



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112955168 A

(43) 申请公布日 2021.06.11

(21) 申请号 201980073615.8

(22) 申请日 2019.11.08

(30) 优先权数据

62/758,344 2018.11.09 US

62/789,924 2019.01.08 US

62/818,003 2019.03.13 US

62/825,437 2019.03.28 US

62/843,036 2019.05.03 US

62/848,372 2019.05.15 US

62/924,015 2019.10.21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.05.08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/060609 2019.11.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/097556 EN 2020.05.14

(71) 申请人 尼克塔治疗公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 宫崎宇广 L·马达卡穆蒂尔

S·基维梅

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

代理人 袁志明

(51) Int.Cl.

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 47/60 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

权利要求书2页 说明书49页

序列表3页 附图29页

(54) 发明名称

与另一种药理活性剂组合的长效白介素-15
受体激动剂

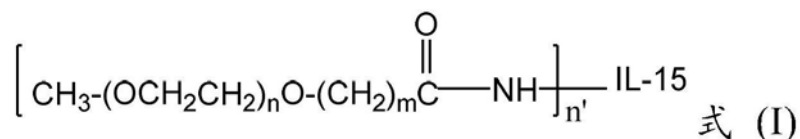
(57) 摘要

本披露提供了包含 (a) 长效IL-15受体激动剂和 (b) 一种或多种靶向肿瘤抗原的抗体 (mAb) 的组合治疗、组合物和试剂盒,相关的制备方法,以及例如在治疗对有效提供例如持续的免疫激活和/或抗肿瘤活性的疗法有应答的病状中的用途。

1. 一种治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括:

向所述受试者施用

(a) 具有以下结构的长效IL-15受体激动剂:



其中IL-15为白介素-15部分,n为约150至约3,000的整数,m为选自2、3、4和5的整数,n'为1,~NH~表示IL-15部分的氨基基团;以及

(b) 特异性结合肿瘤抗原的单克隆抗体,所述肿瘤抗原选自磷蛋白、跨膜蛋白、糖蛋白、糖脂和生长因子,其中所述单克隆抗体具有抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 作为作用机制;

其中步骤 (a) 和 (b) 同时地或以任何顺序依次进行。

2. 如权利要求1所述的方法,其中其中所述长效IL-15受体激动剂是药学上可接受的盐。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其中式 (I) 中的 (m) 为2或3。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的方法,其中式 (I) 中的 (m) 为3。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的方法,其中式 (I) 中 (n) 的值约为909。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述癌症是实体癌。

7. 如权利要求6所述的方法,其中所述实体癌选自由以下组成的组:乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、结直肠癌、胃癌、恶性黑色素瘤、肝癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、甲状腺癌、肾癌、胆管癌、脑癌、宫颈癌、上颌窦癌、膀胱癌、食管癌、霍奇金病、以及肾上腺皮质癌,包括上述任何一种的转移形式。

8. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述癌症是血液恶性肿瘤。

9. 如权利要求8所述的方法,其中所述血液恶性肿瘤选自由以下组成的组:多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤、白血病和淋巴瘤。

10. 如权利要求1至9中任一项所述的方法,其中步骤 (a) 在步骤 (b) 之前进行。

11. 如权利要求1至9中任一项所述的方法,其中步骤 (b) 在步骤 (a) 之前进行。

12. 如权利要求1至9中任一项所述的方法,其中步骤 (a) 和步骤 (b) 同时或基本同时进行。

13. 如权利要求1至12中任一项所述的方法,其中如在合适的动物模型中所测量的,所述施用有效地刺激NK激活,其程度大于所述长效IL-15受体激动剂作为单一药剂施用时所观察到的程度。

14. 如权利要求1-13中任一项所述的方法,其中如在合适的动物模型中所测量的,所述施用有效地刺激NK增殖,其程度大于所述长效IL-15受体激动剂作为单一药剂施用时所观察到的程度。

15. 如权利要求1-14中任一项所述的方法,其中如在合适的动物模型中所测量的,所述施用有效支持CD8⁺T细胞存活和记忆形成,其程度大于所述长效IL-15受体激动剂作为单一药剂施用时所观察到的程度。

16. 如权利要求1至15中任一项所述的方法,其中所述长效IL-15受体激动剂通过皮下施用。

17. 如权利要求1-16中任一项所述的方法,其中所述单克隆抗体通过静脉内施用。

18. 如权利要求1-17中任一项所述的方法,其中所述单克隆抗体选自抗CD19抗体、抗CD20抗体和抗CD38抗体。

19. 如权利要求1-17中任一项所述的方法,其中与糖蛋白特异性结合的所述单克隆抗体选自抗SLAMF7抗体、抗EpCAM抗体、抗gpA3抗体3和抗FBP抗体。

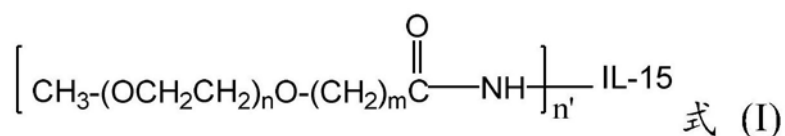
20. 如权利要求1-17中任一项所述的方法,其中与生长因子特异性结合的所述单克隆抗体选自抗VEGF抗体、抗VEGFR抗体和抗EGFR抗体。

21. 如权利要求1-17中任一项所述的方法,其中所述单克隆抗体是IgG抗体。

22. 如权利要求1-17中任一项所述的方法,其中所述单克隆抗体选自由以下组成的组: 达雷木单抗、利妥昔单抗、西妥昔单抗和曲妥珠单抗。

23. 一种用于治疗癌症的治疗组合,其包含

(a) 具有以下结构的长效IL-15受体激动剂:



其中IL-15为白介素-15部分,n为约150至约3,000的整数,m为选自2、3、4和5的整数,n'为1,~NH~表示IL-15部分的氨基基团;以及

(b) 特异 α 性结合肿瘤抗原的单克隆抗体,所述肿瘤抗原选自磷蛋白、跨膜蛋白、糖蛋白、糖脂和生长因子,其中所述单克隆抗体包括抗体依赖性细胞毒性(ADCC)作为作用机制。

24. 如权利要求23所述的治疗组合,其中其中所述长效受体激动剂是药学上可接受的盐。

25. 如权利要求23或24所述的治疗组合,其中所述长效IL-15受体激动剂具有如权利要求3、4或5中任一项所述的结构。

26. 一种试剂盒,其包含如权利要求23-25中任一项所述的治疗组合,并附使用说明书,其中所述长效IL-15受体激动剂和所述单克隆抗体各自包含在一种或多种单独的单位剂型中。

27. 长效受体激动剂与抗肿瘤抗体一起施用,增强NK细胞介导的抗体依赖性细胞毒性的用途。

与另一种药理活性剂组合的长效白介素-15受体激动剂

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请根据35U.S.C. §119 (e) 要求以下临时专利申请的优先权的权益:2018年11月9日提交的美国临时专利申请序列号62/758,344;2019年1月8日提交的62/789,924;2019年3月13日提交的62/818,003;2019年3月28日提交的62/825,437;2019年5月3日提交的62/843,036;2019年5月15日提交的62/848,372;以及2019年10月21日提交的62/924,015,其披露内容通过引用并入本文。

技术领域

[0002] 本披露(尤其)涉及包含长效白介素-15(“IL-15”)受体激动剂和另一种药理活性剂(即诸如单克隆抗体等抗体)的治疗组合和组合物,相关使用方法,例如用于治疗对有效提供例如持续的免疫激活和抗肿瘤活性的疗法有应答的病症。

背景技术

[0003] 白介素-15(“IL-15”)是由Grabstein等人首先报道的多效性细胞因子(Grabstein等人(1994) *Science* [科学] 264:965-968)。作为162个氨基酸的前体被分泌,人IL-15包含29个氨基酸的前导序列和19个氨基酸的前序列;该成熟蛋白的长度因此是114个氨基酸。属于细胞因子的四个 α -螺旋束家族,IL-15结合到异源三聚体受体,其中独特的 α 亚基(IL-15R α)赋予受体对于IL-15的特异性,并且该受体的 β 和 γ 亚基共享与一种或多种其他细胞因子受体的共性。Giri等人(1995) *EMBO J.* [欧洲分子生物学杂志] 14:3654-3663。

[0004] 作为细胞因子,IL-15对先天免疫系统和适应性免疫系统二者具有影响(DiSabitino等人(2011) *Cytokine Growth Factor Rev.* [细胞因子与生长因子综述] 22:19-33)。关于先天免疫系统(其一般性地防卫宿主免受外来入侵物),除了具有其他特性之外,IL-15导致自然杀伤细胞(“NK细胞”)和自然杀伤T细胞(“NK T细胞”)的发育并且维持其存活。与它们在先天免疫系统中的作用一致,NK细胞不特异性攻击入侵病原体;相反,这些细胞破坏受到损害的宿主细胞(诸如肿瘤细胞或病毒感染细胞)。NK T细胞产生免疫调节细胞因子,特别是干扰素- γ ,这导致免疫应答的一般激活。

[0005] 关于适应性免疫系统(与特定病原体初次相遇后,其防卫宿主免受特定外来入侵物),IL-15对于产生免疫调节细胞因子的辅助T细胞的维护是必要的。重要的是,IL-15还支持“经历过抗原的”记忆T细胞的长期维护,这些记忆T细胞具有快速繁殖的能力,从而在再暴露于入侵宿主的特定外来病原体时产生较快且较强的免疫应答。

[0006] 最后,尽管IL-15在先天性和适应性免疫系统二者中有特定作用,它在这两种类别的免疫系统中有显著且广泛的影响。具体地,IL-15抑制或减少在这两种类别的免疫系统内关联的许多细胞类型(包括树突细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、CD4+T细胞和B细胞)的凋亡(或细胞死亡)。还已经证明IL-15介导的应答在CD8+T细胞和肠上皮内淋巴细胞的发育、功能和存活中起作用。

[0007] 由于它刺激免疫系统内的许多细胞(这些细胞可以抵抗对于宿主表现为外来物

(或“非自体”)的细胞)的增殖和维护,已经提出在罹患癌症的个体的治疗中使用IL-15 (Steel等人(2012) Trends Pharmacol.Sci.[药理科学趋势]33(1):35-41)。例如,已经提出基于IL-15的激动剂来治疗骨髓瘤(Wong等人(2013) OncoImmunology[肿瘤免疫学]2(11), e26442:1-3)。另外,已经提出IL-15药物治疗用于治疗罹患病毒感染(诸如HIV感染)的个体。

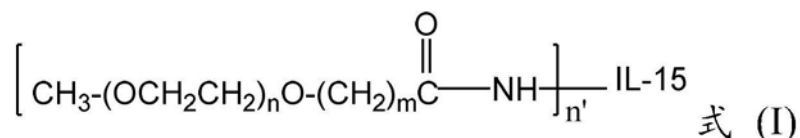
[0008] 已经描述了包含至少一个稳定地共价连接至IL-15氨基基团的水溶性聚合物(例如,聚乙二醇)部分的长效IL-15受体激动剂(PCT申请号PCT/US 2018/032817,通过引用以其整体并入本文),其与IL-15和其他IL-15受体激动剂相比,提供改善的特性和体内特征,例如有效的免疫刺激作用、低的全身性毒性、稳定性和/或改善的药代动力学、改善的治疗效果等其他改善。

[0009] 已经确定了用于治疗某些癌症(包括血液恶性肿瘤和实体瘤)的单克隆抗体(mAb)的产生和使用(Scott等人,2012,Cancer Immunity[癌症免疫],第12卷,第14页)。肿瘤相关mAb的作用机制包括以下一种或多种:对肿瘤细胞的直接作用、免疫介导的作用以及血管和基质的消融。mAb靶向的肿瘤相关抗原包括分化簇(CD)抗原(例如CD20、CD30、CD33、CD52)、糖蛋白(例如EpCAM、CEA、gpA33、粘蛋白等)、糖脂(例如神经节苷脂,诸如GD2、GD3和GM2)、血管靶标(例如VEGF、VEGFR)、生长因子(例如ErbB1/EGFR、ErbB2/HER2、ErbB3、c-MET、IGF1R)以及基质抗原和细胞外基质抗原(例如FAP、生腱蛋白)。许多mAb已被美国FDA批准用于肿瘤学(例如,利妥昔单抗、奥法木单抗、ZEVALIN®、BEXXAR®、吉妥珠单抗奥佐米星(gemtuzumab ozogamicin)、维汀-布伦妥昔单抗(brentuximab vedotin)、西妥昔单抗和帕尼单抗),尽管某些类型的癌细胞比其他类型的癌细胞更易受基于单克隆抗体的疗法的攻击。

[0010] 然而,尽管采用上述方法,仍对改进的抗癌免疫疗法存在需求。本披露通过以下方式解决了这些需求和其他需求:特别是提供包含长效IL-15受体激动剂和至少一种针对肿瘤抗原的mAb的组合疗法(该组合具有许多有利的特征,将在下面更详细地描述),以及包含这种组合的组合物和试剂盒,以及相关的制备和使用方法,这些被认为是新的且完全没有被本领域提议过。

发明内容

[0011] 在第一方面,本文提供了治疗患有癌症的受试者的方法。特别地,所述方法包括向受试者施用长效IL-15受体激动剂和(b)单克隆抗体,例如靶向(即结合)肿瘤细胞的单克隆抗体,其中步骤(a)和(b)同时地或以任何顺序依次进行。在一些实施例中,所述长效IL-15受体激动剂具有以下结构:



其中所述结构也可以描绘为 $[\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{C}(=\text{O})\text{NH}]_{n'}-\text{IL-15}$,其中IL-15为白介素-15部分,(n)为约150至约3,000的整数,(m)为选自2、3、4和5的整数,(n')为1,~NH~表示IL-15部分的氨基基团;或其药学上可接受的盐形式。在一些特定的实施例中,式(I)

中的 (m) 为2或3。在一个优选的实施例中,式 (I) 中的 (m) 为3。在一些特定的实施例中,式 (I) 中的 (n) 具有约227的平均值、或约340的平均值、或约454的平均值、或约681的平均值、或约909的平均值。在一个或多个实施例中,(n) 的值约为909。

[0012] 在一些实施例中,抗体是特异性结合肿瘤抗原的抗体,所述肿瘤抗原选自磷蛋白、跨膜蛋白、糖蛋白、糖脂和生长因子。

[0013] 在所述方法的其他实施例中,所述受试者患有实体癌。在一些实施例中,所述实体癌选自由以下组成的组:乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、结直肠癌、胃癌、恶性黑色素瘤、多发性骨髓瘤、肝癌、淋巴瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、甲状腺癌、肾癌、胆管癌、脑癌、宫颈癌、上颌窦癌、膀胱癌、食管癌、霍奇金病、以及肾上腺皮质癌,包括上述任何一种的转移形式。

[0014] 在一些其他实施例中,所述受试者患有淋巴瘤或白血病。

[0015] 在一些其他实施例中,所述受试者患有多发性骨髓瘤。

[0016] 在所述方法的一些实施例中,步骤 (a) 在步骤 (b) 之前进行。在其他实施例中,步骤 (b) 在步骤 (a) 之前进行。在又其他实施例中,步骤 (a) 和步骤 (b) 同时或基本同时进行。所述方法可以进一步包括长效IL-15受体激动剂和单克隆抗体中的一者或两者的一个或多个另外的给药周期。

[0017] 在一些实施例中,如在合适的动物模型中所测量的,所述施用有效地刺激NK激活和增殖,其程度大于所述长效IL-15受体激动剂作为单一药剂施用时所观察到的程度。在一些另外的实施例中,如在合适的动物模型中所测量的,所述施用有效支持CD8⁺ T细胞存活和记忆形成,其程度大于所述长效IL-15受体激动剂作为单一药剂施用时所观察到的程度。在一些其他实施例中,如在合适的动物模型中所测量的(本文提供了其实例),所述施用有效导致肿瘤细胞数量的减少,该减少大于作为单一药剂(即,作为单一疗法)施用的长效受体激动剂施用后所观察到的减少,并且大于作为单一药剂的单克隆抗体施用后所观察到的减少。在一些相关的实施例中,与将等剂量的长效受体激动剂作为单一药剂施用相比,所述施用导致受试者肿瘤细胞数量减少3倍或更多,或更优选减少5倍或更多,或更优选减少7倍或更多。在一些其他实施例中,所述施用有效诱导NK细胞的增殖(即,增加NK细胞的数量)并激活它们在例如骨髓组织中的肿瘤细胞杀伤能力。

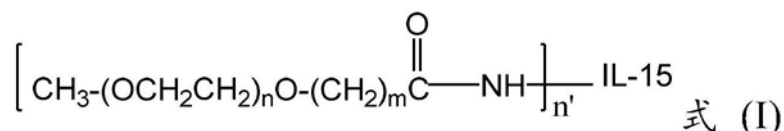
[0018] 在一些实施例中,所述长效IL-15受体激动剂通过皮下施用。在另外的实施例中,所述单克隆抗体通过静脉内施用。

[0019] 在一个或多个实施例中,所述抗体是利用抗体依赖性细胞毒性(ADCC,也称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性)作用机制的靶向性单克隆抗体。

[0020] 在一些实施例中,所述单克隆抗体选自抗CD19抗体、抗CD20抗体和抗CD38抗体。在其他实施例中,与糖蛋白特异性结合的所述单克隆抗体选自抗SLAMF7抗体、抗EpCAM抗体、抗gpA3抗体3和抗FBP抗体。在另外的实施例中,与生长因子特异性结合的所述单克隆抗体选自抗VEGF抗体、抗VEGFR抗体和抗EGFR抗体。在又一些另外的实施例中,所述抗体是抗BCMA抗体。在一些另外的实施例中,所述抗体是靶向多发性骨髓瘤的抗体。

[0021] 在第二方面,本文提供了用于治疗诸如癌症等病状的治疗组合。所述组合包含长效IL-15受体激动剂和单克隆抗体,例如靶向(即结合)肿瘤细胞的单克隆抗体,包括但不限于本文所述的单克隆抗体。

[0022] 在一些相关且更具体的实施例中,所述长效IL-15受体激动剂具有以下结构:



其中IL-15为白介素-15部分,(n)为约150至约3,000的整数,(m)为选自2、3、4和5的整数,(n')为1,~NH~表示IL-15部分的氨基基团;或其药学上可接受的盐形式。在又一些另外的实施例中,所述单克隆抗体是特异性结合肿瘤抗原的抗体,所述肿瘤抗原选自磷蛋白、跨膜蛋白、糖蛋白、糖脂和生长因子。在一些实施例中,式(I)中的(m)为2或3。在一些特定的实施例中,式(I)中的(m)为3。在一些其他实施例中,式(I)中的(n)的值为约227、或约340、或约454、或约681、或约909。在一个或多个实施例中,(n)的值约为909。

[0023] 在第三方面,本文提供了试剂盒。在实施例中,所述试剂盒包含如本文所述的长效IL-15受体激动剂和单克隆抗体的治疗组合,并附有使用说明书,其中所述长效IL-15受体激动剂和单克隆抗体各自包含在一种或多种单独的单位剂型中。所述试剂盒和治疗组合可用于例如治疗患有癌症的受试者。

[0024] 另外的方面和实施例在以下说明书和权利要求书中进行阐述。除非另外指示,本文所描述的实施例旨在等同地应用于本文所描述的每个方面,并且在适用时以单独和组合两种形式进行考虑。

附图说明

[0025] 图1提供了来自大肠杆菌的示例性重组人IL-15的氨基酸序列(SEQ ID NO:1),该氨基酸序列为含有115个氨基酸的非糖基化多肽单链,分子量为12.9kDa。

[0026] 图2是显示接种有Daudi B淋巴瘤细胞并经以下治疗的小鼠的存活百分比的图:如实例1中详细描述, (i) 同型对照, (ii) 40mg/kg的利妥昔单抗, (iii) 0.3mg/kg的长效IL-15受体激动剂,或(iv) 40mg/kg的利妥昔单抗和0.3mg/kg的长效IL-15受体激动剂的组合。

[0027] 图3是显示用以下治疗接种有Daudi B细胞的小鼠后,骨髓组织中NK细胞计数的图:如实例2中描述的, (i) 达雷木单抗(0.5mg/kg IP,接种Daudi细胞后14天)和两个剂量的长效IL-15受体激动剂,即单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15(0.3mg/kg SC,接种后14天和21天各一个剂量), (ii) 单一药剂达雷木单抗(0.5mg/kg IP,接种Daudi细胞后14天), (iii) 单一药剂单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15(0.3mg/kg SC,接种后14和21天),与(iv) 未治疗的对照组相比。

[0028] 图4是显示用以下治疗接种有Daudi B细胞的小鼠后,骨髓组织中Daudi B细胞数目的图:如实例2中描述的, (i) 达雷木单抗(0.5mg/kg IP,接种Daudi细胞后14天)和两个剂量的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15(0.3mg/kg SC,接种后14天和21天各一个剂量), (ii) 单一药剂达雷木单抗(0.5mg/kg IP,接种Daudi细胞后14天), (iii) 单一药剂单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15(0.3mg/kg SC,接种后14和21天),与(iv) 未治疗的对照组相比。

[0029] 图5是显示接种有Daudi B细胞淋巴瘤细胞,然后进行以下治疗的小鼠的存活百分比的图:如实例3中详细描述, (i) 同型对照, (ii) 0.5mg/kg IP的达雷木单抗, (iii) 0.3mg/kg SC的长效IL-15受体激动剂单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15,或(iv) 0.3mg/kg的长效IL-15受体激动剂和0.5mg/kg SC的达雷木单抗的组合。

[0030] 图6是显示用以下治疗接种有Daudi B细胞的小鼠后,骨髓NK细胞中的颗粒酶B诱导的图:如实例2中详细描述, (i) 达雷木单抗 (0.5mg/kg IP, 接种Daudi细胞后14天) 和两个剂量的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15 (0.3mg/kg SC, 接种后14天和21天各一个剂量), (ii) 单一药剂达雷木单抗 (0.5mg/kg IP, 接种Daudi细胞后14天), (iii) 单一药剂单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15 (0.3mg/kg SC, 接种后14和21天), 与(iv) 未治疗的对照组相比。

[0031] 图7A和7B是显示用以下治疗接种有Daudi B细胞的小鼠后,在骨髓腔中在细胞表面表达NKG2A (图7A) 或NKG2D (图7B) 的NK细胞的分数的图:如实例4中详细描述, (i) 达雷木单抗 (0.5mg/kg IP, 接种Daudi细胞后14天) 和两个剂量的缀合物1 (0.3mg/kg或0.03mg/kg SC, 接种后14天和21天各一个剂量), (ii) 单一药剂达雷木单抗 (0.5mg/kg IP, 接种Daudi细胞后14天), (iii) 单一药剂化合物1 (0.3mg/kg SC, 接种后14和21天), 与(iv) 未治疗的对照组或(v) 同型对照 (0.5mg/kg) 相比。

[0032] 图8A-8D是显示使用(i) 单独的化合物1 (图8C), (ii) 单独的hIgG (图8B), (iii) 化合物1+hIgG (图8D) 或(iv) 未治疗的对照 (图8A), 在人外周血单核细胞 (PBMC) 制剂中人NK细胞的%增殖的直方图,如实例5中详细描述。

[0033] 图9A是显示使用(i) hIgG涂覆的板, (ii) 化合物1 (1 μ g/ml), (iii) hIgG涂覆的板+化合物1 (1 μ g/ml), 或(ii) 显示NK细胞激活的对照, 在培养过夜的PBMC制剂中CD56+NK细胞表面的CD69检测抗体的中值荧光强度 (MFI) 信号的图,如实例6中详细描述。

[0034] 图9B是显示使用(i) hIgG涂覆的板, (ii) 化合物1 (1 μ g/ml), (iii) hIgG涂覆的板+化合物1 (1 μ g/ml), 或(ii) 显示NK细胞激活的对照, 在培养过夜的PBMC制剂中CD56+NK细胞表面的CD107a检测抗体的中值荧光强度 (MFI) 信号的图,如实例6中详细描述。

[0035] 图9C是显示在暴露于以下物质后在人PBMC中的颗粒酶B诱导的图: (i) hIgG涂覆的板, (ii) 化合物1 (1 μ g/ml), hIgG涂覆的板+化合物1 (1 μ g/ml), 或(ii) 对照,如实例6中详细描述。该图示出了针对四种治疗中的每一种,分泌的颗粒酶B的浓度,单位为pg/ml。

[0036] 图10A是显示与IL-15或长效IL-15受体激动剂(单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15)一起孵育后KHYG-1细胞内pSTAT5阳性百分比的图,如实例7中详细描述。图10B是显示与IL-15或长效IL-15受体激动剂(单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15)一起孵育后KHYG-1细胞的%最大增殖的图,如实例7中详细描述。

[0037] 图11是显示与IL-15或长效IL-15受体激动剂(单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15)一起孵育后CD56+人NK细胞的%最大增殖的图,如实例8中详细描述。

[0038] 图12是显示用长效IL-15受体激动剂(单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素15) (+) 或未治疗的(-) 刺激后,用达雷木单抗(+) 预先涂覆的人多发性骨髓瘤细胞的%7-AAD+靶细胞的图,如实例9中详细描述。

[0039] 图13A是显示用以下治疗接种有Daudi B细胞的小鼠后,在骨髓腔中在细胞表面表达CD16的NK细胞的分数的图(图13A) (表达CD16的细胞占总NK细胞的%) 的图:如实例10中详细描述, (i) 达雷木单抗 (0.5mg/kg IP, 接种Daudi细胞后14天) 和两个剂量的缀合物1 (0.3mg/kg或0.03mg/kg SC, 接种后14天和21天各一个剂量), (ii) 单一药剂达雷木单抗 (0.5mg/kg IP, 接种Daudi细胞后14天), (iii) 单一药剂化合物1 (0.3mg/kg SC, 接种后14和21天), 与(iv) 未治疗的对照组或(v) 同型对照 (0.5mg/kg) 相比。

[0040] 图13B是显示用以下治疗接种有Daudi B细胞的小鼠后,如通过中值荧光强度(MFI)信号所测量的CD16+骨髓NK细胞的每个细胞的CD16表达变化(在化合物1治疗组中增加的图:如实例10中详细描述, (i) 达雷木单抗(0.5mg/kg IP, 接种Daudi细胞后14天)和两个剂量的缀合物1(0.3mg/kg或0.03mg/kg SC, 接种后14天和21天各一个剂量), (ii) 单一药剂达雷木单抗(0.5mg/kg IP, 接种Daudi细胞后14天), (iii) 单一药剂化合物1(0.3mg/kg SC, 接种后14和21天), 与(iv) 未治疗的对照组或(v) 同型对照(0.5mg/kg) 相比。

[0041] 图14是显示用以下治疗接种有Daudi B细胞的小鼠后,如通过中值荧光强度(MFI)信号所测量的单个骨髓NK细胞中的颗粒酶B表达的图:如实例11中详细描述, (i) 达雷木单抗(0.5mg/kg IP, 接种Daudi细胞后14天)和两个剂量的化合物1(0.3mg/kg或0.03mg/kg SC, 接种后14天和21天各一个剂量), (ii) 单一药剂达雷木单抗(0.5mg/kg IP, 接种Daudi细胞后14天), (iii) 单一药剂化合物1(0.3mg/kg SC, 接种后14和21天), 与(iv) 未治疗的对照组或(v) 同型对照(0.5mg/kg) 相比。

[0042] 图15A和15B是显示用长效IL-15受体激动剂(单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素15)(+)或未治疗的(-)刺激后,用达雷木单抗(+) (图15A) 或利妥昔单抗(+) (图15B) 预先涂覆的人多发性骨髓瘤细胞的%7-AAD+靶细胞的图,如实例12中详细描述。

[0043] 图16是显示接种有Daudi B细胞淋巴瘤细胞、然后用以下进行治疗的SCID或SCID beige小鼠的存活百分比的图: (i) 未治疗的SCID对照(□), (ii) 未治疗的SCID beige对照小鼠(○), (iii) 针对SCID小鼠的0.3mg/kg的长效IL-15受体激动剂和0.5mg/kg SC的达雷木单抗的组合(■); 以及(iv) 针对SCID beige小鼠的0.3mg/kg的长效IL-15受体激动剂和0.5mg/kg SC的达雷木单抗的组合(●), 如实例13中详细描述。

[0044] 图17A是显示用以下治疗接种有Daudi B细胞的小鼠后,骨髓组织中Daudi细胞计数的图:如实例14中详细描述, (i) 高剂量达雷木单抗(5mg/kg IP, 接种Daudi细胞后14天)和两个低剂量的长效IL-15受体激动剂,即单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15(化合物1)(0.03mg/kg IV, 接种后14天和21天各一个剂量)(◆), (ii) 单一药剂高剂量达雷木单抗(5mg/kg IP, 接种Daudi细胞后14天)(▼), (iii) 单一药剂低剂量单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15(化合物1)(0.03mg/kg IV, 接种后14和21天)(▲), 与(iv) 未治疗的对照组(●)相比。图17B是显示用以下治疗接种有Daudi B细胞的小鼠后,骨髓组织中Daudi细胞计数的图:如实例14中详细描述, (i) 低剂量达雷木单抗(0.05mg/kg IP, 接种Daudi细胞后14天)和两个高剂量的长效IL-15受体激动剂,即单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15(化合物1)(0.6mg/kg IV, 接种后14天和21天各一个剂量)(◆), (ii) 单一药剂低剂量达雷木单抗(0.05mg/kg IP, 接种Daudi细胞后14天)(▼), (iii) 单一药剂高剂量单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15(化合物1)(0.6mg/kg IV, 接种后14和21天)(▲), 与(iv) 未治疗的对照组(●)相比。

[0045] 图18A是显示与媒介物对照相比,用西妥昔单抗(20mg/kg, IP) 和缀合物1(0.3mg/kg IV) 治疗携带皮下HCT-116结肠直肠细胞肿瘤的小鼠后第3天或第5天的NK细胞的肿瘤内分数的图,如实例15中详细描述。

[0046] 图18B是显示与媒介物对照相比,用西妥昔单抗(20mg/kg, IP) 和缀合物1(0.3mg/kg IV) 治疗携带皮下HCT-116肿瘤的小鼠后第3天或第5天的肿瘤内NK细胞计数的图,如实例15中详细描述。

[0047] 图18C是显示与媒介物对照相比,用西妥昔单抗(20mg/kg, IP) 和缀合物1 (0.3mg/kg IV) 治疗携带皮下HCT-116肿瘤的小鼠后在血液或肿瘤细胞中以%Ki67阳性所示的NK细胞增殖的图,如实例15中详细描述。

[0048] 图18D是显示与媒介物对照相比,用西妥昔单抗(20mg/kg, IP) 和缀合物1 (0.3mg/kg IV) 治疗携带皮下HCT-116肿瘤的小鼠后在血液或肿瘤细胞中的颗粒酶B表达(%GzmB+)的图,如实例15中详细描述。

[0049] 图18E是显示与媒介物对照相比,用西妥昔单抗(20mg/kg, IP) 和缀合物1 (0.3mg/kg IV) 治疗携带皮下HCT-116肿瘤的小鼠后,如通过中值荧光强度(MFI) 信号所测量的NK细胞上CD16细胞表面表达的图,如实例15中详细描述。

[0050] 图18F是显示与媒介物对照相比,用西妥昔单抗(20mg/kg, IP) 和缀合物1 (0.3mg/kg IV) 治疗携带皮下HCT-116肿瘤的小鼠后,在细胞表面表达NKG2D的NK细胞的肿瘤内分数(%NKG2D+)的图,如实例15中详细描述。

[0051] 图19A是显示与媒介物对照相比,用西妥昔单抗(20mg/kg, IP) 和缀合物1 (0.3mg/kg IV) 治疗携带皮下FaDu鳞状细胞癌肿瘤的小鼠后第3天或第5天的NK细胞的肿瘤内分数的图,如实例16中详细描述。

[0052] 图19B是显示与媒介物对照相比,用西妥昔单抗(20mg/kg, IP) 和缀合物1 (0.3mg/kg IV) 治疗携带皮下FaDu肿瘤的小鼠后第3天或第5天的肿瘤内NK细胞计数的图,如实例16中详细描述。

[0053] 图19C是显示与媒介物对照相比,用西妥昔单抗(20mg/kg, IP) 和缀合物1 (0.3mg/kg IV) 治疗携带皮下FaDu肿瘤的小鼠后血液或肿瘤细胞中以%Ki67阳性所示的NK细胞增殖的图,如实例16中详细描述。

[0054] 图19D是显示与媒介物对照相比,用西妥昔单抗(20mg/kg, IP) 和缀合物1 (0.3mg/kg IV) 治疗携带皮下FaDu肿瘤的小鼠后血液或肿瘤细胞中颗粒酶B表达(%GzmB+)的图,如实例16中详细描述。

[0055] 图19E是显示与媒介物对照相比,用西妥昔单抗(20mg/kg, IP) 和缀合物1 (0.3mg/kg IV) 治疗携带皮下FaDu肿瘤的小鼠后,如通过中值荧光强度(MFI) 信号所测量的NK细胞上CD16细胞表面表达的图,如实例16中详细描述。

[0056] 图19F是显示与媒介物对照相比,用西妥昔单抗(20mg/kg, IP) 和缀合物1 (0.3mg/kg IV) 治疗携带皮下FaDu肿瘤的小鼠后,在细胞表面表达NKG2D的NK细胞的肿瘤内分数(%NKG2D+)的图,如实例16中详细描述。

[0057] 图20是显示用以下治疗接种有H1975肺癌细胞的小鼠后0至27天的相对肿瘤体积的图:(i) 在接种肿瘤后第9、12和16天施用的西妥昔单抗(0.25mg/kg, IP), 以及在接种后第9、16和23天施用的化合物1 (0.3mg/kg, IV) (Δ), (ii) 单一药剂西妥昔单抗(0.25mg/kg, IP, BIWx3) ($\blacktriangle$), (iii) 单一药剂化合物1 (0.3mg/kg, IV, q7dx3) ($\blacktriangledown$), 与媒介物对照($\bullet$) 相比, 如实例17中详细描述。

[0058] 图21A是显示用以下治疗接种有HT-29结肠癌细胞的小鼠后0至21天的相对肿瘤体积的图:(i) 西妥昔单抗(40mg/kg, IP, BIWx3) 和化合物1 (0.3mg/kg, IV, q7dx3) (Δ), (ii) 单一药剂西妥昔单抗(40mg/kg, IP, BIWx3) ($\blacktriangle$), (iii) 单一药剂化合物1 (0.3mg/kg, IV, q7dx3) ($\blacktriangledown$), 与媒介物对照($\bullet$) 相比, 如实例18中详细描述。

[0059] 图21B是显示接种有HT-29结直肠癌细胞并经以下治疗的小鼠的以存活百分比表示的肿瘤生长延迟(TVQT)的图:在治疗开始后0至23天(平均肿瘤体积约150mm³), (i) 西妥昔单抗(40mg/kg, IP, BIWx3) 和化合物1(0.3mg/kg, IV, q7dx3) (▼), (ii) 单一药剂西妥昔单抗(40mg/kg, IP, BIWx3) (■), (iii) 单一药剂化合物1(0.3mg/kg, IV, q7dx3) (▲), 与媒介物对照(●)相比, 如实例18中详细描述。

[0060] 图22A是显示用以下治疗接种有HCT-116结直肠癌细胞的小鼠后0至19天的相对肿瘤体积的图: (i) 西妥昔单抗(40mg/kg, IP, BIWx3) 和化合物1(0.3mg/kg, IV, q7dx3) (Δ), (ii) 单一药剂西妥昔单抗(40mg/kg, IP, BIWx3) (▲), (iii) 单一药剂化合物1(0.3mg/kg, IV, q7dx3) (▼), 与PBS媒介物对照(OP, BIWx3) (●)相比, 如实例19中详细描述。

[0061] 图22B是显示接种有HCT-116结直肠癌细胞并经以下治疗的小鼠的以存活百分比表示的肿瘤生长延迟(TVQT)的图: (i) 西妥昔单抗(40mg/kg, IP, BIWx3) 和化合物1(0.3mg/kg, IV, q7dx3) (Δ), (ii) 单一药剂西妥昔单抗(40mg/kg, IP, BIWx3) (▲), (iii) 单一药剂化合物1(0.3mg/kg, IV, q7dx3) (▼), 与PBS媒介物对照(IP, BIWx3) (●)相比, 如实例19中详细描述。

[0062] 图23A是显示预先涂覆有单独的西妥昔单抗(+) 或在用化合物1(+)、同型对照(+)、或未治疗的(-)刺激后的HCT-116结直肠癌细胞的%CD45-EpCAM+7-AAD+靶细胞的图, 如实例20中详细描述。

[0063] 图23B是显示预先涂覆有单独的西妥昔单抗(+) 或在用化合物1(+)、同型对照(+)、或未治疗的(-)刺激后的FaDu鳞状细胞癌细胞(HNSCC)的%CD45-7-AAD+靶细胞的图, 如实例20中详细描述。

[0064] 图24是显示用以下治疗接种有SKOV-3卵巢腺癌细胞的小鼠后0至35天的相对肿瘤体积的图: (i) 曲妥珠单抗(13.5mg/kg, IV, BIWx3) 和化合物1(0.3mg/kg, IV, q7dx3) (Δ), (ii) 单一药剂曲妥珠单抗(13.5mg/kg, IV, BIWx3) (▲), (iii) 单一药剂化合物1(0.3mg/kg, IV, q7dx3) (▼), 与媒介物对照(●)相比, 如实例21中详细描述。

[0065] 图25是显示用以下治疗接种有NCI-N87胃癌细胞的小鼠后0至35天的相对肿瘤体积的图: (i) 曲妥珠单抗(3/1/1mg/kg, IV, q7dx3) 和化合物1(0.3mg/kg, IV, q7dx3) (Δ), (ii) 单一药剂曲妥珠单抗(3/1/1mg/kg, IV, q7dx3) (▲), (iii) 单一药剂化合物1(0.3mg/kg, IV, q7dx3) (▼), 与媒介物对照(●)相比, 如实例22中详细描述。

具体实施方式

[0066] 在详细描述本披露的一个或多个方面或实施例之前, 应当指出的是, 本披露并非旨在限于特定合成技术、IL-15部分等, 因此可如本披露所适用的领域的普通技术人员所理解那样变化。

[0067] 在描述和要求本披露的某些特征时, 除非另外指明, 否则将依据以下所述定义使用以下术语。

[0068] 如本说明书所使用的, 单数形式“一个/种(a/an)”和“该(the)”包括复数指示物, 除非上下文另外清楚地指示。

[0069] “水溶性非肽聚合物”是指一种聚合物, 该聚合物在室温下在水中是至少35% (按重量计) 可溶的, 优选地大于70% (按重量计)、并且更优选地大于95% (按重量计) 可溶的。

典型地,“水溶性”聚合物的未经过滤的水性制剂透射过滤后相同溶液透射的光量的至少75%,更优选至少95%。然而,最优选的是水溶性聚合物至少95%(按重量计)可溶于水或完全可溶于水。关于“非肽”,当聚合物具有少于35%(按重量计)的氨基酸残基时,它是非肽的。

[0070] 如本文所使用的“PEG”或“聚乙二醇”意指包括任何水溶性的聚(环氧乙烷)。除非另外指明,否则“PEG聚合物”或聚乙二醇是如下物质,其中基本上所有(优选所有)单体亚单元是环氧乙烷亚单元,但是,该聚合物可以含有不同的封端部分或官能团,例如用于缀合的封端部分或官能团。用于在本披露中使用的PEG聚合物将包括两种以下结构之一:“(CH₂CH₂O)_n-”或“- (CH₂CH₂O)_{n-1}CH₂CH₂-”,这取决于末端的一个或多个氧是否被置换(例如在合成转化期间)。如上所述,对于这些PEG聚合物,该变量(n)的范围可以是从约3至4000,并且整个PEG的末端基团和架构可以变化。然而,示例性或优选的包含PEG的分子可以包含一种或多种特定的PEG架构和/或接头、和/或分子量范围。

[0071] 在水溶性聚合物(诸如PEG)的情况下,分子量可以表示为数均分子量或重均分子量。除非另外指明,否则所有对分子量的提及本文均指重均分子量。两种分子量测定(数均与重均分子量)均可以使用凝胶渗透色谱法或其他液相色谱技术(例如,凝胶过滤色谱法)来测量。最常采用的是凝胶渗透色谱法和凝胶过滤色谱法。用于确定分子量的其他方法包括末端基团分析或依数性(例如冰点降低、沸点升高或渗透压)的测量以确定数均分子量;或使用光散射技术、超速离心法、MALDI TOF或粘度测定法以确定重均分子量。PEG聚合物典型地是多分散的(即,这些聚合物的数均分子量与重均分子量不相等),具有优选小于约1.2、更优选小于约1.15、仍然更优选小于约1.10、又仍然更优选小于约1.05并且最优选小于约1.03的低多分散性值。

[0072] “生理学上可裂解的”或“可水解的”或“可降解的”键是与水在生理学条件下进行反应(即,被水解)的相对不稳定的键。键在水中水解的趋势可能不仅取决于在给定分子之内连接两个原子的键联的一般类型,而且取决于连接至这些原子的取代基。适当的水解不稳定的或弱的键联可以包括但不限于羧酸酯、磷酸酯、酸酐、缩醛、缩酮、酰氧基烷基醚、亚胺、原酸酯、肽、寡核苷酸、硫酸酯、以及碳酸酯。

[0073] 例如在可以共价连接至活性部分(诸如白介素-15)的聚乙二醇的背景下,共价“可释放”键联是在生理条件下,例如通过任何适合的机制,以临床上有用的速率从活性部分释放或分离聚乙二醇聚合物,并且包括例如且不限于可水解键和酶可降解键联。

[0074] “酶可降解的键联”意指经受一种或多种酶降解的键联。

[0075] “稳定的”键联或键是指在水中基本上稳定,也就是说在生理条件下经延长的时间段没有经受任何明显程度水解的化学键。水解稳定的键联的实例通常包括但不限于以下:碳-碳键(例如,在脂族链中)、醚、酰胺、胺等。一般而言,稳定的键联是在生理条件下展现出小于约1%-2%的每日水解速率的键联。代表性化学键的水解速率可以在大多数标准化学教科书中找到。

[0076] “基本上”或“实质上”意指几乎全部地或完全地,例如给定量的95%或更大。

[0077] 类似地,如本文所使用的“约”或“大约”意指在给定量的加或减5%内。

[0078] “任选的”或“任选地”意指随后描述的情形可以但是并非必然发生,这样该说明包括其中该情形发生的情况以及该情形不发生的情况。

[0079] “药学上可接受的赋形剂”或“药学上可接受的载体”是指可以包含在如本文所述的组合物中并且不会对受试者引起显著不良毒理学作用的组分。

[0080] 短语“药学上有效量”和“药理学上有效量”和“治疗有效量”以及“生理学上有效量”在本文中可互换使用,并且指在血流中或靶组织中提供所希望水平的物质以产生所希望的生物或药物应答所需的如本文提供的长效IL-15受体激动剂的量或如本文所述的单克隆抗体的量。例如,这种应答可能会破坏靶癌细胞和/或减缓或遏制受试者中的癌症进展,和/或增加患者的NK细胞数量。该术语还适用于将诱导靶细胞中特定应答的剂量。精确量将取决于许多因素,例如,所治疗的特定病状、预期的患者群体、个体患者的考虑因素、待施用的治疗组合物和特定组合的组分和物理特性等,并且可以由本领域技术人员容易地确定。

[0081] 如本文所使用的,术语“IL-15部分”是指具有人IL-15活性的肽或蛋白质部分。另外,术语“IL-15部分”涵盖缀合之前的IL-15部分以及缀合之后的IL-15部分残基。如下文中将进一步详细解释,本领域的普通技术人员可以确定任何给定部分是否具有IL-15活性。包含与SEQ ID NO:1至3中任一项对应的氨基酸序列的蛋白质以及基本上与其同源的任何蛋白质或多肽都是IL-15部分。如本文所使用的,术语“IL-15部分”包括例如通过位点定向诱变而有意修饰或通过突变而偶然修饰的此类肽和蛋白质。这些术语还包括具有从1至6个额外糖基化位点的类似物、在肽或蛋白质的羧基末端处具有至少一个额外氨基酸(其中该一个或多个额外氨基酸包含至少一个糖基化位点)的类似物以及具有包含至少一个糖基化位点的氨基酸序列的类似物。该术语包括天然地、重组地和合成地产生的IL-15部分。IL-15部分可以通过本领域已知的任何合适的方法产生。在实施例中,IL-15部分在大肠杆菌或中国仓鼠卵巢(CHO)表达系统中重组产生。提及如本文所述的长效IL-15受体激动剂意指涵盖其药学上可接受的盐形式。

[0082] 如本文所使用的,“抗体”在广义上意指并且包括属于免疫球蛋白(Ig)超家族的糖蛋白。抗体旨在包括多克隆抗体、单克隆抗体(例如鼠的、人的、人适应的、人源化的和嵌合的)、抗体片段、以及与抗原(例如肿瘤抗原)特异性结合的单链抗体。以下片段,抗原结合(Fab)区,包含来自每个重链和轻链的恒定结构域和至少一个可变结构域。如本文所述的抗体至少具有抗体依赖性细胞毒性(ADCC)作为作用机制。

[0083] 如本文所使用的术语“单克隆抗体”(mAb)是指从基本上均质的分子群体中获得的非天然存在的抗体分子,使得这些抗体分子具有基本相同的一级序列,除了可能少量存在的天然存在的突变。单克隆抗体对单个结合位点或特定表位具有高度特异性。单克隆抗体是分离的抗体的实例。单克隆抗体可以通过本领域已知的任何方式产生,包括但不限于杂交瘤细胞培养技术、重组方法和转基因方法。

[0084] 应该理解,可以改变或修饰抗体的靶结合序列,以提高对靶标的亲和力,使靶结合序列人源化,提高其在细胞培养中的产生,降低其体内免疫原性,产生多特异性抗体等。在本文中具体考虑了这样的改变的抗体。

[0085] “分离的”抗体是已经从其天然环境的组分中鉴定、分离和/或回收的抗体。

[0086] 如本文所使用的“结合亲和力”是指抗体的抗原结合位点与其结合配偶体(例如,抗原)之间相互作用的强度。抗体对其抗原的亲和力通常可以用亲和常数(K_A)、处于平衡状态的抗体-抗原复合物的量或平衡解离常数(K_D)表示。亲和力可以通过本领域已知的任何方法进行测量,包括但不限于ELISA、凝胶迁移实验、拉下实验、平衡透析、分析超速离心法、

表面等离子共振法 (SPR)、等温滴定量热法 (ITC) 和光谱测定。

[0087] 如本文所使用的术语“患者”或“受试者”是指罹患或易患可以通过施用如本文提供的化合物或组合物来预防或治疗的病状的活生物体。受试者包括但不限于哺乳动物(例如,鼠类、猿猴、马科、牛科、猪科、犬科、猫科等),并且优选是人。

[0088] 术语“基本上同源”或“基本上相同”意指特定主题序列(例如突变序列)因一个或多个取代、缺失或添加而不同于参考序列,其净效应不导致该参考序列与该主题序列之间不利的官能差异。出于本文的目的,与给定序列具有大于95%的同源性(同一性)、等效的生物活性(但并非必须是等效强度的生物活性)、以及等效的表达特征的序列被认为是基本上同源的(相同的)。出于确定同源性的目的,应当忽略成熟序列的截短。本文所用的示例性 IL-15 多肽包括与 SEQ ID NO:1 基本上同源的那些序列。SEQ ID NO:2 与 SEQ ID NO:1 几乎相同,不同之处在于 SEQ ID NO:2 在序列开端具有甲硫氨酸,该甲硫氨酸是大肠杆菌中起始翻译所需的。

[0089] 术语“片段”意指具有蛋白质或多肽(例如 IL-15 部分)的一部分或片段的氨基酸序列、并且具有蛋白质或多肽(例如 IL-15)的生物活性或基本具有其生物活性的任何蛋白质或多肽。片段包括由蛋白水解降解所产生的蛋白质或多肽以及通过本领域中的常规方法通过化学合成产生的蛋白质或多肽。

[0090] 将肽中的氨基酸残基缩写如下:苯丙氨酸为 Phe 或 F;亮氨酸为 Leu 或 L;异亮氨酸为 Ile 或 I;甲硫氨酸为 Met 或 M;缬氨酸为 Val 或 V;丝氨酸为 Ser 或 S;脯氨酸为 Pro 或 P;苏氨酸为 Thr 或 T;丙氨酸为 Ala 或 A;酪氨酸为 Tyr 或 Y;组氨酸为 His 或 H;谷氨酰胺为 Gln 或 Q;天冬酰胺为 Asn 或 N;赖氨酸为 Lys 或 K;天冬氨酸为 Asp 或 D;谷氨酸为 Glu 或 E;半胱氨酸为 Cys 或 C;色氨酸为 Trp 或 W;精氨酸为 Arg 或 R;并且甘氨酸为 Gly 或 G。

概述

[0091] 本披露尤其涉及提供与病状(如癌症)的治疗有关的包含 (a) 长效 IL-15 受体激动剂和 (b) 针对肿瘤抗原的抗体的组合、组合物、方法和试剂盒,其中,肿瘤定向抗体包括抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 作为作用机制。此类组合物和方法将理想地具有若干个有利和不可预测的特征,例如以下中的至少一个(如果不是更多的话):增加肿瘤清除率;患者增加的存活和/或长期存活;与单独施用的这两者中的任何一种活性剂相比,尤其是在靶组织区室中施用,长效 IL-15 受体激动剂和抗体组合施用,它们中的一者或两者具有更高的活性;NK 细胞的脱粒增强;NK 细胞增殖增加;NK 细胞活力增加;T 细胞(例如 CD8+T 细胞)的增殖增加,和/或 T 细胞(例如 CD8+T 细胞)活力增加。令人惊讶地,申请人已经获得了长效 IL-15 受体激动剂和至少一种针对肿瘤抗原的抗体(例如单克隆抗体)的组合,该组合具有有利特性的独特组合,将在下面更详细描述,并在支持实例中进行说明。

[0092] 已经发现,本文所述的长效 IL-15 激动剂与通过 ADCC 介导肿瘤杀伤的靶向性抗体的组合显示出增强的免疫治疗作用。ADCC 是通过某些肿瘤靶向性抗体在肿瘤消耗中进行的关键机制,其中 NK 细胞上的受体识别结合肿瘤细胞的抗体。NK 细胞受体与抗体的重新接合触发细胞毒性颗粒和/或细胞因子的释放,以杀伤肿瘤细胞。已经发现,本文所述的长效 IL-15 激动剂可通过使具有增加的细胞毒性和/或其他功能激活的 NK 细胞扩增而有效地提高具有 ADCC 作用机制的靶向性抗体疗法的疗效。

治疗组合、组合物和使用方法

[0093] 在第一方面,本文描述了用于治疗罹患癌症或肿瘤的受试者的方法。该方法包括一起或分别施用与肿瘤抗原特异性结合的抗体或其抗原结合部分、以及长效IL-15受体激动剂。由于长效IL-15受体激动剂具有诱导NK细胞增殖并激活其肿瘤细胞杀伤能力的能力,因此已经开发出一种组合治疗方法,其中长效IL-15受体激动剂,例如单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15(也称为单(mPEG-丁酰胺)白介素-15、单(mPEG-丁酰胺)IL-15或单-mPEG-SBA-IL15)与识别肿瘤细胞的治疗性单克隆抗体组合,从而产生数量增加的激活的细胞杀伤性NK细胞,这些NK细胞也可以有效地与抗体分子结合,然后可以通过抗体指向肿瘤细胞,以促进增强的协同性肿瘤细胞杀伤作用。参见,例如,本文所附实例中描述的结果。

[0094] 为了清楚起见,关于施用顺序,其中术语“施用”在这种情况下用于指长效IL-15受体激动剂或肿瘤定向抗体的递送,IL-15受体激动剂和肿瘤定向抗体可以同时或以任何顺序依次施用。此外,组合中任一组分的治疗可以包括单个治疗周期或者可以包括多个周期。也就是说,在施用长效IL-15激动剂和施用肿瘤定向抗体之后,另外的疗法可以包括施用长效IL-15受体激动剂与施用肿瘤定向抗体组合,施用长效IL-15受体激动剂而无需进一步施用肿瘤定向抗体,或施用肿瘤定向抗体而无需进一步施用长效IL-15受体激动剂,或以上施用的任意组合。

[0095] 在第二方面,本文描述了一种组合物(或多种组合物),所述组合物包含特异性结合肿瘤抗原的抗体或其抗原结合部分、以及长效IL-15受体激动剂。

[0096] 通常,如本文所述的抗体指向在癌细胞或肿瘤细胞的细胞表面上表达的蛋白质(下文称为癌症抗原或肿瘤抗原)。许多癌症或肿瘤抗原是本领域已知的。非限制性实例包括磷蛋白、跨膜蛋白、糖蛋白、糖脂和生长因子。用于确定给定化合物是否可以充当针对如本文所述的任何抗原或靶标的抗体的测定可以由本领域普通技术人员通过常规实验确定。

[0097] 在一些实施例中,该抗体是免疫球蛋白G(IgG)类型的抗体,其通常在人血液循环中发现。

[0098] 在一些实施例中,该抗体是抗CD16、抗CD19、抗CD20或抗CD38抗体,即与CD16、CD19、CD20、CD30、CD38或CD52特异性结合的抗体。

[0099] 人CD19抗原是属于免疫球蛋白(Ig)超家族的95kDa的糖蛋白。CD19是正常和赘生性B细胞以及滤泡树突细胞的生物标志物。CD19从前B细胞发育的早期阶段通过末端分化表达,从而调节B淋巴细胞的发育和功能。CD19的表达在大多数B细胞肿瘤(包括B细胞淋巴瘤,如非霍奇金淋巴瘤)中高度保守。CD19也可以在大多数类型的白血病中表达,包括B细胞白血病、急性淋巴母细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(WM)。大多数B细胞恶性肿瘤(淋巴瘤和白血病)以正常至较高水平表达CD19。在实施例中,该抗体是抗CD19单克隆抗体。预期用于本文的方法和组合物中的一些示例性抗CD19抗体包括但不限于,例如抗B4-bR、BiTE(双特异性T细胞接合抗体)、MEDI-551(英商梅迪缪斯有限公司(MedImmune, LLC)、MOR-208(莫弗西斯公司(MorphoSys AG))、博纳吐单抗、双特异性抗CD19/CD3 BiTE®抗体(Blinicyto®,安进公司(Amgen))、雷星-考妥昔单抗(coltuximab ravtansine)(免疫原公司(ImmunoGen Inc.)和赛诺菲公司(Sanofi))、玛汀-地宁妥珠单抗(denintuzumab mafodotin)(西雅图遗传学公司(Seattle Genetics))、帕他普莫单抗(taplutumomab paptox)(美国国家癌症研究所(National Cancer Institute))、XmAb 5871(安进公司和Xencor公司)、MDX-1342(Medarex公司)、AFM11(Affimed

Therapeutics公司)、以及描述于美国专利号8,691,952中的抗CD19抗体(huB4,DI B4,默克公司(Merck))。在一个或多个实施例中,长效IL-15受体激动剂和抗CD19抗体的组合可用于治疗B细胞恶性肿瘤,包括但不限于非霍奇金淋巴瘤、急性淋巴母细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(WM)。

[0100] CD20是大约33-37kD的非糖基化的磷蛋白,其在几乎所有正常和恶性B细胞的表面上表达。CD20 mAb可通过涉及效应子机制的激活的、Fab介导的作用发挥抗肿瘤作用(Boross等人,Am J Cancer[美国癌症研究杂志]2(6):676-690,2012)。在一个或多个实施例中,与本文所述的长效IL-15受体激动剂一起施用的抗体是抗CD20单克隆抗体。预期用于本文的方法和组合物中的一些示例性抗CD20抗体包括利妥昔单抗(**Rituxan®**,基因泰克公司(Genentech))、奥法木单抗(**Arzerra®**,Genmab公司(Genmab AC))、奥瑞珠单抗(ocrelizumab)(基因泰克公司)、维妥珠单抗(veltuzumab)(Immunomedics公司)、AME-133V(礼来公司(Eli Lilly))、PR0131921(基因泰克公司)、GA101(Gly cart公司/罗氏公司(Roche))、替伊莫单抗(Zevalin)、托西莫单抗(Bexxar)和奥滨尤妥珠单抗(**Gazyva®**,基因泰克公司)。在实施例中,如本文所述的长效IL-15受体激动剂和抗CD20抗体的组合可用于治疗B细胞恶性肿瘤,包括但不限于非霍奇金淋巴瘤、CLL、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)和滤泡性淋巴瘤。

[0101] CD38是具有受体和酶功能的45kDa II型跨膜糖蛋白。CD38通常在各种血液组织和实体组织中以低水平表达,但浆细胞以高水平表达CD38(在浆细胞肿瘤(如多发性骨髓瘤(MM))中显示出特别广泛且高表达的水平)。CD38也在血液肿瘤的子集中表达。在一些其他实施例中,本组合包括施用长效IL-15受体激动剂和抗CD38单克隆抗体。预期用于本文提供的方法和组合物中的一些示例性抗CD38抗体包括达雷木单抗(**DARZALEX®**,杨森生物科技公司(Janssen Biotech))、艾萨妥昔单抗(isatuximab)(SAR650984,赛诺菲肿瘤公司(Sanofi Oncology)) and MOR202(莫弗西斯公司)。在一些其他实施例中,长效IL-15受体激动剂和抗CD38抗体的组合可用于治疗选自以下的病状:多发性骨髓瘤、CD38+非霍奇金淋巴瘤、CDCLL、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、原发性系统性淀粉样变、套细胞淋巴瘤、急性淋巴母细胞性白血病、急性髓性白血病、NK细胞白血病、NK/T细胞淋巴瘤和浆细胞白血病。

[0102] 在一些另外的实施例中,基于治疗性免疫肿瘤学的组合包括如本文所述的长效IL-15受体激动剂和指向糖蛋白(选自但不限于SLAMF7、EpCAM、gpA3或叶酸结合蛋白(FBP))的抗体。在实施例中,该抗体是抗SLAMF7抗体、抗EpCAM抗体、抗gpA3抗体或抗FBP抗体。

[0103] 信号传导淋巴细胞激活分子家族成员7(SLAMF7,以前称为CS1、CD319、CRACC)是信号传导淋巴细胞激活分子家族的成员。SLAMF7在免疫细胞(例如B细胞、T细胞、树突细胞、NK T细胞和单核细胞)以及多发性骨髓瘤细胞上表达。在本组合的实施例中,该抗体是抗SLAMF7单克隆抗体。预期用于本文的方法和组合物中的一个示例性抗SLAMF7抗体是埃罗妥珠单抗(Emplicity™,百时美施贵宝公司(Bristol-Myers Squibb))。在实施例中,长效IL-15受体激动剂和抗SLAMF7抗体的组合可用于治疗多发性骨髓瘤。

[0104] 上皮细胞粘附分子(EpCAM)是一种跨膜糖蛋白,由许多包括胃肠道起源的肿瘤和某些泌尿生殖道癌症的上皮癌细胞表达。EpCAM在例如人结肠癌、转移性乳腺癌、胆囊癌、卵巢癌和胰腺癌中表达。在本文提供的治疗组合的实施例中,该抗体是抗EpCAM单克隆抗体。

预期用于本文的方法和组合物中的一些示例性抗EpCAM抗体包括依决洛单抗 (Panorex, 创新生物实验室公司 (Creative Biolabs))、ING-1 (Xoma公司)、3622W94 (创新生物实验室公司) 和阿迪妥单抗 (adecatumumab) (安进公司)。在一个或多个实施例中, 长效IL-15受体激动剂和抗EpCAM抗体的组合可用于治疗人结肠癌、转移性乳腺癌、胆囊癌、卵巢癌、腺癌和胰腺癌。

[0105] 在一些其他实施例中, 该抗体指向生长因子, 该生长因子选自但不限于例如血管内皮生长因子 (VEGF)、血管内皮生长因子受体 (VEGFR) 和表皮生长因子受体 (EGFR)。在一些实施例中, 该抗体选自抗VEGF抗体、抗VEGFR抗体和抗EGFR抗体。

[0106] 血管内皮生长因子 (VEGF) 是一种27kDa的血管生成信号传导蛋白。VEGF在包括胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌和肺癌在内的大多数类型的非消化道和消化道癌症中表达。预期用于本文的方法和组合物中的一些示例性抗VEGF抗体包括贝伐单抗 (**Avasatin®**, 基因泰克公司)、兰尼单抗、2C3和r84 (AT001, Affitech AS公司)、和VEGF-Trap (阿帕西普, 再生元制药公司 (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.))。在一个或多个实施例中, 长效IL-15受体激动剂和抗VEGF抗体的组合可用于治疗癌症, 例如胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌、转移性肾细胞癌和非小细胞肺癌。

[0107] 血管内皮生长因子受体 (VEGFR) 是一种受体酪氨酸激酶 (RTK), 其可以诱导血管生成、增加细胞生长和转移等。VEGFR家族具有三种主要亚型: VEGFR-1、VEGFR-2和VEGFR-3。预期用于本文的方法和组合物中的一些示例性抗VEGFR抗体包括MF1/IMC-18F1 (英克隆系统公司 (ImClone Systems))、IMC-1121B (英克隆系统公司) 和DC101/IMC-1C11。在一些其他实施例中, 长效IL-15受体激动剂和抗VEGFR抗体的组合可用于治疗癌症, 例如乳腺癌或非小细胞肺癌。在一些实施例中, 该抗VEGFR抗体可用于如上针对抗VEGF抗体所述的适应症。

[0108] 表皮生长因子受体 (EGFR) 是受体酪氨酸激酶的一大家族, 在多种类型的癌症中表达, 包括乳腺癌、肺癌、食管癌、转移性结直肠癌和头颈癌。预期用于本文的方法和组合物中的一些示例性抗EGFR抗体包括西妥昔单抗 (**Erbitux®**, 美国礼来公司 (Lilly USA)) 和帕尼单抗 (**Vectibix®**, 安进公司)。在一个或多个特定的实施例中, 该抗体是抗人表皮生长因子受体2抗体 (抗HER2)。预期用于本文的方法和组合物中的一些示例性抗HER2抗体包括人源化单克隆抗体曲妥珠单抗 (**Herceptin®**, 基因泰克公司) 和/或帕妥珠单抗 (**Perjeta®**, 基因泰克公司)。在一些相关的实施例中, 长效IL-15受体激动剂和抗EGFR抗体的组合可用于治疗癌症, 例如乳腺癌 (例如, 转移性乳腺癌)、肺癌、食管癌、转移性结直肠癌和头颈癌。

[0109] 还预期用于本文提供的方法和组合中的是抗BCMA (B细胞成熟抗原, 也称为CD269) 抗体。BCMA是肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 超家族的成员。BCMA结合B细胞激活因子 (BAFF) 和增殖诱导配体 (APRIL)。在非恶性细胞中, 据报道BCMA主要在浆细胞和成熟B细胞的子集中表达。在多发性骨髓瘤细胞中已检测到BCMA RNA, 并且在多发性骨髓瘤患者的浆细胞表面上已检测到BCMA蛋白。BCMA在各种人类癌症中表达或过表达。表达或过表达BCMA的癌症的实例包括但不限于伯基特淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL)、急性淋巴细胞性白血病 (ALL) 淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和多发性骨髓瘤。示例性的抗BCMA抗体描述于例如美国专利公

开号20120082661、20170051068和20180318435(其各自的全部内容通过引用并入本文)。示例性的抗BCMA抗体包括描述于Pillariseti, K. 等人, Blood[血液], 2016, 128:2116的BCMA_xXD3, 以及抗BCMA抗体药物缀合物GSK2857916的人源化抗体部分。

[0110] 在一些实施例中, 该抗体可以同时结合一个以上的特异性抗原, 例如, 双特异性抗体。

[0111] 在一些实施例中, 该抗体是与上述任何抗体交叉竞争结合的抗体。与上述任何一种抗体交叉竞争的抗体有望具有相似或相同的功能特性。

[0112] 在一些实施例中, 本文使用的抗体是如上所述的任何抗体的抗原结合部分, 如本领域众所周知的, 抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段来执行。

[0113] 现在转向长效IL-15受体(IL-15R)激动剂, 通常, 优选的长效IL-15受体激动剂或其药学上可接受的盐形式包含经由酰胺键联稳定地共价连接到IL-15氨基基团的单个线性聚烯化氧(例如聚乙二醇或“PEG”)部分。介于PEG部分与到IL-15氨基基团的稳定酰胺键联之间的是具有从2至5个碳原子的直链未取代的亚烷基基团($\sim\text{CH}_2\sim$)_m(即, m为2、3、4、或5)。在一个或多个优选的实施例中, m为3, 使得稳定的酰胺键为丁酰胺。

[0114] 在一个或多个优选的实施例中, 长效IL-15R激动剂为(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{20-60kD}白介素-15, 更优选为(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{20-40kD}白介素-15, 甚至更优选为(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kD}白介素-15。在一个或多个优选的实施例中, 长效IL-15R激动剂为单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{20-60kD}白介素-15, 更优选为单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{20-40kD}白介素-15, 甚至更优选为单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kD}白介素-15。在一个优选的实施例中, 长效IL-15R激动剂为单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kD}白介素-15。

[0115] 本文所述的具有式(I)所涵盖的结构IL-15R激动剂, 尤其是单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kD}白介素-15, 保留了对IL-15受体 α (IL-15R α)亚基以及 β 和 γ 亚基的结合亲和力。本文所述的长效IL-15R激动剂呈递给相同(顺式)或相邻细胞(反式)上的IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ 复合物。本文所述的长效IL-15R激动剂与IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ 复合物的接合可诱导Janus激酶/信号转导子和转录-5(JAK-STAT5)通路的激活剂, 这增加T细胞的增殖、存活和/或活性。长效IL-15R激动剂可进一步显著增强CD8⁺T细胞的增殖和激活。与相应的未修饰的IL-15R激动剂相比, 该长效IL-15R激动剂优选具有降低的清除率。不受理论的限制, 据推测, 与未缀合的rhIL-15相比, PEG的连接增加了IL-15部分的流体力学体积, 从而导致更长的有效半衰期、更低的最大峰浓度(C_{max})和/或降低的清除率。本文所述的长效IL-15R激动剂提供了持续的IL-15生物学活性, 而无需每日给药。

[0116] 当考虑IL-15部分时, 术语“IL-15部分”是指在缀合之前的IL-15部分以及在连接至非肽水溶性聚合物(例如PEG)之后的IL-15部分。虽然在下文特别提及的PEG为下文的非肽水溶性聚合物, 但应了解的是, 本披露总体上涉及非肽水溶性聚合物或聚(亚烷基二醇)。然而, 应了解的是, 当原始IL-15部分连接至聚乙二醇部分时, 由于存在与一种或多种聚合物的键联相关的一个或多个共价键而使IL-15部分轻微改变。

[0117] IL-15部分可以源自非重组方法和重组方法, 并且在此方面本披露不受限制。另外, IL-15部分可以源自人类来源、动物来源(包括昆虫)、真菌来源(包括酵母)、以及植物来源。

[0118] IL-15部分可以根据例如Grabstein等人描述的程序获得(Grabstein等人(1994))

Science[科学]264:965-968)。IL-15部分还可以使用重组方法,例如像英姆纳克斯公司(Immunex Corporation)的欧洲专利号0 772 624B2中所述的那些重组方法制备。可替代地,IL-15部分可以商购自例如金斯瑞美国有限公司(GenScript USA Inc.) (新泽西州皮斯卡特维(Piscataway NJ))和派普泰克公司(Peprotech) (新泽西州洛基山(Rockyhill, NJ))。

[0119] IL-15部分可以在细菌(例如大肠杆菌,参见例如,Fischer等人(1995) Biotechnol. Appl. Biotechnol. [生物技术与应用生物化学]21(3):295-311)、哺乳动物(参见例如,Kronman等人(1992) Gene [基因]121:295-304)、酵母(例如,毕赤酵母(*Pichia pastoris*),参见例如,Morel等人(1997) Biochem. J. [生物化学杂志]328(1):121-129)、以及植物(参见例如,Mor等人(2001) Biotechnol. Bioeng. [生物技术与生物工程]75(3):259-266)表达系统中表达。表达可以经由外源性表达(当宿主细胞天然地包含所希望的遗传编码时)或经由内源性表达来进行。

[0120] 制备和/或纯化IL-15部分的其他方法在PCT申请号PCT/US 2018/032817中描述,其通过引用以其全文并入本文。

[0121] 根据用于表达具有IL-15活性的蛋白质的系统,IL-15部分可以是非糖基化或糖基化的并且任一种都可以使用。在一个或多个实施例中,IL-15部分是非糖基化的。

[0122] 可以有利地修饰IL-15部分以包含和/或取代一个或多个氨基酸残基,例如像赖氨酸、半胱氨酸和/或精氨酸,以便使聚合物与氨基酸侧链内部的原子容易连接。IL-15部分的取代实例描述于美国专利号6,177,079中。另外,可以修饰IL-15部分以包含非天然存在的氨基酸残基。用于添加氨基酸残基和非天然存在的氨基酸残基的技术是为本领域普通技术人员众所周知的。参考J. March, Advanced Organic Chemistry: Reactions Mechanisms and Structure [高级有机化学:反应机理和结构], 第4版(纽约:Wiley-Interscience [威利出版公司], 1992), 以及Bioinformatics for Geneticists [遗传学工作者的生物信息学] (Michael R. Barnes和Ian C Gray编辑), 2003 John Wiley & Sons, Ltd [约翰威利父子有限公司], 第14章, Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions [氨基酸特性和取代的结果], Betts, M. J. 和 Russell, R. B.

[0123] 另外的用于IL-15部分的此类修饰的合适的修饰和方法在PCT申请号PCT/US 2018/032817中描述,其通过引用以其全文并入本文。示例性的修饰包括官能团的连接(除了通过添加含官能团的氨基酸残基之外),例如,包括硫醇基、N-末端 α 碳、一个或多个碳水化合物部分、醛基或酮基。在一些实施例中,优选的是IL-15部分不修饰成包括以下中的一种或多种:硫醇基、N-末端 α 碳、碳水化合物、醛基或酮基。

[0124] 在本文中、在文献中、并且在例如美国专利申请公开号US 2006/0104945, Pettit等人(1997) J. Biol. Chem. [生物化学杂志]272(4):2312-2318, Wong等人(2013) OncoImmunology [肿瘤免疫学]2(11), e26442:1-3, 以及PCT申请号PCT/US 2018/032817中描述了示例性IL-15部分,其各自的全部内容通过引用并入本文。优选的IL-15部分包括具有以下氨基酸序列的那些,该氨基酸序列包括选自SEQ ID NO:1至3组成的组的序列,以及基本上与其同源的序列(其中虽然SEQ ID NO 2和3、以及基本上与其同源的序列不满足本文提供的IL-15部分的体外活性标准,将理解的是为了本披露的目的,这些序列也被理解为“IL-15部分”)。优选的IL-15部分具有与SEQ ID NO:1对应的氨基酸序列。在一些实施例

中,IL-15部分是与SEQ ID NO:1-3中的任一种具有至少约85%或至少约90%同一性的功能同源物。在一些实施例中,IL-15部分是与SEQ ID NO:1-3中的任一种具有至少约95%、98%或99%同一性的功能同源物。

[0125] 在一些情况下,IL-15部分将处于“单体”形式,其中将相应肽的单一表达组织成离散单元。在其他情况下,IL-15部分将处于“二聚体”形式(例如重组IL-15的二聚体),其中蛋白质的两个单体形式彼此缔合。

[0126] 另外,IL-15的前体形式可以用作IL-15部分。IL-15的一种示例性前体形式具有序列SEQ ID NO:3。

[0127] 在一些实施例中,长效IL-15R激动剂是如美国公开的申请号2018/0360977中所述的PEG化的IL-15分子,并且特别是其中所述的多臂PEG IL-15。

[0128] 在一些实施例中,IL-15部分是IL-15突变蛋白或其他IL-15相关分子,如美国专利号10,350,270中所述。

[0129] 前述序列中任一项的截短形式、杂交变体、以及肽模拟物也可以充当IL-15部分。前述序列中任一项的维持至少一些程度的IL-15活性的生物活性片段、缺失变体、取代变体或添加变体也可以充当IL-15部分。

[0130] 对于任何给定的肽、蛋白质部分或缀合物,有可能确定该肽、蛋白质部分或缀合物是否具有IL-15活性。本领域中描述了用于确定体外IL-15活性的不同方法。示例性方法是基于pSTAT测定。简言之,如果将IL-15依赖性CTLL-2细胞暴露于具有IL-15活性的测试物品,可以定量地测量包括STAT5在酪氨酸残基694(Tyr694)处磷酸化的信号传导级联结果的开始。测定方案和试剂盒是已知的并且包括例如MSD磷酸(Tyr694)/总STATa,b全细胞溶解产物试剂盒(马里兰州盖瑟斯堡的Meso Scal Diagnostics公司(Meso Scal Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MD))。例如,使用该方法,展现出至少一个5分钟或10分钟不超过约300ng/mL(更优选不超过约150ng/mL)的pSTAT5 EC₅₀值的所提出的IL-15部分被认为是与本披露有关的“IL-15部分”。优选的是,然而,所使用的IL-15部分是更有效力的(例如,具有在至少5分钟或10分钟之一小于150ng/mL的pSTAT5 EC₅₀值,诸如小于约1ng/mL、并且甚至更优选至少一个5分钟或10分钟小于0.5ng/mL)。

[0131] 本领域中已知的其他方法也可以用于评估IL-15功能,包括量电法、分光光度法、色谱法以及辐射测量方法。对于一种这样的另外类型的测定,参见例如, Ring等人(2012) Nat. Immunol. [自然免疫学] 13 (12): 1187-1195。

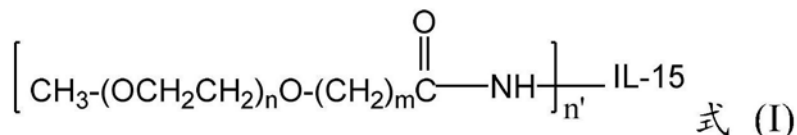
[0132] 与测量IL-15部分的活性相联系使用的测定也可以用于测量本文所述的长效IL-15受体激动剂的活性。参见例如,本文提供的支持性实例。

[0133] 只要在施用于受试者之后化合物展现出体内IL-15R激动性,持续的时间量比施用IL-15的情况更长,该激动剂就视为根据本披露的长效IL-15受体激动剂。可以使用常规方法,诸如涉及放射性标记化合物、将该化合物施用于体内、并测定其清除率的那些方法,可用于评估提出为长效IL-15受体激动剂的化合物是否是“长效”的(即,具有的清除率是否长于在相同体内系统中施用的IL-15的清除率)。出于本文的目的,长效IL-15受体激动剂的长效性质可以、并且典型地使用流式细胞术来测定以在施用有待在小鼠中评价的激动剂之后的不同时间点测量淋巴细胞中的STAT5磷酸化。作为参考,在IL-15的情况下信号丢失约24小时,但是持续时间段大于长效IL-15激动剂的时间段。

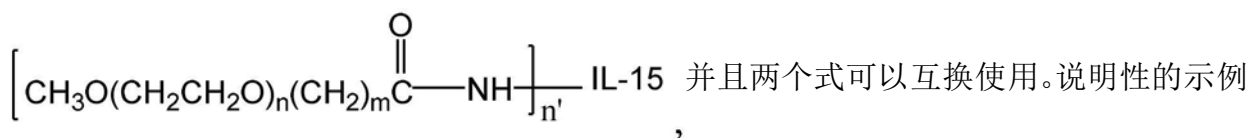
[0134] 优选的长效IL-15受体激动剂通常将包含经由酰胺键联稳定地共价连接至IL-15氨基基团的单个直链PEG(聚乙二醇)部分。介于PEG部分与到IL-15氨基基团的稳定酰胺键联之间的是具有从2至5个碳原子的直链未取代的亚烷基基团($\sim\text{CH}_2\sim$)_m(即,其中m=2、3、4、或5)。

[0135] 例如,在一些实施例中,该未取代的亚烷基基团是($\sim\text{CH}_2\sim$)₂;或者,在一些另外的实施例中,该未取代的亚烷基基团是($\sim\text{CH}_2\sim$)₃;在又一些其他实施例中,该未取代的亚烷基基团是($\sim\text{CH}_2\sim$)₄;在又一些其他实施例中,该未取代的亚烷基基团是($\sim\text{CH}_2\sim$)₅。

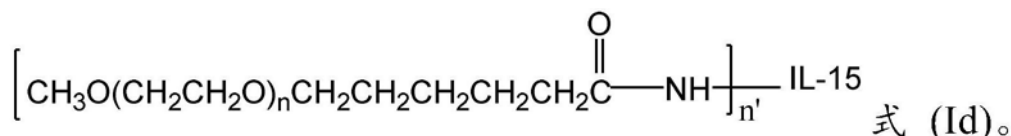
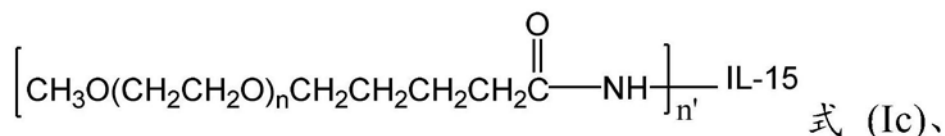
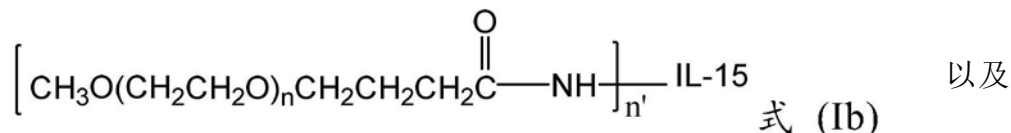
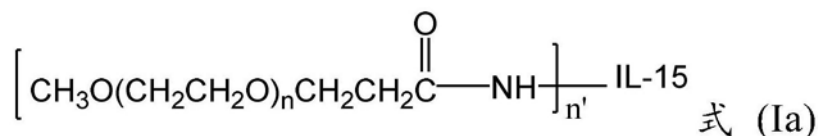
[0136] 例如,在一些实施例中,该长效IL-15受体激动剂具有以下结构:



其中IL-15是白介素-15部分,n是从约150至约3,000的整数;m是2-5的整数(例如,2、3、4或5)并且n'是1。在式I中(以及在本文提供的类似式中),结构中的 $\sim\text{NH}\sim$ 表示IL-15部分的氨基基团。式(I)还可以如下描绘,其中移动括号以反映末端PEG甲氧基基团,



性化合物包括由式(I)涵盖的以下化合物:



[0137] 在一些优选的实施例中,长效IL-15受体激动剂对应于式(Ia)或式(Ib)。在一些特别优选的实施例中,长效IL-15受体激动剂对应于式(Ib)。

[0138] 在一些其他实施例中,关于本文所述的结构和式,n是从约200至约2000、或从约400至约1300、或从约450至约1200的整数。也就是说,在一些实施例中,n是从约200至约2000的整数。在又一些其他实施例中,n是从约400至约1300的整数。在又一些其他实施例中,n是从约450至约1200的整数。

[0139] 具有对应于n值的前述范围中的任一个的分子量的PEG通常是优选的。

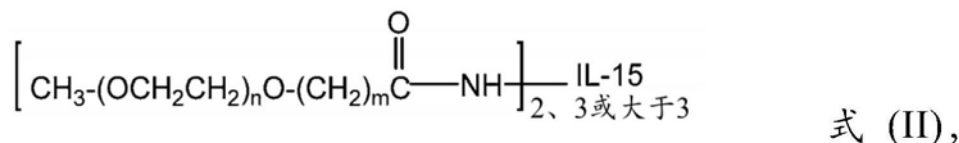
[0140] 在一个或多个另外的实施例中,n是具有对应于具有选自下组的重均分子量的聚乙二醇聚合物的值的整数,该组由以下组成:约10,000道尔顿(其中n是约227)、或约15,000道尔顿(其中n是约340)、或约20,000道尔顿(其中n是约454)、或约25,000道尔顿(其中n是约568)、或约30,000道尔顿(其中n是约681)、或约40,000道尔顿(其中n是约907至909,例如约909)、或约50,000道尔顿(其中n是约1136)或甚至约60,000道尔顿(其中n是约1364)。

[0141] 除了前述重均分子量之外,化合物的聚乙二醇部分的其他示例性重均分子量包括约11,000道尔顿、约12,000道尔顿、约13,000道尔顿、约14,000道尔顿、约22,500道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿、约55,000道尔顿、约65,000道尔顿、约70,000道尔顿、和约75,000道尔顿。在一些实施例中,IL-15缀合物的聚乙二醇部分的重均分子量为约37,000至约45,000道尔顿。

[0142] 在一些优选的实施例中,IL-15缀合物的聚乙二醇聚合物部分的重均分子量是约40,000道尔顿。关于本文所述的式(I)和(II)中的每一个,包括其任何子式,优选PEG的重均分子量为40,000道尔顿。

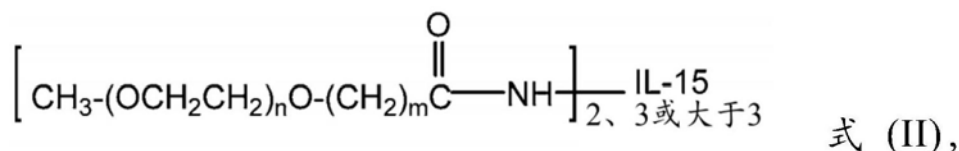
[0143] 虽然PEG部分优选地如上文式(I)中所示用甲氧基基团进行末端封端,但PEG部分可以在其末端以任何低级C₁₋₆烷氧基基团封端,或者可以以羟基基团、或其他适合的末端封端基团封端。

[0144] 在一些实施例中,长效IL-15受体激动剂包含在共同考虑时不超过约20摩尔百分比(mol%)的由下式涵盖的长效IL-15受体激动剂(该组合物中含IL-15的分子):



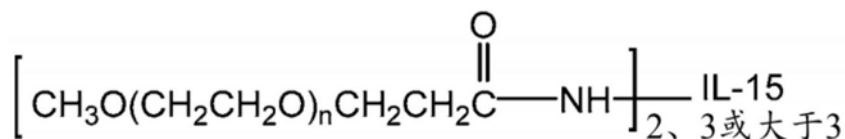
其中n和m的值如上文针对式(I)所提供。也就是说,单PEG化的长效IL-15受体激动剂,例如式(I)、(Ia)、(Ib)、(Ic)和(Id)中的任一个,例如式(Ib),例如,当包含在长效IL-15受体激动剂化合物的组合物(例如具有相同化学式但具有共价连接至白介素-15部分的不同数目PEG部分(例如2聚体、3聚体等))中时,包含不超过约20摩尔百分比的具有式(II)的长效IL-15受体激动剂。

[0145] 在一些另外的实施例中,长效IL-15受体激动剂组合物包含在共同考虑时不超过约15摩尔百分比(mol%)的由下式涵盖的长效IL-15受体激动剂(该组合物中含IL-15的分子):



其中n和m的值如上文针对式(I)所提供。也就是说,就这类组合物的长效IL-15受体激动剂组分而言,所述组合物中包含的不超过约15mol%的长效IL-15受体激动剂具有式(II)。在一些实施例中,长效IL-15受体激动剂组合物包含不超过约0.1-20mol%的具有式(II)的化合物。在实施例中,这些组合物包含不超过约0.1-15、0.1-10、0.1-5、0.1-1、1-20、1-15、1-10、1-5、5-20、5-15、5-10、10-20、10-15、或15-20mol%的具有式(II)的化合物。优选的实施例是其中式(II)中的“m”为3的那些。

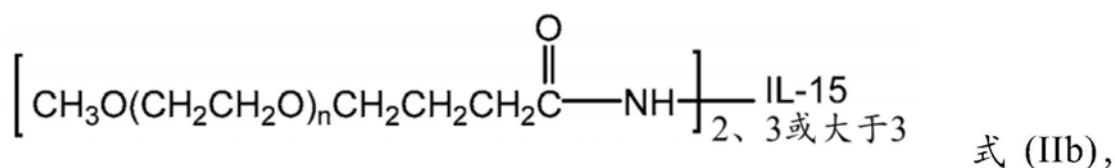
[0146] 在与前述相关的一些特定实施例中,关于式 (Ia),长效IL-15受体激动剂组合物包含在共同考虑时不超过约15摩尔百分比 (mol%) 的由下式涵盖的长效IL-15受体激动剂(该组合物中含IL-15的分子):



式 (IIa),

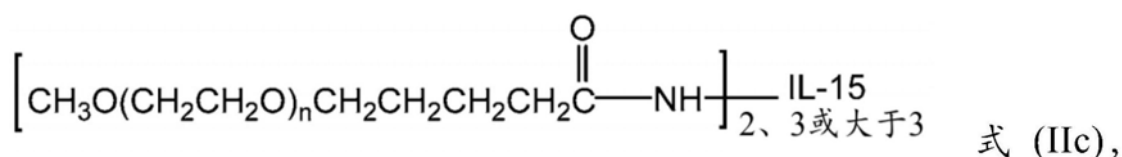
其中n和m的值如上文针对式 (Ia) 所提供。

[0147] 在一些特别优选的实施例中,关于式 (Ib),长效IL-15受体激动剂组合物包含在共同考虑时不超过约15摩尔百分比 (mol%) 的由下式涵盖的长效IL-15受体激动剂(该组合物中含IL-15的分子):



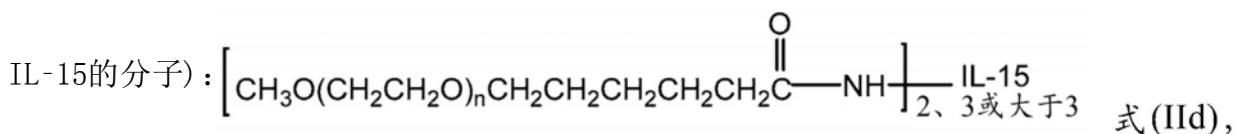
其中n和m的值如上文针对式 (Ib) 所提供。

[0148] 在一些其他实施例中,关于式 (Ic),长效IL-15受体激动剂组合物包含在共同考虑时不超过约15摩尔百分比 (mol%) 的由下式涵盖的长效IL-15受体激动剂(该组合物中含IL-15的分子):



其中n和m的值如上文针对式 (Ic) 所提供。

[0149] 在一些其他实施例中,关于式 (Id),长效IL-15受体激动剂组合物包含在共同考虑时不超过约15摩尔百分比 (mol%) 的由下式涵盖的长效IL-15受体激动剂(该组合物中含



其中n和m的值如上文针对式 (Id) 所提供。

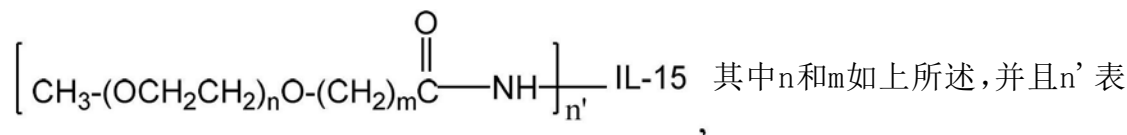
[0150] 在一些实施例中,长效IL-15受体激动剂包含不超过约0.1-20mol%的具有式 (II) 的化合物,这些化合物包括具有式 (IIa)、(IIb)、(IIc)、和 (IId) 的化合物。在一些另外的实施例中,这些组合物包含不超过约0.1-15、0.1-10、0.1-5、0.1-1、1-20、1-15、1-10、1-5、5-20、5-15、5-10、10-20、10-15、或15-20mol%的具有式 (II) 的化合物,这些化合物包括具有 (IIa)、(IIb)、(IIc)、和 (IId) 的化合物。在一些实施例中,这些组合物包含不超过约0.1、1、5、10、15、或20mol%的具有式 (II) 的化合物,这些化合物包括具有式 (IIa)、(IIb)、(IIc)、和 (IId) 的化合物。应当理解,可以通过本领域已知的方法针对具有式 (I) 的化合物纯化这些组合物,从而使得没有、痕量的、或基本上没有具有式 (II) 的化合物存在于该组合物中。

[0151] 例如,在一些实施例中,长效IL-15受体激动剂组合物包含在共同考虑时不超过约

12摩尔百分比、或不超过约10摩尔百分比的由式 (II) 涵盖的长效IL-15受体激动剂,包括具有式 (IIa)、(IIb)、(IIc)、和 (IId) 的化合物。

[0152] 在所述的一些另外的实施例中,该组合物包含不超过约7mol%的n' 等于2、3或大于3 (即,高级PEG聚体) 的长效IL-15受体激动剂。在又一些其他实施例中,该组合物包含不超过约5mol%的n' 等于2、3或大于3 (即,2或更大) 的长效IL-15受体激动剂。

[0153] 在一些其他实施例中,所述组合物包含根据式 (I) 的长效IL-15受体激动剂,



(针对组合物的) 共价连接至IL-15氨基基团的聚乙二醇部分的平均数目,并且针对组合物的n' 在从1.0至约1.3的范围内。例如,每个IL-15部分的聚乙二醇部分的平均数目选自约1.0、1.1、1.2和约1.3。也就是说,优选的根据式 (I) 的长效IL-15受体激动剂在本文中可以称为“单PEG化”,其中应理解,关于如上所述的PEG化度存在一定可变性。在关于本文所述的式的一些优选的实施例中,“m”等于3。

[0154] 长效IL-15受体激动剂的组合物可以包含单一物质,其中n' 等于约1并且该组合物中基本上所有的IL-15缀合物的PEG部分连接在同一位置;或可替代地,可以包含单PEG化缀合物物质的混合物,其中直链聚乙二醇部分的连接发生在白介素-15部分上的不同位点,也就是说,其中组合物中包含的所有单PEG化IL-15物质的具体连接位点并不相同。因此,这类组合物就连接至IL-15的PEG部分的数目而言是基本上均质的 (例如,1聚体),但就IL-15分子上氨基基团连接的位置而言是异质的。

[0155] 虽然另外的PEG体系结构和键联化学可以用于实现长效IL-15受体激动剂,但诸如前文描述的化合物在一个或多个实施例中是优选的,如在根据支持性实例考虑时将变得显而易见的。然而,还涵盖具有如本文提供的结构的另外的长效IL-15受体激动剂。

[0156] 在一些实施例中,长效IL-15受体激动剂组合物包含在共同考虑时至少约80mol%的由式 (I) (包括式 (Ia-I d)) 涵盖的长效IL-15受体激动剂 (该组合物中含IL-15的分子)。在一个或多个实施例中,长效IL-15受体激动剂组合物包含至少约85mol%、90mol%、95mol%、98mol%或99mol%的具有式 (I) 的长效IL-15受体激动剂,其中特别优选的式是式 (Ib) 的式。

[0157] 本文所述的每种化合物 (包括长效IL-15受体激动剂) 意在明确包括药学上可接受的盐形式的此类化合物。典型地,此类盐 (例如,碱性化合物的盐) 通过与药学上可接受的酸或酸等效物反应而形成。术语“药学上可接受的盐”在此方面通常将是指相对无毒的无机或有机酸加成盐。这些盐可以在施用媒介物或剂型制造过程中原位制备,或通过将如本文所述的长效白介素-15受体激动剂与适合的有机酸或无机酸分别反应并分离因此形成的盐来制备。代表性盐包括但不限于氢溴酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、硝酸盐、乙酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、月桂酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲苯磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、萘酸盐 (naphylate)、草酸盐、甲磺酸盐、葡庚糖酸盐、乳糖醛酸盐、和月桂基磺酸盐等。(参见,例如Berge等人 (1977) “Pharmaceutical Salts [药用盐]”, J. Pharm. Sci. [药物科学杂志] 66:1-19)。因此,如所描述的盐可以衍生自无机酸,这些无机酸诸如盐酸、氢溴酸、硫酸、氨基磺酸、磷酸、硝酸等;或

由有机酸制备,这些有机酸诸如乙酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、棕榈酸、马来酸、羟基马来酸、苯基乙酸、谷氨酸、苯甲酸、水杨酸、磺胺酸、2-乙酰氧基苯甲酸、富马酸、甲苯磺酸、甲烷磺酸、乙烷二磺酸、草酸、衣康酸等。

[0158] 在一些实施例中,长效IL-15受体激动剂组合物包含在共同考虑时不超过约1-5mol%的游离IL-15蛋白质(该组合物中含IL-15的分子)。在一些其他实施例中,长效IL-15激动剂组合物包含不超过约0.5mol%、1mol%、2mol%、3mol%、4mol%、或5mol%的游离(即,未缀合的)IL-15。

[0159] 为制备长效IL-15受体激动剂,IL-15部分可以例如在其氨基基团(例如,赖氨酸或N-末端)处与用琥珀酰亚胺基基团(或其他激活的酯基团)官能化的PEG试剂缀合。使用该方法,经琥珀酰亚胺基激活的PEG可以在水性介质中在约7.0到9.0的pH下与IL-15部分上的氨基基团连接,不过使用不同的反应条件(例如,诸如6至7或7至8的更低pH,或不同温度和/或小于15℃)可以导致PEG部分与IL-15部分上的不同位置连接。

[0160] 制备长效IL-15受体激动剂的示例性方法描述于PCT申请号PCT/US 2018/032817,例如实施例1-2中,其通过引用以其全文并入本文。在一示例性实施例中,通常可以通过使白介素-15(例如,经纯化的IL-15,诸如重组IL-15)与经激活的PEG试剂(诸如,激活的酯、甲氧基PEG-琥珀酰亚胺丁酸酯、mPEG-SBA)反应来制备长效IL-15受体激动剂。其他适合的经激活的PEG试剂包括丙酸甲氧基PEG-琥珀酰亚胺酯、戊酸甲氧基PEG-琥珀酰亚胺酯、和己酸甲氧基PEG-琥珀酰亚胺酯。虽然典型地使用琥珀酰亚胺基激活基团,但可以使用任何适合的活性酯或激活基团,其中这种反应基团适合于形成所希望的稳定酰胺键联。然后通常可以通过任何适合的方法(例如,离子交换色谱法)来纯化PEG化的IL-15反应产物以获得所希望的产物。例如,可以采用阴离子交换色谱法。然后将色谱法产物池浓缩并使用例如切向过滤(TFF)渗滤到适合的配制品缓冲液(例如,含蔗糖的乙酸钠缓冲液)中。可以通过任何适合的方法进行分析,该方法例如像SDS-PAGE、反相HPLC或任何其他适合的分析方法。

[0161] 如先前所述,IL-15部分上的氨基基团在IL-15部分与聚乙二醇部分之间提供连接位点以提供诸如由式(I)涵盖的长效IL-15受体激动剂。考虑到本文提供的示例性IL-15氨基酸序列,显然的是存在各自具有可用于缀合至少SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的ε-氨基酸的七个赖氨酸残基。此外,甲硫氨酸的N-末端胺也可以充当与PEG部分的连接点。应当理解,聚乙二醇部分可以在赖氨酸或N-末端胺位置中的任何一个或多个处连接。在一些实施例中,聚乙二醇部分连接位点位于Lys¹⁰和Lys¹¹(使用如例如SEQ ID NO:2中所示的编号或使用SEQ ID NO:1的Lys¹¹和Lys¹²)中的一个或多个处。在一些实施例中,聚乙二醇部分在N-末端胺处连接。应当理解,赖氨酸位点中的任何一个都可以适合作为PEG部分的连接位点(例如SEQ ID NO:1的Lys³⁷或Lys⁴²)。在一些实施例中,长效白介素-15受体激动剂包括位置异构体的混合物,其中聚乙二醇部分的共价连接主要位于N-末端(也就是说,在位置异构体的集合中,与其他位置异构体相比时,具有在N-末端连接的PEG部分的异构体以最高量存在)。

[0162] 如果希望,则产物池可以通过以下方式进一步分离为位置异构体:反相色谱法,使用反相高效液相色谱法(RP-HPLC),使用适合的柱(例如可从诸如安玛西亚生物科学公司(Amersham Biosciences)或维达克(Vydac)的公司商购获得的C18柱或C3柱);或离子交换色谱法,使用离子交换柱,例如可从安玛西亚生物科学公司获得的Sephacrose™离子交换柱。可以使用任一方法来分离具有相同分子量的PEG-白介素-15位置异构体(即位置同种

型)。

[0163] 已发现本发明长效IL-15受体激动剂具有某些显著且有利的特征。虽然据信下文所述的特征大体适用于如本文提供并由式(I)涵盖的化合物,但以下一个或多个特征可以特别由根据式(Ib)并且引申开来根据式(IIb)的化合物展现出。长效IL-15受体激动剂可以具有以下特征中的一个或多个。例如,在一些实施例中,所述长效IL-15受体激动剂与未经修饰的IL-15相比时展现出EC₅₀值(ng/mL,CTLL-2pSTAT5)不超过约7倍的减少。例如,在一个或多个相关实施例中,所述长效IL-15受体激动剂与IL-15相比时展现出EC₅₀值(ng/mL,CTLL-2pSTAT5)的不超过约6.5倍的减少、或EC₅₀值(ng/mL,CTLL-2pSTAT5)的不超过约6倍的减少、或EC₅₀值(ng/mL,CTLL-2pSTAT5)的不超过约5.5倍的减少、或EC₅₀值(ng/mL,CTLL-2pSTAT5)的不超过约5倍的减少、或EC₅₀值(ng/mL,CTLL-2pSTAT5)的不超过约4.5倍的减少、或EC₅₀值(ng/mL,CTLL-2pSTAT5)的不超过约4倍的减少、或EC₅₀值(ng/mL,CTLL-2pSTAT5)的不超过约3.5倍的减少、或甚至EC₅₀值(ng/mL,CTLL-2pSTAT5)的不超过约3倍的减少。根据上述特征的示例性长效IL-15受体激动剂在本文和PCT申请号PCT/US2018/032817中描述,其通过引用以其全文并入本文。

[0164] 组合物中包含的长效IL-15受体激动剂的量将根据多个因素而改变,但是当该组合物在单位剂量容器(例如,小瓶)中储存时它最佳地将是治疗有效剂量。另外,可以将药物制剂收纳在注射器中。治疗有效剂量可以通过重复施用渐增量的长效IL-15受体激动剂以便确定产生如本文所述的临床上所希望的终点的量来以实验方式确定。组合物中任何单独赋形剂的量将根据赋形剂的活性和组合物的特定需要而变化。典型地,任何单独赋形剂的最佳量通过常规实验确定,即通过制备含有不同量的赋形剂(范围从低到高)的组合物,检查稳定性和其他参数,并且然后确定在没有显著不利作用的情况下获得最佳性能的范围。

[0165] 该方法的每种药理学组分可以分开施用。可替代地,如果希望同时施用两种药理学组分--并且这两种药理学组分是一起且在给定配制品中相容的--那么该同时施用可以经由施用单一剂型/配制品(例如,静脉内施用包含两种药理活性剂的静脉内配制品)来实现。本领域的普通技术人员可以通过常规测试确定两种给定药理学组分是否一起且在一种给定配制品中相容。应当理解,抗体和长效IL-15受体激动剂可以以任何顺序施用。此外,可以根据需要将抗体和长效IL-15受体激动剂的施用间隔数分钟、数小时或数天。

[0166] 关于施用该长效IL-15受体激动剂的频率,本领域普通技术人员将能够确定适当的频率。例如,临床医生可以决定相对不频繁地(例如,每两周或三周一次)施用该长效IL-15受体激动剂并且逐渐缩短患者耐受的给药之间的周期。关于施用抗体的频率,可以按类似的方式来确定这些药剂的频率。此外,因为本文所述的一些长效IL-15受体激动剂以及抗体处于高级临床测试中或可商购获得,所以还可能的是参考文献来获得一个适当的施用频率(记住鉴于治疗方案的组合作用,一些调整可能是必要的)。

[0167] 在一些治疗方案中,长效IL-15受体激动剂在治疗开始时以单剂量施用。将抗体与长效IL-15受体激动剂同时施用,在施用长效IL-15受体激动剂之前,或者在施用长效IL-15受体激动剂之后施用。例如,在一些治疗方式中,在施用长效IL-15受体激动剂的7-14天内(之前或之后)施用抗体(例如,在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天中的任何一天),其中第1天表示治疗的开始。基于长效IL-15受体激动剂的长效性质,这种化合物可以相对不频繁地施用(例如,每三周一次、每两周一次、每8-10天一次、每周一次、每三天一次

等)。此外,抗体可以根据批准的时间表(例如每天一次、每周两次或三次、每周一次、每两周一次等)施用。在一个示例性时间表中,长效IL-15R激动剂在第一天和此后每21天施用。从施用长效IL-15R激动剂后7-14天开始,每周一次、每两周一次或每月施用抗体。应当理解,长效IL-15R激动剂和抗体中的一者或两者的给药方案可以在治疗期间进行调整。例如,长效IL-15R激动剂和/或抗体可以每周施用一段时间(例如4-8周),然后每两周一次或每月一次施用一段时间。

[0168] 本文描述的治疗方法可以持续长达监督患者的护理的临床医生认为该治疗方法有效的时间。指示该治疗方法有效的非限制性参数包括以下:肿瘤缩小(就重量和/或体积而言);个体肿瘤集落的数量减少;肿瘤消除;以及无进展存活。

[0169] 与本文所述的治疗过程相关的示例性时间长度包括:约一周;两周;约三周;约四周;约五周;约六周;约七周;约八周;约九周;约十周;约十一周;约十二周;约十三周;约十四周;约十五周;约十六周;约十七周;约十八周;约十九周;约二十周;约二十一周;约二十二周;约二十三周;约二十四周;约七个月;约八个月;约九个月;约十个月;约十一个月;约十二个月;约十三个月;约十四个月;约十五个月;约十六个月;约十七个月;约十八个月;约十九个月;约二十个月;约二十一个月;约二十二个月;约二十三个月;约二十四个月;约三十个月;约三年;约四年以及约五年。应当理解,抗体和长效IL-15受体激动剂的给药频率可以相同或不同。此外,可以适当地设计抗体和/或长效IL-15受体激动剂的给药频率或方案,以实现受体的持续占用/与抗原的持续结合。

[0170] 任选地,抗体和/或长效IL-15受体激动剂包含在组合物中,该组合物还包含一种或多种药学上可接受的赋形剂。示例性赋形剂包括但不限于选自下组的那些赋形剂,该组由以下组成:碳水化合物、无机盐、抗微生物剂、抗氧化剂、表面活性剂、缓冲剂、酸、碱、氨基酸、及其组合。

[0171] 碳水化合物,诸如糖、衍生化糖(诸如糖醇、醛糖酸、酯化糖和/或糖聚合物),可以作为赋形剂存在。具体的碳水化合物赋形剂包括,例如:单糖,诸如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等;二糖,诸如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等;多糖,诸如棉子糖、松三糖、麦芽糖糊精、葡聚糖、淀粉等;以及糖醇,诸如甘露糖醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇、山梨糖醇(葡萄糖醇)、吡喃糖基山梨糖醇、肌醇、环糊精等。

[0172] 赋形剂还可以包括无机盐或缓冲剂,诸如柠檬酸、氯化钠、氯化钾、磷酸钾、硫酸钠、硝酸钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠以及其组合。

[0173] 所述一种或多种组合物还可以包含用于防止或遏制微生物生长的抗微生物剂。适合于本披露的一个或多个实施例的抗微生物剂的非限制性实例包括苯扎氯铵、苄索氯铵、苯甲醇、十六烷基吡啶氯化物、氯丁醇、苯酚、苯乙醇、硝酸苯汞、硫柳汞(thimersol)、及其组合。

[0174] 抗氧化剂也可以存在于组合物中。抗氧化剂用于防止氧化,由此防止缀合物或制剂的其他组分的变质。适用于本披露的一个或多个实施例的抗氧化剂包括例如棕榈酸抗坏血酸酯、丁基化羟基苯甲醚、丁基化羟基甲苯、次磷酸、单硫代甘油、没食子酸丙酯、亚硫酸氢钠、甲醛次硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、及其组合。

[0175] 表面活性剂可以作为赋形剂存在。示例性表面活性剂包括:聚山梨醇酯,诸如“吐温20”和“吐温80”以及普郎尼克(pluronic),诸如F68和F88(两者均可从新泽西州芒特奥

利夫的巴斯夫公司 (BASF, Mount Olive, New Jersey) 获得); 脱水山梨糖醇酯; 脂质, 诸如磷脂, 诸如卵磷脂和其他磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺 (但是优选不呈脂质体形式)、脂肪酸和脂肪酯; 类固醇, 诸如胆固醇; 以及 IL-15 螯合剂, 诸如 EDTA、锌和其他此类适合的阳离子。

[0176] 酸或碱可以作为赋形剂存在于组合物中。可以使用的酸的非限制性实例包括选自下组的那些, 该组由以下组成: 盐酸、乙酸、磷酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、甲酸、三氯乙酸、硝酸、高氯酸、磷酸、硫酸、富马酸、及其组合。适合的碱的实例包括但不限于选自下组的碱, 该组由以下组成: 氢氧化钠、乙酸钠、氢氧化铵、氢氧化钾、乙酸铵、乙酸钾、磷酸钠、磷酸钾、柠檬酸钠、甲酸钠、硫酸钠、硫酸钾、富马酸钾、及其组合。

[0177] 一种或多种氨基酸可以作为赋形剂存在于本文描述的组合物中。在此方面, 示例性氨基酸包括精氨酸、赖氨酸以及甘氨酸。另外的适合的药学上可接受的赋形剂包括例如在 Handbook of Pharmaceutical Excipients [药物赋形剂手册], 第 7 版, Rowe, R.C. 编辑, Pharmaceutical Press [医药出版社], 2012 中描述的那些。

[0178] 在一些实施例中, 长效 IL-15 受体激动剂包含在包含磷酸钾和海藻糖的组合物中。在一些实施例中, 组合物是包含无菌注射用水的液体配制品。在一些其他实施例中, 组合物是适于重构的冻干粉末。

[0179] 根据本文所述的方法, 将长效 IL-15 受体激动剂和抗体以治疗有效量施用于患者。本领域普通技术人员可以确定多少给定的长效 IL-15 受体激动剂和/或抗体足以提供临床上相关的量 (例如, IL-15 受体或与所需的受体/抗原结合的抗体的分别的激动活性)。例如, 本领域的普通技术人员可以参考文献和/或施用一系列增加量的该长效 IL-15 受体激动剂并且确定哪个或哪些量提供 IL-15 的临床激动活性。应当理解, 长效 IL-15 受体激动剂和抗体中任一者或两者的治疗量可能低于单独施用任一组分的治疗有效量。施用本文所述的长效 IL-15 受体激动剂与抗体的组合的协同作用允许以较低的剂量施用 (对于组合中的一种或两种组分), 或允许在任一组分的单独确定的剂量下具有更高的疗效。通常, 抗体的治疗有效量为约 0.01 至约 100mg/kg, 包括端点。在一些特定但非限制性的实施例中, 抗体以约 0.01-50mg/kg、约 0.05-50mg/kg、约 0.1-50mg/kg、约 0.5-50mg/kg、约 1-50mg/kg、约 5-50mg/kg、约 10-50mg/kg、约 15-50mg/kg、约 20-50mg/kg、约 30-50mg/kg、约 40-50mg/kg、约 0.01-40mg/kg、约 0.05-40mg/kg、约 0.1-40mg/kg、约 0.5-40mg/kg、约 1-40mg/kg、约 5-40mg/kg、约 10-40mg/kg、约 15-40mg/kg、约 20-40mg/kg、约 30-40mg/kg、约 0.01-30mg/kg、约 0.05-30mg/kg、约 0.1-30mg/kg、约 0.5-30mg/kg、约 1-30mg/kg、约 5-30mg/kg、约 10-30mg/kg、约 15-30mg/kg、约 20-30mg/kg、约 0.05-25mg/kg、约 0.1-25mg/kg、约 0.5-25mg/kg、约 1-25mg/kg、约 5-25mg/kg、约 10-25mg/kg、约 15-25mg/kg、约 20-25mg/kg、约 0.01-20mg/kg、约 0.05-20mg/kg、约 0.1-20mg/kg、约 0.5-20mg/kg、约 1-20mg/kg、约 5-20mg/kg、约 10-20mg/kg、约 15-20mg/kg、约 0.01-15mg/kg、约 0.05-15mg/kg、约 0.1-15mg/kg、约 0.5-15mg/kg、约 1-15mg/kg、约 5-15mg/kg、约 10-15mg/kg、约 0.01-10mg/kg、约 0.05-10mg/kg、约 0.1-10mg/kg、约 0.5-10mg/kg、约 1-10mg/kg、约 5-10mg/kg、约 0.1-5mg/kg、约 0.5-5mg/kg、约 1-5mg/kg、约 0.1-1mg/kg、约 0.5-1mg/kg kg、或约 0.1-0.05mg/kg 的剂量施用或包含在组合物中。在一些实施例中, 抗体以约 0.01mg/kg、约 0.05mg/kg、约 0.1mg/kg、约 0.5mg/kg、约 1mg/kg、约 1.5mg/kg、约 5mg/kg、约 10mg/kg、约 15mg/kg、约 16mg/kg、约 20mg/kg、约 25mg/kg、约 30mg/kg、约 40mg/kg 或约 50mg/kg 的剂量施用。应当理解, 抗体的治疗有效量可以是政府监管机构

批准的任何剂量。

[0180] 在一些实施例中,抗体是利妥昔单抗,并且治疗有效量在每次施用约 $100\text{mg}/\text{m}^2$ - $750\text{mg}/\text{m}^2$ 的范围内,包括端点。在实施例中,治疗有效量在每次施用约 $100\text{mg}/\text{m}^2$ - $500\text{mg}/\text{m}^2$ 、约 $150\text{mg}/\text{m}^2$ - $500\text{mg}/\text{m}^2$ 、约 $200\text{mg}/\text{m}^2$ - $500\text{mg}/\text{m}^2$ 、约 $375\text{mg}/\text{m}^2$ - $500\text{mg}/\text{m}^2$ 或约 $400\text{mg}/\text{m}^2$ - $500\text{mg}/\text{m}^2$ 的范围内。在一些实施例中,抗体以约 $100\text{mg}/\text{m}^2$ 、约 $150\text{mg}/\text{m}^2$ 、约 $200\text{mg}/\text{m}^2$ 、约 $250\text{mg}/\text{m}^2$ 、约 $375\text{mg}/\text{m}^2$ 、约 $400\text{mg}/\text{m}^2$ 、约 $500\text{mg}/\text{m}^2$ 或约 $750\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量施用。

[0181] 在一些实施例中,抗体是达雷木单抗,并且治疗有效量在每次施用约 $10\text{mg}/\text{kg}$ - $50\text{mg}/\text{kg}$ 的范围内,包括端点。在实施例中,治疗有效量在每次施用约 10 - $25\text{mg}/\text{kg}$ 、约 10 - $20\text{mg}/\text{kg}$ 、约 10 - $16\text{mg}/\text{kg}$ 、约 10 - $15\text{mg}/\text{kg}$ 、约 15 - $50\text{mg}/\text{kg}$ 、约 15 - $25\text{mg}/\text{kg}$ 、约 15 - $20\text{mg}/\text{kg}$ 、约 16 - $50\text{mg}/\text{kg}$ 、约 16 - $25\text{mg}/\text{kg}$ 或约 16 - $20\text{mg}/\text{kg}$ 的范围内。在一些实施例中,抗体以每次施用约 $10\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $15\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $16\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $20\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $25\text{mg}/\text{kg}$ 或约 $50\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量施用。

[0182] 在一些实施例中,抗体是西妥昔单抗,并且治疗有效量在每次施用约 $100\text{mg}/\text{m}^2$ - $750\text{mg}/\text{m}^2$ 的范围内,包括端点。在实施例中,治疗有效量在每次施用约 $100\text{mg}/\text{m}^2$ - $500\text{mg}/\text{m}^2$ 、约 $150\text{mg}/\text{m}^2$ - $500\text{mg}/\text{m}^2$ 、约 $200\text{mg}/\text{m}^2$ - $500\text{mg}/\text{m}^2$ 、约 $250\text{mg}/\text{m}^2$ - $500\text{mg}/\text{m}^2$ 、约 $400\text{mg}/\text{m}^2$ - $500\text{mg}/\text{m}^2$ 、约 $200\text{mg}/\text{m}^2$ - $400\text{mg}/\text{m}^2$ 、约 $250\text{mg}/\text{m}^2$ - $400\text{mg}/\text{m}^2$ 或约 $300\text{mg}/\text{m}^2$ - $400\text{mg}/\text{m}^2$ 的范围内。在一些实施例中,抗体以约 $100\text{mg}/\text{m}^2$ 、约 $150\text{mg}/\text{m}^2$ 、约 $200\text{mg}/\text{m}^2$ 、约 $250\text{mg}/\text{m}^2$ 、约 $400\text{mg}/\text{m}^2$ 、约 $500\text{mg}/\text{m}^2$ 或约 $750\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量施用。

[0183] 在一些实施例中,抗体是曲妥珠单抗,并且治疗有效量在每次施用约 $1\text{mg}/\text{kg}$ - $20\text{mg}/\text{kg}$ 的范围内。在实施例中,治疗有效量在约 2 - $20\text{mg}/\text{kg}$ 、约 2 - $15\text{mg}/\text{kg}$ 、约 2 - $10\text{mg}/\text{kg}$ 、约 2 - $8\text{mg}/\text{kg}$ 、约 2 - $6\text{mg}/\text{kg}$ 、 2 - $4\text{mg}/\text{kg}$ 、约 4 - $10\text{mg}/\text{kg}$ 、约 4 - $8\text{mg}/\text{kg}$ 、约 4 - $6\text{mg}/\text{kg}$ 、约 6 - $10\text{mg}/\text{kg}$ 、约 6 - $8\text{mg}/\text{kg}$ 或约 8 - $10\text{mg}/\text{kg}$ 的范围内。在一些实施例中,抗体以约 $1\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $2\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $3\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $4\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $5\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $6\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $7\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $8\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $9\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $10\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $15\text{mg}/\text{kg}$ 或约 $20\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量施用。

[0184] 将理解的是,剂量可以通过本领域已知的方法确定,并且具体剂量可以由监管机构设定。可以定期施用给定剂量直到例如临床医生确定实现了适当的终点(例如,治愈、消退、部分消退等等)。

[0185] 通常,长效IL-15受体激动剂的治疗有效量的范围为约 0.0001mg 至约 100mg ,或约 0.001mg 至约 100mg ,优选剂量为约 $0.01\text{mg}/\text{天}$ 至约 $75\text{mg}/\text{天}$,更优选剂量为约 $0.10\text{mg}/\text{天}$ 至约 $50\text{mg}/\text{天}$ 。可以定期施用给定剂量直到例如临床医生确定实现了适当的终点(例如,治愈、消退、部分消退等等)。

[0186] 在一些实施例中,长效IL-15R激动剂的治疗有效量的范围为约 0.25 - $25\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在其他实施例中,治疗有效剂量(例如每天)的范围为每天约 $0.25\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $0.375\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 $20\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约 $0.375\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 $15\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约 $0.375\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约 $0.375\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 $5.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约 $0.375\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 $1.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约 $1.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 $20\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约 $1.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 $15\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约 $1.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约 $1.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 $5.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 $1.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约 $1.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 $20\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约 $1.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 $15\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约 $1.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约 $1.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 $5.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约 $5.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 $20\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约 $5.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 $15\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约 $5.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约 10 约 $1.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 $20\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 $20\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 $15\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约 $15\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约 $20\mu\text{g}/\text{kg}$ 、约 $0.01\text{mg}/\text{kg}$ 至约 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ 或约 $0.03\text{mg}/\text{kg}$ 至约 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ 。在其他实施例

中,治疗有效剂量的范围为约1-10 μ g/kg、约0.03mg/kg至约0.1mg/kg。在一些特定但非限制性的实施例中,治疗有效剂量为每天约0.25 μ g/kg、约0.3 μ g/kg、约0.375 μ g/kg、约0.5 μ g/kg、约0.75 μ g/kg、约1 μ g/kg、约1.5 μ g/kg、约2 μ g/kg、约3 μ g/kg、约4 μ g/kg、约4.5 μ g/kg、约5 μ g/kg、约6 μ g/kg、约7 μ g/kg、约8 μ g/kg、约9 μ g/kg、约10 μ g/kg、约15 μ g/kg、约20 μ g/kg、约25 μ g/kg、约0.01mg/kg、约0.03mg/kg、约0.05mg/kg、或约0.1mg/kg。

[0187] 应当理解,如上所述的长效IL-15R激动剂的剂量可以指缀合物或蛋白质当量。在一些优选的实施例中,剂量以蛋白质当量计。

[0188] 在实施例中,当分别伴随抗体或长效IL-15R激动剂的剂量增加时,可降低抗体和/或长效IL-15R激动剂的剂量水平。如实例14中所示,在小鼠肿瘤模型中,抗体治疗或长效IL-15R激动剂的剂量水平的降低分别通过IL-15R激动剂或抗体的剂量水平的相关增加来补偿。因此,将低剂量的抗体与高剂量的长效IL-15R激动剂组合施用、以及将高剂量的抗体与低剂量的长效IL-15R激动剂组合施用都有效减少小鼠肿瘤模型的骨髓中的Daudi细胞数量。

[0189] 参考本文实例中所提及的剂量,本领域普通技术人员可以使用如本领域已知的转化法(例如Nair等人,J.Basic and Clin.Pharmacy[基础与临床药学杂志](2016)7:27-31)将动物(例如小鼠)剂量转化为人类中的相应剂量。

[0190] 根据临床医师的判断、患者的需要等等,可以按多种给药方案施用单位剂量的任何给定抗体和/或缀合物(同样,优选作为药物制剂的一部分提供)。具体给药方案将是本领域的普通技术人员已知的或可以使用常规方法以实验方式确定。示例性的给药方案包括但不限于每天施用一次、每周施用三次、每周施用两次、每周施用一次、每月施用两次(例如q/14天)、每月施用一次(例如q/30或31天、q/28天或q/21天)、及其任何组合。应当理解,可以根据需要调整给药方案,例如每周一次,持续一段时间,然后根据需要调整为较短或较长的时间表。一旦已实现所希望的临床终点,就暂停或减少组合物的给药。在一些实施例中,可以施用一次单位剂量的任何给定缀合物以提供持续效果。

[0191] 待施用的抗体和/或长效IL-15受体激动剂的实际剂量将根据受试者的年龄、体重和一般状况,以及所治疗的病状的严重程度、健康专家的判断、和所施用的缀合物而变化。治疗有效量是本领域的普通技术人员已知的和/或在相关参考文本和文献中描述的。

[0192] 抗体和长效IL-15受体激动剂的组合适用于向患有癌症或肿瘤的患者施用。该方法包括向患者施用治疗有效量的针对肿瘤抗原的抗体,并且通常肠胃外施用治疗有效量的长效IL-15受体激动剂(优选作为相同或不同药物组合物的一部分提供)。

[0193] 抗体和/或长效IL-15受体激动剂可以通过本领域已知的任何合适的方式施用。在一些实施例中,抗体和长效IL-15受体激动剂中的一者或两者可以肠胃外施用,包括皮下、静脉内、动脉内、腹膜内、心内、鞘内和肌内注射,以及输注注射。适合用于肠胃外施用的配制品类型包括注射即用型溶液、在使用之前与溶剂组合的干散剂、注射即用型混悬剂、在使用之前与媒介物组合的干燥不溶性组合物以及在施用之前稀释的乳剂和液体浓缩剂等等。在一些特定实施例中,抗体和/或长效IL-15受体激动剂提供在适合于静脉内施用的配制品中,并且以静脉内方式施用。在一些其他实施例中,抗体和/或长效IL-15受体激动剂提供在适合于皮下施用的配制品中,并且以皮下方式施用。在一些另外的实施例中,抗体和长效IL-15受体激动剂中的一者或两者在肿瘤内施用。还涵盖其他施用方式,如经肺、经鼻、经

颊、经直肠、舌下和经皮施用。

[0194] 施用长效IL-15受体激动剂(例如,作为药物组合物的一部分提供)的方法可以任选地进行以使激动剂定位到特定区域中。例如,也可以将包含激动剂的液体、凝胶以及固体配制品以手术方式植入患病区域内(诸如在肿瘤中、在肿瘤附近、在发炎区域中以及在发炎区域附近)。方便地,还可以对器官和组织成像以便确保所希望的位置更佳地暴露于缀合物。

[0195] 如本文所述,本披露的一个方面提供了一种方法,该方法可用于(尤其)治疗患有对用这两种化合物中的任一种或两种的治疗有应答的病状的患者。例如,患者可以对单独以及组合的单个药剂有应答,但是对组合的应答更强。作为进一步举例,患者可能对单个药剂中的一种无应答,但是对组合有应答。作为仍然进一步举例,患者可能对单独的单个药剂中的任一种无应答,但是对组合有应答。

[0196] 如本文关于治疗患有癌症的患者所使用的,术语“治疗(treatment/treat/treating)”意指包括对受试者所罹患癌症的全谱干预,诸如施用组合以缓解、减缓、终止、或逆转癌症的一个或多个症状或即时未实际上消除也延迟癌症的进展。治疗可以包括例如减小症状的严重程度、症状的数目、或复发的频率,例如,抑制肿瘤生长、遏制肿瘤生长、或使已经存在的肿瘤消退。此外,术语“治疗癌症”并非旨在是绝对术语,并且可以包括例如减小肿瘤的尺寸或减少癌细胞的数量,使癌症缓解或阻止癌细胞的尺寸或数量增长等。在一些情况下,根据本披露的治疗产生改善的预后。

[0197] 例如,癌症或癌症相关疾病的改善可表征为完全或部分应答。“完全应答”是指不存在临床上可检测到的疾病,其中任何先前异常的X射线照像研究、骨髓、和脑脊液(CSF)或异常的单克隆蛋白测量都正常化。“部分应答”是指在不存在新的病灶下,所有可测量的肿瘤负荷(即,受试者中存在的恶性肿瘤细胞的数目、或测量的肿瘤块的体积或异常单克隆蛋白的数量)减少至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、或90%。术语“治疗”涵盖完全应答和部分应答二者。

[0198] 术语“癌症”和“癌性”是指或描述哺乳动物中典型地以不受调控的细胞生长为特征的生理病状。

[0199] 如本文所使用的“肿瘤”和“实体肿瘤”是指所有病灶和赘生性细胞生长和增殖(不论是恶性的还是良性的)、以及所有癌变前和癌变细胞和组织。

[0200] 如本文所使用的,术语“提高的”或“提高”(例如在提高的应答的上下文中)是指当与给定的基线或参考疗法比较时,受试者或肿瘤细胞对治疗(例如,如本文所披露的)的改善的应答能力。例如,基于对治疗的应答性的任何一个或多个指标,提高的应答可以包括应答性增加至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%或更多。如本文所使用的,术语“提高的”或“提高”还可以指提高有利地对治疗有应答的受试者的数量,例如,当与用于这种比较的给定基线相比较时。

[0201] 示例性病状是癌症,例如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤(Ewing's tumor)、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、头颈癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊

腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、维尔姆斯氏肿瘤(Wilms' tumor)、宫颈癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌、结直肠癌、上皮癌、胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑素瘤(包括例如葡萄膜黑素瘤、粘膜黑素瘤和柔脑膜黑素瘤)、成神经细胞瘤、成视网膜细胞瘤、头颈部鳞状细胞癌、白血病和淋巴瘤。其他示例性病状是血液恶性肿瘤,包括但不限于非霍奇金淋巴瘤和多发性骨髓瘤。

[0202] 在一种特定的方法中,单克隆抗体和长效IL-15受体激动剂用于治疗血液恶性肿瘤,例如白血病或淋巴瘤。在又另一种方法中,单克隆抗体和长效IL-15受体激动剂用于治疗实体癌。在一些实施例中,实体癌选自但不限于结肠癌、结直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、头颈癌、肾细胞癌、宫颈癌和小细胞肺癌、非小细胞肺癌。

[0203] 在一些实施例中,当以治疗有效剂量向受试者施用,本文所述的抗体和长效IL-15受体激动剂的组合(或相关组合物)有效刺激NK的激活和/或增殖,其程度大于单独等剂量施用的任何一种药剂所观察到的程度,例如,在合适的动物模型中。在一些实施例中,当以治疗有效剂量向受试者施用,本文所述的单克隆抗体和长效IL-15受体激动剂的组合或组合物有效提供比单独等剂量施用的任何一种药剂所观察到的肿瘤清除率更高的肿瘤清除率,例如,当在合适的动物模型中评价时。在一些实施例中,当以治疗有效剂量向受试者施用,本文所述的单克隆抗体和长效IL-15受体激动剂的组合或组合物有效提供比单独等剂量施用的任何一种药剂所观察到的增加的受试者存活和/或长期的存活,例如,存活提高或肿瘤消退程度更高,例如,当在合适的动物模型中评价时。在一些实施例中,当以治疗有效剂量向受试者施用,本文所述的抗体和长效IL-15受体激动剂的组合或组合物有效提供长效IL-15受体激动剂和抗体中的一者或两者的活性增加,特别是在组织区室内,例如骨髓内。在一些实施例中,当以治疗有效剂量向受试者施用,本文所述的抗体和长效IL-15受体激动剂的组合或组合物有效提供增强的NK细胞脱粒和/或增加的NK细胞活力。在实施例中,当以治疗有效剂量向受试者施用,本文所述的抗体和长效IL-15受体激动剂或组合物的施用有效治疗对单独单克隆抗体的治疗具有抗性的癌症。

[0204] 与本文所述的组合疗法相关的显著发现在下文突出显示,并在本文包括的说明性实例中进一步详述。在如实例1中所述的示例性Daudi B细胞淋巴瘤小鼠模型中,与单独施用长效IL-15受体激动剂或抗体相比,施用示例性长效IL-15受体激动剂和抗CD20单克隆抗体利妥昔单抗有效延长了存活。如图1所示,在约45天后,用长效IL-15受体激动剂和抗CD20抗体利妥昔单抗治疗的小鼠具有100%的存活率。约30天后,单独用同型对照或利妥昔单抗治疗的小鼠具有0%的存活率。在约35天后,用同型对照和长效IL-15受体激动剂治疗的小鼠具有0%的存活率。在如实例2中所述的其他示例性小鼠模型中,与单独施用长效IL-15受体激动剂或抗体相比,施用长效IL-15R激动剂(例如单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15)和抗CD38单克隆抗体达雷木单抗有效延长了存活。如图5所示,用说明性的长效IL-15受体激动剂(单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15)和抗CD38抗体达雷木单抗治疗的小鼠的中位存活期为55天(肿瘤注射后),相比抗体单一药剂的28.5天。如实例13中所述,向SCID小鼠施用长效IL-15R激动剂(例如,单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15)和抗CD38单克隆抗体达雷木单抗导致存活期增加多于一倍。相比之下,向SCID beige小鼠施用长效IL-15R激动剂和抗CD38单克隆抗体达雷木单抗,这些小鼠的NK细胞功能降低,存活期的增加降低。这些结

果表明,通过施用长效IL-15R激动剂和抗CD38单克隆抗体达雷木单抗对NK细胞功能的影响导致更长的存活。实例18和19显示了在两个示例性结直肠癌小鼠模型(HT-29结直肠癌细胞模型和HCT-116结直肠癌异种移植模型)中,施用长效IL-15R激动剂(例如单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15)和抗EGFR单克隆抗体西妥昔单抗提高了存活率。

[0205] 在一些实施例中,与单独长效IL-15受体激动剂和/或抗体的治疗相比,施用本文所述的长效IL-15受体激动剂和抗体有效增加受试者的存活时间。在一些其他实施例中,与传统治疗相比,施用本文所述的长效IL-15受体激动剂和抗体有效增加受试者的存活时间。在一个或多个实施例中,与用目前描述的组合中的组分中的一种治疗的受试者或用于相同适应症的传统疗法相比,存活期增加至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18、24个月或更长时间。在一些实施例中,存活期为至少约1、2、3、4、5年或更长时间。

[0206] 在一些实施例中,本组合治疗有效地增加了受试者的无进展存活期(没有所治疗的疾病的实质进展的存活期)。在实施例中,与用目前描述的组合中的组分中的一种治疗的受试者或用于相同适应症的传统疗法相比,无进展存活期增加至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18、24个月或更长时间。在一些实施例中,无进展存活期为至少约1、2、3、4、5年或更长时间。

[0207] 在某些实施例中,本组合治疗有效地提高了用该组合治疗的受试者的应答率。在实施例中,与用目前描述的组合中的组分中的一种治疗的受试者或用于相同适应症的传统疗法相比,本组合有效地将治疗的受试者的应答提高至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或100%。

[0208] 组合疗法还有效地促进受试者中的NK细胞扩增至比单独施用的任一药剂或未经治疗的受试者显著增加的程度。在实例2中所述的示例性Daudi B细胞淋巴瘤异种移植小鼠模型中,施用长效IL-15受体激动剂(更特别是单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15)和抗CD38单克隆抗体达雷木单抗导致NK细胞在经治疗的小鼠的骨髓中显著扩增。如图3所示,与未治疗的小鼠或单独用任一种药剂治疗的小鼠相比,用长效IL-15受体激动剂和抗CD38抗体达雷木单抗治疗的小鼠显示出骨髓中的NK细胞增殖(细胞数)的显著增加。如图4所示,与未治疗的小鼠或单独用任一种药剂治疗的小鼠相比,用长效IL-15受体激动剂和抗CD38抗体达雷木单抗治疗的小鼠在骨髓中的B细胞淋巴瘤细胞数量显著减少。实例16显示在人头颈部鳞状细胞癌的示例性FaDu小鼠模型中,施用示例性长效IL-15R激动剂(例如单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15)和抗EGFR单克隆抗体西妥昔单抗后,NK细胞在肿瘤组织中的增殖增加。

[0209] 在一些实施例中,施用本文所述的长效IL-15受体激动剂和抗体有效增加NK细胞的扩增和增殖。在一些其他实施例中,与用目前描述的组合中的组分中的一种治疗的受试者或用于相同适应症的传统疗法相比,本组合有效地使经治疗的受试者的NK细胞的增殖或扩增增加至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或100%。在实施例中,与用目前描述的组合中的组分中的一种治疗的受试者或用于相同适应症的传统疗法相比,本组合有效地使经治疗的受试者的NK细胞的增殖或扩增增加至少约5倍、10倍、15倍、20倍、25倍或更多。

[0210] 在一些实施例中,施用本文所述的长效IL-15受体激动剂和抗体有效地增加癌细胞消耗/减少癌细胞的数量。在一些实施例中,与用目前描述的组合中的组分中的一种治疗

的受试者或用于相同适应症的传统疗法相比,本组合有效地使经治疗的受试者的癌细胞消耗增加至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或100%。在实施例中,与用目前描述的组合中的组分中的一种治疗的受试者或用于相同适应症的传统疗法相比,本组合有效地使经治疗的受试者的癌细胞消耗增加至少约5倍、10倍、15倍、20倍、25倍或更多。

[0211] 在实例2中所述的示例性Daudi B细胞淋巴瘤异种移植小鼠模型中,施用示例性长效IL-15受体激动剂(例如单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15)和抗CD38单克隆抗体达雷木单抗导致经治疗的小鼠的骨髓NK细胞中颗粒酶B的表达显著增加。如图6所示,与未治疗的小鼠或单独用抗体治疗的小鼠相比,大多数用示例性长效IL-15受体激动剂(例如单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15)和抗CD38抗体达雷木单抗治疗的小鼠显示出骨髓中的NK细胞中颗粒酶B表达的增加。如图6进一步所示,如颗粒酶B(一种细胞毒性蛋白酶)标志物的增加所示,组合治疗激活了大部分NK细胞的功能。如图14所示和实例11所述,与未治疗的小鼠或单独用抗体治疗的小鼠相比,施用示例性长效IL-15受体激动剂(例如单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15)和抗CD38抗体达雷木单抗有效增加针对骨髓中每个NK细胞的颗粒酶B的表达。在如实例16中所述的示例性FaDu人头颈部鳞状细胞癌小鼠模型中,与未治疗的小鼠相比,施用示例性长效IL-15受体激动剂(例如单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15)和抗EGFR单克隆抗体西妥昔单抗有效增加血液和肿瘤样品中存在的NK细胞中颗粒酶B的表达。

[0212] 在一些实施例中,施用本文所述的长效IL-15受体激动剂和抗体有效增加NK细胞中颗粒酶B表达。在一个或多个实施例中,与用目前描述的组合中的组分中的一种治疗的受试者或用于相同适应症的传统疗法相比,本组合有效地使经治疗的受试者的NK细胞中颗粒酶B表达增加至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或100%。在实施例中,与用目前描述的组合中的组分中的一种治疗的受试者或用于相同适应症的传统疗法相比,本组合有效地使经治疗的受试者的NK细胞中颗粒酶B表达增加至少约5倍、10倍、15倍、20倍、25倍或更多。

[0213] 在如实例10中所述的示例性小鼠模型中,与单独施用长效IL-15受体激动剂或抗体相比,施用示例性长效IL-15受体激动剂(单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15)和抗CD38单克隆抗体达雷木单抗有效增加表达细胞表面CD16受体的NK细胞的分数。在如实例15中所述的另一示例性结直肠癌小鼠模型中,与未治疗的小鼠相比,施用长效IL-15受体激动剂和抗EGFR单克隆抗体西妥昔单抗有效增加血液和肿瘤样品中CD16在细胞表面的表达。在一些实施例中,当与指向CD16且具有ADCC作用机制的抗体组合使用时,长效IL-15R激动剂提供低亲和力和Fc受体CD16的增强的表面表达,以提供进一步的免疫治疗作用。

[0214] 在第三方面,本文提供了一种试剂盒,所述试剂盒包含如上所述的抗体和长效IL-15受体激动剂。试剂盒可进一步包括使用说明书以及任选的施用抗体和长效IL-15受体激动剂所需的任何医疗用品或装置。

[0215] 应当理解,尽管已经结合优选的具体实施例描述了方法、组合、试剂盒等,但是前述说明以及随后的实例旨在说明而不是限制所披露的方法、组合、试剂盒等的范围。在本披露的范围内的其他方面、优点和修改对于相关领域的普通技术人员将是显而易见的。

[0216] 在本文中引用的所有文章、书籍、专利、及其他出版物通过引用以其全文并入本文。倘若本说明书的传授内容和通过引用并入的本领域之间不一致,则以本说明书中的传

授内容和定义的含义为准(特别是关于在本文所附的权利要求中使用的术语)。例如,如果本申请和通过引用并入的出版物以不同方式定义了同一术语,则将该术语的定义保留在该定义所处文件的传授内容内。

实例

[0217] 应理解,前述描述以及随后的实例旨在说明而不是限制本文提供的方法、组合、试剂盒等的范围。其他方面、优点和修改对本披露所属领域的技术人员而言将是显而易见的。

[0218] 在以下实例中,已努力确保所使用数字(例如量、温度等)的准确性,但应将一些实验误差和偏差考虑在内。除非另外指明,否则温度是以℃为单位并且压强是在或接近海平面的大气压。认为以下每个实例对于本领域普通技术人员进行本文所述的一个或多个实施例是有指导性的。

材料与方法

[0219] 除非另有说明,否则以下实例中使用的示例性长效IL-15受体激动剂是单(甲氧基

PEG-N-丁酰胺)_{40kD}白介素-15,其通常由以下结构描述:

$$\left[\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH} \right] (\text{IL-15}),$$

其中n的值约为909(例如该分子的聚乙二醇部分具有约40千道尔顿的重均分子量),其也称为[mPEG_{40kD}-CH₂CH₂CH₂C(O)NH]-IL-15。该示例性的长效IL-15受体激动剂在本文中被描述为缀合物1或化合物1,这些术语在以下实例中可互换使用。单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15的制备描述于PCT申请号PCT/US 2018/032817(国际公开号W02018/213341)的实例1中。这些实例中的剂量和浓度基于IL-15蛋白质含量。

SDS-PAGE分析

[0220] 样品可以使用英杰公司(Invitrogen)凝胶电泳系统(XCell SureLock Mini-Cell)通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行分析。将样品与样品缓冲液混合,并将制备的样品装载到NuPAGE Novex预制凝胶中并且运行大约30分钟。

RP-HPLC分析

[0221] 可以在Agilent 1200HPLC系统(安捷伦公司(Agilent))上进行反相色谱(RP-HPLC)分析。可以使用Poroshell 300SB-C3柱(2.1x 75mm,安捷伦公司)在60℃分析样品。流动相可以是0.1%TFA/H₂O(A)和0.1%TFA/CH₃CN(B)。柱的流速可以是0.5ml/min。使用UV在280nm处检测洗脱的蛋白质和PEG-蛋白质缀合物。

生物测定

在CTLL-2细胞中基于STAT5磷酸化的效力测定(小鼠T细胞)

[0222] 在磷酸化STAT5测定中,在受体结合之后,下游细胞信号传导可以通过磷酸化激活信号转导子及转录激活因子5(STAT5)以促进基因表达从而诱导细胞增殖。响应于样品和参考治疗约10分钟,使用磷酸化STAT5/总STAT5多重测定法(马里兰州的Meso Scale Discovery公司)在适当的细胞系中测量磷酸化STAT5的激活,如PCT申请号PCT/US 2018/032817所描述,其通过引用并入本文。

HuPBMC-pStat5测定

[0223] 如在PCT申请号PCT/US 2018/032817中进一步描述的,可以通过磷酸化STAT5(Y694)剂量响应测定法确定IL-15或长效IL-15受体激动剂对各种细胞的效力。

实例1

在施用长效IL-15受体激动剂和示例性抗CD-20单克隆抗体利妥昔单抗后,对DAUDI B细胞淋巴瘤异种移植模型中存活率的评价

[0224] 在第0天,向SCID小鼠静脉内注射 1×10^7 个Daudi细胞。将小鼠分为四组。在Daudi细胞注射后的第14天和第17天,如下通过注射来治疗各组:第1组:同型对照抗体,第2组:40mg/kg IP利妥昔单抗,第3组:0.3mg/kg单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kd}白介素-15(长效IL-15受体激动剂),第4组:40mg/kg IP利妥昔单抗和0.3mg/kg SC单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kd}白介素-15(组合)。

[0225] 通过测量后肢瘫痪的发作作为替代参数来确定存活率。结果在图2中示出。

[0226] 如图2所示,与作为单一药剂疗法施用时任一组分的施用相比(参见标有“组合”的水平线),利妥昔单抗和单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15(在图2中表示为“IL-15受体激动剂”)的组合施用显著增加长期存活。该结果证明,在体内淋巴瘤模型中评价时,当与说明性抗CD-20单克隆抗体(如利妥昔单抗)组合施用,长效受体激动剂mPEG-BA-IL-15具有显著提高小鼠存活时间的能力。

实例2

在施用长效IL-15受体激动剂和示例性抗CD38单克隆抗体达雷木单抗后,对DAUDI B细胞淋巴瘤异种移植模型中的骨髓中的细胞计数和颗粒酶B表达的评价

[0227] 在第0天向SCID小鼠(N=6只/组)静脉内接种 1×10^7 个Daudi细胞,并用单剂量的抗人CD38抗体达雷木单抗(0.5mg/kg IP,接种Daudi细胞后14天)和两个剂量的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15(0.3mg/kg SC,接种后14天和21天各一个剂量)治疗。小鼠也用单一药剂疗法治疗:达雷木单抗(0.5mg/kg IP,接种Daudi细胞后14天)或两个剂量的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kd}白介素-15(0.3mg/kg SC,接种后14和21天)。

[0228] 在第二剂量的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kd}白介素-15后三天(第24天),通过流式细胞术评估骨髓中NK细胞的扩增和激活以及淋巴瘤的消耗,分别如图3和图4所示。如图3所示,与使用单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kd}白介素-15和达雷木单抗作为单一药剂疗法(分别为 $p=0.0026$ 和 $p<0.0001$)治疗的小鼠相比,以及与未治疗的对照相比($p<0.0001$),单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15和达雷木单抗的组合导致经治疗的小鼠的骨髓中NK细胞显著扩增。(单向方差分析,Tukey多重比较检验)。对于组合疗法,观察到NK细胞计数增加了19倍,而对于单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kd}白介素-15单一疗法,观察到NK细胞计数增加了10倍,这表明在骨髓组织内在示例性单克隆抗体与单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15之间存在协同作用。

[0229] 如图4所示,与单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15单一药剂治疗和达雷木单抗单一药剂治疗(分别为 $p=0.02$ 和 $p=0.001$)相比,以及与未治疗的对照($p<0.0001$)相比,单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15与达雷木单抗的组合显著提高了B细胞淋巴瘤的消耗。(单向方差分析,Tukey多重比较检验)。

[0230] 如图6所示,测量在骨髓NK细胞中颗粒酶B的表达。如其中所示,单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15即使在高度专化的免疫区室中也有效地控制NK细胞的动力学,并且其单独或与单克隆抗体(如达雷木单抗)的组合均有效增加在经治疗的小鼠的骨髓中颗粒酶B的表达。因此,单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15与肿瘤结合抗体(如达雷木单抗)的组合不仅有效地显著扩增骨髓中NK细胞的数量,而且还激活这些NK细胞的大多数杀伤功能(>

70%)，如图6中的颗粒B(细胞毒性蛋白酶)标志物所示。

[0231] 这些结果进一步说明，当与抗肿瘤抗体一起施用，单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15有效地大幅增强NK细胞介导的ADCC。

实例3

在施用长效IL-15受体激动剂和抗CD38单克隆抗体达雷木单抗后，

对DAUDI B细胞淋巴瘤异种移植模型中存活率的评价

[0232] 将静脉内接种有 1×10^7 个Daudi B细胞淋巴瘤细胞的SCID小鼠(N=8只/组)用单剂量达雷木单抗(0.5mg/kg, IP, 接种后14天)和总共三个剂量的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kD}白介素-15(0.3mg/kg, SC, 在接种肿瘤后14、21和28天施用)治疗。还评价了作为对照的未治疗的小鼠，以及用达雷木单抗作为单一药剂疗法治疗的小鼠。通过以身体状况评分作为终点标记来测量接种肿瘤的小鼠的存活期。结果在图5中以图形方式提供。

[0233] 如图5所示，与达雷木单抗单一药剂治疗相比，与达雷木单抗组合的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15显著增加了中位存活期($p < 0.05$, 对数秩检验)。用组合疗法治疗的组的中位存活期为肿瘤注射后55天，而达雷木单抗单一药剂治疗组的中位存活期为28.5天。

实例4

在用肿瘤靶向治疗性抗体和长效IL-15受体激动剂治疗后，NK细胞的激活和抑制性受体细胞表面表达的调节

[0234] 在Daudi细胞静脉内接种后第14天，对骨髓中携带Daudi B细胞淋巴瘤肿瘤的Balb/c小鼠(n=6/组)腹膜内施用单一0.5mg/kg剂量的靶向人CD38蛋白的临床抗体达雷木单抗(DARZALEX®，杨森生物科技公司)或具有相配同型的非特异性对照抗体。在接种Daudi细胞后第14天和第21天，对另外的组皮下施用作为单一药剂的0.3mg/kg剂量的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kD}白介素-15(缀合物1)，或施用组合治疗，即，在接种Daudi细胞后第14天和第21天以0.03mg/kg或0.3mg/kg的剂量皮下施用的缀合物1以及在接种Daudi细胞后第14天以0.5mg/kg的剂量腹膜内施用的达雷木单抗。

[0235] 第二次施用缀合物1后三天(接种Daudi后的第24天)，收集骨髓，并通过流式细胞术测量总骨髓中的NK细胞分数。细胞表面激活受体NKG2D和抑制性检查点受体NKG2A的表达分别在图7A和7B中示出。

[0236] 结果提供在表1和图7A-7B中。与不包括缀合物1的所有治疗相比，接受治疗剂量的缀合物1作为单一药剂或与达雷木单抗的组合的所有组均显示在细胞表面表达NKG2A的NK细胞分数增加(图7A)，以及在细胞表面表达NKG2D的NK细胞分数降低(图7B)。在该实例中以达雷木单抗为例的治疗性肿瘤靶向抗体存在的情况下，抑制性检查点受体激活的增加和表达激活受体的NK细胞的减少均指示缀合物1激活NK细胞。

表1. 通过缀合物1和达雷木单抗调节NKG2A和NKG2D表面表达。

携带 Daudi B 细胞淋巴瘤的小鼠的治疗	表达 NKG2A 的 NK 细胞% (平均, n = 6)	表达 NKG2D 的 NK 细胞% (平均, n = 6)
无治疗	59.08	9.480
同型对照抗体	57.13	10.04
达雷木单抗	54.83	10.22
缀合物 1 0.3 mg/kg	73.70	2.157
缀合物 1 0.3 mg/kg 和达雷木单抗	69.47	2.138
缀合物 1 0.03 mg/kg 和达雷木单抗	58.60	6.890

实例5

在用长效IL-15受体激动剂和免疫球蛋白治疗后,人NK细胞增殖的诱导

[0237] 在体外诱导CFSE制剂标记的人外周血单核细胞(PBMC)中的NK细胞增殖。在以下项存在下,将CFSE标记的PBMC在体外孵育5天:(i)浓度为100ng/ml的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kD}白介素-15(缀合物1);(ii)在事先用浓度为0.1mg/ml的人总免疫球蛋白G(hIgG)溶液涂覆过夜的细胞培养塑料制品上,(iii)在事先用浓度为0.1mg/ml的人总免疫球蛋白G(hIgG)溶液涂覆过夜的细胞培养塑料制品上,以及在浓度为100ng/ml的缀合物1存在下;或(iv)在常规细胞培养塑料制品上。孵育期后,通过流式细胞术(图8A-8D)测量经历细胞倍增的细胞中CFSE的减少所指示的细胞增殖,所述流式细胞术测量四个孵育条件中的每一个条件下PBMC制剂中的CD56+人NK细胞中的CFSE水平。

[0238] 结果提供在表2和图8A-8D中。数据显示,当缀合物1和hIgG均未暴露于PBMC时,仅2.25%的NK细胞增殖。单独存在hIgG时,3.92%的NK细胞增殖。缀合物1暴露导致49.7%的NK细胞增殖。但是,当PBMC暴露于hIgG和缀合物1这两者时,72%的NK细胞增殖,这表明hIgG和缀合物1的组合治疗比单独的hIgG单一药剂治疗和缀合物1单一药剂治疗的总和引起明显更多的细胞增殖。

表2. 在缀合物1和hIgG存在下的人NK细胞体外增殖。

PBMC处理	CD56+NK细胞增殖%
无缀合物1,无hIgG	2.25%
hIgG	3.92%
缀合物1	49.7%
hIgG和缀合物1	72%

实例6

在施用长效IL-15受体激动剂和免疫球蛋白后,人NK细胞的功能激活

[0239] 在体外诱导人外周血单核细胞(PBMC)制剂中人NK细胞的功能激活。在以下项存在下,将来自两个供体的PBMC孵育过夜:(i)浓度为1μg/ml的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kD}白介素-15(缀合物1);(ii)在事先用浓度为0.1mg/ml的人总免疫球蛋白G(hIgG)溶液涂覆过夜的细胞培养塑料制品上,(iii)在事先用浓度为0.1mg/ml的人总免疫球蛋白G(hIgG)溶液

涂覆过夜的细胞培养塑料制品上,以及在浓度为1μg/ml的缀合物1存在下;或(iv)在常规细胞培养塑料制品上。

[0240] 孵育期后,使用流式细胞术通过测量PBMC中CD56+人NK细胞表面上的CD69 (图9A)和CD107a (图9B) 检测抗体的中值荧光强度 (MFI) 信号的增加来测量NK细胞的激活。当比较NK细胞未暴露于hIgG或缀合物1的对照条件时,通过计算MFI的倍数变化来评估NK细胞的功能激活。激活标记MFI的倍数变化增加表明单个NK细胞上这些标记蛋白的增加,表明NK细胞的功能激活。通过ELISA测量了在实验结束时培养基中分泌的颗粒酶B的浓度,其也指示NK细胞的激活 (图9C)。

[0241] 结果提供在表3和图9A-9C中。数据显示,在存在hIgG的情况下,NK细胞上的CD69 MFI增加了1.4倍。缀合物1暴露导致CD69 MFI增加1.8倍。但是,当PBMC暴露于hIgG和缀合物1这两者时,NK细胞上的CD69 MFI增加了3.2倍,超过了每种单独处理。在存在hIgG的情况下,NK细胞上的CD107a MFI增加了1.8倍。缀合物1暴露导致CD107a MFI增加2.6倍。但是,当PBMC暴露于hIgG和缀合物1这两者时,NK细胞上的CD107a MFI增加了4.3倍,超过了每种单独的处理。与对照条件相比,在存在hIgG的情况下,分泌的颗粒酶B的浓度没有增加。缀合物1暴露导致培养基中颗粒酶B的浓度增加了4.1倍。但是,当PBMC暴露于hIgG和缀合物1这两者时,培养基中的颗粒酶B的浓度增加了18.7倍,明显超过了每种单独处理。

表3.在缀合物1和hIgG存在下的人NK细胞体外激活。

PBMC 处理	CD56+ NK 细胞平均 (n = 2) CD69 MFI 和相对于无刺激对照的倍数变化	CD56+ NK 细胞平均 (n = 2) CD107a MFI 和相对于无刺激对照的倍数变化	颗粒酶 B 的浓度 (以 pg/ml 为单位) 和相对于无刺激对照的倍数变化
无缀合物 1, 无 hIgG	4197, N/A	601.5, N/A	13.5, N/A
hIgG	5731, 1.4	1104, 1.8	11, 0.8
缀合物 1	7749, 1.8	1553, 2.6	56, 4.1
hIgG 和缀合物 1	13232, 3.2	2594, 4.3	252.6, 18.7

实例7

长效IL-15受体激动剂的体外信号传导及其对增殖的影响

[0242] 将KHYG-1细胞在37℃和5%CO₂的湿润培养箱中在补充有20%FBS、2mM L-谷氨酰胺和20ng/mL IL-2的RPMI-1640培养基 (完全生长培养基) 中培养。

[0243] 在用测试化合物治疗前一天,将细胞以500,000个活细胞/ml的密度接种在完全生长培养基中,并在正常生长条件下孵育过夜。在测定当天,将KHYG-1细胞用DPBS洗涤3次,重悬于测定培养基 (补充有20%FBS、2mM L-谷氨酰胺的RPMI-1640培养基) 中,并在37℃、5%CO₂下孵育4至5小时。将细胞在测定培养基中调节至合适的密度 (8x 10⁵个细胞/mL),并将50,000个细胞/孔等分到96孔板 (View-Plate 96,珀金埃尔默公司 (Perkin-Elmer)) 的各孔中。

对STAT5磷酸化的评价

[0244] 用IL-15或长效IL-15受体激动剂 (单 (mPEG-丁酰胺) IL-15) 刺激KHYG-1细胞,然后

在37℃、5%CO₂下孵育10分钟。将经处理的细胞在冰上溶解。

[0245] 使用Phospho (Tyr694) /总STAT5a,b测定全细胞裂解产物试剂盒 (MSD产品编号K15163D) 进行细胞裂解产物中磷酸化STAT5蛋白水平的检测。使用Sector®Imager 2400酶标仪 (MSD) 收集了与磷酸化STAT5相对应的相对光单位 (RLU) 信号,结果如图10A所示。IL-15和长效IL-15受体激动剂均在人NK细胞系KHYG-1中产生了对STAT5的剂量依赖性磷酸化,这表明这些化合物在体外信号传导中有效。长效IL-15受体激动剂诱导STAT5的磷酸化,这产生与IL-15相似的STAT5磷酸化的最大百分比,尽管效力降低了约3倍。该数据表明,长效IL-15受体激动剂可以有效地参与并激活KHYG-1细胞系中的下游信号传导。

对细胞增殖的评价

[0246] 通过将IL-15或长效IL-15受体激动剂 (单 (mPEG-丁酰胺) IL-15) 转移至含有细胞的复孔中,然后在37℃、5%CO₂下孵育48小时,启动对KHYG-1细胞的刺激。

[0247] 按照制造商的说明,通过使用CellTiter-Glo 2.0监控ATP的水平来测量每个孔中的细胞生长。在治疗48小时后,使用CellTiter-Glo 2.0将长效IL-15受体激动剂对KHYG-1细胞增殖的作用与IL-15进行了比较,结果如图10B所示。如图所示,长效IL-15受体激动剂的最大增殖响应与IL-15产生的响应相当。

实例8

在用长效IL-15受体激动剂治疗后,人NK细胞增殖的体外诱导

[0248] 在增加剂量的rhIL-15 (剂量范围1ng/ml-100ng/ml,5点、3倍稀释) 或长效IL-15受体激动剂 (单 (mPEG-丁酰胺) IL-15) (剂量范围10ng/ml-1000ng/ml,5点、3倍稀释) 存在的情况下,将CFSE制剂标记的人外周血单核细胞 (PBMC) 在体外孵育5天。孵育期后,通过流式细胞术测量经历细胞倍增的细胞中CFSE的减少所指示的细胞增殖,所述流式细胞术测量PBMC制剂中的CD56+人NK细胞中的CFSE水平。结果提供在图11和下表4中。

表4. 人PBMC的体外增殖。

PBMC处理	EC50 (ng/ml) - % 增殖	E _{max} - % 增殖
rhIL-15	2.28	69.6%
长效IL-15受体激动剂 α	39.04	71.6%

[0249] rhIL-15和长效IL-15受体激动剂均剂量依赖性地诱导人NK细胞增殖。长效IL-15受体激动剂在诱导人NK细胞增殖方面的功效比rhIL-15低约17倍。然而,rhIL-15和长效IL-15受体激动剂产生的最大增殖响应是相当的。

实例9

在用长效IL-15受体激动剂和免疫球蛋白治疗后,

对NK细胞的细胞毒性的评价

[0250] 使用阴性选择从正常供体PBMC中磁性分选人NK细胞。将NK细胞以400,000个细胞/孔的密度接种在96孔U型底板中。在补充有10%胎牛血清 (FBS) 和1%抗生素/抗霉菌药的完全RPMI-1640培养基中,在37℃,在5%CO₂中,用1000ng/mL长效IL-15受体激动剂 (单 (mPEG-丁酰胺) IL-15) (+) 刺激NK细胞过夜,或不刺激NK细胞 (-)。

[0251] 在PBS中洗涤人多发性骨髓瘤RPMI-8226细胞 (ATCC#CCL-155),并在37℃用0.15 μ M CFSE染色5分钟。在所指示的情况下,将肿瘤细胞用100ng/mL达雷木单抗 (+) 在37℃预先涂覆1小时。将经刺激的NK细胞 (效应细胞) 和预先涂覆的CFSE标记的肿瘤细胞 (靶细胞) 在5%

CO₂中以10:1的E:T比在37℃共培养3小时。孵育后,将细胞在流动染色缓冲液中洗涤,在4℃进行Fc封闭15分钟,并进行表面染色(CD45、CD56、CD3荧光偶联抗体)。将细胞在PBS中洗涤,并在7-氨基放线菌素(7-AAD)活力染料中在4℃孵育30分钟,然后使用Fortessa(BD公司)进行流式细胞术分析。7-AAD+CFSE+靶细胞占总细胞群的百分比是死亡的肿瘤细胞的百分比。

[0252] 结果提供在图12中。数据显示,长效IL-15受体激动剂引发的人NK细胞增强了预先涂覆达雷木单抗的多发性骨髓瘤细胞的ADCC。用长效IL-15受体激动剂引发的NK细胞比未处理的NK细胞或仅用达雷木单抗处理的NK细胞对靶细胞的细胞毒性更高。

实例10

在用肿瘤靶向治疗性抗体和长效IL-15受体激动剂治疗后,NK细胞低亲和力免疫球蛋白受体(CD16)细胞表面表达的调节

[0253] 在Daudi细胞静脉内接种后第14天,对骨髓中携带Daudi B细胞淋巴瘤肿瘤的Balb/c小鼠(n=6/组)腹膜内施用单一0.5mg/kg剂量的靶向人CD38蛋白的临床抗体达雷木单抗(DARZALEX®,杨森生物科技公司)或具有相配同型的非特异性对照抗体。用以下治疗另外的组:(i)在接种Daudi细胞后第14天和第21天,作为单一药剂以0.3mg/kg的剂量皮下施用的单(mPEG-N-丁酰胺)_{40kD}白介素-15(缀合物1),或(ii)组合治疗,即,在接种Daudi细胞后第14天和第21天以0.03mg/kg或0.3mg/kg的剂量皮下施用缀合物1以及在接种Daudi细胞后第14天以0.5mg/kg的剂量腹膜内施用的达雷木单抗。

[0254] 第二次施用缀合物1后三天(接种Daudi后的第24天),收集骨髓,并通过流式细胞术测量总骨髓中的NK细胞分数。在肿瘤靶向抗体的存在下表达已知介导抗体依赖性细胞毒性机制的细胞表面CD16受体的NK细胞的分数,以及每个NK细胞的CD16表达的变化分别示于图13A和13B中。

[0255] 结果提供在表5和表6以及图13A-13B中。与不包括缀合物1的所有治疗相比,接受治疗剂量的缀合物1作为单一药剂或与达雷木单抗的组合的所有组均显示在细胞表面表达CD16的NK细胞分数增加(图13A),以及每个NK细胞上的CD16表达也增加(图13B)。在该实例中以达雷木单抗为例的治疗性肿瘤靶向抗体存在的情况下,表达CD16受体的NK细胞的增加以及单个NK细胞上CD16表达的增加均指示缀合物1激活NK细胞。

表5.在细胞表面表达CD16的NK细胞的分数

治疗	表达细胞表面 CD16 的 NK 细胞的 分数 (平均值)
未治疗的	83%
同型对照抗体	81%
缀合物 1, 0.3 mg/kg	96%
达雷木单抗, 0.5 mg/kg	81%
达雷木单抗 + 缀合物 1, 0.3 mg/kg	97%
达雷木单抗 + 缀合物 1, 0.03 mg/kg	91%

表6.在每个NK细胞上的CD16表达

治疗	CD16 平均荧光强度 (MFI 平均值)	与未治疗的条件相比 的相对 CD16 表达
未治疗的	477	NA
同型对照抗体	425	无增加 (0.9 倍)
缀合物 1, 0.3 mg/kg	853	1.8 倍增加
达雷木单抗, 0.5 mg/kg	448	无增加 (1 倍)
达雷木单抗 + 缀合物 1, 0.3 mg/kg	954	2x 增加
达雷木单抗 + 缀合物 1, 0.03 mg/kg	663	1.4 倍增加

实例11

在用肿瘤靶向治疗性抗体和长效IL-15受体激动剂治疗后,NK细胞细胞毒性蛋白颗粒酶B的表达的调节

[0256] 在Daudi细胞静脉内接种后第14天,对骨髓中携带Daudi B细胞淋巴瘤肿瘤的Balb/c小鼠(n=6/组)腹膜内施用单一0.5mg/kg剂量的靶向人CD38蛋白的临床抗体达雷木单抗(**DARZALEX®**,杨森生物科技公司)或具有相配同型的非特异性对照抗体。用以下治疗另外的组:(i)在接种Daudi细胞后第14天和第21天,作为单一药剂以0.3mg/kg的剂量皮下施用的单(mPEG-N-丁酰胺)_{40kD}白介素-15(缀合物1),或(ii)组合治疗,即,在接种Daudi细胞后第14天和第21天以0.03mg/kg或0.3mg/kg的剂量皮下施用缀合物1以及在接种Daudi细胞后第14天以0.5mg/kg的剂量腹膜内施用的达雷木单抗。

[0257] 第二次施用缀合物1后三天(接种Daudi后的第24天),收集骨髓,并通过流式细胞术测量总骨髓中的NK细胞分数。每个NK细胞上的细胞内颗粒酶B表达的变化示于图14中。

[0258] 结果提供在表7和图14中。与不包括缀合物1的所有治疗相比,接受治疗剂量的缀合物1作为单一药剂或与达雷木单抗的组合的组显示在每个NK细胞上的颗粒酶B的表达增加(图14)。在该实例中以达雷木单抗为例的治疗性肿瘤靶向抗体存在的情况下,单个NK细胞中颗粒酶B表达的相应增加指示缀合物1激活NK细胞。

表7. 在每个NK细胞中的颗粒酶B表达

治疗	颗粒酶 B 平均荧光强度 (MFI 平均值)	与未治疗的条件相比的相 对颗粒酶 B 表达
未治疗的	396	NA
同型对照抗体	312	无增加 (0.8 倍)
缀合物 1, 0.3 mg/kg	2649	6.7 倍增加
达雷木单抗, 0.5 mg/kg	272	无增加 (0.7 倍)
达雷木单抗 + 缀合物 1, 0.3 mg/kg	2056	5.2 倍增加
达雷木单抗 + 缀合物 1, 0.03 mg/kg	431	无增加 (1 倍)

实例12

在用长效IL-15受体激动剂治疗后,对B细胞淋巴瘤细胞上抗体介导的抗体依赖性

细胞毒性 (ADCC) 的体外评价

[0259] 使用阴性选择从正常供体PBMC中磁性分选人NK细胞。将NK细胞以80,000个细胞/孔(图15A)或400,000个细胞/孔(图15B)的密度接种在96孔U型底板中。在补充有10%胎牛血清(FBS)和1%抗生素/抗霉菌药的完全RPMI-1640培养基中,在37℃,在5%CO₂中,用300ng/mL长效IL-15受体激动剂(单(mPEG-丁酰胺)IL-15)(+)刺激NK细胞过夜,或不刺激NK细胞(-)。

[0260] 在PBS中洗涤人多发性骨髓瘤RPMI-8226细胞(ATCC#CCL-155),并在37℃用0.15μM CFSE染色5分钟。将经刺激的NK细胞(效应细胞)和达雷木单抗(+1μg/mL)预先涂覆的CFSE标记的肿瘤细胞(靶细胞)在5%CO₂中以10:1的E:T比在37℃共培养3小时。孵育后,将细胞在流动染色缓冲液中洗涤,在4℃进行Fc封闭15分钟,并进行表面染色(CD45、CD56、CD3荧光偶联抗体)。将细胞在PBS中洗涤,并在7-氨基放线菌素(7-AAD)活力染料中在4℃孵育30分钟,然后使用Fortessa(BD公司)进行流式细胞术分析。7-AAD+CFSE+靶细胞占总细胞群的百分比是死亡的肿瘤细胞的百分比。结果提供于图15A中。

[0261] 可替代地,将人B细胞淋巴瘤(Daudi)细胞在PBS中洗涤,并在37℃下用0.3μM CFSE染色5分钟。将利妥昔单抗(+10ng/mL)涂覆的CFSE标记的肿瘤(靶细胞)细胞与NK细胞(效应细胞)在5%CO₂中以2:1的E:T比在37℃共培养3小时。孵育后,将细胞在流动染色缓冲液中洗涤,在4℃进行Fc封闭15分钟,并进行表面染色(CD45、CD56、CD3荧光偶联抗体)。将细胞在PBS中洗涤,并在7-氨基放线菌素(7-AAD)活力染料中在4℃孵育30分钟,然后使用Fortessa(BD公司)进行流式细胞术分析。7-AAD+CFSE+靶细胞占总细胞群的百分比是死亡的肿瘤细胞的百分比。结果提供于图15B中。

[0262] 数据显示,长效IL-15受体激动剂引发的人NK细胞增强了达雷木单抗涂覆的和利妥昔单抗涂覆的B细胞淋巴瘤细胞的ADCC。长效IL-15受体激动剂引发的NK细胞比未处理的NK细胞对靶细胞的细胞毒性更高。

实例13

在施用长效IL-15受体激动剂和抗CD38单克隆抗体达雷木单抗后,

对DAUDI B淋巴瘤异种移植模型中存活率的评价

[0263] 将静脉内接种有一千万个Daudi B细胞淋巴瘤细胞的SCID或SCID beige小鼠(N=8只/组)用单剂量达雷木单抗(0.5mg/kg, IP, 接种后14天)和总共三个剂量的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kD}白介素-15(化合物1)(0.3mg/kg, 静脉内, 在接种肿瘤后14、21和28天施用)治疗。还评价了作为对照的未治疗的SCID/beige或CB17 SCID小鼠。通过以身体状况评分和后肢瘫痪发作作为终点标记来测量接种肿瘤的小鼠的存活期。结果在图16中以图形方式提供。

[0264] 如图16所示,与达雷木单抗组合的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15的治疗使存活增加了一倍以上(33天),从未治疗的对照SCID小鼠的中值存活期27天到组合治疗的小鼠的中值存活期60天。相比之下,在具有降低NK细胞功能的beige突变的SCID小鼠(SCID beige)中,与达雷木单抗组合的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15的治疗仅使存活提高了7天(从未经治疗的SCID beige小鼠的23天到组合治疗的SCID beige小鼠的30天)。这些结果表明,NK细胞活性是与达雷木单抗组合的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15的治疗的完整治疗效果所必需的。

实例14

在施用长效IL-15受体激动剂和示例性抗CD38单克隆抗体达雷木单抗后,对DAUDI B细胞淋巴瘤异种移植模型中细胞计数的评价

[0265] 在第0天,将SCID小鼠(N=6只/组)静脉内接种一千万个Daudi细胞,并用单剂量的较低或较高剂量的达雷木单抗(0.05mg/kg或5mg/kg IP,在接种Daudi细胞后14天)和两个剂量的较低或较高剂量的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15(化合物1)(0.03mg/kg或0.6mg/kg,静脉内,接种后14天和21天各一个剂量)治疗。小鼠也用单一药剂疗法治疗:达雷木单抗(0.05mg/kg或5mg/kg IP,接种Daudi细胞后14天)或两个剂量的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kD}白介素-15(化合物1)(0.03mg/kg或0.6mg/kg,静脉内,接种后14天和21天)。在第二剂量的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kD}白介素-15后三天(第24天),通过流式细胞术评估骨髓中的Daudi细胞数,如图17A和图17B所示。

[0266] 如图17A-17B所示,与低剂量达雷木单抗(0.05mg/kg)和高剂量单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15(0.6mg/kg)组合时(图17B)消耗了92%的肿瘤细胞相比,当高剂量水平达雷木单抗(5mg/kg)与低剂量单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15(0.03mg/kg)组合时(图17A)消耗了96%的肿瘤细胞时,单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15(化合物1)与达雷木单抗的组合以相当的功效消耗骨髓内肿瘤细胞。作为单一药剂治疗,低剂量的达雷木单抗和单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15分别仅消耗了30%和42%的肿瘤细胞。作为单一药剂治疗,高剂量的达雷木单抗和单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15分别仅消耗了58%和69%的肿瘤细胞。这些结果表明,达雷木单抗治疗中剂量水平或组织浓度的降低可通过单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15剂量水平或组织浓度的增加来补偿,以维持组合治疗对肿瘤细胞的高效杀伤。

实例15

在施用长效IL-15受体激动剂和示例性抗EGFR单克隆抗体西妥昔单抗后,对HCT-116结直肠癌细胞模型的评价

[0267] 在接种前,将HCT-116细胞在含5%FBS的RPMI1640中培养两周。将Balb/c SCID小鼠(N=4只/组)皮下接种500万个HCT-116细胞。将接种肿瘤细胞后7天的平均肿瘤体积约为150mm³(第0天)的小鼠用单剂量的抗人EGFR抗体西妥昔单抗(20mg/kg IP)和单剂量的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15(化合物1)(0.3mg/kg IV)治疗。

[0268] 治疗后三天和五天,收集血液和肿瘤组织,并通过流式细胞术测量NK细胞分数,如图18A所示。如图18A所示,通过治疗诱导了肿瘤中总活细胞内NK细胞分数的增加。治疗后三天和五天,收集血液和肿瘤组织,并通过流式细胞术测量NK细胞数量,如图18B所示。如图18B所示,通过治疗诱导了肿瘤组织中NK细胞数量的增加。

[0269] 在治疗后第3天,通过流式细胞术对样品进行针对%Ki-67的免疫分型(参见图18C)。图18C是通过%Ki-67阳性(用作增殖细胞的标记)测量的NK细胞增殖随时间变化的图。*在大多数NK细胞中观察到Ki67标记诱导,这表明治疗后有效的增殖响应。

[0270] 如图18D所示,在治疗后第3天,通过流式细胞术测量血液或肿瘤NK细胞中的颗粒酶B表达。如其中所示,在治疗后在血液和肿瘤NK细胞中均观察到GzmB表达的增加,这表明治疗激活了NK细胞的细胞毒性。

[0271] 用流式细胞术通过测量CD16的中值荧光强度(MFI)信号的增加来测量表达细胞表

面CD16受体的血液或肿瘤NK细胞的分数,如图18E所示。如其中所示,治疗诱导了细胞表面CD16表达的增加,这表明NK细胞被激活。

[0272] 治疗后三天,收集血液和肿瘤细胞,并通过流式细胞术测量细胞表面激活受体NKG2D的表达,结果显示在图18F中。如其中所示,通过治疗,NKG2D表面表达降低,这与NK细胞的功能激活一致。

[0273] 这些结果进一步表明,当与抗肿瘤抗体一起施用,单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15有效地大幅增强NK细胞介导的ADCC。

实例16

在施用长效IL-15受体激动剂和示例性抗EGFR单克隆抗体西妥昔单抗后,对FaDu人头颈部鳞状细胞癌模型的评价

[0274] 将Balb/c SCID小鼠(N=4只/组)静脉内接种300万个FaDu细胞。将接种肿瘤细胞后7天的平均肿瘤体积约为150mm³(第0天)的小鼠用单剂量的抗人EGFR抗体西妥昔单抗(20mg/kg IP)和单剂量的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15(化合物1)(0.3mg/kg IV)治疗约150mm³。

[0275] 治疗后三天和五天,收集血液和肿瘤组织,并通过流式细胞术测量NK细胞分数,如图19A所示。如图19A所示,通过治疗诱导了肿瘤中总活细胞内NK细胞分数的增加。治疗后三天和五天,收集血液和肿瘤组织,并通过流式细胞术测量NK细胞数,如图19B所示。如图19B所示,通过治疗诱导了肿瘤组织中NK细胞数量的增加。

[0276] 在治疗后第3天,对样品进行针对%Ki-67的免疫分型(参见图19C)。图19C是通过%Ki-67阳性(用作增殖细胞的标记)测量的NK细胞增殖随时间变化的图。在大多数NK细胞中观察到Ki67标记诱导,这表明治疗后有效的增殖响应。

[0277] 如图19D所示,在治疗后第3天,通过流式细胞术测量血液或肿瘤NK细胞中的颗粒酶B表达。如其中所示,在治疗后在血液和肿瘤NK细胞中均观察到GzmB表达的增加,这表明治疗激活了NK细胞的细胞毒性。

[0278] 用流式细胞术通过测量CD16的中值荧光强度(MFI)信号的增加来测量表达细胞表面CD16受体的血液或肿瘤NK细胞的分数,如图19E所示。如其中所示,治疗诱导了细胞表面CD16表达的增加,这表明NK细胞被激活。

[0279] 治疗后三天,收集血液和肿瘤细胞,并通过流式细胞术测量细胞表面激活受体NKG2D的表达,结果显示在图19F中。如其中所示,通过治疗,NKG2D表面表达降低,这与NK细胞的功能激活一致。

[0280] 这些结果进一步表明,当与抗肿瘤抗体一起施用,单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15有效地大幅增强NK细胞介导的ADCC。

实例17

在施用长效IL-15受体激动剂和示例性抗EGFR单克隆抗体西妥昔单抗后,对H1975肺肿瘤模型中肿瘤生长抑制作用的评价

[0281] 将侧腹皮下接种有500万个H1975细胞的Balb/c裸小鼠(N=10只/组)用总共3个剂量的西妥昔单抗(0.25mg/kg, IP, 接种后9、12和16天施用)和总共三个剂量单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kD}白介素-15(化合物1)(0.3mg/kg, 静脉内, 在接种肿瘤后9、16和23天施用)治疗。在治疗开始后第27天评价失去肿瘤生长控制的延迟。结果在图20中以图形方式提供。

[0282] 如图20所示,单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15的治疗在经治疗的小鼠中没有导致肿瘤生长抑制。西妥昔单抗治疗方案完成后,西妥昔单抗治疗的小鼠显示出肿瘤生长的恢复。相比之下,与西妥昔单抗组合的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15治疗导致肿瘤生长复发延迟至治疗开始后第27天,这表明与西妥昔单抗单一药剂治疗相比,与西妥昔单抗组合的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15的治疗中的肿瘤生长明显减慢($p=0.02$, Mann-Whitney检验)。这些数据表明,在该肿瘤模型中,与西妥昔单抗单一药剂治疗相比,与西妥昔单抗组合的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15导致对肿瘤生长更好的控制。

实例18

在施用长效IL-15受体激动剂和示例性抗EGFR单克隆抗体西妥昔单抗后,对HT-29结直肠癌细胞模型中肿瘤生长抑制和延迟的评价

[0283] 将侧腹皮下接种有500万个HT-29细胞的SCID小鼠($N=8$ 只/组)用总共六个剂量的西妥昔单抗(40mg/kg , IP, 接种后7、11、14、18、21、25天施用)和总共三个剂量的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kD}白介素-15(化合物1)(0.3mg/kg , 静脉内, 在接种肿瘤后7、14和21天施用)治疗。在治疗开始后第21天评价肿瘤生长抑制。结果在图21A中以图形方式提供。

[0284] 如图21A所示,单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15或西妥昔单抗单一药剂治疗在经治疗的小鼠中没有导致肿瘤生长抑制。相比之下,与西妥昔单抗组合的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15的治疗导致明显的肿瘤生长抑制。这些数据表明,与西妥昔单抗组合的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15在西妥昔单抗耐药肿瘤模型中导致肿瘤生长抑制。

[0285] 评价肿瘤生长延迟(TVQT),将终点设为距基线400%的肿瘤生长。图21B显示,通过测量距在治疗开始当天的基线肿瘤体积的肿瘤体积翻四倍时间(TVQT),38%的肿瘤生长延迟被诱导。

实例19

在施用长效IL-15受体激动剂和示例性抗EGFR单克隆抗体西妥昔单抗后,对HCT-116结直肠癌异种移植模型中肿瘤生长抑制和延迟的评价

[0286] 将侧腹皮下接种有500万个HCT-116细胞的SCID小鼠($N=8$ 只/组)用总共六个剂量的西妥昔单抗(40mg/kg , IP, 接种后7、11、14、18、21、25天施用)和总共三个剂量的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kD}白介素-15(化合物1)(0.3mg/kg , 静脉内, 在接种肿瘤后7、14和21天施用)治疗。在治疗开始后第19天评价肿瘤生长抑制。结果在图22A中以图形方式提供。

[0287] 如图22A所示,西妥昔单抗单一药剂治疗在经治疗的小鼠中没有导致肿瘤生长抑制。单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15单一药剂治疗导致31%的肿瘤生长抑制。相比之下,与西妥昔单抗组合的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15的治疗导致42%的肿瘤生长抑制。这些数据表明,与西妥昔单抗组合的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15在西妥昔单抗耐药肿瘤模型中导致肿瘤生长抑制。

[0288] 通过测量距在治疗开始当天的基线肿瘤体积的肿瘤体积翻四倍时间(TVQT)来评估肿瘤生长延迟。图22B显示,组合治疗诱导了42%的肿瘤生长延迟,并且单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kD}白介素-15(化合物1)单一药剂治疗诱导了26%的肿瘤生长延迟,而西妥昔单抗单一药剂治疗未导致肿瘤生长延迟。

实例20

在施用长效IL-15受体激动剂和示例性抗EGFR单克隆抗体西妥昔单抗后,对HCT-

116结直肠癌体外模型中的抗体介导的细胞毒性 (ADCC) 的评价

[0289] 使用阴性选择从正常供体PBMC中磁性分选人NK细胞。将NK细胞以400,000个细胞/孔的密度接种在96孔U型底板中。在补充有10%胎牛血清 (FBS) 和1%抗生素/抗霉菌药的完全RPMI-1640培养基中,在37℃,在5%CO₂中,用单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kd}白介素-15(化合物1) (300ng/mL) (+) 刺激NK细胞过夜,或不刺激NK细胞(-)。

[0290] 在37℃,在5%CO₂中,将结肠人HCT-116细胞(ATCC#CCL-247)在补充有10%胎牛血清 (FBS) 和1%抗生素/抗霉菌药的McCoy 5A培养基(ATCC+30-2007)中培养。通过在0.25%胰蛋白酶-0.53mM EDTA中于37℃孵育5分钟,将HCT-116细胞进行亚培养,在无菌PBS中洗涤,重悬于培养基中,计数,并使用10:1的效应子:靶标(E:T)与NK细胞共培养。同时,将西妥昔单抗(麦克森外科医学公司(McKesson Medical Surgical) #66733-948-23,批次号C1800115)和IgG1同种型(Biolegend公司;LEAF纯化的IgG1)以30ug/mL的浓度添加(+)到相应的孔中,然后在37℃在5%CO₂中孵育3小时。孵育后,将细胞在流动染色缓冲液中洗涤,在4℃下进行Fc封闭15分钟,并在黑暗在4℃进行表面染色(EpCAM、CD45、CD56、CD3荧光偶联抗体)20分钟。将细胞在PBS中洗涤,并在7-氨基放线菌素(7-AAD)活力染料中在4℃孵育30分钟,然后使用Fortessa (BD公司)进行流式细胞术分析。7-AAD+CD45-EpCAM+靶细胞占总细胞群的百分比是死亡的肿瘤细胞的百分比。结果提供于图23A中。

[0291] 在37℃,在5%CO₂中,将上皮/咽部的头颈部人FaDu细胞(ATCC#HTB-43)在补充有10%胎牛血清 (FBS) 和1%抗生素/抗霉菌药的伊格尔氏极限必需培养基(EMEM;ATCC+30-2003)中培养。通过在0.25%胰蛋白酶-0.53mM EDTA中于37℃孵育5分钟,将FaDu细胞进行亚培养,在无菌PBS中洗涤,重悬于培养基中,计数,并使用10:1的效应子:靶标(E:T)与NK细胞共培养。同时,将西妥昔单抗(麦克森外科医学公司#66733-948-23,批次号C1800115)和IgG1同种型(Biolegend公司;LEAF纯化的IgG1)以300ng/mL的浓度添加(+)到相应的孔中,然后在37℃在5%CO₂中孵育3小时。孵育后,将细胞在流动染色缓冲液中洗涤,在4℃下进行Fc封闭15分钟,并在黑暗在4℃进行表面染色(CD45、CD56、CD3荧光偶联抗体)20分钟。将细胞在PBS中洗涤,并在7-氨基放线菌素(7-AAD)活力染料中在4℃孵育30分钟,然后使用Fortessa (BD公司)进行流式细胞术分析。7-AAD+CD45-靶细胞占总细胞群的百分比是死亡的肿瘤细胞的百分比。结果提供于图23B中。

[0292] 如图23A和23B所示,单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kd}白介素-15引发的人NK细胞增强了涂覆西妥昔单抗的人实体瘤细胞的ADCC。

实例21

在施用长效IL-15受体激动剂和示例性抗HER单克隆抗体曲妥珠单抗后,对SKOV-3卵巢癌细胞模型中的肿瘤生长抑制作用的评价

[0293] 将侧腹皮下接种有一千万个与基质胶以1:1比例混合的SKOV-3细胞的Balb/c裸小鼠(N=10只/组)用总共六个剂量的曲妥珠单抗(13.5mg/kg, IV,从接种后第6天开始,每周两次施用,持续3周)和总共三个剂量的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kd}白介素-15(化合物1) (0.3mg/kg, IV,在接种肿瘤后6、13和20天施用)治疗。在治疗开始后35天测量接种的小鼠中的肿瘤生长抑制。结果在图24中以图形方式提供。

[0294] 如图24所示,单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15组合治疗在经治疗的小鼠中没有导致肿瘤生长抑制。曲妥珠单抗治疗的小鼠显示出61%的肿瘤生长抑制,但曲妥珠单抗

治疗未产生无肿瘤的动物。相比之下,与曲妥珠单抗组合的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15的治疗导致所有治疗动物的肿瘤完全消失,并且动物保持无肿瘤状态。这些数据表明,在该肿瘤模型中,与曲妥珠单抗单一药剂治疗相比,与曲妥珠单抗组合的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15导致对肿瘤生长更好的抑制。

实例22

在施用长效IL-15受体激动剂和示例性抗HER单克隆抗体曲妥珠单抗后,对NCI-N87胃癌细胞模型中的肿瘤生长抑制作用的评价

[0295] 将侧腹皮下接种有一千万个与基质胶以1:1比例混合的NCI-N87细胞的Balb/c裸小鼠(N=10只/组)用总共三个剂量的曲妥珠单抗(第一剂量3mg/kg,随后两个剂量各1mg/kg,IV,在接种后5、12和20天施用)和总共三个剂量的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kD}白介素-15(化合物1)(0.3mg/kg,静脉内,在接种肿瘤后5、12和19天施用)治疗。在治疗开始后25天测量接种小鼠的肿瘤生长抑制。结果在图25中以图形方式提供。

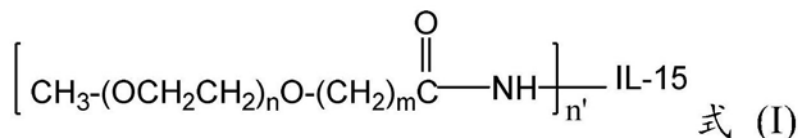
[0296] 如图25所示,单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15的治疗在经治疗的小鼠中没有导致肿瘤生长抑制。曲妥珠单抗治疗的小鼠显示29%的肿瘤生长抑制。相比之下,与曲妥珠单抗组合的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15的治疗在经治疗的小鼠中导致较高的41%的肿瘤生长抑制。这些数据表明,在该肿瘤模型中,与曲妥珠单抗单一药剂治疗相比,与曲妥珠单抗组合的单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)白介素-15导致对肿瘤生长更好的抑制。

[0297] 本方法、治疗组合和试剂盒的实施例包括但不限于:

实施例1.一种治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括:

向所述受试者施用

(a) 具有以下结构的长效IL-15受体激动剂:



其中IL-15为白介素-15部分,n为约150至约3,000的整数,m为选自2、3、4和5的整数,n'为1,~NH~表示IL-15部分的氨基基团;以及

(b) 特异性结合肿瘤抗原的肿瘤定向抗体,所述肿瘤抗原选自磷蛋白、跨膜蛋白、糖蛋白、糖脂和生长因子,其中所述抗体具有抗体依赖性细胞毒性(ADCC)作为作用机制;

其中步骤(a)和(b)同时地或以任何顺序依次进行。

实施例2.如实施例1所述的方法,其中所述长效IL-15受体激动剂是药学上可接受的盐。

实施例3.如组合或单独的实施例1-2所述的方法,其中式(I)中的m为2或3。

实施例4.如组合或单独的实施例1-3所述的方法,其中式(I)中的m为3。

实施例5.如组合或单独的实施例1-4所述的方法,其中式(I)中n的值约为909。

实施例6.如组合或单独的实施例1-5所述的方法,其中所述长效IL-15受体激动剂选自(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{20-60kD}白介素-15、(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{20-40kD}白介素-15、(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kD}白介素-15、单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{20-60kD}白介素-15、单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{20-40kD}白介素-15和单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kD}白介素-15。

实施例7.如组合或单独的实施例1-6所述的方法,其中所述长效IL-15受体激动剂

是单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kD}白介素-15。

实施例8.如组合或单独的实施例1-7所述的方法,其中所述癌症是实体癌。

实施例9.如组合或单独的实施例1-8所述的方法,其中所述实体癌选自以下组成的组:乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、结直肠癌、胃癌、恶性黑色素瘤、肝癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、甲状腺癌、肾癌、胆管癌、脑癌、宫颈癌、上颌窦癌、膀胱癌、食管癌、霍奇金病、以及肾上腺皮质癌,包括上述任何一种的转移形式。

实施例10.如组合或单独的实施例1-7所述的方法,其中所述癌症是血液恶性肿瘤。

实施例11.如组合或单独的实施例1-7和10所述的方法,其中所述血液恶性肿瘤选自以下组成的组:多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤、白血病和淋巴瘤。

实施例12.如组合或单独的实施例1-7和10-11所述的方法,其中所述癌症是B细胞恶性肿瘤。

实施例13.如组合或单独的实施例1-12所述的方法,其中步骤(a)在步骤(b)之前进行。

实施例14.如组合或单独的实施例1-12所述的方法,其中步骤(b)在步骤(a)之前进行。

实施例15.如组合或单独的实施例1-12所述的方法,其中步骤(a)和步骤(b)同时或基本同时进行。

实施例16.如组合或单独的实施例1-15所述的方法,其中如在合适的动物模型中所测量的,所述施用有效地刺激NK激活,其程度大于长效IL-15受体激动剂或肿瘤定向抗体作为单一药剂施用时所观察到的程度。

实施例17.如组合或单独的实施例1-16所述的方法,其中如在合适的动物模型中所测量的,所述施用有效地刺激NK增殖,其程度大于长效IL-15受体激动剂或肿瘤定向抗体作为单一药剂施用时所观察到的程度。

实施例18.如组合或单独的实施例1-17所述的方法,其中如在合适的动物模型中所测量的,所述施用有效地支持CD8⁺T细胞存活和记忆形成,其程度大于长效IL-15受体激动剂或肿瘤定向抗体作为单一药剂施用时所观察到的程度。

实施例19.如组合或单独的实施例1-18所述的方法,其中所述长效IL-15受体激动剂通过静脉内或皮下施用。

实施例20.如组合或单独的实施例1-19所述的方法,其中所述长效IL-15受体激动剂以q7d、q14d、q21d或每月一次或其任何组合施用。

实施例21.如组合或单独的实施例1-20所述的方法,其中所述肿瘤定向抗体通过静脉内或腹膜内施用。

实施例22.如组合或单独的实施例1-21所述的方法,其中所述肿瘤定向抗体以q7d、q14d、q21d或每月一次或其任何组合施用。

实施例23.如组合或单独的实施例1-22所述的方法,其中所述肿瘤定向抗体是单克隆抗体。

实施例24.如组合或单独的实施例1-23所述的方法,其中所述肿瘤定向抗体选自抗CD19抗体、抗CD20抗体和抗CD38抗体。

实施例25.如组合或单独的实施例1-23所述的方法,其中与糖蛋白特异性结合的所述肿瘤定向抗体选自抗SLAMF7抗体、抗EpCAM抗体、抗gpA3抗体3和抗FBP抗体。

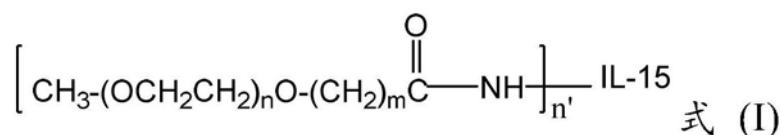
实施例26.如组合或单独的实施例1-23所述的方法,其中与生长因子特异性结合的所述肿瘤定向抗体选自抗VEGF抗体、抗VEGFR抗体和抗EGFR抗体。

实施例27.如组合或单独的实施例1-23所述的方法,其中所述肿瘤定向抗体是IgG抗体。

实施例28.如组合或单独的实施例1-23所述的方法,其中所述肿瘤定向抗体选自由以下组成的组:达雷木单抗、利妥昔单抗、西妥昔单抗和曲妥珠单抗。

实施例29.一种用于治疗癌症的治疗组合,其包含

(a) 具有以下结构的长效IL-15受体激动剂:



其中IL-15为白介素-15部分,n为约150至约3,000的整数,m为选自2、3、4和5的整数,n'为1,~NH~表示IL-15部分的氨基基团;以及

(b) 特异性结合肿瘤抗原的肿瘤定向抗体,所述肿瘤抗原选自磷蛋白、跨膜蛋白、糖蛋白、糖脂和生长因子,其中所述肿瘤定向抗体包括抗体依赖性细胞毒性(ADCC)作为作用机制。

实施例30.如实施例29所述的治疗组合,其中所述长效受体激动剂是药学上可接受的盐。

实施例31.如组合或单独的实施例29-30所述的治疗组合,其中式(I)中的m为2或3。

实施例32.如组合或单独的实施例29-31所述的治疗组合,其中式(I)中的m为3。

实施例33.如组合或单独的实施例29-32所述的治疗组合,其中式(I)中n的值约为909。

实施例34.如组合或单独的实施例29-33所述的治疗组合,其中其中所述长效IL-15受体激动剂选自(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{20-60kD}白介素-15、(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{20-40kD}白介素-15、(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kD}白介素-15、单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{20-60kD}白介素-15、单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{20-40kD}白介素-15和单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kD}白介素-15。

实施例35.如组合或单独的实施例29-34所述的治疗组合,其中其中所述长效IL-15受体激动剂是单(甲氧基PEG-N-丁酰胺)_{40kD}白介素-15。

实施例36.如组合或单独的实施例29-35所述的治疗组合,其中所述长效IL-15受体激动剂被配制为用于静脉内或皮下施用。

实施例37.如组合或单独的实施例29-36所述的治疗组合,其中所述肿瘤定向抗体被配制为用于静脉内或腹膜内施用。

实施例38.如组合或单独的实施例29-37所述的治疗组合,其中所述长效IL-15受体激动剂被配制为用于静脉内或皮下施用。

实施例39.如组合或单独的实施例29-38所述的治疗组合,其中所述肿瘤定向抗体被配制为用于静脉内或腹膜内施用。

实施例40.如组合或单独的实施例29-39所述的治疗组合,其中所述肿瘤定向抗体是单克隆抗体。

实施例41.如组合或单独的实施例29-40所述的治疗组合,其中所述肿瘤定向抗体选自抗CD19抗体、抗CD20抗体和抗CD38抗体。

实施例42.如组合或单独的实施例29-40所述的治疗组合,其中与糖蛋白特异性结合的所述肿瘤定向抗体选自抗SLAMF7抗体、抗EpCAM抗体、抗gpA3抗体3和抗FBP抗体。

实施例43.如组合或单独的实施例29-40所述的治疗组合,其中与生长因子特异性结合的所述肿瘤定向抗体选自抗VEGF抗体、抗VEGFR抗体和抗EGFR抗体。

实施例44.如组合或单独的实施例29-40所述的治疗组合,其中所述肿瘤定向抗体是IgG抗体。

实施例45.如组合或单独的实施例29-40所述的治疗组合,其中所述肿瘤定向抗体选自由以下组成的组:达雷木单抗、利妥昔单抗、西妥昔单抗和曲妥珠单抗。

实施例46.如组合或单独的实施例29-45所述的治疗组合,其中所述癌症是实体癌。

实施例47.如组合或单独的实施例29-46所述的治疗组合,其中所述实体癌选自由以下组成的组:乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、结直肠癌、胃癌、恶性黑色素瘤、肝癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、甲状腺癌、肾癌、胆管癌、脑癌、宫颈癌、上颌窦癌、膀胱癌、食管癌、霍奇金病、以及肾上腺皮质癌,包括上述任何一种的转移形式。

实施例48.如组合或单独的实施例29-45所述的治疗组合,其中所述癌症是血液恶性肿瘤。

实施例49.如组合或单独的实施例29-45和48所述的治疗组合,其中所述血液恶性肿瘤选自由以下组成的组:多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤、白血病和淋巴瘤。

实施例50.如组合或单独的实施例29-45和48-49所述的治疗组合,其中所述癌症是B细胞恶性肿瘤。

实施例51.一种试剂盒,其包含如组合或单独的实施例29-50所述的治疗组合,并附使用说明书。

实施例52.如实施例51所述的试剂盒,其中所述长效IL-15受体激动剂和所述单克隆抗体各自包含在一种或多种单独的单位剂型中。

实施例53.如实施例51所述的试剂盒,其中所述长效IL-15受体激动剂和所述单克隆抗体各自包含在相同的单位剂型中。

序列表

SEQ ID NO:1 (rhIL-15)

10	20	30	40	50	60
NWVNVISDLK	KIEDLIQSMH	IDATLYTESD	VHPSCKVTAM	KCFLLELQVI	SLESGDASIH
70	80	90	100	110	
DTVENLIILA	NNSLSSNGNV	TESGCKECEE	LEEKNIKEFL	QSFVHIVQMF	INTS

SEQ ID NO:2

-1	10	20	30	40	50	60
M	NWVN	VISDLK	KIEDLIQSMH	IDATLYTESD	VHP	SCKVTAM
				KCF	LLELQVI	SLESGDASIH
	70	80	90	100	110	
	DTVENLIILA	NNSLSSNGNV	TESGCKECEE	LEEKNIKEFL	QSFVHIVQMF	INTS

SEQ ID NO:3

10	20	30	40	50	60
MRISKPHLRS	ISIQCYLCLL	LNSHFLTEAG	IHV	FILGCFS	AGLPKTEANW
				VN	VISDLKKI
70	80	90	100	110	120
EDLIQSMHID	ATLYTESDVH	PSCKVTAMKC	FLLELQVISL	ESGDASIHDT	VENLIILANN
130	140	150	160		
SLSSNGNVTE	SGCKECEELE	EKNIKEFLQS	FVHIVQMFIN	TS	

序列表

<110> 内克塔治疗公司(Nektar Therapeutics)

Miyazaki, Takahiro

Madakamutil, Loui

Kivimae, Saul

<120> 与另一种药理活性剂组合的长效白介素-15受体激动剂

<130> SHE0566.PCT

<140> 尚未指定

<141> 同时提交

<150> US 62/758,344

<151> 2018-11-09

<150> US 62/789,924

<151> 2019-01-08

<150> US 62/818,003

<151> 2019-03-13

<150> US 62/828,437

<151> 2019-03-28

<150> US 62/843,036

<151> 2019-05-03

<150> US 62/848,372

<151> 2019-05-15

<150> US 62/924,015

<151> 2019-10-21

<160> 3

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成蛋白质

<400> 1

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile

1 5 10 15

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His

20 25 30

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln

35 40 45

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
 50 55 60
 Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
 65 70 75 80
 Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
 85 90 95
 Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
 100 105 110

Thr Ser

<210> 2

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成蛋白质

<400> 2

Met Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu
 1 5 10 15
 Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val
 20 25 30
 His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu
 35 40 45
 Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val
 50 55 60
 Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn
 65 70 75 80
 Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn
 85 90 95
 Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile
 100 105 110

Asn Thr Ser

115

<210> 3

<211> 162

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成蛋白质

<400> 3

Met	Arg	Ile	Ser	Lys	Pro	His	Leu	Arg	Ser	Ile	Ser	Ile	Gln	Cys	Tyr
1				5					10					15	
Leu	Cys	Leu	Leu	Leu	Asn	Ser	His	Phe	Leu	Thr	Glu	Ala	Gly	Ile	His
				20				25					30		
Val	Phe	Ile	Leu	Gly	Cys	Phe	Ser	Ala	Gly	Leu	Pro	Lys	Thr	Glu	Ala
				35				40					45		
Asn	Trp	Val	Asn	Val	Ile	Ser	Asp	Leu	Lys	Lys	Ile	Glu	Asp	Leu	Ile
								50				55		60	
Gln	Ser	Met	His	Ile	Asp	Ala	Thr	Leu	Tyr	Thr	Glu	Ser	Asp	Val	His
65					70					75					80
Pro	Ser	Cys	Lys	Val	Thr	Ala	Met	Lys	Cys	Phe	Leu	Leu	Glu	Leu	Gln
					85					90					95
Val	Ile	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Asp	Ala	Ser	Ile	His	Asp	Thr	Val	Glu
								100				105			110
Asn	Leu	Ile	Ile	Leu	Ala	Asn	Asn	Ser	Leu	Ser	Ser	Asn	Gly	Asn	Val
												115		120	125
Thr	Glu	Ser	Gly	Cys	Lys	Glu	Cys	Glu	Glu	Leu	Glu	Glu	Lys	Asn	Ile
								130				135			140
Lys	Glu	Phe	Leu	Gln	Ser	Phe	Val	His	Ile	Val	Gln	Met	Phe	Ile	Asn
145						150					155				160
Thr	Ser														

SEQ ID NO:1

10 20 30 40 50 60
 MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI
 70 80 90 100 110
 HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS

图1

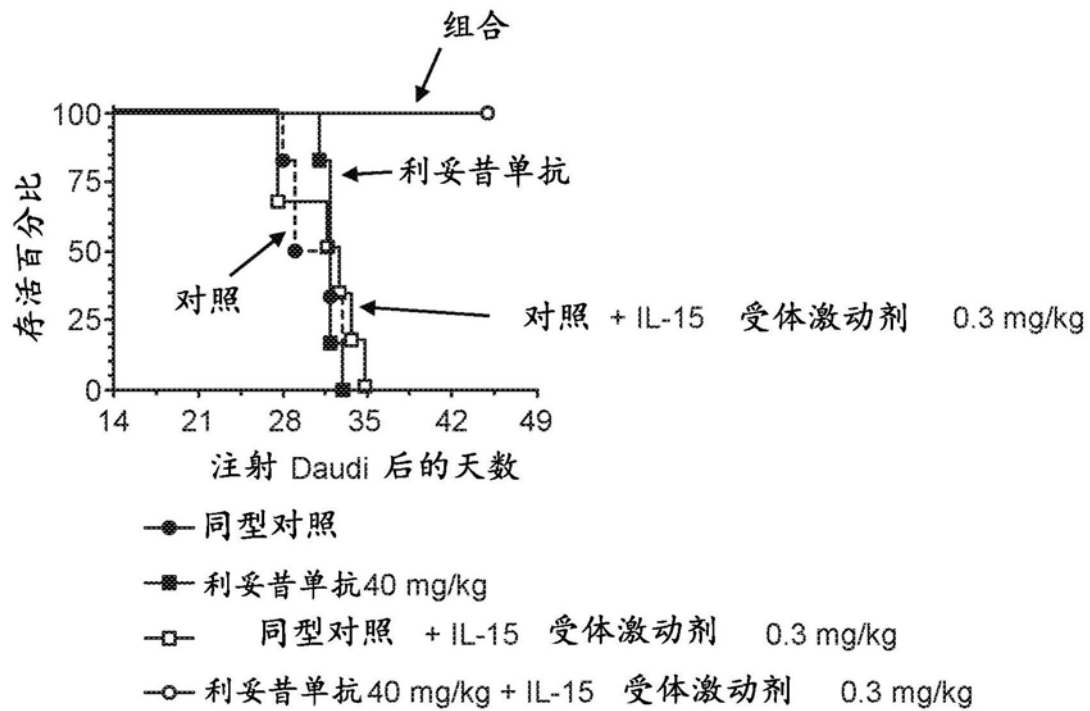


图2

骨髓中的NK细胞计数

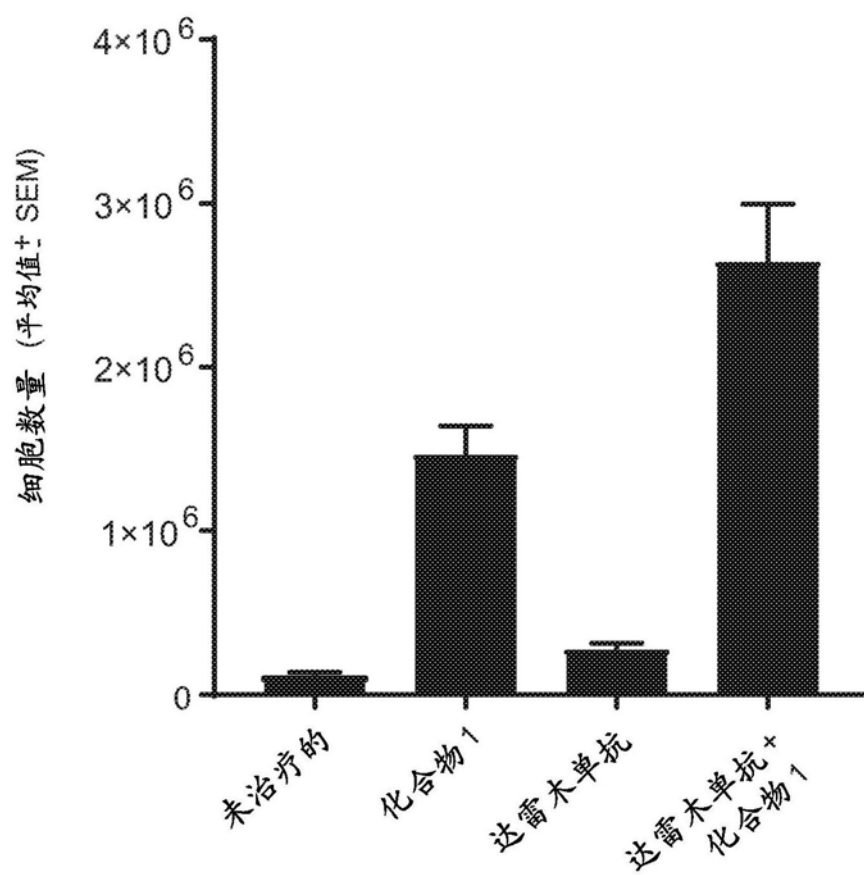


图3

骨髓中的Daudi细胞计数 (HLA-DR+)

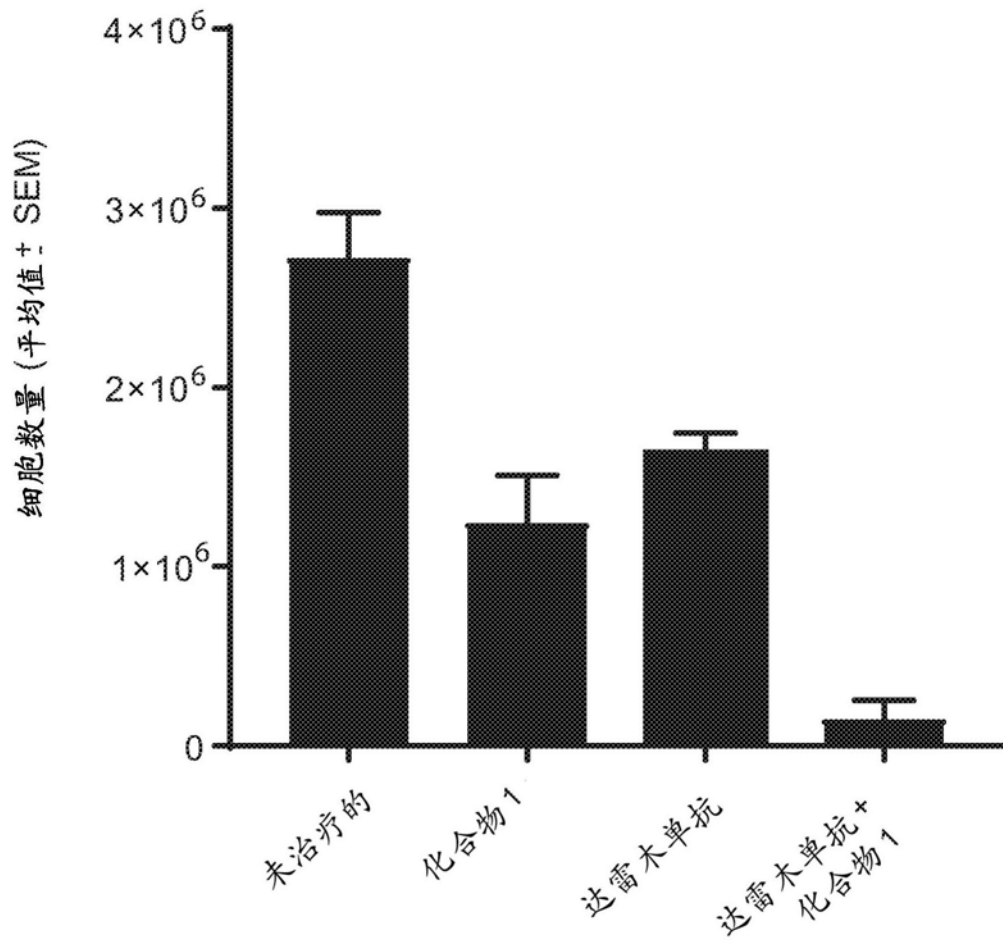


图4

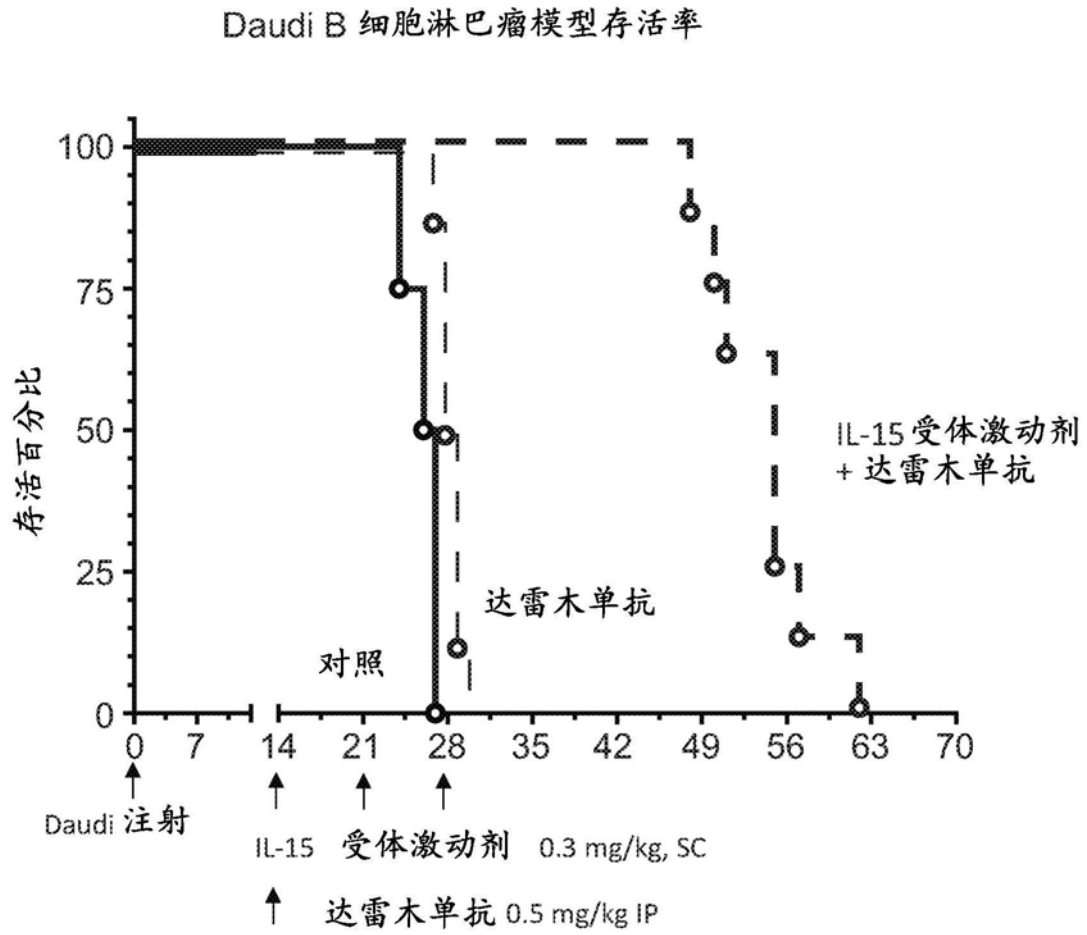


图5

骨髓NK细胞中的颗粒酶B诱导

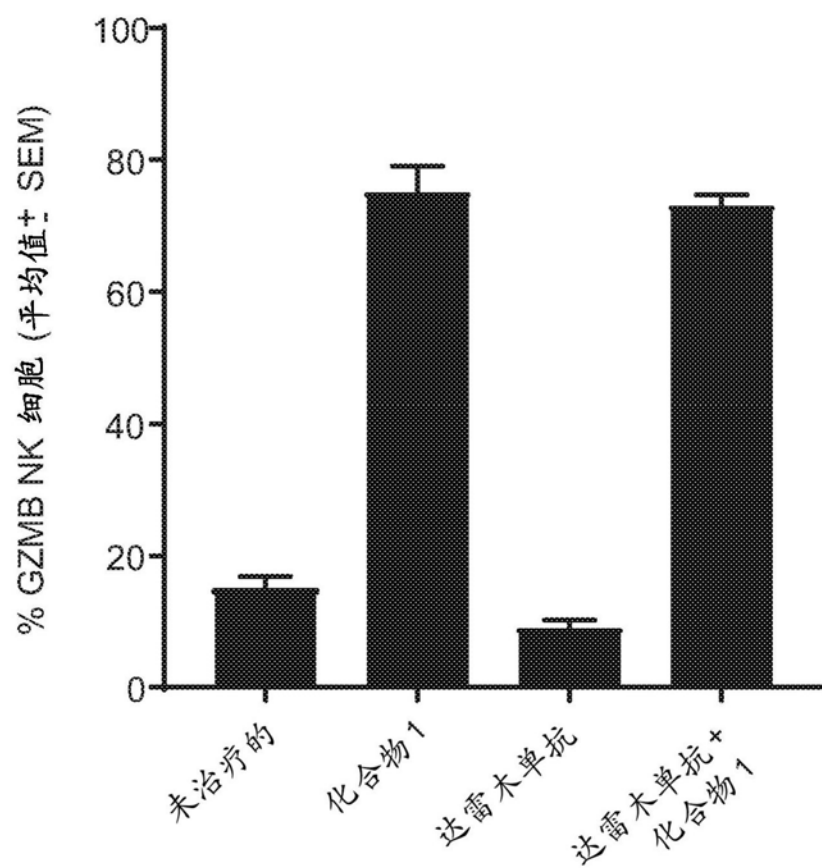


图6

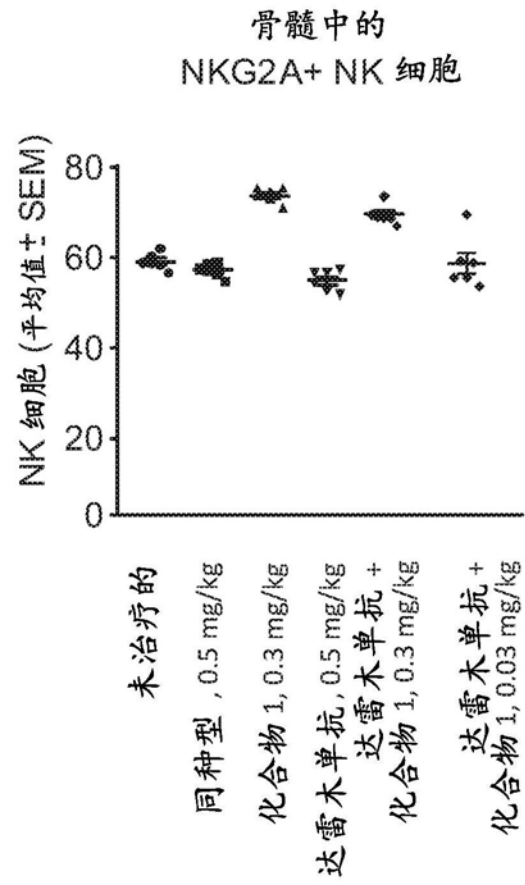


图7A

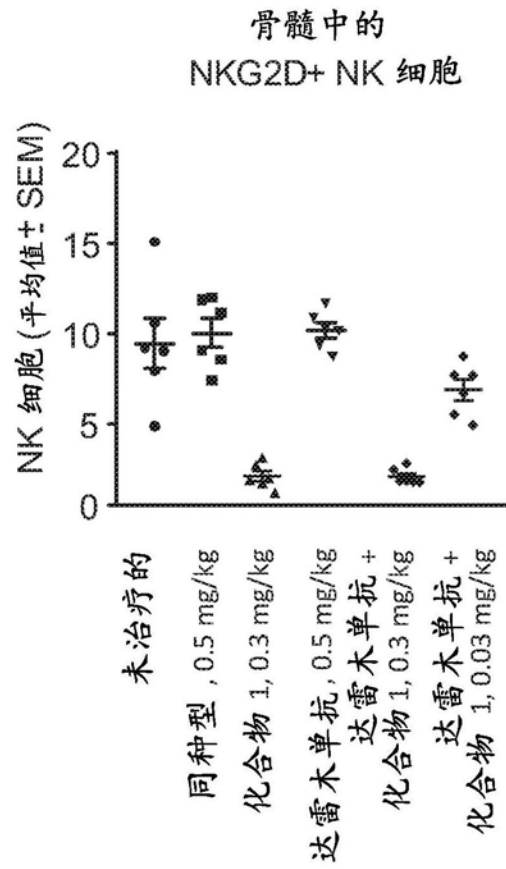


图7B

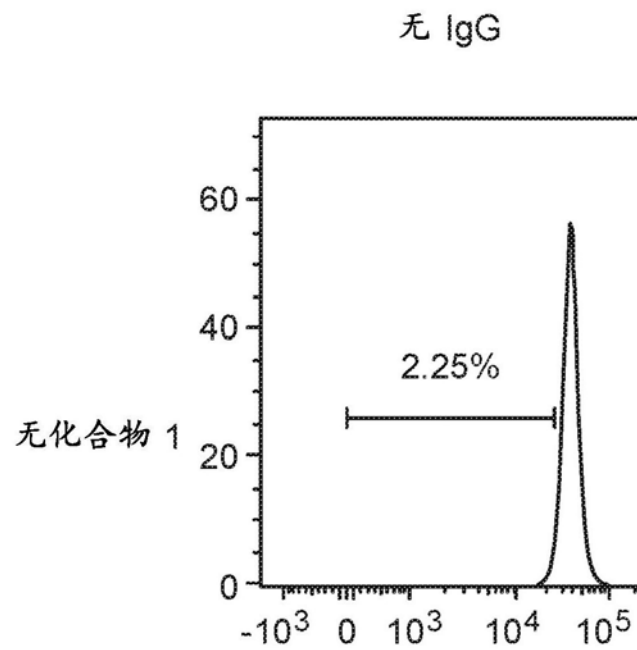


图8A

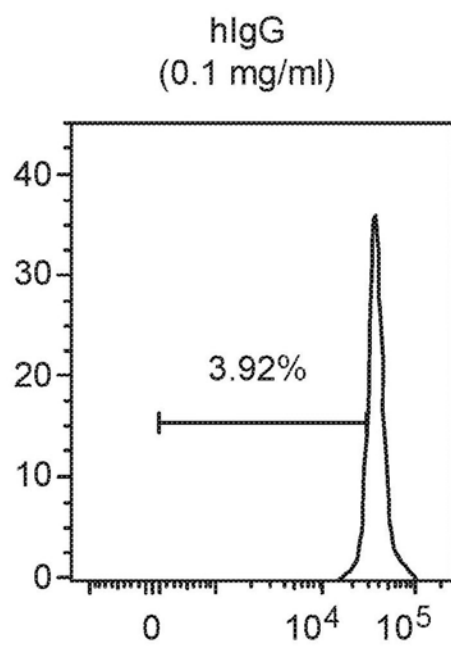


图8B

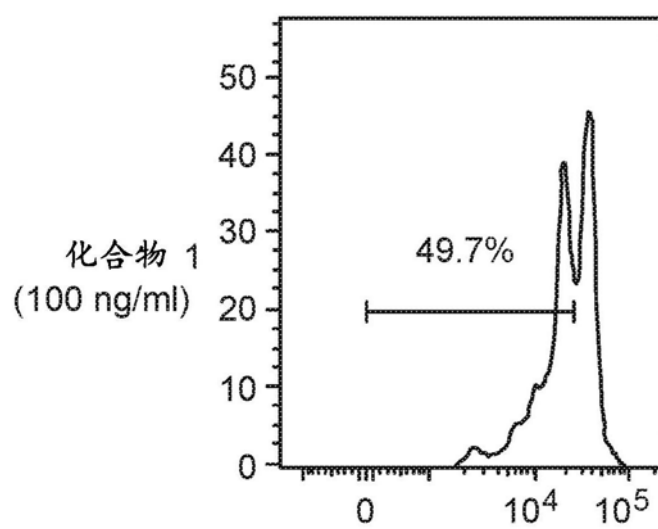


图8C

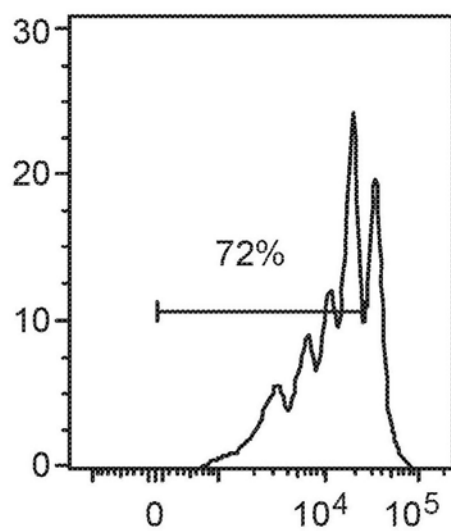


图8D

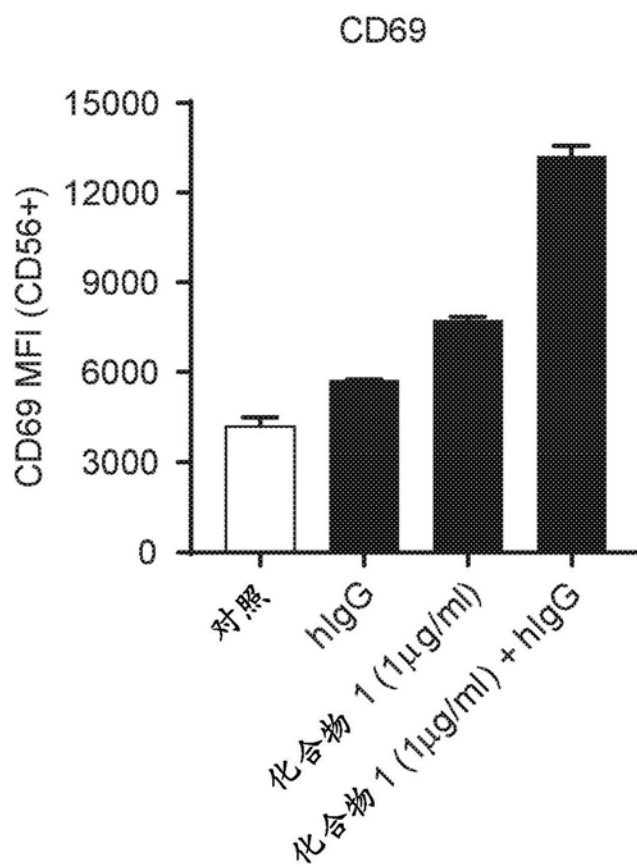


图9A

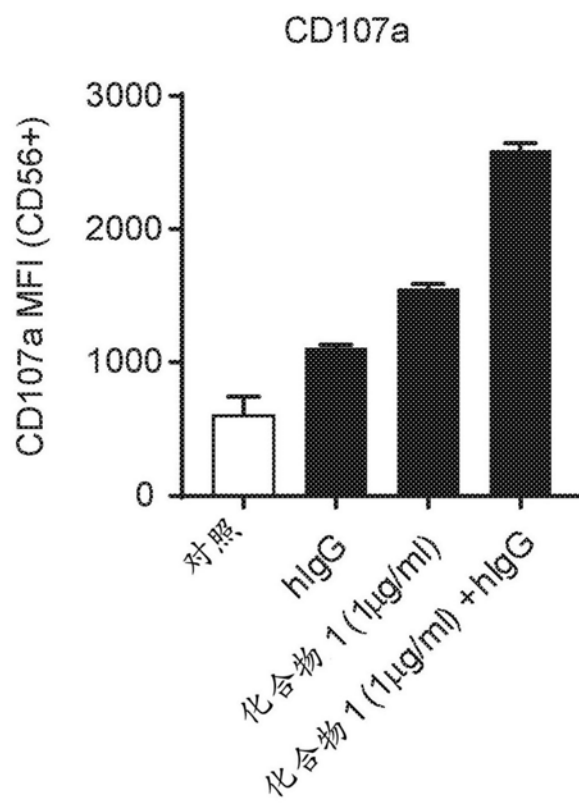


图9B

分泌的颗粒酶 B

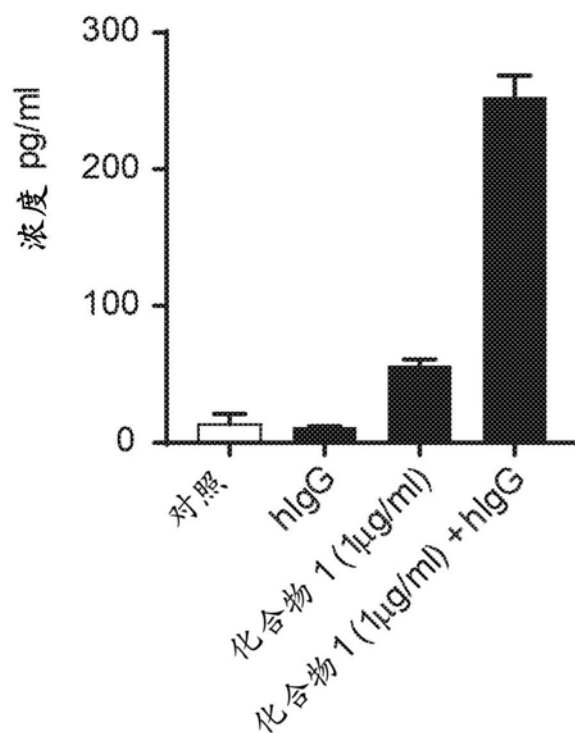


图9C

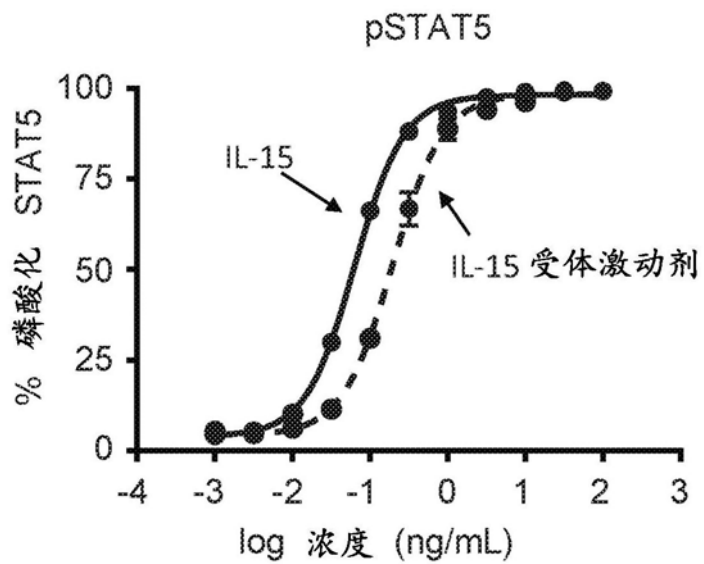


图10A

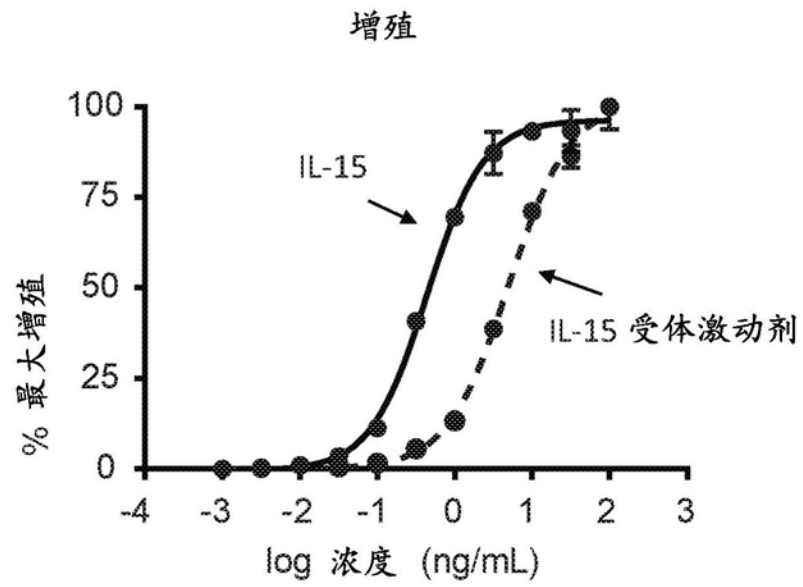


图10B

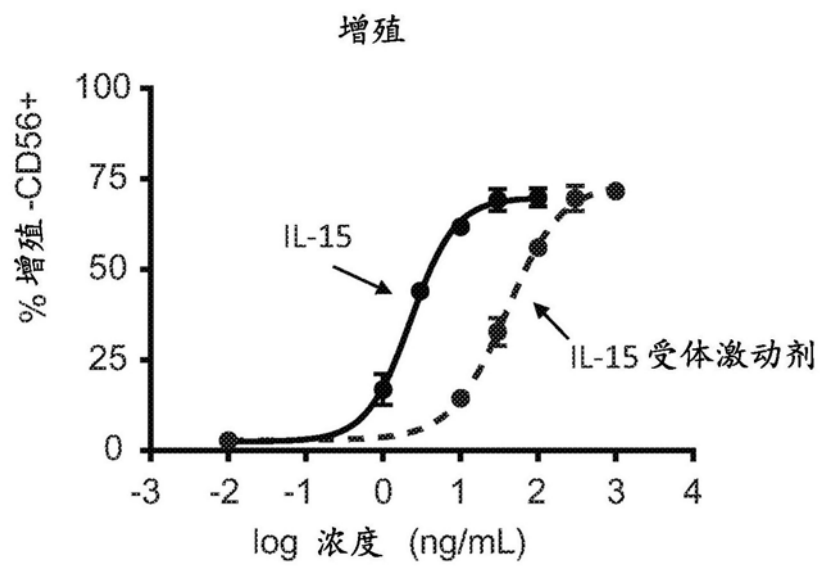


图11

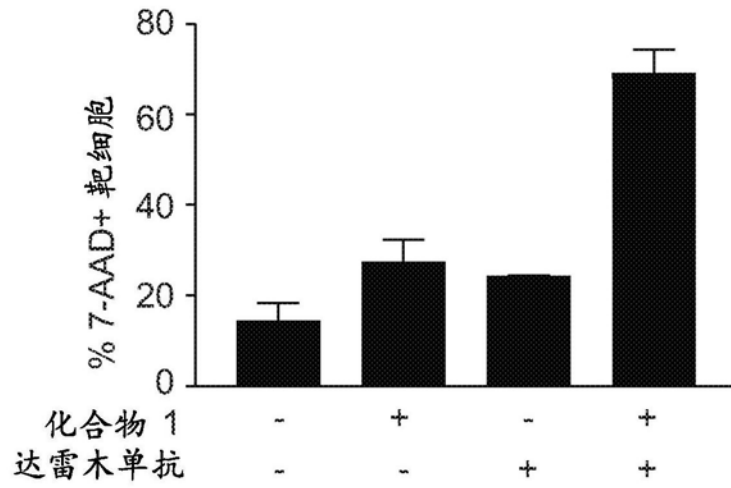


图12

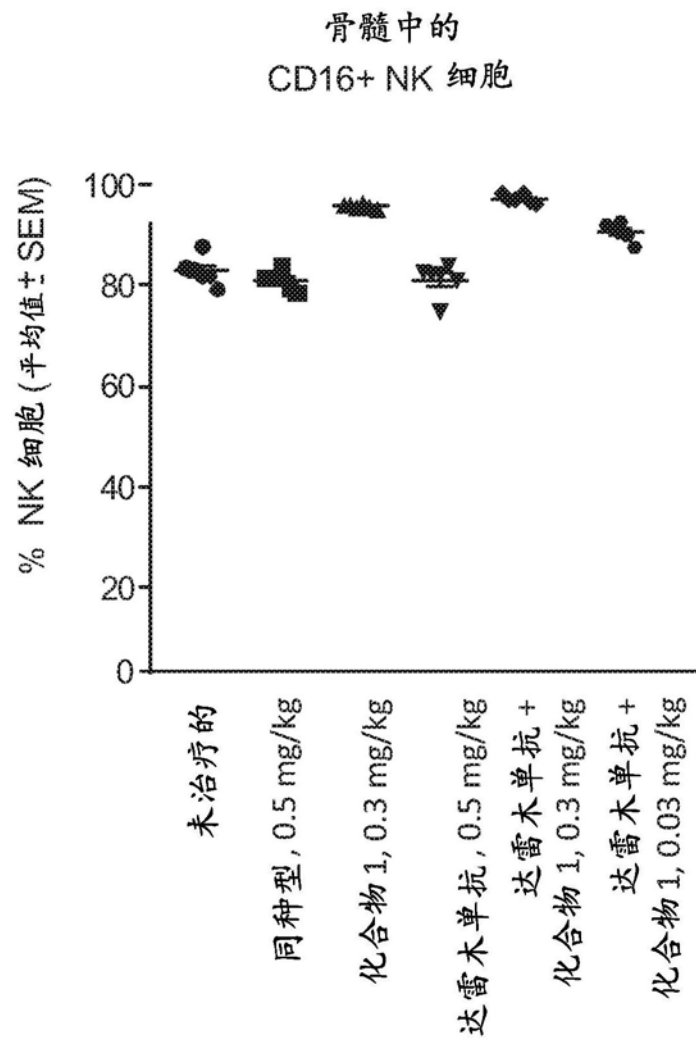


图13A

在骨髓NK细胞上的CD16表达

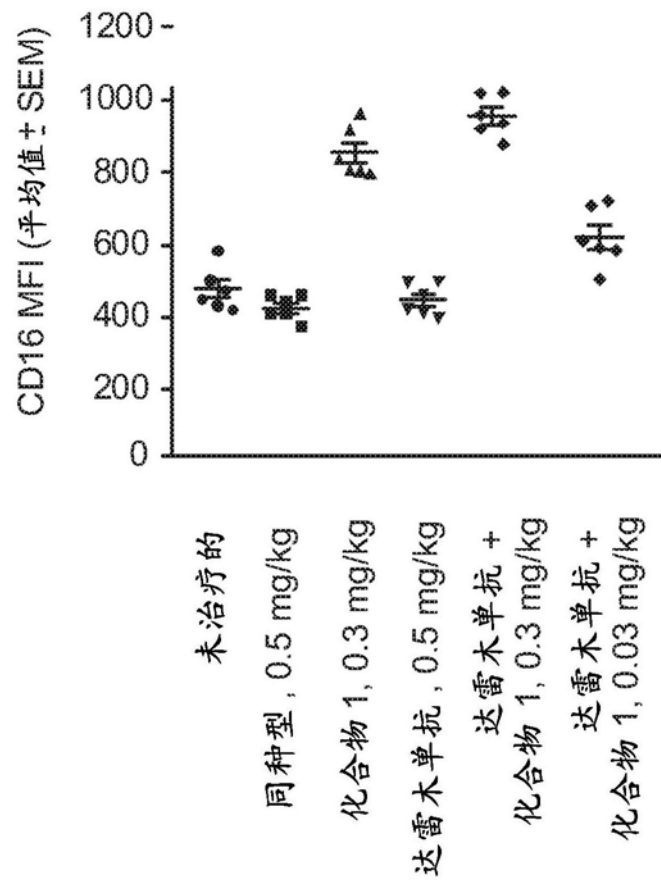


图13B

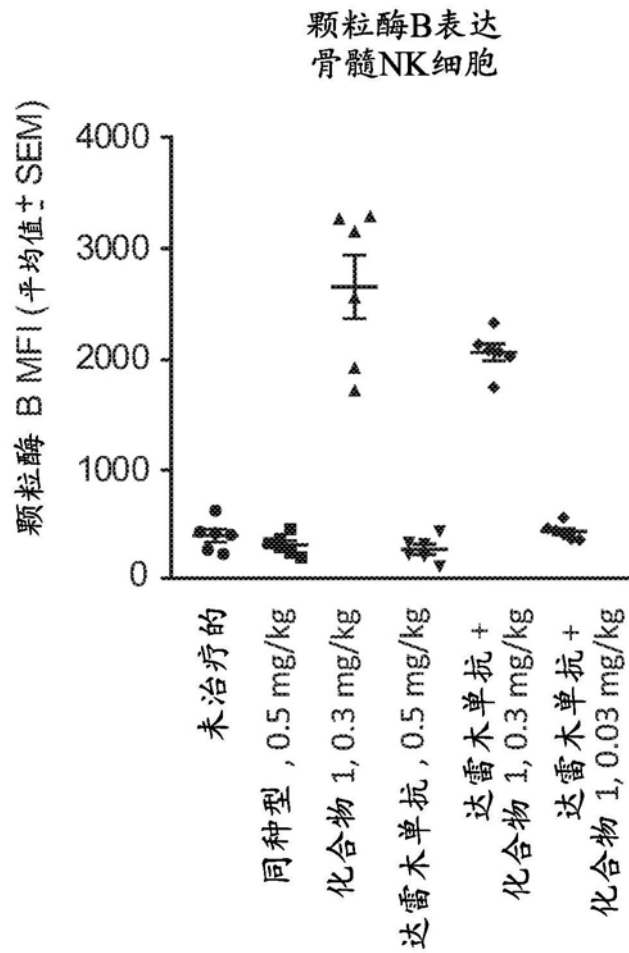


图14

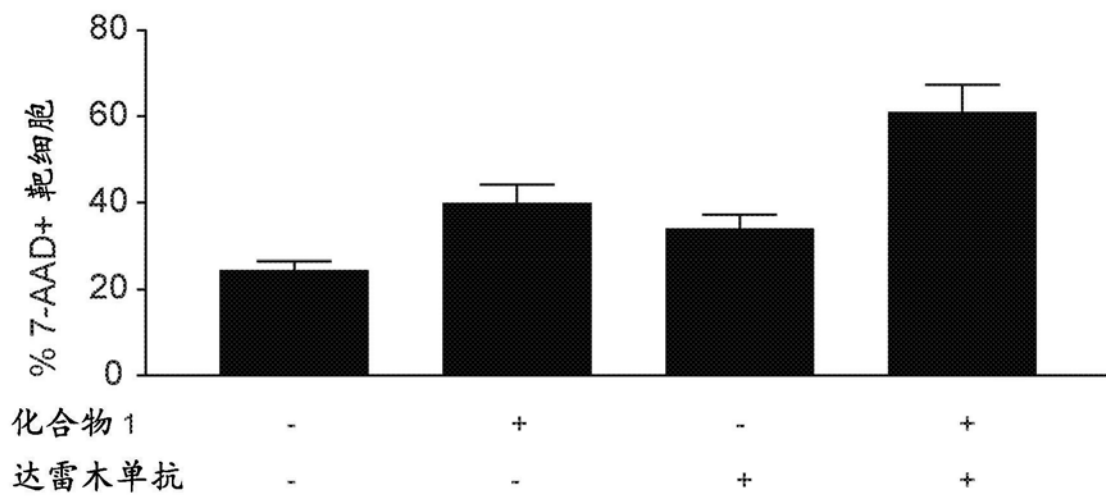


图15A

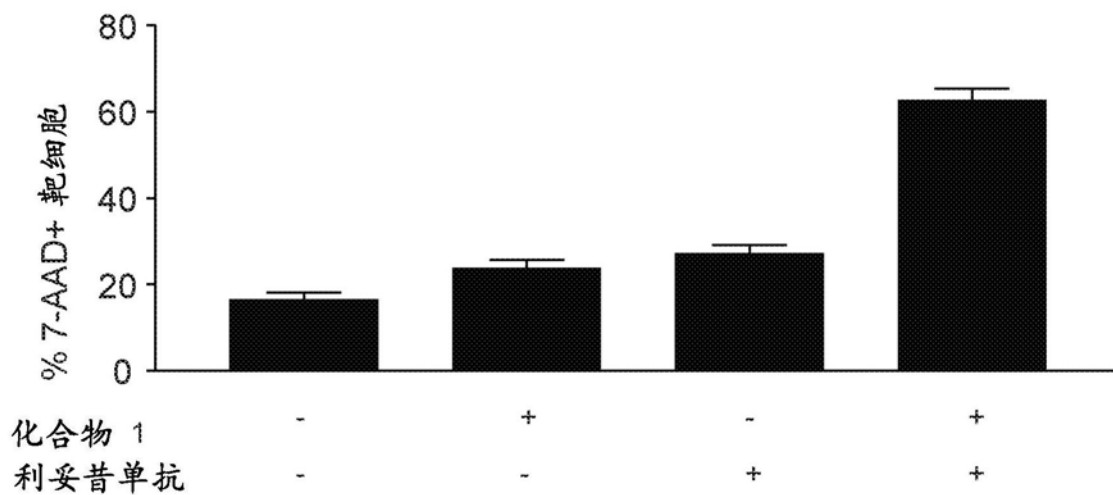


图15B

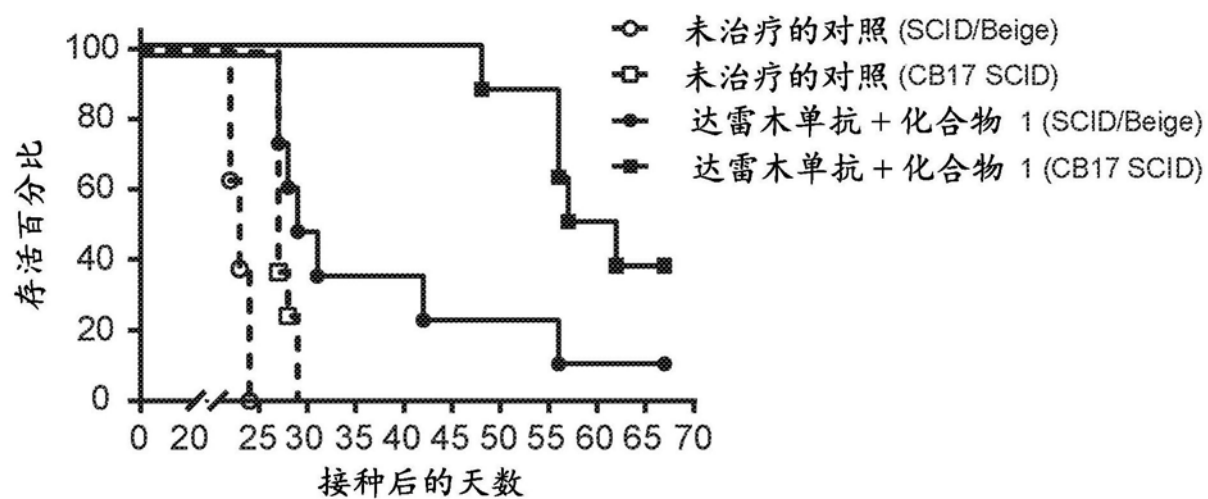


图16

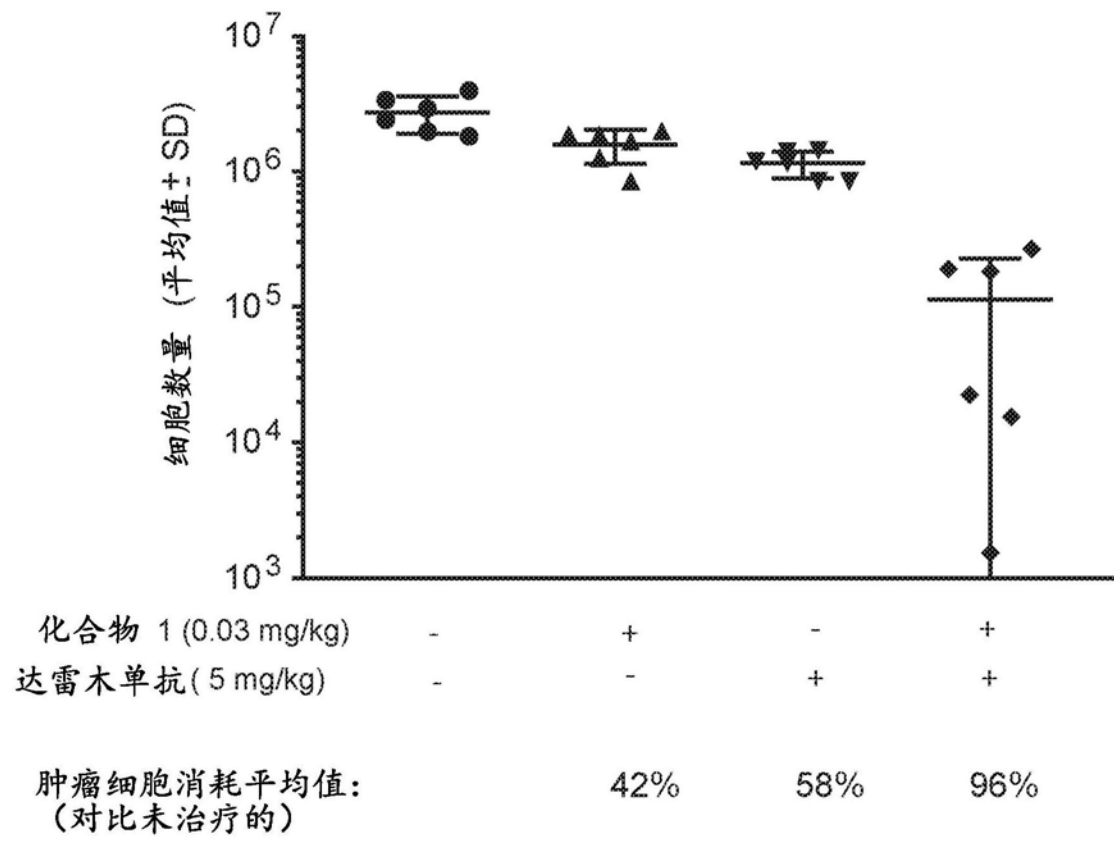


图17A

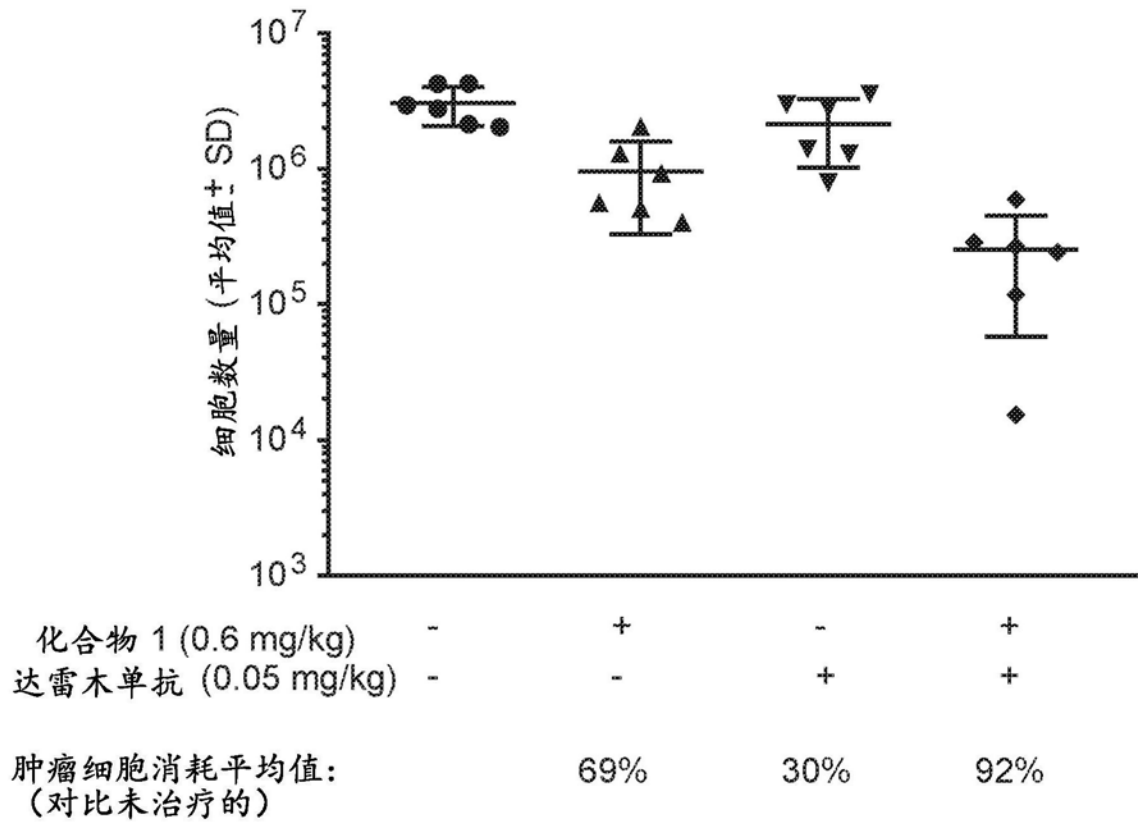


图17B

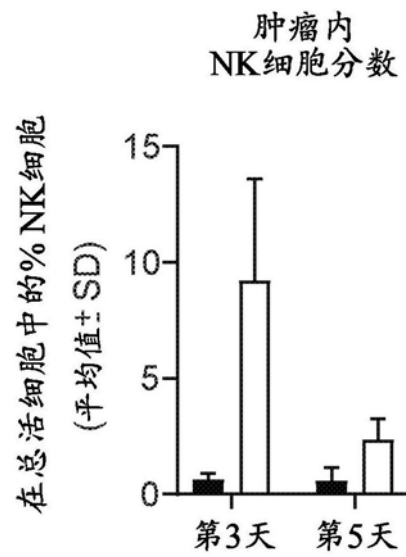


图18A

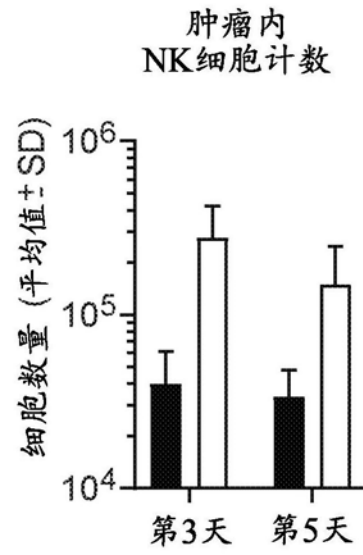


图18B

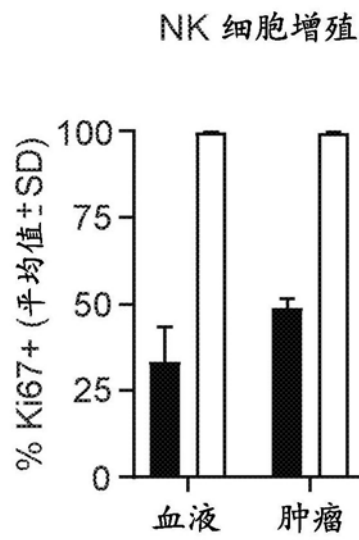


图18C

NK细胞中的GzmB表达

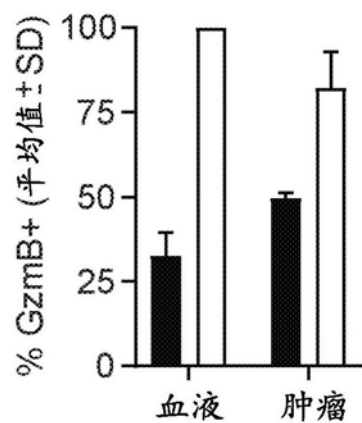


图18D

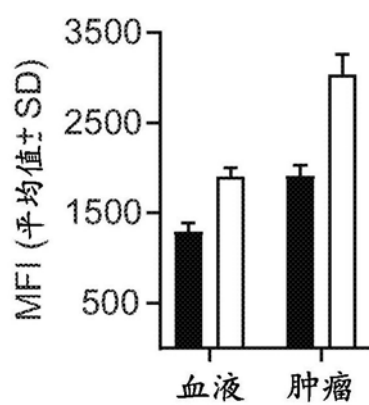
NK细胞上的
CD16细胞表面表达

图18E

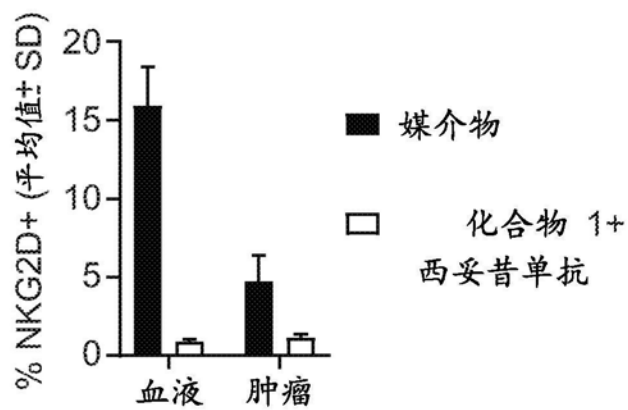
NK细胞上的
NKG2D表达

图18F

肿瘤内NK细胞分数

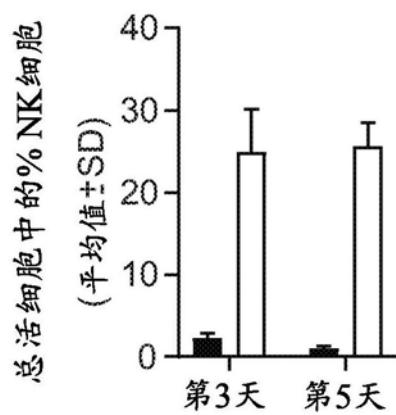


图19A

肿瘤内NK细胞计数

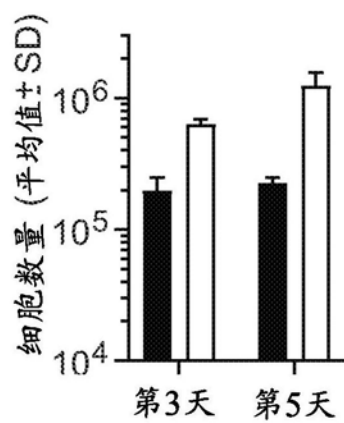


图19B

NK细胞增殖

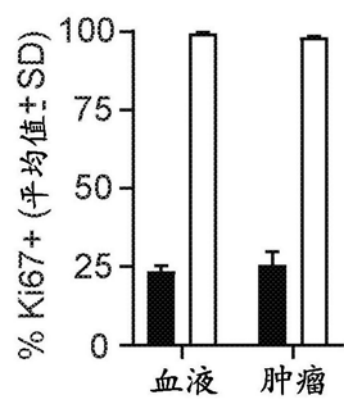


图19C

NK细胞中的GzmB表达

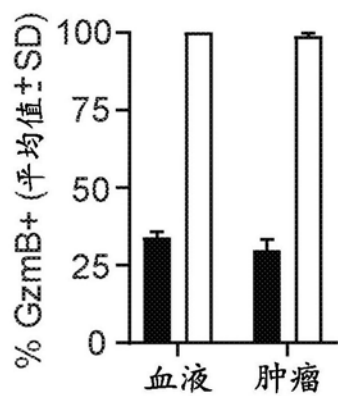


图19D

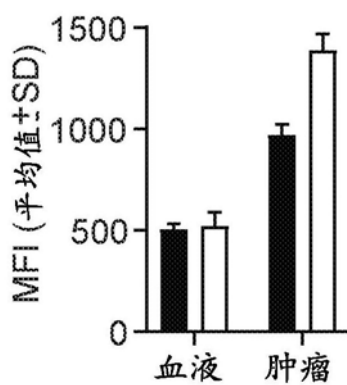
NK细胞上的CD16
细胞表面表达

图19E

NK细胞上的NKG2D表达

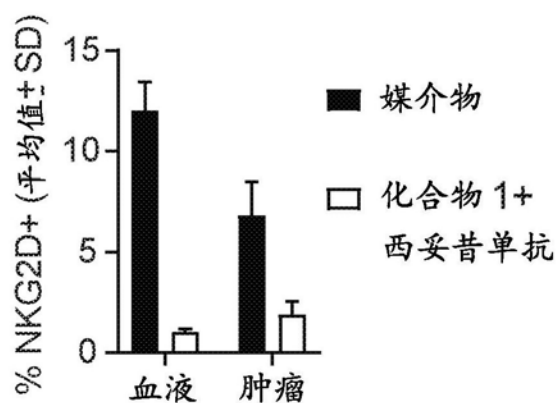


图19F

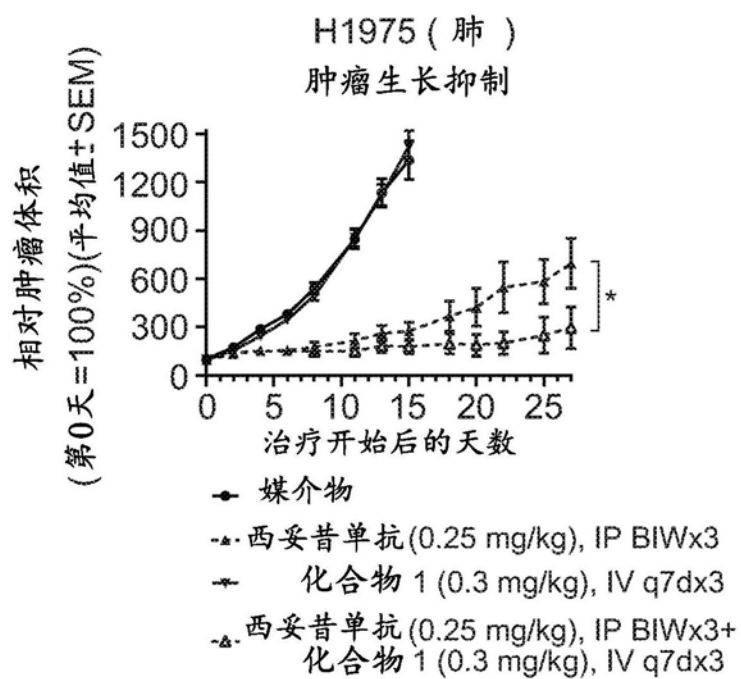


图20

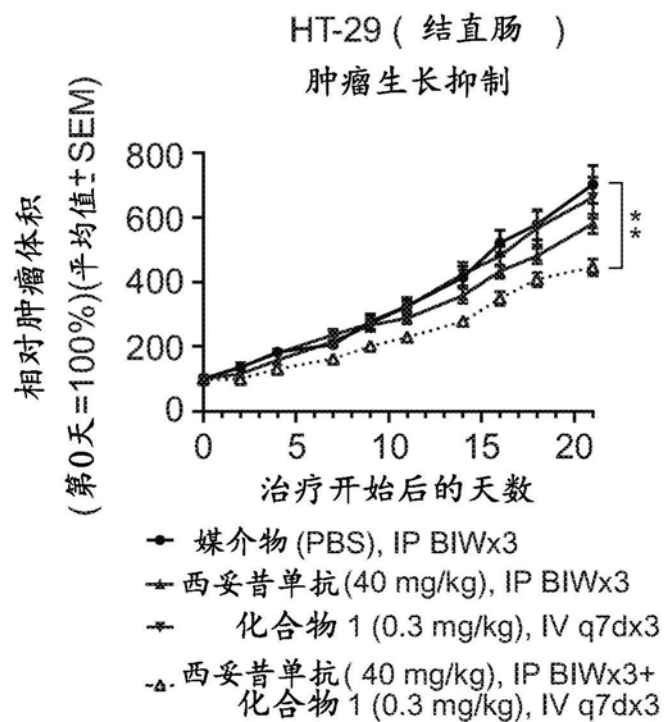


图21A

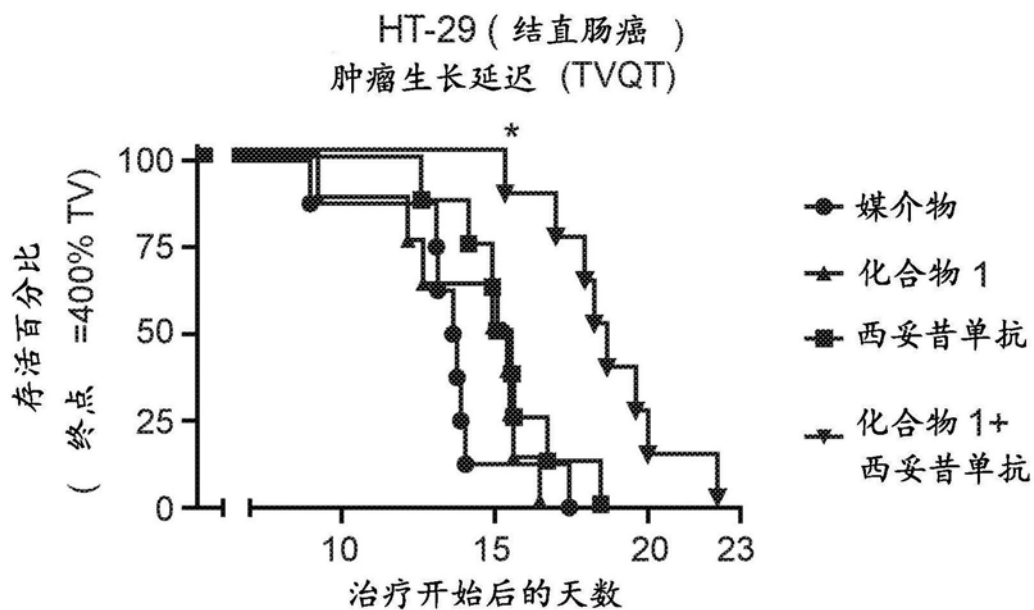


图21B

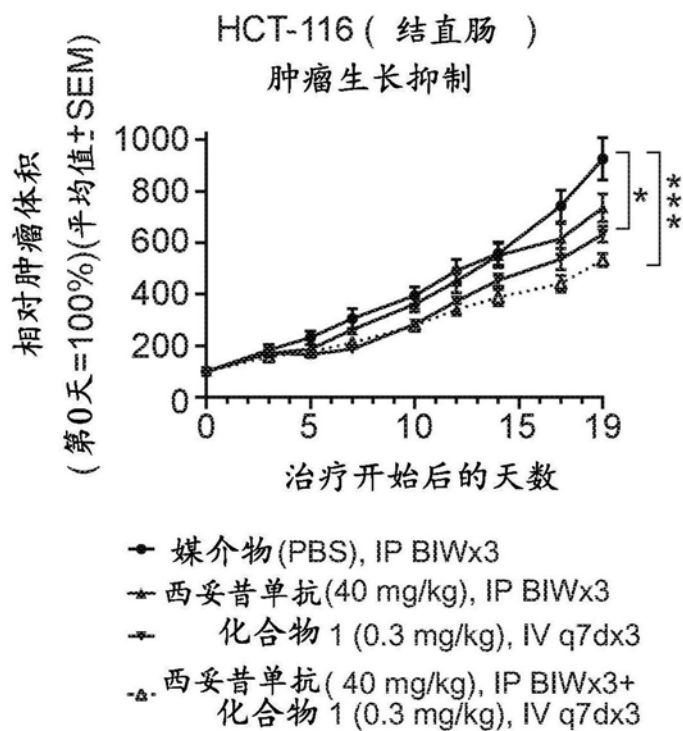


图22A

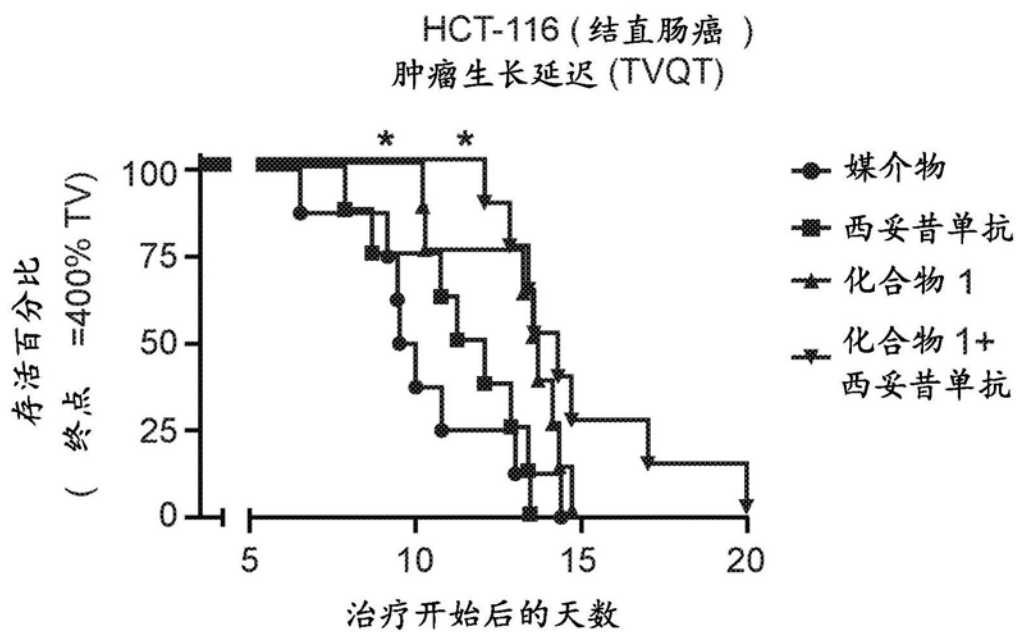


图22B

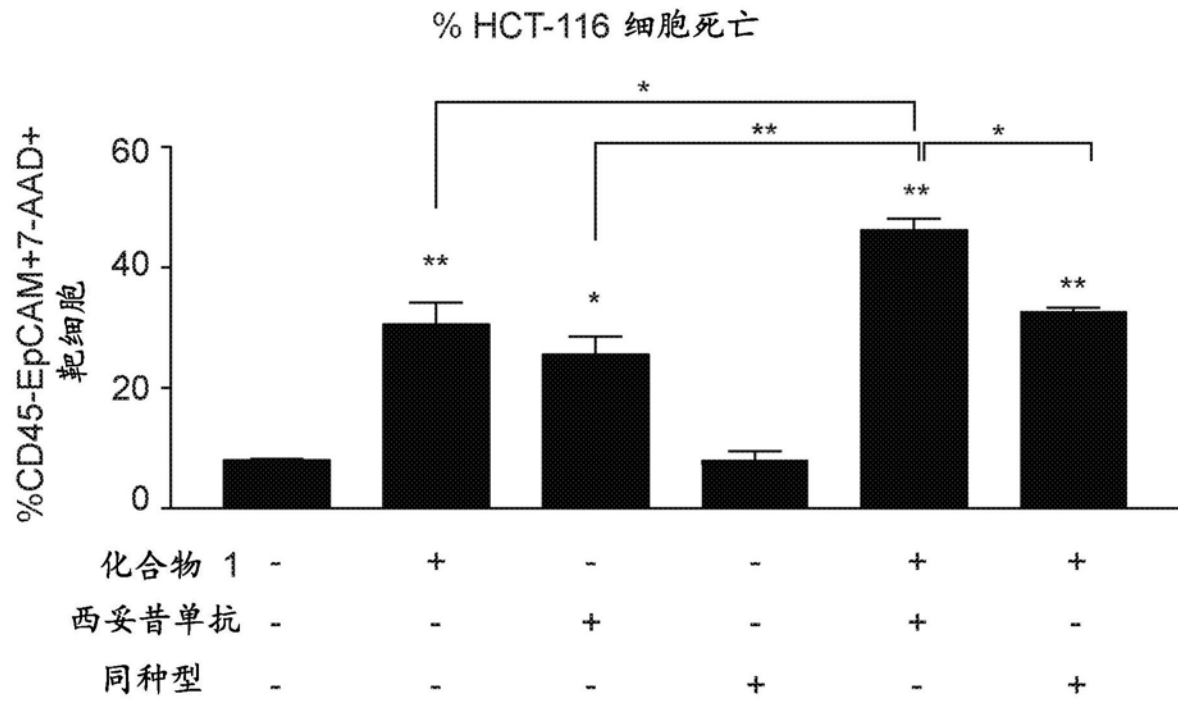


图23A

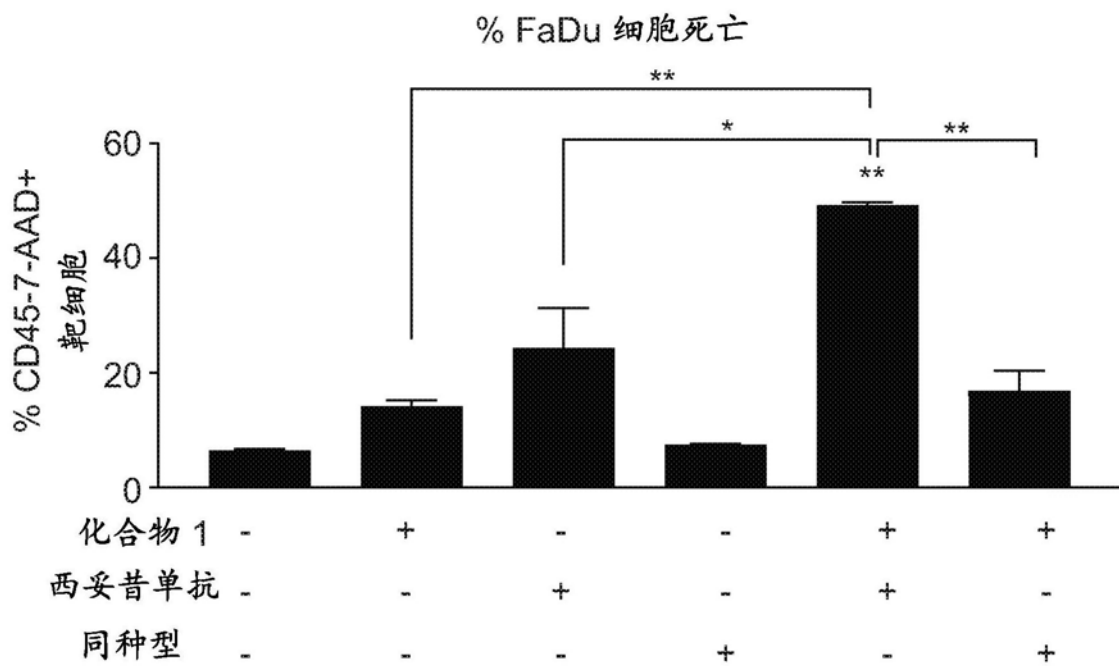


图23B

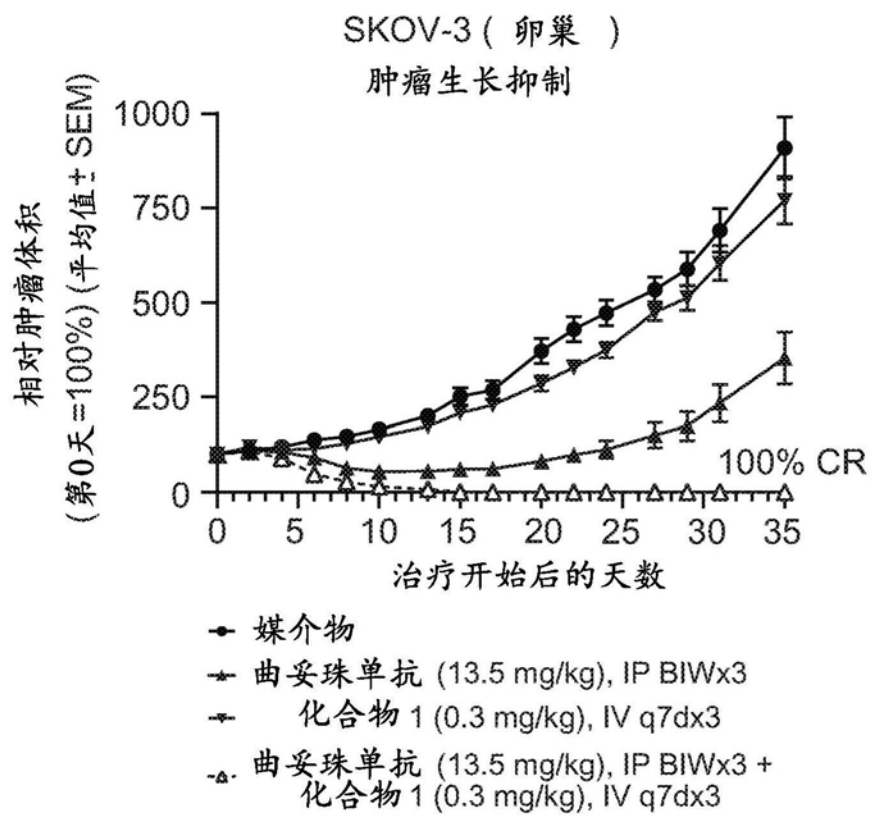


图24

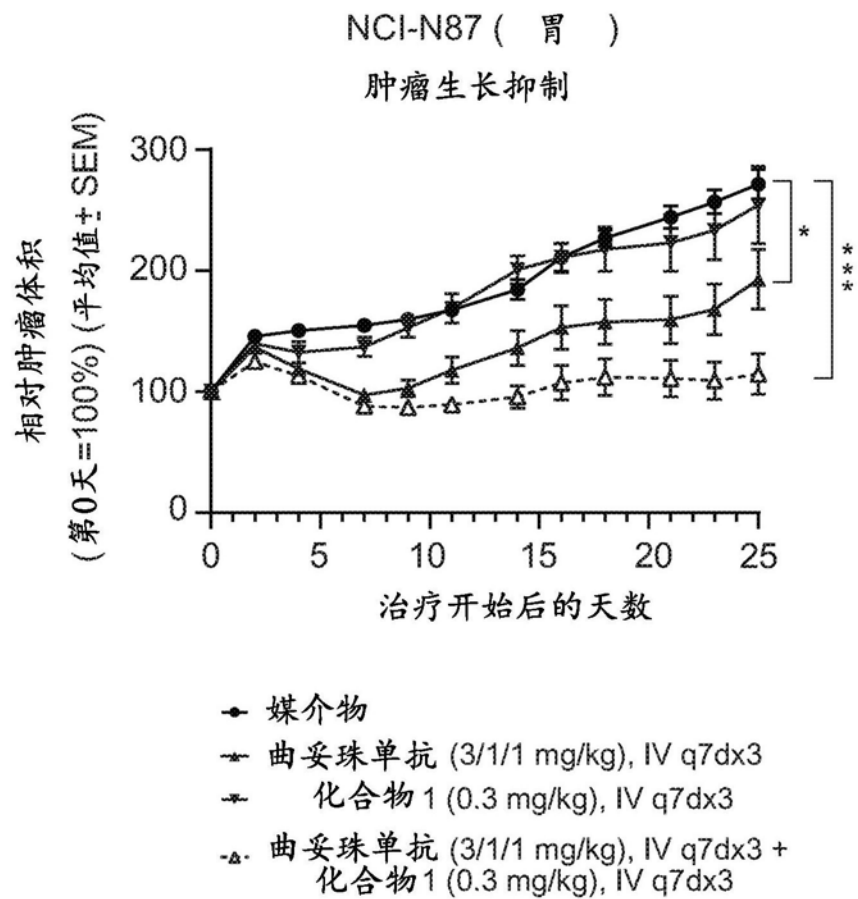


图25