



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118562016 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 30

(21) 申请号 202410633109.2

(22) 申请日 2017.10.21

(30) 优先权数据

62/411,216 2016.10.21 US

62/513,964 2017.06.01 US

(62) 分案原申请数据

201780079905.4 2017.10.21

(71) 申请人 艾尔特生物科技有限公司

地址 美国佛罗里达州

申请人 南特细胞公司

(72) 发明人 黄兴忠 W·马克斯 刘白 W·许

R·纽曼 K·卡格 L·尤

彼得·罗德 P·苏恩-希翁

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

专利代理师 程伟

(51) Int.Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

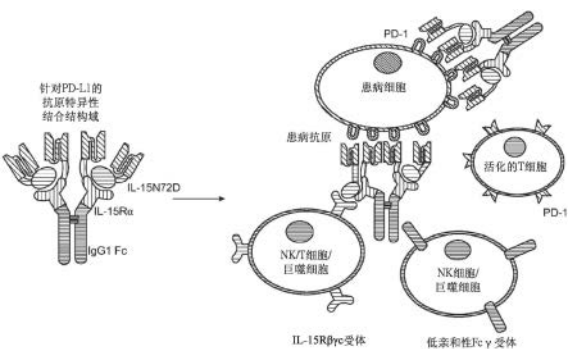
权利要求书1页 说明书81页  
序列表(电子公布) 附图35页

(54) 发明名称

基于多聚体IL-15的分子

(57) 摘要

本发明的特征在于多特异性的蛋白质复合体,该蛋白质复合体具有一个包括IL-15或功能变体的结构域,与一个对疾病抗原、免疫检查点或信号传导分子有特异性的结合结构域。



1. 一种包括两种可溶性蛋白质的分离的可溶性融合蛋白质复合体,其中,  
第一可溶性蛋白质由白细胞介素-15多肽结构域所组成,且第二可溶性蛋白质包括与免疫球蛋白Fc结构域融合的白细胞介素-15受体 $\alpha$ sushi结构域,  
其中,该第一可溶性蛋白质由IL-15N72D所组成,且该第二可溶性蛋白质由SEQ ID NO: 4所组成;或  
其中,该第一可溶性蛋白质由IL-15N72D所组成,且该第二可溶性蛋白质由SEQ ID NO: 8的氨基酸序列所组成;以及  
其中,该第一可溶性蛋白质的该白细胞介素-15多肽结构域与该第二可溶性蛋白质的该白细胞介素-15受体 $\alpha$ sushi结构域非共价结合以形成该可溶性融合蛋白质复合体。
2. 一种可溶性融合蛋白质复合体,包括如权利要求1所述的可溶性融合蛋白质复合体,其通过Fc结构域与第二个如权利要求1所述的可溶性融合蛋白质复合体的Fc结构域共价链接。
3. 一种药物组合物,包括如权利要求1或2所述的分离的可溶性融合蛋白质复合体。
4. 一种包括两种可溶性蛋白质的分离的可溶性融合蛋白质复合体,其中,  
第一可溶性蛋白质由白细胞介素-15多肽结构域所组成,且第二可溶性蛋白质包括与免疫球蛋白Fc结构域融合的白细胞介素-15受体 $\alpha$ sushi结构域,  
其中,该第一可溶性蛋白质由IL-15N72D所组成,且该第二可溶性蛋白质由SEQ ID NO: 14所组成;以及  
其中,该第一可溶性蛋白质的该白细胞介素-15多肽结构域与该第二可溶性蛋白质的该白细胞介素-15受体 $\alpha$ sushi结构域非共价结合以形成该可溶性融合蛋白质复合体。
5. 如权利要求1或权利要求4所述的可溶性融合蛋白质复合体,其中,该IL-15N72D具有SEQ ID NO: 2的氨基酸261至274的氨基酸序列。
6. 一种可溶性融合蛋白质复合体,包括如权利要求4所述的可溶性融合蛋白质复合体,其通过Fc结构域与第二个如权利要求4所述的可溶性融合蛋白质复合体的Fc结构域共价链接。
7. 一种药物组合物,包括如权利要求4或6所述的分离的可溶性融合蛋白质复合体。
8. 一种包括两种可溶性蛋白质的分离的可溶性融合蛋白质复合体,其中,  
第一可溶性蛋白质由白细胞介素-15多肽结构域所组成,且第二可溶性蛋白质包括与免疫球蛋白Fc结构域融合的白细胞介素-15受体 $\alpha$ sushi结构域,  
其中,该第一可溶性蛋白质由SEQ ID NO: 18所组成,且该第二可溶性蛋白质由SEQ ID NO: 14所组成;以及  
其中,该第一可溶性蛋白质的该白细胞介素-15多肽结构域与该第二可溶性蛋白质的该白细胞介素-15受体 $\alpha$ sushi结构域非共价结合以形成该可溶性融合蛋白质复合体。
9. 一种可溶性融合蛋白质复合体,包括如权利要求8所述的可溶性融合蛋白质复合体,其通过Fc结构域与第二个如权利要求8所述的可溶性融合蛋白质复合体的Fc结构域共价链接。
10. 一种药物组合物,包括如权利要求8或9所述的分离的可溶性融合蛋白质复合体。

## 基于多聚体IL-15的分子

[0001] 本发明是中国专利申请号为2017800799054,发明名称为“基于多聚体IL-15的分子”,申请日为2017年10月21日的专利申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明一般涉及多聚体融合蛋白的领域。

### 背景技术

[0003] 在本文中所描述的发明之前,迫切需要开发新的策略将多样的效应分子靶向至疾病位置,以提供治疗性益处而没有与非特异性免疫活性相关的副作用。

### 发明内容

[0004] 本发明至少部分地基于令人惊讶的发现,即基于多特异性的IL-15(InterLeukin-15,即白细胞介素-15,也称白介素-15)的蛋白质复合体增强对免疫细胞的刺激并促进其对抗疾病细胞的活性,从而导致疾病的减少或预防。这些基于IL-15的蛋白质复合体亦显示出对疾病抗原和靶标抗原的结合增加。本文提供了多特异性蛋白质复合体,其具有一个包括IL-15或功能变体的结构域,以及一个对疾病抗原、免疫检查点或信号分子特异的结合结构域。特别地,本文描述了包括IL-15N72D:IL-15R $\alpha$ Su-Ig Fc支架的蛋白质复合体,该支架与辨识如下分子的结合结构域融合:程序性死亡配体1(PD-L1)、程序性死亡1(PD-1)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)、分化簇47(CD47)、T细胞免疫球蛋白粘蛋白分子-3(TIM-3,TIM3)或糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体(TNFR)家族相关基因(GITR)。这些复合体通过IL-15活性来诱导NK和T细胞应答,并通过免疫检查点阻断进一步增强免疫应答,该阻断是经由抗-PD-L1,PD-1,CTLA-4,CD47,TIM3或GITR结合结构域(图1)所达成。在某些情况下,这些复合体也辨识抗原,比如PD-L1,单链脱氧核糖核酸(ssDNA),CD20,人表皮生长因子受体2(HER2),表皮生长因子受体(EGFR),CD19,CD38,CD52,双唾液酸神经节苷脂(GD2),CD33,Notch1,细胞间粘附分子1(ICAM-1),组织因子或HIV(人免疫缺陷病毒)包膜,上述抗原在疾病细胞上表达并经由Fc结合域刺激针对疾病细胞的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)。

[0005] 提供了包括至少两种可溶性蛋白质的经分离的可溶性融合蛋白复合体。譬如,第一蛋白质包括白细胞介素-15(IL-15)多肽,例如包括N72D突变(IL-15N72D)的变体IL-15多肽。第二蛋白质包括可溶性IL-15受体alpha sushi结合结构域(IL-15R $\alpha$ Su),且其与免疫球蛋白Fc结构域融合(IL-15R $\alpha$ Su/Fc)。该分离的可溶性融合蛋白复合体的第三组分包括结合域,该结合域辨识疾病抗原、免疫检查点分子或信号传导分子,例如PD-L1,PD-1,CTLA-4,CD47,TIM3或GITR,其中该结合域与IL-15N72D或IL-15R $\alpha$ Su/Fc蛋白融合。在一些情况下,这些结合结构域与IL-15N72D和IL-15R $\alpha$ Su/Fc蛋白二者都融合。在其他情况下,这些结合结构域其中之一与IL-15N72D或IL-15R $\alpha$ Su/Fc蛋白融合,且第二结合结构域,即是对免疫检查点或信号传导分子或疾病抗原具有特异性的结合结构域,与另一个蛋白融合。在一个方面中,疾

病抗原与瘤形成、传染病或自身免疫疾病相关。在一些情况下,该第一或第二可溶性蛋白质进一步包括结合结构域,该结合结构域辨识疾病抗原,例如在疾病细胞上表达的PD-L1, ssDNA, CD20, HER2, EGFR, CD19, CD38, CD52, GD2, CD33, Notch1, 细胞间粘附分子1 (ICAM-1), 组织因子或HIV包膜或其他已知抗原。或者, IL-15N72D或IL-15R $\alpha$ Su/Fc蛋白包括对疾病抗原、免疫检查点或信号传导分子有特异性的结合结构域,而另一种蛋白(分别为IL-15R $\alpha$ Su/Fc或IL-15N72D蛋白)不包括另外的融合的结合结构域。第一蛋白质的IL-15N72D结构域与第二蛋白质的可溶性IL-15R $\alpha$ Su结构域结合,而形成可溶性融合蛋白复合体。示例性融合蛋白复合体包括与IL-15N72D和/或IL-15R $\alpha$ Su/Fc融合蛋白共价链接的抗PD-L1抗体(图1和图2)。或者,第一蛋白质包括抗PD-L1抗体,该抗体共价链接到可溶性IL-15受体alpha sushi结合结构域(IL-15R $\alpha$ Su)上,且IL-15R $\alpha$ Su与免疫球蛋白Fc结构域融合,而第二蛋白质包括辨识疾病抗原的结合结构域,该结构域共价链接到包括N72D突变的白细胞介素-15(IL-15)变体多肽(IL-15N72D)上。

[0006] 在一些情况下,结合结构域包括单链抗体(scAb或scFv),其中免疫球蛋白轻链可变结构域通过多肽链接序列与免疫球蛋白重链可变结构域共价链接。或者,结合结构域包括能够充当免疫检查点抑制剂或免疫激动剂的可溶性或细胞外配体或受体结构域。

[0007] 示例性的第一蛋白质包括SEQ ID NO:2,6,10,18,20,24,28,32,或38中所述的氨基酸序列。示例性的第二蛋白质包括SEQ ID NO:4,8,12,14,16,22,26,30,34,36,40,42,44,46,51,52,53,或54中所述的氨基酸序列。编码第一蛋白质的示例性核酸序列包括SEQ ID NO:1,5,9,17,19,23,27,31或37中所述的序列。编码第二蛋白质的示例性核酸序列包括SEQ ID NO:3,7,11,13,15,21,25,29,33,35,39,41,43,45,47,48,49,或50中所示的序列,在一个方面中,核酸序列(复数)进一步包括启动子、翻译起始信号、以及可操作地链接至编码该融合蛋白的序列的前导序列。亦提供了包括本文所述核酸序列的DNA载体。例如,核酸序列处于用来复制、表达或两者兼具的载体中。

[0008] 亦提供了可溶性融合蛋白复合体,其包括与第二可溶性融合蛋白复合体共价链接的第一可溶性融合蛋白复合体。譬如,本发明的可溶性融合蛋白复合体是多聚体化的,例如二聚体化、三聚体化或其它多聚体化(例如,四复合体,五复合体,等)。例如,多聚体是同源多聚体或异源多聚体。可溶性融合蛋白复合体通过共价键链接,例如二硫键,化学交联剂。在一些情况下,一个可溶性融合蛋白通过二硫键与另一个可溶性融合蛋白共价链接,该二硫键将第一可溶性蛋白的Fc结构域与第二可溶性蛋白的Fc结构域链接起来。

[0009] Fc结构域或其功能性片段包含选自下列组中的Fc结构域: IgG Fc结构域,人IgG1 Fc结构域,人IgG2 Fc结构域,人IgG3 Fc结构域,人IgG4 Fc结构域, IgA Fc结构域, IgD Fc结构域, IgE Fc结构域,以及IgM Fc结构域;小鼠IgG2A结构域,或其任何组合。任选地, Fc结构域包含氨基酸的变化,该变化导致Fc结构域具有改变的补体或Fc受体结合特性或改变的二聚体化或糖基化图谱的。氨基酸变化以产生具有改变的补体或Fc受体结合特性或改变的二聚体化或糖基化图谱的Fc结构域,这是本领域中已知的。例如,将IgG1 CH2的234位和235位的亮氨酸残基(以抗体共有序列为基准编号)(即...P E L L G G...)替换为丙氨酸残基(即...P E A A G G...)导致Fc gamma受体结合的丧失,而将IgG1 CH2的322位的赖氨酸残基(以抗体共有序列为基准编号)(即...K C K S L...)替换为丙氨酸残基(即...K C A S L...)导致补体激活的丢失。在一些具体实施方案中,这些突变被合并。

[0010] 在一些方面中,结合结构域通过多肽链接序列共价链接到IL-15多肽(或其功能性片段)。类似地,结合结构域通过多肽链接序列共价链接到IL-15R $\alpha$ 多肽(或其功能性片段)。任选地,IL-15R $\alpha$ 多肽(或其功能性片段)通过多肽链接序列共价链接到Fc结构域(或其功能性片段)。可以独立地选择每个多肽链接序列。任选地,多肽链接序列是相同的。或者,它们是不同的。

[0011] 任选地,本发明的可溶性融合蛋白复合体以如下的方式提供,其中至少一种可溶性融合蛋白包括可检测的标记。可检测的标记包含但不限于生物素、链霉亲和素、酶或其具有催化活性的片段、放射性核素、纳米颗粒、顺磁性金属离子、或荧光、磷光或化学发光分子,或其任何组合。

[0012] 在一些具体例中,编码第一可溶性蛋白的核酸序列包括SEQ ID NO:1,5,9,17,19,23,27,31或37中所述的序列。在一些具体例中,编码第二可溶性蛋白的核酸序列包括SEQ ID NO:3,7,11,13,15,21,25,29,33,35,39,41,43,45,47,48,49或50中所述的序列。

[0013] 在一些具体例中,核酸序列包括SEQ ID NO:1,3,5,7,9,11,13,15,17,19,21,23,25,27,29,31,33,35,37,39,41,43,45,47,48,49或50。

[0014] 该核酸序列进一步包括启动子、翻译起始信号、以及可操作地链接至编码该融合蛋白的序列的前导序列。

[0015] 在其他具体例中,多肽包括SEQ ID NO:2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24,26,28,30,32,34,36,38,40,42,44,46,51,52,53或54。

[0016] 本发明提供了制备本发明的可溶性融合蛋白复合体的方法。该方法包含以下步骤:a)将具有编码第一蛋白的适当控制序列的DNA载体引入第一宿主细胞中;b)在足以将第一蛋白质表达在细胞或培养基中的条件下,在培养基中培养该第一宿主细胞;c)从该宿主细胞或培养基中纯化第一蛋白质;d)将具有编码第二蛋白质的适当控制序列的DNA载体引入第二宿主细胞中;e)在足以将第二蛋白质表达在细胞或培养基中的条件下,在培养基中培养该第二宿主细胞;f)从该宿主细胞或培养基中纯化第二蛋白质;和g)在足以容许第一蛋白质的IL-15结构域与第二蛋白质的可溶性IL-15R $\alpha$ 结构域之间结合的条件下,混合第一和第二蛋白质以形成可溶性融合蛋白复合体。

[0017] 在一些情况下,该方法进一步包含在足以容许在由表达载体所表达的多肽之间形成二硫键的条件下,混合第一和第二蛋白质。

[0018] 或者,制备本发明的可溶性融合蛋白复合体的方法如下所述完成:a)将具有编码第一蛋白质的适当控制序列的DNA载体和具有编码第二种蛋白质的适当控制序列的DNA载体引入宿主细胞中;b)在足以将蛋白质表达在细胞或培养基中的条件下,在培养基中培养宿主细胞,容许第一蛋白质的IL-15结构域与第二蛋白质的可溶性IL-15R $\alpha$ 结构域结合,以形成可溶性融合蛋白复合体;和c)从宿主细胞或培养基中纯化可溶性融合蛋白复合体。

[0019] 在一个方面中,该方法进一步包含在足以容许在由表达载体所表达的多肽之间形成二硫键的条件下,混合第一和第二蛋白质。

[0020] 亦提供了制备可溶性融合蛋白复合体的方法,包括a)将具有编码第一和第二蛋白质的适当控制序列的一个DNA载体引入宿主细胞中;b)在足以将蛋白质表达在细胞或培养基中的条件下,在培养基中培养宿主细胞,容许第一蛋白质的IL-15结构域与第二蛋白质的可溶性IL-15R $\alpha$ 结构域结合,以形成可溶性融合蛋白复合体,并容许在多肽之间形成二硫

键;c)从宿主细胞或培养基中纯化可溶性融合蛋白复合体。

[0021] 任选地,该方法进一步包含在足以容许在由表达载体所表达的多肽之间形成二硫键的条件下,混合第一和第二蛋白质。

[0022] 用于在有需要的受试者中治疗瘤形成、传染病或自身免疫疾病的方法的进行,是通过对受试者施用有效量的药物组合物,其包括本文所述的可溶性融合蛋白复合体,例如可溶性抗-PD-L1 scAb/IL-15N72D:抗-PD-L1 scAb/IL-15R $\alpha$ Su/Fc融合蛋白复合体,从而治疗瘤形成、传染病或自身免疫疾病。例如,用于在有需要的受试者中治疗实体或血液恶性肿瘤的方法的进行,是通过对受试者施用有效量的药物组合物,其包括可溶性抗-人PD-L1

[0023] scAb/huIL-15N72D:抗-人PD-L1 scAb/huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1 Fc融合蛋白复合体,从而治疗恶性肿瘤。示例性的抗-人PD-L1 scAb/huIL-15N72D蛋白包括SEQ ID NOs:2和6中所述的氨基酸序列。示例性的抗-人PD-L1 scAb/huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1 Fc蛋白包括SEQ ID NOs:4和8中所述的氨基酸序列。

[0024] 适合用本文所述方法治疗的瘤形成包含:胶质母细胞瘤,前列腺癌、急性髓细胞白血病、B细胞瘤、多发性骨髓瘤、B细胞淋巴瘤、B细胞非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、皮肤T细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、实体瘤、尿路上皮/膀胱癌、黑色素瘤、肺癌、肾细胞癌、乳腺癌、胃癌和食道癌、头颈癌、胰腺癌、结直肠癌、卵巢癌、非小细胞肺癌和鳞状细胞头颈癌。

[0025] 使用本文所述方法对其治疗的示例性感染是人免疫缺陷病毒(HIV)感染。示例性核酸序列包含:SEQ ID NOs:47,48,49或50。示例性氨基酸序列包含:SEQ ID NO:51,52,53或54。本文所述方法亦可用于治疗细菌感染(例如,革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌)

[0026] (Oleksiewicz等.2012.Arch Biochem Biophys.526:124-31)。使用本文所述方法对其治疗的示例性自身免疫疾病是由B细胞介导的自身免疫疾病。此类自身免疫性疾病包含:类风湿性关节炎、多发性硬化症、特发性血小板减少症、IgM介导的多发性神经病变、第八凝血因子缺乏症(A型血友病)、系统性红斑狼疮、干燥综合征(修格连氏症候群)、炎症性肌炎、寻常性天疱疮、视神经脊髓炎、ANCA相关性血管炎(ANCA=Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies抗中性粒细胞胞质抗体)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病变、自身免疫性贫血、单纯红细胞再生障碍性贫血(纯红再障)、血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、伊文氏综合征、血管炎(例如肉芽肿性多血管炎,先前称为韦格纳氏症)、大疱性皮肤病(例如天疱疮、类天疱疮)、I型糖尿病、抗NMDA受体脑炎和Devic病、Graves眼病、自身免疫性胰腺炎、眼阵挛肌阵挛综合征(OMS)和IgG4相关性疾病。

[0027] 包括融合蛋白复合体的药物组合物是以有效量施用的。例如,药物组合物的有效量为约1 $\mu$ g/kg至100 $\mu$ g/kg之间,例如1,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,90,95,或100 $\mu$ g/kg。或者,TxM复合体以固定剂量或基于身体表面面积(即每平方米)施用。

[0028] 包括融合蛋白复合体的药物组合物每月至少给药一次,例如:每月两次,每周一次,每周两次,每天一次,每天两次,每8小时一次,每4小时一次,每2小时一次,或者每小时一次。药物组合物的适合的给药方式包含:全身给药,静脉内给药,局部给药,皮下给药,肌肉内给药,肿瘤内给药,吸入和腹膜内给药。

[0029] 优选地,融合蛋白复合体增加干扰素gamma (IFN-  $\gamma$ ) 的血清水平,和/或刺激CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞和NK细胞以杀死受试者体内的患病细胞或肿瘤细胞。

[0030] 在本发明的可溶性融合蛋白复合体的某些方面中,IL-15多肽是具有与天然IL-15多肽不同氨基酸序列的IL-15变体。人IL-15多肽在本文中被指称为huIL-15,hIL-15,huIL15,hIL15,IL-15野生型(wt),而其变体使用天然氨基酸、该氨基酸在成熟序列中的位置和变体氨基酸来指称。例如,huIL15N72D是指包括在位置72处的N至D替换的人IL-15。在一个方面中,IL-15变体作为IL-15激动剂而起作用,如后所示,即与天然IL-15多肽相比,IL-15变体对IL-15/IL-2 $\beta$   $\gamma_c$ 受体(IL-15R)结合活性增加。或者,IL-15变体作为IL-15拮抗剂而起作用,如后所示,即与天然IL-15多肽相比,IL-15变体对IL-15/IL-2 $\beta$   $\gamma_c$ 受体(IL-15R)结合活性降低。

[0031] 用于杀死靶细胞的方法通过如下步骤进行:a)使复数个细胞与本发明的可溶性融合蛋白复合体接触,其中该复数个细胞进一步包括:承载可被IL-15结构域辨识的IL-15R链的免疫细胞,或承载由检查点抑制剂或免疫激动剂结合结构域调节的检查点或信号传导分子的免疫细胞,以及靶疾病细胞;b)经由IL-15R或信号传导分子或经由检查点分子之阻断活化免疫细胞;和c)通过活化的免疫细胞杀死靶细胞。例如,靶疾病细胞是肿瘤细胞、自身免疫细胞或被病毒感染的细胞。在一些情况下,结合结构域包括抗-PD-L1抗体。

[0032] 杀死靶细胞的方法进一步包括:a)使复数个细胞与本发明的可溶性融合蛋白复合体接触,其中该复数个细胞进一步包含:承载可被Fc结构域辨识的Fc受体链的免疫细胞,以及承载可被结合结构域(如抗原特异性scAb)辨识的抗原的靶疾病细胞;b)在靶疾病细胞上的抗原和免疫细胞上的Fc受体链之间形成特异性结合复合体(桥),而足以结合并活化免疫细胞;和c)通过结合的活化免疫细胞杀死靶细胞。例如,靶疾病细胞是肿瘤细胞、自身免疫细胞或被病毒感染的细胞。在一些情况下,结合结构域包括抗-PD-L1抗体。

[0033] 亦提供了预防或治疗患者体内疾病的方法,该方法包含以下步骤:a)给患者施用本发明的可溶性融合蛋白复合体;b)活化患者体内的免疫细胞;和c)经由足以预防或治疗患者体内疾病的活化免疫细胞破坏或杀死疾病细胞。

[0034] 本发明亦提供了用于预防或治疗患者体内疾病其患病细胞的方法,该方法包含以下步骤:a)将承载IL-15R链或检查点或信号传导分子的免疫细胞与本发明的可溶性融合蛋白复合体混合;b)活化免疫细胞;c)给患者施用活化的免疫细胞;和d)经由足以预防或治疗患者体内疾病的活化免疫细胞破坏或杀死疾病细胞。

[0035] 施用本发明的融合蛋白复合体诱导受试者体内的免疫应答。例如,施用本发明的融合蛋白复合体诱导免疫应答,其对抗与瘤形成、传染病或自身免疫疾病相关的细胞。在一个方面中,本发明的融合蛋白复合体增加免疫细胞增殖。

[0036] 本发明提供了刺激哺乳动物体内免疫应答的方法,其通过给哺乳动物施用有效量的本发明的可溶性融合蛋白复合体。本发明亦提供了抑制哺乳动物体内免疫应答的方法,其通过给哺乳动物施用有效量的本发明任一项的可溶性融合蛋白复合体。

[0037] 除非另做界定,否则本文所使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域技术人员一般理解的意义。下述参考文献向该领域技术人员提供本发明中所用的多数术语的通常定义:Singleton等人编撰的《微生物学和分子生物学词典(第二版)》(Dictionary of Microbiology and Molecular Biology(2nd ed.1994));《剑桥科技词典》(The Cambridge

Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988));《遗传学词汇(第五版)》(The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger等. (eds.), Springer Verlag (1991));以及Hale和Marham编撰的《哈珀柯林斯生物学词典》(The Harper Collins Dictionary of Biology (1991))。本文中,除非另做说明,否则下述术语具有其下方所述的意义。

[0038] “剂”意为肽、核酸分子或小化合物。

[0039] “TxM”意为包括与结合结构域链接的IL-15N72D: IL-15R $\alpha$ Su/Fc支架的复合体(图2)。示例性TxM是IL-15N72D: IL-15R $\alpha$ Su复合体,其包括与特异性识别PD-L1的结合域的融合(PD-L1 TxM)。

[0040] “改善”意为降低、抑制、衰减、减少、停滞、或稳定疾病的发展或进展。

[0041] “类似物”意为虽不相同、但具有类似的功能性或结构性特征的分子。例如,多肽类似物保留对应的天然存在的多肽的生物活性,同时具有相对于天然存在的多肽的增强该类似物功能的某些生物化学修饰。这些生物化学修饰可以增加该类似物的蛋白酶抗性、膜渗透性或半衰期,而不改变例如配体结合。类似物可包含非天然氨基酸。

[0042] 术语“结合结构域”旨在涵盖领域中已知的抗体、单链抗体、Fab、Fv、T细胞受体结合结构域、配体结合结构域、受体结合结构域或其他抗原特异性多肽。

[0043] 本发明包含这些抗体或这些抗体的片段,只要它们展现出所期望的生物活性即可。本发明亦包含嵌合抗体,例如人源化抗体。一般地,人源化抗体具有从非人类来源引入的一个或复数个氨基酸残基。例如,可以使用本领域所述方法执行人源化,通过用啮齿动物互补决定区的至少一部分替换人抗体的对应区域。

[0044] 术语“抗体”或“免疫球蛋白”旨在涵盖多克隆和单克隆抗体。优选的抗体是与抗原反应的单克隆抗体。术语“抗体”亦旨在涵盖一种以上与抗原反应的抗体的混合物(例如,与抗原反应的不同类型的单克隆抗体的鸡尾酒混合物)。术语“抗体”进一步旨在涵盖完整抗体、其生物学功能片段、单链抗体、和基因改变的抗体,例如包括来自一种以上物种的部分的嵌合抗体、二功能抗体、偶联抗体、人源化抗体和人抗体。亦可以使用的生物学功能性抗体片段是来源于抗体的、足以结合抗原的那些肽片段。如本文中所用的“抗体”意指包含完整抗体以及能够结合表位、抗原或目标抗原片段的任何抗体片段(例如F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab, Fv)。

[0045] “结合至”某分子意为对该分子具有物理化学亲和性。

[0046] “检测”指的是鉴别待检测的分析物的存在、不存在或其数量。

[0047] “疾病”意为任何损害或干扰细胞、组织或器官的正常功能的病况或病症。疾病的例子包含瘤形成、自体免疫疾病和病毒感染。

[0048] 制剂或制剂组分的“有效量”和“治疗有效量”术语意为单独或组合使用的该制剂或组分足以提供所期望效果的量。例如,“有效量”意为改善未经治疗患者的疾病症状的单独或组合使用的化合物的必要用量。用来实践本发明之用于治疗疾病的活性化合物的有效量,依据给药方式、受试者的年龄、体重和一般健康状况而变化。最终,主治医生或兽医将决定适宜的量和(给药的)剂量方案。此量被称为“有效”量。

[0049] “片段”意为多肽或核酸分子的一部分。优选地,该部分含有参考核酸分子或多肽之全长的至少10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 或90%。例如,片段可含有10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, or 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 或1000个核苷酸



或氨基酸。然而,本发明亦包括多肽和核酸片段,只要它们分别展现出全长多肽和核酸的所期望的生物活性即可。几乎任何长度的核酸片段被使用。例如,本发明的许多实施例包含总长度为约10,000、约5,000、约3,000、约2,000、约1,000、约500、约200、约100、约50个碱基对长度(包含所有中间长度)的例示性多核苷酸片段。类似地,几乎任何长度的多肽片段被使用。例如,本发明的许多实施例包含总长度为约10,000、约5,000、约3,000、约2,000、约1,000、约500、约200、约100或约50个氨基酸长度(包含所有中间长度)的例示性多肽片段。

[0050] 术语“分离的”、“纯化的”或“生物学纯的”是指材料和天然状态下通常与其相伴的组分之分离的不同程度。“分离的”表示与原始来源或周围环境的一种分离程度。“纯化”表示高于分离的一种分离程度。

[0051] “纯化的”或“生物学纯的”蛋白质充分地不含其他材料,使得任何杂质不会实质地影响蛋白质的生物学特性或造成其他不利后果。也就是说,本发明的核酸或肽,如果以重组DNA技法生产而实质上不含细胞材料、病毒材料或培养介质;或,如果以化学合成而实质上不含化学前体或其他化学品,则本发明的核酸或肽即视为纯化的。纯度和同质性通常用分析化学技法确定,例如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱。术语“纯化的”可表示核酸或蛋白质在电泳凝胶中基本上产生一条带。对于可以被修饰的蛋白质,例如磷酸化或糖基化,不同的修饰可能产生不同的分离的蛋白质,其可以被单独纯化。

[0052] 类似地,“实质上纯的”是指核苷酸或多肽已经与其天然相伴组分分离。通常,以重量计,当核苷酸和多肽为至少60%、70%、80%、90%、95%或甚至99%不含与其天然伴随的蛋白质和(天然存在的)有机分子时,该核苷酸和多肽即视为实质上纯的。

[0053] “分离的核酸”意为一核酸,其不含在该核酸来源生物体的天然存在的基因组中位于该核酸两侧翼的基因。该术语涵盖例如:(a)一DNA,其是天然存在的基因组DNA分子的一部分,但侧翼没有在其天然存在的生物体基因组中位于该分子部分之侧翼的两个核酸序列;(b)一核酸,其被插入载体中或插入原核或真核生物的基因组DNA中的方式,使得所得到的分子不同于任何天然存在的载体或基因组DNA;(c)一单独的分子,例如cDNA、基因组片段、通过聚合酶链式反应(PCR)生产的片段、或限制性酶切片段;(d)一重组核苷酸序列,其为杂合基因(即编码融合蛋白的基因)的一部分。根据本发明,分离的核酸分子进一步包含以合成所生产的分子,以及在化学上被改变的和/或骨架被修饰的任何核酸。例如,分离的核酸是纯化的cDNA或RNA多核苷酸。分离的核酸分子亦包含信使核糖核酸(mRNA)分子。

[0054] “分离的多肽”意为已同与其天然相伴的组分分离的本发明的多肽。通常,以重量计,当多肽至少60%不含与其天然伴随的蛋白质和天然存在的有机分子时,该多肽即视为分离的。优选地,制备为至少75%,更优选至少90%,最优选至少99%,以重量计,本发明的多肽。分离的本发明的多肽可以被得到,例如,通过从天然来源提取,通过表达编码这种多肽的重组核酸,或通过蛋白质的化学合成。纯度可以通过任何适当的方法测量,例如柱色谱、聚丙烯酰胺凝胶电泳或通过HPLC/高效液相色谱分析。

[0055] “标记物”意为具有与疾病或病症相关的表达水平或活性改变的任何蛋白质或多核苷酸。

[0056] “瘤形成”意为以增殖过度或凋亡减少为特征的疾病或病症。本发明可以用于的例示性瘤包含但不限于:白血病(例如,急性白血病、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血

病、急性髓细胞白血病(acute myeloblastic leukemia)、急性早幼粒细胞白血病、急性髓单核细胞白血病、急性单核细胞白血病、急性红白血病、慢性白血病、慢性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤(霍奇金氏症、非霍奇金氏症)、华氏/瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、重链病、实体瘤比如肉瘤和癌(例如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮细胞肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、肾母细胞瘤/Wilms瘤、宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、胶质瘤、多形性胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突胶质细胞瘤、神经鞘瘤/施万细胞瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤)。在特定的具体例中、瘤形成是多发性骨髓瘤、 $\beta$ 细胞淋巴瘤、尿路上皮/膀胱癌或黑色素瘤。如本文所用,“得到一试剂”中的“得到”包含合成、购买或在其他情况下获得该试剂。

[0057] “减少”意为至少5%,10%,25%,50%,75%,或100%的负向改变。

[0058] “参考”意为标准条件或对照条件。

[0059] “参考序列”是用作序列比对的基准的界定序列。参考序列可以是指定序列的子集或整体;例如,全长cDNA或基因序列的一节段、或完整的cDNA或基因序列。对多肽来说,参考多肽序列的长度一般为至少约16个氨基酸,优选至少约20个氨基酸,更优选至少约25个氨基酸,甚至再更优选约35个氨基酸、约50个氨基酸、或约100个氨基酸。对核酸来说,参考核酸序列的长度一般为至少约50个核苷酸,优选至少约60个核苷酸,更优选至少约75个核苷酸,甚至再更优选约100个核苷酸或约300个核苷酸或任何约等于它们或在它们之间的整数。

[0060] “特异性结合”意为化合物或抗体辨识并结合本发明的多肽,但实质上不识别和结合样品中的其他分子,该样品的一个例子为天然包含本发明的多肽的生物学样品。

[0061] 可用于本发明之方法的核酸分子包含任何编码本发明的多肽或该多肽片段的核酸分子。这种核酸分子不需要与内源性核酸序列100%相同,但将通常展现出实质的同一性。与内源性序列具有“实质的同一性”的多核苷酸通常能够与双链核酸分子的至少一条链杂交。“杂交”意为在各种严格条件下,互补的多核苷酸序列(例如本文所述的基因)或其部分之间配对并且形成双链分子(参见,例如,Wahl,G.M.and S.L.Berger(1987)Methods Enzymol.152:399;Kimmel,A.R.(1987)Methods Enzymol.152:507)。

[0062] 例如,严格的盐浓度将一般小于约750mM氯化钠和75mM柠檬酸钠,优选小于约500mM氯化钠和50mM柠檬酸钠,更优选小于约250mM氯化钠和25mM柠檬酸钠。低严格度杂交可在无有机溶剂(例如甲酰胺)的情况下得到,而高严格度杂交可在至少约35%甲酰胺,而更优选至少约50%甲酰胺的存在下得到。严格的温度条件将一般包含至少约30°C,更优选至少约37°C,最优选至少约42°C的温度。变化其他参数,例如杂交时间、洗涤剂浓度,例如十二烷基硫酸钠(SDS)、以及载体DNA的包含或排除,是本领域技术人员熟知的。通过根据需要合并这些不同的条件来实现各种严格程度。在一优选的具体例中,杂交将发生在30°C下、750mM氯化钠,75mM柠檬酸钠和1%SDS中。在一更优选的具体例中,杂交将发生在37°C下、

500mM氯化钠,50mM柠檬酸钠,1% SDS,35% 甲酰胺和100 $\mu$ g/ml变性的鲑鱼精子DNA(ssDNA)中。在一最优选的具体例中,杂交将发生在42 $^{\circ}$ C下、250mM氯化钠,25mM柠檬酸钠,1% SDS,50% 甲酰胺和200 $\mu$ g/ml ssDNA中。对于本领域技术人员来说,变化这些条件的用处是显而易见的。

[0063] 对于大多数应用,杂交后的洗涤步骤在严格度方面也将变化。洗涤的严格条件可以通过盐浓度和温度来定义。如上,洗涤的严格度可以通过降低盐浓度或通过升高温度而提高。例如,洗涤步骤的严格盐浓度将优选是小于约30mM氯化钠和3mM柠檬酸钠,最优选是小于约15mM氯化钠和1.5mM柠檬酸钠。洗涤步骤的严格温度条件将一般包含至少约25 $^{\circ}$ C的温度,更优选至少约42 $^{\circ}$ C,甚至更优选至少约68 $^{\circ}$ C。在一优选的具体例中,洗涤步骤将发生在25 $^{\circ}$ C下、30mM氯化钠,3mM柠檬酸钠和0.1% SDS中。在更优选的具体例中,洗涤步骤将发生在42 $^{\circ}$ C下、15mM氯化钠,1.5mM柠檬酸钠和0.1% SDS中。在一更优选的具体例中,洗涤步骤将发生在68 $^{\circ}$ C下、15mM氯化钠,1.5mM柠檬酸钠和0.1% SDS中。对于本领域技术人员来说,这些条件的其他变化是显而易见的。杂交手段是本领域技术人员熟知的,并且例如,在如下文献中描述:Benton和Davis (Science 196:180,1977);Grunstein和Hogness (Proc.Natl.Acad.Sci.,USA 72:3961,1975);Ausubel等.《当代实验方案-分子生物学》Current Protocols in Molecular Biology,Wiley Interscience,New York,2001);Berger和Kimmel《分子克隆技术指南》Guide to Molecular Cloning Techniques,1987,Academic Press,New York);以及Sambrook等,《分子克隆:实验室手册》Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York。

[0064] “实质上相同”意为多肽或核酸分子展现出与参考氨基酸序列(例如本文所述的任何一段氨基酸序列)或核酸序列(例如本文所述的任何一段核酸序列)至少50%的同一性。优选地,这种序列与用于比对的序列在氨基酸或核酸水平上是至少60%相同的,更优选是80%或85%,更优选90%、95%或甚至99%相同的。

[0065] 序列同一性通常使用序列分析软件来测量(例如,Sequencher, Gene Codes Corporation,775Technology Drive,Ann Arbor,MI;Vector NTI,Life Technologies,3175Staley Rd.Grand Island,NY)。这种软件匹配相同或相似的序列,通过将同源性程度指定为各种替换、缺失和/或其他修饰。保守性替换通常包含以下组中的替换:甘氨酸,丙氨酸;缬氨酸,异亮氨酸,亮氨酸;天冬氨酸,谷氨酸,天冬酰胺,谷氨酰胺;丝氨酸,苏氨酸;赖氨酸,精氨酸;和苯丙氨酸,酪氨酸。在确定同一性程度的示例性方法中,可以使用BLAST程序,其中 $e^{-3}$ 和 $e^{-100}$ 之间的概率分数表示密切相关的序列。

[0066] “受试者”意为哺乳动物,包含但不限于人或非人哺乳动物,例如牛、马、犬、羊或猫。受试者优选是需要这种治疗的哺乳动物,例如,已被诊断患有B细胞淋巴瘤或对其有易染病体质的受试者。该哺乳动物是任何哺乳动物,例如人、灵长类、小鼠、大鼠、狗、猫、马、以及为食用而养殖的牲畜或动物,例如牛、绵羊、猪、鸡、和山羊。在优选的具体例中,该哺乳动物是人。

[0067] 本文提供的范围应理解为该范围内的所有数值的简写。例如,1至50的范围应被理解为包含由1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,或50所组成的组中的任何数字、数字组合或子范围。

[0068] 如本文所用,术语“(进行)治疗”/treating和“治疗(过程)”/treatment是指将药剂或制剂给予遭受不利病况、病症或疾病影响的有临床症状之个体,以便影响其严重性和/或症状频率的降低、消除症状和/或其根本原因,和/或促进损害的改善或补救。应知悉,尽管不排除,对病症或病况进行治疗不需要该病症、病况或伴随其的症状被完全消除。

[0069] 术语“(进行)预防”/preventing和“预防(过程)”/prevention是指将药剂或组合物给予对特定不利病况、病症或疾病有易感性或易染病体质的、但无临床症状的个体,因此涉及预防症状的发生和/或症状的根本原因。

[0070] 除非特别说明或从上下文中显而易见,否则如本文所用,术语“或”应被理解为包含在内。除非特别说明或从上下文中显而易见,否则如本文所用,“一(a)”,“一(an)”和“该”应被理解为单数或复数。

[0071] 除非特别说明或从上下文中显而易见,否则如本文所用,术语“约”应被理解为在本领域的正常容许偏差范围内,例如在平均值的2个标准差内。约可以被理解为在所载明的数值的10%,9%,8%,7%,6%,5%,4%,3%,2%,1%,0.5%,0.1%,0.05%,或0.01%的范围内。除非上下文中另有说明,否则本文提供的所有数字数值全部由术语约修饰。

[0072] 本文中对变量的任何定义中的化学基团列表的叙述包含将该变量定义为所列基团的任何单个基团或组合。本文对某变量或某方面的具体例的叙述包含作为任何单个具体例或者与任何其他具体例或其部分的组合。

[0073] 本文提供的任何组合物或方法可与本文提供的任何其他组合物和方法中的一种或多种合并。

[0074] 过渡术语“包括”与“包含”、“含有”或“特征在于”同义,是包含性的或开放式的,不排除另外的、未叙述的元素或方法步骤。相反,过渡短语“由.....组成”排除了权利要求中未指明的任何要素、步骤或成分。过渡短语“基本上由.....组成”将权利要求的范围限制于指定的材料或步骤“和那些不会实质地影响所主张的发明的基本特征和新颖特征的材料或步骤”。

[0075] 从下述本发明优选具体例的描述和权利要求中,易见本发明的其他特征和优点。除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。尽管与本文描述的那些类似或等同的方法和材料可用于本发明的实践或测试,但下文描述了适合的方法和材料。本文引用的所有已出版的外国专利和专利申请均通过引用并入本文。

[0076] 本文援引的由登录号标示的Genbank和NCBI文件通过引用并入本文。本文引用的所有其他已出版的参考文献、文件、手稿和科学文献均通过引用并入本文。在冲突的情况下,则以包含定义的本说明书为准。另外,材料、方法和实施例仅是例示性的而非限制性的。

## 附图说明

[0077] 图1是示意图,演示包括抗-PD-L1 scAb/huIL-15N72D和抗-PD-L1 scAb/huIL-15R $\alpha$ Su/Fc融合蛋白的PD-L1 TxM复合体的活性,及其在对抗表达PD-L1抗原的疾病细胞时免疫介导的效果。

[0078] 图2是示意图,演示包括IL-15/IL-15R $\alpha$ Su/Fc支架的不同TxM复合体与结合结构域融合,该结合结构域辨识免疫检查点分子、免疫信号传导分子和/或疾病抗原。

[0079] 图3的照片显示TxM复合体经二硫键还原后的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。右线道:PD-L1 TxM;左线道:标记。

[0080] 图4A是线图,显示抗人PD-L1 TxM复合体与对人IL-15及人IgG的特异性抗体的结合活性。图4B显示第二抗人PD-L1 TxM复合体与对人IL-15及人IgG的特异性抗体的结合活性。图4C显示抗小鼠PD-L1 TxM复合体与对人IL-15和小鼠IgG的特异性抗体的结合活性。

[0081] 图5A是线图,显示PD-L1 TxM复合体与承载PD-L1的人MB231肿瘤细胞的结合活性。图5B显示PD-L1 TxM复合体对表达在人MB231肿瘤细胞上的PD-L1的阻断活性。图5C显示PD-L1TxM复合体对表达在人MB231肿瘤细胞上的PD-L1的结合活性。

[0082] 图6A是线图,显示PD-L1 TxM复合体对表达在小鼠5T33P肿瘤细胞上的PD-L1的阻断活性。图6B显示PD-L1 TxM复合体对表达在小鼠MB491uc肿瘤细胞上的PD-L1的阻断活性。

[0083] 图7A和图7B是线图,比较抗PD-L1 Ab和PD-L1 TxM复合体对表达在小鼠A20肿瘤细胞上的PD-L1的阻断活性。

[0084] 图8是线图,演示由PD-L1 TxM复合体介导的IL-15依赖性32D $\beta$ 细胞增殖。

[0085] 图9A是示意图,演示“4头”和“2头”PD-L1 TxM复合体。图9B的照片显示四头和双头小鼠特异性PD-L1 TxM复合体经二硫键还原后的SDS-PAGE分析。图9C和图9D所显示的线图,分别代表双头和四头小鼠特异性PD-L1 TxM复合体经分析型尺寸排阻柱洗脱后的色谱图谱,其展示了TxM复合体与蛋白质聚集体的分离。

[0086] 图10A是线图,显示双头和四头小鼠特异性PD-L1 TxM复合体与承载IL-2R $\beta$   $\gamma$ 的32D $\beta$ 细胞的结合活性。图10B和图10C所显示的线图展示了双头和四头小鼠特异性PD-L1 TxM复合体对表达在5T33P骨髓瘤细胞上的PD-L1的阻断活性。

[0087] 图11A是线图,演示与ALT-803(IL-15N72D:IL-15R $\alpha$ /Fc复合体)相比,由双头小鼠特异性PD-L1 TxM复合体介导的IL-15依赖性32D $\beta$ 细胞增殖。图11B是线图,演示与ALT-803相比,由四头小鼠特异性PD-L1 TxM复合体介导的IL-15依赖性32D $\beta$ 细胞增殖。

[0088] 图12A的照片显示两头和四头人特异性PD-L1 TxM复合体经二硫键还原后的SDS-PAGE分析。图12B和图12C所显示的线图,分别代表双头和四头人特异性PD-L1 TxM复合体经分析型尺寸排阻柱洗脱后的色谱图谱,其展示了TxM复合体与蛋白质聚集体的分离。

[0089] 图13是线图,显示双头和四头人特异性PD-L1 TxM复合体对表达在PC-3人前列腺癌细胞上的PD-L1的阻断活性。

[0090] 图14A是线图,演示与ALT-803相比,由双头人特异性PD-L1 TxM复合体介导的IL-15依赖性32D $\beta$ 细胞增殖。图14B是线图,演示与ALT-803相比,由四头人特异性PD-L1 TxM复合体介导的IL-15依赖性32D $\beta$ 细胞增殖。

[0091] 图15A的条形图,显示经处理的小鼠的脾脏重量,所用处理试剂如下:PBS、ALT-803、四头小鼠特异性PD-L1 TxM(T4M-mPD-L1)和双头小鼠特异性PD-L1 TxM(T2M-mPD-L1)。图15B和图15C的条形图演示经处理的小鼠的脾和淋巴结中不同免疫细胞亚群的百分比,所用处理试剂分别如下:PBS、ALT-803、四头小鼠特异性PD-L1 TxM(T4M-mPD-L1)和双头小鼠特异性PD-L1 TxM(T2M-mPD-L1)。

[0092] 图16的条形图演示由PD-L1 TxM、抗-PD-L1 Ab或ALT-803诱导的免疫细胞对抗5T33骨髓瘤细胞的细胞毒性。

[0093] 图17的条形图演示与仅培养基相比,由抗-人PD-L1 Ab、双头人特异性PD-L1 TxM

(T4M-mPD-L1),或四头人特异性PD-L1 TxM诱导的人免疫细胞对抗PD-L1阳性SW1990人胰腺癌细胞的细胞毒性。

[0094] 图18是线图,演示承载5T33骨髓瘤的小鼠经PD-L1 TxM复合体、ALT-803、ALT-803+抗-PD-L1 Ab或PBS处理后的存活率。

[0095] 图19是线图,演示承载原位MB491uc膀胱肿瘤的小鼠经2H PD-L1 TxM复合体、ALT-803、ALT-803+抗-PD-L1 Ab或PBS处理后的存活率。

[0096] 图20是线图,显示不同的纯化TxM蛋白经分析型尺寸排阻柱洗脱后的色谱图谱,其展示了TxM复合体与蛋白质聚集体的分离。

[0097] 图21A是线图,显示CTLA-4TxM复合体对表达在小鼠淋巴细胞上的CTLA-4的阻断活性。图21B是线图,显示CTLA-4TxM复合体对表达在人淋巴细胞上的CTLA-4的阻断活性。

[0098] 图22A是线图,显示PD-L1/CTLA-4TxM复合体对表达在小鼠5T33P肿瘤细胞上PD-L1的阻断活性。图22B是线图,显示PD-L1/CTLA-4TxM复合体对表达在小鼠淋巴细胞上的CTLA-4的阻断活性。

[0099] 图23A是线图,显示CD47 TxM复合体与承载CD47的小鼠B16F10黑色素瘤细胞的结合活性。图23B是线图,显示CD47 TxM复合体与承载CD47的人Jurkat T细胞的结合活性。

[0100] 图24A是线图,展示TNT scAb TxM复合体与单链DNA的结合活性。图24B是线图,展示TNT scAb/抗-PD-L1 scAb TxM复合体与单链DNA的结合活性。

[0101] 图25A是线图,显示透化(permilibilized)的人MB231乳腺癌细胞与下列物质的结合活性:TNT scAb TxM、TNT scAb/抗-PD-L1 scAb TxM、和双头抗-PD-L1 scAb TxM复合体。图25B显示通透化的人A549肺癌细胞与下列物质的结合活性:TNT scAb TxM、TNT scAb/anti-PD-L1scAb TxM和双头抗-PD-L1 scAb TxM复合体。

[0102] 图26是线图,显示人TF阳性PD-L1阳性的SW1990人胰腺癌细胞与下列物质的结合活性:双头hOAT scAb TxM、抗人PD-L1 scAb/hOAT scAb TxM、双头抗人PD-L1 scAb TxM复合体和hOAT对照抗体和抗人PD-L1对照抗体。

[0103] 图27A是线图,展示LFA-1TxM复合体与对人IL-15及人IgG的特异性抗体的结合活性。图27B的条形图显示LFA-1TxM复合体与ICAM-1的结合活性。

[0104] 图28是线图,展示Notch1特异性TxM复合体与对人IL-15及人IgG的特异性抗体的结合活性。

[0105] 图29是线图,展示抗人TIM3 scAb TxM复合体与对人IL-15及人IgG的特异性抗体的结合活性。

[0106] 图30A和图30B是线图,展示HIV特异性bNAbs scFv TxM复合体与对人IL-15及人IgG的特异性抗体的结合活性。图30C至图30F的线图展示HIV特异性bNAbs TxM复合体与HIV包膜蛋白的结合活性。

[0107] 图31的条形图演示,与仅培养基相比,由双头hOAT scAb TxM或hOAT对照Ab诱导的人免疫细胞对抗人TF-阳性SW1990人胰腺癌细胞的细胞毒性。

## 具体实施方式

[0108] 本发明至少部分地基于令人惊讶的发现,即基于多特异性的IL-15的蛋白质复合体增强免疫细胞的活性并促进其对抗疾病细胞的活性,从而导致疾病的减少或预防。这些

蛋白质复合体亦显示出对疾病抗原和靶标抗原的结合增加。本文提供了多特异性蛋白质复合体,其具有一个包括IL-15或功能变体的结构域,以及一个包括对疾病特异性的结合结构域、免疫检查点抑制剂或免疫激动剂的结合结构域。此类蛋白质复合体的功用在于治疗受试者的瘤形成、传染病或自身免疫疾病的方法。特别地,如下所详细描述,可溶性抗-PD-L1 scAb/huIL-15N72D:抗-PD-L1 scAb/huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1 Fc复合体(“PD-L1 TxM”)刺激免疫细胞杀死肿瘤靶标细胞(图1)。因此,本文提供了以PD-L1 TxM为特征的组合物和使用此类组合物以增强对抗瘤形成(例如,实体和血液肿瘤)的免疫应答的方法。

[0109] 如本文所述,有能力靶向患病细胞用于宿主免疫辨识和回应的蛋白质的使用,是治疗癌症、传染病和自身免疫疾病的有效策略。如美国专利No.8,507,222(通过引用并入本文)中所述,包括IL-15和IL-15受体 $\alpha$ 结构域的蛋白质支架已用于产生能够辨识疾病细胞上的抗原和免疫细胞上的受体的多特异性蛋白质。请参见实施例15的美国专利No.8,507,222。本文描述了包括IL-15和IL-15受体 $\alpha$ 的可溶性多特异性蛋白质复合体的产生过程,且该IL-15和IL-15受体 $\alpha$ 链接到辨识免疫检查点或信号传导分子的一个或复数个结合结构域上。在一些情况下,这些复合体亦包括辨识抗原的结合结构域,该抗原为在疾病细胞上表达的例如PD-L1、ssDNA、CD20、HER2、EGFR、CD19、CD38、CD52、GD2、CD33、Notch1、细胞间粘附分子1(ICAM-1),组织因子,HIV包膜或其他肿瘤抗原。

[0110] 在一些情况下,结合结构域包括单链抗体,其中免疫球蛋白轻链可变结构域通过多肽链接序列与免疫球蛋白重链可变结构域共价链接。单链抗体结构域可以以VH-链接头-VL或VL-链接头-VH型式排列。或者,结合结构域包括能够充当免疫检查点抑制剂或免疫激动剂的可溶性或细胞外配体或受体结构域。识别免疫检查点或信号传导分子的结合结构域与IL-15或IL-15受体 $\alpha$ 蛋白的N-或C-末端链接,该链接不论有或没有另外的链接序列,只要结合活性得到保持即可。优选地,结合结构域与人IL-15N72D超激动剂蛋白(huIL-15N72D)的N-末端链接。或者,结合结构域与人IL-15N72D蛋白的C末端链接。优选地,结合结构域与人IL-15受体 $\alpha$ sushi结构域(huIL-15R $\alpha$ Su)的N末端链接。或者,结合结构域与huIL-15R $\alpha$ SuFc蛋白的C末端链接。在一些情况下,本发明的多特异性蛋白质复合体进一步包括IgG Fc结构域,其用于蛋白质二聚化和免疫细胞上CD16受体的辨识。这种结构域介导对抗靶细胞的抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和补体依赖性细胞毒性(CDC)的刺激。在一些实施例中,使用具有增强或减少的CD16结合活性的Fc结构域是有用的。在一个方面中,Fc结构域含有降低ADCC活性的氨基酸替换L234A和L235A(LALA)(以Fc共有序列为基准编号),但保留形成以二硫键链接的二聚体的能力。

[0111] 白细胞介素-15

[0112] 白细胞介素-15(IL-15)是用于效应NK细胞和CD8<sup>+</sup>记忆T细胞的发育、增殖和活化的重要细胞因子。IL-15结合到IL-15受体 $\alpha$ (IL-15R $\alpha$ )上,然后IL-15被反式呈递到效应细胞上的IL-2/IL-15受体 $\beta$ -共用 $\gamma$ 链(IL-15R $\beta$  $\gamma_c$ )复合体。IL-15和IL-2共享与IL-15R $\beta$  $\gamma_c$ 的结合,并透过STAT3和STAT5通路传递信号。然而,与IL-2不同,IL-15不支持CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>调节性T(Treg)细胞的维持或诱导活化的CD8<sup>+</sup>T细胞的细胞死亡,上述效应可能限制着IL-2对抗多发性骨髓瘤的疗效。另外,IL-15是唯一已知的向效应CD8<sup>+</sup>T细胞提供抗细胞凋亡信号的细胞因子。IL-15,单独给药或作为与IL-15R $\alpha$ 的复合体给药,在实验动物模型中展现出对抗已确立的实体瘤的有效抗肿瘤活性,因此,已被指认为最有希望的可治愈癌症的免疫治

疗药物之一。

[0113] 为了促进基于IL-15的癌症治疗的临床开发,鉴别出了一种与IL-15相比具有增加的生物活性的IL-15突变体(IL-15N72D)(Zhu等.,J Immunol,183:3598-3607,2009)。通过创建IL-15N72D:IL-15R $\alpha$ /Fc融合复合体(ALT-803),此种IL-15超级激动剂(IL-15N72D)的药物动力学和生物活性被进一步改善,这样的超级激动剂复合体具有体内天然细胞因子活性的至少25倍(Han等,Cytokine,56:804-810,2011)。

[0114] 免疫检查点抑制剂和免疫激动剂结构域

[0115] 在其他具体例中,结合结构域对免疫检查点或信号传导分子或其配体是特异性的,且充当免疫检查点抑制活性的抑制剂或充当免疫刺激活性的激动剂。此类免疫检查点和信号分子和配体包含PD-1,PD-L1,PD-L2,CTLA-4,CD28,CD80,CD86,B7-H3,B7-H4,B7-H5,ICOS-L,ICOS,BTLA,CD137L,CD137,HVEM,KIR,4-1BB,OX40L,CD70,CD27,CD47,CIS,OX40,GITR,IDO,TIM3,GAL9,VISTA,CD155,TIGIT,LIGHT,LAIR-1,Siglecs和A2aR(Pardoll DM.2012.Nature Rev Cancer 12:252-264,Thaventhiran T等.2012.J Clin Cell Immunol S12:004)。此外,本发明的优选抗体结构域可包含伊匹单抗(ipilimumab)和/或曲美木单抗(tremelimumab)(anti-CTLA4)、纳武单抗(nivolumab)、派姆单抗(pembrolizumab)、皮地利珠单抗(pidilizumab)、TSR-042、ANB011、AMP-514和AMP-224(a配体-Fc融合物)(抗-PD1)、阿特朱单抗(atelizumab)(MPDL3280A)、阿维鲁单抗(avelumab)(MSB0010718C)、德瓦鲁单抗(durvalumab)(MEDI4736)、MEDI0680、和BMS-9365569(抗-PDL1)、MEDI6469(抗-OX40激动剂)、BMS-986016、IMP701、IMP731、IMP321(抗-LAG3)和GITR配体。

[0116] 抗原特异性结合结构域

[0117] 抗原特异性结合结构域由特异性结合患病细胞上的靶标的多肽组成。或者,这些结构域可以与支持患病状态的其他细胞上的靶标结合,例如支持肿瘤生长的基质细胞上的靶标或支持疾病介导的免疫抑制的免疫细胞上的靶标。抗原特异性结合结构域包含抗体、单链抗体、Fabs、Fv、T细胞受体结合结构域、配体结合结构域、受体结合结构域、结构域抗体、单结构域抗体、微型抗体、纳体(nanobody)、肽体或本领域已知的各种其他抗体模拟物(例如:affimers、affitins[来源于Sac7d]、 $\alpha$ 体alphabodies、atrimers、基于CTLA4的分子、adnectins[来源于第10个纤连蛋白类型III结构域/the 10th fibronectin type III domain]、抗运载蛋白anticalins、基于Kunitz结构域的蛋白、高亲合性多聚体avimers、打结素knottins、fynomers[来源于人Fyn蛋白的SH3结构域]、人造锚蛋白重复序列蛋白darpins[Designed Ankyrin Repeat Proteins]、亲和体affibodies、affilins、单体抗体monobodies和基于犰狳重复序列的蛋白armadillo repeat protein-based proteins(Weidle,UH等.2013.Cancer Genomics&Proteomics 10:155-168))。

[0118] 在某些具体例中,抗原特异性结合结构域的抗原包括细胞表面受体或配体。在进一步的具体例中,抗原包括CD抗原、细胞因子或趋化因子受体或配体、生长因子受体或配体、组织因子、细胞粘附分子、MHC/MHC样分子、Fc受体,Toll样受体、NK受体、TCR、BCR、阳性/阴性共刺激受体或配体、死亡受体或配体,肿瘤相关抗原或病毒编码的抗原。

[0119] 优选地,抗原特异性结合结构域能够结合肿瘤细胞上的抗原。肿瘤特异性结合结构域可以源自批准用于治疗癌症患者的抗体,其包含:利妥昔单抗(rituximab)、奥法木单



抗(ofatumumab)、和阿托珠单抗(obinutuzumab)(抗-CD20 Abs);曲妥珠单抗(trastuzumab)和帕妥珠单抗(pertuzumab)(抗-HER2 Abs);西妥昔单抗(cetuximab)和帕尼单抗(panitumumab)(抗-EGFR Abs);和阿仑单抗alemtuzumab(抗-CD52 Ab)。类似地,可以使用来自对如下分子有特异性的核准的抗体-效应分子偶联物的结合结构域:CD20(<sup>90</sup>Y 钇-标记的替伊莫单抗螯合物/ibritumomab tiuxetan,<sup>131</sup>I碘-标记的托西莫单抗/tositumomab)、HER2([细胞毒性剂DM1]美登素-ado-曲妥珠单抗-/ado-trastuzumab emtansine)、CD30(维多汀-本妥昔单抗/brentuximab vedotin)和CD33([卡奇霉素]奥-吉妥珠单抗/gemtuzumab ozogamicin)(Sliwowski MX,Mellman I.2013Science 341:1192)。

[0120] 此外,本发明的优选结合结构域可包括本领域已知的各种其他肿瘤特异性抗体结构域。用于治疗癌症的抗体及其各自的靶标包括但不限于:纳武单抗(nivolumab)(抗-PD-1Ab)、TA99(抗-gp75)、3F8(抗-GD2)、8H9(抗-B7-H3)、阿巴伏单抗(abagovomab)(抗-CA-125(模拟))、阿德木单抗(adecatumumab)(抗-EpCAM)、阿夫土珠单抗(afutuzumab)(抗-CD20)、培-阿赛珠单抗(alacizumab pegol)(抗-VEGFR2)、喷替酸-阿妥莫单抗(altumomab pentetate)(抗-CEA)、阿麦妥昔单抗(amatuximab)(抗-间皮素/mesothelin)、AME-133(抗-CD20)、肠毒素-麻安莫单抗(anatumomab mafenatox)(抗-TAG-72)、阿泊珠单抗(apolizumab)(抗-HLA-DR)、阿西莫单抗(arcitumomab)(抗-CEA)、巴维昔单抗(bavituximab)(抗-磷脂酰丝氨酸/phosphatidylserine)、贝妥莫单抗(bectumomab)(抗-CD22)、贝利木单抗(belimumab)(抗-BAFF)、贝索单抗(besilesomab)(抗-CEA-相关的抗原)、贝伐珠单抗(bevacizumab)(抗-VEGF-A)、美登素-比伐珠单抗(bivatuzumab mertansine)(抗-CD44 v6)、博纳吐单抗(blinatumomab)(抗-CD19)、BMS-663513(抗-CD137)、维多汀-本妥昔单抗(brentuximab vedotin)(抗-CD30(TNFRSF8))、美登素-坎妥珠单抗(cantuzumab mertansine)(抗-粘液素CanAg)、细胞毒性剂DM4-坎妥珠单抗(cantuzumab ravtansine)(抗-MUC1)、喷地肽-卡罗单抗(capromab pendetide)(抗-前列腺癌细胞)、卡鲁单抗(carlumab)(抗-MCP-1)、卡妥索单抗(catumaxomab)(抗-EpCAM,CD3)、cBR96-阿霉素免疫偶联物(抗-Lewis-Y抗原)、CC49(抗-TAG-72)、西利珠单抗(cedelizumab)(抗-CD4)、Ch.14.18(抗-GD2)、ch-TNT(抗-DNA相关抗原)、蛋白合成抑制剂-西他妥珠单抗(citatzumab bogatox)(抗-EpCAM)、西妥木单抗(cixutumumab)(抗-IGF-1受体)、替坦司-可利妥珠单抗(clivatuzumab tetraxetan)(抗-MUC1)、可那妥木单抗(conatumumab)(抗-TRAIL-R2)、CP-870893(抗-CD40)、达西珠单抗(dacetuzumab)(抗-CD40)、达利珠单抗(daclizumab)(抗-CD25)、达罗土珠单抗(dalotuzumab)(抗-胰岛素样生长因子I受体)、达雷木单抗(daratumumab)(抗-CD38(环ADP核糖水解酶))、登西珠单抗(demcizumab)(抗-DLL4)、地莫单抗(detumomab)(抗-B淋巴瘤细胞)、卓齐妥单抗(drozitumab)(抗-DR5)、杜力戈图单抗(duligotumab)(抗-HER3)、杜昔单抗(dusigitumab)(抗-ILGF2)、依美昔单抗(ecromeximab)(抗-GD3神经节苷脂)、依决洛单抗(edrecolomab)(抗-EpCAM)、埃罗妥珠单抗(elotuzumab)(抗-SLAMF7)、艾西莫单抗(elsilimomab)(抗-IL-6)、埃文单抗(enavatuzumab)(抗-TWEAK受体)、依诺替库单抗(enoticumab)(抗-DLL4)、恩司昔单抗(ensituximab)(抗-5AC)、西(螯合剂)依匹莫(epitumomab cituxetan)(抗-上皮唾蛋白)、依帕珠单抗(epratuzumab)(抗-CD22)、厄马索单抗(ertumaxomab)(抗-HER2/neu、

CD3)、埃达珠单抗(etaracizumab)(抗-整合素 $\alpha v\beta 3$ )、法拉莫单抗(faralimomab)(抗-干扰素受体)、法勒珠单抗(farletuzumab)(抗-叶酸受体1)、FBTA05(抗-CD20)、芬克拉妥珠单抗(ficlatuzumab)(抗-HGF)、芬妥木单抗(figitumumab)(抗-IGF-1受体)、弗拉伏妥单抗(flanvotumab)(抗-TYRP1(糖蛋白75))、夫苏木单抗(fresolimumab)(抗-TGF $\beta$ )、弗妥昔单抗(futuximab)(抗-EGFR)、加利昔单抗(galiximab)(抗-CD80)、甘尼妥单抗(ganitumab)(抗-IGF-I)、卡奇霉素/奥-吉妥珠单抗(gemtuzumab ozogamicin)(抗-CD33)、吉瑞妥昔单抗(girentuximab)(抗-碳酸酐酶9(CA-IX))、格莱木单抗-维多汀(glembatumumab vedotin)(抗-GPNMB)、古塞库单抗(guselkumab)(抗-IL13)、伊巴利珠单抗(ibalizumab)(抗-CD4)、替-伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan)(抗-CD20)、依库克单抗(icrucumab)(抗-VEGFR-1)、伊戈伏单抗(igovomab)(抗-CA-125)、IMAB362(抗-CLDN18.2)、IMC-CS4(抗-CSF1R)、IMC-TR1(抗-TGF $\beta$ RII)、英加妥珠单抗(imgatuzumab)(抗-EGFR)、英克拉库单抗(inclacumab)(抗-选择素P)、拉-英达西单抗(indatuximab ravtansine)(抗-SDC1)、卡奇霉素/奥-英妥珠(inotuzumab ozogamicin)(抗-CD22)、英特单抗(intetumumab)(抗-CD51)、伊匹单抗(ipilimumab)(抗-CD152)、伊妥木单抗(iratumumab)(抗-CD30(TNFRSF8))、KM3065(抗-CD20)、KW-0761(抗-CD194)、LY2875358(抗-MET)、拉贝珠单抗(labetuzumab)(抗-CEA)、兰洛珠单抗(lambrolizumab)(抗-PDCD1)、来沙木单抗(lexatumumab)(抗-TRAIL-R2)、林妥珠单抗(lintuzumab)(抗-CD33)、立鲁单抗(lirilumab)(抗-KIR2D)、美登素-洛伏珠单抗(lorvotuzumab mertansine)(抗-CD56)、鲁卡木单抗(lucatumumab)(抗-CD40)、鲁昔单抗(lumiliximab)(抗-CD23(IgE受体))、马帕木单抗(mapatumumab)(抗-TRAIL-R1)、马格士希单抗(margetuximab)(抗-ch4D5)、马妥珠单抗(matuzumab)(抗-EGFR)、马夫利列单抗(mavrilimumab)(抗-GMCSF受体 $\alpha$ -链)、米拉珠单抗(milatumumab)(抗-CD74)、明瑞莫单抗(minretumomab)(抗-TAG-72)、米妥莫单抗(mitumomab)(抗-GD3神经节苷脂)、莫加珠单抗(mogamulizumab)(抗-CCR4)、帕-西妥莫单抗(moxetumomab pasudotox)(抗-CD22)、他-那可单抗(nacolomab tafenatox)(抗-C242抗原)、他-那莫单抗(naptumomab estafenatox)(抗-5T4)、纳那妥单抗(narnatumab)(抗-RON)、耐昔妥珠单抗(necitumumab)(抗-EGFR)、奈弗库单抗(nesvacumab)(抗-血管生长素2)、尼妥珠单抗(nimotuzumab)(抗-EGFR)、纳武单抗(nivolumab)(抗-IgG4)、莫-诺非莫单抗(nofetumomab merpentan)、奥瑞珠单抗(ocrelizumab)(抗-CD20)、奥卡土珠单抗(ocaratumumab)(抗-CD20)、奥拉单抗(olaratumab)(抗-PDGF-R $\alpha$ )、奥纳妥珠单抗(onartuzumab)(抗-c-MET)、欧士希珠单抗(ontuxizumab)(抗-TEM1)、莫度-奥妥珠单抗(oportuzumab monatox)(抗-EpCAM)、奥戈伏单抗(oregovomab)(抗-CA-125)、奥特乐土珠(otlertuzumab)(抗-CD37)、潘可单抗(pankomab)(抗-MUC1的肿瘤特异性糖基化)、帕撒图单抗(parsatuzumab)(抗-EGFL7)、帕考珠单抗(pascolizumab)(抗-IL-4)、帕曲妥单抗(patritumab)(抗-HER3)、培妥莫单抗(pemtumomab)(抗-MUC1)、帕妥珠单抗(pertuzumab)(抗-HER2/neu)、皮地利珠单抗(pidilizumab)(抗-PD-1)、维多汀-皮那妥珠单抗(pinatumumab vedotin)(抗-CD22)、平妥单抗(pintumomab)(抗-腺癌抗原)、维多汀-泊拉妥珠单抗(polatumumab vedotin)(抗-CD79B)、普托木单抗(pritumumab)(抗-波形蛋白)、PR0131921(抗-CD20)、奎立珠单抗(quilizumab)(抗-IGHE)、雷妥莫单抗(racotumomab)(抗-N-羟乙酰神经氨酸)、雷德妥单抗(radretumab)(抗-纤维连接蛋白额外结构域-B)、雷

莫芦单抗(ramucirumab) (抗-VEGFR2)、利妥木单抗(rilotumumab) (抗-HGF)、罗妥木单抗(robatumumab) (抗-IGF-1受体)、罗勒杜单抗(roledumab) (抗-RHD)、罗维珠单抗(rovelizumab) (抗-CD11&CD18)、沙玛立珠单抗(samalizumab) (抗-CD200)、喷地肽-沙妥莫单抗(satumomab pendetide) (抗-TAG-72)、司里班妥单抗(seribantumab) (抗-ERBB3)、SGN-CD19A(抗-CD19)、SGN-CD33A(抗-CD33)、西罗珠单抗(sibrotuzumab) (抗-FAP)、司妥昔单抗(siltuximab) (抗-IL-6)、索利托单抗(solitomab) (抗-EpCAM)、索土珠单抗(sontuzumab) (抗-上皮唾蛋白)、他贝鲁单抗(tabalumab) (抗-BAFF)、替坦司-他珠(tacatumab tetraxetan) (抗-甲胎蛋白)、帕-他普莫单抗(taplutumomab paptox) (抗-CD19)、(telimomab aritox)、替妥莫单抗(tenatumomab) (抗-生腱蛋白C/tenascin C)、替奈昔单抗(teneliximab) (抗-CD40)、替妥木单抗(teprotumumab) (抗-CD221)、TGN1412(抗-CD28)、替西木单抗(ticilimumab) (抗-CTLA-4)、替加珠单抗(tigatuzumab) (抗-TRAIL-R2)、TNX-650(抗-IL-13)、托西莫单抗(tositumomab) (抗-CS20)、托维图单抗(tovetumab) (抗-CD140a)、TRBS07(抗-GD2)、曲加珠单抗(tregalizumab) (抗-CD4)、曲美木单抗(tremelimumab) (抗-CTLA-4)、TRU-016(抗-CD37)、西莫白介素-图考珠单抗(tucotuzumab celmoleukin) (抗-EpCAM)、优利妥昔单抗(ublituximab) (抗-CD20)、乌瑞鲁单抗(urelumab) (抗-4-1BB)、伐提克图单抗(vantictumab) (抗-卷曲受体/Frizzled receptor)、伐利昔单抗(vapaliximab) (抗-AOC3(VAP-1))、伐特殊单抗(vatelizumab) (抗-ITGA2)、维妥珠单抗(veltuzumab) (抗-CD20)、维森库单抗(vesencumab) (抗-NRP1)、维西珠单抗(visilizumab) (抗-CD3)、伏洛昔单抗(volociximab) (抗-整合素 $\alpha 5\beta 1$ )、马佛多汀-伏司妥珠单抗(vorsetuzumab mafodotin) (抗-CD70)、伏妥莫单抗(votumumab) (抗-肿瘤抗原CTAA16.88)、扎鲁木单抗(zalutumumab) (抗-EGFR)、扎木单抗(zanolimumab) (抗-CD4)、扎妥昔单抗(zatuximab) (抗-HER1)、齐拉木单抗(ziralimumab) (抗-CD147(basigin))、RG7636(抗-ETBR)、RG7458(抗-MUC16)、RG7599(抗-NaPi2b)、MPDL3280A(抗-PD-L1)、RG7450(抗-STEAP1)、和GDC-0199(抗-Bcl-2)。

[0121] 可用于本发明的其他抗体结构域或肿瘤靶标结合蛋白(例如TCR结构域)包含但不限于结合下列抗原的那些(抗体结构域或肿瘤靶标结合蛋白)(注意,所示的癌症适应症代表非限制性实例):氨肽酶N(CD13)、膜联蛋白A1、B7-H3(CD276、各种癌症)、CA125(卵巢癌)、CA15-3(癌)、CA19-9(癌)、L6(癌)、Lewis Y(癌)、Lewis X(癌)、甲胎蛋白(癌)、CA242(结肠直肠癌)、胎盘碱性磷酸酶(癌)、前列腺特异性抗原(前列腺)、前列腺酸性磷酸酶(前列腺)、表皮生长因子(癌)、CD2(霍奇金病、NHL[非霍奇金]淋巴瘤、多发性骨髓瘤)、CD3 $\epsilon$ (T细胞淋巴瘤、肺癌、乳腺癌、胃癌、卵巢癌、自身免疫疾病、恶性腹水)、CD19(B细胞恶性肿瘤)、CD20(非霍奇金淋巴瘤、B细胞瘤、自身免疫疾病)、CD21(B细胞淋巴瘤)、CD22(白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、SLE/系统性红斑狼疮)、CD30(霍奇金淋巴瘤)、CD33(白血病、自身免疫疾病)、CD38(多发性骨髓瘤)、CD40(淋巴瘤、多发性骨髓瘤、白血病(CLL/慢性淋巴细胞白血病))、CD51(转移性黑色素瘤、肉瘤)、CD52(白血病)、CD56(小细胞肺癌、卵巢癌、Merkel细胞癌、以及液体瘤、多发性骨髓瘤)、CD66e(癌)、CD70(转移性肾细胞癌和非霍奇金淋巴瘤)、CD74(多发性骨髓瘤)、CD80(淋巴瘤)、CD98(癌)、CD123(白血病)、粘蛋白(癌)、CD221(实体瘤)、CD227(乳腺癌、卵巢癌)、CD262(NSCLC/非小细胞肺癌和其他癌症)、CD309(卵巢癌)、CD326(实体瘤)、CEACAM3(结肠直肠癌、胃癌)、CEACAM5(CEA、CD66e)(乳腺癌、结肠直肠癌和肺

癌)、DLL4 (A-like-4)、EGFR (各种癌症)、CTLA4 (黑色素瘤)、CXCR4 (CD184、血液肿瘤、实体瘤)、Endoglin (CD105、实体瘤)、EPCAM (上皮细胞粘附分子、膀胱、头、颈、结肠、NHL非霍奇金淋巴瘤、前列腺和卵巢癌)、ERBB2 (肺、乳腺、前列腺癌)、FCGR1 (自身免疫疾病)、FOLR (叶酸受体、卵巢癌)、FGFR (癌)、GD2神经节苷脂 (癌)、G-28 (细胞表面抗原糖脂、黑色素瘤)、GD3特发型 (癌)、热休克蛋白 (癌)、HER1 (肺癌、胃癌)、HER2 (乳腺癌、肺癌和卵巢癌)、HLA-DR10 (NHL)、HLA-DRB (NHL非霍奇金淋巴瘤、B细胞白血病)、人绒毛膜促性腺激素 (癌)、IGF1R (实体瘤、血癌)、IL-2受体 (T细胞白血病和淋巴瘤)、IL-6R (多发性骨髓瘤、RA类风湿性关节炎、Castleman氏症、IL6依赖性肿瘤)、整合素 ( $\alpha\text{v}\beta 3$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$ ,  $\alpha 11\beta 3$ ,  $\alpha 5\beta 5$ ,  $\alpha\text{v}\beta 5$ , 各种癌症)、MAGE-1 (癌)、MAGE-2 (癌)、MAGE-3 (癌)、MAGE 4 (癌)、抗转铁蛋白受体 (癌)、p97 (黑色素瘤)、MS4A1 (跨膜4域亚家族A成员1、非霍奇金B细胞淋巴瘤、白血病)、MUC1 (乳腺癌、卵巢癌、子宫颈癌、支气管癌和胃肠道癌)、MUC16 (CA125) (卵巢癌)、CEA (结肠直肠癌)、gp100 (黑色素瘤)、MART1 (黑色素瘤)、MPG (黑色素瘤)、MS4A1 (跨膜4域亚家族A、小细胞肺癌、NHL非霍奇金淋巴瘤)、核仁素、Neu致癌基因产物 (癌)、P21 (癌)、nectin-4 (癌)、抗-N-羟乙酰神经氨酸的抗体互补位 (paratope) (乳腺癌、黑色素瘤)、PLAP样睾丸碱性磷酸酶 (卵巢癌、睾丸癌)、PSMA (前列腺肿瘤)、PSA (前列腺)、ROB04、TAG 72 (肿瘤相关糖蛋白72、AML/急性髓细胞白血病、胃癌、结肠直肠癌、卵巢癌)、T细胞跨膜蛋白 (癌症)、Tie (CD202b)、组织因子、TNFRSF10B (肿瘤坏死因子受体超家族成员10B、癌)、TNFRSF13B (肿瘤坏死因子受体超家族成员13B、多发性骨髓瘤、NHL非霍奇金淋巴瘤、其他癌症、RA类风湿性关节炎和SLE系统性红斑狼疮)、TPBG (滋养细胞糖蛋白、肾细胞癌)、TRAIL-R1 (肿瘤坏死细胞凋亡诱导配体受体1、淋巴瘤、NHL非霍奇金淋巴瘤、结肠直肠癌、肺癌)、VCAM-1 (CD106、黑色素瘤)、VEGF、VEGF-A、VEGF-2 (CD309) (各种癌症)。一些其他肿瘤相关抗原靶标已经被综述 (Gerber, 等, mAbs 2009 1: 247-253; Novellino等, Cancer Immunol Immunother. 2005 54: 187-207; Franke等, Cancer Biother Radiopharm. 2000, 15: 459-76; Guo等, Adv Cancer Res. 2013, 119: 421-475; Parmiani等, J Immunol. 2007 178: 1975-9)。这些抗原的实例包含分化簇 (CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD9、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD12w、CD14、CD15、CD16、CD17、CD18、CD21、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD31、CD32、CD34、CD35、CD36、CD37、CD41、CD42、CD43、CD44、CD45、CD46、CD47、CD48、CD49b、CD49c、CD53、CD54、CD55、CD58、CD59、CD61、CD62E、CD62L、CD62P、CD63、CD68、CD69、CD71、CD72、CD79、CD81、CD82、CD83、CD86、CD87、CD88、CD89、CD90、CD91、CD95、CD96、CD100、CD103、CD105、CD106、CD109、CD117、CD120、CD127、CD133、CD134、CD135、CD138、CD141、CD142、CD143、CD144、CD147、CD151、CD152、CD154、CD156、CD158、CD163、CD166、CD168、CD184、CD186、CD195、CD202 (a、b)、CD209、CD235a、CD271、CD303、CD304)、膜联蛋白A1、核仁素、内皮联蛋白 (CD105)、ROB04、氨肽酶N、DLL4 (即Delta-like 4基因, 编码Notch配体)、VEGFR-2 (CD309)、CXCR4 (CD184)、Tie2、B7-H3、WT1、MUC1、LMP2、HPV E6 E7、EGFRvIII、HER-2/neu、独特型 (idiotype)、MAGE A3、p53非突变体、NY-ESO-1、GD2、CEA、MelanA/MART1、Ras突变体、gp100、p53突变体、蛋白酶3 (PR1)、bcr-abl、酪氨酸酶、存活素、hTERT、肉瘤易位断点、EphA2、PAP、ML-IAP、AFP、EpCAM、ERG (TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、PAX3、ALK、雄激素受体、细胞周期蛋白B1、聚唾液酸、MYCN、RhoC、TRP-2、GD3、岩藻糖基GM1、间皮素、PSCA、MAGE A1、sLe (a)、CYP1B1、PLAC1、GM3、BORIS、Tn、GloboH、ETV6-AML、NY-BR-1、RGS5、SART3、STn、碳酸酐酶IX、PAX5、OY-TES1、精子

蛋白17、LCK、HMWMAA、AKAP-4、SSX2、XAGE 1、B7H3、legumain、Tie 2、Page4、VEGFR2、MAD-CT-1、FAP、PDGFR- $\beta$ 、MAD-CT-、Notch1、ICAM1和Fos相关抗原1。

[0122] 此外,本发明的优选结合结构域包含对本领域已知的与被感染细胞相关的抗原和表位靶标有特异性的结合结构域。这些靶标包含但不限于来源于下列目标感染剂的靶标: HIV病毒(特别是来源于HIV包膜刺突和/或gp120和gp41表位的抗原)、人乳头瘤病毒(HPV)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)、肺炎球菌(*Pneumococcus*)、新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)、荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)、B型流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae B*)、梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*)、莱姆病螺旋体(*Lyme disease spirochetes*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、麻风分枝杆菌(*Mycobacterium leprae*)、布鲁氏菌(*Brucella abortus*)、狂犬病毒(rabies virus)、流感病毒(influenza virus)、巨细胞病毒(cytomegalovirus)、I型单纯疱疹病毒(herpes simplex virus I)、II型单纯疱疹病毒(herpes simplex virus II)、人类血清细小病毒(人serum parvo-like virus)、呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus)、水痘-带状疱疹病毒(varicella-zoster virus)、乙型肝炎病毒(hepatitis B virus)、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus)、麻疹病毒(measles virus)、腺病毒(adenovirus)、人T细胞白血病病毒(人T-cell leukemia viruses)、爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus)、鼠白血病病毒(murine leukemia virus)、腮腺炎病毒(mumps virus)、水疱性口炎病毒(vesicular stomatitis virus)、辛德毕斯病毒(sindbis virus)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(lymphocytic choriomeningitis virus)、疣病毒(wart virus)、蓝舌病毒(blue tongue virus)、仙台病毒(Sendai virus)、猫白血病病毒(feline leukemia virus)、呼肠孤病毒(reovirus)、脊髓灰质炎病毒(polio virus)、猿猴病毒40(simian virus 40)、小鼠乳腺肿瘤病毒(小鼠mammary tumor virus)、登革病毒(dengue virus)、风疹病毒(rubella virus)、西尼罗河病毒(West Nile virus)、恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)、弓形虫(*Toxoplasma gondii*)、让氏锥虫(*Trypanosoma rangeli*)、克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)、罗德西亚锥虫(*Trypanosoma rhodesiense*)、布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*)、曼森氏血吸虫(*Schistosoma mansoni*)、日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*)、牛焦虫/牛巴贝氏虫(*Babesia bovis*)、柔嫩艾美球虫(*Elmeria tenella*)、旋盘尾丝虫(*Onchocerca volvulus*)、热带利什曼原虫(*Leishmania tropica*)、旋毛虫(*Trichinella spiralis*)、水泰勒原虫(*Theileria parva*)、水泡绦虫(*Taenia hydatigena*)、羊绦虫(*Taenia ovis*)、牛肉绦虫(*Taenia saginata*)、细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*)、科氏中殖孔绦虫(*Mesocostoides corti*)、关节炎支原体(*Mycoplasma arthritidis*)、猪鼻支原体(*M.hyorhinis*)、口腔支原体(*M. orale*)、精氨酸支原体(*Marginini*)、赖氏支原体(*Acholeplasma laidlawii*)、唾液支原体(*M. salivarium*)以及肺炎支原体(*M. pneumoniae*)。

[0123] T细胞受体(TCRs)

[0124] T细胞是细胞子群,其与其他免疫细胞类型(多形核细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、B细胞、NK细胞)一起构成免疫系统的细胞组分。在生理条件下,T细胞在免疫监测和消除外来抗原中起作用。然而,在病理条件下,有令人信服的证据表明T细胞在疾病的引起和传播中起主要作用。在这些病症中,T细胞的中枢或外周的免疫耐受性的崩溃是自身免疫疾病引起中的基本过程。

[0125] TCR复合体由至少七种跨膜蛋白组成。二硫键链接的( $\alpha\beta$ 或 $\gamma\delta$ )异二聚体形成单型抗原识别单元,而由 $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$ 和 $\eta$ 链组成的CD3的恒定链则负责将配体结合与信号通路偶联,进而导致T细胞活化和细胞免疫反应的细化。尽管TCR链具有基因多样性,但两种结构特征对于所有已知的亚基是共同的。首先,它们是具有单个跨膜结构域的跨膜蛋白-据推测为 $\alpha$ 螺旋。其次,所有TCR链具有一异常特征,即在预测的跨膜结构域内拥有一带电氨基酸。恒定链具有单个负电荷,在小鼠和人之间保守,且变体链拥有一个(TCR- $\beta$ )或两个(TCR- $\alpha$ )正电荷。TCR- $\alpha$ 的跨膜序列在一些物种中高度保守,因此可以在系统发育学上起重要的功能作用。含有亲水性氨基酸精氨酸和赖氨酸的八肽序列在物种之间是相同的。

[0126] T细胞应答是通过抗原与TCR的结合而被调节。一种类型的TCR是膜结合的、由 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链组成的异二聚体,类似于免疫球蛋白的可变(V)区和恒定(C)区。TCR $\alpha$ 链包含共价链接的V- $\alpha$ 和C- $\alpha$ 链,而 $\beta$ 链包含共价链接的V- $\beta$ 链和C- $\beta$ 链。V- $\alpha$ 和V- $\beta$ 链形成口袋或裂缝,其可以在主要组织相容性复合体(MHC)(在人类中称为HLA复合体)的情境下结合超抗原或抗原。参见,Davis Ann.Rev.of Immunology 3:537(1985);《免疫学基础》Fundamental Immunology 3rd Ed., W.Paul Ed. Rsen Press LTD. New York(1993)。

[0127] TCR链( $\alpha\beta$ 或 $\gamma\delta$ )的细胞外结构域也可以被工程化而成为与异源跨膜结构域的融合物并表达在细胞表面上。此类TCR可包含与CD3、CD28、CD8、4-1BB和/或嵌合活化受体(CAR)跨膜或活化结构域的融合。TCR也可以是包括一个或复数个 $\alpha\beta$ 或 $\gamma\delta$ 链的抗原结合结构域的可溶性蛋白质。此类TCR可包含TCR可变结构域或其功能片段,不论其是否具有TCR恒定结构域。可溶性TCR可以是异二聚体或单链分子。

[0128] Fc结构域

[0129] 本发明的蛋白质复合体可含有Fc结构域。例如,PD-L1 TxM包括抗-PD-L1

[0130] scAb/huIL-15N72D:抗-PD-L1 scAb/huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1 Fc融合复合体。将IgG的Fc区与另一种蛋白质(例如各种细胞因子和可溶性受体)的结构域合并的融合蛋白已被报告(参见例如,Capon等,Nature,337:525-531,1989;Chamow等,Trends Biotechnol.,14:52-60,1996;美国专利Nos.5,116,964和5,541,087)。原型融合蛋白是通过IgG Fc铰链区中的半胱氨酸残基链接起来的同源二聚体蛋白,得到一种类似于没有重链可变和C<sub>H</sub>1结构域以及轻链的IgG分子。包含Fc结构域的融合蛋白的二聚体性质可能有利于提供与其他分子的更高阶的相互作用(即二价的或双特异性结合)。由于结构同源性,Fc融合蛋白展现出与有相似之同型的人IgG相当的体内药物动力学图谱。IgG类的免疫球蛋白是人体血液中最丰富的蛋白质之一,且其循环半衰期可长达21天。为了延长IL-15或IL-15融合蛋白的循环半衰期和/或增加其生物活性,本文描述了融合蛋白复合体,其含有与IL-15结构域非共价结合的IL-15R $\alpha$ ,并且该IL-15R $\alpha$ 又与人重链IgG蛋白的Fc部分共价链接。

[0131] 术语“Fc”是指片段-可结晶区域,其是抗体的恒定区,且与名为Fc受体的细胞表面受体和补系统的一些蛋白质相互作用。这种“Fc”是二聚体形式。天然Fc的原始免疫球蛋

白来源是优选人来源,且可以是任何免疫球蛋白,尽管优选是IgG1和IgG2。天然Fc由单体多肽组成,该单体多肽可通过共价(即二硫键)和非共价结合而链接成为二聚体或多聚体形式。天然Fc分子的单体亚基之间的分子间二硫键的数量范围为1至4,取决于(抗体)类别(例如,IgG、IgA、IgE)或子类(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgA1、IgA2)。天然Fc的一个实例是由木瓜蛋白酶消化IgG而产生的二硫键链接的二聚体(参见Ellison等(1982),*Nucleic Acids Res.* 10:4071-9)。本文中所用的术语“天然Fc”对于单体、二聚体和多聚体形式是通用的。Fc结构域含有蛋白A,蛋白G,各种Fc受体和补体蛋白的结合位点。在一些具体例中,复合体的Fc结构域能够与Fc受体相互作用,以介导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。在其他应用中,复合体包括不能有效介导ADCC或ADCP的Fc结构域(例如,IgG4 Fc)。

[0132] 在一些具体例中,术语“Fc变体”是指从天然Fc修饰而得到的分子或序列,但其仍然包括补救受体FcRn的结合位点。国际申请W0 97/34631和W0 96/32478描述了示例性的Fc变体,以及其与补救受体的相互作用,且通过引用并入本文。因此,术语“Fc变体”包括从非人类的天然Fc进行人源化所得的分子或序列。进一步地,天然Fc包括可以被去除的位点,因为它们提供的结构特征或生物活性是本发明的融合分子所不需要的。因此,在某些具体例中,术语“Fc变体”包括一个或复数个天然Fc位点或残基被改变的分子或序列,该位点或残基影响或涉及(1)二硫键形成,(2)与选定的宿主细胞的不相容性(3)在选定的宿主细胞中表达时的N-末端异质性,(4)糖基化,(5)与补体的相互作用,(6)与补救受体以外的Fc受体的结合,(7)抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)或(8)抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。这些改变可以增加或减少这些Fc特性中的任何一个或复数个。Fc变体在下文中进一步详细描述。

[0133] 术语“Fc结构域”包括如上定义的自然Fc和Fc变体分子和序列。与Fc变体和天然Fc一样,术语“Fc结构域”包含单体或多聚体形式的分子,无论是从完整抗体的消化得到还是通过重组基因表达或通过其他方式生产得到。

#### [0134] 融合蛋白复合体

[0135] 本发明提供融合蛋白复合体(图1和图2)。在一些情况下,第一蛋白质包括与白细胞介素-15(IL-15)或其功能片段共价链接的第一生物活性多肽;第二蛋白质包括与可溶性白介素-15受体 $\alpha$ (IL-15R $\alpha$ )多肽或其功能片段共价链接的第二生物活性多肽,其中第一蛋白质的IL-15结构域与第二蛋白质的可溶性IL-15R $\alpha$ 结构域结合,以形成可溶性融合蛋白复合体。本发明的融合蛋白复合体还包括与第一和第二蛋白质中的一种或两种链接的免疫球蛋白Fc结构域或其功能片段。优选地,与融合蛋白链接的Fc结构域相互作用以形成融合蛋白复合体。可以通过免疫球蛋白Fc结构域之间的二硫键形成稳定这种复合体。在一个方面中,本发明的可溶性融合蛋白复合体包含IL-15多肽、IL-15变体或其功能片段和可溶性IL-15R $\alpha$ 多肽或其功能片段,其中IL-15和IL-15R $\alpha$ 多肽中的一种或两种进一步包含免疫球蛋白Fc结构域或其功能片段。

[0136] 在某些实例中,第一和第二蛋白质中的一种或两种包括抗体或其功能片段。例如,结合域之一包括可溶性抗PD-L1单链抗体或其功能片段。在另一个实例中,另一个或第二结合域包括抗CTLA4单链抗体或疾病抗原特异性抗体或其功能片段。在一个具体例中,本发明提供PD-L1 TxM,其包括可溶性的抗-PD-L1 scAb/huIL-15N72D:抗-PD-L1

[0137] scAb/huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1 Fc融合蛋白复合体。在该复合体中,huIL-15N72D和huIL-15R $\alpha$ Su结构域相互作用,而位于两个抗-PD-L1 scAb/huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1 Fc融合蛋白上的huIgG1 Fc结构域形成多链融合蛋白复合体。

[0138] 如本文所用,术语“生物活性多肽”或“效应分子”意为可产生如本文所述的所期望效果的氨基酸序列,例如:蛋白质、多肽或肽;糖或多糖;脂质或糖脂、糖蛋白或脂蛋白。效应分子亦包含化学试剂。编码生物活性或效应蛋白、多肽或肽的效应分子核酸也被考虑。因此,适合的分子包含调节因子、酶、抗体、或药剂以及DNA、RNA和寡核苷酸。生物活性多肽或效应分子可以是天然存在的,或者可以由已知组分合成,例如通过重组或化学合成,且可以包含异源组分。通过标准的确定尺寸的技法(例如离心或SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳)判定,生物活性多肽或效应分子一般为约0.1至100KD或更高至约1000KD,优选在约0.1,0.2,0.5,1,2,5,10,20,30和50KD之间。本发明的期望效果包含但不限于,例如,形成具有增加的结合活性的本发明的融合蛋白复合体、杀死靶细胞,例如,要么在预防或治疗疾病时诱导细胞增殖或细胞死亡、启动免疫应答,要么在用于诊断目的时作为检测分子。对于此种检测,可以使用测定法,例如包含下列连续步骤的测定法:培养细胞使其增殖,使该细胞与本发明的融合复合体接触,然后评估融合复合体是否抑制细胞的进一步发育。

[0139] 根据本发明,将效应分子共价链接到本发明的融合蛋白复合体提供了若干显着的优点。含有单个效应分子(包含已知结构的肽)的本发明的融合蛋白复合体可以被生产出来。此外,可以在类似的DNA载体中生产多种效应分子。即是说,一个不同效应分子的文库可以被链接到融合蛋白复合体,而用于辨识受感染的或患病的细胞。进一步地,对治疗性应用来说,并非将本发明的融合蛋白复合体给予受试者,而是可以施用编码融合蛋白复合体的DNA表达载体,用于融合蛋白复合体的体内表达。这种手段避免了通常与制备重组蛋白质相关的昂贵的纯化步骤,并避免了与常规手段相关的抗原摄取和处理的复杂性。

[0140] 如上所述,本文披露的融合蛋白的组分,例如效应分子,比如:细胞因子、趋化因子、生长因子、蛋白质毒素、免疫球蛋白结构域或其他生物活性分子和任何肽链接头,可以以几乎任何方式被组起来,只要融合蛋白具有其预期的功能。特别地,如果需要,融合蛋白的每个组分可以通过至少一种适合的肽链接序列与另一种组分隔开。此外,融合蛋白可包含标签,例如,以促进融合蛋白的修饰、识别和/或纯化。更具体的融合蛋白在后文描述的实施例中。

[0141] 链接头

[0142] 本发明的融合复合体优选地亦包含插入IL-15或IL-15R $\alpha$ 结构域与生物活性多肽之间的柔性链接序列。该链接序列应允许生物活性多肽相对于IL-15或IL-15R $\alpha$ 结构域的有效定位,以允许两个结构域的功能活性。

[0143] 在某些情况下,可溶性融合蛋白复合体具有链接头,其中第一生物活性多肽通过多肽链接序列与IL-15(或其功能片段)共价链接。在其他方面中,如本文所述的可溶性融合蛋白复合体具有链接头,其中第二生物活性多肽通过多肽链接序列与IL-15R $\alpha$ 多肽(或其功能片段)共价链接。

[0144] 链接序列优选由核苷酸序列编码,而产生能够有效定位TCR分子的结合槽的肽,该TCR结合槽是用于辨识提呈中的抗原或辨识抗体分子的结合结构域以识别抗原。如本文所用,短语“生物活性多肽相对于IL-15或IL-15R $\alpha$ 结构域的有效定位”或其他类似短语,意指:



与IL-15或IL-15 $\alpha$ 链接的生物活性多肽的定位使得IL-15或IL-15 $\alpha$ 结构域能够彼此相互作用以形成蛋白质复合体。例如,IL-15或IL-15 $\alpha$ 结构域被有效定位而允许与免疫细胞的相互作用以启动或抑制免疫反应,或以抑制或刺激细胞发育。

[0145] 本发明的融合复合体优选地亦包含插入IL-15或IL-15 $\alpha$ 结构域与免疫球蛋白Fc结构域之间的柔性链接序列。该链接序列应允许Fc结构域、生物活性多肽和IL-15或IL-15 $\alpha$ 结构域的有效定位,以允许每个结构域的功能活性。例如,Fc结构域被有效定位以允许正常的融合蛋白复合体形成、和/或与免疫细胞上的Fc受体或补体系统的蛋白质相互作用以刺激Fc介导的作用,包含调理作用,细胞裂解,肥大细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞的脱颗粒,以及其他Fc受体依赖性过程;补体通路的活化;以及提高的融合蛋白复合体的体内半衰期。

[0146] 链接序列也可用于链接两个或复数个生物活性多肽,以产生具有期望功能活性的单链分子。

[0147] 优选地,链接序列包括约7至20个氨基酸,更优选地约10至20个氨基酸。链接序列优选是柔性的,以免生物活性多肽或效应分子被保持在单一的不需要的构象中。链接序列可用于例如使识别位点与融合分子分隔开。特别地,肽链接序列可以被安置在生物活性多肽和效应分子之间,例如,使其化学交联并提供分子柔顺性(flexibility)。链接头优选地主要包括具有小侧链的氨基酸,例如甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸,以提供柔顺性。优选地,约80%或90%或更多的链接序列包括甘氨酸、丙氨酸或丝氨酸残基,特别是甘氨酸和丝氨酸残基。

[0148] 可以使用不同的链接序列,包含已经成功用于将抗体可变区连结在一起的若干柔性链接头设计中的任何一种(参见,Whitlow,M等,(1991)Methods:A Companion to Methods in Enzymology,2:97-105)。

[0149] 药物治疗学

[0150] 本发明提供包括融合蛋白复合体的用作治疗制剂的药物组合物。一方面,本发明的融合蛋白复合体被全身给药,例如,被配制在药学上可接受的缓冲液如生理盐水中。优选的给药路径包含,例如,滴注到膀胱中、皮下、静脉内、腹膜内、肌肉内、瘤内或皮内注射,该路径在患者体内提供连续的、持续的或有效水平的组合物。人类患者或其他动物的治疗是使用治疗有效量的本文鉴别出的治疗制剂(该治疗制剂位于生理学上可接受的载体中)而进行的。适合的载体及其制剂描述于,例如E.W.Martin的《雷明顿药物科学》Remington's Pharmaceutical Sciences中。待施用的治疗剂的量根据施用方式、患者的年龄和体重以及肿瘤的临床症状而变化。一般地,所述的量将是在用于治疗与瘤形成、自身免疫或传染病相关的其他疾病的其他药剂的用量范围内,尽管在某些情况下由于化合物的特异性增加而需要更低的量。化合物以一剂量给药,该剂量(的给药)增强受试者免疫应答,或减少肿瘤性的、受感染的或自身免疫细胞的增殖、存活或侵袭性,而该增强或减少则通过本领域技术人员熟知的方法测定。

[0151] 药物组合物的制剂

[0152] 用于治疗瘤形成、传染病或自身免疫疾病的本发明的融合蛋白复合体的施用可通过任何适合的手段,只要该手段所导致的治疗制剂的浓度再结合其他组分,可有效地改善、减少或稳定上述的瘤形成、传染病或自身免疫疾病。本发明的融合蛋白复合体可以以任何

适当的量被包含于任何适合的载体物质中,并且一般为组合物总重量的1-95%。该组合物可以以适合非消化道(例如,皮下、静脉内、肌肉内、囊内、瘤内或腹膜内)给药途径的剂型提供。例如,药物组合物的制剂是按照常规的制药实践(参见例如,《雷明顿:药学的科学与实践》

[0153] Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed.), ed. A. R. Gennaro,

[0154] Lippincott Williams & Wilkins, 2000 and 《制药科技百科全书》 Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York)。

[0155] 人体剂量最初是从在小鼠或非人灵长类中使用的化合物的量通过推估来确定的,因为技术人员认可本领域的常规做法,即修改动物模型的剂量而将其用于人类。例如,剂量可在约1 g化合物/kg体重至约5000mg化合物/kg体重之间变化;或者约5mg/kg体重至约4,000mg/kg化合物/kg体重或约10mg/kg体重至约3,000mg/kg体重;或者约50mg/kg体重至约2000mg/kg体重;或者约100mg/kg体重至约1000mg/kg体重;或者约150mg/kg体重至约500mg/kg体重。例如,剂量为约1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1,000, 1,050, 1,100, 1,150, 1,200, 1,250, 1,300, 1,350, 1,400, 1,450, 1,500, 1,600, 1,700, 1,800, 1,900, 2,000, 2,500, 3,000, 3,500, 4,000, 4,500, 或5,000mg/kg体重。或者,剂量范围为约5mg化合物/Kg体重至约20mg化合物/kg体重。在另一个实例中,剂量为约8, 10, 12, 14, 16或18mg/kg体重。优选地,融合蛋白复合体以0.5mg/kg至约10mg/kg (例如,0.5, 1, 3, 5, 10mg/kg)施用。当然,根据初始临床试验的结果和特定患者的需要,该剂量可以向上或向下调整,正如在这种治疗方案中常规做的那样。

[0156] 药物组合物与适当的赋形剂一起被制剂成一种在给药后可以可控方式释放治疗制剂的药物组合物。实例包含单个或复数个单位片剂或胶囊组合物、油溶液、悬浮液、乳化液、微胶囊、微球、分子复合体、纳米颗粒、贴片/膏药和脂质体。优选地,融合蛋白复合体是于适合非消化道给药的赋形剂中被制剂。

[0157] 非消化道给药的组合物

[0158] 包括本发明的融合蛋白复合体的药物组合物是以非消化道给药,通过注射、输液或植入(皮下、静脉内、肌肉内、瘤内、囊内、腹膜内),且该药物组合物是以剂型、配方剂型、或经由适合的递送设备或含有常规无毒且药物学上可接受的载体和佐剂的植入物而给药。这些组合物的制剂和制备是药物制剂领域的技术人员所熟知的。配方可以在上文中的《雷明顿:药学的科学与实践》中找到。

[0159] 非消化道使用的包括本发明的融合蛋白复合体的组合物是以单位剂型提供(例如,在单剂量安瓿中)。或者,组合物是以含有几种剂量的小药瓶提供,且其中可以加入适合的防腐剂(见下文)。组合物的形式为溶液、悬浮液、乳化液、输液设备或用于植入的递送设备,或者其呈现为干粉末,在使用前用水或其它适合的媒液以再制。除了减少或改善瘤形成、传染病或自身免疫疾病的活性试剂外,该组合物还包含适合的非消化道可接受的载体和/或赋形剂。活性治疗剂可被并入微球、微胶囊、纳米颗粒、脂质体中以达到可控的释放。此外,组合物可包含悬浮剂、增溶剂、稳定剂、pH值调节剂、张力调节剂和/或分散剂。

[0160] 如上所示,包括本发明的融合蛋白复合体的药物组合物可以是适合无菌注射的形式。为了制备这样的组合物,适合的活性治疗制剂被溶解或悬浮在非消化道可接受的液态媒液中。可接受的媒液和溶剂中,可用的有:水、通过加入适量盐酸调节至合适pH值的水、氢氧化钠水溶液或适合的缓冲液,1,3-丁二醇、林格氏液、等渗氯化钠溶液和葡萄糖溶液。水性制剂亦可含有一种或多种防腐剂(例如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯)。在其中一种化合物仅一点点或稍微溶于水的情况下,可以加入溶解促进剂或增溶剂,或者溶剂可以包含10-60%重量百分比的丙二醇。

[0161] 本发明提供治疗瘤形成、传染病或自身免疫疾病或其症状的方法,其包括给受试者(例如,哺乳动物比如人)施用治疗有效量的包括本文配方之化合物的药物组合物。因此,一个具体例是治疗患有或易患瘤形成、传染病或自身免疫疾病或其症状的受试者的方法。该方法包含,在疾病或病症可被治疗的条件下,给哺乳动物施用足以治疗疾病或病症或其症状的治疗用量的化合物的步骤。

[0162] 本文的方法包含向受试者(包含被识别为需要此治疗的受试者)施用有效量的本文所述的化合物或本文所述的组合物以产生这种效果。识别需要此治疗的受试者可以是受试者或医疗专业人员的判断,且可以是主观的(例如意见)或客观的(例如通过测试或诊断方法是可测量的)。

[0163] 本发明的治疗方法(包括预防性治疗)一般包括对有需要的受试者(例如,动物、人,包含哺乳动物,特别是人)施用治疗有效量的本文之化合物,例如本文配方之化合物。这种治疗将适度地给予罹患、具有、易患或有下列疾病患病风险的受试者(特别是人):瘤形成、传染病、自身免疫疾病、病症或其症状。确定“有风险”的受试者可通过诊断测试,或受试者或医疗提供者的意见做出任何客观或主观的确定(例如遗传检验、酶或蛋白质标记物、标记物(如本文所定义)、家族史等)。本发明的融合蛋白复合体可用于治疗任何其他需要增加免疫应答(才可被治疗)的病症。

[0164] 本发明亦提供了一种监测治疗进展的方法。该方法包含确定受试者体内的诊断标记物(标记物)(例如,由本文之化合物、蛋白质或其指示物等所调节的本文划定的任何靶标)的水平或诊断量测(例如,筛选、测定)的水平的步骤;该受试者患有或易患与瘤形成相关的病症或其症状,且该受试者已被施用足以治疗该疾病或其症状的治疗量的化合物。该方法确定的标记物水平可与健康正常对照体内的或与其他为病所苦患者体内的已知标记物水平进行比较,以确定受试者的疾病状态。在一些情况下,受试者体内标记物的第二水平在晚于第一水平被确定的时间点被确定,并且比较这两个水平以监测疾病的病程或疗法的效能。在某些方面中,受试者体内的标记物的治疗前水平在根据本发明的治疗之前被确定;然后,此标记物的治疗前水平可以与治疗起始后受试者体内的标记物水平进行比较,以确定治疗的效能。

[0165] 组合疗法

[0166] 任选地,本发明的融合蛋白复合体是与任何其他标准疗法组合施用;这些方法是本领域技术人员已知的并在E.W.Martin的《雷明顿药物科学》中描述。如果需要,本发明的融合蛋白复合体与任何常规抗肿瘤疗法组合施用,包含但不限于免疫疗法、治疗性抗体、靶向疗法、手术、放射疗法或化疗。

[0167] 试剂盒或药物系统

[0168] 包括本发明的融合蛋白复合体的药物组合物可以组装成用于改善瘤形成、传染病或自身免疫疾病的试剂盒或药物系统。根据本发明这方面的试剂盒或药物系统包括载体构件,例如盒子、纸盒、管子,其中具有紧密限制的一个或复数个容器构件,例如小药瓶、管子、安瓿、瓶子等。本发明的试剂盒或药物系统亦可包括使用本发明的融合蛋白复合体的相关说明书。

[0169] 重组蛋白表达

[0170] 一般地,本发明的融合蛋白复合体(例如TxM复合体的组分)的制备可以通过本文揭露的流程和通过公认的重组DNA技法完成。

[0171] 一般地,重组多肽的生产是通过用位于适合的表达载体内的全部或部分编码多肽之核酸分子或其片段转化适合的宿主细胞。分子生物学领域的技术人员将理解,多种表达系统中的任何一种可用来提供重组蛋白。所使用的宿主细胞是否确切对本发明不重要。重组多肽可在几乎任何真核宿主(例如酿酒酵母、昆虫细胞,例如Sf21细胞、或哺乳动物细胞,例如NIH 3T3、HeLa或优选为COS细胞)中生产。这些细胞可从广泛的来源得到(例如,美国典型培养物保藏中心/the American Type Culture Collection, Rockland, Md.; 亦参见例如, Ausubel等, *Current Protocol in Molecular Biology*, New York: John Wiley and Sons, 1997)。转染的方法和表达媒介的选择将取决于所选择的宿主系统。转化方法描述于例如Ausubel等的文献中(同上); 表达媒介可选自例如《克隆载体: 实验室手册》*Cloning Vectors: A Laboratory Manual* (P.H. Pouwels等, 1985, Supp. 1987)中提供的那些。

[0172] 存在着多种用于生产重组多肽的表达系统。可用于生产此类多肽的表达载体包含但不限于染色体的、附加体的和来源自病毒的载体,例如来源自细菌质粒、噬菌体、转座子、酵母附加体、插入因子、酵母染色体元件、病毒(比如杆状病毒、乳头多瘤空泡病毒比如SV40、牛痘病毒、腺病毒、禽痘病毒、伪狂犬病病毒和逆转录病毒)的载体,以及源自上述载体组合的载体。

[0173] 重组多肽被表达后,立即对其进行分离,例如使用亲和层析。在一个实例中,对抗该多肽而生成的抗体(例如,如本文所述方式被生产出来的)可以被连接到柱上并用于分离该重组多肽。在亲和层析之前,包含着多肽的细胞的裂解和分馏可通过标准方法执行(参见例如, Ausubel等, 同上)。如果需要,分离出来的重组蛋白可以被进一步纯化,例如通过高效液相层析(参见例如, Fisher, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, eds., Work and Burdon, Elsevier, 1980)。

[0174] 如本文所用,本发明的生物活性多肽或效应分子可包含多种因子,比如细胞因子、趋化因子、生长因子、蛋白质毒素,免疫球蛋白结构域或其他生物活性蛋白质如酶。又,生物活性多肽可包含与其他化合物的偶联物,比如非蛋白质毒素、细胞毒性剂、化疗剂、可检测的标记、放射性材料等。

[0175] 本发明的细胞因子的定义为,细胞产生的任何因子,其影响其他细胞,并且其对(该影响所导致的)细胞免疫的多种效应中的任何一种负责。细胞因子的实例包含但不限于IL-2家族、干扰素(IFN)、IL-10、IL-1、IL-17、TGF和TNF细胞因子家族、以及IL-1至IL-35、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN  $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、和TNF $\beta$ 。

[0176] 在本发明的一个方面,第一蛋白质包括与白细胞介素-15(IL-15)结构域或其功能片段共价链接的第一生物活性多肽。IL-15是影响T细胞活化和增殖的细胞因子。IL-15在影

响免疫细胞活化和增殖方面的活性在某些方面与IL-2相似,尽管二者的基本差异已经被充分分析(Waldmann, T A, 2006, Nature Rev. Immunol. 6:595-601)。

[0177] 在本发明的另一方面,第一蛋白质包括白细胞介素-15(IL-15)结构域,其是IL-15变体(在本文中亦称为IL-15突变体)。IL-15变体优选包括与天然(或野生型)IL-15蛋白不同的氨基酸序列。IL-15变体优选结合IL-15R $\alpha$ 多肽并作为IL-15激动剂或拮抗剂而起作用。优选地,具有激动剂活性的IL-15变体具有超激动剂活性。IL-15变体可以作为IL-15激动剂或拮抗剂起作用,且该作用独立于其与IL-15R $\alpha$ 的结合。具有相对于野生型IL-15相当的或增加的生物活性,是IL-15激动剂的范例。具有相对于野生型IL-15减少的生物活性或具有抑制IL-15介导之反应的能力,是IL-15拮抗剂的范例。在一些实例中,IL-15变体与IL-15R $\beta$   $\gamma$  C受体的结合的活性增加或减少。在一些情况下,IL-15变体的序列与天然IL-2序列相比具有至少一个氨基酸变化,例如替换或缺失,而这种变化导致IL-15的激动剂或拮抗剂的活性。优选地,该氨基酸替换/缺失是位于与IL-15R $\beta$ 和/或 $\gamma$  C相互作用的IL-15结构域中。更优选地,氨基酸替换/缺失不影响与IL-15R $\alpha$ 多肽的结合或生产该IL-15变体的能力。产生IL-15变体的适合的氨基酸取代/缺失可以被鉴别出来,该鉴别是基于:推定的或已知的IL-15结构,或将IL-15与具有已知结构的同源分子例如IL-2进行比较,该比较是通过如本文中或其他经验方法所提供的循理式(rational)突变或随机突变和功能测定。此外,适合的氨基酸替换可以是保守的或非保守的变化以及额外氨基酸的插入。优选地,本发明的IL-15变体在成熟的人IL-15序列的位置6,8,10,61,65,72,92,101,104,105,108,109,111, or 112含有一个或多个氨基酸替换/缺失;特别地,D8N(“D8”系指天然的成熟人IL-15序列中的氨基酸和残基位置,“N”系指IL-15变体中该位置的替换后的氨基酸残基),I6S,D8A,D61A,N65A,N72R,V104P或Q108A的替换导致具有拮抗剂活性的IL-15变体和N72D替换导致具有激动剂活性的IL-15变体。

[0178] 与细胞因子相似的趋化因子的定义为,任何化学因子或分子,当其曝露于其他细胞时的,其对(该曝露所导致的)细胞免疫的多种效应中的任何一种负责。适合的趋化因子可包含但不限于CXC,CC,C,和CX<sub>3</sub>C趋化因子家族以及CCL-1至CCL-28,CXC-1至CXC-17,XCL-1,XCL-2,CX3CL1,MIP-1b,IL-8,MCP-1,和Rantes。

[0179] 生长因子包含当曝露于特定细胞时诱导受影响的该细胞增殖和/或分化的任何分子。生长因子包含蛋白质和化学分子,其中一些包含:GM-CSF、G-CSF、人生长因子和干细胞生长因子。另外的生长因子也可适用于本文所述的用途。

[0180] 毒素或细胞毒性剂包含当曝露于细胞时具有致死效果或对生长具有抑制效果的任何物质。更具体地,效应分子可以是细胞毒素,例如植物或细菌来源的,比如:白喉毒素(diphtheria toxin)(DT)、志贺毒素(shiga toxin)、相思子毒素(abrin)、霍乱毒素(cholera toxin)、蓖麻毒素(ricin)、皂草毒蛋白(saporin)、假单胞菌外毒素(pseudomonas exotoxin,PE)、商陆抗病毒蛋白(pokeweed antiviral protein)、或白树毒素(gelonin)。这些毒素的生物活性片段是本领域熟知的,包含例如DT A链和蓖麻毒素A链。此外,毒素可以是在细胞表面有活性的试剂,比如磷脂酶(例如磷脂酶C)。

[0181] 此外,效应分子可以是化疗药物,例如长春地辛(vindesine)、长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastin)、甲氨蝶呤(methotrexate)、阿霉素(adriamycin)、博来霉素(bleomycin)、或顺铂(cisplatin)。

[0182] 此外,效应分子可以是适于诊断或成像研究的可检测的被标记分子。这些标记包含生物素或链霉亲和素/亲和素、可检测的纳米颗粒或晶体、酶或其催化活性片段、荧光标记比如绿色荧光蛋白、异硫氰酸荧光素 (FITC)、藻红蛋白、细胞色素 (cychrome)、德州红或量子点;放射性核素,例如碘-131、钇-90、镱-188或铽-212;磷光或化学发光分子或可被PET (正电子断层扫描)、超声波或MRI检测到的标记,例如基于钆 (Gd) 或基于顺磁性金属离子的造影剂。参见例如Moskaug等.J.Biol.Chem.264,15709 (1989);Pastan,I.等.Cell 47,641, 1986;Pastan等.,Recombinant Toxins as Novel Therapeutic Agents, Ann.Rev.Biochem.61,331, (1992);“Chimeric Toxins”Olsnes and Phil,Pharmac.Ther., 25,355 (1982);已公布的PCT申请W0 94/29350;已公布的PCT申请W0 94/04689;已公布的PCT申请W02005046449和美国专利5,620,939中的涉及制备和使用包括效应物或标签的蛋白质的公开内容。

[0183] 包含共价链接的IL-15和IL-15 $\alpha$ 结构域的蛋白质融合或偶联复合体具有若干重要用途。例如,包括抗-PD-L1 scAb的蛋白质融合或偶联复合体可用于将IL-15:IL-15 $\alpha$ 复合体递送至某些细胞,例如表达PD-L1的肿瘤细胞。因此,蛋白质融合或偶联复合体提供了选择性破坏或杀死包括该配体的细胞的手段。能够被蛋白质融合或偶联复合体破坏或杀死的细胞或组织的实例包含肿瘤以及被病毒或细菌感染的且表达一种或多种配体的细胞。易被破坏或杀死的细胞或组织可通过本文揭露的方法便利地予以测定。

[0184] 本发明的IL-15和IL-15 $\alpha$ 多肽在氨基酸序列中适当地对应天然存在的IL-15和IL-15 $\alpha$ 分子,例如人、小鼠或其他啮齿动物、或其他哺乳动物的IL-15和IL-15 $\alpha$ 分子。这些多肽的和编码核酸的序列在文献中是已知的,包含人白细胞介素15 (IL15)mRNA-GenBank:U14407.1 (通过引用并入本文),小鼠白细胞介素15 (IL15)mRNA-GenBank:U14332.1 (通过引用并入本文),人白细胞介素-15受体 $\alpha$ 链前体 (IL15RA)mRNA-GenBank:U31628.1 (通过引用并入本文),小鼠白细胞介素15受体 $\alpha$ 链-GenBank:BC095982.1 (通过引用并入本文)。

[0185] 在一些设定中,使本发明的蛋白质融合或偶联复合体多价化是有用的,例如,以增加sc-抗体的化合价。特别地,融合蛋白复合体的IL-15和IL-15 $\alpha$ 结构域之间的相互作用提供了产生多价复合体的手段。此外,可以制造出多价融合蛋白:将一到四个蛋白(相同或不同)通过其之间的共价或非共价键链接在一起,而该链接是通过使用例如标准的生物素-链霉亲和素标记技法,或通过偶联到适合的固体支撑物(例如乳胶珠)上。化学交联的蛋白质(例如与树枝状聚合物交联)亦是适合的多价类型。例如,蛋白质可以被修饰,通过包含编码可被修饰的标签序列的序列,比如生物素化的BirA标签或具有化学活性侧链的氨基酸残基例如Cys或His。此类氨基酸标签或化学活性氨基酸可位于融合蛋白的复数个位置,优选是位于生物活性多肽或效应分子的活性位点的远端。例如,可溶性融合蛋白的C末端可以与一标签或包含此类活性氨基酸(单个或复数个)的其他融合蛋白共价链接。可以包含适合的侧链,其将两个或更复数个融合蛋白化学链接到适合的树枝状聚合物或其他纳米颗粒,以产生多价的分子。树枝状聚合物是合成的化学聚合物,其可以具有其表面的若干不同官能基团中的任何一种(D.Tomalia,Aldrichimica Acta,26:91:101 (1993))。根据本发明使用的示例性树枝状聚合物包含例如,E9星射状聚胺树枝状聚合物(starburst polyamine dendrimer)和E9 combust聚胺树枝状聚合物,其可以链接胱氨酸残基。示例性的纳米颗粒包含脂质体、核-壳型颗粒或基于PLGA(聚乳酸羟基乙酸共聚物)的颗粒。

[0186] 另一方面,融合蛋白复合体的一种或两种多肽包括免疫球蛋白结构域。或者,蛋白质结合结构域-IL-15融合蛋白可以进一步与免疫球蛋白结构域连接。优选的免疫球蛋白结构域包括(一个或复数个)区域,该区域允许与其他免疫球蛋白结构域相互作用以形成如上所述的多链蛋白。例如,免疫球蛋白重链区比如IgG1 C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3,能够稳定地相互作用以产生Fc区。包含Fc结构域的优选免疫球蛋白结构域亦包括具有效应物功能(所述功能包含Fc受体或补体蛋白的结合活性)的区域和/或具有糖基化位点的区域。在一些方面中,融合蛋白复合体的免疫球蛋白结构域含有减少或增大Fc受体或补体结合活性或糖基化或二聚化的突变,从而影响所得到的蛋白质的生物活性。例如,含有减少与Fc受体结合的突变的免疫球蛋白结构域可用于产生本发明的融合蛋白复合体,其对承载Fc受体的细胞具有较低的结合活性,这对于设计用于辨识或检测特定抗原的试剂可能是有利的。

#### [0187] 核酸和载体

[0188] 本发明进一步提供了核酸序列,特别是编码本发明融合蛋白(例如TxM的组分)的DNA序列。优选地,DNA序列由适合于染色体外复制的载体携带,例如噬菌体、病毒、质粒、噬菌粒、粘粒、酵母人工染色体(YAC)或附加体。特别地,编码所期望的融合蛋白的DNA载体可用于促进本文所述的制备方法和得到显著数量的融合蛋白。DNA序列可被插入到适当的表达载体,即含有插入的蛋白质编码序列的转录和翻译所必需元件的载体。多种宿主-载体系统可被利用以表达蛋白质编码序列。这些包含,感染病毒的哺乳动物细胞系统(例如牛痘病毒,腺病毒等);被病毒感染的昆虫细胞系统(例如杆状病毒);微生物如含有酵母载体的酵母,或用噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA转化的细菌。取决于所用的宿主-载体系统,可以使用若干适合的转录和翻译元件中的任何一种。参见Sambrook等(同上)和Ausubel等(同上)。

[0189] 本发明包含制备可溶性融合蛋白复合体的方法,该方法包括将编码第一和第二蛋白的如本文所述的DNA载体引入宿主细胞,在足以将蛋白质表达在细胞或培养基中的条件下,在培养基中培养宿主细胞,容许第一蛋白质的IL-15结构域与第二蛋白质的可溶性IL-15 $\alpha$ 结构域结合以形成可溶性融合蛋白复合体,从宿主细胞或培养基中纯化可溶性融合蛋白复合体。

[0190] 一般地,根据本发明的优选DNA载体包括由磷酸二酯键链接的核苷酸序列,该核苷酸序列包括在5'至3'方向的第一克隆位点,该位点用于引入编码生物活性多肽的第一核苷酸序列,且该位点与编码效应分子的序列可操作地连接。

[0191] 由DNA载体编码的融合蛋白组分可以用卡匣(cassette)型式提供。术语“卡匣”意为每种组分可通过标准的重组方法便利地被替换为另一种组分。特别地,当编码的融合复合体将被用于对抗可能具有或已具有发展出不同血清型的能力的病原体时,以卡匣型式配置的DNA载体是特别理想的。

[0192] 为了制造编码融合蛋白复合体的载体,通过使用适合的连接酶将编码生物活性多肽的序列与编码效应肽的序列连接。可以得到编码呈递肽的DNA的途径有:通过从天然来源(例如适合的细胞系)中分离DNA,或通过已知的合成方法,例如磷酸三酯法(the phosphate triester method)。参见例如,《寡核苷酸合成》Oligonucleotide Synthesis, IRL Press (M.J.Gait, ed., 1984)。合成的寡核苷酸也可以使用市售的自动化寡核苷酸合成仪制备。被分离后,编码生物活性多肽的基因即可通过聚合酶链式反应(PCR)或本领域已知的其他方法被扩增。扩增生物活性多肽基因的适合的PCR引物可以对PCR产物添加限制性酶切位点。

PCR产物优选包含用于下列序列的剪接位点:效应肽和前导序列,该前导序列对于生物活性多肽-效应物融合复合体的正常表达和分泌是必要的。PCR产物亦优选包含编码链接序列的序列,或用于连接这种序列的限制性酶切位点。

[0193] 优选地通过标准重组DNA技法生产本文描述的融合蛋白。例如,编码生物活性多肽的DNA分子被分离后,该序列就可以被连接到编码效应多肽的另一DNA分子上。编码生物活性多肽的核苷酸序列可以直接被连接到编码效应肽的DNA序列上或者,更通常地,编码本文论及的链接序列的DNA序列可以插入编码生物活性多肽的序列和编码效应肽的序列之间,并用适合的连接酶连接。得到的杂合DNA分子可以在适合的宿主细胞中表达以生产融合蛋白复合体。DNA分子以5'至3'的取向相互被连接,使得在连接后,被编码的多肽的翻译框架不会改变(即,DNA分子相互连接的方式为“符合读框(in-frame)”)。得到的DNA分子编码符合读框的融合蛋白。

[0194] 其他核苷酸序列亦可被包含在基因构建体中。例如,启动子序列(其控制融合到效应肽的生物活性多肽的编码序列的表达)或前导序列(其将融合蛋白导向至细胞表面或培养基)可被包含在构建体中,或是存在于构建体所插入的表达载体中。免疫球蛋白启动子或CMV启动子是特别优选的。

[0195] 在得到变体生物活性多肽、IL-15、IL-15R $\alpha$ 或Fc结构域的编码序列时,本领域的普通技术人员将认可,可通过某些氨基酸替换、添加、缺失和翻译后修饰对多肽加以修饰,而该多肽并不丧失或减少生物活性。特别地,众所周知,保守的氨基酸替换,即用一个氨基酸替换相似大小、电荷、极性和构象的另一个氨基酸,不大可能显着改变蛋白质的功能。构成蛋白质的20种标准氨基酸可大致分类为如下四组保守氨基酸:非极性(疏水)组包含丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸和缬氨酸;极性(不带电、中性)组包含天冬酰胺、半胱氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸;带正电荷的(碱性)基团含有精氨酸、组氨酸和赖氨酸;带负电的(酸性)组含有天冬氨酸和谷氨酸。在同一组中将蛋白质中的一种氨基酸替换为另一种不大可能对蛋白质的生物活性具有不利影响。在其他情况下,可以对氨基酸位置进行修饰以减少或增强蛋白质的生物活性。这些变化可以被随机引入,或基于目标残基(一个或复数个)的已知或假定的结构或功能特性经由位点特异性突变引入。在表达变体蛋白后,由于修饰而引起的生物活性的变化可以用结合测定或功能测定对其便利地评估。

[0196] 核苷酸序列之间的同源性可以通过DNA杂交分析来确定,其中双链DNA杂合体的稳定性取决于碱基配对发生的程度。高温和/或低盐含量的条件降低杂交体的稳定性,并且可以变换该条件以防止具有低于选定同源性程度的序列的退火。例如,对于具有约55%G-C含量的序列,40-50°C、6×SSC(氯化钠/柠檬酸钠缓冲液)和0.1%SDS(十二烷基硫酸钠)的杂交和洗涤条件表明约60-70%的同源性;50-65°C、1×SSC和0.1%SDS的杂交和洗涤条件表明约82-97%的同源性;52°C、0.1×SSC和0.1%SDS的杂交和洗涤条件表明约99-100%的同源性。用于比较核苷酸和氨基酸序列(以及测量同源性程度)的各种计算机程序是可取得的,提供市售和自由软件来源的列表请参见Ausubel等的文献(1999)。易于取得的序列比较和多序列对位算法分别是基本局部比对搜索工具(BLAST)(Altschul等,1997)和ClustalW程序。BLAST可在ncbi.nlm.nih.gov的万维网上得到,而ClustalW的版本可在2.ebi.ac.uk得到。



[0197] 融合蛋白的组分可以几乎以任何顺序组织,只要每个组分能执行其预定的功能。例如,在一个具体例中,生物活性多肽坐落于效应分子的C或N末端。

[0198] 本发明的优选效应分子将具有有助于这些结构域所预期之功能的大小。本发明的效应分子可以通过多种方法制备并与生物活性多肽融合,包含众所周知的化学交联方法。参见例如,Means, G.E.和Feeney, R.E. (1974) in《蛋白质的化学修饰》Chemical Modification of Proteins, Holden-Day. 亦参见, S.S.Wong (1991) in《蛋白质偶联和交联化学》Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press。然而,一般优选使用重组操作来制备符合读框的融合蛋白。

[0199] 如上所述,根据本发明的融合分子或偶联分子可以以若干种方式组织。在示例性构型中,生物活性多肽的C末端与效应分子的N末端可操作地链接。如果需要,可以通过重组方法进行该链接。然而,在另一种构型中,生物活性多肽的N-末端与效应分子的C-末端链接。

[0200] 或者,或另外,可根据需要将一种或多种另外的效应分子插入生物活性多肽或偶联复合体中。

[0201] 载体和表达

[0202] 可以使用若干策略来表达本发明的融合蛋白复合体的组分(例如, TxM)。例如,编码本发明的融合蛋白复合体的一种或多种组分的构建体被并入适合的载体中,该并入过程使用限制性内切酶在载体上制造酶切切口,其用来插入构建体并随后进行连接。然后,含有该基因构建体的载体被引入适合的宿主中以表达融合蛋白。一般参见Sambrook等,同上。可以基于与克隆方案有关的因素,凭经验选择出适合的载体。例如,对所用宿主而言,载体应与其相容,并具有(在该宿主中)正常的复制子。载体必须能够容纳编码待表达的融合蛋白复合体的DNA序列。适合的宿主细胞包含真核细胞和原核细胞,优选那些易于被转化并在培养基中展现出快速生长的细胞。特别地,优选的宿主细胞包含原核生物,比如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌等,以及真核生物,比如动物细胞和酵母菌株,如酿酒酵母。一般地,优选哺乳动物细胞,特别是J558(小鼠骨髓瘤)、NS0(即NS0,小鼠骨髓瘤)、SP2/0(即Sp2/0-Ag14或SP2,小鼠骨髓瘤)或CHO(中国仓鼠卵巢细胞)。其他适合的宿主包含例如昆虫细胞,如Sf9(草地贪夜蛾细胞)。常规的培养条件被使用。参见Sambrook,同上。然后可以筛选稳定转化或稳定转染的细胞系。表达本发明的融合蛋白复合体的细胞可通过已知流程测定。例如,与免疫球蛋白链接的融合蛋白复合体的表达可以通过对该链接的免疫球蛋白特异性的ELISA(酶联免疫吸附测定)和/或通过免疫印迹来确定。在实施例中揭露了用于检测融合蛋白之表达的其他方法,所述融合蛋白包括与IL-15或IL-15 $\alpha$ 结构域链接的生物活性多肽。

[0203] 如上所述,宿主细胞可用于制备目的,以增殖编码所期望融合蛋白的核酸。因此,宿主细胞可包含特异性地产生融合蛋白的原核或真核细胞。因此,宿主细胞特别地包含能够增殖编码融合蛋白的核酸的酵母、蝇、虫、植物、蛙、哺乳动物细胞和器官。可以使用的哺乳动物细胞系的非限制性实例包含CHO dhfr-细胞(二氢叶酸还原酶缺失型CHO细胞)(Urlaub和Chasm, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)), 293细胞(人胚胎肾细胞)(Graham等, J. Gen. Virol., 36:59 (1977))或骨髓瘤细胞如SP2或NS0(Galfre和Milstein, Meth. Enzymol., 73(B):3 (1981))。

[0204] 能够增殖编码所期望融合蛋白复合体的核酸的宿主细胞也包括非哺乳动物的真

核细胞,包含昆虫(例如,草地贪夜蛾)、酵母(例如酿酒酵母、粟酒裂殖酵母、毕赤巴斯德酵母、乳酸克鲁维酵母、多形汉逊酵母;总体性的综述参见Fleer,R.,Current Opinion in Biotechnology,3(5):486496(1992))、真菌和植物细胞。被考虑到的还有某些原核生物,例如大肠杆菌和芽孢杆菌。

[0205] 编码所期望融合蛋白的核酸可以通过用于转染细胞的标准技法被引入宿主细胞中。术语“(进行)转染”或“转染(作用)”旨在涵盖用于将核酸引入宿主细胞的所有常规技术,包含磷酸钙共沉淀、二乙基氨基乙基-葡聚糖(DEAE-dextran)介导的转染、脂质体转染、电穿孔、显微注射、病毒转导和/或整合。用于转染宿主细胞的适合的方法可以在Sambrook等(同上)和其他实验室教科书中找到。

[0206] 各种启动子(转录起始调节区)可以根据本发明被使用。适当启动子的选择取决于所提出的表达宿主。异源的启动子可以被使用,只要它们在所选宿主中起作用即可。

[0207] 启动子的选择亦取决于所期望的效率和肽或蛋白质的生产水平。可诱导型启动子如tac经常被使用,以大幅增加大肠杆菌中蛋白质表达的水平。蛋白质的过度表达可能对宿主细胞有害。因此,宿主细胞的生长可能受限。可诱导型启动子系统的使用允许在诱导基因表达之前将宿主细胞培养至可接受的密度,从而促进更高的产物产量。

[0208] 各种信号序列可以根据本发明被使用。与生物活性多肽的编码序列同源的信号序列可以被使用。或者,已经被选定或设计过的用于在表达宿主中有效分泌和加工处理的信号序列也可以被使用。例如,适合的信号序列/宿主细胞的配对包含,用于在枯草芽孢杆菌中分泌的枯草芽孢杆菌sacB信号序列,以及用于毕赤巴斯德酵母分泌的酿酒酵母 $\alpha$ -交配因子或毕赤巴斯德酵母酸性磷酸酶phoI信号序列。信号序列可以通过编码信号肽酶切割位点的序列直接连接到蛋白质编码序列,或通过由通常少于10个密码子组成的短核苷酸桥连接,该桥确保下游TCR序列的正确阅读框架。

[0209] 用于真核蛋白质表达系统的增强转录和翻译的元件已经被鉴别出。例如,将花椰菜花叶(嵌纹)病毒(CaMV)启动子定位在异源启动子任一侧的1,000bp可以在植物细胞中将转录水平提高10-400倍。表达构建体亦应包含适当的翻译起始序列。修饰表达构建体以包含用于正常的翻译起始的Kozak一致序列可以将翻译水平提高10倍。

[0210] 选择性标记物经常被使用,其可以是表达构建体的一部分或与其分开(例如,由表达载体携带),使得标记物可以整合在与目的基因不同的位点。实例包含赋予对抗生素的抗性的标记物(例如,bla赋予大肠杆菌宿主细胞对氨苄青霉素的抗性,nptII赋予多种原核和真核细胞对卡那霉素的抗性)或允许宿主在基本培养基上生长(例如,HIS4使毕赤巴斯德酵母或His<sup>-</sup>酿酒酵母在没有组氨酸的情况下生长)。选择性标记物具有其自身的转录和翻译起始和终止调节区,以允许标记物的独立表达。如果使用抗生素抗性作为标记物,则用于筛选的抗生素浓度将根据抗生素而变化,一般为10至600 $\mu$ g抗生素/mL培养基。

[0211] 表达构建体通过使用已知的重组DNA技法组装(Sambrook等,1989;Ausubel等,1999)。限制内切酶消化和连接是用于连接两个DNA片段的基本步骤。DNA片段的末端在连接前可能需要修饰,而这可以通过填充突出端、用核酸酶(例如ExoIII)删除片段的末端部分、定点突变或通过以PCR添加新的碱基对来进行。多位点接头和衔接子可被用来促进所选片段的连接。表达构建体的组装通常是分阶段的,其使用多轮的限制性酶切、连接和大肠杆菌的转化。适用于建构表达构建体的许多克隆载体是本领域已知的( $\lambda$ ZAP和pBLUESCRIPT SK-

1, Stratagene, La Jolla, CA, pET, Novagen Inc., Madison, WI, 引自Ausubel等, 1999), 而特别选择哪个载体对本发明并不重要。克隆载体的选择将受选定的基因转移系统(用于将表达构建体引入宿主细胞)的影响。在每个(组装)阶段结束时, 可以通过限制性酶切、DNA测序、杂交和PCR分析来分析所得的构建体。

[0212] 表达构建体可以作为克隆载体构建体被转化到宿主中(以线状或环状), 或者可以从克隆载体中将表达构建体取出并以其现况直接使用、或是将其引入到递送载体中。递送载体有助于在所选宿主细胞类型中引入和维持表达构建体。表达构建体被引入宿主细胞中, 是通过若干已知的基因转移系统中的任何一种(例如, 自然感受态(natural competence)、化学介导的转化、天然质体转化、电穿孔、基因枪/生物射弹转化、转染或偶联)(Ausubel等, 1999; Sambrook等, 1989)。选择的基因转移系统取决于所用的宿主细胞和载体系统。

[0213] 例如, 可以通过天然质体转化或电穿孔将表达构建体引入酿酒酵母细胞中。酿酒酵母的电穿孔可以便利地进行, 并收获与天然质体转化相当的转化效率。

[0214] 本发明进一步提供了分离目的融合蛋白的生产过程。在该过程中, 已经引入了与调节序列可操作地连接的编码目的蛋白质之核酸的宿主细胞(例如酵母、真菌、昆虫、细菌或动物细胞)以生产规模在培养基中生长, (该培养基)以刺激编码目的融合蛋白的核苷酸序列的转录。随后, 目的融合蛋白从收获的宿主细胞中或培养基中被分离。标准的蛋白质纯化技法可用于从培养基中或收获的细胞中分离目的蛋白质。特别地, 纯化技法可用于以多种仪器(包含滚瓶、(细胞悬浮)旋转瓶、组织培养板、生物反应器、或发酵罐)实施大规模表达并纯化所期望的融合蛋白。

[0215] 表达的蛋白融合复合体可以通过已知方法被分离和纯化。通常, 培养基被离心或过滤, 然后上清液通过亲和层析或免疫亲和层析纯化, 例如Protein-A或Protein-G亲和层析或免疫亲和(层析)方案, 其包括使用结合表达的融合复合体的单克隆抗体。本发明的融合蛋白可以通过已知技法的适当组合被分离和纯化。这些方法包含例如, 利用可溶性的方法, 如盐沉淀法和溶剂沉淀法; 利用分子量差异的方法, 如透析、超过滤、凝胶过滤和SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳; 利用电荷差异的方法, 如离子交换柱层析; 利用特异性亲和性的方法, 如亲和层析法; 利用疏水性差异的方法, 如反相高效液相层析; 以及利用等电点差异的方法, 如等电聚焦电泳、金属亲和柱(层析)如Ni-NTA。涉及这些方法的公开内容一般参见Sambrook等和Ausubel等(同上)。

[0216] 优选地, 本发明的融合蛋白是实质上纯的。也就是说, 融合蛋白已同与其天然相伴的细胞组分分离, 因此融合蛋白优选以至少80%或90%至95%的同质性(w/w, 重量/重量)存在。具有至少98%至99%同质性(w/w)的融合蛋白对于许多制药、临床和研究应用是最优选的。一旦被纯化到实质上的程度(substantially purified), 用于治疗应用的该融合蛋白即应实质上不含污染物。一旦被纯化到部分地的程度(purified partially)或已被纯化到实质纯度(purified to substantial purity), 该可溶性融合蛋白即可用于治疗, 或用于执行本文中揭露的体外或体内的各种测定。实质纯度可通过多种标准技法如层析和凝胶电泳加以确定。

[0217] 本发明的融合蛋白复合体适合使用在多种细胞上(体外或体内的使用), 该各种细胞为癌变的、或被感染的、或可能会被一种或多种疾病感染的。

[0218] 人白细胞介素-15 (huIL-15) 通过在抗原呈递细胞上表达的人IL-15受体 $\alpha$ 链 (huIL-15 $\alpha$ ) 被反式呈递到免疫效应细胞。IL-15 $\alpha$ 主要通过细胞外的sushi结构域 (huIL-15 $\alpha$ Su) 以高亲和力 (38pM) 结合huIL-15。如本文所述, huIL-15和huIL-15 $\alpha$ Su结构域可用作支架以建构多结构域融合复合体。

[0219] IgG结构域, 特别是Fc片段, 已被成功地被用作若干治疗性分子 (包含核准的生物药物) 的二聚体支架。例如, 依那西普是与人IgG1的Fc结构域链接的人p75肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 受体 (sTNFR) 的可溶性二聚体。这种二聚化使得依那西普在抑制TNF- $\alpha$ 活性方面比单体sTNFR强效最多1000倍, 并赋予融合物比单体形式长5倍的血清半衰期。因此, 依那西普有效地在体内中和TNF- $\alpha$ 的促炎症活性, 并且改善了患者的一些不同的自身免疫适应症的预后。

[0220] 除了其二聚化活性之外, Fc片段亦通过补体活化和与自然杀手细胞 (NK)、中性粒细胞、吞噬细胞和树突细胞上所展示的Fc  $\gamma$  受体的相互作用而提供细胞毒性的效应物功能。在抗癌的治疗性抗体和其他抗体结构域-Fc融合蛋白的背景下, 这些活性可能在动物肿瘤模型和癌症患者中观察到的疗效中起重要作用。然而, 在一些治疗性应用中, 这些细胞毒性效应物的反应可能不足够。因此, 人们对改善和扩展Fc结构域的效应物活性以及开发经由靶向治疗性分子招募细胞溶解性免疫应答 (包含T细胞活性) 至疾病部位的其他方法产生了相当大的兴趣。IgG结构域已被用作支架以形成双特异性抗体, 以改善由传统杂交瘤融合技术产生的产物的质量和数量。尽管这些方法绕过了其他支架的缺点, 但是一直都难以在哺乳动物细胞中生产足以支持临床开发和使用的水平的双特异性抗体。

[0221] 为了开发人源免疫刺激性多聚体支架, 使用人IL-15 (huIL-15) 和IL-15受体结构域。huIL-15是小的四 $\alpha$ -螺旋束细胞因子家族的成员, 其与huIL-15受体 $\alpha$ 链 (huIL-15 $\alpha$ ) 结合, 具有高结合亲和力 (平衡解离常数 (KD)  $\sim 10^{-11}$ M)。得到的复合体被反式呈递到在T细胞和NK细胞表面上展示的人IL-2/15受体 $\beta$ /共用  $\gamma$  链 (huIL-15 $\beta$   $\gamma$  C) 复合体上。这种细胞因子/受体相互作用导致效应T细胞和NK细胞的扩张和活化, 其在根除病毒感染和恶性细胞中起重要作用。通常, huIL-15和huIL-15 $\alpha$ 在树突细胞中共同被生产, 以在细胞内形成复合体, 其随后被分泌并在细胞表面上显示为异二聚体分子。因此, huIL-15和huIL-15 $\alpha$ 相互作用的特征表明, 这些链间结合结构域可以充当人源免疫刺激支架, 以制备能够特异性结合靶标的可溶性二聚体分子。

[0222] 如下文中详细描述, huIL-15:huIL-15 $\alpha$ Su-基底的支架用于创建PD-L1 TxM。该二聚体融合蛋白复合体保留了其huIL-15结构域和结合结构域的免疫刺激和靶标特异性的生物活性, 表明huIL-15和huIL-15 $\alpha$ 的添加没有显着改变融合结构域的空间排列, 而是提供了充足的构象灵活性, 且不影响细胞因子活性。因此, 此支架可用于形成多价融合复合体, 例如PD-L1 TxM, 以增加分子的总体结合亲和力。可溶性融合蛋白在重组CHO细胞培养物中以相对高的水平被生产 (无需广泛的细胞系筛选或优化的细胞培养物上清液中, 每升的产量即可达mg/毫克级别), 且可以从细胞培养物上清液中便利地被纯化。

[0223] 除非另有说明, 本发明的实践使用分子生物学 (包含重组技法)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技法, 其完全在本领域技术人员知识范围内。这些技法在文献中有充分的解释, 例如“《分子克隆: 实验室手册》Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, second edition (Sambrook, 1989); “《寡核苷酸合成》Oligonucleotide

Synthesis” (Gait,1984);“《动物细胞培养》Animal Cell Culture” (Freshney,1987);“《酶学方法》Methods in Enzymology”“《实验免疫学手册》Handbook of Experimental Immunology” (Weir,1996);“《用于哺乳动物细胞的基因转移载体》Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells”

[0224] (Miller and Calos,1987);“《当代实验方案-分子生物学》Current Protocols in Molecular Biology” (Ausubel,1987);“《PCR:聚合酶链式反应》PCR:The Polymerase Chain Reaction”, (Mullis,1994);“《当代实验方案-免疫学》Current Protocols in Immunology” (Coligan,1991)。这些技法适用于本发明的多核苷酸和多肽的生产,因此,可以在制备和实践本发明时考虑这些技术。用于特定具体例的特别有用的技法将在后面部分中被讨论。

[0225] 淋巴瘤

[0226] 淋巴瘤是血癌的一种类型,发生于当B或T淋巴细胞比正常细胞分裂更快或比自身预期寿命活得更长时。例如,B细胞淋巴瘤包含霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤,后者占大多数。B细胞淋巴瘤表达CD20。

[0227] 淋巴瘤可在淋巴结、脾脏、骨髓、血液或其他器官中发展。这些恶性细胞通常起源于淋巴结中,其呈现为淋巴结的扩大,即淋巴细胞的实体瘤。淋巴瘤的确诊是通过淋巴结的活体组织检查(活检),即将淋巴结部分或全部切除并在显微镜下检查。此检查可揭示可能表明淋巴瘤的组织病理学特征。治疗可能涉及化疗、放疗和/或骨髓移植。

[0228] 提出以下实施例以向本领域普通技术人员提供如何制备和使用本发明的测定、筛选和治疗方法的完整公开和描述,并非意图限制发明人所视本发明的范围。

[0229] 实施例

[0230] 实施例1:包括抗-PD-L1结合结构域的基于IL-15的融合蛋白复合体的生成和特性分析(PD-L1 TxM)

[0231] 癌细胞能够開啟由免疫检查点分子和配体(例如PD-L1)调节的各种免疫抑制通路。阻断这些检查点分子的抗体已被显示可增强抗肿瘤免疫力。IL-15活化并扩增NK和CD8<sup>+</sup>细胞,同时增加此它们的细胞溶解活性。Ig分子的Fc区可以与NK细胞和巨噬细胞上的Fc  $\gamma$  受体相互作用,并介导对抗靶疾病细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)或抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。如下文中详细描述,包括与抗-PD-L1结合结构域融合的

[0232] IL-15N72D:IL-15 $\alpha$ Su/Fc支架的蛋白质复合体被生成。这些复合体经由抗-PD-L1结合结构域辨别肿瘤细胞,经由IL-15活性诱导NK和T细胞应答,并经由Fc结合结构域刺激ADCC和CDC。

[0233] 具体地,构建体的制备是将单链抗-PD-L1抗体链接到huIL-15N72D和IL-15 $\alpha$ Su/Fc链上。抗-PD-L1单链抗体(抗-PD-L1 scAb)的序列包括经由柔性链接序列链接的该抗体的重链V结构域和轻链V结构域的编码区。单链抗体结构域可以以VH-链接头-VL或VL-链接头-VH型式排列。在一些情况下,抗-PD-L1 scAb是与IL-15N72D和/或IL-15 $\alpha$ Su/Fc链的C末端链接。在其他情况下,抗-PD-L1是与IL-15N72D和/或IL-15 $\alpha$ Su/Fc链的N末端链接。在这些构建体中,对小鼠或人的PD-L1分子有特异性的抗-PD-L1 scAb被使用。

[0234] 1) 包括与huIL-15N72D和huIL-15 $\alpha$ Su/huIgG1 Fc链的N末端链接的抗-人PD-L1 scAb的构建体的核酸和蛋白质序列如下所示。抗-人PD-L1 scAb/IL-15N72D构建体的核酸

序列(包含信号肽序列和终止密码子)如下(SEQ ID NO:1):

[0235] (信号肽)

[0236] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

[0237] (抗-人PD-L1 scAb)

[0238] (VL)

[0239] AACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCGTGTCCGCCTCCGTGGGAGATCGGGTGACCATCACCTGT  
AGGGCCTCCCAGGACATCTCCAGGTGGCTGGCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGTGATCTA  
CGCCGCCTCCTCCCTGCAGTCCGGAGTGCCTAGCAGGTTCTCCGGCTCCGGATCCGGCACAGACTTCGCCCTGACCA  
TCTCTCCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGCCGACTCCAGGTTCTCCATCACCTTCGGC  
CAGGGCACCAGGCTGGAGATCAAGAGG

[0240] (链接头)

[0241] GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

[0242] (VH)

[0243] GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCCCTGAGGCTGTCCTGTGCC  
GCTTCCGGCTTCACCTTCAGCTCCTACTCCATGAACTGGGTGAGGCAGGCCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTC  
CTACATCTCCAGCTCCTCCTCCACCATCCAGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCAGGGACAACG  
CCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGACGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCGAC  
TATTACTACGGCATGGACGTGTGGGGCCAGGGAACACCGTGACCGTGTCTCTCC

[0244] (人IL-15N72D)

[0245] AACTGGGTAAACGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATGCATATTGATGCT  
ACTTTATATACGGAAAGTGATGTTACCCCAAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGT  
TATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTTGT  
CTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAATATTAAAGAATTTTG  
CAGAGTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTAA

[0246] 抗-人PD-L1 scAb/IL-15N72D融合蛋白(包含信号肽序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:2):

[0247] (信号肽)

[0248] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0249] (抗-人PD-L1 scAb)

[0250] (VL)

[0251] NIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQDISRWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT  
DFALTISSLQP

[0252] EDFATYYCQQADSRFSITFGQGRLEIKR

[0253] (链接头)

[0254] GGGSGGGSGGGGS

[0255] (VH)

[0256] EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSTIQYADSVKGRFT  
ISRDNAKNSLY

[0257] LQMNSLRDEDTAVYYCARGDYYYGMDVWGQGTITVTVSS

[0258] (人IL-15N72D)

[0259] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL  
ANDSLSSNGNV

[0260] TESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0261] 在一些情况下,前导肽会从成熟多肽上剪切。

[0262] 抗人PD-L1 scAb/huIL-15 $\alpha$ Su/huIgG1 Fc构建体(包括前导序列)的核酸序列如下(SEQ ID NO:3):

[0263] (前导序列)

[0264] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

[0265] (抗-人PD-L1 scAb)

[0266] (VL)

[0267] AACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCGTGTCCGCCTCCGTGGGAGATCGGGTGACCATCACCTGT  
AGGGCCTCCCAGGACATCTCCAGGTGGCTGGCTGGTACCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTA  
CGCCGCCTCCTCCCTGCAGTCCGGAGTGCCTAGCAGGTTCTCCGGCTCCGGATCCGGCACAGACTTCGCCCTGACCA  
TCTCCTCCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGCCGACTCCAGGTTCTCCATCACCTTCGGC  
CAGGGCACCAGGCTGGAGATCAAGAGG

[0268] (链接头)

[0269] GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

[0270] (VH)

[0271] GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCCCTGAGGCTGTCCTGTGCC  
GCTTCCGGCTTCACCTTCAGCTCCTACTCCATGAACTGGGTGAGGCAGGCCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTC  
CTACATCTCCAGCTCCTCCTCCACCATCCAGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCAGGGACAACG  
CCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGACGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCGAC  
TATTACTACGGCATGGACGTGTGGGGCCAGGGAACCACCGTGACCGTGTCTCTCC

[0272] (人IL-15 $\alpha$ sushi结构域)

[0273] ATCACGTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTACTCC  
AGGGAGCGGTACATTTGTAACCTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTGAACAA  
GGCCACGAATGTCGCCCACTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

[0274] (人IgG1 CH2-CH3(Fc)结构域)

[0275] GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG  
TCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT  
GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA  
AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT  
GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG  
GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT  
GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAG  
ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA  
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT  
CTCCTGGTAAATAA

[0276] 抗-人PD-L1 scAb/huIL-15 $\alpha$ Su/huIgG1 Fc融合蛋白(包括前导序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:4):

[0277] (前导序列)

[0278] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0279] (抗-人PD-L1 scAb)

[0280] (VL)

[0281] NIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQDISRWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFALTISSLQPEDFATYYCQQADSRFSITFGQGTRLEIKR

[0282] (链接头)

[0283] GGGSGGGSGGGGS

[0284] (VH)

[0285] EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSTIQYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARGDYGGMDVWGQGTITVTVSS

[0286] (人IL-15 $\alpha$ sushi结构域)

[0287] ITCPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIR

[0288] (人IgG1 CH2-CH3 (Fc) 结构域)

[0289] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0290] 在一些情况下,前导肽会从成熟多肽上剪切。

[0291] 2) 包括与huIL-15N72D和huIL-15 $\alpha$ Su/huIgG1 Fc链的N末端链接的第二抗-人PD-L1 (阿维鲁单抗(avelumab)) scAb的构建体的核酸和蛋白质序列如下所示。抗-人PD-L1scAb/IL-15N72D构建体的核酸序列(包含信号肽序列和终止密码子)如下(SEQ ID NO:5):

[0292] (信号肽)

[0293] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

[0294] (抗-人PD-L1 scAb)

[0295] (VL)

[0296] CAGTCCGCTCTGACCCAGCCTGCTTCCGTGTCCGGCTCCCCTGGACAGTCCATCACCATCTCCTGTACCGGCACCTCCTCCGATGTGGGCGGCTACAACCTACGTGTCCTGGTACCAGCAGCACCCCGGCAAAGCCCCAAGCTGATGATCTATGACGTGTCCAACCGGCCCTCCGGCGTGTCCAACAGGTTCTCCGGCTCCAAGTCCGGCAACACCGCCTCCCTGACAATCTCCGGCCTGCAGGCCGAGGATGAGGCTGACTACTGCTCCTCCTACACCTCCTCCTCCACCAGGGTGTTCCGGCACCGGCACCAAGGTGACCGTGCTG

[0297] (链接头)

[0298] GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

[0299] (VH)

[0300] GAGGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGAGGCGGACTGGTGCAGCCTGGAGGATCCCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCTCCTACATCATGATGTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTC



CTCCATCTACCCCTCCGGCGGCATCACCTTCTACGCCGATACCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCCGGGACAAC  
CCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGATCAAG  
CTGGGCACCGTGACCACAGTGGACTACTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCTCC

[0301] (人IL-15N72D)

[0302] AACTGGGTAAACGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATGCATATTGATGCT  
ACTTTATATACGAAAGTGATGTTACCCCAAGTGCAGAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTGGAGTTACAAGT  
TATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAAATCTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTTGT  
CTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAATATTAAAGAATTTTTG  
CAGAGTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTCAACACTTCTTAA

[0303] 抗-人PD-L1 scAb/IL-15N72D融合蛋白(包括信号肽序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:6):

[0304] (信号肽)

[0305] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0306] (抗-人PD-L1 scAb)

[0307] (VL)

[0308] QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSKSKS  
GNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTVL

[0309] (链接头)

[0310] GGGSGGGSGGGGS

[0311] (VH)

[0312] EVQLLESGLLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFT  
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGLTVTVSS

[0313] (人IL-15N72D)

[0314] NWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL  
ANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0315] 在一些情况下,前导肽会从成熟多肽上剪切。

[0316] 抗-人PD-L1 scAb/huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1 Fc构建体(包含前导序列)的核酸序列如下(SEQ ID NO:7):

[0317] (前导序列)

[0318] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

[0319] (抗-人PD-L1 scAb)

[0320] (VL)

[0321] CAGTCCGCTCTGACCCAGCCTGCTTCCGTGTCCGGCTCCCCTGGACAGTCCATCACCATCTCCTGTACC  
GGCACCTCCTCCGATGTGGGCGGCTACAACCTACGTGTCCTGGTACCAGCAGCACCCCGGCAAAGCCCCAAGCTGAT  
GATCTATGACGTGTCCAACCGGCCCTCCGGCGTGTCCAACAGGTTCTCCGGCTCCAAGTCCGGCAACACCGCCTCCC  
TGACAATCTCCGGCCTGCAGGCCGAGGATGAGGCTGACTACTGCTCCTCCTACACCTCCTCCTCCACCAGGGTG  
TTCGGCACCGGCACCAAGGTGACCGTGCTG

[0322] (链接头)

[0323] GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

[0324] (VH)

[0325] GAGGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGAGGCGGACTGGTGCAGCCTGGAGGATCCCTGAGGCTGTCCTGCGCT  
GCCTCCGGCTTCACCTTCTCCTCCTACATCATGATGTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTC  
CTCCATCTACCCCTCCGGCGGCATCACCTTCTACGCCGATACCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCCGGACAAC  
CCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGGGCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGATCAAG  
CTGGGCACCGTGACCACAGTGGACTACTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCTCTCC

[0326] (人IL-15 $\alpha$ sushi结构域)

[0327] ATCACGTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGACTCC  
AGGGAGCGGTACATTTGTAACCTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTTGAACAA  
GGCCACGAATGTCGCCCACTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

[0328] (人IgG1 CH2-CH3 (Fc) 结构域)

[0329] GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG  
TCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT  
GGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA  
AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT  
GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG  
GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT  
GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAG  
ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCA  
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT  
CTCCTGGTAAATAA

[0330] 抗人PD-L1 scAb/huIL-15 $\alpha$ Su/huIgG1 Fc融合蛋白(包含前导序列)的氨基酸序  
列如下(SEQ ID NO:8):

[0331] (前导肽)

[0332] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0333] (抗-人PD-L1 scAb)

[0334] (VL)

[0335] QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSNRFSKSKS  
GNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTVL

[0336] (链接头)

[0337] GGGGSGGGSGGGGS

[0338] (VH)

[0339] EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFT  
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGLTVTVSS

[0340] (人IL-15 $\alpha$ sushi结构域)

[0341] ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIR

[0342] (人IgG1 CH2-CH3 (Fc) 结构域)

[0343] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV  
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN

QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQ  
KSLSLSPGK

[0344] 在一些情况下,前导肽会从成熟多肽上剪切。

[0345] 3) 包括与huIL-15N72D和huIL-15R $\alpha$ Su/muIgG2A Fc链的N末端链接的抗-小鼠PD-L1scAb的构建体的核酸和蛋白质序列如下。抗-小鼠PD-L1 scAb/IL-15N72D构建体(包含信号肽序列和终止密码子)的核酸序列如下(SEQ ID NO:9):

[0346] (信号肽)

[0347] ATGACATGGACTCTACTATTCCTTGCCCTCCTTCATCACTTAACAGGGTCATGTGCCAGTTTGTGCTT  
ACTCAGCCAAACTCT

[0348] (抗-小鼠PD-L1 scAb)

[0349] (VL)

[0350] GTGTCTACGAATCTCGGAAGCACAGTCAAGCTGTCTTGCAACCGCAGCACTGGTAACATTGGAACAAT  
TATGTGAAGTGGTACCAGCAGCATGAAGGAAGATCTCCCACTCTGATTTATTGGGATGATAGGAGACCAGATGG  
AGTTCCTGACAGGTTCTCTGGCTCCATTGACAGATCTTCCAACCTCAGCCCTCCTGACAATCAATAATGTGCAGACTG  
AGGATGAAACTGACTACTTCTGTGCTAGTCTTACAGTAGTGGTATGTATATTTTCGGCGGTGGAACCAAGCTCACTGTC  
CTA

[0351] (链接头)

[0352] GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

[0353] (VH)

[0354] GAGGTTCACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTCAGTAAAGTTGTCCTGCAAA  
ACTTCTGGTTACACCTTCAGCAATTACTATATGAGTTGGTTGAAGCAGATGCCTGGACAGAATATTGAGTGGATCGG  
AAACATTTATGGTGGAAATGGTGGTGTGGCTATAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACAGTGGACAAAT  
CTTCCAGCACAGCGTACATGGATCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGCCTCTGCAGTCTATTTTTGTGCAAGGGTCGGA  
CTTCCCGGCCTTTTTGATTACTGGGGCCAGGGAGTCATGGTCACAGTCTCCTCA

[0355] (人IL-15N72D)

[0356] AACTGGGTGAATGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATGCATATTGATGCT  
ACTTTATATACGAAAGTGATGTTACCCCAAGTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGT  
TATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTTGT  
CTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAATATTAAAGAATTTTTG  
CAGAGTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTAA

[0357] 抗-小鼠PD-L1 scAb/IL-15N72D融合蛋白(包含信号肽序列)的氨基酸序列如下  
(SEQ ID NO:10):

[0358] (信号肽)

[0359] MTWTLFLAFLHHLTGSCAQFVLTPNS

[0360] (抗-小鼠PD-L1 scAb)

[0361] (VL)

[0362] VSTNLGSTVKLSCNRSTGNIGNNYVNWYQQHEGRSPTTLIYWDDRRPDGVPDRFSGSIDRSSNSALLTI  
NNVQTEDETDYFCQSYSSGMYIFGGGKLTVL

[0363] (链接头)

[0364] GGGGSGGGGSGGGG

[0365] (VH)

[0366] EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKTSGYTFSNYYMSWLKQMPGQNIIEWIGNIYGGNGGAGYNQKFKGKAT  
LTVDKSSSTAYMDLSSLTSEASAVYFCARVGLPGLFDYWGQGVMTVSS

[0367] (人IL-15N72D)

[0368] NWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL  
ANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0369] 在一些情况下,前导肽会从成熟多肽上剪切。

[0370] 抗-小鼠PD-L1 scAb/huIL-15R $\alpha$ Su/muIgG2A Fc构建体的核酸序列(包含前导序列)如下(SEQ ID NO:11):

[0371] (信号肽)

[0372] ATGACATGGACTCTACTATTCCTTGCCCTCCTTCATCACTTAACAGGGTCATGTGCCAGTTTGTGCTT  
ACTCAGCCAACTCT

[0373] (抗-小鼠PD-L1 scAb)

[0374] (VL)

[0375] GTGTCTACGAATCTCGGAAGCACAGTCAAGCTGTCTTGCAACCGCAGCACTGGTAACATTGGAAACAAT  
TATGTGAAGTGGTACCAGCAGCATGAAGGAAGATCTCCCACTCTGATTTATTGGGATGATAGGAGACCAGATGG  
AGTTCCTGACAGGTTCTCTGGCTCCATTGACAGATCTTCCAACCTCAGCCCTCCTGACAATCAATAATGTGCAGACTG  
AGGATGAAACTGACTACTTCTGTCTAGTCTTACAGTAGTGGTATGTATATTTTCGGCGGTGGAACCAAGCTCACTGTC  
CTA

[0376] (链接头)

[0377] GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

[0378] (VH)

[0379] GAGGTTCACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTAAAGTTGTCCTGCAAA  
ACTTCTGGTTACACCTTCAGCAATTACTATATGAGTTGGTTGAAGCAGATGCCTGGACAGAATATTGAGTGGATCGG  
AAACATTTATGGTGGAAATGGTGGTGTGGCTATAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCCACTGACAGTGGACAAAT  
CTTCCAGCACAGCGTACATGGATCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGCCTCTGCAGTCTATTTTTGTGCAAGGGTCGGA  
CTTCCCGCCTTTTTGATTACTGGGGCCAGGGAGTCATGGTCACAGTCTCCTCA

[0380] (人IL-15R $\alpha$ sushi结构域)

[0381] ATCACGTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGACTCC  
AGGGAGCGGTACATTTGTAACCTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTTGAACAA  
GGCCACGAATGTCGCCCCTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

[0382] (小鼠IgG2a CH2-CH3结构域)

[0383] GAACCAAGAGGGCCCAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAATGCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGA  
CCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGT  
GGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGA  
CACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCACTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATG  
AGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCCAGCGCCATCGAGAGAACCATCTCAAAACCCAA  
AGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGA

CCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTAC  
AAGAACACTGAACCAGTCTGGAAGTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAAGT  
GGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTTCTGAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGACTAAGAGCTTCTCCC  
GGAAGTCCAGGTAAATAA

[0384] 抗-小鼠PD-L1 scAb/huIL-15R $\alpha$ Su/muIgG2A Fc融合蛋白(包含前导序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:12):

[0385] (信号肽)

[0386] MTWLLFLAFLHHLTGSCAQFVLTQPNS

[0387] (抗-小鼠PD-L1 scAb)

[0388] (VL)

[0389] VSTNLGSTVKLSCNRSTGNIGNNYVNWYQQHEGRSPTTLIYWDDRRPDGVPDRFSGSIDRSSNSALLTI  
NNVQTEDETDFCQSYSSGMYIFGGGTKLTVL

[0390] (链接头)

[0391] GGGSGGGSGGGGS

[0392] (VH)

[0393] EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKTSGYTFSNYMSWLKQMPGQNIIEWIGNIYGGNGGAGYNQKFKGKAT  
LTVDKSSSTAYMDLSSLTSEASAVYFCARVGLPGLFDYWGGVMVTVSS

[0394] (人IL-15R $\alpha$ sushi结构域)

[0395] ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

[0396] (小鼠IgG2a CH2-CH3结构域)

[0397] EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVE  
VHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMGKEFKCKVNNKDLPAIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTK  
KQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHT  
TKSFSRTPGK

[0398] 在一些情况下,前导肽会从成熟多肽上剪切。

[0399] 如前所述(美国专利-专利号8,507,222,通过引用并入本文)将抗-PD-L1 scAb/  
IL-15N72D和抗-PD-L1 scAb/IL-15R $\alpha$ Su/Fc序列克隆到表达载体中,并且将表达载体转染  
进入CHO细胞。两种构建体在CHO细胞中的共表达允许可溶性抗-PD-L1 scAb/IL-15N72D:  
抗-PD-L1scAb/IL-15R $\alpha$ Su/Fc复合体的形成和分泌,并从CHO细胞培养物上清液中使用蛋白  
A亲和层析纯化该复合体。

[0400] 纯化的抗-PD-L1 scAb/IL-15N72D:抗-PD-L1 scAb/IL-15R $\alpha$ Su/Fc蛋白复合体的  
SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳)分析结果显示于图3。观察到分别对应于  
~60kDa和~40kDa的可溶性抗-小鼠PD-L1 scAb/huIL-15R $\alpha$ Su/muIgG2A蛋白和抗-小鼠PD-  
L1scAb/IL-15N72D蛋白的条带。

[0401] 实施例2:PD-L1 TxM活性的体外特性分析

[0402] 基于ELISA的方法证实了PD-L1 TxM复合体的形成。在图4A中,在来自转染的CHO细  
胞的培养物上清液中,融合蛋白复合体抗-人PD-L1 scAb/IL-15N72D:抗-人PD-L1 scAb/  
huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1 Fc被检测到,检测是使用huIgG1/huIL15特异性ELISA,其用到了捕获  
抗体,抗-人IgG抗体(杰克森免疫研究(Jackson ImmunoResearch))和检测抗体,生物素化

的抗-人IL-15抗体(BAM 247,R&D Systems)。上述结果与对照样品(仅使用未转染的CHO细胞的培养基上清液)比较,在来自转染的CHO细胞的培养物上清液中观察到的增加的信号验证了PD-L1 TxM复合体的形成。第二种抗-人PD-L1 scAb/IL-15N72D:抗-人PD-L1scAb/huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1 Fc融合蛋白复合体(阿维鲁单抗/avelumab TxM)也得到了类似的实验结果(图4B)。

[0403] 对于小鼠特异性PD-L1 TxM,此融合蛋白复合体的检测是使用mIgG2a特异性或huIL15特异性ELISA,其具有捕获抗体分别为,AffiniPure驴抗-小鼠IgG(杰克森免疫研究)或人/灵长类IL15抗体(MAB647,R&D Systems)和检测抗体分别为,辣根过氧化物酶AffiniPure<sup>®</sup>驴抗小鼠IgG(杰克森免疫研究)或生物素化的抗-人IL-15抗体(BAM 247,R&D Systems)(图4C)。与阳性对照相比,抗体对纯化的小鼠特异性PD-L1 TxM的反应性验证了复合体的形成。

[0404] 这些融合蛋白复合体结合肿瘤细胞上的PD-L1的能力亦被检查。使用承载受体的MB231肿瘤细胞,以流式细胞仪评估人特异性PD-L1 TxM的结合。在这些研究中, $1 \times 10^5$ 个细胞用PD-L1TxM复合体染色。如图5A所示,流式细胞仪分析展示,当PD-L1 TxM复合体结合到MB231细胞上时,即被所用的APC(Allophycocyanin别藻蓝蛋白)偶联的小鼠抗-人Fc Ab(生物传奇Biolegend)检测到。如图5B所示,该结合的特异性的测试是通过用PD-L1 TxM复合体去阻断市售APC偶联的抗-人PD-L1 Ab(生物传奇)对MB231细胞的染色。类似地,流式细胞仪分析展示了基于avelumab的PD-L1 TxM复合体与MB231肿瘤细胞的结合(图5C)。

[0405] 为了评估小鼠特异性PD-L1 TxM复合体的结合,PD-L1阳性的5T33P骨髓瘤和MB49luc膀胱肿瘤细胞( $5 \times 10^5$ 个细胞/测试)最初用PE(Phycoerythrin,藻红蛋白)或Brilliant Violet<sup>®</sup>标记的抗-小鼠PD-L1 Ab染色( $2 \mu\text{g}/\text{test}$ , $100 \mu\text{L}$ 体积)(图6A和图6B)。该结合的特异性的测试是通过添加纯化的小鼠特异性PD-L1 TxM复合体来阻断抗体与PD-L1配体的结合。纯化的抗-mPD-L1 Ab(S1-PD-L1)被用作阳性对照。有趣的是,PD-L1 TxM复合体被发现比等同量的抗-PD-L1 Ab更好地阻断肿瘤细胞上的PD-L1染色。此发现被进一步的阻断研究评估,其使用A20 B细胞淋巴瘤细胞。滴定分析指出,就阻断与肿瘤细胞表面上表达的PD-L1的相互作用来讲,相比抗-PD-L1 Ab,PD-L1 TxM的效果至少提高了5倍(图7A和图7B)。

[0406] 为了评估PD-L1 TxM复合体的IL-15免疫刺激活性,评估了IL-15依赖性的32D $\beta$ 细胞(小鼠造血细胞系)的增殖。渐增水平的PD-L1 TxM被加入32D $\beta$ 细胞( $10^4$ 细胞/孔)中,并在2天后使用WST-1增殖试剂确定细胞增殖。如图8所示,剂量依赖性的32D $\beta$ 细胞增殖的增加是由PD-L1 TxM所介导,验证了该复合体的免疫刺激活性。

[0407] 进行了进一步的研究以评估不同形式的PD-L1 TxM复合体的特征和活性。包括抗-PD-L1scAb/IL-15N72D蛋白和抗-PD-L1 scAb/IL-15R $\alpha$ Su/Fc蛋白的复合体预计会有四个抗-PD-L1scAb结合结构域(即,4头(4H)),而包括IL-15N72D蛋白和抗-PD-L1scAb/IL-15R $\alpha$ Su/Fc蛋白的复合体预计会有两个抗-PD-L1 scAb结合结构域(即2头(2H))(图9A)。与2H TxM相比,4H TxM与靶细胞的结合有更高的亲和力,基于这一点,这些复合体预计会具有不同的活性。蛋白质与IL-15N72D的融合已显示会降低IL-15的生物学活性。因此,4H TxM型式预计会具有比2H TxM更低的IL-15活性。这些差异预计在如下情况中可提供好处,当优选需要高(抗体样)靶向和较低的免疫刺激活性(即4H TxM型式)时,或当优选需要较低靶向和较

高免疫刺激活性(免疫细胞因子)时。

[0408] 为了评估这些型式,通过分别用抗-小鼠PD-L1 scAb/IL-15N72D和抗-小鼠PD-L1scAb-/IL-15 $\alpha$ Su/Fc表达载体、或IL-15N72D和抗-小鼠PD-L1 scAb-/IL-15 $\alpha$ Su/Fc表达载体去转染CHO细胞,分别生成了4H小鼠特异性PD-L1 TxM(2C2)和2H小鼠特异性PD-L1 TxM(PDN3)。然后,TxM复合体从转染的CHO细胞上清液中通过蛋白A层析被纯化,并通过还原性SDS-PAGE(注:在将样品跑SDS-PAGE跑电泳前,以还原剂对该样品做还原处理)评估纯化的蛋白质(图9B)。对应可溶性抗-小鼠PD-L1 scAb/huIL-15 $\alpha$ Su/muIgG2A、抗-小鼠PD-L1scAb/IL-15N72D和IL-15N72D蛋白的条带分别在约60kDa、约40kDa和约16kDa被观察到。此外,当以分析型尺寸排阻层析(SEC)被分析时,纯化的4H PD-L1 TxM(2C2)和2H PD-L1TxM(PDN3)复合体以单个蛋白质峰迁移(图9C和图9D)。这些结果指出,两种不同的PD-L1 TxM复合体可以被生产并纯化,以作为具有预期结构性质的可溶性蛋白质。

[0409] 与上述研究类似,这些融合蛋白复合体结合免疫细胞上的IL-2R $\beta$ /  $\gamma$  和肿瘤细胞上的PD-L1的能力被检查。IL-2R $\beta$ /  $\gamma$  阳性的32D $\beta$ 细胞与4H PD-L1 TxM(2C2)、2H PD-L1 TxM(PDN3)或对照ALT-803复合体一起温育。接下来是洗涤步骤,加入抗-人IL-15Ab-PE(或同型对照Ab)以通过流式细胞仪检测结合的TxM/ALT-803复合体。如图10A所示,与对照相比,4H PD-L1TxM(2C2)、2H PD-L1 TxM(PDN3)和ALT-803蛋白能够结合32D $\beta$ 细胞。为了评估与PD-L1的结合,PD-L1阳性5T33P骨髓瘤细胞最初用Brilliant Violet 421(BV421)标记的抗-小鼠PD-L1 Ab(10F.9G2)染色。该结合的特异性的测试是通过添加纯化的4H PD-L1 TxM(2C2)和2H PD-L1 TxM(PDN3)复合体,以阻断BV421抗体与PD-L1配体的结合(图10B和图10C)。纯化的抗-mPD-L1 Ab(NJI6)被用作阳性对照。与其更高的亲合力一致,1 $\mu$ g的4H PD-L1 TxM在阻断抗-PD-L1 Ab染色方面与6 $\mu$ g 2H PD-L1 TxM一样有效。这些结果证实4H PD-L1和2HPD-L1 TxM复合体保留了IL-2R $\beta$ /  $\gamma$  和PD-L1的靶标结合活性。

[0410] 如上所述,小鼠特异性4H PD-L1和2H PD-L1 TxM复合体的IL-15免疫刺激活性的确定是基于IL-15依赖性32D $\beta$ 细胞的增殖。如图11A和图11B所示,剂量依赖性的32D $\beta$ 细胞增殖的增加是由4H PD-L1或2H PD-L1 TxM复合体所介导,验证了这些TxM型式的免疫刺激活性。与ALT-803相比,2H PD-L1 TxM复合体(PDN-3)展现出略有下降的IL-15生物活性,而4H PD-L1 TxM复合体(2C2)展现出降低约30倍的IL-15生物活性。此结果与先前的结合结构域-IL-15N72D融合蛋白的较低IL-15活性一致。

[0411] 在4H人特异性PD-L1 TxM和2H人特异性PD-L1 TxM复合体上进行了类似的研究。这些蛋白质通过如下步骤生成,分别用抗-人PD-L1 scAb/IL-15N72D和抗-人PD-L1

[0412] scAb-/IL-15 $\alpha$ Su/Fc表达载体、或IL-15N72D和抗-人PD-L1 scAb-/IL-15 $\alpha$ Su/Fc表达载体去转染CHO细胞,然后经由蛋白A层析从细胞培养物上清液中纯化。还原性SDS-PAGE分析证实了纯化的4H人特异性PD-L1 TxM和2H人特异性PD-L1 TxM制备中的预期的蛋白质条带(图12A)。类似地,分析型SEC(尺寸排阻层析)指出纯化的4H人特异性PD-L1 TxM和2H人特异性PD-L1 TxM复合体各自以单一蛋白质峰而迁移(图12B和图12C)。

[0413] 这些融合蛋白复合体结合肿瘤细胞上的PD-L1的能力被检查。在有或无10nM纯化的人特异性4H PD-L1 TxM、2H PD-L1 TxM或对照2H抗-CD20 scAb(2B8)TxM复合体的条件下,用APC标记的抗-小鼠PD-L1 Ab去染色PD-L1阳性的PC-3人前列腺癌细胞(图13)。结果显示人特异性4H PD-L1和2H PD-L1 TxM复合体能够阻断抗-PD-L1 Ab与人肿瘤细胞的结合,

而对照TxM复合体则不能。与先前的结果一致,4H PD-L1 TxM复合体显示出比2H PD-L1 TxM复合体更好的结合活性。这些结果证实人特异性4H PD-L1和2H PD-L1 TxM复合体保留了对人肿瘤细胞的PD-L1的靶结合活性。

[0414] 如上所述,人特异性4H PD-L1和2H PD-L1 TxM复合体的IL-15免疫刺激活性的确定是基于IL-15依赖性32D $\beta$ 细胞的增殖。如图14A和图14B所示,剂量依赖性的32D $\beta$ 细胞增殖的增加是由4H PD-L1或2H PD-L1 TxM复合体所介导,验证了这些TxM型式的免疫刺激活性。与ALT-803相比,2H PD-L1 TxM复合体展现出略有下降的IL-15生物活性;而与ALT-803相比,4H PD-L1 TxM复合体展现出降低约5倍的IL-15生物活性。这与先前的结合结构域-IL-15N72D融合蛋白的较低IL-15活性一致。

[0415] 实施例3:PD-L1 TxM在体外和体内的免疫刺激和抗肿瘤活性

[0416] PD-L1 TxM在体内刺激免疫应答的能力在小鼠中被评估。C57BL/6小鼠被皮下注射以:200 $\mu$ l of PBS,ALT-803(0.4mg/kg,对照),4H小鼠特异性PD-L1 TxM(200 $\mu$ g,2C2(T4M-mPD-L1))或2H小鼠特异性PD-L1 TxM(200 $\mu$ g,PDN3(T2M-mPD-L1))。于该处置的3天后,提取脾脏和淋巴结。脾细胞和淋巴细胞被制备,然后使用抗-CD4、CD8、NK和CD19 Abs对免疫细胞亚群染色,并用于流式细胞仪分析。如图15A所示,经ALT-803、2H PD-L1 TxM和4H PD-L1 TxM的处理都诱导脾脏重量的增加,这与这些蛋白质的免疫刺激活性一致。特别地,经2H PD-L1 TxM的处理诱导的脾脏重量增加比4H PD-L1 TxM更多,这与用这些复合体观察到的IL-15活性的差异一致。与PBS对照组相比,经2H PD-L1 TxM和4H PD-L1 TxM的处理亦导致小鼠脾和淋巴结中CD8 T细胞和NK细胞的百分比增加(图15B和图15C)。这些免疫应答与这些TxM复合体的IL-15生物活性一致。

[0417] 此外,PD-L1 TxM刺激针对肿瘤细胞的免疫细胞细胞毒性的能力在体外被评估。根据制造商的说明,PD-L1阳性细胞被CellTrace Violet(Invitrogen)标记,并与免疫效应细胞(即脾细胞)在一起培养,其中效应细胞与靶标(细胞)5T33P骨髓瘤(细胞)的比例为10:1,而培养条件为在R10培养基(RPMI-1640with 10%胎牛血清(fetal calf serum))中并在37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>下。通过用抗-CD3 Ab(2C11:4 $\mu$ g/ml)刺激Pmel小鼠脾细胞3天来制备效应细胞。将肿瘤和效应细胞与小鼠特异性PD-L1 TxM一起温育4天,然后通过流式细胞仪分析以确定靶细胞的存活率。PBS作为阴性对照,ALT-803(IL-15N72D:IL-15R $\alpha$ /Fc)、抗PD-L1 Ab和ALT-803+anti-PD-L1 Ab作为阳性对照。如图16所示,与PBS处理相比,在含有2.1 $\mu$ g PD-L1TxM的实验组中发现对5T33P肿瘤细胞有显著杀死。

[0418] 类似的体外抗肿瘤活性的评估使用了人特异性2H PD-L1 TxM和4H PD-L1 TxM复合体。来自两个不同供体的人NK细胞用来自Stemcell Technologies(干细胞科技)的NK细胞分离试剂盒从肤色血球层(成分为白细胞和血小板)中纯化,并用作效应细胞。PD-L1阳性人胰腺肿瘤细胞SW1990被以CellTrace Violet标记并用作靶细胞。人NK细胞和SW1990肿瘤细胞以5:1的E:T(effector:target,效应细胞:靶细胞)比例在仅培养基中混合,或在含有50nM抗-人PD-L1 Ab(对照)、人特异性2H PD-L1 TxM复合体或4H PD-L1 TxM复合体的培养基中混合。40小时后,靶细胞死亡的百分比以流式细胞仪评估,其基于Violet标记的靶细胞的碘化丙啶染色。如图17所示,与未经处理的NK细胞或经抗-人PD-L1 Ab处理的NK细胞(即传统的ADCC)相比,与人特异性2H PD-L1 TxM或4H PD-L1 TxM复合体一起温育的人NK细胞能够介导更强的对抗PD-L1阳性人肿瘤细胞的细胞毒性。这些结果代表,与抗-PD-L1 Abs相



比,PD-L1 TxM复合体的免疫细胞介导的靶向抗肿瘤活性的显着改善。

[0419] 原位5T33P骨髓瘤模型被用于评估PD-L1 TxM在承载肿瘤的动物中的效能。在第0天,雌性C57BL/6NHsd小鼠(4只小鼠/组)被静脉内注射5T33P骨髓瘤细胞( $1 \times 10^7$ /小鼠)。然后在第7天和第14天,以皮下给药,给予低剂量的PD-L1 TxM(0.11mg/kg,摩尔等值剂量为0.05mg/kg ALT-803)或高剂量的PD-L1 TxM(52.5 $\mu$ g/剂,摩尔等值剂量为25 $\mu$ g/剂抗-PD-L1 Ab)。ALT-803(0.15mg/kg)和ALT-803(0.05mg/kg)+抗-PD-L1 Ab(25 $\mu$ g/剂)作为阳性对照,PBS作为阴性对照。存活率(或后腿瘫痪的发病率)的监测作为研究终点。明显地,与PBS处理相比,高剂量PD-L1 TxM(52.5 $\mu$ g/小鼠)处理被发现延长了载瘤小鼠的存活(图18)。该效果与用ALT-803+抗-PD-L1 Ab组合疗法所观察到的效果相当。载瘤的动物经PD-L1 TxM处理后,未观察到明显的毒性。

[0420] 此外,PD-L1 TxM复合体的抗肿瘤活性在承载原位MB491uc肿瘤的小鼠中被评估。在第0天,以膀胱内灌注将MB491uc膀胱肿瘤细胞( $3 \times 10^4$ /小鼠)引入C57BL/6NHsd小鼠(6只小鼠/组)的膀胱中。在第7、11、14和18天,用小鼠特异性2H PD-L1 TxM(2.8mg/kg)皮下注射载瘤小鼠。ALT-803处理(0.2mg/kg, subQ皮下)和ALT-803(0.2mg/kg, subQ)+抗-PD-L1Ab(50  $\mu$ g/dose, subQ)作为阳性对照,PBS作为阴性对照。存活率(或发病率)的监测作为研究终点。如图19所示,与PBS处理相比,2H PD-L1 TxM处理被发现延长了承载MB491uc肿瘤小鼠的存活。2H PD-L1 TxM的抗肿瘤效果与用ALT-803和ALT-803+抗-PD-L1 Ab的阳性对照所观察到的效果同样好或更佳。

[0421] 实施例4:包括抗-CTLA4结合结构域(CTLA4 TxM)和抗-PD-1结合结构域(PD-1TxM)的基于IL-15的融合蛋白复合体的生成

[0422] 与实施例1至3中描述的融合蛋白复合体类似,包括辨识CTLA4和PD-1的结合域的本发明的融合蛋白复合体已经被生成。具体地,构建体的制备为,将单链抗-CTLA4抗体与huIL-15N72D和IL-15 $\alpha$ Su/Fc链链接。抗-CTLA4单链抗体(抗-CTLA4scAb)序列包括经由柔性链接序列链接的该抗体的重链和轻链V(可变)抗体结构域的编码区。单链抗体结构域可以以VH-链接头-VL或VL-链接头-VH型式排列。在一些情况下,抗-CTLA4scAb是与IL-15N72D和/或IL-15 $\alpha$ Su/Fc链的C末端链接。在其他情况下,抗-CTLA4是与IL-15N72D和/或IL-15 $\alpha$ Su/Fc链的N末端链接。在这些构建体中,对小鼠或人的CTLA4分子有特异性的抗-CTLA4scAb被使用。

[0423] 抗-人CTLA-4scAb/huIL-15 $\alpha$ Su/huIgG1 Fc构建体的核酸序列(包含前导序列)如下(SEQ ID NO:13):

[0424] (信号肽)

[0425] ATGAAGTGGGTGACCTTTATCTCCCTGCTGTTTCCTGTTTTCTCCGCCTACAGC-

[0426] (抗-人CTLA-4 scAb)

[0427] (VL)

[0428] ATCGTGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGAGCGCTAGCGTGGGAGACCGGGTGACCATCACCTGTCGGGCTCCAGAGCATTTCCAGCTACCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATTTACGGTGCCAGCAGCCTGCAGTCCGGAGTGCCTCCCAGGTTTAGCGGCTCCGGATCCGGCACCGAGTTCACCCTGACCATCTCCTCCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCAGCAGGCCAACAGCTTTCCCCCACCTTTGGCCAAGGAACCAAGGTGGACATCAAGAGGACCGTGGCC

[0429] (链接头)

[0430] GGAGGCGGAGGCTCCGGCGGGCGGCTCCGGCGGGCGGCTCC

[0431] (VH)

[0432] CTGGTGCAGTCCGGCGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGCGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCGAGGCCTCCGGC  
TACACCTTCACCAACTACTACATCCACTGGCTGAGGCAGGCTCCTGGACAGGGCCTGGAGTGGATGGGCATCATCAA  
CCCCTCCGGAGGCTCCACCACCTACGCCCAGAAGTTCCAGGGCAGGATCACCATGACAAGGGACACCTCCACCAACA  
CCCTGTACATGGAAGTGTCTCCCTCCGGTCCGAGGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAGGAGGGATTGCAGGGGC  
CCTAGCTGCTACTTCGCTTACTGGGGCCAGGGAACACCGTGACCGTGTCTCCGCCTCCACCAAGGGC

[0433] (人IL-15 $\alpha$ sushi结构域)

[0434] ATCACGTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTACTCC  
AGGGAGCGGTACATTTGTAAGTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGTTGAACAA  
GGCCACGAATGTCGCCCCTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

[0435] (人IgG1 CH2-CH3 (Fc) 结构域)

[0436] GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG  
TCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT  
GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA  
AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGGCTGAAT  
GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGG  
GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCT  
GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAG  
ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCA  
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT  
CTCCTGGTAAATAA

[0437] 人CTLA-4scAb/huIL-15 $\alpha$ Su/huIgG1 Fc蛋白(包含前导序列)的氨基酸序列如下  
(SEQ ID NO:14):

[0438] (信号肽)

[0439] MKWVTFISLLFLFSSAYS-

[0440] (抗-人CTLA-4 scAb)

[0441] (VL)

[0442] IVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPPRFSGSGSGTE  
FTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPPTFGQGTKVDIKRTVA

[0443] (链接头)

[0444] GGGGSGGGSGGGGS

[0445] (VH)

[0446] LVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYTFTNYYIHWLRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTTYAQKFQGRITMTR  
DTSTNTLYMELSSLRSEDTAIYYCARRDCRGPSCYFAYWGQGTTVTVSSASTKG

[0447] (人IL-15 $\alpha$ sushi结构域)

[0448] ITCPPMSVEHADIWKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIR

[0449] (人IgG1 CH2-CH3 (Fc) 结构域)

[0450] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0451] 在一些情况下,前导肽会从成熟多肽上剪切。

[0452] 类似地,抗-小鼠CTLA-4scAb/huIL-15 $\alpha$ Su/mIgG2a构建体的核酸序列(包含前导序列)如下(SEQ ID NO:15):

[0453] (信号肽)

[0454] ATGAAGTGGGTAACCTTTATTTCCCTTCTTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATTCC

[0455] (抗-小鼠CTLA-4 scAb)

[0456] (VL)

[0457] GACATCATGATGACCCAGTCCCCTTCTCCCTGTCCGTGAGCGCTGGCGAGAAGGCTACCATCAGCTGCAAGTCCTCCAGTCCCTGTTCAACAGCAACGCCAAGACCAACTACCTGAACTGGTACCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCAAGCTGCTGATCTATTACGCTAGCACCAGGCATACCGCGGTGCCCGACAGGTTTAGGGGATCCGGCAGCGGCA CCGACTTCACCCTGACCATCTCCAGCGTGACAGGACGAGGACCTCGCTTTCTACTACTGCCAGCAATGGTACGATTAC CTTACACCTTCGGCGCTGGCACCAAGGTGGAGATTAAGAGG

[0458] (链接头)

[0459] GGGCGAGGCGGATCCGGCGGGCGGCTCCGGCGGGCGGAGGCTCC

[0460] (VH)

[0461] CAGATTGAGCTGCAGGAGTCCGGCCCTGGACTGGTCAACCCTAGCCAGTCCCTGAGCCTGTCCTGTTCCGTGACAGGCTATAGCATCACCAGCGGCTACGGCTGGAAGTGGATCAGGCAGTTTCCCGGCCAGAAAGTGGAGTGGATGGGCTTCATCTACTACGAGGGCTCCACCTACTATAACCCCTCCATCAAGTCCCGGATCAGCATCACCAGGGATACCTCCAAGAACCAGTTCTTCTGCAAGTCAACTCCGTGACCACCGAAGACACCGCCACCTACTACTGCGCCAGGCAGACAGGCTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACAATGGTGACCGTCAGCAGCGCC

[0462] (人IL-15 $\alpha$ sushi结构域)

[0463] ATCACGTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAAGTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTGAACAAAGGCCACGAATGTCGCCCAGTGGACAACCCCAAGTCTCAAATGCATTAGA

[0464] (小鼠IgG2a CH2-CH3结构域)

[0465] GAACCAAGAGGGCCACAATCAAGCCCTGTCTCCATGCAAATGCCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCCAGCGCCATCGAGAGAACCATCTCAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAGTCTGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTTCAAGTGGTCCACGAGGTCTGCACAATCACCACAGCTAAGAGCTTCTCCCGACTCCAGGTAAATAA

[0466] 抗-小鼠CTLA-4scAb/huIL-15R $\alpha$ Su/mIgG2a融合蛋白(包含前导序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:16):

[0467] (信号肽)

[0468] MKWVTFISLLFLFSSAYS-

[0469] (抗-小鼠CTLA-4 scAb)

[0470] (VL)

[0471] DIMMTQSPSSLSVSAGEKATISCKSSQSLFNSNAKTNYNWYLQKPGQSPKLLIYYASTRHTGVPDRFR  
GSGSGTDFLTISSVQDEDLAFYYCQQWYDYPYTFGAGTKVEIKR

[0472] (链接头)

[0473] GGGSGGGSGGGGS

[0474] (VH)

[0475] QIQLQESGPGLVNPSQSLSLSCSVTGYSITSGYGWNWIRQFPGQKVEWMGFIYYEGSTYYNPSIKSRI  
SITRDTSKNQFFLQVNSVTTEDTATYYCARQTGYFDYWGGQTMVTVSSA-

[0476] (人IL-15R $\alpha$ sushi结构域)

[0477] ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

[0478] (小鼠IgG2a CH2-CH3结构域)

[0479] EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVNNVE  
VHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTK  
KQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHT  
TKSFSRTPGK

[0480] 在一些情况下,前导肽会从成熟多肽上剪切。

[0481] 如上所示,抗-人和抗-小鼠的CTLA4 scAb结构域作为与IL-15N72D蛋白的融合也已经被生成。

[0482] 类似地,抗-人PD1 scAb/IL-15N72D构建体的核酸序列(包含信号肽序列和终止密码子)如下(SEQ ID NO:17):

[0483] (信号肽)

[0484] ATGGAATGGAGCTGGGTGTTCTTCTGTCCGTGACCACCGGTGTCCACTCC

[0485] (抗-人PD1 scAb)

[0486] (VL)

[0487] CTGCCTGTGCTGACTCAACCACCCTCGGTGTCTGAAGTCCCCGGGCAGAGGGTCACCATTTCTGTTCT  
GGAGGCATCTCCAACATCGGAAGCAATGCTGTAACTGGTACCAGCACTTCCCAGGAAAGGCTCCCAAACCTCCTCAT  
CTATTATAATGATCTGCTGCCCTCAGGGGTCTCTGACCGATTCTCTGCCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGG  
CCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTACTGTGCAGCATGGGATGACAATCTGAGTGCTTATGTC  
TTCGCAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTGAGT

[0488] (链接头)

[0489] GGAGGTGGCGGATCCGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

[0490] (VH)

[0491] CAGGTTTCTGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG  
GCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGG

ATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACAT  
CCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGTTA  
TACGGTGACGAGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTGAGCTCA

[0492] (人IL-15N72D)

[0493] AACTGGGTAAACGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATGCATATTGATGCT  
ACTTTATATACGGAAGTGATGTTACCCCGAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAGT  
TATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTTGT  
CTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAATATTAAAGAATTTTTG  
CAGAGTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTAA

[0494] 抗-PD1 scAb-IL-15N72D融合蛋白(包含信号肽序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:18):

[0495] (信号肽)

[0496] MEWSWVFLFFLSVTTGVHS-

[0497] (抗-人PD1 scAb)

[0498] (VL)

[0499] LPVLTQPPSVSEVPGQRTVISCSSGGISNIGSNAVNWYQHFPKGKPKLLIYYNDLLPSGVSDRFSASKSG  
TSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDNLSAYVFATGKVTVLS

[0500] (链接头)

[0501] GGGGSGGGGSGGGGS

[0502] (VH)

[0503] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVT  
MTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGLYGDEYWGQGLTVTVSS

[0504] (人IL-15N72D)

[0505] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL  
ANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0506] 在一些情况下,前导肽会从成熟多肽上剪切。如上所示,抗-人PD-1scAb结构域作为与huIL-15R $\alpha$ Su/Fc构建体的融合已被生成。

[0507] 如实施例1和之前所述(实施例1和2中的美国专利-专利号8,507,222,通过引用并入本文)序列被克隆到表达载体中,并将该表达载体转染到CHO细胞中。在一些情况下,用编码huIL-15N72D和huIL-15R $\alpha$ Su/Fc两种融合蛋白的载体转染CHO细胞,而该两种融合蛋白具有相同或不同(即抗-PD-L1和抗-CTLA4 scAb)的结合结构域。使用如上所述的蛋白A亲和层析从CHO细胞培养物上清液中纯化融合蛋白复合体。

[0508] 除了上述的抗-人PD-1scAb/抗-人CTLA-4scAb TxM复合体外,通过使用包括抗-人PD-L1scAb/IL-15N72D(SEQ. ID NO:1)和抗-人CTLA-4scAb/huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1 Fc((SEQ ID NO:15)构建体的表达载体对CHO细胞进行共转染,生成了抗-人PD-L1 scAb/抗-人CTLA-4scAb TxM复合体。使用如上所述的蛋白A亲和层析从CHO细胞培养物上清液中纯化这些融合蛋白复合体。

[0509] 实施例5:包括其他结合结构域的基于IL-15的融合蛋白的生成

[0510] 与实施例1至4中描述的融合蛋白复合体类似,已经生成了包括辨识CD47、GITR、

ssDNA和其他疾病相关靶标(即CD20,CD19等)的结合结构域的本发明的融合蛋白复合体。

[0511] CD47是一种细胞表面分子,其促进免疫逃脱是通过吸引(engaging)信号调节蛋白 $\alpha$ (SIRP $\alpha$ ),其作为巨噬细胞的抑制性受体。这种“不要吃我的信号”可以通过阻断CD47和SIRP $\alpha$ 的相互作用而被破坏,因此复原了通过巨噬细胞的抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。本发明的IL-15结构域活化并扩增NK和CD8<sup>+</sup>细胞,同时增加它们的细胞溶解活性。在足够高的浓度下,本发明的Fc区可以分别与NK细胞和巨噬细胞上的Fc $\gamma$ 受体相互作用,该相互作用分别涉及ADCC或ADCP。此实施例描述了融合蛋白复合体的生成和初始特性分析,所述融合蛋白复合体包括纳体的Vh区(NbVh;PNAS2016 113(19)E2646-E2654)以阻断CD47/SIRP $\alpha$ 通路、通过IL-15结构域活化NK和CD8<sup>+</sup>细胞、并允许经由Fc介导的ADCC/ADCP以清除肿瘤。如下文详述的,包括抗-小鼠CD47 NbVh/huIL-15N72D和抗-小鼠CD47NbVh/huIL-15 $\alpha$ Su/mIgG2a Fc的蛋白质复合体被生成。

[0512] 具体地,构建体的制备是将抗-小鼠CD47 NbVh与huIL-15N72D链链接。抗-小鼠CD47 NbVh序列包括一羊驼纳体的重链可变结构域的编码区。抗-小鼠CD47 NbVh与huIL-15N72D的N末端链接。包括与huIL-15N72D的N-末端链接的抗-小鼠CD47 NbVh的构建体的核酸和蛋白质序列如下所示。

[0513] 抗-小鼠CD47 NbVh/huIL-15N72D构建体的核酸序列(包含信号肽序列)如下(SEQ ID NO:19):

[0514] (信号肽)

[0515] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

[0516] (抗-小鼠CD47纳体(nanobody)的Vh链)

[0517] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGCCTGGTGGAGCCTGGAGGATCCCTGAGGCTGTCCTGTGCCGCCAGCGGCATCATCTTCAAGATCAACGACATGGGCTGGTATCGGCAGGCCCTGGCAAAAGGAGGGAGTGGGTGGCGCTTCCACAGGAGGCGATGAGGCCATCTACAGGGACTCCGTGAAGGACAGGTTACCATCTCCAGGGACGCCAAGA ACTCCGTGTTCTGCAGATGAACTCCCTGAAGCCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCACCGCCGTGATCTCCACC GATAGGGACGGCACCGAGTGGAGGAGGTACTGGGGCCAGGGCACACAGGTGACTGTGTCCTCCGGCGGC

[0518] (人IL-15N72D)

[0519] AACTGGGTAAACGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATGCATATTGATGCT ACTTTATATACGAAAGTGATGTTACCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGAGTTACAAGT TATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAAATCTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTTGT CTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAATATTAAAGAATTTTTC CAGAGTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTAA

[0520] 抗-小鼠CD47 NbVh/IL-15N72D融合蛋白(包含信号肽序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:20):

[0521] (信号肽)

[0522] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0523] (抗-小鼠CD47纳体(nanobody)的Vh链)

[0524] QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGIIIFKINDMGWYRQAPGKRREWVAASTGGDEAIYRDSVKDRFTI SRDAKNSVFLQMNSLKPEDTAVYYCTAVISTDRDGTWRRYWGQGTQVTVSSGG

[0525] (人IL-15N72D)

[0526] NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL  
ANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0527] 抗-小鼠CD47 NbVh/huIL-15 $\alpha$ Su/mIgG2a Fc构建体的核酸序列(包含前导序列)  
如下(SEQ ID NO:21):

[0528] (信号肽)

[0529] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

[0530] (抗-小鼠CD47纳体的Vh链)

[0531] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGCCTGGTGGAGCCTGGAGGATCCCTGAGGCTGTCCTGTGCC  
GCCAGCGGCATCATCTTCAAGATCAACGACATGGGCTGGTATCGGCAGGCCCTGGCAAAGGAGGGAGTGGGTGGC  
CGCTTCCACAGGAGGCGATGAGGCCATCTACAGGGACTCCGTGAAGGACAGGTTACCATCTCCAGGGACGCCAAGA  
ACTCCGTGTTCTGCAGATGAATCCCTGAAGCCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCACCGCCGTGATCTCCACC  
GATAGGGACGGCACCGAGTGGAGGAGGTACTGGGGCCAGGGCACACAGGTGACTGTGTCCTCCGGCGGC

[0532] (人IL-15 $\alpha$ sushi结构域)

[0533] ATCACGTGTCTCTCTCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGACTCC  
AGGGAGCGGTACATTTGTAATCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTGAACAA  
GGCCACGAATGTCGCCCACTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

[0534] (小鼠IgG2a CH2-CH3 (Fc) 结构域)

[0535] GAACCAAGAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCTCCATGCAAATGCCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGA  
CCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGT  
GGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGA  
CACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCACTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATG  
AGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAAACCCAA  
AGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGA  
CCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTAC  
AAGAACACTGAACCAGTCTGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTG  
GGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTCACTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACAGCTAAGAGCTTCTCCC  
GGACTCCAGGTAAA

[0536] 抗-小鼠CD47 NbVh/huIL-15 $\alpha$ Su/mIgG2a Fc融合蛋白(包含前导序列)的氨基酸  
序列如下(SEQ ID NO:22):

[0537] (信号肽)

[0538] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0539] (抗-小鼠CD47纳体的Vh链)

[0540] QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGIIIFKINDMGWYRQAPGKRREWVAASTGGDEAIYRDSVKDRFTI  
SRDAKNSVFLQMNSLKPEDTAVYYCTAVISTDRDGTWRRYWGQGTQVTVSSGG

[0541] (人IL-15 $\alpha$ sushi结构域)

[0542] ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIR

[0543] (小鼠IgG2a CH2-CH3 (Fc) 结构域)

[0544] EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNE  
VHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTK

KQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHT  
TKSFSRTPGK

[0545] 如上所示,在一些情况下,前导肽会从成熟肽上剪切。

[0546] 类似的构建体的生成是使用来源于对人CD47特异性抗体的单链抗体结构域。抗-人CD47<sub>scAb</sub>/huIL-15N72D构建体的核酸序列(包含信号肽序列)如下(SEQ ID NO:23):

[0547] (信号肽)

[0548] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC (抗-人CD47<sub>scAb</sub>)

[0549] (VL)

[0550] AACATCCAGATGACCCAGTCCCCTTCCGCCATGAGCGCTCCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGC  
AAGGCCTCCCAGGACATCCACAGGTACCTGTCTGGTCCAGCAGAAGCCCGCAAGGTGCCCAAGCACCTGATCTA  
CAGGGCTAACAGGCTGGTGTCCGGCGTGCCTTCCAGGTTTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCGAGTTCACCCTGACCA  
TCTCCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGTACGACGAGTTCCTTACACCTTCGGCGGC  
GGCACCAAGGTGGAGATCAAG

[0551] (链接头)

[0552] GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

[0553] (VH)

[0554] CAGATGCAGCTGGTACAGTCCGGCGCCGAGGTGAAGAAGACCGGCTCCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAG  
GCCTCCGGCTTCAACATCAAGGACTACTACCTGCACTGGGTGAGGCAGGCCCTGGACAAGCCCTGGAGTGGATGGG  
CTGGATCGACCCCGACAACGGCGACACCGAGTACGCCAGAAGTCCAGGACAGGGTGACCATCACCAGGGACAGGT  
CCATGAGCACCGCCTACATGGAGCTGTCTCCCTGAGGTCCGAGGACACCGCCATGTACTACTGCAACGCCGCTAC  
GGCTCCTCCTCCTACCCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAACCGTGACCGTG

[0555] (人IL-15N72D)

[0556] AACTGGGTAAACGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATGCATATTGATGCT  
ACTTTATATACGAAAGTGATGTTACCCCAAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTCTCTTGGAGTTACAAGT  
TATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTTGT  
CTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAATATTAAAGAATTTTGT  
CAGAGTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTAA

[0557] 抗-人CD47<sub>scAb</sub>/huIL-15N72D融合蛋白(包含信号肽序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:24):

[0558] (信号肽)

[0559] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0560] (抗-人CD47<sub>scAb</sub>)

[0561] (VL)

[0562] NIQMTQSPSAMSASVGDRVITICKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGT  
EFTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK

[0563] (链接头)

[0564] GGGSGGGSGGGGS

[0565] (VH)



[0566] QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYILHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRV  
ITRDRSMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV

[0567] (人 IL-15N72D)

[0568] NWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL  
ANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0569] 抗-人CD47 scAb/huIL-15R $\alpha$ Su/hIgG1 Fc构建体的核酸序列(包含前导序列)如下  
(SEQ ID NO:25):

[0570] (信号肽)

[0571] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

[0572] (抗-人CD47 scAb)

[0573] (VL)

[0574] AACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCGCCATGAGCGCTCCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGC  
AAGGCCTCCCAGGACATCCACAGGTACCTGTCTGGTCCAGCAGAAGCCCGCAAGGTGCCAAGCACCTGATCTA  
CAGGGCTAACAGGCTGGTGTCCGGCGTGCCTTCCAGGTTTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCGAGTTCACCCTGACCA  
TCTCCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGTACGACGAGTCCCCTACACCTTCGGCGGC  
GGCACCAAGGTGGAGATCAAG

[0575] (链接头)

[0576] GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

[0577] (VH)

[0578] CAGATGCAGCTGGTACAGTCCGGCGCCGAGGTGAAGAAGACCGGCTCCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAG  
GCCTCCGGCTTCAACATCAAGGACTACTACCTGCACTGGGTGAGGCAGGCCCTGGACAAGCCCTGGAGTGGATGGG  
CTGGATCGACCCCGACAACGGCGACACCGAGTACGCCCAGAAGTCCAGGACAGGGTGACCATCACCAGGGACAGGT  
CCATGAGCACCGCCTACATGGAGCTGTCTCCCTGAGGTCCGAGGACACCGCCATGTACTACTGCAACGCCGCTAC  
GGCTCCTCCTCCTACCCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAACCGTGACCGTG

[0579] (人 IL-15R $\alpha$ sushi 结构域)

[0580] ATCACGTGTCTCCTCCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTACTCC  
AGGGAGCGGTACATTTGTAACCTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTGAACAA  
GGCCACGAATGTCGCCCCTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

[0581] (人 IgG1 CH2-CH3 (Fc) 结构域)

[0582] GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG  
TCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGT  
GGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA  
AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT  
GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG  
GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCCTGACCT  
GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAG  
ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCA  
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT  
CTCCTGGTAAATAA

[0583] 抗-人CD47 scAb/huIL-15 $\alpha$ Su/hIgG1 Fc融合蛋白(包含前导序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:26):

[0584] (信号肽)

[0585] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0586] (抗-人CD47 scAb)

[0587] (VL)

[0588] NIQMTQSPSAMSASVGDRVITITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGT  
EFTLTISLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK

[0589] (链接头)

[0590] GGGSGGGSGGGGS

[0591] (VH)

[0592] QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCASGFNIKDYLLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRV  
ITRDRSMSTAYMELSSLRSEDAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV

[0593] (人IL-15 $\alpha$ sushi结构域)

[0594] ITCPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR

[0595] (人IgG1 CH2-CH3 (Fc) 结构域)

[0596] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV  
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN  
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQ  
KSLSLSPGK

[0597] 已知GITR配体和GITR之间的相互作用为免疫细胞提供刺激信号传导,因此已知GITR配体(GITRL)是潜在的与IL-15的免疫刺激活性协同作用的免疫激动剂分子。因此,构建体的制备是将人GITRL与huIL-15N72D链链接。

[0598] 人GITRL/huIL-15N72D构建体的核酸序列(包含信号肽序列)如下(SEQ ID NO:27):

[0599] (信号肽)

[0600] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

[0601] (人GITRL)

[0602] ACCGCCAAGGAGCCCTGCATGGCCAAGTTCGGCCCTCTGCCCTCCAAGTGGCAGATGGCCTCCTCCGAG  
CCTCCCTGTGTGAACAAGGTGTCCGACTGGAAGCTGGAGATCCTGCAGAACGGCCTGTACCTGATCTACGGCCAGGT  
GGCCCCAACGCCAACTACAACGACGTGGCCCCCTTCGAGGTGCGGCTGTACAAGAACAAGGACATGATCCAGACCC  
TGACCAACAAGTCCAAGATCCAGAACGTGGGCGGCACCTATGAGCTGCACGTGGGCGACACCATCGACCTGATCTTC  
AACTCCGAGCACCAGGTGCTGAAGAACAACACCTACTGGGGCATC

[0603] (人IL-15N72D)

[0604] AACTGGGTAAACGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATGCATATTGATGCT  
ACTTTATATACGGAAAGTGATGTTACCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGAGTTACAAGT  
TATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTTGT  
CTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAAGTGGAGGAAAAAATATTAAAGAATTTTG  
CAGAGTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTAA

[0605] 人GITRL/IL-15N72D融合蛋白(包含信号肽序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO: 28):

[0606] (信号肽)

[0607] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0608] (人GITRL)

[0609] TAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGLYLIYGQVAPNANYNDVAPFEVRLYKNK  
DMIQTLTNKSKIQNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLKNNTYWGI

[0610] (人IL-15N72D)

[0611] NWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL  
ANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0612] 人GITRL/huIL-15R $\alpha$ Su/hIgG1 Fc构建体的核酸序列(包含前导序列)如下(SEQ ID NO: 29):

[0613] (信号肽)

[0614] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

[0615] (人GITRL)

[0616] ACCGCCAAGGAGCCCTGCATGGCCAAGTTCGGCCCTCTGCCCTCCAAGTGGCAGATGGCCTCCTCCGAG  
CCTCCCTGTGTGAACAAGGTGTCCGACTGGAAGCTGGAGATCCTGCAGAACGGCCTGTACCTGATCTACGGCCAGGT  
GGCCCCAACGCCAACTACAACGACGTGGCCCCCTTCGAGGTGCGGCTGTACAAGAACAAGGACATGATCCAGACCC  
TGACCAACAAGTCCAAGATCCAGAACGTGGGCGGCACCTATGAGCTGCACGTGGGCGACACCATCGACCTGATCTTC  
AACTCCGAGCACCAGGTGCTGAAGAACAACACCTACTGGGGCATC

[0617] (人IL-15R $\alpha$ sushi结构域)

[0618] ATCACGTGTCTCTCTCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGACTCC  
AGGGAGCGGTACATTTGTAACCTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTTGAACAA  
GGCCACGAATGTGCGCCACTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

[0619] (人IgG1 CH2-CH3 (Fc) 结构域)

[0620] GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG  
TCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGTTGGT  
GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA  
AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT  
GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG  
GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT  
GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAG  
ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA  
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT  
CTCCTGGTAAATAA

[0621] 人GITRL/huIL-15R $\alpha$ Su/hIgG1 Fc融合蛋白(包含前导序列)的氨基酸序列如下  
(SEQ ID NO: 30):

[0622] (信号肽)

[0623] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0624] (人GITRL)

[0625] TAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGLYLIYGQVAPNANYNDVAPFEVRLYKNK  
DMIQTLTNKSKIQNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLKNNTYWGI

[0626] (人IL-15R $\alpha$ sushi结构域)

[0627] ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIR

[0628] (人IgG1 CH2-CH3 (Fc) 结构域)

[0629] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV  
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN  
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQ  
KSLSLSPGK

[0630] 包括靶向患病细胞所表达之抗原的结合结构域的本发明的融合蛋白复合体亦可被生成。此类抗原可包括疾病细胞(包含肿瘤细胞)所释放的单链DNA(ssDNA)。因此,本发明的融合蛋白复合体的生成是使用辨识ssDNA的单链Ab结构域(来自Hu51-4抗体的TNT scAb)。

[0631] TNT scAb/huIL-15N72D构建体的核酸序列(包含信号肽序列)如下(SEQ ID NO: 31):

[0632] (信号肽)

[0633] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC (TNT scAb)

[0634] (VL)

[0635] GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCTACCCTGTCCCTGTCCCCTGGCGAGAGGGCTACCCTGTCCTGC  
AGGGCCAGGCAATCCATCTCCAACCTACCTGCACTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCCCCAGGCTGCTGATCTA  
CTACGCCTCCCAGTCCATCTCCGGCATCCCTGACAGGTTACGCGATCCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCA  
TCTCCAGGCTGGAGCCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCCAACCTCTGGCCTCTGACCTTCGGCCAG  
GGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGG

[0636] (链接头)

[0637] GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

[0638] (VH)

[0639] GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAAGTGAAGAAGCCCGAGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAG  
GCCTCCGGCTACACCTTCACCAGGTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGGCCCTGGACAGGGACTGGAGTGGATCGG  
CGCCATCTACCCCGGCAACTCCGACACCTCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACCATCACCGCCGACACCT  
CCACCAACACCGCCTACATGGAGCTGTCTCCCTGAGGTCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGGGGCGAG  
GAGATCGGCGTGAGGAGGTGGTTCGCCTACTGGGGACAGGGCACCTGGTGACCGTGTCAGC

[0640] (人IL-15N72D)

[0641] AACTGGGTAAACGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATGCATATTGATGCT  
ACTTTATATACGGAAAGTGATGTTACCCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTGGAGTTACAAGT  
TATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTTGT  
CTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAAGTGGAGGAAAAAATATTAAAGAATTTTG  
CAGAGTTTTGTACATATTGTCAAATGTTTCATCAACACTTCTTAA

[0642] TNT scAb/IL-15N72D融合蛋白(包含信号肽序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:

32) :

[0643] (信号肽)

[0644] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0645] (TNT scAb)

[0646] (VL)

[0647] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRARQSSISNYLHWYQQKPGQAPRLLIYYASQSSISGIPDRFSGSGSGT  
DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSNSWPLTFGQGTKVEIKR

[0648] (链接头)

[0649] GGGSGGGSGGGGS

[0650] (VH)

[0651] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGNSDTSYNQKFKGKAT  
ITADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGEEIGVRRWFAYWGQGLTVTVSS

[0652] (人 IL-15N72D)

[0653] NWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL  
ANDSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0654] TNT/huIL-15R $\alpha$ Su/hIgG1 Fc构建体的核酸序列(包含前导序列)如下 (SEQ ID NO:  
33) :

[0655] (信号肽)

[0656] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

[0657] (TNT scAb)

[0658] (VL)

[0659] GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCTACCCTGTCCCTGTCCCCTGGCGAGAGGGCTACCCTGTCCTGC  
AGGGCCAGGCAATCCATCTCCAACCTACCTGCACTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCCCCAGGCTGCTGATCTA  
CTACGCCTCCCAGTCCATCTCCGGCATCCCTGACAGGTTACGCGGATCCGGCTCCGGCACCAGCTTCACCCTGACCA  
TCTCCAGGCTGGAGCCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCCAACCTCTGGCCTCTGACCTTCGGCCAG  
GGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGG

[0660] (链接头)

[0661] GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

[0662] (VH)

[0663] GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAAGTGAAGAAGCCCGGAGCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAG  
GCCTCCGGCTACACCTTCACCAGGTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGGCCCCCTGGACAGGGACTGGAGTGGATCGG  
CGCCATCTACCCCGGCAACTCCGACACCTCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACCATCACCGCCGACACCT  
CCACCAACACCGCCTACATGGAGCTGTCTCCCTGAGGTCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGGGGCGAG  
GAGATCGGCGTGAGGAGGTGGTTCGCCTACTGGGGACAGGGCACCTGGTGACCGTGTCACG

[0664] (人 IL-15R $\alpha$ sushi结构域)

[0665] ATCACGTGTCTCTCTCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTA  
AGGGAGCGGTACATTTGTAACCTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTTGAACAA  
GGCCACGAATGTCGCCCCTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

[0666] (人 IgG1 CH2-CH3 (Fc) 结构域)

[0667] GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCGAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

[0668] TNT scAb/huIL-15 $\alpha$ Su/hIgG1 Fc融合蛋白(包含前导序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:34):

[0669] (信号肽)

[0670] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0671] (TNT scAb)

[0672] (VL)

[0673] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRARQISNYLHWYQQKPGQAPRLLIYYASQISIGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSNSWPLTFGQGTKVEIKR

[0674] (链接头)

[0675] GGGSGGGSGGGGS

[0676] (VH)

[0677] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGNSDTSYNQKFKGKATITADTSTNTAYMELSSLRSEDFAVYYCARGEEIGVRRWFAYWGQGLTVTVSS

[0678] (人IL-15 $\alpha$ sushi结构域)

[0679] ITCPPMSVEHADIWKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIR

[0680] (人IgG1 CH2-CH3 (Fc) 结构域)

[0681] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0682] 包括靶向患病细胞所表达之其他抗原的结合结构域的本发明的融合蛋白复合体亦可被生成。此类抗原可包括疾病细胞(包含肿瘤细胞)上所表达的组织因子或CD33,或免疫细胞上所表达的检查点抑制剂。

[0683] 组织因子(TF)是一种跨膜糖蛋白,其根据文献报道在若干肿瘤细胞类型中过度表达。重要的是,已知增加的TF表达涉及癌细胞的信号传导、肿瘤细胞的迁移和细胞凋亡的减少,这些都导致癌细胞转移的可能性增加。因此,靶向TF可能有益于针对过度表达此蛋白的肿瘤细胞类型的免疫治疗策略。嵌合抗组织因子抗体ALT-836先前已经被生成并已对其进行临床测试。人源化的此抗体的可变链(hOAT)亦已被进行了特性分析。因此,具有辨识人组织因子的单链Ab结构域(hOAT scAb)的本发明的融合蛋白复合体亦被生成。

[0684] hOAT scAb/huIL-15R $\alpha$ Su/hIgG1 Fc构建体的核酸序列(包含前导序列)如下(SEQ ID NO:35):

[0685] (信号肽)

[0686] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTTCTCCAGCGCCTACTCC

[0687] (hOAT scAb)

[0688] (VL)

[0689] GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTGCTTCCCTGTCCGCTTCCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCCTGGCCTCCCAGACCATCGACACCTGGCTGGCCTGGTACCTGCAGAAGCCCGCAAGTCCCCCAGCTGCTGATCTACGCCGCTACCAACCTGGCCGACGGCGTGCCTAGCAGGTTTTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCAGCTTCTCCTTCACCACTCTCCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGTGTACTCCTCCCCCTTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG

[0690] (链接头)

[0691] GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

[0692] (VH)

[0693] CAGATCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGGCGAAGTGAAAAAGCCCGGCGCCAGCGTGAGGGTGTCTGTAAAGCCTCCGGCTACTCCTTCACCGACTACAACGTGTACTGGGTGAGGCAGTCCCCCGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCTACATCGACCCCTACAACGGCATCACCATCTACGACCAGAACTCAAGGGCAAGGCCACCCTGACCGTGGACAAGTCCACCTCCACAGCCTACATGGAGCTGTCTCCTGAGGTCCGAGGACACCGCCGTGTACTTCTGCGCCAGGGACGTGACCACCGCTCTGGACTTCTGGGGACAGGGCACCCCGTGACCGTGAGCTCC

[0694] (人IL-15R $\alpha$ sushi结构域)

[0695] ATCAGTGTCTCTCTCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGACTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAACCTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTTGAACAAAGCCACGAATGTGCCCCACTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

[0696] (人IgG1 CH2-CH3 (Fc) 结构域)

[0697] GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCGAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCTGTCTCCTGGTAAA

[0698] hOAT scAb/huIL-15R $\alpha$ Su/hIgG1 Fc融合蛋白(包含信号肽序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:36):

[0699] (信号肽)

[0700] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0701] (hOAT scAb)

[0702] (VL)

[0703] DIQMTQSPASLSASVGDRVITITCLASQTIDTWLAWYLQKPGKSPQLLIYAATNLADGVPSRFSGSGSGT  
DFSFTISLQPEDFATYYCQQVYSSPFTFGQGTKLEIK

[0704] (链接头)

[0705] GGGGSGGGGSGGGGS

[0706] (VH)

[0707] QIQLVQSGGEVKKPGASVRVSKASGYSFTDYNVYVVRQSPGKGLEWIGYIDPYNGITIYDQNFKGKAT  
LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARDVTTALDFWGQGTTVTVSS

[0708] (人IL-15 $\alpha$ sushi结构域)

[0709] ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIR

[0710] (人IgG1 CH2-CH3 (Fc) 结构域)

[0711] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV  
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN  
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQ  
KSLSLSPGK

[0712] 在一些情况下,前导肽会从成熟多肽上剪切。

[0713] 类似的构建体可被生成,以表达hOAT scAb/huIL-15N72D融合蛋白。

[0714] 如实施例1和之前所述(实施例1和2中的美国专利-专利号8,507,222,通过引用并  
入本文)序列被克隆到表达载体中,并将该表达载体转染到CHO细胞中。在一些情况下,用编  
码huIL-15N72D和huIL-15 $\alpha$ Su/Fc两种融合蛋白的载体转染CHO细胞,而该两种融合蛋白具  
有本发明的相同或不同的结合结构域。使用如上所述的蛋白A亲和层析从CHO细胞培养物上  
清液中纯化融合蛋白复合体。

[0715] 具有辨识CD33的单链Ab结构域(CD33 scAb)的本发明的融合蛋白复合体亦被生  
成。CD33 scAb/huIL-15N72D构建体的核酸序列(包含信号肽序列)如下(SEQ ID NO:37):

[0716] (信号肽)

[0717] ATGGATTTTCAGGTGCAGATTATCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCTTCAGTCATAATGTCAAGAGGA

[0718] (CD33 scAb)

[0719] (VL)

[0720] CAGGTGCAGCTGGTTCAGAGCGGTGCGGAAGTTAAAAAGCCGGGCTCTTCCGTGAAAGTTAGCTGCAAA  
GCGTCTGGTTATACCTTCACCGACTACAACATGCACTGGGTCCGCCAGGCCCCAGGCCAGGTCTGGAATGGATCGG  
TTATATTTACCCGTACAACGGTGGCACGGGATATAACCAGAAATTCAAATCCAAAGCTACCATCACTGCGGACGAAA  
GCACCAACACCGCATATATGGAATTGTCTTCTCTGCGTAGCGAAGATACCGCGGTTTACTATTGCGCTCGTGGTCGT  
CCAGCGATGGATTACTGGGGTCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCTCT

[0721] (链接头)

[0722] GGCGGAGGCGGATCTGGTGGTGGCGGATCCGGTGGAGGCGGAAGC

[0723] (VH)

[0724] GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGACCGCGTGACTATCACCTGC  
CGTGCGTCCGAAAGCGTGGATAACTACGGCATTTCCTTTATGAACTGGTTCAGCAGAAACCGGGTAAAGCCCCGAA  
ACTGCTGATTTATGCGGCCTCTAACCAGGGCAGCGGTGTGCCGAGCCGCTTTTCCGGCAGCGGTTGGGGACCGATT



TCACTCTGACCATTCTAGCCTGCAGCCAGATGACTTCGCGACCTACTACTGCCAACAGTCTAAAGAAGTTCCGTGG  
ACCTTCGGTCAGGGTACCAAAGTTGAAATTA

[0725] (人 IL-15N72D)

[0726] AACTGGGTAAACGTAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCTATGCATATTGATGCT  
ACTTTATATACGGAAGTGATGTTACCCCAAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTGGAGTTACAAGT  
TATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACGACAGTTTGT  
CTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAATATTAAAGAATTTTGT  
CAGAGTTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTAA

[0727] CD33 scAb/IL-15N72D融合蛋白(包含信号肽序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:38):

[0728] (信号肽)

[0729] MDFQVQIIISFLLISASVIMSRG

[0730] (CD33 scAb)

[0731] (VL)

[0732] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDYNMHVVRQAPGQGLEWIGYIYPYNGGTGYNQKFKSKAT  
ITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPAMDYWGQGTLVTVSS

[0733] (链接头)

[0734] GGGSGGGSGGGGS

[0735] (VH)

[0736] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQSGVPSRFSGS  
GSGTDFTLTISSLQPDFFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIK

[0737] (人 IL-15N72D)

[0738] NWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL  
ANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0739] 在一些情况下,前导肽会从成熟多肽上剪切。

[0740] CD33 scAb/huIL-15R $\alpha$ Su/hIgG1 Fc构建体的核酸序列(包含前导序列)如下(SEQ ID NO:39):

[0741] (信号肽)

[0742] ATGGATTTTCAGGTGCAGATTATCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCTTCAGTCATAATGTCAAGAGGA

[0743] (CD33 scAb)

[0744] (VL)

[0745] CAGGTGCAGCTGGTTCAGAGCGGTGCGGAAGTTAAAAAGCCGGGCTCTCCGTGAAAGTTAGCTGCAAA  
GCGTCTGGTTATACCTTCACCGACTACAACATGCACTGGGTCCGCCAGGCCCCAGGCCAGGGTCTGGAATGGATCGG  
TTATATTTACCCGTACAACGGTGGCACGGGATATAACCAGAAATTCAAATCCAAAGCTACCATCACTGCGGACGAAA  
GCACCAACACCGCATATATGGAATTGTCTTCTCTGCGTAGCGAAGATACCGCGGTTTACTATTGCGCTCGTGGTCGT  
CCAGCGATGGATTACTGGGGTCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCTCT

[0746] (链接头)

[0747] GGGCGAGGCGGATCTGGTGGTGGCGGATCCGGTGGAGGCGGAAGC

[0748] (VH)

[0749] GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGACCGCGTGACTATCACCTGC  
CGTGCGTCCGAAAGCGTGGATAACTACGGCATTTCCCTTTATGAACTGGTTCCAGCAGAAACCGGGTAAAGCCCCGAA  
ACTGCTGATTTATGCGGCTCTAACCAGGGCAGCGGTGTGCCGAGCCGCTTTTCCGGCAGCGGTTCCGGGACCGATT  
TCACTCTGACCATTTCTAGCCTGCAGCCAGATGACTTCGCGACCTACTACTGCCAACAGTCTAAAGAAGTTCCGTGG  
ACCTTCGGTCAGGGTACCAAAGTTGAAATTAAA

[0750] (人IL-15R $\alpha$ sushi结构域)

[0751] ATCACGTGTCTCCTCCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGACTCC  
AGGGAGCGGTACATTTGTAACCTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTTGAACAA  
GGCCACGAATGTCGCCCACTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

[0752] (人IgG1 C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3(Fc)结构域)

[0753] GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG  
TCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT  
GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA  
AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT  
GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG  
GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT  
GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAG  
ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCA  
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT  
CTCCTGGTAAATAA

[0754] CD33 scAb/huIL-15R $\alpha$ Su/hIgG1 Fc融合蛋白(包含前导序列)的氨基酸序列如下  
(SEQ ID NO:40):

[0755] (信号肽)

[0756] MDFQVQIIISFLLISASVIMSRG

[0757] (CD33 scAb)

[0758] (VL)

[0759] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIYPYNGGTGYNQKFKSKAT  
ITADESTNTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGRPAMDYWGQGTLVTVSS

[0760] (链接头)

[0761] GGGSGGGSGGGGS

[0762] (VH)

[0763] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQSGVPSRFSGS  
GSGTDFTLTISSLQPDFFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIK

[0764] (人IL-15R $\alpha$ sushi结构域)

[0765] ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIR

[0766] (人IgG1 CH2-CH3(Fc)结构域)

[0767] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV  
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN  
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQ

KSLSLSPGK

[0768] 在一些情况下,前导肽会从成熟多肽上剪切。

[0769] 如实施例1和之前所述(实施例1和2中的美国专利-专利号8,507,222,通过引用并入本文)序列被克隆到表达载体中,并将该表达载体转染到CHO细胞中。在一些情况下,用编码huIL-15N72D和huIL-15R $\alpha$ Su/Fc两种融合蛋白的载体转染CHO细胞,而该两种融合蛋白具有本发明的相同或不同的结合结构域。使用如上所述的蛋白A亲和层析从CHO细胞培养物上清液中纯化融合蛋白复合体。

[0770] 细胞间粘附分子1(ICAM-1)是免疫球蛋白超家族中的一种细胞表面糖蛋白。已被展示,细胞表面上ICAM-1蛋白表达水平与各种实体瘤的转移潜力正相关。淋巴细胞功能相关抗原1(LFA-1)在所有T细胞和B细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和NK细胞上被发现。已知其与ICAM-1结合,特别是通过“I结构域”,以维持细胞粘附(免疫性/细胞溶解性的突触形成)或滚动(在外渗(癌细胞转移出血管)之前减缓血流中细胞的移动)。被添加两个突变K287C和K294C后,单独的I结构域即可以支持与ICAM-1的高亲和力结合。因此,包括LFA-1I结构域及所述二突变的TxM被生成,以靶向肿瘤并促进效应免疫细胞的活化和定位,其经由huIL-15N72D:huIL-15R $\alpha$ Su复合体。

[0771] 人LFA-1I结构域(K287C/K294C)/huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1 Fc构建体的核酸序列(包含前导序列)如下(SEQ ID NO:41):

[0772] (信号肽)

[0773] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

[0774] (人LFA-1I结构域(K287C/K294C))

[0775] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCCGATTTAGTGTTTCTGTTCGACGGCTCCATGTCTTTACAGCCCGATGAGTTCCAGAAGATTTAGACTTCATGAAGGACGTGATGAAGAACTGTCCAACACCAGCTACCAGTTCGCTGCCGTGCAGTTCTCCACCTCCTACAAGACCGAGTTCGACTTCTCCGACTACGTGAAGCGGAAGGACCCCGATGCTTTACTGAAGCACGTCAAGCACATGCTGCTGCTCACCAACACCTTTGGCGCCATCAACTACGTGGCCACCGAGGTGTTTCGTGAGGAACTGGGAGCTCGGCCCGATGCCACCAAGGTGCTGATTATCATCACCGACGGCGAAGCCACCGATAGCGGAAACATCGATGCCGCCAAGGACATCATCCGGTACATTATCGGCATCGGCAAGCACTTCCAGACCAAGGAGAGCCAAGAGACTTTACACAAGTTCGCCTCCAAGCCCGCTCCGAGTTCGTGTGCATTTTACACCTTCGAGTGTTTAAAGGATTTATTTACCGAGCTGCAGAAGAAGATCTACGTGATTGAGGGCACCAGCAAGCAAGATCTGACCTCCTTCAACATGGAGCTGTCCAGCAGCGGCATTTCCGCTGATTTATCTCGTGGCCACGCC

[0776] (人IL-15R $\alpha$ sushi结构域)

[0777] ATCACGTGTCTCCTCCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGACTCCAGGGAGCGGTACATTTGTAACCTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCAGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTTGAACAAAGCCACGAATGTCGCCCACTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

[0778] (人IgG1 CH2-CH3(Fc)结构域)

[0779] GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGTTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG

GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT  
GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAG  
ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA  
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT  
CTCCTGGTAAATAA

[0780] 成熟的人LFA-1I结构域(K287C/K294C)/huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1 Fc融合蛋白(包含前导序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:42):

[0781] (信号肽)

[0782] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0783] (人LFA-1I结构域(K287C/K294C))

[0784] DLVFLFDGSMQLPDEFQKILDFMKDVMKKLSNTSYQFAAVQFSTSYKTEFDSDYVVRKDPDALLKHV  
KHMLLLTNTFGAINYVATEVVFREELGARPDAKVLIIITDGEATDSGNIDAAKDIIIRYIIIGIKHFQTKESQETLHK  
FASKPASEFVCILDTFECLKDLFTLQKKIYVIEGTSKQDLTSFNMELSSSGISADLSRGHA

[0785] (人IL-15R $\alpha$ sushi结构域)

[0786] ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIR

[0787] (人IgG1 CH2-CH3(Fc)结构域)

[0788] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV  
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN  
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQ  
KSLSLSPGK

[0789] 在一些情况下,前导肽会从成熟多肽上剪切。

[0790] 类似的构建体可被生成以表达人LFA-1结构域(K287C/K294C)/huIL-15N72D融合蛋白。

[0791] 如实施例1和之前所述(实施例1和2中的美国专利-专利号8,507,222,通过引用并入本文)序列被克隆到表达载体中,并将该表达载体转染到CHO细胞中。在一些情况下,用编码huIL-15N72D和huIL-15R $\alpha$ Su/Fc两种融合蛋白的载体转染CHO细胞,而该两种融合蛋白具有本发明的相同或不同的结合结构域。使用如上所述的蛋白A亲和层析从CHO细胞培养物上清液中纯化融合蛋白复合物。

[0792] 例如,用huIL-15N72D表达载体转染CHO细胞。对该细胞也转染如下载体,表达人LFA-1I结构域(K287C/K294C)/huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1 Fc构建体的载体。该两个构建体在CHO细胞中的共表达允许可溶性huIL-15N72D:人LFA-1I结构域(K287C/K294C)/huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1Fc复合物(称为2\**hLFA1*/TxM)的形成和分泌。

[0793] Notch1是I型跨膜蛋白家族的成员,该家族共享如下结构特征,包含由复数个表皮生长因子(EGF)样重复组成的细胞外结构域和由多种不同结构域类型组成的细胞内结构域。它的过度表达已在若干肿瘤类型中得到展示,使其成为免疫疗法的有吸引力的靶标。 $\delta$ 样蛋白4(DLL4)是Notch1的若干个配体之一,并且已显示具有最高的亲和力。因此,在TxM复合物的生成中,DLL4的细胞外结构域(位置27-529)是用于靶向Notch1。

[0794] hDLL4/huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1 Fc构建体的核酸序列(包含前导序列)如下(SEQ ID NO:43):

[0795] (信号肽)

[0796] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

[0797] (hDLL4)

[0798] AGCGGCGTGTTCCAGCTGCAGCTGCAAGAGTTTATCAACGAGAGGGGCGTGCTGGCTTCCGGTCGTCCT  
TGTGAGCCCGGTTGTAGGACCTTTTTCCGGGTGTGTTAAAGCATTTTCAAGCTGTGGTGTCCCCGGACCTTGTA  
CTTCGGCACCGTGTCCACCCCGTTCTGGGCACCAACTCCTTCGCCGTTTCGTGACGACAGCTCCGGAGGAGGTGTA  
ATCCTTTACAGCTGCCTTTCAACTTTACTTGGCCCCGGCACCTTCTCCCTCATCATCGAAGCTTGGCATGCCCCCGT  
GACGATCTGCGGCCGAAGCTCTGCCCCCGATGCTTTAATCAGCAAGATTGCCATTCAAGGTTCTTTAGCCGTGGG  
CCAGAACTGGCTGCTGGACGAGCAGACCAGCACACTCACTCGTCTGAGGTACTCCTATCGTGTGATCTGCAGCGACA  
ACTACTACGGCGACAATTGCAGCCGGCTGTGCAAGAAGAGGAACGACCACTTCGGCCATTACGTCTGCCAGCCCGAC  
GGCAATTTATCTTGTCTGCCCCGTTGGACCGGCGAGTACTGTGACGAGCCCATCTGTTTAAAGCGGCTGCCACGAGCA  
GAACGGCTACTGCAGCAAGCCCGCTGAGTGTCTGTGTAGGCCCGGCTGGCAAGGTAGGCTGTGCAACGAGTGCATCC  
CCCACAATGGCTGTGCGCACGGCACTTGTTCACCCCTTGGCAGTGCATTGTGACGAGGGCTGGGGAGGTTTATTC  
TGCGACCAAGATCTGAACTACTGCACCCACCACAGCCCTTGAAGAACGGAGCTACTTGTTC AACAGCGGCCAGAG  
GTCCTACACTTGTACTTGTAGGCCCGGTTACACCGGCGTCGACTGCGAACTGGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGT  
CTTGTCGTAACGGCGGCAGCTGCAAGGACCAAGAAGACGGCTACCACTGTTTATGCCCTCCCGGATACTACGGTTTA  
CACTGCGAGCACTCCACACTGTCTTGTGCCGACTCCCCTTGTTC AACGGCGGAAGCTGTCTGTGAGAGGAACCAAGG  
TGCCAACTACGCTTGTGAGTGCCCTCCCAACTTCACCGGCTCCAACTGCGAGAAGAAGGTGGATCGTTGCACCTCCA  
ACCCTTGCGCAACGGCGGCCAGTGTTTAAATAGGGGCCCTTCCCGGATGTGTCTGTGTCGTTCCCGGTTTTACGGG  
ACCTACTGCGAGCTGCACGTCAGCGATTGCGCCCGGAATCCTTGCCTCACGGCGGAAGTGTGACGATTTAGAGAA  
CGGTTTAAATGTGCACTTGTCCCGCTGGATTACGCGGTCTGAGGTGTGAGGTGAGGACCTCCATCGACGCTTGTGCCA  
GCAGCCCTTGCTTCAATCGTGCCACTTGTACACCGATTTATCCACCGACACCTTCGTGTGCAACTGCCCTACGGC  
TTCGTGGGATCTCGTTGCGAGTTCCCCGTTGGCCTGCCTCCTAGCTTTCCCTGG

[0799] (人IL-15 $\alpha$ sushi结构域)

[0800] ATCAGTGTCTCCTCCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTACTCC  
AGGGAGCGGTACATTTGTAATCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTTGAACAA  
GGCCACGAATGTGCCCCACTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

[0801] (人IgG1 CH2-CH3 (Fc) 结构域)

[0802] GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG  
TCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGT  
GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA  
AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCTGACACGAGGACTGGCTGAAT  
GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGG  
GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCT  
GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAG  
ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA  
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT  
CTCCTGGTAAATAA

[0803] 成熟的hDLL4/huIL-15 $\alpha$ Su/huIgG1 Fc融合蛋白(包含前导序列)的氨基酸序列如

下 (SEQ ID NO:44):

[0804] (信号肽)

[0805] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0806] (hDLL4)

[0807] SGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCPGCRTFFRVCLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDS  
SGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLI IEAWHAPGDDL RPEALPPDALISKIAIQGSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLSYR  
VICSDNYYGDNCSRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTGEYCQQPICLSGCHEQNGYCSKPAECLCRPGWQGR  
CNECIPHNGCRHGTCTPWQCTCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHSPCKNGATCSNSGQRSYTCTCRPGYTGVDCLELS  
ECDSNPCRNGGSKDQEDGYHCLCPPGYGLHCEHSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGANYACECPPNFTGSNCEKKV  
DRCTSNPCANGGQCLNRGPSRMCRCRPGFTGT YCELHVSDCARNPCAHHGGTCHDLENGLMCTCPAGFSGRRCVVRTS  
IDACASSPCFNATCYTDLSTDTFVCNCPYGFVGSRCFPPVGLPPSPFW

[0808] (人IL-15 $\alpha$ sushi结构域)

[0809] ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIR

[0810] (人IgG1 CH2-CH3 (Fc) 结构域)

[0811] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV  
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN  
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQ  
KSLSLSPGK

[0812] 在一些情况下,前导肽会从成熟多肽上剪切。

[0813] 类似的构建体可被生成以表达hDLL4结构域/huIL-15N72D融合蛋白。

[0814] 如实施例1和之前所述(实施例1和2中的美国专利-专利号8,507,222,通过引用并入本文)序列被克隆到表达载体中,并将该表达载体转染到CHO细胞中。在一些情况下,用编码huIL-15N72D和huIL-15 $\alpha$ Su/Fc两种融合蛋白的载体转染CHO细胞,而该两种融合蛋白具有本发明的相同或不同的结合结构域。使用如上所述的蛋白A亲和层析从CHO细胞培养物上清液中纯化融合蛋白复合体。

[0815] 例如,用huIL-15N72D表达载体转染CHO细胞。对该细胞也转染如下载体,表达人LFA-1I结构域(K287C/K294C)/huIL-15 $\alpha$ Su/huIgG1 Fc构建体的载体。该两个构建体在CHO细胞中的共表达允许可溶性huIL-15N72D:人LFA-1I结构域(K287C/K294C)/huIL-15 $\alpha$ Su/huIgG1 Fc复合体(称为2\* $h$ LFA1/TxM)的形成和分泌。

[0816] 例如,在CHO细胞中的huIL-15N72D和hDLL4/huIL-15 $\alpha$ Su/huIgG1 Fc表达载体的共表达允许可溶性TxM复合体(称为2\* $h$ DLL4/TxM)的形成和分泌。

[0817] T细胞免疫球蛋白粘蛋白分子-3(Tim-3)是在制造IFN- $\gamma$ 的CD4<sup>+</sup>TH1辅助细胞(Thelper 1,Th1)和CD8<sup>+</sup>细胞毒性T细胞1(Tc1)上发现的免疫检查点受体。因此,它是癌症免疫疗法的有吸引力的靶标。所以,本发明的融合蛋白复合体的生成是使用辨识人Tim-3的单链Ab结构域(haTIM3scFv)。

[0818] haTIM3scFv/huIL-15 $\alpha$ Su/huIgG1 Fc构建体的核酸序列(包含前导序列)如下(SEQ ID NO:45):

[0819] (信号肽)

[0820] ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTCTCCTGTCAGTAACCACCGGTGTCCACTCC(haTIM3scFv:

VL-linker-VH scFv)

[0821] (VL)

[0822] TCCTATGTGCTGACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGCACT  
GGAACCAGCAGTGACGTTGGTAATAATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCAT  
GATTTATGATGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTTCTACTCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCC  
TGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTACTGCAGCTCATATACAACCAGCAGTACTTATGTC  
TTCGGAAGTGGGACCAAGCTGACCGTCTGGGGCAGCCAAAGGCG

[0823] (链接头)

[0824] GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

[0825] (VH)

[0826] CTGGTGAATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGA  
TACACCTTCACCGGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAA  
CCCTAACAGTGGTGGCACAACACTATGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGAACACCTCCATAAGCA  
CAGCCTACATGGAGTTGAGCAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGATGTATTACTAT  
GGTTTCGGGGTACAAGTGGTTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTGAGCTCA

[0827] (人IL-15R $\alpha$ sushi结构域)

[0828] ATCACGTGTCTCTCTCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTACTCC  
AGGGAGCGGTACATTTGTAAGTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGTTGAACAA  
GGCCACGAATGTCGCCCCTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

[0829] (人IgG1 CH2-CH3 (Fc) 结构域)

[0830] GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG  
TCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGT  
GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA  
AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT  
GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG  
GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCT  
GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAG  
ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCA  
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT  
CTCCTGGTAAATAA

[0831] 成熟的haTIM3scFv/huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1 Fc融合蛋白(包含前导序列)的氨基酸  
序列如下(SEQ ID NO:46):

[0832] (信号肽)

[0833] MEWSWVFLFFLSVTTGVHS

[0834] (haTIM3scFv:VL-linker-VH scFv)

[0835] (VL)

[0836] SYVLTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDVGNNNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSTRFSGSKS  
GNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTTSSSTYVFGTGTKLTVLGQPKA

[0837] (链接头)

[0838] GGGGSGGGGSGGGGS

[0839] (VH)

[0840] LVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYIMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTR  
NTSISTAYMELSSLRSDDTAVYYCAREMYYYGSGYNWFDPPWQGGLTVTVSS

[0841] (人IL-15R $\alpha$ sushi结构域)

[0842] ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIR

[0843] (人IgG1 CH2-CH3 (Fc) 结构域)

[0844] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV  
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN  
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ  
KSLSLSPGK

[0845] 在一些情况下,前导肽会从成熟多肽上剪切。

[0846] 类似的构建体可被生成以表达haTIM3scFv/huIL-15N72D融合蛋白。

[0847] 如实施例1和之前所述(实施例1和2中的美国专利-专利号8,507,222,通过引用并  
入本文)序列被克隆到表达载体中,并将该表达载体转染到CHO细胞中。在一些情况下,用编  
码huIL-15N72D和huIL-15R $\alpha$ Su/Fc两种融合蛋白的载体转染CHO细胞,而该两种融合蛋白具  
有本发明的相同或不同的结合结构域。使用如上所述的蛋白A亲和层析从CHO细胞培养物上  
清液中纯化融合蛋白复合体。

[0848] 例如,用huIL-15N72D表达载体转染CHO细胞。对该细胞也转染如下载体,表达  
haTIM3scFv/huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1 Fc构建体的载体。该两个构建体在CHO细胞中的共表达  
允许可溶性huIL-15N72D:haTIM3scFv/huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1 Fc复合体(称为2\*haTIM3/  
TxM)的形成和分泌。

[0849] 除了靶向肿瘤的分子之外,检测并对抗被病毒感染的细胞的TxM复合体可被创建  
出来。最近发现的非常强效且具有广泛中和能力的HIV特异性单克隆抗体(bNAbs)提供了一  
类新颖的潜在治疗剂。人们早就知道,中和抗体可以靶向HIV的包膜(Env)并在体外有效地  
抑制病毒复制。为了将这种抗体介导的抑制作用与“激活暨消灭(kick and kill)” (唤醒潜  
伏的病毒复制并以经由IL-15刺激活化的效应细胞杀死病毒)的方法相结合,已经创建了包  
括bNAbs的单链抗体结构域(scFvs)的TxM复合体已被创建。包含来自bNAb N6、2G12、VRC07  
和10-1074的scFvs的四种不同抗-HIV TxM的创建和特性分析的描述如下。

[0850] N6scFv/huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1 Fc构建体的核酸序列(包含前导序列)如下(SEQ ID  
NO:47):

[0851] (信号肽)

[0852] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

[0853] (N6 scFv:VL-linker-VH scFv)

[0854] (VL)

[0855] TACATCCACGTGACCCAGTCCCCCTCCTCTTTAAGCGTGAGCATCGGAGATCGTGTGACCATCAACTGC  
CAGACCTCCCAAGGTGTGGGCTCCGATTTACACTGGTACCAGCACAAGCCCGGTCGGGCCCCCAAGCTGCTGATCCA  
CCACACCAGCTCCGTGGAGGATGGCGTGCCCTCTCGTTTCTCCGGCTCCGGCTTCCATACCTCCTTCAATTTAACCA  
TCAGCGATTTACAAGCTGACGACATCGCCACCTACTACTGCCAAGTTCTCCAGTTCTTCGGCCGGGGCTCTCGTCTG



CATATCAAG

[0856] (链接头)

[0857] GGAGGCGGCGGATCCGGCGGCGGAGGCAGCGGCGGAGGCGGATCT

[0858] (VH)

[0859] CGTGCTCATCTGGTGCAGAGCGGAACCGCCATGAAGAAGCCCGGTGCTAGCGTGCGGGTGTCTTGTCAG  
ACCAGCGGATACACCTTCACCGCCACATTTTATTCTGGTTTCGTCAAGCTCCCGGTCTGGACTGGAATGGGTGGG  
CTGGATCAAGCCCCAGTATGGCGCCGTGAACTTTGGCGGCGGCTTTCGTGATCGGGTGACTTTAACTCGTGACGTGT  
ATCGGGAGATCGCCTACATGGACATTAGGGGTTTAAAGCCCGACGATACCGCCGTGTACTACTGCGCTCGTGATCGT  
TCCTACGGCGATAGCAGCTGGGCTTTAGATGCTTGGGGCCAAGGTACCACAGTGTGGTCCGCC

[0860] (人IL-15 $\alpha$ sushi结构域)

[0861] ATCACGTGTCTCTCTCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTACTCC  
AGGGAGCGGTACATTTGTAACCTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTTGAACAA  
GGCCACGAATGTCGCCCAGTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

[0862] (人IgG1 CH2-CH3 (Fc) 结构域)

[0863] GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG  
TCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT  
GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA  
AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT  
GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG  
GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT  
GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAG  
ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA  
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT  
CTCCTGGTAAATAA

[0864] 2G12scFv/huIL-15 $\alpha$ Su/huIgG1 Fc构建体的核酸序列(包含前导序列)如下(SEQ ID NO:48):

[0865] (信号肽)

[0866] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

[0867] (2G12 scFv:VL-linker-VH scFv)

[0868] (VL)

[0869] GTGGTGATGACCCAGTCCCCTTCCACCCTGTCCGCTTCCGTGGGCGACACCATCACCTGCAGG  
GCCTCCCAGTCCATCGAGACCTGGCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACAA  
GGCCTCCACCCTGAAGACCGGCGTGCCCTCCAGGTTTCCGGATCCGGCTCCGGCACCGAGTTCACCCTGACCATCA  
GCGGCCTGCAGTTCGACGACTTCGCCACCTACCACTGCCAGCACTACGCCGGCTACTCCGCCACCTTTGGACAGGGC  
ACCAGGGTGGAGATCAAG

[0870] (链接头)

[0871] GGAGGTGGCGGATCCGGAGGTGGAGTTCTGGTGGAGGTGGGAGT

[0872] (VH)

[0873] GAGGTGCAGCTGGTGAATCCGGAGGCGGCCTGGTGAAAGCTGGCGGAAGCCTGATCCTGAGCTGCGGC

GTGTCCAACCTTCAGGATCTCCGCCACACCATGAACTGGGTGAGGAGGGTGCCTGGAGGAGGACTGGAGTGGGTGGC  
CAGCATCTCCACCTCCTCCACCTACAGGGACTACGCCGACGCCGTGAAGGGCAGGTTACCGTGAGCAGGGACGACC  
TGGAGGACTTCGTGTACCTGCAGATGCACAAGATGCGGGTGGAGGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAGGAAGGGC  
TCCGACAGGCTGTCCGACAACGACCCCTTTGACGCCTGGGGCCCTGGAACCGTGGTGACAGTGTCCTCC

[0874] (人IL-15 $\alpha$ sushi结构域)

[0875] ATCACGTGTCTCCTCCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTACTCC  
AGGGAGCGGTACATTTGTAACCTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCAGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTTGAACAA  
GGCCACGAATGTCGCCCACTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

[0876] (人IgG1 CH2-CH3 (Fc) 结构域)

[0877] GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG  
TCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGTTGGT  
GGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA  
AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT  
GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG  
GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCT  
GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAG  
ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCA  
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT  
CTCCTGGTAAATAA

[0878] VRC07 (523) scFv/huIL-15 $\alpha$ Su/huIgG1 Fc构建体的核酸序列(包含前导序列)如下 (SEQ ID NO:49):

[0879] (信号肽)

[0880] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

[0881] (VRC07 (523) scFv:VL-linker-VH scFv)

[0882] (VL)

[0883] TCCTCCCTGACCCAGAGCCCCGGAACACTCTCCCTCTCCCCCGGTGAGACCGCTATCATCTCTTGTAGG  
ACCAGCCAGTACGGCTCTTTAGCTTGGTATCAACAGAGGCCCGGCCAAGCTCCTAGGCTGGTCATTTACAGCGGCAG  
CACAAGGGCCGCCGCATCCCCGATAGGTTCTCCGGTCCCGGTGGGGCCCCGATTACAATTTAACAATCTCCAATT  
TAGAGTCCGGAGACTTCGGCGTCTACTACTGCCAGCAGTACGAGTTCTTCGGCCAAGGTACCAAAGTGCAAGTTGAT  
ATCAAG

[0884] (链接头)

[0885] GGCGGCGGAGGCTCCGGCGGCGGCGGATCCGGCGGAGGAGGATCC

[0886] (VH)

[0887] CAAGTTAGGCTGTCCAGAGCGGAGGCCAGATGAAGAAGCCCGGTGACTCCATGCGGATCAGCTGTCGT  
GCCAGCGGCTACGAGTTCATCAACTGCCCCATCAACTGGATTTCGTCTGGCCCCCGGTAAGCGGCCCAATGGATGGG  
CTGGATGAAACCTCGTCACGGCGCTGTGTCTACGCTCGTCAGCTGCAAGGTCGTGTGACCATGACTCGTGACATGT  
ACAGCGAGACCGCCTTTTTAGAGCTGAGGTCTTTAACCTCCGACGACACCGCTGTGTACTTCTGCACCCGGGGCAAG  
TACTGCACCGCTCGGGACTACTACAACCTGGGACTTCGAGCACTGGGGCCAAGGTACACCCGTGACAGTGTCCTCC

[0888] (人IL-15 $\alpha$ sushi结构域)

[0889] ATCACGTGTCCTCCTCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGACTCC  
AGGGAGCGGTACATTTGTAACCTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTTGAACAA  
GGCCACGAATGTCGCCCCTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

[0890] (人IgG1 CH2-CH3 (Fc) 结构域)

[0891] GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG  
TCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGTTGGT  
GGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA  
AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT  
GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG  
GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT  
GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAG  
ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCA  
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT  
CTCCTGGTAAATAA

[0892] 10-1074scFv/huIL-15 $\alpha$ Su/huIgG1 Fc构建体的核酸序列(包含前导序列)如下  
(SEQ ID NO:50):

[0893] (信号肽)

[0894] ATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTCCAGCGCCTACTCC

[0895] (10-1074scFv:VL-linker-VH scFv)

[0896] (VL)

[0897] TCCAGCTACGTGAGGCCTCTCTCCGTGGCTCTGGGCGAAACAGCTCGTATCAGCTGCGGTCTGTAAGCT  
CTGGGATCTCGTGCTGTGCAGTGGTACCAGCACCGGCCCCGGTCAAGCTCCCATTTTACTGATCTACAACAACCAAGA  
TCGGCCCTCCGGCATCCCCGAAAGGTTTAGCGGCACCCCCGATATCAACTTCGGCACAAGGGCCACTTTAACCATTA  
GCGGAGTGAGGCCGGCGACGAGGCCGACTACTACTGCCACATGTGGGACTCCCGGTCCGGCTTTTCTTGAGCTTT  
GGCGGCGCTACTCGTCTGACAGTGCTG

[0898] (链接头)

[0899] GGCGGAGGCGGCTCCGGAGGCGGCGGCAGCGGAGGAGGCGGATCC

[0900] (VH)

[0901] CAAGTTCAGCTGCAAGAATCCGGACCCGGTTTAGTGAAGCCCAGCGAGACTTTAAGCGTGACTTGTAGC  
GTGAGCGGCGACAGCATGAACAACCTACTACTGGACTTGATTTCGTCAGAGCCCCGGTAAGGGTTTAGAGTGATCGG  
CTACATCTCCGACCGGGAGTCCGCCACCTACAACCCCTCTTTAAACTCCCGGGTGGTGATCTCTCGTGACACCTCCA  
AGAACCAGCTGTCTTTAAAGCTGAACTCCGTGACCCCCGCTGACACCGCGTGTACTACTGCGCTACCGCTAGGCGG  
GGCCAGAGGATCTACGGCGTGGTGAGCTTCGGCGAGTTCTTCTACTACTACAGCATGGACGTGTGGGGCAAAGGCAC  
CACCGTGACCGTGTCTCTCC

[0902] (人IL-15 $\alpha$ sushi结构域)

[0903] ATCACGTGTCCTCCTCTATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGACTCC  
AGGGAGCGGTACATTTGTAACCTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCGTGTTGAACAA  
GGCCACGAATGTCGCCCCTGGACAACCCCCAGTCTCAAATGCATTAGA

[0904] (人IgG1 CH2-CH3 (Fc) 结构域)

[0905] GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCGAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCTGGTAAATAA

[0906] 成熟的N6scFv/huIL-15 $\alpha$ Su/huIgG1 Fc融合蛋白(包含前导序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:51):

[0907] (信号肽)

[0908] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0909] (N6 scFv:VL-linker-VH scFv)

[0910] (VL)

[0911] YIHVTQSPSSLSVSIQDRVTINCQTSQGVGSDLHWYQHKKPGRAPKLLIHHTSSVEDGVPSRFSGSGFHTSFNLTISDLQADDIATYYCQVLQFFGRGSRLLHIK

[0912] (链接头)

[0913] GGGSGGGSGGGGS

[0914] (VH)

[0915] RAHLVQSGTAMKKPGASVRVSCQTSGYTFTAHLFWFRQAPGRGLEWVGWIKPQYGAVNFGGGFRDRVTLTRDVYREIAYMDIRGLKPDDTAVYYCARDRSYGDSSWALDAWGQGTTVWSA

[0916] (人IL-15 $\alpha$ sushi结构域)

[0917] ITCPPMSVEHADIWKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIR

[0918] (人IgG1 CH2-CH3 (Fc) 结构域)

[0919] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0920] 成熟的2G12scFv/huIL-15 $\alpha$ Su/huIgG1 Fc融合蛋白(包含前导序列)的氨基酸序列如下(SEQ ID NO:52):

[0921] (信号肽)

[0922] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0923] (2G12 scFv:VL-linker-VH scFv)

[0924] (VL)

[0925] VVMTQSPSTLSASVGDITITICRASQSIETWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLKTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISGLQFDDFATYHCQHYAGYSATFGQGTRVEIK

[0926] (链接头)

[0927] GGGGSGGGGSGGGGS

[0928] (VH)

[0929] EVQLVESGGGLVKAGGSLILSCGVSNFRISAHTMNWRRVPGGGLEWVASISTSSSTYRDYADAVKGRFT  
VSRDDLEDVYVLQMHKMRVEDTAIYYCARKGSDRLSDNDPFDWPGTVVTVSP

[0930] (人IL-15R $\alpha$ sushi结构域)

[0931] ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIR

[0932] (人IgG1 CH2-CH3 (Fc) 结构域)

[0933] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV  
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN  
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQ  
KSLSLSPGK

[0934] 成熟的VRC07 (523) scFv/huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1 Fc融合蛋白(包含前导序列)的氨基酸序列如下 (SEQ ID NO:53):

[0935] (信号肽)

[0936] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0937] (VRC07 (523) scFv:VL-linker-VH scFv)

[0938] (VL)

[0939] SSSLTQSPGTLSPGETAIISCRTSQYGSRAWYQQRPQGAPRLVIYSGSTRAAGIPDRFSGSRWGPDYN  
LTISNLESGDFGVYYCQQYEFFGQGTKVQVDIK

[0940] (链接头)

[0941] GGGGSGGGGSGGGGS

[0942] (VH)

[0943] QVRLSQSGGQMKKPGDSMRISCRASGYEFINCPINWIRLAPGKRPEWMGWMKPRHGAVSYARQLQGRVT  
MTRDMYSETAFLELRSLTSDDTAVYFCTRKYCTARDYYNWDFEHWGQGPVTVSS

[0944] (人IL-15R $\alpha$ sushi结构域)

[0945] ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIR

[0946] (人IgG1 CH2-CH3 (Fc) 结构域)

[0947] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV  
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN  
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQ  
KSLSLSPGK

[0948] 成熟的10-1074scFv/huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1 Fc融合蛋白(包含前导序列)的氨基酸序列如下 (SEQ ID NO:54):

[0949] (信号肽)

[0950] MKWVTFISLLFLFSSAYS

[0951] (10-1074) scFv:VL-linker-VH scFv)

[0952] (VL)

[0953] SSVYRPLSVALGETARISCGRQALGSRVQWYQHRPGQAPILLIYNNQDRPSGIPERFSGTPDINFGTR  
ATLTISGVEAGDEADYYCHMWDSRSGFSWSFGGATRLTVL

[0954] (链接头)

[0955] GGGSGGGSGGGGS

[0956] (VH)

[0957] QVQLQESGPGLVKPSSETLSVTCSVSGDSMNYYWTWIRQSPGKGLEWIGYISDRESATYNPSLNSRVVI  
SRDTSKNQLSLKLNSVTPADTAVYYCATARRGQRIYGVVSFGEFFYYYSMDVWGKGTITVTVSS

[0958] (人IL-15R $\alpha$ sushi结构域)

[0959] ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTPSLKCIR

[0960] (人IgG1 CH2-CH3 (Fc) 结构域)

[0961] EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV  
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN  
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQ  
KSLSLSPGK

[0962] 在一些情况下,前导肽会从成熟多肽上剪切。

[0963] 类似的构建体可被生成以表达如上所述的bNAb scFv/huIL-15N72D融合蛋白。

[0964] 如实施例1和之前所述(实施例1和2中的美国专利-专利号8,507,222,通过引用并入本文)序列被克隆到表达载体中,并将该表达载体转染到CHO细胞中。在一些情况下,用编码huIL-15N72D和huIL-15R $\alpha$ Su/Fc两种融合蛋白的载体转染CHO细胞,而该两种融合蛋白具有本发明的相同或不同的结合结构域。使用如上所述的蛋白A亲和层析从CHO细胞培养物上清液中纯化融合蛋白复合体。

[0965] 例如,huIL-15N72D和N6scFv/huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1 Fc表达载体在CHO细胞中的共表达允许可溶性TxM复合体(称为2\*hN6/TxM)的形成和分泌。huIL-15N72D和2G12scFv/huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1 Fc表达载体在CHO细胞中的共表达允许可溶性TxM复合体(称为2\*h2G12/TxM)的形成和分泌。huIL-15N72D和VRC07(523)scFv/huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1 Fc表达载体在CHO细胞中的共表达允许可溶性TxM复合体(称为2\*hVRC07(523)/TxM)的形成和分泌。huIL-15N72D和10-1074scFv/huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1 Fc表达载体在CHO细胞中的共表达允许可溶性TxM复合体(称为2\*h10-1074/TxM)的形成和分泌。

[0966] 如上所示,可以通过蛋白A层析和其他分离方法(即,离子交换、疏水和/或尺寸排阻层析和过滤方法)从CHO细胞上清液中纯化TxM蛋白。再者,纯化的蛋白质可以通过凝胶、层析和其他分析方法被特性分析。例如,图20显示各种TxM复合体的尺寸排阻层析的分析,其包含具有2个scAb或结合结构域的那些(即2头(2H) IL-15N72D:抗-PD-L1 scAb/IL-15R $\alpha$ Su/Fc复合体)或具有4个scAb或结合结构域的那些(即4头(4H) 抗-PD-L1scAb/IL-15N72D:抗-PD-L1 scAb/IL-15R $\alpha$ Su/Fc复合体)或不同靶向结构域的组合(即,肿瘤靶向结构域/抗-PDL1scAb TxM复合体)。SEC层析谱表明,经蛋白A纯化的TxM蛋白主要由具有与IL-15N72D:IL-15R $\alpha$ Su/Fc复合体一致的迁移模式的一个主要蛋白质峰组成。

[0967] 包括scAb或结合结构域类似TxM构建体可以使用对下列分子有特异性的抗体序列而便利地生成:其他CD抗原、细胞因子或趋化因子受体或配体、生长因子受体或配体、细胞粘附分子、MHC/MHC样分子、Fc受体、Toll-样受体、NK受体、TCRs、BCRs、阳性/阴性共刺激受体或配体、死亡受体或配体、肿瘤相关抗原、病毒编码的和细菌编码的抗原、以及细菌特异性抗原。人们特别感兴趣的是对下列分子之抗原具有疾病特异性结合结构域(例如

scAbs)的TxM:CD4,CD19,CD20,CD21,CD22,CD23,CD25,CD30,CD33,CD38,CD40,CD44,CD51,CD52,CD70,CD74,CD80,CD123,CD152,CD147,CD221,EGFR,HER-2/neu,HER-1,HER-3,HER-4,CEA,OX40配体,cMet,组织因子,Nectin-4,PSA,PSMA,EGFL7,FGFR,IL-6受体,IGF-1受体,GD2,CA-125,EpCam,死亡受体5,MUC1,VEGFR1,VEGFR2,PDGFR,Trail R2,叶酸受体,血管生成素(angiopoietin)-2,alphavbeta3 integrin receptor,HLA-DR抗原和本文描述的其他疾病靶标。针对来自HIV,HCV,HBC,CMV,HTLV,HPV,EBV,RSV和其他病毒的病毒抗原的抗体结构域也是令人感兴趣的,特别是那些辨识HIV包膜刺突和/或gp120和gp41表位的抗体结构域。此类抗体结构域可以由本领域已知的序列生成,或者从本领域已知的多种来源(即,脊椎动物宿主或细胞、组合文库、随机合成文库、计算模型等)中从头分离。

[0968] 实施例6:其他TxM的活性的特性分析

[0969] 使用CTLA-4阳性免疫细胞评估CTLA-4TxM的结合活性。在对小鼠特异性CTLA-4TxM的研究中,首先通过抗-CD3 Ab (2C11, 4 $\mu$ g/ml) 诱导小鼠淋巴细胞中CTLA-4的表达4天。CTLA-4表达的评估是通过使用PE抗-小鼠CTLA-4抗体(克隆UC10-4B9)或PE亚美尼亚仓鼠IgG同型对照(对细胞)染色。如图21A所示,流式细胞仪分析展示小鼠CTLA-4被显著诱导。添加小鼠特异性CTLA-4TxM(100 $\mu$ l上清液(sup))能够阻断抗-小鼠CTLA-4抗体结合,正如阳性对照抗-mCTLA-4抗体(克隆HB304)也能。对于人特异性CTLA-4TxM的研究,通过抗-CD3 Ab (OKT3: 4 $\mu$ g/ml) 诱导人PBMC(外周血单个核细胞)中CTLA-4的表达3天。然后使用PE抗-人CTLA-4抗体(克隆BNI3,生物传奇)或PE小鼠IgG2a, $\kappa$ 同型对照对细胞染色。与前述结果一致,人特异性CTLA-4TxM(CL-8-100u1)能够阻断人免疫细胞表面上的CTLA-4(图21B)。这些结果展示了CTLA-4TxM复合体的特异性。

[0970] 类似地,在PD-L1-阳性5T33骨髓瘤细胞(按照实施例2所述方法)和CTLA-4-阳性免疫细胞中,评估小鼠特异性PD-L1/CTLA-4TxM复合体的结合活性。如图22A和图22B所示,PD-L1/CTLA-4TxM(sup)能够阻断与细胞表面上表达的PD-L1和CTLA-4二者的结合。这也表明,多特异性TxM复合体保留了每个链接结合结构域各自的反应性。

[0971] 使用CD47-阳性细胞评估CD47 TxM构建体的直接结合。如图23A和图23B所示,小鼠和人特异性CD47 TxM复合体能够分别染色小鼠B16F10黑素瘤细胞和人Jurkat T细胞。这些结果表明这些复合体保留了CD47结合活性。

[0972] 使用单链DNA ELISA方法(ALPCO ssDNA ELISA试剂盒35-SSSHU-E01)评估包括TNT scAb结构域的TxM复合体的结合。简言之,将包括TNT scAb结构域的纯化的TxM蛋白连续稀释,并将100 $\mu$ L加入用人重组单链DNA包被的ELISA孔中。温育30分钟后,洗涤孔并加入100 $\mu$ L HRP-抗-人IgG抗体。在额外的温育和洗涤步骤后,用TMB底物检测已结合的TxM蛋白。孔的吸光度是在450nm处读取。如图24A和图24B所示,TNT scAb TxM和TNT scAb/抗-人PD-L1scAb TxM复合体都能够结合单链DNA,同时TNT scAb TxM( $K_d=188$ pM)具有比TNT scAb/抗-人PD-L1 scAb TxM( $K_d=10279$ pM)更低的 $K_d$ ,其可能是因为与TNT scAb/抗-人PD-L1 scAb TxM中的2H TNT scAb相比,TNT scAb TxM中4H TNT scAb的亲合力更高。

[0973] TNT scAb TxM复合体结合肿瘤细胞的能力亦被评估,其通过固定和透化细胞以暴露肿瘤细胞DNA。在最初的研究中,首先用1.5%多聚甲醛固定MB231乳腺癌细胞并用0.1%皂苷使其透化,然后将 $10^5$ 个细胞( $10^6$ 细胞/mL)与0.01-100nM TNT scAb TxM、TNT scAb/抗-人PD-L1scAb TxM或2H-抗-人PD-L1 scAb TxM(阴性对照)在室温下温育30分钟。洗涤细胞

并用抗-人IgG Fc-APC染色,然后通过流式细胞仪分析。图25A显示在不同TxM浓度下MB231细胞染色的平均荧光强度(MFI),证实了TNT scAb TxM和TNT scAb/抗-人PD-L1 scAb TxM对透化的乳腺肿瘤细胞的特异性和浓度依赖性的结合。用阴性对照PD-L1 scAb TxM复合体观察到最弱的结合,其与MB231细胞系上PD-L1的低水平表达一致。用固定和透化的PD-L1-阴性A549人肺肿瘤细胞进行了类似的研究。再一次,结果(图25B)证实了TNT scAb TxM和TNT scAb/抗-人PD-L1 scAb TxM对透化的肺肿瘤细胞的特异性和浓度依赖性的结合。

[0974] 此外,包括hOAT scAb和/或抗-人PD-L1 scAb结构域的TxM复合体结合肿瘤细胞的能力被评估。SW1990人胰腺癌细胞系表达高水平的人TF和低水平的人PD-L1。在该研究中,将 $10^5$ 个SW1990细胞( $10^6$ 细胞/mL)与0.01-100nM的2头(h2)hOATscAb/TxM、抗-人PD-L1scAb/hOATscAb/TxM、h2\*抗-人PD-L1scAb/TxM或对照hOAT Ab或对照抗-人PD-L1 Ab(Avelumab)在室温下温育30分钟。洗涤细胞并用抗-人IgG Fc-APC染色,然后通过流式细胞仪分析。图26显示在不同蛋白质浓度下SW1990细胞染色的平均荧光强度(MFI)。结果证实,在SW1990肿瘤细胞上,包括hOAT scAb(h2\*hOATscAb/TxM和抗-人

[0975] PD-L1scAb/hOATscAb/TxM)的TxM复合体展现出与对照hOAT Ab相似的高水平的人TF染色。在SW1990肿瘤细胞上,包括抗-人PD-L1 scAb(h2\*抗-人PD-L1scAb/TxM)的TxM复合体展现出与对照抗-人PD-L1 Ab(阿维鲁单抗(Avelumab))相似的较低水平的人PD-L1染色。

[0976] 基于ELISA的方法被用于证实huIL-15N72D:人LFA-1I结构域(K287C/K294C)/huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1 Fc复合体的形成。被huIL-15N72D表达载体和人LFA-1I结构域(K287C/K294C)/huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1 Fc表达载体共转染的CHO细胞的培养物上清液用于评估(复合体的)结合活性。如图27A所示,融合蛋白复合体的检测是使用huIL15/huIgG1-特异性ELISA,其具有捕获抗体,抗-人IL-15抗体(R&D Systems)和检测抗体,抗-人IgG抗体(杰克森免疫研究)。此结合与对照样品(仅使用含有未转染的CHO细胞的培养基上清液)进行比较。结果表明2\*hLFA1/TxM的产生和其正常的复合体形成。

[0977] 此外,通过ELISA评估2\*hLFA1/TxM对ICAM-1的结合(图27B)。免疫板的孔用1 $\mu$ g人ICAM-1-Fc(生物传奇)所包被。在洗涤步骤之后,向细胞中加入含有2\*hLFA1/TxM的CHO培养物上清液。在温育和另外的洗涤步骤之后,使用HRP-偶联的抗-人IL-15抗体(R&D Systems)检测融合蛋白复合体的结合。在与ABTS温育后,孔中的吸光度是在405nm处读取。图27B的结果表明此复合体可辨识ICAM-1。

[0978] 类似的基于ELISA的方法证实,在转染的CHO细胞培养物上清液中有

[0979] huIL-15N72D:hDLL4/huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1 Fc复合体的形成。在图28中,培养物上清液中的该融合蛋白复合体的检测是使用huIL15/huIgG1-特异性ELISA,其具有捕获抗体,抗-人IL-15抗体(R&D Systems)和检测抗体,抗人IgG抗体(杰克森免疫研究)。此样品与对照样品(仅使用含有未转染的CHO细胞的培养基上清液)进行比较。结果表明2\*hDLL4/TxM复合体的产生和其正常的复合体形成。

[0980] 基于ELISA的方法亦证实了huIL-15N72D:haTIM3scFv/huIL-15R $\alpha$ Su/huIgG1 Fc复合体的形成。在图29中,在转染的CHO培养物上清液中的融合蛋白复合体的检测是使用huIL15/huIgG1-特异性ELISA,其具有捕获抗体,抗-人IL-15抗体(R&D Systems)和检测抗体,抗-人IgG抗体(杰克森免疫研究)。此结合与对照样品(仅使用含有未转染的CHO细胞的培养基上清液)进行比较。结果表明2\*haTIM3/TxM复合体的产生和其正常的复合体形成。



[0981] 来自用bNAb scFv TxM表达载体共转染的CHO细胞的上清液被用于确定TxM复合体的表达和结合能力。基于ELISA的方法证实了bNAb scFv TxM复合体的形成。在图30A和图30B中,在转染的CHO培养物上清液中的融合蛋白复合体的检测是使用huIL15/huIgG1-特异性ELISA,其具有捕获抗体,抗-人IL-15抗体(R&D Systems)和检测抗体,抗-人IgG抗体(杰克森免疫研究)。阳性对照TxM可辨识hCD20。结果表明四种不同的bNAb scFv TxM复合体的产生和其正常的复合体形成。

[0982] 此外,通过ELISA评估bNAb scFv TxM对HIV蛋白靶标(gp120(SF162.LS)和gp140(SF162.LS))的结合。对于该研究,免疫板的孔用0.1 $\mu$ g HIV gp120(SF162.LS)或gp140(SF162.LS)(ProtTech公司)所包被。在洗涤步骤之后,向细胞中加入含有bNAb scFv TxMs的CHO培养物上清液。阴性对照TxM可识别hCD20。在温育和另外的洗涤步骤之后,使用HRP-偶联的抗-人IgG抗体(杰克森免疫研究)检测融合蛋白复合体的结合。在与ABTS温育后,孔中的吸光度是在405nm处读取。图30C至图30F中的结果表明bNAb scFv TxM复合体可辨识HIV蛋白质靶标。

[0983] 总之,这些结果展示,具有特异于多种免疫检查点和信号传导分子的结合结构域的TxM复合体可以被生成,并提供对靶分子的增强的结合活性。这些复合体展现出IL-15免疫刺激活性,并且能够导向针对细胞上的靶抗原的免疫介导的细胞毒性。这些复合体在动物肿瘤模型中也是非常有效的。

[0984] 实施例7:TxM复合体的免疫刺激和抗肿瘤活性

[0985] 如实施例2所示,已对TxM复合体的IL-15免疫刺激活性所做的评估是基于IL-2R $\beta$ / $\gamma$ -承载之免疫细胞的增殖,例如32D $\beta$ 细胞系。简言之,渐增浓度的纯化TxM蛋白质被加到在200 $\mu$ L IMDM:10% FBS培养基中的32D $\beta$ 细胞( $10^4$ 细胞/孔)中,并将细胞在37 $^{\circ}$ C下温育3天。然后加入PrestoBlue细胞存活率试剂(20 $\mu$ L/孔)。4小时后,吸光度是在570nm处测量(辅以600nm参考波长用于标准化)来确定细胞增殖,其原理是基于PrestoBlue(一种基于刃天青(resazurin)的溶液)会被代谢活跃的细胞所还原。然后,TxM复合体的IL-15生物活性的半最大效应浓度(half maximal effective concentration,EC 50)的确定是基于吸光度和TxM蛋白质浓度之间的关系。表1显示包含本发明的包括结合结构域的各种TxM复合体的IL-15EC50值。该结果证实了各种纯化的TxM复合体的免疫刺激活性,包含那些具有两个scAb/结合结构域的复合体(即,2头(2H)抗-PD-L1 scAb/IL-15N72D:抗-PD-L1scAb/IL-15R $\alpha$ Su/Fc复合体)或具有四个scAb/结合结构域的复合体(即,4头(4H)抗-PD-L1scAb/IL-15N72D:抗-PD-L1 scAb/IL-15R $\alpha$ Su/Fc复合体)或不同靶向结构域的组合(即,肿瘤靶向结构域/抗-PDL1scAb TxM复合体)。

[0986] 表格1.TxM复合体的IL-15活性

[0987]

	EC50 (pM TxM)
2H-抗-人 PD-L1 scAb TxM	14
4H-抗-人 PD-L1 scAb TxM	220
2H-抗-小鼠 PD-L1 scAb TxM	58
抗-人 CTLA-4 scAb/抗-人 PD-L1 scAb TxM	73
TNT scAb TxM	1013
TNT scAb/抗-人 PD-L1 scAb TxM	8498

[0988]

2H-hOAT TxM	115
hOAT/抗-人 PD-L1 scAb TxM	202

[0989] hOAT scAb TxM刺激针对肿瘤细胞的免疫细胞细胞毒性的能力在体外被评估。人NK细胞用来自Stemcell Technologies(干细胞科技)的NK细胞分离试剂盒从肤色血球层中纯化,并用作效应细胞。TF-阳性人胰腺肿瘤细胞SW1990被以CellTrace Violet标记并用作靶细胞。人NK细胞和SW1990肿瘤细胞以1:1的E:T比例(effector:target,效应细胞:靶细胞)在仅培养基中混合,或在含有10nM hOAT Ab(对照)或2H hOAT scAb TxM复合体的培养基中混合。40小时后,靶细胞死亡的百分比以流式细胞仪评估,其基于Violet标记的靶细胞的碘化丙啶染色。如图31所示,与未经处理的NK细胞或经hOAT Ab处理的NK细胞(即传统的ADCC)相比,与2H hOAT scAb TxM复合体一起温育的人NK细胞能够介导更强的对抗TF-阳性人肿瘤细胞的细胞毒性。这些结果代表,与抗-TF抗体相比,抗-TF TxM复合体的免疫细胞介导的靶向抗肿瘤活性的显著改善。

[0990] TxM复合体克服检查点介导的T细胞活性抑制的能力在先前描述的体外测定中被评估(Steward,R等Cancer Immunol Res 2015 3(9):1052-1062)。例如,将新鲜分离的原代人T细胞与以抗-CD3和抗-CD28包被的珠子一起培养,以展示增加的免疫细胞增殖(以BrDU(溴化去氧尿苷)掺入法测量)和IFN  $\gamma$  释放(以ELISA测量)。因PD-L1/PD-1相互作用的抑制性信号传导,在珠子上添加PD-L1显著降低了T细胞增殖和IFN  $\gamma$  释放。在以抗-CD3、抗-CD28和PD-L1包被的珠子以及T细胞的情境下,添加可溶性PD-L1 TxM或PD-1TxM增加T细胞增殖和IFN  $\gamma$  释放,由于所添加的复合体阻断了PD-L1/PD-1的相互作用。在以抗-CD3、抗-CD28和抗CTLA-4包被的珠子以及T细胞的情境下使用CTLA-4TxM所做的类似测定亦展示了CTLA-4TxM的免疫检查点抑制活性。

[0991] 使用人肿瘤细胞系和患者来源肿瘤细胞在小鼠异种移植模型中评估这些复合体的抗肿瘤活性(Morton,J.J.等.Cancer Research 2016doi:10.1158/0008-5472)。市售的人源化小鼠模型(即,Hu-CD34 NSG<sup>TM</sup>,杰克森实验室(Jackson Laboratory))已被开发以评估,在对抗源自人肿瘤细胞系和患者来源肿瘤细胞的肿瘤时,免疫疗法对人免疫细胞应答

的活性。例如,皮下承载PD-L1-阳性人MDA-MB-231乳腺癌肿瘤的Hu-CD34 NSG<sup>TM</sup>小鼠用PBS或渐增剂量水平的PD-L1 TxM或PD-1TxM处理(即,每周两次皮下给药,共计2周)并评估肿瘤生长。肿瘤体积的剂量依赖性降低提供了PD-L1 TxM和/或PD-1TxM对PD-L1-阳性人肿瘤的治疗活性的证据。使用患者来源的PD-L1-阳性肿瘤细胞(即BR1126(TM00098),LG1306(TM00302))也可获得实体瘤小鼠模型。承载BR1126肿瘤的Hu-CD34 NSG<sup>TM</sup>小鼠中PD-L1 TxM和/或PD-1TxM的活性的评估是通过评估处理后的肿瘤生长或小鼠存活率。此外,血液和肿瘤微环境中T细胞应答的处理依赖性变化在这些模型中被评估。经PD-L1 TxM和/或PD-1TxM处理后,血液或肿瘤中T细胞的水平或活性(即IFN  $\gamma$ -阳性细胞)的增加提供了载瘤小鼠中这些复合体的免疫刺激活性的证据。综上所述,这些研究展示了PD-L1 TxM和/或PD-1TxM在体内对抗人肿瘤的免疫细胞介导的活性。

[0992] 其他具体例

[0993] 虽然已经对本发明结合其详细说明加以描述,但是前文的说明旨在演示而并非限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求的范围界定。其他方面、优点和修改在以下权利要求的范围内。

[0994] 本文参考的专利和科学文献建立了本领域技术人员可用的知识。本文引用的所有美国专利和公开或未公开的美国专利申请通过引用并入本文。本文引用的所有公开的外国专利和专利申请均在此通过引用并入本文。本文引用的以登录号表示的Genbank和NCBI提交在此通过引用并入本文。本文引用的所有其他公开的参考文献、文件、手稿和科学文献在此通过引用并入本文。

[0995] 虽然已经参考其优选的具体例而具体表明和描述了本发明,但是本领域技术人员应理解,在不脱离所附权利要求所涵盖的本发明的范围的情况下,可以在形式和细节上进行各种变化。

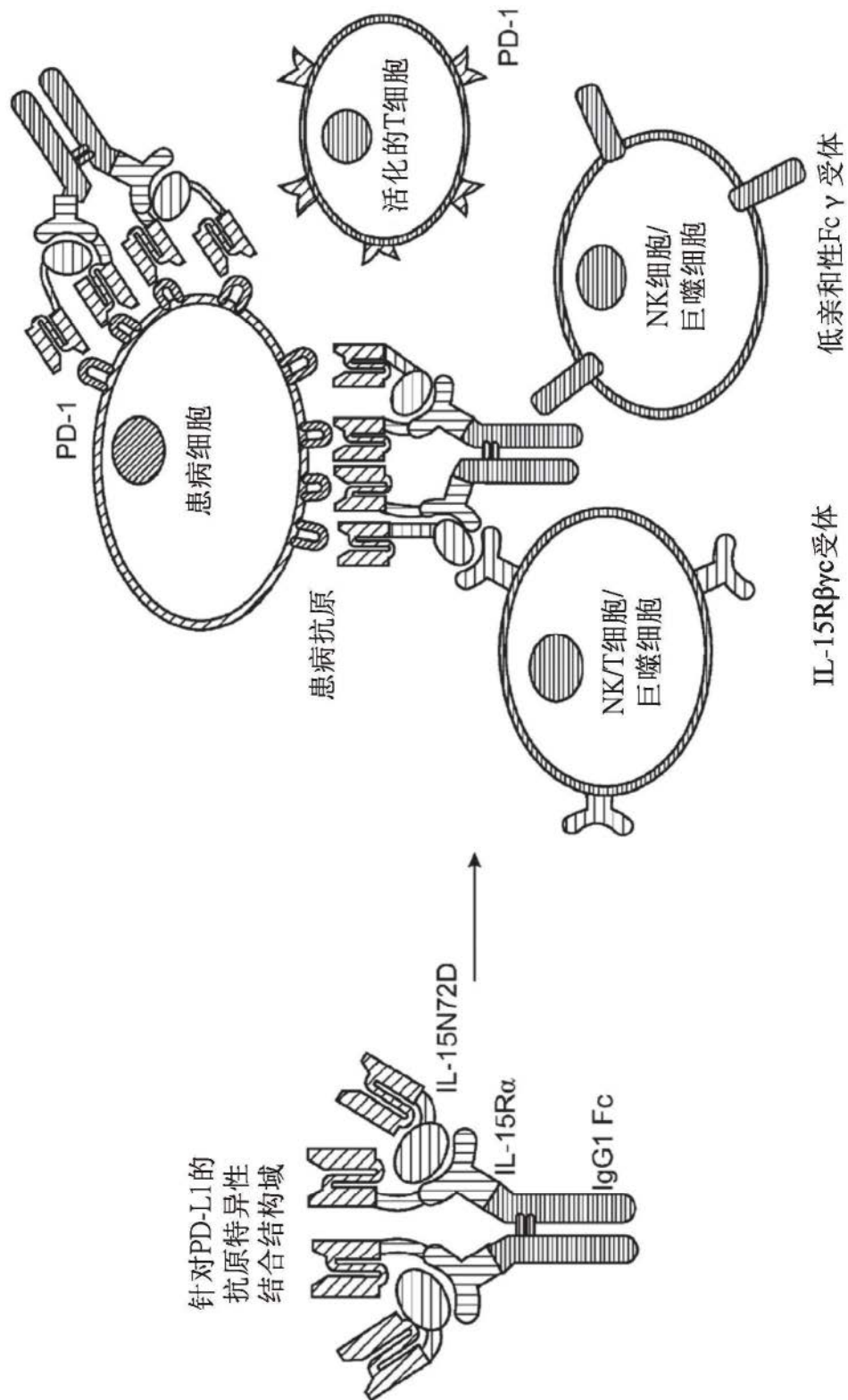


图1

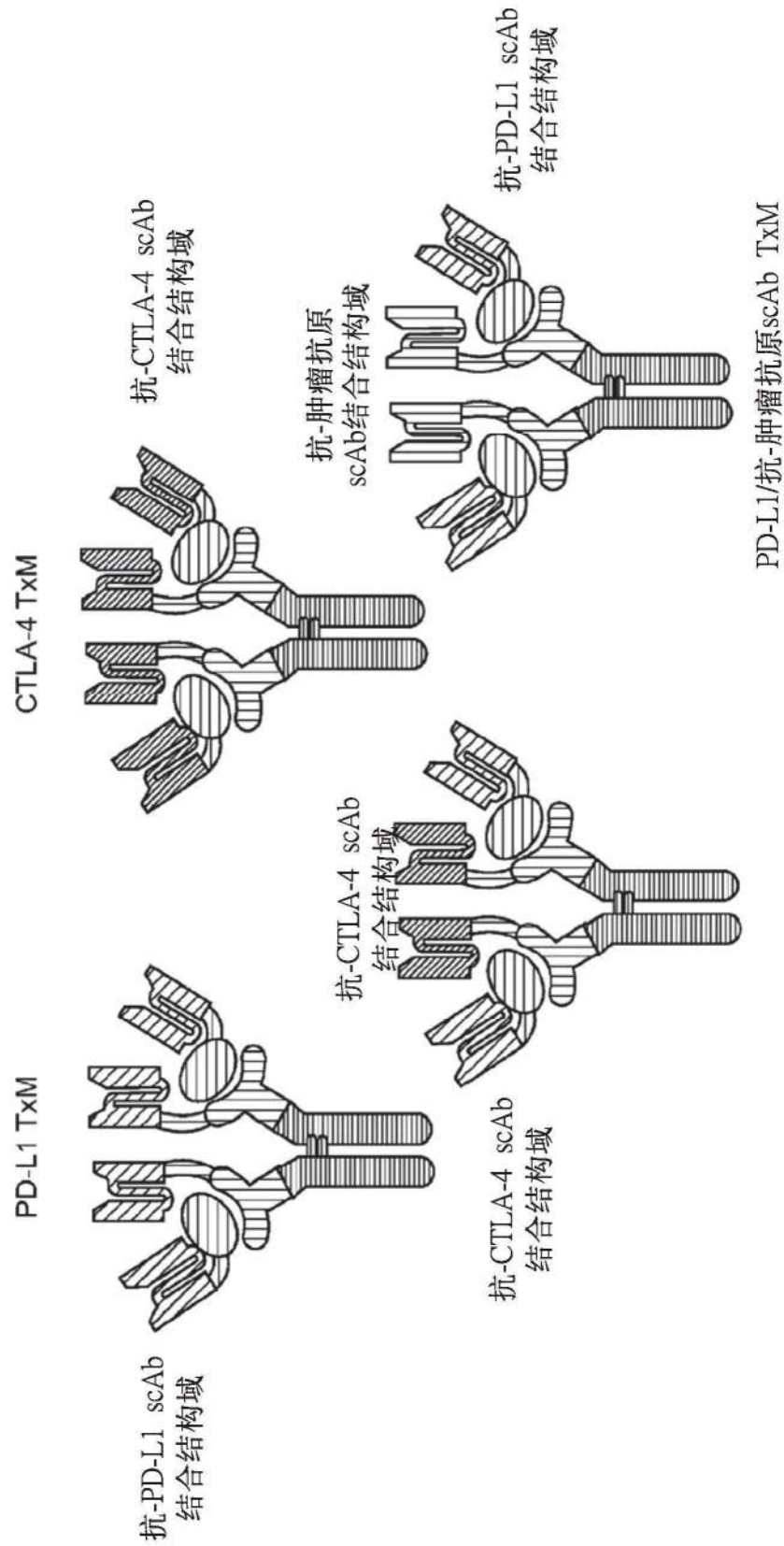


图2

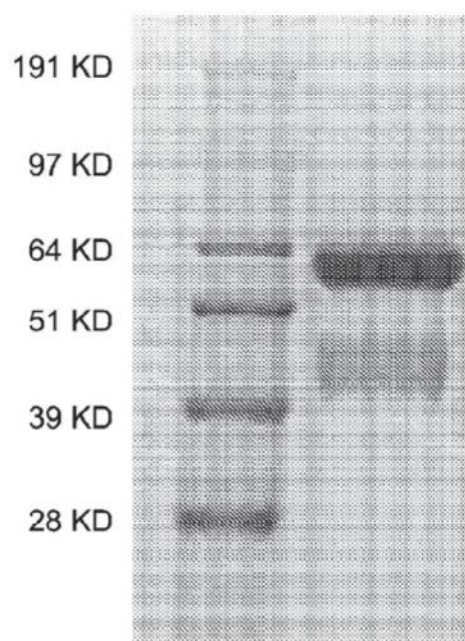


图3

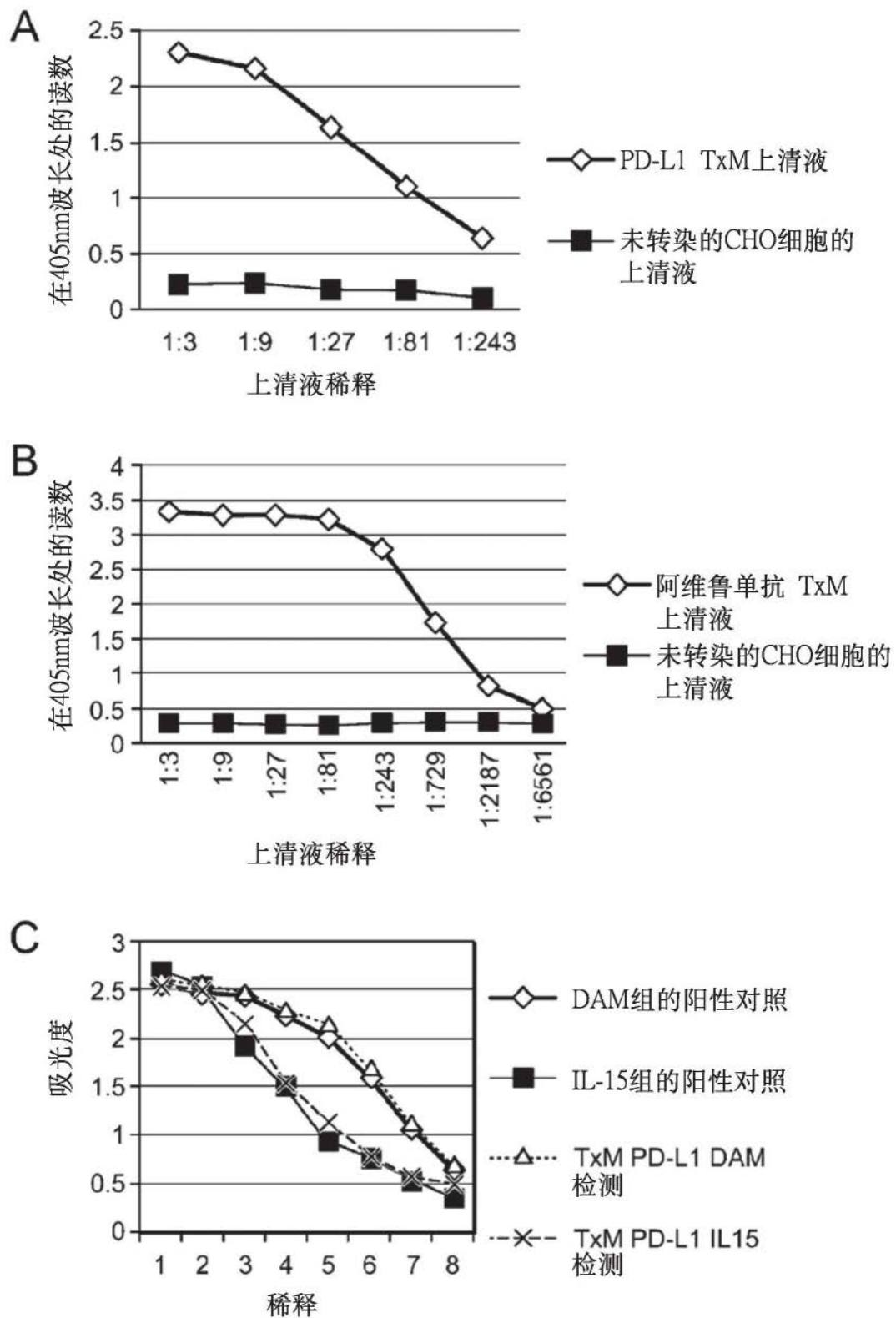


图4

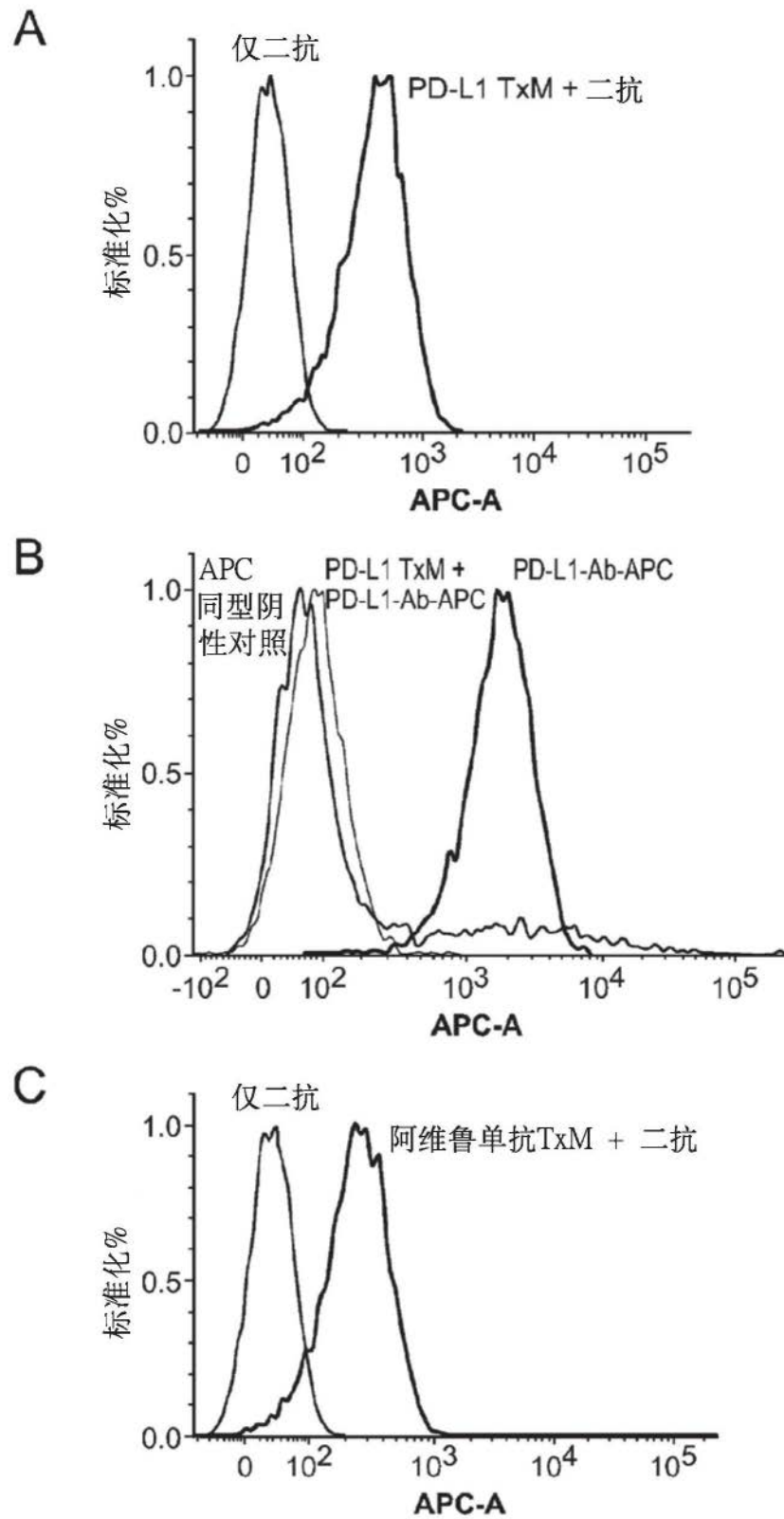


图5



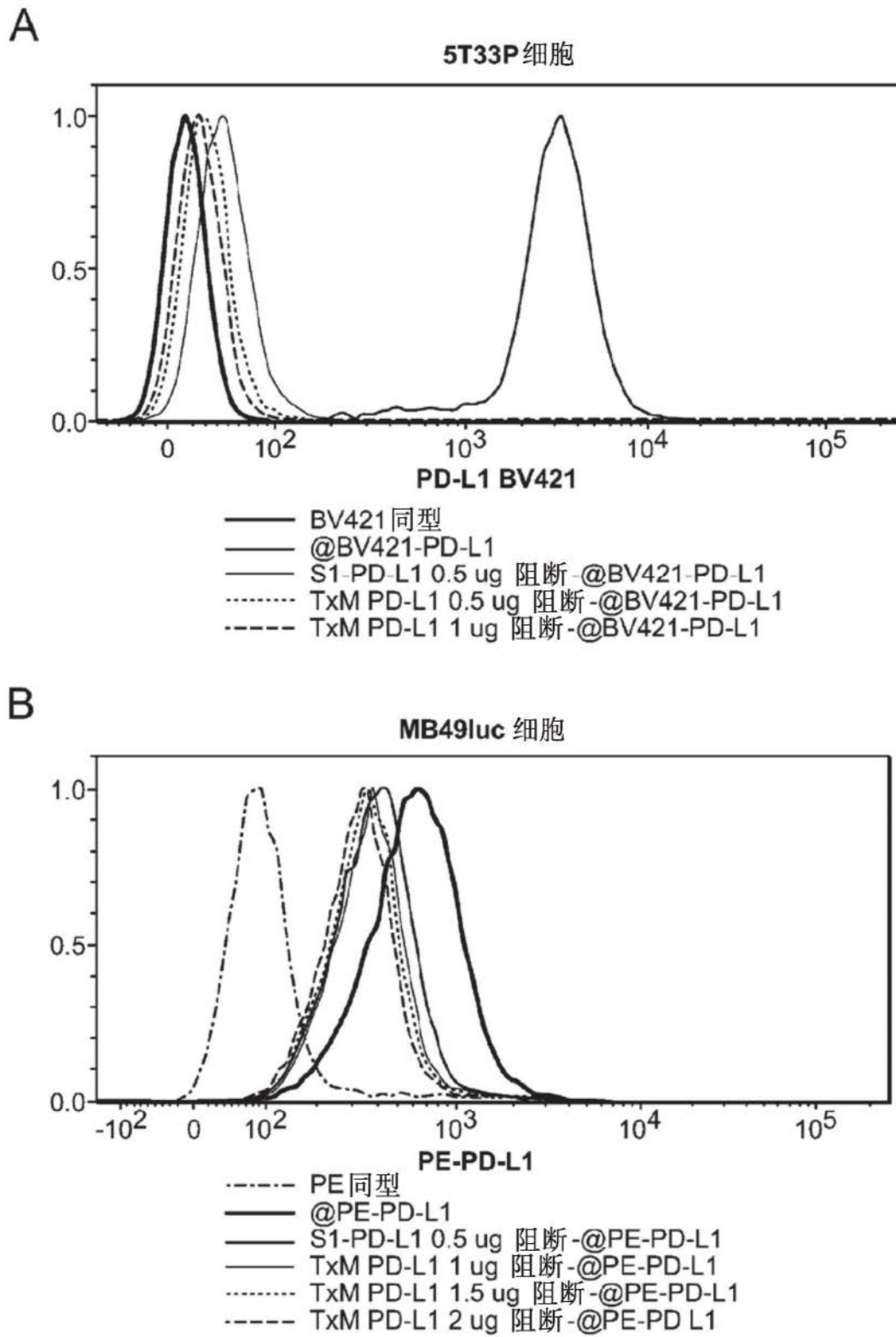


图6

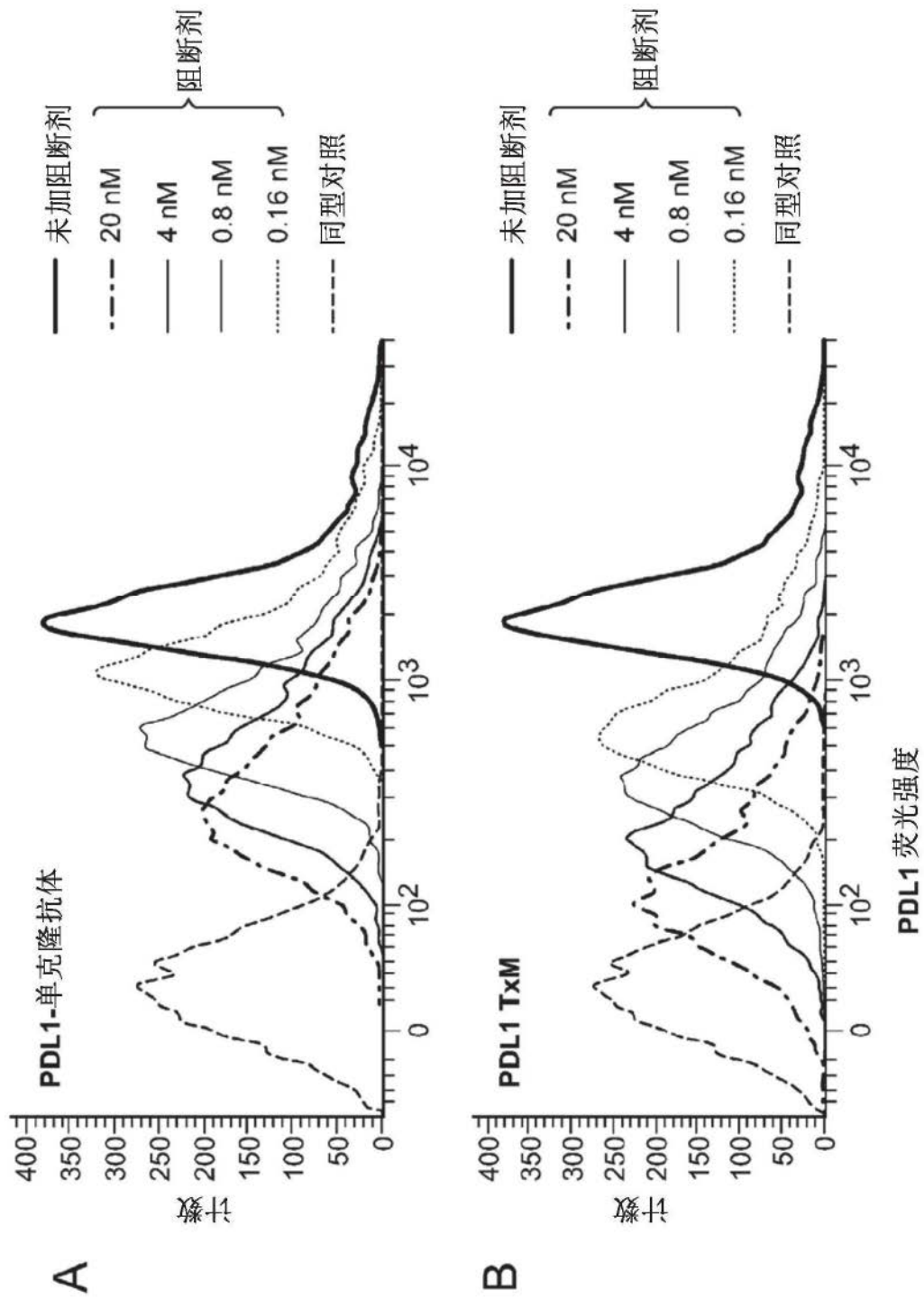


图7

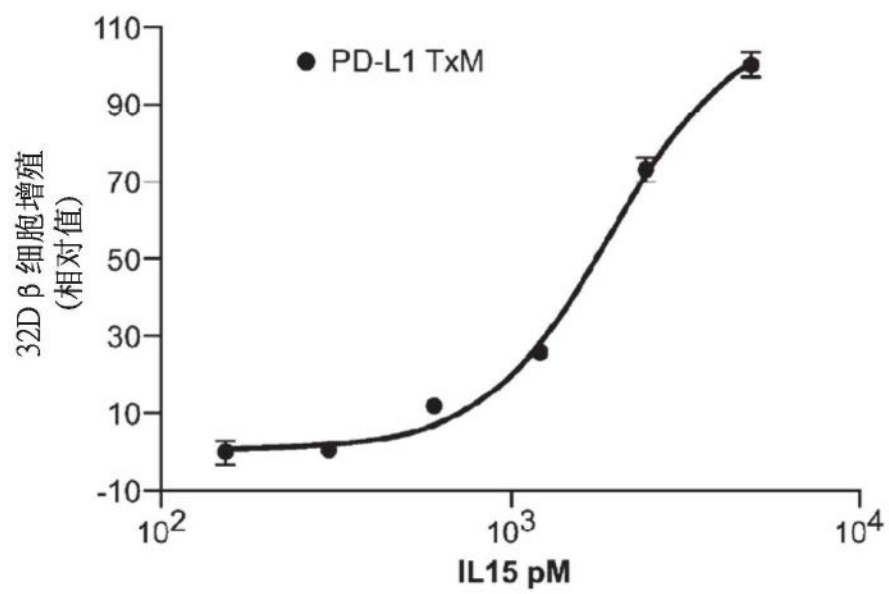


图8

A

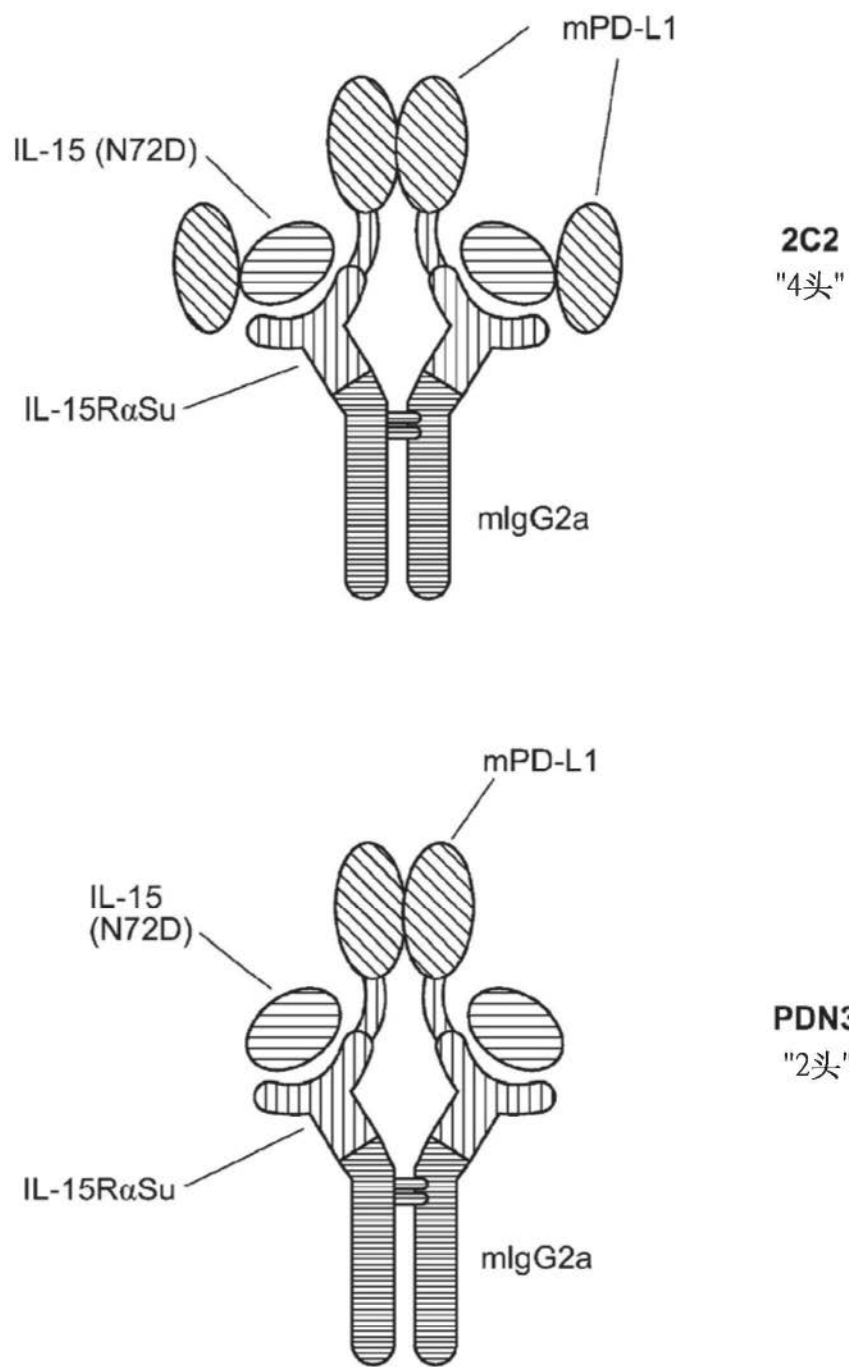


图9

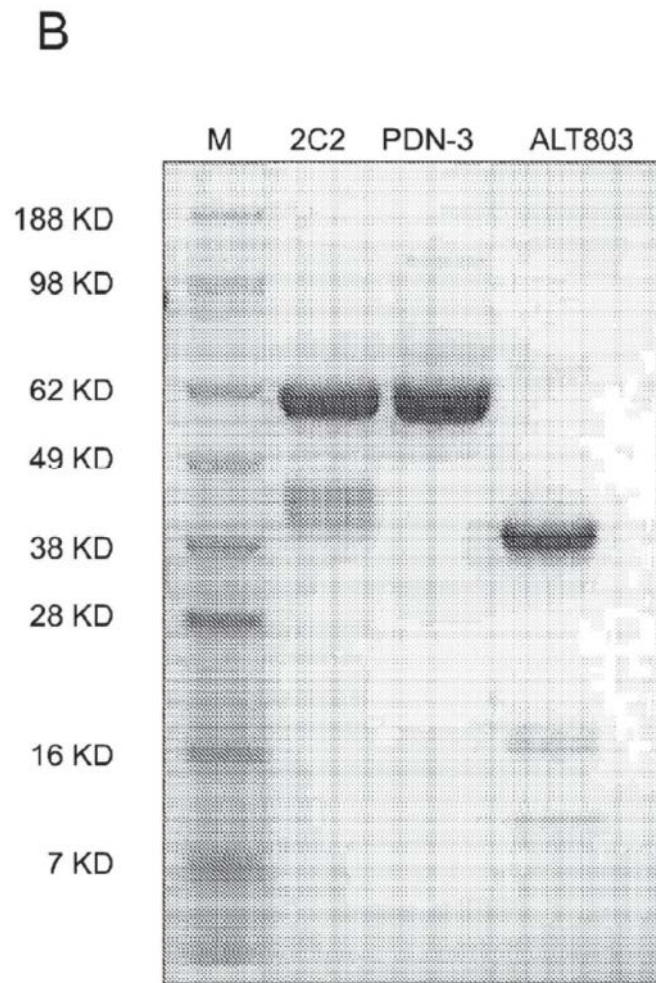


图9(续)

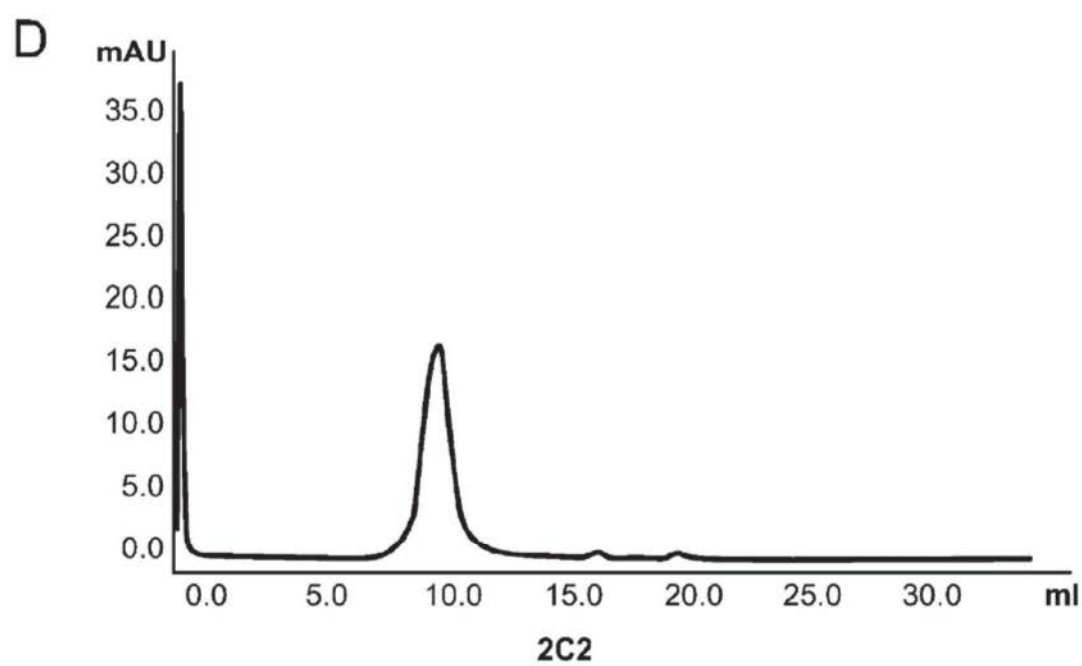
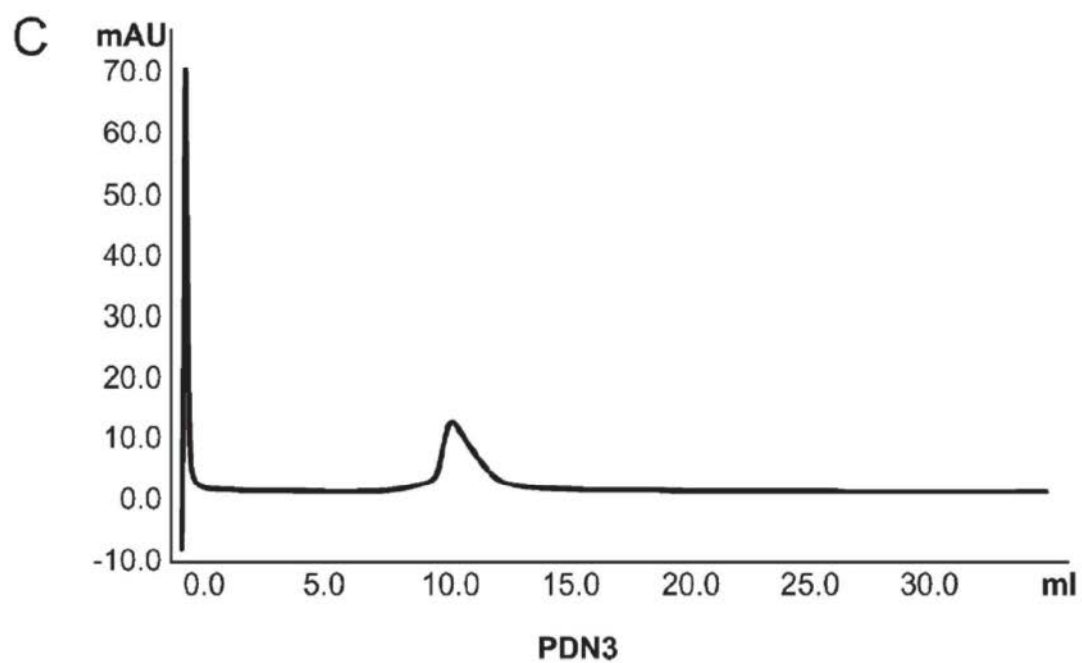


图9 (续)

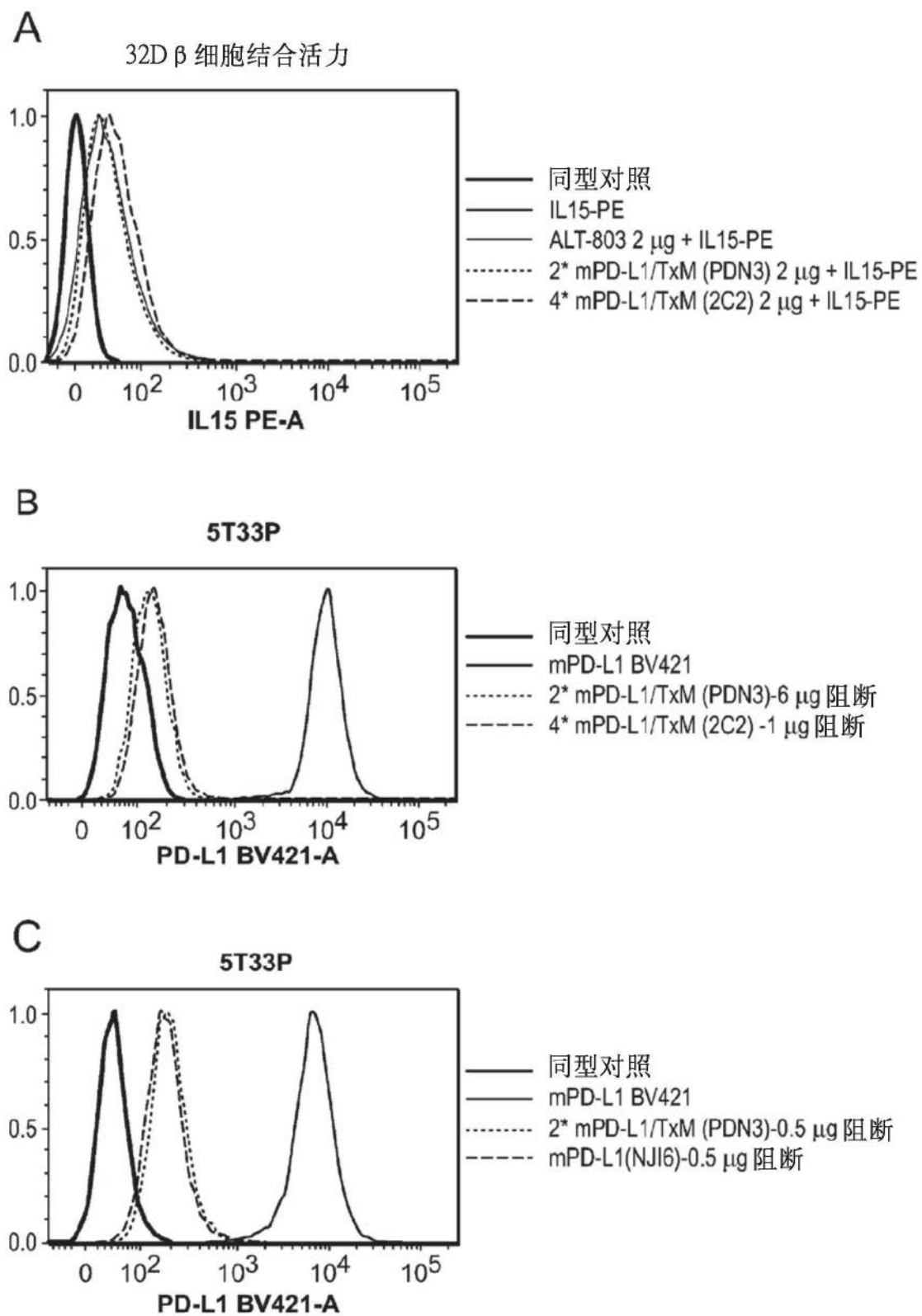
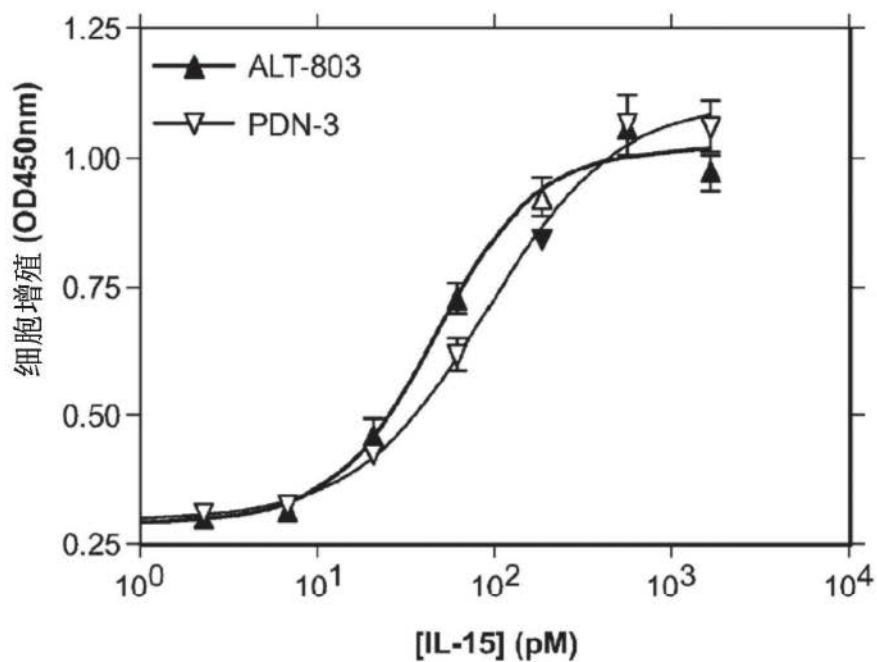
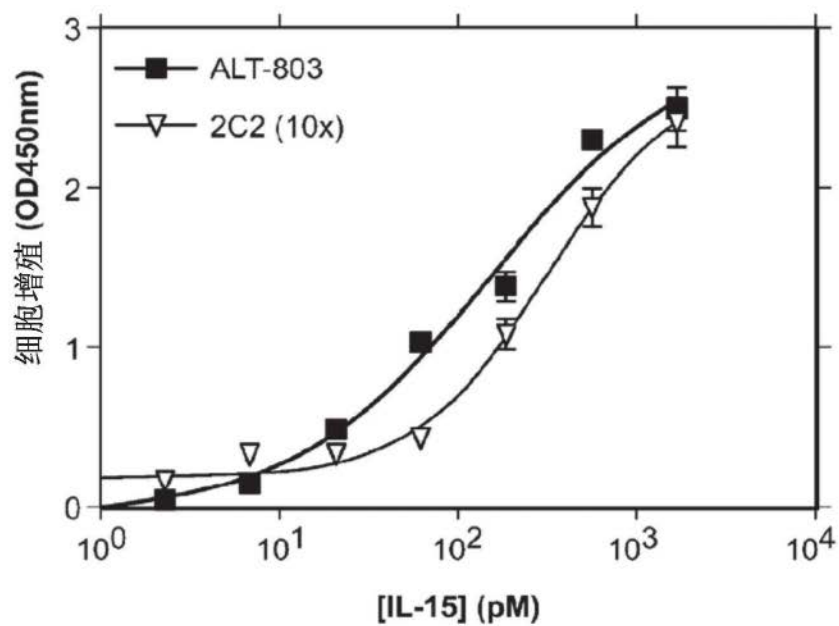


图10

A

使用32D  $\beta$  细胞的EC50测定

B

使用32D  $\beta$  细胞的EC50测定

注：使用了10倍浓度的2C2

图11



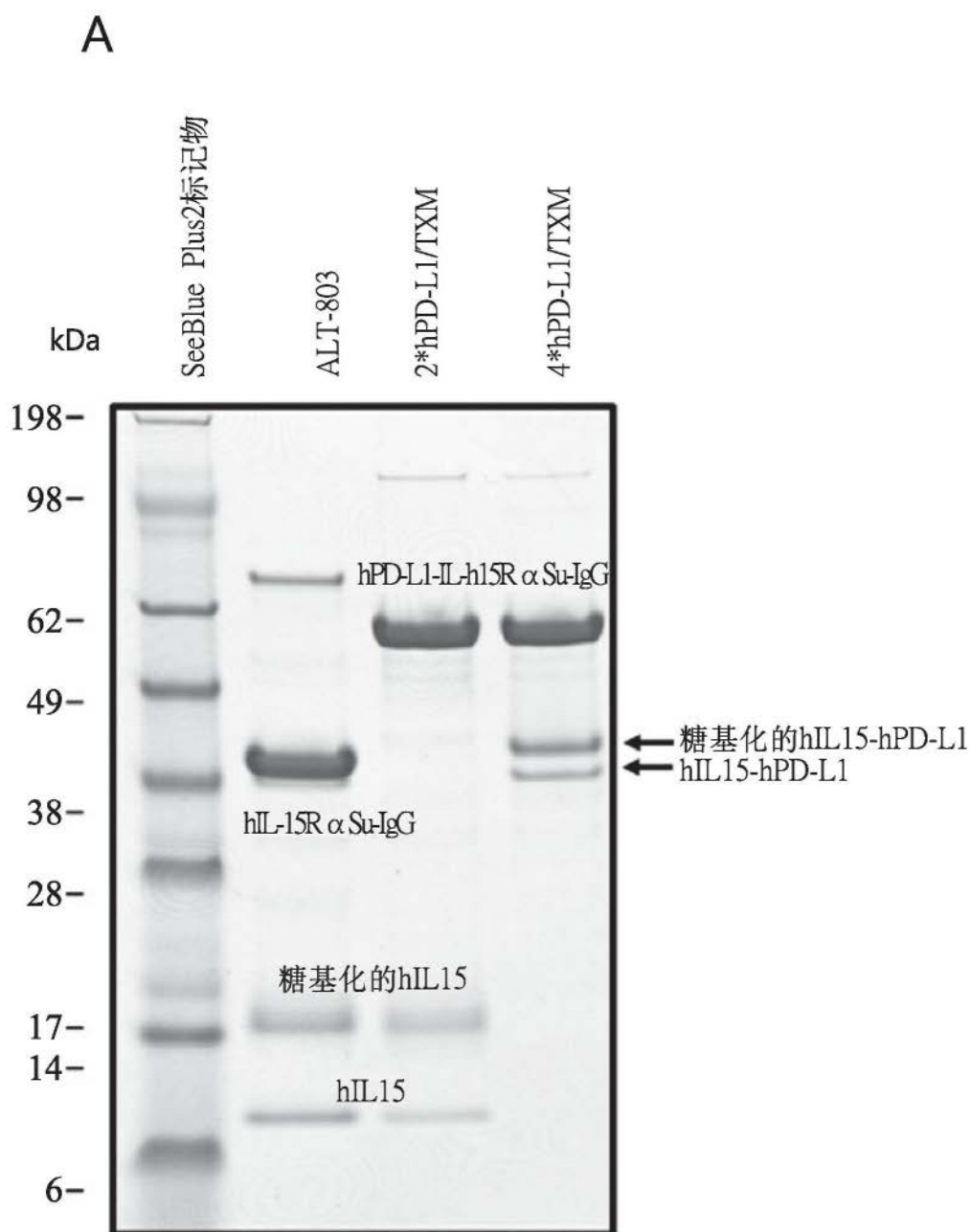


图12

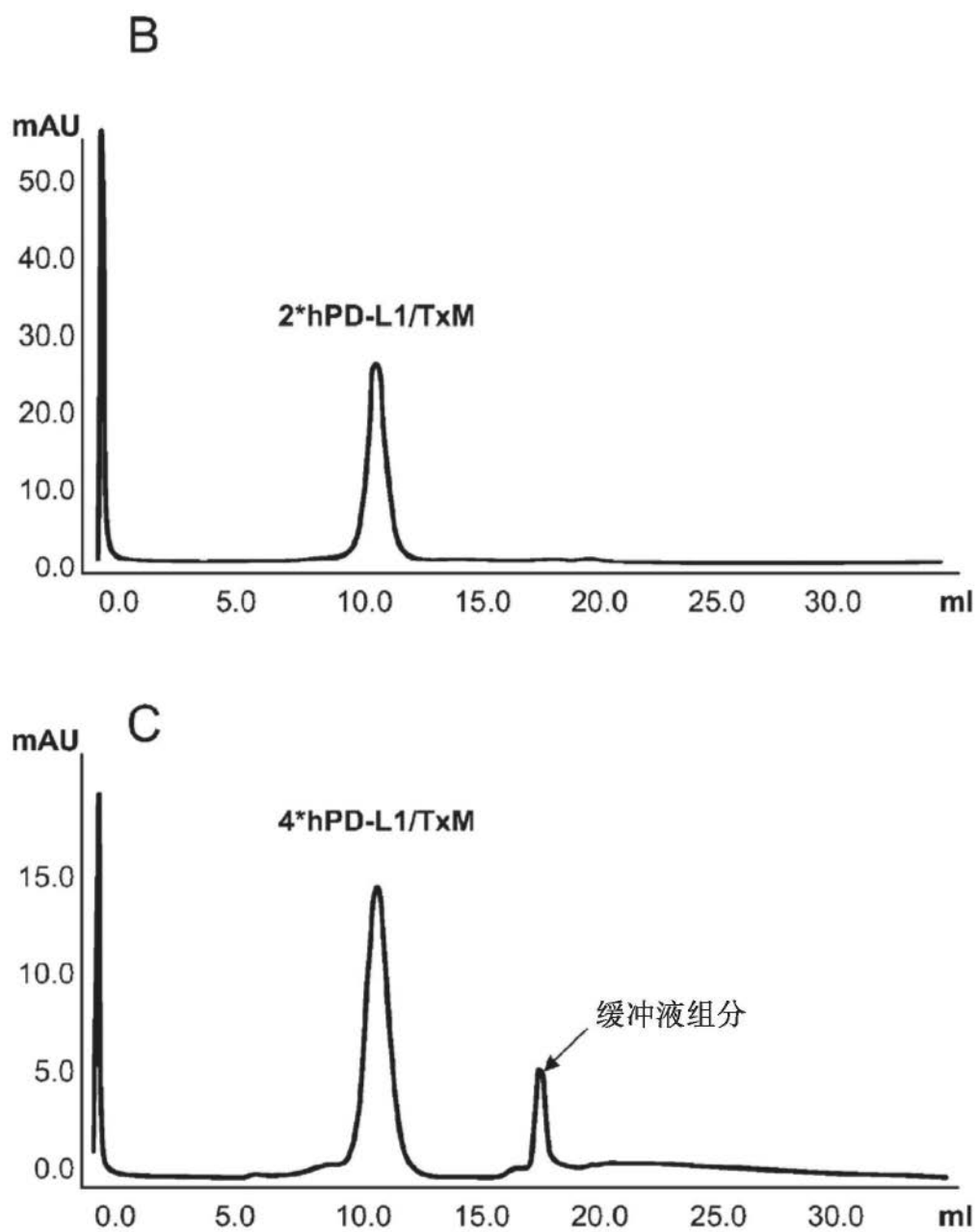


图12(续)

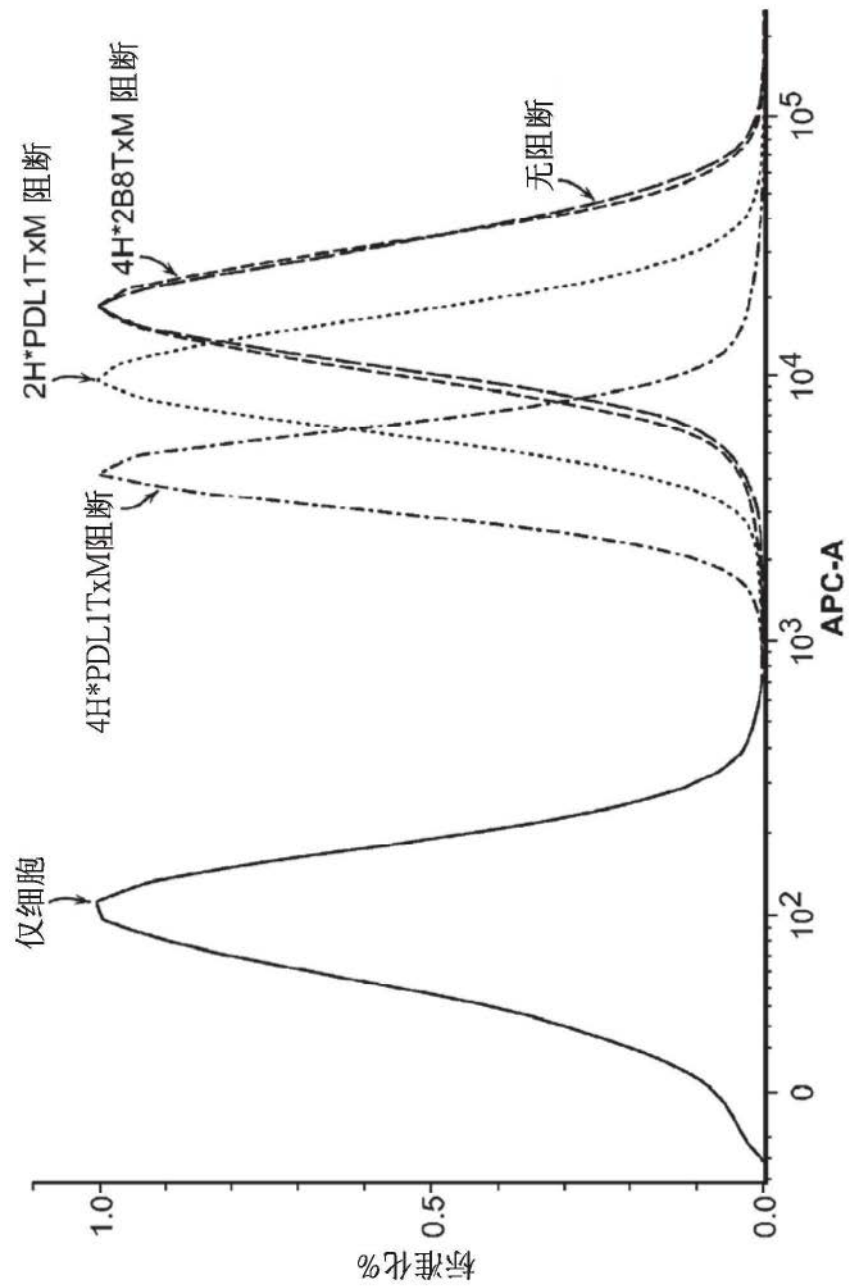
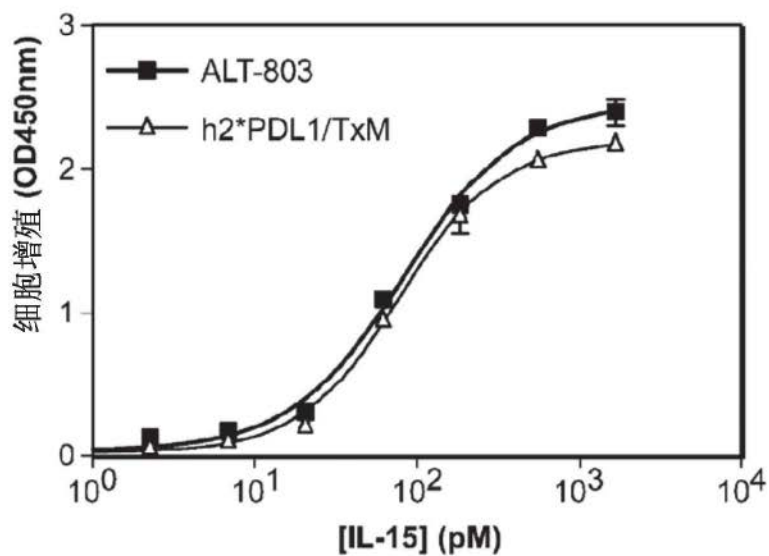


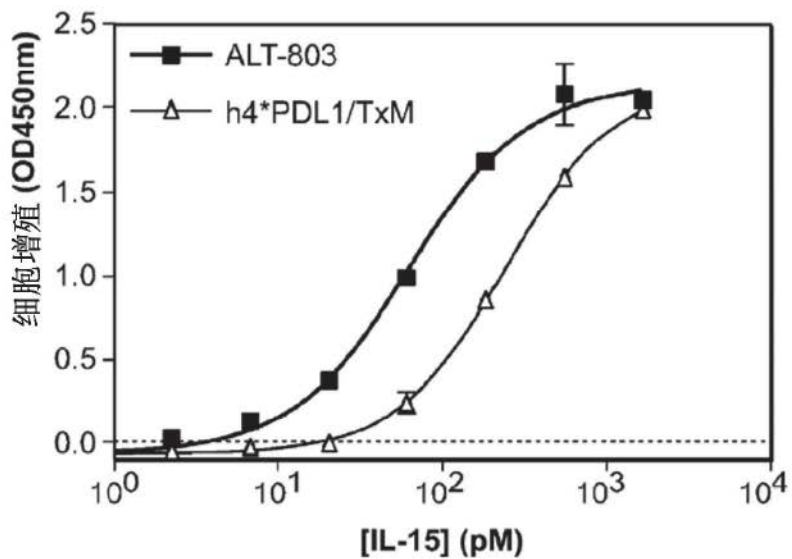
图13

A

使用32D  $\beta$  细胞EC50测定

h2\*PDL1/TxM的EC50数值比  
ALT-803的高1-1.5倍

B

使用32D  $\beta$  细胞的EC50测定

h4\*PDL1/TxM的EC50数值比  
ALT-803的高5倍

图14

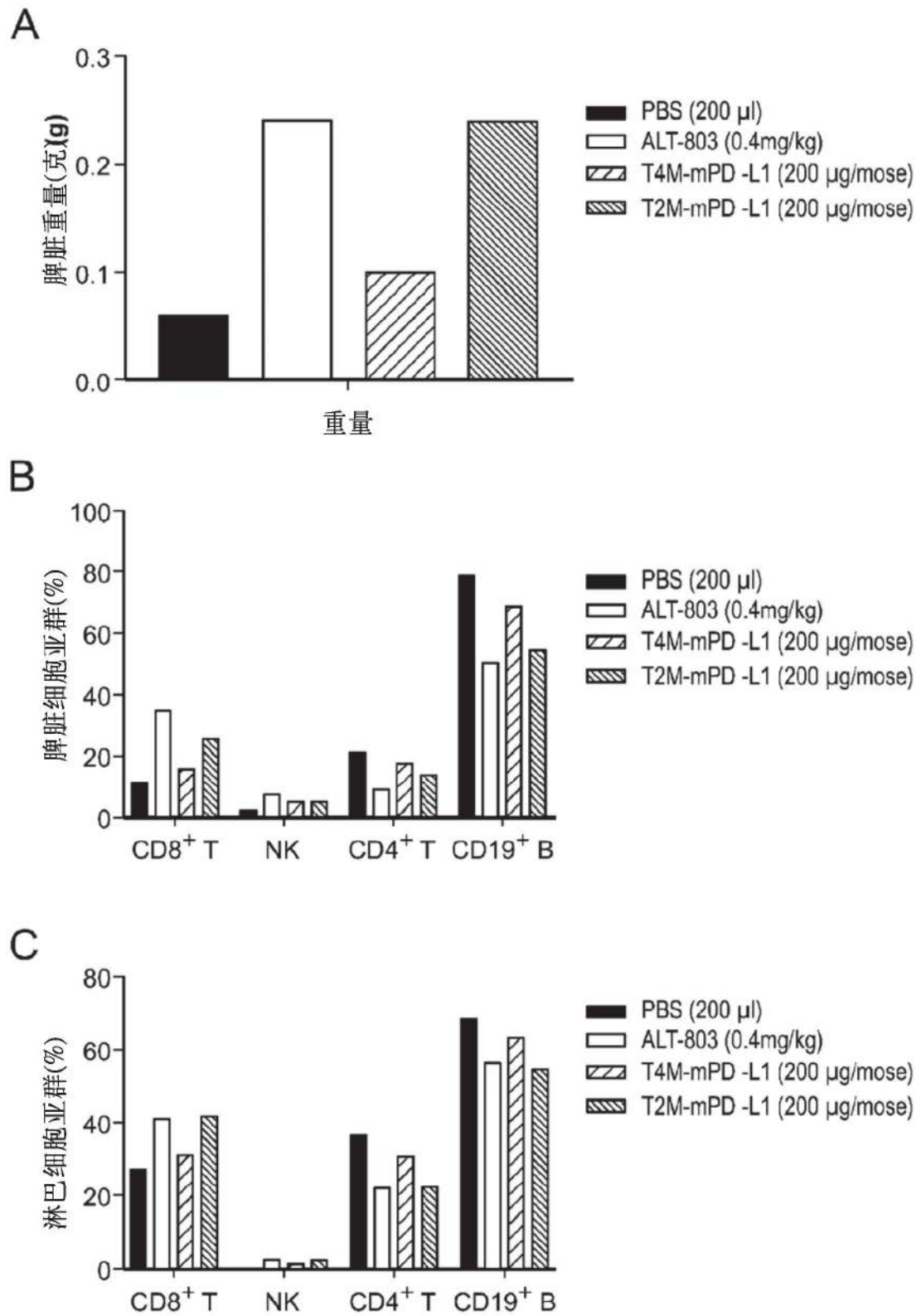


图15

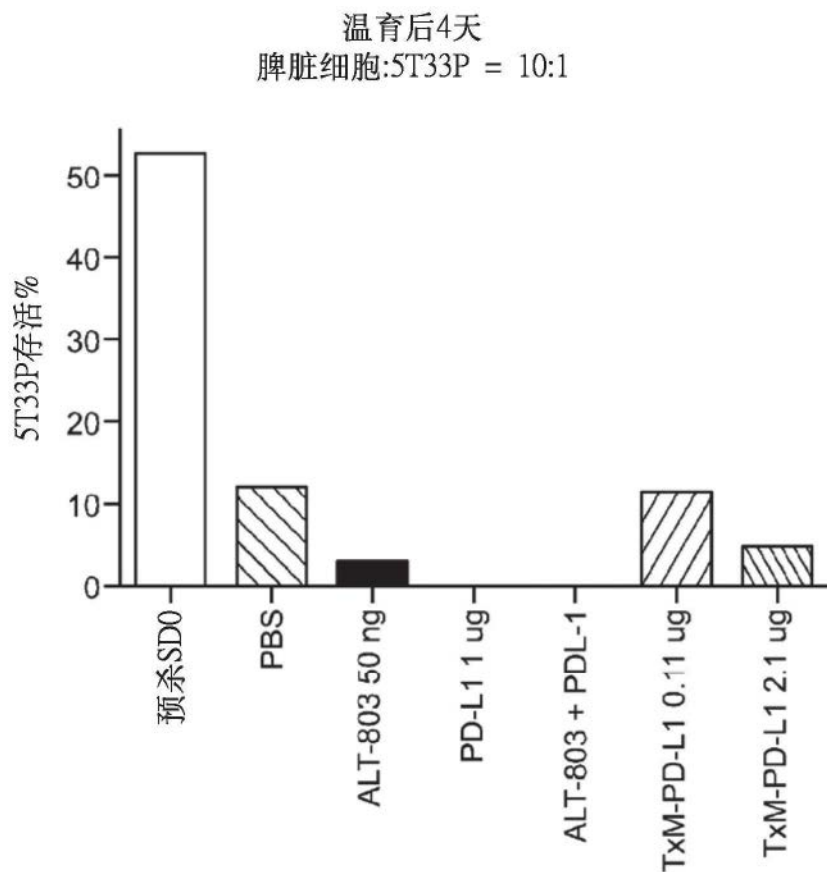


图16

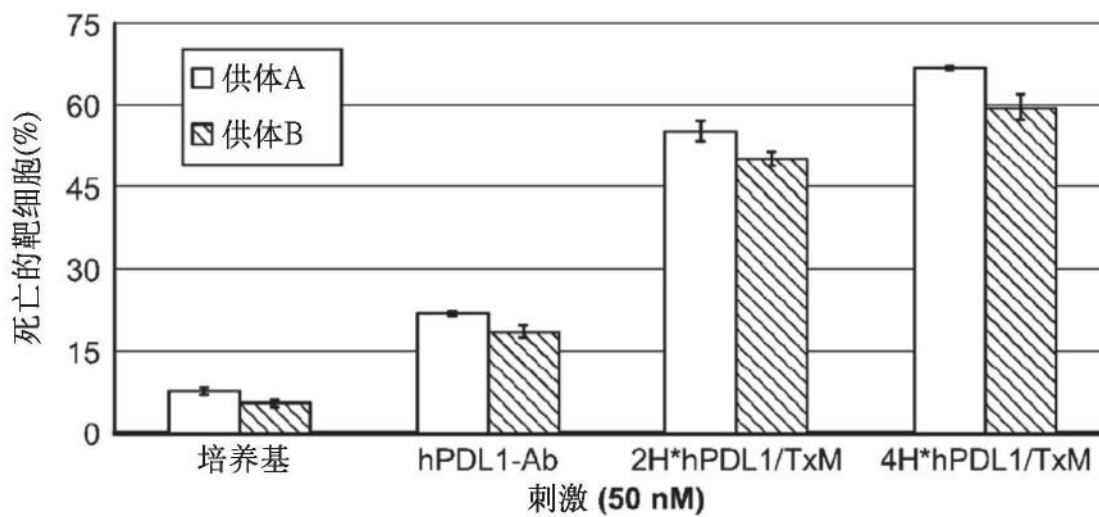


图17

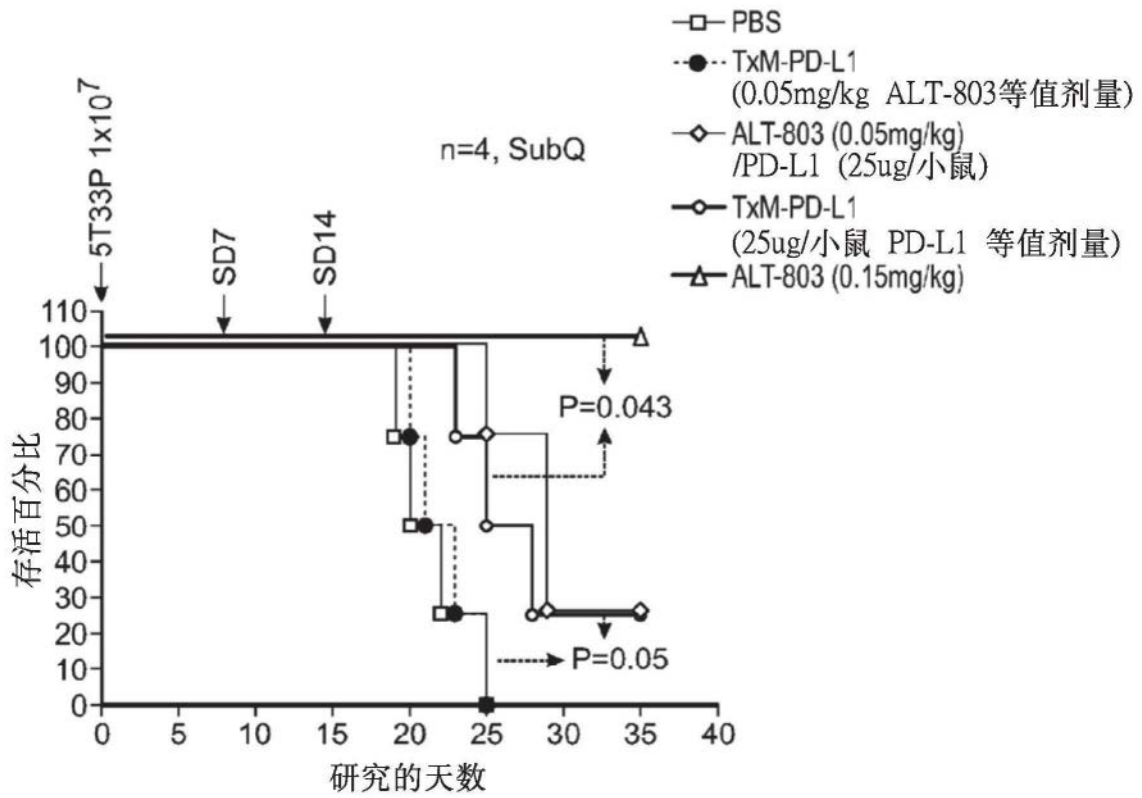


图18

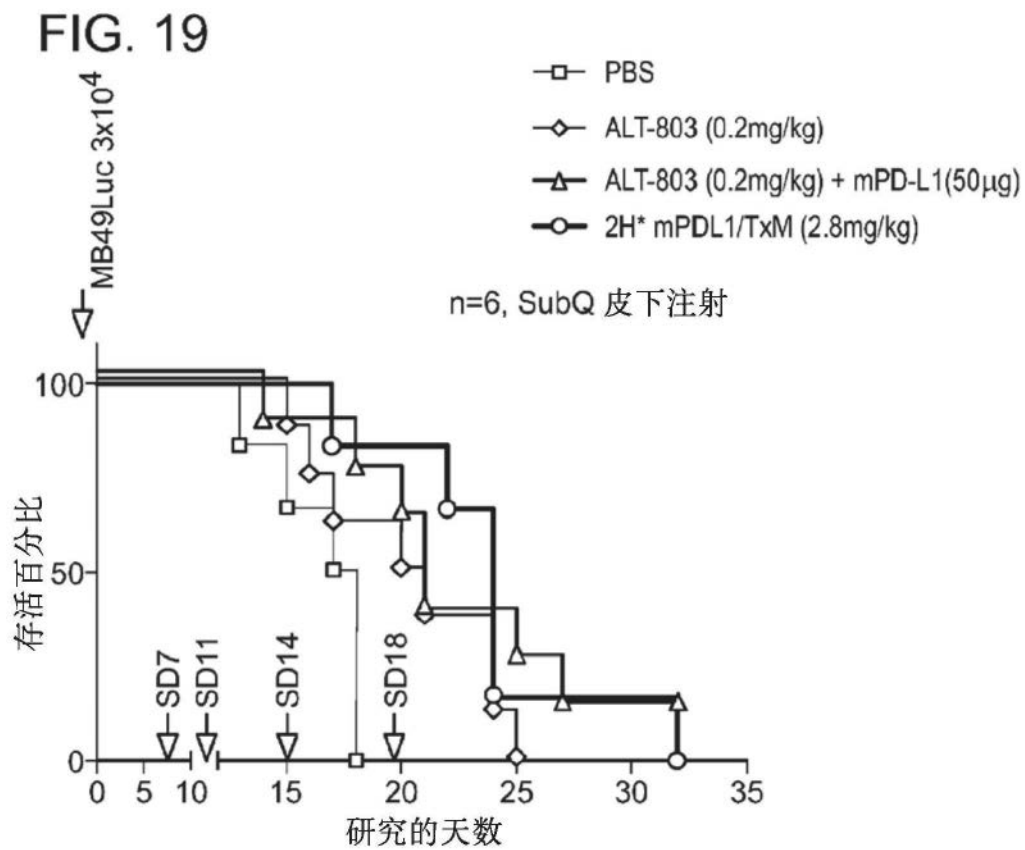


图19



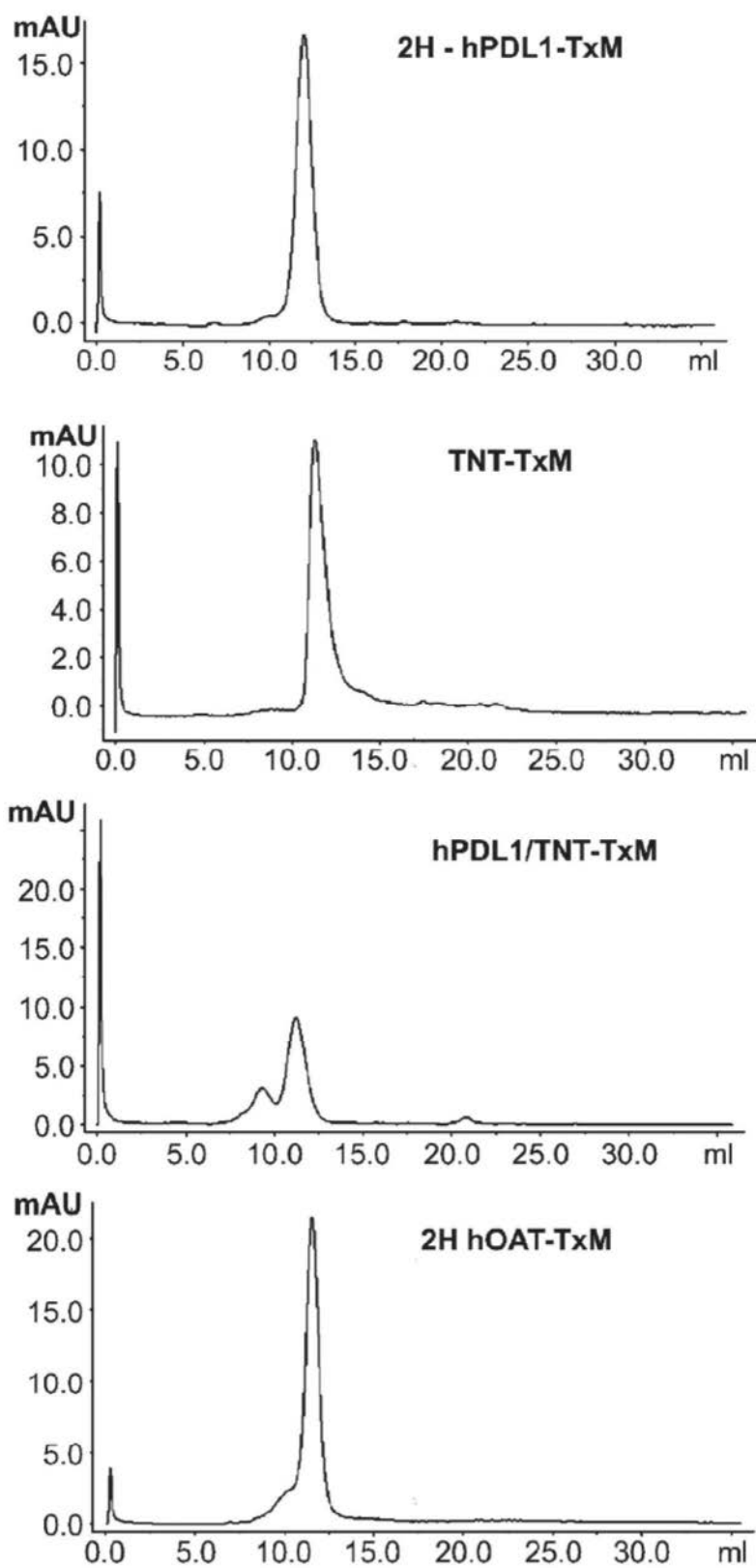


图20

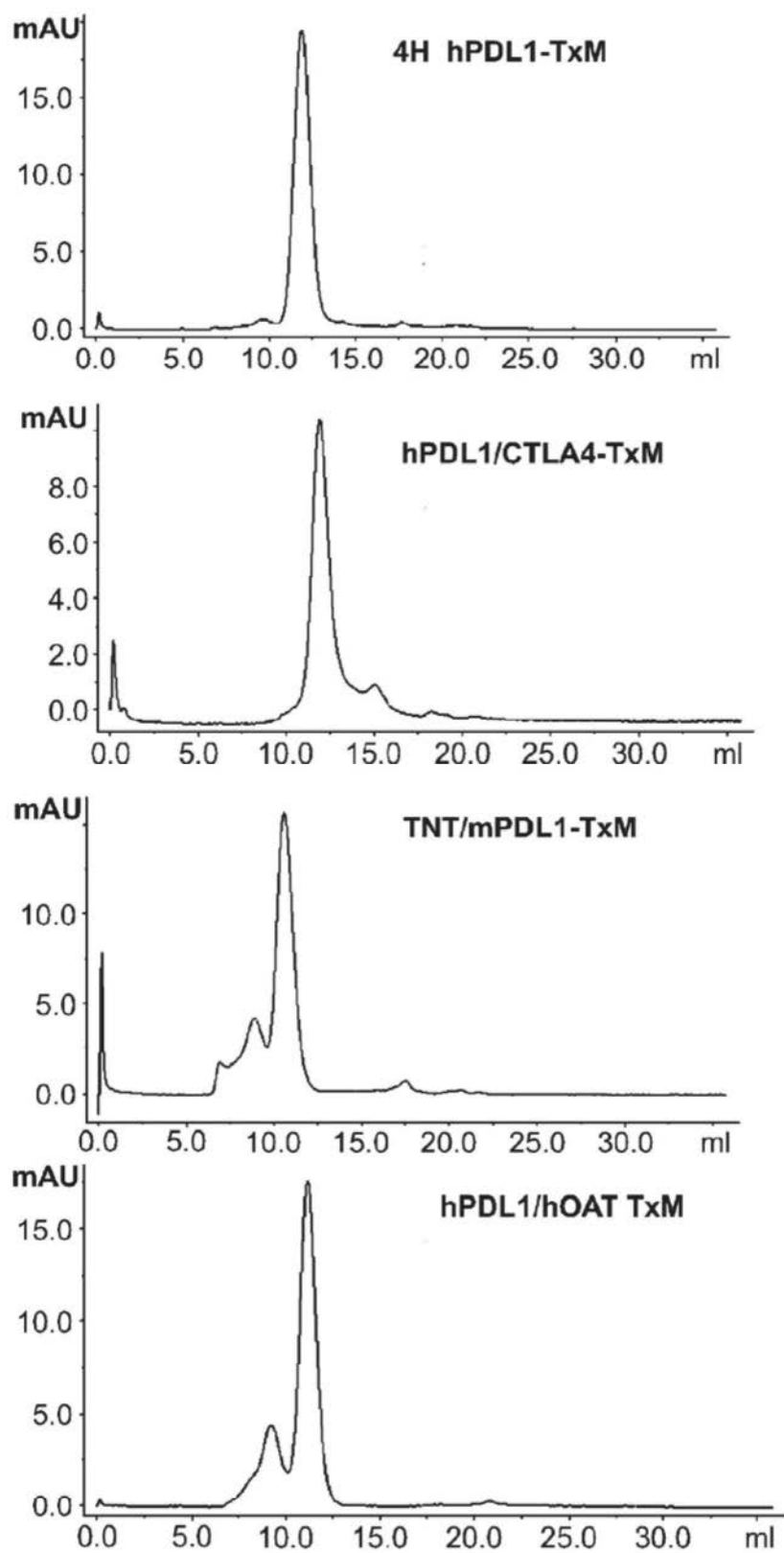


图20(续)

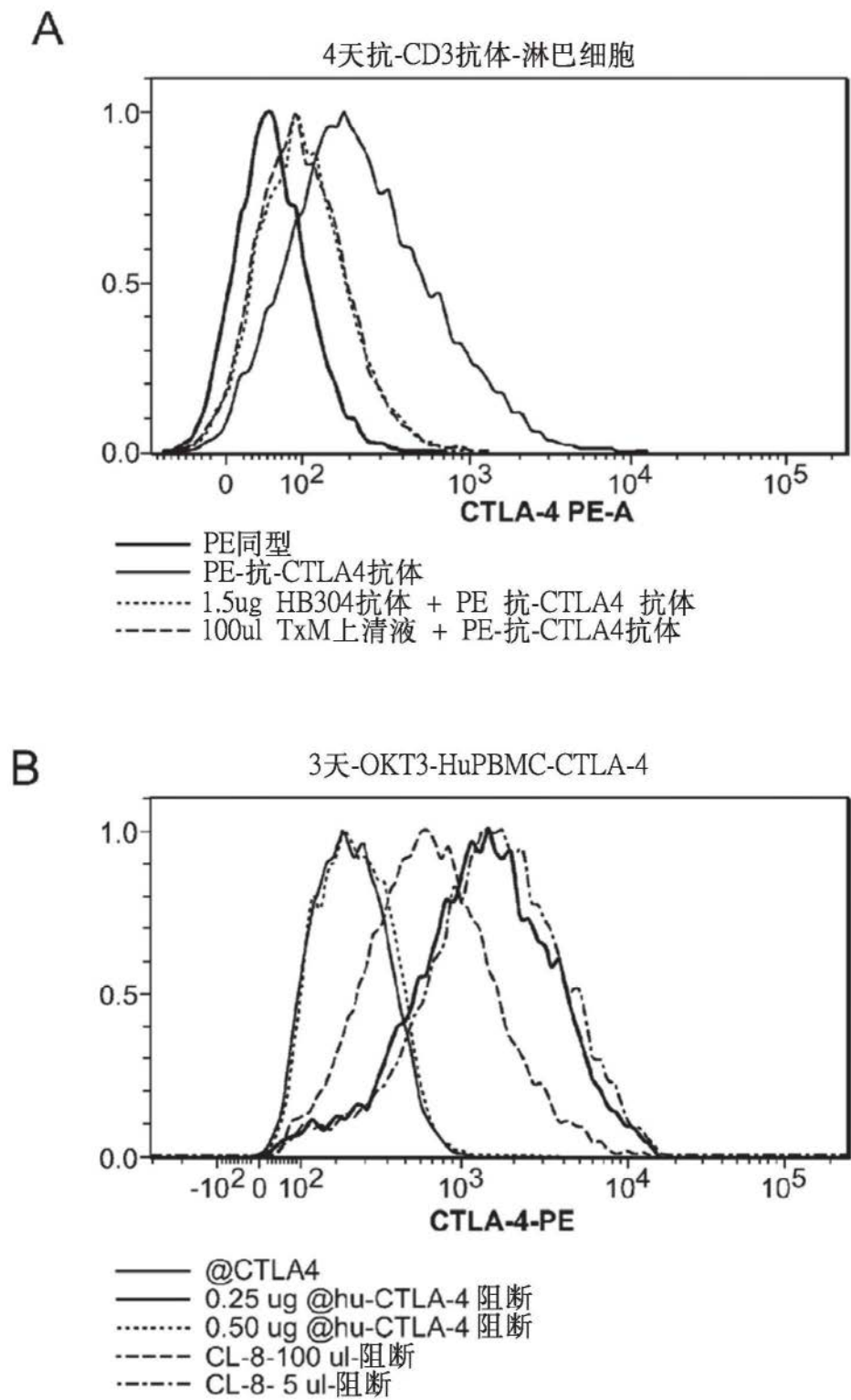
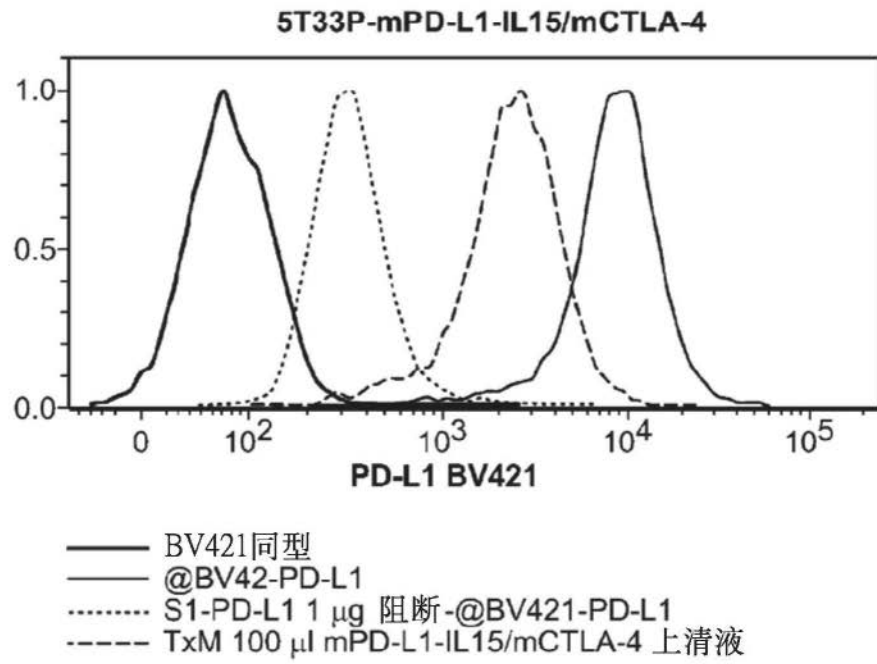


图21

A



B

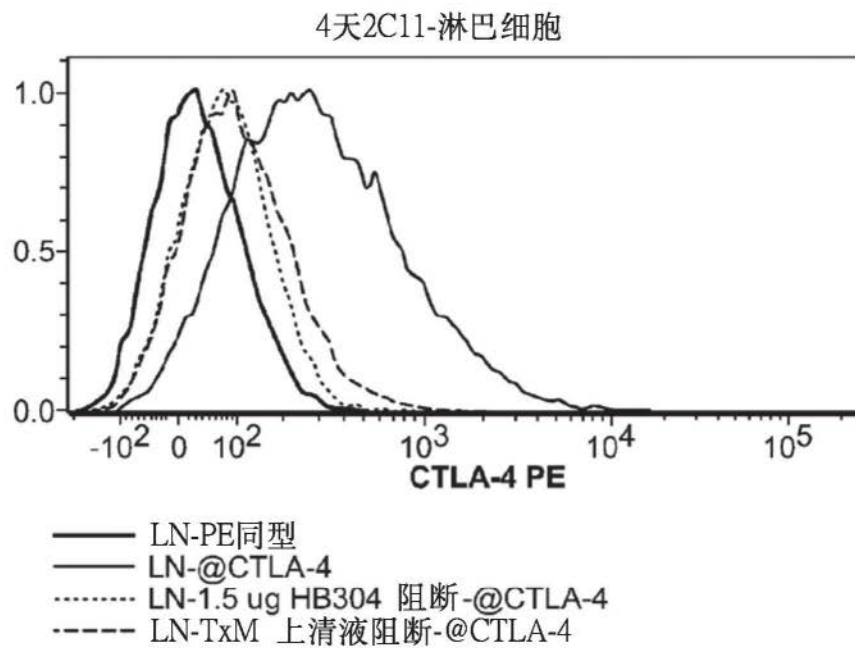


图22

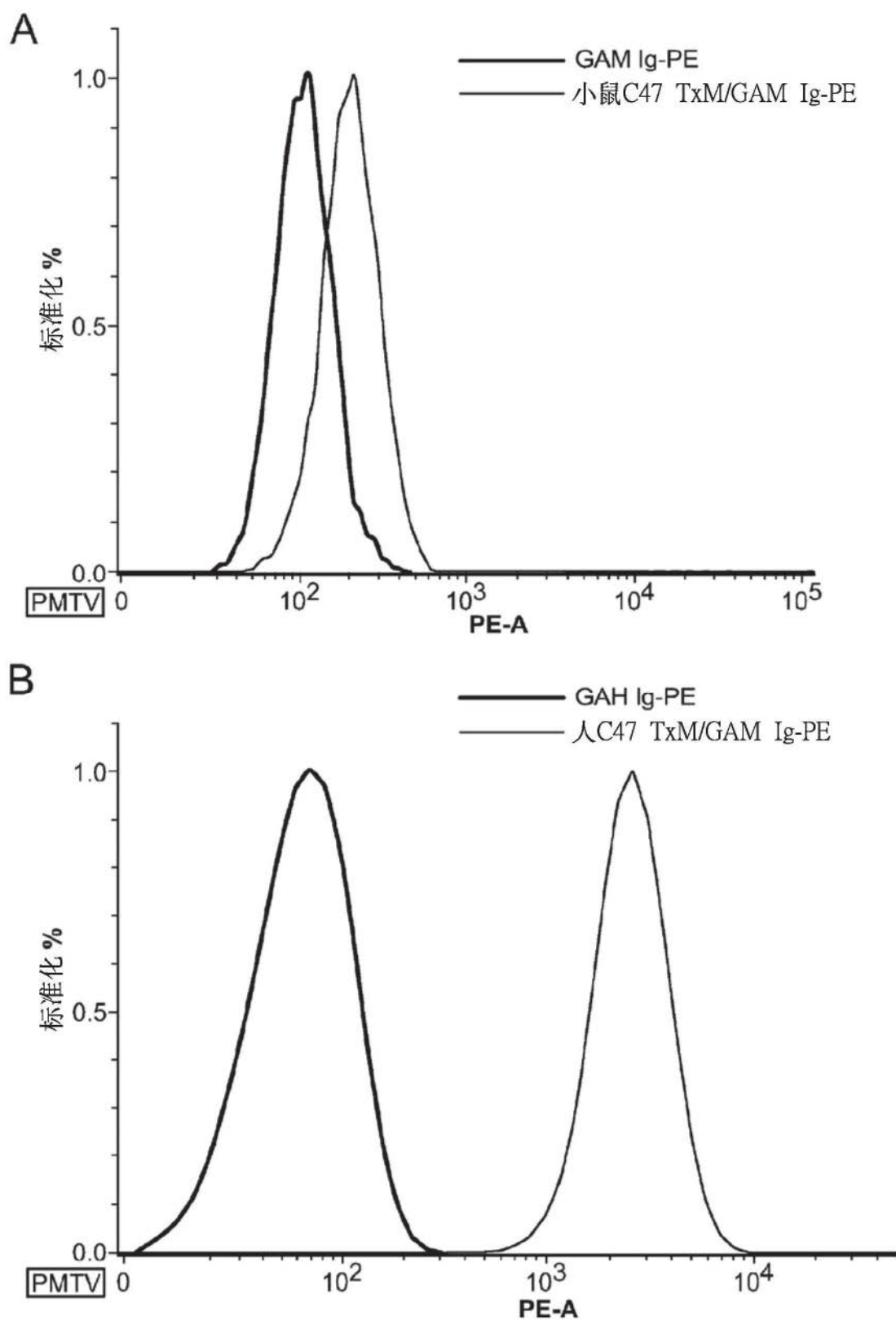


图23

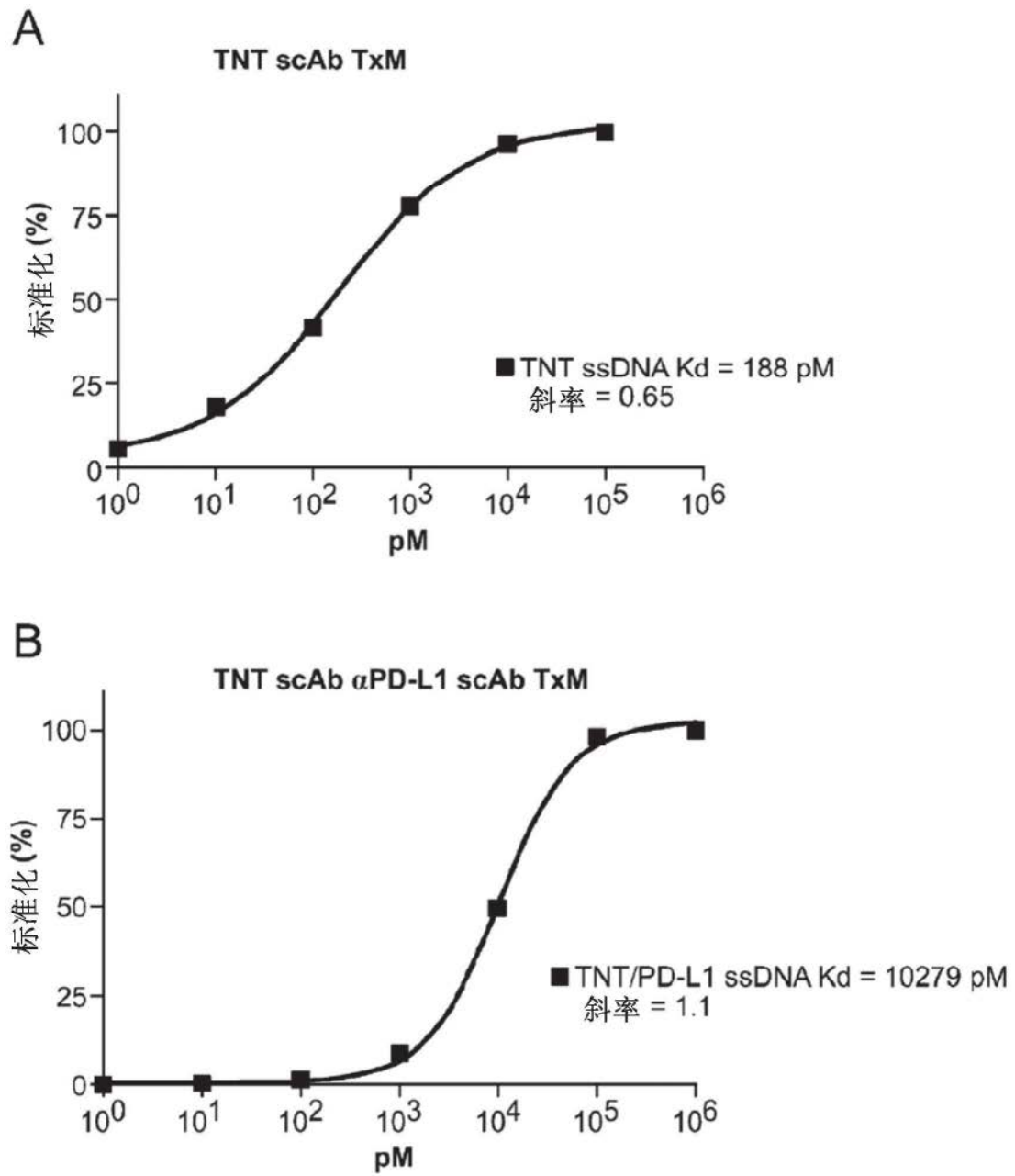


图24

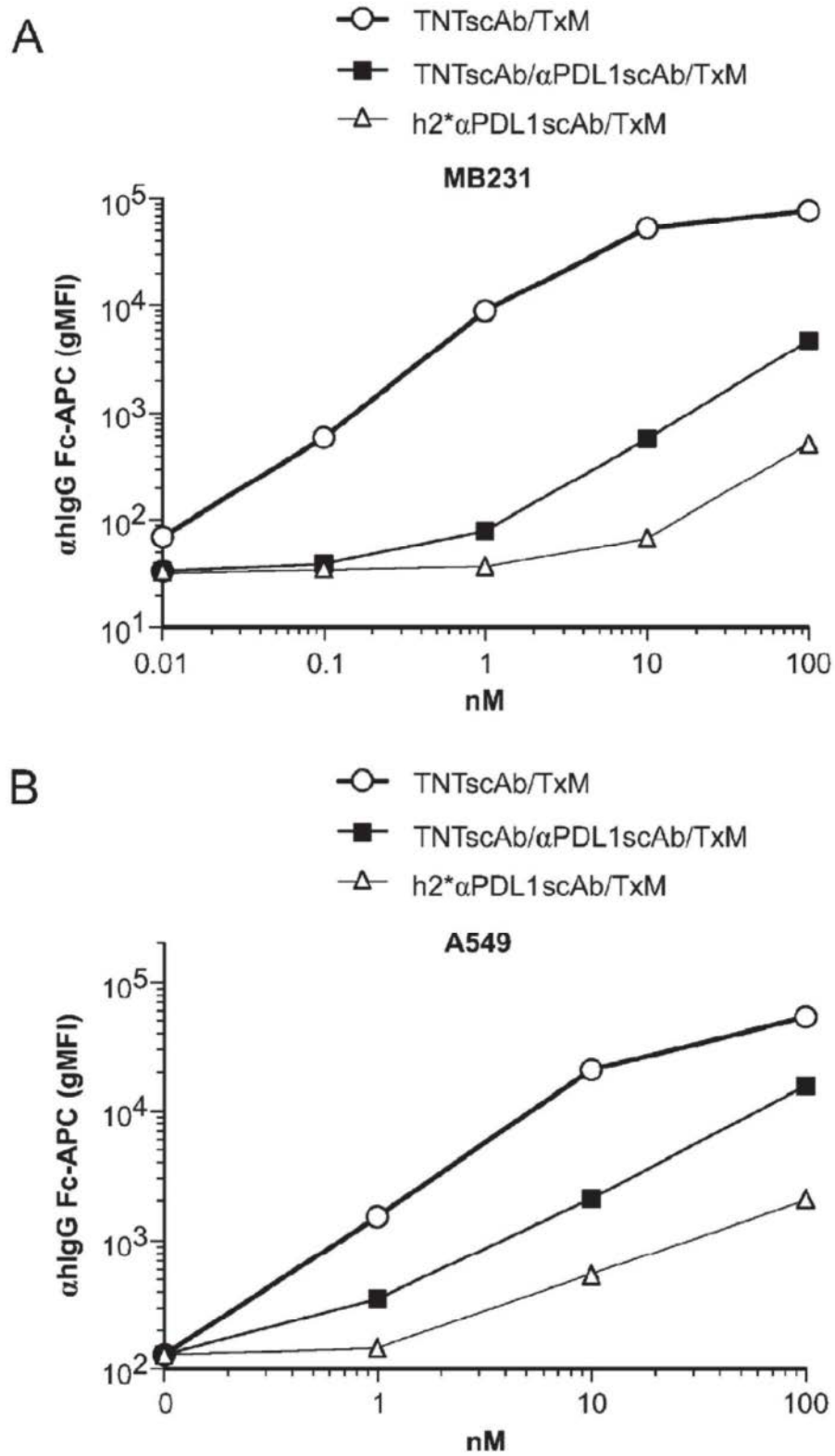


图25

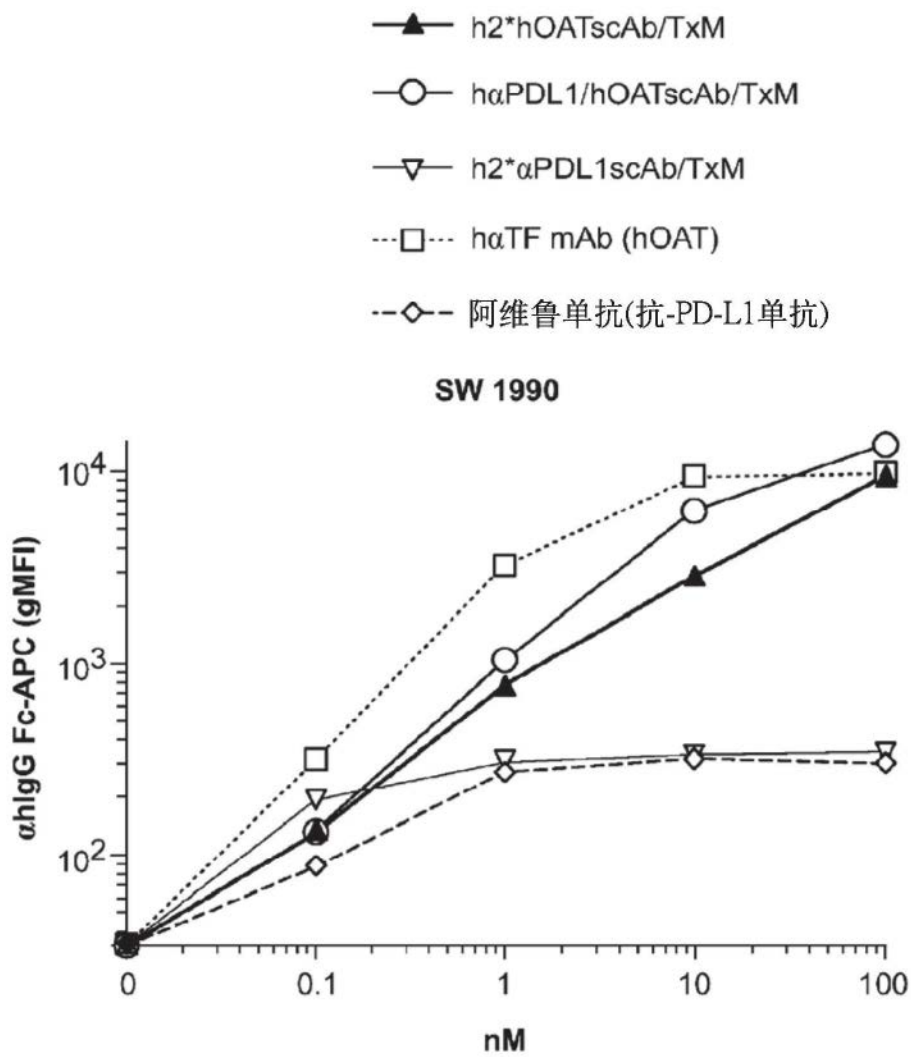


图26



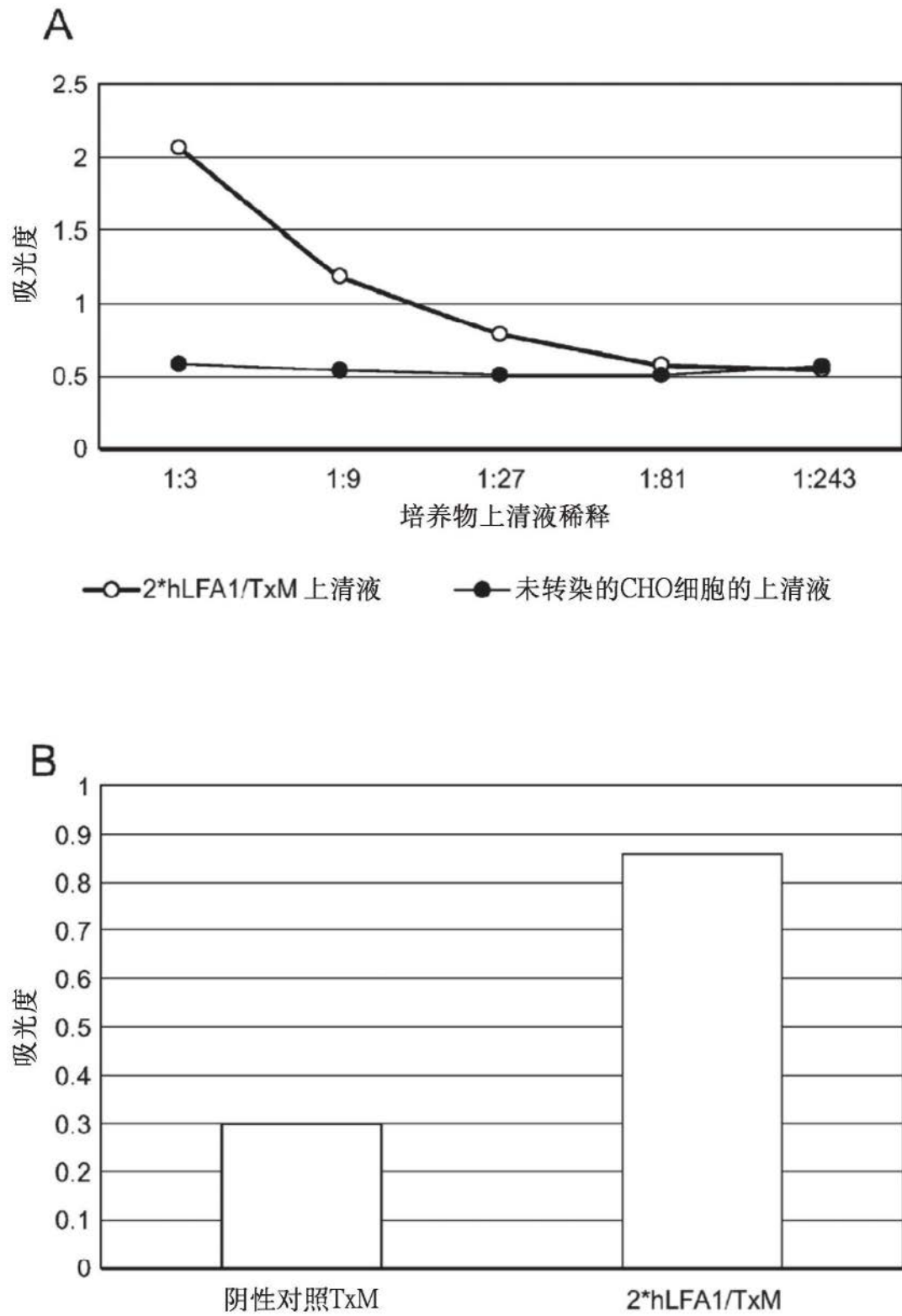


图27

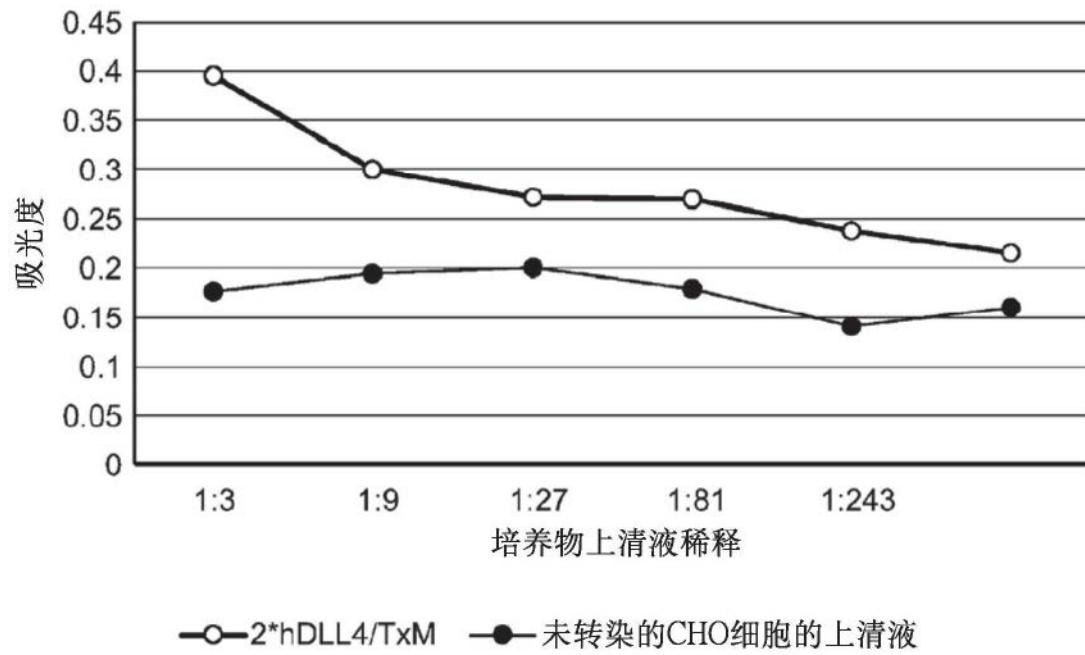


图28

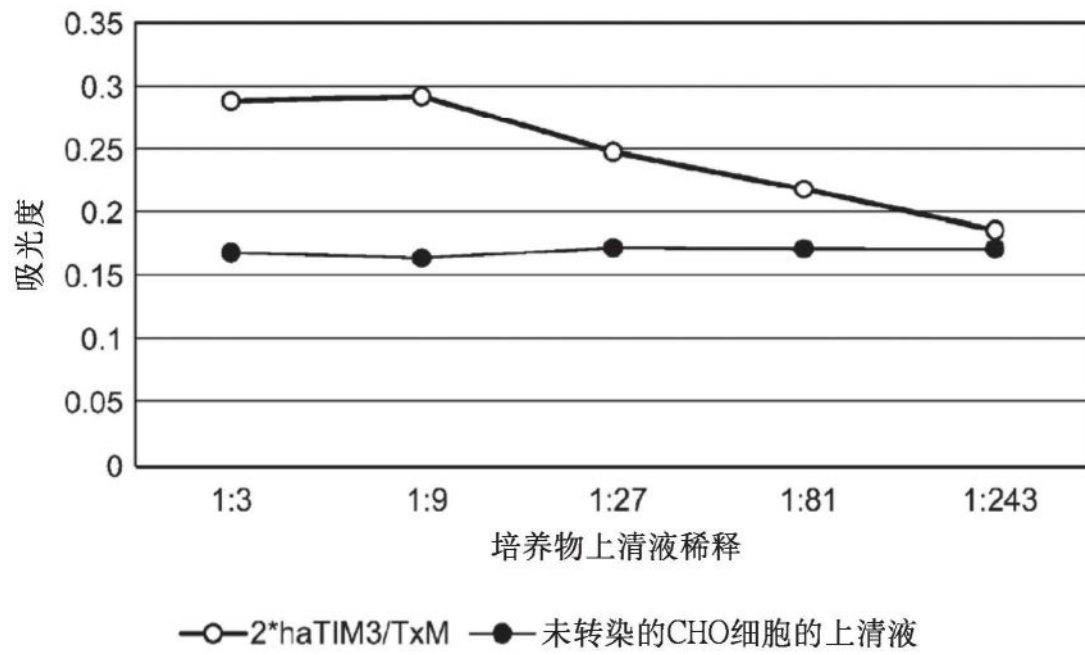


图29

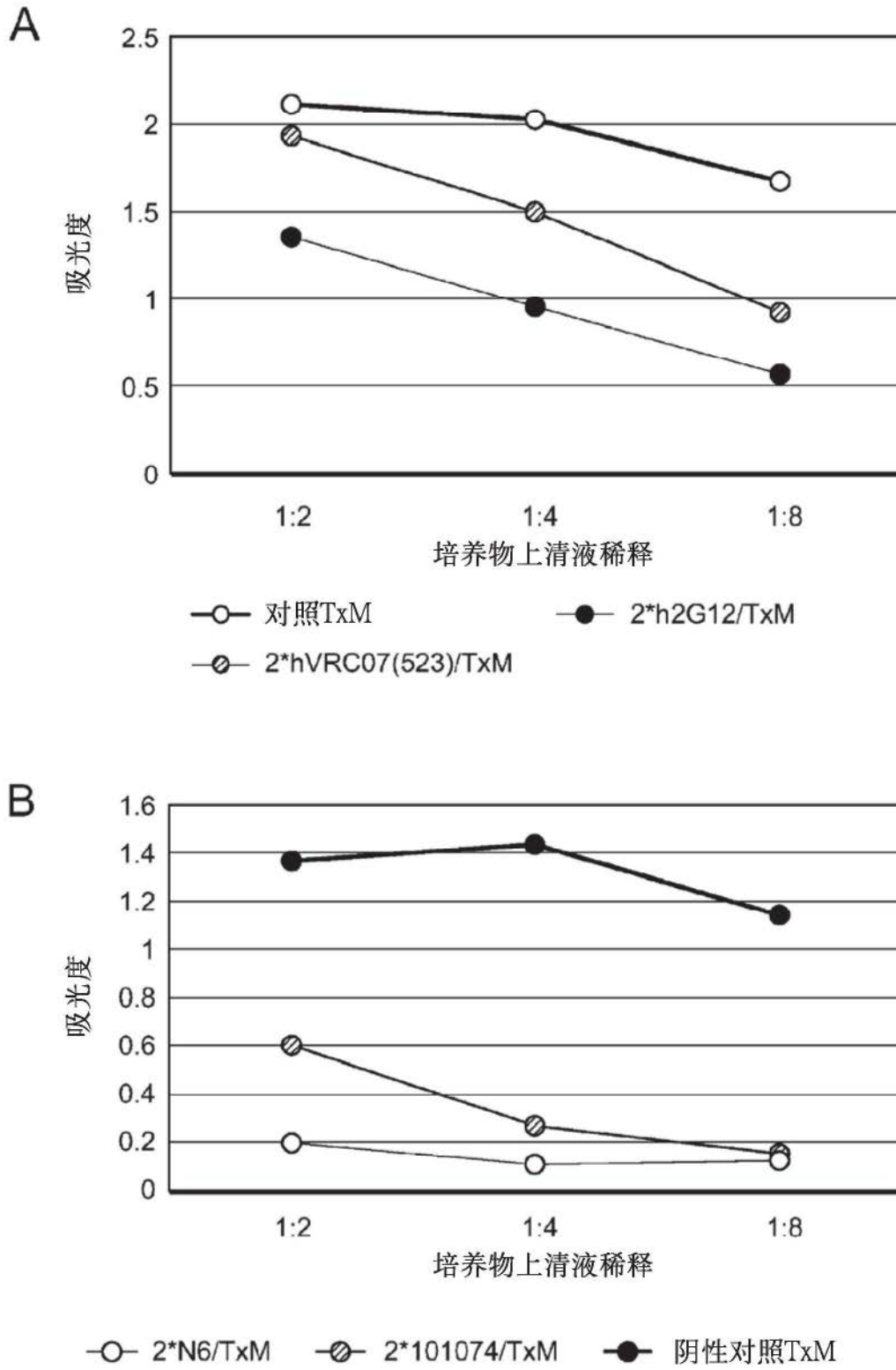
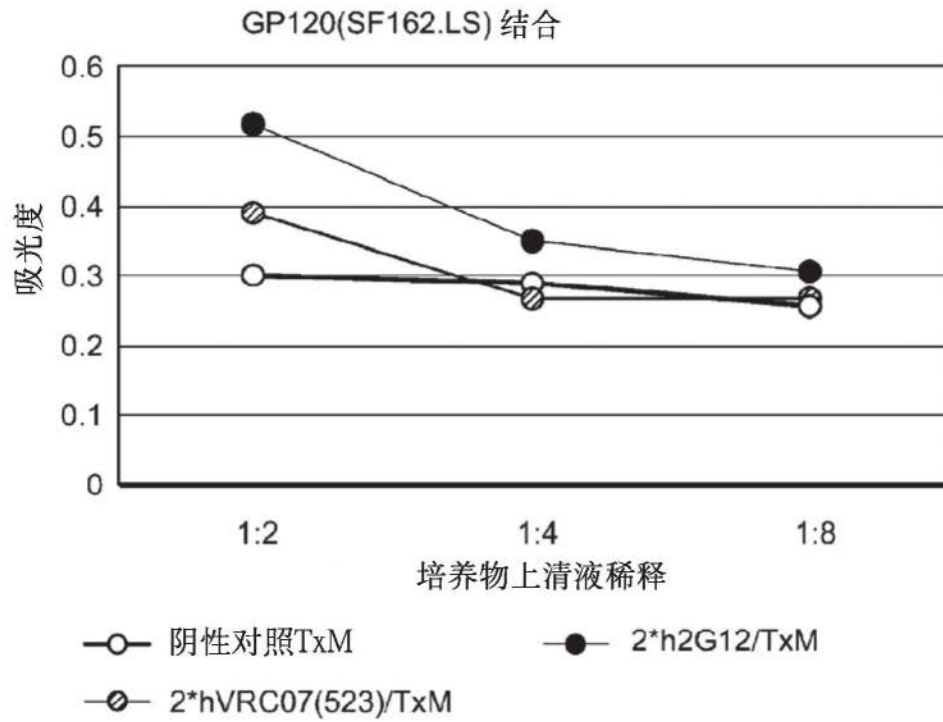


图30

C



D

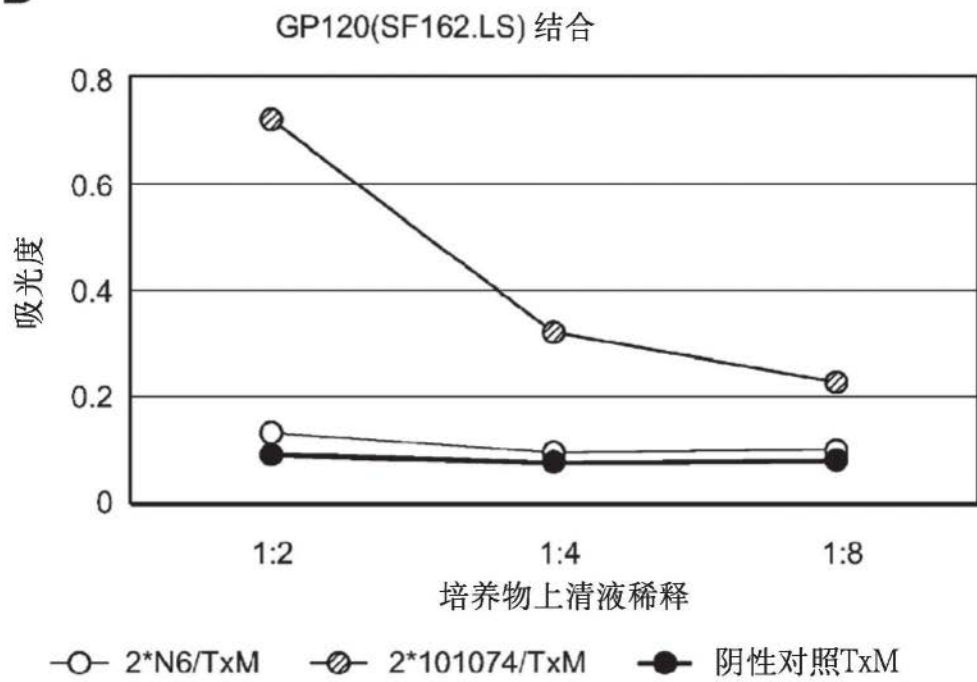
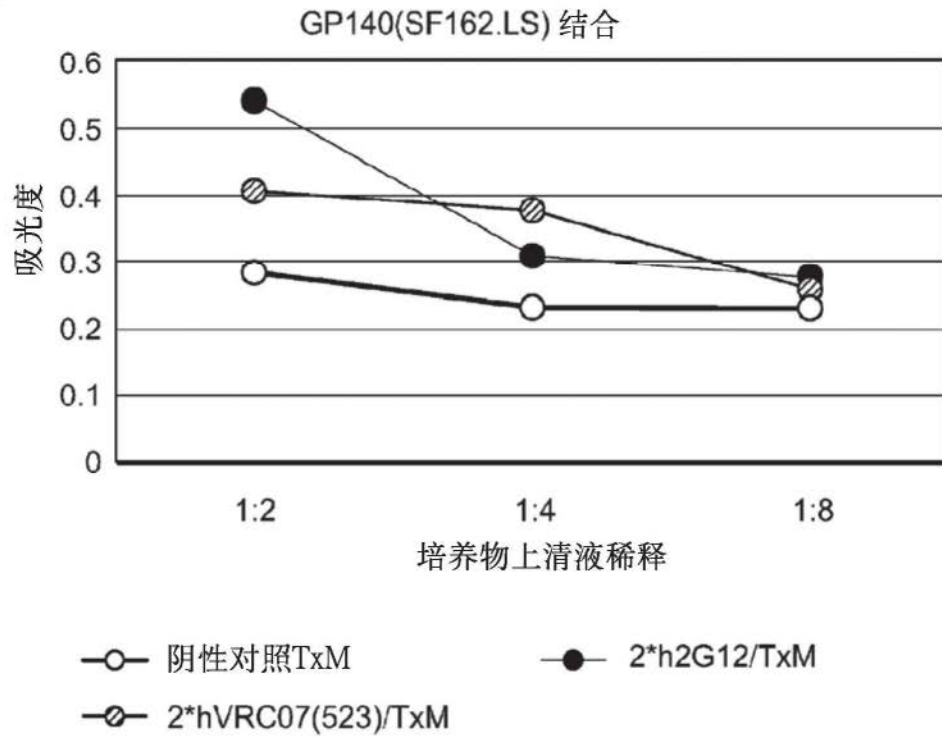


图30(续)

E



F

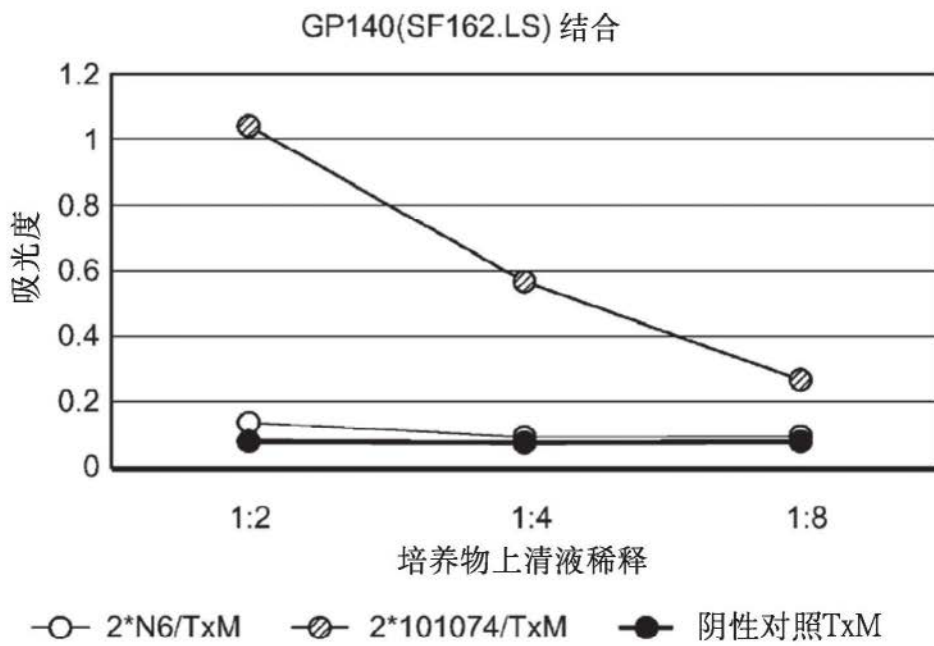


图30(续)

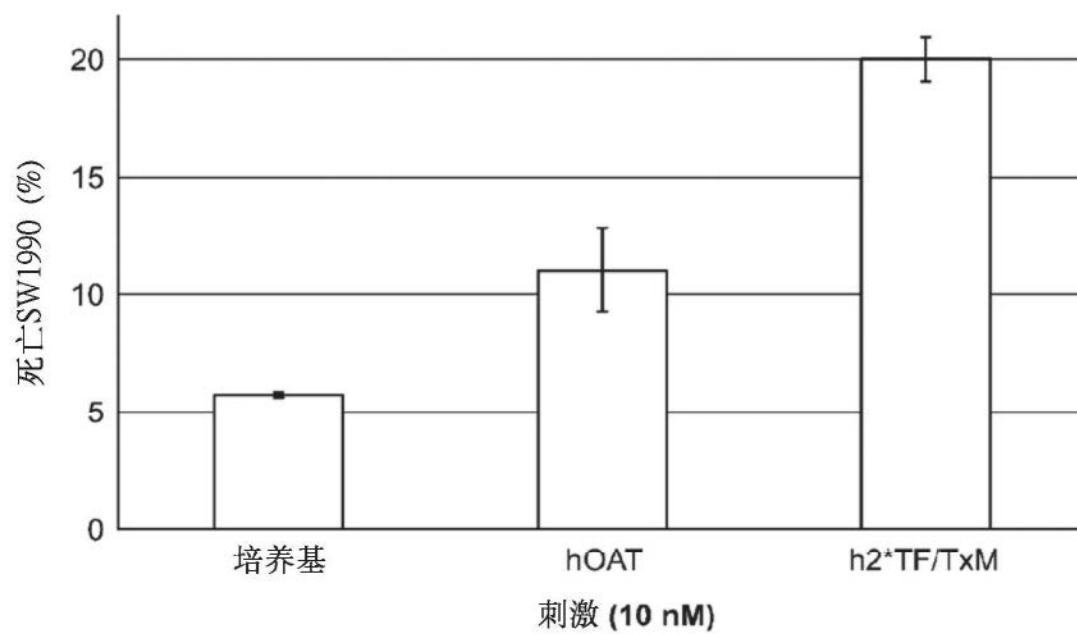


图31