



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111432843 A

(43)申请公布日 2020.07.17

(21)申请号 201880067030.0

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限
公司 31100

(22)申请日 2018.09.05

代理人 张静 陈扬扬

(30)优先权数据

62/554,067 2017.09.05 US

62/616,221 2018.01.11 US

(51)Int.Cl.

A61K 47/50(2006.01)

A61K 47/51(2006.01)

A61K 47/62(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.04.14

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/049594 2018.09.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/050977 EN 2019.03.14

(71)申请人 转矩医疗股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 T·安德烈森

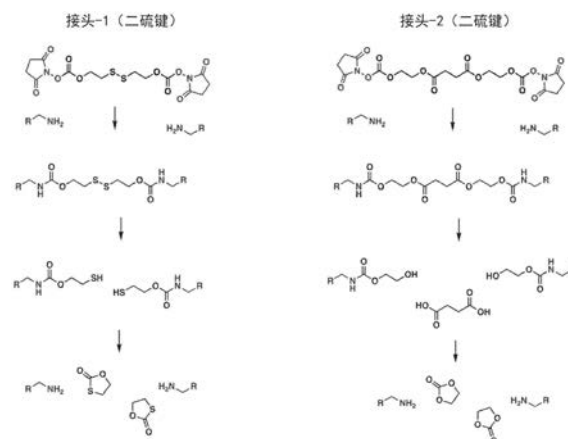
权利要求书2页 说明书24页 附图29页

(54)发明名称

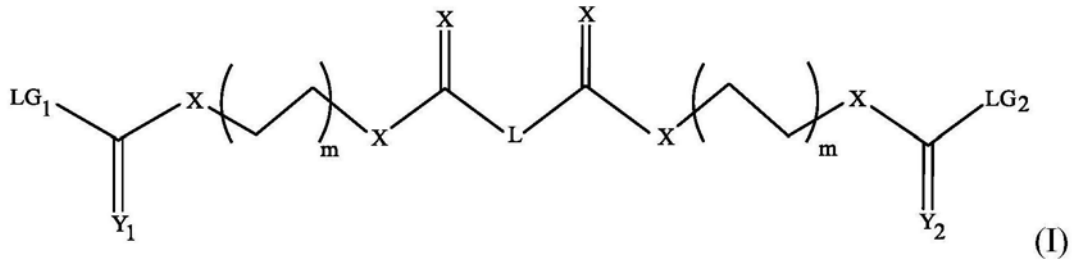
可逆接头及其用途

(57)摘要

本文公开了用于蛋白质治疗剂的制备和递送的组合物和方法,并且更具体地涉及可逆接头及其用途。



1. 一种式 (I) 的化合物:

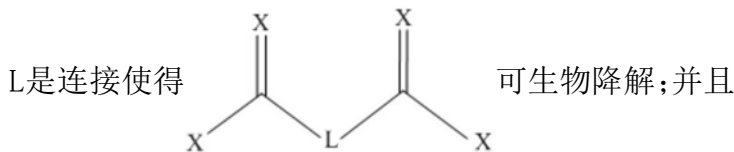


其中:

LG₁和LG₂各自为离去基团,独立地选自三氟甲磺酸酯,甲苯磺酰基,C1,N-羟基琥珀酰亚胺和咪唑啉;

Y₁和Y₂各自独立地选自O和S;

在每次出现时,X独立地选自O、S和N;

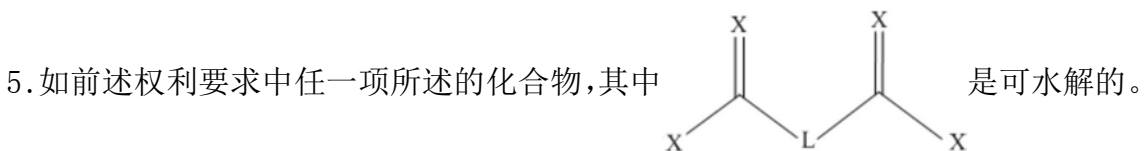


在每次出现时,m是选自1-6的整数,优选2。

2. 如权利要求1所述的化合物,其中所述化合物是对称的。

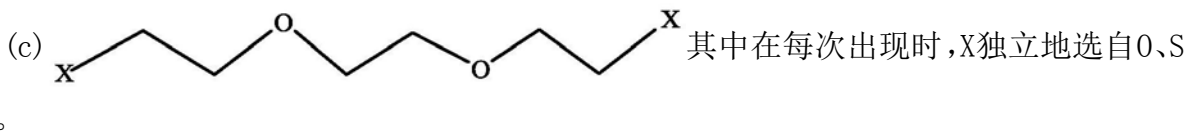
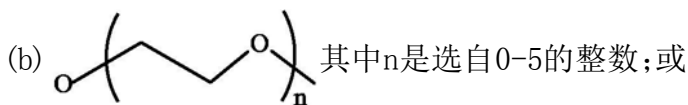
3. 如权利要求1或2所述的化合物,其中LG₁和LG₂能够与蛋白质、药物、聚合物和/或颗粒上的官能团反应。

4. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中LG₁和LG₂均为咪唑啉或N-羟基琥珀酰亚胺。

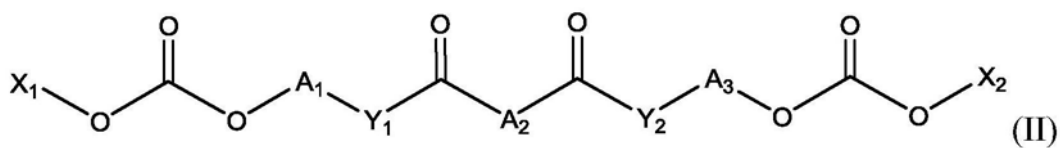


6. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中L选自:

(a) - (CH₂)_n-, 其中n是选自0-5的整数;



7. 一种式 (II) 的化合物:



其中:

X₁和X₂各自独立地选自三氟甲磺酸酯,甲苯磺酰基,C1,N-羟基琥珀酰亚胺和咪唑啉基;

A₁和A₃各自独立地是-(CR¹R²)_n-;

A₂是-(CR¹R²)_m-;

Y₁和Y₂各自独立地选自NR³、O和S;

其中每次出现时,R¹和R²独立地选自氢,卤素,羟基,C₁₋₁₂烷基,C₂₋₁₂烯基,C₃₋₁₂环烷基,C₂₋₁₂杂环基;任选地被1个或多个卤素,羟基,C₁₋₆烷基和/或C₁₋₆烷氧基取代的C₆₋₁₂芳基;和任选地被1个或多个卤素,羟基,C₁₋₆烷基和/或C₁₋₆烷氧基取代的C₄₋₁₂杂芳基;

其中R³选自氢,C₁₋₁₂烷基,C₂₋₁₂烯基,C₃₋₁₂环烷基,C₂₋₁₂杂环基;任选地被1个或多个卤素,羟基,C₁₋₆烷基和/或C₁₋₆烷氧基取代的C₆₋₁₂芳基;和任选地被1个或多个卤素,羟基,C₁₋₆烷基和/或C₁₋₆烷氧基取代的C₄₋₁₂杂芳基;

在每次出现时,n是独立地选自1-12的整数;并且

m是从0到12的整数。

8.如权利要求7所述的化合物,其中所述化合物是对称的。

9.如权利要求7或8所述的化合物,其中X₁和X₂各自是能够与蛋白质、药物和/或颗粒反应的离去基团。

10.如权利要求9所述的化合物,其中X₁和X₂均为咪唑啉或N-羟基琥珀酰亚胺。

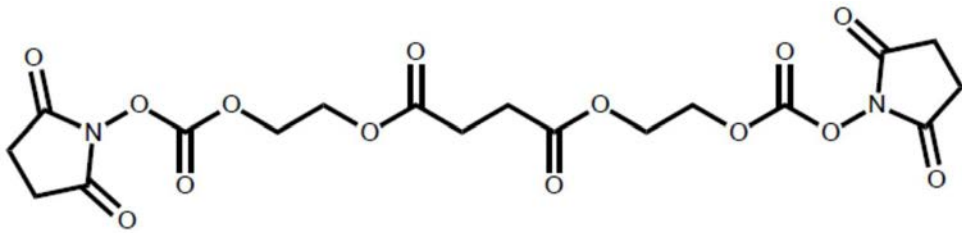
11.如权利要求7或8所述的化合物,其中R¹和R²都是氢。

12.如权利要求11所述的化合物,其中A₁和A₃均为-(CH₂)₂-。

13.如权利要求7、8、10和12中任一项所述的化合物,其中A₂是-(CH₂)₂-。

14.如权利要求7-13中任一项所述的化合物,其中Y₁和Y₂均为O。

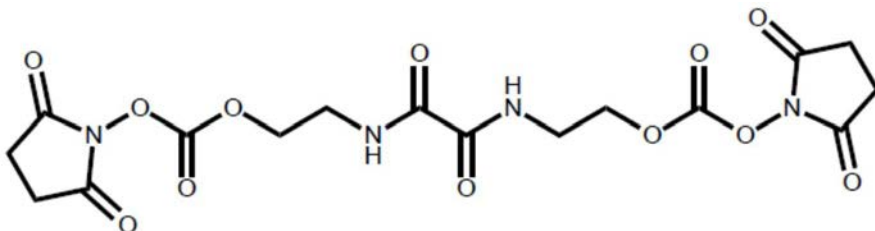
15.如权利要求14所述的化合物,其中,所述化合物是:



16.如权利要求7、8、10和12中任一项所述的化合物,其中A₂是键。

17.如权利要求16所述的化合物,其中Y₁和Y₂均为NH。

18.如权利要求17所述的化合物,其中,所述化合物是:



可逆接头及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年9月5日提交的美国临时申请62/554,067和2018年1月11日提交的美国临时申请62/616,221的优先权权益,两者都通过引用全文纳入本文。

技术领域

[0003] 本公开总体上涉及用于蛋白质治疗剂的制备和递送的组合物和方法,并且更具体地涉及可逆接头及其用途。

背景技术

[0004] 蛋白质治疗剂,例如抗体,细胞因子,生长因子和疫苗,是用于治疗多种疾病的重要治疗剂,所述疾病包括例如癌症,糖尿病和心血管疾病。在最近几年中,这类蛋白质治疗剂在全球制药行业中得到了快速发展。相对于小分子药物,蛋白质治疗剂具有高特异性和强效性的优势。然而,由于其内在的不稳定性、免疫原性和短的半衰期,蛋白质治疗剂的用途受到限制。

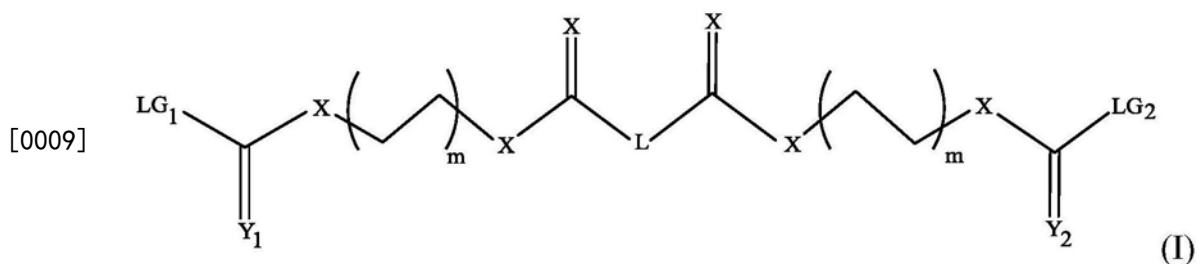
[0005] 为了解决这些限制,通常有两种方法:一种是治疗性蛋白质的基因融合,另一种是使用工程化的运载体来递送蛋白质治疗剂。使用工程化运载体,蛋白质可以通过包封/吸附或偶联来加载。蛋白质在脂质体或纳米颗粒中/上的包封或吸附通常效率低下。蛋白质的偶联通常会降低其生物活性。因此,这两种方法都是有问题的。

[0006] 因此,迫切需要将治疗剂高效纳入递送系统中的新组合物和方法。

发明内容

[0007] 本文公开了用于治疗用途的改进的接头的改进的方法和组合物。

[0008] 一方面,本文公开了具有式(I)的化合物:

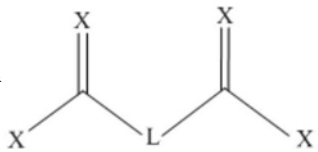


[0010] 其中:

[0011] LG₁和LG₂各自为离去基团,独立地选自三氟甲磺酸酯,甲苯磺酰基,C1,N-羟基琥珀酰亚胺和咪唑啉;

[0012] Y₁和Y₂各自独立地选自O和S;

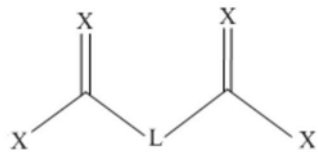
[0013] 在每次出现时,X独立地选自O、S和N;

[0014] L是连接使得  可生物降解;并且

[0015] 在每次出现时, m是选自1-6的整数。

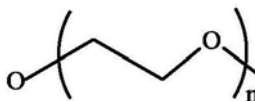
[0016] 在一些实施方式中, 式(I)的化合物是对称的。


[0017] 在一些实施方式中, LG₁和LG₂能够与蛋白质、药物和/或颗粒反应。在一个实例中, LG₁和LG₂均为咪唑啉。在另一个实例中, LG₁和LG₂均为N-羟基琥珀酰亚胺。

[0018] 在一些实施方式中,  是可水解的。

[0019] 在一些实施方式中, 例如, 当一个或多个X为N时, L选自:

[0020] (a) $-(CH_2)_n-$, 其中n是选自0-5的整数;

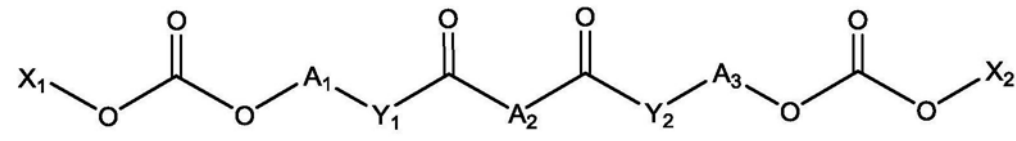
[0021] (b)  其中n是选自0-5的整数;或

[0022] (c)  其中在每次出现时, X独立地选

自O、S和N。

[0023] 在一些实施方式中, m为2。

[0024] 另一方面涉及具有式(II)的化合物:

[0025]  (II)

[0026] 其中:

[0027] X₁和X₂各自独立地选自三氟甲磺酸酯, 甲苯磺酰基, C₁, N-羟基琥珀酰亚胺和咪唑啉;

[0028] A₁和A₃各自独立地为 $-(CR^1R^2)_n-$;

[0029] A₂是 $-(CR^1R^2)_m-$;

[0030] Y₁和Y₂各自独立地选自NR³、O和S;

[0031] 其中每次出现时, R¹和R²独立地选自氢, 卤素, 羟基, C₁₋₁₂烷基, C₂₋₁₂烯基, C₃₋₁₂环烷基, C₂₋₁₂杂环基; 任选地被1个或多个卤素, 羟基, C₁₋₆烷基和/或C₁₋₆烷氧基取代的C₆₋₁₂芳基; 和任选地被1个或多个卤素, 羟基, C₁₋₆烷基和/或C₁₋₆烷氧基取代的C₄₋₁₂杂芳基;

[0032] 其中R³选自氢, C₁₋₁₂烷基, C₂₋₁₂烯基, C₃₋₁₂环烷基, C₂₋₁₂杂环基; 任选地被1个或多个卤素, 羟基, C₁₋₆烷基和/或C₁₋₆烷氧基取代的C₆₋₁₂芳基; 和任选地被1个或多个卤素, 羟基, C₁₋₆烷基和/或C₁₋₆烷氧基取代C₄₋₁₂杂芳基;

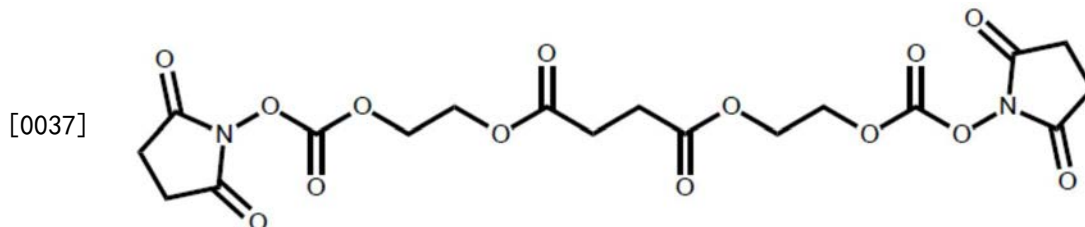
[0033] 在每次出现时, n为独立选自1-12的整数; 和

[0034] m是从0到12的整数。

[0035] 在一些实施方式中, 式(II)的化合物是对称的。在一些实施方式中, X₁和X₂各自可

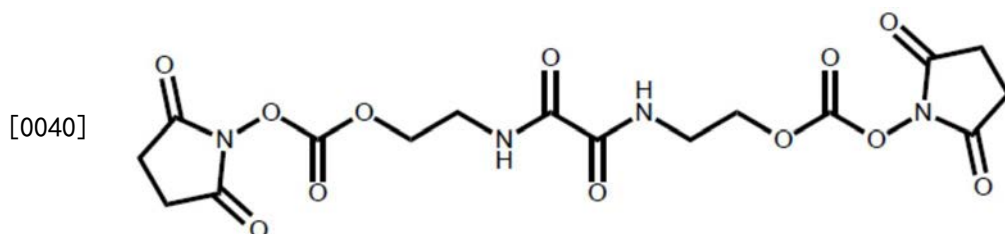
以是能够与蛋白质、药物和/或颗粒反应的离去基团。在一个实例中, X_1 和 X_2 均为咪唑啉。在另一个实例中, X_1 和 X_2 均为N-羟基琥珀酰亚胺。在一些实施方式中, R^1 和 R^2 均为氢。在一个实例中, A_1 和 A_3 均为 $-(CH_2)_2-$ 。在一个实施方式中, A_2 为 $-(CH_2)_2-$ 。在一些实施方式中, Y_1 和 Y_2 均为O。

[0036] 在一个实施方式中, 该化合物为:



[0038] 在一些实施方式中, A_2 为键。在一个实施方式中, Y_1 和 Y_2 均为NH。

[0039] 在某些实施方式中, 该化合物是:



[0041] 如本文所公开的, 该化合物可用于在例如胺基团如末端胺或内部胺上偶联或交联一种或多种感兴趣的蛋白质或试剂。内部胺包括侧链胺, 例如赖氨酸胺。

[0042] 在某些实施方式中, 本文公开的化合物可用于将多种治疗性蛋白质单体可逆地交联成直径例如为30nm至1000nm的蛋白质簇。蛋白质簇可以进行表面修饰, 例如聚阳离子。在一些实施方式中, 这些蛋白质簇被称为“背包”或“BP”。

[0043] 在各种实施方式中, 可以通过提供本文公开的蛋白质簇或背包, 并用有核细胞如T细胞, B细胞, 自然杀伤(NK)细胞和造血干细胞孵育蛋白质簇或背包来制备细胞治疗组合物。T细胞可包括CD4+T细胞, 细胞毒性T细胞(例如, CD8+ T细胞), α T细胞, β T细胞, γ T细胞, δ T细胞和调节性T细胞(Treg)。在一些实施方式中, 有核细胞(例如, T细胞或NK细胞)可以包含, 例如, 表达与癌症抗原结合的嵌合抗原受体(CAR), 例如CAR。

[0044] 在一些实施方式中, 该化合物可以用作可降解或可水解的接头。在一些实施方式中, 可降解的接头是氧化还原响应性接头。美国公开号2017/0080104, 美国专利号9,603,944和美国公开号2014/0081012中公开了制备和使用各种接头(例如, 制备纳米凝胶或背包)的方法, 其各自通过引用全文纳入本文。

[0045] 在另一方面, 本公开提供了一种颗粒, 例如纳米颗粒, 其由本文所述的接头形成, 例如包含蛋白质的纳米颗粒(例如, 蛋白质纳米凝胶)。纳米颗粒及其制备方法公开于2017年6月13日提交的PCT国际申请PCT/US2017/037249, 例如第57-79页上, 其全部内容通过引用纳入本文。在某些实施方式中, 本文公开的接头可与背包技术结合使用, 例如用于细胞疗法, 例如在美国公开号2017/0080104, 美国专利号9,603,944, 美国公开号2014/0081012, 和PCT申请号PCT/US2017/037249中所述, 其各自通过引用全文纳入本文。

附图说明

- [0046] 图1示出了两种示例性接头,接头-1和接头-2。
- [0047] 图2显示背包可以通过使使用本文公开的一种或多种交联剂交联的各种治疗性蛋白质单体反应而制备。
- [0048] 图3示出了背包在细胞疗法中的示例性用途。
- [0049] 图4:两种接头-2交联的IL-15背包制剂(17HF1和17HF2)显示出与接头-1交联的IL-15背包制剂(HF6)相当的细胞扩增。
- [0050] 图5:示例性PMEL实验概述。
- [0051] 图6,BP-接头-1和BP-接头-2在体内显示相似的抗肿瘤活性。此外,BP-接头-1和BP-接头-2在包括血液,脾,肺和肿瘤在内的被分析器官中显示出相当的分布(未显示)。
- [0052] 图7显示在患有肿瘤或无肿瘤的小鼠中,使用BP-接头-1(TRQ-PMEL1)和BP-接头-2(TRQ-PMEL2)对全血细胞计数(CBC)没有显著影响。
- [0053] 图8:与BP-接头-1相比,BP-接头-2显示了更低的淋巴结清除趋势(CD8,NK1.1和转移的PMEL)。
- [0054] 图9:另一组PMEL研究的实验概述。
- [0055] 图10和11是按细胞数量(图10)和当前存活细胞(图11)的体外PMEL扩增曲线。
- [0056] 图11:接头-1 NG和接头-2 NG均显示出抗肿瘤活性。
- [0057] 图12:接头-1 NG和接头-2 NG显示相当数量的循环PMEL。
- [0058] 图13:接头-1 NG和接头-2 NG显示相当数量的肿瘤浸润PMEL。
- [0059] 图14:接头-2背包细胞具有较旧的记忆表型,注射后第4天相对于接头-1,接头-2中的Teff细胞显著增加。Tcm:中央记忆T细胞;Teff:效应记忆T细胞;Temra:效应记忆RA+T细胞;Tscm:记忆干T细胞;Tnaive:幼稚T细胞。
- [0060] 图15:背包嵌合抗原受体(CAR)T细胞的功效。
- [0061] 图16:CAR,接头-1-HF6,接头-2-HF1和TF在第0、1、3、7、10、14、17和21天的体外增殖。
- [0062] 图18:与单独CAR或空白相比,背包细胞的扩增明显更多。
- [0063] 图19A-19B:到第21天,Tnaive,Tscm和Tcm的表型保持相似,而Tem和Temra组成略有变化(Tcm:中央记忆T细胞;Tem:效应记忆T细胞;Temra:效应记忆RA+ T细胞;Tscm:记忆干T细胞;Tnaive:幼稚T细胞)。
- [0064] 图20显示了背包CAR T治疗的功效,在所有分析的时间点,与单独CAR或h9.4-IL15背包相比,接头-1-HF6和接头-2-HF1在统计学上均显著(如**所示)延迟/抑制了肿瘤生长。
- [0065] 图21和22:在第22天,还分析了肿瘤大小,肿瘤重量,脾脏重量,肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的数量,CAR TIL的数量和TIL表型。
- [0066] 图23:给予后D1和D4的幼稚小鼠的临床化学参数。HBSS=载剂对照;DP-15 PMEL=深IL-15引发的PMEL细胞;D=天。使用ANOVA然后进行Tukey的多重比较测试进行统计学比较。*= $p<0.05$;**= $p<0.01$;***= $p<0.001$;****= $p<0.0001$ 。
- [0067] 图24:给予后D1和D4的荷瘤小鼠的临床化学参数。HBSS=载剂对照;DP-15 PMEL=深IL-15引发的PMEL细胞;D=天。使用ANOVA然后进行Tukey的多重比较测试进行统计学比较。*= $p<0.05$;**= $p<0.01$;***= $p<0.001$ 。

[0068] 图25:ACT后24小时与幼稚小鼠相比,荷瘤小鼠的血清IFN- γ 水平。相比于幼稚和荷瘤小鼠中PMEL和DP-15 PMEL组,PMEL+IL15-Fc组的血清IFN- γ 水平显著升高(Tuway多重比较的双向ANOVA, $p<0.001$)。ACT=过继细胞转移;DP-15 PMEL=深IL-15引发的PMEL细胞。

[0069] 图26:在幼稚和荷瘤小鼠中,用PMEL+IL15-Fc和深IL-15引发的PMEL细胞处理的小鼠中的IL15-Fc全身暴露。

[0070] 图27:随时间和在第16天的平均肿瘤体积。在第-5天,第-3天,第0天,第1天,第2天,第4天,第6天,第9天,第10天,第11天,第14天和第16天测量肿瘤体积。数据为平均值 \pm SEM(左图)。右图显示了D16上单个动物的肿瘤体积。使用ANOVA然后进行Tukey的多重比较测试进行统计学比较。 $*=p<0.05$; $**=p<0.01$; $***=p<0.001$; $****=p<0.0001$ 。星号的颜色代表统计上不同的组。例如,灰色(HBSS)线上方的绿色星号表示HBSS和PMEL细胞之间存在显著差异。HBSS=载剂对照;ACT=过继细胞转移。DP-15 PMEL=深IL-15引发的PMEL细胞。

[0071] 图28:处死时的平均肿瘤重量($n=2-5$ /组/时间点)。在第1、4、10和16天处死时肿瘤重量(每个时间点 $n=2-5$ /组)。使用ANOVA然后进行Tukey的多重比较测试进行统计学比较。 $*=p<0.05$; $**=p<0.01$; $****=p<0.0001$ 。HBSS=载剂对照;DP-15 PMEL=深IL-15引发的PMEL细胞。

具体实施方式

[0072] 癌症免疫疗法,包括过继性T细胞疗法,是治疗癌症的一种有前途的策略,因为它利用对象自身的免疫系统攻击癌细胞。但是,这种方法的主要局限性在于所移植的T淋巴细胞的活力和功能迅速下降。为了在肿瘤中维持大量活的肿瘤特异性细胞毒性T淋巴细胞,免疫刺激剂与转移细胞的共同给予是必要的。当以高剂量全身给予时,这些试剂可以增强转移的(即供体)细胞的体内活力,改善转移的细胞的治疗功能,从而导致总体上提高的抗癌功效;但是,高剂量的此类试剂也可能导致危及生命的副作用。例如,将白介素2(IL-2)用作佐剂极大地支持了黑色素瘤的过继性T细胞疗法,其中IL-2为转移的T细胞提供关键的佐剂信号,但也引起严重的剂量限制性炎性毒性并扩增了调节性T细胞(Treg)。将佐剂活性集中在转移的细胞上的一种方法是对转移的细胞进行基因工程改造以分泌其自身的支持因子。迄今为止,技术难度和挑战以及大规模生产基因工程改造的T淋巴细胞的高成本已大大限制了该方法在临床应用中的潜力。

[0073] 在某些方面,本文公开的技术平台允许通过蛋白质,药物或颗粒负载的无载体接头直接化学偶联到细胞的质膜上将生物活性剂(例如药物,蛋白质(例如,佐剂,例如IL-2))或颗粒简单,安全和高效地递送至细胞。

[0074] 除了前述内容之外,本发明还考虑了其他纳米结构,其包括除对过继转移的细胞产生佐剂作用以外的目的的其他蛋白质治疗剂。如本文所提供的,本领域技术人员将容易认识到,本公开具有更广泛的应用。

[0075] 本公开的各个方面可以单独使用、组合使用、或者以前面描述的实施例中未具体讨论的各种配置使用,因此在其应用上不限于在前面的描述中阐述的或者在附图中示出的部件的细节和布置。例如,一个实施方式中描述的方面可以以任何方式与其它实施方式中描述的方面组合。

[0076] 定义

[0077] 方便起见,将说明书、实施例和所附权利要求中使用的特定术语汇集在此。除非另外定义,否则,本文中所使用的所有技术和科学术语都具有本文所属领域普通技术人员通常所理解的含义。

[0078] 本文使用冠词“一个”和“一种”表示一个或一个以上的(即至少一个)该冠词语法上的宾语。术语“一种”或“一个”当与术语“包含”在本文中联用时,可表示“一个”,但也与“一个或多个”,“至少一个”和“一个或多个”的意思一致。

[0079] 如本文所用,“约”和“大约”通常表示在考虑测量的性质或精度的情况下测量的量的可接受的误差度。示例性误差度在给定数值范围的20%以内,通常在10%以内,更通常在5%以内。术语“基本上”表示超过50%,更优选超过80%并且最优选超过90%或95%。

[0080] 如本文所用,术语“包含”或“包括”是指存在于给定实施方式中,但未包含未指定要素的组合物,方法及其各自的组分。

[0081] 如本文所用,术语“基本上由……组成”是指给定实施方式所需的那些要素。该术语允许存在实质上不影响本公开的该实施方式的基本和新颖的或功能的特征的附加要素。

[0082] 术语“由……组成”是指本文所述的组合物,方法及其各自的组分,其排除了在该实施方式的描述中未列举的任何要素。

[0083] 本文所用“多个/多种”表示超过1个/种,例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个/种,例如25、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500或更多个/种,或其间任何整数。

[0084] 本文使用的术语“治疗物”,“治疗剂”,“活性物”,“活性剂”,“活性药物剂”,“活性药物”或“药物”是指任何活性药物成分(API),包括其药学上可接受的盐(例如盐酸盐,氢溴酸盐,氢碘酸盐和糖精盐),以及无水,水合和溶剂化形式,前药形式,以及API各自的光学活性对映体以及API的多晶型物。治疗剂包括药学,化学或生物试剂。另外,药学,化学或生物试剂可包括具有期望性质或影响其是否为治疗剂的任何试剂。例如,试剂还包括诊断剂,杀生物剂等。

[0085] 术语“蛋白质”、“肽”和“多肽”在本文中可互换使用,指任何长度的氨基酸的聚合物。聚合物可以是线性或支化聚合物,可以包含经修饰的氨基酸,并且可间插有非氨基酸。该术语也包括修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其它操作,如与标记组分偶联。多肽可从天然来源分离,可采用重组技术由原核或真核宿主产生,或者可为合成方法的产品。应当理解,术语“蛋白质”包括融合蛋白或嵌合蛋白,以及细胞因子,抗体及其抗原结合片段。

[0086] 如本文所用的“抗体”或“抗体分子”是指包含至少一种免疫球蛋白可变结构域序列的蛋白质,例如免疫球蛋白链或其片段。抗体分子包括抗体(例如,全长抗体)和抗体片段。在一个实施方式中,抗体分子包含全长抗体或全长免疫球蛋白链的抗原结合或功能片段。例如,全长抗体是天然存在的或通过正常免疫球蛋白基因片段重组过程形成的免疫球蛋白(Ig)分子(例如,IgG)。在实施方式中,抗体分子是指免疫球蛋白分子的免疫活性的抗原结合部分,例如抗体片段。抗体片段(例如功能片段)是抗体的一部分,例如Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₂, 可变片段(Fv), 域抗体(dAb)或单链可变片段(scFv)。功能性抗体片段结合与完整(例如,全长)抗体识别的抗原相同的抗原。术语“抗体片段”或“功能片段”还包括由

可变区组成的分离的片段,例如由重链和轻链的可变区或其中轻链和重链可变区通过肽接头(“scFv蛋白”)连接的重组单链多肽分子组成的“Fv片段。”在一些实施方式中,抗体片段不包括没有抗原结合活性的抗体部分,例如Fc片段或单氨基酸残基。示例性抗体分子包括全长抗体和抗体片段,例如,dAb(域抗体),单链,Fab,Fab'和F(ab')₂片段以及单链可变片段(scFv)。术语“Fab”和“Fab片段”可互换使用,并且是指包括来自抗体的每个重链和轻链的一个恒定域和一个可变域的区域,即V_L,C_L,V_H,和C_{H1}。

[0087] 在实施方式中,抗体分子是单特异性的,例如,其包含对单个表位的结合特异性。在一些实施方式中,抗体分子是多特异性的,例如,其包含多个免疫球蛋白可变结构域序列,其中第一免疫球蛋白可变结构域序列对第一表位具有结合特异性,第二免疫球蛋白可变结构域序列对第二表位具有结合特异性。在一些实施方式中,抗体分子是双特异性抗体分子。如本文所用,“双特异性抗体分子”是指对一种以上(例如,两,三,四或更多种)表位和/或抗原具有特异性的抗体分子。

[0088] 如本文所用,“抗原”(Ag)是指大分子,包括所有蛋白质或肽。在一些实施方式中,抗原是可以引起免疫应答的分子,例如涉及某些免疫细胞的激活和/或抗体产生。抗原不仅参与抗体产生。T细胞受体还识别抗原(尽管其肽或肽片段与MHC分子复合的抗原)。任何大分子,包括几乎所有蛋白质或肽,都可以是抗原。抗原也可以源自基因组重组体或DNA。例如,包含编码能够引发免疫应答的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何DNA都编码“抗原”。在实施方式中,抗原不需要仅由基因的全长核苷酸序列编码,抗原也不需要完全由基因编码。在实施方式中,抗原可以合成或可以衍生自生物学样品,例如组织样品,肿瘤样品,细胞或具有其他生物学组分的流体。如本文所用,“肿瘤抗原”或可互换使用的“癌症抗原”包括存在于癌症,例如,癌症细胞或肿瘤微环境上或与之相关的可以激发免疫应答的任何分子。如本文所用,“免疫细胞抗原”包括存在于免疫细胞上或与之相关的可引起免疫应答的任何分子。

[0089] 抗体分子的“抗原结合位点”或“抗原结合片段”或“抗原结合部分”(在本文中可互换使用)是指抗体分子,例如免疫球蛋白(Ig)分子,例如IgG参与抗原结合的一部分。在一些实施方式中,抗原结合位点由重(H)链和轻(L)链的可变(V)区的氨基酸残基形成。重链和轻链的可变区域内的三个高度发散的延伸(称为高变区域)位于称为“框架区”(FR)的更为保守的侧翼延伸之间。FR是天然在免疫球蛋白中的高变区之间并与其相邻的氨基酸序列。在实施方式中,在抗体分子中,轻链的三个高变区和重链的三个高变区在三维空间中相对于彼此布置以形成抗原结合表面,其与结合的抗原的三维表面互补。重链和轻链三个高变区中的每一个被称为“互补决定区”或“CDR”。框架区和CDR已经在例如Kabat,E.A.等,(1991)《热门免疫学蛋白质序列》,第五版,美国卫生和人服务部,NIH出版号91-3242,和Chothia,C.等,(1987)J.Mol.Biol.196:901-917中被定义和描述。每条可变链(例如,可变重链和可变轻链)通常由三个CDR和四个FR组成,按照下述氨基酸顺序从氨基端到羧基端排列:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3和FR4。可变轻链(VL)CDR通常定义为包括位置27-32(CDR1),50-56(CDR2)和91-97(CDR3)上的残基。可变重链(VH)CDR通常定义为包括位置27-33(CDR1),52-56(CDR2)和95-102(CDR3)上的残基。本领域普通技术人员将理解,环在抗体之间可以具有不同的长度,并且以诸如Kabat或Chotia的编号系统为准,从而框架在抗体之间具有一致的编号。

[0090] 在一些实施方式中,抗体的抗原结合片段(例如,当作为融合分子的一部分包括时)可以缺乏或没有完整的Fc结构域。在某些实施方式中,抗体结合片段不包含完整的IgG或完整的Fc,但是可以包含来自轻链和/或重链的一个或多个恒定区(或其片段)。在一些实施方式中,抗原结合片段可以完全不含任何Fc结构域。在一些实施方式中,抗原结合片段可以基本上没有完整的Fc结构域。在一些实施方式中,抗原结合片段可包括完整Fc结构域的一部分(例如,CH2或CH3结构域或其部分)。在一些实施方式中,抗原结合片段可包括完整的Fc结构域。在一些实施方式中,Fc结构域是IgG结构域,例如IgG1,IgG2,IgG3或IgG4Fc结构域。在一些实施方式中,Fc结构域包含CH2结构域和CH3结构域。

[0091] 如本文所用,“细胞因子分子”是指天然存在的野生型细胞因子的全长,片段或变体(包括其具有天然存在的细胞因子分子的至少10%活性的片段和功能变体)。在实施方式中,细胞因子分子具有天然存在的分子至少30%,50%或80%的活性,例如免疫调节活性。在实施方式中,细胞因子分子还包含任选地与免疫球蛋白Fc区偶联的受体结构域,例如细胞因子受体结构域。在其他实施方式中,细胞因子分子与免疫球蛋白Fc区偶联。在其他实施方式中,细胞因子分子与抗体分子(例如,免疫球蛋白Fab或scFv片段,Fab片段,FAB₂片段或亲和体片段或衍生物,例如sdAb(纳米抗体)片段,重链抗体片段,单域抗体,双特异性或多特异性抗体),或非抗体支架和抗体模拟物(例如载脂蛋白(例如抗运载蛋白(anticalin)),亲和体,纤连蛋白(例如单抗体(monobody)或阿迪连接素(Adnectin)),结蛋白,锚蛋白重复序列(例如DARPin)和A域(例如avimer))偶联。

[0092] 除非另有说明,否则使用某些化学基团的以下定义。下面列出的关于自由基,取代基和范围的特定和一般值仅作说明之用;它们不排除其他定义的值或在自由基和取代基的定义范围内的其他值。除非另有说明,否则烷基,烷氧基,烯基等表示直链和支链基团。

[0093] 术语“烷基”是指可以是直链或支链的饱和烃链,其包含所示数目的碳原子。例如,C₁₋₆烷基表示该基团中可以具有1至6个(含)碳原子。任何原子可以任选地被例如一个或多个取代基取代。烷基的实例包括但不限于甲基,乙基,正丙基,异丙基和叔丁基。

[0094] 如本文所指,术语“烷氧基”是指式-O(烷基)的基团。烷氧基可以是例如甲氧基(-OCH₃),乙氧基,丙氧基,异丙氧基,丁氧基,异丁氧基,仲丁氧基,戊氧基,2-戊氧基,3-戊氧基或己氧基。如本文所用,单独或与其他术语组合使用的术语“羟基”是指式-OH的基团。

[0095] 术语“烯基”是指含有指定数目的碳原子并具有一个或多个碳-碳双键的直链或支链烃链。任何原子可以任选地被例如一个或多个取代基取代。烯基可包括例如乙烯基,烯丙基,1-丁烯基和2-己烯基。双键碳之一可以任选地是烯基取代基的连接点。

[0096] 术语“炔基”是指含有指定数目的碳原子并具有一个或多个碳-碳三键的直链或支链烃链。炔基可以任选地被例如一个或多个取代基取代。炔基可包括例如乙炔基,炔丙基和3-己炔基。三键碳原子之一可以任选地是炔基取代基的连接点。

[0097] 术语“杂环基”是指具有一个或多个独立地选自O,N(应理解,可以存在一个或两个另外的基团以匹配氮价和/或形成盐)或S的构成杂原子的环原子的完全饱和的单环,双环,三环或其他多环系统。杂原子或环碳可以是杂环基取代基与另一个部分的连接点。任何原子可以任选地被例如一个或多个取代基取代。杂环基可包括例如四氢呋喃基,四氢吡喃基,哌啶基(哌啶子基),哌嗪基,吗啉基(吗啉代基),吡咯啉基和吡咯烷基。例如,短语“含有5-6个环原子的杂环,其中1-2个环原子独立地选自N,NH,N(C₁₋₆烷基),NC(O)(C₁₋₆烷基),O和

S;并且其中所述杂环任选地被1-3个独立选择的R^a取代”将包括(但不限于)四氢呋喃基,四氢吡喃基,哌啶基(哌啶子基),哌嗪基,吗啉基(吗啉代基),吡咯啉基和吡咯烷基。

[0098] 术语“环烷基”是指完全饱和的单环,双环,三环或其他多环烷基。任何原子可以任选地被例如一个或多个取代基取代。环碳用作环烷基与另一个部分的连接点。环烷基部分可包括例如环丙基,环丁基,环戊基,环己基,环庚基,金刚烷基和降冰片基(双环[2.2.1]庚基)。

[0099] 术语“芳基”是指芳族单环,双环(2个稠合环)或三环(3个稠合环)或多环(>3个稠合环)烃环系。一个或多个环原子可以任选地被例如一个或多个取代基取代。芳基部分包括例如苯基和萘基。

[0100] 术语“杂芳基”是指具有一个或多个独立地选自O,N(应理解,可以存在一个或两个另外的基团以匹配氮价和/或形成盐)或S的杂原子的环原子的芳族单环,双环(2个稠合环),三环(3个稠合环)或多环(>3个稠合环)烷基。一个或多个环原子可以任选地被例如一个或多个取代基取代。杂芳基的示例包括但不限于2H-吡咯基,3H-吡啶基,4H-喹啉基,吡啶基,苯并[b]噻吩基,苯并噻唑基,对-咪唑基,咪唑基,香豆基,色烯基,肉桂基,二苯并[b,d]呋喃基,呋喃基,呋喃基,咪唑基,咪唑基(imidizoly),吡啶基,吡啶基,异苯并呋喃基,异吡啶基,异喹啉基,异噻唑基,异噻唑基,萘啶基,噻唑基,萘啶二氮杂苯基(perimidinyl),菲啶基,菲咯啉基(phenanthrolinyl),吩吡嗪基(phenarsazinyl),吩嗪基,吩噻嗪基,吩噻嗪基,吩噻嗪基,酞嗪基,蝶啶基,嘌呤基,吡喃基,吡嗪基,吡啶基,吡嗪基,吡啶基,嘧啶基,嘧啶基,吡咯基,喹啉基,喹啉基,喹啉基,噻二唑基,噻噻基,噻吩基,三唑基和噻吨基。

[0101] 术语“取代基”是指在该基团的任何原子上“取代”的基团,例如烷基,卤代烷基,环烷基,杂环基,杂环烯基,环烯基,芳基或杂芳基。在一方面,一个基团上的一个或多个取代基独立地是为该取代基描述的任何单个或者两个或多个可允许原子或原子团的任意组合。另一方面,取代基本身可以被上述取代基中的任何一个取代。此外,如本文所用,短语“任选取代的”是指未取代的(例如被H取代)或取代的。如本文所用,术语“取代的”是指氢原子被去除并被取代基取代。可以理解,在给定原子上的取代受价态限制。

[0102] 下面进一步详细描述本公开的各个方面。在整个说明书中提供了其他定义。

[0103] 接头

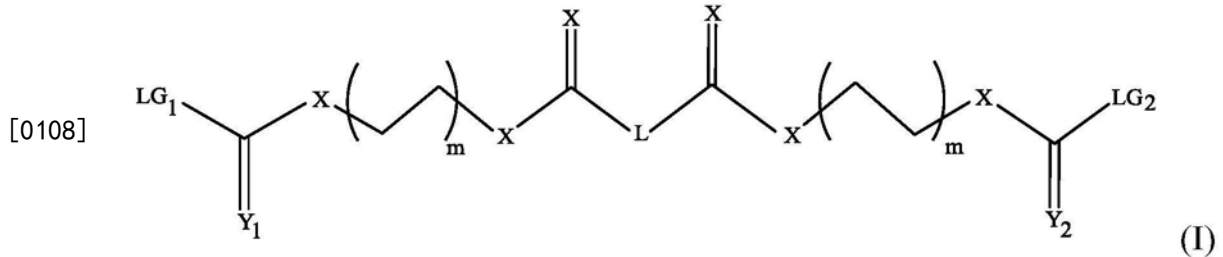
[0104] 在一些实施方式中,本公开的至少一种药物,蛋白质,聚合物和/或颗粒(统称为“试剂”)通过可降解的接头可逆地彼此连接,使得在生理条件下,该接头降解并释放完整的生物活性剂。在一个实施方式中,蛋白质单体可以被交联在一起以形成包含多个蛋白质单体的簇。在其他实施方式中,各种试剂通过可降解的接头连接至官能团。在各种实施方式中,如下所述,可逆地修饰或链接所述试剂。

[0105] 如本文所用,“可逆地与另一种试剂连接”的试剂是指通过可降解的接头与另一种药物,蛋白质,聚合物或颗粒附连(例如,共价附连)的药物,蛋白质,聚合物或颗粒。

[0106] 在本文中“可逆地连接至官能团”的试剂或“可逆地修饰”的试剂是指通过可降解的接头与官能团附连(例如,共价附连)的试剂。这样的试剂在本文中可以被称为“试剂偶联物”或“可逆修饰的试剂偶联物”,这些术语在本文中可以互换使用。应当理解,蛋白质和聚合物(例如,聚乙二醇)各自包含官能团,试剂可以通过可逆接头,例如胺,硅烷,羟基,聚(环

氧乙烷), 聚乳酸, 聚乳酸-羟基乙酸共聚物与之连接。本文提供的试剂偶联物和可逆修饰的蛋白质的实例包括但不限于与另一试剂可逆连接 (例如, 经由可降解的接头) 的试剂, 与聚合物可逆连接的试剂, 和与另一个官能团可逆连接的蛋白质。应当理解, 术语“蛋白质”包括融合蛋白。

[0107] 根据本公开使用的可降解接头的的一个示例由式 (I) 表示:

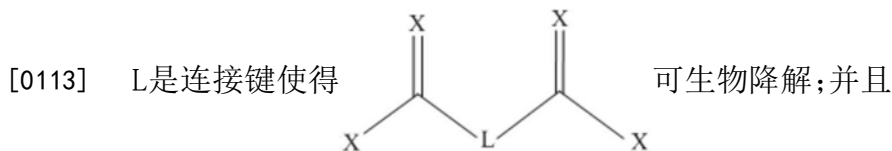


[0109] 其中:

[0110] LG₁和LG₂各自为离去基团, 优选独立地选自三氟甲磺酸酯, 甲苯磺酰基, C1, N-羟基琥珀酰亚胺和咪唑啉基;

[0111] Y₁和Y₂各自独立地选自O和S;

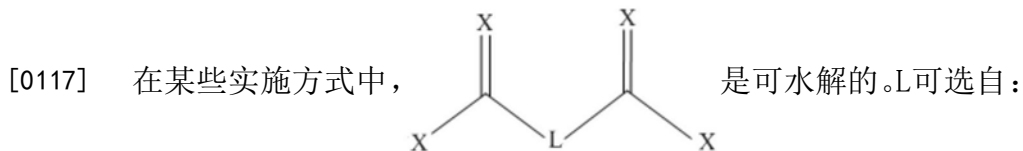
[0112] 在每次出现时, X独立地选自O、S和N;



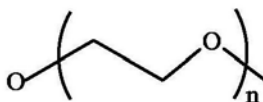
[0114] 在每次出现时, m是选自1-6的整数。

[0115] 在一些实施方式中, 式 (I) 所示的化合物在L是对称的。例如, LG₁和LG₂可以相同。Y₁和Y₂可以相同。


[0116] 在各种实施方式中, LG₁和LG₂能够与蛋白质, 药物和/或颗粒反应。LG₁和LG₂可均为咪唑啉。在另一个实例中, LG₁和LG₂均为N-羟基琥珀酰亚胺。



[0118] (a) -(CH₂)_n-, 其中n是选自0-5的整数;

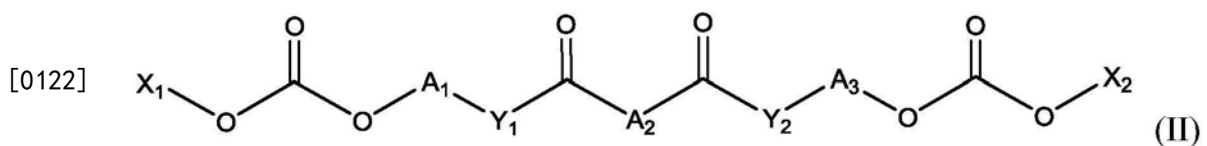
[0119] (b)  其中n是选自0-5的整数; 或

The structure shows a polyether chain with an oxygen atom in the middle, enclosed in brackets with subscript n.

[0120] (c)  其中在每次出现时, X独立地选自O、S和N。

The structure shows a polyether chain with two oxygen atoms, each with an X group attached to the oxygen atom.

[0121] 根据本公开使用的可降解接头的另一个示例由式 (II) 表示:



[0123] 其中：

[0124] X_1 和 X_2 各自独立地选自三氟甲磺酸酯, 甲苯磺酰基, C_1 , N-羟基琥珀酰亚胺和咪唑啉；

[0125] A_1 和 A_3 各自独立地是 $-(CR^1R^2)_n-$ ；

[0126] A_2 是 $-(CR^1R^2)_m-$ ；

[0127] Y_1 和 Y_2 各自独立地选自 NR^3 、O和S；

[0128] 其中每次出现时, R^1 和 R^2 独立地选自氢, 卤素, 羟基, C_{1-12} 烷基, C_{2-12} 烯基, C_{3-12} 环烷基, C_{2-12} 杂环基；任选地被1个或多个卤素, 羟基, C_{1-6} 烷基和/或 C_{1-6} 烷氧基取代的 C_{6-12} 芳基；和任选地被1个或多个卤素, 羟基, C_{1-6} 烷基和/或 C_{1-6} 烷氧基取代的 C_{4-12} 杂芳基；

[0129] 其中 R^3 选自氢, C_{1-12} 烷基, C_{2-12} 烯基, C_{3-12} 环烷基, C_{2-12} 杂环基；任选地被1个或多个卤素, 羟基, C_{1-6} 烷基和/或 C_{1-6} 烷氧基取代的 C_{6-12} 芳基；和任选地被1个或多个卤素, 羟基, C_{1-6} 烷基和/或 C_{1-6} 烷氧基取代 C_{4-12} 杂芳基；

[0130] 在每次出现时, n 为独立选自1-12的整数；和

[0131] m 是从0到12的整数。

[0132] 在一些实施方式中, 由式 (II) 表示的化合物是对称的。

[0133] 在一些实施方式中, X_1 和 X_2 各自是能够与蛋白质、药物和/或颗粒反应的离去基团。在某些实施方式中, X_1 和 X_2 均为咪唑啉或N-羟基琥珀酰亚胺。

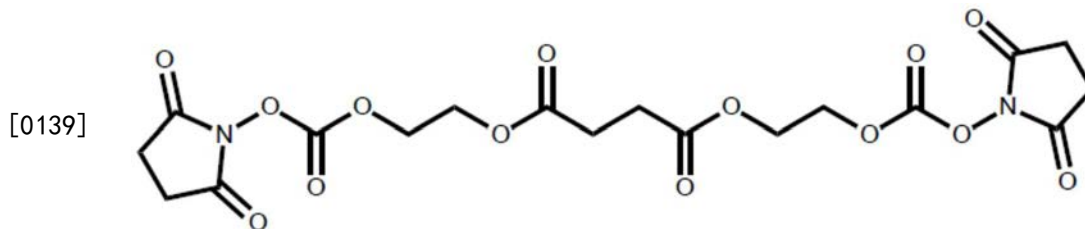
[0134] 在一些实施方式中, R^1 和 R^2 均为氢。

[0135] 在一些实施方式中, A_1 和 A_3 均为 $-(CH_2)_2-$ 。

[0136] 在某些实施方式中, A_2 为 $-(CH_2)_2-$ 。

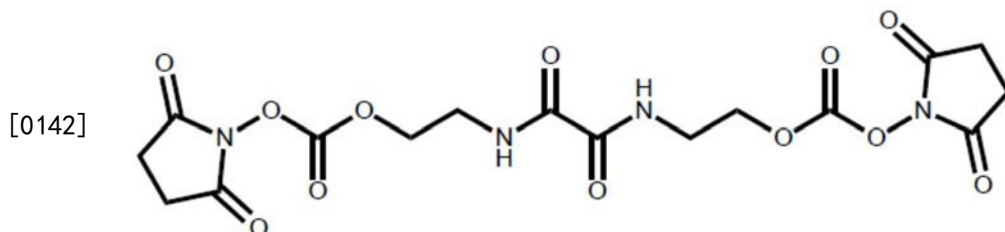
[0137] 在一些实施方式中, Y_1 和 Y_2 均为O。

[0138] 在一些实施方式中, 所述化合物是：



[0140] 在一些实施方式中, A_2 为键。在某些实施方式中, Y_1 和 Y_2 均为NH。

[0141] 在一些实施方式中, 所述化合物是：



[0143] 接头的用途

[0144] 根据本公开使用的蛋白质单体的实例包括但不限于抗体 (例如, IgG, Fab, 混合的Fc和Fab), 单链抗体, 抗体片段, 工程化的蛋白质, 例如Fc融合体, 酶, 辅因子, 受体, 配体, 转录因子和其他调节因子, 细胞因子, 趋化因子, 人血清白蛋白等。这些蛋白质可能是天然的

也可能不是天然的。考虑并且可以根据本公开使用其他蛋白质。如在例如美国公开号2017/0080104,美国专利号9,603,944,美国公开号2014/0081012和2017年6月13日提交的PCT申请号PCT/US17/37249中所公开的,可以通过交联可逆地修饰任何蛋白质以形成簇或纳米凝胶结构,其全部通过引用并入本文。

[0145] 如图1中所示,两个示例性接头,接头-1和接头-2可用于交联具有胺基(由R-NH₂表示)的各种蛋白质单体。在合适的条件下,可将接头1中的二硫键或接头2中的二酯键水解以释放原始的蛋白质单体,以达到例如治疗效果。

[0146] 在一些实施方式中,本公开的蛋白质单体是免疫刺激蛋白质。如本文所用,免疫刺激蛋白是在其被给予的对象中刺激免疫应答(包括增强预先存在的免疫应答)的蛋白质,无论是单独还是与另一种蛋白质或试剂组合。可以根据本公开使用的免疫刺激蛋白的实例包括但不限于抗原,佐剂(例如鞭毛蛋白,胞壁酰二肽),细胞因子包括白介素(例如IL-2,IL-7,IL-15,IL-10,IL-18,IL-21,IL-23(或这些细胞因子的超激动剂/突变形式,例如IL-15SA),IL-12,IFN- γ ,IFN- α ,GM-CSF,FLT3-配体),和免疫刺激抗体(例如,抗CTLA-4,抗CD28,抗CD3或这些分子的单链/抗体片段)。考虑并且可以根据本公开使用其他免疫刺激蛋白质。在一些实施方式中,免疫刺激蛋白可以是结合免疫抑制剂的抑制剂,例如检查点抑制剂的抑制剂,例如PD-1,PD-L1,LAG-3,TIM-3,CTLA-4,抑制性KIR,CD276,VTCN1,BTLA/HVEM,HAVCR2和ADORA2A的抗体或其抗原结合片段,例如,US2016/0184399中所述的那些,其通过引用并入本文。

[0147] 在一些实施方式中,本公开的蛋白质单体是抗原。可以根据本公开使用的抗原的实例包括但不限于癌症抗原,自身抗原,微生物抗原,变应原和环境抗原。考虑并且可以根据本公开使用其他蛋白质抗原。

[0148] 在一些实施方式中,本公开的蛋白质单体是癌症抗原。癌症抗原是优先由癌细胞表达的抗原(即,其在癌细胞中表达的水平高于在非癌细胞上的表达),并且在某些情况下,它仅由癌细胞表达。癌症抗原可以在癌细胞内或在癌细胞表面上表达。可以根据本公开使用的癌症抗原包括但不限于MART-1/Melan-A,gp100,腺苷脱氨酶结合蛋白(ADAbp),FAP,亲环蛋白b,结直肠相关抗原(CRC)-0017-1A/GA733,癌胚抗原(CEA),CAP-1,CAP-2,etv6,AML1,前列腺特异性抗原(PSA),PSA-1,PSA-2,PSA-3,前列腺特异性膜抗原(PSMA),T细胞受体/CD3- ζ 链和CD20。癌症抗原可以选自下组:MAGE-A1,MAGE-A2,MAGE-A3,MAGE-A4,MAGE-A5,MAGE-A6,MAGE-A7,MAGE-A8,MAGE-A9,MAGE-A10,MAGE-A11,MAGE-A12,MAGE-Xp2(MAGE-B2),MAGE-Xp3(MAGE-B3),MAGE-Xp4(MAGE-B4),MAGE-C1,MAGE-C2,MAGE-C3,MAGE-C4和MAGE-C5。所述癌症抗原可以选自下组:GAGE-1,GAGE-2,GAGE-3,GAGE-4,GAGE-5,GAGE-6,GAGE-7,GAGE-8和GAGE-9。癌症抗原可以选自下组:BAGE,RAGE,LAGE-1,NAG,GnT-V,MUM-1,CDK4,酪氨酸酶,p53,MUC家族,HER2/neu,p21ras,RCAS1, α -甲胎蛋白,E-钙粘附蛋白, α -连环蛋白, β -连环蛋白, γ -连环蛋白,p120ctn,gp100Pmel117,PRAME,NY-ESO-1,cdc27,腺瘤性息肉病大肠杆菌蛋白(APC),铁蛋白,连接蛋白37,Ig独特型,p15,gp75,GM2神经节苷脂,GD2神经节苷脂,人乳头瘤病毒蛋白,Smad肿瘤抗原家族,Imp-1,P1A,EBV编码的核抗原(EBNA)-1,脑糖原磷酸化酶,SSX-1,SSX-2(HOM-MEL-40),SSX-1,SSX-4,SSX-5,SCP-1和CT-7,CD20和c-erbB-2。考虑并且可以根据本公开使用其他癌症抗原。

[0149] 在一些实施方式中,本公开内容的蛋白质是抗体或抗体片段,包括但不限于贝伐

单抗(AVASTIN®),曲妥珠单抗(HERCEPTIN®),阿仑单抗(CAMPATH®),适用于B细胞慢性淋巴细胞性白血病),吉妥单抗(MYLOTARG®,hP67.6,抗CD33,适用于白血病,例如急性髓细胞白血病),利妥昔单抗(RITUXAN®),托西单抗(BEXXAR®,抗CD20,适用于B细胞恶性肿瘤),MDX-210(同时结合HER-2/neu癌基因蛋白产物和免疫球蛋白G(IgG)(Fc γ RI)的I型Fc受体的双特异性抗体),奥戈伏单抗(OVAREX®,适用于卵巢癌),依决洛单抗(PANOREX®),达利珠单抗(ZENAPAX®),帕利珠单抗(SYNAGIS®,适用于呼吸道疾病,例如RSV感染),替伊莫单抗(ZEVALIN®,适用于非霍奇金淋巴瘤),西妥昔单抗(ERBITUX®),MDX-447,MDX-22,MDX-220(抗TAG-72),IOR-05,IOR-T6(抗CD1),IOR EGF/R3,西洛伐单抗(ONCOSCINT®OV103),依帕妥珠单抗(LYMPHOCIDE®),喷突莫单抗(THERAGYN®)和Gliomab-H(适用于脑癌,黑色素瘤)。考虑并且可以根据本公开使用其他抗体和抗体片段。

[0150] 蛋白质可通过任何末端或内部亲核基团例如-NH₂官能团(例如赖氨酸的侧链)连接(例如,共价连接)至可降解的接头。例如,蛋白质可以在允许蛋白质通过可降解的接头彼此可逆的共价交联的条件下与可降解的接头接触。在一些实施方式中,蛋白质可以被交联以形成多个蛋白质纳米凝胶。在一些实施方式中,条件包括使蛋白质与可降解的接头在水性缓冲液中在4°C至25°C的温度下接触。在一些实施方式中,接触步骤可以在水性缓冲液中进行30分钟至一小时。在一些实施方式中,水性缓冲液包含磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在一些实施方式中,水性缓冲液中蛋白质的浓度为10mg/mL至50mg/mL(例如10、15、20、25、30、35、40、45或50mg/mL)。

[0151] 细胞因子分子

[0152] 本文所述的方法和组合物,例如接头化合物,可用于交联一种或多种细胞因子分子。在实施方式中,细胞因子分子是细胞因子的全长,片段或变体,例如,包含一个或多个突变的细胞因子。在一些实施方式中,细胞因子分子包含选自以下的细胞因子:白细胞介素-1 α (IL-1 α),白细胞介素-1 β (IL-1 β),白细胞介素-2(IL-2),白细胞介素-4(IL-4),白细胞介素-5(IL-5),白细胞介素-6(IL-6),白细胞介素-7(IL-7),白细胞介素-12(IL-12),白细胞介素-15(IL-15),白细胞介素-17(IL-17),白细胞介素-18(IL-18),白细胞介素-21(IL-21),白细胞介素-23(IL-23),干扰素(IFN) α ,IFN β ,IFN γ ,肿瘤坏死因子 α ,GM-CSF,GCSF或其片段或变体,或任何上述细胞因子的组合。在其他实施方式中,细胞因子分子选自白细胞介素-2(IL-2),白细胞介素-7(IL-7),白细胞介素-12(IL-12),白细胞介素-15(IL-15),白细胞介素-18(IL-18),白细胞介素-21(IL-21),白细胞介素-23(IL-23)或干扰素 γ ,或其片段或变体,或任何上述细胞因子的组合。细胞因子分子可以是单体或二聚体。

[0153] 在实施方式中,细胞因子分子还包含受体结构域,例如细胞因子受体结构域。在一个实施方式中,细胞因子分子包含如本文所述的IL-15受体或其片段(例如,IL-15受体 α 的胞外IL-15结合结构域)。在一些实施方式中,细胞因子分子是IL-15分子,例如本文所述的IL-15或IL-15超激动剂。如本文所用,与天然存在的细胞因子相比,细胞因子分子的“超激动剂”形式显示增加,例如至少10%,20%,30%的活性。示例性的超激动剂是IL-15 SA。在一些实施方式中,IL-15 SA包含IL-15和IL-15受体的IL-15结合片段的复合物,例如IL-15

受体 α 或其IL-15结合片段,例如,如本文所述。

[0154] 在其他实施方式中,细胞因子分子进一步包含抗体分子,例如,免疫球蛋白Fab或scFv片段,Fab片段,FAB₂片段或亲和体片段或衍生物,例如,sdAb(纳米抗体)片段,重链抗体片段,例如,Fc区,单结构域抗体,双特异性抗体或多特异性抗体。在一个实施方式中,细胞因子分子还包含免疫球蛋白Fc或Fab。

[0155] 在一些实施方式中,细胞因子分子是IL-2分子,例如IL-2或IL-2-Fc。在其他实施方式中,细胞因子激动剂可用于本文公开的方法和组合物中。在实施方式中,细胞因子激动剂是细胞因子受体的激动剂,例如针对细胞因子受体的抗体分子(例如,激动性抗体),其引起天然存在的细胞因子的至少一种活性。在实施方式中,细胞因子激动剂是细胞因子受体的激动剂,例如针对选自IL-15Ra或IL-21R的细胞因子受体的抗体分子(例如,激动性抗体)。

[0156] 在一些实施方式中,细胞因子分子是IL-15分子,例如IL-15(例如人IL-15)的全长、片段或变体。在实施方式中,IL-15分子是野生型人IL-15。在其他实施方式中,IL-15分子是人IL-15的变体,例如,具有一个或多个氨基酸修饰。在一些实施方式中,IL-15分子包含突变,例如N72D点突变。

[0157] 在其他实施方式中,细胞因子分子还包含任选地与免疫球蛋白Fc或抗体分子偶联的受体结构域,例如IL-15Ra的胞外结构域。在实施方式中,细胞因子分子是如WO 2010/059253中所述的IL-15超激动剂(IL-15SA)。在一些实施方式中,细胞因子分子包含IL-15和与Fc融合的可溶性IL-15受体 α 结构域(例如,sIL-15Ra-Fc融合蛋白),如Rubinstein等,PNAS 103:24 p.9166-9171(2006)中所述。

[0158] IL-15分子可进一步包含多肽,例如细胞因子受体,例如细胞因子受体结构域,和第二异源结构域。在一个实施方式中,异源结构域是免疫球蛋白Fc区。在其他实施方式中,异源结构域是抗体分子,例如,Fab片段,FAB₂片段,scFv片段或亲和体片段或衍生物,例如sdAb(纳米抗体)片段,重链抗体片段。在一些实施方式中,多肽还包含第三异源结构域。在一些实施方式中,细胞因子受体结构域是第二结构域的N-末端,并且在其他实施方式中,细胞因子受体结构域是第二结构域的C-末端。

[0159] 某些细胞因子和抗体公开于例如美国公开号2017/0080104,美国专利号9,603,944,美国公开号2014/0081012和PCT申请号PCT/US2017/037249中(各自通过引用全文纳入本文)。

[0160] 在一些实施方式中,细胞因子或其他免疫调节剂可以通过融合蛋白靶向受体(例如,在免疫细胞上),例如在PCT申请号PCT/US2018/040777,PCT/US18/40783和PCT/US18/40786(各自通过引用全文纳入本文)。

[0161] 背包和细胞疗法

[0162] 可以通过使各种治疗性蛋白质单体反应来制备背包,所述治疗性蛋白质单体可以使用本文公开的一种或多种交联剂进行交联,如图2所示。虽然图2仅出于说明的目的显示了含二硫键的接头,但也可以使用本文公开的其他可生物降解的接头。

[0163] 在某些实施方式中,背包可以通过使多种治疗性蛋白质单体与多种交联剂反应以形成直径为例如约30nm至1000nm的蛋白质簇而制备。在一些实施方式中,反应可以在约5°C至约40°C的温度下进行。该反应可以进行约1分钟至约8小时。

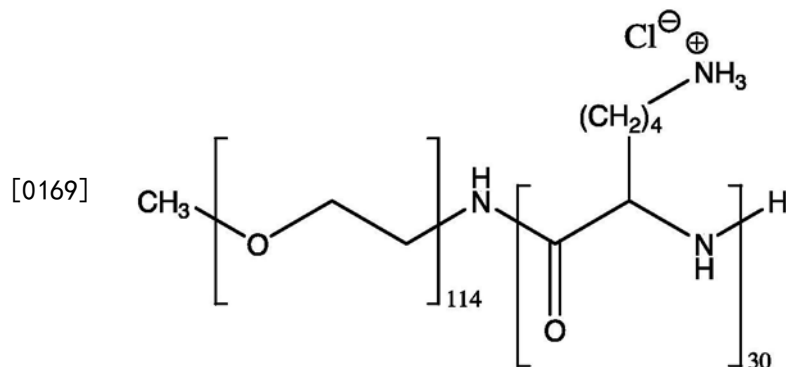
[0164] 可以为蛋白质簇提供表面修饰,例如聚阳离子(图2),使其附连于带负电的细胞表面。在美国公开号2017/0080104和美国专利号9,603,944中公开了某些表面修饰,两者均通过引用全文纳入本文。

[0165] 在一些实施方式中,交联反应可以在一种或多种拥挤剂例如聚乙二醇(PEG)和甘油三酯的存在下进行。示例性的PEG包括PEG400,PEG1000,PEG1500,PEG2000,PEG3000和PEG4000。

[0166] 某些蛋白质溶解性助剂,例如甘油,乙二醇和丙二醇,山梨糖醇和甘露醇也可以提高背包形成的产率。

[0167] 在某些实施方式中,由于背包中阳离子赖氨酸残基的反应,本发明的某些交联剂将导致背包具有净负电荷,其将抑制细胞附着。这样,首先通过静电相互作用用聚阳离子络合背包驱动细胞附着可能是有用的。例如,背包可以用聚阳离子如聚赖氨酸(聚-L-赖氨酸),聚乙烯亚胺,聚精氨酸,聚组氨酸,聚凝胺(Polybrene)和/或DEAE-右旋糖酐涂覆或表面修饰。聚阳离子可以帮助背包非特异性地结合或吸附在带负电荷的细胞膜上。在一些实施方式中,待包含在混合溶液中的聚阳离子可以是具有阳离子基团或可以变成阳离子基团的基团的聚合化合物,并且游离聚阳离子的水溶液显示碱性。可以变成阳离子基团的基团的实例包括氨基,亚氨基等。聚阳离子的实例包括:聚氨基酸,例如聚赖氨酸,聚鸟氨酸,聚组氨酸,聚精氨酸,聚色氨酸,聚2,4-二氨基丁酸,聚-2,3-二氨基丙酸,鱼精蛋白和多肽链中具有至少一种或多种选自下组的氨基酸残基的多肽:赖氨酸,组氨酸,精氨酸,色氨酸,鸟氨酸,2,4-二氨基丁酸和2,3-二氨基丙酸;聚胺,例如聚烯丙胺,聚乙烯胺,烯丙胺和二烯丙胺的共聚物,以及聚二烯丙胺;和聚亚胺,例如聚乙烯亚胺。

[0168] 在一些实施方式中,用于促进背包粘附至细胞的聚阳离子涂层或表面修饰剂是PEG-聚赖氨酸的阳离子嵌段共聚物,例如[甲氧基-聚(乙二醇)n-嵌段-聚(L-赖氨酸盐酸盐),PEG-聚赖氨酸](PK30)。该嵌段共聚物可包含约114个PEG单元(MW约5000Da)和30个赖氨酸单元(MW约4900Da)。线性PEG聚合物具有甲氧基端基,聚赖氨酸为盐酸盐形式。PK30是线性两亲嵌段共聚物,其具有聚(L-赖氨酸盐酸盐)嵌段和非反应性PEG嵌段。聚-L-赖氨酸嵌段在生理pH下提供净阳离子电荷,并在缔合后使背包具有净正电荷。PK30结构[甲氧基-聚(乙二醇)n-嵌段-聚(L-赖氨酸盐酸盐)]如下。



[0170] 在一些实施方式中,背包可以用与免疫细胞表面上的受体结合的抗体或其抗原结合片段包被,从而将背包特异性地靶向免疫细胞。示例性抗体包括本文公开的那些或包含该抗体的融合蛋白。

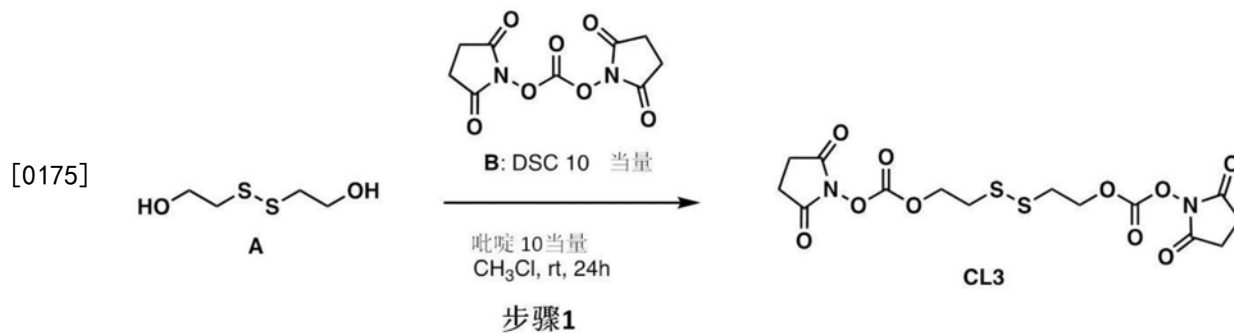
[0171] 在一些实施方式中,一旦制备和纯化,背包可以任选地冷冻直到用于细胞疗法,如

图3所示。

[0172] 例如,可以通过提供本文公开的蛋白质簇或背包,并用有核细胞如T细胞,B细胞,自然杀伤(NK)细胞和造血干细胞孵育蛋白质簇或背包来制备细胞治疗组合物。T细胞可包括CD4⁺ T细胞,细胞毒性T细胞(例如,CD8⁺ T细胞), α T细胞, β T细胞, γ T细胞, δ T细胞和调节性T细胞(Treg)。在一些实施方式中,有核细胞(例如,T细胞或NK细胞)可以包含,例如,表达与癌症抗原结合的嵌合抗原受体(CAR),例如CAR。

[0173] 实施例

[0174] 实施例1:接头-1的合成



[0176] 碳酸盐形成

[0177] A:2,2'-二硫烷二基二(乙-1-醇) (2.0g,1当量)

[0178] B:DSC(N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯) (33.2g,10.0当量)

[0179] 吡啶 (11.3mL,10.0当量)

[0180] CHCl₃, 室温 (rt), 24小时 (h)

[0181] (1) 搅拌在氯仿 (333mL,165V) 中2,2'-二硫烷二基二(乙-1-醇) (2.0g,12.98mmol, 1当量) 的溶液

[0182] (2) 添加DSC (33.2g,12.98mmol,10.0当量)

[0183] (3) 添加吡啶 (11.3mL,12.98mmol,10.0当量)

[0184] (4) 在室温下搅拌反应混合物24小时 (TLC对照)

[0185] (5) 在减压下浓缩反应混合物以产生半固体

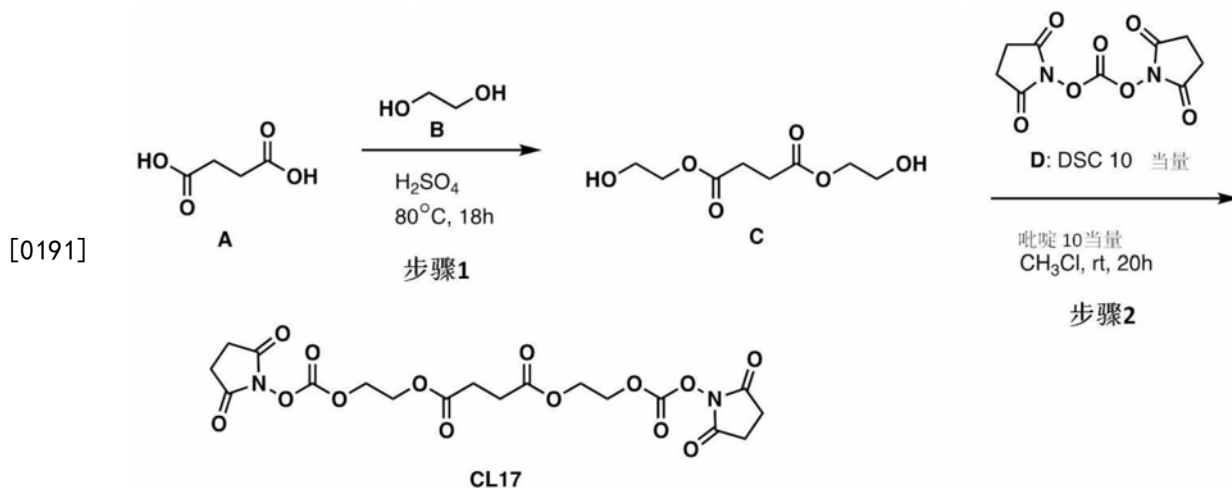
[0186] (6) 用乙酸乙酯 (200mL) 稀释半固体并用水洗涤 (2x 200mL)

[0187] (7) 在减压下浓缩有机层以产生白色固体 (2.4g, 不纯)

[0188] (8) 通过DCM纯化白色固体以产生产物 (60%产率)

[0189] HPLC纯度-96.75%。¹HNMR含有1.63%DCM

[0190] 实施例2:接头-2的合成



[0192] 步骤:1 (酯形成)

[0193] A:琥珀酸 (5.0g, 1当量)

[0194] B:一乙二醇 (10V)

[0195] H₂SO₄ (35滴)

[0196] 80°C, 18小时

[0197] (1) 在室温下向琥珀酸 (A) (5.0g, 42.34mmol, 1当量)

[0198] (2) 添加一乙二醇 (B) (50mL)

[0199] (3) 添加H₂SO₄ (35滴)

[0200] (4) 加热所得反应混合物至80°C持续18小时 (TLC对照)

[0201] (5) 冷却至室温

[0202] (6) 用碳酸氢钠中和 (pH约7-8)

[0203] (7) 通过柱层析纯化粗材料;用乙酸乙酯稀释所需化合物

[0204] (8) 所得是无色液体C: (双(2-羟乙基)丁二酸酯) (3.96g, 45.36%产率)

[0205] 步骤:2 (碳酸酯形成)

[0206] C: 双(2-羟乙基)丁二酸酯 (1.5g, 1当量)

[0207] D: DSC (18.66g, 10当量)

[0208] 吡啶 (5.76g, 10当量)

[0209] CHCl₃, 室温, 20小时

[0210] (1) 搅拌在CHCl₃ (150mL, 100V) 中双(2-羟乙基)丁二酸酯 (C) (1.5g, 1当量, 7.2mmol) 的溶液

[0211] (2) 添加DSC (D) (18.66g, 72.74mmol, 10当量)

[0212] (3) 添加吡啶 (5.76g, 72.74mmol, 10当量)

[0213] (4) 在室温下搅拌反应混合物20小时 (TLC对照)

[0214] (5) 在减压下浓缩反应混合物

[0215] (6) 用DCM洗脱并用水洗涤 (2x 300mL)

[0216] (7) 分离有机层并在无水硫酸钠上干燥

[0217] (8) 在减压下浓缩以产生1.9g灰白色半固体,

[0218] (9) 冻干

[0219] (10)用DCM:甲醇研磨1.9g(不纯)化合物以得到1.06g的灰白色固体

[0220] 实施例3:IL-15背包介导体外细胞扩增

[0221] 包含交联的蛋白质纳米颗粒的蛋白质纳米凝胶如下形成。IL15通过在存在终浓度为2.5%的聚乙二醇,平均分子量为400道尔顿(PEG-400,斯百全化学公司(Spectrum Chemical Mfg.Corp.))和10%的甘油(西格玛公司)的条件下,与27倍摩尔过量的接头-1或接头-2以17mg/mL的浓度孵育,从而将蛋白质交联成蛋白质纳米凝胶。在室温下孵育30分钟后,将反应液用Dulbecco磷酸盐缓冲液(DPBS)稀释至最终细胞因子浓度为1.5mg/mL。然后,通过使用Zeba色谱柱(截止分子量为40,000MW,赛默飞世尔)将缓冲液交换成DPBS,从接头离去基团(包含作为交联反应的一部分被除去的接头的分子片段)和未反应的接头中纯化蛋白质纳米凝胶。根据制造商的说明使用Zeba色谱柱,包括使用DPBS连续洗涤3次以平衡DPBS中的色谱柱,以促进缓冲液交换,然后施加反应产物。使用BioSep™ SEC-s4000色谱柱(Phenomenex公司(Phenomenex Inc.)),以PBS(pH 7.2)作为洗脱液(流速0.5mL/分钟),在配备有光电二极管阵列(岛津公司(Shimadzu Corp.))的Prominence HPLC系统上通过尺寸排阻色谱(SEC)分析缓冲液交换的蛋白质纳米凝胶。

[0222] 细胞因子浓度约为1-1.5mg/mL的蛋白质纳米凝胶与聚乙二醇-聚赖氨酸(PEG-polyK)嵌段共聚物:PEG5k-polyK30(Alamanda聚合物目录号050-KC030)偶联,该嵌段共聚物包含平均分子量为5千道尔顿(kD)的聚乙二醇聚合物和30个氨基酸的聚赖氨酸聚合物(polylysine30或polyK30)。PEG5k-polyK30或在DPBS中重建至1mg/mL,并以50ug/mL的最终嵌段共聚物浓度添加至1-1.5mg/mL的蛋白质纳米凝胶中,并在室温下孵育30分钟。

[0223] T细胞扩增分析。将蛋白质浓度为1-1.5mg/mL的包含PEG5k-polyK30的蛋白质纳米凝胶与以 100×10^6 细胞/mL的细胞浓度在HBSS中的 1×10^6 CD3+ T细胞等体积混合,并在37°C下孵育1小时。然后用含10%FBS,青霉素/链霉素和Glutamax(均来自赛默飞世尔科学公司)的RPMI培养基将T细胞洗涤3次,以大约 1×10^6 细胞/mL的细胞密度接种,并在24孔组织培养板中培养9天。背包细胞附着后三天,将细胞以1:5的比例分入新鲜培养基。在第0、3、6、9、12、15天通过流式细胞术通过活死细胞染色(7-AAD)和计数珠(CountBright绝对计数珠,赛默飞世尔科学公司)测量细胞增殖。

[0224] 如图4所示,两种接头-2交联的IL-15背包制剂(17HF1和17HF2)显示出与接头-1交联的IL-15背包制剂(HF6)相当的细胞扩增。空白仅是HBSS的阴性对照。

[0225] 实施例4:使用Pme1 T细胞比较接头-1-和接头-2-交联的IL-15背包

[0226] 将B16F10鼠黑色素瘤细胞皮内注射到6周龄C57BL/6雌性小鼠的剃毛肋腹中(10^5 个细胞/小鼠)。7天后,静脉内给予先前已与HBSS,IL15,接头-1-IL15背包("PMEL1"或"BP-接头-1")或接头-2-IL15背包("PMEL2"或"BP-接头-2")孵育的Pme1转基因CD8 T细胞(10^6 个细胞/小鼠)。在第5天或第7天,通过流式细胞术计数血液中转移的T细胞。数据报道为每ul血液的供体CD8 T细胞的数量。实验概述如图5所示。治疗组包括:

[0227] 1. 盐水

[0228] 2. PMEL T细胞(10×10^6)

[0229] 3. IL-015(10ug)+PMEL T细胞(10×10^6)(分开注射)

[0230] 4. TRQ-PMEL1(10×10^6)(接头-1交联的IL-015;BP-接头-1)

[0231] 5. TRQ-PMEL2(10×10^6)(接头-2交联的IL-015;BP-接头-2)

[0232] 读出包括:

[0233] 1. T细胞扩增和表型(血液、肿瘤、脾、引流肺)的流图

[0234] 2. 血液和组织(肿瘤,肝,脾,肺,肾;ELISA)中IL-15(TRQ-15A)含量

[0235] 3. 完全血液计数(CBC;全血)

[0236] 4. 血液化学(AST,ALT,···;血清)

[0237] 5. 细胞因子释放(Luminex/ELISA;血清)

[0238] 6. 组织学上的病理汇报(肝、脾、肺、肾、脑和肿瘤)

[0239] 7. 肿瘤生长和小鼠体重变化

[0240] 如图6所示,BP-接头-1和BP-接头-2在体内显示相似的抗肿瘤活性。此外,BP-接头-1和BP-接头-2在包括血液,脾,肺和肿瘤在内的被分析器官中显示出相当的分布(未显示)。

[0241] 图7显示在患有肿瘤或无肿瘤的小鼠中,使用BP-接头-1(TRQ-PMEL1)和BP-接头-2(TRQ-PMEL2)对全血细胞计数(CBC)没有显著影响。

[0242] 与BP-接头-1相比,BP-接头-2显示了更低的淋巴结清除趋势(CD8,NK1.1和转移的PMEL)(图8)。

[0243] 在图9中概述的另一组PMEL实验中,将BP-接头-1(也称为“接头-1NG”)和BP-接头-2(也称为“接头-2 NG”)与抗CD45 Fab和IL-15(“IL15 TF”)的系链融合物比较。简而言之,Pme1细胞根据标准方案生长,然后用1.5mg/ml接头-1 NG,接头-2 NG或IL15 TF背包。然后将细胞以12.5M/ml(2.5M/注射液)重悬,并在HBSS中以1:10稀释以进行250k/ml注射。系链融合物公开在PCT申请号PCT/US2018/040777,PCT/US18/40783和PCT/US18/40786中(均通过引用全文纳入本文)。

[0244] 背包和洗涤后,对细胞进行计数,标准化和铺板。注射后,对铺板的细胞进行计数并确定细胞数量和活力。图10和11是按细胞数量(图10)和当前存活细胞(图11)的体外Pme1扩增曲线。没有NG或TF,Pme1会在体外迅速死亡。接头-1 NG和接头-2 NG的扩增相对于TF略有滞后,然后稳健地扩增。尽管在铺板/注射时已将细胞数标准化,但到4小时时,接头-1 NG和接头-2 NG背包的细胞相对于空白或TF背包的细胞而言,细胞数量明显增加,并且活力显著提高。

[0245] 体内数据显示,接头-1 NG和接头-2 NG都显示出抗肿瘤活性(图11),并具有相当数量的循环Pme1(图12)和相当数量的肿瘤浸润Pme1(图13)。接头-2背包细胞具有较老的记忆表型,注射后第4天相对于接头-1,接头-2中的Teff细胞显著增加(图14)。(Tcm:中央记忆T细胞;Teff:效应记忆T细胞;Temra:效应记忆RA+ T细胞;Tscm:记忆干T细胞;Tnaive:幼稚T细胞)。

[0246] 实施例5:CAR T治疗中接头-1-和接头-2-交联的IL-15背包

[0247] 如图15中所列分析背包的嵌合抗原受体(CAR)T细胞的功效:

[0248] 组1:未治疗(“空白”)

[0249] 组2:5M EGFR CAR CD3 T细胞(“CAR”)

[0250] 组3:5M接头-1-IL15背包(75μg,1小时)EGFR CAR CD3 T细胞(“接头-1-HF6”)

[0251] 组4:5M接头-2-IL15背包(75μg,1小时)EGFR CAR CD3 T细胞(“接头-2-HF1”)

[0252] 组5:5M抗-CD45 Fab-IL15系链融合物(100nM,0.5小时)EGFR CAR CD3 T细胞

(“TF”或“h9.4Fab-IL15”)

[0253] 图16中显示了CAR,接头-1-HF6,接头-2-HF1和TF在第0、1、3、7、10、14、17和21天的体外增殖。接头-1-HF6和接头-2-HF1显示出相当的体外增殖。这些细胞随时间的表型显示在图17中。再次,接头-1-HF6和接头-2-HF1显示出相当的表型。

[0254] 体内增殖和分型分别显示在图18和19A-19B中。与单独CAR或空白相比,背包的细胞的扩增明显更多(图18)。到第21天,Tnaive,Tscm和Tcm的表型保持相似,而Tem和Temra组成略有变化(图19A-19B)(Tcm:中央记忆T细胞;Tem:效应记忆T细胞;Temra:效应记忆RA⁺T细胞;Tscm:记忆干T细胞;Tnaive:幼稚T细胞)。

[0255] 图20显示了背包CAR T治疗的功效,在所有分析的时间点,与单独CAR或h9.4-IL15背包相比,接头-1-HF6和接头-2-HF1在统计学上均显著(如**所示)延迟/抑制了肿瘤生长。在第22天,还分析了肿瘤大小,肿瘤重量,脾脏重量,肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的数量,CAR TIL的数量和TIL表型(图21和22)。

[0256] 总之,接头-1-和接头-2-背包的CAR T细胞在体内均显示出增强的T细胞扩增,与未背包的CAR T细胞相比,具有更好的治疗效果和肿瘤杀伤活性。接头-1或接头-2诱导的扩增CAR T的倍数是相同的,比非背包的CAR T细胞高4倍。与接头-1相比,接头-2可能在较早的时间点减慢T细胞分化,同时具有基本上相同的肿瘤抑制结果。在3周的治疗中,肿瘤大小与脾脏大小,外周CAR T细胞,增殖性肿瘤浸润CAR T细胞略相关。接头-1和接头-2在体外增殖和体内功效研究中相当。

[0257] 实施例6:深IL-15引发的PMEL T细胞的药理活性

[0258] 深IL-15是指具有两个缔合的IL-15分子的人IL-15受体 α -sushi-结构域-Fc融合同源二聚体(IL15-Fc)的多聚体,通过可裂解的交联剂(接头-2)连接,且非共价包覆有聚乙二醇(PEG)-聚赖氨酸₃₀嵌段共聚物(PK30)。具体而言,深IL-15是指人IL15-Fc单体的多聚体,通过可水解的交联剂(CL17)连接,且非共价包覆有聚乙二醇(PEG)-聚赖氨酸₃₀嵌段共聚物(PK30)。IL15-Fc单体由两个亚基组成,每个亚基由与非共价结合至IL-15分子的IL-15受体 α -sushi-结构域融合的效应子减毒IgG2 Fc变体组成。深IL-15引发的T细胞是通过加载过程生成的,在该过程中,靶细胞与高浓度的深IL-15共孵育。通过此过程,深IL-15通过静电相互作用与细胞缔合,并被内化以产生深IL-15的细胞内储库。从这些储库中,深IL-15通过交联剂的水解缓慢释放生物活性IL15-Fc。IL15-Fc的这种延长释放促进了深IL-15引发的T细胞的增殖和存活,从而提供了靶向的,可控制的和时间依赖性的免疫刺激。

[0259] 这项研究的目的是测试在有或没有原位放置B16-F10黑色素瘤的C57BL/6J小鼠中深IL-15引发的PMEL T细胞的药理活性。对照组包括载剂对照,单独的PMEL细胞和PMEL细胞+IL15-Fc,分别注射给予(10 μ g,最大耐受剂量,MTD)。

[0260] 材料和方法

[0261] B16-F10肿瘤建立和肿瘤测量

[0262] 在研究第-12天,将B16-F10黑色素瘤肿瘤细胞(0.2×10^6)皮内注射到雌性C57BL/6小鼠(杰克逊实验室)的剃毛的右肋腹中。记录体重并每周用卡尺测量肿瘤尺寸(在缩写列表中定义的长度[L]和宽度[W])2至3次。使用以下公式计算肿瘤体积: $W^2 \times L \times \pi/6$ 。

[0263] PEML细胞的分离和扩增

[0264] 从14只雌性转基因PMEL小鼠(杰克逊实验室,缅因州巴港)的脾脏和淋巴结(腹膜,

腋窝和宫颈)中分离出PMEL细胞。用GentleMACS Octo Dissociator(美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotech),加利福尼亚州奥本)处理脾脏和淋巴结,并通过40 μ m过滤器。离心洗涤细胞,并使用IMACS幼稚CD8a⁺分离试剂盒(美天旎生物技术公司)和MultiMACS细胞24块(美天旎生物技术公司)和带有18根柱的分离器(美天旎生物技术公司)按照制造商的操作规程纯化CD8a⁺细胞。通过亲和柱除去非CD8a⁺细胞,并在柱洗脱液中收集CD8a⁺ T细胞。通过流式细胞术确认了CD8a⁺细胞的纯度。

[0265] 分离后(D0),将来自PMEL小鼠的纯化的CD8a⁺细胞以5x 10⁶个细胞/孔的密度接种到十个包被有抗CD3和抗CD28的6孔组织培养板中,并在37°C和5%二氧化碳下孵育24小时。接种后24小时(D1)加入鼠IL-2(20ng/mL)和鼠IL-7(0.5ng/mL)。在D2和D3上,对细胞计数并用含有鼠IL-21(10ng/mL)的新鲜培养基稀释至0.2x 10⁶个细胞/mL的浓度。在D4收集细胞以在28mL载剂对照中获得总计100x 10⁶个PMEL细胞/mL。

[0266] 深IL-15引发的PMEL T细胞的制备

[0267] 将5mL PMEL细胞(100x 10⁶个细胞/mL)与5.5mL的深IL-15(1.36mg/ml)混合,并在37°C旋转孵育1小时,以产生深IL-15引发的PMEL细胞。通过离心(500g)洗涤深IL-15引发的PMEL细胞(3X,首先用培养基,然后用HBSS洗涤两次)并计数。将深IL-15引发的PMEL细胞以50x 10⁶个细胞/mL的浓度重悬。给5A和5B组的小鼠注射200 μ L的这种制剂,每只小鼠总共10x 10⁶个深IL-15引发的PMEL细胞。将PMEL细胞(15mL以100x 10⁶个细胞/mL)与15mL HBSS混合,在37°C旋转孵育1小时,通过离心(500g)洗涤(3X,先用培养基,然后再用HBSS洗涤2次)并计数。将PMEL细胞以50x 10⁶个细胞/mL的浓度重悬。给2A和2B组的小鼠静脉内注射200 μ L的这种制剂,每只小鼠总共10x 10⁶个PMEL细胞。给3A和3B组的小鼠静脉内注射200 μ L的这种制剂,每只小鼠总共10x 10⁶个PMEL细胞,并接受眶后注射IL15-Fc(每只小鼠在50 μ L HBSS中10 μ g/小鼠;批号TS0)。基于39%的平均加载效率,与10x 10⁶个PMEL细胞缔合的IL15-Fc总量为58.5 μ g,这比3A和3B组中通过注射IL15-Fc(10 μ g)全身递送的量高5.85倍。

[0268] Fc-IL-15 ELISA

[0269] Fc-IL15酶联免疫吸附测定(ELISA)用于确定给予后2小时,第1天,第2天,第4天和第10天收集的样品中IL15 Fc的浓度。ELISA板在4°C下用山羊抗人IgG Fc捕获抗体包被过夜。洗涤板,并在30°C下用试剂稀释剂封闭至少2小时。洗涤板,向孔中加入样品(在试剂稀释剂中稀释)和IL15-Fc标准品(一式两份,在试剂稀释剂中31至2000pg/mL),并将板在37°C下孵育1小时。洗涤板,然后加入生物素-抗IL15检测抗体并在37°C下孵育1小时。洗涤板并在37°C下与链霉亲和素-HRP孵育20分钟。洗涤板,然后添加3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物溶液并在黑暗中于室温下孵育20分钟,直到反应停止。在酶标仪(450nm)上读板。

[0270] 该测定运行两次。对于第一次运行,以以下稀释度对样品进行评估:2小时时间点为1:20000,第1天时间点为1:5000,并且第2天,第4天和第10天时间点为1:250。对于第二次运行,将来自3A和3B组的样品在第1天时间点按1:5000稀释,在第2天时间点按1:250稀释,并在第4天和第10天时间点按1:25稀释。在所有分析的时间点,将来自1A和1B,2A和2B和5A和5B组的样品按1:25稀释。报告第二次运行的数据。但是,由于第二次运行中2小时时间点的样品已消耗尽,并且考虑到两次运行中3A和3B组在24小时IL15-Fc的浓度相似,因此包含了第一次运行的2小时值与来自第二次运行的其他数据点一起用于计算药代动力学(PK)参数。

[0271] 1:20000稀释中血液的定量下限 (LLOQ) 为310ng/ml, 1:5000稀释中为77.5ng/ml, 1:250稀释中为3.875ng/ml, 而1:25稀释中为0.3875ng/ml。

[0272] 来自小鼠的血清中的血清细胞因子水平

[0273] 根据制造商的方案, 使用ThermoFisher ProcartaPlex小鼠高灵敏度面板5plex目录号EPXS0S0-22199-901试剂盒, 并在Bio-Plex 200系统上分析样品。将血清在冰上解冻, 并测试20 μ L血清的IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4和IL-6水平。在一些样品中, 无法获得20 μ L的血清, 因此使用了较小的体积。调节稀释因子, 以根据标准曲线计算浓度。统计分析在GraphPad Prism中进行。

[0274] 结果

[0275] 临床化学

[0276] 在血清样品上测量临床化学参数。图23显示了临床化学参数, 其中在给予后第1天和第4天观察到幼稚小鼠的统计学显著变化。给予后第1天, 相对于深IL-15引发的PMEL组, 观察到PMEL+IL15-Fc组的白蛋白水平显著降低 ($p < 0.05$), 以及与载剂对照和深IL-15引发的PMEL相比, 血尿素氮 (BUN) 水平也显著降低 (两者均 $p < 0.05$)。给予后第4天, PMEL+IL15-Fc组显示显著降低的白蛋白 (与所有其他治疗组相比, $p < 0.05$), 总蛋白 (与载剂对照相比, $p < 0.05$), 葡萄糖 (与深IL-15引发的PMEL相比 $p < 0.05$), 白蛋白/球蛋白 (ALB/GLOB) 比率 (与载剂对照相比 $p < 0.05$, 并且与PMEL和深IL-15引发的PMEL相比 $p < 0.01$)。此外, PMEL+IL15-Fc组胆固醇水平显著增加 (与载剂对照和深IL-15引发的PMEL相比, $p < 0.05$)。与载剂对照相比, 所有治疗组均表现出钙水平降低的趋势, 这在PMEL组中是统计学显著的 ($p < 0.05$)。深IL-15引发的PMEL组在总胆红素 (与载剂对照和PMEL相比, $p < 0.05$) 和磷 (与PMEL相比, $p < 0.05$) 上显示出统计学显著的变化。

[0277] 图24显示了临床化学参数, 其中在给予后第1天和第4天观察到荷瘤小鼠的统计学显著变化。给予后第1天, 在临床化学上唯一的统计学显著变化是胆红素-偶联物的减少, 在PMEL+IL15-Fc和深IL-15引发的PMEL组中均观察到 (与载剂对照相比, 两者均 $p < 0.05$)。在给予后第4天, PMEL组的白蛋白 (与载剂对照相比, $p < 0.05$), 总蛋白 (与载剂对照相比, $p < 0.01$) 和碳酸氢盐TCO₂ (与载剂对照相比, $p < 0.05$) 在统计学上显著增加。此外, PMEL组 (与载剂对照相比 $p < 0.001$; 与DP-15 PMEL相比 $p < 0.05$) 和PMEL+IL15-Fc组 (与载剂对照相比, $P < 0.05$) 观察到球蛋白的统计学显著增加。

[0278] 全身细胞因子释放

[0279] 使用Luminex 5-plex试剂盒, 在给予后2小时, 24小时和96小时测量血清细胞因子 (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6和TNF α)。在幼稚非荷瘤小鼠中, PMEL+IL15-Fc组中的IFN- γ 水平为 12.8 ± 3.7 pg/mL, 而在深IL-15引发的PMEL组中, IFN- γ 低于定量下限 (LLOQ = 0.06 pg/mL) (图25)。在荷瘤小鼠中, 与深IL-15引发的PMEL组 (0.5 ± 0.1 pg/mL) 相比, PMEL+IL15-Fc组 (20.5 ± 0.5 pg/mL) 中的IFN- γ 浓度平均高41倍。与其他组相比, PMEL+IL15-Fc组也观察到更高水平的IL-2, IL-6和TNF α 。

[0280] 血液中IL15-Fc的药代动力学

[0281] 夹心ELISA (抗Fc捕获抗体, 然后抗IL15检测抗体) 用于测量注射PMEL+IL15-Fc (10 μ g) 和深IL-15引发的PMEL (携带58.5 μ g的IL15-Fc) 的小鼠血液中的IL15-Fc。

[0282] 对于幼稚和荷瘤小鼠, 确定了复合动物的单次剂量给予深IL-15引发的PMEL和

PMEL+IL15-Fc的药代动力学(PK)。对于PMEL+IL15-Fc组,在幼稚和荷瘤小鼠中,给予后2小时均达到最大浓度(C_{max})。在深IL-15引发的PMEL组中,首次测量的浓度在24小时(最初以非最佳稀释度测量2小时样品,未检测到IL15-Fc,并且没有足够的样品供用理想稀释度重复测量)。荷瘤小鼠达到比幼稚小鼠略低的浓度。在荷瘤小鼠和非荷瘤小鼠中,PMEL+IL15-Fc组中IL15-Fc的计算平均值t_{1/2}分别为28.9小时和7.12小时。

[0283] 比较了PMEL+IL15-Fc和深IL-15引发的PMEL组在24小时时间点的IL15-Fc浓度。PMEL+IL15-Fc (10 μ g) 组中的总IL15-Fc浓度高于深IL-15引发的PMEL组 (58.5 μ g的IL15-Fc),在幼稚小鼠约高3488倍,并且在荷瘤小鼠中高3299倍。表1总结了复合IL15-Fc PK参数,图26描绘了平均(SD) IL15-Fc PK曲线。

[0284] 表1:幼稚和荷瘤小鼠 (10 μ g剂量的IL15-Fc) 中PMEL+IL15-Fc组的复合IL15-Fc PK参数

动物	化合物	组	T _{1/2} (hr)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (hr)	C _{最后} (ng/mL)	T _{last} (hr)	AUC _{最后} (hr*ng/mL)	AUC _{INF} (hr*ng/mL)
[0285]	复合	非荷瘤	7.12	6931	2	3.64	96	202387	202424
		荷瘤	28.9	7300	2	0.448	240	156335	156353

[0286] 肿瘤生长的抑制

[0287] 在第0天(给予当天),肿瘤已达到约140mm³的平均体积。与载剂对照相比,在所有治疗组中,在给予后第4天观察到对肿瘤生长的统计学显著抑制(p<0.0001),并且这种差异随着时间的推移变得更加明显(图27,左图)。在研究第16天,在载剂对照组中仅剩余2/5的动物(由于广泛的肿瘤负担而处死了其他动物),但是在每个治疗组中剩余了4/5的动物。载剂对照组中的肿瘤体积与所有其他组均显著(p<0.0001)不同。PMEL组的肿瘤体积显著(p<0.05)大于深IL-15引发的PMEL和PMEL+IL15-Fc组的肿瘤体积。在第16天,PMEL+IL15-Fc和深IL-15引发的PMEL组中肿瘤生长的抑制作用彼此不同(图27,左图和右图)。在给予后第1、4、10和16天,在处死后(n=2-5,每个组,每个时间点)称量肿瘤。肿瘤重量示于图28。

[0288] 在研究指定的终点之前,发现一些动物濒死或死亡。这些包括在载剂对照(共4只:第9天1只,第10天1只,第14天2只),PMEL组(共2只:第2天1只,第6天1只),PMEL+IL15-Fc组(共2只:第9天1只,第11天1只)和深IL-15引发的PMEL组(共2只:第9天1只,第16天1只)中的小鼠。这些不被认为与治疗有关,因为它们在组间分布,并在载剂对照中具有最高数量(n=4)。最后,与PMEL相比,深IL-15引发的PMEL组相关的濒死或死亡的动物没有差异。

[0289] 结论

[0290] 该研究的主要发现总结如下。

[0291] 1. 深IL-15引发的PMEL细胞在10x 10⁶个细胞的给予剂量下具有良好的耐受性。

[0292] 2. 与载剂对照相比,PMEL,PMEL+IL15-Fc和深IL-15引发的PMEL细胞均导致肿瘤生长抑制。与PMEL相比,PMEL+IL15-Fc和深IL-15引发的PMEL细胞的抑制作用更高。

[0293] 3. 使用PMEL或深IL-15引发的PMEL细胞均未观察到毒理学相关的临床化学参数变化。用PMEL+IL-15 Fc观察到一些变化。

[0294] 4. 在任何时间点,使用PMEL或深IL-15引发的PMEL细胞均未检测到血清IFN- γ , TNF- α 或IL-6的变化。使用PMEL+IL15-Fc在24小时观察到血清IFN- γ 和TNF- α 的显著变化。

在2小时(仅非荷瘤(幼稚)小鼠)和24小时,PMEL+IL15-Fc使IL-6升高。

[0295] 5. 与在PMEL+IL15-Fc组中检测到的水平相比,深IL-15引发的PMEL组中的IL15-Fc血清水平低3000倍以上,对应于与PMEL+IL15-Fc组相比,无体重减轻,CBC和内源性免疫细胞(CD8⁺,NK1.1⁺和CD4⁺细胞)无明显变化,降低的IFN- γ 血清水平和相关药理变化。

[0296] 对本公开所述方法和组合物的改进和变动对本领域技术人员是显而易见的,而不偏离本公开的范围和精神。虽然已结合具体的优选实施方案对本公开作了描述,但应了解,如权利要求所述,本公开不应过分地受限于这些具体实施方案。实际上,本公开所属领域的相关领域的技术人员意图和理解对所描述的用于实施本公开的方式的各种修改,这些修改落入由所附权利要求所表示的本公开的范围。

[0297] 通过引用纳入

[0298] 本说明书中提到的所有专利和公开通过引用纳入本文,就好像将各篇单独的专利或公开专门和单独地通过引用纳入本文那样。

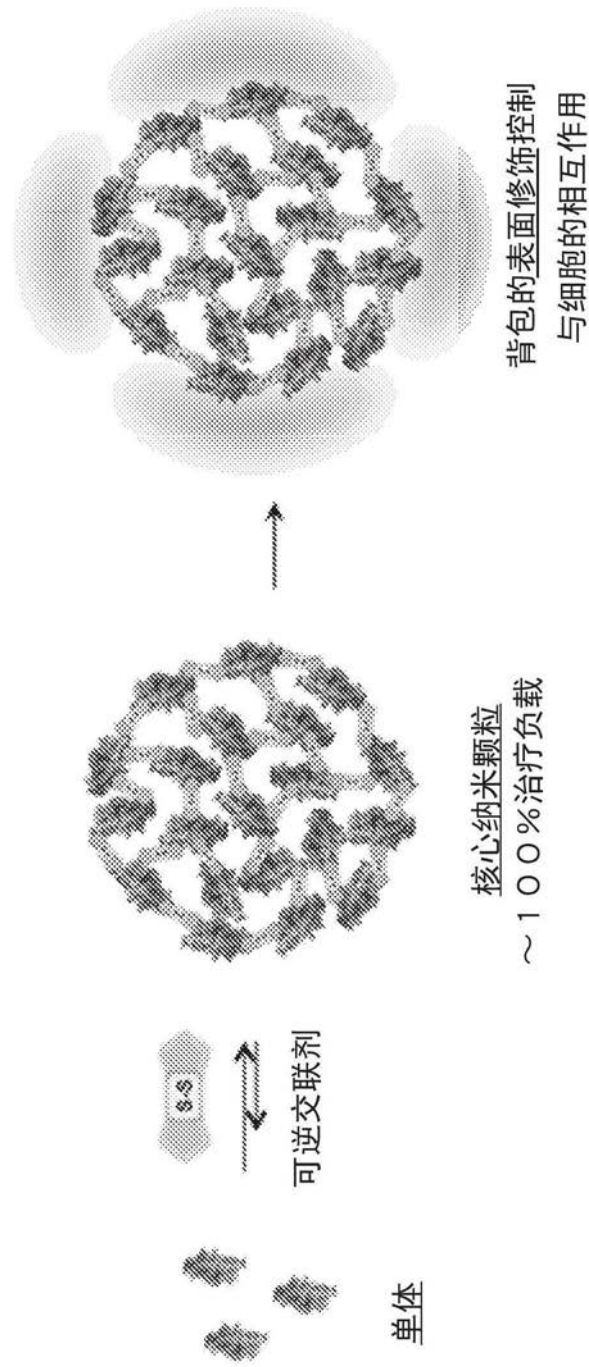


图2

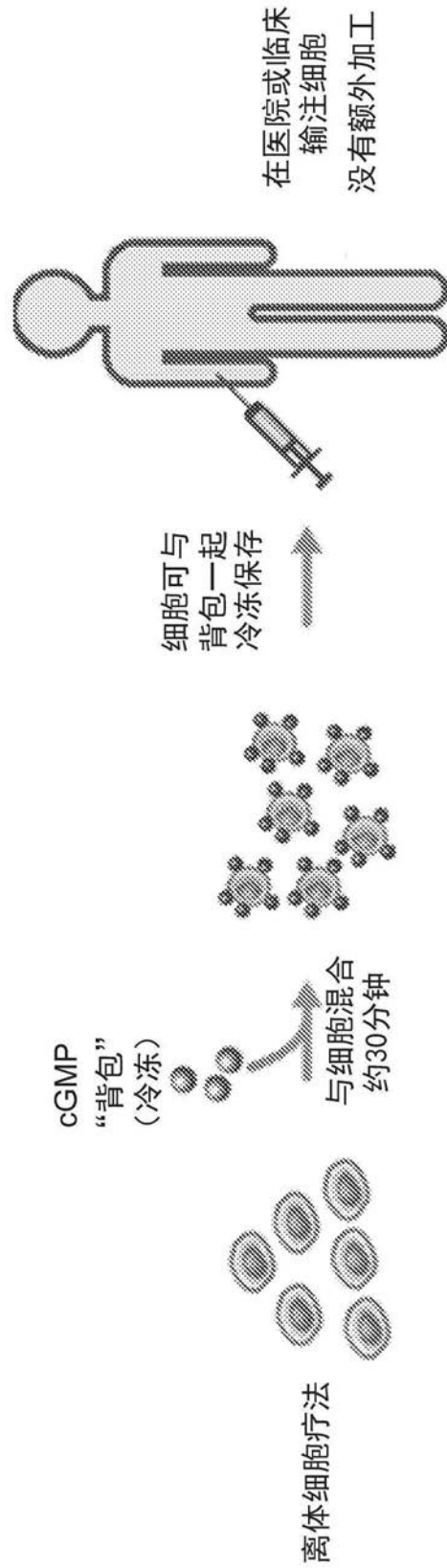


图3

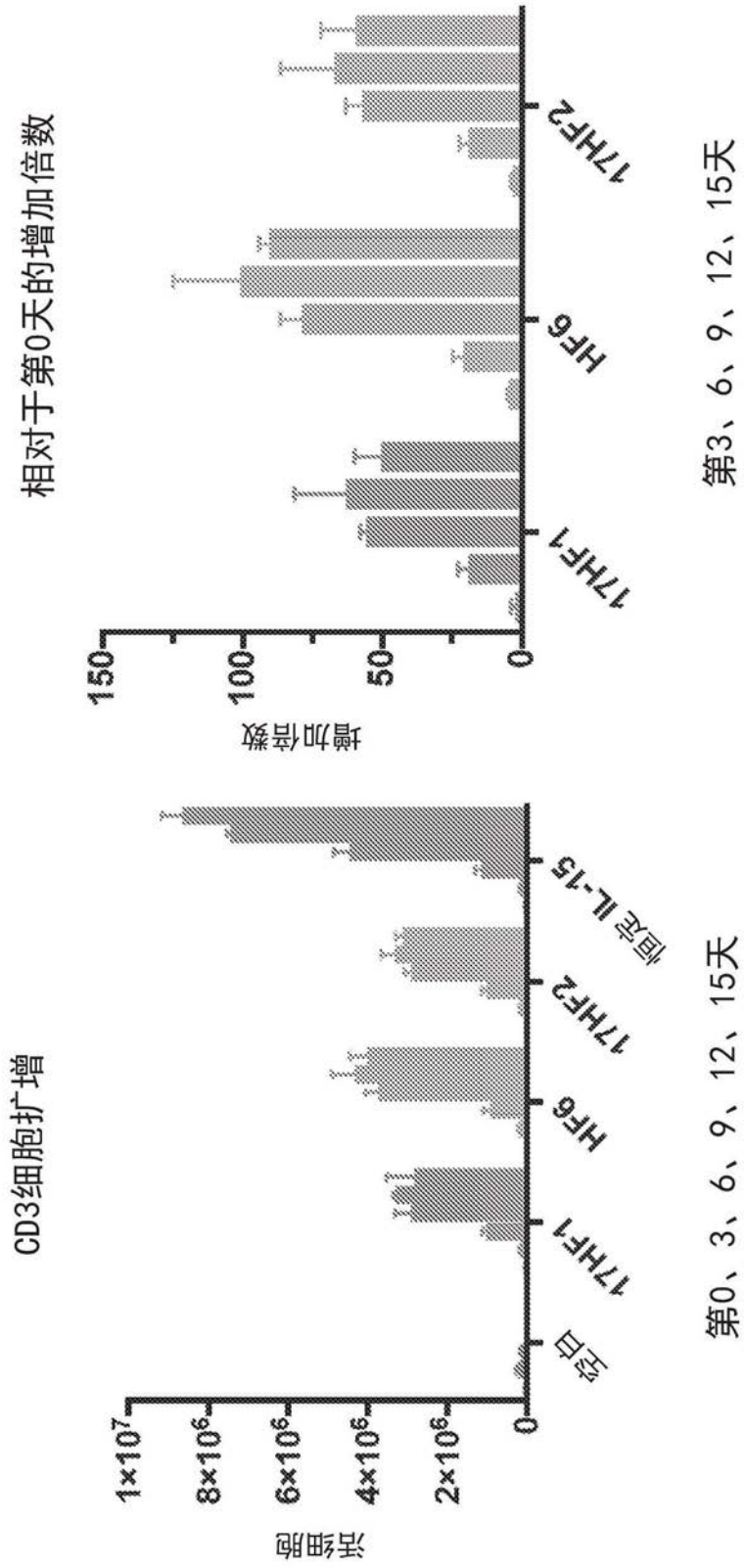


图4

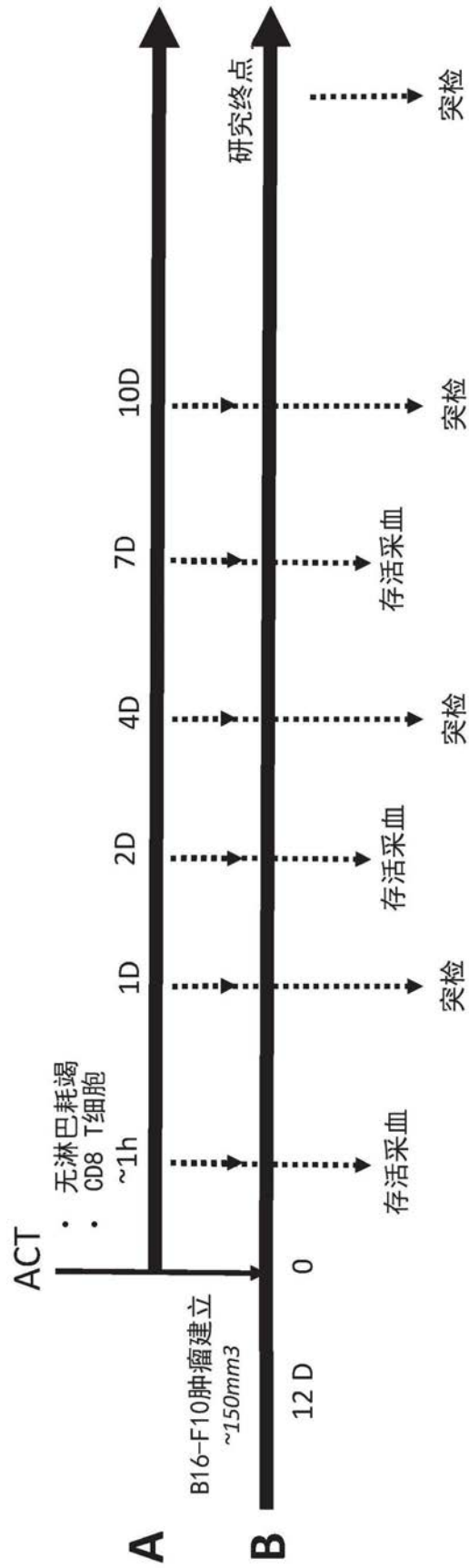


图5

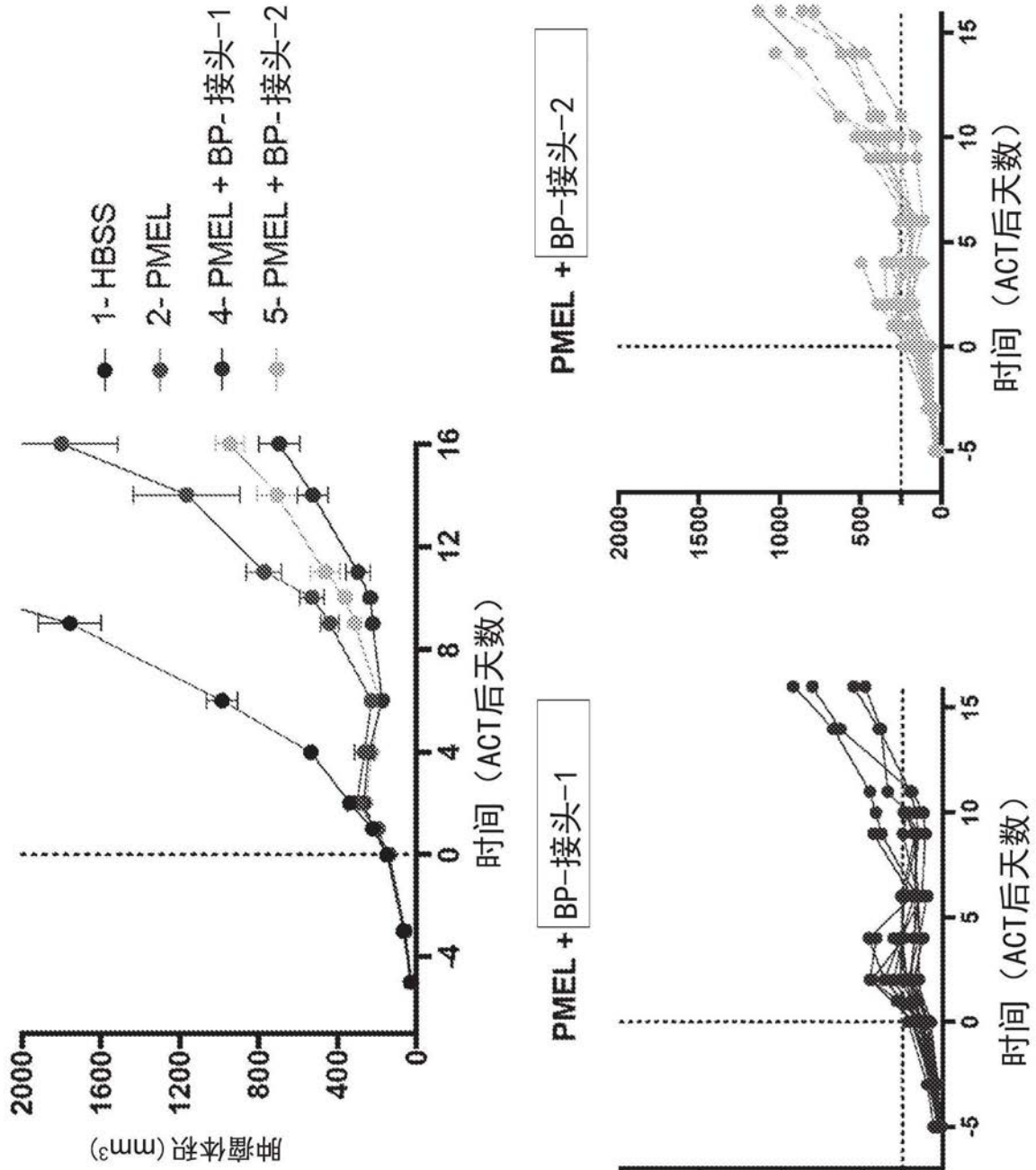


图6

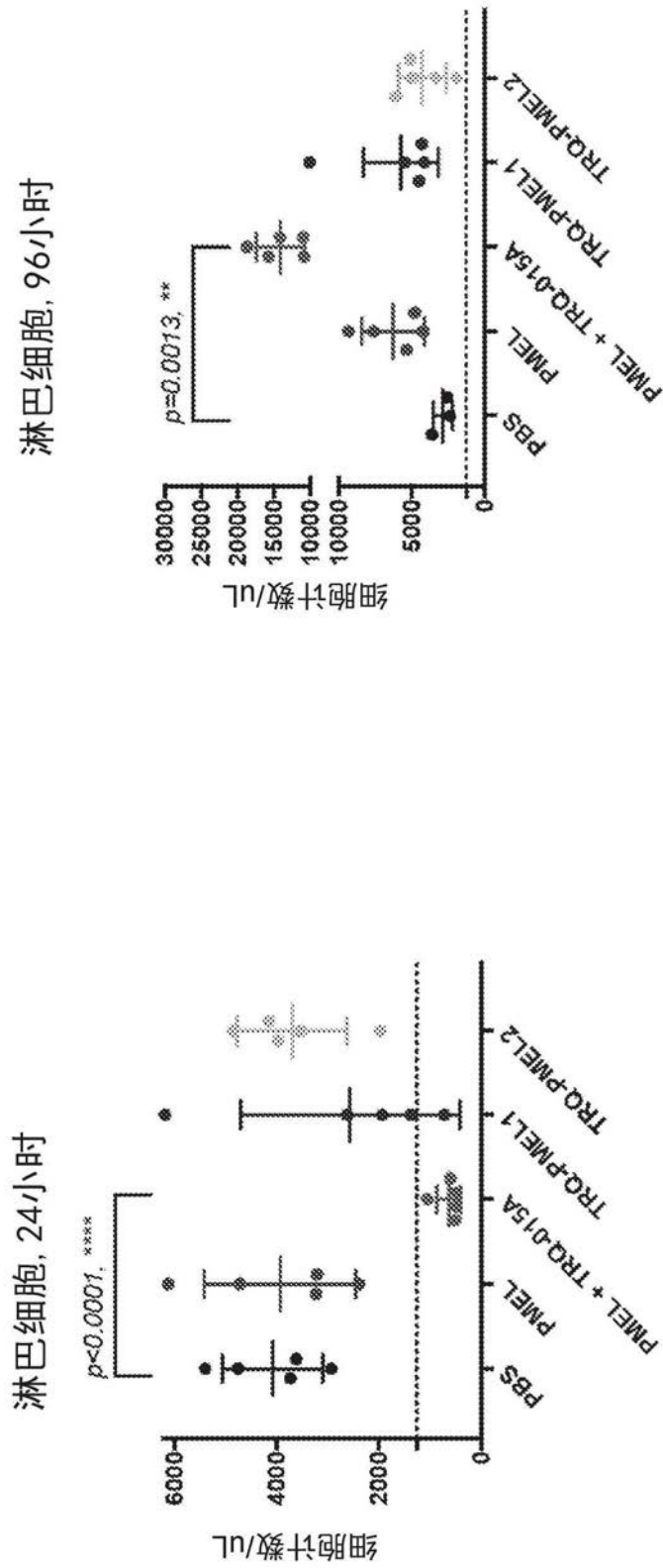


图7

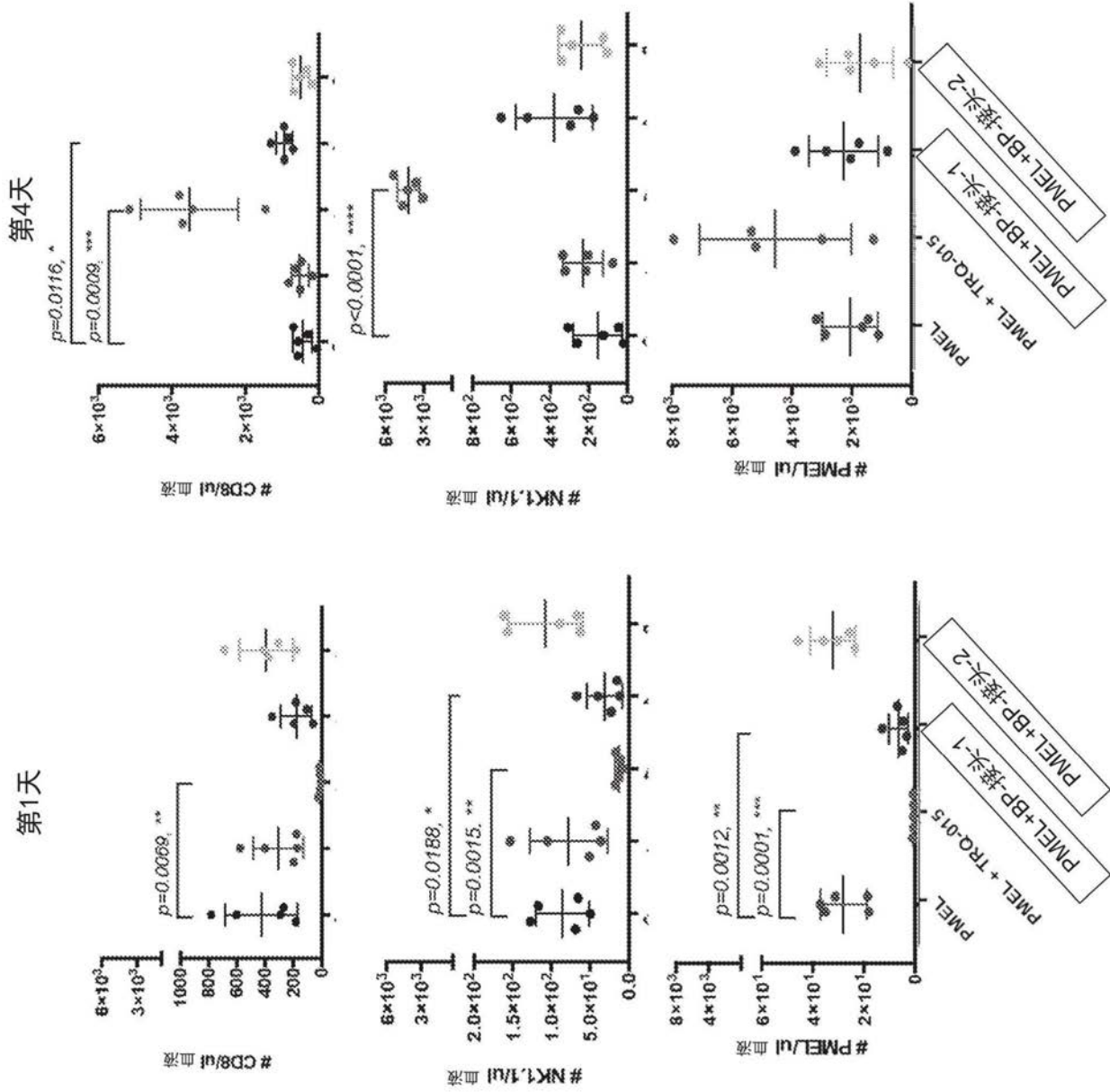


图8

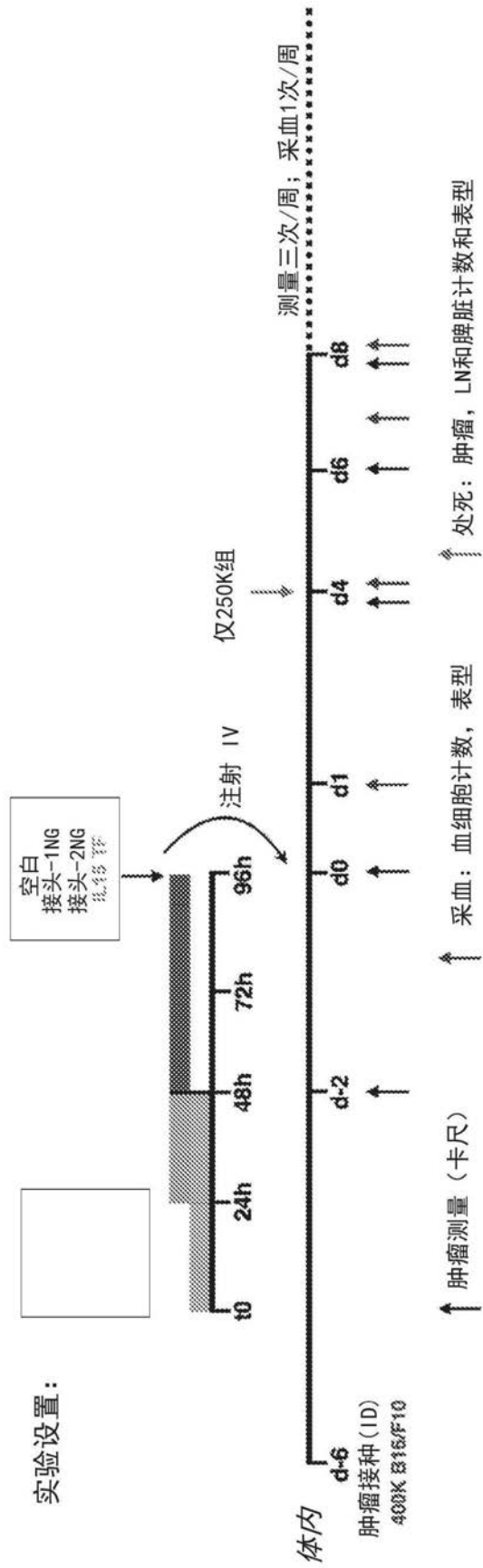


图9

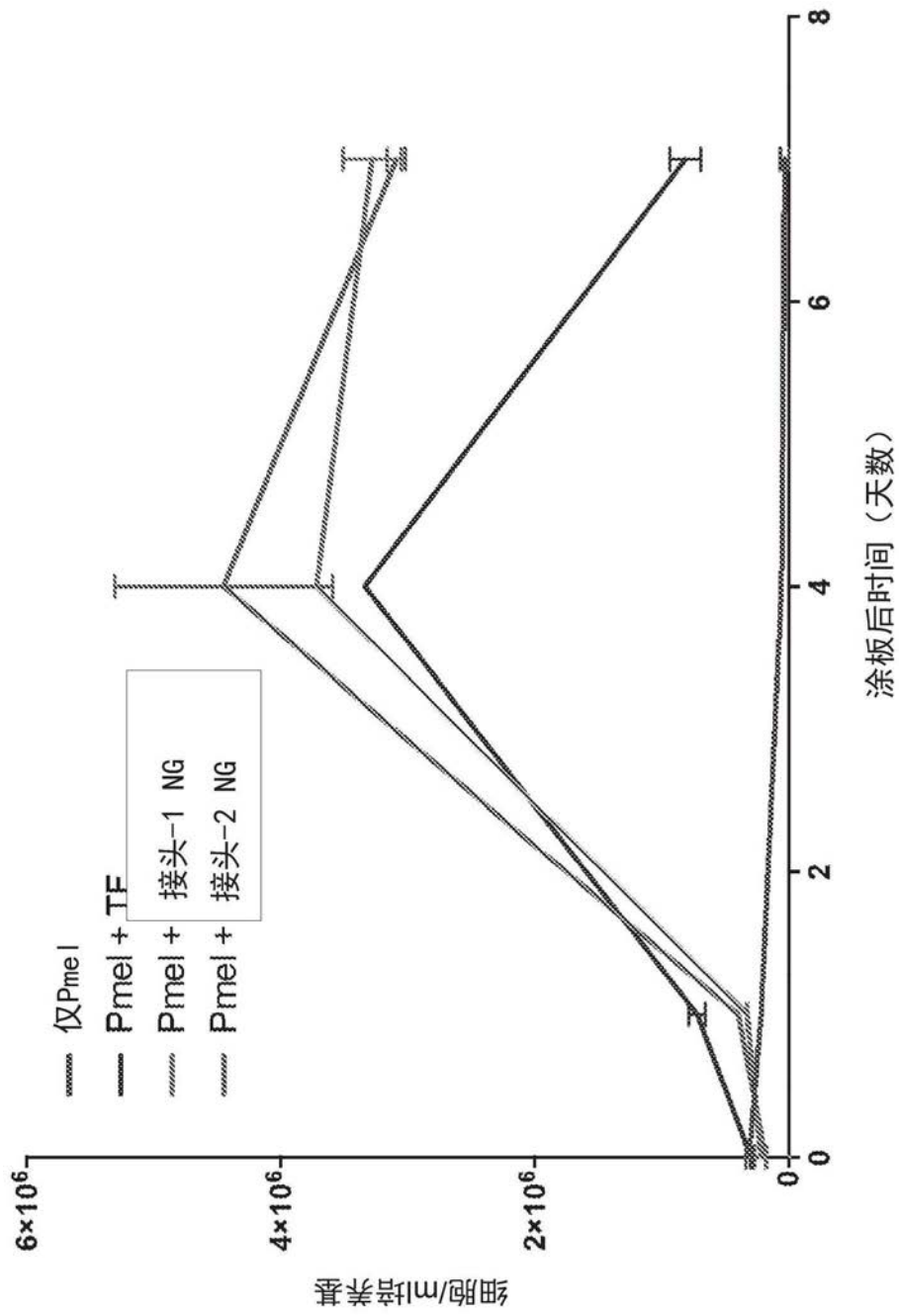


图10

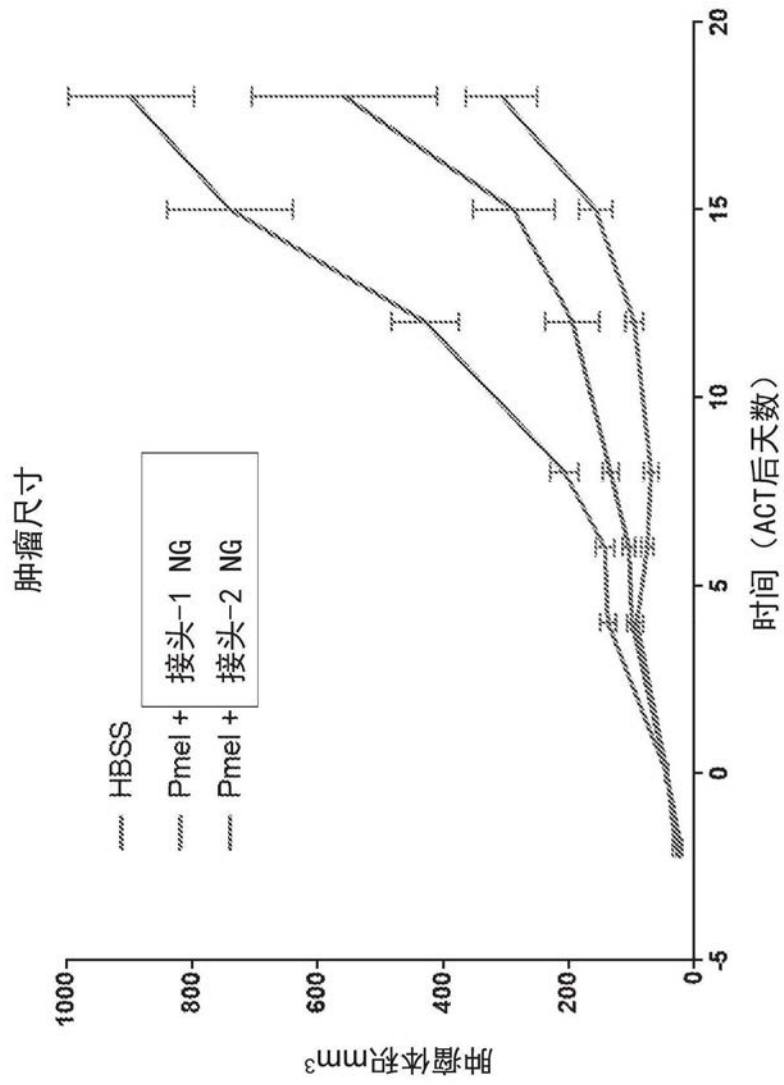


图11

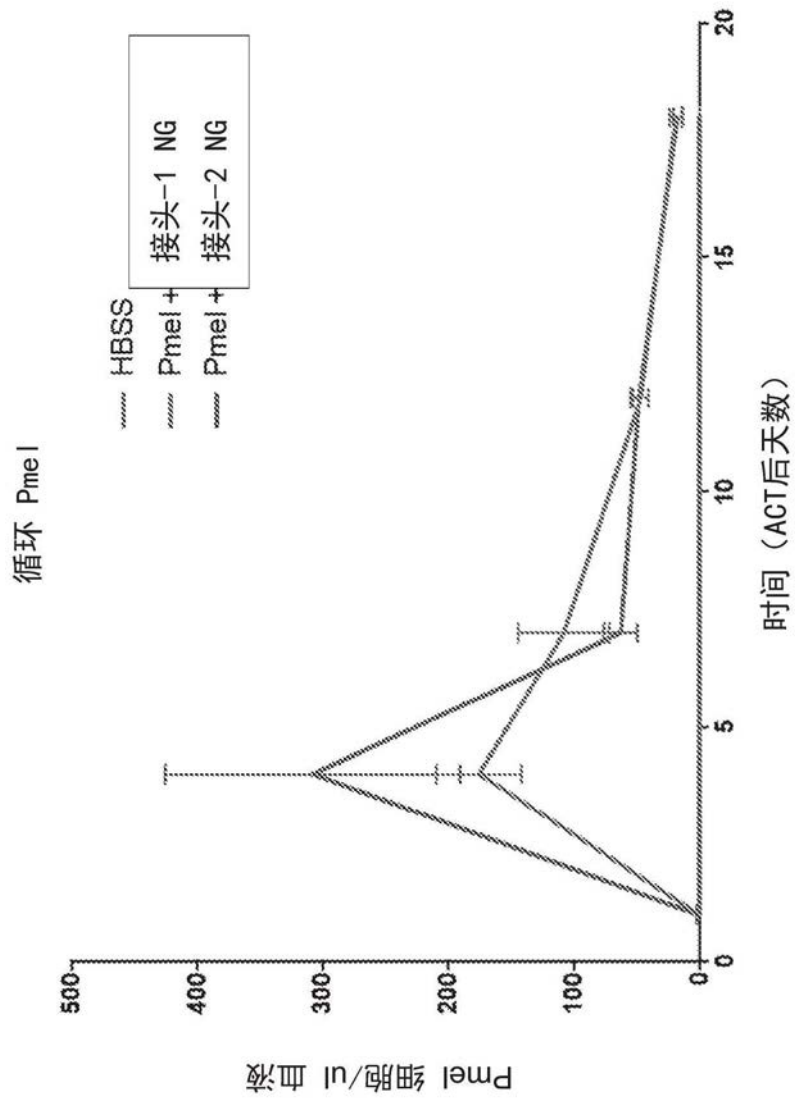


图12

早期突检细胞数量

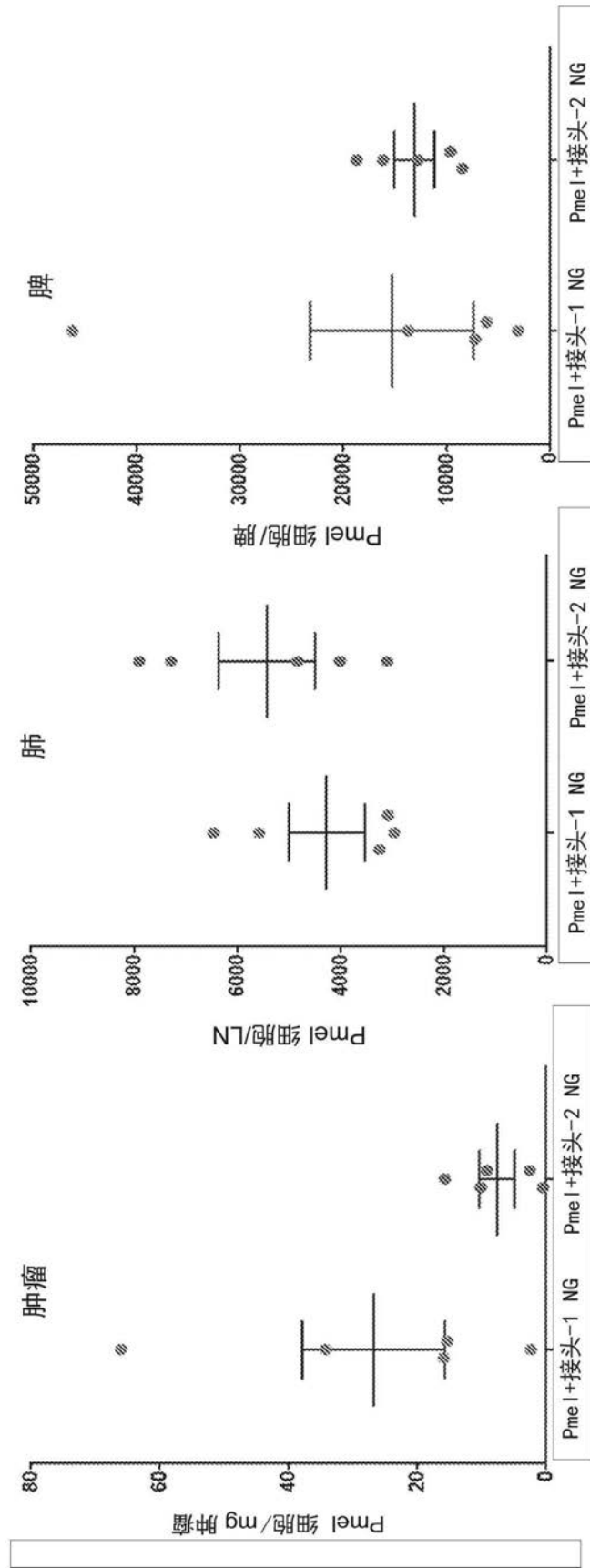


图13

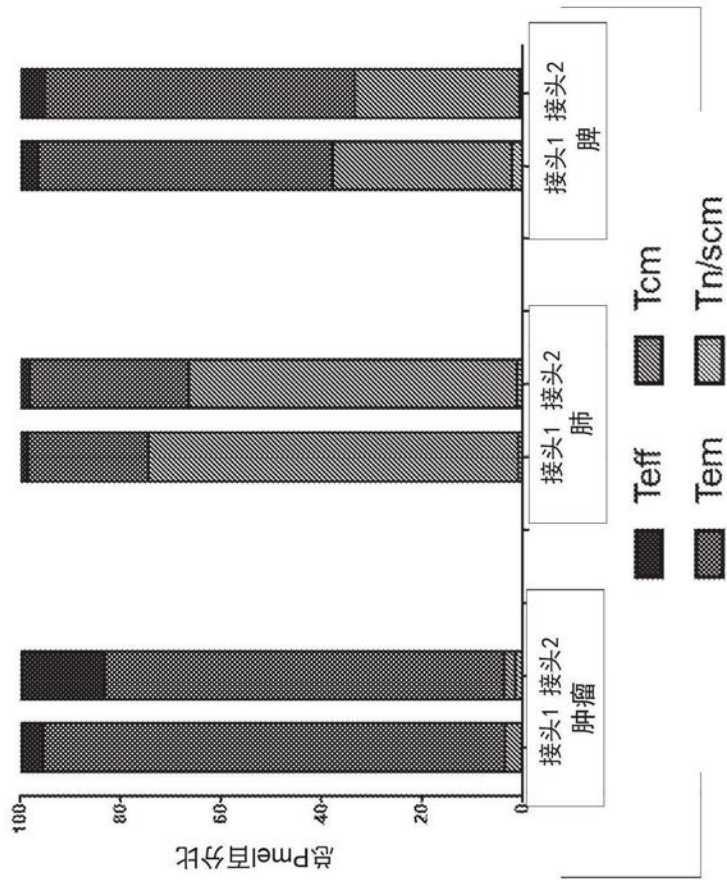


图14

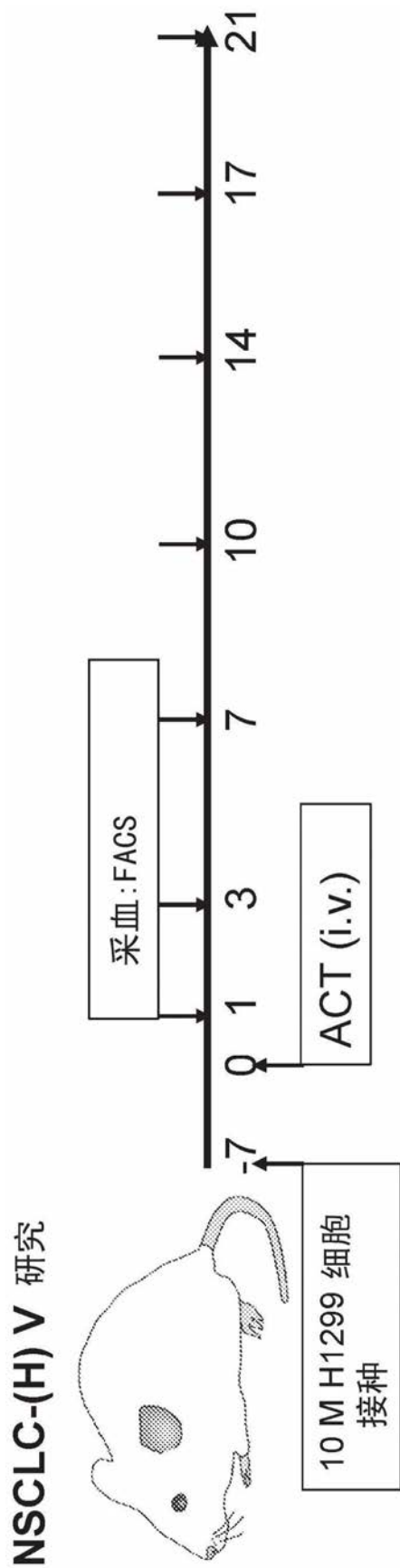


图15

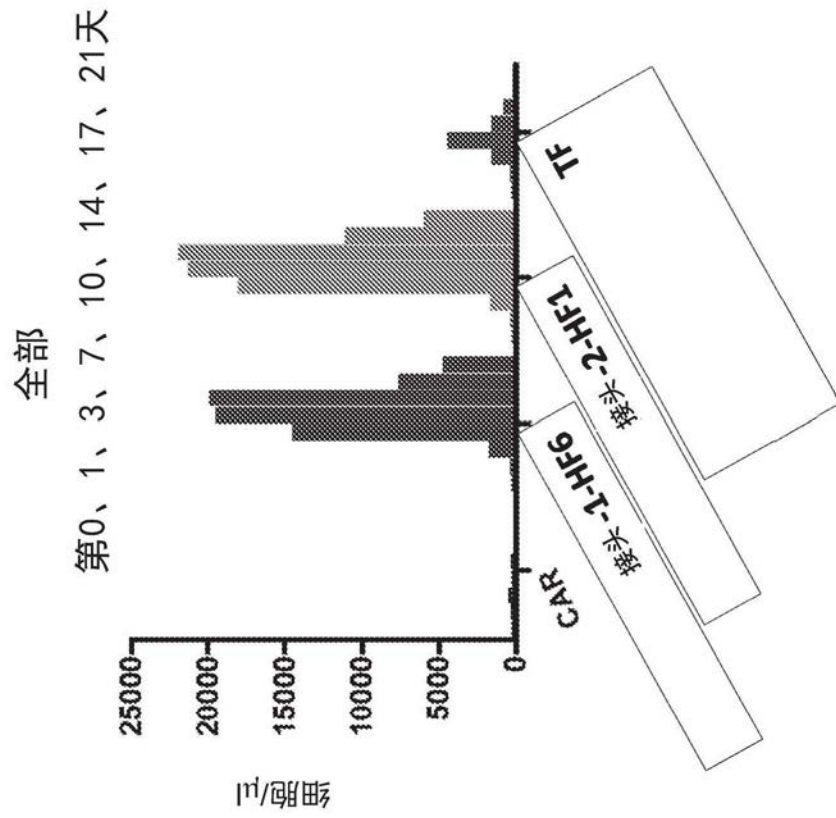


图16

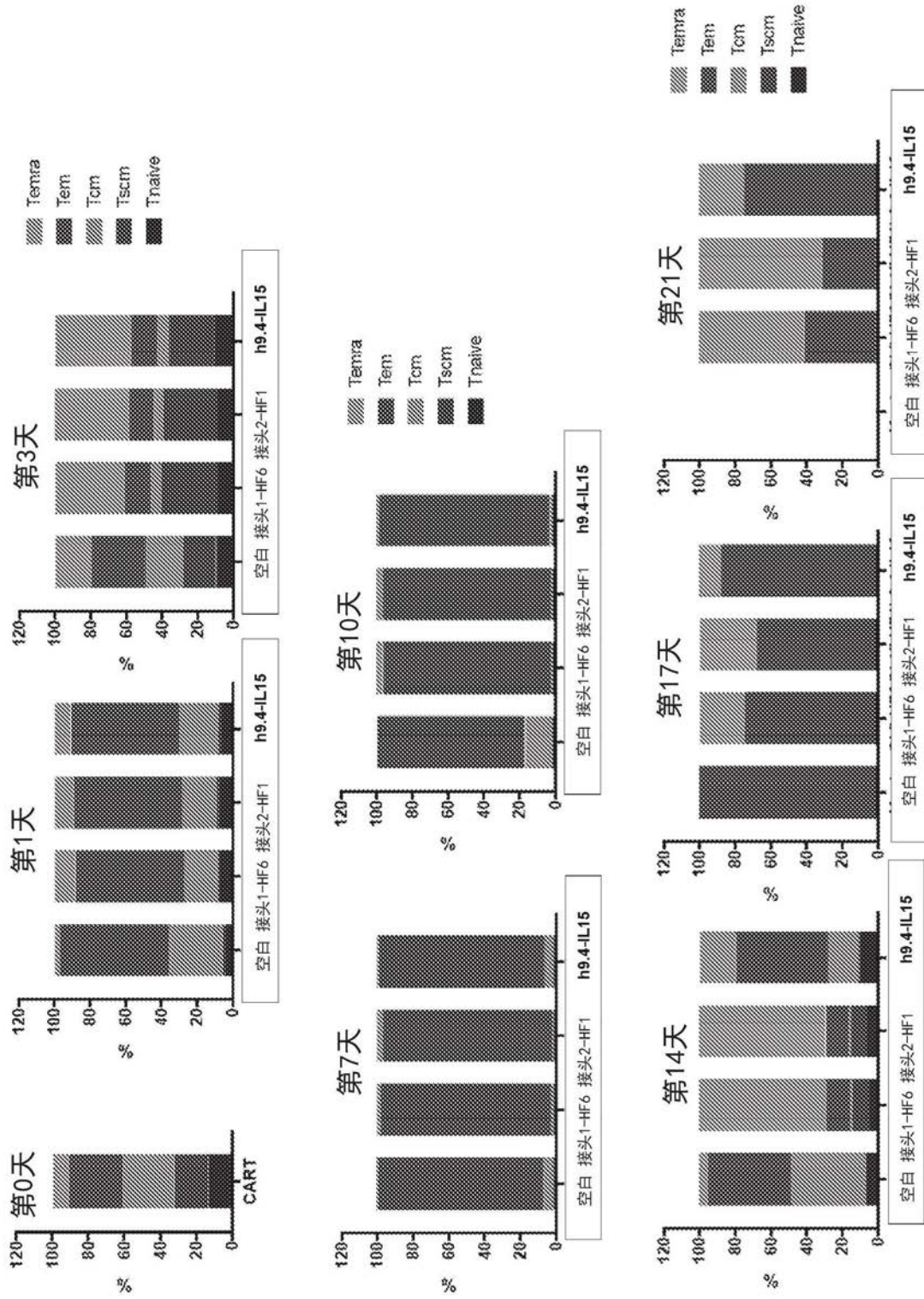


图17

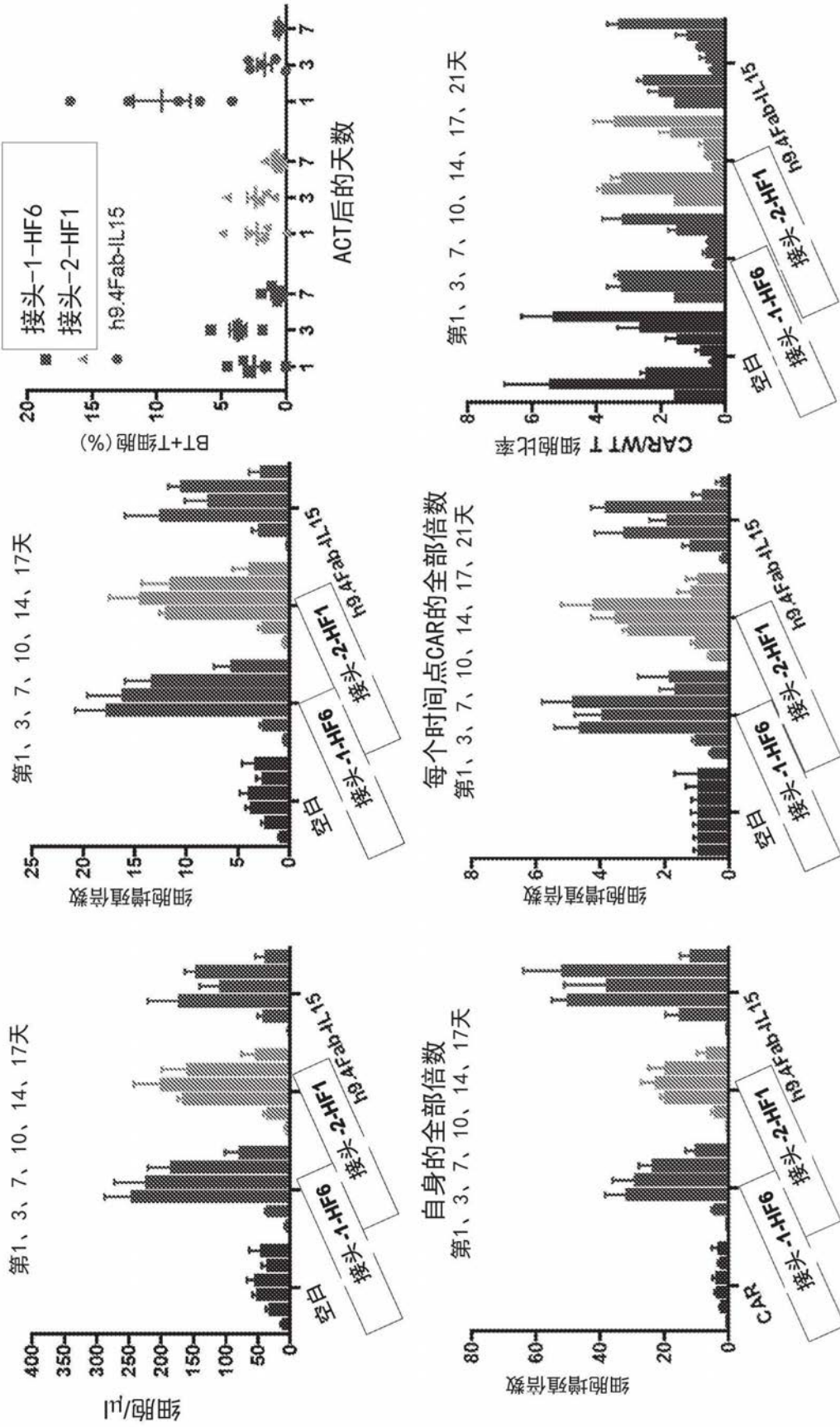


图18

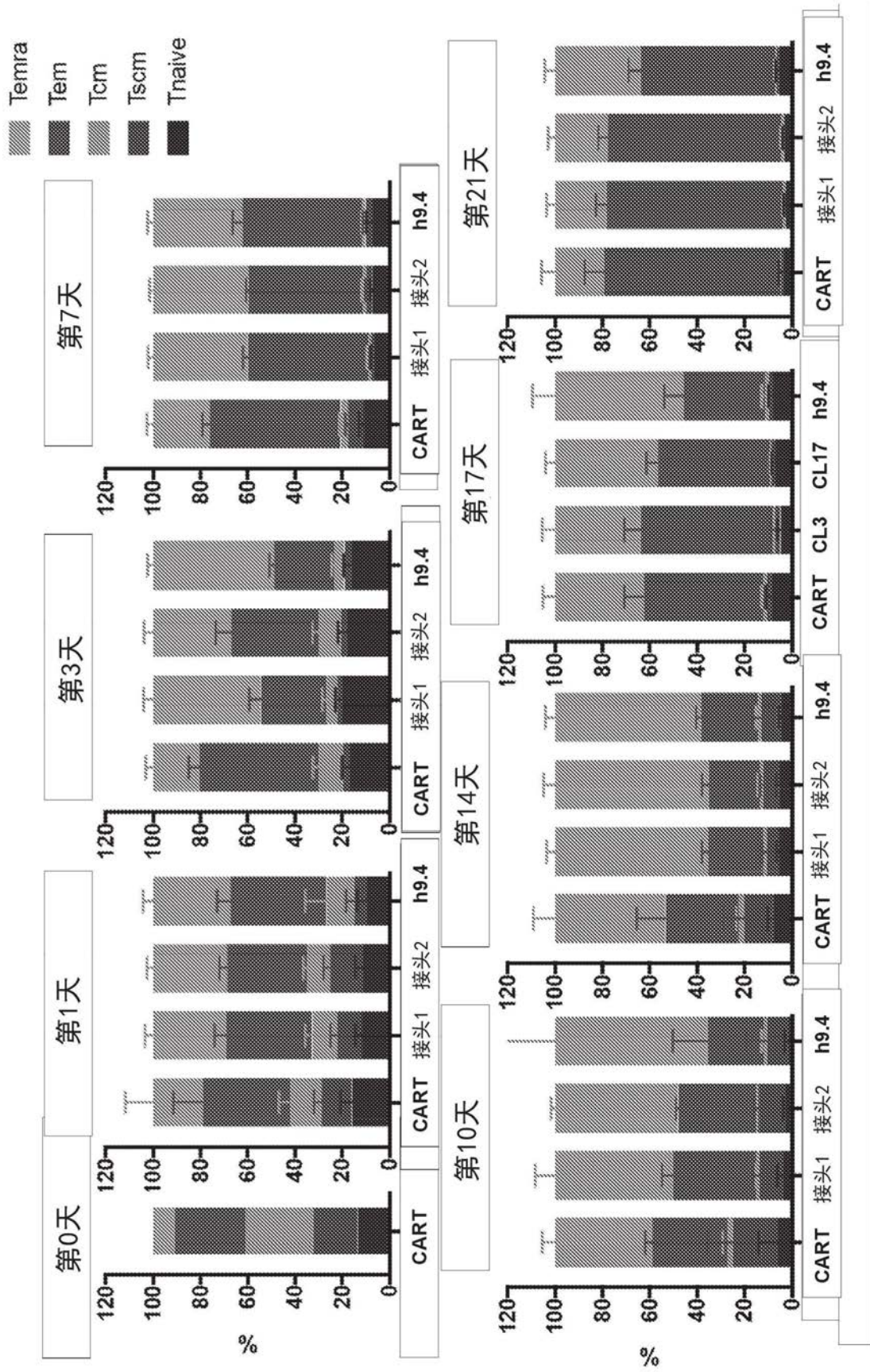


图19A

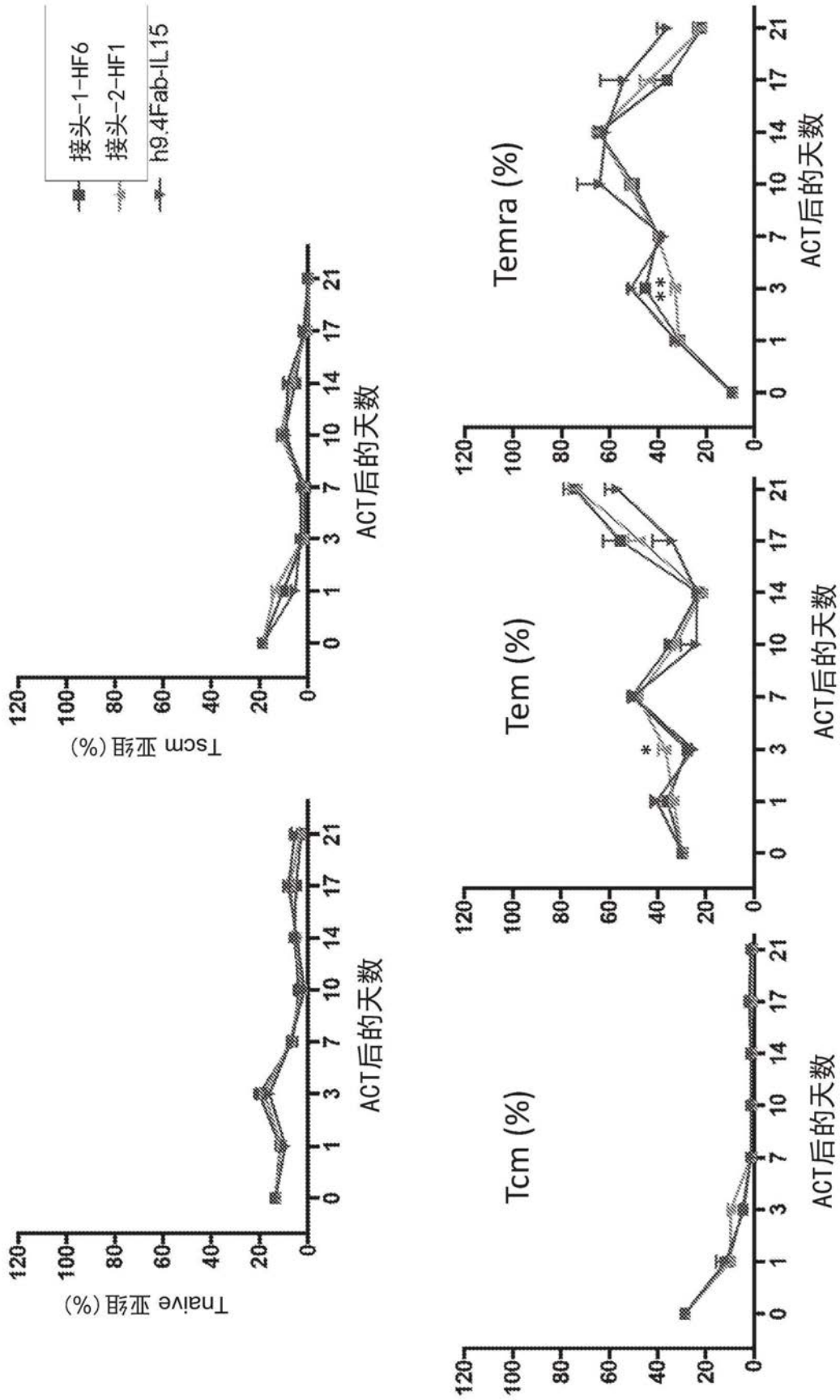


图19B

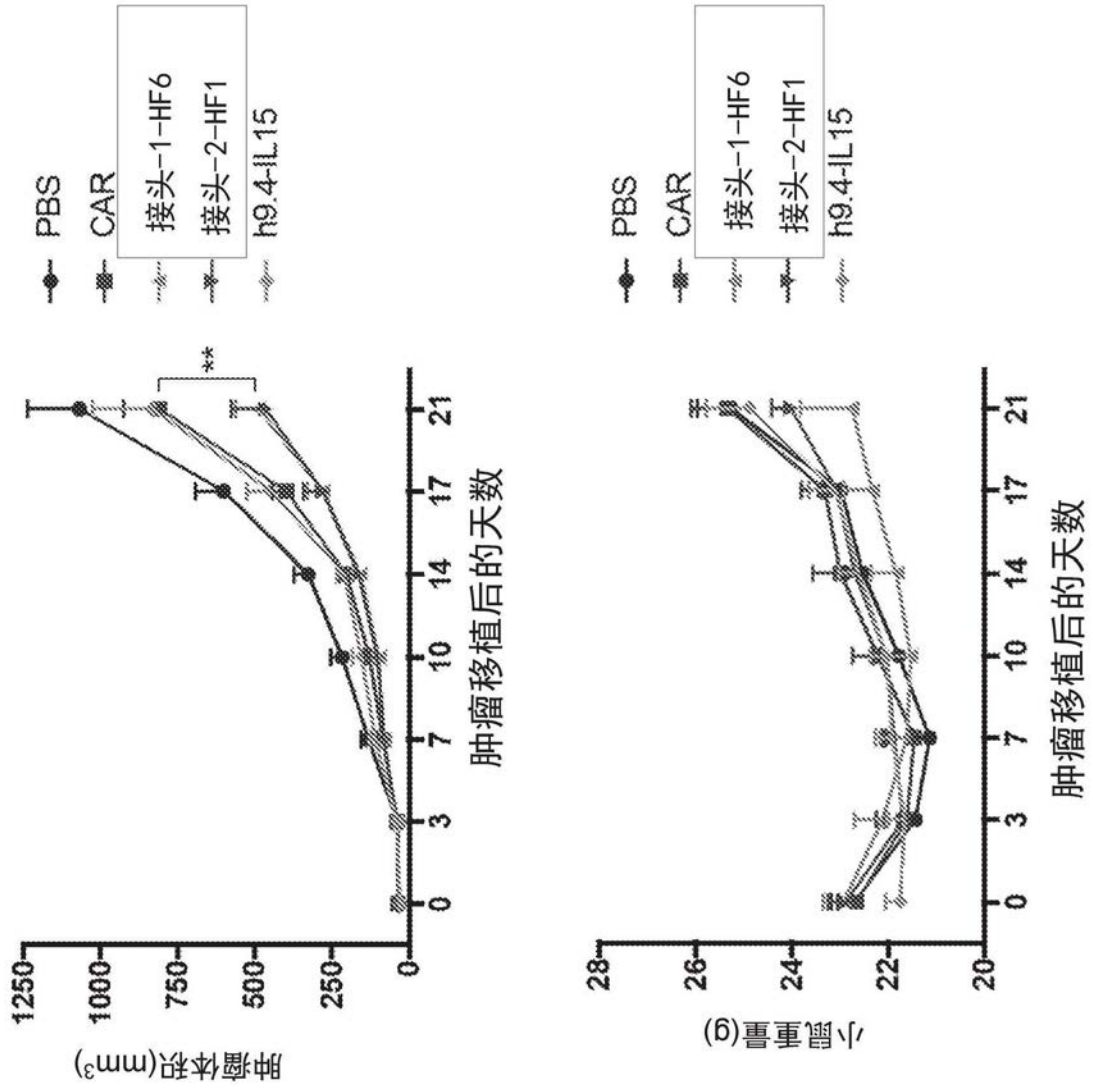


图20

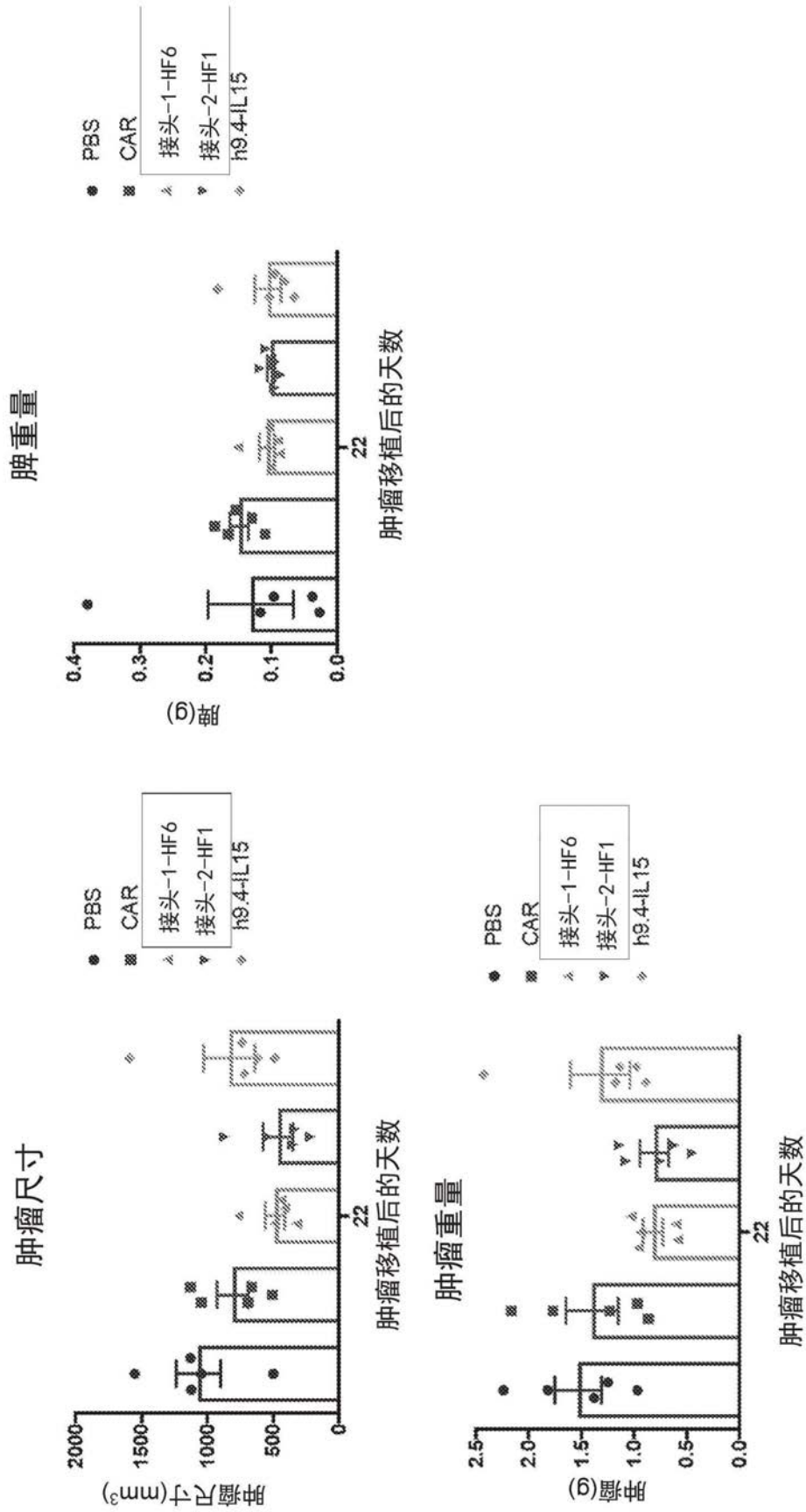


图21

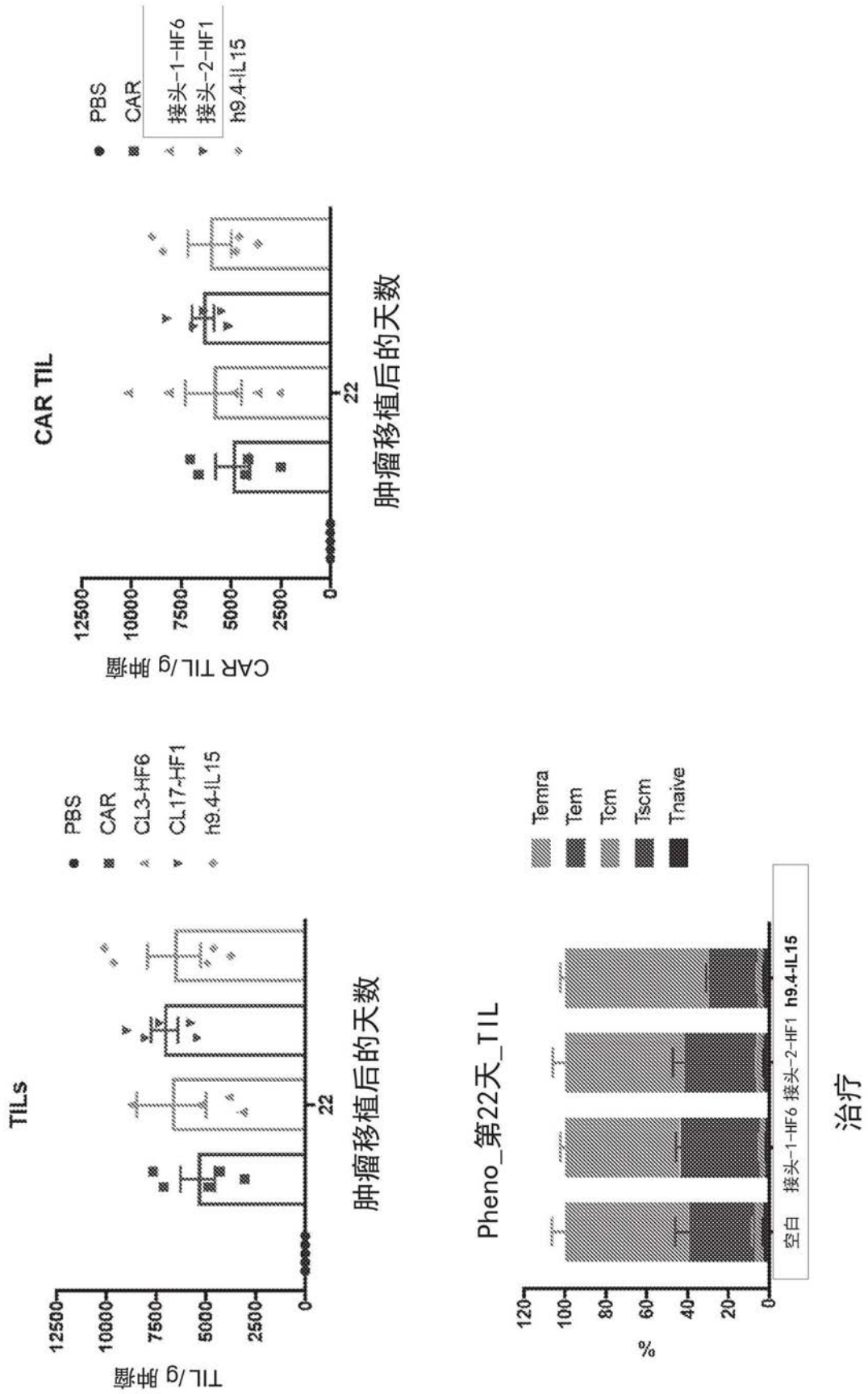


图22

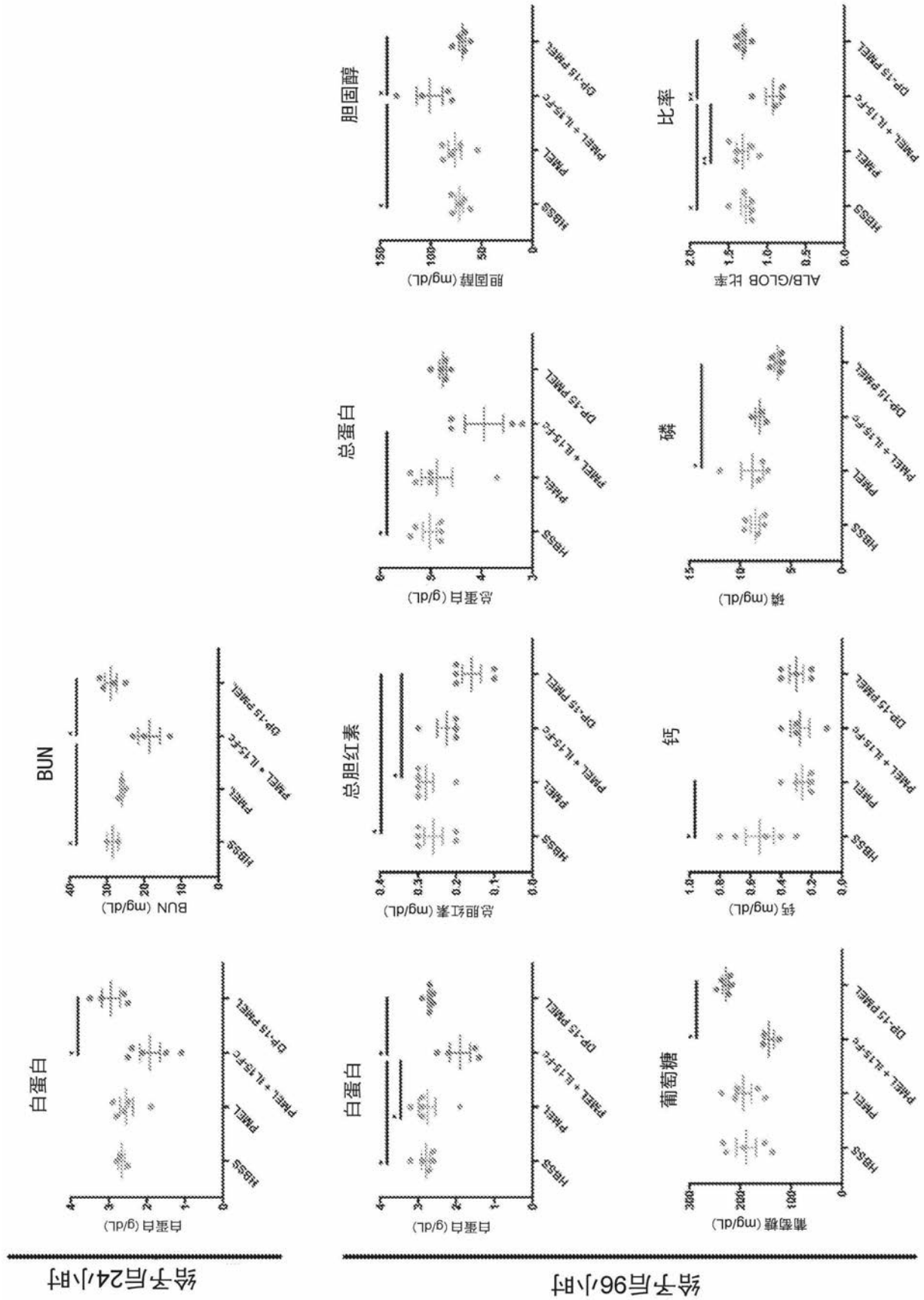


图23

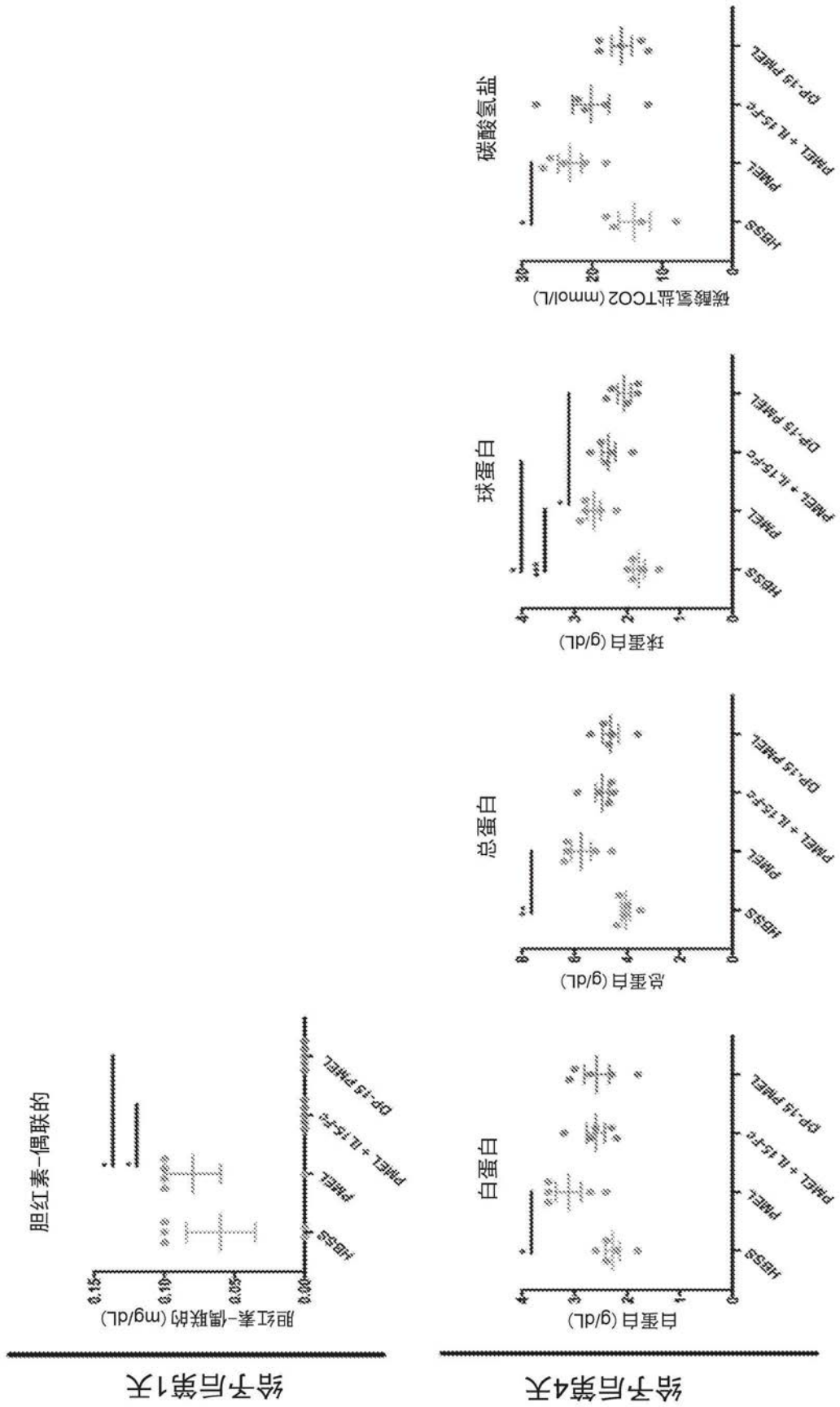


图24

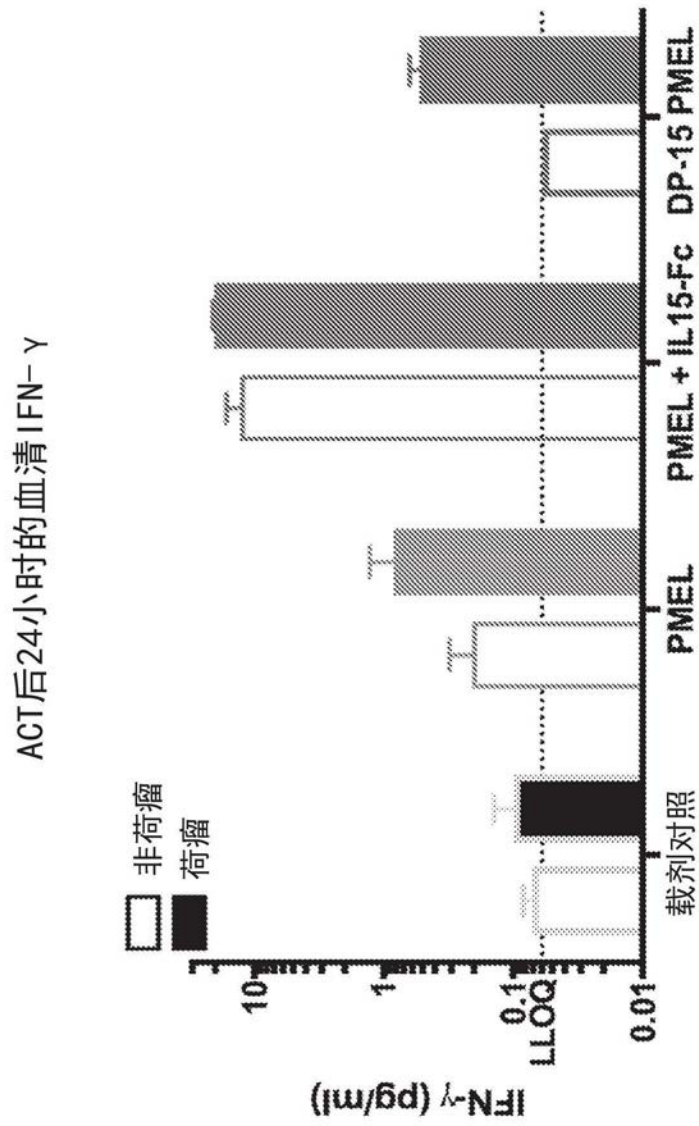


图25

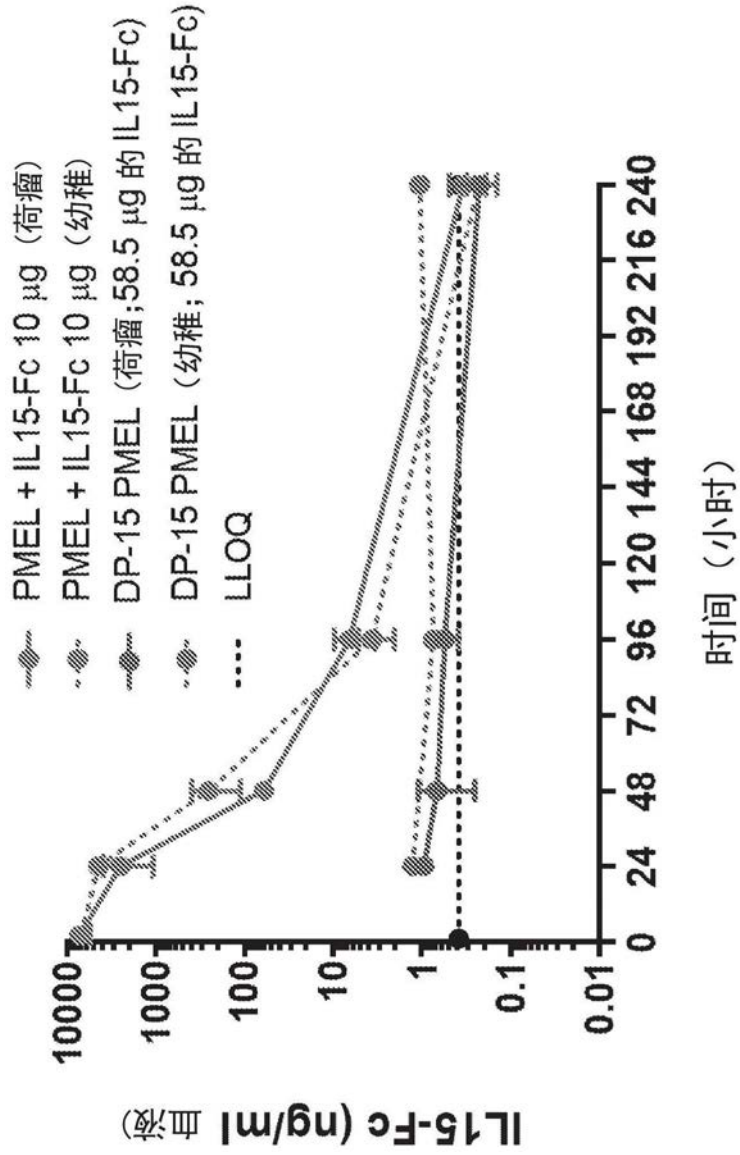


图26

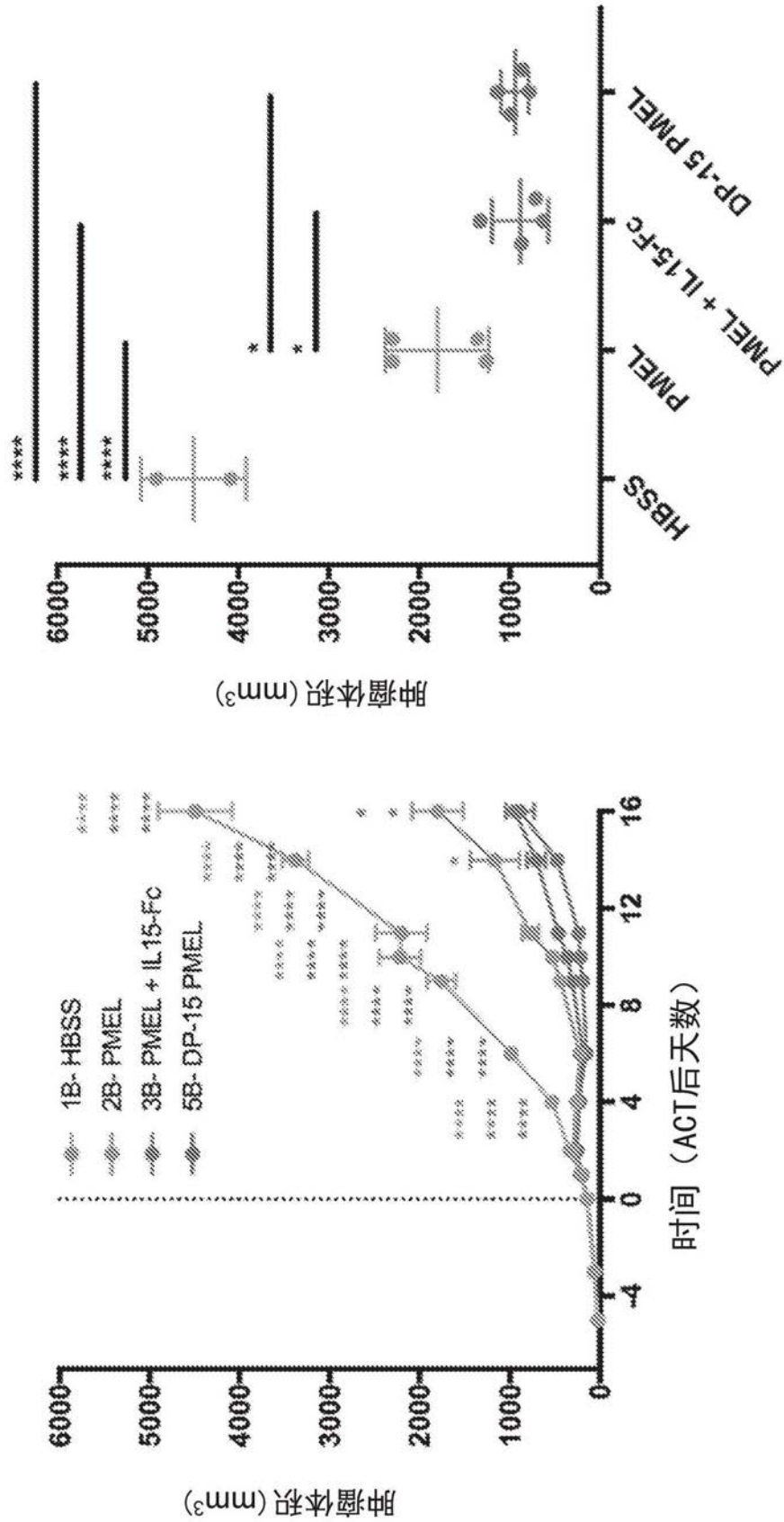


图27

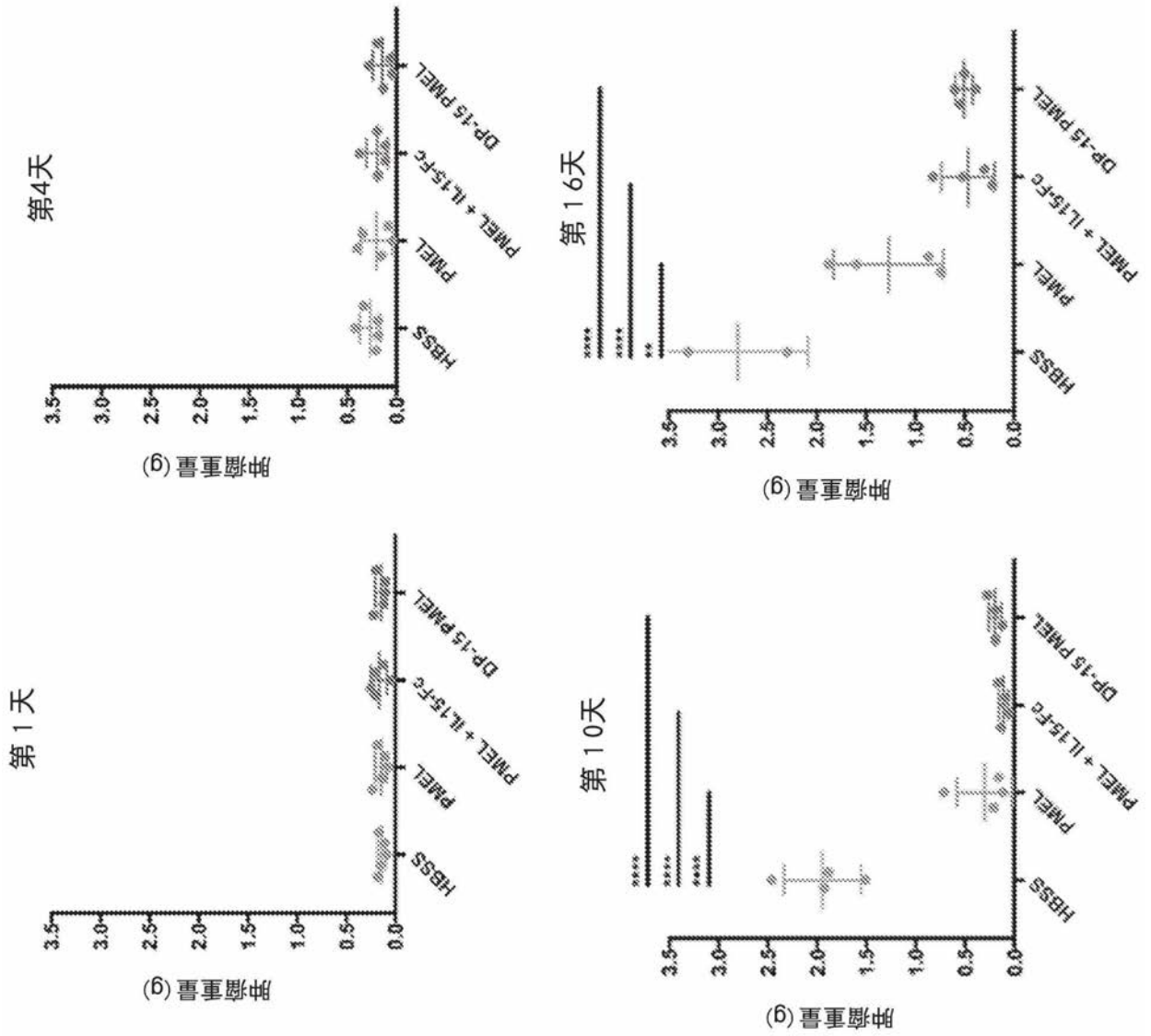


图28