



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112004547 A

(43) 申请公布日 2020.11.27

(21) 申请号 201980027030.2

(22) 申请日 2019.02.26

(30) 优先权数据

62/635,133 2018.02.26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.10.20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/019637 2019.02.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/165453 EN 2019.08.29

(71) 申请人 新索思股份有限公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 C·E·卡法雷尔 J·普塔辛

M·米拉

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51) Int.Cl.

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C12N 15/24 (2006.01)

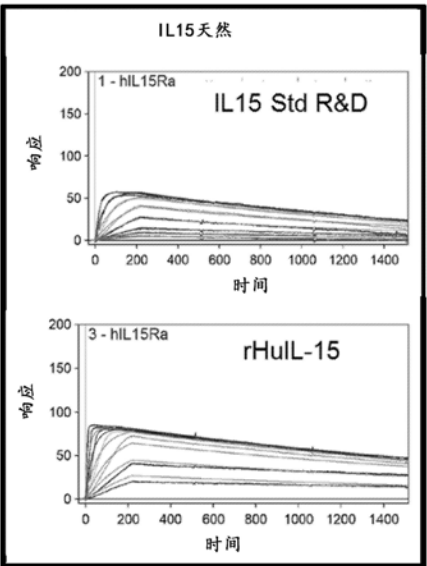
权利要求书8页 说明书73页 附图22页

(54) 发明名称

IL-15缀合物及其用途

(57) 摘要

本文公开了白介素 (IL) 15缀合物及其在治疗一种或多种适应症中的用途。本文还描述的包括包含一种或多种IL-15缀合物的药物组合物和试剂盒。



1. 一种经分离和修饰的白介素15 (IL-15) 多肽, 其在所述多肽上的如下位置处包含至少一种非天然氨基酸, 所述位置降低所述经修饰的IL-15多肽与白介素15受体 α (IL-15R α) 之间的结合但保留与白介素15受体 $\beta\gamma$ (IL-15R $\beta\gamma$) 信号传导复合物的显著结合以形成IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ 复合物, 其中与IL-15R α 的降低的结合是与野生型IL-15多肽与IL-15R α 之间的结合相比。

2. 一种经分离和修饰的白介素15 (IL-15) 多肽, 其在所述多肽上的延长半衰期的位置处包含至少一种非天然氨基酸, 其中所述延长的半衰期是与野生型IL-15蛋白的半衰期相比。

3. 一种经分离和修饰的白介素15 (IL-15) 多肽, 其在所述多肽上的如下位置处包含至少一种非天然氨基酸, 所述位置降低所述经修饰的IL-15多肽与白介素15受体 α (IL-15R α) 之间的结合但保留与白介素15受体 $\beta\gamma$ (IL-15R $\beta\gamma$) 信号传导复合物的显著信号传导效力, 其中与IL-15R α 的降低的结合是与野生型IL-15多肽与IL-15R α 之间的结合相比。

4. 根据权利要求3所述的经分离和修饰的IL-15多肽, 其中将所述信号传导效力与野生型IL-15多肽与IL-15R $\beta\gamma$ 之间的信号传导效力进行比较。

5. 根据权利要求4所述的经分离和修饰的IL-15多肽, 其中所述经修饰的IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ 复合物与所述野生型IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ 复合物之间的受体信号传导效力的差异小于1000倍、小于500倍、小于200倍、小于100倍、小于50倍、小于10倍、小于5倍、小于4倍、小于3倍、小于2倍或小于1倍。

6. 根据权利要求4所述的经分离和修饰的IL-15多肽, 其中所述经修饰的IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ 复合物与所述野生型IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ 复合物之间的受体信号传导效力的差异大于10倍、大于20倍、大于30倍、大于40倍、大于50倍、大于100倍、大于200倍、大于300倍、大于400倍或大于500倍。

7. 根据权利要求1-3中任一项所述的经分离和修饰的IL-15多肽, 其中所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自N1、W2、V3、N4、I6、S7、D8、K10、K11、E13、D14、L15、Q17、S18、M19、H20、I21、D22、A23、T24、L25、Y26、E28、S29、D30、V31、H32、P33、S34、C35、K36、V37、T38、K41、L44、E46、Q48、V49、S51、L52、E53、S54、G55、D56、A57、S58、H60、D61、T62、V63、E64、N65、I67、I68、L69、N71、N72、S73、L74、S75、S76、N77、G78、N79、V80、T81、E82、S83、G84、C85、K86、E87、C88、E89、E90、L91、E92、E93、K94、N95、I96、K97、E98、L100、Q101、S102、V104、H105、Q108、M109、F110、I111、N112、T113和S114, 其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。

8. 根据权利要求1或3所述的经分离和修饰的IL-15多肽, 所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自

D22、A23、T24、L25、Y26、L44、E46、Q48、V49、E53、E89、E90和E93, 其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置;

Y26、E46、V49、E53和L25, 其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置;

A23、T24、E89和E93, 其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置;

D22、L44、Q48和E90, 其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置;

L25、E53、N77和S83, 其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置; 或

L25和E53, 其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。

9. 根据权利要求2所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自:

E13、D14、L15、Q17、S18、M19、H20、I21、S34、C35、K36、V37、T38、K41、L44、S51、L52、S54、G55、D56、A57、S58、H60、V63、I67、N71、S73、L74、S75、S76、N77、G78、N79、V80、T81、E82、S83、G84、C85、K86、E87、C88、L91、E92、K94、N95、I96、K97、E98、L100、Q101和F110,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置;

D14、Q17、S18、K41、S51、L52、G55、D56、A57、S58、S75、S76、N77、N79、V80、T81、S83、G84、E92、K94、N95、K97和E98,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置;

E13、L15、M19、H20、K36、V37、T38、S54、H60、I67、N71、G78、K86、E87和Q101,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置;或

I21、S34、C35、L44、V63、S73、L74、E82、C85、C88、L91、I96、L100和F110,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。

10. 根据权利要求1-3中任一项所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述至少一种非天然氨基酸:

- 是赖氨酸类似物;
- 包含芳族侧链;
- 包含叠氮基基团;
- 包含炔基基团;或者
- 包含醛或酮基团。

11. 根据权利要求1-3中任一项所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述至少一种非天然氨基酸不包括芳族侧链。

12. 根据权利要求1-3中任一项所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述至少一种非天然氨基酸包括N6-叠氮基乙氧基-L-赖氨酸(AzK)、N6-炔丙基乙氧基-L-赖氨酸(PraK)、BCN-L-赖氨酸、降冰片烯赖氨酸、TCO-赖氨酸、甲基四嗪赖氨酸、烯丙氧基羰基赖氨酸、2-氨基-8-氧代壬酸、2-氨基-8-氧代辛酸、对-乙酰基-L-苯丙氨酸、对-叠氮基甲基-L-苯丙氨酸(pAMF)、对-碘-L-苯丙氨酸、间-乙酰基苯丙氨酸、2-氨基-8-氧代壬酸、对-炔丙基氧基苯丙氨酸、对-炔丙基-苯丙氨酸、3-甲基-苯丙氨酸、L-多巴、氟化苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、对-叠氮基-L-苯丙氨酸、对-酰基-L-苯丙氨酸、对-苯甲酰基-L-苯丙氨酸、对-溴苯丙氨酸、对-氨基-L-苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、O-烯丙基酪氨酸、O-甲基-L-酪氨酸、O-4-烯丙基-L-酪氨酸、4-丙基-L-酪氨酸、磷酸酪氨酸、三-O-乙酰基-GlcNAcp-丝氨酸、L-磷酸丝氨酸、磷酸丝氨酸、L-3-(2-萘基)丙氨酸、2-氨基-3-((2-((3-(苄氧基)-3-氧丙基)氨基)乙基)硒基)丙酸、2-氨基-3-(苯基硒基)丙酸或硒代半胱氨酸。

13. 根据权利要求1-3中任一项所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述至少一种非天然氨基酸通过正交tRNA合成酶/tRNA对掺入所述经修饰的IL-15多肽中。

14. 根据权利要求13所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述正交合成酶/tRNA对的正交tRNA包含至少一种非天然核碱基。

15. 根据权利要求13所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述正交合成酶/tRNA对的正交tRNA包含非天然碱基对。

16. 根据权利要求1-3中任一项所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述经修饰的

IL-15多肽通过所述至少一种非天然氨基酸共价附接至缀合部分。

17. 根据权利要求16所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述缀合部分包括水溶性聚合物、脂质、蛋白质或肽。

18. 根据权利要求17所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述水溶性聚合物包括聚乙二醇(PEG)、聚(丙二醇)(PPG)、乙二醇和丙二醇的共聚物、聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯烴醇)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(羟烷基甲基丙烯酰胺)、聚(甲基丙烯酸羟烷基酯)、聚(糖类)、聚(α -羟基酸)、聚(乙烯醇)、聚磷腈、聚噁唑啉(P0Z)、聚(N-丙烯酰吗啉)或其组合。

19. 根据权利要求17所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述水溶性聚合物包括PEG分子。

20. 根据权利要求19所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述PEG分子是线性PEG。

21. 根据权利要求19所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述PEG分子是支化PEG。

22. 根据权利要求17所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述水溶性聚合物包括多糖。

23. 根据权利要求22所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述多糖包括葡聚糖、聚唾液酸(PSA)、透明质酸(HA)、直链淀粉、肝素、硫酸乙酰肝素(HS)、糊精或羟乙基淀粉(HES)。

24. 根据权利要求17所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述脂质包括脂肪酸。

25. 根据权利要求24所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述脂肪酸包含约6至约26个碳原子、约6至约24个碳原子、约6至约22个碳原子、约6至约20个碳原子、约6至约18个碳原子、约20至约26个碳原子、约12至约26个碳原子、约12至约24个碳原子、约12至约22个碳原子、约12至约20个碳原子或约12至约18个碳原子。

26. 根据权利要求24所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述脂肪酸是饱和脂肪酸。

27. 根据权利要求17所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述蛋白质包括白蛋白、转铁蛋白或运甲状腺素蛋白。

28. 根据权利要求16所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述缀合部分包括TLR激动剂。

29. 根据权利要求17所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述蛋白质包括抗体或其结合片段。

30. 根据权利要求29所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述抗体或其结合片段包括抗体的Fc部分。

31. 根据权利要求17所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述肽包括XTEN肽、富含甘氨酸的高氨基酸聚合物(HAP)、PAS多肽、弹性蛋白样多肽(ELP)、CTP肽或明胶样蛋白(GLK)聚合物。

32. 根据权利要求16所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述缀合部分通过接头与所述经修饰的IL-15的至少一种非天然氨基酸间接结合。

33. 根据权利要求32所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述接头包括同双官能接头、异双官能接头、零长度接头、可切割或不可切割二肽接头、马来酰亚胺基团、间隔基或其组合。

34. 根据权利要求1-3中任一项所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述经修饰的IL-15多肽还包含在残基位置N71、N72或N77处的修饰,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。

35. 根据权利要求34所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述修饰改善了CMC状况和/或效力。

36. 根据权利要求1或3所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述经修饰的IL-15多肽还包含残基E13、D14、L15、Q17、S18、M19、H20、I21、S34、C35、K36、V37、T38、K41、L44、S51、L52、S54、G55、D56、A57、S58、H60、V63、I67、N71、S73、L74、S75、S76、N77、G78、N79、V80、T81、E82、S83、G84、C85、K86、E87、C88、L91、E92、K94、N95、I96、K97、E98、L100、Q101或F110处的修饰,其中所述修饰是为了提高半衰期延长。

37. 根据权利要求2所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述经修饰的IL-15多肽还包含在以下位置处的修饰:

残基D22、A23、T24、L25、Y26、L44、E46、Q48、V49、E53、E89、E90或E93,其中所述修饰削弱与IL-15R α 的相互作用;

残基N1、N4、S7、D8、K11、D61、T62、E64、N65、I68、L69或N72,其中所述修饰削弱与IL-15R β 的相互作用;

残基V3、I6、K10、E28、S29、D30、V31、H32、P33、S102、V104、H105、Q108、M109、I111、N112、T113或S114,其中所述修饰削弱与IL-15R γ 的相互作用;或

其组合。

38. 根据权利要求36或37所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述修饰是针对天然氨基酸或非天然氨基酸。

39. 根据权利要求1-3中任一项所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中相对于野生型IL-15多肽,结合亲和力的减小是对IL-15R α 的结合亲和力减小约30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%。

40. 根据权利要求1-3中任一项所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中相对于野生型IL-15多肽,对IL-15R α 的结合亲和力减小约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍。

41. 根据权利要求1-3中任一项所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述经修饰的IL-15多肽是:

全长IL-15多肽的功能活性片段;

重组IL-15多肽;或

重组人IL-15多肽。

42. 根据权利要求1-3中任一项所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述经修饰的IL-15多肽包括N-末端缺失、C-末端缺失或其组合。

43. 根据权利要求1-3中任一项所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述N-末端缺失包括从所述N-末端缺失前1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25或30个残基,其中所述残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。

44. 根据权利要求1-3中任一项所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述C-末端缺失包括从所述C-末端缺失最后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20或更多个残基,

其中所述残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。

45. 根据权利要求1-3中任一项所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中对IL-15R α 的结合亲和力减小的所述经修饰的IL-15多肽能够扩增CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞群体或其组合。

46. 根据权利要求16所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述缀合部分或所述非天然氨基酸削弱或阻断IL-15与IL-15R α 的结合。

47. 根据权利要求16所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述缀合部分或所述非天然氨基酸延长半衰期,但不削弱或阻断IL-15与IL-15受体的结合。

48. 根据权利要求16所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述缀合部分或所述非天然氨基酸增加IL-15与IL-15R β 和/或IL-15R γ 的结合。

49. 根据权利要求1-3中任一项所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述IL-15的延长的半衰期为至少90分钟、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、18小时、24小时、36小时、48小时、3天、4天、5天、6天、7天或长于所述野生型IL-15的血浆半衰期。

50. 根据权利要求1-3中任一项所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述IL-15的延长的半衰期为约90分钟、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、18小时、24小时、36小时、48小时、3天、4天、5天、6天或7天。

51. 根据权利要求1-3中任一项所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中相对于野生型IL-15多肽,通过所述经修饰的IL-15多肽经由所述IL-15R β γ 复合物激活CD8+效应幼稚和记忆细胞、自然杀伤(NK)细胞或自然杀伤T(NKT)细胞群体保留了激活所述细胞群体的显著效力。

52. 根据权利要求51所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述经修饰的IL-15多肽对所述IL-15R β γ 复合物的受体信号传导效力高于所述野生型IL-15多肽对所述IL-15R β γ 复合物的受体信号传导效力。

53. 根据权利要求51所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述经修饰的IL-15多肽对所述IL-15R β γ 复合物的受体信号传导效力低于所述野生型IL-15多肽对所述IL-15R β γ 复合物的受体信号传导效力。

54. 一种经分离和修饰的白介素15(IL-15)多肽,其包含至少一种非天然氨基酸,其中所述至少一种非天然氨基酸是在选择性减小所述经修饰的IL-15多肽与白介素2/白介素15受体 β (IL-2/IL-15R β)、白介素15受体 γ (IL-15R γ)或其组合的结合亲和力但不影响与所述白介素15受体 α (IL-15R α)的相互作用的残基位置处。

55. 根据权利要求54所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述经修饰的IL-15多肽对IL-15R β 具有减小的结合亲和力。

56. 根据权利要求55所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自N1、N4、S7、D8、K11、D61、T62、E64、N65、I68、L69和N72,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。

57. 根据权利要求55所述的经分离和修饰的IL-15多肽,其中所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自:

N4、S7、K11和D61;

D8、E64、N65、I68和N72；或
N1、T62和L69。

58. 根据权利要求54所述的经分离和修饰的IL-15多肽，其中所述经修饰的IL-15多肽对IL-15R γ 具有减小的结合亲和力。

59. 根据权利要求58所述的经分离和修饰的IL-15多肽，其中所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自V3、I6、K10、E28、S29、D30、V31、H32、P33、S102、V104、H105、Q108、M109、I111、N112、T113和S114，其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。

60. 根据权利要求58所述的经分离和修饰的IL-15多肽，其中所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自：

V3、K10、S29、D30、H32、H105、Q108、M109、I111、N112、T113和S114；
E28、P33、S102和V104；或
I6和V31。

61. 根据权利要求54-60中任一项所述的经分离和修饰的IL-15多肽，其中所述经修饰的IL-15多肽还包含改善半衰期延长的修饰。

62. 根据权利要求61所述的经分离和修饰的IL-15多肽，其中所述修饰在残基位置E13、D14、L15、Q17、S18、M19、H20、I21、S34、C35、K36、V37、T38、K41、L44、S51、L52、S54、G55、D56、A57、S58、H60、V63、I67、N71、S73、L74、S75、S76、N77、G78、N79、V80、T81、E82、S83、G84、C85、K86、E87、C88、L91、E92、K94、N95、I96、K97、E98、L100、Q101或F110处，其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。

63. 根据权利要求54-62中任一项所述的经分离和修饰的IL-15多肽，其中所述经修饰的IL-15多肽还包含在残基位置N71、N72或N77处的修饰，其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。

64. 根据权利要求61-63中任一项所述的经分离和修饰的IL-15多肽，其中所述修饰是针对非天然氨基酸。

65. 根据权利要求61-63中任一项所述的经分离和修饰的IL-15多肽，其中所述修饰是针对天然氨基酸。

66. 根据权利要求63所述的经分离和修饰的IL-15多肽，其中所述修饰改善了CMC状况和/或效力。

67. 一种白介素15 (IL-15) 缀合物，其包含：

经分离和纯化的IL-15多肽；和

缀合部分，所述缀合部分在选自N4、E46、D61、E64、N65、I68和L69的氨基酸位置处与所述经分离和纯化的IL-15多肽结合，其中所述氨基酸残基的编号对应于SEQ ID NO:1。

68. 根据权利要求67所述的IL-15缀合物，其中所述氨基酸残基突变为半胱氨酸或赖氨酸。

69. 根据权利要求67所述的IL-15缀合物，其中选自N4、E46、N65和L69的氨基酸残基进一步突变为非天然氨基酸。

70. 一种药物组合物，所述药物组合物包含：

根据权利要求1-66中任一项所述的经修饰的IL-15多肽或根据权利要求67-69中任一项所述的IL-15缀合物；和

药学上可接受的赋形剂。

71. 根据权利要求70所述的药物组合物,其中所述药物组合物被配制用于肠胃外给予。

72. 一种在有需要的受试者中治疗增殖性疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者给予治疗有效量的根据权利要求1-66中任一项所述的经修饰的IL-15多肽或根据权利要求67-69中任一项所述的IL-15缀合物。

73. 根据权利要求72所述的方法,其中所述增殖性疾病或病症是癌症。

74. 根据权利要求73所述的方法,其中所述癌症是实体瘤癌症。

75. 根据权利要求74所述的方法,其中所述实体瘤癌症是膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、结直肠癌、食道癌、眼癌、头颈癌、肾癌、肺癌、黑色素瘤、卵巢癌、胰腺癌或前列腺癌。

76. 根据权利要求73所述的方法,其中所述癌症是恶性血液病。

77. 根据权利要求76所述的方法,其中所述恶性血液病是慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、华氏巨球蛋白血症、多发性骨髓瘤、结外边缘区B细胞淋巴瘤、结边缘区B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、非伯基特高级B细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBL)、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤、前体B淋巴母细胞淋巴瘤、B细胞前淋巴细胞性白血病、淋巴浆细胞性淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞骨髓瘤、浆细胞瘤、纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤或淋巴瘤样肉芽肿病。

78. 根据权利要求72-77中任一项所述的方法,所述方法还包括给予另外的治疗剂。

79. 根据权利要求78所述的方法,其中同时给予所述经修饰的IL-15多肽或所述IL-15缀合物和所述另外的治疗剂。

80. 根据权利要求78所述的方法,其中顺序给予所述经修饰的IL-15多肽或所述IL-15缀合物和所述另外的治疗剂。

81. 根据权利要求80所述的方法,其中在所述另外的治疗剂之前给予所述经修饰的IL-15多肽或所述IL-15缀合物。

82. 根据权利要求80所述的方法,其中在给予所述另外的治疗剂之后给予所述经修饰的IL-15多肽或所述IL-15缀合物。

83. 根据权利要求72-82中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

84. 一种扩增效应T(Teff)细胞、记忆T(Tmem)细胞和自然杀伤(NK)细胞群体的方法,所述方法包括:

a) 使细胞与根据权利要求1-66中任一项所述的经修饰的IL-15多肽或根据权利要求67-69所述的IL-15缀合物接触;和

b) 使所述IL-15与IL-15R β 和IL-15R γ 亚基相互作用以形成IL-15/IL-15R β γ 复合物;其中所述IL-15缀合物对IL-15R α 亚基具有减小的亲和力,并且其中所述IL-15/IL-15R β γ 复合物刺激Teff、Tmem和NK细胞的扩增。

85. 根据权利要求84所述的方法,其中所述细胞是真核细胞。

86. 根据权利要求84-85中任一项所述的方法,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

87. 根据权利要求84-86中任一项所述的方法,其中所述细胞是人细胞。

88. 根据权利要求84-87中任一项所述的方法,其中所述IL-15缀合物包含经分离和纯化的IL-15多肽和在选自N4、E46、N65和L69的氨基酸残基处与所述经分离和纯化的IL-15多

肽结合的缀合部分,其中所述氨基酸残基的编号对应于SEQ ID NO:1。

89.根据权利要求84-88中任一项所述的方法,其中相对于野生型IL-15多肽,所述减小的亲和力是对IL-15R α 的结合亲和力减小约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%。

90.根据权利要求84-88中任一项所述的方法,其中相对于野生型IL-15多肽,对IL-15R α 的亲和力减小约1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍。

91.根据权利要求84-90中任一项所述的方法,其中所述缀合部分削弱或阻断IL-15与IL-15R α 的结合。

92.一种试剂盒,所述试剂盒包含根据权利要求1-66中任一项所述的经修饰的IL-15多肽、根据权利要求67-69中任一项所述的IL-15缀合物或根据权利要求70-71中任一项所述的药物组合物。

93.一种试剂盒,所述试剂盒包含编码根据权利要求1-66中任一项所述的经修饰的IL-15多肽的多核酸分子。

IL-15缀合物及其用途

交叉引用

[0001] 本申请要求2018年2月26日提交的美国临时申请号62/635,133的权益,将其通过引用以其整体并入本文。

背景技术

[0002] T细胞的不同种群调节免疫系统,以维持免疫稳态和耐受性。例如,调节性T (Treg) 细胞通过防止病理性自身反应性来防止免疫系统的不适当反应,而细胞毒性T细胞靶向并破坏感染的细胞和/或癌细胞。在一些实施方案中,不同T细胞群体的调节为治疗疾病或适应症提供了选择。

发明内容

[0003] 在某些实施方案中,本文公开了IL-15缀合物及其在癌症治疗中的用途。在一些实施方案中,本文还描述了调节IL-15与IL-15受体之间的相互作用以刺激或扩增特异性T细胞群体的方法。在另外的情况下,本文进一步描述了包含一种或多种本文所述的IL-15缀合物的药物组合物和试剂盒。

[0004] 在某些实施方案中,本文公开了包含至少一种经翻译后修饰的非天然氨基酸的经修饰的白介素15 (IL-15) 多肽,其中所述至少一种非天然氨基酸是在选择性减小所述经修饰的IL-15多肽与白介素15受体 α (IL-15R α) 的结合亲和力的残基位置处,其中结合亲和力的减小是相对于野生型IL-15多肽与所述IL-15R α 之间的结合亲和力,并且其中所述经修饰的IL-15多肽与白介素2/白介素15受体 $\beta\gamma$ (IL-2/IL-15R $\beta\gamma$) 的相互作用不受显著影响。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自N1、W2、V3、N4、I6、S7、D8、K10、K11、E13、D14、L15、Q17、S18、M19、H20、I21、D22、A23、T24、L25、Y26、E28、S29、D30、V31、H32、P33、S34、C35、K36、V37、T38、K41、L44、E46、Q48、V49、S51、L52、E53、S54、G55、D56、A57、S58、H60、D61、T62、V63、E64、N65、I67、I68、L69、N71、N72、S73、L74、S75、S76、N77、G78、N79、V80、T81、E82、S83、G84、C85、K86、E87、C88、E89、E90、L91、E92、E93、K94、N95、I96、K97、E98、L100、Q101、S102、V104、H105、Q108、M109、F110、I111、N112、T113和S114,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自D22、A23、T24、L25、Y26、L44、E46、Q48、V49、E53、E89、E90和E93; Y26、E46、V49、E53和L25; A23、T24、E89和E93; D22、L44、Q48和E90; L25、E53、N77和S83; 或L25和E53。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自E89、E53、E93、V49、E46、Y26、L25、T24、A23、D22、I21和L52,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自E46、Y26、V49、E53、T24、N4、K11、N65、L69、S18、H20和S83,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自E46、Y26、V49、E53和T24,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自E46、V49、E53和T24,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。

的位置。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自Y26、V49、E53和T24,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自V49、E53和T24,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自E46和Y26,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是E46,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是Y26,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是V49,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是E53,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是T24,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自N4、K11、N65、L69、S18、H20和S83,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸包含对-乙酰基-L-苯丙氨酸、对-碘-L-苯丙氨酸、O-甲基-L-酪氨酸、对-炔丙氧基苯丙氨酸、对-炔丙基-苯丙氨酸、L-3-(2-萘基)丙氨酸、3-甲基-苯丙氨酸、O-4-烯丙基-L-酪氨酸、4-丙基-L-酪氨酸、三-O-乙酰基-GlcNAcp-丝氨酸、L-多巴、氟化苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、对-叠氮基-L-苯丙氨酸、对-酰基-L-苯丙氨酸、对-苯甲酰基-L-苯丙氨酸、L-磷酸丝氨酸、磷酰丝氨酸、磷酰酪氨酸、对-溴苯丙氨酸、对-氨基-L-苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸或N6-(2-叠氮基乙氧基)-羰基-L-赖氨酸。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸包括如图2C所示的非天然氨基酸。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸通过正交tRNA合成酶/tRNA对掺入所述经修饰的IL-15多肽中。在一些实施方案中,所述经修饰的IL-15多肽通过所述至少一种非天然氨基酸与缀合部分缀合。在一些实施方案中,所述缀合部分包括水溶性聚合物、蛋白质或多肽。在一些实施方案中,所述水溶性聚合物包括:聚乙二醇(PEG)、聚(丙二醇)(PPG)、乙二醇和丙二醇的共聚物、聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯炔醇)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(羟烷基甲基丙烯酸酯)、聚(甲基丙烯酸羟烷基酯)、聚(糖类)、聚(α -羟基酸)、聚(乙烯醇)、聚磷腈、聚噁唑啉(POZ)、聚(N-丙烯酰吗啉)或其组合;或多糖。在一些实施方案中,所述水溶性聚合物包括PEG。在一些实施方案中,所述PEG是线性PEG或支化PEG。在一些实施方案中,所述水溶性聚合物包括聚糖。在一些实施方案中,所述多糖包括葡聚糖、聚唾液酸(PSA)、透明质酸(HA)、直链淀粉、肝素、硫酸乙酰肝素(HS)、糊精或羟乙基淀粉(HES)。在一些实施方案中,所述缀合部分包括饱和脂肪酸。在一些实施方案中,所述饱和脂肪酸包括十六烷酸、十四烷酸或15-叠氮基十五烷酸。在一些实施方案中,所述蛋白质包括白蛋白、转铁蛋白、运甲状腺素蛋白或抗体的Fc部分。在一些实施方案中,所述多肽包括XTEN肽、富含甘氨酸的高氨基酸聚合物(HAP)、PAS多肽、弹性蛋白样多肽(ELP)、CTP肽或明胶样蛋白(GLK)聚合物。在一些实施方案中,所述缀合部分与所述经修饰的IL-15的至少一种非天然氨基酸直接结合。在一些实施方案中,所述缀合部分通过接头与所述经修饰的IL-15的至少一种非天然氨基酸间接结合。在一些实施方案中,所述接头包括同双官能接头。在一些实施方案中,所述同双官能接头包括Lomant试剂二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)DSP、3'3'-二硫代双(磺基琥珀酰亚胺基丙酸酯)(DTSSP)、二琥珀酰亚胺辛二酸酯(DSS)、双(磺基琥珀酰亚胺

基) 辛二酸酯 (BS)、酒石酸二琥珀酰亚胺酯 (DST)、酒石酸二磺基琥珀酰亚胺酯 (磺基DST)、乙二醇双(琥珀酰亚胺基琥珀酸酯) (EGS)、二琥珀酰亚胺戊二酸酯 (DSG)、N,N'-二琥珀酰亚胺碳酸酯 (DSC)、己二亚氨酸二甲酯 (DMA)、庚二亚氨酸二甲酯 (DMP)、辛二亚氨酸二甲酯 (DMS)、3,3'-二硫代双丙亚氨酸二甲酯 (DTBP)、1,4-二-(3'-(2'-吡啶基二硫代) 丙酰胺基) 丁烷 (DPDPB)、双马来酰亚胺基己烷 (BMH)、含芳基卤化物的化合物 (DFDNB), 例如像1,5-二氟-2,4-二硝基苯或1,3-二氟-4,6-二硝基苯、4,4'-二氟-3,3'-二硝基苯砒 (DFDNPS)、双-[β -(4-叠氮基水杨酰胺基) 乙基] 二硫化物 (BASED)、甲醛、戊二醛、1,4-丁二醇二缩水甘油醚、己二酸二酰肼、碳酰肼、邻-甲苯胺、3,3'-二甲基联苯胺、联苯胺、 α,α' -对-二氨基二苯基、二碘-对-二甲苯磺酸、N,N'-亚乙基-双(碘乙酰胺) 或N,N'-六亚甲基-双(碘乙酰胺)。在一些实施方案中,所述接头包括异双官能接头。在一些实施方案中,所述异双官能接头包括N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫) 丙酸酯 (sPDP)、长链N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫) 丙酸酯 (LC-sPDP)、水溶性长链N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫) 丙酸酯 (磺基-LC-sPDP)、琥珀酰亚胺基氧羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基二硫) 甲苯 (sMPT)、磺基琥珀酰亚胺基-6-[α -甲基- α -(2-吡啶基二硫) 甲苯酰胺] 己酸酯 (磺基-LC-sMPT)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基) 环己烷-1-羧酸酯 (sMCC)、磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基) 环己基-1-羧酸酯 (磺基-sMCC)、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯 (MB)、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯 (磺基-MB)、N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基) 氨基苯甲酸酯 (sIAB)、磺基琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基) 氨基苯甲酸酯 (磺基-sIAB)、琥珀酰亚胺基-4-(对-马来酰亚胺基苯基) 丁酸酯 (sMPB)、磺基琥珀酰亚胺基-4-(对-马来酰亚胺基苯基) 丁酸酯 (磺基-sMPB)、N-(γ -马来酰亚胺基丁酰氧基) 琥珀酰亚胺酯 (GMB)、N-(γ -马来酰亚胺基丁酰氧基) 磺基琥珀酰亚胺酯 (磺基-GMB)、琥珀酰亚胺基6-((碘乙酰基) 氨基) 己酸酯 (sIAX)、琥珀酰亚胺基6-[6-(((碘乙酰基) 氨基) 己酰基) 氨基] 己酸酯 (sIAXX)、琥珀酰亚胺基4-(((碘乙酰基) 氨基) 甲基) 环己烷-1-羧酸酯 (sIAC)、琥珀酰亚胺基6-((((4-碘乙酰基) 氨基) 甲基) 环己烷-1-羧基) 氨基) 己酸酯 (sIACX)、对-硝基苯基碘乙酸酯 (NPIA)、羰基反应性和巯基反应性交联剂,如4-(4-N-马来酰亚胺基苯基) 丁酸酰肼 (MPBH)、4-(N-马来酰亚胺基甲基) 环己烷-1-羧基-酰肼8 (M_2C_2H)、3-(2-吡啶基二硫) 丙酰酰肼 (PDPH)、N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基水杨酸 (NHs-AsA)、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基水杨酸 (磺基-NHs-AsA)、磺基琥珀酰亚胺基-(4-叠氮基水杨酰胺基) 己酸酯 (磺基-NHs-LC-AsA)、磺基琥珀酰亚胺基-2-(对-叠氮基水杨酰胺基) 乙基-1,3'-二硫丙酸酯 (sAsD)、N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯 (HsAB)、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯 (磺基-HsAB)、N-琥珀酰亚胺基-6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨基) 己酸酯 (sANPAH)、磺基琥珀酰亚胺基-6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨基) 己酸酯 (磺基-sANPAH)、N-5-叠氮基-2-硝基苯甲酰氧基琥珀酰亚胺 (ANB-NOs)、磺基琥珀酰亚胺基-2-(间-叠氮基-邻-硝基苯甲酰胺基)-乙基-1,3'-二硫丙酸酯 (sAND)、N-琥珀酰亚胺基-4(4-叠氮基苯基) 1,3'-二硫丙酸酯 (sADP)、N-磺基琥珀酰亚胺基(4-叠氮基苯基)-1,3'-二硫丙酸酯 (磺基-sADP)、磺基琥珀酰亚胺基4-(对-叠氮基苯基) 丁酸酯 (磺基-sAPB)、磺基琥珀酰亚胺基2-(7-叠氮基-4-甲基香豆素-3-乙酰胺) 乙基-1,3'-二硫丙酸酯 (sAED)、磺基琥珀酰亚胺基7-叠氮基-4-甲基香豆素-3-乙酰胺 (磺基-sAMCA)、对-硝基苯基重氮丙酮酸酯 (pNPDP)、对-硝基苯基-2-重氮-3,3,3-三氟丙酸酯 (PNP-DTP)、1-(对-叠氮基水杨酰胺基)-4-(碘乙酰胺基) 丁烷 (AsIB)、N-[4-(对-

叠氮基水杨酰胺基) 丁基]-3'-(2'-吡啶基二硫) 丙酰胺 (APDP)、二苯甲酮-4-碘乙酰胺、对-叠氮基苯甲酰肼 (ABH)、4-(对-叠氮基水杨酰胺基) 丁胺 (AsBA) 或对-叠氮基苯乙二醛 (APG)。在一些实施方案中, 所述接头包括可裂解或不可裂解的二肽接头。在一些实施方案中, 所述二肽接头包括Val-Cit、Phe-Lys、Val-Ala或Val-Lys。在一些实施方案中, 所述接头包括马来酰亚胺基团。在一些实施方案中, 所述接头包括间隔基。在一些实施方案中, 所述间隔基包括对-氨基苄醇 (PAB)、对-氨基苄氧基羰基 (PABC)、其衍生物或类似物。在一些实施方案中, 所述缀合部分能够延长所述经修饰的IL-15多肽的血清半衰期。在一些实施方案中, 相对于野生型IL-15多肽, 结合亲和力的减小是对IL-15R α 的结合亲和力减小约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%。在一些实施方案中, 相对于野生型IL-15多肽, 对IL-15R α 的结合亲和力减小约1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍。在一些实施方案中, 所述经修饰的IL-15多肽是全长IL-15多肽的功能活性片段。在一些实施方案中, 所述经修饰的IL-15多肽是重组IL-15多肽。在一些实施方案中, 所述经修饰的IL-15多肽是重组人IL-15多肽。在一些实施方案中, 对IL-15R α 的结合亲和力减小的所述经修饰的IL-15多肽能够扩增效应T (Teff) 细胞和天然杀伤 (NK) 细胞群体。

[0005] 在某些实施方案中, 本文公开了包含至少一种经翻译后修饰的非天然氨基酸的经修饰的白介素15 (IL-15) 多肽, 其中所述至少一种非天然氨基酸是在不显著影响所述经修饰的IL-15多肽与白介素15受体 α (IL-15R α) 或IL-2/白介素15受体 $\beta\gamma$ (IL-2/IL-15R $\beta\gamma$) 的结合亲和力的残基位置处。在一些实施方案中, 所述经修饰的IL-15多肽具有延长的半衰期。在一些实施方案中, 所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自N1、W2、V3、N4、I6、S7、D8、K10、K11、E13、D14、L15、Q17、S18、M19、H20、I21、D22、A23、T24、L25、Y26、E28、S29、D30、V31、H32、P33、S34、C35、K36、V37、T38、K41、L44、E46、Q48、V49、S51、L52、E53、S54、G55、D56、A57、S58、H60、D61、T62、V63、E64、N65、I67、I68、L69、N71、N72、S73、L74、S75、S76、N77、G78、N79、V80、T81、E82、S83、G84、C85、K86、E87、C88、E89、E90、L91、E92、E93、K94、N95、I96、K97、E98、L100、Q101、S102、V104、H105、Q108、M109、F110、I111、N112、T113和S114, 其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些实施方案中, 所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自D22、A23、T24、L25、Y26、L44、E46、Q48、V49、E53、E89、E90和E93; Y26、E46、V49、E53和L25; A23、T24、E89和E93; D22、L44、Q48和E90; L25、E53、N77和S83; 或L25和E53。在一些实施方案中, 所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自M1、S18、H20、K36、K41、G55、D56、S75、S76、N77、G78、V80、T81、S83和K86, 其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些实施方案中, 所述至少一种非天然氨基酸包含对-乙酰基-L-苯丙氨酸、对-碘-L-苯丙氨酸、O-甲基-L-酪氨酸、对-炔丙氧基苯丙氨酸、对-炔丙基-苯丙氨酸、L-3-(2-萘基) 丙氨酸、3-甲基-苯丙氨酸、O-4-烯丙基-L-酪氨酸、4-丙基-L-酪氨酸、三-O-乙酰基-GlcNAcp-丝氨酸、L-多巴、氟化苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、对-叠氮基-L-苯丙氨酸、对-酰基-L-苯丙氨酸、对-苯甲酰基-L-苯丙氨酸、L-磷酸丝氨酸、磷酸丝氨酸、磷酸酪氨酸、对-溴苯丙氨酸、对-氨基-L-苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸或N6-(2-叠氮基乙氧基)-羰基-L-赖氨酸。在一些实施方案中, 所述至少一种非天然氨基酸包括如图2C所示的非天然氨基酸。在一些实施方案中, 所述至少一种非天然氨基酸通过正交tRNA合成酶/tRNA对掺入所述经修饰的IL-15多肽中。在一些实施方案中, 所述经修饰的IL-15多肽通过所述至少一种非天然氨基酸与缀合部分缀合。在一些实施方案中, 所述缀合部分包括水溶性聚合物、蛋白质

或多肽。在一些实施方案中,所述水溶性聚合物包括:聚乙二醇(PEG)、聚(丙二醇)(PPG)、乙二醇和丙二醇的共聚物、聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯炔醇)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(羟烷基甲基丙烯酸酰胺)、聚(甲基丙烯酸羟烷基酯)、聚(糖类)、聚(α -羟基酸)、聚(乙烯醇)、聚磷酸、聚噁唑啉(POZ)、聚(N-丙烯酰吗啉)或其组合;或多糖。在一些实施方案中,所述水溶性聚合物包括PEG。在一些实施方案中,所述PEG是线性PEG或支化PEG。在一些实施方案中,所述水溶性聚合物包括聚糖。在一些实施方案中,所述多糖包括葡聚糖、聚唾液酸(PSA)、透明质酸(HA)、直链淀粉、肝素、硫酸乙酰肝素(HS)、糊精或羟乙基淀粉(HES)。在一些实施方案中,所述缀合部分包括饱和脂肪酸。在一些实施方案中,所述饱和脂肪酸包括十六烷酸、十四烷酸或15-叠氮基十五烷酸。在一些实施方案中,所述蛋白质包括白蛋白、转铁蛋白、运甲状腺素蛋白或抗体的Fc部分。在一些实施方案中,所述多肽包括XTEN肽、富含甘氨酸的高氨基酸聚合物(HAP)、PAS多肽、弹性蛋白样多肽(ELP)、CTP肽或明胶样蛋白(GLK)聚合物。在一些实施方案中,所述缀合部分与所述经修饰的IL-15的至少一种非天然氨基酸直接结合。在一些实施方案中,所述缀合部分通过接头与所述经修饰的IL-15的至少一种非天然氨基酸间接结合。在一些实施方案中,所述接头包括同双官能接头。在一些实施方案中,所述同双官能接头包括Lomant试剂二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)DSP、3',3'-二硫代双(磺基琥珀酰亚胺基丙酸酯)(DTSSP)、二琥珀酰亚胺辛二酸酯(DSS)、双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯(BS)、酒石酸二琥珀酰亚胺酯(DST)、酒石酸二磺基琥珀酰亚胺酯(磺基DST)、乙二醇双(琥珀酰亚胺基琥珀酸酯)(EGS)、二琥珀酰亚胺戊二酸酯(DSG)、N,N'-二琥珀酰亚胺碳酸酯(DSC)、己二亚氨酸二甲酯(DMA)、庚二亚氨酸二甲酯(DMP)、辛二亚氨酸二甲酯(DMS)、3,3'-二硫代双丙亚氨酸二甲酯(DTBP)、1,4-二-(3'-(2'-吡啶基二硫代)丙酰胺基)丁烷(DPDPB)、双马来酰亚胺基己烷(BMH)、含芳基卤化物的化合物(DFDNB),例如像1,5-二氟-2,4-二硝基苯或1,3-二氟-4,6-二硝基苯、4,4'-二氟-3,3'-二硝基苯砜(DFDNPS)、双-[β -(4-叠氮基水杨酰胺基)乙基]二硫化物(BASED)、甲醛、戊二醛、1,4-丁二醇二缩水甘油醚、己二酸二酰肼、碳酰肼、邻-甲苯胺、3,3'-二甲基联苯胺、联苯胺、 α,α' -对-二氨基二苯基、二碘-对-二甲苯磺酸、N,N'-亚乙基-双(碘乙酰胺)或N,N'-六亚甲基-双(碘乙酰胺)。在一些实施方案中,所述接头包括异双官能接头。在一些实施方案中,所述异双官能接头包括N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯(sPDP)、长链N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯(LC-sPDP)、水溶性长链N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯(磺基-LC-sPDP)、琥珀酰亚胺基氧羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基二硫)甲苯(sMPT)、磺基琥珀酰亚胺基-6-[α -甲基- α -(2-吡啶基二硫)甲苯酰胺]己酸酯(磺基-LC-sMPT)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(sMCC)、磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己基-1-羧酸酯(磺基-sMCC)、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MB)、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-MB)、N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(sIAB)、磺基琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(磺基-sIAB)、琥珀酰亚胺基-4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(sMPB)、磺基琥珀酰亚胺基-4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(磺基-sMPB)、N-(γ -马来酰亚胺基丁酰氧基)琥珀酰亚胺酯(GMB)、N-(γ -马来酰亚胺基丁酰氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-GMB)、琥珀酰亚胺基6-((碘乙酰基)氨基)己酸酯(sIAX)、琥珀酰亚胺基6-[6-(((碘乙酰基)氨基)己酰基)氨基]己酸酯(sIAXX)、琥珀酰亚胺基4-(((碘乙酰基)氨基)甲基)环己烷-1-羧酸酯(sIAC)、琥珀酰亚胺基6-((((4-碘乙酰

基)氨基)甲基)环己烷-1-羧基)氨基)己酸酯(sIACX)、对-硝基苯基碘乙酸酯(NPIA)、羰基反应性和巯基反应性交联剂,如4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)丁酸酐(MPBH)、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧基-酐8(M₂C₂H)、3-(2-吡啶基二硫)丙酰酐(PDPH)、N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基水杨酸(NHs-AsA)、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基水杨酸(磺基-NHs-AsA)、磺基琥珀酰亚胺基-(4-叠氮基水杨酰胺基)己酸酯(磺基-NHs-LC-AsA)、磺基琥珀酰亚胺基-2-(对-叠氮基水杨酰胺基)乙基-1,3'-二硫丙酸酯(sAsD)、N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯(HsAB)、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯(磺基-HsAB)、N-琥珀酰亚胺基-6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨基)己酸酯(sANPAH)、磺基琥珀酰亚胺基-6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨基)己酸酯(磺基-sANPAH)、N-5-叠氮基-2-硝基苯甲酰氧基琥珀酰亚胺(ANB-NOs)、磺基琥珀酰亚胺基-2-(间-叠氮基-邻-硝基苯甲酰胺基)-乙基-1,3'-二硫丙酸酯(sAND)、N-琥珀酰亚胺基-4(4-叠氮基苯基)1,3'-二硫丙酸酯(sADP)、N-磺基琥珀酰亚胺基(4-叠氮基苯基)-1,3'-二硫丙酸酯(磺基-sADP)、磺基琥珀酰亚胺基4-(对-叠氮基苯基)丁酸酯(磺基-sAPB)、磺基琥珀酰亚胺基2-(7-叠氮基-4-甲基香豆素-3-乙酰胺)乙基-1,3'-二硫丙酸酯(sAED)、磺基琥珀酰亚胺基7-叠氮基-4-甲基香豆素-3-乙酸酯(磺基-sAMCA)、对-硝基苯基重氮丙酮酸酯(ρNPDP)、对-硝基苯基-2-重氮-3,3,3-三氟丙酸酯(PNP-DTP)、1-(对-叠氮基水杨酰胺基)-4-(碘乙酰胺基)丁烷(AsIB)、N-[4-(对-叠氮基水杨酰胺基)丁基]-3'-(2'-吡啶基二硫)丙酰胺(APDP)、二苯甲酮-4-碘乙酰胺、对-叠氮基苯甲酰酐(ABH)、4-(对-叠氮基水杨酰胺基)丁胺(AsBA)或对-叠氮基苯乙二醛(APG)。在一些实施方案中,所述接头包括可裂解或不可裂解的二肽接头。在一些实施方案中,所述二肽接头包括Val-Cit、Phe-Lys、Val-Ala或Val-Lys。在一些实施方案中,所述接头包括马来酰亚胺基团。在一些实施方案中,所述接头包括间隔基。在一些实施方案中,所述间隔基包括对-氨基苄醇(PAB)、对-氨基苄氧基羰基(PABC)、其衍生物或类似物。在一些实施方案中,所述经修饰的IL-15多肽是全长IL-15多肽的功能活性片段。在一些实施方案中,所述经修饰的IL-15多肽是重组IL-15多肽。在一些实施方案中,所述经修饰的IL-15多肽是重组人IL-15多肽。在一些实施方案中,对IL-15Rα的结合亲和力减小的所述经修饰的IL-15多肽能够扩增效应T(Teff)细胞和天然杀伤(NK)细胞群体。

[0006] 在某些实施方案中,本文公开了包含至少一种经翻译后修饰的非天然氨基酸的经修饰的白介素15(IL-15)多肽,其中所述至少一种非天然氨基酸是在选择性减小所述经修饰的IL-15多肽与白介素2/白介素15受体β(IL-2/IL-15Rβ)的结合亲和力但不影响与所述白介素15受体α(IL-15Rα)的相互作用的残基位置处。在一些实施方案中,其中所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自V3、I6、K10、E28、S29、D30、V31、H32、P33、S102、V104、H105、Q108、M109、I111、N112、T113和S114,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自V3、K10、S29、D30、H32、H105、Q108、M109、I111、N112、T113和S114;E28、P33、S102和V104;或I6和V31。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自N1、N4、S7、D8、K11、D61、T62、E64、N65、I68、L69和N72。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自N4、S7、K11和D61;D8、E64、N65、I68和N72;或N1、T62和L69。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸包含对-乙酰基-L-苯丙氨酸、对-碘-L-苯丙氨酸、O-甲基-L-酪氨酸、对-炔丙氧基苯丙氨酸、对-炔丙基-苯丙氨酸、L-3-(2-萘基)丙氨酸、3-甲基-苯丙氨酸、O-4-烯丙基-L-酪氨

酸、4-丙基-L-酪氨酸、三-O-乙酰基-GlcNAc β -丝氨酸、L-多巴、氟化苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、对-叠氮基-L-苯丙氨酸、对-酰基-L-苯丙氨酸、对-苯甲酰基-L-苯丙氨酸、L-磷酸丝氨酸、磷酸丝氨酸、磷酸酪氨酸、对-溴苯丙氨酸、对-氨基-L-苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸或N⁶-(2-叠氮基乙氧基)-羰基-L-赖氨酸。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸包括如图1-图3所示的非天然氨基酸。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸通过正交tRNA合成酶/tRNA对掺入所述经修饰的IL-15多肽中。在一些实施方案中,所述经修饰的IL-15多肽通过所述至少一种非天然氨基酸与缀合部分缀合。在一些实施方案中,所述缀合部分包括水溶性聚合物、蛋白质或多肽。在一些实施方案中,所述水溶性聚合物包括:聚乙二醇(PEG)、聚(丙二醇)(PPG)、乙二醇和丙二醇的共聚物、聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯醇)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(羟烷基甲基丙烯酸酯)、聚(甲基丙烯酸羟烷基酯)、聚(糖类)、聚(α -羟基酸)、聚(乙醇醇)、聚磷腈、聚噁唑啉(P₀Z)、聚(N-丙烯酰吗啉)或其组合;或多糖。在一些实施方案中,所述水溶性聚合物包括PEG。在一些实施方案中,所述PEG是线性PEG或支化PEG。在一些实施方案中,所述水溶性聚合物包括聚糖。在一些实施方案中,所述多糖包括葡聚糖、聚唾液酸(PSA)、透明质酸(HA)、直链淀粉、肝素、硫酸乙酰肝素(HS)、糊精或羟乙基淀粉(HES)。在一些实施方案中,所述缀合部分包括饱和脂肪酸。在一些实施方案中,所述饱和脂肪酸包括十六烷酸、十四烷酸或15-叠氮基十五烷酸。在一些实施方案中,所述蛋白质包括白蛋白、转铁蛋白、运甲状腺素蛋白或抗体的Fc部分。在一些实施方案中,所述多肽包括XTEN肽、富含甘氨酸的高氨基酸聚合物(HAP)、PAS多肽、弹性蛋白样多肽(ELP)、CTP肽或明胶样蛋白(GLK)聚合物。在一些实施方案中,所述缀合部分与所述经修饰的IL-15的至少一种非天然氨基酸直接结合。在一些实施方案中,所述缀合部分通过接头与所述经修饰的IL-15的至少一种非天然氨基酸间接结合。在一些实施方案中,所述接头包括同双官能接头。在一些实施方案中,所述同双官能接头包括Lomant试剂二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)DSP、3',3'-二硫代双(磺基琥珀酰亚胺基丙酸酯)(DTSSP)、二琥珀酰亚胺辛二酸酯(DSS)、双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯(BS)、酒石酸二琥珀酰亚胺酯(DST)、酒石酸二磺基琥珀酰亚胺酯(磺基DST)、乙二醇双(琥珀酰亚胺基琥珀酸酯)(EGS)、二琥珀酰亚胺戊二酸酯(DSG)、N,N'-二琥珀酰亚胺碳酸酯(DSC)、己二亚氨酸二甲酯(DMA)、庚二亚氨酸二甲酯(DMP)、辛二亚氨酸二甲酯(DMS)、3,3'-二硫代双丙亚氨酸二甲酯(DTBP)、1,4-二-(3'-(2'-吡啶基二硫代)丙酰胺基)丁烷(DPDPB)、双马来酰亚胺基己烷(BMH)、含芳基卤化物的化合物(DFDNB),例如像1,5-二氟-2,4-二硝基苯或1,3-二氟-4,6-二硝基苯、4,4'-二氟-3,3'-二硝基苯砜(DFDNPS)、双-[β -(4-叠氮基水杨酰胺基)乙基]二硫化物(BASED)、甲醛、戊二醛、1,4-丁二醇二缩水甘油醚、己二酸二酰肼、碳酰肼、邻-甲苯胺、3,3'-二甲基联苯胺、联苯胺、 α,α' -对-二氨基二苯基、二碘-对-二甲苯磺酸、N,N'-亚乙基-双(碘乙酰胺)或N,N'-六亚甲基-双(碘乙酰胺)。在一些实施方案中,所述接头包括异双官能接头。在一些实施方案中,所述异双官能接头包括N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯(sPDP)、长链N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯(LC-sPDP)、水溶性长链N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯(磺基-LC-sPDP)、琥珀酰亚胺基氧羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基二硫)甲苯(sMPT)、磺基琥珀酰亚胺基-6-[α -甲基- α -(2-吡啶基二硫)甲苯酰胺]己酸酯(磺基-LC-sMPT)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(sMCC)、磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己基-1-羧酸酯(磺基-sMCC)、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟

基琥珀酰亚胺酯(MB)、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-MB)、N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(sIAB)、磺基琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(磺基-sIAB)、琥珀酰亚胺基-4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(sMPB)、磺基琥珀酰亚胺基-4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(磺基-sMPB)、N-(γ -马来酰亚胺基丁酰氧基)琥珀酰亚胺酯(GMB)、N-(γ -马来酰亚胺基丁酰氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-GMB)、琥珀酰亚胺基6-((碘乙酰基)氨基)己酸酯(sIAX)、琥珀酰亚胺基6-[6-(((碘乙酰基)氨基)己酰基)氨基]己酸酯(sIAXX)、琥珀酰亚胺基4-(((碘乙酰基)氨基)甲基)环己烷-1-羧酸酯(sIAC)、琥珀酰亚胺基6-((((4-碘乙酰基)氨基)甲基)环己烷-1-羧基)氨基)己酸酯(sIACX)、对-硝基苯基碘乙酸酯(NPIA)、羰基反应性和巯基反应性交联剂,如4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)丁酸酰肼(MPBH)、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧基-酰肼8(M_2C_2H)、3-(2-吡啶基二硫)丙酰酰肼(PDPH)、N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基水杨酸(NHs-AsA)、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基水杨酸(磺基-NHs-AsA)、磺基琥珀酰亚胺基-(4-叠氮基水杨酰氨基)己酸酯(磺基-NHs-LC-AsA)、磺基琥珀酰亚胺基-2-(对-叠氮基水杨酰氨基)乙基-1,3'-二硫丙酸酯(sAsD)、N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯(HsAB)、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯(磺基-HsAB)、N-琥珀酰亚胺基-6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨基)己酸酯(sANPAH)、磺基琥珀酰亚胺基-6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨基)己酸酯(磺基-sANPAH)、N-5-叠氮基-2-硝基苯甲酰氧基琥珀酰亚胺(ANB-NOs)、磺基琥珀酰亚胺基-2-(间-叠氮基-邻-硝基苯甲酰氨基)-乙基-1,3'-二硫丙酸酯(sAND)、N-琥珀酰亚胺基-4(4-叠氮基苯基)1,3'-二硫丙酸酯(sADP)、N-磺基琥珀酰亚胺基(4-叠氮基苯基)-1,3'-二硫丙酸酯(磺基-sADP)、磺基琥珀酰亚胺基4-(对-叠氮基苯基)丁酸酯(磺基-sAPB)、磺基琥珀酰亚胺基2-(7-叠氮基-4-甲基香豆素-3-乙酰胺)乙基-1,3'-二硫丙酸酯(sAED)、磺基琥珀酰亚胺基7-叠氮基-4-甲基香豆素-3-乙酰胺(磺基-sAMCA)、对-硝基苯基重氮丙酮酸酯(ρ NPDP)、对-硝基苯基-2-重氮-3,3,3-三氟丙酸酯(PNP-DTP)、1-(对-叠氮基水杨酰氨基)-4-(碘乙酰胺基)丁烷(AsIB)、N-[4-(对-叠氮基水杨酰氨基)丁基]-3'-(2'-吡啶基二硫)丙酰肼(APDP)、二苯甲酮-4-碘乙酰胺、对-叠氮基苯甲酰酰肼(ABH)、4-(对-叠氮基水杨酰氨基)丁胺(AsBA)或对-叠氮基苯乙二醛(APG)。在一些实施方案中,所述接头包括可裂解或不可裂解的二肽接头。在一些实施方案中,所述二肽接头包括Val-Cit、Phe-Lys、Val-Ala或Val-Lys。在一些实施方案中,所述接头包括马来酰亚胺基团。在一些实施方案中,所述接头包括间隔基。在一些实施方案中,所述间隔基包括对-氨基苄醇(PAB)、对-氨基苄氧基羰基(PABC)、其衍生物或类似物。在一些实施方案中,所述缀合部分能够延长所述经修饰的IL-15多肽的血清半衰期。在一些实施方案中,相对于野生型IL-15多肽,结合亲和力的减小是对IL-15R α 的结合亲和力减小约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%。在一些实施方案中,相对于野生型IL-15多肽,对IL-15R α 的结合亲和力减小约1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍。在一些实施方案中,所述经修饰的IL-15多肽是全长IL-15多肽的功能活性片段。在一些实施方案中,所述经修饰的IL-15多肽是重组IL-15多肽。在一些实施方案中,所述经修饰的IL-15多肽是重组人IL-15多肽。在一些实施方案中,对IL-15R α 的结合亲和力减小的所述经修饰的IL-15多肽能够扩增效应T(Teff)细胞和天然杀伤(NK)细胞群体。

[0007] 在某些实施方案中,本文公开了白介素15(IL-15)缀合物,其包含:经分离和纯化

的IL-15多肽;和缀合部分,所述缀合部分在选自N4、E46、D61、E64、N65、I68和L69的氨基酸位置处与所述经分离和纯化的IL-15多肽结合,其中所述氨基酸残基的编号对应于SEQ ID NO:1。在一些实施方案中,所述氨基酸位置是N4。在一些实施方案中,所述氨基酸位置是E46。在一些实施方案中,所述氨基酸位置是D61。在一些实施方案中,所述氨基酸位置是E64。在一些实施方案中,所述氨基酸位置是N65。在一些实施方案中,所述氨基酸位置是I68。在一些实施方案中,所述氨基酸位置是L69。在一些实施方案中,所述氨基酸残基突变为半胱氨酸。在一些实施方案中,所述氨基酸残基突变为赖氨酸。在一些实施方案中,选自N4、E46、N65和L69的氨基酸残基进一步突变为非天然氨基酸。在一些实施方案中,所述非天然氨基酸包括对-乙酰基-L-苯丙氨酸、对-碘-L-苯丙氨酸、O-甲基-L-酪氨酸、对-炔丙基苯丙氨酸、对-炔丙基-苯丙氨酸、L-3-(2-萘基)丙氨酸、3-甲基-苯丙氨酸、O-4-烯丙基-L-酪氨酸、4-丙基-L-酪氨酸、三-O-乙酰基-GlcNAc α -丝氨酸、L-多巴、氟化苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、对-叠氮基-L-苯丙氨酸、对-酰基-L-苯丙氨酸、对-苯甲酰基-L-苯丙氨酸、L-磷酸丝氨酸、磷酸丝氨酸、磷酸酪氨酸、对-溴苯丙氨酸、对-氨基-L-苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸或N6-(2-叠氮基乙氧基)-羰基-L-赖氨酸。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸包括如图2C所示的非天然氨基酸。在一些实施方案中,相对于野生型IL-15多肽,所述IL-15缀合物对IL-15受体 α (IL-15R α) 亚基具有减小的亲和力。在一些实施方案中,相对于野生型IL-15多肽,所述减小的亲和力是对IL-15R α 的结合亲和力减小约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%。在一些实施方案中,相对于野生型IL-15多肽,对IL-15R α 的亲和力减小约1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍。在一些实施方案中,所述缀合部分削弱或阻断IL-15与IL-15R α 的结合。

[0008] 在某些实施方案中,本文公开了药物组合物,其包含:经修饰的IL-15多肽或IL-15缀合物;和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,将所述药物组合物配制用于肠胃外给予。

[0009] 在某些实施方案中,本文公开了在有需要的受试者中治疗增殖性疾病或病症的方法,其包括向所述受试者给予治疗有效量的经修饰的IL-15多肽或IL-15缀合物。在一些实施方案中,所述增殖性疾病或病症是癌症。在一些实施方案中,所述癌症是实体瘤癌症。在一些实施方案中,所述实体瘤癌症是膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、结直肠癌、食道癌、眼癌、头颈癌、肾癌、肺癌、黑色素瘤、卵巢癌、胰腺癌或前列腺癌。在一些实施方案中,所述癌症是恶性血液病。在一些实施方案中,所述恶性血液病是慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤 (SLL)、滤泡性淋巴瘤 (FL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL)、套细胞淋巴瘤 (MCL)、华氏巨球蛋白血症 (Waldenstrom's macroglobulinemia)、多发性骨髓瘤、结外边缘区B细胞淋巴瘤、结边缘区B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、非伯基特高级B细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤 (PMBL)、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤、前体B淋巴母细胞淋巴瘤、B细胞前淋巴细胞性白血病、淋巴浆细胞性淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞骨髓瘤、浆细胞瘤、纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤或淋巴瘤样肉芽肿病。在一些实施方案中,方法进一步包括给予另外的治疗剂。在一些实施方案中,同时给予所述经修饰的IL-15多肽或所述IL-15缀合物和所述另外的治疗剂。在一些实施方案中,顺序给予所述经修饰的IL-15多肽或所述IL-15缀合物和所述另外的治疗剂。在一些实施方案中,在所述另外的治疗剂之前给予所述经修饰的IL-15多肽或所述IL-15缀合物。在一些实施方

案中,在给予所述另外的治疗剂之后给予所述经修饰的IL-15多肽或所述IL-15缀合物。在一些实施方案中,所述受试者是人。

[0010] 在某些实施方案中,本文公开了扩增效应T (Teff) 细胞和天然杀伤 (NK) 细胞群体的方法,其包括:(a) 使细胞与经修饰的IL-15多肽或IL-15缀合物接触;和(b) 使所述IL-15与IL-15R β 和IL-15R γ 亚基相互作用以形成IL-15/IL-15R β γ 复合物;其中所述IL-15缀合物对IL-15R α 亚基具有减小的亲和力,并且其中所述IL-15/IL-15R β γ 复合物刺激Teff和NK细胞的扩增。在一些实施方案中,所述细胞是真核细胞。在一些实施方案中,所述细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,所述细胞是人细胞。在一些实施方案中,所述IL-15缀合物包含经分离和纯化的IL-15多肽和在选自N4、E46、N65和L69的氨基酸残基处与所述经分离和纯化的IL-2多肽结合的缀合部分,其中所述氨基酸残基的编号对应于SEQ ID NO:1。在一些实施方案中,相对于野生型IL-15多肽,所述减小的亲和力是对IL-15R α 的结合亲和力减小约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%。在一些实施方案中,相对于野生型IL-15多肽,对IL-15R α 的亲和力减小约IL-15R α 1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍。在一些实施方案中,所述缀合部分削弱或阻断IL-15与IL-15R α 的结合。

[0011] 在某些实施方案中,本文公开了试剂盒,其包含经修饰的IL-15多肽、IL-15缀合物或药物组合物。

[0012] 在某些实施方案中,本文公开了试剂盒,其包含编码经修饰的IL-15多肽或IL-15多肽的多核酸分子。

附图说明

[0013] 本公开文本的不同方面在随附权利要求书中具体阐述。将通过参考阐述了利用本公开文本的原理的说明性实施方案的以下具体实施方式和附图获得对本公开文本的特征和优点的更好的理解,在所述附图中:

[0014] 图1示出了示例性的非天然氨基酸。此图改编自Young等人,“Beyond the canonical 20 amino acids:expanding the genetic lexicon,”J.of Biological Chemistry 285 (15):11039-11044 (2010) 的图2;

[0015] 图2A-图2B示出了示例性的非天然氨基酸。图2A示出了示例性的赖氨酸衍生物。图2B示出了示例性的苯丙氨酸衍生物。

[0016] 图3A-图3D示出了示例性的非天然氨基酸。这些非天然氨基酸(UAA)已在蛋白质中进行了基因编码(图3A-UAA#1-42;图3B-UAA#43-89;图3C-UAA#90-128;图3D-UAA#129-167)。图3A-图3D改编自Dumas等人,Chemical Science 2015,6,50-69的表1。

[0017] 图4示出了阴离子交换色谱图。

[0018] 图5示出了反相色谱图。

[0019] 图6示出了在CTLL2增殖测定中具有天然效力的示例性IL-15缀合物的EC50值。结果绘制为响应百分比。

[0020] 图7示出了在CTLL2增殖测定中具有降低效力的示例性IL-15缀合物的EC50值。如此处所示,位点特异性聚乙二醇化有助于体外药理学。结果绘制为响应百分比。

[0021] 图8示出了与不同PEG大小缀合的示例性IL-15的EC50值。结果绘制为响应百分比。

[0022] 图9A-图9C显示了rHuIL-15(一种与IL-15R α 结合的IL-15缀合化合物)的响应单位(RU,Y轴)与时间(s,X轴)的关系。图9A:rHuIL-15;图9B:IL15缀合物N77PEG30和S83PEG30;以及图9C:IL15缀合物E46PEG30和E53PEG30。

[0023] 图10显示了rHuIL-15(与IL-15R α 和IL-2R β 结合的IL-15N77PEG30)的响应单位(RU,Y轴)与时间(s,X轴)的关系。

[0024] 图11显示了rHuIL-15(与IL-15R α 和IL-2R β 结合的IL-15E53PEG30)的响应单位(RU,Y轴)与时间(s,X轴)的关系。

[0025] 图12A-图12D示出了用示例性IL-15PEG缀合物刺激后NK和CD8+T细胞上的STAT5磷酸化。图12A和图12C:半衰期延长(S83PEG30和N77PEG30);图12B和图12D:与IL-15R α (V49PEG30、E53PEG30和L25PEG30)的经调节的相互作用。

[0026] 图13显示了0.3mg/kg的rHuIL-15、IL-15S83PEG30、IL-15V49PEG30、IL-15L25PEG30和IL-15N77 PEG30的血浆浓度曲线。

[0027] 图14A-图14D显示了在用rHuIL-15或聚乙二醇化化合物给药的小鼠中,CD8+T细胞(图14A)、CD8记忆细胞(图14B)、NK细胞(图14C)和Treg细胞(图14D)中STAT5磷酸化的百分比。

[0028] 图15A-图15D显示了在用聚乙二醇化化合物给药的动物中,CD8+T(图15A)、NK细胞(图15B)、CD8+Tmem(图15C)中早期增殖分子标记物Ki67的表达增加,但Treg细胞并非如此(图15D)。

[0029] 图16A-图16C显示了CD8+T细胞(图16A)、NK细胞(图16B)和CD8记忆T细胞(图16C)的增殖的诱导。

[0030] 图17A-图17B显示了在小鼠中随着IL-15L25PEG30化合物的剂量增加,NK细胞(图17A)和CD8+T(图17B)中的Ki67表达增加。

具体实施方式

[0031] 癌症是一类复杂的疾病,涉及异常细胞生长,并且具有侵入或扩散至身体的其他部分的可能性。针对癌症驱动器和途径的癌症疗法(如放射疗法和化学疗法)可能是成功的。在一些情况下,癌细胞能够适应这些疗法,从而限制了此类疗法的功效。与手术、化学疗法或放射疗法不同,免疫疗法刺激免疫系统以识别并杀死肿瘤细胞。

[0032] 若干种细胞因子因其触发免疫应答的能力而被用于免疫疗法。然而,当前利用细胞因子的免疫疗法导致几种不良反应,包括毒性和不受控制的细胞增殖。本文提供了用于治疗癌症的经修饰的细胞因子或细胞因子缀合物,其具有刺激或扩增特定T细胞和NK群体的能力,从而导致改善的治疗和减少的不良事件。

[0033] 细胞因子包括细胞信号传导蛋白家族(如趋化因子、干扰素、白介素、淋巴因子和肿瘤坏死因子)。细胞因子是由免疫细胞(如巨噬细胞、B淋巴细胞、T淋巴细胞和肥大细胞、内皮细胞、成纤维细胞和不同的基质细胞)产生的。在一些情况下,细胞因子调节体液与基于细胞的免疫应答之间的平衡。

[0034] 白介素是信号传导蛋白,其调节T和B淋巴细胞和造血细胞的发育和分化。白介素是由辅助CD4 T淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞和内皮细胞产生的。在一些情况下,存在约15种白介素:白介素1-13、白介素15和白介素17。

[0035] 白介素15 (IL-15) 是一种多效性细胞因子,其结构是14-15kDa糖蛋白。IL-15的转录、翻译和分泌是通过多种复杂机制调节的。IL-15和IL-15受体 α (IL-15R α , CD215) 蛋白主要由激活的单核细胞和树突细胞 (DC) 共表达。在单核细胞/DC与1型或2型干扰素 (IFN) 或CD40连接或通过激活NF- κ B的Toll样受体 (TLR) 起作用的药剂相互作用后,发生异二聚体IL-15/IL-15R α 的转录。此外,IL-15/IL-15R α 蛋白的表达主要受翻译和分泌水平的控制。

[0036] IL-15通过异三聚体受体发出信号,所述异三聚体受体包含独特的 α 链 (IL-15R α)、与IL-2 (CD122) 共享的 β 亚基 (IL-15R β , CD132) 和与若干种细胞因子共享的共同 γ 亚基 (CD132; IL-15R γ)。IL-15R α 对IL-15具有高亲和力,其 K_d 为约 10^{-11} M。

[0037] 在一些实施方案中,将IL-15信号传导用于调节T细胞反应,并随后用于治疗癌症。在一些实施方案中,将IL-15信号传导用于模拟激活的CD4⁻CD8⁻、CD4⁺CD8⁺、CD4⁺和CD8⁺T细胞的增殖及其在限定的效应T细胞亚组中的分化。在一些实施方案中,将IL-15信号传导用于模拟天然杀伤 (NK) 细胞的产生和增殖。在一些实施方案中,将IL-15信号传导用于促进记忆CD8T细胞、幼稚CD8 T细胞和NK细胞的维持和存活。在一些实施方案中,将IL-15信号传导用于诱导记忆CD8 T细胞的形成。在一些实施方案中,将IL-15信号传导用于引发NK细胞靶标特异性激活。在一些实施方案中,IL-15信号传导不导致Treg扩增。

[0038] 在一些实施方案中,本文描述了经修饰的IL-15多肽,其用于调节T细胞反应并随后用于治疗癌症。在一些实施方案中,经修饰的IL-15多肽包含与白介素15受体 α (IL-15R α) 的结合的减少。在一些实施方案中,结合亲和力的减小是相对于野生型IL-15多肽与IL-15R α 之间的结合亲和力。在一些实施方案中,经修饰的IL-15多肽对经修饰的IL-15多肽与白介素2/白介素15受体 $\beta\gamma$ (IL-2/IL-15R $\beta\gamma$) 的相互作用具有很少或没有影响。在一些实施方案中,经修饰的IL-15多肽包含一种或多种修饰,所述一种或多种修饰对经修饰的IL-15多肽与IL-15R α 和IL-15R $\beta\gamma$ 的结合亲和力具有很少或没有影响。在一些实施方案中,经修饰的IL-15多肽包含与IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ 的结合的减少,且IL-15R α 相互作用不受影响。

[0039] 本文描述了具有改善的刺激抗肿瘤反应的能力的经修饰的IL-15多肽或IL-15缀合物。在一些实施方案中,经修饰的IL-15多肽或IL-15缀合物具有改善的安全特性。在一些实施方案中,经修饰的IL-15多肽或IL-15缀合物包含用于增加半衰期的位点特异性聚乙二醇化。在一些实施方案中,位点特异性聚乙二醇化增加半衰期并且对生物活性具有很少或没有影响。在一些实施方案中,经修饰的IL-15多肽或IL-15缀合物的信号传导偏向IL-15R $\beta\gamma$ 。在一些实施方案中,经修饰的IL-15多肽或IL-15缀合物包含用于增加半衰期并降低毒性的位点特异性聚乙二醇化。在一些实施方案中,位点特异性聚乙二醇化导致经修饰的IL-15多肽或IL-15缀合物的更少给药。在一些实施方案中,通过阻断IL-15R α 相互作用的经修饰的IL-15多肽或IL-15缀合物降低了毒性。在一些实施方案中,经修饰的IL-15多肽或IL-15缀合物的活性限于肿瘤部位。在一些实施方案中,经修饰的IL-15多肽或IL-15缀合物包含位点特异性聚乙二醇化,使得自然杀伤 (NK) 和效应细胞增殖和功能不需要IL-15的反式呈递。在一些实施方案中,经修饰的IL-15多肽或IL-15缀合物包含位点特异性聚乙二醇化,使得清除被抑制或禁止。

经修饰的IL-15多肽和IL-15缀合物

[0040] 在一些实施方案中,本文描述了经修饰的IL-15多肽。在一些情况下,所述修饰是针对天然氨基酸。在一些情况下,所述修饰是针对非天然氨基酸。在一些情况下,本文描述

了包含至少一种非天然氨基酸的经分离和修饰的IL-15多肽。在一些情况下,IL-15多肽是经分离和纯化的哺乳动物IL-15,例如人IL-15蛋白。在一些情况下,IL-15多肽是人IL-15蛋白。在一些情况下,IL-15多肽与SEQ ID NO:1或2具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。在一些情况下,IL-15多肽包含SEQ ID NO:1或2的序列或由其组成。

[0041] 在一些情况下,经修饰的IL-15多肽是截短的变体。在一些情况下,所述截短是N-末端缺失。在其他情况下,所述截短是C-末端缺失。在另外的情况下,所述截短包括N-末端和C-末端缺失两者。例如,所述截短可以是N-末端或C-末端或两个末端缺失至少或约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20或更多个残基。在一些情况下,经修饰的IL-15多肽包含至少或约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20或更多个残基的N-末端缺失。在一些情况下,经修饰的IL-15多肽包含至少或约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个残基的N-末端缺失。在一些情况下,经修饰的IL-15多肽包含至少或约2个残基的N-末端缺失。在一些情况下,经修饰的IL-15多肽包含至少或约3个残基的N-末端缺失。在一些情况下,经修饰的IL-15多肽包含至少或约4个残基的N-末端缺失。在一些情况下,经修饰的IL-15多肽包含至少或约5个残基的N-末端缺失。在一些情况下,经修饰的IL-15多肽包含至少或约6个残基的N-末端缺失。在一些情况下,经修饰的IL-15多肽包含至少或约7个残基的N-末端缺失。在一些情况下,经修饰的IL-15多肽包含至少或约8个残基的N-末端缺失。在一些情况下,经修饰的IL-15多肽包含至少或约9个残基的N-末端缺失。在一些情况下,经修饰的IL-15多肽包含至少或约10个残基的N-末端缺失。

[0042] 在一些实施方案中,经修饰的IL-15多肽是功能活性片段。在一些情况下,功能活性片段包含IL-15区域5-114、10-114、15-114、20-114、1-110、5-110、10-110、15-110、20-110、1-105、5-105、10-105、15-105、20-105、1-100、5-100、10-100、15-100或20-100,其中残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。在一些情况下,功能活性片段包含IL-15区域5-114、10-114、15-114或20-114,其中残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。在一些情况下,功能活性片段包含IL-15区域1-110、5-110、10-110、15-110或20-110,其中残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。在一些情况下,功能活性片段包含IL-15区域1-105、5-105、10-105、15-105或20-105,其中残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。在一些情况下,功能活性片段包含IL-15区域1-100、5-100、10-100、15-100或20-100,其中残基位置参考SEQ ID NO:1中的位置。

[0043] 在一些实施方案中,功能活性IL-15片段包含内部缺失。在一些情况下,内部缺失包括环区。在一些情况下,内部缺失包括2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多个残基的缺失。

[0044] 在一些实施方案中,本文所述的IL-15多肽包含至少一种非天然氨基酸。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自N1、W2、V3、N4、I6、S7、D8、K10、K11、E13、D14、L15、Q17、S18、M19、H20、I21、D22、A23、T24、L25、Y26、T27、E28、S29、D30、V31、H32、P33、S34、C35、K36、V37、T38、A39、K41、L44、L45、E46、Q48、V49、S51、L52、E53、S54、G55、D56、A57、S58、H60、D61、T62、V63、E64、N65、I67、I68、L69、N71、N72、S73、L74、S75、S76、N77、G78、N79、V80、T81、E82、S83、G84、C85、K86、E87、C88、E89、E90、L91、E92、E93、K94、N95、I96、K97、E98、L100、Q101、S102、V104、H105、Q108、M109、F110、I111、N112、T113和S114,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残

基位置选自N1、W2、V3、N4、I6、S7、D8、K10、K11、E13、D14、L15、Q17、S18、M19、H20、I21、D22、A23、T24、L25、Y26、E28、S29、D30、V31、H32、P33、S34、C35、K36、V37、T38、K41、L44、E46、Q48、V49、S51、L52、E53、S54、G55、D56、A57、S58、H60、D61、T62、V63、E64、N65、I67、I68、L69、N71、N72、S73、L74、S75、S76、N77、G78、N79、V80、T81、E82、S83、G84、C85、K86、E87、C88、E89、E90、L91、E92、E93、K94、N95、I96、K97、E98、L100、Q101、S102、V104、H105、Q108、M109、F110、I111、N112、T113和S114,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自E13、D14、L15、Q17、S18、M19、H20、I21、S34、C35、K36、V37、T38、K41、L44、S51、L52、S54、G55、D56、A57、S58、H60、V63、I67、N71、S73、L74、S75、S76、N77、G78、N79、V80、T81、E82、S83、G84、C85、K86、E87、C88、L91、E92、K94、N95、I96、K97、E98、L100、Q101和F110。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自D14、Q17、S18、K41、S51、L52、G55、D56、A57、S58、S75、S76、N77、N79、V80、T81、S83、G84、E92、K94、N95、K97和E98。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自N1、N4、S7、D8、K11、D61、T62、E64、N65、I68、L69和N72。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自V3、I6、K10、E28、S29、D30、V31、H32、P33、S102、V104、H105、Q108、M109、I111、N112、T113和S114。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自D22、A23、T24、L25、Y26、L44、E46、Q48、V49、E53、E89、E90和E93。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自Y26、E46、V49、E53和L25。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自V3、K10、S29、D30、H32、H105、Q108、M109、I111、N112、T113和S114。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自N4、S7、K11和D61。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自L25、E53、N77和S83。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自L25和E53。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自E46、Y26、V49、E53、T24、N4、K11、N65、L69、S18、H20和S83。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自E46、Y26、V49、E53和T24。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自E46、V49、E53和T24。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自Y26、V49、E53和T24。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自V49、E53和T24。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自E46和Y26。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是E46。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是L25。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是Y26。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是V49。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是E53。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是T24。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是N77。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自N4、K11、N65、L69、S18、H20和S83。下表1中示出了IL-15的示例性氨基酸序列。

名称	序列	SEQ ID NO.
IL-15 (成熟形式)	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDV HPSCCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHT VENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEE KNIKEFLQSFVHIVQMFINTS	1
IL-15 GenBank: CAA71044.1 (前体)	MDFQVQIFSLLISASVIMSRANWVNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCCKVTAM KCFLLELQVISLESGDASIHTVENLIILANN SLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSF VHIVQMFINTS	2

[0045] 在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸位于N-末端的近端。如本文所用,近端是指位于距N-末端残基至少1个残基且直到距N-末端残基约50个残基处的残基。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸位于从N-末端残基起的前10、20、30、40或50个残基内。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸位于从N-末端残基起的前10个残基内。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸位于从N-末端残基起的前20个残基内。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸位于从N-末端残基起的前30个残基内。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸位于从N-末端残基起的前40个残基内。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸位于从N-末端残基起的前50个残基内。

[0046] 在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸是N-末端残基。

[0047] 在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸位于C-末端的近端。如本文所用,近端是指位于距C-末端残基至少1个残基且直到距C-末端残基约50个残基处的残基。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸位于从C-末端残基起的前10、20、30、40或50个残基内。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸位于从C-末端残基起的前10个残基内。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸位于从C-末端残基起的前20个残基内。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸位于从C-末端残基起的前30个残基内。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸位于从C-末端残基起的前40个残基内。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸位于从C-末端残基起的前50个残基内。

[0048] 在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸是C-末端残基。

[0049] 在一些实施方案中,经修饰的IL-15多肽包含至少一种非天然氨基酸,其中所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是在选择性减小IL-15多肽与白介素15受体 α (IL-15R α) 的结合亲和力的残基位置处。在一些实施方案中,结合亲和力的减小是相对于野生型IL-15多肽与IL-15R α 之间的结合亲和力。在一些实施方案中,经修饰的IL-15多肽与IL-15R α 的结合不影响经修饰的IL-15多肽与白介素2/白介素15受体 $\beta\gamma$ (IL-2/IL-15R $\beta\gamma$) 的相互作用或改善了经修饰的IL-15多肽与IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ 的相互作用。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自D22、A23、T24、L25、Y26、L44、E46、Q48、V49、E53、E89、E90和E93,

其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自Y26、E46、V49、E53和L25,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自A23、T24、E89和E93,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自D22、L44、Q48和E90,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是Y26。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是E46。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是V49。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是E53。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是L25。在一些实施方案中,经修饰的IL-15多肽还包含PEG。在一些情况下,PEG在选自D22、A23、T24、L25、Y26、L44、E46、Q48、V49、E53、E89、E90和E93的残基位置处缀合。在一些实施方案中,经修饰的IL-15多肽还包含用于增加半衰期的PEG。在一些情况下,所述PEG在选自E13、D14、L15、Q17、S18、M19、H20、I21、S34、C35、K36、V37、T38、K41、L44、S51、L52、S54、G55、D56、A57、S58、H60、V63、I67、N71、S73、L74、S75、S76、N77、G78、N79、V80、T81、E82、S83、G84、C85、K86、E87、C88、L91、E92、K94、N95、I96、K97、E98、L100、Q101和F110的残基位置处缀合,以增加半衰期。在一些情况下,PEG在选自N71、N72和N77的残基位置处缀合。在一些情况下,与PEG缀合的残基突变为天然氨基酸。在其他情况下,与PEG缀合的残基突变为非天然氨基酸。在另外的情况下,N71、N72或N77处的突变进一步改善了CMC状况(例如,产量、纯度、稳定性、减少的聚集和/或改善的蛋白质折叠)、效力或其组合。

[0050] 在一些情况下,经修饰的IL-15多肽包含至少一种非天然氨基酸,其中所述至少一种非天然氨基酸是在选择性减小经修饰的IL-15多肽与IL-2/IL-15R β 、IL-15R γ 或其组合的结合亲和力的残基位置处。在一些实施方案中,经修饰的IL-15对与IL-15R α 的相互作用具有很少或没有影响。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自N1、V3、N4、I6、S7、D8、K10、K11、E28、S29、D30、V31、H32、P33、D61、T62、E64、N65、I68、L69、N72、S102、V104、H105、Q108、M109、I111、N112、T113和S114,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸是在选择性减小经修饰的IL-15多肽与IL-2/IL-15R β 的结合亲和力的残基位置处。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自N1、N4、S7、D8、K11、D61、T62、E64、N65、I68、L69和N72,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自N4、S7、K11和D61。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自D8、E64、N65、I68和N72。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自N1、T62和L69。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是N4。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是S7。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是K11。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是D61。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸是在选择性减小经修饰的IL-15多肽与IL-2/IL-15R γ 的结合亲和力的残基位置处。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自V3、I6、K10、E28、S29、D30、V31、H32、P33、S102、V104、H105、Q108、M109、I111、N112、T113和S114,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自V3、K10、S29、D30、H32、H105、Q108、M109、I111、N112、T113

和S114。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自E28、P33、S102和V104。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自I6和V31。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是V3。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是K10。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是S29。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是D30。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是H32。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是H105。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是Q108。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是M109。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是I111。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是N112。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是T113。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是S114。在一些实施方案中,经修饰的IL-15多肽还包含PEG。在一些情况下,PEG在选自N1、V3、N4、I6、S7、D8、K10、K11、E28、S29、D30、V31、H32、P33、D61、T62、E64、N65、I68、L69、N72、S102、V104、H105、Q108、M109、I111、N112、T113和S114的残基位置处缀合。在一些实施方案中,经修饰的IL-15多肽还包含用于增加半衰期的PEG。在一些情况下,PEG在选自E13、D14、L15、Q17、S18、M19、H20、I21、S34、C35、K36、V37、T38、K41、L44、S51、L52、S54、G55、D56、A57、S58、H60、V63、I67、N71、S73、L74、S75、S76、N77、G78、N79、V80、T81、E82、S83、G84、C85、K86、E87、C88、L91、E92、K94、N95、I96、K97、E98、L100、Q101和F110的残基位置处缀合,以增加半衰期。在一些情况下,PEG在选自N71、N72和N77的残基位置处缀合。在一些情况下,与PEG缀合的残基突变为天然氨基酸。在其他情况下,与PEG缀合的残基突变为非天然氨基酸。在另外的情况下,N71、N72或N77处的突变进一步改善了CMC状况(例如,产量、纯度、稳定性、减少的聚集和/或改善的蛋白质折叠)、效力或其组合。

[0051] 在一些情况下,经修饰的IL-15多肽包含至少一种非天然氨基酸,其中所述至少一种非天然氨基酸是在不影响经修饰的IL-15多肽与IL-15R α 和IL-15R β γ 的结合亲和力的残基位置处。在一些实施方案中,经修饰的IL-15多肽还包含用于增加半衰期的PEG。在一些实施方案中,经修饰的IL-15包含PEG,其中生物活性没有变化。在一些实施方案中,所述残基被修饰以延长半衰期。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自E13、D14、L15、Q17、S18、M19、H20、I21、S34、C35、K36、V37、T38、K41、L44、S51、L52、S54、G55、D56、A57、S58、H60、V63、I67、N71、S73、L74、S75、S76、N77、G78、N79、V80、T81、E82、S83、G84、C85、K86、E87、C88、L91、E92、K94、N95、I96、K97、E98、L100、Q101和F110,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自D14、Q17、S18、K41、S51、L52、G55、D56、A57、S58、S75、S76、N77、N79、V80、T81、S83、G84、E92、K94、N95、K97和E98,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自E13、L15、M19、H20、K36、V37、T38、S54、H60、I67、N71、G78、K86、E87和Q101,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自I21、S34、C35、L44、V63、S73、L74、E82、C85、C88、L91、I96、L100和F110,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自N71、N72和N77,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置选自N77和S83。在一些实施方案中,所述至少一种非

天然氨基酸的残基位置是D14。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是Q17。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是S18。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是K41。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是S51。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是L52。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是G55。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是D56。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是A57。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是S58。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是S75。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是S76。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是N77。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是N79。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是V80。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是T81。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是S83。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是G84。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是E92。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是K94。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是N95。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是K97。在一些实施方案中,所述至少一种非天然氨基酸的残基位置是E98。在一些情况下,N71、N72或N77处的突变包括天然氨基酸的突变。在一些情况下,N71、N72或N77处的突变进一步改善了CMC状况(例如,产量、纯度、稳定性、减少的聚集和/或改善的蛋白质折叠)、效力或其组合。

[0052] 在一些实施方案中,包含至少一种非天然氨基酸的IL-15多肽进一步与缀合部分缀合以产生IL-15缀合物。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的氨基酸位置是在N1、W2、V3、N4、I6、S7、D8、K10、K11、E13、D14、L15、Q17、S18、M19、H20、I21、D22、A23、T24、L25、Y26、T27、E28、S29、D30、V31、H32、P33、S34、C35、K36、V37、T38、A39、K41、L44、L45、E46、Q48、V49、S51、L52、E53、S54、G55、D56、A57、S58、H60、D61、T62、V63、E64、N65、I67、I68、L69、N71、N72、S73、L74、S75、S76、N77、G78、N79、V80、T81、E82、S83、G84、C85、K86、E87、C88、E89、E90、L91、E92、E93、K94、N95、I96、K97、E98、L100、Q101、S102、V104、H105、Q108、M109、F110、I111、N112、T113或S114处,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些情况下,所述至少一种非天然氨基酸的氨基酸位置是在N1、W2、V3、N4、I6、S7、D8、K10、K11、E13、D14、L15、Q17、S18、M19、H20、I21、D22、A23、T24、L25、Y26、E28、S29、D30、V31、H32、P33、S34、C35、K36、V37、T38、K41、L44、E46、Q48、V49、S51、L52、E53、S54、G55、D56、A57、S58、H60、D61、T62、V63、E64、N65、I67、I68、L69、N71、N72、S73、L74、S75、S76、N77、G78、N79、V80、T81、E82、S83、G84、C85、K86、E87、C88、E89、E90、L91、E92、E93、K94、N95、I96、K97、E98、L100、Q101、S102、V104、H105、Q108、M109、F110、I111、N112、T113或S114处。在一些情况下,缀合部分与所述至少一种非天然氨基酸结合。在一些情况下,缀合部分与N-末端或C-末端氨基酸残基结合。在一些情况下,缀合部分与所述至少一种非天然氨基酸或末端残基直接结合。在其他情况下,缀合部分经由下文描述的接头与所述至少一种非天然氨基酸或末端残基间接结合。

[0053] 在一些实施方案中,相对于野生型IL-15多肽,IL-15多肽或IL-15缀合物对IL-15

受体 α (IL-15R α) 亚基的亲合力减小约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%。在一些实施方案中,亲合力减小约10%。在一些实施方案中,亲合力减小约20%。在一些实施方案中,亲合力减小约40%。在一些实施方案中,亲合力减小约50%。在一些实施方案中,亲合力减小约60%。在一些实施方案中,亲合力减小约80%。在一些实施方案中,亲合力减小约90%。在一些实施方案中,亲合力减小约95%。在一些实施方案中,亲合力减小100%。

[0054] 在一些实施方案中,相对于野生型IL-15多肽,IL-15多肽或IL-15缀合物对IL-15受体 α (IL-15R α) 亚基的亲合力减小约1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍。在一些实施方案中,亲合力减小约1倍。在一些实施方案中,亲合力减小约2倍。在一些实施方案中,亲合力减小约4倍。在一些实施方案中,亲合力减小约5倍。在一些实施方案中,亲合力减小约6倍。在一些实施方案中,亲合力减小约8倍。在一些实施方案中,亲合力减小约10倍。

[0055] 在一些实施方案中,IL-15多肽或IL-15缀合物不与IL-15R α 相互作用。

[0056] 在一些实施方案中,相对于野生型IL-15多肽,IL-15多肽或IL-15缀合物对IL-2受体 (IL-2R) 亚基的亲合力减小约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%。在一些实施方案中,IL-2R亚基是IL-2R β γ 。在一些实施方案中,亲合力减小约10%。在一些实施方案中,亲合力减小约20%。在一些实施方案中,亲合力减小约40%。在一些实施方案中,亲合力减小约50%。在一些实施方案中,亲合力减小约60%。在一些实施方案中,亲合力减小约80%。在一些实施方案中,亲合力减小约90%。在一些实施方案中,亲合力减小约95%。在一些实施方案中,亲合力减小100%。

[0057] 在一些实施方案中,相对于野生型IL-15多肽,IL-15多肽或IL-15缀合物对IL-2受体 (IL-2R) 亚基的亲合力减小约1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍。在一些实施方案中,IL-2R亚基是IL-2R β γ 。在一些实施方案中,亲合力减小约1倍。在一些实施方案中,亲合力减小约2倍。在一些实施方案中,亲合力减小约4倍。在一些实施方案中,亲合力减小约5倍。在一些实施方案中,亲合力减小约6倍。在一些实施方案中,亲合力减小约8倍。在一些实施方案中,亲合力减小约10倍。

[0058] 在一些实施方案中,IL-15多肽或IL-15缀合物不与IL-2R α 相互作用。

[0059] 在一些实施方案中,IL-15多肽或IL-15缀合物具有延长的半衰期。在一些情况下,将延长的半衰期与野生型IL-15蛋白或野生型IL-15缀合物的半衰期进行比较。

[0060] 在一些情况下,IL-15多肽或IL-15缀合物的延长的半衰期比野生型IL-15蛋白或野生型IL-15缀合物的半衰期长至少90分钟、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、18小时、24小时、36小时、48小时、3天、4天、5天、6天、7天、10天、12天、14天、21天、28天、30天或更久。在一些情况下,IL-15多肽或IL-15缀合物的延长的半衰期比野生型IL-15蛋白或野生型IL-15缀合物的半衰期长至少90分钟或更久。在一些情况下,IL-15多肽或IL-15缀合物的延长的半衰期比野生型IL-15蛋白或野生型IL-15缀合物的半衰期长至少2小时或更久。在一些情况下,IL-15多肽或IL-15缀合物的延长的半衰期比野生型IL-15蛋白或野生型IL-15缀合物的半衰期长至少3小时或更久。在一些情况下,IL-15多肽或IL-15缀合物的延长的半衰期比野生型IL-15蛋白或野生型IL-15缀合物的半衰期长至少4小时或更久。在一些情况下,IL-15多肽或IL-15缀合物的延长的半衰期比野

生型IL-15蛋白或野生型IL-15缀合物的半衰期长至少5小时或更久。在一些情况下,IL-15多肽或IL-15缀合物的延长的半衰期比野生型IL-15蛋白或野生型IL-15缀合物的半衰期长至少6小时或更久。在一些情况下,IL-15多肽或IL-15缀合物的延长的半衰期比野生型IL-15蛋白或野生型IL-15缀合物的半衰期长至少10小时或更久。在一些情况下,IL-15多肽或IL-15缀合物的延长的半衰期比野生型IL-15蛋白或野生型IL-15缀合物的半衰期长至少12小时或更久。在一些情况下,IL-15多肽或IL-15缀合物的延长的半衰期比野生型IL-15蛋白或野生型IL-15缀合物的半衰期长至少18小时或更久。在一些情况下,IL-15多肽或IL-15缀合物的延长的半衰期比野生型IL-15蛋白或野生型IL-15缀合物的半衰期长至少24小时或更久。在一些情况下,IL-15多肽或IL-15缀合物的延长的半衰期比野生型IL-15蛋白或野生型IL-15缀合物的半衰期长至少36小时或更久。在一些情况下,IL-15多肽或IL-15缀合物的延长的半衰期比野生型IL-15蛋白或野生型IL-15缀合物的半衰期长至少48小时或更久。在一些情况下,IL-15多肽或IL-15缀合物的延长的半衰期比野生型IL-15蛋白或野生型IL-15缀合物的半衰期长至少3天或更久。在一些情况下,IL-15多肽或IL-15缀合物的延长的半衰期比野生型IL-15蛋白或野生型IL-15缀合物的半衰期长至少4天或更久。在一些情况下,IL-15多肽或IL-15缀合物的延长的半衰期比野生型IL-15蛋白或野生型IL-15缀合物的半衰期长至少5天或更久。在一些情况下,IL-15多肽或IL-15缀合物的延长的半衰期比野生型IL-15蛋白或野生型IL-15缀合物的半衰期长至少6天或更久。在一些情况下,IL-15多肽或IL-15缀合物的延长的半衰期比野生型IL-15蛋白或野生型IL-15缀合物的半衰期长至少7天或更久。在一些情况下,IL-15多肽或IL-15缀合物的延长的半衰期比野生型IL-15蛋白或野生型IL-15缀合物的半衰期长至少10天或更久。在一些情况下,IL-15多肽或IL-15缀合物的延长的半衰期比野生型IL-15蛋白或野生型IL-15缀合物的半衰期长至少12天或更久。在一些情况下,IL-15多肽或IL-15缀合物的延长的半衰期比野生型IL-15蛋白或野生型IL-15缀合物的半衰期长至少14天或更久。在一些情况下,IL-15多肽或IL-15缀合物的延长的半衰期比野生型IL-15蛋白或野生型IL-15缀合物的半衰期长至少21天或更久。在一些情况下,IL-15多肽或IL-15缀合物的延长的半衰期比野生型IL-15蛋白或野生型IL-15缀合物的半衰期长至少28天或更久。在一些情况下,IL-15多肽或IL-15缀合物的延长的半衰期比野生型IL-15蛋白或野生型IL-15缀合物的半衰期长至少30天或更久。

[0061] 在一些情况下,与野生型IL-15蛋白或野生型IL-15缀合物的半衰期相比,IL-15多肽或IL-15缀合物的延长的半衰期为约4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、18小时、24小时、36小时、48小时、3天、4天、5天、6天、7天、10天、12天、14天、21天、28天或30天。在一些情况下,具有生物活性的IL-15多肽或IL-15缀合物具有约90分钟的延长的半衰期。在一些情况下,具有生物活性的IL-15多肽或IL-15缀合物具有约2小时的延长的半衰期。在一些情况下,具有生物活性的IL-15多肽或IL-15缀合物具有约3小时的延长的半衰期。在一些情况下,具有生物活性的IL-15多肽或IL-15缀合物具有约4小时的延长的半衰期。在一些情况下,具有生物活性的IL-15多肽或IL-15缀合物具有约5小时的延长的半衰期。在一些情况下,具有生物活性的IL-15多肽或IL-15缀合物具有约6小时的延长的半衰期。在一些情况下,具有生物活性的IL-15多肽或IL-15缀合物具有约7小时的延长的半衰期。在一些情况下,具有生物活性的IL-15多肽或IL-15缀合物具有约8小时的延长的半衰期。在一些情况下,具有生物活性的IL-15多肽或IL-15缀合物具有约9小时的延长的半衰期。

期。在一些情况下,具有生物活性的IL-15多肽或IL-15缀合物具有约10小时的延长的半衰期。在一些情况下,具有生物活性的IL-15多肽或IL-15缀合物具有约11小时的延长的半衰期。在一些情况下,具有生物活性的IL-15多肽或IL-15缀合物具有约12小时的延长的半衰期。在一些情况下,具有生物活性的IL-15多肽或IL-15缀合物具有约18小时的延长的半衰期。在一些情况下,具有生物活性的IL-15多肽或IL-15缀合物具有约24小时的延长的半衰期。在一些情况下,具有生物活性的IL-15多肽或IL-15缀合物具有约36小时的延长的半衰期。在一些情况下,具有生物活性的IL-15多肽或IL-15缀合物具有约48小时的延长的半衰期。在一些情况下,具有生物活性的IL-15多肽或IL-15缀合物具有约3天的延长的半衰期。在一些情况下,具有生物活性的IL-15多肽或IL-15缀合物具有约4天的延长的半衰期。在一些情况下,具有生物活性的IL-15多肽或IL-15缀合物具有约5天的延长的半衰期。在一些情况下,具有生物活性的IL-15多肽或IL-15缀合物具有约6天的延长的半衰期。在一些情况下,具有生物活性的IL-15多肽或IL-15缀合物具有约7天的延长的半衰期。在一些情况下,具有生物活性的IL-15多肽或IL-15缀合物具有约10天的延长的半衰期。在一些情况下,具有生物活性的IL-15多肽或IL-15缀合物具有约12天的延长的半衰期。在一些情况下,具有生物活性的IL-15多肽或IL-15缀合物具有约14天的延长的半衰期。在一些情况下,具有生物活性的IL-15多肽或IL-15缀合物具有约21天的延长的半衰期。在一些情况下,具有生物活性的IL-15多肽或IL-15缀合物具有约28天的延长的半衰期。在一些情况下,具有生物活性的IL-15多肽或IL-15缀合物具有约30天的延长的半衰期。

[0062] 在一些实施方案中,经修饰的IL-15多肽保留与白介素15受体 $\beta\gamma$ (IL-15R $\beta\gamma$) 信号传导复合物的显著信号传导效力。在一些情况下,将所述信号传导效力与野生型IL-15多肽与IL-15R $\beta\gamma$ 之间的信号传导效力进行比较。在一些情况下,经修饰的IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ 复合物与野生型IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ 复合物之间的受体信号传导效力的差异小于1000倍、小于500倍、小于200倍、小于100倍、小于50倍、小于10倍、小于5倍、小于4倍、小于3倍、小于2倍或小于1倍。在一些情况下,经修饰的IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ 复合物与野生型IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ 复合物之间的受体信号传导效力的差异大于10倍、大于20倍、大于30倍、大于40倍、大于50倍、大于100倍、大于200倍、大于300倍、大于400倍或大于500倍。在一些情况下,经修饰的IL-15多肽是部分激动剂,例如激活受体(例如,IL-15 $\beta\gamma$ 信号传导复合物)但相对于完全激动剂在受体上仅具有部分功效的激动剂。在一些情况下,经修饰的IL-15多肽是完全激动剂,例如以最大反应激活受体(例如IL-15 $\beta\gamma$ 信号传导复合物)的激动剂。

[0063] 在一些情况下,通过EC50值来衡量受体信号传导效力。在一些情况下,经修饰的IL-15多肽提供的EC50值与野生型IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ 复合物的EC50值相差小于1000倍、小于500倍、小于200倍、小于100倍、小于50倍、小于10倍、小于5倍、小于4倍、小于3倍、小于2倍或小于1倍。在一些情况下,经修饰的IL-15多肽提供的EC50值与野生型IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ 复合物的EC50值相差大于10倍、大于20倍、大于30倍、大于40倍、大于50倍、大于100倍、大于200倍、大于300倍、大于400倍或大于500倍。

[0064] 在一些情况下,通过ED50值来衡量受体信号传导效力。在一些情况下,经修饰的IL-15多肽提供的ED50值与野生型IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ 复合物的EC50值相差小于1000倍、小于500倍、小于200倍、小于100倍、小于50倍、小于10倍、小于5倍、小于4倍、小于3倍、小于2倍或小于1倍。在一些情况下,经修饰的IL-15多肽提供的ED50值与野生型IL-15/IL-15R $\beta\gamma$ 复合

物的EC50值相差大于10倍、大于20倍、大于30倍、大于40倍、大于50倍、大于100倍、大于200倍、大于300倍、大于400倍或大于500倍。

[0065] 在一些实施方案中,在化学、制造和控制(CMC)阶段期间,IL-15多肽被修饰(例如,聚乙二醇化)以延长半衰期、改善稳定性、改善纯化产率、改善纯度、减少聚集、改善蛋白质折叠或其组合。在一些情况下,IL-15多肽在氨基酸位置:N71、N72或N77处被修饰,其中所述残基位置对应于如SEQ ID NO:1中所示的位置。在一些情况下,在CMC阶段期间,IL-15多肽在残基N77处被修饰(例如,经由聚乙二醇化)以延长半衰期、改善稳定性、改善纯化产率、改善纯度、减少聚集、改善蛋白质折叠或其组合。在一些情况下,IL-15多肽在位置N1、W2、V3、N4、I6、S7、D8、K10、K11、E13、D14、L15、Q17、S18、M19、H20、I21、D22、A23、T24、L25、Y26、E28、S29、D30、V31、H32、P33、S34、C35、K36、V37、T38、K41、L44、E46、Q48、V49、S51、L52、E53、S54、G55、D56、A57、S58、H60、D61、T62、V63、E64、N65、I67、I68、L69、N71、N72、S73、L74、S75、S76、N77、G78、N79、V80、T81、E82、S83、G84、C85、K86、E87、C88、E89、E90、L91、E92、E93、K94、N95、I96、K97、E98、L100、Q101、S102、V104、H105、Q108、M109、F110、I111、N112、T113或S114处被进一步修饰。在一些情况下,IL-15多肽在位置D22、A23、T24、L25、Y26、L44、E46、Q48、V49、E53、E89、E90或E93处被进一步修饰,其中所述修饰削弱与IL-15R α 的相互作用。在一些情况下,IL-15多肽在位置N1、N4、S7、D8、K11、D61、T62、E64、N65、I68、L69或N72处被进一步修饰,其中所述修饰削弱与IL-15R β 的相互作用。在一些情况下,IL-15多肽在位置V3、I6、K10、E28、S29、D30、V31、H32、P33、S102、V104、H105、Q108、M109、I111、N112、T113或S114处被进一步修饰,其中所述修饰削弱与IL-15R γ 的相互作用。在一些情况下,IL-15多肽在位置E13、D14、L15、Q17、S18、M19、H20、I21、S34、C35、K36、V37、T38、K41、L44、S51、L52、S54、G55、D56、A57、S58、H60、V63、I67、N71、S73、L74、S75、S76、N77、G78、N79、V80、T81、E82、S83、G84、C85、K86、E87、C88、L91、E92、K94、N95、I96、K97、E98、L100、Q101或F110处被进一步修饰,其中所述修饰改善半衰期延长。在一些情况下,IL-15多肽在以上位置中的一个或多个处被进一步修饰,以削弱与IL-15R α 的相互作用、削弱与IL-15R β 的相互作用、削弱与IL-15R γ 的相互作用,改善半衰期延长或其组合。

IL-15缀合物前体

[0066] 本文公开了IL-15缀合物前体,其包含经修饰的IL-15多肽,其中一个或多个氨基酸已经从野生型氨基酸突变。此类前体通常与本文公开的方法一起用于治疗疾病或病症。在一些实施方案中,IL-15前体是未缀合的。此类突变不同地包括添加、缺失或取代。在一些情况下,所述添加包括在IL-15多肽的N-末端、C-末端或内部区域处包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个残基。在另外的情况下,所述缺失包括从IL-15多肽的N-末端、C-末端或在其内部区域内去除1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个残基。

天然和非天然氨基酸

[0067] 在一些实施方案中,在与缀合部分结合(或反应)之前,本文公开的氨基酸残基(例如,在IL-15多肽内)突变为赖氨酸、半胱氨酸、组氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸。例如,赖氨酸、半胱氨酸、组氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸的侧链可以与本文公开的缀合部分结合。在一些情况下,氨基酸残基突变为半胱氨酸、赖氨酸或组氨酸。在一些情况下,氨基酸残基突变为半胱氨酸。在一些情况下,氨基酸残基突变为赖氨酸。在一些情况下,氨基酸残基突变为组氨酸。在一些情况下,氨基酸残

基突变为酪氨酸。在一些情况下,氨基酸残基突变为色氨酸。在一些情况下,氨基酸残基位于N-或C-末端的近端、在N-或C-末端处或在内部残基位置处。在一些情况下,氨基酸残基是N-末端或C-末端残基,并且突变是半胱氨酸或赖氨酸。在一些情况下,氨基酸残基位于N-末端或C-末端残基的近端(例如,从N-末端或C-末端残基起的50、40、30、20或10个残基内),并且突变为半胱氨酸或赖氨酸。

[0068] 在一些情况下,将氨基酸残基添加至N-末端或C-末端残基,即IL-15多肽在N-末端或C-末端处包含另外的氨基酸残基,并且所述另外的氨基酸残基是半胱氨酸或赖氨酸。在一些情况下,所述另外的氨基酸残基是半胱氨酸。在一些情况下,所述另外的氨基酸与缀合部分缀合。

[0069] 在一些实施方案中,本文所述的氨基酸残基(例如,在IL-15多肽内)突变为非天然氨基酸。在一些实施方案中,非天然氨基酸不与缀合部分缀合。在一些实施方案中,本文公开的IL-15多肽包含非天然氨基酸,其中IL-15与蛋白质缀合,其中附接点不是所述非天然氨基酸。

[0070] 在一些实施方案中,在与缀合部分结合之前,本文公开的氨基酸残基(例如,在IL-15多肽内)突变为非天然氨基酸。在一些情况下,突变为非天然氨基酸防止或最小化免疫系统的自身抗原反应。如本文所用,术语“非天然氨基酸”是指除蛋白质中天然存在的20种氨基酸之外的氨基酸。非天然氨基酸的非限制性例子包括:对-乙酰基-L-苯丙氨酸、对-碘-L-苯丙氨酸、对-甲氧基苯丙氨酸、O-甲基-L-酪氨酸、对-炔丙基氧基苯丙氨酸、对-炔丙基-苯丙氨酸、L-3-(2-萘基)丙氨酸、3-甲基-苯丙氨酸、O-4-烯丙基-L-酪氨酸、4-丙基-L-酪氨酸、三-O-乙酰基-GlcNAc-丝氨酸、L-多巴、氟化苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、对-叠氮基-L-苯丙氨酸、对-酰基-L-苯丙氨酸、对-苯甲酰基-L-苯丙氨酸、对-硼酸基苯丙氨酸、O-炔丙基酪氨酸、L-磷酸丝氨酸、磷酸丝氨酸、磷酸酪氨酸、对-溴苯丙氨酸、硒代半胱氨酸、对-氨基-L-苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、N6-[(2-叠氮基乙氧基)羰基]-L-赖氨酸(AzK)、酪氨酸氨基酸的非天然类似物;谷氨酰胺氨基酸的非天然类似物;苯丙氨酸氨基酸的非天然类似物;丝氨酸氨基酸的非天然类似物;苏氨酸氨基酸的非天然类似物;烷基、芳基、酰基、叠氮基、氰基、卤素、肼、酰肼、羟基、烯基、炔基、醚、硫醇、磺酰基、硒代、酯、硫代酸、硼酸盐、硼酸酯、磷酸、磷酸、磷酰、磷化氢、杂环、烯酮、亚胺、醛、羟胺、酮或氨基取代的氨基酸或其组合;具有可光活化的交联剂的氨基酸;自旋标记的氨基酸;荧光氨基酸;金属结合氨基酸;含金属的氨基酸;放射性氨基酸;光笼化和/或光异构化氨基酸;含有氨基酸的生物素或生物素类似物;含有氨基酸的酮;包含聚乙二醇或聚醚的氨基酸;重原子取代的氨基酸;化学可裂解或可光裂解的氨基酸;具有延长的侧链的氨基酸;含有毒性基团的氨基酸;糖取代的氨基酸;碳连接的含糖氨基酸;氧化还原活性氨基酸;含 α -羟基的酸;氨基硫代酸; α , α 二取代氨基酸; β -氨基酸;除脯氨酸或组氨酸之外的环状氨基酸,以及除苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸之外的芳族氨基酸。

[0071] 在一些实施方案中,非天然氨基酸包含选择性反应性基团,或用于位点选择性标记靶多肽的反应性基团。在一些情况下,化学是双正交反应(例如,生物相容性和选择性反应)。在一些情况下,化学是Cu(I)催化或“无铜”炔-叠氮三唑形成反应、施陶丁格连接(Staudinger ligation)、反电子需求的迪尔斯-阿尔德(inverse-electron-demand Diels-Alder, IEDDA)反应、“光-点击”化学或金属介导的过程(如烯烃复分解和Suzuki-

Miyaura或Sonogashira交叉偶联)。

[0072] 在一些实施方案中,非天然氨基酸包含光反应性基团,所述光反应性基团在用例如UV辐照时交联。

[0073] 在一些实施方案中,非天然氨基酸包括光笼化氨基酸。

[0074] 在一些情况下,非天然氨基酸是对位取代、间位取代或邻位取代的氨基酸衍生物。

[0075] 在一些情况下,非天然氨基酸包括对-乙酰基-L-苯丙氨酸、对-叠氮甲基-L-苯丙氨酸(pAMF)、对-碘-L-苯丙氨酸、0-甲基-L-酪氨酸、对-甲氧基苯丙氨酸、对-炔丙氧基苯丙氨酸、对-炔丙基-苯丙氨酸、L-3-(2-萘基)丙氨酸、3-甲基-苯丙氨酸、0-4-烯丙基-L-酪氨酸、4-丙基-L-酪氨酸、三-0-乙酰基-GlcNAcp-丝氨酸、L-多巴、氟化苯丙氨酸、异丙基-L-苯丙氨酸、对-叠氮基-L-苯丙氨酸、对-酰基-L-苯丙氨酸、对-苯甲酰基-L-苯丙氨酸、L-磷酸丝氨酸、膦酰丝氨酸、膦酰酪氨酸、对-溴苯丙氨酸、对-氨基-L-苯丙氨酸或异丙基-L-苯丙氨酸。

[0076] 在一些情况下,非天然氨基酸是3-氨基酪氨酸、3-硝基酪氨酸、3,4-二羟基-苯丙氨酸或3-碘酪氨酸。

[0077] 在一些情况下,非天然氨基酸是苯基硒代半胱氨酸。

[0078] 在一些情况下,非天然氨基酸是含二苯甲酮、酮、碘化物、甲氧基、乙酰基、苯甲酰基或叠氮化物的苯丙氨酸衍生物。

[0079] 在一些情况下,非天然氨基酸是含二苯甲酮、酮、碘化物、甲氧基、乙酰基、苯甲酰基或叠氮化物的赖氨酸衍生物。

[0080] 在一些情况下,非天然氨基酸包含芳族侧链。

[0081] 在一些情况下,非天然氨基酸不包含芳族侧链。

[0082] 在一些情况下,所述非天然氨基酸包含叠氮基基团。

[0083] 在一些情况下,所述非天然氨基酸包含Michael受体基团。在一些情况下,Michael受体基团包含能够通过1,2-加成反应形成共价键的不饱和部分。在一些情况下,Michael受体基团包括缺电子的烯烃或炔烃。在一些情况下,Michael受体基团包括但不限于 α 、 β 不饱和基团:酮、醛、亚砷、砷、腈、亚胺或芳族化合物。

[0084] 在一些情况下,非天然氨基酸是脱氢丙氨酸。

[0085] 在一些情况下,非天然氨基酸包含醛或酮基团。

[0086] 在一些情况下,非天然氨基酸是包含醛或酮基团的赖氨酸衍生物。

[0087] 在一些情况下,非天然氨基酸是在 β 、 γ 或 δ 位置处包含一个或多个O、N、Se或S原子的赖氨酸衍生物。在一些情况下,非天然氨基酸是在 γ 位置处包含O、N、Se或S原子的赖氨酸衍生物。

[0088] 在一些情况下,非天然氨基酸是赖氨酸衍生物,其中 ϵ N原子被氧原子替代。

[0089] 在一些情况下,非天然氨基酸是赖氨酸衍生物,其不是天然存在的经翻译后修饰的赖氨酸。

[0090] 在一些情况下,非天然氨基酸是包含侧链的氨基酸,其中从 α 位置起的第六个原子包括羰基基团。在一些情况下,非天然氨基酸是包含侧链的氨基酸,其中从 α 位置起的第六个原子包括羰基基团,并且从 α 位置起的第五个原子是氮。在一些情况下,非天然氨基酸是包含侧链的氨基酸,其中从 α 位置起的第七个原子是氧原子。

[0091] 在一些情况下,非天然氨基酸是包含硒的丝氨酸衍生物。在一些情况下,非天然氨基酸是硒代丝氨酸(2-氨基-3-氢硒代丙酸)。在一些情况下,非天然氨基酸是2-氨基-3-((2-((3-(苄氧基)-3-氧丙基)氨基)乙基)硒基)丙酸。在一些情况下,非天然氨基酸是2-氨基-3-(苯基硒基)丙酸。在一些情况下,非天然氨基酸包括硒,其中硒的氧化导致形成包含烯烃的非天然氨基酸。

[0092] 在一些情况下,非天然氨基酸包含环辛炔基基团。

[0093] 在一些情况下,非天然氨基酸包含反式环辛烯基基团。

[0094] 在一些情况下,非天然氨基酸包含降冰片烯基基团。

[0095] 在一些情况下,非天然氨基酸包含环丙烯基基团。

[0096] 在一些情况下,非天然氨基酸包含二吡丙因基基团。

[0097] 在一些情况下,非天然氨基酸包含四嗪基基团。

[0098] 在一些情况下,非天然氨基酸是赖氨酸衍生物,其中侧链氮被氨甲酰化。在一些情况下,非天然氨基酸是赖氨酸衍生物,其中侧链氮被酰化。在一些情况下,非天然氨基酸是2-氨基-6-[[叔丁氧基]羰基]氨基]己酸。在一些情况下,非天然氨基酸是2-氨基-6-[[叔丁氧基]羰基]氨基]己酸。在一些情况下,非天然氨基酸是N6-Boc-N6-甲基赖氨酸。在一些情况下,非天然氨基酸是N6-乙酰基赖氨酸。在一些情况下,非天然氨基酸是吡咯赖氨酸。在一些情况下,非天然氨基酸是N6-三氟乙酰基赖氨酸。在一些情况下,非天然氨基酸是2-氨基-6-[[苄氧基]羰基]氨基]己酸。在一些情况下,非天然氨基酸是2-氨基-6-[[对-碘代苄氧基]羰基]氨基]己酸。在一些情况下,非天然氨基酸是2-氨基-6-[[对-硝基苄氧基]羰基]氨基]己酸。在一些情况下,非天然氨基酸是N6-脯氨酰基赖氨酸。在一些情况下,非天然氨基酸是2-氨基-6-[[环戊基氧基]羰基]氨基]己酸。在一些情况下,非天然氨基酸是N6-(环戊烷羰基)赖氨酸。在一些情况下,非天然氨基酸是N6-(四氢呋喃-2-羰基)赖氨酸。在一些情况下,非天然氨基酸是N6-(3-乙炔基四氢呋喃-2-羰基)赖氨酸。在一些情况下,非天然氨基酸是N6-((丙-2-炔-1-基氧基)羰基)赖氨酸。在一些情况下,非天然氨基酸是2-氨基-6-[[2-叠氮基环戊基氧基]羰基]氨基]己酸。在一些情况下,非天然氨基酸是N6-[(2-叠氮基乙氧基)羰基]赖氨酸。在一些情况下,非天然氨基酸是2-氨基-6-[[2-硝基苄氧基]羰基]氨基]己酸。在一些情况下,非天然氨基酸是2-氨基-6-[[2-环辛炔基氧基]羰基]氨基]己酸。在一些情况下,非天然氨基酸是N6-(2-氨基丁-3-炔酰基)赖氨酸。在一些情况下,非天然氨基酸是2-氨基-6-((2-氨基丁-3-炔酰基)氧基)己酸。在一些情况下,非天然氨基酸是N6-(烯丙氧基羰基)赖氨酸。在一些情况下,非天然氨基酸是N6-(丁烯基-4-氧羰基)赖氨酸。在一些情况下,非天然氨基酸是N6-(戊烯基-5-氧羰基)赖氨酸。在一些情况下,非天然氨基酸是N6-((丁-3-炔-1-基氧基)羰基)-赖氨酸。在一些情况下,非天然氨基酸是N6-((戊-4-炔-1-基氧基)羰基)-赖氨酸。在一些情况下,非天然氨基酸是N6-(噻唑烷-4-羰基)赖氨酸。在一些情况下,非天然氨基酸是2-氨基-8-氧代壬酸。在一些情况下,非天然氨基酸是2-氨基-8-氧代辛酸。在一些情况下,非天然氨基酸是N6-(2-氧代乙酰基)赖氨酸。

[0099] 在一些情况下,非天然氨基酸是N6-丙酰基赖氨酸。在一些情况下,非天然氨基酸是N6-丁酰基赖氨酸,在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-(丁-2-烯酰基)赖氨酸,在一些情况下,所述非天然氨基酸是N6-((双环[2.2.1]庚-5-烯-2-基氧基)羰基)赖氨酸。在一些情况下,非天然氨基酸是N6-((螺[2.3]己-1-烯-5-基甲氧基)羰基)赖氨酸。在一些情况

下,非天然氨基酸是N6-(((4-(1-(三氟甲基)环丙-2-烯-1-基)苄基)氧基)羰基)赖氨酸。在一些情况下,非天然氨基酸是N6-((双环[2.2.1]庚-5-烯-2-基甲氧基)羰基)赖氨酸。在一些情况下,非天然氨基酸是半胱氨酸赖氨酸。在一些情况下,非天然氨基酸是N6-((1-(6-硝基苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)乙氧基)羰基)赖氨酸。在一些情况下,非天然氨基酸是N6-((2-(3-甲基-3H-二吡丙因-3-基)乙氧基)羰基)赖氨酸。在一些情况下,非天然氨基酸是N6-((3-(3-甲基-3H-二吡丙因-3-基)丙氧基)羰基)赖氨酸。在一些情况下,非天然氨基酸是N6-((间硝基苯氧基)N6-甲基羰基)赖氨酸。在一些情况下,非天然氨基酸是N6-((双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲氧基)羰基)-赖氨酸。在一些情况下,非天然氨基酸是N6-((环庚-3-烯-1-基氧基)羰基)-L-赖氨酸。

[0100] 在一些情况下,非天然氨基酸是2-氨基-3-((((苄氧基)羰基)氨基)甲基)硒基丙酸。

[0101] 在一些实施方案中,非天然氨基酸通过重构的琥珀、蛋白石或赭石终止密码子掺入IL-15多肽中。

[0102] 在一些实施方案中,非天然氨基酸通过4-碱基密码子掺入IL-15多肽中。

[0103] 在一些实施方案中,非天然氨基酸通过重构的稀有有义密码子或重构的常见的有义密码子掺入IL-15多肽中。

[0104] 在一些实施方案中,非天然氨基酸通过包含非天然核酸的合成密码子掺入IL-15多肽中。

[0105] 在一些情况下,非天然氨基酸通过正交的、经修饰的合成酶/tRNA对掺入IL-15中。此类正交对包含天然合成酶,所述天然合成酶能够将非天然氨基酸装载到非天然tRNA上,同时最小化a)其他内源性氨基酸装载到非天然tRNA上和b)非天然氨基酸装载到其他内源性tRNA上。此类正交对包含tRNA,所述tRNA能够通过非天然合成酶进行装载,同时避免通过内源性合成酶装载其他内源性氨基酸。在一些实施方案中,从各种生物体(如细菌、酵母、古细菌或人来源)鉴定出此类对。在一些实施方案中,正交合成酶/tRNA对包含来自单一生物体的组分。在一些实施方案中,正交合成酶/tRNA对包含来自两种不同生物体的组分。在一些实施方案中,正交合成酶/tRNA对包含在修饰之前促进两个不同氨基酸翻译的组分。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的丙氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的精氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的天冬酰胺合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的天冬氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的半胱氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的谷氨酰胺合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的谷氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的丙氨酸甘氨酸。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的组氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的亮氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的异亮氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的赖氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的甲硫氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的苯丙氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的脯氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的丝氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的苏氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的色氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的酪氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的缬氨

酸合成酶。在一些实施方案中,正交合成酶是经修饰的磷酸丝氨酸合成酶。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的丙氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的精氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的天冬酰胺tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的天冬氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的半胱氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的谷氨酰胺tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的谷氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的丙氨酸甘氨酸。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的组氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的亮氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的异亮氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的赖氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的甲硫氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的苯丙氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的脯氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的丝氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的苏氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的色氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的酪氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的缬氨酸tRNA。在一些实施方案中,正交tRNA是经修饰的磷酸丝氨酸tRNA。

[0106] 在一些实施方案中,非天然氨基酸通过氨酰基(aaRS或RS)-tRNA合成酶-tRNA对掺入IL-15多肽中。示例性aaRS-tRNA对包括但不限于詹氏甲烷球菌(*Methanococcus jannaschii*) (Mj-Tyr) aaRS/tRNA对、大肠杆菌(*E. coli*) TyrRS (Ec-Tyr) /嗜热脂肪芽孢杆菌(*B. stearothermophilus*) tRNA_{CUA}对、大肠杆菌LeuRS (Ec-Leu) /嗜热脂肪芽孢杆菌tRNA_{CUA}对和吡咯基-tRNA对。在一些情况下,非天然氨基酸通过Mj-TyrRS/tRNA对掺入细胞因子(例如,IL多肽)中。可以通过Mj-TyrRS/tRNA对掺入的示例性UAA包括但不限于对位取代的苯丙氨酸衍生物,如对-氨基苯丙氨酸和对-甲氧基苯丙氨酸;间位取代的酪氨酸衍生物,如3-氨基酪氨酸、3-硝基酪氨酸、3,4-二羟基苯丙氨酸和3-碘酪氨酸;苯基硒代半胱氨酸;对-硼酸基苯丙氨酸;和邻-硝基苄基酪氨酸。

[0107] 在一些情况下,非天然氨基酸通过Ec-Tyr/tRNA_{CUA}或Ec-Leu/tRNA_{CUA}对掺入IL-15多肽中。可以通过Ec-Tyr/tRNA_{CUA}或Ec-Leu/tRNA_{CUA}对掺入的示例性UAA包括但不限于含有苯甲酮、酮、碘化物或叠氮化物取代基的苯丙氨酸衍生物;0-炔丙基酪氨酸; α -氨基辛酸;0-甲基酪氨酸;0-硝基苄基半胱氨酸;和3-(萘-2-基氨基)-2-氨基-丙酸。

[0108] 在一些情况下,非天然氨基酸通过吡咯基-tRNA对掺入IL-15多肽中。在一些情况下,Py1RS获自古细菌,例如获自产甲烷的古细菌。在一些情况下,Py1RS获自巴氏甲烷八叠球菌(*Methanosarcina barkeri*)、马氏甲烷八叠球菌(*Methanosarcina mazei*)或乙酸甲烷八叠球菌(*Methanosarcina acetivorans*)。可以通过吡咯基-tRNA对掺入的示例性UAA包括但不限于酰胺和氨基甲酸酯取代的赖氨酸,如2-氨基-6-((R)-四氢呋喃-2-甲酰胺基)己酸、N- ϵ -D-脯氨酰基-L-赖氨酸和N- ϵ -环戊基氧基羰基-L-赖氨酸;N- ϵ -丙烯酰基-L-赖氨酸;N- ϵ -[(1-(6-硝基苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)乙氧基)羰基]-L-赖氨酸;和N- ϵ -(1-甲基环丙-2-烯甲酰氨基)赖氨酸。

[0109] 在一些情况下,非天然氨基酸通过US 9,988,619和US 9,938,516中披露的合成酶掺入IL-15多肽中。可以通过此类合成酶掺入的示例性UAA包括对-甲基叠氨基-L-苯丙氨酸、芳烷基、杂环基、杂芳烷基非天然氨基酸等。在一些实施方案中,此类UAA包含吡啶基、吡嗪基、吡唑基、三唑基、噁唑基、噻唑基、噻吩基或其他杂环。在一些实施方案中,此类氨基酸

包含叠氮化物、四嗪或能够与偶联配偶体(如水溶性部分)缀合的其他化学基团。在一些实施方案中,此类合成酶被表达并用于将UAA在体内掺入细胞因子中。在一些实施方案中,使用无细胞翻译系统将此类合成酶用于将UAA掺入细胞因子中。

[0110] 在一些情况下,非天然氨基酸通过天然存在的合成酶掺入IL-15多肽中。在一些实施方案中,非天然氨基酸通过对一种或多种氨基酸营养缺陷的生物体掺入细胞因子中。在一些实施方案中,对应于营养缺陷型氨基酸的合成酶能够将非天然氨基酸装载在相应的tRNA上。在一些实施方案中,非天然氨基酸是硒代半胱氨酸或其衍生物。在一些实施方案中,非天然氨基酸是硒代甲硫氨酸或其衍生物。在一些实施方案中,非天然氨基酸是芳族氨基酸,其中所述芳族氨基酸包括芳基卤化物,如碘化物。在实施方案中,非天然氨基酸在结构上与营养缺陷型氨基酸相似。

[0111] 在一些情况下,非天然氨基酸包括图1所示的非天然氨基酸。

[0112] 在一些情况下,非天然氨基酸包括赖氨酸或苯丙氨酸衍生物或类似物。在一些情况下,非天然氨基酸包括赖氨酸衍生物或赖氨酸类似物。在一些情况下,非天然氨基酸包括吡咯赖氨酸(Py1)。在一些情况下,非天然氨基酸包括苯丙氨酸衍生物或苯丙氨酸类似物。在一些情况下,非天然氨基酸是Wan等人,“Pyrrolysyl-tRNA synthetase:an ordinary enzyme but an outstanding genetic code expansion tool,”*Biochem Biophys Acta* 1844 (6):1059-4070 (2014)中描述的非天然氨基酸。在一些情况下,非天然氨基酸包括图2(例如,图2A和图2B)所示的非天然氨基酸。

[0113] 在一些实施方案中,非天然氨基酸包括图3A-图3D所示的非天然氨基酸(从Dumas等人,*Chemical Science* 2015,6,50-69的表1获得)。

[0114] 在一些实施方案中,掺入IL-15多肽中的非天然氨基酸在US 9,840,493;US 9,682,934;US 2017/0260137;US 9,938,516;或US 2018/0086734中披露。可以通过此类合成酶掺入的示例性UAA包括对-甲基叠氮基-L-苯丙氨酸、芳烷基、杂环基和杂芳烷基,以及赖氨酸衍生物非天然氨基酸。在一些实施方案中,此类UAA包含吡啶基、吡嗪基、吡唑基、三唑基、噁唑基、噻唑基、噻吩基或其他杂环。在一些实施方案中,此类氨基酸包含叠氮化物、四嗪或能够与偶联配偶体(如水溶性部分)缀合的其他化学基团。在一些实施方案中,UAA包含经由烷基接头附接至芳族部分的叠氮化物。在一些实施方案中,烷基接头是C₁-C₁₀接头。在一些实施方案中,UAA包含经由烷基接头附接至芳族部分的四嗪。在一些实施方案中,UAA包含经由氨基基团附接至芳族部分的四嗪。在一些实施方案中,UAA包含经由烷基氨基基团附接至芳族部分的四嗪。在一些实施方案中,UAA包含经由烷基链附接至氨基酸侧链的末端氮(例如,赖氨酸衍生物的N6,或包含较短烷基侧链的衍生物的N5、N4或N3)的叠氮化物。在一些实施方案中,UAA包含经由烷基链附接至氨基酸侧链的末端氮的四嗪。在一些实施方案中,UAA包含经由烷基接头附接至酰胺的叠氮化物或四嗪。在一些实施方案中,UAA是3-氨基丙氨酸、丝氨酸、赖氨酸或其衍生物的叠氮化物或含四嗪的氨基甲酸酯或酰胺。在一些实施方案中,将此类UAA在体内掺入细胞因子中。在一些实施方案中,将此类UAA在无细胞系统中掺入细胞因子中。

缀合部分

[0115] 在某些实施方案中,本文公开了与上述一种或多种经修饰的IL-15多肽结合的缀合部分。在一些实施方案中,缀合部分是干扰IL-15与其受体相互作用的分子。在一些实施

方案中,缀合部分是当与IL-15结合时能够使IL-15缀合物调节免疫应答的任何分子。在一些实施方案中,缀合部分通过共价键与IL-15结合。在一些情况下,本文所述的IL-15附接至具有三唑基团的缀合部分。在一些情况下,本文所述的IL-15附接至具有二氢吡嗪或吡嗪基团的缀合部分。在一些情况下,缀合部分包括水溶性聚合物。在其他情况下,缀合部分包括蛋白质或其结合片段。在另外的情况下,缀合部分包括肽。在另外的情况下,缀合部分包括核酸。在另外的情况下,缀合部分包括小分子。在另外的情况下,缀合部分包括生物缀合物(例如,TLR激动剂,如TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8或TLR9激动剂;或合成配体,如Pam3Cys、CFA、MALP2、Pam2Cys、FSL-1、Hib-OMPC、聚肌苷酸:聚胞苷酸、聚腺苷酸:聚尿苷酸、AGP、MPL A、RC-529、MDF2 β 、CFA或鞭毛蛋白)。在一些情况下,缀合部分增加血清半衰期和/或改善稳定性。在一些情况下,缀合部分降低了细胞因子与一个或多个细胞因子受体结构域或亚基的相互作用。在另外的情况下,缀合部分阻断IL-15与具有其一种或多种同源受体的一个或多个IL-15结构域或亚基的相互作用。在一些实施方案中,本文所述的IL-15缀合物包含多个缀合部分。在一些实施方案中,缀合部分附接至IL-15多肽中的非天然或天然氨基酸。在一些实施方案中,IL-15缀合物包含附接至天然氨基酸的缀合部分。在一些实施方案中,IL-15缀合物附接至细胞因子肽中的非天然氨基酸。在一些实施方案中,缀合部分附接至IL-15多肽的N或C末端氨基酸。本文公开了各种组合位点,例如,第一缀合部分附接至IL-15多肽中的非天然或天然氨基酸,并且第二缀合部分附接至IL-15多肽的N或C末端氨基酸。在一些实施方案中,单个缀合部分附接至IL-15多肽的多个残基(例如钉)。在一些实施方案中,缀合部分附接至IL-15多肽的N和C末端氨基酸两者。

水溶性聚合物

[0116] 在一些实施方案中,本文所述的缀合部分是水溶性聚合物。在一些实施方案中,水溶性聚合物是非肽的、无毒的和生物相容的。如本文所用,如果与单独使用物质或与另一种物质(例如,活性剂,如IL-15部分)结合活组织使用(例如,给予至患者)相关的有益效果超过由临床医生(例如,医师)评估的任何有害效果,则所述物质被认为是生物相容的。在一些实施方案中,水溶性聚合物是进一步非免疫原性的。在一些实施方案中,如果物质在体内的预期用途未产生不希望的免疫应答(例如,抗体形成),或者如果产生了免疫应答,这种应答被临床医生(例如,医师、毒理学家或临床发展专家)评估为临床上不显著或不重要,则所述物质被认为是非免疫原性的。

[0117] 在一些实施方案中,所述水溶性聚合物的特征在于具有约2至约300个末端。示例性水溶性聚合物包括但不限于聚(亚烷基二醇),如聚乙二醇(“PEG”)、聚(丙二醇)(“PPG”)、乙二醇和丙二醇的共聚物等、聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯醇)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(羟烷基甲基丙烯酰胺)、聚(甲基丙烯酸羟烷基酯)、聚(糖类)、聚(α -羟基酸)、聚(乙醇)、聚磷腈、聚噁唑啉(“POZ”)(其描述于WO 2008/106186中)、聚(N-丙烯酰吗啉)以及前述任何一种的组合。

[0118] 在一些实施方案中,水溶性聚合物不限于特定结构。在一些实施方案中,水溶性聚合物是线性的(例如,封端的,例如,烷氧基PEG或双官能PEG)、支化的或多臂的(例如,叉状的PEG或附接至多元醇核的PEG)、树状的或星形)架构,每个架构都带有或不带有一个或多个可降解的连接。此外,水溶性聚合物的内部结构可以以任何数量的不同重复图案来组织,并且可以选自均聚物、交替共聚物、无规共聚物、嵌段共聚物、交替三聚物、无规三聚物和嵌

段三聚物。

[0119] 在一些实施方案中,IL-21缀合物中的水溶性聚合物的重均分子量为约100道尔顿至约150,000道尔顿。示例性范围包括,例如,重均分子量在大于5,000道尔顿至约100,000道尔顿的范围内、约6,000道尔顿至约90,000道尔顿的范围内、约10,000道尔顿至约85,000道尔顿的范围内、大于10,000道尔顿至约85,000道尔顿的范围内、约20,000道尔顿至约85,000道尔顿的范围内、约53,000道尔顿至约85,000道尔顿的范围内、约25,000道尔顿至约120,000道尔顿的范围内、约29,000道尔顿至约120,000道尔顿的范围内、约35,000道尔顿至约120,000道尔顿的范围内,以及约40,000道尔顿至约120,000道尔顿的范围内。

[0120] 所述水溶性聚合物的示例性重均分子量包括约100道尔顿、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道尔顿和约75,000道尔顿。还可以使用总分子量为上述任何一种的支化形式的水溶性聚合物(例如,由两种20,000道尔顿聚合物构成的支化40,000道尔顿水溶性聚合物)。在一个或多个实施方案中,缀合物将不具有直接或间接附接有重均分子量小于约6,000道尔顿的PEG的任何PEG部分。

[0121] PEG通常将包含许多(OCH_2CH_2)单体[或($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$)单体,取决于PEG如何定义]。如本文所用,重复单元的数目由“ $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ ”中的下标“n”标识。因此,(n)的值通常落入以下范围中的一个或多个:2至约3400、约100至约2300、约100至约2270、约136至约2050、约225至约1930、约450至约1930、约1200至约1930、约568至约2727、约660至约2730、约795至约2730、约795至约2730、约909至约2730,以及约1,200至约1,900。对于其中分子量已知的任何给定聚合物,可以通过将聚合物的总重均分子量除以重复单体的分子量来确定重复单元的数目(即“n”)。

[0122] 在一些实施方案中,水溶性聚合物是封端的聚合物,即具有被相对惰性的基团(如低级 C_{1-6} 烷氧基基团或羟基基团)封端的至少一个末端的聚合物。当所述聚合物是PEG时,例如,可以使用甲氧基-PEG(通常称为mPEG),其是PEG的线性形式,其中所述聚合物的一个末端是甲氧基($-\text{OCH}_3$)基团,而另一个末端是羟基或可以任选地被化学修饰的其他官能团。

[0123] 在一些实施方案中,示例性水溶性聚合物包括但不限于来自Quanta Biodesign, Ltd的线性或支化的离散PEG(dPEG);来自Nektar Therapeutics的线性、支化或叉状PEG;来自JenKem Technology的线性、支化或Y形PEG衍生物。

[0124] 在一些实施方案中,本文所述的IL-15多肽与选自以下的水溶性聚合物缀合:聚(亚烷基二醇)(如聚乙二醇(“PEG”)、聚丙二醇(“PPG”)、乙二醇和丙二醇的共聚物等)、聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯炔醇)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(羟烷基甲基丙烯酰胺)、聚(甲基丙烯酸羟烷基酯)、聚(糖类)、聚(α -羟基酸)、聚(乙烯醇)、聚磷腈、聚噁唑啉(“POZ”)、聚(N-丙烯酰吗啉)及其组合。在一些实施方案中,IL-15多肽与PEG缀合(例如,聚乙二醇化)。在一

些实施方案中,IL-15多肽与PPG缀合。在一些实施方案中,IL-15多肽与POZ缀合。在一些情况下,IL-15多肽与PVP缀合。

[0125] 在一些情况下,水溶性聚合物包括聚甘油(PG)。在一些情况下,聚甘油是超支化PG(HPG)(例如,如Imran等人“*Influence of architecture of high molecular weight linear and branched polyglycerols on their biocompatibility and biodistribution*,”*Biomaterials* 33:9135-9147 (2012)所述)。在其他情况下,聚甘油是线性PG(LPG)。在另外的情况下,聚甘油是中功能性PG、线性-嵌段-超支化PG(例如,如Wurm等人,“*Squaric acid mediated synthesis and biological activity of a library of linear and hyperbranched poly(glycerol)-protein conjugates*,”*Biomacromolecules* 13:1161-1171 (2012)所述)、或侧链功能性PG(例如,如Li等人,“*Synthesis of linear polyether polyol derivatives as new materials for bioconjugation*,”*Bioconjugate Chem.*20:780-789 (2009)所述)。

[0126] 在一些情况下,本文所述的IL-15多肽与PG,例如HPG、LPG、中功能性PG、线性-嵌段-超支化PG或侧链功能性PG缀合。

[0127] 在一些实施方案中,水溶性聚合物是可降解的合成PEG替代物。示例性可降解的合成PEG替代物包括但不限于聚[低聚(乙二醇)甲基丙烯酸甲酯](POEGMA);通过远螯或基于二末端官能化的PEG大分子单体的聚合反应生成的经骨架修饰的PEG衍生物;包含含有可降解连接的共聚单体的PEG衍生物,如聚[(环氧乙烷)-共-(亚甲基环氧乙烷)][P(EO-共-MEO)]、环烯酮缩醛,如与OEGMA共聚的5,6-苯并-2-亚甲基-1,3-二氧杂环庚烷(BMD0)、2-亚甲基-1,3-二氧杂环庚烷(MD0)和2-亚甲基-4-苯基-1,3-二氧戊环(MPDL);或聚(ϵ -己内酯)-接枝-聚(环氧乙烷)(PCL-g-PEO)。

[0128] 在一些情况下,本文所述的IL-15多肽与可降解的合成PEG替代物(例如像POEGM;通过远螯或基于二末端官能化的PEG大分子单体的聚合反应生成的经骨架修饰的PEG衍生物;P(EO-共-MEO);与OEGMA共聚的环状烯酮缩醛,如BMD0、MD0和MPDL;或PCL-g-PEO)缀合。

[0129] 在一些实施方案中,水溶性聚合物包括聚(两性离子)。示例性聚(两性离子)包括但不限于聚(甲基丙烯酸磺基甜菜碱)(PSBMA)、聚(甲基丙烯酸羧基甜菜碱)(PCBMA)和聚(2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱)(PMPC)。在一些情况下,IL-15多肽与聚(两性离子)(如PSBMA、PCBMA或PMPC)缀合。

[0130] 在一些实施方案中,水溶性聚合物包括聚碳酸酯。示例性聚碳酸酯包括但不限于五氟苯基5-甲基-2-氧代-1,3-二氧六环-5-羧酸酯(MTC-OC₆F₅)。在一些情况下,本文所述的IL-15多肽与聚碳酸酯(如MTC-OC₆F₅)缀合。

[0131] 在一些实施方案中,水溶性聚合物包括聚合物杂化物,例如像聚碳酸酯/PEG聚合物杂化物、肽/蛋白质-聚合物缀合物或含羟基和/或两性离子衍生化聚合物(例如,含羟基和/或两性离子衍生化PEG聚合物)。在一些情况下,本文所述的IL-15多肽与聚合物杂化物(如聚碳酸酯/PEG聚合物杂化物、肽/蛋白质-聚合物缀合物或含羟基和/或两性离子衍生化聚合物(例如,含羟基和/或两性离子衍生化PEG聚合物))缀合。

[0132] 在一些实施方案中,水溶性聚合物包括多糖。示例性多糖包括但不限于葡聚糖、聚唾液酸(PSA)、透明质酸(HA)、直链淀粉、肝素、硫酸乙酰肝素(HS)、糊精或羟乙基淀粉(HES)。在一些实施方案中,IL-15多肽与葡聚糖缀合。在一些实施方案中,IL-15多肽与PSA

缀合。在一些实施方案中,IL-15多肽与HA缀合。在一些实施方案中,IL-15多肽与直链淀粉缀合。在一些实施方案中,IL-15多肽与肝素缀合。在一些实施方案中,IL-15多肽与HS缀合。在一些实施方案中,IL-15多肽与糊精缀合。在一些实施方案中,IL-15多肽与HES缀合。

[0133] 在一些实施方案中,水溶性聚合物包括聚糖。聚糖的示例性类别包括N-连接的聚糖、O-连接的聚糖、糖脂、O-GlcNAc和糖胺聚糖。在一些实施方案中,IL-15多肽与聚糖缀合。在一些实施方案中,IL-15多肽与N-连接的聚糖缀合。在一些实施方案中,IL-15多肽与O-连接的聚糖缀合。在一些实施方案中,IL-15多肽与糖脂缀合。在一些实施方案中,IL-15多肽与O-GlcNAc缀合。在一些实施方案中,IL-15多肽与糖胺聚糖缀合。

[0134] 在一些实施方案中,水溶性聚合物包括聚噁唑啉聚合物。聚噁唑啉聚合物是线性合成聚合物,并且与PEG相似,具有低多分散性。在一些实施方案中,聚噁唑啉聚合物是多分散的聚噁唑啉聚合物,其特征在于平均分子量。在一些实施方案中,聚噁唑啉聚合物的平均分子量包括例如1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、100,000、200,000、300,000、400,000或500,000Da。在一些实施方案中,聚噁唑啉聚合物包括聚(2-甲基2-噁唑啉)(PMOZ)、聚(2-乙基2-噁唑啉)(PEOZ)或聚(2-丙基2-噁唑啉)(PPOZ)。在一些实施方案中,IL-15多肽与聚噁唑啉聚合物缀合。在一些实施方案中,IL-15多肽与PMOZ缀合。在一些实施方案中,IL-15多肽与PEOZ缀合。在一些实施方案中,IL-15多肽与PPOZ缀合。

[0135] 在一些实施方案中,水溶性聚合物包括聚丙烯酸聚合物。在一些实施方案中,IL-15多肽与聚丙烯酸聚合物缀合。

[0136] 在一些实施方案中,水溶性聚合物包括多胺。多胺是包含两个或更多个伯氨基基团的有机聚合物。在一些实施方案中,多胺包括支化多胺、线性多胺或环状多胺。在一些实施方案中,多胺是低分子量线性多胺。示例性多胺包括腐胺、尸胺、亚精胺、精胺、乙二胺、1,3-二氨基丙烷、六亚甲基二胺、四乙基亚甲基二胺和哌嗪。在一些实施方案中,IL-15多肽与多胺缀合。在一些实施方案中,IL-15多肽与腐胺、尸胺、亚精胺、精胺、乙二胺、1,3-二氨基丙烷、六亚甲基二胺、四乙基亚甲基二胺或哌嗪缀合。

脂质

[0137] 在一些实施方案中,本文所述的缀合部分是脂质。在一些情况下,脂质是脂肪酸。在一些情况下,脂肪酸是饱和脂肪酸。在其他情况下,脂肪酸是不饱和脂肪酸。示例性脂肪酸包括但不限于包含约6至约26个碳原子、约6至约24个碳原子、约6至约22个碳原子、约6至约20个碳原子、约6至约18个碳原子、约20至约26个碳原子、约12至约26个碳原子、约12至约24个碳原子、约12至约22个碳原子、约12至约20个碳原子或约12至约18个碳原子的脂肪酸。在一些情况下,脂质与一种或多种血清蛋白结合,从而增加血清稳定性和/或血清半衰期。

[0138] 在一些实施方案中,脂质与本文所述的IL-15多肽缀合。在一些情况下,脂质是脂肪酸,例如饱和脂肪酸或不饱和脂肪酸。在一些情况下,脂肪酸是约6至约26个碳原子、约6至约24个碳原子、约6至约22个碳原子、约6至约20个碳原子、约6至约18个碳原子、约20至约26个碳原子、约12至约26个碳原子、约12至约24个碳原子、约12至约22个碳原子、约12至约20个碳原子或约12至约18个碳原子的。在一些情况下,脂肪酸的长度包含约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或26个碳原子。在一些情况下,脂肪酸包括己酸(己酸(hexanoic acid))、庚酸(庚酸(heptanoic acid))、辛酸(辛酸(octanoic acid))。

acid))、壬酸(壬酸(nonanoic acid))、癸酸(癸酸(decanoic acid))、十一酸(十一烷酸)、月桂酸(十二烷酸)、十三酸(十三烷酸)、肉豆蔻酸(十四烷酸)、十五酸(十五烷酸)、棕榈酸(十六烷酸)、十七酸(十七烷酸)、硬脂酸(十八烷酸)、十九酸(十九烷酸)、花生酸(二十烷酸)、二十一酸(二十一烷酸)、山萘酸(二十二烷酸)、二十三酸(二十三烷酸)、木酚酸(二十四烷酸)、二十五酸(二十五烷酸)或蜡酸(二十六烷酸)。

[0139] 在一些实施方案中,IL-15脂质缀合物增加血清稳定性和/或血清半衰期。

蛋白质

[0140] 在一些实施方案中,本文所述的缀合部分是蛋白质或其结合片段。示例性蛋白质包括白蛋白、转铁蛋白或运甲状腺素蛋白。在一些实施方案中,蛋白质或其结合片段包括抗体或其结合片段。在一些实施方案中,IL-15缀合物包含蛋白质或其结合片段。在一些实施方案中,包含蛋白质或其结合片段的IL-15缀合物具有增加的半衰期和/或稳定性。在一些实施方案中,包含蛋白质或其结合片段的IL-15缀合物与一个或多个IL-15R/IL-2R亚基的IL-15相互作用降低。在另外的情况下,蛋白质或其结合片段阻断IL-15与一个或多个IL-15R/IL-2R亚基的相互作用。

[0141] 在一些实施方案中,缀合部分是白蛋白。白蛋白是水溶性球状蛋白家族。其通常在血浆中发现,占有血浆蛋白的约55-60%。人血清白蛋白(HSA)是一种585个氨基酸的多肽,其中三级结构分为三个结构域:结构域I(氨基酸残基1-195)、结构域II(氨基酸残基196-383)和结构域III(氨基酸残基384-585)。每个结构域进一步包含结合位点,其可以与内源性配体(如长链和中链脂肪酸、胆红素或血红素)或外源性化合物(如杂环或芳族化合物)可逆或不可逆地相互作用。

[0142] 在一些实施方案中,IL-15多肽与白蛋白缀合。在一些实施方案中,IL-15多肽与人血清白蛋白(HSA)缀合。在另外的情况下,IL-15多肽与白蛋白的功能片段缀合。

[0143] 在一些实施方案中,缀合部分是转铁蛋白。转铁蛋白是一种679个氨基酸的多肽,其大小约为80kDa,并且包含两个 Fe^{3+} 结合位点,其中一个在N-末端结构域处并且另一个在C-末端结构域处。在一些实施方案中,人转铁蛋白的半衰期为约7-12天。

[0144] 在一些实施方案中,IL-15多肽与转铁蛋白缀合。在一些实施方案中,IL-15多肽与人转铁蛋白缀合。在另外的情况下,IL-15多肽与转铁蛋白的功能片段缀合。

[0145] 在一些实施方案中,缀合部分是运甲状腺素蛋白(TTR)。运甲状腺素蛋白是一种位于血清和脑脊液中的转运蛋白,其转运甲状腺激素甲状腺素(T_4)和与视黄醇结合的视黄醇结合蛋白。

[0146] 在一些实施方案中,IL-15多肽与运甲状腺素蛋白缀合(经由其末端之一或经由内部铰链区)。在一些实施方案中,IL-15多肽与运甲状腺素蛋白的功能片段缀合。

[0147] 在一些实施方案中,缀合部分是抗体或其结合片段。在一些实施方案中,抗体或其结合片段包括人源化抗体或其结合片段、鼠抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价 Fab' 、二价 Fab_2 、 F(ab)'_3 片段、单链可变片段(scFv)、双scFv、 $(\text{scFv})_2$ 、双抗体、微抗体、纳米抗体、三抗体、四抗体、五抗体、二硫键稳定的Fv蛋白(dsFv)、单结构域抗体(sdAb)、Ig NAR、骆驼科动物抗体或其结合片段、双特异性抗体或其结合片段或其经化学修饰的衍生物。

[0148] 在一些情况下,缀合部分包括scFv、双scFv、 $(\text{scFv})_2$ 、dsFv或sdAb。在一些情况下,

缀合部分包括scFv。在一些情况下,缀合部分包括bis-scFv。在一些情况下,缀合部分包括(scFv)₂。在一些情况下,缀合部分包括dsFv。在一些情况下,缀合部分包括sdAb。

[0149] 在一些实施方案中,缀合部分包括抗体(例如IgG、IgA、IgM、IgE或IgD)的Fc部分。在一些实施方案中,所述部分包括IgG(例如,IgG₁、IgG₃或IgG₄)的Fc部分。

[0150] 在一些实施方案中,IL-15多肽与抗体或其结合片段缀合。在一些实施方案中,IL-15多肽与人源化抗体或其结合片段、鼠抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab₂、F(ab)'₃片段、单链可变片段(scFv)、双scFv、(scFv)₂、双抗体、微抗体、纳米抗体、三抗体、四抗体、五抗体、二硫键稳定的Fv蛋白(dsFv)、单结构域抗体(sdAb)、Ig NAR、骆驼科动物抗体或其结合片段、双特异性抗体或其结合片段或其经化学修饰的衍生物缀合。在另外的情况下,IL-15多肽与抗体的Fc部分缀合。在另外的情况下,IL-15多肽与IgG(例如,IgG₁、IgG₃或IgG₄)的Fc部分缀合。

[0151] 在一些实施方案中,IL-15多肽与水溶性聚合物(例如,PEG)和抗体或其结合片段缀合。在一些情况下,抗体或其结合片段包括人源化抗体或其结合片段、鼠抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab₂、F(ab)'₃片段、单链可变片段(scFv)、双scFv、(scFv)₂、双抗体、微抗体、纳米抗体、三抗体、四抗体、五抗体、二硫键稳定的Fv蛋白(dsFv)、单结构域抗体(sdAb)、Ig NAR、骆驼科动物抗体或其结合片段、双特异性抗体或其结合片段或其经化学修饰的衍生物。在一些情况下,抗体或其结合片段包括scFv、双scFv、(scFv)₂、dsFv或sdAb。在一些情况下,抗体或其结合片段包括scFv。在一些情况下,抗体或其结合片段将所述IL-15缀合物引导至目的靶细胞,并且水溶性聚合物增强稳定性和/或血清半衰期。

[0152] 在一些情况下,一种或多种IL-15多肽-水溶性聚合物(例如,PEG)缀合物进一步与抗体或其结合片段结合。在一些情况下,IL-15缀合物与抗体的比率为约1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1或12:1。在一些情况下,IL-15缀合物与抗体的比率为约1:1。在其他情况下,IL-15缀合物与抗体的比率为约2:1、3:1或4:1。在另外的情况下,IL-15缀合物与抗体的比率为约6:1或更高。

[0153] 在一些实施方案中,所述一种或多种IL-15多肽-水溶性聚合物(例如,PEG)缀合物与抗体或其结合片段直接结合。在其他情况下,IL-15缀合物通过接头与所述抗体或其结合片段间接结合。示例性接头包括同双官能接头、异双官能接头、基于马来酰亚胺的接头、零迹线接头、自消灭接头、间隔基等。

[0154] 在一些实施方案中,抗体或其结合片段与IL-15多肽-水溶性聚合物(例如,PEG)缀合物的IL-15多肽部分直接或间接结合。在此类情况下,抗体与IL-15多肽的缀合位点是在不会阻碍IL-15多肽与IL-15R结合的位点处。在另外的情况下,抗体与IL-15多肽的缀合位点是在部分阻断IL-15多肽与IL-15R结合的位点处。在其他实施方案中,抗体或其结合片段与IL-15多肽-水溶性聚合物(例如,PEG)缀合物的水溶性聚合物部分直接或间接结合。

肽

[0155] 在一些实施方案中,本文所述的缀合部分是肽。在一些实施方案中,肽是非结构化肽。在一些实施方案中,细胞因子(例如,白介素、IFN或TNF)多肽与肽缀合。在一些实施方案中,包含肽的IL-15缀合物具有增加的血清半衰期和/或稳定性。在一些实施方案中,包含肽的IL-15缀合物与一个或多个IL-15R亚基的IL-15相互作用降低。在另外的情况下,肽阻断

IL-15与一个或多个IL-15R亚基的相互作用。

[0156] 在一些实施方案中,缀合部分是XTEN™肽(Amunix Operating Inc.),并且修饰被称为XTENylation。XTENylation是编码目的多肽的核酸与编码XTEN™肽(Amunix Operating Inc.)的核酸的基因融合,所述XTEN™肽是一种长的非结构化亲水性肽,其包含不同百分比的六种氨基酸:Ala、Glu、Gly、Ser和Thr。在一些实施方案中,基于如表达、遗传稳定性、溶解性、抗聚集性、延长的半衰期、增强的效力和/或增强的体外活性的特性,结合目的多肽来选择XTEN™肽。在一些实施方案中,细胞因子(例如,白介素、IFN或TNF)多肽与XTEN肽缀合。在一些实施方案中,IL-15多肽与XTEN肽缀合。

[0157] 在一些实施方案中,缀合部分是富含甘氨酸的均氨基酸聚合物(HAP),并且修饰被称为HAPylation。HAPylation是编码目的多肽的核酸与编码富含甘氨酸的均氨基酸聚合物(HAP)的核酸的基因融合。在一些实施方案中,HAP聚合物包含(Gly₄Ser)_n重复基序,并且有时长度为约50、100、150、200、250、300或更多个残基。在一些实施方案中,细胞因子(例如,白介素、IFN或TNF)多肽与HAP缀合。在一些实施方案中,IL-15多肽与HAP缀合。

[0158] 在一些实施方案中,缀合部分是PAS多肽,并且修饰被称为PASylation。PASylation是编码目的多肽的核酸与编码PAS多肽的核酸的基因融合。PAS多肽是由Pro、Ala和Ser残基组成的亲水性不带电多肽。在一些实施方案中,PAS多肽的长度为至少约100、200、300、400、500或600个氨基酸。在一些实施方案中,细胞因子(例如,白介素、IFN或TNF)多肽与PAS多肽缀合。在一些实施方案中,IL-15多肽与PAS多肽缀合。

[0159] 在一些实施方案中,缀合部分是弹性蛋白样多肽(ELP),并且所述修饰被称为ELPylation。ELPylation是编码目的多肽的核酸与编码弹性蛋白样多肽(ELP)的核酸的基因融合。ELP包含VPGxG重复基序,其中x是除脯氨酸之外的任何氨基酸。在一些实施方案中,细胞因子(例如,白介素、IFN或TNF)多肽与ELP缀合。在一些实施方案中,IL-15多肽与ELP缀合。

[0160] 在一些实施方案中,缀合部分是CTP肽。CTP肽包含31个氨基酸残基的肽FQSSSS*KAPPPS*LPSPS*RLGPS*DTPILPQ,其中S*表示O-糖基化位点(OPKO)。在一些实施方案中,CTP肽与细胞因子多肽(例如,IL-15多肽)遗传融合。在一些实施方案中,细胞因子多肽(例如,IL-15多肽)与CTP肽缀合。

[0161] 在一些实施方案中,细胞因子(例如,IL-15多肽)通过谷氨酰化被修饰。谷氨酰化(或聚谷氨酰化)是谷氨酸的可逆翻译后修饰,其中谷氨酸的γ-羧基基团与游离谷氨酸的氨基基团形成肽样键,其中α-羧基基团延伸到聚谷氨酸酯链中。

[0162] 在一些实施方案中,IL-15多肽通过明胶样蛋白(GLK)聚合物被修饰。在一些实施方案中,GLK聚合物包含Gly-Xaa-Yaa的多个重复,其中Xaa和Yaa分别主要包含脯氨酸和4-羟基脯氨酸。在一些实施方案中,GLK聚合物还包含氨基酸残基Pro、Gly、Glu、Qln、Asn、Ser和Lys。在一些实施方案中,GLK聚合物的长度为约20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、150个残基或更长。

另外的缀合部分

[0163] 在一些实施方案中,缀合部分包含细胞外生物标记物。在一些实施方案中,细胞外生物标记物是肿瘤抗原。在一些实施方案中,示例性细胞外生物标记物包括CD19、PSMA、B7-H3、B7-H6、CD70、CEA、CSPG4、EGFRvIII、EphA3、EpCAM、EGFR、ErbB2 (HER2)、FAP、FRα、GD2、

GD3、Lewis-Y、间皮素、Muc1、Muc 16、ROR1、TAG72、VEGFR2、CD11、Gr-1、CD204、CD16、CD49b、CD3、CD4、CD8和B220。在一些实施方案中，缀合部分与IL-15键合或缀合。在一些实施方案中，缀合部分是遗传融合的，例如在IL-15的N-末端或C-末端处。

[0164] 在一些实施方案中，缀合部分包含来自翻译后修饰的分子。在一些实施方案中，翻译后修饰的例子包括肉豆蔻酰化、棕榈酰化、异戊二烯化(或异戊烯化)(例如，法尼基化或香叶基香叶基化)、糖基磷脂酰肌醇化、酰化(例如，O-酰化、N-酰化、S-酰化)、烷基化(例如，烷基基团(如甲基或乙基基团)的添加)、酰胺化、糖基化、羟基化、碘化、核苷酸加成、氧化、磷酸化、琥珀酰化、硫酸化、糖化、氨甲酰化、谷氨酰化或脱氨酰化。在一些实施方案中，IL-15通过翻译后修饰(如肉豆蔻酰化、棕榈酰化、异戊二烯化(或异戊烯化)(例如，法尼基化或香叶基香叶基化)、糖基磷脂酰肌醇化、酰化(例如，O-酰化、N-酰化、S-酰化)、烷基化(例如，烷基基团(如甲基或乙基基团)的添加)、酰胺化、糖基化、羟基化、碘化、核苷酸加成、氧化、磷酸化、琥珀酰化、硫酸化、糖化、氨甲酰化、谷氨酰化或脱氨酰化)被修饰。

接头

[0165] 在一些实施方案中，用于将缀合部分与本文所述的IL-15多肽缀合或结合的有用的功能性反应性基团包括例如零阶或更高阶的接头。在一些情况下，掺入本文所述白介素中的非天然氨基酸包含功能性反应性基团。在一些情况下，接头包含与掺入本文所述白介素中的非天然氨基酸反应的功能性反应性基团。在一些情况下，缀合部分包含与掺入本文所述白介素中的非天然氨基酸反应的功能性反应性基团。在一些情况下，缀合部分包含与本文所述接头(任选地预附接至细胞因子肽)反应的功能性反应性基团。在一些实施方案中，接头包含与本文所述IL-15多肽中的天然氨基酸反应的反应性基团。在一些情况下，更高阶接头包含双官能接头，如同双官能接头或异双官能接头。示例性同双官能接头包括但不限于Lomant试剂二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)DSP、3',3'-二硫代双(磺基琥珀酰亚胺基丙酸酯)(DTSSP)、二琥珀酰亚胺辛二酸酯(DSS)、双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯(BS)、酒石酸二琥珀酰亚胺酯(DST)、酒石酸二磺基琥珀酰亚胺酯(磺基DST)、乙二醇双(琥珀酰亚胺基琥珀酸酯)(EGS)、二琥珀酰亚胺戊二酸酯(DSG)、N,N'-二琥珀酰亚胺碳酸酯(DSC)、己二亚氨酸二甲酯(DMA)、庚二亚氨酸二甲酯(DMP)、辛二亚氨酸二甲酯(DMS)、3,3'-二硫代双丙亚氨酸二甲酯(DTBP)、1,4-二-(3'-(2'-吡啶基二硫代)丙酰胺基)丁烷(DPDPB)、双马来酰亚胺基己烷(BMH)、含芳基卤化物的化合物(DFDNB)，例如像1,5-二氟-2,4-二硝基苯或1,3-二氟-4,6-二硝基苯、4,4'-二氟-3,3'-二硝基苯砜(DFDNPS)、双-[β-(4-叠氮基水杨酰胺基)乙基]二硫化物(BASED)、甲醛、戊二醛、1,4-丁二醇二缩水甘油醚、己二酸二酰肼、碳酰肼、邻甲苯胺、3,3'-二甲基联苯胺、联苯胺、α,α'-对-二氨基二苯基、二碘-对-二甲苯磺酸、N,N'-亚乙基-双(碘乙酰胺)或N,N'-六亚甲基-双(碘乙酰胺)。

[0166] 在一些实施方案中，双官能接头包括异双官能接头。示例性异双官能接头包括但不限于胺反应性和巯基交联接头，如N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯(sPDP)、长链N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯(LC-sPDP)、水溶性长链N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯(磺基-LC-sPDP)、琥珀酰亚胺基氧羰基-α-甲基-α-(2-吡啶基二硫)甲苯(sMPT)、磺基琥珀酰亚胺基-6-[α-甲基-α-(2-吡啶基二硫)甲苯酰胺]己酸酯(磺基-LC-sMPT)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(sMCC)、磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己基-1-羧酸酯(磺基-sMCC)、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟

基琥珀酰亚胺酯(MB)、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-MB)、N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(sIAB)、磺基琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(磺基-sIAB)、琥珀酰亚胺基-4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(sMPB)、磺基琥珀酰亚胺基-4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(磺基-sMPB)、N-(γ -马来酰亚胺基丁酰氧基)琥珀酰亚胺酯(GMB)、N-(γ -马来酰亚胺基丁酰氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-GMB)、琥珀酰亚胺基6-((碘乙酰基)氨基)己酸酯(sIAX)、琥珀酰亚胺基6-[6-(((碘乙酰基)氨基)己酰基)氨基]己酸酯(sIAXX)、琥珀酰亚胺基4-(((碘乙酰基)氨基)甲基)环己烷-1-羧酸酯(sIAC)、琥珀酰亚胺基6-(((4-碘乙酰基)氨基)甲基)环己烷-1-羧基(氨基)己酸酯(sIACX)、对-硝基苯基碘乙酸酯(NPIA)、羰基反应性和巯基反应性交联剂如4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)丁酸酰肼(MPBH)、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧基-酰肼8(M₂C₂H)、3-(2-吡啶基二硫)丙酰酰肼(PDPH);胺反应性和光反应性交联接头,如N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基水杨酸(NHs-AsA)、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基水杨酸(磺基-NHs-AsA)、磺基琥珀酰亚胺基-(4-叠氮基水杨酰氨基)己酸酯(磺基-NHs-LC-AsA)、磺基琥珀酰亚胺基-2-(对-叠氮基水杨酰氨基)乙基-1,3'-二硫丙酸酯(sAsD)、N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯(HsAB)、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯(磺基-HsAB)、N-琥珀酰亚胺基-6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨基)己酸酯(sANPAH)、磺基琥珀酰亚胺基-6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨基)己酸酯(磺基-sANPAH)、N-5-叠氮基-2-硝基苯甲酰氧基琥珀酰亚胺(ANB-NOs)、磺基琥珀酰亚胺基-2-(间-叠氮基-邻-硝基苯甲酰氨基)-乙基-1,3'-二硫丙酸酯(sAND)、N-琥珀酰亚胺基-4(4-叠氮基苯基)1,3'-二硫丙酸酯(sADP)、N-磺基琥珀酰亚胺基(4-叠氮基苯基)-1,3'-二硫丙酸酯(磺基-sADP)、磺基琥珀酰亚胺基4-(对-叠氮基苯基)丁酸酯(磺基-sAPB)、磺基琥珀酰亚胺基2-(7-叠氮基-4-甲基香豆素-3-乙酰胺)乙基-1,3'-二硫丙酸酯(sAED)、磺基琥珀酰亚胺基7-叠氮基-4-甲基香豆素-3-乙酰胺(磺基-sAMCA)、对-硝基苯基重氮丙酮酸酯(ρ NPDP)、对-硝基苯基-2-重氮-3,3,3-三氟丙酸酯(PNP-DTP);巯基反应性和光反应性交联接头,如1-(对-叠氮基水杨酰氨基)-4-(碘乙酰胺基)丁烷(AsIB)、N-[4-(对-叠氮基水杨酰氨基)丁基]-3'-(2'-吡啶基二硫)丙酰胺(APDP)、二苯甲酮-4-碘乙酰胺;二苯甲酮-4-马来酰亚胺羰基反应性和光反应性交联接头,如对-叠氮基苯甲酰酰肼(ABH);羧酸酯反应性和光反应性交联接头,如4-(对-叠氮基水杨酰氨基)丁胺(AsBA);以及精氨酸反应性和光反应性交联接头,如对-叠氮基苯乙二醛(APG)。

[0167] 在一些情况下,反应性官能团包含与存在于结合部分(例如,缀合部分或IL-15)上的亲电基团具有反应性的亲核基团。示例性亲电基团包括羰基基团,如醛、酮、羧酸、酯、酰胺、烯酮、酰基卤或酸酐。在一些实施方案中,反应性官能团是醛。示例性亲核基团包括酰肼、肼、氨基、肼、缩氨基硫脲、肼羧酸酯和芳基酰肼。在一些实施方案中,掺入本文所述白介素中的非天然氨基酸包含亲电基团。

[0168] 在一些实施方案中,接头是可切割接头。在一些实施方案中,可切割接头是二肽接头。在一些实施方案中,二肽接头是缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit)、苯丙氨酸-赖氨酸(Phe-Lys)、缬氨酸-丙氨酸(Val-Ala)和缬氨酸-赖氨酸(Val-Lys)。在一些实施方案中,二肽接头是缬氨酸-瓜氨酸。

[0169] 在一些实施方案中,接头是肽接头,其包含例如至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、20、25、30、35、40、45、50或更多个氨基酸。在一些情况下,肽接头包含至多2、3、4、5、6、7、

8、9、10、11、12、15、20、25、30、35、40、45、50个或更少的氨基酸。在另外的情况下，肽接头包含约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸。

[0170] 在一些实施方案中，接头包含自消灭接头部分。在一些实施方案中，自消灭接头部分包含对-氨基苄醇 (PAB)、对-氨基苄氧基羰基 (PABC) 或其衍生物或类似物。在一些实施方案中，接头包含二肽接头部分和自消灭接头部分。在一些实施方案中，自消灭接头部分如美国专利号9089614和WIPO申请号WO 2015038426中所述。

[0171] 在一些实施方案中，可切割接头是葡糖苷酸。在一些实施方案中，可切割接头是酸可切割接头。在一些实施方案中，酸可切割接头是肼。在一些实施方案中，可切割接头是可还原接头。

[0172] 在一些实施方案中，所述接头包括马来酰亚胺基团。在一些情况下，马来酰亚胺基团也称为马来酰亚胺间隔基。在一些情况下，马来酰亚胺基团还包含己酸，从而形成马来酰亚胺基己酰基 (mc)。在一些情况下，接头包括马来酰亚胺基己酰基 (mc)。在一些情况下，接头是马来酰亚胺基己酰基 (mc)。在其他情况下，马来酰亚胺基团包括马来酰亚胺基甲基基团，如上述琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基) 环己烷-1-羧酸酯 (sMCC) 或磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基) 环己烷-1-羧酸酯 (磺基-sMCC)。

[0173] 在一些实施方案中，马来酰亚胺基团是自稳定马来酰亚胺。在一些情况下，自稳定马来酰亚胺利用二氨基丙酸 (DPR) 掺入碱性氨基基团，使之与马来酰亚胺相邻，以提供硫代琥珀酰亚胺环水解的分子内催化，从而通过逆迈克尔反应进行消除反应以消除马来酰亚胺。在一些情况下，自稳定马来酰亚胺是Lyon等人，“Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates,”*Nat. Biotechnol.* 32 (10):1059-1062 (2014) 中描述的马来酰亚胺基团。在一些情况下，接头包括自稳定马来酰亚胺。在一些情况下，接头是自稳定马来酰亚胺。

缀合化学

[0174] 各种缀合反应用于缀合物接头、缀合部分和掺入本文所述IL-15多肽中的非天然氨基酸。此类缀合反应通常与水性条件相容，如“双正交”反应。在一些实施方案中，缀合反应由化学试剂(如催化剂)、光、或在接头、缀合部分或非天然氨基酸上发现的反应性化学基团介导。在一些实施方案中，缀合反应由酶介导。在一些实施方案中，本文使用的缀合反应描述于Gong, Y., Pan, L. *Tett. Lett.* 2015, 56, 2123中。在一些实施方案中，本文使用的缀合反应描述于Chen, X.; Wu, Y.-W. *Org. Biomol. Chem.* 2016, 14, 5417中。

[0175] 在本文所述的一些实施方案中，缀合反应包括酮或醛与亲核试剂的反应。在一些实施方案中，缀合反应包括酮与氨基基团的反应以形成肟。在一些实施方案中，缀合反应包括酮与芳基或杂芳基胺基团的反应以形成亚胺。在一些实施方案中，缀合反应包括醛与芳基或杂芳基胺基团的反应以形成亚胺。在一些实施方案中，本文所述的缀合反应产生包含经由肟附接的接头或缀合部分的IL-15多肽。在一些实施方案中，缀合反应包括醛或酮与色胺亲核试剂的Pictet-Spengler反应。在一些实施方案中，缀合反应包括肼基-Pictet-Spengler反应。在一些实施方案中，缀合反应包括Pictet-Spengler连接。

[0176] 在本文所述的一些实施方案中，本文所述的缀合反应包括叠氮化物和磷的反应(施陶丁格连接)。在一些实施方案中，磷是芳基磷。在一些实施方案中，芳基磷包含原酸酯基团。在一些实施方案中，磷包括结构2-(二苯基磷酰基) 苯甲酸甲酯。在一些实施方案中，

本文所述的缀合反应产生包含经由芳基酰胺附接的接头或缀合部分的IL-15多肽。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应产生包含经由酰胺附接的接头或缀合部分的IL-15多肽。

[0177] 在本文所述的一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括1,3-偶极环加成反应。在一些实施方案中,1,3-偶极环加成反应包括叠氮化物和磷的反应(“点击”反应)。在一些实施方案中,缀合反应由铜催化。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应产生包含经由三唑附接的接头或缀合部分的IL-15多肽。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括叠氮化物与应变炔烃的反应。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括叠氮化物与应变炔烃的反应。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括叠氮化物与环炔(例如OCT、DIFO、DIFBO、DIBO、BARAC、TMTH或其他应变环炔)的反应,其结构示于Gong, Y., Pan, L. *Tett. Lett.* 2015, 56, 2123中。在一些实施方案中,1,3-偶极环加成反应通过光催化(“photoclick”)。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括末端烯丙基基团与四唑和光的反应。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括末端炔基基团与四唑和光的反应。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括邻-烯丙基氨基酸与四唑和光的反应。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括邻-烯丙基酪氨酸与四唑和光的反应。

[0178] 在本文所述的一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括包含二烯和亲二烯体的逆电子需求环加成反应。在一些实施方案中,二烯包括四唑。在一些实施方案中,亲二烯体包括炔烃。在一些实施方案中,亲二烯体包括炔。在一些实施方案中,炔烃是应变炔烃。在一些实施方案中,炔烃是应变二烯。在一些实施方案中,炔烃是反式环辛炔。在一些实施方案中,炔烃是环辛炔。在一些实施方案中,炔烃是环丙烯。在一些实施方案中,炔烃是氟环丙烯。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应导致形成经由在环中包含两个氮原子的6元环杂环环附接至接头或缀合部分的IL-15多肽。

[0179] 在本文所述的一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括炔烃复分解反应。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括炔烃和炔烃与钌催化剂的反应。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括两种炔烃与钌催化剂的反应。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括两种炔烃与钌催化剂的反应。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括炔烃或炔烃与钌催化剂和包含烯丙基基团的氨基酸的反应。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括炔烃或炔烃与钌催化剂和包含烯丙基硫醚或硒醚的氨基酸的反应。在一些实施方案中,钌催化剂是Hovey-Kates第二代催化剂。在一些实施方案中,炔烃复分解反应包括一种或多种应变炔烃或炔烃的反应。

[0180] 在本文所述的一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括与炔烃的(4+2+环加成反应)。

[0181] 在本文所述的一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括交叉偶联反应。在一些实施方案中,交叉偶联反应包含过渡金属催化剂,如铱、金、钌、铑、钯、镍、铂或其他过渡金属催化剂和一种或多种配体。在一些实施方案中,过渡金属催化剂是水溶性的。在本文所述的一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括Suzuki-Miyaura交叉偶联反应。在本文所述的一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括芳基卤化物(或三氟甲磺酸酯或甲苯磺酸酯)、芳基或烯基硼酸和钯催化剂的反应。在本文所述的一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括Sonogashira交叉偶联反应。在本文所述的一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括芳基卤化物(或三氟甲磺酸酯或甲苯磺酸酯)、炔烃和钯催化剂的反应。在一些实施方

案中,交叉偶联反应导致接头或缀合部分经由碳-碳键附接至IL-15多肽。

[0182] 在本文所述的一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括在缀合之前反应性基团的脱保护或“解笼”反应。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括用光使反应性基团解笼,随后进行缀合反应。在一些实施方案中,反应性基团被包含一个或多个硝基基团的芳烷基部分保护。在一些实施方案中,反应性基团的解笼导致游离胺、硫化物或其他反应性基团。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括用过渡金属催化剂使反应性基团解笼,随后进行缀合反应。在一些实施方案中,过渡金属催化剂包含钯和一种或多种配体。在一些实施方案中,反应性基团被烯丙基部分保护。在一些实施方案中,反应性基团被烯丙基氨基甲酸酯保护。在一些实施方案中,反应性基团被炔丙基部分保护。在一些实施方案中,反应性基团被氨基甲酸炔丙酯保护。在一些实施方案中,反应性基团被亲二烯体保护,其中暴露于二烯(如四嗪)导致反应性基团的脱保护。

[0183] 在本文所述的一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括配体定向反应,其中配体(任选地)附接至反应性基团)促进了反应性基团与IL-15多肽之间的缀合位点。在一些实施方案中,配体在IL-15多肽与反应性基团反应期间或之后被切割。在一些实施方案中,IL-15多肽的缀合位点是天然氨基酸。在一些实施方案中,IL-15多肽的缀合位点是赖氨酸、半胱氨酸或丝氨酸。在一些实施方案中,IL-15多肽的缀合位点是本文所述的非天然氨基酸。在一些实施方案中,反应性基团包括离去基团,如贫电子的芳基或杂芳基基团。在一些实施方案中,反应性基团包括离去基团,如被IL-15多肽置换的贫电子的烷基基团。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括自由基捕获剂与自由基物质的反应。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括氧化自由基加成反应。在一些实施方案中,自由基捕获剂是芳基胺。在一些实施方案中,自由基物质是酪氨酸自由基。在一些实施方案中,自由基物质由钌催化剂(如[Ru(bpy)₃])和光产生。

[0184] 酶促反应任选地用于本文所述的缀合反应。示例性酶缀合包括SortA介导的缀合、TGs介导的缀合或FGE介导的缀合。在一些实施方案中,本文所述的缀合反应包括末端1-氨基-2-巯基团与硫酯的天然蛋白连接(NPL),以形成酰胺键。

[0185] 本文描述了用于使接头或缀合部分与IL-15多肽反应的各种缀合反应,其中所述反应与IL-15多肽中的天然(“规范”)氨基酸一起发生。在一些实施方案中,天然氨基酸在野生型序列中发现的缀合位置处被发现,或替代地,所述位置已被突变。在一些实施方案中,缀合反应包括在IL-15残基处形成二硫键。在一些实施方案中,缀合反应包括半胱氨酸或赖氨酸的1,4Michael加成反应。在一些实施方案中,缀合反应包括IL-15的氰基苯并噻唑连接。在一些实施方案中,缀合反应包括与丙酮部分,如1,3-二氯-2-丙酮的交联。在一些实施方案中,缀合反应包括通过半胱氨酸与邻-均三甲苯磺酰基羟胺反应形成的脱氢丙氨酸的1,4Michael加成。在一些实施方案中,缀合反应包括酪氨酸与三唑啉二酮(TAD)或TAD衍生物的反应。在一些实施方案中,缀合反应包括色氨酸与铈类卡宾的反应。

使用方法

增殖性疾病或病症

[0186] 在一些实施方案中,本文描述了在有需要的受试者中治疗增殖性疾病或病症的方法,其包括向受试者给予治疗有效量的本文所述的IL-15缀合物。在一些实施方案中,IL-15缀合物包含经分离和纯化的IL-15多肽和缀合部分,其中相对于野生型IL-15多肽,所述IL-

IL-15缀合物对IL-15受体 α (IL-15R α) 亚基具有减小的亲和力。在一些实施方案中,IL-15缀合物包含经分离和纯化的IL-15多肽;和在选自以下的氨基酸位置处与所述经分离和纯化的IL-15多肽结合的缀合部分:N1、W2、V3、N4、I6、S7、D8、K10、K11、E13、D14、L15、Q17、S18、M19、H20、I21、D22、A23、T24、L25、Y26、T27、E28、S29、D30、V31、H32、P33、S34、C35、K36、V37、T38、A39、K41、L44、L45、E46、Q48、V49、S51、L52、E53、S54、G55、D56、A57、S58、H60、D61、T62、V63、E64、N65、I67、I68、L69、N71、N72、S73、L74、S75、S76、N77、G78、N79、V80、T81、E82、S83、G84、C85、K86、E87、C88、E89、E90、L91、E92、E93、K94、N95、I96、K97、E98、L100、Q101、S102、V104、H105、Q108、M109、F110、I111、N112、T113和S114,其中所述氨基酸残基的编号对应于SEQ ID NO:1。在一些实施方案中,IL-15缀合物包含经分离和纯化的IL-15多肽;和在选自以下的氨基酸位置处与所述经分离和纯化的IL-15多肽结合的缀合部分:N1、W2、V3、N4、I6、S7、D8、K10、K11、E13、D14、L15、Q17、S18、M19、H20、I21、D22、A23、T24、L25、Y26、E28、S29、D30、V31、H32、P33、S34、C35、K36、V37、T38、K41、L44、E46、Q48、V49、S51、L52、E53、S54、G55、D56、A57、S58、H60、D61、T62、V63、E64、N65、I67、I68、L69、N71、N72、S73、L74、S75、S76、N77、G78、N79、V80、T81、E82、S83、G84、C85、K86、E87、C88、E89、E90、L91、E92、E93、K94、N95、I96、K97、E98、L100、Q101、S102、V104、H105、Q108、M109、F110、I111、N112、T113和S114。

[0187] 在一些实施方案中,IL-15缀合物优先与IL-15R β 和IL-15R β γ 亚基相互作用以形成IL-15/IL-15R β γ 复合物。在一些实施方案中,IL-15/IL-15R β γ 复合物刺激和/或增强Teff细胞(例如,CD8⁺Teff细胞)和/或NK细胞的扩增。在另外的情况下,Teff细胞的扩增使Teff:Treg比率偏向Teff群体。

[0188] 在一些实施方案中,所述增殖性疾病或病症是癌症。在一些实施方案中,癌症是实体瘤。在一些实施方案中,将本文所述的IL-15缀合物给予有需要的受试者,用于治疗实体瘤。在此类情况下,受试者患有膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、结直肠癌、食道癌、眼癌、头颈癌、肾癌、肺癌、黑色素瘤、卵巢癌、胰腺癌或前列腺癌。在一些实施方案中,将IL-15缀合物给予受试者用于治疗膀胱癌。在一些实施方案中,将IL-15缀合物给予受试者用于治疗乳腺癌。在一些实施方案中,将IL-15缀合物给予受试者用于治疗肠直肠癌。在一些实施方案中,将IL-15缀合物给予受试者用于治疗食道癌。在一些实施方案中,将IL-15缀合物给予受试者用于治疗头颈癌。在一些实施方案中,将IL-15缀合物给予受试者用于治疗肾癌。在一些实施方案中,将IL-15缀合物给予受试者用于治疗肺癌。在一些实施方案中,将IL-15缀合物给予受试者用于治疗黑色素瘤。在一些实施方案中,将IL-15缀合物给予受试者用于治疗卵巢癌。在一些实施方案中,将IL-15缀合物给予受试者用于治疗胰腺癌。在一些实施方案中,将IL-15缀合物给予受试者用于治疗前列腺癌。在一些实施方案中,将IL-15缀合物给予受试者用于治疗转移性癌症。在另外的情况下,将IL-15缀合物给予受试者用于治疗复发性或难治性癌症。

[0189] 在一些实施方案中,所述癌症是恶性血液病。在一些实施方案中,将本文所述的IL-15缀合物给予有需要的受试者,用于治疗恶性血液病。在一些实施方案中,所述受试者患有慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、华氏巨球蛋白血症、多发性骨髓瘤、结外边缘区B细胞淋巴瘤、结边缘区B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、非伯基特高级B细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBL)、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤、前体B淋巴母细胞淋巴瘤、B细胞前

淋巴细胞性白血病、淋巴浆细胞性淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞骨髓瘤、浆细胞瘤、纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤或淋巴瘤样肉芽肿病。在一些实施方案中,将IL-15缀合物给予受试者用于治疗CLL。在一些实施方案中,将IL-15缀合物给予受试者用于治疗SLL。在一些实施方案中,将IL-15缀合物给予受试者用于治疗FL。在一些实施方案中,将IL-15缀合物给予受试者用于治疗DLBCL。在一些实施方案中,将IL-15缀合物给予受试者用于治疗MCL。在一些实施方案中,将IL-15缀合物给予受试者用于治疗华氏巨球蛋白血症。在一些实施方案中,将IL-15缀合物给予受试者用于治疗多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,将IL-15缀合物给予受试者用于治疗伯基特淋巴瘤。在一些实施方案中,将IL-15缀合物给予受试者用于治疗转移性恶性血液病。在另外的情况下,将IL-15缀合物给予受试者用于治疗复发性或难治性恶性血液病。

[0190] 在一些实施方案中,将另外的治疗剂进一步给予受试者。在一些实施方案中,将另外的治疗剂与IL-15缀合物同时给予。在其他情况下,顺序给予另外的治疗剂和IL-15缀合物,例如,在另外的治疗剂之前给予IL-15缀合物,或者在给予另外的治疗剂之后给予IL-15缀合物。

[0191] 在一些实施方案中,另外的治疗剂包括化学治疗剂、免疫治疗剂、靶向疗法、放射疗法或其组合。说明性另外的治疗剂包括但不限于烷基化剂,如奥曲胺、白消安、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、达卡巴嗪、洛莫司汀、美法仑、奥沙利铂、替莫唑胺或噻替帕;抗代谢物,如5-氟尿嘧啶(5-FU)、6-巯基嘌呤(6-MP)、卡培他滨、阿糖胞苷、氟尿苷、氟达拉滨、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤或培美曲塞;蒽环类药物,如柔红霉素、阿霉素、表柔比星或伊达比星;拓扑异构酶I抑制剂,如拓扑替康或伊立替康(CPT-11);拓扑异构酶II抑制剂,如依托泊苷(VP-16)、替尼泊苷或米托蒽醌;有丝分裂抑制剂,如多西他赛、雌莫司汀、伊沙匹隆、紫杉醇、长春碱、长春新碱或长春瑞滨;或皮质类固醇,如泼尼松、甲基泼尼松龙或地塞米松。

[0192] 在一些情况下,另外的治疗剂包括一线疗法。如本文所用,“一线疗法”包括针对患有癌症的受试者的主要疗法。在一些情况下,癌症是原发性或局部性癌症。在其他情况下,癌症是转移性或复发性癌症。在一些情况下,一线疗法包括化学疗法。在其他情况下,一线治疗包括免疫疗法、靶向疗法或放射疗法。技术人员将容易理解,不同的一线治疗可以适用于不同类型的癌症。

[0193] 在一些实施方案中,将IL-15缀合物与选自以下的另外的治疗剂一起给予:烷基化剂,如奥曲胺、白消安、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、达卡巴嗪、洛莫司汀、美法仑、奥沙利铂、替莫唑胺或噻替帕;抗代谢物,如5-氟尿嘧啶(5-FU)、6-巯基嘌呤(6-MP)、卡培他滨、阿糖胞苷、氟尿苷、氟达拉滨、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤或培美曲塞;蒽环类药物,如柔红霉素、阿霉素、表柔比星或伊达比星;拓扑异构酶I抑制剂,如拓扑替康或伊立替康(CPT-11);拓扑异构酶II抑制剂,如依托泊苷(VP-16)、替尼泊苷或米托蒽醌;有丝分裂抑制剂,如多西他赛、雌莫司汀、伊沙匹隆、紫杉醇、长春碱、长春新碱或长春瑞滨;或皮质类固醇,如泼尼松、甲基泼尼松龙或地塞米松。

[0194] 在一些情况下,将本文所述的IL-15缀合物与酶聚ADP核糖聚合酶(PARP)的抑制剂一起给予。示例性PARP抑制剂包括但不限于奥拉帕尼(AZD-2281, **Lynparza®**,来自Astra Zeneca)、卢卡帕尼(PF-01367338, **Rubraca®**,来自Clovis Oncology)、尼拉帕尼(MK-

4827, **Zejula®**, 来自Tesarro)、他佐帕利 (BMN-673, 来自BioMarin Pharmaceutical Inc.)、维利帕利 (ABT-888, 来自AbbVie)、CK-102 (原CEP 9722, 来自Teva Pharmaceutical Industries Ltd.)、E7016 (来自Eisai)、艾尼帕利 (BSI 201, 来自Sanofi) 和帕米帕尼 (BGB-290, 来自BeiGene)。在一些情况下, 将IL-15缀合物与PARP抑制剂 (如奥拉帕尼、卢卡帕尼、尼拉帕尼、他佐帕利、维利帕利、CK-102, E7016、艾尼帕利或帕米帕尼) 组合给予。

[0195] 在一些实施方案中, 将本文所述的IL-15缀合物与酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) 一起给予。示例性TKI包括但不限于阿法替尼、阿来替尼、阿昔替尼、博舒替尼、卡博替尼、塞利替尼、考比替尼、克唑替尼、达拉非尼、达沙替尼、厄洛替尼、吉非替尼、依鲁替尼、伊马替尼、拉帕替尼、仑伐替尼、尼罗替尼、宁特达尼、奥希替尼、帕唑帕尼、帕纳替尼、瑞拉非尼、卢利替尼、索拉非尼、舒尼替尼、托法替尼和万迪他尼。

[0196] 在一些情况下, 将本文所述的IL-15缀合物与免疫检查点调节剂一起给予。示例性检查点调节剂包括:

[0197] PD-L1调节剂, 如Genentech的MPDL3280A (RG7446)、来自Merck/Pfizer的阿维鲁单抗 (Bavencio); 来自AstraZeneca的度伐单抗 (Imfinzi); 来自BioXcell的抗小鼠PD-L1抗体克隆10F.9G2 (目录号BE0101); 来自Bristol-Meyer's Squibb的抗PD-L1单克隆抗体MDX-1105 (BMS-936559)、BMS-935559和BMS-986192; 来自XytomX Therapeutics的MSB0010718C、小鼠抗PD-L1克隆29E.2A3、CX-072; 来自Novartis Pharmaceuticals的FAZ053; 来自3D Medicine的KN035; 来自Eli Lilly的LY3300054, 和AstraZeneca的MEDI4736;

[0198] PD-L2调节剂, 如葛兰素史克 (GlaxoSmithKline) 的AMP-224 (Amplimmune) 和rHIgM12B7;

[0199] PD-1调节剂, 如来自BioXcell的抗小鼠PD-1抗体克隆J43 (目录号BE0033-2); 来自BioXcell的抗小鼠PD-1抗体克隆RMP1-14 (目录号BE0146); 小鼠抗PD-1抗体克隆EH12; Merck的MK-3475抗小鼠PD-1抗体 (Keytruda, 派姆单抗, pembrolizumab); AnaptysBio的抗PD-1抗体 (称为ANB011); 抗体MDX-1 106 (ON0-4538); Bristol-Myers Squibb的人IgG4单克隆抗体纳武单抗 (**Opdivo®**, BMS-936558, MDX1106); AstraZeneca的AMP-514和AMP-224; 来自Eli Lilly/Innovent Biologics的sintilimab (IBI-308); 来自Agenus的AGEN 2034; 来自BeiGene的BGB-A317; 来自Boehringer-Ingelheim Pharmaceuticals的BI-754091; 来自CBT Pharmaceuticals的CBT-501 (genolimzumab); 来自Incyte的INCSR1210; 来自Janssen Research&Development的JNJ-63723283; 来自MedImmune的MEDI0680; 来自Novartis Pharmaceuticals的PDR001; 来自Pfizer的PF-06801591; 来自Regeneron Pharmaceuticals的REGN2810, 和来自CureTech Ltd的匹地利珠单抗 (CT-011);

[0200] CTLA-4调节剂, 如Bristol Meyers Squibb的抗CTLA-4抗体伊匹单抗 (也称为**Yervoy®**、MDX-010、BMS-734016和MDX-101); 来自Millipore的抗CTLA4抗体克隆9H10; Pfizer的曲美利木单抗 (CP-675, 206, ticilimumab); 来自Agenus的AGEN 1884, 和来自Abcam的抗CTLA4抗体克隆BNI3;

[0201] LAG3调节剂, 如来自eBioscience的抗Lag-3抗体克隆eBioC9B7W (C9B7W); 来自LifeSpan Biosciences的抗Lag3抗体LS-B2237; 来自Novartis Pharmaceuticals的IMP701和LAG525; 来自Immutep的IMP321 (ImmuFact); 抗Lag3抗体BMS-986016; 来自Bristol-Myers

Squibb的BMS-986016;来自Regeneron Pharmaceuticals的REGN3767,和LAG-3嵌合抗体A9H12;

[0202] B7-H3调节剂,如MGA271;

[0203] KIR调节剂,如来自Bristol-Myers Squibb的利瑞鲁单抗 (IPH2101);

[0204] CD137调节剂,如乌瑞鲁单抗 (BMS-663513,Bristol-Myers Squibb)、PF-05082566 (抗4-1BB,PF-2566,Pfizer),或XmAb-5592 (Xencor);

[0205] PS调节剂,如巴韦妥昔单抗;

[0206] OX40调节剂,如来自Bristol-Myers Squibb的BMS-986178;来自GlaxoSmithKline的GSK3174998;来自Agenus的INCAGN1949;来自MedImmune的MEDI0562;来自Pfizer的PF-04518600,或来自Genentech的RG7888;

[0207] GITR调节剂,如来自Novartis Pharmaceuticals的GWN323;来自Agenus的INCAGN1876,或来自Leap Therapeutics的TRX518;

[0208] TIM3调节剂,如来自Novartis Pharmaceuticals的MBG453,或来自TESARO的TSR-042;

[0209] 和调节剂,如抗体或其片段 (例如,单克隆抗体,人、人源化或嵌合抗体)、RNAi分子或CD52、CD30、CD20、CD33、CD27、ICOS、BTLA (CD272)、CD160、2B4、LAIR1、TIGHT、LIGHT、DR3、CD226、CD2或SLAM的小分子。

[0210] 在一些情况下,将IL-15缀合物与派姆单抗、纳武单抗、曲美利木单抗或伊匹单抗组合给予。

[0211] 在一些情况下,将本文所述的IL-15缀合物与抗体 (如阿仑单抗、曲妥珠单抗、替伊莫单抗、本妥昔单抗、ado-曲妥珠单抗emtansine或博纳吐单抗) 一起给予。

[0212] 在一些情况下,将IL-15缀合物与选自抗VEGFR抗体的另外的治疗剂一起给予。示例性抗VEGFR抗体包括但不限于贝伐单抗或雷姆赛卢单抗。在一些情况下,IL-15缀合物增强了另外的治疗剂的ADCC作用。

[0213] 在一些情况下,将IL-15缀合物与选自西妥昔单抗、英加妥珠单抗、马妥珠单抗 (EMD 72000)、托木妥昔单抗或帕尼单抗的另外的治疗剂一起给予。在一些情况下,IL-15缀合物增强了另外的治疗剂的ADCC作用。

[0214] 在一些情况下,将IL-15缀合物与选自另外的细胞因子 (例如,天然细胞因子或工程化细胞因子,如聚乙二醇化和/或融合细胞因子) 的另外的治疗剂一起给予。在一些情况下,另外的细胞因子增强和/或协同T效应细胞扩增和/或增殖。在一些情况下,另外的细胞因子包括IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-18、IL-21或TNF α 。在一些情况下,另外的细胞因子是IL-2。在一些情况下,另外的细胞因子是IL-21。在一些情况下,另外的细胞因子是IL-10。在一些情况下,另外的细胞因子是TNF α 。

[0215] 在一些情况下,将IL-15缀合物与选自受体激动剂的另外的治疗剂一起给予。在一些情况下,受体激动剂包括Toll样受体 (TLR) 配体。在一些情况下,TLR配体包括TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8或TLR9。在一些情况下,所述TLR配体包括合成配体,例如像Pam3Cys、CFA、MALP2、Pam2Cys、FSL-1、Hib-OMPC、聚肌苷酸:聚胞苷酸、聚腺苷酸:聚尿苷酸、AGP、MPL A、RC-529、MDF2 β 、CFA或鞭毛蛋白。在一些情况下,将IL-21缀合物与一种或多种选自TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8和TLR9的TLR激动剂一起给予。在一些

情况下,将IL-15缀合物与一种或多种选自Pam3Cys、CFA、MALP2、Pam2Cys、FSL-1、Hib-OMPC、聚肌苷酸:聚胞苷酸、聚腺苷酸:聚尿苷酸、AGP、MPL A、RC-529、MDF2 β 、CFA和鞭毛蛋白的TLR激动剂一起给予。

[0216] 在一些实施方案中,将本文所述的IL-15缀合物与过继性T细胞转移(ACT)疗法结合使用。在一个实施方案中,ACT涉及在受试者中鉴定具有例如抗肿瘤活性的自体T淋巴细胞、在体外扩增自体T淋巴细胞、以及随后将经扩增的T淋巴细胞再输注到受试者中。在另一个实施方案中,ACT包括使用具有例如抗肿瘤活性的同种异体T淋巴细胞、在体外扩增T淋巴细胞、以及随后将经扩增的同种异体T淋巴细胞输注到有需要的受试者中。在一些实施方案中,将本文所述的IL-15缀合物作为ACT疗法的一部分与自体T淋巴细胞结合使用。在其他情况下,将本文所述的IL-15缀合物作为ACT疗法的一部分与同种异体T淋巴细胞结合使用。在一些实施方案中,将IL-15缀合物与ACT疗法同时给予有需要的受试者。在其他情况下,将IL-15缀合物与ACT疗法顺序地给予有需要的受试者。

[0217] 在一些实施方案中,本文所述的IL-15缀合物用于自体 and/or 同种异体T细胞转移的离体激活和/or 扩增。在此类情况下,IL-15缀合物用于激活和/or 扩增包含自体 and/or 同种异体T细胞的样品,并且在将所述样品给予有需要的受试者之前,任选地从所述样品中去除IL-15缀合物。

[0218] 在一些实施方案中,将本文所述的IL-15缀合物与疫苗一起给予。在一些情况下,将IL-21缀合物与溶瘤病毒组合使用。在此类情况下,IL-21缀合物作为刺激剂来调节免疫应答。在一些情况下,将IL-21缀合物作为辅助疗法的一部分与溶瘤病毒一起使用。示例性溶瘤病毒包括T-Vec (Amgen)、G47 Δ (Todo等人)、JX-594 (Sillajen)、CG0070 (Cold Genesys) 和Reolysin (Oncolytics Biotech)。在一些情况下,将IL-21缀合物与溶瘤病毒(如T-Vec、G47 Δ 、JX-594、CG0070或Reolysin)组合使用。

[0219] 在一些实施方案中,将IL-15缀合物与放射疗法组合给予。

细胞群体扩增的方法

[0220] 在一些实施方案中,本文另外描述了扩增淋巴细胞群体(例如,效应T (Teff) 细胞、记忆T (Tmem) 细胞和/or 自然杀伤(NK) 细胞群体)的方法。在一些实施方案中,方法包括使细胞与本文所述的细胞因子缀合物接触,以及使细胞因子与细胞因子受体相互作用以形成复合物,其中所述复合物刺激不同的淋巴细胞群体的扩增。

[0221] 在一些实施方案中,扩增效应T (Teff) 细胞、记忆T (Tmem) 细胞和/or 天然杀伤(NK) 细胞群体的方法包括:(a) 使细胞与经修饰的IL-15多肽或IL-15缀合物接触;和使IL-15与IL-15R β 和IL-15R γ 亚基相互作用以形成IL-15/IL-15R β γ 复合物;其中IL-15缀合物对IL-15R α 亚基的亲合力降低,并且其中所述IL-15/IL-15R β γ 复合物刺激Teff、Tmem和NK细胞的扩增。如本文所述,在一些实施方案中,经修饰的IL-15多肽在选自N1、W2、V3、N4、I6、S7、D8、K10、K11、E13、D14、L15、Q17、S18、M19、H20、I21、D22、A23、T24、L25、Y26、T27、E28、S29、D30、V31、H32、P33、S34、C35、K36、V37、T38、A39、K41、L44、L45、E46、Q48、V49、S51、L52、E53、S54、G55、D56、A57、S58、H60、D61、T62、V63、E64、N65、I67、I68、L69、N71、N72、S73、L74、S75、S76、N77、G78、N79、V80、T81、E82、S83、G84、C85、K86、E87、C88、E89、E90、L91、E92、E93、K94、N95、I96、K97、E98、L100、Q101、S102、V104、H105、Q108、M109、F110、I111、N112、T113和S114的残基位置处包含至少一个经翻译后修饰的非天然氨基酸,其中所述残基位置对应于如SEQ ID

N0:1中所示的位置。在一些实施方案中,残基位置选自N1、W2、V3、N4、I6、S7、D8、K10、K11、E13、D14、L15、Q17、S18、M19、H20、I21、D22、A23、T24、L25、Y26、E28、S29、D30、V31、H32、P33、S34、C35、K36、V37、T38、K41、L44、E46、Q48、V49、S51、L52、E53、S54、G55、D56、A57、S58、H60、D61、T62、V63、E64、N65、I67、I68、L69、N71、N72、S73、L74、S75、S76、N77、G78、N79、V80、T81、E82、S83、G84、C85、K86、E87、C88、E89、E90、L91、E92、E93、K94、N95、I96、K97、E98、L100、Q101、S102、V104、H105、Q108、M109、F110、I111、N112、T113和S114。在一些实施方案中,残基位置选自E13、D14、L15、Q17、S18、M19、H20、I21、S34、C35、K36、V37、T38、K41、L44、S51、L52、S54、G55、D56、A57、S58、H60、V63、I67、N71、S73、L74、S75、S76、N77、G78、N79、V80、T81、E82、S83、G84、C85、K86、E87、C88、L91、E92、K94、N95、I96、K97、E98、L100、Q101和F110。在一些实施方案中,残基位置选自D14、Q17、S18、K41、S51、L52、G55、D56、A57、S58、S75、S76、N77、N79、V80、T81、S83、G84、E92、K94、N95、K97和E98。在一些实施方案中,残基位置选自N1、N4、S7、D8、K11、D61、T62、E64、N65、I68、L69和N72。在一些实施方案中,残基位置选自V3、I6、K10、E28、S29、D30、V31、H32、P33、S102、V104、H105、Q108、M109、I111、N112、T113和S114。在一些实施方案中,残基位置选自D22、A23、T24、L25、Y26、L44、E46、Q48、V49、E53、E89、E90和E93。在一些实施方案中,残基位置选自Y26、E46、V49、E53和L25。在一些实施方案中,残基位置选自V3、K10、S29、D30、H32、H105、Q108、M109、I111、N112、T113和S114。在一些实施方案中,残基位置选自N4、S7、K11和D61。在一些实施方案中,残基位置选自L25、E53、N77和S83。在一些实施方案中,残基位置选自L25和E53。在一些实施方案中,残基位置选自E46、Y26、V49、E53、T24、N4、K11、N65、L69、S18、H20和S83。在一些实施方案中,残基位置选自E46、Y26、V49、E53和T24。在一些实施方案中,残基位置选自E46、V49、E53和T24。在一些实施方案中,残基位置选自Y26、V49、E53和T24。在一些实施方案中,残基位置选自V49、E53和T24。在一些实施方案中,残基位置选自E46和Y26。在一些实施方案中,残基位置是E46。在一些实施方案中,残基位置是L25。在一些实施方案中,残基位置是Y26。在一些实施方案中,残基位置是V49。在一些实施方案中,残基位置是E53。在一些实施方案中,残基位置是T24。在一些实施方案中,残基位置是N77。在一些实施方案中,残基位置是S83。

[0222] 在一些实施方案中,如本文所述,扩增效应T (Teff) 细胞、记忆T (Tmem) 细胞和/或自然杀伤(NK) 细胞群体的方法包括使细胞与IL-15缀合物接触。如本文所述,在一些实施方案中,白介素15 (IL-15) 缀合物包含:经分离和纯化的IL-15多肽;和在选自以下的氨基酸位置处与所述经分离和纯化的IL-15多肽结合的缀合部分:N1、W2、V3、N4、I6、S7、D8、K10、K11、E13、D14、L15、Q17、S18、M19、H20、I21、D22、A23、T24、L25、Y26、T27、E28、S29、D30、V31、H32、P33、S34、C35、K36、V37、T38、A39、K41、L44、L45、E46、Q48、V49、S51、L52、E53、S54、G55、D56、A57、S58、H60、D61、T62、V63、E64、N65、I67、I68、L69、N71、N72、S73、L74、S75、S76、N77、G78、N79、V80、T81、E82、S83、G84、C85、K86、E87、C88、E89、E90、L91、E92、E93、K94、N95、I96、K97、E98、L100、Q101、S102、V104、H105、Q108、M109、F110、I111、N112、T113和S114,其中所述残基位置对应于如SEQ ID N0:1中所示的位置。在一些实施方案中,残基位置选自N1、W2、V3、N4、I6、S7、D8、K10、K11、E13、D14、L15、Q17、S18、M19、H20、I21、D22、A23、T24、L25、Y26、E28、S29、D30、V31、H32、P33、S34、C35、K36、V37、T38、K41、L44、E46、Q48、V49、S51、L52、E53、S54、G55、D56、A57、S58、H60、D61、T62、V63、E64、N65、I67、I68、L69、N71、N72、S73、L74、S75、S76、N77、G78、N79、V80、T81、E82、S83、G84、C85、K86、E87、C88、E89、E90、L91、E92、E93、K94、N95、I96、

K97、E98、L100、Q101、S102、V104、H105、Q108、M109、F110、I111、N112、T113和S114。在一些实施方案中，残基位置选自E13、D14、L15、Q17、S18、M19、H20、I21、S34、C35、K36、V37、T38、K41、L44、S51、L52、S54、G55、D56、A57、S58、H60、V63、I67、N71、S73、L74、S75、S76、N77、G78、N79、V80、T81、E82、S83、G84、C85、K86、E87、C88、L91、E92、K94、N95、I96、K97、E98、L100、Q101和F110。在一些实施方案中，残基位置选自D14、Q17、S18、K41、S51、L52、G55、D56、A57、S58、S75、S76、N77、N79、V80、T81、S83、G84、E92、K94、N95、K97和E98。在一些实施方案中，残基位置选自N1、N4、S7、D8、K11、D61、T62、E64、N65、I68、L69和N72。在一些实施方案中，残基位置选自V3、I6、K10、E28、S29、D30、V31、H32、P33、S102、V104、H105、Q108、M109、I111、N112、T113和S114。在一些实施方案中，残基位置选自D22、A23、T24、L25、Y26、L44、E46、Q48、V49、E53、E89、E90和E93。在一些实施方案中，残基位置选自Y26、E46、V49、E53和L25。在一些实施方案中，残基位置选自V3、K10、S29、D30、H32、H105、Q108、M109、I111、N112、T113和S114。在一些实施方案中，残基位置选自N4、S7、K11和D61。在一些实施方案中，残基位置选自L25、E53、N77和S83。在一些实施方案中，残基位置选自L25和E53。在一些实施方案中，残基位置选自E46、Y26、V49、E53、T24、N4、K11、N65、L69、S18、H20和S83。在一些实施方案中，残基位置选自E46、Y26、V49、E53和T24。在一些实施方案中，残基位置选自E46、V49、E53和T24。在一些实施方案中，残基位置选自Y26、V49、E53和T24。在一些实施方案中，残基位置选自V49、E53和T24。在一些实施方案中，残基位置选自E46和Y26。在一些实施方案中，残基位置是E46。在一些实施方案中，残基位置是L25。在一些实施方案中，残基位置是Y26。在一些实施方案中，残基位置是V49。在一些实施方案中，残基位置是E53。在一些实施方案中，残基位置是T24。在一些实施方案中，残基位置是N77。在一些实施方案中，残基位置是S83。

IL-15多肽产生

[0223] 在一些实施方案中，重组产生或化学合成本文所述的IL-15多肽，其含有天然氨基酸突变或非天然氨基酸突变。在一些实施方案中，例如通过宿主细胞系统或在无细胞系统中重组产生本文所述的IL-15多肽。

[0224] 在一些实施方案中，通过宿主细胞系统重组产生IL-15多肽。在一些实施方案中，宿主细胞是真核细胞（例如，哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞或植物细胞）、原核细胞（例如，革兰氏阳性细菌或革兰氏阴性细菌）或古细菌细胞。在一些情况下，真核宿主细胞是哺乳动物宿主细胞。在一些情况下，哺乳动物宿主细胞是稳定的细胞系，或者是将目的遗传物质掺入其自身基因组中并且具有在多次细胞分裂后表达所述遗传物质产物的能力的细胞系。在其他情况下，哺乳动物宿主细胞是瞬时细胞系，或者是未将目的遗传物质掺入其自身基因组中并且不具有在多次细胞分裂后表达所述遗传物质产物的能力的细胞系。

[0225] 示例性哺乳动物宿主细胞包括293T细胞系、293A细胞系、293FT细胞系、293F细胞、293H细胞、A549细胞、MDCK细胞、CHO DG44细胞、CHO-S细胞、CHO-K1细胞、Expi293FTM细胞、Flp-InTM T-RExTM 293细胞系、Flp-InTM-293细胞系、Flp-InTM-3T3细胞系、Flp-InTM-BHK细胞系、Flp-InTM-CHO细胞系、Flp-InTM-CV-1细胞系、Flp-InTM-Jurkat细胞系、FreeStyleTM 293-F细胞、FreeStyleTM CHO-S细胞、GripTiteTM 293MSR细胞系、GS-CHO细胞系、HepaRGTM细胞、T-RExTM Jurkat细胞系、Per.C6细胞、T-RExTM-293细胞系、T-RExTM-CHO细胞系和T-RExTM-HeLa细胞系。

[0226] 在一些实施方案中，真核宿主细胞是昆虫宿主细胞。示例性昆虫宿主细胞包括果

蝇 (*Drosophila*) S2细胞、Sf9细胞、Sf21细胞、High Five™细胞和**expresSF+®**细胞。

[0227] 在一些实施方案中,真核宿主细胞是酵母宿主细胞。示例性酵母宿主细胞包括毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 酵母菌株,如GS115、KM71H、SMD1168、SMD1168H和X-33,以及酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 酵母菌株,如INVSc1。

[0228] 在一些实施方案中,真核宿主细胞是植物宿主细胞。在一些实施方案中,植物细胞包含来自藻类的细胞。示例性植物细胞系包括来自莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 137c或细长聚球藻 (*Synechococcus elongatus*) PPC 7942的菌株。

[0229] 在一些实施方案中,宿主细胞是原核宿主细胞。示例性原核宿主细胞包括BL21、Mach1™、DH10B™、TOP10、DH5α、DH10Bac™、OmniMax™、MegaX™、DH12S™、INV110、TOP10F'、INVαF、TOP10/P3、ccdB Survival、PIR1、PIR2、Stb12™、Stb13™或Stb14™。

[0230] 在一些实施方案中,用于产生本文所述IL-15多肽的合适的多核酸分子或载体包括源自真核或原核来源的任何合适的载体。示例性多核酸分子或载体包括来自细菌 (例如大肠杆菌)、昆虫、酵母 (例如毕赤酵母)、藻类或哺乳动物来源的载体。细菌载体包括例如, pACYC177、pASK75、pBAD载体系列、pBADM载体系列、pET载体系列、pETM载体系列、pGEX载体系列、pHAT、pHAT2、pMal-c2、pMal-p2、pQE载体系列、pRSET A、pRSET B、pRSET C、pTrcHis2系列、pZA31-Luc、pZE21-MCS-1、pFLAG ATS、pFLAG CTS、pFLAG MAC、pFLAG Shift-12c、pTAC-MAT-1、pFLAG CTC或pTAC-MAT-2。

[0231] 昆虫载体包括例如, pFastBac1、pFastBac DUAL、pFastBac ET、pFastBac HTa、pFastBac HTb、pFastBac HTc、pFastBac M30a、pFastBac M30b、pFastBac M30c、pVL1392、pVL1393、pVL1393 M10、pVL1393 M11、pVL1393 M12、FLAG载体 (如pPolh-FLAG1或pPolh-MAT2) 或MAT载体 (如pPolh-MAT1或pPolh-MAT2)。

[0232] 酵母载体包括例如, **Gateway®** pDEST™ 14载体、**Gateway®** pDEST™ 15载体、**Gateway®** pDEST™ 17载体、**Gateway®** pDEST™ 24载体、**Gateway®** pYES-DEST52载体、pBAD-DEST49**Gateway®** 目的载体、pA0815毕赤酵母属载体、pFLD1毕赤酵母载体、pGAPZA、B和C毕赤酵母载体、pPIC3.5K毕赤酵母属载体、pPIC6 A、B、&C毕赤酵母属载体、pPIC9K毕赤酵母属载体、pTEF1/Zeo、pYES2酵母载体、pYES2/CT酵母载体、pYES2/NT A、B和C酵母载体或pYES3/CT酵母载体。

[0233] 藻类载体包括例如, pChlamy-4载体或MCS载体。

[0234] 哺乳动物载体包括例如,瞬时表达载体或稳定表达载体。示例性哺乳动物瞬时表达载体包括p3xFLAG-CMV 8、pFLAG-Myc-CMV 19、pFLAG-Myc-CMV 23、pFLAG-CMV 2、pFLAG-CMV 6a, b, c、pFLAG-CMV 5.1、pFLAG-CMV 5a, b, c、p3xFLAG-CMV 7.1、pFLAG-CMV 20、p3xFLAG-Myc-CMV 24、pCMV-FLAG-MAT1、pCMV-FLAG-MAT2、pBICEP-CMV 3或pBICEP-CMV 4。示例性哺乳动物稳定表达载体包括pFLAG-CMV 3、p3xFLAG-CMV 9、p3xFLAG-CMV 13、pFLAG-Myc-CMV 21、p3xFLAG-Myc-CMV 25、pFLAG-CMV 4、p3xFLAG-CMV 10、p3xFLAG-CMV 14、pFLAG-Myc-CMV 22、p3xFLAG-Myc-CMV 26、pBICEP-CMV 1或pBICEP-CMV 2。

[0235] 在一些实施方案中,将无细胞系统用于产生本文所述的IL-15多肽。在一些实施方案中,无细胞系统包含来自细胞的细胞质和/或核组分的混合物 (例如,由完全纯化的重组

组分或部分纯化的组分构成),并且适用于体外核酸合成。在一些情况下,无细胞系统利用原核细胞组分。在其他情况下,无细胞系统利用真核细胞组分。核酸合成是在基于例如果蝇细胞、非洲爪蟾卵、古细菌或HeLa细胞的无细胞系统中获得的。示例性无细胞系统包括大肠杆菌S30提取系统、大肠杆菌T7 S30系统或PURExpress®、XpressCF和XpressCF+。

[0236] 无细胞翻译系统不同地包含组分,如质粒、mRNA、DNA、tRNA、合成酶、释放因子、核糖体、伴侣蛋白、翻译起始和延伸因子、天然和/或非天然氨基酸和/或用于蛋白质表达的其他组分。任选地修饰此类组分以提高产率、增加合成速率、增加蛋白质产物保真度或掺入非天然氨基酸。在一些实施方案中,本文所述的细胞因子是使用描述于US 8,778,631;US 2017/0283469;US 2018/0051065;US 2014/0315245;或US 8,778,631中的无细胞翻译系统合成的。在一些实施方案中,无细胞翻译系统包含经修饰的释放因子,或甚至从所述系统中去除一种或多种释放因子。在一些实施方案中,无细胞翻译系统包含降低的蛋白酶浓度。在一些实施方案中,无细胞翻译系统包含具有重新分配的密码子的经修饰的tRNA,所述密码子用于编码非天然氨基酸。在一些实施方案中,将本文所述的用于掺入非天然氨基酸的合成酶用于无细胞翻译系统。在一些实施方案中,在将tRNA添加到无细胞翻译系统之前,使用酶促或化学方法将其用非天然氨基酸预加载。在一些实施方案中,用于无细胞翻译系统的组分获自经修饰的生物体,如经修饰的细菌、酵母或其他生物体。

[0237] 在一些实施方案中,经由表达宿主系统或通过无细胞系统以循环排列的形式产生IL-15多肽。

包含非天然氨基酸的IL-15多肽的产生

[0238] 可以在本公开中使用正交或扩增的遗传密码,其中将存在于IL-15多肽的核酸序列中的一个或多个特定密码子分配以编码非天然氨基酸,使得可以通过使用正交tRNA合成酶/tRNA对将其遗传掺入IL-15中。正交tRNA合成酶/tRNA对能够将非天然氨基酸装载在tRNA,并能够响应于所述密码子将所述非天然氨基酸掺入多肽链中。

[0239] 在一些实施方案中,密码子是密码子琥珀、赭色、蛋白石或四联体密码子。在一些情况下,密码子对应于将用于携带非天然氨基酸的正交tRNA。在一些情况下,密码子是琥珀。在其他情况下,密码子是正交密码子。

[0240] 在一些情况下,密码子是四联体密码子,其可以由正交核糖体ribo-Q1解码。在一些情况下,四联体密码子如Neumann等人,“Encoding multiple unnatural amino acids via evolution of a quadruplet-decoding ribosome,”*Nature*,464(7287):441-444(2010)中所述。

[0241] 在一些情况下,在本公开中使用的密码子是重新编码的密码子,例如,被可替代密码子替代的同义密码子或稀有密码子。在一些情况下,重新编码的密码子如Napolitano等人,“Emergent rules for codon choice elucidated by editing rare arginine codons in *Escherichia coli*,”*PNAS*,113(38):E5588-5597(2016)中所述。在一些情况下,重新编码的密码子如Ostrov等人,“Design,synthesis,and testing toward a 57-codon genome,”*Science* 353(6301):819-822(2016)中所述。

[0242] 在一些实施方案中,利用非天然核酸导致一种或多种非天然氨基酸掺入IL-15中。示例性非天然核酸包括但不限于尿嘧啶-5-基、次黄嘌呤-9-基(I)、2-氨基腺嘌呤-9-基、5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤

的6-甲基衍生物和其他烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基衍生物和其他烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶、6-偶氮基尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-巯基、8-硫烷基、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代(具体地5-溴)、5-三氟甲基和其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤以及3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。某些非天然核酸,如5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶和N-2取代的嘌呤、N-6取代的嘌呤、O-6取代的嘌呤、2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、增加双链体形成稳定性的那些分子、通用核酸、疏水性核酸、混杂核酸、尺寸扩大的核酸、氟化核酸、5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶以及N-2、N-6和O-6取代的嘌呤,包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基衍生物和其他烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基衍生物和其他烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶、5-卤代胞嘧啶、5-丙炔基(-C≡C-CH₃)尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、嘧啶核酸的其他炔基衍生物、6-偶氮基尿嘧啶、6-偶氮基胞嘧啶、6-偶氮基胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-巯基、8-硫烷基、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代(具体地5-溴)、5-三氟甲基、其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤、7-甲基腺嘌呤、2-F-腺嘌呤、2-氨基-腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤、8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮杂嘌呤、3-脱氮鸟嘌呤、3-脱氮杂嘌呤、三环嘧啶、吩噻嗪胞苷([5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮)、吩噻嗪胞苷(1H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮)、G-夹具、吩噻嗪胞苷(例如9-(2-氨基乙氧基)-H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噻嗪-2(3H)-酮)、咪唑胞苷(2H-嘧啶并[4,5-b]咪唑-2-酮)、吡啶并咪唑胞苷(H-吡啶并[3',2':4,5]吡咯并[2,3-d]嘧啶-2-酮)、其中嘌呤或嘧啶碱基被其他杂环替代的那些、7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、2-氨基吡啶、2-吡啶酮、氮杂胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、溴尿嘧啶、5-氯胞嘧啶、氯代胞嘧啶、环胞嘧啶、胞嘧啶阿拉伯糖苷、5-氟胞嘧啶、氟嘧啶、氟尿嘧啶、5,6-二氢胞嘧啶、5-碘胞嘧啶、羟基脲、碘尿嘧啶、5-硝基胞嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-氟尿嘧啶和5-碘尿嘧啶、2-氨基-腺嘌呤、6-硫代-鸟嘌呤、2-硫代-胸腺嘧啶、4-硫代-胸腺嘧啶、5-丙炔基-尿嘧啶、4-硫代-尿嘧啶、N4-乙基胞嘧啶、7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮-8-氮杂鸟嘌呤、5-羟基胞嘧啶、2'-脱氧尿苷、2-氨基-2'-脱氧腺苷,以及描述于美国专利号3,687,808;4,845,205;4,910,300;4,948,882;5,093,232;5,130,302;5,134,066;5,175,273;5,367,066;5,432,272;5,457,187;5,459,255;5,484,908;5,502,177;5,525,711;5,552,540;5,587,469;5,594,121;5,596,091;5,614,617;5,645,985;5,681,941;5,750,692;5,763,588;5,830,653和6,005,096;WO 99/62923;Kandimalla等人,(2001)Bioorg.Med.Chem.9:807-813;The Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering,Kroschwitz,J.I.,编辑,John Wiley&Sons,1990,858-859;Englisch等人,Angewandte Chemie,International Edition,1991,30,613;和Sanghvi,第15章,Antisense Research and Applications,Crookeand Lebleu编,CRC Press,1993,273-288中的那些。另外的碱基修饰可以在例如美国专利号3,687,808;Englisch等人,Angewandte Chemie,International Edition,1991,30,613;和Sanghvi,第15章,Antisense Research and Applications,第289-302页,Crooke和Lebleu编,CRC

Press, 1993中找到。

[0243] 包含各种杂环碱基和各种糖部分(和糖类似物)的非天然核酸是本领域可获得的,并且在一些情况下,核酸包括一种或几种除天然存在的核酸的主要五种碱基组分之外的杂环碱基。例如,在一些情况下,杂环碱基包括尿嘧啶-5-基、胞嘧啶-5-基、腺嘌呤-7-基、腺嘌呤-8-基、鸟嘌呤-7-基、鸟嘌呤-8-基、4-氨基吡咯并[2.3-d]嘧啶-5-基、2-氨基-4-氧代吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基、2-氨基-4-氧代吡咯并[2.3-d]嘧啶-3-基基团,其中所述嘌呤经由9-位置、所述嘧啶经由1-位置、所述吡咯并嘧啶经由7-位置且所述吡唑并嘧啶经由1-位置附接至核酸的糖部分。

[0244] 在一些实施方案中,核苷酸类似物也在磷酸酯部分处被修饰。经修饰的磷酸酯部分包括但不限于在两个核苷酸之间的连接处被修饰的那些,并且含有例如,硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其他烷基磷酸酯(包括3'-亚烷基磷酸酯和手性磷酸酯)、次磷酸酯、氨基磷酸酯(包括3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基磷酸酯)、硫代磷酸酯、硫代烷基磷酸酯、硫代烷基磷酸三酯和硼烷磷酸酯。应理解,两个核苷酸之间的这些磷酸酯或经修饰的磷酸酯连接是通过3'-5'连接或2'-5'连接,并且所述连接含有相反的极性,如3'-5'至5'-3'或2'-5'至5'-2'。还包括各种盐、混合盐和游离酸形式。许多美国专利教导了如何制备和使用含有经修饰的磷酸酯的核苷酸,并且包括但不限于3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,196;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,306;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;和5,625,050。

[0245] 在一些实施方案中,非天然核酸包括2',3'-二脱氧-2',3'-二脱氢-核苷(PCT/US2002/006460)、5'-取代的DNA和RNA衍生物(PCT/US2011/033961;Saha等人,J.Org Chem.,1995,60,788-789;Wang等人,Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters,1999,9,885-890;和Mikhailov等人,Nucleosides&Nucleotides,1991,10(1-3),339-343;Leonid等人,1995,14(3-5),901-905;以及Eppacher等人,Helvetica Chimica Acta,2004,87,3004-3020;PCT/JP2000/004720;PCT/JP2003/002342;PCT/JP2004/013216;PCT/JP2005/020435;PCT/JP2006/315479;PCT/JP2006/324484;PCT/JP2009/056718;PCT/JP2010/067560)或制成具有经修饰碱基的单磷酸酯的5'-取代的单体(Wang等人,Nucleosides Nucleotides&Nucleic Acids,2004,23(1&2),317-337)。

[0246] 在一些实施方案中,非天然核酸包括在糖环的5'-位置和2'-位置处的修饰(PCT/US94/02993),如5'-CH₂-取代的2'-O-保护的核苷(Wu等人,Helvetica Chimica Acta,2000,83,1127-1143和Wu等人,Bioconjugate Chem.1999,10,921-924)。在一些情况下,非天然核酸包括已被制备用于掺入寡核苷酸中的酰胺连接的核苷二聚体,其中所述二聚体中的3'连接的核苷(5'至3')包含2'-OCH₃和5'-(S)-CH₃(Mesmaeker等人,Synlett,1997,1287-1290)。非天然核酸可以包括2'-取代的5'-CH₂(或O)修饰的核苷(PCT/US92/01020)。非天然核酸可以包括5'-亚甲基磷酸酯DNA和RNA单体,以及二聚体(Bohringer等人,Tet.Lett.,1993,34,2723-2726;Collingwood等人,Synlett,1995,7,703-705;和Hutter等人,Helvetica Chimica Acta,2002,85,2777-2806)。非天然核酸可以包括具有2'-取代基的5'-磷酸酯单体(US2006/0074035)和其他经修饰的5'-磷酸酯单体(WO1997/35869)。非天然

核酸可以包括5'-修饰的亚甲基磷酸酯单体(EP614907和EP629633)。非天然核酸可以包括在5'和/或6'-位置处包含羟基基团的5'或6'-磷酸酯核糖核苷的类似物(Chen等人, Phosphorus, Sulfur and Silicon, 2002, 777, 1783-1786; Jung等人, Bioorg. Med. Chem., 2000, 8, 2501-2509; Gallier等人, Eur. J. Org. Chem., 2007, 925-933; 以及Hampton等人, J. Med. Chem., 1976, 19 (8), 1029-1033)。非天然核酸可以包括5'-磷酸酯脱氧核糖核苷单体和具有5'-磷酸酯基团的二聚体(Nawrot等人, Oligonucleotides, 2006, 16 (1), 68-82)。非天然核酸可以包括具有6'-磷酸酯基团的核苷, 其中5'或/和6'-位置未被取代或被以下取代: 硫代-叔-丁基基团($\text{SC}(\text{CH}_3)_3$) (及其类似物); 亚甲基氨基(基团 CH_2NH_2) (及其类似物)或氰基基团(CN) (及其类似物)(Fairhurst等人, Synlett, 2001, 4, 467-472; Kappler等人, J. Med. Chem., 1986, 29, 1030-1038; Kappler等人, J. Med. Chem., 1982, 25, 1179-1184; Vrudhula等人, J. Med. Chem., 1987, 30, 888-894; Hampton等人, J. Med. Chem., 1976, 19, 1371-1377; Geze等人, J. Am. Chem. Soc., 1983, 105 (26), 7638-7640; 以及Hampton等人, J. Am. Chem. Soc., 1973, 95 (13), 4404-4414)。

[0247] 在一些实施方案中, 非天然核酸还包括糖部分的修饰。在一些情况下, 核酸含有其中糖基团已被修饰的一种或多种核苷。此类糖修饰的核苷可以赋予增强的核酸酶稳定性、增加的结合亲和力或一些其他有益的生物学特性。在某些实施方案中, 核酸包含经化学修饰的呋喃核糖环部分。经化学修饰的呋喃核糖环的例子包括但不限于添加取代基(包括5'和/或2'取代基; 两个环原子桥接形成双环核酸(BNA); 用S、N(R)或C(R₁)(R₂)替代核糖环氧原子(R=H、C₁-C₁₂烷基或保护基团); 及其组合。经化学修饰的糖的例子可以在WO 2008/101157、US 2005/0130923和WO 2007/134181中找到。

[0248] 在一些情况下, 经修饰的核酸包含经修饰的糖或糖类似物。因此, 除核糖和脱氧核糖之外, 所述糖部分可以是戊糖、脱氧戊糖、己糖、脱氧己糖、葡萄糖、阿拉伯糖、木糖、来苏糖或糖“类似物”环戊基基团。所述糖可以呈吡喃糖基或呋喃糖基形式。所述糖部分可以是核糖、脱氧核糖、阿拉伯糖或2'-O-烷基核糖的呋喃糖苷, 并且所述糖可以以[α]或[β]异头构型附接至相应的杂环碱基。糖修饰包括但不限于2'-烷氧基-RNA类似物、2'-氨基-RNA类似物、2'-氟-DNA和2'-烷氧基-或氨基-RNA/DNA嵌合体。例如, 糖修饰可以包括2'-O-甲基-尿苷或2'-O-甲基-胞苷。糖修饰包括2'-O-烷基-取代的脱氧核糖核苷和2'-O-乙二醇样核糖核苷。这些糖或糖类似物以及其中此类糖或类似物附接至杂环碱基(核酸碱基)的相应“核苷”的制备是已知的。还可以进行糖修饰并将其与其他修饰组合。

[0249] 糖部分的修饰包括核糖和脱氧核糖的天然修饰以及非天然修饰。糖修饰包括但不限于在2'位置处的以下修饰: OH; F; O-、S-或N-烷基; O-、S-或N-烯基; O-、S-或N-炔基; 或O-烷基-O-烷基, 其中烷基、烯基和炔基可以是取代或未取代的C₁至C₁₀烷基或C₂至C₁₀烯基和炔基。2'糖修饰还包括但不限于-O[(CH₂)_n]_mCH₃、-O(CH₂)_nOCH₃、-O(CH₂)_nNH₂、-O(CH₂)_nCH₃、-O(CH₂)_nONH₂和-O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, 其中n和m是1至约10。

[0250] 2'位置处的其他修饰包括但不限于: C₁至C₁₀低级烷基、取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基、O-芳烷基、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、聚烷基氨基、取代的甲硅烷基、RNA切割基团、报告基团、嵌入剂、用于改善寡核苷酸药代动力学特性的基团或用于改善寡核苷酸的药效学特性的基团, 以及具有类似特性的其他取代基。还可以在所述糖的其他位置(特别是在3'末

端核苷酸或2'-5'连接的寡核苷酸中糖的3'位置和5'末端核苷酸的5'位置)处进行类似的修饰。经修饰的糖还包括在桥环氧处含有修饰(如CH₂和S)的那些糖。核苷酸糖类似物也可以具有糖模拟物,如环丁基部分代替戊呋喃糖基糖。许多美国专利教导了此类经修饰的糖结构的制备,并且详述并描述了一系列的碱基修饰,所述美国专利是例如美国专利号4,981,957;5,118,800;5,319,080;5,359,044;5,393,878;5,446,137;5,466,786;5,514,785;5,519,134;5,567,811;5,576,427;5,591,722;5,597,909;5,610,300;5,627,053;5,639,873;5,646,265;5,658,873;5,670,633;4,845,205;5,130,302;5,134,066;5,175,273;5,367,066;5,432,272;5,457,187;5,459,255;5,484,908;5,502,177;5,525,711;5,552,540;5,587,469;5,594,121;5,596,091;5,614,617;5,681,941;和5,700,920,将其每一个均通过引用以其整体并入本文。

[0251] 具有经修饰的糖部分的核酸的例子包括但不限于包含5'-乙烯基、5'-甲基(R或S)、4'-S、2'-F、2'-OCH₃和2'-O(CH₂)₂OCH₃取代基的核酸。2'位置处的取代基还可以选自烯丙基、氨基、叠氮基、硫代、O-烯丙基、O-(C₁-C₁₀烷基)、OCF₃、O(CH₂)₂SCH₃、O(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)和O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n),其中R_m和R_n各自独立地是H或者取代或未取代的C₁-C₁₀烷基。

[0252] 在某些实施方案中,本文所述的核酸包括一种或多种双环核酸。在某些此类实施方案中,双环核酸包含4'与2'核糖基环原子之间的桥。在某些实施方案中,本文提供的核酸包括一种或多种双环核酸,其中所述桥包含4'至2'双环核酸。此类4'至2'双环核酸的例子包括但不限于下式之一:4'-(CH₂)-O-2'(LNA);4'-(CH₂)-S-2';4'-(CH₂)₂-O-2'(ENA);4'-CH(CH₃)-O-2'和4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2'及其类似物(参见美国专利号7,399,845);4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2'及其类似物(参见WO 2009/006478、WO 2008/150729、US 2004/0171570、美国专利号7,427,672, Chattopadhyaya等人, J. Org. Chem., 209, 74, 118-134, 以及WO 2008/154401)。还参见例如: Singh等人, Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin等人, Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97, 5633-5638; Kumar等人, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; Singh等人, J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; Srivastava等人, J. Am. Chem. Soc., 2007, 129 (26) 8362-8379; Elayadi等人, Curr. Opin. Inven. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch等人, Chem. Biol., 2001, 8, 1-7; Oram等人, Curr. Opin. Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; 美国专利号4,849,513;5,015,733;5,118,800;5,118,802;7,053,207;6,268,490;6,770,748;6,794,499;7,034,133;6,525,191;6,670,461;和7,399,845;国际公开号WO 2004/106356、WO 1994/14226、WO 2005/021570、WO 2007/090071和WO 2007/134181;美国专利公开号US 2004/0171570、US 2007/0287831和US 2008/0039618;美国临时申请号60/989,574、61/026,995、61/026,998、61/056,564、61/086,231、61/097,787和61/099,844;以及国际申请号PCT/US2008/064591、PCT US2008/066154、PCT US 2008/068922和PCT/DK98/00393。

[0253] 在某些实施方案中,核酸包含连接的核酸。核酸可以使用任何核酸间连接而连接在一起。核酸间连接基团的两个主要类别是通过磷原子的存在或不存在来定义的。代表性的含磷的核酸间连接包括但不限于磷酸二酯、磷酸三酯、甲基磷酸酯、氨基磷酸酯和硫代磷酸酯(P=S)。代表性的不含磷的核酸间连接基团包括但不限于亚甲基甲基亚氨基(-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-)、硫代二酯(-O-C(O)-S-)、硫代氨基甲酸酯(-O-C(O)(NH)-S-);硅氧烷(-O-Si

(H)₂-O-); 和N,N*-二甲基胍(-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃))。在某些实施方案中,可以将具有手性原子的核酸间连接制备为外消旋混合物,作为单独的对映体,例如烷基膦酸酯和硫代膦酸酯。非天然核酸可以含有单个修饰。非天然核酸可以在所述部分之一内或不同部分之间含有多个修饰。

[0254] 对核酸的骨架膦酸酯修饰包括但不限于甲基膦酸酯、硫代膦酸酯、氨基膦酸酯(桥连或非桥连)、磷酸三酯、二硫代膦酸酯、硫代膦酸酯和硼烷膦酸酯,并且可以以任何组合使用。还可以使用其他非膦酸酯连接。

[0255] 在一些实施方案中,骨架修饰(例如,甲基膦酸酯、硫代膦酸酯、氨基膦酸酯和二硫代膦酸酯核苷酸间连接)可以赋予经修饰的核酸免疫调节活性和/或增强其体内稳定性。

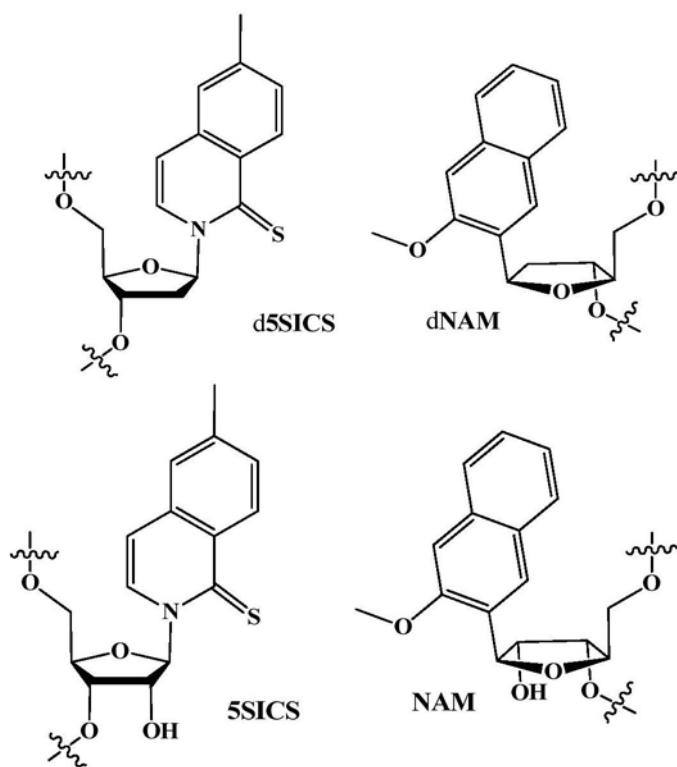
[0256] 在一些情况下,磷衍生物(或经修饰的膦酸酯基团)附接至糖或糖类似物部分,并且可以是单膦酸酯、二膦酸酯、三膦酸酯、烷基膦酸酯、硫代膦酸酯、二硫代膦酸酯、氨基膦酸酯等。含有经修饰的膦酸酯连接或非膦酸酯连接的示例性多核苷酸可以在Peyrottes等人,1996,Nucleic Acids Res.24:1841-1848;Chaturvedi等人,1996,Nucleic Acids Res.24:2318-2323;和Schultz等人,(1996)Nucleic Acids Res.24:2966-2973;Matteucci,1997,“Oligonucleotide Analogs:an Overview”in Oligonucleotides as Therapeutic Agents,(Chadwick和Cardew编)John Wiley and Sons,New York,NY;Zon,1993,“Oligonucleoside Phosphorothioates”in Protocols for Oligonucleotides and Analogs,Synthesis and Properties,Humana Press,第165-190页;Miller等人,1971,JACS 93:6657-6665;Jager等人,1988,Biochem.27:7247-7246;Nelson等人,1997,JOC 62:7278-7287;美国专利号5,453,496;以及Micklefield,2001,Curr.Med.Chem.8:1157-1179中找到。

[0257] 在一些情况下,骨架修饰包括用可替代部分(如阴离子、中性或阳离子基团)替代磷酸二酯连接。此类修饰的例子包括:阴离子核苷间连接;N3'至P5'氨基膦酸酯修饰;硼烷膦酸酯DNA;前寡核苷酸;中性核苷间连接,如甲基膦酸酯;酰胺连接的DNA;亚甲基(甲基亚氨基)连接;甲缩醛和硫代甲缩醛连接;含有磺酰基基团的骨架;吗啉代寡核苷酸;肽核酸(PNA);以及带正电荷的脱氧核糖核酸胍(DNG)寡聚物(Micklefield,2001,Current Medicinal Chemistry 8:1157-1179)。经修饰的核酸可以包含嵌合或混合的骨架,所述嵌合的或混合的骨架包含一种或多种修饰(例如,膦酸酯连接的组合,如磷酸二酯和硫代膦酸酯连接的组合)。

[0258] 膦酸酯的取代基包括,例如,短链烷基或环烷基核苷间连接、混合的杂原子和烷基或环烷基核苷间连接,或一个或多个短链杂原子或杂环核苷间连接。这些包括具有以下的那些:吗啉代连接(部分地由核苷的糖部分形成);硅氧烷骨架;硫化物、亚砷和砷骨架;甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基骨架;亚甲基甲酰乙酰基和硫代甲酰乙酰基骨架;含烯烃的骨架;氨基磺酸酯骨架;亚甲基亚胺基和亚甲基胍基骨架;磺酸酯和磺酰胺骨架;酰胺骨架;以及具有混合N、O、S和CH₂组成部分的其他骨架。许多美国专利披露了如何制备和使用这些类型的膦酸酯替代品,并且包括但不限于美国专利号5,034,506;5,166,315;5,185,444;5,214,134;5,216,141;5,235,033;5,264,562;5,264,564;5,405,938;5,434,257;5,466,677;5,470,967;5,489,677;5,541,307;5,561,225;5,596,086;5,602,240;5,610,289;5,602,240;5,608,046;5,610,289;5,618,704;5,623,070;5,663,312;5,633,360;5,677,437;和

5,677,439。还应理解在核苷酸取代基中,核苷酸的糖和磷酸酯部分都可以被例如酰胺型连接(氨基乙基甘氨酸)(PNA)替代。美国专利号5,539,082;5,714,331;和5,719,262教导了如何制备和使用PNA分子,将其每一个均通过引用并入本文。还参见Nielsen等人,Science, 1991,254,1497-1500。还可以将其他类型的分子(缀合物)与核苷酸或核苷酸类似物连接,以增强例如细胞摄取。缀合物可以与所述核苷酸或核苷酸类似物化学连接。此类缀合物包括但不限于脂质部分,如胆固醇部分(Letsinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1989,86,6553-6556)、胆酸(Manoharan等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,1994,4,1053-1060)、硫醚(例如己基-S-三苯甲基硫醇(Manoharan等人,Ann.KY.Acad.Sci.,1992,660,306-309;Manoharan等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.,1993,3,2765-2770))、硫代胆固醇(Oberhauser等人,Nucl.Acids Res.,1992,20,533-538)、脂肪族链(例如十二烷二醇或十一烷基残基(Saison-Behmoaras等人,EM50J,1991,10,1111-1118;Kabanov等人,FEBS Lett.,1990,259,327-330;Svinarchuk等人,Biochimie,1993,75,49-54))、磷脂(例如二-十六烷基-rac-甘油或三乙铵1-二-0-十六烷基-rac-甘油-S-H-磷酸酯(Manoharan等人,Tetrahedron Lett.,1995,36,3651-3654;Shea等人,Nucl.Acids Res.,1990,18,3777-3783))、多胺或聚乙二醇链(Manoharan等人,Nucleosides&Nucleotides,1995,14,969-973)或金刚烷乙酸(Manoharan等人,Tetrahedron Lett.,1995,36,3651-3654)、棕榈基部分(Mishra等人,Biochem.Biophys.Acta,1995,1264,229-237)或十八烷基胺或己氨基-羰基-氧胆固醇部分(Crooke等人,J.Pharmacol.Exp.Ther.,1996,277,923-937)。许多美国专利教导了此类缀合物的制备,并且包括但不限于美国专利号4,828,979;4,948,882;5,218,105;5,525,465;5,541,313;5,545,730;5,552,538;5,578,717;5,580,731;5,580,731;5,591,584;5,109,124;5,118,802;5,138,045;5,414,077;5,486,603;5,512,439;5,578,718;5,608,046;4,587,044;4,605,735;4,667,025;4,762,779;4,789,737;4,824,941;4,835,263;4,876,335;4,904,582;4,958,013;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,245,022;5,254,469;5,258,506;5,262,536;5,272,250;5,292,873;5,317,098;5,371,241;5,391,723;5,416,203;5,451,463;5,510,475;5,512,667;5,514,785;5,565,552;5,567,810;5,574,142;5,585,481;5,587,371;5,595,726;5,597,696;5,599,923;5,599,928和5,688,941。

[0259] 在一些实施方案中,非天然核酸进一步形成非天然碱基对。能够在体内条件下形成非天然DNA或RNA碱基对(UBP)的示例性非天然核苷酸包括但不限于5SICS、d5SICS、NAM、dNaM、TPT3TP、dTPT3TP及其组合。在一些实施方案中,非天然核苷酸包括:



[0260] 在一些实施方案中,非天然碱基对产生非天然氨基酸,如Dumas等人,“Designing logical codon reassignment-Expanding the chemistry in biology,”*Chemical Science*,6:50-69 (2015) 中所述。

[0261] 将引入了本文公开的构建体或载体的宿主细胞在合适的培养基中培养或维持,使得产生tRNA、tRNA合成酶和目的蛋白质。培养基还包含一种或多种非天然氨基酸,使得目的蛋白质掺入所述一种或多种非天然氨基酸中。

[0262] 正交tRNA合成酶/tRNA对将非天然氨基酸装载在tRNA上,并响应于所述密码子将所述非天然氨基酸掺入多肽链中。示例性aaRS-tRNA对包括但不限于詹氏甲烷球菌 (Mj-Tyr) aaRS/tRNA对、大肠杆菌TyrRS (Ec-Tyr) /嗜热脂肪芽孢杆菌tRNA_{CUA}对、大肠杆菌LeuRS (Ec-Leu) /嗜热脂肪芽孢杆菌tRNA_{CUA}对和吡咯基-tRNA对。

[0263] 通过将本文所述的包含tRNA和tRNA合成酶并包含具有一个或多个框内正交(终止)密码子的目的核酸序列的核酸构建体引入宿主细胞中,来制备包含一种或多种非天然氨基酸的IL-15多肽。使宿主细胞暴露于包含所述一种或多种非天然氨基酸的生理溶液,然后将宿主细胞维持在允许表达目的蛋白质编码序列的条件下。响应于所述密码子,将所述一种或多种非天然氨基酸掺入多肽链中。例如,将一种或多种非天然氨基酸掺入IL-15多肽中。可替代地,可以在蛋白质的两个或更多个位点处将两个或更多个非天然氨基酸掺入IL-15多肽中。

[0264] 当将多个非天然氨基酸掺入IL-15多肽中时,应理解,需要将多个密码子在所希望位置处掺入编码核酸序列中,使得tRNA合成酶/tRNA对可以响应于密码子引导非天然氨基酸的掺入。可以将至少1、2、3、4或更多个编码密码子的核酸掺入目的核酸序列中。

[0265] 当希望将多于一种类型的非天然氨基酸掺入目的蛋白质成为单个蛋白质时,可以使用第二或另外的正交tRNA-tRNA合成酶对来掺入所述第二或另外的非天然氨基酸;合适

地,所述第二或另外的正交tRNA-tRNA合成酶对识别编码所述目的蛋白质的核酸中的不同密码子,使得可以在单个制造步骤中将所述两个或更多个非天然氨基酸特异性地掺入蛋白质中的不同定义位点中。在某些实施方案中,因此可以使用两个或更多个正交tRNA-tRNA合成酶对。

[0266] 一旦在宿主细胞中产生了掺入非天然氨基酸的IL-15多肽,就可以通过本领域已知的多种技术(包括酶促、化学和/或渗透裂解和物理破坏)从其提取。IL-15多肽可以通过本领域已知的标准技术(如制备色谱法、亲和纯化或任何其他合适的技术)纯化。

[0267] 合适的宿主细胞可以包括细菌细胞(例如,大肠杆菌),但最合适的宿主细胞是真核细胞,例如昆虫细胞(例如果蝇,如黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*))、酵母细胞、线虫(例如秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*))、小鼠(例如小家鼠)或哺乳动物细胞(如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或COS细胞、人293T细胞、HeLa细胞、NIH 3T3细胞和小鼠红白血病(MEL)细胞)或人细胞或其他真核细胞。其他合适的宿主细胞是本领域技术人员已知的。合适地,宿主细胞是哺乳动物细胞,如人细胞或昆虫细胞。

[0268] 通常可以在本发明的实施方案中使用的其他合适的宿主细胞是在实施例部分中提到的那些。可以经由常规转化或转染技术将载体DNA引入宿主细胞中。如本文所用,术语“转化”和“转染”旨在指用于将外来核酸分子(例如,DNA)引入宿主细胞中的多种公认的技术,包括磷酸钙或氯化钙共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂质转染或电穿孔。用于转化或转染宿主细胞的合适方法是本领域熟知的。

[0269] 当创建细胞系时,通常优选制备稳定的细胞系。例如,对于哺乳动物细胞的稳定转染,已知根据所使用的表达载体和转染技术,只有一小部分细胞可以将外来DNA整合到其基因组中。为了鉴定和选择这些组成部分,通常将编码可选择标记物(例如,对抗生素的抗性)的基因与目的基因一起引入宿主细胞中。优选的可选择标记物包括赋予对药物(如G418、潮霉素或甲氨蝶呤)的抗性的那些可选择标记物。可以将编码可选择标记物的核酸分子在相同载体上引入宿主细胞中,或者可以引入单独的载体上。可以通过药物选择来鉴定被引入的核酸分子稳定转染的细胞(例如,已掺入可选择标记基因的细胞将存活,而其他细胞死亡)。

[0270] 在一个实施方案中,将本文所述的构建体整合到宿主细胞的基因组中。稳定整合的优点是实现了各个细胞或克隆之间的均匀性。另一个优点是可以进行最佳生产者的选择。因此,希望创建稳定的细胞系。在另一个实施方案中,将本文所述的构建体转染到宿主细胞中。将构建体转染到宿主细胞中的优点是可以使蛋白质产量最大化。在一个方面,描述了包含本文所述的核酸构建体或载体的细胞。

药物组合物和配制品

[0271] 在一些实施方案中,通过多种给予途径(包括但不限于肠胃外、口服或透皮给予途径)将本文所述的药物组合物和配制品给予受试者。在一些情况下,肠胃外给予包括静脉内、皮下、肌肉内、脑内、鼻内、动脉内、关节内、皮内、玻璃体内、骨内输注、腹膜内或鞘内给予。在一些情况下,将药物组合物配制成用于局部给予。在其他情况下,将药物组合物配制成用于全身给予。

[0272] 在一些实施方案中,药物配制品包括但不限于水性液体分散体、自乳化分散体、脂质体分散体、气雾剂、速释配制品、控释配制品、延迟释放配制品、延长释放配制品、脉冲式

释放配制品以及混合的速释和控释配制品。

[0273] 在一些实施方案中,药物配制品包括基于与本文公开的组合物相容性和所希望剂型的释放特性而选择的一种或多种载体材料。示例性载体材料包括例如粘合剂、表面活性剂、增溶剂、稳定剂、润滑剂、湿润剂、稀释剂等。药学上相容的载体材料包括但不限于阿拉伯胶、明胶、胶体二氧化硅、甘油磷酸钙、乳酸钙、麦芽糊精、甘油、硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、胆固醇、胆固醇酯、酪蛋白酸钠、大豆卵磷脂、牛磺胆酸、磷脂酰胆碱、氯化钠、磷酸三钙、磷酸氢二钾、纤维素和纤维素缀合物、糖硬脂酰乳酸钠、角叉菜胶、甘油单酯、甘油二酯、预胶化淀粉等。参见例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第十九版(Easton,Pa.:Mack Publishing Company,1995),Hoover,John E.,Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co.,Easton,Pennsylvania 1975,Liberman,H.A.和Lachman,L.,编辑,Pharmaceutical Dosage Forms,Marcel Decker,纽约,纽约州,1980,以及Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,第七版(Lippincott Williams&Wilkins1999)。

[0274] 在一些情况下,将药物组合物配制成免疫脂质体,其包含与脂质体的脂质双层直接或间接结合的多个IL-15缀合物。示例性脂质包括但不限于脂肪酸;磷脂;甾醇类,如胆固醇;鞘脂,如鞘磷脂;糖鞘脂,如神经节苷脂、红细胞糖苷脂和脑苷脂;表面活性剂胺,如硬脂酰胺、油酰胺和亚油酰胺。在一些情况下,脂质包括阳离子脂质。在一些情况下,脂质包括磷脂。示例性磷脂包括但不限于磷脂酸("PA")、磷脂酰胆碱("PC")、磷脂酰甘油("PG")、磷脂酰乙醇胺("PE")、磷脂酰肌醇("PI")和磷脂酰丝氨酸("PS")、鞘磷脂(包括脑鞘磷脂)、卵磷脂、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、脑苷脂、二花生酰基磷脂酰胆碱("DAPC")、二癸酰基-L- α -磷脂酰胆碱("DDPC")、二反油酰基磷脂酰胆碱("DEPC")、二月桂酰基磷脂酰胆碱("DLPC")、二亚油酰基磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱("DMPC")、二油酰基磷脂酰胆碱("DOPC")、二棕榈酰基磷脂酰胆碱("DPPC")、二硬脂酰基磷脂酰胆碱("DSPC")、1-棕榈酰基-2-油酰基-磷脂酰胆碱("POPC")、二花生酰基磷脂酰甘油("DAPG")、二癸酰基-L- α -磷脂酰甘油("DDPG")、二反油酰基磷脂酰甘油("DEPG")、二月桂酰基磷脂酰甘油("DLPG")、二亚油酰基磷脂酰甘油、二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油("DMPG")、二油酰基磷脂酰甘油("DOPG")、二棕榈酰基磷脂酰甘油("DPPG")、二硬脂酰基磷脂酰甘油("DSPG")、1-棕榈酰基-2-油酰基-磷脂酰甘油("POPG")、二花生酰基磷脂酰乙醇胺("DAPE")、二癸酰基-L- α -磷脂酰乙醇胺("DDPE")、二反油酰基磷脂酰乙醇胺("DEPE")、二月桂酰基磷脂酰乙醇胺("DLPE")、二亚油酰基磷脂酰乙醇胺、二肉豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺("DMPE")、二油酰基磷脂酰乙醇胺("DOPE")、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺("DPPE")、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺("DSPE")、1-棕榈酰基-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺("POPE")、二花生酰基磷脂酰肌醇("DAPI")、二癸酰基-L- α -磷脂酰肌醇("DDPI")、二反油酰基磷脂酰肌醇("DEPI")、二月桂酰基磷脂酰肌醇("DLPI")、二亚油酰基磷脂酰肌醇、二肉豆蔻酰基磷脂酰肌醇("DMPI")、二油酰基磷脂酰肌醇("DOPI")、二棕榈酰基磷脂酰肌醇("DPPI")、二硬脂酰基磷脂酰肌醇("DSPI")、1-棕榈酰基-2-油酰基-磷脂酰肌醇("POPI")、二花生酰基磷脂酰丝氨酸("DAPS")、二癸酰基-L- α -磷脂酰丝氨酸("DDPS")、二反油酰基磷脂酰丝氨酸("DEPS")、二月桂酰基磷脂酰丝氨酸("DLPS")、二亚油酰基磷脂酰丝氨酸("DMPS")、二油酰基磷脂酰丝氨酸("DOPS")、二棕榈酰基磷脂酰丝氨酸("DPPS")、二硬脂酰基磷脂酰丝氨酸("DSPS")、1-棕榈酰基-2-油酰基-磷

脂酰丝氨酸(“POPS”)、二花生酰基鞘磷脂、二癸酰基鞘磷脂、二反油酰基鞘磷脂、二月桂酰基鞘磷脂、二亚油酰基鞘磷脂、二肉豆蔻酰基鞘磷脂、鞘磷脂、二油酰基鞘磷脂、二棕榈酰基鞘磷脂、二硬脂酰基鞘磷脂以及1-棕榈酰基-2-油酰基-鞘磷脂。

[0275] 在一些实施方案中,药物配制品还包括pH调节剂或缓冲剂,其包括酸,如乙酸、硼酸、柠檬酸、乳酸、磷酸和盐酸;碱,如氢氧化钠、磷酸钠、硼酸钠、柠檬酸钠、乙酸钠、乳酸钠和三羟甲基氨基甲烷;以及缓冲液,如柠檬酸盐/葡萄糖、碳酸氢钠和氯化铵。以使组合物的pH维持在可接受范围内所需的量包括此类酸、碱和缓冲液。

[0276] 在一些情况下,药物配制品包含一种或多种盐,其量需要使组合物的渗透度达到可接受的范围。此类盐包括具有钠、钾或铵阳离子和氯离子、柠檬酸根、抗坏血酸根、硼酸根、磷酸根、碳酸氢根、硫酸根、硫代硫酸根或亚硫酸氢根阴离子的那些盐,合适的盐包括氯化钠、氯化钾、硫代硫酸钠、亚硫酸氢钠和硫酸铵。

[0277] 在一些实施方案中,药物配制品包括但不限于糖(如海藻糖、蔗糖、甘露醇、山梨糖醇、麦芽糖、葡萄糖)、或盐(如磷酸钾、柠檬酸钠、硫酸铵)和/或其他药剂(如肝素),以增加多肽的溶解度和体内稳定性。

[0278] 在一些实施方案中,药物配制品还包含用于稳定化合物的稀释剂,因为它们可以提供更稳定的环境。溶解在缓冲溶液中的盐(其也可以提供pH控制或维持)在本领域中用作稀释剂,包括但不限于磷酸盐缓冲盐溶液。

[0279] 稳定剂包括化合物,如任何抗氧化剂、缓冲剂、酸、防腐剂等。示例性稳定剂包括L-精氨酸盐酸盐、氨基丁三醇、白蛋白(人)、柠檬酸、苯甲醇、苯酚、磷酸二氢二钠脱水、丙二醇、间甲酚或间甲酚(m-cresol)、乙酸锌、聚山梨酯-20或Tween®20或氨丁三醇。

[0280] 表面活性剂包括化合物,如月桂基硫酸钠、多库酯钠、吐温60或80、三醋精、维生素E TPGS、脱水山梨糖醇单油酸酯、聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯、聚山梨酸酯、聚山梨醇酯、胆汁盐、单硬脂酸甘油酯、环氧乙烷和环氧丙烷的共聚物,例如Pluronic® (BASF)等。另外的表面活性剂包括聚氧乙烯脂肪酸甘油酯和植物油(例如聚氧乙烯(60)氢化蓖麻油)以及聚氧乙烯烷基醚和烷基苯基醚(例如辛苯聚醇10、辛苯聚醇40)。有时,包含表面活性剂以增强物理稳定性或用于其他目的。

治疗方案

[0281] 在一些实施方案中,给予本文所述的药物组合物用于治疗应用。在一些实施方案中,将药物组合物每天给予一次、每天给予两次、每天给予三次或更多次。将药物组合物每日给予、每天给予、每隔一天给予、每周给予五天、每周给予一次、每隔一周给予、每月给予两周、每月给予三周、每月给予一次、每月给予两次、每月给予三次或更多次。给予所述药物组合物至少1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、18个月、2年、3年或更久。

[0282] 在其中患者状况确实有所改善的情况下,根据医生的判断,连续给予所述组合物,可替代地,将给予的组合物的剂量暂时减少或暂时中止一定时间(即“药物假期”)。在一些实施方案中,药物假期的长度在2天至1年之间变化,仅作为示例,所述药物假期的长度包括2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、12天、15天、20天、28天、35天、50天、70天、100天、120天、150天、180天、200天、250天、280天、300天、320天、350天或365天。药物假期期间的剂量减少为10%-100%,仅作为示例,包括10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、

55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

[0283] 一旦患者病症得到改善,必要时给予维持剂量。随后,可以根据症状将剂量或给予频率或两者降低至保留改善的疾病、障碍或病症的水平。

[0284] 在一些实施方案中,对应于这样的量的给定药剂的量取决于多种因素而变化,所述多种因素是例如特定的化合物、疾病的严重程度、需要治疗的受试者或宿主的特性(例如,体重),然而以本领域已知的方式根据围绕病例的特定情况(包括例如所给予的特定药剂、给予途径和所治疗的受试者或宿主)常规地确定。在一些实施方案中,希望的剂量方便地以单剂量或以分开的剂量同时(或在短时间段内)或以适当的间隔(例如每天两个、三个、四个或更多个亚剂量)提供。

[0285] 前述范围仅仅是提示性的,因为关于单个治疗方案的变量数目很大,并且与这些推荐值的相当大的偏差并不罕见。此类剂量根据许多变量而改变,不限于所使用化合物的活性、待治疗的疾病或病症、给予方式、个体受试者的需求、所治疗的疾病或病症的严重程度以及医师的判断。

[0286] 在一些实施方案中,此类治疗方案的毒性和治疗功效通过细胞培养物或实验动物中的标准制药学程序来确定,所述标准制药学程序包括但不限于LD50(对50%的群体致死的剂量)和ED50(对50%的群体具有治疗效果的剂量)的确定。毒性与治疗效果之间的剂量比是治疗指数,并且其表示为LD50与ED50之间的比率。展现出高治疗指数的化合物是优选的。将从细胞培养测定和动物研究获得的数据用于制定用于人的剂量范围。此类化合物的剂量优选地在循环浓度的范围内,所述循环浓度包括具有最小毒性的ED50。所述剂量取决于所采用的剂型和所利用的给予途径而在这个范围内变化。

试剂盒/制品

[0287] 在某些实施方案中,本文公开了与本文所述的一种或多种方法和组合物一起使用的试剂盒和制品。此类试剂盒包含载体、包装或容器,其被分隔以容纳一个或多个容器,如小瓶、管等,每个容器包含待用于本文所述方法的单独元素中的一种。合适的容器包括例如瓶、小瓶、注射器和试管。在一个实施方案中,容器由各种材料(如玻璃或塑料)制成。

[0288] 本文提供的制品含有包装材料。药物包装材料的例子包括但不限于泡罩包装、瓶、管、袋、容器、瓶、以及适用于所选配制品以及预期给予方式和治疗的任何包装材料。

[0289] 例如,所述一种或多种容器包含本文公开的IL-15多肽或IL-15缀合物中的一种或多种,以及任选地一种或多种本文所述的药物赋形剂,以促进IL-15多肽或IL-15缀合物的递送。此类试剂盒任选地还包含与其在本文所述的方法中的使用有关的识别描述或标签或说明。

[0290] 试剂盒通常包含列出内容物和/或使用说明的标签、以及包含使用说明的包装说明书。通常还将包括一组指令。

[0291] 在一个实施方案中,标签在容器上或与容器相关。在一个实施方案中,当形成标签的字母、数字或其他字符被贴附、模制或蚀刻到容器本身中时,标签在容器上;当标签存在于容纳容器的器皿或载体内时,标签与容器相关,例如作为包装说明书。在一个实施方案中,标签用于指示内容物将用于特定治疗应用。标签还指示使用内容物的指示,如在本文所述的方法中。

[0292] 在某些实施方案中,药物组合物存在于包装或分配器装置中,所述装置含有一种

或多种含有本文提供的化合物的单位剂型。包装例如含有金属或塑料箔,如泡罩包装。在一个实施方案中,包装或分配器装置附有给予说明。在一个实施方案中,包装或分配器还附有与容器相关的通知,该通知的形式由规范药物制造、使用或销售的政府机构规定,所述通知反映了所述机构对于人或兽医给予的药物形式的批准。例如,此类通知是由美国食品和药物管理局批准的药物标签,或批准的产品插页。在一个实施方案中,还制备了在相容的药物载体中配制的含有本文提供的化合物的组合物,将其放置在适当的容器中,并标记用于治疗指定病症。

特定术语

[0293] 除非另外定义,否则本文中使用的所有技术术语和科学术语具有与要求保护的主体所属领域的技术人员通常所理解的相同的含义。应理解,详细描述仅是示例性和解释性的,并不是对所要求保护的主体任何主题的限制。在本申请中,除非另外明确陈述,否则使用单数包括复数。必须指出,如在说明书中所使用,单数形式“一个/一种(a/an)”和“该(the)”包括复数指示物,除非上下文另外清楚地规定。在本申请中,除非另外陈述,否则“或”的使用意指“和/或”。此外,术语“包括(including)”以及其他形式如“包括(include)”、“包括(includes)”和“包括(included)”的使用是非限制性的。

[0294] 尽管本发明的各种特征可以在单个实施方案的上下文中描述,但所述特征也可以单独提供或以任何合适的组合提供。相反,尽管为了清楚起见,本文可在单独的实施方案的上下文中描述本发明,但本发明也可在单个实施方案中实施。

[0295] 在说明书中对“一些实施方案”、“实施方案”、“一个实施方案”或“其他实施方案”的提及意指结合实施方案描述的特定特征、结构或特性包括在本公开文本的至少一些实施方案中,但不必包括在本发明的所有实施方案中。

[0296] 如本文所用,范围和数量可以表示为“约”特定值或范围。约也包括确切的量。因此,“约5 μ L”意指“约5 μ L”并且也意指“5 μ L”。通常,术语“约”包括预期在实验误差内的量。

[0297] 本文使用的章节标题仅用于组织目的,而不应解释为限制所描述的主题。

[0298] 如本文所用,术语“一个或多个个体”、“一名或多名受试者”和“一名或多名患者”意指任何哺乳动物。在一些实施方案中,哺乳动物是人。在一些实施方案中,哺乳动物是非人。所述术语均不要求或不限于以卫生保健工作者(例如医生、注册护士、执业护士、医师助理、护理员或临终关怀工作者)进行监督(例如持续或间断)为特征的情况。

[0299] 如本文所用,关于受体结合的术语“显著”和“显著地”意指足以影响IL-15多肽与靶受体结合的变化。在一些情况下,所述术语是指至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更大的变化。在一些情况下,所述术语意指至少2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、50倍、100倍、500倍、1000倍或更大的变化。

[0300] 在一些情况下,涉及经由细胞因子信号传导复合物激活一个或多个细胞群体的术语“显著地”意指足以激活细胞群体的变化。在一些情况下,将激活细胞群体的变化测量为受体信号传导效力。在此类情况下,可以提供EC₅₀值。在其他情况下,可以提供ED₅₀值。在另外的情况下,可以提供细胞因子的浓度或剂量。

[0301] 如本文所用,术语“效力”是指产生靶效应所需的细胞因子(例如,IL-15多肽)的量。在一些情况下,术语“效力”是指激活靶细胞因子受体(例如,IL-15受体)所需的细胞因子(例如,IL-15多肽)的量。在其他情况下,术语“效力”是指激活靶细胞群体所需的细胞因

子(例如, IL-15多肽)的量。在一些情况下, 将效力测量为ED50 (有效剂量50) 或产生50%最大效应所需的剂量。在其他情况下, 将效力测量为EC50 (有效浓度50) 或在50%群体中产生靶效应所需的剂量。

[0302] 如本文所用, 术语“一种或多种肿瘤浸润性免疫细胞”是指已经浸入包含肿瘤细胞的区域中(例如, 在肿瘤微环境中)的免疫细胞。在一些情况下, 肿瘤浸润性免疫细胞与肿瘤细胞破坏、肿瘤细胞增殖减少、肿瘤负荷降低或其组合相关。在一些情况下, 肿瘤浸润性免疫细胞包括肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。在一些情况下, 肿瘤浸润性免疫细胞包括T细胞、B细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞或嗜碱性粒细胞。在一些情况下, 肿瘤浸润性免疫细胞包括CD4+或CD8+T细胞。

实施例

[0303] 这些实施例仅仅出于说明性目的提供, 并且不限制本文提供的权利要求的范围。

实施例1.

[0304] 经修饰的IL-15多肽的表达

[0305] 使经修饰的IL-16多肽在37℃、250rpm和5小时诱导下生长。培养基组成如表2所示。

表2.

名称	组成
生长培养基	2xYT
	30.8 mM磷酸氢二钾
对于1 L: 2x 2xYT沉淀物, 磷酸二氢钾, 磷酸氢二钾	19.2 mM磷酸二氢钾
	100 ug/ml氨苄青霉素
	5 ug/ml氯霉素
对液体循环进行高压灭菌	50 ug/ml博来霉素
	37.5 uM dTPT3TP
	150 uM dNAMTP

[0306] 当表达培养物达到OD₆₀₀ 0.85-0.9时, 在培养物中预加载NaMTP (最终浓度为250uM)、TPT3TP (最终浓度为25uM) 和叠氮基赖氨酸 (最终浓度为15mM)。在预加载核糖核苷酸和氨基酸后约15-20分钟, 添加IPTG, 并使蛋白质表达约5小时。

[0307] 包涵体

[0308] 在收集细胞沉淀物后, 将沉淀物进一步加工成包涵体。简而言之, 将1L细胞沉淀物重悬于10ml裂解缓冲液(20mM Tris-HCl, pH 8.0; 150mM NaCl; 1mM DTT; 和蛋白酶抑制剂(1个沉淀物/50ml))中。在重悬后, 用裂解缓冲液将1L沉淀物的体积增加到45ml, 并通过微流化器运行2次。然后将样品转移到50ml离心管中, 并在4℃下以16k rpm离心20分钟。接下来, 将沉淀物重悬于5ml裂解缓冲液中, 并用裂解缓冲液将总体积增加到30ml。添加约10%的Triton X-100至最终浓度为0.5%。然后将溶液在4℃下以16k rpm离心20分钟, 然后收集沉淀物并用30ml裂解缓冲液洗涤3次。每次洗涤时, 用带针头的5ml注射器来完全重悬。在最后

旋转后,弃去上清液并将沉淀物快速冷冻以在-80℃下储存。

[0309] 溶解和重折叠

[0310] 将约5ml溶解缓冲液添加到包涵体沉淀物中。在重悬后,在溶解缓冲液中将体积增加到30ml。接下来,将样品在4℃下孵育30-60分钟。然后,将样品转移到2x 50ml离心管(15ml/管)中,并向每个管中添加15ml稀释缓冲液。然后将样品随后于4℃下在缓冲液A1,接着是A2透析缓冲液、A3透析缓冲液、A4透析缓冲液和A5透析缓冲液中透析过夜。在透析后,将样品在4℃下以4000rpm离心30分钟,并浓缩至约5ml。

[0311] 表3示出了溶解缓冲液。

名称	组成
溶解缓冲液	6 M盐酸胍 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 1 mM DTT 20 mM咪唑
稀释缓冲液	3 M盐酸胍 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 1 mM DTT 20 mM咪唑
A1透析缓冲液	2 M盐酸胍 20 mM Tris-HCl, pH 8.5

	150 mM NaCl 1 mM GSH (还原型谷胱甘肽) 0.1 mM GSSG (氧化型谷胱甘肽) 0.4 M L-精氨酸
A2透析缓冲液	0.75 M 盐酸胍 20 mM Tris-HCl, pH 8.5 150 mM NaCl 1 mM GSH (还原型谷胱甘肽) 0.1 mM GSSG (氧化型谷胱甘肽) 0.4 M L-精氨酸
A3透析缓冲液	20 mM Tris-HCl, pH 8.5 150 mM NaCl 1 mM GSH (还原型谷胱甘肽) 0.1 mM GSSG (氧化型谷胱甘肽) 0.1 M L-精氨酸
A4透析缓冲液	20 mM Tris-HCl, pH 8.5 150 mM NaCl
A5透析缓冲液	20 mM Tris-HCl, pH 7.5 12.5 mM NaCl

[0312] 纯化

[0313] 首先在具有1x PBS洗脱缓冲液的GE HiLoad 16/600Superdex 200pg凝胶过滤柱上纯化样品,接着在GE HiTrapQ阴离子交换柱上纯化以去除游离的PEG,然后进行反相色谱法,用20个柱体积的30%-70%洗脱缓冲液进行梯度洗脱。

[0314] 表4示出了用于阴离子交换色谱法的缓冲液。表5示出了用于反相色谱法的缓冲液。

表4

名称	组成
运行缓冲液	20 mM Tris-HCl, pH 7.5
洗脱缓冲液	20 mM Tris-HCl, pH 7.5
	500 mM NaCl

表5

名称	组成
运行缓冲液	4.5%乙腈 0.043% TFA
洗脱缓冲液	90%乙腈 0.028% TFA

[0315] 图4显示了阴离子交换色谱法的示例性运行。

[0316] 图5显示了反相色谱法的示例性运行。

实施例2

[0317] 基于细胞的筛选用于鉴定具有天然IL-15R α 接合或没有IL-15R α 接合的聚乙二醇化IL-15化合物

[0318] 将IL-15/异三聚受体信号传导复合物(PDB:4GS7)的结构数据用于指导nAA-聚乙二醇化位点的设计,以保留与异三聚受体的天然相互作用或特异性消除IL-15与IL-15受体 α 亚基(IL-15R α)的相互作用。对示例性IL-15缀合物进行功能分析:S18、A23、T24、L25、Y26、E46、V49、L52、E53、N77、S83、E89、E90。使IL-15缀合物在大肠杆菌中表达为包涵体,使用标准程序将其纯化并重折叠,然后使用DBC0介导的无铜点击化学将IL-15产物位点特异性地聚乙二醇化,以将稳定的共价mPEG部分附接到AzK。使用比色CTLL2增殖测定筛选IL-15缀合物的功能活性。CTLL2是小鼠T细胞的亚克隆,其表达所有三种IL-15受体亚基,并需要IL-2/IL-15用于生长。进行了初步实验,以确定适当剂量-响应曲线的最佳细胞密度、IL-15标准品或IL-15缀合物的范围以及孵育时间。将内部重组人IL-15(rHuIL-15)与商业IL-15标准品(R&D,目录号247-IL)进行了比较。在限定的条件下,商业IL-15标准品的EC₅₀为约10.7pM,并且内部rHuIL-15为9.7pM。

[0319] 表6显示了30kDa线性聚乙二醇化IL-15缀合物的EC₅₀数据,所述缀合物被设计成保留与异三聚体IL-15受体的天然相互作用。平均值中包含的值的数量在括号中指示。结果显示,与天然IL-15相比,与30kDa PEG的生物缀合不会干扰三聚受体的效力,并且EC₅₀降低小于5倍。

表6

位点	平均EC ₅₀ (pg/mL)	平均EC ₅₀ (pM)	EC ₅₀ 比率 IL-15 PEG30/rHuIL-15
R&D IL-15	136.80 $\pm$ 36.84 (6)	10.7	
rHuIL-15	124.62 $\pm$ 73.75 (6)	9.7	
S18 PEG30	414.10 (2)	32.1	3.3
S83 PEG30	199.80 (2)	15.5	1.6
N77 PEG30	236.05 (2)	18.3	1.9

[0320] 表7显示了30kDa线性和40kDa支化聚乙二醇化IL-15缀合物的EC₅₀数据,所述缀合

物被设计成特异性地消除IL-15与IL-15受体 α 亚基(IL-15R α)的相互作用。平均值中包含的值数在方括号之间指示。结果表明,与天然IL-15相比,与30kDa PEG的生物缀合降低了三聚受体的效力。与rHuIL-15相比,线形PEG 30kDa或支化40kDa PEG与V49的生物缀合适度降低了三聚受体的效力(约6-8倍,分别为814.4pg/mL至1,029pg/mL相对于124.62pg/mL)。此外,相对于rHuIL-15,L25 PEG39的效力被更强烈地降低(约54倍,分别为6,827pg/mL相对于124.62pg/mL)。

表7

位点	平均EC50 (pg/mL)	平均EC50 (pM)	EC50比率 IL-15 PEG/rHuIL-15
R&D IL-15	136.80 $\pm$ 36.84 (6)	10.7	
rHuIL-15	124.62 $\pm$ 73.75 (6)	9.7	1
L25 PEG30	6,827 (2)	529.0	54
V49 PEG30	814.45 (2)	63.1	6
V49 PEG (40b)	1,019	79.0	8
E46 PEG30	65,893	5,106	526
E53 PEG30	22,766	1,764	182

[0321] 图6示出了在CTLL2增殖测定中具有天然效力的示例性IL-15缀合物的EC50值。结果绘制为响应百分比。

[0322] 图7示出了示例性IL-15缀合物的EC50值。如此处所示,位点特异性聚乙二醇化有助于体外药理学。结果绘制为响应百分比。

[0323] 图8示出了与不同PEG大小缀合的示例性IL-15的EC50值。结果绘制为响应百分比。

实施例3

[0324] 聚乙二醇化IL-15与人IL-15受体亚基的生物化学相互作用

[0325] 使用Biofizik(加利福尼亚州圣地亚哥)的表面等离子体共振 (SPR) 测量了聚乙二醇化IL-15化合物与人IL-15受体亚基相互作用的动力学。对于这些研究,在Biacore蛋白A包被的CM3或CM4传感器芯片的表面上捕获了人IgG1 Fc融合的IL-15R α (Sino Biological#18366-H02H,R&D#7194-IR) 和IL-2R β (Sino Biological#10696-H02H) 细胞外结构域。在25℃下在CM3芯片上通过胺偶联以大约1500RU的密度偶联蛋白A。使用4min接触时间,接着在分析物注射之前等待20分钟,从而捕获了大约400RU的IL15R α -Fc融合物。使用100mM磷酸实现了注射之间的表面再生。再生后每个循环均捕获了新鲜受体。将这些表面在25℃下一式三份进行探测。在典型的实验中,注射了10个剂量的分析物,其中最高浓度为500nM。在一些情况下,需要高浓度范围,而在其他情况下,忽略分析中的更高剂量。

[0326] 由于化合物与IL2R β 的结合较弱,因此再生不是必要的,并且在没有再生步骤的情况下进行了正交结合研究。在运行缓冲液中使用原液的1/100稀释液的1-2min接触时间捕获了大约600-700RU的IL2R β Fc融合物。对于测试化合物,注射了10个剂量的分析物,其中最高浓度为1000nM。使用Scrubber2程序使用双参照程序分析了原始数据,其中将化合物信号

校正为空白表面,并在蛋白质表面上注射缓冲液。参见表8-表10。

表8.rHuIL-15和IL-15聚乙二醇化化合物IL-15R α 亚基表面的动力学参数。

化合物	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (nM)
rHuIL-15	2.409E+05	5.105E-04	0.2117
	2.450E+06	4.763E-04	0.1943
	1.988E+06	4.184E-04	0.2103
IL15 N77PEG30	2.249E+05	4.146E-04	1.845
	2.404E+05	3.613E-04	1.502
	2.206E+05	2.926E-04	1.328
IL15 S83PEG30	3.669E+05	2.137E-04	0.5833
	3.543E+05	2.560E-04	0.7227
	3.215E+05	1.905E-04	0.5909

表9.rHuIL-15和IL-15聚乙二醇化化合物与IL-15R α 亚基表面降低的结合的动力学参数。

化合物	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (nM)
rHuIL-15	2.409E+05	5.105E-04	0.2117
	2.450E+06	4.763E-04	0.1943
	1.988E+06	4.184E-04	0.2103
IL15 L25PEG30	5.07E+03	1.19E-03	233.6
	3990	1.04E-03	260.9
	4930	1.22E-03	248.1
IL15 E46PEG30	3.83E+03	4.01E-04	104.6
	2805	3.01E-04	107.3
	3.17	3.25E-04	102.4
IL15 V49PEG30	1.73E+05	5.30E-04	3.066
	1.54E+05	5.76E-04	3.75
	1.50E+05	4.22E-04	2.823
IL15 V49PEG40b	1.51E+05	6.11E-04	4.059
	1.26E+05	5.70E-04	4.522
	1.32E+05	4.60E-04	3.483
IL15 E53PEG30	8.76E+04	0.01484	169.4
	8.39E+04	0.01614	192.4
	1.42E+05	0.02439	171

表10. rHuIL-15和IL-15聚乙二醇化化合物与IL-2R β 亚基表面的动力学参数。

化合物	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (nM)
rHuIL-15	4.161E+05	3.095E-02	74.4
	4.223E+05	3.251E-02	77
	3.632E+05	2.863E-02	78.8
IL15 N77PEG30	1.101E+05	2.220E-02	201.6
	1.158E+05	2.361E-02	204
	1.099E+05	2.309E-02	210.2
IL15 S83PEG30	1.214E+05	2.517E-02	207
	1.153E+05	2.458E-02	213
	1.386E+05	2.962E-02	213.8
IL15 V49PEG30	1.061E+05	3.212E-02	302.7
	9.810E+04	3.045E-02	310.5
	9.700E+04	2.710E-02	279.5
IL15 V49PEG40b	1.187E+05	3.091E-02	260.5
	1.071E+05	2.690E-02	251.2
	1.061E+05	2.552E-02	240.5
IL15 E53PEG30	5.770E+05	3.350E-02	58
	6.010E+05	3.525E-02	58.6
	6.300E+05	3.348E-02	53.1
IL 15 E46PEG30	2.01E+04	1.650E-02	823
IL 15 L25PEG30	2.06E+04	4.460E-02	2,160

[0327] 在含有固定化IL-15R α 的传感器表面上,天然IL-15 (rHuIL-15和来自R&D的商业IL-15) 显示出快速的缔合和非常缓慢的解离动力学,这表明了非常高亲和力的结合(图9A)。被设计成延长半衰期而不阻断与IL-15受体相互作用的IL-15聚乙二醇化变体显示出了与天然IL-15相似的结合动力学。在化合物之间针对亚基观察到的 K_D 的适度差异(对于IL-15N77PEG30和IL-15S83PEG30, K_D 分别减小了约10倍和约3倍)是由于IL-15缀合化合物相对于rHuIL-15的缔合速率降低,这是从聚乙二醇化化合物的较低扩散系数和大PEG部分在远处结合表面上的非特异性屏蔽效应所预期的(图9B)。相比之下,由于PEG部分在IL-15R α 结合表面上的特异性定位,因此IL-15E46PEG30以缓慢的缔合和缓慢的解离与IL-15R α 相互作用,而IL-15E53PEG30显示出快速的缔合和快速的解离(图9C)。

[0328] 含有固定化IL-2R β 的表面显示出与天然IL-15和被设计用于通过天然受体接合延长半衰期的化合物两者的可比较的缔合和解离响应。其中PEG部分位于IL-15R α 结合表面的

化合物显示出与IL-2R β 表面不同的结合动力学。尽管IL-15E46PEG30和IL-15L25PEG显示出与这些表面的结合降低了约10倍和约30倍,但IL-15E53PEG30保留了与IL-2R β 的“天然”结合。这些结果表明,PEG部分的特异性定位可以赋予IL-15与其受体不同的相互作用方式。

[0329] 图9A-图9C显示了rHuIL-15(一种与IL-15R α 结合的IL-15缀合化合物)的响应单位(RU,Y轴)与时间(s,X轴)的关系。结合动力学分析证实了位点特异性聚乙二醇化调节与IL-15R α 的相互作用。

[0330] 图10显示了rHuIL-15(与IL-15R α 和IL-2R β 结合的IL-15N77PEG30)的响应单位(RU,Y轴)与时间(s,X轴)的关系。结合动力学分析证实了位置N77处的位点特异性聚乙二醇化保留与IL-15R α 和IL-2R β 的天然相互作用。

[0331] 图11显示了rHuIL-15(与IL-15R α 和IL-2R β 结合的IL-15E53PEG30)的响应单位(RU,Y轴)与时间(s,X轴)的关系。结合动力学分析证实了位置E53处的位点特异性聚乙二醇化降低与IL-15R α 的结合,同时保留与IL-2R β 的天然相互作用。

实施例4

[0332] 原代人白细胞减少系统(LRS)来源的PBMC样品中IL-15PEG缀合物的离体免疫应答谱分析

[0333] 为了确定IL-15PEG缀合物的差异受体特异性如何影响原代免疫细胞亚群的激活,使用多色流式细胞术进行了人LRS来源的外周血单核细胞(PBMC)样品中淋巴细胞激活的浓度-响应谱分析。这些研究是在PrimityBio LLC(加利福尼亚州费利蒙)进行的。用rHuIL-15或不同的IL-15聚乙二醇化化合物以5倍稀释系列处理新鲜的LRS来源的样品,以30 μ g/mL的最高浓度开始。将经处理的细胞群体在37 $^{\circ}$ C下孵育45分钟,然后添加BD Lyse/Fix缓冲液并用表11所示的荧光抗体组染色。使用多色流式细胞术检测和定量不同T细胞和NK细胞亚组中的pSTAT5激活。针对不同T和NK细胞亚组在浓度-响应模式下的激活,分析了流式细胞术数据,读取用rHuIL-15或IL-15聚乙二醇化化合物处理后的pSTAT5积累。

表11.LRS来源的PBMC样品的流式细胞术研究的染色组

组	人
Pan-T	CD3
CD4	CD4
CD8	CD8
NK标记物	CD7
Treg	FoxP3
Treg	CD25(或CD127)
CD45RA	CD45RA
C62L	C62L
CD14/CD19	CD14/CD19
磷	STAT5(pY694)

[0334] 在NK和效应T细胞(CD3+CD8+)群体中,IL-15N77PEG30和IL-15S83PEG30相对于rHuIL-15保留了效力,其中对于pSTAT5产生的EC₅₀值在天然细胞因子的2倍内。相比之下,与rHuIL-15相比,CD8+T和NK细胞群体中对于IL-15L25PEG30的pSTAT5诱导的EC₅₀值分别降低了约14倍和约18倍。对于IL-15L25PEG30的EC₅₀的大量增加指示,此位置处IL-15的聚乙二醇

化降低了IL-15受体的激动作用。与rHuIL-15相比,CD8+T和NK细胞群体中对于IL-15E53PEG30的pSTAT5诱导的EC₅₀值仅降低了约2倍。考虑到此化合物显示出对IL-15R α 的快速缔合和快速解离结合动力学。

[0335] 表12显示了用rHuIL-15或IL-15缀合物处理的人LRS样品中STAT5信号传导的剂量响应(EC₅₀)。

化合物	CD8+ T细胞 EC50 (ng/ml)	NK细胞 EC50 (ng/ml)	CD4+ T细胞 EC50 (ng/ml)	Treg EC50 (ng/ml)
rHuIL-15	63.6	88.3	73.7	34.7
IL-15 S83PEG30	59.4	137.8	83.3	19.2

化合物	CD8+ T细胞 EC50 (ng/ml)	NK细胞 EC50 (ng/ml)	CD4+ T细胞 EC50 (ng/ml)	Treg EC50 (ng/ml)
IL-15 N77PEG30	74.0	156.2	95.6	18.2
IL-15 V49PEG30	100.9	180.2	135.1	32.6
IL-15 V49PEG40b	205.8	261.8	264.0	57.4
IL-15 E53PEG30	117.3	82.4	186.8	37.1
IL-15 L25PEG30	896.1	1,654	1,232.1	267.3

[0336] 图12A-图12D示出了用示例性IL-15PEG缀合物刺激后NK和CD8+T细胞上的STAT5磷酸化。

实施例5

[0337] 示例性IL-15缀合物的体内药理学研究

[0338] 幼稚 (E3826-U1821) C57BL/6小鼠中的PK研究

[0339] 将小鼠用0.3mg/Kg的rHuIL-15和IL-15缀合物S83-PEG 30kDa、V49-PEG 30kDa、L25-PEG 30kDa或N77-PEG 30kDa给药。在以下时间点抽血:0.25、0.5、2、8、24、48、72、96、120、144和192小时。

[0340] 表13显示了实验设置。每只小鼠接受单一IV剂量的媒介物、rHuIL-15或三种IL-15缀合物中的一种。

组	治疗	剂量 (mg/Kg)
1	媒介物	0
2	rHuIL-15	0.3
3	L25 PEG30	0.3
4	N77 PEG30	0.3
5	V49 PEG30	0.3
6	S83 PEG30	0.3

[0341] 使用ELISA测定确定源自血浆的样品中rHuIL-15、IL-15聚乙二醇化化合物和内标物的浓度。在NW Solutions (华盛顿州西雅图) 进行了PK数据分析。将PK数据导入Phoenix WinNonlin v6.4 (Certara/Pharsight, 新泽西州普林斯顿) 进行分析。使用IV推注给予模型用3室法分析了组平均血浆浓度与时间的数据。

[0342] 表14显示了相对于rHuIL-15, IL-15缀合物在小鼠中延长的半衰期。

剂量 (mg/kg)	参数	单位	第2组	第3组	第4组	第5组	第6组
			rHuIL-15	L25PEG	N77PEG	V49PEG	S83PEG
			估计值				
0.3	$\alpha_{1/2}$	hr	0.305	2.89	0.0349	0.242	0.381
	$\beta_{1/2}$	hr	1.08	15.8	13.1	7.77	11.4
	$\gamma_{1/2}$	hr	32.1	167	58.4	19.8	71.6
	MRT	hr	3.81	21.2	20.5	20.6	18.7
	CL ₁	mL/hr/kg	1590	6.16	5.17	4.69	9.13
	CL ₂	mL/hr/kg	333	5.68	56.4	52.4	65.4
	CL ₃	mL/hr/kg	108	0.0317	0.157	1.03	0.213
	V ₁	mL/kg	978	82.3	3.20	32.8	79.0
	V ₂	mL/kg	397	40.7	89.8	44.9	70.1
	V ₃	mL/kg	4680	7.59	12.8	19.1	21.4
	V _{SS}	mL/kg	6050	131	106	96.8	170
	C _{max}	ng/mL	307	3650	93700	9140	3800
	AUC	hr*ng/mL	189	48700	58100	64000	32900

[0343] 图13显示了0.3mg/kg的rHuIL-15、IL-15 S83PEG30、IL-15 V49PEG30、IL-15 N77PEG30和IL-15 L25 PEG30的血浆浓度曲线。

[0344] 如所预期的那样, 聚乙二醇化化合物相对于rHuIL-15展现出优异的PK曲线, 如表14所总结。MRT (平均停留时间) 代表测试物品分子在体内停留的平均时间, 并考虑在整个PK曲线内。与rHuIL-15相比, 聚乙二醇化化合物显示出MRT增加约5倍。与rHuIL-15相比, IL-15S18PEG30展现出 $\beta_{1/2}$ 延长了约15倍 (15.8h相对于1.08h), 并且CL₂降低了约59倍 (5.68相对于333mL/h/Kg)。相对于rHuIL-15, 聚乙二醇化化合物的分布体积减少了, 这表明聚乙二醇化化合物主要分布在体循环内。

实施例6

[0345] 外周血隔室中的药效学观察

[0346] 幼稚 (E3826-U1821) C57BL/6小鼠中的PD研究

[0347] 将小鼠用0.1、0.3或1mg/Kg的rHuIL-15、IL-15缀合物S18-PEG 30kDa、IL-15缀合物V49-PEG 30kDa或IL-15缀合物S83-PEG 30kDa (表10) 给药。在以下时间点抽血: 0.25、0.5、2、8、24、48、72、96、120、144和192小时。鉴于已知的短半衰期, rHuIL-15还包括另外的

0.13个时间点。PD读数包括细胞内pSTAT5监测以及所有时间点的CD8+T细胞的表型分型。
[0348] 表15显示了实验设置。每只小鼠接受单一IV剂量的媒介物、rHuIL-15或三种IL-15缀合物中的一种。

组	治疗	剂量 (mg/Kg)
1	媒介物	0
2	rHuIL-15	0.3
3	S18 PEG30	0.1
4	S18 PEG30	0.3
5	V49 PEG30	0.1
6	V49 PEG30	0.3
7	L25 PEG30	0.3
8	L25 PEG30	1.0

[0349] 将STAT5磷酸化和细胞增殖的诱导(早期分子标记物Ki-67和细胞计数)用作药效学读数,以评估IL-15 S18PEG30、IL-15 V49PEG30和IL-15 L25 PEG30的药理学曲线。虽然在用聚乙二醇化化合物给药的小鼠中观察到pSTAT5较低或类似的升高,但STAT5磷酸化转化为NK细胞和CD8+效应以及记忆T细胞(而非Treg细胞)更高的增殖和持续性(给药后1至7天)。(图14-图17)。

[0350] 图14A-图14D显示了不同外周血细胞群体中的%pSTAT5。

[0351] 图15A-图15D显示在用聚乙二醇化化合物给药的动物中,早期增殖分子标记物Ki67在CD8+T、CD8+Tmem和NK细胞中的表达增加,但在Treg细胞中并非如此。

[0352] 图16A-图16C显示了在用聚乙二醇化化合物给药的动物中强健的外周CD8+T、CD8+Tmem和NK细胞,但Treg细胞并非如此。

[0353] 图17A-图17B显示了在小鼠中随着IL-15L25PEG30化合物剂量的增加,CD8+T和NK细胞中的Ki67表达增加。

[0354] 虽然本文已显示并描述本公开文本的优选实施方案,但对于本领域技术人员将显而易见,此类实施方案仅以举例方式来提供。在不背离本公开文本的情况下,本领域技术人员现将想到多种修改、改变和取代。应理解,在本公开文本的实践中可以采用本文所述本公开文本的实施方案的多种备选方案。以下权利要求旨在界定本公开文本的范围,并且由此涵盖这些权利要求和其等效内容的范围内的方法和结构。

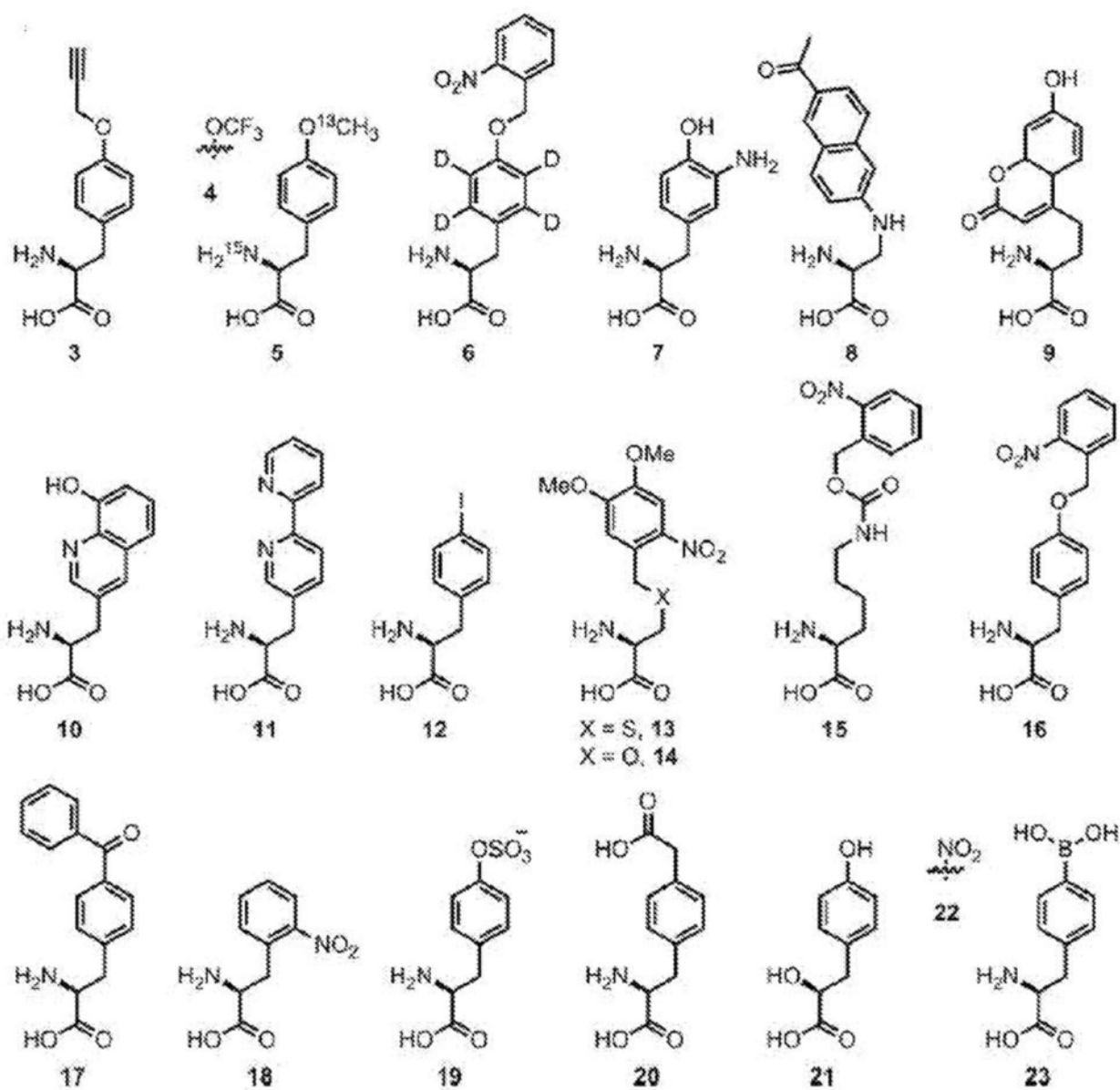


图1

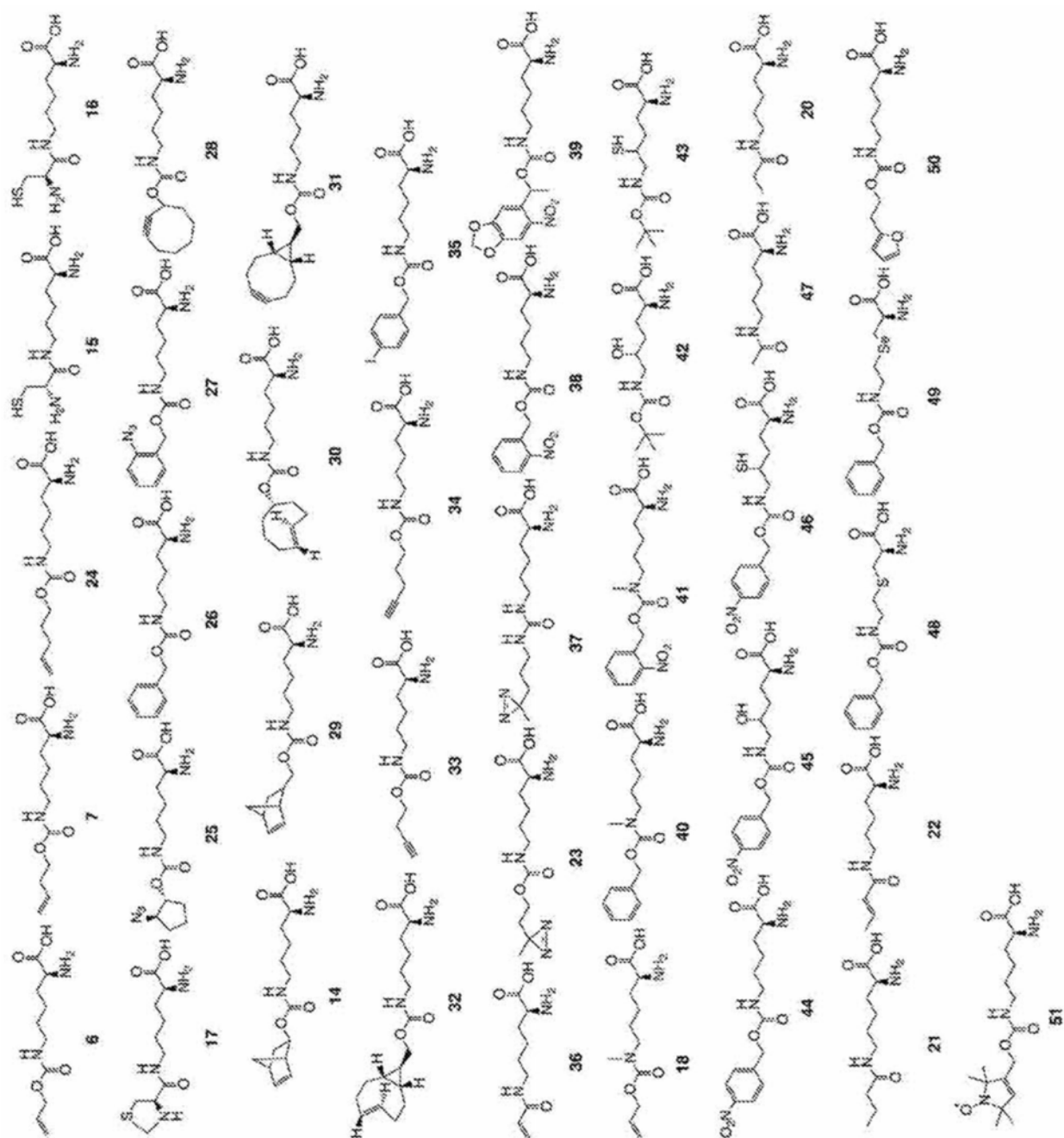


图2A

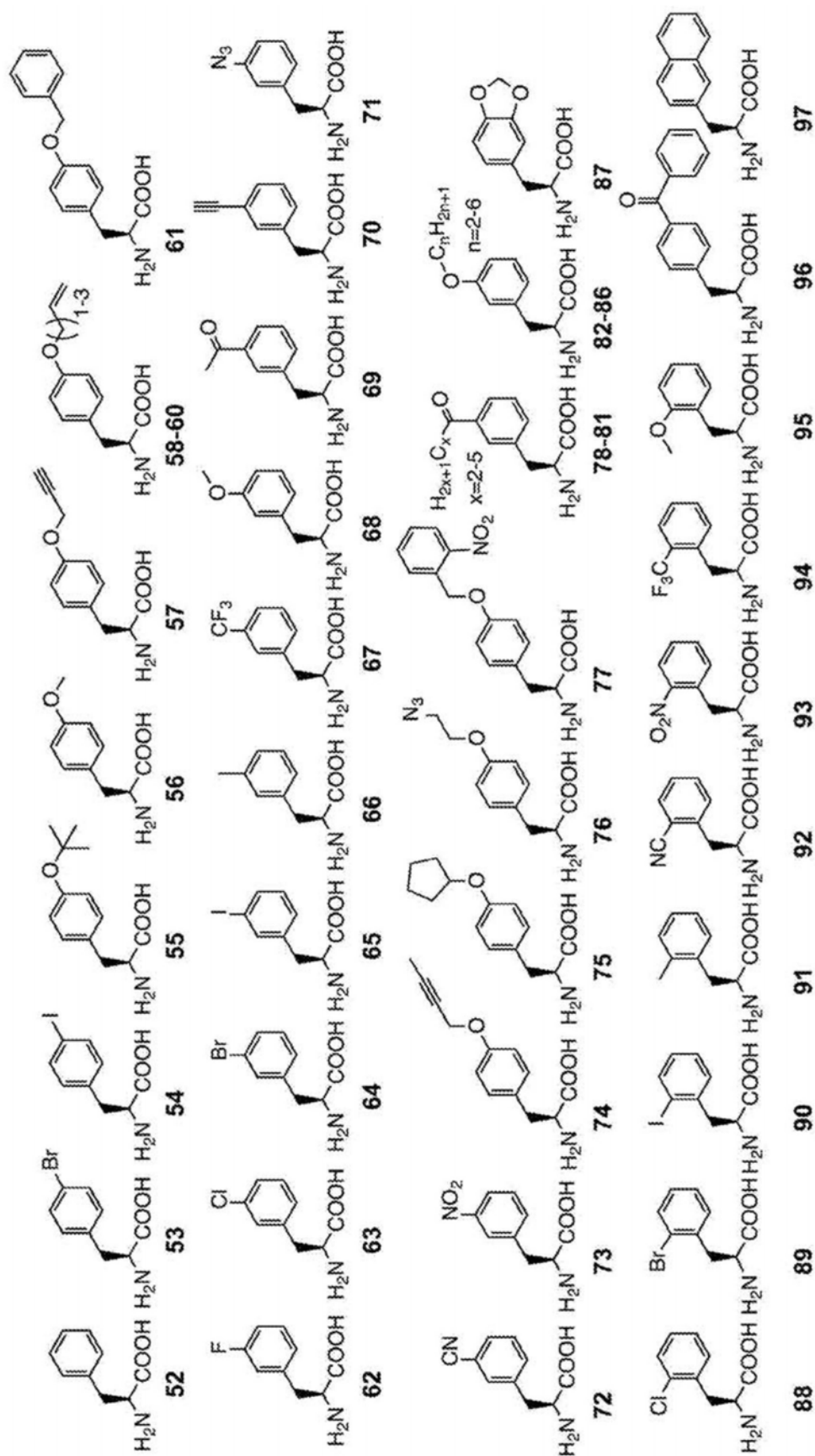


图2B

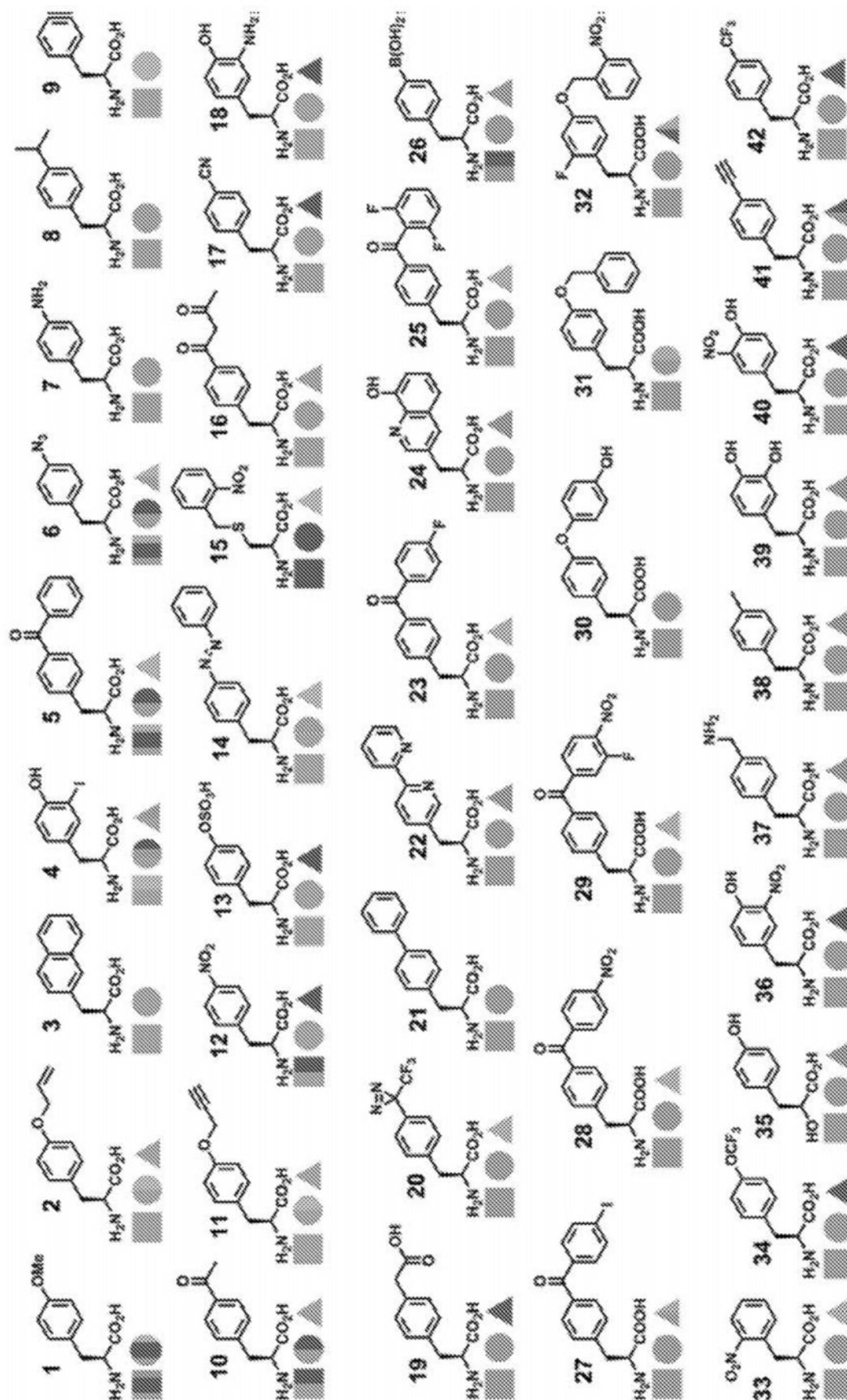


图3A

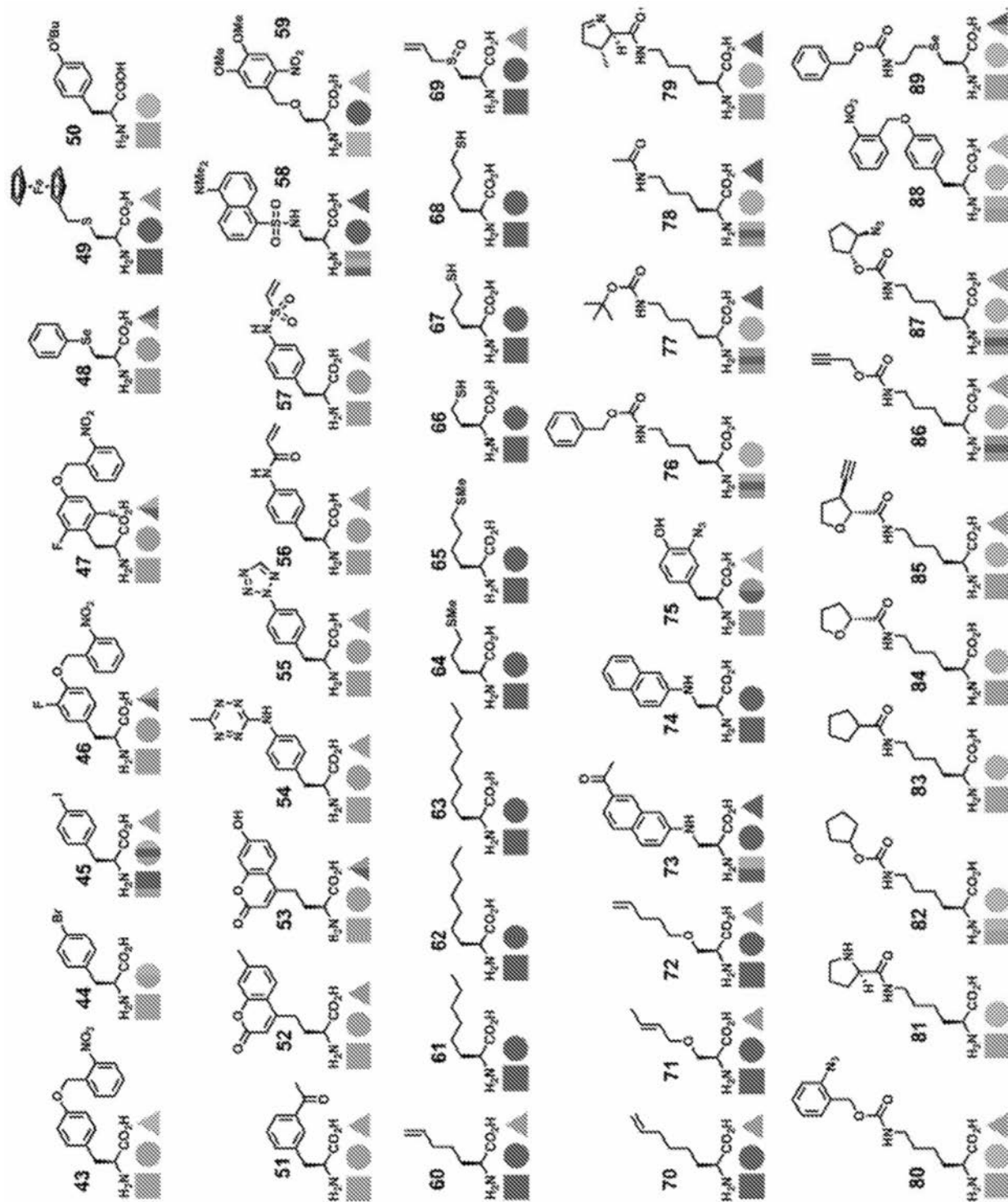


图3B

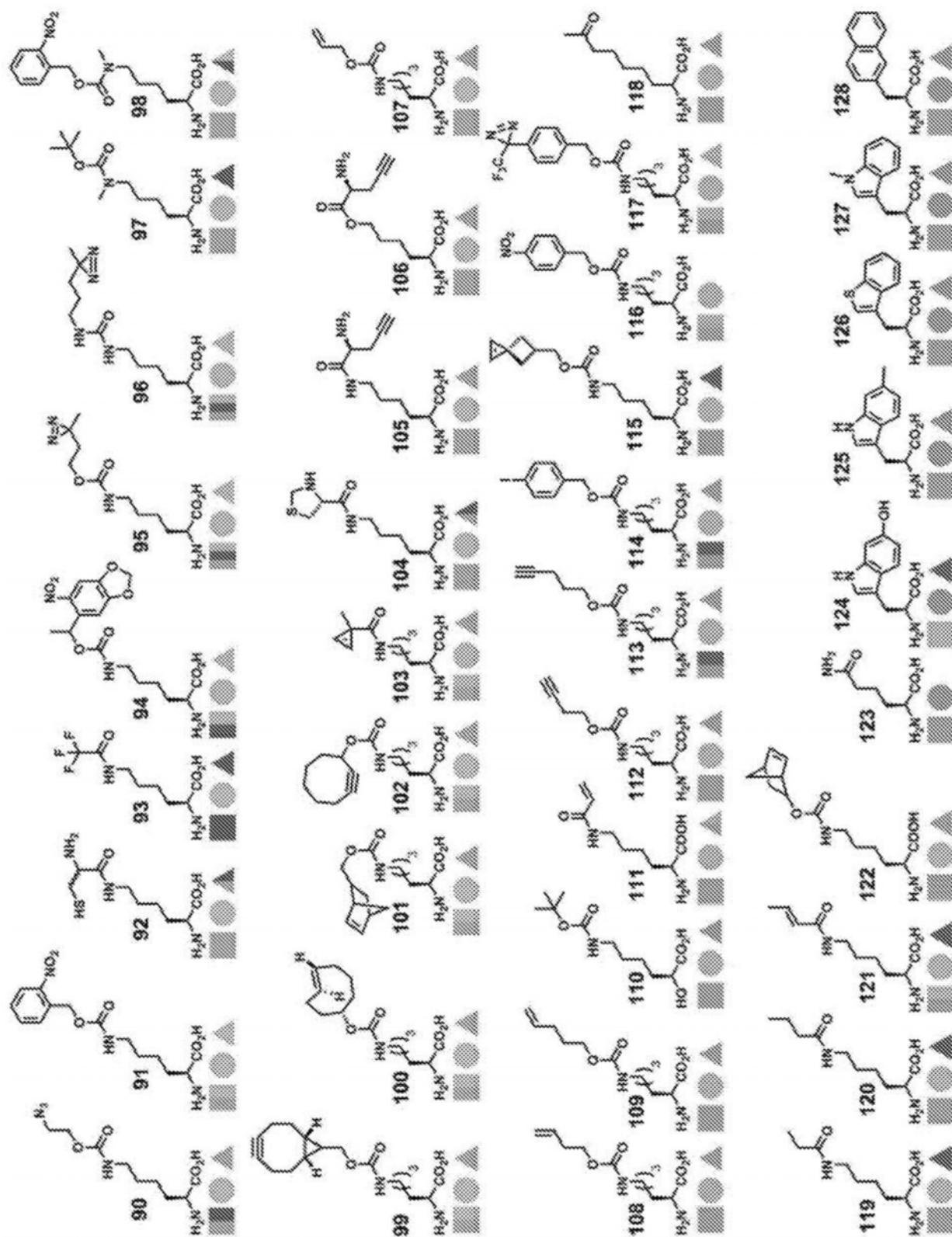


图3C

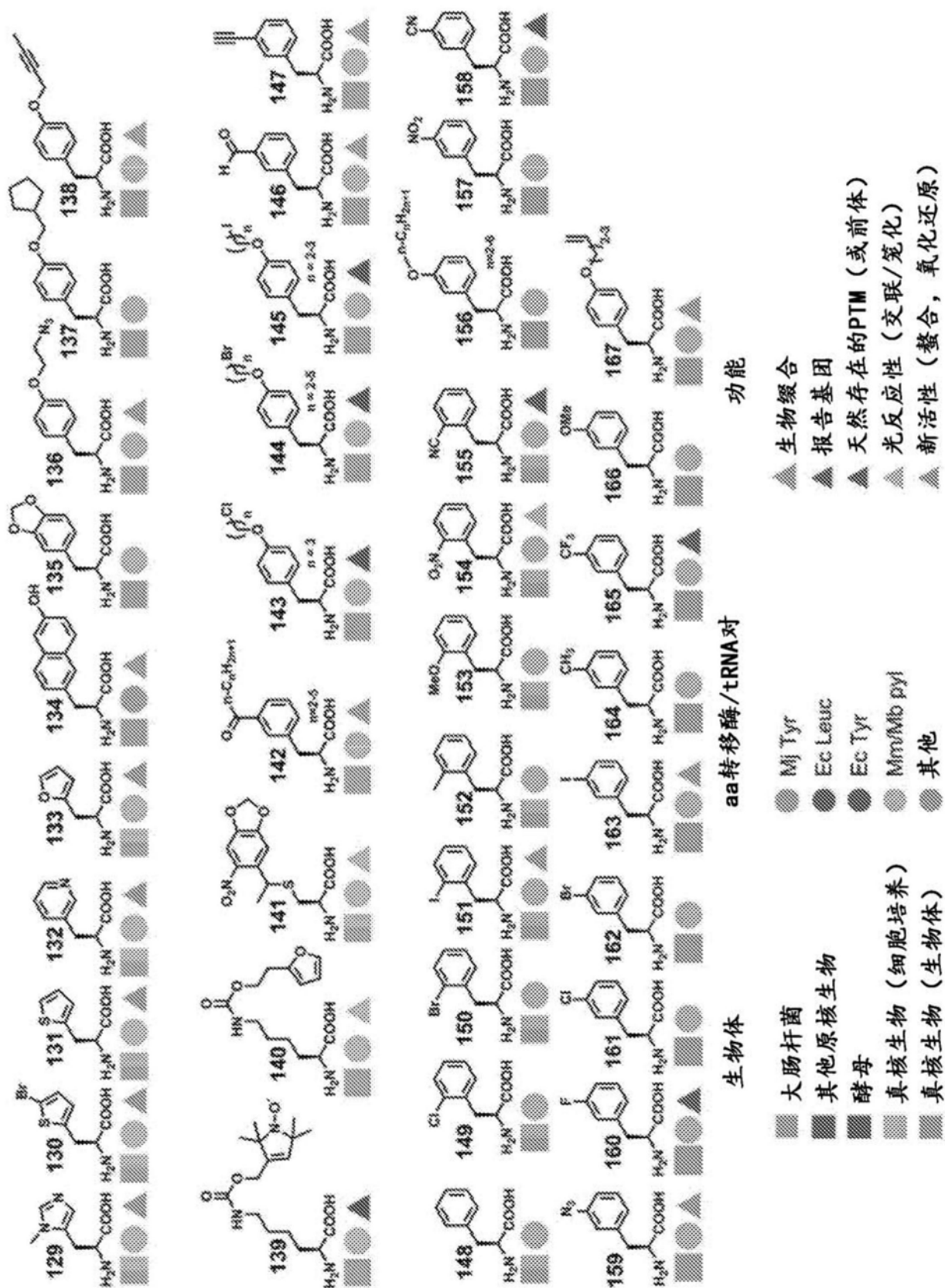


图3D

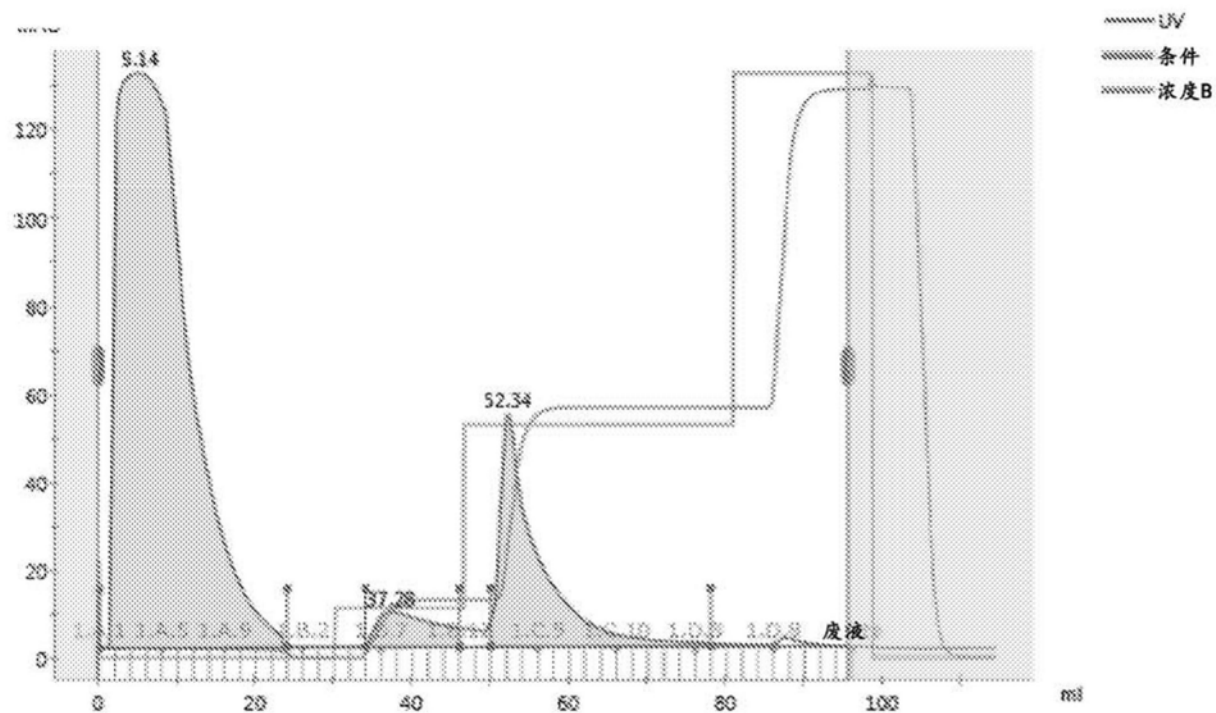


图4

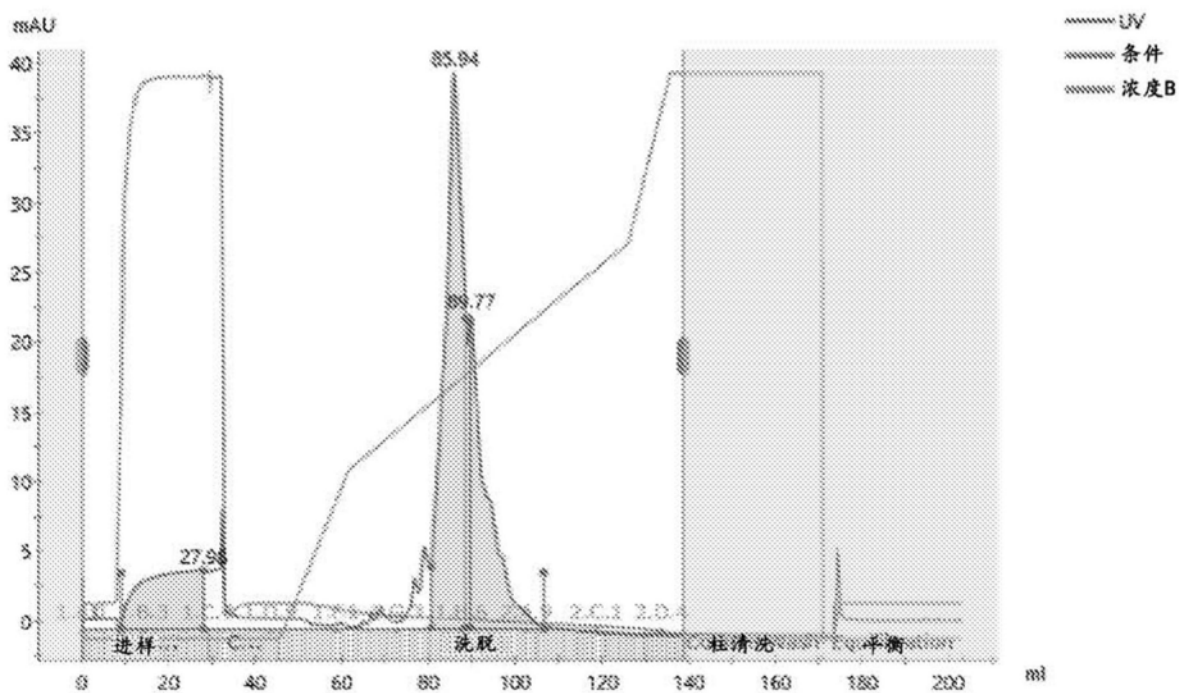


图5

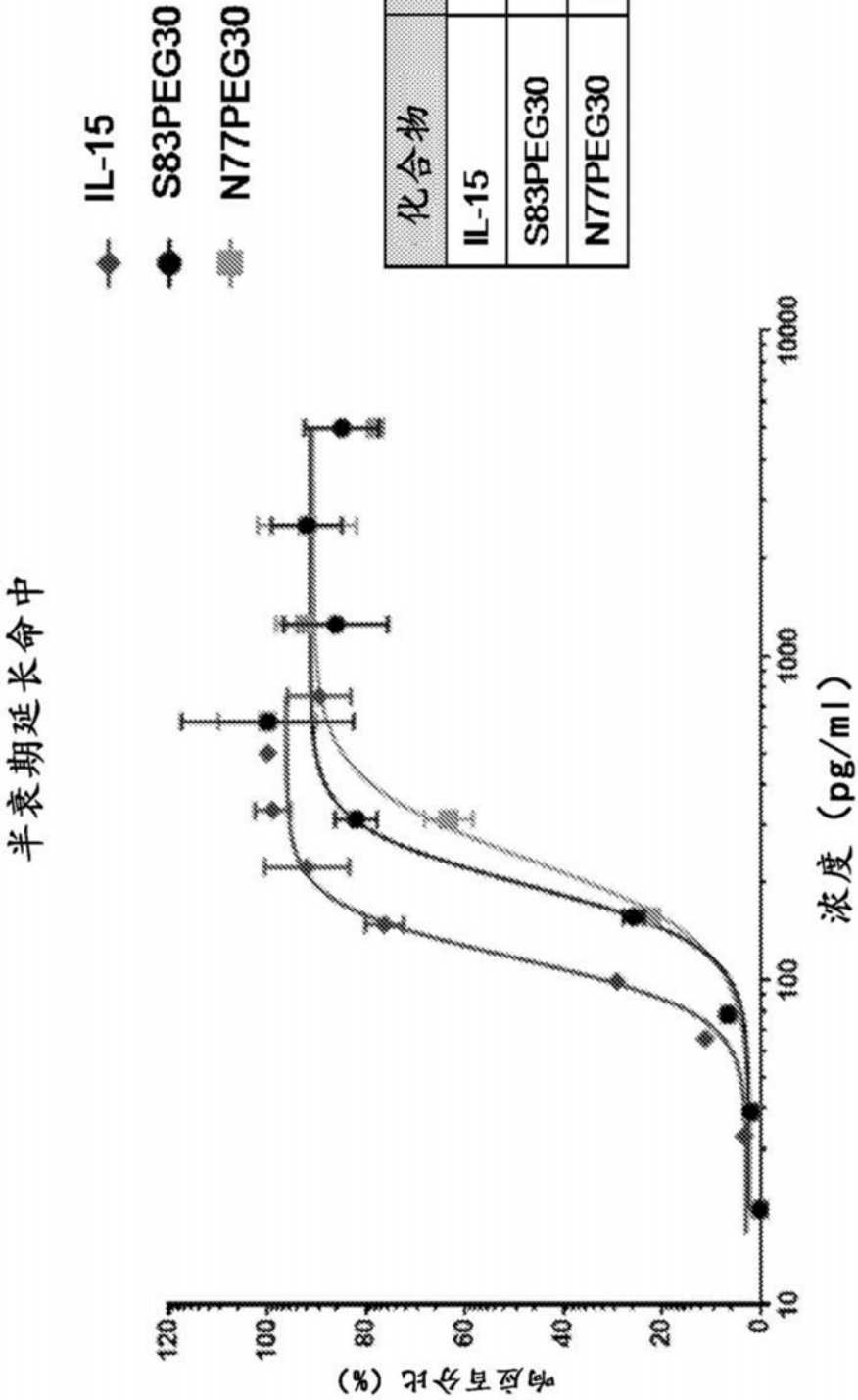
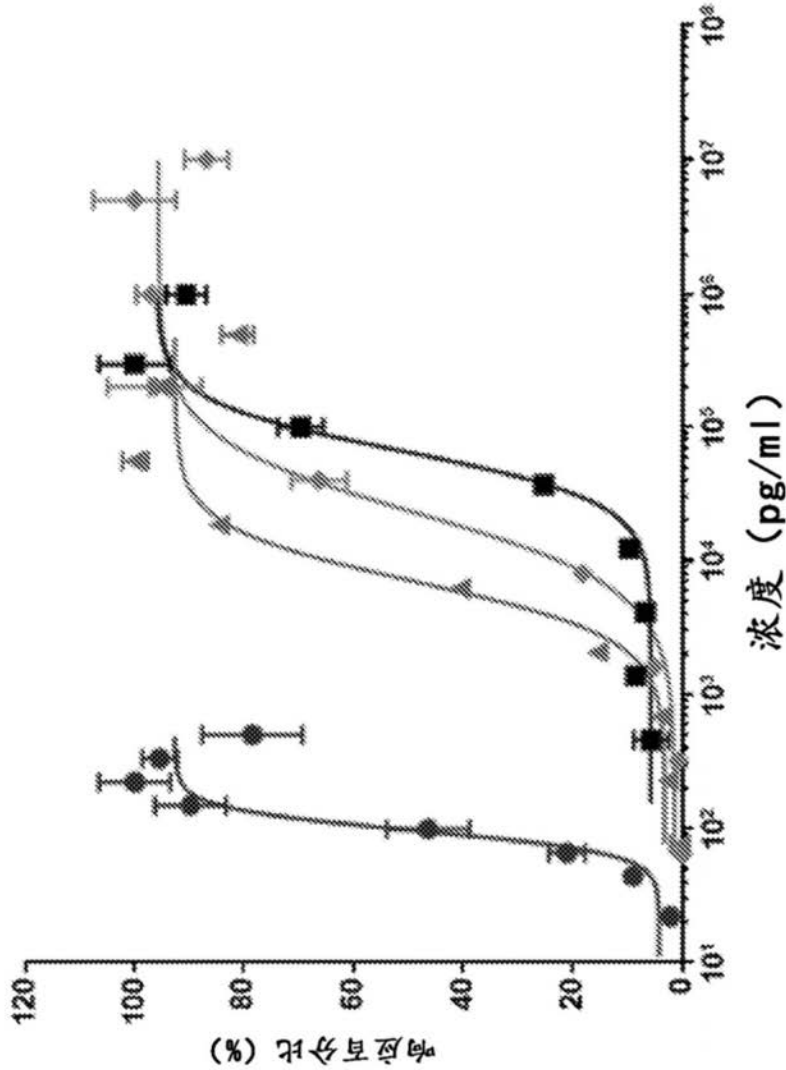


图6

“非α”命中



- IL-15
- L25PEG30
- E46PEG30
- E53PEG30

化合物	EC50 (pg/mL)
IL-15	96.13
L25PEG30	6,845
E46PEG30	65,893
E53PEG30	22,766

图7

使用不同大小的不同PEG的生物缀合

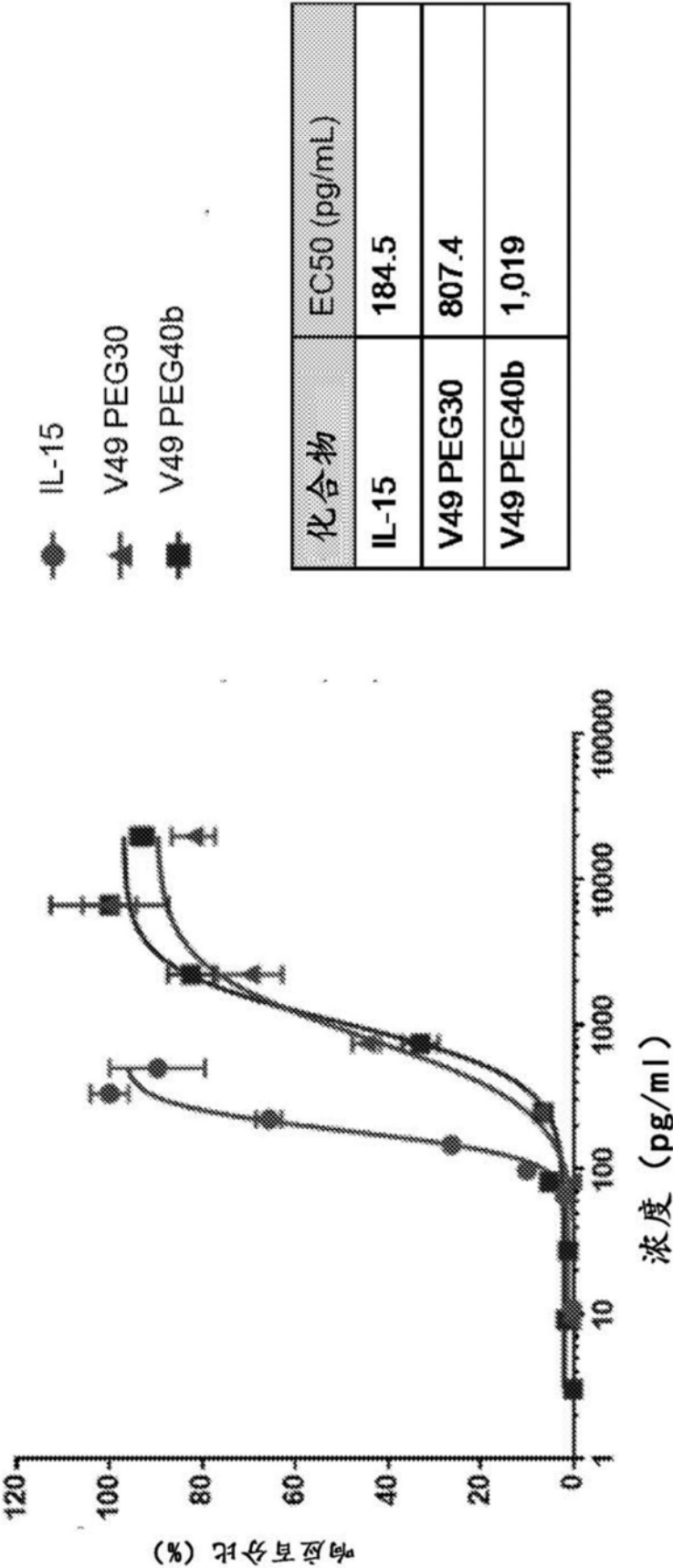


图8

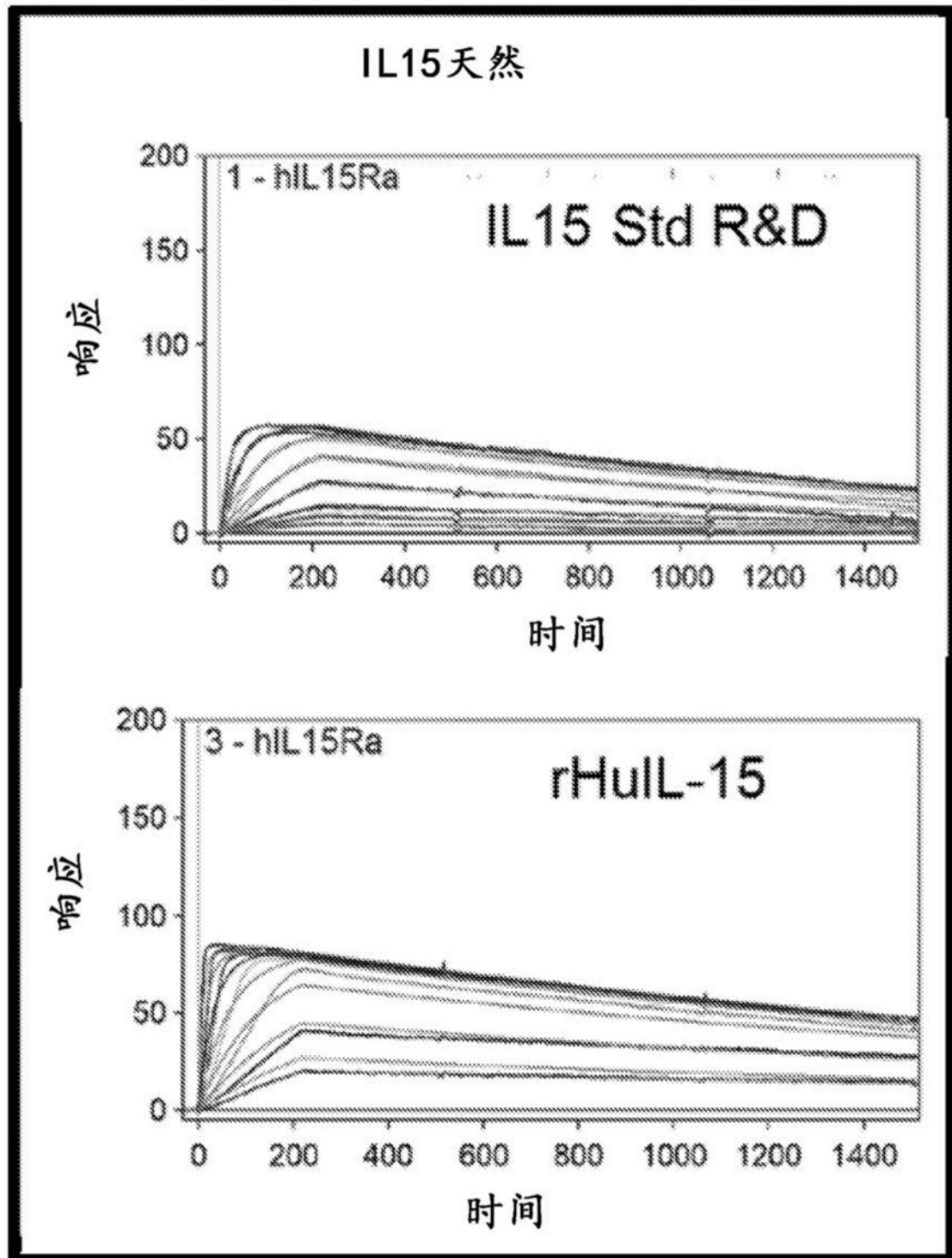


图9A

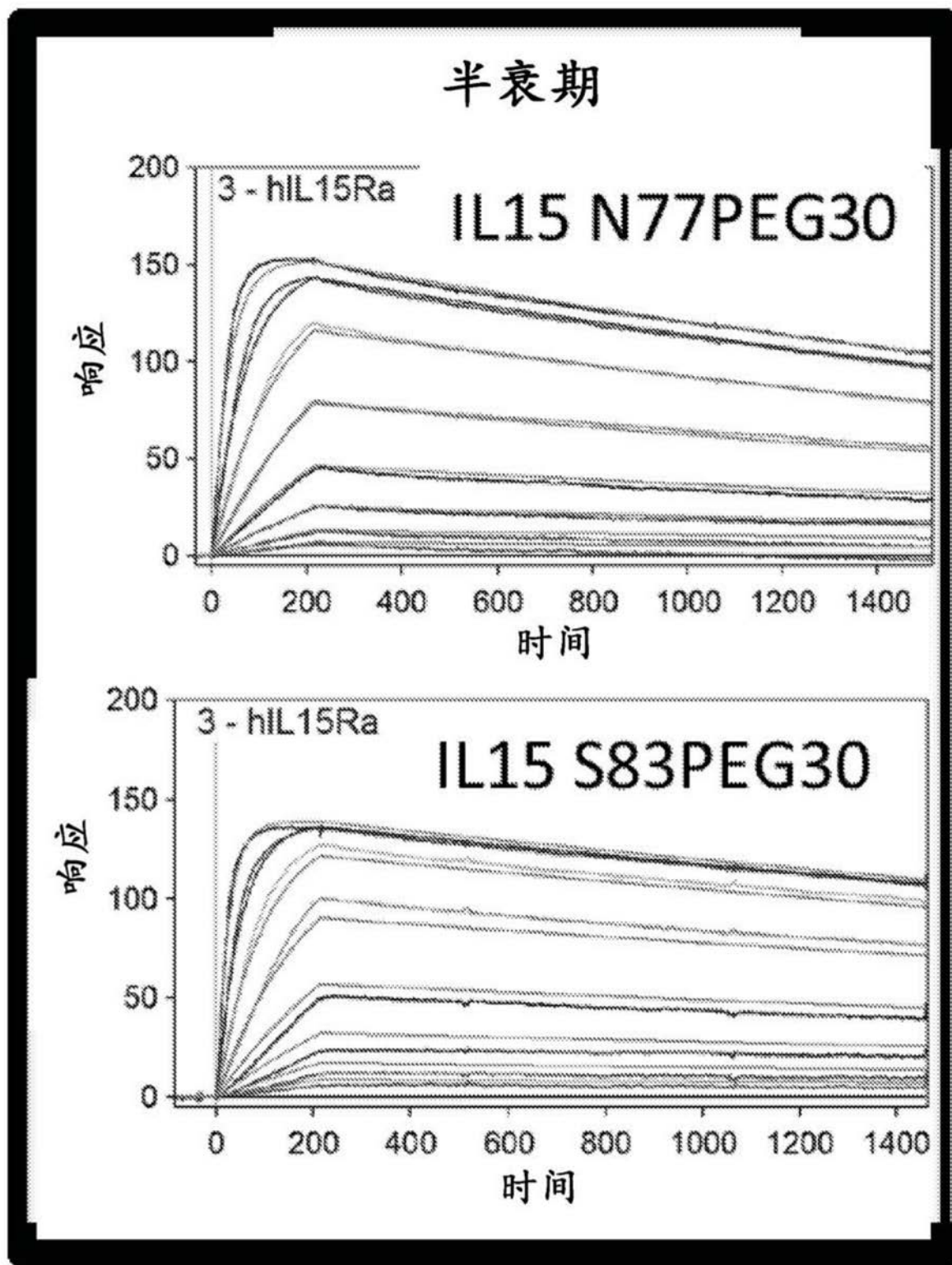


图9B

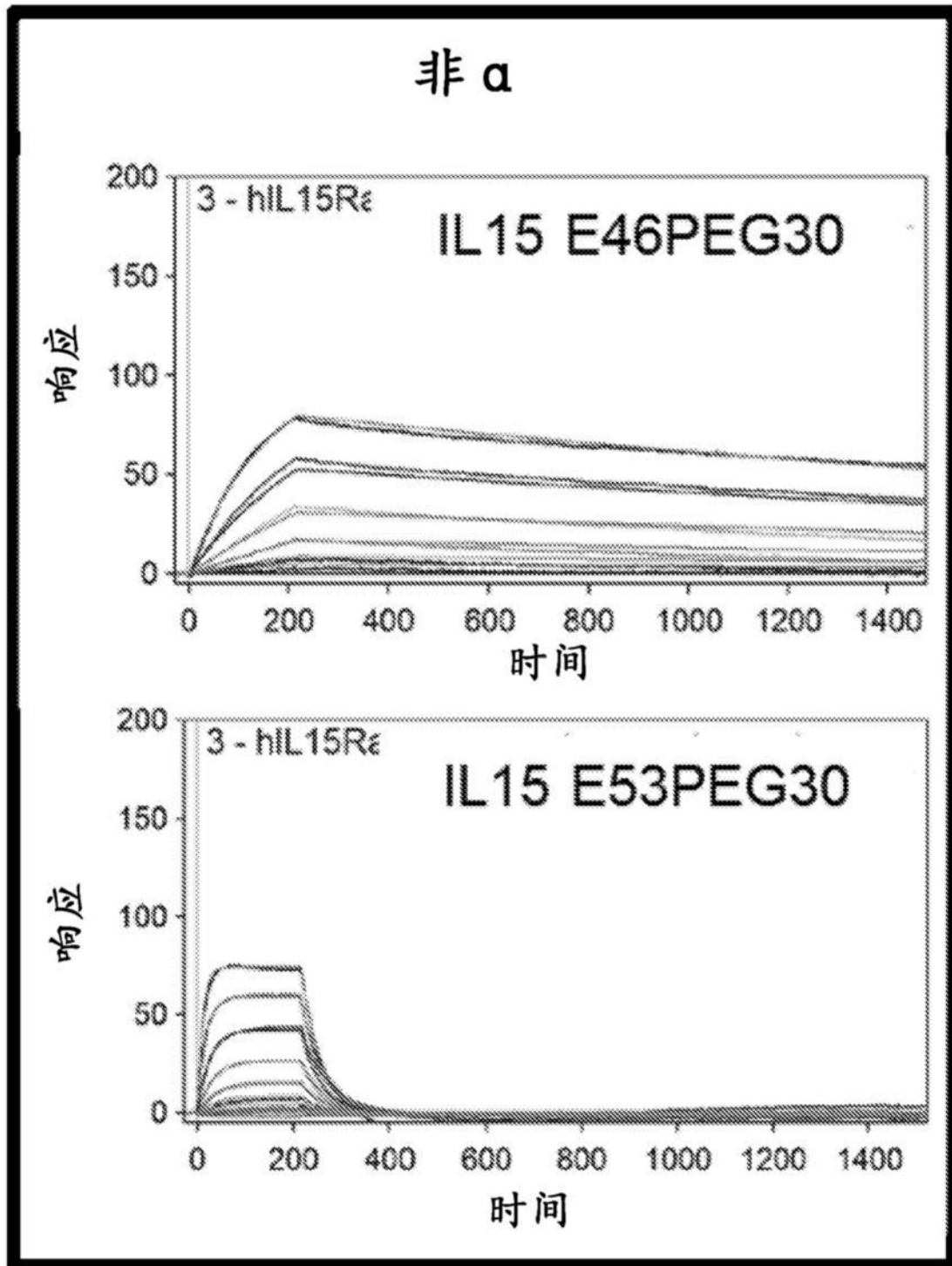


图9C

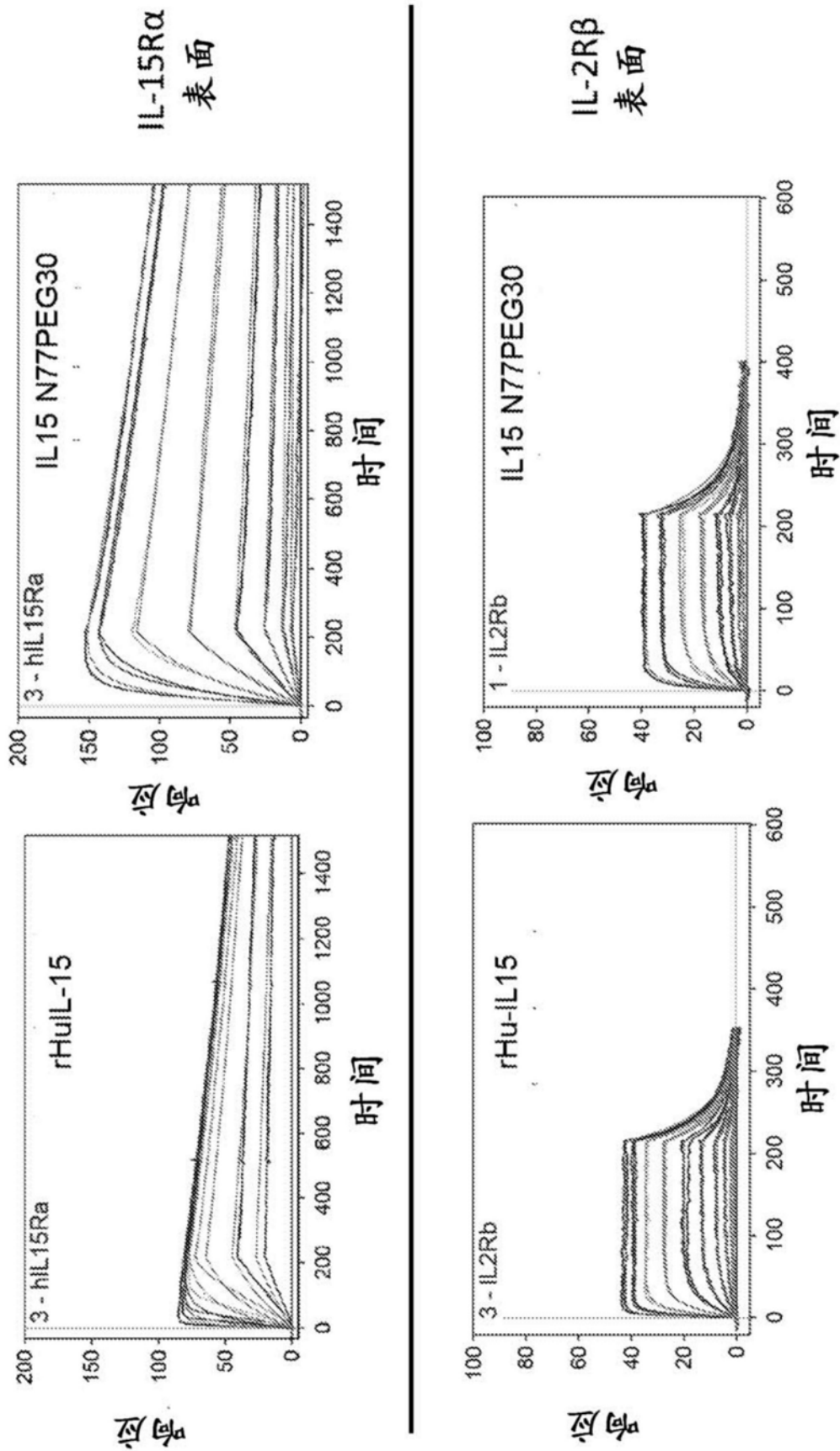


图10

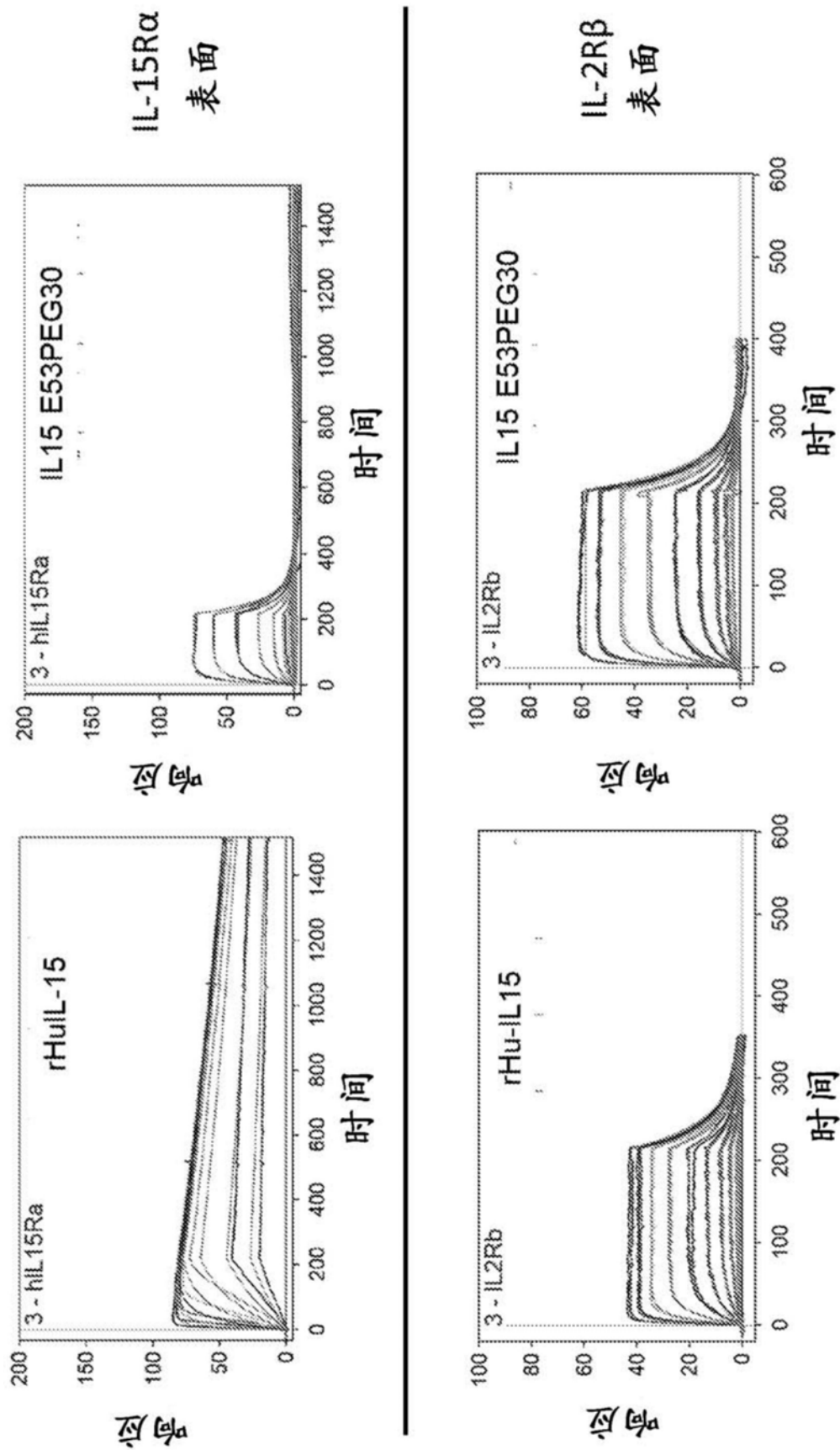
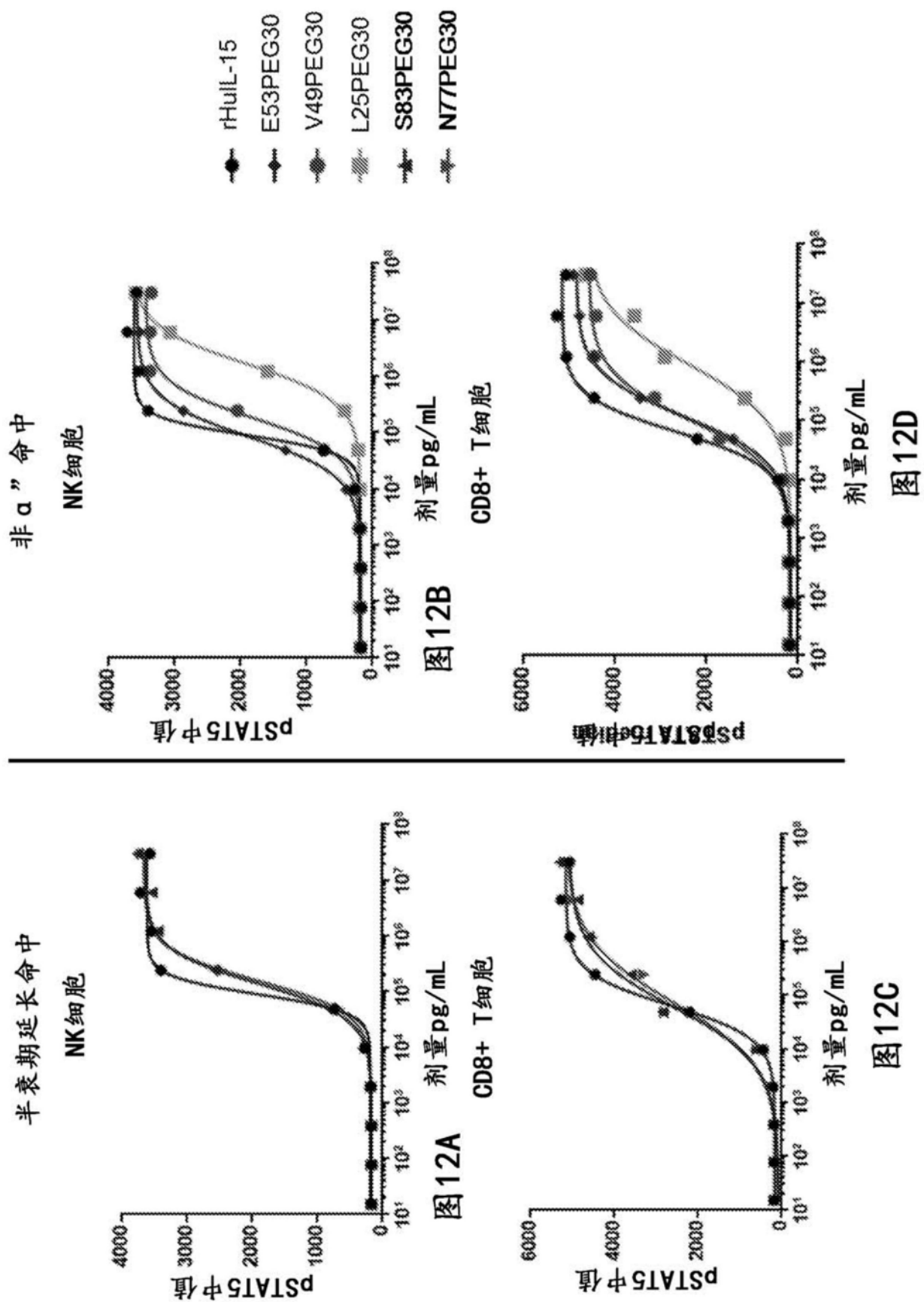


图11



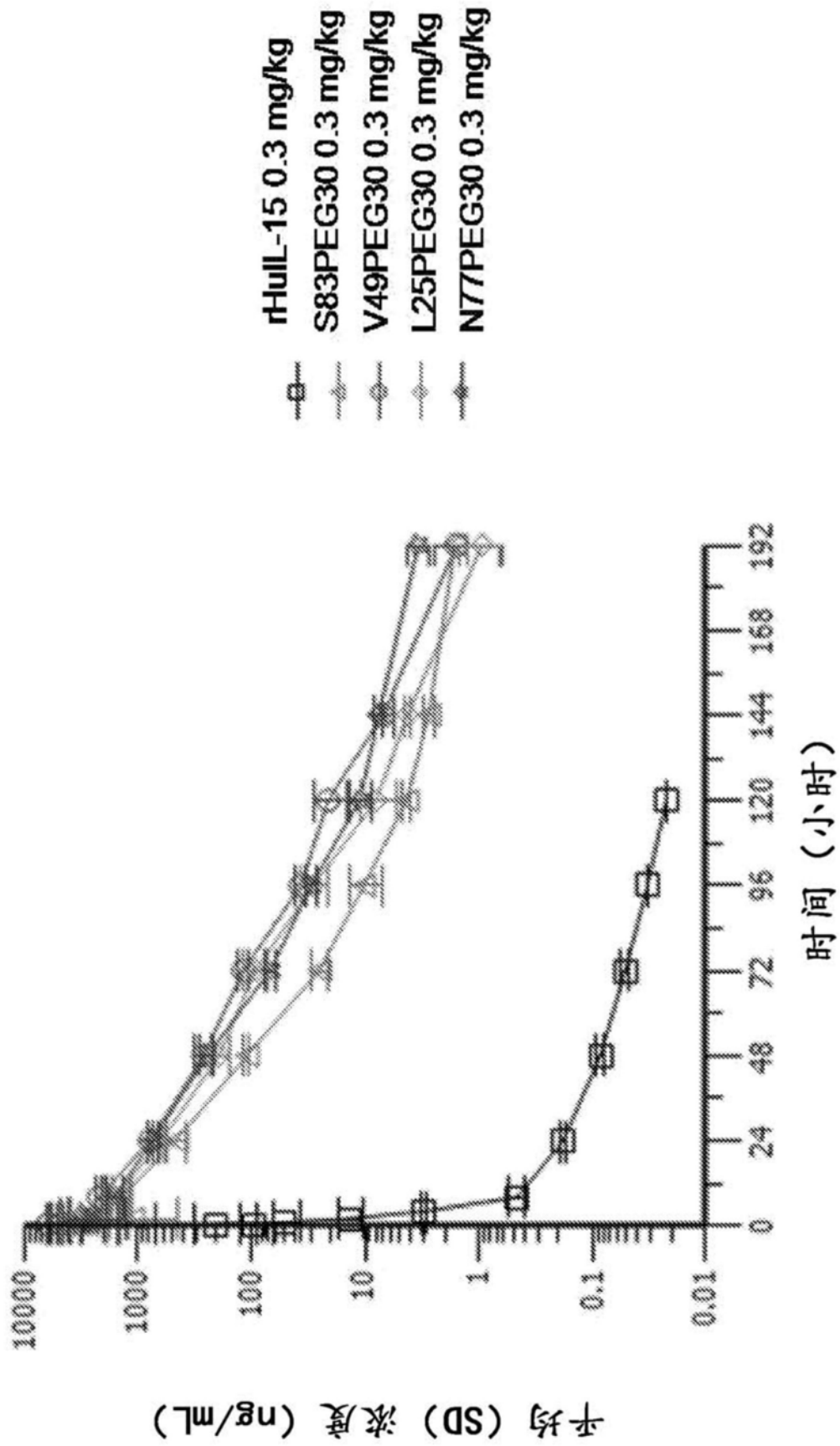


图13

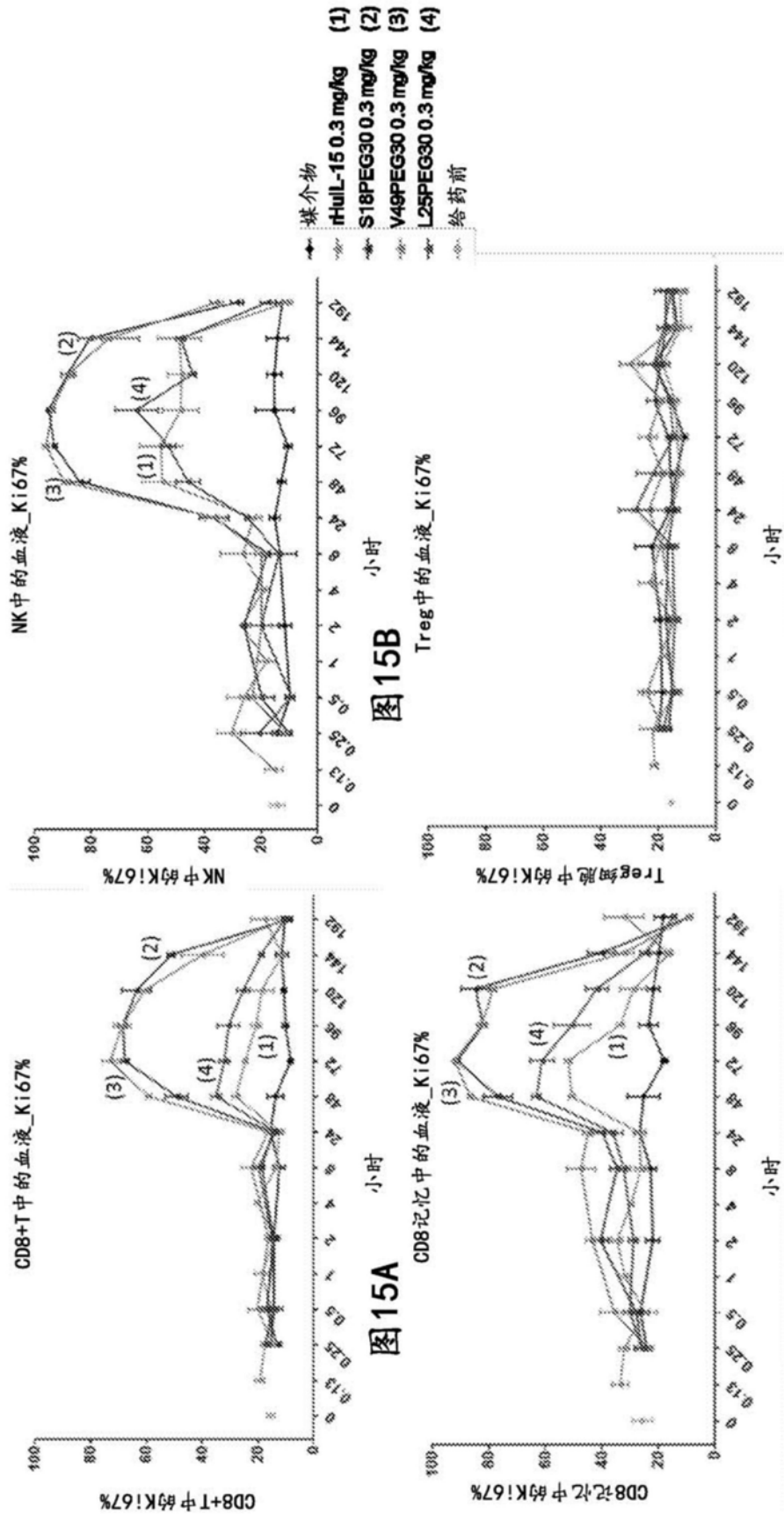


图15C

图15D

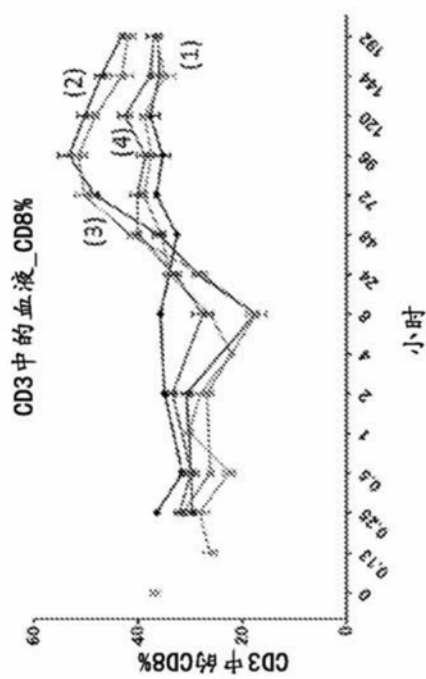
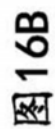
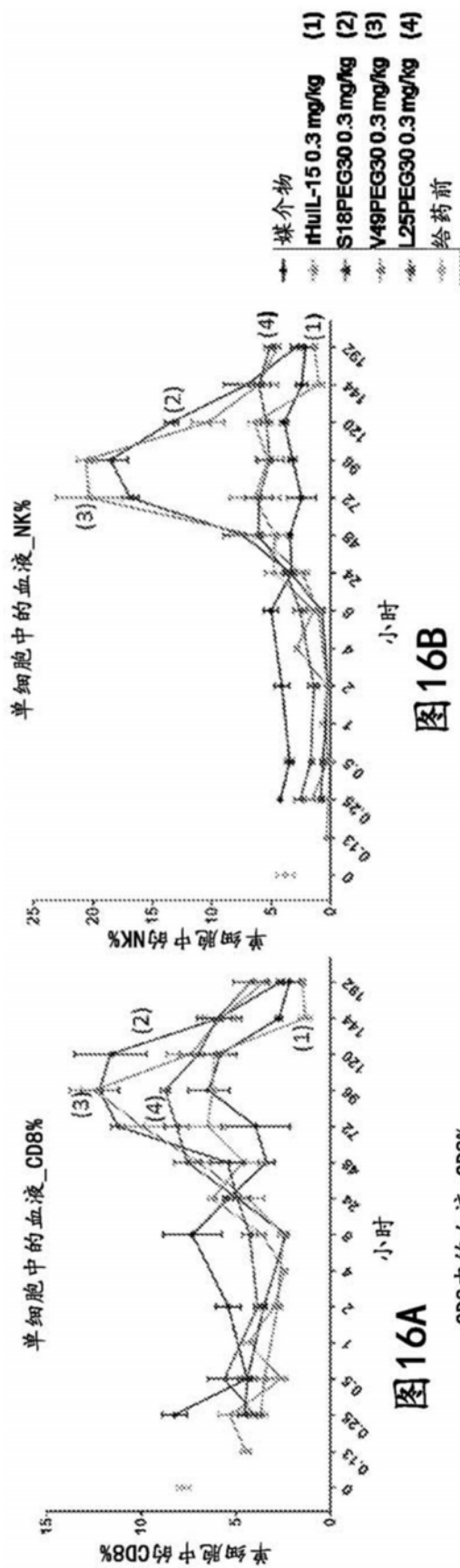


图16C

