(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119233980 A
(43)申请公布日 2024.12.31

(21)申请号 202380038425.9
(22)申请日 2023.04.12
(30)优先权数据
10-2022-0054766 2022.05.03 KR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.11.04
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2023/004936 2023.04.12
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/214705 KO 2023.11.09
(71)申请人 高丽大学校产学协力团
地址 韩国首尔
(72)发明人 郑相泽 河志妍
(74)专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283
专利代理师 水文钰 王卫彬
(51)Int.Cl.
C07K 14/47(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61K 38/00(2006.01)
G01N 33/574(2006.01)

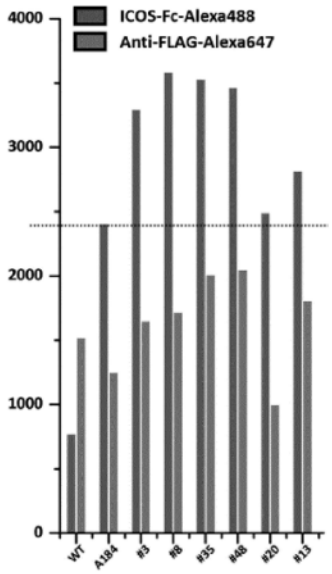
权利要求书3页 说明书26页
序列表（电子公布） 附图24页

(54)发明名称

与ICOS的结合力得到提高的ICOS-L变异体

(57)摘要

本发明涉及与ICOS的结合力得到增大的ICOS-L变异体,与野生型ICOS-L及以往的ICOS-L变异体相比,本发明的ICOS-L变异体具有显著增加的与ICOS的结合力(~约100倍),与作为巨大分子的IgG抗体相比,大小显著小,易于侵入肿瘤微环境,易于生产,易于通过与多种免疫治疗剂的融合来应用为治疗剂及成像分子,可以在癌症治疗及诊断中有效使用。



CN 119233980 A

1.一种ICOS-L变异体,其特征在于,选自由野生型ICOS-L的氨基酸序列中的第4位、第51位、第52位、第54位、第57位、第74位、第130位及低234位氨基酸组成的组中的一个以上氨基酸被与野生型氨基酸不同的序列取代。

2.根据权利要求1所述的ICOS-L变异体,其特征在于,野生型ICOS-L的氨基酸包含序列1的氨基酸序列。

3.根据权利要求1所述的ICOS-L变异体,其特征在于,包含选自由E4D、Q51P、Q51H、、N52S、S54N、N57H、L74R、S130C及K234R组成的组中的一种以上氨基酸取代。

4.根据权利要求1所述的ICOS-L变异体,其特征在于,包含Q51P及N57H的氨基酸取代。

5.根据权利要求1所述的ICOS-L变异体,其特征在于,包含Q51H、S54N及S130C的氨基酸取代。

6.根据权利要求1所述的ICOS-L变异体,其特征在于,包含N52S及K234R的氨基酸取代。

7.根据权利要求1所述的ICOS-L变异体,其特征在于,包含E4D及Q51P的氨基酸取代。

8.根据权利要求1所述的ICOS-L变异体,其特征在于,包含Q51P及L74R的氨基酸取代。

9.根据权利要求1所述的ICOS-L变异体,其特征在于,还包含跨膜结构域。

10.根据权利要求9所述的ICOS-L变异体,其特征在于,还包含与跨膜结构域连接的细胞质信号传导结构域。

11.一种免疫调节蛋白,其特征在于,包含权利要求1所述的ICOS-L变异体及免疫球蛋白的Fc结构域或其变异体。

12.根据权利要求11所述的免疫调节蛋白,其特征在于,Fc结构域变异体在野生型人IgG1的Fc结构域中包含一个以上的氨基酸取代。

13.根据权利要求11所述的免疫调节蛋白,其特征在于,Fc结构域变异体为与野生型人IgG1的Fc相比表现出效应功能降低的Fc结构域变异体。

14.根据权利要求11所述的免疫调节蛋白,其特征在于,Fc结构域变异体为野生型人IgG1的Fc结构域中根据Kabat编号系统编号的第234位、第235位或第329位氨基酸被与野生型氨基酸不同的序列取代的Fc结构域变异体。

15.根据权利要求11所述的免疫调节蛋白,其特征在于,Fc结构域变异体包含L234A、L235A及P329G的氨基酸取代。

16.一种偶联物,其特征在于,包含权利要求1所述的ICOS-L变异体或权利要求11所述的免疫调节蛋白及靶向部分。

17.根据权利要求16所述的偶联物,其特征在于,靶向部分与免疫细胞表面的分子特异性结合。

18.根据权利要求17所述的偶联物,其特征在于,免疫细胞为抗原呈递细胞或淋巴细胞。

19.根据权利要求16所述的偶联物,其特征在于,靶向部分为与肿瘤表面的分子结合的肿瘤定位部分。

20.根据权利要求16所述的偶联物,其特征在于,靶向部分为抗体或具有其免疫活性的片段。

21.根据权利要求20所述的偶联物,其特征在于,抗体为西妥昔单抗、帕尼单抗、扎鲁木单抗、伊诺珠单抗、曲妥珠单抗、ado-曲妥珠单抗、emtansine、托西莫单抗、利妥昔单抗、替

伊莫单抗、达利珠单抗、吉妥珠单抗、阿仑单抗、CEA扫描Fab片段、OC125单克隆抗体、ab75705、B72.3、贝伐珠单抗、阿法替尼、阿西替尼、博舒替尼、卡博替尼、塞瑞替尼、克唑替尼、达拉非尼、达沙替尼、地努妥昔单抗、厄洛替尼、依维莫司、依鲁替尼、伊马替尼、拉帕替尼、乐伐替尼、尼洛替尼、奥拉帕尼、奥拉单抗、帕博西尼、帕唑帕尼、帕妥珠单抗、雷莫芦单抗、瑞戈非尼、鲁索替尼、索拉非尼、舒尼替尼、替西罗莫司、曲美替尼、凡德他尼、维罗非尼、维莫德吉、巴利昔单抗、伊匹单抗、纳武单抗、派姆单抗、MPDL3280A、匹迪利珠单抗、AMP-224、MSB001078C、MEDI4736、BMS-935559、LY3300054、阿替利珠单抗、阿维鲁单抗或杜瓦鲁单抗。

22.一种T细胞激活剂,其特征在于,包含权利要求1所述的ICOS-L变异体、权利要求11所述的免疫调节蛋白或权利要求16所述的偶联物。

23.根据权利要求22所述的T细胞激活剂,其特征在于,T细胞为细胞毒性T细胞或嵌合抗原受体T细胞。

24.一种多核苷酸,其特征在于,包含编码权利要求9所述的ICOS-L变异体的核酸及编码重组抗原受体的一条以上链的一种以上核酸。

25.根据权利要求24所述的多核苷酸,其特征在于,重组抗原受体为嵌合抗原受体或工程T细胞受体。

26.一种工程细胞,其特征在于,包含权利要求1所述的ICOS-L变异体、权利要求11所述的免疫调节蛋白或权利要求16所述的偶联物。

27.根据权利要求26所述的工程细胞,其特征在于,还包含嵌合抗原受体或工程T细胞受体。

28.一种抗癌辅助剂,其特征在于,包含权利要求1所述的ICOS-L变异体、权利要求11所述的免疫调节蛋白、权利要求16所述的偶联物或权利要求26所述的工程细胞。

29.根据权利要求28所述的抗癌辅助剂,其特征在于,上述抗癌辅助剂为增进免疫检查点抑制剂的抗癌效果的免疫抗癌辅助剂。

30.根据权利要求28所述的抗癌辅助剂,其特征在于,上述抗癌辅助剂与免疫检查点抑制剂同时、单独或依次联合给药。

31.根据权利要求29所述的抗癌辅助剂,其特征在于,免疫检查点抑制剂为抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗CTLA-4抗体或它们的变异体。

32.一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,其特征在于,包含权利要求1所述的ICOS-L变异体、权利要求11所述的免疫调节蛋白、权利要求16所述的偶联物或权利要求26所述的工程细胞作为有效成分。

33.根据权利要求32所述的用于预防或治疗癌症的药物组合物,其特征在于,癌症为选自由脑肿瘤、黑色素瘤、骨髓瘤、非小细胞肺癌、口腔癌、肝癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、宫颈癌、卵巢癌、大肠癌、小肠癌、直肠癌、输卵管癌、肛周癌、子宫内膜癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、食管癌、淋巴结癌、膀胱癌、胆囊癌、内分泌腺癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、慢性或急性白血病、淋巴细胞淋巴瘤、肾或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统肿瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、脊髓肿瘤、脑干神经胶质瘤及脑垂体腺瘤组成的组中的一种以上。

34.一种癌症诊断用组合物,其特征在于,包含权利要求1所述的ICOS-L变异体、权利要

求11所述的免疫调节蛋白、权利要求16所述的偶联物或权利要求26所述的工程细胞。

35.根据权利要求34所述的癌症诊断用组合物,其特征在于,还包含选自由显色酶、放射性同位素、生色团、发光物质及荧光物质组成的组中的一种。

36.一种提供用于诊断癌症的信息的方法,其特征在于,包括:

步骤a),使从对象中分离的生物试样与权利要求34所述的癌症诊断用组合物接触;

步骤b),确认试样中ICOS的表达;以及

步骤c),与正常对照组试样中ICOS的表达进行比较。

37.一种对免疫检查点抑制剂的治疗反应性预测或预后诊断方法,其特征在于,包括使用权利要求1所述的ICOS-L变异体、权利要求11所述的免疫调节蛋白、权利要求16所述的偶联物或权利要求26所述的工程细胞确认从处理免疫检查点抑制剂的对象中分离的生物试样中ICOS的表达量的步骤。

38.一种权利要求1所述的ICOS-L变异体、权利要求11所述的免疫调节蛋白、权利要求16所述的偶联物或权利要求26所述的工程细胞在预防或治疗癌症中的用途。

39.一种癌症的治疗方法,其特征在于,包括以药学上有效的量向患有癌症的个体给药权利要求1所述的ICOS-L变异体、权利要求11所述的免疫调节蛋白、权利要求16所述的偶联物或权利要求26所述的工程细胞的步骤。

与ICOS的结合力得到提高的ICOS-L变异体

技术领域

[0001] 本发明涉及与ICOS的结合力得到增大的ICOS-L(T-细胞可诱导共刺激分子-配体)变异体。

背景技术

[0002] 用于癌症治疗的药品大体分为低分子药品和高分子药品,与没有特异性而副作用相对大的低分子药品相比,具有特异性的高分子药品作为治疗剂而备受关注。为了逃避通过免疫细胞的杀伤作用机制,癌细胞在细胞表面表达正常细胞抑制免疫细胞激活时利用的免疫检查点(immune checkpoint)蛋白,近来,作为用于治疗癌症的方法,有关免疫检查点抑制蛋白的研究正活跃地进行着。据报告,表现出对免疫检查点抑制剂的反应的患者在治疗过程中的副作用少,与以往的抗癌剂相比,对多种癌症具有优秀的治疗效果,因此其利用呈爆发式增长,但仍有一半以上的患者对临床上得到认可的免疫检查点抑制剂没有反应,一部分初期反应者在治疗后仍观测到重新引起癌症恶化的耐药性。对于免疫检查点抑制剂的耐药性原因随患者的肿瘤免疫学特性的不同而不同,因此,为了有效的治疗以及节减治疗费用,需要能够筛选适合治疗的患者的新型生物标记物,据报告,在许多临床前及临床研究病理中,利用免疫刺激药物的联合治疗方法提高患者的反应率,因此,还需要有效的免疫刺激治疗剂。

[0003] 最近,随着抑制细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4,Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4)、程序性细胞死亡蛋白-1(PD-1,Programmed Cell Death Protein 1)等免疫检查点蛋白的作用的多种抗体治疗剂的开发,它们的临床需要呈爆发式增长,因此,预计免疫检查点抑制剂市场将在2020年到2027年以平均每年21.8%的增速持续成长。然而,由于抗体为分子量为150000的巨大分子蛋白质,难以侵入癌组织内部,因此,具有难以抑制肿瘤微环境(tumor micro-environment)内部肿瘤细胞与免疫细胞的免疫检查点蛋白的作用的缺点。为了更为有效的治疗,对于大小比抗体小得多且易于侵入癌组织内部的蛋白质治疗剂的需求日益抬头。

[0004]]另一方面,作为用于T细胞激活的共刺激受体的可诱导共刺激分子(ICOS,Inducible Co-Stimulator)为激活T细胞对外部抗原的反应的T细胞特异性共刺激分子,据报告,与多种癌症的治疗预后相关,揭示其不仅能够用作用于免疫刺激的治疗剂,还具有用作用于预测免疫检查点抑制剂治疗反应的生物标记物的可能性。为了观测存在于肿瘤微环境中的T细胞,需要利用放射性同位素的实时成像或分离癌组织后通过染色的ICOS表达与否的检验,优选地,使用大小比巨大分子的抗体小很多且易于侵入癌组织的小蛋白分子。并且,ICOS靶向物质作为与免疫检查点抑制剂的联合治疗剂的功效也得到验证,从通过促进ICOS的活性来进一步激活在癌细胞杀灭中起到非常重要的作用的细胞毒性T细胞或通过杀灭表达ICOS的调节T细胞来诱导抗癌功效的两个层面出发来进行治疗剂的开发研究。然而,野生型ICOS-L对ICOS具有非常低的亲和力(平衡解离常数＝～700nM),因此具有难以利用的问题。

发明内容

[0005] 技术问题

[0006] 本发明的目的在于,提供ICOS-L变异体。

[0007] 并且,本发明的目的在于,提供包含上述ICOS-L变异体的免疫调节蛋白。

[0008] 并且,本发明的目的在于,提供包含上述ICOS-L变异体的偶联物。

[0009] 并且,本发明的目的在于,提供T细胞激活剂。

[0010] 并且,本发明的目的在于,提供工程细胞。

[0011] 并且,本发明的目的在于,提供抗癌辅助剂。

[0012] 并且,本发明的目的在于,提供用于治疗或预防癌症的药物组合物。

[0013] 并且,本发明的目的在于,提供癌症诊断用组合物。

[0014] 并且,本发明的目的在于,提供提供用于诊断癌症的信息的方法。

[0015] 并且,本发明的目的在于,提供对免疫检查点抑制剂的治疗反应性预测或预后诊断方法。

[0016] 并且,本发明的目的在于,提供ICOS-L变异体、免疫调节蛋白、偶联物或工程细胞在预防或治疗癌症中的用途。

[0017] 同时,本发明的目的在于,提供癌症的治疗方法。

[0018] 技术方案

[0019] 为了实现上述目的,本发明提供与ICOS的结合力得到增大的ICOS-L变异体。

[0020] 并且,本发明提供包含上述ICOS-L变异体及免疫球蛋白的Fc结构域或其变异体的免疫调节蛋白。

[0021] 并且,本发明提供包含上述ICOS-L变异体或免疫调节蛋白及靶向部分的偶联物。

[0022] 并且,本发明包含上述ICOS-L变异体、免疫调节蛋白或偶联物的T细胞激活剂。

[0023] 并且,本发明提供包含上述ICOS-L变异体、免疫调节蛋白或偶联物的工程细胞。

[0024] 并且,本发明提供包含上述ICOS-L变异体、免疫调节蛋白、偶联物或工程细胞的抗癌辅助剂。

[0025] 并且,本发明提供包含上述ICOS-L变异体、免疫调节蛋白、偶联物或工程细胞的用于治疗或预防癌症的药物组合物。

[0026] 并且,本发明提供包含上述ICOS-L变异体、免疫调节蛋白、偶联物或工程细胞的癌症诊断用组合物。

[0027] 并且,本发明提供提供用于诊断癌症的信息的方法。

[0028] 并且,本发明提供对免疫检查点抑制剂的治疗反应性预测或预后诊断方法。

[0029] 并且,本发明提供ICOS-L变异体、免疫调节蛋白、偶联物或工程细胞在预防或治疗癌症中的用途。

[0030] 同时,本发明提供癌症的治疗方法,包括以药学上有效的量向患有癌症的个体给药ICOS-L变异体、免疫调节蛋白、偶联物或工程细胞的步骤。

[0031] 发明的效果

[0032] 与野生型ICOS-L及以往的ICOS-L变异体相比,本发明的ICOS-L变异体具有显著增加的与ICOS的结合力(~约100倍),与作为巨大分子的IgG抗体相比,大小显著小,易于侵入肿瘤微环境,易于生产,易于通过与多种免疫治疗剂的融合来应用为治疗剂及成像分子,可

以在癌症治疗及诊断中有效使用。

附图说明

[0033] 图1为示出ICOS-Fc蛋白的表达载体及纯化的蛋白质的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶照片的图。

[0034] 图2为通过酶联免疫吸附测定(ELISA)分析纯化的ICOS-Fc与野生型ICOS-L的结合力的图。PD-L1 WT:阴性对照组。

[0035] 图3为示出用于选择ICOS-L展示方法的流式细胞分析结果的图。

[0036] 图4为示出分析构建的初始文库的氨基酸序列的结果的图。

[0037] 图5为示出使用流式细胞仪检验随着筛选进行过程的文库扩增的结果的图。

[0038] 图6为示出利用流式细胞仪分析ICOS-L变异体与ICOS的结合力的结果的图。

[0039] 图7为示出野生型ICOS-L、对照组A184以及表达及纯化的本发明中发掘的6种ICOS-L变异体(Y3、Y8、Y13、Y20、Y35及Y48)的SDS-PAGE凝胶照片的图。

[0040] 图8为通过酶联免疫吸附测定分析野生型ICOS-L、对照组A184以及本发明中发掘的6种ICOS-L变异体的ICOS结合力的图。

[0041] 图9为示出为了Y8变异体的关键突变分析而表达及纯化的ICOS-L变异体(Y8_P51Q及Y8_H57N)的SDS-PAGE凝胶照片的图。

[0042] 图10为通过酶联免疫吸附测定分析野生型ICOS-L、对照组A184、Y8变异体、Y8_P51Q变异体及Y8_H57N变异体与ICOS的结合力的图。

[0043] 图11示出使用Octet来测定野生型ICOS-L、对照组A184、Y8变异体、Y8_P51Q变异体及Y8_H57N变异体的传感图。

[0044] 图12示出使用Octet来测定野生型ICOS-L、对照组A184、Y8变异体、Y8_P51Q变异体及Y8_H57N变异体的KD值。

[0045] 图13为示出纯化的ICOS单一蛋白的SDS-PAGE凝胶照片的图。

[0046] 图14为示出与表达及纯化的Fc融合的野生型ICOS-L、A184及本发明的变异体(Y8及Y8_H57N)蛋白的SDS-PAGE凝胶照片的图。

[0047] 图15为通过酶联免疫吸附测定分析表达及纯化的ICOS-L-Fc(野生型-Fc、A184-Fc、Y8-Fc及Y8_H57N-Fc)与野生型ICOS的结合力的图。

[0048] 图16为示出使用流式细胞仪检验PD-L1-Fc及ICOS-L-Fc(野生型-Fc、A184-Fc、Y8-Fc及Y8_H57N-Fc)诱导的T细胞分化程度的结果的图。

[0049] 图17为示出通过酶联免疫吸附测定检验PD-L1-Fc及ICOS-L-Fc(野生型-Fc、A184-Fc、Y8-Fc及Y8_H57N-Fc)诱导的T细胞的γ-干扰素分泌量的结果的图。

[0050] 图18为示出向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗(ATZ)的SDS-PAGE凝胶照片。

[0051] 图19为示出野生型ICOS-L、ICOS-L A184变异体或本发明的ICOS-L变异体(Y8及Y8_H57N)蛋白与向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗的重链融合的蛋白质(融合在抗体的ICOS-L)的SDS-PAGE凝胶照片的图。

[0052] 图20为示出野生型ICOS-L、ICOS-L A184变异体或本发明的ICOS-L变异体(Y8及Y8_H57N)蛋白与向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗的轻链融合的蛋白质(融合在

抗体的ICOS-L)的SDS-PAGE凝胶照片的图。

[0053] 图21为通过酶联免疫吸附测定分析野生型ICOS-L、ICOS-L A184变异体或本发明的ICOS-L变异体(Y8及Y8_H57N)与阿替利珠单抗的重链融合的蛋白与野生型ICOS的结合力的图。ATZ:向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗;ATZ(H)-Wild-type:野生型ICOS-L与向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗的重链融合的蛋白;ATZ(H)-A184:ICOS-L A184变异体与向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗的重链融合的蛋白;ATZ(H)-Y8:ICOS-L Y8变异体与向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗的重链融合的蛋白;以及ATZ(H)-Y8_H57N:ICOS-L Y8_H57N变异体与向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗的重链融合的蛋白。

[0054] 图22通过酶联免疫吸附测定分析野生型ICOS-L、ICOS-L A184变异体或本发明的ICOS-L变异体(Y8及Y8_H57N)与阿替利珠单抗的轻链融合的蛋白与野生型ICOS的结合力的图。ATZ:向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗;ATZ(L)-Wild-type:野生型ICOS-L与向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗的轻链融合的蛋白;ATZ(L)-A184:ICOS-L A184变异体与向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗的轻链融合的蛋白;ATZ(L)-Y8:ICOS-L Y8变异体与向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗的轻链融合的蛋白;以及ATZ(L)-Y8_H57N:ICOS-L Y8_H57N变异体与向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗的轻链融合的蛋白。

[0055] 图23为示出使用流式细胞仪检验由在阿替利珠单抗的重链融合野生型ICOS-L、ICOS-L A184变异体或本发明的ICOS-L变异体(Y8及Y8_H57N)的蛋白(50nM)诱导的T细胞分化程度的结果的图。ATZ:向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗;ATZ(H)-Wild-type:野生型ICOS-L与向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗的重链融合的蛋白;ATZ(H)-A184:ICOS-L A184变异体与向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗的重链融合的蛋白;ATZ(H)-Y8:ICOS-L Y8变异体与向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗的重链融合的蛋白;以及ATZ(H)-Y8_H57N:ICOS-L Y8_H57N变异体与向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗的重链融合的蛋白。

[0056] 图24为示出使用流式细胞仪检验由野生型ICOS-L、ICOS-L A184变异体或本发明的ICOS-L变异体(Y8及Y8_H57N)与阿替利珠单抗的轻链融合的蛋白(50nM)诱导的T细胞分化程度的结果的图。ATZ:向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗;ATZ(L)-Wild-type:野生型ICOS-L与向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗的轻链融合的蛋白;ATZ(L)-A184:ICOS-L A184变异体与向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗的轻链融合的蛋白;ATZ(L)-Y8:ICOS-L Y8变异体与向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗的轻链融合的蛋白;以及ATZ(L)-Y8_H57N:ICOS-L Y8_H57N变异体与向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗的轻链融合的蛋白。

[0057] 图25为示出通过酶联免疫吸附测定检验由在阿替利珠单抗的重链融合野生型ICOS-L、ICOS-L A184变异体或本发明的ICOS-L变异体(Y8及Y8_H57N)的蛋白(100nM)诱导的T细胞的γ-干扰素分泌量的结果的图。ATZ(H)-Wild-type:野生型ICOS-L与向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗的重链融合的蛋白;ATZ(H)-A184:ICOS-L A184变异体向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗的重链融合的蛋白;ATZ(H)-Y8:ICOS-L Y8变异体与向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗的重链融合的的蛋白;以及ATZ(H)-Y8_

H57N:在向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗的重链融合有ICOS-L Y8_H57N变异体的蛋白。

[0058] 图26为示出通过酶联免疫吸附测定检验由在阿替利珠单抗的轻链融合野生型ICOS-L、ICOS-L A184变异体或本发明的ICOS-L变异体(Y8及Y8_H57N)的蛋白(100nM)诱导的T细胞的γ-干扰素分泌量的结果的图。ATZ:向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗;ATZ(L)-Wild-type:野生型ICOS-L与向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗的轻链融合的蛋白;ATZ(L)-A184:ICOS-L A184变异体与向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗的轻链融合的蛋白;ATZ(L)-Y8:ICOS-L Y8变异体与向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗的轻链融合的蛋白;以及ATZ(L)-Y8_H57N:ICOS-L Y8_H57N变异体与向Fc结构域导入LALAPG突变的阿替利珠单抗的轻链融合的蛋白。

具体实施方式

[0059] 以下,参照附图通过本发明的实例详细说明本发明。但是,下述实例仅为本发明的例示,当判断对本发明所属技术领域的普通技术人员来说主旨鲜明的技术或结构的具体说明有可能不必要地混淆本发明的要旨时,可以省略其详细说明,但本发明不以此为限定。本发明可以在随附的发明要求保护范围的记载以及由此解释的同等范畴内具有多种变形及应用。

[0060] 并且,本说明书中使用的术语(terminology)为用来适当表达本发明的优选实施例的术语,可以根据使用人员、运用人员的意图或本发明所属技术领域的惯例等的不同而不同。因此,这些术语应基于本说明书全文的内容来下定义。在说明书全文中,当提及某部分“包含”某结构要素时,若无特别反对的记载,则表示还可以包含其他结构要素,而不是排除其他结构要素。

[0061] 若无其他定义,则本发明中使用的所有技术术语以本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解的含义来使用。并且,本说明书中虽记载优选的方法或试样,但与之相似或同等的也包括在本发明的范畴内。本说明书中以参考文献来记载的所有刊物的内容都并入在本发明中。

[0062] 在本所明书全文中,对于天然存在的氨基酸,使用通常的单个字母或三字母的缩写,不仅如此,对于α-氨基异丁酸(Aib)、N-甲基甘氨酸(Sar,N-methylglycine)等其他氨基酸,也使用通常可接受的三字母缩写。并且,本发明中以缩写来提及的氨基酸根据如下IUPAC-IUB命名法来记载。

[0063] 丙氨酸:A,精氨酸:R,天冬酰胺:N,天冬氨酸:D,半胱氨酸:C,谷氨酸:E,谷氨酰胺:Q,甘氨酸:G,组氨酸:H,异亮氨酸:I,亮氨酸:L,赖氨酸:K,甲硫氨酸:M,苯丙氨酸:F,脯氨酸:P,丝氨酸:S,苏氨酸:T,色氨酸:W,酪氨酸:Y及缬氨酸:V。

[0064] 在一实施方式中,本发明涉及ICOS-L变异体,其中,选自由野生型(Wild type)T-细胞可诱导共刺激分子-配体(ICOS-L,Inducible Co-Stimulator-ligand)的氨基酸序列中的第4位、第51位、第52位、第54位、第57位、第74位、第130位及低234位氨基酸组成的组中的一个以上氨基酸被与野生型氨基酸不同的序列取代。

[0065] 在一实例中,与野生型ICOS-L相比,上述ICOS-L变异体可以增大与ICOS的结合力。

[0066] 在一实例中,野生型ICOS-L的氨基酸可以包含序列1的氨基酸序列,上述氨基酸位

置能够以序列1的氨基酸序列为基准。

[0067] 在一实例中,ICOS-L变异体可以由相对于序列1的氨基酸序列至少示出90％、91％％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％的序列同源性的氨基酸序列构成。

[0068] 在一实例中,本发明的ICOS-L变异体可以包含选自由E4D、Q51P、Q51H、N52S、S54N、N57H、L74R、S130C及K234R组成的组中的一种以上氨基酸取代,可以因此而增大与ICOS的结合力。

[0069] 在一实例中,本发明的ICOS-L变异体可以包含氨基酸取代N57H,可以为包含序列2的氨基酸序列的变异体Y8_P51Q。

[0070] 在一实例中,本发明的ICOS-L变异体可以包含氨基酸取代Q51P,可以为包含序列3的氨基酸序列的变异体Y8_H51N。

[0071] 在一实例中,本发明的ICOS-L变异体可以包含氨基酸取代Q51P及N57H,可以为包含序列4的氨基酸序列的变异体Y8。

[0072] 在一实例中,本发明的ICOS-L变异体可以包含氨基酸取代Q51H、S54N及S130C,可以为包含序列5的氨基酸序列的变异体Y13。

[0073] 在一实例中,本发明的ICOS-L变异体可以包含氨基酸取代N52S及K234R,可以为包含序列6的氨基酸序列的变异体Y20。

[0074] 在一实例中,本发明的ICOS-L变异体可以包含氨基酸取代E4D及Q51P,可以为包含序列7的氨基酸序列的变异体Y35。

[0075] 在一实例中,本发明的ICOS-L变异体可以包含氨基酸取代Q51P及L74R,可以为包含序列8的氨基酸序列的变异体Y48。

[0076] 在一实例中,本发明的ICOS-L变异体还可以包含跨膜结构域。

[0077] 在一实例中,本发明的ICOS-L变异体还可以包含连接在跨膜结构域的细胞质信号传导结构域。

[0078] 在一实例中,本发明的ICOS-L变异体可以被选自由显色酶、放射性同位素、生色团(chromophore)、发光物质及荧光物质组成的组中的一种标记,荧光物质可以为花青(Cy,cyanine)系列、罗丹明(Rhodamine)系列、Alexa系列、BODIPY系列或ROX系列的荧光物质,可以为尼罗红(Nile Red)、4,4-二氟-4-硼-3a,4a-二氮杂基吲哚(BODIPY,4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene)、花青(cyanine)、荧光素(fluorescein)、罗丹明(rhodamine)、香豆素(coumarine)或Alexa。

[0079] 本发明的ICOS-L变异体在野生型ICOS-L蛋白(或肽)中一部分氨基酸序列被取代,本发明中使用的术语“变异体”是指与标准物质相比较时,最少包含一个氨基酸差异(取代、插入或缺失)的对应的氨基酸序列。在特定具体例中,“变异体”与标准序列相比较时,具有高的氨基酸序列同源性(homolog)和/或保护性氨基酸取代、缺失和/或插入。并且,本发明中使用的术语“ICOS-L变异体”是指为了调节其与ICOS的结合活性而在一个以上氨基酸中发生突变的ICOS-L变异体蛋白。

[0080] 具体地,本发明的ICOS-L变异体可以通过标准合成方法、重组表达系统或任意其他本发明所属技术领域的方法来制备。因此,本发明的肽可以通过例如包括下述方法在内的许多方法来合成:方法(a),以固相或液相方法的手段以步骤或片段组装的方式合成肽后,分离及纯化最终肽产物;或者方法(b),在宿主细胞中表达编码肽的核酸构建体后,从宿

主细胞培养物中回收表达产物;或者方法(c),在无细胞实验室中表达编码肽的核酸构建体后,回收表达产物;或者通过方法(a)、方法(b)及方法(c)的任意组合获得肽的片段后,接着通过连接片段来获得肽,从而回收相关肽的方法。

[0081] 在更具体的例中,可以通过基因工程制备编码本发明的ICOS-L变异体的基因并将其转化到宿主细胞后,通过表达来生产本发明的ICOS-L变异体。

[0082] 在一实施方式中,本发明涉及包含本发明的ICOS-L变异体及半衰期延长部分的免疫调节蛋白。

[0083] 在一实例中,ICOS-L变异体可以与半衰期延长部分直接连接或通过接头间接连接。

[0084] 在一实例中,半衰期延长部分可以包含多聚化结构域、白蛋白、白蛋白结合多肽、Pro/Ala/Ser(PAS)、人绒毛膜促性腺激素的β亚型的C-末端肽(CTP)、聚乙二醇(PEG)、未形成氨基酸的结构化的长的亲水性序列(XTEN)、羟乙基淀粉(HES)、白蛋白结合小分子或它们的组合。

[0085] 在一实例中,多聚化结构域可以为免疫球蛋白的Fc结构域、亮氨酸拉链、已亮氨酸拉链或锌指蛋白。

[0086] 在一实例中,本发明的免疫调节蛋白可以包含上述ICOS-L变异体及免疫球蛋白的Fc结构域或其变异体。

[0087] 在一实例中,上述Fc结构域变异体可以在野生型人IgG1的Fc结构域中包含一个以上氨基酸取代。

[0088] 在一实例中,与野生型人IgG1的Fc相比,上述Fc结构域变异体可以表现出降低的效应功能(effector function),可以为灭活或无效的(effectorless)Fc。

[0089] 在一实例中,效应功能可以为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性、程序化的细胞凋亡或细胞性吞噬作用。

[0090] 在一实例中,上述Fc结构域变异体可以在野生型人IgG1的Fc结构域中将根据Kabat编号系统(Kabat numbering system)编号的第234位、第235位或第329位氨基酸取代为与野生型氨基酸不同的序列,可以包含L234A、L235A及P329G的氨基酸取代。

[0091] 在一实施方式中,本发明涉及包含本发明的ICOS-L变异体或免疫调节蛋白以及及靶向部分的偶联物。

[0092] 在一实例中,ICOS-L变异体或免疫调节蛋白可以与靶向部分直接连接或通过接头间接连接。

[0093] 在一实例中,靶向部分可以与免疫细胞表面的分子特异性结合,免疫细胞可以为抗原呈递细胞或淋巴细胞。

[0094] 在一实例中,靶向部分可以为与肿瘤表面的分子结合的肿瘤定位部分。

[0095] 在一实例中,靶向部分可以对分子HER1/EGFR、HER2/ERBB2、CD20、CD25(IL-2Rα受体)、CD33、CD52、CD133、CD206、CEA、CEACAM1、CEACAM3、CEACAM5、CEACAM6、癌症抗原125(CA125)、甲胎蛋白(AFP)、刘易斯Y、标签72、Caprin-1、间皮素、PDGF受体(PDGFR;例如PDGF-Rα)、PD-1、PD-L1、CTLA-4、IL-2受体、血管内皮生长因子(VEGF)、CD30、EpCAM、EphA2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、gpA33、粘蛋白、CAIX、PSMA、叶酸结合蛋白、神经节苷脂(例如,GD2、GD3、GM1及GM2)、VEGF受体(VEGFR)、VEGFR2、VEGF-A、整联蛋白αVβ3、整联蛋白α5β1、ERBB3、MET、

IGF1R、EPHA3、TRAILR1、TRAILR2、RANKL、FAP、生腱蛋白、AFP、BCR复合物、CD3、CD18、CD44、CTLA-4、gp72、HLA-DR 10β、HLA-DR抗原、IgE、MUC-1、nuC242、PEM抗原、金属蛋白酶、肝配蛋白受体、肝配蛋白配体、HGF受体、CXCR4、CXCR4、蛙皮素受体、SK-1抗原、Bcr-abl、RET、MET、TRKB、TIE2、ALK、ROS、EML4-ALK、ROS1、BRAFV600E、SRC、c-KIT、mTOR、TSC1、TSC2、BTK、KIT、BRCA、CDK 4/6、JAK1、JAK2、BRAF、FLT-3、MEK1、MEK2、SMO或B7-H6(NCR3LG1)具有特有异性或与上述成分结合。

[0096] 在一实例中,靶向部分为蛋白、肽、核酸、小分子或纳米粒子,更为优选地,为抗体或具有其活性的片段。

[0097] 在一实例中,上述抗体可以为西妥昔单抗、帕尼单抗、扎鲁木单抗、伊诺珠单抗、曲妥珠单抗、ado-曲妥珠单抗、emtansine、托西莫单抗(Bexxar®)、利妥昔单抗(retuximab、MabThera)、替伊莫单抗(Zevalin)、达利珠单抗(ZENAPAX)、吉妥珠单抗(Mylotarg)、阿仑单抗、CEA扫描Fab片段、OC125单克隆抗体、ab75705、B72.3、贝伐珠单抗(Avastin)、阿法替尼、阿西替尼、博舒替尼、卡博替尼、塞瑞替尼、克唑替尼、达拉非尼、达沙替尼、地努妥昔单抗、厄洛替尼、依维莫司、依鲁替尼、伊马替尼、拉帕替尼、乐伐替尼、尼洛替尼、奥拉帕尼、奥拉单抗、帕博西尼、帕唑帕尼、帕妥珠单抗、雷莫芦单抗、瑞戈非尼、鲁索替尼、索拉非尼、舒尼替尼、替西罗莫司、曲美替尼、凡德他尼、维罗非尼、维莫德吉、巴利昔单抗、伊匹单抗、纳武单抗、派姆单抗、MPDL3280A、匹迪利珠单抗(CT-011)、AMP-224、MSB001078C、MEDI4736、BMS-935559、LY3300054、阿替利珠单抗、阿维鲁单抗或杜瓦鲁单抗或抗体的变异体,可以为阿替利珠单抗或其变异体。

[0098] 在一实例中,具有免疫活性的片段可以为选自由Fab、Fd、Fab'、dAb、F(ab')、F(ab')2、scFv(单链可变区(single chain fragment variable))、Fv、单链抗体、Fv二聚体、互补决定区片段、人源化抗体、嵌合抗体及双特异抗体(diabody)组成的组中的任一种。

[0099] 在一实例中,本发明的ICOS-L变异体可以与抗体或具有其免疫活性的片段的重链或轻链的C-末端或N-末端直接连接或通过接头间接连接。

[0100] 在一实例中,本发明的偶联物可以为融合蛋白。

[0101] 在一实例中,本发明的偶联物还可以包含用于探测或纯化的标记。

[0102] 在一实例中,本发明的偶联物通过偶联物的抗体或具有其免疫活性的片段与癌细胞表面分子(例如,PD-L1)特异性结合,偶联物的ICOS-L变异体与存在于肿瘤微环境的T细胞的ICOS结合来激活T细胞,从而具有通过由免疫细胞引起的癌细胞凋亡的抗癌活性,由于与癌细胞特异性结合,因此可以用作癌癌症的诊断中也可以使用的治疗诊断制剂。并且,还可以制备嵌合抗原受体(CAR,chimeric antigen receptor)T细胞来用作抗癌剂,还可以用作与抗癌剂同时、单独或依次给药的抗癌辅助剂。

[0103] 上述抗体不仅包括完整的(whole)抗体形态,还包括抗体分子的功能性片段。完整的抗体为具有2个全长的轻链(light chain)及2个全长的重链(heavy chain)的结构,各个轻链通过二硫键(disulfide bond)与重链连接。抗体分子的功能性片段是指保有抗原结合功能的片段,抗体片段的例包括:(i)由轻链的可变区(VL)及重链的可变区(VH)与轻链的恒定区(CL)及重链的第一个恒定区(CH1)形成的Fab片段;(ii)由VH及CH1结构域形成的Fd片段;(iii)由单链抗体的VL及VH结构域形成的Fv片段;(iv)由VH结构域形成的dAb片段(Ward ES et al.,Nature 341:544-546(1989));(v)分离的CDR区;(vi)包含2个连接的Fab片段的

作为二价片段的F(ab')2片段;(vii)通过以VH结构域及VL结构域形成抗原结合部位的方式结合的肽接头来结合的单链Fv分子(scFv);(viii)双特异单链Fv二聚体(PCT/US92/09965);以及(ix)通过基因融合制备的作为多价或多特异片段的双特异抗体(WO94/13804)。

[0104] 本发明的抗体或具有其免疫活性的片段可以选自由动物源性抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人类抗体以及具有它们的免疫活性的片段组成的组中。上述抗体可以通过重组或合成来生产。

[0105] 通过向被免疫动物免疫所希望的抗原来生产的动物来源抗体,在以治疗目的向人类给药时通常会引起免疫排斥反应,为了抑制这样的免疫排斥反应而开发了嵌合抗体(chimeric antibody)。嵌合抗体为利用基因工程学将成为抗同种型(anti-isotype)反应的原因的动物来源抗体的恒定区取代为人类抗体的恒定区。虽然与动物来源抗体相比,嵌合抗体在抗同种型反应中可以得到相当程度的改善,但可变区中仍存在动物来源氨基酸,因此包含着潜在性的对于抗独特型(anti-idiotypic)反应的副作用。为改善这样的副作用而开发的是人源化抗体(humanized antibody)。这通过将嵌合抗体的可变区中在抗原的结合中起到重要作用的CDR(互补决定区(complementaritiy determining regions))部位移植到人类抗体骨架(framework)来制备。

[0106] 用于制备人源化抗体的CDR移植(grafting)技术中最为重要的是,选择能够最佳接受动物来源抗体的CDR部位的最优化的人类抗体,为此可以利用抗体数据库、结晶结构(crystal structure)的分析、分子建模技术等。然而,即使将动物来源抗体的CDR部位移植到最优化的人类抗体骨架中,仍存在位于动物来源抗体的骨架中并给抗原结合带来影响的氨基酸的情况,相当一部分仍存在抗原结合力得不到保存的情况,因此可以说用于复原抗原结合力的追加的抗体工程技术的应用是必需的。

[0107] 上述抗体或具有其免疫活性的片段可以为从生物体中分离的(不存在于生物体中)或非自然生产(non-naturally occurring)的,例如,可以为通过合成或重组来生产的。

[0108] 在本发明中,“抗体”是指在免疫系统中通过抗原的刺激来产生的物质,其种类不受特别限制,可以通过自然或非自然(例如,合成或重组)的方式来获得。不仅在生物体外,抗体在生物体内也非常稳定且半衰期长,因此有利于大量表达及生产。并且,抗体在本质上具有二聚体(dimer)结构,因此亲和力(avidity)非常高。完整的抗体为仅具有两个全长(full length)轻链及两个全长重链的结构,各个轻链通过二硫键与重链连接。抗体的恒定区分为重链恒定区和轻链恒定区,重链恒定区具有伽马(γ)、缪(μ)、阿尔法(α)、德尔塔(δ)及伊普西龙(ε)型,亚型有伽马1(γ1)、伽马2(γ2)、伽马3(γ3)、伽马4(γ4)、阿尔法1(α1)及阿尔法2(α2)。轻链的恒定区具有卡帕(κ)及兰布达(λ)型。

[0109] 本发明中的术语“重链(heavy chain)”解释为包括包含具有用来赋予对抗原的特异性的充分的氨基酸序列的可变区结构域VH及3个恒定区结构域C_{H1}、C_{H2}及C_{H3}与铰链(hinge)的全长重链及其片段在内的含义。并且,术语“轻链(light chain)”解释为包括包含具有用来赋予对抗原的特异性的充分的可变区序列的氨基酸序列的可变区结构域V_L及恒定区结构域C_L的全长轻链及其片段在内的含义。

[0110] 本发明中的术语“可变区(variable region)或可变部位(variabledomain)”是指在执行与抗原特异性结合的功能的同时在序列上示出许多变异的抗体分子的部分,可变区

中存在作为互补决定区的CDR1、CDR2及CDR3。上述CDR之间存在骨架区(framework region,FR)部分来起到支撑CDR环的作用。上述“互补决定区”作为与抗原的识别相关的环形的部位,根据该部位的序列的变化来决定抗体对抗原的特异性。

[0111] 本发明中的术语“单链可变区(scFv,single chain fragment variable)”是指通过基因重组以仅表达抗体的可变区的方式制备的单链抗体,是指以短的肽链连接抗体的VH区与VL区的单链形态的抗体。若无其他明示或上下文没有其他理解的内容,则上述术语“scFv”包括抗原接合片段等scFv片段。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说,这是不言而喻的。

[0112] 本发明中的术语“互补决定区(CDR,complementarity determining region)”是指免疫球蛋白的重链及轻链的超变区(hypervariable region)的氨基酸序列。重链及轻链可以分别包含3个CDR(CDRH1、CDRH2、CDRH3及CDRL1、CDRL2、CDRL3)。上述CDR可以在抗体与抗原或抗原决定部位的结合中提供主要的接触残基。

[0113] 在本发明中,术语“特异性结合”或“特异性识别”与本发明所属技术领域的普通技术人员通常公知的含义相同,是指通过抗原与抗体的特异性相互作用来引起免疫反应。

[0114] 本发明中的术语“抗原结合片段”作为相对于免疫球蛋白全部结构的片段,是指包含能够与抗原结合的部分的多肽的一部分。例如,可以为scFv、(scFv)2、scFv-Fc、Fab、Fab’或F(ab’)2,但不限定于此。在上述抗原结合片段中,Fab为具有轻链及重链的可变区与轻链的恒定区及重链的第一个恒定区(C_{H1})的结构,具有1个抗原结合部位。Fab’在重链C_{H1}结构域的C-末端具有包含一个以上半胱氨酸残基的铰链区(hinge region),这一点有别于Fab。F(ab’)2抗体通过Fab’的铰链区的半胱氨酸残基之间形成二硫键来生成。Fv为仅具有重链可变区及轻链可变区的最小的抗体片段,生成Fv片段的重组技术是本发明所属技术领域中广为人知的。双链Fv(two-chain Fv)通过非共价键连接重链可变区与轻链可变区,单链Fv(single-chain Fv)通常通过肽接头使重链的可变区与单链的可变区以共价键连接或者在C-末端直接连接,从而像双链Fv一样形成如二聚体的结构。上述接头可以为由1个至100个或2个至50个任意氨基酸形成的肽接头,适当的序列在本发明所属技术领域中是公知的。上述抗原结合片段可以利用蛋白水解酶来获得(例如,使用木瓜蛋白酶有限切割完整抗体可以获得Fab,利用胃蛋白酶切割可以获得F(ab’)2片段),可以通过基因重组技术制备。

[0115] 本发明中的术语“铰链区(hunge region)”为包含在抗体的重链的区域,存在于CH_1与CH_2区域之间,是指提供抗体内抗原结合部位的灵活性(flexibility)功能的区域。例如,上述铰链可以源自人类抗体,具体地,可以源自IgA、IgE或IgG,例如,可以源自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0116] 在一实施方式中,本发明涉及编码本发明的ICOS-L变异体、免疫调节蛋白或偶联物的核酸分子、包含其的载体以及包含上述载体的宿主细胞。

[0117] 本发明中使用的术语“核酸分子”为以单链或双链形态存在的脱氧核糖核酸或核糖核酸,若无其他特别提及的内容,则包括自然的核酸类似物(Scheit,Nucleotide Analogs,John Wiley,New York(1980);Uhlman及Peyman,Chemical Reviews,90:543-584(1990))。

[0118] 本发明中使用的术语“载体”是指插入宿主细胞中与细胞基因组重组并插入其中的或者包含作为附加体来自发复制的感受态核苷酸序列的任意核酸。上述载体有线型核

酸、质粒、噬菌粒、粘粒、核糖核酸(RNA)载体、病毒载体等。

[0119] 本发明中使用的术语“宿主细胞”是指导入一个以上脱氧核糖核酸(DNA)或载体的真核或原核细胞,不应理解为仅表示特定对象细胞,还应理解为是指它们的后代或潜在后代。虽然会因后代突发某些变形或环境影响而使上述后代事实上与亲本细胞不相同,但仍包括在本发明中使用的上述术语的范畴内。

[0120] 在一实施方式中,本发明涉及包含本发明的ICOS-L变异体、免疫调节蛋白或偶联物的T细胞激活剂。

[0121] 在一实例中,T细胞可以为细胞毒性T细胞或CAR-T细胞。

[0122] ICOS作为激活T细胞对外部抗原的反应的T细胞特异性共刺激分子,据报告,与多种癌症的治疗预后相关,本发明的T细胞激活剂不仅可以用作增进免疫刺激的治疗剂,还可以用作用于预测免疫检查点抑制剂的治疗反应的生物标记物。

[0123] 在一实施方式中,本发明涉及包含本发明的ICOS-L变异体、免疫调节蛋白或偶联物的ICOS检测用组合物。

[0124] 在一实例中,上述ICOS检测用组合物能够以用于观测存在于肿瘤微环境中的T细胞的用途来使用。

[0125] 在一实例中,可以通过检验癌组织中是否表达ICOS来观测存在于肿瘤微环境中的T细胞。

[0126] 在一实例中,上述组合物可以检测及定量ICOS的蛋白表达量。

[0127] 在一实施方式中,本发明涉及包含本发明的ICOS-L变异体、免疫调节蛋白或偶联物的生物体成像用组合物。

[0128] 在一实施方式中,本发明涉及包含跨膜结构域的ICOS-L变异体或编码还包含在上述跨膜结构域连接细胞质信号传导结构域ICOS-L变异体的核酸及包含编码重组抗原受体的一条以上链的一种以上核酸的多核苷酸。

[0129] 在一实例中,上述重组抗原受体可以为嵌合抗原受体或工程T细胞受体(T cell receptor,TCR)。

[0130] 在一实例中,上述编码ICOS-L变异体的核酸及编码重组受体的一条以上链的一种以上核酸可以分别通过编码引起核糖体跳跃(ribosome skipping)的肽或自裂解肽的核酸来分离。

[0131] 在一实例中,上述多核苷酸可以包含编码ICOS-L变异体的核酸、编码自裂解肽或引起核糖体跳跃的肽的核酸及编码CAR的核酸。

[0132] 在一实例中,上述多核苷酸可以包含编码ICOS-L变异体的核酸、编码第一自裂解肽或引起核糖体跳跃的肽的核酸、编码工程化的TCR的α链或工程化的TCR的β链中的一个链的核酸、编码第二自裂解肽或引起核糖体跳跃的肽的核酸以及编码工程化的TCR的α链或工程化的TCR的β链中的另一个链的核酸,自裂解肽或引起核糖体跳跃的肽可以为T2A、P2A、E2A或F2A。

[0133] 本发明中的术语“嵌合抗原受体(CAR,chimeric antigen receptor)”是指能够向免疫效应器细胞赋予对特定抗原的特异性的非自然存在的受体。通常,上述CAR是指为了向T细胞移植单克隆抗体的特异性而使用的受体。CAR大体上由细胞外结构域(Ectodomain)、跨膜结构域(transmembrane domain)及细胞内结构域(Ectodomain)构成。

[0134] 上述细胞外结构域包含抗原结合部位(antigen recognition region),CAR的跨膜结构域为与细胞外结构域连接的形态,可以为自然或合成来源的。在来源于自然存在的情况下,可以源自膜结合或跨膜蛋白,可以为源自T细胞受体的α、贝塔或ζ链、CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CDS、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154或CD8等多种蛋白的跨膜区的部分。上述跨膜结构域的序列可以从公知跨膜蛋白的跨膜区部分的通常的技术领域中公知的文献等中获得,但不限定于此。

[0135] 并且,在合成上述跨膜结构域的情况下,主要可以包含亮氨酸及缬氨酸等疏水性氨基酸残基,例如,可以存在合成苯丙氨酸、色氨酸及缬氨酸的三联体(triplet)的跨膜结构域,但不限定于此。有关上述跨膜结构域的序列信息可以从有关合成的跨膜结构域的通常的技术领域中公知的文献中获得,但不限定于此。

[0136] 在本发明的CAR中,上述细胞内结构域作为存在于细胞内的CAR的结构域的一部分,为与跨膜结构域连接的形态。本发明的上述细胞内结构域可以包含细胞内信号传导结构域,上述细胞内信号传导结构域的特征在于,当CAR的抗原结合部位与抗原时激活T细胞,优选地,引起T细胞增殖。上述细胞内信号传导结构域只要是当抗体与存在于细胞外的抗原结合部位结合时传导能够引起T细胞激活的信号的部分,其种类就不受特别限制,可以使用多种细胞内信号传导结构域,例如,可以为免疫受体酪氨酸激活基序(tyrosine-based activation motif),即ITAM,上述ITAM包括来源于CD3ζ(zeta)、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CDS、CD22、CD79a、CD79b、CD66d或FcεRIγ的,但不限定于此。

[0137] CAR包含对于通过铰链及跨膜区与T细胞信号化分子细胞质结构域偶联的肿瘤相关抗原(TAA)具有特异性的抗体的单链可变区(scFv)。大部分通常的淋巴细胞激活部分在具有T细胞触发(例如CD3ζ)部分的串联(tandem)中包含T细胞共刺激(例如,CD28、CD137、OX40、ICOS及CD27)结构域。在CAR介导的过继性免疫疗法中,移植CAR的细胞以非HLA-限制的方式直接识别肿瘤细胞上的TAA。

[0138] 在一实施方式中,本发明涉及包含上述多核苷酸的载体。

[0139] 在一实例中,上述载体可以为病毒载体,病毒载体可以为逆转录病毒载体或慢病毒载体。

[0140] 在一实施方式中,本发明涉及包含上述多核苷酸或载体的工程细胞。

[0141] 在一实施方式中,本发明涉及包含本发明的ICOS-L变异体、免疫调节蛋白或偶联物的工程细胞。

[0142] 在一实例中,上述工程细胞还可以包含嵌合抗原受体或工程T细胞受体。

[0143] 在一实例中,本发明的ICOS-L变异体、免疫调节蛋白或偶联物可以从工程细胞中分泌,工程细胞可以包含含有跨膜结构域的ICOS-L变异体。

[0144] 在一实例中,本发明的ICOS-L变异体可以在细胞表面表达。

[0145] 在一实例中,上述细胞可以为免疫细胞,免疫细胞可以为抗原呈递细胞(APC)或淋巴细胞,淋巴细胞可以为T细胞。上述T细胞可以为$CD4^+$T细胞(辅助性T细胞,TH细胞)、$CD8^+$T细胞(细胞毒性T细胞,CTL)、记忆T细胞、调节T细胞(Treg细胞)、自然杀伤T细胞等,优选地,本发明中导入CAR的T细胞为$CD8^+$T细胞,但不限定于此。

[0146] 在一实例中,上述工程细胞可以为原代细胞,根据情况,细胞可以为哺乳动物细胞,可以为人类细胞。

[0147] 在一实例中,上述工程细胞可以为嵌合抗原受体表达细胞,可以为嵌合抗原受体表达巨噬细胞(CAR-macrophage)、嵌合抗原受体表达T(CAR-T)细胞、嵌合抗原受体表达-γ-δT(CAR-Gamma-delta T)细胞或自然杀伤(CAR-NK)细胞。

[0148] 本发明中的术语"嵌合抗原受体表达T(CAR-T)细胞"是指表达CAR的T细胞。上述嵌合抗原受体表达T细胞具有如下优点:i)以不依赖人类白细胞抗原(HLA,human leukocyte antigen)的方式识别癌症抗原,可以治疗通过在细胞表面减少HLA的表达来逃避抗癌剂的作用的癌症,ii)可以与HLA类型无关地,与患者的HLA类型无关地在治疗中使用,iii)可以在短时间内产生大量对癌症具有特异性的T细胞,从而可以表现出优秀的抗癌效果。

[0149] 在一实施方式中,本发明涉及包含编码本发明的ICOS-L变异体、免疫调节蛋白或偶联物的核酸分子的感染物质(infectious agent)。

[0150] 在一实例中,ICOS-L变异体、免疫调节蛋白或偶联物在表达时从感染物质中分泌,在一部分情况下,编码的ICOS-L变异体可以包含跨膜结构域。

[0151] 在一实例中,编码的ICOS-L变异体在表达的细胞的表面可以几乎不表达。

[0152] 在一实例中,感染物质可以为细菌或病毒,病毒可以为抗癌病毒(oncolytic virus)。抗癌病毒可以为腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、带状疱疹病毒、水泡性口炎病毒、呼肠孤病毒、新城疫病毒、细小病毒、麻疹病毒、水泡性口炎病毒(VSV)、柯萨奇病毒或痘苗病毒。

[0153] 在一实例中,病毒可以特异性地以树突状细胞(DC)为靶向和/或为树突状细胞指向性(dendritic cell-tropic),上述病毒可以为由辛德毕斯病毒包膜伪装的慢病毒载体。

[0154] 在一实例中,感染物质还可以包含编码引起靶向细胞的凋亡或能够启动或促进免疫反应的其他基因产物的核酸分子。上述追加的基因产物可以选自抗癌剂、抗代谢剂、抗血管形成剂、免疫调节分子、免疫检查点抑制剂、抗体、细胞因子、生长因子、抗原、细胞毒性基因产物、促细胞凋亡基因产物、抗细胞凋亡基因产物、细胞基质分解基因、用于组织再生的基因或以多能性将人类体细胞再程序化的细胞中。

[0155] 在一实施方式中,本发明涉及包含本发明的ICOS-L变异体或免疫调节蛋白作为有效成分的用于预防或治疗炎症或自身免疫疾病的药物组合物。

[0156] 在一实例中,上述炎症疾病可以为抗中性粒细胞胞质抗体(ANCA)相关性血管炎、脉管炎、自身免疫性皮肤疾病、移植、风湿性疾病、炎性胃肠道疾病、炎性眼疾病、炎性神经疾病、炎性肺疾病、炎性内分泌疾病或自身免疫性血液疾病。

[0157] 在一实例中,上述自身免疫性疾病可以为炎性肠疾病、克罗恩病、溃疡性大肠炎、多发性硬化症、哮喘、类风湿性关节炎或银屑病。

[0158] 在一实施方式中,本发明涉及包含本发明的ICOS-L变异体、免疫调节蛋白、偶联物或工程细胞的抗癌辅助剂。

[0159] 在一实例中,上述辅助剂可以增进免疫检查点抑制剂(Immune checkpoint inhibitors)的抗癌效果,可以与免疫检查点抑制剂同时、单独或依次来联合给药。

[0160] 在一实例中,免疫检查点抑制剂可以为抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗CTLA-4抗体或其变异体。

[0161] 在一实施方式中,本发明涉及包含本发明的ICOS-L变异体、免疫调节蛋白、偶联物或工程细胞作为有效成分的用于预防或治疗癌症的药物组合物。

[0162] 在一实例中,癌症可以为选自由脑肿瘤、黑色素瘤、骨髓瘤、非小细胞肺癌、口腔癌、肝癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、宫颈癌、卵巢癌、大肠癌、小肠癌、直肠癌、输卵管癌、肛周癌、子宫内膜癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病(Hodgkin's disease)、食管癌、淋巴结癌、膀胱癌、胆囊癌、内分泌腺癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、慢性或急性白血病、淋巴细胞淋巴瘤、肾或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统肿瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、脊髓肿瘤、脑干神经胶质瘤及脑垂体腺瘤组成的组中的一种以上。

[0163] 本发明的药物组合物用作单独的治疗方法,也可以与其他通常的生物疗法、化疗方法或放射疗法一同使用,在实施这样的联合疗法的情况下,可以更为有效地治疗癌症。在癌症的预防及治疗中使用本发明时,可以与上述组合物一同使用的化疗剂包括顺铂(cisplatin)、卡铂(carboplatin)、甲基苄肼(procarbazine)、氮芥(mechlorethamine)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、异环磷酰胺(ifosfamide)、左旋苯丙氨酸氮芥(melphalan)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、白消安(bisulfan)、亚硝基脲(nitrosourea)、放线菌素D(dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、阿霉素(doxorubicin)、博来霉素(bleomycin)、普卡霉素(plicomycin)、丝裂霉素(mitomycin)、依托泊苷(etoposide)、他莫昔芬(tamoxifen)、紫杉醇(taxol)、反铂(transplatinum)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)、长春新碱(vincristin)、长春碱(vinblastin)及甲氨蝶呤(methotrexate)等。可以与本发明的组合物一同使用的放射疗法为X射线照射及γ射线照射。

[0164] 本发明中的术语"预防"是指通过给药本发明的ICOS-L变异体或包含其的组合物来抑制或延迟癌症的发病、扩散及复发的所有行为。

[0165] 本发明的组合物的治疗有效量会随着多种因素,例如给药方法、目标部位、患者的状态等的不同而不同。因此,在人体使用时,给药量应同时考虑安全性及效率性来确定适当的量。可以从通过动物实验确定的有效量推算人类使用的量。确定有效量时需考虑的事项在例如Hardman and Limbird,eds.,Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,10th ed.(2001),Pergamon Press;及E.W.Martin ed.,Remington'sPharmaceutical Sciences,18th ed.(1990),Mack Publishing Co.中记述。

[0166] 本发明的药物组合物以药学上有效的量来给药。本发明中使用的术语"药学上有效的量"是指以能够在医学治疗中应用的合理的收益/风险比例治疗疾病的充分且无副作用的量,有效剂量水平可以根据包括患者的健康状态、疾病的种类、疾病的严重程度、药物的活性、对药物的敏感度、给药方法、给药时间、给药途径及代谢比例、治疗期间、配合或同时使用的药物在内的因素以及其他医学领域中广为人知的因素来决定。本发明的组合物能够以单独治疗剂给药或与其他治疗剂联合给药,可以与现有的治疗剂依次或同时给药,可以单次或多次给药。重点在于,在考虑上述所有因素后以无副作用的最小的量获得最大效果的量来给药,这可以通过本发明所属技术领域的普通技术人员轻松确定。

[0167] 本发明的药物组合物可以包含生物制剂中通常使用的载体、稀释剂、赋形剂或两种以上它们的组合。本发明中使用的术语"药学上可接受的"是指对暴露于上述组合物的正常细胞或人类显出无毒性的特性。上述载体只要是能向生物体内运输组合物的就不受特别限制,例如,可以使用Merck Index,13th ed.,Merck&Co.Inc.中记载的化合物、生理盐水、灭菌水、林格氏液、缓冲生理盐水、葡萄糖溶液、麦芽糊精溶液、甘油、乙醇及混合上述成分

中的一种以上成分来使用,还可以根据需要加入抗氧化剂、缓冲液、静菌剂等通常的添加剂。并且,还可以加入稀释剂、分散剂、表面活性剂、结合剂及润滑剂来配制为水溶液、混悬液、乳浊液等注射用剂型、丸药、胶囊、颗粒或片剂等。进而,可以利用本发明所属技术领域中的适当方法或Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA,18th,1990)中公开的方法根据各疾病或成分优选地配制。

[0168] 在一实例中,上述药物组合物可以为选自由口服剂型、外用剂、栓剂、灭菌注射溶液及喷雾剂组成的组中的一种以上剂型。

[0169] 并且,本发明的组合物可以包含生物制剂中通常使用的载体、稀释剂、赋形剂或两种以上它们的组合。药学上可接受的载体只要是能向生物体内运输组合物的就不受特别限制,例如,可以使用Merck Index,13th ed.,Merck&Co.Inc.中记载的化合物、生理盐水、灭菌水、林格氏液、缓冲生理盐水、葡萄糖溶液、麦芽糊精溶液、甘油、乙醇及混合上述成分中的一种以上成分来使用,还可以根据需要加入抗氧化剂、缓冲液、静菌剂等通常的添加剂。并且,还可以加入稀释剂、分散剂、表面活性剂、结合剂及润滑剂来配制为水溶液、混悬液、乳浊液等注射用剂型、丸药、胶囊、颗粒或片剂等。进而,可以利用本发明所属技术领域中的适当方法或Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company,Easton PA,18th,1990)中公开的方法根据各疾病或成分优选地配制。

[0170] 本发明的组合物还可以包含一种以上示出相同或相似功能的有效成分。相对于组合物的总重量,本发明的组合物包含0.0001重量百分比至10重量百分比上述蛋白,优选地,包含0.001重量百分比至1重量百分比。

[0171] 本发明的药物组合物还可以包含药学上可接受的添加剂,在此情况下,药学上可接受的添加剂可以使用淀粉、明胶化淀粉、微晶纤维素、乳糖、聚维酮、胶体二氧化硅、磷酸钙、乳糖、甘露醇、糖稀、阿拉伯胶、预糊化淀粉、玉米淀粉、粉末纤维素、羟丙基纤维素、欧巴代、淀粉乙醇酸钠、棕榈蜡、合成硅酸铝、硬脂酸、硬脂酸镁、硬脂酸铝、硬脂酸钙、白糖、葡萄糖、山梨糖醇及滑石粉等。相对于上述组合物,优选地,包含0.1重量份至90重量份的本发明的药学上可接受的添加剂,但不限定于此。

[0172] 本发明的组合物可以根据所目标的方法来胃肠外给药(例如,静脉内、皮下、腹腔内或局部应用)或口服给药,给药量的范围可以根据患者的体重、年龄、性别、健康状态、饮食、给药时间、给药方法、代谢率及疾病的严重程度等的不同而不同。本发明的组合物的一日给药量可以为0.0001~10mg/ml,优选地,可以为0.0001~5mg/ml,更优选地,一天一次至分为数次给药。

[0173] 本发明的组合物的用于口服给药的液体制剂有混悬剂、内溶液剂、乳剂、糖浆剂等,除通常用作单纯稀释剂的水、液体石蜡以外,还可以一同包含多种赋形剂,例如,湿润剂、甜味剂、芳香剂、保存剂等。用于胃肠外给药的制剂包括灭菌的水溶液、非水性溶剂、悬浮剂、冷冻干燥制剂、栓剂等。

[0174] 在一实例中,上述本发明的组合物可以用作与免疫检查点抑制剂的联合治疗剂。

[0175] 在一实施方式中,本发明涉及包含本发明的ICOS-L变异体、免疫调节蛋白、偶联物或工程细胞的癌症诊断用组合物。

[0176] 在一实例中,上述组合物还可以包含选自由显色酶、放射性同位素、生色团、发光物质及荧光物质组成的组中的一种。

[0177] 在一实施方式中,本发明涉及包含本发明的癌症诊断用组合物的癌症诊断试剂盒。

[0178] 在一实例中,上述试剂盒不仅可以包括用于从对象或患者收集生物试样的工具和/或试剂,还可以包括用于从该试样准备基因组脱氧核糖核酸、互补脱氧核糖核酸(cDNA)、核糖核酸或蛋白质的工具和/或试剂。

[0179] 本发明中的术语“癌症诊断试剂盒”是指包含本发明的癌症诊断用组合物的试剂盒。因此,上述表达“癌症诊断试剂盒”可以与“癌症诊断用组合物”相互交叉或混合来使用。本说明书中的术语“诊断”包括:判断个体对特定疾病或疾患的敏感性(susceptibility);判断一个个体当前是否患有特定疾病或疾患;判断已患有特定疾病或疾患的一个个体的预后(prognosis)(例如,转移前或转移性癌症状态的检验、癌症的阶段确定或确定癌症对治疗的反应性);或者therametrics(例如,为了提供有关治疗功效的信息而监测个体的状态)。

[0180] 本发明的ICOS-L变异体以显著增大结合力与ICOS特异性结合,通过作为促进T细胞的激活的免疫刺激药物起作用来表现出杀灭癌细胞的抗癌活性或者通过杀灭表达ICOS的调节T细胞来具有诱导抗癌功效的抗癌活性,由于与癌细胞特异性结合,因此可以用作癌症的诊断中也可以使用的治疗诊断制剂。

[0181] 在一实施方式中,本发明涉及提供用于诊断癌症的信息的方法,包括:使从对象中分离的生物试样与本发明的癌症诊断用组合物接触的步骤;确认ICOS-L变异体与ICOS的结合水平的步骤;以及与正常对照组试样中的上述ICOS-L变异体与ICOS的结合水平进行比较的步骤。

[0182] 在一实例中,还可以包括如下步骤:若从对象中分离的生物试样中的ICOS-L变异体与ICOS的结合水平比正常对照组试样中的ICOS-L变异体与ICOS的结合水平高,则判断上述检查对象为癌症。

[0183] 本发明中使用的术语“试样(sample)”是指从对象或患者获得的生物试样。生物试样的供应源可以为:新鲜的、冷冻的和/或保存的器官或组织样品,或者从活检或吸引物的固体组织;血液或任意血液的结构成分;对象的人身或发育的任意时点的细胞。

[0184] 在一实施方式中,本发明涉及对免疫检查点抑制剂的治疗反应性预测或预后诊断方法,包括使用本发明的ICOS-L变异体、免疫调节蛋白、偶联物或工程细胞确认从处理免疫检查点抑制剂的对象中分离的生物试样中ICOS的表达量的步骤。

[0185] 在一实施方式中,本发明涉及本发明的ICOS-L变异体、免疫调节蛋白、偶联物或工程细胞在预防或治疗癌症中的用途。

[0186] 在一实施方式中,本发明涉及癌症的治疗方法,包括以药学上有效的量向患有癌症的个体给药本发明的ICOS-L变异体、免疫调节蛋白、偶联物或工程细胞的步骤。

[0187] 通过下述实施例更为详细地说明本发明。但下述实施例仅用于使本发明具体化,而不是限定本发明。

[0188] 本发明的实施方式

[0189] 实施例1.制备用于探索ICOS-L变异体的二聚体人类ICOS(ICOS-Fc)

[0190] 1-1.克隆二聚体人类ICOS

[0191] 为了通过提高结合活性(Avidity)来更为效率地筛选与ICOS的结合力强的ICOS-L

变异体,通过在ICOS的C-末端部分表达人类IgG抗体的Fc区(结构域)来诱导二聚化反应(dimerization),在Fc与ICOS之间放入由甘氨酸(glycine)及丝氨酸(serine)构成的GS接头来确保各个蛋白质的流动性。具体地,在Twist Bioscience公司(美国)合成作为ICOS细胞外区域部分的氨基酸序列E21-K140的脱氧核糖核酸并利用设计的引物和Vent聚合酶(Polymerase)(新英格兰生物实验室(New England Biolab))来扩增基因。Fc也使用设计的引物和Vent聚合酶来扩增基因,扩增的ICOS与Fc基因在进行装配聚合酶链式反应(assembly PCR)后,使用BssHII及XbaI(新英格兰生物实验室)来处理限制酶。将处理限制酶的ICOS-Fc基因与处理相同的限制酶的作为动物细胞用载体的pMAZ载体连接。将连接的质粒转化到Jude1大肠杆菌后,获得单克隆后通过碱基序列分析确认到ICOS-Fc成功插入pMAZ载体。

[0192] 1-2.二聚体人类ICOS(ICOS-Fc)的表达及纯化

[0193] 将Expi293F细胞以2×10^6cells/ml的密度传代培养300ml,一天后,在30ml的Freestyle293表达(expression)培养液(Gibco.12338-018)中以1:4的比例混合上述实施例1中制备的ICOS-Fc表达载体与聚乙烯亚胺(PEI,Polyehylenimine,Polyscience公司,23966)并在常温下放置20分钟后,向上述Expi293F动物细胞转染。在CO_2振荡培养器中以37℃、125rpm、8%的CO_2的条件培养细胞7天后,通过离心来仅采取上清液。然后,使用25x的磷酸盐缓冲溶液(PBS)平衡后,使用瓶顶过滤器通过0.2μm的过滤器(默克密理博公司(Merck Millipore))来过滤。向过滤的培养液放入1ml的蛋白A树脂(Protein Aresin)并在4℃的温度下搅拌16小时后,使其通过柱来回收树脂后使用10ml的磷酸盐缓冲溶液洗涤。使用100mM的甘氨酸(glycine,pH2.7)缓冲液洗脱洗涤的树脂后,利用1M的Tris-HCl(pH8.0)中和来获得纯化的ICOS-Fc二聚体蛋白后使用离心过滤装置3K(Centrifugal filter units 3K,默克密理博公司)将缓冲液(buffer)更换为1x的磷酸盐缓冲溶液。使用SDS-PAGE凝胶确认表达及纯化的ICOS-Fc二聚体蛋白(图1)。

[0194] 1-3.检验纯化的ICOS-Fc与ICOS-L的结合力及荧光物质标记化

[0195] 为了分析上述实施例1-2中纯化的ICOS-Fc与ICOS-L的结合力,进行酶联免疫吸附测定分析。具体地,将在0.05M的碳酸钠(Na_2CO_3)(pH9.6)中稀释为4μg/ml的ICOS-Fc向平底聚苯乙烯高结合(Flat Bottom Polystyrene High Bind)96孔酶标板(Costar公司)的每孔分注50μl,在4℃的温度下固定16小时后,使用100μl的0.5%的牛血清白蛋白(BSA,Bovine serum albumin)(Gibco)(包含在磷酸盐缓冲溶液中(in PBS),pH7.4)在常温下封闭2小时。使用180μl的0.05%的PBST(pH7.4)洗涤4次后,向每孔分注50μl的使用0.5%的牛血清白蛋白(包含在磷酸盐缓冲溶液中,pH7.4(in PBS pH7.4))连续稀释的野生型ICOS-L后在常温下反应1小时。洗涤4次后,放入50μl的抗-His-HRP偶联物并在常温下反应1小时后洗涤4次。然后,各加入50μl的1-Step Ultra TMB-ELISA底物溶液(Substrate S olution)(赛默飞世尔公司(Thermo Fisher Scientific))来显色并使用50μl的2M的硫酸(H_2SO_4)终止反应后使用Epoch微孔板分光光度计(Microplate Spectrophotometer)(伯腾仪器有限公司(BioTek))来分析。

[0196] 结果,确认到ICOS-Fc与野生型ICOS-L结合(图2),为了用作探针,使用Alexa488标记试剂盒(labeling kit)将ICOS二聚体蛋白荧光标记化。

[0197] 实施例2.选择筛选方法

[0198] 2-1.克隆用于选择酵母表面展示(Yeastsurfacedisplay)方法的ICOS-L

[0199] 为了效率的变异体筛选,决定确定酵母表面锚定基序(yeast surface anchoring motif),为了比较将ICOS-L的N-末端锚定(anchoring)在Aga2的系统(pCTCON-Aga2-ICOS-L-FLAG)与将C-末端锚定在Aga2的系统(pCTCON-ICOS-L-Aga2-FLAG),克隆了ICOS-L。具体地,在Twist Bioscience(美国)公司合成野生型ICOS-L基因和现有的变异体A184(N52H、N57Y及Q100P)并利用设计的引物和Vent聚合酶(新英格兰生物实验室)来扩增基因。扩增的野生型ICOS-L和A184基因使用SfiI(新英格兰生物实验室)来处理限制酶,将处理限制酶的基因与处理相同的限制酶的pCTCON载体连接。将连接的质粒转化到Jude1大肠杆菌后,获得单克隆后通过碱基序列分析确认到成功克隆pCTCON-Aga2-ICOS-L_WT-FLAG、pCTCON-Aga2-ICOS-L_A184-FLAG、pCTCON-ICOS-L_WT-Aga2-FLAG及pCTCON-ICOS-L_A184-Aga2-FLAG四种质粒。

[0200] 2-2.选择展示方法

[0201] 通过检验与ICOS的结合力来选择酵母(yeast)展示方法,将上述实施例2-1中制备的四种质粒分别转化到AWY101(Trp-)菌株。为了利用流式细胞仪确认ICOS-L与ICOS的结合力,在5ml的添加有50μg/ml的卡那霉素(Kanamycin)及40μg/ml的氯霉素(Chloramphenicol)的SDCAA(20g/L的葡萄糖(Glucose)、6.7g/L的无氨基酸的酵母氮源(Yeast nitrogen base without amino acids)、5g/L的酪蛋白氨基酸(casamino acids)、5.4g/L的磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、8.56g/L的磷酸二氢钠(NaH_2PO_4))培养基中以30℃及225rpm的条件培养16小时。对培养的细胞进行离心(2500g,5分钟,4℃)来获得5×10^7个细胞后,在5ml的添加有50μg/ml的卡那霉素及40μg/ml的氯霉素的SGCAA(20g/L的半乳糖(Galactose)、6.7g/L的无氨基酸的酵母氮源、5g/L的酪蛋白氨基酸、5.4g/L的磷酸氢二钠、8.56g/L的磷酸二氢钠)培养基中以20℃及225rpm的条件诱导(induction)24小时。诱导后,对2×10^7个细胞进行离心(14000g,30秒钟,4℃)并回收到e-试管。向回收细胞的各e-试管放入1ml的PBSB(包含0.1%的牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲溶液(0.1%BSA in PBS))再悬浮并离心(14000g,30秒钟,4℃)来重新聚集细胞后,放入0.5ml的PBSB再悬浮后制备为4×10^7cell/ml的密度。将25μl的细胞移到新的e-试管后,分别放入25μl的PBSB、ICOS-Fc-Alexa488(200nM)及Anti-FLAG-iFluor647(1000:

[0202] 1)探针并在常温下培养30分钟来使用荧光探针标记细胞。然后,进行离心(14000g,30秒钟,4℃)来去除上清液后使用200μl的PBSB再悬浮并洗涤,重新进行离心(14000g,1分钟,4℃)后使用200μl的PBSB再悬浮来准备试样。使用FACSLyric(BD Biosciences公司)设备测量准备的试样的荧光信号值分析野生型ICOS-L及A184的表达量并间接分析与ICOS的结合力。

[0203] 结果,虽然上述质粒都很好地表达,但确认到与N-末端部分锚定在Aga2来在酵母中展示的野生型ICOS-L相比,C-末端部分锚定在Aga2来在酵母中展示的ICOS-L对ICOS的结合力显著增加,因此决定以锚定C-末端的形态来进行筛选(图3)。

[0204] 实施例3.制作用于使用超高速筛选技术的巨大ICOS-L易错文库(error-prone library)

[0205] 为了高速探索与ICOS的结合力得到增加的ICOS-L变异体,基于pCTCON-ICOS-L_WT-Aga2-FLAG设计包含两侧的SfiI site的引物以使ICOS-L的所有部位都可以出现随机突

变。使用设计的引物和Taq聚合酶(宝日医生物技术公司(TAKARA))、dNTPs(Invitrogen公司)、氯化镁($MgCl_2$)及氯化锰($MnCl_2$)(西格玛公司(SIGMA))通过易错聚合酶链式反应(error-prone PCR)技术对脱氧核糖核酸进行一次扩增。利用Vent聚合酶对扩增的基因进行二次扩增来准备(24μg),相关载体处理SfiI限制酶来准备(8μg)。将准备的两种基因转化到AWY101菌株来构建通过同源重组(homologous recombination)的文库。构建的文库大小为4.5×10^7,通过序列分析确认到以脱氧核糖核酸为基准有0.89%的错误率(error-rate)(平均6.3个突变/共714bp),以氨基酸为基准有2.05%的错误率(平均4.8个突变/共238个氨基酸)(图4)。

[0206] 实施例4.筛选ICOS-L变异体

[0207] 4-1.筛选ICOS-L变异体

[0208] 将转化到AWY101的初始文库在500ml的添加有50μg/ml的卡那霉素及40μg/ml的氯霉素的SDCAA(20g/L的葡萄糖、6.7g/L的无氨基酸的酵母氮源、5g/L的酪蛋白氨基酸、5.4g/L的磷酸氢二钠、8.56g/L的磷酸二氢钠)培养基中以30℃及225rpm的条件培养16小时。为了捞出死的细胞,将培养的细胞以OD_{450}=0.7接种到100ml的SDCAA培养基中后,以30℃及225rpm的条件培养16小时,将培养的细胞以OD_{450}=0.7接种到100ml的SGCAA培养基中以20℃及225rpm的条件培养2天。诱导后,对1×10^8个细胞进行离心(14000g,30秒钟,4℃)并回收到e-试管中。向回收细胞的e-试管放入1ml的PBSB(包含0.1%的牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲溶液)再悬浮并离心(14000g,30秒钟,4℃)来重新聚集细胞后,使用放入Anti-FLAG-iFluor647(1000:1)及ICOS-Fc-Alexa488(200nM)探针的1ml的PBSB再悬浮并在常温下培养1小时来标记。然后,进行离心(14000g,30秒钟,4℃)来去除上清液后使用1ml的PBSB再悬浮并洗涤,再重新离心(14000g,1分钟,4℃)后使用1ml的PBSB再悬浮来准备试样。利用S3 sorter(Bio-Rad公司)设备测量准备的文库试样的荧光信号值来回收对ICOS具有高结合力的酵母,将回收的酵母在20ml的SDCAA中以30℃及225rpm的条件培养。第二天回收培养的细胞并在100ml的SGCAA中以20℃及225rpm的条件培养2-3天来诱导后,进行下一轮。如上所述的筛选过程通过减少探针(probe)的浓度来进行共4次。

[0209] 4-2.确认与ICOS的结合力得到增加的ICOS-L变异体的丰富

[0210] 将初始、第一轮、第二轮、第三轮及第四轮的文库分别单独接种到100ml的添加有50μg/ml的卡那霉素及40μg/ml的氯霉素的SDCAA(20g/L的葡萄糖、6.7g/L的无氨基酸的酵母氮源、5g/L的酪蛋白氨基酸、5.4g/L的磷酸氢二钠、8.56g/L的磷酸二氢钠)培养基中以30℃及225rpm的条件培养16小时。为了捞出死的细胞,将培养的细胞以OD_{450}=0.7接种到100ml的SDCAA培养基中后,以30℃及225rpm的条件培养16小时,将培养的细胞以OD_{450}=0.7接种到100ml的SGCAA培养基中以20℃及225rpm的条件培养2天。诱导后,分别以2×10^7个细胞的量离心(14000g,30秒钟,4℃)文库后会受到e-试管中。向回收细胞的各e-试管放入1ml的PBSB(包含0.1%的牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲溶液)再悬浮并离心(14000g,30秒钟,4℃)来重新聚集细胞后,放入0.5ml的PBSB再悬浮后制备为4×10^7cell/ml的密度。将25μl的细胞移到新的e-试管后,分别放入25μl的PBSB、ICOS-Fc-Alexa488(200nM)及Anti-FLAG-iFluor647(1000:1)探针并在常温下培养30分钟来使用荧光探针标记细胞。然后,进行离心(14000g,30秒钟,4℃)来去除上清液后使用200μl的PBSB再悬浮并洗涤,重新进行离心(14000g,1分钟,4℃)后使用200μl的PBSB再悬浮来准备试样。使用FACSLyric(BD

Biosciences公司)设备测量准备的试样的荧光信号值来间接分析各文库与ICOS的结合力。

[0211] 结果,确认到随着筛选的进行,与ICOS的结合力得到提高的变异体也随之逐渐丰富(enrichment)(图5)。

[0212] 实施例5.分析ICOS-L变异体的氨基酸序列分析及筛选与ICOS的结合力得到增加的ICOS-L变异体

[0213] 利用Zymoprep酵母质粒少量制备试剂盒(Yeast Plasmid Miniprep kits)(Zymo Research公司)来获得4轮文库的脱氧核糖核酸后,转化到Jude1大肠杆菌并对50个克隆进行碱基序列分析。结果,可以筛选出18种变异体,为了分析它们与ICOS的结合力,分别将18种变异体的质粒转化到AWY101(Trp-)菌株。为了利用流式细胞仪确认变异体与ICOS的结合力,将野生型ICOS-L、A184及18种变异体在5ml的添加有50μg/ml的卡那霉素及40μg/ml的氯霉素的SDCAA(20g/L的葡萄糖、6.7g/L的无氨基酸的酵母氮源、5g/L的酪蛋白氨基酸、5.4g/L的磷酸氢二钠、8.56g/L的磷酸二氢钠)培养基中以30℃及225rpm条件培养16小时。对培养的细胞进行离心(2500g,5分钟,4℃)来获得5×10^7个细胞后,在5ml的添加有50μg/ml的卡那霉素及40μg/ml的氯霉素的SGCAA(20g/L的半乳糖、6.7g/L的无氨基酸的酵母氮源、5g/L的酪蛋白氨基酸、5.4g/L的磷酸氢二钠、8.56g/L的磷酸二氢钠)培养基中以20℃及225rpm的条件诱导24小时。诱导后,对2×10^7个细胞进行离心(14000g,30秒钟,4℃)并回收到e-试管。向回收细胞的各e-试管放入1ml的PBSB(包含0.1%的牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲溶液)再悬浮并离心(14000g,30秒钟,4℃)来重新聚集细胞后,放入0.5ml的PBSB再悬浮后制备为4×10^7cell/ml的密度。将25μl的细胞移到新的e-试管后,分别放入25μl的PBSB、ICOS-Fc-Alexa488(67.7nM)及Anti-FLAG-iFluor647(1000:1)探针并在常温下培养30分钟来使用荧光探针标记细胞。然后,进行离心(14000g,30秒钟,4℃)来去除上清液后使用200μl的PBSB再悬浮并洗涤,重新进行离心(14000g,1分钟,4℃)后使用200μl的PBSB再悬浮来准备试样。使用FACSLyric(BD Biosciences公司)设备测量准备的试样的荧光信号值来分析变异体的表达量并间接分析与ICOS的结合力。通过此筛选出Y3、Y8、Y13、Y20、Y35及Y48共6种与ICOS的结合力得到提高的ICOS-L变异体(图6)。

[0214] 实施例6.与ICOS的结合力得到增加的ICOS-L变异体的表达及纯化

[0215] 为了制备ICOS-L变异体的动物细胞表达载体,使用设计的引物和Vent聚合酶(Vent Polymerase,新英格兰生物实验室)扩增野生型ICOS-L、作为对照组的ICOS-L_A184、上述实施例5中获得的6种变异体基因中的Y3、Y13、Y20、Y35及Y48。扩增的基因使用BssHII及XbaI(新英格兰生物实验室)来处理限制酶。将处理限制酶的ICOS-Fc基因与处理相同的限制酶的作为动物细胞用载体的pMAZ载体连接。将连接的质粒转化到Jude1大肠杆菌后,获得单克隆后进行碱基序列分析的结果,确认到变异体的基因成功插入载体。并且,由于Y8变异体的基因序列内存在XbaI限制酶位置,因此,使用设计的引物进而Vent聚合酶扩增后,使用2X Gibson装配预混液(assembly master mix)(新英格兰生物实验室)插入pMAZ载体中。将反应结束的基因试样转化到Jude1大肠杆菌后,获得单克隆后进行碱基序列分析的结果,确认到Y8的基因也成功插入载体中。将制备的ICOS-L变异体表达用载体(pMAZ-ICOS-L_WT、pMAZ-ICOS-L_A184、pMAZ-ICOS-L_Y3、pMAZ-ICOS-L_Y8、pMAZ-ICOS-L_Y13、pMAZ-ICOS-L_Y20、pMAZ-ICOS-L_Y35及pMAZ-ICOS-L_Y48)转染到Expi293F动物细胞并在CO_2振荡培养器中以37℃、125rpm及8%的CO_2的条件培养7天后离心来仅分离上清液。然后,使用25x磷酸盐

缓冲溶液平衡后,利用0.2μm的注射过滤器(赛多利斯公司(Sartorius),S6634)过滤。向过滤的培养液放入0.15ml的Ni-NTA树脂并在常温下搅拌1小时来回收树脂后,使用1ml的包含10mM的咪唑(西格玛公司)的磷酸盐缓冲溶液洗涤2次后使用1ml的包含20mM的咪唑的磷酸盐缓冲溶液洗再洗涤2次。使用包含250mM的咪唑的磷酸盐缓冲溶液洗脱后,使用centrifugal filter units 10K(默克密理博公司)将缓冲液更换为1X磷酸盐缓冲溶液(pH7.4)。然后,通过SDS-PAGE凝胶确认表达及纯化的野生型ICOS-L、对照组A184及本发明中发掘的6种变异体(图7)。

[0216] 实施例7.检验ICOS-L变异体与ICOS的结合力

[0217] 为了分析纯化的ICOS-L变异体与ICOS的结合力,进行酶联免疫吸附测定。具体地,将在0.05M的碳酸钠(pH9.6)中稀释为4μg/ml的ICOS-Fc向平底聚苯乙烯高结合96孔酶标板(Costar公司)的每孔分注50μl,在4℃的温度下固定16小时后,使用100μl的0.5%的牛血清白蛋白(Gibco)(包含在磷酸盐缓冲溶液中,pH7.4)在常温下封闭2小时。使用180μl的0.05%的PBST(pH7.4)洗涤4次后,向每孔分注50μl的使用0.5%的牛血清白蛋白(包含在磷酸盐缓冲溶液中,pH7.4)连续稀释的ICOS-L变异体后在常温下反应1小时。洗涤4次后,放入50μl的抗-His-HRP偶联物并在常温下反应1小时后洗涤4次。然后,各加入50μl的1-Step Ultra TMB-ELISA底物溶液(赛默飞世尔公司)来显色并使用50μl的2M的硫酸终止反应后使用Epoch微孔板分光光度计(伯腾仪器有限公司)来分析。

[0218] 结果,除Y3变异体以外,所有变异体都示出比野生型ICOS-L更高的与ICOS的结合力,尤其是Y8变异体示出比现有的A184更高的结合力(图8)。

[0219] 实施例8.探索提高与ICOS的结合力的ICOS-L的决定性突变

[0220] 8-1.制备突变恢复变异体

[0221] 为了探索具有比作为对照组的A184提高的结合力的Y8变异体的决定性突变(critical mutation)是什么,将Y8所具有的2个突变分别制备为作为由野生型ICOS-L的氨基酸序列取代的变异体的Y8_P51Q(使用Q取代Y8变异体的P51)及Y8_H57N(使用N取代Y8变异体的H57)。为了制备Y8_P51Q及Y8_H57N变异体的动物细胞表达载体,使用设计的引物和Pfu turbo聚合酶(Pfu turbo polymerase,安捷伦公司(Agilent))通过Quikchange聚合酶链式反应方法扩增pMAZ-ICOS-L_Y8质粒的基因组。将扩增的基因转化到Jude1来确认序列。将制备的ICOS-L变异体表达用载体(pMAZ-ICOS-L_WT、pMAZ-ICOS-L_A184、pMAZ-ICOS-L_Y8、pMAZ-ICOS-L_Y8_P51Q及pMAZ-ICOS-L_Y8_H57N)转染到Expi293F动物细胞并培养7天后离心来仅分离上清液。然后,使用25x的磷酸盐缓冲溶液(PBS)平衡后,使用瓶顶过滤器(Bottle top filter)通过0.2μm的过滤器(filter)(赛默飞世尔公司)过滤。向过滤的培养液放入0.5ml的Ni-NTA树脂并在4℃的温度下搅拌16小时后,利用柱回收树脂后使用20CV(柱体积(column volume))的包含10mM的咪唑(西格玛公司)的磷酸盐缓冲溶液洗涤后,使用20CV的包含20mM的咪唑的磷酸盐缓冲溶液再洗涤一次。然后,使用包含250mM的咪唑的磷酸盐缓冲溶液溶液洗脱后,使用离心过滤装置10K(centrifugal filter units 10K,默克密理博公司)将缓冲液更换为1X磷酸盐缓冲溶液(pH7.4)。结果,可以获得1mg以上纯化的4种变异体。为了提高纯化的ICOS-L变异体的纯度,进行体积排阻色谱(Size exclusion chromatography)(NGC Chromatography,Biorad公司)。利用Superdex 200 10/300GL柱(思拓凡公司(Cytiva))去除凝集(aggregation)的蛋白,仅恢复级分(Fraction)21和22。然后,

通过SDS-PAGE确认到5种ICOS-L变异体的纯度提高(图9)。

[0222] 8-2.探索Y8变异体的决定性突变

[0223] 为了探索Y8变异体的决定性突变,进行酶联免疫吸附测定。具体地,将在0.05M的碳酸钠(pH9.6)中稀释为4μg/ml的ICOS-Fc向平底聚苯乙烯高结合96孔酶标板(Costar公司)的每孔分注50μl,在4℃的温度下固定16小时后,使用100μl的0.5%的牛血清白蛋白(Gibco)(包含在磷酸盐缓冲溶液中,pH7.4)在常温下封闭2小时。使用180μl的0.05%的PBST(pH7.4)洗涤4次后,向每孔分注50μl的使用0.5%的牛血清白蛋白(包含在磷酸盐缓冲溶液中,pH7.4)连续稀释的上述实施例8-1中制备的纯化的各ICOS-L变异体后,在常温下反应1小时。洗涤4次后,放入50μl的抗-His-HRP偶联物并在常温下反应1小时后洗涤4次。然后,各加入50μl的1-Step Ultra TMB-ELISA底物溶液(赛默飞世尔公司)来显色并使用50μl的2M的硫酸终止反应后使用Epoch微孔板分光光度计(伯腾仪器有限公司)来分析。

[0224] 结果,与Y8的H57突变相比,P51突变示出给结合力提高带来更大影响,P51及H57突变在一起存在时,表现出最为优秀的结合力(图10)。

[0225] 实施例9.比较包含决定性突变的ICOS-L变异体对ICOS的结合力

[0226] 通过生物膜干涉技术测定(Bio-layer interferometry assay)(Octet R8,赛多利斯公司(Satorius))比较野生型ICOS-L、现有的A184变异体及ICOS-L变异体(Y8,Y8_P51Q及Y8_H57N)对ICOS的结合力。具体地,在由1X磷酸盐缓冲溶液(pH7.4)平衡(equilibrium)1分钟的蛋白A生物传感器(Protein Abiosensor)(赛多利斯公司)中将5μg/ml的ICOS-Fc固定1分钟后,使用1X磷酸盐缓冲溶液(pH7.4)绘制基准线(baseline)1分钟后,使3.13nM-500nM浓度范围的ICOS-L变异体结合(association)10分钟后,使1X磷酸盐缓冲溶液(pH7.4)流过10分钟来分解(dissociation)。这样,分析各变异体不同浓度的传感图(sensorgram)(图11),从而分析最终的平衡解离常数(KD)值(图12)。

[0227] 实施例10.制备用于测定ICOS-L变异体的结合力的ICOS单体

[0228] 10-1.克隆ICOS单体

[0229] 为了测定多种形态的ICOS-L变异体的ICOS结合力,使用设计的引物和Vent聚合酶(新英格兰生物实验室)扩增编码去除ICOS的二聚体形成可能性的ICOS细胞外区域部分的氨基酸序列E21-H129的脱氧核糖核酸。扩增的基因使用BssHII及XbaI(新英格兰生物实验室)来处理限制酶,将处理限制酶的ICOS(E21-H129)基因与处理相同限制酶的作为动物细胞用载体的pMAZ载体连接。将连接的质粒的转化到Jude1大肠杆菌后,获得单克隆后通过碱基序列分析确认到ICOS(E21-H129)成功插入pMAZ载体。

[0230] 10-2.ICOS单一蛋白的表达及纯化

[0231] 将制备的ICOS表达用载体转染到Expi293F动物细胞后,在CO_2振荡培养器中以37℃、125rpm及8%的CO_2的条件培养7天后通过离心来仅分离上清液。然后,利用25×磷酸盐缓冲溶液平衡后利用0.2μm的瓶顶过滤器(默克密理博公司)过滤。向过滤的培养液放入0.5ml的Ni-NTA树脂并在常温下搅拌1小时来回收树脂后,使用10ml的包含10mM的咪唑(西格玛公司)的磷酸盐缓冲溶液洗涤后使用10ml的包含20mM的咪唑的磷酸盐缓冲溶液再洗涤一次。使用包含250mM的咪唑的磷酸盐缓冲溶液洗脱后,使用centrifugal filter units 10K(默克密理博公司)将缓冲液更换为1×磷酸盐缓冲溶液(pH7.4)。然后,通过SDS-PAGE凝胶确认表达及纯化的ICOS单一蛋白(图13)。

[0232] 实施例11.制备与抗体Fc结构域融合的ICOS-L变异体

[0233] 11-1.克隆与抗体Fc结构域融合的ICOS-L变异体

[0234] 为了评估发掘的ICOS-L变异体的T细胞激活能力,与作为人类IgG1抗体的silent Fc变异体的LALAPG(L234A/L235A/P329G)融合。为了将人类IgG1抗体的Fc结构域融合在野生型ICOS-L、现有的A184变异体及本发明的ICOS-L变异体(Y8及Y8_H57N)的C-末端部分,使用设计的引物和Vent聚合酶(新英格兰生物实验室)扩增了ICOS-L及Fc(LALAPG)基因。对扩增的基因进行装配聚合酶链式反应后,使用2X Gibson装配预混液(新英格兰生物实验室)插入pMAZ载体(pMAZ-ICOS-L_WT-Fc、pMAZ-ICOS-L_A184-Fc、pMAZ-ICOS-L_Y8-Fc及pMAZ-ICOS-L_Y8_H57N-Fc)。将反应结束的基因试样转化到Jude1大肠杆菌后,获得单克隆来进行碱基序列分析的结果,确认到与Fc(LALAPG)融合的4种ICOS-L变异体成功插入pMAZ载体。

[0235] 11-2.与抗体Fc结构域融合的ICOS-L变异体的表达及纯化

[0236] 将Expi293F细胞以2×10^6cells/ml的密度传代培养100ml,一天后,在10ml的Freestyle293表达培养液(Gibco.12338-018)10ml中以1:4的比例混合上述实施例11-1中制备的与Fc融合的ICOS-L变异体表达载体(pMAZ-ICOS-L_WT-Fc、pMAZ-ICOS-L_A184-Fc、pMAZ-ICOS-L_Y8-Fc及pMAZ-ICOS-L_Y8_H57N-Fc)与聚乙烯亚胺(Polyscience公司,23966)并在常温下放置20分钟后向上述Expi293F动物细胞转染。在CO_2振荡培养器中以37℃、125rpm及8%的CO_2的条件培养细胞7天后通过离心仅采取上清液后,利用25×磷酸盐缓冲溶液平衡后利用瓶顶过滤器以0.2μm的过滤器(默克密理博公司)过滤。向过滤的培养液放入0.5ml的蛋白A树脂并使其通过柱来回收树脂后,使用10ml的磷酸盐缓冲溶液洗涤。使用100mM的甘氨酸(pH2.7)缓冲液洗脱洗涤的树脂后,利用1M的Tris-HCl(pH8.0)中和来获得纯化的ICOS-L变异体融合蛋白,使用离心过滤装置10K(默克密理博公司)将缓冲液更换为1×磷酸盐缓冲溶液。通过SDS-PAGE凝胶确认表达及纯化的与抗体Fc结构域(LALAPG)融合的ICOS-L变异体(图14)。

[0237] 11-3.检验与抗体Fc结构域融合的ICOS-L变异体与ICOS的结合力

[0238] 为了分析上述实施例11-2中纯化的与抗体Fc结构域(LALAPG)融合的ICOS-L变异体与ICOS的结合力,进行酶联免疫吸附测定。具体地,将在0.05M的碳酸钠(pH9.6)中稀释为4μg/ml的ICOS-L-Fc向平底聚苯乙烯高结合96孔酶标板(Costar公司)的每孔分注50μl,在4℃的温度下固定16小时后,使用100μl的0.5%的牛血清白蛋白(Gibco)(包含在磷酸盐缓冲溶液中,pH7.4)在常温下封闭2小时。使用180μl包含0.05%的吐温20(Tween20)的1×磷酸盐缓冲溶液(pH7.4)(PBST)洗涤4次后,向每孔分注50μl使用包含0.5%的牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲溶液(pH7.4)连续稀释的野生型ICOS后在常温下反应1小时。洗涤4次后,放入50μl的anti-His-HRP偶联物(conjugate)并在常温下反应1小时后洗涤4次。然后,各加入50μl的1-Step Ultra TMB-ELISA底物溶液(赛默飞世尔公司)来显色并使用50μl的2M的硫酸终止反应后使用Epoch微孔板分光光度计(伯腾仪器有限公司)来分析。结果,确认到与抗体Fc结构域(LALAPG)融合的ICOS-L变异体以与融合Fc之前相同的顺序与野生型ICOS结合(图15)。

[0239] 实施例12.确认与抗体Fc结构域融合的ICOS-L变异体的T细胞激活

[0240] 12-1.通过T细胞分化分析检验T细胞活性

[0241] 为了确认与抗体Fc结构域融合的ICOS-L变异体由共刺激(co-stimulation)信号

传导引起的T细胞激活能力,确认T细胞的分化程度。具体地,向平底细胞培养板(Flat Bottom Cell Culture Plate)(SPL公司)每孔分注1.5μg/ml的抗CD3抗体(生物传奇公司(Biolegend))及50μl的融合有50nM的Fc的ICOS-L变异体并在4℃的温度下固定20小时后,使用200μl的磷酸盐缓冲溶液(pH7.4)洗涤3次。使用PanT细胞分离试剂盒(T Cell Isolation Kit)(美天旎生物科技公司(Miltenyi Biotec))从人类外周血单个核细胞(PBMCs,Peripheral Blood Mononuclear Cells)中分离T细胞后,使用羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE,Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester)(Invitrogen公司)染色并在AIM-V培养基(medium)(Gibco)中再悬浮(resuspension)后,向固定蛋白的培养板每孔分注5×10^4cells。在CO_2细胞培养器中以37℃、5%CO_2的条件培养3天后,以400×g离心培养的T细胞培养液5分钟,使用100μl的磷酸盐缓冲溶液再悬浮并使用V型底细胞培养板(V-bottom cell culture plate)(康宁公司(Corning))回收细胞。离心回收的细胞并使用50μl的磷酸盐缓冲溶液再悬浮,每孔放入50μl的抗CD4-APC探针或抗CD8-APC探针(200:1)后在常温下培养20分钟来在细胞标记荧光探针。然后,使用100μl的磷酸盐缓冲溶液洗涤后离心(400×g,5分钟)并使用200μl的磷酸盐缓冲溶液再悬浮来准备试样,使用FACSLyric(BD Biosciences公司)设备测量准备的试样的CFSE荧光信号值的减少。结果,确认到通过与抗体Fc结构域融合的ICOS-L变异体诱导了T细胞的激活,从而引起T细胞的分化(图16)。通过此,确认到与ICOS的结合力得到提高的本发明的ICOS-L变异体成功诱导$CD4^+$T细胞及$CD8^+$T细胞的分化。

[0242] 12-2.通过细胞因子分泌分析检验T细胞活性

[0243] 为了确认由与抗体Fc结构域融合的ICOS-L变异体的共刺激信号传导引起的T细胞激活能力,确认细胞因子(γ-干扰素)分泌程度。具体地,以与上述实施例12-1相同的方式分离T细胞,使用CFSE(Invitrogen公司)染色并在AIM-V培养基(Gibco)中再悬浮后,向固定蛋白的培养板每孔分注5×10^4cells。在CO_2细胞培养器中以37℃、5%CO_2的条件培养3天后,以400×g离心培养的T细胞培养液5分钟,获得上清液并使用DuoSet®人γ-干扰素酶联免疫吸附测定试剂盒(Human IFN-γELISAKit)(R&D Systems公司)检验与抗体Fc结构域融合的ICOS-L变异体的T细胞激活能力。结果,与抗体Fc结构域融合的变异体表现出显著提高细胞因子分泌度(图17)。

[0244] 实施例13.制备与抗体融合的ICOS-L变异体

[0245] 13-1.制备抗PD-L1抗体(阿替利珠单抗(Atezolizumab))

[0246] 13-1-1.克隆阿替利珠单抗表达载体

[0247] 作为ICOS-L变异体应用的一例,为了确认能否通过将抗体与ICOS-L变异体融合来使抗体的功效最大化,制备作为抗PD-L1抗体的阿替利珠单抗,为了与现有的抗体相比提高纯化收率和蛋白稳定性,向阿替利珠单抗的Fc结构域导入LALAPG突变,而不是现有的IgG1 N297A突变,以此来降低抗体的效应功能。具体地,利用设计的引物和Vent聚合酶(新英格兰生物实验室)分别扩增阿替利珠单抗的重链(heavy chain)的可变区(variable region)基因和导入LALAPG突变的重链的恒定区(constant region)基因来进行装配聚合酶链式反应,将获得的基因使用BssHII及XbaI(新英格兰生物实验室)来处理限制酶。并且,阿替利珠单抗轻链的可变区基因也与轻链的恒定区基因进行装配聚合酶链式反应来处理相同的限制酶。将处理限制酶的重链及轻链基因与处理相同的限制酶的作为动物细胞用载体的pMAZ

载体连接,将连接的质粒转化到Jude1大肠杆菌来获得单克隆后进行碱基序列分析来确认到去除效应功能的阿替利珠单抗的重链及轻链基因成功插入pMAZ载体。

[0248] 13-1-2.阿替利珠单抗的表达及纯化

[0249] 将上述实施例13-1-1中制备的阿替利珠单抗的重链与轻链基因以1:1的比例混合后,以1:4的比例与聚乙烯亚胺(Polyscience公司,23966)混合并在常温下放置20分钟后向Expi293F动物细胞转染。在CO_2振荡培养器中以37℃、125rpm及8%的CO_2的条件培养7天后进行离心来仅分离上清液。然后,利用25x磷酸盐缓冲溶液平衡后利用瓶顶过滤器以0.2μm的过滤器(默克密理博公司)过滤。向过滤的培养液放入1ml的蛋白A树脂使其通过柱来回收树脂后,使用10ml的磷酸盐缓冲溶液洗涤。使用100mM的甘氨酸(pH2.7)缓冲液洗脱洗涤的树脂后,利用1M的Tris-HCl(pH8.0)中和来获得纯化的阿替利珠单抗后使用离心过滤装置30K(Centrifugal filter units 30K,默克密理博公司)将缓冲液更换为1×磷酸盐缓冲溶液。然后,使用SDS-PAGE凝胶确认表达及纯化的阿替利珠单抗抗体(ATZ)(图18)。

[0250] 13-2.制备与抗PD-L1抗体融合的ICOS-L变异体

[0251] 13-2-1.克隆与阿替利珠单抗融合的ICOS-L变异体

[0252] 为了将本发明的ICOS-L变异体与作为抗PD-L1抗体的阿替利珠单抗(IgG1 Fc-LALAPG)融合而进行克隆。具体地,为了分别将野生型ICOS-L、现有的ICOS-L A184变异体及本发明的ICOS-L变异体(Y8及Y8_H57N)融合在阿替利珠单抗的重链的C-末端或轻链的C-末端,使用设计的引物和Vent聚合酶(新英格兰生物实验室)扩增ICOS-L、阿替利珠单抗的重链及轻链基因。对扩增的基因进行装配聚合酶链式反应后,使用2XGibson装配预混液(新英格兰生物实验室)来向pMAZ载体插入。将反应技术的基因试样转化到Jude1大肠杆菌后,获得单克隆并进行碱基序列分析的结果,确认到与阿替利珠单抗的重链或轻链C-末端融合的ICOS-L变异体成功插入pMAZ载体。

[0253] 13-2-2.与阿替利珠单抗融合的ICOS-L变异体的表达及纯化

[0254] 将Expi293F细胞以2×10^6cells/ml的密度传代培养100ml,一天后,在10ml的Freestyle293表达培养液(Gibco.12338-018)中将上述实施例13-2-1中制备的与阿替利珠单抗的重链的ICOS-L变异体表达载体(pMAZ-Atezolizumab-IgH-ICOS-L_WT、pMAZ-Atezolizumab-IgH-ICOS-L_A184、pMAZ-Atezolizumab-IgH-ICOS-L_Y8或pMAZ-Atezolizumab-IgH-ICOS-L_Y8_H57N)(+pMAZ-Atezolizumab-IgL)及与阿替利珠单抗的轻链融合的ICOS-L变异体表达载体(pMAZ-Atezolizumab-IgL-ICOS-L_WT、pMAZ-Atezolizumab-IgL-ICOS-L_A184,pMAZ-Atezolizumab-IgL-ICOS-L_Y8或pMAZ-Atezolizumab-IgL-ICOS-L_Y8_H57N)(+pMAZ-Atezolizumab-IgH)分别与聚乙烯亚胺(Polyscience公司,23966)以1:4的比例混合并在常温下放置20分钟后向上述Expi293F动物细胞转染。在CO_2振荡培养器中以37℃、125rpm、8%的CO_2的条件培养细胞7天后,通过离心来仅采取上清液。然后,利用25x磷酸盐缓冲溶液平衡后利用瓶顶过滤器以0.2μm的过滤器(默克密理博公司)过滤。先过滤的培养液放入0.5ml的蛋白A树脂并使其通过柱来回收树脂后,使用10ml的磷酸盐缓冲溶液洗涤。使用100mM的甘氨酸(pH2.7)缓冲液洗脱洗涤的树脂后利用1M的Tris-HCl(pH8.0)中和来回收与纯化的阿替利珠单抗的重链或轻链融合的ICOS-L变异体后使用离心过滤装置10K(默克密理博公司)将缓冲液更换为1×磷酸盐缓冲溶液。并且,使用SDS-PAGE凝胶确认到表达及纯化的与阿替利珠单抗的重链或轻链融合的

ICOS-L变异体(图19及图20)。

[0255] 13-3.检验与抗PD-L1抗体融合的ICOS-L变异体与ICOS的结合力

[0256] 为了分析上述实施例13-2中纯化的与阿替利珠单抗的重链或轻链融合的ICOS-L变异体与ICOS的结合力而进行酶联免疫吸附测定。具体地,将在0.05M的碳酸钠(pH9.6)中稀释为4μg/ml的ICOS-Fc向平底聚苯乙烯高结合96孔酶标板(Costar公司)的每孔分注50μl,在4℃的温度下固定16小时后,使用100μl的包含0.5%的牛血清白蛋白(Gibco)的磷酸盐缓冲液(pH7.4)在常温下封闭2小时。使用180μl的0.05%的PBST(pH7.4)洗涤4次后,将200nM的使用包含0.5%的牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲溶液(pH7.4)稀释的与阿替利珠单抗的重链或轻链融合的ICOS-L变异体200nM在常温下反应1小时。洗涤4次后,向每孔分注50μl的使用0.5%的牛血清白蛋白(包含在磷酸盐缓冲溶液中,pH7.4)连续稀释的野生型ICOS后在常温下反应1小时。洗涤4次后,放入50μl的抗-His-HRP偶联物并在常温下反应1小时后洗涤4次。然后,各加入50μl的1-Step Ultra TMB-ELISA底物溶液(赛默飞世尔公司)来显色并使用50μl的2M的硫酸终止反应后使用Epoch微孔板分光光度计(伯腾仪器有限公司)来分析。结果示出,在与阿替利珠单抗的重链融合的ICOS-L变异体(ATZ(H)-A184、ATZ(H)-Y8及ATZ(H)-Y8_H57N)及与轻链融合的ICOS-L变异体(ATZ(L)-A184、ATZ(L)-Y8及ATZ(L)-Y8_H57N)以与阿替利珠单抗融合之前相同的顺序与野生型ICOS结合(图21及图22)。

[0257] 实施例14.检验与抗体融合的ICOS-L变异体的T细胞激活能力

[0258] 14-1.通过T细胞分化分析来检验T细胞活性

[0259] 为了检验与阿替利珠单抗的重链或轻链融合的ICOS-L变异体的由共刺激信号传导引起的T细胞激活能力,以与上述实施例12-1相同的方式确认T细胞的分化程度。结果,确认到通过与阿替利珠单抗的重链或轻链融合的ICOS-L变异体诱导了T细胞的激活,从而引起T细胞的分化(图23及图24)。通过此确认即使与阿替利珠单抗融合,ICOS-L变异体仍成功地诱导$CD4^+$T细胞及$CD8^+$T细胞的分化。

[0260] 14-2.通过细胞因子分泌分析检验T细胞活性

[0261] 为了检验由与阿替利珠单抗的重链或轻链融合的ICOS-L变异体的共刺激信号传导引起的T细胞激活能力,以与上述实施例12-2相同的方式确认细胞因子(γ-干扰素)的分泌程度。结果示出,与阿替利珠单抗抗体相比,处理融合ICOS-L的阿替利珠单抗的T细胞的细胞因子分泌显著增加(图25及图26)。通过此确认,ICOS-L通过成功诱导T细胞的激活来使阿替利珠单抗的功效最大化。

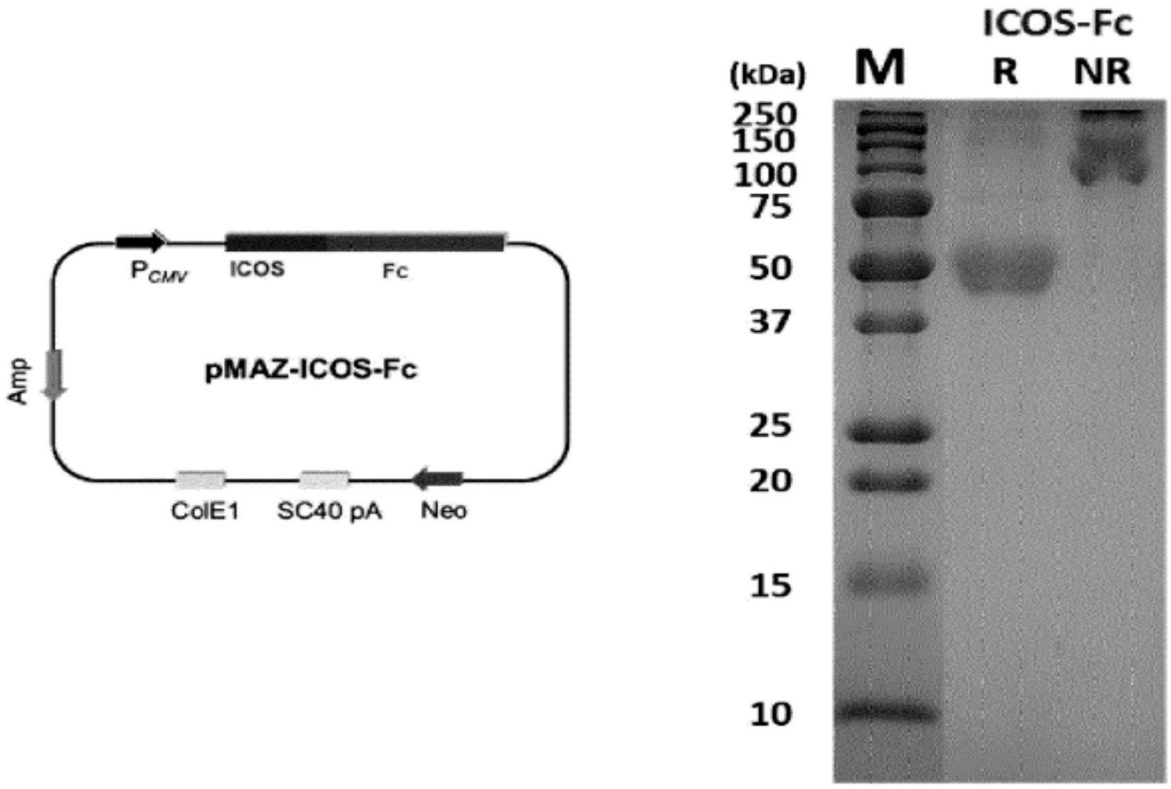

P CMV
ICOS
Fc
pMAZ-ICOS-Fc
Amp
ColE1
SC40 pA
Neo
ICOS-Fc
(kDa)
M
R
NR
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10

图1

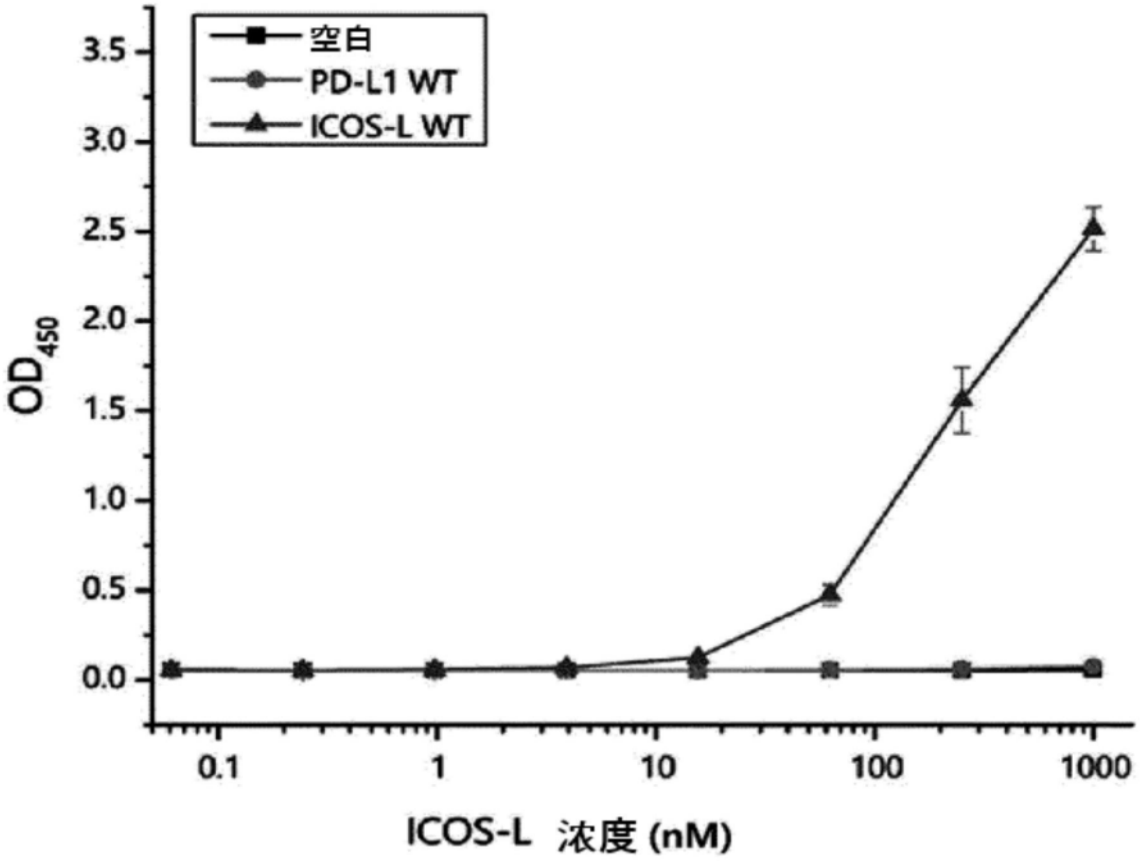

空白
PD-L1 WT
ICOS-L WT
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
OD450
0.1
1
10
100
1000
ICOS-L 浓度 (nM)

图2

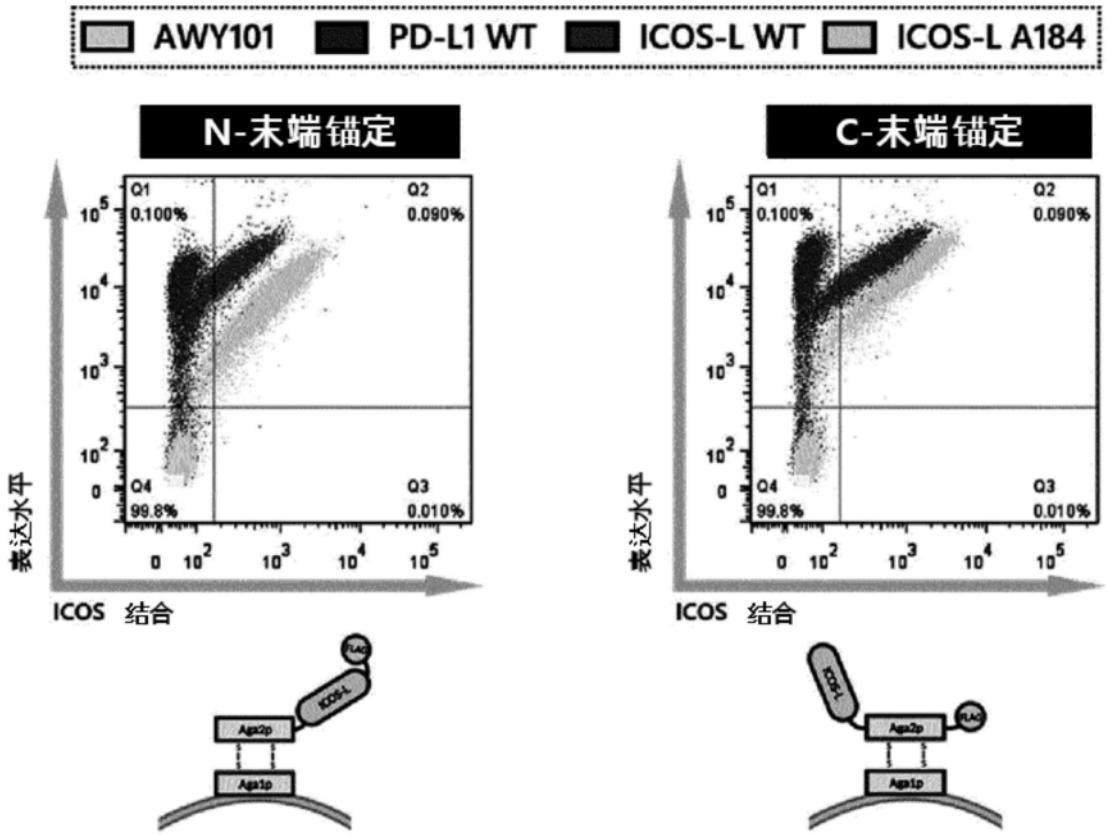

AWY101
PD-L1 WT
ICOS-L WT
ICOS-L A184
N-末端锚定
C-末端锚定
Q1
0.100%
Q2
0.090%
Q4
99.8%
Q3
0.010%
表达水平
ICOS 结合
Aga2p
Aga1p
ICOS-L
FLAG

图3

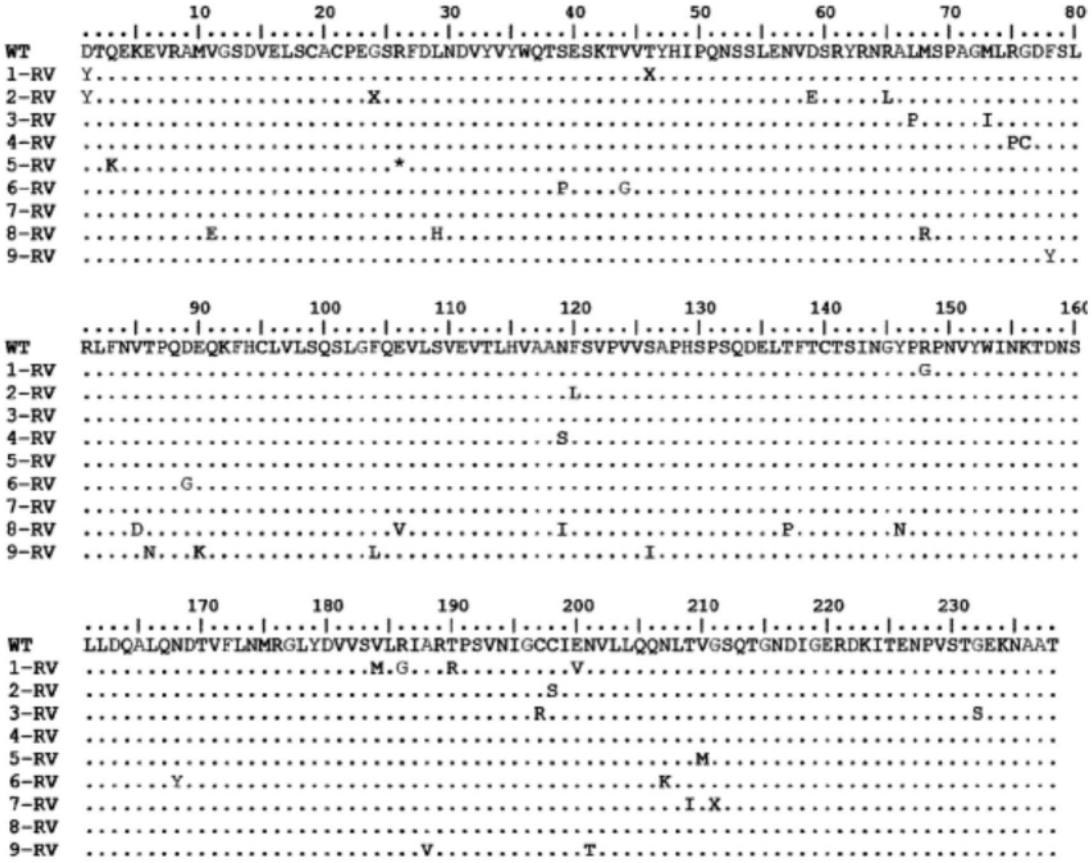

10 20 30 40 50 60 70 80
WT DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTYHIPQNSSLENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSL
1-RV Y.....X.....
2-RV Y.....X.....E.....L.....
3-RV .....P.....I.....
4-RV .....PC....
5-RV ..K.....*.....
6-RV .....P....G.....
7-RV .....
8-RV .....E.....H.....R.....
9-RV .....Y..
90 100 110 120 130 140 150 160
WT RLFNVTPQDEQKFHCLVLSQSLGFQEVLSVEVTLHVAANFSVPVVSAPHSPSQDELTFTCTSINGYPRPNVYWINKTDNS
1-RV .....G.....
2-RV .....L.....
3-RV .....
4-RV .....S.....
5-RV .....
6-RV .....G.....
7-RV .....
8-RV ....D.....V.....I.....P.....N.....
9-RV .....N...K.....L.....I.....
170 180 190 200 210 220 230
WT LLDQALQNDTVFLNMRGLYDVVSVLRIARTPSVNIGCCIENVLLQQNLTVGSQTGNDIGERDKITENPVSTGEKNAAT
1-RV .....M.G...R.....V.....
2-RV .....S.....
3-RV .....R.....S.....
4-RV .....
5-RV .....M.....
6-RV .....Y.....K.....
7-RV .....I.X.....
8-RV .....
9-RV .....V.....T.....

图4

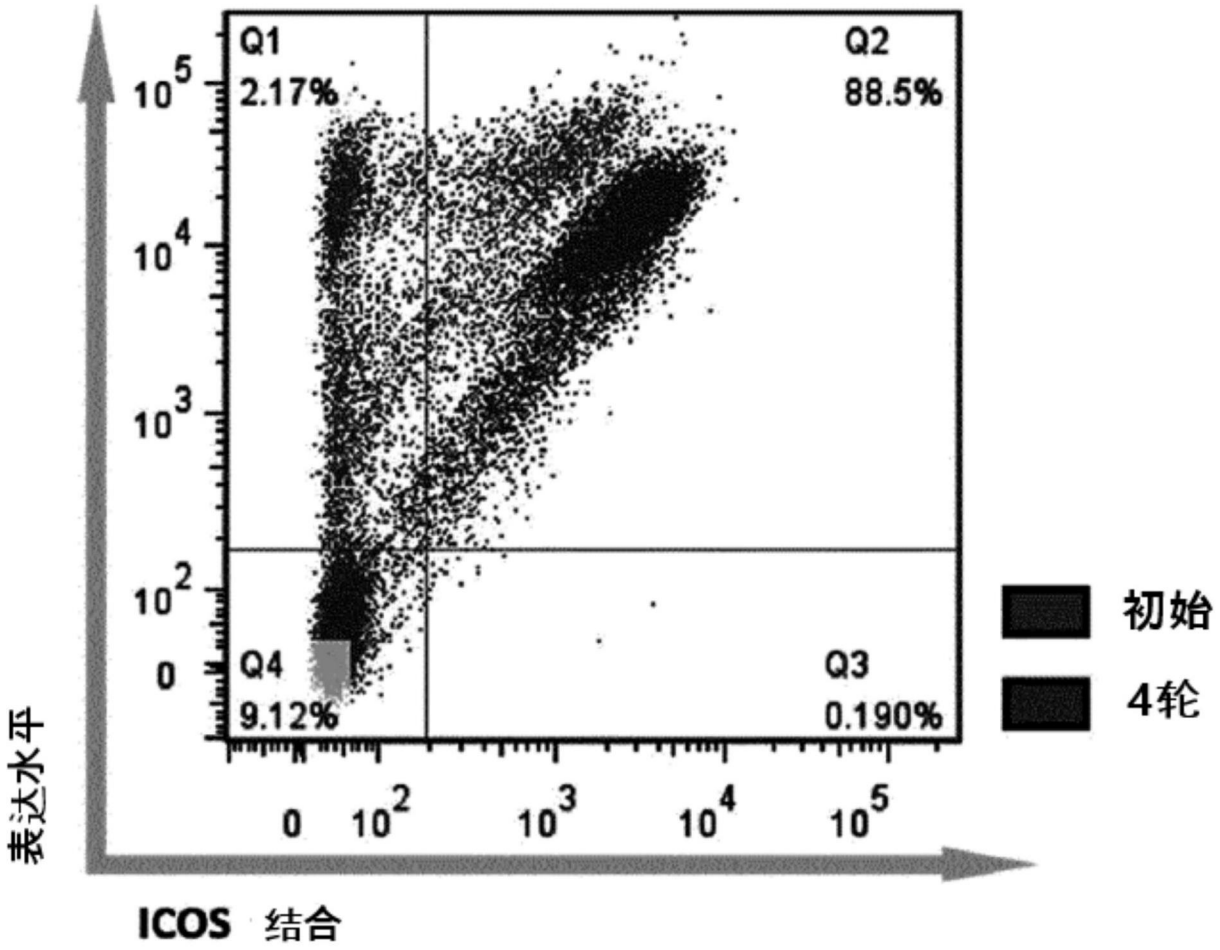

Q1
2.17%
Q2
88.5%
Q4
9.12%
Q3
0.190%
10^5
10^4
10^3
10^2
0
0
10^2
10^3
10^4
10^5
表达水平
ICOS 结合
初始
4轮

图5

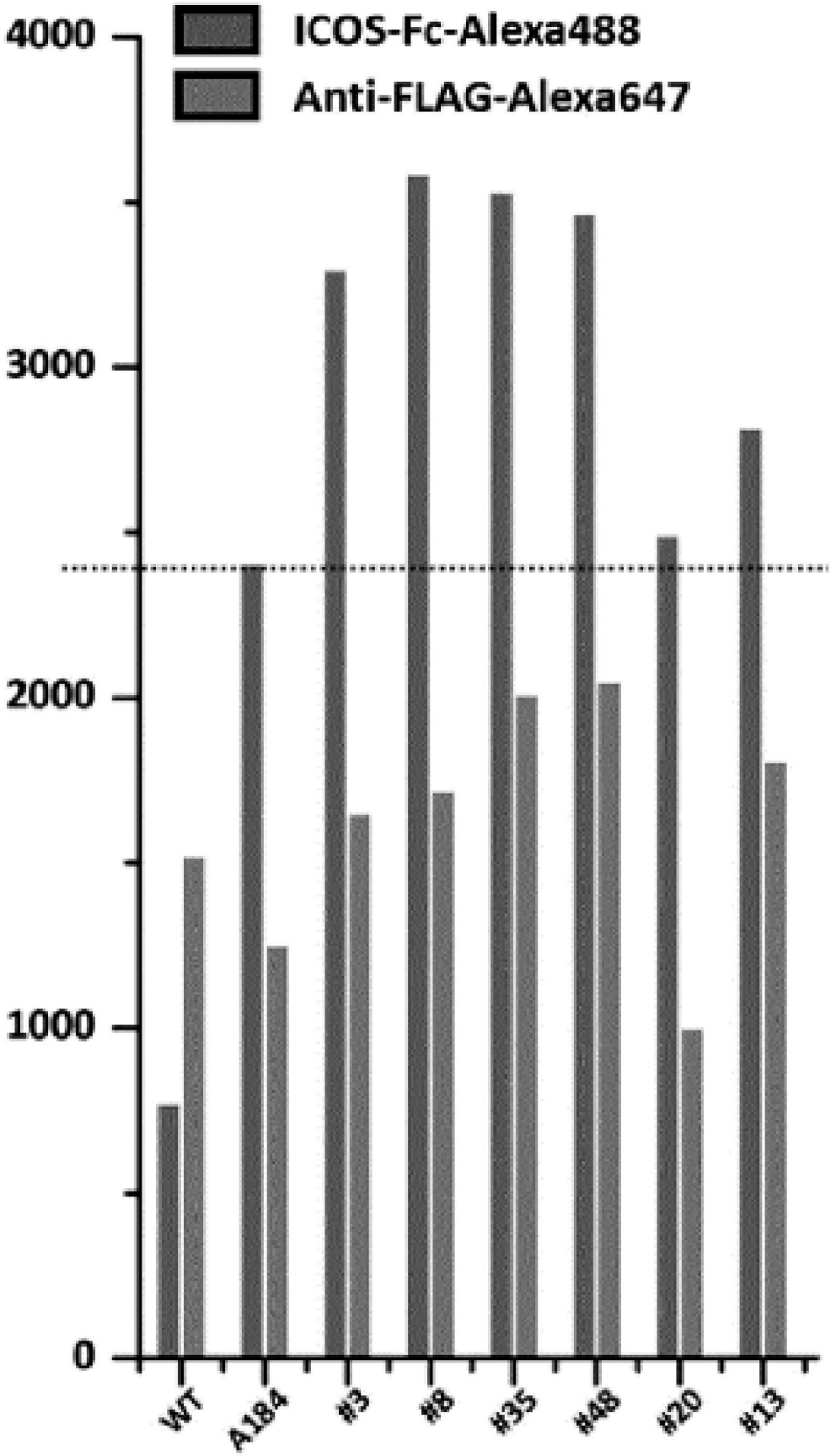

ICOS-Fc-Alexa488
Anti-FLAG-Alexa647
4000
3000
2000
1000
0
WT
A184
#3
#8
#35
#48
#20
#13

图6

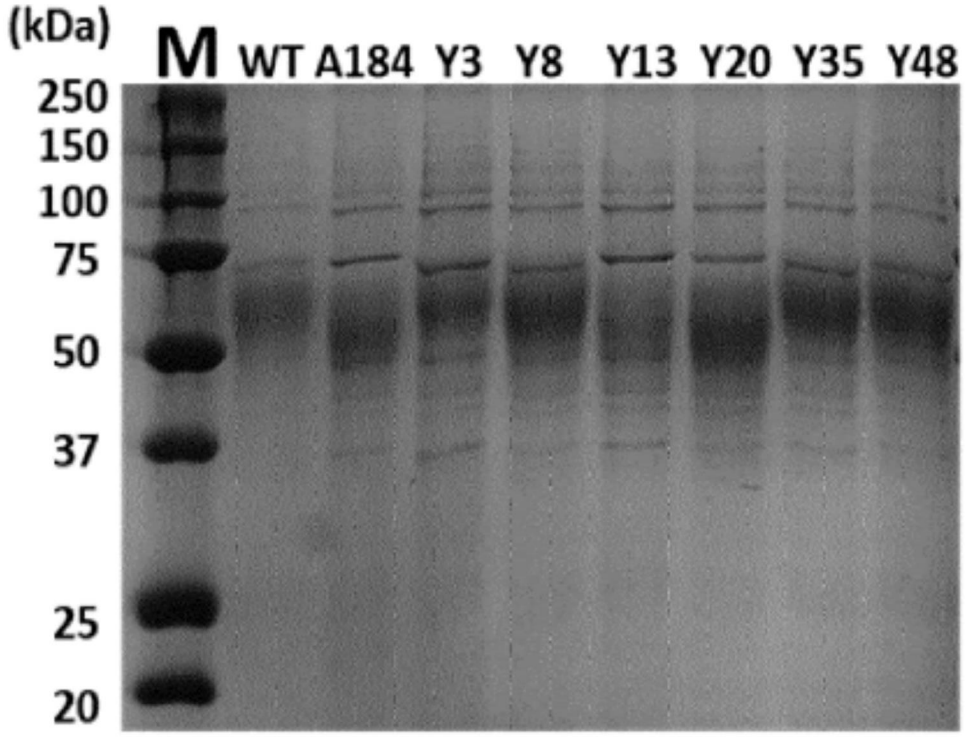

(kDa)
M
WT
A184
Y3
Y8
Y13
Y20
Y35
Y48
250
150
100
75
50
37
25
20

图7

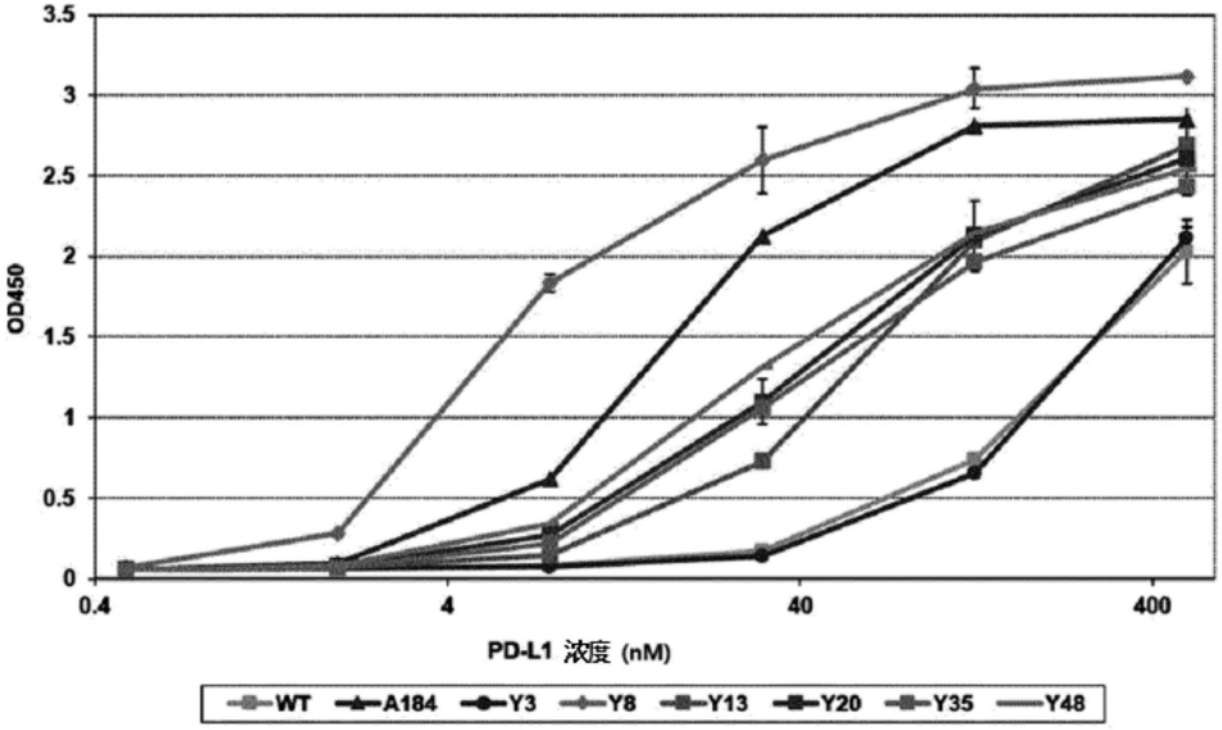

3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
OD450
0.4
4
40
400
PD-L1 浓度 (nM)
WT
A184
Y3
Y8
Y13
Y20
Y35
Y48

图8

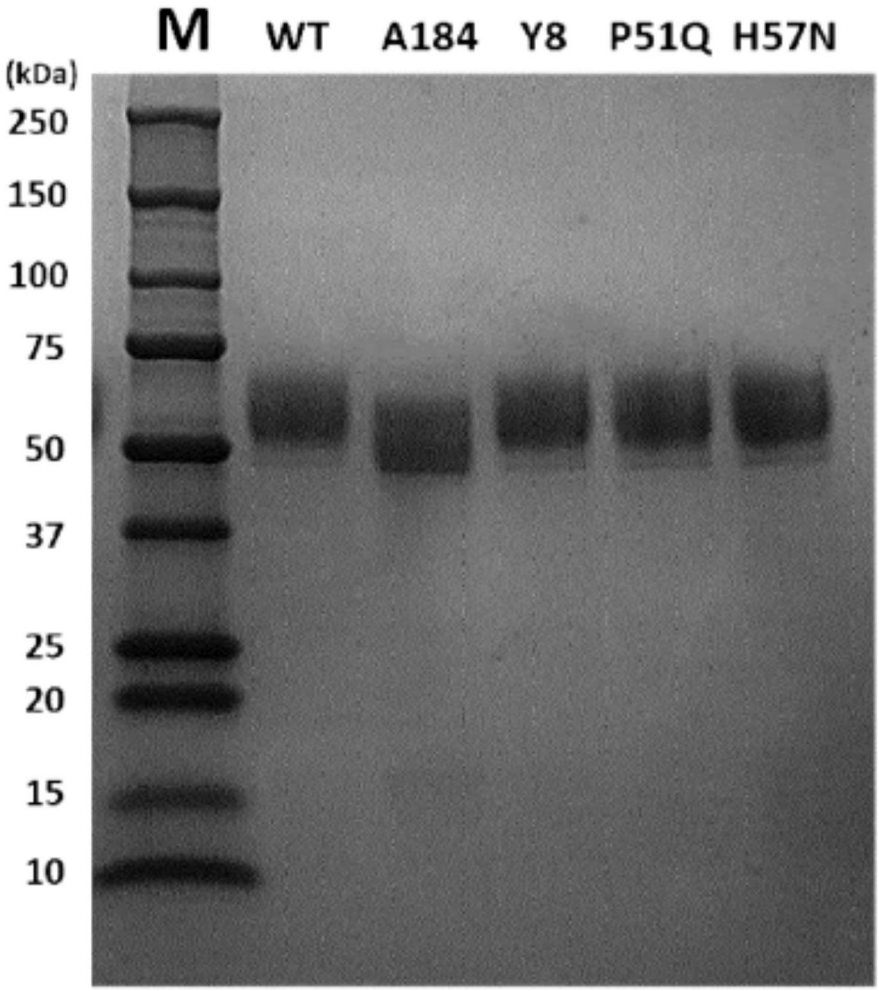


图9

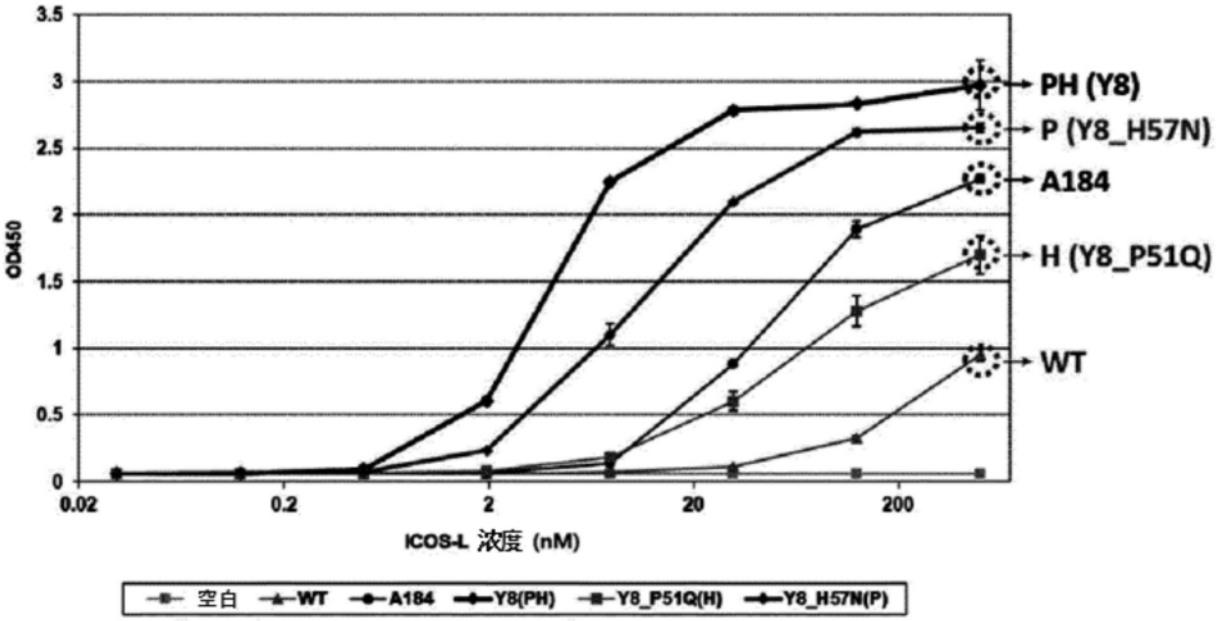

3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
OD450
0.02
0.2
2
20
200
ICOS-L 浓度 (nM)
PH (Y8)
P (Y8_H57N)
A184
H (Y8_P51Q)
WT
空白
WT
A184
Y8(PH)
Y8_P51Q(H)
Y8_H57N(P)

图10

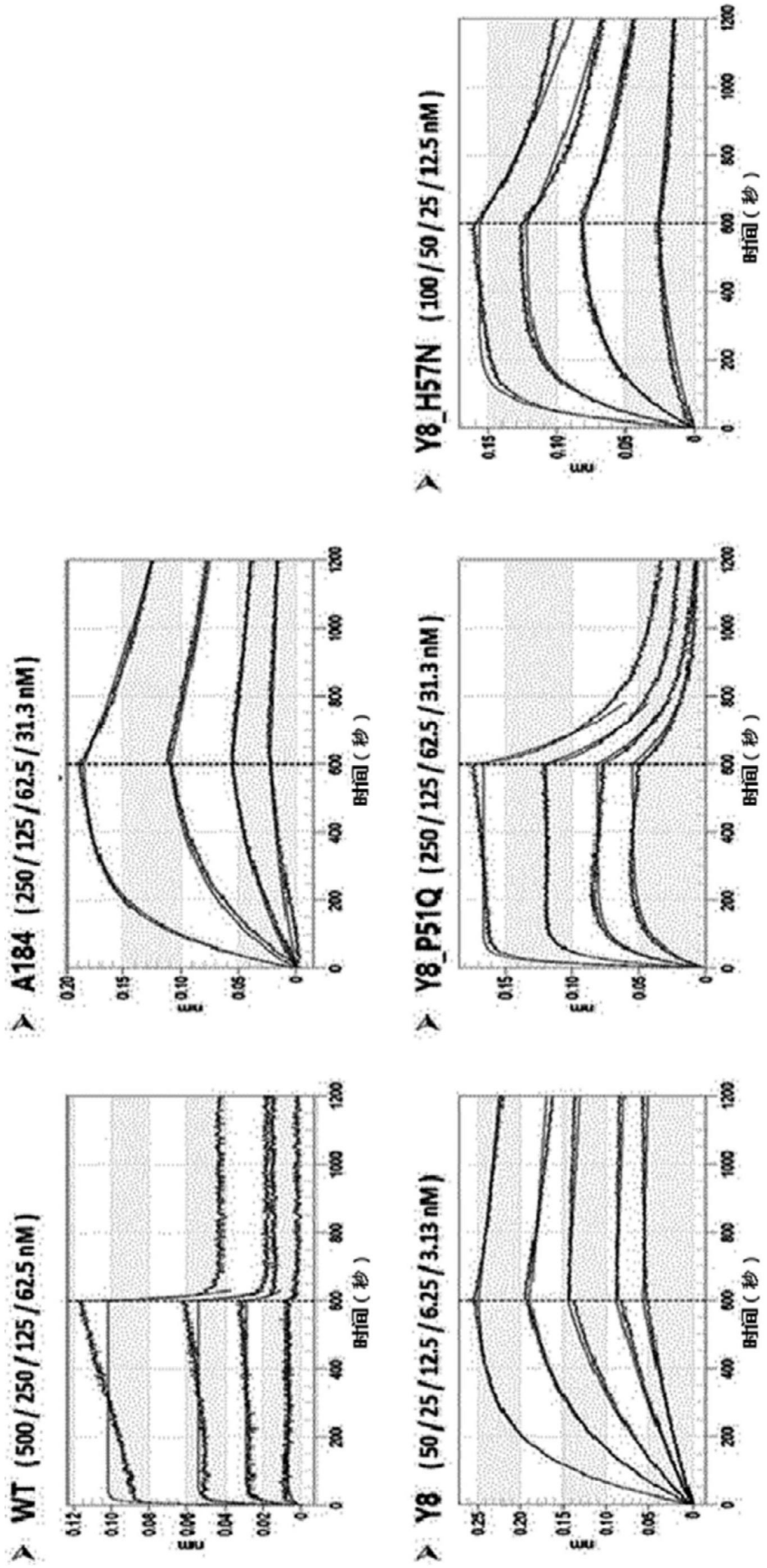

WT (500/250/125/62.5nM)
A184 (250/125/62.5/31.3nM)
Y8_H57N (100/50/25/12.5nM)
Y8 (50/25/12.5/6.25/3.13nM)
Y8_P51Q (250/125/62.5/31.3nM)
nm
时间(秒)

图11

ICOS-L 变异体	k_{on}	k_{off}	K_D	增加倍数	排位
WT	2.98×10^{5}	3.37×10^{-2}	1.13×10^{-7}	1	5
A184	2.80×10^{4}	6.45×10^{-4}	2.31×10^{-8}	4.89	3
Y8	1.50×10^{5}	1.79×10^{-4}	1.19×10^{-9}	94.96	1
P51Q	2.44×10^{5}	5.67×10^{-3}	2.33×10^{-8}	4.85	4
H57N	2.02×10^{5}	9.61×10^{-4}	4.75×10^{-9}	23.79	2

图12

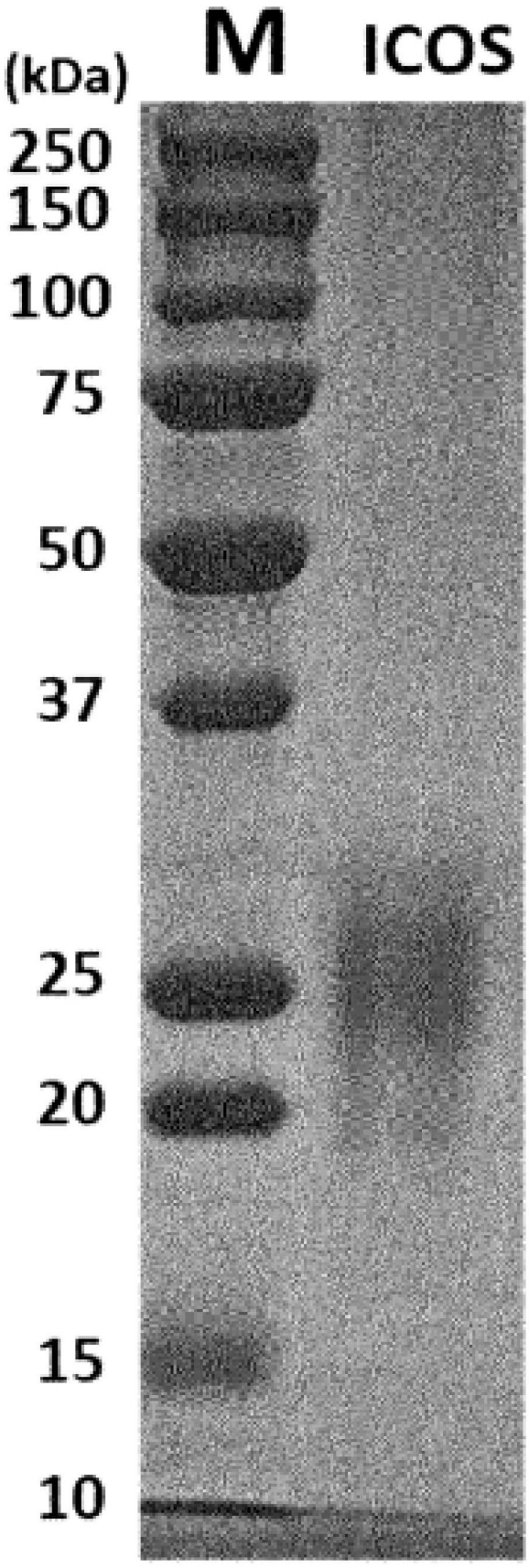


图13

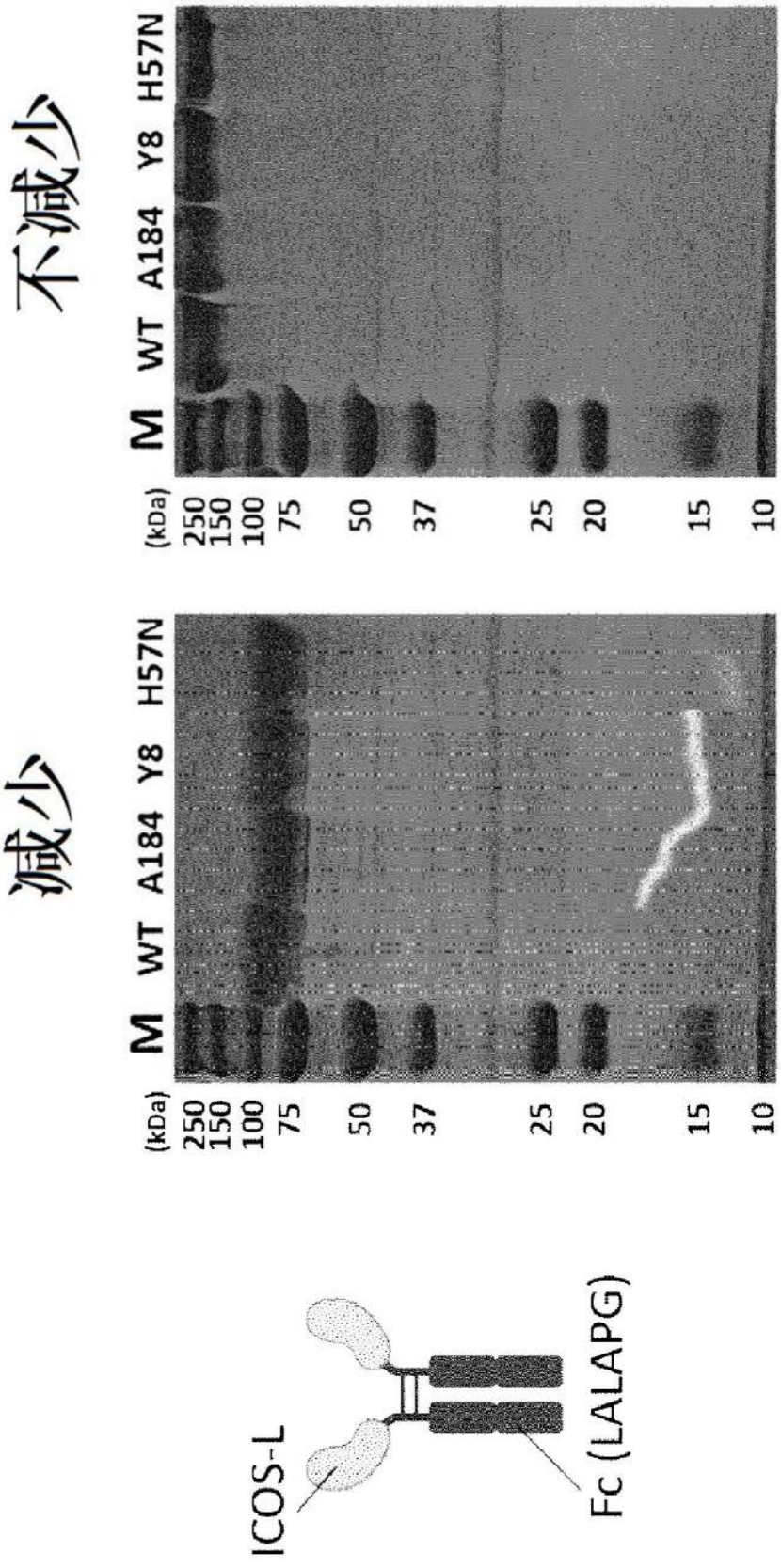

不减少
M WT A184 Y8 H57N
(kDa)
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
减少
M WT A184 Y8 H57N
(kDa)
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
ICOS-L
Fc (LALAPG)

图14

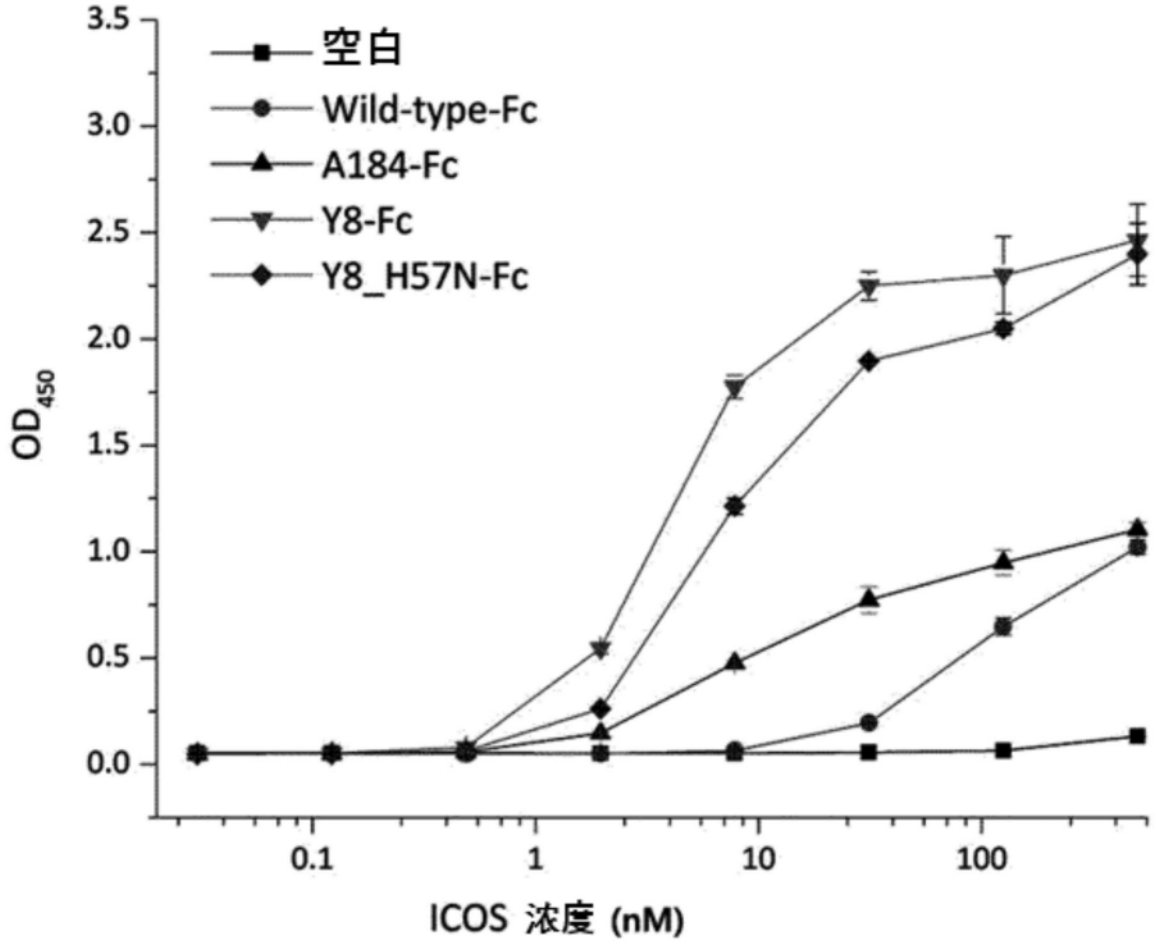

空白
Wild-type-Fc
A184-Fc
Y8-Fc
Y8_H57N-Fc
OD450
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
10
100
ICOS 浓度 (nM)

图15

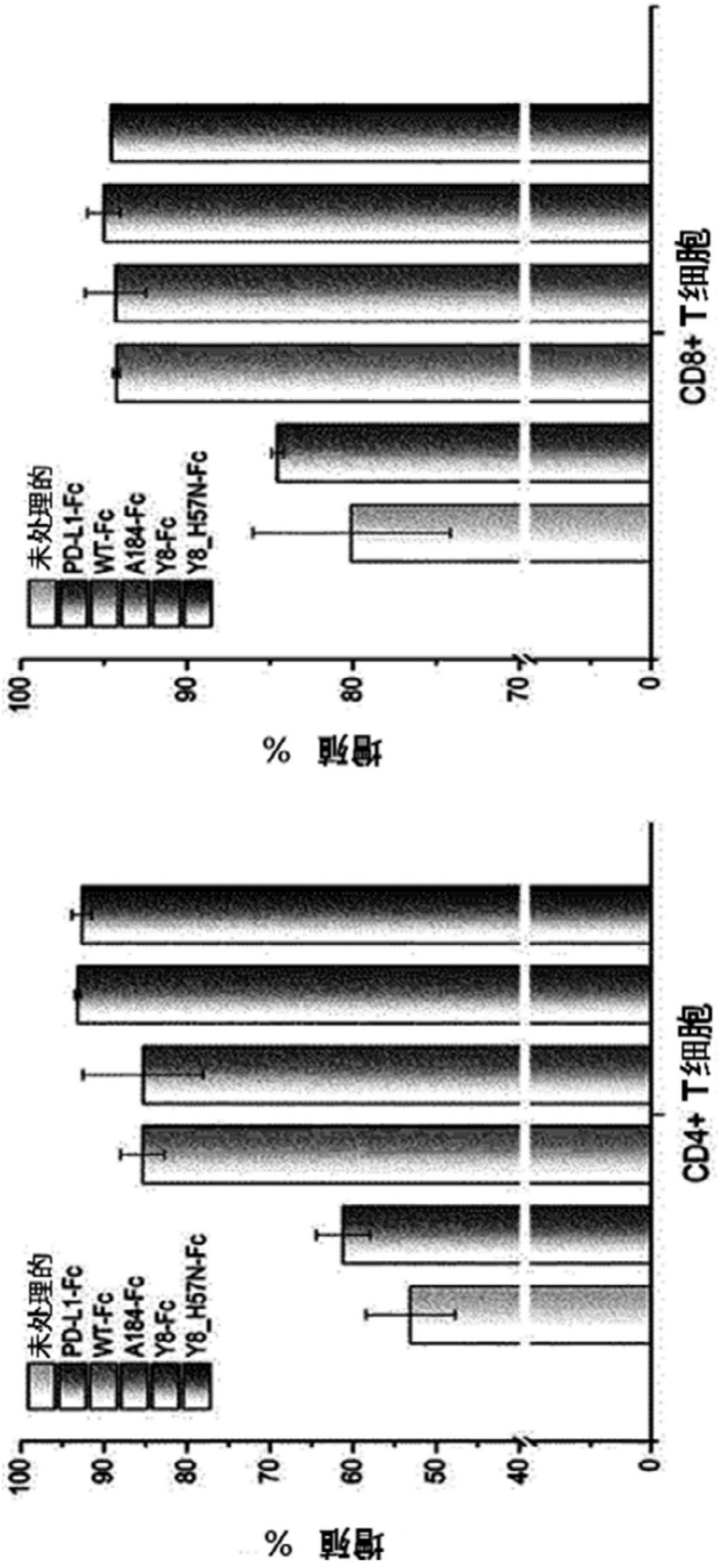

CD8+ T细胞
CD4+ T细胞
增殖 %
未处理的
PD-L1-Fc
WT-Fc
A184-Fc
Y8-Fc
Y8_H57N-Fc
100
90
80
70
60
50
40
0

图16

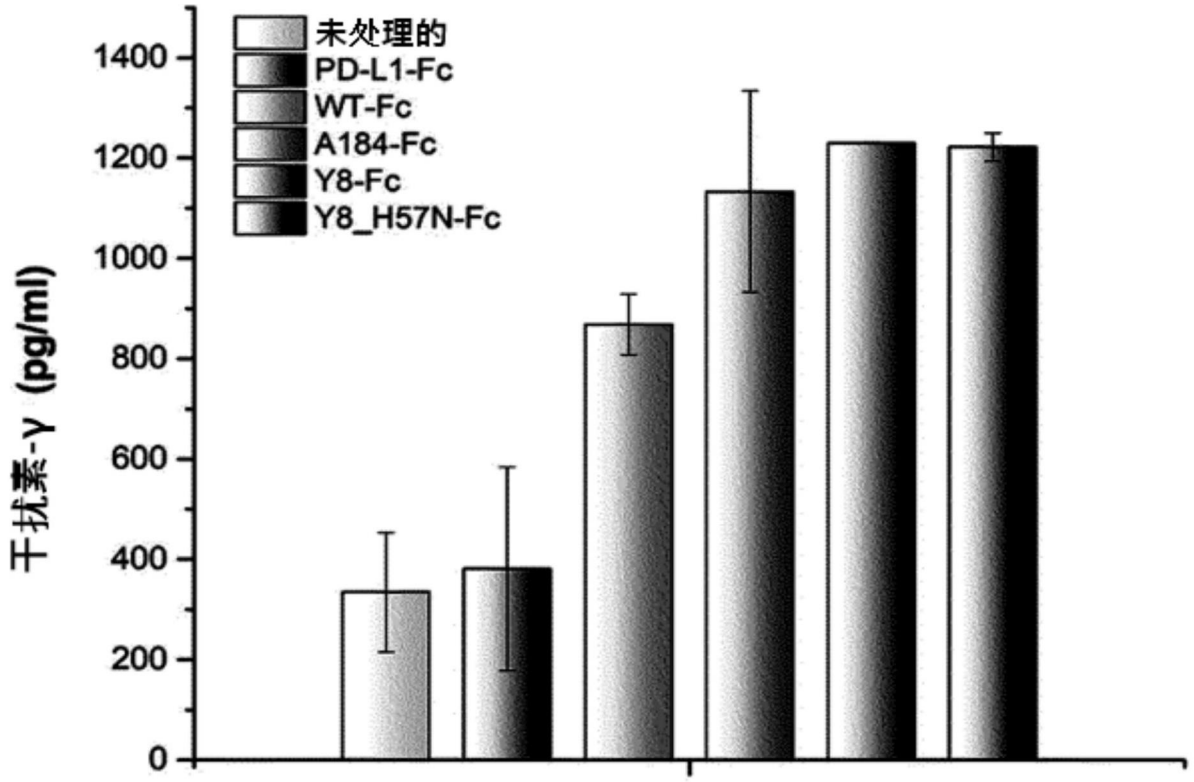

未处理的
PD-L1-Fc
WT-Fc
A184-Fc
Y8-Fc
Y8_H57N-Fc
干扰素-γ (pg/ml)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0

图17

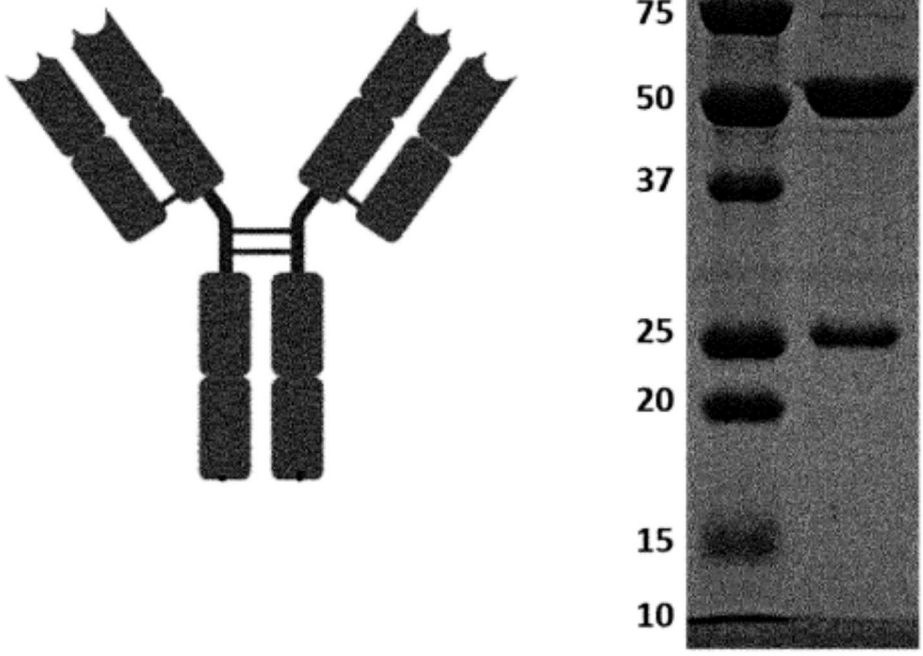


图18

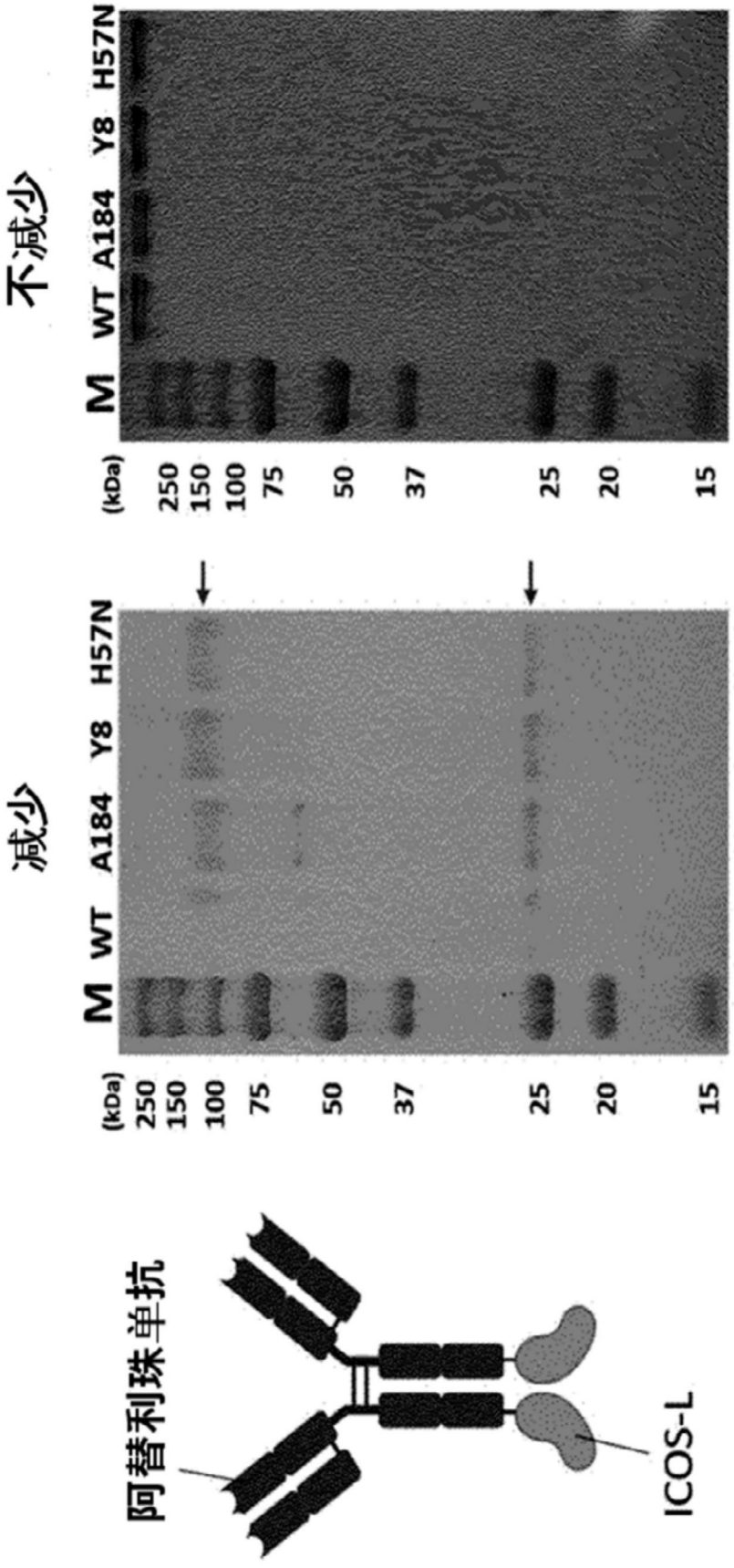

不减少
M
WT
A184
Y8
H57N
(kDa)
250
150
100
75
50
37
25
20
15
减少
M
WT
A184
Y8
H57N
(kDa)
250
150
100
75
50
37
25
20
15
阿替利珠单抗
ICOS-L

图19

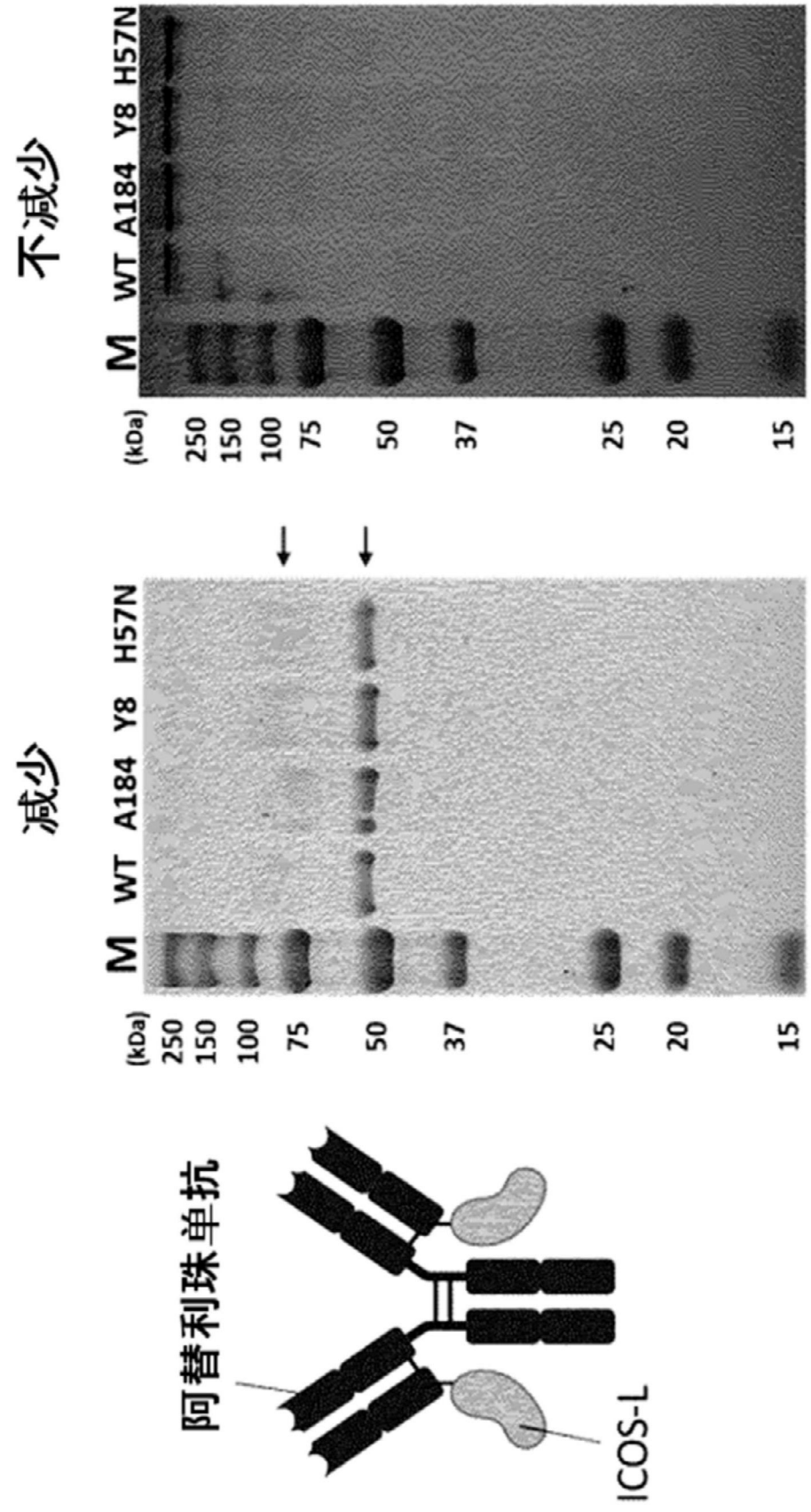

不减少
M
WT
A184
Y8
H57N
(kDa)
250
150
100
75
50
37
25
20
15
减少
M
WT
A184
Y8
H57N
(kDa)
250
150
100
75
50
37
25
20
15
阿替利珠单抗
ICOS-L

图20

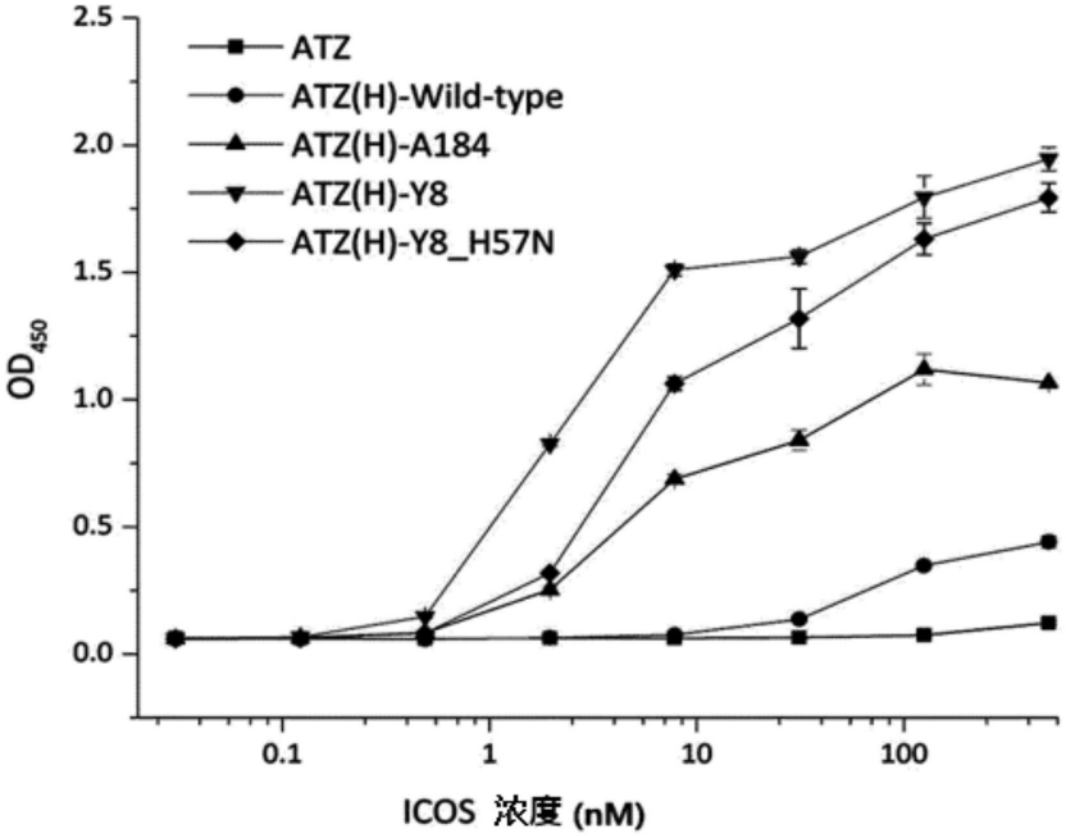

ATZ
ATZ(H)-Wild-type
ATZ(H)-A184
ATZ(H)-Y8
ATZ(H)-Y8_H57N
OD450
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
10
100
ICOS 浓度 (nM)

图21

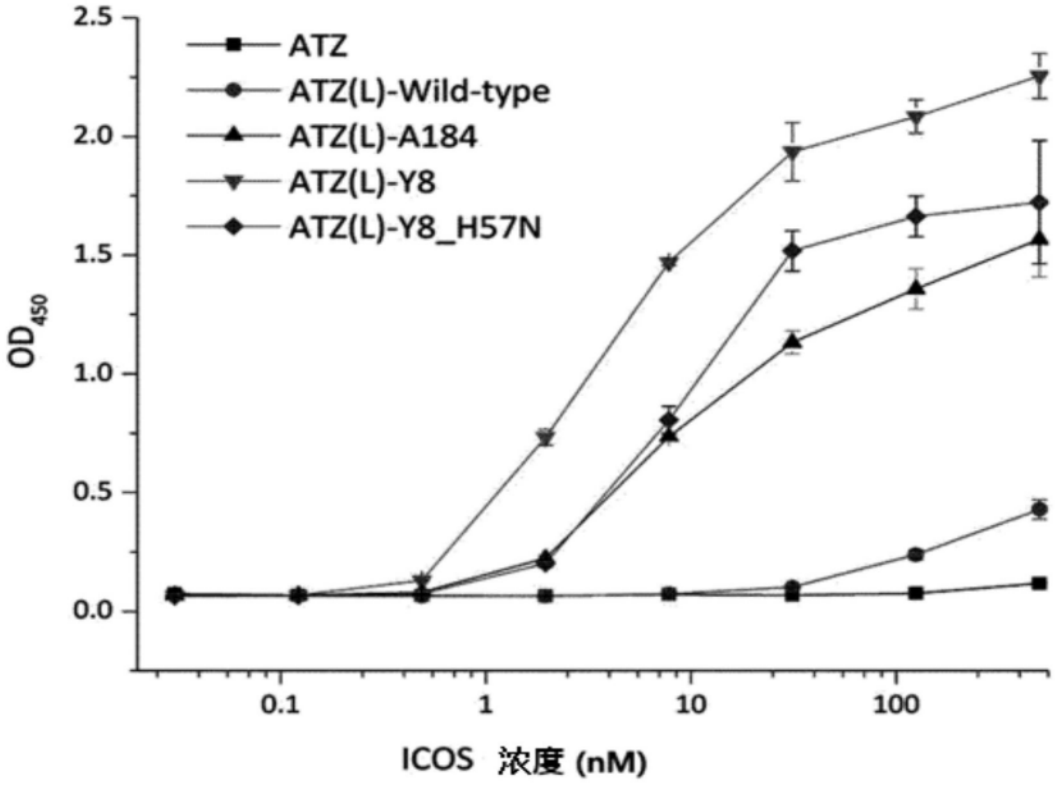

ATZ
ATZ(L)-Wild-type
ATZ(L)-A184
ATZ(L)-Y8
ATZ(L)-Y8_H57N
OD450
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
10
100
ICOS 浓度 (nM)

图22

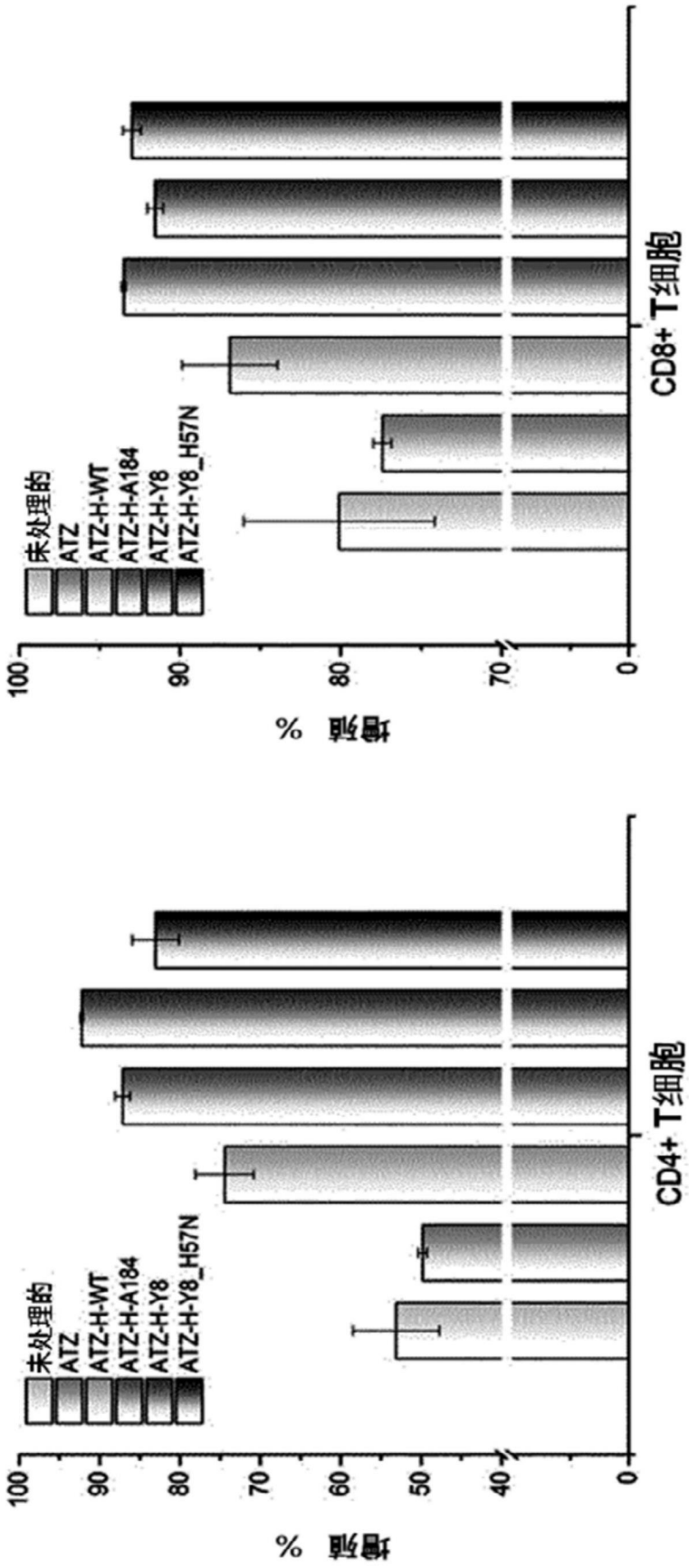

未处理的
ATZ
ATZ-H-WT
ATZ-H-A184
ATZ-H-Y8
ATZ-H-Y8_H57N
增殖 %
100
90
80
70
0
CD8+ T细胞
未处理的
ATZ
ATZ-H-WT
ATZ-H-A184
ATZ-H-Y8
ATZ-H-Y8_H57N
增殖 %
100
90
80
70
60
50
40
0
CD4+ T细胞

图23

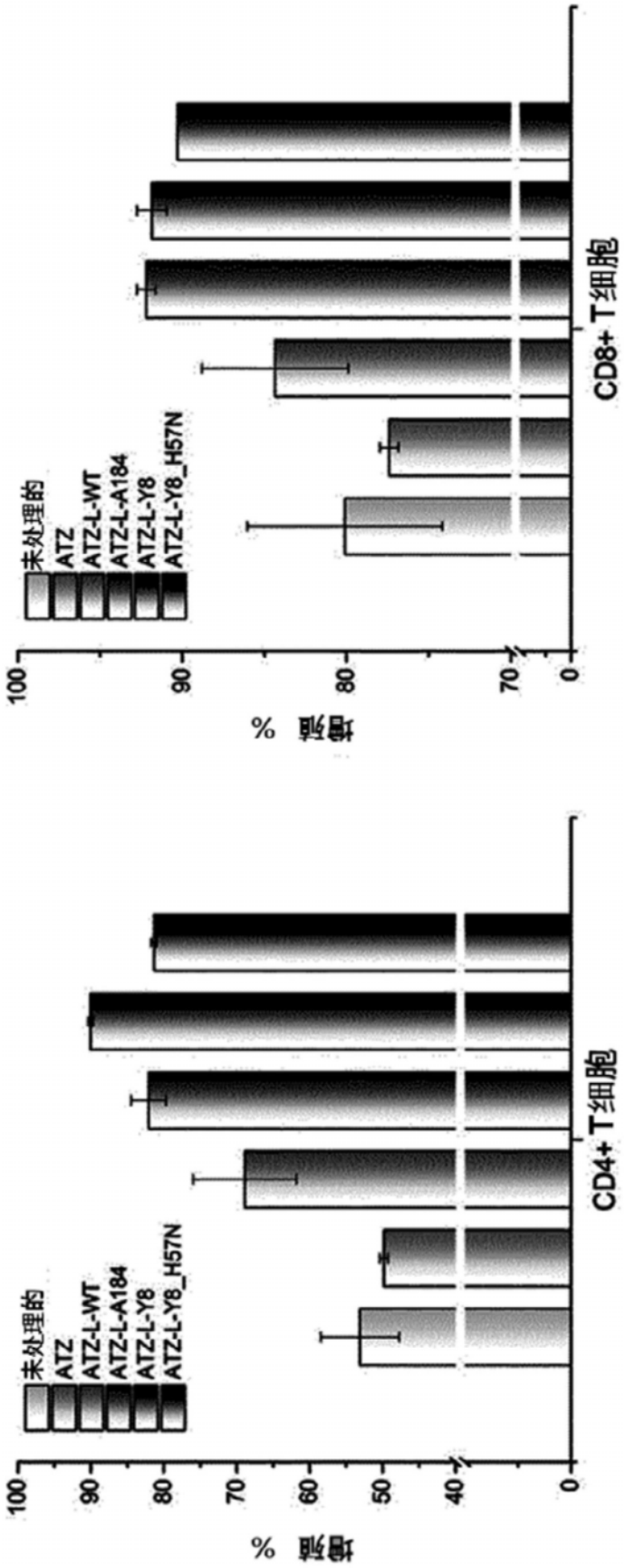

CD8+ T细胞
CD4+ T细胞
增殖 %
未处理的
ATZ
ATZ-L-WT
ATZ-L-A184
ATZ-L-Y8
ATZ-L-Y8_H57N
100
90
80
70
60
50
40
0

图24

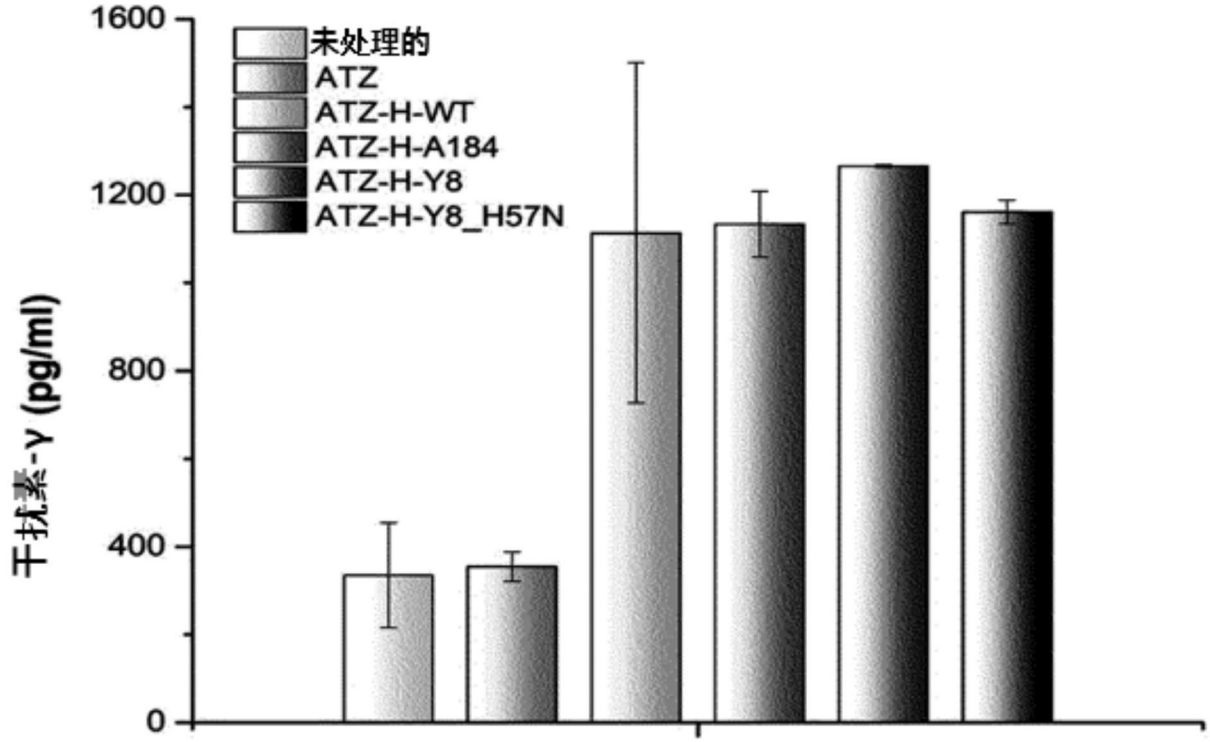

1600
1200
800
400
0
干扰素-γ (pg/ml)
未处理的
ATZ
ATZ-H-WT
ATZ-H-A184
ATZ-H-Y8
ATZ-H-Y8_H57N

图25

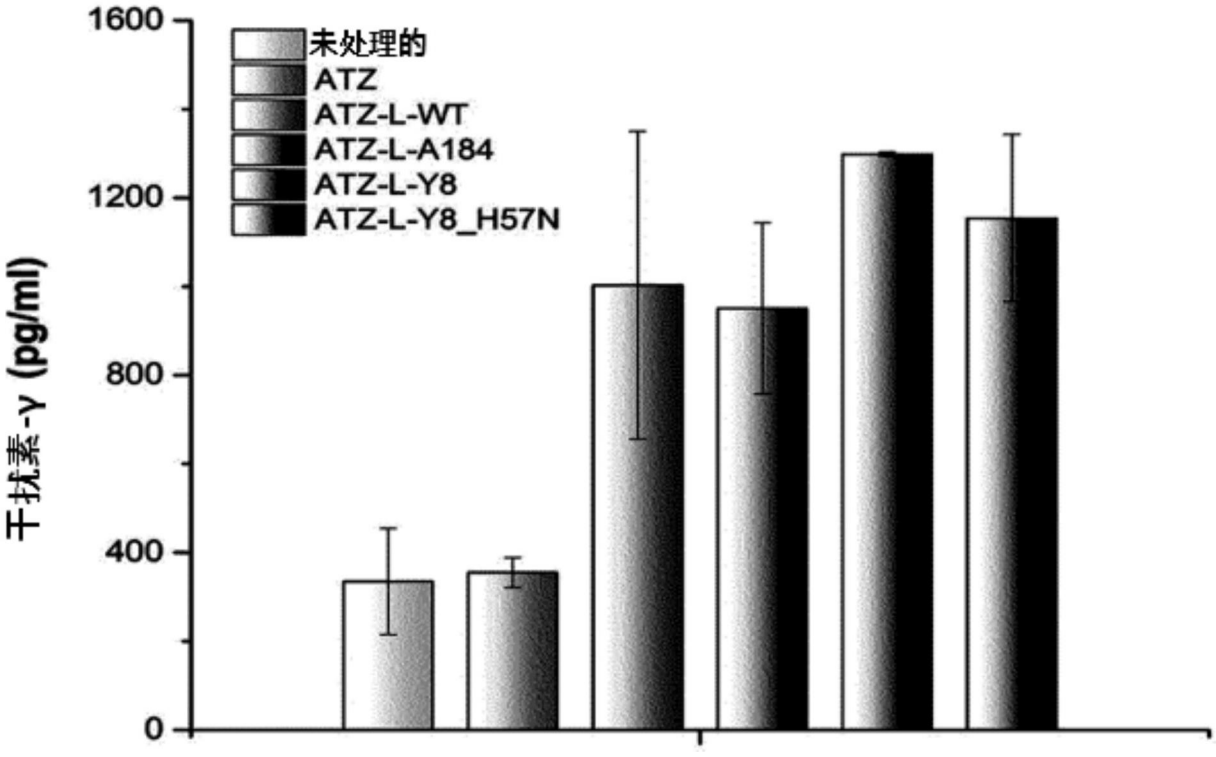

1600
1200
800
400
0
干扰素-γ (pg/ml)
未处理的
ATZ
ATZ-L-WT
ATZ-L-A184
ATZ-L-Y8
ATZ-L-Y8_H57N

图26