



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109890406 A

(43)申请公布日 2019.06.14

(21)申请号 201780067219.5

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

(22)申请日 2017.11.09

代理人 袁志明

(30)优先权数据

62/420,442 2016.11.10 US

62/582,852 2017.11.07 US

(51)Int.Cl.

A61K 38/20(2006.01)

A61K 38/19(2006.01)

A61K 38/00(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.04.29

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/060911 2017.11.09

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/089669 EN 2018.05.17

(71)申请人 尼克塔治疗公司

地址 美国加利福尼亚

(72)发明人 D·H·卡瑞士 宫崎宇广

W·奥维克 P·吴 M·夏尔马

权利要求书2页 说明书26页 附图20页

(54)发明名称

肿瘤免疫治疗性治疗方法

(57)摘要

在此提供了通过向患有癌症的受试者给予癌症疫苗、伴随给予长效IL-2R α β 偏向性激动剂来治疗该受试者的方法和组合物。

1. 一种给予方法,该方法包括向患有癌症的受试者给予IL-2R β 活化量的长效IL-2R β 偏向性激动剂和疫苗,其中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂以小于约0.7mg/kg的剂量给予。

2. 一种增强癌症疫苗的治疗有效性的方法,该方法包括向患有癌症的受试者给予癌症疫苗和IL-2R β 活化量的长效IL-2R β 偏向性激动剂,其中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂以小于0.7mg/kg的剂量给予,并且该长效IL-2R β 偏向性激动剂的给予有效改善该受试者对该疫苗的应答。

3. 一种治疗受试者的癌症的方法,该方法包括向该受试者给予IL-2R β 活化量的长效IL-2R β 偏向性激动剂和有效治疗癌症的量的疫苗,其中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂以小于约0.7mg/kg的剂量给予,并且当在该癌症的小鼠模型中评价时,基于前述治疗各自的50%最大肿瘤生长之间的时间延迟,使用等效量的该长效IL-2R β 偏向性激动剂和该疫苗相对于给予该疫苗和非长效型式的该IL-2R激动剂有效使存活延长至少15天。

4. 一种抑制正在经历针对癌症的治疗的受试者中调控性T细胞(Treg)的累积的方法,该方法包括向该受试者给予IL-2R β 活化量的长效IL-2R β 偏向性激动剂和有效治疗癌症的量的疫苗,其中,当在癌症小鼠模型中评价时,使用等效量的该长效IL-2R β 偏向性激动剂和该疫苗有效抑制该肿瘤中选自由CD4+Treg、CD25+Treg和FoxP3+Treg组成的组的调控性T细胞的累积,抑制量相对于在给予非长效IL-2R偏向性激动剂和该疫苗时观察到的抑制得以提高。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的方法,其中,将该疫苗与该长效IL-2R β 偏向性激动剂分开给予至该受试者。

6. 如权利要求5所述的方法,其中,将该疫苗在给予该长效IL-2R β 偏向性激动剂之前给予至该受试者。

7. 如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中,该疫苗和该长效IL-2R β 偏向性激动剂两者均在治疗的第1天给予。

8. 如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中,该疫苗在治疗的第1天给予,并且该长效IL-2R β 偏向性激动剂在治疗的第1天至第4天中的任一天给予。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的方法,其中该受试者是人。

10. 如权利要求1-9中任一项所述的方法,其中该癌症是实体癌。

11. 如权利要求1-10中任一项所述的方法,其中,该癌症选自下组,该组由以下组成:乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌、骨癌、结肠直肠癌、胃癌、淋巴瘤、恶性黑素瘤、肝癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、甲状腺癌、肾癌、胆管癌、脑癌、宫颈癌、上颌窦癌、膀胱癌、食管癌、何杰金氏病以及肾上腺皮质癌。

12. 如权利要求11所述的方法,其中,该癌症是恶性黑素瘤。

13. 如权利要求1-12中任一项所述的方法,其中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂以小于0.7mg/kg至约0.2mg/kg范围内的剂量给予。

14. 如权利要求10所述的方法,其中,当在1个治疗周期后评价时,该给予有效使得实体瘤大小减小至少25%。

15. 如权利要求1-14中任一项所述的方法,其中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂包含可释放地共价衔接至聚乙二醇的阿地白介素。

16. 如权利要求15所述的方法,其中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂包含可释放地共价附

接至平均6种聚乙二醇聚合物的阿地白介素。

17. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中,该疫苗选自抗原疫苗、全细胞疫苗、树突细胞疫苗、以及DNA疫苗。

18. 如权利要求17所述的方法,其中,该疫苗是同种异体疫苗。

19. 如权利要求17所述的方法,其中,该疫苗是自体疫苗。

20. 如权利要求17所述的方法,其中,该疫苗是抗原疫苗。

21. 如权利要求20所述的方法,其中,该抗原疫苗包含肿瘤特异性抗原。

22. 如权利要求21所述的方法,其中,该肿瘤特异性抗原选自癌-睾丸抗原、分化抗原和广泛存在的过表达的肿瘤相关抗原。

23. 如权利要求20所述的方法,其中,该疫苗包含新抗原。

24. 如权利要求1-22中任一项所述的方法,其中,该疫苗以包含一种或多种佐剂的组合物的形式给予。

25. 一种试剂盒,该试剂盒包括IL-2R β 活化量的长效IL-2R β 偏向性激动剂和疫苗,随附用于治疗患有癌症的受试者的说明书。

26. 如权利要求25所述的试剂盒,其中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂和该疫苗包含在用于给予至该受试者的单一组合物中。

27. 如权利要求25所述的试剂盒,其中,该组合物进一步包含药学上可接受的赋形剂。

28. 如权利要求25所述的试剂盒,其中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂和该疫苗被提供在单独的容器中。

29. 如权利要求28所述的试剂盒,该试剂盒随附用于将该疫苗和该长效IL-2R β 偏向性激动剂分开给予至该受试者的说明书。

30. 如权利要求28所述的试剂盒,其中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂和该疫苗两者均呈固体形式。

31. 如权利要求30所述的试剂盒,其中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂和该疫苗各自包含在含有药学上可接受的赋形剂的组合物中。

32. 如权利要求31所述的试剂盒,其中,包含该长效IL-2R β 偏向性激动剂的组合物和包含该疫苗的组合物两者均含有按重量计少于5%的水。

33. 如权利要求30-32中任一项所述的试剂盒,其中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂和该疫苗两者均呈适于在水性稀释剂中重构的固体形式。

肿瘤免疫治疗性治疗方法

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请依据35 U.S.C. §119 (e) 要求2016年11月10日提交的美国临时专利申请号62/420,442、以及2017年11月07日提交的美国临时专利申请号62/582,852的优先权权益,这些临时专利申请的披露内容通过引用以其全文结合在此。

技术领域

[0002] 本申请涉及(除其他事项之外)免疫疗法领域,并且在特定方面涉及癌症免疫疗法,并且涉及通过向患有癌症的个体给予癌症疫苗、伴随给予长效IL-2R α β 偏向性激动剂(IL-2R α β -biased agonist)来治疗该个体。

背景技术

[0003] 治疗性癌症疫苗代表通过刺激或恢复受试者的免疫系统对抗感染和疾病的能力而起作用的一类物质。与预防性或防治性疫苗对照,治疗性疫苗用于通过增强身体针对癌症的天然免疫应答来治疗现有癌症并且代表一种类型的免疫疗法。癌症治疗疫苗被设计来活化细胞毒性T细胞并且指导它们识别并抵抗特定类型的癌症或诱导产生与癌细胞表面上的分子结合的抗体。然而,产生有效的治疗性疫苗已被证明是具有挑战性的工作,因为疫苗干预必须对抗身体免疫系统,该免疫系统受到维持癌症的机制的限制。为了有效,治疗性癌症疫苗不仅必须刺激针对预期靶标的特异性免疫应答,而且必须足够强大来克服癌细胞用于保护它们自身免受杀伤性T细胞攻击的屏障。在过去几年中,已经在开发治疗性疫苗方面进行了大量努力(包含各种平台),然而,迄今为止,仅一种疫苗**Provenge**[®] (sipuleucal-T,一种自体疫苗)已获得FDA批准。例如,已经在患有乳腺癌、肺癌、黑素瘤、胰腺癌、结肠直肠癌和肾癌的患者中评价了治疗性疫苗(Melero, I., 等人, Nat Rev Clin Oncol [自然综述:临床肿瘤学], 2014, 11 (9), 509-524)。

[0004] 为了改善免疫抗癌策略,可以将如佐剂的物质添加至疫苗以加强这些疫苗诱导有效抗癌免疫应答的能力,尽管改善的应答通常可能是部分和/或短暂的。用于癌症疫苗的佐剂可以来自多种来源,如细菌、由细菌产生的物质、蛋白质、以及合成或天然细胞因子。已经研究了包括细胞因子的各种物质,以用于增强疫苗诱导的抗肿瘤活性。虽然一些细胞因子似乎充当有效佐剂,但已经发现了其他细胞因子在调节疫苗有效性中出人意料地无效。用于癌症治疗疫苗的细胞因子包括例如IL-2、干扰素- α 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。

[0005] 尽管迄今为止已经在开发治疗性疫苗方面进行了大量努力(包含各种平台),但仍需要鉴定和提供新的且更有效的免疫治疗性疫苗和相关的治疗方案。因此,本披露力图解决这种和其他需求。

发明内容

[0006] 在第一方面,在此提供了一种方法,该方法包括向患有癌症的受试者给予将在此

更详细地描述的疫苗和IL-2R β 活化量的长效IL-2R β 偏向性激动剂。

[0007] 在第二方面,在此提供了一种增强癌症疫苗的治疗有效性的方法,该方法包括向患有癌症的受试者给予治疗性癌症疫苗和IL-2R β 活化量的长效IL-2R β 偏向性激动剂,其中该长效IL-2R β 偏向性激动剂可有效改善该受试者对该疫苗的应答。

[0008] 在又一第三方面,在此提供了一种治疗受试者的癌症的方法,该方法包括向受试者给予IL-2R β 活化量的长效IL-2R β 偏向性激动剂和有效治疗癌症的量的疫苗,其中当在该癌症的小鼠模型中评价时,基于两种治疗方案的50%最大肿瘤生长之间的时间延迟,治疗相对于给予该疫苗和非长效型式的IL-2R激动剂可有效使存活延长至少15天。

[0009] 在又一第四方面,本披露提供了一种抑制正在经历针对癌症的治疗的受试者中调控性T细胞(Treg)累积的方法,该方法包括向该受试者给予IL-2R β 活化量的长效IL-2R β 偏向性激动剂和有效治疗癌性肿瘤的量的疫苗,其中当在癌症小鼠模型中评价时,该治疗有效抑制该肿瘤中选自由CD4+Treg、CD25+Treg和FoxP3+Treg组成的组的调控性T细胞的累积,抑制量相对于在给予非长效型式的IL-2R激动剂和该疫苗时观察到的抑制得以提高。

[0010] 为清楚起见,关于给予顺序,该疫苗和该长效IL-2R β 偏向性激动剂可以同时或依次并按任何顺序给予,并且经由相同和/或不同的给予途径给予。此外,治疗可以包括单个治疗周期,或者可以包括多个周期。

[0011] 在与在此提供的任何一个或多个方面或实施例有关的一个或多个实施例中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂以小于或等于约0.7mg/kg的剂量给予。在一个或多个特定实施例中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂以小于约0.7mg/kg的剂量给予。

[0012] 在与前述方面中的任何一个或多个相关的一个或多个实施例中,将该疫苗与该长效IL-2R β 偏向性激动剂分开给予至该受试者。

[0013] 在又一个或多个其他实施例中,将该疫苗在给予该长效IL-2R β 偏向性激动剂之前给予至受试者。例如,在一个或多个实施例中,该疫苗和该长效IL-2R β 偏向性激动剂两者均在治疗的第1天给予。在一个或多个替代实施例中,该疫苗在治疗的第1天给予,并且该长效IL-2R β 偏向性激动剂在治疗的第1天至第4天中的任一天给予。例如,该长效IL-2R β 偏向性激动剂在治疗的第1天、第2天、第3天或第4天中的任一天或甚至此后给予。

[0014] 在一些实施例中,该受试者是人受试者。

[0015] 在一个或多个另外的实施例中,癌症是实体癌。例如,该癌症可以选自下组,该组由以下组成:乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌、骨癌、结肠直肠癌、胃癌、淋巴瘤、恶性黑素瘤、肝癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、甲状腺癌、肾癌、胆管癌、脑癌、宫颈癌、上颌窦癌、膀胱癌、食管癌、何杰金氏病以及肾上腺皮质癌。

[0016] 在又一个或多个其他实施例中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂以小于或等于约0.7mg/kg至约0.2mg/kg范围内的剂量给予。在又一个或多个其他实施例中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂以小于约0.7mg/kg至约0.2mg/kg范围内的剂量给予。在一些其他实施例中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂以小于或等于约0.7mg/kg至约0.3mg/kg的剂量或以从小于约或等于约0.7mg/kg至约0.5mg/kg范围内的剂量给予。该长效IL-2R β 偏向性激动剂的说明性剂量的量包括例如0.7mg/kg、0.65mg/kg、0.6mg/kg、0.5mg/kg、0.4mg/kg、0.3mg/kg、以及0.2mg/kg。

[0017] 在涉及前述方面中的任何一个或多个的一些实施例中,当治疗实体癌性肿瘤时,

当在1个治疗周期之后评价时该方法有效使得实体瘤大小减小至少约25%。

[0018] 在一些实施例中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂包含可释放地共价附接至聚乙二醇的阿地白介素。在又一些另外的实施例中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂包含可释放地共价附接至4、5和6种聚乙二醇聚合物的阿地白介素。在又一些其他实施例中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂包含可释放地共价附接至平均约6种聚乙二醇聚合物的阿地白介素。在一个或多个另外的实施例中,这些可释放地共价附接至阿地白介素的聚乙二醇聚合物是分支的。

[0019] 在与前述方面中的任何一个或多个相关的又一些其他实施例中,该疫苗选自例如抗原疫苗、全细胞疫苗、树突细胞疫苗、以及DNA疫苗。在一个或多个实施例中,该疫苗是同种异体疫苗。可替代地,在一些实施例中,该疫苗是自体疫苗。在一些其他特定实施例中,该疫苗是抗原疫苗。在一个或多个相关的实施例中,该抗原疫苗包含肿瘤特异性抗原。例如,在一些实施例中,该肿瘤特异性抗原选自癌-睾丸抗原、分化抗原和广泛存在的过表达的肿瘤相关抗原。

[0020] 在又一些其他实施例中,该疫苗包含新抗原。

[0021] 在又另一方面,提供了一种试剂盒,该试剂盒包括IL-2R β 活化量的长效IL-2R β 偏向性激动剂和疫苗、连同用于治疗患有癌症的受试者的说明书。

[0022] 在该试剂盒的一个或多个实施例中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂和该疫苗包含在用于给予至受试者的单一组合物中,其中该单一组合物任选地包含药学上可接受的赋形剂。

[0023] 在该试剂盒的一些替代实施例中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂和该疫苗被提供在单独的容器中,并且该试剂盒包括用于将该疫苗和该长效IL-2R β 偏向性激动剂分开给予至受试者的说明书。

[0024] 在该试剂盒的一些实施例中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂和该疫苗两者均呈固体形式。在一个或多个相关的实施例中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂和该疫苗呈适于在水性稀释剂中重构的固体形式。

[0025] 在又一个或多个其他实施例中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂和该疫苗各自包含在各自含有药学上可接受的赋形剂的单独组合物中。

[0026] 在又一些另外的实施例中,包含该长效IL-2R β 偏向性激动剂的组合物和包含该疫苗的组合物两者均含有按重量计少于5%的水。

[0027] 另外的方面和实施例在以下描述和权利要求书中进行了阐述,并且本披露不应被认为在此方面受到限制。

附图说明

[0028] 图1A-1H。这些图说明如实例2中详细描述的用单剂量的RSLAIL-2或5个每日剂量的阿地白介素处理后B16F10小鼠黑素瘤模型中的免疫细胞改变。在所指示的时间点从动物中分离肿瘤浸润性淋巴细胞,并且通过流式细胞术评估免疫细胞群体。每个数据点代表单独的小鼠肿瘤,并且线代表平均值。数据从2至4个独立研究组合,每个时间点3至4个重复。图1A示出在用媒介物(空心圆圈)、阿地白介素(实心正方形)和RSLAIL-2(实心三角形)中的每种处理后的不同时间点(第5天、第7天和第10天)肿瘤中CD8T细胞的总百分比;图1B示出在用媒介物(空心圆圈)、阿地白介素(实心正方形)和RSLAIL-2(实心三角形)中的每种

处理后的不同时间点肿瘤中记忆CD8T细胞的百分比；图1C示出在用媒介物(空心圆圈)、阿地白介素(实心正方形)和RSLAIL-2(实心三角形)中的每种处理后的不同时间点(第5天、第7天和第10天)肿瘤中活化的NK细胞的百分比；图1D和1E示出在处理后的不同时间点(第5天、第7天和第10天)肿瘤中CD4T细胞的百分比；图1F示出在处理后的不同时间点(第5天、第7天和第10天)肿瘤中CD4Treg细胞的百分比；图1G示出在处理后总CD4细胞的Treg细胞的百分比；并且图1H提供在处理后总CD8细胞与Treg细胞的比率。

[0029] 图2是如实例3中所描述展示与未修饰的IL-1(阿地白介素,实心倒三角形)相比,RSLAIL-2(实心正方形)(及其释放的活性共轭的IL-2形式,实心圆圈)的肿瘤药物代谢动力学的图。

[0030] 图3A-3H是示出如实例4中针对详细的各种处理组详细描述,在携带已确立的皮下B16肿瘤、随后用单独(i)含有GP-100(一种说明性肽疫苗)、抗CD40mAb和TLR-7激动剂R848(瑞喹莫德,一种咪唑并喹啉)的混合物配制品或(ii)与长效IL-2R $\alpha\beta$ 偏向性激动剂RSLAIL-2(基于IL-2 0.2mg/kg)组合或(iii)与高剂量或低剂量未修饰的IL-2(阿地白介素)组合疫苗接种的C57BL/6小鼠中的处理过程内肿瘤大小(mm²)的图。

[0031] 图4是示出对于在实例4中详细描述的研究组中的每个,携带已确立的皮下B16肿瘤的C57BL/6小鼠中的处理过程内平均肿瘤大小(mm²)的图。

[0032] 图5是与gp100特异性T细胞功能相关,即展示对于在实例4中详细描述的研究组中的每个,携带已确立的皮下B16肿瘤的C57BL/6小鼠中的处理过程内IFN-g+T细胞(表示为pme1-1的百分比)的图。该图表明,对于GP100/抗CD40/TRL-7激动剂/RSLAIL-2处理组,在疫苗接种后稳定且持久的IGN-g+T细胞(pme1-1)应答高于90%延长至约40天;与其他处理组相比,疫苗/RSLAIL-2组合疗法达到并维持最高百分比的IFN-g+T细胞(pme1-1)应答。另外,疫苗/RSAIL-2组合疗法诱导的IGN-g+T细胞(pme1-1)应答比其他处理组更慢地下降。

[0033] 图6是展示对于在实例4中详细描述的研究组中的每个,携带已确立的皮下B16肿瘤的C57BL/6小鼠中的处理过程内的存活百分比的图。与示出在处理过程内的肿瘤大小的图一致(图3A-3H和图4),与其他处理组相比,疫苗/RSLAIL-2处理组(GRP8)的存活显著延长。

[0034] 图7是展示对于在实例4中描述的研究组中的每个,携带已确立的皮下B16肿瘤的C57BL/6小鼠中的处理过程内的pme1-细胞百分比(表示为总CD8+T细胞百分比)的图。当与结合肽疫苗疗法的高剂量和低剂量IL-1处理相比时,RSLAIL-2当与GP-100疫苗组合时表现出显著升高的pme1-1应答。

[0035] 图8是示出对于在实例4中描述的研究组中的每个,携带已确立的皮下B16肿瘤的C57BL/6小鼠中的处理过程内调控性T细胞CD25+F α xp3+T细胞(表示为CD4细胞的百分比)的图。如从该图中可以看出,RSLAIL-2诱导的调控性T细胞的百分比在每个给药周期结束左右迅速降低。

[0036] 图9是指示对于在实例5中描述的研究组中的每个,在携带已确立的皮下B16肿瘤的C57BL/6小鼠中在第5天、第7天、第10天和第30天中的每一天的处理过程内Thy1.1+pme1-1细胞的数量/克肿瘤的条形图。

[0037] 图10是指示对于在实例5中描述的研究组中的每个,在携带已确立的皮下B16肿瘤的C57BL/6小鼠中在第5天、第7天、第10天和第30天中的每一天Thy1.1+pme1-1细胞的数量/

克脾组织的条形图。

[0038] 图11提供NOUS-020插入序列,其对应于来自CT26鼠肿瘤细胞系的20种新抗原,如实例(例如,实例6-9)SEQ ID NO:5中所描述。

[0039] 图12A和12B。如实例6中所描述,图12A和12B说明用于在此描述的鼠类研究中的说明性小鼠新抗原性癌症疫苗NOUS-020的免疫原性。在单突变肽上通过IFN- γ ELISpot在初次接受实验的小鼠中免疫后3周测量的T细胞应答的分析示于图12A中,并且在20种肽的池上通过细胞内细胞因子染色在初次接受实验的小鼠中免疫后3周测量的T细胞应答的分析示于图12B(肽池)中。示出了对5种免疫原性肽(#3、10、17、18、19)的应答。ID表位对应于构建体中抗原的位置,其中SFC是指斑点形成细胞。如所示,说明性小鼠新抗原性癌症疫苗NOUS-020GAd诱导CD4和CD8T细胞。

[0040] 图13A提供构建体的示意图,其示出在实例7中描述的研究中诱导CD8和CD4应答的新抗原。图13B提供在20种疫苗编码的新抗原池上通过IFN- γ ELISpot在初次接受实验的小鼠中GAd/MVA免疫后测量的T细胞应答的分析。

[0041] 图14A-14F是如实例8中所描述,接受无处理、用单独NOUS-020GAd疫苗处理、用单独RSLAIL-2处理或用NOUS-020GAd疫苗与RSLAIL-2的组合处理的Balb/c小鼠中CT26肿瘤生长的图。图14A提供对照组(未处理)的结果;图14B展示用单独GAd疫苗处理的小鼠中CT26肿瘤的体积;图14C和14D展示用RSLAIL-2(分别在第0天或第7天给予)以及分别在第0天同时(图14E)或依次给予(图14F)RSLAIL-2和GAd处理的小鼠中CT26肿瘤的体积。

[0042] 图15A是用单独RSLAIL-2处理的具有已确立肿瘤的个体小鼠中肿瘤体积的图;图15B是如实例9中所描述用NOUS-020疫苗与RSLAIL-2的组合处理的具有已确立肿瘤的个体小鼠中肿瘤体积的图。CR=完全应答PR=部分应答(>40%肿瘤缩小)。

[0043] 图16A和16B提供如在实例9中所描述,对分别用(i)仅RSLAIL-2以及(ii)NOUS-020和RSLAIL-2处理有反应的小鼠的脾脏中测量的第54天的免疫应答的分析。通过ICS定量针对前5种免疫原性新抗原的池和针对由疫苗编码的剩余15种新抗原的T细胞应答。虚线和实线代表分别对CD4和CD8T细胞的阳性应答的阈值。

[0044] 图17A是示出对于实例10中描述的研究组中的每个,携带已确立的CT26肿瘤的BALB/c小鼠中的平均肿瘤大小(mm^2)的图。图17B是展示对于在实例10中详细描述的研究组中的每个,携带已确立的皮下CT26肿瘤的BALB/c小鼠中的处理过程内的存活百分比的图。与这些图一致,与其他处理组相比,AH1疫苗/RSLAIL-2处理组的存活显著延长。

[0045] 图18A是指示携带已确立的皮下CT26肿瘤并如实例10中针对研究组中的每个所描述处理的BALB/c小鼠的脾组织中CD8+T细胞与Treg的比率的条形图。图18B是指示携带已确立的皮下CT26肿瘤并如实例10中针对研究组中的每个所描述处理的BALB/c小鼠的肿瘤组织中CD8+T细胞与Treg的比率的条形图。

具体实施方式

术语

[0046] 如在本说明书中所使用的,单数形式“一个/种(a/an)”和“该”包括复数个指示物,除非上下文中另外明确规定。

[0047] 在描述和要求本披露的某些特征时,除非另外指明,否则将依据以下所描述的定

义使用以下术语。

[0048] 应当理解,无论在什么情况下在此用语言“包含”描述方面时,还提供了关于“由……组成”和/或“主要由……组成”描述的其他类似方面。

[0049] “水溶性的非肽聚合物”是指在室温下在水中至少35% (按重量计) 可溶的聚合物。然而,优选的水溶性非肽聚合物是在水中优选大于70% (按重量计)、且更优选大于95% (按重量计) 可溶的。典型地,“水溶性”聚合物的未过滤的水性制剂传输由相同溶液在过滤后传输的光的量的至少75%。优选地,这种未过滤的水性制剂传输由相同溶液在过滤后传输的光的量的至少95%。最优选的是在水中至少95% (按重量计) 可溶或在水中完全可溶的水溶性聚合物。关于为“非肽的”,聚合物当含有少于35% (按重量计) 的氨基酸残基时是非肽的。

[0050] 术语“单体”、“单体亚单元”和“单体单元”在此可互换使用并且是指聚合物的基本结构单元之一。在均聚物的情况下,单一的重复结构单元形成该聚合物。在共聚物的情况下,两个或更多个结构单元重复出现—以一种模式或随机地—以形成该聚合物。与本发明相结合使用的优选聚合物是均聚物。该水溶性的非肽聚合物包含串联附接以形成单体链的一个或多个单体。

[0051] 如在此使用的“PEG”和“聚乙二醇”意指包括任何水溶性的聚(环氧乙烷)。除非另外指明,“PEG聚合物”或聚乙二醇是这样一种物质,其中基本上所有的(优选所有的)单体亚单元是环氧乙烷亚单元,但是,该聚合物可以含有不同的封端部分或官能团,例如用于共轭。用于在本发明中使用的PEG聚合物将包括两种以下结构之一:“ $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ ”或“ $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n-1}\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ”,这取决于末端的一个或多个氧是否被置换(例如在合成转化期间)。如上所述,对于这些PEG聚合物,该变量(n)的范围是从约3至4000,并且整个PEG的末端基团和架构可以变化。

[0052] 关于聚合物的几何学或总体结构而言的“分支的”是指具有从分支点或中心结构特征伸出的两个或更多个聚合物“臂”或“链”的聚合物。

[0053] 在水溶性聚合物(如PEG)的背景下,分子量可以表示为数均分子量或重均分子量。除非另外指明,否则所有对分子量的提及在此均指重均分子量。两种分子量测定(数均与重均分子量)均可以使用凝胶渗透色谱法或其他液相色谱技术来测量。也可以使用用于测量分子量值的其他方法,如使用端基分析或测量依数性(colligative property)(例如凝固点降低、沸点升高或渗透压)来确定数均分子量或使用光散射技术、超速离心法或粘度测定法来确定重均分子量。PEG聚合物典型地是多分散的(即,这些聚合物的数均分子量与重均分子量不相等),具有优选小于约1.2、更优选小于约1.15、仍然更优选小于约1.10、又仍然更优选小于约1.05并且最优选小于约1.03的低多分散性值。

[0054] “生理学上可裂解的”或“可水解的”或“可降解的”键是与水在生理学条件下进行反应(即,被水解)的相对不稳定的键。键在水中水解的趋势可能不仅取决于在给定分子之内连接两个原子的键联的一般类型,而且取决于附接至这些原子的取代基。适当的水解不稳定的或弱的键联可以包括但不限于羧酸酯、磷酸酯、酸酐、缩醛、缩酮、酰氧基烷基醚、亚胺、原酸酯、肽、寡核苷酸、硫酸酯以及碳酸酯。

[0055] “酶可降解的键联”意指经受一种或多种酶降解的键联。

[0056] “稳定的”键联或键是指在水中基本上稳定的化学键,也就是说在生理条件下经一段延长的时间没有经受任何明显程度的水解。水解稳定的键联的实例通常可以包括但不限

于以下：碳-碳键（例如，在脂族链中）、醚、酰胺、胺等。大体上，稳定的键联是在生理条件下表现出小于约1%-2%的每日水解率的键联。代表性化学键的水解速率可以在大多数标准化学教科书中找到。

[0057] 共价的“可释放”键联（例如，在与活性部分如白细胞介素-2共价附接的聚乙二醇的背景下）是在生理条件下通过任何适合的释放机制从活性部分如白细胞介素-2释放或脱离聚乙二醇聚合物部分的键联。

[0058] 提及如在此描述的长效IL-2R $\alpha\beta$ 偏向性激动剂意指包括其药学上可接受的盐形式。

[0059] “基本上”或“实质上”意指几乎全部地或完全地，例如给定量的95%或更大。

[0060] 类似地，如在此使用的“约”或“大约”意指在给定量的加或减5%内。

[0061] “药学上可接受的赋形剂”或“药学上可接受的载体”是指可以包含在在此描述的组合物中并且对于受试者不会引起显著不良毒理学效应的组分。

[0062] 如在此使用的术语“患者”或“受试者”是指患有或易患可以通过给予如在此提供的化合物或组合物或组合来预防或治疗的病状（如癌症）的活生物体，并且包括人和动物两者。受试者包括但不限于哺乳动物（例如，鼠科动物、猿猴、马科动物、牛科动物、猪科动物、犬科动物、猫科动物等），并且优选是人。

[0063] “给予”是指使用本领域技术人员已知的各种方法和递送系统中的任一种将治疗剂引入受试者。示例性给予途径包括静脉内、肌肉内、皮下、腹膜内、脊柱或其他胃肠外给予途径，例如通过注射或输注。如在此使用的短语“胃肠外给予”意指除了肠给予和局部给予之外，通常通过注射的给予方式，并且包括但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、淋巴管内、病灶内、囊内、眼眶内、心脏内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外以及胸骨内注射和输注。治疗剂也可以经由非胃肠外途径或口服给予。其他非胃肠外途径包括局部、表皮或粘膜给予途径，例如鼻内、经阴道、经直肠、舌下或局部。

[0064] 治疗剂的“治疗有效量”或“治疗有效剂量”是当单独或与另一种治疗剂组合使用时 (i) 保护受试者免于疾病的发作或 (ii) 促进通过疾病症状的严重程度降低、无疾病症状期的频率和持续时间的增加、或由于疾病折磨所致的损伤或残疾的预防而证实的疾病消退的该药剂的任何量。可以使用熟练的从业人员已知的各种方法如在人受试者中、在预测人中功效的动物模型系统中或通过测定体外测定中治疗剂的活性来评价该治疗剂促进疾病消退的能力。

[0065] 作为治疗肿瘤的实例，药剂或药剂组合的治疗有效量是相对于未治疗的受试者使细胞生长或肿瘤生长抑制至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、或至少约80%、至少约90%、至少约95%、或至少约100%的量。优选地，治疗有效量是使细胞生长或肿瘤生长抑制至少约30%的量。

概述

[0066] 为了解决与当前抗癌疫苗策略相关的至少一些缺点，如例如弱免疫应答，在此提供了一种包括向患有癌症的受试者给予疫苗和IL-2R β 活化量的长效IL-2R β 偏向性激动剂的方法。虽然已经探索了如IL-2的细胞因子以及其他佐剂以改善对癌症疫苗的抗肿瘤应答，但需要进一步的增强以提供持久的、可再现的且有效的基于疫苗的癌症疗法。因此，本

披露至少部分地基于包含癌症疫苗和长效IL-2R激动剂且更具体地IL-2R β 偏向性激动剂的特别有益的治疗组合的发现。

[0067] IL-2通过含有 α (IL2R α , CD25)、 β (IL2R β , CD122) 和常见 γ 链受体 (γ_c , CD132) 的受体-信号传导复合物刺激免疫细胞增殖和活化。在高剂量下, IL2结合至异二聚体IL2R β γ 受体, 从而导致肿瘤杀伤CD8+记忆效应T (CD8T) 细胞的所希望的扩增。然而, IL2还以更大的亲和力结合至其异三聚体受体IL2R $\alpha\beta$ γ , 其扩增免疫遏制性CD4+、CD25+调控性T细胞 (Treg), 这可能导致对癌症免疫疗法的不良作用。因此, 为了克服与IL-2增强的抗癌疫苗接种策略相关的一个或多个缺点, 在此提供了一种治疗模式, 该治疗模式将治疗性癌症疫苗接种与IL-2R $\alpha\beta$ 偏向性激动剂、并且具体地说长效IL-2R $\alpha\beta$ 偏向性激动剂的给予组合。不受理论束缚, 本申请人已经发现通过利用长效IL-2化合物, 其中与负责活化免疫遏制性Treg的IL2R α 亚基相互作用的区域, 即长效IL-2R $\alpha\beta$ 偏向性激动剂被掩蔽(即, 其活性被遏制或抑制), 可以选择性地扩增疫苗接种诱导的T细胞应答以实现优异的治疗功效, 如将从本披露和支持实例中变得显而易见。

疫苗

[0068] 在此提供的治疗方法包括给予疫苗, 即用于刺激癌症特异性免疫应答, 例如先天性和适应性免疫应答, 以产生针对癌症的宿主免疫。在此提供的组合物和方法尤其可用于临床应用和研究应用两者中。可以根据在此描述的方法给予各种癌症免疫原, 并且本发明在此方面不受限制。申请人的观点是, 成功的疫苗接种结果可以经由IL-2途径(即, 经由与疫苗一起共同给予长效IL-2R $\alpha\beta$ 偏向性激动剂) 以由于癌症疫苗和长效IL-2R $\alpha\beta$ 偏向性激动剂的互补性质来模拟所希望的T细胞应答而实现。也就是说, 可以采用长效IL-2R $\alpha\beta$ 偏向性激动剂与疫苗接种的组合的给予来实现以下中的任何一种或多种: (i) 大大增强多类疫苗的功效和效用, (ii) 促进强烈的T细胞应答, 以及 (iii) 增加针对高、中和低亲和力抗原的免疫活性。支持实例说明这种方法的效用。更具体地说, 如在此说明的, 长效IL-2R $\alpha\beta$ 偏向性激动剂(即RSLAIL-2) 与疫苗接种组合以刺激癌症特异性免疫应答可有效提供以下中的一种或多种: 相对于当单独地(即, 单独) 给予时的疫苗接种或长效IL-2R $\alpha\beta$ 偏向性激动剂, 肿瘤组织中显著增强的抗肿瘤作用、改善的存活以及扩增的pme1-1CD8+T细胞增殖。

[0069] 说明性疫苗包括但不限于例如抗原疫苗、全细胞疫苗、树突细胞疫苗和DNA疫苗。此外, 取决于特定类型的疫苗, 疫苗组合物可以包含一种或多种已知增强受试者对该疫苗的免疫应答的适合佐剂。该疫苗可以是例如基于细胞的, 即使用来自患者的自身癌细胞的细胞产生以鉴定并获得抗原。示例性疫苗包括基于肿瘤细胞的疫苗和基于树突细胞的疫苗, 其中来自受试者的活化的免疫细胞与其他蛋白质一起被递送回至同一受试者, 以进一步促进这些肿瘤抗原引发的免疫细胞的免疫活化。基于肿瘤细胞的疫苗包括全肿瘤细胞和基因修饰的肿瘤细胞。可以任选地加工全肿瘤细胞疫苗以增强抗原呈递, 例如通过照射肿瘤细胞或肿瘤溶解产物)。根据所用疫苗的类型, 疫苗给予还可以伴随佐剂, 如卡介苗 (BCG) 或钥孔虫血蓝蛋白 (KLH)。也可以使用质粒DNA疫苗, 并且可以经由直接注射或生物弹射击法 (biolistically) 给予。还考虑使用肽疫苗、病毒基因转移载体疫苗和抗原修饰的树突细胞 (DC)。

[0070] 在一些实施例中, 该疫苗是基于治疗性癌症肽的疫苗。肽疫苗可以使用已知序列或从来自受试者的自身肿瘤的分离抗原产生, 并且包括新抗原和修饰的抗原。说明性的基

于抗原的疫苗包括其中抗原是肿瘤特异性抗原的那些疫苗。例如,该肿瘤特异性抗原可以选择自癌-睾丸抗原、分化抗原和广泛存在的过表达的肿瘤相关抗原等。当在本发明方法中使用,基于来自肿瘤相关抗原的肽的重组肽疫苗可以与佐剂或免疫调节剂一起给予或配制。用于基于肽的疫苗的说明性抗原包括但不限于以下,因为此列表意指仅说明性的。例如,肽疫苗可以包含由通常在成体组织中沉默、但在肿瘤细胞中转录再活化的基因编码的癌-睾丸抗原,如MAGE、BAGE、NY-ESO-1和SSX-2。可替代地,肽疫苗可以包含组织分化相关抗原(即正常组织来源的抗原)并且由正常组织和肿瘤组织两者共有。例如,该疫苗可以包含黑素瘤相关抗原,如gp100、Melan-A/Mart-1、MAGE-3或酪氨酸酶;或者可以包含前列腺癌抗原,如PSA或PAP。该疫苗可以包含乳腺癌相关抗原,如乳房珠蛋白-A。可以包含在用于本发明方法中的疫苗中的其他肿瘤抗原包括例如CEA、MUC-1、HER1/Neu、hTERT、ras、以及B-raf。可以用于疫苗的其他适合的抗原包括与癌症干细胞或EMT过程相关的SOX-2和OCT-4。

[0071] 抗原疫苗包括多抗原疫苗和单抗原疫苗。示例性癌抗原可以包括具有从约5至约30个氨基酸、或从约6至25个氨基酸、或从约8至20个氨基酸的肽。

[0072] 如上所描述,免疫刺激佐剂(不同于RSLAIL-2)可以用于疫苗,特别是基于肿瘤相关抗原的疫苗中以帮助产生有效的免疫应答。例如,疫苗可以并入病原体相关分子模式(PAMP)以帮助提高免疫力。另外适合的佐剂包括单磷酸脂质A或其他脂多糖;toll样受体(TLR)激动剂,如例如咪喹莫特、瑞喹莫德(R-848)、TLR3、IM0-8400和林托莫德(rintatolimod)。适合使用的另外佐剂包括热休克蛋白。

[0073] 还适用于在此提供的方法是基因疫苗。基因疫苗典型地使用携带表达盒的病毒或质粒DNA载体。在给予时,它们转染体细胞或树突细胞作为炎症应答的一部分,以由此导致交叉引发或直接抗原呈递。在一些实施例中,基因疫苗是在一次免疫中提供多种抗原的递送的疫苗。基因疫苗包括DNA疫苗、RNA疫苗和基于病毒的疫苗。

[0074] 用于本发明方法中的DNA疫苗是被构建用于递送和表达肿瘤抗原的细菌质粒。DNA疫苗可以通过任何适合的给予方式,例如皮下或皮内注射给予,但也可以直接注射到淋巴结中。另外的递送模式包括例如基因枪、电穿孔、超声、激光、脂质体、微颗粒和纳米颗粒。

[0075] 更具体地说,在一些实施例中,该疫苗包含新抗原或多种新抗原。也就是说,在一些实施例中,该疫苗是基于新抗原的疫苗。这种方法在在此的实例6-9中使用鼠类癌症模型举例说明。例如,在一些实施例中,基于新抗原的疫苗(NBV)组合物可以串联编码多种癌症新抗原,其中每种新抗原是源自癌细胞中突变的蛋白质的多肽片段。例如,新抗原性疫苗可以包含第一载体,该第一载体包含编码各自在癌细胞中突变的蛋白质的多个免疫原性多肽片段的核酸构建体,其中每个免疫原性多肽片段包含侧接可变数量的来自原始蛋白质的野生型氨基酸的一个或多个突变氨基酸,并且每个多肽片段头尾相连以形成免疫原性多肽。形成免疫原性多肽的每个免疫原性多肽片段的长度可以变化。

[0076] 也可以使用病毒基因转移载体疫苗;在此类疫苗中,使用重组工程化的病毒、酵母、细菌等来将癌症特异性蛋白质引入患者的免疫细胞。在基于载体的方法中,该载体可以是肿瘤溶解性的或非肿瘤溶解性的,由于例如其固有的免疫刺激性质,该载体可以提高疫苗的效率。说明性的基于病毒的载体包括来自痘病毒科的那些载体,如牛痘、修饰的牛痘毒株安卡拉和禽痘病毒。还适合使用的是癌症疫苗PROSTVAC,其含有具有复制能力的牛痘引发载体和无复制能力的鸡痘加强载体。每种载体含有PSA的转基因和三种共刺激分子CD80、

CD54和CD58,统称为TRICOM。其他适合的基于载体的癌症疫苗包括Trovax和TG4010(编码MUC1抗原和IL-2)。

[0077] 用于使用的另外疫苗包括基于细菌和酵母的疫苗,如重组单核细胞增多性李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。

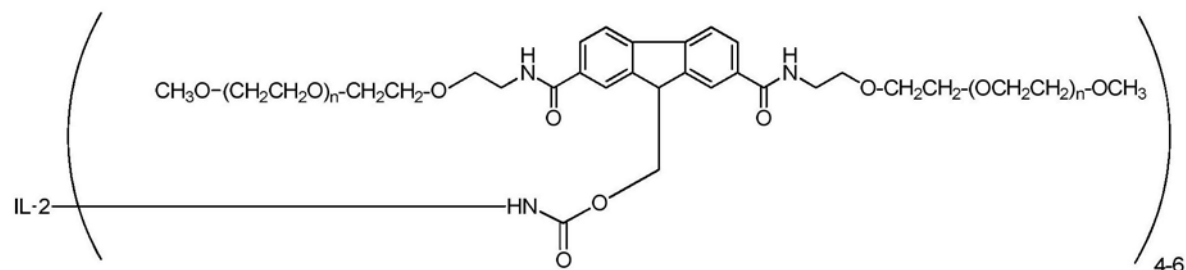
[0078] 如先前所描述,前述疫苗可以与佐剂和其他免疫加强剂组合和/或一起配制以增加功效。此外,取决于特定疫苗,给予可以是肿瘤内或非肿瘤内(即,全身)。在一些实施例中,与长效IL-2R β 偏向性激动剂一起给予的疫苗不是糖蛋白100(GP100)疫苗。在一些其他实施例中,该疫苗不是作为包含抗CD-40激动剂和TLR7激动剂的配制品混合物的组分给予的gp100疫苗。

[0079] 癌症疫苗可以通过如在此描述的任何适合的给予途径给予,例如皮内、静脉内、皮下、结内、淋巴管内、肿瘤内等。

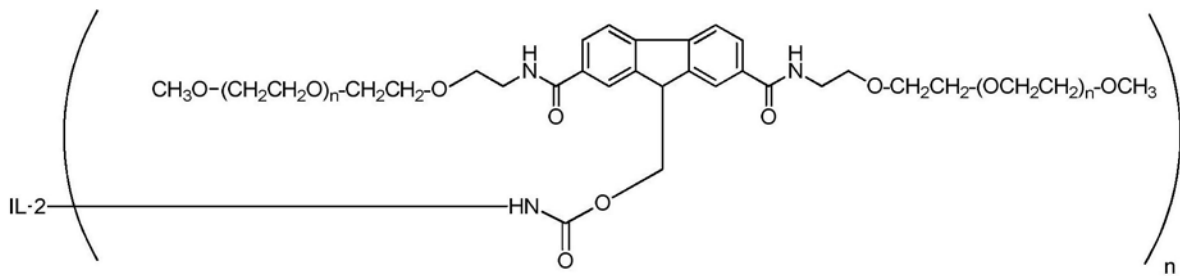
长效IL-2R β 偏向性激动剂

[0080] 在此描述的方法、配制品、试剂盒等涉及给予长效IL-2R β -偏向性激动剂。在此方面,本披露不限于任何特定的长效IL-2R β 偏向性激动剂,只要该激动剂表现出的对IL-2R β 的体外结合亲和力比在相同体外模型中对IL-2R $\alpha\beta$ 的结合亲和力大至少5倍(更优选地大至少10倍),并且具有比IL-2大至少10倍的有效体内半衰期(基于IL-2的体内消失的半衰期)。作为举例,有可能测量针对IL-2的结合亲和力作为标准。在此方面,在此的实例1中提及的RSLAIL-2表现出相对于IL-2,对IL-2R $\alpha\beta$ 的亲合力的约60倍降低;但是相对于IL-2,对IL-2R β 的亲合力的仅约5倍降低。

[0081] 长效IL-2R β 偏向性激动剂的非限制性实例描述于国际专利公开号WO 2012/065086和WO 2015/125159中。示例性长效IL-2R β 偏向性激动剂是本申请实例1中引提及的RSLAIL-2,其中可释放的PEG是基于如下所示的2,7,9-取代的茛,其中聚(乙二醇)链经由酰胺键联(茛-C(O)-NH~)从茛环上的2-和7-位置延伸,并且经由与经由亚甲基(-CH₂-)附接至茛环的9-位置的氨基甲酸酯氮原子附接而可释放的共价附接至IL-2。在此方面,RSLAIL-2是包含由下式所涵盖的化合物的组合物:



其中IL-2是IL-2的残基;以及其药学上可接受的盐,其中“n”是从约3至约4000的整数。如上式中所示,IL-2分子优选地具有如上所示与其共价附接的4、5或6个分支聚乙二醇部分。在一个或多个实施例中,该组合物含有不超过10%(基于摩尔量)、并且优选地不超过5%(基于摩尔量)的由下式所涵盖的化合物



其中IL-2是IL-2的残基，(n) (是指与IL-2附接的聚乙二醇部分的数量) 是选自下组的整数，该组由以下组成：1、2、3、7和>7；以及其药学上可接受的盐。在一些实施例中，RSLAIL-2具有平均约六个与IL-2附接的聚乙二醇部分。

[0082] 为了确定组合物(如在此描述的RSLAIL-2组合物)的平均聚乙二醇化程度，典型地通过如二辛可宁酸(BCA)测定或通过UV分析的方法定量蛋白质，以确定样品中蛋白质的摩尔数。然后通过使样品暴露于释放PEG部分的条件而释放PEG部分，并且然后定量所释放的PEG(例如，通过BCA或UV)并与蛋白质摩尔数相关以确定平均聚乙二醇化程度。

[0083] 在一些其他实施例中，RSLAIL-2通常被认为是无活性的前药，即在给予时无活性，并且凭借在体内缓慢释放聚乙二醇部分，从而提供白细胞介素-2的活性共轭形式，而有效在肿瘤部位达到持续浓度。如实例2中提供的，RSLAIL-2可以被认为是CD-122(也称为IL-2R β)激动剂，即，能够活化或刺激CD-122(IL-2R β)的分子。此外，RSLAIL-2可以被认为是选择性地结合并活化IL-2R β γ 超过IL-2R α β γ 的CD-122激动剂。

[0084] RSLAIL-2的另外的示例性组合物包含根据以上式的化合物，其中该分子的总体聚合物部分具有从约250道尔顿至约90,000道尔顿范围内的重均分子量。另外适合的范围包括选自约1,000道尔顿至约60,000道尔顿的范围、从约5,000道尔顿至约60,000道尔顿的范围、约10,000道尔顿至约55,000道尔顿的范围、从约15,000道尔顿至约50,000道尔顿的范围、以及从约20,000道尔顿至约50,000道尔顿的范围内的重均分子量。

[0085] 聚乙二醇聚合物部分的另外的说明性重均分子量包括约200道尔顿、约300道尔顿、约400道尔顿、约500道尔顿、约600道尔顿、约700道尔顿、约750道尔顿、约800道尔顿、约900道尔顿、约1,000道尔顿、约1,500道尔顿、约2,000道尔顿、约2,200道尔顿、约2,500道尔顿、约3,000道尔顿、约4,000道尔顿、约4,400道尔顿、约4,500道尔顿、约5,000道尔顿、约5,500道尔顿、约6,000道尔顿、约7,000道尔顿、约7,500道尔顿、约8,000道尔顿、约9,000道尔顿、约10,000道尔顿、约11,000道尔顿、约12,000道尔顿、约13,000道尔顿、约14,000道尔顿、约15,000道尔顿、约20,000道尔顿、约22,500道尔顿、约25,000道尔顿、约30,000道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿、约50,000道尔顿、约55,000道尔顿、约60,000道尔顿、约65,000道尔顿、约70,000道尔顿、以及约75,000道尔顿。在一些实施例中，聚乙二醇聚合物的重均分子量是约20,000道尔顿。

[0086] 如上所述，长效IL-2R β 偏向性激动剂可以呈药学上可接受的盐的形式。典型地，此类盐通过与药学上可接受的酸或酸等效物反应而形成。术语“药学上可接受的盐”在此方面通常将是指相对无毒的无机和有机酸加成盐。这些盐可以在给予媒介物或剂型制造过程中原位制备，或通过将如在此描述的长效白细胞介素-2与适合有机酸或无机酸单独反应并分离因此形成的盐来制备。代表性盐包括氢溴酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、硝酸盐、乙酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、月桂酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲

苯磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、萘酸盐 (naphylate)、草酸盐、甲磺酸盐、葡庚糖酸盐、乳糖醛酸盐、以及月桂基磺酸盐等等。(参见例如, Berge 等人 (1977) "Pharmaceutical Salts [药用盐]", J. Pharm. Sci. [药物科学杂志] 66:1-19)。因此, 如所描述的盐可以衍生自无机酸, 这些无机酸如盐酸、氢溴酸、硫酸、氨基磺酸、磷酸、硝酸等; 或由有机酸制备, 这些有机酸如乙酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、棕榈酸、马来酸、羟基马来酸、苯基乙酸、谷氨酸、苯甲酸、水杨酸、磺胺酸、2-乙酰氧基苯甲酸、富马酸、甲苯磺酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、草酸、衣康酸等。

[0087] 关于前述 IL-2R β 偏向性激动剂, 如在此使用的术语 "IL-2" 是指具有人 IL-2 活性的部分。在 IL-2 残基的背景下, 术语 '残基' 意指 IL-2 分子在一个或多个共价附接位点处共价附接至聚合如聚乙二醇之后保留的部分, 如以上式中所示。应了解的是, 当未修饰 IL-2 附接至聚合物 (如聚乙二醇) 时, 由于存在与这种或这些聚合物的键联相关的一个或多个共价键而使 IL-2 轻微改变。将这种附接至另一个分子的 IL-2 的轻微改变形式称为 IL-2 的 "残基"。

[0088] 例如, 具有对应于国际专利公开号 WO 2012/065086 中描述的 SEQ ID NO:1 至 4 中任一者的氨基酸序列的蛋白质是示例性 IL-2 蛋白质, 如与其基本上同源的任何蛋白质或多肽一样。在此还提供了这些序列。术语基本上同源意指特定主题序列 (例如突变序列) 因一个或多个取代、缺失或添加而不同于参考序列, 其净效应不导致在该参考序列与主题序列之间不利的官能差异。为了在此的目的, 具有大于 95% 的同源性、等效的生物活性 (不过不必是等效强度的生物活性)、以及等效的表达特征的序列被认为是基本上同源的。出于确定同源性的目的, 应当忽略成熟序列的截短。如在此所使用, 术语 "IL-2" 包括例如通过位点定向诱变而有意修饰或通过突变而偶然修饰的此类蛋白质。这些术语还包括具有从 1 至 6 个额外糖基化位点的类似物、在蛋白质的羧基末端处具有至少一个额外氨基酸 (其中该一个或多个额外氨基酸包括至少一个糖基化位点) 的类似物以及具有包含至少一个糖基化位点的氨基酸序列的类似物。该术语包括天然部分和重组产生的部分。另外, IL-2 可以来源于人类来源、动物来源以及植物来源。一种示例性和优选的 IL-2 是称为阿地白介素的重组 IL-2 (SEQ ID NO:3)。

[0089] 常规方法 (如涉及放射性标记化合物、体内给予该化合物以及确定其清除率的那些方法) 可以用于确定提出为长效 IL-2R β 偏向性激动剂的化合物是否是 "长效的"。出于在此的目的, IL-2R β 偏向性激动剂的长效性质典型地使用流式细胞术来测定以测量在给予有待在小鼠中评价的激动剂之后的不同时间点淋巴细胞中的 STAT5 磷酸化。作为参考, 信号在 IL-2 的情况下丢失约 24 小时, 但是持续时间段大于长效 IL-2R β 偏向性激动剂的时间。作为说明, 对于 RSLAIL-2 组合物, 信号持续数天。

[0090] 现在考虑如在此描述的长效激动剂的 IL-2R β 偏向性, 实例 2 提供与 RSLAIL-2 的示例性组合物的受体偏向性有关的体外数据和体内数据两者。如实例 2 中所描述, 在鼠黑素瘤肿瘤模型中, 当与 IL-2 比较时, RSLAIL-2 的 CD8/ 调控性 T 细胞的比率支持 IL-2 受体 β 相对于 IL2 受体 α 的优先活化。示例性长效 IL-2R β 偏向性激动剂如 RSLAIL-2 例如可有效相对于 Treg 优先活化和扩增效应 CD8+T 细胞和 NK 细胞。

[0091] 此外, 代表性的长效 IL-2R β 偏向性激动剂如 RSLAIL-2 相对于 IL-2 提供增加的肿瘤暴露并且优选地显著增强的肿瘤暴露, 例如当针对 IL-2 的等效物标准化时暴露增加至少 50 倍、或暴露增加至少 100 倍、或暴露增加至少 200 倍、或暴露增加至少 300 倍、或暴露增加至少

400倍、或暴露增加至少500倍。作为说明,实例3中描述了RSLAIL-2在小鼠黑素瘤肿瘤模型中的抗肿瘤活性。如其中所描述,发现RSLAIL-2相对于IL-2提供显著增强的肿瘤暴露,例如500倍(基于IL-2等效物标准化)。

[0092] 基于如在此描述的长效IL-2R β 偏向性激动剂的至少一种或多种特征,在此提供了通过给予长效IL-2化合物而有效选择性地扩增癌症患者中的疫苗接种诱导的T细胞应答的方法,其中与负责活化免疫遏制性Treg的IL2R α 亚基相互作用的区域被掩蔽,以由此实现优异的治疗功效。

[0093] 根据在此描述的方法、组合物和试剂盒,该长效IL-2R β 偏向性激动剂以IL-2R β 活化量提供。本领域的普通技术人员可以确定多少给定的长效IL-2R β 偏向性激动剂足以提供在IL-2R β 处的临床相关的激动活性。例如,本领域的普通技术人员可以参考文献和/或给予一系列增加量的长效IL-2R β 偏向性激动剂并且确定哪个或哪些量提供IL-2R β 的临床上有有效的激动活性。可替代地,长效IL-2R β 偏向性激动剂的活化量可以使用以上描述的体内STAT5磷酸化测定来确定(在给予之后体内测定),其中足以在大于10%NK细胞的峰值下诱导STAT5磷酸化的量被视为活化量。

[0094] 然而,在一个或多个实例中,该IL-2R β 活化量是以蛋白质的量表达的由以下范围中的一个或多个所涵盖的量:从约0.01至100mg/kg;从约0.01mg/kg至约75mg/kg;从约0.02mg/kg至约60mg/kg;从约0.03mg/kg至约50mg/kg;从约0.05mg/kg至约40mg/kg;从约0.05mg/kg至约30mg/kg;从约0.05mg/kg至约25mg/kg;从约0.05mg/kg至约15mg/kg;从约0.05mg/kg至约10mg/kg;从约0.05mg/kg至约5mg/kg;从约0.05mg/kg至约1mg/kg。在一些实施例中,长效IL-2R β 偏向性激动剂以小于或等于0.7mg/kg的剂量给予。具体的说明性给药范围包括例如,从约0.1mg/kg至约10mg/kg、或从约0.2mg/kg至约7mg/kg或从约0.2mg/kg至小于约0.7mg/kg。

[0095] 为了确认,关于长效IL-2R β 偏向性激动剂,活化的量和程度可以广泛变化,并且当与给予治疗性癌症疫苗结合时仍然有效。也就是说,长效IL-2R β 偏向性激动剂的仅表现出在IL-2R β 处的最小激动活性持续足够延长的时间段的量仍然可以是长效IL-2R β 偏向性激动剂,只要当与癌症疫苗一起给予时,在此描述的方法、组合物和试剂盒产生临床上有意义的应答。在一些情况下,由于(例如)协同相互作用和应答,当伴随抗癌疫苗接种时,可能仅需要IL-2R β 的最小激动活性。

[0096] 在此描述的治疗方法可以持续长达监督患者的护理的临床医生认为该治疗方法有效的的时间。指示该治疗方法有效的非限制性参数包括以下中的任何一个或多个:肿瘤缩小(就重量和/或体积而言);个体肿瘤集落的数量减少;肿瘤消除;以及无进展存活。肿瘤大小的变化可以通过任何适合的方法如成像来确定。可以采用各种诊断成像模态,如计算机断层摄影术(CT扫描)、双能CDT、正电子发射断层摄影术和MRI。

[0097] 疫苗和长效IL-2R β 偏向性激动剂的实际剂量以及与在此描述的方法、组合物和试剂盒相关的给药方案将根据受试者的年龄、体重和一般状况以及所治疗的癌症的类型和进展、医疗保健专业人员的判断、以及有待给予的特定疫苗和长效IL-2R β 偏向性激动剂而变化。

[0098] 关于给予该疫苗和长效IL-2R β 偏向性激动剂的频率和时间表,本领域普通技术人员将能够确定适当的频率。例如,在治疗周期中,临床医生可以决定以单剂量或一系列剂量

(例如,在数天或数周的过程内)给予疫苗。长效IL-2R β 偏向性激动剂与疫苗同时、或在疫苗接种之前、或在给予癌症疫苗之后给予。例如,在一些治疗方式中,长效IL-2R β 偏向性激动剂在疫苗给予的7天内(例如,在第1天、第2天、第3天、第4天、第5天、第6天或第7天中的任一天)给予。在一些情况下,长效IL-2R β 偏向性激动剂在疫苗接种的4天内(例如,在第1天、第2天、第3天或第4天中的任一天)给予。基于IL-2R β 偏向性激动剂的长效性质,这种化合物典型地相对不频繁地给予(例如,每三周一、每两周一、每8-10天一次、每周一次等)。

[0099] 与治疗过程相关的示例性时间长度包括约一周;约两周;约三周;约四周;约五周;约六周;约七周;约八周;约九周;约十周;约十一周;约十二周;约十三周;约十四周;约十五周;约十六周;约十七周;约十八周;约十九周;约二十周;约二十一;约二十二周;约二十三周;约二十四周;约七个月;约八个月;约九个月;约十个月;约十一个月;约十二个月;约十三个月;约十四个月;约十五个月;约十六个月;约十七个月;约十八个月;约十九个月;约二十个月;约二十一个月;约二十二个月;约二十三个月;约二十四个月;约三十个月;约三年;约四年、以及约五年。

[0100] 在此描述的治疗方法典型地持续长达监督患者的护理的临床医生认为该治疗方法有效(即该患者响应于治疗)的时间。指示该治疗方法有效的非限制性参数可以包括以下中的一个或多个:肿瘤缩小(就重量和/或体积和/或视觉外观而言);个体肿瘤集落的数量减少;肿瘤消除;无进展存活;通过适合的肿瘤标志物(如果适用)的适当应答、NK(自然杀伤)细胞的数量增加、T细胞的数量增加、记忆T细胞的数量增加、中心记忆T细胞的数量增加、调控性T细胞如CD4+Treg、CD25+Treg和FoxP3+Treg的数量减少等。

[0101] 在此提供的方法可用于(除其他事项外)治疗患有癌症的患者。例如,患者可以对单独以及长效IL-2R β 偏向性激动剂组合的疫苗有应答,但是对组合的应答更强。作为进一步举例,患者可以对疫苗或长效IL-2R β 偏向性激动剂无应答,但对组合有应答。作为仍然进一步举例,患者可以对单独疫苗或长效IL-2R β 偏向性激动剂中的任一种无应答,但对组合有应答。

[0102] 例如,疫苗和/或长效IL-2R β 偏向性激动剂的给予典型地经由注射。还考虑了其他给药方式,如经肺、经鼻、经颊、经直肠、经舌下、以及经皮给药。如在此所使用,术语“胃肠外”包括皮下、静脉内、动脉内、肿瘤内、淋巴管内、腹膜内、心脏内、鞘内和肌肉内注射,以及输注注射。如先前所描述,疫苗和长效IL-2R β 偏向性激动剂可以分开给予。可替代地,如果希望疫苗和长效IL-2R β 偏向性激动剂的给予是同时的,作为初始剂量或在整个治疗过程中或在给药方案的各个阶段--并且该疫苗和长效IL-2R β 偏向性激动剂是一起且在给定配制品中相容--则同时给予可以经由给予单一剂型/配制品(例如,静脉内给予含有两种免疫组分的静脉内配制品)来实现。本领域的普通技术人员可以通过常规测试确定两种此类组分是否一起且在给定配制品中相容。例如,给予至患者可以通过注射包含IL-2R β 偏向性激动剂和稀释剂的组合物来实现。另外,给予至患者可以通过注射癌症疫苗和稀释剂来实现。例如,给予可以通过注射包含IL-2R β 偏向性激动剂、疫苗和稀释剂的组合物来实现。关于可能的稀释剂,该稀释剂可以选自下组,该组由以下组成:抑菌注射用水、5%葡萄糖水溶液、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液、乳酸化林格氏溶液、盐水、无菌水、去离子水、以及其组合。本领域的普通技术人员可以通过常规测试确定两种给定药理学组分是否一起在给定配制品中相容。

[0103] 在此描述的治疗组合,即长效IL-2R β 偏向性激动剂和疫苗可以按试剂盒的形式提供。如上所述,这些组分可以包含在单一组合中,任选地伴有一种或多种药学上可接受的赋形剂,或者可以提供在单独的容器中,其中试剂盒典型地包括使用说明书。适合的药学上可接受的赋形剂包括例如在Handbook of Pharmaceutical Excipients[药物赋形剂手册],第7版,Rowe,R.C.,编辑,Pharmaceutical Press[医药出版社],2012中描述的那些。这些试剂盒组分(例如包含疫苗和长效IL-2R β 偏向性激动剂的组合)可以呈液体或固体形式。在某些优选的实施例中,该疫苗和长效IL-2R β 偏向性激动剂两者均呈固体形式。优选的固体形式是为固体干燥形式的那些,例如含有按重量计少于5%的水,或优选地按重量计少于2%的水。这些固体形式通常适于在水性稀释剂中重构。

[0104] 当前描述的方法、试剂盒和相关组合可以用于治疗患有可以通过在此提供的方法补救或预防的任何病状(如癌症)的患者。癌症是指广泛的各种疾病,其特征在于体内异常细胞的不受控制的生长,其中癌症或癌组织可以包括肿瘤。示例性的病状是癌症,如例如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、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、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、脑癌、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、维尔姆斯氏肿瘤、宫颈癌、何杰金淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、脑癌、膀胱癌、上皮癌、胶质瘤、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、脑膜瘤、黑素瘤、多发性骨髓瘤、成神经细胞瘤、成视网膜细胞瘤、以及白血病。在一些特定实施例中,有待治疗的癌症是实体癌,如例如乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌、骨癌、结肠直肠癌、胃癌、淋巴瘤、恶性黑色素瘤、肝癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、甲状腺癌、肾癌、胆管癌、脑癌、宫颈癌、上颌窦癌、膀胱癌、食管癌、何杰金氏病以及肾上腺皮质癌。

[0105] 本发明的方法、试剂盒和组合可用于例如通过改善受试者对疫苗的应答而增强癌症疫苗的治疗有效性。可以在治疗期间、单轮治疗后、2-3个治疗周期之后等的任何适合的时间点以及通过多种适合的方法中的任一种来评价增强的应答,包括肿瘤缩小(部分应答),即肿瘤大小或体积的评价、肿瘤消失、疾病进展的减少(癌症未进展)以及在适当的情况下一种或多种肿瘤测试标志物的分析。在一些情况下,治疗功效的指示可以在比较用疫苗和长效IL-2R β 偏向性激动剂治疗与用相应的非长效形式的IL-2(例如,给药以实现相当数量的IL-2当量)和疫苗一起给予治疗时就50%最大肿瘤生长之间的时间延迟而言来进行测量。该比较可以在人类患者中进行,或者在适合的动物模型(如适合的癌症鼠类模型)中进行。特别有效的治疗将使存活延长(当以50%最大肿瘤生长评价时)至少5天、或至少10天、或至少12天、或至少15天、或至少20天、或至少30天或更长时间。

[0106] 在此提供的方法、试剂盒、组合等也可用于减少经历治疗的受试者的肿瘤生长或大小(或体积)。通过将治疗有效量的如在此提供的癌症疫苗和长效IL-2R β 偏向性激动剂给予至患有已确立的肿瘤的受试者进行的治疗在一个或多个实施例中可有效减少受试者中的肿瘤生长或大小。例如,在一些实施例中,当与治疗前肿瘤的大小相比时,一个或多个治疗周期可有效使肿瘤大小减小约25%、或约30%、或约40%、或约50%、或甚至约60%、或约70%或更多。

[0107] 在又一些实施例中,在此提供的方法、试剂盒、组合物等可有效抑制经历针对癌症的治疗的受试者中调控性T细胞 (Treg) 的累积。在一些实施例中,当在相应癌症的癌症小鼠模型中评价时,该方法例如可有效抑制肿瘤中选自由CD4+Treg、CD25+Treg和FoxP3+Treg组成的组的调控性T细胞(即,前述细胞类型中的任何一种或多种)的累积,抑制量相对于在给予非长效IL-2R β 偏向性激动剂如IL-2和疫苗时观察到的抑制得以提高。例如,当与用疫苗和IL-2治疗相比时,受试者Treg(单独测量或作为Treg的任何一种可能的组合测量)可以被抑制1.5倍或更多、或2倍或更多倍、或3倍或更多、或甚至4倍或更多。在一些实施例中,当与未治疗的受试者相比时,该治疗可以有效使受试者中调控性T细胞 (Treg) 的累积抑制至少2倍或更多、或3倍或更多、或甚至4倍或更多、或5倍或更多、或6倍或更多。

[0108] 在又一些其他实施例中,在此提供的方法、试剂盒、组合物等可有效刺激受试者中的T细胞和/或NK细胞活性和/或增殖。在一些实施例中,当在相应癌症的癌症小鼠模型中评价时,该方法可有效例如用于增加受试者中CD8+T细胞的数量。在又一些其他实施例中,当在相应癌症的癌症小鼠模型中评价时,该方法可有效例如增加受试者中NK细胞的数量。例如,当与用疫苗和未修饰的IL-2治疗相比时,受试者的CD8+T细胞可以增加1.5倍或更多、或2倍或更多、或3倍或更多、或甚至4倍或更多。在一些实施例中,当与未治疗的受试者相比时,该治疗可以有效使受试者的CD8+T细胞增加至少2倍或更多、或3倍或更多、或甚至4倍或更多、或5倍或更多、或6倍或更多。类似地,当与用疫苗和未修饰的IL-2治疗相比时,受试者的NK细胞可以增加1.5倍或更多、或2倍或更多、或3倍或更多、或甚至4倍或更多。在一些实施例中,当与未治疗的受试者相比时,该治疗可以有效使受试者的NK细胞增加至少2倍或更多、或3倍或更多、或甚至4倍或更多、或5倍或更多、或6倍或更多。

[0109] 在转向实例时,至少实例4和5提供了由给予说明性治疗性疫苗、伴随给予示例性长效IL-2R β 偏向性激动剂如RSLAIL-2引起的协同作用的进一步指示。例如,在考虑图3A-3H和图4中的结果时,可以看出RSLAIL-2(一种说明性长效IL-2R $\alpha\beta$ 偏向性激动剂)当在疫苗接种后给予时可有效显著延迟所采用的小鼠模型中的肿瘤生长并且由此实现当与单独疫苗接种或疫苗接种伴随给予高剂量IL-2或低剂量IL-2相比时显著改善的应答。转到图4,可以看出,例如,在处理大约38天后,疫苗接种/RSLAIL-2处理组的平均肿瘤大小是大约25mm²,而最接近的处理组(就在减缓肿瘤生长中的有效性而言)疫苗接种/IL-2低剂量中的平均肿瘤大小是大约125mm²,差异大约5倍。这些结果突出了当伴随疫苗疗法时,IL-2R $\alpha\beta$ 偏向性激动剂如RSLAIL-2改善治疗应答的优异能力。

[0110] 进一步证明了抗癌疫苗接种伴随给予说明性IL-2R $\alpha\beta$ 偏向性激动剂RSLAIL-2的显著治疗结果,图6提供各个处理组中每一组的存活百分比的图。最显著的是,肽疫苗/长效IL-2R $\alpha\beta$ 偏向性激动剂处理组中100%的受试者存活至约57天,在大约62天50%存活;对于就对疗法的阳性应答而言的下一个最接近的处理组,即肽疫苗/低剂量IL-2处理组,观察到100%存活至大约32天,在约48天50%存活-增加大约15天。

[0111] 在转向如实例4和5中描述的主题治疗方法的免疫刺激或免疫抑制作用时,可以看出与IL-2相比,RSLAIL-2可有效诱导肿瘤组织中显著更高且稳定的Pmel-1应答。此外,当比较以类似于肿瘤微环境的方式疫苗接种伴随给予高剂量IL-2或RSLAIL-2时,与IL-2相比,RSLAIL-2可有效诱导脾脏中显著更高且稳定的Pmel-1应答。RSLAIL-2在第7天有效地介导调控性T细胞 (Treg) 的减少,并且在肿瘤中维持最小数量的Treg延伸直到至少第30天。基于

在处理过程中对各种免疫细胞类型 (Treg 和非 Treg) 的评价, 当与 RSLAIL-2 组合但不与 IL-2 组合时, 肽疫苗在肿瘤以及脾脏中产生更高的 Pmel 与 Treg 比率。基于至少这些数据, 似乎示例性 IL-2R $\alpha\beta$ 偏向性激动剂 RSLAIL-2 在肿瘤组织中并且在更长时间段内稳定维持大量 Pmel-1 细胞和低 Treg 方面明显优于 IL-2。此外, RSLAIL-2 特异性地抑制 Treg 向肿瘤的累积, 并促进维持肿瘤组织中高 Pmel 与 Treg 比率直至治疗第 30 天。

[0112] 实例 6-9 尤其说明, 当与单独给予基于新抗原的疫苗组合物相比时, 与 RSLAIL-2 的组合可有效提供针对大量疫苗编码的新抗原的免疫应答, 以及与疫苗编码的新抗原反应的 CD4 和 CD8T 细胞数量的增加。此外, 用在此描述的组合处理的小鼠中的肿瘤高度富集与疫苗编码的新抗原反应的 T 细胞。也就是说, 基于代表性新抗原的疫苗与 RSLAIL-2 的组合产生显著抗肿瘤作用, 并且诱导强烈的新抗原特异性免疫应答。

[0113] 如图 10 所示, 当与单独给予时与 AH-1 疫苗和 RSLAIL-2 中的每种相比时, 当与 RSLAIL-2 组合给予时, 说明性 AH-1 单抗原肽疫苗显著延迟肿瘤生长并改善存活。因此, 当与基于肽的癌症疫苗组合时, RSLAIL-2 可有效延迟肿瘤生长并改善存活。另外, 该组合对于可有效在肿瘤组织中产生大量 Pmel-1 细胞和少量 Treg, 作为当向患有癌症的受试者给予时其提供显著抗肿瘤作用的能力的进一步证据。

[0114] 在此引用的所有文章、书籍、专利、专利公开及其他的公开物通过引用以其全部内容结合。倘若本说明书的传授内容和通过引用结合的本领域之间不一致, 以本说明书中的传授内容和定义的含义为准 (特别是关于在此处所附的权利要求书中使用的术语)。例如, 其中本申请和通过引用结合的公开物不同地定义了相同术语, 该术语的定义将保留在该定义位于的文件的传授内容之内。

实例

[0115] 应理解, 前述描述以及随后的实例旨在说明而不是限制在此提供的本发明的范围。本发明范围内的其他方面、优点和修改对本发明所属领域的技术人员而言将是显而易见的。

材料和方法

[0116] 克隆并表达具有与阿地白介素 (SEQ ID NO:3) 的氨基酸序列相同的氨基酸序列的重组人 IL-2, 并且用于制备在此称为 RSLAIL-2 的示例性长效 IL-2R $\alpha\beta$ 偏向性激动剂。

[0117] RSLAIL-2 是指可按照 PCT 国际专利申请公开号 WO 2015/125159 中的实例 1 的程序获得的组合物, 并且一般是指包含多聚乙二醇化形式的 IL-2 的组合物, 其中用于形成共轭物的 PEG 试剂的附接在给予至受试者后是可释放的。

[0118] NOUS-020 新抗原性疫苗: NOUS-020 构建体含有来自 CT-26 鼠类肿瘤细胞系的 20 个非同义单核苷酸变体 (SNV)。NOUS-020 疫苗是基于编码来自 CT26 鼠类肿瘤细胞系的 20 种新抗原的源自类人猿的腺病毒和 MVA 疫苗, 其用于在此描述的小鼠模型研究中。NOUS-020 插入序列在图 11 中示出。对于每种突变, 氨基酸变化包埋在野生型蛋白质序列中, 并且在上游和下游侧接 12 个氨基酸, 新抗原的总长度为 25 个氨基酸。来自不同新抗原的蛋白质片段的序列头尾相连以形成与 HA 肽序列在下游融合的人工抗原, 以监测重组人工蛋白质的表达。

实例 1

使用 MPEG2-C2-FMOC-20KD-NHS 对 RIL-2 进行聚乙二醇化

[0119] 将 1.44mg/ml 的纯化的 rIL-2 (106.4mL) 装入第一容器中, 接着添加 53.6mL 的配制

缓冲液(10mM乙酸钠(pH 4.5),5%海藻糖)。测量pH为4.62,测量温度为21.2℃。将PEG试剂C2-PEG2-FMOC-NHS-20K(如在WO 2006/138572中所描述可供使用的)(13.1g)装入第二容器中,接着添加73.3mL的2mM HCl。将所得溶液手动涡旋25分钟。将硼酸钠(0.5M,pH 9.8)添加至该第一容器以使pH升高至约9.1,并且接着将含有该PEG试剂的第二容器的内容物经从1至2分钟的时间段添加至该第一容器。接着通过将8.1mL的2mM HCl装入该第二容器并且将内容物添加至该第一容器来执行冲洗步骤。对于共轭反应,最终rIL-2浓度是0.6mg/mL,硼酸钠浓度是120mM,pH是9.1+/-0.2,温度是20℃-22℃,并且PEG试剂与rIL-2的摩尔比在针对该试剂的活性调整之后(取代水平)是35:1。使该共轭反应进行30分钟,并且通过添加75mL的2N乙酸酸化(以使pH降至大约4)淬灭。如先前所描述通过离子交换色谱法纯化产物,以提供主要为4聚体、5聚体和6聚体(是指可释放地共价附接至r-IL-2的PEG试剂的数量)的组合物(其中8聚体和更高的聚乙二醇化程度在与色谱法相关的洗涤步骤期间除去)。这种组合物在此称为“RSLAIL-2”。

实例2

RSLAIL-2的受体偏向性和相关的免疫治疗特性

[0120] 与IL-2受体的结合亲和力和与免疫刺激概况相关的受体偏向性:RSAIL-2与IL-2R α 和IL-2R β 的结合亲和力通过表面等离子体共振(Biacore T-100)直接测量并且将其与临床上可用的IL-2(阿地白介素)的结合亲和力相比较。抗人抗体(英杰公司(Invitrogen))使用EDC/NHS化学偶合至CM-5传感器芯片的表面。然后,将人IL-2R α -Fc或IL-2R β -Fc融合蛋白用作此表面上捕获的配体。RSLAIL-2及其活性IL-2共轭物代谢物(1-PEG-和2-PEG-IL-2)的连续稀释液在pH 4.5的乙酸盐缓冲液中制备,起始于5mM。允许这些稀释液结合至配体5分钟,并且针对浓度对结合的反应单位(RU)作图以确定EC₅₀值。将每种同种型对每种IL-2受体亚型的亲和力计算为相对于IL-2的亲和力的变化倍数。

[0121] RSLAIL-2的体外结合和活化概况表明聚乙二醇化干扰IL2与IL2R α 之间相对于阿地白介素的相互作用;进行了调查以确定这些效应是否使体内免疫细胞亚型的概况偏向。在给予RSLAIL-2或IL2后肿瘤中CD8T细胞和Treg细胞的数量是IL2的多效性效应是否由于IL2与聚(乙二醇)在IL2/IL2R α 界面处的共轭(如在RSLAIL-2中)而变化的重要量度。为了解决该问题,用单剂量的RSLAIL-2或5剂量的阿地白介素处理携带皮下B16F10小鼠黑素瘤肿瘤的小鼠,并通过流式细胞术定量肿瘤微环境中的免疫细胞。结果显示在图1A-1G中。

[0122] 在阿地白介素处理的小鼠的肿瘤中,总CD8细胞和记忆CD8细胞作为肿瘤浸润性淋巴细胞的百分比增加;然而,这些效应是短暂的,在第5天达到相对于媒介物的显著性。相比之下,在单次RSLAIL-2给予后实现显著(P<0.05)和持续的总CD8T细胞和记忆CD8T细胞刺激,相对于阿地白介素具有优异的记忆CD8(第7天)和总CD8(第7天和第10天)百分比。RSLAIL-2和阿地白介素处理两者均在处理开始后5天和7天产生增加的活化的自然杀伤(NK)细胞,尽管这种效应在第10天减少。在第5天相对于媒介物进行RSLAIL-2处理后,肿瘤浸润性淋巴细胞的CD4细胞百分比减少。在第10天,与媒介物和阿地白介素相比,RSLAIL-2产生更少的CD4细胞百分比。进一步分析CD4细胞群体的FoxP3⁺子集,其定义Treg群体。RSLAIL-2给予在每个时间点降低Treg的百分比,这与由PEG链引起的对IL2R α 亚基的接近减少一致。相比之下,使用阿地白介素的Treg减少是适度的,在第5天达到显著性。到第7天,CD8T细胞的增加和Treg的减少导致肿瘤中CD8/Treg比率的显著升高。RSLAIL-2、阿地白介

素和媒介物的CD8/Treg的比率分别为449、18和4,从而支持对于RSLAIL-2,相对于IL2受体 α ,IL2受体 β 的优先活化。

[0123] 进行免疫组织化学染色,并且证实CD8T细胞不仅数量增加,而且散布有肿瘤细胞。这些结果表明,在没有肿瘤中Treg的相称刺激的情况下,与未修饰的IL-2(阿地白介素)情况下观察到的相比,RSLAIL-2可有效诱导更稳健的体内记忆效应CD8T细胞应答,这与体外IL2R β 偏向性结合概况一致。也就是说,RSLAIL-2可有效相对于Treg优先活化和扩增效应CD8+T细胞和NK细胞。

实例3

RSLAIL-2的肿瘤暴露

[0124] 此研究的目的是评价当与阿地白介素相比时,植入B16F10黑素瘤细胞的C57BL/6小鼠中RSLAIL-2的抗肿瘤活性。

[0125] 将C57BL/6小鼠用B16F10黑素瘤细胞(每只动物 1×10^6 个)皮下植入右侧腹中。在植入后7天,当肿瘤测量为 200mm^3 时,向动物给予RSLAIL-2($2\text{mg}/\text{kg} \times 1$)或阿地白介素($3\text{mg}/\text{kg}$ 每天 $\times 5$)。收获肿瘤(每个观察时间 $n=4$),在含有蛋白酶抑制剂(罗氏公司(Roche))和0.25%乙酸的冰冷PBS中均质化,并离心以获得上清液。为了定量肿瘤组织中的RSLAIL-2水平,通过将上清液在pH 9缓冲液中在 37°C 下孵育过夜来从IL2释放PEG。通过对人IL2具有特异性的夹心ELISA测量IL2。为了计算AUC,使用非房室模型用Phoenix WinNonLin拟合数据。基于第1天AUC乘以5估计阿地白介素后的AUC。

[0126] 如图2所示,肿瘤阿地白介素水平迅速达到 C_{max} 且然后迅速下降,从而在每次剂量后24小时导致 $<4\text{ng}/\text{g}$ 浓度,以及 $0.09 \pm 0.02\mu\text{g}/\text{小时}/\text{g}$ 的每日AUC。相比之下,在单剂量后长达8天RSLAIL-2在肿瘤中可检测,从而达到 $30 \pm 6.9\mu\text{g}/\text{小时}/\text{g}$ 的AUC。基于AUC,单剂量的RSLAIL-2导致与5个每日剂量的阿地白介素相比高67倍的暴露,即使使用RSLAIL-2给药少7.5个IL2当量($3\text{mg}/\text{kg}$ 每日 $\times 5 = 15\text{mg}/\text{kg}$ 对 $2\text{mg}/\text{kg}$)。因此,基于IL2当量标准化暴露,RSLAIL-2相对于阿地白介素实现增加500倍的暴露。还定量了RSLAIL-2的活性共轭的IL-2形式(2-PEG-IL2和1-PEG-IL2一起),并且在肿瘤中保持可检测长达5天,从而产生 $23 \pm 4.4\mu\text{g}/\text{g}$ 的AUC。因此,与阿地白介素相比,暴露于活性共轭的IL2高50倍,转化为相对于等效剂量的阿地白介素增加380倍的暴露。因此,与阿地白介素每日两次持续两个5天周期相比,RSLAIL-2的肿瘤暴露允许在小鼠中每9天给药一次。

实例4

RSLAIL-2在鼠类B16黑素瘤模型中改善对示例性疫苗GP100的应答的有效性的评价

[0127] 进行研究以使用鼠类B16黑素瘤模型确定RSLAIL-2是否能够有效地促进疫苗接种诱导的肿瘤特异性效应CD8+T细胞的扩增和功能。该研究比较了RSLAIL-2和未修饰的IL-2两者增强说明性肽疫苗的治疗功效的能力。

[0128] 在接种300,000个B16野生型细胞/部位后7天开始研究的起始。在该研究中,将初始gp100特异性TCR转基因pme1-1CD8+T细胞过继性转移到携带已确立的皮下B16肿瘤的C57BL/6小鼠中,然后用(i)单独含有GP-100(糖蛋白100)肽疫苗($50\mu\text{g}/\text{小鼠}$)、抗CD40mAb($50\mu\text{g}/\text{小鼠}$)和TLR-7激动剂R848(瑞喹莫德,一种咪唑并喹啉,5只小鼠/包)的疫苗配制品或(ii)与RSLAIL-2(基于IL-2 $0.2\text{mg}/\text{kg}$)组合或(iii)与高剂量或低剂量未修饰的IL-2(阿地白介素)组合进行疫苗接种。小鼠然后每8天接受单剂量的RSLAIL-2或IL-2(高剂量)。处

理组是如下：

表1.处理组

第 1 组	无处理
第 2 组	IL-2 高剂量：（第 0 天、第 1 天和第 2 天 100,000 IU × 5 个剂量）；每 8 天重复周期
第 3 组	IL-2 低剂量：62,500 IU/小鼠/每天
第 4 组	RSLAIL-2：基于蛋白质 0.2 mg/kg
第 5 组	GP100 肽/抗 CD40/TLR 激动剂（单独疫苗混合物）
第 6 组	GP100 肽/抗-CD40/TLR-激动剂+ IL-2 高剂量（第 0 天、第 1 天和第 2 天 100,000 IU × 5 个剂量）；每 8 天重复周期剂量（100,000 IU × 5 个剂量）
第 7 组	GP100 肽/抗 CD40/TLR-激动剂+ IL-2 低剂量（62,500 IU/小鼠/每天）
第 8 组	每 8 天 GP100 肽/抗 CD40/TLR-激动剂+ RSLAIL-2（0.2 mg/kg）

[0129] 监测血液中的肿瘤生长、存活和T细胞应答,并且分析肿瘤和脾脏中效应pme1-1CD8+T细胞和CD4+Foxp3+Treg的定位。在第5天、第7天、第12天、第15天和第20天以及整个处理过程中测量T细胞应答。图3A-3H是分别示出组1-8中每组的处理过程内肿瘤大小(mm^2)的图。如图3H所示,当与其他处理组相比时,配制为混合物的RSLAIL-2与示例性肽疫苗的组在延迟肿瘤生长方面特别有效。图4是示出在每个研究组的处理过程内的平均肿瘤大小(mm^2)以便于比较的图。如图4所示,RSLAIL-2(一种说明性长效IL-2 $\text{R}\alpha\text{B}$ 偏向性激动剂)当在疫苗接种后给予时可有效显著延迟所采用的小鼠模型中的肿瘤生长,并且实现当与单独疫苗接种或疫苗接种伴随给予高剂量IL-2或低剂量IL-2相比时显著改善的应答。转到图4,可以看出,例如,在处理大约38天后,疫苗接种/RSLAIL-2处理组的平均肿瘤大小是大约 25mm^2 ,而最接近的处理组(就在减缓肿瘤生长中的有效性而言)疫苗接种/IL-2低剂量中的平均肿瘤大小是大约 125mm^2 -说明当伴随疫苗疗法时,IL-2 $\text{R}\alpha\text{B}$ 偏向性激动剂如RSLAIL-2改善治疗应答的优异能力的显著差异。

[0130] 图5是与gp100特异性T细胞功能相关,即展示在上述各种处理组的处理过程内的IFN-g+T细胞(表示为pme1-1的百分比)的图。该图表明,对于GP100/抗CD40/TRL-7激动剂/RSLAIL-2处理组,在疫苗接种后稳定且持久的IGN-g+T细胞(pme1-1)应答高于90%延长至约40天;与其他处理组相比,疫苗/RSLAIL-2组合疗法达到并维持最高百分比的IFN-g+T细胞(pme1-1)应答。另外,疫苗/RSAIL-2组合疗法诱导的IGN-g+T细胞(pme1-1)应答比其他处理组更慢地下降。

[0131] 图6是展示每个处理组的存活百分比的图。与示出在处理过程内的肿瘤大小的图一致(图3A-3H和图4),与其他处理组相比,疫苗/RSLAIL-2处理组(GRP8)的存活显著增强。肽疫苗/长效IL-2R α β 偏向性激动剂处理组中100%的受试者存活至约57天,在大约62天50%存活;对于就对疗法的阳性应答而言的下一个最接近的处理组,即肽疫苗/低剂量IL-2处理组,观察到100%存活至大约32天,在约48天50%存活。

[0132] 图7是展示在处理过程内每个处理组的pme-细胞百分比(表示为总CD8+T细胞的百分比)的图。当与结合肽疫苗疗法的高剂量和低剂量IL-1处理相比时,RSLAIL-2当与GP-100疫苗组合时表现出显著升高的pme1-1应答。

[0133] 图8是示出对于在实例4中描述的研究组中的每个,携带已确立的皮下B16肿瘤的C57BL/6小鼠中的处理过程内调控性T细胞,即CD25+Foxp3+T细胞(表示为CD4细胞的百分比)的图。如从该图中可以看出,RSLAIL-2诱导的调控性T细胞的百分比在每个给药周期结束左右迅速降低。

[0134] 当与单独疫苗接种或伴随给予以高剂量和低剂量处理方式给予的未修饰的(即,非长效)IL-2相比时,RSLAIL-2(一种说明性长效IL-2R α β 偏向性激动剂)展示与疫苗接种的显著协同作用,从而有效抑制肿瘤生长并显著改善小鼠的存活。RSLAIL-2另外增强了pme1-1CD8+T细胞数量并且减少了肿瘤中免疫遏制性Treg的数量。RSLAIL-2可有效在肿瘤中稳定地维持高pme1-1CD8+T细胞相对于Treg的比率超过30天。尽管诱导非常强的CD8+T细胞应答和抗肿瘤活性,但未观察到总体毒性。

实例5

RSLAIL-2在鼠类B16黑素瘤模型中改善对示例性疫苗GP100的应答的有效性的进一步评价-肿瘤、脾脏和血液中PMEL和TREG的分析

[0135] 进行研究以研究使用如上文实例4中描述的鼠类B16黑素瘤模型,当与示例性肽疫苗组合给予时RSLAIL-2对效应CD8+T细胞和Treg定位至肿瘤和脾脏的影响。

[0136] 在该研究中,将初始gp100特异性TCR转基因pme1-1CD8+T细胞过继性转移到携带已确立的皮下B16肿瘤的C57BL/6小鼠中,然后用(i)单独含有GP-100(一种糖蛋白100肽疫苗)(50 μ g/小鼠)、抗CD40mAb(50 μ g/小鼠)和TLR-7激动剂R848(瑞喹莫德,一种咪唑并喹啉,5只小鼠/包)的混合物或(ii)与RSLAIL-2(基于IL-2 0.2mg/kg)组合或(iii)与高剂量IL-2(阿地白介素)组合进行疫苗接种。小鼠然后每8天接受单剂量的RSLAIL-2或IL-2(高剂量)。处理组是如下:

[0137] 表2. 处理组

第 1 组	无处理
第 2 组	GP100 肽/抗-CD40/TLR-激动剂+ IL-2 高剂量 (第 0 天、第 1 天和第 2 天 100,000 IU × 5 个剂量) ; 每 8 天重复周期
第 3 组	每 8 天 GP100 肽/抗 CD40/TLR-激动剂+ RSLAIL-2 (0.2 mg/kg)
第 4 组	GP100 肽/抗 CD40/TLR 激动剂 (单独疫苗混合物)

[0138] 收集肿瘤和脾细胞样品,并且首先用可固定的活力指示剂处理,且然后针对活的免疫细胞染色。计数每个样品的活免疫细胞的总量,并且用于门控/收集受试细胞类型的总事件。原始细胞计数源自流式细胞仪读数的总结的原始数据并且进行分析。图9是指示对于处理组2、3和4,第5天、第7天、第10天和第30天的Thy1.1+Pme1-1细胞数量/克肿瘤的条形图。可以看出,当比较疫苗处理伴随给予高剂量IL-2或RSLAIL-2时,与IL-2相比,RSLAIL-2可有效诱导肿瘤组织中显著更高且稳定的Pme1-1应答。图10是指示对于处理组2、3和4,第5天、第7天、第10天和第30天的Thy1.1+Pme1-1细胞数量/克脾脏的条形图。可以看出,当比较以类似于肿瘤微环境的方式疫苗治疗伴随给予高剂量IL-2或RSLAIL-2时,与IL-2相比,RSLAIL-2可有效诱导脾脏中显著更高且稳定的Pme1-1应答。与上文实例4中描述的结果类似,RSLAIL-2在第7天有效地介导调控性T细胞(Treg)的减少,并且在肿瘤中维持最小数量的Treg延伸直到至少第30天。基于在处理过程中对各种免疫细胞类型(Treg和非Treg)的评价,当与RSLAIL-2组合但不与IL-2组合时,肽疫苗在肿瘤以及脾脏中产生更高的Pme1与Treg比率。总之,基于这些数据,似乎示例性IL-2R $\alpha\beta$ 偏向性激动剂RSLAIL-2在肿瘤组织中并且在更长时间段内稳定维持大量Pme1-1细胞和低Treg方面明显优于IL-2。此外,RSLAIL-2特异性地抑制Treg向肿瘤的累积,并促进维持肿瘤组织中高Pme1与Treg比率直至治疗第30天。

实例6

NOUS-020GAd疫苗的免疫原性

[0139] 在 5×10^8 个病毒颗粒(vp)剂量的单次肌肉内免疫后,在BALB/c近交系小鼠中评价NOUS-020GAd疫苗的免疫原性。在免疫后三周收集脾细胞,并且通过在对应于每种编码的新抗原疫苗的合成肽存在下刺激细胞,通过IFN- γ ELISpot进行测试。阴性对照培养物包括在肽稀释剂二甲基亚砷(DMSO)存在下用单独培养基刺激的细胞。免疫应答(每百万脾细胞产生IFN- γ 的T细胞的数量)在相关图中示出。如果抗原孔的平均值大于15SFC/ 10^6 PBMC并且超过DMSO孔的背景值的3倍,则认为应答是阳性的。使用在ELISpot测定中具有免疫原性的5种新抗原的池,通过细胞内IFN- γ 细胞因子染色测量T细胞应答(CD4和CD8)的质量。免疫应答(每百万脾细胞产生IFN- γ 的T细胞的数量)在图12A和12B中示出。可以看出,NOUS-020GAd疫苗诱导CD4和CD8T细胞。

实例7

NOUS-020GAd-MVA疫苗的免疫原性

[0140] 在初免-加强研究中评价了NOUS-020GAd-MVA疫苗的免疫原性。用GAd (5×10^8 个病毒颗粒的剂量) 引发BALB/c近交小鼠, 且然后在第4周用MVA (10^7 pfu) 加强。使用20种疫苗编码的新抗原的池通过IFN- γ ELISpot刺激脾细胞, 在加强后一周测量疫苗诱导的应答。阴性对照培养物包括在肽稀释剂二甲基亚砷 (DMSO) 存在下用单独培养基刺激的细胞。

[0141] 免疫应答 (每百万脾细胞产生IFN- γ 的T细胞的数量) 在图13B和13C中示出。如果抗原孔的平均值大于15SFC/ 10^6 PBMC并且超过DMSO孔的背景值的3倍, 则认为应答是阳性的。使用对于ELISpot测定产生免疫原性的5种新抗原的池, 通过细胞内IFN- γ 细胞因子染色测量T细胞应答 (CD4和CD8) 的质量。使用对于ELISpot测定产生免疫原性的前5种新抗原的池, 通过细胞内IFN- γ 细胞因子染色测量T细胞应答 (CD4和CD8) 的质量。如所示, 新抗原性疫苗诱导对CD4和CD8T细胞的应答。图13A提供示出诱导CD8和CD4应答的新抗原的构建体的示意图。图13B提供在20种疫苗编码的新抗原池上通过IFN- γ ELISpot在初次接受实验的小鼠中GAd/MVA免疫后测量的T细胞应答的分析。

实例8

在鼠类CT26肿瘤模型 (早期治疗环境) 中与NOUS-020GAd-CT26新抗原性疫苗和RSLAIL-2的组合治疗

[0142] 在BALB/c小鼠中关于CT26肿瘤生长评价伴随给予 (在第0天NOUS-020GAd疫苗和RSLAIL-2) 和随后给予 (GAd第0天, 和RSLAIL-2, 第7天) NOUS-020疫苗和RSLAIL-2的治疗功效。

[0143] 在第-3天向BALB/c小鼠注射CT26结肠癌细胞。在三天后 (第0天), 用 (i) 单独NOUS-020GAd疫苗 (肌肉内, 5×10^8 个病毒颗粒的剂量)、(ii) 单独RSLAIL-2 (静脉内, 0.8mg/kg, q9 \times 3) 或 (iii) 在第0天同时或 (iv) 以依次给予方案 (其中在第0天给予NOUS-020GAd疫苗且在第7天给予RSLAIL-2) 给予的NOUS-020GAd疫苗与RSLAIL-2的组合处理小鼠。

[0144] 随时间推移记录每个处理组的肿瘤体积。结果在图14A-14F中示出。图14A提供对照组 (未处理) 的结果; 图14B展示用单独GAd疫苗处理的小鼠中CT26肿瘤的体积; 图14C和14D展示用RSLAIL-2 (分别在第0天或第7天给予) 以及分别在第0天同时 (图14E) 或依次给予 (图14F) RSLAIL-2和GAd处理的小鼠中CT26肿瘤的体积。

[0145] 如从图中可以看出, 在第7天给予RSLAIL-2显著改善了NOUS-020GAd疫苗在早期治疗环境中 (即, 在相当大的肿瘤块生长之前) 的功效。

[0146] 为了进一步探索组合给予NOUS-020GAd疫苗和RSLAIL-2的各种处理方案, 探索了不同的治疗间隔时间。

[0147] 用CT26肿瘤细胞激发BALB/c小鼠, 并在激发后3天 (第0天) 接受NOUS-020GAd疫苗 (第0天, 5×10^8 个病毒颗粒) 或是在第0天给予的NOUS-020GAd与在第3天、第5天或第7天给予的RSLAIL-2的组合。在各个处理组中随时间推移监测肿瘤生长。以下表3示出对于每种治疗方式在研究结束时无肿瘤小鼠的百分比。

表3. 给药方案对完全应答

方案	无肿瘤小鼠百分比 (完全应答百分比)
NOUS-020 GAd	6%
NOUS-020 GAd + RSLAIL-2 (第3天)	28%
NOUS-020 GAd + RSLAIL-2 (第5天)	70%
NOUS-020 GAd + RSLAIL-2 (第7天)	80%

[0148] 基于表3中的数据,似乎GAd疫苗接种与单剂量给予RSLAIL-2之间的时间间隔影响协同活性。基于上述数据,似乎RSLAIL-2优选首次在疫苗接种后超过5天,例如在疫苗接种后6天、或7天、或8天、或9天或10天或更长时间给予。

实例9

在鼠类CT26肿瘤模型中使用NOUS-020GAd-MVA CT26新抗原性疫苗和RSLAIL-2组合治疗已确立的肿瘤

[0149] 用CT26细胞激发BALB/c小鼠。在一周后,将肿瘤质量为100mm³的小鼠随机分成2组(第0天),一组接受单独RSLAIL-2,第二组接受NOUS-020与分别在第0天(5×10^8 个病毒颗粒)和第6天(静脉内,0.8mg/kg)给予的RSLAIL-2的组合。在第14天、第22天、第36天、第43天和第46天重复给予RSLAIL-2。在第28天进行接受组合治疗的组的MVA加强,肌肉内注射剂量为 10^7 pfu的MVA。随时间推移监测肿瘤体积。结果在图15A(单独RSLAIL-2)和15B(NOUS-020和RSLAIL-2)中示出。单独给予RSLAIL-2的组具有44%的应答率,具有2个完全应答者和2个部分应答者(部分应答=大于40%的肿瘤缩小,但肿瘤未完全消失)。相比之下,如上所述给予NOUS-020与RSLAIL-2的组的组对治疗具有89%应答,具有4个完全应答者和4个部分应答者。

[0150] 这些结果表明,使用说明性小鼠新抗原性NOUS-020癌症疫苗和RSLAIL-2的组合疗法在治疗具有已确立的肿瘤的小鼠中是有效的。

[0151] 在第54天处死来自组合组NOUS-020和RSLAIL-2或仅RSLAIL-2的应答小鼠。通过细胞内IFN- γ 染色对在两个独立肽池存在下刺激的脾细胞进行抗原特异性T细胞应答的评估:前5种免疫原性新肽的池和含有剩余的15种疫苗编码的新肽的第二池。结果在图16A(仅RSLAIL-2)和16B(NOUS-020和RSLAIL-2)中示出。

实例10

RSLAIL-2与疫苗的组合在鼠类C26结肠癌模型中的抗肿瘤作用

[0152] 进行研究以在BALB/c小鼠中的C26结肠癌模型中(每组5只小鼠)使用说明性单抗原肽疫苗(AH1肽)与给予RSLAIL-2的组合来研究对疫苗接种的抗肿瘤免疫应答。

[0153] 在每只小鼠接种 1×10^6 个CT26野生型细胞后4天开始研究的起始(第0天)。研究组是如下:

[0154] 第1组(未处理);

[0155] 第2组:仅RSLAIL-2,0.8mg/kg,每8天给予;

[0156] 第3组:仅AH1疫苗配制品。在第5天和第13天给予的包含AH1肽(源自在CT26中表达

的gp70₍₄₂₃₋₄₃₁₎的免疫显性CD8表位,氨基酸序列SPSYVYHQF (Huang, A., 等人, Immunology [免疫学]. Proc. Natl. Acad. Sci, USA [美国国家科学院院刊], 93, 9730-9735 (1996), 25μg/小鼠)、抗αCD-40mAB (50μg/小鼠) 和tol1样受体7激动剂咪喹莫特, 5只小鼠/包) 的疫苗;

[0157] 第4组: AH1疫苗 (AH1肽, gp70₍₄₂₃₋₄₃₁₎), 25μg/小鼠/抗αCD-40mAB (50μg/小鼠)/咪喹莫特, 5只小鼠/包) 和在第4天和第12天给予的RSLAIL-2 (0.8mg/kg)。

[0158] 随时间推移监测肿瘤体积。结果在17A和17B中示出。如这些图所示, 当单独给予时, AH-1疫苗和RSLAIL-2两者均延迟肿瘤生长, 然而当组合给予时, 观察到显著的抗肿瘤作用 (20%存活率)。

[0159] 结果: 在结肠癌的小鼠模型中, 当与单独给予时与AH-1疫苗和RSLAIL-2中的每种相比时, 当与RSLAIL-2组合给予时, 说明性AH-1单抗原肽疫苗显著延迟肿瘤生长并改善存活。

[0160] 如上所述, 进行单独的研究以确定在用AH1肽疫苗、RSLAIL-2或两者的组合处理的CT26-肿瘤处理的小鼠的肿瘤和脾脏中肿瘤CD8+T细胞对Treg的定位。在第7天收集肿瘤和脾细胞样品, 并且首先用可固定的活力指示剂处理, 且然后针对活的免疫细胞染色。计数每个样品的活免疫细胞的总量, 并且用于门控/收集受试细胞类型的总事件。原始细胞计数源自流式细胞仪读数的总结的原始数据并且进行分析。结果在18A和18B中示出。

[0161] 结果: 如这些图中提供的, 当与脾脏相比时, 疫苗接种与RSLAIL-2的给予相结合产生肿瘤中显著更高的CD8 T细胞与Treg比率。因此, 与单独疫苗接种或单独给予RSLAIL-2相比, 当与疫苗接种组合时, 给予RSLAIL-2可有效诱导肿瘤组织中显著更高且稳定的Pmel-1应答。

SEQ ID NO:1 (具有前体的IL-2)

MYRMQLLS CI ALSLALVTNS APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN
-20 -10 1 11 21

YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL
31 41 51 61 71

RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS
81 91 101 111 121

TLT

SEQ ID NO:2 (IL-2)

APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN

YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL

RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS

TLT

SEQ ID NO:3 (阿地白介素=脱-丙氨酰-1, 丝氨酸-125人白细胞介素-2)

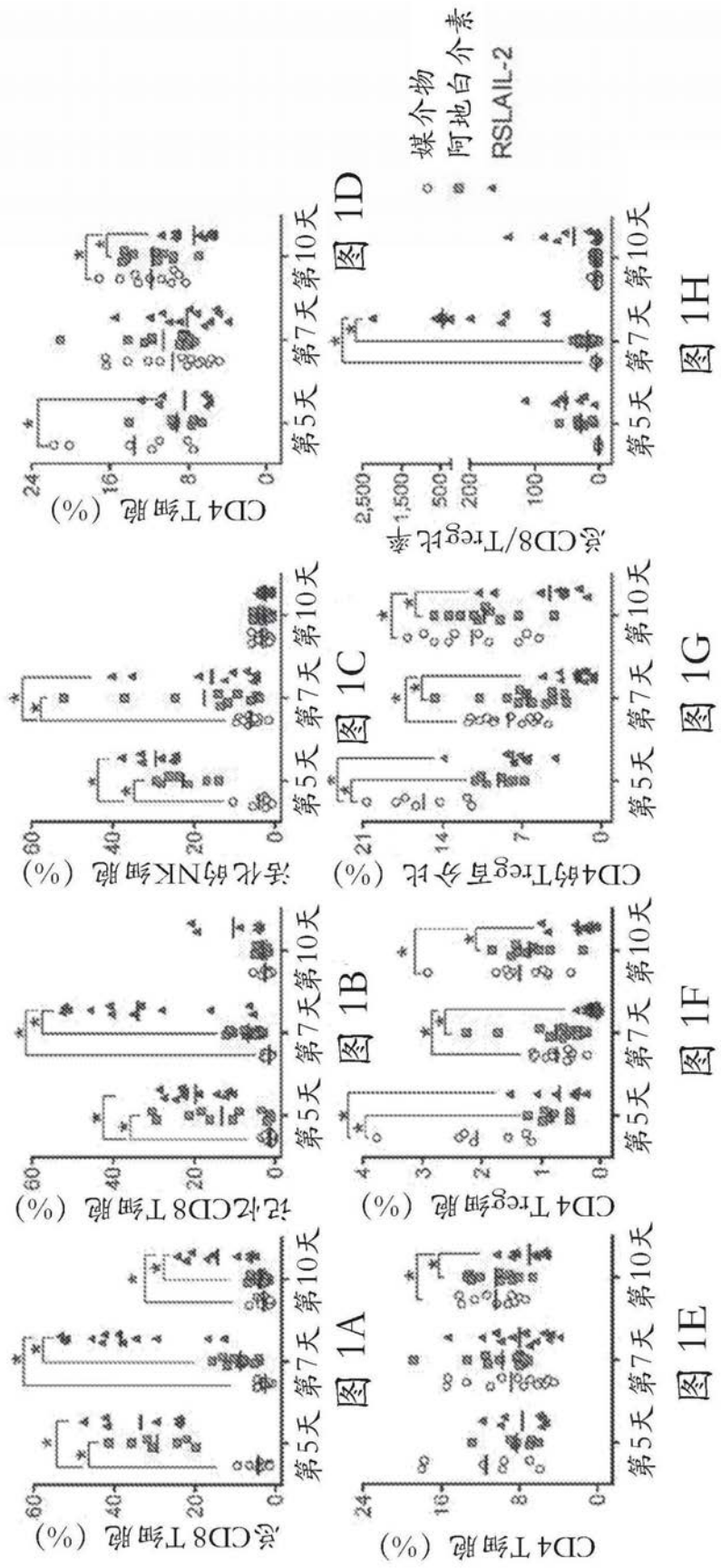
PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN
YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL
RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS
TLT

SEQ ID NO:4 (BAY 50-4798或“N88R突变体”,参见WO 99/60128)

APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN
YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL
RPRDLISRIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS
TLT

SEQ ID NO:5 NOUS-020

MQTSPTGILPTTSNSISTSEMTWKSSFPEFARYTTPEDTTPEPGEDPRVTRHSGQNHKE
MAISVLEARACAAAGQTVSVVALHDDMENQPLIGIQSTAIPEVATRMQSFGMKIVGYD
PIISPEVAIIQVSPKDIQLTIFPSKSVKEGDTVKASKKGMWSEGNSHTIRDLYTIETSIPSV
SNALNWKEFSFIQSTLGYVLRATAAYVNAIEKIFKVYNEAGVTFTSWIHCWKYLSVQSQLFR
GSSLLFRRSNFTVDCSKAGNDMLLVGVHGRTPALGSLALMIWLMTPHSHETEQRLL
PGFKGVKGHSGIDGLKGQPGAQGVAVQKLNQNLVILQAPENLTLSNLSESDRNKESD
QTSVNMNGLENKISYLLPFYPPDEALEIGLELNSSALPPTILPQAPSGPSYATYLQPAQAQ
MLTPKPLRRNNSYTSYIMAICGMPLDSFRVIQTSKYMRDVIAIESAWLLELAPHIHRAGG
LFVADAIQVGFGRIGKHFYGYDVPDYAS



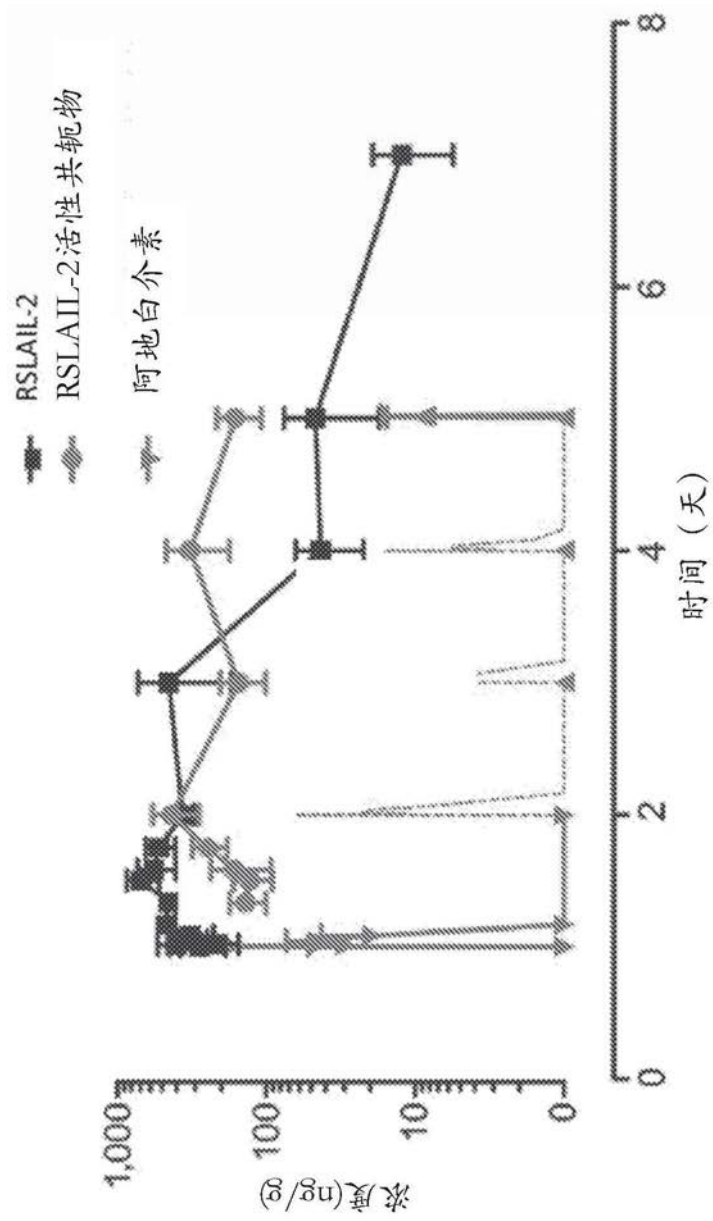


图2

肿瘤大小, mm²

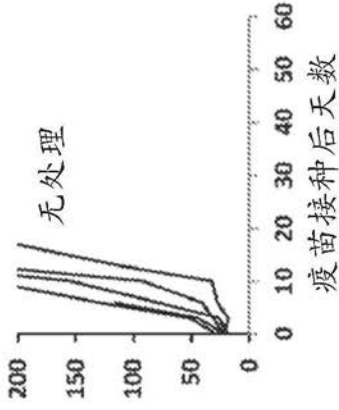


图 3A

肿瘤大小, mm²

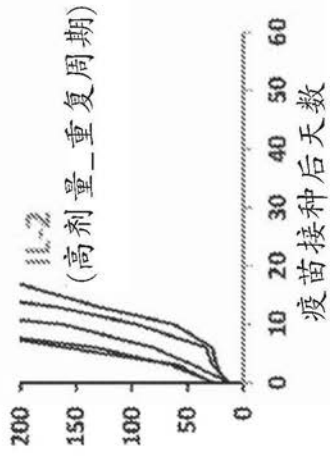


图 3B

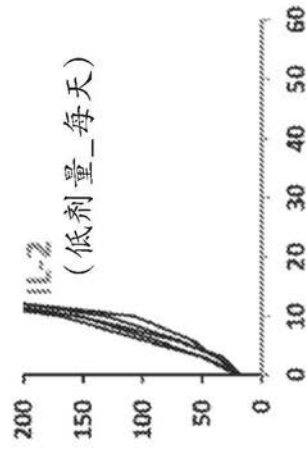


图 3C

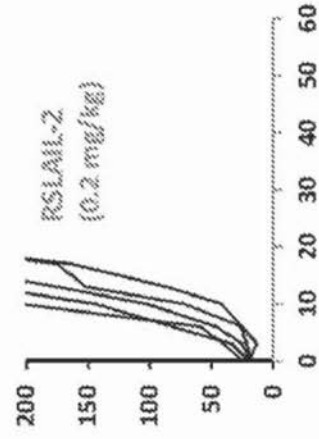


图 3D

肿瘤大小, mm²

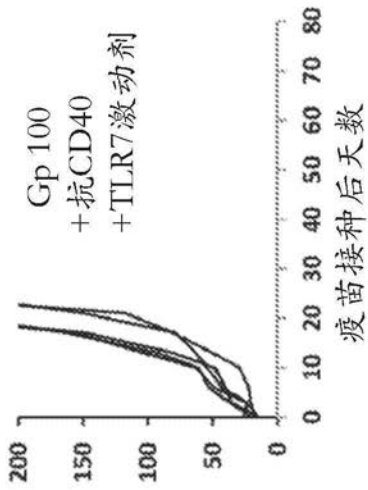


图 3E

肿瘤大小, mm²

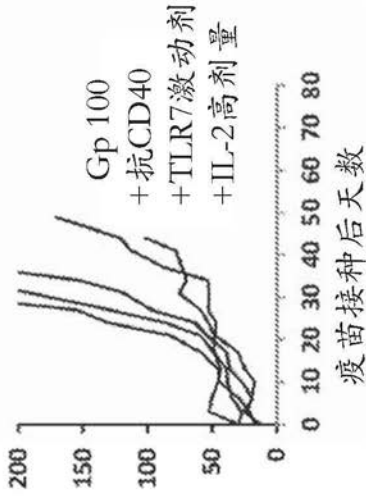


图 3F

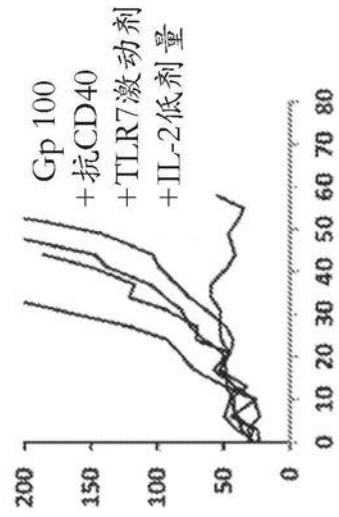


图 3G

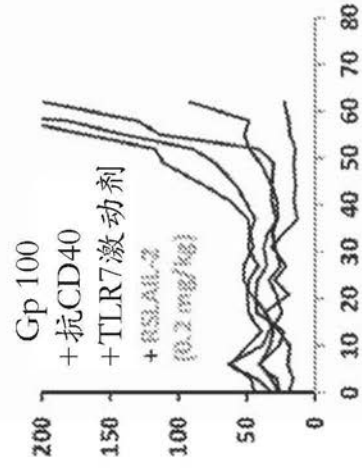


图 3H

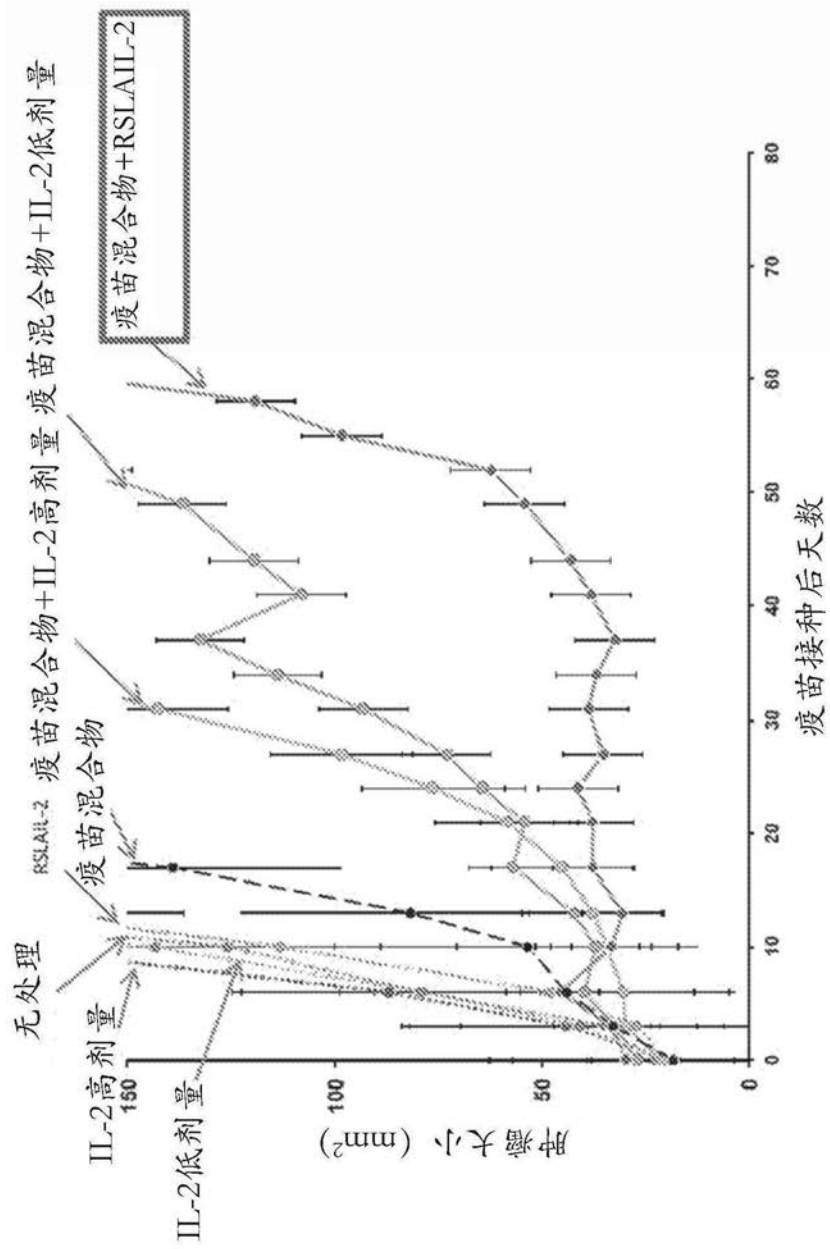


图4

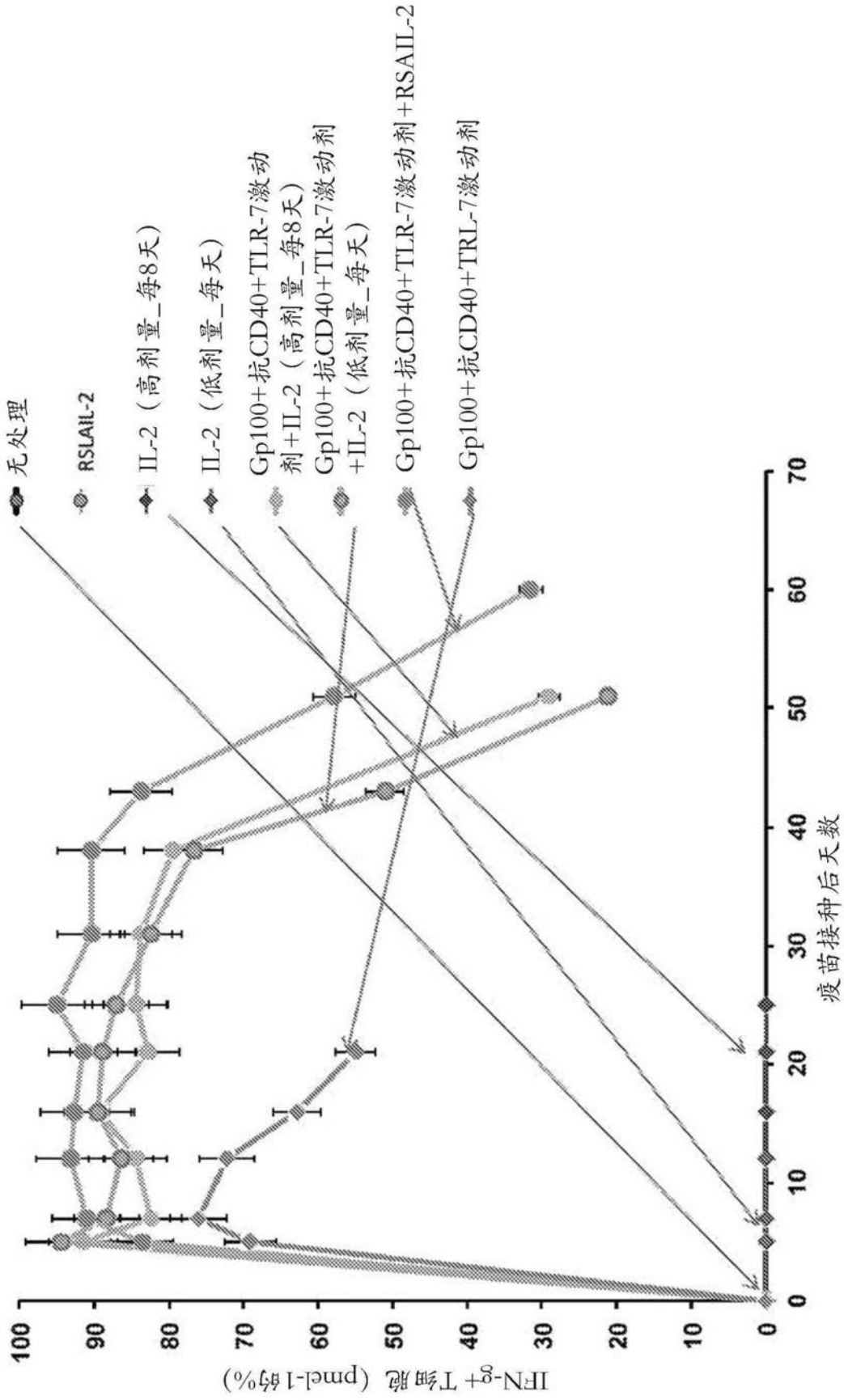


图5

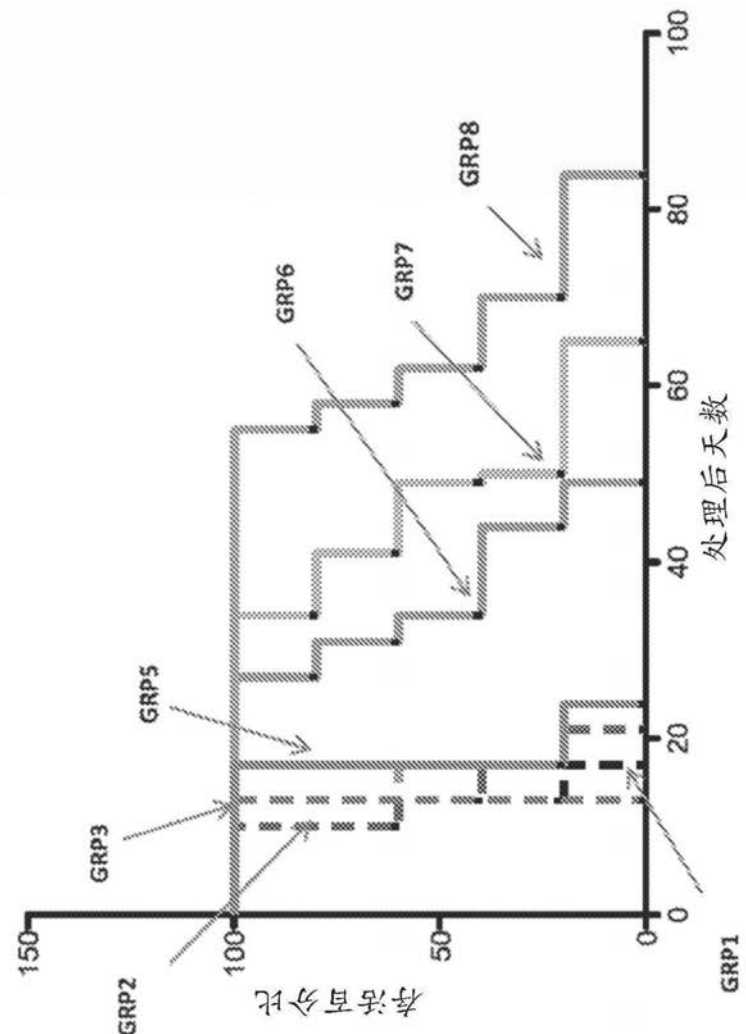
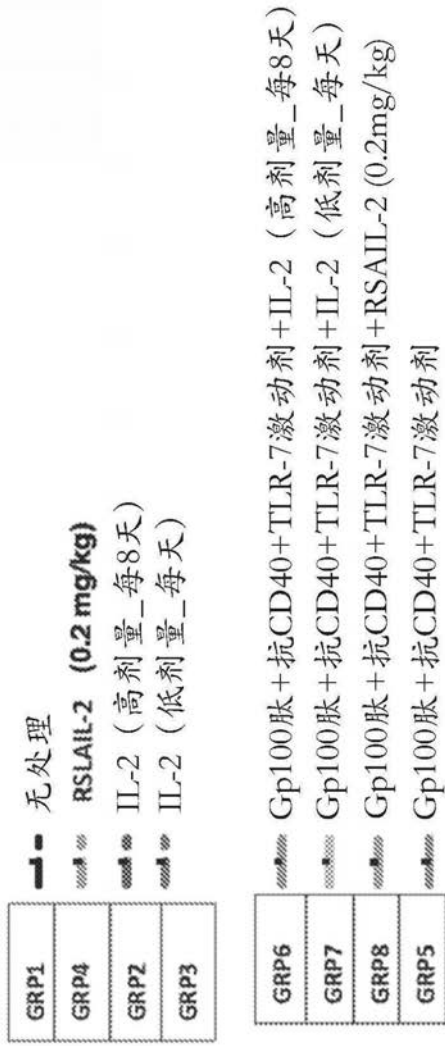


图6

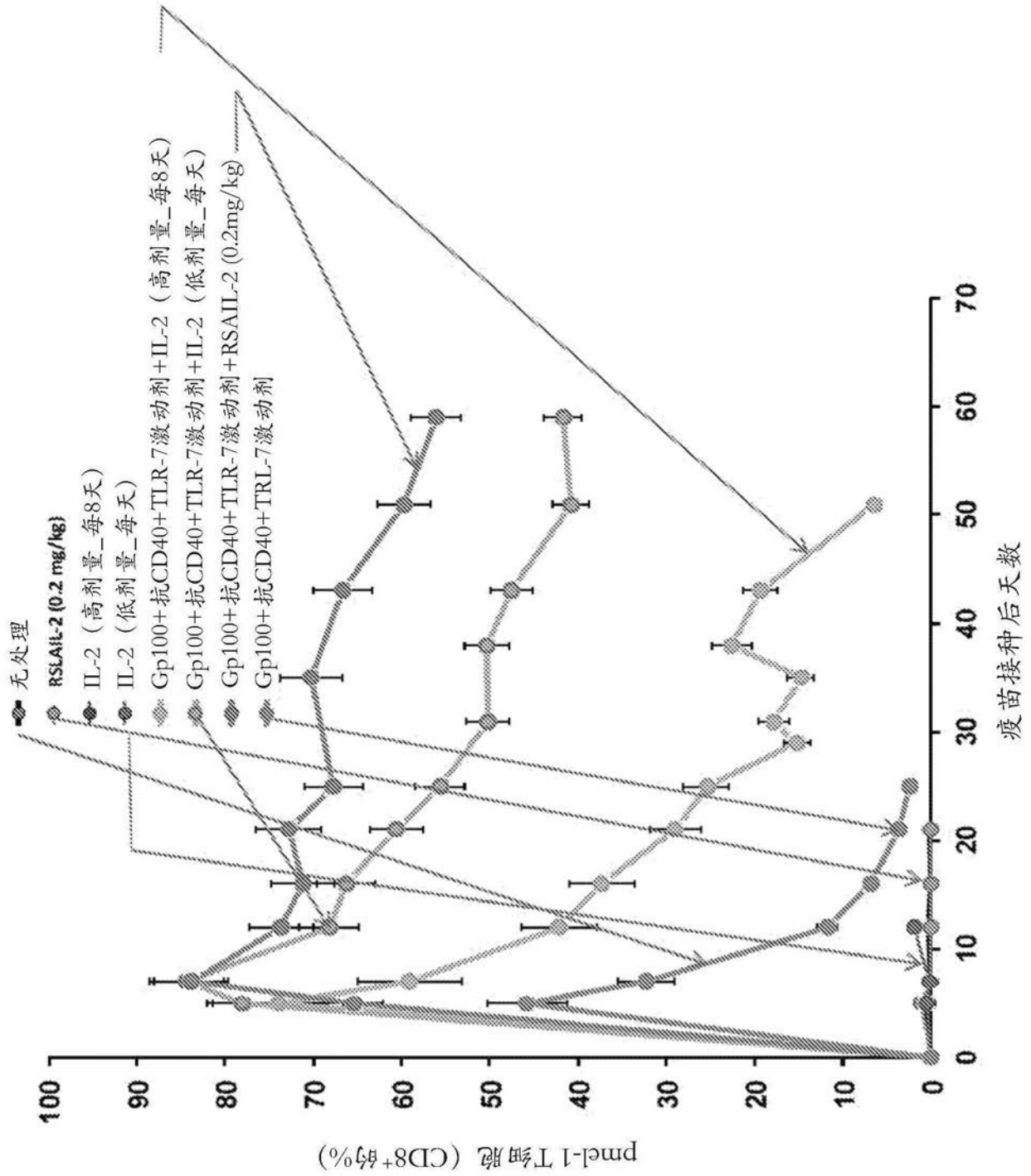


图7

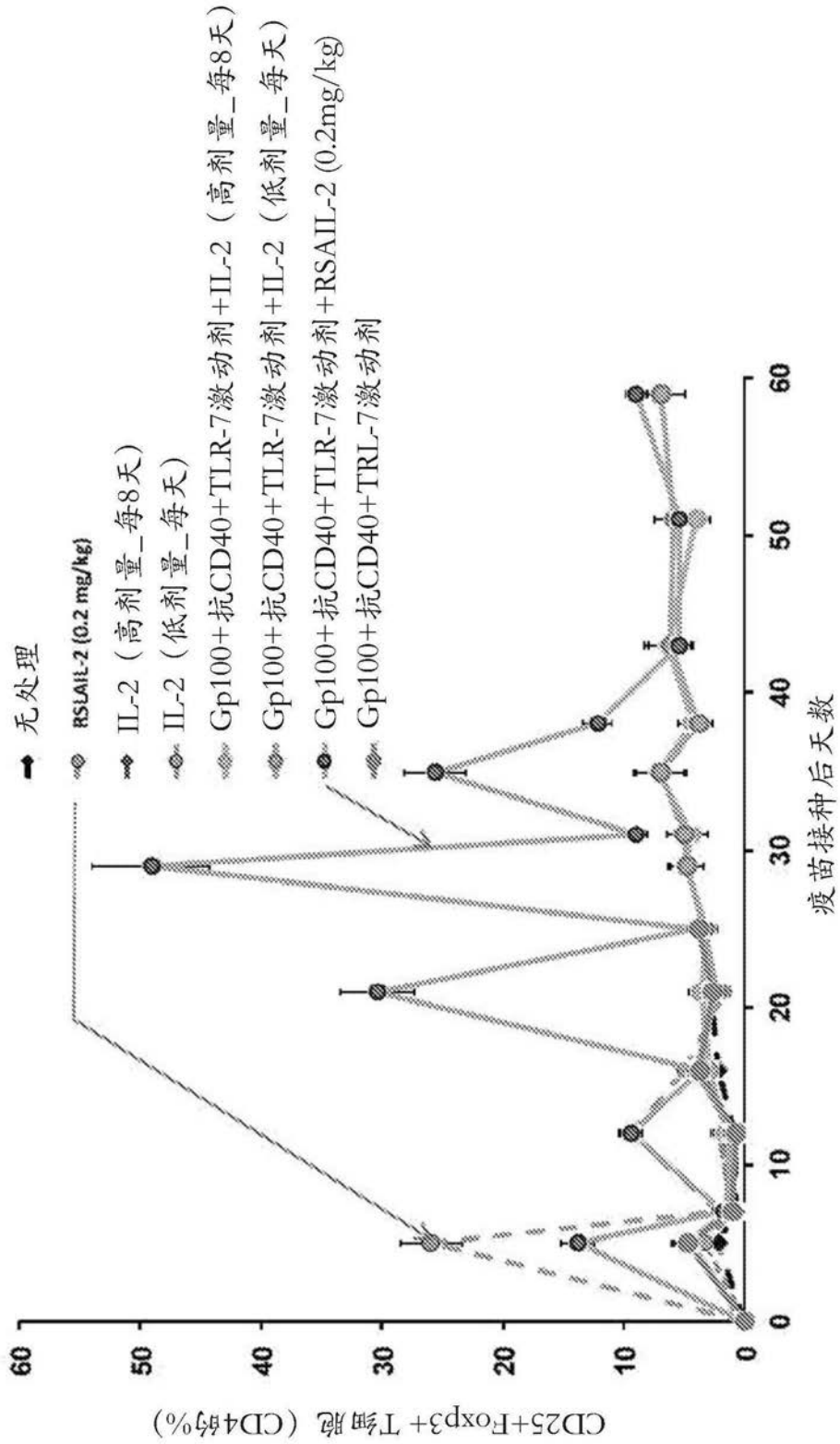


图8

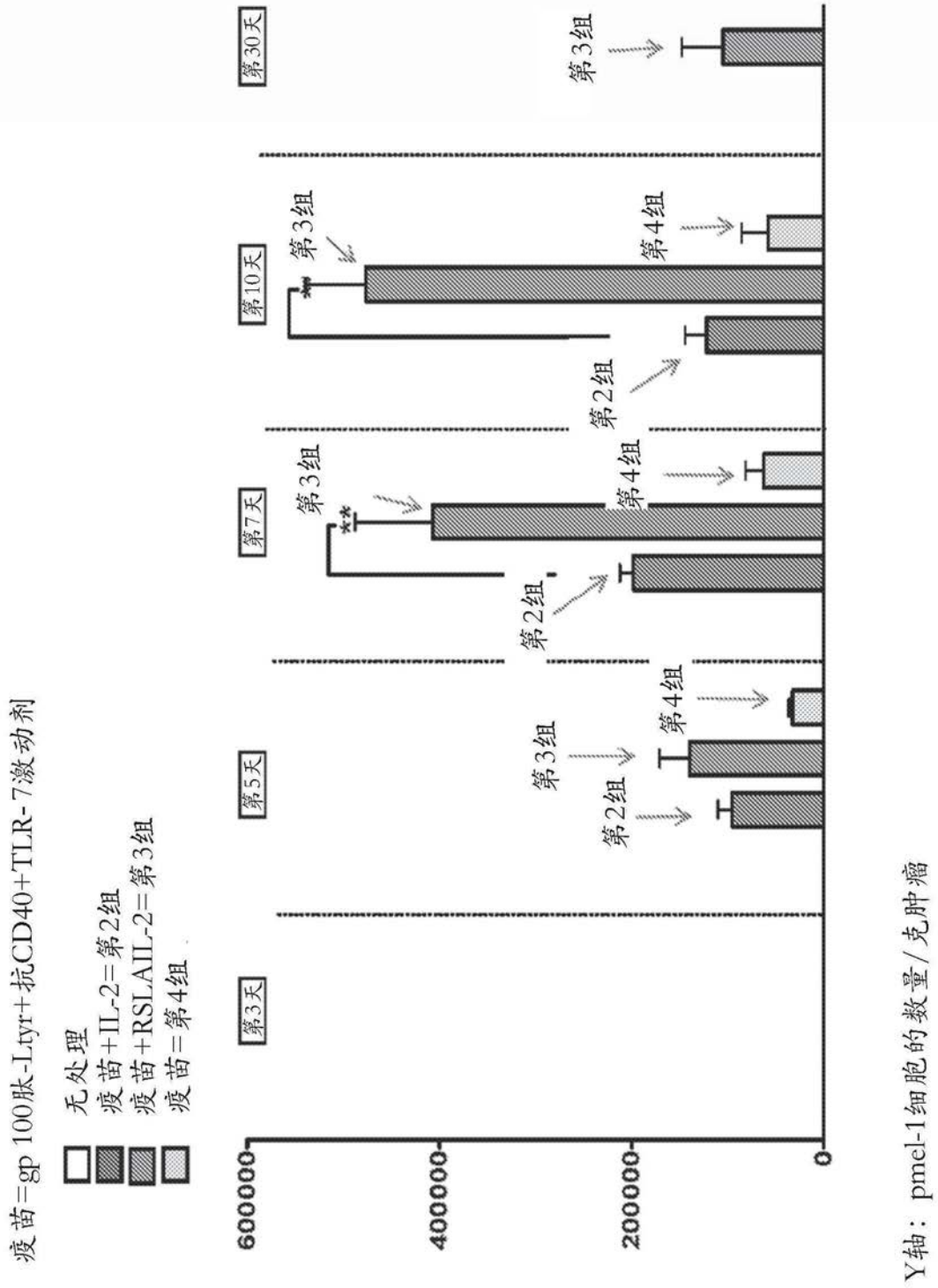


图9

疫苗=gp 100肽-Ltyr+抗CD40+TLR-7激动剂

- 无处理
- ▨ 疫苗+IL=第2组
- ▩ 疫苗+RSLAIL-2=第3组
- ▧ 疫苗=第4组

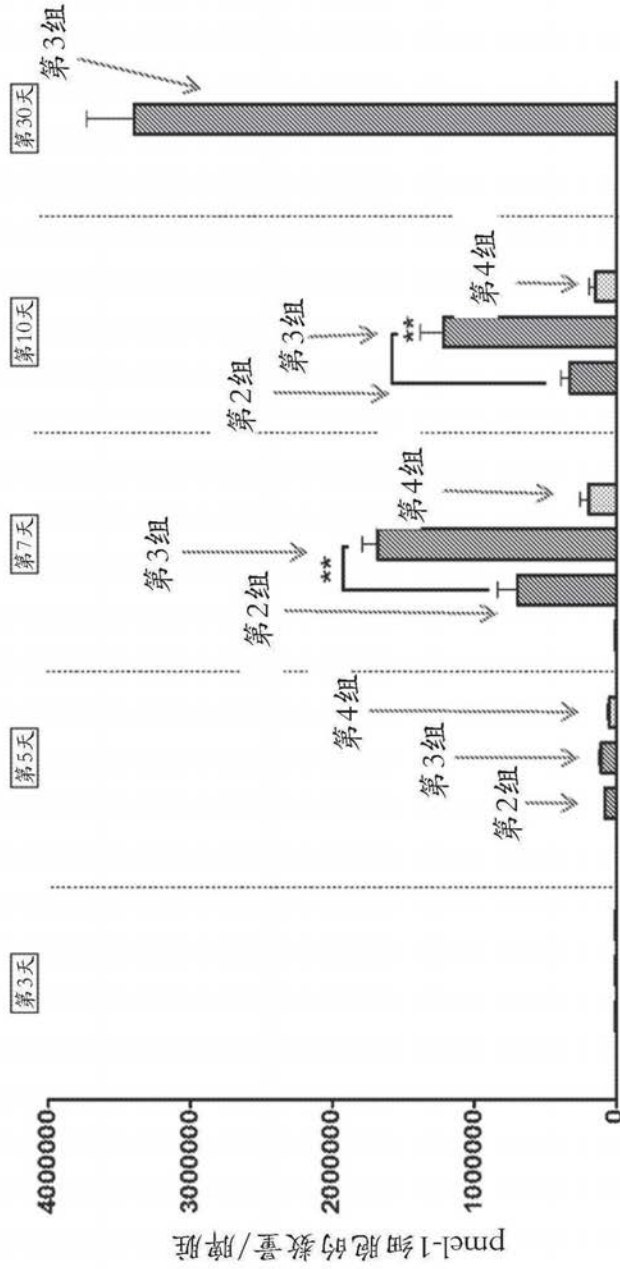


图10

SEQ ID NO:5 NOUS-020

MQTSPTGILPTTSNSISTSEMTWKSSFPEFARYTTPEDTTPEPGEDPRVTRHSGQNHLKEM
 AISVLEARACAAAGQTVSVVALHDDMENQPLIGIQSTAPEVATRMQSFQGMKIVGYDPIIS
 PEVAIIQVSPKDIQLTIFPSKSVKEGDTVKASKKGMWSEGNSSHTIRDLYTIETSIPSVSNA
 LNWKESFIQSTLGYVLRATAAYVNAIEKIFKVYNEAGVTFTSWIHCWKYLSVQSQLFRGSSL
 LFRRSNFTVDCSKAGNDMLLVGVHGPRTPALGSLALMIWLMTPHSHETEQRLLPGFK
 GVKGHSGIDGLKQPGAQGVAVQKLNQLNLVILQAPENLTLSNLSESDRNKESDQTSVN
 MNGLENKISYLLPFYPPDEALEIGLELNSSALPPTILPQAPSGPSYATYLQPAQAQMLTPKPL
 RRNNSYTSYIMAICGMPLDSFRVIQTSKYMRDVIAIESAWLLELAPHIHRAGGLFVADAI
 QVGFGRIGKHFGYPYDVPDYAS

图11

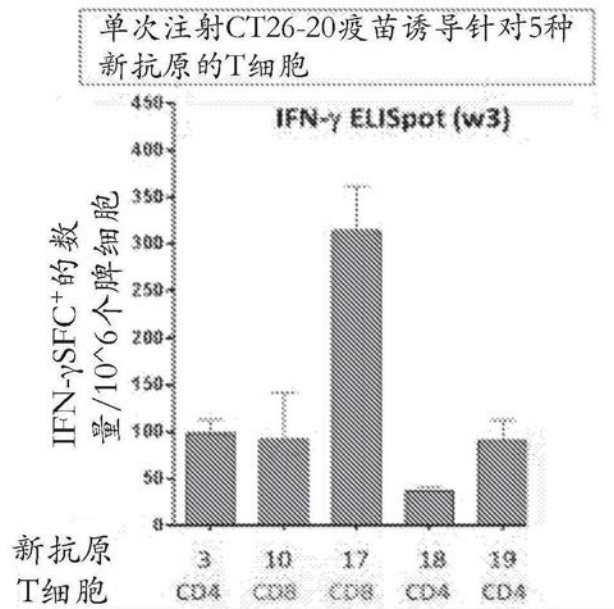


图12A

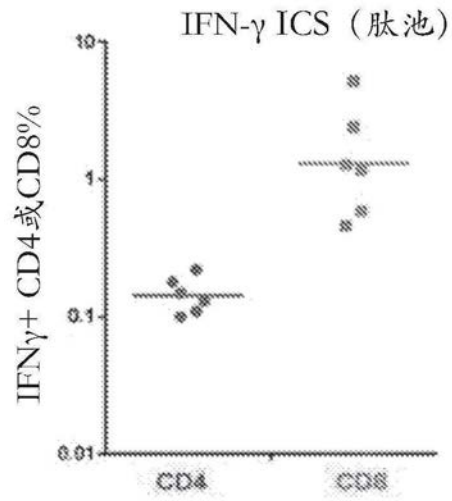


图12B

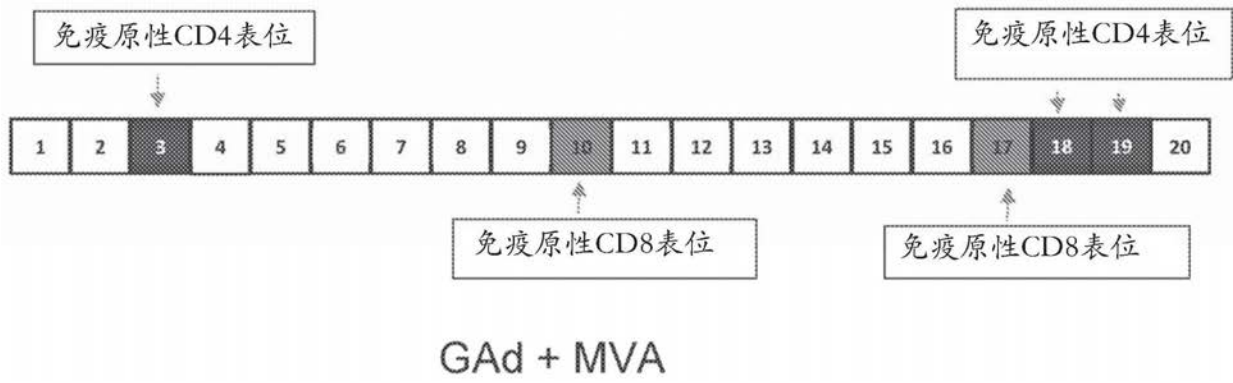


图13A

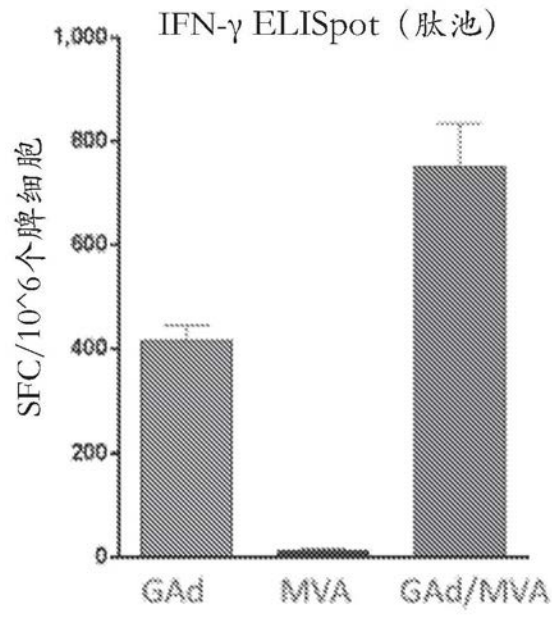


图13B

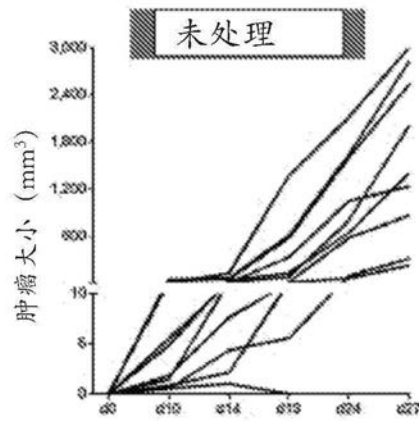


图14A

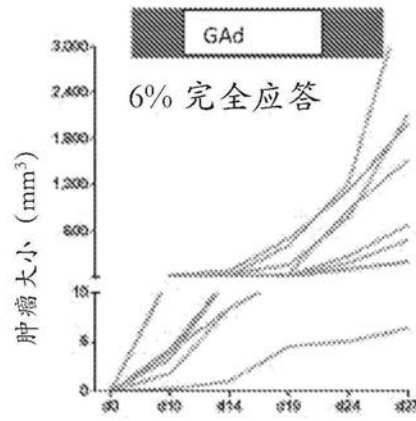


图14B

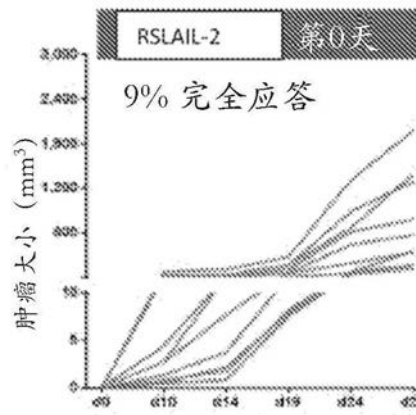


图14C

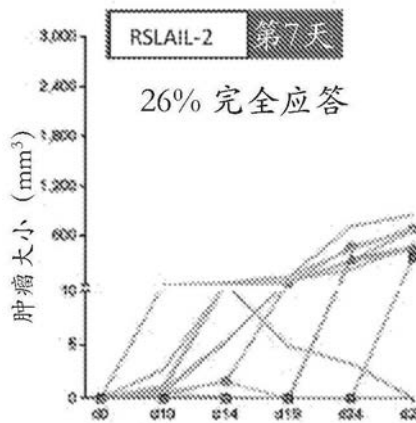


图14D

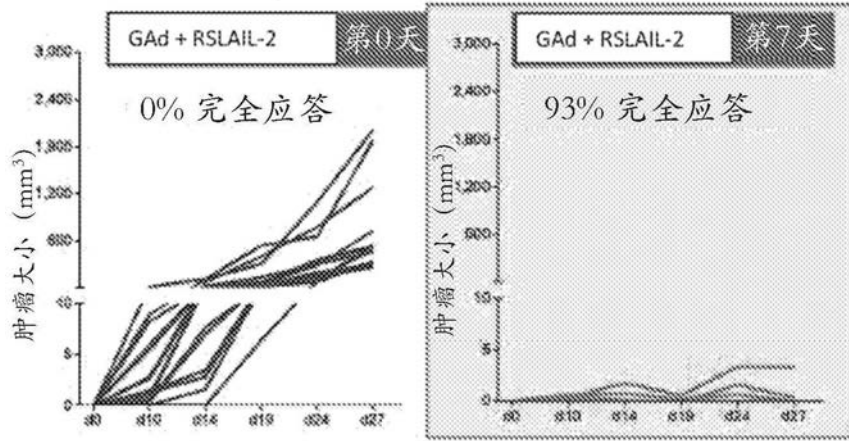


图 14E

图 14F

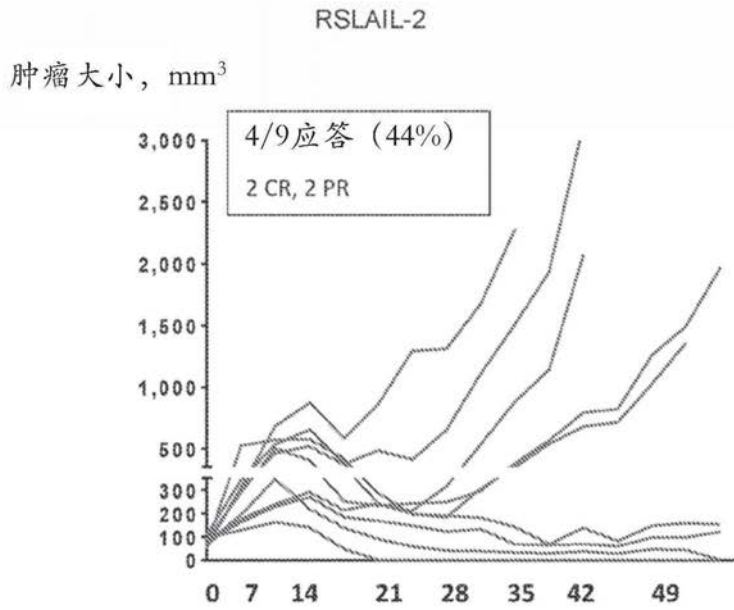


图 15A

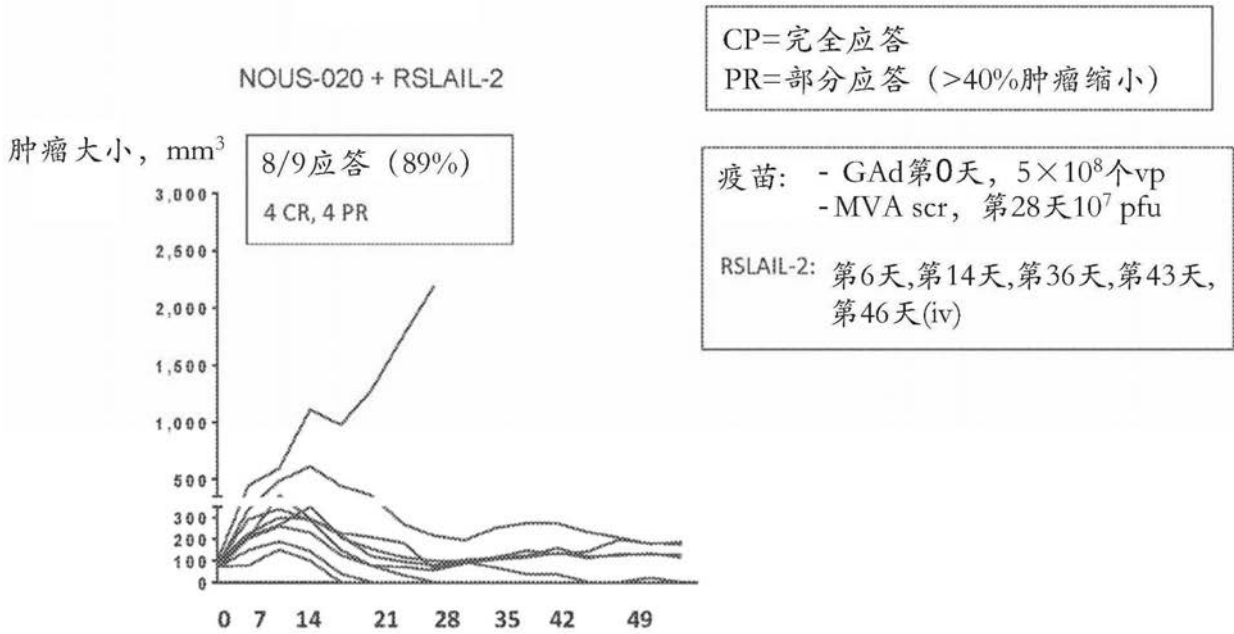


图 15B

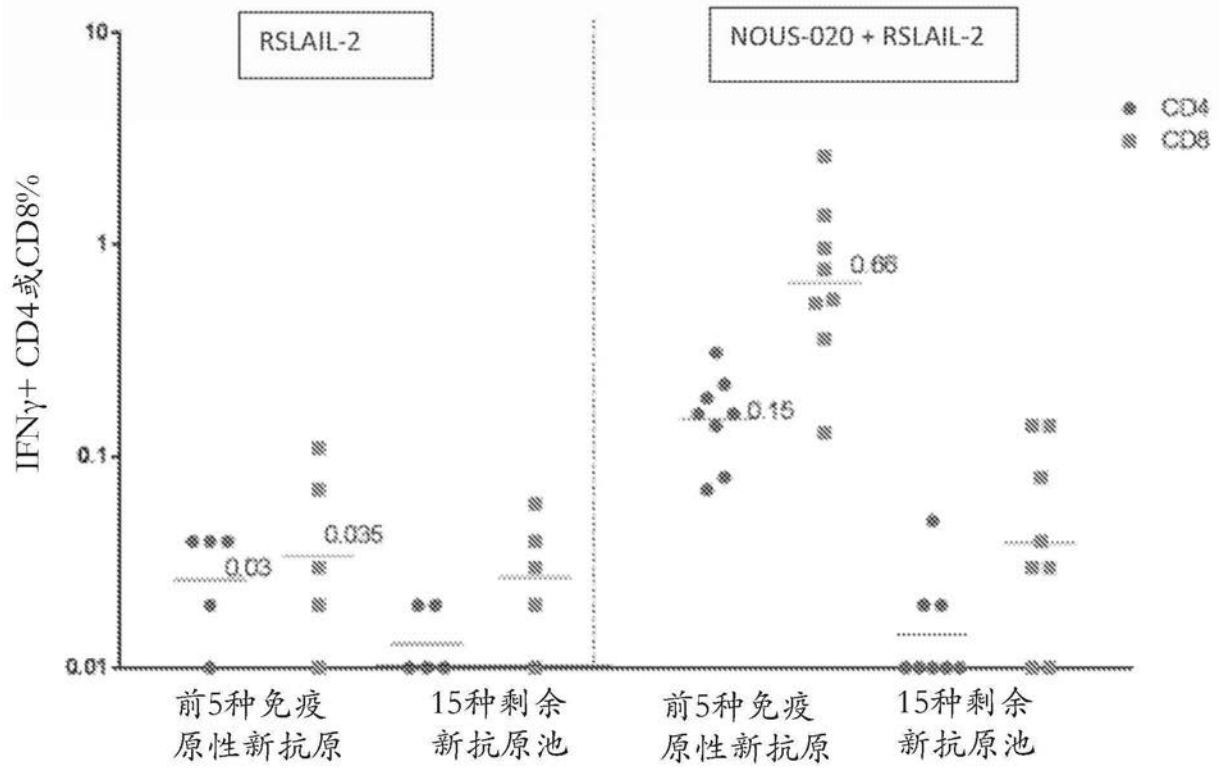


图 16A

图 16B

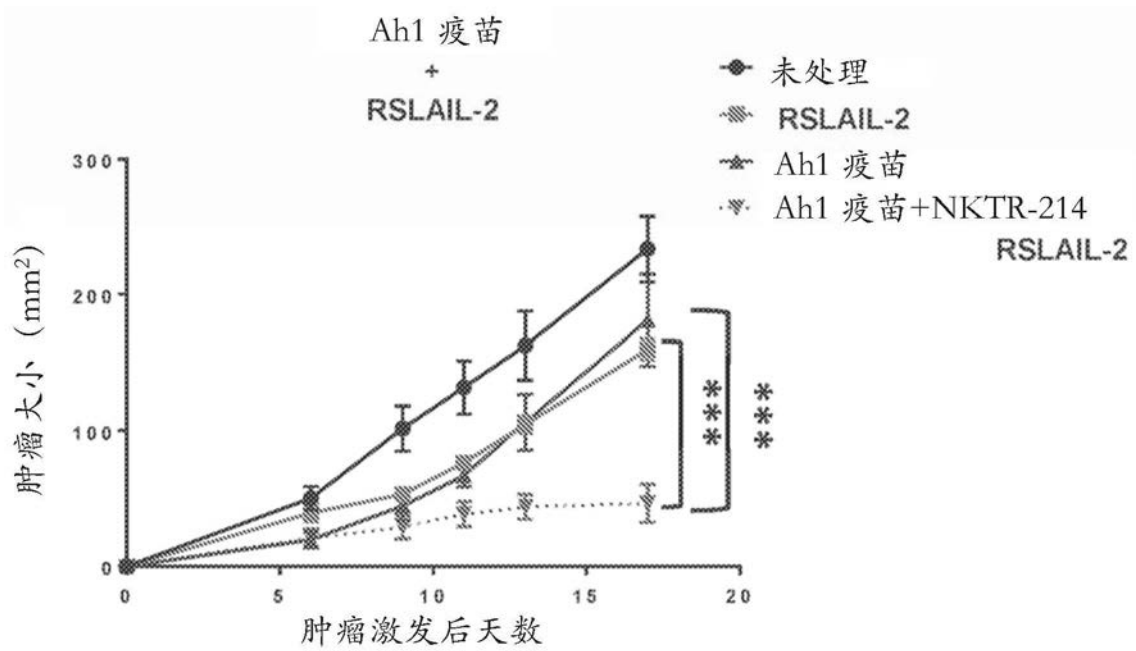


图17A

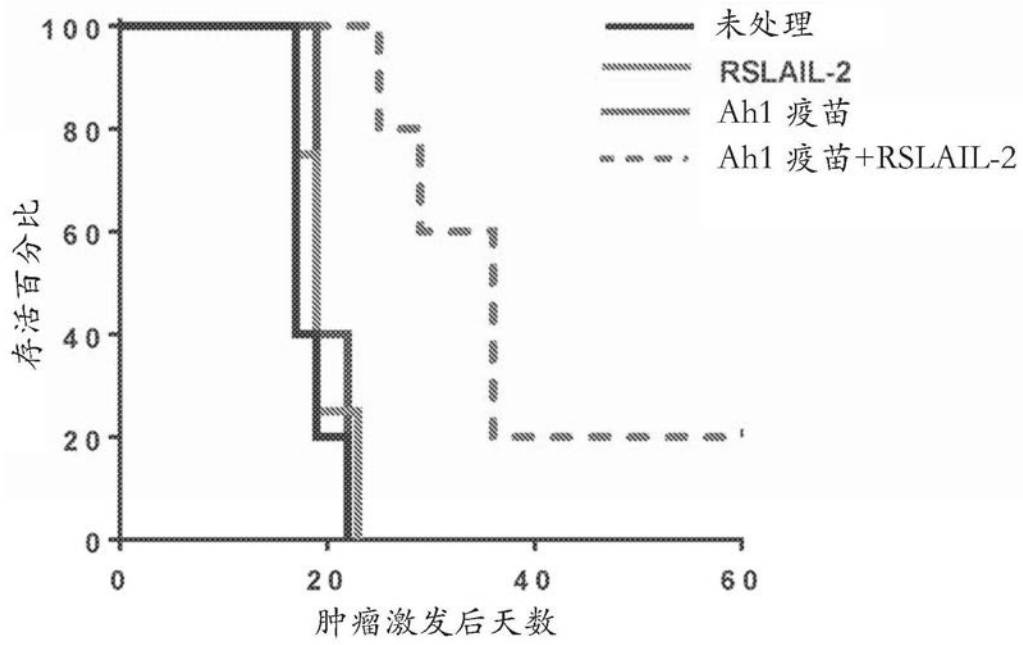


图17B

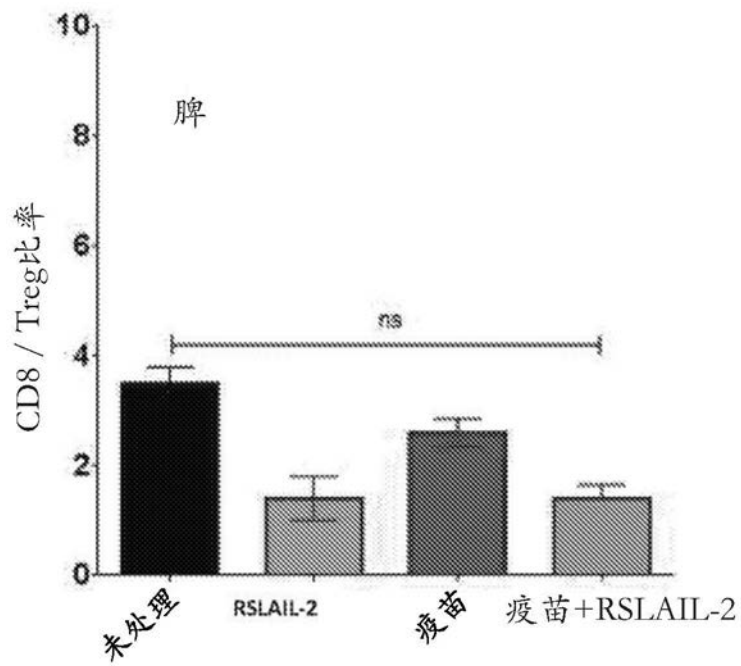


图18A

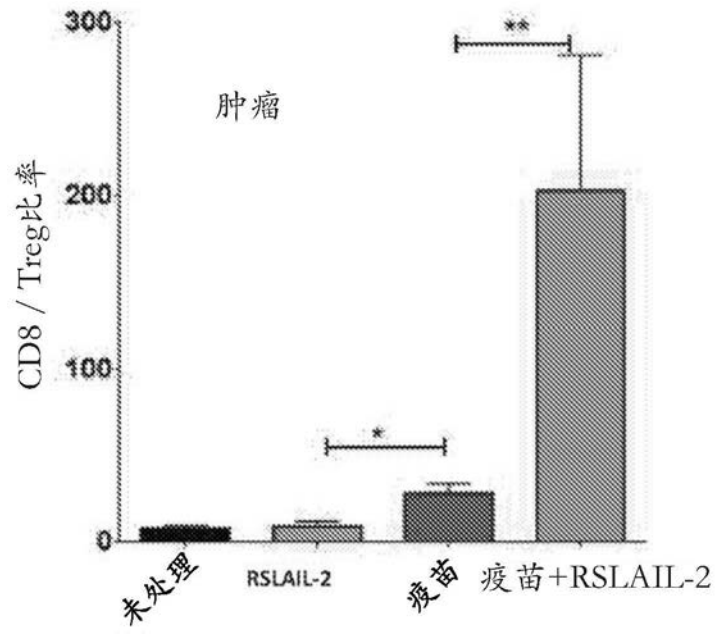


图18B