



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117362450 A

(43) 申请公布日 2024.01.09

(21) 申请号 202311304218.1

C12N 15/62 (2006.01)

(22) 申请日 2017.05.26

(30) 优先权数据

62/342,311 2016.05.27 US

62/397,236 2016.09.20 US

(62) 分案原申请数据

201780045989.X 2017.05.26

(71) 申请人 阿尔托生物科学有限公司

地址 美国佛罗里达州

(72) 发明人 刘白 彼得·罗德 黄兴忠

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

专利代理人 程伟

(51) Int.Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书52页

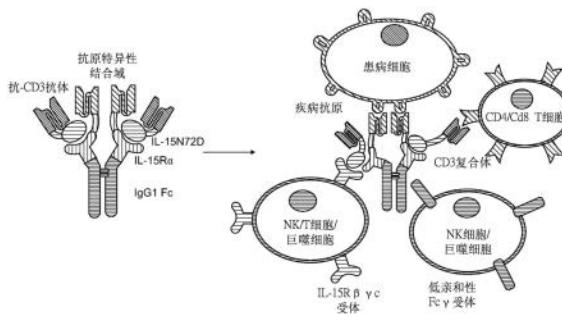
序列表(电子公布) 附图21页

(54) 发明名称

具有CD3结合域的基于多聚体IL-15的分子的构造和表征

(57) 摘要

具有CD3结合域的基于多聚体IL-15的分子的构造和表征。具体的，本发明提出包含至少两种可溶性融合蛋白的可溶性融合蛋白复合体。例如，第一融合蛋白是共价链接至白介素-15(IL-15)多肽或其功能性片段的抗-CD3抗体。第二融合蛋白包含识别疾病抗原的结合域，其中，这一域共价链接至可溶性白介素-15受体 α (IL-15R α)多肽或其功能性片段。该第一和第二融合蛋白中的一个或两个进一步包括免疫球蛋白Fc域或其功能性片段，且该第一融合蛋白的IL-15域结合至该第二融合蛋白的可溶性IL-15R α 域以形成可溶性融合蛋白复合体。本发明进一步提供制作和使用本发明的复合体的方法。



1. 一种分离的可溶性融合蛋白复合体,包含至少两种可溶性融合蛋白,其中,
 - A. 第一融合蛋白包含共价链接至白介素-15(IL-15)多肽域的第一结合域,其中,该第一融合蛋白包含SEQ ID NO:2中详述的氨基酸序列;第二融合蛋白包含共价链接至融合至免疫球蛋白Fc域的可溶性IL-15受体 α sushi结合域(IL-15R α Su)的第二结合域,
 - B. 该第一结合域包含抗-CD3抗体,且该第二结合域包含抗原特异性结合域,其中,该抗原与瘤形成、传染病或自体免疫疾病相关,
 - C. 该第一融合蛋白的IL-15域结合至该第二融合蛋白的可溶性IL-15R α Su域以形成可溶性融合蛋白复合体。
2. 如权利要求1所述的可溶性融合蛋白复合体,其中,该抗-CD3抗体包含通过多肽链接序列共价链接至免疫球蛋白重链可变域的免疫球蛋白轻链可变域。
3. 如权利要求1或2所述的可溶性融合蛋白复合体,其中,该抗原结合域包含通过多肽链接序列共价链接至免疫球蛋白重链可变域的免疫球蛋白轻链可变域。
4. 如权利要求1所述的可溶性融合蛋白复合体,其中,该抗原特异性结合域选自由抗体或其结合域和T细胞受体或其结合域组成的组。
5. 如权利要求1所述的可溶性融合蛋白复合体,其中,该抗原特异性结合域对肿瘤抗原具有特异性。
6. 如权利要求5所述的可溶性融合蛋白复合体,其中,该肿瘤抗原包含CD4、CD19、CD21、CD22、CD23、CD25、CD30、CD33、CD38、CD40、CD44、CD51、CD52、CD70、CD74、CD80、CD123、CD152、CD147、CD221、EGFR、HER-2/neu、HER-1、HER-3、HER-4、CEA、OX40配体、cMet、组织因子、连接素-4、PSA、PSMA、EGFL7、FGFR、IL-6受体、IGF-1受体、GD2、CA-125、EpCam、死亡受体5、MUC1、VEGFR1、VEGFR2、PDGFR、Tra11 R2、叶酸受体、血管生成素-2、 α v β 3整合素受体或HLA-DR。
7. 如权利要求1所述的可溶性融合蛋白复合体,其中,该抗原特异性结合域对检查点抑制剂具有特异性。
8. 如权利要求7所述的可溶性融合蛋白复合体,其中,该检查点抑制剂包含PD1、PDL1、PDL2、CTLA4、CD28、CD80、CD86、B7-H3、B7-H4、B7-H5、ICOS-L、ICOS、BTLA、CD137L、CD137、HVEM、KIR、4-1BB、OX40L、CD70、CD27、OX40、GITR、IDO、TIM3、GAL9、VISTA、CD155、TIGIT、LIGHT、LAIR-1、Siglecs或A2aR。
9. 如权利要求7所述的可溶性融合蛋白复合体,其中,该抗原特异性结合域源自检查点抑制剂抗体。
10. 如权利要求9所述的可溶性融合蛋白复合体,其中,该检查点抑制剂抗体包含伊匹单抗、曲美木单抗、妮威禄单抗、派姆单抗、皮地利珠单抗、TSR-042、ANB011、AMP-514、AMP-224、MPDL3280A、MEDI4736、MEDI0680、BMS-9365569、MEDI6469、BMS-986016、IMP701、IMP731或IMP321。
11. 如权利要求1所述的可溶性融合蛋白复合体,其中,该抗原特异性结合域对病毒抗原具有特异性。
12. 如权利要求11所述的可溶性融合蛋白复合体,其中,该病毒抗原包含源自HIV、HCV、HBC、CMV、HTLV、HPV、EBV或RSV的抗原。
13. 如权利要求12所述的可溶性融合蛋白复合体,其中,该病毒抗原包含源自HIV衣壳尖突及/或gp120和gp41表位的抗原。

14. 一种可溶性融合蛋白复合体,包含第一個如权利要求1所述的可溶性融合蛋白复合体,其共价链接至第二個如权利要求1所述的可溶性融合蛋白复合体。

15. 如权利要求14所述的可溶性融合蛋白复合体,其中,该第一個可溶性融合蛋白复合体通过二硫键共价链接至该第二個可溶性融合蛋白复合体,且该第一個可溶性融合蛋白复合体的Fc域链接至该第二個可溶性融合蛋白复合体的Fc域。

16. 一种包含编码如权利要求1所述的第一融合蛋白的核酸序列的核酸,其中,所述核酸包含SEQ ID NO:1中详述的序列。

17. 如权利要求16所述的核酸,其中,该核酸进一步包含启动子、转译起始信号以及可操作地链接至编码该融合蛋白的序列的前导序列。

18. 一种DNA载体,其包含如权利要求16所述的核酸序列。

19. 如权利要求18所述的DNA载体,其中,该DNA载体还包含编码如权利要求1所述的第二融合蛋白的第二核酸序列。

具有CD3结合域的基于多聚体IL-15的分子的构造和表征

[0001] 本发明是中国专利申请号为201780045989.X,发明名称为“具有CD3结合域的基于多聚体IL-15的分子的构造和表征”,申请日为2017年5月26日的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明通常涉及多聚体融合分子领域。

背景技术

[0003] 在本文中揭示的发明之前,迫切需要研发新的策略,将多种效应分子靶向引导至疾病部位,以提供治疗性益处而没有与非特异性免疫活性相关的副作用。

发明内容

[0004] 本发明至少部分地基于下述令人惊奇的发现,多特异性蛋白激活效应子T细胞和天然杀手(NK)细胞并引导其活性以对抗疾病细胞为目标,从而导致疾病特异性的细胞毒性。本文提供多特异性蛋白,其具有一个失败疾病抗原的结合域和识别T细胞上CD3的第二结合域。例示性的疾病抗原与瘤形成、传染病、或自体免疫疾病相关。具体而言,本文揭示一种蛋白复合体,其包含抗-CD3

[0005] scAb/huIL-15N72D融合蛋白和抗-CD20 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc融合蛋白。这一复合体经由该抗-CD20 scAb域识别B细胞淋巴瘤,经由IL-15活性诱导NK和T细胞应答,经由该抗-CD3 scAb域激活T细胞应答,且经由该Fc结合域刺激抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0006] 提供一种包含至少两种可溶性融合蛋白的分离的可溶性融合蛋白复合体。例如,该第一融合蛋白包含共价链接至白介素-15(IL-15)多肽的第一结合域。该第二融合蛋白包含识别疾病抗原的第二结合域,其中,此域共价链接至融合至免疫球蛋白Fc域的可溶性IL-15受体 α sushi-结合域(IL-15R α Su)。该第一结合域或第二结合域中的一个包含抗-CD3抗体,且另一个结合域包含抗原特异性结合域。融合蛋白的例示性的抗原特异性结合域包括抗-CD20抗体。例如,第二融合蛋白包含共价链接至IL-15R α Su/Fc融合体的抗-CD20抗体。该第一融合蛋白的IL-15域结合至该第二融合蛋白的可溶性IL-15R α Su域,以形成可溶性融合蛋白复合体。或者,该第一融合蛋白包含共价链接至可溶性IL-15受体 α sushi-结合域(IL-15R α Su)的抗-CD3抗体,其中,该IL-15R α Su融合至免疫球蛋白Fc域;而该第二融合蛋白包含识别共价链接至白介素-15(IL-15)多肽的疾病抗原的结合域。一些情形中,该IL-15多肽包含具有N72D突变的IL-15变体(IL-15N72D)。

[0007] 一些情形中,该抗-CD3抗体包含单链抗体,其中,免疫球蛋白轻链可变域通过一多肽链接序列共价链接至免疫球蛋白重链可变域。同样,一些情形中,该识别疾病抗原的结合域,如抗-CD-20抗体,是单链抗体,该单链抗体包含通过一多肽链接序列共价链接至免疫球蛋白重链可变域的免疫球蛋白轻链可变域。

[0008] 一种例示性第一融合蛋白包含SEQ ID NO:2中详述的氨基酸序列。一种例示性第

二融合蛋白包含SEQ ID NO:4中详述的氨基酸序列。一种例示性的编码该第一融合蛋白的核酸序列包含SEQ ID NO:1中详述的序列。一种例示性的编码该第二融合蛋白的核酸序列包含SEQ ID NO:3中详述的序列。一方面,该核酸序列进一步包含启动子、转译起始信号、以及可操作地链接至编码该融合蛋白的序列的前导序列。

[0009] 还提供包含本文所揭示核酸序列的DNA载体。例如,该核酸序列处于用于复制、表达或两者的载体内。

[0010] 还提供一种可溶性融合蛋白复合体,其包含共价链接至第二可溶性融合蛋白复合体的第一可溶性融合蛋白复合体。例如,本发明的可溶性融合蛋白复合体经多聚体化,如二聚体化、三聚体化、或其它多聚体化(如,四复合体、五复合体等)。例如,该多聚体是同源多聚体或异源多聚体。该可溶性融合蛋白复合体通过共价键如二硫键、化学交联剂结合在一起。一些情形中,一种可溶性融合蛋白通过二硫键链接至另一种可溶性融合蛋白,其中,该二硫键将该第一可溶性融合蛋白的Fc域键结至该第二可溶性融合蛋白的Fc域。

[0011] 该Fc域或其功能性片段包括选自下列组成的组的Fc域:IgG Fc域、人IgG1Fc域、人IgG2 Fc域、人IgG3 Fc域、人IgG4 Fc域、IgA Fc域、IgD Fc域、IgE Fc域、和IgM Fc域;或其任意组合。任选地,该Fc域包括一氨基酸改变,该改变导致Fc域具有变更的补体或Fc受体结合性质、或者变更的二聚化或糖基化概况。改变氨基酸以产生具有变更的补体或Fc受体结合性质、或者变更的二聚化或糖基化概况的Fc域,是该领域中已知的。例如,将IgG1 CH2的234和235位(以抗体共有序列为基准编号)的亮氨酸残基(即,···P E L L G G···)置换为丙氨酸残基(即,···P E A A G G···),导致Fc γ 受体结合的丢失;而将IgG1 CH2的322位(以抗体共有序列为基准编号)的赖氨酸残基(即,···K C K S L···)置换为丙氨酸残基(即,···K C A S L···),则导致补体激活的丢失。一些实例中,这些突变组合使用。

[0012] 一些方面,该第一生物活性多肽通过一多肽链接序列共价链接至IL-15多肽(或其功能性片段)。同样,该第二生物活性多肽通过一多肽链接序列共价链接至IL-15R α 多肽(或其功能性片段)。任选地,该IL-15R α 多肽(或其功能性片段)通过一多肽链接序列共价链接至该Fc域(或其功能性片段)。每一多肽链接序列可以是独立选择的。任选地,该多肽链接序列是相同的。或者,它们是不同的。

[0013] 任选地,本发明的可溶性融合蛋白复合体被提供为,其中至少一种该可溶性融合蛋白包含可检测的标记。可检测的标记包括但不限于,生物素、链霉亲和素、酶或其具有催化活性的片段、放射性同位素、纳米粒子、顺磁金属离子、或荧光、磷光或化学发光分子、或其任意组合。

[0014] 本发明提供一种制作本发明的可溶性融合蛋白复合体的方法。该方法包括下述步骤:a)将具有编码该第一融合蛋白的适宜控制序列的DNA载体引入第一宿主细胞内;b)在足以将该第一融合蛋白表达在该细胞内或培养基内的条件下,在培养基中培养该第一宿主细胞;c)从该宿主细胞或培养基纯化该第一融合蛋白;d)将具有编码该第二融合蛋白的适宜控制序列的DNA载体引入第二宿主细胞内;e)在足以将该第二融合蛋白表达在该细胞内或培养基内的条件下,在培养基中培养该第二宿主细胞;f)该宿主细胞或培养基纯化该第二融合蛋白;以及g)混合该第一融合蛋白与第二融合蛋白,混合条件为足以令第一融合蛋白的IL-15域与第二融合蛋白的可溶性IL-15R α 域之间结合以形成该可溶性融合蛋白复合体。

[0015] 一些情形中,该方法进一步包括混合该第一融合蛋白与第二融合蛋白,混合条件

为足以令从该表达载体表达的多肽之间形成二硫键。

[0016] 或者,制作本发明的可溶性融合蛋白复合体的方法通过下述进行:a)将具有编码该第一融合蛋白的适宜控制序列的DNA载体和具有编码该第二融合蛋白的适宜控制序列的DNA载体引入宿主细胞内;b)在培养基中培养该宿主细胞,培养条件为足以将该融合蛋白表达在该细胞内或该培养基中,并令第一融合蛋白的IL-15域与第二融合蛋白的可溶性IL-15R α 域之间关联以形成该可溶性融合蛋白复合体;以及c)从该宿主细胞或培养基纯化该可溶性融合蛋白复合体。

[0017] 一方面,该方法进一步包括混合该第一融合蛋白与第二融合蛋白,混合条件为足以在从该表达载体表达的多肽之间形成二硫键。

[0018] 还提供制作可溶性融合蛋白复合体的方法,该方法包含:a)将编码该第一和第二融合蛋白的适宜控制序列的DNA载体引入宿主细胞内;b)在培养基中培养该宿主细胞,培养条件为足以将该融合蛋白表达在该细胞中或该培养基中,并令第一融合蛋白的IL-15域与第二融合蛋白的可溶性IL-15R α 域之间关联以形成该可溶性融合蛋白复合体,并且在该多肽之间形成二硫键;以及c)从该宿主细胞或培养基纯化该可溶性融合蛋白复合体。

[0019] 任选地,该方法进一步包括混合该第一融合蛋白与第二融合蛋白,混合条件为足以在从该表达载体表达的多肽之间形成二硫键。

[0020] 通过向有此需要的受试者给药有效量的包含可溶性抗-CD3 scAb/IL-15N72D:疾病抗原特异性scAb/IL-15R α Su/Fc融合蛋白复合体的医药组合物而实施治疗该受试者的瘤形成、传染病或自体免疫疾病的方法,从而治疗瘤形成、传染病或自体免疫疾病。例如,通过向有此需要的受试者给药有效量的包含可溶性抗-CD3scAb/huIL-15N72D:抗-CD20 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc融合蛋白复合体(2B8T3M)的医药组合物来实施治疗该受试者体内的B细胞淋巴瘤或B细胞介导的自体免疫疾病的方法,从而治疗该淋巴瘤或自体免疫疾病。例示性的抗-CD3scAb/huIL-15N72D包含SEQ ID NO:2中详述的氨基酸序列。例示性的抗-CD20scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc包含SEQ ID NO:4中详述的氨基酸序列。优选的,该融合蛋白复合体诱导该受试者体内的免疫应答。

[0021] 适用于使用本文中揭示的方法治疗的瘤形成包括成胶质细胞瘤、前列腺癌、血液学癌症、急性髓性白血病、B细胞瘤、多发性骨髓瘤、B细胞淋巴瘤、B细胞非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、皮肤T细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、实体瘤、泌尿道上皮/膀胱癌、黑素瘤、肺癌、肾细胞癌、乳腺癌、胃和食道癌、胰腺癌、头颈癌、结直肠癌、和卵巢癌、非小细胞肺癌、和鳞状细胞头颈癌。使用本文中揭示的方法治疗的例示性感染是人免疫缺陷病毒(HIV)感染。本文中揭示的方法也可用来治疗细菌感染(如,革兰氏阳性细菌或革兰氏阴性细菌)(Oleksiewicz et al. 2012. Arch Biochem Biophys. 526:124-31)。使用本文中揭示的方法治疗的例示性自体免疫疾病是由B细胞介导的自体免疫疾病。这类自体免疫疾病包括类风湿性关节炎、多发性硬化、特发性血小板减少、IgM介导的多神经病、因子VIII缺乏、全身性红斑狼疮、肖格伦综合征、验证下肌炎、寻常天疱疮、视神经脊髓炎、ANCA相关血管炎、慢性炎症性脱髓鞘多神经病、自体免疫性贫血、纯红细胞再生障碍、血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、埃文斯(Evans)综合征、血管炎(例如,伴随多血管炎的肉芽肿病,旧名Wegener氏症)、大疱性皮肤病(例如,天疱疮、类天疱疮)、1型糖尿病、抗-NMDA受体脑炎和德维克病(Devic's disease)、格拉芙眼病(Graves',

ophthalmopathy)、https://en.wikipedia.org/wiki/Rituximab-cite_note-17、自体免疫性胰腺炎、斜视眼阵挛综合征(OMS)、https://en.wikipedia.org/wiki/Rituximab-cite_note-19和IgG4相关疾病。

[0022] 该包含融合蛋白的医药组合物是以有效量给药的。例如,该医药组合物的有效量为约1 μ g/kg至100 μ g/kg之间,如,1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、或100 μ g/kg。或者,以固定剂量或基于身体表面积(即,每 m^2)给药ALT-803。

[0023] 该包含融合蛋白复合体的医药组合物每月至少给药一次,如每月两次、每周一次、每周两次、每天一次、每天两次、每8小时一次、每4小时一次、每2小时一次、或每小时一次。该医药组合物的适当给药模式包括全身给药、静脉给药、皮下给药、肌肉给药、肿瘤内给药、吸入、和腹腔内给药。

[0024] 优选的,该融合蛋白增加干扰素 γ (IFN- γ)的血清水平,及/或刺激CD4 $^+$ 和CD8 $^+$ T细胞以及NK细胞以杀死受试者体内的死亡细胞或肿瘤细胞。例如,该融合蛋白复合体刺激CD4 $^+$ 和CD8 $^+$ T细胞的对抗与所述瘤形成、传染病或自体免疫疾病相关的细胞的应答。

[0025] 在本发明的可溶性融合蛋白复合体的某些方面,该IL-15多肽是具有不同于天然IL-15多肽的氨基酸序列的IL-15变体。本文中,人IL-15多肽称为huIL-15、hIL-15、huIL15、hIL15、IL-15野生型(wt),而其变体则使用其天然序列中天然氨基酸位置和变体氨基酸指代。例如,huIL15N72D指的是,包含在位置72处的N置换为D的人IL-15。一方面,该IL-15变体发挥IL-15兴奋剂的功能,如通过诸如IL-15R β γ C受体的结合活性比天然IL-15多肽增加而表明。或者,该IL-15变体发挥IL-15拮抗剂的功能,如通过诸如IL-15R β γ C受体的结合活性比天然IL-15多肽降低而表明。

[0026] 杀死靶点细胞的方法可同下述进行:a)令多个细胞与本发明的可溶性融合蛋白复合体接触,其中,该多个细胞进一步包括荷载被抗-CD3抗体如抗-CD3单链抗体识别的CD3和被IL-15域识别的IL-15R链的细胞,或荷载被该Fc域识别的Fc受体链的细胞,以及荷载被结合域如抗原特异性scAb识别的抗原的靶点细胞;b)在该靶点疾病细胞上的抗原与该免疫细胞上的CD3、IL-15R或Fc受体链之间形成足以结合并激活该免疫细胞的特异性结合复合体(桥);以及c)通过所结合的被激活的免疫细胞杀伤该靶点疾病细胞。例如,该靶点疾病细胞是肿瘤细胞、自体免疫疾病相关的细胞如自体免疫B细胞、或被感染的细胞如病毒感染的细胞。例如,该抗原特异性结合域包含抗-CD-20抗体。

[0027] 还提供预防或治疗其体内患病细胞表达疾病相关抗原的患者的疾病的方法,该方法包括下述步骤:a)向该患者给药本发明的具有疾病抗原特异性结合域如scAb的可溶性融合蛋白复合体;b)在表达抗原的患病细胞与表达CD3、IL-15R或Fc受体的免疫细胞之间形成阻抑锁定该免疫细胞的特异性结合复合体(桥);以及c)损害或杀死该患病细胞至足以预防或治疗该患者的疾病。

[0028] 本发明还提供预防或治疗其体内患病细胞表达疾病相关抗原的患者的疾病的方法,该方法包括下述步骤:a)将荷载CD3、IL-15R链或Fc受体链的免疫细胞与本发明的包含疾病抗原特异性结合域的可溶性融合蛋白复合体混合;b)向该患者给药该免疫细胞-融合蛋白复合体混合物;c)在表达抗原的患病细胞与表达CD3、IL-15R或Fc受体的免疫细胞之间形成阻抑锁定该免疫细胞的特异性结合复合体(桥);以及d)损害或杀死该患病细胞至足以预防或治疗该患者的疾病。

[0029] 本发明提供通过向哺乳动物给药有效量的本发明的可溶性融合蛋白复合体而刺激该哺乳动物的免疫应答的方法。本发明还提供通过向哺乳动物给药有效量的本发明任一可溶性融合蛋白复合体而抑制该哺乳动物的免疫应答的方法。

[0030] 除非另做界定,否则本文中使用的所有科技术语具有本发明所属领域技术人员一般理解的意义。下述参考文献向该领域技术人员提供本发明中所用的多数术语的通常定义:Singleton等人编撰的《微生物学和分子生物学词典(第二版)》(Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed.1994)) ;《剑桥科技词典》(The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988)) ;《遗传性词汇(第五版)》(The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991)) ;以及Hale和Marham编撰的《哈珀柯林斯生物学词典》(The Harper Collins Dictionary of Biology (1991))。本文中,除非另做说明,否则下述术语具有其下方所述的意义。

[0031] “剂”意为肽、核酸分子、或小化合物。例示性的治疗剂是2B8T3M。

[0032] “2B8T3M”意为包含抗-CD3 scAb/huIL-15N72D和抗-CD20scAb/huIL-15RaSu/huIgG1 Fc的复合体。

[0033] “减轻”意为降低、抑制、衰减、减少、停滞、或稳定化疾病的发展或进展。

[0034] “类似物”意为一种不完全一致但具有类似功能特征或结构特征的分子。例如,多肽类似物保留相对应的天然出现的多肽的生物活性,同时具有相对于天然出现的多肽增强该类似物功能的某些生化修饰。这些生化修饰将增加该类似物的蛋白酶抗性、膜渗透性或半衰期,而不改变例如配体结合。类似物可包括非天然氨基酸。

[0035] 术语“结合域”或“抗原特异性结合域”试图涵盖该领域中已知的抗体、单链抗体、Fab、Fv、T细胞受体结合域、配体结合域、受体结合域、或其它抗原特异性多肽。

[0036] 本发明包括抗体或这些抗体的片段,只要它们展现所希望的生物活性即可。本发明还包括嵌合抗体,如人源化抗体。通常,人源化抗体具有一个或多个被引入的来自非人类来源的氨基酸残基。例如,可使用该领域中揭示的方法,通过以啮齿动物互补性决定区的至少一部分替换人抗体的对应部分,实施人源化。

[0037] 术语“抗体”或“免疫球蛋白”试图涵盖多克隆抗体和单克隆抗体两类。优选的抗体是可与该抗原反应的单克隆抗体。术语“抗体”还试图涵盖超过一种可与该抗原反应的抗体的混合物(如,不同类型的可与该抗原反应的单克隆抗体的鸡尾酒混合物)。术语“抗体”进一步试图涵盖完整抗体、其生物学功能片段、单链抗体、和在基因方面改变的抗体如包含来自不止一个物种的多个部分的嵌合抗体、双功能抗体、抗体交联物、人源化抗体和人抗体。还可使用的生物学功能性抗体片段是那些源自足够结合至抗原的抗体的肽片段。本文中使用的“抗体”意为包括完整抗体以及能结合表位、抗原或感兴趣的抗原性片段的任何抗体片段(如,F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv)。

[0038] “结合至”分子意为具有对于该分子的物理化学亲和性。

[0039] “检测”指的是鉴别待检测的分析质的存在、不存在或量。

[0040] “疾病”意为任何损害或干扰细胞、组织或器官的正常功能的病症或病变。疾病的实例包括瘤形成、自体免疫疾病和病毒感染。

[0041] 术语“有效量”和“治疗有效量”的配方或配方组分意为,单独使用或联合使用的该

配方或组分的足以提供所希望的效果的量。例如，“有效量”意为，相对于未治疗的患者减轻疾病症状的单独或联合使用的化合物的量。用来实践本发明的用于治疗性处理疾病的活性化合物的有效量，依据给药方式以及受试者的年龄、体重和一般健康情况而变。基本上，主治医生或兽医将确定适宜的量和剂量方案。这一量被称为“有效”量。

[0042] “片段”意为多肽或核酸分子的一部分。优选这一部分含有所参照的核酸分子或多肽整体长度的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、或90%。例如，一个片段可含有10、20、30、40、50、60、70、80、90、or 100、200、300、400、500、600、700、800、900、或1000个核苷酸或氨基酸。但是，本发明还包含多肽和核酸片段，只要它们分别展现全长度多肽和核酸的所希望的生物活性即可。可采用几乎任何长度的核酸片段。例如，在本发明的多种实施操作中，包括总长度为约10,000、约5,000、约3,000、约2,000、约1,000、约500、约200、约100、约50个碱基对(包括所有中间长度)的作为示例的多核苷酸段。同样地，可采用几乎任何长度的多肽片段。例如，在本发明的多种实施操作中，包括总长度为约10,000、约5,000、约3,000、约2,000、约1,000、约500、约200、约100、或约50个氨基酸(包括所有中间长度)的作为示例的多肽段。

[0043] 术语“分离的”、“纯化的”或“生物学纯的”指的是，材料在不同程度上部含来自在其天然状态下与其相伴的组分。“分离”表示与原始来源或周围物质分隔的程度。“纯化”表示高于分离的分隔程度。

[0044] “纯化的”或“生物学纯的”蛋白质充分不含有其它材料，因此，任何杂质均不在材料商影响该蛋白质的生物学性质或造成其它负面后果。换言之，如果通过重组DNA技术生产时，本发明的核酸或肽实质上不含细胞材料、病毒材料或培养基，则它是纯化的；或者当化学合成时，不含化学前体或其它化学品时，则它是纯化的。纯度和同质性典型是使用分析化学技术如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱确定的。术语“纯化的”可表示，核酸或蛋白质在电泳凝胶中基本上给出一个条带。对于可进行修饰如磷酸化或糖基化的蛋白质，不同的修饰可给出不同的分离的蛋白质，而该单品种可分别纯化。

[0045] 同样地，“实质上纯的”意为，核苷酸或多肽已经与其天然伴随组分分隔。典型地，以重量计，当核苷酸和多肽是至少60%、70%、80%、90%、95%、或甚至99%不含蛋白质和它们所天然关联的天然出现的有机分子时，则该核苷酸和多肽是实质上纯的。

[0046] “分离的核酸”意为一种核酸，其不含该核酸所来源的有机体天然出现的基因组中位于该核酸侧翼的基因。该术语覆盖，例如：(a)一种DNA，其是天然出现的基因组DNA的一部分，但侧翼没有在其天然出现的有机体基因组中位于该分子部分侧翼的两个核酸序列；(b)并入载体中或原核生物或真核生物的基因组DNA中的核酸，并入方式为导致分子不同于任何天然出现的载体或基因组DNA；(c)一种独立的分子如cDNA、基因组片段、通过聚合酶链反应(PCR)生成的片段、或限制性片段；以及(d)一种重组核苷酸序列，其是杂交基因即编码融合蛋白的基因的一部分。根据本发明的分离的核酸分子进一步包括通过合成生产的分子，以及已经在化学上改变的任何核酸及/或具有改性骨架的核酸。例如，该分离的核酸是纯化的cDNA或RNA多核苷酸。分离的核酸分子也包括信使核糖核酸(mRNA)分子。

[0047] “分离的多肽”意为已经与其天然伴随组分分隔的本发明的多肽。典型地，当多肽的至少60重量%不含蛋白质和其天然关联的天然出现的有机分子时，则该多肽是分离的。优选该制备为至少75重量%，更优选至少90重量%，且最优选至少99重量%的本发明的多

肽。本发明的分离的多肽可通过下述获得：例如，从天然来源萃取、表达编码这一多肽的重组核酸、或化学合成该蛋白质。可通过任何适宜的方法如柱色谱、聚丙烯酰胺凝胶电泳、或HPLC分析来测量纯度。

[0048] “标记物”意为，与疾病或病变相关的表达水平或活性有所改变的任何蛋白质或多核苷酸。

[0049] “瘤形成”意为以过度增殖或凋亡下降为特征的疾病或病变。可使用本发明的例示性瘤形成包括但不限于，白血病(如，急性白血病、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性成髓细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、急性髓单核细胞白血病、急性单核细胞白血病、急性红白血病、慢性白血病、慢性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤(霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤)、华氏巨球蛋白血症、重链病、和实体瘤如肉瘤和癌(如，纤维肉瘤、黏液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏肿瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、威尔姆斯瘤、宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮细胞癌、神经胶质瘤、多形性胶质细胞瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、神经鞘瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、成神经细胞瘤、和成视网膜细胞瘤)。在具体具体例中，该瘤形成是多发性骨髓瘤、 β 细胞淋巴瘤、泌尿道上皮/膀胱癌或黑色素瘤。本文中，“获得一剂”中的“获得”包括合成、购买、或其它撷取该剂的方法。

[0050] “减少”意为负向改变至少5%、10%、25%、50%、75%、或100%。

[0051] “参考”意为标准条件或对照条件。.

[0052] “参考序列”是所界定的用作序列比对基准的序列。参考序列可以是具体序列的子集或整体；例如，全长度cDNA或基因序列的一段、或完整的cDNA或基因序列。对于多肽，参考多肽序列的长度通常为至少约16个氨基酸，优选至少约20个氨基酸，更优选至少约25个氨基酸，且甚至更优选约35个氨基酸、约50个氨基酸、或约100个氨基酸。对于核酸，参考核酸序列的长度通常为至少约50个核苷酸，优选至少约60个核苷酸，更优选至少约75个核苷酸，且甚至更优选约100个核苷酸或约300个核苷酸或与之接近或其之间的任何整数个核苷酸。

[0053] “特异性地结合”意为，化合物或抗体识别并结合本发明的多肽，但基本上不识别并结合天然包括本发明多肽的样品如生物样品中的其它分子。

[0054] 可用于本发明的方法中的核酸分子包括编码本发明的多肽或其片段的任何核酸分子。这些核酸分子不需要与内源性核酸序列100%一致，但典型将会展现实质上的一致性。具有与内源性序列的“实质一致性”的多核苷酸典型能与双链核酸分子中的至少一条链杂交。可用于本发明的方法中的核酸分子包括编码本发明的多肽或其片段的任何核酸分子。这些核酸分子不需要与内源性核酸序列100%一致，但典型将会展现实质上的一致性。具有与内源性序列的“实质一致性”的多核苷酸典型能与双链核酸分子中的至少一条链杂交。“杂交”意为，在互补的多核苷酸序列(如，本文中揭示的基因)或其部分之间在多种严苛条件下配对以形成双链分子(见，如，Wahl, G. M. and S. L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399; Kimmel, A. R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507)。

[0055] 例如,严苛的盐浓度通常为低于约750mM NaCl和75mM柠檬酸三钠,优选低于约500mM NaCl和50mM柠檬酸三钠,且更优选低于约250mM NaCl和25mM柠檬酸三钠。低严苛性杂交可在有机溶剂如甲酰胺的不存在下获得,而高严苛性的杂交可在至少约35%甲酰胺且更优选至少约50%甲酰胺的存在下获得。严苛的温度条件通常包括至少约30℃,更优选至少约37℃,且最优选至少约42℃的温度。其它可变的参数如杂交时间、洗涤剂如十二烷基硫酸钠(SDS)的浓度、以及包含或不饱和载体DNA,是该领域技术人员所周知的。通过按照需要组合这些各种条件而实施各种水平的严苛性。在优选的具体例中,杂交将在30℃的750mM NaCl、75mM柠檬酸三钠和1% SDS中出现。在更优选的具体例中,杂交将出现在37℃的500mM NaCl、50mM柠檬酸三钠、1% SDS、35% 甲酰胺和100μg/ml变性的鲑鱼精DNA(ssDNA)中出现。最优选的具体例中,杂交将在42℃的250mM NaCl、25mM柠檬酸三钠、1% SDS、50% 甲酰胺和200μg/ml ssDNA中出现。对这些条件进行可用的变更对于该领域技术人员是显而易见的。

[0056] 对于大多数应用,杂交后的洗涤步骤的严苛性也可改变。洗涤严苛性条件可通过盐浓度和温度定义。如上所述,可通过降低盐浓度或提高温度来增加洗涤严苛性。例如,对于洗涤步骤的严苛的盐浓度优选为低于约30mM NaCl和3mM柠檬酸三钠,且最优选低于约15mM NaCl和1.5mM柠檬酸三钠。用于洗涤步骤的严苛温度条件包括至少约25℃,更优选至少约42℃,且甚至更优选至少约68℃的温度。在优选的具体例中,洗涤步骤将以25℃的30mM NaCl、3mM柠檬酸三钠和0.1% SDS出现。在更优选的具体例中,洗涤步骤将出现在42℃的15mM NaCl、1.5mM柠檬酸三钠和0.1% SDS中。在更优选的具体例中,洗涤步骤将出现在68℃15mM NaCl、1.5mM柠檬酸三钠和0.1% SDS中。对于这些条件的额外变更对于该领域技术人员是显而易见的。杂交技术是该领域技术人员所周知的且揭示于,例如,Benton和Davis(Science 196:180,1977);Grunstein and Hogness(Proc.Natl.Acad.Sci.,USA 72:3961,1975);Ausubel等人所著《现代分子生物学技术》(Current Protocols in Molecular Biology,Wiley Interscience,New York,2001);Berger和Kimmel所著《分子克隆技术指南》(Guide to Molecular Cloning Techniques,1987,Academic Press,New York)和Sambrook等人所著《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York)中。

[0057] “实质上一致”意为多肽或核酸分子展现与参考氨基酸序列(例如,本文中揭示的任一氨基酸序列)或核酸序列(例如,本文中揭示的任一核酸序列)的至少50%一致性。优选地,该序列在氨基酸水平或核酸上与用于比对的序列的一致性为至少60%,更优选80%或85%,且更优选90%、95%或甚至99%。

[0058] 典型地,使用序列分析软件(例如,Sequencher,Gene Codes Corporation,775 Technology Drive,Ann Arbor,MI;Vector NTI,Life Technologies,3175 Staley Rd.Grand Island,NY)测量序列一致性。该软件通过将同源程度分配至各种替换、删除及/或其它修饰来匹配一致序列或相似序列。保守替换典型包括下述各组内的替换:甘氨酸、丙氨酸;缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸;天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺;丝氨酸、苏氨酸;赖氨酸、精氨酸;以及苯丙氨酸、酪氨酸。例示性的确定一致程度的途径中,可使用BLAST程序,且介于e⁻³至e⁻¹⁰⁰之间的可能性评分表明密切相关的序列。

[0059] “受试者”意为哺乳动物,包括但不限于,人或非人哺乳动物,如牛科、马科、犬科、羊科或猫科动物。该受试者优选需要此治疗的哺乳动物,如已经被诊断患有B细胞淋巴瘤或

其倾向的受试者。该哺乳动物是任何哺乳动物,如,人、灵长类、鼠、大鼠、狗、猫、马、以及家畜或用于食品消费的动物,如牛、绵羊、猪、鸡和山羊。在优选的具体例中,该哺乳动物是人。

[0060] 本文中提供的范围应理解为是该范围内所有数值的简写。例如,1至50的范围理解为包括由1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、或50所组成组中的任何数字、数字组合、或子范围。

[0061] 本文中使用的术语“治疗”(treating和treatment)指的是,将一剂或配方给药至罹患有害病症、病变或疾病的有临床症状的个体,以造成症状严重性及/或频率下降的效果、消除该症状及/或其基本病因、及/或促进对损害的改善或矫正。应知悉,尽管未被排除,但治疗病变或病症并不需要完全消除该病变、病症或与之关联的症状。

[0062] 术语“预防”(preventing和prevention)指的是,将一剂或组合物给药至易患有害病症、病变或疾病或由患病倾向的没有临床症状的个体,并因此涉及对症状的出现及/或其基本病因的预防。

[0063] 除非具体指明或从语境中明显可见,本文中,术语“或”理解为包含在内。除非具体指明或从语境中明显可见,本文中,术语“一”和“该”理解为单数或复数。

[0064] 除非具体指明或从语境中明显可见,本文中,术语“约”理解为处于该领域正常公差范围内,例如,处于均值的2标准偏差之内。“约”可理解为处于所指明的值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、或0.01%内。除非语境中明确排除,否则本文中提供的所有数字值均可由术语“约”修饰。

[0065] 对本文中变量的任何定义中所列化学基团的描述包括该变量作为任何单一基团或所列基团的组合。对本文中变量或方法的具体例的描述包括该具体例作为任何单一具体例或与任何其它具体例或其部分组合。

[0066] 本文中提供的任何组合物或方法可与本文中提供的任何其它组合物和方法合用。

[0067] 连接词“包含”与“包括”、“含有”或“其中”同义,是包容性的或开放性的,且并不排除额外的未引用的元件或方法步骤。相反,连接词组“由…组成”排除该权利要求中未指定的任何元件、步骤或成分。连接词组“主要由…组成”将权利要求的范畴限制为指定的材料或步骤以及“那些不在材料上影响所主张的发明的基本特征和新颖特征”的材料或步骤。

[0068] 从下述对本发明优选具体例的说明和权利要求中可获知本发明的其它特征和优点。除非明确界定,否则本文中使用的所有科技术语均具有与本发明所属领域技术人员所一般理解者相同的意义。尽管与本文中揭示者类似或等效的方法和材料可用于本发明的实践或测试,但适当的方法和材料如下所述。本文中引用的所有已公开的外国专利和专利申请通过引用并入本文。

[0069] 本文中引用的通过保藏号指明的基因银行(Genbank)和NCBI文本通过引用并入本文。本文中引用的所有其它已出版的参考文献、文档、手稿和科学文献通过引用并入本文。若存在冲突,则以包括定义在内的本说明书为准。此外,该材料、方法和实施例仅用于例示而非限制。

附图说明

[0070] 图1是说明一种多链融合多肽——T3分子(T3M)——及其对抗疾病细胞的免疫介

导效应的示意图。

[0071] 图2是说明2B8T3M复合体及其对抗表达CD20抗原的疾病细胞的免疫介导效应的示意图,其中,该2B8T3M复合体包含抗-CD3 scAb/huIL-15N72D和抗-CD20scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc融合蛋白。

[0072] 图3是显示该T3M复合体在二硫键还原后的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析的照片。右图:2B8T3M(3 μ g);左图:标记物。

[0073] 图4A是说明2B8T3M结合至荷载Fc受体的细胞系的活性的曲线图。图4B是显示2B8T3M结合至荷载IL-15受体的细胞系的活性的曲线图。

[0074] 图5A是显示2B8T3M结合至荷载CD20的人淋巴细胞的活性的曲线图。图5B是显示2B8T3M结合至荷载CD3的人淋巴细胞的活性的曲线图。图5C是显示2B8T3M结合至荷载IL-15受体的人淋巴细胞的活性的曲线图。

[0075] 图6是例示性说明由2B8T3M、2B8T2M、和ALT-803介导的IL-15依赖性32D β 细胞的增殖的折线图。

[0076] 图7是例示性说明由2B8T2M或2B8T3M诱导的人免疫细胞对抗Daudi-B细胞淋巴瘤的细胞毒性的柱状图。

[0077] 图8是显示由2B8T2M或2B8T3M诱导的干扰素 γ (IFN- γ) 从人免疫细胞释放的柱状图。

[0078] 图9的A图至图9的C图显示2B8T2M融合蛋白结构和表征。图9的A图是包括2B8的单链成分的组织的2B8T2M复合体的示意图。图9的B图是经纯化的2B8T2M融合蛋白在还原条件下的SDS-PAGE分析。各栏: (1) MW标记物; (2) 2B8T2M。图9的C图显示2B8T2M蛋白的体积排阻色谱分析。

[0079] 图10的A图至图10的C图显示2B8T2M的B细胞结合。通过流式细胞术进行的2B8T2M的靶点特异性结合的分析。向人PBMCs (5×10^5 /测试) 中加入1 mg/mL的利妥昔单抗 (rituximab)、2B8T2M、或人IgG作为同种型对照,最终体积为0.1mL,分析时间为10分钟。该反应以FITC交联的利妥昔单抗(图10的A图)或2 μ g/样品的FITC交联的2B8T2M(图10的B图)和5 μ l/样品的PE-交联的HLA-DR染色30分钟。图10的C图显示,人组织细胞性淋巴瘤U-937细胞以FITC交联的利妥昔单抗、2B8T2M、或2B8T2M-LA突变体染色30分钟,随后通过流式细胞术进行Fc受体结合活性的分析。

[0080] 图11的A图和图11的B图显示,2B8T2M诱导CDC和细胞凋亡。图11的A图显示,在37°C,在补体(正常人血清)的存在下,以多种浓度的2B8T2M、2B8T2M-LA突变体、2B8T2M-D8N突变体、以及作为阳性对照的利妥昔单抗将Daudi细胞 (3×10^5 /测试) 孵化2小时。加入碘化丙啶并通过流式细胞术分析。死亡细胞的百分比表明碘化丙啶阳性细胞的百分比 (n=3)。图11的B图显示,在37°C,以2B8T2M、2B8T2M-LA、2B8T2M-D8N或利妥昔单抗将Daudi细胞孵化3天。Daudi细胞以Annexin V染色,并通过流式细胞术测定细胞死亡的百分比。数据表示为均值 \pm SE。

[0081] 图12的A图至图12的D图显示利妥昔单抗和2B8T2M的ADCC活性。以CellTrace紫标记Daudi细胞,使用新鲜的人PBMCs(图12的A图, n=5)或经纯化的NK细胞(图12的B图, n=两位供体)作为效应子细胞。使用所标注浓度的利妥昔单抗或2B8T2M以紫色标记的靶点细胞以所标注的效应子:靶点比镀覆该效应子细胞。通过使用流式细胞术分析碘化丙啶阳性的

紫色标记的Daudi细胞,在第2天评价PBMCs的靶点细胞存活率(图12的A图)或在第2天评价NK细胞的靶点细胞存活率(图12的B图)。死亡Daudi细胞的百分比表示碘化丙啶阳性细胞.*表示相对于2B8T2M的p<0.01 (10nM) 和p<0.05 (1nM)。数值表示均值±SE。图12的C图和图12的D图是其中人PBMCs (5×10^6) 在2mL的RPMI-10中以2B8T2M孵化2天的图。使用抗-NKp46(图12的C图,NK细胞)或抗-CD8(图12的D图,CD8⁺T细胞)染色2B8T2M激活的PBMCs,之后进行细胞内颗粒酶B和穿孔素染色。通过流式细胞术测定由被激活的CD8⁺T细胞和NK细胞表达的颗粒酶B和穿孔素的水平。

[0082] 图13的A图至图13的F图显示,使用利妥昔单抗作为对照,对2B8T2M的PET成像数据的定量分析。图13的A图和图13的D图显示在注射⁶⁴Cu-NOTA-2B8T2M和⁶⁴Cu-NOTA-利妥昔单抗后不同的时间点(0.5、6、30、和70小时)的一系列二维投影PET图像。图13的B图和图13的E图中,用来计算主要器官的每克组织所注射剂量的百分比(% ID/g)的感兴趣区域分析,是基于该PET成像在不同的时间点进行的。图13的C图和图13的F图是其中小鼠被安乐死,收集主要器官/组织且称重的图。使用伽马计数器测定2B8T2M和利妥昔单抗的组织生物分布。数据是每组4只鼠的代表(均值±SD)。

[0083] 图14的A图至图14的D图显示由2B8T2M诱导的膨胀CD8⁺T细胞和NK细胞。将Ce11Trace紫标记的富集同基因T细胞(1×10^7 /鼠)过继转移至C57BL/6雌性接受者体内(n=5或6/组)。在转移2天后,静脉注射2B8T2M(5mg/kg)、2B8T2M-LA(5mg/kg)、2B8T2M-D8N(5mg/kg)、IL-15(0.056mg/kg)、及PBS。图14的A图和图14的B图中,对于在第5天收获的脾细胞,以抗-CD4、抗-CD8染色T细胞(图14的A图),并以抗-NK1.1染色NK细胞(图14的B图),以待通过流式细胞术分析。图14的C图中,基于Ce11Trace紫的荧光强度显示细胞分裂(通过最明亮的细胞表示无增殖)。图14的D图是通过流式细胞术分析增殖细胞的百分比的图。p>0.05: IL-15 vs 2B8T2M-D8N和2B8T2M vs 2B8T2M-LA;其它组别中,p<0.01。数据表示为均值±SD。

[0084] 图15的A图至图15的E图显示,以2B8T2M治疗的荷瘤鼠的存活期延长,以及2B8T2M的抗肿瘤活性功效。图15的A图显示,在静脉注射 1×10^7 Daudi细胞/鼠之后,荷Daudi B淋巴细胞瘤的鼠随机分为3个治疗组(n=6),并在接种后15天和18天,以10mg/kg的利妥昔单抗(▲)、5mg/kg的2B8T2M(●)、和PBS(■)媒介对照物治疗。PBS vs利妥昔单抗:p=0.001;利妥昔单抗vs 2B8T2M:p=0.006。图15的B图至图15的D图显示,将荷Daudi B淋巴瘤的鼠随机分为若干治疗组,并入图15的A图中所示,以10mg/kg的利妥昔单抗(n=7)、0.2、1、5、12.8mg/kg的2B8T2M(n=6/剂量水平)、和PBS(n=7)媒介对照物治疗。在第二次治疗4天后,小鼠被安乐死,收获骨髓和脾细胞。图15的B图显示,通过HLA-DR染色使用流式细胞术测定骨髓中Daudi细胞的百分比。图15的C图显示,通过NKp46染色使用流式细胞术测定脾脏中NK细胞的百分比。图15的D图显示,通过NKp46染色使用流式细胞术测定的骨髓中NK细胞的百分比。图15的E图显示,将荷Daudi B淋巴瘤的SCID-浅褐色鼠随机分为3个治疗组,并在接种后13天和16天,以10mg/kg的利妥昔单抗(n=8)、5mg/kg的2B8T2M(n=7)和PBS(n=8)媒介对照物治疗。在第二次治疗4天后,小鼠被安乐死,收获骨髓。通过HLA-DR染色使用流式细胞术测定骨髓中Daudi细胞的百分比。数据表示为均值±SD。图15的B图至图15的E图中,*表示,相对于PBS,p<0.01;†表示,相对于利妥昔单抗,p<0.01。

[0085] 图16的A图和图16的B图显示2B8T2M的不同突变蛋白质的抗肿瘤功能的比较。图16的A图显示,静脉注射 1×10^7 Daudi细胞/鼠之后,将荷Daudi B淋巴瘤的SCID鼠随机分为4个

治疗组 (n=8) ,并入图15中所示,以5mg/kg的2B8T2M、2B8T2M-LA、2B8T2M-D8N、和作为媒介对照物的PBS治疗。在第二次治疗4天后,小鼠被安乐死,并收获骨髓。如图15所示,测定骨髓中Daudi细胞的百分比。图16的B图显示,将荷Daudi B淋巴瘤的SCID鼠随机分为2个治疗组 (n=10) ,并在接种后18天和21天,以5mg/kg的2B8T2M、和c264scTCR-IL15N72D/C264scTCR-IL15RaSuFc治疗。在第二次治疗4天后,将所有小鼠安乐死,并收获骨髓。如图15所示,测定骨髓中Daudi细胞的百分比。*表示,相对于PBS, p<0.01; §表示,相对于2B8T2M, p<0.05。数据表示为均值±SD。

[0086] 图17的A图和图17的B图显示食蟹猕猴体内由2B8T2M造成的B细胞消耗。研究由3组食蟹猕猴组成,每组4只雄猴。以静脉注射5mg/kg的2B8T2M、10mg/kg的利妥昔单抗、和PBS媒介对照物治疗这些动物。3天后,重复相同的治疗。在治疗前、第一次治疗1天(24小时)后、第一次治疗2天后、第一次治疗3天后、第二次治疗前、第一次治疗4天(第二次治疗24小时)后、第一次治疗5天后和第一次治疗7天后,获得用于B细胞分选的血液样品(图17的A图)。在第一次治疗7天后,将食蟹猕猴安乐死,并收获脾细胞和肠系膜淋巴结(LN)细胞用于通过流式细胞术进行B细胞分析(图17的B图)。

具体实施方式

[0087] 本发明至少部分地基于下述令人惊奇的发现:多特异性蛋白复合体激活效应子T细胞并将其活性靶向指向疾病细胞,从而导致疾病特异性的细胞毒性。本文提供多特异性蛋白复合体,其具有一个识别疾病抗原(如,CD20)的结合域和识别T细胞上的CD3的第二结合域。这些蛋白复合体可用于治疗受试者的瘤形成、传染病或自体免疫疾病的方法中(图1)。具体而言,如下文中所详述,可溶性抗-CD3scAb/huIL-15N72D:抗-CD20 scAb/huIL-15RaSu/huIgG1 Fc复合体(“抗-CD3 scAb-抗-CD20 scAb T3M”或“2B8T3M”)刺激CD8⁺和CD4⁺T细胞,以杀死肿瘤靶点细胞(图2)。2B8T3M还刺激干扰素-γ(IFN-γ)从人外周血单个核细胞(PBMCs)以及CD8⁺和CD4⁺T细胞中释放。因此,本文提供以2B8T3M为特征的组合物,以及使用该组合物提升对抗瘤形成(如,B细胞淋巴瘤和慢性淋巴细胞白血病)的免疫应答和耗尽B细胞以治疗自体免疫疾病(如,免疫和血栓形成性血小板减少性紫癜和类风湿性关节炎)的方法。

[0088] 如本文中所述,使用具有以患病细胞为靶向的用于宿主免疫识别和应答的能力的蛋白质是治疗癌症、传染病和自体免疫疾病的有效策略。如美国专利US 8,507,222(通过引用并入本文)中所述,包含IL-15和IL-15受体α域的蛋白质支架已经用来生成能识别疾病细胞上的抗原和免疫细胞上的受体的多特异性蛋白质。见,美国专利US 8,507,222的实施例15。本文中揭示可溶性多特异性蛋白复合体的生成,其中,该蛋白复合体包含链接至识别疾病相关抗原和CD3的结合域的IL-15和IL-15受体α。例如,该抗原特异性结合域是识别B细胞淋巴瘤上的人CD20的单链抗体(scAb),而该CD3识别域具有对于人CD3的scAb特异性。

[0089] 一些情形中,该抗-CD20 scAb源自利妥昔单抗的可变链,而利妥昔单抗是一种嵌合单克隆抗-CD20抗体。例如,该抗-CD20 scAb序列包含经由柔性链接序列链接的该利妥昔单抗抗体的重链V域编码区和轻链V域编码区。或者,可使用来自其它该领域中已知的抗-CD20 Ab的结合域。

[0090] 一些情形中,该抗-CD3 scAb源自OKT3的可变链,而OKT3是一种鼠单克隆抗-CD3抗

体。例如,该抗-人CD3 scAb序列包含经由柔性链接序列链接的该OKT3抗体的重链V域编码区和轻链V域编码区。或者,可使用来自其它该领域中已知的抗-CD3 Ab的结合域。

[0091] 该识别疾病抗原的结合域和识别CD3的结合域经或不经额外的链接序列链接至IL-15或IL-15受体 α 蛋白的N端或C端,只要结合活性得以维持即可。优选的,该抗-CD3 scAb域链接至人IL-15N72D超兴奋蛋白(huIL-15N72D)的N端。或者,该抗-CD3 scAb域链接至人IL-15N72D蛋白的C端。优选的,该抗原特异性结合域链接至人IL-15受体 α sushi域(huIL-15R α Su)的N端。一些情形中,本发明的多特异性蛋白复合体进一步包含用于蛋白二体化和识别免疫细胞上的CD16受体的IgG Fc域。这一域介导对抗靶点细胞的抗体依赖性细胞内细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)的刺激。一些实例中,可采用具有经提升或降低的CD16结合活性的Fc域。一方面,该Fc域含有降低ADCC活性的L234A和L235A(LALA)氨基酸替换(基于Fc共有序列进行编号),但维持形成以二硫键键结的二聚体的能力。

[0092] 白介素-15

[0093] 白介素-15(IL-15)是用于效应子NK细胞和CD8+T记忆细胞的发育、增殖和激活的重要细胞因子。IL-15结合至IL-15受体 α (IL-15R α),且以IL-2/IL-15受体 β -一般 γ 链(IL-15R β γ c)复合体的反式形式呈递在效应子细胞上。IL-15和IL-2共享与IL-15R β γ c的结合,以及通过STAT3途径和STAT5途径传递信号。但是,不同于IL-2,IL-15不支持对CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$ T调节(Treg)细胞的维护或诱导被激活的CD8+T细胞的细胞死亡,这些效果可能限制IL-2对于多发性骨髓瘤的治疗活性。此外,IL-15是仅有的已知向效应子CD8+T细胞提供抗凋亡信号的细胞因子。IL-15,或单独给药或作为与IL-15R α 的复合体给药,在实验动物模型最终展现潜在的对抗已确立的实体瘤的抗肿瘤活性,并因此已经被认定为最具前景的可能治愈癌症的免疫治疗药物之一。

[0094] 为了促进基于IL-15的癌症疗法的临床发展,鉴别出一种具有比IL-15增加的生物活性的IL-15突变体(IL-15N72D)(Zhu et al., J Immunol, 183:3598-3607, 2009)。通过创建IL-15N72D:IL-15R α /Fc融合复合体(ALT-803),这一IL-15超兴奋剂(IL-15N72D)的药代动力学和生物活性得以进一步改善,而该融合复合体的创建令该超兴奋剂复合体的活性为体内天然细胞因子活性的至少25倍(Han et al., Cytokine, 56:804-810, 2011)。

[0095] 抗原特异性结合域

[0096] 抗原特异性结合域由特异性地结合至患病细胞上的靶点的多肽组成。或者,这些域可结合至支持该疾病状态的其它细胞上的靶点,如支持肿瘤生长的基质细胞上的靶点或支持疾病介导的免疫抑制的免疫细胞上的靶点。抗原特异性结合域包括该领域中已知的抗体、单链抗体、Fab、Fv、T细胞受体结合域、配体结合域、受体结合域、域抗体、单域抗体、为性抗体、纳米抗体、肽抗体、或多种其它抗体嵌合体(如,affimers、affitins、 α 抗体、atrimers、基于CTLA4的分子、adnectins、anticalins、基于Kunitz域的蛋白、avimers、knottins、fynomers、darpins、affibodies、affilins、单抗体和基于犰狳重复蛋白的蛋白质(Weidle, UH, et al. 2013. Cancer Genomics&Proteomics 10:155-168))。

[0097] 某些具体例中,用于该抗原特异性结合域的抗原包含细胞表面受体或配体。再一具体例中,该抗原包含CD抗原、细胞因子或趋化因子受体或配体、生长因子受体或配体、组织因子、细胞粘附分子、MHC/MHC样分子、Fc受体、Toll样受体、NK受体、TCR、BCR、阳性/阴性共刺激受体或配体、死亡受体或配体、肿瘤相关的抗原、或病毒编码的抗原。

[0098] 优选的,该抗原特异性结合域能结合至肿瘤细胞上的抗原。肿瘤特异性结合域可源自被批准用于治疗癌症患者的抗体,该抗体包括利妥昔单抗、奥法木单抗(ofatumumab)和阿妥珠单抗(obinutuzumab)(抗-CD20 Abs);曲妥珠单抗(trastuzumab)和帕妥珠单抗(pertuzumab)(抗-HER2 Abs);西妥昔单抗(cetuximab)和帕尼单抗(panitumumab)(抗-EGFR Abs);以及阿伦单抗(alemtuzumab)(抗-CD52 Ab)。同样,可使用来自获批的具有对于CD20(⁹⁰Y标记的替依莫单抗(ibritumomab tiuxetan)、¹³¹I标记的托西莫单抗(tositumomab))、HER2(ado曲妥珠单抗(ado-trastuzumab emtansine))、CD30(本妥昔单抗(brentuximab vedotin))和CD33(吉妥单抗(gemtuzumab ozogamicin))的特异性的抗体-效应分子交联物的结合域(Sliwkowski MX, Mellman I. 2013 Science 341:1192)。

[0099] 此外,本发明的优选结合域可包括该领域中已知的多种其它肿瘤特异性抗体域。用于治疗癌症的抗体及其各自靶点包括但不限于,纳武单抗(nivolumab)(抗-PD-1Ab)、TA99(抗-gp75)、3F8(抗-GD2)、8H9(抗-B7-H3)、阿巴伏单抗(abagovomab)(抗-CA-125(仿制))、阿德木单抗(adecatumumab)(抗-EpCAM)、阿夫土珠单抗(afutuzumab)(抗-CD20)、培化阿珠单抗(alacizumab pegol)(抗-VEGFR2)、喷替酸阿妥莫单抗(altumomab pentetate)(抗-CEA)、阿麦妥昔(amatuximab)(抗-间皮素)、AME-133(抗-CD20)、马安莫单抗(Anatumomab mafenatox)(抗-TAG-72)、阿泊珠单抗(apolizumab)(抗-HLA-DR)、阿西莫单抗(arcitumomab)(抗-CEA)、巴维昔单抗(Bavituximab)(抗-磷脂酰丝氨酸)、贝妥莫单抗(bectumomab)(抗-CD22)、贝利木单抗(belimumab)(抗-BAFF)、贝索单抗(besilesomab)(抗-CEA相关抗原)、贝伐单抗(bevacizumab)(抗-VEGF-A)、莫比伐单抗(bivatuzumab mertansine)(抗-CD44 v6)、兰妥莫单抗(blinatumomab)(抗-CD19)、BMS-663513(抗-CD137)、本妥昔单抗(brentuximab vedotin)(抗-CD30(TNFRSF8))、美坎珠单抗(cantuzumab mertansine)(抗-粘蛋白CanAg)、美坎珠单抗(cantuzumab ravtansine)(抗-MUC1)、喷替酸卡罗单抗(capromab pentetide)(抗-前列腺癌细胞)、卡鲁单抗(carlumab)(抗-MCP-1)、卡妥索单抗(catumaxomab)(抗-EpCAM、CD3)、cBR96-阿霉素免疫交联物(抗-Lewis-Y抗原)、CC49(抗-TAG-72)、西塔珠单抗(cedelizumab)(抗-CD4)、Ch.14.18(抗-GD2)、ch-TNT(抗-DNA相关抗原)、西他土珠单抗(citatumomab bogatox)(抗-EpCAM)、西妥木单抗(cixutumumab)(抗-IGF-1受体)、替坦司可利妥珠单抗(clivatuzumab tetraxetan)(抗-MUC1)、可那木单抗(conatumumab)(抗-TRAIL-R2)、CP-870893(抗-CD40)、达西珠单抗(dacetuzumab)(抗-CD40)、达利珠单抗(daclizumab)(抗-CD25)、达洛珠单抗(dalotuzumab)(抗-胰岛素样生长因子I受体)、达雷木单抗(daratumumab)(抗-CD38(环状ADP核糖水解酶))、登西珠单抗(demcizumab)(抗-DLL4)、地莫单抗(detumomab)(抗-B淋巴瘤细胞)、德罗图单抗(drozitumab)(抗-DR5)、杜力戈图单抗(duligotumab)(抗-HER3)、杜氏图单抗(dusigitumab)(抗-ILGF2)、依美昔单抗(ecromeximab)(抗-GD3神经节苷脂)、依决洛单抗(edrecolomab)(抗-EpCAM)、埃罗妥珠单抗(elotuzumab)(抗-SLAMF7)、艾西莫单抗(elsilimomab)(抗-IL-6)、埃文单抗(enavatuzumab)(抗-TWEAK受体)、诺提克单抗(enotucumab)(抗-DLL4)、埃斯托西单抗(ensituximab)(抗-5AC)、西依匹莫单抗(epitumomab cituxetan)(抗-上皮唾蛋白)、依帕珠单抗(epratuzumab)(抗-CD22)、厄马索单抗(ertumaxomab)(抗-HER2/neu、CD3)、埃达珠单抗(etaracizumab)(抗-整合素αvβ3)、法拉莫单抗(faralimomab)(抗-干扰素受体)、法拉图组单抗(farletuzumab)(抗-叶酸受体)

1)、FBTA05 (抗-CD20)、费希腊妥单抗 (ficiatuzumab) (抗-HGF)、芬妥木单抗 (figitumumab) (抗-IGF-1受体)、弗兰托单抗 (flanvotumab) (抗-TYRP1 (糖蛋白75))、夫苏木单抗 (fresolimumab) (抗-TGF β)、弗图希单抗 (futuximab) (抗-EGFR)、加利昔单抗 (galiximab) (抗-CD80)、盖尼塔单抗 (ganitumab) (抗-IGF-I)、吉妥珠单抗奥佐米星 (gemtuzumab ozogamicin) (抗-CD33)、吉仁土希单抗 (girentuximab) (抗-碳酸酐酶9(CA-IX))、维德汀单抗 (glembatumumab vedotin) (抗-GPNMB)、古谢夫单抗 (guselkumab) (抗-IL13)、伊立珠单抗 (ibalizumab) (抗-CD4)、替伊莫单抗 (ibritumomab tiuxetan) (抗-CD20)、依库单抗 (icrucumab) (抗-VEGFR-1)、伊戈伏单抗 (igovomab) (抗-CA-125)、IMAB362 (抗-CLDN18.2)、IMC-CS4 (抗-CSF1R)、IMC-TR1 (TGF β RII)、英戈土珠单抗 (imgatuzumab) (抗-EGFR)、英克拉库单抗 (inclacumab) (抗-选择素P)、依坦希单抗 (indatuximab ravidansine) (抗-SDC1)、伊珠单抗奥佐米星 (inotuzumab ozogamicin) (抗-CD22)、英妥木单抗 (intetumumab) (抗-CD51)、英妥木单抗 (ipilimumab) (抗-CD152)、英妥木单抗 (iratumumab) (抗-CD30 (TNFRSF8))、KM3065 (抗-CD20)、KW-0761 (抗-CD194)、LY2875358 (抗-MET)、拉贝珠单抗 (labetuzumab) (抗-CEA)、拉姆布罗力珠单抗 (lambrolizumab) (抗-PDCD1)、来沙木单抗 (lexatumumab) (抗-TRAIL-R2)、林妥珠单抗 (lintuzumab) (抗-CD33)、立鲁单抗 (lirilumab) (抗-KIR2D)、劳乌土珠单抗 (lorvotuzumab mertansine) (抗-CD56)、鲁卡木单抗 (lucatumumab) (抗-CD40)、鲁昔单抗 (lumiliximab) (抗-CD23 (IgE受体))、马帕木单抗 (mapatumumab) (抗-TRAIL-R1)、马格土希单抗 (margetuximab) (抗-ch4D5)、马妥珠单抗 (matuzumab) (抗-EGFR)、美力姆单抗 (mavrilimumab) (抗-GM-CSF受体 α 链)、米拉珠单抗 (milatuzumab) (抗-CD74)、明瑞莫单抗 (minretumomab) (抗-TAG-72)、米妥莫单抗 (mitumomab) (抗-GD3神经节苷脂)、莫格穆里单抗 (mogamulizumab) (抗-CCR4)、莫希土姆单抗 (moxetumomab pasudotox) (抗-CD22)、他那可单抗 (nacolomab tafenatox) (抗-C242抗原)、他那莫单抗 (naptumomab estafenatox) (抗-5T4)、纳瑞特单抗 (narnatumab) (抗-RON)、奈昔木单抗 (necitumumab) (抗-EGFR)、耐西维单抗 (nesvacumab) (抗-血管生成素2)、尼妥珠单抗 (nimotuzumab) (抗-EGFR)、妮威禄单抗 (nivolumab) (抗-IgG4)、巯诺莫单抗 (nofetumomab merpentan)、奥瑞珠单抗 (ocrelizumab) (抗-CD20)、奥卡土珠单抗 (ocaratumumab) (抗-CD20)、奥拉图单抗 (olaratumab) (抗-PDGF-R α)、欧那土珠单抗 (onartuzumab) (抗-c-MET)、欧土希珠单抗 (ontuxizumab) (抗-TEM1)、莫奥珠单抗 (oportuzumab monatox) (抗-EpCAM)、奥戈伏单抗 (oregovomab) (抗-CA-125)、奥特乐土珠单抗 (otlertuzumab) (抗-CD37)、帕尼库单抗 (pankomab) (抗-MUC1的肿瘤特异性糖基化)、帕萨土珠单抗 (parsatuzumab) (抗-EGFL7)、帕考珠单抗 (pascolizumab) (抗-IL-4)、帕图单抗 (patritumab) (抗-HER3)、帕尼单抗 (pemtumomab) (抗-MUC1)、帕妥珠单抗 (pertuzumab) (抗-HER2/neu)、皮地利珠单抗 (pidilizumab) (抗-PD-1)、平尼土珠单抗 (pinatuzumab vedotin) (抗-CD22)、平妥莫单抗 (pintumomab) (抗-腺癌抗原)、普拉土珠单抗 (polatuzumab vedotin) (抗-CD79B)、普立木单抗 (pritumumab) (抗-波形蛋白)、PRO131921 (抗-CD20)、坤立珠单抗 (quilizumab) (抗-IGHE)、雷库图单抗 (racotumomab) (抗-N-羟乙酰基神经氨酸)、雷德图单抗 (radretumab) (抗-纤连蛋白额外结构域-B)、雷莫芦单抗 (ramucirumab) (抗-VEGFR2)、利妥木单抗 (rilotumumab) (抗-HGF)、罗妥木单抗 (robatumumab) (抗-IGF-1受体)、罗勒杜单抗 (roledumab) (抗-RHD)、罗维珠单抗

(rovelizumab) (抗-CD11和CD18)、沙玛立珠单抗(samalizumab) (抗-CD200)、沙妥莫单抗(satumomab pendetide) (抗-TAG-72)、司瑞斑图单抗(seribantumab) (抗-ERBB3)、SGN-CD19A(抗-CD19)、SGN-CD33A(抗-CD33)、西罗珠单抗(sibrotuzumab) (抗-FAP)、西图希单抗(siltuximab) (抗-IL-6)、苏力图单抗(solitomab) (抗-EpCAM)、松妥珠单抗(sontuzumab) (抗-上皮唾蛋白)、他贝鲁单抗(tabalumab) (抗-BAFF)、他珠单抗(tacatuzumab tetraxetan) (抗- α -甲胎蛋白)、帕他莫单抗(taplitumomab paptox) (抗-CD19)、阿替莫单抗(telimomab aritox)、替妥莫单抗(tenatumomab) (抗-腱生蛋白C)、替奈昔单抗(teneliximab) (抗-CD40)、替普单抗(teprotumumab) (抗-CD221)、TGN1412(抗-CD28)、替西木单抗(ticilimumab) (抗-CTLA-4)、替加珠单抗(tigatuzumab) (抗-TRAIL-R2)、TNX-650(抗-IL-13)、托西莫单抗(tositumomab) (抗-CS20)、托维图单抗(tovetumab) (抗-CD140a)、TRBS07(抗-GD2)、曲加立珠单抗(tregalizumab) (抗-CD4)、曲美木单抗(tremelimumab) (抗-CTLA-4)、TRU-016(抗-CD37)、西莫白介素单抗(tucotuzumab celmoleukin) (抗-EpCAM)、乌波利土西单抗(ublituximab) (抗-CD20)、乌瑞鲁单抗(urelumab) (抗-4-1BB)、伐提克图单抗(vantictumab) (抗-Frizzled受体)、伐利昔单抗(vapaliximab) (抗-AOC3(VAP-1))、维特立珠单抗(vatelizumab) (抗-ITGA2)、维妥珠单抗(veltuzumab) (抗-CD20)、维西库单抗(vesencumab) (抗-NRP1)、维西珠单抗(visilizumab) (抗-CD3)、伏洛昔单抗(volociximab) (抗-整合素 $\alpha 5\beta 1$)、伏妥土珠单抗(vorsetuzumab mafodotin) (抗-CD70)、伏妥莫单抗(votumumab) (抗-肿瘤抗原CTAA16.88)、扎芦木单抗(zalutumumab) (抗-EGFR)、扎木单抗(zanolimumab) (抗-CD4)、扎土希单抗(zatuximab) (抗-HER1)、齐拉木单抗(ziralimumab) (抗-CD147(basigin))、RG7636(抗-ETBR)、RG7458(抗-MUC16)、RG7599(抗-NaPi2b)、MPDL3280A(抗-PD-L1)、RG7450(抗-STEAP1)、和GDC-0199(抗-Bc1-2)。

[0100] 可用于本发明的其它抗体域或肿瘤靶点结合蛋白(如,TCR域)包括但不限于,结合下列抗原的那些抗体域或肿瘤靶点结合蛋白(注意,所标注的癌症指示物代表非限制性实例):氨基肽酶N(CD13)、膜联蛋白A1、B7-H3(CD276,各种癌症)、CA125(卵巢癌)、CA15-3(癌)、CA19-9(癌)、L6(癌)、Lewis Y(癌)、Lewis X(癌)、 α 胎蛋白(癌)、CA242(结直肠癌)、胎盘碱性磷酸酶(癌)、前列腺特异性抗原(前列腺癌)、前列腺酸性磷酸酶(前列腺癌)、表皮生长因子(癌)、CD2(霍奇金病、NHL淋巴瘤、多发性骨髓瘤)、CD3 ϵ (T细胞淋巴瘤、肺癌、乳腺癌、胃癌、卵巢癌、自体免疫疾病、恶性腹水)、CD19(B细胞恶性肿瘤)、CD20(非霍奇金氏淋巴瘤、B细胞瘤、自体免疫疾病)、CD21(B细胞淋巴瘤)、CD22(白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、SLE)、CD30(霍奇金淋巴瘤)、CD33(白血病、自体免疫疾病)、CD38(多发性骨髓瘤)、CD40(淋巴瘤、多发性骨髓瘤、白血病(CLL))、CD51(转移性黑素瘤、肉瘤)、CD52(白血病)、CD56(小细胞肺癌、卵巢癌、Merkel细胞癌、和液体肿瘤、多发性骨髓瘤)、CD66e(癌)、CD70(转移性肾细胞癌和非霍奇金氏淋巴瘤)、CD74(多发性骨髓瘤)、CD80(淋巴瘤)、CD98(癌)、CD123(白血病)、粘蛋白(癌)、CD221(实体瘤)、CD227(乳腺癌、卵巢癌)、CD262(NSCLC和其它癌症)、CD309(卵巢癌)、CD326(实体瘤)、CEACAM3(结直肠癌、胃癌)、CEACAM5(CEA、CD66e)(乳腺癌、结直肠癌和肺癌)、DLL4(A样4)、EGFR(各种癌症)、CTLA4(黑素瘤)、CXCR4(CD 184、血液肿瘤、实体瘤)、内皮糖蛋白(Endoglin)(CD 105、实体瘤)、EPCAM(上皮细胞粘附分子、膀胱癌、头颈癌、结肠癌、NHL前列腺癌、和卵巢癌)、ERBB2(肺癌、乳腺癌、前列腺癌)、FCGR1(自体免疫疾病)、FOLR(叶酸受体、卵巢癌)、FGFR(癌)、GD2神经节苷脂(癌)、G-28(细胞表面抗原糖脂质,黑素瘤)、

GD3个体基因型(癌)、热休克蛋白(癌)、HER1(肺癌、胃癌)、HER2(乳腺癌、肺癌和卵巢癌)、HLA-DR10(NHL)、HLA-DRB(NHL、B细胞白血病)、人绒膜促性腺激素(癌)、IGF1R(实体瘤、血癌)、IL-2受体(T细胞白血病和淋巴瘤)、IL-6R(多发性骨髓瘤、RA、Castleman病、IL6依赖性肿瘤)、整合素($\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 4$ 、 $\alpha 11\beta 3$ 、 $\alpha 5\beta 5$ 、 $\alpha v\beta 5$,用于各种癌症)、MAGE-1(癌)、MAGE-2(癌)、MAGE-3(癌)、MAGE-4(癌)、抗-转铁蛋白受体(癌)、p97(黑素瘤)、MS4A1(跨膜4域子族A成员1,非霍奇金B细胞淋巴瘤、白血病)、MUC1(乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、支气管癌和胃肠癌)、MUC16(CA125)(卵巢癌)、CEA(结直肠癌)、gp100(黑素瘤)、MART1(黑素瘤)、MPG(黑素瘤)、MS4A1(跨膜4域子族A,小细胞肺癌、NHL)、核仁素、Neu致癌基因产物(癌)、P21(癌)、连接素-4(癌)、抗-N-羟乙酰基神经氨酸的互补位(乳腺癌、黑素瘤癌症)、PLAP样睾丸碱性磷酸酶(卵巢癌、睾丸癌)、PSMA(前列腺肿瘤)、PSA(前列腺)、ROB04、TAG 72(肿瘤相关糖蛋白72,AML、胃癌、结直肠癌、卵巢癌)、T细胞跨膜蛋白(癌症)、Tie(CD202b)、组织因子、TNFRSF10B(肿瘤坏死因子受体超家族成员10B,癌)、TNFRSF13B(肿瘤坏死因子受体超家族成员13B、多发性骨髓瘤、NHL、其它癌症、RA和SLE)、TPBG(滋养层糖蛋白、肾细胞癌)、TRAIL-R1(肿瘤坏死细胞凋亡诱导配体受体1,淋巴瘤、NHL、结直肠癌、肺癌)、VCAM-1(CD106,黑素瘤)、VEGF、VEGF-A、VEGF-2(CD309)(各种癌症)。对于一些其它肿瘤相关抗原靶点也有评论(Gerber, et al, mAbs 2009 1:247-253; Novellino et al, Cancer Immunol Immunother. 2005 54:187-207; Franke, et al, Cancer Biother Radiopharm. 2000, 15: 459-76; Guo, et al., Adv Cancer Res. 2013, 119:421-475; Parmiani et al. J Immunol. 2007 178:1975-9)。这些抗原的实例包括分化抗原簇(CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD9、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD12w、CD14、CD15、CD16、CDw17、CD18、CD21、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD31、CD32、CD34、CD35、CD36、CD37、CD41、CD42、CD43、CD44、CD45、CD46、CD47、CD48、CD49b、CD49c、CD53、CD54、CD55、CD58、CD59、CD61、CD62E、CD62L、CD62P、CD63、CD68、CD69、CD71、CD72、CD79、CD81、CD82、CD83、CD86、CD87、CD88、CD89、CD90、CD91、CD95、CD96、CD100、CD103、CD105、CD106、CD109、CD117、CD120、CD127、CD133、CD134、CD135、CD138、CD141、CD142、CD143、CD144、CD147、CD151、CD152、CD154、CD156、CD158、CD163、CD166、CD168、CD184、CDw186、CD195、CD202(a、b)、CD209、CD235a、CD271、CD303、CD304)、膜联蛋白A1、核仁素、内皮糖蛋白(CD105)、ROB04、氨基肽酶N、-样-4(DLL4)、VEGFR-2(CD309)、CXCR4(CD184)、Tie2、B7-H3、WT1、MUC1、LMP2、HPV E6 E7、EGFRvIII、HER-2/neu、个体基因型、MAGE A3、p53非突变体、NY-ESO-1、GD2、CEA、MelanA/MART1、Ras突变体、gp100、p53突变体、蛋白酶3(PR1)、bcr-ab1、酪氨酸酶、生存素、hTERT、肉瘤易位断点、EphA2、PAP、ML-IAP、AFP、EpCAM、ERG(TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、PAX3、ALK、雄激素受体、细胞周期素B1、多唾液酸、MYCN、RhoC、TRP-2、GD3、岩藻糖基GM1、间皮素、PSCA、MAGE A1、sLe (a)、CYP1B1、PLAC1、GM3、BORIS、Tn、GloboH、ETV6-AML、NY-BR-1、RGS5、SART3、STn、碳酸酐酶IX、PAX5、OY-TES1、精液蛋白17、LCK、HMWMAA、AKAP-4、SSX2、XAGE 1、B7H3、豆类蛋白(legumain)、Tie 2、Page4、VEGFR2、MAD-CT-1、FAP、PDGFR- β 、MAD-CT-2、以及Fos相关抗原1。

[0101] 此外,本发明的优选结合域包括那些具有对于该领域中已知的抗原和表位相关感染细胞的特异性的结合域。此类靶点包括但不限于源自下述感兴趣的传染剂的靶点:HIV病毒(尤其是源自HIV衣壳尖突及/或gp120表位和gp41表位的抗原)、人乳头状瘤病毒(HPV)、结合分支杆菌(Mycobacterium tuberculosis)、无乳链球菌(Streptococcus agalactiae)、

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*)、酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、淋病奈瑟菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟菌 (*Neisseria meningitidis*)、肺炎球菌 (*Pneumococcus*)、新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*)、荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*)、乙型流感病毒、梅毒螺旋体 (*Treponema pallidum*)、莱姆病 (*Lyme disease*) 螺旋体、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、麻风杆菌 (*Mycobacterium leprae*)、流产布鲁氏菌 (*Brucella abortus*)、狂犬病病毒、流感病毒、巨细胞病毒、I型单纯疱疹病毒、II型单纯疱疹病毒、人血清细小病毒症样病毒、呼吸道合胞体病毒、水痘-带状疱疹病毒、乙肝病毒、丙肝病毒、麻疹病毒、腺病毒、人T-细胞白血病病毒、Epstein-Barr病毒、鼠科动物白血病病毒、腮腺炎病毒、水痘性口炎病毒、辛德毕斯病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、疣病毒、蓝舌病病毒、仙台病毒、猫科动物白血病病毒、呼肠弧病毒、脊髓灰质炎病毒、猿猴病毒40、鼠乳腺肿瘤病毒、登革病毒、风疹病毒、西尼罗病毒、恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫 (*Plasmodium vivax*)、刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*)、让氏锥虫 (*Trypanosoma rangeli*)、克氏锥虫 (*Trypanosoma cruzi*)、布氏罗得西亚锥虫 (*Trypanosoma rhodesiense*)、布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*)、曼氏裂体吸虫 (*Schistosoma mansoni*)、日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*)、牛巴贝虫 (*Babesia bovis*)、柔嫩艾美球虫 (*Elmeria tenella*)、旋盘尾丝虫 (*Onchocerca volvulus*)、利士曼原虫 (*Leishmania tropica*)、旋毛形线虫 (*Trichinella spiralis*)、小泰累尔氏梨浆虫 (*Theileria parva*)、水泡绦虫 (*Taenia hydatigena*)、羊绦虫 (*Taenia ovis*)、牛肉绦虫 (*Taenia saginata*)、细粒棘球绦虫 (*Echinococcus granulosus*)、科氏中殖孔绦虫 (*Mesocestoides corti*)、关节炎支原体 (*Mycoplasma arthritidis*)、猪鼻支原体 (*M. hyorhinis*)、口腔支原体 (*M. orale*)、精氨酸支原体 (*M. arginini*)、拉氏无胆甾原体 (*Acholeplasma laidlawii*)、唾液支原体 (*M. salivarium*) 和肺炎支原体 (*M. pneumoniae*)。

[0102] 其它具体例中,该结合域具有对于免疫检查点分子或其配体的特异性,且作为免疫检查点抑制活性的抑制剂或作为免疫检查点刺激活性的兴奋剂而发挥作用。此类免疫检查点分子和配体包括PD1、PDL1、PDL2、CTLA4、CD28、CD80、CD86、B7-H3、B7-H4、B7-H5、ICOS-L、ICOS、BTLA、CD137L、CD137、HVEM、KIR、4-1BB、OX40L、CD70、CD27、OX40、GITR、IDO、TIM3、GAL9、VISTA、CD155、TIGIT、LIGHT、LAIR-1、Siglecs和A2aR (Pardoll DM. 2012. *Nature Rev Cancer* 12:252-264; Thaventhiran T, et al. 2012. *J Clin Cell Immunol* S12:004)。此外,本发明的优选抗体域可包括伊匹单抗 (*ipilimumab*) 和曲美木单抗 (*tremelimumab*) (抗-CTLA4)、妮威禄单抗 (*nivolumab*)、派姆单抗 (*pembrolizumab*)、皮地利珠单抗 (*pidilizumab*)、TSR-042、ANB011、AMP-514和AMP-224 (配体-Fc融合物) (抗-PD1)、MPDL3280A、MEDI4736、MEDI0680、和BMS-9365569 (抗-PDL1)、MEDI6469 (抗-OX40兴奋剂)、BMS-986016、IMP701、IMP731、和IMP321 (抗-LAG3)。

[0103] T细胞受体 (TCR)

[0104] T细胞是细胞子群,它们与其它类型的免疫细胞 (多形核细胞、嗜酸细胞、嗜碱细胞、肥大细胞、B细胞、NK细胞) 一起构成了免疫系统的细胞组成。在生理条件下,T细胞在免疫监督中和消除外来抗原中发挥功能。但是,在生理条件下,有明确证据显示,T细胞在疾病的肇始和传播中扮演主要角色。这些病变中,中枢或外周的T细胞免疫耐受是自体免疫疾病肇

始中的基本过程。

[0105] 该TCR复合体由至少7个跨膜蛋白组成。二硫键链接的($\alpha\beta$ 或 $\gamma\delta$)异质二聚体形成单型抗原识别单元,而CD3的由 ϵ 链、 γ 链、 δ 链、 ζ 链、和 η 链组成的不变链是将结合至信号通路的配体偶合的原因,其导致T细胞激活和细胞免疫应答的细化。无论TCR链的基因差异如何,所有已知的亚基均具有两种结构特征。首先,它们诠释具有可假定为 α 螺旋的单个跨膜域的跨膜蛋白。其次,所有TCR链均具有在预计的跨膜域内拥有带电氨基酸的不寻常特征。该不变域具有单个负电荷,在鼠和人体内均得以保留,且该可变域具备一个(TCR- β)或两个(TCR- α)正电荷。大量物种的TCR- α 的跨膜序列是高度保守的,因此在种系发生上可扮演重要的功能性角色。不同物种的含有亲水性氨基酸精氨酸和赖氨酸的八肽序列完全一致。

[0106] T细胞应答受到结合至TCR的抗原调整。一种类型的TCR是颇似免疫球蛋白可变区(V)和恒定区(C)的 α 链和 β 链组成的膜结合异质二聚体。该TCR α 链包括共价链接的V- α 链和C- α 链,而该 β 链包括共价链接至C- β 链的V- β 链。在主要组织相容性复合体(MHC)(人体内称为HLA复合体)的情况下,该V- α 链和V- β 链形成可结合上层抗原或抗原的袋或裂口。见,Davis Ann.Rev.of Immunology 3:537(1985);Fundamental Immunology 3rd Ed.,W.Paul Ed.Rsen Press LTD.New York(1993)。

[0107] 该TCR链($\alpha\beta$ 或 $\gamma\delta$)的细胞外结构域也可工程化为融合至异种跨膜域,用于在该细胞表面上表达。此类TCR可包括融合至CD3、CD28、CD8、4-1BB及/或嵌合激活受体(CAR)跨膜结构域或激活结构域。TCR也可以是包含 $\alpha\beta$ 链或 $\gamma\delta$ 链的异种或多种抗原结合域的可溶性蛋白。此类TCR可包括具有或不具有该TCR恒定域的TCR可变域或其功能片段。可溶性TCR可以是异质二聚体分子或单链分子。

[0108] Fc域

[0109] 本发明的蛋白复合体可含有Fc域。例如,2B8T3M包含抗-CD3 scAb/huIL-15N72D:抗-CD20 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc融合复合体。已经报导了将IgG的Fc区与另一蛋白的该域合并的融合蛋白,如各种细胞因子和可溶性受体(见,例如,Capon et al.,Nature,337:525-531,1989;Chamow et al.,Trends Biotechnol.,14:52-60,1996;US 5,116,964和US 5,541,087)。该原型融合蛋白是通过IgG Fc的铰接区内的半胱氨酸残基链接的同型二聚体蛋白,导致类似于IgG分子而没有该重链可变域及CH1域和轻链的分子。包含该Fc域的融合蛋白的二聚特性在提供更高级别的与其它分子的相互反应(即,二价或双特异性结合)中,可能是优势。由于结构的同源性,Fc融合蛋白展现与具有相似同种型的人IgG相当的体内药代动力学模式。IgG类的免疫球蛋白是人血液中最丰富的蛋白质之一,且其循环半衰期可长达21天。为了IL-15或IL-15融合蛋白的循环半衰期及/或增加其生物活性,本文中揭示融合蛋白复合体(如,2B8T3M),其含有非共价键结至IL-15R α 的IL-15域,且该IL-15R α 共价链接至人重链IgG蛋白的Fc部分。

[0110] 术语“Fc”指的是片段可结晶区域,是抗体的恒定区,与被称为Fc受体的细胞表面受体以及该补体系统的一些蛋白质相互作用。此“Fc”是二聚体形式。天然Fc的原始免疫球蛋白来源优选人类,且可以是任何免疫球蛋白,但优选IgG1和IgG2。天然Fc由可通过共价(即,二硫键)和非共价关联而链结入二聚体或多聚体形式内的单体多肽作成。依照类别(如,IgG、IgA、IgE)或子类(如,IgG1、IgG2、IgG3、IgA1、IgGA2),天然Fc分子的单体亚基之间的分子间二硫键的数目为1至4的范围。天然Fc的一个实例是从IgG的木瓜蛋白酶消解得到

的以二硫键结合的二聚体(见, Ellison et al. (1982), Nucleic Acids Res. 10:4071-9)。本文中使用的术语“天然Fc”是单体形式、二聚体形式和多聚体形式所通用的。Fc域含有用于蛋白A、蛋白G、各种Fc受体和补体蛋白的结合位点。一些具体例中,该复合体的Fc域能与Fc受体相互作用,以介导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)及/或抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。其它应用中,该复合体包含不能有效介导ADCC或ADCP的Fc域(如, IgG4 Fc)。

[0111] 一些具体例中,术语“Fc变体”指代是,从天然Fc修饰而得的分子或序列,但其仍包含用于挽救受体FcRn的结合位点。国际专利申请WO 97/34631和WO 96/32478揭示例示性的Fc变体,以及与挽救受体的相互作用,该申请通过引用并入本文。因此,术语“Fc变体”包含从非人类天然Fc进行人源化所得的分子或序列。再者,天然Fc包含多个位点,由于这些位点提供本发明的融合分子不需要的结构特征或生物活性,这些位点可以移除。因此,某些具体例中,术语“Fc变体”包含改变一个或多个天然Fc位点或残基的分子或序列,其中,该位点或残基影响或牵涉入(1)二硫键形成,(2)与所选择的宿主细胞不相容,(3)在所选择的宿主细胞内表达时的N端异质性,(4)糖基化,(5)与补体相互反应,(6)结合至不同于挽救受体的Fc受体,(7)抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)或(8)抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。这些改变可增加或降低这些Fc形式的任何一种或多种。Fc变体在后文中进一步揭示。

[0112] 术语“Fc域”涵盖如上文定义的天然Fc及Fc变体分子和序列。就Fc变体和天然Fc而言,术语“Fc域”包括单体形式或多体形式的分子,而无论其是从完全抗体消解而来或通过重组基因表达或其它手段生产。

[0113] **融合蛋白复合体**

[0114] 本发明提供融合蛋白复合体(图1)。一些情形中,该第一融合蛋白包含共价链接至白介素-15(IL-15)或其功能性片段的第一生物活性多肽;且该第二融合蛋白包含共价链接至可溶性白介素-15受体 α (IL-15R α)多肽或其功能性片段的第二生物活性多肽,其中,该第一融合蛋白的IL-15域结合至该第二融合蛋白的IL-15R α 域,以形成可溶性融合蛋白复合体。本发明的融合蛋白复合体还包含链接至该第一和第二融合蛋白的一者或两者的免疫球蛋白Fc域或功能片段。优选的,链接至融合蛋白的Fc域相互作用以形成融合蛋白复合体。该复合体可通过在免疫球蛋白Fc域之间形成二硫键得以稳定化。一方面,本发明的可溶性融合蛋白复合体包括IL-15多肽、IL-15变体或其功能片段以及可溶性IL-15R α 多肽或其功能片段,其中,该IL-15和IL-15R α 多肽的一个或两个进一步包括免疫球蛋白Fc域或其功能片段。

[0115] 某些实例中,该第一和第二生物活性多肽中的一个或两个包含抗体或其功能性片段。例如,该生物活性多肽之一包含第一可溶性抗-CD3单链抗体或其功能性片段。另一实例中,另一个或第二生物活性多肽包含疾病抗原特异性抗体或其功能性片段。一种具体例中,本发明提供2B8T3M,其包含可溶性抗-CD3 scAb/huIL-15N72D:抗-CD20 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc融合蛋白复合体。这一复合体中,该huIL-15N72D域与huIL-15R α Su域相互作用,且两个抗-CD20 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc融合蛋白上的huIgG1 Fc域形成多链融合蛋白复合体(见,例如,图2)。

[0116] 本文中,术语“生物活性多肽”或“效应分子”意为可产生本文中讨论的所希望的效果的氨基酸序列,如蛋白质、多肽或肽;糖或多糖;脂质或糖脂质、糖蛋白、或脂蛋白。效应分子还包括化学剂。还关注编码生物活性或效应子蛋白、多肽或肽的效应分子核酸。因此,适

当的分子包括调节因子、酶、抗体、或药物,以及DNA、RNA和寡核苷酸。该生物活性多肽或效应分子可以是天然出现的,或其可从已知成分通过例如重组或化学合成而得,且可包括异源性组分。通过标准分子大小测量技术如离心分离或SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳判断,生物活性多肽或效应分子通常为约0.1至100KD或高达约1000KD的更大分子量之间,优选约0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、30和50KD。本发明希望达成的效果包括但不限于,例如,形成结合活性增加的本发明的融合蛋白复合体;杀死靶点细胞以例如诱导细胞增殖或细胞死亡、启动免疫应答;预防或治疗疾病;或作为检测分子用于诊断目的。对于该检测,可使用检验分析,例如,包括下述顺序步骤的检验分析:培养细胞以令其增殖,令该细胞与本发明的融合复合体接触,随后评估该融合复合体是否抑制该细胞的进一步发育。

[0117] 根据本发明将该效应分子共价链接至本发明的融合蛋白复合体,提供大量显着优点。本发明的融合蛋白复合体可生产为含有单个效应分子,该效应分子包括已知结构的肽。此外,可在类似的DNA载体中生产多种效应分子。换言之,可将不同效应分子的分子库与该融合蛋白复合体关联,用于识别被感染或患病的细胞。再者,对于治疗性应用,并非向受试者给药本发明的融合蛋白复合体,而是可给药编码该融合蛋白复合体的DNA表达载体,用于该融合蛋白复合体的体内表达。这一途径避免了典型由制备重组蛋白造成的耗费巨大的纯化步骤,也避免了传统途径带来的抗原摄取和加工的复杂性。

[0118] 注意,本文中揭露的融合蛋白的组分,如,效应分子如细胞因子、趋化因子、生长因子、蛋白毒素、免疫球蛋白域或其它生物活性分子和任何肽链接物(linker),几乎可以任何方式组织,只要该融合蛋白具有其预期功能即可。特别地,若必要,该融合蛋白的各组分可通过至少一个适当的肽链接序列与另一组分分隔。此外,该融合蛋白可包括标记,以例如促进该融合蛋白的修饰、鉴别及/或纯化。更具体的融合蛋白揭示于后文实施例中。

[0119] 链接物

[0120] 本发明的融合复合体优选还包括插置于该IL-15或IL-15R α 域与该生物活性多肽之间的柔性链接序列。该链接序列应令该生物活性多肽可关于该IL-15或IL-15R α 域而有效定位,以令两域均具有功能活性。

[0121] 某些倾向中,该可溶性融合蛋白复合体具有链接物,其中,该第一生物活性多肽通过多肽链接序列共价链接至IL-15(或其功能性片段)。其它方面,本文中揭示的可溶性融合蛋白复合体具有链接物,其中,该第二生物活性多肽通过多肽链接序列共价链接至IL-15R α 多肽(或其功能性片段)。

[0122] 编码该链接序列的核苷酸序列,优选从能有效定位用于识别呈递抗原的TCR分子的结合槽或用于识别抗原的抗体分子的结合域的肽获得。本文中,短语“有效地关于该IL-15或IL-15R α 域而定位该生物活性多肽”或其它类似短语,倾向于意指该链接至IL-15或IL-15R α 域的生物活性多肽被定位,因此该IL-15或IL-15R α 域能彼此相互作用以形成蛋白复合体。例如,该IL-15或IL-15R α 域被有效地定位,令其与免疫细胞相互作用,以启动或抑制免疫反应或者抑制或刺激细胞发育。

[0123] 本发明的融合复合体优选还包括插置于该IL-15或IL-15R α 域与该免疫球蛋白Fc域之间的柔性链接序列。该链接序列应令该Fc域、生物活性多肽和IL-15或IL-15R α 域有效定位,以令各域显现其功能活性。例如,该Fc域被有效地定位,以令形成适宜的融合蛋白复合体,及/或与免疫细胞上的Fc受体或补体系统的蛋白质相互作用以刺激Fc介导的效应,该

效应包括肥大细胞、嗜碱粒细胞和嗜酸粒细胞的调理素作用、细胞溶解、脱粒,以及其它Fc受体依赖的过程;补体途径的激活;以及增加该融合蛋白复合体的体内半衰期。

[0124] 链接序列亦可用来连接该生物活性多肽的两个或更多个多肽,以生成具有所希望的功能活性的单链分子。

[0125] 该链接序列优选包含约7至20个氨基酸,更优选约10至20个氨基酸。该链接序列优选是柔性的,从而不将该生物活性多肽或效应分子保持在单一的不希望的构象。该链接序列可用来,例如,将识别位点与该融合分子分隔开来。具体地,该肽链接序列可位于该生物活性多肽与该效应分子之间,以例如将其化学交联并提供分子柔性。该链接物优选主要包括具有小侧链的氨基酸,如甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸,以提供柔性。优选地,该链接序列的约80%或90%或更多包含甘氨酸、丙氨酸或丝氨酸残基,尤其是甘氨酸和丝氨酸残基。

[0126] 可使用不同的包括任何数量的已经成功用来将抗体可变区接合在一起的柔性链接物设计的链接序列(见,Whitlow,M. et al., (1991) *Methods:A Companion to Methods in Enzymology*, 2:97-105)。

[0127] 药物疗法

[0128] 本发明提供包含融合蛋白复合体的作为治疗剂使用的药物组合物。一方面,将本发明的融合蛋白复合体进行系统性给药,例如,配制在药学可接受的缓冲剂如生理盐水中。优选的给药途径包括,例如,灌注入膀胱中、皮下注射、静脉注射、腹膜注射、肌肉注射、肿瘤内注射或皮内注射,该途径在患者体内提供连续、持续或有效水平的该组合物。使用配制在生理学可接受的载剂中的治疗有效量的经本文中鉴别的治疗剂进行人类患者或其它动物的治疗。适当的载剂及其配方揭示于,例如,E.W.Martin所著《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences)中。所给药的治疗剂的量依据给药模式、患者的年龄和体重、以及该瘤形成的临床症状而变。通常,该量为用于治疗其它与瘤形成、自体免疫或传染病相关疾病治疗中的其它剂的用量范围,但在某些例子中,因为化合物的特异性增加,将需要较低的量。以通过该领域技术人员已知的方法确定的增强受试者免疫应答的剂量,或以降低瘤形成、感染或自体免疫细胞的增殖、存活或侵入的剂量,给药化合物。

[0129] 药物组合物的配方

[0130] 通过任何适当的手段给药本发明融合蛋白复合体以哟昂与治疗瘤形成、传染病或自体免疫疾病,该手段导致与其它组分合用的治疗剂的浓度能够有效地缓解、减轻或稳定所述瘤形成、传染病或自体免疫疾病。本发明的融合蛋白复合体可以任何适宜的量并入适当的载剂物质中,且以给组合物的总重为基准,通常以1重量%至95重量%的量存在。该组合物可提供为适用于非肠道(如,皮下、静脉内、肌肉内、囊内、肿瘤内或腹膜内)给药途径的剂型。例如,根据传统制药实践(见,如,《雷明顿:药物科学与实践(第20版)》(Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed.), ed.A.R.Gennaro, Lippincott Williams&Wilkins, 2000)和《制药工艺学百科全书》(Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds.J.Swarbrick and J.C.Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York))配制该药物组合物

[0131] 人用剂量最初从鼠或非人灵长动物所用化合物的剂量外推而得,而相对于动物模型而修正人用剂量对于该领域技术人员来说是常识。例如,该剂量可在约1g化合物/kg体重至约5000mg化合物/kg体重之间改变;或从约5mg/kg体重至约4,000mg/kg体重或从约10mg/

kg体重至约3,000mg/kg体重之间改变;或胸约50mg/kg体重至约2000mg/kg体重之间改变;或从约100mg/kg体重至约1000mg/kg体重之间改变;或从约150mg/kg体重至约500mg/kg体重之间改变。例如,该剂量为约1、5、10、25、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1,000、1,050、1,100、1,150、1,200、1,250、1,300、1,350、1,400、1,450、1,500、1,600、1,700、1,800、1,900、2,000、2,500、3,000、3,500、4,000、4,500、或5,000mg/kg体重。或者,剂量为约5mg化合物/Kg体重至约20mg化合物/kg体重的范围。另一实例中,该剂量为约8、10、12、14、16或18mg/kg体重。优选以0.5mg/kg至约10mg/kg(如,0.5、1、3、5、10mg/kg)给药2B8T3M。当然,这一剂量可上调或下调,这是依据初始临床试验的结果和特定患者所需对此类治疗策略进行的常规调整。

[0132] 与适宜的赋形剂一起配制为药物组合物,当给药时,该药物组合物以受控的方式释放该治疗剂。实例包括单一或多个单位的片剂或胶囊组合物、油溶液、悬浮体、乳液、微胶囊、微球、分子复合体、纳米颗粒、贴剂和脂质体。优选将2B8T3M配制在适用于非肠道给药的赋形剂中。

[0133] 非肠道给药组合物

[0134] 通过以含有传统的无毒药学可接受的载剂和佐剂的剂型、配方、或经由适当的递送装置或埋植剂注射、输液或植入(皮下、静脉内、肌肉内、肿瘤内、囊内、腹膜内)给药包含本发明的融合蛋白复合体的药物组合物。此类组合物的配方和制备是只要配方领域技术人员所周知的。配方可在前文所述的《雷明顿:制药科学与实践》中找到。

[0135] 以单位剂型(如,在单剂安瓿中)提供包含本发明的融合蛋白复合体的用于非肠道用途的组合物。或则,将该组合物提供于含有若干剂量的小瓶内,其中,该小瓶内已加入适当的防腐剂(见下文)。该组合物的形式为溶液、悬浮液、乳液、输液装置、或用于植入的递送装置,或其呈现为待使用水或其它适当媒介物在使用之前重构的干粉。该组合物除了包括减轻或缓解瘤形成、传染病或自体免疫疾病的活性剂之外,还包括适当的适用于非肠道给药的载剂及/或赋形剂。该活性治疗剂可并入用于控释的微球、微胶囊、纳米颗粒、脂质体内。再者,该组合物可包括悬浮剂、增溶剂、稳定剂、pH调节剂、张度调节剂、及/或分散剂。

[0136] 如上文所述,本发明的包含融合蛋白复合体的药物组合物可以是适用于无菌注射的形式。为了制备这一组合物,将该适当的活性治疗剂溶解或分散在非肠道给药可接受的液体媒介中。可采用的适宜的媒介和溶剂是水;通过加入适量盐酸、氢氧化钠或适当缓冲剂而调节至适当pH的水;1,3-丁二醇;林格溶液;以及等渗氯化钠和葡萄糖溶液。该水性制剂亦可含有一种或多种防腐剂(如,对羟基苯甲酸甲酯、乙酯或正丙酯)。在该化合物之一仅略溶于水或微溶于水的情形中,可加入溶解增强剂或增溶剂,或该溶剂可包括10至60%w/w的丙二醇。

[0137] 本发明提供治疗瘤形成、传染病或自体免疫疾病或其症状的方法,其包含将治疗有效量的包含本文中各式化合物的药物组合物给药至受试者(如,哺乳动物,如人)。因此,一种具体例为治疗苦于或易患瘤形成、传染病或自体免疫疾病或其症状的受试者。该方法包括,在能治疗该疾病或病变的条件下,将治疗量的本文化合物给药至该哺乳动物,给药量足以治疗该疾病或病变或其症状。

[0138] 本文中的方法包括将有效量的本文中揭示的化合物或本文中揭示的组合物给药至该受试者(包括被鉴定为需要此治疗的受试者),以产生该效果。对需要此治疗的受试

者的鉴定可以是受试者或专业卫生保健人员的判断,且可以是主观的(如主张)或客观的(如可通过测试或诊断方法测量)。

[0139] 本发明的治疗方法(包括预防性治疗)通常包含将治疗有效量的本文中的化合物,如本文中各式的化合物,给药至有此需要的受试者(如,动物、人),包括哺乳动物,尤其是人。该治疗将适当地应用至苦于、罹患、易患瘤形成、传染性、自体免疫疾病、病变或其症状或有此风险的受试者,尤其是人。对于那些受试者“有风险”的确认可由任何客观或主观决定而通过受试者或医疗服务人员的诊断性测试或观点(如,基因测试、酶或蛋白标志物、标志物(如本文中所定义)、家族病史等)做出。本发明的融合蛋白复合体可用于任何希望增加免疫应答的其它病变的治疗中。

[0140] 本发明还提供一种监控治疗进展的方法。该方法包括下述步骤:确定苦于或易患与瘤形成相关的病变或其症状且已经给药阻抑治疗该疾病或其症状的治疗量的本文化合物的受试者体内的诊断性标志物(标志物)(如,本文中描绘的任何由本文中的化合物调节的靶点、蛋白质或其指示物等)或诊断性测量(如,筛选、检验)的水平。可将该方法中确定的标志物的水平与健康正常对照或其它患者的标志物的已知水平比较,以确立该受试者的疾病状态。一些情形中,在晚于该第一水平的确定的时间点确定该受试者的标志物的第二水平,并比较两个水平以监控疾病进程或该疗法的功效。在某些方面,在开始根据本发明治疗之前,确定该受试者体内的标志物的治疗前水平;随后可将标志物的这一治疗前水平与治疗开始后该受试者体内的标志物水平比较,以确定该治疗的功效。

[0141] 联合疗法

[0142] 任选地,本发明的融合蛋白复合体与任何其它标准疗法联合应用;这些方法是该领域技术人员所知的并揭示于E.W.Martin所著的《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences)中。若需要,本发明的融合蛋白复合体与任何传统的抗瘤形成疗法联合应用,该抗瘤形成疗法包括但不限于,免疫治疗、治疗性抗体、靶向治疗、外科手术、放疗、或化疗。

[0143] 试剂盒或药物系统

[0144] 包含本发明的融合蛋白复合体的药物组合物可组装在试剂盒或药物系统内,用于减轻瘤形、传染病或自体免疫疾病。根据本发明这一方面的试剂盒或药物系统包含一运载单元如盒、纸箱、管,其内部严格限制有一个或多个容器单元如小管、管、安瓿、瓶等。本发明的试剂盒或药物系统亦可包含使用本发明的融合蛋白复合体的相对应的使用说明书。

[0145] 重组蛋白质表达

[0146] 通常,可通过本文中揭露的过程以及通过公认的重组DNA技术完成本发明的融合蛋白复合体(如,2B8T3M的成分)的制备。

[0147] 通常,重组多肽通过将具有全部或部分的编码多肽的核酸分子或其片段的适当宿主细胞在适当的表达媒介中的转化而生产。分子生物学领域技术人员应理解,可使用多种表达系统中的任一种来提供该重组蛋白。所使用的确切宿主细胞并不为本发明所限。重组多肽可在几乎任何真核生物宿主(如,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、昆虫细胞如Sf21细胞、或哺乳动物细胞如NIH 3T3、HeLa,或优选COS细胞)中生产。此类细胞可从多个来源获得(如,美国模式培养物保藏(American Type Culture Collection, Rockland, Md.) ;也见,如,《分子生物学当代方法》(Ausubel et al., *Current Protocol in Molecular*

Biology, New York: John Wiley and Sons, 1997)。转染和选择表达媒介的方法将取决于所选择的宿主系统。转化方法揭示于,如,Ausubel et al. (如前文)中;表达媒介可选自例如《克隆载体:实验室手册》(Cloning Vectors: A Laboratory Manual (P.H. Pouwels et al., 1985, Supp. 1987))中提供的那些媒介物。

[0148] 存在多种用于生产重组多肽的表达系统。可用于生产此类多肽的表达载体包括而不限于,染色体载体、附加体载体、和源自病毒的载体,如,源自细菌质粒、噬菌体、转座子、酵母附加体、嵌入天然、酵母染色体元素、病毒(如杆状病毒、乳多空病毒如SV40、牛痘病毒、腺病毒、禽痘病毒、假狂犬病病毒和逆转录酶病毒)的载体,及源自其组合的载体。

[0149] 一旦该重组多肽被表达,即使用例如亲和色谱将其分离。一个实例中,可将对抗该多肽的抗体(如,如本文所述而生产的抗体)粘附至柱并用来分离该重组多肽。可通过标准方法(见,如,Ausubel et al.,如前文)在亲和色谱之前实施内含多肽的细胞的裂解和分馏。一旦被分离,则该重组蛋白可根据需要而通过例如高效液相色谱(见,如,《生物化学和分子生物学实验室技术》(Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry and Molecular Biology, eds., Work and Burdon, Elsevier, 1980))进一步纯化。

[0150] 本文中,本发明的生物活性多肽或效应分子可包括多种因子,如细胞因子、趋化因子、生长因子、蛋白质毒素、免疫球蛋白域或其它生物活性蛋白如酶。另外,生物活性多肽可包括与其它化合物如非蛋白质毒素、细胞毒性剂、化疗剂、可检测的标记物、放射活性材料等的偶联物。

[0151] 本发明的细胞因子通过由细胞生产的任何因子,其影响其它细胞并且是多种细胞免疫效果原因。细胞因子的实例包括但不限于,IL-2家族、干扰素(IFN)、IL-10、IL-1、IL-17、TGF和TNF细胞因子家族,以及IL-1至IL-35、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、TGF- β 、TNF- α 、和TNF β 。

[0152] 在本发明的一方面,该第一融合蛋白包含共价链接至白介素-15(IL-15)域或其功能性片段的第一生物活性多肽。IL-15是影响T细胞激活和增殖的细胞因子。IL-15影响免疫细胞激活和增殖的活性在某种程度上类似于IL-2,但已经证实二者之间存在根本性差异(Waldmann, T A, 2006, Nature Rev. Immunol. 6:595-601)。

[0153] 在本发明的另一方面,该第一融合蛋白包含作为IL-15变体(本文中也称为IL-15突变体)的白介素-15(IL-15)域。该IL-15变体优选包含不同于天然(或野生型)IL-15蛋白的氨基酸序列。该IL-15变体优选结合该IL-15R α 多肽并作为IL-15兴奋剂或拮抗剂而起作用。优选地,具有兴奋剂活性的IL-15变体具有超兴奋剂活性。该IL-15变体无论与IL-15R α 相关与否,均可作为IL-15兴奋剂或拮抗剂而起作用。IL-15兴奋剂通过与野生型IL-15相当或比后者增加的生物学活性而得以示例。IL-15拮抗剂通过比野生型IL-15降低的生物活性或通过抑制IL-15介导的应答的能力而得以示例。一些实例中,该具有增加或降低的活性的IL-15变体结合至IL-15R β 及/或 γ C受体。一些情形中,该IL-15变体的序列具有至少一个相对于天然IL-2序列的氨基酸改变如替换或删除,此类改变导致IL-15兴奋剂或拮抗剂活性。优选该氨基酸替换/删除发生在IL-15的与IL-15R β 及/或 γ C相互作用的域中。更优选该氨基酸替换/删除并不影响与IL-15R α 多肽的结合或生产该IL-15变体的能力。可基于推定或已知的IL-15结构,通过如本文中提供的合理或随机突变和功能检验、或其它实证研究方法,将IL-15与具有已知结构的同源分子如IL-2比较,鉴别用以生成IL-15变体的适当的氨基酸替换/删除。此外,适当的氨基酸替换可以是保守的或非保守的改变,以及额外氨基酸的插入。

本发明的IL-15变体优选含有位于成熟的人IL-15序列的位置6、8、10、61、65、72、92、101、104、105、108、109、111、或112处的一个或超过一个氨基酸替换/删除,尤其是D8N(“D8”指的是天然成熟的人IL-15序列中的氨基酸和残基的位置,而“N”指的是该IL-15变体中位于该位置处的所替换后的氨基酸残基)、I6S、D8A、D61A、N65A、N72R、V104P或Q108A替换导致了具有拮抗剂活性的IL-15变体,而N72D替换导致了具有兴奋剂活性的IL-15变体。

[0154] 趋化因子与细胞因子类似,定义为当暴露于其它细胞时造成多种细胞免疫效果中任一种的任何化学因子或分子。适当的趋化因子可包括但不限于,CXC、CC、C、和CX3C趋化因子家族,以及CCL-1至CCL-28、CXC-1至CXC-17、XCL-1、XCL-2、CX3CL1、MIP-1b、IL-8、MCP-1、和Rantes。

[0155] 生长因子包括,当暴露于特定细胞时诱导被影响细胞的增殖及/或分化的任何分子。生长因子包括蛋白质和化学分子,其中一些包括:GM-CSF、G-CSF、人生长因子和干细胞生长因子。另外的生长因子亦可适用于本文中揭示的用途。

[0156] 毒素或细胞毒性剂包括,当暴露于细胞时对于生长具有致死效应或抑制效果的任何物质。更具体地,该效应分子可以是起源于植物或细菌的细胞毒素,如,白喉毒素(DT)、志贺毒素、相思豆毒素、霍乱毒素、蓖麻毒素、皂草素、假单胞菌外毒素(PE)、美洲商陆抗病毒蛋白、或白树毒素。此类毒素的生物活性片段是该领域中周知的,且包括,如,DT A链和蓖麻毒素A链。此外,该毒素可以是在细胞表面具有活性的剂,如,磷脂酶(如,磷脂酶C)。

[0157] 再者,该效应分子可以是化疗药物,如长春地辛、长春新碱、长春碱、甲氨蝶呤、阿霉素、博来霉素、或顺铂。

[0158] 此外,该效应分子可以是适用于诊断或成像研究的可检测地标记的分子。此类标记包括生物素或链霉亲和素/卵白素;可检测的纳米颗粒或晶体;酶或其具有催化活性的片段;荧光标记,如绿色荧光蛋白、FITC、藻红蛋白、cychome、德克萨斯红或量子点;放射性核素,如碘-131、钇-90、铼-188或铋-212;磷光或化学发光分子;或可通过PET、超声或MRI检测的标记,如基于Gd或顺磁金属离子的造影剂。见,如,Moskaug, et al. *J. Biol. Chem.* 264, 15709 (1989); Pastan, I. et al. *Cell* 47, 641, 1986; Pastan et al., *Recombinant Toxins as Novel Therapeutic Agents*, *Ann. Rev. Biochem.* 61, 331, (1992); "Chimeric Toxins" Olsnes and Phil, *Pharmac. Ther.*, 25, 355 (1982); 已公开的PCT申请案WO 94/29350;已公开的PCT申请案WO 94/04689;已公开的PCT申请案WO2005046449;和US 5,620,939中关于制作和使用包含效应子或标签的蛋白质的公开内容。

[0159] 包括共价链接的IL-15域和IL-15R α 域的蛋白融合或偶联复合体,具有若干重要用途。例如,该包含抗-CD3 scAb和抗-CD20 scAb的蛋白融合或偶联复合体可用来将IL-15:IL-15R α 复合体递送至某些细胞,如表达CD20受体的B细胞淋巴瘤细胞和表达CD3受体的CD8 $^+$ T细胞。据此,该蛋白融合或偶联复合体提供选择性地损害或杀死包含该配体的细胞的手段。能通过该蛋白融合或偶联复合体损害或杀死的细胞或组织包括肿瘤和表达一种或多种配体的被病毒或细菌感染的细胞。易被损害或杀死的细胞或组织可通过本文中揭露的方法容易地检验。

[0160] 本发明的IL-15和IL-15R α 多肽的氨基酸序列,适当地与天然出现的IL-15和IL-15R α 分子如人类、小鼠或其它啮齿动物或其它哺乳动物的IL-15和IL-15R α 分子一致。这些多肽和编码核酸的序列是文献中已知的,该文献包括,人白介素15(IL15)mRNA:基因银行

(GenBank) :U14407.1 (通过引用并入本文) ; 小家鼠白介素15 (IL15) mRNA :GenBank : U14332.1 (通过引用并入本文) ; 人白介素-15受体 α 链前体 (IL15RA) mRNA :GenBank : U31628.1 (通过引用并入本文) ; 小家鼠白介素15受体 α 链 :GenBank :BC095982.1 (通过引用并入本文)。

[0161] 一些设定中,将本发明的蛋白融合或偶联复合体制作为多价态,可用来例如增加该sc-抗体的价态。特别地,该融合蛋白复合体的IL-15域与IL-15Ra域之间的相互作用提供生成多价复合体的手段。此外,通过使用例如标准生物素-链霉亲和素标记技术或通过偶联至适当的固体支撑物如乳胶珠,而将1至4个蛋白质(相同或不同)共价或非共价地链接在一起,从而作成该多价融合蛋白。化学交联的蛋白质(例如,交联至树枝状大分子)也是适当的多价物质。例如,可通过包括可被修饰的序列编码标签序列如生物素酰化BirA标签或具有化学反应性侧链的氨基酸残基如Cys或His,而修饰该蛋白质。此类氨基酸标签或具有化学反应性的氨基酸可以位于该融合蛋白内的多个位置,优选位于该生物活性多肽或效应分子的活性位点的远侧。例如,可溶性融合蛋白的C端可共价链接至包括此反应性氨基酸的标签或其它融合蛋白。可包括适当的侧链,以将两个或更多个融合蛋白化学链接至适当的树枝状大分子或其它纳米颗粒,以给出多价分子。树枝状大分子是合成化学聚合物,其表面可具有多种不同官能团中的任意一个(D.Tomalia, Aldrichimica Acta, 26:91:101 (1993))。用于根据本发明使用的例示性树枝状大分子包括,例如,E9 starbust聚胺树枝状大分子和E9 combust聚胺树枝状大分子,其可链接胱氨酸残基。例示性纳米颗粒包括脂质体、芯-壳颗粒或基于PLGA的颗粒。

[0162] 另一方面,该融合蛋白复合体的一个或两个多肽包含免疫球蛋白域。或者,该蛋白结合域-IL-15融合蛋白可进一步链接至免疫球蛋白域。优选的免疫球蛋白域包含可与其它免疫球蛋白域反应以形成如上文提供的多链蛋白的区域。例如,该免疫球蛋白重链域,如IgG1 C_H2-C_H3,能稳定地相互作用以创建Fc区域。优选的包括Fc域的免疫球蛋白域还包含具有效应子功能及/或糖基化位点的区域,其中,该效应子功能包括Fc受体或补体蛋白结合活性。在一些方面,该融合蛋白复合体的免疫球蛋白域含有突变,该突变降低或增大Fc受体或补体结合活性或糖基化或二聚化,从而影响所得蛋白质的生物学活性。例如,含有降低与Fc受体的结合的突变的免疫球蛋白域,可用来生成本发明的具有更低的与荷Fc受体细胞的结合活性的融合蛋白复合体,这对于被设计用来识别或检测特定抗原的试剂来说可能是优势。

[0163] 核酸和载体

[0164] 本发明进一步提供编码本发明融合蛋白(如,2B8T3M的成分)的核酸序列,尤其是DNA序列。该DNA序列优选由适用于染色体外复制的载体如噬菌体、病毒、质粒、噬菌粒、粘粒、YAC、或附加体所携带。特别地,编码所希望的融合蛋白的DNA载体可用来促进本文中揭示的制备方法,并用来获得大量该融合蛋白。可将该DNA序列插入适宜的表达载体中,如含有所插入蛋白质编码序列的转录和转移所必需元素的载体。大量宿主-载体系统可用来表达该蛋白质编码序列。这些系统包括被病毒(如,牛痘病毒、腺病毒等)感染的哺乳动物细胞;被病毒(如,杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;微生物,如含有酵母的酵母载体,或以噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA转化的细菌。依据所使用的宿主-载体系统,可使用大量适当的转录和转译元素中的任一种。见,Sambrook等人(如前文)和Ausubel等人(如前文)。

[0165] 本发明包括制作可溶性融合蛋白复合体的方法,该方法包含:将本文中揭示的编码该第一和第二融合蛋白的DNA载体引入宿主细胞内;在培养基中在足以令该融合蛋白在该细胞中表达的调价下培养宿主细胞,或在该培养基中在令第一融合蛋白的IL-15域与第二融合蛋白的IL-15R α 域关联的条件下培养宿主细胞,以形成该可溶性融合蛋白复合体;以及从该宿主细胞或培养基中纯化该可溶性融合蛋白复合体。

[0166] 通常,根据本发明的DNA载体优选包含通过磷酸二酯键链接的核苷酸序列,该序列包含,在5'至3'方向,用于引入编码生物活性多肽的第一核苷酸序列的第一克隆位点,且该序列可操作地链接至编码效应分子的序列。

[0167] 由该DNA载体编码的融合蛋白成分可提供为暗盒格式。术语“暗盒”意为,每一成分可通过标准重组方法轻易地替换为另一组分。特别地,当所编码的融合复合体待用来对抗可能具有或不具有发展血清型能力的病原体时,配置为暗盒格式的DNA载体尤其合意。

[0168] 为了制作编码融合蛋白复合体的载体,使用适当的连接酶将编码该生物活性多肽的序列链接至编码该效应子肽的序列。通过从自然来源如从适当的细胞系分离DNA,或通过已知的合成方法如磷酸三酯方法,可获得编码所呈递肽的DNA。见,如,《寡核苷酸合成》(Oligonucleotide Synthesis, IRL Press (M.J. Gait, ed., 1984))。还可使用可商购的自动寡核苷酸合成器制备合成寡核苷酸。一旦被分离,编码该生物活性多肽的基因即可通过聚合酶链反应(PCR)或该领域中已知的其它手段被扩增。适用于扩增该生物活性多肽基因的PCR引物可将限制性位点加至该PCR产物中。该PCR产物优选包括用于该效应子肽的剪接位点,以及该生物活性多肽-效应子融合复合体的适量表达和分泌所必需的前导序列。该PCR产物还优选包括编码该链接序列的序列、或用于连接该序列的限制性酶位点。

[0169] 本文中揭示的融合蛋白优选通过标准重组DNA技术生产。例如,一旦编码该生物活性多肽的DNA分子被分离,其序列即可被连接至编码该效应子多肽的另一DNA分子。可将该编码生物活性多肽的核苷酸序列直接结合至编码该效应子肽的DNA序列,或更典型地,可将本文中讨论的编码该链接序列的DNA序列插置于编码该生物活性多肽的序列与编码该效应子肽的序列之间并使用适当的连接酶接合在一起。所得的杂交DNA分子可在适当的宿主细胞内表达,以生产该融合蛋白复合体。该DNA分子以5'至3'取向彼此连接,因此,在连接后不改变所编码多肽的转译框(即,该DNA分子在框内彼此连接)。所得DNA分子编码框内的融合蛋白。

[0170] 该基因构造中亦可包括其它核苷酸序列。例如,控制编码该融合至该效应子肽的生物活性多肽的序列表达的启动子序列,或将该融合蛋白引导至该细胞表面或该培养基的前导序列,可包括在该构造中或存在于其内部插入该构造的表达载体内。尤其优选免疫球蛋白或CMV启动子。

[0171] 在获得突变的生物活性多肽、IL-15、IL-15R α 或Fc域编码序列中,该领域技术人员应知悉,该多肽可通过某些氨基酸替换、加成、删除、以及转译后修饰得以修饰,而不丧失或减少其生物学活性。特别地,众所周知,保守氨基酸替换,即一个氨基酸替换为另一个具有相似体积、电荷、极性和构型的氨基酸,不太可能显着改变蛋白质功能。构成蛋白质的20种标准氨基酸在广义上可归为下述四组保守氨基酸:非极性(疏水性)组,包括丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸和缬氨酸;极性(不带电,中性)组,包括天冬酰胺、半胱氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸;带正电(碱性)组,含有精氨

酸、组氨酸和赖氨酸；以及带负电(酸性)组，含有天冬氨酸和谷氨酸。蛋白质中的一个氨基酸替换为同一组中的另一氨基酸，不太可能对于该蛋白质的生物学活性造成不利影响。其它例子中，可作出对氨基酸位置的修饰以减少或增强该蛋白质的生物学活性。此类改变可随机引入，或基于靶点残基的已知或假定的结构或功能性质而经由位点特异性突变引入。在该变体蛋白质表达之后，可使用结合或功能检验容易地评估由于修饰造成的对其生物学活性的改变。

[0172] 可通过DNA杂交分析确定核苷酸序列之间的同源性，其中，双链DNA杂交种的稳定性取决于碱基配对出现的程度。高温及/或低盐浓度的条件，降低该杂交种的稳定性，且可改变该条件以防止同源性低于所选择程度的序列解链。例如，对于具有约55%G-C含量的序列，在40至50°C、6x SSC(氯化钠/柠檬酸钠缓冲液)和0.1%SDS(十二烷基硫酸钠)的杂交和洗涤条件下，显示约60%至70%的同源性；在50至65°C、1x SSC和0.1%SDS的杂交和洗涤条件下，显示约82%至97%的同源性；而在52°C、0.1x SSC和0.1%SDS的杂交和洗涤条件下，显示约99%至100%的同源性。亦可使用多种用于比对核苷酸序列和氨基酸序列(并测量同源性程度)的计算机程序，且一系列可商购的软件和免费软件的供应商可在Ausubel et al. (1999)中找到。易获得的序列比对和多序列对准算法分别为，局部序列排比检索基本工具(Basic Local Alignment Search Tool(BLAST) (Altschul et al., 1997))和ClustalW程序。BLAST可在万维网的网址ncbi.nlm.nih.gov获得，而ClustalW版本可在网址2.ebi.ac.uk获得。

[0173] 该融合蛋白的成分可以几乎任何次序组织，只要各自能实施其预期功能即可。例如，一种具体例中，该生物活性多肽位于该效应分子的C端或N端。

[0174] 本发明的优选效应分子的体积应有利于那些域的预期功能。本发明的效应分子可通过多种方法制作并融合至该生物活性多肽，该方法包括周知的化学交联方法。见，如，Means, G.E. 和 Feeney, R.E. 在1974年所著的《蛋白质的化学修饰》(Chemical Modification of Proteins, Holden-Day)。也见，S.S. Wong在1991年所著的《蛋白质偶联和交联化学》(Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press)。但通常优选使用重组操作来制作框内的融合蛋白。

[0175] 注意，根据本发明的融合分子或偶联分子可通过若干途径组织。一种例示性的构型中，该生物活性多肽的C端被可操作地链接至该效应分子的N端。若需要，该链接可通过重组方法实现。但在另一种构型中，该生物活性多肽的N端被链接至该效应分子的C端。

[0176] 或者，或此外，可根据需要将一种或多种额外的效应分子插入该生物活性多肽或偶联复合体中。

[0177] 载体和表达

[0178] 可采用多种策略来表达本发明的融合蛋白复合体(如，2B8T3M)的成分。例如，可使用限制性内切酶在适当的载体中做出用于插入构造的切口并在其后进行连接，而将编码本发明的融合蛋白复合体的一种或多种成分的构造并入该载体中。随后将含有该基因构造的载体引入适当的用于表达融合蛋白的宿主中。通常，见前文的Sambrook等人。可基于与克隆方案相关的因素，经验性地选择适当的载体。例如，该载体应与所采用的宿主相容，并具有适用于该宿主的复制子。该载体必须能接纳编码待表达的融合蛋白复合体的DNA序列。适当的宿主细胞包括真核生物细胞和原核生物细胞，优选那些可轻易地被转化且在培养基中展

现快速生长的细胞。具体而言,优选的宿主细胞包括原核生物如大肠杆菌(*E.coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)等,真核生物如动物细胞和酵母株如酿酒酵母(*S.cerevisiae*)。通常优选哺乳动物细胞,尤其是J558、NS0、SP2-0或CHO。其它适当的宿主包括,例如,昆虫细胞如Sf9。采用传统的培养条件。见前文的Sambrook。随后可选择稳定的转化或转染细胞系。可通过已知过程确定表达本发明的融合蛋白复合体的细胞。例如,可通过对于该交联免疫球蛋白为特异性的ELISA及/或通过免疫印迹法,测定对链接至免疫球蛋白的融合蛋白复合体的表达。其它用于检测包含链接至IL-15或IL-15R α 域的生物活性多肽的融合蛋白表达的方法,揭露于实施例中。

[0179] 如上文通常所述,宿主细胞可用于制备目的,以繁殖编码所希望的融合蛋白的核酸。因此,宿主细胞可包括原核生物或真核生物细胞,其中,该融合蛋白的生产是特别预期的。因此,宿主细胞具体包括能繁殖编码该融合物的核酸的酵母、苍蝇、蠕虫、植物、青蛙、哺乳动物细胞和器官。可使用的哺乳动物细胞系的非限制性实例包括CHO dhfr细胞(Urlaub and Chas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980))、293细胞(Graham et al., J Gen. Virol., 36: 59 (1977))或骨髓瘤细胞如SP2或NS0(Galfre and Milstein, Meth. Enzymol., 73 (B): 3 (1981))。

[0180] 能繁殖编码所希望的融合蛋白复合体的核酸的宿主细胞,还涵盖非哺乳动物真核细胞,包括昆虫(如,草地贪夜蛾(*Sp. Frugiperda*))、酵母(如,啤酒酵母(*S.cerevisiae*)、非洲酒酵母(*S.pombe*)、毕赤酵母(*P.pastoris*)、乳酸克鲁维酵母(*K.lactis*)、多形汉逊酵母(*H.polymorpha*);如Fleer, R., Current Opinion in Biotechnology, 3 (5): 486-496 (1992)中总结)、真菌和植物细胞。该预期某些原核生物如大肠杆菌和芽孢杆菌。

[0181] 可通过用于转染细胞的标准技术将编码所希望的融合蛋白的核酸引入宿主细胞内。术语“转染”试图涵盖所有用于将核酸引入宿主细胞内的传统技术,包括磷酸钙共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂质转染、电穿孔、显微注射、病毒转导及/或整合。适用于转染宿主细胞的方法可在前文的Sambrook等人和其它实验室教材中找到。

[0182] 多种启动子(转录起始调节区域)可根据本发明使用。对适宜启动子的选择取决于待采用的表达宿主。可以使用来自异种来源的启动子,只要他们在所选宿主中发挥作用即可。

[0183] 对启动子的选择还取决于所希望的肽或蛋白质生产效率和水平。为了急剧增加蛋白质在大肠杆菌中的表达水平,一般采用诱导型启动子如tac。蛋白质的过表达可能对该宿主细胞有害。结果,可能限制宿主细胞的生长。使用诱导型启动子系统令该宿主细胞能在诱导基因表达之前培养至可接受的密度,从而更容易获得更高的产率。

[0184] 多种信号序列可根据本发明使用。可使用与该生物活性多肽编码序列同源的信号序列。或者,也可使用被选择或设计用于在表达宿主中有效分泌和加工的信号序列。例如,适当的信号肽/宿主细胞配对包括,用于在枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*)中分泌的枯草芽孢杆菌sacB信号序列;以及用于在毕赤酵母(*P.pastoris*)分泌的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) α -交配因子或毕赤酵母酸性磷酸酶phoI信号肽。该信号序列可通过编码该信号肽酶裂解位点的序列直接接合至该蛋白质编码序列,或通过由通常少于十个密码子构成的短核苷酸桥接合,其中,该桥确保下游TCR序列的正确阅读框。

[0185] 已经鉴别了真核生物蛋白质表达系统中用于增强转录和转译的元件。例如,位于

异源启动子任一侧的花椰菜花叶病毒(CaMV)启动子1,000bp可在植物细胞内将转录水平提升10倍至400倍。该表达构造还应包括适宜的转译起始序列。将该表达构造修饰为包括用于适宜的转译起始的Kozak共有序列,可将转译水平增加10倍。

[0186] 一般采用选择性标志物,该标志物可以是表达构造的一部分或与该表达构造分离(如,由该表达载体携带),因此,该标志物可整合在不同于感兴趣的基因的位点。实例包括,赋予抗体以抗性(如,赋予大肠杆菌宿主细胞以氨苄青霉素耐药性的b1a、赋予多种原核生物和真核生物细胞以卡那霉素耐药性的nptII)或允许宿主在最小量培养基上生长(如,HIS4能令毕赤酵母或His-酿酒酵母在不存在组氨酸的条件下生长)的标志物。可选择的标志物具有其自身转录和转译起始和终止调节区域,以令该标志物以非依赖性方式表达。如果采用抗生素耐药性作为标志物,则用于选择的抗生素浓度将依据该抗生素而变,通常为每毫升(mL)培养基中10至600微克(μg)的抗生素。

[0187] 采用已知的重组DNA技术(Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1999)组装该表达构造。限制性内切酶消解和连接是用来接合两个DNA片段的基本步骤。在接合之前,该DNA片段的末端可能需要修饰,这一修饰可以通过填充悬垂、以核酸酶(如,ExoIII)删除该片段的末端部分、定点突变而实施,或通过PCR加入新的碱基对而实施。可采用多链接物(polylinker)和适配体来促进所选择的片段的接合。该表达构造典型在采用限制性内切、连接、和大肠杆菌转化循环的阶段组装。大量适用于构建该表达构造的克隆载体是该领域中已知的(λZAP和pBLUESCRIPT SK-1, Stratagene, La Jolla, CA, pET, Novagen Inc., Madison, WI, Ausubel et al., 1999中引用),且对其的具体选择并不限于本发明。对于克隆载体的选择,将受到被选择用于将该表达构造引入宿主细胞的基因转移系统的影响。在每一步骤结束时,可通过限制性分析、DNA序列分析、杂交分析和PCR分析来分析所得构造。

[0188] 该或线性或环状的表达构造可被转化至作为克隆载体构造的宿主内,或可被从该克隆载体移除并直接使用或引入至递送载体上。该递送载体促进该表达构造被引入所选择的宿主细胞类型中并在该细胞内维持。通过大量已知的基因转移系统(如,天然能力、化学介导的转化、天然质体转化、电穿孔、基因枪转化、转染、或偶联)将该表达构造引入该宿主细胞内(Ausubel et al., 1999; Sambrook et al., 1989)。所选择的基因转移系统取决于所使用的宿主细胞和载体系统。

[0189] 例如,可通过天然质体转化或电穿孔将该表达构造引入酿酒酵母细胞内。酿酒酵母的电穿孔容易实施,并获得与天然质球转化相当的转化效率。

[0190] 本发明进一步提供一种用于分离感兴趣的融合蛋白的过程。在该过程中,令其内部已经引入编码可操作地链接至调节序列的感兴趣的蛋白质的核酸的宿主细胞(如,酵母、真菌、昆虫、细菌或动物细胞)以生产规格在培养基中生长,以刺激该编码感兴趣的融合蛋白的核苷酸序列的转录。之后,将该感兴趣的融合蛋白从所收获的宿主细胞或从该培养基分离出来。可使用标准的蛋白质纯化技术将该感兴趣的蛋白质从培养基或所收获的宿主细胞分离出来。特别地,可使用该纯化技术,以大规格(即,至少毫克量级)在多种实际操作设施中表达并纯化所希望的融合蛋白,该实际操作设施包括滚瓶、搅拌瓶、组织培养板、生物反应器、或发酵罐。

[0191] 可通过已知方法分离并纯化所表达的蛋白融合复合体。典型地,将该培养基离心或过滤,随后通过亲和色谱或免疫亲和色谱如蛋白质-A或蛋白质-G亲和色谱或包含使用结

合所表达的融合复合体的单克隆抗体的免疫亲和方案纯化上清液。可通过已知技术的适当组合分离并纯化本发明的融合蛋白。这些方法包括,例如,使用溶解性的方法,如盐沉淀和溶剂沉淀;使用分子量差异的方法,如渗析、超滤、凝胶过滤、和SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳;使用电荷差异的方法,如离子交换柱色谱;使用特异亲和性的方法,如亲和色谱;使用疏水性差异的方法,如反相高效液相色谱;以及使用等电点差异的方法,如等电点聚焦电泳、金属亲和柱如Ni-NTA。通常见于前文的Sambrook等人和Ausubel等人中关于这些方法的揭露内容。

[0192] 优选本发明的融合蛋白是实质上纯的。换言之,该融合蛋白已经与其天然伴随的细胞替代物分离,因此该融合蛋白优选以至少80%或90%至5%同质性(w/w)存在。对于多种药学、临床和研究应用,最优选具有至少98至99%同质性(w/w)的融合蛋白。一旦经实质上纯化,该融合蛋白即应实质上不含对于治疗性应用来说是污染物的物质。一旦经部分纯化或纯化至实质纯度,则该可溶性融合蛋白即可用于治疗性的用途,或用于实施本文中揭露的体外或体内检验。可通过多种标准技术如色谱和凝胶电泳来测定实质纯度。

[0193] 本发明的融合蛋白复合体适合与多种细胞一起用于体外或体内用途,其中,该细胞是癌细胞或被感染的细胞或可变为被一种或多种疾病感染。

[0194] 人白介素-15(huIL-15)通过在抗原呈递细胞上表达的人IL-15受体 α 链(huIL-15R α)而反向呈递于免疫效应子细胞。IL-15R α 主要通过细胞外sushi域(huIL-15R α Su)以高亲和性(38pM)结合huIL-15。如本文中所述,该huIL-15和huIL-15R α Su域可作为支架用来构建多域融合复合体。

[0195] IgG域,尤其是Fc片段,已经成功地作为二聚体支架用于包括被批准的生物药物在内的多种治疗性分子。例如,依那西普(etanercept)是用于链接至人IgG1的Fc域的可溶性人p75肿瘤坏死因子- α (TNF- α)受体(sTNFR)的二聚体。这种二聚作用令依那西普抑制TNF- α 活性的潜力比单体TNFR提高1,000倍,并向该融合物提供5倍于其单体形式的更长的血清半衰期。结果是,依那西普在中和TNF- α 的体内促炎活性和改善具有多种不同自体免疫适应症的患者的恢复结果中有效。

[0196] 除了其二聚活性外,该Fc片段还通过补体激活和与呈递在天然杀手(NK)细胞、中性粒细胞、吞噬细胞和树突细胞上的Fc γ 受体的相互作用而提供细胞毒性效应子功能。在抗癌治疗抗体和其它抗体域-Fc融合蛋白的情境中,这些活性似乎在所观察到的在动物肿瘤模型和癌症患者体内的功效中扮演重要角色。但是,这些细胞毒性效应子应答在大量治疗性应用可能不足。因此,在改善并拓展该Fc域的效应子活性和研发经由靶向治疗分子将包括T细胞活性在内的细胞溶解免疫应答聚集至疾病部位的其它手段方面,已经引起相当大的关注。IgG域已经作为支架用来形成双特异性抗体,以改善由传统的杂交瘤融合技术生成的产物的质量和数量。尽管这些方法绕开了其它支架的缺点,但其仍难以在哺乳动物细胞内以足以支持临床研发和使用的水平生产双特异性抗体。

[0197] 在一种研发人源性免疫刺激多聚体支架的尝试中,使用人IL-15(huIL-15)和IL-15受体域。huIL-15是小的四 α -螺旋束细胞因子家族成员,与huIL-15受体 α 链(huIL-15R α)相关,具有高亲和性(平衡解离常数(KD)约为 10^{-11} M)。随后,所得复合体被反向呈递为表现于T细胞和NK细胞表面上的人IL-2/15受体 β /公共 γ 链(huIL-15R β γ C)复合体。这一细胞因子/受体相互作用导致效应子T细胞和NK细胞的扩张和激活,而该细胞在根除被病毒感染的

细胞和恶性细胞中扮演重要作用。正常情况下,huIL-15和huIL-15R α 从同在树突细胞中被生产,以在细胞内形成复合体,该复合体后来被分泌并作为异质二聚体分子表现在细胞表面上。因此,huIL-15与huIL-15R α 相互作用的特征表明,这些链内结合域可作为人源性免疫刺激支架而用来制作能够靶点特异性结合的可溶性二聚体分子。

[0198] 如下文中所详述,使用基于huIL-15:huIL-15R α 的支架创建2B8T3M。该二聚体融合蛋白复合体保留它们的huIL-15域和结合域的免疫刺激和靶点特异性生物活性,表明huIL-15和huIL-15R α 的加入非但没有显着改变该融合域的空间排列,还提供了适当程度的构象柔性而不影响细胞因子活性。因此,这一支架可用来形成多价融合复合体,如2B8T3M,以增加分子的整体结合亲和性。该可溶性融合蛋白以相对高的水平在重组CHO细胞培养中生产(每升细胞培养物上清液中若干毫克,无需繁冗的细胞系筛选或优化),且可容易地从该细胞培养物上清液中纯化。

[0199] 除非明确排除,本发明的实践采用传统的分子生物学技术(包括重组技术)、微生物学技术、细胞生物学技术、生物化学技术和免疫学技术,这些技术完全处于该领域技术人员的知识范围内。此类技术完整地解释于文献中,如《分子克隆:生物学手册(第二版)》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual, second edition (Sambrook, 1989));《寡核苷酸合成》(Oligonucleotide Synthesis (Gait, 1984));《动物细胞培养》(Animal Cell Culture (Freshney, 1987));《酶学方法:实验免疫学手册》(Methods in Enzymology, Handbook of Experimental Immunology (Weir, 1996));《用于哺乳动物细胞的基因转移载体》(Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Miller and Calos, 1987));《当代分子生物学方法》(Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, 1987));《PCR:聚合酶链反应》(PCR:The Polymerase Chain Reaction (Mullis, 1994));《当代免疫学方法》(Current Protocols in Immunology (Coligan, 1991))。这些技术适用于生产本发明的多核苷酸和多肽,且因此可考虑用来作成并实践本发明。尤其可用于特定具体例的技术将在下文中讨论。

[0200] 发表下述实施例,以向该领域技术人员提供如何作成并使用本发明的检验、筛选和治疗方法的完全揭露和说明,且该实施例并非试图限制本发明人所认为的发明的范畴。

[0201] 淋巴瘤

[0202] 淋巴瘤是一种血液癌症类型,当B淋巴细胞或T淋巴细胞比正常细胞更快地分化或比预期存活更久时,即出现淋巴瘤。例如,B细胞淋巴瘤包括霍奇金淋巴瘤和非霍奇金氏淋巴瘤两类,但大多数为非霍奇金氏淋巴瘤。B细胞淋巴瘤表达CD20。

[0203] 淋巴瘤可在淋巴结、脾脏、骨髓、血液或其它器官内发展。这些恶性细胞通常起源于淋巴结,表现为淋巴结增大,即淋巴细胞的实体瘤。淋巴瘤通过淋巴结活检确诊,该淋巴结活检为将淋巴结的部分或整体切除,并在显微镜下检查。这一检查可揭示可能指示淋巴瘤的病理组织下特征。治疗可牵涉化疗、放疗、及/或骨髓移植。

[0204] [实施例]

[0205] 实施例1:T3融合蛋白的生成和纯化

[0206] 如下文详述,生成包含抗-CD3 scAb/huIL-15N72D和抗-CD20scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc的蛋白复合体。这一复合体经由该抗-CD20 scAb域而识别B细胞淋巴瘤,经由IL-15活性而诱导NK和T细胞应答,经由该抗-CD3scAb域而激活T细胞,以及经由该Fc结合域而

刺激ADCC和CDC(图2)。

[0207] 具体而言,制作将单链抗-人CD3抗体链接至huIL-15N72D链的构造。该抗-人CD3单链抗体(抗-CD3 scAb)序列包含,经由柔性链接序列链接的该OKT3抗体的重链和轻链V域的编码区域。一些情形中,抗-CD3 scAb被链接至huIL-15N72D的C端。其它情形中,抗-CD3 scAb被链接至huIL-15N72D的N端。下文显示包含其中抗-CD3 scAb链接至huIL-15N72D的N端的构造的核酸和蛋白质序列。

[0208] 抗-CD3 scAb-IL-15N72D构造(包括信号肽序列和终止密码子)的核酸序列如下(SEQ ID NO:1):

[0209] (信号肽)

[0210] ATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACCGGT-

[0211] (抗-CD3 scAb(OKT3 VL-链接物VH scFv))

[0212] CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTACCATGACCTGCA
AGTGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGAACCTGGTACCAGCAGAACGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTATGA
CACATCCAAACTGGCTCTGGAGTCCCTGCTCACTTCAGGGCAGTGGTCTGGGACCTCTACTCTCACAAATCA
GCGGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCATTACGTTGGCTCGGGG

[0213] (链接物)

[0214] ACAAAAGTTGGAAATAAACCGGACTAGTGGAGGTGGCGGATCAGGAGGCAGGTTCTGGCGGAGGTGG
GAGTCTCGAGCAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGC
AAGGCTTCTGGCTACACCTTACTAGGTACACGATGCACTGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGA
TTGGATACATTAATCCTAGCCGTGGTTACTAATTACAATCAGAAGTCAAGGACAAGGCCACATTGACTACAGA
CAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGA
TATTATGATGATCATTACTGCCTTGACTACTGGGCCAAGGCACCCTCACAGTCTCCTCA-

[0215] (人IL-15N72D)

[0216] AACTGGGTTAACGTAATAAGTGATTGAAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATGCATATTGATGCT
ACTTTATATACGGAAAGTGATGTTACCCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTCTCTGGAGTTACAAGT
TATTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTGATGACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTGT
CTTCTAAATGGGAATGTAACAGAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAATATTAAAGATTTTG
CAGAGTTTGATCATATTGTCAAATGTTCAACACTTCTAA

[0217] 抗-CD3 scAb-IL-15N72D融合蛋白(包括信号肽序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:2):

[0218] (信号肽)

[0219] METDTLLWVLLWVPGSTG-

[0220] (抗-CD3 scAb(OKT3 VL-链接物VH scFv))

[0221] QIVLTQSPA**IMSASPGEKVTMTC**SASSSVSYM**WYQQKSGTSPKRW**IYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTS
YSLTISGMEADEAATYYCQQWSSNPFTFGSC

[0222] (链接物)

[0223] TKLEINRTSGGGSGGGSGGGSLEQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPG
QGLEWIGYINPSRGYTNQNQFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLV
SS-

[0224] (人IL-15N72D)

[0225] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDIVENLIL
ANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0226] 如先前所述,将该序列克隆入表达载体内(US 8,507,222,实施例1和实施例2,通过引用并入本文),并将该表达载体转移至CHO细胞内。还使用表达抗-CD20 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc构造(US 8,507,222,实施例18,通过引用并入本文)的载体转染细胞。

[0227] 抗-CD20 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc构造(包括前导序列)的核酸序列如下(SEQ ID NO:3):

[0228] (前导序列)

[0229] ATGGATTTTCAGGTGCAGATTATCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCTTCAGTCATAATGTCCAGAGGA

[0230] (抗-CD20轻链V域)

[0231] CAAATTGTTCTCTCCAGTCTCCAGCAATCCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTACAATGACTTGC
AGGGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATCCACTGGTCCAGCAGAACGCCAGGATCCTCCCCAAACCCCTGGATTATGC
CACATCCAACCTGGCTCTGGAGTCCCTGTTGCTCAGTGGCAGTGGCTGGGACTTCTACTCTCACAAATCA
GCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGACTAGTAACCCACCCACGTTGGAGGGGG
ACCAAGCTGAAATCAA

[0232] (链接物)

[0233] AGTGGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGAGT

[0234] (抗-CD20重链V域)

[0235] CAGGTACAACACTGCAGCAGCCTGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAG
GCTCTGGCTACACATTACAGTTACAATATGCACTGGTAAACAGACACCTGGTGGGGCTGGAATGGATTGG
AGCTATTATCCCGAAATGGTGATACTTCCTACAATCAGAAGTTCAAAGGCCACATTGACTGCAGACAAAT
CCTCCAGCACGCCATACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGGGTCTATTACTGTGCAAGATGACT
TACTACGGCGGTGACTGGTACTTCRATGTCTGGGCGCAGGGACCACGGTCACMGTCCTGCA

[0236] (人IL-15R α sushi域)

[0237] ATCACGTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGTCAAGAGCTACAGCTTGTACTCC
AGGGAGCGGTACATTGTAACTCTGGTTCAAGCGTAAAGCCGGACGTCCAGCCTGACGGAGTGGTGTGAACAA
GGCCACGAATGTCGCCACTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

[0238] (人IgG1 CH2-CH3 (Fc) 域)

[0239] GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCGTCCCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCG
TCAGTCTTCCTCTCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGG
GGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA
AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCCCTGCCCTGAGGTACAGCTGACCAAGAACCAAGGTGACCT
GGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGG
GCAGCCCCGAGAACCAACAGGTGTACACCCTGCCCTGAGGTACAGCTGACCAAGAACCAAGGTGACCT
GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAAACTACAAG
ACCACGCCTCCCGTGGACTCCGACGGCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
CTCCTGGTAAATAA

[0240] 成熟的抗-CD20 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc融合蛋白(包括前导序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:4)：

[0241] (抗-CD20轻链V域)

[0242] QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKWYATSNLASGVPVRFSGSGSGTS
YSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK

[0243] (链接物)

[0244] SGGGGSGGGGSGGGGS

[0245] (抗-CD20重链V域)

[0246] QVQLQQPGAEVKGPGASVKSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKAT
LTADKSSSTAYMQLSSLTSEDAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSA

[0247] (人IL-15R α sushi域)

[0248] ITCPPPMSEHADIWVKSYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIR

[0249] (人IgG1 CH2-CH3(Fc)域)

[0250] EPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0251] 例示性的IL-15N72D氨基酸序列提供于下(具有前导肽)(SEQ ID NO:5)：

[0252] (前导肽)

[0253] METDTLLLWVLLWVPGSTG-

[0254] (IL-15N72D)

[0255] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLII
ANDSLSSNGNVNTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0256] 一些情形中,该前导肽从成熟的IL-15N72D多肽裂解。

[0257] 例示性的IL-15R α Su/Fc氨基酸序列(具有前导肽)提供于下(SEQ ID NO:6)：

[0258] (前导肽)

[0259] MDRLTSSFLLLIVPAYVLS-

[0260] (IL-15R α Su)

[0261] ITCPPPMSEHADIWVKSYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIR-

[0262] (IgG1 CH2-CH3(Fc域))

[0263] EPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0264] 一些情形中,成熟的IL-15R α Su/Fc蛋白缺少该前导序列。

[0265] 两种构造在CHO细胞中共表达,令可溶性抗-CD3 scAb/huIL-15N72D:抗-CD20 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc复合体(称为抗-CD3 scAb-抗-CD20 scAb T3M;2B8T3M)形成并分泌,使用蛋白质A亲和色谱从该CHO细胞培养物上清液纯化该复合体。对所纯化蛋白质的SDS-PAGE分析显示于图3中。分别观察到了对应于该~60kDa和~40kDa的可溶性抗-CD20

scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc抗-CD3 scAb/huIL-15N72D蛋白质的条带。

[0266] 实施例2:对T3分子的结合活性的体外表征

[0267] 基于ELISA的方法证实了抗-CD3 scAb/huIL-15N72D:抗-CD20 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc复合体的形成。一个实例中,使用huIgG1/huIL15-特异性ELISA检测融合蛋白复合体,该ELISA使用一捕获抗体即抗-人IgG抗体(Jackson ImmunoResearch)和检测抗体即生物素化的抗-人IL-15抗体(BAM 247,R&D系统)。

[0268] 此外,通过使用荷载受体的细胞的流式细胞术来评估复合体至Fc受体、IL-15 β γ 受体、CD3和CD20的结合。这些研究中,使用异硫氰酸荧光素(FITC)-标记的抗-CD3 scAb-抗-CD20 scAb T3M(4 μ g/测试,100 μ L)将Fc受体阳性的U937和IL-15R β γ 阳性的32D β 细胞(5 \times 10⁵细胞/测试)染色。如图3中所示,流式细胞术分析表明,该抗-CD3 scAb-抗-CD20 scAb T3M复合体(2B8T3M)结合至该U937和32D β 细胞。通过将含有该Fc域(抗-CD20 Ab:利妥昔单抗)或该IL-15域(IL-15N72D/IL-15R-Fc:ALT-803)的未标记的阻断试剂(80 μ g/测试)加入该细胞染色试验中,测试这一结合的特异性(图3)。“ALT-803”意为一种复合体,其包含非共价地与二聚体IL-15R α Su/Fc融合蛋白关联的IL-15N72D,其中,所述复合体展现免疫刺激活性(见,如,U.S.S.N.13/769,179,通过引用并入本文)。这些试剂将Fc受体阳性的U937和IL-15R β γ 阳性的32D β 细胞的FITC-2B8T3M特异性染色区分开来(图4)。

[0269] 之后,确定该复合体是否会结合荷载受体的人外周血单核细胞(PBMC)。在使用或不使用阻断试剂(50 μ g/测试)的条件下,以FITC标记的2B8T3M(2 μ g/测试,140 μ L)将人PBMC(5 \times 10⁵细胞/测试)染色,该阻断试剂为:用来阻断CD20结合的利妥昔单抗、用来阻断CD3结合的cOKT3(嵌合体OKT3 Ab)、和用来阻断IL-15受体结合的ALT-803。使用适宜的抗体染色,鉴别了该PBMC集落中荷载CD20的HLA-DR $^+$ B细胞、荷载CD3的CD8 $^+$ T细胞、以及荷载IL-15R的CD16 $^+$ NK细胞。每一种情形中,基于阳性染色和该阻断试剂的抑制,观察到了FITC-标记的2B8T3M复合体至这些细胞的特异性结合(图5)。

[0270] 实施例3:对T3M复合体的生物学活性的表征

[0271] 使用该抗-CD3 scAb-抗-CD20 scAb T3M复合体(2B8T3M),实施基于IL-15R β γ 阳性32D β 细胞增殖的IL-15生物学活性试验。在37°C,将IL-15依赖性细胞以1 \times 10⁴细胞/孔的浓度在含有渐增量的2B8T3M的200 μ L RPMI:10%FBS培养基中孵化。3天后,加入WST-1(一种水溶性四唑盐)增殖试剂(10 μ L/孔)。4小时后,测量在450nm的吸收,以基于通过代谢活性细胞进行的WST-1至可溶性甲瓒染料的裂解,而测定细胞增殖。作为阳性对照而评估ALT-803和抗-CD20 scAb T2M复合体(2B8T2M)的生物活性。“2B8T2M”意为一种可溶性抗-CD20 scAb/huIL-15N72D:抗-CD20 scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc复合体(见,如,US 8,507,222,通过引用并入本文)。如图6中所示,2B8T3M能促进32D β 细胞的细胞增殖,从而证明IL-15活性。2B8T3M的活性略低于2B8T2M的活性,但显着低于ALT-803的活性,推测是由于抗-CD3 scAb至IL-15N72D域的链接。

[0272] 实施例4:T3M复合体的抗肿瘤活性

[0273] 之后,测定该抗-CD3 scAb-抗-CD20 scAb T3M复合体能否经由CD3介导的T细胞激活而杀死CD20 $^+$ 肿瘤细胞(Daudi细胞)。将人外周血单核细胞从供体血液的血沉棕黄层分离出来。通过令该细胞穿过尼龙绒线柱而富集天然杀手(NK)细胞和T细胞。通过使用MACS柱的磁珠分离来纯化CD4和CD8 T细胞。将人免疫效应子细胞(1 \times 10⁶/孔)与Violet CellTrace标

记的目标Daudi细胞(2×10^5 /孔)(E:T-5:1)和多种浓度的抗-CD3 scAb-抗-CD20 scAb T3M复合体混合。作为对照,使用缺少CD3识别的可溶性抗-CD20 scAb/huIL-15N72D:抗-CD20 scAb/huIL-15RaSu/huIgG1 Fc复合体(抗-CD20 scAb T2M)。于37°C在RPMI-10%FBS培养基中孵化20小时后,收获细胞,并使用最终浓度为10 μ g/ml的碘化丙啶(PI)染色。使用FACSVersa细胞分析仪通过流式细胞术分析该细胞。经鉴定,经紫色标记的细胞为目标Daudi细胞,而经紫色PI染色的细胞为死亡的目标Daudi细胞。将CD20靶点特异性细胞毒性的测量值确定为死亡Daudi细胞的百分比。

[0274] 如图7中所示,抗-CD3 scAb-抗-CD20 scAb T3M(2B8T3M)和抗-CD20 scAb T2M(2B8T2M)两种复合体均能通过人PBMC和T细胞+NK细胞而介导强有力的CD20细胞特异性细胞毒性。但出乎意料的是,2B8T3M能刺激CD8 $^+$ T细胞且能以较低程度刺激CD4 $^+$ T细胞,从而以高于与2B8T2M相当者的水平更有效地杀死Daudi细胞。这些结果证实,2B8T3M能有效地提升CD3阳性T细胞对肿瘤细胞的细胞毒性。

[0275] 通过ELISA测定基于在这些人免疫细胞-Daudi细胞培养物中释放干扰素- γ (IFN- γ)的免疫激活的水平。如图8中所示,出乎意料的是,10nM的2B8T3M能够比2B8T2M更有效地刺激IFN- γ 从人PBMC以及CD4 $^+$ 和CD8 $^+$ T细胞中释放,表明免疫细胞经由该CD3结合域而激活。

[0276] 基于本文中呈现的体外结果,该抗-CD20 scAb T3M分子在标准移植瘤模型中刺激免疫应答且展现抗人淋巴瘤的抗肿瘤活性(见,例如,Rossi et al.Blood 2009;114:3864; Gillis et al.Blood. 2005;105:3972;和Xuan et al.Blood 2010;115:2864-2871)。

[0277] 类似的包含scAb或抗体识别域的T3M构造,可使用抗体序列容易地生成,该抗体序列具有对于其它CD抗原、细胞因子或趋化因子受体或配体、生长因子受体或配体、细胞粘附分子、MHC/MHC样分子、Fc受体、Toll样受体、NK受体、TCR、BCR、阳性/阴性共刺激受体或配体、死亡受体或配体、肿瘤相关抗原、病毒编码和细菌编码的抗原、和细菌的特异性。尤其感兴趣的是,具有下述抗原特异性的疾病特异性结合域(如,scAb)的T3M:CD4、CD19、CD21、CD22、CD23、CD25、CD30、CD33、CD38、CD40、CD44、CD51、CD52、CD70、CD74、CD80、CD123、CD152、CD147、CD221、EGFR、HER-2/neu、HER-1、HER-3、HER-4、CEA、OX40配体、cMet、组织因子、连接素-4、PSA、PSMA、EGFL7、FGFR、IL-6受体、IGF-1受体、GD2、CA-125、EpCam、死亡受体5、MUC1、VEGFR1、VEGFR2、PDGFR、Trail R2、叶酸受体、血管生成素-2、 α v β 3整合素受体、HLA-DR抗原和本文中揭示的其它疾病靶点。还关注对抗来自HIV、HCV、HBC、CMV、HTLV、HPV、EBV、RSV和其他病毒的病毒抗原的抗体域,尤其是那些识别HIV衣壳尖突(envelope spike)及/或gp120和gp41表位的抗体域。此类抗体域可从该领域中已知的序列生成,或可从该领域中已知的多种来源(如,脊椎动物宿主或细胞、组合库、随机合成库、计算机建模等)从头分离。

[0278] 实施例5:ALT-803(IL-15超兴奋剂)与抗体的新颖融合体演示抗原特异性的抗肿瘤响应

[0279] 白介素(IL)-15及其受体 α (IL-15Ra)被共同表达在抗原呈递细胞上,该细胞允许将IL-15反向呈递至荷载IL-2R β γ C的免疫细胞并且刺激效应子免疫应答。先前已有报导,可利用IL-15超兴奋剂(IL-15N72D)与细胞外IL-15RaSu域(IL-15RaSu)之间的高亲和性相互作用来创建用于设计多价疾病靶向复合体的功能性支架。该IL-15N72D:IL-15RaSuFc复合体,也称为ALT-803,是通过将IL-15N72D:IL-15RaSu融合至IgG1的Fc域而构建的多聚体复合物。ALT-803是一种IL-15超兴奋剂复合体,已经作为强有力的抗肿瘤免疫治疗剂而

被研发,且已经用于临床试验中。本文中揭示,使用融合至肿瘤靶向单克隆抗体利妥昔单抗的四条单链的ALT-803支架,创建新颖的融合分子——2B8T2M。该分子显示三特异性结合活性,分别为:识别肿瘤细胞上的CD20分子、经由呈现在免疫效应子细胞上的IL-2R β γC进行刺激、以及结合至天然杀手(NK)细胞和巨噬细胞上的Fcγ受体。2B8T2M激活NK细胞,以提升抗体依赖的细胞毒性(ADCC)、介导补体依赖的细胞毒性(CDC)、以及诱导B淋巴瘤细胞的凋亡。与利妥昔单抗相比,2B8T2M在异种移植SCID小鼠模型中展现显着更强的抗肿瘤活性,且在猕猴体内更有效地耗尽B细胞。因此,可将ALT-803修饰为功能性支架,用于创建多特异性的基于IL-15的靶向免疫治疗剂,且可作为新颖的平台用来改善治疗性抗体的抗肿瘤活性和临床功效。

[0280] 白介素(IL)-15,一种四螺旋的通用γ链(γC)细胞因子,是天然杀手(NK)细胞和CD8⁺T细胞的发育、增殖和激活的关键因子(1、2)。IL-15与其α-链受体(IL-15R α)通过抗原呈递细胞共表达,且两种蛋白质在该细胞表面上形成复合体,该复合体被反向呈递至荷载IL-2R β γC复合体的NK细胞和T细胞(2)。IL-15以高亲和性结合至IL-15R α ,且IL-15R α 发挥分子伴侣和构象稳定剂的作用以增强IL-15与IL-2R β γC之间的相互作用(2)。IL-15变体被证实为携带位于氨基酸72的天冬酰胺至天冬氨酸的突变(N72D),其展现杰出的至免疫细胞上的IL-2R β γC的结合和增加的免疫刺激活性(3)。先前的研究已经证明,当这一IL-15变体与融合至IgG1Fc的可溶性IL-15R α SuFc域融合物(IL-15R α SuFc)关联时,将会形成异质二聚体复合物,即IL-15N72D:IL-15R α SuFc(称为ALT-803),与天然IL-15相比,ALT-803与该IL-2R β γC复合体的结合增加、刺激NK细胞和T细胞的能力增强、且具有更长的生物半衰期(4)。在多种动物模型中,ALT-803发挥强力免疫刺激剂的作用,能同步激活免疫系统的先天的和过继的武器,以引出对抗瘤形成挑战的快速且持续时间长的保护性应答(5)。此外,在小鼠肿瘤模型体内,ALT-803与检查点阻滞或治疗性抗体合用,在降低肿瘤负荷和延长存活期中有效(6、7)。为了令基于ALT-803的分子在与疾病斗争中更具特异性且更有效,通过将ALT-803在基因方面与位于IL-15N72D和IL-15R α SuFc蛋白质N端的单链抗体(scFv)融合,而将ALT-803转化为靶向免疫治疗剂。这一研究中,使用该抗-CD20 scFv作为靶点识别域,以证明ALT-803是用于创建疾病靶向免疫刺激分子的通用功能性支架。还发现,这一新颖的单一融合蛋白途径改善该抗体依赖的细胞毒性(ADCC)和该抗-CD20治疗性抗体利妥昔单抗的令细胞凋亡的功能。

[0281] 使用IL-15:IL-15R α 支架创建多功能蛋白复合体

[0282] 先前显示,可使用IL-15:IL-15R α Su支架,通过将IL-15和IL-15R α Su的N端融合至p53(264-272)特异性嵌合单链TCR(c264scTCR)而生成生物活性融合蛋白复合体(8)。因此,推测ALT-803(即,该IL-15N72D:IL-15R α SuFc复合体)亦可发挥作为支架来创建多特异性的基于IL-15的靶向免疫治疗剂的功能。为了测试这一点,将利妥昔单抗的重链和轻链的可变区域转变为scFv(sc2B8)(9),并在基因层面将sc2B8融合至ALT-803的IL-15N72D蛋白和IL-15R α SuFc蛋白的N端。基于IL-15N72D域与IL-15R α Su域之间的高结合亲和性,预期该融合蛋白将会在sc2B8-IL-15N72D与sc2B8-IL-15R α SuFc之间形成异质二聚体复合物。此外,预期该sc2B8-IL-15R α SuFc使用由该Fc域提供的二硫键形成共价二聚体。因此,这一新颖的融合蛋白复合体(记为2B8T2M)预计由两个sc2B8-IL-15N72D蛋白和两个sc2B8-IL-15R α SuFc蛋白组成(图9A)。将该融合蛋白表达载体稳定地共转染入CHO细胞内之后,从细胞培养物上清

液中容易地以10至40mg/L的范围生产并纯化可溶性2B8T2M。当通过还原性SDS-PAGE评估时,该纯化的制剂由迁移至~40kDa和~60kDa的2中蛋白质组成(图9B),分别对应于分子量为38kDa的sc2B8-IL-15N72D和分子量为59kDa的sc2B8-IL-15R α SuFc。此外,通过体积排阻色谱验证多聚体融合蛋白复合体,结果表明,以蛋白质体积标准为基准,2B8T2M的分子质量为162kDa(图9C)。除2B8T2M以外,生成类似的融合蛋白复合体,其含有具备降低的Fc受体结合活性的突变Fc域(2B8T2M-LA)(10)或能够结合IL-2R β 的突变IL-15域(2B8T2M-D8N)。将另一种由不同的靶向域(c264scTCR(8))构成的融合蛋白复合体(记为c264T2M)在基因层面融合至IL-15N72D蛋白和IL-15R α SuFc蛋白的N端。这些复合体作为对照物用来测定该Fc域、IL-15N72D域和sc2B8域在2B8T2M的生物活性中扮演的角色。

[0283] 2B8T2M保留CD20结合活性、Fc受体结合活性和IL-15生物学活性

[0284] 为了验证CD20结合性质,生成FITC标记的2B8T2M和利妥昔单抗并用其染色人HLA-DR+B细胞。结果表明,人B细胞能结合FITC标记的利妥昔单抗(图10A)以及FITC标记的2B8T2M(图10B)。相比之下,这些分子的CD20特异性结合活性被未标记的利妥昔单抗和未标记的2B8T2M阻断,但并未被非特异性人IgG阻断。这些发现证明,2B8T2M保留了利妥昔单抗的CD20特异性结合活性。同样,在其细胞表面上荷载Fc受体而非CD20或IL-2R β γC的人组织细胞淋巴瘤U937细胞系,被用来通过流式细胞术评估2B8T2M的Fc受体结合。如图10C中所示,2B8T2M和利妥昔单抗均能结合U937细胞,而该Fc突变2B8T2M-LA复合体显示比2B8T2M减少的结合。

[0285] 先前报导中显示,scTCR-IL-15N72D和scTCR-IL-15N72D:scTCR-IL-15R α Su融合复合体保留IL-15的生物学活性,但其水平比IL-15低(3、8)。这一较低的活性大概是由于所融合的scTCR域与IL-15N72D:IL-2R β γC之间相互作用的位阻。为了评估2B8T2M的IL-15生物活性,使用一种先前揭示的IL-15依赖的细胞系,即32D β (3)。结果表明,2B8T2M支持32D β 细胞扩增,但展现比天然IL-15或ALT-803显着降低的活性(2B8T2M:EC50=889pM;IL-15:EC50=34pM;而ALT-803:EC50=14pM)。这些发现合起来证明,2B8T2M保留了利妥昔单抗的IL-15生物活性以及CD20受体结合能力和Fc受体结合能力。

[0286] 2B8T2M能介导补体依赖的细胞毒性(CDC)并直接导向CD20⁺B淋巴瘤细胞的凋亡

[0287] 基于抗-CD20抗体与CD20形成不同复合体并在B细胞上介导不同的功能活性的能力,将抗-CD20抗体分为两类:I型(利妥昔单抗样)和II型(托西莫单抗样)(10)。结合至B细胞的I型抗体导致CD20进入脂质筏中的再分布和集簇,造成更强的C1q结合和强有力的CDC诱导以及仅仅低水平的直接抗体介导的细胞死亡(即,细胞凋亡活性)(10)。相比之下,II型抗体不令CD20在脂质筏中稳定,并因此展现比I型抗体降低的CDC,但这些抗体强有力地诱导溶酶体介导的细胞死亡。利妥昔单抗是一种I型抗-CD20 mAb,其展现比II型抗-CD20 mAb如托西莫单抗更高的CDC活性和更低的诱导B淋巴瘤细胞凋亡的能力(11)。2B8T2M具有与利妥昔单抗相同的结合域,且预计拥有与利妥昔单抗相似的性质。为了探究这一点,评估2B8T2M介导对抗CD20+Daudi细胞的CDC的能力。如图11A中所示,当以2B8T2M(或该IL-15突变2B8T2M-D8N复合体)孵化时,Daudi细胞在人补体因子的存在下被裂解。该Fc突变2B8T2M-LA复合体展现比2B8T2M更低的CDC活性,基于先前研究显示含有这一Fc突变域的抗体具有更低的CDC活性,这一结果在意料之中(10)。因此,2B8T2M展现CDC活性,但其水平低于利妥昔单抗。为了评估2B8T2M的促凋亡活性,使用Annexin V染色来分析在含有2B8T2M的培养基

中培养的Daudi细胞的凋亡。令人惊奇的是,发现在0.4至10nM的浓度范围内,2B8T2M有效地诱导了Daudi细胞的凋亡(图11B)。相比之下,诱导与之相当的对Daudi细胞的凋亡活性所需的利妥昔单抗浓度比该范围高>600倍(即,250nM)。使用Fc突变2B8T2M-LA复合体和IL-15突变2B8T2M-D8N复合体也观察到了这一活性(图11B),但使用c264T2M未观察到这一活性,表明该活性取决于CD20结合。这些发现合起来表明,2B8T2M展现类似I型和II型两种抗-CD20抗体的特征。

[0288] 与利妥昔单抗相比,2B8T2M显示杰出的抗体依赖的细胞毒性(ADCC)

[0289] I型和II型两类mAb似乎都证明了有效对抗B淋巴瘤细胞系的Fc依赖的ADCC(11)。但是,2B8T2M可能通过IL-15介导的免疫细胞激活而进一步扩大了这一活性,这一结论受到先前使用ALT-803进行的研究的支持(7)。因此,比较了2B8T2M和利妥昔单抗引导对抗CD20+B淋巴瘤细胞的ADCC的能力。为了评估这一点,最初使用人PBMC作为效应子细胞,并使用Daudi细胞作为靶点细胞。如图12A中所示,在诱导通过PBMC对抗Daudi细胞的ADCC方面,2B8T2M比利妥昔单抗明显更有效。使用其它不具有功能Fc的T2M复合体(2B8T2M-LA)、不具备生物活性IL-15的T2M复合体(2B8T2M-D8N)、或不具有CD20能力的T2M复合体(c264T2M),进一步表明,2B8T2M的ADCC活性的增强部分地取决于抗-CD20结合域和Fc结合域中的每一个以及IL-15N72D突变体活性(图12A)。为了探究免疫细胞子群在ADCC中扮演的角色,将CD4+T细胞、CD8+T细胞、和NK细胞分类并作为效应子细胞用于同一试验中。不出所料,结果表明,NK细胞是PBMC的ADCC活性的主要贡献者,而CD8+和CD4+T细胞扮演次要至微不足道的角色(图12B)。此外,当与利妥昔单抗比较时,2B8T2M诱导更强的通过所有细胞子群对抗Daudi细胞的ADCC。

[0290] 为了进一步评估2B8T2M在人免疫细胞的细胞毒性潜力上的效果,将供体PBMC在含有2B8T2M和颗粒酶B的培养基中培养,并通过流式细胞术评估穿孔素水平。2B8T2M以浓度依赖的方式上调NK细胞内的颗粒酶B和穿孔素表达(图12C),以及CD8+T细胞中的颗粒酶B表达(图12D)。加入200nM的2B8T2M后,CD8+T细胞中的穿孔素表达仅略微提高(图12D)。CD4+T细胞对颗粒酶B和穿孔素的上调微不足道或不存在。

[0291] 2B8T2M的药代动力学和生物分布的病毒和定量测量

[0292] 使用系列非侵入性PET扫描作为进行对64Cu标记的2B8T2M和64Cu标记的利妥昔单抗的全身分布和药代动力学的可视化和定量测量。先前进行的对给药64Cu标记的ALT-803的小鼠与给药64Cu-IL-15的小鼠的对比研究显示截然不同的药代动力学类型,表明64Cu-IL-15通过肾脏途径被快速清除,而ALT-803清除出现在肝脏中且在淋巴器官内维持至少70小时(12)。本研究中,64Cu-NOTA-2B8T2M通过肝胆和肾脏两种途径被从小鼠体内清除,且肾脏吸收低(图13A至图13C)。

[0293] 64Cu-NOTA-2B8T2M的淋巴结吸收与先前使用64Cu-NOTA-ALT-803所观察到的水平相当(12),表明这两种融合蛋白的高IL-15受体靶向效率。在注射(p.i)后6小时,64Cu-NOTA-2B8T2M的淋巴结吸收稳定地保持在4.2±0.5百分比注射剂量每克器官(%ID/g),且由于其在小鼠体内的循环半衰期(184小时)比ALT-803(18小时)相对更长,在腹膜注射后70小时甚至为5.3±1.3%ID/g(4)。比较而言,64Cu-NOTA-利妥昔单抗展现比具有不同生物学分布类型的64Cu-2B8T2M更长的血液循环期。64Cu-NOTA-利妥昔单抗的淋巴结吸收更低(在腹膜注射后6小时为3.5±0.2%ID/g;在腹膜注射后70小时为4.1±0.8%ID/g;图13B),而

血液和肌肉吸收较高,生成更高的背景信号(图13D至图13F)。这一结果暗示,ALT-803蛋白质支架提供将2B8T2M优先地送至淋巴组织的媒介物。

[0294] 由2B8T2M诱导的NK细胞和CD8+T细胞的体内增殖

[0295] 先前的研究表明,ALT-803复合体在体内的免疫细胞刺激显着强于IL-15(4)。为了与ALT-803、IL-15、和其它T2M复合体比较而评估2B8T2M的体内免疫刺激活性,分离CD3+T细胞和NK细胞并以CellTrace紫标记。将富集的经紫色标记的CD3+T细胞和NK细胞经静脉注射而过继转移至C57BL/6雌性小鼠体内,在转移后第2天,以PBS对照、2B8T2M、2B8T2M-LA、2B8T2M-D8N、ALT-803、或摩尔当量剂量的游离IL-15治疗该小鼠。在转移后第5天,通过流式细胞术评估小鼠脾脏内的紫色阳性细胞。如图14A中所示,经2B8T2M治疗的小鼠脾脏内的CD8+T细胞比例显着高于经IL-15或PBS治疗的小鼠($p<0.001$),但CD8+T细胞比例显着低于ALT-803治疗组($p<0.001$)。接受2B8T2M的小鼠脾脏内的NK细胞的百分比高于经IL-15或PBS治疗的小鼠($p<0.001$;图14B)。与经IL-15或PBS治疗的小鼠相比,经2B8T2M治疗的小鼠脾脏中的CD4+T细胞百分比相对减少(图14A)。使用该Fc突变体2B8T2M-LA对小鼠的治疗,显示脾脏中经过继转移的NK细胞和CD8+T细胞的百分比与该2B8T2M治疗组中所见相同的增长,而使用IL-15突变体2B8T2M-D8N进行的治疗则未显示类似的效果。这一结果表明,IL-15N72D域是这些免疫细胞子群改变的原因。

[0296] 进一步检查接纳者小鼠脾脏内供体CD8+T细胞和NK细胞的增殖。如图14C和图14D中所示,以2B8T2M治疗导致经过继转移的细胞的增殖比以IL-15或PBS治疗者增加,而以2B8T2M治疗后的增殖比以ALT-803治疗后低。与对脾脏免疫细胞子群的影响一致,该Fc突变体2B8T2M-LA具有与2B8T2M类似的免疫增殖活性,而以IL-15突变体2B8T2M-D8N治疗则导致体内经过继转移的淋巴细胞的增殖极低或不存在。

[0297] 在SCID小鼠体内,2B8T2M抗Daudi B淋巴瘤的功效比利妥昔单抗更佳

[0298] 为了比较2B8T2M和利妥昔单抗的总体内抗肿瘤活性,采用Daudi B淋巴瘤/SCID小鼠模型。将Daudi细胞(1×10^7)静脉注射入雌性SCID小鼠体内,并在接种后第15天,使用PE偶联的抗-人HLA-DR抗体通过流式细胞术验证骨髓中肿瘤细胞的存在(即,显示两只小鼠骨髓中的Daudi细胞分别为0.5%和2.8%)。剩余的荷Daudi小鼠随机分为3组,并在第15天和第18天分别以10mg/kg的利妥昔单抗(等量于用于非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)患者的375mg/m²临床剂量)、5mg/kg的2B8T2M、或作为媒介对照物的PBS治疗。使用后腿瘫痪作为本研究的存活终点。如图15A中所示,经PBS、利妥昔单抗、和2B8T2M治疗的小鼠的存活时间中值分别为27天、35天、和42天。尽管利妥昔单抗相对于PBS对照组显着改善了荷Daudi小鼠的存活($p=0.001$),但2B8T2M治疗相对于利妥昔单抗进一步延长了存活时间($p=0.006$)。

[0299] 在后续的剂量反应研究中,将荷Daudi小鼠随机分为6组,并在接种后第15天和第18天,分别以10mg/kg的利妥昔单抗;12.8(与10mg/kg的利妥昔单抗为摩尔当量)、5、1、或0.2mg/kg的2B8T2M;或作为媒介对照物的PBS治疗。在第22天通过流式细胞术测定骨髓中的Daudi肿瘤负荷。如图15B中所示,经利妥昔单抗治疗的小鼠骨髓中Daudi细胞的百分比显着低于PBS对照组($p=0.003$)。而且,以1、5、或12.8mg/kg的2B8T2M治疗导致骨髓中的Daudi肿瘤负荷显着低于在利妥昔单抗治疗组($p<0.01$)或PBS治疗组($p<0.001$),而在0.2mg/kg的2B8T2M治疗组中观察到与利妥昔单抗治疗组等效($p=0.24$)的骨髓Daudi细胞减少。除了Daudi细胞外,还通过流式细胞术评估骨髓和脾脏中的NK细胞百分比。如图15C和图15D中所

示,经利妥昔单抗治疗小鼠与经PBS治疗小鼠的骨髓中NK细胞百分比并无差异。但是,所有经2B8T2M治疗的小鼠骨髓和脾脏中NK细胞的比例全部显着高于经PBS治疗的小鼠($p < 0.05$)。NK细胞水平的增加可能是2B8T2M的强力抗肿瘤活性的主要贡献者。为了评估NK细胞是否为2B8T2M的抗肿瘤活性所必需,在SCID褐色小鼠体内实施类似的动物研究,而SCID浅褐色小鼠的NK细胞活性在基因层面上比SCID小鼠弱(图15E)。将荷Daudi的SCID浅褐色小鼠随机分为3个治疗组,并分别以10mg/kg的利妥昔单抗、5mg/kg的2B8T2M、或作为媒介对照物的PBS治疗。出乎意料的是,经2B8T2M和利妥昔单抗治疗的小鼠骨髓中Daudi细胞的百分比仍显着低于($p < 0.01$)对照组,表明NK细胞不是2B8T2M或利妥昔单抗的抗肿瘤活性所必需的。这进一步暗示,尽管2B8T2M诱导通过ADCC进行的抗肿瘤活性,但在NK细胞活性被削弱的小鼠体内,这一融合蛋白的体内抗肿瘤活性通过其凋亡效果和抗肿瘤细胞的CDC而得以保留。还已知,巨噬细胞和中性粒细胞展现ADCC和抗体依赖性的细胞吞噬作用(ADCP)功能(13)。噬菌体和中性粒细胞可能对这一融合蛋白在SCID小鼠体内的抗肿瘤活性有所贡献。此外,由于2B8T2M在这一模型中的效力比在Daudi SCID小鼠模型中低,NK细胞很可能确实在放大2B8T2M的抗肿瘤活性中扮演了角色。

[0300] 2B8T2M的多个域在SCID小鼠体内抗Daudi B淋巴瘤的抗肿瘤活性

[0301] 为了仔细分析2B8T2M中不同结构域的功能,在Daudi B淋巴瘤/SCID小鼠模型中进行Fc突变体2B8T2M-LA与IL-15突变体2B8T2M-D8N的比较。如图16A中所示,与PBS治疗组相比,所有以5mg/kg给药的测试剂均显着降低了骨髓中的Daudi肿瘤负荷。此外,Fc突变体2B8T2M-LA和IL-15突变体2B8T2M-D8N在降低骨髓中Daudi肿瘤负荷中的效率低于2B8T2M($p < 0.05$)。而且,该c264T2M在独立实验中用作非靶向对照复合体,且发现其在降低骨髓中Daudi细胞百分比中的效率低于2B8T2M(图16B)。这些发现合起来表明,IL-15介导的免疫激活、Fc域活性、和CD20的2B8特异性靶向对于2B8T2M对抗Daudi B淋巴瘤的体内抗肿瘤活性有效的重要贡献者。

[0302] 在猕猴体内通过2B8T2M耗尽B细胞

[0303] 在Daudi B淋巴瘤/SCID小鼠模型中进行2B8T2M的效力研究之后,进一步探究2B8T2M在猕猴体内耗尽B细胞的能力。在第0天和第3天对动物($n=4$ /组)静脉注射5mg/kg的2B8T2M、10mg/kg的利妥昔单抗、或作为媒介对照物的PBS,在第7天实施安乐死。收集脾脏和肠系膜淋巴结,并通过流式细胞术评估B细胞和其它淋巴细胞子群的水平。还使用在给药前和第1天(第一次给药后24小时)、第3天(第二次给药前)、第4天(第二次给药后24小时)、第5天和第7天取得的样品,测定外周血中B细胞百分比的改变。如图17A至图17B中所示,在第一次给药后一天,经2B8T2M治疗的和经利妥昔单抗治疗的两组中,外周血中的B细胞均被有效耗尽。第二次给药后,经2B8T2M治疗的动物外周血中的B细胞水平较之于经利妥昔单抗治疗的动物进一步降低,但这一效果并非总是统计学显着的(第4天, $p=0.004$;第5天, $p=0.051$;以及第7天, $p=0.067$)。有趣的是,经2B8T2M治疗的猕猴淋巴结中B细胞的百分比显着低于PBS治疗组。但是,利妥昔单抗治疗组与PBS治疗组之间没有显着差异。以2B8T2M治疗导致淋巴结NK细胞的百分比显着增加(2.4倍于对照),而血液CD8+和CD4+T细胞的百分比下降(分别为0.8倍和0.5倍于对照),且脾脏CD4+T细胞的百分比也下降(0.4倍于对照),推测是由于该IL-15N72D域对于免疫细胞增殖和移动(trafficking)的免疫刺激效果。相比之下,利妥昔单抗治疗导致脾脏CD8+和CD4+T细胞百分比增加1.4中1.8倍($p < 0.05$),很可能是

由于对B细胞丧失的补偿效果。在2B8T2M治疗组或利妥昔单抗治疗组中均未观察到显着的不良反应。

[0304] 目前,识别肿瘤细胞上的特异性抗原的单克隆抗体(mAb)已被用作癌症疗法。以在>90%的非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)上表达的CD20抗原为靶向的利妥昔单抗,已经成功地对患者应用了超过十年。抗-CD20 mAb的作用机制牵涉细胞凋亡诱导、ADCC、CDC、和靶点细胞的吞噬作用(14)。mAb的抗肿瘤活性主要通过ADCC作用,该活性可通过与增强对效应子细胞的激活的辅助治疗而得以进一步改善。IL-15是CD8+T细胞和NK细胞的强力刺激剂和激活剂,是一种新兴的癌症免疫治疗剂,它可与mAb合用以增强NK细胞介导的ADCC(15)。创建IL-15超兴奋剂ALT-803,即IL-15N72D突变体与二聚体IL-15R α SuFc融合蛋白的复合体。ALT-803展现杰出的体内外活性。与天然IL-15相比,该N72D突变将IL-15的体外生物活性增加~5倍,而该IL-15N72D:IL-15R α SuFc复合体进一步将IL-15的体外活性增加~25倍(3、4)。另外,与天然IL-15相比,ALT-803具有更高的与呈现在免疫细胞表面上的IL-2R β γC复合体的结合活性、实质上更长的血清半衰期、以及更佳的在淋巴组织中的生物分布和滞留(3、4、12)。ALT-803展现强有力的免疫刺激性和抗肿瘤性质,因此是作为单剂或与其它治疗剂合用而在动物模型内对抗多种肿瘤的有效试剂(5、6)。例如,ALT-803刺激在体外显着增加了通过人NK细胞对抗B细胞淋巴瘤细胞系或初代滤泡性淋巴瘤细胞的利妥昔单抗介导的ADCC。此外,在两种不同的B细胞淋巴瘤小时模型中,将ALT-803加入抗-CD20 mAb疗法中提供了显着降低的肿瘤细胞孵化并增加了存活率(7)。作为结果,目前,ALT-803在多种临床试验中被用于对抗实体和血液系统恶性肿瘤(血液系统恶性肿瘤在同种异体干细胞移植后的复发、难治性多发性骨髓瘤、和无痛性非霍奇金氏淋巴瘤;分别为NCT01885897、NCT02099539、和NCT02384954)。在本文中揭示的研究中进一步表明,可将ALT-803修饰为通用蛋白质支架而用于创建新颖的多价抗原特异性免疫治疗复合体。靶向免疫治疗剂指的是所构建的2B8T2M。这一融合蛋白由利妥昔单抗的识别域和IL-15N72D:IL-15R α SuFc组成,且能介导对抗B淋巴瘤的ADCC和CDC,同时展现促凋亡活性和体内免疫细胞刺激作用。因此,作为单一分子,该2B8T2M复合体除了保留ALT-803的免疫刺激性之外,还保留了利妥昔单抗的抗-CD20性质。当与利妥昔单抗比较时,2B8T2M表明改善的抗肿瘤活性,并导致荷Daudi B淋巴瘤的SCID小鼠存活期延长。再者,经2B8T2M治疗的小鼠体内的NK细胞比例增加,表明NK细胞在提升2B8T2M的体内抗肿瘤活性中扮演关键角色。为了进一步评估NK细胞是否为2B8T2M的抗肿瘤活性所必需,在缺乏NK细胞的SCID浅褐色小鼠体内实施类似的动物研究。出乎意料地,经2B8T2M治疗的小鼠骨髓内的Daudi细胞百分比仍显着低于媒介对照组。这表明该融合蛋白的体内抗肿瘤活性可通过其凋亡效果和CDC而在NK细胞活性被削弱的小鼠体内得以保留。还已知巨噬细胞和中性粒细胞也展现ADCC功能(13)。在SCID浅褐色小鼠体内,可能是巨噬细胞和中性粒细胞代替了这一融合蛋白的NK细胞ADCC功能。与自SCID小鼠研究获得的结果不同,在SCID浅褐色小鼠体内,2B8T2M与利妥昔单抗的抗肿瘤活性之间没有显着差异。因此,NK增强了2B8T2M的体内抗肿瘤活性。这很可能是2B8T2M的IL-15组分增大NK细胞比例及/或上调NK细胞ADCC功能的结果。

[0305] 抗-CD20 mAb已经有效地用于NHL的治疗中。I型和II型抗-CD20抗体各自能够聚集表达FcR的细胞,以介导定向对抗CD20+细胞的ADCC和吞噬作用(16)。重要地,基于I型和II型两类抗体对抗多种CD20+B淋巴瘤或B细胞介导的自体免疫疾病,它们已经被批准用于临

床(17、18)。如该研究中所示,2B8T2M保留了与利妥昔单抗类似的对抗CD20+靶点细胞的CDC,同时展现增强的细胞凋亡活性。这些发现表明,2B8T2M除了具备强劲提升的通过基于IL-15的免疫刺激活性而用于强力NK细胞效应子应答的ADCC之外,还具备I型和II型两类抗-CD20抗体的功能优势。2B8T2M的促凋亡活性取决于该CD20-结合域而非取决于FcR结合活性或IL-15活性。先前研究已经显示,化学交联的利妥昔单抗同源二聚体和重组四价利妥昔单抗scFv-Ig融合具有比单体利妥昔单抗杰出的对抗B淋巴瘤细胞的诱导凋亡的活性(19、20)。这些结果表明,2B8T2M的促凋亡活性比利妥昔单抗增强,也可能是由于其多价结合至CD20+细胞的能力。

[0306] ALT-803诱导CD8+T记忆细胞,以令其增殖、上调NKG2D、分泌IFN- γ 并获取在抗原刺激的缺席下杀死恶性细胞的能力(5、21)。本文中呈现的结果表明,该CD20特异性复合体2B8T2M保留了ALT-803的独特能力。例如,过继转移实验显示,2B8T2M促进了CD8+T记忆细胞和NK细胞的扩张。因此,2B8T2M的抗-CD20 scFv域并不改变该ALT-803组分对于CD8+T记忆细胞的生物学效果,但该scFv域将相关IL-15活性比ALT-803降低大约60倍。由于使用其它IL-15融合体也观察到了类似的效果,2B8T2M的IL-15活性的下降可能是由于抗-CD20单链Ab影响IL-15N72D结合域结合至IL-2R $\beta\gamma$ C的位阻效应(3、8)。这些融合分子的较低的IL-15活性,通常可增强这一类型分子的临床实用性。已经证明,抗体的ADCC有效性的决定因素之一是浓度,浓度影响抗体在靶点细胞上的限制密度(22)。这些融合分子的较低的IL-15活性,可能潜在地令该分子可以较高剂量水平给药,以实现有效的ADCC而不诱导不需要的免疫相关的系统性毒性。这一研究中显示的2B8T2M在鼠科动物和非人灵长动物两类模型中的ADCC依赖的功效和耐受良好的安全性,证明了这一点且支持这些分子的临床实用性。

[0307] 在使用天然IL-15进行的比较性生物分布研究中,ALT-803被分布至并更好地保留在小鼠的淋巴器官中(12)。同样,2B8T2M生物分布数据表明其被淋巴组织吸收并在该组织内滞留至少70小时。在非人灵长动物体内进行的CD40+B细胞耗尽研究中发现,较低剂量水平的2B8T2M比利妥昔单抗更有效,尤其是在淋巴结内。2B8T2M治疗也诱导淋巴结NK细胞的百分比增加,令其显着高于对照组。可能是2B8T2M被保留在淋巴组织内,通过其IL-15组分将T细胞和NK细胞潜在地刺激较长时间,而利妥昔单抗缺乏这一活性。可能由于穿孔素和颗粒酶B的诱导造成的NK细胞的这一刺激作用(23),可具有显着增强的对抗B细胞的ADCC。因此,这些融合分子可能在对抗B细胞淋巴瘤中尤其有效。

[0308] 也已经证明,治疗性抗体的ADCC经由“疫苗作用”而诱导适宜的对抗呈现在癌细胞上的靶点抗原的免疫应答(14、24至26)。这一效果是Fc依赖的,并通过肿瘤注射及之后激发而相宿主提供持续的记忆应答(27)。IL-15,2B8T2M的一种组分,是效应子和CD8+T记忆细胞发育的关键细胞因子。因此,可以想象,通过激活CD8+T细胞的免疫应答,2B8T2M分子的IL-15组分使得比单独使用治疗性抗体更强的对抗靶点抗原的“疫苗响应”成为可能。另外,应注意,ALT-803支架增强了利妥昔单抗结合域的淋巴组织滞留。因此,该ALT-803支架可表示媒介物,以将该融合组分地送至淋巴器官而用于免疫系统激活。

[0309] 这些研究显示,基于IL-15N72D:IL-15R α SuFc的支架分子可潜在地融合至源自抗体、粘附分子、或其它受体的多个靶点识别域。所得复合体具有适宜的靶点域,因此可促进与多种免疫效应子细胞的偶联并介导靶点细胞的摧毁,该靶点细胞包括呈现特异性靶点的癌细胞或被病毒感染的细胞。该复合体的IL-15域可提供免疫刺激活性,以支持效应子细胞

增殖和细胞毒性。这一单一融合蛋白途径亦可排除对于采用组合免疫疗法的复杂治疗的需求。因此,该IL-15N72D:IL-15R α SuFc支架复合体可提供极为难得的使用IL-15作为对抗癌症和传染病的靶向免疫治疗药物的巨大潜力的机会。

[0310] 下述实验过程用于这一实施例。

[0311] 小鼠和细胞系

[0312] 将FOX Chase SCID小鼠 (C.B-17/IcrHsd-Prkdc-scid)、SCID浅褐色小鼠 (C.B-17/IcrHsd-PrkdcscidLystbg-J) 和C57BL/6NHsd小鼠 (6至8周龄雌性,哈伦实验室 (Harlan Laboratories)) 圈养在奥尔托生物科技公司 (Altor BioScience) 的动物设施内。所有动物研究均根据美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health (NIH)) 动物保护指导准则在实验动物护理和使用委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)) 批准下实施。

[0313] 人Daudi B淋巴瘤细胞系购自美国模式培养物保藏所 (American Type Culture Collection (ATCC)) ,并在完全的洛维斯帕克纪念研究所 (Roswell Park Memorial Institute (RPMI)) -1640培养基中在37°C、5%CO₂气氛中进行常规培养。在这些研究中使用之前,Daudi细胞已经在2014年和2015年通过流式细胞术确认细胞生长形态 (淋巴母细胞) 、生长特征、人CD20的均匀表达的表型、以及功能性地作为ADCC的抗-CD20 mAb调理靶点而得以验证。将IL-15依赖的32D β 细胞 (3) 在以1至2ng/ml IL-15补充的完全的伊斯科夫改进的杜尔贝科培养基 (Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM)) (由美国国立癌症研究所 (National Cancer Institute-Frederick, MD) 的J.Yovandich博士慷慨地提供) 中培养。

[0314] sc2B8融合构造的生成

[0315] 为了生成可溶性单链二域抗-CD20 mAb构造 (sc2B8) ,从2B8杂交瘤 (ATCC) 克隆2B8 mAb轻链和重链的V基因段。将该VL基因段经由链接基 (Gly4Ser) 3融合至该VH基因段的5' 端。如先前所述,将该sc2B8基因融合至包括 (1) IL-15超兴奋剂 (IL-15N72D) 和 (2) IL-15拮抗剂 (IL-15D8N) 的IL-15突变蛋白质的5' 端以及融合构造 (IL-15R α SuFc) 的5' 端 (3) 。为了生成FcR结合不足的突变蛋白质,将该sc2B8融合至IL-15R α SuFc-LA,在该IL-15R α SuFc-LA中,hIgG1重链氨基酸234和235从亮氨酸突变为丙氨酸 (10) 。还如先前所揭示,构建可溶性单链三域T细胞受体 (TCR) ——c264scTCR (嵌合的人p53 (264至272) 特异性的单链TCR) (3、8) 。与该sc2B8融合类似,将该c264scTCR融合至IL-15N72D或IL-15R α SuFc,以作成c264scTCR-IL-15N72D构造和c264scTCR-IL-15R α SuFc构造。所得的sc2B8-IL-15N72D:sc2B8-IL-15R α SuFc (2B8T2M) 、sc2B8-IL-15D8N:sc2B8-IL-15R α SuFc (2B8T2M-D8N) 、sc2B8-IL-15N72D:sc2B8-IL-15R α SuFc-LA (2B8T2M-LA) 、和c264scTCR-IL-15N72D:c264scTCR-IL-15R α SuFc (c264T2M) 基因被表达在pMSGV逆转录病毒载体中 (28) 。

[0316] 融合蛋白生产和纯化

[0317] 将含有多种构造的表达载体转染入来自ATCC的CHO细胞内,之后在含有适宜抗生素的培养基内进行选择。对于该融合蛋白的生产,令该重组CHO细胞在不含血清的确定成分培养基 (SFM4CHO, Hyclone, Logan, UT) 中在37°C生长。当培养物的活细胞密度达到最大时,将孵化温度下调至30°C,保持10至14天以蓄积该可溶性复合体。通过免疫亲和性蛋白A色谱从该重组CHO细胞培养物上清液中纯化该融合蛋白。在装载样品之前,以5倍柱体积 (CV) 的pH 8.0的20mM Tris-HCl洗涤该柱,使用5CV的0.1N NaOH消毒1小时,随后使用7CV的pH 8.0

的20mM Tris-HCl平衡。将该上清液以2mL/min装载于该柱上,随后先以8CV的pH8.0的20mM Tris-HCl洗涤该柱,再以7CV的洗涤缓冲液(0.1M柠檬酸钠,pH 5.0)洗涤,以移除非特异性结合的蛋白质。随后以pH 4.0的0.2M柠檬酸钠溶液洗脱蛋白质,并使用pH 8.0的2M Tris-HCl立即中和所收集的峰值馏分的pH。浓缩该制剂,并使用Amicon Ultra-15离心浓缩机(截留分子量为30kDa, Millipore, Billerica, MA)将缓冲液交换为磷酸盐缓冲盐水(PBS)。通过体积排阻色谱移除所纯化的融合蛋白中的聚集体。通过还原性SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)(12% Bis Tris凝胶)并在之后进行SimplyBlue™安全染色剂(Invitrogen)染色,分析所纯化的融合蛋白。通过体积排阻色谱表征2B8T2M分子的同质性。该融合蛋白在4°C在至少12个月内稳定(数据未显示)。

[0318] 流式细胞术分析

[0319] 为了验证2B8T2M的CD20结合性质,使用FITC标记的2B8T2M或利妥昔单抗进行外周血单核细胞(PBMC)的染色,并通过使用未标记的2B8T2M或利妥昔单抗阻断而证明结合特异性。为了验证2B8T2M的Fc受体结合,使用FITC标记的2B8T2M、利妥昔单抗或2B8T2M-LA进行人组织细胞淋巴瘤U937细胞系(ATCC)的染色。在FACSVerse上使用FACSuite软件(BD Biosciences)分析被染色的PBMC和U937细胞。

[0320] 细胞增殖试验

[0321] 如先前所述测量32D β 细胞的增殖(3,8)。简而言之,使用融合蛋白在37°C将32D β 细胞(1×10^4 细胞/孔)孵化48小时。在最后4小时孵化过程中,加入细胞增殖试剂WST-1(Roche Applied Science)。通过在450nm的吸光度测量来测定WST-1至有色的甲瓒染料的转化。基于剂量响应曲线使用Prism4软件(GraphPad Software)测定EC50。

[0322] 体外细胞毒性试验

[0323] 在2B8T2M、其突变蛋白质、或利妥昔单抗的存在下,将CDC试验-Daudi细胞在37°C在RPMI-10中孵化2小时。使用正常人血清(创新研究)进行补体反应。通过碘化丙啶(Sigma)染色并在BD FACSVerse上分析来测定Daudi细胞的生存能力。

[0324] ADCC试验

[0325] 根据制造商的使用说明书,以CellTrace紫(Invitrogen)标记Daudi细胞,将其用作靶点细胞。从血沉棕黄层(OneBlood)分离出新鲜的人PBMC或MACS纯化的NK细胞,用作效应子细胞。将该效应子细胞与Daudi细胞以所标注的效应子:靶点比在2B8T2M、其突变蛋白质、或利妥昔单抗的存在下混合。在37°C以及5% CO₂气氛下孵化2至3天后,通过碘化丙啶(Sigma)染色并在BD FACSVerse上分析,评估Daudi细胞的存活率。

[0326] 凋亡试验

[0327] 在2B8T2M、其突变蛋白质、或利妥昔单抗的存在下,将Daudi细胞在37°C孵化3天。在第3天,以FITC-偶联的膜联蛋白V(BioLegend)染色Daudi细胞,并使用BD FACSVerse分析凋亡Daudi细胞的百分比。

[0328] 正电子成像术(PET)成像和组织生物分布研究

[0329] 对C57BL/6小鼠静脉注射10至15MBq的⁶⁴Cu标记的2B8T2M和⁶⁴Cu-NOTA-利妥昔单抗。在注射后的多个时间点,使用Inveon microPET/microCT啮齿动物模型扫描器(Siemens)对经安乐死的动物实施静态PET扫描。如先前所述(29,30),实施主要器官的数据撷取、图像重建、和感兴趣区域的分析,以计算每克组织中所注射剂量的百分比(% ID/g)。

使用 γ 射线计数器(Perkin Elmer)测量每一组织的放射活性,并表示为% ID/g。

[0330] 肿瘤模型

[0331] 以 1×10^7 Daudi细胞/小鼠静脉注射后,严密监控荷载肿瘤的FOX Chase SCID小鼠或SCID-浅褐色小鼠的后腿瘫痪,将其作为存活期终点。使用PE-偶联的抗-人HLA-DR抗体(BioLegend)通过流式细胞术(FACSVerse)测定骨髓中Daudi细胞的百分比。

[0332] T细胞标记和过继转移

[0333] 根据制造商的使用说明书,以CellTrace紫(Invitrogen)标记来自C57BL/6NHsd小鼠供体脾脏和淋巴结的富CD3⁺细胞(CD3富集柱,R&D系统)。在研究的第0天(SD0),将 1×10^7 紫色标记的细胞过继转移至同基因的C57BL/6NHsd小鼠体内。在SD2,通过静脉注射测试品治疗小鼠。在SD5,获取脾脏,并通过流式细胞术分析供体淋巴细胞的增殖(经紫色标记)和淋巴细胞亚群的组成。

[0334] 食蟹猕猴研究

[0335] 雄性食蟹猕猴(2.20至2.85kg,2至3岁)由云南实验灵长类动物有限公司(Yunnan Laboratory Primate, Inc.,中国昆明)提供。根据云南实验灵长类动物有限公司的IACUC批准的研究计划进行本研究。在研究的第0天和第3天,静脉注射给药5mg/kg的2B8T2M、10mg/kg的利妥昔单抗、以及作为治疗对照的PBS。在第7天,对猕猴实施安乐死,获取脾脏和肠系膜淋巴结,处理以用于免疫细胞分析。在给药之前和第1(给药后24)、3(第2次给药前),4(给药后24小时)、5、和7天取得血样。

[0336] 数据分析

[0337] 使用Kaplan-Meier方法分析存活数据。使用学生t测试或ANOVA(双尾)(GraphPad Prism4)进行连续变量的比较。将P值 ≤ 0.05 者视为显着。

[0338] 这一实施例中引用下述参考文献。

[0339] 参考文献

[0340] 1.Fehniger,T.A.,and Caligiuri,M.A.(2001) Interleukin 15:biology and relevance to human disease.Blood 97,14-32

[0341] 2.Waldmann,T.A.(2006) The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design.Nat Rev Immunol 6,595-601

[0342] 3.Zhu,X.,Marcus,W.D.,Xu,W.,Lee,H.I.,Han,K.,Egan,J.O.,Yovandich,J.L.,Rhode,P.R.,and Wong,H.C.(2009) Novel human interleukin-15agonists.J Immunol 183,3598-3607

[0343] 4.Han,K.P.,Zhu,X.,Liu,B.,Jeng,E.,Kong,L.,Yovandich,J.L.,Vyas,V.V.,Marcus,W.D.,Chavaillaz,P.A.,Romero,C.A.,Rhode,P.R.,and Wong,H.C.(2011) IL-15: IL-15 receptor alpha superagonist complex:high-level co-expression in recombinant mammalian cells,purification and characterization.Cytokine 56,804-810

[0344] 5.Xu,W.,Jones,M.,Liu,B.,Zhu,X.,Johnson,C.B.,Edwards,A.C.,Kong,L.,Jeng,E.K.,Han,K.,Marcus,W.D.,Rubinstein,M.P.,Rhode,P.R.,and Wong,H.C.(2013) Efficacy and mechanism-of-action of a novel superagonist interleukin-15: interleukin-15 receptor alphaSu/Fc fusion complex in syngeneic murine models

of multiple myeloma. *Cancer Res* 73, 3075-3086

[0345] 6.Mathios,D.,Park,C.K.,Marcus,W.D.,Alter,S.,Rhode,P.R.,Jeng,E.K.,Wong,H.C.,Pardoll,D.M.,and Lim,M. (2016) Therapeutic administration of IL-15 superagonist complex ALT-803 leads to long-term survival and durable antitumor immune response in a murine glioblastoma model. *Int J Cancer* 138, 187-194

[0346] 7.Rosario,M.,Liu,B.,Kong,L.,Collins,L.I.,Schneider,S.E.,Chen,X.,Han,K.,Jeng,E.K.,Rhode,P.R.,Leong,J.W.,Schappe,T.,Jewell,B.A.,Keppel,C.R.,Shah,K.,Hess,B.,Romee,R.,Piwnica-Worms,D.R.,Cashen,A.F.,Bartlett,N.L.,Wong,H.C.,and Fehniger,T.A. (2016) The IL-15-Based ALT-803 Complex Enhances Fc_{gamma}RIIIa-Triggered NK Cell Responses and In Vivo Clearance of B Cell Lymphomas. *Clinical cancer research:an official journal of the American Association for Cancer Research* 22, 596-608

[0347] 8.Wong,R.L.,Liu,B.,Zhu,X.,You,L.,Kong,L.,Han,K.P.,Lee,H.I.,Chavaillaz,P.A.,Jin,M.,Wang,Y.,Rhode,P.R.,and Wong,H.C. (2011) Interleukin-15: Interleukin-15 receptor alpha scaffold for creation of multivalent targeted immune molecules. *Protein Eng Des Sel* 24, 373-383

[0348] 9.Nishida,M.,Usuda,S.,Okabe,M.,Miyakoda,H.,Komatsu,M.,Hanaoka,H.,Teshigawara,K.,and Niwa,O. (2007) Characterization of novel murine anti-CD20 monoclonal antibodies and their comparison to 2B8 and c2B8(rituximab). *Int J Oncol* 31, 29-40

[0349] 10.Hessell,A.J.,Hangartner,L.,Hunter,M.,Havenith,C.E.,Beurskens,F.J.,Bakker,J.M.,Lanigan,C.M.,Landucci,G.,Forthal,D.N.,Parren,P.W.,Marx,P.A.,and Burton,D.R. (2007) Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV. *Nature* 449, 101-104

[0350] 11.Beers,S.A.,Chan,C.H.,French,R.R.,Cragg,M.S.,and Glennie,M.J. (2010) CD20 as a target for therapeutic type I and II monoclonal antibodies. *Semin Hematol* 47, 107-114

[0351] 12.Rhode,P.R.,Egan,J.O.,Xu,W.,Hong,H.,Webb,G.M.,Chen,X.,Liu,B.,Zhu,X.,Wen,J.,You,L.,Kong,L.,Edwards,A.C.,Han,K.,Shi,S.,Alter,S.,Sacha,J.B.,Jeng,E.K.,Cai,W.,and Wong,H.C. (2016) Comparison of the Superagonist Complex,ALT-803,to IL15 as CancerImmunotherapeutics in Animal Models. *Cancer immunology research* 4, 49-60

[0352] 13.Sips,M.,Krykbaeva,M.,Diefenbach,T.J.,Ghebremichael,M.,Bowman,B.A.,Dugast,A.S.,Boesch,A.W.,Streeck,H.,Kwon,D.S.,Ackerman,M.E.,Suscovich,T.J.,Brouckaert,P.,Schacker,T.W.,and Alter,G. (2016) Fc receptor-mediated phagocytosis in tissues as a potent mechanism for preventive and therapeutic HIV vaccine strategies. *Mucosal immunology*

[0353] 14.Abes,R.,Gelize,E.,Fridman,W.H.,and Teillaud,J.L. (2010) Long-lasting

antitumor protection by anti-CD20 antibody through cellular immune response. *Blood* 116, 926-934

[0354] 15. Wang, W., Erbe, A.K., Hank, J.A., Morris, Z.S., and Sondel, P.M. (2015) NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in immunology* 6, 368

[0355] 16. van Meerten, T., and Hagenbeek, A. (2010) CD20-targeted therapy: the next generation of antibodies. *Semin Hematol* 47, 199-210

[0356] 17. Goede, V., Fischer, K., Busch, R., Engelke, A., Eichhorst, B., Wendtner, C.M., Chagorova, T., de la Serna, J., Dilhuydy, M.S., Illmer, T., Opat, S., Owen, C.J., Samoylova, O., Kreuzer, K.A., Stilgenbauer, S., Dohner, H., Langerak, A.W., Ritgen, M., Kneba, M., Asikanius, E., Humphrey, K., Wenger, M., and Hallek, M. (2014) Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *The New England journal of medicine* 370, 1101-1110

[0357] 18. Hillmen, P., Robak, T., Janssens, A., Babu, K.G., Kloczko, J., Grosicki, S., Doubek, M., Panagiotidis, P., Kimby, E., Schuh, A., Pettitt, A.R., Boyd, T., Montillo, M., Gupta, I.V., Wright, O., Dixon, I., Carey, J.L., Chang, C.N., Lisby, S., McKeown, A., and Offner, F. (2015) Chlorambucil plus ofatumumab versus chlorambucil alone in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia (COMPLEMENT 1): a randomised, multicentre, open-label phase 3 trial. *Lancet (London, England)* 385, 1873-1883

[0358] 19. Ghetie, M.A., Bright, H., and Vitetta, E.S. (2001) Homodimers but not monomers of Rituxan (chimeric anti-CD20) induce apoptosis in human B-lymphoma cells and synergize with a chemotherapeutic agent and an immunotoxin. *Blood* 97, 1392-1398

[0359] 20. Li, B., Shi, S., Qian, W., Zhao, L., Zhang, D., Hou, S., Zheng, L., Dai, J., Zhao, J., Wang, H., and Guo, Y. (2008) Development of novel tetravalent anti-CD20 antibodies with potent antitumor activity. *Cancer Res* 68, 2400-2408

[0360] 21. Wong, H.C., Jeng, E.K., and Rhode, P.R. (2013) The IL-15-based superagonist ALT-803 promotes the antigen-independent conversion of memory CD8 T cells into innate-like effector cells with antitumor activity. *Oncoimmunology* 2, e26442

[0361] 22. Smalls-Mantey, A., Doria-Rose, N., Klein, R., Patamawenu, A., Migueles, S.A., Ko, S.Y., Hallahan, C.W., Wong, H., Liu, B., You, L., Scheid, J., Kappes, J.C., Ochsenbauer, C., Nabel, G.J., Mascola, J.R., and Connors, M. (2012) Antibody-dependent cellular cytotoxicity against primary HIV-infected CD4+T cells is directly associated with the magnitude of surface IgG binding. *Journal of virology* 86, 8672-8680

[0362] 23. Seay, K., Church, C., Zheng, J.H., Deneroff, K., Ochsenbauer, C., Kappes, J.C., Liu, B., Jeng, E.K., Wong, H.C., and Goldstein, H. (2015) In Vivo Activation of

Human NK Cells by Treatment with an Interleukin-15 Superagonist Potently Inhibits Acute In Vivo HIV-1 Infection in Humanized Mice. *Journal of virology* 89, 6264-6274

[0363] 24. Zhu, E.F., Gai, S.A., Opel, C.F., Kwan, B.H., Surana, R., Mihm, M.C., Kauke, M.J., Moynihan, K.D., Angelini, A., Williams, R.T., Stephan, M.T., Kim, J.S., Yaffe, M.B., Irvine, D.J., Weiner, L.M., Dranoff, G., and Wittrup, K.D. (2015) Synergistic innate and adaptive immuneresponse to combination immunotherapy with anti-tumor antigen antibodies and extended serum half-life IL-2. *Cancer cell* 27, 489-501

[0364] 25. Park, S., Jiang, Z., Mortenson, E.D., Deng, L., Radkevich-Brown, O., Yang, X., Sattar, H., Wang, Y., Brown, N.K., Greene, M., Liu, Y., Tang, J., Wang, S., and Fu, Y.X. (2010) The therapeutic effect of anti-HER2/neu antibody depends on both innate and adaptive immunity. *Cancer cell* 18, 160-170

[0365] 26. Hilchey, S.P., Hyrien, O., Mosmann, T.R., Livingstone, A.M., Friedberg, J.W., Young, F., Fisher, R.I., Kelleher, R.J., Jr., Bankert, R.B., and Bernstein, S.H. (2009) Rituximab immunotherapy results in the induction of a lymphoma idiotype-specific T-cell response in patients with follicular lymphoma: support for a "vaccinal effect" of rituximab. *Blood* 113, 3809-3812

[0366] 27. DiLillo, D.J., and Ravetch, J.V. (2015) Differential Fc-Receptor Engagement Drives an Anti-tumor Vaccinal Effect. *Cell* 161, 1035-1045

[0367] 28. Hughes, M.S., Yu, Y.Y., Dudley, M.E., Zheng, Z., Robbins, P.F., Li, Y., Wunderlich, J., Hawley, R.G., Moayeri, M., Rosenberg, S.A., and Morgan, R.A. (2005) Transfer of a TCR gene derived from a patient with a marked antitumor response conveys highly active T-cell effector functions. *Human gene therapy* 16, 457-472

[0368] 29. Shi, S., Orbay, H., Yang, Y., Graves, S.A., Nayak, T.R., Hong, H., Hernandez, R., Luo, H., Goel, S., Theuer, C.P., Nickles, R.J., and Cai, W. (2015) PET Imaging of Abdominal Aortic Aneurysm with 64Cu-Labeled Anti-CD105 Antibody Fab Fragment. *Journal of nuclear medicine:official publication, Society of Nuclear Medicine* 56, 927-932

[0369] 30. Shi, S., Hong, H., Orbay, H., Graves, S.A., Yang, Y., Ohman, J.D., Liu, B., Nickles, R.J., Wong, H.C., and Cai, W. (2015) ImmunoPET of tissue factor expression in triple-negative breast cancer with aradiolabeled antibody Fab fragment. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 42, 1295-1303

[0370] 其他具体例

[0371] 本发明尽管已经联合其详细说明书予以揭示,但前述说明书仅用于例示性说明而不限制本发明的范畴,本发明的范畴由所附权利要求书界定。其它方面、优势和修饰处于权利要求书的范畴内。

[0372] 本文中引用的转录和科技文献建立了该领域技术人员所能获得的知识。本文中引用的所有美国专利和已公开或未公开的美国专利申请案通过引用并入本文。本文中引用的所有外国转录和专利申请案通过引用并入本文。本文中引用的通过保藏号表述的Genbank和NCBI文本通过引用并入本文。本文中引用的所有其它已出版的参考文献、文档、手稿和科技文献通过引用并入本文。

[0373] 尽管已经参考优选具体例具体显示并揭示本发明,但应理解,该领域技术人员可作出形式和细节上的各种改变而不悖离由所附权利要求书涵盖的本发明范畴。

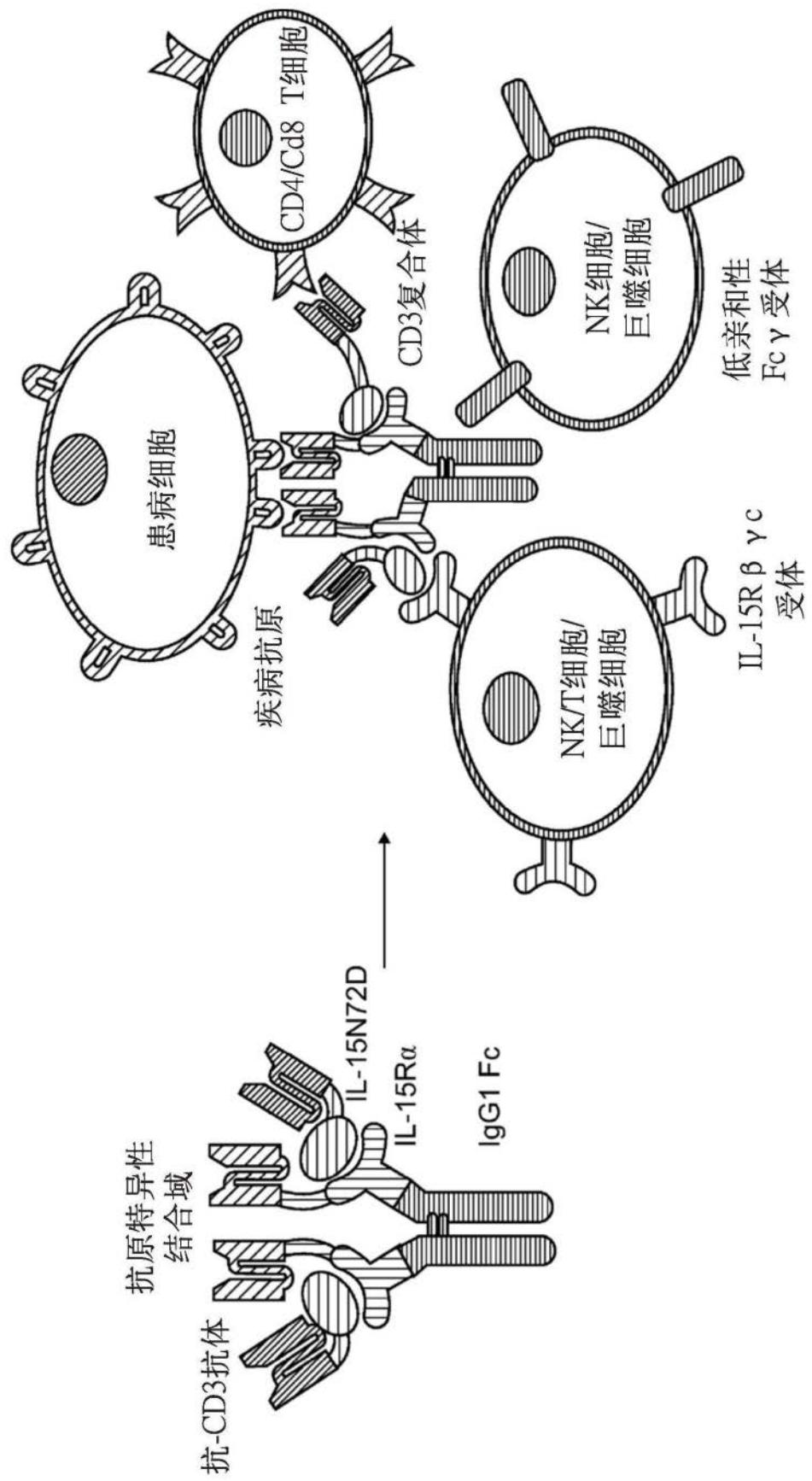
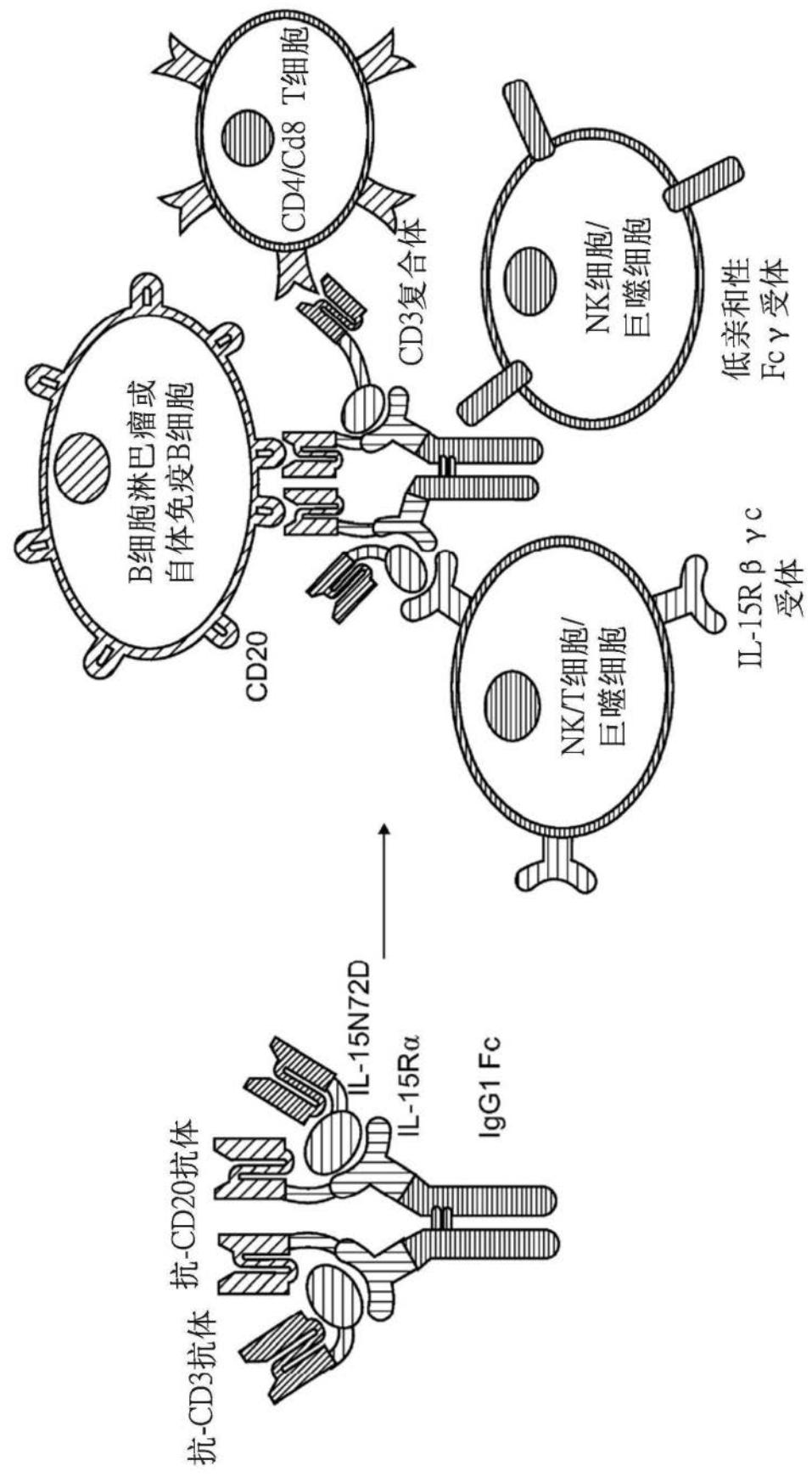


图1



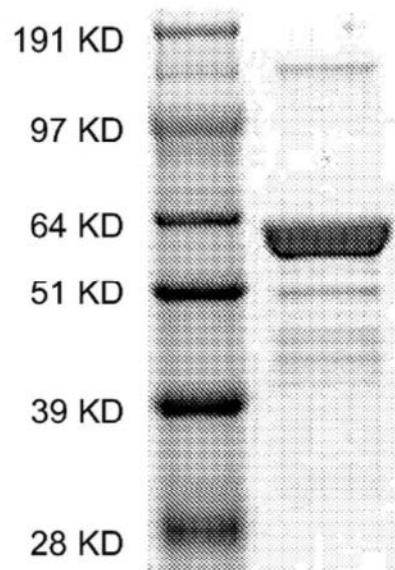


图3

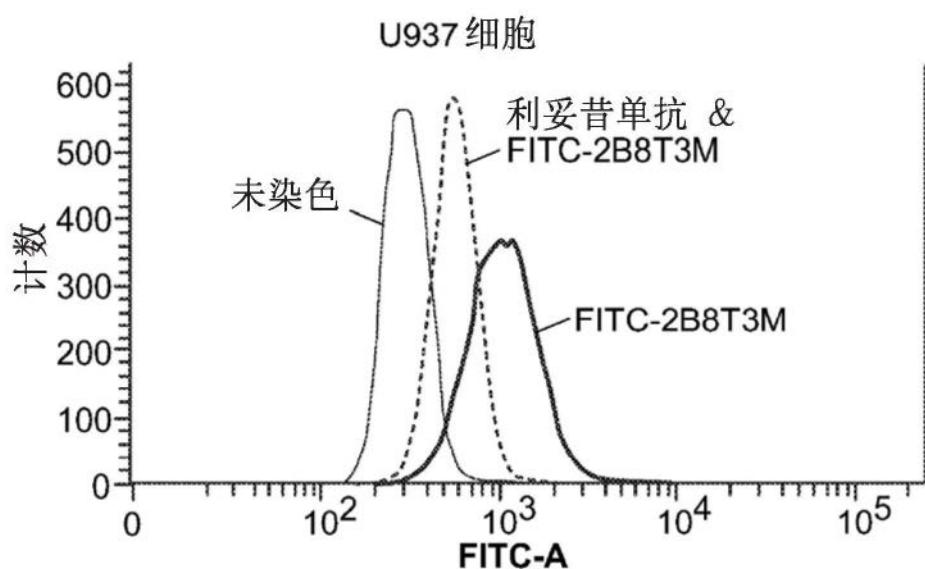


图4A

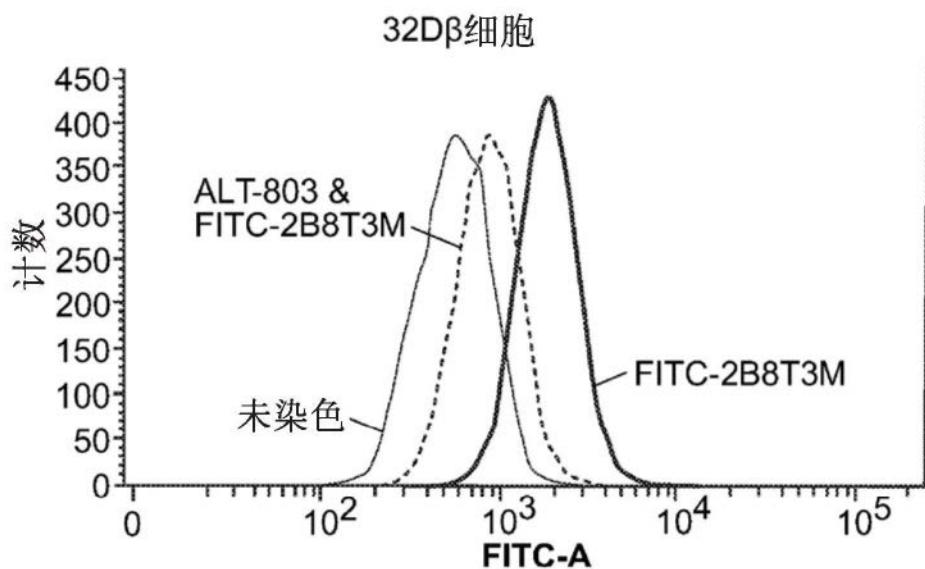


图4B

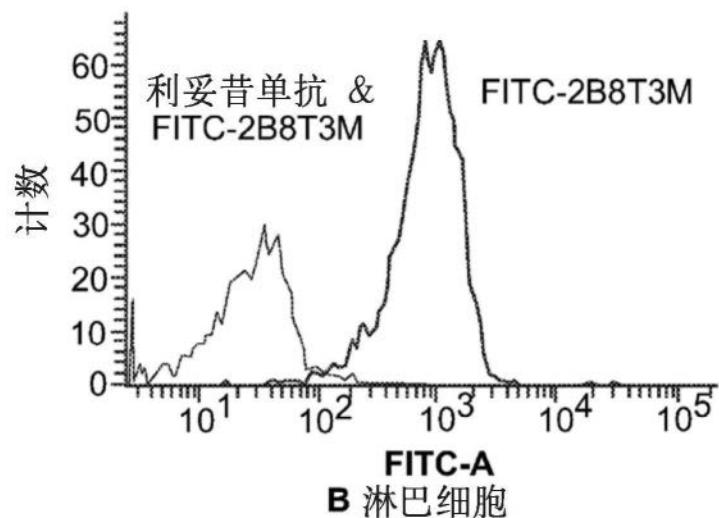


图5A

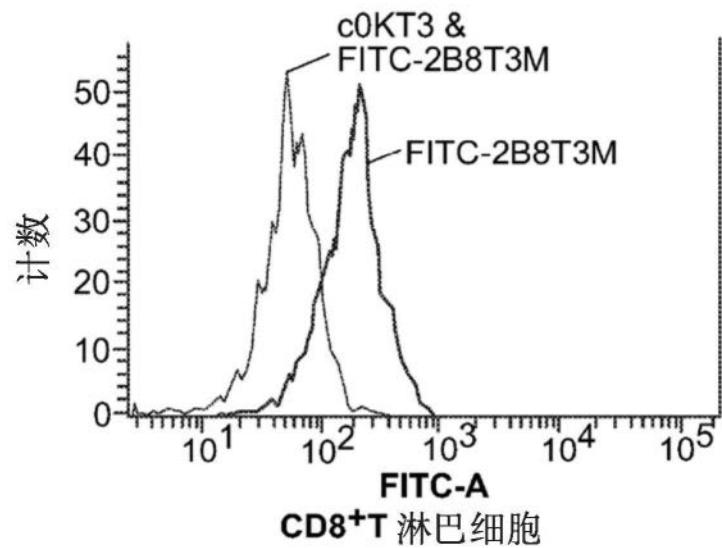


图5B

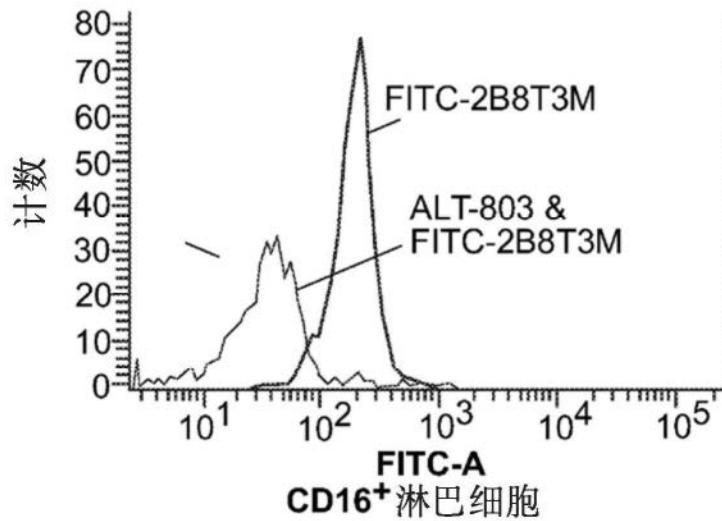
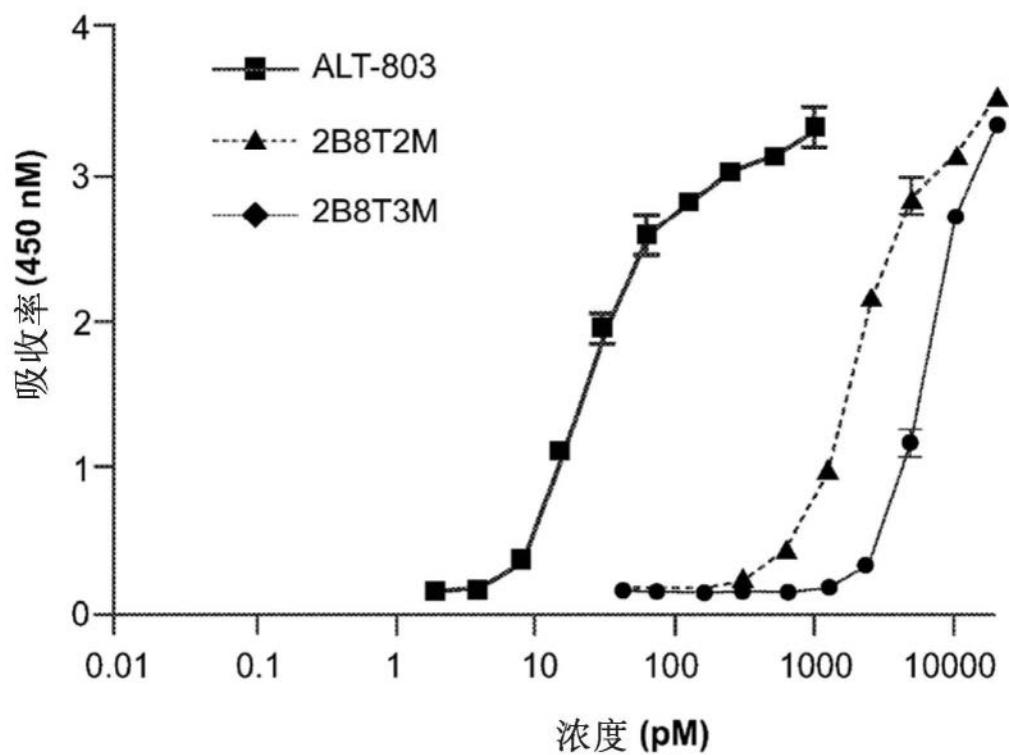


图5C



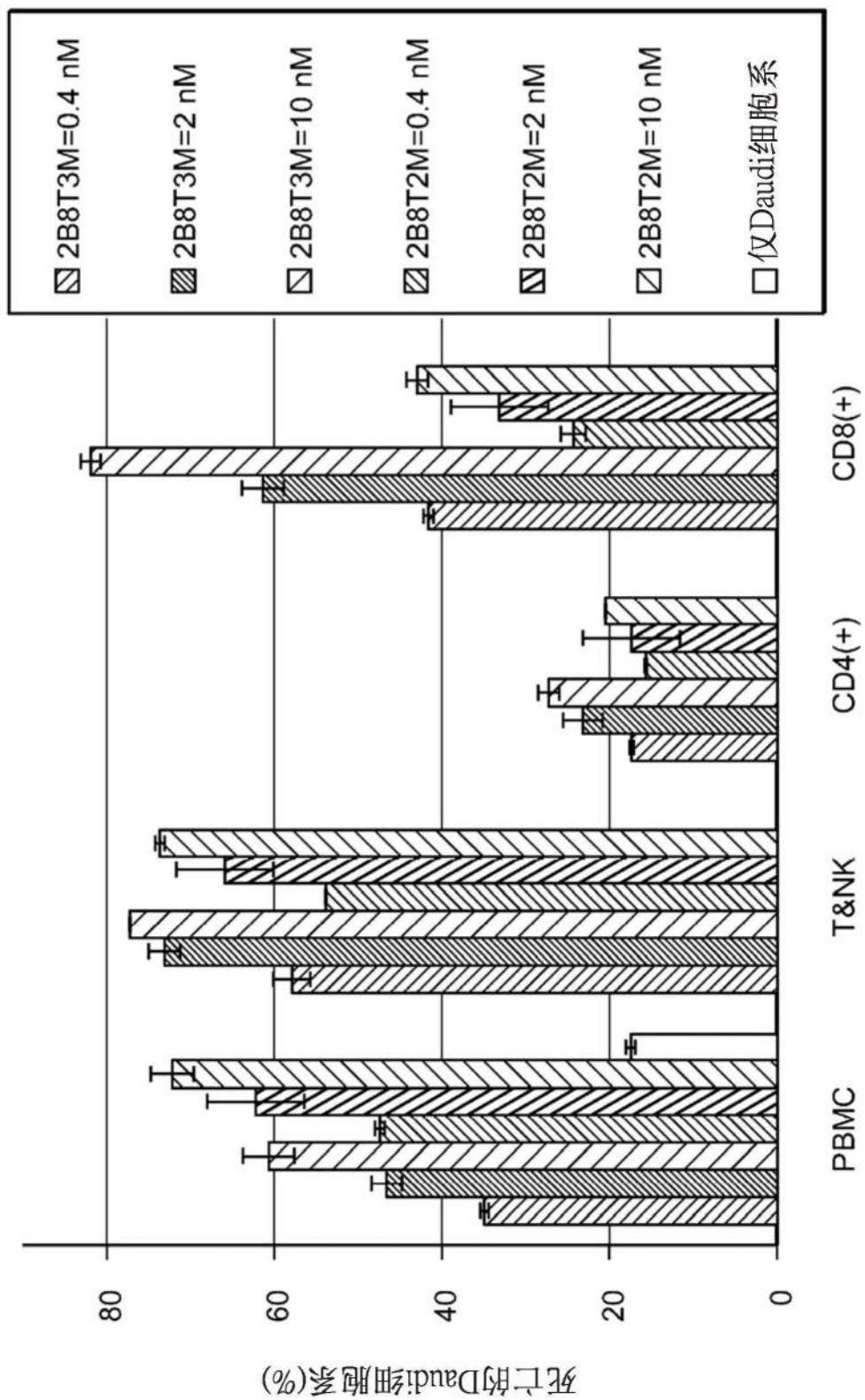


图7

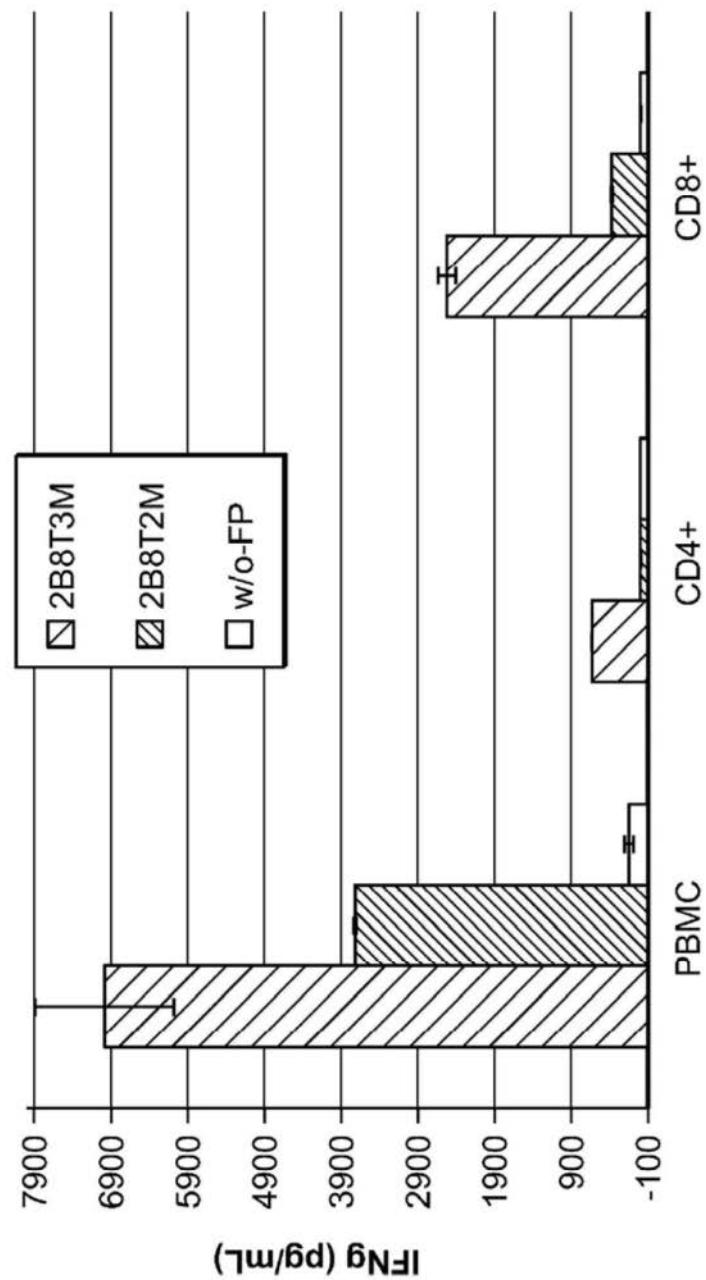


图8

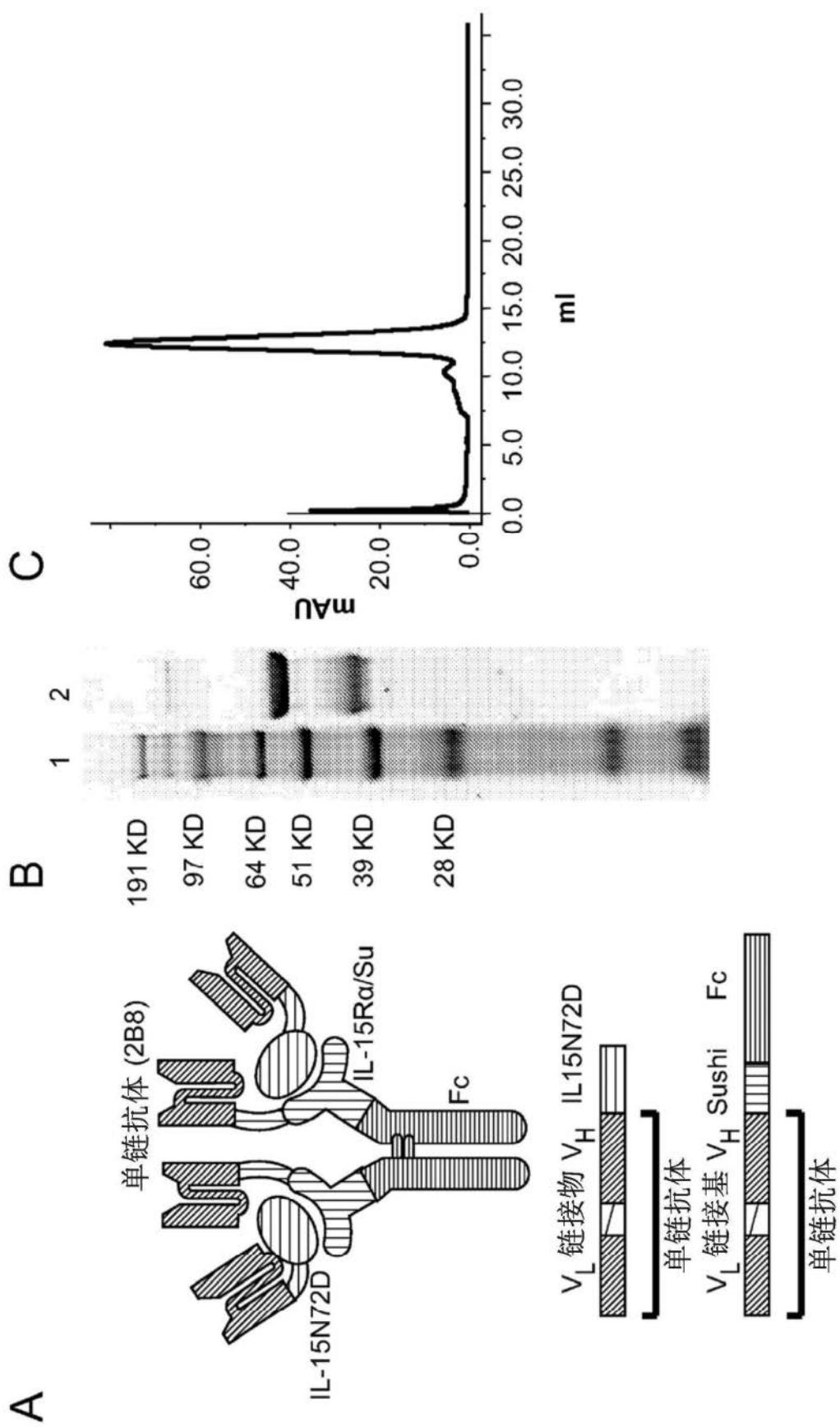


图9

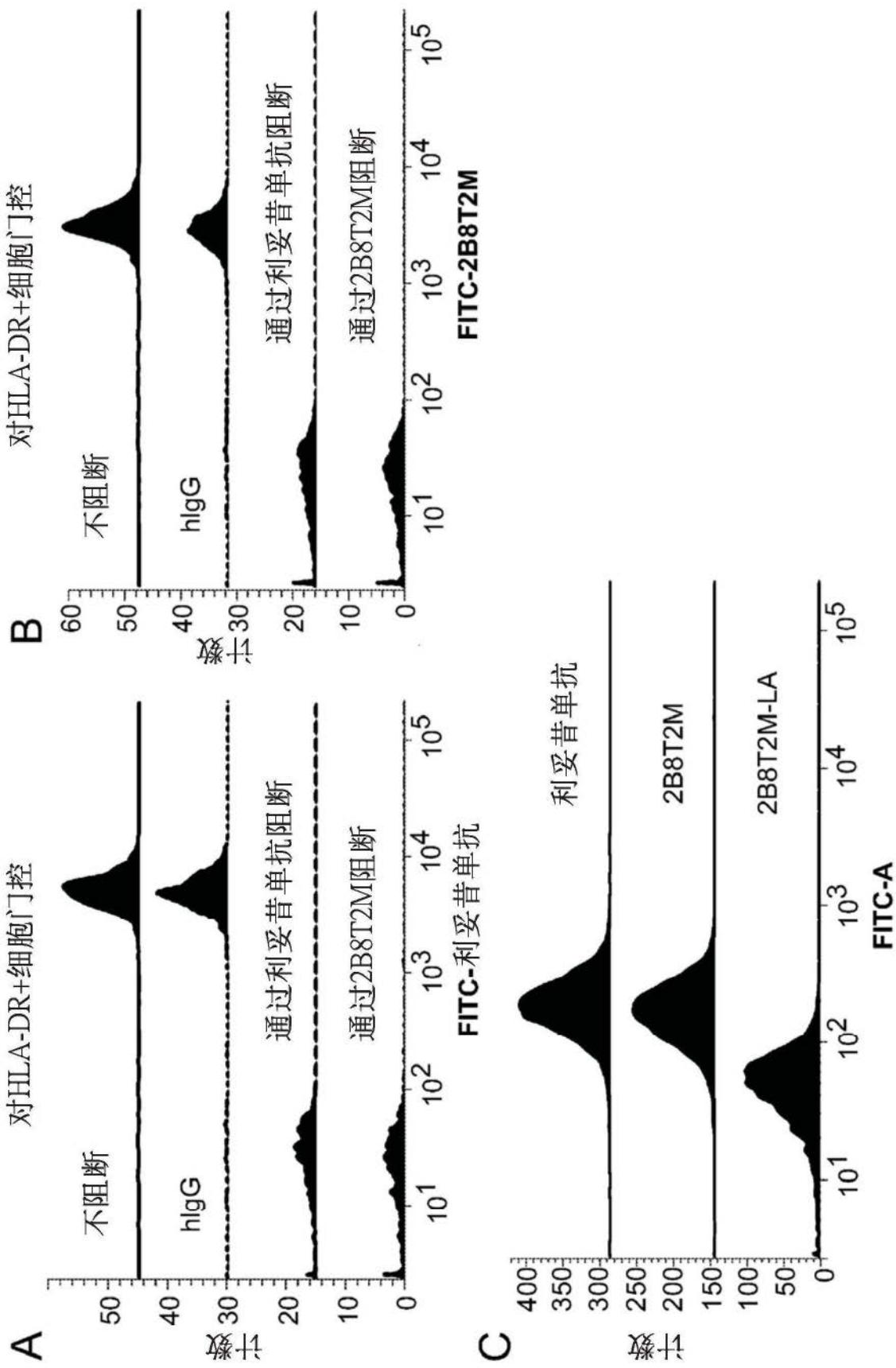


图10

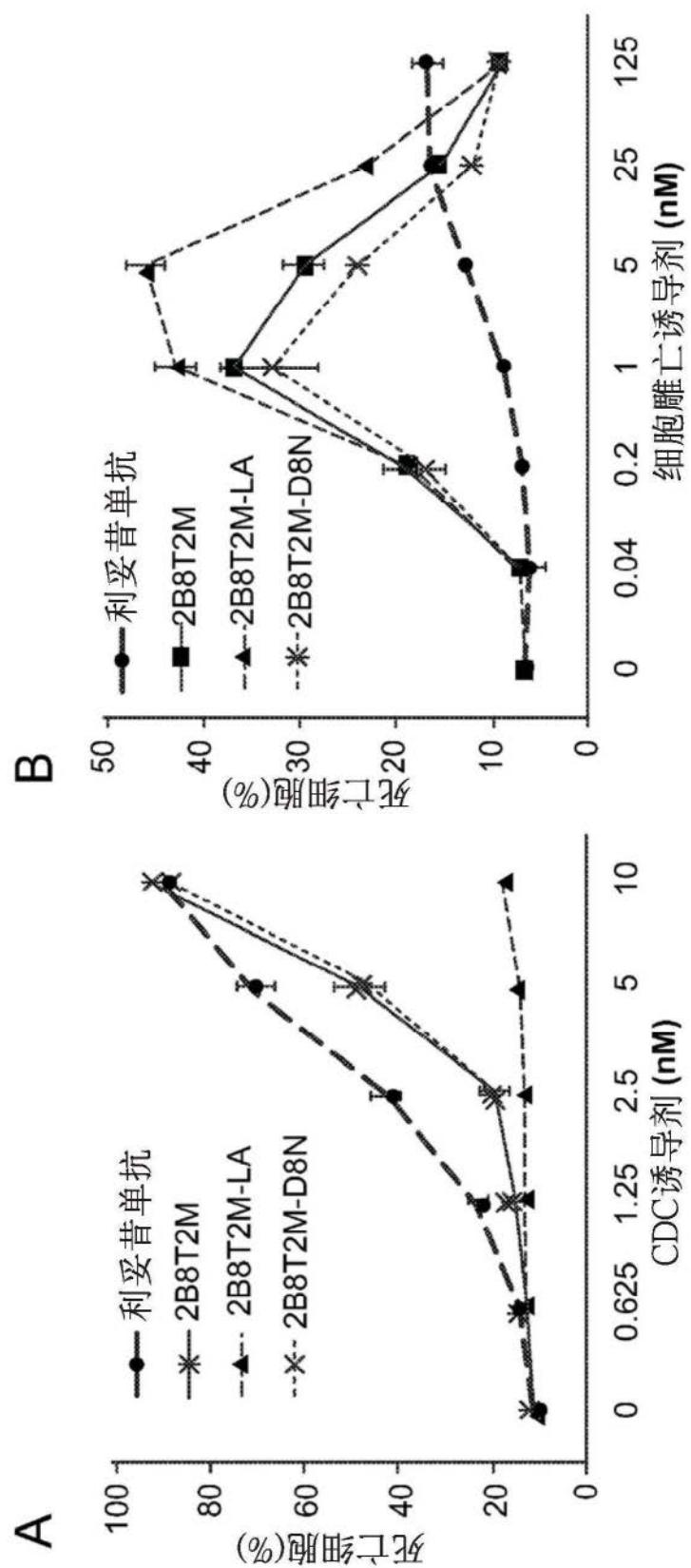


图11

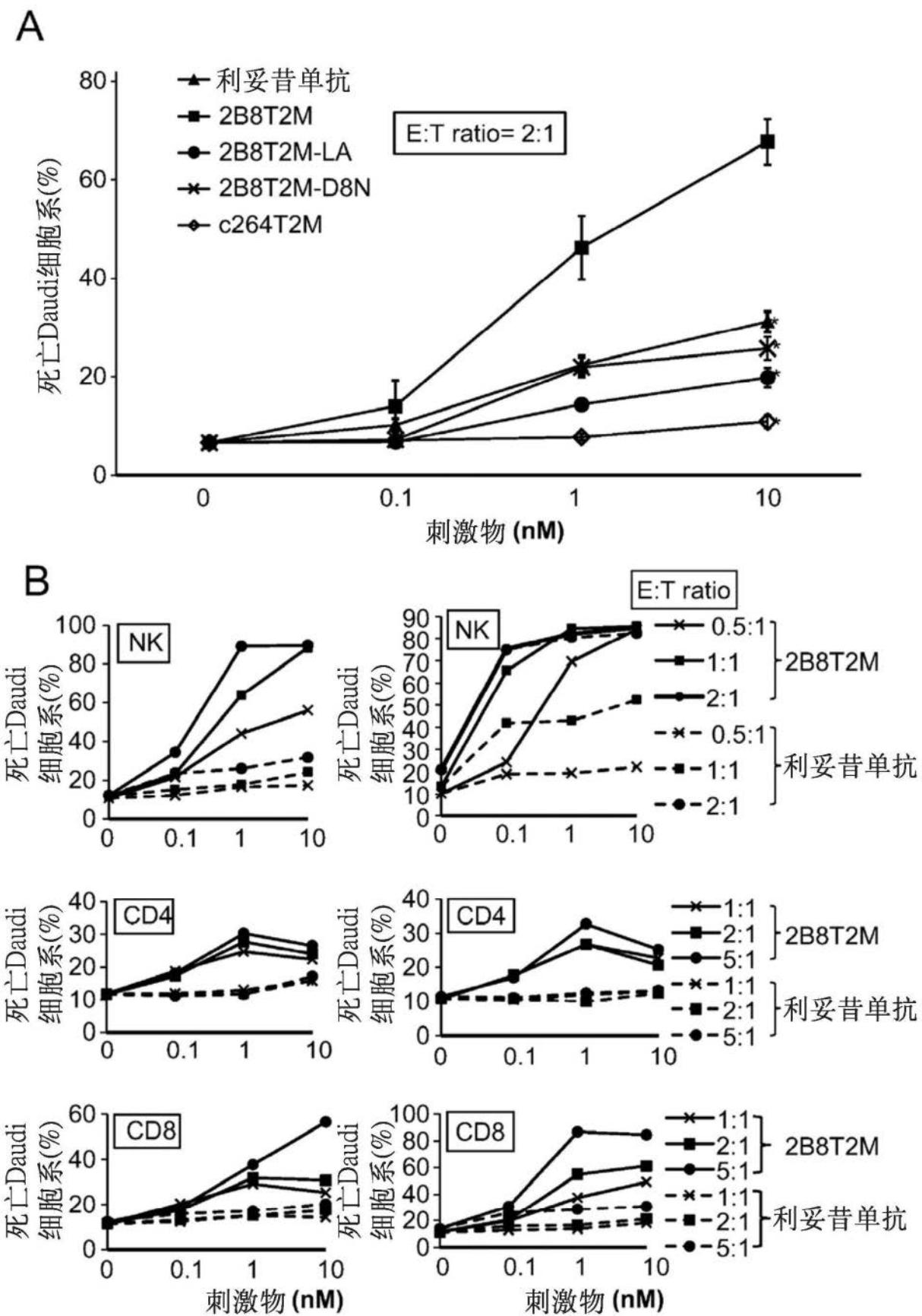


图12

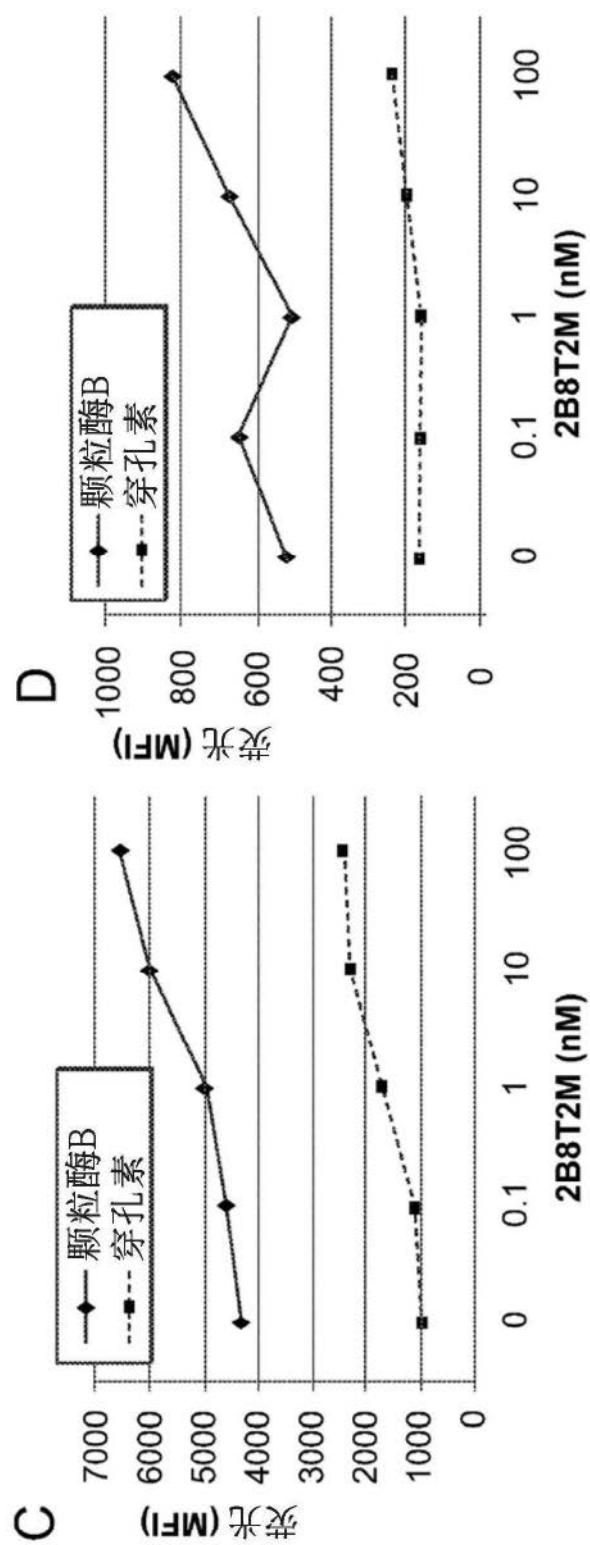


图12(续)

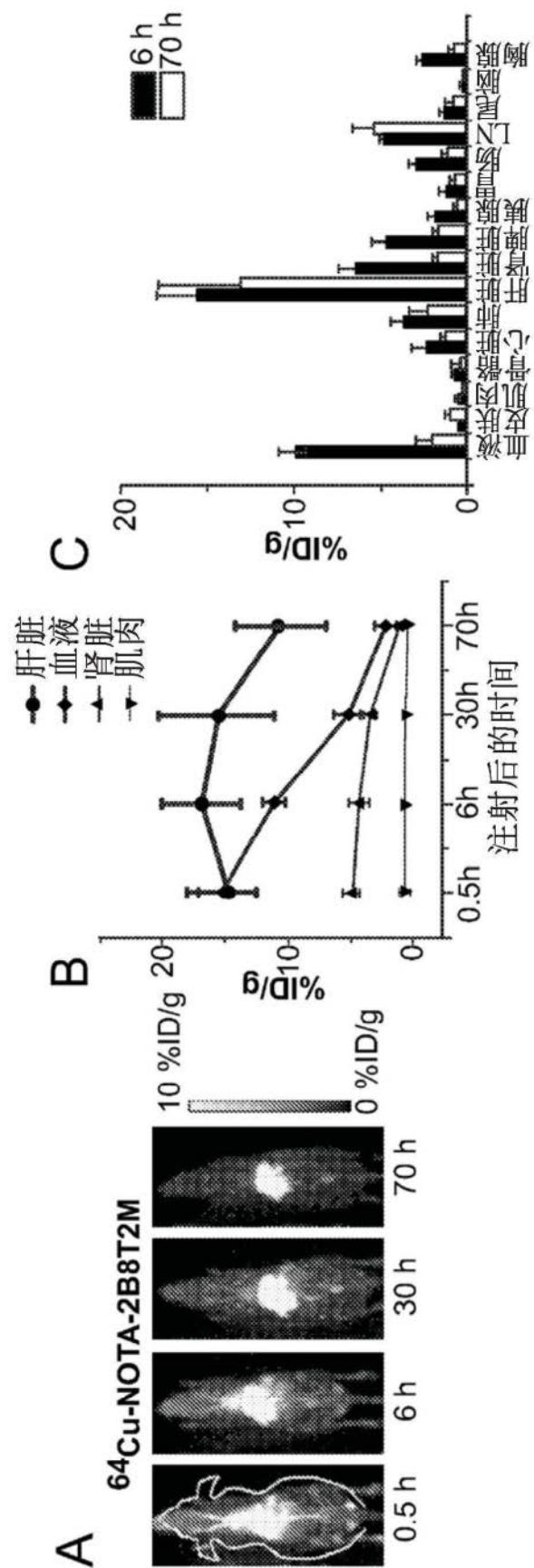


图13

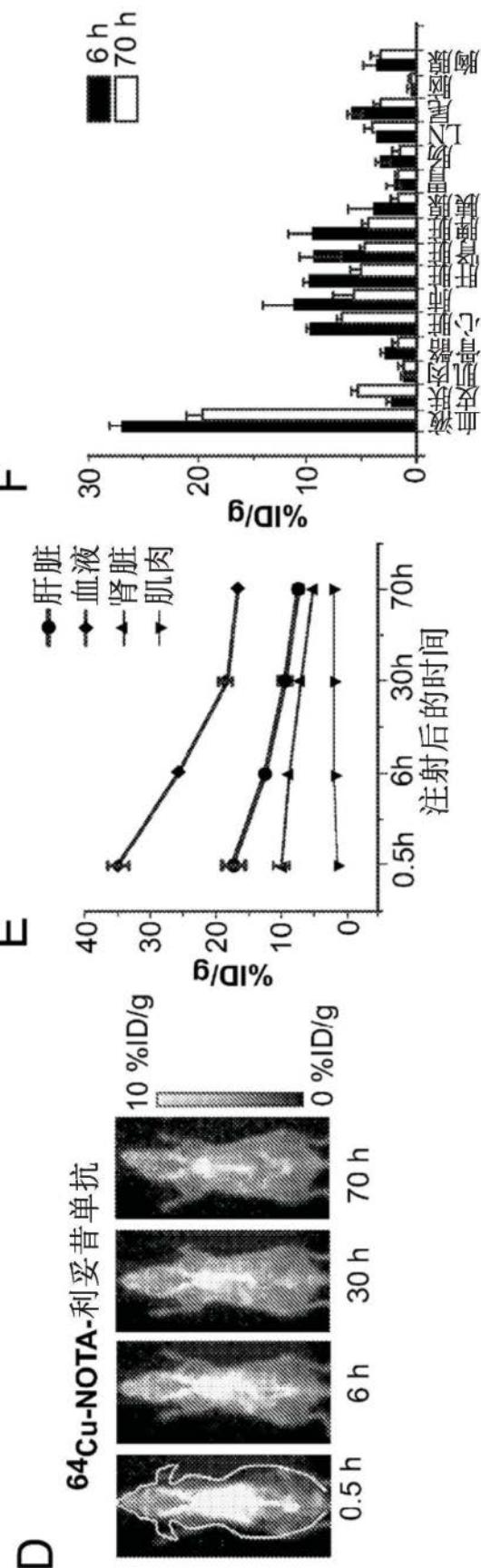


图13(续)

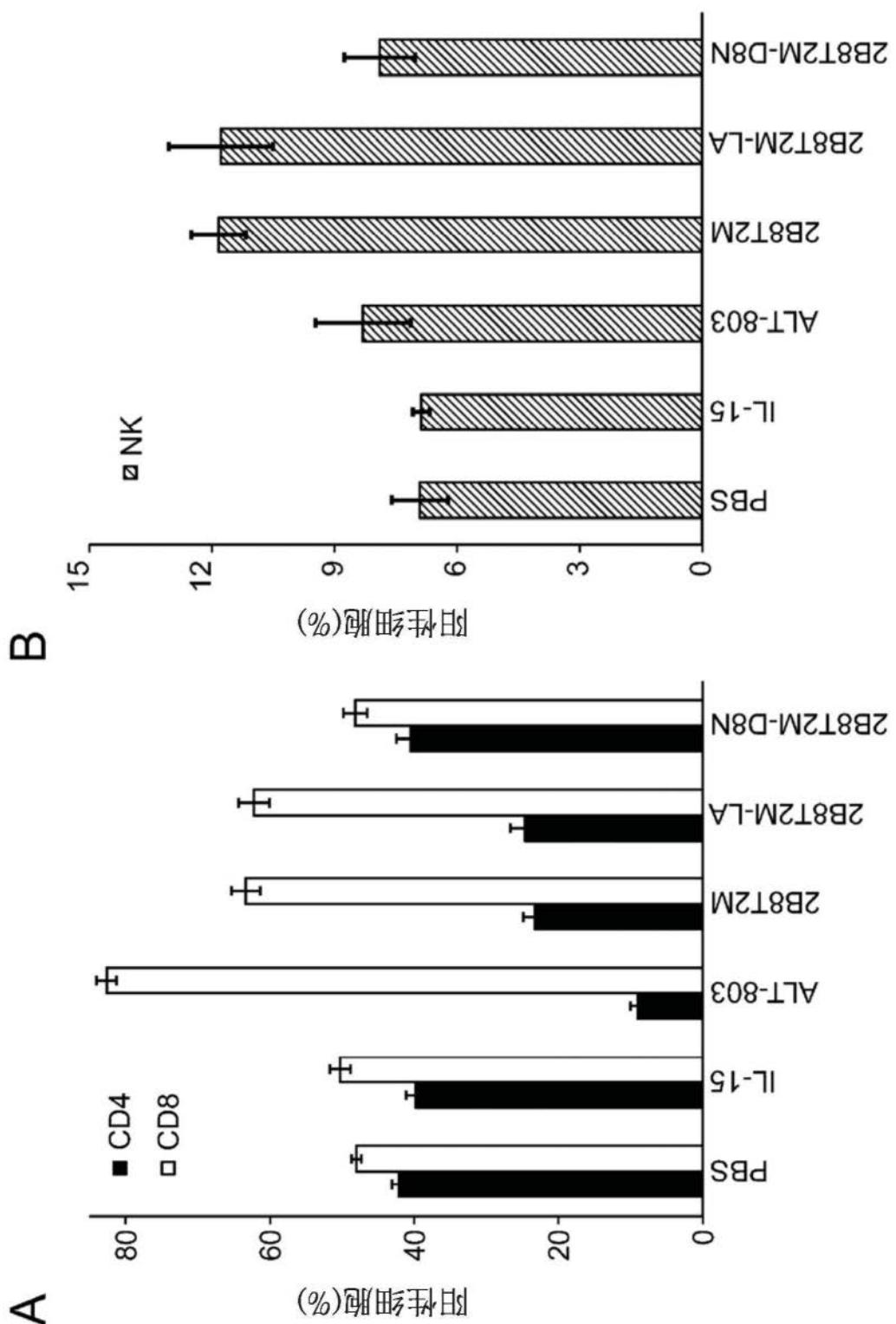


图14

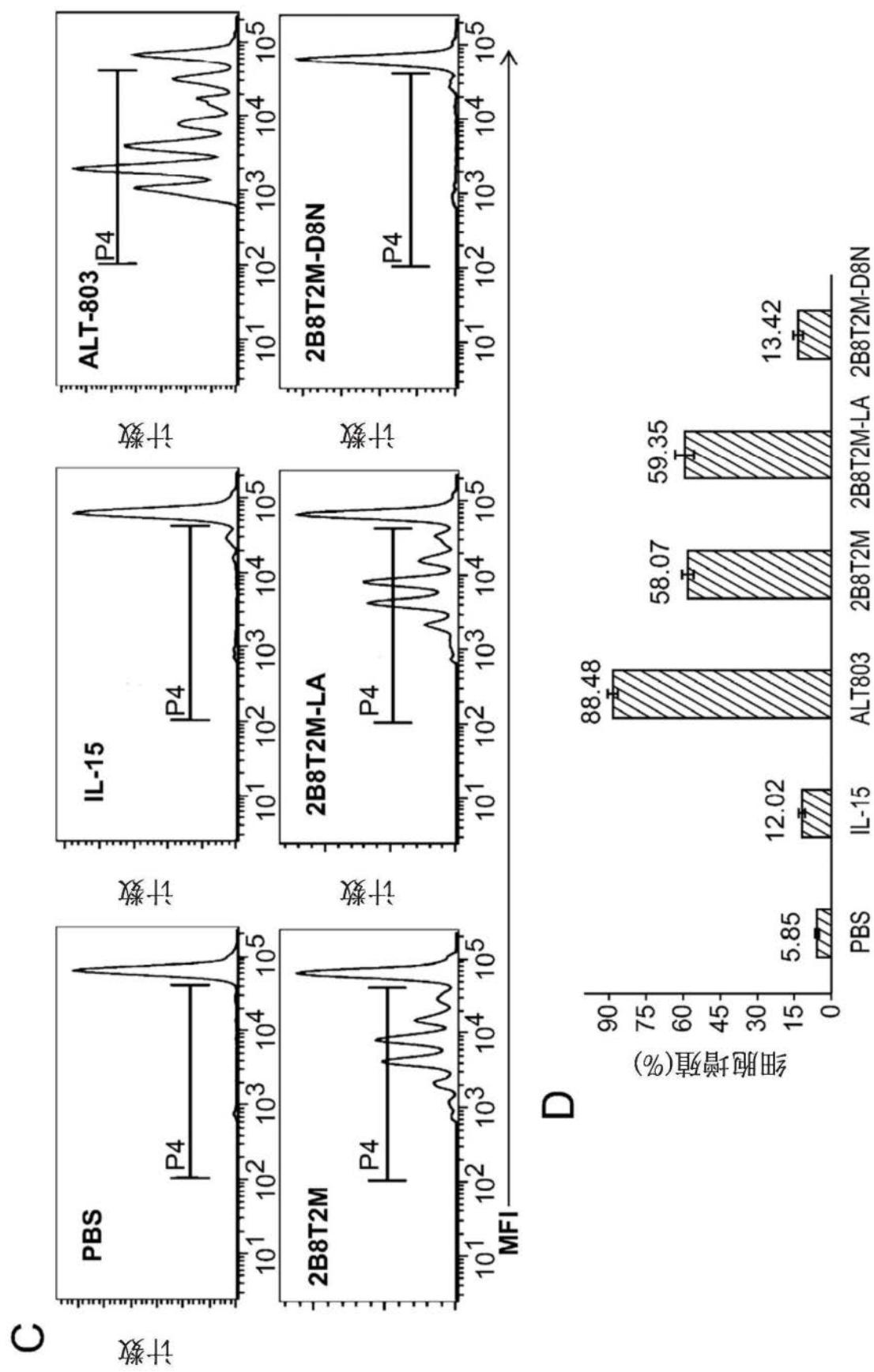


图14(续)

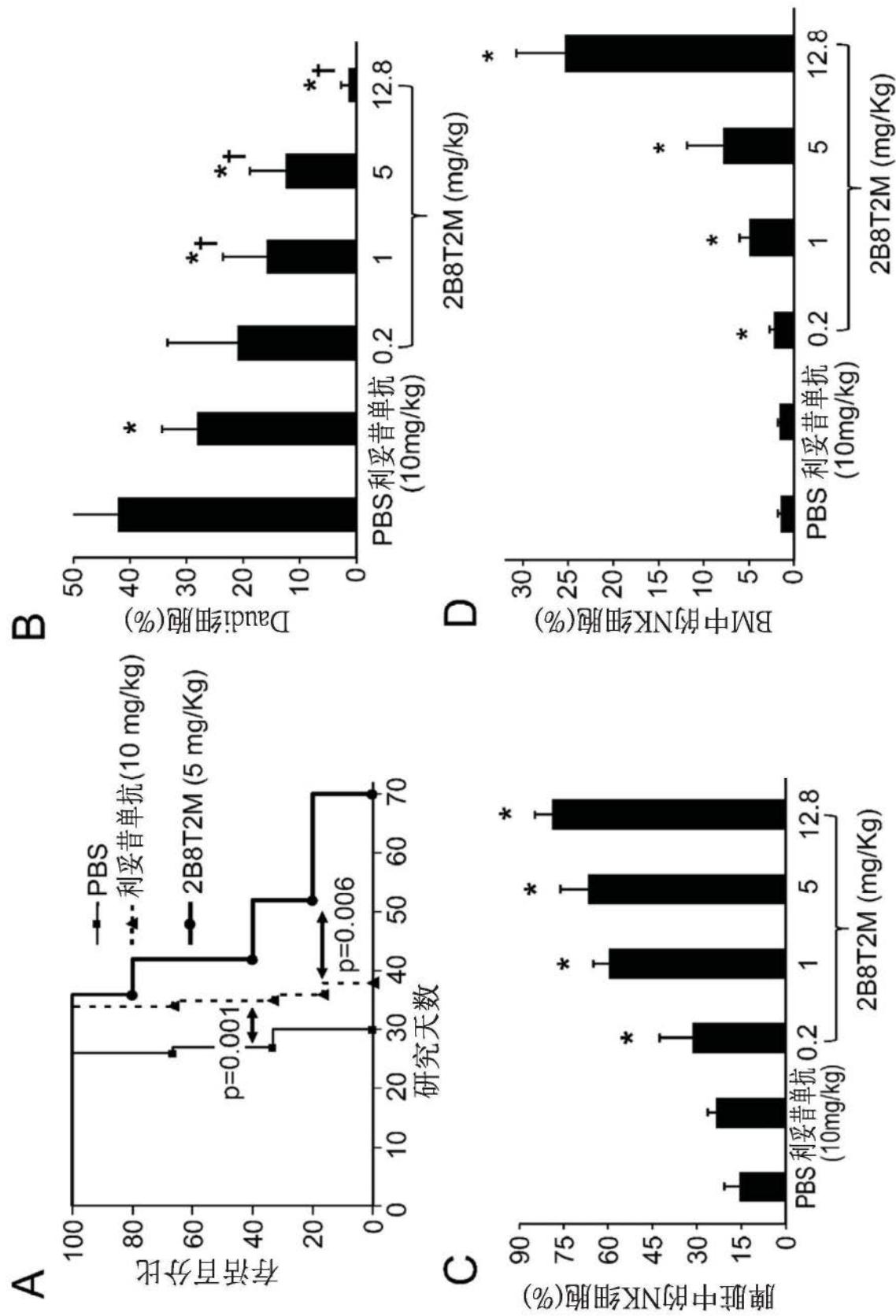


图15

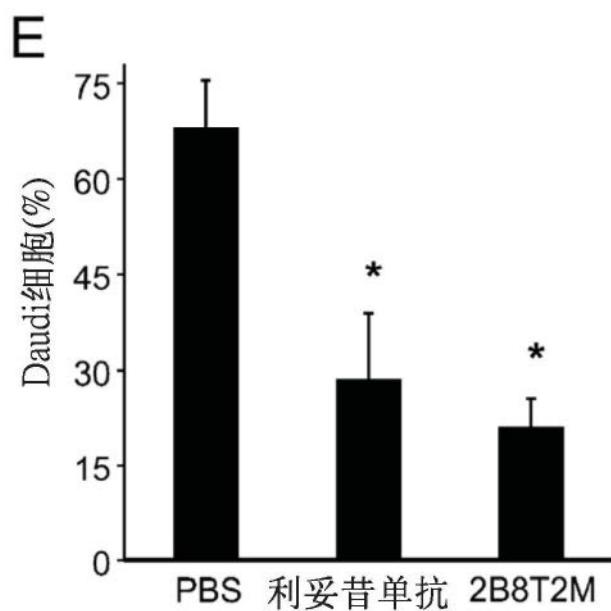


图15(续)

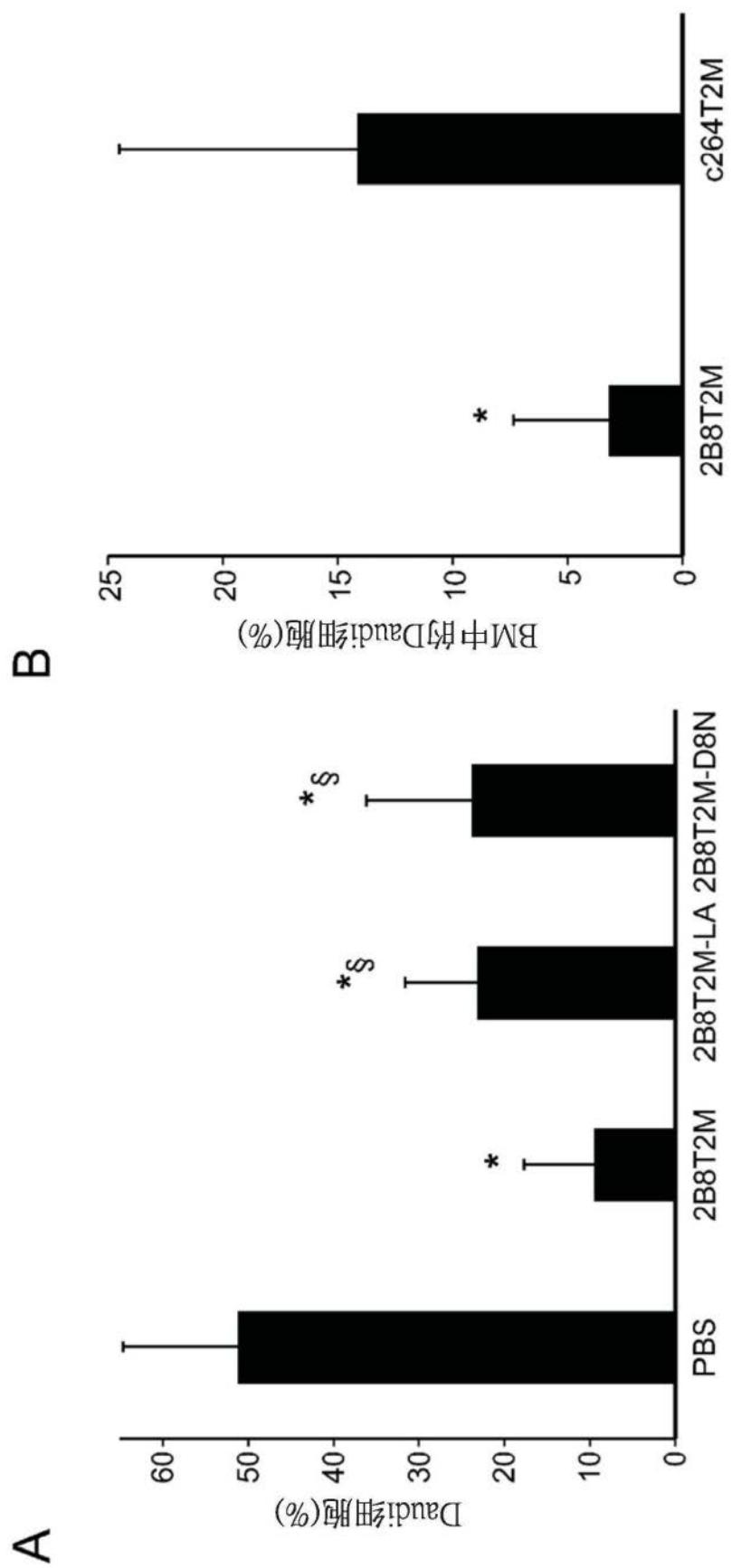


图16

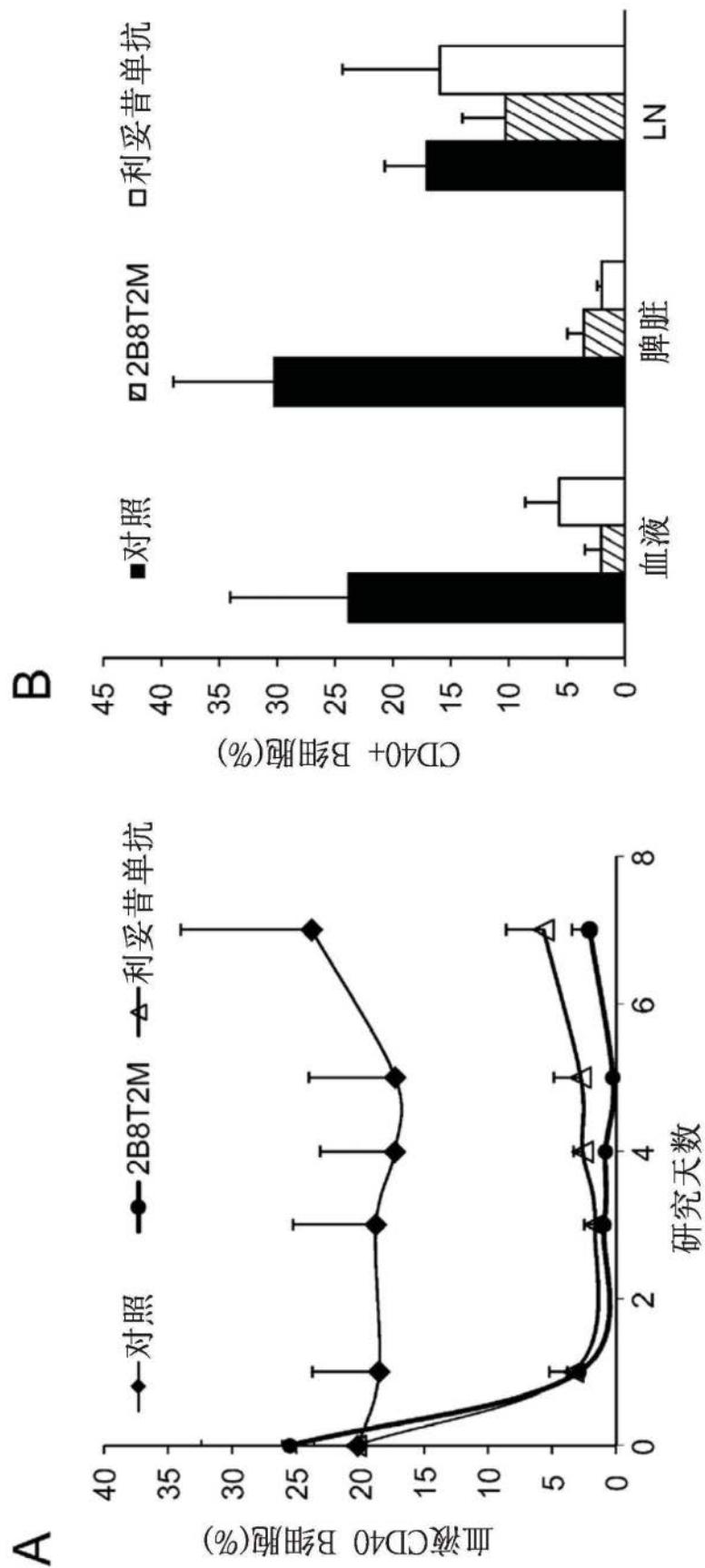


图17