



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110167957 A

(43)申请公布日 2019.08.23

(21)申请号 201780068887.X

(22)申请日 2017.11.08

(30)优先权数据

62/419,118 2016.11.08 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.05.07

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/060534 2017.11.08

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/089420 EN 2018.05.17

(71)申请人 德里尼亚公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 J·格雷沃

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 徐志明

(51)Int.Cl.

C07K 14/55(2006.01)

C12N 5/0783(2006.01)

A61K 38/00(2006.01)

权利要求书3页 说明书36页

序列表10页 附图27页

(54)发明名称

用于治疗自身免疫疾病的IL-2变体

(57)摘要

本公开提供了用于通过向需要的受试者施用治疗有效量的包含IL-2受体结合部分的化合物来治疗病症的方法。本公开中描述的方法提供了增强的药代动力学特性。本公开还提供用于治疗自身免疫疾病的方法,包括施用治疗有效量的包含IL-2变体蛋白的融合蛋白。

1. 一种用于治疗自身免疫疾病的方法,该方法包括向需要的受试者施用至少两个剂量的包含治疗有效量的融合蛋白的药物组合物,该融合蛋白包含:

a. 人IL-2变体蛋白结构域,其相对于SEQ ID NO:2的氨基酸序列包含选自D20H、N88I、N88G、N88R、Q126L和Q126F的置换;

b. 肽接头结构域;和

c. IgG Fc蛋白结构域,

其中每个结构域具有氨基末端(N-末端)和羧基末端(C-末端);且其中所述融合蛋白配置为使得所述人IL-2变体蛋白结构域的C-末端通过肽键与所述肽接头结构域的N-末端融合,且所述IgG Fc蛋白结构域的N-末端通过肽键与所述肽接头结构域的C-末端融合,

其中所述组合物以每周一次至每月一次的给药频率施用于所述受试者。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述药物组合物施用于所述受试者提高调节性T细胞(Treg)与传统T细胞(Tconv)的比率至至少0.2。

3. 如权利要求2所述的方法,其中在所述药物组合物施用于所述受试者后五天,所述Treg/Tconv比率是至少0.2。

4. 一种用于在需要的受试者中提高调节性T细胞的增殖和/或活性的方法,该方法包括向所述受试者施用至少两个剂量的包含治疗有效量的融合蛋白的药物组合物,该融合蛋白包含:

a. 人IL-2变体蛋白结构域,其相对于SEQ ID NO:2的氨基酸序列包含选自D20H、N88I、N88G、N88R、Q126L和Q126F的置换;

b. 肽接头结构域;和

c. IgG Fc蛋白结构域,

其中每个结构域具有氨基末端(N-末端)和羧基末端(C-末端);且其中所述融合蛋白配置为使得所述人IL-2变体蛋白结构域的C-末端通过肽键与所述肽接头结构域的N-末端融合,且所述IgG Fc蛋白结构域的N-末端通过肽键与所述肽接头结构域的C-末端融合,

其中所述组合物以每周一次至每月一次的给药频率施用于所述受试者。

5. 如权利要求4所述的方法,其中所述药物组合物施用于所述受试者相对于包含等摩尔量的阿地白介素的组合物导致调节性T细胞的增殖和/或活性更大的提高。

6. 如权利要求4所述的方法,其中所述药物组合物施用于所述受试者相对于用所述药物组合物治疗前所述受试者的调节性T细胞水平提高调节性T细胞的水平至少2-倍。

7. 如权利要求4所述的方法,其中所述药物组合物施用于所述受试者不增加传统T细胞或CD8⁺T细胞的增殖。

8. 如权利要求4所述的方法,其中所述药物组合物施用于所述受试者提高所述调节性T细胞中选自CD25、FOXP3、CTLA-4、ICOS和CD39的生物标志物的水平。

9. 一种用于在需要治疗自身免疫疾病的受试者中维持调节性T细胞(Treg)与传统T细胞(Tconv)的比率在足以治疗所述自身免疫疾病的水平的方法,该方法包括向所述受试者施用至少两个剂量的包含治疗有效量的融合蛋白的药物组合物,该融合蛋白包含:

a. 人IL-2变体蛋白结构域,其相对于SEQ ID NO:2的氨基酸序列包含选自D20H、N88I、N88G、N88R、Q126L和Q126F的置换;

b. 肽接头结构域;和

c. IgG Fc蛋白结构域,

其中每个结构域具有氨基末端(N-末端)和羧基末端(C-末端);且其中所述融合蛋白配置为使得所述人IL-2变体蛋白结构域的C-末端通过肽键与所述肽接头结构域的N-末端融合,且所述IgG Fc蛋白结构域的N-末端通过肽键与所述肽接头结构域的C-末端融合,

其中所述组合物以每周一次至每月一次的给药频率施用于所述受试者。

10. 如权利要求9所述的方法,其中在所述药物组合物施用于所述受试者后五天,所述Treg/Tconv比率是至少0.2。

11. 一种用于治疗自身免疫疾病的方法,该方法包括:

(i) 向需要的受试者施用第一剂量的包含治疗有效量的融合蛋白的药物组合物,该融合蛋白包含:

a. 人IL-2变体蛋白结构域,其相对于SEQ ID NO:2的氨基酸序列包含选自D20H、N88I、N88G、N88R、Q126L和Q126F的置换;

b. 肽接头结构域;和

c. IgG Fc蛋白结构域,

其中每个结构域具有氨基末端(N-末端)和羧基末端(C-末端);且其中所述融合蛋白配置为使得所述人IL-2变体蛋白结构域的C-末端通过肽键与所述肽接头结构域的N-末端融合,且所述IgG Fc蛋白结构域的N-末端通过肽键与所述肽接头结构域的C-末端融合;

(ii) 测量在所述第一剂量施用于所述受试者后从所述受试者获得的样品中生物标志物的表达以测定所述生物标志物的峰值水平,其中所述生物标志物选自CD25、FOXP3、CTLA-4、ICOS和CD39;和

(iii) 当至少一种生物标志物的水平相对于所述生物标志物的峰值水平降低至少10%时,向所述受试者施用第二剂量的治疗有效量的所述药物组合物。

12. 如权利要求11所述的方法,其中所述生物标志物是CD25。

13. 如权利要求1-12任一项所述的方法,其中所述给药频率范围是每周一次至每两周一次。

14. 如权利要求1-13任一项所述的方法,其中所述药物组合物施用于所述受试者不引起所述受试者的腹泻。

15. 如权利要求1-14任一项所述的方法,其中所述人IL-2变体蛋白结构域相对于SEQ ID NO:2的氨基酸序列包含N88R置换。

16. 如权利要求1-15任一项所述的方法,其中所述人IL-2变体蛋白结构域相对于SEQ ID NO:2的氨基酸序列包含T3A置换。

17. 如权利要求1-16任一项所述的方法,其中所述人IL-2变体蛋白结构域相对于SEQ ID NO:2的氨基酸序列包含C125S置换。

18. 如权利要求1-17任一项所述的方法,其中所述人IL-2变体蛋白结构域包含与SEQ ID NO:2具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

19. 如权利要求1-18任一项所述的方法,其中所述人IL-2变体蛋白结构域包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

20. 如权利要求1-19任一项所述的方法,其中所述肽接头结构域是各自独立地为丝氨酸或甘氨酸的氨基酸残基的序列。

21. 如权利要求1-20任一项所述的方法,其中所述肽接头结构域是15个氨基酸残基。
22. 如权利要求1-21任一项所述的方法,其中所述肽接头结构域包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。
23. 如权利要求1-22任一项所述的方法,其中所述IgG Fc蛋白结构域是IgG1 Fc蛋白结构域。
24. 如权利要求1-23任一项所述的方法,其中所述IgG Fc蛋白结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。
25. 如权利要求1-24任一项所述的方法,其中所述融合蛋白包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列。
26. 如权利要求1-25任一项所述的方法,其中所述治疗有效量是约5 μ g/kg至约250 μ g/kg。
27. 如权利要求1-3和9-26任一项所述的方法,其中所述自身免疫疾病选自寻常型天疱疮、1型糖尿病、系统性红斑狼疮、移植物抗宿主病、自身免疫性血管炎、溃疡性结肠炎、克罗恩病、牛皮癣、多发性硬化症、肌萎缩侧索硬化症、斑秃、葡萄膜炎、杜氏肌营养不良症、硬皮病、视神经脊髓炎。
28. 如权利要求1-27任一项所述的方法,其中所述受试者是人类。
29. 如权利要求1-28任一项所述的方法,其中所述药物组合物通过皮下施用施用于所述受试者。

用于治疗自身免疫疾病的IL-2变体

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2016年11月8日提交的美国临时专利申请No.62/419,118的优先权,其内容以其整体并入本文。

[0003] 序列表的提交

[0004] 与本申请相关的序列表通过EFS-Web以电子格式提交,并通过引用整体并入本说明书中。包含序列表的文本文件的名称是127754_00402_Sequence_Listing。该文本文件的大小为13KB,且文本文件创建于2017年11月4日。

背景技术

[0005] 自身免疫疾病的特征在于免疫系统对内源组织的过度反应。免疫应答机制包括特化细胞的激活和效应子功能的获得。调节性T细胞(Treg),以前也称为抑制性T细胞,是T细胞的特化亚群。Treg抑制免疫系统的激活,从而调节免疫系统的自身耐受性。因此,Treg在预防自身免疫疾病的发病中起重要作用,并且可以增强Treg活性的疗法可用于治疗自身免疫疾病。

发明内容

[0006] 在某些方面,本发明涉及治疗自身免疫疾病的方法,该方法包括向需要的受试者施用至少两个剂量的包含治疗有效量的融合蛋白的药物组合物,该融合蛋白包含:人IL-2变体蛋白结构域,其相对于SEQ ID NO:2的氨基酸序列包含选自D20H、N88I、N88G、N88R、Q126L和Q126F的置换;肽接头结构域;和IgG Fc蛋白结构域,

[0007] 其中每个结构域具有氨基末端(N-末端)和羧基末端(C-末端);且其中所述融合蛋白配置为使得所述人IL-2变体蛋白结构域的C-末端通过肽键与所述肽接头结构域的N-末端融合,且所述IgG Fc蛋白结构域的N-末端通过肽键与所述肽接头结构域的C-末端融合,其中所述组合物以每周一次至每月一次的给药频率施用于所述受试者。在某些实施方案中,所述药物组合物施用于所述受试者提高调节性T细胞(Treg)与传统T细胞(Tconv)的比率至至少0.2。在某些实施方案中,在所述药物组合物施用于所述受试者后五天,所述Treg/Tconv比率是至少0.2。

[0008] 在某些方面,本发明涉及在需要的受试者中提高调节性T细胞的增殖和/或活性的方法,该方法包括向所述受试者施用至少两个剂量的包含治疗有效量的融合蛋白的药物组合物,该融合蛋白包含:人IL-2变体蛋白结构域,其相对于SEQ ID NO:2的氨基酸序列包含选自D20H、N88I、N88G、N88R、Q126L和Q126F的置换;肽接头结构域;和IgG Fc蛋白结构域,其中每个结构域具有氨基末端(N-末端)和羧基末端(C-末端);且其中所述融合蛋白配置为使得所述人IL-2变体蛋白结构域的C-末端通过肽键与所述肽接头结构域的N-末端融合,且所述IgG Fc蛋白结构域的N-末端通过肽键与所述肽接头结构域的C-末端融合,

[0009] 其中所述组合物以每周一次至每月一次的给药频率施用于所述受试者。

[0010] 在本文所述方法的某些实施方案中,所述药物组合物施用于所述受试者相对于包

含等摩尔量的阿地白介素的组合物导致调节性T细胞的增殖和/或活性的更大提高。在某些实施方案中,所述药物组合物施用于所述受试者相对于用所述药物组合物治疗前所述受试者的调节性T细胞水平提高调节性T细胞的水平至少2-倍。在某些实施方案中,所述药物组合物施用于所述受试者不增加传统T细胞或CD8⁺T细胞的增殖。在某些实施方案中,所述药物组合物施用于所述受试者提高所述调节性T细胞中选自CD25、FOXP3、CTLA-4、ICOS和CD39的生物标志物的水平。

[0011] 在某些方面,本发明涉及一种用于在需要治疗自身免疫疾病的受试者中维持调节性T细胞(Treg)与传统T细胞(Tconv)的比率在足以治疗所述自身免疫疾病的水平的方法,该方法包括向所述受试者施用至少两个剂量的包含治疗有效量的融合蛋白的药物组合物,该融合蛋白包含:人IL-2变体蛋白结构域,其相对于SEQ ID NO:2的氨基酸序列包含选自D20H、N88I、N88G、N88R、Q126L和Q126F的置换;肽接头结构域;和IgG Fc蛋白结构域,其中每个结构域具有氨基末端(N-末端)和羧基末端(C-末端);且其中所述融合蛋白配置为使得所述人IL-2变体蛋白结构域的C-末端通过肽键与所述肽接头结构域的N-末端融合,且所述IgG Fc蛋白结构域的N-末端通过肽键与所述肽接头结构域的C-末端融合,

[0012] 其中所述组合物以每周一次至每月一次的给药频率施用于所述受试者。在某些实施方案中,在所述药物组合物施用于所述受试者后五天,所述Treg/Tconv比率是至少0.2。

[0013] 在某些方面,本发明涉及一种用于治疗自身免疫疾病的方法,该方法包括:(i)向需要的受试者施用第一剂量的包含治疗有效量的融合蛋白的药物组合物,该融合蛋白包含:人IL-2变体蛋白结构域,其相对于SEQ ID NO:2的氨基酸序列包含选自D20H、N88I、N88G、N88R、Q126L和Q126F的置换;肽接头结构域;和IgG Fc蛋白结构域,其中每个结构域具有氨基末端(N-末端)和羧基末端(C-末端);且其中所述融合蛋白配置为使得所述人IL-2变体蛋白结构域的C-末端通过肽键与所述肽接头结构域的N-末端融合,且所述IgG Fc蛋白结构域的N-末端通过肽键与所述肽接头结构域的C-末端融合;(ii)测量在所述第一剂量施用于所述受试者后从所述受试者获得的样品中生物标志物的表达以测定所述生物标志物的峰值水平,其中所述生物标志物选自CD25、FOXP3、CTLA-4、ICOS和CD39;(iii)当至少一种生物标志物的水平相对于所述生物标志物的峰值水平降低至少10%时,向所述受试者施用第二剂量的治疗有效量的所述药物组合物。在某些实施方案中,所述生物标志物是CD25。

[0014] 在本文所述方法的某些实施方案中,给药频率范围是每周一次至每两周一次。在某些实施方案中,所述药物组合物施用于所述受试者不引起所述受试者的腹泻。在某些实施方案中,人IL-2变体蛋白结构域相对于SEQ ID NO:2的氨基酸序列包含N88R置换。在某些实施方案中,人IL-2变体蛋白结构域相对于SEQ ID NO:2的氨基酸序列包含T3A置换。在某些实施方案中,人IL-2变体蛋白结构域相对于SEQ ID NO:2的氨基酸序列包含C125S置换。在某些实施方案中,人IL-2变体蛋白结构域包含与SEQ ID NO:2具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,人IL-2变体蛋白结构域包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的氨基酸序列。在某些实施方案中,肽接头结构域是各自独立地为丝氨酸或甘氨酸的氨基酸残基的序列。在某些实施方案中,肽接头结构域是15个氨基酸残基。在某些实施方案中,肽接头结构域包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在某些实施方案中,IgG Fc蛋白结构域是IgG1 Fc蛋白结构域。在某些实施方案中,IgG Fc蛋白结构域包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。在某些实施方案中,融合蛋白包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

[0015] 在本文所述方法的某些实施方案中,治疗有效量是约5 μ g/kg至约250 μ g/kg。在某些实施方案中,自身免疫疾病选自寻常型天疱疮、1型糖尿病、系统性红斑狼疮、移植物抗宿主病、自身免疫性血管炎、溃疡性结肠炎、克罗恩病、牛皮癣、多发性硬化症、肌萎缩侧索硬化症、斑秃、葡萄膜炎、杜氏肌营养不良症、硬皮病、视神经脊髓炎。在某些实施方案中,所述受试者是人类。在某些实施方案中,药物组合物通过皮下施用施用于所述受试者。

[0016] 在一些实施方案中,本公开提供了治疗病症的方法,该方法包括向需要的受试者施用治疗有效量的化合物,其中所述化合物包含在受试者中结合IL-2受体的部分,其中所述化合物以50 μ g/kg施用于受试者在受试者中提供约2000ng-h/mL至约10,000ng-h/mL的AUC_{0- ∞} 。

[0017] 在一些实施方案中,本公开提供了治疗病症的方法,该方法包括向需要的受试者施用治疗有效量的化合物,其中所述化合物包含在受试者中结合IL-2受体的部分,其中所述化合物以50 μ g/kg施用于受试者在受试者中提供约4mL/h-kg至约20mL/h-kg的清除率。

[0018] 在一些实施方案中,本公开提供了治疗病症的方法,该方法包括向需要的受试者施用治疗有效量的化合物,其中所述化合物包含在受试者中结合IL-2受体的部分,其中所述化合物以50 μ g/kg施用于受试者在受试者中提供约10小时至约30小时的半衰期。

[0019] 在一些实施方案中,本公开提供了治疗病症的方法,该方法包括向需要的受试者施用治疗有效量的化合物,其中所述化合物包含在受试者中结合IL-2受体的部分,其中所述化合物以50 μ g/kg施用于受试者在受试者中提供约6小时至约15小时的半衰期。

[0020] 在一些实施方案中,本公开提供了治疗病症的方法,该方法包括向需要的受试者施用治疗有效量的化合物,其中所述化合物包含在受试者中结合IL-2受体的部分,其中所述化合物以50 μ g/kg施用于受试者在受试者中提供约500ng/mL至约3,000ng/mL的C_{max}。

[0021] 在所述方法的某些实施方案中,与向受试者施用等同量(例如等摩尔量)的野生型IL-2多肽或C125S IL-2(例如阿地白介素)相比,所述施用增加受试者中的调节性T细胞计数。在某些实施方案中,所述施用在受试者中提供的半衰期大于通过向受试者施用等同量的野生型IL-2或C125S IL-2(例如阿地白介素)获得的半衰期。在某些实施方案中,所述施用相对于受试者中的T效应细胞计数增加受试者中的调节性T细胞计数。在某些实施方案中,所述施用相对于受试者中的传统T细胞选择性地激活受试者中的调节性T细胞。在某些实施方案中,所述施用相对于受试者中的IL2R β γ 受体复合物选择性地激活受试者中的IL2R α β γ 受体复合物。在某些实施方案中,治疗有效量为约5 μ g/kg至约250 μ g/kg。在某些实施方案中,治疗有效量约为25 μ g/kg。

[0022] 在所述方法的某些实施方案中,病症是自身免疫疾病。在某些实施方案中,病症是寻常型天疱疮。在某些实施方案中,病症是1型糖尿病。在某些实施方案中,病症是系统性红斑狼疮。在某些实施方案中,病症是移植物抗宿主病。在某些实施方案中,病症是自身免疫性血管炎。在某些实施方案中,病症是溃疡性结肠炎。在某些实施方案中,病症是克罗恩病。在某些实施方案中,病症是牛皮癣。在某些实施方案中,病症是多发性硬化症。在某些实施方案中,病症是肌萎缩侧索硬化症。在某些实施方案中,病症是斑秃(Alopecia Areata)。在某些实施方案中,病症是葡萄膜炎。在某些实施方案中,病症是杜氏肌肉营养不良症。在某些实施方案中,自身免疫疾病是硬皮病。在某些实施方案中,自身免疫疾病是视神经脊髓炎。

[0023] 在前述方法的某些实施方案中,受试者是人。在某些实施方案中,施用是静脉内的。在某些实施方案中,施用是皮下的。在某些实施方案中,药物组合物包含IL-2多肽。在某些实施方案中,结合受试者中的IL-2受体的部分是与野生型IL-2具有至少90%同一性的肽序列。在某些实施方案中,结合受试者中的IL-2受体的部分与野生型IL-2不同在于相对于野生型IL-2的N88R的置换。在某些实施方案中,结合受试者中的IL-2受体的部分包含相对于野生型IL-2的突变,其相对于野生型IL-2提高结合受试者中的IL-2受体的部分的稳定性。在某些实施方案中,相对于野生型IL-2提高结合受试者中的IL-2受体的部分的稳定性的突变是相对于野生型IL-2的C125S的置换。在某些实施方案中,结合受试者中的IL-2受体的部分与野生型IL-2不同在于相对于野生型IL-2的T3A的置换。在某些实施方案中,结合受试者中的IL-2受体的部分与SEQ ID NO:1具有至少90%的同一性。在某些实施方案中,结合受试者中的IL-2受体的部分包含SEQ ID NO:1。在某些实施方案中,结合受试者中的IL-2受体的部分是SEQ ID NO:1。

[0024] 在前述方法的某些实施方案中,该化合物包含免疫球蛋白Fc结构域。在某些实施方案中,免疫球蛋白Fc结构域相对于相应的野生型免疫球蛋白Fc结构域是效应子功能缺陷的。在某些实施方案中,免疫球蛋白Fc结构域位于结合受试者中的IL-2受体的部分的C-末端。在某些实施方案中,免疫球蛋白Fc结构域是IgG1免疫球蛋白Fc结构域。在某些实施方案中,IgG1免疫球蛋白Fc结构域与野生型IgG1免疫球蛋白Fc结构域不同在于相对于野生型IgG1免疫球蛋白Fc结构域的N297A的置换。在某些实施方案中,免疫球蛋白Fc结构域包含SEQ ID NO:7。在某些实施方案中,免疫球蛋白Fc结构域是SEQ ID NO:7。

[0025] 在前述方法的某些实施方案中,所述化合物包含与结合受试者中的IL-2受体的部分共价连接并与免疫球蛋白Fc结构域共价连接的接头肽。在某些实施方案中,结合IL-2受体的部分位于接头肽的N-末端,且免疫球蛋白Fc结构域位于接头肽的C-末端,在某些实施方案中,接头肽是从6到20个氨基酸残基。在某些实施方案中,接头肽是12至17个氨基酸残基。在某些实施方案中,接头肽是各自独立地为丝氨酸或甘氨酸的氨基酸残基的序列。在某些实施方案中,接头肽是15个氨基酸残基。在某些实施方案中,接头肽是GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:6)。在某些实施方案中,该化合物包含SEQ ID NO:4。在某些实施方案中,该化合物为SEQ ID NO:4。

附图说明

[0026] 图1显示了用化合物1、化合物2和IL-2对食蟹猴给药并随后收集血液样品的实验时间线。

[0027] 图2A显示IL2 (C125S) 对调节性T细胞的作用,如通过表达Ki67的Treg细胞的百分比的FACS测量所确定的。

[0028] 图2B显示IL2 (C125S) 对传统T细胞的作用,如通过表达Ki67的Treg细胞的百分比的FACS测量所确定的。

[0029] 图2C显示IL2 (C125S) 对CD8细胞的作用,如通过表达Ki67的Treg细胞百分比的FACS测量所确定的。

[0030] 图3A显示化合物1和化合物2对调节性T细胞的激活,如通过表达Ki67的Treg细胞的百分比的FACS测量所确定的。

[0031] 图3B显示化合物1和化合物2对传统T细胞的激活,如通过表达Ki67的Treg细胞的百分比的FACS测量所确定的。

[0032] 图3C显示化合物1和化合物2对CD8细胞的激活,如通过表达Ki67的Treg细胞的百分比的FACS测量所确定的。

[0033] 图4A显示化合物1对每 μL 血浆的调节性T细胞数量的影响,如通过流式细胞术测定的。

[0034] 图4B显示化合物1对每 μL 血浆的传统T细胞数是的的影响,如通过流式细胞术测定的。

[0035] 图4C显示化合物1对每 μL 血浆的CD8细胞数量的影响,如通过流式细胞术测定的。

[0036] 图5A显示化合物1对FOXP3的刺激,如通过流式细胞术测定的(MFI = 平均荧光强度)。

[0037] 图5B显示化合物1对CD25的刺激,如通过流式细胞术测定的(MFI = 平均荧光强度)。

[0038] 图5C显示了化合物1施用过程中表达Ki67的细胞的百分比,如通过流式细胞术测定的。

[0039] 图6显示用化合物1或IL2 (C125S) 处理后的每 μL 调节性T细胞,如通过流式细胞术测定的。

[0040] 图7显示了在化合物1或IL2 (C125S) 处理方案的第5天,调节性T细胞与传统T细胞的比率以及来自代表性动物的那些群体内的标志物表达,如通过流式细胞术测定的。

[0041] 图8A显示在化合物1、IL2 (C125S) 或Fc-V91K处理期间表达Ki67的调节性T细胞的百分比,如通过表达Ki67的Treg细胞百分比的FACS测量确定的。

[0042] 图8B显示了化合物1、IL2 (C125S) 或Fc-V91K处理期间表达Ki67的传统T细胞的百分比,如通过表达Ki67的Tconv细胞的百分比的流式细胞术测量确定的。

[0043] 图8C显示在化合物1、IL2 (C125S) 或Fc-V91K处理期间表达Ki67的CD8细胞的百分比,如通过表达Ki67的CD8+细胞的百分比的FACS测量确定的。

[0044] 图9显示化合物1随时间的食蟹猴血清浓度。

[0045] 图10显示通过静脉内或皮下给药,化合物1随时间的食蟹猴血清浓度。

[0046] 图11A显示用化合物1处理后表达pSTAT-5的不同细胞类型的百分比。

[0047] 图11B显示在IL2 (C125S) 处理期间处理后表达pSTAT-5的不同细胞类型的百分比。

[0048] 图12显示通过化合物1或IL2 (C125S) 的处理而激活的不同人细胞类型的百分比。

[0049] 图13显示用化合物1或IL2 (C125S) 处理的细胞的pSTAT-5和CD56表达。

[0050] 图14A、14B和14C显示了鉴定不同细胞类型的流式细胞术门控策略。

[0051] 图15显示了通过在第1、7、14、21和28天的皮下给药用媒介或化合物2 (IL2 (T3A, N88R) -15氨基酸肽接头-Fc) 处理的食蟹猴中B细胞水平相对于基线的倍数变化。每个剂量后5天定量B细胞水平。化合物2以20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 或2mg/kg的剂量施用。

[0052] 图16显示在第1、7、14、21和28天通过皮下给药用媒介或化合物2 (IL2 (T3A, N88R) -15氨基酸肽接头-Fc) 处理的食蟹猴中自然杀伤(NK) 细胞水平相对于基线的倍数变化。在每个剂量后5天定量NK细胞水平。化合物2以20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 或2mg/kg的剂量施用。

[0053] 图17显示在第1、7、14、21和28天通过皮下给药用媒介或化合物2 (IL2 (T3A, N88R) -

15氨基酸肽接头-Fc)处理的食蟹猴中CD8T细胞水平相对于基线的倍数变化。在每个剂量后5天定量CD8T细胞水平。化合物2以20 μ g/kg、100 μ g/kg或2mg/kg的剂量施用。

[0054] 图18显示在第1、7、14、21和28天通过皮下给药用媒介或化合物2 (IL2 (T3A,N88R) - 15氨基酸肽接头-Fc)处理的食蟹猴中传统T细胞水平相对于基线的倍数变化。每个剂量后5天定量传统T细胞水平。化合物2以20 μ g/kg、100 μ g/kg或2mg/kg的剂量施用。

[0055] 图19显示在第1、7、14、21和28天通过皮下给药用媒介或化合物2 (IL2 (T3A,N88R) - 15氨基酸肽接头-Fc)处理的食蟹猴中调节性T细胞水平相对于基线的倍数变化。在每个剂量后5天定量调节性T细胞水平。化合物2以20 μ g/kg、100 μ g/kg或2mg/kg的剂量施用。化合物2以20 μ g/kg、100 μ g/kg或2mg/kg的剂量施用。

[0056] 图20是图19的放大版,其以更高的清晰度显示了媒介、20 μ g/kg化合物2和100 μ g/kg化合物2处理组之间的差异。

[0057] 图21显示在第1、7、14、21和28天通过皮下给药用媒介或化合物2 (IL2 (T3A,N88R) - 15氨基酸肽接头-Fc)处理的食蟹猴中调节性T细胞与传统T细胞的比率。在每个剂量后5天定量T细胞水平。化合物2以20 μ g/kg、100 μ g/kg或2mg/kg的剂量施用。

[0058] 图22显示了用于比较化合物1或化合物2与阿地白介素 (C125SIL-2) 每周一次或每两周一次给药的示例性研究的给药方案。

[0059] 图23显示了描述化合物1和化合物2的药代动力学/药效学关系的模型。实线表示化合物1或化合物2的水平。小断线表示调节性T细胞 (Treg) 功能激活。大断线表示Treg水平。

具体实施方式

[0060] 免疫系统必须能够区分自身和非自身。当自身/非自身区分失败时,免疫系统会破坏身体的细胞和组织,从而导致自身免疫疾病。调节性T细胞 (Treg) 是一类抑制其他免疫细胞如传统T细胞 (Tconv) 和CD8细胞的活性的CD4+CD25+T细胞。Treg是免疫系统内稳态的核心,并且维持对自身抗原的耐受性和调节对外来抗原的免疫应答。多种自身免疫和炎症疾病,包括1型糖尿病 (T1D)、系统性红斑狼疮 (SLE) 和移植物抗宿主病 (GVHD) 与Treg细胞数量或Treg功能的缺陷相关。调节性T细胞可被白细胞介素2 (IL-2) 激活,但IL-2也激活许多其他T细胞类型。

[0061] IL-2结合IL-2受体 (IL-2R或IL2R)。IL-2R是在多种不同免疫细胞类型上表达的异源三聚体蛋白,包括T细胞、NK细胞、嗜酸性粒细胞和单核细胞。这种广泛的表达模式提供了对免疫系统的多效性和IL-2治疗的高度全身性毒性。

[0062] IL-2R具有三种形式,其由三种不同IL-2R蛋白 (α (alpha)、 β (beta) 和 γ (gamma)) 的不同组合产生。这些受体链组装以产生三种不同的受体形式: (1) 低亲和力受体IL2R α , 它不发出信号; (2) 中间亲和力受体 (IL2R $\beta\gamma$), 其由IL2R β 和IL2R γ 组成,广泛表达于传统T细胞 (Tconv)、NK细胞、嗜酸性粒细胞和单核细胞上;和 (3) 由IL2R α , IL2R β 和IL2R γ 组成的高亲和力受体 (IL2R $\alpha\beta\gamma$), 其在激活的T细胞上瞬时表达和在Treg细胞上组成型表达。传统T细胞是那些被抗原激活并参与免疫攻击的细胞。传统T细胞包括辅助性T细胞、细胞毒性T细胞和记忆T细胞。效应T细胞 (Teff) 包括对刺激产生特异性免疫应答的各种T细胞类型。IL-2中的突变可以改变IL-2与不同IL-2R受体形式的结合亲和力。

[0063] 本公开的方法和组合物涉及包含结合IL-2受体的部分(例如IL-2或IL-2变体)和免疫球蛋白Fc结构域的分子。在一些实施方案中,该分子还包含接合IL-2受体结合部分和免疫球蛋白Fc结构域的接头。与IL-2受体结合的部分调节负责免疫的白血细胞(白细胞,通常是淋巴细胞)的活性。免疫球蛋白Fc结构域增加分子的体内稳定性,并且接头共价接合结构域。

[0064] 结合IL-2受体的部分

[0065] 结合IL-2受体的部分可以是野生型IL-2的全长、更短或更长。IL-2受体结合部分可具有野生型IL-2序列,如SEQ ID NO:2所示:(APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKL TRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFXQSIISTLT),或它可以是IL-2的变体。IL-2变体可含有偏离野生型IL-2氨基酸序列的一个或多个置换、缺失或插入。残基在本文中用单字母氨基酸代码表示,后面是IL-2氨基酸位置,例如,K35是野生型IL-2序列第35位的赖氨酸残基。置换在本文中用单字母氨基酸代码表示,其后是IL-2氨基酸位置,然后是置换的单字母氨基酸代码,例如,K35A是SEQ ID NO:2的35位赖氨酸残基被丙氨酸残基置换。

[0066] 本文的化合物对不同IL-2受体类别可以表现出与野生型IL-2的特异性相似或不相似的特异性。与野生型IL-2相比,本文的化合物可表现出提高的稳定性或生物学效应。例如,与野生型IL-2相比,突变可以提供对某些IL-2受体具有提高的特异性的化合物。例如,IL-2N88R相对于IL2R β γ 受体对于与IL2R α β γ 受体的结合具有选择性。IL-2可以与野生型IL-2一样有效地刺激表达IL2R α β γ 的PHA激活T细胞的增殖,同时表现出对表达IL2R β γ 的NK细胞的增殖的刺激3,000倍的降低。对IL2R α β γ 表现出提高的选择性的其他突变包括置换D20H、N88I、N88G、Q126L和Q126F。

[0067] 在一些实施方案中,IL-2受体结合部分包含增强本公开化合物的稳定性的突变。例如,IL-2C125S突变通过消除未配对的半胱氨酸残基,从而防止IL-2多肽的错折叠来促进稳定性。错折叠可导致蛋白质聚集并增加体内多肽的清除。在一些实施方案中,IL-2多肽包含产生或去除糖基化位点的突变。例如,IL-2突变T3A去除O-连接的糖基化位点。在一些实施方案中,具有T3A突变的IL-2变体还包含N88R突变和/或C125S突变。在一些实施方案中,IL-2变体包含T3A、N88R和C125S突变,如SEQ ID NO:3中。

[0068] 在一些实施方案中,置换发生在位置3、20、88、125和126中的一个或多个位置处。在一些实施方案中,置换发生在一个、两个、三个、四个或五个位置处。在一些实施方案中,IL-2变体包含位置88和125处的突变,例如N88R和C125S。在一些实施方案中,IL-2受体结合部分包含SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列:APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKL TRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT。在一些实施方案中,IL-2变体包含位置3、88和125处的突变,例如T3A、N88R和C125S,如SEQ ID NO:3中所示:APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKL TRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT。在一些实施方案中,IL-2变体与野生型IL-2序列相比包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个突变(例如,置换)。

[0069] 本文的化合物包括本公开的IL-2变体,其包含与野生型IL-2氨基酸序列(SEQ ID NO:2)具有至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少

67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列。本文的化合物包括包含与野生型IL-2氨基酸序列(即SEQ ID NO:2)具有至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的具有N88R突变的氨基酸序列的IL-2变体。实施方案还包括优先刺激Treg细胞且包含与野生型IL-2氨基酸序列(SEQ ID NO:2)具有至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%或至少98%序列同一性的具有N88R和C125S突变的氨基酸序列的IL-2变体。实施方案还包括优先刺激Treg细胞且包含与野生型IL-2氨基酸序列(SEQ ID NO:2)具有至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列的IL-2变体。

[0070] 可以使用各种方法和软件程序来确定两个或更多个肽或核酸之间的同源性,例如NCBI BLAST、Clustal W、MAFFT、Clustal Omega、AlignMe、Praline或另一合适的方法或算法。在一些实施方案中,基于以下参数通过FastDB计算百分同一性:错配罚分1;空位罚分1;空位大小罚分0.33;和连接罚分30。

[0071] 有用算法的示例是PILEUP。PILEUP使用渐进的成对比对从一组相关序列创建多序列比对。它还可以绘制显示用于建立比对的聚类关系的树。有用的PILEUP参数包括默认空位权重3.00,默认空位长度权重0.10和加权末端空位。

[0072] 有用算法的另一个例子是BLAST算法。BLAST程序的有用示例是WU-BLAST-2程序。WU-BLAST-2使用多个搜索参数,其中大多数都设置为默认值。可调参数设置为以下值:重叠跨度=1,重叠分数=0.125,字阈值(T)=11。HSP S和HSP S2参数是动态值,并且根据特定序列的组成和感兴趣的序列针对其进行检索的特定数据库的组成通过程序本身来建立;但是,可以调整这些值以增加灵敏度。

[0073] 另外的有用算法是带空位BLAST。带空位BLAST使用BLOSUM-62替代评分;阈值T参数设置为9;触发无空位扩展的双击方法,k的空位长度花费10+k的代价;Xu设置为16,且Xg对于数据库搜索阶段设置为40和对于算法的输出阶段设置为67。带空位比对通过对应于约22比特位的分数触发。

[0074] 另外的有用工具是Clustal,一系列用于多序列比对的常用计算机程序。Clustal的最新版本包括ClustalW、ClustalX和Clustal Omega。用于成对比对和使用Clustal方法计算蛋白质序列的百分同一性的默认参数是KTUPLE=1,GAP PENALTY=3,WINDOW=5和DIAGONALS SAVED=5。对于核酸,这些参数是KTUPLE=2,GAPPENALTY=5,WINDOW=4和DIAGONALS SAVED=4。

[0075] 突变可以安置在选定的位置或随机安置。例如,在靶密码子或区域的随机诱变可以提供筛选活性的突变体。在具有已知序列的DNA中的预定位点处进行置换突变的技术包括例如M13引物诱变和PCR诱变。例如,可以使用本文所述的分析法完成突变体的筛选。

[0076] 氨基酸置换可以是单个或多个残基的。插入可以是,例如,约1至约20个氨基酸残基,或更多。缺失可以是,例如,约1至约20个氨基酸残基,或更多。置换、缺失、插入或其任何组合可以在样品化合物中发生。

[0077] 免疫球蛋白Fc结构域

[0078] 当并入融合蛋白中时,免疫球蛋白Fc结构域具有许多治疗益处。例如,免疫球蛋白Fc结构域可以(1)对融合伴侣蛋白赋予免疫球蛋白Fc效应子功能;和/或(2)增加融合伴侣蛋白的循环半衰期。IgG蛋白的主要效应子功能是补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞毒性(ADCC),是分别由与补体蛋白C1q和与IgG-Fc受体(Fc γ R)的Fc结合介导的功能。当治疗性蛋白质用于指导或增强对特定抗原靶标或细胞的免疫应答时,这些效应子功能是重要的。效应子功能不是必需的,且甚至可能是毒性的,并且在一些实施方案中不存在。例如,具有效应子功能有效的Fc的IL-2受体结合部分可以杀死而不是激活Treg细胞。

[0079] 如上所述,与不含Fc结构域的IL-2多肽相比,本文所述的融合蛋白可以增加循环半衰期。在一些实施方案中,增加的循环半衰期是由于Fc结构域阻止融合蛋白的聚集,从而增加其稳定性和减慢清除。

[0080] 四种人IgG亚类在效应子功能(CDC、ADCC)、循环半衰期和稳定性方面不同。IgG1具有Fc效应子功能,并且是最丰富的IgG亚类。IgG2缺乏Fc效应子功能,但是经历与其他IgG2分子的二聚化及由于铰链区中二硫键的扰乱导致的不稳定性。IgG3具有Fc效应子功能,并具有长、刚性的铰链区。IgG4缺乏Fc效应子功能,并且具有比其他亚类更短的循环半衰期。由于在铰链区中仅具有单个二硫键导致不同IgG4分子之间的H链交换,IgG4二聚体在生物化学上是不稳定的。可以对IgG2 Fc的铰链区进行Fc序列修饰以防止聚集,或者对IgG4 Fc的铰链区进行修饰以稳定二聚体。

[0081] 可以产生IgG1的效应子功能缺陷的变体。例如,氨基酸置换可以在N297位进行,N297是N-连接的糖基化位点的位置。在一些实施方案中,置换是N297A。该天冬酰胺残基的置换除去了糖基化位点并显著降低了抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)活性,从而防止了不需要的细胞裂解。

[0082] 技术人员也可以理解各种其他效应子功能缺陷的IgG1变体。这种变体的一个非限制性实例是IgG1(L234F/L235E/P331S),其使C1q和Fc γ R结合位点中的氨基酸突变。这些(或类似的)Fc变体可用于产生效应子缺陷的和稳定的IL-2选择性激动剂-Fc融合蛋白(IL2SA-Fc)。Fc蛋白部分的形式还可以工程化以产生稳定的单体而不是二聚体。这些修饰的Fc蛋白部分也可以与本公开的IL-2化合物组合。另外,包含IL-2-Fc H链多肽的功能性单体的异二聚体可以与Fc H链多肽组合,并使用双特异性抗体技术与IL-2选择性激动剂组

装。IL-2 Fc融合蛋白也可以用完整的IgG抗体分子制备,在IgG部分中具有或不具有抗原特异性。此外,缺少部分或所有铰链区的Fc变体可与本文所述的化合物和方法一起使用。

[0083] 在一些实施方案中,免疫球蛋白Fc部分的序列是DKTHTCPPCPAPELLGGSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:7)。在一些实施方案中,免疫球蛋白Fc部分包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0084] 接头

[0085] Fc和融合伴侣蛋白之间的接合处的连接可以是:(1)两个蛋白质序列的直接融合;(2)具有插入接头肽的融合;或(3)通过非肽部分的融合。可以包括接头肽作为两个蛋白质部分之间的间隔区。接头肽可以促进组分蛋白质部分的正确蛋白质折叠、稳定性、表达和生物活性。长的柔性接头肽可由甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸组成,其中多个甘氨酸残基提供高度柔性的构象。丝氨酸或苏氨酸残基提供极性表面区域以限制肽内或与组分融合蛋白部分的疏水相互作用。在一些实施方案中,肽接头富含甘氨酸和丝氨酸,例如序列GGGS的重复序列。在一些实施方案中,肽接头具有(GGGS)_n的序列,其中n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些实施方案中,n是3;即,肽接头具有GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:6)的序列。在一些实施方案中,肽接头包含与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0086] 在一些实施方案中,IL-2受体结合部分在接头肽的N-末端,并且免疫球蛋白Fc结构域在接头肽的C-末端。在一些实施方案中,IL-2受体结合部分在接头肽的C-末端,并且免疫球蛋白Fc结构域在接头肽的N-末端。

[0087] 在一个具体实施方案中,本公开的化合物是相对于SEQ ID NO:2的氨基酸序列包含选自D20H、N88I、N88G、N88R、Q126L和Q126F的置换的人IL-2变体蛋白结构域;肽接头结构域;和IgG Fc蛋白结构域,其中每个结构域具有氨基末端(N-末端)和羧基末端(C-末端);且其中融合蛋白配置为使得人IL-2变体蛋白结构域的C-末端通过肽键与肽接头结构域的N-末端融合,并且IgG Fc蛋白结构域的N-末端通过肽键与肽接头结构域的C-末端融合。

[0088] 本公开化合物的实例是化合物1,其包含具有N88R和C125S置换的IL-2变体、IL-2多肽C-末端的接头肽和接头肽C-末端的IgG1 (N297A) Fc结构域。化合物1具有SEQ ID NO:4的序列:APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEV LNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGSGGGSGG

GGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PG。在一些实施方案中,本公开的化合物包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少60%、
至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少
69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、
至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少
86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、
至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0089] 本公开化合物的另外的实例是化合物2,其包含具有T3A、N88R和C125S置换的IL-2
变体、IL-2变体C-末端的接头肽和接头肽C-末端的IgG Fc结构域。化合物2具有SEQ ID NO:
5的序列:APASSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEE
VLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGSGGGGSG
GGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PG。在某些实施方案中,本公开的化合物包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少60%、
至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少
69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、
至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少
86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、
至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0090] 调节性T细胞增殖和活性

[0091] 在一些实施方案中,本公开的分子在施用于受试者时增加调节性T细胞(Treg)计
数(即增殖)。例如,相对于受试者在施用前的调节性T细胞计数,本公开的分子可以在施用于
受试者后增加受试者中的调节性T细胞计数。例如,向受试者施用包含本公开分子的药物
组合物可使受试者中的调节性T细胞水平相对于在施用前受试者的调节性T细胞计数增加
至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45
倍、50倍、55倍或60倍。

[0092] 在一些实施方案中,相对于施用IL-2(C125S)(例如阿地白介素),例如,等摩尔量
的IL-2(C125S)(例如阿地白介素),本公开的分子在施用于受试者后可以增加受试者中的
调节性T细胞计数。阿地白介素是一种IL-2变体,其相对于人野生型IL-2(SEQ ID NO:2)(其
中N-末端丙氨酸已被除去)包含C125S置换。向受试者施用包含本公开分子的药物组合物可
相对于等摩尔量的IL-2(C125S)(例如阿地白介素)使受试者中的调节性T细胞水平增加至
至少10%、20%、30%、40%、50%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%或
500%。

[0093] 在一些实施方案中,本公开的分子可以增加受试者中调节性T细胞(Treg)与传统T
细胞(Tconv)的比率。在人类中,每日低剂量IL-2疗法已被用于通过增加Treg水平治疗患有
慢性GVHD的患者(参见Koreth J等,Blood.2016Jul 7;128(1):130-7;和Koreth,J.N Engl

JMed.2011Dec 1;365 (22) :2055-66)。在最后一试验中,通过每日皮下注射施用IL-2 (阿地白介素) 12周。总体而言,这些试验中的患者的Treg相对于基线 (治疗前的Treg水平) 增加了5倍以上,Treg/Tconv比率增加了5倍以上,且临床响应率为61%。临床反应与治疗第一周结束时 ≥ 0.2 的Treg/Tconv比率强烈相关,这相对于基线Treg/Tconv比率增加约2.9倍。因此,在一些实施方案中,向受试者施用包含本公开分子的药物组合物可以将Treg/Tconv比率增加至至少0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4或1.5。Treg/Tconv比率可以在几个剂量的本公开分子上维持在上述水平,例如在至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个剂量上。

[0094] 本公开的分子可以对Treg具有高度选择性,并且可以引起其他免疫细胞计数的少量增加。可能不被本公开分子激活的免疫细胞包括传统T细胞,例如辅助性T细胞和杀伤性T细胞,以及CD8+T细胞,也称为细胞毒性T细胞。如图3A、3B和3C所示,用化合物1和化合物2处理食蟹猴导致Treg细胞增殖的强烈和选择性诱导,但在CD4传统T细胞 (Tconv) 或CD8+T细胞 (CD8) 中没有诱导。在食蟹猴中单次静脉内施用250 μ g/kg化合物1导致Treg细胞增殖的超过两倍的诱导。此外,化合物1和化合物2均刺激Treg的剂量依赖性增加,在食蟹猴中施用单次IV剂量后7天,增殖的激活仍然高于基线。化合物1对Treg、Tconv和CD8细胞的作用的更清楚视图可以在图3D、3E和3F中看到。如图4A、4B和4C所示,将化合物1施用于食蟹猴导致总循环Treg细胞增加14.9倍而不增加循环Tconv细胞或CD8+细胞的数量。

[0095] 本公开的分子还可以增加调节性T细胞活性 (例如免疫抑制活性)。调节性T细胞功能可以通过测量一种或多种生物标志物的表达来确定,所述生物标志物包括但不限于CD25、FOXP3、CTLA-4、ICOS和CD39。例如,用250 μ g/kg化合物1处理食蟹猴导致FOXP3和CD25的表达增加 (通过平均荧光强度或MFI测量的),如图5A和5B所示。FOXP3 (Treg功能所必需的蛋白质) 的水平与高抑制性Treg相关 (Miyara M等,Immunity.2009Jun 19;30 (6) :899-911)。CD25 (IL2RA蛋白) 的水平与增加的IL-2消耗 (Treg的主要免疫抑制机制) 相关 (Chinen T等,Nat Immunol.2016Nov;17 (11) :1322-1333)。因此,化合物1和化合物2的处理刺激了Treg的免疫抑制功能。表达细胞分裂标志物Ki67的细胞的百分比也增加,如图5C中所见的。与用IL2 (C125S) 处理相比,用化合物1处理食蟹猴导致Treg细胞的更大诱导,如图6中所见的。此外,用IL2 (C125S) 处理的所有食蟹猴表现出腹泻,而在用化合物1处理的食蟹猴中没有看到腹泻。当来自化合物1和IL2 (C125S) 处理的食蟹猴的血液通过流式细胞术分析时,也观察到Treg细胞的诱导改善。血细胞在CD4表达上分选并通过CD127和FOXP3表达分离。在基线未处理血液中,Treg:Tconv细胞的比率为0.04,如图7所示。在来自用化合物1处理的动物的血液中,Treg:Tconv细胞的比率为0.7。在来自用IL2 (C125S) 处理的动物的血液中,Treg:Tconv细胞的比率为0.3-小于来自用化合物1处理的食蟹猴的血液中所见比率的一半。来自这些食蟹猴的血液通过Ki67表达和CD25表达进一步分离以确定Treg激活,并通过前侧散射 (Fsc) 分离以确定Tconv和CD8激活,如图7所示。与未处理的血液中的17%或IL2 (C125S) 诱导的55%的激活相比,化合物1导致85%的Treg激活。相反,化合物1不激活Tconv细胞 (10%,与未处理的血液中的10%相比) 或CD8细胞 (23%,与未处理的血液中的24%相比)。然而,IL2 (C125S) 激活Tconv细胞约3倍 (34%,与10%基线相比) 和激活CD8细胞几乎3倍 (62%,与24%基线相比)。与Fc-V91K (具有Fc结构域、五氨基酸肽接头和IL2 (V91K) 的对照化合物) 相比,化合物1还显示出相对于Tconv和CD8细胞对Treg细胞的选择性提高,如图8A-

8C所示。

[0096] 自身免疫疾病的治疗

[0097] 本发明的方法可以应用于各种自身免疫或免疫相关疾病或病症,例如治疗这些疾病或病症。自身免疫疾病包括影响器官的疾病,如心脏、肾脏、肝脏、肺、生殖器官、消化系统或皮肤。自身免疫疾病包括影响腺体的疾病,包括内分泌腺、肾上腺、甲状腺、唾液腺和外分泌腺以及胰腺。自身免疫疾病也可以是多腺体的。自身免疫疾病可靶向一种或多种组织,例如结缔组织、肌肉或血液。自身免疫疾病可以靶向神经系统或者眼睛、耳朵或血管系统。自身免疫疾病也可以是全身性的,影响多个器官、组织和/或系统。在一些实施方案中,自身免疫疾病或病症是炎症性疾病或病症。

[0098] 自身免疫或免疫相关疾病或病症的非限制性实例包括炎症、抗磷脂综合征、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、自身免疫性血管炎、乳糜泻病、自身免疫性甲状腺炎、输血后免疫、母胎血型不合、输血反应、免疫缺陷如IgA缺乏、常见变异型免疫缺陷、药物性狼疮、糖尿病、I型糖尿病、II型糖尿病、青少年糖尿病、幼年型类风湿性关节炎、银屑病性关节炎、多发性硬化、免疫缺陷、过敏、哮喘、牛皮癣、特应性皮炎、过敏性接触性皮炎、慢性皮肤病、肌萎缩侧索硬化症、化疗引起的损伤、移植物抗宿主病、骨髓移植排斥反应、强直性脊柱炎、特应性湿疹、天疱疮、白塞病、慢性疲劳综合征、纤维肌痛、化疗引起的损伤、重症肌无力、肾小球肾炎、过敏性视网膜炎、系统性硬化症、亚急性皮肤红斑狼疮、皮肤红斑狼疮包括冻疮样红斑狼疮、干燥综合征、自身免疫性肾炎、自身免疫性脉管炎、自身免疫性肝炎、自身免疫性心脏炎、自身免疫性脑炎、自身免疫介导的血液系统疾病、lc-SSc(局限皮肤型硬皮病)、dc-SSc(弥漫性皮肤型硬皮病)、自身免疫性甲状腺炎(AT)、Grave病(GD)、重症肌无力、多发性硬化症(MS)、强直性脊柱炎、移植排斥、免疫衰老、风湿性/自身免疫性疾病、混合性结缔组织病、脊柱关节病、银屑病、银屑病性关节炎、肌炎、硬皮病、皮肌炎、自身免疫性血管炎、混合性结缔组织病、特发性血小板减少性紫癜、克罗恩病、人佐剂病、骨关节炎、青少年慢性关节炎、脊柱关节病、特发性炎性肌病、系统性血管炎、结节病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性血小板减少症、甲状腺炎、免疫介导的肾病、中枢或外周神经系统的脱髓鞘疾病、特发性脱髓鞘性多发性神经病、格林-巴利综合征、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病、肝胆疾病、感染性或自身免疫性慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、肉芽肿性肝炎、硬化性胆管炎、炎症性肠病、谷蛋白敏感性肠病、惠普尔病、自身免疫或免疫介导的皮肤病、大疱性皮肤病、多形性红斑、过敏性鼻炎、特应性皮炎、食物过敏、荨麻疹、肺部免疫性疾病、嗜酸性粒细胞性肺炎、特发性肺纤维化、过敏性肺炎、移植相关疾病、移植排斥反应或移植物抗宿主病、银屑病性关节炎、牛皮癣、皮炎、多肌炎/皮肌炎、中毒性表皮坏死松懈症、系统性硬皮病和硬化症、与炎症性肠病相关的反应、溃疡性结肠炎、呼吸窘迫综合征、成人呼吸窘迫综合征(ARDS)、脑膜炎、脑炎、葡萄膜炎、结肠炎、肾小球肾炎、过敏性病症、湿疹、涉及T细胞浸润和慢性炎症反应的病症、动脉粥样硬化、自身免疫性心肌炎、白细胞粘附缺陷、过敏性脑脊髓炎、与细胞因子和T淋巴细胞介导的急性和迟发性超敏反应有关的免疫反应、结核病、结节病、肉芽肿病包括韦格纳肉芽肿病、粒细胞缺乏症、血管炎(包括ANCA)、再生障碍性贫血、DiamondBlackfan贫血、免疫性溶血性贫血包括自身免疫性贫血(AIHA)、恶性贫血、纯红细胞再生障碍(PRCA)、因子VIII缺乏、血友病A、自身免疫性中性粒细胞减少症、全血细胞减少症、白细胞减少症、涉及白细胞渗出的疾病、中枢神经系统(CNS)炎症性疾病、多器官损伤综合

征、重症肌无力、抗原-抗体复合物介导的疾病、抗肾小球基底膜病、抗磷脂抗体综合征、过敏性鼻炎、白塞病、Castleman综合征、Goodpasture综合征、Lambert-Eaton肌无力综合征、Reynaud综合征、Stevens-Johnson综合征、大疱性类天疱疮、天疱疮、自身免疫性多内分泌病、瑞特氏病、僵人综合征、巨细胞动脉炎、免疫复合物性肾炎、IgA肾病、IgM多神经病或IgM介导的神经病、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、血栓性血小板减少性紫癜 (TTP)、自身免疫性血小板减少症、睾丸和卵巢的自身免疫疾病包括自身免疫性睾丸炎和卵巢炎、原发性甲状腺功能减退症、自身免疫性内分泌疾病包括自身免疫性甲状腺炎、慢性甲状腺炎 (桥本氏甲状腺炎)、亚急性甲状腺炎、特发性甲状腺功能减退症、艾迪生病、自身免疫性多腺体综合征 (或多腺内分泌病综合征)、希恩综合征、自身免疫性肝炎、淋巴间质性肺炎 (HIV)、闭塞性细支气管炎 (非移植) vs NSIP、大血管血管炎 (包括风湿性多肌痛和巨细胞 (高安氏) 动脉炎)、中血管血管炎 (包括川崎病和结节性多动脉炎)、强直性脊柱炎、伯格氏病 (IgA肾病)、急进性肾小球肾炎、原发性胆汁性肝硬化、口炎性腹泻 (麸质肠病)、冷球蛋白血症和肌萎缩侧索硬化症 (ALS)。

[0099] 本发明的药物组合物可以是本文所述的任何药物化合物与其他化学组分的组合，例如载体、稳定剂、稀释剂、分散剂、悬浮剂、增稠剂和/或赋形剂。药物组合物有助于将化合物施用于生物体。药物组合物可以通过各种形式和途径作为药物组合物以治疗有效量施用、包括例如静脉内、皮下、肌肉内、口服、肠胃外、眼科、皮下、透皮、鼻、阴道和局部施用。

[0100] 药物组合物可以以局部方式施用，例如，通过将化合物直接注射到器官中，任选地以储库或缓释制剂或植入物形式。药物组合物可以以快速释放制剂的形式、以延长释放制剂的形式或以中间释放制剂的形式提供。快速释放形式可以提供立即释放。延长释放制剂可提供控制释放或持续延迟释放。

[0101] 对于口服施用，可以通过将活性化合物与药学上可接受的载体或赋形剂组合来配制药物组合物。这些载体可用于配制液体、凝胶、糖浆、酏剂、浆液或悬浮液，用于供受试者口服摄取。用于口服可溶解制剂的溶剂的非限制性实例可包括水、乙醇、异丙醇、盐水、生理盐水、DMSO、二甲基甲酰胺、磷酸钾缓冲液，磷酸盐缓冲盐水 (PBS)、磷酸钠缓冲液、4-2-羟乙基-1-哌嗪乙磺酸缓冲液 (HEPES)、3-(N-吗啉代) 丙磺酸缓冲液 (MOPS)、哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸) 缓冲液 (PIPES) 和盐水柠檬酸钠缓冲液 (SSC)。用于口腔可溶解制剂的共溶剂的非限制性实例可包括蔗糖、尿素、cremaphor、DMSO和磷酸钾缓冲液。

[0102] 可配制药剂用于静脉内施用。药物组合物可以是作为油性或水性媒介中的无菌悬浮液、溶液或乳液的适合于肠胃外注射的形式，并且可以含有配制剂如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。用于肠胃外施用的药物制剂包括水溶形式的活性化合物的水溶液。活性化合物的悬浮液可以制备成油性注射悬浮液。合适的亲脂性溶剂或媒介包括脂肪油如芝麻油或者合成脂肪酸酯如油酸乙酯或甘油三酯，或脂质体。悬浮液还可含有合适的稳定剂或增加化合物溶解度的试剂以允许制备高度浓缩溶液。或者，活性成分可以是粉末形式，其用于在使用前用合适的媒介 (例如无菌无热原水) 构建。

[0103] 活性化合物可以局部施用，并且可以配制成多种可局部施用的组合物，如溶液、悬浮液、洗剂、凝胶、糊剂、药用棒、香脂、乳膏和软膏。这些药物组合物可含有增溶剂、稳定剂、张力增强剂、缓冲剂和防腐剂。

[0104] 化合物还可以配制成直肠组合物如灌肠剂、直肠凝胶、直肠泡沫、直肠气雾剂、栓

剂、胶冻栓剂或保留灌肠剂,其含有常规栓剂基质如可可脂或其他甘油酯,以及合成聚合物如聚乙烯吡咯烷酮和PEG。在栓剂形式的组合物中,低熔点蜡如脂肪酸甘油酯的混合物,任选地与可可脂组合,可以熔化。

[0105] 在实施本文提供的治疗方法或用途时,将治疗有效量的本文所述化合物在药物组合物中施用于患有待治疗的疾病或病症的受试者。在一些实施方案中,受试者是哺乳动物,例如人。治疗有效量可以根据疾病的严重程度、受试者的年龄和相对健康状况、所用化合物的效力以及其他因素而广泛地变化。化合物可单独使用或与作为混合物的组分的一种或多种治疗剂组合使用。

[0106] 药物组合物可以使用一种或多种生理学上可接受的载体配制,包括赋形剂和助剂,其有助于将活性化合物加工成可以药学上使用的制备物。制剂可以根据所选择的施用途径进行修改。包含本文所述化合物的药物组合物可以例如通过混合、溶解、乳化、包封、包埋或压缩方法制备。

[0107] 药物组合物可包括至少一种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂和作为游离碱或药学上可接受的盐形式的本文所述的化合物。药物组合物可含有增溶剂、稳定剂、张力增强剂、缓冲剂和防腐剂。

[0108] 制备包含本文所述化合物的组合物的方法包括将化合物与一种或多种惰性的、药学上可接受的赋形剂或载体一起配制以形成固体、半固体或液体组合物。固体组合物包括例如粉末、片剂、可分散的颗粒、胶囊和扁囊剂。液体组合物包括例如其中溶解化合物的溶液、包含化合物的乳液或包含脂质体、胶束或含本文公开的化合物的纳米颗粒的溶液。半固体组合物包括例如凝胶、悬浮液和乳膏。组合物可以是液体溶液或悬浮液、适于在使用前溶解或悬浮在液体中的固体形式或为乳液。这些组合物还可含有少量无毒的辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂和其它药学上可接受的添加剂。

[0109] 适用于本发明的剂型的非限制性实例包括液体、粉末、凝胶、纳米悬浮液、纳米颗粒、微凝胶、水性或油性悬浮液、乳液及其任何组合。

[0110] 适用于本发明的药学上可接受的赋形剂的非限制性实例包括粘合剂、崩解剂、抗粘附剂、抗静电剂、表面活性剂、抗氧化剂、包衣剂、着色剂、增塑剂、防腐剂、悬浮剂、乳化剂、抗微生物剂、滚圆剂(spheronization agent)及其任意组合。

[0111] 本发明的组合物可以是例如即释形式或控释制剂。可以配制即释制剂以使化合物快速起作用。即释制剂的非限制性实例包括易溶解的制剂。控释制剂可以已经适应以使得活性剂的释放速率和释放曲线可以与生理和时间治疗要求相匹配,或者可选地,配制以编程速率实现活性剂释放的药物制剂。控释制剂的非限制性实例包括颗粒、延迟释放颗粒、水凝胶(例如,合成或天然来源的)、其他胶凝剂(例如,形成凝胶的膳食纤维)、基于基质的制剂(例如,包含具有至少一种活性成分分散于其中的聚合物材料的制剂)、基质内颗粒、聚合物混合物和颗粒状物质。

[0112] 在一些实施方案中,控释制剂是延迟释放形式。可以配制延迟释放形式以延迟化合物的作用一段延长的时间。可以配制延迟释放形式以延迟有效剂量的一种或多种化合物的释放,例如,持续约4小时、约8小时、约12小时、约16小时或约24小时的时间。

[0113] 控释制剂可以是持续释放形式。可以配制持续释放形式以例如在延长的时间段内维持化合物的作用。可以配制持续释放形式以在约4、约8、约12、约16或约24小时内提供有

效剂量的本文所述任何化合物(例如,提供生理学上有效的血液分布)。

[0114] 药学上可接受的赋形剂的非限制性实例可以在例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Nineteenth Ed (Easton,Pa.:Mack Publishing Company,1995); Hoover,John E.,Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co., Easton,Pennsylvania1975;Lieberman,H.A.和Lachman,L.,Eds.,Pharmaceutical Dosage Forms,Marcel Decker,New York,N.Y.,1980;和Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Seventh Ed. (Lippincott Williams&Wilkins1999)中找到,其全部内容通过引用并入本文。

[0115] 多种治疗剂可以以任何顺序或同时施用。在一些实施方案中,本发明化合物与抗生素组合,在其之前或之后施用。如果同时,多种治疗剂可以以单一的、统一的形式或以多种形式提供,例如,作为多个单独的药丸。药剂可以在单个包装中或多个包装中一起包装或分开包装。一种或所有治疗剂可以多剂量给予。如果不同时,多个剂量之间的时间可以变化多达大约一个月。

[0116] 本文所述的治疗剂可以在疾病或病症发生之前、期间或之后施用,并且施用含有治疗剂的组合物的时机可以变化。例如,组合物可以用作预防剂,并且可以连续施用于具有病症或疾病倾向的受试者以降低疾病或病症发生的可能性。可以在症状发作期间或在症状发作后尽可能快地将组合物施用于受试者。治疗剂的施用可以在症状发作的最初48小时内、症状发作的前24小时内、症状发作的前6小时内或者在症状发作的前3小时内开始。初始施用可以通过任何实用的途径,例如使用本文描述的任何制剂通过本文描述的任何途径。治疗剂可以在检测到或怀疑疾病或病症发作后,在可行的情况下尽快施用,并且持续治疗疾病需要的一段时间,例如,约1个月到约3个月。治疗的长度对于每个受试者可能不同。

[0117] 本文所述的药物组合物可以是适合于单次施用精确剂量的单位剂型。在单位剂型中,将制剂分成含有适量的一种或多种化合物的单位剂量。单位剂量可以是包含离散量的制剂的包装形式。非限制性实例是包装的注射剂、小瓶或安瓿。水性悬浮组合物可以包装在单剂量的不可重新封闭的容器中。可以使用多剂量的可重新封闭的容器,例如,与防腐剂组合或不与防腐剂组合。用于注射的制剂可以以单位剂量形式存在,例如,在安瓿中,或在具有防腐剂的多剂量容器中。

[0118] 本文提供的药物组合物可以与其他疗法结合施用,例如化疗、放射、手术、抗炎剂和选定的维生素。其他药剂可以在药物组合物之前、之后或同时施用。

[0119] 根据预期的施用方式,药物组合物可以是固体、半固体或液体剂型的形式,例如片剂、栓剂、丸剂、胶囊、粉末、液体、悬浮液、洗剂、乳膏或凝胶,例如,适合单次施用精确剂量的单位剂型。

[0120] 对于固体组合物,非毒性固体载体包括,例如,药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖和碳酸镁。

[0121] 适用于本公开的剂型的非限制性实例包括液体、酞剂、纳米悬浮液、水性或油性悬浮液、滴剂、糖浆及其任何组合。适用于本公开的药学上可接受的赋形剂的非限制性实例包括造粒剂、粘合剂、润滑剂、崩解剂、甜味剂、助流剂、抗粘附剂、抗静电剂、表面活性剂、抗氧化剂、树胶、包衣剂、着色剂、调味剂、涂覆剂、增塑剂、防腐剂、悬浮剂、乳化剂、植物纤维素材料和滚圆剂,以及它们的任意组合。

[0122] 本发明的组合物可以作为试剂盒包装。在一些实施方案中,试剂盒包括关于组合物的施用/使用的书面说明。书面材料可以是例如标签。书面材料可以建议施用方法的条件。该说明书为受试者和指导医师提供了从治疗施用中获得最佳临床结果的最佳指导。书面材料可以是标签。在一些实施方案中,标签可以由管理机构批准,例如美国食品和药物管理局(FDA)、欧洲药品管理局(EMA)或其他管理机构。

[0123] 受试者

[0124] 受试者可以是,例如,老年人、成人、青少年、青春期前儿童、儿童、幼儿、婴儿和非人类动物。在一些实施方案中,受试者是患者。非人动物受试者可以是例如小鼠、大鼠、鸡、兔、狗、猫或牛。

[0125] 给药

[0126] 本文所述的药物组合物可以是适于单次施用精确剂量的单位剂型。在单位剂型中,将制剂分成含有适量一种或多种化合物的单位剂量。单位剂量可以是包含离散量制剂的包装的形式。非限制性实例是小瓶或安瓿中的液体。水性悬浮组合物可以包装在单剂量不可重新封闭的容器中。可以使用多剂量可重新封闭的容器,例如与防腐剂组合。用于肠胃外注射的制剂可以以单位剂型存在,例如,在安瓿中,或在具有防腐剂的多剂量容器中。

[0127] 本文所述化合物可以以每剂量约0.5 μ g、约1 μ g、约2 μ g、约3 μ g、约4 μ g、约5 μ g、约10 μ g、约15 μ g、约20 μ g、约25 μ g、约30 μ g、约35 μ g、约40 μ g、约45 μ g、约50 μ g、约55 μ g、约60 μ g、约65 μ g、约70 μ g、约75 μ g、约80 μ g、约85 μ g、约90 μ g、约95 μ g、约100 μ g、约125 μ g、约150 μ g、约175 μ g、约200 μ g、约250 μ g、约300 μ g、约350 μ g、约400 μ g、约450 μ g、约500 μ g、约550 μ g、约600 μ g、约650 μ g、约700 μ g、约750 μ g、约800 μ g、约850 μ g、约900 μ g、约950 μ g、约1000 μ g(1mg)、约1050 μ g、约1100 μ g、约1150 μ g、约1200 μ g、约1250 μ g、约1300 μ g、约1350 μ g、约1400 μ g、约1450 μ g、约1500 μ g、约1550 μ g、约1600 μ g、约1650 μ g、约1700 μ g、约1750 μ g、约1800 μ g、约1850 μ g、约1900 μ g、约1950 μ g、约2000 μ g(2mg)、约3mg、约4mg、约5mg、约6mg、约7mg、约8mg、约9mg、约10mg、约11mg、约12mg、约13mg、约14mg、约15mg、约16mg、约17mg、约18mg、约19mg、约20mg、约30mg、约40mg、约50mg、约60mg、约70mg、约80mg、约90mg、约100mg、约110mg、约120mg、约130mg、约140mg、约150mg、约160mg、约170mg、约180mg、约190mg或约200mg的量存在于组合物中。这些值的任一个可以用于限定组合物中存在的化合物的量的范围。例如,本文所述化合物可以以每剂量约0.5 μ g-约750 μ g、约1 μ g-约500 μ g、约1 μ g-约250 μ g、约1 μ g-约25 μ g、约5 μ g-约50 μ g、约0.5 μ g-约15 μ g、约0.5 μ g-约10 μ g、约1mg-约7mg或约1mg-约100mg的范围存在于组合物中。

[0128] 在一些实施方案中,剂量可以用药物的量除以受试者的质量来表示,例如,每千克受试者体重的药物的微克或毫克数。在一些实施方案中,化合物的施用量范围为约0.5 μ g/kg至约250 μ g/kg、1 μ g/kg至约200 μ g/kg、5 μ g/kg至约150 μ g/kg、约10 μ g/kg至约100 μ g/kg或约50 μ g/kg至约100 μ g/kg。

[0129] 所公开的化合物可以任何所需的间隔给药。在某些实施方案中,化合物每天施用一次。每日给药的间隔可以是任何以小时计的间隔,例如,每小时、每2小时、每3小时、每4小时、每5小时、每6小时、每7小时、每8小时、每9小时、每次10小时、每11小时或每12小时。化合物的施用可具有不规则的给药时间表以适应于施用化合物的人或接受化合物的受试者。因此,化合物可以例如每天一次、一天两次或一天三次施用。

[0130] 在一些实施方案中,化合物的施用频率低于每天一次,例如,每2天一次、每3天一

次、每4天一次、每5天一次、每6天一次或每7天一次。在一些实施方案中,化合物可以每周一次、每周2次、每周3次、每周4次、每周5次、每周6次、每周7次、每周8次、一周9次或每周10次施用。

[0131] 在某些实施方案中,化合物每周一次施用或施用频率低于每周一次。例如,化合物可以每周一次、每8天一次、每9天一次、每10天一次、每11天一次、每12天一次、每13天一次、每2周一次、每15天一次、每16天一次、每17天一次、每18天一次、每19天一次、每20天一次、每3周一次、每22天一次、每23天一次、每24天一次、每25天一次、每26天一次、每27天一次、每4周一次、每5周一次、每6周一次、每7周一次或每8周一次施用。在一些实施方案中,IL2化合物给药之间的间隔是至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40天。

[0132] 在某些实施方案中,多个剂量的本发明化合物可以施用于受试者。例如,在某些实施方案中,至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个剂量的本发明化合物,或者包含该化合物的药物组合物,施用于受试者。

[0133] 在具体的实施方案中,在食蟹猴中评估不频繁给药(例如每周一次或每两周一次)包含N88R突变的IL2化合物(例如化合物1或化合物2)的作用。例如,化合物2(IL2T3A/N88R/C125S-15氨基酸肽接头-Fc)或阿地白介素(IL-2 C125S)可以施用于食蟹猴以比较对免疫细胞群体的影响。化合物可以通过皮下注射(SC)以下表1A中描述的剂量施用。

[0134] 表1A. 处理组和剂量

[0135]

组	动物数	给药日	测试品	剂量($\mu\text{g/kg}$)	途径
1	6	1和8	CC92252	200	SC
2	6	1和15	CC92252	200	
3	3	1和8	阿地白介素	36.9	

[0136] 可以在以下时间点收集全血样品用于免疫细胞分析:

[0137] 第1组和第3组:第1天(给药前),第4、6、8天(给药前),第10、11、12、13、15、17和19天;

[0138] 第2组:第1天(给药前),第4、6、8天(给药前),第10、12、15天(给药前),第18、20、22、24和26天。

[0139] 可以通过流式细胞术分析样品以使用下表1B中所示的流式细胞术实验组确定免疫细胞的水平。流式细胞术抗原和可以鉴定的免疫细胞群体显示在表1C中。

[0140] 表1B. 流式细胞术实验组

[0141]

Fluor.	BV421	BV510	FITC	PE	perCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-Cy7
实验组1	CD20	CD8	CD127	FoxP3	CD3	Ki67	CD25	CD4
实验组2	CTLA-4	CD39	CD127	FoxP3	CD3	ICOS	CD25	CD4

[0142] 表1C. 流式细胞术抗原和细胞群体

[0143]

抗原标志物	鉴定的细胞群体
-------	---------

CD3+/CD4+/FOXP3+/CD127lo	Treg
CD3+/CD4+/CD25hi (设定在基线的前1%)	CD4/CD25hi
CD3+/CD4+/FOXP3-/CD127+	Tconv
CD3+/CD8+	CD8
CD3-/CD20-/CD8+	NK
CD3+/CD4+/FOXP3+/CD127lo/CD39MFI	激活的Treg CD39
CD3+/CD4+/FOXP3+/CD127lo./CTLA4MFI	激活的Treg CTLA-4
CD3+/CD4+/FOXP3+/CD127lo/ICOS MFI	激活的Treg ICOS
CD3+/CD4+//FOXP3+/CD127lo/CD25MFI	激活的Treg CD25MFI
CD3+/CD4+/FOXP3+/CD127lo/Ki67+	增殖Treg
CD3+/CD4+/FOXP3-/CD127+/Ki67+	增殖Tconv
CD3+/CD8+/Ki67+	增殖CD8
CD3-/CD20-/CD8+/Ki67+	增殖NK

[0144] 图22中提供了用于评估化合物1或化合物2的示例性给药和采样时间表。

[0145] 预期当化合物1或化合物2在第8天作为皮下剂量施用,这一第二剂量接近Treg增殖的峰值、Treg数量的增加和Treg功能激活的增强。当化合物1或化合物2在第15天施用,预期Treg增殖数量和功能激活的增加已下降接近于基线水平。实施例23中提供了化合物1或化合物2的水平、调节性T细胞水平和调节性T细胞激活的示例性预期结果。

[0146] 在一些实施方案中,给药频率可以通过测量施用第一剂量的本发明化合物后调节性T细胞中生物标志物的水平(例如蛋白质或mRNA水平)来确定。生物标志物可包括但不限于CD25、FOXP3、CTLA-4(细胞毒性T-淋巴细胞相关蛋白4)、ICOS(可诱导T细胞共刺激剂)和CD39(NTPDase1,或膜外核苷三磷酸二磷酸酶-1)。在具体实施方案中,生物标志物是CD25。生物标志物水平也可以在后续剂量的本发明化合物后测定,例如在第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十剂量后。可以在施用本发明化合物后的几个时间点(例如每天一次)测定生物标志物水平以鉴定生物标志物的峰值水平,即在向受试者施用一定剂量的化合物后,但在施用后续剂量之前达到的生物标志物的最高水平。例如,在一些实施方案中,在向受试者施用一剂本发明化合物后,生物标志物水平被测定至少一次或至少2、3、4、5、6、7、8、9或10次。生物标志物水平可以足以鉴定生物标志物的峰值水平的任何间隔测定,例如,每8小时至少一次、每12小时至少一次、每天至少一次、每两天至少一次、每3天至少一次、每4天至少一次、每5天至少一次、每6天至少一次或每周至少一次。

[0147] 预期生物标志物的水平在施用本发明化合物后增加,达到峰值水平,和然后随时间从峰值水平降低。一旦生物标志物的水平从峰值水平降低,可以施用后续剂量。在一些实施方案中,一旦生物标志物的水平相对于生物标志物的峰值水平降低约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%,则向受试者施用后续剂量。在一些实施方案中,一旦生物标志物的水平相对于生物标志物的峰值水平降低至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%,则将后续剂量施用于受试者。这些值中的任何一个可用于定义生物标志物从峰值水平降低的百分比的范围,例如,5%至15%、5%至25%或10%至50%。

[0148] 在具体的实施方案中,本发明涉及一种治疗自身免疫疾病的方法,该方法包括向需要的受试者施用第一剂量的治疗有效量的本发明药物组合物;测量在向受试者施用第一剂量后从受试者获得的样品中生物标志物的表达以确定测定生物标志物的峰值水平;和当至少一种生物标志物的水平相对于生物标志物的峰值水平降低至少10%时,向受试者施用第二剂量的治疗有效量的药物组合物。在一些实施方案中,该方法还包括从受试者收集样品。在某些实施方案中,从受试者获得的样品是血液样品或组织样品(例如皮肤样品)。

[0149] 可通过测量生物标志物的核酸水平(例如mRNA水平)或蛋白质水平来确定调节性T细胞中生物标志物的水平。为了检测编码生物标志物的核酸(例如mRNA)的水平,可以使用任何合适的方法,包括但不限于Northern印迹分析、聚合酶链式反应(PCR)(参见,例如,美国专利号4,683,195、4,683,202和6,040,166;“PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications”,Innis et al.(Eds),1990,Academic Press:New York)、逆转录酶PCR(RT-PCR)、锚定PCR、竞争性PCR(参见,例如,美国专利号5,747,251)、cDNA末端的快速扩增(RACE)(参见,例如,“Gene Cloning and Analysis:Current Innovations,1997,pp.99-115);连接酶链式反应(LCR)(参见,例如,EP 01 320 308)、单侧PCR(Ohara等,Proc.Natl.Acad.Sci.,1989,86:5673-5677)、原位杂交、定量实时PCR,例如,基于Taqman的测定(Holland等,Proc.Natl.Acad.Sci.,1991,88:7276-7280)、差异显示(参见,例如,Liang等,Nucl.Acids.Res.,1993,21:3269-3275)和其他RNA指纹技术、基于核酸序列的扩增(NASBA)和其他基于转录的扩增系统(参见,例如,美国专利号5,409,818和5,554,527)、Qbeta复制酶、链置换扩增(SDA)、修复链反应(RCR)、核酸酶保护测定、基于减除的方法、Rapid-Scan®等。

[0150] 在一些实施方案中,可以通过扩增由mRNA产生的互补DNA(cDNA)或互补RNA(cRNA)并使用微阵列对其进行分析来测定生物标志物的基因表达水平。许多不同的阵列配置和它们的制造方法是本领域技术人员已知的(参见,例如,美国专利号5,445,934;5,532,128;5,556,752;5,242,974;5,384,261;5,405,783;5,412,087;5,424,186;5,429,807;5,436,327;5,472,672;5,527,681;5,529,756;5,545,531;5,554,501;5,561,071;5,571,639;5,593,839;5,599,695;5,624,711;5,658,734;和5,700,637)。微阵列技术允许同时测量大量基因的稳态mRNA水平。目前广泛使用的微阵列包括cDNA阵列和寡核苷酸阵列。使用微阵列的分析通常基于从用于检测来自样品的cDNA序列的标记探针接收的信号强度的测量,所述cDNA序列与固定在微阵列上的已知位置的核酸探针杂交(参见,例如,美国专利号6,004,755;6,218,114;6,218,122;和6,271,002)。基于阵列的基因表达方法是本领域已知的,并且已在许多科学出版物以及专利中进行了描述(参见,例如,M.Schena等,Science,1995,270:467-470;M.Schena等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1996,93:10614-10619;J.J.Chen等,Genomics,1998,51:313-324;美国专利号5,143,854;5,445,934;5,807,522;5,837,832;6,040,138;6,045,996;6,284,460;和6,607,885)。

[0151] 调节性T细胞中生物标志物的蛋白质水平可以通过用于检测多肽的任何合适方法来测定。在某些实施方案中,检测方法是涉及特异性结合生物标志物的抗体的免疫检测方法。各种有用的免疫检测方法的步骤已在科学文献中描述,例如Nakamura等(1987)。通常,免疫结合方法包括从受试者获得含有调节性T细胞的样品,并使样品与对生物标志物特异的抗体接触以形成免疫复合物。一般,免疫复合物形成的检测在本领域中是公知的,并且可

以通过应用多种途径来实现。这些方法通常基于标记或标志物的检测,例如本领域的任何标准用途的放射性、荧光、生物或酶标签或标记物。关于这些标记的使用的美国专利包括美国专利号3,817,837;3,850,752;3,939,350;3,996,345;4,277,437;4,275,149和4,366,241。用于检测生物标志物的蛋白质水平的方法包括但不限于流式细胞术、酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、蛋白质印迹、斑点印迹和蛋白质质谱法。

[0152] 施用于受试者的本发明化合物的量可以是每个剂量中相同的量或剂量可以变化。例如,第一量可以在早晨给药,和第二量可以在晚上给药。受试者可以接受高的第一剂量和较低的后续剂量。可以根据疾病的症状或标志物的改善或者不良反应的发生来上调或下调剂量。

[0153] 包含本发明化合物的药物组合物可进一步包含药学上可接受的载体。药学上可接受的载体的非限制性实例包括盐水、林格氏溶液和葡萄糖溶液。液体载体可用于制备溶液、悬浮液和乳液。本文所述的化合物可以溶解或悬浮在药学上可接受的液体载体(例如水、有机溶剂或两者的混合物)或药学上可接受的油或脂肪中。液体载体可含有其它合适的药物添加剂,例如增溶剂、乳化剂、缓冲剂、防腐剂、甜味剂、调味剂、悬浮剂、增稠剂、着色剂、粘度调节剂、稳定剂和渗透调节剂。用于肠胃外施用的液体载体的实例包括水、醇(包括一元醇和多元醇,例如二醇)及其衍生物,和油(例如,分馏椰子油和花生油)。对于肠胃外施用,载体可以是油性酯,例如油酸乙酯或肉豆蔻酸异丙酯。无菌液体载体用于无菌液体形式的组合物中以用于肠胃外施用。在某些实施方案中,溶液的pH为约5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5或8.0。这些值中的任何一个都可用于定义溶液pH的范围。例如,溶液的pH可以为约5至约8、约5至约7、约5.5至约6.5或约7至约7.5。

[0154] 在一些实施方案中,用本公开分子的治疗比用野生型IL-2多肽或IL-2(C125S)多肽(例如阿地白介素)的治疗更好耐受。在一些实施方案中,相对于用IL2(C125S)(例如阿地白介素)治疗,用治疗有效剂量的本公开分子治疗引起更小的腹泻发生率。如图2A所示,单剂量的IL-2(IL2(C125S))不足以诱导显著的Treg增殖,但重复剂量在研究中的所有动物中引起腹泻。相反,在用化合物1治疗的受试者中未观察到不良反应(参见图3A)。在一些实施方案中,用治疗有效量的本公开分子治疗不会引起毛细血管渗漏综合征。在一些实施方案中,用治疗有效量的本公开分子治疗不会导致嗜中性粒细胞活性降低或感染风险增加。

[0155] 药代动力学

[0156] 如本文所述,可以调节剂量以实现期望的药代动力学(PK)或药效学特征,例如期望的或有效的血液分布。

[0157] 可以通过各种实验技术获得药代动力学和药效学数据。描述特定组合物的合适的药代动力学和药效学特征组分可因人类受试者中药物代谢的变异而变化。药代动力学和药效学特征可以基于确定一组受试者的平均参数。该组受试者包括任何合理数量的适合于确定代表性平均值的受试者,例如,5个受试者、10个受试者、15个受试者、20个受试者、25个受试者、30个受试者、35个受试者或更多。例如,通过针对所测量的每个参数计算所有受试者测量值的平均来确定平均值。如本文所述,可以调节剂量以实现期望的药代动力学或药效学特征,例如期望的或有效的血液分布。

[0158] 药效学参数可以是适合于描述本发明的组合物的任何参数。例如,药效学特征可以在例如给药后约0分钟、1分钟、约2分钟、约3分钟、约4分钟、约5分钟、约6分钟、约7分钟、

约8分钟、约9分钟、约10分钟、约11分钟、约12分钟、约13分钟、约14分钟、约15分钟、约16分钟、约17分钟、约18分钟、约19分钟、约20分钟、约21分钟、约22分钟、约23分钟、约24分钟、约25分钟、约26分钟、约27分钟、约28分钟、约29分钟、约30分钟、约31分钟、约32分钟、约33分钟、约34分钟、约35分钟、约36分钟、约37分钟、约38分钟、约39分钟、约40分钟、约41分钟、约42分钟、约43分钟、约44分钟、约45分钟、约46分钟、约47分钟、约48分钟、约49分钟、约50分钟、约51分钟、约52分钟、约53分钟、约54分钟、约55分钟、约56分钟、约57分钟、约58分钟、约59分钟、约60分钟、约零小时、约0.5小时、约1小时、约1.5小时、约2小时、约2.5小时、约3小时、约3.5小时、约4小时、约4.5小时、约5小时、约5.5小时、约6小时、约6.5小时、约7小时、约7.5小时、约8小时、约8.5小时、约9小时、约9.5小时、约10小时、约10.5小时、约11小时、约11.5小时、约12小时、约12.5小时、约13小时、约13.5小时、约14小时、约14.5小时、约15小时、约15.5小时、约16小时、约16.5小时、约17小时、约17.5小时、约18小时、约18.5小时、约19小时、约19.5小时、约20小时、约20.5小时、约21小时、约21.5小时、约22小时、约22.5小时、约23小时、约23.5小时、约24小时、约25小时、约26小时、约27小时、约28小时、约29小时、约30小时、约31小时、约32小时、约33小时、约34小时、约35小时、约36小时、约37小时、约38小时、约39小时、约40小时、约41小时、约42小时、约43小时、约44小时、约45小时、约46小时、约47小时、约48小时、约60小时、约72小时、约84小时、约96小时、约108小时、约120小时、约132小时、约144小时(7天)、约8天、约9天、约10天、约11天、约12天、约13天、约14天、约15天、约16天、约17天、约18天、约19天、约20天、约21天、约22天、约23天、约24天、约25天、约26天、约27天、约28天、约29天、约30天或约31天的时间获得。

[0159] 药代动力学参数可以是适合于描述化合物的任何参数。 C_{\max} 可以,例如,不小于约1ng/mL、不小于约5ng/mL、不小于约10ng/mL、不小于约15ng/mL、不小于约20ng/mL、不小于约25ng/mL、不小于约50ng/mL、不小于约75ng/mL、不小于约100ng/mL、不小于约200ng/mL、不小于约300ng/mL、不小于约400ng/mL、不小于约500ng/mL、不小于约600ng/mL、不小于约700ng/mL、不小于约800ng/mL、不小于约900ng/mL、不小于约1000ng/mL、不小于约1250ng/mL、不小于约1500ng/mL、不小于约1750ng/mL、不小于约2000ng/mL、不小于约2500ng/mL;或适合于描述本文所述化合物的药代动力学特征的任何其它 C_{\max} 。当通过静脉内注射以例如50 μ g/kg施用, C_{\max} 可以是,例如,血液里约5-约10,000ng/mL、约50-约10,000ng/mL、约500-约10,000ng/mL、约5000-约10,000ng/mL、约1000-约5,000ng/mL、约1000-约3,000ng/mL、约5,000-约8,000ng/mL或约500-约1000ng/mL。当通过皮下注射以例如50 μ g/kg施用, C_{\max} 可以是,例如,血液里约5-约50ng/mL、约50-约500ng/mL、约100-约250ng/mL、约1000-约5000ng/mL、约1000-约2000ng/mL、约2000-约5000ng/mL、约5000-约10000ng/mL或约5000-约7000ng/mL。 C_{\max} 可以取决于接受的化合物的剂量。接受的剂量可以是1 μ g/kg、5 μ g/kg、10 μ g/kg、20 μ g/kg、30 μ g/kg、40 μ g/kg、50 μ g/kg、100 μ g/kg、200 μ g/kg、250 μ g/kg、300 μ g/kg、400 μ g/kg、500 μ g/kg、600 μ g/kg、700 μ g/kg、800 μ g/kg、900 μ g/kg、1000 μ g/kg、1500 μ g/kg、2000 μ g/kg、2500 μ g/kg或3000 μ g/kg。

[0160] 本文所述化合物的 T_{\max} 可以,例如,不大于约0.5小时、不大于约1小时、不大于约1.5小时、不大于约2小时、不大于约2.5小时、不大于约3小时、不大于约3.5小时、不大于约4小时、不大于约4.5小时、不大于约5小时、不大于约5.5小时、不大于约6小时、不大于约6.5小时、不大于约7小时、不大于约7.5小时、不大于约8小时、不大于约8.5小时、不大于约9小

时、不大于约9.5小时、不大于约10小时、不大于约10.5小时、不大于约11小时、不大于约11.5小时、不大于约12小时、不大于约12.5小时、不大于约13小时、不大于约13.5小时、不大于约14小时、不大于约14.5小时、不大于约15小时、不大于约15.5小时、不大于约16小时、不大于约16.5小时、不大于约17小时、不大于约17.5小时、不大于约18小时、不大于约18.5小时、不大于约19小时、不大于约19.5小时、不大于约20小时,或适合于描述本文所述化合物的药代动力学特征的任何其它 T_{\max} 。 T_{\max} 可以是,例如,约0.1小时-约24小时、约0.1小时-约0.5小时、约0.5小时-约1小时、约1小时-约1.5小时、约1.5小时-约2小时、约2小时-约2.5小时、约2.5小时-约3小时、约3小时-约3.5小时、约3.5小时-约4小时、约4小时-约4.5小时、约4.5小时-约5小时、约5小时-约5.5小时、约5.5小时-约6小时、约6小时-约6.5小时、约6.5小时-约7小时、约7小时-约7.5小时、约7.5小时-约8小时、约8小时-约8.5小时、约8.5小时-约9小时、约9小时-约9.5小时、约9.5小时-约10小时、约10小时-约10.5小时、约10.5小时-约11小时、约11小时-约11.5小时、约11.5小时-约12小时、约12小时-约12.5小时、约12.5小时-约13小时、约13小时-约13.5小时、约13.5小时-约14小时、约14小时-约14.5小时、约14.5小时-约15小时、约15小时-约15.5小时、约15.5小时-约16小时、约16小时-约16.5小时、约16.5小时-约17小时、约17小时-约17.5小时、约17.5小时-约18小时、约18小时-约18.5小时、约18.5小时-约19小时、约19小时-约19.5小时、约19.5小时-约20小时、约20小时-约20.5小时、约20.5小时-约21小时、约21小时-约21.5小时、约21.5小时-约22小时、约22小时-约22.5小时、约22.5小时-约23小时、约23小时-约23.5小时或约23.5小时-约24小时。

[0161] 本文所述化合物的 $AUC_{(0-\infty)}$ (也称为 $AUC_{(0-\infty)}$) 或 $AUC_{(最后)}$ 可以,例如,不小于约 $1ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $5ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $10ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $20ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $30ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $40ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $50ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $100ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $150ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $200ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $250ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $300ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $350ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $400ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $450ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $500ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $600ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $700ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $800ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $900ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $1000ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $1250ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $1500ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $1750ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $2000ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $2500ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $3000ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $3500ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $4000ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $5000ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $6000ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $7000ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $8000ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $9000ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $10,000ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $11,000ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $12,000ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $13,000ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $14,000ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $15,000ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $16,000ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $17,000ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $18,000ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $19,000ng \cdot hr/mL$ 、不小于约 $20,000ng \cdot hr/mL$,或适合于描述本文所述化合物的药代动力学特征的任何其它 $AUC_{(0-\infty)}$ 。化合物的 $AUC_{(0-\infty)}$ 可以是,例如,约 $1ng \cdot hr/mL$ -约 $10,000ng \cdot hr/mL$ 、约 $1ng \cdot hr/mL$ -约 $10ng \cdot hr/mL$ 、约 $10ng \cdot hr/mL$ -约 $25ng \cdot hr/mL$ 、约 $25ng \cdot hr/mL$ -约 $50ng \cdot hr/mL$ 、约 $50ng \cdot hr/mL$ -约 $100ng \cdot hr/mL$ 、约 $100ng \cdot hr/mL$ -约 $200ng \cdot hr/mL$ 、约 $200ng \cdot hr/mL$ -约 $300ng \cdot hr/mL$ 、约 $300ng \cdot hr/mL$ -约 $400ng \cdot hr/mL$ 、约 $400ng \cdot hr/mL$ -约 $500ng \cdot hr/mL$ 、约 $500ng \cdot hr/mL$ -约 $600ng \cdot hr/mL$ 、约 $600ng \cdot hr/mL$ -约 $700ng \cdot hr/mL$ 、约 $700ng \cdot hr/mL$ -约 $800ng \cdot hr/mL$ 、约 $800ng \cdot hr/mL$ -约

900ng • hr/mL、约900ng • hr/mL-约1,000ng • hr/mL、约1,000ng • hr/mL-约1,250ng • hr/mL、约1,250ng • hr/mL-约1,500ng • hr/mL、约1,500ng • hr/mL-约1,750ng • hr/mL、约1,750ng • hr/mL-约2,000ng • hr/mL、约2,000ng • hr/mL-约2,500ng • hr/mL、约2,500ng • hr/mL-约3,000ng • hr/mL、约3,000ng • hr/mL-约3,500ng • hr/mL、约3,500ng • hr/mL-约4,000ng • hr/mL、约4,000ng • hr/mL-约4,500ng • hr/mL、约4,500ng • hr/mL-约5,000ng • hr/mL、约5,000ng • hr/mL-约5,500ng • hr/mL、约5,500ng • hr/mL-约6,000ng • hr/mL、约6,000ng • hr/mL-约6,500ng • hr/mL、约6,500ng • hr/mL-约7,000ng • hr/mL、约7,000ng • hr/mL-约7,500ng • hr/mL、约7,500ng • hr/mL-约8,000ng • hr/mL、约8,000ng • hr/mL-约8,500ng • hr/mL、约8,500ng • hr/mL-约9,000ng • hr/mL、约9,000ng • hr/mL-约9,500ng • hr/mL、约9,500ng • hr/mL-约10,000ng • hr/mL、约10,000ng • hr/mL-约10,500ng • hr/mL、约10,500ng • hr/mL-约11,000ng • hr/mL、约11,000ng • hr/mL-约11,500ng • hr/mL、约11,500ng • hr/mL-约12,000ng • hr/mL、约12,000ng • hr/mL-约12,500ng • hr/mL、约12,500ng • hr/mL-约13,000ng • hr/mL、约13,000ng • hr/mL-约13,500ng • hr/mL、约13,500ng • hr/mL-约14,000ng • hr/mL、约14,000ng • hr/mL-约14,500ng • hr/mL、约14,500ng • hr/mL-约15,000ng • hr/mL、约15,000ng • hr/mL-约15,500ng • hr/mL、约15,500ng • hr/mL-约16,000ng • hr/mL、约16,000ng • hr/mL-约16,500ng • hr/mL、约16,500ng • hr/mL-约17,000ng • hr/mL、约17,000ng • hr/mL-约17,500ng • hr/mL、约17,500ng • hr/mL-约18,000ng • hr/mL、约18,000ng • hr/mL-约18,500ng • hr/mL、约18,500ng • hr/mL-约19,000ng • hr/mL、约19,000ng • hr/mL-约19,500ng • hr/mL或约19,500ng • hr/mL-约20,000ng • hr/mL。例如,当以50 μ g/kg静脉内施用,化合物的AUC_(0-inf)可以是约8500ng • hr/mL,或当以50 μ g/kg皮下施用,可以是约4000ng • hr/mL。

[0162] 本文所述化合物的血浆浓度可以,例如,不小于约1ng/mL、不小于约5ng/mL、不小于约10ng/mL、不小于约15ng/mL、不小于约20ng/mL、不小于约25ng/mL、不小于约50ng/mL、不小于约75ng/mL、不小于约100ng/mL、不小于约150ng/mL、不小于约200ng/mL、不小于约300ng/mL、不小于约400ng/mL、不小于约500ng/mL、不小于约600ng/mL、不小于约700ng/mL、不小于约800ng/mL、不小于约900ng/mL、不小于约1000ng/mL、不小于约1200ng/mL,或本文所述化合物的任何其它血浆浓度。血浆浓度可以是,例如,约1ng/mL-约2,000ng/mL、约1ng/mL-约5ng/mL、约5ng/mL-约10ng/mL、约10ng/mL-约25ng/mL、约25ng/mL-约50ng/mL、约50ng/mL-约75ng/mL、约75ng/mL-约100ng/mL、约100ng/mL-约150ng/mL、约150ng/mL-约200ng/mL、约200ng/mL-约250ng/mL、约250ng/mL-约300ng/mL、约300ng/mL-约350ng/mL、约350ng/mL-约400ng/mL、约400ng/mL-约450ng/mL、约450ng/mL-约500ng/mL、约500ng/mL-约600ng/mL、约600ng/mL-约700ng/mL、约700ng/mL-约800ng/mL、约800ng/mL-约900ng/mL、约900ng/mL-约1,000ng/mL、约1,000ng/mL-约1,100ng/mL、约1,100ng/mL-约1,200ng/mL、约1,200ng/mL-约1,300ng/mL、约1,300ng/mL-约1,400ng/mL、约1,400ng/mL-约1,500ng/mL、约1,500ng/mL-约1,600ng/mL、约1,600ng/mL-约1,700ng/mL、约1,700ng/mL-约1,800ng/mL、约1,800ng/mL-约1,900ng/mL或约1,900ng/mL-约2,000ng/mL。

[0163] 药效学参数可以是适合于描述本公开的组合物任何参数。例如,药效学特征可以表现出增加的Treg细胞计数,例如,约24小时、约48小时、约72小时或1周的时间。

[0164] 可以对于用本发明方法施用的化合物计算的药效学和药代动力学参数的非限制

性实例包括:a)施用的药物量,其可以表示为剂量D;b)给药间隔,其可表示为 τ ;c)其中药物分布的表观体积,其可以表示为分布容积 V_d ,其中 $V_d=D/C_0$;d)给定血浆体积中的药物量,其可表示为浓度 C_0 或 C_{ss} ,其中 C_0 或 $C_{ss}=D/V_d$,并且可表示为多个样品的平均血浆浓度;e)药物的半衰期 $t_{1/2}$,其中 $t_{1/2}=\ln(2)/k_e$;f)药物从体内移除的速率 k_e ,其中 $k_e=\ln(2)/t_{1/2}=CL/V_d$;g)平衡方程式 K_{in} 所需的输注速率,其中 $K_{in}=C_{ss}\cdot CL$;h)施用单剂量后浓度-时间曲线的积分,其可表示为 $AUC_{0-\infty}$,其中 $\int_0^{\infty} C dt$,或处于稳态,其可表示为 AUC^{τ}_{ss} ,其中 $\int_t^{t+\tau} C dt$;i)每单位时间药物清除的血浆体积,其可表示为CL(清除率),其中 $CL=V_d\cdot k_e=D/AUC$;j)药物的系统可用分数,其可表示为f,其中 $f=\frac{AUC_{po}\cdot Div}{AUC_{iv}\cdot Dpo}$;k)施用后药物的峰值血药浓度 C_{max} ;l)药物达到 C_{max} 所花费的时间 t_{max} ;m)在施用下一剂量前药物达到的最低浓度 C_{min} ;和n)稳态下一个给药间隔内的峰谷波动,其可表示为 $\%PTF=100\cdot\frac{(C_{max,ss}-C_{min,ss})}{C_{av,ss}}$,其中 $C_{av,ss}=\frac{AUC\tau_{ss}}{\tau}$ 。

[0165] 本公开的化合物当施用于受试者时可以具有高稳定性。施用的化合物可以具有大于约6hr、大于约7hr、大于约8hr、大于约9hr、大于约10hr、大于约11hr、大于约12hr、大于约13hr、大于约14hr、大于约15hr、大于约16hr、大于约17hr、大于约18hr、大于约19hr、大于约20hr、大于约21hr、大于约22hr、大于约23hr、大于约24hr、大于约25hr、大于约26hr、大于约27hr、大于约28hr、大于约29hr、大于约30hr、大于约31hr、大于约32hr、大于约33hr、大于约34hr、大于约35hr、大于约36hr、大于约37hr、大于约38hr、大于约39hr、大于约40hr、大于约41hr、大于约42hr、大于约43hr、大于约44hr、大于约45hr、大于约46hr、大于约47hr、大于约48hr、大于约49hr、大于约50hr、大于约51hr、大于约52hr、大于约53hr、大于约54hr、大于约55hr、大于约56hr、大于约57hr、大于约58hr、大于约59hr、大于约60hr、大于约61hr、大于约62hr、大于约63hr或大于约64hr的生理半衰期。

[0166] 本公开化合物的半衰期可基于施用剂量而变化。例如,当以50 μ g/kg的剂量施用时代化合物的半衰期可短于当以100 μ g/kg或250 μ g/kg的剂量施用时代化合物的半衰期(参见,例如,图9)。化合物的半衰期可根据使用的施用途径而变化。如果化合物皮下施用而不是静脉内施用,则化合物的半衰期可以较长。例如,皮下递送的化合物的半衰期可为约15小时至约25小时,而静脉内递送的化合物的半衰期可为约5至约15小时。在一些实施方案中,当以50 μ g/kg静脉内施用时代化合物的半衰期为约6小时至约14小时、约7小时至约13小时、约8小时至约12小时或约9小时至约11小时。在一些实施方案中,当以50 μ g/kg静脉内施用时代化合物的半衰期为约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约13小时、约14小时或约15小时。在一些实施方案中,当以50 μ g/kg皮下施用时代化合物的半衰期为约15小时至约27小时、约16小时至约26小时、约17小时至约25小时、约18小时至约24小时、约19小时至约23小时或约20小时至约22小时。在一些实施方案中,当以50 μ g/kg皮下施用时代化合物的半衰期为约10小时、约11小时、约12小时、约13小时、约14小时、约15小时、约16小时、约17小时、约18小时、约19小时、约21小时、约22小时、约23小时、约24小时、约25小时、约26小时、约27小时、约28小时、约29小时或约30小时。对于静脉内递送的化合物,化合物从血液的清除可能比皮下递送的化合物更快。如图10A和10B中所示,当以50

μg/kg皮下注射而不是以50μg/kg静脉内注射时,化合物1具有更长的半衰期和更慢的血液清除率。

[0167] 给出以下实施例是为了说明本发明的各种实施方案的目的,其并不意味着以任何方式限制本发明。本发明的实施例以及本文所述的方法目前是优选实施方案的代表,是示例性的,且并不意图作为对本发明范围的限制。本领域技术人员将想到其中的变化和包含在由权利要求的范围限定的本发明的精神内的其他用途。

[0168] 序列列表

[0169]

SEQ ID NO:	描述
------------	----

[0170]

1	N88R/C125S IL2(化合物 1 的 IL2 变体)
2	野生型人 IL-2
3	T3A/N88R/C125S IL2(化合物 2 的 IL2 变体)
4	N88R/C125S IL2-肽接头(SEQ ID NO: 6) - Fc (SEQ ID NO: 7)(化合物 1)
5	T3A/N88R/C125S IL2-肽接头(SEQ ID NO: 6) - Fc (SEQ ID NO: 7)(化合物 2)
6	15 氨基酸肽接头(GGGGSGGGGSGGGGS)
7	具有 N297A 突变的 IgG1 Fc 区

[0171] 实施例

[0172] 实施例1-基于IL-2的分子在食蟹猴中的评估:单次给药或每日给药

[0173] 将3至8岁龄的雄性食蟹猴用于该研究。动物来源于SNBL USAStock且起源于柬埔寨。动物通过独特的皮肤纹身识别。在实验开始时,猴子的体重范围为2.5至4kg。将动物圈养在温度和湿度受控的环境中。温度和相对湿度的目标范围分别为18至29℃和30至70%。设置自动照明系统以提供12小时明/暗周期。

[0174] 每天两次向动物提供PMILabDiet® Fiber-Plus® Monkey Diet5049饼干。根据需要通过特定程序(例如,在用于血清化学的抽血、尿液收集之前)对动物禁食。定期分析饮食的污染物,并发现其符合制造商的规格。据信没有污染物以干扰研究结果的水平存在。随意地向所有动物提供新鲜饮用水。定期分析水的污染物。根据标准操作程序,在整个研究过程中给动物提供水果、蔬菜、其他膳食补充剂和笼富集(cage enrichment)装置。

[0175] 本研究中使用的化合物列于表1D中。化合物1、化合物2、REF205和REF210在HEK-293细胞中表达,通过蛋白A色谱纯化,并通过Lakepharma, Inc (Belmont, CA) 使用尺寸排阻色谱法(SEC)进一步纯化。IL-2 (C125S) 由Prometheus, Inc. (San Diego, CA) 制造。

[0176] 表1D:测试化合物

[0177]

测试品	描述
化合物1	IL2(N88R, C125S)-15氨基酸肽接头-Fc

[0178]

化合物2	IL2(T3A, N88R, C125S)-15氨基酸肽接头-Fc
REF205	IL2(C125S)-15氨基酸肽接头-Fc
REF210	Fc-5氨基酸肽接头-IL2(V91K)
IL-2(C125S)	IL-2对照

[0179] 所有Fc融合蛋白的储备溶液确定具有<1EU/mg的内毒素水平。

[0180] 最初意图的是在与化合物1、化合物2和REF210相同的中等剂量水平 (50μg/kg) 下测试REF205。然而,在生产规模扩大后,如通过SEC评估的,REF205蛋白被确定为高度聚集的 (25.6%单体),并且不能获得足以以50μg/kg剂量水平给药的产率。因此,REF205转而以10μg/kg的剂量水平施用。

[0181] 因为几种剂量水平以相对低的测试品蛋白质浓度施用,所以将Fc融合蛋白全部配制在含有载体蛋白的缓冲液中以防止吸收到表面和施用装置上。将化合物1、化合物2、REF205和REF210全部配制在30mM HEPES/150mM NaCl/0.5%vol/vol无菌食蟹猴血清 (Bioreclamation Inc., Baltimore, MD) 中,并在-80℃下储存直至施用。来自制造商的小瓶IL-2 (C125S) 用1.2ml无菌注射用水重构以产生1.2ml的含18MIU (1.1mg) rhIL-2, 50mg甘露醇和~180mcg十二烷基硫酸钠缓冲剂的溶液,其用~170mcg磷酸二氢钠和890mcg磷酸氢二钠缓冲至pH值7.5 (范围:7.2-7.8)。将IL-2 (C125S) 用5%葡萄糖水溶液进一步稀释至目标浓度用于注射。

[0182] 如表2所示,给食蟹猴施用单剂量或5个日剂量的测试化合物。在第0、1、3、5、7、9、11和13天收集血液,如图1所示。将来自每个受试者的样品抽吸入K2EDTA收集管中,每个约0.5mL。将样本储存在室温下直至在实验室中处理。

[0183] 表2:处理组和剂量

[0184]

组	测试品	途径	剂量				雄性数
			水平 (μg/kg)	浓度(mg/mL)	体积 ^a (mL/kg)	剂量频率	
1	化合物1	IV	10	0.02	0.5	第1天	3
2	化合物1	IV	50	0.1	0.5	第1天	3
3	化合物1	IV	250	0.5	0.5	第1天	3
4	化合物2	IV	10	0.02	0.5	第1天	3

[0185]

5	化合物2	IV	50	0.1	0.5	第1天	3
6	化合物2	IV	250	0.5	0.5	第1天	3
7	化合物1	SC	50	0.1	0.5	第1天	3
8	化合物2	SC	50	0.1	0.5	第1天	3
9	REF205	IV	50	0.1	0.5	第1天	3
10	REF210	IV	50	0.1	0.5	第1天	3
11	IL-2(C125S)	SC	50	0.2	0.5	第1天	3
12	IL-2(C125S)	SC	50	0.2	0.5	第1-5天	3

[0186] ^a总剂量体积 (mL) 基于第-1天的动物体重计算。

[0187] 用于鉴定NHP全血中的细胞群体的免疫染色过程

[0188] 将全血 (100μL) 添加到荧光团缀合的单克隆抗体 (表3) 中。将样品混合并在黑暗中于2-8℃下孵育 (25-30分钟)。孵育后,通过用1XBD FACS Lyse (其在保留白细胞的同时裂解红细胞) (在ART黑暗中8-12分钟) 的全血裂解分离白细胞。将样品离心 (1700rpm, 5分钟, 带刹车的ART) 并用1X DPBS CMF (1mL) 洗涤一次。将样品倾析, 混合并加入到200μL Fix/Perm缓冲液中, 然后涡旋并在2-8℃下黑暗中孵育30-35分钟。将样品用1mL 1X Perm缓冲液洗涤两次 (如前所述离心), 并重悬于100μL含有Isotype PECy7:5μL/Isotype PE:5μL (对于管1) 或Ki67PECy7:5μL/FoxP3PE:5μL (对于管2) 的1X Perm缓冲液中 (管1含有同种型对照, 且仅用于处理预处理对照样品)。将样品混合并在黑暗中于2-8℃下孵育30-35分钟。用1mL 1X Perm缓冲液洗涤样品两次 (如前所述离心)。将样品倾析并重悬于150μL 1XDPBS CMF中以在流式细胞仪上采集。用Hematology Analyzer计数总白细胞数。

[0189] 对于流式细胞仪,通过在每个测试日按照SOP运行BDCytometer Set-up and Tracking Beads和Spherotech Ultra Rainbow Beads进行常规流体学和校准检验。在初始仪器设置时也进行荧光补偿以解决一个荧光信号可能溢出到另一个荧光信号中的问题。

[0190] 使用FACSCantoII™进行流式细胞术数据采集,其评估两个散射参数和多达八个彩色荧光通道。使用BD FACSDiva™软件获取数据。通过基于前向相对侧向散射的电子门控将白细胞与外周血中的其他细胞类型区分开。该仪器设定为收集100,000个白细胞事件 (管1) 和400,000个白细胞事件 (管2)。产生双组合细胞图以显示P (参数)、LL (-/-)、LR (+/-)、UL (-/+) 和/或UR (+/+) 门控。

[0191] 表3:用于流式细胞分析的抗体

[0192]

标志物	颜色	销售商	克隆
CD127	FITC	BioLegend	A019D5
FOXP3	PE	BioLegend	206D
CD25	APC	eBioscience	CD25-4E3
CD16	PerCP Cy5.5	BioLegend	3G8
Ki67	PECy7	BD	B56
CD4	APCH7	BD	L200
CD8	V510	BioLegend	SK1
CD20	V421	BioLegend	2H7

[0193] 通过已知标志物的表达鉴定血液中的不同细胞群体,如表4所示。

[0194] 表4:通过流式细胞术测量的细胞群体

[0195]

亚集	群体	门控	报告的参数
Treg	比例Treg	CD4+/FOXP3+/CD127-	CD4+的%
Treg	增殖Treg	CD4+/FOXP3+/CD127-/Ki67+	%Ki67+Treg
Treg	激活的Treg	CD4+/FOXP3+/CD127-	FOXP3 MFI
Treg	激活的Treg	CD4+/FOXP3+/CD127-/CD25	CD25 MFI
Treg	绝对细胞数	CD4+/FOXP3+/CD127-	Treg/μl血液

Tconv	比例Tconv	CD4+/FOXP3-/CD127+	CD4+的%
Tconv	增殖Tconv	CD4+/FOXP3-/CD127+/Ki67+	%Ki67+Tconv
Tconv	绝对细胞数	CD4+/FOXP3-/CD127+	Tconv/ μ l血液
CD8	比例CD8	CD8+	淋巴细胞的%
CD8	增殖CD8	CD8+	%CD8+Ki67+
CD8	绝对细胞数	CD8+	CD8/ μ l血液
B	比例B	CD4-/CD8-/CD20+	淋巴细胞的%
B	增殖B	CD4-/CD8-/CD20+/Ki67+	%Ki67+B细胞

[0196] 从细胞的相对比率(淋巴细胞亚集的%) X 计算单个细胞亚集的绝对计数,从血液学分析仪数据计算细胞亚集绝对计数。

[0197] 为了确定IL2 (C125S) 对不同细胞群体的影响,计算了表达Ki67 (增殖标志物) 的每种细胞类型的分数。如图2A所示,单剂量的IL-2仅微弱地刺激了Treg的增殖。接受5个日剂量的IL2 (C125S) 的动物显示出增加的Treg增殖,但也表现出显著的毒性。重复剂量还引发传统T细胞 (Tconv细胞) (图2B) 和CD8+细胞 (图2C) 的增殖,而单剂量仅具有弱的作用。相反,用本公开的两种不同化合物(化合物1和化合物2) 进行单剂量静脉内治疗引起Treg增殖 (图3A),而不激活Tconv (图3B) 或CD8+细胞 (图3C)。10 μ g/kg、50 μ g/kg和250 μ g/kg化合物1和化合物2的单次治疗显示出Treg增殖的剂量依赖性增加。

[0198] 通过将作为Treg的细胞的分数(通过CD4+/FOXP3+/CD127-的流式细胞术门控测定)乘以由血液学分析确定的细胞总数来计算化合物1处理的猴子中每 μ l血浆的Treg细胞总数。如图4A所示,250 μ g/kg化合物1的单剂量治疗导致循环Treg细胞总数14.9倍的增加。较低剂量的化合物1显示出对Treg数量的降低的影响。在任何使用的剂量下,化合物1的治疗都没有导致Tconv (图4B,通过CD4+/FOXP3-/CD127+门控) 或CD8+细胞 (图4C) 的增加。

[0199] 250 μ g/kg化合物1的单剂量治疗的处理也刺激激活标志物FOXP3 (图5A) 和CD25 (图5B) 的表达,如图5A和5B中平均荧光强度的增加所示的,以及Ki67+细胞的百分比 (图5C)。FOXP3是Treg发育和功能所需的转录因子,CD25是IL2R α 受体亚基,而Ki67是仅在增殖细胞中发现的细胞标志物。所有三种激活响应的大小对于化合物1和化合物2两者是与剂量成比例的。所有三种激活响应的动力学相似,激活信号到第7天返回到接近基线水平。

[0200] 与低剂量IL2 (C125S) 相比,化合物1显示出增强的功效。单剂量的最高剂量化合物1或化合物2 (250 μ g/kg) 以摩尔量计与单剂量的IL2 (C125S) 大致等同。单剂量的50 μ g/kg的IL2 (C125S) 相当于3.3mol/kg,而单剂量的化合物1或化合物2相当于3.0mol/kg。六只食蟹猴(每组三只) 用单个静脉内剂量的250 μ g/kg化合物1或五个皮下日剂量的50 μ g/kg IL2 (C125S) 治疗。与接受IL2 (C125S) 的动物相比,接受化合物1的动物显示出更大的Treg细胞峰值诱导 (参见图6)。尽管与5个IL2 (C125S) 日注射相比,化合物1仅施用一次,但是Treg细胞诱导的持续时间对于两种治疗是等同的,两种处理在治疗的第7天和第9天产生相似的Treg数量。作为比较,化合物1表现出比IL2 (C125S) 改善的治疗效力,如每 μ l血浆中Treg细胞的数量所证明的。值得注意的是,从第5-7天,用5XQD IL2 (C125S) 治疗的所有三只动物观察到具有液体或软粪便。这些发现被认为与IL2 (C125S) 治疗有关,因为在治疗组的所有三只动物中都发生,并且因为在化合物的重复剂量后这些现象发生。腹泻是人类中第二常见的IL2 (C125S) 不良事件。

[0201] 与低剂量IL2 (C125S) 相比,化合物1显示出增强的功效。单剂量的最高剂量的化合物1或化合物2 (250 μ g/kg) 在摩尔基础上与单剂量的IL2 (C125S) 大致相等。单剂量的50 μ g/kg的IL2 (C125S) 相当于3.3mol/kg,而单剂量的化合物1或化合物2相当于3.0mol/kg。六只食蟹猴(每组三只)用单次静脉内剂量250 μ g/kg化合物1或每日五次皮下剂量50 μ g/kg IL2 (C125S) 治疗。与接受IL2 (C125S) 的动物相比,接受化合物1的动物显示出更大的Treg细胞峰诱导(参见图6)。尽管与每日注射IL2 (C125S) 相比,化合物1仅施用一次,但是对于两种处理,Treg细胞的诱导持续时间是相等的,两种处理在处理的第7天和第9天产生相似数量的Treg。作为比较,化合物1表现出比IL2 (C125S) 更高的治疗效力,如每 μ l血浆中Treg细胞的数量所证明。值得注意的是,从第5-7天开始,观察到用5XQD IL2 (C125S) 处理的所有三只动物都具有液体或软粪便。这些发现被认为与IL2 (C125S) 治疗有关,因为治疗组中所有三只动物都发生,并且因为在重复给予化合物后发现了这些结果。腹泻是人类中第二常见的IL2 (C125S) 不良事件。

[0202] 与IL2 (C125S) 相比,化合物1导致更多的Treg激活和更高选择性的Treg激活。图7的顶行图面显示来自治疗组的代表动物的免疫细胞的流式细胞分析。Treg细胞和Tconv细胞可通过Foxp3和CD127表达来区分。在未治疗的动物中,Treg细胞与Tconv细胞的比率为0.04。当进一步分析免疫细胞时,17%的Treg细胞表达高Ki67和CD25,从而表明激活。10%的Tconv细胞和24%的CD8细胞表达高Ki67。图7的第二和第三图面显示了在第5天从用250 μ g/kg化合物1单剂量治疗或5个日剂量50 μ g/kg IL2 (C125S) 治疗的动物提取的免疫细胞的流式细胞分析。在化合物1治疗的动物中,Treg细胞与Tconv细胞的比率在第5天为0.7,而在IL2 (C125S) 治疗的动物中,该比率仅为0.3。该数据对应于化合物1治疗的动物中85%的Treg细胞的激活和IL2 (C125S) 治疗的动物中仅55%的Treg细胞的激活。化合物1治疗的动物中Tconv细胞和CD8细胞的进一步激活等同于未治疗动物中的激活水平。相反,IL2 (C125S) 引起这些细胞类型的激活。与未治疗动物中10%的Tconv细胞激活相比,Tconv细胞的激活高达34%,并且而与未处理的动物中24%的CD8细胞激活相比,CD8细胞的激活为62%。

[0203] 改进的Treg激活和选择性在图8A-8B中进一步证明。图8A显示用化合物1 (50 μ g/kg或250 μ g/kg)、Fc-V91K或IL2 (C125S) 治疗的动物的血液中的Treg激活 (Ki67阳性)。250 μ g/kg的化合物1和50 μ g/kg的Fc-V91K显示出类似的Treg激活诱导。但是,如图8B和8C所示,Fc-V91K导致Tconv和CD8细胞的激活。数据表明Fc-V91K缺乏化合物1的选择性。

[0204] 药代动力学分析

[0205] 使用来自R&D Systems (Minneapolis,MN) 的酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒测定食蟹猴血清样品中的测试品 (化合物1、化合物2、IL-2 (C125S)、REF205和REF210) 浓度。测定试剂盒设计为定量血清样品中的Hu-IL-2,但与本研究中测试的IL-2变体分子一起良好地起作用。

[0206] 用测定缓冲液将测试品标准品、QC对照和研究样品稀释至所需的最小1:5稀释度,并与已固定在由供应商提供的96孔微量滴定板上的小鼠抗Hu-IL-2抗体一起孵育。2小时孵育后,洗涤平板以除去任何未结合的物质,并向孔中加入对Hu-IL-2特异性的酶联多克隆抗体。在另外2小时孵育和洗涤后,加入底物溶液并且与初始步骤中结合的TA的量成比率地显色。在添加底物后20分钟停止显色,并在450nm下测量颜色强度。

[0207] 化合物1、化合物2和REF205的测定范围在100%血清中为1.25ng/mL (LLOQ) 至350ng/mL (ULOQ)。REF210的测定范围在100%血清中为0.78ng/mL (LLOQ) 至200ng/mL (ULOQ)。IL-2的测定范围在100%猴血清中为0.63ng/mL (LLOQ) 至40ng/mL (ULOQ)。

[0208] 使用Phoenix WinNonlin (版本6.3, Certara, L.P., St. Louis, MO), 根据Dynamikos的标准操作程序 (DCS_SOP-PK-001r1, “PK Analysis of Plasma (Serum) Concentration Time Data” 和 DCS_SOP-PK-002r1, “Pharmacokinetic/Toxicokinetic Data Analysis by Non-Compartmental Method”) 进行非房室药代动力学分析。本报告中呈现的图形使用SigmaPlot for Windows (13.0, Systat Software Inc., Chicago, IL) 创建。除T_{max}外, 所有毒理动力学参数均报告为3个有效数字。对于数据汇总统计、图形和药代动力学分析, 将第一天的给药 (初始治疗) 指定为时间0。标称PK样本采集时间用于计算汇总统计数据 and 用于图形中的表示。标称PK样品采集时间用于非房室分析, 除非样品采集时间超出可接受的偏差范围。

[0209] 低于测定的定量下限 (BLQ) 的测试品血清浓度如下处理:

[0210] • 给药前样品的BLQ设定为零。

[0211] • 在计算描述性统计数据之前, BLQ设定为零。未报告低于LLOQ的平均浓度。

[0212] • 对于个体和平均浓度的图形显示, BLQ设定为0.00ng/mL。

[0213] 估计以下毒理动力学参数:

[0214] • 最大观察血清浓度, C_{max}, 和最大浓度时间, T_{max}, 是血清浓度对时间数据的直接观察结果。

[0215] • 使用梯形法估算从给药时间到具有可定量浓度的最后PK时间点的血清浓度-时间曲线下面积 (AUC_{0-最后})。

[0216] • 使用线性对数梯形法估算从给药时间外推到无限时间的血清浓度-时间曲线下面积 (AUC_{0-∞})。

[0217] 终末半衰期 (t_{1/2λ_z}) 从与PK曲线的终末 (对数-线性) 部分相关的一阶速率常数 (λ_z) 计算。λ_z通过时间与对数浓度的线性回归估计。

$$[0218] \quad t_{1/2\lambda_z} = \frac{\ln 2}{\lambda_z}$$

[0219] 使用在第1天施用的第一剂量除以得到的AUC_{0-∞}来估计IV剂量的血清清除率 (CL)

$$[0220] \quad CL = \frac{\text{剂量}_{(IV)}}{AUC_{0-\infty}}$$

[0221] 使用在第1天施用的第一剂量或第5天施用的第五剂量除以得到的AUC_{0-∞}来估计SC剂量的血清清除率 (CL/F)

$$[0222] \quad \frac{CL}{F} = \frac{\text{剂量}_{(SC)}}{AUC_{0-\infty}}$$

[0223] 使用λ_z及第一和第五剂量的AUC (0-∞) 估算基于IV和SC剂量的终末期的分布容积 (分别V_z和V_z/F)

$$[0224] \quad V_z = \frac{\text{剂量}_{(IV)}}{\lambda_z \cdot AUC_{0-\infty}}$$

$$[0225] \quad \frac{V_z}{F} = \frac{\text{剂量}_{(SC)}}{\lambda_z \cdot \text{AUC}_{0-\infty}}$$

[0226] 使用浓度-时间曲线下面积和力矩曲线下面积估算平均保留时间 (MRT)

$$[0227] \quad \text{MRT} = \frac{\text{AUMC}}{\text{AUC}}$$

[0228] 通过比较SC剂量的AUC (0-∞) 与静脉内给予的相同剂量的AUC (0-∞) 来估计皮下 (SC) 生物利用度 (F%)

$$[0229] \quad F(\%) = \frac{\text{AUC}_{0-\infty, SC}}{\text{AUC}_{0-\infty, IV}} \times 100$$

[0230] 化合物1和2、REF205、REF210和IL-2 (C125S) 的药代动力学参数示于表5中, 且化合物1和化合物2的药代动力学参数的比较示于表6中。

[0231] 表5: 化合物1的药代动力学参数

[0232]

组	1	2	3	7
剂量(μg/kg)	10	50	250	50
途径	IV	IV	IV	SC
PK参数	平均值± Std Dev (n = 3)			
AUC(0-∞) (ng·h/mL)	880 ± 214	8520 ± 1040	64000 ± 7130	4110 ± 745
Cmax (ng/mL)	211 ± 48.4	1530 ± 130	11200 ± 699	142 ± 23.2
Tmax (h) a	0.033	0.033	0.033	8
CL或CL/F (mL/h·kg)	11.9 ± 3.23	5.93 ± 0.739	3.94 ± 0.415	12.5 ± 2.37
t1/2 λz (h)	6.25 ± 0.868	9.77 ± 0.423	15.1 ± 0.526	21.1 ± 6.05
F(%) b	NA	NA	NA	48.2

[0233] 通过IV注射给予的所有测试品的T_{max}是在给药后2分钟, 即第一PK血液收集时间点。对于化合物1, 在10至250μg/kg的剂量范围内C_{max}随IV剂量增加, 并且该增加与剂量大致成比例 (表5)。化合物1AUC (0-∞) 与剂量成比例地增加, 同时在10至250μg/kg的剂量范围内平均血清清除率从11.9±3.23降低至3.94±0.415mL/h·kg。

[0234] 化合物2AUC (0-∞) 的增加与剂量大致成比例, 分别对于10、50和250μg/kg的剂量具有相似的平均IV清除率值10.4±4.73、6.11±2.33和5.50±1.06mL/h·kg (表6)。

[0235] 与静脉内注射相比, 化合物1的皮下注射显示48%的生物利用度和增加的半衰期 (参见图10A和表5)。表9中显示了化合物1和2的静脉内注射 (IV) 和皮下注射 (SC) 的AUC (0-∞)、C_{max}、T_{max}、清除率和半衰期值的总结。AUC (0-∞) (全身暴露) 在化合物1、化合物2和REF210的50μg/kg IV剂量之间相当, 平均值分别为8520±1040、9150±3840和11300±2270ng·h/mL。化合物1的相应血清清除率为5.93±0.739mL/h·kg, 化合物2为6.11±2.33mL/h·kg, 和REF210为4.56±0.972mL/h·kg。

[0236] 当以10μg/kg的剂量静脉内给药时, 野生型IL-2 (C125S) 的Fc-融合蛋白 (REF205) 与10μg/kg IV剂量的化合物1和化合物2相比给出了类似的全身暴露。对于REF205、化合物1

和化合物2,平均AUC (0-∞) 分别为 669 ± 199 、 880 ± 214 和 1180 ± 718 mL/h·kg; 和平均血清清除率分别为 15.9 ± 4.99 、 11.9 ± 3.23 和 10.4 ± 4.73 mL/kg。

[0237] 当皮下给药时,在给药后6至10小时获得化合物1和化合物2的 T_{\max} (表5和表9)。对于化合物1和化合物2,IV和SC给予的 $50 \mu\text{g/kg}$ 获得的平均AUC (0-∞) 分别给出48.2%和33.0%的估计生物利用度。对于 $50 \mu\text{g/kg}$ 化合物1IV和SC剂量, $T_{1/2\lambda_z}$ 分别为 6.25 ± 0.868 和 21.1 ± 6.05 h。对于 $50 \mu\text{g/kg}$ 化合物2IV和SC剂量, $T_{1/2\lambda_z}$ 分别为 14.9 ± 3.79 和 24.9 ± 1.94 h。

[0238] 在相同蛋白质剂量水平 ($\mu\text{g/kg}$) 下将化合物1和化合物2的SC PK特征与IL-2 (C125S) 的SC PK特征进行对比显示前者蛋白质表现出较低的血清清除率及体内循环半衰期的延长。化合物1和化合物2的平均清除率 (分别 12.5 ± 2.37 和 22.2 ± 11.4 mL/h·kg) 比IL-2 (C125S) (151 ± 39.3 mL/h·kg) 高7至12倍。

[0239] 比较皮下施用化合物1、化合物2和IL2 (C125S) 的PK结果清楚地显示化合物1和化合物2具有比IL2 (C125S) 更长的循环半衰期 (表8)。

[0240] 表6: 化合物1和化合物2 (IV施用) 的PK参数的总结

[0241]

	化合物1			化合物2		
剂量($\mu\text{g/kg}$)	10	50	250	10	50	250
AUC _(0-∞) (ng·h/mL)	880 ± 214	8520 ± 1040	64000 ± 7130	1180 ± 718	9150 ± 3840	46700 ± 9220
C _{max} (ng/mL)	211 ± 48.4	1530 ± 130	11200 ± 699	190 ± 35.5	1440 ± 93.4	12600 ± 2150
T _{max} (h)	0.033	0.033	0.033	0.033	0.033	0.033
CL或CL/F (mL/h·kg)	11.9 ± 3.23	5.93 ± 0.739	3.94 ± 0.415	10.4 ± 4.73	6.11 ± 2.33	5.50 ± 1.06
$t_{1/2 \lambda_z}$ (h)	6.25 ± 0.868	9.77 ± 0.423	15.1 ± 0.526	9.55 ± 8.89	14.9 ± 3.79	17.0 ± 0.734

[0242] 如表8中总结的,化合物1和2均显示出比IL-2 (C125S) 更长的半衰期、更高的C_{max}和更大的AUC_(0-∞)。

[0243] 表7: REF205和REF210PK参数

[0244]

测试品	REF205	REF210
剂量($\mu\text{g/kg}$)	10	50
途径	IV	IV
PK参数	平均值 \pm Std Dev (n = 3)	
AUC(0-∞) (ng·h/mL)	669 ± 199	11300 ± 2270
C _{max} (ng/mL)	237 ± 34.4	966 ± 29.4
T _{max} (h) a	0.033	0.033
CL (mL/h·kg)	15.9 ± 4.99	4.56 ± 0.972
$t_{1/2 \lambda_z}$ (h)	5.35 ± 2.16	7.91 ± 0.715

[0245] 表8: 化合物1、化合物2和IL-2 (C125S) 的PK参数

[0246]

测试品	化合物1	化合物2	IL-2(C125S)
组	7	8	11和12
剂量($\mu\text{g/kg}$)	50	50	50
途径	SC	SC	SC
PK参数	平均值 \pm SD (n = 3)		平均值 \pm SD (n)
AUC(0-最后) (ng-h/mL)	4020 \pm 759	2660 \pm 2390	224 \pm 43.4 (6)
AUC(0- ∞) (ng-h/mL)	4110 \pm 745	3020 \pm 2220	355 \pm 108 (6)
C _{max} (ng/mL)	142 \pm 23.2	73 \pm 33	46.7 \pm 10.5 (6)
T _{max} (h) a	8	6	2
CL/F (mL/h-kg)	12.5 \pm 2.37	22.2 \pm 11.4	151 \pm 39.3 (6)
t _{1/2} λ_z (h)	21.1 \pm 6.05	24.9 \pm 1.94	4.32 \pm 2.22 (6)
V _z /F (mL/kg)	368 \pm 71.8	775 \pm 369	859 \pm 265 (6)
MRT (h)	33.6 \pm 8.88	38.2 \pm 3.75	6.98 \pm 3.08 (6)
F(%) b	48.2	33.0	ND

[0247] 表9: 化合物1的静脉内和皮下给药

[0248]

途径	化合物1		化合物2	
	IV	SC	IV	SC
AUC _(0-∞) (ng-h/mL)	8520 \pm 1040	4110 \pm 745	1180 \pm 718	3020 \pm 2220
C _{max} (ng/mL)	1530 \pm 130	142 \pm 23.2	190 \pm 35.5	73.0 \pm 33.0
T _{max} (h)	0.033	8	0.033	6
CL或CL/F (mL/h-kg)	5.93 \pm 0.739	12.5 \pm 2.37	10.4 \pm 4.73	22.2 \pm 11.4
t _{1/2} λ_z (h)	9.77 \pm 0.423	21.1 \pm 6.05	9.55 \pm 8.89	24.9 \pm 1.94
F(%)	NA	48.2	NA	33.0

[0249] 激活的免疫细胞的标志物是磷酸化的STAT5 (pSTAT5)。STAT5的磷酸化是IL-2信号转导途径中的必需步骤,并且可以通过流式细胞术用对pSTAT5特异性的抗体测量。如图11A和11B所示,化合物1在一系列剂量上显示对于Treg的选择性显著高于其它细胞类型。与Tconv和其他免疫细胞相比,化合物1对于Treg具有超过1,000倍的选择性。响应化合物1的天然杀伤(NK)细胞的剩余分数针对CD56^亮NK细胞进行富集。尽管化合物1的Treg EC50 (4.1pmol)略高于IL2 (C125S) (0.7pmol),但IL2 (C125S)在较窄剂量范围内对Treg细胞具有选择性,并在化合物1显示了Treg细胞的选择性激活的剂量下引起其他细胞类型的强烈激活。

[0250] 实施例2: 人免疫细胞的化合物1激活

[0251] 用10⁻⁸M的化合物1或IL2 (C125S) 处理人外周血单核细胞以评估pSTAT5+激活。将pSTAT5+激活细胞的百分比与未刺激的对照进行比较。化合物1诱导97%的Treg细胞和41%

的NK细胞的增殖(参见图12)。增殖的CD25^低Tconv细胞、CD25^{neg} Tconv细胞和CD8⁺T细胞的百分比与未刺激的细胞的百分比相似。相反,IL2(C125S)引起测定的所有细胞类型的强烈激活。来自图12的激活NK细胞的进一步分析显示化合物1选择性地刺激CD56^亮NK细胞,而IL2(C125S)刺激具有高和低CD56表达的NK细胞(参见图13)。这些数据强调了化合物1选择性激活和扩增Treg群体的能力。

[0252] 实施例3-化合物1(IL-2N88R/C125S-15氨基酸肽接头-Fc)在食蟹猴中的评估:每周给药

[0253] 在食蟹猴中评估化合物1(IL-2N88R/C125S-15氨基酸肽接头-Fc)对免疫细胞水平的影响。猴子的来源、圈养和饲养以及化合物1的制备和制剂基本上如实施例1中所述。在研究的第1、8、15和22天通过皮下给药对猴子施用化合物1。处理组如下表10所示。

[0254] 表10. 处理组和剂量

[0255]

处理组	测试品	剂量
1	媒介	-
2	化合物1	20µg/kg
3	化合物1	100µg/kg
4	化合物1	2mg/kg

[0256] 每个处理组包含5只雄性猴和5只雌性猴。

[0257] 通过流式细胞术定量循环免疫细胞水平的变化。在第一剂量后1天和各个剂量后5天,即在第2、6、13、20和27天,获取血样用于定量免疫细胞水平。测定B细胞、自然杀伤(NK)细胞、CD8⁺T细胞、传统T细胞(Tconv)和调节性T细胞(Treg)的水平。以与实施例1中所述类似的方式对细胞进行免疫分型,具有三个变化:(1)将Treg命名为CD3⁺CD4⁺CD127⁻CD25⁺细胞;(2)将CD4⁺Tconv细胞命名为CD3⁺CD4⁺CD127⁻CD25⁺细胞;和(3)将NK细胞命名为CD3⁻CD20⁻CD8⁺细胞。

[0258] 如图15、16、17和18所示,化合物1分别对B细胞、NK细胞、CD8⁺T细胞或传统T细胞的水平仅具有小的、不显著的影响。相反,化合物1处理导致在几个剂量上持续的调节性T细胞水平的大幅增加。参见图19和20。例如,2mg/kg剂量的化合物1导致调节性T细胞水平在几个剂量上持续的相对于基线约40倍的增加。参见图19。来自这些药效学分析的结果表明,在给药后5天,Treg水平存在剂量依赖性的增加。具体地,在给药后5天,在分别以20ug/kg、100ug/kg和2mg/kg给药的动物中,Treg增加至基线水平的1.76倍、8.65倍和28.6倍。对于三个剂量水平中的每一个,这些Treg水平在研究的剩余部分中保持相对稳定。这些结果在图19中显示为Treg相对于基线的倍数增加,其中将每只动物的绝对水平相对于测试前水平(在第一剂量前10天获取)标准化。图15、16、17、18和19上的Y轴具有相同的标尺以直接比较这些细胞群体的倍数变化。

[0259] 总之,这些数据证明了化合物1对调节性T细胞的显著选择性。

[0260] 此外,化合物1处理导致调节性T细胞与传统T细胞的比率(Treg/Tconv)大幅提高。例如,2mg/kg剂量的化合物1导致约0.8的Treg/Tconv比率,其在几个剂量上持续,并且100µg/kg剂量的化合物1导致约0.2的Treg/Tconv细胞比率,其也在几个剂量上持续。参见图21。具体地,在研究的第6天,分别对于20ug/kg、100ug/kg和2mg/kg剂量,发现Treg/Tconv比率

为0.09 (2.9倍提高)、0.15 (6倍提高) 和0.77 (23倍提高)。

[0261] 在该研究过程中,在任何治疗的动物中均未观察到不良反应。

[0262] 考虑到用IL2治疗的移植物抗宿主病 (GVHD) 患者达到0.2的Treg/Tconv细胞比率具有高的疾病改善的概率,这些结果是特别显著的。例如,在人类中,每日低剂量IL-2已被用于通过提高Treg水平来治疗慢性GVHD的患者 (2016,Koreth J,等,Blood,Jul 7;128(1):130-7;2011,Koreth,J.,N Engl J Med.,Dec 1;365(22):2055-66)。在最后一试验中,通过每日皮下注射给予IL-2 (阿地白介素) 12周。以这种方式治疗的患者获得相对于基线 (治疗前的Treg水平) 的5倍以上的Treg增加及Treg/Tconv比率5倍以上的提高,临床反应率为61%。临床反应与在治疗第一周结束时大于0.2的Treg/Tconv比率密切相关。

[0263] 总之,本文提供的数据显示,在食蟹猴中,化合物1的单一周剂量以高度选择性的方式刺激Treg水平至大大超过预期在人类中的治疗性的水平。

序列表

<110> Delinia, Inc.

<120> 用于治疗自身免疫疾病的 IL-2 变体

<130> 127754-00420

<150> US 62/419,118

<151> 2016-11-08

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0001] <223> N88R C125S 突变体 IL2

<400> 1

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Arg Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 2
<211> 133
<212> PRT
<213> 智人

[0002]

<400> 2

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 3

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

[0003]

<220>

<223> T3A, N88R, C125S IL2 突变体

<400> 3

Ala Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Arg Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 4
<211> 374
<212> PRT
<213> 人工序列

[0004]

<220>
<223> IL2 Fc 融合蛋白, 化合物 1

<400> 4

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu	
	65					70					75					80	
	Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Arg	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu	Leu	
					85					90						95	
	Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala	
				100					105						110		
	Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ser	Gln	Ser	Ile	
			115					120						125			
	Ile	Ser	Thr	Leu	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
		130					135					140					
[0005]	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	
	145					150					155					160	
	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
				165						170					175		
	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	
				180						185					190		
	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
		195					200						205				
	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	
		210					215					220					
	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	
	225					230					235					240	

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
245 250 255

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
260 265 270

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
275 280 285

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
290 295 300

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
305 310 315 320

[0006] Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
325 330 335

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
340 345 350

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
355 360 365

Leu Ser Leu Ser Pro Gly
370

<210> 5

<211> 374

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IL2 Fc 融合蛋白, 化合物 2

<400> 5

Ala Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

[0007]

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Arg Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
145 150 155 160

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
165 170 175

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 180 185 190

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 195 200 205

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 210 215 220

Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 225 230 235 240

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 245 250 255

[0008] Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 260 265 270

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 275 280 285

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 290 295 300

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 305 310 315 320

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 325 330 335

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 340 345 350

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
355 360 365

Leu Ser Leu Ser Pro Gly
370

<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽接头

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

[0009]

<210> 7
<211> 226
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG1 融合蛋白

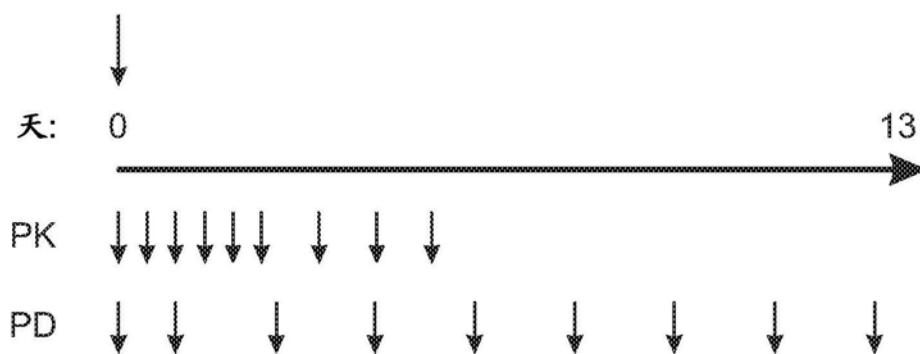
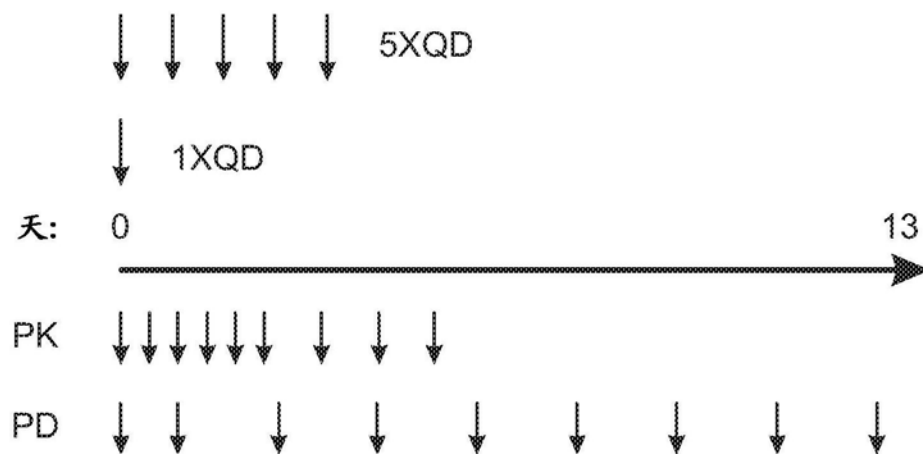
<400> 7

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
	50 55 60
	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr
	65 70 75 80
	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
	85 90 95
	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
	100 105 110
	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
	115 120 125
[0010]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
	130 135 140
	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
	145 150 155 160
	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
	165 170 175
	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
	180 185 190
	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
	195 200 205
	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
	210 215 220
[0011]	Pro Gly
	225

Fc融合蛋白**IL-2(C125S)**

N = 3 只动物/组

图1

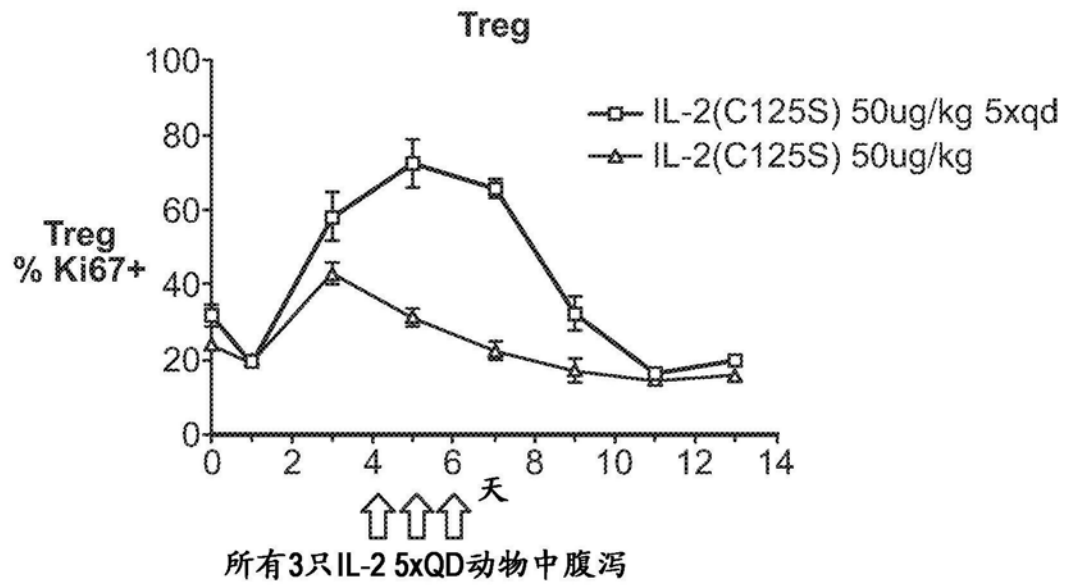


图2A

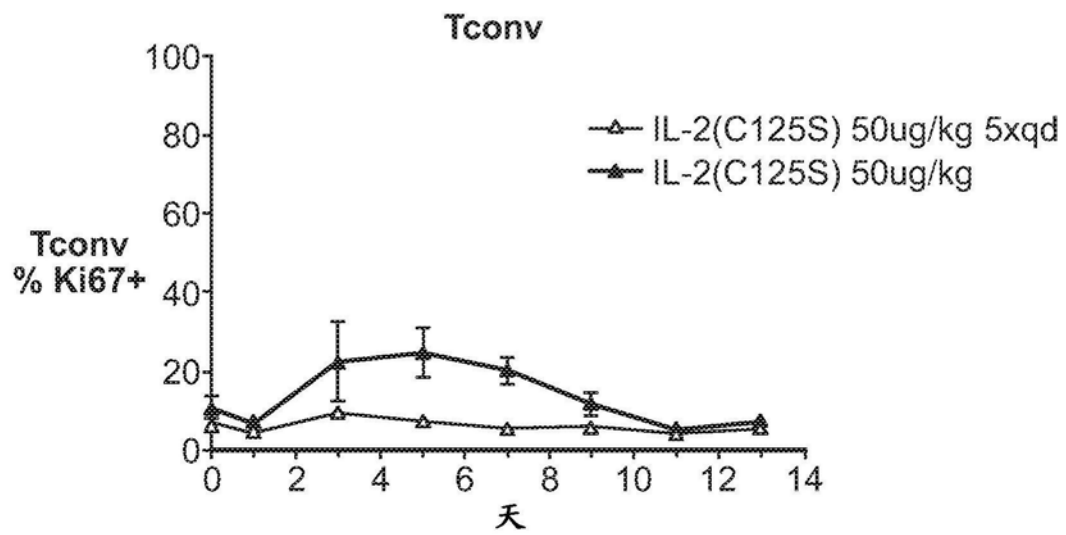


图2B

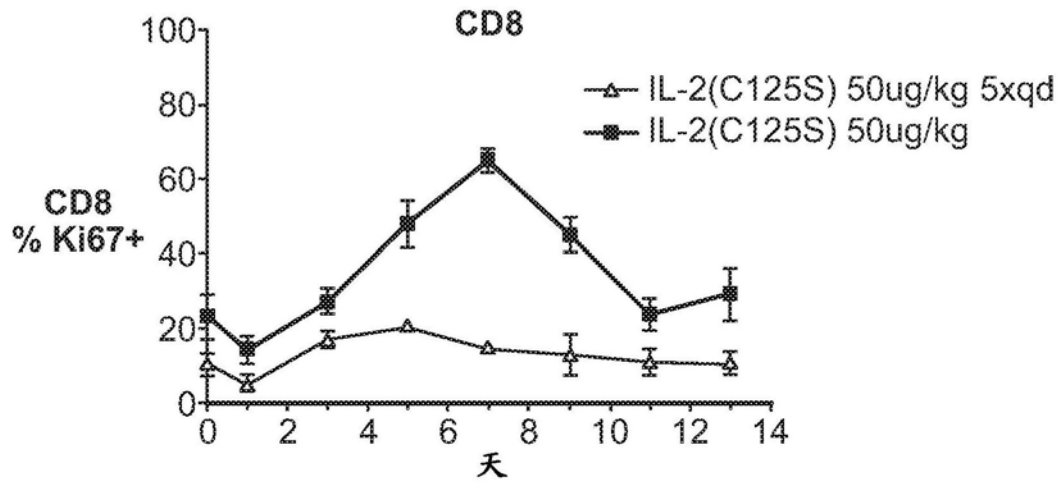


图2C

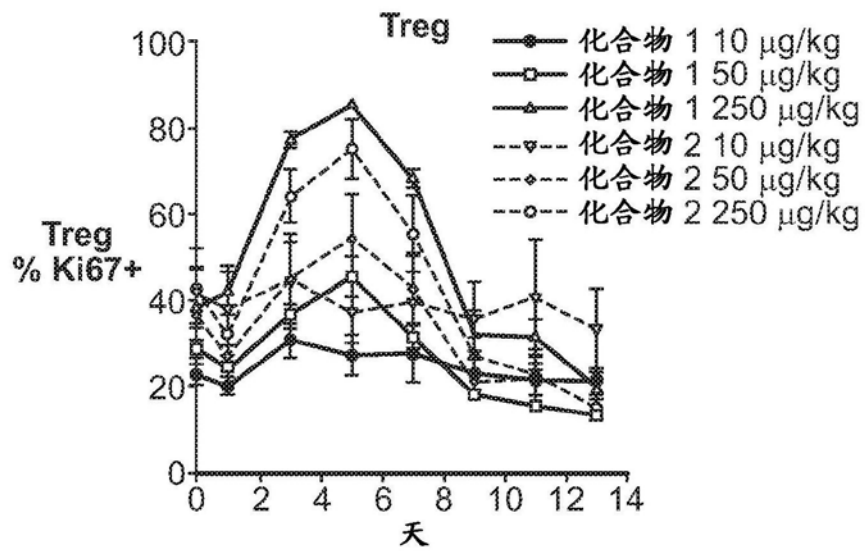


图3A

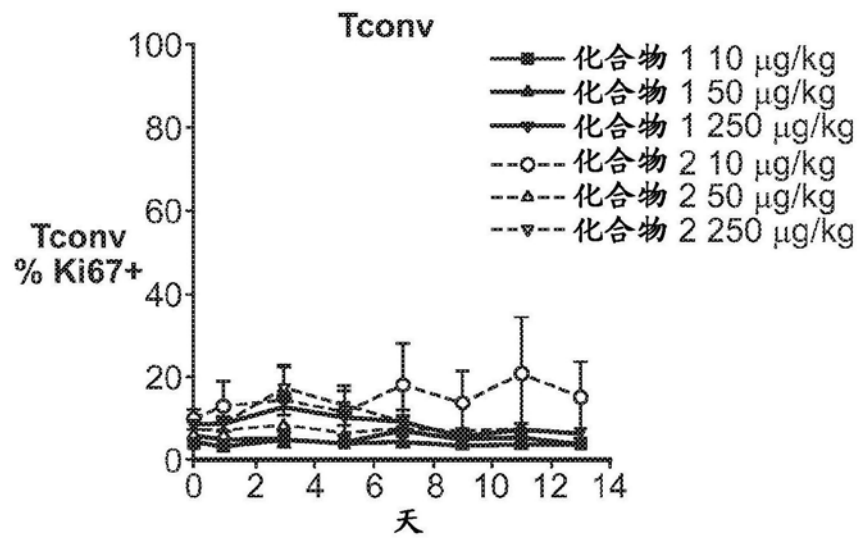


图3B

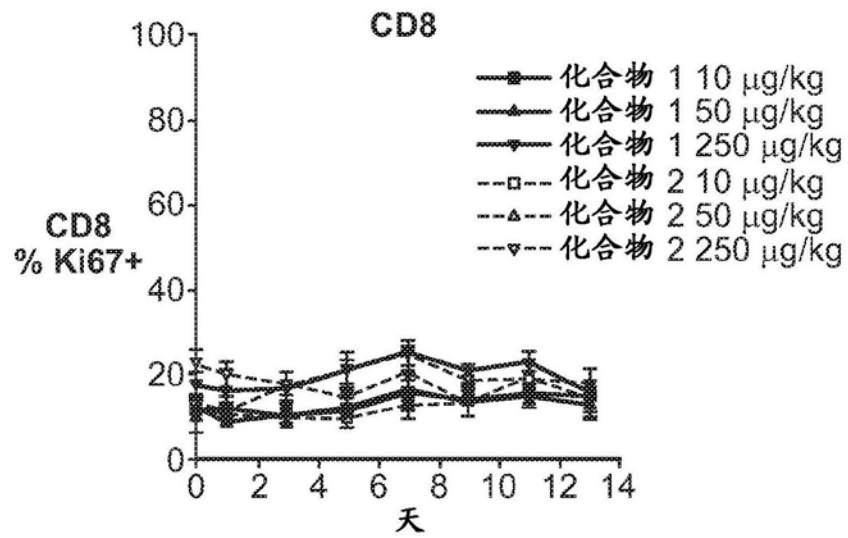


图3C

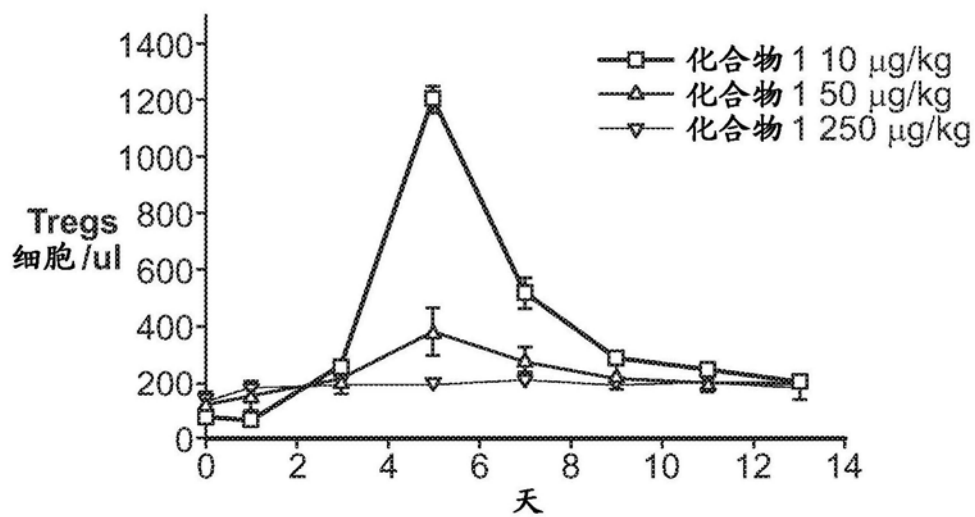


图4A

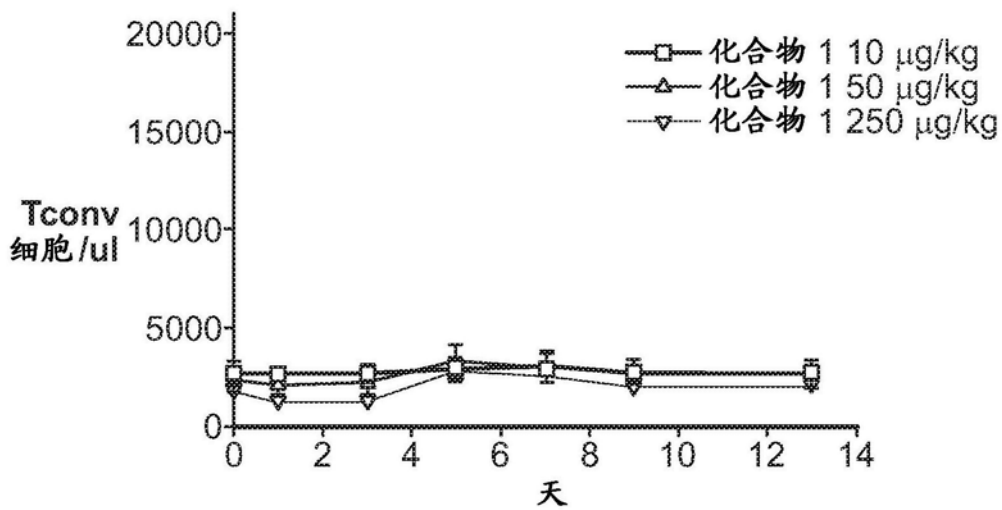


图4B

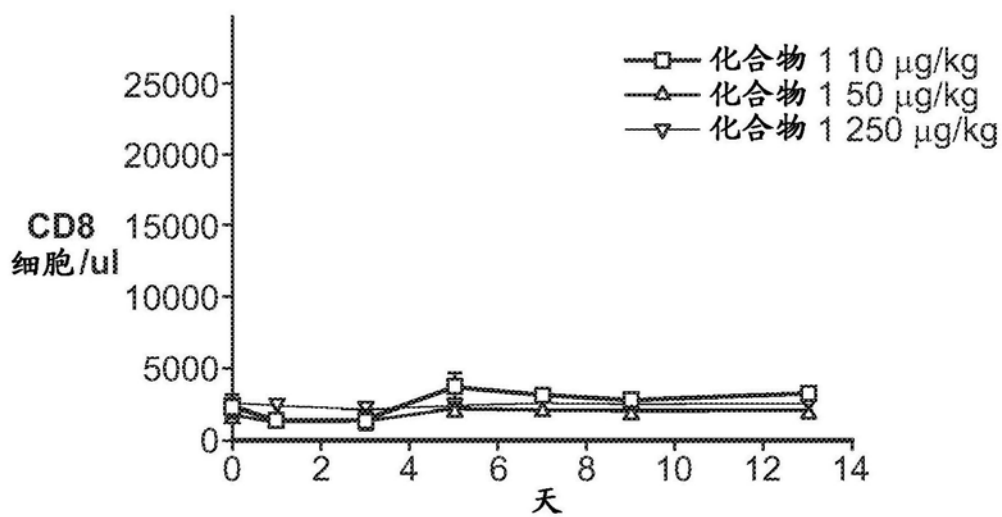


图4C

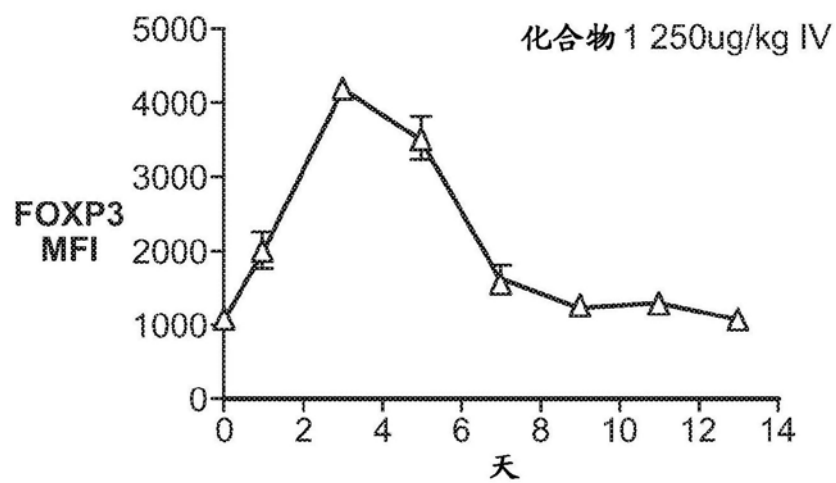


图5A

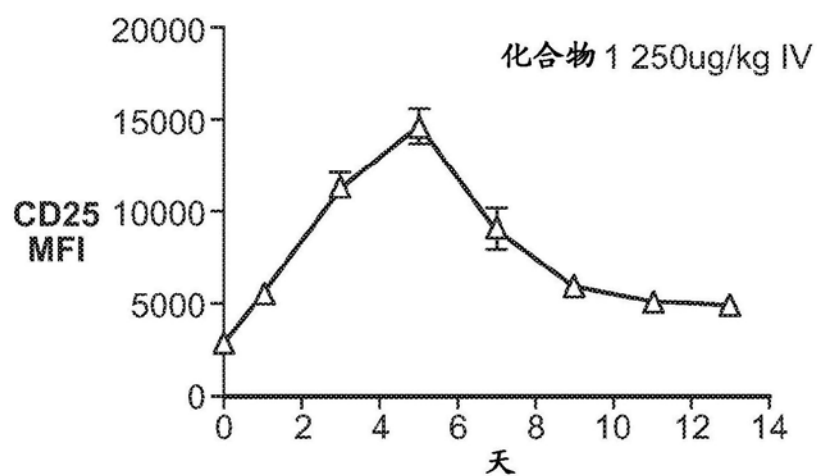


图5B

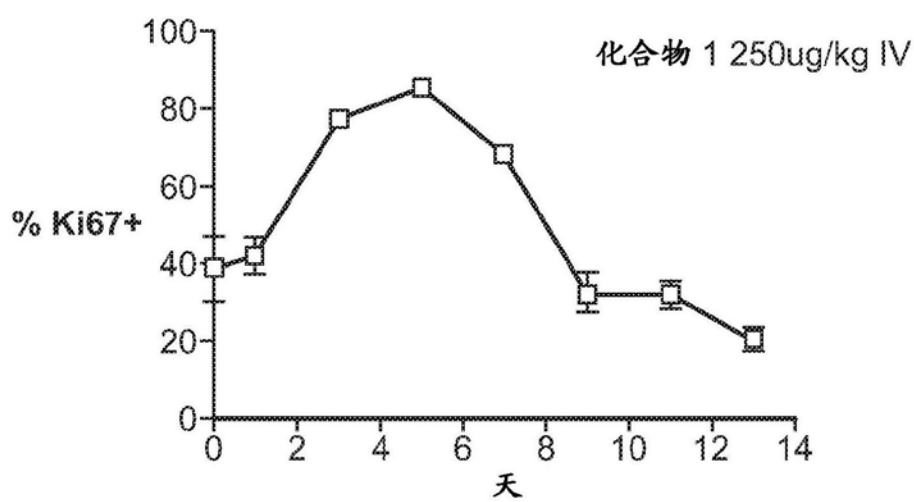


图5C

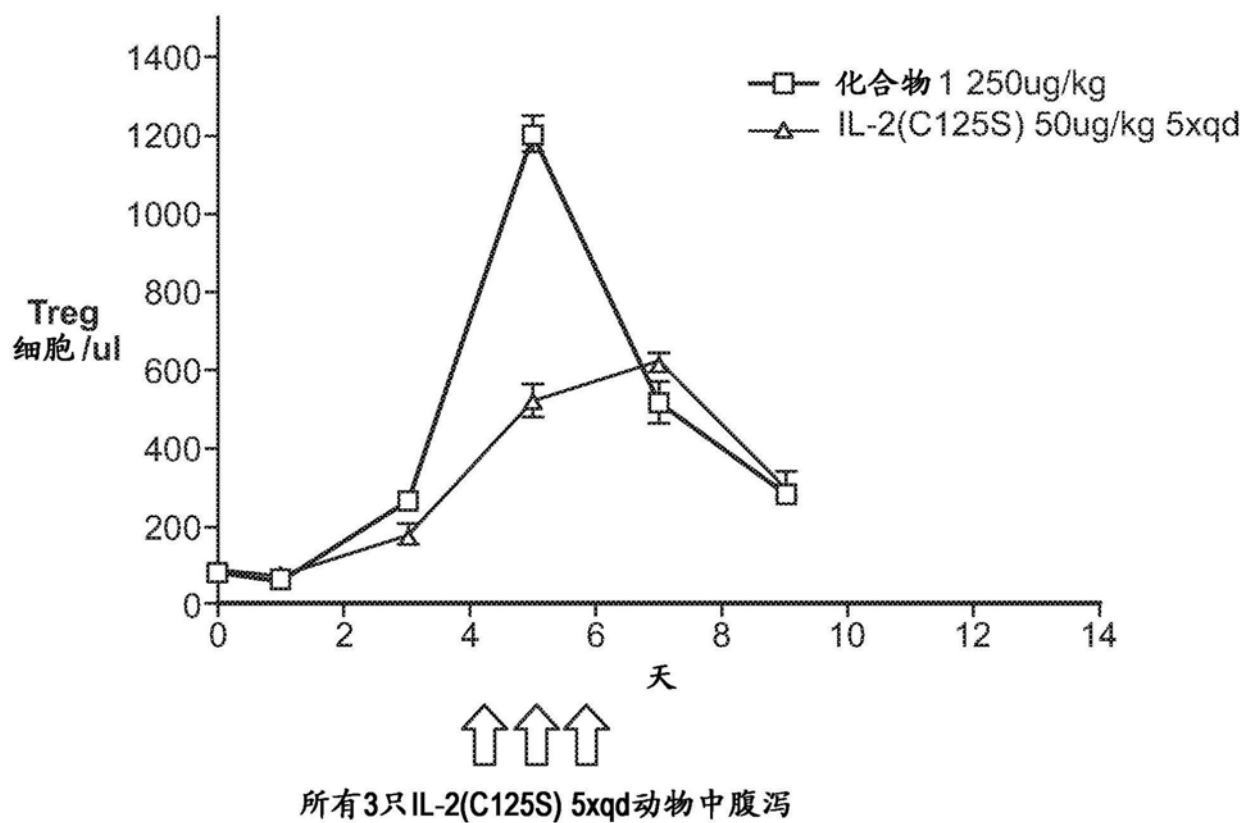


图6

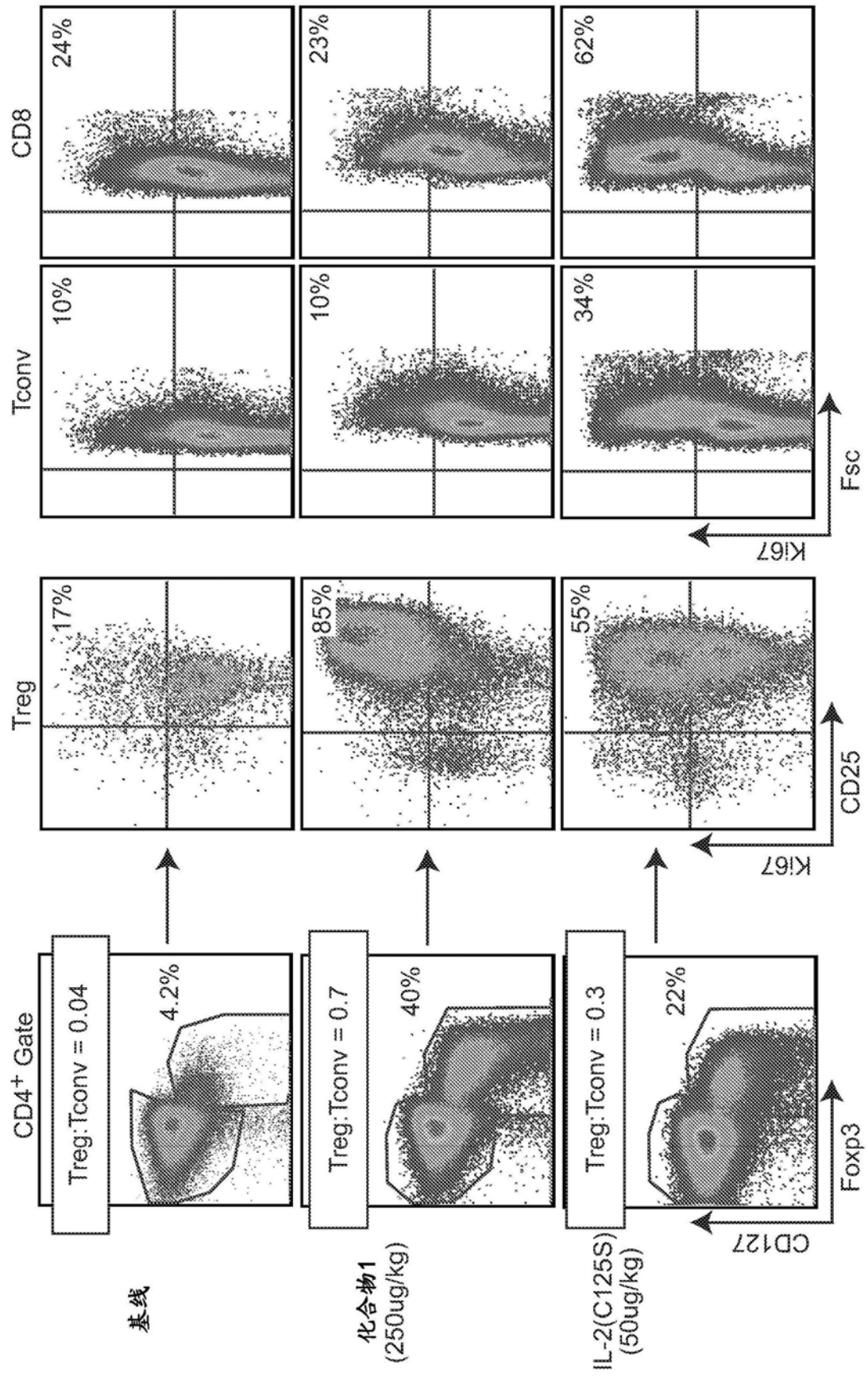


图7

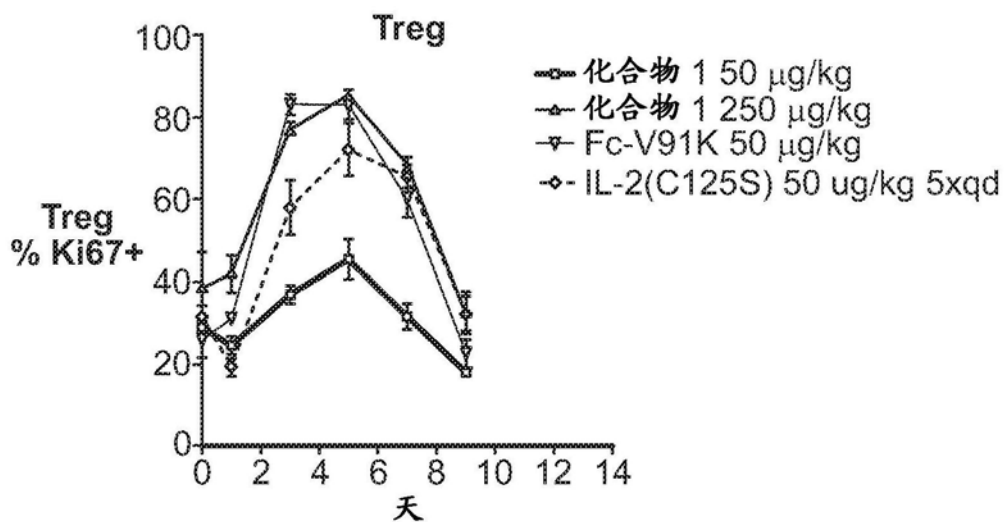


图8A

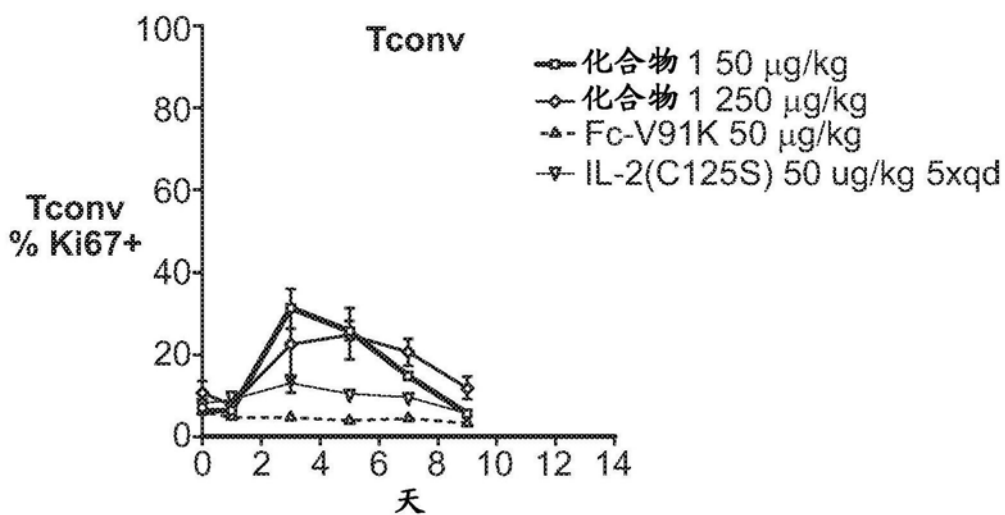


图8B

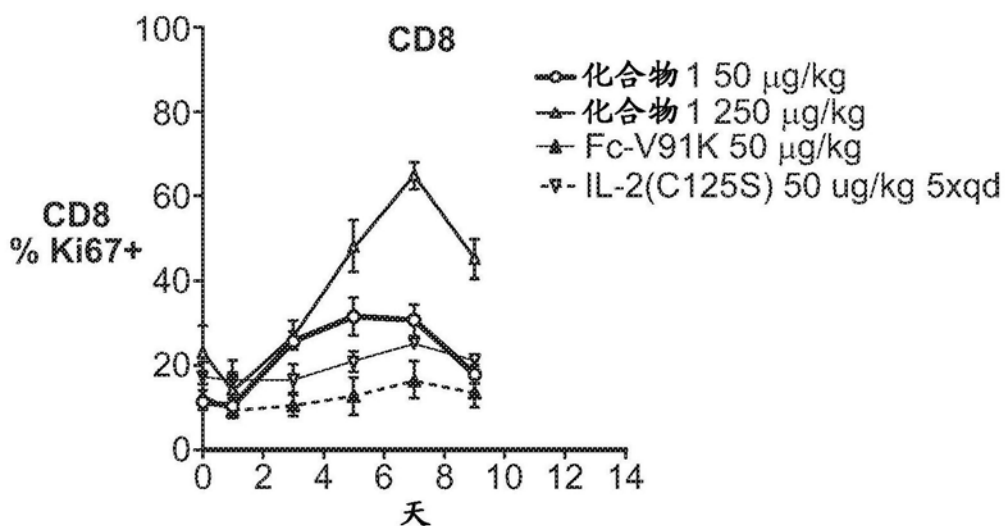


图8C

食蟹猴PK剂量反应

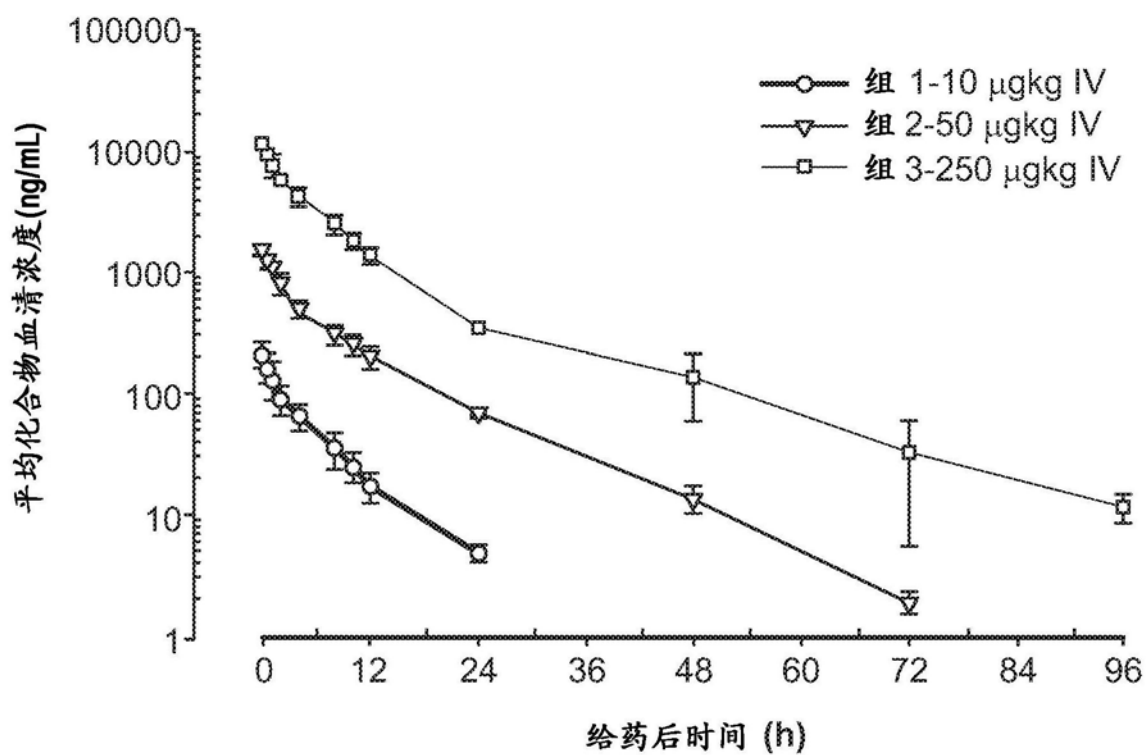


图9

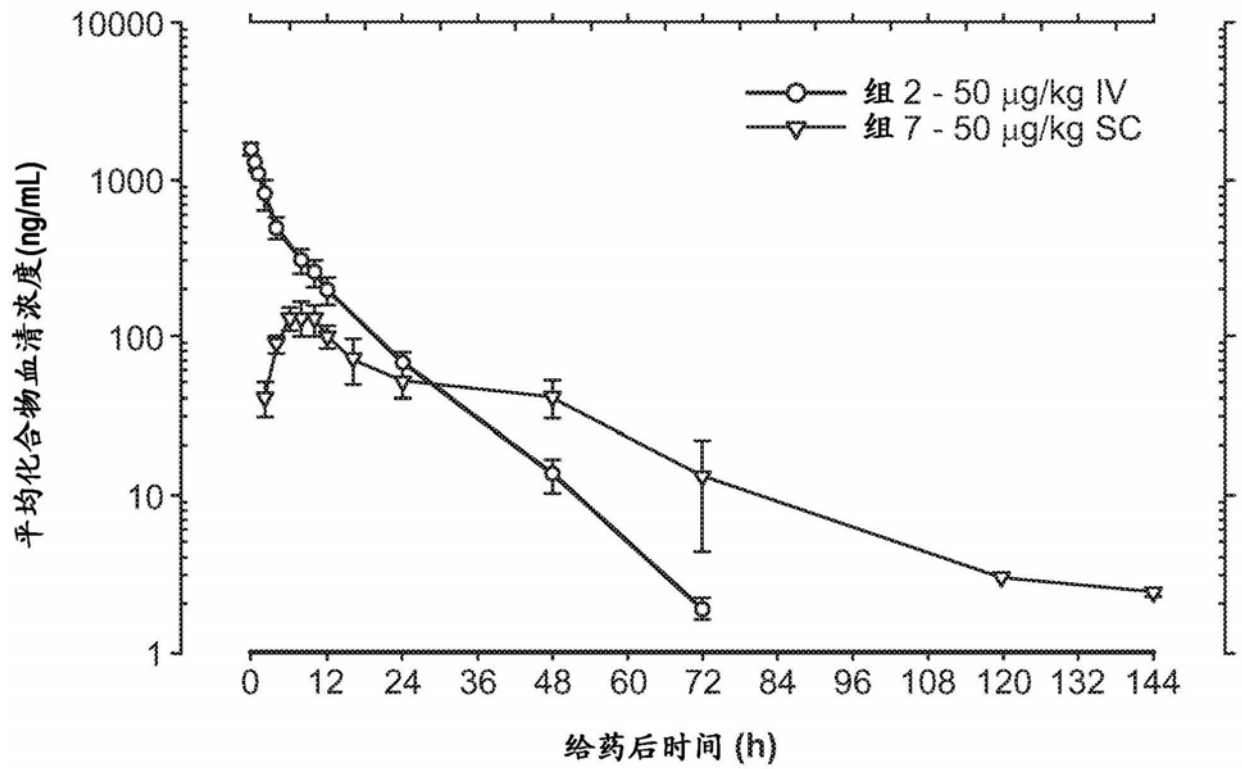


图10

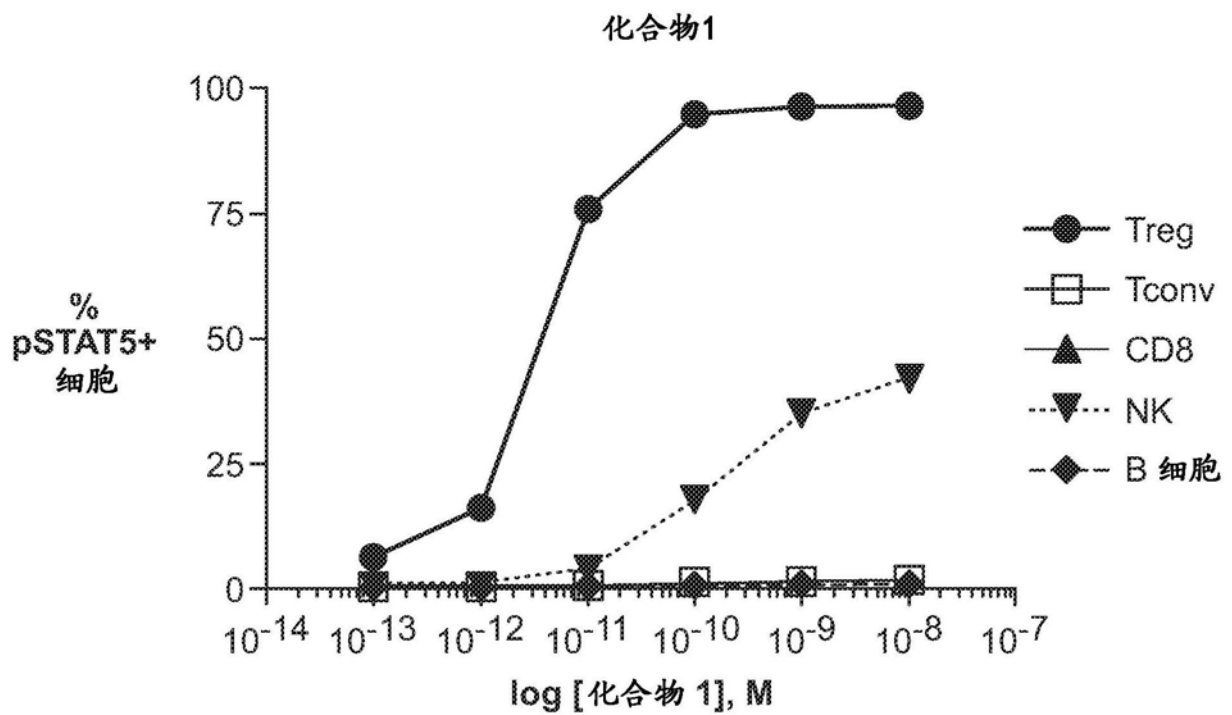


图11A

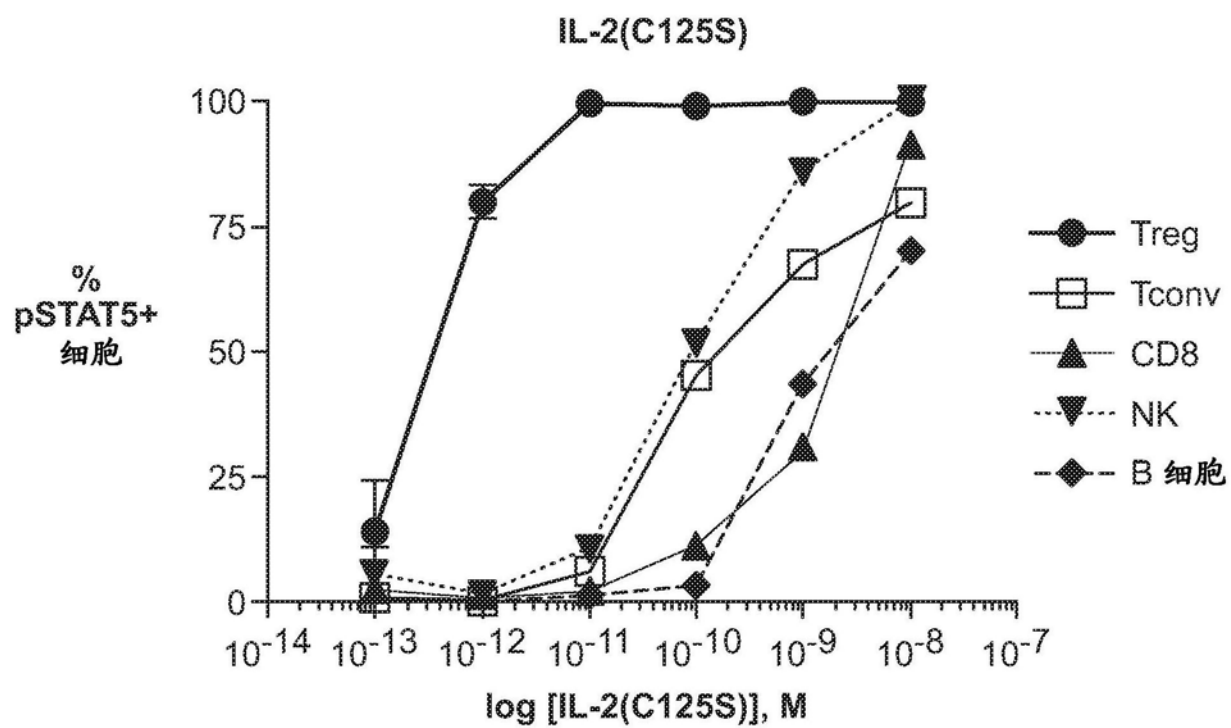


图11B

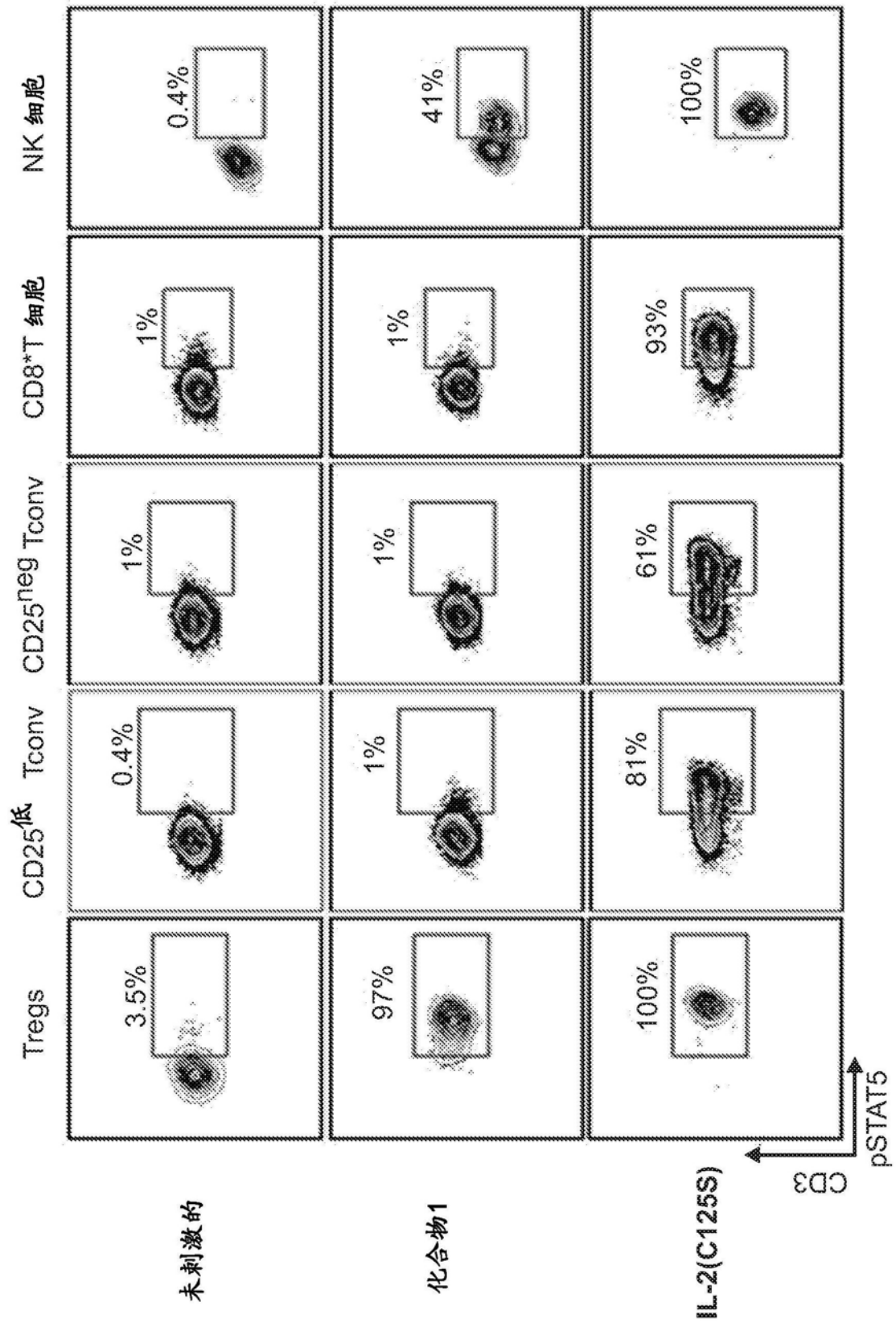


图12

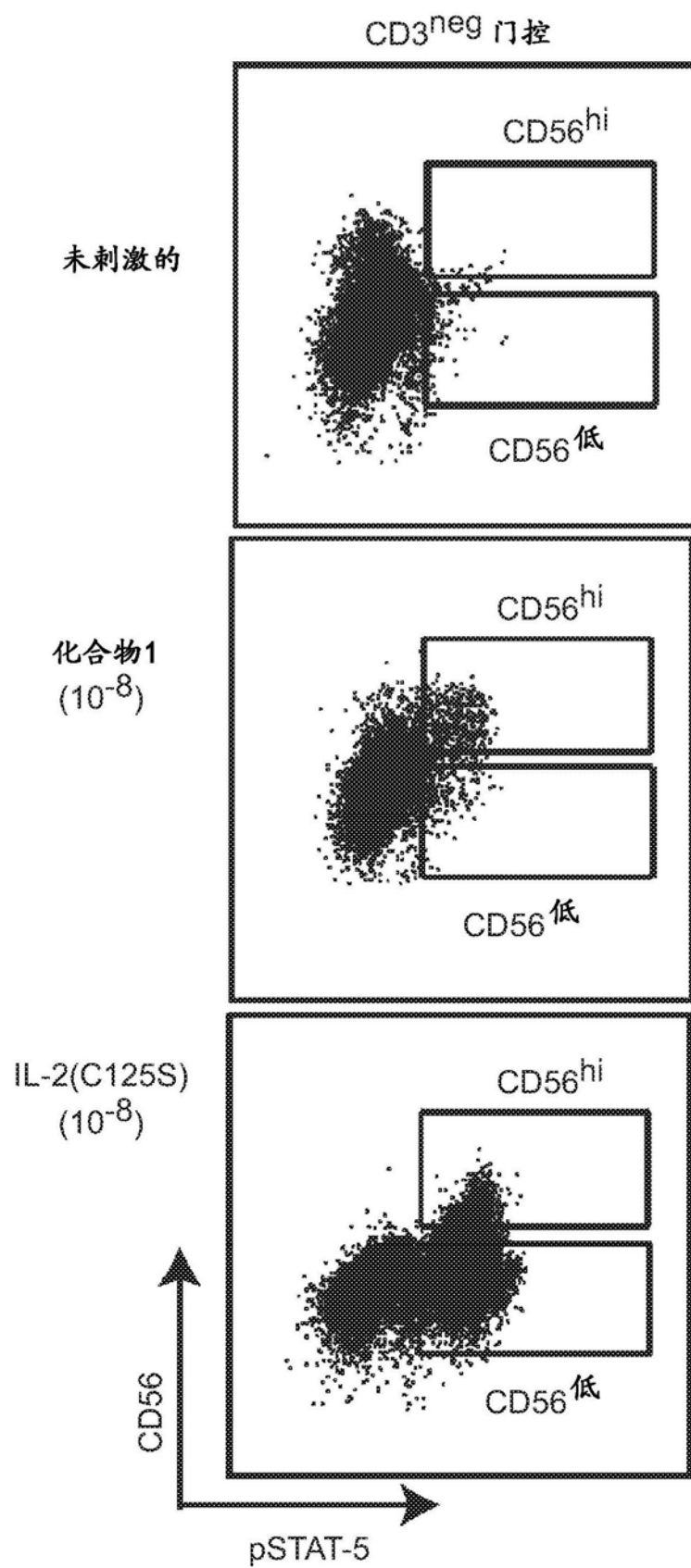


图13

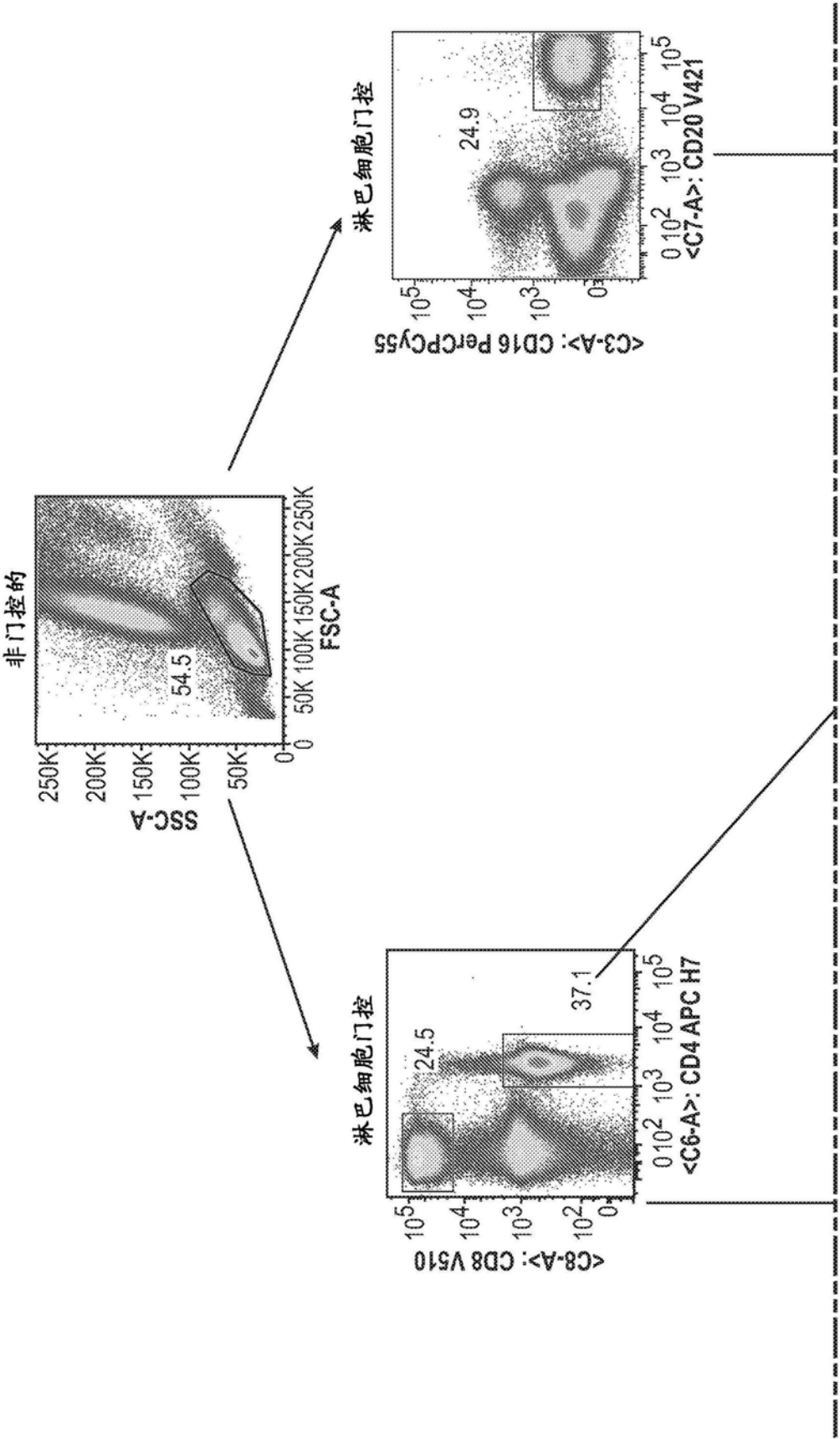


图14A

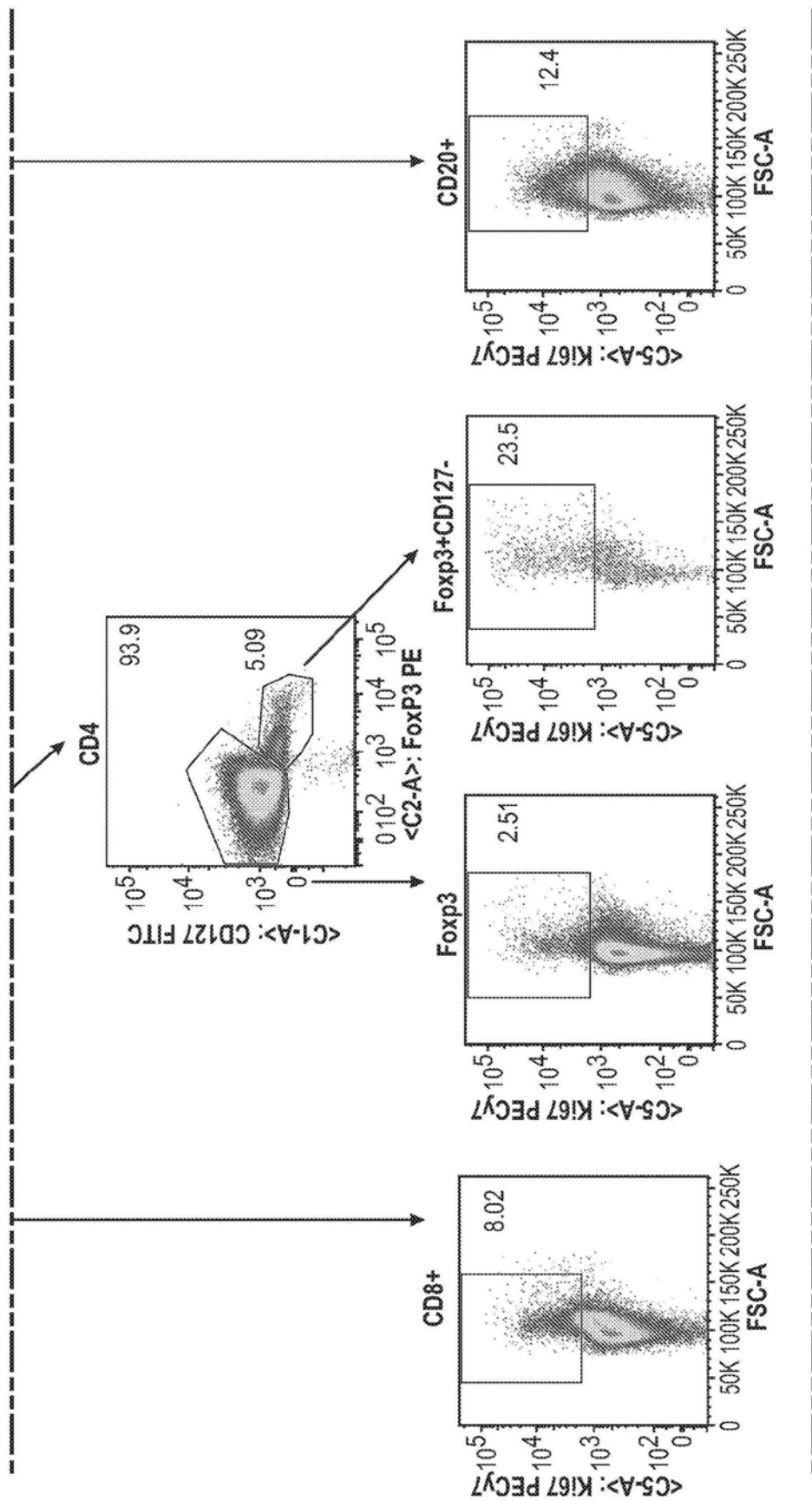


图14B

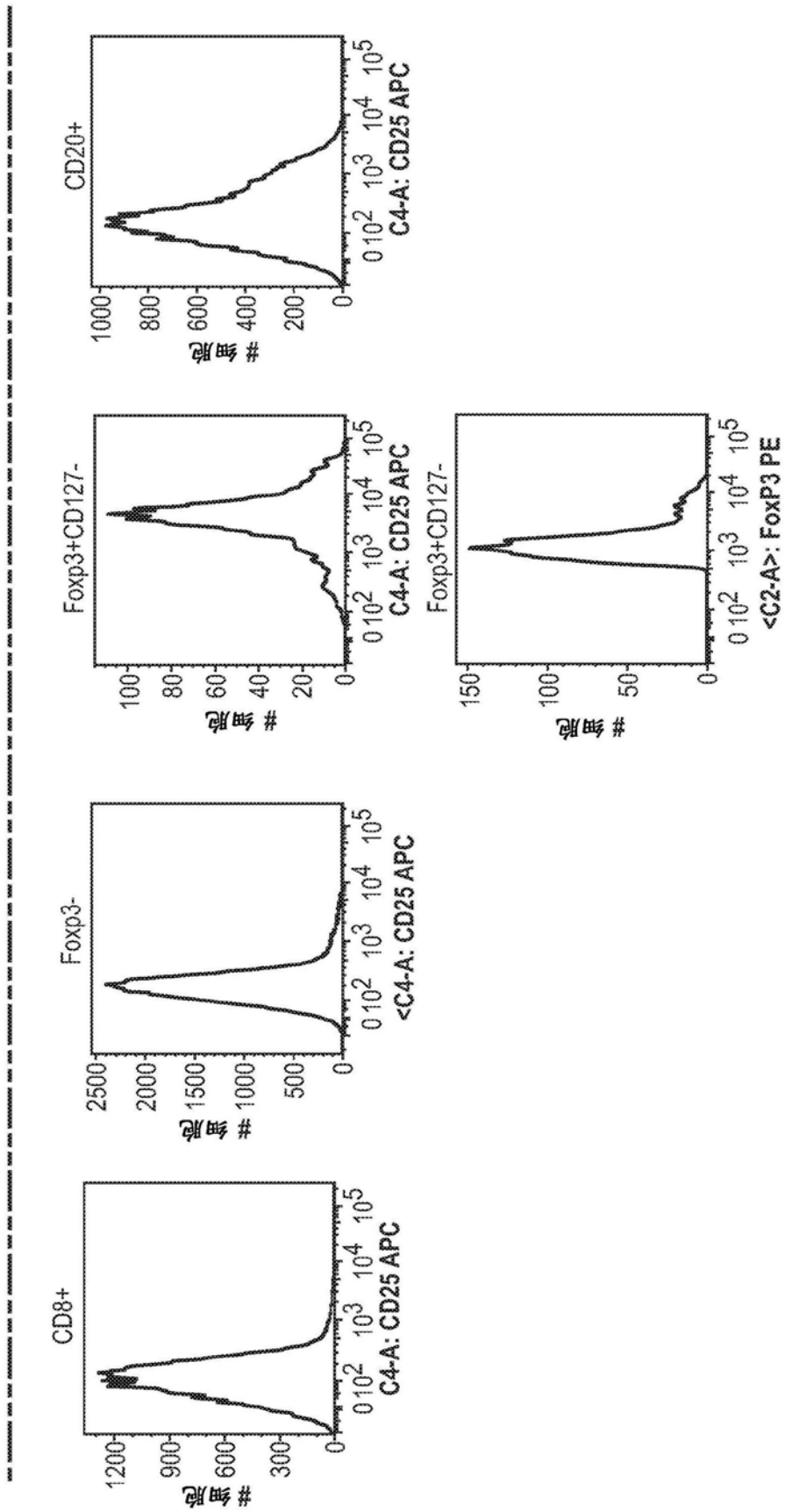


图14C

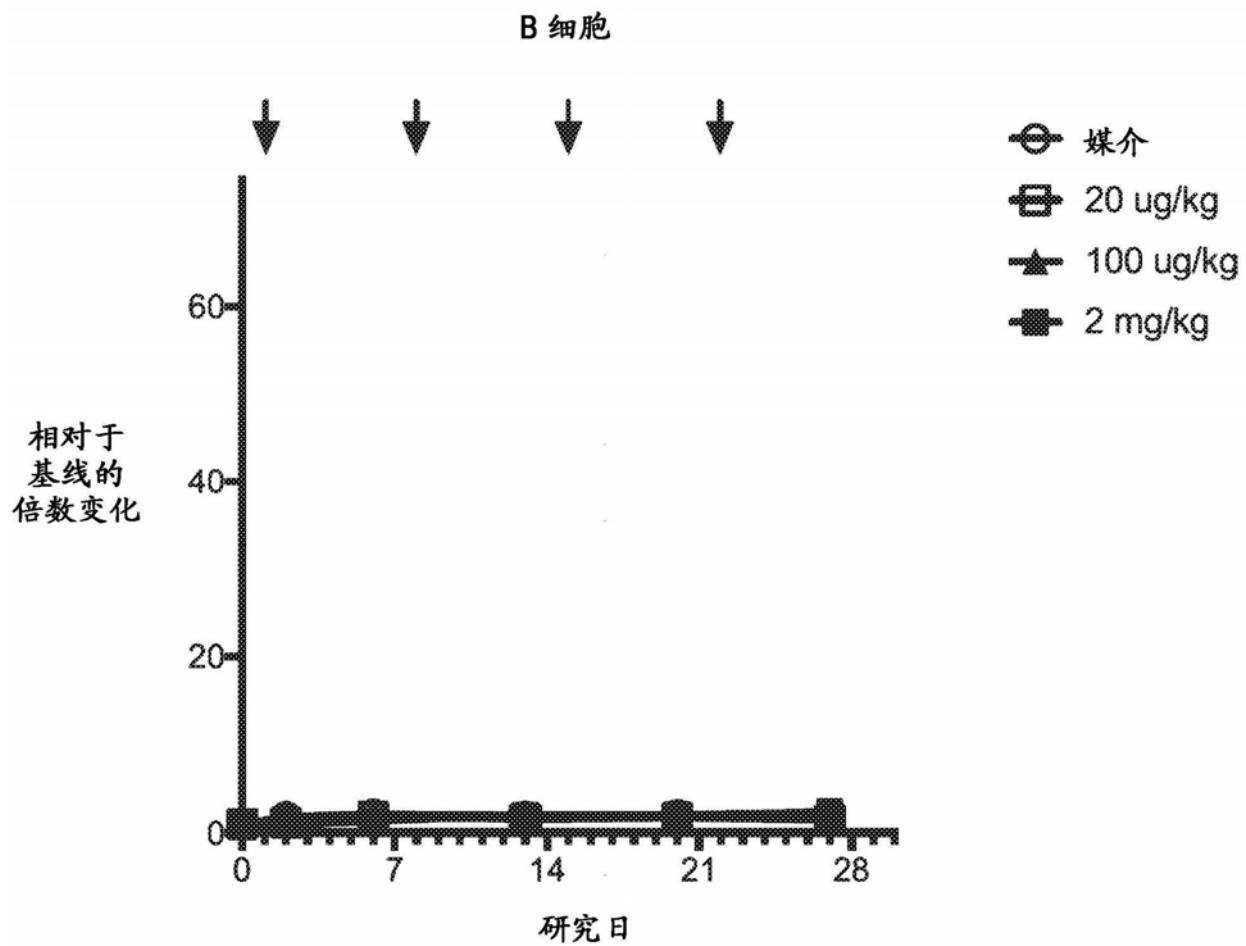


图15

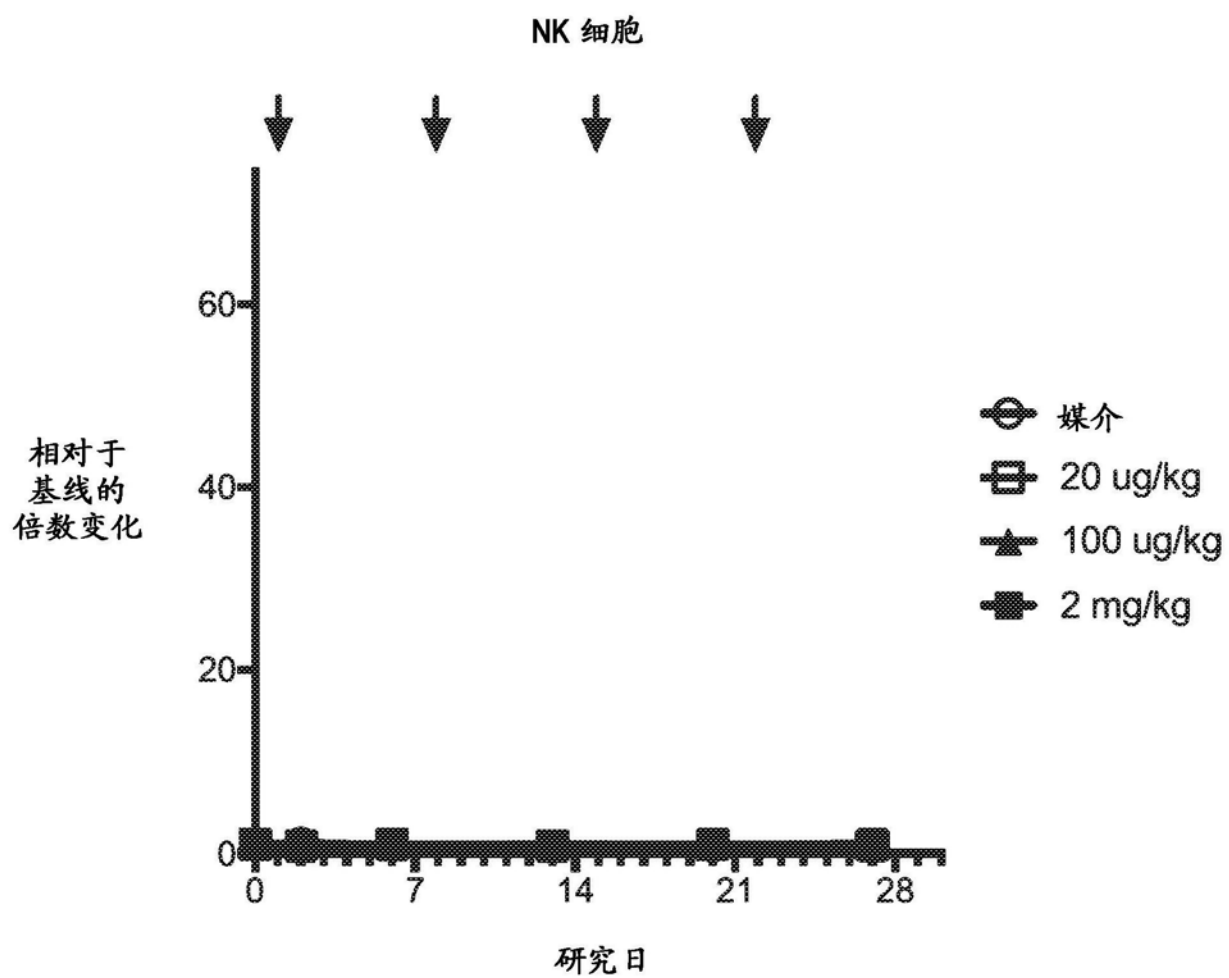


图16

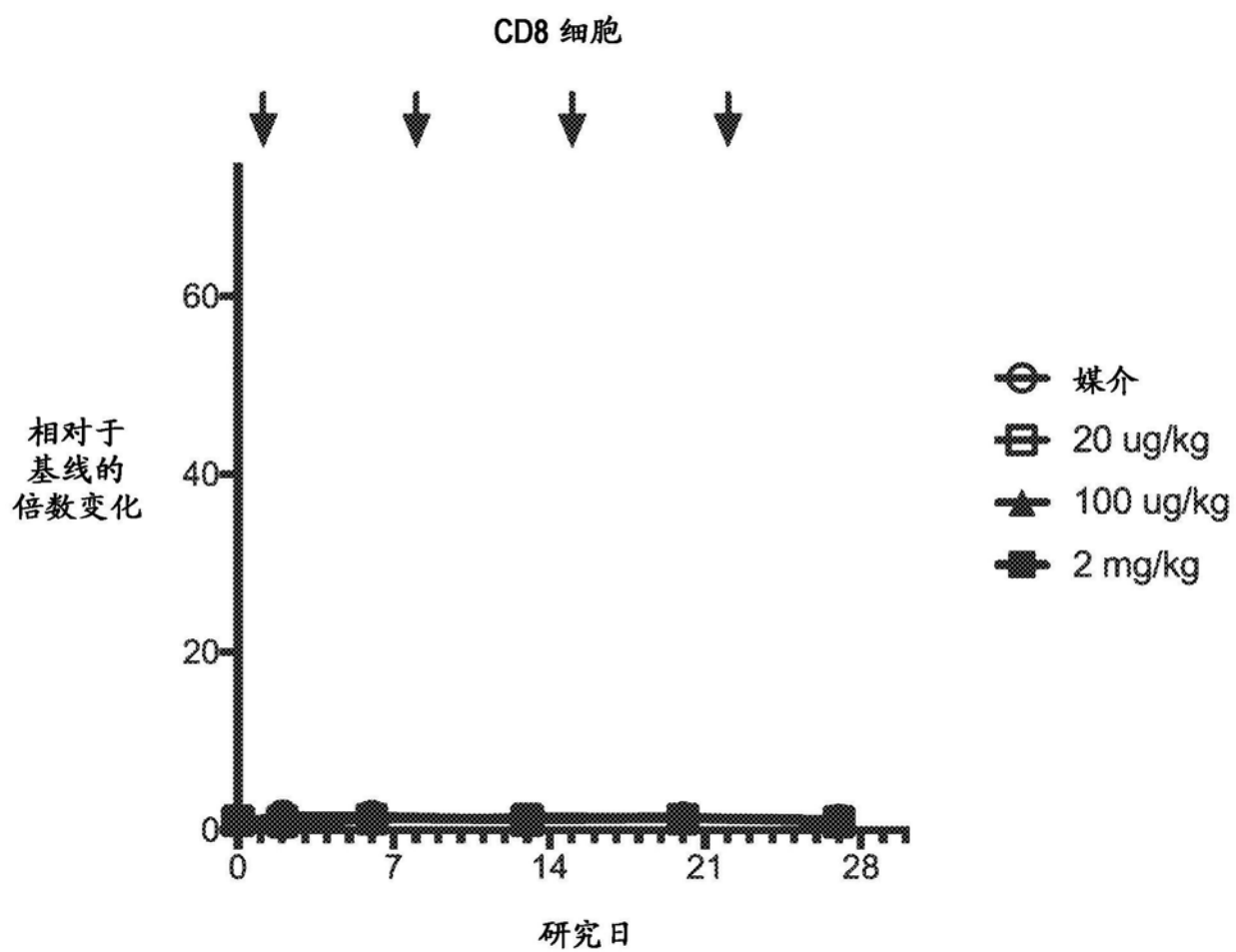


图17

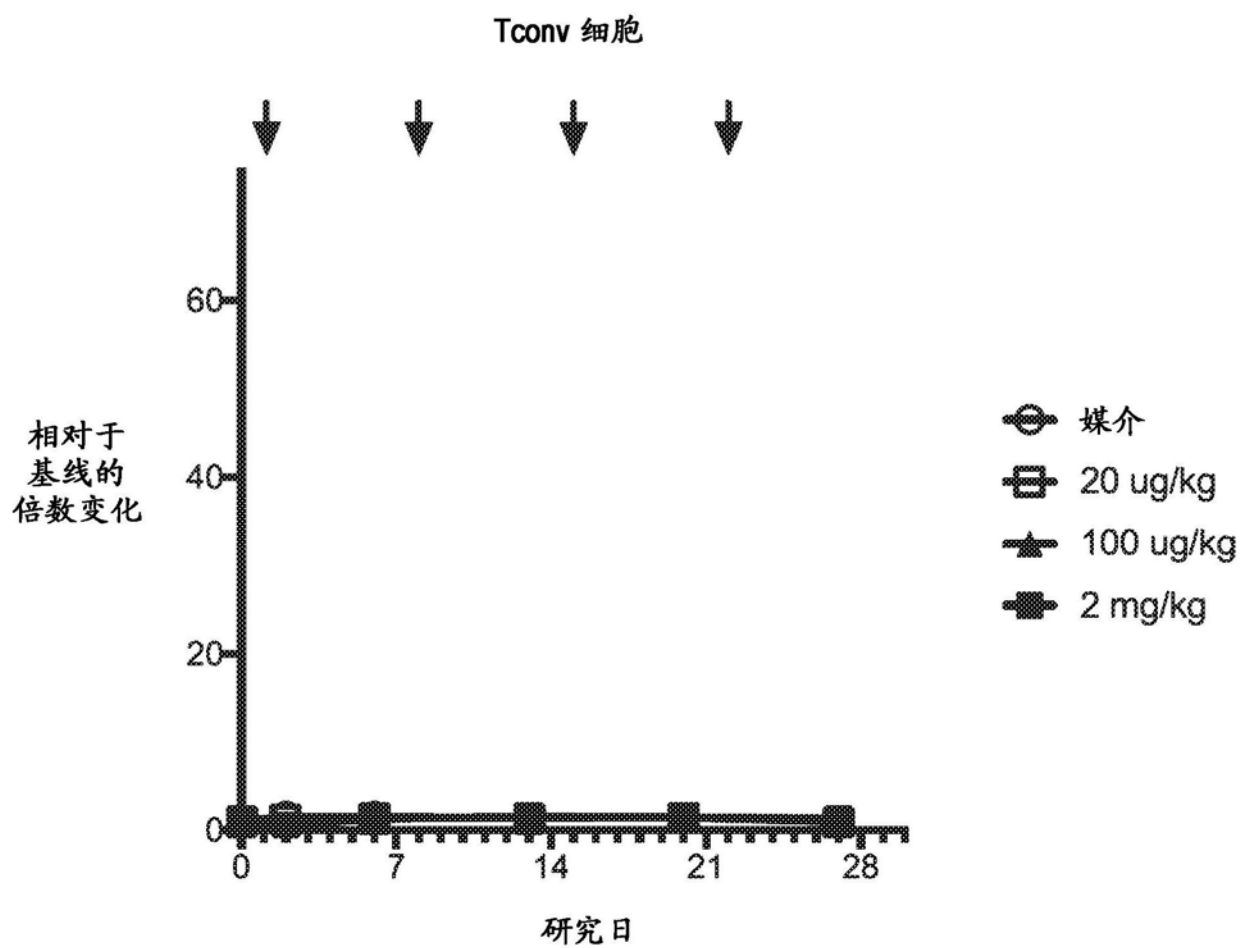


图18

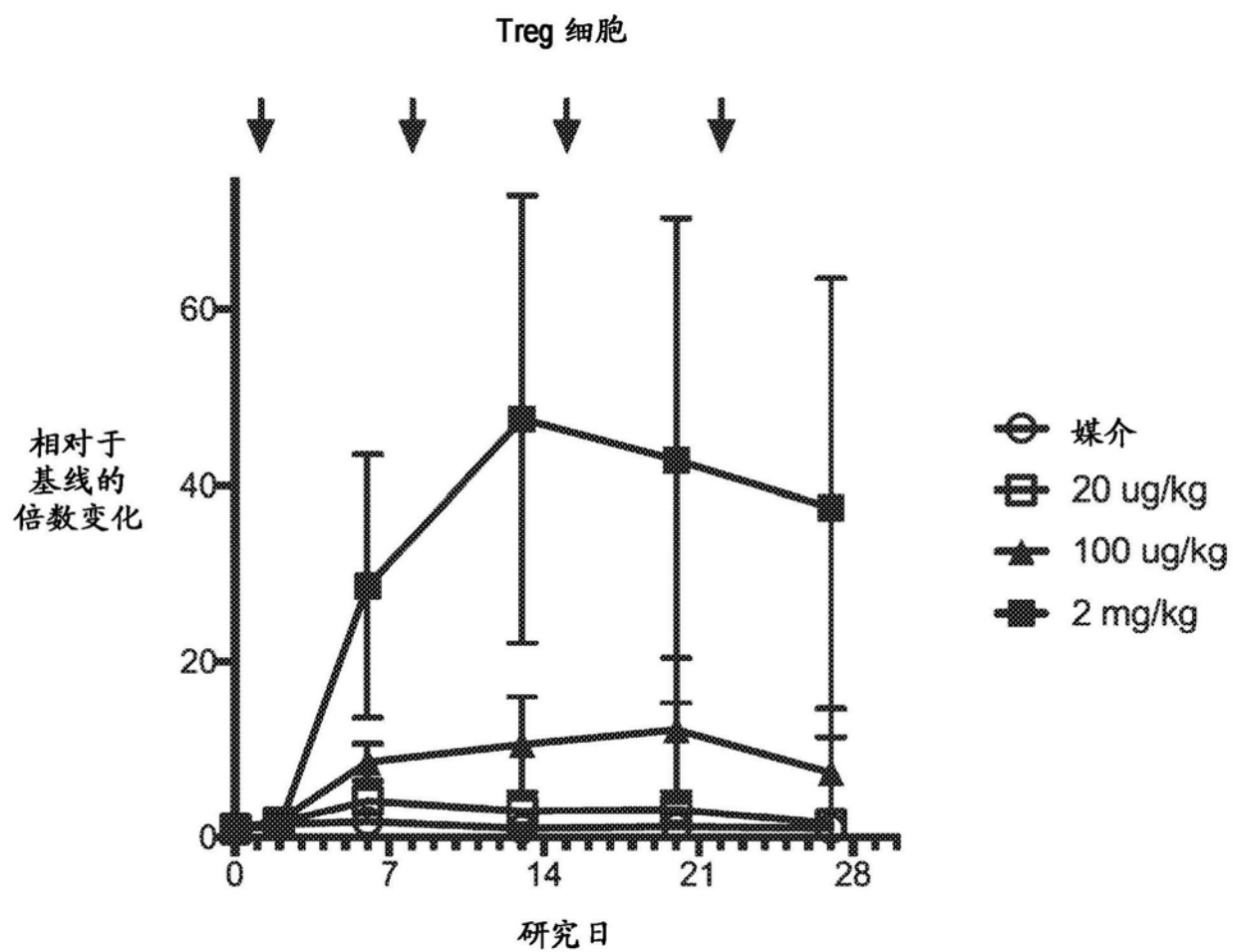


图19

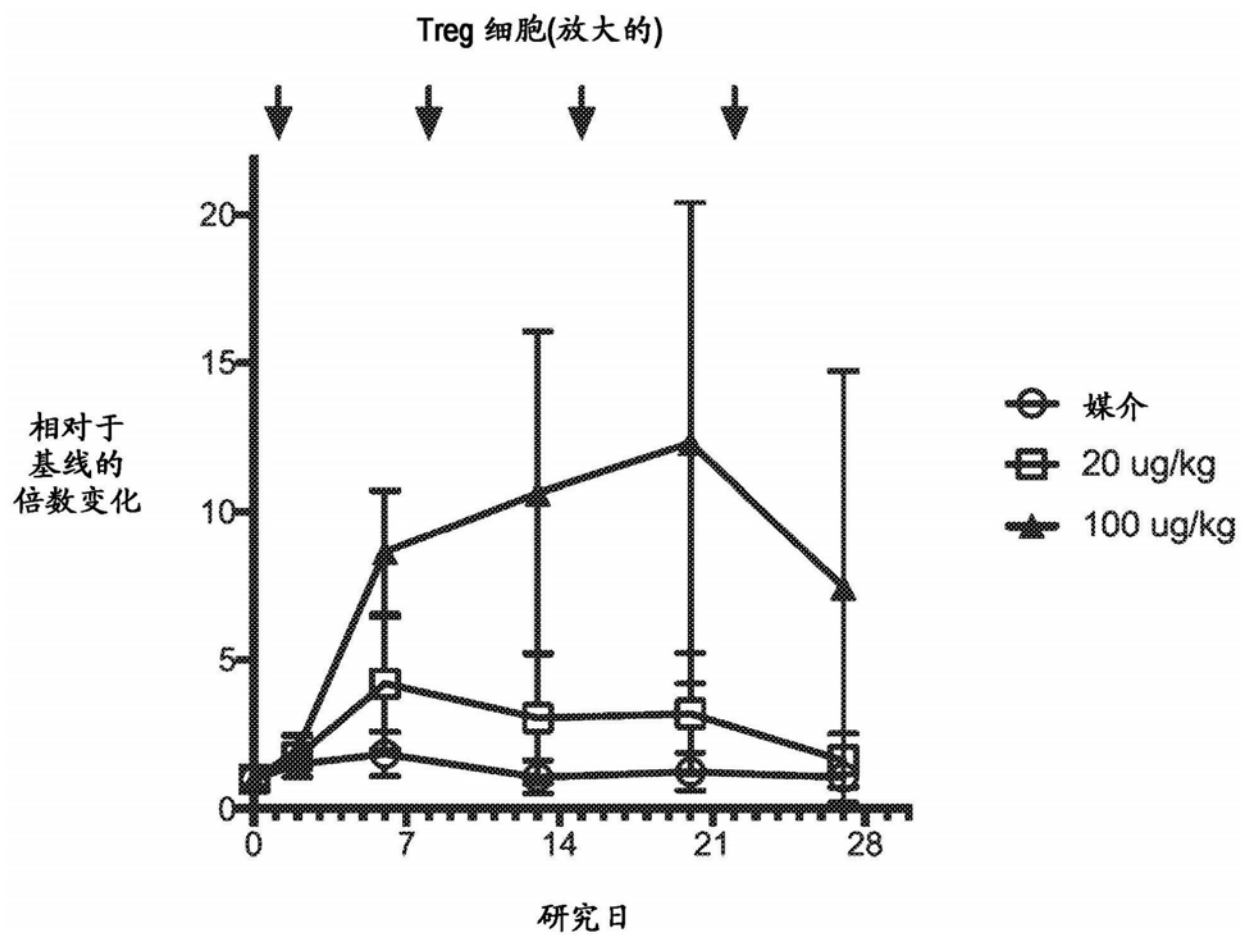


图20

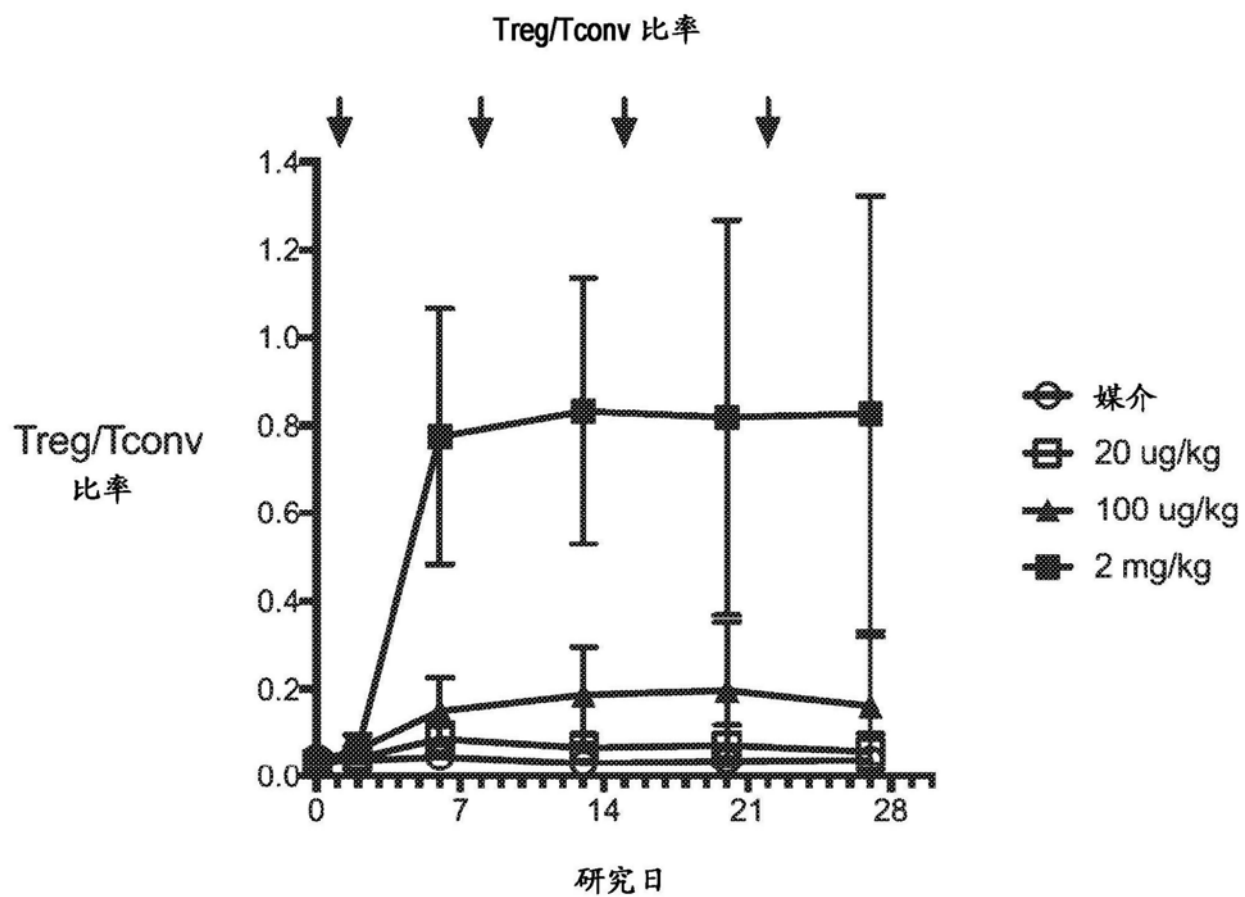


图21

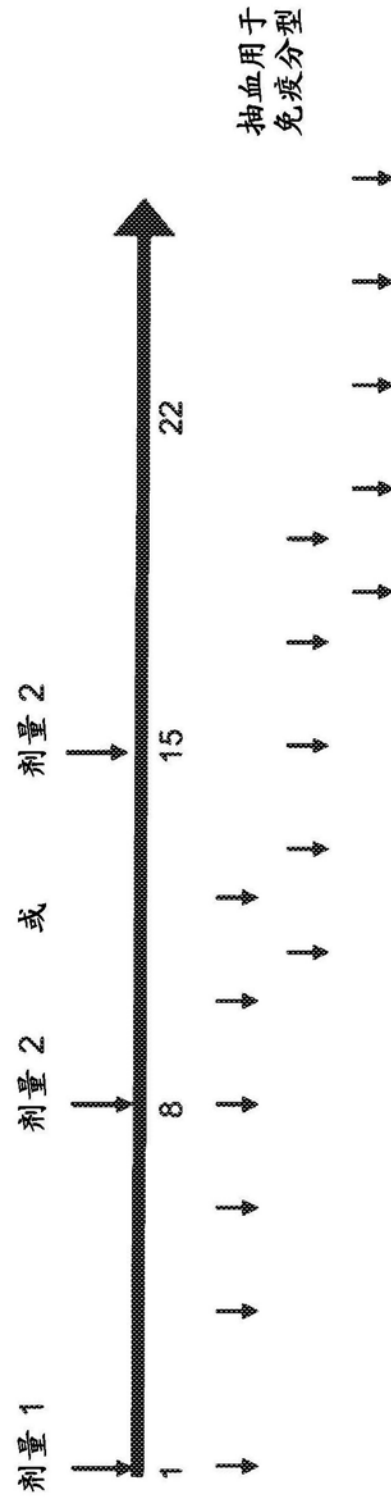


图22

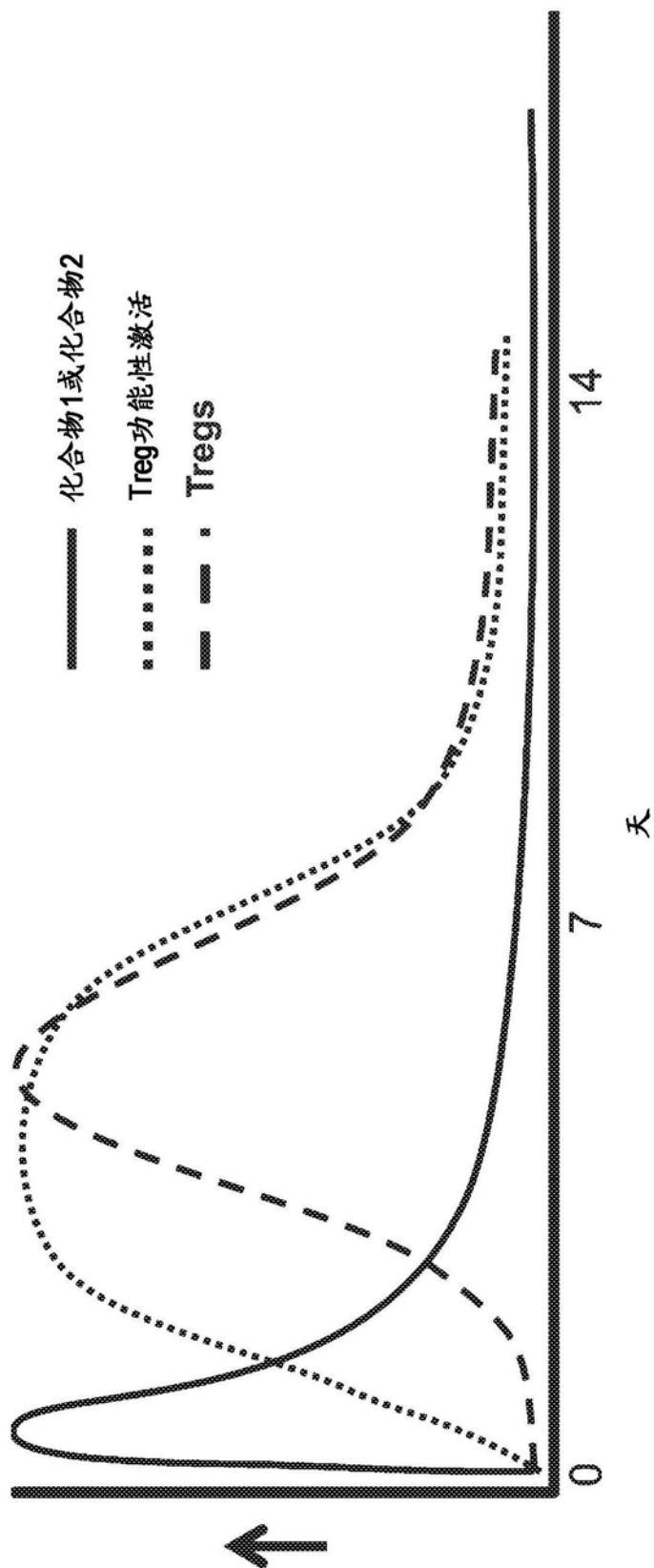


图23