



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 115315434 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 08

(21) 申请号 202080095025.8

(22) 申请日 2020.12.04

(30) 优先权数据

62/944,203 2019.12.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.07.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/063214 2020.12.04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/113577 EN 2021.06.10

(71) 申请人 免疫靶向有限公司

地址 美国德克萨斯州

(72) 发明人 王阳

(74) 专利代理机构 北京市立方律师事务所

11330

专利代理师 谢玉斌 马新良

(51) Int.Cl.

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

权利要求书3页 说明书34页 附图25页

(54) 发明名称

白细胞介素15融合蛋白和前药及其组合物
和方法

(57) 摘要

本发明提供了用于治疗各种疾病和病症(例如,增生、实体瘤或造血系统恶性肿瘤)的新的白细胞介素15的融合蛋白和前药及其组合物和制备方法。

1. 一种融合蛋白或融合蛋白复合物(A), 其为同型二聚体复合物并且包括:
第一结构单元: 白细胞介素15(IL15)受体- α 的整个或亚基结构域;
第二结构单元: 活性IL15;
位于所述融合蛋白C端的第三结构单元: 抗体Fc片段;
位于所述融合蛋白N端的第四结构单元: 经由短的可切割接头(L)或长的可切割接头(L2L)与所述第一结构单元、所述第二结构单元或所述第三结构单元连接的IL15受体 β 的整个或亚基结构域; 以及
一个或多个连接段或连接片段, 其作为连接不同单元的柔性的不可切割接头(L1)。
2. 一种融合蛋白或融合蛋白复合物(B), 其是同型二聚体复合物并且包括:
第一片段(1号片段), 其包括:
第一结构单元: 白细胞介素15(IL15)受体- α 的整个或亚基结构域, 以及
第五结构单元: 轻链(CL)恒定区; 以及
第二片段(2号片段), 其包括:
第二结构单元: 活性IL15,
位于所述融合蛋白C端的第三结构单元: 抗体Fc片段,
位于所述融合蛋白N端的且与短的可切割接头(L2)或长的可切割接头(L2L)连接的第四结构单元: IL15受体 β 的整个或亚基结构域;
第六结构单元: 重链(CH)恒定区; 以及
一个或多个连接段或连接片段, 其作为连接不同单元的柔性的不可切割接头(L1),
其中两个1号片段和两个2号片段通过CH和CL以及两个Fc之间的二硫键连接在一起形成复合物。
3. 根据权利要求1所述的融合蛋白或融合蛋白复合物A和/或根据权利要求2所述的融合蛋白或融合蛋白复合物B, 其中所述活性IL15为人类IL15, 所述抗体Fc片段为人Fc。
4. 根据权利要求1或2所述的融合蛋白或融合蛋白复合物, 其中所述第一结构单元是整个白细胞介素15(IL15)受体- α 。
5. 根据权利要求1或2所述的融合蛋白或融合蛋白复合物, 其中所述第一结构单元是白细胞介素15(IL15)受体- α 的亚基结构域。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的融合蛋白或融合蛋白复合物, 其中所述第四结构单元是IL15受体 β 的亚基结构域, 其小于IL15受体 β 的27aa至240aa全长。
7. 根据权利要求5所述的融合蛋白或融合蛋白复合物, 其中IL15受体 β 的亚基结构域选自27aa-125aa、27aa-128aa、27aa~137aa、32aa-234aa、32aa-137aa、32aa-240aa和83aa-214aa表示的截短的IL15受体 β 。
8. 根据权利要求6所述的融合蛋白或融合蛋白复合物, 其中IL15受体 β 的亚基结构域为27-125aa表示的截短的IL15受体 β 。
9. 根据权利要求1至8中任一项所述的融合蛋白或融合蛋白复合物, 其具有如图14A所示的构建体。
10. 根据权利要求1至8中任一项所述的融合蛋白或融合蛋白复合物, 其具有如图14B所示的构建体。
11. 根据权利要求1至10中任一项所述的融合蛋白或融合蛋白复合物, 其中一个连接段

或连接片段包括氨基酸序列,所述氨基酸序列为具有或没有蛋白酶敏感序列的单个或多个GGGS或 $(G)_nS$, $n=2\sim 4$ 。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的融合蛋白或融合蛋白复合物,其包括短的可切割柔性接头(L2)。

13. 根据权利要求1至11中任一项所述的融合蛋白或融合蛋白复合物,其包括长的可切割柔性接头(L2L)。

14. 根据权利要求1至12中任一项所述的融合蛋白或融合蛋白复合物,其中所述短的可切割柔性接头(L2)和所述长的可切割柔性接头(L2L)能够被在肿瘤微环境中特异性表达的蛋白水解酶识别并水解。

15. 根据权利要求14所述的融合蛋白或融合蛋白复合物,其中可切割柔性接头的水解将IL15受体 β 的亚基结构域与所述融合蛋白的其余部分分开。

16. 根据权利要求14或15所述的融合蛋白或融合蛋白复合物,其中在所述肿瘤微环境中特异性表达的蛋白水解酶为基质金属蛋白酶。

17. 一种融合蛋白复合物的同型二聚体结构,其包括根据权利要求1至18中任一项所述的融合蛋白或融合蛋白复合物。

18. 一种前药,其包括根据权利要求1至17中任一项所述的融合蛋白或融合蛋白复合物。

19. 一种根据权利要求1至28中任一项所述的基本上纯化的融合蛋白或融合蛋白复合物,或其前药。

20. 一种编码根据权利要求1至19中任一项所述的融合蛋白或融合蛋白复合物或其前药的多核苷酸。

21. 一种包括根据权利要求20所述的多核苷酸的表达载体。

22. 一种药物组合物,其包括根据权利要求1至219中任一项所述的融合蛋白或融合蛋白复合物或其前药。

23. 一种治疗疾病或病症的方法,包括:

向有需要的患者施用治疗有效量的根据权利要求1至21中任一项所述的融合蛋白或融合蛋白复合物或其前药或根据权利要求24所述的药物组合物,

其中所述疾病或病症选自增生、实体瘤或造血系统恶性肿瘤。

24. 根据权利要求23所述的方法,还包括对受试者施用化学疗法和放射疗法中的一种或多种。

25. 根据权利要求1至19中任一项所述的融合蛋白或融合蛋白复合物或其前药在治疗或减轻疾病或病症中的用途。

26. 根据权利要求1至19中任一项所述的融合蛋白或融合蛋白复合物或其前药和药理学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂在制备用于治疗或减轻疾病或病症的药物中的用途。

27. 根据权利要求23至26中任一项所述的方法或用途,其中所述疾病或病症选自急性髓性白血病、肾上腺皮质癌、B细胞淋巴瘤、膀胱尿路上皮癌、乳腺导管癌、乳腺小叶癌、食道癌、去势抵抗性前列腺癌(CRPC)、宫颈癌、胆管癌、慢性粒细胞性白血病、结直肠腺癌、结直肠癌(CRC)、食道癌、胃腺癌、多形性胶质母细胞瘤、头颈部鳞状细胞癌、霍奇金淋巴瘤/原发性纵隔B细胞淋巴瘤、肝细胞癌(HCC)、肾嫌色细胞癌、肾透明细胞癌、肾乳头状细胞癌、低级

别胶质瘤、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、黑色素瘤 (MEL)、间皮瘤、非鳞状NSCLC、卵巢浆液性腺癌、胰腺导管腺癌、副神经节瘤和嗜铬细胞瘤、前列腺癌、肾细胞癌 (RCC)、肉瘤、皮肤黑色素瘤、头颈部鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、胸腺瘤、甲状腺乳头状癌、子宫癌肉瘤、子宫体子宫内膜样癌和葡萄膜黑色素瘤。

28. 根据权利要求23至26中任一项所述的方法或用途,其中所述疾病或病症是B细胞淋巴瘤或结肠直肠癌。

29. 根据权利要求23至26中任一项所述的方法或用途,其与免疫检查点阻断、T细胞共信号和肿瘤靶向抗体疗法中的一种或多种组合。

30. 一种细胞系,包括编码根据权利要求1至19中任一项的融合蛋白或融合蛋白复合物或其前药的多核苷酸。

31. 一种制备融合蛋白或融合蛋白复合物或其前药的方法,其包括培养根据权利要求30所述的细胞系。

32. 根据权利要求31所述的方法,还包括纯化或分离生产的融合蛋白或融合蛋白复合物,或其前药。

33. 一种制备蛋白质的方法,包括:

提供编码根据权利要求1至19中任一项所述的融合蛋白或融合蛋白复合物或其前药的表达载体;

将所述表达载体引入宿主细胞;

在足以表达所述蛋白质的条件下在培养基中培养所述宿主细胞;以及

从所述宿主细胞或培养基中纯化所述蛋白质。

34. 根据权利要求33所述的方法,其包括:

构建包括编码所述融合蛋白或前药的编码基因的表达载体;

通过瞬时转染构建包括所述表达载体的宿主细胞;

培养所述宿主细胞;

收集细胞上清液;以及

通过蛋白A/G的亲合层析纯化所述融合蛋白或前药。

白细胞介素15融合蛋白和前药及其组合物和方法

[0001] 优先权要求和相关申请

[0002] 本申请要求于2020年12月5日提交的美国临时申请序列号为62/944,203的权益，用于所有目的，其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明总体上涉及新的融合蛋白及其治疗用途。更具体地，本发明提供了用于治疗各种疾病和病症(例如增生、实体瘤或造血系统恶性肿瘤)的白细胞介素15(IL15或IL-15)的新型融合蛋白和前药，及其组合物和制备方法。

背景技术

[0004] 大多数肿瘤免疫疗法集中于阻断免疫抑制信号或活化免疫刺激途径。然而，一些问题仍然存在并阻碍了临床益处，这包括诱导严重的治疗相关器官毒性和由于脱肿瘤靶向递送导致的肿瘤控制不佳。白细胞介素2(IL2)是一种可以扩增T细胞和NK细胞的多效性细胞因子，是最早获批的用于转移性黑色素瘤和肾细胞癌的免疫治疗药物之一(Rosenberg等,2014J Immunol 192(12):5451-5458)。然而，由于免疫抑制性调节性T细胞(Tregs)的活化和血管内皮的活化偶尔会导致严重的毒性，IL2尚未广泛用于临床(Kolitz等,2014Cancer 120(7):1010-1017;Sim等,2014J Clin Invest 124(1):99-110)。

[0005] IL15受体(IL15R)属于造血系统超家族。异源三聚体IL15R包括 α 、 β (CD122)和 γ (CD132,共同 γ 链, γ_c)亚基。 β 亚基(IL15RB)与IL2受体共享。人类IL15R α 属于I型跨膜蛋白。IL2R α 和IL15R α 都包括保守的sushi结构域。IL15将具有一些与IL2相似的功能，例如促进T细胞和NK细胞的增殖(Thomas等,2006J of Immunology 177:6072-6080)。

[0006] 白细胞介素15(IL15)是一种14-15kDa糖蛋白，是一种于1994年首次发现的可溶性细胞因子(Grabstein等,1994Science 264:965-8)。与IL2相似，IL15属于四螺旋束细胞因子家族。人类IL15基因定位于4号染色体区域q25-35。成熟的IL15由112个氨基酸组成并含有3个N-糖基化位点。IL15的表达受到例如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、干扰素和Toll样受体(TLR)激动剂的细胞因子的刺激。(Marek等,2011Cytokine&Growth Factor Reviews 22:99-108。)各种副作用与IL15治疗有关，例如：诱导细胞因子级联反应，包括TNF α 、IL1、IL6、GM-CSF和促炎性细胞因子；促进某些肿瘤细胞的增殖、存活和转移；活化自身免疫T细胞并参与自身免疫疾病；诱导冠心病；以及诱导抑制分子PD1/PDL1的表达。

[0007] 有几种形式的IL15正在研究或开发中，包括IL-15:IL15R α Su/Fc可溶性复合物和IL-15-IL15R α -Fc融合蛋白。对这些蛋白质的大多数研究将外周血NK和CD8⁺T细胞的扩增确定为活性指标，并优先在转移性肿瘤或血液学癌症中进行测试(Jakobisiak等,2011Cytokine Growth Factor Rev 22(2):99-108)。

[0008] 然而，外周血NK细胞和IFN- γ 的扩增导致全身性毒性，这引起了人们对肿瘤治疗期间应谨慎限制IL-15给药剂量的担忧(Guo等,2015J Immunol 195(5):2353-2364)。这些担忧突出了开发新的IL15方法以特异性活化肿瘤内局部NK或T细胞同时避免外周血NK细胞扩

增的需要。

[0009] 最近的研究表明,肿瘤微环境中的IL-15对于最佳抗肿瘤反应至关重要。IL-15是肿瘤组织内炎性环境的组成部分,它是建立正常数量的CD8⁺T细胞和NK细胞所必需的。结直肠癌肿瘤内IL15的缺失与T细胞增殖减少、肿瘤复发率升高和患者存活率降低相关(Curran等,2013J Exp Med 210(4):743-755;Mlecnik,等,2014Sci Transl Med 6(228):228ra237;Santana Carrero等,2019Proc Natl Acad Sci U S A 116(2):599-608)。然而,外源性IL-15的给药在实体瘤治疗中无效,这可能是由于缺乏有效的IL-15靶向肿瘤递送方法。到目前为止,大多数研究都集中于延长IL-15的半衰期,或增加其与受体的亲和力。

[0010] 目前可用于例如增生、实体瘤或造血系统恶性肿瘤的治疗和方法是不充分的。

[0011] 仍然迫切且持续地需要针对此类疾病和病症的新的和改进的疗效以及减少的副作用。

发明内容

[0012] 本发明部分地基于新的融合蛋白及其治疗用途的惊人发现。本文公开了新的IL15融合蛋白及其前药、组合物和制备方法,其可用于治疗各种疾病和病症,例如增生、实体瘤或造血系统恶性肿瘤。

[0013] 本发明的一方面的显著特征是利用IL15受体β的较短结构域,其与IL15受体β的整个胞外结构域(27aa-240aa)相反,其通过MMP可裂解接头与超级IL15连接(IL15-Rα)阻断其在循环中的活性。Rb在肿瘤组织内被切割,并且升高的MMP酶导致肿瘤微环境内的阻塞物清除以及sIL15的重新活化。这种方法在不增加其毒性反应的情况下提高了抗肿瘤活性。如本文所公开的,研究了各种短形式的IL15受体β,例如,研究了对应于27aa-125aa(或27aa-128aa)的结构域1(D1)以及通过可切割的柔性接头的各种释放和活化机制。

[0014] 一方面,本发明总体上涉及一种融合蛋白或融合蛋白复合物(A),它是一种同型二聚体复合物并且包括:第一结构单元:白细胞介素15(IL15)受体-α的整个或亚基结构域;第二结构单元:活性IL15;位于融合蛋白C端的第三结构单元:抗体Fc片段;位于融合蛋白N端的第四结构单元:经由短的可切割接头(L2)或长的可切割接头(L2L)与第一结构单元、第二结构单元或第三结构单元连接的IL15受体β的整个或亚基结构域;以及一个或多个连接段或连接片段,其作为连接不同单元的柔性的不可切割接头(L1)。

[0015] 另一方面,本发明总体上涉及融合蛋白或融合蛋白复合物(B),其为同型二聚体复合物并且包括:通过二硫键结合的第一片段(1号片段)和第二片段(2号片段)。1号片段包括:第一结构单元:白细胞介素15(IL15)受体-α的整个或亚基结构域,以及第五结构单元:轻链(CL)恒定区。2号片段包括:第二结构单元:活性IL15;位于融合蛋白C端的第三结构单元:抗体Fc片段;位于融合蛋白N端的且与短的可切割接头(L2)或长的可切割接头(L2L)连接的第四结构单元:IL15受体β的整个或亚基结构域;第六结构单元:重链(CH)恒定区;以及一个或多个连接段或连接片段,其作为连接不同单元的柔性的不可切割接头(L1)。两个1号片段和两个2号片段通过CH和CL以及两个Fc之间的二硫键连接在一起形成复合物。

[0016] 又一方面,本发明总体上涉及同型二聚体前蛋白或融合蛋白复合物,其包括本文公开的融合蛋白。

[0017] 又一方面,本发明总体上涉及包括本文公开的融合蛋白或融合蛋白复合物的前

药。

[0018] 又一方面,本发明总体上涉及本文公开的基本上纯化的融合蛋白或融合蛋白复合物、或其前药。

[0019] 又一方面,本发明总体上涉及编码本文公开的融合蛋白或融合蛋白复合物或其前药的多核苷酸。

[0020] 又一方面,本发明总体上涉及包括本文公开的多核苷酸的表达载体。

[0021] 又一方面,本发明总体上涉及包括本文公开的融合蛋白或融合蛋白复合物或其前药的药物组合物。

[0022] 又一方面,本发明总体上涉及一种用于治疗疾病或病症的方法。所述方法包括向有需要的患者给药治疗有效量的本文公开的融合蛋白或融合蛋白复合物或其前药或药物组合物,其中所述疾病或病症选自增生、实体瘤或造血系统恶性肿瘤。

[0023] 又一方面,本发明总体上涉及本文公开的融合蛋白或融合蛋白复合物或其前药在治疗或减轻疾病或病症(例如,增生、实体瘤或造血系统恶性肿瘤)中的用途。

[0024] 又一方面,本发明总体上涉及编码本文公开的蛋白质(例如融合蛋白或其片段)的多核苷酸在治疗或减轻疾病或病症(例如,增生、实体瘤或造血系统恶性肿瘤)中的用途。

[0025] 又一方面,本发明总体上涉及本文公开的融合蛋白或融合蛋白复合物或其前药以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂在制备用于治疗或减轻疾病或病症(例如,增生、实体瘤或造血系统恶性肿瘤)的药物中的用途。

[0026] 又一方面,本发明总体上涉及包括编码本文公开的融合蛋白或融合蛋白复合物或其前药的多核苷酸的细胞系。

[0027] 又一方面,本发明总体上涉及制备蛋白质的方法,其包括培养所述细胞系。在某些实施方式中,所述方法进一步包括纯化或分离产生的蛋白质,例如本文公开的融合蛋白或融合蛋白复合物或其前药。

[0028] 又一方面,本发明总体上涉及一种制备蛋白质的方法。所述方法包括:提供编码本文公开的融合蛋白或融合蛋白复合物或其前药的表达载体;将所述表达载体引入宿主细胞;在足以表达所述蛋白质的条件下在培养基中培养所述宿主细胞;以及从所述宿主细胞或培养基中纯化蛋白质。

附图说明

[0029] 图1:IL15-RA-Fc全身给药后肿瘤控制不佳且毒性严重。(a)通过CTLL2增殖试验检测指定蛋白质的活性。(b)Balb/c小鼠($n=5$)接种 3×10^6 个A20细胞。肿瘤形成后(约 40mm^3),在第8天和第11天通过静脉注射 $0.2\mu\text{mol}$ sIL15-Fc或sIL15-his来治疗小鼠。(c)、(d)C57BL/6小鼠接种 5×10^5 个MC38细胞。肿瘤形成后(约 40mm^3),在第8天和第11天通过静脉注射 $0.8\mu\text{mol}$ sIL-15-Fc($n=16$)来治疗小鼠。监测体重(c)和小鼠存活情况(d)。(e)-(g)在第8天和第11天通过腹腔注射 $0.8\mu\text{mol}$ sIL-15-Fc来治疗MC38荷瘤小鼠($n=5$)。为了耗竭NK细胞,在第8天和第11天给小鼠腹腔注射 $20\mu\text{L}$ 抗抗去唾液酸GM1抗体。在第一次抗Asialo GM1治疗后的第5天,通过FACS(e)计数外周血中指定细胞亚群的数量。监测小鼠的体重变化(f)和存活情况(g)。

[0030] 图2:工程化肿瘤条件性pro-IL-15。(a)在第11天和第14天通过鞘内注射或静脉注

射 $0.2\mu\text{mol}$ sIL-15-Fc来治疗MC38荷瘤小鼠 ($n=4$ 至 5)。(b) pro-IL-15蛋白的示意图。(c)、(d)用预活化的MMP14在体外 37°C 下孵育pro-IL-15持续12小时。通过还原的SDS-PAGE来鉴定蛋白质切割(c),并通过CTLL2增殖试验来检测pro-IL-15的释放活性(d)。e分别在第11、14和18天通过腹腔注射 $0.25\mu\text{mol}$ pro-IL-15 (R β)或pro-IL-15 (R β D1)来治疗MC38荷瘤小鼠。

[0031] 图3:pro-IL-15避免外周血NK扩增介导的毒性。(a)、(b)在第8天和第11天通过静脉注射PBS ($n=6$)、 $0.8\mu\text{mol}$ sIL-15 ($n=12$)或pro-IL-15 ($n=6$)来治疗MC38荷瘤小鼠。监测小鼠的体重变化(a)和存活情况(b)。(c)、(d)采用与a和b相同的方式来治疗MC38荷瘤小鼠。在第一次IL-15治疗后的第1天和第4天定量外周血清中的ALT水平(c)和AST水平(d)。(e)、(f)在肿瘤接种后第8天和第11天,用 $0.5\mu\text{mol}$ sIL-15-Fc或pro-IL-15来治疗MC38荷瘤小鼠。在第一次治疗后24小时收集血液。通过流式细胞术微球阵列法测量血清中的细胞因子水平(e)。在第一次治疗后第5天通过FACS测试外周血中的淋巴细胞扩增(f)。

[0032] 图4:pro-IL-15D1保留了抗肿瘤活性。(a) pro-IL-15 (D1)蛋白与Cy5.5-马来酰亚胺结合。将 $25\mu\text{g}$ Cy5.5标记的pro-IL-15蛋白注射到MC38荷瘤小鼠中。通过IVIS光谱体内成像系统追踪肿瘤内积累的蛋白质。(b)给MC38荷瘤小鼠静脉注射 $0.2\mu\text{mol}$ pro-IL-15。4天后处死小鼠,收集肿瘤、肺、脾和肝组织并匀浆。离心后,将组织匀浆上清液和血液用于进行免疫沉淀加免疫印迹以检测sIL-15和pro-IL-15。(c)在第8天和第11天通过静脉注射 $0.2\mu\text{mol}$ sIL-15-Fc或pro-IL-15来治疗MC38荷瘤小鼠 ($n=5$)。(d)在第8天和第11天通过腹腔注射 $0.2\mu\text{mol}$ sIL-15-Fc或pro-IL-15来治疗A20荷瘤小鼠 ($n=6$)。

[0033] 图5:pro-IL-15D1活化和扩增预先存在的CD8⁺T细胞以控制肿瘤。(a)、(b)在第8、11和14天通过腹腔注射 $0.2\mu\text{mol}$ pro-IL-15来治疗MC38荷瘤小鼠。为了耗竭细胞,在第8、12和16天给小鼠腹腔注射 $400\mu\text{g}$ 抗NK1.1Ab ($n=6$) (a)或 $200\mu\text{g}$ 抗CD8 Ab ($n=5$)。每周两次监测肿瘤生长曲线。(c)在第8、11和14天通过腹腔注射 $0.2\mu\text{mol}$ pro-IL-15来治疗MC38荷瘤小鼠 ($n=5$)。两天后,收集肿瘤组织。通过流式细胞术来评估肿瘤中T细胞的数量。(d)在第13、16和19天通过腹腔注射 $0.2\mu\text{mol}$ pro-IL-15来治疗MC38荷瘤小鼠 ($n=5$)。为了阻止T细胞从LN迁移到肿瘤中,在第13天给小鼠注射 $25\mu\text{g}$ FTY720,然后在实验期间每隔一天给小鼠注射 $20\mu\text{g}$ FTY720。每周两次测量肿瘤体积。(e)在第10、14和18天通过腹腔注射 $0.2\mu\text{mol}$ pro-IL-15来治疗MC38荷瘤小鼠 ($n=6$)。为了阻断IFN- γ ,在第10、14、18和22天给小鼠腹腔注射 $500\mu\text{g}$ 抗IFN- γ Ab (克隆R4-6A2)。(f)、(g)分别在第12天和第15天注射 $0.1\mu\text{mol}$ sIL-15-Fc或pro-IL-15来治疗MC38-OVA荷瘤小鼠。两天后,收获肿瘤组织,并通过流式细胞术进行测定CD8⁺T细胞中的TCF-1⁺Tim⁻ (e)和PD-1⁺Tim3⁺ (f)细胞。

[0034] 图6:pro-IL-15D1与检查点阻断协同以控制晚期肿瘤。(a)、(b) sIL-15治疗增加了肿瘤内的MDSC浸润和PDL1表达。在第8天和第11天,用 $0.2\mu\text{mol}$ sIL-15-Fc来治疗MC38荷瘤小鼠。第一次治疗后三天,收集肿瘤组织并制备单细胞悬液。通过流式细胞术来分析MDSC浸润和PD-L1表达。(c)、(d)在第12天和第16天用 $0.3\mu\text{mol}$ pro-IL-15和/或 $150\mu\text{g}$ 抗PD-L1 Ab对MC38荷瘤小鼠 ($n=5-6$)进行腹腔内治疗。每周两次测量肿瘤体积并记录在s(c)中。如(d)中记录小鼠存活情况。(e)在(c)中的联合治疗后,用 1.5×10^6 个MC38细胞重新攻击初始小鼠或肿瘤完全消退的小鼠 ($n=7$)。每周两次监测肿瘤生长。

[0035] 图7:IL-15和CD8⁺T细胞水平与人类癌症患者更好的生存率呈正相关。(a) TCGA数据分析原发性或转移性皮肤黑色素瘤内IL-15和CD8⁺T细胞水平的相关性。(b)、(c)通过

TIMER分析肿瘤内CD8⁺T细胞 (b) 或IL-15 (c) 水平与原发性或转移性皮肤黑色素瘤患者的存活率的相关性。

[0036] 图8:sIL-15-Fc比IL-15-Fc有更好的抗肿瘤效果。(a) 通过CTLL-2增殖试验检测指定蛋白质的活性。(b) 在第8天和第11天通过静脉注射0.2 μ mol sIL-15-Fc或IL-15-Fc来治疗A20荷瘤小鼠 (n=6)。

[0037] 图9:增加的NK而不是CD8⁺或CD4⁺T细胞有助sIL-15-Fc治疗诱导的体内毒性。(a) 在第8天和第11天通过静脉注射0.2 μ mol sIL-15-Fc来治疗MC38荷瘤C57BL/6小鼠。通过FACS测定第一次治疗后第5天外周血中淋巴细胞的扩增。(b) 至 (d) 在第8天和第11天通过腹腔注射0.8 μ mol sIL-15-Fc来治疗MC38荷瘤C57BL/6小鼠。为了耗竭细胞,在第8天和第11天给小鼠腹腔注射200 μ g抗CD8 Ab (b)、抗CD4 Ab (c) 或400 μ g抗NK1.1Ab (d)。监测小鼠的存活情况。

[0038] 图10:工程化肿瘤条件性pro-IL-15。(a)、(b) 在第10天和第13天通过鞘内注射和静脉注射0.2 μ mol sIL-15-Fc来治疗A20荷瘤小鼠。(b)、(c) 将3 μ g pro-IL15与200ng预活化的MMP-14在37度下共培养,3小时后,通过还原的SDS-PAGE来鉴定蛋白质切割 (b) 并通过CTLL2增殖试验来检测pro-IL-15的释放活性 (c)。

[0039] 图11:pro-IL-15诱导有限的体内毒性。(a)、(b) 在第8天和第11天通过静脉注射0.8 μ mol或1.5 μ mol sIL-15或pro-IL-15来治疗MC38荷瘤小鼠。监测小鼠体重 (a) 和存活情况 (b)。(c) 按照图3a治疗MC38荷瘤小鼠。第一次治疗后4天,处死小鼠并收集肝组织进行HE染色。(d) 给C57BL/6小鼠静脉注射30 μ g sIL-15-Fc (0.3 μ mol) 和30 μ gpro-IL-15 (0.2 μ mol)。通过ELISA测量不同时间点血清中的蛋白质浓度。

[0040] 图12:pro-IL-15-FcD1与较少的外周血脾细胞结合。将脾细胞与指定的蛋白质 (hIgG、sIL-15-Fc、pro-IL-15-Fc) 在4 $^{\circ}$ C下孵育20分钟,两次洗涤后,添加染色B细胞、T细胞、NK细胞、NKT细胞的抗体。通过二抗山羊抗hIgG-PE检测蛋白质与不同细胞亚群的结合。

[0041] 图13:CD4⁺T细胞对于pro-IL-15介导的抗肿瘤活性不是必需的。(a) 在第8、12和16天通过腹腔注射0.2 μ mol pro-IL-15来治疗MC38荷瘤小鼠。为了耗竭T细胞,在同一天腹腔注射200 μ g抗CD8 Ab和200 μ g抗CD4Ab。(b) 在第8、12和16天通过腹腔注射0.2 μ mol pro-IL-15和/或同一天腹腔注射200 μ g抗CD4 Ab来治疗MC38荷瘤小鼠。

[0042] 图14:两个类pro-sIL15 A&B的同型二聚体(模型)结构的示意图。

[0043] 图15:用于构建pro-sIL15融合蛋白的mRbD (1+2) 和mRbD1及hRbD1氨基酸序列。

[0044] 图16:RbD1-sIL15-Fc显示出比Rb-sIL15-Fc更好的抗肿瘤作用:受体 β 有两个结构域。D1减少了阻塞但增加了效力。C57BL/6J小鼠接种 2×10^5 个MC38细胞。肿瘤形成后(10天),分别在第11、14和18天通过腹腔注射0.25 μ mol Rb-sIL15-mFc (MMP4M) 或RbD1-sIL15-mFc (MMP4M) 来治疗小鼠。RbD1表示IL15受体B的D1。

[0045] 图17:pro-IL15 (RbD1) 表现出比IL-15-Fc更少的外周血淋巴细胞扩增。C57BL/6小鼠接种 5×10^5 个MC38细胞。肿瘤形成后(约40mm³),分别在第8天和第11天通过静脉注射0.2 μ mol sIL15和WT或RBD1-IL15-Fc来治疗小鼠。通过FACS测试第13天(治疗后5天)血液中的淋巴细胞扩增。

[0046] 图18:用于构建pro-sIL15-Fc融合蛋白的不同长度的hRb对sIL15活性的阻断作用不同。在非还原条件或还原条件下,在SurePage SDS凝胶 (Genescript) 上分析纯化的蛋白质,将样品在95 $^{\circ}$ C加热5~10分钟,然后上样到凝胶孔中。HEKblue-IL15试验:将60 μ L 1×10^6

个HEKblue-IL2细胞接种于试验培养基中:[DMEM-10%FBS(加热)-P/S+HEPES]放入96孔板中,在5%CO₂、37℃培养箱中培养0/N。次日,在测定培养基中对pro-sIL15-Fc(1102、1172、1188、1103)和对照1100进行严格的1:4稀释。将60μL稀释的样品和对照溶液加入HEKblue-IL2细胞接种板中,在5%CO₂、37℃培养箱中培养0/N。次日,从每孔中收集25μL培养上清液,加入80μL Quantibblue底物(Invivogen),在37℃孵育20分钟~1小时。通过ELISA读板仪在650nm处读取板。

[0047] 图19:分析同型二聚体pro-sIL15前药B和对照融合蛋白。(A),同型二聚体pro-sIL15B(1118/19)和对照(1085/89&1199)的示意图。(B),纯化对照和pro-sIL15前药(5.1)+/-mmp14消化的SDS-PAGE分析,显示部分Rb被切除。C,在HEKblue-IL2细胞上评估纯化对照和pro-sIL15+/-mmp14消化的IL15活性。Rb=(27aa-240aa)。

[0048] 图20:(表1)使用不同长度的Rb生产和表征hPro-sIL15融合蛋白。通过PCR和Gibson组装方法将插入DNA克隆到表达载体中,并通过测序分析进行验证。通过PEI将重组质粒转染到在无血清培养基中培养3-5天的293F细胞中。收获培养上清液中的重组蛋白并通过蛋白A亲和柱纯化。在HEKblue-IL2细胞(Invivogen)上测试融合蛋白中不同长度hRb对sIL15活性的阻断作用,计算阻断因子=pro-sIL15-Fc的EC₅₀/1100对照的EC50(15Ra-Fc-或+/-表示没有或很少表达)。

[0049] 图21:(表2)在体外显示了更好的切割的具有两个MMP14可切割位点的长的可切割接头(L2L)的实施例列表。它不会排除其他组合和排序。R是还原凝胶条件,而N是非还原凝胶条件。

具体实施方式

[0050] 定义

[0051] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。除非根据术语所在的上下文另有说明,否则以下术语旨在具有以下含义。

[0052] 除非上下文另有说明,当本文使用商品名称时,商品名称包括产品配方、仿制药和商品名称产品的活性药物成分。

[0053] 本文提供的范围应理解为该范围内所有值的简写。例如,1到50的范围理解为包括任何数字、数字组合或来自由下列各项组成的组的子范围:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50。

[0054] 如本文所用的,“至少”特定值理解为该值以及大于该值的所有值。

[0055] 如本文所用的,“多于一个”理解为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、100等,或它们之间的任何值。

[0056] 在本说明书和所附权利要求中,单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指代,除非上下文另有明确规定。

[0057] 除非特别说明或从上下文显而易见,如本文所用的,术语“约”理解为在本领域的正常公差范围内,例如在平均值的2个标准偏差内。约可以理解为在10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%以内规定的数值。除非上下文中

另有明确说明,本文提供的所有数值都可以用术语“约”来修饰。

[0058] 除非特别说明或从上下文中显而易见,如本文所用的,术语“或”理解为包含。

[0059] 当用于定义组合物和方法时,术语“包括”旨在表示组合物和方法包括所记载的要素,但不排除其他要素。术语“基本上由……组成”在用于定义组合物和方法时,应表示所述组合物和方法包括所记载的要素并且排除对所述组合物和方法具有任何基本意义的其他要素。例如,“基本上由……组成”是指给予明确记载的药理学地活性剂并且排除未明确记载的药理学地活性剂。基本上由……组成的术语不排除药理学地非活性剂或惰性试剂,例如药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。术语“由……组成”在用于定义组合物和方法时,应表示不包括其他成分的微量元素和实质性方法步骤。由这些过渡术语中的每一个定义的实施方式都在本发明的范围内。

[0060] 如本文所用的,术语“激动剂”是指与受体组合可产生细胞反应的化合物。激动剂可以是直接结合受体的配体。可选地,激动剂可以与受体间接结合,例如,(a)通过与直接结合受体的另一分子形成复合物,或(b)以其他方式导致另一化合物的改性以使另一化合物直接结合到受体。

[0061] 如本文所用的,术语“拮抗剂”是指与激动剂或反向激动剂竞争结合至受体,从而阻断激动剂或反向激动剂对受体的作用的化合物。然而,拮抗剂对组成型受体活性没有影响。

[0062] 如本文所用的,术语“抗体”是指能够结合表位或抗原决定簇的分子。所述术语表示包括完整抗体及其抗原结合片段。所述术语包括多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、Fab抗体、Fv抗体、单链抗体和单个或多个免疫球蛋白可变链或CDR结构域设计以及双特异性和多特异性抗体。抗体可以来自任何动物来源。优选地,抗体是哺乳类动物的,例如人、鼠、兔、山羊、豚鼠、骆驼、马等,或其他合适的动物的。抗体可以识别多肽或多核苷酸抗原。所述术语包括活性片段,包括例如免疫球蛋白的抗原结合片段、重链的可变区和/或恒定区、轻链的可变区和/或恒定区、互补决定区(CDR)、和框架区。这些术语包括多克隆和单克隆抗体试剂,以及包括杂合抗体、改造抗体、嵌合抗体、杂合抗体分子、F(ab)₂和F(ab)片段的试剂;Fv分子(例如,非共价异二聚体)、二聚体和三聚体抗体片段构建体;微抗体、人源化抗体分子和从此类分子获得的任何功能片段,其中此类片段保留特异性结合。

[0063] 如本文所用的,如本文所用的术语“抗原”是指导致免疫系统产生抗体或针对它的特异性细胞介导的免疫反应的任何物质。疾病相关抗原是与导致免疫系统产生抗体或导致特定细胞介导的针对它的反应的任何疾病相关的任何物质。抗原能够被免疫系统识别和/或能够诱导使得B-淋巴细胞和/或T-淋巴细胞活化的体液免疫反应和/或细胞免疫反应。抗原可以具有一个或多个表位(B-细胞表位和/或T-细胞表位)。抗原将优选地典型地以高度选择性的方式与其相应的抗体或TCR反应,而不是与可能由其他抗原诱发的大量其他抗体或TCR反应。如本文所用的抗原也可以是几种单独抗原的混合物。

[0064] 如本文所用的,术语“生物活性”实体或具有“生物活性”的实体是具有天然存在分子的结构、调节或生化功能或与代谢或生理过程有关或相关的任何功能的实体。生物活性多肽或其片段包括可参与生物过程或反应和/或可产生期望效果的多肽或其片段。生物活性可以包括提高的期望活性或降低的不期望活性。例如,当实体参与与另一个分子的分子间相互作用时,当它在缓解疾病病症方面具有治疗价值时,当它在诱导免疫反应方面具有

预防价值时,或当它在确定分子存在方面具有诊断和/或预后时,它就表现出生物活性。生物活性蛋白质或多肽可以是天然存在的,或者它可以由已知成分合成,例如通过重组或化学合成,并且可以包括异源成分。

[0065] 如本文所用的,术语“癌症”和“癌的”是指或描述哺乳类动物中典型地以不受调节的细胞生长为特征的生理状况。癌症的例子包括但不限于癌、淋巴瘤、肉瘤、母细胞瘤和白血病。此类癌症的更具体实施例包括鳞状细胞癌、肺癌、胰腺癌、宫颈癌、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌和头颈癌。

[0066] 如本文所用的,术语“细胞”是指任何原核细胞、真核细胞、原代细胞或永生化细胞系、例如组织或器官中的任何此类细胞组。优选地,细胞是哺乳类动物(例如人)来源的并且可以被一种或多种病原体感染。

[0067] 如本文所用的,术语“共同给药”是指血液中同时存在两种药剂。这两种药剂可以同时给药或依次给药。

[0068] 如本文所用的,术语“共表达”旨在表示两种不同的多肽在宿主细胞中同时表达,使得两种多肽可以在宿主细胞中或在宿主细胞培养基中相互作用或结合并形成复合物。

[0069] 如本文所用的,术语“疾病”或“病症”是指病理状况,例如,是可以通过症状或其他识别因素识别为与健康或正常状态不同的病理状况。术语“疾病”包括病症、综合症、病症和损伤。疾病包括但不限于增殖性疾病、炎性疾病、免疫性疾病、代谢性疾病、感染性疾病和缺血性疾病。

[0070] 如本文所用的,术语活性剂的“有效量”是指足以引发期望的生物反应的量。如本领域普通技术人员将理解的,本发明化合物的有效量可以根据例如如下因素变化:期望的生物学终点、化合物的药代动力学、所治疗的疾病、给药方式、和患者。

[0071] 如本文所用的,术语“核酸分子的表达”是指将包括在核酸分子中的信息转化为基因产物。基因产物可以是基因(例如,mRNA、tRNA、rRNA、反义RNA、核酶、结构RNA或任何其他类型的RNA)或通过mRNA翻译产生的肽或多肽的直接转录产物。基因产物还包括通过例如加帽、多聚腺苷酸化、甲基化和编辑过程修饰的RNA;以及通过例如甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化、ADP-核糖基化、肉豆蔻化(myristilation)和糖基化修饰的蛋白质。

[0072] 如本文所用的,术语“宿主细胞”是指可以是或已经是任何重组载体或分离的多核苷酸的接受者的单个细胞或细胞培养物。宿主细胞可以是任何来源的转染、转化、转导或感染的细胞,包括原核细胞、真核细胞、哺乳类动物细胞、鸟类细胞、昆虫细胞、植物细胞或细菌细胞,或者它可以是任何来源的可用于繁殖本文所述的核酸的细胞。宿主细胞包括单个宿主细胞的后代,并且由于自然、偶然或故意突变和/或变化,所述后代可能不一定与原始亲本细胞完全相同(在形态或总DNA互补方面)。宿主细胞包括用本发明的重组载体或多核苷酸在体内或体外转染或感染的细胞。包括本发明的重组载体的宿主细胞可称为“重组宿主细胞”。

[0073] 宿主细胞包括但不限于哺乳类动物、植物、昆虫、真菌和细菌的细胞。细菌细胞包括但不限于革兰氏阳性菌(例如芽孢杆菌属、链霉菌属和葡萄球菌属的物种)的细胞,以及革兰氏阴性菌的细胞,例如埃希氏杆菌属和假单胞菌属的细胞。真菌细胞优选地包括酵母细胞,例如酵母菌、毕赤酵母和多形汉逊酵母。昆虫细胞包括但不限于果蝇细胞和Sf9细胞。植物细胞尤其包括来自作物(例如谷物、药用或观赏植物或鳞茎)的细胞。适用于本发明的

哺乳类动物细胞包括上皮细胞系(猪等)、骨肉瘤细胞系(人等)、神经母细胞瘤细胞系(人类等)、上皮癌(人类等)、神经胶质细胞(鼠等)、肝细胞系(猴等)。CHO细胞(中国仓鼠卵巢)、COS细胞、BHK细胞、HeLa细胞、911细胞、AT1080细胞、A549细胞、293细胞或PER.C6细胞、人ECC NTERA-2细胞、mESC系的D3细胞、人胚胎干细胞(例如HS293细胞和BGV01细胞、SHEF1细胞、SHEF2细胞和HS181细胞)、NIH3T3细胞、293T细胞、REH细胞和MCF-7细胞以及hMSC细胞。

[0074] 如本文所用的,术语“Fc”是指包括完整抗体的非抗原结合片段的序列的分子或序列,无论是单体形式还是多聚体形式。天然Fc的原始免疫球蛋白来源优选地是人来源的并且可以是任何免疫球蛋白(例如IgG1、IgG2)。天然Fc由可以通过共价(即二硫键)和非共价结合连接成二聚体或多聚体形式的单体多肽组成。天然Fc分子的单体亚基之间的分子间二硫键数量范围为1至4,这取决于类别(例如,IgG、IgA、IgE)或亚类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgA1、IgGA2)。

[0075] 如本文所用的,术语“Fc结构域”或“Fc区”是指免疫球蛋白重链“可结晶片段”区。通常,一个Fc结构域能够与又一Fc结构域相互作用以形成二聚体复合物。Fc结构域能够结合称为Fc受体的细胞表面受体和/或补体系统的蛋白质,或者可以被修饰以降低或增强这些结合活性。Fc结构域可以源自IgG、IgA、IgD、IgM或IgE抗体同型,并影响免疫活性(其包括调理作用,细胞裂解,肥大细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞的脱粒,以及其他Fc受体依赖性过程);补体途径的活化;以及体内蛋白质稳定性。

[0076] “Fc结构域”包括本文定义的天然Fc和Fc变体分子和序列。与Fc变体和天然Fc一样,术语“Fc结构域”包括单体或多聚体形式的分子,无论是从整个抗体消化的还是通过重组基因表达或通过其他方式产生的。

[0077] 已报道Fc融合蛋白将IgG的Fc区与另一蛋白质的结构域结合,例如各种细胞因子和可溶性受体。(例如,Capon等,1989Nature 337:525-531;Chamow等,1996Trends Biotechnol.14:52-60;美国专利号US 5,116,964和US5,541,087)。

[0078] Fc融合物的使用在本领域中是已知的(例如,美国专利号US5,100,110,US7,754,855;US5,480,981;US5,808,029;W07/23614;W098/28427和其中引用的参考文献)。Fc融合蛋白可以包括变体Fc分子(例如,如美国专利号US 7,732,570中所描述的)。Fc融合蛋白可溶于血浆或可与具有特定Fc受体的细胞的细胞表面结合。

[0079] 如本文所用的,术语“Fc变体”是指从天然Fc修饰但仍包括补救受体FcRn的结合位点的分子或序列。国际申请W0 97/34631(1997年9月25日公开)和W0 96/32478描述了示例性Fc变体,以及与补救受体的相互作用,并在此通过引用而并入。因此,术语“Fc变体”包括从非人天然Fc人源化的分子或序列。此外,天然Fc包括可以去除的位点,因为它们提供了本发明的融合分子不需要的结构特征或生物活性。因此,在某些实施方式中,术语“Fc变体”包括缺少一个或多个天然Fc位点或残基的分子或序列,这些位点或残基影响或参与(1)二硫键形成,(2)与所选宿主细胞的不相容性,(3)在选定的宿主细胞中表达后的N端异质性,(4)糖基化,(5)与补体的相互作用,(6)与除补救受体以外的Fc受体结合,或(7)抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。在下文中更详细地描述Fc变体。

[0080] 如本文所用的,术语“融合蛋白”是指包括来自不同或异源蛋白的两个或多个区的多肽,这些区通过重组、化学或其他合适的方法共价连接(即“融合”)。如果需要,融合分子可以通过肽或其他接头段或序列在一个或多个位点融合。例如,一种或多种肽接头可用于

帮助构建融合蛋白。

[0081] 如本文所用的,术语“GC含量”是指由脱氧鸟苷(G)和/或脱氧胞苷(C)脱氧核糖核苷、或鸟苷(G)和/或胞苷(C)核糖核苷残基组成的核酸序列的百分比。

[0082] 如本文所用的,术语“高剂量”是指比用于治疗任何人类疾病或病症的特定化合物的最高标准推荐剂量高至少5%(例如,至少10%、20%、50%、100%、200%或甚至300%)。

[0083] 如本文所用的,术语“免疫反应”是指通过涉及不同粘附和/或活化步骤的多因素过程,免疫细胞被刺激和/或从血液募集到淋巴以及非淋巴组织的过程。活化条件导致细胞因子、生长因子、趋化因子和其他因子的释放,上调免疫细胞上粘附和其他活化分子的表达,促进粘附、形态变化和/或与趋化性同时通过组织的外渗,增加细胞增殖和细胞毒活性,刺激抗原呈递并提供其他表型变化(包括记忆细胞类型的产生)。免疫反应也意指免疫细胞抑制或调节其他免疫细胞的炎症或细胞毒活性的活性。免疫反应是指免疫细胞在体内或体外的活性。

[0084] 在两个或多个核酸或多肽序列的上下文中,术语“相同”或百分比“同一性”是指两个或多个相同的序列或子序列或具有特定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸的序列或子序列(即,约70%同一性,优选地75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或在比较窗口或指定区域上进行比较和对齐以获得最大对应时在特定区域(例如,IL15或IL15R α 序列的特定区域)上的更高同一性),这通过使用具有下述默认参数的BLAST或BLAST 2.0序列对比算法进行测量,或通过手动对齐和目测来进行测量。此类序列然后被称为“基本相同”。这一定义还指或还可以应用于测试序列的补充。所述定义还包括具有缺失和/或添加的序列,以及具有替换的序列。如下所述,优选的算法可以考虑间隙等。优选地,同一性存在于长度为至少约25、50、75、100、150、200个氨基酸或核苷酸的区域上,并且经常存在于长度为225、250、300、350、400、450、500个氨基酸或核苷酸的区域上或存在于氨基酸或核酸序列的全长。

[0085] 对于序列对比,典型地,一个序列作为参考序列,测试序列与之进行比较。当使用序列对比算法时,将测试序列和参考序列输入计算机,如果需要,指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。优选地,可以使用默认程序参数,或者可以指定可选的参数。然后,序列对比算法根据程序参数计算测试序列相对于参考序列的百分比序列同一性。

[0086] 适用于确定百分比序列同一性和序列相似性的算法的优选的实施例是BLAST算法,其分别描述在Altschul等,1977Nuc.Acids Res.25:3389-3402和Altschul等,1990J.Mol.Biol.215:403-410中。BLAST软件通过美国国家生物技术信息中心在万维网ncbi.nlm.nih.gov/网站上公开获得。可以使用缺省参数或其他非缺省参数。作为缺省参数,BLASTN程序(用于核苷酸序列)使用11的字长(W),10的期望值(E),M=5,N=-4和两条链的比较。对于氨基酸序列来说,BLASTP程序使用3的字长(W),10的期望值(E)和50的BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff&Henikoff,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10915(1989))比对(B),10的期望值(E),M=5,N=-4和两条链的比较作为缺省参数。

[0087] 如本文所用的,术语“抑制”是指任何可测量的生物活性降低。因此,如本文所用的,“抑制”或“抑制”可称为正常活性水平的百分比。

[0088] 如本文所用的,术语“白细胞介素15”或“IL15”是指与生物活性的天然哺乳类动物IL15氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序

列同一性,这意味着突变蛋白(“突变蛋白”)在至少一种功能试验中具有与天然IL15蛋白相似(75%或更高)的功能。在功能上,IL15是调节T细胞和自然杀伤细胞活化和增殖的细胞因子。

[0089] IL15和IL2共享许多生物学活性,包括与CD122、IL2 β /IL15 β 受体亚基结合。CD8⁺记忆性的数量由IL15和IL2之间的平衡控制。IL15诱导JAK激酶的活化,以及转录活化因子STAT3、STAT5和STAT6的磷酸化和活化。IL15还可能通过STAT6的转录活化活性增加细胞凋亡抑制剂BCL2L1/BCL-x(L)的表达,从而阻止细胞凋亡。已经报道了编码相同成熟蛋白的IL15基因的两种可变剪接转录变体。

[0090] IL15多肽的示例性功能测定法包括T-细胞的增殖(例如Montes等人,2005Clin Exp Immunol 142:292)以及NK细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞的活化。用于特定免疫细胞子群体的分离和增殖的检测的方法(即3H-胸苷掺入法)在本领域中是公知的。细胞介导的细胞毒性测定法可用于测量NK细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞活化。细胞介导的细胞毒性测定法,包括同位素(51Cr)、染料(例如四唑盐、中性红)或酶的释放,在本领域中也是公知的,可以使用可商购的试剂盒(Oxford Biomedical Research,Oxford,M;Cambrex,Walkersville,Md.;Invitrogen,Carlsbad,Calif.)。也已显示IL15抑制Fas介导的细胞凋亡(例如Demirci等人,2004Cell Mol Immunol 1:123)。细胞凋亡测定法包括例如TUNEL测定法和膜联蛋白V测定法在本领域中是公知的,可以使用可商购的试剂盒(R&D Systems,Minneapolis,Minn.) (例如Coliga等人,1991-2006Current Methods in Immunology John Wiley&Sons)。

[0091] 如本文所用的,术语“白细胞介素15受体 α ”或“IL15R α ”是指来自于哺乳类动物物种的白细胞介素15受体 α 氨基酸序列。本领域技术人员将理解,白细胞介素-15受体 α 核酸和氨基酸序在基因数据库,例如在GenBank中,其通过美国国家生物技术信息中心在万维网网站ncbi.nlm.nih.gov处公开获得。示例性的天然哺乳类动物IL-15受体 α 核酸或氨基酸序列可以来自于例如人类、灵长类动物、犬科动物、猫科动物、猪科动物、马科动物、牛科动物、绵羊、啮齿动物、鼠类、大鼠、仓鼠、豚鼠等。示例性天然哺乳类动物IL-15核酸序列的登录号包括NM_172200.1(人类亚型2)和NM_002189.2(人类亚型1前体)。示例性天然哺乳类动物IL-15氨基酸序列的登录号包括NP_751950.1(人类亚型2)和NP_002180.1(人类亚型1前体)。

[0092] 如本文所用的,“白细胞介素15受体 α ”或“IL15R α ”还可以指与生物活性的天然哺乳类动物IL15 α 氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性,在至少一种功能测定法中具有与天然IL15R α 蛋白相似(75%或更高)的功能性的多肽。IL15R α 是以高亲和性特异性结合IL15的细胞因子受体。一种功能测定法是与天然IL15蛋白的特异性结合。

[0093] 如本文所用的,术语“分离的”分子(例如多肽或多核苷酸)是已被操作以便以比自然界中更高的浓度存在或已从其天然环境中取出的分子。例如,当在自然界中与受试者抗体相关的至少10%或20%或40%或50%或70%或90%的非受试者抗体材料已被移除时,主题抗体被分离、纯化、基本上分离或基本上纯化。例如,天然存在于活体动物中的多核苷酸或多肽不是“分离的”,但与其天然状态的共存材料分开的相同多核苷酸或多肽是“分离的”。此外,出于本发明的目的,载体中包含的重组DNA分子被认为是分离的。分离的RNA分子包括DNA和RNA分子的体内或体外RNA复制产物。分离的核酸分子还包括合成生产的分子。另

外,包含在重组宿主细胞中的载体分子也是分离的。因此,不是所有“分离的”分子都必须是“纯化的”。

[0094] 如本文所用的,术语“接头”或“连接段”是指连接两个其他分子或基团的分子或基团。肽接头可以允许连接的分子或基团获得功能配置。接头肽优选地包括至少2个氨基酸、至少3个氨基酸、至少5个氨基酸、至少10个氨基酸、至少15个氨基酸、至少20个氨基酸、至少30个氨基酸、至少40个氨基酸、至少50个氨基酸、至少60个氨基酸、至少70个氨基酸、至少80个氨基酸、至少90个氨基酸或大约100个氨基酸。

[0095] 融合蛋白的成分,例如细胞因子或其他生物活性分子和任何肽接头,可以以几乎任何方式组织,只要所述融合蛋白具有其打算的功能即可。具体而言,如果需要,融合蛋白的每种成分可以通过至少一个适合的肽接头区段或序列与另一成分分隔开。另外,所述融合蛋白可以包括标签,例如以便于所述融合蛋白的修饰、鉴定和/或纯化。更具体的融合蛋白在下文描述的实施例中。

[0096] 如本文所用的,术语“低剂量”是指比用于治疗任何人类疾病或病症的被配制成用于给定给药途径的特定化合物的最低标准推荐剂量低至少5% (例如至少10%、20%、50%、80%、90%或甚至95%)。例如,被配制成用于通过吸入给药的药剂的低剂量与被配制成用于口服给药的相同药剂的低剂量不同。

[0097] 如本文所用的,术语“培养基”或“培养基质”包括任何培养基、溶液、固体、半固体或刚性承载物,其可以承载或含有任何宿主细胞(包括细菌宿主细胞、酵母宿主细胞、昆虫宿主细胞、植物宿主细胞、真核宿主细胞、哺乳类动物宿主细胞、CHO细胞、原核宿主细胞、大肠杆菌或假单胞菌宿主细胞)和细胞内含物。因此,所述术语可以涵盖宿主细胞已在其中生长的培养基,例如多肽已被分泌在其中的培养基,包括在增殖步骤之前或之后的培养基。所述术语还涵盖含有宿主细胞裂解物的缓冲液或试剂,例如在多肽被细胞内生产并且所述宿主细胞被裂解或破碎以释放出所述多肽的情况下。

[0098] 如本文所用的,术语“调节”是指当与适合的对照相比时,直接或间接地生产测量到的活性的提高或降低、刺激、抑制、干扰或阻断。多肽或多核苷酸的“调节剂”是指当与适合的对照相比时,影响例如提高、降低、刺激、抑制、干扰或阻断所述多肽或多核苷酸的测量到的活性的物质。例如,“调节剂”可以以可测量的亲和性结合和/或激活或抑制靶,或直接或间接地影响受体活性的正常调控。

[0099] 术语“可操作连接”是指第一核酸序列与第二核酸序列之间的功能联系,以使得所述第一和第二核酸序列被转录成单一核酸序列。可操作连接的核酸序列不必在物理上彼此相邻。术语“可操作连接”也指核酸表达控制序列(例如启动子或转录因子结合位点的阵列)与可转录的核酸序列之间的功能联系,其中所述表达控制序列指导对应于可转录序列的核酸的转录。

[0100] 如本文所用的,术语“药学上可接受的”赋形剂、载体或稀释剂是指药学上可接受的材料、组合物或介质,例如液体或固体填料、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封材料,其参与将所述主题药剂从一个器官或身体部分运载或运输到另一个器官或身体部分。每种载体在与所述剂型的其他成分相容和对所述患者无害的意义上必须是“可接受的”。可以用作药学上可接受的载体的材料的一些实施例包括:糖类,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;黄

耆胶粉 (powered tragacanth); 麦芽; 明胶; 滑石; 赋形剂, 例如可可脂和栓剂用蜡; 油类, 例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油; 二醇类, 例如丙二醇; 多元醇, 例如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇; 酯类, 例如油酸乙酯和月桂酸乙酯; 琼脂; 缓冲剂, 例如氢氧化镁和氢氧化铝; 海藻酸; 无热原水; 等渗盐水; 林格氏溶液; 乙醇; 磷酸盐缓冲溶液; 以及药物制剂中使用的其他无毒相容性物质。润湿剂、乳化剂和润滑剂例如月桂基硫酸钠、硬脂酸镁和聚氧化乙烯-聚氧化丙烯共聚物, 以及着色剂、脱模剂、包衣剂、甜味剂、调味和增香剂、防腐剂和抗氧化剂, 也可存在于所述组合物中。

[0101] 如本文所用的, 术语“多核苷酸”、“核酸分子”、“核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸”在本文中可互换使用, 是指任何长度的核苷酸 (包括核糖核苷酸以及脱氧核糖核苷酸) 的聚合形式。它们可以包括双链、单链或三重螺旋序列, 并且包括但不限于来自于病毒、原核和真核来源的 cDNA, mRNA, 来自于病毒 (例如 DNA 病毒和反转录病毒) 或原核来源的基因组 DNA 序列, RNAi, cRNA, 反义分子, 重组多核苷酸, 核酶和合成的 DNA 序列。所述术语还涵盖包括 DNA 和 RNA 的任何已知碱基类似物的序列。核苷酸可以用它们通常被接受的单字母编码来指称。

[0102] 多核苷酸不限于在自然界中出现的多核苷酸, 还包括其中出现非天然核苷酸类似物和核苷酸间键的多核苷酸。核酸分子可以包含修饰的核酸分子 (例如修饰的碱基、糖和/或核苷酸间接头)。这种类型的非天然结构的非限制性实施例包括其中糖不是核糖的多核苷酸、其中出现 3'-5' 和 2'-5' 磷酸二酯键的多核苷酸、其中出现反键 (3'-3' 和 5'-5') 和支链结构的多核苷酸。此外, 本发明的多核苷酸包括非天然的核苷酸间键例如肽核酸 (PNA)、锁核酸 (LNA)、甲基磷酸酯的 C1-C4 烷基磷酸酯键、C1-C6 烷基磷酸三酯、硫代磷酸酯和二硫代磷酸酯类型。在任何情况下, 本发明的多核苷酸维持以与天然多核苷酸相似的方式与靶核酸杂交的能力。

[0103] 除非另有指明或从上下文显而易见, 特定核酸序列也暗含其保守修饰的变体 (例如简并密码子替换) 和互补序列以及所述明确指示的序列。简并密码子替换可以通过产生其中一个或多个所选 (或所有) 密码子的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基替换的序列来实现。(Batzner 等, 1991 *Nucleic Acid Res.* 19:5081; Ohtsuka 等, 1985 *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608; Rossolini 等, 1994 *Mol. Cell. Probes* 8:91-98.)。

[0104] 如本文所用的, 术语“预防”、“预防”或“预防”是指用于阻止、延迟、转移或停止疾病或病症的发作、发生、严重性或复发的方法。例如, 如果与未接受方法的受试者相比, 在对疾病或病症易感的受试者中存在疾病或病症或其一种或多种症状的发作、发生、严重性或复发的减轻或延迟, 则所述方法被认为是预防。如果在对疾病或病症易感的受试者中, 与接受治疗之前所述受试者的发展相比在接受所述方法之后存在所述疾病或病症的一种或多种症状的发作、发生、严重性或复发的减轻或延迟, 则所述公开的方法也被认为是预防。骨质疏松症的发作、发生、严重性或复发的减轻或延迟可以是减少约 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100% 或其间的任何量。

[0105] 预防等并不意味着永远防止受试者患上所述特定疾病或病症。预防可能需要多次给药。预防可以包括在所有疾病症状已被消除的受试者中预防疾病的复发或在复发-缓和型疾病中预防复发。

[0106] 如本文所用的, 术语“启动子”是指能够结合哺乳类动物细胞中的 RNA 聚合酶并初始化与其可操作连接的下游 (3' 方向) 编码序列的转录的 DNA 调控区。启动子序列包括以高

于背景的可检测水平初始化的基因的转录所必需的最小数量的碱基或要素。在启动子序列内可以存在转录起始位点以及负责RNA聚合酶的结合的蛋白质结合结构域(共有序列)。真核启动子通常但不总是含有“TATA”盒和“CAT”盒。启动子包括与核酸分子天然毗邻的启动子和与核酸分子不天然毗邻的启动子。另外,术语“启动子”包括诱导型启动子、条件活性启动子例如cre-lox启动子、组成型启动子和组织特异性启动子。

[0107] 如本文所用的,术语“蛋白质”和“多肽”可互换使用,是指氨基酸残基的聚合物,并且不限于最小长度。因此,肽、寡肽、二聚体、多聚体等被包括在所述定义之内。所述定义涵盖了全长蛋白及其片段两者。所述术语还包括多肽的表达后修饰,例如糖基化、乙酰化、磷酸化等。此外,多肽可以是指包含对天然序列的修饰例如缺失、添加和替换(通常在本质上是保守的)的蛋白质,只要所述蛋白质维持所需活性即可。这些修饰可以是故意的或者可能是偶然的。氨基酸在本文中可以通过它们通常已知的三字母符号或通过IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的单字母符号来指称。

[0108] 如本文所用的,术语“纯化的”是指蛋白质可以实质上或基本上不含在其天然存在的环境中、即在重组生产的蛋白质的情况下天然细胞或宿主细胞中发现的通常与所述蛋白质相伴或相互作用的成分。可以实质上不含细胞材料的蛋白质包括具有少于约30%、少于约20%、少于约15%、少于约10%、少于约5%、少于约4%、少于约3%、少于约2%或少于约1%(以干重计)的污染蛋白质的蛋白质制备物。当蛋白质或其变体由宿主细胞重组生产时,所述蛋白质可以以所述细胞的干重的约30%、约20%、约15%、约10%、约5%、约4%、约3%、约2%或约1%或更少的量存在。当蛋白质或其变体由宿主细胞重组生产时,所述蛋白质可以以所述细胞的干重的约5g/L、约4g/L、约3g/L、约2g/L、约1g/L、约750mg/L、约500mg/L、约250mg/L、约100mg/L、约50mg/L、约10mg/L或约1mg/L或更低的干重浓度存在于培养基中。因此,当通过适合的方法例如SDS/PAGE分析、RP-HPLC、SEC和毛细管电泳确定时,“基本上纯化的”蛋白质可以具有至少约80%的纯度水平,特别是至少约85%的纯度水平,更特别是至少约90%的纯度水平、至少约95%的纯度水平、至少约99%或更高的纯度水平。

[0109] 本发明的蛋白质和前药在它们制备后优选地被分离和/或纯化,以获得含有以重量计等于或高于80%的量的组合物(“实质上纯的”),其然后如本文中所述使用或配制。在某些实施方式中,本发明的化合物超过95%纯度。

[0110] 如本文所用的,术语“受体”是指能够与被称为配体的另一分子相互作用的蛋白质,其包括糖蛋白或其片段。所述配体可以属于任何类别的生物化学或化学化合物。所述配体通常是细胞外分子,其在结合到受体后通常引发细胞反应,例如引发信号转导通路。所述受体不必须是膜结合蛋白。

[0111] 如本文所用的,术语“重组的”对于核酸分子而言,意味着基因组、cDNA、病毒、半合成和/或合成起源的多核苷酸由于其起源或操作,并不伴有在自然界中与其相伴的全部或一部分多核苷酸。术语“重组的”对于蛋白质或多肽而言,意味着通过重组多核苷酸的表达生产的多肽。术语“重组的”当用于宿主细胞时,意味着其中已引入重组多核苷酸的宿主细胞。

[0112] 如本文所用的,术语“样品”是指来自于人类、动物的样品或研究样品,例如细胞、组织、器官、流体、气体、气溶胶、浆液、胶体或凝结物。所述“样品”可以在体内测试,例如不从所述人类或动物取出,或者它可以在体外测试。所述样品可以在加工后测试,例如通过组

织学方法。“样品”也指例如包括流体或组织样品的细胞或从流体或组织样品分离的细胞。“样品”还可以指从人类或动物新鲜获取的细胞、组织、器官或流体,或被加工或储存的细胞、组织、器官或流体。

[0113] 如本文所用的,术语“可溶的”是指融合分子特别是融合蛋白,其在低G力离心(例如在标准离心机中低于约30,000转每分钟)下不容易从水性缓冲液例如细胞培养基中沉降。融合分子如果在高于约5-37℃的温度下,在等于或接近中性pH下,在存在低浓度或不存在阴离子型或非离子型去污剂的情况下保留在水性溶液中,则它是可溶的。在这些条件下,可溶性蛋白通常具有低沉降值,例如小于约10至50个斯维德贝格单位。

[0114] 本文提及的水溶液典型地具有缓冲化合物以建立典型地在约5-9的pH范围内的pH和约2mM至500mM之间的离子强度范围。有时添加蛋白酶抑制剂或温和的非离子型去污剂。另外,如果需要,可以添加载体蛋白(例如牛血清白蛋白)。示例性的水性缓冲液包括标准的磷酸盐缓冲盐水、tris缓冲盐水或其他公知的缓冲液和细胞培养基制剂。

[0115] 如本文所用的,术语“可溶性IL15受体 α ”是指缺少受体的跨膜锚定部分并因此能够被分泌到细胞外而不是锚定到质膜的IL15受体 α 的形式。

[0116] 如本文所用的,术语“刺激”或“刺激”是指提高、放大、增加、增强生理活性例如免疫反应。刺激可以是积极的改变。例如,提高可以是5%、10%、25%、50%、75%或甚至90%-100%。其他示例性的提高包括2倍、5倍、10倍、20倍、40倍或甚至100倍。

[0117] 如本文所用的,术语“受试者”和“患者”在本文中可互换使用,是指活体动物(人类或非人类)。受试者可以是哺乳类动物。术语“哺乳动物”或“哺乳类动物”是指分类学分类哺乳动物纲中的任何动物。哺乳类动物可以是人类或非人类哺乳动物,例如狗、猫、猪、奶牛、绵羊、山羊、马、大鼠和小鼠。术语“受试者”不排除对于疾病或病症来说完全正常的或在所有方面正常的个体。

[0118] 如本文所用的,术语“抑制”或“抑制”是指降低、减弱、减小、停止或稳定生理活性例如免疫反应。抑制可能是消极的改变。例如,降低可以是5%、10%、25%、50%、75%或甚至90%-100%。示例性的降低包括2倍、5倍、10倍、20倍、40倍或甚至100倍。

[0119] 如本文所用的,术语“治疗有效量”是指一种或多种治疗药剂足以实现目标治疗效果并具有极小或没有不想要的副作用的剂量。治疗有效量可以由专业医师容易地确定,例如通过首先给药低剂量的所述药剂,然后逐步提高剂量直至实现所需治疗效果并具有极小或没有不想要的副作用。

[0120] 如本文所用的,术语“转染的”意味着具有引入的DNA或RNA,可以使用或不使用任何伴随的促进剂例如脂质体。本领域中已知的用于转染的方法包括例如磷酸钙转染、DEAE葡聚糖转染、原生质体融合、电穿孔和脂质体转染。

[0121] 如本文所用的,术语“治疗”或“治疗”疾病或病症是指在发生之前或之后减轻、延迟或改善这种病症或这种疾病或病症的一种或多种症状。治疗可以针对疾病和/或潜在病理学的一种或多种效应或症状。治疗可以是任何减轻,并且可以是但不限于所述疾病或疾病症状的完全消除。当通过任何标准技术测量时,与等同的未治疗对照相比,这种减轻或阻止程度是至少5%、10%、20%、40%、50%、60%、80%、90%、95%或100%。

[0122] 如本文所用的,术语“肿瘤”是指任何恶性或赘生性细胞。

[0123] 如本文所用的,术语“载体”是指能够将遗传物质传递到宿主细胞或生物体的核酸

分子。载体可以由DNA或RNA构成。载体带有其自身的复制起点,用于限制性核酸内切酶的一个或多个独特的识别位点(其可用于插入外来DNA),并且通常带有可选择标记例如编码抗生素抗性的基因,并通常含有用于表达插入的DNA的识别序列(例如启动子)。常见载体包括质粒载体和噬菌体载体。

[0124] 本文公开的任何组合物或方法可以与本文中提供的一种或多种任何其他组合物和方法组合。

[0125] 本发明的具体描述

[0126] 本发明提供了新的融合蛋白及其治疗用途。更具体地,本发明提供了新的IL15融合蛋白及其前药、组合物及其制备方法,其可用于治疗各种疾病和病症,例如增生、实体瘤或造血系统恶性肿瘤,在治疗期间具有降低的脱靶毒性和副作用。特别地并且举例来说,本发明使用与整个胞外IL15受体 β (27aa-240aa)相反的较短的IL15受体 β 结构域来阻断超级IL15 (IL15-R α),其中阻断被去除并且sIL15活性在肿瘤微环境中恢复。这种方法在不增加其毒性反应的情况下提高了抗肿瘤活性。如本文所公开的,各种短形式的hIL15受体 β 用于构建pro-sIL15融合蛋白,包括对应于27aa-125aa的结构域1 (D1),以及各种不同的可切割柔性接头 (L2或L2L)。

[0127] 本文公开了各种形式的pro-sIL15融合蛋白或融合蛋白复合物。例如,本文公开了作为肿瘤条件靶向和活化的pro-sIL15 A。IL15R β D1的胞外结构域通过MMP-14可切割肽接头与IL15-IL15R α -Fc的N端融合。发现这种靶向pro-sIL15克服了NK细胞的非肿瘤扩增引起的全身性毒性并有效地抑制了肿瘤生长。pro-sIL15的抗肿瘤作用依赖于CD8⁺T细胞。pro-IL15增加了茎样 (TCF1⁺Tim-3⁻) CD8⁺T细胞并减少具有终末表型的CD8⁺T细胞部分 (PD1⁺Tim3^{hi})。与抗PD-L1联合治疗显著提高了pro-IL-15的治疗效果,可以完全清除大部分肿瘤。

[0128] 一方面,本发明总体上涉及一种融合蛋白或融合蛋白复合物(A),它是一种同型二聚体复合物并且包括:

[0129] 第一结构单元:白细胞介素15 (IL15) 受体- α 的整个或亚基结构域;

[0130] 第二结构单元:活性IL15;

[0131] 位于所述融合蛋白C端的第三结构单元:抗体Fc片段;

[0132] 位于融合蛋白N端的第四结构单元:经由短的可切割接头 (L2) 或长的可切割接头 (L2L) 与第一结构单元、第二结构单元或第三结构单元连接的IL15受体 β 的整个或亚基结构域;以及

[0133] 一个或多个连接段或连接片段,其作为连接不同单元的柔性的不可切割接头 (L1)。

[0134] 在另一方面,本发明总体上涉及一种融合蛋白或融合蛋白复合物(B),它是一种同型二聚体复合物并且包括:

[0135] 第一片段 (1号片段),其包括:

[0136] 第一结构单元:白细胞介素15 (IL15) 受体- α 的整个或亚基结构域,以及

[0137] 第五结构单元:轻链 (CL) 恒定区;以及

[0138] 第二片段 (2号片段),其包括:

[0139] 第二结构单元:活性IL15,

[0140] 位于所述融合蛋白C端的第三结构单元:抗体Fc片段,

- [0141] 位于所述融合蛋白N端的且与短的可切割接头 (L2) 或长的可切割接头 (L2L) 连接的第四结构单元: IL15受体 β 的整个或亚基结构域;
- [0142] 第六结构单元: 重链 (CH) 恒定区; 以及
- [0143] 一个或多个连接段或连接片段, 其作为连接不同单元的柔性的不可切割接头 (L1),
- [0144] 其中两个1号片段和两个2号片段通过CH和CL以及两个Fc
- [0145] 之间的二硫键连接在一起形成复合物。
- [0146] 在某些实施方式中, 活性IL15是人类IL15。
- [0147] 在某些实施方式中, 抗体Fc片段包括具有SEQ ID No.2所示的氨基酸序列的人Fc片段。
- [0148] 在融合蛋白的某些实施方式中, 人Fc片段包括具有SEQ ID No.3中所示的氨基酸序列的突变人类IgG1-Fc。
- [0149] 在某些实施方式中, 第一结构单元是整个白细胞介素15 (IL15) 受体- α 。
- [0150] 在某些实施方式中, 第一结构单元是白细胞介素15 (IL15) 受体- α 的亚基结构域。
- [0151] 在某些实施方式中, 第一结构单元是人类IL15R的 α 亚基的sushi结构域, 其氨基酸序列如SEQ ID No.4所示。
- [0152] 在某些实施方式中, 第四结构单元是人类IL15Rb的整个胞外结构域 (27aa~240aa), 其氨基酸序列如SEQ ID No.5所示。
- [0153] 在某些实施方式中, 第四结构单元是IL15受体 β 的亚基结构域, 其长度比IL15受体 β 的胞外27aa-240aa短。
- [0154] 在某些实施方式中, IL15受体 β 的亚基结构域选自27aa-125aa、27aa-128aa、27aa-137aa、27~234aa、32aa-1378aa、32aa-234aa、32aa-240aa、83aa-214aa、83~234aa、或83~240aa表示的短的IL15受体 β , 如SEQ ID No.6~15所示。
- [0155] 在某些实施方式中, IL15受体 β 的亚基结构域是由27-125aa表示的短的IL15受体 β 。
- [0156] 在某些实施方式中, 融合蛋白或融合蛋白复合物具有如图14A所示的构建体。
- [0157] 在某些实施方式中, 融合蛋白或融合蛋白复合物具有如图14B所示的构建体。
- [0158] 在某些实施方式中, 一个或多个连接段或连接片段中的每一个选自可切割的柔性接头 (L2或L2L) 或不可切割的柔性接头 (L1)。在某些实施方式中, 短的可切割柔性接头 (L2) 和长的可切割柔性接头 (L2L) 能够被在肿瘤微环境中特异性表达的蛋白水解酶识别和水解。
- [0159] 如本文所用的, 术语“短的可切割接头”或接头“L2”是指长度在约10至约20范围内且具有一个可切割位点的可切割接头。短的可切割接头的非限制性实施例列于SEQ ID No.17中。如本文所用的, 术语“长的可切割接头”或接头“L2L”是指长度在约20至约40范围内的可切割接头。在某些实施方式中, 长的可切割接头 (L2L) 包括两个可切割位点。不可切割接头的非限制性实施例列于SEQ ID No.16中。长的可切割接头的非限制性实施例列于SEQ ID No.18中。
- [0160] 在某些实施方式中, 连接段或连接片段之一包括氨基酸序列, 所述氨基酸序列是具有或不具有蛋白酶敏感性序列的GGGS的倍数。

[0161] 在某些实施方式中,一个或多个连接段或接头能够被在肿瘤微环境中特异性表达的蛋白水解酶识别和水解。

[0162] 在某些实施方式中,在肿瘤微环境中特异性表达的蛋白水解酶是基质金属蛋白酶。

[0163] 在某些实施方式中,所述基质金属蛋白酶是基质金属蛋白酶9 (MMP9)。

[0164] 在某些实施方式中,所述基质金属蛋白酶是基质金属蛋白酶14 (MMP14)。

[0165] 在某些实施方式中,连接段或接头包括在SEQ ID No.8中列出的氨基酸序列。

[0166] 在某些实施方式中,连接段或接头包括在SEQ ID No.9中列出的氨基酸序列。

[0167] 在某些实施方式中,连接段或接头包括在SEQ ID No.10-23中列出的氨基酸序列。

[0168] 在某些实施方式中,连接段或接头的水解将IL15受体 β 的亚基结构域与融合蛋白的其余部分分开。

[0169] 在某些实施方式中,第二连接段或接头能够被在肿瘤微环境中特异性表达的蛋白水解酶识别和水解。

[0170] 在某些实施方式中,在肿瘤微环境中特异性表达的蛋白水解酶是基质金属蛋白酶。

[0171] 又一方面,本发明总体上涉及同型二聚体蛋白或融合蛋白复合物,其包括本文公开的融合蛋白。

[0172] 又一方面,本发明总体上涉及包括本文公开的融合蛋白或融合蛋白复合物的前药。

[0173] 在某些实施方式中,同型二聚体复合物或融合蛋白复合物或其前药被在肿瘤微环境中特异性表达的蛋白水解酶水解。

[0174] 又一方面,本发明总体上涉及本文公开的基本上纯化的融合蛋白或融合蛋白复合物、或其前药。

[0175] 又一方面,本发明总体上涉及编码本文公开的融合蛋白或融合蛋白复合物或其前药的多核苷酸。

[0176] 又一方面,本发明总体上涉及包括本文公开的多核苷酸的表达载体。

[0177] 又一方面,本发明总体上涉及包括本文公开的融合蛋白或融合蛋白复合物或其前药的药物组合物。

[0178] 又一方面,本发明总体上涉及一种用于治疗疾病或病症的方法。所述方法包括向有需要的患者给药治疗有效量的本文公开的融合蛋白或融合蛋白复合物或其前药或药物组合物,其中所述疾病或病症选自增生、实体瘤或造血系统恶性肿瘤。

[0179] 在某些实施方式中,所治疗的疾病或病症是增生。

[0180] 在某些实施方式中,所治疗的疾病或病症是实体瘤。

[0181] 在某些实施方式中,所治疗的疾病或病症是造血系统恶性肿瘤。

[0182] 在某些实施方式中,被治疗的受试者进一步被施用化学疗法、放射疗法、靶向疗法、免疫疗法或激素疗法中的一种或多种。

[0183] 在某些实施方式中,所述方法包括向受试者施用一种或多种化学疗法。

[0184] 在某些实施方式中,所述方法包括向受试者施用放射疗法。

[0185] 在某些实施方式中,所述方法包括向受试者施用靶向治疗。

[0186] 在某些实施方式中,所述方法包括向受试者施用免疫疗法。

[0187] 在某些实施方式中,所述方法包括向受试者施用激素疗法。

[0188] 如本文所用的,术语“化疗药剂”是指可用于治疗癌症的化学化合物。化疗药剂的实施例包括埃罗替尼(**TARCEVA®**, Genentech/OSI Pharm.)、硼替佐米(**VELCADE®**, Millennium Pharm.)、氟维司群(**FASLODEX®**, AstraZeneca)、索坦(SU11248, Pfizer)、来曲唑(**FEMARA®**, Novartis)、甲磺酸伊马替尼(**GLEEVEC®**, Novartis)、PTK787/ZK 222584 (Novartis)、奥沙利铂(**Eloxatin®**, Sanofi)、5-FU (5-氟尿嘧啶)、甲酰四氢叶酸、雷帕霉素(西罗莫司, **RAPAMUNE®**, Wyeth)、拉帕替尼(**TYKERB®**, GSK572016, Glaxo Smith Kline)、洛那法尼(SCH 66336)、索拉非尼(BAY43-9006, Bayer Labs)和吉非替尼(**IRESSA®**, AstraZeneca)、AG1478、AG1571 (SU 5271; Sugen), 烷基化试剂例如噻替哌和 **CYTOXAN®** 环磷酰胺, 烷基磺酸酯例如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡, 氮丙啶类例如苯并多巴、卡波醌、米特多巴 (meturedopa) 和优多帕 (uredopa), 乙烯亚胺和甲基蜜胺类(包括六甲蜜胺)、三乙烯蜜胺、三乙烯磷酰胺、三乙烯硫代磷酰胺和三羟甲基蜜胺, 番荔枝内酯(特别是布拉它辛和布拉它辛酮), 喜树碱(包括合成类似物拓扑替康), 苔藓抑素, 凯利他汀 (callystatin), CC-1065 (包括其阿多来新、卡折来新和比折来新合成类似物), 念珠藻素(特别是念珠藻素1和念珠藻素8), 尾海兔素, 倍癌霉素 (duocarmycin) (包括合成类似物 KW-2189 和 CB1-TM1), 五加素, 水鬼蕉碱, 葡枝珊瑚醇, 海绵抑制素, 氮芥例如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯磷酰胺、雌氮芥、异环磷酰胺、二氯甲基二乙胺、二氯甲基二乙胺氧化物盐酸盐、美法仑、新恩比兴、苯芥胆甾醇、泼尼氮芥、曲洛磷胺、尿嘧啶氮芥, 亚硝基脲类例如卡莫司汀、氯脲霉素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀和雷莫司汀, 抗生素类例如烯二炔抗生素(例如卡里奇霉素特别是卡里奇霉素 γ 11 和卡里奇霉素 ω 11 (Angew. Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33: 183-186)、达内霉素(包括达内霉素A)、双膦酸盐例如氯膦酸盐, 埃斯培拉霉素 (esperamicin)、以及新制癌菌素发色团和相关发色蛋白烯二炔抗生素发色团), 阿克拉霉素 (aclacinomycin)、放线菌素、安曲霉素、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素、卡拉比星、洋红霉素、嗜癌菌素 (carzinophilin)、色霉素、放线菌素D、道诺霉素、地托比星、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、阿霉素(多柔比星、吗啉代-多柔比星、氰基吗啉代-多柔比星、2-吡咯啉基-多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素例如丝裂霉素C、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素 (quelamycin)、罗多比星、链黑菌素、链脲霉素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他汀、佐柔比星, 抗代谢物例如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶 (5-FU), 叶酸类似物例如二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙, 嘌呤类似物例如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤, 嘧啶类似物例如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、脱氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷, 雄激素类例如二甲睾酮、屈他雄酮丙酸盐、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯, 抗肾上腺剂例如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦, 叶酸补充剂例如亚叶酸, 乙酰葡醛酯, 醛磷酰胺糖苷, 氨基乙酰丙酸, 恩尿嘧啶, 安吡啶, 倍曲布西 (bestrabucil), 比生群, 依达曲沙, 地佛法明 (defofamine), 地美可辛, 地吡醌, 依洛尼塞 (elfomithine), 依利醋铵, 埃博霉素, 依托格鲁, 硝酸镓, 羟基脲, 香菇多糖, 洛尼代宁 (lonidainine), 美登木素类例如美登素和安丝菌素, 米托胍脲, 米托蒽醌, 莫匹丹莫 (mopidanmol), 尼曲吡啶 (nitraerine), 喷司他汀, 蛋氨

氮芥 (phenamet), 吡柔比星, 洛索萘醌, 鬼臼酸, 2-乙基酰肼, 丙卡巴肼, **PSK[®]** 多糖复合物 (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.), 雷佐生, 根霉素, 西佐喃 (sizofiran), 螺旋锗 (spirogermanium), 细交链孢菌酮酸, 三亚胺醌, 2,2',2''-三氯三乙胺, 单端孢霉烯 (特别是 T-2 毒素、维拉库林 A (verracurin A)、漆斑菌素 A 和蛇形菌素 (anguidine)), 乌拉坦, 长春地辛, 达卡巴嗪, 甘露醇氮芥, 二溴甘露醇, 二溴卫矛醇, 哌泊溴烷, 格塞图辛 (gacytosine), 阿拉伯糖苷 (“Ara-C”), 环磷酰胺, 噻替派, 紫杉烷类例如 **TAXOL[®]** (紫杉醇; Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、**ABRAXANE[®]** (无氢化蓖麻油)、白蛋白工程化的紫杉醇纳米粒子制剂 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) 和 **TAXOTERE[®]** (多西他赛; Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France), 苯丁酸氮芥, **GEMZAR[®]** (吉西他滨), 6-硫代鸟嘌呤, 巯基嘌呤, 甲氨蝶呤, 铂类似物例如顺铂和卡铂, 长春花碱, 依托泊苷 (VP-16), 异环磷酰胺, 米托萘醌, 长春新碱, **NAVELBINE[®]** (长春瑞滨), 诺消灵 (novantrone), 替尼泊苷, 依达曲沙, 道诺霉素, 氨基蝶呤, 卡培他滨 (**XELODA[®]**), 伊班膦酸盐, CPT-11, 拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000, 二氟甲基鸟氨酸 (DMFO), 维甲酸类例如视黄酸, 以及任何上述药剂的药学上可接受的盐、酸和衍生物。

[0189] 第二 (或另外的) 药剂或疗法的实施例可以包括但不限于免疫疗法 (例如 PD-1 抑制剂 (派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗)、PD-L1 抑制剂 (阿特珠单抗、奥维单抗、德鲁瓦单抗)、CTLA4 拮抗剂、细胞信号转导抑制剂 (例如伊马替尼、吉非替尼、硼替佐米、埃罗替尼、索拉非尼、舒尼替尼、达沙替尼、伏立诺他、拉帕替尼、西罗莫司脂化物、尼罗替尼、依维莫司、帕唑帕尼、曲妥珠单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、雷珠单抗、哌加他尼、帕尼单抗等)、有丝分裂抑制剂 (例如紫杉醇、长春新碱、长春碱等)、烷基化试剂 (例如顺铂、环磷酰胺、苯丁酸氮芥、卡莫司汀等)、抗代谢物 (例如甲氨蝶呤、5-FU 等)、嵌入性抗癌药剂 (例如放线菌素、蒽环霉素、博来霉素、丝裂霉素-C 等)、拓扑异构酶抑制剂 (例如伊立替康、拓扑替康、替尼泊苷等)、免疫疗法药剂 (例如白介素、干扰素等) 和抗激素药剂 (例如他莫昔芬、雷洛昔芬等)。

[0190] 又一方面, 本发明总体上涉及本文公开的融合蛋白或融合蛋白复合物或其前药在治疗或减轻疾病或病症 (例如, 增生、实体瘤或造血系统恶性肿瘤) 中的用途。

[0191] 又一方面, 本发明总体上涉及编码本文公开的蛋白质 (例如融合蛋白或其片段) 的多核苷酸在治疗或减轻疾病或病症 (例如, 增生、实体瘤或造血系统恶性肿瘤) 中的用途。

[0192] 又一方面, 本发明总体上涉及本文公开的融合蛋白或融合蛋白复合物或其前药和药理学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂在制备用于治疗或减轻疾病或病症的药物中的用途 (例如, 增生、实体瘤或造血系统恶性肿瘤)。

[0193] 在某些实施方式中, 可用融合蛋白或融合蛋白复合物或其前药治疗的疾病或病症包括选自头颈癌、子宫内膜癌、结肠直肠癌、卵巢癌、乳腺癌、黑素瘤、肺癌、肾癌、肝癌、肛门癌、肉瘤、淋巴瘤、白血病、脑部肿瘤、胃癌、睾丸癌、胰腺癌和甲状腺癌的一种或多种。示例性的疾病或病症包括急性髓性白血病、肾上腺皮质癌、B 细胞淋巴瘤、膀胱尿路上皮癌、乳腺导管癌、乳腺小叶癌、食道癌、去势抵抗性前列腺癌 (CRPC)、宫颈癌、胆管癌、慢性粒细胞性白血病、结直肠癌、结直肠癌 (CRC)、食道癌、胃腺癌、多形性胶质母细胞瘤、头颈部鳞状细胞癌、霍奇金淋巴瘤/原发性纵隔 B 细胞淋巴瘤、肝细胞癌 (HCC)、肾嫌色细胞癌、肾透明细胞癌、肾乳头状细胞癌、低级别胶质瘤、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、黑色素瘤 (MEL)、间皮瘤、非鳞

状非小细胞肺癌、卵巢浆液性腺癌、胰腺导管腺癌、副神经节瘤和嗜铬细胞瘤、前列腺癌、肾细胞癌(RCC)、肉瘤、皮肤黑色素瘤、头颈部鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、胸腺瘤、甲状腺乳头状癌、子宫癌肉瘤、子宫体子宫内膜样癌和葡萄膜黑色素瘤。

[0194] 在某些实施方式中,可用融合蛋白或融合蛋白复合物或其前药治疗的疾病或病症是B细胞淋巴瘤。

[0195] 在某些实施方式中,可用融合蛋白或融合蛋白复合物或其前药治疗的疾病或病症是B型结肠直肠癌。

[0196] 本发明的方法和用途可以是和本文公开的与一种或多种免疫检查点阻断、T细胞共信号和肿瘤靶向抗体疗法组合使用的药剂的联合疗法。

[0197] 又一方面,本发明总体上涉及包括编码本文公开的融合蛋白或融合蛋白复合物或其前药的多核苷酸的细胞系。

[0198] 又一方面,本发明总体上涉及制备蛋白质的方法,其包括培养所述细胞系。在某些实施方式中,所述方法进一步包括纯化或分离产生的蛋白质,例如本文公开的融合蛋白或融合蛋白复合物或其前药。

[0199] 又一方面,本发明总体上涉及一种制备蛋白质的方法。所述方法包括:提供编码本文公开的融合蛋白或融合蛋白复合物或其前药的表达载体;将所述表达载体引入宿主细胞;在足以表达所述蛋白质的条件下在培养基中培养所述宿主细胞;以及从所述宿主细胞或培养基中纯化蛋白质。

[0200] 在某些实施方式中,所述方法包括构建包括编码融合蛋白或前药的编码基因的表达载体;通过瞬时转染构建包括表达载体的宿主细胞;培养宿主细胞;收集细胞上清液;通过蛋白A/G亲和层析纯化融合蛋白或前药。

[0201] 可以使用任何合适的表达载体。

[0202] 可以使用任何合适的宿主细胞,例如293F和CHO细胞。

[0203] 表达载体的引入可以通过任何合适的转染方法来完成,并且可以通过瞬时转染或稳定的细胞系来实现。

[0204] 可以使用任何合适的纯化方法。示例性纯化方法是通过蛋白A/G的亲和层析或孔径排阻方法。

[0205] 又一方面,本发明总体上涉及通过本文公开的方法生产的分离的蛋白质。

[0206] 在某些实施方式中,分离的蛋白基本上是纯的。

[0207] 如本文所公开的,接头序列可用于连接生物活性多肽的两个或多个多肽以产生具有所需功能活性的单链分子。

[0208] 可以采用任何合适的接头。示例性的肽接头序列包括具有约7至28个氨基酸,例如约8至16个氨基酸的那些。接头序列优选地是柔性的,以便不将生物活性多肽或效应分子保持在单个不希望的构象中。可以使用接头序列,例如,以将识别位点与融合分子隔开。具体而言,可以定位肽接头序列以提供分子柔性。接头优选地主要包含具有小侧链的氨基酸,例如甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸,以提供柔性。

[0209] 通常,本发明的融合蛋白复合物的制备可以通过本文中公开的步骤并通过公认的重组DNA技术来实现,所述技术涉及例如聚合酶链扩增反应(PCR)、质粒DNA的制备、使用限制性酶切割DNA、寡核苷酸的制备、DNA的连接、mRNA的分离、将DNA引入到适合的细胞中、宿

主的转化或转染、宿主的培养。此外,融合分子可以使用离液剂和公知的电泳、离心和层析方法来分离和纯化(对于与这些方法相关的公开内容,参见Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第2版,1989);和Ausubel等,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,New York(1989))。

[0210] 本发明进一步提供了编码本发明融合蛋白的核酸序列和DNA序列。DNA序列可以由适合于染色体外复制的载体携带,例如噬菌体、病毒、质粒、噬菌粒、粘粒、YAC或附加体。例如,编码所需融合蛋白的DNA载体可用于促进本文所述的制备方法并获得显著量的融合蛋白或其成分。可以将DNA序列插入适当的表达载体中,即含有对插入的蛋白质编码序列进行转录和翻译所必需的要素的载体。多种宿主-载体系统可用于表达蛋白质编码序列。这些可包括感染病毒(例如,牛痘病毒、腺病毒等)的哺乳类动物细胞系统;感染病毒的昆虫细胞系统(例如杆状病毒);微生物,例如含有酵母载体的酵母,或用噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA转化的细菌。根据所使用的宿主-载体系统,可以使用多种合适的转录和翻译要素中的任何一种(Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第2版(1989);以及Ausubel等,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,New York(1989) for disclosure relating to these methods)。

[0211] 由DNA载体编码的融合蛋白成分可以以盒式形式提供。术语“盒”是指每种成分可以通过标准重组方法容易地替代另一成分。特别地,当编码的融合复合物用于对抗可能具有或具有发展血清型的能力的病原体时,特别需要以盒形式配置的DNA载体。

[0212] 为了制备编码融合蛋白复合物的载体,通过使用合适的连接酶将编码生物活性多肽的序列与编码效应肽的序列连接。编码呈递肽的DNA可以通过从天然来源例如从合适的细胞系中分离DNA或通过已知的合成方法例如磷酸三酯法来获得(Oligonucleotide Synthesis, IRL Press, M.J.Gait, ed., 1984)。合成的寡核苷酸也可以使用可商购的自动化寡核苷酸合成仪来制备。一旦分离,编码生物活性多肽的基因可以通过PCR或本领域已知的其他方法进行扩增。用于扩增生物活性多肽基因的合适的PCR引物可以向PCR产物添加限制性位点。PCR产物优选地包括效应肽的剪接位点和正确表达和分泌生物活性多肽-效应融合复合物所必需的前导序列。PCR产物还优选地包括编码所述接头序列或用于连接这种序列的限制性酶位点的序列。

[0213] 本文所述的融合蛋白可以通过标准重组DNA技术来生产。例如,一旦编码生物活性多肽的DNA分子被分离后,可以将序列连接到编码效应物多肽的另一DNA分子。编码生物活性多肽的核苷酸序列可以被直接联结到编码效应物肽的DNA序列,或者更典型地,可以使用适合的连接酶将本文中所讨论的编码接头序列的DNA序列插入到编码生物活性多肽的序列与编码效应肽的序列之间并联结。得到的杂合DNA分子可以在适合的宿主细胞中表达,以生产融合蛋白复合物。DNA分子彼此以5'至3'的方向连接,使得在连接后,编码的多肽的翻译框不被改变(即DNA分子彼此同框连接)。得到的DNA分子编码同框融合蛋白。

[0214] 其他核苷酸序列也可以包括在基因构建体中。例如,控制编码融合到效应肽的生物活性多肽的序列的表达的启动子序列或将融合蛋白导向细胞表面或培养基的前导序列,可以包括在构建体中或存在于将构建体插入到其中的表达载体中。

[0215] 在获得变体生物活性多肽IL15、IL15R或Fc结构域编码序列中,本领域普通技术人员将会认识到,多肽可以通过某些氨基酸替换、添加、缺失和翻译后修饰进行修饰,而没有

生物活性的丧失或降低。具体而言,公知的是,保守氨基酸替换、即将一个氨基酸用具有相似的尺寸、电荷、极性和构象的另一个氨基酸替换,不太可能显著改变蛋白质功能。作为蛋白质的组成成分的20种标准氨基酸可以被宽泛地分类为如下的四组保守氨基酸:非极性(疏水)组包括丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸和缬氨酸;极性(不带电荷、中性)组包括天冬酰胺、半胱氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸;带正电荷(碱性)组包括精氨酸、组氨酸和赖氨酸;带负电荷(酸性)组含有天冬氨酸和谷氨酸。蛋白质中一个氨基酸被同一组中的另一个氨基酸的替换,不太可能对所述蛋白质的生物活性具有不利影响。在其他情况下,可以做出对氨基酸位置的修改以降低或提高蛋白质的生物活性。这种改变可以随机地或在靶残基的已知或推测的结构或功能性质的基础上通过位点特异性突变来引入。在变体蛋白表达后,可以使用结合或功能测定法容易地评估由修饰造成的生物活性的改变。

[0216] 核苷酸序列之间的同源性可以通过DNA杂交分析来确定,其中双链DNA杂交体的稳定性取决于发生的碱基配对的程度。高温和/或低盐含量的条件降低了杂交体的稳定性,并且可以被改变以防止具有低于所选同源性程度的序列的退火。例如,对于具有约55%G-C含量的序列来说,40-50℃、6×SSC(氯化钠/柠檬酸钠缓冲液)和0.1%SDS(十二烷基硫酸钠)的杂交和清洗条件指示约60%-70%的同源性,50-65℃、1×SSC和0.1%SDS的杂交和清洗条件指示约82%-97%的特异性,52℃、0.1×SSC和0.1%SDS的杂交和清洗条件指示约99%-100%的特异性。大量用于比较核苷酸和氨基酸序列(和测量同源性程度)的计算机程序也是可用的。可容易获得的序列比较和多重序列比对算法分别是基本局部比对搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool)(BLAST)和ClustalW程序。

[0217] 大量策略可用于表达本发明的蛋白融合复合物。例如,可以通过已知方法将上述融合蛋白构建体并入到适合的载体中,例如利用限制性酶在载体中制造用于插入构建体的切口,然后连接。然后将含有基因构建体的载体引入到适合的宿主中,用于表达融合蛋白(对于与这些方法相关的公开内容,参见Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第2版,1989))。

[0218] 适合的载体的选择可以在与克隆方案相关的多种因素的基础上凭经验做出。例如,载体应该与所使用的宿主相容并具有用于宿主的适合的复制子。此外,载体必须能够容纳编码待表达的融合蛋白复合物的DNA序列。适合的宿主细胞包括真核细胞和原核细胞,优选地为那些可以容易地转化并在培养基中表现出快速生长的细胞。具体而言,优选的宿主细胞包括原核生物例如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌等和真核生物例如动物细胞和酵母菌株例如酿酒酵母。哺乳类动物细胞通常是优选的,特别是J558、NS0、SP2-0或CHO。其他适合的宿主包括例如昆虫细胞如Sf9。使用常规的培养条件。参见Sambrook,同上。然后可以选择稳定的被转化或转染的细胞系。表达本发明的融合蛋白复合物的细胞可以通过已知的步骤确定。例如,与免疫球蛋白相连的融合蛋白复合物的表达可以通过特异性针对连接的免疫球蛋白的ELISA和/或通过免疫印迹法来确定。用于检测包含连接到IL15或IL15R结构域的生物活性多肽的融合蛋白的表达的其他方法公开在实施例中。

[0219] 宿主细胞可用于制备目的,以繁殖编码所需融合蛋白或其成分的核酸。宿主细胞可以包括具体打算在其中生产融合蛋白的原核或真核细胞。因此,宿主细胞具体地包括能够繁殖编码融合体的核酸的酵母、蝇、蠕虫、植物、蛙、哺乳动物细胞和器官。可以使用的哺

乳类动物细胞系的非限制性实施例包括CHO dhfr⁻细胞(Urlaub和Chasm, 1980Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:4216),293细胞(Graham等,1977J.Gen.Virol.,36:59)或骨髓瘤细胞例如SP2或NS0(Galfre和Milstein,1977J.Gen.Virol.,36:59)。

[0220] 能够繁殖编码所需融合蛋白复合物的核酸的宿主细胞涵盖非哺乳类动物真核细胞,包括昆虫(例如草地贪夜蛾(*Sp.frugiperda*))、酵母(例如酿酒酵母(*S.cerevisiae*)、裂殖酵母(*S.pombe*)、巴斯德毕赤酵母(*P.pastoris*)、乳酸克鲁维酵母(*K.lactis*)、多形汉逊酵母(*H.polymorpha*);正如Fleer,R.,1992Current Opinion in Biotechnology,3(5):486496)一般性综述的)、真菌和植物细胞。还设想了某些原核生物例如大肠杆菌和芽孢杆菌。

[0221] 编码所需融合蛋白的核酸可以通过用于转染细胞的标准技术引入到宿主细胞中。术语“转染”或“转染”打算涵盖用于将核酸引入到宿主细胞中的所有常规技术,包括磷酸钙共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂染、电穿孔、微注射、病毒转导和/或整合。

[0222] 根据本发明,可以使用各种不同的启动子(转录起始调控区)。适合的启动子的选择取决于提出的表达宿主。可以使用来自于异源来源的启动子,只要它们在所选宿主中有功能即可。

[0223] 启动子选择还取决于肽或蛋白质生产的所需效率和水平。为了显著提高大肠杆菌中的蛋白质表达水平,通常使用诱导型启动子例如tac。蛋白质过表达可能对宿主细胞有害。因此,宿主细胞生长可能受限。诱导型启动子系统的使用允许在基因表达的诱导之前将所述宿主细胞培养到可接受的密度,从而有助于更高的产物收率。

[0224] 根据本发明,可以使用各种不同的信号序列。可以使用与生物活性多肽编码序列同源的信号序列。可选地,也可以使用为在表达宿主中的高效分泌和加工而选择或设计的信号序列。信号序列可以通过编码信号肽酶切割位点的序列或通过短的核苷酸桥联结直接联结到所述蛋白质编码序列。

[0225] 表达构建体可以利用已知的重组DNA技术组装。限制性酶消化和连接是用于联结两个DNA片段的基本步骤。可以使用多接头和接合体来帮助所选片段的联结。表达构建体典型地可以在利用多轮的限制、连接和大肠杆菌的转化的阶段中组装。适合于表达构建体的构建的大量克隆载体在本领域中是已知的(λ ZAP and pBLUESCRIPT SK-1,Stratagene,La Jolla,Calif.,pET,Novagen Inc.,Madison,Wis.,pEE12.4,Lonza Biologics,Basel,Switzerland)。

[0226] 表达构建体可以随着直链或环状的克隆载体构建体转化到宿主中,或者可以从克隆载体取下并原样使用或引入到递送载体上。递送载体便于表达构建体在所选的宿主细胞类型中的引入和维持。表达构建体通过任何已知的基因转移系统(例如天然感受态、化学物介导的转化、原生质体转化、电穿孔、生物弹射转化、转染或接合)引入到宿主细胞中。所选的基因转移系统依赖于所使用的宿主细胞和载体系统。

[0227] 本发明还提供了分离目的融合蛋白的生产方法。在所述方法中,将其中引入有可操作连接到调控序列的编码目的蛋白质的核酸的宿主细胞(例如酵母、真菌、昆虫、细菌或动物细胞)以生产规模在培养基中生长,以刺激编码目的融合蛋白的核苷酸序列的转录。随后,从收获的宿主细胞或从培养基分离目的融合蛋白。可以使用标准的蛋白质纯化技术从培养基或所述收获的细胞分离目的蛋白质。具体而言,纯化技术可用于从各种不同的设备

(包括滚瓶、旋转摇瓶、组织培养板、生物反应器或发酵罐)大规模地(即以至少毫克的量)表达和纯化所需的融合蛋白。

[0228] 可以通过已知方法分离和纯化表达的蛋白质融合复合物。通常,将培养基离心或过滤,然后将上清液通过亲和或免疫亲和层析进行纯化,例如蛋白A或蛋白G亲和层析或包括使用结合表达的融合复合物(例如连接的TCR或其免疫球蛋白区域)的单克隆抗体的免疫亲和方案。本发明的融合蛋白可以通过已知技术的适当组合来分离和纯化。这些方法包括例如利用溶解度的方法例如盐沉淀和溶剂沉淀,利用分子量差异的方法例如透析、超滤、凝胶过滤和SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,利用电荷差异的方法例如离子交换柱层析,利用特异性亲和的方法例如亲和层析,利用疏水性差异的方法例如反相高效液相色谱,以及利用等电点差异的方法例如等电聚焦电泳,金属亲和柱例如Ni-NTA(对于与这些方法相关的公开内容,参见Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(2nd ed.(1989);和Ausubel等,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,New York(1989))。

[0229] 优选地,本发明的融合蛋白基本上是纯的。也就是说,融合蛋白已与天然与其相伴的细胞组成成分分离开,使得融合蛋白优选地以至少80%或90%至95%的均质性(w/w)存在。对于许多制药、临床和研究应用来说,具有至少98%至99%均质性(w/w)的融合蛋白是最优选的。一旦基本上纯化后,融合蛋白应该基本上不含治疗性应用的污染物。一旦部分纯化或纯化到显著纯度,可溶性融合蛋白可以治疗性使用或用于执行本文中所公开的体外或体内测定法。显著纯度可以通过各种不同的标准技术例如层析和凝胶电泳来确定。

[0230] 本发明还提供了包含治疗有效量的根据本发明所述的组合物、融合蛋白、多核苷酸、基因构建体、载体或宿主细胞以及药学上可接受的赋形剂或介质的药物制剂。

[0231] 用于本发明的优选赋形剂包括糖类、淀粉、纤维素、树胶和蛋白质。在优选的实施方式中,本发明的药物组合物被配制成药剂形式,用于作为固体(例如片剂、胶囊、含片、颗粒剂、栓剂、可以重构以提供液体形式的结晶或无定形无菌固体等)、液体(例如溶液、悬液、乳液、酏剂、洗剂、油剂等)或半固体(凝胶、软膏、霜剂等)给药。本发明的药物组合物可以通过任何途径给药,包括但不限于口服、静脉内、肌肉内、动脉内、髓内、囊内、脑室内、透皮、皮下、腹膜内、鼻内、肠、局部、舌下或直肠途径。活性成分的不同给药形式、待使用的赋形剂和它们的制造步骤的修订本,可以在Remington's Pharmaceutical Sciences,第20版,Williams&Wilkins PA,USA(2000)中找到。药学上可接受的介质的实施例在现有技术状态中是已知的,并且包括用磷酸盐缓冲的盐水溶液、水、乳液例如油/水乳液、不同类型的湿化剂、无菌溶液等。包含所述介质的组合物可以通过现有技术状态中已知的常规步骤来配制。

[0232] 在本发明的药物组合物包含核酸(本发明的多核苷酸、载体或基因构建体)的情况下,本发明设想了用于给药所述核酸的特别制备的药物组合物。药物组合物可以包含裸露形式的核酸,换句话说,不存在保护核酸免于被生物体的核酸酶降解的化合物,这具有消除与用于转染的试剂相关的毒性的优点。对于裸露的化合物来说,适合的给药途径包括血管内、肿瘤内、颅内、腹膜内、脾内、肌肉内、视网膜下、皮下、粘膜、局部和口服途径(Templeton,2002DNA Cell Biol.,21:857-867)。可选地,核酸可以形成脂质体的一部分、偶联到胆甾醇或偶联到能够促进通过细胞膜的易位的化合物来给药,所述能够促进通过细胞膜的易位的化合物例如源自于HIV-1的TAT蛋白的Tat肽、黑腹果蝇(D.melanogaster)的

触角足蛋白的同源域的第三螺旋、单纯性疱疹病毒的VP22蛋白、精氨酸的寡聚物和例如在W007069090中描述的肽(Lindgren等,2000Trends Pharmacol.Sci 21:99-103;Schwarze等,2000Trends Pharmacol.Sci.21:45-48;Lundberg等,2003Mol.Therapy 8:143-150;以及Snyder等,2004Pharm.Res.21:389-393)。可选地,多核苷酸可以形成质粒载体或病毒载体、优选地为基于腺病毒的载体的一部分、在腺相关病毒中或在反转录病毒例如基于鼠类白血病病毒(MLV)的病毒中或在慢病毒(HIV、FIV、EIAV)上给药。

[0233] 本发明的组合物可以以低于10mg/千克体重、优选地低于5、2、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005或0.00001mg/kg体重,并低于200nmol药剂的剂量给药、换句话说以大约 4.4×10^{16} 个拷贝/kg体重或低于1500、750、300、150、75、15、7.5、1.5、0.75、0.15或0.075nmol/Kg体重的剂量给药。单位剂量可以通过注射、吸入或局部施用来给药。本发明的双功能多核苷酸和组合物可以被直接给药到靶mRNA在其中表达的器官中,在这种情况下,将给药的剂量为0.00001mg至3mg/器官之间,或优选地为0.0001至0.001mg/器官、约0.03至3.0mg/器官、约0.1至3.0mg/器官之间,或0.3至3.0mg/器官之间。

[0234] 剂量将取决于待治疗的病症的严重性和对所述病症的反应,并且可以在几天至几个月之间变化或直至观察到所述病症缓解为止。最佳剂量可以通过定期测量患者生物体中药剂的浓度来确定。最佳剂量可以从通过事先通过动物模型中的体外或体内测试获得的EC50值来确定。单位剂量可以每天一次或低于每天一次,优选地低于每2、4、8或30天一次给药。可选地,可以给药初始剂量,然后给药一次或几次通常比初始剂量更低的量的维持剂量。维持方案可以包括用范围在0.01 μ g至1.4mg/kg体重/天之间,例如1、0.1、0.01、0.001或0.00001mg/kg体重/天的剂量治疗所述患者。维持剂量优选地最多每5、10或30天给药一次。治疗必须持续一段时间,所述时间根据所述患者经历的改变的类型、其严重程度和患者的状况而变。在治疗后,必须监测所述患者的演变,以便确定在所述疾病对所述治疗无响应的情况下是否应该提高剂量,或在观察到疾病的改善或不想要的次级效应的情况下是否应该降低剂量。

[0235] 根据具体情况,每日剂量可以在单次给药中或在两次或更多次给药中给药。如果需要重复给药或频繁给药,可以建议植入给药装置例如泵、半永久性导管(静脉内、腹膜内、脑池内或囊内)或储存器。

[0236] 本发明的组合物按照本领域专家已知的方法给药,包括但不限于静脉内、口服、鼻、肠胃外、局部、透皮、直肠等方式给药。

[0237] 下面的实施例旨在说明本发明的实践而不是以任何方式限制它。

[0238] 实施例

[0239] 下面的实施例描述了根据本公开的发明制备的化合物的某些示例性实施方式。应当理解,下述通用方法和本领域普通技术人员已知的其他方法,可以应用于本文中所公开的化合物及其亚类和物质。

[0240] IL15-R α -Fc全身给药后肿瘤控制不佳且毒性强

[0241] 我们提出肿瘤内IL-15分泌不足可能是T细胞介导的肿瘤生长失败的原因之一。在人类皮肤黑色素瘤癌症样本中,高CD8⁺T细胞浸润总是与高IL-15水平相关(图7A)。此外,肿瘤内的CD8⁺T细胞数量和IL-15表达水平都与人类癌症患者更好的生存率呈正相关(图7B和图7C)。这些数据表明,IL-15可有助于CD8⁺T细胞浸润和肿瘤抑制。

[0242] 因此,我们探讨了提供额外的IL-15来扩增T细胞是否可以改善肿瘤控制。鉴于IL-15的反式呈递作用机制,据报道,与IL-15Rasushi结构域融合的IL-15(超级IL-15)比单独的IL-15具有提高的活性和稳定性。据报道,Fc融合通过二聚化增加体内半衰期和结合亲和力。我们一起设计并生成了IL-15-Fc和IL-15-IL15R α -Fc(超级IL-15-Fc或sIL-15-Fc)蛋白。sIL-15-Fc具有比IL-15-Fc蛋白高100倍的活性,如体外CTLL2扩增测定所示(图8A)。一致地,在A20模型中,sIL-15-Fc比IL-15-Fc具有更好的肿瘤控制效果(图8B)。尽管体外活性相似,但sIL-15-Fc比sIL-15-Fc-his具有更好的肿瘤控制,这表明Fc融合确实增加了其体内稳定性(图1A和图1B)。在临床和实验动物肿瘤模型中,单独的IL-15治疗显示出相当有限的疗效,但在治疗剂量下具有显著的毒性。一致地,我们观察到超级IL-15-Fc只能部分控制A20肿瘤模型中的肿瘤生长(图1B)。当剂量增加时,严重的全身性毒性变得明显,包括体重减轻和存活率下降(图1C和图1D)。

[0243] 在超级IL-15-Fc治疗后,发现外周血CD8⁺T细胞、NK细胞和NKT细胞明显增多(图9A)。在超级IL-15-Fc处理后,CD4⁺T细胞的数量不受影响(图9A)。尽管据报道CD8⁺T细胞和NK细胞有助于抑制肿瘤,但各种T细胞和NK细胞的全身活化可导致肿瘤外毒性。为了探索哪些免疫细胞介导毒性,我们使用抗体分别耗竭CD8⁺T、NK、NKT或CD4⁺T。CD8⁺T或CD4⁺T细胞的耗竭不影响sIL-15-Fc治疗的小鼠的存活情况,这表明CD8⁺T或CD4⁺T细胞不是必需的(图9B和图9C)。然而,抗NK1.1抗体的施用防止了小鼠死于sIL-15-Fc治疗(图9D)。抗NK1.1(克隆PK136)抗体可以耗竭NK和NKT。为了进一步说明NK或NKT是否有害,我们使用抗去唾液酸GM1抗体仅耗竭NK而不是NK(图1C)。只有NK的耗竭完全保护了小鼠,这表明NK细胞是sIL-15-Fc诱导毒性的主要细胞成分(图1F和图1G)。这些数据表明全身给药的sIL-15-Fc诱导的肿瘤外毒性介导的外周血NK扩增,这在临床上应慎重考虑。

[0244] 工程化肿瘤条件pro-IL15

[0245] 在MC38和A20肿瘤模型中,通过瘤内注射局部递送的超级-IL-15-Fc获得了比全身性治疗更好的肿瘤控制效果(图2A和图10A)。这些数据表明,如果靶向递送到TME中,那么sIL-15-Fc可能对毒性有限的肿瘤更有效。为了设计可以在TME内优先活化的IL-15,我们创建了pro-IL-15,在此期间,IL15R β 的胞外结构域通过MMP-14可切割肽接头融合到sIL-15-Fc的N端。与许多可溶且易于全身渗漏的MMP相比,MMP-14是一种膜蛋白,在肿瘤细胞和肿瘤相关巨噬细胞上高表达并停留在肿瘤组织内。我们选择了一种可以被MMP-14蛋白酶切割的非常敏感的接头作为在富含MMP的肿瘤微环境中暴露IL-15的开关(图2B)。为了在接头切割后优化活性IL-15的释放,我们还设计了结合减少的IL15R β (R β D1)胞外结构域与pro-IL15的结合(图2B)。

[0246] 还原性SDS-PAGE结果显示,单体sIL15-Fc的分子量约为65Kd,pro-IL-15约为85Kd,均大于预期,这可能是糖基化所致(图2C和图10B)。在与MMP-14一起孵育后,pro-IL-15被切割成sIL-15-Fc(图2C和图10B)。然后我们通过CTLL-2增殖试验比较了切割前后pro-IL-15的生物活性。sIL-15-Fc可以以剂量依赖的方式增殖CTLL-2细胞(图2D)。具有R β 的pro-IL-15的活性比超级-IL-15降低100倍,而具有R β D1的pro-IL-15具有降低约50倍的活性(图2D中的R β D1和图10C中的R β)。在与MMP-14一起孵育后,两种形式的pro-IL-15的活性都恢复了与sIL-15-Fc相当的活性。在同基因MC38肿瘤模型中,与R β (D1+D2)相比,具有R β D1的pro-IL-15对肿瘤生长的抑制效果要好得多,这表明具有R β D1的pro-IL-15在体内具有优

化的活性(图2E)。

[0247] pro-IL15避免外周血NK扩增介导的毒性

[0248] 我们提出pro-IL-15的设计将避免外周血淋巴细胞的扩增并诱导较少的毒性。为了证实这一点,我们向小鼠施用致死剂量的sIL-15-Fc或类似分子的pro-IL-15。80 μ g sIL-15-Fc诱导显著的体重减轻,最终70%的小鼠在治疗后约5天死亡(图3A)。然而,pro-IL-15治疗的小鼠在短暂的轻微体重减轻后恢复正常,并且没有小鼠死亡(图3A和图3B)。为了进一步表征由细胞因子治疗引起的毒性,我们在荷瘤小鼠治疗后24小时和96小时对丙氨酸氨基转移酶(ALT,肝损伤标志物)和天冬氨酸氨基转移酶(AST,组织损伤标志物)进行了血液化学分析。sIL-15-Fc提高了血清ALT和AST的活性,但pro-IL-15没有(图3C和图3D)。sIL-15-Fc增加了血清炎性细胞因子例如IFN- γ 、MCP-1和IL-6,但pro-IL-15没有诱导炎性细胞因子(图3E)。一致地,与sIL-15-Fc诱导外周血中NK细胞的急剧增加相反,pro-IL-15诱导的NK扩增要少得多(图3F)。外周血淋巴细胞的扩增可能会损害外周血实体器官,例如肝组织。实际上,sIL-15-Fc诱导了相当数量的免疫细胞浸润到肝组织中(图11C)。然而,pro-IL-15治疗未诱导肝脏炎症,正常显示为对照小鼠(图11C)。pro-IL-15和sIL-15-Fc的血清半衰期相似,表明外周血pro-IL-15毒性降低不是由蛋白质不稳定性引起的(图11D)。为了确认外周血组织中pro-IL-15的降低的生物活性,我们比较了它们与淋巴细胞的结合能力。sIL-15-Fc显示出与脾脏NK、NKT和CD8⁺T细胞的强结合,而与CD4⁺T细胞很少结合(图12)。然而,与sIL-15-Fc相比,pro-IL-15与脾脏NK和NKT细胞的结合弱得多(图12)。总之,与sIL-15-Fc相比,pro-IL-15诱导了的外周血淋巴细胞扩增和毒性要小得多。

[0249] pro-IL15保留了抗肿瘤活性

[0250] 肿瘤组织内淋巴细胞的扩增对于抑制和根除肿瘤至关重要。我们接下来试图探索pro-IL-15是否仍然靶向和抑制肿瘤生长。生物发光数据显示pro-IL-15可以在肿瘤组织内积聚(图4A)。与血液相比,pro-IL15蛋白在肿瘤组织内优先被消化(图4B)。接下来,我们比较了抗肿瘤作用。通过静脉注射sIL-15-Fc或pro-IL-15蛋白来治疗MC38或A20荷瘤小鼠。如图所示,这两种蛋白质均能有效抑制肿瘤生长,延长小鼠存活时间(图4C和图4D)。这些数据表明pro-IL-15可以在肿瘤组织内积累和活化,并有效抑制肿瘤生长。

[0251] 为了测试哪些细胞有助于pro-IL-15介导实体瘤控制,通过抗体分别耗竭不同的免疫细胞。当NK或NKT细胞被耗竭时,pro-IL-15的抗肿瘤作用没有受到损害(图5A)。相反,CD4⁺T和CD8⁺T细胞的耗竭完全消除了pro-IL-15的抗肿瘤作用,这表明T淋巴细胞是必需的(图13A)。单独的CD4⁺T细胞的耗竭不影响pro-IL-15对肿瘤的抑制作用,表明CD4⁺T细胞不是必需的(图13B)。进一步的研究表明,CD8⁺T细胞对于介导IL-15介导的肿瘤控制是必需的(图5B)。我们进一步检查了pro-IL-15治疗后肿瘤组织内CD8⁺T细胞的数量变化。结果显示pro-IL-15显著增加了肿瘤组织中的效应CD8⁺T细胞(图5C)。我们接下来想确定肿瘤内增加的CD8⁺T细胞是来自肿瘤内预先存在的T细胞的扩增,还是新活化的T细胞从外周血淋巴组织迁移到肿瘤中。在利用FTY720阻断外周血淋巴细胞向肿瘤组织迁移时,pro-IL-15仍保持与非FTY720处理组相似的抗肿瘤能力(图5D)。这些数据表明,pro-IL-15扩增肿瘤特异性CD8⁺T细胞,这对于抑制肿瘤生长是必需且足够的。IFN- γ 是T细胞的一种效应细胞因子。为了测试IFN- γ 是否有助于pro-IL-15介导实体瘤控制,在pro-IL-15治疗期间用抗IFN- γ 阻断抗体治疗小鼠,这导致完全消除了抗肿瘤作用,表明了干扰素- γ 的重要作用。最近的研

究表明,肿瘤内的TCF1⁺TIM3⁻T细胞表现出干细胞样表型并且更有效地扩增。在pro-IL-15治疗后,肿瘤组织内干细胞样CD8⁺T细胞的百分比和数量均增加(图5F)。而末端耗尽的CD8⁺T(PD-1⁺Tim3⁺)细胞减少(图5G)。这些结果表明,pro-IL-15扩增干细胞样CD8⁺T细胞并减少肿瘤内末端耗尽的CD8⁺T细胞。

[0252] pro-IL-15与检查点阻断协同控制晚期肿瘤

[0253] 单独的IL-15治疗在动物模型和临床中均显示出有限的抗肿瘤作用,这表明存在其他潜在的免疫抑制机制。在IL-15治疗后,我们观察到骨髓MDSC的百分比和绝对数量均显著增加(图6A)。由于肿瘤组织内的骨髓细胞是表达高PD-L1分子的主要细胞亚群,因此我们检查了PD-L1表达谱。在IL-15治疗后,MDSC中PD-L1的表达高度上调(图6B)。在IL-15治疗后,CD45-肿瘤细胞表达的PD-L1水平远低于髓源性抑制(MDSC)细胞(图6B)。我们推测阻断PD-L1可以改善肿瘤特异性T细胞反应,而额外的抗PD-L1抗体与IL-15可以实现放大的抗肿瘤作用。为了验证这一假设,从第12天(此时,肿瘤已完全建立)开始用pro-IL-15或抗PD-L1治疗MC38荷瘤小鼠。抗PD-L1或pro-IL-15都只能部分控制肿瘤生长,但该组合显著增强了肿瘤控制(图6C)。在联合治疗组中,60%的小鼠最终实现了无瘤生存,而单独治疗组中只有10%的小鼠无瘤(图6D)。我们接下来探索了抗PD-L1和pro-IL-15联合治疗是否有助于建立延长的保护性免疫并防止肿瘤复发,这在临床上很有价值。用致死剂量的MC38细胞再次攻击联合治疗后肿瘤完全消退的小鼠。所有先前肿瘤清除的小鼠都拒绝了再次攻击的肿瘤,显示出强烈的记忆反应(图6E)。

[0254] 材料和方法

[0255] 小鼠

[0256] 雌性(6-8周龄)BALB/c和C57BL/6小鼠购自Vital River Laboratories(中国北京)。所有小鼠都在生物物理研究所的动物设施中保持在特定的无病原体(SPF)条件下。动物护理和实验是按照中国科学院生物物理研究所的指导方针进行的,使用实验动物管理和使用委员会批准的方案。

[0257] 细胞系和试剂

[0258] 293F细胞由徐霆博士(中国江苏苏州Alphamab)提供,并在SMM 293-TI培养基(M293TI,义翘神州)中生长。A20和MC38细胞系购自ATCC(Manassas,VA)。MC38在5%CO₂中培养并体外维持在Dulbecco改性得Eagle培养基中,补充10%热灭活胎牛血清、2mmol/l L-谷氨酰胺、0.1mmol/l最低必需培养基非必需氨基酸、100U/ml青霉素和100mg/ml链霉素。A20细胞和CTLL-2细胞体外维持在RPMI 1640培养基中。抗PD-L1 Ab(10F.9G2)和抗IFN- γ Ab(R4-6A2)购自BioXCell(西黎巴嫩,NH)。内部生产抗CD8 Ab(TIB210)、抗CD4 Ab(GK1.5)、Fc γ RII/III阻断Ab(2.4G2)和抗NK1.1Ab(PK136)。抗去唾液酸-GM1 Ab(Poly21460)购自Biolegend。FTY720购自Sigma。

[0259] IL-15和pro-IL-15融合蛋白的生产

[0260] IL-15-R α -Fc:编码小鼠IL-15成熟小鼠和IL-15R α -sushi结构域(氨基酸1-78)序列的cDNA由26个氨基酸接头(SGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQ)融合。使用人IgG κ 前导序列和hIgG1 Fc的信号肽。然后将整个序列克隆到pEE12.4载体(Lonza)中。pro-IL-15:编码小鼠IL-15R β EDC或IL-15R β D1和IL-15-R α -Fc的cDNA由20个氨基酸融合接头(GGGGSSGFIANPVTAGGGGS)。然后将整个序列克隆到pEE12.4载体(Lonza)中。将质粒瞬时转

染到293F细胞中。在转染后第7天收集上清液。根据手册 (Repligen Corporation) 使用蛋白 A-琼脂糖柱纯化融合蛋白。

[0261] 毒性

[0262] 在肿瘤接种后第8天和第11天,通过静脉注射致死剂量的sIL-15-Fc (80μg或0.8μmol) 或类似分子的pro-IL-15来治疗MC38皮下荷瘤的C57BL/6小鼠。监测小鼠的体重变化。在第一次治疗后的第1天和第4天定量外周血清中的ALT和AST水平。在第一次治疗后24小时收集的血液中的细胞因子水平通过流式细胞术微球阵列法 (CBA) 测量。第一次治疗后4天,处死小鼠并收集肝组织进行HE染色。

[0263] pro-IL15的体外消化条件

[0264] rhMMP-14 (R&D系统) 在37℃下用rhFurin在活化缓冲液 (50mM Tris, 1mM CaCl₂, 0.5% (w/v) Brij-35, pH 9.0) 中活化2小时。pro-IL-15与活化的MMP14在测定缓冲液 (50mM Tris, 3mM CaCl₂, 1μM ZnCl₂, pH 7.5) 中在37℃下共培养12小时。通过还原的SDS-PAGE鉴定蛋白质切割,并通过CTLL-2增殖试验检测pro-IL-15的释放活性。

[0265] CTLL-2增殖试验

[0266] 使用CTLL-2细胞测量功能性IL-15。在96孔板中每孔加入100μL经连续稀释的纯化蛋白或MMP切割产物,然后加入100μL培养基中的3000个CTLL-2细胞,并在37℃、5%CO₂下孵育72小时。添加20μL CCK8 (CCK-8试剂盒) 并将板在37℃和5%CO₂中孵育3-4小时。在450nm处读取吸光度。

[0267] 荧光成像

[0268] pro-IL-15用Cy5.5标记,纯化的。将25μg荧光标记的pro-IL-15静脉注射到MC38皮下荷瘤的C57BL/6小鼠中。在不同时间点用IVIS光谱测量荧光。

[0269] 流式细胞术

[0270] 收集肿瘤组织,切成小块,并重新悬浮在消化缓冲液中 (RPMI-1640培养基,含有1mg/ml IV型胶原酶和100μg/mL脱氧核糖核酸酶I)。肿瘤在37℃消化45分钟,然后通过70μm细胞过滤器制成单细胞悬液。悬浮在FACS缓冲液 (1%牛血清白蛋白和0.05%NaN₃) 中的细胞用抗CD16/32Ab (抗Fc γ III/II受体,克隆2.4G2) 阻断30分钟,然后在冰上用特异性抗体染色30分钟。对于细胞内TCF-1染色,将样品固定、透化并用抗小鼠TCF-1染色。所有荧光标记mAb均购自BioLegend或eBioscience。DAPI或LIVE/DEADTM可固定黄色染料 (ThermoFisher) 用于排除死细胞。在FACSCalibur或Fortessa流式细胞仪 (BD Biosciences) 上分析样品。使用FlowJo软件 (TreeStar) 分析数据。

[0271] 肿瘤生长和治疗

[0272] 将大约 $2-5 \times 10^5$ 个MC38皮下注射到C57BL/6小鼠的右侧。将A20细胞 (3×10^6 个) 皮下注射到Balb/c小鼠的右侧。测量和计算肿瘤体积 (长×宽×高/2)。肿瘤形成后,用sIL15-Fc或pro-IL-15治疗小鼠。为了耗竭不同类型的细胞,在pro-IL-15或sIL-15-Fc治疗的同一天并且此后每4天,腹腔注射200μg的剂量的抗CD8 Ab (克隆TIB210) 或抗CD4 Ab (克隆GK1.5)。在pro-IL-15或sIL-15-Fc治疗的同一天以及之后每4天以400μg的剂量腹腔注射抗NK1.1 Ab (克隆PK136)。在pro-IL-15或sIL-15-Fc治疗的同一天以及之后每4天,以20μl的剂量腹腔注射抗去唾液酸GM1 Ab。为了阻断IFN-γ,在pro-IL-15治疗的同一天和之后每4天以500μg的剂量腹腔注射抗IFN-γ Ab (克隆R4-6A2)。为阻断淋巴细胞运输,每隔一天给小

鼠腹腔注射25μgFTY720和20μg FTY720以维持阻断。

[0273] 统计分析

[0274] 数据显示为平均值±SEM。使用未配对的学生双尾t检验比较统计分析。使用GraphPad Prism 5.0版(GraphPad软件)进行分析。 $p<0.05$ 、 $p<0.01$ 和 $p<0.001$ 的统计学显著差异分别用*、**和***表示。

[0275] SEQ列表

[0276] SEQ ID No.1:hIL15

[0277] NWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL
ANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHVHIVQMFINTS

[0278] SEQ ID No.2:hIgG1Fc (Fcdw)

[0279] EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0280] SEQ ID No.3:hIgG1Fc突变 (Fcdm)

[0281] EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0282] SEQ ID No.4:hRa (sushi结构域)

[0283] ITCPPMSVEHADIWVKSYSYLSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPA
L VHQRPA

[0284] SEQ ID No.5:hRb (27aa~240aa)

[0285] AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDGALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDS
QKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRLMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTL
SPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPAALGKDT

[0286] SEQ ID No.6:hRb (27aa~234aa)

[0287] AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDGALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDS
QKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRLMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTL
SPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPA

[0288] SEQ ID No.7:hRb (32aa~240aa)

[0289] SQFTCFYNSRANISCVWSQDGALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTT
VDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRLMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHT
WEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPAALGKDT

[0290] SEQ ID No.8:hRb (32aa~234aa)

[0291] SQFTCFYNSRANISCVWSQDGALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTT
VDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRLMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHT
WEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPA

[0292] SEQ ID No.9:hRb (27aa~125aa)

- [0293] AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDQALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDS
QKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFK
- [0294] SEQ ID No.10:hRb (27aa~128aa)
- [0295] AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDQALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDS
QKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFE
- [0296] SEQ ID No.11:hRb (27aa~137aa)
- [0297] AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDQALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDS
QKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRMAPIS
- [0298] SEQ ID No.12:hRb (32aa~137aa)
- [0299] SQFTCFYNSRANISCVWSQDQALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTT
VDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRMAPIS
- [0300] SEQ ID No.13:hRb (83aa~214aa)
- [0301] SQASWACNLILGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRMAPISLQVHVETHRC
NISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDTQYEFQVRVKPLQ
- [0302] SEQ ID No.14:hRb (83aa~234aa)
- [0303] SQASWACNLILGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRMAPISLQVHVETHRC
NISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQ
PLAFRTKPA
- [0304] SEQ ID No.15:hRb (83aa~240aa)
- [0305] SQASWACNLILGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRMAPISLQVHVETHRC
NISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQ
PLAFRTKPAALGKDT
- [0306] SEQ ID No.16:L1:不可切割的接头。n=1~10
- [0307] L1.1: (G2S) n;
- [0308] L1.2: (G3S) n;
- [0309] L1.3: (G4S) n;
- [0310] L1.4:SGGGSGGGGS GGGSGGGGS GGGSLQ
- [0311] SEQ ID No.17:短的可切割接头 (L2) ,包括:
- [0312] L2.0: L1-SGRSPAIFTA-L1
- [0313] L2.1: L1-SGRSENIRTA-L1
- [0314] L2.2: L1-SGARYRWLTA-L1
- [0315] L2.3: L1-SGRSYAILTA-L1
- [0316] L2.4: L1-SGRAMHMYTA-L1
- [0317] L2.5: L1-SPVGLIG-L1
- [0318] L2.6: L1-SGRIGFLRTA-L1
- [0319] L2.7: L1-SGAIGFLRTA-L1
- [0320] L2.8: L1-SGAAMHMYTA-L1
- [0321] L2.9: L1-SGASENIRTA-L1
- [0322] L2.10: L1-SGRPENIRTA-L1

[0323] L2.11: L1-SGAPENIRTA-L1

[0324] L2.12: L1-SGLISHSITA-L1

[0325] L2.13: L1-SGNLRSKLTA-L1

[0326] L2.14: L1-SGVFSIPLTA-L1

[0327] L2.15: L1-SGIKYHSLTA-L1

[0328] SEQ ID No.18:长的可切割接头(L2L),作为实施例由以下两个短的接头组成,但不排除其他组合:

L2L.0.1 L1-SGRSPAIFTA-L1-SGRSENIRTA-L1

L2L.1.0 L1-SGRSENIRTA-L1-SGRSPAIFTA-L1

L2L.2.1 L1-SGARYRWLTA-L1-SGRSENIRTA-L1

L2L.1.2 L1-SGRSENIRTA-L1-SGARYRWLTA-L1

L2L.4.1 L1-SGRAMHMYTA-L1-SGRSENIRTA-L1

L2L.1.4 L1-SGRAMHMYTA-L1-SGRAMHMYTA-L1

L2L.0.2 L1-SGRSPAIFTA-L1-SGARYRWLTA-L1

L2L.2.0 L1-SGARYRWLTA-L1-SGRSPAIFTA-L1

[0329] L2L.0.3 L1-SGRSPAIFTA-L1-SGRSYAILTA-L1

L2L.3.0 L1-SGRSYAILTA-L1-SGRSPAIFTA-L1

L2L.0.4 L1-SGRSPAIFTA-L1-SGRAMHMYTA-L1

L2L.4.0 L1-SGRAMHMYTA-L1-SGRSPAIFTA-L1

L2L.2.3 L1-SGARYRWLTA-L1-SGRSYAILTA-L1

L2L.3.2 L1-SGRSYAILTA-L1-SGARYRWLTA-L1

L2L.2.4 L1-SGARYRWLTA-L1-SGRAMHMYTA-L1

L2L.4.2 L1-SGRAMHMYTA-L1-SGARYRWLTA-L1

L2L.3.4 L1-SGRSYAILTA-L1-SGRAMHMYTA-L1

L2L.4.3 L1-SGRAMHMYTA-L1-SGRSYAILTA-L1

[0330] SEQ ID No.19:CH1:

[0331] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC

[0332] SEQ ID No.20:CL

[0333] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

[0334] 示意图:

[0335] 模型A:

[0336] 1100:对照

[0337] hIL15-Ra-L1-Fc (dw, dm)

[0338] 1023, 1102, 1172, 1188 (L2.0) 1191 (L2L)

[0339] Rb (DM1~2) -L2-hIL15-L1-Ra-L1-Fc (dw, dm)

[0340] Rb (DM1~2) -L2L-hIL15-L1-Ra-L1-Fc (dw, dm)

[0341] 模型B:

[0342] IL15-CH1-L1-Fc (dw, dm) +Ra-CL (对照)

[0343] Rb (DM1~2) -L2或L2L-IL15-L1-CH1-Fc (dw, dm) +Ra-CL

[0344] 申请人的公开内容在本文中参考附图描述在优选实施方式中,在所述附图中,相同的数字代表相同或相似的要素。在整个本说明书中对“一个实施方式”、“实施方式”的指称或类似的语言意味着与所述实施方式相关联描述的特定特点、结构或特征被包括在本发明的至少一个实施方式中。因此,在整个本说明书中短语“在一个实施方式中”、“在实施方式中”和类似语言的出现可能但不一定都指相同的实施方式。

[0345] 申请人公开的所描述的特点、结构或特征可以以任何合适的方式组合在一个或多个实施方式中。在说明书中,这里列举了许多具体细节以提供对本发明实施方式的透彻理解。然而,相关领域的技术人员将会认识到,本申请人的组合物和/或方法可以在没有多个或多个所述具体细节的情况下或使用其他方法、组分、材料等来实践。在其他情况下,公知的结构、材料或操作未被示出或详细描述,以避免使本公开的方面模糊不清。

[0346] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语均具有与本领域普通技术人员通常理解的相同的含义。尽管与本文中描述的相似或等同的任何方法和材料也可用于本公开的实践或试验,但现在描述了优选的方法和材料。本文中记载的方法除了以公开的特定顺序进行之外,也可以以逻辑上可能的任何顺序进行。

[0347] 通过引用并入

[0348] 在本公开中对其他文件例如专利、专利申请、专利公布、期刊、书籍、论文、网页内容做出了参考和引用。所有这些文件为所有目的整体通过引用并入本文。被称为通过引用并入本文但与本文中明确阐述的现有定义、陈述或其他公开材料冲突的任何材料或其部分,仅以在所述并入的材料与本公开的材料之间不产生冲突的程度上并入。在有冲突的情况下,所述冲突将以有利于本公开作为优选公开的方式解决。

[0349] 等同物

[0350] 代表性实施例旨在帮助说明本发明,并不打算并且它们也不应被解释为限制本发明的范围。事实上,对于本领域技术人员来说,从本文件的全部内容(包括实施例和对本文中包括的科学和专利文献的引用),除了本文中示出和描述的之外,本发明的各种不同修改及其许多其他实施方式也将变得显而易见。实施例含有重要的附加信息、示例和指导,它们可以被改编以在本发明的各种不同实施方式及其等同方式中适应于本发明的实践。

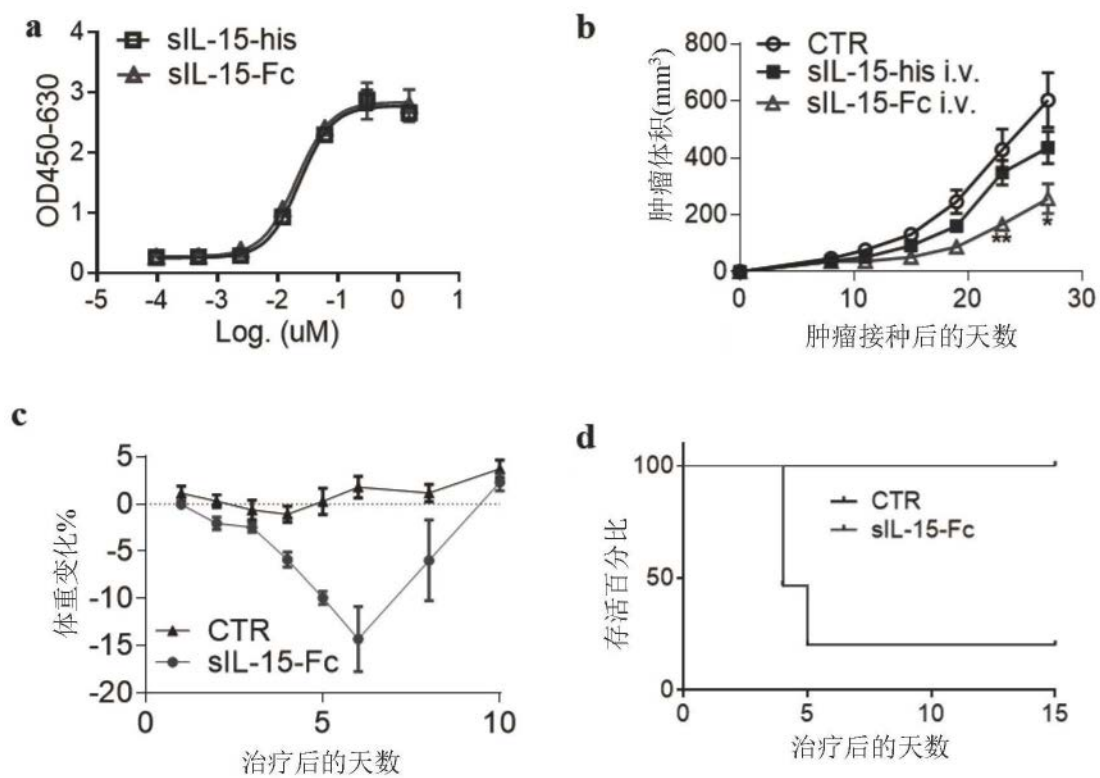


图1

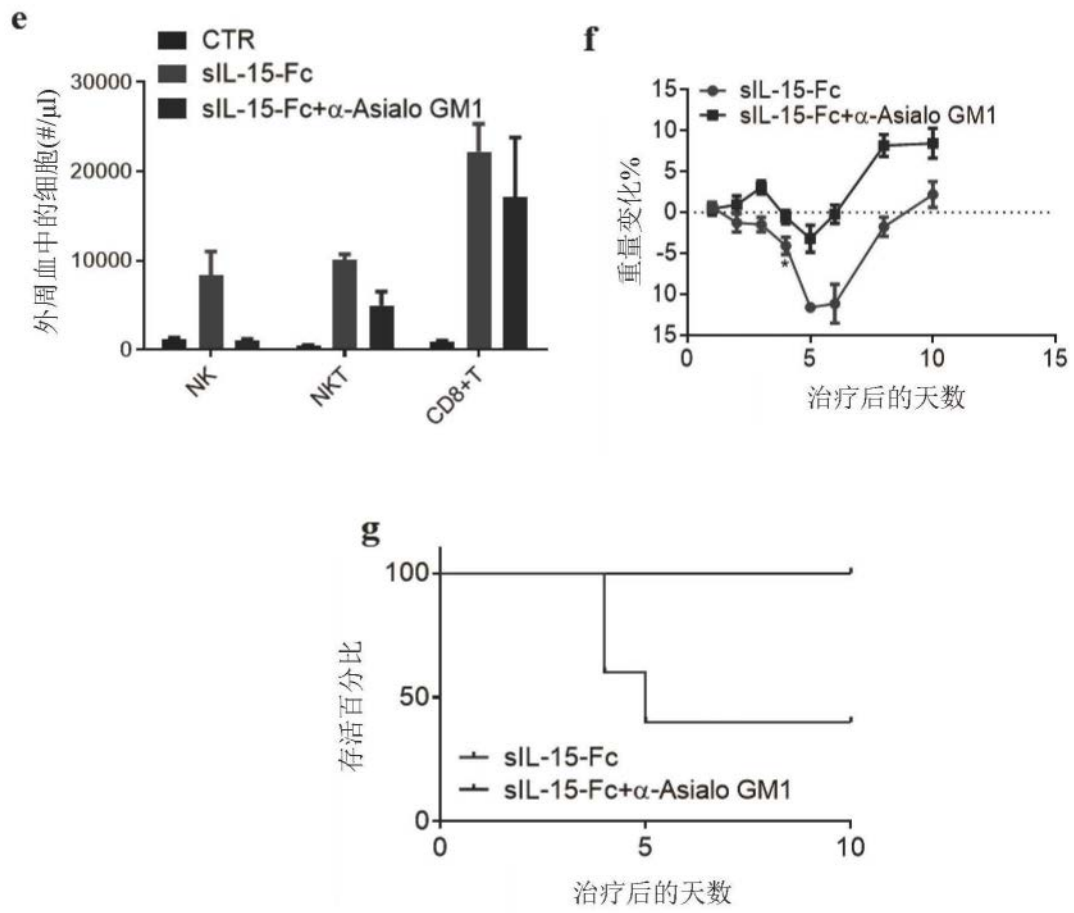


图1 (续)

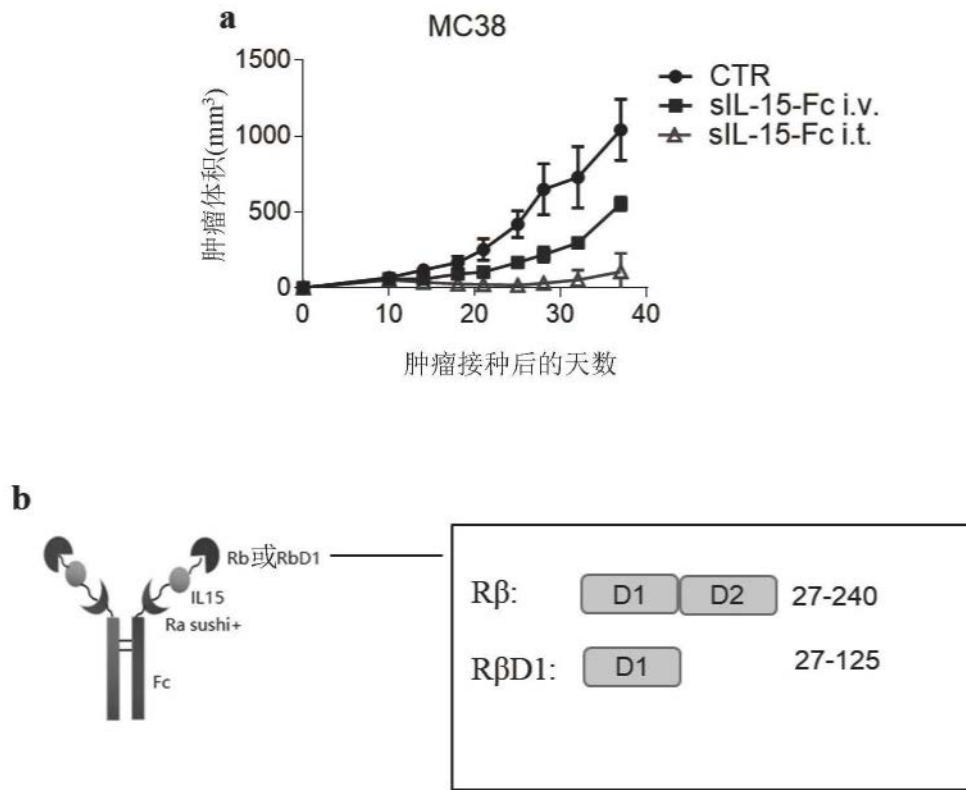


图2

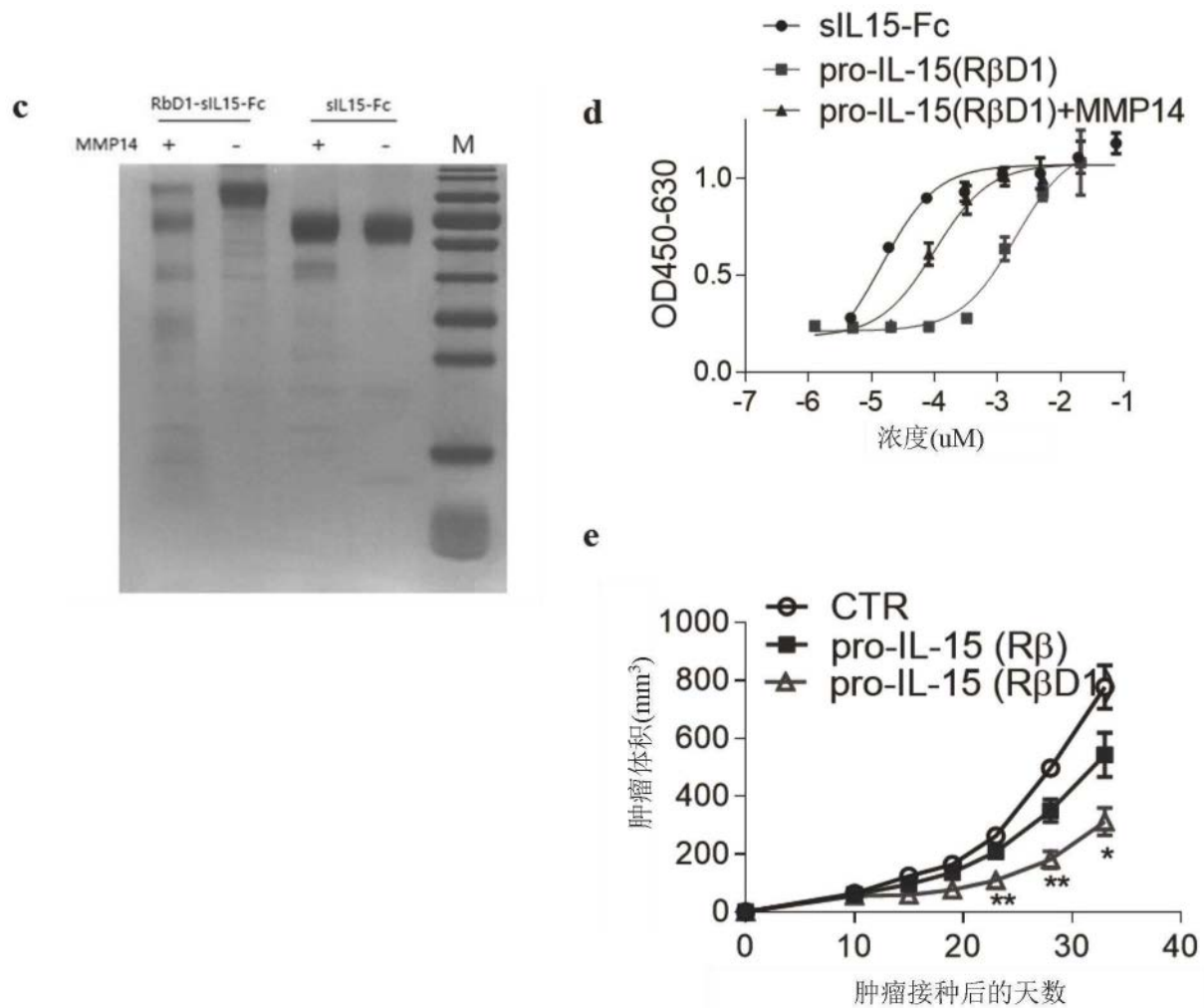


图2(续)

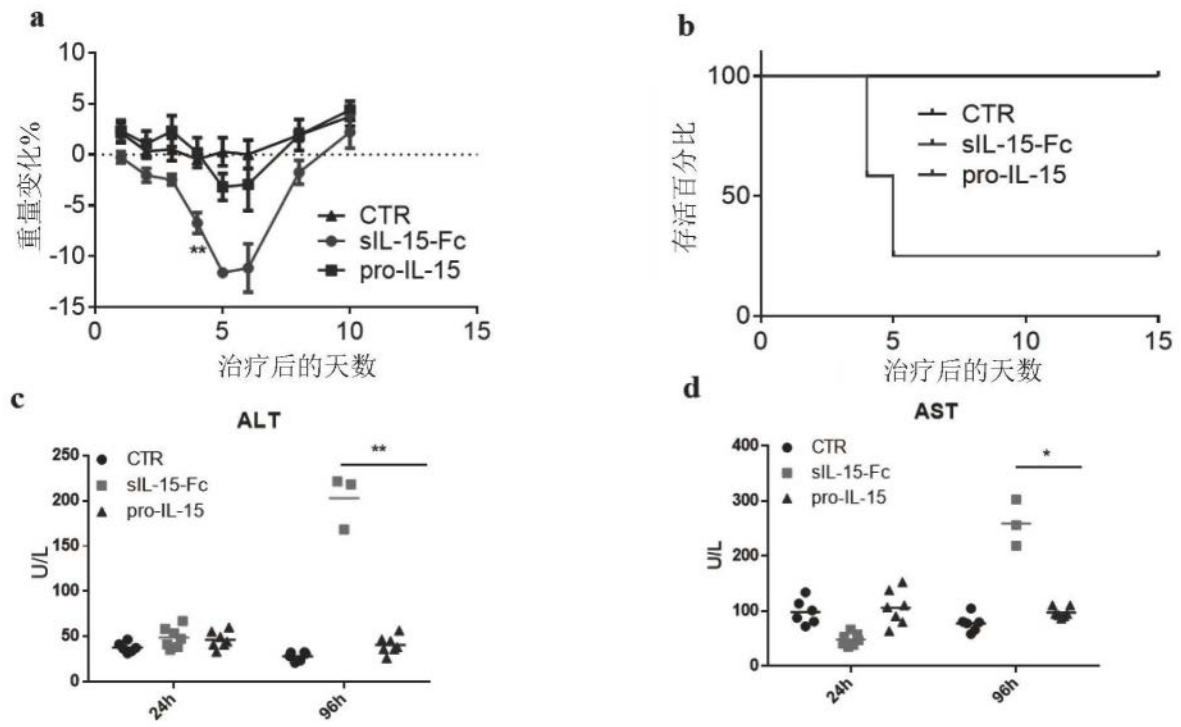


图3

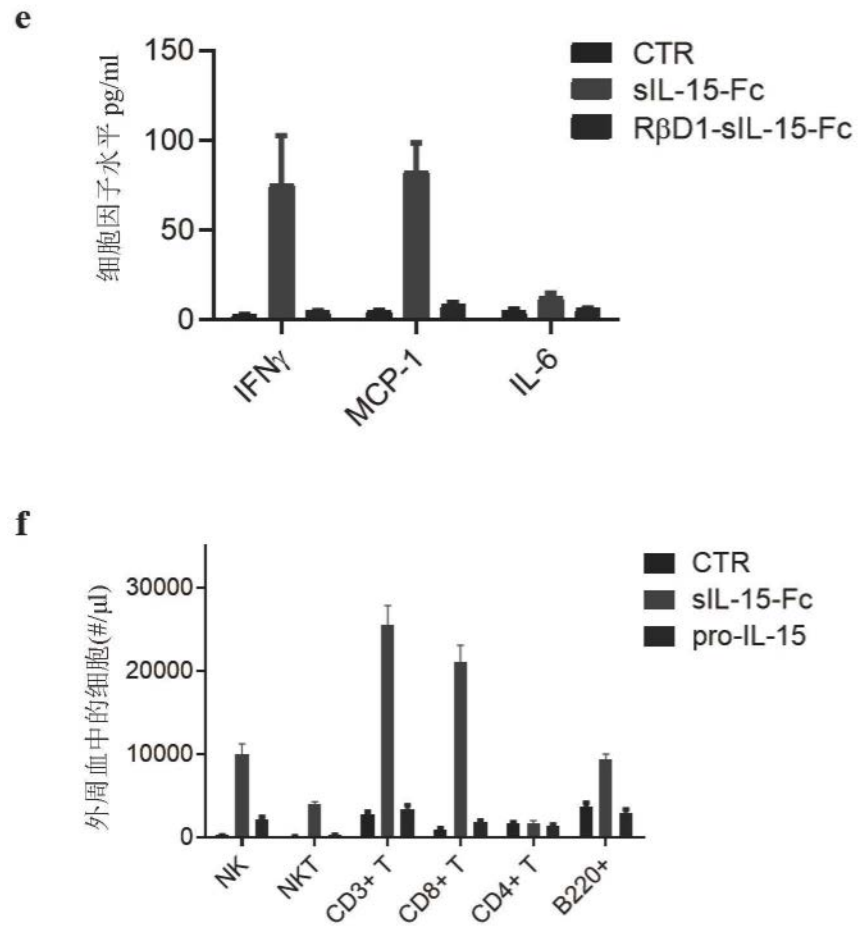


图3(续)

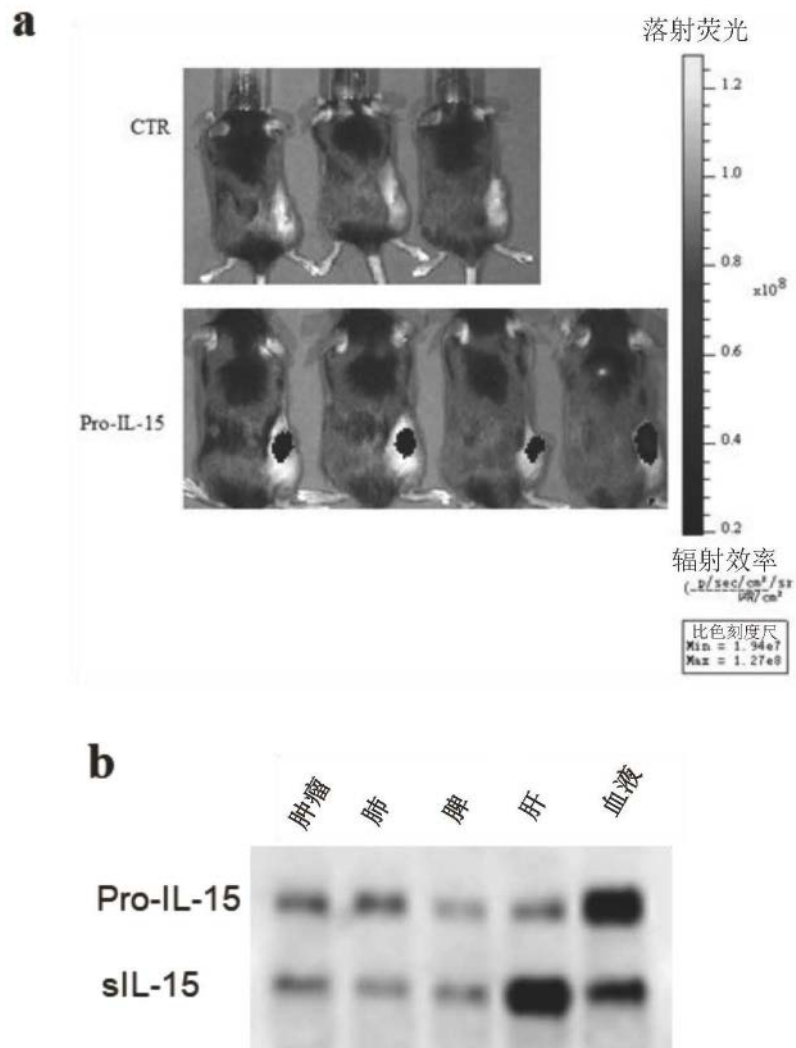


图4

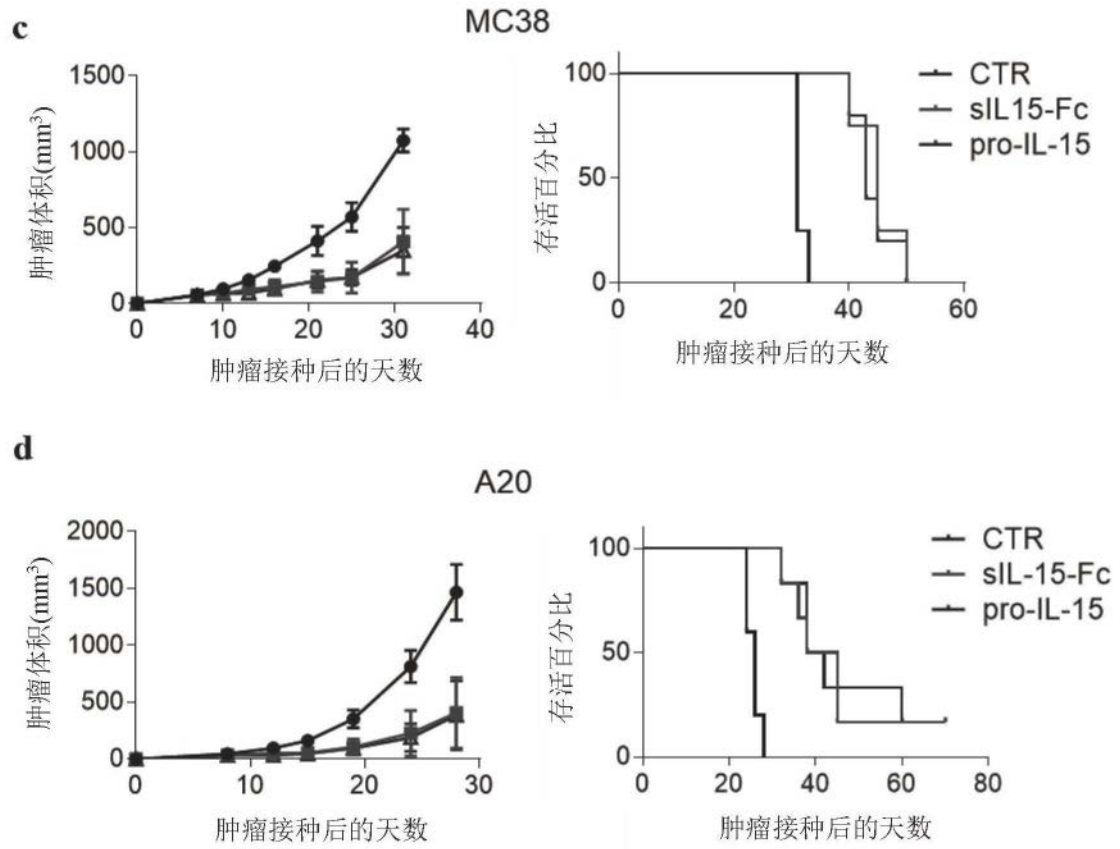


图4(续)

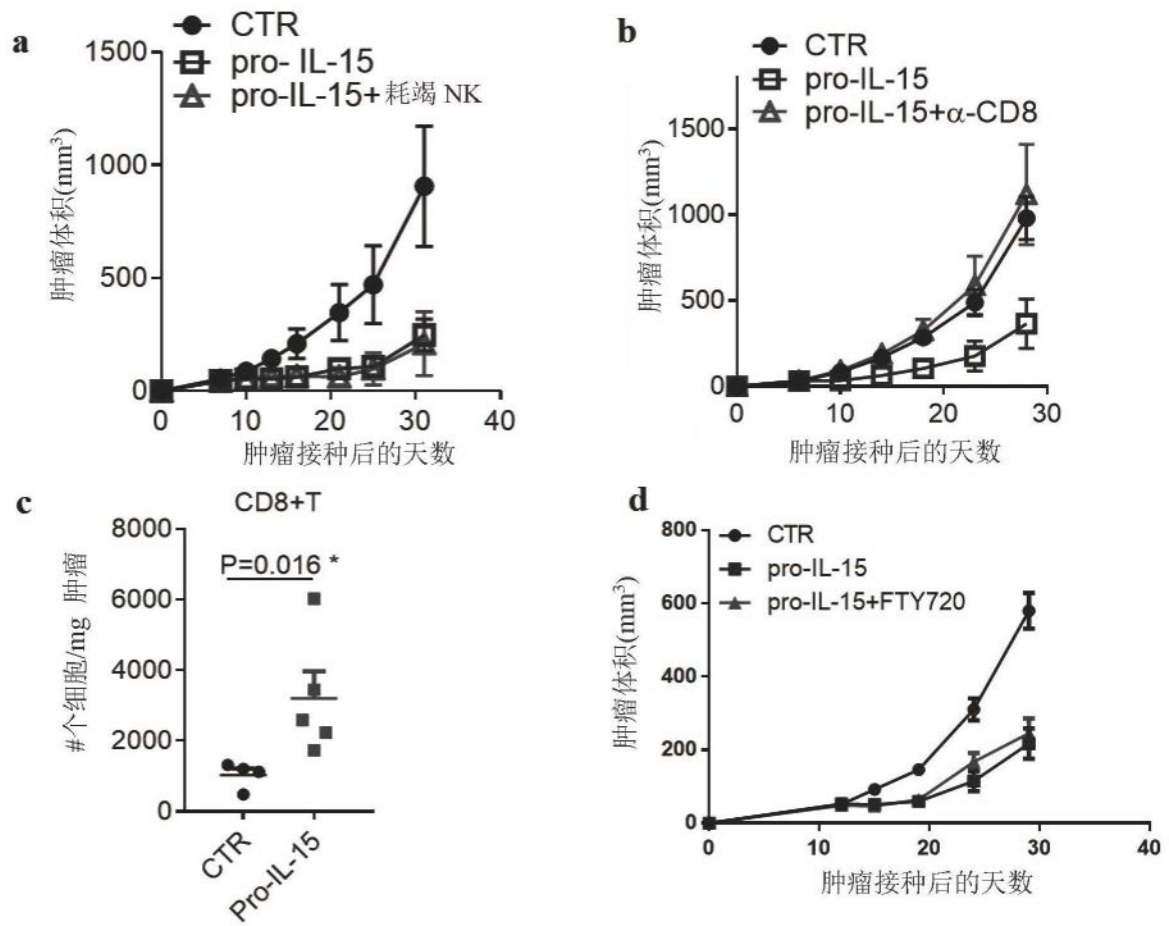


图5

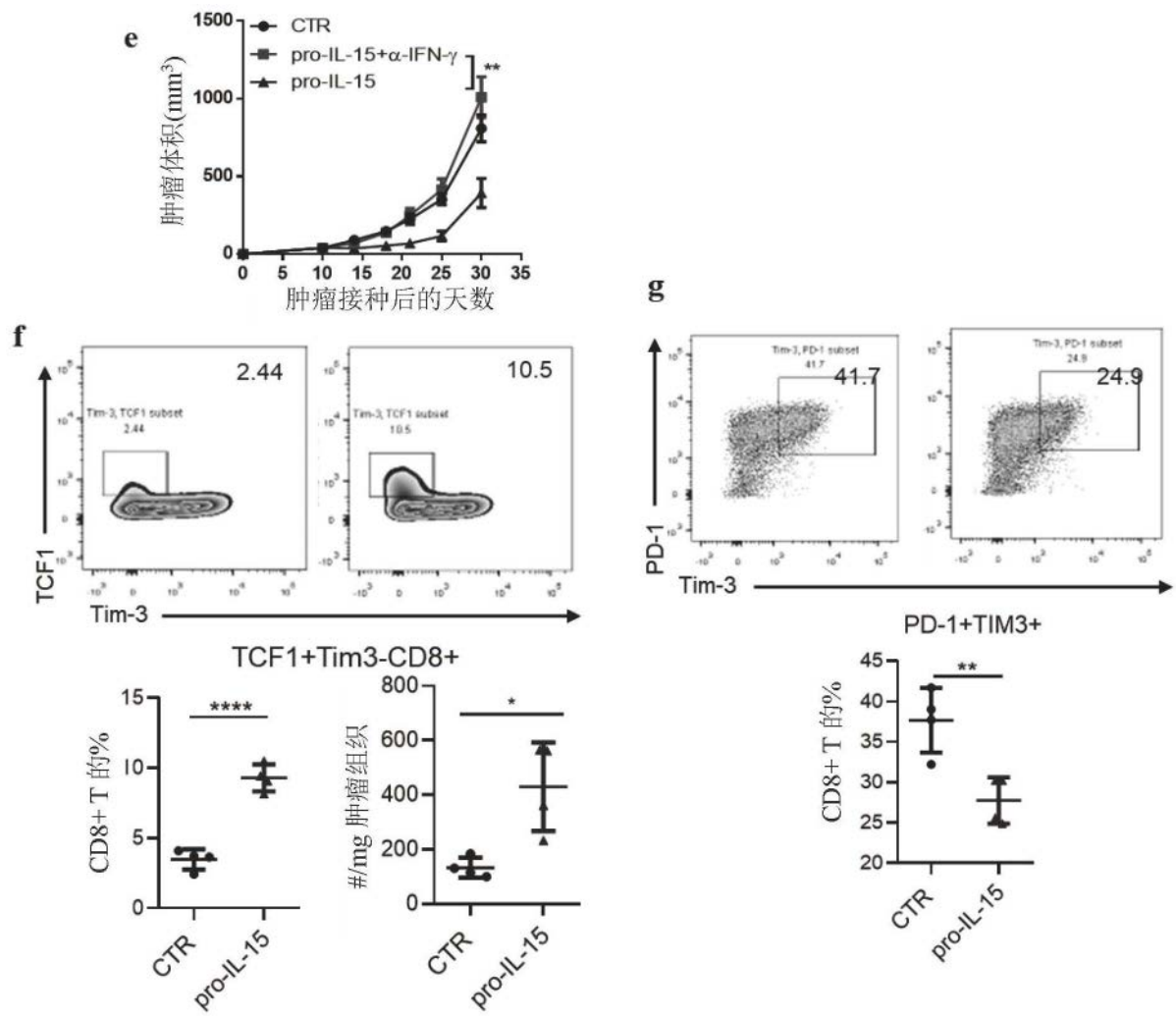


图5(续)

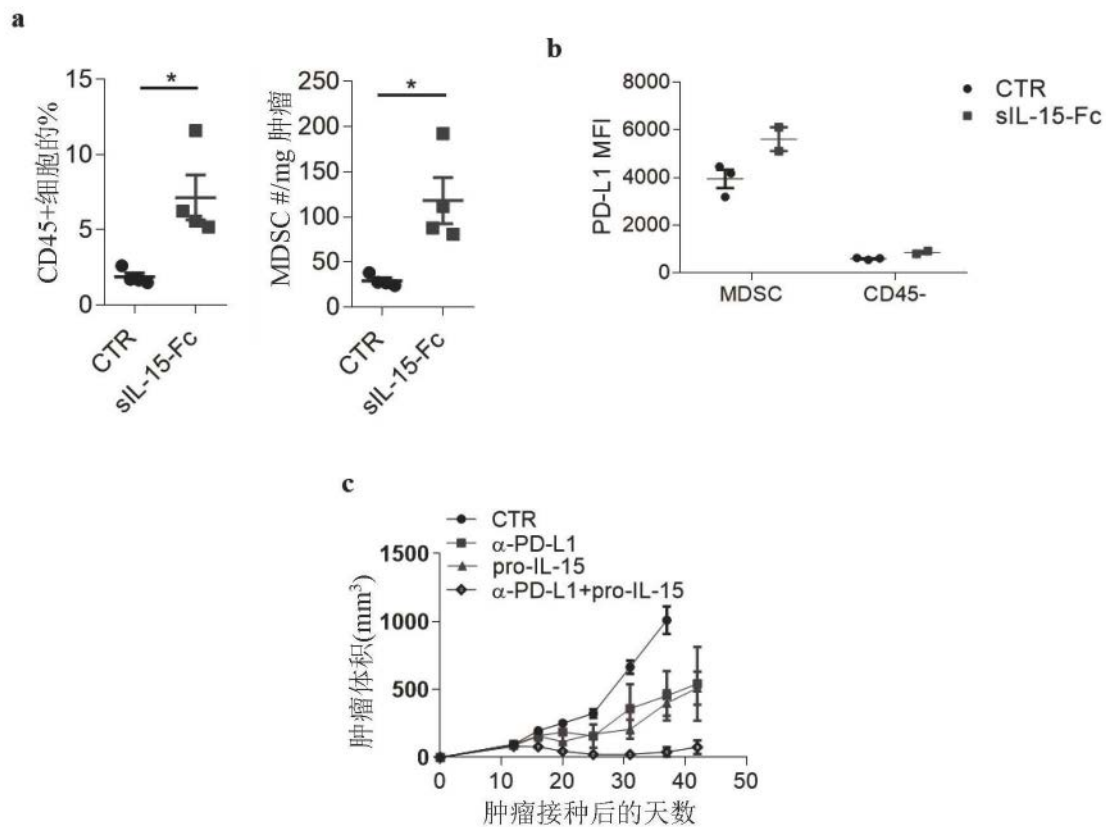


图6

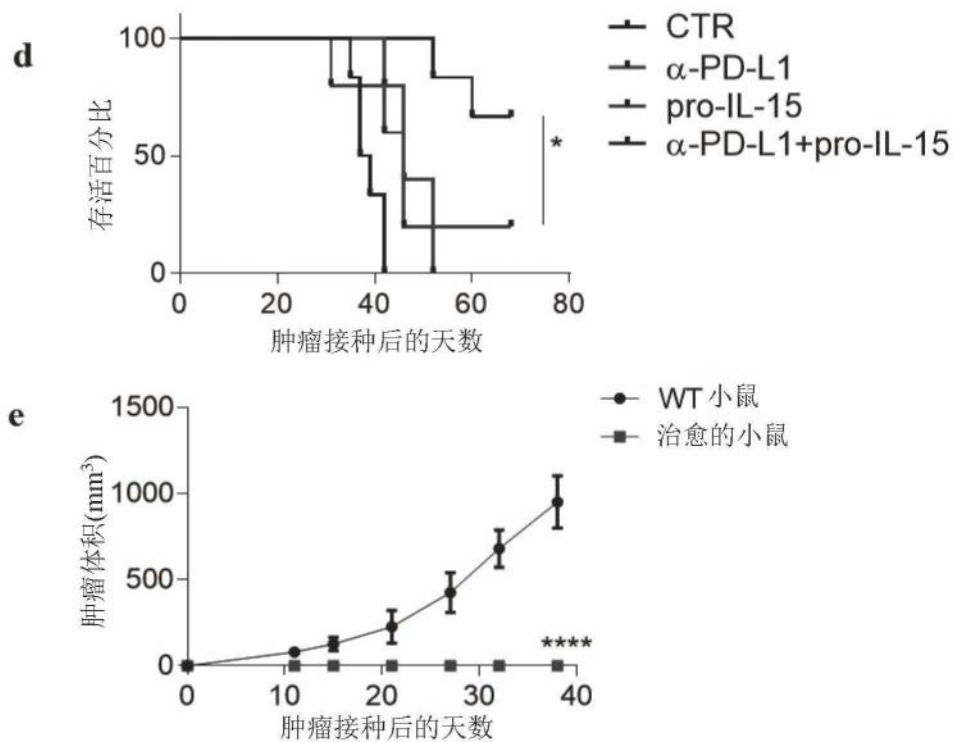


图6(续)

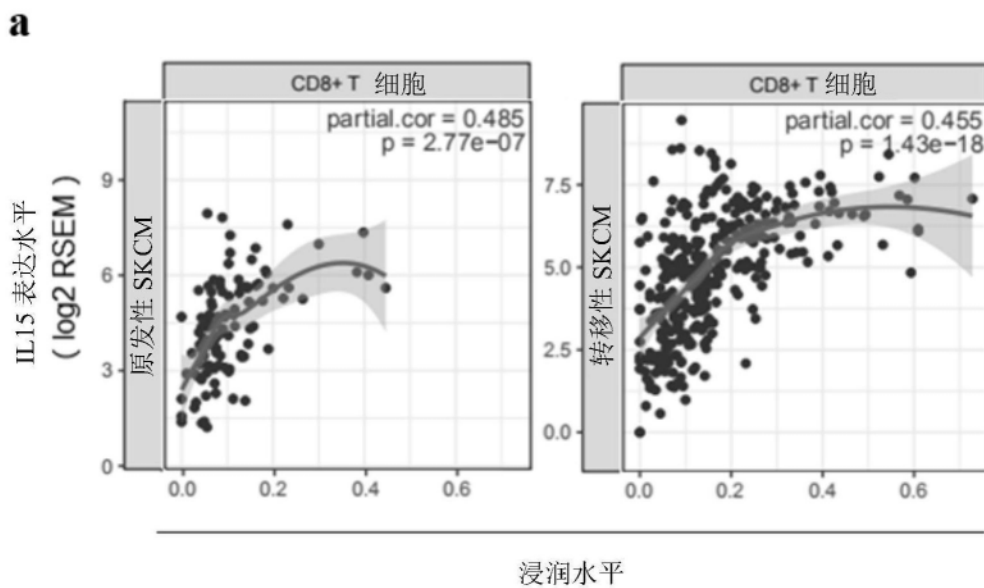


图7

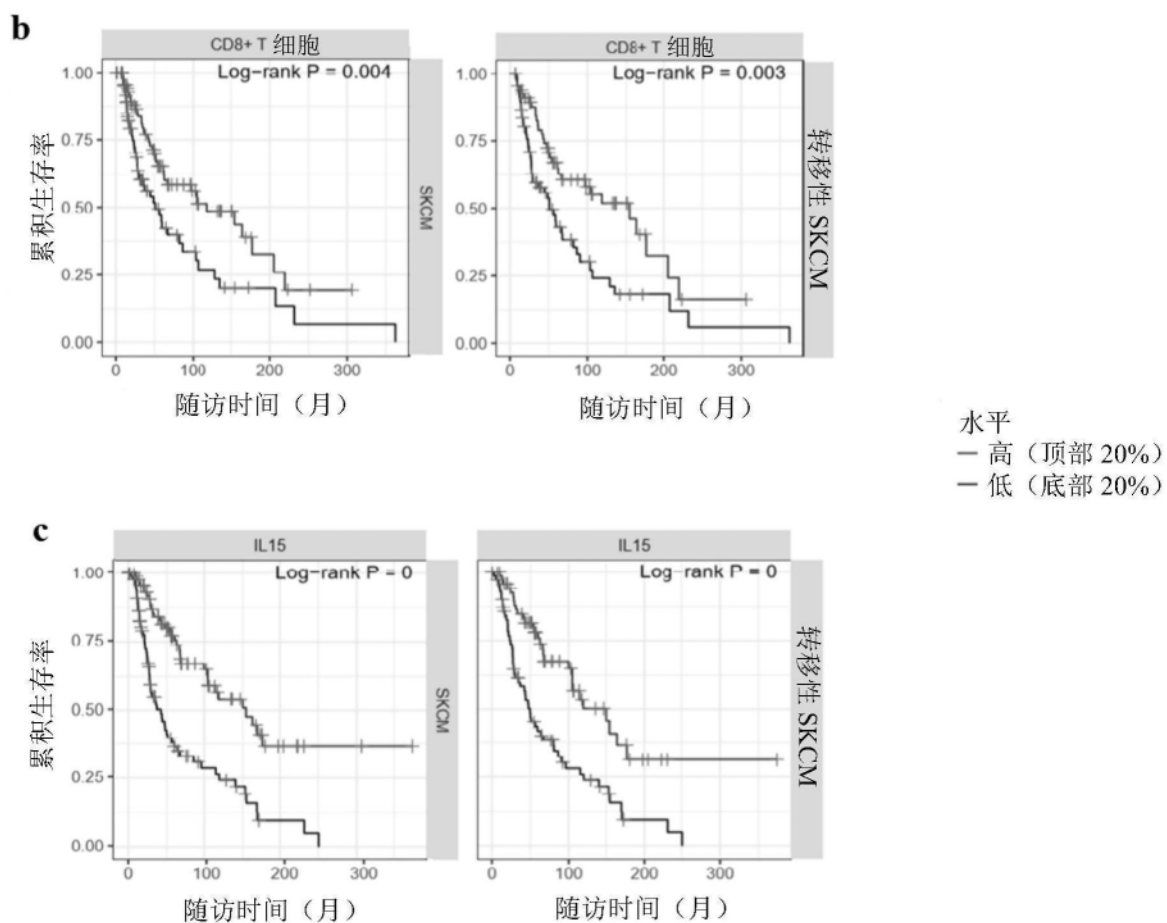


图7(续)

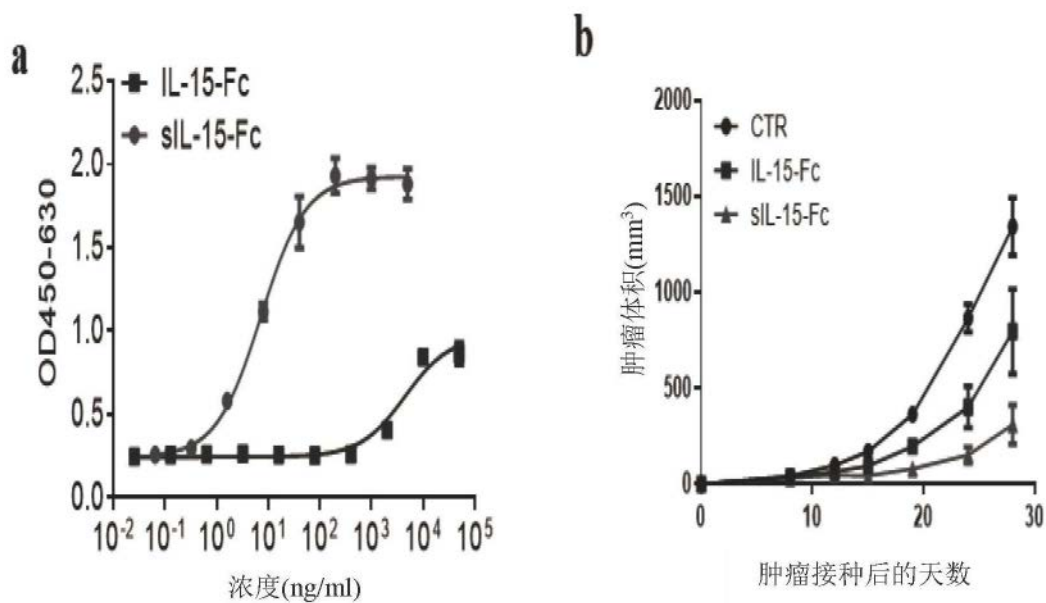


图8

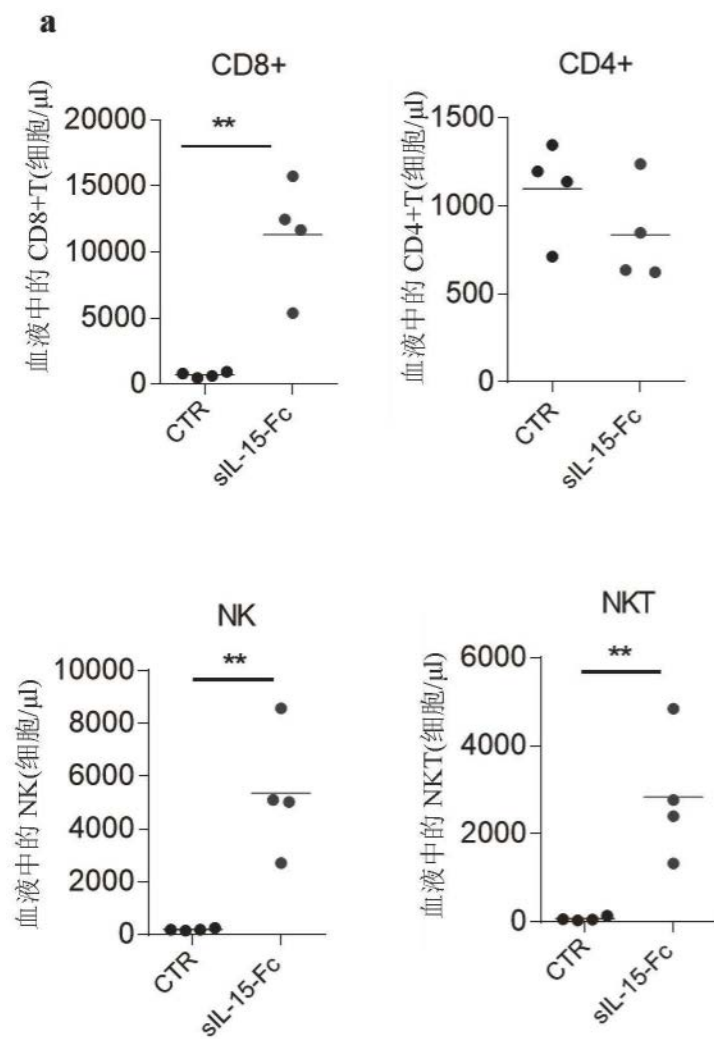


图9

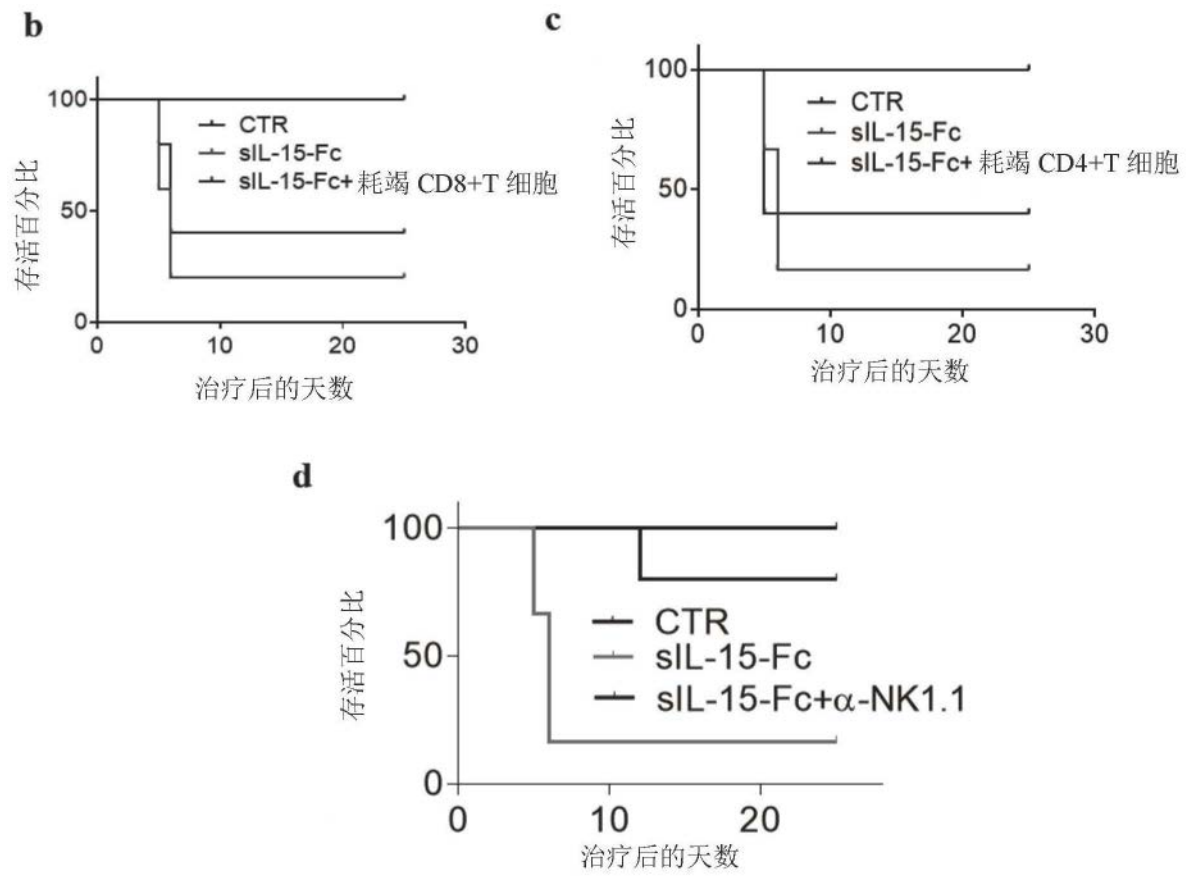


图9(续)

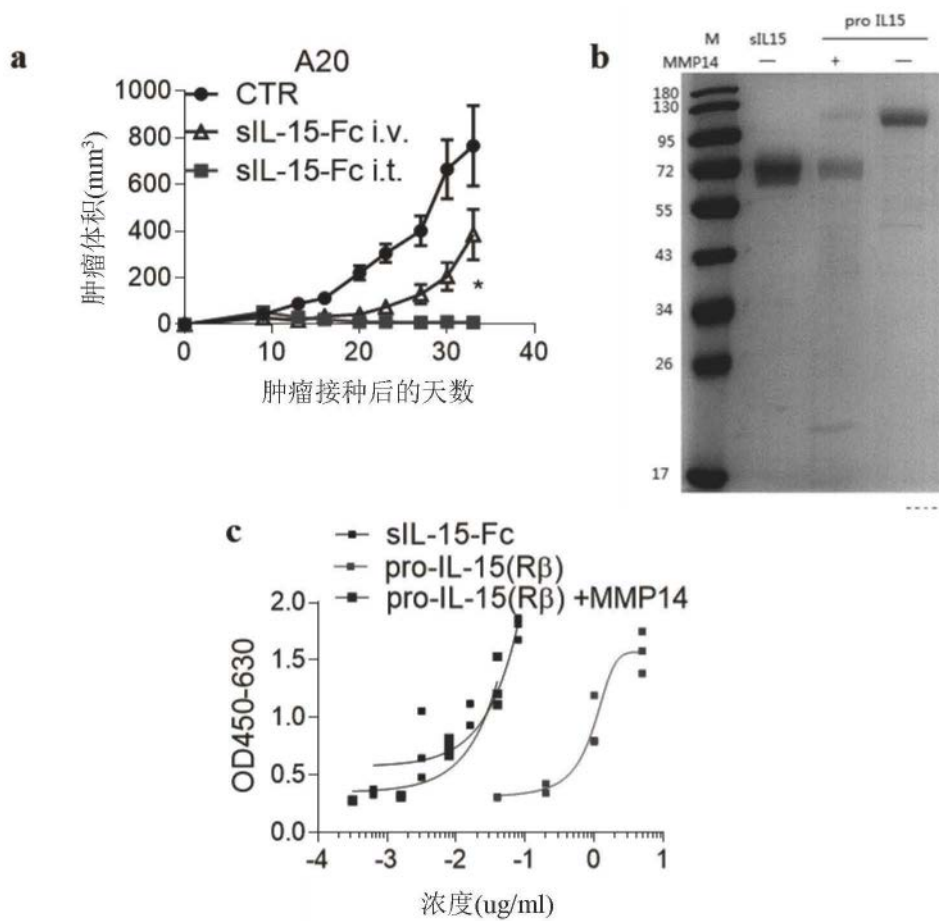


图10

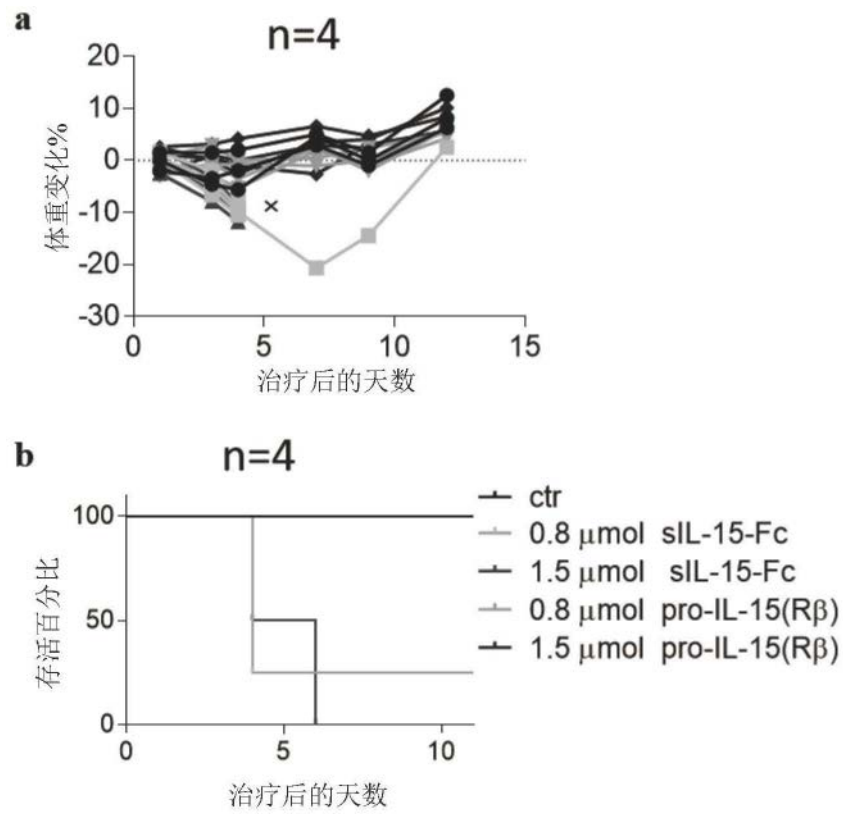


图11

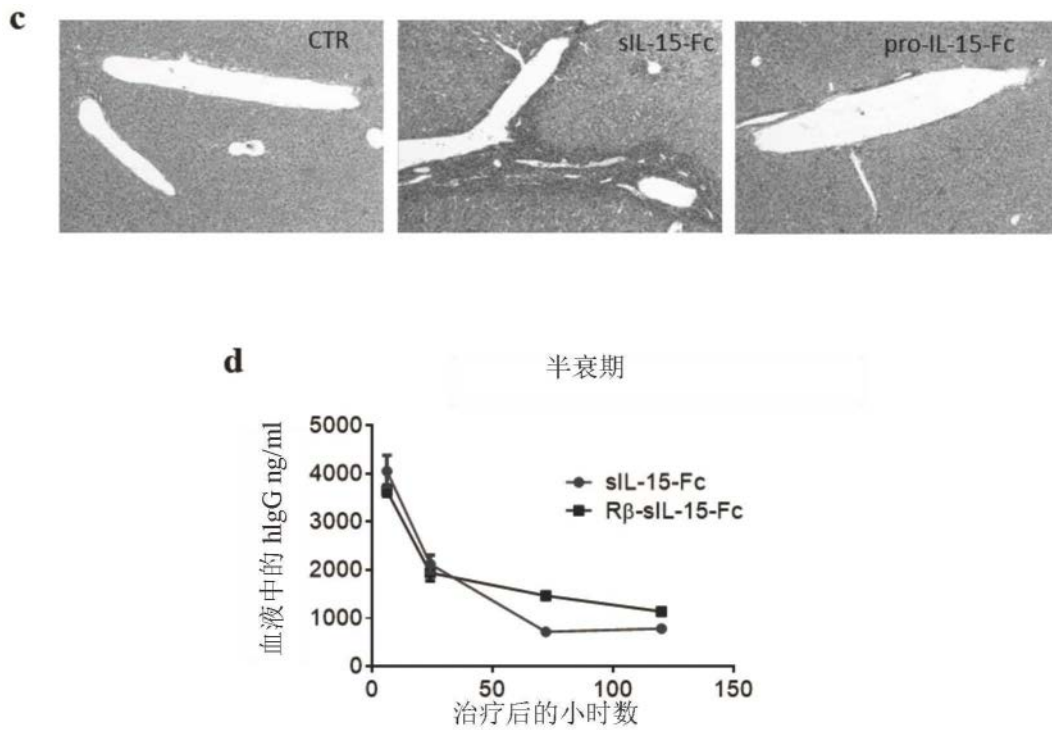


图11 (续)

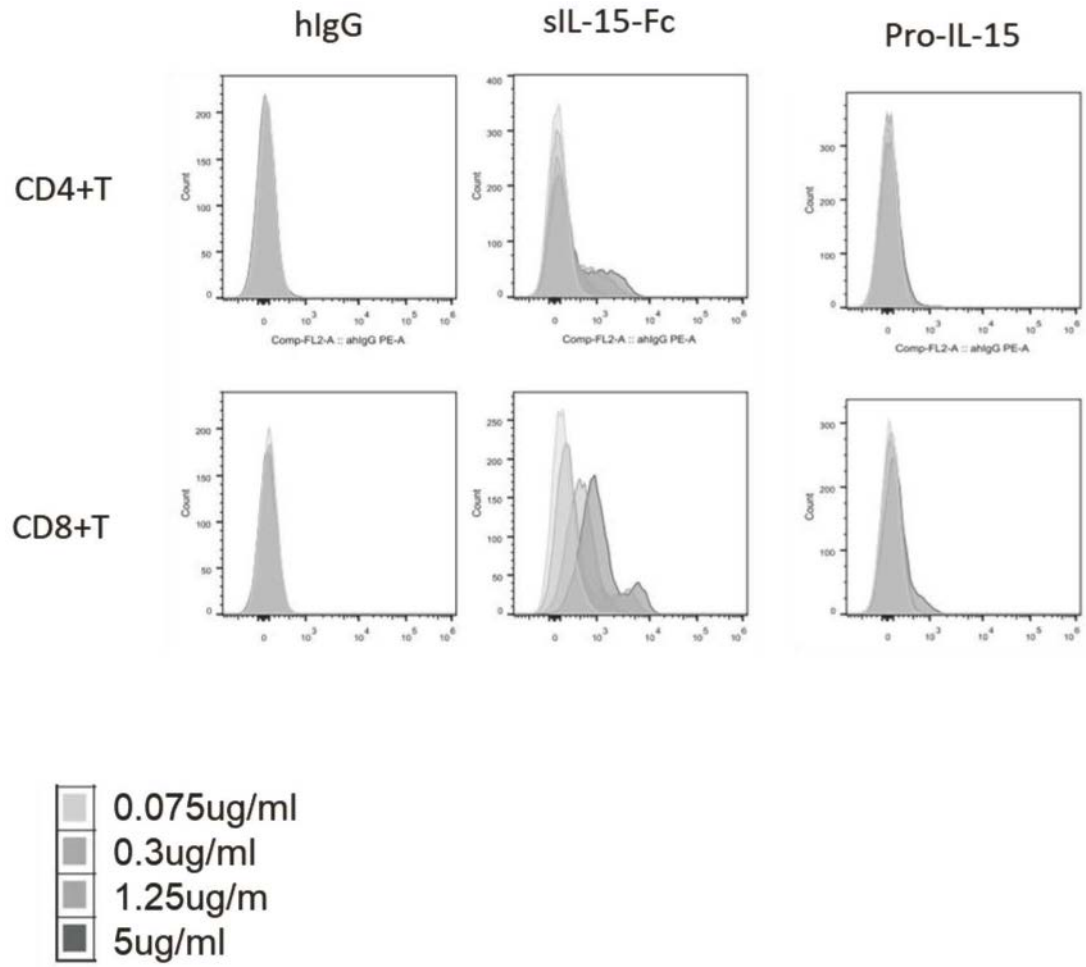


图12

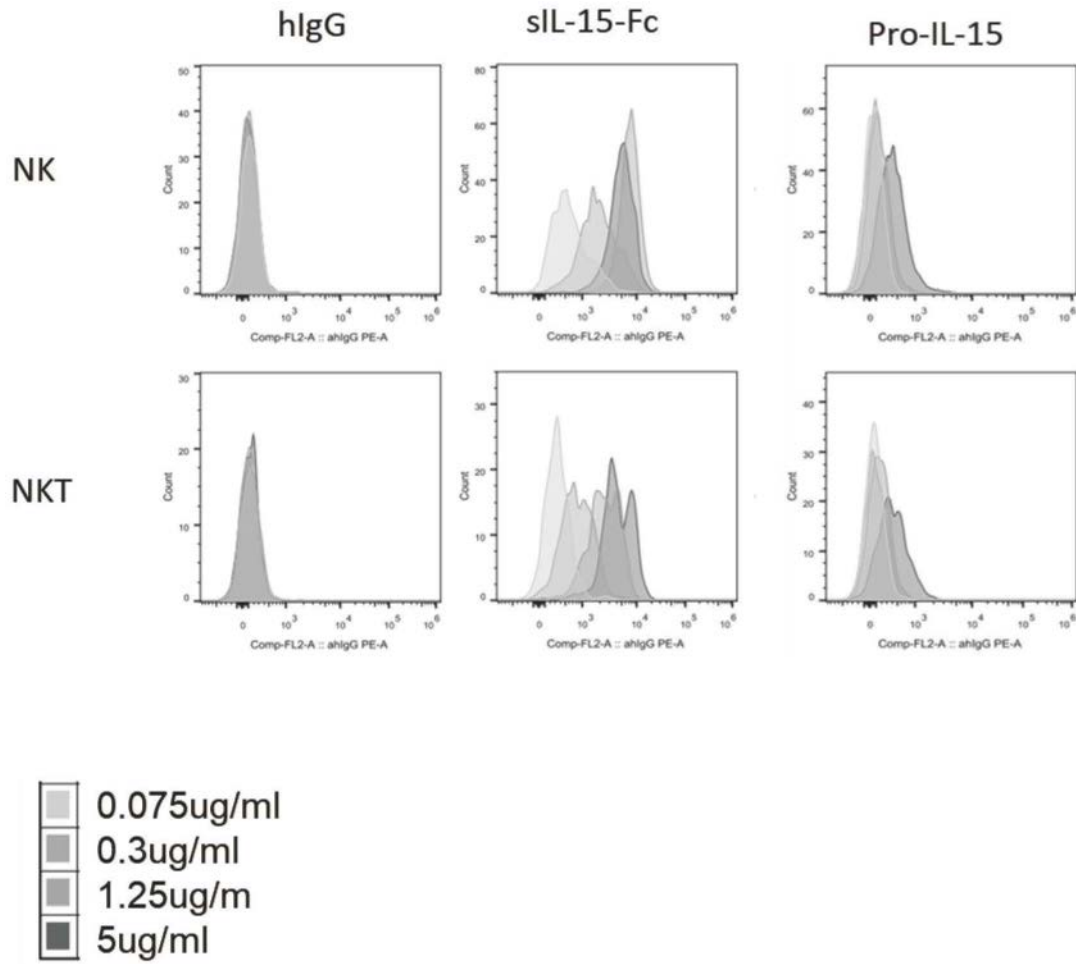


图12(续)

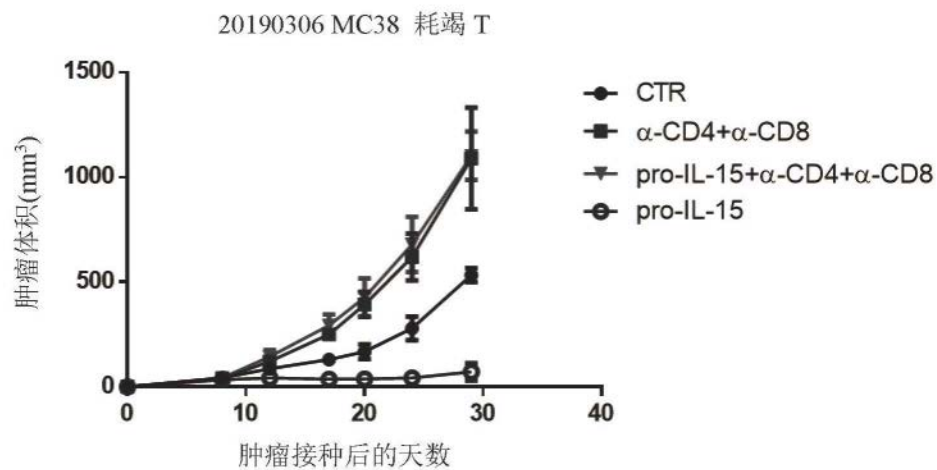
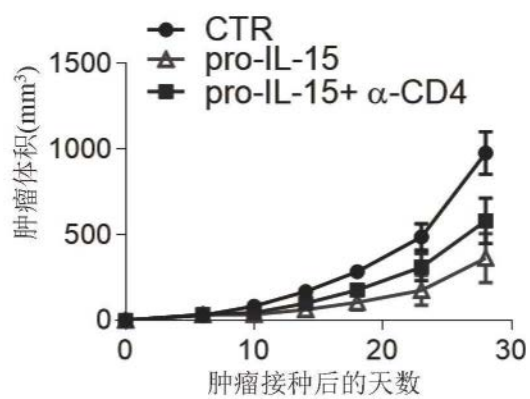
a**b**

图13

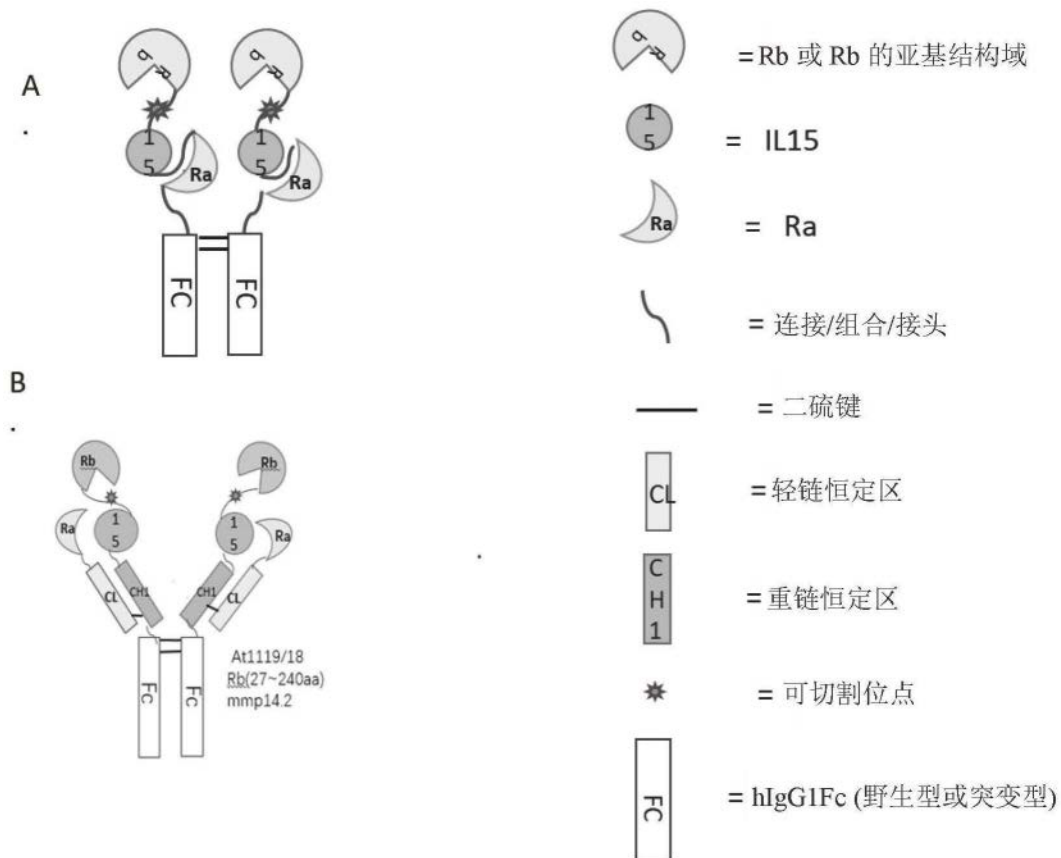


图14

RbD(1+2)-sIL15-Fc 和 RbD1-sIL15-Fc 的氨基酸序列

受体 β 的完整序列: mIL2Rb 胞外结构域 [1+2]: 27aa-240aa

AVKNCSHLECFYNSRANVSCMWSHEEALNVTTCHVHAKSNLRHWNKTCELTIVRQASW
ACNLILGSFPESQSLTSDLLDINVVCWEEKGWRRVKTCDFHPFDNLRRLVAPHSQVLHID
TQRCNISWKVSQVSHYIEPYLEFEARRLLGHSWEDASVLSLKQRQQWLFLEMLIPSTSY
EVQVRVKAQRNNTGTWSPWSQPLTFRTRPADPMKE

短的受体 β 的实施例: mIL2Rb 结构域 1 (P27-P125)

AVKNCSHLECFYNSRANVSCMWSHEEALNVTTCHVHAKSNLRHWNKTCELTIVRQASW
ACNLILGSFPESQSLTSDLLDINVVCWEEKGWRRVKTCDF

• hRb (27aa~128aa):

AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDQALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELLPVQSAS
WACNLILGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFE

图15

RbD1-sIL15-Fc 显示出比 Rb(D1+2)-sIL15-Fc 更好的抗肿瘤作用

20191107 MC38 Rb-sIL15-Fc vs RbD1-sIL15-Fc

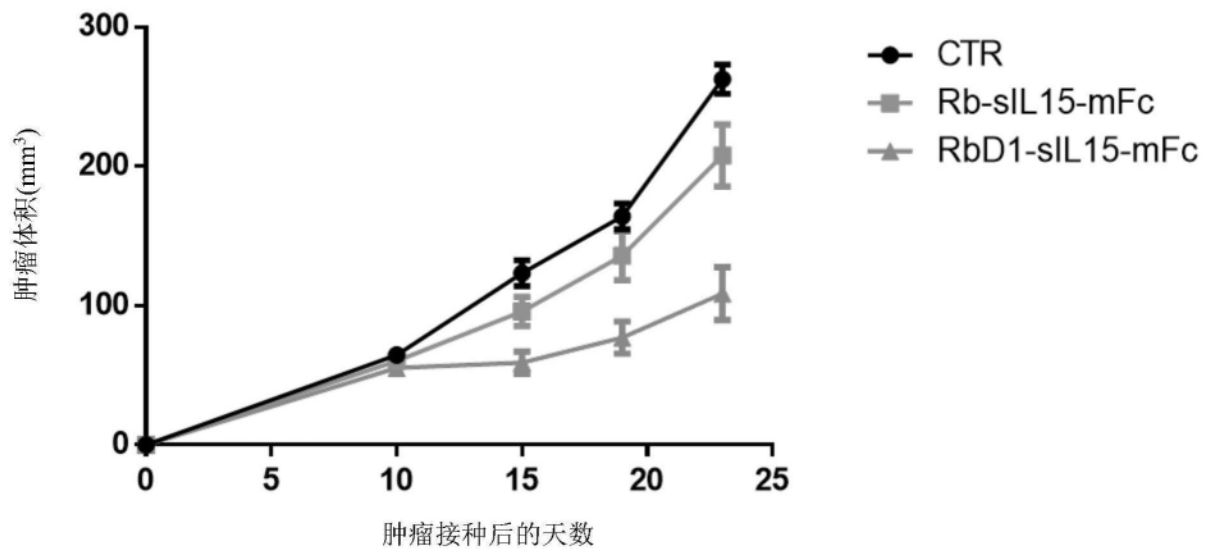


图16

pro-IL15(RbD1)表现出更少的外周血淋巴细胞扩增

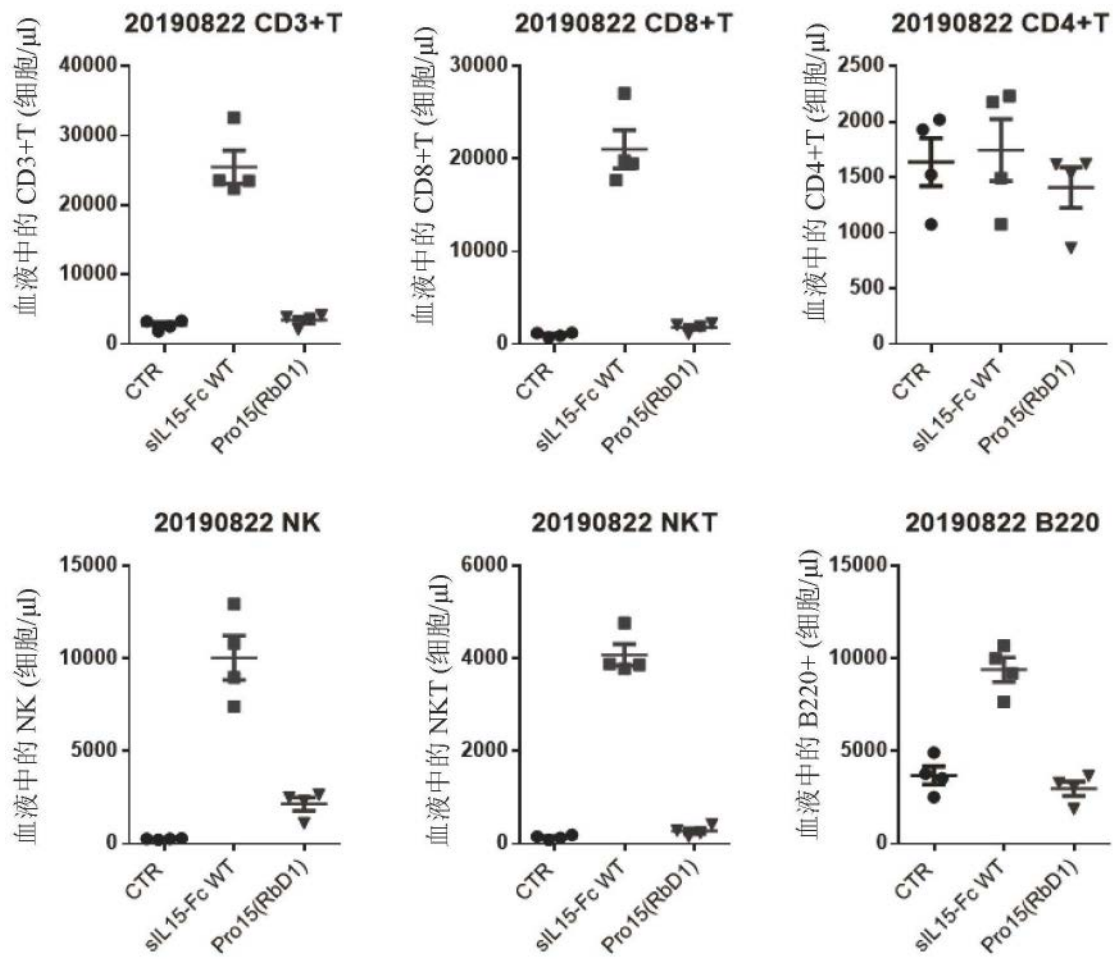


图17

pro-sIL15-Fc 中的不同长度的 hRb 对 IL15 活性显示出不同的阻断作用

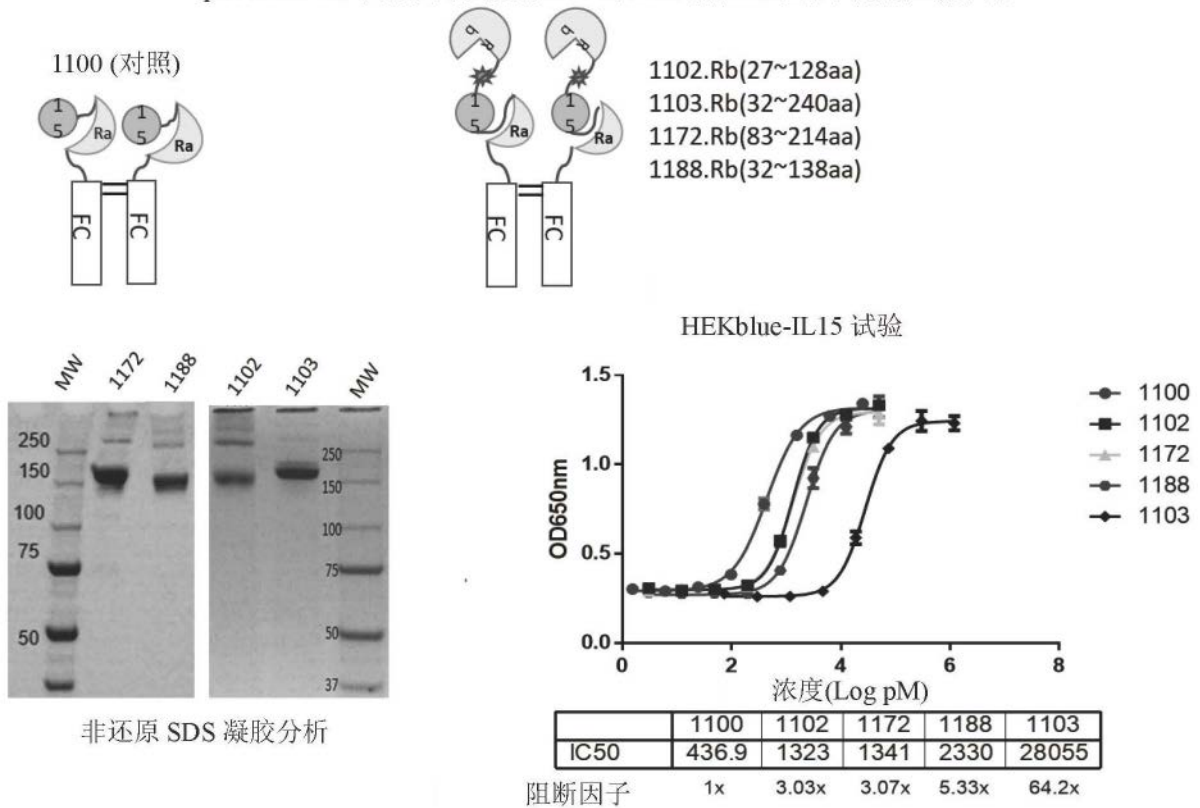


图18

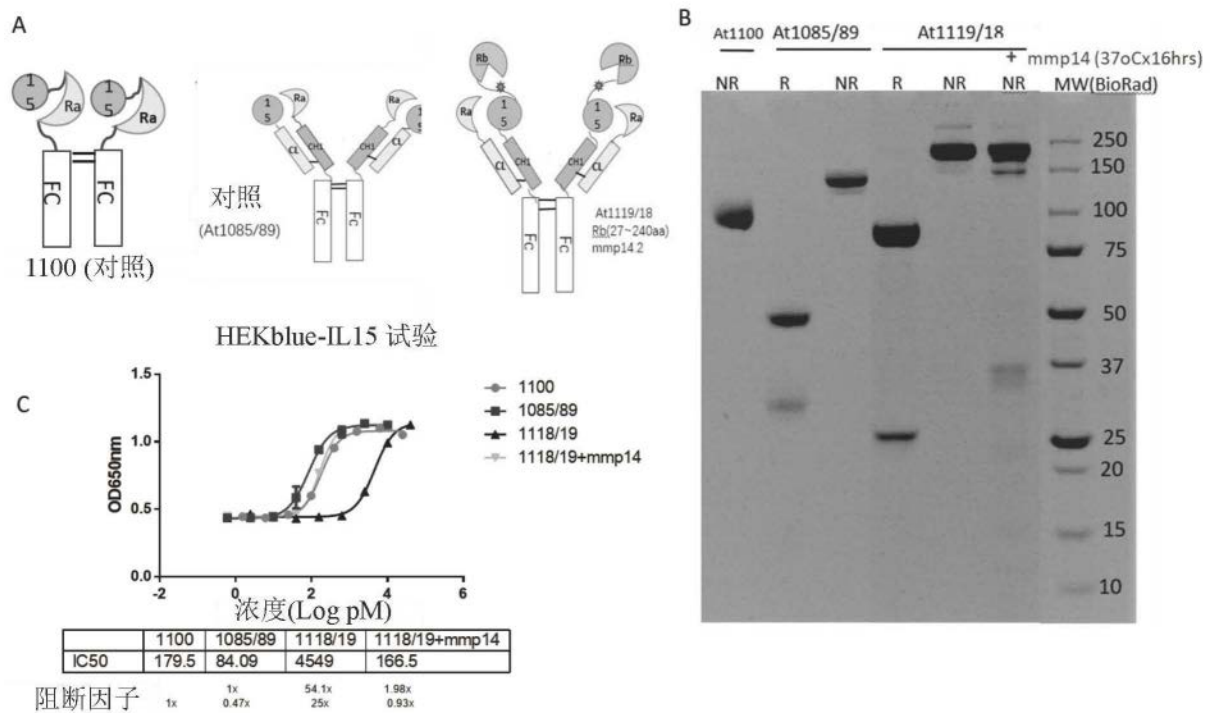


图19

使用长度较短的 hRb 来构建和表达人类 Pro-shIL15-Fc

SN#	描述	表达 (在 293F 细胞中)	阻断因子 (HEKblue 试验)
1165	IgkL-Rb(40aa~187aa)-L2-15-L1.4-Ra-Fcdm	-	
1168	IgkL-Rb(40aa~164aa)- L2-15-L1.4-Ra-Fcdm	-	
1166	IgkL-Rb(40aa~147aa)-L2-15-L1.4-Ra-Fcdm	-	
1167	IgkL-Rb(40aa~137aa)-L2-15-L1.4-Ra-Fcdm	-	
1169	IgkL-Rb(83aa~ 164aa)-L2-15-L1.4-Ra-Fcdm	-	
1170	IgkL-Rb(83aa~ 187aa)-L2-15-L1.4-Ra-Fcdm	-	
1171	IgkL-Rb(40aa~214aa)-L2-15-L1.4-Ra-Fcdm	-	
1172	IgkL-Rb(83aa~ 214aa)-L2-15-L1.4-Ra-Fcdm	~2mg/L	3x
1181	IgkL-Rb (32aa~214aa)-L2-15-L1.4-Ra-Fcdm	-	
1182	IgkL-Rb (32aa~187aa)-L2-15-L1.4-Ra-Fcdm	-	
1183	IgkL-Rb (32aa~164aa)-L2-15-L1.4-Ra-Fcdm	-	
1184	IgkL-Rb (32aa~147aa)-L2-15-L1.4-Ra-Fcdm	-	
1188	IgkL-Rb (32aa~137aa)-L2-15-L1.4-Ra-Fcdm	~1.9mg/L	5x
1087	IgkL-Rb(27aa~125aa)-L2-15-L1.4-Ra-Fcdm	~3.4mg/L	5x
1102	IgkL-Rb(27aa~128aa)-L2-15-L1.4-Ra-Fcdm	~9.94mg/L	3~5x
1098	IgkL-Rb(27aa~240aa)-L2-15-L1.4-Ra-Fcdm	26.6mg/L	123x
1103	IgkL-Rb(32aa~240aa)-L2-15-L1.4-Ra-Fcdm	33.6mg/L	100x~
1191	IgkL-Rb(32aa~234aa)-L2-15-L1.4-Ra-Fcdm	30mg/L	~110x
1100	IgkL-IL15-L1.4-Ra-Fcdm n (Super IL15 control)	43mg/L	1x

图20

两个 mmp14L 可切割接头的 AA 序列

MMP14.0.1	GGGSGRSPAIFTAGGSGRSENIRTAGGS
MMP14.2.1	GGSSGARYRWLTAGGSGRSENIRTAGGS
MMP14.3.1	GGGSGRSYAILTAGGSGRSENIRTAGGS
MMP14.4.1	GGGSGRAMHMYTAGGSGRSENIRTAGGS
MMP14.0.2	GGGSGRSPAIFTAGGSGARYRWLTAGGS
MMP14.0.3	GGGSGRSPAIFTAGGSGRSYAILTAGGS
MMP14.0.4	GGGSGRSPAIFTAGGSGRAMHMYTAGGS
MMP14.2.3	GGSSGARYRWLTAGGSGRSYAILTAGGS
MMP14.2.4	GGSSGARYRWLTAGGSGRAMHMYTAGGS
MMP14.3.4	GGGSGRSYAILTAGGSGRAMHMYTAGGS

具有两个 MMP 切割序列 (MMP14.2.1) 的融合蛋白的实施例

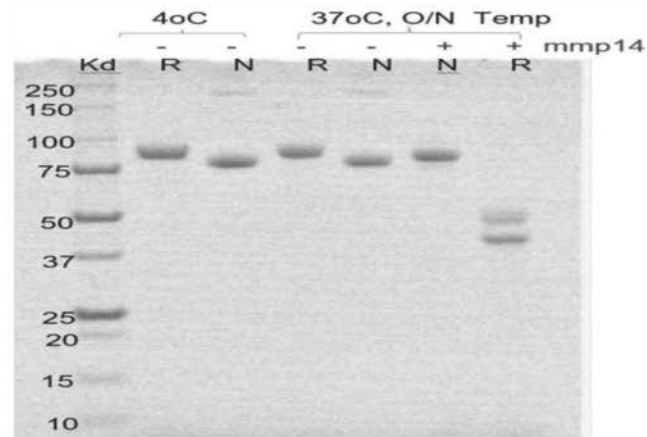


图21