



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110366421 A

(43)申请公布日 2019.10.22

(21)申请号 201880014971.8

G·帕里斯

(22)申请日 2018.03.01

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

(30)优先权数据

代理人 袁志明

62/465,506 2017.03.01 US

62/480,971 2017.04.03 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(51)Int.Cl.

A61K 38/00(2006.01)

C07K 14/435(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

2019.08.30

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/020514 2018.03.01

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/160877 EN 2018.09.07

(71)申请人 尼克塔治疗公司

地址 美国加利福尼亚

申请人 加利福尼亚大学董事会

(72)发明人 D·H·卡瑞士 A·里巴斯

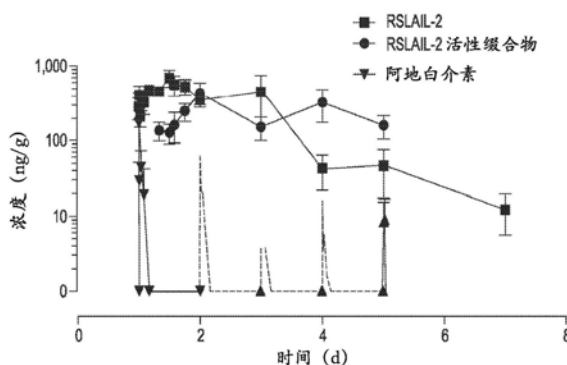
权利要求书2页 说明书21页 附图10页

(54)发明名称

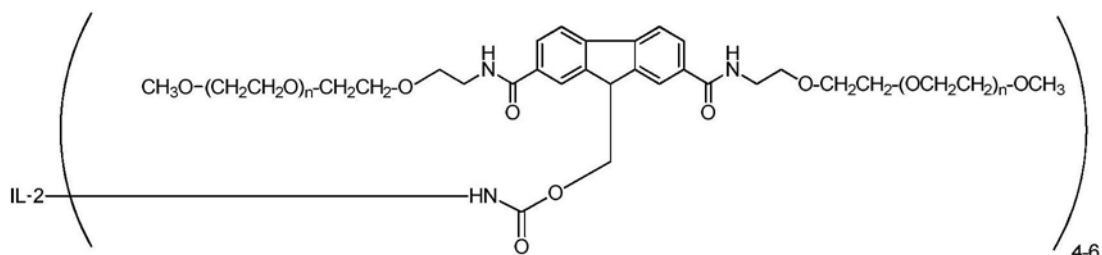
使用白介素-2受体 α , β 选择性激动剂与过继性细胞转移疗法的组合的免疫治疗肿瘤治疗方法

(57)摘要

本发明提供了涉及通过向患有癌症的个体提供过继性细胞转移疗法和给予长效IL-2R α β 偏向性激动剂来治疗该个体的方法和组合物。



1. 一种用于治疗患有癌症的受试者的方法,该方法包括:
 - (i) 向该受试者给予肿瘤特异性宿主T细胞, 这些肿瘤特异性宿主T细胞是从该受试者收获,进行离体培养并扩增,和
 - (ii) 向该受试者给予IL-2R β 活化量的长效IL-2R β 偏向性激动剂。
2. 如权利要求1所述的方法,其中步骤(i)和步骤(ii)以任何次序依序进行或基本上同时进行。
3. 如权利要求1所述的方法,其中步骤(i)在步骤(ii)之前进行。
4. 如权利要求1所述的方法,其中步骤(ii)在步骤(i)之前进行。
5. 如权利要求1所述的方法,其中步骤(i)和步骤(ii)基本上同时进行。
6. 如权利要求5所述的方法,其中步骤(i)和步骤(ii)均在治疗的第1天进行。
7. 如权利要求3所述的方法,其中步骤(ii)在治疗的第1至7天中的任何一天进行。
8. 如权利要求1至7中任一项所述的方法,该方法包括:在该治疗过程中向该受试者单次给予这些经收获、培养并扩增的肿瘤特异性宿主T细胞。
9. 如权利要求1至7中任一项所述的方法,该方法包括:在该治疗过程中向该受试者多次给予IL-2R β 活化量的该长效IL-2R β 偏向性激动剂。
10. 如权利要求1至9中任一项所述的方法,其中这些经收获、培养并扩增的肿瘤特异性宿主T细胞是通过输注给予。
11. 如权利要求1至10中任一项所述的方法,其中这些肿瘤特异性宿主T细胞是肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)。
12. 如权利要求1至11中任一项所述的方法,其中该受试者是人。
13. 如权利要求1至12中任一项所述的方法,其中,该癌症是实体癌症。
14. 如权利要求1至12中任一项所述的方法,其中,该癌症是液体癌症。
15. 如权利要求13所述的方法,其中该癌症是转移性的。
16. 如权利要求1至15中任一项所述的方法,其中该长效IL-2R β 偏向性激动剂包含可释放地共价附接到4至7个聚乙二醇部分的阿地白介素。
17. 如权利要求16所述的方法,其中该长效IL-2R β 偏向性激动剂包含可释放地共价附接到4至6个聚乙二醇部分的阿地白介素。
18. 如权利要求16或权利要求17所述的方法,其中,这些聚乙二醇部分是分支的。
19. 如权利要求18所述的方法,其中这些分支聚乙二醇部分包括从中心苄环的2位和7位延伸的聚乙二醇链。
20. 如权利要求19所述的方法,其中该长效IL-2R β 偏向性激动剂包含根据式I的化合物,



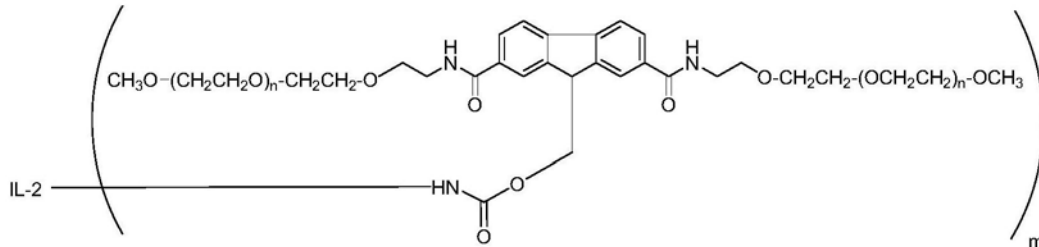
式 (I)

其中IL-2是白介素-2,并且每个“n”独立地是约3至约4000的整数,或其药学上可接受的盐。

21. 如权利要求20所述的方法,其中每个“n”是约40至约550的整数。

22. 如权利要求21所述的方法,其中每个“n”是约227。

23. 如权利要求20至22中任一项所述的方法,其中该长效IL-2R β 偏向性激动剂包括不超过约10% (摩尔量)的根据式II的化合物,



式 II

其中IL-2是白介素-2,“m”是选自由1、2、3、7和>7组成的组的整数,或其药学上可接受的盐。

24. 如权利要求20至23中任一项所述的方法,其中根据式I的该长效IL-2R β 偏向性激动剂平均具有约六个可释放地附接到IL-2的分支聚乙二醇部分。

25. 如权利要求1至23中任一项所述的方法,其中,在向该受试者给予这些经收获、培养并扩增的肿瘤特异性宿主T细胞的4天内初始给予该长效IL-2R β 偏向性激动剂。

26. 如权利要求1至25中任一项所述的方法,其中该长效IL-2R β 偏向性激动剂是通过注射给予。

27. 如权利要求1至13和15至26中任一项所述的方法,其中,当与在不给予该长效IL-2R β 偏向性激动剂的情况下用单独的步骤(i)治疗该受试者时保留在该受试者的肿瘤位点处的肿瘤特异性效应T细胞的数量比较时,或者当与和给予经给药以达到相当数量的IL-2等效物的白介素-2组合用来自步骤(i)的这些经收获、培养并扩增的肿瘤特异性T细胞治疗该受试者时保留在该受试者的肿瘤位点处的肿瘤特异性效应T细胞的数量比较时,当在初始给予该长效IL-2R β 偏向性激动剂后至少10天的时间点测量时,该方法有效于导致保留在该受试者的肿瘤位点处的肿瘤特异性效应T细胞的数量更多。

28. 如权利要求27所述的方法,其中该时间点是在初始给予该长效IL-2R β 偏向性激动剂后第10天、第11天、第12天、第13天、第14天或第15天。

29. 如权利要求1至26中任一项所述的方法,其中该方法导致有益的治疗应答,该治疗应答相对于在根据单独的步骤(i)或步骤(ii)进行给予时观察到的治疗应答得以提高。

30. 如权利要求28所述的方法,其中该有益的治疗应答基于合适的动物模型。

31. 如权利要求1至26中任一项所述的方法,其中该治疗方法有效于抑制该受试者的肿瘤中选自由CD4+Treg、CD25+Treg和FoxP3+Treg组成的组的调节性T细胞的积累,抑制的量相对于当在不给予该长效IL-2R β 偏向性激动剂的情况下用单独的步骤(i)治疗该受试者时,或者当与给予经给药以达到相当数量的IL-2等效物的白介素-2组合用来自步骤(i)的这些经收获、培养并扩增的肿瘤特异性T细胞治疗该受试者时观察到的量得以提高。

32. 如权利要求31所述的方法,其中在体内癌症模型中评价调节性T细胞积累的所述抑制。

使用白介素-2受体 α, β 选择性激动剂与过继性细胞转移疗法的组合的免疫治疗肿瘤治疗方法

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请依据35U.S.C. §119(e) 要求2017年3月1日提交的美国临时专利申请号62/465,506、以及2017年4月3日提交的美国临时专利申请号62/480,971的优先权权益,这些申请的披露内容通过引用以其全文并入本文。

技术领域

[0002] 本申请涉及(除其他事项外)癌症免疫疗法领域,并且涉及通过向患有癌症的个体提供过继性细胞转移疗法伴随给予长效IL-2R $\alpha\beta$ 偏向性(即,IL-2R $\alpha\beta$ 选择性)激动剂来治疗该个体。

背景技术

[0003] 正在不断开发新疗法以获得改善的癌症治疗。癌症治疗最有前景的领域之一是免疫肿瘤学(即,癌症免疫疗法)。癌症免疫疗法是指被设计来调节免疫应答以诱导患者自身免疫系统来对抗癌症的一系列不同治疗策略。在目前的免疫治疗方法中,过继性细胞转移疗法(也称为ACT)在治疗患有某些类型癌症的患者方面显示出前景。过继性细胞疗法涉及肿瘤特异性淋巴细胞的分离和离体扩增,以产生比通过简单疫苗接种可达到的更多数量的肿瘤反应性效应T细胞。将肿瘤特异性T细胞输注到患有癌症的患者中以引发患者的免疫系统来杀伤肿瘤细胞。过继性细胞转移已经显示出有效的临床结果,特别是在转移性黑素瘤中(Dudley, M.E., J.R.Wunderlich等人, J Clin Oncol [临床肿瘤学杂志] 23 (10) :2346-2357 (2005); Dudley, M.E., J.C.Yang等人, J Clin Oncol [临床肿瘤学杂志] 26 (32) :5233-5239 (2008))。过继性细胞转移可以是自体的,如在过继性T细胞疗法中典型的,或者可以是同种异体的。

[0004] 早期(第一代)过继性细胞转移利用具有高剂量IL-2的淋巴因子活化的杀伤(LAK)细胞来治疗患有晚期癌症的患者,但显示不如单独用IL-2治疗(Rosenberg, S.A.等人, Journal of the National Cancer Institute [美国国家癌症研究所杂志], 卷85 (8) ,622-632 (1993))。测定显示扩增的LAK细胞未表现出任何抗肿瘤活性(Dudley, M.E.等人, Seminars in Oncology [肿瘤学研讨会], 卷34 (6) ,524-531 (2007))。

[0005] 第二代过继性细胞转移采用肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)而非LAK细胞。TIL是存在于患者肿瘤内的T细胞,其可以提高特异性识别肿瘤抗原从而消除恶性细胞的能力。然而,在大多数癌症患者中,天然存在的TIL不能破坏肿瘤,因为这些天然存在的TIL典型地是过量的、未完全活化的或被遏制的。可替代地,肿瘤可能已经逃避了免疫系统的识别,包括TIL的识别。因此,TIL过继性细胞转移的主要目的是从患者中分离TIL,随后进行离体刺激和增殖以产生大量活化的肿瘤特异性T细胞。然后将扩增的TIL输注回患者中。在针对转移性黑素瘤的初始TIL-ACT试验中,用自体TIL伴随高剂量静脉内IL-2作为TIL的刺激生长因子来治疗患者。IL-2的多效性以及其短半衰期使得具有有限体内持久性的调节性T细胞和效应T

细胞两者可以生长。给予后一周,应答率很低,并且TIL在循环中的持久性仅为0.1% (Rosenberg, S.A. 等人, *New England Journal of Medicine* [新英格兰医学期刊], 卷323 (9), 570-578 (1990))。效应T细胞的不良持久性和调节性TIL的刺激可能造成应答缺乏。

[0006] 上述试验指示需要改善抗肿瘤应答。下一代过继性细胞转移研究包括向患者增加淋巴细胞耗减性预调节,其目标为遏制内源性调节性T细胞并为输注的TIL提供最佳环境。然而,这些后来的研究证明了相关的患者毒性,包括低血压、肺充血、血管渗漏综合征和骨髓遏制 (Dudley, M.E. 等人, *Journal of Clinical Oncology* [临床肿瘤学杂志], 卷23 (10), 2346-2357 (2005))。除了上述之外,这种方法的另一个缺点是患者的极高退出率,主要是由于上述毒性和应答缺乏。另外,扩增的T细胞群仍然存在问题,因为调节性细胞和效应细胞都可以无区别地扩增。最后,转移细胞在体内缺乏持久性仍然是一大问题。

[0007] 尽管特别存在上述挑战,但用于治疗癌症的过继性细胞转移临床试验仍在招募患者,因为在晚期转移性癌症中,很少有疗法是有效的,包括检查点抑制剂抗体。正在进行的过继性细胞转移试验包括各种类型的细胞扩增剂、转移细胞、患者调节、溶瘤剂;一种用于改善过继性细胞转移的方法涉及转移经遗传修饰的外周T细胞而非TIL。TIL方案典型地需要患者经受手术以切除肿瘤组织来进行TIL分离;相比之下,T细胞过继性细胞疗法典型地允许患者规避手术并且仅需要患者进行白细胞去除术以获得外周T细胞来进行遗传修饰。这种方法需要预先了解可能存在的肿瘤抗原。另外,迄今为止,经遗传工程改造的T细胞疗法 (CAR-T或TCR) 仅对液体肿瘤有效而对实体肿瘤无效,并且T细胞亚群的问题仍然存在。实体肿瘤仅对TIL和白介素-2有应答。即使使用这些方法,由白介素-2扩增的细胞群也不明确,因为扩增的细胞群可包括调节性T细胞、辅助性T细胞和效应T细胞。这种现象源于可同样扩增调节性T细胞和效应T细胞的天然存在的白介素-2的多效性。

[0008] 尽管迄今为止已经在开发涵盖各种平台的有效过继性细胞转移疗法方面进行了大量努力,但是仍然需要提供克服当前疗法的一个或多个缺点以利用这种基于免疫细胞疗法的方法的潜力的新且更有效的免疫治疗性过继性细胞转移策略和相关治疗方案。因此,本披露试图通过提供利用过继性细胞转移的新且有效的癌症免疫疗法来解决这个和其他需求,该过继性细胞转移使得扩增的T细胞群能够以更大的持久性向肿瘤杀伤表型倾斜。

发明内容

[0009] 在第一方面,本文提供了一种包括向患有癌症的受试者进行过继性细胞转移与给予IL-2R β 活化量的长效IL-2R β 偏向性激动剂的组合的方法,该方法将在下文中进行更详细地描述。在一个或多个实施例中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂有效于优先扩增效应T细胞。本披露至少部分源于以下认识:包括以任一次序依序给予或基本上同时给予的一个或多个周期和/或剂量的过继性细胞疗法和效应T细胞的长效偏向性IL-2R β 活化激动剂的组合治疗方案可以特别有效地治疗一些受试者的癌症,和/或可以引发、启动、增加、提高或延长免疫细胞的活性和/或数量,或导致对抗包括液体和实体癌症的癌细胞的有益应答(在适用时,例如稳定、消退、缩小、坏死等),其程度相对于单独的单一免疫治疗方法得以提高。

[0010] 在第二方面,本文提供了一种用于治疗癌症的组合疗法,该组合疗法包括过继性细胞疗法和长效IL-2R β 偏向性激动剂。

[0011] 在第三方面,提供了一种提高过继性细胞疗法的治疗有效性的方法,该方法包括

向患有癌症的受试者提供过继性细胞疗法和向受试者给予IL-2R β 活化量的长效IL-2R β 偏向性激动剂,其中该长效IL-2R β 偏向性激动剂有效于改善受试者对该过继性细胞疗法的应答。

[0012] 在又第四方面,提供了一种抑制正在经受癌症治疗的受试者的调节性T细胞(Treg)的积累的方法,该方法包括将T细胞(例如从受试者血液或肿瘤中收获并且体外扩增的T细胞)输入到受试细胞中和向该受试者给予IL-2R β 活化量的长效IL-2R β 偏向性激动剂。该长效IL-2R β 偏向性激动剂以有效于治疗癌性肿瘤的量给予,其中当例如在小鼠或其他合适的癌症体内模型中评价时,该治疗有效于抑制该肿瘤中选自由CD4+Treg、CD25+Treg和FoxP3+Treg组成的组的调节性T细胞的积累,抑制的量相对于给予IL-2R激动剂的非长效形式与过继性细胞转移的组合时观察到的量或者相对于单独用单一免疫肿瘤治疗(即,单独给予该长效IL-2R β 偏向性激动剂或过继性细胞转移)进行治疗时观察到的量得以提高。

[0013] 为了清楚起见,关于给药顺序,其中术语“给予”在这种情况下用于指递送这些过继性细胞或该长效IL-2R β 偏向性激动剂,这些过继性细胞和该长效IL-2R β 偏向性激动剂可以同时或依序且以任何次序给予。此外,治疗可以包括单个治疗周期,或者可以包括多个周期。在包括过继性细胞转移和给予该长效IL-2R β 偏向性激动剂的初始疗法周期之后,额外轮次的疗法可以包括过继性细胞转移与给予该长效IL-2R β 偏向性激动剂的组合,或不伴随给予该长效IL-2R β 偏向性激动剂的过继性细胞疗法,或不伴随过继性细胞转移的给予该长效IL-2R β 偏向性激动剂。

[0014] 除非另外指示,否则以下实施例旨在同等地应用于上述每个方面,并且在适用时以单独和组合两种形式进行考虑。

[0015] 在一个或多个实施例中,该受试者是人类受试者。

[0016] 在一个或多个其他实施例中,该癌症是实体癌症。例如,在一个或多个实施例中,该癌症选自下组,该组由以下组成:乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌、骨癌、结肠直肠癌、胃癌、恶性黑素瘤、肝癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、甲状腺癌、肾癌、胆管癌、脑癌、子宫颈癌、上颌窦癌、膀胱癌、食管癌和肾上腺皮质癌。

[0017] 在又一个或多个其他实施例中,该癌症选自黑素瘤、肾癌、非小细胞肺癌、乳癌、膀胱癌、头颈癌和结肠癌。

[0018] 在一个或多个特定实施例中,该乳腺癌是三阴性乳腺癌。

[0019] 在一个或多个实施例中,在治疗实体癌性肿瘤时,在单一治疗周期后评价时,该方法有效于使实体肿瘤尺寸减小至少约25%。

[0020] 在一些其他实施例中,该癌症是转移性的。

[0021] 在一些其他实施例中,该癌症是液体癌症,如血癌。在一些实施例中,该癌症是淋巴瘤或白血病。在一个或多个相关的实施例中,该癌症是选自霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma)和非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)的白血病。

[0022] 在一个或多个实施例中,该过继性细胞疗法包括输注过继性T细胞或NK细胞。

[0023] 在一个或多个其他实施例中,该过继性细胞疗法包括输注肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)。

[0024] 在一个或多个实施例中,这些细胞是自体细胞。

[0025] 在一个或多个其他实施例中,这些细胞是同种异体细胞。在一些实施例中,这些同

种异体细胞靶向肿瘤抗原。

[0026] 在一个或多个其他实施例中,这些细胞经遗传工程改造。

[0027] 在一些实施例中,在给予IL-2R β 活化量的长效IL-2R β 偏向性激动剂之前提供过继性细胞疗法。

[0028] 在一些实施例中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂包括可释放地共价附接到聚乙二醇的阿地白介素。在又一些其他实施例中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂包括可释放地共价附接到4个、5个和6个或者4个、5个、6个和7个聚乙二醇聚合物的白介素-2,例如像阿地白介素。在又一些其他实施例中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂包括可释放地共价附接到平均约6个聚乙二醇聚合物的阿地白介素。在一个或多个其他实施例中,可释放地共价附接到阿地白介素的这些聚乙二醇聚合物是分支聚合物。

[0029] 在一些实施例中,在给予长效IL-2R β 偏向性激动剂的情况下,给予过继性细胞疗法一次(在单轮治疗中),随后进行额外轮次的该长效IL-2R β 偏向性激动剂给予。

[0030] 在针对该长效IL-2R β 偏向性激动剂的一个或多个实施例中,该长效IL-2R β 偏向性激动剂包括在组合物中,该组合物还包含药学上可接受的赋形剂。

[0031] 另外的方面和实施例在以下说明书和权利要求书中进行阐述。

附图说明

[0032] 图1A-图1H.这些图说明了如实例2中详细描述,用单剂量的示例性长效IL-2R β 偏向性激动剂RSLAIL-2(下文所述,其中“RSLAIL-2”是指可释放的PEG化白介素-2分子)或5日剂量的阿地白介素治疗后B16F10小鼠黑素瘤模型中的免疫细胞改变。在指示时间点从动物分离肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL),并通过流式细胞术评估免疫细胞群。每个数据点代表单独的小鼠肿瘤,并且线代表平均值。将来自2个至4个独立研究的数据合并,其中每个时间点重复3至4次。图1A显示在用媒介物(空心圆圈)、阿地白介素(实心正方形)和RSLAIL-2(实心三角形)中的每种治疗后的不同时间点(第5天、第7天和第10天)肿瘤中CD8⁺ T细胞的总百分比;图1B显示用媒介物(空心圆)、阿地白介素(实心正方形)和RSLAIL-2(实心三角形)中的每种治疗后的不同时间点肿瘤中记忆CD8⁺ T细胞的百分比;图1C显示用媒介物(空心圆)、阿地白介素(实心正方形)和RSLAIL-2(实心三角形)中的每种治疗后的不同时间点(第5天、第7天和第10天)肿瘤中活化的NK细胞的百分比;图1D和图1E显示在治疗后的不同时间点(第5天、第7天和第10天)肿瘤中CD4⁺ T细胞的百分比;图1F显示在治疗后的不同时间点(第5天、第7天和第10天)肿瘤中CD4⁺ Treg细胞的百分比;图1G显示在治疗后总CD4⁺细胞中Treg细胞的百分比;并且图1H提供在治疗后总CD8⁺细胞与Treg细胞的比率。

[0033] 图2是如实例3中所描述证明与未修饰的IL-1(阿地白介素,实心倒三角形)比较,RSLAIL-2(实心正方形)(及其释放的活性缀合IL-2形式,实心圆圈)的肿瘤药物代谢动力学的图。

[0034] 图3是描述实例5中采用的给药策略的示意图,其中在侵袭性鼠类黑素瘤模型中研究了RSLAIL-2或IL-2与pme1-1过继性细胞转移的组的抗肿瘤活性。

[0035] 图4提供了对于实例5中描述的研究,如由SEM确定的平均肿瘤体积(mm^3)相对于时间的图。通过水平轴下的箭头提供给药方案的示意图。图例:实心圆:ACT+媒介物;实心正方形:ACT+IL-2;实心三角形:ACT+RSLAIL-2。从图4中所示的结果可见,当和IL-2与过继性细

胞转移的组合比较时,在较低给药频率下,RSLAIL-2在与过继性细胞转移组合给予时提供显著肿瘤生长延迟(当和ACT与IL-2的组合比较时, $p < 0.0001$;与媒介物比较, $\#p < 0.0001$)(使用Bonferroni检验进行配对比较)。

[0036] 图5说明了对于实例5中所述的研究,通过内插达到 1000mm^3 的肿瘤体积的时间评估的每个肿瘤生长曲线的肿瘤生长延迟(与ACT+IL-2比较, $*p < 0.0001$;与媒介物比较, $\#p < 0.0001$ (对数秩Mantel-Cox检验); $N = 12/\text{组}$)。

[0037] 图6A和6B提供了到表达萤光素酶的pme1-1T细胞的过继性细胞转移后第19天的脾(图6A)和肿瘤(图6B)的目的区域(ROI)中的系列图像的量化(每个像素的计数),如实例5中对于体内生物发光成像实验所述。图6A和图6B两个图的图例相同:上图,实心三角形:所指示的ACT+RSLAIL-2;中图,实心正方形:ACT+IL-2;下图,实心圆:ACT+媒介物。这些图像证明了过继性细胞转移疗法与给予除白介素-2,阿地白介素外的药剂(如RSLAIL-2)的组合的有效性,因为在ACT/RSLAIL-2组合疗法中观察到持久应答,而相反地,ACT/IL-2疗法的应答减弱,即使用IL-2(阿地白介素)多次治疗时。

[0038] 图7A-图7C是如实例5中描述的各治疗组的肿瘤中免疫细胞数量的图,其中通过流式细胞术评估过继性细胞转移组合疗法(即,与IL-2或RSLAIL-2,或与对照媒介物)对肿瘤中的调节性T细胞和CD8+T细胞的作用。具体地,图7A说明了每个治疗组的肿瘤中Thy 1.1CD8细胞的数量(每个条从左到右为ACT+媒介物;ACT+IL-2和ACT+RSLAIL-2)。图7B说明了每个治疗组的肿瘤中CD4T reg的数量(每个条从左到右为ACT+媒介物;ACT+IL-2和ACT+RSLAIL-2)。图7C提供了如上所述每个治疗组的肿瘤中CD8细胞与Treg的数量比。这些数据说明了对于ACT+RSLAIL-2组合,肿瘤中CD8/Treg细胞比率大于在脾中观察到的比率,表明正常组织没有受到显著影响。此外,ACT+RSLAIL-2组合的CD8/Treg比率基本上高于ACT+IL-2组合中达到的比率,并且其中给予较少RSLAIL-2。

[0039] 图8A-8C说明了如通过流式细胞术评估的ACT组合疗法(即,与IL-2或RSLAIL-2,或与对照媒介物)对脾中的调节性T细胞和CD8+T细胞的作用,如实例5中所详述。更具体地,图8A说明了每个治疗组的脾中Thy 1.1CD8细胞的数量(每个条从左到右为ACT+媒介物;ACT+IL-2和ACT+RSLAIL-2)。图8B说明了每个治疗组的脾中CD4T reg的数量(每个条从左到右为ACT+媒介物;ACT+IL-2和ACT+RSLAIL-2)。图8C提供了如上所述每个治疗组的脾中CD8细胞与Treg的数量比。

[0040] 图9是显示如实例5中所述的每个治疗组在治疗后第5天脾细胞恢复的图示。

[0041] 图10是如实例5中所述在过继性细胞转移后给予IL-2或RSLAIL-2之后第12天肿瘤的IHC(免疫组织化学)。用鼠类抗CD8抗体对福尔马林固定/石蜡包埋的组织进行免疫组织化学染色;使用HALO图像分析软件(印迪卡实验室(Indica Labs),新墨西哥州)进行分析。该图显示了每组3只不同小鼠的肿瘤中的CD8浸润。第一栏("pos")显示CD8染色,第二栏("pos halo")是由HALO软件分析的载玻片,其中在彩色版本中,蓝点是阴性细胞,并且黄色到红色点是CD8阳性细胞(其中黄色是低CD8表达且红色是高CD8表达),第三栏是CD8 T细胞阳性区域的5倍放大。第4栏和第5栏分别是抗体抗CD8的阴性染色、正常染色和HALO分析。第6栏是H&E染色。第1栏中的深色区对应于ACT+RSLAIL-2组合疗法的彩色版本中第2栏中的黄色和红色点。此图证明了两个组之间CD8表达的显著差异,其中对于ACT+RSLAIL-2组合疗法而言,CD8表达水平显著较高。IHC说明了当与用非聚合物修饰的IL-2即阿地白介素治疗比

较时,在用长效偏向性IL-2R β -白介素-2 (RSLAIL-2) 治疗的情况下肿瘤内CD8 T细胞的持久性。

[0042] 图11是正常非肿瘤组织(肾和肝)的IHC,该IHC显示过继性细胞转移后,一剂IL-2(阿地白介素)或RSLAIL-2后第9天没有组织破坏性CD8 T细胞,如实例5中所述的。用鼠类抗CD8抗体对福尔马林固定/石蜡包埋的组织进行免疫组织化学染色;使用HALO图像分析软件(印迪卡实验室(Indica Labs),新墨西哥州)进行分析。

[0043] 图12提供了用于制备长效IL-2R β 偏向性激动剂的示例性白介素-2序列。

具体实施方式

[0044] 如在本说明书中所使用的,单数形式“一个/种(a/an)”和“该”包括复数个指示物,除非上下文中另外明确规定。

[0045] 在描述和要求本披露的某些特征时,除非另外指示,否则将依据以下定义使用以下术语。

[0046] “水溶性的非肽聚合物”是指在室温下在水中至少35%(以重量计)可溶的聚合物。然而,优选的水溶性非肽聚合物在水中优选大于70%(以重量计)、且更优选大于95%(以重量计)可溶。典型地,“水溶性”聚合物传输由相同溶液在过滤后传输的光的量的至少75%。优选地,这种未过滤的水性制剂传输由相同溶液在过滤后传输的光的量的至少95%。最优选的是在水中至少95%(以重量计)可溶或在水中完全可溶的水溶性聚合物。关于为“非肽的”,聚合物当含有少于35%(以重量计)的氨基酸残基时是非肽的。

[0047] 术语“单体”、“单体亚单元”和“单体单元”本文可互换使用并且是指聚合物的基本结构单元之一。在均聚物的情况下,单一的重复结构单元形成该聚合物。在共聚物的情况下,两个或更多个结构单元重复出现--以一种模式或随机地--以形成该聚合物。与本披露结合使用的优选聚合物是均聚物。该水溶性非肽聚合物包括串联附接以形成单体链的一个或多个单体。

[0048] 如本文所使用的“PEG”和“聚乙二醇”意指包括任何水溶性的聚(环氧乙烷)。除非另外指示,否则“PEG聚合物”或聚乙二醇是如下物质,其中基本上所有(优选所有)单体亚单元是环氧乙烷亚单元,但是,该聚合物可以含有不同的封端部分或官能团,例如用于缀合的封端部分或官能团。用于本披露的PEG聚合物将包括以下两种结构之一:“(CH₂CH₂O)_n-”或“(CH₂CH₂O)_{n-1}CH₂CH₂-”,这取决于末端的一个或多个氧是否被置换,例如在合成转化期间。如上所述,对于这些PEG聚合物,该变量(n)的范围典型地是从约3至4000,并且整个PEG的末端基团和架构可以变化。

[0049] 关于聚合物的几何学或总体结构而言的“分支”是指具有从分支点或中心结构特征延伸的两个或更多个聚合物“臂”或“链”的聚合物。

[0050] “生理学上可裂解的”或“可水解的”或“可降解的”键是典型地与水在生理条件下和在任何合适的水解方法下进行反应(即,被水解)的相对不稳定的键。键在水中水解的趋势可能不仅取决于在给定分子内连接两个原子的键联的一般类型,还取决于附接到这些原子上的取代基和分子的整体结构。水解不稳定的或弱的键联典型地可以包括但不限于羧酸酯、磷酸酯、酸酐、缩醛、缩酮、酰氧基烷基醚、亚胺、原酸酯、肽、寡核苷酸、硫酯以及碳酸酯。

[0051] “酶可降解的键联”意指经受一种或多种酶降解的键联。

[0052] “稳定的”键联或键是指在水中基本上稳定,也就是说在生理条件下经延长的时间段没有经受任何明显程度水解的化学键。水解稳定的键联的实例通常包括但不限于以下键联:碳-碳键(例如,在脂族链中)、醚、酰胺、胺等。一般而言,稳定的键联是在生理条件下表现出小于约1%-2%的每日水解速率的键联。代表性化学键的水解速率可以在大多数标准化学教科书中找到。

[0053] 共价“可释放的”键联(例如,在共价可释放地附接到活性部分如白介素-2的聚乙二醇部分的上下文中)是通过任何合适的机制从活性部分释放或脱离聚乙二醇部分(即,去PEG化)的键联。

[0054] 如本文所使用,术语“治疗癌症”并非旨在是绝对术语,并且可以包括例如减小肿瘤的尺寸或减少癌细胞的数量,使癌症缓解或阻止癌细胞的尺寸或细胞数量增长等。在一些情况下,根据本披露的治疗产生改善的预后。

[0055] 如本文所使用,短语“需要治疗的受试者”是指已被诊断患有癌症的个体或受试者。

[0056] 如本文所使用,术语“提高”(例如在提高的应答的上下文中)是指当与给定的基线比较时,受试者或肿瘤细胞对治疗(例如,如本文所披露的)的改善的应答能力。例如,基于对治疗的应答性的任何一个或多个指标,提高的应答可以包括应答性增加至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%或更多。如本文所使用,“提高”还可以指提高有利地对治疗反应的受试者的数量,例如,当与这种比较的给定基线比较时。

[0057] 短语“治疗有效”、“治疗有效量”或“有效量”是指促进所希望生理应答的足够量或剂量,例如但不限于足以促进T细胞应答的量或剂量。

[0058] “基本上”或“实质上”意指几乎全部地或完全地,例如给定量的95%或更大。

[0059] “药学上可接受的赋形剂”或“药学上可接受的载体”是指可以包括在本文描述的组合物中并且不会对受试者引起显著不良毒理学作用的组分。

[0060] 如本文所使用,术语“患者”或“受试者”是指患有或易患可以通过给予如本文提供的化合物或组合物或组合来预防或治疗的病症(如癌症)的活生物体,并且包括人和动物两者。受试者包括但不限于哺乳动物(例如鼠类、猿猴、马科、牛科、猪科、犬科、猫科等),并且优选是人。

概述

[0061] 虽然过继性细胞疗法是诱导有效抗肿瘤应答的有前景的疗法,但在过继性细胞疗法后,癌性肿瘤在初始应答后经常复发。此外,用于过继性T细胞转移的现有方案通常需要免疫刺激剂如细胞因子或其他试剂来刺激并维持T细胞增殖,但此类刺激剂可以刺激效应细胞和调节性T细胞两者。为了解决与当前过继性细胞转移策略相关的至少一些缺点,本文提供了一种方法,该方法包括向患有癌症的受试者给予离体扩增的肿瘤反应性T细胞和IL-2R β 活化量的长效IL-2R β 偏向性激动剂。虽然细胞因子如高剂量IL-2长期以来一直与过继性细胞转移组合使用,但这种治疗导致报告的患者毒性,如毛细血管渗漏综合征,输注细胞缺乏持久性和低应答率。此外,临床批准的IL-2分别通过结合IL-2R β γ 和IL-2R $\alpha\beta$ γ 复合物扩增肿瘤杀伤性CD8⁺效应T细胞(CD8⁺T)以及调节性T细胞(Treg),这样以来肿瘤中的Treg可以产生免疫遏制,其阻碍所希望的应答抗肿瘤。因此,鉴于这些和其他缺点,需要进一步

提高来提供具有改善的抗肿瘤特异性的持久的、可再现的且有效的基于过继性细胞转移的癌症疗法。因此,本披露至少部分基于包括基于细胞的疗法和给予长效IL-2R激动剂且更具体地IL-2R β 偏向性激动剂的特别有益的治疗组合的发现,如示例性体内动物模型中所说明的。

[0062] IL-2通过含有 α (IL2R α ,CD25)、 β (IL2R β ,CD122)和常见 γ 链受体(γ_c ,CD132)的受体-信号传导复合物刺激免疫细胞增殖和活化。在高剂量时,IL-2与异二聚体IL2R β γ 受体结合,引起肿瘤杀伤性CD8+记忆效应T (CD8⁺T)细胞的所希望扩增。然而,IL2还以更大的亲和力结合至其异三聚体受体IL2R $\alpha\beta\gamma$,其扩增免疫遏制性CD4⁺、CD25⁺调控性T细胞(Treg),这可能导致对癌症免疫疗法的不良作用。因此,为了克服与IL-2提高的免疫肿瘤学策略相关的一个或多个缺点,本文提供了一种治疗模式,该治疗模式组合过继性细胞转移与给予IL-2R $\alpha\beta$ 偏向性激动剂(并且特别是长效IL-2R $\alpha\beta$ 偏向性激动剂)。不受理论束缚,本申请人已经发现通过利用其中与负责活化免疫遏制性Treg的IL-2R α 亚单元相互作用的区域被遮蔽(即,其活性被遏制或阻抑)的长效白介素-2分子,即长效IL-2R $\alpha\beta$ 偏向性激动剂,可以(除其他事项外)选择性地增强过继性细胞转移诱导的T细胞应答以达到优异的治疗功效,如将从本披露和支持性实例中变得显而易见。

过继性细胞转移疗法

[0063] 本文提供的治疗方法包括给予离体扩增的肿瘤反应性T细胞,即用于刺激癌症特异性免疫应答。本文提供的组合物和方法(除其他事项外)可用于临床应用和研究应用两者中。可以根据本文描述的方法给予各种过继性细胞转移疗法,并且本披露内容在这个方面不受限制。不受理论束缚,据信可以经由IL-2路径(即,经由与过继性细胞转移一起给予长效IL-2R $\alpha\beta$ 偏向性激动剂)模拟由过继性细胞转移例如T细胞转移的免疫活化和本文提供的长效IL-2R $\alpha\beta$ 偏向性激动剂的互补机制产生的所希望的T细胞应答来达到提高的抗肿瘤结果。

[0064] 任何合适的过继性细胞转移疗法都可以用于本文提供的方法中,并且本披露在这个方面不受限制。参见例如,Rosenberg,S.等人,Adoptive Cell Transfer:A clinical path to effective cancer immunotherapy.[过继性细胞转移:有效的癌症免疫疗法的临床途径]Nat Rev Cancer.[自然癌症综述]2008年4月;8(4):299-308。例如,可以使用过继性T细胞或NK细胞疗法。例如,在选择后,可以将肿瘤特异性宿主T细胞与肿瘤抗原或细胞离体组合,扩增并重新输注到受试者中。在输注之前,还可以进行患者预调节,例如,使用淋巴细胞耗减性非清髓性化疗(NMC)来遏制内源性调节性T细胞并为输注的T细胞提供优化的环境;可替代地,可以使用环磷酰胺或任何其他合适的调节剂。这种预调节用于消除或基本上减少Treg(调节性T细胞)和淋巴细胞的数量,这些细胞与转移的细胞竞争稳态细胞因子。可以从多种来源(例如淋巴结,如腹股沟、肠系膜、浅表远端附件等;骨髓;脾;或外周血)以及肿瘤(例如肿瘤浸润性淋巴细胞)分离宿主细胞。细胞可以是同种异体的,或者优选是自体的。为了进行离体刺激,无菌地取出宿主细胞,并将其悬浮在本领域已知的任何合适的培养基中。使用多种方案中的任一种(特别是抗CD3、B7、抗CD28等的组合)刺激并扩增细胞。用于离体扩增宿主T细胞的合适方案如“Focus on Adoptive T Cell Transfer Trials in Melanoma[关注黑素瘤过继性T细胞转移试验]”,Clinical and Developmental Immunology[临床和发育免疫学],卷2010,领域ID 260267中所述。

[0065] 例如,可以通过如下步骤进行过继性细胞转移:(i)从哺乳动物受试者如人获得自体淋巴细胞,(ii)培养自体淋巴细胞以产生扩增的淋巴细胞,和(iii)向受试者给予(即,患者)扩增的淋巴细胞。优选地,淋巴细胞来自肿瘤,例如其为TIL,并且是从待治疗的受试者中分离的(即自体转移)。还可以通过以下步骤进行自体过继性细胞疗法:(i)培养自体淋巴细胞以产生扩增的淋巴细胞;(ii)向受试者给予非骨髓性淋巴细胞耗减性化疗(NMC);和(iii)给予NMC后,给予扩增的淋巴细胞。可以例如通过机械分解肿瘤或酶促方法(例如,使用胶原酶或DNA酶),例如从切除的肿瘤的基质获得自体TIL。可替代地,细胞可以从血液获得,例如如果细胞经遗传工程改造以表达抗肿瘤T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR),用混合的淋巴细胞肿瘤细胞培养物富集,或使用自体抗原呈递细胞和来源于肿瘤的肽克隆。

[0066] 可以通过本领域已知的许多方法中的任一种来完成淋巴细胞(包括肿瘤浸润性淋巴细胞,如T细胞)的扩增。例如,可以在饲养淋巴细胞和白介素-2(IL-2)、IL-7、IL-15、IL-21或其组合存在下,使用非特异性T细胞受体刺激扩增T细胞。非特异性T细胞受体刺激可以包括例如刺激量的小鼠单克隆抗CD3抗体(可从例如华盛顿州西雅图LS生物公司(LS Bio)获得)。可替代地,可以通过在T细胞生长因子如白介素-2或白介素-15(优选白介素-2)存在下,用一种或多种抗原(包括其抗原部分,如表位)体外刺激外周血单核细胞(PBMC)来快速扩增T细胞,这些抗原可任选地由载体表达,如人白细胞抗原A2(HLA-A2)结合肽。体外诱导的T细胞通过用脉冲到表达HLA-A2的抗原呈递细胞上的一种或多种相同的癌症抗原再刺激来快速扩增。可替代地,可以用经照射的自体淋巴细胞或用经照射的HLA-A2⁺同种异体淋巴细胞和白介素-2再刺激T细胞。

[0067] 扩增的TIL的特异性肿瘤反应性可以通过本领域已知的任何方法测试,例如,通过在与肿瘤细胞共培养后测量细胞因子释放(例如,干扰素- γ)。例如,过继性细胞转移可以包括在细胞快速扩增之前针对CD8⁺T细胞富集培养的TIL。在含有白介素-2的培养基中培养TIL后,T细胞中CD4⁺细胞耗减并且CD8⁺细胞富集,使用例如CD8微珠分离。在一些实施例中,将促进自体T细胞的生长和活化的T细胞生长因子在与自体T细胞同时或在自体T细胞之后向受试者给予。T细胞生长因子可以是促进自体T细胞生长和活化的任何合适生长因子。合适的T细胞生长因子的实例包括白介素(IL)-2、IL-7、IL-15、IL-12和IL-21,这些T细胞生长因子可以单独使用或以各种组合使用,如IL-2和IL-7,IL-2和IL-15,IL-7和IL-15,IL-2、IL-7和IL-15,IL-12和IL-7,IL-12和IL-15,或IL-12和IL2。

[0068] 过继性细胞疗法还可以使用遗传修饰的外周T细胞进行,这些遗传修饰的外周T细胞即通过遗传转移典型地由MHC限制性T细胞受体(TCR)或非MHC限制性合成嵌合抗原受体组成的抗原特异性受体而形成的肿瘤靶向T细胞(参见例如,Sadelain,M.等人,Current Opinion in Immunology[免疫学当前观点],卷21(2),215-223(2009);还参见Kalos,M.等人,Sci Transl Med[科学转化医学]2011;3:95ra73;和Grupp SA等人,N Engl J Med[新英格兰医学期刊]2013;368:1509-1518)。使用这种方法鉴别了高亲合力抗肿瘤T细胞,并将编码其T细胞受体(TCR)的基因克隆并将插入逆转录病毒中。然后产生逆转录病毒上清液并用于将T细胞受体插入正常淋巴细胞中。然后通过荧光活化细胞分选分析和体外识别HLA-A2⁺526黑素瘤系而不是HLA-A2⁺888黑素瘤系,在未转导(UnTd)和转导(Td)的细胞中比较T细胞受体的表达(Rosenberg,S.等人,Nat Rev.Cancer[自然癌症综述],2008年4月;84(4):299-308)。也可以使用通用型T细胞,如Qasim,W.等人,Sci.Transl.Med.[科学转化医学]9,

eaaj2013 (2017) 所述。例如,可以使用TALEN介导的细胞工程改造与慢病毒转导的组合产生通用CAR19T细胞,并用于过继性细胞疗法。通过非人白细胞抗原匹配的供体细胞的慢病毒转导和同时转录活化因子样效应核酸酶 (TALEN) 介导的T细胞受体 α 链和CD52基因座的基因编辑产生细胞。

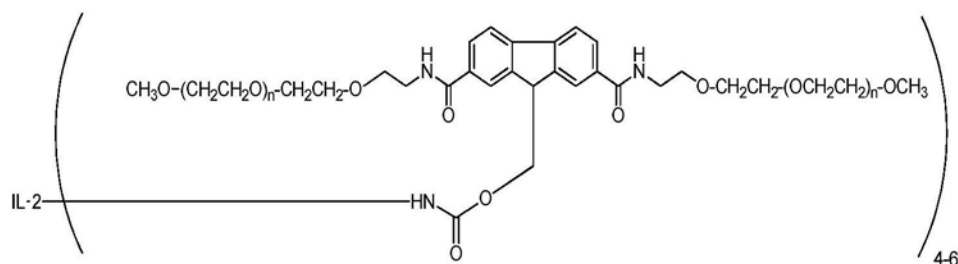
[0069] 然后通过输注(例如静脉内或动脉内输注)或其他合适的递送形式向宿主给予扩增的细胞,该给予典型地持续约30分钟至约60分钟,但可能需要更短或更长的持续时间。例如,典型地给予约 1×10^{10} 个淋巴细胞至约 15×10^{10} 个淋巴细胞。其他给药途径包括腹膜内、鞘内和淋巴管内。在合适的培养基中提供扩增的细胞,该培养基可任选地包括多种药学上可接受的添加剂、粘合剂、填充剂、载体、防腐剂、稳定剂,乳化剂、缓冲剂等中的任一种。稀释剂和赋形剂包括水、盐水和葡萄糖。代表性培养基包括但不限于例如复方电解质注射液,1型,USP,标称pH范围为约5.5至8.0;含有人血清或胎牛血清的组织培养基;或无异种和无血清的培养基,例如像PRIME-XV T Cell Expansion XSFM(欧文科技公司(Irvine Scientific))。可商购培养基包括RPMI 1640(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific),沃尔瑟姆,马萨诸塞州)、AIM V细胞培养基(赛默飞世尔科技公司,沃尔瑟姆,马萨诸塞州)和X-VIVO 15(隆萨公司(Lonza),巴塞尔,瑞士)。

长效IL-2R β 偏向性激动剂

[0070] 本文描述的方法涉及给予长效IL-2R β 偏向性激动剂。在此方面,本披露不限于任何特定的长效IL-2R β 偏向性激动剂,只要在相同体外模型中该激动剂表现出的对IL-2R β 的体外结合亲和力比对IL-2R $\alpha\beta$ 的结合亲和力大至少5倍(更优选地大至少10倍),并且具有比未修饰的IL-2大至少10倍的有效体内半衰期(基于IL-2的体内消失的半衰期)。作为举例,有可能测量针对IL-2的结合亲和力作为标准。在这方面,实例1中提及和下文描述的RSLAIL-2分子表现出相对于IL-2,对IL-2R $\alpha\beta$ 的亲和力降低约60倍;但是相对于IL-2,对IL-2R β 的亲和力仅降低约5倍。因此,示例性长效IL-2R β 偏向性激动剂是RSLAIL-2。

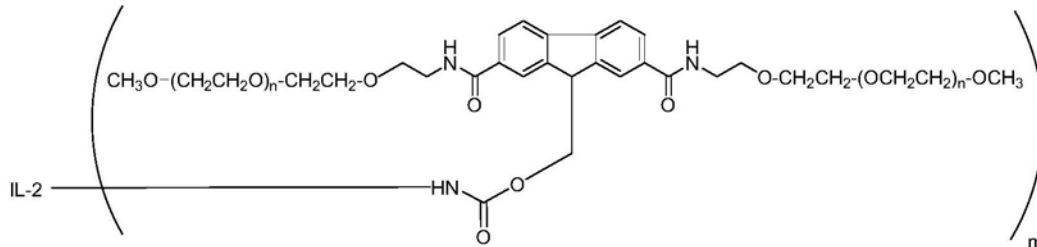
[0071] 长效IL-2R β 偏向性激动剂的非限制性实例描述于国际专利公开号WO 2012/065086和WO 2015/125159中。示例性长效IL-2R β 偏向性激动剂是本申请实例1中提及的RSLAIL-2,其中可释放的PEG基于如下所示的2,7,9取代的芴,其中聚(乙二醇)链经由酰胺键联(芴-C(O)-NH~)从中心芴环的2位和7位延伸,得到分支PEG。基于芴基的分支PEG部分可释放地共价附接到白介素-2部分的氨基基团。IL-2部分氨基基团和基于芴基的分支PEG部分之间的键联是通过亚甲基基团(-CH₂-)附接到芴环9位的氨基甲酸酯键联。具有这种一般结构的可释放PEG典型地在生理条件下经受 β -消除反应,以缓慢释放与IL-2共价附接的PEG部分。据信PEG部分在给药后依次释放。

[0072] 在这方面,在一些优选的实施例中,长效IL-2R β 偏向性激动剂包括由下式涵盖的化合物,式I:



其中IL-2是白介素-2,并且每个“n”是约3至约4000的整数,或其药学上可接受的盐。每个“n”(即,每个PEG“臂”)的代表性范围包括例如约40至约550的整数,或约60至约500的整数,或约113至约400的整数。在一个优选的实施例中,所示的每个线性PEG臂中的“n”为约227。

[0073] 在一个或多个实施例中,具有前一段中所述的式的长效IL-2R β 偏向性激动剂包含在如下组合物中,该组合物包含不超过10%(基于摩尔量)并且优选不超过5%(基于摩尔量)的由下式涵盖的化合物,式II:



[0074] 其中IL-2是白介素-2,“m”(指与IL-2附接的聚乙二醇部分的数量)是选自1、2、3、7和>7组成的组的整数,或其药学上可接受的盐。

[0075] 在一些实施例中,例如,参考式I,长效IL-2R β 偏向性激动剂平均具有约六个可释放地附接到IL-2的分支聚乙二醇部分。在一些其他实施例中,例如,参考式I,长效IL-2R β 偏向性激动剂通常被认为是无活性的前药,即,其在给药时无活性,并且通过在体内缓慢释放聚乙二醇部分提供附接有比初始给予的缀合物少的PEG部分的白介素-2的活性缀合形式,并且有效于在肿瘤位点处达到持续浓度。

[0076] RSLAIL-2的其他示例性组合物包含根据上式的化合物,其中该分子的总体聚合物部分具有在约250道尔顿至约90,000道尔顿范围内的重均分子量。其他适合的范围包括选自约1,000道尔顿至约60,000道尔顿的范围、从约5,000道尔顿至约60,000道尔顿的范围、约10,000道尔顿至约55,000道尔顿的范围、从约15,000道尔顿至约50,000道尔顿的范围、以及从约20,000道尔顿至约50,000道尔顿的范围内的重均分子量。

[0077] 聚乙二醇聚合物部分的其他作例证的重均分子量包括约200道尔顿、约300道尔顿、约400道尔顿、约500道尔顿、约600道尔顿、约700道尔顿、约750道尔顿、约800道尔顿、约900道尔顿、约1,000道尔顿、约1,500道尔顿、约2,000道尔顿、约2,200道尔顿、约2,500道尔顿、约3,000道尔顿、约4,000道尔顿、约4,400道尔顿、约4,500道尔顿、约5,000道尔顿、约5,500道尔顿、约6,000道尔顿、约7,000道尔顿、约7,500道尔顿、约8,000道尔顿、约9,000道尔顿、约10,000道尔顿、约11,000道尔顿、约12,000道尔顿、约13,000道尔顿、约14,000道尔顿、约15,000道尔顿、约20,000道尔顿、约22,500道尔顿、约25,000道尔顿、约30,000道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿、约50,000道尔顿、约55,000道尔顿、约60,000道尔顿、约65,000道尔顿、约70,000道尔顿和约75,000道尔顿。在一些实施例中,聚乙二醇聚合物的重均分子量是约20,000道尔顿。

[0078] 如上所述,长效IL-2R β 偏向性激动剂可以呈药学上可接受的盐的形式。典型地,此类盐通过与药学上可接受的酸或酸等效物反应而形成。术语“药学上可接受的盐”在此方面通常将是指相对无毒的无机和有机酸加成盐。这些盐可以在给予媒介物或剂型制造过程中原位制备,或通过如本文描述的长效白介素-2与适合的有机酸或无机酸分别反应并分离

因此形成的盐来制备。代表性盐包括氢溴酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、硝酸盐、乙酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、月桂酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲苯磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、萘酸盐 (naphylate)、草酸盐、甲磺酸盐、葡庚糖酸盐、乳糖醛酸盐和月桂基磺酸盐等。(参见例如, Berge等人, (1977) “Pharmaceutical Salts [药盐]”, J. Pharm. Sci. [药科学杂志] 66:1-19)。因此, 所述盐可以衍生自无机酸, 这些无机酸如盐酸盐、氢溴酸、硫酸、氨基磺酸、磷酸、硝酸等; 或由有机酸制备, 这些有机酸如乙酸、丙酸、丁二酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、棕榈酸、马来酸、羟基马来酸、苯基乙酸、谷氨酸、苯甲酸、水杨酸、磺胺酸、2-乙酰氧基苯甲酸、富马酸、甲苯磺酸、甲磺酸、乙磺酸、草酸、衣康酸等。

[0079] 关于前述IL-2 β 偏向性激动剂, 如本文所使用的术语“IL-2”是指具有人IL-2活性的部分。在IL-2残基的上下文中, 术语“残基”是指IL-2分子中与聚合物如聚乙二醇共价衔接后在一个或多个共价衔接位点处保留的部分, 如上式所示。应当理解, 当未修饰的IL-2与聚合物如聚乙二醇共价衔接时, 由于与聚合物的键联相关的一个或多个共价键的存在而使IL-2轻微改变。与另一个分子如聚乙二醇部分衔接的IL-2的这种轻微改变形式在本文在一些情况下可被称为IL-2的“残基”, 但应理解在提及IL-2的聚乙二醇缀合物时, 提及这种缀合物中的IL-2涵盖IL-2的这种轻微改变形式, 其中例如IL-2分子内的氨基基团(例如赖氨酸)与一个或多个PEG部分共价衔接。

[0080] 例如, 具有对应于国际专利公开号WO 2012/065086中描述的SEQ ID NO:1至4中任一个的氨基酸序列的蛋白质被认为是示例性IL-2蛋白, 与其基本上同源的任何蛋白质或多肽也是如此。本文还提供了这些作例证的白介素-2序列, 并且这些序列包括以下项: 人白介素-2, 包括信号肽序列; 人白介素-2; 阿地白介素; 和白介素-2特异性激动剂(也称为BAY 50-4798)。术语“基本上同源的”意指特定的主题序列, 例如突变序列, 因一个或多个取代、缺失或添加而相对于参考序列变化, 其净效应不会引起参考序列与主题序列之间不利的功能差异。为了本文的目的, 具有大于95%的同源性、等效的生物活性(不过不必是等效强度的生物活性)、以及等效的表达特征的序列被认为是基本上同源的。出于确定同源性的目的, 应当忽略成熟序列的截短。如本文所使用, 术语“IL-2”包括例如通过定点诱变而有意修饰或通过突变而偶然修饰的蛋白质。这些术语还包括具有1至6个额外糖基化位点的类似物、在蛋白质的羧基端具有至少一个额外氨基酸的类似物(其中该一个或多个额外氨基酸包括至少一个糖基化位点)以及具有包括至少一个糖基化位点的氨基酸序列的类似物。该术语包括天然部分和重组产生的部分。另外, IL-2可以来源于人类来源、动物来源以及植物来源。一种示例性和优选的白介素-2是称为阿地白介素的重组IL-2。阿地白介素(SEQ ID NO:3)与天然IL-2的不同之处在于其未经糖基化, 因为其来源于大肠杆菌, 没有N端丙氨酸, 并且在氨基酸位置125处具有取代半胱氨酸的丝氨酸。

[0081] 可以使用常规方法(如涉及放射性标记化合物、体内给予该化合物和确定其清除率的那些)来判定提出为长效IL-2 β 偏向性激动剂的化合物是否是“长效的”。出于本文的目的, IL-2 β 偏向性激动剂的长效性质典型地使用流式细胞术来测定以测量在给予有待在小鼠中评估的激动剂之后的不同时间点淋巴细胞中的STAT5磷酸化。作为参考, 在IL-2的情况下信号丢失约24小时, 但是持续时间段大于长效IL-2 β 偏向性激动剂的时间段。作为说明, 对于RSLAIL-2组合物, 信号持续数天。

[0082] 现在考虑本文描述的长效激动剂的IL-2R β 偏向性,实例2提供与RSLAIL-2的示例性组合物的受体偏向性有关的体外数据和体内数据两者。如实例2中所描述,在鼠类黑素瘤肿瘤模型中,当与IL-2比较时,RSLAIL-2的CD8/调节性T细胞的比率支持IL-2受体 β 相对于IL2受体 α 的优先活化。示例性长效IL-2R β 偏向性激动剂如RSLAIL-2例如可有效于相对于Treg优先活化和扩增效应CD8+T细胞和NK细胞。

[0083] 此外,代表性的长效IL-2R β 偏向性激动剂如RSLAIL-2相对于IL-2提供增加的肿瘤暴露并且优选地显著提高的肿瘤暴露,例如当针对IL-2的等效物归一化时暴露增加至少50倍、或暴露增加至少100倍、或暴露增加至少200倍、或暴露增加至少300倍、或暴露增加至少400倍、或暴露增加至少500倍。作为说明,实例3中描述了RSLAIL-2在小鼠黑素瘤肿瘤模型中的抗肿瘤活性。如其中所描述,发现RSLAIL-2相对于IL-2提供显著提高的肿瘤暴露,例如500倍(基于IL-2等效物归一化)。

方法

[0084] 基于如本文描述的长效IL-2R β 偏向性激动剂的至少一种或多种特征,本文提供了在癌症患者中有效诱导免疫应答,之后给予长效IL-2R β 偏向性激动剂的方法,这些方法通过给予本文描述的已离体培养和扩增的自体或同种异体抗肿瘤T细胞或其他细胞,随后给予其中与负责活化免疫抑制性Treg的IL2R α 亚单元相互作用的区域被遮蔽的长效IL-2R β 偏向性激动剂来进行,从而获得优异的治疗功效。

[0085] 根据本文描述的方法,以IL-2R β 活化量提供长效IL-2R β 偏向性激动剂。本领域的普通技术人员可以确定多少给定的长效IL-2R β 偏向性激动剂足以提供针对IL-2R β 的临床相关激动活性。例如,本领域的普通技术人员可以参考文献,和/或给予一系列增加量的长效IL-2R β 偏向性激动剂并且确定哪个或哪些量提供IL-2R β 的临床上有效的激动活性。可替代地,长效IL-2R β 偏向性激动剂的活化量可以使用以上描述的体内STAT5磷酸化测定来确定(在给予之后体内确定),其中认为足以在多于10%NK细胞中以峰值诱导STAT5磷酸化的量是活化量。

[0086] 然而,在一种或多种情况下,IL-2R β 活化量是以蛋白质的量表示的由以下范围中的一个或多个涵盖的量:约0.01mg/kg至100mg/kg;约0.01mg/kg至约75mg/kg;约0.02mg/kg至约60mg/kg;约0.03mg/kg至约50mg/kg;约0.05mg/kg至约40mg/kg;约0.05mg/kg至约30mg/kg;约0.05mg/kg至约25mg/kg;约0.05mg/kg至约15mg/kg;约0.05mg/kg至约10mg/kg;约0.05mg/kg至约5mg/kg;约0.05mg/kg至约1mg/kg。在一些实施例中,以小于或等于0.7mg/kg的剂量给予长效IL-2R β 偏向性激动剂。特定的作例证的给药范围包括例如约0.1mg/kg至约10mg/kg、或约0.2mg/kg至约7mg/kg或从约0.2mg/kg至小于约0.7mg/kg。

[0087] 为了确认,就长效IL-2R β 偏向性激动剂而言,活化的量和程度可以广泛变化,并且在与过继性细胞转移疗法结合时仍然有效。也就是说,在足够延长的时间段内对IL-2R β 仅表现出最小激动剂活性的一定量的长效IL-2R β 偏向性激动剂仍然可以是长效IL-2R β 偏向性激动剂,只要与过继性细胞疗法组合给予时,本文描述的方法能够产生临床上有意义的应答。在一些情况下,当伴随过继性细胞转移疗法时,由于(例如)协同相互作用和应答,可能仅需要IL-2R β 的最小激动剂活性。

[0088] 在一个或多个实施例中,在给予长效IL-2R β 偏向性激动剂之前进行过继性细胞转移。例如,基于过继性细胞转移的细胞输注可以在给予长效IL-2R β 偏向性激动剂之前瞬间、

最多1小时、最多2小时、最多3小时、最多4小时、最多5小时、最多6小时、最多7小时、最多到8小时、最多9小时、最多10小时、最多11小时、最多12小时、最多1天、最多2天、最多3天、最多4天、最多5天、最多6天、最多7天、最多8天、最多9天、最多10天、最多11天、最多12天、最多13天、最多14天、最多15天、最多16天、最多17天、最多18天、最多19天、最多20天、最多21天、最多22天、最多23天、最多24天、最多25天、最多26天、最多27天、最多28天、最多29天、最多1个月、最多3个月、最多6个月或其任何组合给予。

[0089] 本文描述的治疗方法可以持续长达监督患者护理的临床医生认为该治疗方法有效的的时间。指示该治疗方法有效的非限制性参数包括以下参数中的任何一个或多个：肿瘤缩小(就重量和/或体积而言)；个体肿瘤集落的数量减少；肿瘤消除；和无进展存活。肿瘤尺寸的变化可以通过任何适合的方法如成像来确定。可以采用各种诊断成像方式，如计算机断层摄影术(CT扫描)、双能CDT、正电子发射断层摄影术和MRI。

[0090] 长效IL-2R β 偏向性激动剂的实际剂量以及与本文描述的方法相关的给药方案将根据以下因素变化：受试者的年龄、体重和一般状况，以及所治疗癌症的类型和进展，医疗保健专业人员的判断，所采用的特定过继性细胞转移疗法和待给予的长效IL-2R β 偏向性激动剂。

[0091] 关于过继性细胞转移和给予长效IL-2R β 偏向性激动剂的频率和时间表，本领域普通技术人员将能够确定适当的频率。例如，在一个治疗周期中，临床医生可以进行过继性细胞转移与给予长效IL-2R β 偏向性激动剂的组合，给予长效IL-2R β 偏向性激动剂是与过继性细胞转移同时进行，或优选地在过继性细胞转移后进行。例如，在一些治疗方式中，长效IL-2R β 偏向性激动剂在过继性细胞转移的7天内给予(例如，在第1、2、3、4、5、6或7天中的任一天)。在一些情况下，长效IL-2R β 偏向性激动剂在过继性细胞转移的4天内给予，例如在第1、2、3或4天中的任一天给予。基于IL-2R β 偏向性激动剂的长效性质，这种化合物典型地相对不频繁地给予(例如，每三周一次、每两周一次、每8-10天一次、每周一次等)。

[0092] 与治疗过程相关的示例性时间长度包括约一周；约两周；约三周；约四周；约五周；约六周；约七周；约八周；约九周；约十周；约十一周；约十二周；约十三周；约十四周；约十五周；约十六周；约十七周；约十八周；约十九周；约二十周；约二十一周；约二十二周；约二十三周；约二十四周；约七个月；约八个月；约九个月；约十个月；约十一个月；约十二个月；约十三个月；约十四个月；约十五个月；约十六个月；约十七个月；约十八个月；约十九个月；约二十个月；约二十一个月；约二十二个月；约二十三个月；约二十四个月；约三十个月；约三年；约四年和约五年。典型地，向患者提供单轮过继性细胞转移，随后提供一个或多个剂量的长效IL-2R β 偏向性激动剂，然而，在一些情况下，可以进行一个或多个额外周期的过继性细胞转移。

[0093] 本文描述的治疗方法典型地持续长达监督患者护理的临床医生认为该治疗方法有效(即该患者对治疗有应答)的时间。指示该治疗方法有效的非限制性参数可以包括以下参数中的一个或多个：肿瘤缩小(就重量和/或体积和/或视觉外观而言)；个体肿瘤集落的数量减少；肿瘤消除；无进展存活；通过合适的肿瘤标志物(如果适用)得知的适当应答，NK细胞(自然杀伤)细胞的数量增加，T细胞的数量增加，记忆T细胞的数量增加，中枢记忆T细胞的数量增加，调节性T细胞如CD4+Treg、CD25+Treg和FoxP3+Treg的数量减少。

[0094] 本文提供的方法可用于(除其他事项外)治疗患有癌症的患者。例如，患者可能对

单独的过继性细胞转移以及过继性细胞转移与长效IL-2R β 偏向性激动剂的组合有应答,但对组合更易有应答。作为进一步举例,患者可能对过继性细胞转移或长效IL-2R β 偏向性激动剂无应答,但对组合有应答。作为仍进一步举例,患者可能对单独的过继性细胞转移或长效IL-2R β 偏向性激动剂中的任一种无应答,但对组合有应答。

[0095] 长效IL-2R β 偏向性激动剂的给药典型地通过注射进行。还涵盖其他给药方式,如经肺、经鼻、经颊、经直肠、舌下和经皮给药。如本文所使用,术语“肠胃外”包括皮下、静脉内、动脉内、瘤内、淋巴管内、腹膜内、心脏内、鞘内和肌肉内注射,以及输注注射。如前所述,可以分别给予过继性细胞和长效IL-2R β 偏向性激动剂。可替代地,如果希望在初始给药时或在整个治疗过程中或在给药方案的各个阶段同时提供过继性细胞转移和给予长效IL-2R β 偏向性激动剂,并且这些细胞和长效IL-2R β 偏向性激动剂在一起和在给定配制品中是相容的,则可以通过输注单一剂型/配制品(例如,静脉内给予含有两种免疫组分的静脉内配制品)来达到同时给药。

[0096] 可以通过注射包括例如IL-2R β 偏向性激动剂(例如,RSLAIL-2)和稀释剂的组合物来向患者给予IL-2R β 偏向性激动剂。关于可能的稀释剂,该稀释剂可以选自由以下物质组成的组:抑菌性注射用水、5%右旋糖水溶液、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)、乳酸化林格氏溶液、盐水、无菌水、去离子水和其组合。

[0097] 本文描述的治疗组合还可以以试剂盒的形式提供,该试剂盒包含长效IL-2R β 偏向性激动剂,伴随用于与过继性细胞转移组合使用的说明书。如上所述,长效IL-2R β 偏向性激动剂可以包括在单剂量组合物中,任选地伴随一种或多种药学上可接受的赋形剂。适合的药学上可接受的赋形剂包括例如在Handbook of Pharmaceutical Excipients,第7版,Rowe,R.C.编,Pharmaceutical Press,2012中描述的那些。试剂盒组分可以处于液体或固体形式。在某些优选的实施例中,长效IL-2R β 偏向性激动剂处于固体形式。优选的固体形式是为固体干燥形式的那些,例如含有少于5%(以重量计)水或优选少于2%(以重量计)水的形式。固体形式通常适于在水性稀释剂中复水,该稀释剂也可以在试剂盒中提供。

[0098] 本文描述的方法、试剂盒和相关组合物可以用于治疗患有可以通过本文提供的方法治疗或预防的任何病症如癌症的患者。癌症可以是液体癌症或实体癌症。示例性病症是癌症,例如像黑素瘤、肾癌、非小细胞肺癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)、膀胱癌、头颈癌、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、脑癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、维尔姆斯氏肿瘤、宫颈癌、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、脑癌、膀胱癌、上皮癌、胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑素瘤、多发性骨髓瘤、成神经细胞瘤、成视网膜细胞瘤、以及白血病。

[0099] 在一些特定的实施例中,待治疗的癌症是实体癌症。

[0100] 在又一些其他实施例中,待治疗的癌症选自例如乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌、骨癌、结肠直肠癌、胃癌、淋巴瘤、恶性黑素瘤、肝癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、甲状腺癌、肾癌、胆管癌、脑癌、子宫颈癌、上颌窦癌、膀胱癌、食管癌和肾上腺皮质癌。

[0101] 在又一个或多个其他实施例中,该癌症选自黑素瘤、肾癌、非小细胞肺癌、乳腺癌、膀胱癌、头颈癌和结肠癌。

[0102] 在一个或多个特定实施例中,该乳腺癌是三阴性乳腺癌。三阴性乳腺癌是高度侵袭性的肿瘤,这些肿瘤缺乏雌激素受体、孕酮受体和ERBB2 (HER2) 基因扩增。

[0103] 本发明的方法、试剂盒和组合物可用于提高过继性细胞转移的治疗效果,例如,通过给予长效IL-2R β 偏向性激动剂来改善受试者的应答。可以在治疗期间、单轮治疗之后、2-3个治疗周期之后等的任何合适的时间点并且通过多种合适方法中的任一种来评价提高的应答,包括肿瘤的缩小(部分应答)(即肿瘤尺寸或体积的评价)、肿瘤消失、疾病进展的减少(癌症未进展)以及在适当时一种或多种肿瘤测试标志物的分析。在一些情况下,治疗功效的指示可以在将用过继性细胞转移和长效IL-2R β 偏向性激动剂如RSLAIL-2治疗与用单独的过继性细胞转移、单独的长效IL-2R β 偏向性激动剂治疗或用过继性细胞转移与IL-2的相应非长效形式(例如,给药以达到相当数量的IL-2等效物)的组合治疗比较时就50%最大肿瘤生长之间的时间延迟而言进行测量。该比较可以在人患者中进行,或在合适的动物模型如合适的鼠癌症模型中进行。

[0104] 本文提供的方法、试剂盒、组合物和组合也可用于减少正经受治疗的受试者的肿瘤生长或尺寸(或体积)。在一个或多个实施例中,采用过继性细胞转移与向患有已确立肿瘤的受试者给予治疗有效量的长效IL-2R β 偏向性激动剂(如本文提供的)的组合的治疗有效于减少受试者的肿瘤生长或尺寸。例如,在一些实施例中,当与治疗前肿瘤的尺寸比较时,一个或多个治疗周期有效于使肿瘤尺寸减少约25%、或约30%、或约40%、或约50%、或甚至约60%、或约70%或更多。

[0105] 在又一些其他实施例中,本文提供的方法、试剂盒、组合物和组合有效于抑制正经受癌症治疗的受试者的调节性T细胞(Treg)的积累。在一些实施例中,例如,当在相应癌症的癌症小鼠模型中评价时,该方法有效于抑制肿瘤中选自CD4⁺Treg、CD25⁺Treg和FoxP3⁺Treg组成的组的调节性T细胞(即,前述细胞类型中的任何一种或多种)的积累,抑制量相对于给予单独的ACT、单独的长效IL-2R β 偏向性激动剂或用ACT与IL-2的相应非长效形式(例如,给药以达到相当数量的IL-2等效物)的组合治疗时观察到的抑制量得以提高。

[0106] 在又一些其他实施例中,本文提供的方法、试剂盒、组合物和组合有效于刺激受试者的T细胞和/或NK细胞活性和/或增殖。在一些实施例中,例如,当在相应癌症的癌症小鼠模型中评价时,该方法有效于增加受试者的CD8⁺T细胞的数量。在又一些其他实施例中,例如,当在相应癌症的癌症小鼠模型中评价时,该方法有效增加了受试者的NK细胞的数量。

[0107] 转向实例,实例4和实例5描述了RSLAIL-2与过继性细胞转移的组合在侵袭性鼠类黑素瘤模型中的抗肿瘤活性的评价。如在此类实例中详细描述,发现用作例证的长效IL-2R β 偏向性激动剂RSLAIL-2与过继性细胞转移的组合治疗(除其他事项外)稳健地将T细胞动员到肿瘤中,这些T细胞将在肿瘤中持久存在。此外,当与用过继性细胞转移/非长效IL-2组合类似治疗的组比较时,该作用显著突出。不仅ACT/RSLAIL-2组合疗法组的肿瘤生长延迟显著提高(当与对照和ACT/IL-2组合比较时),而且脾中T细胞扩增增加,其中RSLAIL-2治疗组中也观察到肿瘤归巢。正如这些结果所表明,过继性细胞疗法和长效IL-2R β 偏向性激动剂RSLAIL-2的组合偏向效应细胞,这些效应细胞不仅在单剂量长效IL-2R β 偏向性激动剂后持久存在,而且在多个剂量后持久存在。此外,当与正常组织比较时,在肿瘤中特异性地

观察到了这种效应细胞偏向性,并且当与过继性细胞转移与白介素-2治疗的组合比较时是显著的,如通过独立分析方法(包括成像、流式细胞术和IHC)所支持。此外,效应细胞的持久性通过给药后时间点的长度以及多个剂量的长效IL-2R β 偏向性激动剂后维持的稳健应答(与应答随后续剂量降低的IL-2给予比较)来显示。与许多基于ACT的疗法相比之下,本文描述的组合免疫疗法有效于增加外源递送的效应细胞在肿瘤位点的程度和持久性(即保留性),从而提供增加的抗肿瘤功效。

[0108] 因此,在又其他方面,本文提供了一种增加受试者的外源引入的效应T细胞的保留性的方法,该方法包括(i)向患有癌性肿瘤的受试者中引入已从受试者的癌性肿瘤获得、离体培养并扩增的淋巴细胞,和(ii)向受试者给予IL-2R β 活化量的长效IL-2R β 偏向性激动剂,从而当与用单独的来自步骤(i)的淋巴细胞治疗(即不给予长效IL-2R β 偏向性激动剂)受试者时保留在肿瘤位点处的所引入淋巴细胞的数量比较时或当与和给予白介素-2的非长效形式(例如,给药以达到相当数量的IL-2等效物)组合用来自步骤(i)的淋巴细胞治疗受试者时保留在肿瘤位点处的所引入淋巴细胞的数量比较时,导致保留在肿瘤位点处的所引入淋巴细胞的数量更多。

[0109] 可以在给予长效IL-2R β 偏向性激动剂后的如下任何合适的时间点测量保留在肿瘤位点处的所引入淋巴细胞的数量,例如,在第一次给予长效IL-2R β 偏向性激动剂后的第1天、第2天、第3天、第4天、第5天、第6天、第7天、第8天、第9天、第10天、第11天、第12天、第13天、第14天、第15天、第16天、第17天、第18天、第19天、第20天等。在一些优选的实施例中,使用用于评估细胞数量的任何合适方法,在第一次给予长效IL-2R β 偏向性激动剂后的第10天、第11天、第12天、第13天、第14天、第15天或第16天中的任一天测量所引入淋巴细胞的数量。合适的方法包括但不限于图像分析、流式细胞术和IHC。

[0110] 本文引用的所有文章、书籍、专利、专利公开和其他的出版物通过引用以其全文并入。倘若本说明书的传授内容和通过引用并入的本领域之间不一致,则以本说明书中的传授内容和定义的含义为准(特别是关于在本文所附的权利要求中使用的术语)。例如,如果本申请和通过引用并入的出版物以不同方式定义了同一术语,则将该术语的定义保留在该定义所处文件的传授内容内。

实例

[0111] 应理解,前述描述以及随后的实例旨在说明而不是限制本披露的范围。本发明范围内的其他方面、优点和修改对本披露所属领域的技术人员而言将是显而易见的。

材料与amp;方法

[0112] 克隆并表达具有与阿地白介素的氨基酸序列相同的氨基酸序列的重组人IL-2,并且用于制备本文称为RSLAIL-2的示例性长效IL-2R $\alpha\beta$ 偏向性激动剂。

[0113] RSLAIL-2是指可按照PCT国际专利申请公开号W02015/125159中的实例1的程序获得的组合物,并且一般是指包括IL-2的多PEG化形式的组合物,其中用于形成缀合物的PEG试剂的衔接在向受试者给予后是可释放的。还参见以下实例1。

实例1

用mPEG2-C2-Fmoc-20kD-NHS进行rIL-2的PEG化

[0114] 将1.44mg/ml的经纯化rIL-2(106.4mL)装入第一容器中,随后添加53.6mL配制缓冲液(10mM乙酸钠,pH 4.5,5%海藻糖)。测量pH为4.62,测量温度为21.2°C。将PEG试剂C2-

PEG2-FMOC-NHS-20K(如WO 2006/138572中所述获得)(13.1g)装入第二容器中,随后添加73.3mL 2mM HCl。将所得溶液手动涡旋25分钟。将硼酸钠(0.5M, pH 9.8)添加到第一容器中以使pH升高至约9.1,接着将含有PEG试剂的第二容器的内容物在1分钟至2分钟的时间段内添加到第一容器中。接着通过将8.1mL 2mM HCl装入第二容器中并将内容物添加到第一容器中来执行冲洗步骤。对于缀合反应,最终rIL-2浓度是0.6mg/mL,硼酸钠浓度是120mM, pH是9.1+/-0.2,温度是20°C-22°C,并且PEG试剂与rIL-2的摩尔比在针对该试剂的活性调整之后(取代水平)是35:1。使缀合反应进行30分钟,并通过添加75mL 2N乙酸酸化(以使pH降至约4)来淬灭。如先前所描述通过离子交换色谱法纯化产物,得到主要为4聚体、5聚体和6聚体(指可释放地共价附接到r-IL-2的PEG试剂的数量)的组合物(其中8聚体和更高的PEG化程度在与色谱法相关的洗涤步骤期间去除)。这种组合物在本文中称为“RSLAIL-2”。

实例2

RSLAIL-2的受体偏向性和相关的免疫治疗特性

[0115] 与IL-2受体的结合亲和力和与免疫刺激概况相关的受体偏向性:通过表面等离子体共振(Biacore T-100)直接测量RSLAIL-2与IL-2R α 和IL-2R β 的结合亲和力并且将其与临床上可用的IL-2(阿地白介素)的结合亲和力比较。使用EDC/NHS化学法使抗人抗体(Invitrogen)与CM-5传感器芯片的表面偶合。然后,使用人IL-2R α -Fc或IL-2R β -Fc融合蛋白作为此表面上捕获的配体。以5mM开始,在pH 4.5的乙酸盐缓冲液中制备RSLAIL-2和其活性IL-2缀合物代谢物(1-PEG-和2-PEG-IL-2)的连续稀释液。允许这些稀释液结合至配体5分钟,并且针对浓度对结合的应答单位(RU)作图以确定EC50值。将每种同种型对每种IL-2受体亚型的亲和力计算为相对于IL-2的亲和力的倍数变化。

[0116] RSLAIL-2的体外结合和活化概况表明相对于阿地白介素,PEG化干扰了IL2与IL2R α 之间的相互作用;进行了研究以判定这些作用是否使体内免疫细胞亚型的概况偏向。在给予RSLAIL-2或IL2后肿瘤中CD8 T细胞和Treg细胞的数量是IL2的多效性作用是否由于IL2与聚(乙二醇)在IL2/IL2R α 界面处缀合(如在RSLAIL-2中)而转变的重要量度。为了解决该问题,用单剂量的RSLAIL-2或5个剂量的阿地白介素治疗具有皮下B16F10小鼠黑素瘤肿瘤的小鼠,并通过流式细胞术定量肿瘤微环境中的免疫细胞。结果如图1A-图1G中所示。

[0117] 在阿地白介素治疗的小鼠的肿瘤中,总CD8细胞和记忆CD8细胞作为肿瘤浸润性淋巴细胞的百分比增加;然而,这些作用是短暂的,在第5天达到相对于媒介物显著。相比之下,在单次RSLAIL-2给予后达到显著($P < 0.05$)和持续的总CD8 T细胞和记忆CD8 T细胞刺激,其中相对于阿地白介素具有超高的记忆CD8(第7天)和总CD8(第7天和第10天)百分比。RSLAIL-2和阿地白介素治疗均在治疗开始后5天和7天产生增加的经活化自然杀伤(NK)细胞,但这种作用在第10天减少。肿瘤浸润性淋巴细胞的CD4细胞百分比在RSLAIL-2治疗后在第5天相对于媒介物减少。在第10天,与媒介物和阿地白介素比较,RSLAIL-2产生更少的CD4细胞百分比。进一步分析CD4细胞群的FoxP3⁺子集,该子集定义了Treg群体。RSLAIL-2给予在每个时间点都减少了Treg的百分比,这与由PEG链引起的对IL2R α 亚单元的接近减少一致。相比之下,使用阿地白介素的Treg减少是适度的,在第5天达到显著。到第7天,CD8 T细胞的增加和Treg的减少使得肿瘤中CD8/Treg比率显著升高。RSLAIL-2、阿地白介素和媒介物的CD8/Treg的比率分别为449、18和4,从而支持对于RSLAIL-2而言,相对于IL2受体 α ,优先活化IL2受体 β 。

[0118] 进行免疫组织化学染色,并且证实CD8 T细胞不仅数量增加,而且散布在肿瘤细胞中。这些结果指示,与未修饰的IL-2(阿地白介素)情况下观察到的相比,RSLAIL-2有效于诱导更稳健的体内记忆效应CD8 T细胞应答,而没有相当地刺激肿瘤中的Treg,这与体外IL2R β 偏向性结合概况一致。也就是说,相对于Treg,RSLAIL-2有效于优先活化并扩增效应CD8+T细胞和NK细胞。

实例3

RSLAIL-2的肿瘤暴露

[0119] 本研究的目的是评价当与阿地白介素比较时,RSLAIL-2在植入B16F10黑素瘤细胞的C57BL/6小鼠中的抗肿瘤活性。

[0120] 将B16F10黑素瘤细胞(每只动物 1×10^6 个)皮下植入C57BL/6小鼠的右侧腹中。在植入后7天,当肿瘤测量为 200mm^3 时,给予动物RSLAIL-2($2\text{mg}/\text{kg} \times 1$)或阿地白介素(每天 $3\text{mg}/\text{kg} \times 5$)。收获肿瘤(每个观察时间 $n=4$),在含有蛋白酶抑制剂(Roche)和0.25%乙酸的冰冷PBS中均质化并离心,获得上清液。为了定量肿瘤组织中的RSLAIL-2水平,通过将上清液在pH 9缓冲液中在 37°C 下孵育过夜来从IL2释放PEG。通过对人IL2具有特异性的夹心ELISA测量IL2。为了计算AUC,使用非房室模型用PhoenixWinNonLin拟合数据。基于第1天AUC乘以5估计阿地白介素后的AUC。

[0121] 如图2所示,肿瘤阿地白介素水平快速达到 C_{max} ,然后快速下降,使得在每次给药后24小时浓度 $<4\text{ng}/\text{g}$,并且每日AUC为 $0.09 \pm 0.02\mu\text{g}/\text{小时}/\text{g}$ 。相比之下,在单剂量后长达8天可在肿瘤中检测到RSLAIL-2,从而达到 $30 \pm 6.9\mu\text{g}/\text{小时}/\text{g}$ 的AUC。基于AUC,单剂量的RSLAIL-2导致与5日剂量的阿地白介素相比高67倍的暴露,即使使用RSLAIL-2给药少7.5个IL2当量($3\text{mg}/\text{kg}$ 每日 $\times 5 = 15\text{mg}/\text{kg}$ 相对于 $2\text{mg}/\text{kg}$)。因此,基于IL2当量归一化暴露,RSLAIL-2相对于阿地白介素实现增加500倍的暴露。还定量了RSLAIL-2的活性缀合IL-2形式(2-PEG-IL2和1-PEG-IL2一起),并且在肿瘤中保持可检测到长达5天,从而产生 $23 \pm 4.4\mu\text{g}/\text{g}$ 的AUC。因此,暴露于活性缀合IL2比阿地白介素高50倍,从而转化为相对于等剂量的阿地白介素,暴露增加380倍。因此,与阿地白介素每天两次持续两个5天周期相比,RSLAIL-2的肿瘤暴露允许在小鼠中每9天给药一次。

实例4

对RSLAIL-2与ACT的组合在侵袭性鼠类黑素瘤模型中的抗肿瘤活性的评价

[0122] 使用pme1-1ACT/BL6黑素瘤肿瘤模型测试RSLAIL-2的抗肿瘤活性,并评价其对肿瘤特异性TCR转基因T细胞的作用。在第0天(D0),将C57/BL6小鼠植入B16-F10小鼠黑素瘤细胞,之后在D6(第6天)用 500cGy 剂量的电离辐射进行淋巴细胞耗减。在D7,用ACT(在体外用 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗原gp100活化的T淋巴细胞)加RSLAIL-2($0.8\text{mg}/\text{kg}$,q9dx3,静脉内)的组合或用C57/BL6 T细胞加PBS(媒介物对照)治疗小鼠。媒介物对照小鼠($n=12$)的肿瘤在治疗后12天内快速生长至 1500mm^3 终点,而RSLAIL-2/ACT组合组($n=12$)为35天,其中仅有1/12达到终点。使用生物发光成像使抗原特异性T细胞的体内分布和肿瘤归巢可视化。有趣的是,在给予RSLAIL-2/ACT后,报告T细胞保留在脾中直至D7,并且可以看到在D9迁移至肿瘤,在D12达到峰值生物发光,其为与通常在用常规IL-2治疗的小鼠中观察到的5天比较延迟的时间点。该信号持久存在直到D20,而在媒介物对照动物中是D7。这些数据表明RSLAIL-2与ACT的组合具有良好的耐受性,并在侵袭性B16F10鼠类黑素瘤模型中提供稳健的抗肿瘤应答。用

RSLAIL-2和ACT疗法治疗稳健地将T细胞动员到肿瘤中,这些T细胞将在肿瘤中持久存在。RSLAIL-2的稳健和耐久作用支持其与基于细胞的疗法的组合使用。

[0123] 用B16-A2/K鼠类黑素瘤或工程改造以表达嵌合鼠类/人MHC分子的EL-4-A2/K鼠类淋巴瘤肿瘤进行类似的研究。

实例5

对RSLAIL-2或IL-2与ACT的组合在鼠类黑色素瘤模型中的抗肿瘤活性的评价

[0124] 在D-7(第-7天),将C57/BL6小鼠皮下植入B16F10(每只动物 0.5×10^6 个)同基因鼠类黑素瘤细胞系,并在D-1(第-1天)用500cGy剂量的电离辐射进行淋巴细胞耗减。在D0(第0天),用ACT(在体外用 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ gp100活化的pme1-1gp100 TCR转基因T淋巴细胞)和RSLAIL-2($0.8 \text{mg}/\text{kg}$, q9dx3, 静脉内)的组合或用IL-2(阿地白介素, $0.4 \text{mg}/\text{kg}$, 每9天qdX3, 3个周期, 腹膜内)或媒介物治疗小鼠。第二和第三个治疗周期不包括ACT。媒介物对照与实例4中相同。图3提供了描述所用剂量策略的示意图。

[0125] 从图4(如由SEM确定的平均肿瘤体积(mm^3)相对于时间的图)中所示的结果可见,当和IL-2与ACT的组合比较时,在较低给药频率下,RSLAIL-2在与ACT组合给予时提供显著肿瘤生长延迟(在和ACT与IL-2的组合比较时, $p < 0.0001$;在和ACT与媒介物的组合比较时, $\#p < 0.0001$ (使用Bonferroni检验进行配对比较))。在考虑该图时,实心圆代表ACT+媒介物(上图);实心正方形代表ACT+IL-2(中图);并且实心三角形代表ACT+RSLAIL-2(下图),到约25天后实质上没有明显肿瘤生长。

[0126] 进一步评估了肿瘤生长延迟,如图5所示,其中通过内插达到 1000mm^3 的肿瘤体积的时间来评估每个肿瘤生长曲线的肿瘤生长延迟(与ACT+IL-2比较, $*p < 0.0001$;与媒介物比较, $\#p < 0.0001$ (对数秩Mantel-Cox检验); $N = 12/\text{组}$)。最左边的图代表给予ACT与媒介物的组合的治疗组;中图代表接受ACT与IL-2的组合的治疗组;最右边的图代表给予ACT与RSLAIL-2的组合的治疗组,当将该组与其他两个治疗组比较时证明了最显著的肿瘤生长延迟。可以看出,对于RSLAIL-2与ACT的组合观察到最显著的肿瘤生长延迟。

[0127] 体内生物发光成像:进行过继性转移的淋巴细胞的体内生物发光成像(BLI)。用逆转录病毒-萤火虫萤光素酶转导Pme1-1转基因T细胞,并用于ACT以使得可视化。与ACT/媒介物或ACT/IL-2组相比之下,对于ACT/RSLAIL-2组合而言,每组5只重复小鼠,第5天和第14天的代表图证明脾中的T细胞扩增和向肿瘤中的动员和在肿瘤中的持久性。

[0128] 图6A和6B提供了到表达萤光素酶的pme1-1T细胞的ACT后第19天的脾(图6A)和肿瘤(图6B)的目的区域(ROI)中的系列图像的量化(每个像素的计数)。图6A:上图,实心三角形:所指示的ACT+RSLAIL-2;中图,实心正方形:ACT+IL-2;下图,实心圆:ACT+媒介物;图6B:上图,实心三角形:所指示的ACT+RSLAIL-2;中图,实心正方形:ACT+IL-2;下图,实心圆:ACT+媒介物。

[0129] 当与3日剂量的IL-2+ACT或媒介物比较时,单次ACT+RSLAIL-2治疗显示第5天至第9天脾中T细胞扩增呈统计学上显著增加(图6A)。当与ACT+IL-2或ACT+媒介物治疗组比较时,在ACT+RSLAIL-2治疗组中,随时间变化的萤光素酶信号在第5天至第7天显示肿瘤浸润性效应T细胞的较强峰。在第9天给予的第二剂RSLAIL-2在第12天至第17天引发脾(图6A)和肿瘤(图6B)中效应T细胞的第二次扩增。相比之下,在第二次IL-2治疗后,在脾或肿瘤中没有扩增。(与IL-2+ACT比较, $**p < 0.0001$,与ACT+媒介物比较, $\#p < 0.0001$,使用Tukey检验进

行配对比较, $n=5$, 平均值 \pm SE)。

[0130] 肿瘤和脾免疫学分析: 在治疗(单剂量RSLAIL-2和qdx3IL-2)后第5天收集肿瘤和脾。通过流式细胞术评估RSLAIL-2对调节性T细胞和CD8⁺T细胞的作用。图7A-图7B是说明了肿瘤中某些类型的免疫细胞的数量。图7C提供了每个治疗组的CD8/Treg比率(肿瘤)。类似地, 图8A-8B是指示脾中免疫细胞的数量, 而图8C提供了每个治疗组的CD8/Treg比率(脾)。

[0131] 更具体地, 图7A说明了每个治疗组的肿瘤中Thy 1.1CD8细胞的数量(每个条从左到右为ACT+媒介物; ACT+IL-2和ACT+RSLAIL-2)。图7B说明了每个治疗组的肿瘤中CD4⁺Treg的数量(每个条从左到右为ACT+媒介物; ACT+IL-2和ACT+RSLAIL-2)。图7C提供了如上所述每个治疗组的肿瘤中CD8细胞与Treg的数量比。

[0132] 现在转向脾, 图8A说明了每个治疗组的脾中Thy1.1 CD8细胞的数量(每个条从左到右为ACT+媒介物; ACT+IL-2和ACT+RSLAIL-2)。图8B说明了每个治疗组的脾中CD4⁺Treg的数量(每个条从左到右为ACT+媒介物; ACT+IL-2和ACT+RSLAIL-2)。图8C提供了如上所述每个治疗组的脾中CD8细胞与Treg的数量比。

[0133] 在肿瘤中, 将免疫细胞的绝对数量针对肿瘤重量(克)归一化并绘图。基于这些结果, 发现当与ACT+IL-2或ACT+媒介物治疗组比较时, ACT+RSLAIL-2治疗增加了pme1-1CD8⁺T细胞并提高了CD8/Treg比率。对于RSLAIL-2治疗组, 肿瘤中的CD8/Treg比率大于脾中的CD8/Treg比率。非配对t检验(** $p<0.05$, 其中条指示比较, $n=3$)。

[0134] 还观察到, 当与ACT+IL-2治疗组比较时, 在治疗后第5天测定脾细胞计数时, ACT+RSLAIL-2治疗组在照射后的脾细胞恢复很快。也就是说, RSLAIL-2诱导照射后脾细胞快速再增殖。非配对t检验(**, $p<0.0001$, 其中条指示比较)。参见图9。

[0135] 用鼠类抗CD8抗体对福尔马林固定/石蜡包埋的组织进行免疫组织化学染色; 使用HALO图像分析软件(印迪卡实验室(Indica Labs), 新墨西哥州)进行分析。图10是第12天肿瘤的IHC(免疫组织化学)。该图显示了每组三只不同小鼠的肿瘤中的CD8浸润。第一栏("pos")显示CD8染色, 第二栏("pos halo")是由HALO软件分析的载玻片, 其中在彩色版本中, 蓝点是阴性细胞, 并且黄色到红色点是CD8阳性细胞(其中黄色是低CD8表达且红色是高CD8表达), 第三栏是CD8⁺T细胞阳性区域的5倍放大。第4栏和第5栏分别是抗体抗CD8的阴性染色、正常染色和HALO分析。第6栏是H&E染色。第1栏中的深色区对应于ACT+RSLAIL-2组合疗法的彩色版本中第2栏中的黄色和红色点。此图证明了两个组之间CD8表达的显著差异, 其中对于ACT+RSLAIL-2组合疗法而言, CD8表达水平显著较高。IHC说明了当与用非聚合物修饰的IL-2即阿地白介素治疗比较时, 在用长效偏向性IL-2R β -白介素-2(RSLAIL-2)治疗的情况下肿瘤内CD8⁺T细胞的持久性。

[0136] 图11是正常非肿瘤组织(肾和肝)的IHC, 该IHC显示在过继性细胞转移后, 一剂IL-2(阿地白介素)或RSLAIL-2后第9天没有组织破坏性CD8⁺T细胞, 如实例5中所述。

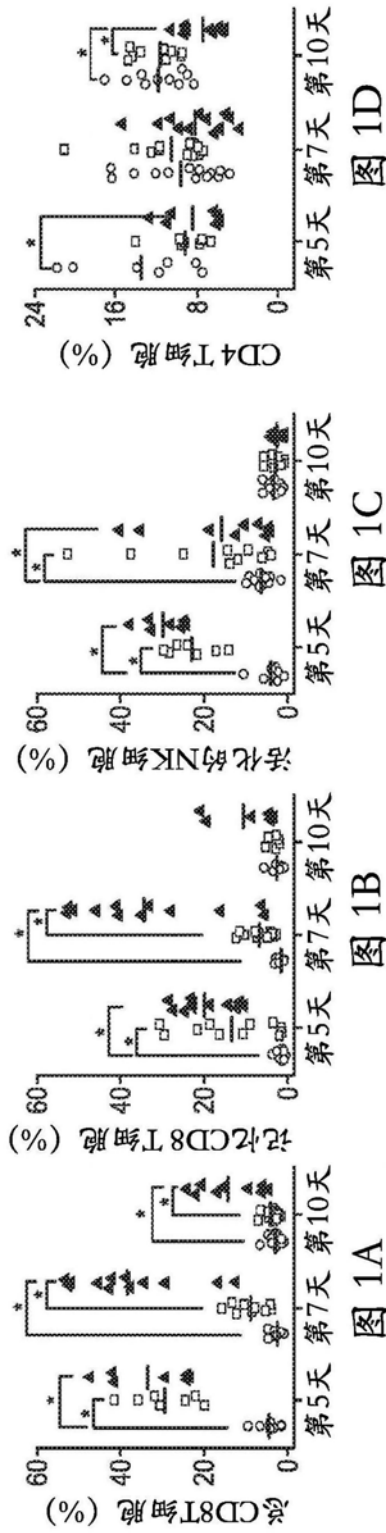


图 1A

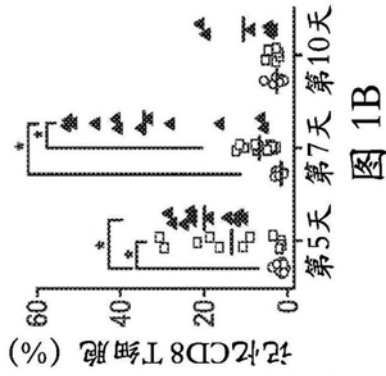


图 1B

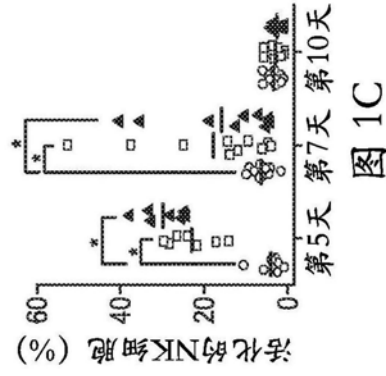


图 1C

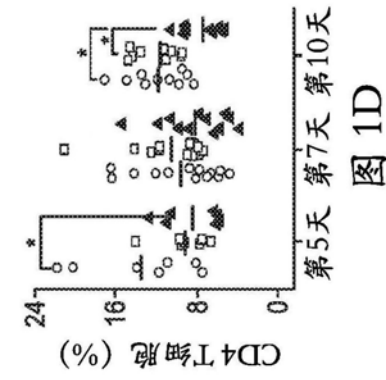


图 1D

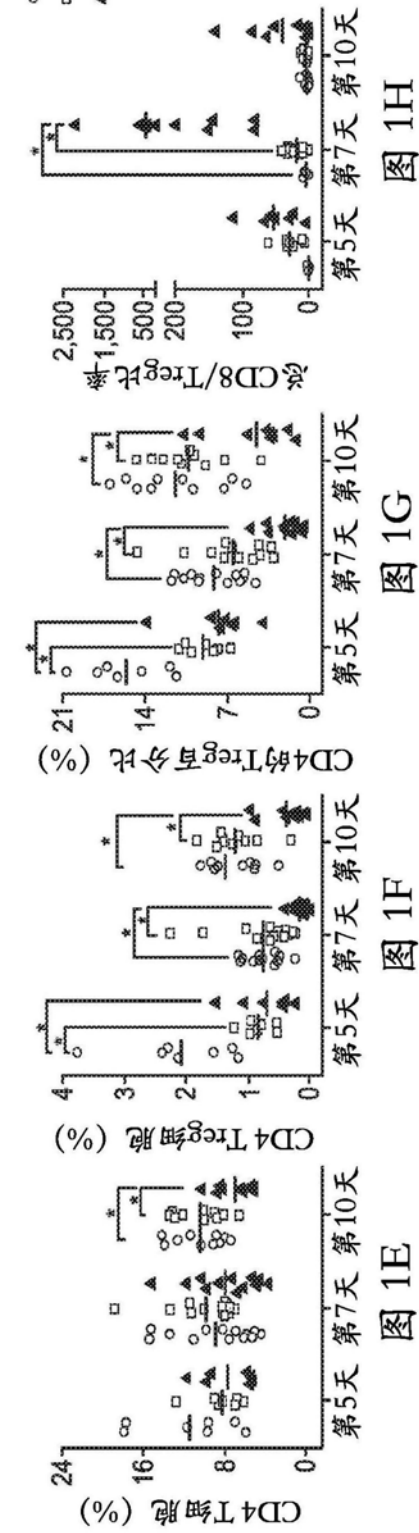


图 1E

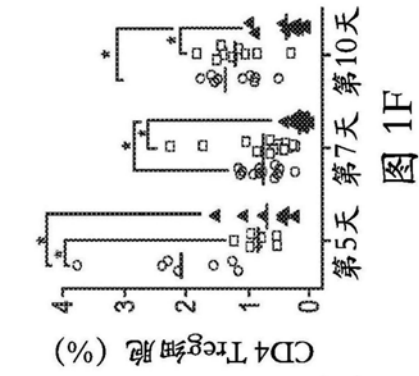


图 1F

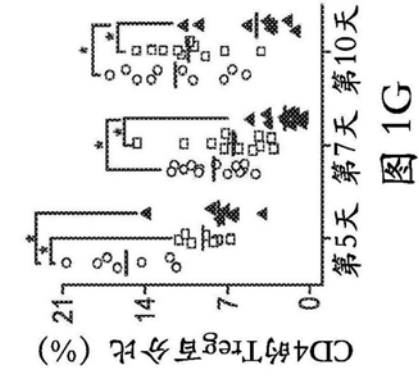


图 1G

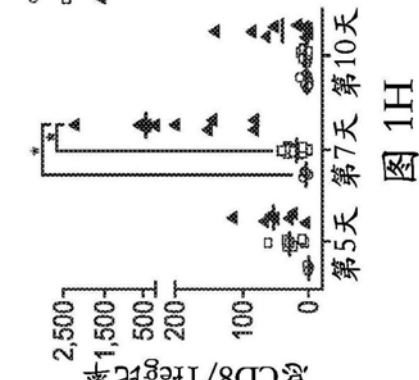


图 1H

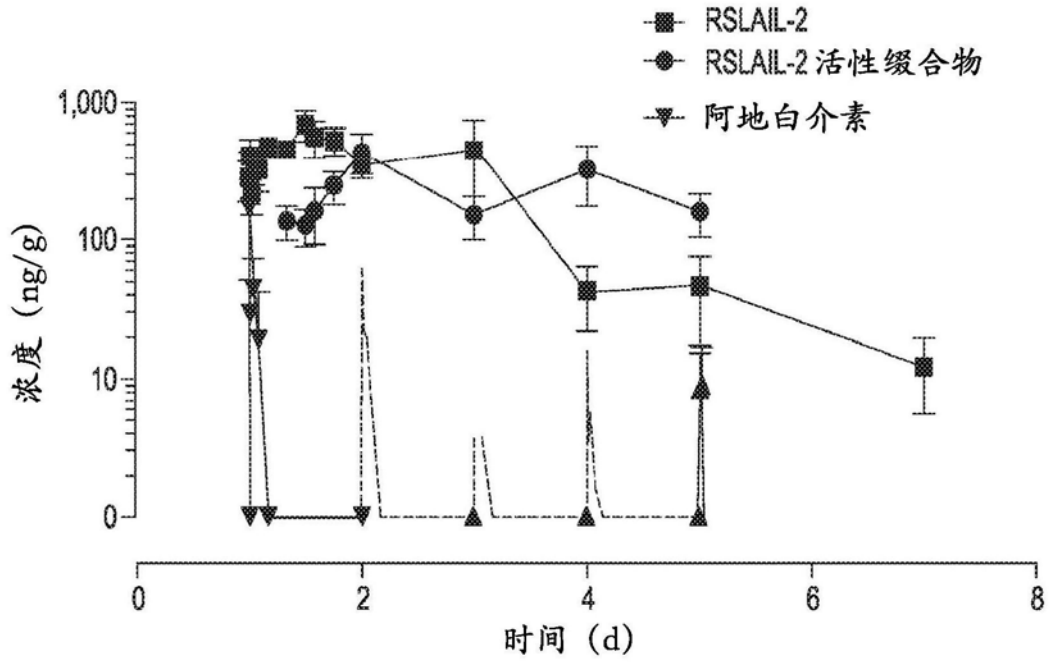


图2

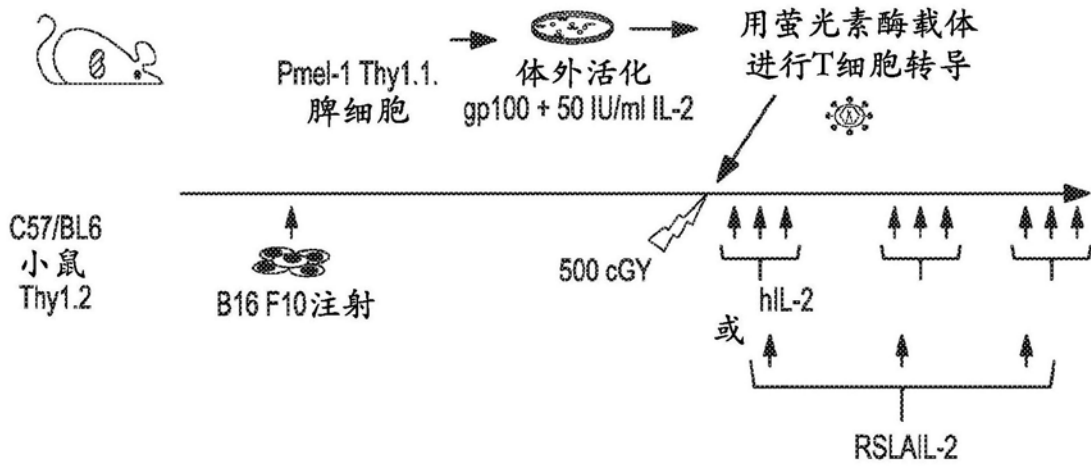


图3

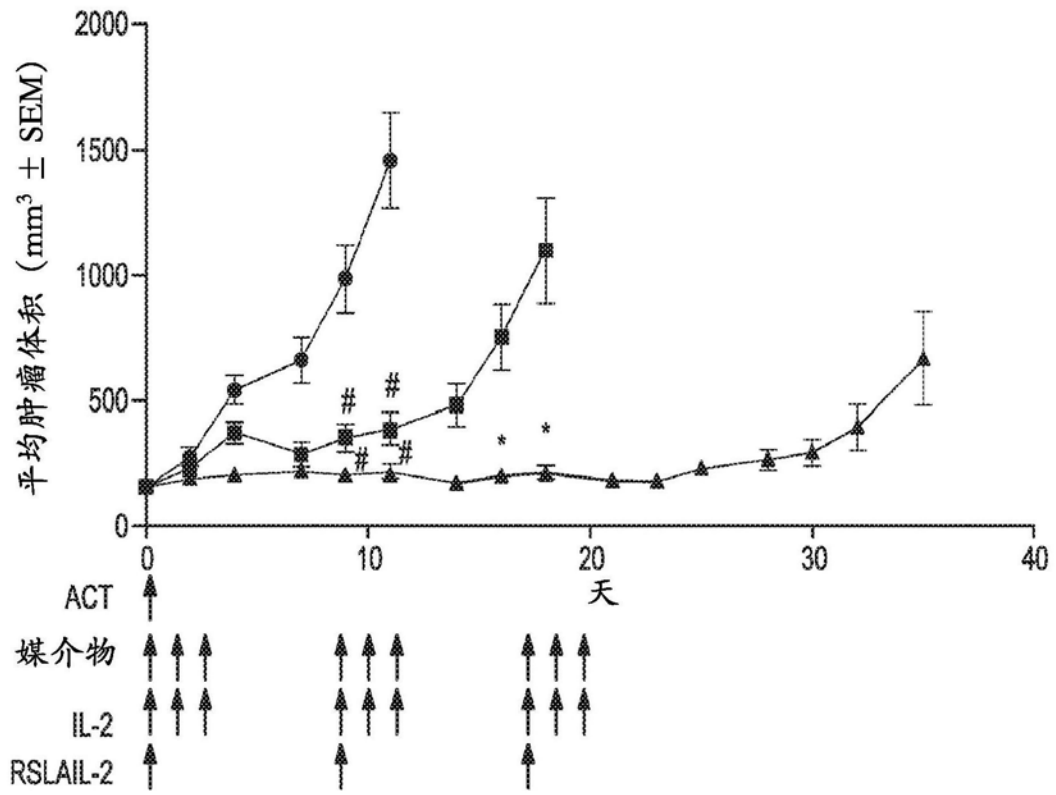


图4

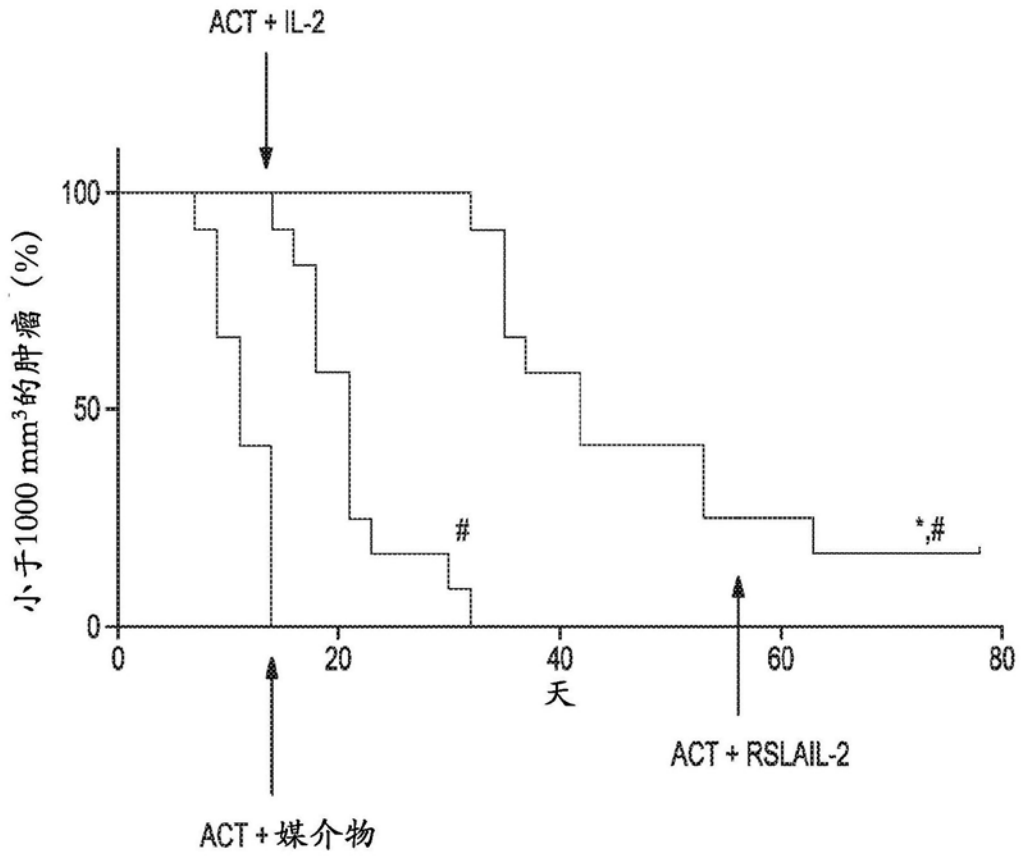


图5

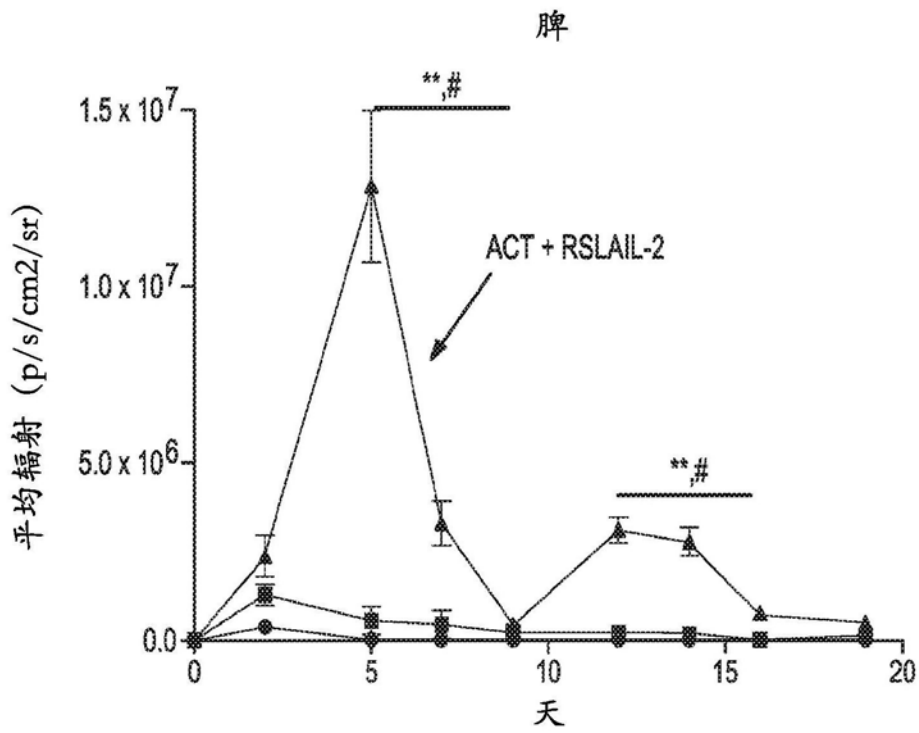


图6A

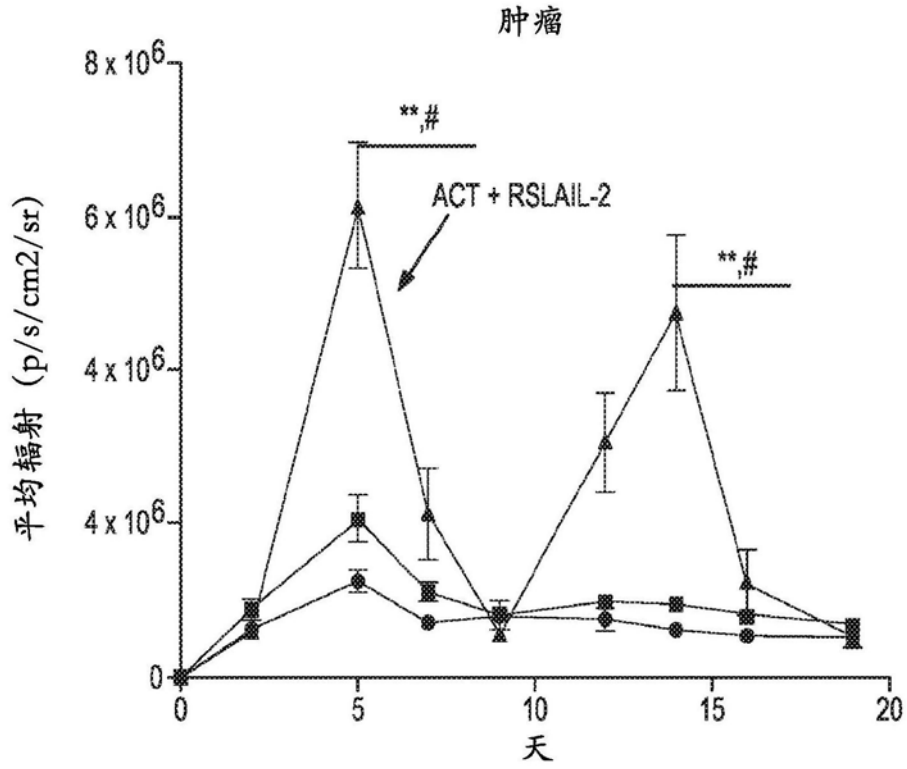


图6B

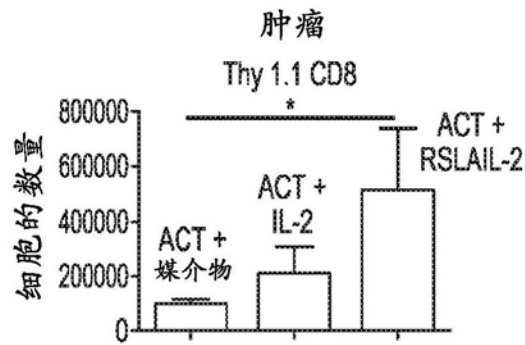


图7A

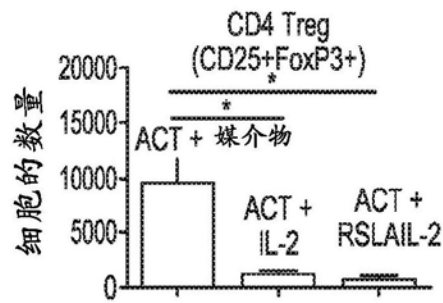


图7B

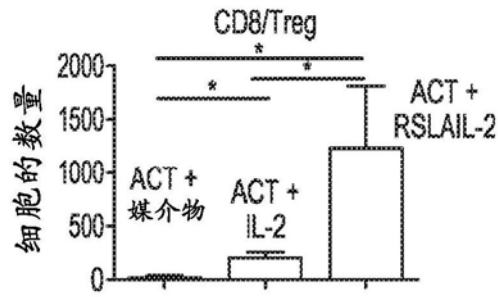


图7C

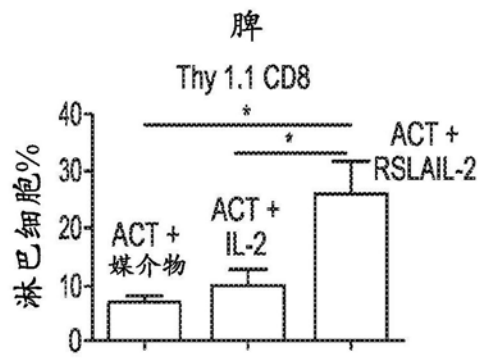


图8A

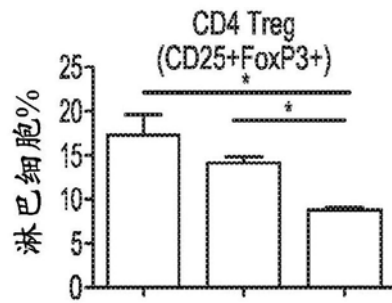


图8B

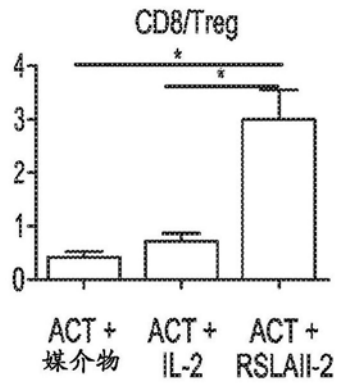


图8C

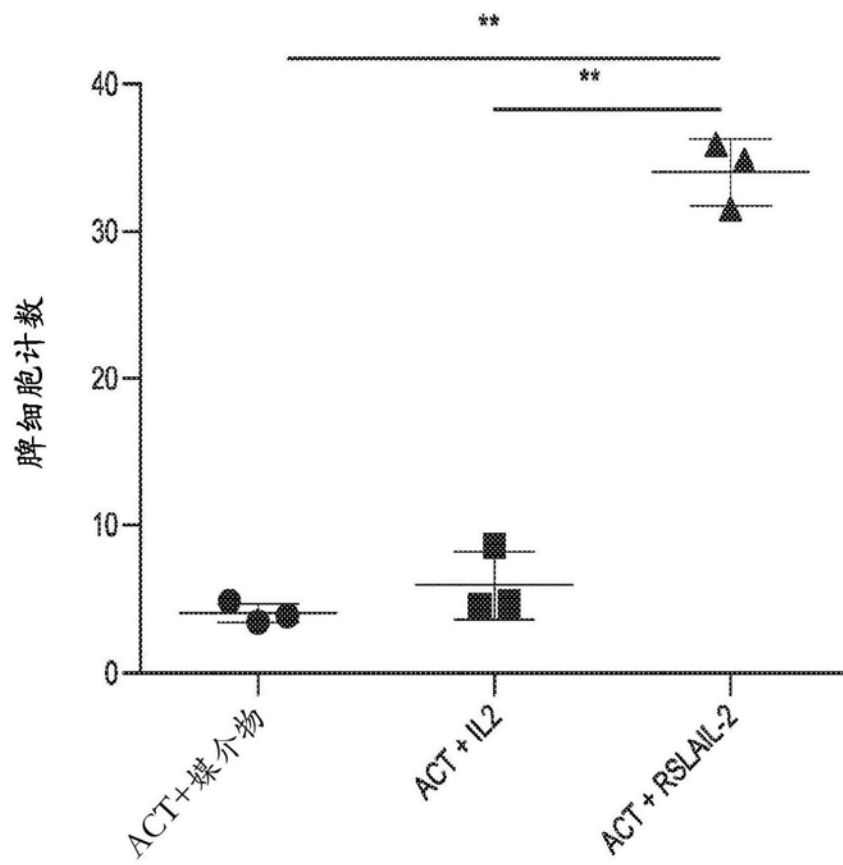


图9

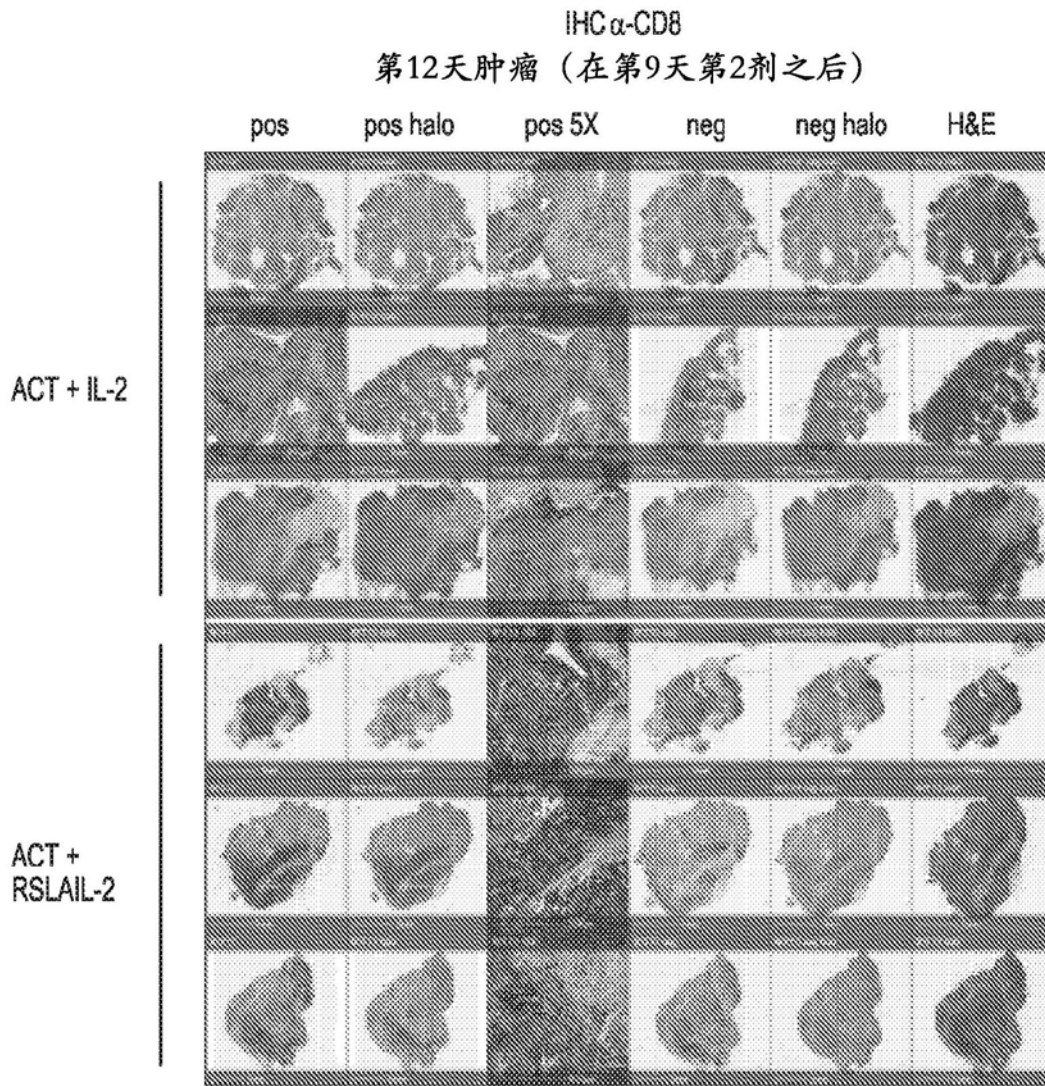


图10

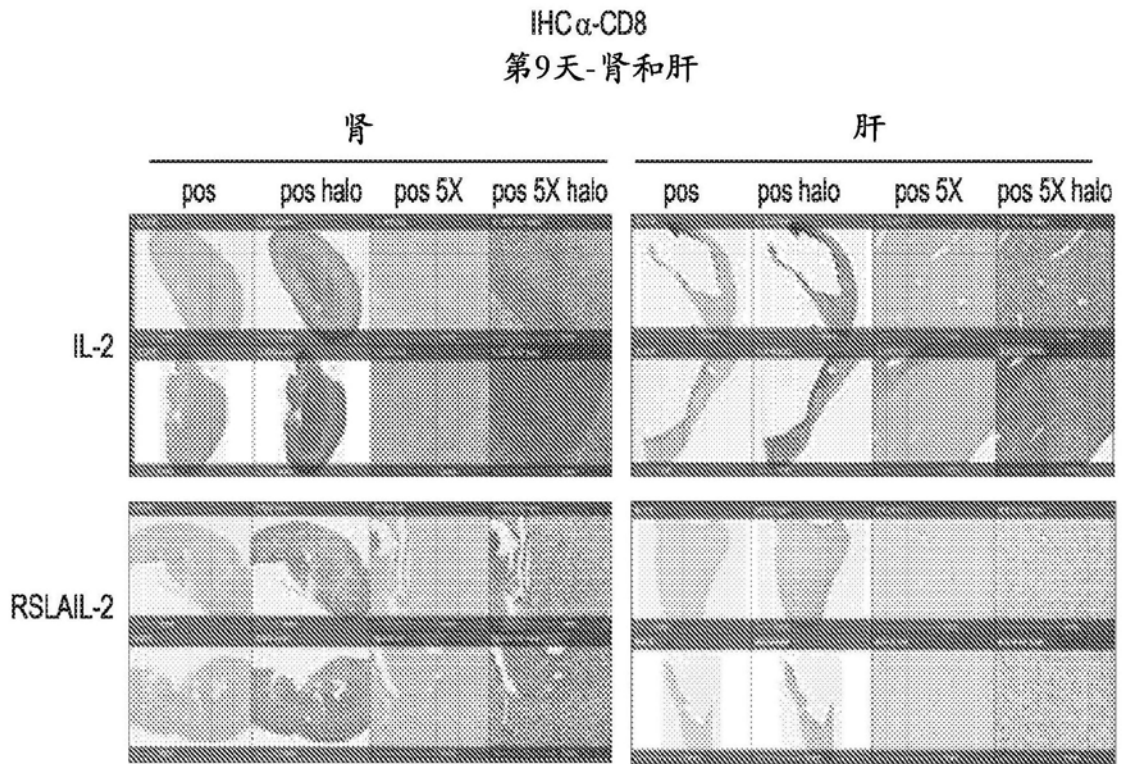


图11

SEQ ID NO:1
 MYRMQLLS CI ALSLALVTNS APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN
 -20 -10 1 11 21
 YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL
 31 41 51 61 71
 RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS
 81 91 101 111 121

TLT

SEQ ID NO:2

APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN
 YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL
 RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS

TLT

SEQ ID NO:3

PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN
 YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL
 RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS

TLT

SEQ ID NO:4

APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN
 YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL
 RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS

TLT

图12