



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118725141 A

(43) 申请公布日 2024. 10. 01

(21) 申请号 202410942368.3

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2019.09.16

C07K 19/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

10-2018-0110698 2018.09.17 KR

C12N 15/62 (2006.01)

10-2019-0001867 2019.01.07 KR

C12N 15/85 (2006.01)

10-2019-0053436 2019.05.08 KR

C12N 5/10 (2006.01)

62/832,013 2019.04.10 US

A61K 38/17 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61K 38/20 (2006.01)

201980025699.8 2019.09.16

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

(71) 申请人 GI 医诺微新

权利要求书2页 说明书34页
序列表（电子公布） 附图63页

地址 韩国

(72) 发明人 张明浩

(74) 专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283

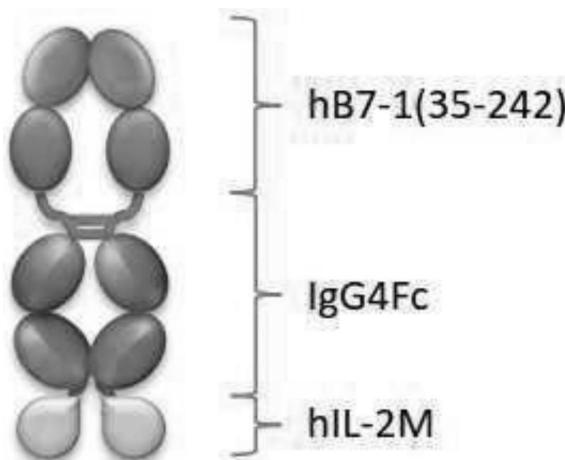
专利代理人 水文钰 徐婕超

(54) 发明名称

包含IL-2蛋白和CD80蛋白的融合蛋白及其用途

(57) 摘要

本发明提供了一种包含IL-2蛋白和CD80蛋白的融合蛋白。在一个实施方案中，包含CD80片段、免疫球蛋白Fc和IL-2变体的融合蛋白可以活化免疫细胞如天然杀伤细胞，同时可以控制调节性T细胞的免疫细胞调节活性。因此，包含该融合蛋白作为活性成分的药物组合物可以增强体内的免疫活性，从而可以有效地应用于抵抗感染性疾病以及癌症，因而此类药物组合物在工业上非常实用。



1. 一种融合蛋白,其包含IL-2蛋白和CD80蛋白;

其中,所述融合蛋白由以下结构式(I)组成:

$N' - X - [接头(1)]_n - Fc\text{结构域} - [接头(2)]_m - Y - C' (I)$

在结构式(I)中,

N' 为所述融合蛋白的N端,

C' 为所述融合蛋白的C端,

X为所述CD80蛋白,

Y为所述IL-2蛋白,

所述接头(1)和接头(2)为肽接头;所述肽接头(1)可以由5-80个连续氨基酸组成;或者肽接头(2)可以由1-50个连续氨基酸组成;并且,

n 和 m 分别独立地为0或1。

2. 如权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,所述IL-2蛋白具有如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。

3. 如权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,所述IL-2蛋白为IL-2变体。

4. 如权利要求3所述的融合蛋白,其特征在于,所述IL-2变体通过取代如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列的选自第38、42、45、61和72位的氨基酸中的至少一个而获得。

5. 如权利要求4所述的融合蛋白,其特征在于,所述IL-2变体通过取代如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列的选自R38A、F42A、Y45A、E61R和L72G中的至少一个而获得。

6. 如权利要求3所述的融合蛋白,其特征在于,所述IL-2变体包含在如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列上进行选自以下取代组合(a)至(d)中的任意一种:

(a) R38A/F42A

(b) R38A/F42A/Y45A

(c) R38A/F42A/E61R

(d) R38A/F42A/L72G。

7. 如权利要求3所述的融合蛋白,其特征在于,所述IL-2变体具有如SEQ ID NO:6、22、23或24所示的氨基酸序列。

8. 如权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,所述CD80蛋白具有如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列。

9. 如权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,所述CD80蛋白为CD80片段。

10. 如权利要求9所述的融合蛋白,其特征在于,所述CD80片段由如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列中的第35个氨基酸至第242个氨基酸组成。

11. 如权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,所述Fc结构域为野生型或变体。

12. 如权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,所述Fc结构域具有如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。

13. 如权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,所述Fc结构域的变体具有如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列。

14. 如权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,所述接头(1)为由如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列组成的肽接头。

15. 如权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,所述接头(2)为由如SEQ ID NO:5所示

的氨基酸序列组成的肽接头。

16. 如权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白与如SEQ ID NO:9、26、28或30所示的氨基酸序列具有85%或更高的序列同一性。

17. 一种融合蛋白二聚体,其特征在于,其为两种如权利要求1-16任一项所述的融合蛋白彼此连接。

18. 如权利要求17所述的融合蛋白二聚体,其特征在于,所述融合蛋白二聚体为同型二聚体。

19. 一种编码如权利要求1-16任一项所述的融合蛋白的多核苷酸。

20. 如权利要求19所述的多核苷酸,其特征在于,所述多核苷酸与如SEQ ID NO:8、25、27或29所示的核苷酸序列具有85%或更高的序列同一性。

21. 一种包含如权利要求19所述的多核苷酸的载体。

22. 一种已导入如权利要求21所述载体的转化细胞。

23. 一种用于预防或治疗癌症或感染性疾病的药物组合物,其包含作为活性成分的:

如权利要求1-16任一项所述的融合蛋白;或

如权利要求17或18所述的融合蛋白二聚体。

24. 如权利要求23所述的药物组合物,其进一步包含药学上可接受的载体。

25. 如权利要求1-16任一项所述的融合蛋白,或者如权利要求17或18所述的融合蛋白二聚体在制备治疗癌症的药物中的应用。

26. 如权利要求25所述的应用,其特征在于,所述癌症为选自由胃癌、肝癌、肺癌、结直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌、宫颈癌、甲状腺癌、喉癌、急性髓细胞性白血病、脑瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、头颈癌、唾液腺癌、黑色素瘤和淋巴瘤组成的组中的任何一种。

包含IL-2蛋白和CD80蛋白的融合蛋白及其用途

[0001] 本申请是申请日为2019年9月16日、申请号为2019800256998、发明创造名称为“包含IL-2蛋白和CD80蛋白的融合蛋白及其用途”的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及一种包含IL-2蛋白和CD80蛋白的融合蛋白及其用途。具体地,本发明涉及一种新型融合蛋白,其具有癌症治疗功效和免疫增强功效。

背景技术

[0003] 白细胞介素2(IL-2),又称为T细胞生长因子(TCGF),是一种球状糖蛋白,其在淋巴细胞的产生、存活和内稳态中起着核心作用。IL-2的蛋白质大小为15.5kDa至16kDa,由133个氨基酸组成。IL-2通过结合由三个不同亚基组成的IL-2受体来介导各种免疫作用。

[0004] 并且,IL-2主要由活化的T细胞合成,特别是由CD4+辅助性T细胞合成。IL-2刺激T细胞的增殖和分化,并诱导细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的产生以及外周血淋巴细胞分化为细胞毒性细胞和淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK细胞)。

[0005] 此外,IL-2参与B细胞的增殖和分化,促进B细胞合成免疫球蛋白,并刺激自然杀伤细胞(NK细胞)的产生、增殖和活化。因此,IL-2可用作抗癌剂,因为它可以增加淋巴细胞的数量并增强活体内免疫细胞的功能。目前,IL-2疗法已被批准并用于患有转移性肾细胞癌和恶性黑色素瘤的患者。

[0006] 然而,IL-2在免疫应答中具有双重功能,其不仅对于介导免疫细胞数量的增加及其活性很重要,而且对于维持免疫耐受性也很重要。另外,已有报道称IL-2对于抑制肿瘤的生长可能并非是最佳的。原因是在存在IL-2的情况下,最终的细胞毒性T淋巴细胞可能发生活化诱导的细胞死亡(AICD),并且IL-2依赖的调节性T细胞(Treg细胞)可能会抑制免疫应答(Imai et al., Cancer Sci 98, 416-423, 2007)。

[0007] 另外,接受IL-2免疫治疗的患者还会出现严重的心血管、肺、肾、肝、胃肠道、神经、皮肤、血液学和全身性的副作用。因此,已经研究了各种IL-2突变以改善IL-2的治疗功效并使其副作用最小化(US 5,229,109 B)。然而,将IL-2用于药理学目的时,仍然有许多问题需要解决。

[0008] 同时,CD80又称为B7-1,是膜结合蛋白B7家族的成员,其通过与配体结合以传递共刺激反应和共抑制反应,从而参与免疫调节。CD80是在T细胞、B细胞、树突状细胞和单核细胞表面表达的跨膜蛋白。已知CD80与CD28、CTLA4(CD152)和PD-L1结合。CD80、CD86、CTLA4和CD28参与共刺激抑制系统。例如,它们调节T细胞的活性并参与其增殖、分化和存活。

[0009] 例如,当CD80和CD86与CD28相互作用时,会产生共刺激信号来活化T细胞。最终,CD80与CTLA4结合并刺激CTLA4的上调。从而在由CD80/CD28相互作用引起的免疫应答活化之前CD80抑制T细胞的应答。该反馈回路可对免疫反应进行精细调节。

[0010] 此外,已知CD80以与CD28结合PD-L1相似的亲和力结合另一个B7家族成员PD-L1。PD-L1为程序性死亡1(PD-1)蛋白的两个配体之一,并且PD-L1参与T细胞的调节。CD80与PD-

L1的结合是另一种可阻止PD-1/PD-L1相互作用的机制,这可能会阻止肿瘤中T细胞应答的抑制。而与此同时,CD80水平的升高会导致CD80与CD28结合,从而诱导CTLA4,以诱导或抑制T细胞的应答。

发明内容

[0011] 技术问题

[0012] 本发明人研究了开发安全且有效的IL-2。结果,本发明人发现,包含IL-2蛋白和CD80蛋白的新型融合蛋白(一个分子)可以活化免疫细胞并有效调节Treg细胞,从而完成了本发明。

[0013] 解决问题的方案

[0014] 为了实现上述目的,在本发明的一个方面提供了一种包含IL-2蛋白和CD80蛋白的融合蛋白。

[0015] 在本发明的另一方面提供了一种融合蛋白二聚体,其通过使所述两种融合蛋白彼此附着而获得。

[0016] 在本发明的又一方面提供了一种编码所述融合蛋白的多核苷酸。

[0017] 在本发明的又一方面提供了一种包含所述多核苷酸的载体。

[0018] 在本发明的又一个方面提供了一种已导入所述载体的转化细胞。

[0019] 在本发明的又一方面提供了一种用于预防或治疗癌症或感染性疾病的药物组合物,其包含作为活性成分的所述融合蛋白或所述融合蛋白二聚体。

[0020] 在本发明的又一方面提供了一种所述融合蛋白在治疗癌症或感染性疾病中的用途。

[0021] 在本发明的又一个方面提供了一种所述融合蛋白在制备用于治疗癌症或感染性疾病的药物中的用途。

[0022] 发明的有益效果

[0023] 包含IL-2蛋白和CD80蛋白的融合蛋白不仅可以由于包含IL-2而活化免疫细胞,而且由于包含CD80还可以有效地调节Treg细胞。因此,所述融合蛋白可以有效地攻击癌细胞,从而可以有效地用于治疗癌症或感染性疾病。

附图说明

[0024] 图1显示了融合蛋白的示意性实施方案。

[0025] 图2显示了融合蛋白调节两种不同类型的免疫细胞的机制。然而,应当理解地是,表达融合蛋白的作用的机制不限于此。

[0026] 图3显示了融合蛋白表现出抗癌作用的机制。

[0027] 图4显示了融合蛋白的结构的示意图。此处,GI101和mGI101中的每一个为本发明融合蛋白的实施方案,并且GI101C1、GI101C2和mGI101C1为用于与融合蛋白的活性进行比较的比较实施例。

[0028] 图5显示了本发明融合蛋白的各种实施方案。可以将人和小鼠衍生的蛋白结合以制备融合蛋白。CD80蛋白和IL-2蛋白可以通过除Fc以外的各类接头彼此结合。

[0029] 图6显示了通过用SDS-PAGE鉴定获得的融合蛋白(GI101)而得到的结果。

- [0030] 图7显示了根据吸光度的融合蛋白(GI101)的量。
- [0031] 图8显示了通过尺寸排阻色谱法(SEC)分析获得的融合蛋白(GI101)而得到的结果。
- [0032] 图9显示了通过用SDS-PAGE鉴定获得的mGI101融合蛋白而得到的结果。
- [0033] 图10显示了通过用SDS-PAGE鉴定获得的GI101C1融合蛋白而得到的结果。
- [0034] 图11显示了通过用SDS-PAGE鉴定获得的GI101C2融合蛋白而得到的结果。
- [0035] 图12显示了通过用SDS-PAGE鉴定获得的mGI101C1融合蛋白而得到的结果。
- [0036] 图13显示了通过用SDS-PAGE鉴定获得的GI102-M45融合蛋白而得到的结果。
- [0037] 图14显示了通过用SDS-PAGE鉴定获得的GI102-M61融合蛋白而得到的结果。
- [0038] 图15显示了通过用SDS-PAGE鉴定获得的GI102-M72融合蛋白而得到的结果。
- [0039] 图16显示了hCTLA4与GI101之间的结合亲和力。
- [0040] 图17显示了hPD-L1和GI101之间的结合亲和力。
- [0041] 图18显示了hPD-L1和hPD-1之间的结合亲和力。
- [0042] 图19显示了mCTLA4和mGI101之间的结合亲和力。
- [0043] 图20显示了mPD-L1和mGI101之间的结合亲和力。
- [0044] 图21和22显示了通过鉴定GI-101(hCD80-Fc-hIL-2v)和CTLA-4之间以及GI-101(hCD80-Fc-hIL-2v)和PD-L1之间的结合能力而获得的结果。已经确定GI-101(hCD80-Fc-hIL-2v)对CTLA-4和PD-L1具有高结合能力。
- [0045] 图23显示了GI101对PD-1/PD-L1结合的影响。GI101有效抑制了PD-1/PD-L1结合。
- [0046] 图24显示了通过鉴定GI101与IL-2R α 或IL-2R β 之间的结合亲和力而获得的结果。
- [0047] 图25显示了通过鉴定GI101和IL-2R α 之间的结合亲和力而获得的结果。
- [0048] 图26显示了通过鉴定GI101和IL-2R。之间的结合亲和力而获得的结果。
- [0049] 图27显示了通过鉴定IL-2R α 与GI102-M45之间的结合亲和力而获得的结果。
- [0050] 图28显示了通过鉴定IL-2R α 与GI102-M61之间的结合亲和力而获得的结果。
- [0051] 图29显示了通过鉴定IL-2R α 与GI102-M72之间的结合亲和力而获得的结果。
- [0052] 图30显示了通过鉴定IL-2R β 与GI102-M45之间的结合亲和力而获得的结果。
- [0053] 图31显示了通过鉴定IL-2R β 与GI102-M61之间的结合亲和力而获得的结果。
- [0054] 图32显示了通过鉴定IL-2R β 与GI102-M72之间的结合亲和力而获得的结果。
- [0055] 图33和图34显示了在用各种浓度的GI101、GI101C1、GI101C2或IL-2处理细胞并进行孵育时,通过检测从细胞中分泌的IFN- γ 的量而获得的结果。
- [0056] 图35和图36显示了通过鉴定GI101、GI101C1、GI101C2和IL-2(Proleukin)对CD8+T细胞增殖的影响而获得的结果。
- [0057] 图37显示了通过鉴定GI101和GI102对CD8+T细胞和CD4+T细胞增殖的影响获得的结果。在此,图37A显示了CD8+T细胞和CD4+T细胞的比例,图37B显示了CD8+T细胞的增殖能力,以及图37C显示了CD4+/FoxP3+Treg细胞的比例。
- [0058] 图38和39显示了通过鉴定GI101和GI101w对CD8+T细胞和NK细胞增殖的影响而获得的结果。
- [0059] 图40和41显示了通过鉴定GI101对效应T细胞的影响而获得的结果。
- [0060] 图42显示了通过鉴定mGI101和mGI102-M61对小鼠免疫细胞的影响而获得的结果。

- [0061] 图43和44显示了通过鉴定GI101对过表达PD-L1的癌细胞的影响而获得的结果。
- [0062] 图45和46显示了通过在小鼠来源的结直肠癌细胞移植小鼠中鉴定GI101的肿瘤抑制作用而获得的结果。
- [0063] 图47显示了通过在小鼠来源的黑色素瘤移植小鼠中鉴定mGI101的肿瘤抑制作用而获得的结果。
- [0064] 图48显示了在小鼠来源的黑色素瘤移植小鼠中mGI101的肿瘤抑制。
- [0065] 图49显示了通过在小鼠来源的结直肠癌细胞移植小鼠中根据剂量鉴定mGI101的肿瘤抑制作用而获得的结果。
- [0066] 图50显示了通过分析已经接受了mGI101的小鼠来源的结直肠癌细胞移植小鼠的存活率而获得的结果。
- [0067] 图51显示了通过在小鼠来源的结直肠癌细胞移植的小鼠中鉴定GI101的肿瘤抑制作用而获得的结果。
- [0068] 图52显示了通过用hIgG4、抗PD-1抗体或GI101处理小鼠来源的结直肠癌细胞移植的小鼠,然后用FACS分析癌症组织中的CD8+T细胞、IFN- γ T细胞、CD4+T细胞和Treg细胞而获得的结果。
- [0069] 图53图解说明了通过用hIgG4、抗PD-1抗体或GI101处理小鼠来源的结直肠癌细胞移植的小鼠,然后用FACS分析癌症组织中的CD8+T细胞、IFN- γ T细胞、CD4+T细胞和Treg细胞而获得的结果。
- [0070] 图54显示了通过用hIgG4、抗PD-1抗体或GI101处理小鼠来源的结直肠癌细胞移植的小鼠,然后用FACS分析癌症组织中的巨噬细胞而获得的结果。
- [0071] 图55图解说明了通过用hIgG4、抗PD-1抗体或GI101处理小鼠来源的结直肠癌细胞移植的小鼠,然后利用FACS分析癌症组织中的巨噬细胞而获得的结果。
- [0072] 图56显示了通过用hIgG4、抗PD-1抗体或GI101处理小鼠来源的结直肠癌细胞移植的小鼠,然后用FACS分析癌症组织中的树突状细胞而获得的结果。
- [0073] 图57图解说明了通过用hIgG4、抗PD-1抗体或GI101处理小鼠来源的结直肠癌细胞移植的小鼠,然后用FACS分析癌症组织中的树突状细胞而获得的结果。
- [0074] 图58显示了通过在小鼠来源的肺癌细胞移植的小鼠中鉴定GI101的肿瘤抑制作用而获得的结果。
- [0075] 图59图解说明了通过用hIgG4、抗PD-1抗体或GI101处理小鼠来源的肺癌细胞移植的小鼠,然后用FACS分析癌症组织中的CD8+T细胞、IFN- γ T细胞、CD4+T细胞和Treg细胞获得的结果。
- [0076] 图60图解说明了通过用hIgG4、抗PD-1抗体或GI101处理小鼠来源的肺癌细胞移植的小鼠,然后用FACS分析癌症组织中的巨噬细胞而获得的结果。
- [0077] 图61图解说明了通过用hIgG4、抗PD-1抗体或GI101处理小鼠来源的肺癌细胞移植的小鼠,然后用FACS分析癌症组织中的树突状细胞而获得的结果。
- [0078] 图62显示了通过在小鼠来源的结直肠癌细胞移植的小鼠中鉴定mGI102-M61的肿瘤抑制作用而获得的结果。
- [0079] 图63显示了通过分析已经接受了mGI102-M61的小鼠来源的结直肠癌细胞移植小鼠的存活率而获得的结果。

[0080] 图64显示了通过在小鼠来源的结直肠癌细胞移植的小鼠中鉴定mGI101的肿瘤抑制作用而获得的结果。

[0081] 图65显示了在小鼠来源的结直肠癌细胞移植的小鼠中mGI101的肿瘤抑制。

[0082] 图66显示了通过对接受了PBS或GI101处理的猴子进行15天临床观察而获得的结果。

[0083] 图67和68显示了通过在-1、1、8和15天对接受了PBS或GI101处理的猴子测量体重而获得的结果。

[0084] 图69说明了接受了PBS或GI101处理的猴子15天的食物消耗。

[0085] 图70-72显示了通过分析在-1、1、8和15天对接受了PBS或GI101处理的猴子的血液获得的结果。

[0086] 图73-79显示了通过在第-1、1、8和15天对于接受了PBS或GI101处理的猴子进行临床和化学分析而获得的结果。

[0087] 图80和81显示了通过在-1、1、8和15天对已经接受了PBS或GI101处理的猴子分析细胞因子而获得的结果。

[0088] 图82-87显示了通过在-1、1、8和15天对已接受了PBS或GI101处理的猴子分析免疫细胞而获得的结果。

[0089] 图88显示了通过在第16天处死接受了PBS或GI101处理的猴子以获得脾脏组织、并进行病理分析脾脏组织而获得的结果。

[0090] 图89显示了融合蛋白,其中CD80蛋白和IL-2蛋白各自结合至载体蛋白。具体地,图89A显示了融合蛋白,其中CD80蛋白和IL-2蛋白分别结合至载体蛋白的N端和C端。此外,图89B显示了融合蛋白,其中CD80蛋白和IL-2蛋白分别结合至载体蛋白的C端和N端。

具体实施方式

[0091] 包含IL-2蛋白和CD80蛋白的融合蛋白

[0092] 在本发明的一方面提供了一种包含IL-2蛋白和CD80蛋白的融合蛋白。

[0093] 如本发明中所用,除非另有说明,否则术语“IL-2”或“白介素-2(interleukin-2)”是指从任何脊椎动物来源获得的任何野生型IL-2,包括源自哺乳动物例如灵长类动物(例如人)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)。IL-2可以获自动物细胞,并且还包括获自能够产生IL-2的重组细胞的IL-2。另外,IL-2可以是野生型IL-2或其变体。

[0094] 在本说明书中,IL-2或其变体可以由术语“IL-2蛋白”或“IL-2多肽”共同表达。IL-2、IL-2蛋白、IL-2多肽和IL-2变体特异性结合至例如IL-2受体。该特异性结合可以通过本领域技术人员已知的方法来鉴定。

[0095] IL-2的一个实施方案可以具有如SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列。这里,IL-2也可以是成熟的形式。具体地,成熟的IL-2可以不包含信号序列,并且可以具有如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。在此,IL-2可以在包含野生型IL-2的片段的概念下使用。野生型IL-2的N端或C端的一部分被截短。

[0096] 此外,IL-2的片段可以是从具有如SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:36所示氨基酸序列的蛋白质的N端截短的具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续氨基酸的形式。IL-2的片段可以为从具有如SEQ ID NO:35或SEQ ID

NO:36所示氨基酸序列的蛋白质的C端截短的具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续氨基酸的形式。

[0097] 如本发明所用,术语“IL-2变体”是指全长IL-2或上述IL-2片段中的一部分氨基酸被取代的形式。即,IL-2变体可以具有与野生型IL-2或其片段不同的氨基酸序列。但是,IL-2变体可能具有与野生型IL-2相同或相似的活性。在此,“IL-2活性”可以例如是指与IL-2受体的特异性结合,该特异性结合可以通过本领域技术人员已知的方法来检测。

[0098] 具体地,可以通过取代野生型IL-2中的一部分氨基酸来获得IL-2变体。通过氨基酸取代获得的IL-2变体的一个实施方案可以通过取代如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的第38、42、45、61和72位氨基酸中的至少一个来获得。

[0099] 具体地,可以通过将如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的第38、42、45、61或72位氨基酸中的至少一个取代为另一种氨基酸来获得IL-2变体。另外,当IL-2为如SEQ ID NO:35所示氨基酸序列中的N端的一部分被截短的形式时,在其上与如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中对应互补的位置处的氨基酸可以被另一个氨基酸取代。例如,当IL-2具有如SEQ ID NO:35所示氨基酸序列时,其IL-2变体可以通过使用另一个氨基酸来取代如SEQ ID NO:35所示氨基酸序列的第58、62、65、81或92位氨基酸中的至少一个来获得。这些氨基酸残基分别对应于如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的第38、42、45、61和72位氨基酸残基。在一个实施方案中,一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个氨基酸可以被取代,只要这种IL-2变体维持IL-2活性即可。另一个实施方案中,一个至五个氨基酸可以被取代。

[0100] 在一个实施方案中,IL-2变体可以是两个氨基酸被取代的形式。具体地,可以通过取代如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的第38和42位氨基酸获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的第38和45位氨基酸获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的第38和61位的氨基酸来获得IL-2变体。此外,在一个实施方案中,可通过取代如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的第38和72位的氨基酸获得IL-2变体。此外,在一个实施方案中,可以通过取代如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的第42和45位的氨基酸来获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的第42和61位的氨基酸来获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的第42和72位的氨基酸获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的第45和61位的氨基酸获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的第45和72位的氨基酸获得IL-2变体。此外,在一个实施方案中,可以通过取代如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的第61和72位氨基酸而获得IL-2变体。

[0101] 此外,IL-2变体可以是其中的三个氨基酸被取代的形式。具体地,可以通过取代如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的第38、42和45位的氨基酸来获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的第38、42和61位的氨基酸获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的第38、42和72位的氨基酸获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的第38、45和61位的氨基酸获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,

案中,可以通过取代如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的第38、45和72位的氨基酸获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的第38、61和72位的氨基酸来获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的第42、45和61位的氨基酸获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的第42、45和72位的氨基酸获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的第45、61和72位的氨基酸获得IL-2变体。

[0102] 另外,IL-2变体可以是其中的四个氨基酸被取代的形式。具体地,可以通过取代如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的第38、42、45和61位的氨基酸来获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以是通过取代如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的第38、42、45和72位的氨基酸获得IL-2变体。此外,在一个实施方案中,可以通过取代如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的第38、45、61和72位的氨基酸获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的第38、42、61和72位的氨基酸获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的第42、45、61和72位的氨基酸获得IL-2变体。

[0103] 此外,IL-2变体可以是其中的五个氨基酸被取代的形式。具体地,可以通过将如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的第38、42、45、61和72位的氨基酸中的每一个取代为另一种氨基酸来获得IL-2变体。

[0104] 在此,通过取代引入的“另一种氨基酸”可以是选自由丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸组成的组中的任何一种。然而,关于IL-2变体的氨基酸取代,在如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列中,第38位的氨基酸不能被精氨酸取代,第42位的氨基酸不能被苯丙氨酸取代,第45位的氨基酸不能被酪氨酸取代,第61位的氨基酸不能被谷氨酸取代,且第72位的氨基酸不能被亮氨酸取代。

[0105] 关于IL-2变体的氨基酸取代,在如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列中,第38位的氨基酸精氨酸可以被除精氨酸以外的氨基酸取代。优选地,关于IL-2变体的氨基酸取代,在如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列中,第38位的氨基酸精氨酸可以被丙氨酸(R38A)取代。

[0106] 关于IL-2变体的氨基酸取代,在如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列中,第42位的氨基酸苯丙氨酸可以被除苯丙氨酸以外的氨基酸取代。优选地,关于IL-2变体的氨基酸取代,在如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列中,第42位的氨基酸苯丙氨酸可以被丙氨酸(F42A)取代。

[0107] 关于IL-2变体的氨基酸取代,在如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列中,第45位的氨基酸酪氨酸可以被除酪氨酸以外的氨基酸取代。优选地,关于IL-2变体的氨基酸取代,在如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列中,第45位的氨基酸酪氨酸可以被丙氨酸(Y45A)取代。

[0108] 关于IL-2变体的氨基酸取代,在如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列中,第61位的氨基酸谷氨酸可以被除谷氨酸以外的氨基酸取代。优选地,关于IL-2变体的氨基酸取代,在如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列中,第61位的氨基酸谷氨酸可以被精氨酸(E61R)取代。

[0109] 关于IL-2变体的氨基酸取代,在如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列中,第72位的氨基酸亮氨酸可以被除亮氨酸以外的氨基酸取代。优选地,关于IL-2变体的氨基酸取代,在

如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列中,第72位的氨基酸亮氨酸可以被甘氨酸(L72G)取代。

[0110] 具体地,可以通过在如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列中进行至少一个选自由R38A、F42A、Y45A、E61R和L72G组成的组中的取代来获得IL-2变体。

[0111] 具体地,可以通过在选自由R38A、F42A、Y45A、E61R和L72G组成的组的位置中的两个、三个,四个或五个位置上的氨基酸取代来获得IL-2变体。

[0112] 另外,IL-2变体可以是其中的两个氨基酸被取代的形式。具体地,可以通过取代R38A和F42A获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代R38A和Y45A获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代R38A和E61R获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代R38A和L72G获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代F42A和Y45A获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代F42A和E61R获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代F42A和L72G获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代E61R和L72G获得IL-2变体。

[0113] 此外,IL-2变体可以是其中的三个氨基酸被取代的形式。具体地,可以通过取代R38A、F42A和Y45A获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代R38A、F42A和E61R获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代R38A、F42A和L72G获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代R38A、Y45A和E61R获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代R38A、Y45A和L72G获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代F42A、Y45A和E61R获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代F42A、Y45A和L72G获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代F42A、E61R和L72G获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代Y45A、E61R和L72G获得IL-2变体。

[0114] 另外,IL-2变体可以是其中的四个氨基酸被取代的形式。具体地,可以通过取代R38A、F42A、Y45A和E61R获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代R38A、F42A、Y45A和L72G获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代R38A、F42A、E61R和L72G获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代R38A、Y45A、E61R和L72G获得IL-2变体。另外,在一个实施方案中,可以通过取代F42A、Y45A、E61R和L72G获得IL-2变体。

[0115] 此外,可以通过取代R38A、F42A、Y45A、E61R和L72G获得IL-2变体。

[0116] 优选地,IL-2变体的一个实施方案可以包含在如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中进行选自以下取代组合(a)至(d)中的任意一种:

[0117] (a) R38A/F42A

[0118] (b) R38A/F42A/Y45A

[0119] (c) R38A/F42A/E61R

[0120] (d) R38A/F42A/L72G。

[0121] 在此,当IL-2具有如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列时,在与SEQ ID NO:10所示氨基酸序列中的氨基酸相应互补的位置上可以存在氨基酸的取代。此外,即便IL-2是如SEQ ID NO:35所示氨基酸序列的片段,在与SEQ ID NO:10的氨基酸序列互补对应的位置可以存在氨基酸的取代。

[0122] 具体而言,IL-2变体可以具有如SEQ ID NO:6、22、23或24所示的氨基酸序列。

[0123] 另外,IL-2变体的特征在于具有低体内毒性。在此,低体内毒性可能是由IL-2与IL-2受体 α 链(IL-2R α)结合所引起的副作用。已经开发出各种IL-2变体以改善由IL-2与

IL-2R由结合引起的副作用,这类IL-2变体可以是美国专利号5,229,109和韩国专利号1,667096中公开的那些。本申请中描述的IL-2变体与IL-2受体 α 链(IL-2R α)的结合能力低,因此体内毒性比野生型IL-2低。

[0124] 如本发明所用,术语“CD80”,也称为“B7-1”,是一种存在于树突细胞、活化的B细胞和单核细胞中的膜蛋白。CD80提供了对T细胞活化和存活必不可少的共刺激信号。CD80被认为是存在于T细胞表面的两种不同蛋白质CD28和CTLA-4的配体。CD80由288个氨基酸组成,并且可以具体地具有如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列。另外,如本发明所用,术语“CD80蛋白”是指全长CD80或CD80片段。

[0125] 如本发明所用,术语“CD80片段”是指CD80的切割形式。另外,CD80片段可以是CD80的细胞外结构域。CD80片段的一个实施方案可以通过从N端消除第1-34个氨基酸获得,所述第1-34个氨基酸是CD80的信号序列。具体地,CD80片段的实施方案可以是由如SEQ ID NO:11所示的第35-288位的氨基酸组成的蛋白质。此外,CD80片段的实施方案可以是由如SEQ ID NO:11所示的第35-242位的氨基酸组成的蛋白质。另外,CD80片段的实施方案可以是由如SEQ ID NO:11所示的第35-232位的氨基酸组成的蛋白质。此外,CD80片段的实施方案可以是由如SEQ ID NO:11所示的第35-139位的氨基酸组成的蛋白质。另外,CD80片段的一个实施方案可以是由如SEQ ID NO:11所示的第142-242位的氨基酸组成的蛋白质。在一个实施方案中,CD80片段可以具有如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。

[0126] 另外,IL-2蛋白和CD80蛋白可以通过接头或载体彼此连接。具体地,IL-2或其变体和CD80(B7-1)或其片段可以经由接头或载体彼此连接。在本说明书中,接头和载体可以互换使用。

[0127] 所述接头连接两个蛋白质。接头的一个实施方案可以包括1-50个氨基酸、白蛋白或其片段、免疫球蛋白的Fc结构域等。在此,免疫球蛋白的Fc结构域是指包含免疫球蛋白的重链恒定区2(CH2)和重链恒定区3(CH3),不包含免疫球蛋白的重链可变区和轻链可变区以及轻链恒定区1(CH1)的蛋白质。免疫球蛋白可以为IgG、IgA、IgE、IgD或IgM,并且可以优选地为IgG4。在此,野生型免疫球蛋白G4的Fc结构域可以具有如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。

[0128] 另外,免疫球蛋白的Fc结构域可以是Fc结构域变体以及野生型Fc结构域。另外,如本发明所用,术语“Fc结构域变体”可以指在糖基化模式方面与野生型Fc结构域不同的形式,与野生型Fc结构域相比具有高糖基化,或与野生型Fc结构域相比具有低糖基化或去糖基化的形式。另外,其中包括无糖基化的Fc结构域。通过培养条件或宿主的遗传操作,Fc结构域或其变体可调节为具有调节数量的唾液酸、岩藻糖基化或糖基化。

[0129] 另外,免疫球蛋白的Fc结构域的糖基化可以通过常规方法来修饰,例如化学方法、酶促方法和使用微生物的基因工程方法。另外,Fc结构域变体可以是免疫球蛋白、IgG、IgA、IgE、IgD和IgM的各个Fc区的混合形式。另外,Fc结构域变体可以是其中Fc结构域的一些氨基酸被其他氨基酸取代的形式。Fc结构域变体的一个实施方案可以具有如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列。

[0130] 所述融合蛋白可以具有结构:使用Fc结构域作为接头(或载体),将CD80蛋白和IL-2蛋白或者将IL-2蛋白和CD80蛋白分别连接至接头或载体的N端和C端(图89)。Fc结构域的N端或C端与CD-80或IL-2之间的连接可任选地通过连接肽来实现。

[0131] 具体而言,融合蛋白可以由以下结构式(I)或(II)组成:

[0132] N'-X-[接头(1)]_n-Fc结构域-[接头(2)]_m-Y-C'(I)

[0133] N'-Y-[接头(1)]_n-Fc结构域-[接头(2)]_m-X-C'(II)

[0134] 此处,在结构式(I)和(II)中,

[0135] N'为所述融合蛋白的N端,

[0136] C'为所述融合蛋白的C端,

[0137] X为所述CD80蛋白,

[0138] Y为所述IL-2蛋白,

[0139] 所示接头(1)和(2)为肽接头,并且

[0140] n和m分别独立地为0或1。

[0141] 优选地,融合蛋白可以由结构式(I)组成。IL-2蛋白如上所述。另外,CD80蛋白如上所述。根据一个实施方案,IL-2蛋白可以是与野生型IL-2相比具有1-5个氨基酸取代的IL-2变体。CD80蛋白可以是通过从野生型CD80的N端或C端截短多达约34个连续氨基酸残基获得的片段。或者,CD蛋白可以是具有与T细胞表面受体CTLA-4和CD28结合的活性的细胞外免疫球蛋白样结构域。

[0142] 具体而言,融合蛋白可以具有如SEQ ID NO:9、26、28或30所示的氨基酸序列。根据另一个实施方案,融合蛋白包括与如SEQ ID NO:9、26、28或30所示的氨基酸序列具有85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在此,同一性是例如同源性百分比,并且可以通过同源性比较软件确定,例如美国国家生物技术信息中心(NCBI)的BlastN软件。

[0143] 肽接头(1)可以包括在CD80蛋白和Fc结构域之间。肽接头(1)可以由5-80个连续氨基酸、20-60个连续氨基酸、25-50个连续氨基酸或30-40个连续氨基酸组成。在一个实施方案中,肽接头(1)可以由30个氨基酸组成。另外,肽接头(1)可以包含至少一个半胱氨酸。具体地,肽接头(1)可以包含一个、两个或三个半胱氨酸。另外,肽接头(1)可以衍生自免疫球蛋白的铰链。在一个实施方案中,肽接头(1)可以是由如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列组成的肽接头。

[0144] 肽接头(2)可以由1-50个连续氨基酸、3-30个连续氨基酸或5-15个连续氨基酸组成。在一个实施方案中,肽接头(2)可以是(G4S)_n(其中n是1-10的整数)。在此,在(G4S)_n中,n可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一个实施方案中,肽接头(2)可以是由如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列组成的肽接头。

[0145] 在本发明的另一方面提供了一种通过结合两种融合蛋白而获得的二聚体,所述两种融合蛋白各自包含IL-2蛋白和CD80蛋白。包含IL-2或其变体和CD80或其片段的融合蛋白如上所述。

[0146] 在此,构成二聚体的融合蛋白之间的结合可以通过但不限于由存在于接头中的半胱氨酸形成的二硫键来实现。构成二聚体的融合蛋白可以是彼此相同或不同的融合蛋白。优选地,二聚体可以是同源二聚体。构成二聚体的融合蛋白的一个实施方案可以是具有如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的蛋白。

[0147] 编码所述融合蛋白的多核苷酸

[0148] 在本发明的另一个方面提供了一种多核苷酸,其编码包含IL-2蛋白和CD80蛋白的

融合蛋白。具体地,多核苷酸可以包含如SEQ ID NO:8、25、27或29所示的核苷酸序列。包含IL-2蛋白和CD80蛋白的融合蛋白如上所述。在多核苷酸中,一个或多个核苷酸可以通过取代、缺失、插入或其组合来改变。当通过化学合成制备核苷酸序列时,可以使用本领域众所周知的合成方法,例如Engels和Uhlmann (Angew Chem Int Ed Eng., 37: 73-127, 1988) 中描述的那些方法。这样的方法可以包括三酯法、亚磷酸酯法、亚磷酸酰胺法和H-磷酸盐法,PCR和其他自动设计引物方法,在固体支持物上的寡核苷酸合成等。

[0149] 根据一个实施方案,该多肽可以包含与SEQ ID NO:8、25、27或29具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或至少约100%同一性的核酸序列。

[0150] 多核苷酸可以进一步包含编码信号序列或前导序列的核酸。如本发明所用,术语“信号序列”是指指导靶蛋白分泌的信号肽。信号肽被翻译然后在宿主细胞中裂解。具体而言,信号序列是蛋白质跨内质网(ER)膜迁移的氨基酸启动序列。在一个实施方案中,信号序列可以具有如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。

[0151] 信号序列的特性在本领域中是众所周知的。此类信号序列通常包含16-30个氨基酸残基,并且可以包含比此类氨基酸残基更多或更少的氨基酸残基。典型的信号肽由三个区域组成,即碱性N端区域、中央疏水区域和极性更大的C端区域。中央疏水区含有4-12个疏水残基,这些残基在未成熟多肽迁移通过膜脂质双层的过程中使信号序列固定。

[0152] 起始后,信号序列在ER内腔中被细胞酶(通常称为信号肽酶)裂解。在此,信号序列可以是tPa(组织纤溶酶原激活物)、HSV gDs(单纯疱疹病毒糖蛋白D的信号序列)或生长激素的分泌信号序列。优选地,可以使用在包括哺乳动物等的高等真核细胞中使用的分泌信号序列。另外,可以使用野生型IL-2和/或CD-80中包含的信号序列,或者可以使用在宿主细胞中已经被具有高表达频率的密码子取代的信号序列。

[0153] 具有编码融合蛋白的多核苷酸的载体

[0154] 在本发明的又一方面提供了一种包含多核苷酸的载体。

[0155] 载体可以被导入宿主细胞从而与宿主细胞重组并插入宿主细胞的基因组。或者,该载体应理解为包含可自主复制为附加体(episome)的多核苷酸序列的核酸类型。载体包括线性核酸、质粒、噬菌粒、粘粒、RNA载体、病毒载体及其类似物。病毒载体的实例包括但不限于逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒。

[0156] 具体而言,载体可以包括质粒DNA、噬菌体DNA等;以及商业开发的质粒(pUC18、pBAD、pIDTSAMRT-AMP等),大肠杆菌来源的质粒(pYG601BR322、pBR325、pUC118、pUC119等),枯草芽孢杆菌来源的质粒(pUB110、pTP5等),酵母来源的质粒(YEp13、YEp24、YCP50等),噬菌体DNA(Charon4A、Charon21A、EMBL3、EMBL4、λMBL4、λMBL4、λMBL等),动物病毒载体(逆转录病毒、腺病毒、牛痘病毒等),昆虫病毒载体(杆状病毒等)。由于载体根据宿主细胞不同表现出不同的表达水平和蛋白质修饰,因此优选选择和使用最适合该目的的宿主细胞。

[0157] 如本发明所用,术语靶蛋白的“基因表达”或“表达”应理解为是指DNA序列的转录、mRNA转录物的翻译以及融合蛋白产物或其片段的分泌。有用的表达载体可以是RcCMV(Invitrogen, Carlsbad)或其变体。表达载体可进一步包含用于促进哺乳动物细胞中靶基因连续转录的人巨细胞病毒(CMV)启动子,以及用于提高转录后RNA稳定性的牛生长激素聚

腺苷酸化信号序列。

[0158] 表达融合蛋白的转化细胞

[0159] 在本发明的又一个方面提供了一种已将载体导入其中的转化细胞。

[0160] 用于转化的宿主细胞可以包括但不限于原核细胞、真核细胞以及哺乳动物、植物、昆虫、真菌或细菌来源的细胞。作为原核细胞的一个例子,可以使用大肠杆菌。另外,作为真核细胞的例子,可以使用酵母。另外,对于哺乳动物细胞,可以使用CH0细胞、F2N细胞、CS0细胞、BHK细胞、鲍氏黑色素瘤(Bowes melanoma)细胞、HeLa细胞、911细胞、AT1080细胞、A549细胞、HEK 293细胞、HEK293T细胞等。然而,哺乳动物细胞不限于此,并且可以使用本领域技术人员已知可用作哺乳动物宿主细胞的任何细胞。

[0161] 另外,为了将表达载体引入宿主细胞中,可以使用CaCl₂沉淀、通过在CaCl₂沉淀中使用二甲基亚砜(DMSO)等还原剂提高了其效率的Hanahan方法、电穿孔、磷酸钙沉淀、原生质体融合,使用碳化硅纤维的搅拌、农杆菌介导的转化、使用PEG的转化、硫酸葡聚糖-、脂质体转染胺-(Lipofectamine-),或干转化/抑制介导的转化等。

[0162] 如上所述,为了优化融合蛋白作为治疗剂的特性或出于任何其他目的,融合蛋白的糖基化模式(例如,唾液酸、岩藻糖基化、糖基化)可以通过本领域技术人员已知的方法通过操纵宿主细胞拥有的糖基化相关基因来调节。

[0163] 产生融合蛋白的方法

[0164] 在本发明的又一方面提供了一种生产包含IL-2蛋白和CD80蛋白的融合蛋白的方法,该方法包括培养转化的细胞。具体地,生产方法可以包括:i)培养转化的细胞以获得培养物;ii)从培养物中收集融合蛋白。

[0165] 培养转化的细胞可以使用本领域众所周知的方法进行。具体地,培养可以分批进行,或者以补料分批或重复的补料分批处理连续进行。

[0166] 融合蛋白或其二聚体的用途

[0167] 在本发明的又一方面提供了一种用于治疗或预防癌症或感染性疾病、和/或用于提高治疗癌症或感染性疾病的功效的药物组合物,该组合物包含作为活性成分的包含IL-2蛋白和CD80蛋白的融合蛋白或两个融合蛋白连接形成的融合蛋白二聚体。

[0168] 包含IL-2蛋白和CD80蛋白的融合蛋白,或连接有两个融合蛋白的融合蛋白二聚体如上所述。

[0169] 所述癌症可以选自胃癌、肝癌、肺癌、结直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌、子宫颈癌、甲状腺癌、喉癌、急性髓细胞性白血病、脑瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、头颈癌、唾液腺癌和淋巴瘤。另外,感染性疾病可以选自乙型肝炎、丙型肝炎、人乳头瘤病毒(HPV)感染、巨细胞病毒感染、病毒性呼吸道疾病和流行性感冒。

[0170] 药物组合物的优选剂量根据患者的状况和体重、疾病的严重程度、药物形式、给药途径和持续时间而变化,并且可以由本领域技术人员适当地选择。在本发明的用于治疗或预防癌症或感染性疾病的药物组合物中,可以包含任何量(有效量)的活性成分,其取决于用途、剂型、掺合目的等,只要该活性成分可以对感染性疾病表现出抗癌活性或治疗作用即可。其常规有效量通常基于所述组合物的总重量,在0.001重量%至20.0重量%的范围内确定。在此,“有效量”是指能够起到抗癌作用或感染性疾病治疗作用的活性成分的量。这样的有效量可以在本领域技术人员的常识范围内通过实验确定。

[0171] 如本发明所用,术语“治疗”可用于表示治疗性和预防性的治疗。在此,预防可用于表示个体的病理状况或疾病被缓解或减轻。在一个实施方案中,术语“治疗”包括用于治疗包括人类在内的哺乳动物中的疾病的治疗或任何形式的给药。另外,该术语包括抑制或减慢疾病或疾病的进展。包括恢复或修复功能受损或丧失的含义,以使疾病得到部分缓解或完全缓解;刺激低效的流程;或缓解严重性疾病。

[0172] 如本发明所用,术语“功效”是指可以由一个或多个参数确定的能力,例如,在诸如一年、五年或十年的一定时间段内的存活或无病存活。另外,该参数可以包括抑制个体中至少一种肿瘤的大小。

[0173] 药代动力学参数(例如生物利用度)和基础参数(例如清除率)也可能影响功效。因此,“增强的功效”(例如,功效的改善)可能归因于增强的药代动力学参数和改善的功效,这可以通过比较测试动物或人类受试者的清除率和肿瘤生长,或通过比较诸如存活率、复发率或无病存活率之类的参数来检测。

[0174] 如本发明所用,术语“治疗有效量”或“药物有效量”是指足以预防或治疗所讨论疾病的化合物或组合物的量,其足以以合理的益处/风险比治疗疾病,且适用于医疗并不会造成不良影响。可以根据包括患者的健康状况、疾病的类型和严重程度、药物活性、患者对药物的敏感性、给药方式、给药时间、给药途径和排泄率、治疗持续时间、制剂或同时施用的药物以及本领域众所周知的医疗领域内的其他因素确定有效量的水平。在一个实施方案中,治疗有效量是指有效治疗癌症的药物的量。

[0175] 在此,药物组合物可以进一步包含药学上可接受的载体。药学上可接受的载体可以是任何载体,只要该载体是适合递送给患者的无毒物质即可。可以包含蒸馏水、酒精、脂肪、蜡和惰性固体作为载体。药物组合物中也可以包含药学上可接受的佐剂(缓冲剂、分散剂)。

[0176] 具体地,通过包含除活性成分之外的药学上可接受的载体,可以使用本领域已知的常规方法根据其给药途径将药物组合物制备成肠胃外制剂。在此,术语“药学上可接受的”是指载体的毒性不超过所施用(处方的)的对象所能适应的量,同时不抑制活性成分的活性。

[0177] 当将药物组合物制成肠胃外制剂时,可以根据本领域已知的方法将其制成具有合适载体的注射剂、透皮贴剂、鼻吸入剂或栓剂形式的制剂。在制备成注射剂的情况下,无菌水、乙醇、多元醇如甘油或丙二醇或它们的混合物可以作为合适的载体。优选使用等渗溶液,例如林格氏溶液(Ringer's solution),含有三乙醇胺的磷酸盐缓冲盐水(PBS)或注射用无菌水和5%右旋糖等。药物组合物的配制在本领域中是已知的,并且可以具体参考雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)(第19版,1995)等。该文献被认为是本说明书的一部分。

[0178] 药物组合物的优选剂量可以为每天0.01μg/kg至10g/kg,或0.01mg/kg至1g/kg,这取决于患者的状况、体重、性别、年龄、患者的严重程度和给药途径。该剂量可以每天一次给药或可以一天分成几次。这样的剂量在任何方面都不应解释为限制本发明的范围。

[0179] 可以施用(处方)药物组合物的对象为哺乳动物和人类,其中特别优选为人类。除活性成分外,本申请的药物组合物还可包含任何化合物或天然提取物,这些化合物或天然提取物已经过安全性验证,并且已知对感染性疾病具有抗癌活性或治疗作用,从而增强或

增强抗癌活性。

[0180] 在本发明的又一方面提供了一种包含IL-2蛋白和CD80蛋白的融合蛋白在治疗癌症或感染性疾病中的用途。

[0181] 在本发明的又一方面提供了一种包含IL-2蛋白和CD80蛋白的融合蛋白在增强对癌症或感染性疾病的治疗作用中的用途。

[0182] 在本发明的又一方面提供了一种包含IL-2蛋白和CD80蛋白的融合蛋白在制备用于治疗癌症或感染性疾病的药物中的用途。

[0183] 在本发明的又一方面提供了一种用于治疗癌症或感染性疾病的方法,和/或用于增强对癌症或感染性疾病的治疗效果的方法,包括对受试者施用包含IL-2蛋白和CD80蛋白的融合蛋白、或两个融合蛋白连接而成的融合蛋白二聚体。

[0184] 受试者可以是患有癌症或感染性疾病的个体。另外,受试者可以是哺乳动物,优选为人。包含IL-2蛋白和CD80蛋白的融合蛋白、或两个融合蛋白连接而成的融合蛋白二聚体如上所述。

[0185] 融合蛋白或融合蛋白二聚体的给药途径、剂量和给药频率可根据患者的病情和是否存在副作用而变化,因此可将融合蛋白或融合蛋白二聚体以不同的方式和剂量施用于受试者。最佳的给药方法、剂量和给药频率可以由本领域技术人员在适当的范围内选择。另外,融合蛋白或融合蛋白二聚体可与其他药物或对于待治疗的疾病而言其治疗作用已知的生理活性物质联合给药,或者可以与其他药物组合制成制剂的形式。

[0186] 由于IL-2的活性,本发明实施方案中的融合蛋白可以活化免疫细胞,例如天然杀伤细胞。因此,融合蛋白可以有效地用于癌症和感染性疾病中。特别地,已确定出与野生型相比具有2-5个氨基酸取代的IL-2变体,特别是在选自由R38A、F42A、Y45A、E61R和L72G组成的组中的两个、三个、四个或五个位置上含有氨基酸取代的IL-2变体,与IL-2受体 α 链的结合能力低,因此相对于常规IL-2的药理副作用显示出改善的特性。因此,当这样的IL-2变体单独使用或以融合蛋白的形式使用时,可以降低血管(或毛细血管)渗漏综合征(VLS)这些常规已知的IL-2会引发问题的发生率。

[0187] 实施例

[0188] 在下文中,将通过以下实施例更详细地描述本发明。然而,以下实施例仅用于说明本发明,本发明的范围不限于此。

[0189] I.融合蛋白的制备

[0190] 制备实施例1.hCD80-Fc-IL-2变体(2M):GI101的制备

[0191] 为了产生包含人CD80片段、Fc结构域和IL-2变体的融合蛋白,通过ThermoFisher Scientific的Invitrogen GeneArt基因合成服务合成了多核苷酸。具体地,多核苷酸包含核苷酸序列(SEQ ID NO:8),其编码包含信号肽(SEQ ID NO:1)、CD80片段(SEQ ID NO:2)、Ig铰链(SEQ ID NO:3)、Fc结构域(SEQ ID NO:4)、接头(SEQ ID NO:5)和具有两个氨基酸取代的IL-2变体(2M)(R38A,F42A)(SEQ ID NO:6)的融合蛋白,依次从N端开始。将多核苷酸插入pcDNA3_4载体。另外,将载体导入CHO细胞(Expi-CHOTM)以表达如SEQ ID NO:9所示的融合蛋白。导入载体后,在37°C、125RPM和8%CO₂浓度下培养7天。然后,收集培养物并从中纯化融合蛋白。纯化的融合蛋白命名为“GI101”。

[0192] 使用含有MabSelect SuRe蛋白A树脂的色谱法进行纯化。在25mM Tris, 25mM

NaCl, pH 7.4的条件下将融合蛋白结合至其中。然后,用pH为3的100mM NaCl、100mM的乙酸进行洗脱。将pH为9的20% 1M Tris-HCl置于收集管中,然后收集融合蛋白。对于收集的融合蛋白,通过透析用PBS缓冲液交换缓冲液16小时。

[0193] 此后,使用TSKgel G3000SWXL色谱柱(TOSOH Bioscience)通过尺寸排阻色谱法随着时间检测280nm波长处的吸光度,以获得高度浓缩的融合蛋白。在此,将分离纯化的融合蛋白在还原(R)或非还原(NR)的条件下进行SDS-PAGE,并用考马斯亮蓝染色以确定其纯度(图6)。当用NanoDrop检测时,鉴定出融合蛋白的浓度为2.78mg/ml(图7)。另外,图8提供了通过使用尺寸排阻色谱分析获得的结果。

[0194] 制备实施例2.mCD80-Fc-IL-2变体(2M):mGI101的制备

[0195] 为了产生包含小鼠CD80、Fc结构域和IL-2变体的融合蛋白,通过ThermoFisher Scientific的Invitrogen GeneArt基因合成服务合成了多核苷酸。具体地,多核苷酸包含核苷酸序列(SEQ ID NO:14),其编码包含信号肽(SEQ ID NO:1)、mCD80(SEQ ID NO:13)、Ig铰链(SEQ ID NO:3)、Fc结构域(SEQ ID NO:4)、接头(SEQ ID NO:5)和具有两个氨基酸取代的IL-2变体(2M)(R38A,F42A)(SEQ ID NO:6)的融合蛋白,依次从N端开始。将多核苷酸插入pcDNA3_4载体。另外,将载体导入CHO细胞(Expi-CHOTM)以表达如SEQ ID NO:15所示的融合蛋白。导入载体后,在37°C、125RPM和8%的CO₂浓度下培养7天。然后,收集培养物,并从中纯化融合蛋白。纯化的融合蛋白命名为“mGI101”。

[0196] 以与制备实施例1中相同的方式进行融合蛋白的纯化和收集。将分离和纯化的融合蛋白在还原(R)或非还原(NR)的条件下进行SDS-PAGE,并用考马斯亮蓝染色以确定其纯度(图9)。发现使用NanoDrop通过在280nm下的吸光度检测时,融合蛋白的浓度为1.95mg/ml。

[0197] 制备实施例3.hCD80-Fc:GI101C1的制备

[0198] 为了产生包含人CD80片段和Fc结构域的融合蛋白,通过ThermoFisher Scientific的Invitrogen GeneArt基因合成服务合成了多核苷酸。具体地,多核苷酸包含核苷酸序列(SEQ ID NO:16),其编码包含信号肽(SEQ ID NO:1)、CD80片段(SEQ ID NO:2)、Ig铰链(SEQ ID NO:3)和Fc结构域(SEQ ID NO:4)的融合蛋白。将多核苷酸插入pcDNA3_4载体。另外,将载体导入CHO细胞(Expi-CHOTM)以表达如SEQ ID NO:17所示的融合蛋白。导入载体后,在37°C,125RPM和8%的CO₂浓度下培养7天。然后,收集培养物,并从中纯化融合蛋白。纯化的融合蛋白命名为“GI101C1”。

[0199] 以与制备实施例1相同的方式进行融合蛋白的纯化和收集。将分离和纯化的融合蛋白在还原(R)或非还原(NR)的条件下进行SDS-PAGE,并用考马斯亮蓝染色以确认其纯度(图10)。当使用NanoDrop通过在280nm处的吸光度检测时,观察到融合蛋白的浓度为3.61mg/ml。

[0200] 制备实施例4.Fc-IL-2变体(2M):GI101C2的制备

[0201] 为了产生包含Fc结构域和IL-2变体的融合蛋白,通过ThermoFisher Scientific的Invitrogen GeneArt基因合成服务合成了多核苷酸。具体地,多核苷酸包含核苷酸序列(SEQ ID NO:18),其编码包含信号肽(SEQ ID NO:1)、Fc结构域(SEQ ID NO:4)、接头(SEQ ID NO:5)以及具有两个氨基酸取代的IL-2变体(2M)(R38A,F42A)(SEQ ID NO:6)的融合蛋白,依次从N端开始。将多核苷酸插入pcDNA3_4载体。另外,将载体导入CHO细胞(Expi-CHOTM)

以表达如SEQ ID NO:19所示的融合蛋白。导入载体后,在37°C,125RPM和8%的CO₂浓度下培养7天。然后,收集培养物,并从中纯化融合蛋白。纯化的融合蛋白命名为“GI101C2”。

[0202] 以与制备实施例1中相同的方式进行融合蛋白的纯化和收集。将分离和纯化的融合蛋白在还原(R)或非还原(NR)的条件下进行SDS-PAGE,并用考马斯亮蓝染色以确定其纯度(图11)。发现使用NanoDrop通过在280nm处的吸光度检测时,融合蛋白的浓度为4.79mg/ml。

[0203] 制备实施例5.mCD80-Fc:mGI101C1的制备

[0204] 为了产生包含小鼠CD80和Fc结构域的融合蛋白,通过ThermoFisher Scientific的Invitrogen GeneArt基因合成服务合成了多核苷酸。具体地,多核苷酸包含核苷酸序列(SEQ ID NO:20),其编码包含信号肽(SEQ ID NO:1)、mCD80(SEQ ID NO:13)、Ig铰链(SEQ ID NO:3)和Fc结构域(SEQ ID NO:4)的融合蛋白,依次从N端开始。将多核苷酸插入pcDNA3_4载体。另外,将载体导入CHO细胞(Expi-CHOTM)以表达如SEQ ID NO:21所示的融合蛋白。导入载体后,在37°C,125RPM和8%的CO₂浓度下培养7天。然后,收集培养物,并从中纯化融合蛋白。纯化的融合蛋白命名为“mGI101C1”。

[0205] 以与制备实施例1中相同的方式进行融合蛋白的纯化和收集。将分离和纯化的融合蛋白在还原(R)或非还原(NR)的条件下进行SDS-PAGE,并用考马斯亮蓝染色以确定其纯度(图12)。当使用NanoDrop通过在280nm处的吸光度检测时,观察到融合蛋白的浓度为2.49mg/ml。

[0206] 将制备实施例1-5中制备的融合蛋白总结在下表1中。

[0207] 表1

| 项目 | N 端 | 接头 | C 端 |
|-----------------------|----------|--------|--------|
| 制备实施例 1 (GI101) | hCD80 片段 | Fc 结构域 | hIL-2m |
| 制备实施例 2 (mGI101) | mCD80 片段 | Fc 结构域 | hIL-2m |
| 制备实施例 3 (GI101C1) | CD80 片段 | Fc 结构域 | - |
| 制备实施例 4 (GI101C2) | - | Fc 结构域 | IL-2m |
| 制备实施例 5 (mGI101C1) | mCD80 片段 | Fc 结构域 | - |

[0209] 制备实施例6.CD80-Fc-IL-2:GI101w的制备

[0210] 为了产生包含人CD80片段、Fc结构域和人IL-2的融合蛋白,通过ThermoFisher Scientific的Invitrogen GeneArt基因合成服务合成了多核苷酸。具体而言,多核苷酸包含核苷酸序列(SEQ ID NO:31),其编码包含信号肽(SEQ ID NO:1)、CD80片段(SEQ ID NO:2)、Ig铰链(SEQ ID NO:3)、Fc结构域(SEQ ID NO:4)、接头(SEQ ID NO:5)和成熟的人IL-2(SEQ ID NO:10)的融合蛋白,依次从N端开始。将多核苷酸插入pcDNA3_4载体。另外,将载体导入CHO细胞(Expi-CHOTM)以表达如SEQ ID NO:32所示的融合蛋白。导入载体后,在37°C、125RPM和8%的CO₂浓度下培养7天。然后,收集培养物,并从中纯化融合蛋白。纯化的融合蛋白命名为“GI101w”。以与制备实施例1相同的方式进行融合蛋白的纯化和收集。

[0211] 制备实施例7.hCD80-Fc-IL-2变体(3M):GI102-M45的制备

[0212] 为了产生包含人CD80片段、Fc结构域和具有三个氨基酸取代的IL-2变体(3M)(R38A,F42A,Y45A)(GI102-M45)的融合蛋白,通过ThermoFisher Scientific的Invitrogen GeneArt基因合成服务合成了多核苷酸。具体地,多核苷酸包含核苷酸序列(SEQ ID NO:25),其编码包含信号肽(SEQ ID NO:1)、CD80片段(SEQ ID NO:2)、Ig铰链(SEQ ID NO:3)、Fc结构域(SEQ ID NO:4)、接头(SEQ ID NO:5)和IL-2变体(SEQ ID NO:22)的融合蛋白,依次从N端开始。将多核苷酸插入pcDNA3_4载体。另外,将载体导入CHO细胞(Expi-CHOTM)以表达如SEQ ID NO:26所示的融合蛋白。导入载体后,在37°C、125RPM和8%的CO₂浓度下培养7天。然后,收集培养物,并从中纯化融合蛋白。纯化的融合蛋白命名为“GI102-M45”。

[0213] 以与制备实施例1中相同的方式进行融合蛋白的纯化和收集。将分离和纯化的融合蛋白在还原(R)或非还原(NR)的条件下进行SDS-PAGE,并用考马斯亮蓝染色以确定其纯度(图13)。

[0214] 制备实施例8.hCD80-Fc-IL-2变体(3M):GI102-M61的制备

[0215] 为了产生包含人CD80片段、Fc结构域和具有三个氨基酸取代的IL-2变体(3M)(R38A,F42A,E61R)(GI102-M61)的融合蛋白,通过ThermoFisher Scientific的Invitrogen GeneArt基因合成服务合成了多核苷酸。具体地,多核苷酸含有核苷酸序列(SEQ ID NO:27),其编码包含信号肽(SEQ ID NO:1)、CD80片段(SEQ ID NO:2)、Ig铰链(SEQ ID NO:3)、Fc结构域(SEQ ID NO:4)、接头(SEQ ID NO:5)和IL-2变体(SEQ ID NO:23)的融合蛋白,依次从N端开始。将多核苷酸插入pcDNA3_4载体。另外,将载体导入CHO细胞(Expi-CHOTM)以表达如SEQ ID NO:28所示的融合蛋白。导入载体后,在37°C、125RPM和8%的CO₂浓度下培养7天。然后,收集培养物,并从中纯化融合蛋白。纯化的融合蛋白命名为“GI102-M61”。

[0216] 以与制备实施例1中相同的方式进行融合蛋白的纯化和收集。将分离和纯化的融合蛋白在还原(R)或非还原(NR)的条件下进行SDS-PAGE,并用考马斯亮蓝染色以确定其纯度(图14)。

[0217] 制备实施例9.hCD80-Fc-IL-3M:GI102-M72的制备

[0218] 为了产生包含人CD80片段、Fc结构域和具有三个氨基酸取代的IL-2变体(3M)(R38A,F42A,L72G)(GI102-M72)的融合蛋白,通过ThermoFisher Scientific的Invitrogen GeneArt基因合成服务合成了多核苷酸。具体地,多核苷酸包含核苷酸序列(SEQ ID NO:29),其编码包含信号肽(SEQ ID NO:1)、CD80片段(SEQ ID NO:2)、Ig铰链(SEQ ID NO:3)、Fc结构域(SEQ ID NO:4)、接头(SEQ ID NO:5)和IL-2变体(SEQ ID NO:24)的融合蛋白,依次从N端开始。将多核苷酸插入pcDNA3_4载体。另外,将载体导入CHO细胞(Expi-CHOTM)以表达如SEQ ID NO:30所示的融合蛋白。导入载体后,在37°C、125RPM和8%CO₂浓度下培养7天。然后,收集培养物,并从中纯化融合蛋白。纯化的融合蛋白命名为“GI102-M72”。

[0219] 以与制备实施例1中相同的方式进行融合蛋白的纯化和收集。将分离和纯化的融合蛋白在还原(R)或非还原(NR)的条件下进行SDS-PAGE,并用考马斯亮蓝染色以确定其纯度(图15)。

[0220] 制备实施例10.mCD80-Fc-IL-3M:mGI102-M61的制备

[0221] 为了产生包含小鼠CD80片段、Fc结构域和具有三个氨基酸取代的IL-2变体(3M)(R38A,F42A,E61R)(GI102-M61)的融合蛋白,通过ThermoFisher Scientific的Invitrogen GeneArt基因合成服务合成了多核苷酸。具体地,多核苷酸包含核苷酸序列(SEQ ID NO:

33),其编码包含信号肽(SEQ ID NO:1)、mCD80片段(SEQ ID NO:13)、Ig铰链(SEQ ID NO:3)、Fc结构域(SEQ ID NO:4)、接头(SEQ ID NO:5)和IL-2变体(SEQ ID NO:23)的融合蛋白,依次从N端开始。将多核苷酸插入pcDNA3_4载体。另外,将载体导入CHO细胞(Expi-CHOTM)以表达如SEQ ID NO:34所示的融合蛋白。导入载体后,在37℃、125RPM和8%的CO₂浓度下培养7天。然后,收集培养物,并从中纯化融合蛋白。纯化的融合蛋白命名为“mGI102-M61”。

[0222] 以与制备实施例1相同的方式进行融合蛋白的纯化和收集。

[0223] II.融合蛋白及其配体之间结合亲和力的鉴定

[0224] 为了鉴定融合蛋白及其配体之间的结合亲和力,使用Octet RED 384检测了结合亲和力。

[0225] 实验实施例1.鉴定hCTLA-4与GI101之间的结合亲和力

[0226] 将AR2G生物传感器(Amine Reactive 2nd gen,ForteBio,目录号:18-5092)事先在96孔微孔板(GreinerBio-one,目录号:655209)中与200μl蒸馏水水合。将要连接到AR2G生物传感器的配体(CTLA-4,人CTLA-4/CD152,His标签,Sino Biological,目录号:11159-H08H)用10mM乙酸盐缓冲液(pH 5,AR2G试剂盒,ForteBio,目录号:18-5095)稀释至浓度为5μg/ml。此外,用1×AR2G动力学缓冲液(AR2G试剂盒,ForteBio,目录号:18-5095)将要连接到配体的GI101稀释至1,000nM,500nM,250nM,125nM或62.5nM的浓度。通过在蒸馏水中混合20mM EDC和10mM s-NHS(AR2G试剂盒,ForteBio,目录号:18-5095)制备活化缓冲液。将每种试剂按照80μl移至384孔微孔板(Greiner Bio-one,目录号:781209)中,并设置程序。

[0227] 结果如图16中所示,图中显示了测定的hCTLA-4与GI101之间的结合亲和力。

[0228] 实验实施例2.鉴定hPD-L1/GI101和hPD-L1/PD-1之间的结合亲和力

[0229] Ni-NTA(Nickel charged Tris-NTA,Ni-NTA Biosensors,ForteBio,18-5101)预先在96孔微孔板(GreinerBio-one,目录号:655209)中与200μl 1×Ni-NTA动力学缓冲液(10×Kinetics缓冲液,ForteBio,18-1042)水合。用1×Ni-NTA动力学缓冲液将要连接至Ni-NTA生物传感器的配体(人类PD-L1/B7-H1蛋白,His-tag,Sino bio,目录号:10084-H08H)稀释至浓度为5μg/ml。用1×Ni-NTA动力学缓冲液将要连接至配体的GI101稀释至1,000nM,500nM,250nM,125nM或62.5nM。此外,用1×Ni-NTA动力学缓冲液将要连接到配体的人PD-1/PDCD1(人PD-1/PDCD1,Fc标签,Sino Biological,目录号:10377-H02H)稀释至2,000nM,1,000nM,500nM,250nM或125nM。然后,将每种试剂按照80μl移至384孔微孔板中,并设置程序。

[0230] 结果如图17所示,图中检测了hPD-L1和GI101之间的结合亲和力。此外,如图18所示,检测了hPD-L1和hPD-1之间的结合亲和力。

[0231] 实验实施例3.鉴定mCTLA-4和mGI101之间的结合亲和力

[0232] 以与实验实施例1相同的方式检测mCTLA-4和mGI101之间的结合亲和力。这里,使用的设备如下:生物传感器:AR2G,配体:mCTLA-4(重组小鼠CTLA-4Fc嵌合体,R&D Systems,目录号:434-CT-200),分析物:mGI101(500nM,250nM,125nM,62.5nM,31.3nM)。

[0233] 结果如图19所示,图中显示了检测的mCTLA-4和mGI101之间的结合亲和力。

[0234] 实验实施例4.鉴定mPD-L1和mGI101之间的结合亲和力

[0235] 以与实验实施例1相同的方式鉴定mPD-L1和mGI101之间的结合亲和力。这里,使用的设备如下:生物传感器:AR2G,配体:mP D-L1(重组小鼠B7-H1/PD-L1 Fc嵌合体,R&D

Systems, 目录号:434-CT-200), 分析物:mGI101(500nM, 250nM, 125nM, 62.5nM, 31.3nM)。

[0236] 结果如图20所示,图中显示了检测的mPD-L1和mGI101之间的结合亲和力。

[0237] 实验实施例5. 鉴定GI-101(hCD80-Fc-hIL-2v)与CTLA-4和PD-L1的结合能力

[0238] 使用Octet RED 384仪器(ForteBio, 颇尔生命科学公司)在30°C和1,000rpm搅拌下进行结合动力学检测。使用胺2代Amine Reactive (AR2G) 生物传感器芯片检测对CTLA-4的结合能力, 使用Nickel charged Tris-NTA (Ni-NTA) 生物传感器芯片检测对PD-L1的结合能力。使用400mM EDC和100mM 碘基-NHS的组合活化AR2G生物传感器芯片。然后, 将人CTLA-4-His标签(Sino Biological, 目录号:11159-H08H)用10mM乙酸盐缓冲液(pH 5)稀释至5μg/ml, 并在AR2G生物传感器芯片上加载300秒并固定。

[0239] 然后, 检测CTLA-4与GI-101(hCD80-Fc-hIL-2v)、GI-101C1(hCD80-Fc)、伊匹木单抗(Ipilimumab, Bristol-Myers Squibb)和GI-101C2(Fc-hIL-2v)在不同浓度时的结合300秒, 并检测其解离300秒。另一方面, 将人PD-L1-His标签(Sino bio, 目录号:10084-H08H)用1×Ni-NTA动力学缓冲液稀释至浓度为5μg/ml, 然后装载到Ni-NTA生物传感器芯片上600秒并固定。然后, 检测PD-L1与GI-101、GI-101C1、hPD-1-Fc(Sino bio, 目录号:10377-H02H)和GI101C2在不同浓度下的结合300秒, 并在测定其解离300秒。使用由颇尔公司提供的Octet Data Analysis HT软件版本10(Octet Data Analysis HT software ver.10)进行结合动力学分析。结果在图21和22中显示。

[0240] 实验实施例6. 鉴定GI-101(hCD80-Fc-hIL-2v)对PD-1/PD-L1结合的作用

[0241] 使用Octet RED 384仪器(ForteBio, 颇尔生命科学)在30°C和1,000rpm的搅拌下进行封闭实验。用1×Ni-NTA动力学缓冲液将人PD-L1-His标签(Sino bio, 目录号:10084-H08H)稀释至浓度为5μg/ml, 并在Ni-NTA生物传感器芯片上加载600秒并固定。为了进行封闭实验, 将固定在生物传感器芯片上的hPD-L1与GI-101在各种浓度(300nM, 100nM, 50nM, 25nM, 12.5nM和0nM)下结合600秒钟, 然后再次使其与竞争的人PD-1(100nM)结合600秒, 以检测hPD-1可以与之竞争的程度。相反, 使hPD-L1以各种浓度(300nM, 100nM, 50nM, 25nM, 12.5nM和0nM)与hPD-1结合600秒, 然后再次与竞争的GI-101(100nM)结合, 持续600秒, 以检测GI-101可以结合多少。使用由颇尔公司提供的Octet Data Analysis HT软件版本10(Octet Data Analysis HT software ver.10)的抗原决定部位合并菜单(epitope binning menu)分析封闭实验。结果如图23所示。

[0242] 实验实施例7. 鉴定IL-2Rα或IL-2Rβ与GI101之间的结合亲和力

[0243] 使用AR2G生物传感器检测对IL-2Rα的结合能力, 并且使用Ni-NTA生物传感器(Nickel charged Tris-NTA, Ni-NTA生物传感器, ForteBio, 18-5101)检测对IL-2Rβ的结合能力。

[0244] 将要连接到AR2G生物传感器的配体(IL-2Rα-His标签, Acro, 目录号:ILA-H52H9)用10mM乙酸盐缓冲液(pH 5, AR2G试剂盒, ForteBio, 目录号:18-5095)稀释至浓度为5μg/ml。将400mM EDC和100mM 碘基-NHS混合制备的缓冲液激活AR2G生物传感器, 然后将稀释的配体加载到AR2G生物传感器上300秒并固定。

[0245] 同时, 将要附着至Ni-NTA生物传感器的配体(IL-2Rβ-His标签, Acro, 目录号:CD2-H5221)用1×Ni-NTA动力学缓冲液稀释至5μg/ml的浓度。将稀释的配体加载到Ni-NTA生物传感器上600秒并固定。

[0246] 此后,将要连接于配体的各种浓度的GI101、GI101w或Proleukin (Novartis, hIL-2) 加载300秒。然后,检测其结合并且进一步检测其解离300秒。结合动力学分析使用颇尔公司提供的Octet Data Analysis HT软件版本10进行 (Octet Data Analysis HT software ver. 10)。结果显示在图24-26中。

[0247] 结果显示,与GI101w和Proleukin相比,已确定GI101对IL-2受体 α 链 (IL-2R α) 的结合能力低,对IL-2R β 的结合能力高。

[0248] 实验实施例8.融合蛋白与配体之间的结合亲和力的检测

[0249] 为了鉴定融合蛋白及其配体之间的结合亲和力,使用Octet RED 384检测了结合亲和力。

[0250] 实验实施例8.1鉴定IL2 α 受体与GI101-M45、GI101-M61或GI101-M72之间的结合亲和力

[0251] AR2G生物传感器 (Amine Reactive 2nd gen, ForteBio, 目录号:18-5092) 事先在96孔微孔板 (GreinerBio-one, 目录号:655209) 中与200 μ l蒸馏水 (DW) 水合。用10mM乙酸盐缓冲液 (pH 5) 将要连接至生物传感器的配体 (人类IL-2R α 蛋白, His Tag, Acro, ILA-H52H9) (AR2G试剂盒, ForteBio, 目录号18-5095) 稀释至浓度为5 μ g/ml。用1×AR2G动力学缓冲液 (AR2G试剂盒, ForteBio, 目录号:18-5095) 将要连接至配体的分析物 (GI101-M45, GI101-M61, GI101-M72) 分别稀释至500nM, 250nM, 125nM和62.5nM。通过在DW中混合20mM EDC和10mM s-NHS (AR2G试剂盒, ForteBio, 目录号:18-5095) 制备活化缓冲液。将每种试剂按照80 μ l移至384孔微孔板 (Greiner Bio-one, 目录号:781209) 中,并设置程序。

[0252] 结果,图27显示了IL2 α 受体与GI101-M45之间的结合亲和力。另外,图28显示了IL2 α 受体与GI101-M61之间的结合亲和力,以及图29显示了IL2 α 受体与GI101-M72之间的结合亲和力。

[0253] 实验实施例8.2鉴定GI102-M45、GI102-M61和GI102-M72对IL-2R β 的结合亲和力

[0254] Ni-NTA生物传感器预先在96孔微孔板中与200 μ l 1×Ni-NTA动力学缓冲液 (10×Kinetics缓冲液, ForteBio, 18-1042) 水合。用1×Ni-NTA动力学缓冲液将要连接至生物传感器的配体 (人类IL-2R β 蛋白, His-Tag, Acro, CD2-H5221) 稀释至浓度为2 μ g/ml。用1×Ni-NTA动力学缓冲液将要连接至配体的GI102-M45、GI102-M61或GI102-M72稀释至500nM, 250nM, 125nM或62.5nM的浓度。将每种试剂按照80 μ l移至384孔微孔板中,并设置程序。

[0255] 结果如图30所示,图中显示了测定的IL-2R β 与GI102-M45之间的结合亲和力,并且图31显示了测定的IL-2R β 与GI102-M61之间的结合亲和力。此外,图32显示了检测的IL-2R β 与GI102-M72之间的亲和力。

[0256] III.融合蛋白免疫活性的鉴定

[0257] 实验实施例9.鉴定融合蛋白引起的IFN- γ 产生

[0258] 实验实施例9.1CFSE标记的PBMC的培养

[0259] 通过将从人分离的外周血单核细胞 (PBMC) 与1 μ M CellTrace CFSE染料在37°C下反应20分钟,用羧基荧光素琥珀酰亚胺酯 (CFSE) 对其进行标记。通过与具有5倍体积染色反应溶液的培养基反应5分钟,然后通过以1300rpm离心5分钟,去除未结合至细胞的CFSE。将CFB标记的PBMC重悬在培养基中 (含有10%FBS、10mM HEPES、100U/ml青霉素/链霉素、1mM丙酮酸钠、55 μ M 2-巯基乙醇、1mM非必需氨基酸,和2mM L-谷氨酰胺),然后以每孔1×10⁵个细

胞的量添加到96孔板中。用5 μ g/ml的PHA(Lactin from Phaseolus Vulgaris, red kidney bean, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, 目录号L1668-5MG) 以及GI101、GI101C1、GI101C2或IL-2进行处理(Aldesleukin; 人重组IL-2, Novartis), 并在5% CO₂培养箱中在37°C下培养6天。

[0260] 此处, GI101、GI101C1、GI101C2和IL-2的处理浓度为1nM、10nM或100nM。通过FACS分析细胞, 并使用ELISA试剂盒(Biolegend, San Diego, CA, USA, 目录号430103) 检测培养基中存在的人IFN- γ 。

[0261] 实验实施例9.2流式细胞仪分析

[0262] 用FACS缓冲液(3% FBS、10mM EDTA、1M HEPES、100单位/ml青霉素链霉素、10 μ g/ml、1mM丙酮酸钠)洗涤去除上清液后获得的细胞沉淀, 然后与Fc阻断剂(Biolegend, 目录号422302)在4°C下放置5分钟。然后, 用APC抗CD3Ab(Biolegend, 目录号300412)和PE抗CD8aAb(Biolegend, 目录号300908)处理, 并使反应在4°C下进行20分钟。接着, 将所得物用FACS缓冲液洗涤。将细胞沉淀重悬于FACS缓冲液中, 然后使用BD LSR Fortessa(BD Biosciences, 圣地亚哥, 加利福尼亚, 美国)和FlowJo软件进行分析。

[0263] 实验实施例9.3人IFN- γ ELISA

[0264] 使用人IFN- γ ELISA试剂盒(Biolegend, 目录号430103)检测每个样本的细胞培养上清液中的人IFN- γ 的量。简而言之, 将抗人IFN- γ 抗体添加至ELISA板, 并使反应在4°C下进行过夜, 从而将这些抗体包被在其上。然后, 在室温下用添加了1% BSA的PBS溶液封闭1小时。用洗涤缓冲液(PBS中添加0.05% Tween-20)进行洗涤, 然后将标准溶液和各样品适当地稀释并添加到其中。接着, 使反应在室温进行2小时。

[0265] 反应完成后, 洗涤板并向其中添加二抗(检测抗体)。使反应在室温下进行1小时。接着用洗涤缓冲液进行洗涤, 然后向其中添加抗生物素蛋白-HRP溶液。使反应在室温下进行30分钟。向其添加底物溶液, 并在黑暗中于室温下20分钟引发显色反应。最后, 向其中加入H₂SO₄终止显色反应, 并用Epoch Microplate分光光度计(BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)检测450nm处的吸光度。

[0266] 结果发现, 与用GI101C1、GI101C2或IL-2处理的细胞相比, 用GI101处理的细胞表现出显著的IFN- γ 分泌的增加(图33和34)。

[0267] 实验实施例10. 鉴定GI101对CD8+T细胞增殖的作用

[0268] 通过使从人体内分离的外周血单核细胞(PBMC)与1 μ M CellTrace CFSE染料在37°C下反应20分钟, 用CFSE标记对其进行标记。通过与具有5倍体积染色反应溶液的培养基反应5分钟, 然后通过以1300rpm离心5分钟, 去除未结合至细胞的CFSE。将CFB标记的PBMC重新悬浮在培养基中(含有10% FBS、10mM HEPES、100U/ml青霉素/链霉素、1mM丙酮酸钠、55 μ M 2-巯基乙醇、1mM非必需氨基酸, 和2mM L-谷氨酰胺), 然后以每孔1 \times 10⁵个细胞的量添加到96孔板中。

[0269] 此后, 用1 μ g/ml的抗CD3 ϵ 抗体(Biolegend目录号L1668-5MG)和GI101、GI101C1、GI101C2或Proleukin(诺华公司)进行处理, 并在5% CO₂培养箱中于37°C培养6天。在此, 用浓度为100nM的GI101、GI101C1、GI101C2和IL-2处理细胞。通过使用APC-TCR $\alpha\beta$ 和PE-CD8 α 抗体进行的FACS分析, 检测未用CFSE标记的CD8+T细胞的比例, 以确定培养细胞的增殖程度。

[0270] 结果发现, GI101在体外以与野生型IL-2Proleukin相似的程度激活CD8+T细胞的

增殖(图35和36)。

[0271] 实验实施例11. 鉴定GI101和GI102对CD8+T细胞增殖的作用

[0272] 人PBMC购自Allcells (Lot#3014928, 美国)。使用1M CellTrace CFSE染料, 在室温且在遮光条件下与人PBMC反应20分钟。通过与1 μ M CellTrace CFSE染料在37°C下反应20分钟, 用CFSE标记细胞。通过与具有5倍体积染色反应溶液的培养基反应5分钟, 然后通过以1300rpm离心5分钟, 去除未结合至细胞的CFSE。将CFB标记的PBMC重悬在培养基中(含有10%FBS、10mM HEPES、100U/ml青霉素/链霉素、1mM丙酮酸钠、55 μ M 2-巯基乙醇、1mM非必需氨基酸, 和2mM L-谷氨酰胺), 然后以每孔 1×10^5 个细胞的量添加到96孔板中。

[0273] 之后, 使用1 μ g/ml的抗CD3 ϵ 抗体 (OKT3, eBioscience, 美国) 和GI101、GI101C1、GI101C2或Proleukin(诺华公司) 处理CFB标记的PBMC, 并在5%培养箱中在37°C下培养7天。在此, 用浓度为10 μ M的GI101、GI101C1、GI101C2和IL-2处理细胞。

[0274] 通过使用抗人CD4-PE抗体 (anti-human CD4-PE antibody, BioLegend, 美国)、抗人CD8-PE/Cy7抗体 (anti-human CD8-PE/Cy7 antibody, BioLegend, 美国) 和抗人FoxP3-APC抗体 (anti-human FoxP3-APC antibody, BioLegend, 美国) 进行FACS分析以检测未用CFSE标记的CD8+T细胞的比例, 从而确定孵育的细胞的增殖程度。

[0275] 结果显示, 与对照组(无刺激)、仅接受了抗CD3抗体的处理组和GI101C1处理相比, 接受了GI101、GI102_M61、GI101C2和Proleukin处理的组中CD8+T细胞的比例显著增加。此外, 与阴性对照组(无刺激)和单独接受抗CD3的处理组相比, 接受了GI101、GI101C2和Proleukin的处理组中CD4+/FoxP3+Treg细胞的增殖明显增加, 而接受了GI102和GI101C1的处理组未表现出CD4+/FoxP3+Treg细胞增殖的显著增加(图37)。

[0276] 实验实施例12. 鉴定GI101或GI101w对CD8+T细胞和NK细胞增殖的作用

[0277] 将购自Orient Bio(韩国釜山)的7周大的C57BL/6小鼠分成3组, 每组包含3只小鼠, 并腹膜内注射PBS、GI101或GI101w。在此, GI101和GI101w分别是通过在200 μ l PBS中加入40.5 μ g进行制备, 然后腹膜内注入。注射五天后, 从每组小鼠中分离出脾脏。从其中分离细胞, 并使用血细胞计数器检测细胞总数。通过使用APC-CD3 ϵ 抗体 (Biolegend; 145-2C11)、PE-NK1.1抗体 (Biolegend; PK136) 和Pacific blue-CD8 α 抗体 (BD; 53-6.7) 染色的FACS分析检查脾细胞中CD8+T细胞和NK细胞的比例。因此计算出脾脏中存在的CD8+T细胞和NK细胞的数目。

[0278] 结果鉴定出, 与GI101w相比, GI101在体内激活了CD8+T细胞和NK细胞的增殖(图38和39)。

[0279] 实验实施例13. 鉴定GI101对T细胞功能的作用

[0280] 使用CTLA-4阻断生物测定试剂盒 (CTLA-4blockade bioassay kit, Promega, 目录号JA4005) 进行实验。实验简要描述如下。将保存在液氮中的CTLA-4效应细胞在37°C恒温水浴中融化3分钟, 然后将0.8ml的CTLA-4效应细胞与3.2ml预热的测定缓冲液 (90% RPMI+10% FBS) 充分混合。接着将混合物以每孔25 μ l添加至96孔白细胞培养板 (SPL, 目录号30196)。然后, 向其中加入25 μ l不同浓度的GI101。对于阴性对照, 向其中添加25 μ l的测定缓冲液。然后, 盖上白色平板细胞培养板并置于室温下, 直到制备出aAPC/Raji细胞。

[0281] 将保存在液氮中的aAPC/Raji细胞在37°C的恒温水浴中融化3分钟, 然后将0.8ml的aAPC/Raji细胞与3.2ml的预热测定缓冲液充分混合。然后, 将混合物加入到板中, 每孔25

μ l, 并且在37°C的5% CO₂培养箱中反应16小时。反应完成后, 将所得物在室温下静置15分钟, 然后向其中加入Bio-Glo试剂, 同时注意避免气泡。并且将Bio-Glo试剂添加到三个最外面的孔中, 并将这些孔作为空白以校正背景信号。在室温下反应10分钟, 然后用Cytation 3 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) 检测发光。通过计算RLU(GI101-背景)/RLU(未处理-背景) 进行最终的数据分析。

[0282] 结果发现, 连接于CTLA-4的GI101在效应T细胞上表达, 并激活T细胞的功能而非抑制T细胞的功能(图40和41)。

[0283] 实验实施例14. 鉴定mGI101和mGI102对免疫细胞的作用

[0284] 从Orient Bio(Korea) 购买的7周大的C57BL/6小鼠分为3组, 每组包含3只小鼠, 并且向其中静脉内给药PBS, 3mg/kg、6mg/kg或12mg/kg的GI101, 或3mg/kg、6mg/kg或12mg/kg的mGI102 (mGI102-M61)。注射后的第1、3、5、7和14天, 从每组小鼠中分离出脾脏。此后, 对于脾脏组织, 使用各自的抗体通过FACS分析来计算效应CD8+T细胞、NK细胞和Treg细胞的数目, 并且分别计算效应CD8+T细胞和NK细胞相对于Treg细胞的比例。有关每种细胞测定中使用的抗体的信息如下:

[0285] 效应CD8+T细胞: PB抗小鼠CD3 ϵ 抗体 (PB anti-mouse CD3 ϵ antibody, Biolegend, #155612; KT3.1.1), FITC抗小鼠CD8 α 抗体 (FITC anti-mouse CD8 α antibody, BD, #553031, 53-6.7), PE/Cy7抗小鼠CD44抗体 (PE/Cy7 anti-mouse CD44 antibody, Biolegend, #103030; IM7), APC抗小鼠CD122抗体 (APC anti-mouse CD122 antibody, Biolegend, #123214; TM- β 1)

[0286] NK细胞: PB抗小鼠CD3 ϵ 抗体 (PB anti-mouse CD3 ϵ antibody, Biolegend, #155612; KT3.1.1), PE抗小鼠NK-1.1 (PE anti-mouse NK-1.1, Biolegend, #108708; PK136)

[0287] Treg细胞: FITC抗小鼠CD3抗体 (FITC anti-mouse CD3 antibody, Biolegend, #100204; 17A2), PB抗小鼠CD4抗体 (PB anti-mouse CD4 antibody, Biolegend, #100531; RM4-5), PE抗小鼠CD25抗体 (PE anti-mouse CD25 antibody, Biolegend, #102008; PC61), APC抗小鼠Foxp3抗体 (APC anti-mouse Foxp3 antibody, Invitrogen, #FJK-16s, 17-5773-82)。

[0288] 结果显示, 与PBS施用组相比, 接受mGI101或mGI102 (mGI102-M61) 处理的组在施用后3-14天的时间点显示出CD8+T细胞和NK细胞数量的显著增加。另外发现, 与PBS给药组相比, 接受mGI102处理的组在给药后3-14天的时间点处显示出活化的CD8+T细胞/Treg细胞和NK细胞/Treg细胞的比例显著增加(图42)。

[0289] IV融合蛋白的抗癌作用鉴定

[0290] 实验实施例15. 鉴定GI101对过表达PD-L1的癌细胞的作用

[0291] 将过表达PD-L1的NC1-H292癌细胞系在含有10 μ g/ml丝裂霉素C (Sigma) 的培养基中培养3小时, 然后用培养基洗涤以去除丝裂霉素C。此后, 在96孔板中将5 \times 10⁴个丝裂霉素C处理后的NC1-H292癌细胞系的细胞与1 \times 10⁵个人PBMC的细胞一起孵育。在此, 用5 μ g/ml的PHA (Sigma) 进行T细胞活性的处理。另外, 将浓度为50nM的GI101C1和GI101与浓度为50nM的IgG1-Fc (Biolegend) 或阿巴西普 (abatacept) (=Orencia; Bristol-Myers Squibb) 于4°C反应30分钟, 然后将产生的溶液用于处理NC1-H292癌细胞。3天后, 收集细胞孵育的上清液, 并使用ELISA试剂盒 (Biolegend) 定量检测IFN- γ 的量。

[0292] 作为阳性对照组,在未经丝裂霉素C处理的NC1-H292癌细胞系的情况下,用PHA刺激的人PBMC;作为阴性对照组,在丝裂霉素C处理的NC1-H292癌细胞系的存在下,用PHA刺激的人PBMC。使用与实验实施例9.3相同的方法并使用IFN- γ ELISA试剂盒进行实验。

[0293] 结果,GI101有效地激活了被过表达PD-L1的癌细胞系抑制的免疫应答。另外,发现GI101抑制了效应T细胞上表达的CTLA-4的信号传导(图43和44)。

[0294] 实验实施例16.鉴定GI101在小鼠源性结直肠癌细胞移植的小鼠中的抗癌作用

[0295] 将 5×10^6 细胞/0.05ml小鼠源CT-26癌细胞系与0.05ml无基质胶基质酚红(Matrigel matrix phenol red-free) (BD)混合,并将0.1ml混合物通过在右背侧皮下给药移植至6周大的雌性BALB/c小鼠(Orient Bio)。在癌细胞移植后的一定时间段内,测量肿瘤体积并分离体积达到约 80mm^3 至 120mm^3 的受试者。然后,给受试者静脉内施用0.1ml的GI101。自第一次给药后,每三天给药一次,共给药三次,阴性对照组则注射PBS。每天测量肿瘤大小以鉴定抗癌作用。

[0296] 结果显示,与阴性对照组相比,观察到用GI101处理的移植有CT-26癌细胞系的小鼠中肿瘤尺寸显著减小(图45和46)。

[0297] 实验实施例17.鉴定mGI101在源自小鼠的黑色素瘤移植的小鼠中的抗癌作用

[0298] 从Orient Bio获得的C57BL/6小鼠(雌性,7周大)进行了7天的适应期。然后,将 5×10^6 细胞的B16F10癌细胞系(ATCC,美国)与0.05ml无基质胶基质酚红(Matrigel matrix phenol red-free) (BD)混合,并将0.1ml的混合物皮下注射在老鼠的右背区进行同种异体移植。在癌细胞移植后的一定时间段内,测量肿瘤体积并选择体积达到约 50mm^3 至 120mm^3 的受试者,然后根据肿瘤的大小和体重将选定的小鼠平均分组,每组10只小鼠。

[0299] 之后,使用一次性注射器(31G,1mL),将hIgG4以4mg/kg的剂量施用于阴性对照组,将抗PD-1抗体以5mg/kg的剂量施用于阳性对照组。对于实验组,以1mg/kg或4mg/kg的剂量静脉内给药mGI101。另外,还将接受了剂量为4mg/kg的mGI101和接受了剂量为5mg/kg的抗PD-1抗体的处理组作为实验组。第一次给药后,每三天给药一次,共进行三次。每天测量肿瘤大小。

[0300] 结果显示,所有组的初始肿瘤体积为 90mm^3 ,并且每组的标准误差(S.E.)为 5mm^3 至 6mm^3 。在阴性对照组中,在实验期间观察到肿瘤体积的变化,其中到给药后15天为止,肿瘤体积从 90mm^3 增加到 1434mm^3 。

[0301] 在以1mg/kg的剂量接受了mGI101处理的组中,在与阴性对照组相同的实验期间内,观察到肿瘤体积从 90mm^3 增加到 885mm^3 ,并且在某些测量时间点观察到具有统计学上显著的肿瘤生长的抑制作用(p值:第11天为0.5,第7天为p值<0.01,第3天为p值0.001)。在以4mg/kg的剂量接受mGI101处理的组中,在与阴性对照组相同的实验期间内,观察到肿瘤体积从 90mm^3 增加到 748mm^3 ,并且在某些测量时间点观察到具有统计学上显著的肿瘤生长的抑制作用(p值:第9天为0.5,第7天和第11天p值<0.01)。

[0302] 另外,通过将以4mg/kg的剂量接受了mIgG处理的组作为参照,并与其他每个小组进行比较分析了肿瘤生长抑制率。在以1mg/kg的剂量接受了mGI101处理的组中,观察到了与阴性对照组相比有36.5%的生长抑制率,并且未观察到统计学上的显著性差异(p值:0.5)。在以4mg/kg的剂量接受了mGI101处理的组中,与阴性对照组相比,观察到统计学上显著的(p值:0.5)肿瘤生长抑制率。第一次给药后,每三天给药一次,共给药两次。每天测量肿

瘤大小。

[0303] 由此发现,在异种移植黑色素瘤B16F10到C57BL/6小鼠中的肿瘤生长抑制功效试验中,mGI101具有剂量依赖性地抑制肿瘤生长的作用(图47和48)。

[0304] 实验实施例18.mGI101在小鼠来源的结直肠癌细胞移植的小鼠中的抗癌作用的鉴定

[0305] 从Orient Bio获得的BALB/c小鼠(雌性,7周大)进行了7天的适应期。然后,将 5×10^6 个细胞的CT-26癌细胞系(ATCC,美国)与0.05ml的无基质胶基质酚红(Matrigel matrix phenol red-free)(BD)混合,并通过在老鼠右背侧以0.1ml的皮下给药方式进行同种异体移植。在癌细胞移植后的一段时间内,测量肿瘤体积并选择体积达到约 28mm^3 的受试者,然后根据肿瘤的大小和体重将所选择的小鼠平均分组,每组10只小鼠。之后,使用一次性注射器(31G,1mL),将hIgG4以6mg/kg的剂量施用于阴性对照组。对于实验组,以3mg/kg、6mg/kg或12mg/kg的剂量静脉内给药mGI101。第一次给药后,每三天给药一次,共进行三次。每天测量肿瘤大小。

[0306] 结果发现,与阴性对照组相比,接受了剂量为6mg/kg或12mg/kg的mGI101处理的实验组在某些测量时间点和试验结束时对肿瘤生长具有显著的抑制作用(图49)。另外,从测定存活率的结果发现,与阴性对照组相比,接受了剂量为6mg/kg的mGI101处理的实验组在某些测量时间点和试验结束时表现出显著的改善。(图50)。

[0307] 实验实施例19. 鉴定GI101在小鼠来源的结直肠癌细胞移植的小鼠中的抗癌作用
实验实施例19.1 鉴定肿瘤抑制作用

[0308] 从Orient Bio获得的BALB/c小鼠(雌性,7周大)进行了7天的适应期。然后,将 5×10^6 个CT-26癌细胞系(ATCC,美国)的细胞悬浮于0.1ml PBS中,并通过以0.1ml皮下施用的方式在小鼠的右背区域中进行同种异体移植。癌细胞移植后的一段时间内,测量肿瘤体积并选择体积约 50mm^3 至 200mm^3 的受试者,然后根据肿瘤的大小和体重将选定的小鼠平均分组,每组10只小鼠。之后,使用一次性注射器(31G,1mL),阴性对照组不施用药物,向阳性对照组静脉内施用剂量为5mg/kg的抗PD-1抗体,或静脉内施用剂量为5mg/kg的抗PD-1抗体和剂量为5mg/kg的抗CTLA-4抗体。对于实验组,以0.1mg/kg或1mg/kg的剂量静脉内给药GI101。第一次给药后,每三天给药,共进行三次。每天测量肿瘤大小。

[0309] 结果显示,在移植了CT-26癌细胞的小鼠中,与阴性对照相比,以0.1mg/kg或1mg/kg的剂量给药了抗PD-1抗体、抗PD-1抗体和抗CTLA-4抗体、或GI101的所有组中均显示出显著的肿瘤生长抑制。特别地,与抗PD-1抗体处理组相比,以0.1mg/kg的剂量接受了GI101处理的实验组表现出显著的肿瘤抑制作用(*p<0.05) (图51)。

[0310] 实验实施例19.2 癌症组织中的免疫细胞分析

[0311] 当肿瘤的体积平均达到 200mm^3 时,处死实验实施例19.1中的每组小鼠,并收集癌症组织。此后,将癌症组织分离到单细胞的水平以分析其中的免疫细胞,然后使用以下抗体对癌症组织中的免疫细胞进行FACS分析:抗小鼠CD3(Biolegend,目录号100320),抗小鼠CD4(Biolegend,目录号100526),抗小鼠CD8(Biolegend,目录号100750),抗小鼠FoxP3(eBioscience,目录号12-5773-82),抗小鼠CD25(Biolegend,目录号102049),抗小鼠CD44(eBioscience,目录号61-0441-82),抗小鼠PD-1(Biolegend,目录号135218),抗小鼠IFN- γ (Biolegend,目录号505832),抗小鼠CD-49b(Biolegend,目录号108906),抗小鼠H2

(Invitrogen, 目录号A15443), 抗小鼠CD11c (Biolegend, 目录号117343), 抗小鼠CD80 (eBioscience, 目录号47-4801-82), 抗小鼠CD86 (Biolegend, 目录号104729), 抗小鼠-F4/80 (eBioscience, 目录号47-4801-82) 和抗小鼠CD206 (eBioscience, 目录号17-2061-80)。

[0312] 结果显示,与仅接受剂量为5mg/kg的抗PD-1抗体处理的阳性对照组相比,接受剂量为0.1mg/kg的GI101处理的实验组中CD8+T细胞显著增加(*p<0.05,图52和53)。此外,与阴性对照组相比,所有已接受GI101处理的实验组均表现出T细胞中IFN- γ 表达的显著增加(*p<0.05,图52和53)。另外,与阴性对照组和仅接受抗PD-1抗体处理的阳性对照组相比,接受了剂量为0.1mg/kg的GI101处理的实验组表现出M1巨噬细胞的增加(图54和55)。另外,所有接受了GI101处理的实验组在巨噬细胞和树突状细胞中均表现出升高的CD86表达水平(*p<0.05,图54-57)。

[0313] 实验实施例20. 鉴定GI101在小鼠来源的肺癌细胞移植的小鼠中的抗癌作用

[0314] 实验实施例20.1 鉴定肿瘤抑制作用

[0315] 从Orient Bio获得的C57BL/6小鼠(雌性,7周大)进行了7天的适应期。然后,将 5×10^6 个LLC2癌细胞系(ATCC,美国)的细胞悬浮于0.1ml PBS中,并通过以0.1ml皮下给药在小鼠的右背区域中进行同种异体移植。癌细胞移植后的一段时间内,测量肿瘤体积并选择体积约50mm³至200mm³的受试者,然后根据肿瘤的大小和体重将选定的小鼠平均分组,每组10只小鼠。之后,使用一次性注射器(31G,1mL),阴性对照组不施用药物,向阳性对照组静脉内施用剂量为5mg/kg的抗PD-1抗体,或施用剂量为5mg/kg的抗PD-1抗体和剂量为5mg/kg的抗CTLA-4抗体。对于实验组,以0.1mg/kg或1mg/kg的剂量静脉内给药GI101。第一次给药后,每三天给药一次,共进行三次。每天测量肿瘤大小。

[0316] 结果显示,与阴性对照组相比,所有实验组均表现出显著的肿瘤抑制作用(*p<0.05)(图58)。

[0317] 实验实施例20.2 癌症组织中的免疫细胞分析

[0318] 当肿瘤体积平均达到200mm³时,处死实验实施例20.1中的每组小鼠,并收集癌症组织。此后,以与实验实施例19.2相同的方式进行FACS分析,以分析癌症组织中的免疫细胞。

[0319] 结果显示,与仅接受了抗PD-1抗体处理的阳性对照组相比,以0.1mg/kg的剂量接受GI101处理的实验组显示出CD8+T细胞的显著增加(*p<0.05,图59)。此外,与阴性对照组相比,所有已接受GI101处理的实验组均表现出明显增加的IFN- γ 表达水平(*p<0.05,图59)。另外,所有接受GI101处理的实验组在巨噬细胞和树突状细胞中表现出增加的CD86表达水平(*p<0.05,图59至61)。

[0320] 实验实施例21. 鉴定mGI102-M61在小鼠源性结直肠癌细胞移植的小鼠中的抗癌作用

[0321] 从Orient Bio获得的BALB/c小鼠(雌性,7周大)进行了7天的适应期。然后,将 5×10^6 个CT-26癌细胞系(ATCC,美国)的细胞与0.05ml的无基质胶基质酚红(Matrigel matrix phenol red-free) (BD)混合,并通过在老鼠的右背侧以0.1ml的皮下给药方式进行同种异体移植。在癌细胞移植后的一段时间内,测量肿瘤体积并选择达到约28mm³的受试者,然后根据肿瘤的大小和体重将所选择的小鼠平均分组,每组10只小鼠。之后,使用一次性注射器(31G,1mL),将hIgG4以6mg/kg的剂量施用于阴性对照组。对于实验组,以3mg/kg、6mg/kg或

12mg/kg的剂量静脉内给药mGI102-M61。第一次给药后,每三天给药一次,共进行三次。每天测量肿瘤大小。

[0322] 结果显示,确认了与阴性对照组相比,接受了剂量为12mg/kg的mGI102-M61处理的实验组在某些测量时间点和测试结束时表现出对肿瘤生长的显著抑制(图62)。另外,通过检测存活率可以确定,与阴性对照组相比,接受了剂量为12mg/kg的mGI102-M61处理的实验组在某些检测时间点和测试结束时表现出显著的改善(图63)。

[0323] 实验实施例22.mGI101在小鼠源性结直肠癌细胞移植的小鼠中的抗癌作用的鉴定

[0324] 从Orient Bio获得的BALB/c小鼠(雌性,7周大)进行了7天的适应期。然后,将 5×10^6 个CT-26癌细胞系(ATCC,美国)的细胞与0.05ml的无基质胶基质酚红(Matrigel matrix phenol red-free)(BD)混合,并通过在老鼠右背侧以0.1ml皮下给药方式进行同种异体移植。在癌细胞移植后的一定时间段内,测量肿瘤体积并选择体积达到 200mm^3 至 250mm^3 左右的受试者,然后根据肿瘤大小和体重将选定的小鼠平均分组,每组10只小鼠。

[0325] 之后,使用在一次性注射器(31G,1mL)中,将hIgG4以4mg/kg的剂量施用于阴性对照组。对于实验组,以1mg/kg、4mg/kg或6mg/kg的剂量静脉内给药mGI101。另外,将接受了4.9mg/kg的mCD80或2.8mg/kg的Fc-IL-2v(GI101C2)处理的组作为对照组。另外,将同时接受4.9mg/kg的mCD80和2.8mg/kg的Fc-IL-2v(GI101C2)处理的组作为对照组。

[0326] 在肿瘤体积测量中,已确定与阴性对照相比,接受了剂量为6mg/kg的mGI101处理的组在某些测量时间点和测试结束时表现出显著的抑制作用。与接受mCD80和Fc-IL-2v(GI101C2)的组合处理的组相比,其观察到优异的肿瘤生长抑制率(图64和65)。

[0327] 综上所述,与mCD80和IL-2v单一制剂相比,在异种移植有BALB/c小鼠结直肠癌细胞系CT-26的BALB/c小鼠的肿瘤生长抑制作用试验中,证明了受试物质mGI101在试验条件下具有抑瘤作用;并且已经确定,与接受mCD80和IL-2v的组合处理的组相比,mGI101表现出优异的抗癌功效(图64和65)。特别地,与阴性对照组和接受了mCD80和Fc-IL2v(GI101C2)的组合处理的组相比,接受了6mg/kg的mGI101处理的组显示出对肿瘤大小的显著抑制。

[0328] V.融合蛋白的毒性评价

[0329] 实验实施例23.使用猴子对GI101的毒性评估

[0330] 实验实施例23.1猴子繁殖与药物施用

[0331] 在本实验中,使用了9只2-3岁的雄性菲律宾猴子(食蟹猴)。根据日本的《动物福利与管理法》(Act on Welfare and Management of Animals)和Ina Research Inc.的《动物护理和使用指南》(Guidance for Animal Care and Use)进行实验。实验方案已通过机构动物护理和使用委员会(IACUC)的审查,然后由AAALAC International机构批准(认证单位编号:001107)。

[0332] 从给药前的一天到给药后的15天进行实验。在笼子周围观察每只猴子,并另外检查粪便状态。在给药前一天,以及给药后第1、8和15天,使用数字秤(Shimadzu Corporation,LDS-150H)测量体重。另外,从给药前的一天到处死猴子为止测量食物的剩余量。

[0333] 在此,将一次性注射器(24G)装满药物GI101,并通过静脉内途径进行给药,总共两次,每次给药的速率为0.17ml/sec。以5mg/kg/天或10mg/kg/天的剂量给药GI101两次,间隔一周。对照组以相同方式施用PBS(pH 7.4)。

[0334] 实验实施例23.2临床观察,确定体重和食物摄入量的变化

[0335] 从给药前一天至给药后第1、8和15天进行临床观察,并测量体重和食物摄入量的变化。结果显示,GI101没有引起毒性(图66-69)。

[0336] 实验实施例23.3血液分析

[0337] 在实验实施例23.1中,在给药前一天以及给药后第1、8和15天从猴子中收集血液。在此,用一次性注射器(22G)经由股静脉收集血液。对于下表2中所列的项目,使用自动血液系统XN-2000(Automated Hematology System XN-2000,Sysmex Corporation)和自动血液凝结分析仪CA-510(Automated Blood Coagulation Analyzer CA-510,Sysmex Corporation)对收集的血液进行血液分析。

[0338] 表2

| 参数 | Abbr. | 单位 | 方法 | 仪器 |
|-------------------|-------|--------------------|--|---------|
| 全血细胞计数 | | | | |
| 红细胞计数 | RBC | $10^6/\mu\text{L}$ | DC 鞘流(sheath-flow)检测 | XN-2000 |
| 血红蛋白浓度 | HGB | g/dL | SLS-血红蛋白 | XN-2000 |
| 血细胞比容(Hematocrit) | HCT | % | RBC 脉冲高度检测 | XN-2000 |
| 平均红细胞体积 | MCV | fL | HCT/RBC ($\times 10^4/\mu\text{L}$) X 1000 | XN-2000 |
| 平均血红蛋白 | MCH | pg | HGB/RBC ($\times 10^4/\mu\text{L}$) X 1000 | XN-2000 |
| 平均红细胞血红蛋白浓 | MCHC | g/dL | HGB/HCT X 100 | XN-2000 |

| 参数 | Abbr. | 单位 | 方法 | 仪器 |
|---------------------------|--------------------------------|-------------------------|-------|---------|
| 度 | | | | |
| 网织红细胞比率计数 | RET % RET # | % $10^9/\mu\text{L}$ | 流式细胞仪 | XN-2000 |
| 血小板计数 | PLT | $10^3/\mu\text{L}$ | 流式细胞仪 | XN-2000 |
| 白细胞计数 | WBC | $10^3/\mu\text{L}$ | 流式细胞仪 | XN-2000 |
| 差异性白细胞 ^{a)} 比率计数 | Diff WBC % Diff WBC # | % $10^3/\mu\text{L}$ | 流式细胞仪 | XN-2000 |
| 凝血测试 | | | | |
| 凝血酶原时间 | PT | s | 光散射检测 | CA-510 |
| 活化部分凝血活酶时间 | APTT | s | 光散射检测 | CA-510 |

^{a)} 中性粒细胞(NEUT), 淋巴细胞(LYMPH), 单核细胞(MONO), 嗜酸性粒细胞(EO) 和嗜碱性粒细胞(BASO)

[0341] 结果,以5mg/kg/天或10mg/kg/天的剂量接受GI101的组在第15天表现出网状细胞、白细胞和淋巴细胞的数量增加(图70-72)。

[0342] 实验实施例23.4临床和化学分析

[0343] 在实验实施例23.1中,在给药前一天以及给药后第1、8和15天从猴子中收集血液。在此,以与实验实施例23.3中相同的方式收集血液。使用临床分析仪型号7180(Clinical Analyzer Model 7180,日立高新技术公司)对收集的血液进行临床和化学分析,分析项目见下表3。

[0344] 表3

| 参数 | Abbr. | 单位 | 方法 |
|----------|-------|-------|------------------------------------|
| 天冬氨酸转氨酶 | AST | U/L | JSCC traceable method (JSCC 可追溯方法) |
| 丙氨酸氨基转移酶 | ALT | U/L | JSCC traceable method (JSCC 可追溯方法) |
| 碱性磷酸酶 | ALP | U/L | JSCC traceable method (JSCC 可追溯方法) |
| 乳酸脱氢酶 | LD | U/L | JSCC traceable method (JSCC 可追溯方法) |
| 肌酸激酶 | CK | U/L | JSCC traceable method (JSCC 可追溯方法) |
| 葡萄糖 | GLU | mg/dL | 酶促方法 (Gluc-DH) |
| 总胆红素 | BIL | mg/dL | 酶促方法(BOD) |
| 尿素氮 | UN | mg/dL | 酶促方法(脲酶-LEDH, urease-LEDH) |
| 肌酐 | CRE | mg/dL | 酶促方法 |
| 总胆固醇 | CHO | mg/dL | 酶促方法(胆固醇氧化酶, cholesterol oxidase) |

| 参数 | Abbr. | 单位 | 方法 |
|--|-------|-------|---|
| 甘油三酸酯 | TG | mg/dL | 酶促方法(消除游离甘油的 GK-GPO, GK-GPO with free glycerol elimination) |
| 磷脂 | PL | mg/dL | 酶促方法(胆碱氧化酶, choline oxidase) |
| 无机磷 | IP | mg/dL | 酶促方法(麦芽糖磷酸化酶, maltose phosphorylase) |
| 钙 | CA | mg/dL | OCPC |
| 钠 | NA | mEq/L | 离子选择电极 |
| 钾 | K | mEq/L | 离子选择电极 |
| 氯化物 | CL | mEq/L | 离子选择电极 |
| 总蛋白质 | TP | g/dL | 缩二脲 (Biuret) |
| 白蛋白 | ALB | g/dL | BCG |
| 白蛋白-球蛋白比率 | A/G | - | 计算 |
| JSCC: Japan Society of Clinical Chemistry (日本临床化学学会) | | | |

[0347] 结果显示,在临床和化学分析中未检测到由GI101引起的毒性(图73-79)。

[0348] 实验实施例21.5细胞因子分析

[0349] 在实验实施例23.1中,在给药前一天以及给药后第1、8和15天从猴子中收集血液。这里,以与实验实施例23.3相同的方式收集血液。使用Bio-Plex 200 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) 仪器和非人类灵长类细胞因子磁珠板(Non-Human Primate Cytokine Magnetic Bead Panel, EMD Millipore)检测试剂盒,分析采集的血液中的TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10和IL-12。结果显示,就细胞因子分析而言,没有检测到由GI101引起的毒性(图80和81)。

[0350] 实验实施例23.6免疫细胞分析

[0351] 在实验实施例23.1中,在给药前一天以及给药后第1、8和15天从猴子中收集血液。

这里,以与实验实施例23.3相同的方式收集血液。使用流式细胞仪 (LSRFortessa X-20, Becton, Dickinson and Company), 对采集的血液进行以下项目分析:

- [0352] 1) Ki67+CD4:CD45+/CD3+/CD4+/Ki67+
- [0353] 2) Ki67+CD8:CD45+/CD3+/CD8+/Ki67+
- [0354] 3) Ki67+Treg:CD45+/CD3+/FoxP3+/Ki67+
- [0355] 4) Ki67+ICOS+Treg:CD45+/CD3+/FoxP3+/Ki67+/CD278+
- [0356] 5) ICOS+Treg:CD45+/CD3+/FoxP3+/CD278+
- [0357] 6) Ki67+NK细胞:CD45+/CD16+和CD56+/Ki67+。

[0358] 结果显示,在免疫细胞分析中,接受GI101的所有组在第15天表现出T细胞、CD4+T细胞、CD8+T细胞、调节性T细胞、NK细胞和Ki67+T细胞、Ki67+CD4+T细胞、Ki67+CD8+T细胞、Ki67+调节性T细胞、Ki67+ICOS+调节性T细胞、Ki67+NK细胞、ICOS+调节性T细胞数量增加。

[0359] 具体而言,在淋巴细胞中,T细胞,CD4+T细胞,调节性T细胞的比例增加,而NK细胞的比例减少,同时CD8+T细胞的比例不变。调节性T细胞的比例在第3天增加而在第8天和15天下降。但是,该比例仍然高于对照组。

[0360] 另外,关于免疫细胞Ki67+在各种免疫细胞中的比例,Ki67+T细胞、Ki67+CD4+T细胞、Ki67+CD8+T细胞、Ki67+调节性T细胞、Ki67+ICOS+调节性T细胞、Ki67+NK细胞,和ICOS+调节性T细胞的比例有所增加。

[0361] 此外,在第3、8和15天,Ki67+T细胞、Ki67+CD8+T细胞和Ki67+NK细胞的比例增加;在第3天和第8天,Ki67+CD4+T细胞和Ki67+调节性T细胞的比例增加;Ki67+ICOS+调节性T细胞和ICOS+调节性T细胞的比例仅在第8天增加(图82-87)。

- [0362] 实验实施例23.7病理分析

[0363] 在第16天,处死实验实施例23.1中的猴子,并使用10%福尔马林固定所有器官和组织。并且,用福尔马林-蔗糖-乙酸(FSA)溶液固定睾丸,并用配制在磷酸盐缓冲液中的1%甲醛-2.5%戊二醛固定眼睛和视神经。对下表4所列项目的器官和组织进行苏木精-曙红染色 (Hematoxylin-eosin staining),并在光学显微镜下进行观察。

- [0364] 表4

[0365]

| 器官/组织 | 固定 | 器官重量 | 样品制备 | |
|----------|---------|-------------------------|-------|------------------------------|
| | | | HE 染色 | 注意 |
| 心脏 | O | O | - | 左心室乳头肌, 右心室壁以及包括冠状动脉和主动脉瓣的区域 |
| 主动脉 (胸廓) | O | - | | |
| 胸骨 | O | - | | 脱钙 |
| 胸骨骨髓 | | - | | |
| 股骨 | O (R&L) | - | | 远端关节软骨和轴; 脱钙 |
| 股骨髓 | O (R) | - | | 脱钙 |
| 胸腺 | O | O | O | |
| 脾脏 | O | O | O | |
| 下颌下淋巴结 | O | - | O | |
| 肠系膜淋巴结 | O | - | O | |
| 气管 | O | - | | 脱钙 |
| 细支气管 | O (R&L) | O (R&L separated, 左右分离) | - | 左前和右后叶 |
| 肺 | | | | |

[0366]

| 器官/组织 | 固定 | 器官重量 | 样品制备 | |
|---------|---------|-------------------------|---------|------------------------------------|
| | | | HE 染色 | 注意 |
| 舌 | O | - | | |
| 颌下腺 | O (R&L) | O (R&L combined, 左右一起) | | |
| 腮腺 | O (R&L) | - | | |
| 食管 | O | - | | |
| 胃 | O | - | | 贲门、身体和幽门 |
| 十二指肠 | O | - | | |
| 空肠 | O | - | | |
| 回肠 | O | - | | |
| 淋巴集结 | | | | |
| 盲肠 | O | - | | |
| 结肠 | O | - | | |
| 直肠 | O | - | | |
| 肝 | O | O (胆汁排出的胆囊) | O | 左外侧叶和右内侧叶(包括胆囊) |
| 胆囊 | | | O | |
| 胰腺 | O | O | - | |
| 肾脏 | O (R&L) | O (R&L separated, 左右分离) | O (R&L) | |
| 膀胱 | O | - | | |
| 垂体 | O | O | | |
| 甲状腺 | O (R&L) | O (R&L separated, 左右分离) | | |
| 甲状旁腺 | | | | |
| 肾上腺 | O (R&L) | O (R&L separated, 左右分离) | | |
| 睾丸 | O (R&L) | O (R&L separated, 左右分离) | | |
| 附睾 | O (R&L) | O (R&L separated, 左右分离) | | |
| 前列腺 | O | O | | |
| 精囊 | O | O | - | |
| 脑 | O | O | - | 大脑(额叶、顶叶(包括基底神经节和海马)和枕叶);小脑;脑桥;和延髓 |
| 脊髓 (胸廓) | O | - | | |
| 坐骨神经 | O (L) | - | | |

| 器官/组织 | 固定 | 器官重量 | 样品制备 | |
|--------|---|---------|-------|----|
| | | | HE 染色 | 注意 |
| [0367] | 眼睛 | O (R&L) | - | |
| | 视神经 | O (R&L) | - | |
| | 泪腺 | O (R&L) | - | |
| | 骨骼肌 (股二头肌) | O (L) | - | |
| | 皮肤 (胸廓) | O | - | |
| | 注射部位 (尾静脉) | O | - | 脱钙 |
| | 具有 ID No. 的胸部或股骨内侧区域的皮肤 | O | - | - |
| | O: 已执行 -: 未执行 R&L: 进行左器官/组织和右器官/组织。 L: 进行右器官/组织或左器官/组织 (通常是左)。 R: 进行右器官/组织或左器官/组织 (通常是右) | | | |

[0368] 结果,以5mg/kg/天或10mg/kg/天的剂量用GI101治疗的组表现出脾脏重量的增加(图88)。在其他组织中未观察到明显变化。总之,在接受GI101的组中,观察到一些变化,但未观察到毒性。

[0369] VI. 实验实施例24用于鉴定GI102的抗癌作用。鉴定GI102-M45的抗癌作用

[0370] 实验实施例24.1鉴定GI102-M45对移植小鼠源性结直肠癌细胞的小鼠的抗癌作用将 5×10^6 个细胞/0.05ml的小鼠源性CT-26癌细胞系与0.05ml无基质胶基质酚红 (Matrigel matrix phenol red-free) (BD) 混合,在右后侧区域以皮下给药的方式将0.1ml的混合物移植至6周龄雌性BALB/c小鼠 (Orient Bio)。在癌细胞移植后的一定时间段内,测量肿瘤体积并分离体积达到约80mm³至120mm³的受试者。然后,向受试者静脉内施用0.1ml的GI102-M45。第一次给药后,每三天给药一次,共给药三次,并以PBS作为阴性对照。每天测量肿瘤大小以鉴定抗癌作用。以与实验实施例16相同的方式鉴定GI102-M45的活性。

[0371] 实验实施例24.2GI102-M45对小鼠来源的肺细胞移植小鼠的抗癌作用的鉴定

[0372] 从Orient Bio获得的C57BL/6小鼠(雌性,7周大)进行了7天的适应期。然后,将 5×10^6 个LLC2癌细胞系 (ATCC,美国) 的细胞悬浮于0.1ml的PBS中,并通过在小鼠的右背区域中以0.1ml皮下给药进行同种异体移植。癌细胞移植后的一段时间内,测量肿瘤体积并选择约50mm³至200mm³的受试者,然后根据肿瘤的大小和体重将选定的小鼠平均分组,每组10只小鼠。之后,使用一次性注射器 (31G,1mL),阴性对照组不施用药物,向阳性对照组静脉内施用剂量为5mg/kg的抗PD-1抗体,或施用剂量为5mg/kg的抗PD-1抗体和剂量为5mg/kg的抗CTLA-4抗体。对于实验组,以0.1mg/kg或1mg/kg的剂量静脉内施用GI102-M45。第一次给药后,每三天给药一次,共进行三次给药。每天测量肿瘤大小。以与实验实施例20.1相同的方式鉴定GI102-M45的活性。

[0373] 实验实施例25.GI102-M61的抗癌作用的鉴定

[0374] 实验实施例25.1GI102-M61对小鼠源性结直肠癌细胞移植小鼠抗癌作用的鉴定

[0375] 将 5×10^6 个细胞/0.05ml的小鼠源CT-26癌细胞系与0.05ml无基质胶基质酚红 (Matrigel matrix phenol red-free) (BD) 混合,并通过在右背区以皮下给药的方式将0.1ml的混合物移植至6周大的雌性BALB/c小鼠 (Orient Bio)。在癌细胞移植后的一定时间段内,测量肿瘤体积并分离达到约80mm³至120mm³的受试者。然后,向受试者静脉内施用

0.1ml的GI102-M61。第一次给药后,每三天给药一次,总共给药三次,并将PBS作为阴性对照。每天测量肿瘤大小以鉴定抗癌作用。以与实验实施例16相同的方式鉴定GI102-M61的活性。

[0376] 实验实施例25.2GI102-M61在移植小鼠肺癌细胞中的抗肿瘤作用的鉴定

[0377] 从Orient Bio获得的C57BL/6小鼠(雌性,7周大)进行了7天的适应期。然后,将 5×10^6 个LLC2癌细胞系(ATCC,美国)的细胞悬浮于0.1ml的PBS中,并通过以0.1ml皮下给药在小鼠的右背区域中进行同种异体移植。癌细胞移植后的一段时间内,测量肿瘤体积并选择体积约 50mm^3 至 200mm^3 的受试者,然后根据肿瘤的大小和体重将选定的小鼠平均分组,每组10只小鼠。之后,使用一次性注射器(31G,1mL),阴性对照组不施用药物,向阳性对照组静脉内施用剂量为5mg/kg的抗PD-1抗体,或施用剂量为5mg/kg的抗PD-1抗体和剂量为5mg/kg的抗CTLA-4抗体。对于实验组,以0.1mg/kg或1mg/kg的剂量静脉内施用GI102-M61。自第一次给药后,每三天给药一次,总共给药三次。每天测量肿瘤大小。以与实验实施例20.1相同的方式鉴定GI102-M61的活性。

[0378] 实验实施例26.GI102-M72的抗癌作用鉴定

[0379] 实验实施例26.1GI102-M72在小鼠源性结直肠癌细胞移植的小鼠体内的抗肿瘤作用的鉴定

[0380] 将 5×10^6 细胞/0.05ml的小鼠源CT-26癌细胞系与0.05ml无基质胶基质酚红(BD)混合,并通过在右背区以皮下给药的方式将0.1ml的混合物移植到6周大的雌性BALB/c小鼠(Orient Bio)。在癌细胞移植后的一定时间段内,测量肿瘤体积并分离体积达到约 80mm^3 至 120mm^3 的受试者。然后,向受试者静脉内施用0.1ml的GI102-M72。第一次给药后,每三天给药一次,总共给药三次,并将PBS作为阴性对照。每天测量肿瘤大小以鉴定抗癌作用。以与实验实施例16相同的方式鉴定GI102-M72的活性。

[0381] 实验实施例26.2GI102-M72在小鼠肺癌细胞移植的小鼠体内的抗癌作用鉴定

[0382] 从Orient Bio获得的C57BL/6小鼠(雌性,7周大)进行了7天的适应期。然后,将 5×10^6 个LLC2癌细胞系(ATCC,美国)的细胞悬浮于0.1ml的PBS中,并通过以0.1ml皮下施用在小鼠的右背区域中进行同种异体移植。癌细胞移植后的一段时间内,测量肿瘤体积并选择体积约 50mm^3 至 200mm^3 的受试者,然后根据肿瘤的大小和体重将选定的小鼠平均分组,每组10只小鼠。之后,使用一次性注射器(31G,1mL),阴性对照组不施用药物,向阳性对照组静脉内施用剂量为5mg/kg的抗PD-1抗体,或施用剂量为5mg/kg的抗PD-1抗体和剂量为5mg/kg的抗CTLA-4抗体。对于实验组,以0.1mg/kg或1mg/kg的剂量静脉内施用GI102-M72。第一次给药后,每三天给药一次,共进行三次。每天测量肿瘤大小。以与实验实施例20.1相同的方式鉴定GI102-M72的活性。

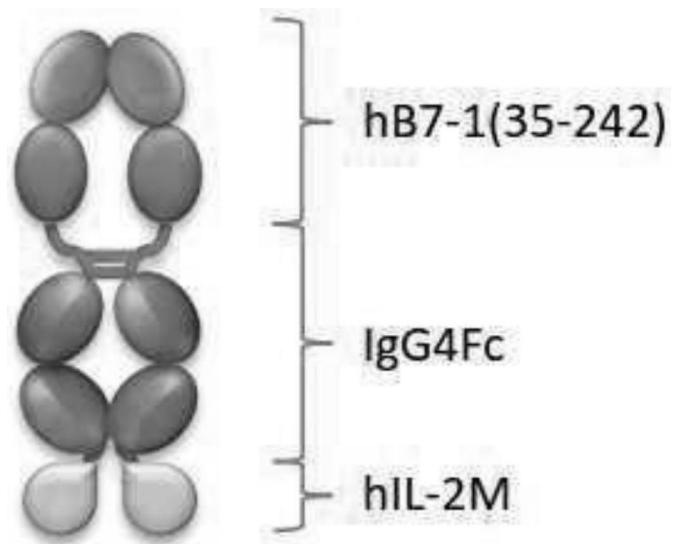


图1



图2

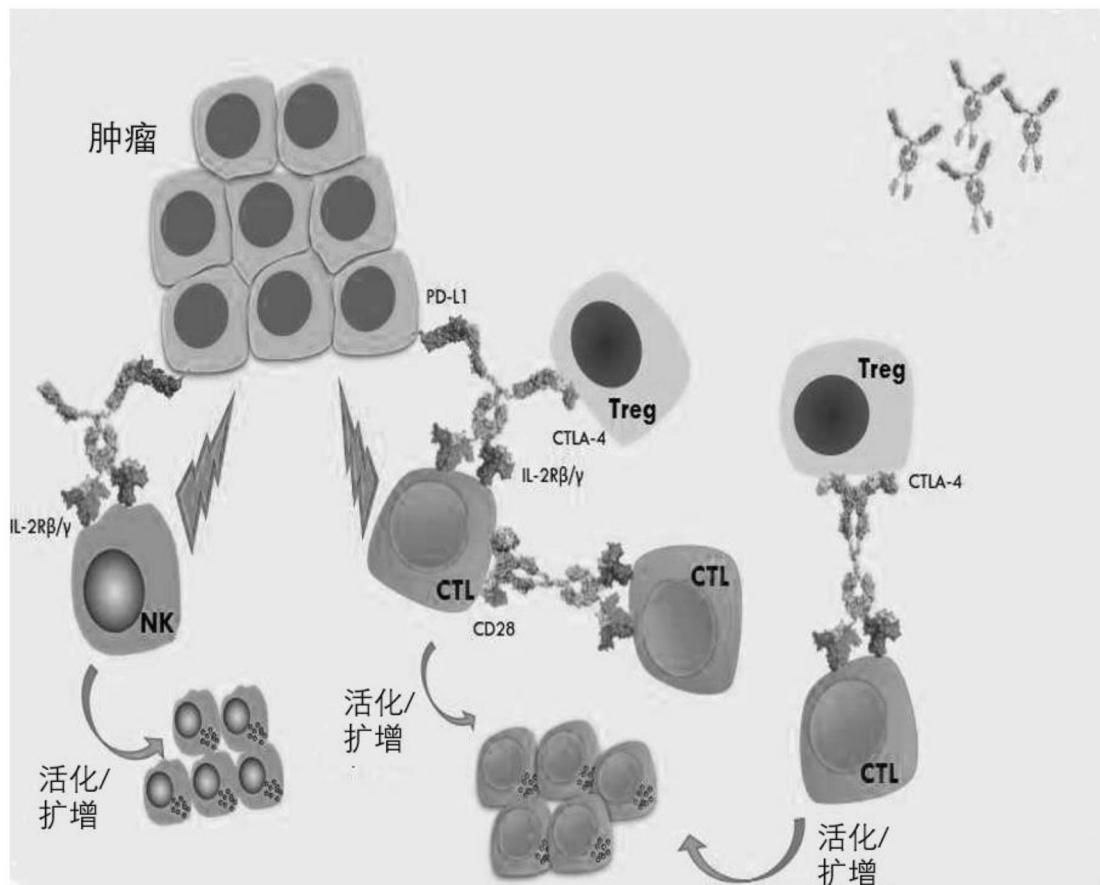


图3

GI101

hCD80

Fc

hIL-2M

GI101C1

hCD80

Fc

GI101C2

Fc

hIL-2M

小鼠版本

mGI101

mCD80

Fc

hIL-2M

小鼠版本

mGI101C1

mCD80

Fc

图4



图5

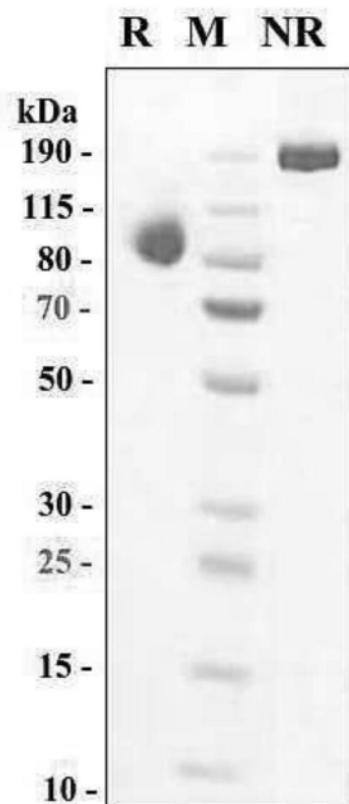
SDS-PAGE

图6

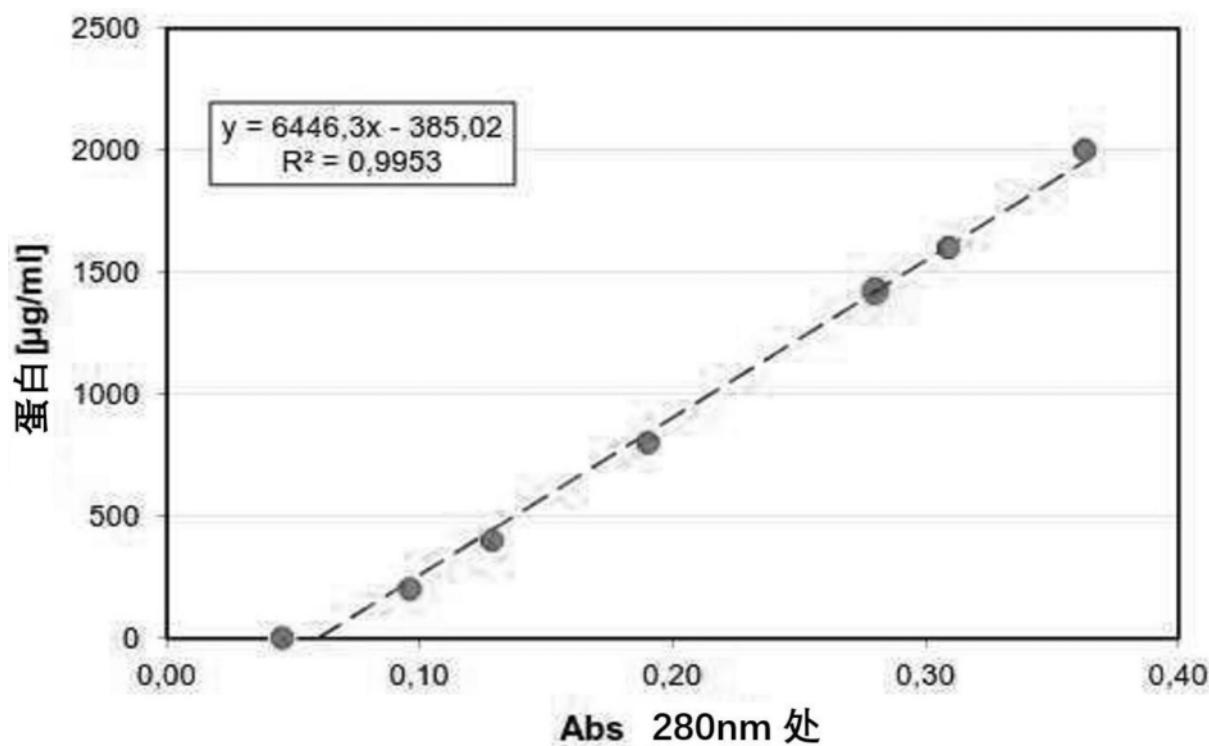


图7

分析的尺寸排阻色谱 (SEC)

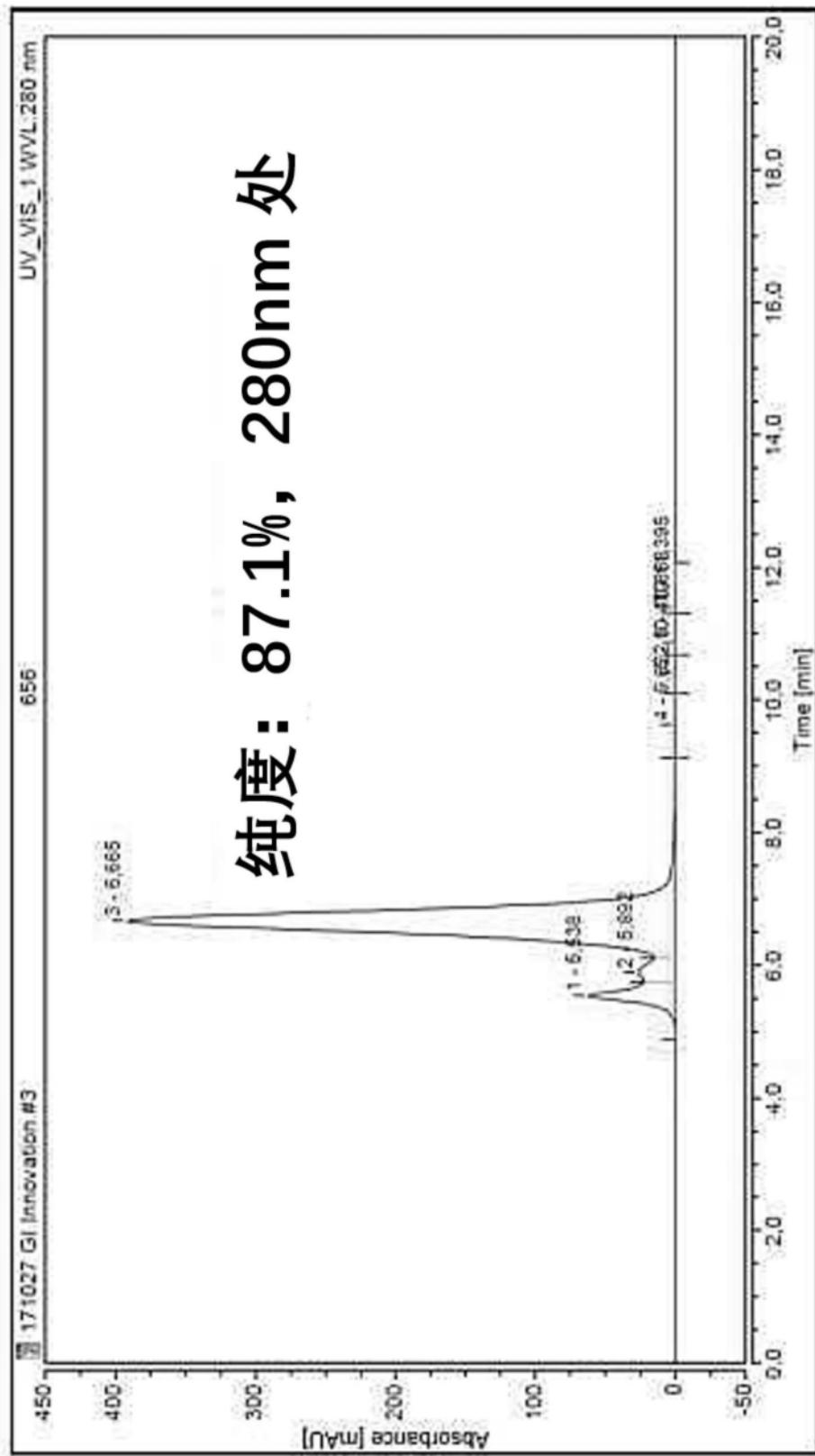


图8

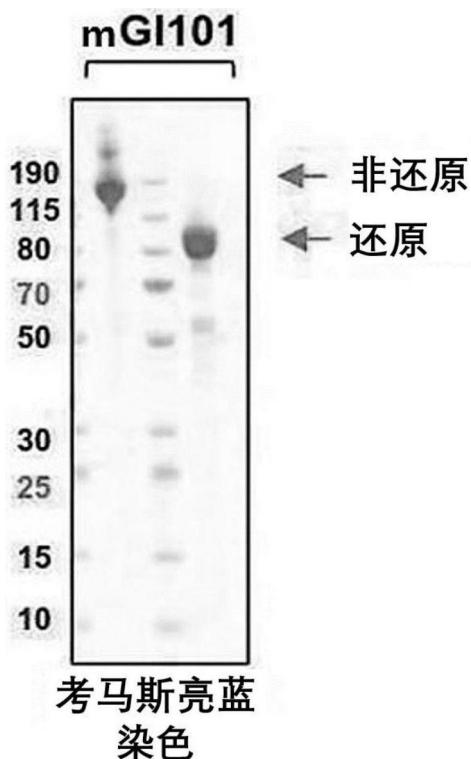


图9

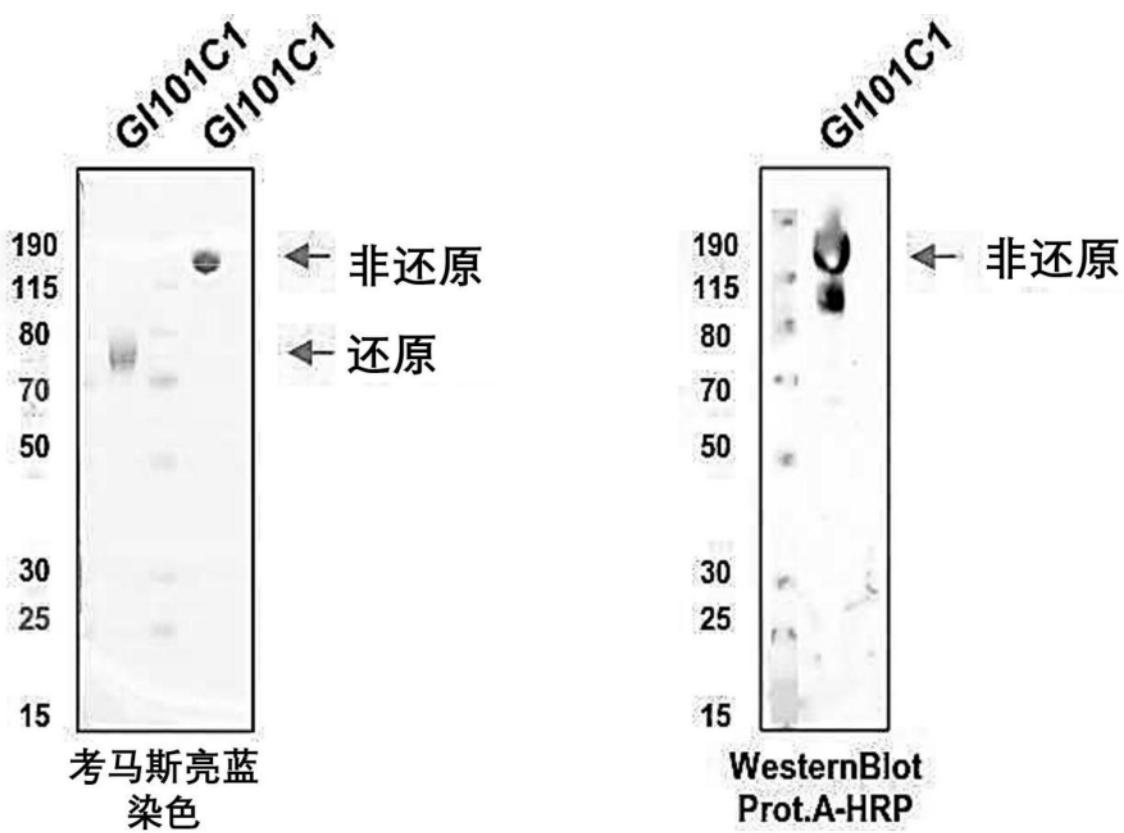


图10

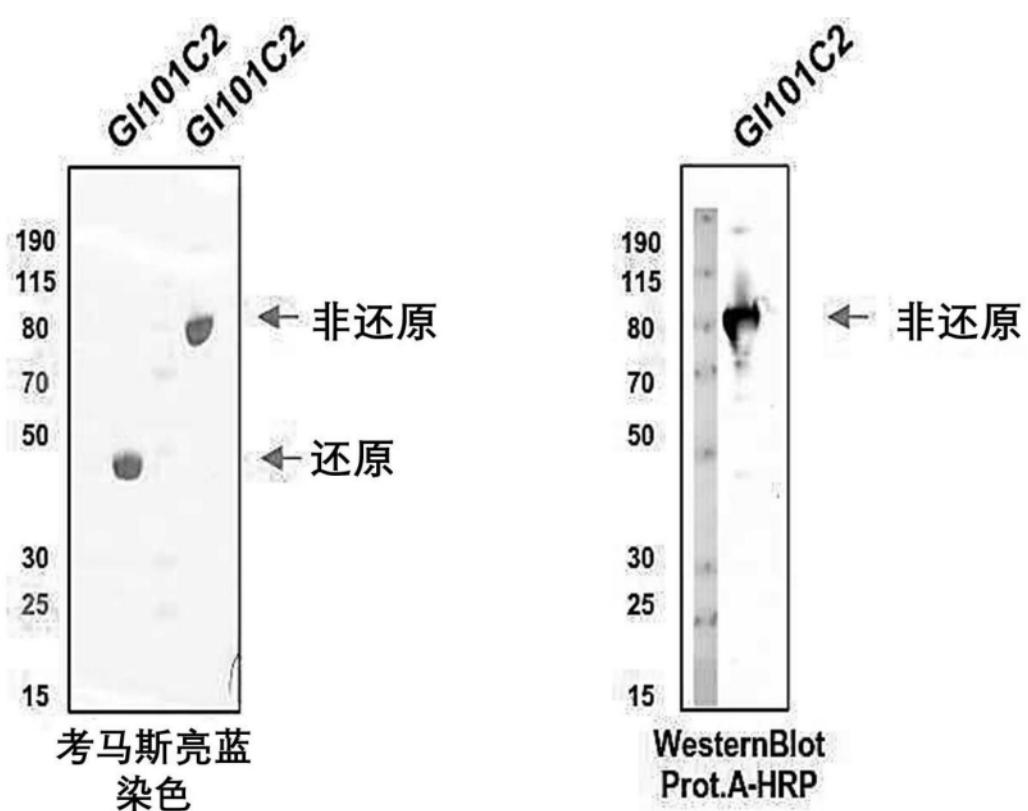


图11

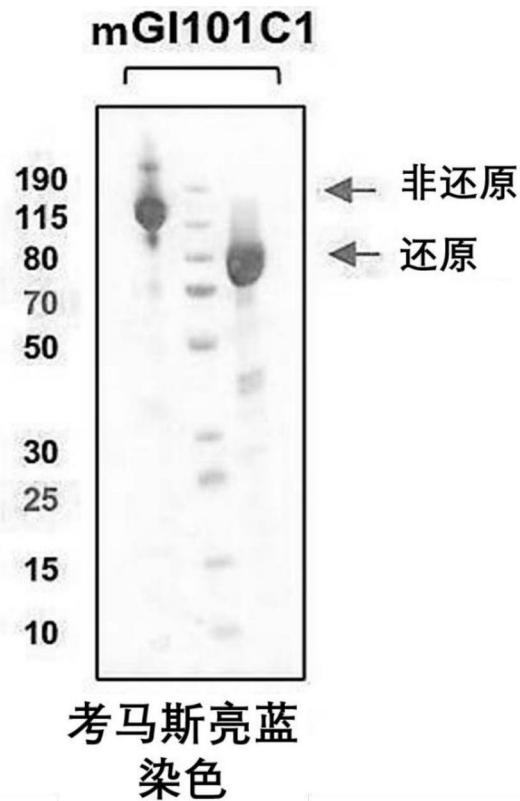


图12

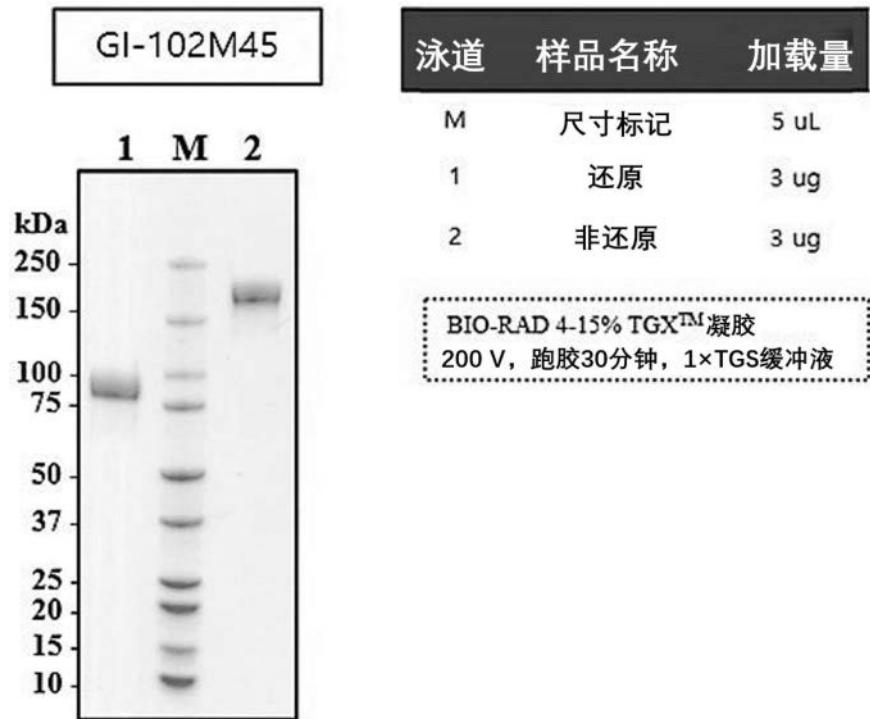


图13

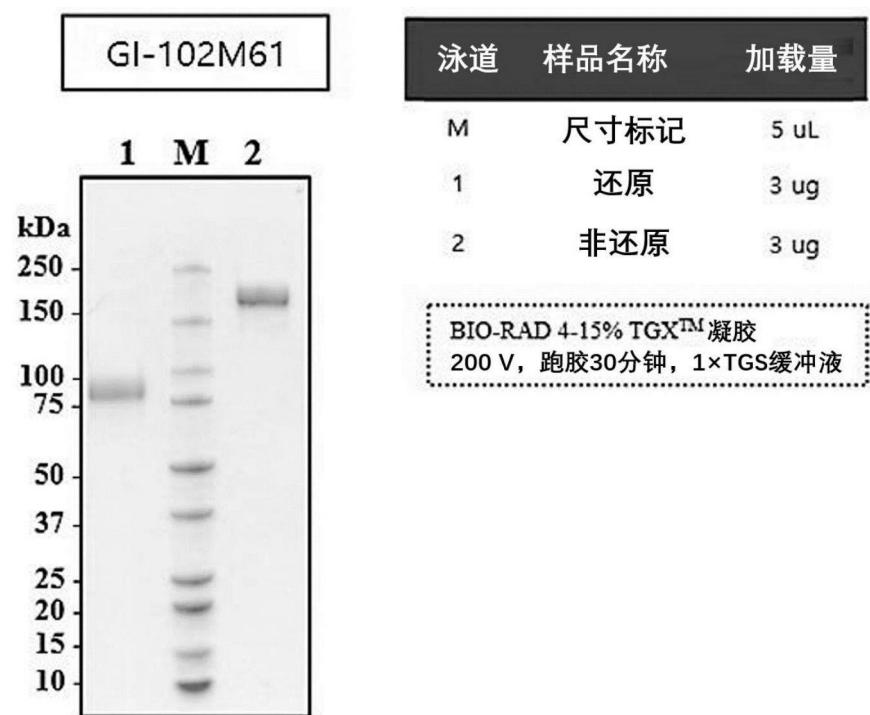


图14

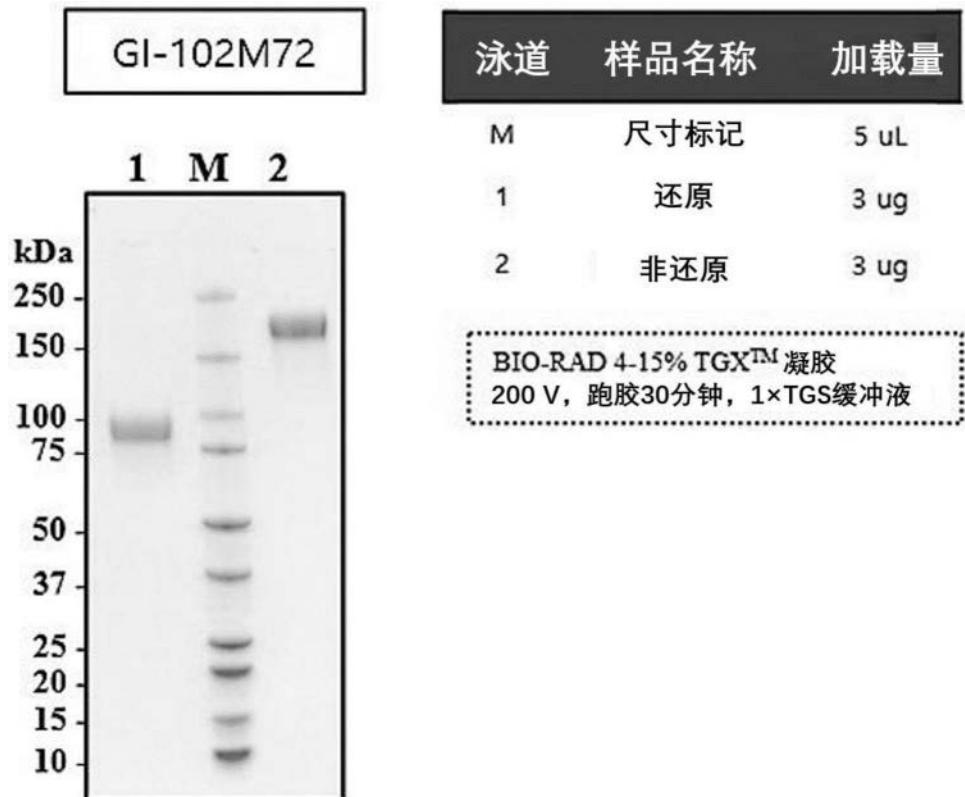
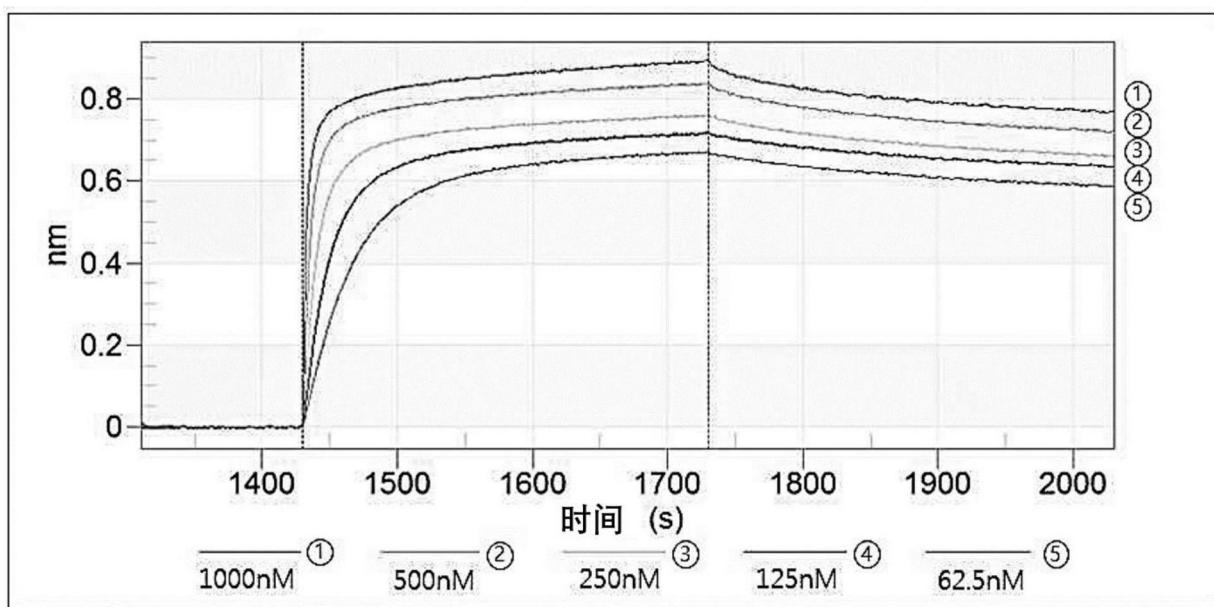
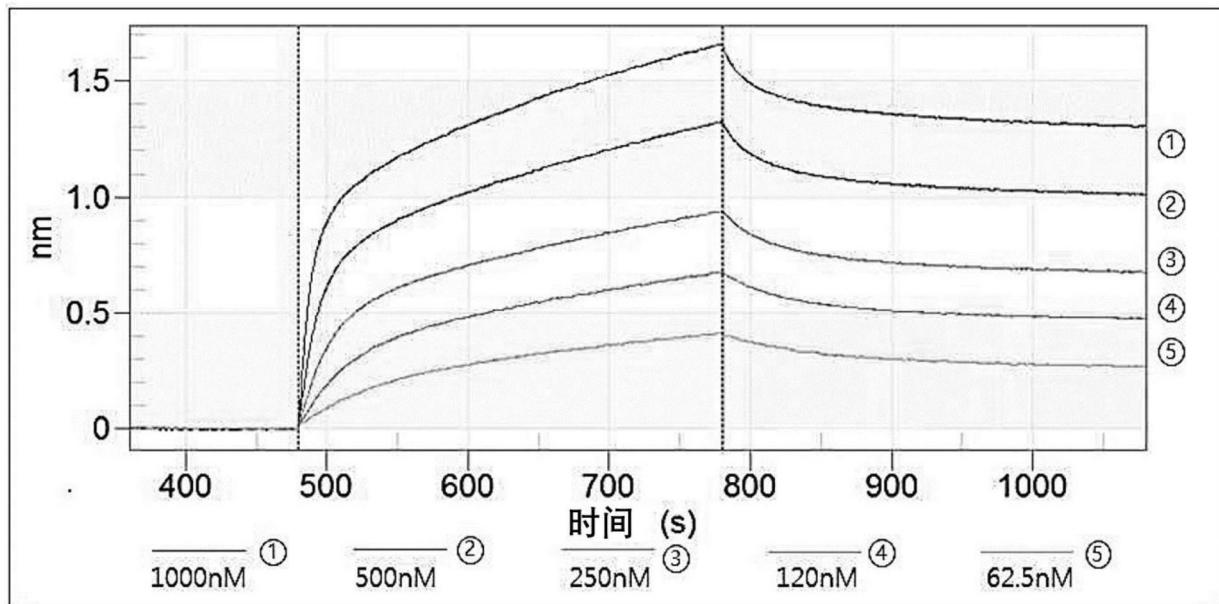


图15



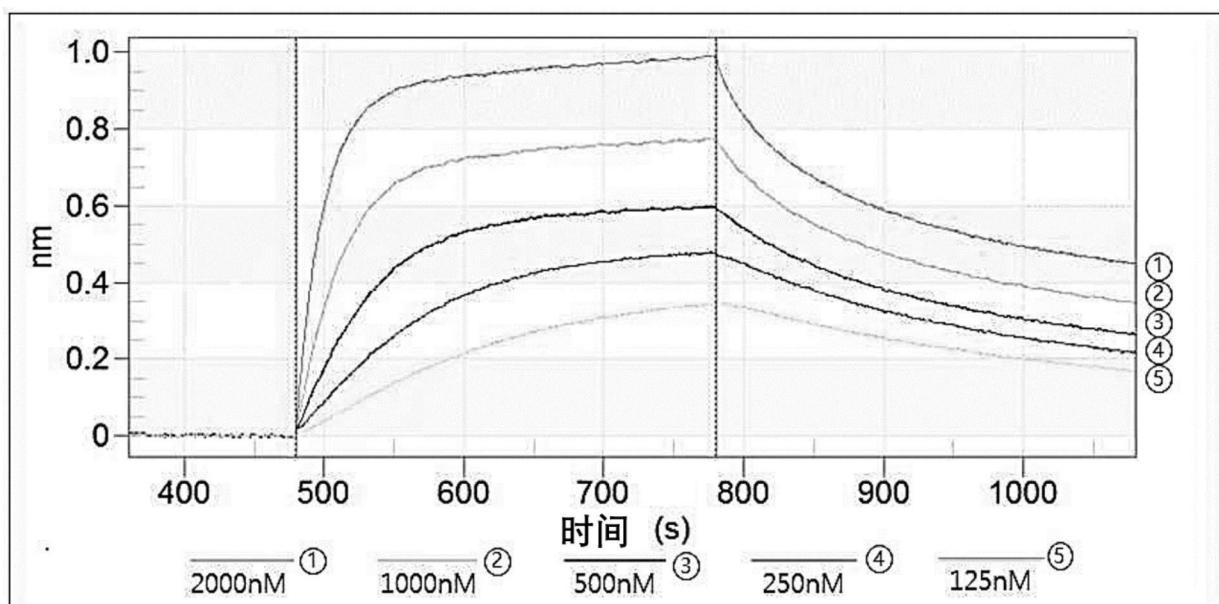
| 分析物 | K_D (M) | K_{on} (1/Ms) | K_{dis} (1/s) |
|-------|-----------|-----------------|-----------------|
| GI101 | 1.07E-09 | 3.86E+05 | 4.14E-04 |

图16



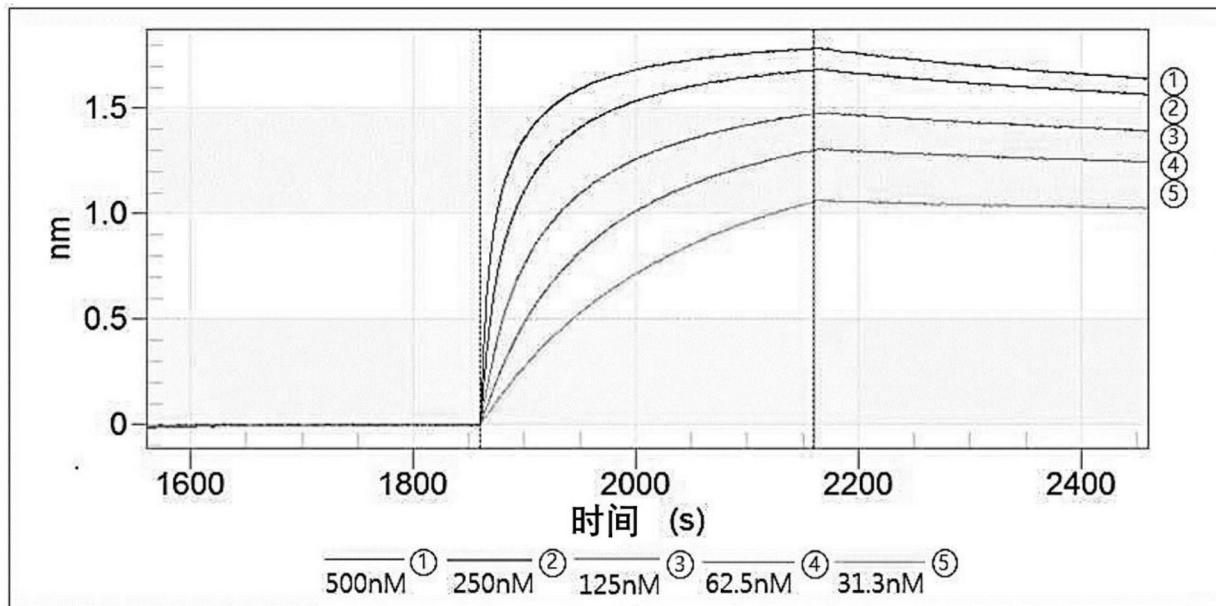
| 分析物 | K_D (M) | K_{on} (1/Ms) | K_{dis} (1/s) |
|-------|-----------|-----------------|-----------------|
| GI101 | 3.46E-08 | 7.0E+04 | 2.42E-03 |

图17



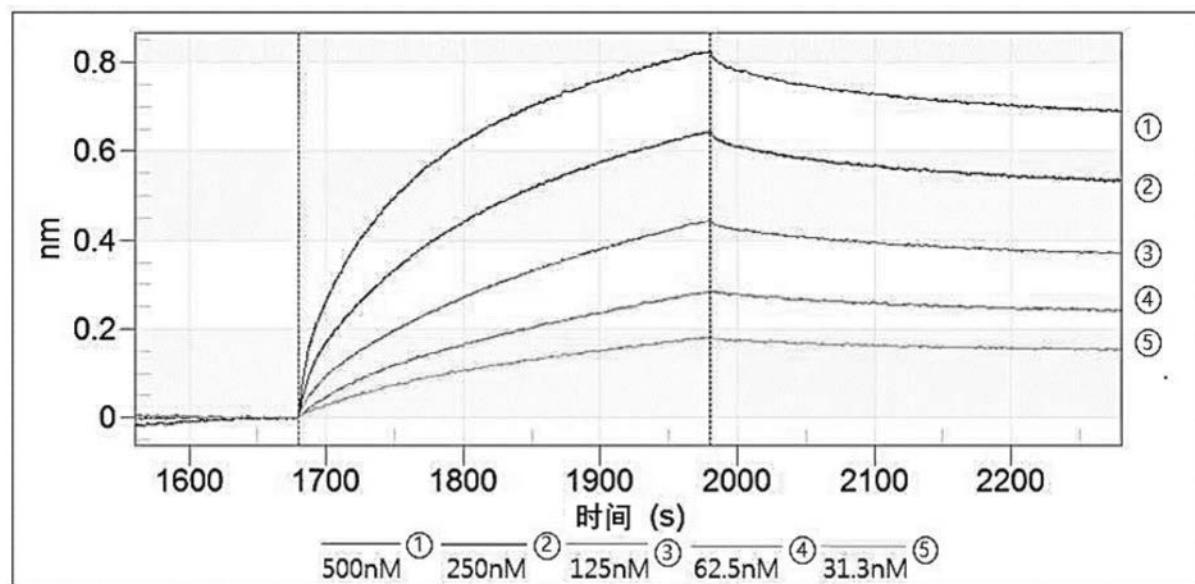
| 分析物 | K_D (M) | K_{on} (1/Ms) | K_{dis} (1/s) |
|------|-----------|-----------------|-----------------|
| PD-1 | 1.13E-07 | 2.72E+04 | 3.07E-03 |

图18



| 分析物 | K_D (M) | K_{on} (1/Ms) | K_{dis} (1/s) |
|--------|-----------|-----------------|-----------------|
| mGI101 | 2.58E-08 | 3.05E+05 | 7.88E-04 |

图19



| 分析物 | K_D (M) | K_{on} (1/Ms) | K_{dis} (1/s) |
|--------|-----------|-----------------|-----------------|
| mGI101 | 9.91E-09 | 8.12E+05 | 8.04E-03 |

图20

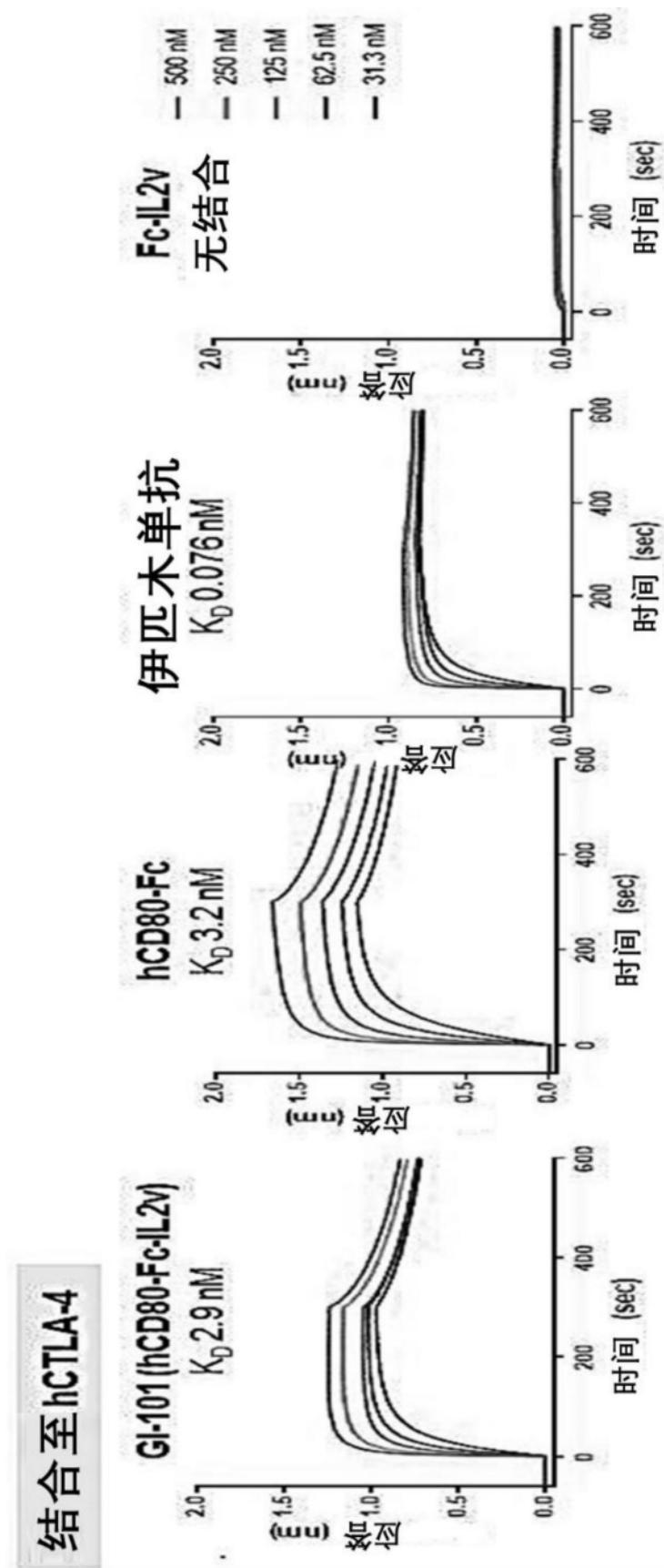


图21

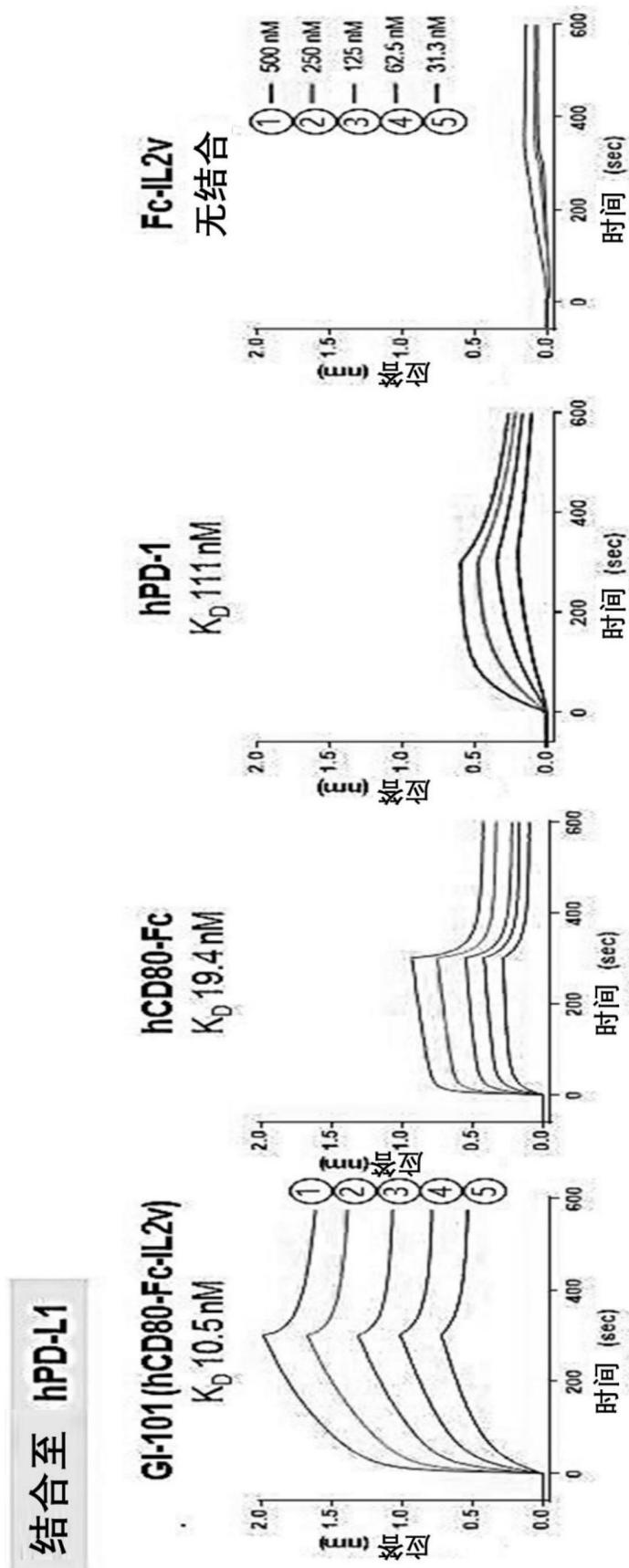


图22

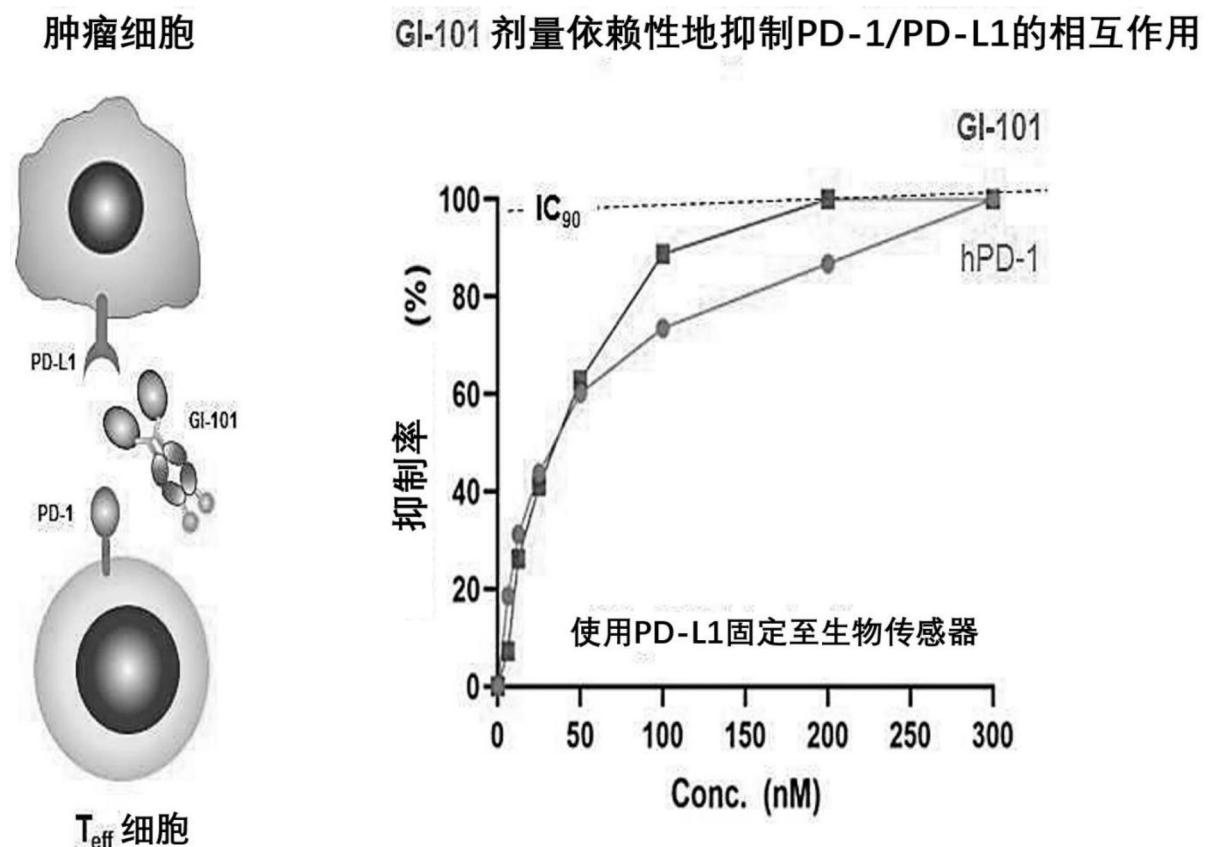


图23

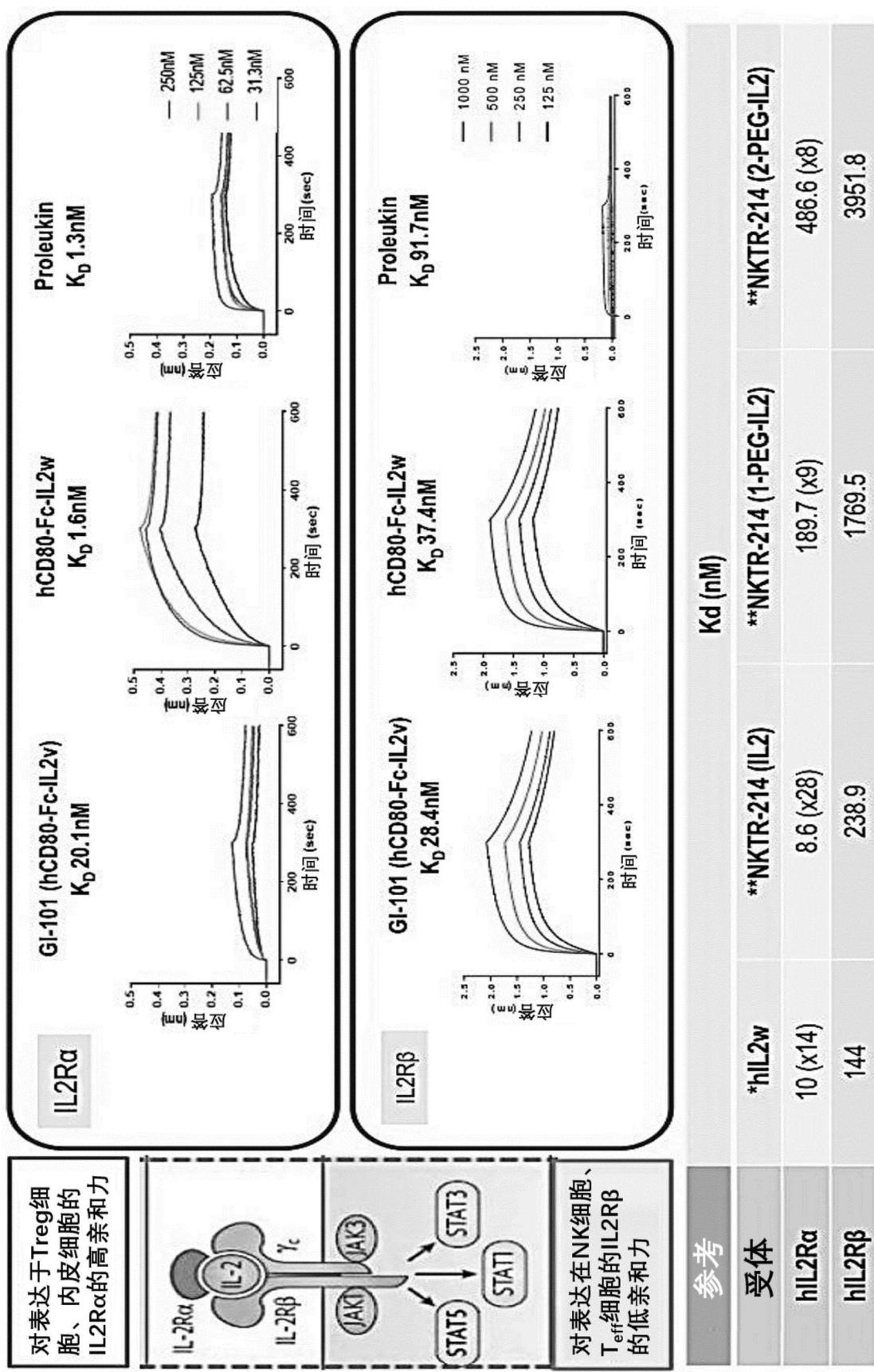


图24

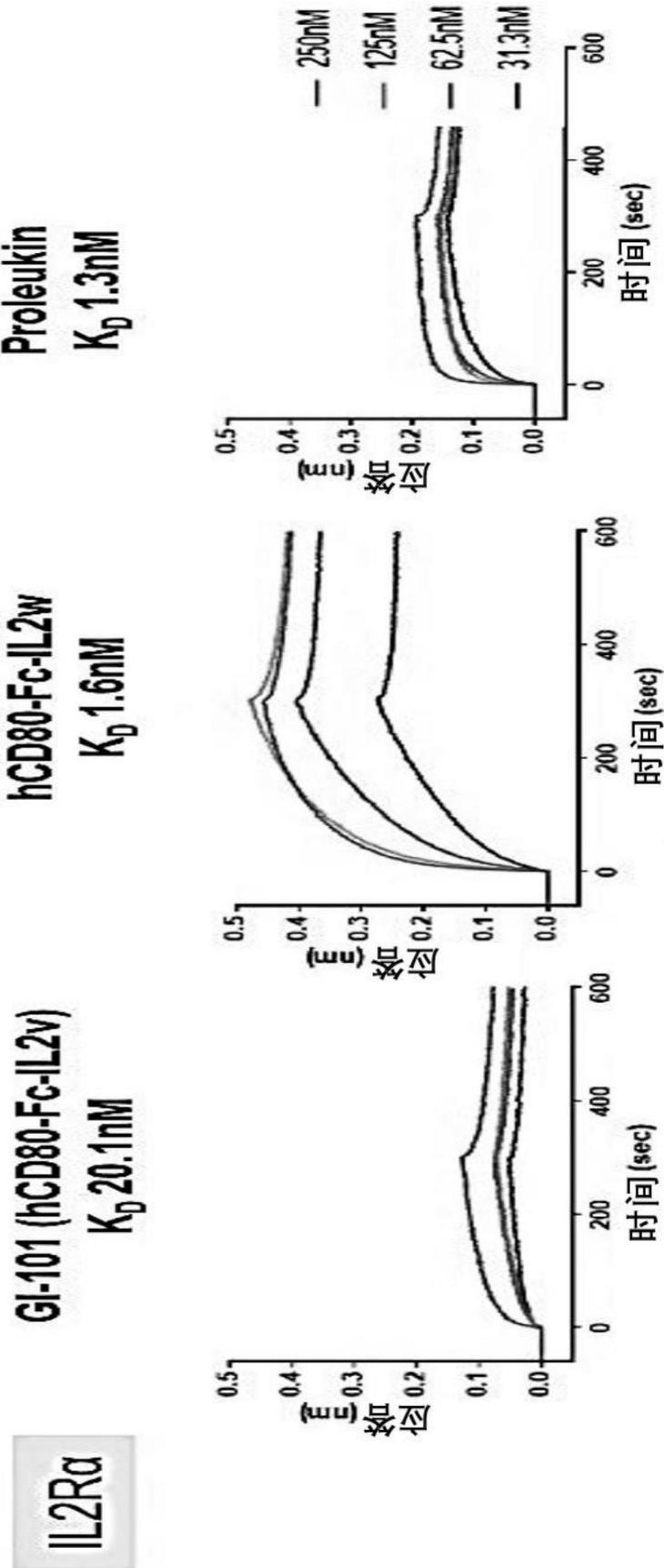


图25

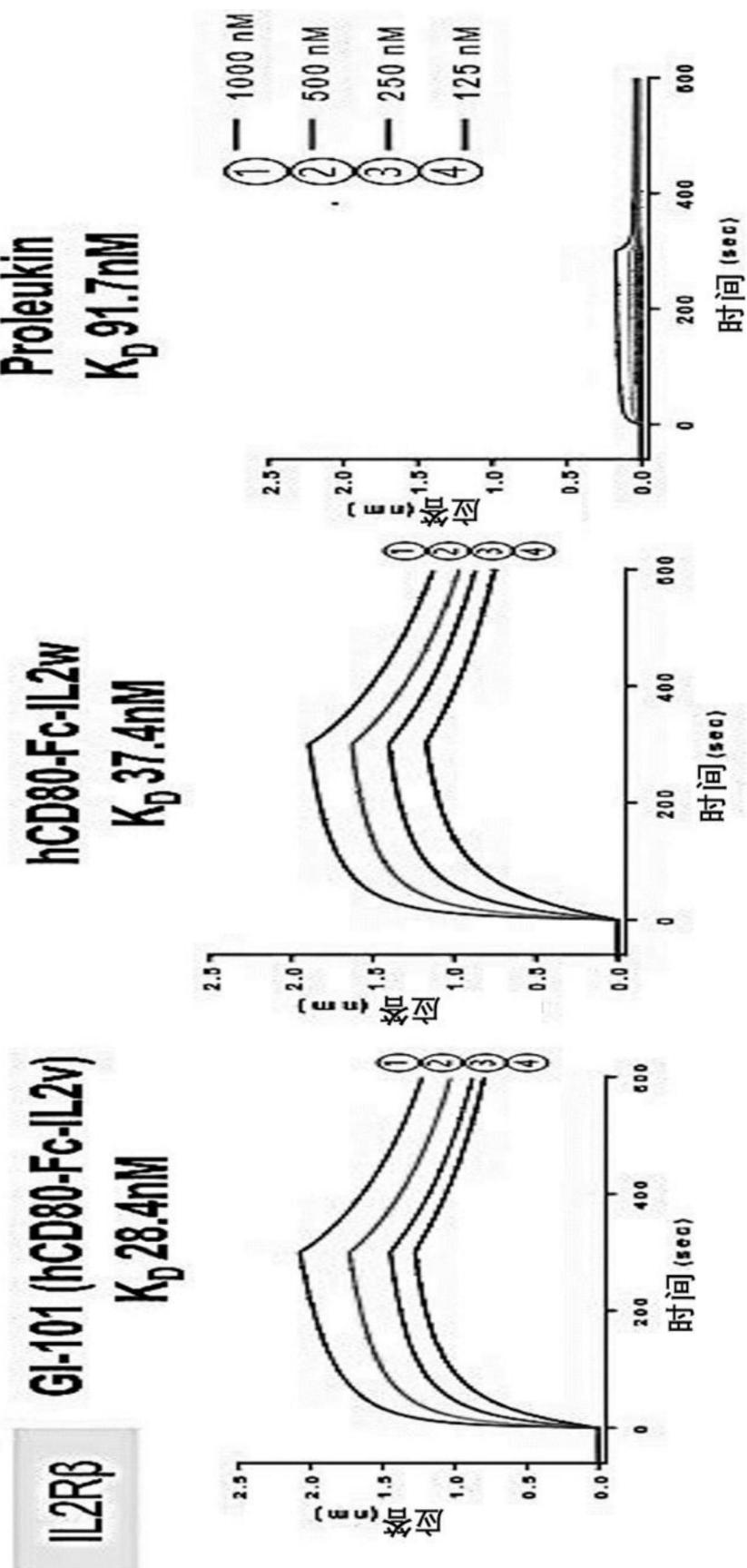


图26

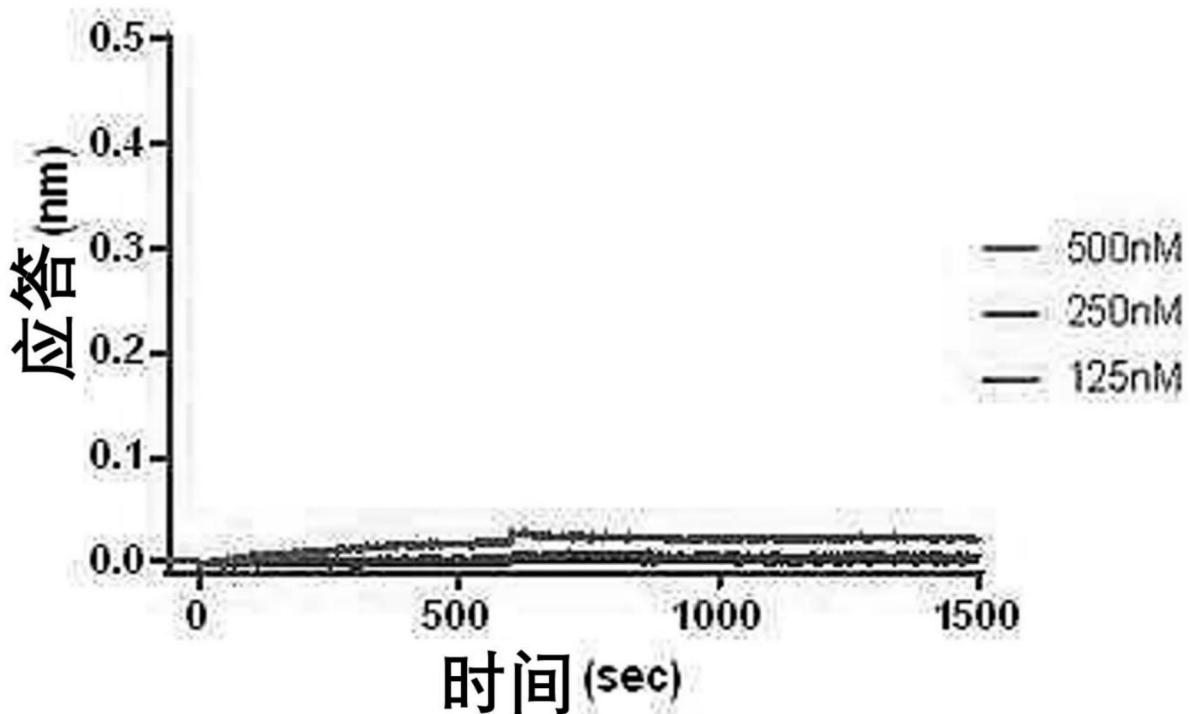


图27

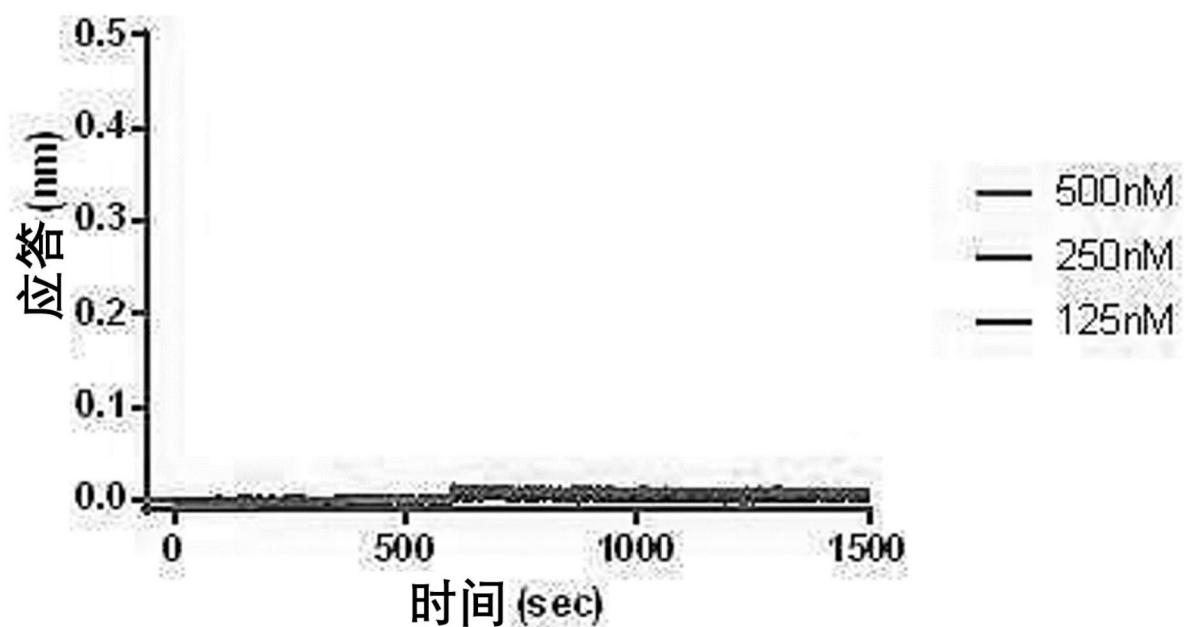


图28

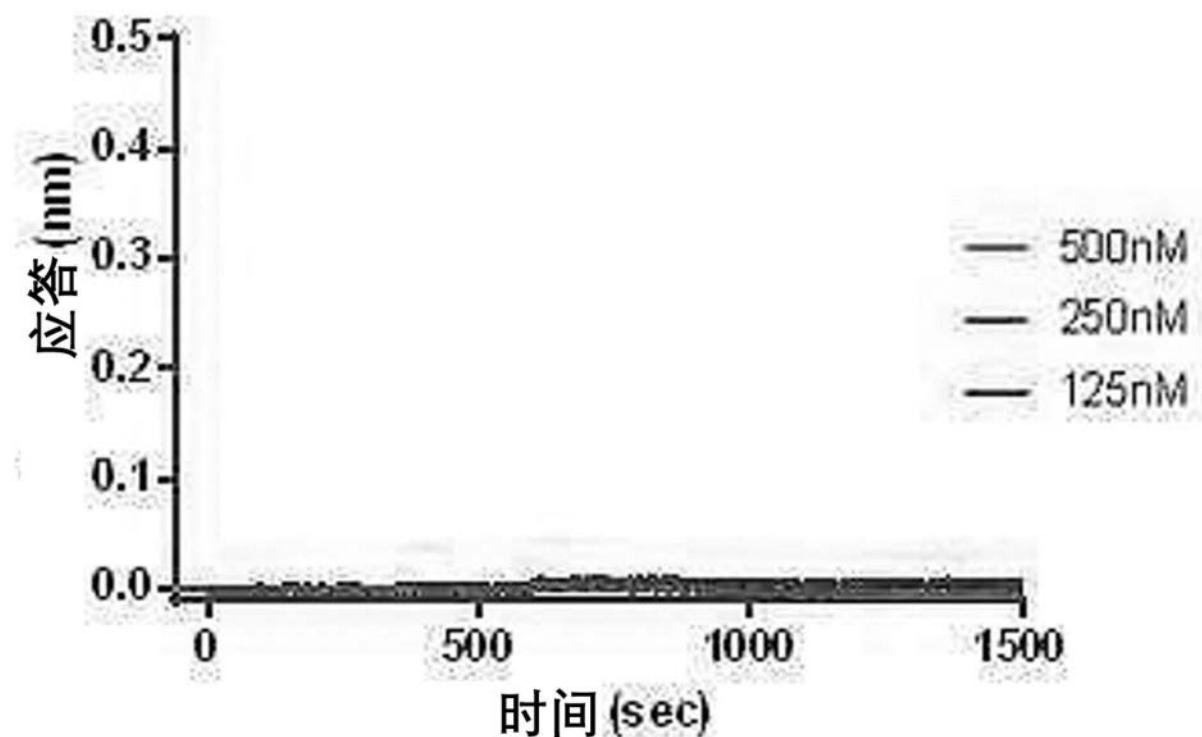
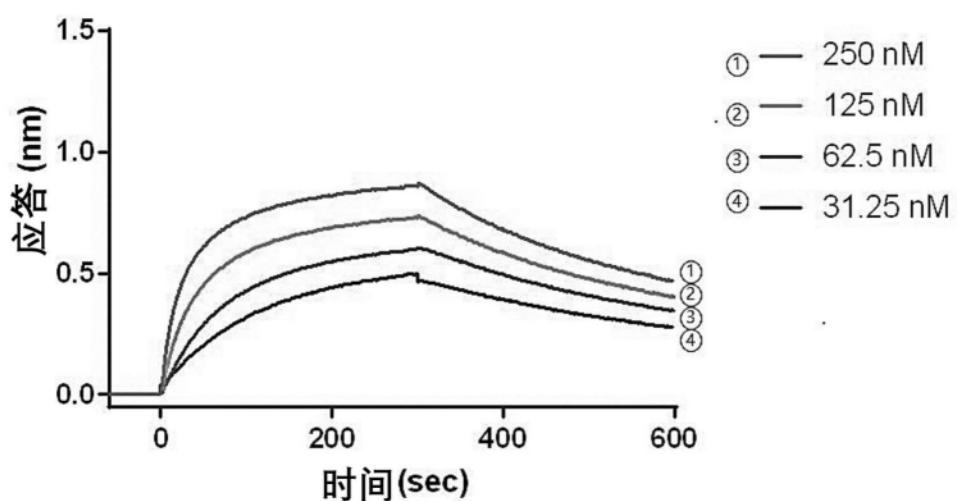
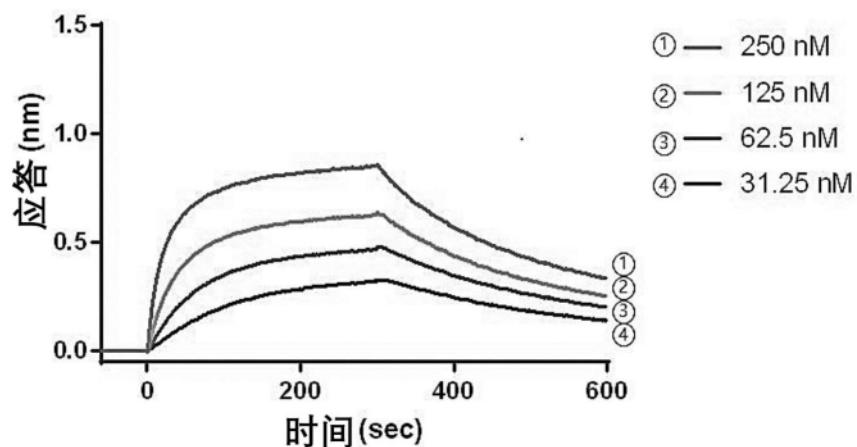


图29



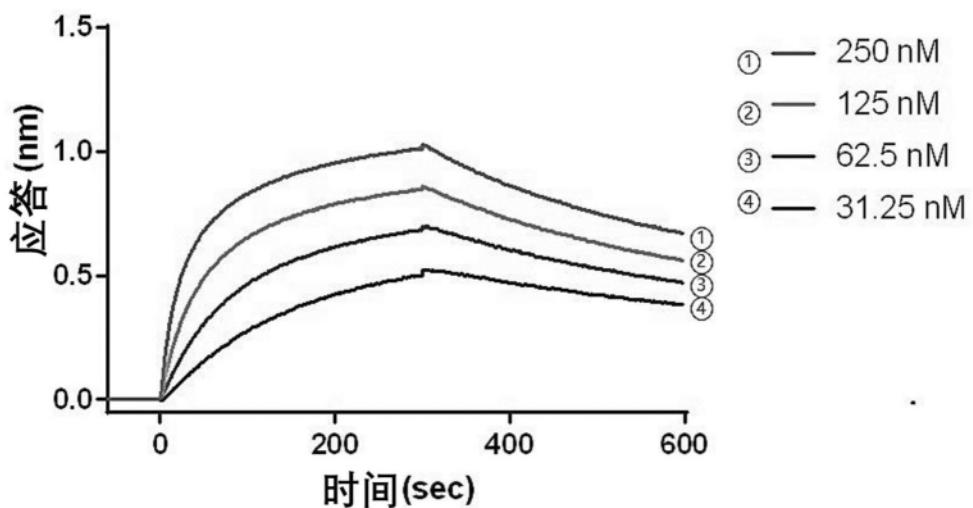
| Kon | Koff | Kd |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1.30X10 ⁵ | 2.01X10 ⁻³ | 1.55X10 ⁻⁸ |

图30



| Kon | Koff _o | Kd |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1.32X10 ⁵ | 3.11X10 ⁻³ | 2.36X10 ⁻⁸ |

图31



| Kon | Koff | Kd |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1.10X10 ⁵ | 1.27X10 ⁻³ | 1.15X10 ⁻⁸ |

图32

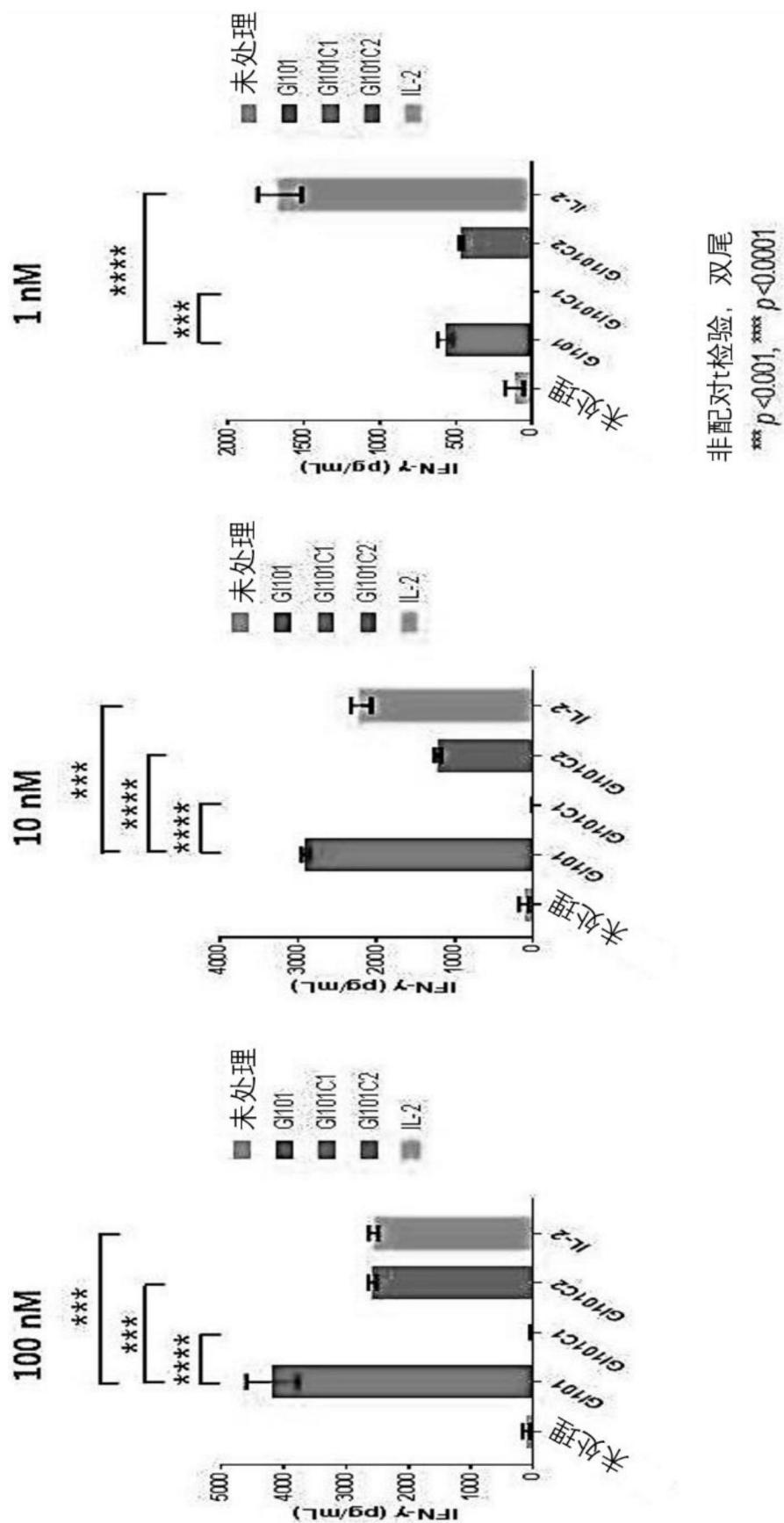


图33

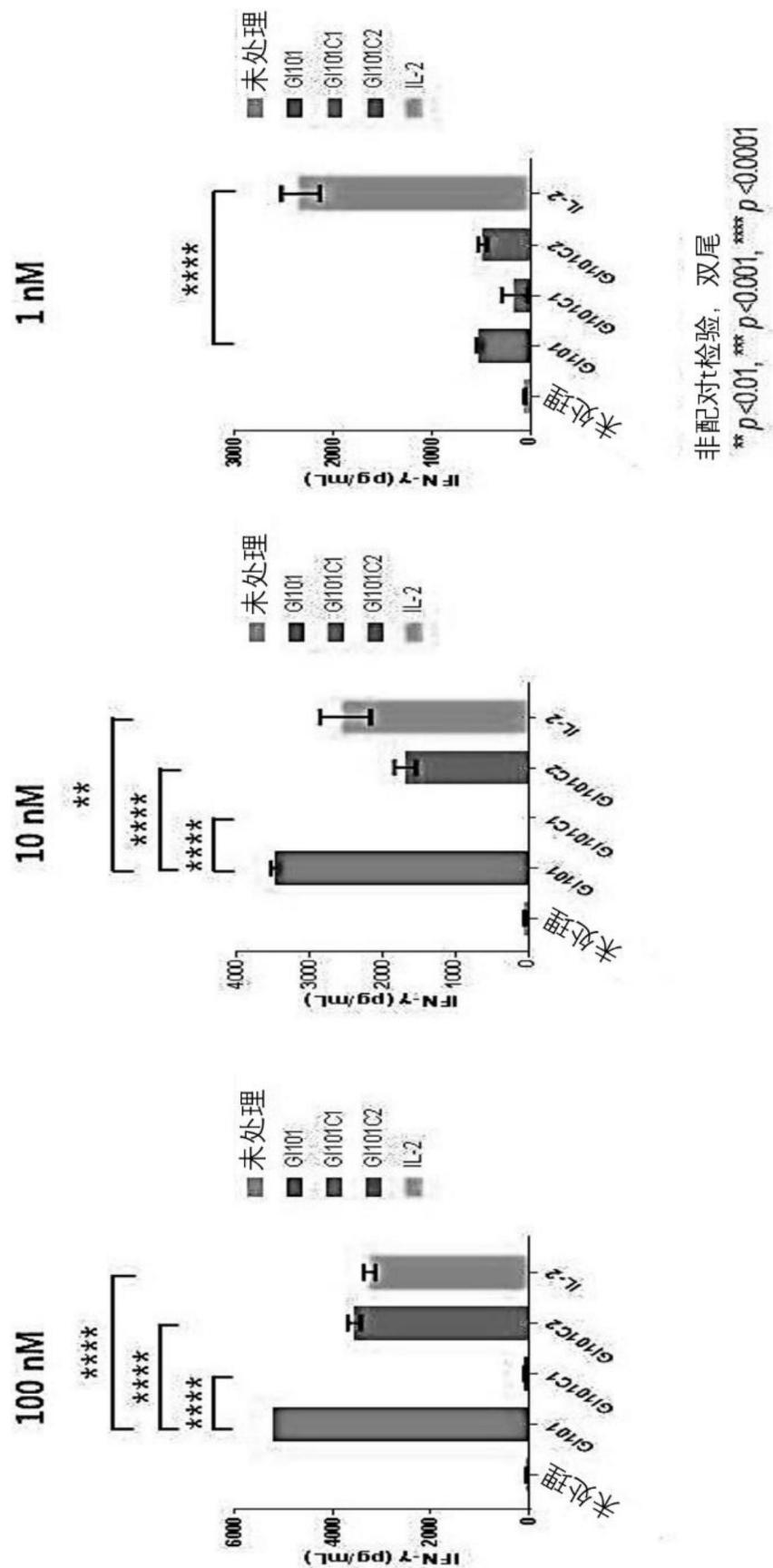


图34

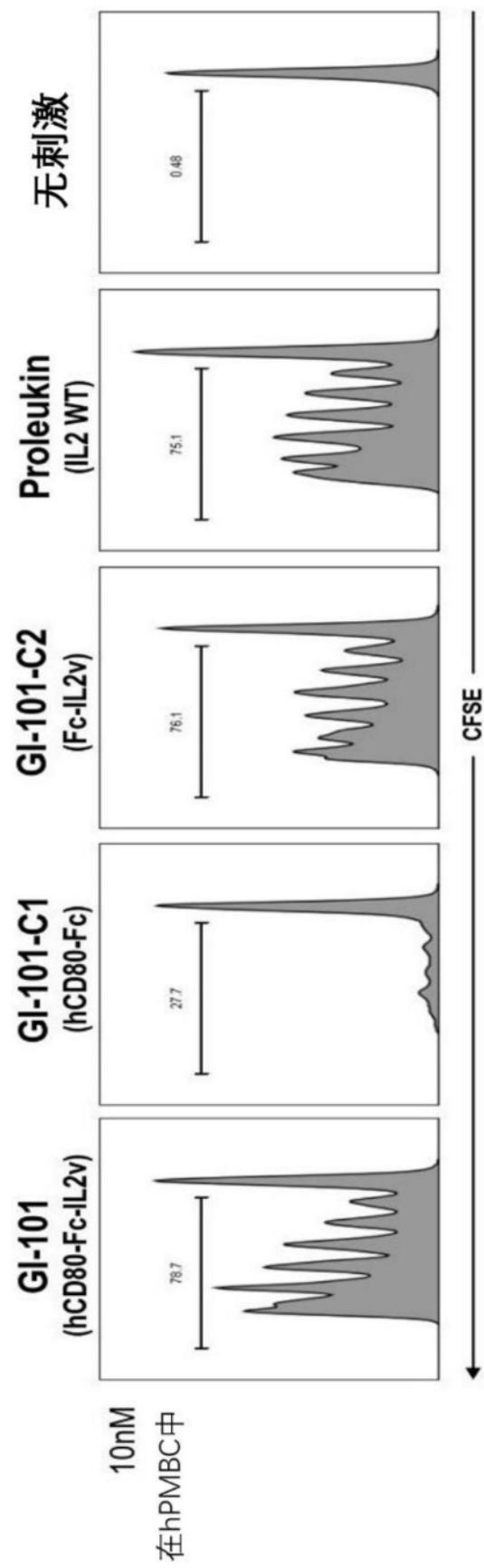


图35

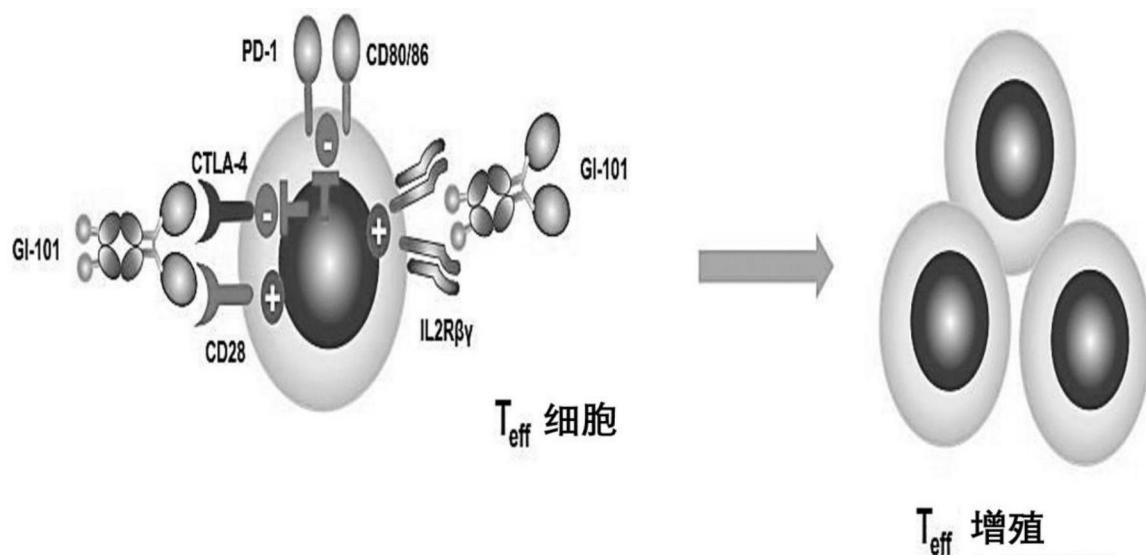


图36

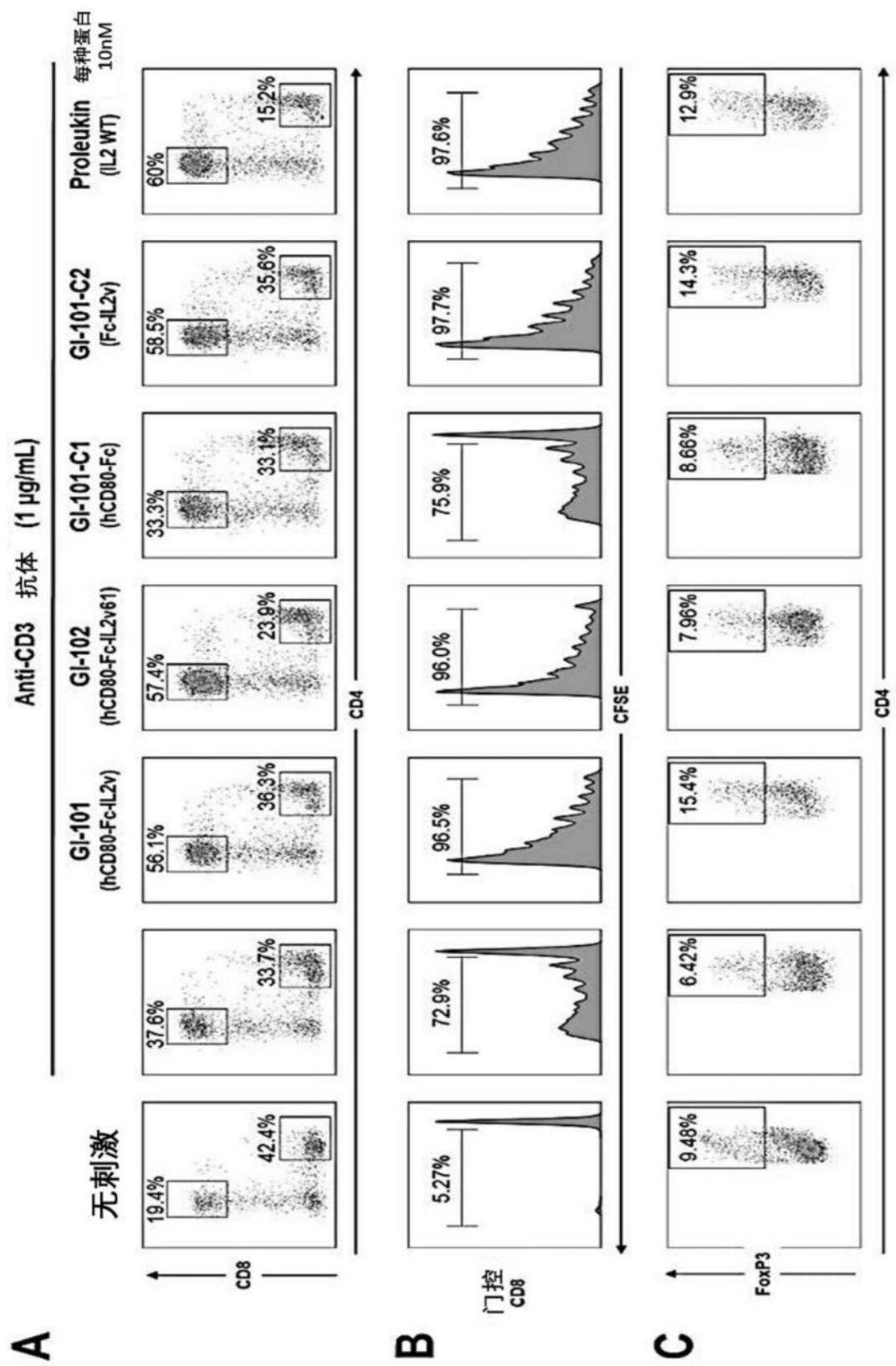


图37

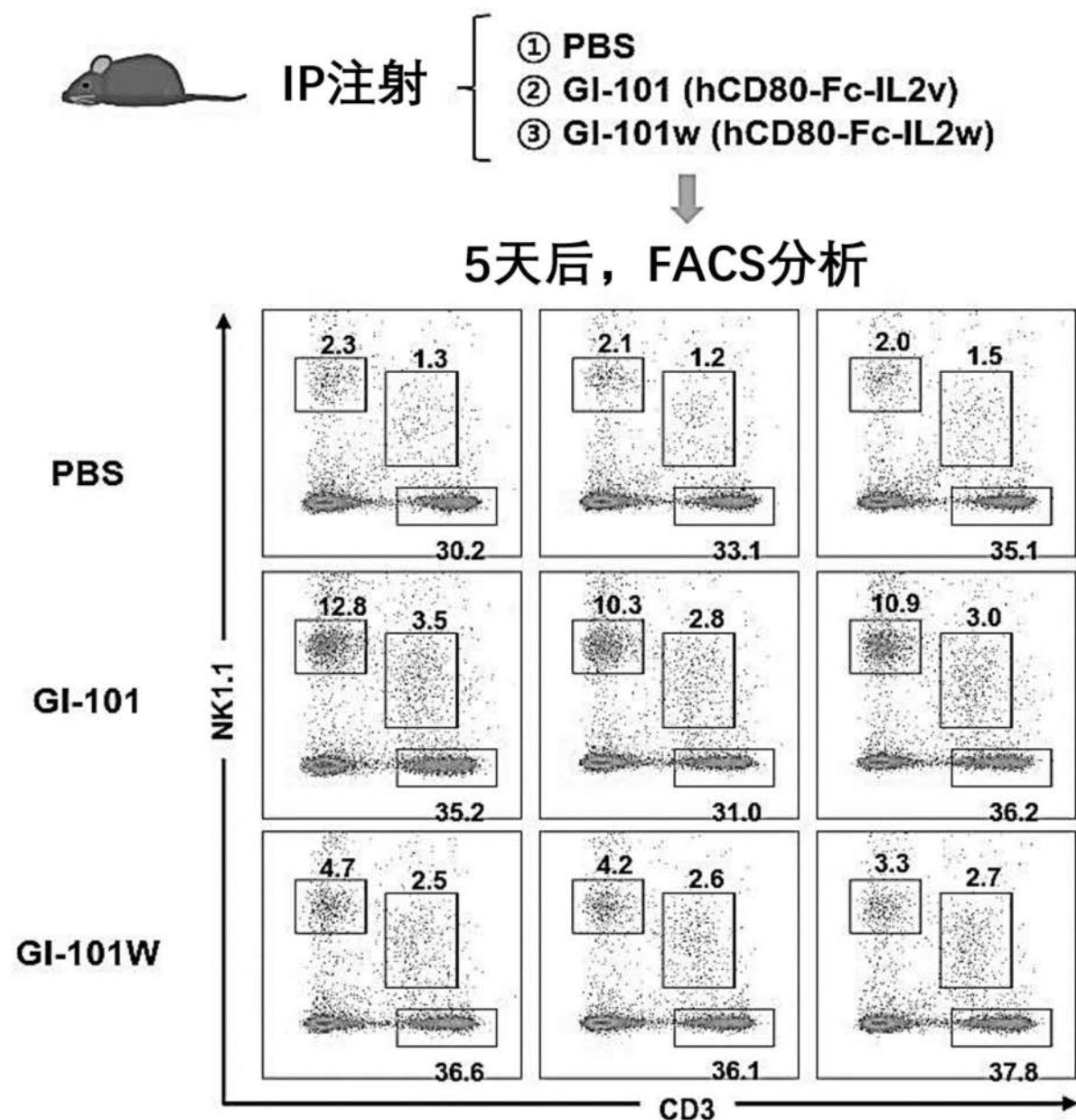


图38

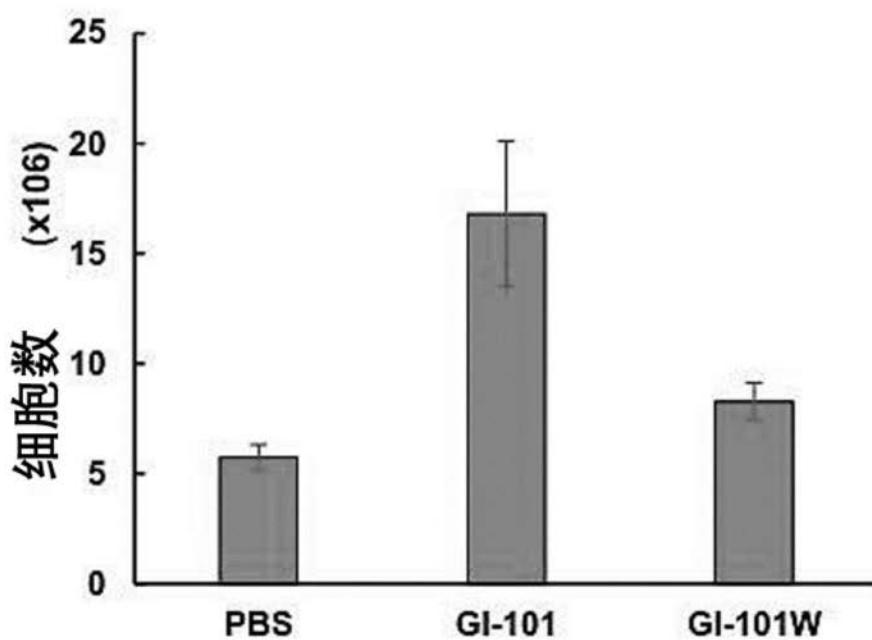
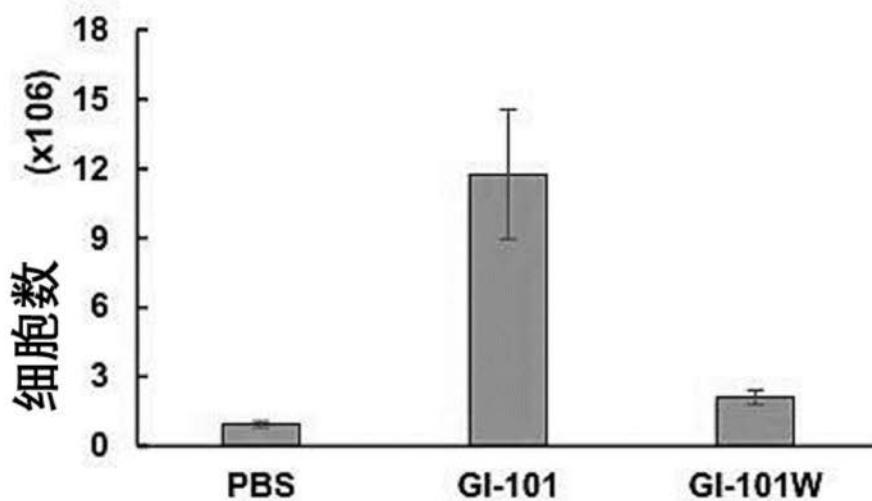
CD8 T 细胞**NK 细胞**

图39

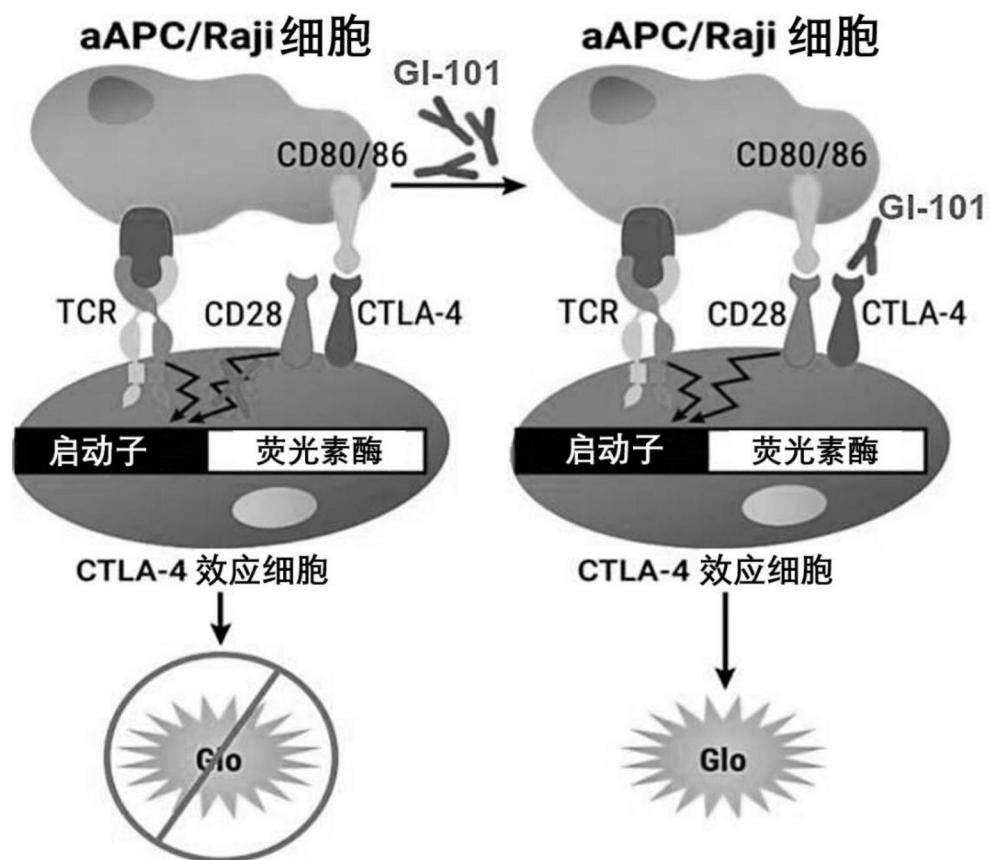


图40

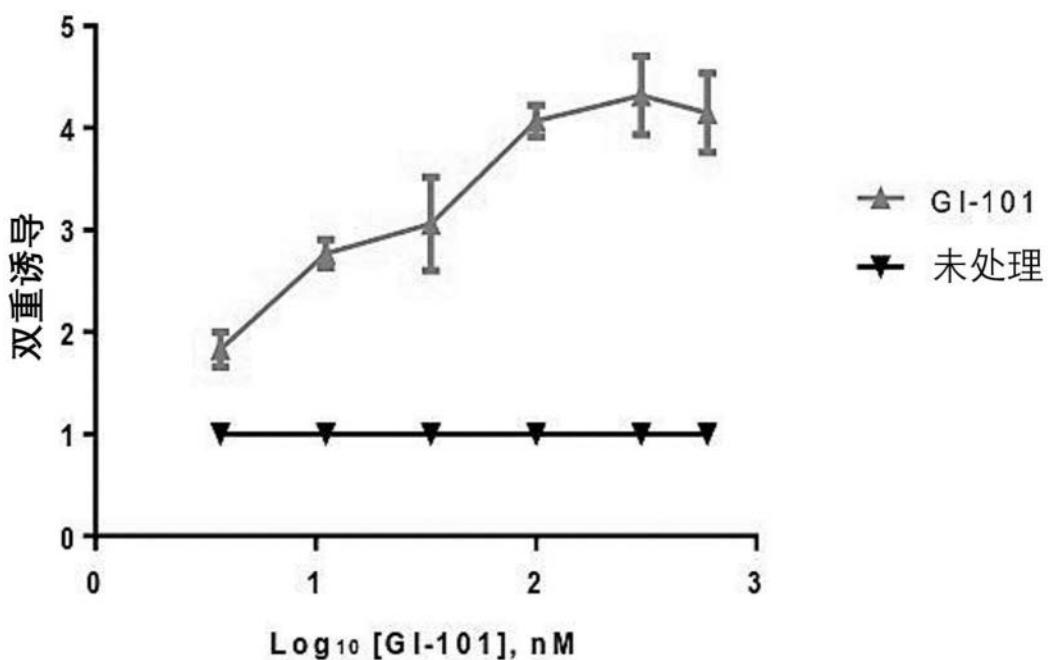


图41

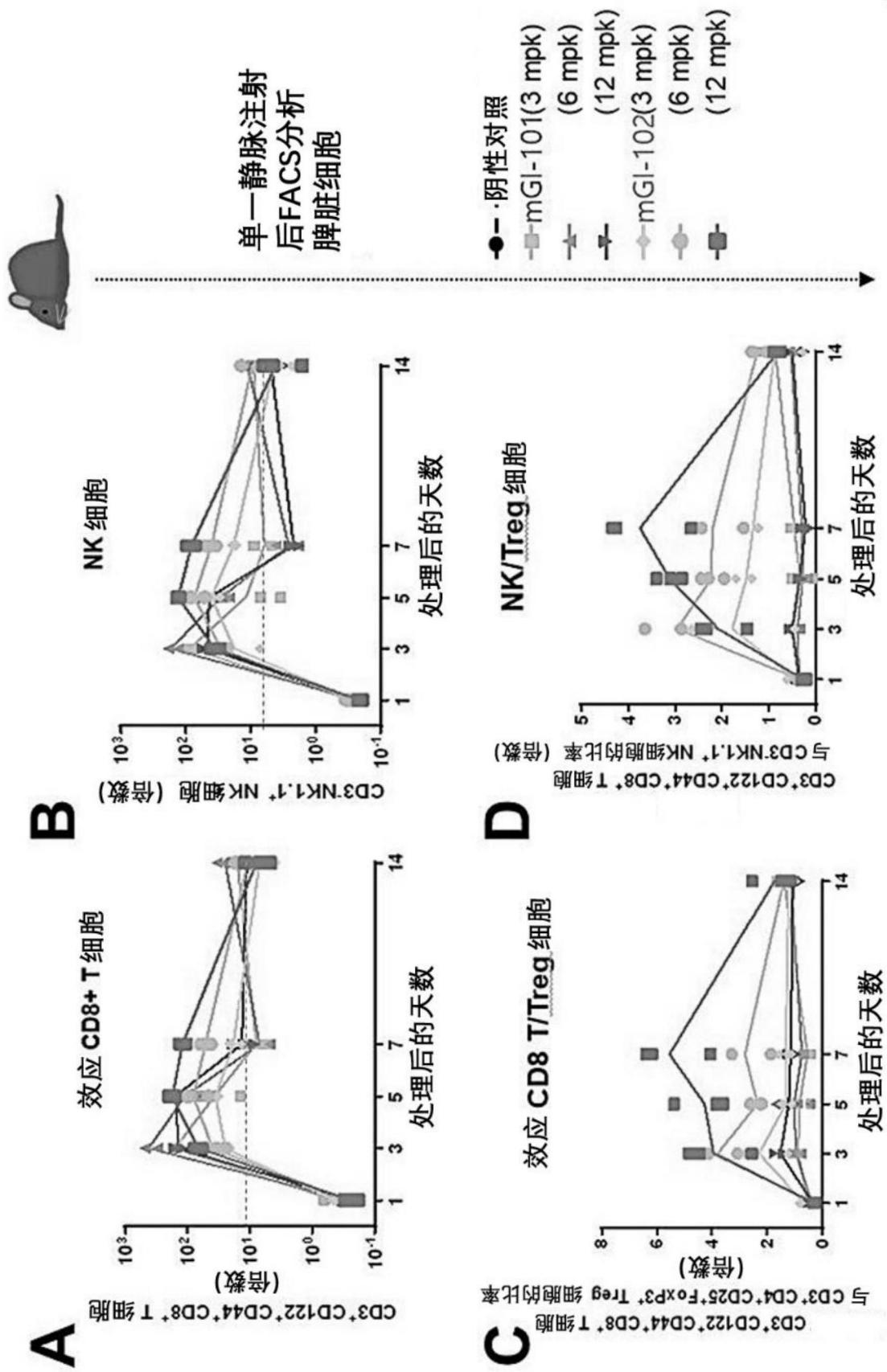


图42

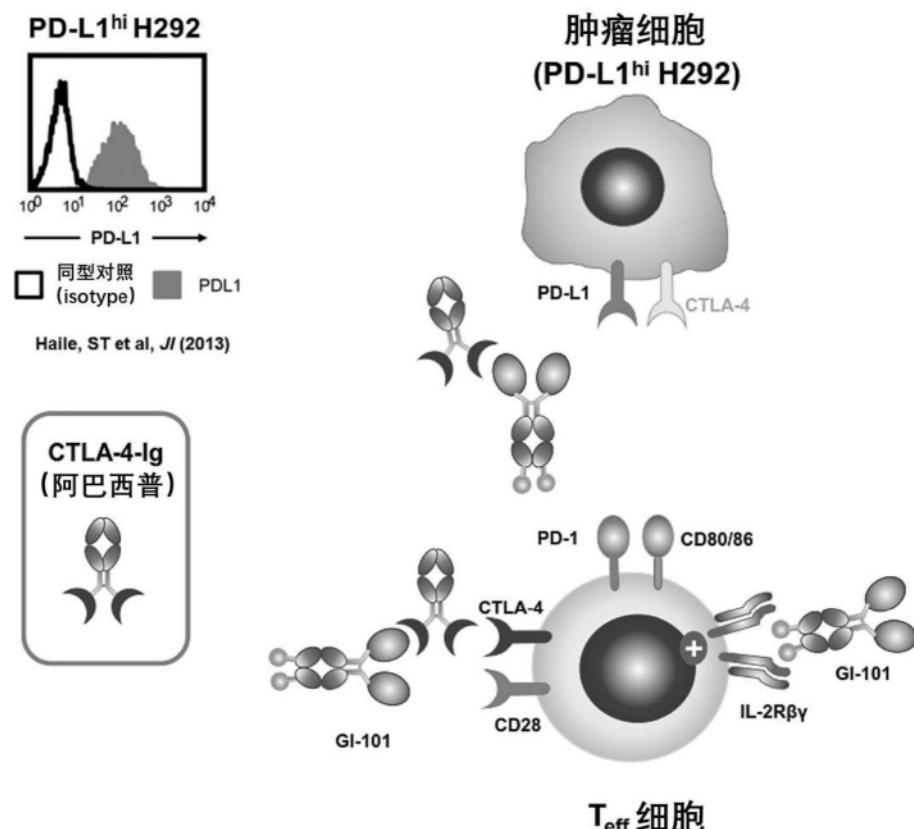


图43

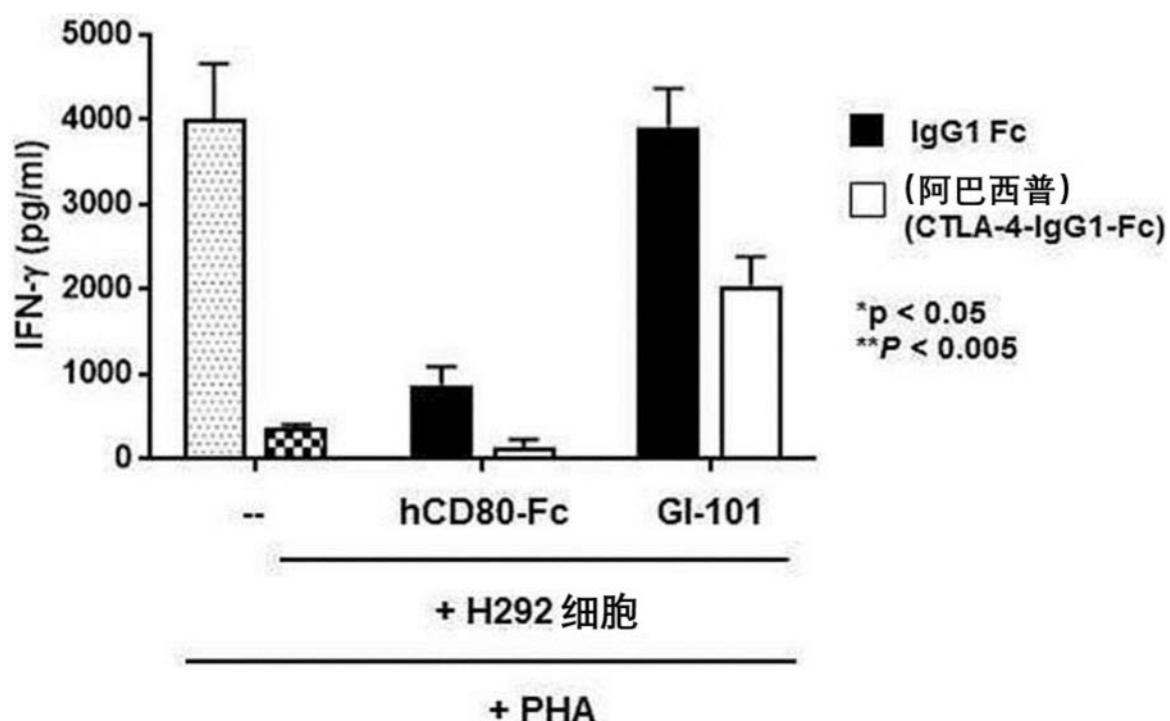


图44

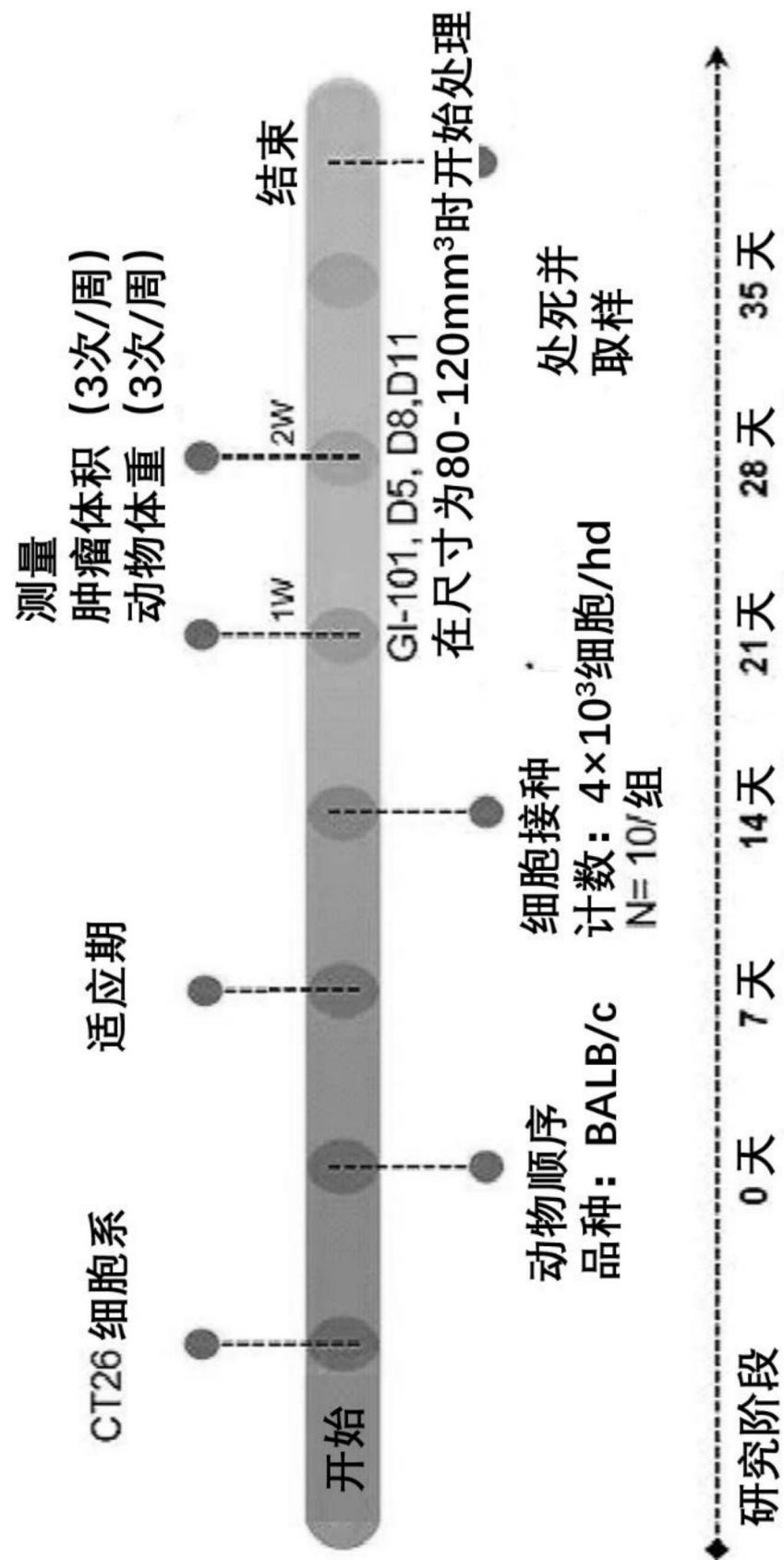


图45

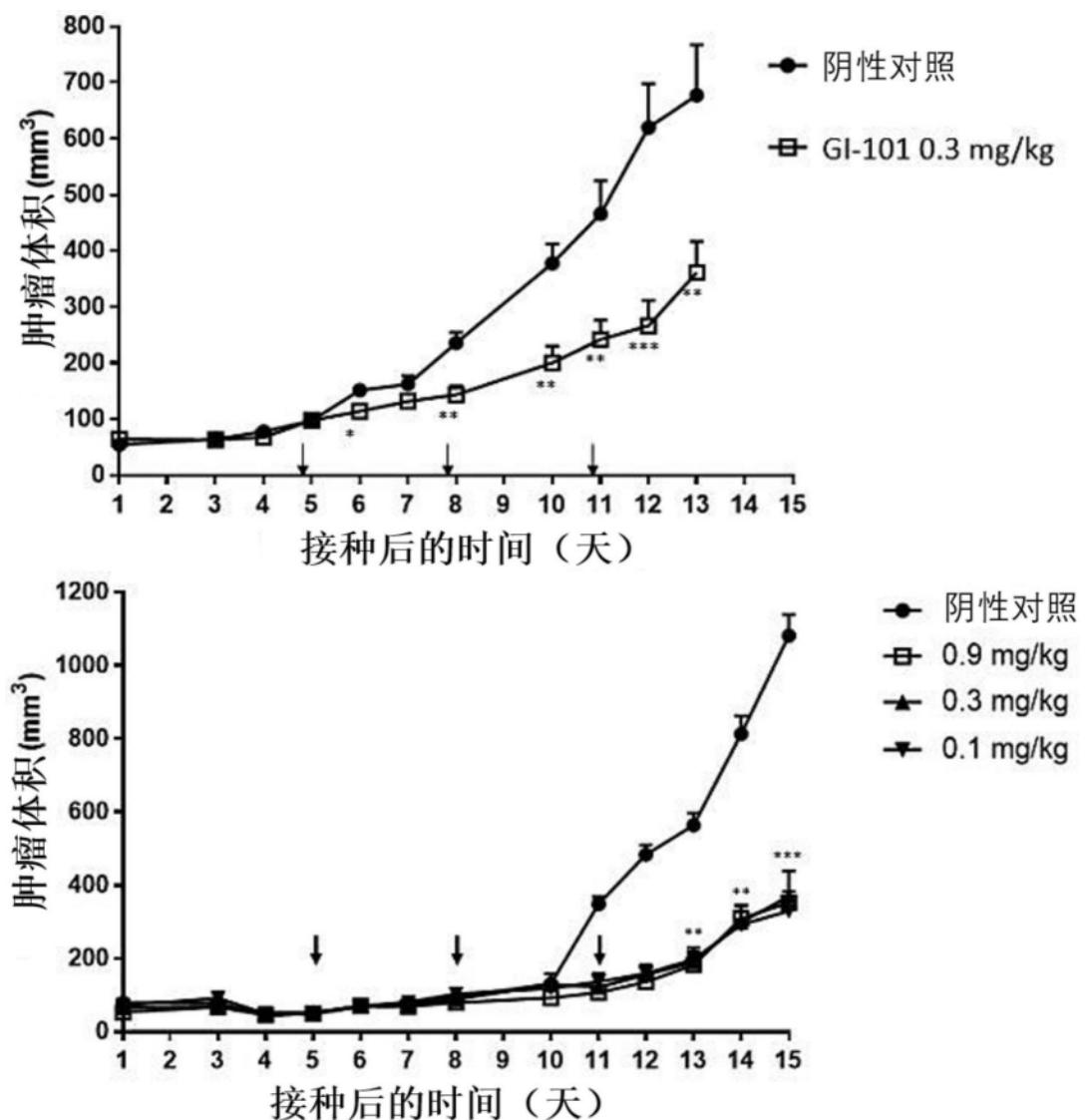


图46

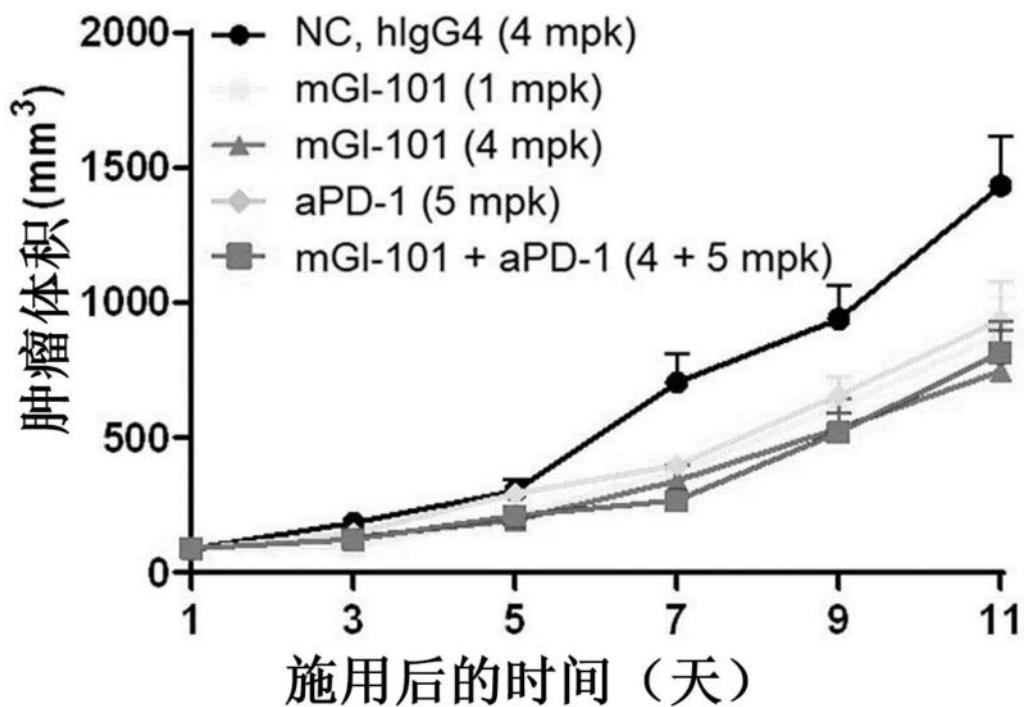


图47

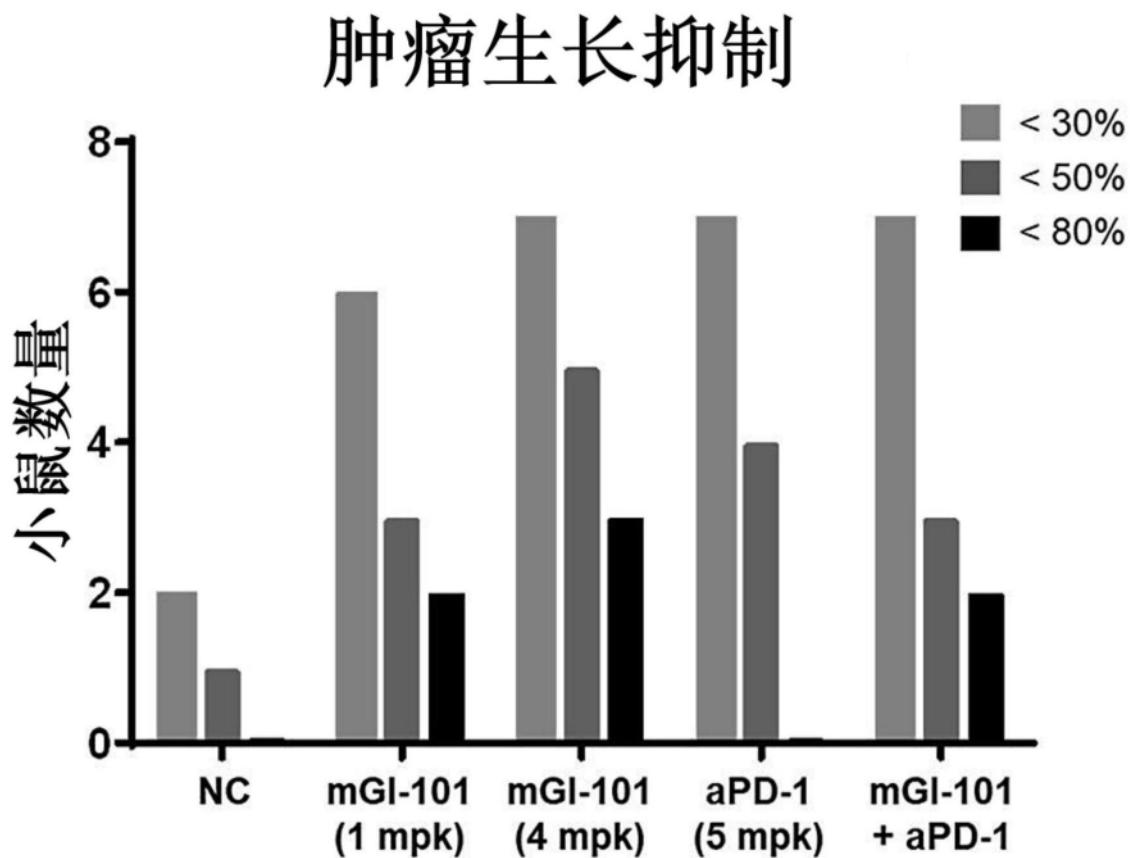


图48

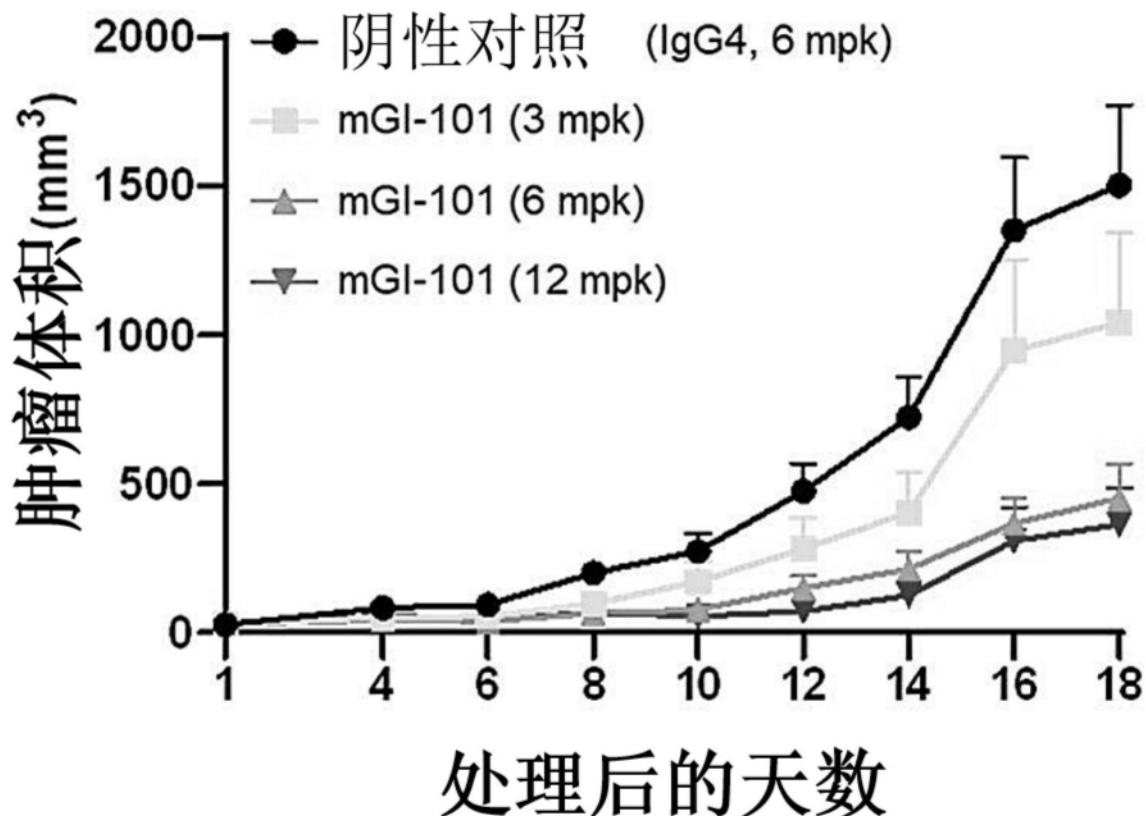


图49

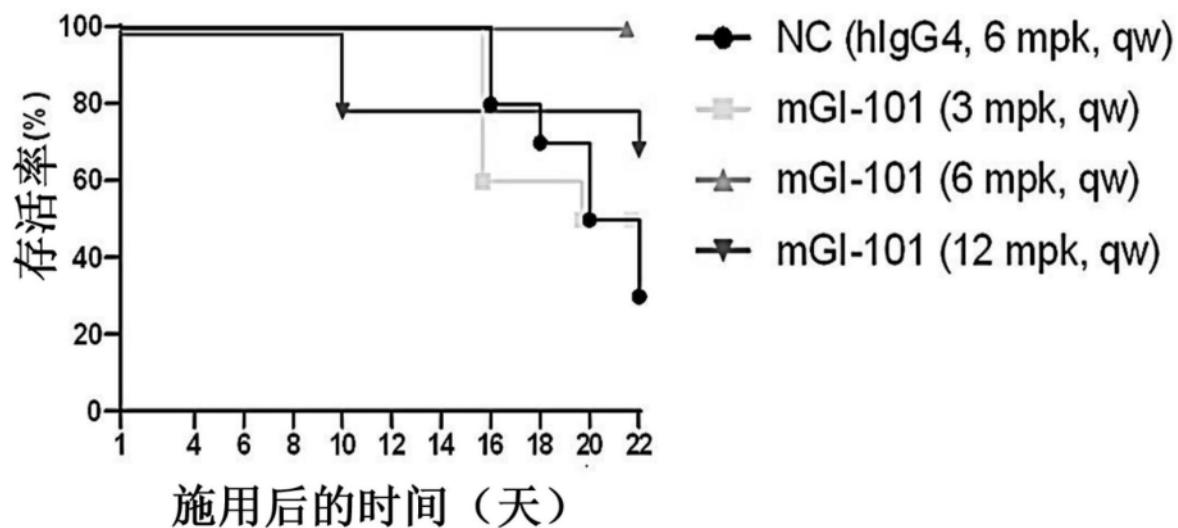


图50

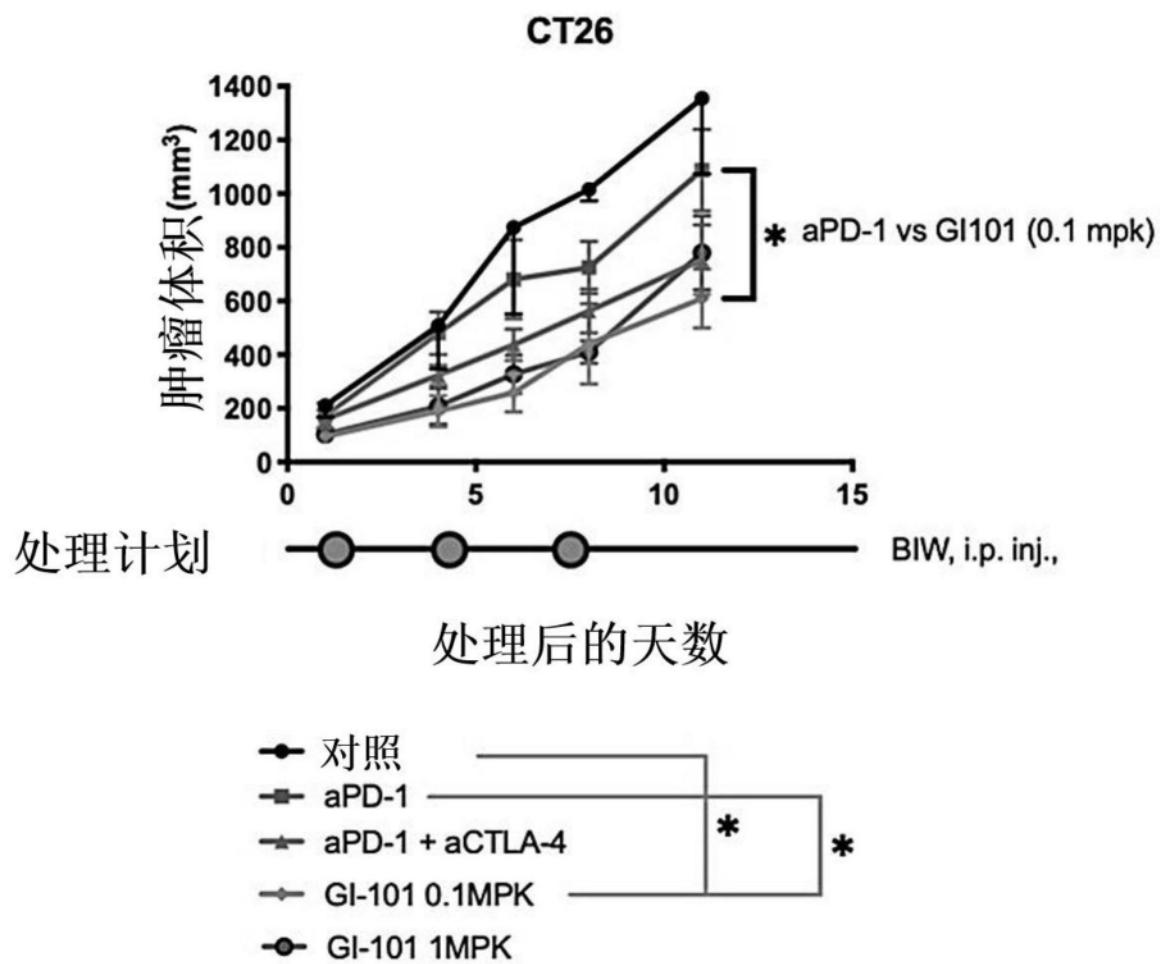


图51

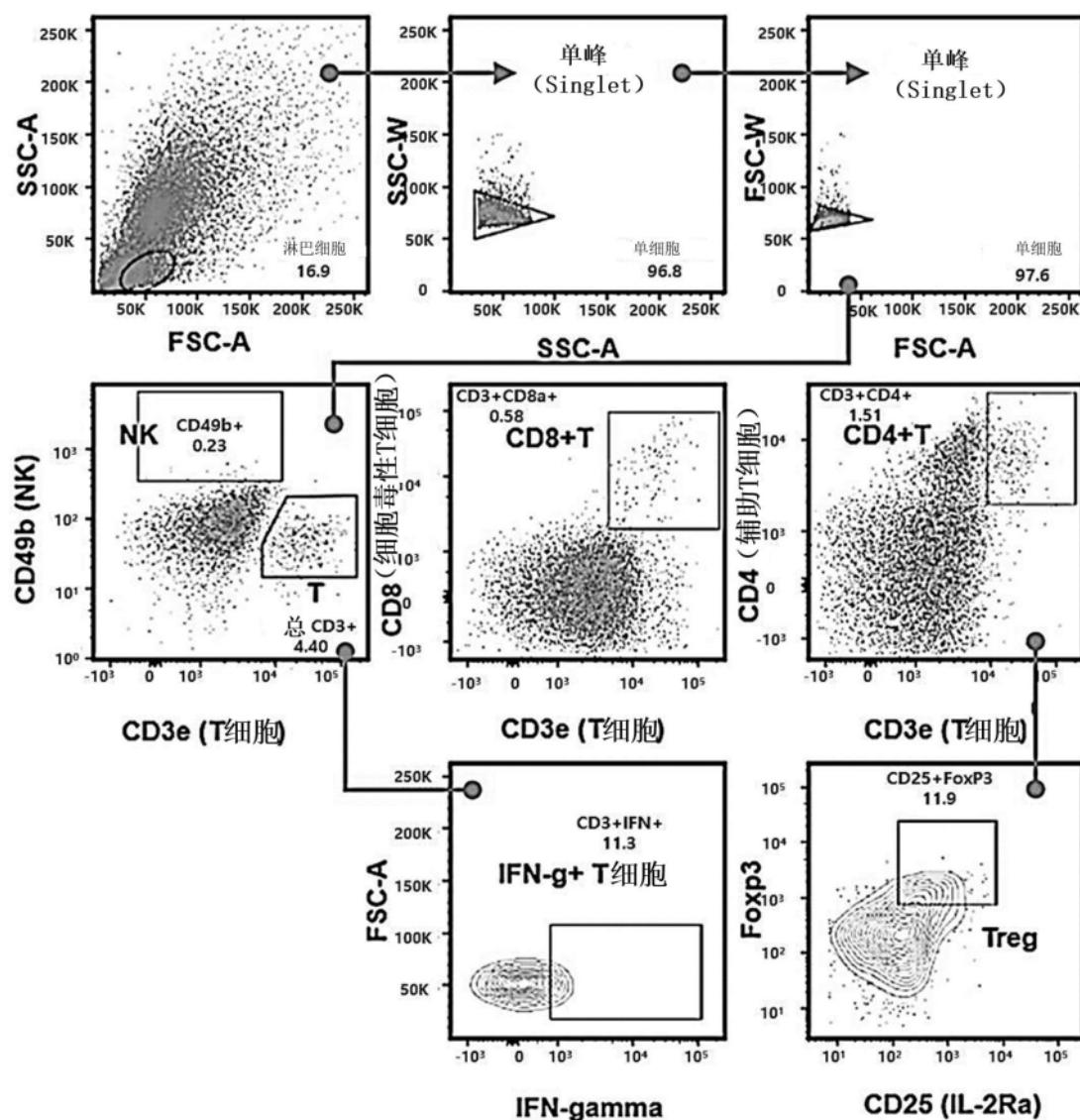


图52

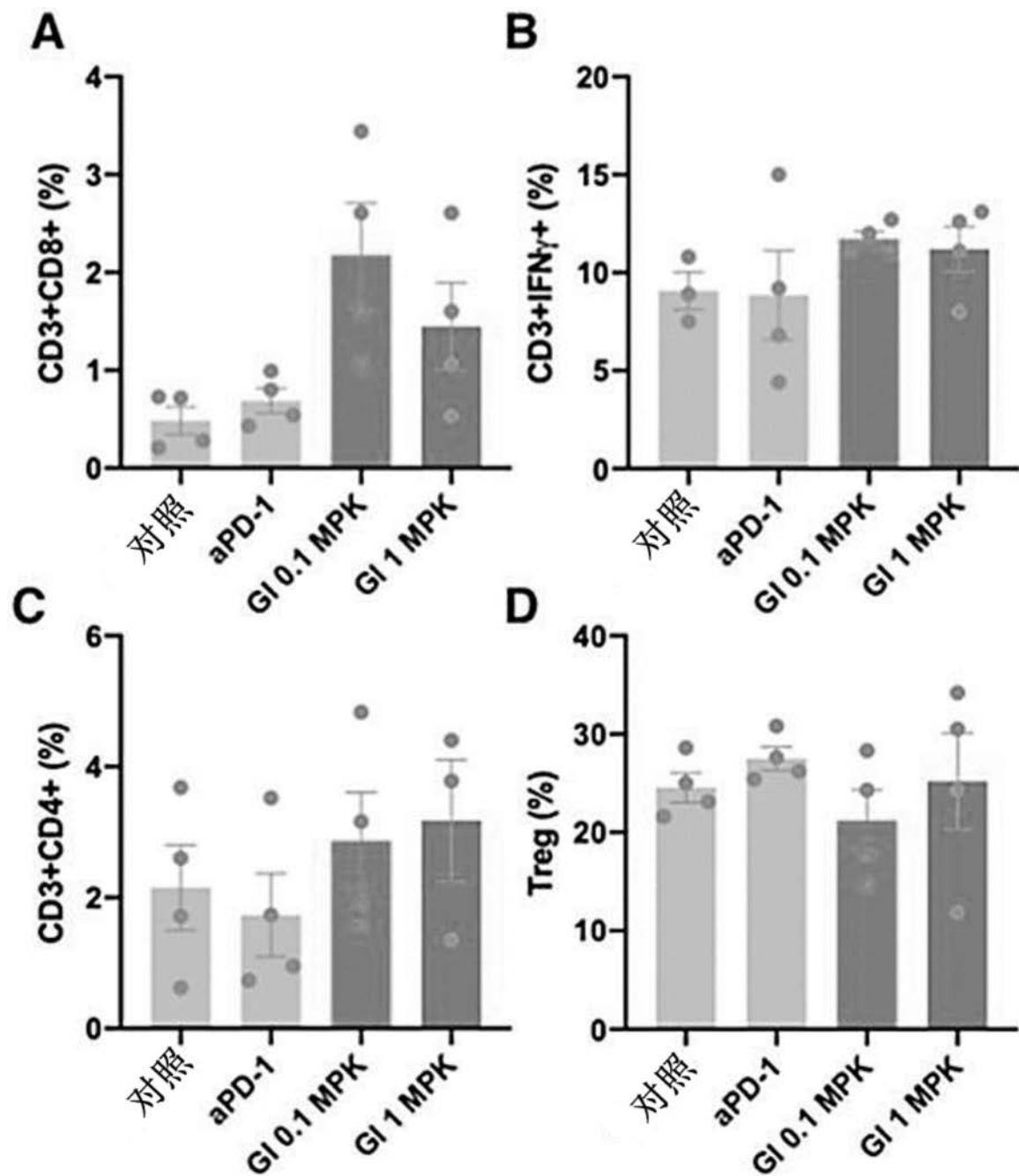


图53

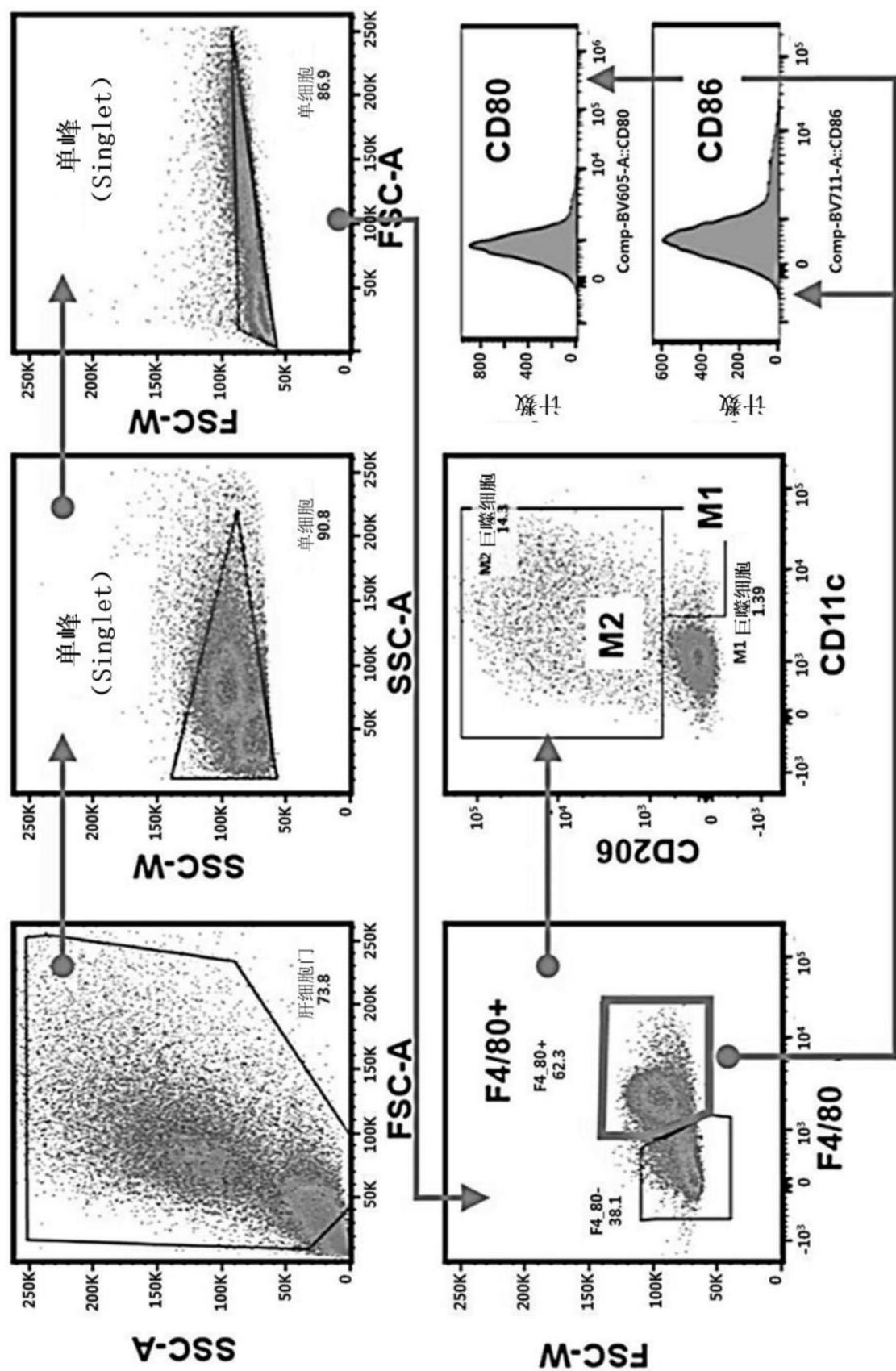


图54

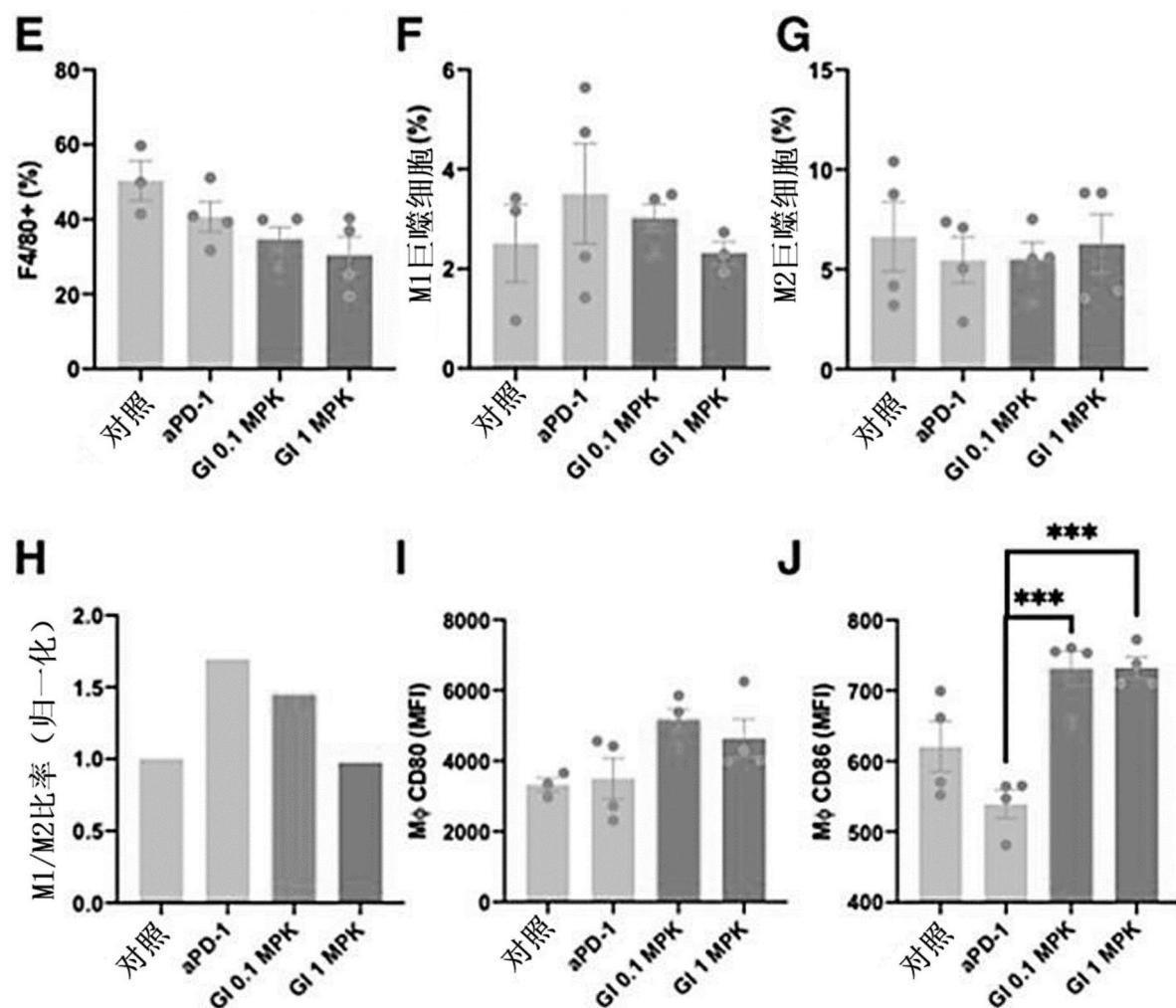


图55

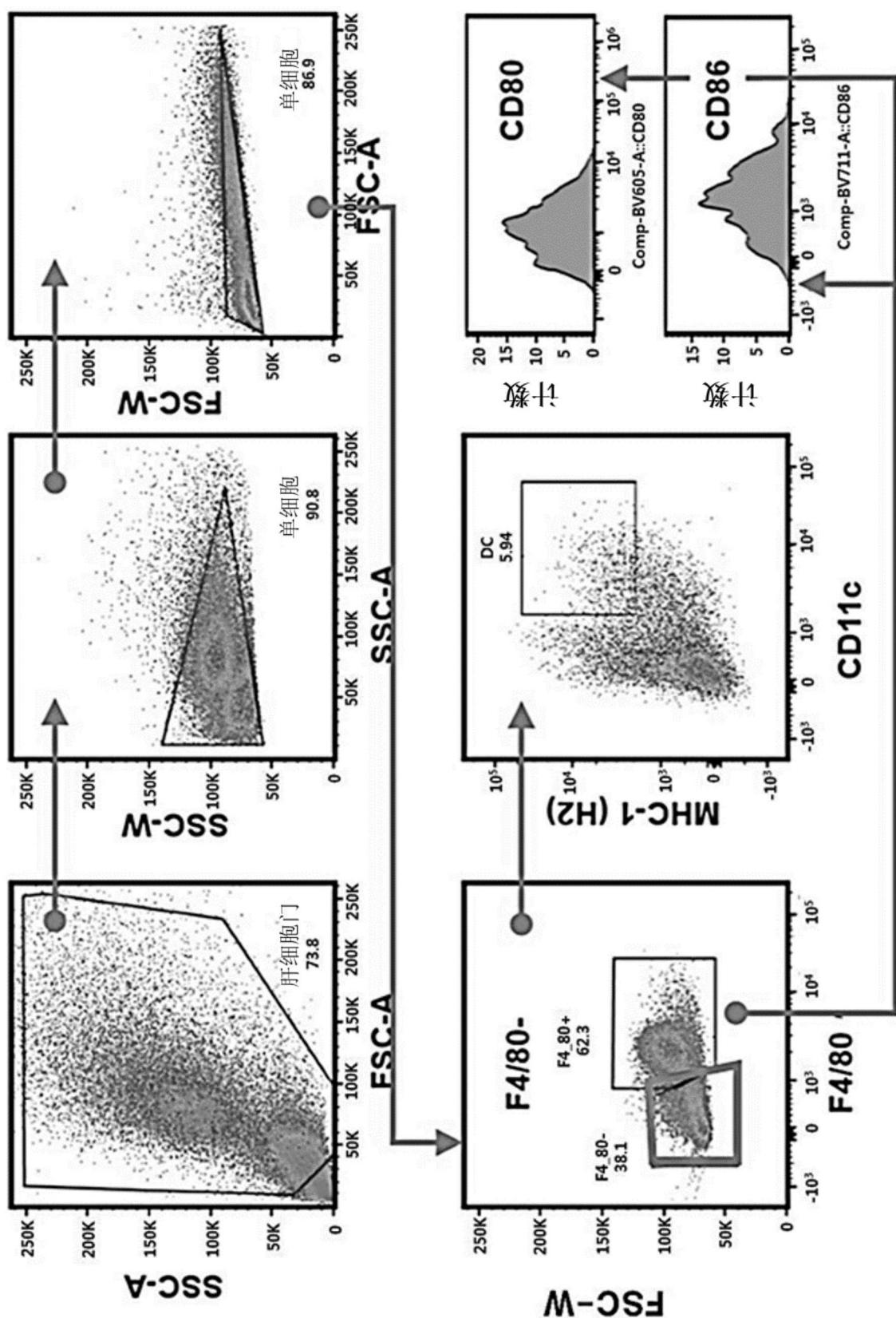


图56

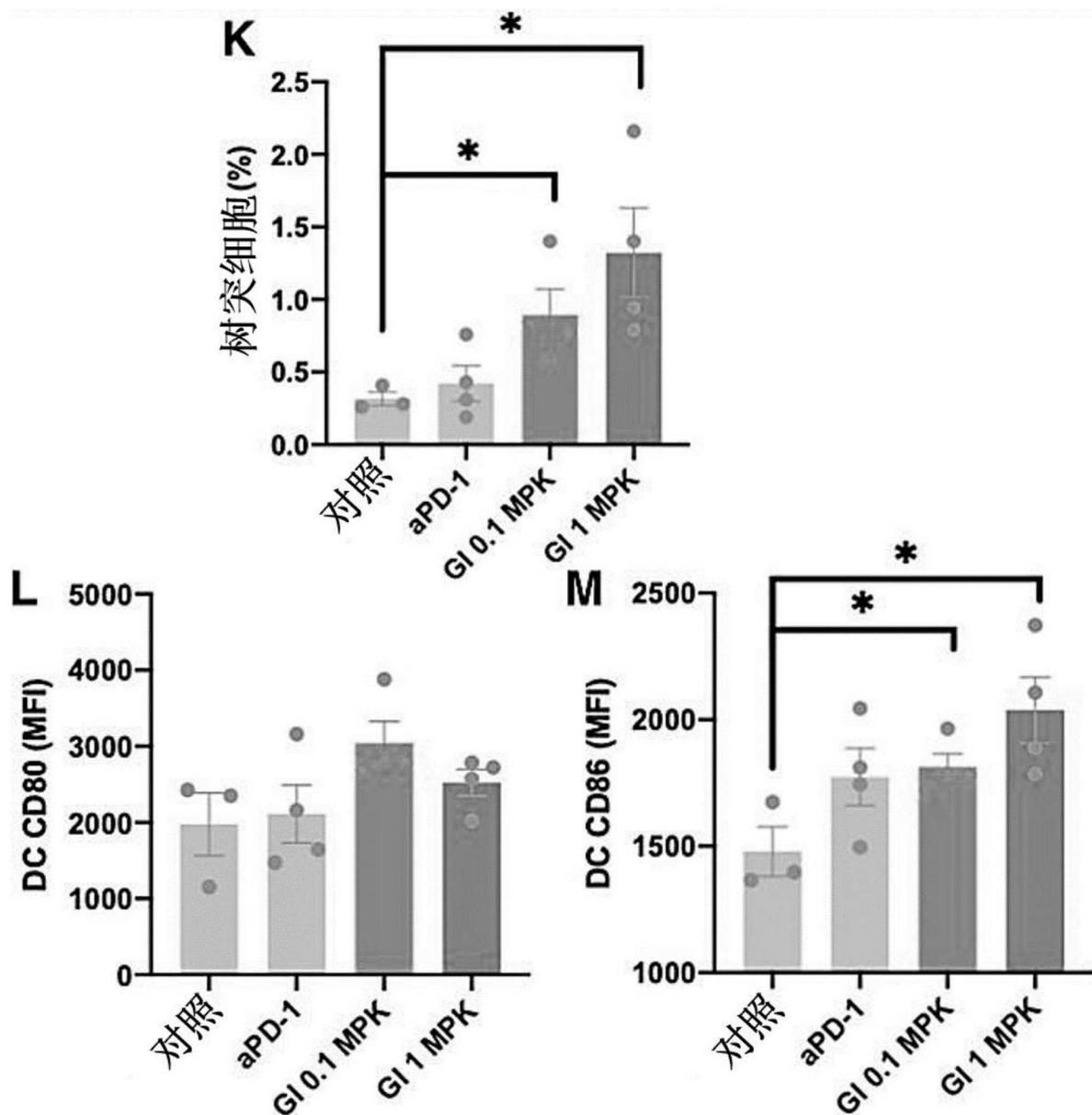


图57

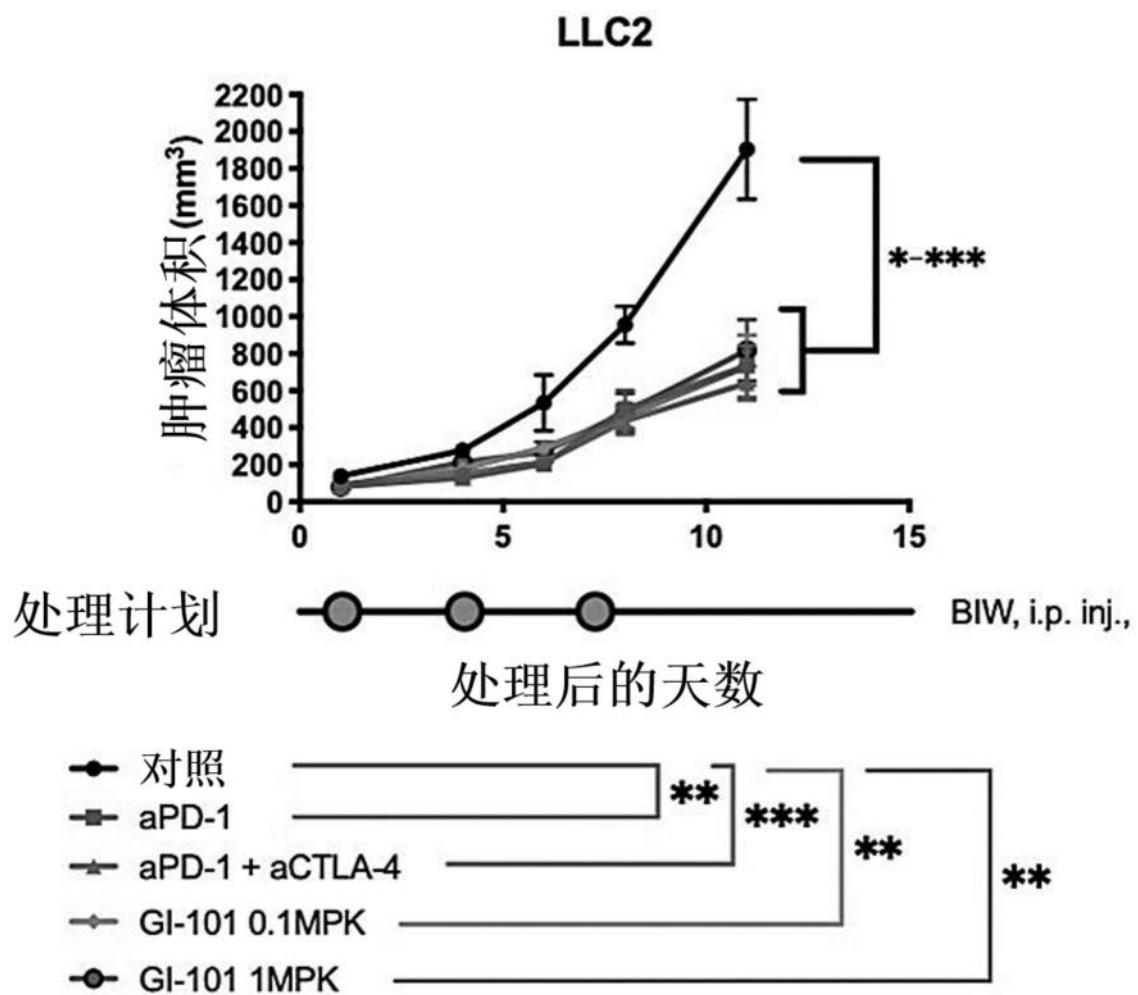


图58

GI-101处理后表达IFN γ 的T细胞有所增加，
但是，肿瘤中调节性T细胞群未增加

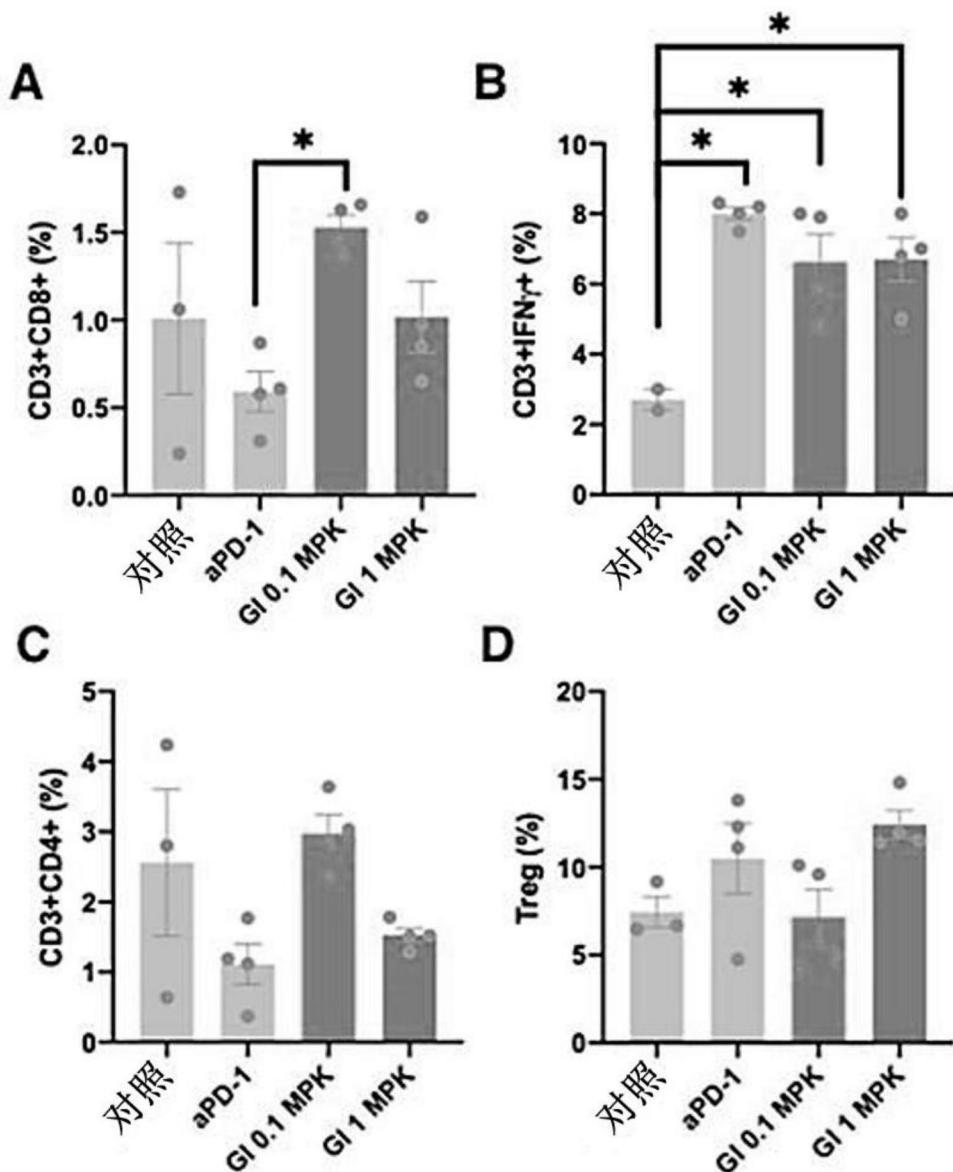


图59

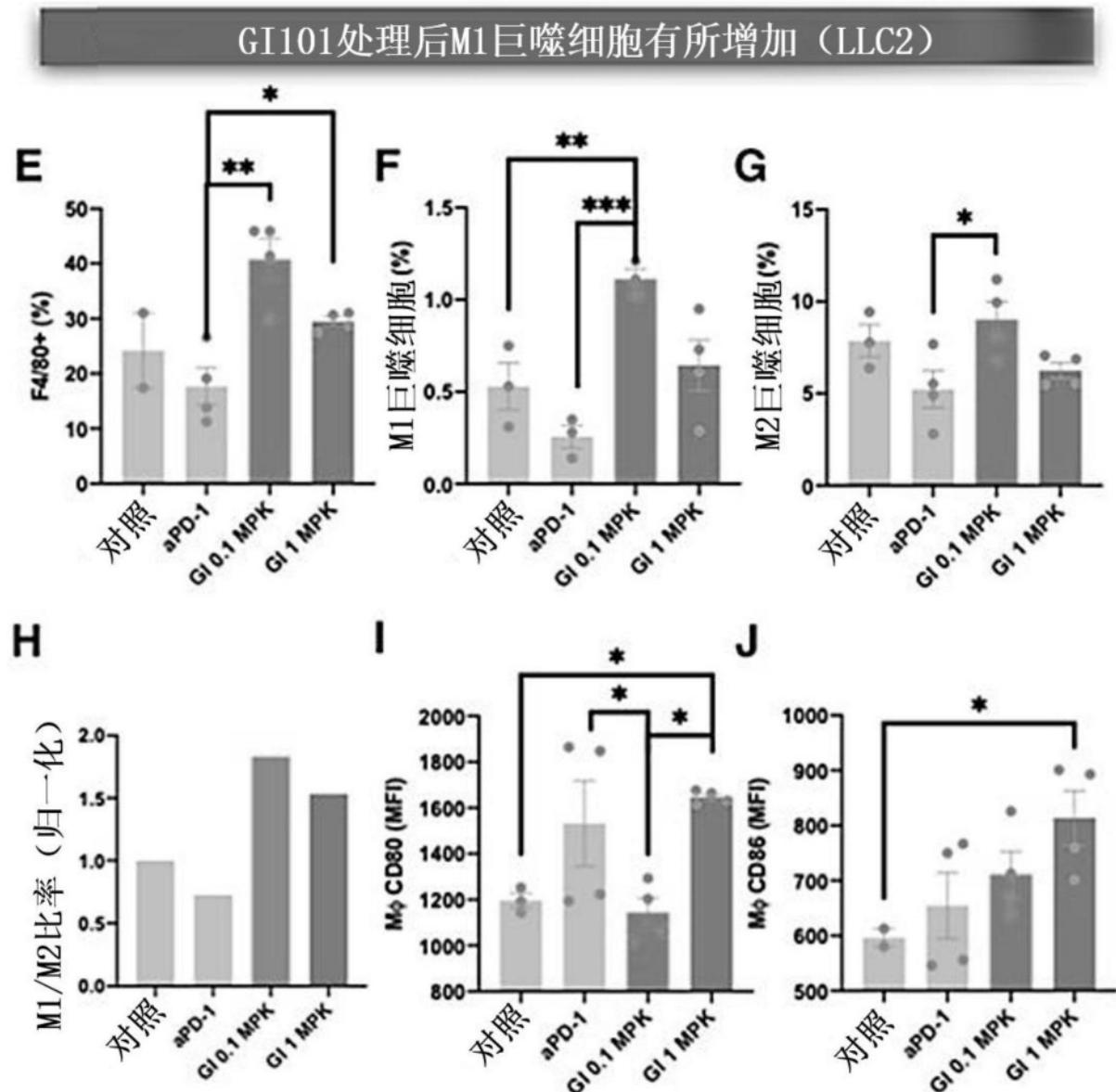


图60

GI101处理后树突细胞群和抗原
呈递效应均有所增加 (LLC2)

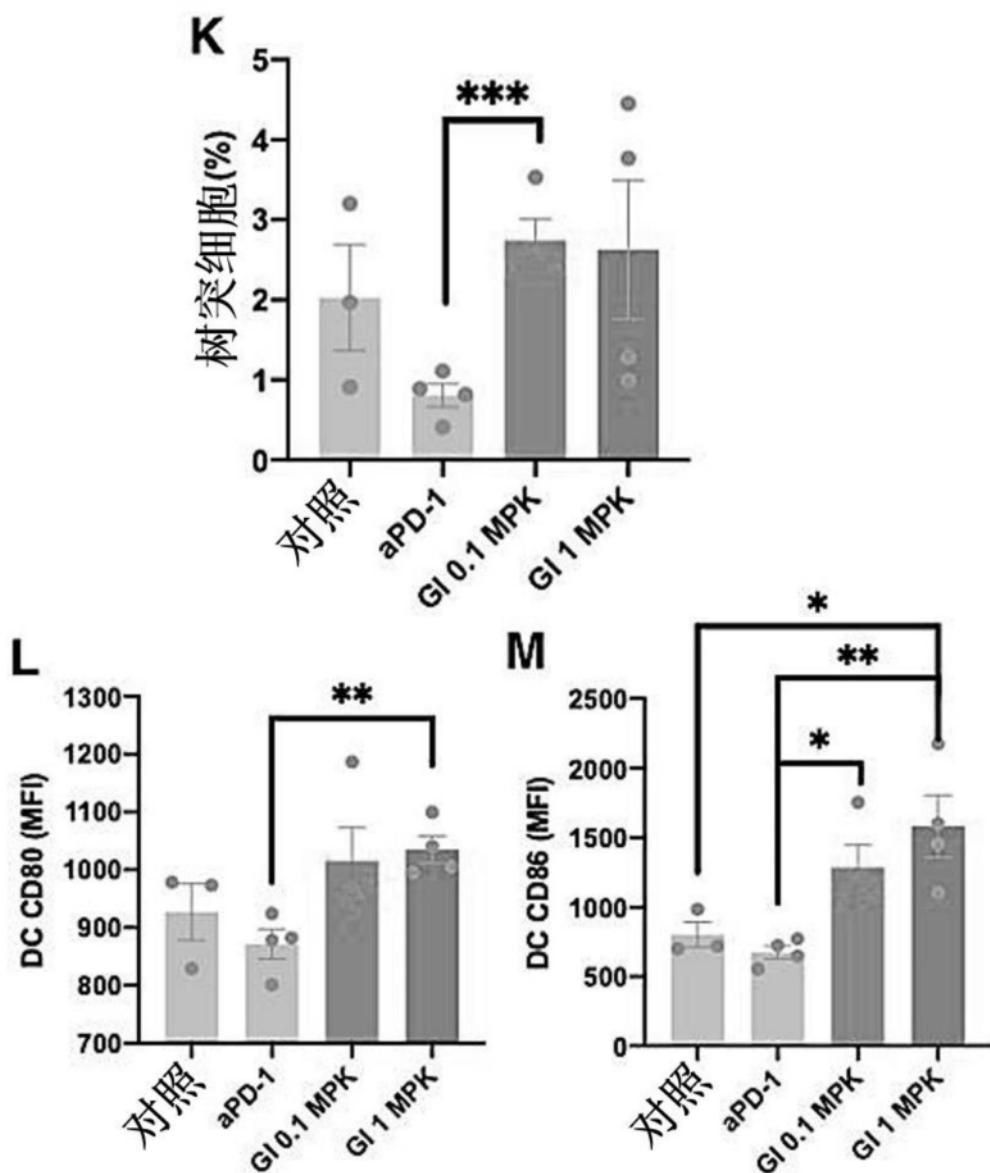


图61

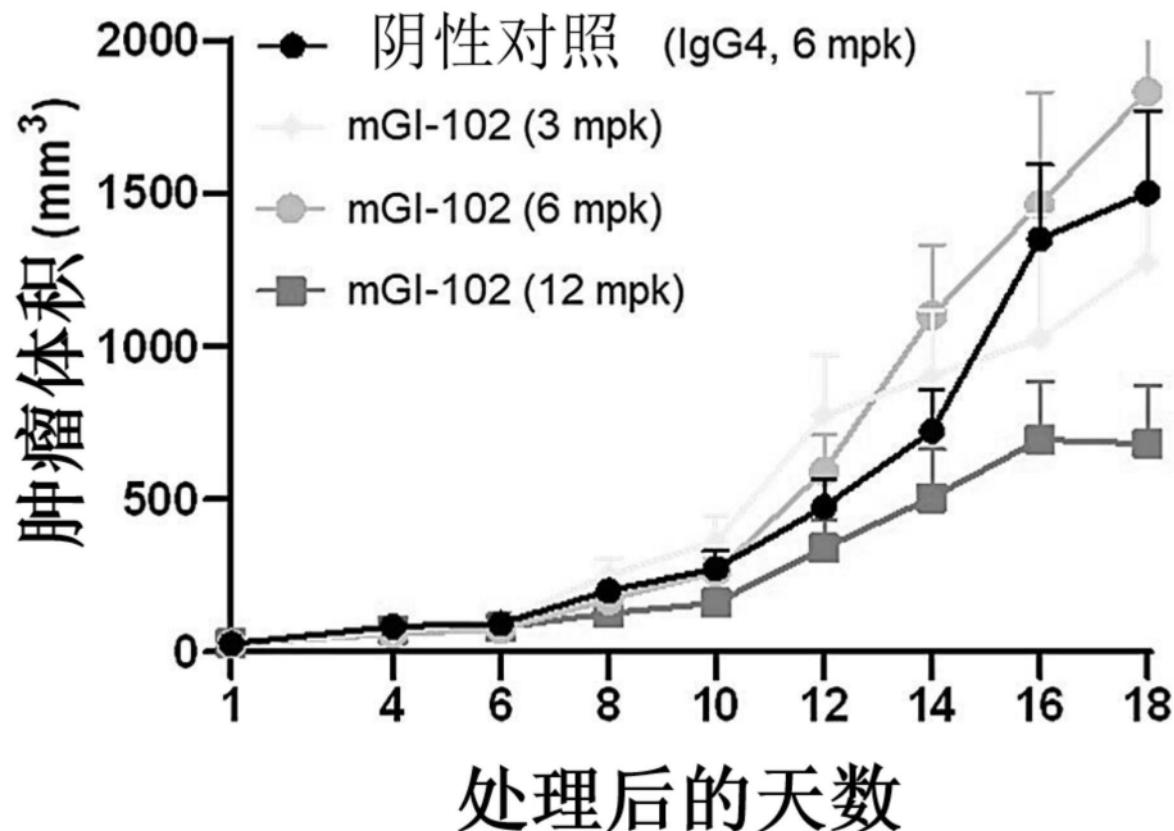


图62

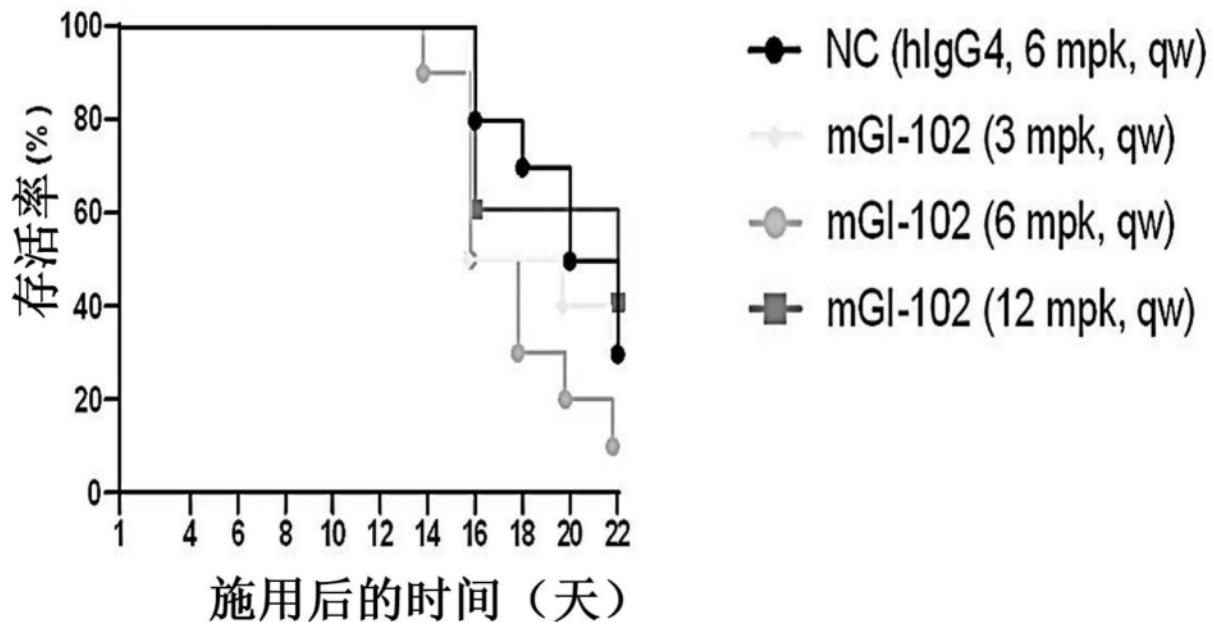


图63

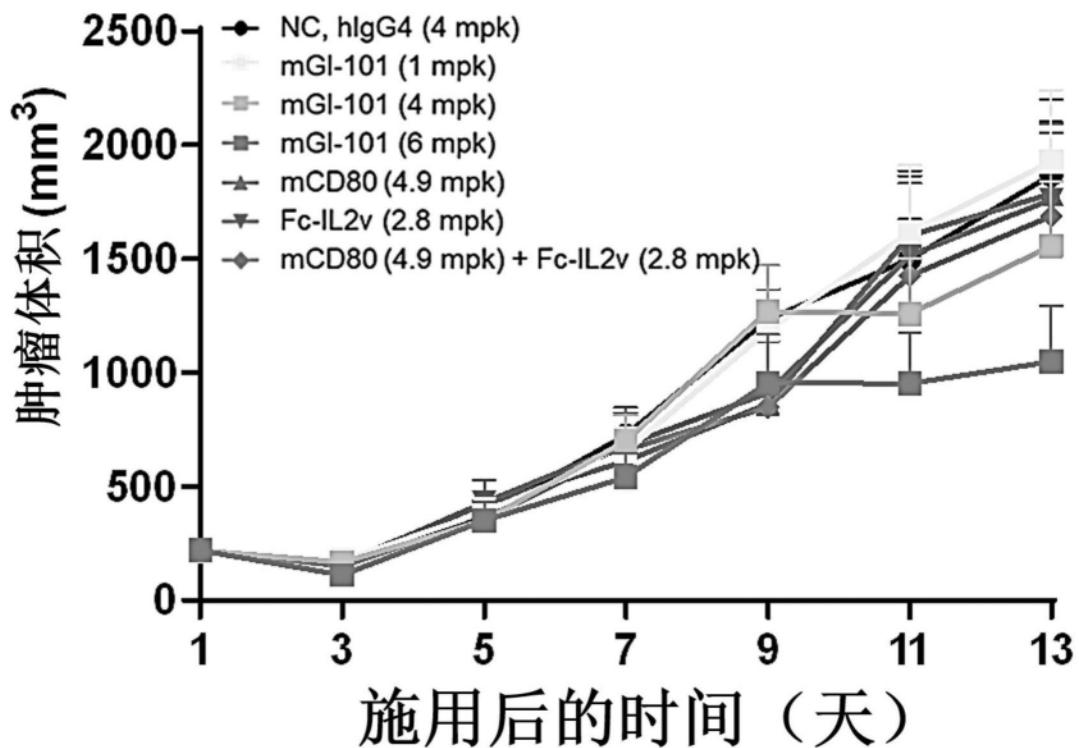


图64

肿瘤生长抑制

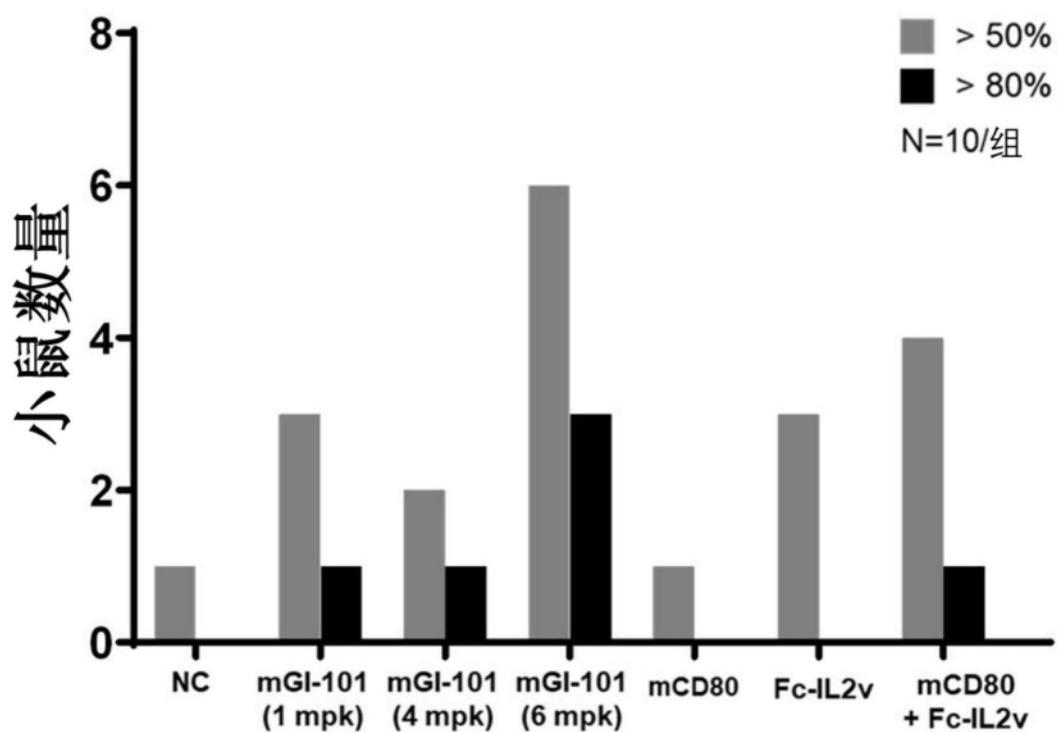


图65

在食蟹猴中2周静脉内注射GI-101的毒性研究

表1 临床观察

| 组别 | 动物 编号 | 天 | | | | | | | | | | | | 剖解 天数 | |
|---------|----------|----|----|----|----|----|----|----|----|-----------|----|----|----|----------|----|
| | | -1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
| 0 | CJ1M01 | NA | Pre 0.5 h | am | am | am | am | am |
| mg/kg/天 | CJ1M02 | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| | CJ1M03 | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| 5 | CJ2M01 | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| mg/kg/天 | CJ2M02 | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| | CJ2M03 | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| 10 | CJ3M01 | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| mg/kg/天 | CJ3M02 | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| | CJ3M03 | NA | NA | NA | NA | NA | NA |

通用脚注: Pre: 给药前 0.5h: 给药后0.5小时

NA: 无临床或排便异常

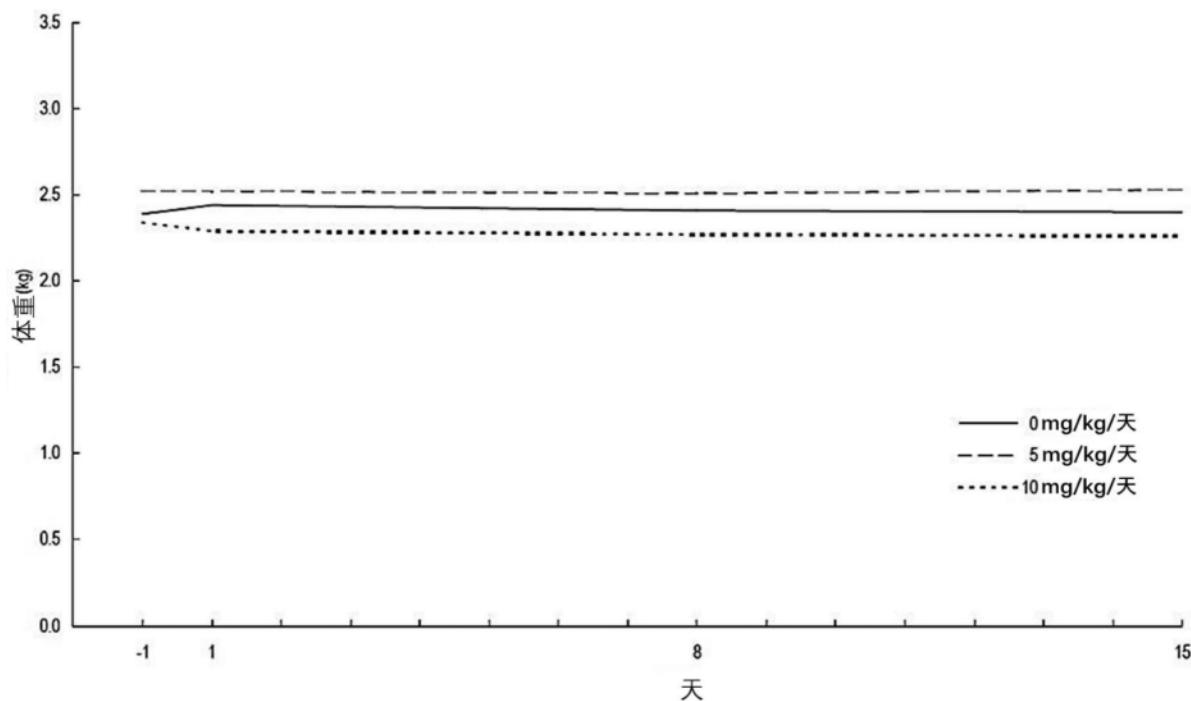


图67

| 性别: 雄性 | | 0 mg/kg/天 | 5 mg/kg/天 | 10 mg/kg/天 |
|------------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 相对于开始日期的天数 | | | | |
| -1 | 平均 S.D. N | 2.39 0.10 3 | 2.52 0.31 3 | 2.34 0.16 3 |
| 1 | 平均 S.D. N | 2.44 0.07 3 | 2.52 0.31 3 | 2.29 0.16 3 |
| 8 | 平均 S.D. N | 2.41 0.12 3 | 2.51 0.34 3 | 2.27 0.08 3 |
| 15 | 平均 S.D. N | 2.40 0.12 3 | 2.53 0.34 3 | 2.26 0.11 3 |

统计学检验: 广义的方差/协方差检验 转变: 一致 (无转变)

图68

在食蟹猴中2周静脉内注射GI-101的毒性研究

表3 食物消耗

| 性别: 雄性 | | 食物消耗 | | | | | | | | | | | | 单位: (g/day) | | |
|---------------|--------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------|------|-----|
| 组别 | 动物编号 | 天 | | | | | | | | | | | | 平均 | S.D. | N |
| | | -1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | | | |
| 0 mg/kg/天 | CJ1M01 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | CJ1M02 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | CJ1M03 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 5 mg/kg/天 | CJ2M01 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | CJ2M02 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | CJ2M03 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 10 mg/kg/天 | CJ3M01 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | CJ3M02 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | CJ3M03 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | 平均 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | S.D. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

图69

| 性别: 雄性 | | | 0 mg/kg/天 | 5 mg/kg/天 | 10 mg/kg/天 |
|--------------------------------|----|-----------------|-------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 相对于开始日期的天数 | | | | | |
| %Retic. (%) | -2 | 平均 S.D. N | 0.75 0.07 3 | 1.40 0.52 3 | 0.93 0.30 3 |
| | 15 | 平均 S.D. N | 1.67 0.61 3 | 3.10 d ¹ 0.55 3 | 3.14 d ¹ 0.32 3 |
| #Retic (10 ⁹ /L) | -2 | 平均 S.D. N | 44.0 7.0 3 | 81.9 28.4 3 | 55.1 19.7 3 |
| | 15 | 平均 S.D. N | 91.5 33.6 3 | 171.6 d ¹ 32.3 3 | 161.5 d ¹ 17.2 3 |
| PLT (10 ³ /μL) | -2 | 平均 S.D. N | 404 25 3 | 380 90 3 | 380 28 3 |
| | 15 | 平均 S.D. N | 501 29 3 | 522 135 3 | 601 85 3 |

图70

| 性别: 雄性 | | | 0 mg/kg/天 | 5 mg/kg/天 | 10 mg/kg/天 |
|------------------------------|----|-----------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 相对于开始日期的天数 | | | | | |
| WBC (10 ³ /μL) | -2 | 平均 S.D. N | 10.59 1.63 3 | 8.18 1.43 3 | 8.29 2.11 3 |
| | 15 | 平均 S.D. N | 8.09 0.25 3 | 12.08 0.74 3 | 16.52 6.81 3 |
| %Neut (%) | -2 | 平均 S.D. N | 38.1 23.2 3 | 23.1 3.2 3 | 23.6 13.1 3 |
| | 15 | 平均 S.D. N | 35.9 14.3 3 | 14.5 2.1 3 | 22.4 14.2 3 |
| %Lymph (%) | -2 | 平均 S.D. N | 57.7 21.7 3 | 71.6 2.8 3 | 69.8 13.7 3 |
| | 15 | 平均 S.D. N | 59.6 13.1 3 | 81.2 1.4 3 | 69.5 15.0 3 |

图71

| 性别: 雄性 | | | 0 mg/kg/天 | 5 mg/kg/天 | 10 mg/kg/天 |
|---------------------------------|----|-----------------|-------------------|-------------------|----------------------------------|
| 相对于开始日期的天数 | | | | | |
| #Neut (10 ³ /μL) | -2 | 平均 S.D. N | 4.24 3.09 3 | 1.86 0.22 3 | 1.77 0.52 3 |
| | 15 | 平均 S.D. N | 2.93 1.26 3 | 1.76 0.35 3 | 3.11 0.63 3 |
| #Lymph (10 ³ /μL) | -2 | 平均 S.D. N | 5.92 1.78 3 | 5.87 1.24 3 | 5.98 2.54 3 |
| | 15 | 平均 S.D. N | 4.80 0.94 3 | 9.80 0.48 3 | 12.05 6.47 3 |
| #Mono (10 ³ /μL) | -2 | 平均 S.D. N | 0.36 0.10 3 | 0.37 0.09 3 | 0.45 0.08 3 |
| | 15 | 平均 S.D. N | 0.32 0.11 3 | 0.33 0.06 3 | 0.77 d ¹ 0.26 3 |

图72

| 性别: 雄性 | | | 0 mg/kg/天 | 5 mg/kg/天 | 10 mg/kg/天 |
|--------------|----|-----------------|------------------|------------------|------------------|
| 相对于开始日期的天数 | | | | | |
| AST (U/L) | -2 | 平均 S.D. N | 36 19 3 | 45 21 3 | 30 7 3 |
| | 15 | 平均 S.D. N | 24 5 3 | 34 5 3 | 33 8 3 |
| ALT (U/L) | -2 | 平均 S.D. N | 58 51 3 | 72 71 3 | 34 8 3 |
| | 15 | 平均 S.D. N | 34 6 3 | 52 44 3 | 36 5 3 |
| ALP (U/L) | -2 | 平均 S.D. N | 1511 542 3 | 1658 258 3 | 1972 357 3 |
| | 15 | 平均 S.D. N | 1395 365 3 | 1444 346 3 | 1565 235 3 |

图73

| 性别：雄性 | | | 0 mg/kg/天 | 5 mg/kg/天 | 10 mg/kg/天 |
|----------------|----|-----------------|----------------|----------------|--------------------------------|
| 相对于开始日期的天数 | | | | | |
| LD (U/L) | -2 | 平均 S.D. N | 255 6 3 | 289 57 3 | 292 47 3 |
| | 15 | 平均 S.D. N | 236 15 3 | 304 47 3 | 361 dd ¹ 38 3 |
| CK (U/L) | -2 | 平均 S.D. N | 132 23 3 | 140 4 3 | 182 61 3 |
| | 15 | 平均 S.D. N | 120 31 3 | 128 19 3 | 140 23 3 |
| GLU (mg/dL) | -2 | 平均 S.D. N | 98 17 3 | 91 4 3 | 112 15 3 |
| | 15 | 平均 S.D. N | 87 9 3 | 88 17 3 | 104 5 3 |

图74

| 性别：雄性 | | | 0 mg/kg/天 | 5 mg/kg/天 | 10 mg/kg/天 |
|----------------|----|-----------------|-------------------|----------------------------------|-------------------|
| 相对于开始日期的天数 | | | | | |
| BIL (mg/dL) | -2 | 平均 S.D. N | 0.10 0.02 3 | 0.15 d ¹ 0.03 3 | 0.10 0.01 3 |
| | 15 | 平均 S.D. N | 0.11 0.04 3 | 0.15 0.03 3 | 0.10 0.03 3 |
| UN (mg/dL) | -2 | 平均 S.D. N | 19.1 7.2 3 | 15.4 2.3 3 | 18.8 4.5 3 |
| | 15 | 平均 S.D. N | 16.2 5.6 3 | 13.9 0.7 3 | 14.2 2.4 3 |
| CRE (mg/dL) | -2 | 平均 S.D. N | 0.73 0.07 3 | 0.69 0.17 3 | 0.73 0.10 3 |
| | 15 | 平均 S.D. N | 0.72 0.06 3 | 0.66 0.13 3 | 0.65 0.11 3 |

图75

| 性别: 雄性 | | | 0 mg/kg/天 | 5 mg/kg/天 | 10 mg/kg/天 |
|----------------|----|------|--------------|--------------|---------------|
| 相对于开始日期的天数 | | | | | |
| CHO (mg/dL) | -2 | 平均 | 109 | 162 | 147 |
| | | S.D. | 23 | 59 | 47 |
| | | N | 3 | 3 | 3 |
| | 15 | 平均 | 108 | 159 | 143 |
| | | S.D. | 24 | 46 | 34 |
| | | N | 3 | 3 | 3 |
| TG (mg/dL) | -2 | 平均 | 44 | 27 | 40 |
| | | S.D. | 24 | 12 | 2 |
| | | N | 3 | 3 | 3 |
| | 15 | 平均 | 35 | 29 | 34 |
| | | S.D. | 2 | 14 | 14 |
| | | N | 3 | 3 | 3 |
| PL (mg/dL) | -2 | 平均 | 180 | 236 | 220 |
| | | S.D. | 48 | 43 | 65 |
| | | N | 3 | 3 | 3 |
| | 15 | 平均 | 164 | 216 | 195 |
| | | S.D. | 31 | 52 | 40 |
| | | N | 3 | 3 | 3 |

图76

| 性别: 雄性 | | | 0 mg/kg/天 | 5 mg/kg/天 | 10 mg/kg/天 |
|---------------|----|------|--------------|--------------|---------------|
| 相对于开始日期的天数 | | | | | |
| IP (mg/dL) | -2 | 平均 | 5.16 | 5.14 | 5.00 |
| | | S.D. | 1.16 | 0.91 | 0.90 |
| | | N | 3 | 3 | 3 |
| | 15 | 平均 | 5.52 | 5.94 | 5.66 |
| | | S.D. | 0.61 | 0.61 | 0.94 |
| | | N | 3 | 3 | 3 |
| CA (mg/dL) | -2 | 平均 | 9.63 | 9.82 | 9.79 |
| | | S.D. | 0.59 | 0.55 | 0.19 |
| | | N | 3 | 3 | 3 |
| | 15 | 平均 | 9.45 | 9.48 | 9.31 |
| | | S.D. | 0.57 | 0.25 | 0.03 |
| | | N | 3 | 3 | 3 |
| NA (mEq/L) | -2 | 平均 | 152.8 | 154.5 | 153.9 |
| | | S.D. | 2.4 | 4.2 | 2.5 |
| | 15 | 平均 | 151.8 | 153.5 | 153.4 |
| | | S.D. | 3.3 | 2.0 | 3.3 |
| | | N | 3 | 3 | 3 |

图77

| 性别: 雄性 | | | 0 mg/kg/天 | 5 mg/kg/天 | 10 mg/kg/天 |
|---------------|----|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 相对于开始日期的天数 | | | | | |
| K (mEq/L) | -2 | 平均 S.D. N | 4.28 0.69 3 | 4.17 0.29 3 | 3.90 0.40 3 |
| | 15 | 平均 S.D. N | 3.99 0.50 3 | 4.09 0.18 3 | 3.85 0.14 3 |
| CL (mEq/L) | -2 | 平均 S.D. N | 112.3 2.2 3 | 111.1 3.9 3 | 110.7 2.6 3 |
| | 15 | 平均 S.D. N | 111.5 0.7 3 | 109.6 3.7 3 | 110.2 2.8 3 |
| TP (g/dL) | -2 | 平均 S.D. N | 7.20 0.59 3 | 7.36 0.42 3 | 7.53 0.22 3 |
| | 15 | 平均 S.D. N | 6.99 0.62 3 | 7.22 0.37 3 | 7.30 0.11 3 |

图78

| 性别: 雄性 | | | 0 mg/kg/天 | 5 mg/kg/天 | 10 mg/kg/天 |
|---------------|----|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 相对于开始日期的天数 | | | | | |
| ALB (g/dL) | -2 | 平均 S.D. N | 4.18 0.34 3 | 4.11 0.46 3 | 4.14 0.19 3 |
| | 15 | 平均 S.D. N | 4.09 0.36 3 | 3.98 0.47 3 | 3.88 0.17 3 |
| A/G | -2 | 平均 S.D. N | 1.39 0.06 3 | 1.27 0.19 3 | 1.22 0.04 3 |
| | 15 | 平均 S.D. N | 1.41 0.04 3 | 1.24 0.22 3 | 1.13 0.07 3 |

图79

| 性别：雄性 | | 动物 | | | 肿瘤坏死因子α (pg/mL) | | | 干扰素γ (pg/mL) | | | 白介素-1β (pg/mL) | | | 白介素-2 (pg/mL) | | | 白介素-4 (pg/mL) | | | | |
|---------------|--------|------|------|------|--------------------|------|------|-----------------|------|------|-------------------|------|------|------------------|------|------|------------------|------|------|------|------|
| 组别 | 编号 | 预试验 | 第3天 | 第8天 | 第15天 | 预试验 | 第3天 | 第8天 | 第15天 | 预试验 | 第3天 | 第8天 | 第15天 | 预试验 | 第3天 | 第8天 | 第15天 | 预试验 | 第3天 | 第8天 | 第15天 |
| 0 mg/kg/天 | CJ1M01 | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ |
| | CJ1M02 | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ |
| | CJ1M03 | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ |
| 5 mg/kg/天 | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. |
| | S.D. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. |
| | N | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 mg/kg/天 | CJ2M01 | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ |
| | CJ2M02 | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ |
| | CJ2M03 | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ |
| 20 mg/kg/天 | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. |
| | S.D. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. |
| | N | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 40 mg/kg/天 | CJ3M01 | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ |
| | CJ3M02 | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ |
| | CJ3M03 | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ |
| 80 mg/kg/天 | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. |
| | S.D. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. |
| | N | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

通用脚注：第8天：给药前
BLQ：低于量化的下限（白介素-4为4.9 pg/ml，其余为2.4 pg/ml）
当3只动物中的1只的血浆浓度为BLQ，计算其余2只动物的平均的值
当3只动物中的2只的血浆浓度为BLQ，平均的值被认为是N.C.
N.C.：未计算

性别：雄性

| 组别 | 动物 编号 | 白介素-6 (pg/mL) | | | | 白介素-8 (pg/mL) | | | | 白介素-10 (pg/mL) | | | | 白介素-12 (pg/mL) | | | |
|---------------|----------|------------------|------|--------------|------|------------------|---------|--------------|---------|-------------------|--------|--------------|------|-------------------|------|--------------|------|
| | | 预试验 | | 第3天 第8天 第15天 | | 预试验 | | 第3天 第8天 第15天 | | 预试验 | | 第3天 第8天 第15天 | | 预试验 | | 第3天 第8天 第15天 | |
| | | 第3天 | 第8天 | 第15天 | | 第3天 | 第8天 | 第15天 | | 第3天 | 第8天 | 第15天 | | 第3天 | 第8天 | 第15天 | |
| 0 mg/kg/天 | CJ1M01 | BLQ | 2.95 | BLQ | 3.34 | 4047.41 | 4861.65 | 7894.37 | 6783.89 | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ |
| | CJ1M02 | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | 3418.18 | 1382.07 | 6035.41 | 4096.95 | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ |
| | CJ1M03 | BLQ | 2.78 | BLQ | BLQ | 809.60 | 905.96 | 972.78 | 981.31 | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ |
| 5 mg/kg/天 | CJ2M01 | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | 2758.40 | 2383.23 | 4967.52 | 3954.05 | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. |
| | CJ2M02 | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | 1716.78 | 2159.54 | 3582.23 | 2903.93 | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. | N.C. |
| | CJ2M03 | BLQ | 2.91 | BLQ | BLQ | 2633.61 | 2388.95 | 4778.15 | 5266.00 | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ |
| 10 mg/kg/天 | CJ3M01 | BLQ | 5.26 | BLQ | BLQ | 8312.98 | 2753.66 | 7101.75 | 8973.45 | BLQ | BLQ | 19.41 | BLQ | BLQ | 3.41 | BLQ | 2.96 |
| | CJ3M02 | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | 7136.73 | 2722.78 | 9985.51 | 9298.79 | BLQ | 108.34 | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ |
| | CJ3M03 | BLQ | 2.41 | BLQ | BLQ | 5832.12 | 4900.91 | 8873.95 | 9812.62 | BLQ | 39.40 | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ |

通用脚注：第8天：给药前

BLQ：低于量化的下限（白介素-10为12.2 pg/ml，其余为2.4 pg/ml）

当3只动物中的1只的血浆浓度为BLQ，计算其余2只动物的平均的值

当3只动物中的2只的血浆浓度为BLQ，平均的值被认为N.C.

N.C.：未计算

1 [d-Test (d检测)：双边Dunnett (Dunnett 2 Sided) p < 0.05]

性别：雄性

| 组别 | 动物 编号 | 淋巴细胞中的比率 (%) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|----------|--------------|------|------|------|---------|------|------|------|---------|------|------|------|--------|-----|-----|------|------|------|------|------|------|
| | | T细胞 | | | | CD4 T细胞 | | | | CD8 T细胞 | | | | 调节性T细胞 | | | | | | | | |
| | | Pre | D3 | D8 | D15 | Pre | D3 | D8 | D15 | Pre | D3 | D8 | D15 | Pre | D3 | D8 | D15 | | | | | |
| 0 mg/kg/天 | CJIM01 | 49.2 | 57.1 | 57.0 | 53.3 | 28.0 | 34.9 | 34.6 | 32.9 | 15.1 | 15.3 | 16.0 | 13.5 | 1.3 | 1.5 | 1.6 | 38.4 | 33.5 | 34.4 | 37.1 | | |
| 5 mg/kg/天 | CJIM02 | 69.4 | 68.5 | 67.3 | 55.2 | 27.3 | 29.6 | 25.4 | 19.0 | 35.7 | 31.7 | 35.6 | 30.4 | 0.8 | 0.9 | 0.8 | 0.7 | 18.3 | 10.9 | 20.3 | 30.5 | |
| 5 mg/kg/天 | CJIM03 | 55.4 | 70.8 | 61.2 | 51.6 | 27.5 | 38.7 | 29.9 | 22.3 | 22.5 | 26.9 | 26.3 | 24.8 | 1.3 | 1.7 | 1.3 | 1.5 | 31.7 | 16.6 | 29.0 | 35.5 | |
| 平均 | | 58.0 | 65.5 | 61.8 | 53.4 | 27.6 | 34.4 | 30.0 | 24.7 | 24.4 | 24.6 | 26.0 | 22.9 | 1.1 | 1.4 | 1.2 | 1.3 | 29.5 | 20.3 | 27.9 | 34.4 | |
| S.D. | | 10.3 | 7.3 | 5.2 | 1.8 | 0.4 | 4.6 | 4.6 | 7.3 | 10.4 | 8.4 | 9.8 | 8.6 | 0.3 | 0.4 | 0.4 | 0.5 | 10.2 | 11.8 | 7.1 | 3.4 | |
| N | | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| 6 mg/kg/天 | | CJDM01 | 62.6 | 86.7 | 60.8 | 59.7 | 25.0 | 55.3 | 22.7 | 17.1 | 32.2 | 25.1 | 32.2 | 35.4 | 1.0 | 4.4 | 2.0 | 2.0 | 26.0 | 4.4 | 28.2 | 29.6 |
| 6 mg/kg/天 | | CJDM02 | 52.7 | 75.9 | 55.3 | 51.9 | 22.7 | 41.0 | 24.3 | 19.4 | 24.8 | 28.2 | 25.6 | 25.6 | 0.8 | 3.6 | 2.6 | 1.6 | 27.2 | 6.3 | 28.9 | 34.4 |
| 6 mg/kg/天 | | CJDM03 | 61.0 | 78.0 | 62.9 | 59.3 | 17.2 | 31.0 | 16.2 | 17.2 | 38.0 | 39.4 | 40.8 | 36.4 | 0.8 | 3.5 | 2.5 | 2.6 | 19.0 | 6.9 | 17.8 | 21.3 |
| 平均 | | 58.8 | 80.2 | 59.7 | 57.0 | 21.6 | 42.4 | 21.1 | 17.9 | 31.7 | 30.9 | 32.9 | 32.5 | 0.9 | 3.8 | 2.4 | 2.1 | 24.1 | 5.9 | 25.0 | 28.4 | |
| S.D. | | 5.3 | 5.7 | 3.9 | 4.4 | 4.0 | 12.2 | 4.3 | 1.3 | 6.6 | 7.5 | 7.6 | 6.0 | 0.1 | 0.5 | 0.3 | 0.5 | 4.4 | 1.3 | 6.2 | 6.6 | |
| N | | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| 10 mg/kg/天 | | CJBM01 | 69.3 | 80.8 | 73.6 | 69.8 | 15.2 | 32.7 | 18.3 | 18.0 | 43.8 | 34.8 | 45.4 | 44.1 | 0.8 | 4.1 | 3.0 | 2.5 | 17.1 | 6.5 | 14.1 | 15.1 |
| 10 mg/kg/天 | | CJBM02 | 65.2 | 86.4 | 65.4 | 66.0 | 18.4 | 28.4 | 13.7 | 16.6 | 39.0 | 48.8 | 42.1 | 37.3 | 0.6 | 2.8 | 1.6 | 1.9 | 16.0 | 3.8 | 14.8 | 15.3 |
| 10 mg/kg/天 | | CJBM03 | 70.2 | 89.7 | 76.8 | 74.0 | 19.2 | 46.7 | 23.8 | 28.2 | 44.9 | 33.8 | 44.9 | 37.5 | 1.0 | 7.6 | 4.6 | 5.9 | 17.5 | 3.0 | 10.6 | 16.5 |
| 平均 | | 68.2 | 85.6 | 71.9 | 69.9 | 17.6 | 35.9 | 18.6 | 20.9 | 42.6 | 39.1 | 44.1 | 39.6 | 0.8 | 4.8 | 3.1 | 3.4 | 16.9 | 4.4 | 13.2 | 15.6 | |
| S.D. | | 2.7 | 4.5 | 5.9 | 4.0 | 2.1 | 9.6 | 5.1 | 6.3 | 3.1 | 8.4 | 1.8 | 3.9 | 0.2 | 2.5 | 1.5 | 2.2 | 0.8 | 1.8 | 2.3 | 0.8 | |
| N | | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |

通用脚注：Pre：预实验 D3, D8和D15：(给药前) 第3、8天和第15天
1[d-T test (d检测)：双边Dunnett (Dunnett 2 Sided) p < 0.05] 2[dd-T test (dd检测)：双边Dunnett (Dunnett 2 Sided) p < 0.01]

性别：雄性

| 组别 | 动物 编号 | 淋巴细胞 (10 ³ /μL) | | 绝对计数(10 ³ /μL) | | | | | | | | | |
|---------------|----------|-------------------------------|-------|---------------------------|-------|----------|------|--------|------|-------|------|------|------|
| | | T 细胞 | | CD4 T 细胞 | | CD8 T 细胞 | | 调节性T细胞 | | NK 细胞 | | | |
| | | Pre | D15 | Pre | D15 | Pre | D15 | Pre | D15 | Pre | D15 | Pre | D15 |
| 0 mg/kg/天 | CJ1M01 | 7.40 | 5.60 | 3.64 | 2.98 | 2.07 | 1.84 | 1.12 | 0.76 | 0.10 | 0.09 | 2.84 | 2.08 |
| | CJ1M02 | 6.42 | 5.03 | 4.46 | 2.78 | 1.75 | 0.96 | 2.29 | 1.53 | 0.05 | 0.04 | 1.17 | 1.53 |
| | CJ1M03 | 3.94 | 3.77 | 2.18 | 1.95 | 1.08 | 0.84 | 0.89 | 0.93 | 0.05 | 0.06 | 1.25 | 1.34 |
| 平均 | | 5.92 | 4.80 | 3.43 | 2.57 | 1.63 | 1.21 | 1.43 | 1.07 | 0.07 | 0.06 | 1.75 | 1.65 |
| S.D. | | 1.78 | 0.94 | 1.15 | 0.55 | 0.51 | 0.55 | 0.75 | 0.40 | 0.03 | 0.03 | 0.94 | 0.38 |
| N | | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 5 mg/kg/天 | CJ2M01 | 5.01 | 9.42 | 3.14 | 5.62 | 1.25 | 1.61 | 1.61 | 3.33 | 0.05 | 0.19 | 1.30 | 2.79 |
| | CJ2M02 | 7.29 | 10.34 | 3.84 | 5.37 | 1.65 | 2.01 | 1.81 | 2.65 | 0.06 | 0.17 | 1.98 | 3.56 |
| | CJ2M03 | 5.32 | 9.63 | 3.25 | 5.71 | 0.92 | 1.66 | 2.02 | 3.51 | 0.04 | 0.25 | 1.01 | 2.05 |
| 平均 | | 5.87 | 9.80 | 3.41 | 5.57 | 1.27 | 1.76 | 1.81 | 3.16 | 0.05 | 0.20 | 1.43 | 2.80 |
| S.D. | | 1.24 | 0.48 | 0.38 | 0.18 | 0.37 | 0.22 | 0.21 | 0.45 | 0.01 | 0.04 | 0.50 | 0.76 |
| N | | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 10 mg/kg/天 | CJ3M01 | 8.38 | 13.41 | 5.81 | 9.36 | 1.27 | 2.41 | 3.67 | 5.91 | 0.07 | 0.34 | 1.43 | 2.02 |
| | CJ3M02 | 6.25 | 17.73 | 4.08 | 11.70 | 1.15 | 2.94 | 2.44 | 6.61 | 0.04 | 0.34 | 1.00 | 2.71 |
| | CJ3M03 | 3.32 | 5.01 | 2.33 | 3.71 | 0.64 | 1.41 | 1.49 | 1.88 | 0.03 | 0.30 | 0.58 | 0.83 |
| 平均 | | 5.98 | 12.05 | 4.07 | 8.26 | 1.02 | 2.25 | 2.53 | 4.80 | 0.05 | 0.33 | 1.00 | 1.85 |
| S.D. | | 2.54 | 6.47 | 1.74 | 4.11 | 0.33 | 0.78 | 1.09 | 2.55 | 0.02 | 0.02 | 0.43 | 0.95 |
| N | | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

通用脚注: Pre: 预实验 D15: 第15天

1[d-Test (d检测) : 双边Dunnett (Dunnett 2 Sided) p < 0.05] 2[dd-Test (dd检测) : 双边Dunnett (Dunnett 2 Sided) p < 0.01]

图83

性别：雄性

| 组别 | 动物 编号 | 相对于基线的比率 (预试验, %) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|----------|-------------------|------|------|------|---------|------|------|------|---------|------|------|------|--------|------|------|------|-------|------|------|------|
| | | T细胞 | | | | CD4 T细胞 | | | | CD8 T细胞 | | | | 调节性T细胞 | | | | NK 细胞 | | | |
| | | Pre | D3 | D8 | D15 | Pre | D3 | D8 | D15 | Pre | D3 | D8 | D15 | Pre | D3 | D8 | D15 | Pre | D3 | D8 | D15 |
| 0 mg/kg/天 | CJ1M01 | 1.00 | 1.16 | 1.16 | 1.08 | 1.00 | 1.25 | 1.24 | 1.18 | 1.00 | 1.01 | 1.06 | 0.89 | 1.00 | 1.15 | 1.15 | 1.23 | 1.00 | 0.87 | 0.90 | 0.97 |
| | CJ1M02 | 1.00 | 0.99 | 0.97 | 0.80 | 1.00 | 1.08 | 0.93 | 0.70 | 1.00 | 0.89 | 1.00 | 0.85 | 1.00 | 1.13 | 1.00 | 0.88 | 1.00 | 0.60 | 1.11 | 1.67 |
| | CJ1M03 | 1.00 | 1.28 | 1.10 | 0.93 | 1.00 | 1.41 | 1.09 | 0.81 | 1.00 | 1.20 | 1.17 | 1.10 | 1.00 | 1.31 | 1.00 | 1.15 | 1.00 | 0.52 | 0.91 | 1.12 |
| 平均 | | 1.00 | 1.14 | 1.08 | 0.94 | 1.00 | 1.25 | 1.09 | 0.90 | 1.00 | 1.03 | 1.08 | 0.95 | 1.00 | 1.20 | 1.05 | 1.09 | 1.00 | 0.66 | 0.97 | 1.25 |
| S.D. | | 0.00 | 0.15 | 0.10 | 0.14 | 0.00 | 0.17 | 0.16 | 0.25 | 0.00 | 0.16 | 0.09 | 0.13 | 0.00 | 0.10 | 0.09 | 0.18 | 0.00 | 0.18 | 0.12 | 0.37 |
| N | | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 5 mg/kg/天 | CJ2M01 | 1.00 | 1.38 | 0.97 | 0.95 | 1.00 | 2.21 | 0.91 | 0.68 | 1.00 | 0.78 | 1.00 | 1.10 | 1.00 | 4.40 | 2.00 | 2.00 | 1.00 | 0.17 | 1.08 | 1.14 |
| | CJ2M02 | 1.00 | 1.44 | 1.05 | 0.98 | 1.00 | 1.81 | 1.07 | 0.85 | 1.00 | 1.14 | 1.03 | 1.03 | 1.00 | 4.50 | 3.25 | 2.00 | 1.00 | 0.23 | 1.06 | 1.26 |
| | CJ2M03 | 1.00 | 1.28 | 1.03 | 0.97 | 1.00 | 1.80 | 0.94 | 1.00 | 1.00 | 1.04 | 1.07 | 0.96 | 1.00 | 4.38 | 3.13 | 3.25 | 1.00 | 0.36 | 0.94 | 1.12 |
| 平均 | | 1.00 | 1.37 | 1.02 | 0.97 | 1.00 | 1.94 | 0.97 | 0.84 | 1.00 | 0.99 | 1.03 | 1.03 | 1.00 | 4.43 | 2.79 | 2.42 | 1.00 | 0.25 | 1.03 | 1.17 |
| S.D. | | 0.00 | 0.08 | 0.04 | 0.02 | 0.00 | 0.23 | 0.09 | 0.16 | 0.00 | 0.19 | 0.04 | 0.07 | 0.00 | 0.06 | 0.69 | 0.72 | 0.00 | 0.10 | 0.08 | 0.08 |
| N | | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 10 mg/kg/天 | CJ3M01 | 1.00 | 1.17 | 1.06 | 1.01 | 1.00 | 2.15 | 1.20 | 1.18 | 1.00 | 0.79 | 1.04 | 1.01 | 1.00 | 5.13 | 3.75 | 3.13 | 1.00 | 0.38 | 0.82 | 0.88 |
| | CJ3M02 | 1.00 | 1.33 | 1.00 | 1.01 | 1.00 | 1.54 | 0.74 | 0.90 | 1.00 | 1.25 | 1.08 | 0.96 | 1.00 | 4.67 | 2.67 | 3.17 | 1.00 | 0.24 | 0.93 | 0.96 |
| | CJ3M03 | 1.00 | 1.28 | 1.09 | 1.05 | 1.00 | 2.43 | 1.24 | 1.47 | 1.00 | 0.75 | 1.00 | 0.84 | 1.00 | 7.60 | 4.60 | 5.90 | 1.00 | 0.17 | 0.61 | 0.94 |
| 平均 | | 1.00 | 1.26 | 1.05 | 1.02 | 1.00 | 2.04 | 1.06 | 1.18 | 1.00 | 0.93 | 1.04 | 0.94 | 1.00 | 5.80 | 3.67 | 4.07 | 1.00 | 0.26 | 0.79 | 0.93 |
| S.D. | | 0.00 | 0.08 | 0.05 | 0.02 | 0.00 | 0.46 | 0.28 | 0.29 | 0.00 | 0.28 | 0.04 | 0.09 | 0.00 | 1.58 | 0.97 | 1.59 | 0.00 | 0.11 | 0.16 | 0.04 |
| N | | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

通用脚注: Pre: 预实验 D3, D8和D15: (给药前) 第3、8天和第15天

1[d-Test (d检测) : 双边Dunnett (Dunnett 2 Sided) p < 0.05] 2[dd-Test (dd检测) : 双边Dunnett (Dunnett 2 Sided) p < 0.01]

图84

性别：雄性

| 组别 | 动物 编号 | 每种细胞类型中的比率 (%) | | | | | | | | | | | | K67+ NK细胞 | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|----------|----------------|------|------|------|--------------|------|------|------|-----------|------|------|------|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | K67+ CD4 T细胞 | | | | K67+ CD8 T细胞 | | | | K67+ Treg | | | | ICOS+ Treg | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | Pre | D3 | D8 | D15 | Pre | D3 | D8 | D15 | Pre | D3 | D8 | D15 | Pre | D3 | D8 | D15 | | | | | | | | | | | | |
| 0 mg/kg/天 | CJ1M01 | 9.6 | 7.6 | 9.1 | 10.3 | 9.3 | 5.8 | 7.7 | 7.9 | 6.3 | 5.8 | 7.2 | 9.2 | 30.6 | 23.4 | 23.2 | 28.5 | 40.6 | 37.5 | 38.2 | 7.0 | 19.0 | 16.3 | 9.6 | | | | | |
| | CJ1M02 | 10.9 | 8.2 | 7.6 | 10.0 | 7.5 | 7.1 | 7.3 | 10.7 | 11.7 | 7.3 | 6.5 | 7.5 | 14.7 | 16.8 | 28.0 | 24.4 | 13.8 | 13.6 | 24.7 | 20.3 | 23.3 | 17.6 | 25.4 | 20.6 | 9.6 | 11.2 | 8.5 | |
| | CJ1M03 | 10.1 | 7.2 | 12.6 | 16.8 | 7.5 | 5.3 | 7.2 | 15.1 | 12.3 | 8.2 | 17.2 | 16.6 | 34.5 | 24.1 | 28.7 | 46.8 | 29.4 | 20.1 | 25.5 | 38.2 | 40.8 | 29.5 | 32.1 | 46.2 | 15.4 | 15.7 | 39.9 | 25.4 |
| 5 mg/kg/天 | CJ2M01 | 10.4 | 16.9 | 40.5 | 30.5 | 9.6 | 13.3 | 16.2 | 15.2 | 10.2 | 21.5 | 53.3 | 34.4 | 40.4 | 41.9 | 68.9 | 62.0 | 35.5 | 33.4 | 51.5 | 45.2 | 49.5 | 42.4 | 57.0 | 52.0 | 8.6 | 27.8 | 54.1 | 45.3 |
| | CJ2M02 | 6.6 | 14.6 | 36.9 | 24.6 | 5.4 | 13.7 | 22.7 | 11.5 | 5.2 | 13.3 | 46.4 | 28.4 | 29.2 | 39.2 | 65.0 | 43.4 | 25.0 | 32.0 | 55.4 | 30.8 | 41.7 | 39.4 | 65.1 | 42.0 | 11.5 | 39.8 | 58.6 | 52.3 |
| | CJ2M03 | 9.9 | 13.4 | 48.9 | 31.6 | 11.7 | 11.7 | 28.6 | 17.2 | 8.1 | 13.4 | 54.6 | 36.3 | 39.4 | 28.2 | 61.7 | 49.8 | 32.3 | 22.8 | 40.4 | 25.3 | 39.4 | 28.4 | 45.6 | 28.1 | 8.4 | 13.1 | 57.1 | 45.5 |
| 10 mg/kg/天 | CJ3M01 | 9.1 | 21.7 | 57.2 | 29.5 | 8.9 | 23.1 | 35.7 | 13.3 | 7.5 | 17.9 | 63.2 | 32.5 | 35.3 | 51.8 | 68.3 | 47.4 | 32.4 | 38.3 | 54.5 | 31.2 | 48.8 | 47.4 | 67.9 | 44.2 | 12.7 | 34.2 | 57.8 | 44.0 |
| | CJ3M02 | 9.8 | 23.0 | 54.6 | 32.3 | 10.6 | 23.6 | 28.0 | 20.4 | 8.3 | 19.4 | 65.3 | 37.1 | 38.7 | 45.3 | 66.5 | 61.4 | 35.5 | 29.2 | 42.5 | 36.6 | 53.7 | 36.0 | 49.1 | 48.4 | 10.8 | 32.6 | 77.5 | 51.2 |
| | CJ3M03 | 11.4 | 20.8 | 51.0 | 32.9 | 12.3 | 16.8 | 32.8 | 18.4 | 9.6 | 23.7 | 56.5 | 36.9 | 41.9 | 39.2 | 68.8 | 54.5 | 37.6 | 28.7 | 51.3 | 22.0 | 52.6 | 33.4 | 58.0 | 27.9 | 6.0 | 12.6 | 42.2 | 24.0 |
| 20 mg/kg/天 | CJ4M01 | 12.1 | 3.1 | 1.8 | 1.7 | 3.8 | 3.9 | 3.7 | 1.1 | 3.0 | 4.6 | 2.6 | 3.3 | 6.3 | 1.2 | 7.0 | 2.6 | 5.4 | 6.2 | 7.4 | 2.6 | 7.4 | 9.4 | 10.8 | 3.5 | 12.0 | 17.7 | 14.1 | |
| | CJ4M02 | 10.1 | 21.8 | 54.3 | 31.6 | 10.6 | 21.2 | 32.2 | 17.4 | 8.5 | 20.3 | 61.7 | 35.5 | 38.6 | 45.4 | 67.9 | 54.4 | 35.2 | 32.1 | 49.4 | 29.9 | 51.7 | 38.9 | 58.3 | 40.2 | 9.8 | 26.5 | 59.2 | 39.7 |
| | CJ4M03 | 10.1 | 21.8 | 54.3 | 31.6 | 10.6 | 21.2 | 32.2 | 17.4 | 8.5 | 20.3 | 61.7 | 35.5 | 38.6 | 45.4 | 67.9 | 54.4 | 35.2 | 32.1 | 49.4 | 29.9 | 51.7 | 38.9 | 58.3 | 40.2 | 9.8 | 26.5 | 59.2 | 39.7 |

通用脚注：Pre：预实验 D3, D8和D15：(给药前) 第3、8天和第15天 Treg：调节性T细胞
 1 [dd-Test (dd检测)：双边Dunnett (Dunnett 2 Sided) p<0.01] 2[d-Test (d检测)：双边Dunnett (Dunnett 2 Sided) p<0.05]

| 组别 | 动物 编号 | 每种细胞类型的绝对计数 ($10^3/\mu\text{L}$) | | | | | | | | | | | |
|--|----------|------------------------------------|------|-----------------|------|-----------------|------|-------------|------|--------------------|------|-------------|------|
| | | Ki67 + T 细胞 | | Ki67 + CD4 T 细胞 | | Ki67 + CD8 T 细胞 | | Ki67 + Treg | | Ki67 + ICOS + Treg | | ICOS + Treg | |
| | | Pre | D15 | Pre | D15 | Pre | D15 | Pre | D15 | Pre | D15 | Pre | D15 |
| 0 mg/kg/天 | CJ1M01 | 0.35 | 0.31 | 0.19 | 0.15 | 0.07 | 0.03 | 0.03 | 0.02 | 0.05 | 0.03 | 0.20 | 0.20 |
| | CJ1M02 | 0.49 | 0.28 | 0.13 | 0.10 | 0.27 | 0.11 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.24 | 0.13 |
| | CJ1M03 | 0.22 | 0.33 | 0.08 | 0.13 | 0.11 | 0.15 | 0.02 | 0.03 | 0.01 | 0.02 | 0.03 | 0.19 |
| 5 mg/kg/天 | CJ2M01 | 0.33 | 1.71 | 0.12 | 0.24 | 0.16 | 1.15 | 0.02 | 0.12 | 0.02 | 0.09 | 0.02 | 0.10 |
| | CJ2M02 | 0.25 | 1.32 | 0.09 | 0.23 | 0.09 | 0.75 | 0.02 | 0.07 | 0.02 | 0.05 | 0.03 | 0.07 |
| | CJ2M03 | 0.32 | 1.80 | 0.11 | 0.29 | 0.16 | 1.27 | 0.02 | 0.12 | 0.01 | 0.06 | 0.02 | 0.07 |
| 10 mg/kg/天 | CJ3M01 | 0.66 | 3.08 | 0.16 | 0.44 | 0.35 | 2.18 | 0.03 | 0.19 | 0.03 | 0.07 | 0.04 | 0.09 |
| | CJ3M02 | 0.37 | 3.45 | 0.10 | 0.39 | 0.18 | 2.15 | 0.01 | 0.16 | 0.01 | 0.11 | 0.02 | 0.15 |
| | CJ3M03 | 0.23 | 1.20 | 0.07 | 0.29 | 0.12 | 0.70 | 0.01 | 0.18 | 0.01 | 0.11 | 0.02 | 0.15 |
| 平均 | | 0.30 | 1.61 | 0.11 | 0.25 | 0.14 | 1.06 | 0.02 | 0.10 | 0.02 | 0.07 | 0.02 | 0.08 |
| S.D. | | 0.04 | 0.26 | 0.02 | 0.03 | 0.04 | 0.27 | 0.00 | 0.03 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.08 |
| N | | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 通用脚注: Pre: 预实验 D15: 第15天 Treg: 调节性T细胞 1[d-TTest (d检测) : 双边Dunnett (Dunnett 2 Sided) p < 0.05] 2[dd-TTest (dd检测) : 双边Dunnett (Dunnett 2 Sided) p < 0.01] | | | | | | | | | | | | | |

性别：雄性

| 组别 | 动物 编号 | 相对于基线的比率 (预试验, %) | | | | | | | | | | | | K67 + NK细胞 | | | | | | | |
|---------------|----------|-------------------|------|------|------|------|------|---------------|------|------|------|------|------|------------|------|------|-------------------|------|------|------|------|
| | | K67 + CD4 T细胞 | | | | | | K67 + CD8 T细胞 | | | | | | K67 + Treg | | | K67 + ICOS + Treg | | | | |
| | | Pre | D3 | D8 | D15 | Pre | D3 | D8 | D15 | Pre | D3 | D8 | D15 | Pre | D3 | D8 | D15 | Pre | D3 | D8 | |
| 0 mg/kg/天 | CJIM01 | 1.00 | 0.79 | 0.95 | 1.07 | 1.00 | 0.62 | 0.83 | 0.85 | 1.00 | 0.92 | 1.14 | 1.46 | 1.00 | 0.76 | 0.78 | 0.76 | 1.00 | 0.73 | 0.71 | 0.74 |
| | CJIM02 | 1.00 | 0.75 | 0.70 | 0.92 | 1.00 | 0.95 | 0.97 | 1.43 | 1.00 | 0.62 | 0.56 | 0.64 | 1.00 | 1.14 | 1.90 | 1.66 | 1.00 | 0.99 | 1.79 | 1.47 |
| | CJIM03 | 1.00 | 0.71 | 1.25 | 1.66 | 1.00 | 0.71 | 0.96 | 2.01 | 1.00 | 0.67 | 1.40 | 1.35 | 1.00 | 0.70 | 0.83 | 1.36 | 1.00 | 0.68 | 0.87 | 1.30 |
| 5 mg/kg/天 | CJ2M01 | 1.00 | 1.63 | 3.89 | 2.93 | 1.00 | 1.39 | 1.69 | 1.58 | 1.00 | 2.11 | 5.23 | 3.37 | 1.00 | 1.04 | 1.71 | 1.53 | 1.00 | 0.94 | 1.45 | 1.27 |
| | CJ2M02 | 1.00 | 2.21 | 5.59 | 3.73 | 1.00 | 2.54 | 4.20 | 2.13 | 1.00 | 2.56 | 8.92 | 5.46 | 1.00 | 1.34 | 2.23 | 1.49 | 1.00 | 1.28 | 2.22 | 1.23 |
| | CJ2M03 | 1.00 | 1.35 | 4.94 | 3.19 | 1.00 | 1.00 | 2.44 | 1.47 | 1.00 | 1.65 | 6.74 | 4.48 | 1.00 | 0.72 | 1.57 | 1.26 | 1.00 | 0.71 | 1.25 | 0.78 |
| 10 mg/kg/天 | CJ3M01 | 1.00 | 1.73 | 4.81 | 3.28 | 1.00 | 1.64 | 2.78 | 1.73 | 1.00 | 2.11 | 6.96 | 4.44 | 1.00 | 1.03 | 1.84 | 1.43 | 1.00 | 0.98 | 1.64 | 1.09 |
| | CJ3M02 | 0.00 | 0.44 | 0.86 | 0.41 | 0.00 | 0.80 | 1.29 | 0.35 | 0.00 | 0.46 | 1.86 | 1.05 | 0.00 | 0.31 | 0.35 | 0.15 | 0.00 | 0.29 | 0.51 | 0.27 |
| | CJ3M03 | 1.00 | 2.35 | 5.57 | 3.30 | 1.00 | 2.23 | 2.64 | 1.92 | 1.00 | 2.34 | 7.87 | 4.47 | 1.00 | 1.17 | 1.72 | 1.59 | 1.00 | 0.82 | 1.20 | 1.03 |
| 20 mg/kg/天 | CJ4M01 | 1.00 | 2.18 | 5.44 | 3.14 | 1.00 | 2.07 | 3.11 | 1.64 | 1.00 | 2.40 | 7.40 | 4.21 | 1.00 | 1.19 | 1.76 | 1.41 | 1.00 | 0.92 | 1.41 | 0.86 |
| | CJ4M02 | 0.00 | 0.32 | 0.92 | 0.22 | 0.00 | 0.63 | 0.78 | 0.25 | 0.00 | 0.07 | 1.33 | 0.33 | 0.00 | 0.27 | 0.15 | 0.16 | 0.00 | 0.23 | 0.24 | 0.24 |
| | CJ4M03 | 1.00 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |

通用脚注：Pre：预实验 D3, D8和D15：（给药前）第3、8天和第15天 Treg：调节性T细胞
1[dd-Test (d检验)：双边Dunnett (Dunnett 2 Sided) p < 0.05] 2[dd-Test (dd检验)：双边Dunnett (Dunnett 2 Sided) p < 0.01]

天数：相对于开始日期第15天

| 性别：雄性 | | 0 mg/kg/天 | 5 mg/kg/天 | 10 mg/kg/天 |
|-----------|------|--------------|--------------|----------------------|
| 肝脏 (g) | 平均 | 41.5 | 42.7 | 42.1 |
| | S.D. | 0.9 | 7.1 | 5.6 |
| | N | 3 | 3 | 3 |
| 肝脏 (%) | 平均 | 1.73 | 1.68 | 1.86 |
| | S.D. | 0.09 | 0.10 | 0.18 |
| | N | 3 | 3 | 3 |
| 脾脏 (g) | 平均 | 1.727 | 3.358 | 3.886 d ¹ |
| | S.D. | 0.520 | 0.758 | 1.087 |
| | N | 3 | 3 | 3 |
| 脾脏 (%) | 平均 | 0.072 | 0.132 | 0.171 d ¹ |
| | S.D. | 0.023 | 0.025 | 0.040 |
| | N | 3 | 3 | 3 |
| 胰腺 (g) | 平均 | 4.27 | 4.27 | 3.24 |
| | S.D. | 0.54 | 1.20 | 0.38 |
| | N | 3 | 3 | 3 |

图88

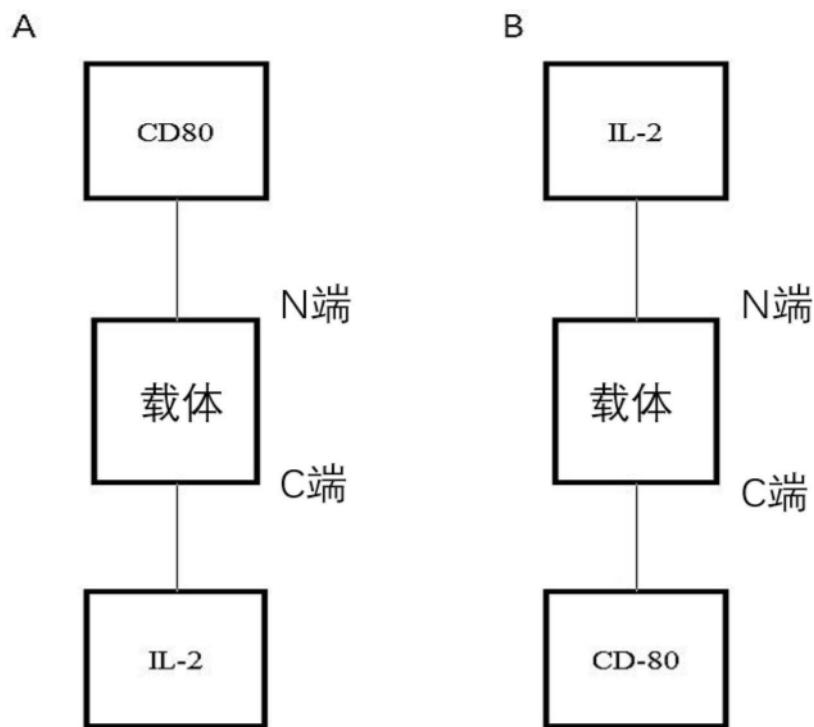


图89