5\%$ 。选择该时间间隔是因为这些综合征可快速进展。

[0483] 急性GVHD分期

[0484]

| 器官阶段 | 皮肤*         | 肝 <sup>1</sup>   | GUT <sup>2</sup>             |
|------|-------------|------------------|------------------------------|
| 1    | 皮疹< 25%     | 胆红素 2-3 mg/dl    | 腹泻 500-999 ml/d 或活检证明的上消化道涉及 |
| 2    | 皮疹 25-50%   | 胆红素 3.1-6 mg/dl  | 腹泻 1000-1499 ml/d            |
| 3    | 皮疹> 50%     | 胆红素 6.1-15 mg/dl | 腹泻 ≥1500 ml/d                |
| 4    | 广义红皮病, 伴随大泡 | 胆红素> 15 mg/dl    | 严重腹痛, 伴随或不伴随肠梗阻              |
|      |             |                  |                              |
| 总体阶段 |             |                  |                              |
| I    | 1-2 期       | 无                | 无                            |
| II   | 3 期或        | 1 期或             | 1 期                          |
| III  | -           | 2-3 期或           | 2-4 期                        |
| IV   | 4 期或        | 4 期              | -                            |

[0485] \*使用“九分法”以确定体表面积。

[0486] <sup>1</sup>以总胆红素形式给出范围。若已记录胆红素提高的额外原因,则下调一期。[0487] <sup>2</sup>若已记录腹泻的额外原因,则下调一期。

[0488] (改编自Thomas等人,NEJM,1975,895-90页)。

[0489] 在基线时和在8周IL-2结束时记录参与者的皮质类固醇每日总剂量。在替代的皮质类固醇每日剂量的情况下,为研究目的记录平均日剂量。参与者还经历免疫功能测试,其在IL-2开始之前,以及1、2、3、4、6和8周的结束时进行。测试包括定量免疫球蛋白;血浆存储;和去单核细胞的储存。

[0490] 在之前低剂量IL2研究中,观测到给予一群患者固定的剂量,尽管每日给予IL-2,血浆IL-2水平在治疗1周时达到峰值后下降,而Treg计数上升。进一步的研究显示Treg增殖和活化水平也在2周后平息。本文相信血浆IL-2水平的下降是由于其被在经IL-2-扩张的Treg上表达的增加的高亲和力IL-2受体(CD25)摄取和截留,血浆IL-2水平的下降可减小对于扩张的Treg池的IL-2随后可用性。据信患者间(intra-patient)剂量递增最大化IL-2诱导的Treg体内增强并避免由于被增加数目的具有较高CD25表达的循环Treg结合后血浆IL-2水平降低所导致的快速耐受。此外,据信毒性/DLT率随着各患者内剂量的连续增加而降低,因为在剂量递增时更大的Treg池将可用于IL-2摄取和截留。

[0491] 如上所述,考虑了三个IL-2递增剂量:成人患者为 $0.67 \times 10^6$  (剂量水平A)、 $1.35 \times 10^6$  (剂量水平B)和 $2 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>/d (剂量水平C)而小儿患者为 $0.33 \times 10^6$  (剂量水平A)、 $0.67 \times 10^6$  (剂量水平B)和 $1 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>/d (剂量水平C)以确定各患者中的MTD。各参与者的初始招募是在剂量水平A。在不存在DLT或严重的非DLT的AE的情况下,各成人或小儿参与者在2周时剂量递增(至剂量水平B)和在4周时剂量递增(至剂量水平C),并继续接受MTD IL-2共4周。若患者在任何剂量水平经历DLT,则将所述患者从研究中移除。若患者在剂量递增时经历不可接受的IL-2相关性AE(非DLT),则患者可递减至先前耐受的剂量。MTD被定义为在各患者中不存在DLT的情况下的最大剂量水平。下表11显示了各种DLT率下个体剂量递增的概率。例如,若个体的真实但未知的DLT率是10%,则剂量递增的概率是90%,其是DLT率的互补概率。

[0492] 表11各受试者中剂量递增的概率

|        |                        |      |     |      |     |      |     |      |     |      |     |
|--------|------------------------|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|
| [0493] | 各受试者中真实的<br>但未知的 DLT 率 | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.35 | 0.4 | 0.45 | 0.5 |
|        | 剂量递增的概率                | 0.95 | 0.9 | 0.85 | 0.8 | 0.75 | 0.7 | 0.65 | 0.6 | 0.55 | 0.5 |

[0494] 总共招募20名患者(10名成人和10名小儿患者)并评估研究设计的可行性。在之前成人患者中的IL-2研究中,  $1 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>/天的IL-2被确认为MTD。然而, 采用患者内剂量递增的当前设计, 据信患者经历较低的毒性且因此MTD剂量水平较高。若在20名患者中15名或更多的患者宣称剂量水平B或C为其MTD, 则认为当前研究设计是可行的。采用该决策规则, 若真实但未知的可行率是85%则推断该研究设计可行的概率是0.93, 若可行率是80%则概率是0.8, 且若可行率是55%则概率是0.06。

[0495] 基于之前研究, 据信各群体中至少7名患者将达到其MTD而不经历DLT, 且若真实但未知的DLT率是0.2则观测到至少7名患者完成其MTD而无DLT的概率将是0.88, 且若DLT率是0.3则概率是0.65。在相关研究中, 组合以及单独分析IL-2剂量、血浆IL-2水平和Treg和成人和小儿患者临床响应之间的关系。

[0496] 受试者的性别不被用作入选或排除的标准且对于少数族裔的应计 (accrual) 没有限制。在2013年, 41%的全部获移植的患者是女性且约10%的患者是少数族裔。基于我们2013年移植项目中的该自我报告的种族和性别, 通过性别和种族定义的亚组中预期的应计在下表12中汇总。

[0497] 表12

[0498]

| 应计目标          |        |   |         |   |         |
|---------------|--------|---|---------|---|---------|
| 人种类别          | 性别     |   |         |   |         |
|               | 女性     |   | 男性      |   | 合计      |
| 西班牙裔或拉丁裔      | 0      | + | 1       | = | 2       |
| 不是西班牙裔或拉丁裔    | 8      | + | 11      | = | 18      |
| 人种类别：全部受试者的合计 | 8 (A1) | + | 12 (B1) | = | 20 (C1) |
| 种族类别          |        |   |         |   |         |
| 美洲印第安人或阿拉斯加土著 | 0      | + | 0       | = | 0       |
| 亚洲人           | 0      | + | 1       | = | 1       |
| 黑人或非裔美国人      | 0      | + | 1       | = | 1       |
| 夏威夷土著或其他太平洋岛民 | 0      | + | 0       | = |         |
| 白人            | 8      | + | 10      | = | 20      |
| 种族类别：全部受试者的合计 | 8 (A2) | + | 12 (B2) | = | 20 (C2) |

(A1 = A2)

(B1 = B2)

(C1 = C2)

[0499]

[0500] 次要终点包括8周的慢性GVHD响应率、研究进入后1年的总体存活和复发以及8周治疗期间的免疫学评估。叙述性和图表性地分析次要终点。在相关研究中, 组合以及单独研

究IL-2剂量、血浆IL-2水平和Treg增殖和活化和成人和小儿患者临床响应之间的关系。

[0501] 实施例3:与调节性T细胞给予相结合的代表性低剂量IL-2治疗方案

[0502] 以下提供了与调节性T细胞给予相结合的低剂量IL-2治疗方案的代表性、非限制性实施方式。在其它实施方式中,低剂量IL-2治疗方案可替换为实施例1的多次-可变剂量IL-2治疗方案和/或本文所述的方法,包括来自任意实施例的任意组合。例如且除非另外指明,来自实施例2的标准可全部或部分伴随以下实施例3中所述的那些使用。

[0503] 虽然低剂量IL-2可在体内优先增加Tregs,但持久的临床响应仅为~50%的cGVHD患者。此外,在一项寻求增强具有HSCT后恶性肿瘤复发的患者中移植物抗白血病(GVL)反应的试验中,CD4<sup>+</sup>富集的供体淋巴细胞输注(CliniMACS CD8<sup>+</sup>耗尽;剂量 $3-10 \times 10^7$  CD4<sup>+</sup>细胞/kg)加上12周低剂量IL-2 ( $0.6 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>/d) 相比于单独的低剂量IL-2或CD4<sup>+</sup>富集的细胞输注诱导了更大的体内FOXP3<sup>+</sup> Treg扩张,而未诱导GVHD (Zorn等人, (2009) Biol. Blood Marrow Transplant. 15:382-388) (图8)。伴随低剂量IL-2接受CD4富集的DLI的患者相比于接受单独的低剂量IL-2的患者具有更大的体内Treg扩张 ( $p=.03$ ) 或相比于接受CD4富集的DLI的患者具有更大的体内Treg扩张 ( $p=.001$ ) (图8)。这些CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T细胞显示正常抑制功能且CD4富集的DLI和IL-2治疗与GVHD不相关。在意大利一项经历CD34选择的单倍相合HSCT的28名患者的试验中,移植周围输注供体Treg富集细胞后输注供体Tcon,即便是在不存在移植后免疫抑制的情况下也预防了GVHD (Di Ianni等人, (2011) Blood 117:3921-3928)。

[0504] 基于本文所述的结果,据信结合低剂量IL-2和采用的Treg富集细胞治疗会产生附加的临床受益。已接受供体Tregs富集细胞输注加上低剂量IL-2的首位参与者无任何不良反应。此外,来自5组独立白细胞除去术的数据证实了2步CliniMACS CD8/CD19共耗尽后CD25<sup>+</sup> Treg富集的可行性(表13)。起始自具有包含6.5-9.7%CD20<sup>+</sup>B细胞、11.4-28.3%CD8<sup>+</sup> T细胞和5.9-16.7%CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>-Treg细胞的 $1.6-4.07 \times 10^{10}$ 存活的总有核细胞(TNC)的白细胞分离产物,取得了具有包含0-0.4%CD20<sup>+</sup>B细胞、0.01-1.2%CD8<sup>+</sup> T细胞、83.1-92%CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg富集细胞和72.8-93.9%CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>-Treg细胞的 $0.58-1.76 \times 10^8$ 存活的TNC的Treg富集产物。典型FOXP3<sup>+</sup> Treg包含41.3-69.6%的上述产物,为了抑制,其也在1:2的Treg:Tcon比率之上。

[0505] 表13

| 白细胞分离术验证                         |                 |                 |                 |                 |                 |
|----------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 白细胞分离术                           | #1              | #2              | #3              | #4              | #5              |
| 起始产物                             |                 |                 |                 |                 |                 |
| 存活率                              | 100%            | 100%            | 100%            | 100%            | 99%             |
| TNC                              | 2.60E+10        | 2.97E+10        | 3.16E+10        | 1.60E+10        | 4.07E+10        |
| 总 CD3+ T 细胞                      | 1.51E+10        | 1.28E+10        | 6.92E+09        | 7.92E+09        | 2.47E+10        |
| <b>CD3+ T 细胞/kg (100 kg 接受者)</b> | <b>1.51E+08</b> | <b>2.97E+08</b> | <b>3.16E+08</b> | <b>1.60E+08</b> | <b>4.07E+08</b> |
| % CD20+ B 细胞                     | 6.50%           | 9.70%           | 6.90%           | 7.10%           | 8.40%           |
| % CD8 T 细胞                       | 28.30%          | 14.40%          | 11.40%          | 20.80%          | 23.10%          |
| % CD4+CD25+ Treg 富集细胞            | 7.30%           | 12.80%          | 8.00%           | 11.90%          | 18.00%          |
| <b>%CD4+CD25+CD127- Treg 细胞</b>  | <b>5.9%</b>     | <b>6.7%</b>     | <b>16.7%</b>    | <b>5.9%</b>     | <b>11.4%</b>    |
| Treg 富集产物                        |                 |                 |                 |                 |                 |
| 无菌                               | 阴性              | 阴性              | 阴性              | 阴性              | 阴性              |

|                                  |                 |                 |                 |                 |                 |
|----------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 内毒素                              | 阴性              | 阴性              | 阴性              | 阴性              | 阴性              |
| 存活率                              | <b>98%</b>      | <b>82%</b>      | <b>100%</b>     | <b>90%</b>      | <b>83%</b>      |
| TNC                              | 1.76E+08        | 5.85E+07        | 1.31E+08        | 6.51E+07        | 1.28E+08        |
| <b>TNC/kg (100 kg 接受者)</b>       | <b>1.76E+06</b> | <b>0.59E+06</b> | <b>1.31E+06</b> | <b>0.65E+06</b> | <b>1.28E+06</b> |
| <b>TNC/kg (60 kg 接受者)</b>        | <b>2.93E+06</b> | <b>0.98E+06</b> | <b>2.18E+06</b> | <b>1.09E+06</b> | <b>2.13E+06</b> |
| % CD20+ B 细胞                     | 0.10%           | 0.40%           | 0.10%           | 0.30%           | 0%              |
| % CD8+ T 细胞                      | 1.20%           | 0.01            | 0.20%           | 0.50%           | 0.10%           |
| <b>% CD4+CD25+ Treg 富集细胞</b>     | <b>91.90%</b>   | <b>91.50%</b>   | <b>95.50%</b>   | <b>83.10%</b>   | <b>92%</b>      |
| <b>% CD4+CD25+CD127- Treg 细胞</b> | <b>93.10%</b>   | <b>93.90%</b>   | <b>72.80%</b>   | <b>85.70%</b>   | <b>88.70%</b>   |

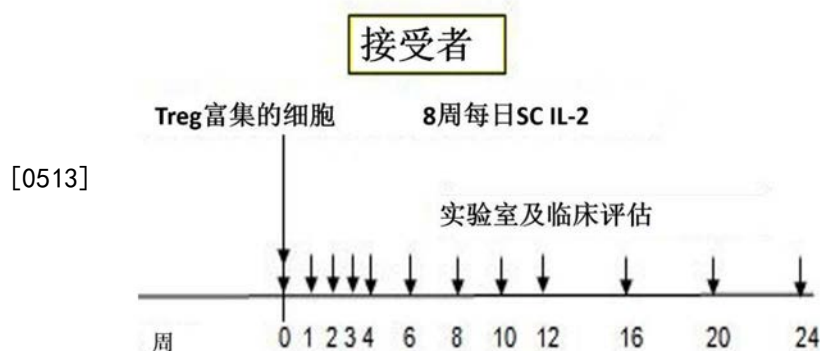
[0508] 使用以下患者群体标准:1) 具有需要系统治疗的慢性GVHD(需要系统治疗的广泛或有限的慢性GVHD)的参与者;2) 尽管接受2种或多种治疗的活动性cGVHD;所述治疗包括至少4周的 $\geq 0.25\text{mg/kg/天}$ 剂量的强的松(或等价物);3) 无不受控制的活动性感染;和4) 无恶性疾病复发。

[0509] 以下详述了特定的入选和排除标准:

[0510] 1) 参与者数目:2-25;

[0511] 2) 研究设计和方法学:评估在类固醇难治性慢性移植物抗宿主病(cGVHD)中调节性T细胞(Treg)富集细胞加上8周低剂量每日白细胞介素-2(IL-2)的安全性和最大耐受剂量水平(MTD)。

[0512] 3) I期



[0513] Treg富集细胞目标剂量:

[0514] 剂量水平A:  $0.1 \times 10^6$  细胞/kg (起始剂量水平)

[0515] 剂量水平B:  $0.3 \times 10^6$  细胞/kg

[0516] 剂量水平C:  $1 \times 10^6$  细胞/kg

[0517] 安全性和有效性分析如下: 主要终点是Treg富集的供体细胞输注加上低剂量每日SC IL-2 ( $1 \times 10^6$  U/m<sup>2</sup>/d) 的毒性和MTD。次要终点是1) Treg富集的输注加上8周低剂量IL-2的可行性; 2) Treg富集的输注加上8周低剂量IL-2的临床响应; 3) Treg富集的输注加上8周低剂量IL-2的免疫效应; 和4) 临床响应的预测器。

[0518] 评估(8周时)如下: 1) 评估Treg富集细胞输注的可行性; 2) 评估Treg富集细胞输注的输注毒性; 3) 评估不涉及恶性疾病的3级或更高级的血液毒性; 4) 评估不涉及GVHD的3级或更高级的非血液毒性; 5) 评估危及生命的感染; 6) 评估慢性GVHD响应或进展; 和7) 评估免疫影响。

[0519] 此外, 评估供体来源的Treg富集细胞产物中和在基线时以及8周IL-2治疗后研究患者中Treg和Tcon群体的总体T细胞库的多样性。所得序列数据可用于追踪跨越系列患者样本的个体T细胞克隆, 实现在低剂量IL-2治疗期间对于采用的Treg细胞产物而言独特的T细胞克隆的体内扩张和继而的存活。还测定了Treg和Tcon之间共享TCR库的程度及以采用的Treg细胞输注加上低剂量IL-2治疗的组合作为用于重建Treg体内平衡的参数后其如何改变。

[0520] 样本组分分离和低温保存: 对于单核细胞的分离, 用Hank平衡盐溶液 (HBSS) 稀释抗凝样本, 将其层置在Ficoll-Paque™ PLUS上并接着在17°C下1,000x g离心20分钟。离心后, 收获聚蔗糖 (Ficoll) 和介质之间界面处的细胞, 在HBSS中洗涤两次并计数。用编码CM数的条形码标记冷冻管并将其储存在汽相液氮中, 并在冷冻工作表中记录位置信息。对于血浆储存, 轻轻旋转原发抗凝样本并在用如上所述的介质稀释细胞团块之前移除血浆。当需要非冷冻保存样本时 (例如, 用于流式细胞术的全血), 未经进一步处理而分散样本。依照实验室SOP录入和录出样本。使用Qiagen Blood Mini和Micro柱 (取决于细胞量) 使用制造商推荐的试验方案从  $2.5 \times 10^4$  至  $10 \times 10^6$  细胞之间分离双链DNA (dsDNA) 以用于TCR。将样本洗脱入100μL洗脱缓冲液。按照制造商的说明, 在加入Quant-iT™ PicoGreen™ 试剂 (Invitrogen)、生成标准DNA曲线和在荧光读板器上测量后量化洗脱的dsDNA。

[0521] 免疫学方法: 表型分析: 通过计数外周血中确定的淋巴细胞亚群来评估免疫重建。分析有15% EDTA的采集的全血。将荧光染料缀合的抗体 (Beckman Coulter, BD Biosciences, Invitrogen or Miltenyi) 加至各反应管, 然后加入100μL全血。孵育10分钟

后,加入1mL BD FACSLyse溶血剂并将样本涡旋和孵育15分钟。使用BD FACSCanto® II流式细胞仪和FACSDiva®软件分析抗体标记的细胞。虽然这些分析常规是在采集24小时内的新鲜全血上进行的,但它们也可用于冷冻保存的PBMC。直接的缀合试剂和荧光染料组在下表14中显示。各管中同时分析7-8种颜色提供了采用3-管组对T、B和NL细胞内的不同亚群的综合调查。

[0523]

| 表 14 用于分析淋巴细胞亚群的试剂/荧光染料组 |             |        |       |        |         |       |         |       |        |
|--------------------------|-------------|--------|-------|--------|---------|-------|---------|-------|--------|
| 管                        | 亚群          | FITC   | PE    | PE-Cy5 | PE-Cy7  | APC   | APC-Cy7 | Pac 蓝 | Pac 橙  |
| 1                        | T 细胞 / Treg | CD45RO | PD-1  | CD127  | CD25    | CD62L | CD4     | CD3   | CD8    |
| 2                        | B 细胞        | BAFF-R | IgD   | CD27   | CD38    | CD19  | CD45    | CD5   | CD20   |
| 3                        | NK 细胞       | CD16   | CD56  |        | CD8     | NKG2D | CD45    | CD3   | CD4    |
| 4                        | 树突细胞        | CD123  | CD141 | CD11c  | LINEAGE | CD86  | CD45    | CD14  | HLA-DR |

[0524] 各管中仅使用400μL全血和分析200,000细胞。可将附加的管加至该标准组以提供对特定亚群更详细的分析或为新亚群的增加标记。由于消除了与聚蔗糖-泛影葡胺密度沉积低温保存和重融相关的可变性,全血的使用促进了准确计数各样本中特定细胞的绝对数。

[0525] Treg和Tcon体内平衡:对Treg和Tcon亚群的分析利用之前开发的表型和功能分析(Matsuoka等人,(2010) J.Clin.Invest.120:1479-1493)。以下表15中汇总了标记的表型组。

[0526]

| 表 15 用于分析 Treg 和 Tcon 体内平衡的多参数单克隆抗体组 |      |       |        |        |       |       |      |      |
|--------------------------------------|------|-------|--------|--------|-------|-------|------|------|
| 管                                    | V450 | Pac 橙 | APC-H7 | PE-Cy7 | APC   | PerCP | PE   | FITC |
| 1                                    | CD3  | CD8   | CD4    | CD45RA | CD62L | FOXP3 | CD31 | Ki67 |
| 2                                    | CD3  | CD8   | CD4    | CD45RA | CD62L | FOXP3 | CD95 | BCL2 |

[0527] 这些分析提供了一种定量方式以评估胸腺新生,以及表型上定义明确的T细胞亚群的增殖和程序性凋亡敏感性。聚焦于T细胞新生(例如,CD45RA+CD31+)、增殖(例如,Ki-67)、活化(例如,pSTAT5)和存活(例如,Bcl-2)的不同测量,它们提供了各T细胞群体的稳态平衡的详细评估。流式分选的细胞群还可用于体外功能分析(例如,通过Fas诱导实验的程序性凋亡抑制;通过CFSE稀释的Tcon抑制、胸苷掺入、或IFN- $\gamma$  试验)。相同样本内Treg和Tcon亚群的内部交叉比较提供了一种评估差别效应和对共同体内环境的反应的独特方式。在定义间隔的结果的比较识别在一段时间内稳态平衡的改变。

[0528] 血浆细胞因子的测量:通过在1000x g下全血离心15分钟来分离血浆,并在-70℃

下储存库等分。使用ELISA以测量不同时间点的稳态细胞因子水平。将结果与流式细胞术、功能分析和临床结果相关联。当前使用市售的高灵敏性和可再生试剂盒：人IL-2化学发光ELISA (Pierce: 产品#84772) ; Quantikine免疫测定人IL-7HS (R&D: 产品#HS750) ; 和 QuantiGlo®化学发光免疫测定人IL-15 (R&D: 产品#Q1500B) 。遵循推荐的程序, 包括一式两份使用样本, 采用适当的标准稀释和对照。在各96孔测试板上包括三份已知浓度的样本以评估批间精度。使用Spectra 180酶标仪 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 测量分析结果。

[0529] TCR序列分析: 分析来自采用的Treg富集细胞产物和来自在基线时以及低剂量IL-2后的患者系列PBMC样本的CD3+CD4+CD25<sup>中-高</sup>CD127<sup>低</sup>Treg和CD3+CD4+CD25<sup>阴-低</sup>CD127<sup>中-高</sup>Tcon。基于以上免疫表型概况通过细胞分选纯化Treg和Tcon (各自>25,000细胞), 在装载用于ImmunoSeq分析之前在板上点样各样本400-1200ng提取的dsDNA。

[0530] 相关分析: 在探索性统计分析中, 确定在一段时间内测量的临床 (例如, cGVHD特性和/或伴随试剂) 或免疫学变量 (例如, IL-2前后的Treg计数、Treg/Tcon比率、Treg扩张) 和治疗反应的关联。

[0531] 根据以下合格标准选择参与者:

[0532] 1) 7-8/8HLA-匹配的 (HLA-A, -B, -C, -DRB1) 同种异体造血干细胞移植的接受者;

[0533] 2) 参与者必须是尽管使用2种或多种治疗却具有类固醇难治性cGVHD。类固醇难治性cGVHD被定义为尽管使用 $\geq 0.25\text{mg/kg/天}$  (或每隔一天 $0.5\text{mg/kg}$ ) 的强的松至少4周 (或等价剂量的替代糖皮质激素) 却具有持续的cGVHD体征和症状 (表2和3), 没有完全消退体征和症状。患有需要系统治疗的广泛的慢性GVHD或有限的慢性GVHD的参与者是适合的;

[0534] 3) 招募之前接受4周稳定剂量的糖皮质激素;

[0535] 4) 招募之前4周末加入或减去其他免疫抑制药物 (例如, 钙调磷酸酶-抑制剂、西罗莫司、吗替麦考酚酯)。免疫抑制药物的剂量可基于该药物的治疗范围进行调整;

[0536] 5) 患者年龄 $\geq 18$ 岁。因为关于在<18岁的参与者中使用IL-2, 当前没有可用的剂量或不良事件数据, 将儿童从该研究排除;

[0537] 6) ECOG表现状态0-2 (表4);

[0538] 7) 参与者必须具有如下定义的足够器官功能: a) 肝: 足够的肝功能 (总胆红素 $\leq 2.0\text{mg/dl}$ -在患有Gilbert综合症的参与者中例外允许; AST (SGOT) /ALT (SGPT)  $\leq 2 \times \text{ULN}$ ), 除非肝功能缺陷是推测的cGVHD的表现。对于将具有异常的肝功能检查 (LFTs) 作为cGVHD的唯一表现的参与者, 将需要在招募之前在肝活检组织上有记录在案的GVHD。若治疗医师将异常LFTs记录为与肝cGVHD相符, 则涉及其他器官系统的活性cGVHD背景下的异常LFTs也是允许的, 且在该情况下将不强制进行肝活检; b) 肺: FEV1 $\geq 50\%$ 或DLCO (Hb)  $\geq 40\%$ 预测值, 除非肺功能障碍被认为是由于慢性GVHD; c) 肾: 血清肌酐小于正常机构限值的上限或对于肌酐水平在机构正常值之上的参与者肌酐清除率 $\geq 60\text{mL/min/1.73m}^2$ ; d) 通过以下指示的足够的骨髓功能: ANC $> 1000/\text{mm}^3$ 和血小板 $> 50,000/\text{mm}^3$ , 无生长因子或输血; 和e) 心脏: 招募之前6个月内无心肌梗死或NYHA III或IV级心力衰竭、不受控制的心绞痛、严重不受控制的室性心律失常、或急性缺血或主动传导系统异常的心电图证据。研究进入之前, 筛查时的任何ECG异常必须是研究者记录为非医学相关的;

[0539] 8) IL-2对发育中的人类胎儿的作用是未知的。因为该原因且因为已知化疗剂是致

畸的,具有怀孕可能性的女性和男性必须同意在研究进入之前和参与研究期间使用充分避孕(激素或屏障的生育控制方法;禁欲)。当参与该研究时若女性受孕或疑似受孕,则她应当立即告知其治疗医师;和

[0540] 9) 对签署书面知情同意书具有理解能力和意愿。

[0541] 根据以下排除标准排除参与者:1) >1mg/kg/天的持续强的松(或等价物)剂量需求;2) 同时使用钙调磷酸酶-抑制剂加上西罗莫司的参与者(单独的任一试剂是可接受的);3) 血栓性微血管病、溶血性尿毒症综合征或血栓性血小板减少性紫癜病史;4) 之前4周内新的慢性GVHD治疗(例如,格列卫、体外光分离置换、利妥昔单抗、免疫抑制药物);5) 之前4周内低剂量IL-2治疗;6) 之前100天内移植后暴露于T细胞或替代的IL-2靶向药物治疗(例如,ATG、阿伦单抗、巴利昔单抗、地尼白介素-白喉毒素连接物);7) 之前100天内供体淋巴细胞输注;8) 活性恶性病复发;9) 活性不受控制的感染;10) 不能遵从IL-2治疗方案;11) 器官移植(同种异体移植)接受者;12) 处于联合抗逆转录病毒治疗的HIV-阳性个体是不适合的,因为与同种异体HSCT后使用的试剂有药代动力学相互作用的可能性。此外,这些个体处于增加的致命感染的风险中。当指示时在接受联合抗逆转录病毒治疗的参与者中进行适当的研究;13) 具有活性不受控制的乙型肝炎或丙型肝炎的个体是不适合的,因为他们处于HSCT后致命的治疗相关肝毒性的高风险中;14) 招募之前4周内其它研究药物,除非项目负责人放行了(cleared);和15) 因为致畸或堕胎作用的可能性而从该研究排除孕妇。因为在乳儿中具有承继于接受治疗的母亲的未知但潜在的不良事件风险,所以应停止母乳喂养。

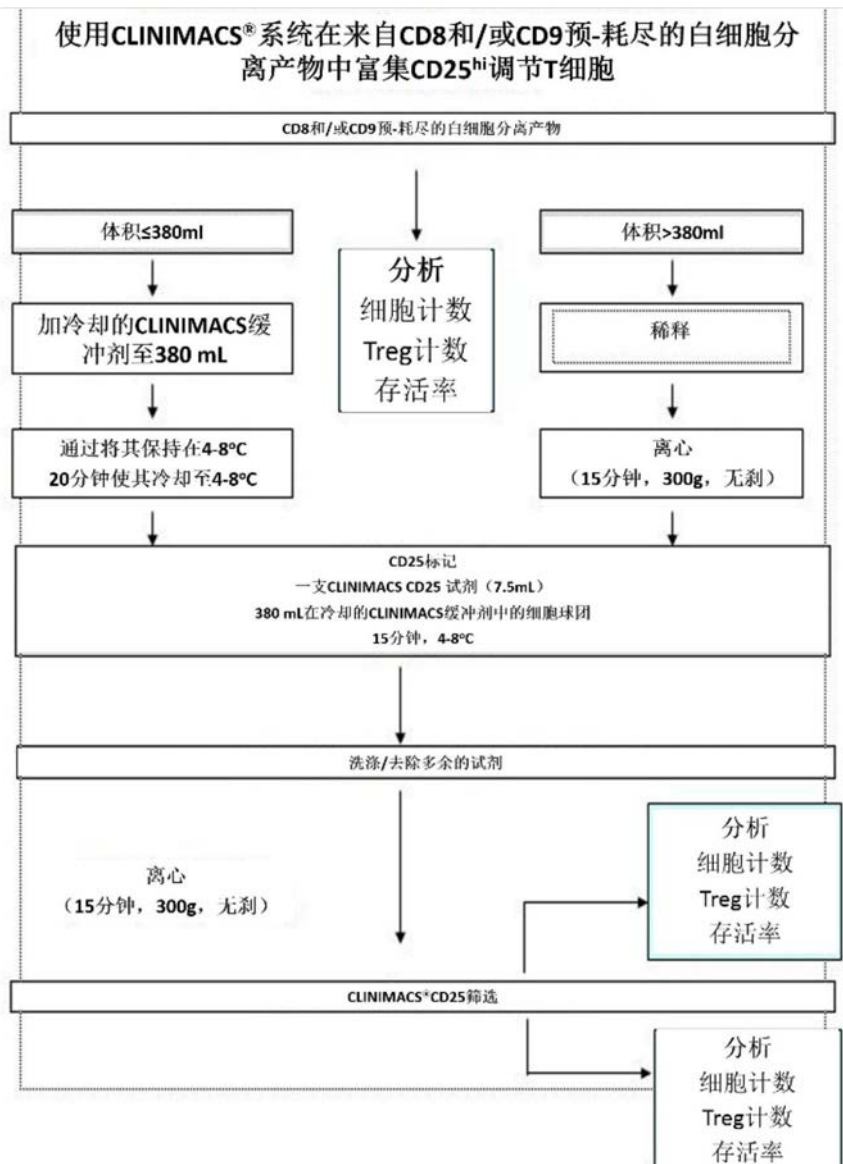
[0542] 根据以下治疗方案治疗受试者:

[0543] 供体白细胞分离产物:用于该研究的清血法相比于通常未改变的白细胞分离法未给供体带来任何增加的风险。相同的原始造血干细胞供体将经历清血法以获得供体淋巴细胞。当可能时,这通过外周静脉途径进行。供体评估和清血法可在其它中心(包括国际站点)进行,并需要按照各供体中心的标准操作程序完成适当的同意书和医学评估。遵循21CFR 1271的C部分评估所有供体并按照用于移植受体以及他们的各自供体的那些规定对其进行处理。供体淋巴细胞优选采集自单一清血法。清血法后,一小份产物经历分析以确定基线细胞计数、存活率和微生物学/无菌检验。若按照CMCF是足够的,则如下详述地处理产物并在完成处理的36小时内输注。

[0544] 研究治疗:Treg富集细胞产物:一旦收到供体白细胞分离产物,则根据制造商的说明(Miltenyi Biotec)使用临床级CliniMACS试剂系统对其进行连续的2步Treg细胞富集:i) CD8+/CD19+共耗尽(2.1耗尽程序,CliniMACS);然后是ii) CD25+阳性选择(3.1富集程序,CliniMACS)。用于该制备的详细方案以及CliniMACS试剂系统的使用是按照CliniMACS用户手册(表16)。例如,受试者的先前干细胞供体可经历清血法以获得用于受试者的供体淋巴细胞。若适当的话(最小剂量 $\geq 3 \times 10^7$  CD3+细胞/kg),则如下所述处理产物并在规定的产物过期时间内输注。一旦收到供体白细胞分离产物,则根据制造商的说明(Miltenyi Biotec)使用临床级CliniMACS试剂系统对其进行CD8+/CD19+共耗尽然后是CD25+阳性选择的连续2步Treg细胞富集。使用处理之前和完成Treg富集之后移出的样本以确定细胞活力并计数CD3+、CD4+、CD8+、CD25+、CD127+和FoxP3+细胞。将产物表示为“Treg富集细胞”。释放的标准包括:产物中>70%细胞活力,革兰氏阴性染色; $\geq 90\%$  CD4+CD25+;和 $\geq 50\%$  FoxP3+细胞。

[0545] 表16

[0546]



[0547] 细胞产物评估:在处理之前和完成Treg富集之后移出样本。将这些用于在处理之前和/或之后确定细胞活力并计数CD3+、CD4+、CD8+、CD25+、CD127+和FOXP3+细胞(必要时组合,例如CD4+CD25+FOXP3+细胞)。还进行革兰氏染色、内毒素和无菌检验。将产物表示为“Treg富集细胞”。释放的标准包括:产物中通过台盼蓝测定≥70%细胞存活率、革兰氏阴性染色/内毒素、≥70%CD4+CD25+和≥50%CD4+CD25+CD127-细胞(表17)。

[0548] 表17

[0549] A. 针对释放标准的ClinMACS选择后/输注前测试

| 样本     | 进行的测试       | 测试设备 | 发布标准                                                                                                                   |
|--------|-------------|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| [0550] | 选择后/<br>输注前 | CMCF | <b>剂量 A: <math>0.1 \times 10^6</math> 细胞/kg (起始水平)</b><br>剂量 B: $0.3 \times 10^6$ 细胞/kg<br>剂量 C: $1 \times 10^6$ 细胞/kg |
|        | 细胞活力        | CMCF | 通过台盼蓝测定 $\geq 70\%$                                                                                                    |
|        | 革兰氏染色       | CMCF | 无生物体                                                                                                                   |
|        | 内毒素         | CMCF | $< 5$ EU/ml                                                                                                            |
|        | 免疫表型        | CMCF | $\geq 70\%$ CD4+CD25+细胞                                                                                                |
|        | 免疫表型        | CMCF | $\geq 50\%$ CD25+CD127-细胞                                                                                              |

[0551] \*目标剂量,然而也可输注具有较低细胞剂量的产物。

[0552] B. 用于文件编制的输注后测试

| 样本     | 进行的测试 | 测试设备 | 标准      |
|--------|-------|------|---------|
| [0553] | 输注后   |      |         |
|        | 无菌    | CMCF | 14 天无生长 |

| 试验    | 处理前 | Treg富集产物 | 发布标准 |
|-------|-----|----------|------|
| 革兰氏染色 |     | X        | X    |
| 内毒素   |     | X        | X    |
| 总有核细胞 | X   | X        | X*   |
| 免疫表型  | X   | X        | X*   |
| 生活力   | X   | X        | X    |
| 无菌    | X   | X        |      |

[0555] \*需要确定CD3、CD4、CD25、CD127计数

[0556] 值得注意的是,目标Treg富集细胞剂量/kg不是释放标准。即便在获得必需QC样本后细胞剂量/kg在可用的最大细胞数上低于目标也输注产物。

[0557] Treg富集细胞剂量:参与者以供体Treg富集的总有核细胞的确定剂量作为目标。初始募集是在目标剂量水平A。随后的列组将按照以下计划剂量递增

[0558] \*接受者重量

| 列组                         | Treg富集细胞剂量 (活细胞/kg*)                |
|----------------------------|-------------------------------------|
| [0559] <b>剂量水平A (起始剂量)</b> | $0.1 \times 10^6$                   |
| 剂量水平B                      | <b><math>0.3 \times 10^6</math></b> |
| [0560] 剂量水平C               | $1 \times 10^6$                     |

[0561] 这是I期剂量发现设计:在给定的剂量水平应计5名参与者(在初始4名参与者积累(accrued)后具有强制的28天中断)。若5名中 $\leq 1$ 名经28天具有DLT,则进行剂量递增。若这是剂量水平C,则该剂量是MTD。若群体中 $\geq 2$ 名参与者经历DLT,则该MTD被认为是超出的。若这是剂量水平A,则停止积累。若这是剂量水平B,则剂量水平A是MTD。若这是剂量水平C,则剂量水平B是MTD。然后在推定的MTD积累另外10名参与者以进一步评估毒性和功效。

[0562] Treg富集细胞输注:在CliniMACS细胞产物已通过释放标准(表17)之前不将其给

予。若不符合释放标准,则不输注产物,且患者不可评估DLT,但产物可评估可行性。如本文所述确定生成适当的Treg富集产物的可行性。

[0563] 一旦已符合释放标准,则通过中央或外周静脉导管将产物输注入接受者。通过静脉导管经~5-10分钟输注细胞。在输注前Tylenol 650mg PO和Benadryl 25mg IV术前用药是通常的(但不必需)。结束输注后监测参与者的输液反应发展~1小时。利用超过剂量输注的Treg富集细胞小份用于表型、功能和/或DNA、RNA和蛋白研究。按照标准操作程序冷冻保存任何剩余的Treg富集细胞用于未来的质量控制应用和相关性分析。

[0564] 白细胞介素-2:Treg富集细胞输注日开始,各参与者接受每日皮下IL-2用于自我给药8周,然后是4周的中断(除非应用根据本发明方法的多次-可变剂量IL-2方案)。以门诊治疗标准给予IL-2。在实施例2中描述预期的毒性和潜在风险以及剂量改变。

[0565] 伴随继续无剂量改变的IL-2和强的松(或等价类固醇)和其它试剂的给予。在研究的初始6周期间不允许递减强的松,但其后在治疗医师的裁量下(例如类固醇毒性)可在反应者中减少强的松(在按照NIH cGVHD标准记录反应后)。值得注意的是,其它免疫抑制药物递减期间临床稳定的cGVHD被认为是功效的证据;且其它免疫抑制疗法递减期间cGVHD的进展不被认为是毒性或缺乏功效的证据。

[0566] 延长期限的治疗:完成研究期(8周IL-2研究治疗和4周停止IL-2)后,允许经历临床受益(完全或部分反应;以及不符合NIH部分反应标准的微反应)并具有可接受的毒性概况的参与者在治疗医师的裁量下继续延长期限的IL-2治疗。每6个月的延长IL-2治疗后再评估参与者以确定是否应在治疗医师的裁量下继续IL-2治疗,该治疗医师记录继续IL-2治疗的理由。

[0567] 进行延长期限的IL-2治疗的参与者不可评估I期毒性终点(例如,为了细胞剂量递增/递减目的)。延长期限的IL-2期间其它免疫抑制药物的递减是由治疗医师裁量。在治疗医师的裁量下,继续进行延长期限的治疗的参与者允许加入其它cGVHD治疗以增强反应。在可归因于IL-2的毒性事件中,在治疗医师的裁量下允许按照指南进行剂量改变。在进行延长期限的IL-2治疗时的以下建议时间表评估参与者:1)每4周(±2周)门诊随访和实验室(CBC、肌酐、ALT、AST、总胆红素)评估IL-2的毒性和临床受益;2)每8周(±2周)免疫试验,其包括定量血清免疫球蛋白;血浆储存入库;和其他单核细胞的储存;和3)每16周(±4周)cGVHD评估和cGVHD症状记分表直至自IL-2治疗1年或参与者停止IL-2治疗,取其先到期者。

[0568] 在治疗所有参与者之前2周内进行以下评估:1)病史和治疗患者疾病的基本原理的文档(包括类固醇剂量);2)体格检查,包括生命体征、体重、表现状况;3)cGVHD评估;4)生育潜能女性的妊娠试验;5)传染性标记测试;6)肺功能检查(之前4周内);7)血液学:具有分类的全血细胞计数(CBC);8)血清化学:葡萄糖、BUN、肌酐、尿酸、总胆红素、碱性磷酸酶、LDH、总蛋白、白蛋白、AST、ALT、和钙;9)甲状腺功能测试(TSH,T4,游离-T4);10)CMV病毒载量;和11)免疫学:定量血清免疫球蛋白;血浆存储入库;和他单核细胞储存。

[0569] 除非另有指明,否则在治疗具有涉及特定器官的cGVHD的参与者之前两周内需要以下评估:1)采用希曼试验的眼部检查,对于具有眼部cGVHD的参与者(可选的);2)皮肤病学评估,对于具有皮肤cGVHD的参与者;3)口腔检查(±活检),对于具有口腔cGVHD的参与者(可选的);和4)受影响关节的屈曲评估,对于具有与cGVHD相关的挛缩或肌肉骨骼涉及的个体。

[0570] 治疗(1、2、3、4、6、8周的结束)、停止IL-2(10、12周的结束)和延长观测(16、20、24周的结束)期间评估包括:1)病史和临床检查;2)与病史和临床检查同日进行的毒性评估;3)血液学:具有分类的CBC;4)血清化学:葡萄糖、BUN、肌酐、尿酸、总胆红素、碱性磷酸酶、LDH、总蛋白、白蛋白、AST、ALT、和钙;5)CMV病毒载量;6)免疫学:定量免疫球蛋白;血浆存银;和附加单核细胞储存;和7)甲状腺功能测试(TSH、T4、游离-T4)(8、16、24周)。

[0571] 对于具有涉及特定器官的cGVHD的参与者,除非另有指明,否则在结束8周的研究治疗时以及在类固醇递减时(若更早的话)需要以下评估(除了cGVHD症状评分以外):1)类固醇剂量;2)采用希曼试验的眼部检查,对于具有眼部cGVHD的参与者(可选的);3)皮肤病学评估,对于具有皮肤cGVHD的参与者;4)口腔检查(±活检),对于具有口腔cGVHD的参与者(可选的);5)肺功能测试,对于具有肺部cGVHD临床表现的参与者;和6)受影响关节的屈曲评估,对于具有与cGVHD相关的挛缩或肌肉骨骼涉及的个体。

[0572] Treg富集细胞输注的不良事件列表:用于治疗恶性疾病复发的未经选择的供体淋巴细胞输注已与Tcon介导的GVHD恶化以及与主要在涉及骨髓的重大白血病/淋巴瘤情况下的骨髓抑制相关。然而,Treg是Tcon的主导抑制物,且CliniMACS Treg富集产物即便在1:2的Treg:Tcon比率下也是体外抑制性的,在不具有活性GVHD或恶性疾病复发的HSCT接受者中,达 $4 \times 10^6$ 细胞/kg的输注后也未报告毒性(Di Ianni等人,(2011)Blood117:3921-3928)。因此,据信以包含 $\geq 50\%$ CD4+CD25+CD127-Treg(在1:2的Treg:Tcon抑制作用比率之上)的 $0.5 \times 10^6$ 细胞/kg的起始剂量水平输注Treg富集产物是安全的。监测GVHD进展和骨髓抑制以确认活性cGVHD中Treg富集细胞输注的安全性。

[0573] 下表是用于记录的数据的汇总:

[0574] 表18

[0575]

|                   | IL-2 之前<br>2周内 | IL-2 治疗期间<br>(1、2、3、<br>4、6周的结<br>束) <sup>a</sup> | 8周的<br>结束 <sup>a</sup> | 10、12<br>周的结<br>束 <sup>a</sup> | 16、20、<br>24周的结<br>束 <sup>b</sup> |
|-------------------|----------------|---------------------------------------------------|------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| 病史                | X              | X                                                 | X                      | X                              | X                                 |
| 体格检查              | X              | X                                                 | X                      | X                              | X                                 |
| 毒性评估              |                | X                                                 | X                      | X                              | X                                 |
| cGVHD 症状评分        | X              |                                                   | X                      | X                              |                                   |
| 传染性疾病标记           | X              |                                                   |                        |                                |                                   |
| EKG               | X              |                                                   |                        |                                |                                   |
| 妊娠试验 <sup>†</sup> | X              |                                                   |                        |                                |                                   |
| 肺功能               | X <sup>d</sup> |                                                   | o                      |                                |                                   |
| 皮肤病学评估            | o              |                                                   | o                      |                                |                                   |
| 口腔评估              | o              |                                                   | o                      |                                |                                   |
| 屈曲评估              | o              |                                                   | o                      |                                |                                   |
| 眼部评估              | o              |                                                   | o                      |                                |                                   |
| 具有分类的 CBC         | X              | X*                                                | X                      | X                              | X                                 |

|        |                    |   |    |   |   |                |
|--------|--------------------|---|----|---|---|----------------|
| [0576] | 血清化学               | X | X* | X | X | X              |
|        | 免疫学 <sup>1</sup>   | X | X  | X | X | X              |
|        | 类固醇评估 <sup>2</sup> | X |    | X |   |                |
|        | CMV 病毒载量           | X | X  | X | X | X              |
|        | 甲状腺功能              | X |    | X |   | X <sup>c</sup> |
|        | 药物日志 <sup>a</sup>  |   | X  | X |   |                |

[0577] X-需要评估

[0578] o-具有这些器官系统的临床牵连的参与者需要

[0579] 1免疫学:定量免疫球蛋白;血浆存储;其他单核细胞储存

[0580] 2在8周之前不应递减系统性类固醇,除非认为医疗需要(例如类固醇毒性),且若在早期递减,进行‘8周等价’cGVHD评估以记录反应

[0581] a 1、2、3、4、6、8、10、12周的测试将±4天进行,以考虑到周末、假日等附近的时间安排和管理灵活性。

[0582] b 16、20、24周的测试将±7天进行,用于时间安排和管理灵活性。对于接受延长的IL-2的参与者,还请参考针对附加随访需求的相关试验方案章节。

[0583] c 16、24周

[0584] d测试可安排至直至4周前,以考虑到时间安排和管理灵活性

[0585] \*在IL-2开始后还将进行4天(+/-1天)CBC/手动分类、血清肌酐和LDH的附加实验室测试,以评估与血栓性微血管病相关的贫血、血小板减少、裂细胞和/或肾功能不全。

[0586] ¶对于具有妊娠可能的女性。

[0587] +对于开始的8周IL-2,至少每2周完成并回到临床;且对于延长期限的IL-2,至少每8周。

[0588] 评估毒性和反应二者。接受Treg富集细胞输注的参与者可评估毒性。已接受Treg富集细胞输注加上至少6周IL-2的参与者被认为可评估反应的缺乏。这些参与者具有根据本文所述定义分类的他们的反应。例如且在实施例2中定义之外,慢性GVHD症状评分是指参与者使用经确认的慢性GVHD症状量表自我报告cGVHD的症状和体征。在基线和8、10、12周的结束时(以及在8周之前早期类固醇递减的时间,如果必要的话)获得自我报告的症状量表。慢性GVHD的类固醇使用是指参与者在基线时以及在8周IL-2结束时记录其皮质类固醇的每日总剂量。在替代的皮质类固醇每日剂量的情况下,为研究目的记录平均日剂量。免疫评估是指参与者经历针对免疫功能的测试,其在IL-2开始之前,以及在1、2、3、4、6、8、10、12、16和24周的结束时进行。测试包括定量免疫球蛋白;血浆存储;和其他单核细胞储存。

[0589] 该I期研究的主要终点是确定连同 $1 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>/天皮下IL-2给予至具有需要系统治疗的类固醇难治性慢性GVHD的接受者的Treg富集细胞的MTD。在8周IL2治疗后通过DLT评估MTD。考虑三个Treg富集细胞递增剂量以确定MTD: $0.1 \times 10^6$  细胞/kg (剂量水平A); $0.3 \times 10^6$  细胞/kg (剂量水平B); $1 \times 10^6$  细胞/kg (剂量水平C)。直至 $4 \times 10^6$  Treg富集细胞/kg的剂量按照文献是良好耐受的,但在该研究中 $0.1 \times 10^6$  Treg富集细胞/kg将为初始剂量水平以提供分析缓冲。一组5名接受符合发布标准的产品的可评估参与者以各目标剂量水平进入(在初始4名参与者积累后具有28天中断)。若参与者未发展DLT而需要从该研究早期移除,则他们被认为不可用于确定MTD的评估。在特定剂量组招募额外的参与者以替代该组内从研究移除的

任何参与者。若在1组5名参与者内观测到 $\leq 1$ DLT,则进行剂量递增。若这是剂量水平C,则该剂量为MTD。若在1组中观测到 $\geq 2$ DLT,则该MTD被认为是超出的。若这是剂量水平A,则停止积累。若这是剂量水平B,则剂量水平A是MTD。若这是剂量水平C,则剂量水平B是MTD。

[0590] 采用该设计,若真实但未知的DLT率是10%,则剂量递增的概率是0.92;若DLT率是20%则概率是0.74,但若DLT率是40%则概率是0.34。下表19提供了剂量递增的操作特性。

[0591] 表19操作特性

| 真实但未知的DLT率             | 10%  | 20%  | 30%  | 40%  | 50%  | 60%  |
|------------------------|------|------|------|------|------|------|
| 剂量递增的概率(5名中 $\leq 1$ ) | 0.92 | 0.74 | 0.53 | 0.34 | 0.19 | 0.09 |

[0593] 一旦确立MTD,则在MTD下治疗附加的10名可评估参与者。采用10名可评估参与者,针对毒性的90%置信区间的最大宽度是在 $\pm 28\%$ 以内。样本大小范围将为约2-25名可评估的参与者,其取决于经测试剂量水平的数目。

[0594] 还分析次要终点。例如,进行CliniMACS评估。评估使用CliniMACS装置实现成功的Treg富集输注产品的可行性。若白细胞分离产物包含 $\geq 70\%$ 细胞活力、阴性微生物学,则认为其适合用于确定CliniMACS选择的可行性。输注的CliniMACS产物在处理后的产物包含 $\geq 70\%$ 细胞活力、革兰氏阴性染色/内毒素、 $\geq 70\%$ CD4+CD25+细胞和 $\geq 50\%$ CD4+CD25+CD127-Treg,并适合用于MTD评估。若用于确定MTD的适合产物的比率(可行率)是80%或更高则认为CliniMACS系统是可行的,且若50%或更低则认为其是不可行的。在开始的10个产物中,若只有6个或更少的产物符合这些标准,则认为该系统是不可行的。相反地,若开始的10个产物中 $\geq 7$ 个符合该标准,则研究继续进行。采用该决策规则,若真实但未知的可行率是50%则早期停止的概率是0.83,且若可行率是80%则概率是0.12。还评估了制造Treg富集产物符合目标细胞剂量水平的可行性。若实际实现的细胞剂量低于目标剂量水平,则实际给予的细胞剂量表明选择用于10名患者扩大组的推定MTD。

[0595] 次要终点还包括临床响应,如通过简单描述性汇总统计描绘的Treg富集输注加上8周低剂量IL-2的完全和部分反应、稳定和进展的疾病、以及免疫效应所汇总的。主要叙述性和图表性分析次要终点。特别地,表征Treg富集输注加上8周低剂量IL-2同时在细胞数目和细胞因子产生中的治疗前和治疗后改变两方面,对B细胞、NK细胞或树突细胞的免疫效应。此外,若样本大小允许,则探索反应的临床(患者和移植相关的)和生物(例如Treg、Tcon数目、Treg:Tcon比率和Treg功能)预测器。

[0596] 还对反应进行监测。接受至少6周IL-2的参与者可评估反应的缺乏,即便具有主要试验方案治疗差异或即便他们是不适合的。分配各参与者以下类别中的一种:1)按照NIH标准完成完全cGVHD响应,2)按照NIH标准部分cGVHD响应,3)按照NIH标准无反应(包括病情稳定),4)按照NIH标准进展性cGVHD,5)恶性疾病复发,6)因毒性的早期死亡,7)因为其它原因的早期死亡,或9)未知(不能评估,数据不足)。通过任意约定,类别9通常指定临床数据库中任意数据类型的“未知”状态。

[0597] 还对毒性进行监测。接受Treg富集细胞产物的所有参与者可评估毒性。cGVHD的进展(按照NIH标准)被认为是DLT。在之前研究中,无患者在8周IL-2期间经历cGVHD进展以致他们按照治疗医师的判断需要附加的治疗或增加类固醇。还评估参与者的恶性疾病复发和感染。

[0598] 实施例4:与体外光分离置换法(ECP)相结合的代表性低剂量IL-2治疗方案

[0599] 以下提供了与ECP相结合的低剂量IL-2治疗方案的代表性、非限制性实施方式。在其它实施方式中,低剂量IL-2治疗方案可替换为实施例1的多次-可变剂量IL-2治疗方案和/或本文所述的方法,包括来自任意实施例的任意组合。例如且除非另外指明,来自实施例2的标准可全部或部分与以下实施例4中所述的那些一起使用。

[0600] ECP最常见的适应症是同种异体HSCT后糖皮质激素难治性cGVHD。在急性GVHD的小鼠模型中的初始研究表明ECP的治疗机制依赖于 $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ 的调节性T细胞( $T_{reg}$ ),其用于控制由常规T细胞( $T_{con}$ )介导的自体 and 同种免疫反应。然而,支持该ECP  $T_{reg}$  假说的人类数据是缺乏的。平行地,用于糖皮质激素难治性cGVHD的低剂量白细胞介素-2(IL-2)的人类试验显示出伴随体内 $T_{reg}$ 数目和功能增加的临床响应。然而,半数治疗患者未具有临床响应且长期ECP期间免疫抑制物的递减是缓慢的,且经常不完全(Dignan等人,(2012) Br.J.Haematol.58:62-78;Flowers等人,(2008) Blood 112:2667-2674)。在ECP患者中没有以下研究:1) 报道定量的Treg和DC亚群数据,2) 报道相关的细胞因子改变,或3) 将任意这些改变与ECP剂量或淋巴细胞凋亡程度相关联。ECP和低剂量IL-2二者在cGVHD中均具有可测量的临床疗效。

[0601] 基于本文所述的结果,据信联合干预策略显著调节 $T_{reg}$ 扩张以更好抑制cGVHD,以及期望抑制免疫反应的其它病症。IL-2同时在体外和体内递送增殖和存活信号至 $T_{reg}$ 。

[0602] 实际上,4名受试者已如本文所述接受IL-2和ECP用于难治性皮肤cGVHD而无副作用。全部在3个月时具有客观的cGVHD反应,具有增加的皮肤柔韧度,且全部被选择继续IL-2和ECP。重要的是,2名测试受试者中的2名采用IL-2和ECP相比于单一疗法具有体内Treg上升。一名对IL-2具有部分反应的患者在延长期限的IL-2治疗期间开始ECP,相比于单独的IL-2具有增强的cGVHD临床响应和Treg的1.7倍上升。在对ECP反应不足的另一患者中,加入低剂量IL-2诱导cGVHD响应伴随相比于单独的ECP的Treg的33倍上升。

[0603] 该研究扩大至在1-16周每周两次ECP的16周试验,在8-16周期间以 $1 \times 10^6$  IU/ $m^2$ /天的剂量连续加入每日低剂量IL-2,目标是优化用于cGVHD的ECP治疗。在一些实施方式中,该研究是12周研究,其中具有类固醇难治性cGVHD的患者将接受1-12周ECP,连续加入低剂量IL-2 6-12周。

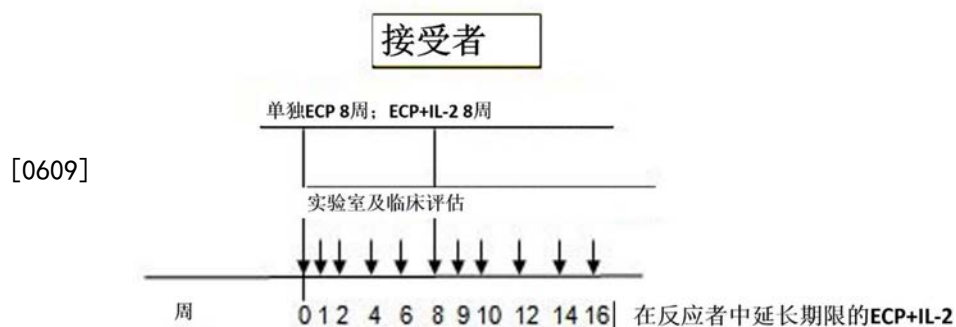
[0604] 使用以下患者群体标准:1) 具有需要系统治疗的cGVHD的患者。具有需要系统治疗的广泛cGVHD或有限cGVHD的患者是有资格的;和2) 对至少4周的 $\geq 0.25$  mg/kg/天剂量的强的松(或等价物)反应不足。

[0605] 以下详述了特定的入选和排除标准:

[0606] 1) 参与者数目:25-34;

[0607] 2) 研究设计和方法学:

[0608] II期



[0610] 安全性和有效性分析如下：主要终点是确定在类固醇难治性cGVHD中ECP加上低剂量每日SC IL-2的总体临床响应率。例如，可评估16周时的总体cGVHD反应率、加至ECP的8周每日IL-2的毒性、ECP加上低剂量IL-2的免疫效应、ECP加上低剂量IL-2期间的强的松使用、以及研究进入后的总体和无进展存活、非复发死亡率和1年时复发。次要终点是1) 确定ECP加上低剂量SC IL-2治疗的毒性；2) 评估ECP加上低剂量每日SC IL-2的免疫效应；3) 确定采用ECP加上低剂量IL-2治疗的持续强的松使用；和4) 评估开始ECP加上低剂量IL-2后的总体存活、无进展存活、非复发死亡率和1年时复发。

[0611] 根据以下合格标准选择参与者：

[0612] 1) 7-8/8HLA-匹配的成人供体同种异体干细胞移植的接受者，具有清髓性或非清髓性预处理方案；

[0613] 2) 参与者必须具有类固醇难治性cGVHD。类固醇难治性cGVHD被定义为尽管使用 $\geq 0.25\text{mg/kg/天}$  (或每隔一日 $0.5\text{mg/kg}$ ) 的强的松至少4周 (或等价剂量的替代皮质类固醇) 却具有持续的cGVHD体征和症状 (表2和3)，没有完全消退体征和症状。患有需要系统治疗的广泛慢性GVHD或有限慢性GVHD的患者是适合的；

[0614] 3) 招募之前接受4周稳定剂量的皮质类固醇；

[0615] 4) 招募之前4周末加入或减去其他免疫抑制药物 (例如，钙调磷酸酶-抑制剂、西罗莫司、吗替麦考酚酯)。免疫抑制药物的剂量可基于该药物的治疗范围进行调整；

[0616] 5) 患者年龄 $\geq 18$ 岁。因为关于在 $< 18$ 岁的参与者中使用IL-2，当前没有可用的剂量或不良事件数据，将儿童从该研究排除；

[0617] 6) 估计的预期寿命大于3个月；

[0618] 7) ECOG表现状态0-2 (表4)；

[0619] 8) 参与者必须具有如下定义的足够器官功能：a) 肝：足够的肝功能 (总胆红素 $< 2.0\text{mg/dl}$  - 在患有Gilbert综合征的患者中例外允许；AST (SGOT) /ALT (SGPT)  $\leq 2 \times \text{ULN}$ )，除非肝功能缺陷是推测的cGVHD的表现。对于将具有异常的肝功能检查 (LFTs) 作为cGVHD的患者，将需要在招募之前在肝活检组织上有记录在案的GVHD。若治疗医师将异常LFTs记录为与肝cGVHD相符，则涉及其他器官系统的活性cGVHD背景下的异常LFTs也是允许的，且在该情况下将不强制进行肝活检；b) 肾：血清肌酐在正常机构限值内或对于肌酐水平在机构正常之上的参与者水平肌酐清除率 $\geq 60\text{mL/min/1.73m}^2$ ；c) 通过以下指示的足够的骨髓功能：ANC $> 1000/\text{mm}^3$ 和血小板 $> 50,000/\text{mm}^3$ ，无生长因子或输血；和d) 心脏：招募之前6个月内无心肌梗死或NYHA III或IV级心力衰竭、不受控制的心绞痛、严重不受控制的室性心律失常、或急性缺血或主动传导系统异常的心电图证据。研究进入之前，任何ECG异常必须是研究者记录为非医学相关的；

[0620] 9) IL-2对发育中的人类胎儿的作用是未知的。因为该原因且因为已知化疗剂是致畸的,具有怀胎可能的女性和男性必须同意在研究进入之前和参与研究期间使用充分避孕(激素或屏障的生育控制方法;禁欲)。当参与该研究时若女性受孕或疑似她受孕,则她应当立即告知其治疗医师;和

[0621] 10) 对签署书面知情同意书具有理解能力和意愿。

[0622] 根据以下排除标准排除参与者:1) >1mg/kg/天的持续强的松(或等价物)剂量需求;2) 同时使用钙调磷酸酶-抑制剂加上西罗莫司的参与者。单独的任一试剂是可接受的;3) 血栓性微血管病、溶血性尿毒症综合征或血栓性血小板减少性紫癜病史;4) 招募之前4周内暴露于任何新的免疫抑制药物;5) 招募之前4周内体外光分离置换(ECP)或利妥昔单抗;6) ECP的任何禁忌症,即肝素或8-MOP的禁忌症;7) 招募之前100天内移植后暴露任何新的免疫抑制药物(例如,阿伦单抗);8) 招募之前100天内供体淋巴细胞输注;9) 活性恶性病复发;10) 活性不受控制的感染;11) 不能顺应IL-2治疗方案;12) 不受控制的心绞痛或有症状的充血性心力衰竭(NYHA III或IV级;表9);13) 器官移植(同种异体移植)接受者;14) 处于联合抗逆转录病毒治疗的HIV-阳性个体是不适合的,因为与同种异体HSCT后使用的试剂有药代动力学相互作用的可能性。此外,这些个体处于增加的致命感染的风险中。当指示时在接受联合抗逆转录病毒治疗的参与者中进行适当的研究;15) 具有活性乙型肝炎或丙型肝炎的个体是不适合的,因为他们处于HSCT后致命的治疗相关的肝毒性的高风险中;16) 招募之前4周内其它研究药物,除非被主要研究者清除;和17) 因为致畸或堕胎作用的可能性而排除孕妇。因为在乳儿中具有在继发承继于接受治疗的母亲未知但潜在的不良事件风险,所以应停止母乳喂养。

[0623] 根据以下治疗方案治疗受试者:

[0624] 各研究参与者按照输血医学SOP接受医护标准每周两次的ECP 16周。简而言之,采用Therakos UVAR XTS系统进行ECP。按照制造商指南通过受试者血细胞比容和血容量确定处理的血容量和8-MOP剂量。还可在光活化之前从ECP再循环袋采集500μL血沉棕黄层小份并表征WBC亚群的绝对数。ECP和ECP加上IL-2的免疫影响的详细评估可在外周血Treg、Tcon、CD8、B、NK和DC细胞亚群上进行,包括凋亡群体。在各ECP循环后测量细胞因子。还确定反应与免疫变量的经时关联,其包括分析强的松使用、总体存活、无进展存活、非复发死亡率和复发。清血法医师可评估ECP相关性毒性,包括出血、血球减少和程序不耐受(即,全身症状或心血管不稳定)。还对接受任意ECP或ECP加上IL-2的参与者中的毒性进行监测。还确定反应预测器,例如使用单变量分析,包括先前cGVHD治疗数目的影响。

[0625] 临床响应者在16周后依照医护标准继续ECP,和或不和延长期限的IL-2治疗。若进行ECP的参与者在8周之前经历需要附加治疗的cGVHD恶化,经与研究PI磋商,他们可早期开始低剂量IL-2。8周后,即,从结束8-16周,参与者开始每日低剂量SC IL-2 ( $1 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>/天)用于自我给药剩下的8周ECP。通常以门诊治疗标准给予IL-2。在实施例2中描述预期的毒性和潜在风险以及剂量改变。伴随继续无剂量改变的IL-2给予和强的松(或等价类固醇)的给予。若认为符合参与者的利益(例如类固醇毒性),则在治疗医师的裁量下允许递减强的松。值得注意的是,其它免疫抑制药物递减期间临床稳定的cGVHD被认为是IL-2功效的证据且其它免疫抑制疗法递减期间cGVHD的进展不被认为是IL-2毒性或缺乏功效的证据。

[0626] 在其它实施方式中,给予cGVHD受试者每周两次ECP共12周以及6-12周期间6周

$1 \times 10^6$  IU/m<sup>2</sup>/天的IL-2的一阶段单臂试验,所述受试者例如以下那些:对于至少4周的剂量为0.25/mg/kg/天的强的松或其等价物反应不足;总白血球计数 $\geq 1000/\text{mm}^3$ ,血小板 $\geq 25,000/\text{mm}^3$ ;和无先前ECP或IL-2治疗。

[0627] 延长期限的治疗:完成16周研究后,允许经历临床受益(完全或部分反应;以及不符合NIH部分反应标准的微反应)与可接受的毒性概况的患者在治疗医师的裁量下继续无限期延长期限的IL-2治疗。对于合理的临床或管理原因,延长期限的治疗的重新开始可延迟长达2周。重新开始治疗中更长的延迟必须得到主要研究者的批准。进行延长的IL-2的情况下,每4周再评估患者以确定是否应在治疗医师的裁量下继续IL-2治疗,所述治疗医师记录继续IL-2治疗的基本原理。

[0628] 在持续进行的基础上采集延长期限的IL-2的毒性数据并将所有治疗相关的SAE报告至主要研究者和IRB。延长期限的IL-2期间其它免疫抑制药物的递减是在治疗医师的裁量下进行。在可归因于IL-2的毒性事件中,在治疗医师的裁量下允许如本文所述的剂量改变。

[0629] 进行延长期限的IL-2治疗的患者需要的评估包括:1)在当地或在研究中心临床随访用于评估每4周( $\pm 2$ 周)IL-2的毒性和临床受益。需要的实验室测试是具有分类的CBC和血清化学-葡萄糖、BUN、肌酐、总胆红素、碱性磷酸酶、AST、ALT、钙。2)每8周( $\pm 4$ 周)在研究中心临床随访。需要的实验室试验(除了以上以外)包括包含定量血清免疫球蛋白、血浆存储、和其他单核细胞储存的免疫试验。

[0630] 针对所有参与者在ECP之前2周内进行以下评估:1)病史和治疗患者疾病的基本原理的文档(包括类固醇剂量);2)体格检查,包括生命体征、体重、表现状况;3) cGVHD评估;4)生育潜能女性的妊娠试验;5)血液学:具有分类的全血细胞计数(CBC);6)血清化学:葡萄糖、BUN、肌酐、尿酸、总胆红素、碱性磷酸酶、LDH、总蛋白、白蛋白、AST、ALT、和钙;7)甲状腺功能测试(TSH、T4、游离-T4);8)CMV病毒载量;9)定量血清免疫球蛋白;和10)免疫学:血浆存储和其他单核细胞储存。

[0631] 在针对具有涉及特定器官系统的cGVHD的患者进行ECP之前两周内需要以下评估(除非指明的情形):1)采用希曼试验的眼部检查,对于具有眼部cGVHD的患者(可选的);2)皮肤病学( $\pm$ 活检),对于具有皮肤cGVHD的患者;3)口腔检查( $\pm$ 活检),对于具有口腔cGVHD的患者(可选的);4)肺功能测试,对于具有肺部cGVHD临床表现的患者(治疗之前4周内至之后1周);和5)受影响关节的屈曲评估,对于具有与cGVHD相关的挛缩或肌肉骨骼涉及的个体。

[0632] ECP和IL-2治疗(1、2、4、6、8、9、10、12、14周的结束)和停止研究(16周的结束)期间评估以下:1)病史和临床检查(包括类固醇剂量,8&16周);2)研究团队成员回顾的药物日志(伴随IL-2治疗开始);3)将与病史和临床检查同日进行的毒性评估;4)血液学:具有分类的CBC;5)血清化学:葡萄糖、BUN、肌酐、尿酸、总胆红素、碱性磷酸酶、LDH、总蛋白、白蛋白、AST、ALT、和钙;6)CMV病毒载量(或按照机构实践);7)定量血清免疫球蛋白(4、8、12、16周);8)免疫学:血浆存储和附加单核细胞储存(1、2、4、6、8、9、10、12、14、16周);和9)甲状腺功能测试(TSH、T4、游离-T4)(16周)。

[0633] 对于具有涉及特定器官的cGVHD的患者,在结束8周和16周的研究时需要(除非指明的情况)以下评估(除了cGVHD症状评分以外):1) cGVHD评估;2)采用希曼试验的眼部检

查,对于具有眼部cGVHD的患者(可选的);3)皮肤病学评估(±活检),对于具有皮肤cGVHD的患者;4)口腔检查(±活检),对于具有口腔cGVHD的患者(可选的);5)肺功能测试,对于具有肺部cGVHD临床表现的患者;和6)受影响关节的屈曲评估,对于具有与cGVHD相关的挛缩或肌肉骨骼涉及的个体。

[0634] 下表是用于记录的数据的汇总:

[0635] 表20

[0636]

|                    | 之前 2 周内<br>(基线) | 治疗期间<br>(1、2、4、6、<br>8、9、10、12、<br>14 周的结束) <sup>a</sup> | 16 周的结<br>束 <sup>a</sup> | 延长的 IL-2<br>(每 4 周) <sup>c</sup> |
|--------------------|-----------------|----------------------------------------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| 病史                 | X               | X                                                        | X                        | X                                |
| 体格检查               | X               | X                                                        | X                        | X                                |
| 毒性评估               |                 | X                                                        | X                        | X                                |
| cGVHD 症状评分         | X               | X <sup>b</sup>                                           | X                        | X <sup>#</sup>                   |
| 妊娠试验 <sup>¶</sup>  | X               |                                                          |                          |                                  |
| 肺功能                | o               | o <sup>b</sup>                                           | o                        | o <sup>#</sup>                   |
| 皮肤病学评估             | o               | o <sup>b</sup>                                           | o                        | o <sup>#</sup>                   |
| 口腔评估               | o               | o <sup>b</sup>                                           | o                        | o <sup>#</sup>                   |
| 屈曲评估               | o               | o <sup>b</sup>                                           | o                        | o <sup>#</sup>                   |
| 眼部评估               | o               | o <sup>b</sup>                                           | o                        | o <sup>#</sup>                   |
| 具有分类的 CBC          | X               | X <sup>*</sup>                                           | X                        | X                                |
| 血清化学               | X               | X <sup>*</sup>                                           | X                        | X                                |
| 定量免疫球蛋白            | X               | X <sup>d</sup>                                           | X                        | X <sup>δ</sup>                   |
| 免疫学 <sup>1</sup>   | X               | X                                                        | X                        | X <sup>δ</sup>                   |
| 类固醇评估 <sup>2</sup> | X               | X <sup>b</sup>                                           | X                        | X <sup>δ</sup>                   |
| CMV 病毒载量           | X               | X                                                        | X                        | X                                |
| 甲状腺功能              | X               |                                                          | X                        | X <sup>δ</sup>                   |
| 药物日志 <sup>+</sup>  |                 | X                                                        | X                        | X                                |

[0637] X-需要评估

[0638] o-具有这些器官系统的临床牵连(口腔和眼部评估是可选的),为了时间安排的灵活性,基线肺功能测试可安排至直至开始治疗前4周至之后1周。

[0639] 1免疫学:血浆存储;其他单核细胞储存。

[0640] 2不应递减系统性类固醇,除非具有毒性,例如严重高血糖症(有研究PI的许可)。

[0641] a 1、2、4、6、8、9、10、12、14周的测试将±4天进行,以考虑到周末、假日等周围的时间安排和管理灵活性。

[0642] b在8周用于类固醇剂量和cGVHD评估。

[0643] c延长的治疗期间的测试将±2周进行,以考虑到患者旅行、工作、假日等周围的时间安排和管理灵活性。

[0644] d 4、8、12周。

[0645] \*在IL-2开始后还将进行4±2天CBC/手动分类、血清肌酐和LDH的附加实验室测试,以评估与血栓性微血管病相关的贫血、血小板减少、裂细胞和/或肾功能不全。δ在强制

性研究中心随访的时间每8周( $\pm 4$ 周)。

[0646] #在强制性研究中心随访的时间1年期间每16周(+/-4周)。

[0647] ¶对于具有妊娠可能的女性。

[0648] +研究IL-2治疗期间至少每2周完成并回到临床。对于延长期限的IL-2,至少每8周完成并回到临床。

[0649] 评估毒性和反应二者。接受至少一个剂量IL-2的参与者可评估IL-2治疗毒性。接受至少4周IL-2并已再评估他们的疾病的参与者被认为可评估结合IL-2加上ECP反应。这些参与者具有根据本文提供以及以下描述的定义分类的他们的反应。例如且在实施例2中定义之外,慢性GVHD症状评分是指参与者使用经确认的慢性GVHD症状量表自我报告cGVHD的症状和体征。在基线以及8和16周时获得自我报告的症状量表。慢性GVHD的类固醇使用是指参与者在基线时以及在8和16周时记录其皮质类固醇的每日总剂量。在替换皮质类固醇每日剂量的情况下,为研究目的记录平均日剂量。免疫评估是指参与者经历针对免疫功能的测试,其在基线时,以及在1、2、4、6、8、9、10、12、14和16周时进行。测试包括血浆存储和其他单核细胞储存。在基线时以及在4、8、12和16周时测试定量免疫球蛋白。

[0650] 对于在患有类固醇难治性慢性移植物抗宿主病(cGVHD)的患者中评估12周体外光分离置换(ECP)并在6-12周加入每日低剂量皮下(SC)白细胞介素-2(IL-2)的疗效的一阶段II期试验,主要终点是如在治疗12周时评估的总体反应。基于随机2期ECP对比安慰剂试验(40%皮肤cGVHD响应率和33%非皮肤cGVHD响应率)(Flowers等人,(2008) Blood 112: 2667-2674),若总体反应率 $\geq 60\%$ 则IL-2加上ECP是有效的,且若 $\leq 40\%$ 则是无价值的。采用该设计,若真实但未知的反应率是60%则得出有效结论的概率是0.84,且若真实率是40%则概率是0.09。在之前的1期IL-2研究中相同患者群体中中位基线Treg计数是16.8细胞/ $\mu\text{L}$ 。假设相似的基线Treg计数,在34名患者中若效应量(即,平均差除以其标准偏差)是1则将有 $>99\%$ 概率在6周ECP时检测Treg计数增加至33.6细胞/ $\mu\text{L}$ ,且若效应量是0.6则90%概率。还相信ECP加上IL-2对于Treg计数具有协同效应。在34名患者中,若30名完成12周治疗且Treg从6周时的33.6上升至12周时的200,若效应量是1则将有 $>99\%$ 概率检测该差异且若效应量是0.6则87%概率。纵向数据分析评估Treg经时增加且确定其是否与单独的ECP或ECP加上IL-2相关。还进行免疫和临床响应之间的关联分析。

[0651] 受试者的性别不被用作该研究中入选或排除的标准且对于少数族裔的应计(accrual)没有限制。在2013年,41%的全部已接受移植的患者是女性且约10%的患者是少数族裔。基于我们2013年移植项目中该自我报告中的种族和性别,通过性别和种族定义的亚组中预期的应计在下表21中汇总。

[0652] 表21

| 应计目标                 |                |          |                |                  |
|----------------------|----------------|----------|----------------|------------------|
| 人种类别                 | 性别             |          |                |                  |
|                      | 女性             |          | 男性             | 合计               |
| 西班牙裔或拉丁裔             | 1              | +        | 1              | = 2              |
| 不是西班牙裔或拉丁裔           | 9              | +        | 14             | = 23             |
| <b>人种类别：全部受试者的合计</b> | <b>10 (A1)</b> | <b>+</b> | <b>15 (B1)</b> | <b>= 25 (C1)</b> |
| 种族类别                 |                |          |                |                  |
| 美洲印第安人或阿拉斯加土著        | 0              | +        | 0              | = 0              |
| 亚洲人                  | 1              | +        | 1              | = 2              |
| 黑人或非裔美国人             | 1              | +        | 1              | = 2              |
| 夏威夷土著或其他太平洋岛民        | 0              | +        | 0              | =                |
| 白人                   | 8              | +        | 13             | = 21             |
| <b>种族类别：全部受试者的合计</b> | <b>10 (A2)</b> | <b>+</b> | <b>15 (B2)</b> | <b>= 25 (C2)</b> |

[0654] 通过引用并入

[0655] 本文提及的所有出版物、专利和专利申请均通过引用以其整体并入本文，就如同指示各出版物、专利或专利申请明确特别地和单独地通过引用并入。在冲突的情况下，将以本申请(包括本文中的任意定义)为准。

[0656] 以登录号的形式与公共数据库中的条目相关联的任意多核苷酸和多肽序列也均通过引用以其整体并入本文，例如在万维网上由基因组研究所(TIGR)和/或在万维网上由国家生物技术信息中心(NCBI)所维护的那些。

[0657] 等同物

[0658] 本领域技术人员将意识到或者能够确定使用不超过常规的实验就能够得到本文所述本发明特定实施方式的多种等同物。此类等同物旨在包括在以下权利要求中。

## 序列表

&lt;110&gt; 丹娜法伯癌症研究院

&lt;120&gt; 用于治疗免疫失调的多次-可变IL-2剂量方案

&lt;130&gt; DFS-143.25

&lt;141&gt; 2015-10-07

&lt;150&gt; 62/061,952

&lt;151&gt; 2014-10-09

&lt;160&gt; 12

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 462

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 1

```

atgtacagga tgcaactcct gtcttgcat gcactaagtc ttgcacttgt cacaacagt 60
gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 120
ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 180
acatttaagt ttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 240
gaagaactca aacctctgga ggaagtgcata aatttagctc aaagcaaaaa ctttacttta 300
agaccaggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 360
acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 420
tggtattacct tttgtcaaag catcatctca acactgactt ga 462

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 153

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 2

```

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1           5           10           15
Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
          20           25           30
Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
          35           40           45
Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
          50           55           60
Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
65           70           75           80
Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys

```



Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile  
 100 105 110  
 Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala  
 115 120 125  
 Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe  
 130 135 140  
 Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr  
 145 150

<210> 5

<211> 465

<212> DNA

<213> 猕猴

<400> 5

atgtacagga tgcaactcct gtcttgcatt gcactaagtc ttgcacttgt cacaaacagt 60  
 gcacctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 120  
 ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 180  
 acattttaagt ttacatgcc caagaaggcc acagaattga aacatcttca gtgtctagaa 240  
 gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttcactta 300  
 agagatacca aggacttaat cagcaatatc aacgtaatag ttctggaact aaagggatct 360  
 gaaacaacac tgatgtgtga atatgctgat gagacagcaa ccattgtaga atttctgaac 420  
 agatggatta ccttttgtca aagcatcatc tcaacactga cctga 465

<210> 6

<211> 154

<212> PRT

<213> 猕猴

<400> 6

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu  
 1 5 10 15  
 Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu  
 20 25 30  
 Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile  
 35 40 45  
 Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe  
 50 55 60  
 Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu  
 65 70 75 80  
 Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys  
 85 90 95  
 Asn Phe His Leu Arg Asp Thr Lys Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val

|                                                                       |     |     |
|-----------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 100                                                                   | 105 | 110 |
| Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Leu Met Cys Glu Tyr       |     |     |
| 115                                                                   | 120 | 125 |
| Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr       |     |     |
| 130                                                                   | 135 | 140 |
| Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr                               |     |     |
| 145                                                                   | 150 |     |
| <210> 7                                                               |     |     |
| <211> 468                                                             |     |     |
| <212> DNA                                                             |     |     |
| <213> 家犬                                                              |     |     |
| <400> 7                                                               |     |     |
| atgtacaaaa tgcaactctt gtcttgcac gcactgacgc ttgtacttgt cgcaaacagt 60   |     |     |
| gcacctatta cttcaagctc tacaaaggaa acagagcaac agatggagca attactgctg 120 |     |     |
| gatttacagt tgcttttgaa tggagttaat aattatgaga accccaact ctccaggatg 180  |     |     |
| ctcacattta agttttacac gccaagaag gccacagaat ttacacacct tcaatgtcta 240  |     |     |
| gcagaagaac tcaaaaacct ggaggaagtg ctaggtttac ctcaaagcaa aaacgttcac 300 |     |     |
| ttgacagaca ccaaggaatt aatcagcaat atgaatgtaa cacttctgaa actaaaggga 360 |     |     |
| tctgaaacaa gttacaactg tgaatatgat gacgagacag caaccattac agaatttctg 420 |     |     |
| aacaaatgga ttaccttttg tcaaagcatc ttctcaacac tgacttga 468              |     |     |
| <210> 8                                                               |     |     |
| <211> 155                                                             |     |     |
| <212> PRT                                                             |     |     |
| <213> 家犬                                                              |     |     |
| <400> 8                                                               |     |     |
| Met Tyr Lys Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Thr Leu Val Leu       |     |     |
| 1 5 10 15                                                             |     |     |
| Val Ala Asn Ser Ala Pro Ile Thr Ser Ser Ser Thr Lys Glu Thr Glu       |     |     |
| 20 25 30                                                              |     |     |
| Gln Gln Met Glu Gln Leu Leu Leu Asp Leu Gln Leu Leu Leu Asn Gly       |     |     |
| 35 40 45                                                              |     |     |
| Val Asn Asn Tyr Glu Asn Pro Gln Leu Ser Arg Met Leu Thr Phe Lys       |     |     |
| 50 55 60                                                              |     |     |
| Phe Tyr Thr Pro Lys Lys Ala Thr Glu Phe Thr His Leu Gln Cys Leu       |     |     |
| 65 70 75 80                                                           |     |     |
| Ala Glu Glu Leu Lys Asn Leu Glu Glu Val Leu Gly Leu Pro Gln Ser       |     |     |
| 85 90 95                                                              |     |     |
| Lys Asn Val His Leu Thr Asp Thr Lys Glu Leu Ile Ser Asn Met Asn       |     |     |
| 100 105 110                                                           |     |     |

Val Thr Leu Leu Lys Leu Lys Gly Ser Glu Thr Ser Tyr Asn Cys Glu  
 115 120 125  
 Tyr Asp Asp Glu Thr Ala Thr Ile Thr Glu Phe Leu Asn Lys Trp Ile  
 130 135 140  
 Thr Phe Cys Gln Ser Ile Phe Ser Thr Leu Thr  
 145 150 155

<210> 9

<211> 510

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 9

atgtacagca tgcagctcgc atcctgtgtc acattgacac ttgtgctcct tgtcaacagc 60  
 gcacccactt caagctccac ttcaagctct acagcggaag cacagcagca gcagcagcag 120  
 cagcagcagc agcagcagca cctggagcag ctgttgatgg acctacagga gctcctgagc 180  
 aggatggaga attacaggaa cctgaaactc cccaggatgc tcaccttcaa attttacttg 240  
 cccaagcagg ccacagaatt gaaagatctt cagtgcctag aagatgaact tggacctctg 300  
 cggcatgttc tggatttgac tcaaagcaaa agctttcaat tggaagatgc tgagaatttc 360  
 atcagcaata tcagagtaac tgttgtaaaa ctaaagggtc ctgacaacac atttgagtgc 420  
 caattcgatg atgagtcagc aactgtggtg gactttctga ggagatggat agccttctgt 480  
 caaagcatca tctcaacaag ccctcaataa 510

<210> 10

<211> 169

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 10

Met Tyr Ser Met Gln Leu Ala Ser Cys Val Thr Leu Thr Leu Val Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Val Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Ser Ser Ser Thr Ala  
 20 25 30  
 Glu Ala Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln His Leu  
 35 40 45  
 Glu Gln Leu Leu Met Asp Leu Gln Glu Leu Leu Ser Arg Met Glu Asn  
 50 55 60  
 Tyr Arg Asn Leu Lys Leu Pro Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Leu  
 65 70 75 80  
 Pro Lys Gln Ala Thr Glu Leu Lys Asp Leu Gln Cys Leu Glu Asp Glu  
 85 90 95  
 Leu Gly Pro Leu Arg His Val Leu Asp Leu Thr Gln Ser Lys Ser Phe  
 100 105 110

Gln Leu Glu Asp Ala Glu Asn Phe Ile Ser Asn Ile Arg Val Thr Val  
 115 120 125  
 Val Lys Leu Lys Gly Ser Asp Asn Thr Phe Glu Cys Gln Phe Asp Asp  
 130 135 140  
 Glu Ser Ala Thr Val Val Asp Phe Leu Arg Arg Trp Ile Ala Phe Cys  
 145 150 155 160  
 Gln Ser Ile Ile Ser Thr Ser Pro Gln  
 165

<210> 11

<211> 468

<212> DNA

<213> 大鼠

<400> 11

atgtacagca tgcagctcgc atcctgtgtt gcaactgacgc ttgtcctcct tgtcaacagc 60  
 gcaccactt caagccctgc aaaggaaaca cagcagcacc tggagcagct gttgctggac 120  
 ttacaggtgc tcctgagagg gatcgataat tacaagaatc tgaaactccc catgatgctc 180  
 acgttttaaat ttacttgcc caagcaggcc acagaattga aacatcttca gtgcctggaa 240  
 aatgaactcg gagctctgca gcgtgtgttg gatttgactc aaagcaaaag ctttcacttg 300  
 gaagacgctg gaaatttcat cagcaatata agagtaactg ttgtaaaact aaagggtctc 360  
 gaaaacaaat ttgagtgcc attcgatgat gagccagcaa ctgtggtgga atttctgagg 420  
 agatggatag ccatctgtca aagcatcatc tcaacaatga ctcagtaa 468

<210> 12

<211> 155

<212> PRT

<213> 大鼠

<400> 12

Met Tyr Ser Met Gln Leu Ala Ser Cys Val Ala Leu Thr Leu Val Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Val Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Pro Ala Lys Glu Thr Gln Gln  
 20 25 30  
 His Leu Glu Gln Leu Leu Leu Asp Leu Gln Val Leu Leu Arg Gly Ile  
 35 40 45  
 Asp Asn Tyr Lys Asn Leu Lys Leu Pro Met Met Leu Thr Phe Lys Phe  
 50 55 60  
 Tyr Leu Pro Lys Gln Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu  
 65 70 75 80  
 Asn Glu Leu Gly Ala Leu Gln Arg Val Leu Asp Leu Thr Gln Ser Lys  
 85 90 95  
 Ser Phe His Leu Glu Asp Ala Gly Asn Phe Ile Ser Asn Ile Arg Val

---

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |
| Thr | Val | Val | Lys | Leu | Lys | Gly | Ser | Glu | Asn | Lys | Phe | Glu | Cys | Gln | Phe |  |
|     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |  |
| Asp | Asp | Glu | Pro | Ala | Thr | Val | Val | Glu | Phe | Leu | Arg | Arg | Trp | Ile | Ala |  |
|     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |  |
| Ile | Cys | Gln | Ser | Ile | Ile | Ser | Thr | Met | Thr | Gln |     |     |     |     |     |  |
| 145 |     |     |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     |     | 155 |     |     |  |

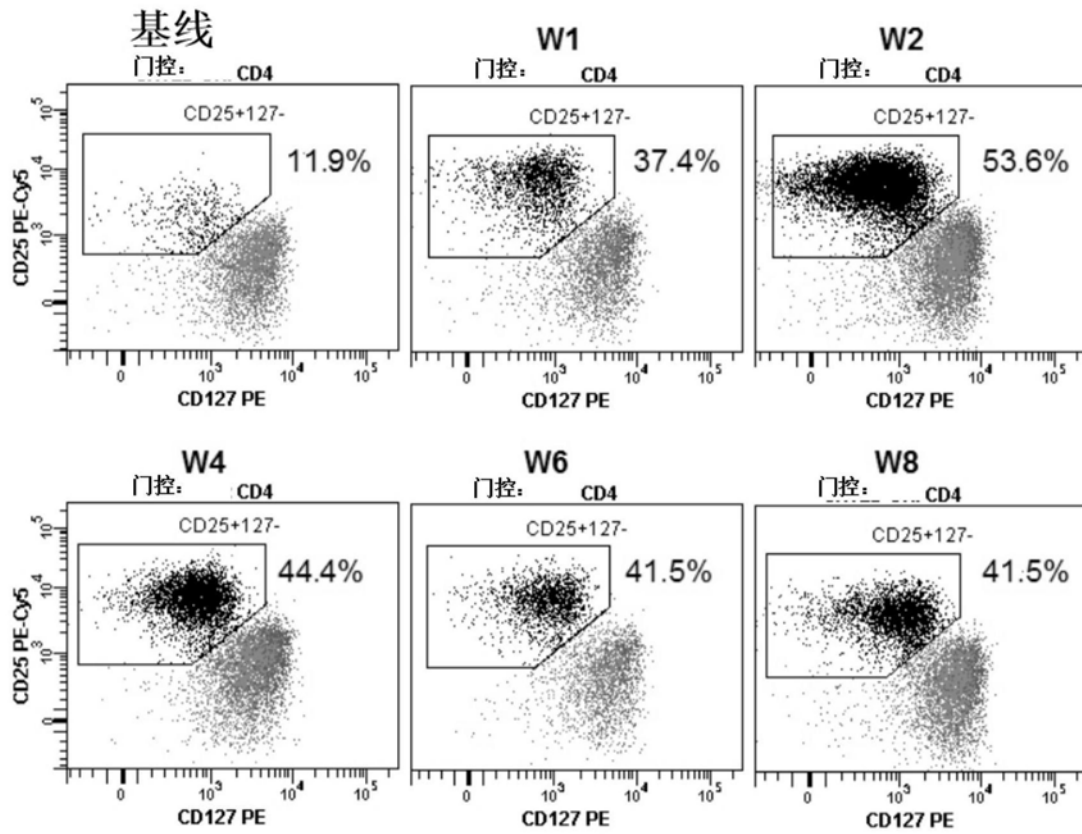


图1

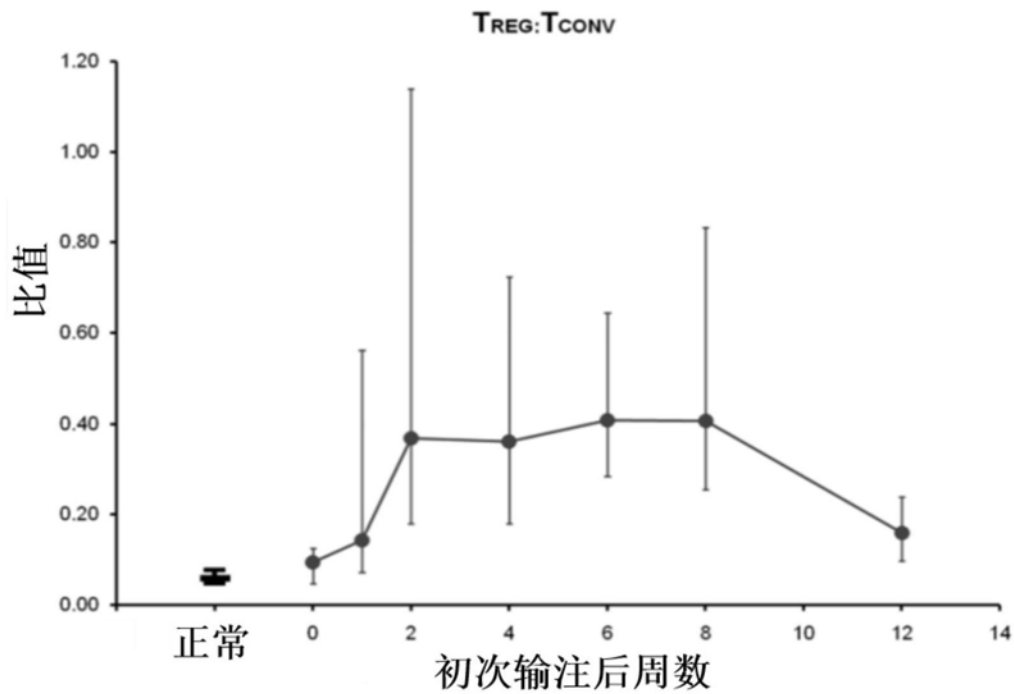


图2

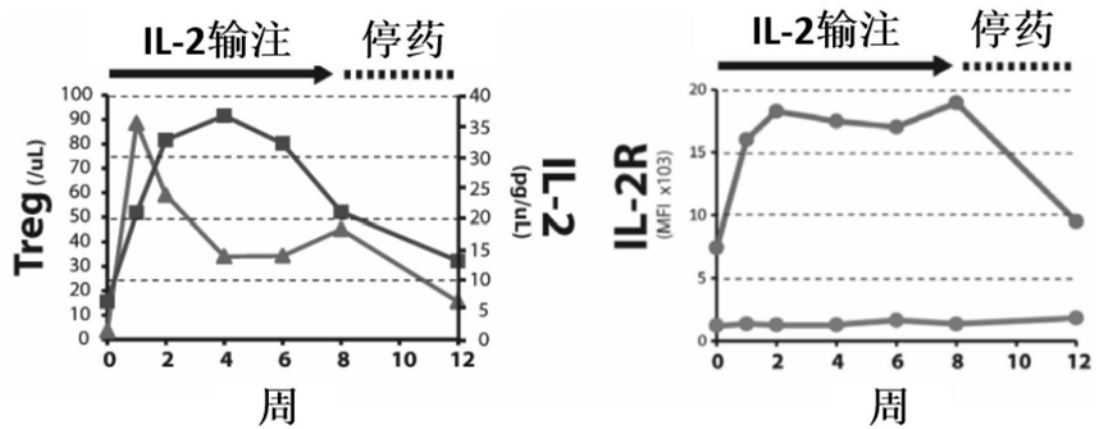


图3

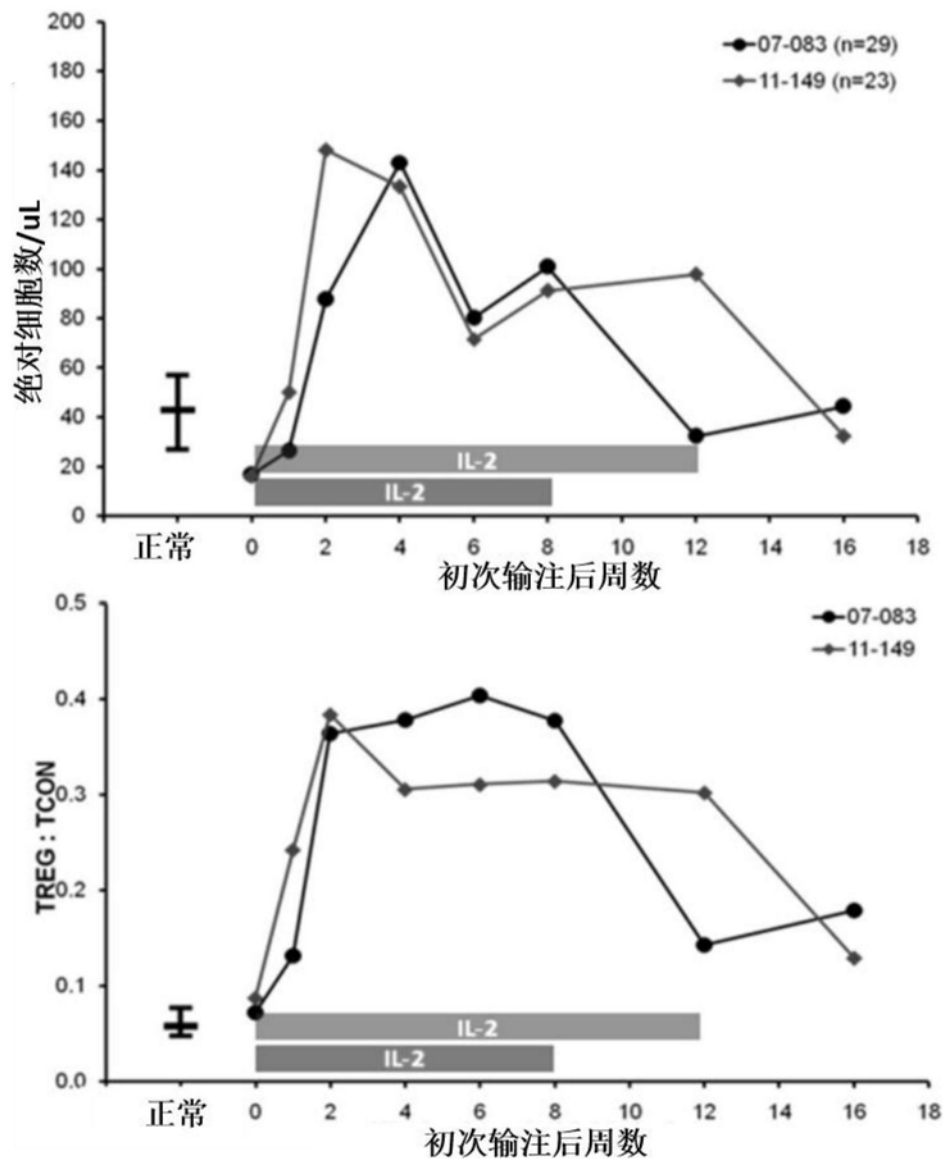


图4

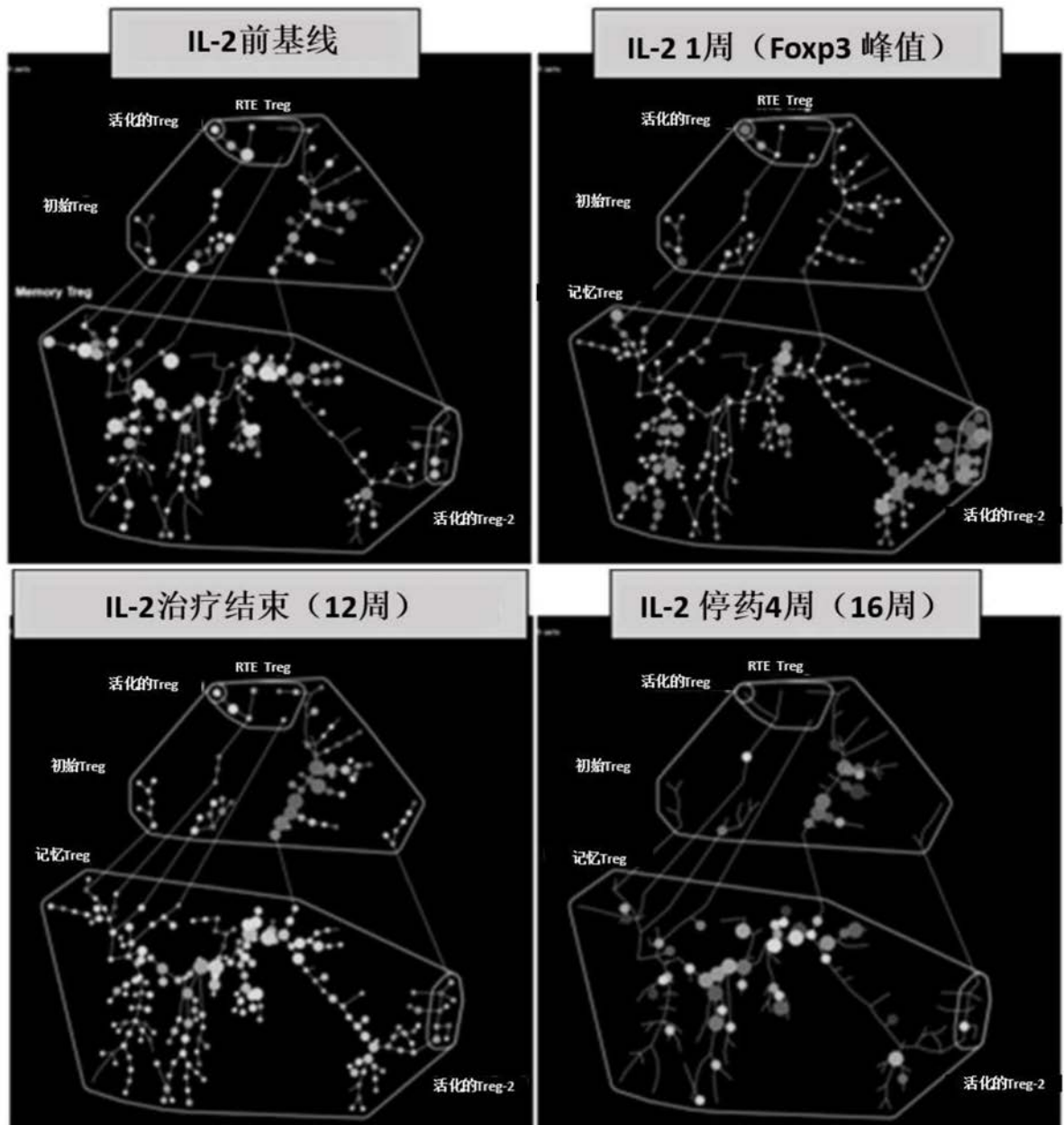
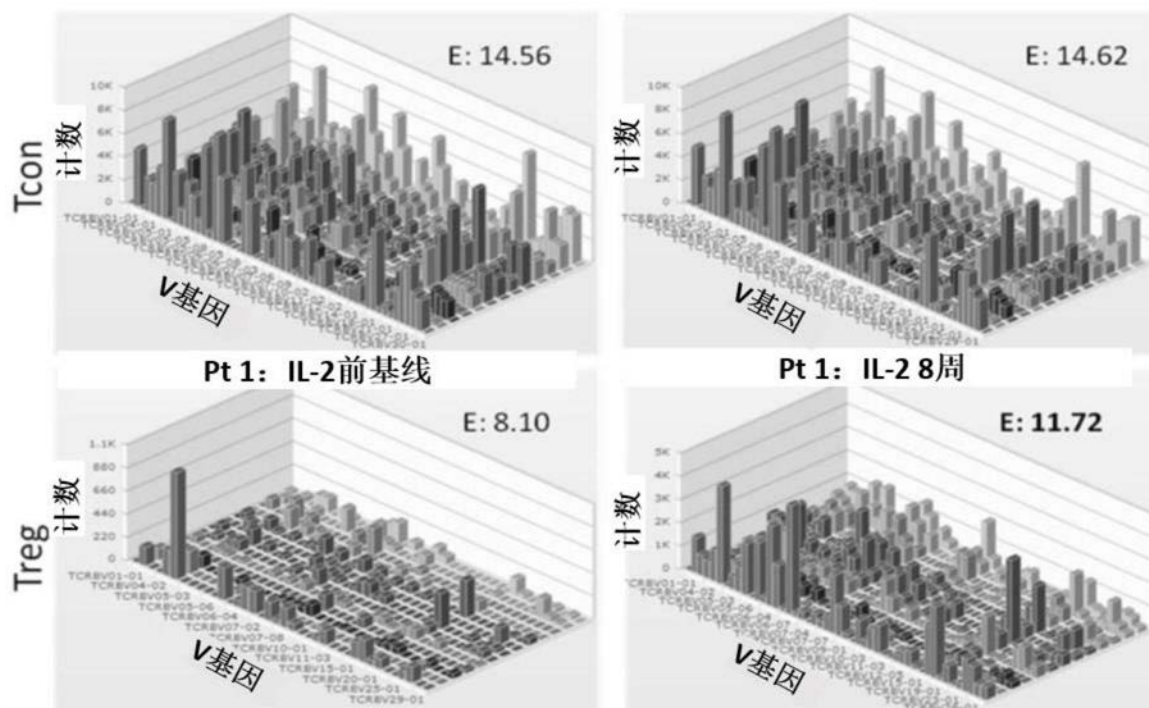


图5



| TCR库多样性          | cGVHD<br>患者 1 | cGVHD<br>患者 2 |
|------------------|---------------|---------------|
| 基线CD4 Tcon 熵值    | 14.56         | 14.00         |
| IL-2后CD4 Tcon 熵值 | 14.62         | 13.27         |
| 基线CD4 Treg 熵值    | 8.10          | 9.49          |
| IL-2后CD4 Treg 熵值 | 11.72         | 11.56         |

图6

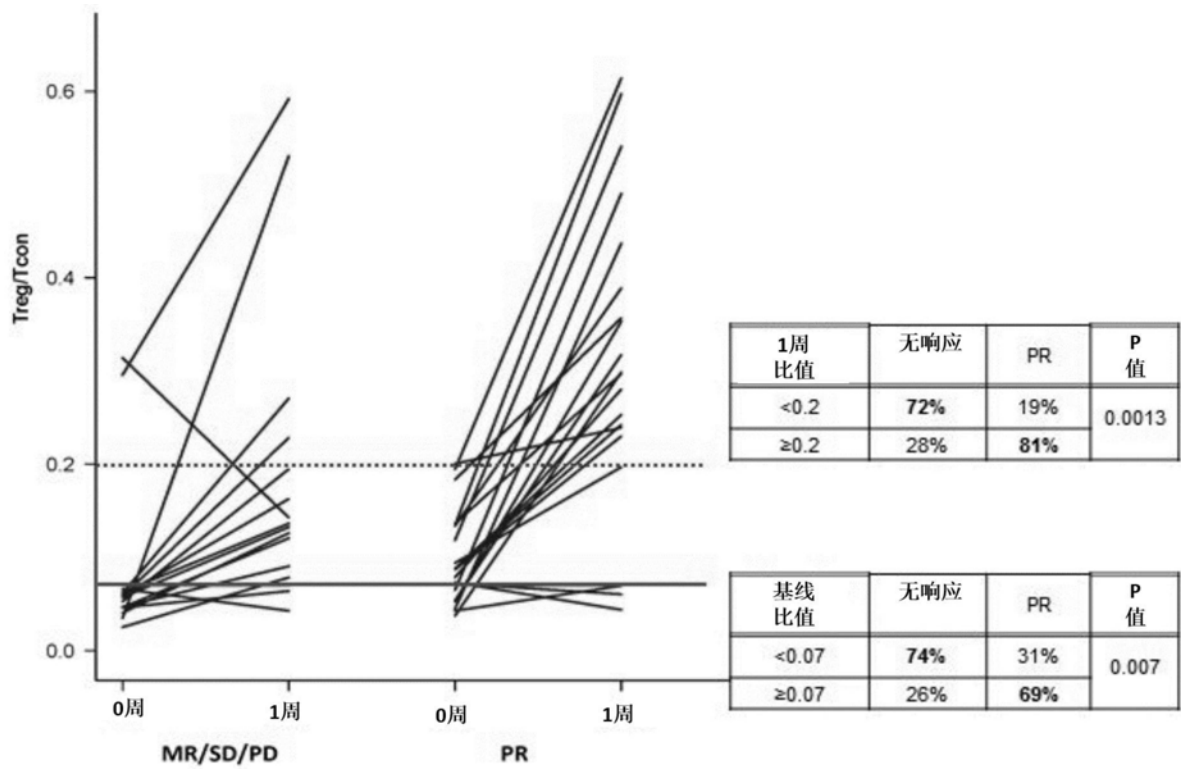


图7

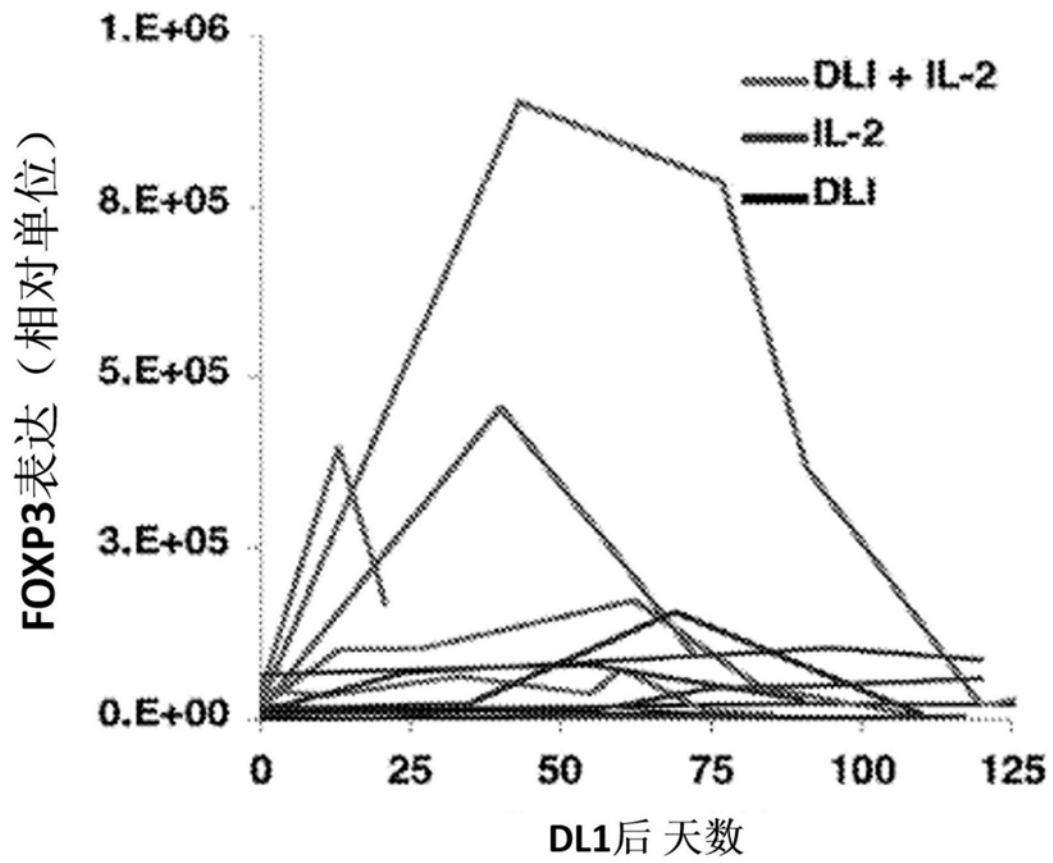


图8