(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119790078 A
(43)申请公布日 2025.04.08

(21)申请号 202380062431.8
(22)申请日 2023.08.29
(66)本国优先权数据
PCT/CN2022/116012 2022.08.31 CN
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.02.26
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2023/115537 2023.08.29
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/046322 EN 2024.03.07
(71)申请人 苏州复融生物技术有限公司
地址 215000 江苏省苏州市高新区永安路19号上市科创园1号楼三层309
(72)发明人 纪恩 王春雨
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴
(51)Int.Cl.
C07K 19/00(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C07K 14/54(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61K 38/20(2006.01)

权利要求书2页 说明书30页
序列表（电子公布） 附图35页

(54)发明名称

激动性白细胞介素15复合物及其用途

(57)摘要

本公开提供了具有治疗用途的激动性IL-15复合物以及制备这类蛋白质的方法。此外,本公开还提供了通过施用此类激动性IL-15复合物治疗有此需要的受试者的疾病的方法。

CN 119790078 A

1.一种融合蛋白,其包含与Fc单体融合的白细胞介素-15(IL-15)受体α寿司结构域,其中所述IL-15受体α寿司结构域包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,且所述Fc单体包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

2.根据权利要求1所述的融合蛋白,其中所述IL-15受体α寿司结构域的羧基末端通过具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的接头与所述Fc单体的氨基末端融合。

3.根据权利要求2所述的融合蛋白,其中所述接头由SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成。

4.根据权利要求3所述的融合蛋白,其包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

5.根据权利要求3所述的融合蛋白,其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

6.一种由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的融合蛋白。

7.一种由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成的融合蛋白。

8.一种蛋白质复合物,其包含根据权利要求1-7中任一项所述的融合蛋白和IL-15。

9.根据权利要求8所述的蛋白质复合物,其中所述IL-15包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

10.根据权利要求8所述的蛋白质复合物,其中所述IL-15由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成。

11.根据权利要求8所述的蛋白质复合物,其中所述IL-15包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

12.根据权利要求8所述的蛋白质复合物,其中所述IL-15由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成。

13.一种核酸分子,如载体,其编码根据权利要求1-7中任一项所述的融合蛋白。

14.一种宿主细胞,其包含根据权利要求13所述的核酸分子。

15.一种产生根据权利要求1-7中任一项所述的融合蛋白的方法,所述方法包括在足以表达所述融合蛋白的条件下培养根据权利要求14所述的宿主细胞,以及分离所述融合蛋白。

16.一种或多种核酸分子,如一种或多种载体,其编码根据权利要求8-12中任一项所述的蛋白质复合物的融合蛋白和IL-15。

17.一种或多种宿主细胞,其包含根据权利要求16所述的一种或多种核酸分子。

18.一种产生根据权利要求8-12中任一项所述蛋白质复合物的方法,包括在足以表达所述融合蛋白和IL-15的条件下培养根据权利要求17所述的一种或多种宿主细胞,分离所述融合蛋白和IL-15,并任选地通过在体外组合分离的融合蛋白和IL-15来组装所述蛋白质复合物。

19.一种药物组合物,其包含根据权利要求1-7中任一项所述的融合蛋白、根据权利要求8-12中任一项所述的蛋白质复合物、根据权利要求13所述的核酸分子、根据权利要求16所述的一种或多种核酸分子、根据权利要求14所述的宿主细胞或根据权利要求17所述的一种或多种宿主细胞,以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载剂。

20.根据权利要求19所述的药物组合物,其包含权利要求8-12中任一项所述的蛋白质复合物。

21.一种治疗有此需要的受试者的疾病的方法,其包括向所述受试者施用有效量的根

据权利要求19或权利要求20所述的药物组合物。

22.根据权利要求21所述的方法,其进一步包括向所述受试者施用另一治疗活性剂。

23.根据权利要求22所述的方法,其中所述另一治疗活性剂包含小分子化合物、靶向化疗剂、放射治疗剂或抗体或其抗原结合片段。

24.根据权利要求23所述的方法,其中所述另一治疗活性剂包含特异性结合CD20、PD1、PDL1、Her2、EGFR或c-MET的抗体或其抗原结合片段。

25.根据权利要求24所述的方法,其中所述另一治疗活性剂包含抗PD-1抗体或其抗原结合片段。

26.根据权利要求21-25中任一项所述的方法,其中所述疾病为肿瘤。

27.根据权利要求26所述的方法,其中所述肿瘤为实体瘤。

28.根据权利要求21-25中任一项所述的方法,其中所述疾病为病原体感染,如细菌感染和/或病毒感染。

29.根据权利要求21-25中任一项所述的方法,其中所述疾病为自身免疫性疾病。

30.根据权利要求21-25中任一项所述的方法,其中所述疾病为炎症性疾病。

31.根据权利要求21-25中任一项所述的方法,其中所述疾病为神经退行性疾病。

32.一种治疗肿瘤的方法,其包括向有此需要的受试者施用有效量的根据权利要求20所述的药物组合物。

33.根据权利要求32所述的方法,其中所述肿瘤为实体肿瘤,如癌、肉瘤或黑色素瘤。

34.根据权利要求33所述的方法,其中所述实体肿瘤选自由膀胱癌、肺癌、乳腺癌、结直肠癌、脑肿瘤、前列腺癌、黑色素瘤、默克尔细胞癌、头颈癌、小肠癌、鳞状细胞癌、转移性实体瘤或宫颈癌组成的组。

35.根据权利要求34所述的方法,其中所述肿瘤为膀胱癌。

36.根据权利要求34所述的方法,其中所述肿瘤为肺癌,如小细胞肺癌。

37.根据权利要求34所述的方法,其中所述肿瘤为乳腺癌。

38.根据权利要求34所述的方法,其中所述肿瘤为宫颈癌。

39.根据权利要求34所述的方法,其中所述肿瘤为结直肠癌。

40.根据权利要求32-39中任一项所述的方法,其进一步包括向所述受试者施用免疫疗法。

41.根据权利要求40所述的方法,其中所述免疫疗法包含抗PD-1抗体或其抗原结合片段。

42.根据权利要求32-41中任一项所述的方法,其中在施用所述药物组合物之后,所述受试者不经历肝脏、脾脏、肺和/或肾脏的坏死。

43.根据权利要求32-41中任一项所述的方法,其中所述药物组合物的施用不导致细胞因子风暴,特别地,所述药物组合物的施用对细胞因子IL-1β、IL-2、IL-4、IL-10、IL-5、CXCL/KC和IL-12P/p70的体内释放没有显著作用。

44.根据权利要求32-43中任一项所述的方法,其中所述药物组合物的施用不增加肝功能指标谷氨酸转氨酶(ALT)和谷胱甘肽转氨酶(AST)。

45.根据权利要求32-44中任一项所述的方法,其中所述药物组合物的施用不增加白细胞释放、淋巴细胞释放和/或单核细胞释放。

激动性白细胞介素15复合物及其用途

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2022年8月31日提交的国际申请号PCT/CN2022/116012的优先权,该申请的公开内容通过提述以其整体并入本文。

对电子提交的序列表的引用

[0002] 本申请包含序列表,文件名称为“069777.11027-6WO2_sequence_listing.xml”,创建日期为2023年8月17日,大小为10kb。该序列表是说明书的一部分,并且通过提述以其整体并入本文。

技术领域

[0003] 本公开总体涉及包含白细胞介素15(IL-15)激动剂如激动性IL-15复合物的组合物和方法,所述激动性IL-15复合物可以用于,例如,治疗有此需要的受试者的疾病的方法。

背景技术

[0004] 细胞因子白细胞介素15(IL-15)是由体内许多细胞产生的四α螺旋束家族淋巴因子的成员。IL-15在调节先天性和适应性免疫系统二者的活性方面起着关键作用,例如维持记忆T细胞对入侵病原体的反应、抑制细胞凋亡、激活树突状细胞以及诱导自然杀伤(NK)细胞增殖和细胞毒性活性。

[0005] IL-15受体由三种多肽组成,类型-特异性IL-15受体α(“IL-15Rα”)、IL-2/IL-15受体β(或CD122)(“3”)和多种细胞因子受体共享的共同γ链(或CD132)(“γ”)。IL-15Rα被认为由多种细胞类型表达,但不一定与β和γ一起表达。已表明IL-15信号传导通过IL-15Rα、β和γ的异二聚体复合物;通过β和γ的异二聚体复合物;或通过肥大细胞上发现的亚基IL-15RX发生(Ikemizu,Shinji等,“IL-2and IL-15signaling complexes:different but the same.”Nature immunology vol.13,12(2012):1141-2,PMID:23160210;Briukhovetska,Daria等,“Interleukins in cancer:from biology to therapy.”Nature reviews.Cancer vol.21,8(2021):481-499,PMID:3408378)。

[0006] IL-15是一种可溶性蛋白,但内源性IL-15在血清或体液中不容易检测到——相反,它主要以膜结合形式存在,由几种类型辅助细胞表达或获取(Fehniger,T A和M A Caligiuri.“Interleukin 15:biology and relevance to human disease.”Blood vol.97,1(2001):14-32,PMID:11133738)。例如,尽管在造血和非造血谱系二者的细胞中都检测到IL-15mRNA,但T细胞并不产生IL-15。相反,IL-15与IL-15Rα结合,在T细胞上形成细胞表面复合物。IL-15通过受体的胞外结构域的外显子2中的“寿司结构域(sushi Domain)”与IL-15Rα以高亲和力特异性结合(Budagian,Vadim等,“IL-15/IL-15receptor biology:a guided tour through an expanding universe.”Cytokine&growth factor reviews vol.17,4(2006):259-80,PMID:16815076)。跨核内体再循环以及迁移回至细胞表面后,这些IL-15复合物获得激活表达IL-15Rβγ低亲和力受体复合物的旁细胞(bystander)的特性,经由Jak/Stat途径诱导IL-15介导的信号传导。已观察到一种天然存在的可溶性形式的

IL-15Rα(“sIL-15Rα”),其在受体的跨膜结构域紧邻远端的胞外结构域中的切割位点处被切割(Lukic,M L等,“Lack of the mediators of innate immunity attenuate the development of autoimmune diabetes in mice.”Journal of autoimmunity vol.21,3(2003):239-46,PMID:14599848)。肿瘤坏死因子-α-转换酶(TACE/ADAM17)被认为是参与此过程的蛋白酶。

[0007] 基于其在免疫系统中的多方面作用,探索了经设计以调节IL-15介导的功能的多种疗法。例如,外源性IL-15的施用可以增强以人免疫缺陷病毒(HIV)感染的患者的免疫功能。尽管在理解IL-15的功能方面取得了一定量的进展,但基于IL-15的疗法仍有许多挑战,如下文进一步讨论。因此,人们对进一步开发新的基于IL-15的治疗方法有着强烈的兴趣。

发明内容

[0008] 本公开总体涉及一种融合蛋白,其包含与Fc单体融合的白细胞介素15(IL-15)受体α寿司结构域,其中IL-15受体α寿司结构域包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,且Fc单体包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在一些方面,IL-15受体α寿司结构域的羧基末端通过具有GGGGS的氨基酸序列(SEQ IDNO:7)的接头与Fc单体的氨基末端融合。在一些方面,接头由SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成。在一些方面,融合蛋白包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。在一些方面,融合蛋白包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

[0009] 此外,本公开总体涉及一种由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的融合蛋白。而且,本公开总体涉及一种由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成的融合蛋白。另外,本公开总体涉及一种蛋白质复合物,其包含如本文所述的融合蛋白和IL-15。在一些方面,IL-15包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。在一些方面,IL-15由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成。在一些方面,IL-15包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。在一些方面,IL-15由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成。

[0010] 此外,本公开总体涉及一种核酸分子,如载体,其编码如本文所述的融合蛋白。此外,本公开总体涉及一种宿主细胞,其包含编码如本文所述融合蛋白的核酸分子,如载体。另外,本公开总体涉及一种制备如本文所述的融合蛋白的方法,其包括在足以表达所述融合蛋白的条件下培养如本文所述的宿主细胞,并分离该融合蛋白。而且,本公开总体涉及一种或多种核酸分子,如一种或多种载体,其编码如本文所述的蛋白质复合物的融合蛋白和IL-15。此外,本公开总体涉及一种或多种宿主细胞,其包含一种或多种核酸分子,如一种或多种载体,其编码如本文所述蛋白质复合物的融合蛋白和IL-15。另外,本公开总体涉及一种制备如本文所述蛋白质复合物的方法,其包括在足以表达所述融合蛋白和IL-15的条件下培养如本文所述的一种或多种宿主细胞,分离所述融合蛋白和IL-15,并任选地通过在体外组合分离的融合蛋白和IL-15来组装蛋白质复合物。

[0011] 此外,本公开总体涉及一种药物组合物,其包含如本文所述的融合蛋白、如本文所述的蛋白质复合物、如本文所述的核酸分子、如本文所述的一种或多种核酸分子、如本文所述的宿主细胞或如本文所述的一种或多种宿主细胞,以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载剂。在一些方面,所述药物组合物包含如本文所述的蛋白质复合物。

[0012] 而且,本公开总体涉及一种治疗有需要的受试者的疾病的方法,其包括向所述受试者施用有效量的如本文所述的药物组合物。在一些方面,所述方法进一步包括向受试者施用另一治疗活性剂。在一些方面,另一治疗活性剂包含小分子化合物、靶向化疗剂、放射

治疗剂或抗体或其抗原结合片段。在一些方面,另一治疗活性剂包含特异性结合CD20、PD1、PDL1、Her2、EGFR或c-MET的抗体或其抗原结合片段。在一些方面,另一治疗活性剂包含抗PD-1抗体或其抗原结合片段。在一些方面,疾病是肿瘤。在一些方面,肿瘤是实体肿瘤。在一些方面,疾病是病原体感染,如细菌感染和/或病毒感染。在一些方面,疾病是自身免疫性疾病。在一些方面,疾病是炎症性疾病。在一些方面,疾病是神经退行性疾病。

[0013] 此外,本公开总体涉及一种治疗肿瘤的方法,其包括向有此需要的受试者施用有效量的如本文所述的药物组合物。在一些方面,肿瘤是实体肿瘤,如癌、肉瘤或黑色素瘤。在一些方面,实体肿瘤选自由膀胱癌、肺癌、乳腺癌、结直肠癌、脑肿瘤、前列腺癌、黑色素瘤、默克尔细胞癌、头颈癌、小肠癌、鳞状细胞癌、转移性实体瘤或宫颈癌组成的组。在一些方面,肿瘤是膀胱癌。在一些方面,肿瘤是肺癌,如小细胞肺癌。在一些方面,肿瘤是乳腺癌。在一些方面,肿瘤是宫颈癌。在一些方面,肿瘤是结直肠癌。在一些方面,所述方法进一步包括向受试者施用免疫疗法。在一些方面,免疫疗法包含抗PD-1抗体或其抗原结合片段。在一些方面,在施用药物组合物之后,受试者不经历肝脏、脾脏、肺和/或肾脏的坏死。在一些方面,药物组合物的施用不导致细胞因子风暴,特别地,药物组合物的施用对细胞因子IL-1β、IL-2、IL-4、IL-10、IL-5、CXCL/KC和IL-12P/p70的体内释放没有显著作用。在一些方面,药物组合物的施用不增加肝功能指标谷氨酸转氨酶(ALT)和谷胱甘肽转氨酶(AST)。在一些方面,药物组合物的施用不增加白细胞释放、淋巴细胞释放和/或单核细胞释放。

[0014] 本发明的其他方面、特征和优点将从以下公开内容中显而易见,包括本发明的详细描述及其优选的实施方式和所附权利要求书。

附图简要说明

[0015] 图1A-图1D展示了IL-15激动性复合物的示意图(图1A),以及根据本申请的实施方式(例如实施例2),FL115、ALT803和FL115-WT分别与IL-15Rβ结合的生物层干涉测量(BLI)结果的图形表示(图1B-图1D)。图1A展示了IL-15激动性复合物的示意表示。图1B展示了FL115与IL-15Rβ结合的图形表示。图1C展示了ALT803与IL-15Rβ结合的图形表示。图1D展示了FL115-WT与IL-15Rβ结合的图形表示。参考图1B-图1D,kon表示结合速率常数,koff表示解离速率常数,且KD表示kon/koff,其指示融合蛋白与抗原结合的平衡常数,反映了融合蛋白的亲和力。

[0016] 图2A-图2B展示了根据本申请的实施方式(如实施例3),如通过CTLL2细胞增殖测定(图2A)和M-07e细胞增殖测定(图2B)检测的FL115的生物活性的图形表示。图2A展示了CTLL2细胞的增殖活性的图形表示,其中测量OD450作为FL115-V1(正方形)、FL115-V2(圆形)或sFc(倒三角形)浓度的函数。图2B展示了M-07e细胞的增殖活性的图形表示,其中测量发光强度作为FL115浓度的函数。

[0017] 图3A-图3E展示了根据本申请的实施方式(如实施例4),FL115对人免疫细胞的免疫刺激作用的图形表示。图3A展示了淋巴细胞增殖测定的图形表示,其中增殖反应百分比相对于ALT803(正方形)或FL115(圆形)的浓度作图。图3B展示了免疫细胞增殖测定的图形表示,其中按细胞类型对于培养基(实心黑色)、ALT803(实心白色)或FL115(交叉阴影图案)中每个表示的绝对细胞数。图3C展示了细胞表面标记激活测定的图形表示,其中CD69 MFI相对于ALT803 CD8+T细胞(正方形)、FL115 CD8+T细胞(六边形)、ALT803NK细胞(菱形)、FL115 NK细胞(星形)、FL115 CD4+T细胞(倒三角形)或ALT803 CD4+T细胞(圆形)的浓度作

图。图3D展示了颗粒酶B表达测定的图形表示,其中MFI相对于NK细胞(圆形)或CD8+T细胞(正方形)的浓度作图。图3E展示了穿孔素表达测定的图形表示,其中MFI相对于NK细胞(圆形)或CD8+T细胞(正方形)的浓度作图。

[0018] 图4展示了根据本申请的实施方式(如实施例5),通过表面等离子共振(SPR)测量的FL115与FcRn结合的图形表示。

[0019] 图5A-图5E展示了根据本申请的实施方式(例如实施例6),FL115在MC38皮下移植瘤模型中的抗肿瘤作用的图形表示。图5A展示了FL115(圆形)、ALT803(正方形)和PBS(三角形)的肿瘤体积随时间的变化获得的数据。图5B展示了FL115的肿瘤体积随时间的变化获得的数据。图5C展示了ALT803的肿瘤体积随时间的变化获得的数据。图5D展示了PBS的肿瘤体积随时间的变化获得的数据。图5E展示了FL115(圆形)、ALT803(正方形)和PBS(三角形)的体重随时间的变化获得的数据。

[0020] 图6A-图6D展示了根据本申请的实施方式(例如实施例7),测量NK细胞和CD8+T细胞在MC38小鼠结肠癌细胞皮下移植瘤模型的肿瘤组织中的杀伤功能的测定的图形表示。图6A展示了测量PBS、ALT803或FL115的CD3+细胞中GZMB+CD8+的结果。图6B展示了测量PBS、ALT803或FL115的CD3+细胞中穿孔素+CD8+的结果。图6C展示了测量PBS、ALT803或FL115的NK细胞中GZMB+的结果。图6D展示了测量PBS、ALT803或FL115的NK细胞中穿孔素+的结果。

[0021] 图7展示了根据本申请的实施方式(如实施例8),在被施用了PBS、ALT803或FL115的CT26小鼠结肠癌转移性肿瘤模型中小鼠的生存曲线的图形表示。注意的是在图7的图形表示中,代表FL115和ALT803的线重叠。

[0022] 图8A-图8D展示了根据本申请的实施方式(如实施例9),FL115与抗PD-1抗体组合在小鼠中的抗肿瘤作用的图形表示。图8A展示了涉及用PBS(圆形)、FL115(正方形)、PD1(正三角形)或FL115+PD-1(倒三角形)处理的CMT167小鼠的肿瘤体积随时间的变化的结果。图8B展示了涉及用PBS(圆形)、FL115(正方形)、PD1(正三角形)或FL115+PD-1(倒三角形)处理的CMT167小鼠的体重随时间的变化的结果。图8C展示了涉及用PBS(圆形)、FL115(正方形)、PD1(正三角形)或FL115+PD-1(倒三角形)处理的LLC小鼠的肿瘤体积随时间的变化的结果。图8D展示了涉及用PBS(圆形)、FL115(正方形)、PD1(正三角形)或FL115+PD-1(倒三角形)处理的LLC小鼠的体重随时间的变化的结果。

[0023] 图9A-图9B展示了根据本申请的实施方式(如实施例10),FL115对CD16a 158V和CD16a 158F亲和力的BLI验证的图形表示。图9A展示了FL115对CD16a 158F亲和力的BLI验证的图形表示。图9B展示了FL115对CD16a 158V亲和力的BLI验证的图形表示。

[0024] 图10A-图10D展示了根据本申请的实施方式(如实施例11),在小鼠安全性评估中FL115对肝脏和肾脏功能的作用的图形表示。图10A展示了施用给定剂量的PBS、FL115或ALT803的小鼠中肌酸酐(ECRE)水平的图形表示。图10B展示了施用给定剂量的PBS、FL115或ALT803的小鼠中尿素氮(UN)水平的图形表示。图10C展示了施用给定剂量的PBS、FL115或ALT803的小鼠中谷胱甘肽转氨酶(AST)水平的图形表示。图10D展示了施用给定剂量的PBS、FL115或ALT803的小鼠中谷氨酸转氨酶(ALT)水平的图形表示。

[0025] 图11A-图11D展示了根据本申请的实施方式(如实施例11),在安全性评估期间FL115在小鼠中的血液学作用的图形表示。图11A展示了施用给定剂量的PBS、FL115或ALT803的小鼠中WBC计数。图11B展示了施用给定剂量的PBS、FL115或ALT803的小鼠中淋巴

细胞计数。图11C展示了施用给定剂量的PBS、FL115或ALT803的小鼠中单核细胞计数。图11D展示了施用给定剂量的PBS、FL115或ALT803的小鼠中中性粒细胞计数。

[0026] 图12A-图12F展示了根据本申请的实施方式(如实施例11),在FL115安全性评估期间小鼠中多个器官的脏器重量的图形表示。图12A展示了施用PBS、FL115或ALT803的小鼠的肺重量。图12B展示了施用PBS、FL115或ALT803的小鼠的淋巴结重量。图12C展示了施用PBS、FL115或ALT803的小鼠的脾脏重量。图12D展示了施用PBS、FL115或ALT803的小鼠的肝脏重量。图12E展示了施用PBS、FL115或ALT803的小鼠的肾脏重量。图12F展示了施用PBS、FL115或ALT803的小鼠的心脏重量。

[0027] 图13展示了根据本申请的实施方式(如实施例11),20mg/kg ALT803组的H&E结果的图像。

[0028] 图14展示了根据本申请的实施方式(如实施例11),来自不同给药组的小鼠中脏器组织化学的结果的图像。

[0029] 图15A-图15J展示了根据本申请的实施方式(如实施例12),FL115在小鼠中对IL-6(图15A)、IFN-γ(图15B)、TNF-α(图15C)、IL-1β(图15D)、IL-2(图15E)、IL-4(图15F)、IL-10(图15G)、IL-5(图15H)、CXCL/KC(图15I)和IL-12P/p70(图15J)的刺激的图形表示。空心圆形代表剂量为20mg/kg的ALT803;菱形代表剂量为2mg/kg的ALT803;倒三角形代表剂量为0.2mg/kg的ALT803;正三角形代表剂量为20mg/kg的FL115;正方形代表剂量为2mg/kg的FL115;圆形代表剂量为0.2mg/kg的FL115。

[0030] 图16A-图16C展示了根据本申请的实施方式(如实施例13),IL-15在皮下小鼠膀胱癌模型中的抗肿瘤效果的结果的图形表示。图16A展示了施用PBS(圆形)、0.2mg/kg FL115(正方形)、2mg/kg FL115(正三角形)或20mg/kg FL115(倒三角形)的小鼠的肿瘤体积随时间的变化的图形表示。图16B展示了施用PBS(圆形)、0.2mg/kg FL115(正方形)、2mg/kg FL115(正三角形)或20mg/kg FL115(倒三角形)的小鼠的肿瘤抑制率随时间的图形表示。图16C展示了施用PBS(圆形)、0.2mg/kg FL115(正方形)、2mg/kg FL115(正三角形)或20mg/kg FL115(倒三角形)的小鼠的体重随时间的变化的图形表示。

[0031] 图17A-图17C展示了涉及根据本申请的实施方式(例如实施例13),IL-15在小鼠原位膀胱癌模型中的抗肿瘤效果的数据。图17A展示了四个不同组小鼠中每只小鼠的膀胱重量。图17B展示了从来自四个不同组小鼠中每只小鼠中切除的膀胱的图像。图17C展示了四个不同组小鼠中每只小鼠的体重的图形表示。

[0032] 图18A-图18B展示了小鼠中FL115和ALT 803的半衰期的测量结果(例如实施例14)。图18A展示了向小鼠施用后多个时间点FL115的血清浓度。图18B展示了向小鼠施用后不同时间点ALT 803的血清浓度。

发明详述

[0033] 在背景技术部分以及整个说明书中引用或描述了各种出版物、文章和专利;这些参考文献中的每一篇均通过提述以其整体并入本文。在本说明书中对文献、行为、材料、装置、文章等内容的讨论是出于为本发明提供背景的目的。此类讨论并不意味着承认这些内容中的任何或全部构成与所披露或所主张的任何发明相关的现有技术的一部分。

[0034] 除非另有定义,本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。否则,本文所用的某些术语具有说明书中所规定的含义。本

文引用的所有专利、已公开的专利申请和出版物均通过提述以其整体并入本文,如同在本文中完整阐述一样。

[0035] 必须指出的是,如本文以及所附权利要求书中所用,单数形式“一(a、an)”和“该/所述(the)”包括复数指代,除非上下文明确另有指示。

[0036] 除非另有说明,本文所述的任何数值,例如序列同一性%或序列同一性%范围,应理解为在所有情况下均由“约”一词修饰。因此,一个数值通常包括所提及数值的±10%。例如,10mg的剂量包括9mg至11mg。如本文所用的,使用数值范围明确包括所有可能的子范围、该范围内的所有单个数值,包括该范围内的整数和这些数值的分数,除非上下文明确另有指示。

[0037] 如本文所用的,多个所列要素之间的连接性术语“和/或”应理解为涵盖单独和组合的选项。例如,当两个要素由“和/或”连接时,第一选项是指第一要素适用而第二要素不适用;第二选项是指第二要素适用而第一个要素不适用;第三选项是指第一个和第二个要素共同适用。应理解,这些选项中的任何一个均落入如本文所用的术语“和/或”的含义中,因此满足其要求。也应理解,一个以上的选项的同时适用同样落入如本文所用的术语“和/或”的含义中,因此也满足其要求。

[0038] 除非另有指示,位于一系列要素之前的术语“至少”应理解为是指该系列中的每个要素。本领域技术人员将认识到或能够仅仅使用常规实验确定本文所述的发明的具体实施方式的许多等同方案。此类等同方案旨在由本发明所涵盖。

[0039] 在整个说明书以及随附的权利要求书中,除非上下文另有要求,否则词语“包含(comprise)”以及变型诸如“(comprises)”和“(comprising)”将被理解为暗示包含所陈述的一个整数或一个步骤或一组整数或一组步骤,但并不排除任何其他整数或步骤或一组整数或一组步骤。如本文所用的,术语“包含(comprising)”可以用术语“含有(containing)”或“包括(including)”替换,有时也可以用术语“具有(having)”替换。

[0040] 如本文所用,“由……组成(consisting of)”排除权利要求要素中未指定的任何要素、步骤或成分。如本文所用的,“基本上由……组成(consisting essentially of)”不排除不会实质性影响权利要求的基本和新颖特征的材料或步骤。本文在本发明的一个方面或实施方式的上下文中使用的上述术语“包含(comprising)”、“含有(containing)”、“包括(including)”和“具有(having)”中的任何一个,都可以用术语“由……组成(consisting of)”或“基本上由……组成(consisting essentially of)”替换,以改变公开内容的范围。

[0041] 如本文所用,术语“抗体(antibody)”和“多种抗体(antibodies)”是指含有抗原结合位点的分子。抗体包括但不限于单克隆抗体、多特异性抗体、人抗体、人源化抗体、合成抗体、嵌合抗体、多克隆抗体、单域抗体、驼源化抗体、单链Fv(scFv)、单链抗体、Fab片段、F(ab')片段、二硫键连接的双特异性Fv(sdFv)、胞内抗体(intrabodies)以及抗独特型(抗Id)抗体(包括例如针对抗体的抗Id和抗-抗Id抗体),以及上述任何一种的表位结合片段。特别地,抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的具有免疫活性的片段。免疫球蛋白分子可以是任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、任何类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。

[0042] 如本文所用的,术语“疾病”和“病症”可互换使用以指受IL-15信号转导影响的状况。特别地,“疾病”和“病症”可以是一种病理状况,更特别地,是受IL-15信号转导影响的疾

病。

[0043] 术语“激动剂”是指与受体结合并引发激动性细胞内反应的化合物。激动剂模拟内源性配体、激素的作用,并产生与例如通过内源性配体所产生的生理反应相似的生理反应。

[0044] 如本文所用,“片段可结晶的区域”或“Fc”是指含有抗体重链恒定区但不包括恒定区第一结构域CH1的多肽。因此,Fc可包括IgA、IgD或IgG抗体的重链恒定区的最后两个结构域(CH2和CH3),IgE和IgM抗体的重链恒定区的最后三个结构域(CH2、CH3和CH4)。Fc还可以包括连接到CH2结构域的N末端的柔性铰链区。对于IgA和IgM,Fc可以包括J链。对于IgG,Fc含有免疫球蛋白结构域Cγ2和Cγ3以及Cγ1和Cγ2之间的铰链。Fc在形成Ig的Y形结构和维持该结构的二聚化、Fc介导的效应子功能和血清半衰期延长中发挥多种作用。IgG中的Fc与其受体Fc-γ受体(FcγR)的结合触发抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和抗体依赖性细胞介导的吞噬作用,以杀伤和清除靶细胞(例如肿瘤细胞)。Fc与血清补体分子(C1q)的结合可启动由补体级联蛋白形成的膜攻击复合物的组装,以破坏靶细胞,这称为补体依赖性细胞毒性(CDC)。除了介导效应子功能外,Fc还可以以pH依赖性方式与新生儿Fc受体(FcRn)结合,这可以导致IgG的血清半衰期延长。此外,Fc与免疫相关分子如Fc受体的结合可以调节体内的免疫反应。Fc可以指孤立的此区域,也可以指在抗体、抗体片段或Fc融合物的背景下的此区域。Fc可以是抗体、Fc融合物或包含Fc的蛋白质或蛋白质结构域的一部分。天然存在的Fc形成同二聚体。特别优选的是Fc变体,其是使用合成生物学获得的非天然存在的Fc变体。

[0045] 如本文所用,“Fc单体”或“单体Fc”是指在生理条件下不再形成同二聚体的Fc变体。Fc单体的实例包括但不限于Wang等,2017,Front.Immunol.,vol.8,article 1545、WO2022088484A1和US20210206847中描述的Fc单体,这些文献的内容均通过提述以其整体并入本文。

[0046] 在一些方面,本公开的Fc单体包含一种Fc多肽,其分子量仅为野生型Fc二聚体的一半,并且保留了抗体Fc区的FcRn的结合性能和蛋白A/G结合性能,并且可以在宿主细胞(如原核宿主细胞)中实现高效表达,并且与先前开发的单体IgG1 Fc突变体相比,可以显著降低非特异性结合。

[0047] 如本文所用的,术语“IL-15功能性片段”是指IL-15中能够引发或诱导与IL-15相关的任何程度的生物学活性的部分。此类功能性片段包括任何长度的任何突变的IL-15和/或保留IL-15的生物学活性的任何截短版本的IL-15。在一些方面,IL-15功能性片段包含SEQ ID NO:3的序列或由其组成。在一些方面,IL-15功能性片段包含SEQ ID NO:4的序列或由其组成。在一些方面,IL-15功能性片段包含遍及本申请所述的任何IL-15序列。

[0048] 如本文可互换使用的,“多核苷酸”或“核酸”是指任何长度的核苷酸的聚合物,且包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基和/或它们的类似物,或者是可以通过DNA或RNA聚合酶或通过合成反应并入聚合物中的任何底物。多核苷酸可包含修饰的核苷酸,如甲基化的核苷酸及其类似物。如本文所用的,“寡核苷酸”指短的、通常为单链的合成多核苷酸,其长度通常(但不一定)少于约200个核苷酸。术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”并非相互排斥。上述对多核苷酸的描述同样且完全适用于寡核苷酸。除非另有说明,本文所公开的任何单链多核苷酸序列的左侧端为5’端;双链多核苷酸序列的左侧方向被称为5’方向。新生RNA转录本从5’到3’的添加方向被称为转录方向;DNA链上

与RNA转录本序列相同且位于RNA转录本5’端的5’的序列区域被称为“上游序列”;DNA链上与RNA转录本序列相同且位于RNA转录本3’端的3’的序列区域称为“下游序列”。

[0049] 本文中,“自身免疫性疾病”是指免疫系统针对正常宿主的抗原的部分(即自身抗原)产生免疫反应(例如B细胞或T细胞反应),然后引起组织损伤的疾病。自身抗原可以源自宿主细胞,也可以源自共生生物,如通常定植于粘膜表面的微生物(称为共生生物)。影响哺乳动物的自身免疫性疾病包括但不限于类风湿性关节炎、青少年寡关节炎、胶原诱导性关节炎、佐剂诱导性关节炎、舍格伦综合征/干燥综合征(Sjogren’s syndrome)、多发性硬化症、实验性自身免疫性脑脊髓炎、炎性肠病(例如克罗恩病、溃疡性结肠炎)、自身免疫性胃萎缩、寻常型天疱疮、银屑病、白癜风、1型糖尿病、非肥胖型糖尿病、重症肌无力、格雷夫斯病、桥本甲状腺炎、硬化性胆管炎、硬化性唾液腺炎、系统性红斑狼疮、自身免疫性血小板减少性紫癜、古德帕斯丘综合征、艾迪森病、系统性硬化症、多发性肌炎、皮肌炎、自身免疫性溶血性贫血、恶性贫血等。

[0050] 本公开的“病毒”包括但不限于以下病毒科的病毒:逆转录病毒科(Retroviridae)(例如,人免疫缺陷病毒(HIV)、人T细胞白血病病毒(HTLV));小RNA病毒科(Picornaviridae)(例如,脊髓灰质炎病毒、甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、肠道病毒、人柯萨奇病毒、鼻病毒、埃柯病毒、口蹄疫病毒);Cadheroviridae(例如引起肠胃炎的病毒株);膜状病毒科(Tunica Virus family)(例如马脑炎病毒、风疹病毒);黄病毒科(Flaviviridae)(例如登革热病毒、黄热病病毒、西尼罗河病毒、圣路易斯脑炎病毒、日本脑炎病毒及其他脑炎病毒);冠状病毒科(Coronavirus Family)(例如冠状病毒、严重急性呼吸综合征(SARS)病毒);弹状病毒科(Rhabdoviridae)(例如水疱性口腔炎病毒、狂犬病病毒);副粘液病毒科(Paramyxoviridae)(例如副流感病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞病毒(RSV));正粘病毒科(Orthomyxoviridae)(例如流感病毒);布尼亚病毒科(Bunyaviridae)(例如汉坦病毒、辛诺柏病毒、裂谷热病毒、布尼亚病毒、白蛉病毒和内罗病毒);沙粒病毒科(Arenaviridae)(例如出血热病毒、马丘波病毒、胡宁病毒);呼肠孤病毒科(Reoviridae)(例如呼肠孤病毒、环状病毒和轮状病毒);双纳病毒科(Binnaviridae);嗜肝病毒科(Hepatoviridae)(例如乙型肝炎病毒);细小病毒科(Parvoviridae)(例如细小病毒);乳多空病毒科(Papovaviridae)(例如乳头瘤病毒、多瘤病毒、BK病毒);腺病毒科(Adenoviridae)(例如大多数腺病毒,如腺相关病毒);疱疹病毒科(Herpes Virus family)(例如单纯疱疹病毒(HSV-1和HSV-2)、巨细胞病毒(CMV)、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)、水痘-带状疱疹病毒(VZV)以及其他疱疹病毒,包括HSV-6);痘病毒科(Poxvirus family)(例如天花病毒、牛痘病毒、痘病毒);和虹膜病毒科(Iris virus family)(例如非洲猪瘟病毒);病毒科(例如埃博拉病毒、马尔堡病毒);杯状病毒科(Calicivirus Family)(例如诺沃克病毒)以及未分类的病毒(例如海绵状脑病的病原体、丁型肝炎的病原体(被认为是乙型肝炎病毒的缺陷卫星病毒)和星状病毒)。

[0051] 本公开的“细菌”包括但不限于:幽门螺杆菌(Helicobacter pylori)、伯氏疏螺旋体(Borelia burgdorferi)、嗜肺军团菌(Legionella pneumophila)、分枝杆菌属(Mycobacterium)(例如结核分枝杆菌(M.tuberculosis)、鸟分枝杆菌(M.avium)、胞内分枝杆菌(M.intracellulare)、堪萨斯分枝杆菌(M.kansasii)、戈登分枝杆菌(M.gordonae))、金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)、淋病奈瑟菌(Neisseria gonorrhoeae)、脑膜

炎奈瑟菌(Neisseria meningitidis)、单核细胞增生李斯特菌(Listeria monocytogenes)、酿脓链球菌(Streptococcus pyogenes)(A组链球菌)、无乳链球菌(Streptococcus agalactiae)(B组链球菌)、链球菌(幸运草)组(Streptococcus(lucky grass)Group)、粪链球菌(Streptococcus faecalis)、牛链球菌(Streptococcus bovis)、链球菌属(厌氧细菌)(Streptococcus(anaerobic bacteria))、肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)、致病性弯曲杆菌属(Pathogenic Campylobacter)、肠球菌属(Enterococcus)、流感嗜血杆菌(Haemophilus influenzae)、炭疽芽孢杆菌(Bacillus anthracis)、白喉棒状杆菌(Corynebacterium diphtheria)、棒状杆菌属(Corynebacterium)、猪瘟病毒(Swine fever Viruses)、产气荚膜梭菌(Clostridium perfringens)、破伤风梭菌(Clostridium tetani)、产气肠杆菌(Enterobacter aerogenes)、肺炎克雷伯菌(Klebsiella pneumoniae)、多杀巴斯德菌(Pasteurella multocida)、拟杆菌属(Bacteroides)、梭菌属(Clostridium)、麦芽链霉菌(Streptomyces malt)、肺炎密螺旋体(Treponema pneumoniae)、肺炎密螺旋体螺旋体(Treponema pneumoniae Spirochetes)、钩端螺旋体属(Leptospira)或放线菌属(Actinomyces)(伊氏放线菌(Actinomyces israelli))。

[0052] 本公开的“真菌”包括但不限于:新型隐球菌(Cryptococcus neoformans)、荚膜组织胞浆菌(Histoplasmacapsulatum)、粗球孢子菌(Coccidioides immitis)、皮炎芽生菌(Blastomycesdermatitidis)、沙眼衣原体(Chlamydia trachomatis)或白色念珠菌(Candida albicans Bacteria)(白色假丝酵母(Candida albicans))。

[0053] 本公开的“寄生虫”包括但不限于:恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)或刚地弓形虫(Toxoplasma gondii)。

[0054] 如本文所用的,“癌症”是指实体肿瘤或血源性癌症。本公开的实体肿瘤包括肉瘤或癌症,如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤或其他肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、淋巴样恶性肿瘤、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、髓质癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、威尔姆斯瘤/肾母细胞瘤(Wilms tumor)、宫颈癌、睾丸肿瘤、膀胱癌或中枢神经系统肿瘤(如神经胶质瘤)、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、少突胶质细胞瘤、血管瘤、黑色素瘤、成神经细胞瘤或视网膜母细胞瘤)。本公开的血源性癌症包括白血病,如急性白血病(如急性成淋巴细胞白血病、急性髓样白血病、急性髓样白血病以及成髓细胞、早幼粒细胞、髓单核细胞、单核细胞和红白血病);慢性白血病(如慢性粒细胞(粒细胞)白血病、慢性粒细胞白血病和慢性淋巴细胞白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金氏病、非霍奇金氏淋巴瘤(惰性和进展型)、多发性骨髓瘤、华氏巨球蛋白血症、重链病、骨髓增生异常综合征、毛细胞白血病或骨髓发育不良。

[0055] 如本文所用的,“受试者”意指任何动物,优选哺乳动物,最优选人类,根据本公开实施方式的方法将对其进行治疗或已经对其进行了治疗。如本文所用的术语“哺乳动物”涵盖任何哺乳动物。哺乳动物的实例包括但不限于牛、马、羊、猪、猫、狗、小鼠、大鼠、兔子、豚鼠、非人灵长类动物(NHP)如猴子或猿、人类等,更优选人类。人受试者可以包括患者。

[0056] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,且是指任何长度的氨基酸的

聚合物。所述聚合物可以是线性或支链的,它可包含修饰的氨基酸,并且它可以被非氨基酸打断。所述术语还涵盖天然修饰或干预修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其他操作或修饰。定义中还包括例如含有一个或多个氨基酸类似物的多肽,所述氨基酸类似物包括但不限于非天然氨基酸,以及本领域已知的其他修饰。应理解的是,由于本公开的多肽可以基于抗体或免疫球蛋白超家族的其他成员,因此在某些实施方式中,"多肽"可以作为单链或作为两条或更多条相关联的链存在。

[0057] 如本文所用的,在向受试者施用疗法的背景下,术语"治疗(treat)"、"正在治疗(treating)"和"治疗(treatment)"是指受试者从疗法中获得的有益效果,如但不限于,由于施用一种或多种疗法而减少或抑制疾病或病症的进展、扩散和/或持续时间,减轻或改善疾病或病症的严重程度,改善疾病或病症的一种或多种症状,和/或减少疾病或病症的一种或多种症状的持续时间。在特定实施方式中,在癌症的背景下,此类术语包括但不限于在向受试者施用疗法之后的一个、两个或三个或更多个结果:(1)肿瘤或赘生物的生长减少;(2)肿瘤的形成减少;(3)根除、去除或控制原发性、局部性和/或转移性癌症;(4)转移扩散的减少;(5)死亡率降低;(6)存活率提高;(7)生存长度增加;(8)处于缓解期的患者的数量增加;(9)住院率降低;(10)住院长度缩短;(11)维持肿瘤大小,使其增加不超过10%,或不超过8%,或不超过6%,或不超过4%;优选肿瘤大小增加不超过2%。

[0058] 如本文中所用的,在向受试者施用疗法的背景下,术语"预防(prevent)"、"进行预防(preventing)"和"预防措施(prevention)"是指抑制受试者的疾病或病症的发作或复发。

[0059] 当提及氨基酸序列时,短语"序列同一性百分比(%)"或"同一性%"或"与……%相同"描述的是两条或更多条比对后的氨基酸序列中相同氨基酸的匹配数量("命中数"),并与构成氨基酸序列总长度的氨基酸残基数量进行比较。换言之,使用比对,当使用本领域已知的序列比较算法所测量的对序列进行比较和比对以供最大对应性时,或者当进行手动比对和目视检查时,可以确定两条或更多条序列的相同氨基酸残基的百分比(例如,在氨基酸序列的全长上90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%或100%同一性)。对于核苷酸序列也可以进行相同的测定。用于确定序列同一性而进行比较的序列可由于氨基酸的取代、添加或缺失而有所不同。本领域技术人员已知合适的比对蛋白质序列的程序。例如,可以使用程序如CLUSTALW、Clustal Omega、FASTA或BLAST来确定蛋白质序列的百分比同一性,如使用NCBI BLAST算法(Altschul SF等,(1997),Nucleic Acids Res.25:3389-3402)。

[0060] 如本文中所用的,"非天然存在的"核酸或多肽是指在自然界中不存在的核酸或多肽。"非天然存在的"核酸或多肽可以在实验室和/或制造环境中进行合成、处理、制造和/或以其他方式进行操纵。在一些情况下,"非天然存在的"核酸或多肽可包含经过处理、加工或操纵的天然存在的核酸或多肽,以表现出在处理前天然存在的核酸或多肽所不存在的特性。如本文中所用的,"非天然存在的"核酸或多肽可以是从发现它的天然来源中分离或提取出来的核酸或多肽,并且它与在天然来源中与之相连的序列之间不存在共价键。"非天然存在的"核酸或多肽可以通过重组方法或其他方法(如化学合成)而制备。

[0061] 如本文中所用的,术语"可操作地连接"是指连接或并置,其中如此描述的组分处于一种允许它们按其预期方式发挥功能的关系。例如,与感兴趣的核酸序列可操作地连接

的调控序列能够指导感兴趣的核酸序列的转录,或者与感兴趣的氨基酸序列可操作地连接的信号序列能够使该感兴趣的氨基酸序列分泌或跨膜移位。

[0062] 为了帮助本公开内容的读者,本说明书被分成了不同的段落或章节,或者针对本公开的不同实施方式进行阐述。这些划分不应被视为将某一段落、章节或实施方式的主旨与其他段落、章节或实施方式的主旨割裂开来。相反地,本领域技术人员将理解,本说明书具有广泛的应用性,且涵盖了可以想到的各个章节、段落和句子的所有组合。对任何实施方式的讨论意欲仅为示例性的,而非意欲表明本公开(包括权利要求)的范围仅限于这些实例。本公开考虑使用具有可用于本公开的核糖核酸分子中任何序列、以任何组合的任何适用的组分,无论特定组合是否被明确描述。

IL-15及其激动性IL-15复合物

[0063] 尽管肿瘤免疫检查点抑制剂已被证明是肿瘤疗法中的一个里程碑式成果,但此类治疗的总体有效率并不高,且单药治疗的客观反应率大多在20%-30%的范围内。基于对肿瘤微环境的理解,许多研究人员认为,针对NK细胞进行免疫激活是解决PD-1单克隆抗体的低效率问题的重要方式。

[0064] Grabstein等在1994年发现了一种人IL-15,例如12-14kD细胞因子。它可以在机体正常免疫反应中发挥作用,如促进T细胞、B细胞和NK细胞的增殖。已表明,IL-15可作为一种有用的替代治疗或组合治疗。例如,与IL-2相比,IL-15具有更偏重的NK细胞激活活性。此外,IL-2除了能刺激杀伤性免疫细胞增殖外,还刺激调节性T细胞(Treg)增殖,且这些Treg抑制免疫反应,这导致抗肿瘤效果削弱。相反地,IL-15的特异性受体是IL-15Rα(CD125),其不激活Treg细胞。因此,从作为免疫激活剂的角度来看,IL-15相较于IL-2具有显著优势,并且预期依赖于其独特的NK细胞激活能力成为新一代抗肿瘤免疫激活剂,用于70%-80%对PD-1单克隆抗体无反应的肿瘤患者,具有巨大的市场潜力。如本文所用的,术语“IL-15”涵盖全长IL-15或IL-15功能性片段。“IL-15”可以是野生型IL-15或变体IL-15。

[0065] 尽管野生型IL-15具有潜力,但它在体内的半衰期极短,且疗效非常有限。此外,IL-15具有一种反式递送机制,有效的IL-15疗法需要考虑IL-15与IL-15Rα之间复合物的形成,这带来了很大困难。除了半衰期短和药代动力学不佳这些限制其临床应用的因素外,增加IL-15的剂量还可引发细胞因子风暴,导致强烈的毒副作用,由此极大地限制了其临床剂量水平。因此,改善的IL-15疗法受到高度关注且具有极大价值。

[0066] 因此,本公开总体涉及一种蛋白复合物,即激动性IL-15复合物,其包含IL-15和单体IL-15受体αSu/Fc融合蛋白,以及该复合物的用途。本文所述的激动性IL-15复合物具有长半衰期,已证实具有良好的安全性概况,并且与其他基于IL-15的治疗相比,显示出更高的抗肿瘤活性。例如,如以下实施例所证明的,根据本申请的实施方式的激动性IL-15复合物在体内的分布概貌比参照物(即ALT 803)更为平坦,且根据本申请的实施方式的激动性IL-15复合物的C_{max}不如参照物高,这导致不会促使细胞因子(如IL-6)的大量释放。不同于本文所述的激动性IL-15复合物中包含单体IL-15受体αSu/Fc融合蛋白连同IL-15,参照物ALT 803是一种包含二聚体形式IL-15受体αSu/Fc融合蛋白连同IL-15的蛋白质复合物。

[0067] 在一个总体方面,本申请涉及一种包含与Fc单体融合的白细胞介素-15(IL-15)受体α寿司结构域的融合蛋白,其中IL-15受体α寿司结构域包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,且Fc单体包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在一些实施方式中,IL-15受体α寿司结构域的羧

基末端通过具有GGGGS的氨基酸序列(SEQ ID NO:7)的接头(如由SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的接头)与Fc单体的氨基末端融合。在某些实施方式中,所述融合蛋白包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或由其组成。在某些实施方式中,所述融合蛋白包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列或由其组成。

[0068] 在另一总体方面,本申请涉及一种包含根据本申请的实施方式的融合蛋白和IL-15的蛋白复合物。在一些实施方式中,IL-15包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列或由其组成的功能性IL-15片段。在其他一些实施方式中,IL-15包含具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列或由其组成的功能性IL-15片段。

[0069] 在一些实施方式中,本公开总体涉及一种激动性白细胞介素-15(IL-15)复合物,其中该激动性IL-15复合物激动剂包含Fc单体、IL-15受体α寿司结构域和IL-15功能性片段,其中Fc单体与IL-15受体α寿司结构域融合,其中Fc单体-IL-15受体α寿司结构域融合物包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的序列,并且进一步地其中IL-15功能性片段包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的序列。在一些方面,Fc单体-IL-15受体α寿司结构域融合物包含SEQ ID NO:1的序列,且IL-15功能性片段包含SEQ ID NO:3的序列。在一些方面,Fc单体-IL-15受体α寿司结构域融合物包含SEQ ID NO:1的序列,且IL-15功能性片段包含SEQ ID NO:4的序列。在一些方面,Fc单体-IL-15受体α寿司结构域融合物包含SEQ ID NO:2的序列,且IL-15功能性片段包含SEQ ID NO:3的序列。在一些方面,Fc单体-IL-15受体α寿司结构域融合物包含SEQ ID NO:2的序列,且IL-15功能性片段包含SEQ ID NO:4的序列。

[0070] 在某些方面,IL-15受体α寿司结构域的C末端与Fc单体连接,并且该IL-15受体α寿司结构域能够与IL-15功能性片段结合。在一些方面,IL-15受体α寿司结构域的C末端通过共价键与Fc单体连接;优选地,Fc单体和IL-15受体α寿司结构域通过连接肽连接,且更优选地,连接肽为GGGGS或$(GGGGS)_3$。连接肽是指含有柔性氨基酸残基的多肽链,且这些柔性氨基酸残基为Gly、Ser、Ala或Thr。多肽链应具有合适的距离,该距离适于连接两个分子,以使它们相对于彼此具有正确的构型,从而维持所需的活性。出于此目的的合适的长度包括至少1个且不超过30个氨基酸残基。优选地,接头的长度为约1-30个氨基酸,且接头的优选长度为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和20个氨基酸。此外,选择并入连接肽的氨基酸残基所示的特性不应显著影响两个连接的分子的活性。因此,连接肽通常不具有与两个连接的分子不一致的电荷,或者不影响内部折叠,或者不与一个或多个单体中的氨基酸残基形成键或其他相互作用,使得单体会严重阻碍受体单体结构域的结合。在一些实施方式中,连接肽含有柔性氨基酸残基。例如,连接肽可以包括甘氨酸-丝氨酸聚合物,如$(GS)_n$、$(GSGGS)_n$、$(GGGGS)_n$、$(GGGS)_n$,其中n为至少1的整数;甘氨酸-丙氨酸聚合物;丙氨酸-丝氨酸聚合物;以及本领域已知的其他柔性连接肽,如Shaker钾离子通道的连接序列等。

[0071] 在一些方面,本公开的IL-15受体α寿司结构域包含IL-15受体α的胞外结构域,该结构域从由第一外显子2编码的半胱氨酸残基(C1)开始,且在第四外显子处结束。由亚外显子2编码的半胱氨酸残基(C4)、残基C1和C4都包含在寿司结构域中。通过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的且具有相应活性的IL-15受体的α寿司结构域的氨基酸序列也包括在本公开中。

[0072] 在一些方面,激动性IL-15复合物与IL-15受体β(IL-15Rβ)结合。在一些方面,激动

性IL-15复合物与IL-15Rβ结合,其Kd为9.00×10^{-9}M或更小、8.00×10^{-9}M或更小、7.00×10^{-9}M或更小、6.00×10^{-9}M或更小、5.00×10^{-9}M或更小、4.75×10^{-9}M或更小、4.50×10^{-9}M或更小或4.47×10^{-9}M或更小。在一些方面,激动性IL-15复合物与FcRn结合。在一些方面,激动性IL-15复合物能够以9.00×10^{-6}M或更小、8.00×10^{-6}M或更小、7.00×10^{-6}M或更小、6.00×10^{-6}M或更小、5.00×10^{-6}M或更小、4.75×10^{-6}M或更小、4.50×10^{-6}M或更小、4.25×10^{-6}M或更小或4.07×10^{-6}M或更小的亲和力与FcRn结合。在一些方面,激动性IL-15复合物能够刺激M-07e细胞的增殖。在一些方面,激动性IL-15复合物能够诱导从肿瘤浸润杀伤性NK细胞和/或CD8+T细胞分泌颗粒酶。颗粒酶是一类丝氨酸蛋白酶,其诱导由一组细胞毒性淋巴细胞(CL),例如细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、自然杀伤(NK)细胞)介导的细胞死亡。在一些方面,激动性IL-15复合物不能与CD16a 158V或CD16a 158F结合。在一些方面,Fc单体-IL-15受体α寿司结构域融合物能够与IL-15功能性片段结合。在一些方面,IL-15功能性片段是内源性表达的IL-15功能性片段。在一些方面,IL-15功能性片段是突变型IL-15片段。在一些方面,Fc单体-IL-15受体α寿司结构域融合物能够延长IL-15或IL-15功能性片段在体内的半衰期。

核酸分子、多核苷酸和宿主细胞

[0073] 本公开进一步总体涉及编码如本文所述的激动性IL-15复合物的核酸分子,其中Fc单体-IL-15受体α寿司结构域融合物和IL-15功能性片段是由多核苷酸编码的。在一些方面,Fc单体-IL-15受体α寿司结构域融合物和IL-15功能性片段是由分开的多核苷酸编码的。在一些方面,Fc单体-IL-15受体α寿司结构域融合物和IL-15功能性片段是由相同的多核苷酸编码的。在一些方面,Fc单体-IL-15受体α寿司结构域融合物和IL-15功能性片段存在于相同的载体中。在一些方面,Fc单体-IL-15受体α寿司结构域融合物和IL-15功能性片段存在于分开的载体中。在一些方面,Fc单体-IL-15受体α寿司结构域融合物和IL-15功能片段各自与不同的启动子可操作地连接。如本文所用的,“载体”是一种用于将遗传物质携带到另一细胞中的核酸分子,在该细胞中遗传物质可以被复制和/或表达。本领域技术人员根据本公开内容所知的任何载体均可使用。载体的实例包括但不限于质粒、病毒载体(噬菌体、动物病毒和植物病毒)、粘粒和人工染色体(如YAC)。优选地,载体是DNA质粒。载体可以是DNA载体或RNA载体。本领域普通技术人员根据本公开内容可以通过标准重组技术构建本申请的载体。本申请的载体可以是表达载体。如本文所用的,术语“表达载体”是指包含编码能够被转录的RNA的核酸的任何类型的遗传构建体。表达载体包括但不限于用于重组蛋白表达的载体(如DNA质粒或病毒载体),以及用于将核酸递送至受试者以在受试者组织中表达的载体(如DNA质粒或病毒载体)。本领域技术人员会理解的是,表达载体的设计可以取决于待转化的宿主细胞的选择、所需的蛋白质的表达水平等因素。

[0074] 本申请的载体可以含有各种调控序列。如本文所用的,术语“调控序列”是指允许、促成或调节核酸分子的功能性调控的任何序列,包括核酸或其衍生物(即mRNA)在宿主细胞或生物体中的重复、复制、转录、剪接、翻译、稳定性和/或转运。在本公开的上下文中,该术语涵盖启动子、增强子和其他表达控制元件(如聚腺苷酸化信号和影响mRNA稳定性的元件)。

[0075] 在本申请的一些实施方式中,载体是非病毒载体。非病毒载体的实例包括但不限于DNA质粒、细菌人工染色体、酵母人工染色体、噬菌体等。非病毒载体的实例包括但不限于

RNA复制子、mRNA复制子、修饰的mRNA复制子或自我扩增的mRNA、闭合的线性脱氧核糖核酸(例如线性共价闭合的DNA,例如线性共价闭合的双链DNA分子)。优选地,非病毒载体是DNA质粒。“DNA质粒”,其与“DNA质粒载体”、“质粒DNA”或“质粒DNA载体”可互换使用,是指能够在合适的宿主细胞中自主复制的双链且通常为环状的DNA序列。用于表达编码的多核苷酸的DNA质粒通常包含复制起点、多克隆位点和可选择的标记(其例如可为抗生素抗性基因)。可使用的合适DNA质粒的实例包括但不限于用于公知表达系统(包括原核和真核系统)的可商用的表达载体,如pSE420(Invitrogen,San Diego,Calif.),其可用于在大肠杆菌(Escherichia coli)中生产和/或表达蛋白;pYES2(Invitrogen,Thermo Fisher Scientific),其可用于在酵母的酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)菌株中生产和/或表达;MAXBAC®完全杆状病毒表达系统(Thermo Fisher Scientific),其可用于在昆虫细胞中生产和/或表达;pcDNA™或pcDNA3™(Life Technologies,Thermo Fisher Scientific),其可用于在哺乳动物细胞中高水平组成型蛋白表达;以及pVAX或pVAX-1(Life Technologies,Thermo Fisher Scientific),其可用于在大多数哺乳动物细胞中高水平瞬时表达感兴趣的蛋白质。可以通过使用常规技术和容易获得的起始材料,对任何可商用的DNA质粒的骨架进行修饰,以优化在宿主细胞中的蛋白质表达,如逆转某些元件(例如复制起点和/或抗生素抗性盒)的方向、替换对于质粒内源的启动子(例如抗生素抗性盒中的启动子)和/或替换编码经转录的蛋白质的多核苷酸序列(例如抗生素抗性基因的编码序列)。(参见,例如,Sambrook等,Molecular Cloning a Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor Press(1989))。

[0076] 本申请的载体(如DNA质粒或病毒载体)可以包含任何调控元件,以建立载体的常规功能。调控元件包括但不限于启动子、增强子、多腺苷酸化信号、翻译终止密码子、核糖体结合元件、转录终止子、选择标记、复制起点等。载体可以包含一个或多个表达盒。“表达盒”是载体的一部分,它指导细胞机制制造RNA和蛋白质。表达盒通常包含三个组分:启动子序列、开放阅读框和任选地包含多腺苷酸化信号的3'-非翻译区(UTR)。开放阅读框(ORF)是一个含有从起始密码子到终止密码子的感兴趣蛋白的编码序列的阅读框。如本文所用的,术语“可操作地连接”应在其最宽泛的合理语境中理解,是指多核苷酸元件以功能性关系连接。当一个多核苷酸与另一个多核苷酸处于功能性关系时,它就是“可操作地连接”的。例如,如果启动子影响编码序列的转录,那么它就与该编码序列可操作地连接。本文所述的表达盒中适用的任何组分可以以任何组合和任何顺序使用以制备本申请的载体。

[0077] 载体可以包含启动子序列(优选在表达盒内)以控制表达。术语“启动子”按其常规含义使用,是指启动与之可操作地连接的核苷酸序列的转录的核苷酸序列。启动子位于其转录的核苷酸序列附近的同一条链上。启动子可以是组成型的、诱导型的或阻遏型的。启动子可以是天然存在的或合成的。启动子可以来源于包括病毒、细菌、真菌、植物、昆虫和动物的来源。启动子可以是同源启动子(即与载体来源于相同的遗传来源)或异源启动子(即来源于不同的载体或遗传来源)。例如,如果使用的载体是DNA质粒,启动子可为对于质粒内源性的(同源)或来源于其他来源的(异源)。

[0078] 可使用的启动子的实例包括但不限于:来自猿猴病毒40(SV40)的启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、人免疫缺陷病毒(HIV)启动子(如牛免疫缺陷病毒(BIV)长末端重复序列(LTR)启动子)、莫洛尼(Moloney)病毒启动子、禽白血病病毒(ALV)启动子、巨细胞

病毒(CMV)启动子(如CMV即刻早期启动子(CMV-IE))、爱泼斯坦-巴尔(Epstein Barr)病毒(EBV)启动子或劳斯(Rous)肉瘤病毒(RSV)启动子。启动子也可以是来自人基因的启动子,如人肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌肉肌酸或人金属硫蛋白的启动子。启动子还可以是组织特异性启动子,如肌肉或皮肤特异性启动子,天然或合成的。

[0079] 此外,本公开总体涉及包含如本文所述的核酸分子、质粒和/或载体的宿主细胞。本公开的宿主细胞可以是任何原核细胞或真核细胞,包括但不限于细菌细胞(如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌)、昆虫细胞(如使用杆状病毒表达系统)、酵母或哺乳动物细胞(如CHO或BHK细胞系)。本领域技术人员已知其他合适的宿主细胞。

[0080] 药物组合物

[0081] 本公开另外总体涉及药物组合物,其包含如本文所述的融合蛋白、如本文所述的核酸分子、如本文所述的质粒和/或如本文所述的宿主细胞,以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载剂。在一些方面,药物组合物包含如本文所述的蛋白复合物。在一些方面,药物组合物进一步包含一种或多种抗PD-1抗体或其抗原结合片段和/或抗PD-L1抗体或其抗原结合片段。

[0082] 通常,本公开的药物组合物和治疗组合的施用具有治疗性目的,以产生针对疾病(如癌症)的免疫反应。如本文所用,“有效量”或“治疗有效量”是指如本文所述的激动性IL-15复合物或包含所述复合物的组合物的量足以在有此需要的受试者中诱导期望的免疫效果、免疫反应或治疗效果。治疗有效量可以是足以在有此需要的受试者中诱导免疫反应的量。治疗有效量可以是足以在有此需要的受试者中产生免疫力的量,例如针对疾病诸如癌症提供治疗效果。治疗有效量可以取决于多种因素而变化,如受试者的身体状况、年龄、体重、健康状况等;特定的应用,如提供保护性免疫或治疗性免疫;以及期望获得免疫的具体疾病,如病毒感染。本领域普通技术人员可以根据本公开内容容易地确定治疗有效量。

[0083] 本公开的组合物和治疗组合,如激动性IL-15复合物与抗PD-1和/或抗PD-L抗体或其片段的组合,还可以包含药学上可接受的载剂。药学上可接受的载剂是无毒的,并且不应干扰活性成分的功效。药学上可接受的载剂可以包括一种或多种赋形剂,如粘合剂、崩解剂、膨胀剂、悬浮剂、乳化剂、湿润剂、润滑剂、调味剂、甜味剂、防腐剂、染料、增溶剂和包衣剂。药学上可接受的载剂可以包括媒介物,如脂质(纳米)颗粒。载体或其他材料的确切性质可取决于施用途径,例如肌内、皮内、皮下、口服、静脉内、皮肤、粘膜内(如肠道)、鼻内或腹腔内途径。对于液体可注射的制剂(例如悬浮剂和溶液),合适的载剂和添加剂包括水、二醇(glycol)、油、醇、防腐剂、着色剂等。对于固体口服制剂(如粉末、胶囊、囊片(caplet)、软胶囊(gelcap)和片剂),合适的载剂和添加剂包括淀粉、糖、稀释剂、制粒剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂等。对于鼻喷雾剂/吸入剂混合物,水溶液/悬浮液可以包含水、二醇、油、润肤剂、稳定剂、湿润剂、防腐剂、芳香剂、调味剂等作为合适的载剂和添加剂。

[0084] 本申请的组合物和治疗性组合,即包含激动性IL-15复合物的那些组合物和治疗性组合,可以配制成适合向受试者施用的任何形式,以促进施用并改善功效,包括但不限于口服(肠道)施用和肠胃外注射。肠胃外注射包括静脉内注射或输注、皮下注射、皮内注射和肌内注射。本申请的组合物还可以配制成用于其他施用途径,包括经粘膜、眼部、直肠、长效植入、舌下施用、从口腔粘膜绕过门脉循环(bypassing the portal circulation)、吸入或鼻内施用。

[0085] 根据本公开的方面,用于施用的组合物和治疗性组合通常将在药学上可接受的载剂(例如水性载剂,如缓冲盐水等,例如磷酸盐缓冲盐水(PBS))中包含缓冲溶液。组合物和治疗性组合还可以含有按要求接近生理条件的药学上可接受的物质,如pH调节剂和缓冲剂。例如,包含质粒DNA的本申请的组合物或治疗组合可以包含磷酸盐缓冲盐水(PBS)作为药学上可接受的载剂。

治疗方法

[0086] 本公开进一步总体涉及一种治疗有此需要的受试者的疾病的方法,其包括向受试者施用有效量的如本文所述的药物组合物。在一些方面,所述方法进一步包括向受试者施用另一治疗活性剂。在一些方面,另一治疗活性剂包含小分子化合物、靶向化疗剂、放射治疗剂,或抗体或其抗原结合片段。在一些方面,另一治疗活性剂包含特异性结合CD20、PD1、PDL1、Her2、EGFR或c-MET的抗体或其抗原结合片段。在一些方面,另一治疗活性剂包含抗PD-1抗体或其抗原结合片段。

[0087] 此外,本公开进一步总体涉及一种治疗有此需要的受试者的疾病的方法,其包括向受试者施用有效量的如本文所述的激动性IL-15复合物、如本文所述的核酸分子、如本文所述的质粒、如本文所述的宿主细胞或如本文所述的药物组合物。在一些方面,所述方法进一步包括施用一种或多种抗PD-1抗体或其抗原结合片段和/或抗PD-L1抗体或其抗原结合片段。在一些方面,激动性IL-15复合物与一种或多种抗PD-1抗体或其抗原结合片段和/或抗PD-L1抗体或其抗原结合片段同时施用。在一些方面,激动性IL-15复合物与一种或多种抗PD-1抗体或其抗原结合片段和/或抗PD-L1抗体或其抗原结合片段的施用是顺序施用。在一些方面,激动性IL-15复合物与小分子抑制剂或抗体类似物组合使用。在一些方面,小分子抑制剂是靶向化疗剂或放射治疗剂,且所述抗体类似物是抗CD20、PD1、PDL1、Her2、EGFR或c-MET抗体。

[0088] 在一些方面,受试者是哺乳动物,优选是人。在一些方面,疾病是肿瘤。在一些方面,肿瘤是实体肿瘤。在一些方面,疾病是癌症。在一些方面,癌症是白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、恶性黑色素瘤、乳腺癌、肺癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌、结肠癌或肾细胞癌。在一些方面,癌症是结肠癌或肺癌。在一些方面,本公开的癌症包括但不限于淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤(包括脂肪肉瘤)、神经内分泌肿瘤、间皮瘤、神经鞘瘤、脑膜瘤、腺瘤、黑色素瘤,以及非白血病性白血病或淋巴样恶性肿瘤。上述癌症的更具体的实例包括鳞状细胞癌(如鳞状细胞癌)、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状细胞癌、腹膜癌、肝细胞癌,和胃癌、胃肠道癌、胰腺癌、恶性胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞肿瘤、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、肛门癌、阴茎癌、睾丸癌、食管癌、胆管肿瘤、头癌、颈癌、骨髓基质肿瘤、破骨细胞瘤、多发性骨髓瘤、溶骨性骨癌、中枢神经系统肿瘤、脑肿瘤(胶质瘤、成神经细胞瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、室管膜瘤和视网膜成神经细胞瘤)、鼻咽癌、基底细胞癌、胆管癌、卡波西氏(Kaposi's)肉瘤、原发性肝癌或子宫内膜癌,以及血管系统肿瘤(血管肉瘤和血管外皮细胞瘤)。

[0089] 在一些方面,所述方法包括治疗病原体感染。本公开所涉及的病原体包括但不限于细菌、真菌、病毒和寄生虫。在一些方面,病原体感染是细菌感染和/或病毒感染。在一些方面,病毒感染包括免疫缺陷病毒、天花病毒、乙肝病毒感染,或上述任意组合。在一些方

面,病毒感染是HIV感染。

[0090] 在一些方面,所述疾病是自身免疫性疾病。在一些方面,所述疾病是炎性疾病。在一些方面,所述疾病为神经退行性疾病。在一些方面,如相较于施用ALT803的患者和/或如相较于阴性对照,在施用激动性IL-15复合物之后,受试者未经历肝脏、脾脏、肺和/或肾脏的炎症或经历轻微炎症。在一些方面,施用激动性IL-15复合物不导致细胞因子风暴。在一些方面,相较于施用ALT803的患者和/或相较于阴性对照,施用激动性IL-15复合物对细胞因子IL-1β、IL-2、IL-4、IL-10、IL-5、CXCL/KC和IL-12P/p70的体内释放没有显著作用。在一些方面,相较于施用阴性对照的受试者和/或相较于施用ALT803的受试者,施用激动性IL-15复合物不增加肝功能指标谷氨酸转氨酶(ALT)和谷胱甘肽转氨酶(AST)。在一些方面,相较于施用阴性对照的受试者和/或施用ALT803的受试者,施用激动性IL-15复合物不增加白细胞释放、不增加淋巴细胞释放和/或不增加单核细胞释放。

[0091] 在一些方面,受试者施用0.1mg/kg、0.20mg/kg、0.30mg/kg、0.40mg/kg、0.50mg/kg、0.60mg/kg、0.70mg/kg、0.80mg/kg、0.90mg/kg、1.00mg/kg、1.50mg/kg、2.00mg/kg、2.50mg/kg、3.00mg/kg、3.50mg/kg、4.00mg/kg、4.50mg/kg、5.00mg/kg、6.00mg/kg、7.00mg/kg、8.00mg/kg、9.00mg/kg、10.0mg/kg、12.5mg/kg、15.0mg/kg、17.5mg/kg、20.0mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、35mg/kg、40mg/kg、45mg/kg、50mg/kg、60mg/kg、70mg/kg、80mg/kg、90mg/kg或100mg/kg的激动性IL-15复合物。在一些方面,激动性IL-15复合物是通过皮下、肌肉内或肠胃外施用的。

[0092] 在一些方面,激动性IL-15复合物作为细胞免疫疗法的一部分施用于受试者。在一些方面,细胞免疫疗法是CAR-T、TCR-T、DC、CIK、DC-CIK、ECIK、NK、CAS-T或BiAb-T肿瘤细胞免疫疗法。在一些方面,施用激动性IL-15复合物诱导肿瘤组织中NK细胞和CD8+T细胞的功能。

[0093] 在一些方面,如本文所述的激动性IL-15复合物可用于治疗病况,其具体包括但不限于:充血性心力衰竭(CHF)、血管炎、酒渣鼻、痤疮、湿疹、心肌炎及其他心肌病症、系统性红斑狼疮、糖尿病、椎关节强硬(Spodylosis)、滑膜成纤维细胞增生、骨质流失、佩吉特病、废用性骨质减少症、营养不良、牙周病、家族性脾性贫血、朗格汉斯细胞组织细胞增多症、脊髓损伤、急性化脓性关节炎、骨软化症、皮质醇增多症、单骨纤维性骨发育不良、多骨纤维性骨发育不良、牙周组织修复和骨折、结节病、骨转移/骨痛治疗以及体液恶性高钙血症、强直性脊柱炎及其他脊柱关节病、移植排斥、病毒感染、血肿、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(如伯基特氏淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤/慢性淋巴细胞白血病、蕈样肉芽肿、套细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、弥漫大B细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、毛细胞白血病和淋巴浆细胞性白血病)、淋巴细胞前体细胞肿瘤、B细胞急性成淋巴细胞性非白血病性白血病/淋巴瘤、T细胞急性成淋巴细胞性非白血病性白血病/淋巴瘤、胸腺瘤、成熟T细胞和NK细胞肿瘤、外周T细胞非白血病性白血病、成熟T细胞非白血病性白血病/T细胞淋巴瘤、大颗粒淋巴细胞白血病、朗格汉斯细胞组织细胞增多症、急性髓系白血病骨髓瘤、成熟急性髓系白血病(AML)、分化型急性髓系白血病、急性早幼粒细胞白血病、急性髓单核细胞白血病、急性单核细胞白血病、骨髓增生异常综合征、慢性骨髓增生异常、慢性髓细胞白血病、骨质疏松症、肝炎、HIV感染、艾滋病、椎关节炎、类风湿性关节炎、炎症性肠病(IBD)、败血症和感染性休克、克罗恩病、银屑病、硬皮病、移植物抗宿主病(GVHD)、同种异体胰岛移植物排斥、血液系统恶性肿瘤

(如多发性骨髓瘤(MM)、骨髓增生异常综合征(MDS)和急性髓系白血病(AML))、肿瘤相关炎症、外周神经损伤或脱髓鞘疾病。

[0094] 此外,本公开总体涉及一种治疗肿瘤的方法,包括向有需要的受试者施用有效量的如本文所述的药物组合物。在一些方面,所述肿瘤为实体肿瘤,如癌、肉瘤或黑色素瘤。在一些方面,所述实体肿瘤选自下组:膀胱癌、肺癌、乳腺癌、结直肠癌、脑肿瘤、前列腺癌、黑色素瘤、默克尔细胞癌、头颈癌、小肠癌、鳞状细胞癌、转移性实体瘤或宫颈癌。在一些方面,所述肿瘤是膀胱癌。在一些方面,所述肿瘤是肺癌,如小细胞肺癌。在一些方面,所述肿瘤为乳腺癌。在一些方面,所述肿瘤为宫颈癌。在一些方面,所述肿瘤为结直肠癌。在一些方面,所述方法进一步包括向受试者施用免疫疗法。在一些方面,所述免疫疗法包含抗PD-1抗体或其抗原结合片段。在一些方面,施用药物组合物之后,受试者不经历肝脏、脾脏、肺和/或肾脏的坏死。在一些方面,施用药物组合物不导致细胞因子风暴,特别是,施用药物组合物对细胞因子IL-1β、IL-2、IL-4、IL-10、IL-5、CXCL/KC和IL-12P/p70的体内释放没有显著作用。在一些方面,施用药物组合物不增加肝功能指标谷氨酸转氨酶(ALT)和谷胱甘肽转氨酶(AST)。在一些方面,施用药物组合物不增加白细胞释放、淋巴细胞释放和/或单核细胞释放。

[0095] 除了用于治疗人类疾病外,本文所述的激动性IL-15复合物在兽医领域也有重要应用,例如用于治疗家畜如牛、羊等以及宠物如狗和猫的病症。

产生方法

[0096] 本公开进一步总体涉及一种产生如本文所讨论的融合蛋白的方法,所述方法包括在足以表达所述融合蛋白的条件下培养如本文所述的宿主细胞,并分离所述融合蛋白。

[0097] 此外,本公开总体涉及一种产生如本文所述的蛋白复合物的方法,所述方法包括在足以表达融合蛋白和IL-15的条件下培养一种或多种如本文所述的宿主细胞,分离融合蛋白和IL-15,并任选地通过在体外组合分离的融合蛋白和IL-15来组装所述蛋白复合物。

[0098] 而且,本公开总体涉及一种产生激动性IL-15复合物的方法,所述方法包括:a.用包含Fc单体-IL-15受体α寿司结构域融合物和IL-15功能性片段的核酸分子转染细胞;b.在足以表达Fc单体-IL-15受体α寿司结构域融合物和IL-15功能性片段的条件下培养宿主细胞;c.表达Fc单体-IL-15受体α寿司结构域融合物和IL-15功能性片段;d.在体外组装激动性IL-15复合物;e.纯化激动性IL-15复合物。在一些方面,Fc单体-IL-15受体α寿司结构域融合物和IL-15功能性片段是由分开的核酸分子编码的。在一些方面,Fc单体-IL-15受体α寿司结构域融合物和IL-15功能性片段是由相同的核酸分子编码的。

检测试剂盒

[0099] 本公开还总体涉及一种检测试剂盒,其包含如本文所述的激动性IL-15复合物、如本文所述的核酸分子、如本文所述的质粒、如本文所述的宿主细胞或如本文所述的药物组合物,其中所述检测试剂盒可任选用于检测病原体和/或肿瘤细胞。

实施方式

[0100] 实施方式1.一种融合蛋白,其包含与Fc单体融合的白细胞介素-15(IL-15)受体α寿司结构域,其中所述IL-15受体α寿司结构域包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,且所述Fc单体包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0101] 实施方式2a.根据实施方式1所述的融合蛋白,其中所述IL-15受体α寿司结构域的

羧基末端通过接头与所述Fc单体的氨基末端融合,所述接头如为甘氨酸-丝氨酸聚合物,如$(GS)_n$、$(GSGGS)_n$、$(GGGGS)_n$、$(GGGS)_n$,其中n为至少1的整数;或为甘氨酸-丙氨酸聚合物;或为丙氨酸-丝氨酸聚合物。

[0102] 实施方式2.根据实施方式1所述的融合蛋白,其中所述IL-15受体α寿司结构域的羧基末端通过具有GGGGS(SEQ ID NO:7)的氨基酸序列的接头与所述Fc单体的氨基末端融合。

[0103] 实施方式3.根据实施方式1所述的融合蛋白,其中所述接头由SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成。

[0104] 实施方式4.根据实施方式3所述的融合蛋白,其包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0105] 实施方式5.根据实施方式3所述的融合蛋白,其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

[0106] 实施方式6.一种融合蛋白,其由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的。

[0107] 实施方式7.一种融合蛋白,其由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成。

[0108] 实施方式8.一种蛋白复合物,其包含根据实施方式1-7中任一项所述的融合蛋白和IL-15。

[0109] 实施方式9a.根据实施方式8所述的蛋白复合物,其中所述IL-15包含全长IL-15或IL-15功能性片段。

[0110] 实施方式9b.根据实施方式8或9a所述的蛋白复合物,其中所述IL-15包含野生型IL-15、变体IL-15或其功能性片段。

[0111] 实施方式9.根据实施方式8所述的蛋白复合物,其中所述IL-15包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0112] 实施方式10.根据实施方式8所述的蛋白复合物,其中所述IL-15由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成。

[0113] 实施方式11.根据实施方式8所述的蛋白复合物,其中所述IL-15包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0114] 实施方式12.根据实施方式8所述的蛋白复合物,其中所述IL-15由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成。

[0115] 实施方式13.一种核酸分子,如载体,其编码根据实施方式1-7中任一项所述的融合蛋白。

[0116] 实施方式13a.一种载体,如质粒、DNA载体、RNA载体或病毒载体,其编码根据实施方式1-7中任一项所述的融合蛋白。

[0117] 实施方式14.一种宿主细胞,其包含根据实施方式13所述的核酸分子。

[0118] 实施方式14a.一种宿主细胞,其包含根据实施方式13a所述的载体。

[0119] 实施方式15.一种产生根据实施方式1-7中任一项所述的融合蛋白的方法,其包括在足以表达所述融合蛋白的条件下培养根据实施方式14所述的宿主细胞,和分离所述融合蛋白。

[0120] 实施方式15a.一种产生根据实施方式1-7中任一项所述的融合蛋白的方法,其包括在足以表达所述融合蛋白的条件下培养根据实施方式14a所述的宿主细胞,和分离所述融合蛋白。

[0121] 实施方式16.一种或多种核酸分子,如一种或多种载体,其编码实施方式8-12中任

一项所述的蛋白复合物的融合蛋白和IL-15。

[0122] 实施方式16a.一种或多种载体,如一种或多种质粒、DNA载体、RNA载体或病毒载体,其编码根据实施方式8-12中任一项所述的蛋白复合物的融合蛋白和IL-15。

[0123] 实施方式17.一种或多种宿主细胞,其包含根据实施方式16所述的一种或多种核酸分子。

[0124] 实施方式17a.一种或多种宿主细胞,其包含根据实施方式16a所述的一种或多种载体。

[0125] 实施方式18.一种产生根据实施方式8-12中任一项所述的蛋白质复合物的方法,其包括在足以表达所述融合蛋白和IL-15的条件下培养根据实施方式17所述的一种或多种宿主细胞,分离所述融合蛋白和IL-15,并任选地通过在体外组合分离的融合蛋白和IL-15来组装所述蛋白质复合物。

[0126] 实施方式18a.一种产生根据实施方式8-12中任一项所述的蛋白质复合物的方法,其包括在足以表达融合蛋白和IL-15的条件下培养根据实施方式17a所述的一种或多种宿主细胞,分离所述融合蛋白和IL-15,并任选地通过在体外组合分离的融合蛋白和IL-15以组装蛋白质复合物。

[0127] 实施方式19.一种药物组合物,其包含根据实施方式1-7中任一项所述的融合蛋白、根据实施方式8-12中任一项所述的蛋白质复合物、根据实施方式13所述的核酸分子、根据实施方式16所述的一种或多种核酸分子、根据实施方式14所述的宿主细胞或根据实施方式17所述的一种或多种宿主细胞,以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载剂。

[0128] 实施方式20.根据实施方式19所述的药物组合物,其包含根据实施方式8-12中任一项所述的蛋白质复合物。

[0129] 实施方式21.一种治疗有此需要的受试者的疾病的方法,其包括向所述受试者施用有效量的根据实施方式19或实施方式20所述的药物组合物。

[0130] 实施方式22.根据实施方式21所述的方法,其进一步包括向所述受试者施用另一治疗活性剂。

[0131] 实施方式23.根据实施方式22所述的方法,其中另一治疗活性剂包含小分子化合物、靶向化疗剂、放射治疗剂或抗体或其抗原结合片段。

[0132] 实施方式24.根据实施方式23所述的方法,其中另一治疗活性剂包括特异性结合CD20、PD1、PDL1、Her2、EGFR或c-MET的抗体或其抗原结合片段。

[0133] 实施方式25.根据实施方式24所述的方法,其中另一治疗活性剂包含抗PD-1抗体或其抗原结合片段。

[0134] 实施方式26.根据实施方式21-25中任一项所述的方法,其中所述疾病为肿瘤。

[0135] 实施方式27.根据实施方式26所述的方法,其中所述肿瘤为实体肿瘤。

[0136] 实施方式28.根据实施方式21-25中任一项所述的方法,其中所述疾病为病原体感染,如细菌感染和/或病毒感染。

[0137] 实施方式29.根据实施方式21-25中任一项所述的方法,其中所述疾病为自身免疫性疾病。

[0138] 实施方式30.根据实施方式21-25中任一项所述的方法,其中所述疾病为炎症性疾病。

[0139] 实施方式31.根据实施方式21-25中任一项所述的方法,其中所述疾病为神经退行性疾病。

[0140] 实施方式32.一种治疗肿瘤的方法,其包括向有此需要的受试者施用有效量的根据实施方式20所述的药物组合物。

[0141] 实施方式33.根据实施方式32所述的方法,其中所述肿瘤为实体肿瘤,如癌、肉瘤或黑色素瘤。

[0142] 实施方式34.根据实施方式33所述的方法,其中实体肿瘤选自下组:膀胱癌、肺癌、乳腺癌、结直肠癌、脑肿瘤、前列腺癌、黑色素瘤、默克尔细胞癌、头颈癌、小肠癌、鳞状细胞癌、转移性实体肿瘤或宫颈癌。

[0143] 实施方式35.根据实施方式34所述的方法,其中所述肿瘤为膀胱癌。

[0144] 实施方式36.根据实施方式34所述的方法,其中所述肿瘤为肺癌,如小细胞肺癌。

[0145] 实施方式37.根据实施方式34所述的方法,其中所述肿瘤为乳腺癌。

[0146] 实施方式38.根据实施方式34所述的方法,其中所述肿瘤为宫颈癌。

[0147] 实施方式39.根据实施方式34所述的方法,其中所述肿瘤为结直肠癌。

[0148] 实施方式40.根据实施方式32-39中任一项所述的方法,其进一步包括向所述受试者施用免疫疗法。

[0149] 实施方式41.根据实施方式40所述的方法,其中所述免疫疗法包含抗PD-1抗体或其抗原结合片段。

[0150] 实施方式42.根据实施方式32-41中任一项所述的方法,其中施用所述药物组合物之后,所述受试者不经历肝脏、脾脏、肺和/或肾脏的坏死。

[0151] 实施方式43.根据实施方式32-41中任一项所述的方法,其中施用所述药物组合物不导致细胞因子风暴,特别地,施用所述药物组合物对细胞因子IL-1β、IL-2、IL-4、IL-10、IL-5、CXCL/KC和IL-12P/p70的体内释放没有显著作用。

[0152] 实施方式44.根据实施方式32-43中任一项所述的方法,其中施用所述药物组合物不增加肝功能指标谷氨酸转氨酶(ALT)和谷胱甘肽转氨酶(AST)。

[0153] 实施方式45.根据实施方式32-44中任一项所述的方法,其中施用所述药物组合物不增加白细胞释放、淋巴细胞释放和/或单核细胞释放。

序列表

SEQ IDNO	描述	序列
1	IL15Rα-GGGGS-sFc	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRGGGGSAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLRCHVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTKPVLDSDGSFFLYSTLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
2	IL15Rα-(GGGGS)3-sFC	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRGGGGSGGGGSGGGGSAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLRCHVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTKPVLDSDGSFFLYSTLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
3	IL-15突变体	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
4	WT IL-15	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
5	IL15Rα 寿司结构域	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR
6	sFc	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLRCHVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTKPVLDSDGSFFLYSTLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
7	GGGGS接头	GGGGS
8	(GGGGS)3 接头	GGGGSGGGGSGGGGS

实施例

实施例1:制备激动性白介素15复合物

[0154] 图1A展示了激动性白细胞介素15复合物的示意图。编码IL15Rα-GGGGS-sFc(SEQ ID NO:1)、IL15Rα-$(GGGGS)_3$-sFc(SEQ ID NO:2)以及IL15突变体(SEQ ID NO:3)的基因是由南京金斯瑞生物科技有限公司(Nanjing,GenScript)合成的。所述基因被克隆到真核表

达载体PTT(Thermo Fisher)中。在确认表达载体的序列后,根据制造商的说明书,使用Expi293表达系统(Thermo Fisher)瞬时表达重组蛋白,并通过蛋白G树脂(GE Healthcare)进行纯化。从条件培养基中纯化激动性白细胞介素15复合物,并透析至PBS中。通过SDS-PAGE检查激动性白细胞介素15复合物的纯度,并以分光光度法在280nm处(NanoVue,GE Healthcare)测量蛋白质浓度(具体的转化、表达和纯化方法,参见:Ying,Tianlei等,JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,2012.287(23):19399-19408)。

实施例2:激动性白细胞介素15复合物与IL-15Rβ的结合活性

[0155] 使用Octet-RED(Pall ForteBio)生物层干涉法(BLI)仪器测定激动性白细胞介素15复合物与受体IL-15Rβ的结合活性。简要来说,将在动力学缓冲液(补充有0.02%吐温20的PBS缓冲液)中5μg/mL的IL-15Rβ蛋白质固定在NI-NTA生物传感器上,直到饱和(例如,参见Wang,Chunyu等,"Engineered Soluble Monomeric IgG1 Fc with Significantly Decreased Non-Specific Binding."Frontiers in immunology vol.8 1545.13Nov.2017,PMID:29181008;Wang,Chunyu等,"Design of a Novel Fab-Like Antibody Fragment with Enhanced Stability and Affinity for Clinical use."Small methods vol.6,2(2022):e2100966;和Wang,Chunyu等,"Design of a Novel Fab-Like Antibody Fragment with Enhanced Stability and Affinity for Clinical use."Small methods vol.6,2(2022):e2100966,PMID:35174992)。在动力学缓冲液中建立基线,然后将加载的生物传感器浸入含有系列稀释的激动性白细胞介素15复合物的孔中300秒(s)。FL115(也称为FL115-V2),根据本申请的实施方式的激动性白细胞介素15复合物,含有具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的单体IL-15受体αSu/Fc融合蛋白和具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的突变型IL15。FL115-WT,根据本申请的实施方式的另一激动性白细胞介素15复合物,包含具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的单体IL-15受体αSu/Fc融合蛋白和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的野生型IL15。激动性白细胞介素15复合物与固定化的IL-15Rβ蛋白质结合。然后允许IL-15Rβ蛋白-激动性IL15复合物的结合复合物在动力学缓冲液中解离。使用数据分析软件8.1版本,将拟合到1:1结合模型全局数据用于估计亲和力。通过对具有大于90%置信水平的R2值的稀释系列内的结合曲线求平均,确定kon(结合速率常数)、koff(解离速率常数)和KD(平衡解离常数)的值。

[0156] 测定的结果示于图1B-1D中。现在参照图1B-图1D,FL115与IL-15Rβ的KD为4.47×10-9M,结合常数为$2.77\times10^{5}M^{-1}s^{-1}$,解离常数为$1.24\times10^{-3}s^{-1}$,由此相较于对照ALT803,显示出相似的动力学和亲和力特征。图1B-图1D的结果表明,与Fc单体融合的IL-15受体αSu不影响其蛋白质相互作用,并且FL115与IL-15Rβ的结合活性与ALT803的结合活性相当,ALT803是一种激动性白细胞介素15复合物,其含有IL-15突变体以及与Fc二聚体融合的IL-15受体αSu/Fc融合蛋白。

实施例3:激动性白细胞介素15复合物的细胞增殖研究

[0157] 使用CTLL2细胞和M-07e细胞(巨核细胞)进行的细胞增殖试验,进一步评价FL115的生物活性。CTLL-2细胞的生长和增殖依赖于IL-2,而IL-15能促进CTLL-2细胞的生长和增殖。因此,CTLL-2细胞可用于对IL-15生物活性的定量测定。将待测试的样品与激动性白细胞介素15复合物一起添加到CTLL-2细胞中,培养24小时,然后使用CCK-8(细胞计数试剂盒-8)方法检测细胞的增殖,以分析其生物活性。巨核细胞M-07e是一种IL-15依赖性细胞系,因

此IL-15可以刺激它们的增殖(参见,例如Meazza,R等,“Interleukin(IL)-15induces survival and proliferation of the growth factor-dependent acute myeloid leukemia M-07e through the IL-2receptor beta/gamma.”International journal of cancer vol.78,2(1998):189-95,PMID:9754651;和Finch,D K等,“Identification of a potent anti-IL-15antibody with opposing mechanisms of action in vitro and in vivo.”British journal of pharmacology vol.162,2(2011):480-90,PMID:20942844)。FL115-V1,根据本申请的实施方式的另一激动性白细胞介素15复合物,含有具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的单体IL-15受体αSu/Fc融合蛋白和具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的突变型IL15。处于对数生长期的M-07e细胞系用20mL的PBS洗涤一次,然后使用实验培养基将50μL的细胞悬液添加到96孔白板的每个孔中,并将细胞浓度调整至2.0×10^5个细胞/mL。将50μL的稀释的FL115(起始点工作浓度1.2μg/mL)添加到96孔样品板的每个孔中,并与M-07e细胞混合。每个浓度梯度点设置2个重复孔。将96孔白板在37℃在5%二氧化碳培养箱中孵育48小时。用CellTiter-Glo发光细胞活力测定试剂盒检测荧光信号。使用酶标仪检测发光信号值。

[0158] 检测结果示于图2A-图2B中。图2A中显示的是用FL115-V1和FL115-V2处理的样品中CTLL2细胞的增殖活性。如图2B所示,FL115以剂量依赖性方式显著刺激M-07e细胞的增殖。值得注意的是,测定中使用的蛋白质浓度越高,观察到的M-07e细胞的增殖越明显。EC50为1.894ng/ml。本实施例的测定提供了本申请的激动性白细胞介素15复合物在体外测定中的生物活性的另一个证明。

实施例4:FL115对人免疫细胞的免疫刺激作用

[0159] 为了评价人免疫细胞的FL115介导的反应,对与FL115一起孵育的人PBMC进行了研究。对于增殖测定,使用CFSE检测PBMC增殖。CFSE标记的PBMC细胞在2e5平板中每孔以100nM、10nM、1nM和0.1nM浓度的FL115细胞和ALT803进行刺激。细胞孵育4天,然后通过流式细胞术分析,以基于CFSE确定细胞增殖。为了评价免疫细胞亚群和激活标志物,将人PBMC在多种浓度的FL115和ALT803中培养,在适当条件下用标志物特异性抗体染色,并使用FACSuite软件在FACSVerse流式细胞仪(BD Biosciences)上分析。

[0160] 现在参照图3A-图3E,在人PBMC培养物中观察到FL115剂量依赖性的淋巴细胞增殖,总体上优于ALT803(图3A)。用0.0050μg/ml的FL115处理导致NK计数显著增殖,明显优于ALT803(图3B)。此外,通过FL115以剂量依赖性方式刺激NK细胞、CD8+T细胞和CD4+T细胞上CD69的细胞表面激活标志物表达(图3C)。FL115还诱导人NK细胞和CD8+T细胞二者中颗粒酶B和穿孔素表达增加(图3D和图3E)。总之,这些研究结果表明,浓度低至0.01nmol/L的FL115能够在体外激活人免疫细胞。

实施例5:FL115与FcRn的BLI研究

[0161] 在本实施例中,使用SPR、使用SPR的标准测定规程,测量FL115与人FcRn的结合(参见,例如,Ying,Tianlei等,“Soluble monomeric IgG1 Fc.”The Journal of biological chemistry vol.287,23(2012):19399-408,PMID:22518843;和Ying,Tianlei等,“Monomeric IgG1 Fc molecules displaying unique Fc receptor interactions that are exploitable to treat inflammation-mediated diseases.”mAbs vol.6,5(2014):1201-10,PMID:25517305)。使用CM5芯片进行配体偶联,参照氨基偶联试剂盒所提供的操作

说明书。PBS-P+用作缓冲液。流动池(Fc)1和流动池2的流道用11.5mg/ml NHS和75mg/ml EDC(1:1)激活420秒(s)。将配体用NaAc pH 5.0稀释至1μg/mL,然后以10μL/min的流速偶联到激活的流道Fc 2上,偶联水平设定为100RU。通过注射1M乙醇胺420秒封闭Fc 1和Fc 2流道。分别使用pH 6.0和pH 7.4的PBS-P+作为缓冲液,测定在不同pH条件下人FcRn与FL115的结合。用PBS-P+(pH 6.0或pH7.4)缓冲液将FL115稀释至200μg/mL,并将此用作最高浓度。将200μg/mL的FL115用PBS-P+(pH 6.0或pH7.4)缓冲液稀释2倍,多至0.78μg/mL。流速设定在30μL/min,并将2倍梯度稀释的FL115依次注入流道,使其与偶联在芯片上的人FcRn结合,结合时间为90秒,解离时间设定在110秒。解离完成后,用pH7.4下的PBS-P+进行再生。对不同浓度的FL115重复进行结合、解离和再生。最后,使用通过Biacore T200评估软件选择的稳态亲和力模型对数据进行分析,以检测FL115与人FcRn的结合速率。用NaAC pH 5.0将FcRn稀释至1μg/mL的固定浓度,并将用PBS-P+(pH 6.0或pH 7.4)缓冲液进行2倍梯度稀释的FL115用作分析物用于检测。

[0162] 参照图4,在pH 6.0下,FL115与FcRn的亲和力KD值为4.07×10^{-6}M,并且在PH7.4下它不结合FcRn(数据未显示)。上述结果表明,长效激动性IL-15复合物FL115保持了sFc的特征性pH依赖性FcRn结合,这指示其在体内的半衰期延长。

实施例6:FL115在MC38皮下移植瘤模型中的抗肿瘤作用

[0163] 在本实施例中,在MC38(一种小鼠结肠腺癌细胞系)皮下移植瘤模型中评价了FL115的抗肿瘤作用。简要来说,将5×10^{5}个MC38小鼠结肠癌细胞注射到6-8周龄雌性C57BL/6小鼠(购自上海吉辉实验动物有限公司)的背部的右侧。从接种后的第1天和第8天开始,分别施用0.2mg/kg的FL115、阳性对照(ALT803)和阴性对照(PBS)。在指定日期测量小鼠的肿瘤大小和重量(参见图5A-图5E)。

[0164] 现在参照图5A-图5E,在MC38皮下移植瘤模型中,FL115和ALT803均具有抗肿瘤功效,与阴性对照组相比有统计学显著性差异。值得注意的是,FL115的抗肿瘤效果明显优于阳性对照ALT803。此外,小鼠体重随时间的增加(图5E)进一步证实了FL115的安全性。

实施例7:检测通过FL115在MC38皮下瘤模型中诱导的肿瘤微环境变化

[0165] 在本实施例中,评价了MC38皮下肿瘤模型中肿瘤组织中免疫细胞的变化。将5×10^{5}个MC38肿瘤细胞皮下接种到C57小鼠中,并在接种后次日随机分组。每组的8只小鼠以每7天0.2mg/kg的剂量静脉施用FL115和ALT803,总共三个剂量。在第三剂量后24小时处死小鼠,剥离肿瘤组织。用镊子将肿瘤轻轻破碎成小块,并用0.2mg/ml胶原酶IV(Sigma-Aldrich)和0.1mg/ml的DNA酶I(Sigma-Aldrich)在37℃下消化1小时。收集单细胞悬液,通过70μm尼龙网过滤,并使用小鼠淋巴细胞分离液(Dacor for)分离小鼠淋巴细胞。用流式抗体(购自BD公司)对淋巴细胞表面蛋白进行染色,对细胞内蛋白使用固定的破碎的膜(购自Sigma-Aldrich)处理,然后立即置于流式细胞仪(购自BD公司)上检测CD8 T细胞和NK细胞。结果如图所示。左侧展示了从一只小鼠剥离的肿瘤的流式测定结果,而右侧展示了每组小鼠中测量的免疫细胞比例(平均值±SD),其中一个点代表一只小鼠中的肿瘤。

[0166] 现在参照图6A-图6D,在相同施用的剂量(0.2mg/kg)下,与阳性对照ALT803相比,FL115诱导肿瘤浸润杀伤性NK细胞和CD8+T细胞分泌更多的颗粒酶(NK细胞:FL115(3.65%)对比PBS(0.30%),$P<0.01$;CD8+T细胞:FL115(18.52%)对比PBS(8.23%),$P<0.05$),并且在CD3+细胞中诱导产生比阳性对照ALT803更多的穿孔素+CD8+(NK细胞:FL115(20.78%)对比

PBS(4.99%),P<0.01;CD8+T细胞:FL115(1.75%)对比PBS(0.14%),P<0.01)(参见图6A-图6D)。上述结果表明,与阳性对照ALT803相比,FL115具有更强的抗肿瘤活性,因为FL115抗肿瘤治疗产生了NK细胞和CD8+T细胞在肿瘤微环境中比ALT803更强的杀伤功能。此外,相较于ALT803,FL115对NK细胞激活的作用是显著不同的。

实施例8:FL115在CT26转移性肿瘤模型中的抗肿瘤作用

[0167] 在本实施例中,在CT26转移性肿瘤模型中对FL115进行评价。简要地说,将2×10^5个CT26小鼠结肠癌细胞注射到6-8周龄雄性C57BL/6小鼠(购自上海吉辉实验动物有限公司)的尾静脉中。在注射后第1天、第4天、第8天和第11天开始施用0.2mg/kg的FL115、阳性对照(ALT803)和阴性对照(PBS)。

[0168] 现在参照图7,在CT26小鼠结肠癌转移性肿瘤模型中,FL115具有明确的抗肿瘤效果,而阴性对照组中所有小鼠在观察期内死亡。另外还观察到,FL115组中小鼠具有良好的生命体征。

实施例9:FL115与抗PD-1抗体组合在小鼠中的抗肿瘤作用

[0169] 在本实施例中,评价了FL115与抗PD-1抗体(InVivoPlus抗小鼠PD-1(CD279),克隆号:RMP1-14,产品目录:BP0146-100 mg)组合的抗肿瘤作用(参见,例如,Li,Howard Y等,"The Tumor Microenvironment Regulates Sensitivity of Murine Lung Tumors to PD-1/PD-L1 Antibody Blockade."Cancer immunology research vol.5,9(2017):767-777,PMID:28819064)。具体而言,测量了FL115激活NK细胞以增强对PD1单克隆抗体无反应的肿瘤患者的抗肿瘤作用的能力。此外,在非小细胞肺癌(NSCLC)模型中测试了FL115与PD1抗体组合的抗肿瘤活性,以测试两者是否具有协同作用。将5×10^5个肺腺癌CMT167细胞或LLC细胞注射到6-8周龄雄性C57BL/6小鼠(购自上海吉辉实验动物有限公司)的背部右侧(参见,例如,Li,Howard Y等,"The Tumor Microenvironment Regulates Sensitivity of Murine Lung Tumors to PD-1/PD-L1Antibody Blockade."Cancer immunology research vol.5,9(2017):767-777,PMID:28819064;Tang,Honglin等,"Inhibition of COX-2and EGFR by Melafolone Improves Anti-PD-1Therapy through Vascular Normalization and PD-L1 Downregulation in Lung Cancer."The Journal of pharmacology and experimental therapeutics vol.368,3(2019):401-413,PMID:30591531;以及Johnson,Amber M等,"Cancer Cell-Intrinsic Expression of MHC Class II Regulates the Immune Microenvironment and Response to Anti-PD-1Therapy in Lung Adenocarcinoma."Journal of immunology(Baltimore,Md.:1950)vol.204,8(2020):2295-2307,PMID:32179637)。每组中的动物分别给予FL115、抗PD1抗体以及FL115与抗PD1抗体的组合,同时设立裂解对照组(PBS)。每个受试者静脉内施用10mg/kg的FL115和200μg的抗PD1抗体,FL115每周施用1次,总共三个剂量(第1天、第8天、第15天),且抗PD1抗体施用3次(第11天、第14天、第17天)。

[0170] 参照图8A-图8D,对于肺腺癌CMT167细胞皮下移植肿瘤C57小鼠模型,相较于阴性对照组,在施用的24天时间点后,FL115与PD-1单克隆抗体组合施用组的相对肿瘤TGI为88.43%(P<0.0001),且未发现动物具有完全肿瘤消退,以及没有个体动物完全缓解。在以10mg/kg的施用FL115后,相较于阴性对照(PBS)组,第24天的相对肿瘤生长抑制(TGI)为79.90%(P<0.001),且1只小鼠肿瘤具有完全肿瘤生长抑制;在以200μg施用PD1单克隆抗体

后,相较于阴性对照组,第24天的相对TGI为-25.37％(P>0.05)。FL115与PD-1单克隆抗体组合具有显著更好的肿瘤抑制,因为FL115与PD-1单克隆抗体组合施用组的抑瘤效果明显优于PD1单克隆抗体组,具有显著性差异(P<0.0001)。FL115与PD-1单克隆抗体组合施用组的肿瘤抑制优于FL115组,尽管差异不显著。对于鼠类肺癌LLC细胞皮下移植肿瘤C57小鼠模型,相较于阴性对照组,在施用的第28天后,FL115与PD-1单克隆抗体组合施用组的相对肿瘤TGI为91.12％(P<0.01),且在2只小鼠中肿瘤生长被完全抑制。以10mg/kg施用FL115后,相较于阴性对照组,第28天的相对TGI为64.91％。以10mg/kg施用FL115后,相较于阴性对照组,第28天的相对TGI为64.91％(P<0.05),且1只小鼠被完全抑制。在以200μg施用PD1单克隆抗体后,相对于阴性对照组,第28天的相对TGI为-15.79％(P>0.05),且1只小鼠在第24天死亡。FL115与PD-1单克隆抗体组合施用组的肿瘤抑制效果显著优于PD1单克隆抗体组,具有显著性差异(P<0.05);FL115与PD-1单克隆抗体组合施用组的肿瘤抑制效果优于FL115组,但没有显著差异。在研究期间,所有给药组的动物均未出现明显体重减轻,以及无发病情况。

[0171] 总之,结果表明FL115与抗PD-1抗体的组合显著降低了肿瘤负荷,且针对CMT167细胞(鼠类肺泡生成肺癌细胞系CMT167的高转移亚克隆)和Lewis肺癌细胞(LLC)移植肿瘤均有效。

实施例10:FL115对CD16a 158V和CD16a 158F亲和力的BLI研究

[0172] 在本实施例中,使用BLI测量了FL115对CD16a 158V和CD16a158F的亲和力。先前已测试的单体Fc不与CD16a和CD16b结合。通常,CD16a充当用于激活具有杀伤功能的固有免疫细胞(如NK细胞)的受体。存在该受体的两种多态性变体:对IgG1具有高亲和力的158V和对IgG1具有低亲和力的158F。基于上述情况,评价了FL115对Fc受体CD16a 158V和F158的亲和力。简而言之,将动力学缓冲液(补充有0.02％吐温20的PBS缓冲液)中5μg/mL的CD16a 158F和158V蛋白固定在NI-NTA生物传感器上,直至饱和(参见,例如,Wang,Chunyu等,“Engineered Soluble Monomeric IgG1 Fc with Significantly Decreased Non-Specific Binding.”Frontiers in immunology vol.8 1545.13Nov.2017,PMID:29181008;和Wang,Chunyu等,“Design of a Novel Fab-Like Antibody Fragment with Enhanced Stability and Affinity for Clinical use.”Small methods vol.6,2(2022):e2100966,PMID:35174992)。在动力学缓冲液中建立基线,然后将负载的生物传感器浸入含有系列稀释的FL115及其变体的孔中300秒(s)。然后使CD16a抗原-FL115复合物在动力学缓冲液中解离。使用数据分析软件8.1版,使用对1:1结合模型进行全局数据拟合来估算亲和力。通过对具有R2值大于90％置信水平的稀释系列内的结合曲线取平均值,来确定kon(结合速率常数)、koff(解离速率常数)和KD(平衡解离常数)的值。

[0173] 现在参照图9A-图9B,FL115既不与CD16a 158V结合,也不与CD16a 158F结合,这表明FL115的低毒性。

实施例11:FL115的安全性评价

[0174] 在本实施例中,通过在尾静脉中施用不同剂量(0.2mg/kg、2mg/kg、20mg/kg)的FL115和ALT803,持续4周(每周一次,4次),来评价FL115和ALT803在BALB/C小鼠中的潜在毒性。

[0175] 现在参照图10A-图10D,结果表明,相较于对照组,ALT803在2mg/kg和20mg/kg剂量

下引起肝功能指标谷氨酸转氨酶(ALT)和谷胱甘肽转氨酶(AST)显著增加(ALT:2mg/kg时P<0.0001,20mg/kg时P<0.0001;AST:2mg/kg时P<0.0001,20mg/kg时P<0.0001),并且相较于FL115组,也显著更高(ALT:2mg/kg时P<0.0001,20mg/kg时P<0.0001;AST:2mg/kg时P>0.05,20mg/kg时P<0.0001),这两者都表明了实质性肝损伤。此外,相较于FL115组,剂量为2mg/kg的ALT803引起肾功能指标肌酐(ECRE)显著增加(P<0.05),相较于对照组和FL115组,剂量为20mg/kg的ALT803引起肾功能指标尿素氮(UN)的显著差异(P<0.01)。这些结果显示,2mg/kg和20mg/kg的ALT803引起肝功能的实质性损害,但对肾功能没有显著影响,而FL115对肝脏和肾脏均无显著影响。

[0176] 现在参照图11A-图11D,20mg/kg的ALT803在第3天后引起所有小鼠死亡,且0.2mg/kg和2mg/kg的ALT803引起小鼠中白细胞大量增加,这与对照组引起的白细胞释放显著不同(WBC:0.2mg/kg时P<0.001;2mg/kg时P<0.0001),与FL115组显著不同(WBC:0.2mg/kg时P<0.01;2mg/kg时P<0.0001)。0.2mg/kg和2mg/kg的剂量引起小鼠中淋巴细胞显著增加,这与对照组引起的淋巴细胞释放显著不同(淋巴细胞:0.2mg/kg时P<0.0001;2mg/kg时P<0.0001),与FL115组引起的淋巴细胞释放显著不同(淋巴细胞:0.2mg/kg时P<0.001;2mg/kg时P<0.0001)。0.2mg/kg和2mg/kg的剂量引起小鼠中单核细胞大量增加,这与对照组诱导的单核细胞释放显著不同(淋巴细胞:0.2mg/kg时P<0.05;2mg/kg时P<0.001),与FL115组诱导的单核细胞释放显著不同(淋巴细胞:0.2mg/kg时P<0.05;2mg/kg时P<0.01)。

[0177] 现在参照图12A-图12F,不同于ALT803施用组,在勇FL115处理、在第四剂量后第4天处死并称重的小鼠中,相较于对照组,未观察到肺、脾和淋巴结重量显著增加或内脏重量显著增加。

[0178] 现在参照图13,在ALT803 20mg/kg施用组中,小鼠显示心脏中无坏死但有轻度炎症;肝脏中的轻度坏死和严重炎症;脾脏中的严重坏死和严重炎症;肺中的中度坏死和严重炎症;肾脏中的轻度坏死和严重炎症。图14进一步显示,在其他施用组中,ALT803 2mg/kg小鼠的心脏是轻度坏死的,所有其他组有轻度炎症。值得注意的是,FL115 20mg/kg小鼠的肝脏和脾脏无坏死,有轻度炎症,而ALT803 2mg/kg小鼠中有轻度炎症。肺部无坏死,有轻度炎症。未观察到肾脏中的坏死,且未观察到它们任一者中有炎症。除20mg/kg高剂量组,FL115在肝脏和脾脏中表现出轻度炎症外,在低剂量和中剂量组(0.2mg/kg和2mg/kg)基本无显著影响,这再次支持了FL115的高安全性,并在动物水平上证实了随着剂量增加也无明显毒副作用。

[0179] 基于上述结果,确定小鼠中FL115的最终耐受剂量>20mg/kg,而ALT803当以2mg/kg施用时就显示显著的毒副作用。

实施例12:FL115对小鼠中细胞因子的体内分泌的影响

[0180] 在本实施例中,评价了FL115对小鼠中十种细胞因子包括IFN-γ、IL-10、IL-12p70、CXCL1/KC、IL-1β、IL-2、IL-4、IL-6、IL-5和TNF-α的释放的作用,以探究其诱导细胞因子风暴的潜在风险。测定使用基于Luminex平台的化学发光技术。简要来说,对六周龄小鼠静脉内注射高剂量和低剂量的FL115,或施用一定剂量的ALT803作为对照。血液收集的时间点设在0小时、2小时、4小时、6小时、8小时、24小时、48小时和72小时。收集的小鼠血清通过上海优宁维生物科技股份有限公司(Shanghai Uninvest Biotechnology Co.)的化学发光检测技术分析,以检测上述十种细胞因子的表达。使用Graphpad软件制图,FL115及对照

刺激的小鼠体内分泌的各细胞因子水平示于图15A-图15J。

[0181] 现在参照图15A-图15J,结果显示,不同剂量的FL115对小鼠中细胞因子IL-1β、IL-2、IL-4、IL-10、IL-5、CXCL/KC和IL-12P/p70的体内释放无显著作用,而FL115对小鼠中细胞因子IL-6、IFN-γ和TNF-α的体内释放有一定程度的作用,其中在FL115施用后IL-6略有增加。FL115施用的2小时后IL-6释放略有增加,且在24小时后逐渐恢复至正常。FL115施用的2小时后IFN-γ的释放略有增加,高剂量20mg/kg组在48小时时具有最高释放。FL115施用的2小时后TNF-α释放略有增加,且在6小时后逐渐降至正常水平。

[0182] 进一步参照图15A-图15J,不同剂量的ALT803对小鼠细胞因子的释放的作用在高剂量组中最为明显,其中IL-6、IFN-γ、TNF-α、IL-1β、IL-4、IL-10和CXCL/KC的释放是最显著的,引发了细胞因子风暴,其导致该剂量组中的小鼠在施用后96小时死亡。中剂量组中对IL-6、IFN-γ、IL-2和CXCL/KC释放的作用也是显著的,但无小鼠死亡。

实施例13:FL115在MB49小鼠膀胱癌模型中的抗肿瘤作用

[0183] 在本实施例中,在MB49小鼠膀胱癌模型中评价了FL115的抗肿瘤作用。简要来说,将1×10^6个MB49小鼠膀胱癌细胞注射到6-8周龄雄性C57BL/6小鼠(购自北京维通利华实验动物技术有限公司)的背部右侧。当小鼠平均肿瘤体积达到约60-100mm^3时,将其按每组10只小鼠进行分组施用,标记为D0。随后每周对小鼠施用一次,总共5次剂量。在指定日期测量小鼠的肿瘤大小和重量(参见图16A-图16C)。

[0184] 对C57BL/6小鼠原位接种MB49(一种尿路上皮癌细胞系)细胞。收集处于对数生长期(复苏后第3-4代)的MB49细胞,去除培养液,并在接种前用DPBS洗涤两次(接种前后均测量细胞活力),且在接种前用膀胱灌注预处理液对膀胱进行预处理。原位接种后第7天,即D7,根据体重对细胞随机分组,并在分组当天施用。此后,每周施用一次药物,总共4次。在指定日期对小鼠称重并观察它们的状态。在实验结束时,对荷瘤小鼠的膀胱称重并拍照(参见图17A-图17C)。

[0185] 现在参照图16A-图16C,在小鼠膀胱癌的皮下荷瘤模型中,FL115呈现出高度显著的剂量依赖性作用(图16A)。高剂量组(20mg/kg)中的所有小鼠均实现完全肿瘤缓解,中剂量组(2mg/kg)中的肿瘤抑制率高达69.93%(图16B)。所有小鼠的体重均无显著变化,这表明FL115在体内具有高安全性(图16C)。

[0186] 现在参照图17A-图17C,在小鼠的膀胱癌原位模型中,FL115以静脉内和膀胱内施用都具有非常显著的肿瘤抑制作用,且明显优于BCG组。没有动物具有可触及的肿瘤,即晚期肿瘤。相较于裂解液对照组,在第21天,膀胱灌注和静脉内FL115组均显著降低了肿瘤负荷(膀胱重量),膀胱灌注FL115组平均膀胱重量降低了63.68%,静脉内FL115组平均膀胱重量降低了68.92%,两者具有相当的肿瘤负荷抑制作用;相较于裂解液对照组,在第21天,仅膀胱内BCG治疗的平均膀胱重量降低了13.23%,这表明无论是通过膀胱灌注还是静脉内注射,单独的FL115的肿瘤抑制作用都显著优于单独的BCG膀胱灌注施用的肿瘤抑制作用(图17A、B)。其次,所有小鼠的体重均无显著变化(图17C),这表明FL115小鼠的高体内安全性。

[0187] 基于上述结果,确定的是在临床前研究中FL115在小鼠中引发细胞因子风暴的风险低。

实施例14:FL115的延长的血清半衰期

[0188] 本研究旨在评估FL115(如FL115-V2)单次静脉内注射到ICR小鼠后的药代动力学

概貌。

[0189] 在本研究中,使用6-8周龄的雄性ICR小鼠(购自北京维通利华实验动物技术有限公司)。基于体重和大小将小鼠随机化。在研究中,将小鼠随机分为4组,每组5只动物。四组的小鼠分别通过静脉内注射给予0.2mg/kg和2mg/kg FL115以及阳性对照ALT803。在给药前(0小时)、给药后30分钟、1小时、2小时、4小时、8小时、10小时、24小时、48小时、72小时和96小时收集血清样品,并使用经过验证的ELISA方法确定FL115和ALT803的浓度。使用WinNonLin非房室分析(NCA)计算FL115和ALT803的药代动力学参数。

[0190] 如图18A和图18B所示,结果表明FL115组和ALT803组的小鼠中血清浓度变化趋势一致。小鼠中单次静脉内注射0.2mg/kg FL115后,FL115的血清浓度在注射后30分钟达到最大,在注射后约2小时开始下降,并在24小时后基本稳定。FL115的血清半衰期($T_{1/2}$)为11.11小时。在小鼠中单次静脉内注射0.2mg/kg的ALT803后,ALT803的血清浓度在注射后30分钟达到最大,在注射后约2小时开始下降,并在72小时后基本稳定。ALT803的血清半衰期($T_{1/2}$)为12.66小时。这表明FL115和ALT803具有相似的药代动力学概貌。

[0191] 对于本领域技术人员来说显而易见的是,本公开内容并不限于上述说明性实施例,在不脱离其本质属性的情况下,它可以以其他特定形式体现。因此,希望将这些实施例在所有方面都视为说明性而非限制性的,应参考所附权利要求书,而非上述实施例,所有落入权利要求含义和等同范围内的变化都意欲包含在其中。

[0192] 对于本领域技术人员显然的是,在不脱离本发明的范围和精神的情况下,可以对本文公开的发明进行各种替换和修改。

[0193] 说明书中提及的所有专利和出版物都表明了本发明所属领域技术人员的水平。

[0194] 在不使用本文未具体公开的任何一个或多个元素、限制的情况下,本文以示例方式描述的发明可以合适地实施。因此,例如,本文中“包含”“基本上由……组成”和“由……组成”这些术语中的任何一个,在每种情况下都可以替换为另外两个术语中的任何一个。所使用的术语和表述是作为说明性术语而非限制性术语,使用这些术语和表述并非旨在排除所示和所述特征或其部分的任何等同物,但应认识到在所要求保护的发明范围内可以进行各种修改。此外,当发明的特征或方面以马库什群组的形式描述时,本领域技术人员会认识到,本发明也因此以马库什群组的任何单个成员或成员的亚组的形式进行描述。例如,如果X被描述为选自溴、氯和碘组成的群组,则对X为溴的权利要求以及对X为溴和氯的权利要求均得到充分描述。其他实施方式在所附权利要求范围内。

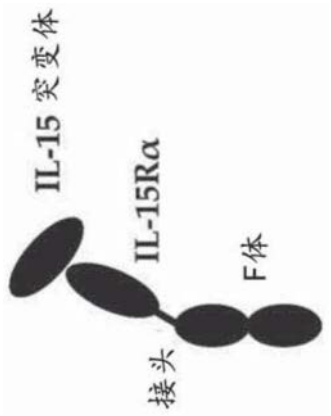

IL-15 突变体
IL-15Rα
F体
接头

图1A

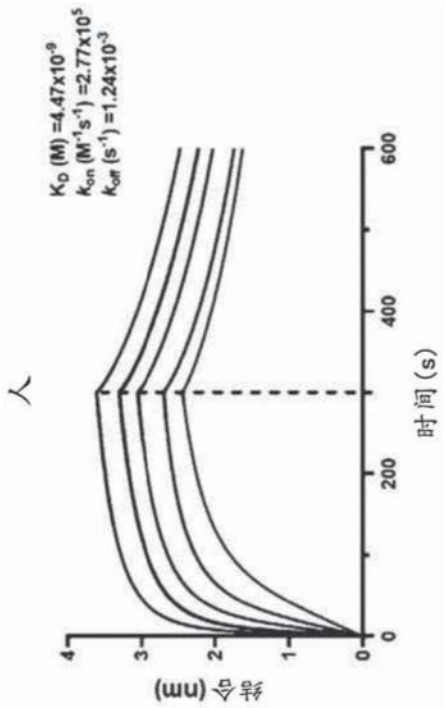

K_D (M) =4.47x10^{-9}
k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$) =2.77x10^5
k_{off} (s^{-1}) =1.24x10^{-3}
人
结合 (nm)
时间 (s)
0
1
2
3
4
0
200
400
600

图1B

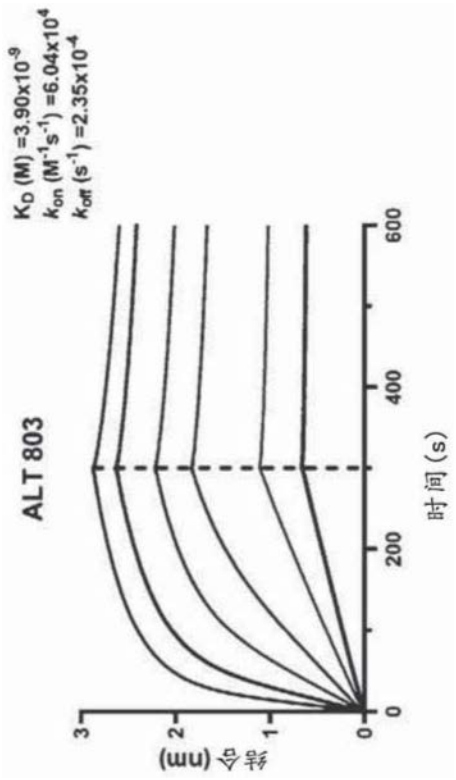

ALT 803
K_D (M) =3.90x10^{-9}
k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$) =6.04x10^{4}
k_{off} (s^{-1}) =2.35x10^{-4}
结合 (nm)
时间 (s)
0
1
2
3
0
200
400
600

图1C

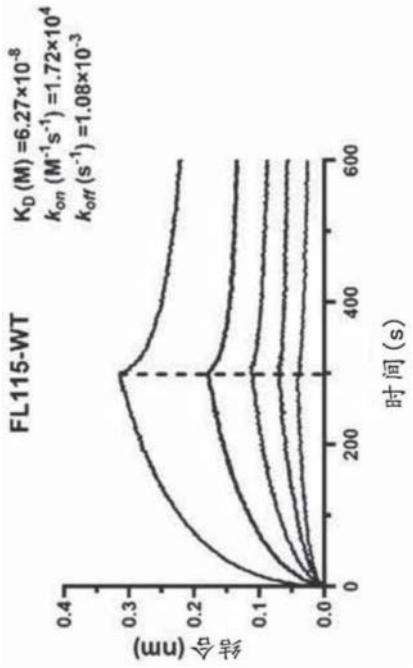

FL115-WT
K_D (M) =6.27×10^{-8}
k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$) =1.72×10^{4}
k_{off} (s^{-1}) =1.08×10^{-3}
结合 (nm)
时间 (s)
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0
200
400
600

图1D

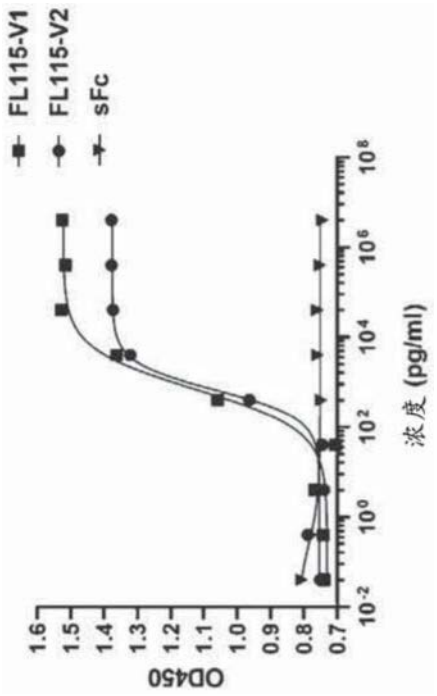


图2A

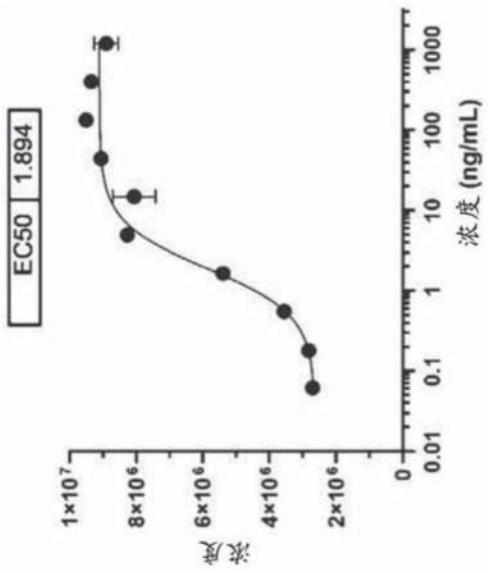


图2B

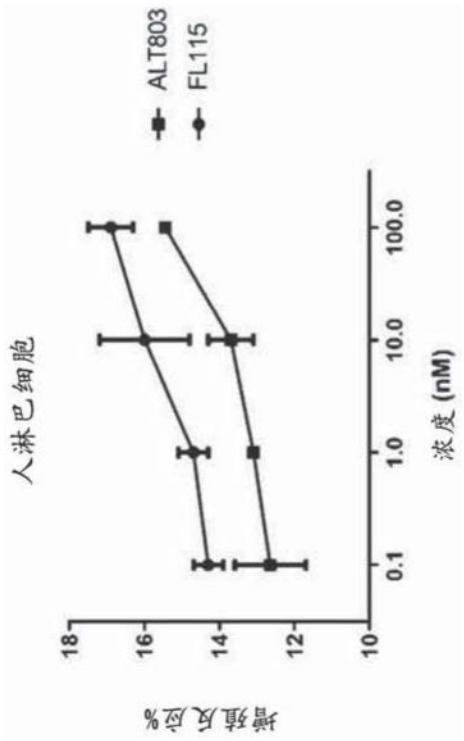

ALT803
FL115
人淋巴细胞
浓度 (nM)
0.1
1.0
10.0
100.0
10
12
14
16
18
增殖反应%

图3A

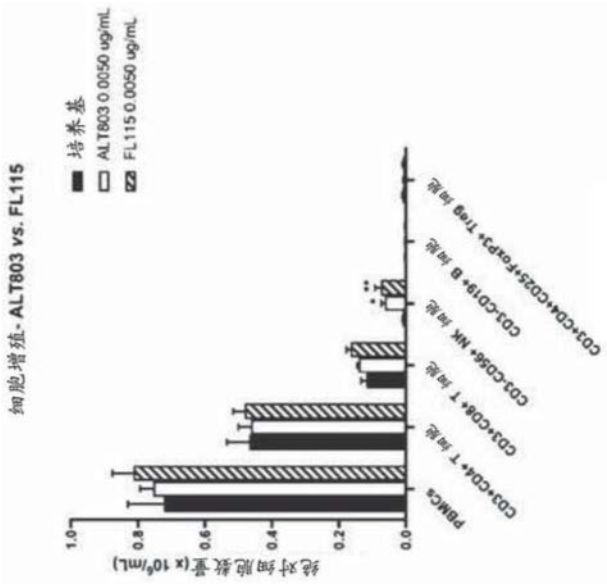

细胞增殖- ALT803 vs. FL115
培养基
ALT803 0.0050 ug/mL
FL115 0.0050 ug/mL
PBMCs
CD3+CD4+ T 细胞
CD3+CD8+ T 细胞
CD3-CD56+ NK 细胞
CD3-CD19+ B 细胞
CD3+CD4+CD25+FoxP3+ Treg 细胞
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

图3B

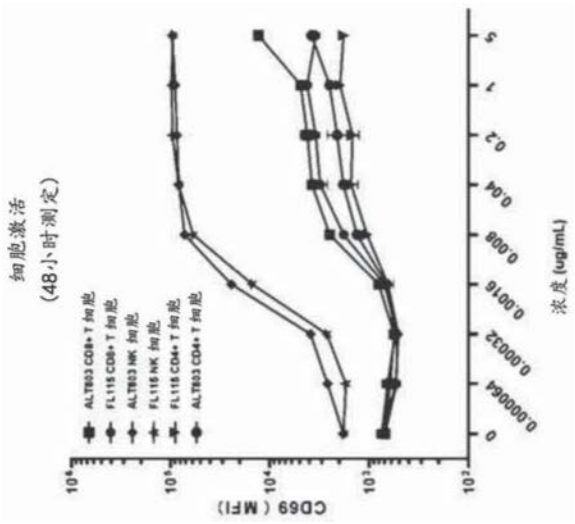

细胞激活
(48小时测定)
CD69 (MFI)
浓度 (ug/mL)
ALT803 CD8+ T 细胞
FL115 CD8+ T 细胞
ALT803 NK 细胞
FL115 NK 细胞
FL115 CD4+ T 细胞
ALT803 CD4+ T 细胞

图3C

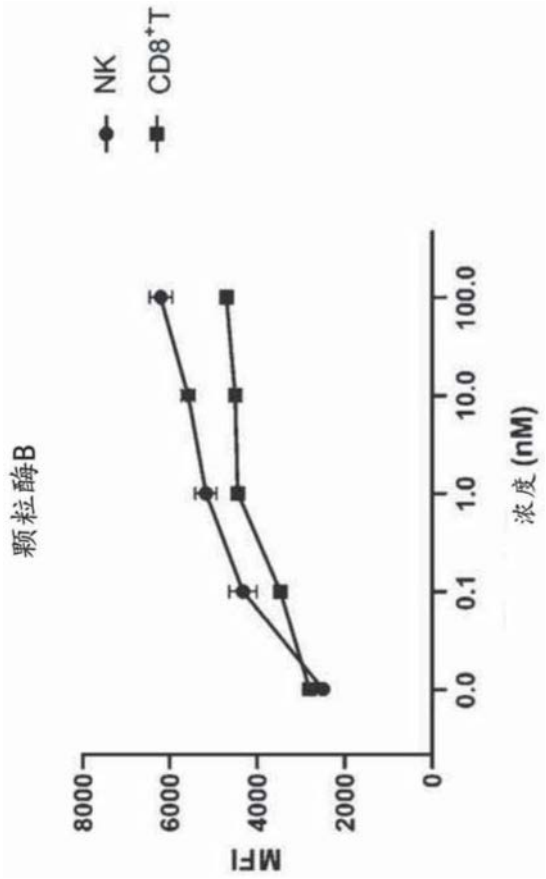

NK
CD8+T
颗粒酶B
MFI
浓度 (nM)

图3D

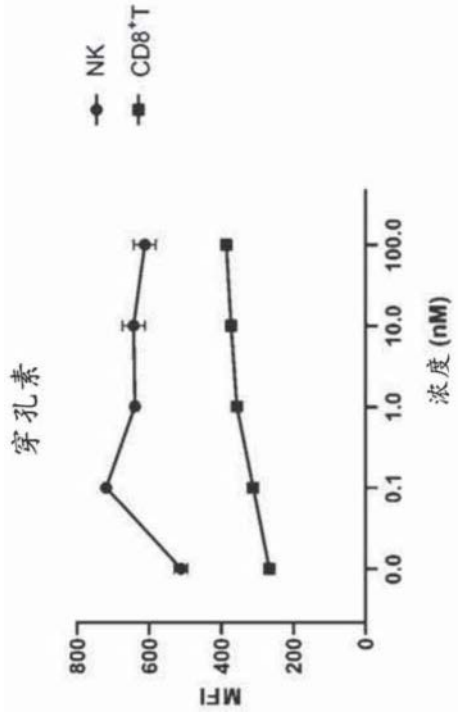

NK
CD8+T
穿孔素
MFI
800
600
400
200
0
0.0
0.1
1.0
10.0
100.0
浓度 (nM)

图3E

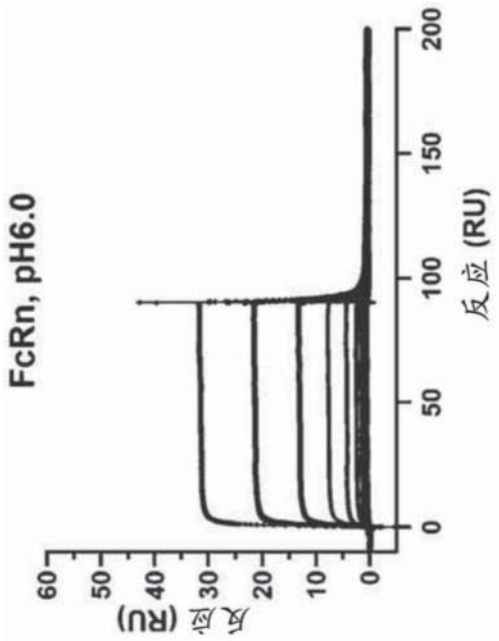

FcRn, pH6.0
反应 (RU)
60
50
40
30
20
10
0
0
50
100
150
200
反应 (RU)

图4

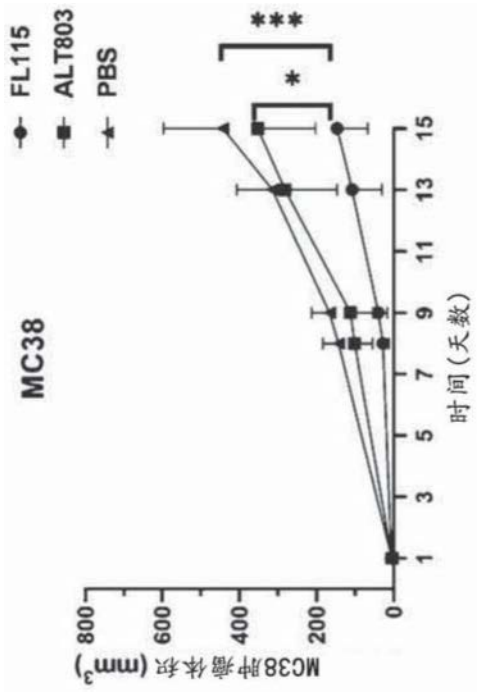

FL115
ALT803
PBS
MC38
***
*
MC38肿瘤体积 (mm³)
时间（天数）
0
200
400
600
800
1
3
5
7
9
11
13
15

图5A

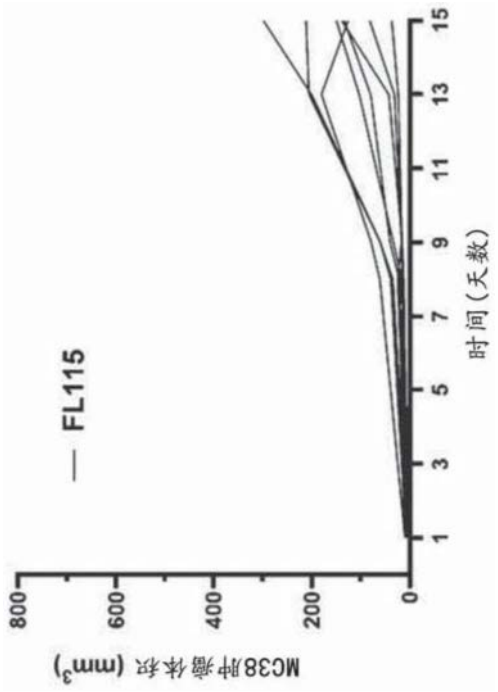

FL115
MC38肿瘤体积 (mm³)
时间（天数）
0
200
400
600
800
1
3
5
7
9
11
13
15

图5B

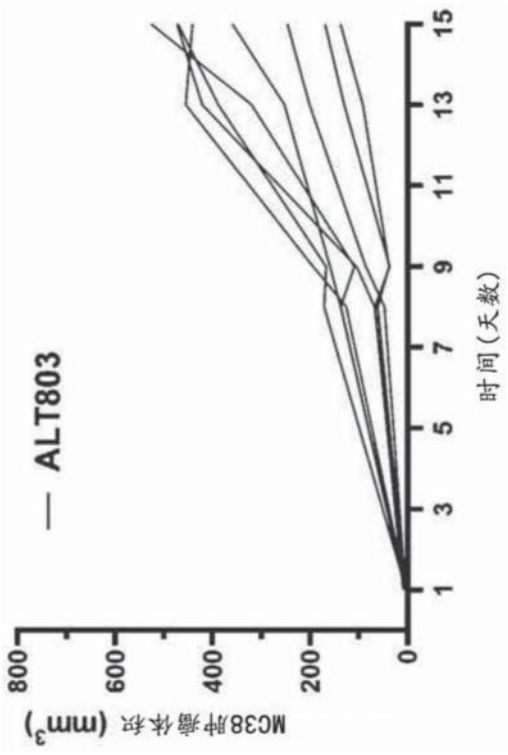

— ALT803
MC38肿瘤体积 (mm^3)
800
600
400
200
0
1
3
5
7
9
11
13
15
时间(天数)

图5C

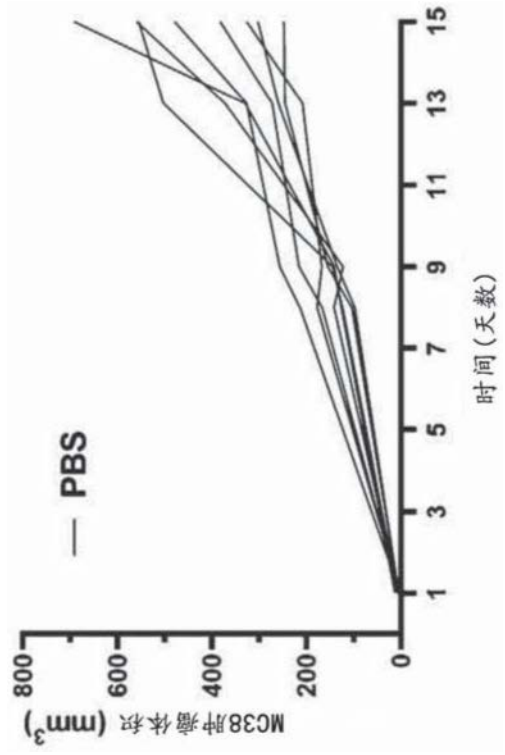

— PBS
MC38肿瘤体积 (mm^3)
800
600
400
200
0
1
3
5
7
9
11
13
15
时间(天数)

图5D

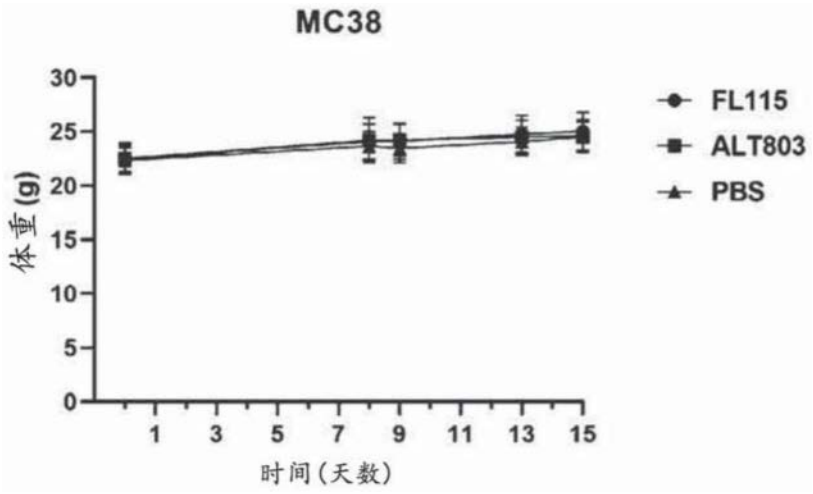

MC38
体重(g)
时间(天数)
FL115
ALT803
PBS

图5E

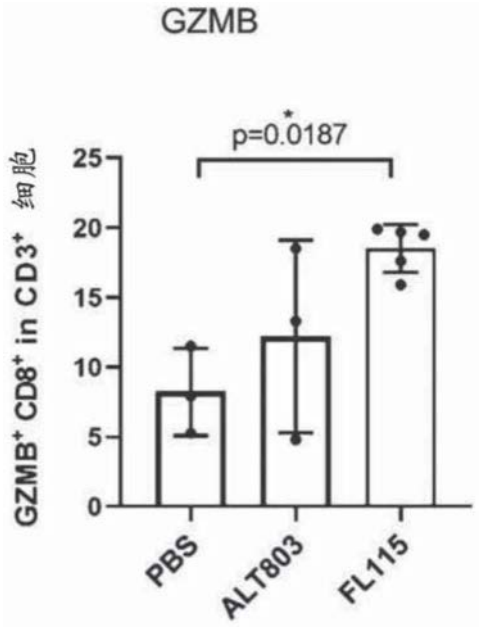

GZMB
p=0.0187
GZMB+ CD8+ in CD3+ 细胞
PBS
ALT803
FL115

图6A

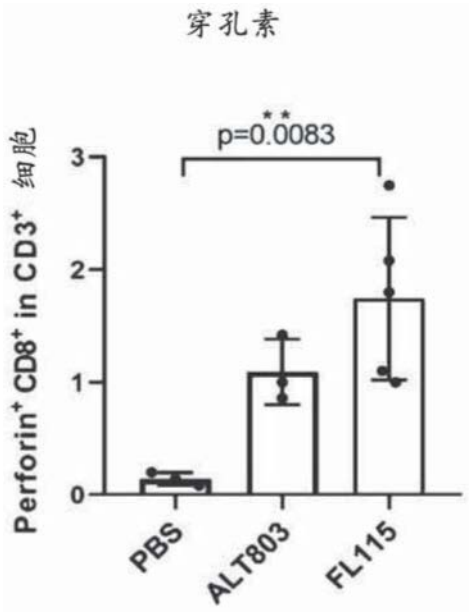

穿孔素
p=0.0083
Perforin+ CD8+ in CD3+ 细胞
3
2
1
0
PBS
ALT803
FL115

图6B

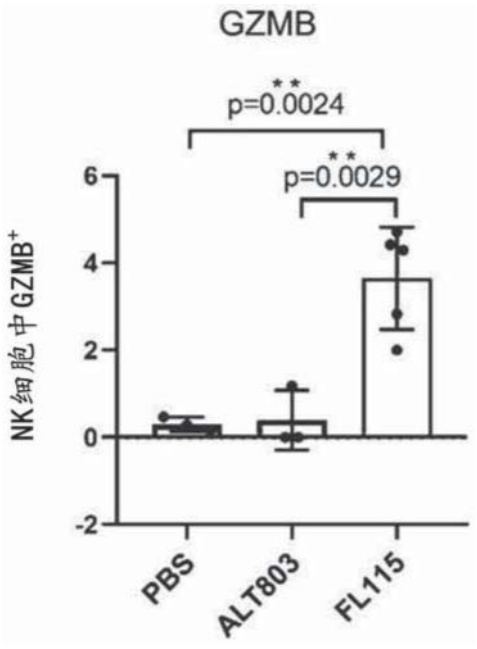

GZMB
p=0.0024
p=0.0029
NK细胞中GZMB+
6
4
2
0
-2
PBS
ALT803
FL115

图6C

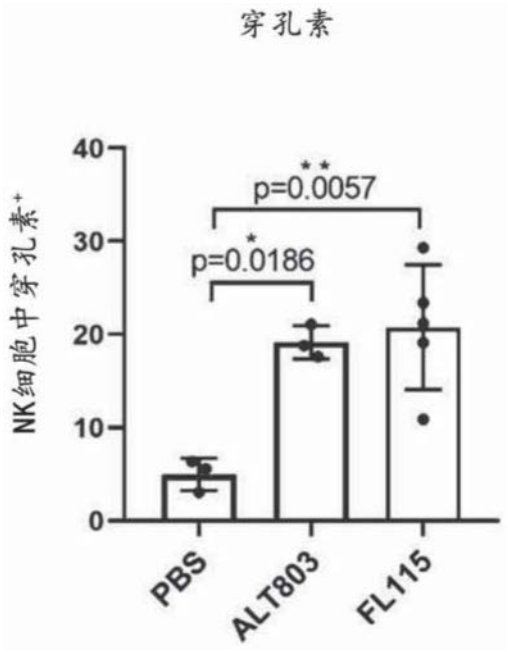

穿孔素
NK细胞中穿孔素+
40
30
20
10
0
p=0.0057
p=0.0186
PBS
ALT803
FL115

图6D

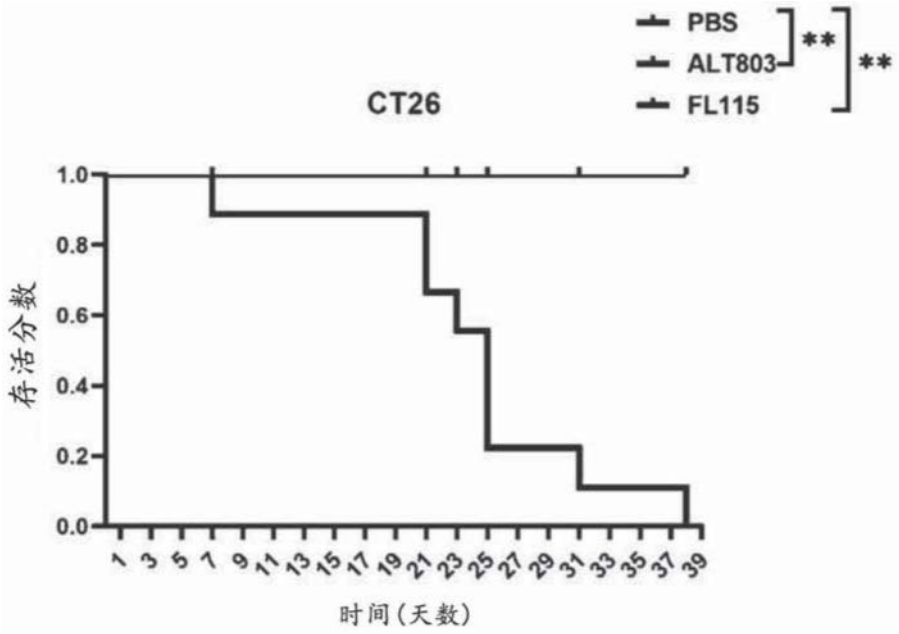

PBS
ALT803
FL115
**
**
CT26
存活分数
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39
时间(天数)

图7

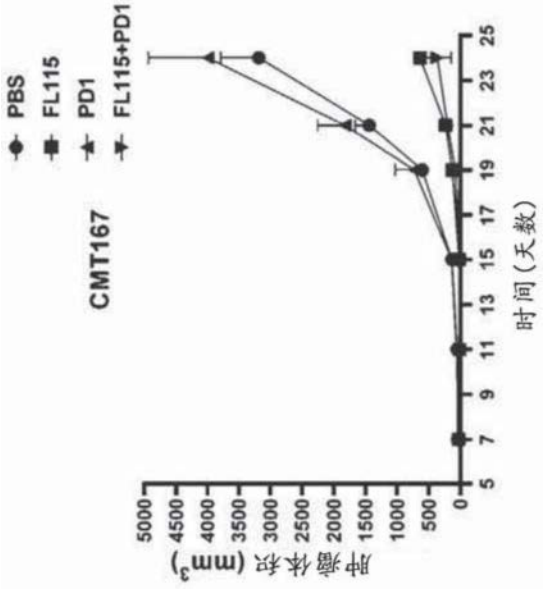

PBS
FL115
PD1
FL115+PD1
CMT167
肿瘤体积 (mm³)
时间(天数)
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
4500
5000
5
7
9
11
13
15
17
19
21
23
25

图8A

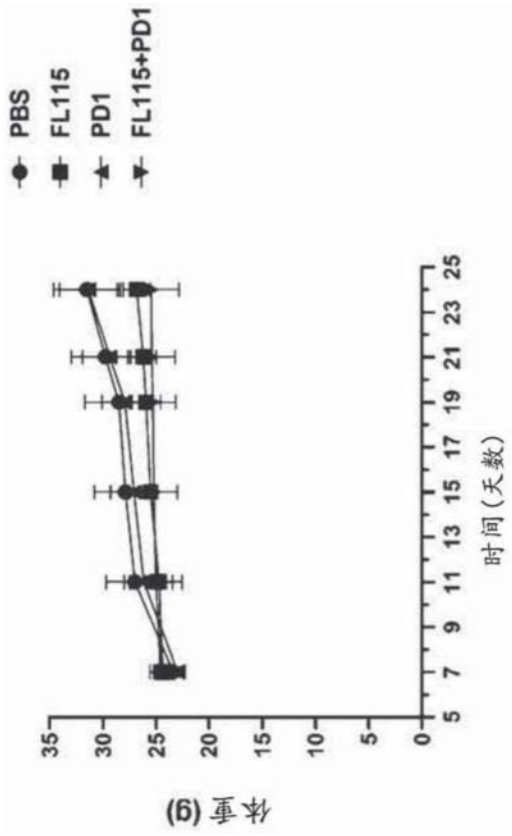

PBS
FL115
PD1
FL115+PD1
体重 (g)
时间(天数)
0
5
10
15
20
25
30
35
5
7
9
11
13
15
17
19
21
23
25

图8B

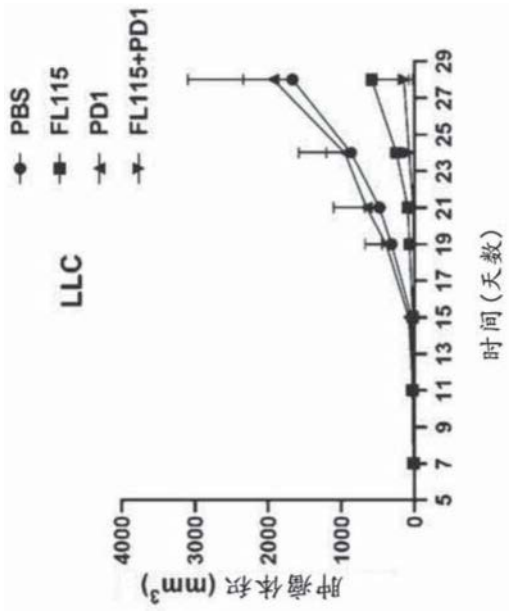

PBS
FL115
PD1
FL115+PD1
LLC
肿瘤体积 (mm³)
4000
3000
2000
1000
0
5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29
时间(天数)

图8C

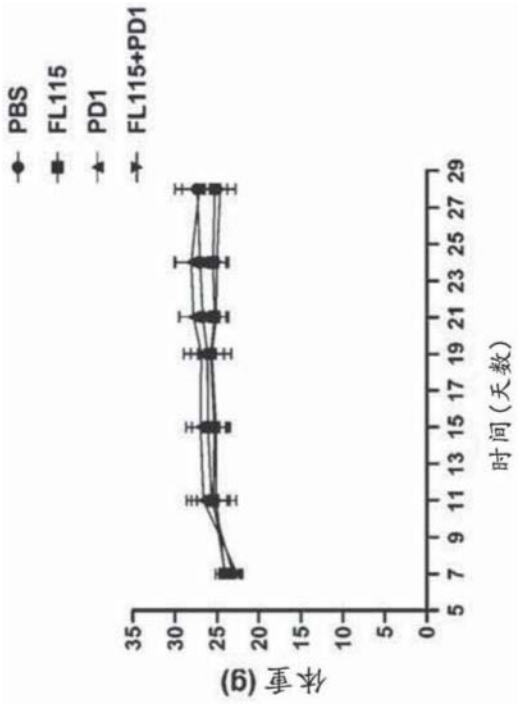

PBS
FL115
PD1
FL115+PD1
体重 (g)
35
30
25
20
15
10
5
0
5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29
时间(天数)

图8D

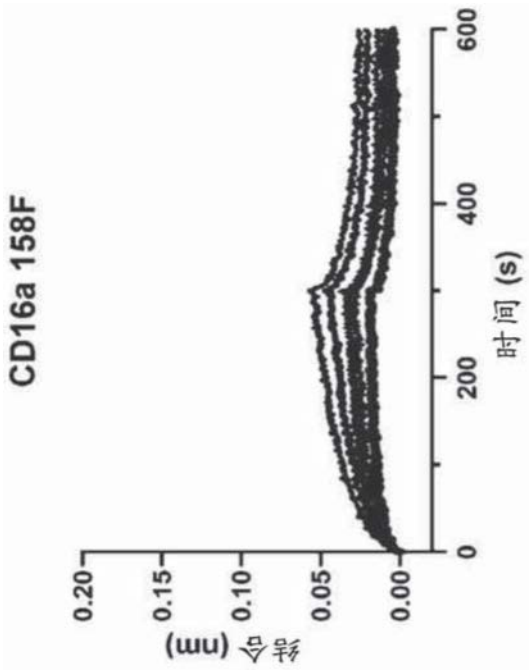

CD16a 158F
结合 (nm)
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0
200
400
600
时间 (s)

图9A

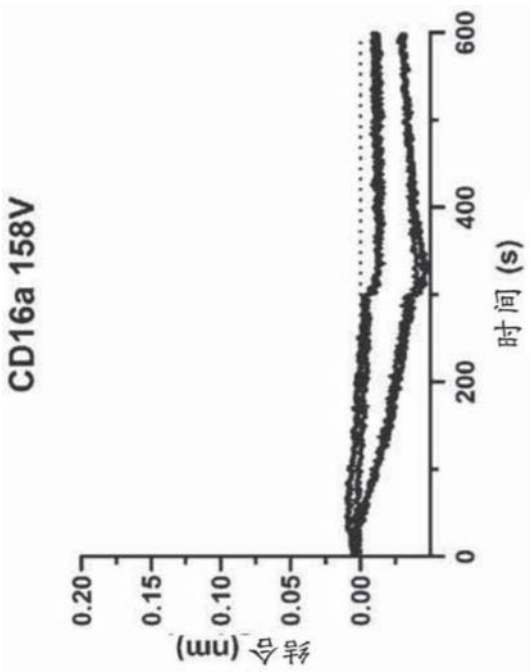

CD16a 158V
结合 (nm)
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0
200
400
600
时间 (s)

图9B

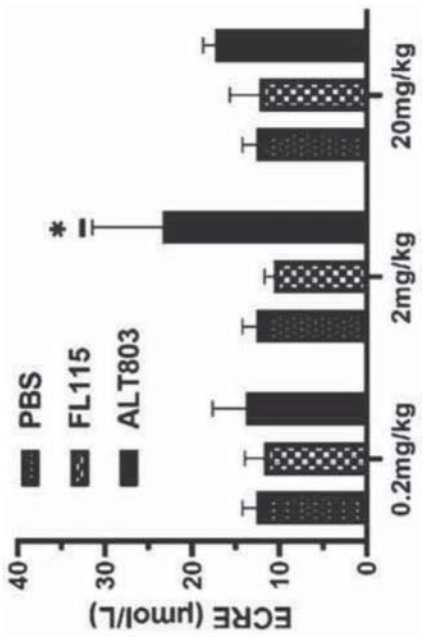

PBS
FL115
ALT803
*
0.2mg/kg
2mg/kg
20mg/kg
0
10
20
30
40
ECRE (μmol/L)

图10A

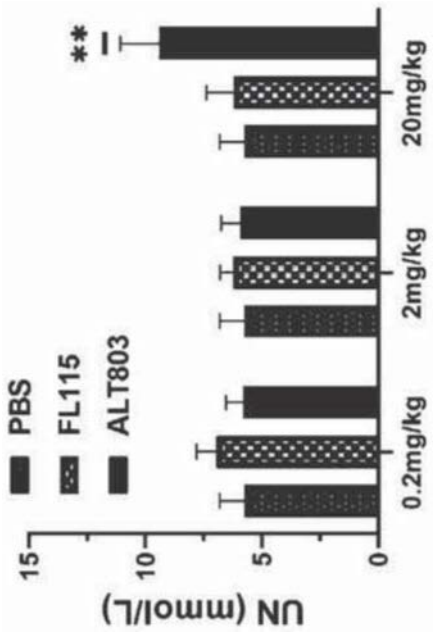

PBS
FL115
ALT803
**
0.2mg/kg
2mg/kg
20mg/kg
0
5
10
15
UN (mmol/L)

图10B

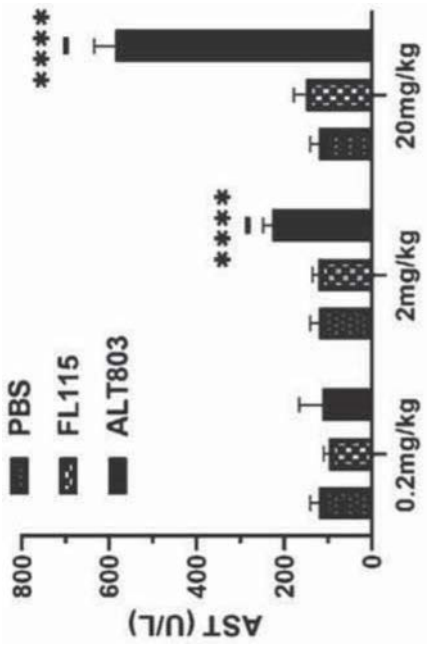

AST (U/L)
800
600
400
200
0
PBS
FL115
ALT803
****
****
0.2mg/kg
2mg/kg
20mg/kg

图10C

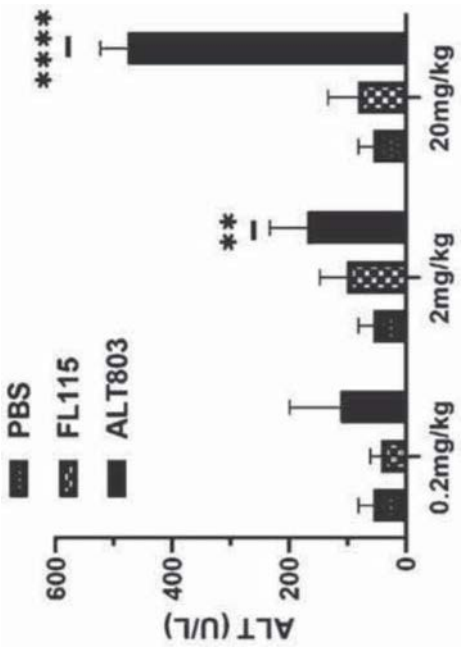

ALT (U/L)
600
400
200
0
PBS
FL115
ALT803
****
**
0.2mg/kg
2mg/kg
20mg/kg

图10D

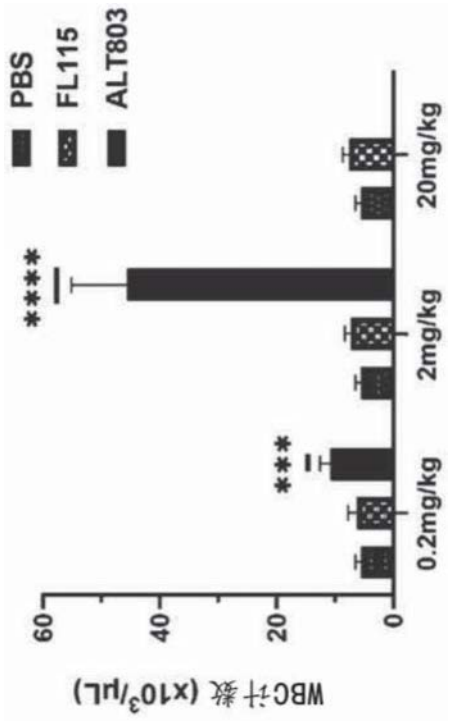

PBS
FL115
ALT803
WBC计数 (x10³/μL)
0
20
40
60
0.2mg/kg
2mg/kg
20mg/kg
***
****

图11A

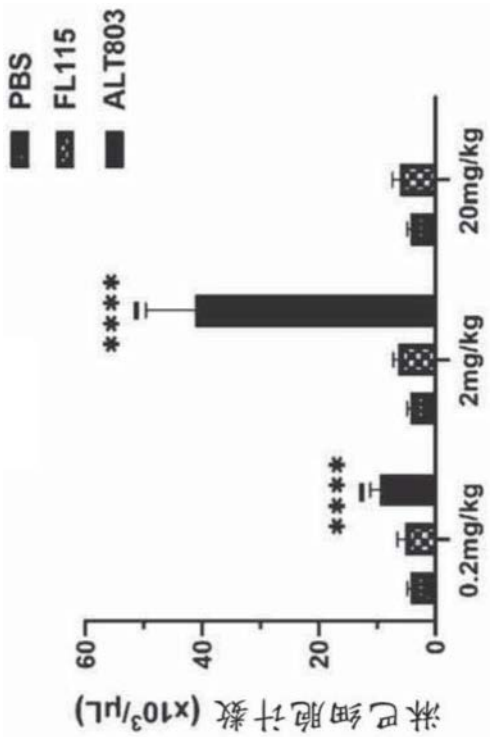

PBS
FL115
ALT803
淋巴细胞计数 (x10³/μL)
0
20
40
60
0.2mg/kg
2mg/kg
20mg/kg
****
****

图11B

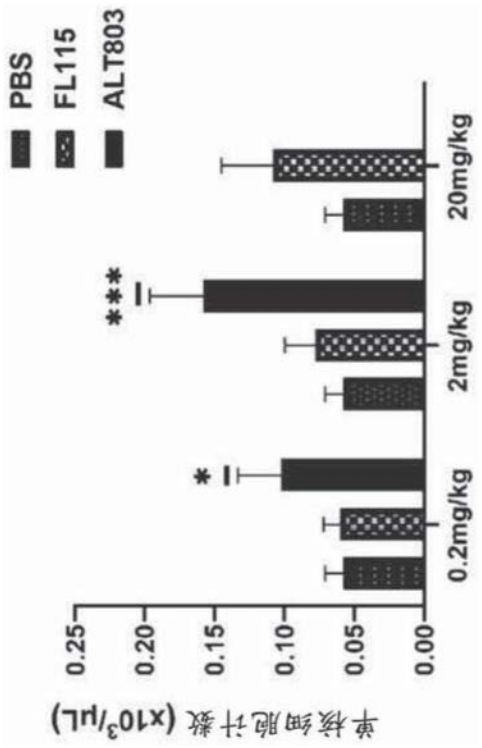

PBS
FL115
ALT803
***
*
0.2mg/kg
2mg/kg
20mg/kg
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
单核细胞计数 (x10³/μL)

图11C

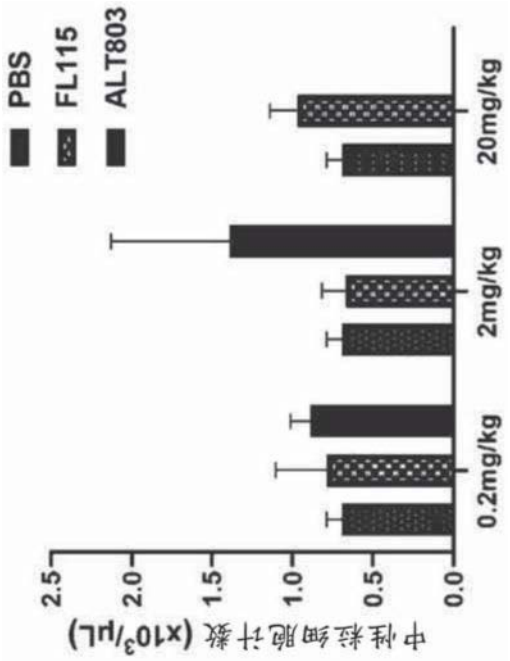

PBS
FL115
ALT803
0.2mg/kg
2mg/kg
20mg/kg
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
中性粒细胞计数 (x10³/μL)

图11D

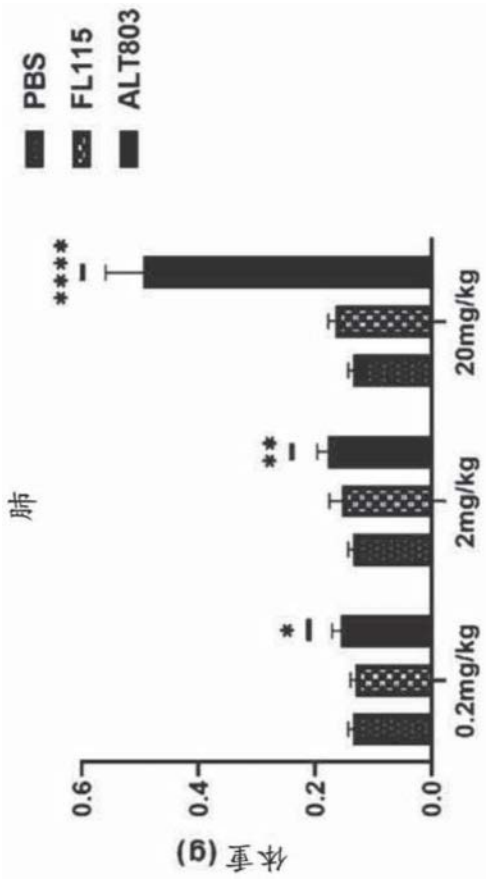


图12A

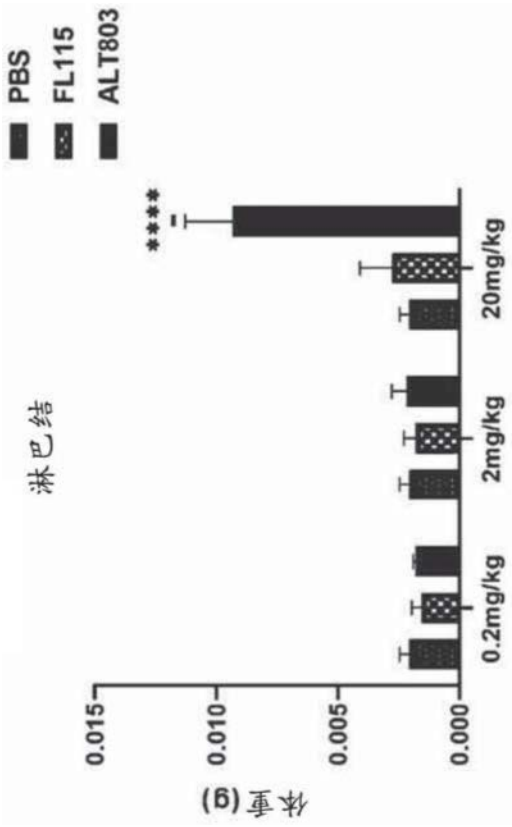

PBS
FL115
ALT803
****
淋巴结
体重(g)
0.015
0.010
0.005
0.000
0.2mg/kg
2mg/kg
20mg/kg

图12B

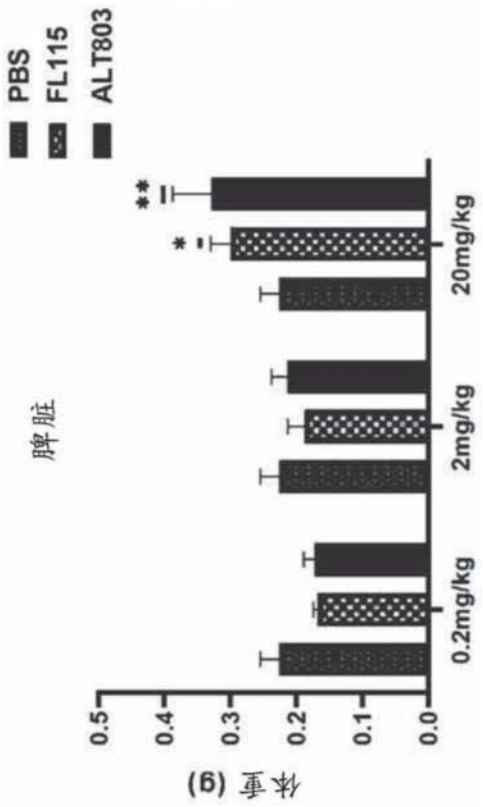


图12C

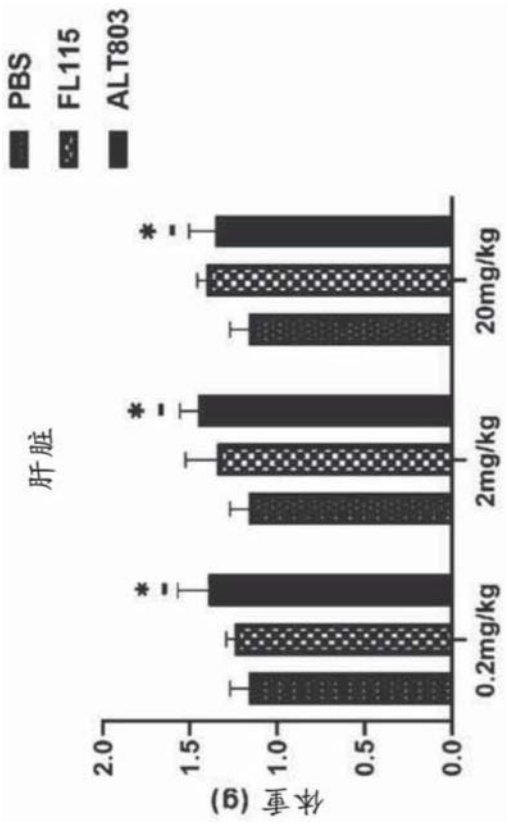


图12D

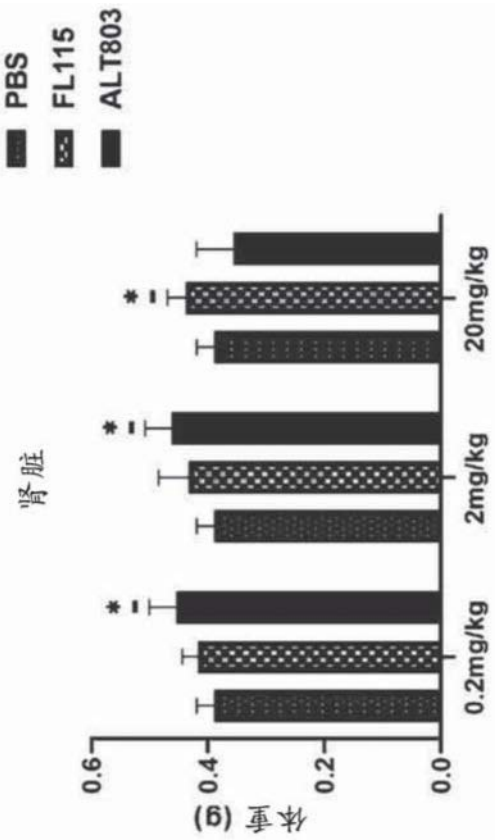


图12E

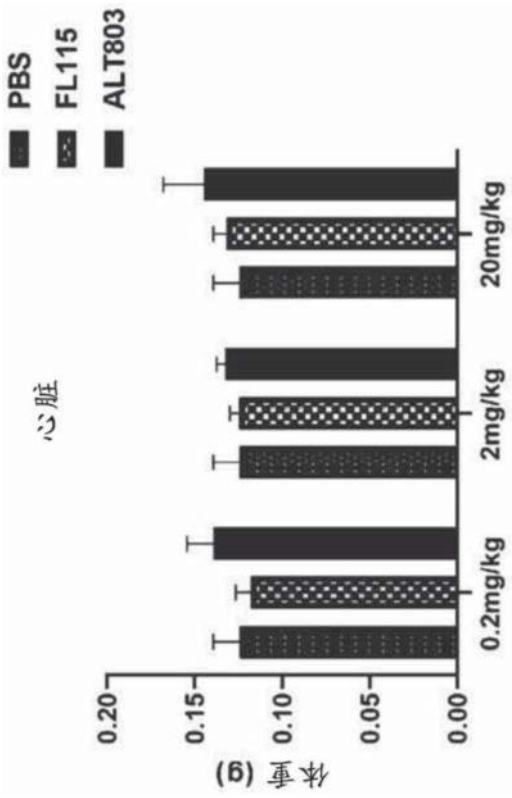

PBS
FL115
ALT803
心脏
体重 (g)
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0.2mg/kg
2mg/kg
20mg/kg

图12F

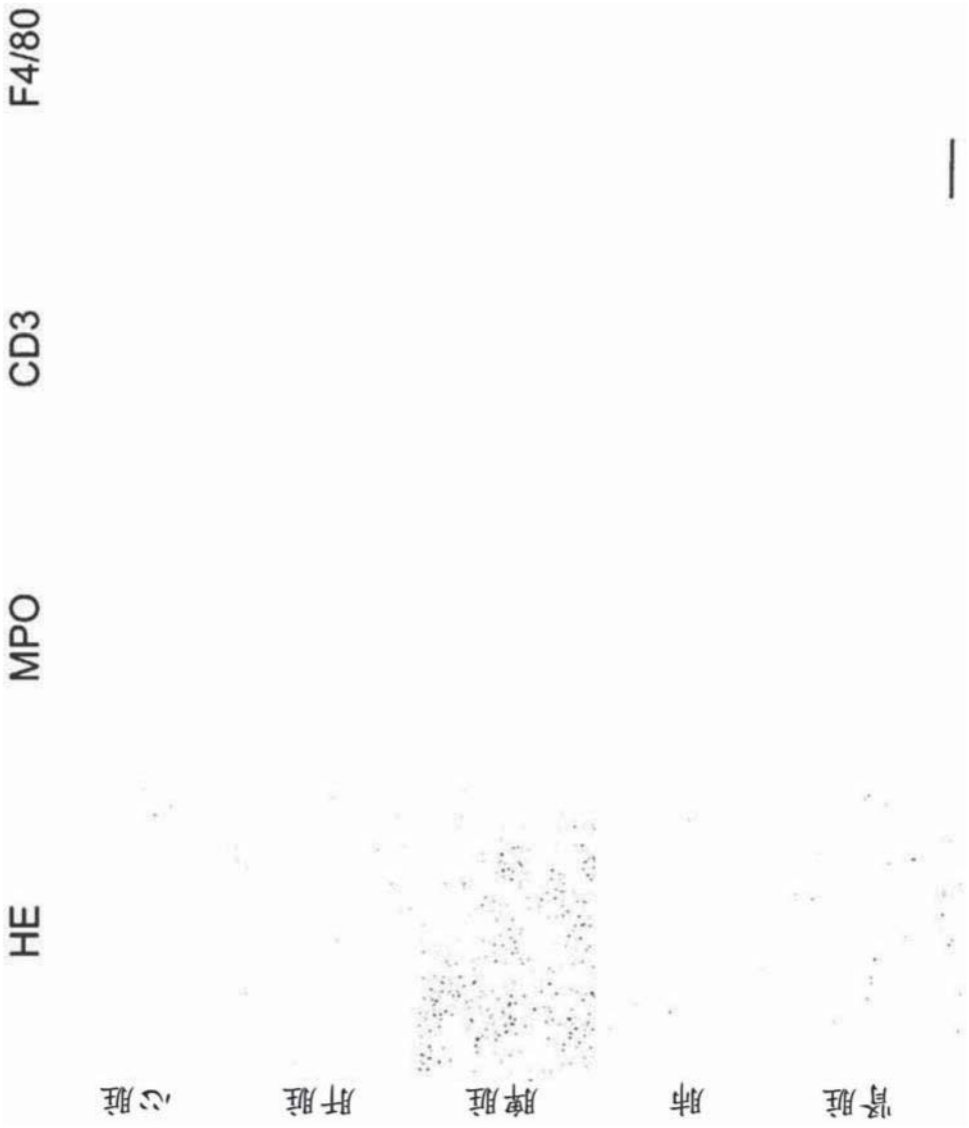


图13

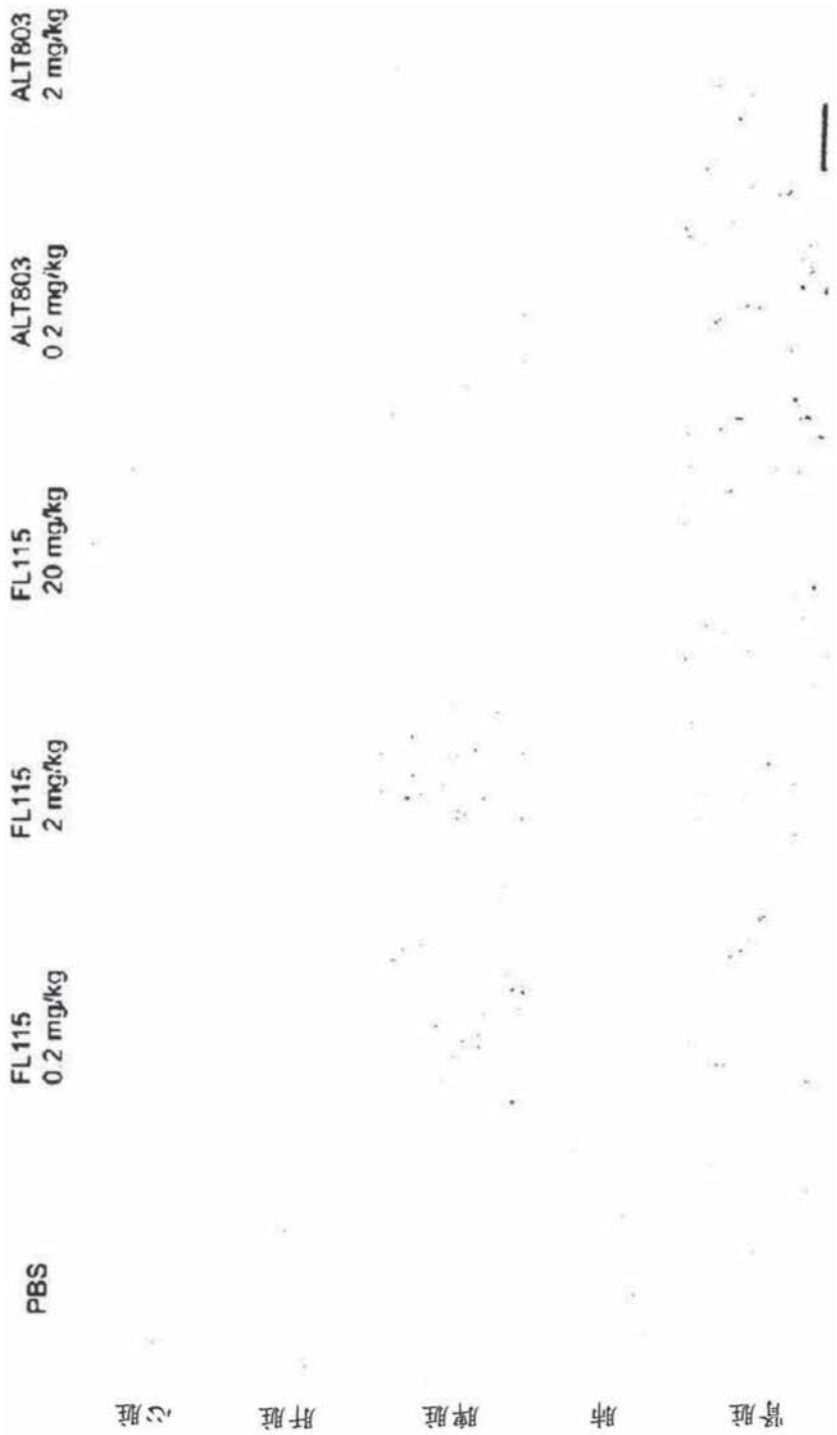

PBS
FL115 0.2 mg/kg
FL115 2 mg/kg
FL115 20 mg/kg
ALT803 0.2 mg/kg
ALT803 2 mg/kg
肾脏
肺
脾脏
肝脏
心脏

图14

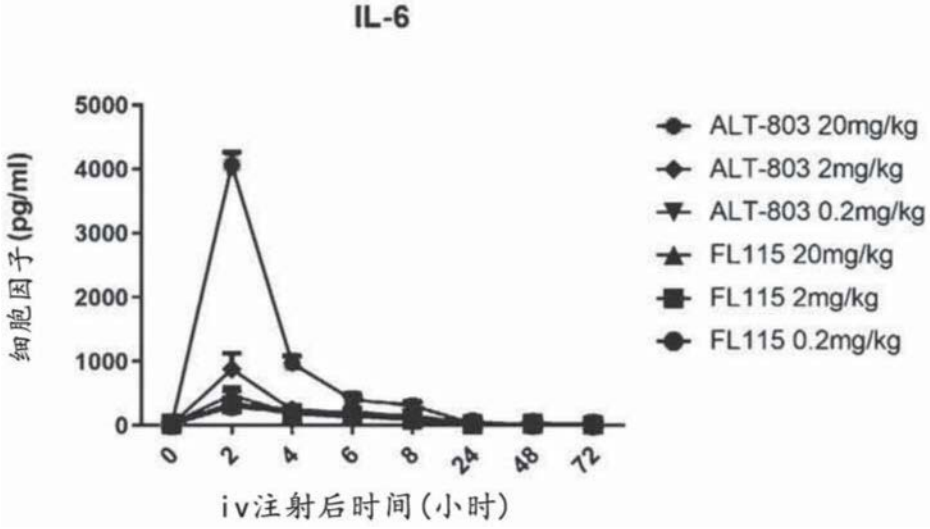

IL-6
细胞因子(pg/ml)
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
2
4
6
8
24
48
72
iv注射后时间(小时)
ALT-803 20mg/kg
ALT-803 2mg/kg
ALT-803 0.2mg/kg
FL115 20mg/kg
FL115 2mg/kg
FL115 0.2mg/kg

图15A

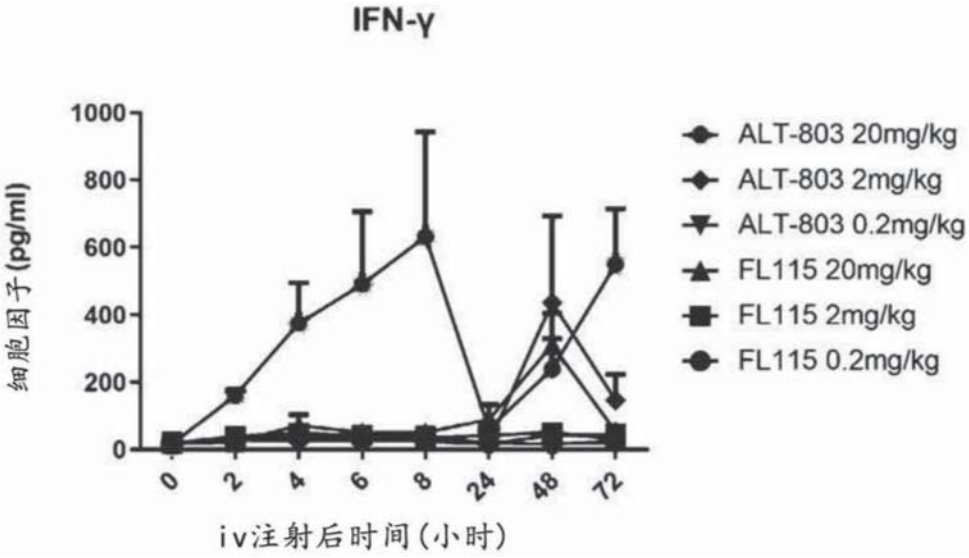

IFN-γ
细胞因子(pg/ml)
1000
800
600
400
200
0
0
2
4
6
8
24
48
72
iv注射后时间(小时)
ALT-803 20mg/kg
ALT-803 2mg/kg
ALT-803 0.2mg/kg
FL115 20mg/kg
FL115 2mg/kg
FL115 0.2mg/kg

图15B

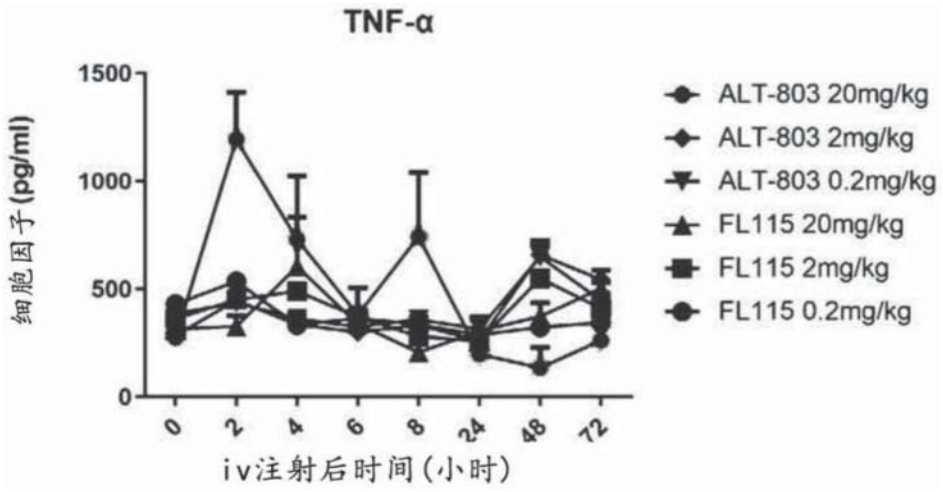

TNF-α
细胞因子(pg/ml)
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
24
48
72
iv注射后时间(小时)
ALT-803 20mg/kg
ALT-803 2mg/kg
ALT-803 0.2mg/kg
FL115 20mg/kg
FL115 2mg/kg
FL115 0.2mg/kg

图15C

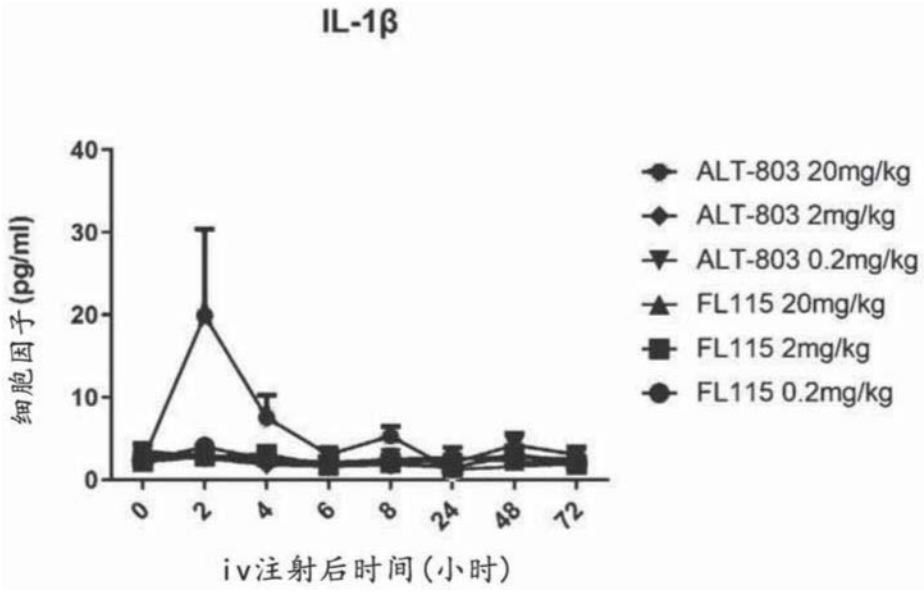

IL-1β
细胞因子(pg/ml)
40
30
20
10
0
0
2
4
6
8
24
48
72
iv注射后时间(小时)
ALT-803 20mg/kg
ALT-803 2mg/kg
ALT-803 0.2mg/kg
FL115 20mg/kg
FL115 2mg/kg
FL115 0.2mg/kg

图15D

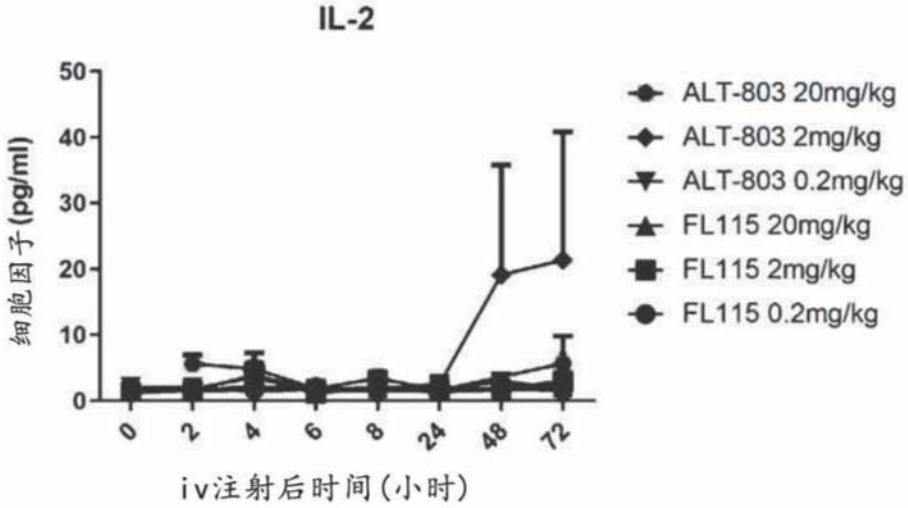

IL-2
细胞因子(pg/ml)
50
40
30
20
10
0
0
2
4
6
8
24
48
72
iv注射后时间(小时)
ALT-803 20mg/kg
ALT-803 2mg/kg
ALT-803 0.2mg/kg
FL115 20mg/kg
FL115 2mg/kg
FL115 0.2mg/kg

图15E

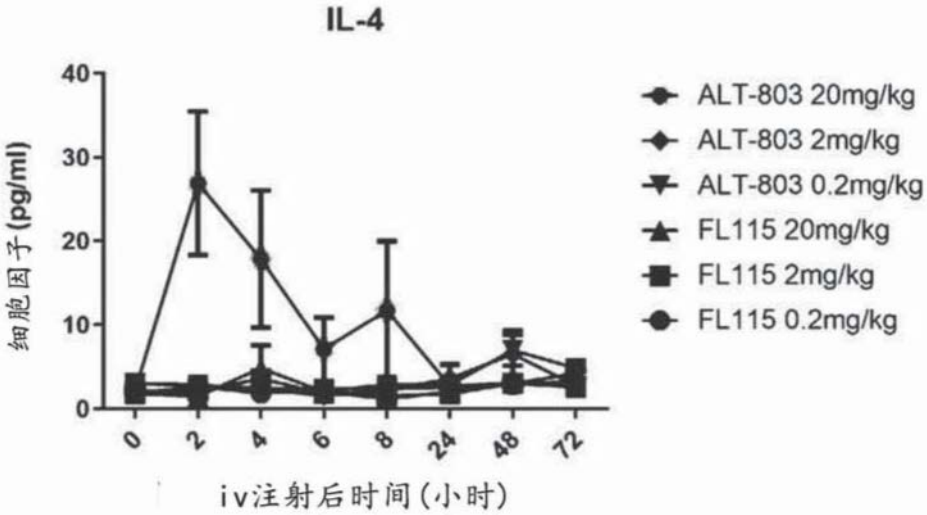

IL-4
细胞因子(pg/ml)
40
30
20
10
0
0
2
4
6
8
24
48
72
iv注射后时间(小时)
ALT-803 20mg/kg
ALT-803 2mg/kg
ALT-803 0.2mg/kg
FL115 20mg/kg
FL115 2mg/kg
FL115 0.2mg/kg

图15F

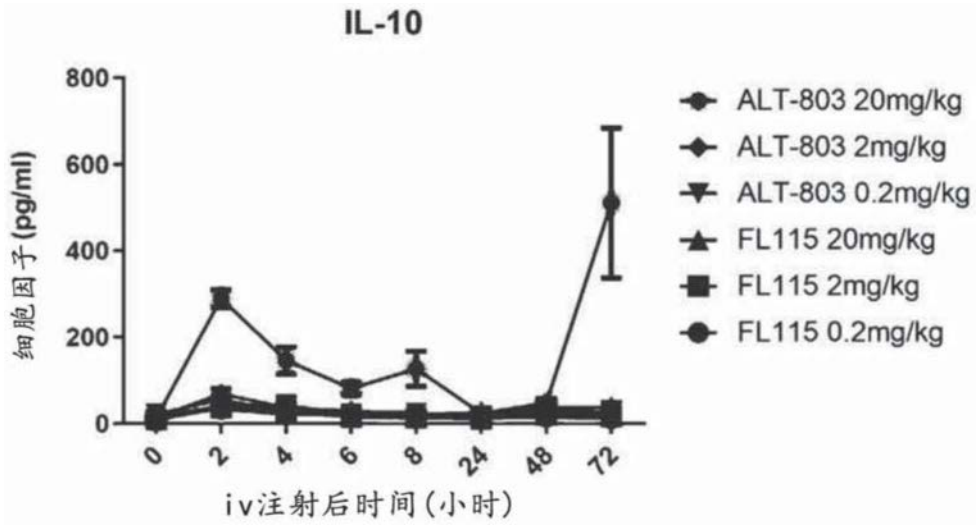

IL-10
细胞因子(pg/ml)
800
600
400
200
0
0
2
4
6
8
24
48
72
iv注射后时间(小时)
ALT-803 20mg/kg
ALT-803 2mg/kg
ALT-803 0.2mg/kg
FL115 20mg/kg
FL115 2mg/kg
FL115 0.2mg/kg

图15G

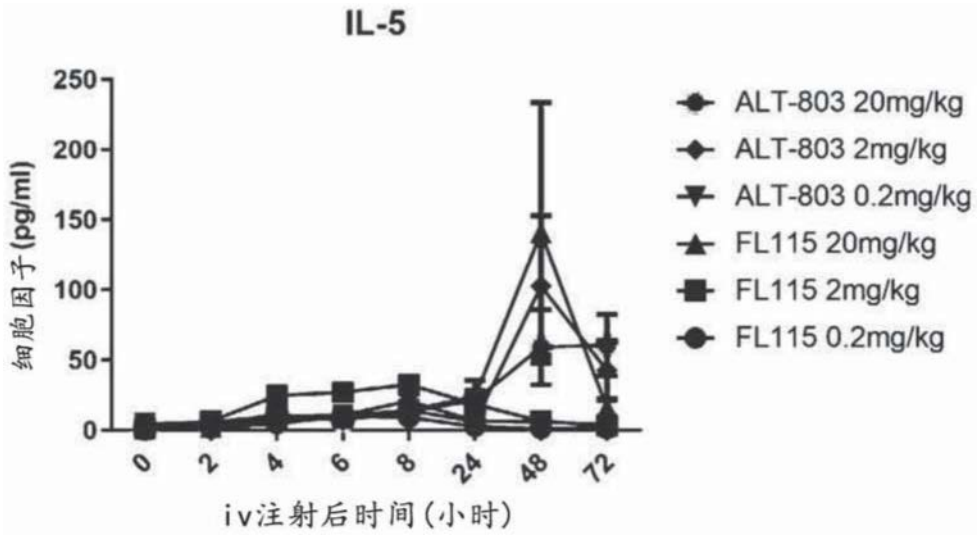

IL-5
细胞因子(pg/ml)
250
200
150
100
50
0
0
2
4
6
8
24
48
72
iv注射后时间(小时)
ALT-803 20mg/kg
ALT-803 2mg/kg
ALT-803 0.2mg/kg
FL115 20mg/kg
FL115 2mg/kg
FL115 0.2mg/kg

图15H

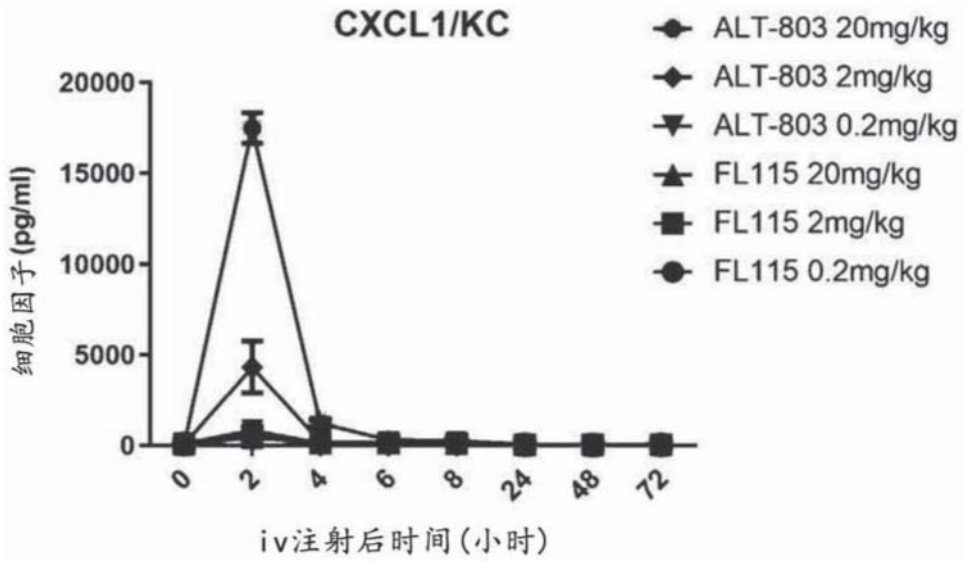

CXCL1/KC
ALT-803 20mg/kg
ALT-803 2mg/kg
ALT-803 0.2mg/kg
FL115 20mg/kg
FL115 2mg/kg
FL115 0.2mg/kg
细胞因子(pg/ml)
20000
15000
10000
5000
0
0
2
4
6
8
24
48
72
iv注射后时间(小时)

图15I

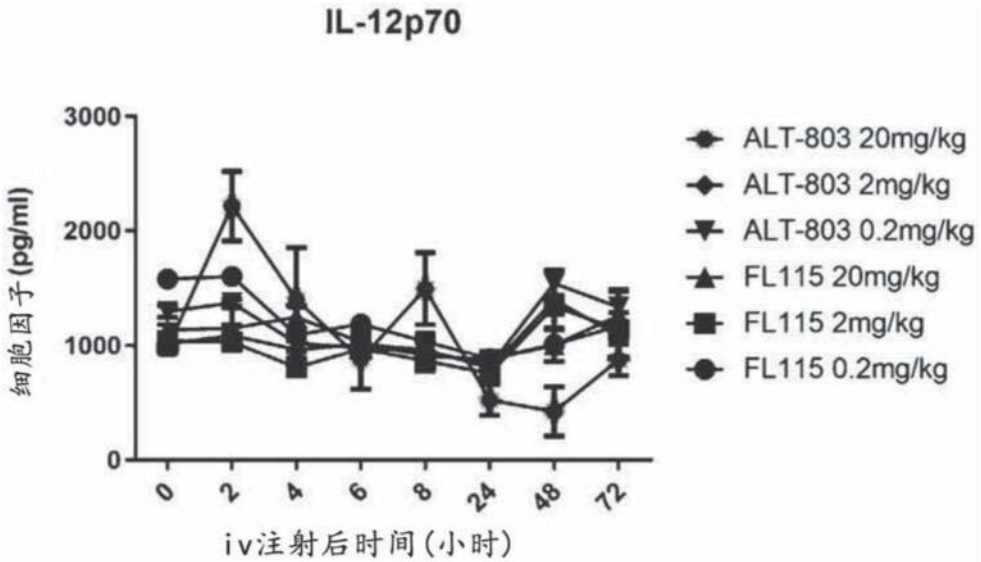

IL-12p70
ALT-803 20mg/kg
ALT-803 2mg/kg
ALT-803 0.2mg/kg
FL115 20mg/kg
FL115 2mg/kg
FL115 0.2mg/kg
细胞因子(pg/ml)
3000
2000
1000
0
0
2
4
6
8
24
48
72
iv注射后时间(小时)

图15J

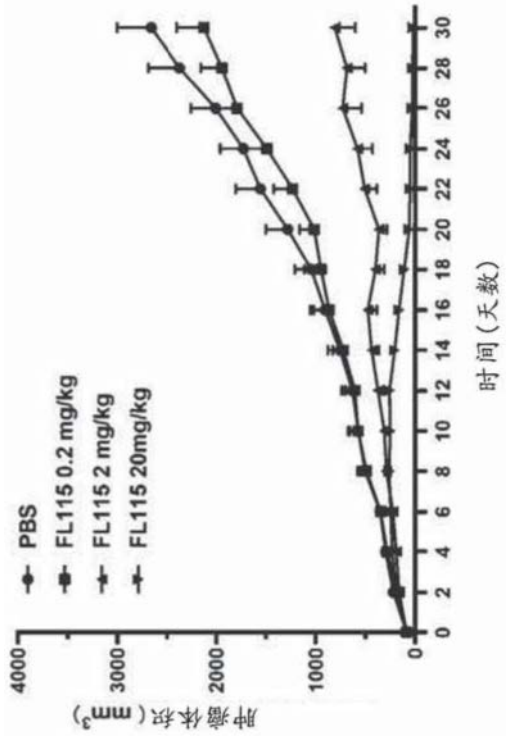

PBS
FL115 0.2 mg/kg
FL115 2 mg/kg
FL115 20mg/kg
肿瘤体积（mm³）
时间（天数）

图16A

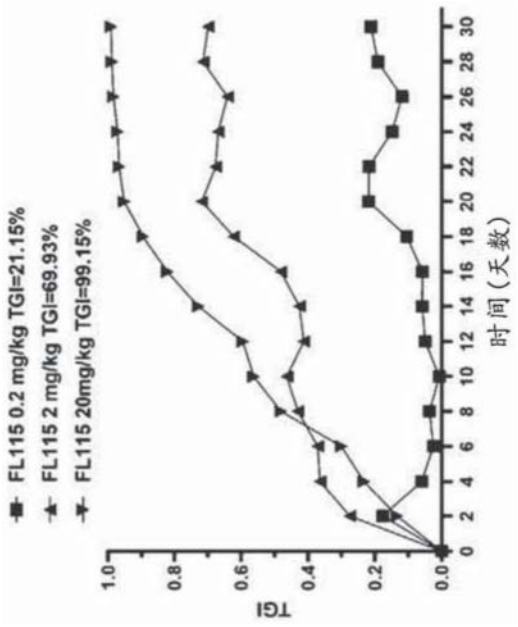

FL115 0.2 mg/kg TGI=21.15%
FL115 2 mg/kg TGI=69.93%
FL115 20mg/kg TGI=99.15%
TGI
时间（天数）

图16B

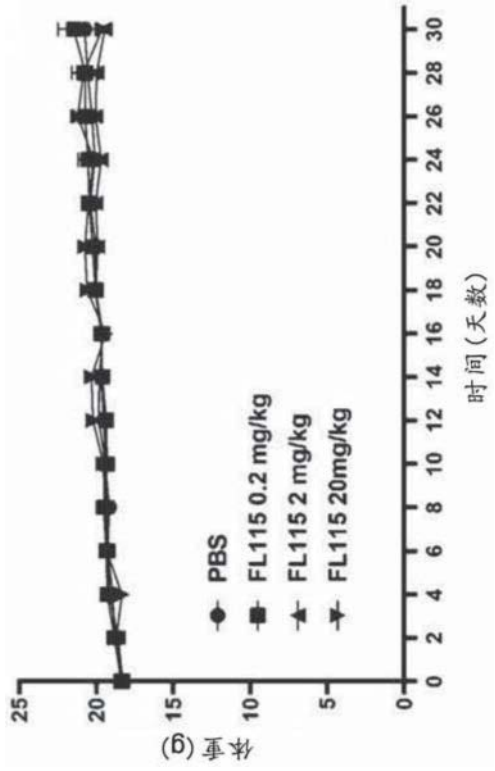

体重 (g)
25
20
15
10
5
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30
时间（天数）
PBS
FL115 0.2 mg/kg
FL115 2 mg/kg
FL115 20mg/kg

图16C

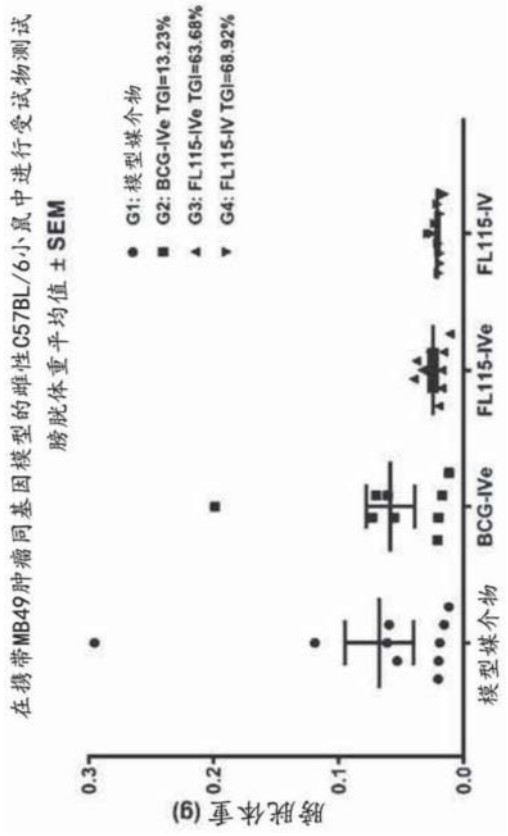

在携带MB49肿瘤同基因模型的雌性C57BL/6小鼠中进行受试物测试
膀胱体重平均值 ± SEM
G1: 模型媒介物
G2: BCG-IVe TGI=13.23%
G3: FL115-IVe TGI=63.68%
G4: FL115-IV TGI=68.92%
膀胱体重 (g)
0.3
0.2
0.1
0.0
模型媒介物
BCG-IVe
FL115-IVe
FL115-IV

图17A

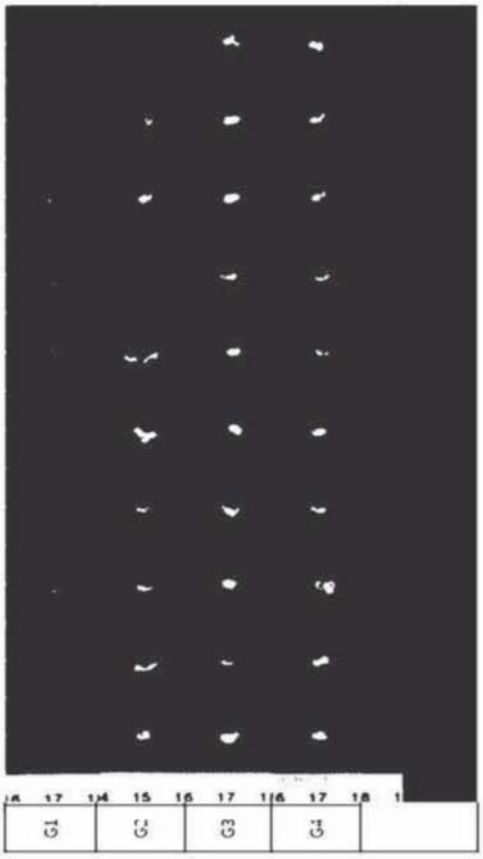

G1
G2
G3
G4

图17B

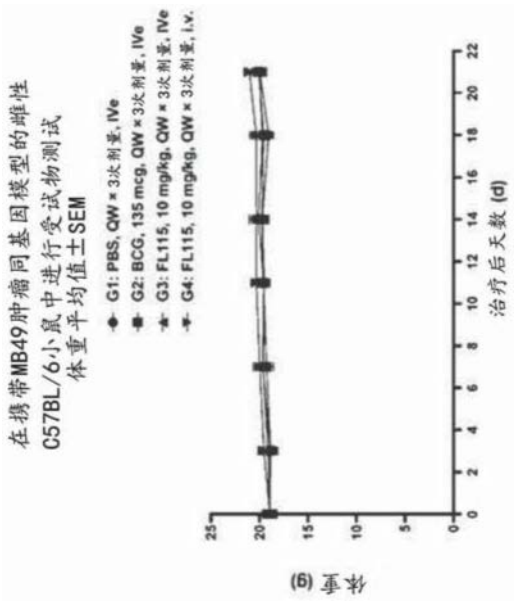

在携带MB49肿瘤同基因模型的雌性
C57BL/6小鼠中进行受试物测试
体重平均值±SEM
G1: PBS, QW × 3次剂量, IVe
G2: BCG, 135 mcg, QW × 3次剂量, IVe
G3: FL115, 10 mg/kg, QW × 3次剂量, IVe
G4: FL115, 10 mg/kg, QW × 3次剂量, i.v.
体重 (g)
治疗后天数 (d)

图17C

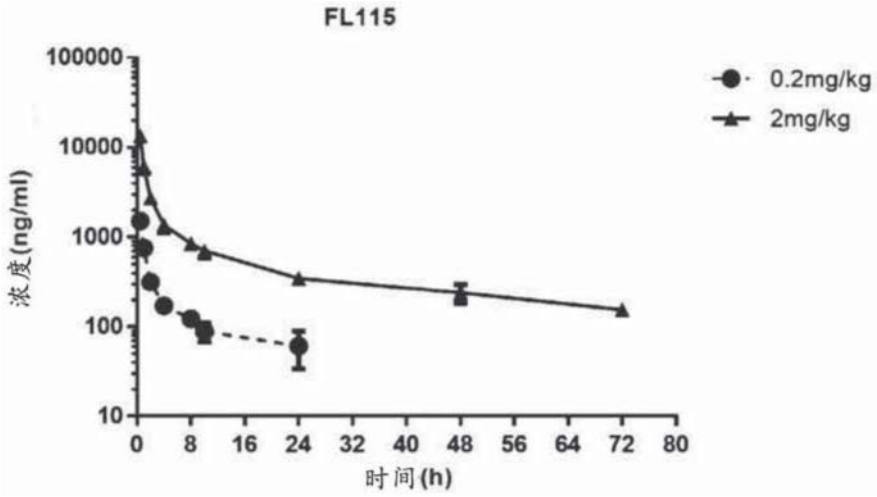

FL115
100000
10000
1000
100
10
浓度(ng/ml)
0 8 16 24 32 40 48 56 64 72 80
时间(h)
0.2mg/kg
2mg/kg

图18A

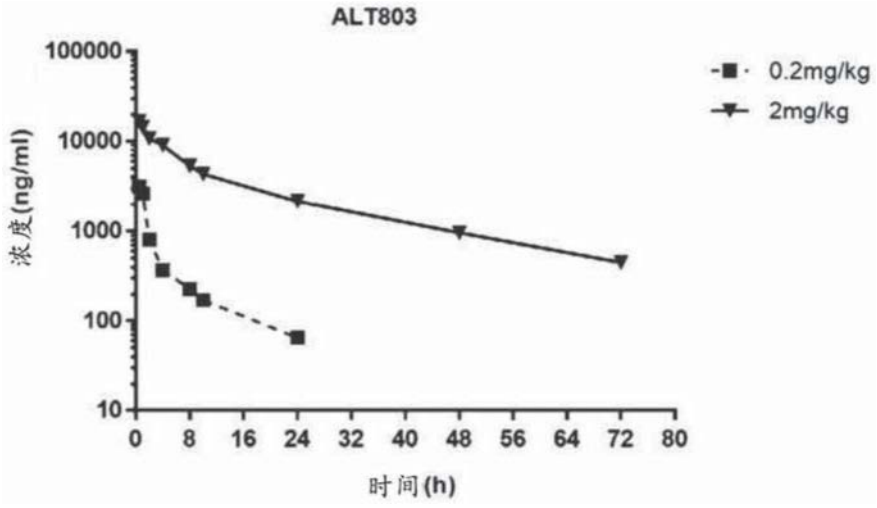

ALT803
100000
10000
1000
100
10
浓度(ng/ml)
0 8 16 24 32 40 48 56 64 72 80
时间(h)
0.2mg/kg
2mg/kg

图18B