



1. 一种治疗患有肿瘤性疾病、紊乱或病症的对象的方法,通过将与式:1的多肽至少95%同源的多肽给予所述对象:

(AA1)<sub>a</sub>-(AA2)<sub>b</sub>-(AA3)<sub>c</sub>-(AA4)<sub>d</sub>-(AA5)<sub>e</sub>-(AA6)<sub>f</sub>-(AA7)<sub>g</sub>-(AA8)<sub>h</sub>-(AA9)<sub>i</sub>-T10-Q11-L12-Q13-L14-E15-H16-L17-(AA18)-L19-D20-L21-(AA22)-M23-I24-L25-N26-G27-I28-N29-N30-Y31-K32-N33-P34-(AA35)-L36-T37-(AA38)-(AA39)-L40-T41-F42-K43-F44-Y45-M46-P47-K48-K49-A50-T51-E52-L53-K54-(AA55)-L56-Q57-C58-L59-E60-E61-E62-L63-K64-P65-L66-E67-E68-(AA69)-L70-N71-L72-A73-(AA74)-S75-K76-N77-F78-H79-(AA80)-(AA81)-P82-R83-D84-(AA85)-(AA86)-S87-N88-(AA89)-N90-(AA91)-(AA92)-V93-L94-E95-L96-(AA97)-G98-S99-E100-T101-T102-F103-(AA104)-C105-E106-Y107-A108-(AA109)-E110-T111-A112-(AA113)-I114-V115-E116-F117-L118-N119-R120-W121-I122-T123-F124-(AA125)-(AA126)-S127-I128-I129-(AA130)-T131-L132-T133

1

其中:

a、b、c、d、e、f、g、h和i各自单独地选自0或1;

AA1是A(野生型, a=1)或缺失(a=0);

AA2是P(野生型, b=1)或缺失(b=0);

AA3是T(野生型, c=1)、C、A、G、Q、E、N、D、R、K、P或缺失(c=0);

AA4是S(野生型, d=1)或缺失(d=0);

AA5是S(野生型, e=1)或缺失(e=0);

AA6是S(野生型, f=1)或缺失(f=0);

AA7是T(野生型, g=1)或缺失(g=0);

AA8是K(野生型, h=1)或缺失(h=0);

AA9是K(野生型, i=1)或缺失(i=0);

AA18是L(野生型)或R、L、G、M、F、E、H、W、K、Q、S、V、I、Y、H、D或T;

AA22是Q(野生型)或F、E、G、A、L、M、F、W、K、S、V、I、Y、H、R、N、D、T或F;

AA35是K(野生型)或E;

AA38是R(野生型)、W或G;

AA39是M(野生型)、L或V;

AA55是H(野生型)或Y;

AA69是V(野生型)或A;

AA74是Q(野生型)、P、N、H、S;

AA80是L(野生型)、F或V;

AA81是R(野生型)、I、D或T;

AA85是L(野生型)或V;

AA86是I(野生型)或V;

AA89是I(野生型)或V;

AA92是I(野生型)或F;

AA97是K(野生型)或Q;

AA104是M(野生型)或A;

AA109是D(野生型)、C或具有激活的侧链的非天然氨基酸;

AA113是T(野生型)或N;

AA125是C(野生型)、A或S;

AA126是Q(野生型)或H、M、K、C、D、E、G、I、R、S或T;和

AA130是S(野生型)、T、G或R。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述多肽包含以下突变:

AA18选自下组:L(野生型)或R、L、G、M、F、E、H、W、K、Q、S、V、I、Y、H、D或T;

AA22选自下组:Q(野生型)或F、E、G、A、L、M、F、W、K、S、V、I、Y、H、R、N、D、T或F;和

AA126选自下组:Q(野生型)或H、M、K、C、D、E、G、I、R、S或T。

3. 如权利要求1所述的方法,其中所述多肽包含以下突变:

a=0;

AA18选自下组:L(野生型)或R、L、G、M、F、E、H、W、K、Q、S、V、I、Y、H、D或T;

AA22选自下组:Q(野生型)或F、E、G、A、L、M、F、W、K、S、V、I、Y、H、R、N、D、T或F;和

AA126选自下组:Q(野生型)或H、M、K、C、D、E、G、I、R、S或T。

4. 如权利要求1所述的方法,其中所述多肽包含一组突变,选自以下突变组:L18R、Q22E和Q126H;L18R、Q22E和Q126K;L18R、Q22E和Q126M;L18R、Q22E、Q126T;L18R、Q22E;V91K;V91R;Q126H;L18R和Q126H;Q22E和Q126H;L18G、Q22E和Q126H;L18A、Q22E和Q126H;L18M、Q22E和Q126H;L18F、Q22E和Q126H;L18W、Q22E和Q126H;L18K, Q22E和Q126H;L18Q、Q22E和Q126H;L18E、Q22E和Q126H;L18S、Q22E和Q126H;L18V、Q22E和Q126H;L18I、Q22E和Q126H;L18Y、Q22E和Q126H;L18H、Q22E和Q126H;L18N、Q22E和Q126H;L18D、Q22E和Q126H;L18T、Q22E和Q126H;L18R、Q22G和Q126H;L18R、Q22A和Q126H;L18R、Q22L和Q126H;L18R、Q22M和Q126H;L18R、Q22F和Q126H;L18R、Q22W和Q126H;L18R、Q22K和Q126H;L18R、Q22S和Q126H;L18R、Q22V和Q126H;L18R、Q22I和Q126H;L18R、Q22Y和Q126H;L18R、Q22H和Q126H;L18R、Q22R和Q126H;L18R、Q22N和Q126H;L18R、Q22D和Q126H;和L18R、Q22T和Q126H。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的多肽,其为PEG化的。

6. 如权利要求4所述的多肽,其中所述PEG化的多肽的PEG组分的分子量为约10kD至约70kD。

7. 如权利要求6所述的多肽,其中所述PEG化的多肽的PEG组分的分子量为约40kD。

8. 如权利要求1-4中任一项所述的多肽,其中所述多肽是融合蛋白。

9. 如权利要求8所述的多肽,其中所述融合蛋白包括Fc结构域。

10. 一种编码权利要求1-4和8-9中任一项所述多肽的核酸。

11. 如权利要求10所述的核酸,其中所述核酸是DNA。

12. 一种包含如权利要求10或11所述核酸的重组表达载体。

13. 如权利要求12所述的载体,其中所述载体是病毒载体。

14. 如权利要求12所述的载体,其中所述载体是非病毒载体。

15. 一种用权利要求13-14中任一项所述载体转化的宿主细胞。

16. 一种包含权利要求1-9中任一项所述多肽、权利要求10或11所述核酸或权利要求

12-14中任一项所述载体的药物制剂。

17. 一种治疗患有肿瘤性病症的疾病、紊乱的哺乳动物对象的方法,所述方法包括给予治疗有效量的权利要求16所述药物制剂。

18. 如权利要求17所述的方法,其中所述方法还包括给予所述对象补充剂。

19. 如权利要求18所述的方法,其中所述补充剂选自下组:化疗剂、抗体、免疫检查点调节剂、TIL、CAR-T细胞和物理方法。

20. 如权利要求19所述的方法,其中所述补充剂是免疫检查点调节剂。

21. 如权利要求19所述的方法,其中所述免疫检查点调节剂是抗-PD-1或抗-PD-L1抗体。

22. 如权利要求19所述的方法,其中所述补充剂是选自下组的抗体:[fam]-德喜曲妥珠单抗、恩诺单抗维多汀、泊洛妥珠单抗维多汀、切米普单抗、莫妥昔单抗假单抗、莫格利珠单抗、替拉珠单抗、伊巴珠单抗、度伐鲁单抗、伊妥珠单抗、奥佐米星、阿维鲁单抗、阿特珠单抗、奥拉单抗、伊克珠单抗、达雷妥尤单抗、依洛珠单抗、奈昔妥珠单抗、地努妥昔单抗、纳武单抗、博纳吐单抗、派姆单抗、雷莫芦单抗、司妥昔单抗、奥滨尤妥珠单抗、阿多曲妥珠单抗美坦、帕妥珠单抗、本妥昔单抗维多汀、伊匹单抗、奥法木单抗、聚乙二醇化赛妥珠单抗、卡妥索单抗、帕尼单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、托西莫单抗-I131、替伊莫单抗、吉妥珠单抗、奥佐米星、曲妥珠单抗、英夫利昔单抗、利妥昔单抗和依决洛单抗。

23. 如权利要求1-22中任一项所述的方法,其中所述肿瘤性疾病,紊乱或病症选自下组:腺瘤,纤维瘤,血管瘤,增生,异型,化生,发育异常,癌,白血病,乳腺癌,肉瘤,白血病,淋巴瘤,泌尿生殖系统癌,卵巢癌,尿道癌,膀胱癌,前列腺癌,胃肠道癌,结肠癌,食道癌,胃癌,肺癌;骨髓瘤;胰腺癌;肝癌;肾癌;内分泌癌;皮肤癌;胶质瘤,成神经细胞瘤,星形细胞瘤,骨髓增生异常症;宫颈原位癌;肠息肉;口腔白斑病;组织细胞增多症,增生型疤痕,包括瘢瘤,呼吸系统癌,胃肠系统癌,泌尿生殖系统癌,睾丸癌,乳腺癌,前列腺癌,内分泌系统癌,黑色素瘤,腺癌,骨髓增生性肿瘤,伴嗜酸性细胞增多症的骨髓和淋巴疾病,骨髓增生性/骨髓增生异常性肿瘤,骨髓增生异常综合征,急性髓性白血病和相关前体肿瘤,和不明细胞系急性白血病,早幼粒细胞白血病(APML),急性髓性白血病(AML)和慢性髓系白血病(CML),前体淋巴性肿瘤,成熟B细胞肿瘤,成熟T细胞肿瘤,霍奇金淋巴瘤和免疫缺陷相关的淋巴增生性疾病,淋巴细胞白血病(ALL),其包括B系ALL和T系ALL,慢性淋巴细胞性白血病(CLL),幼淋巴细胞白血病(PLL),毛细胞白血病(HLL)和华氏巨球蛋白血症(WM);成红细胞白血病和急性成巨核细胞白血病,恶性淋巴瘤,包括但不限于非霍奇金淋巴瘤及其变种,外周T细胞淋巴瘤,成人T细胞白血病/淋巴瘤(ATL),皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL),大颗粒淋巴细胞白血病(LGF),霍奇金病和里-斯氏病。

24. 如权利要求1-23中任一项所述的方法,其包括给予所述对象治疗有效量的hIL2突变蛋白,其足以使血清浓度维持大于约50%的至少24小时的时间段,所述血清浓度处于或高于足以促进CD3-激活的原代人T细胞的增殖的IL2突变蛋白的有效浓度,处于或低于足以诱导T细胞由所述IL2突变蛋白激活的所述IL2突变蛋白的血清浓度。

## 偏向化IL2突变蛋白方法和组合物

[0001] 关于政府资金的声明

[0002] 在构思本公开的主题或将其付诸实施时,没有使用美国政府的资金。

[0003] 相关申请

[0004] 本申请要求2020年1月14日提交的美国临时专利申请序列号62/961,141和2021年1月12日提交的美国临时专利申请序列号63/136,599的优先权,其各自通过引用纳入用于所有目的。

[0005] 发明背景

[0006] 肿瘤免疫疗法:肿瘤免疫疗法(或癌症免疫疗法)是一种治疗肿瘤性疾病的形式,其基于增强免疫系统攻击肿瘤细胞的先天能力。尽管目前对免疫系统机制的理解极大地帮助了癌症免疫疗法的发展,但调节免疫系统以治疗癌症的概念可能要追溯到100多年前。目前,有多种方法用于癌症的免疫疗法,例如抗癌疫苗、工程改造免疫细胞、同种异体TIL治疗、细胞因子和检查点调节抗体。所有这些方法的共同原则是,对象的先天和适应性免疫系统能够有效地攻击肿瘤细胞并消除肿瘤的基本信念。人癌症患者的抗肿瘤免疫力受限于抗肿瘤、免疫检查点阳性的CD8+T细胞和/或其耗竭的低发生率(prevalence)。

[0007] 白介素2:IL2是一种多能细胞因子,由抗原激活的T细胞产生。IL2对免疫系统产生广泛的影响,在调节免疫激活、抑制和内稳态方面发挥重要作用。IL2促进激活的T淋巴细胞的增殖和扩增,诱导初始T细胞的增殖和激活,增强B细胞的生长,并促进NK细胞的增殖和扩增。人白细胞介素2(IL2)是一个由133个氨基酸组成的4个 $\alpha$ 螺旋束的细胞因子。IL2是细胞因子IL2家族的成员,其包括IL2、IL-4、IL-7、IL9、IL-15和IL21。然而,IL2的功能是非冗余的,小鼠的基因敲除证明了这一点(Schorle,等(1991)Nature 352 (6336) :621-624)。hIL-2 (SEQ ID NO:1)的氨基酸序列可在Genbank中找到,登录号定位为NP\_000577.2。

[0008] IL2受体:IL2通过与三种不同的细胞表面蛋白相互作用在哺乳动物免疫细胞上发挥作用:(1)CD25(也称为IL2受体 $\alpha$ 、IL-2R $\alpha$ 、p55),CD122(也称为白细胞介素-2受体 $\beta$ 、IL2R $\beta$ 、IL15R $\gamma$ 和p70-75)和CD132(也称为白细胞介素2受体 $\gamma$ 、IL-2R $\gamma$ ;或共有 $\gamma$ 链,由其为IL2受体家族中其他多聚体受体的组分)。

[0009] CD25 (IL2R $\alpha$ ):CD25是55kD的多肽,其在Treg细胞中组成型表达,并响应于激活在其他T细胞上诱导型表达。hIL2结合至hCD25的Kd约为 $10^{-8}$ M。CD25在文献中也被称为"低亲和力"IL2受体。人CD25("hCD25")表达为272个氨基酸的前蛋白,其包含21个氨基酸的信号序列,信号序列在翻译后被去除,以产生251个氨基酸的成熟蛋白质。氨基酸22-240(成熟蛋白的氨基酸1-219)对应于胞外结构域。氨基酸241-259(成熟蛋白的氨基酸220-238)对应于跨膜结构域。氨基酸260-272(成熟蛋白的氨基酸239-251)对应于胞内结构域。CD25的胞内结构域相对较小(13个氨基酸),并且没有与任何独立的信号转导活性相关。尚未观察到IL2/CD25复合物产生可检测的胞内信号转导反应。人CD25的核酸和蛋白序列可分别在Genbank登录号NM\_000417和NP\_0004Q8中找到。

[0010] CD122 (IL2R $\beta$ ):CD122是单通道I型跨膜蛋白。人CD122(hCD122)表达为551个氨基酸的前蛋白质,前26个氨基酸包括信号序列,其在成熟的525个氨基酸的蛋白质中翻译后被

裂解。氨基酸27-240(成熟蛋白的氨基酸1-214)对应于胞外结构域,氨基酸241-265(成熟蛋白的氨基酸225-239)对应于跨膜结构域,氨基酸266-551(成熟蛋白的氨基酸240-525)对应于胞内结构域。如本文所用,术语CD122包括CD122蛋白的天然存在的变体,其包括含有S57F和D365E取代(按照成熟的hCD122蛋白的编号)的CD122变体。hCD122在UniProtKB数据库中被引为条目P14784。人CD122的核酸和蛋白序列可分别在Genbank登录号NM\_000878和NP\_000869中找到。

[0011] CD132 (IL2R  $\gamma$ ):CD132是1型细胞因子受体,被IL-4、IL-7、IL-9、IL-15和IL21的受体复合物共有,因此文献中被称为“共有”  $\gamma$  链。人CD132 (hCD132) 表达为369个氨基酸的前蛋白,包括22个氨基酸的N-末端信号序列。氨基酸23-262(成熟蛋白的氨基酸1-240)对应于细胞外结构域,氨基酸263-283(成熟蛋白的氨基酸241-262)对应于21个氨基酸的跨膜结构域,氨基酸284-369(成熟蛋白的氨基酸262-347)对应于胞内结构域。hCD132在UniProtKB数据库中被引为条目P31785。人CD132的核酸和蛋白质序列可分别在Genbank登录号NM\_000206和NP\_000197中找到。

[0012] IL2中等和高亲和力受体:除了“低亲和力”CD25 IL2受体,已经表征了两种其他IL2受体复合物:(a)“中等亲和力”二聚体IL2受体,其包括CD122和CD132(也称为“IL2R $\beta$   $\gamma$ ”),和(b)“高亲和力”三聚体IL2受体复合物,其包括CD25、CD122和CD132蛋白(也称为IL2Ra $\beta$   $\gamma$ )。hIL2对于中等亲和力的CD122/CD132 (IL2R  $\gamma$ ) 受体复合物的Kd约为 $10^{-9}$ M。hIL2对于高IL2亲和力受体复合物的Kd约为 $10^{-11}$ M。

[0013] IL2受体表达:IL2受体在大多数淋巴细胞表面表达,特别是在T细胞、NK细胞和B细胞上,但其表达水平是可变的,取决于各种因素,包括细胞的激活阶段。非激活的T细胞和NK细胞几乎只表达中等亲和力的二聚体IL2受体,由两个信号转导受体CD122和CD132组成,对IL2的反应性相对较低,因为它们主要表达中等亲和力的CD122/CD132复合物,相较于CD25/CD122/CD132的高亲和力受体来说,对IL2的亲和力相对较低。相反,激活的T细胞和调节性T细胞表达由CD25、CD122和CD132组成的三聚体高亲和力IL2受体。TCR激活的T细胞(即所谓的“经历抗原的”T细胞)表达高亲和力的三聚体IL2受体。T细胞,包括肿瘤浸润T细胞(“TIL”)和肿瘤识别细胞,在接收到T细胞受体(TCR)信号时,会上调CD25和CD122(Kalia,等(2010) *Immunity* 32 (1):91-103。响应于接受T细胞受体(TCR)信号,CD25和CD122受体的上调使抗原激活的T细胞对IL2细胞因子高度敏感。虽然,Treg组成型表达CD25,并因此表达高亲和力的三聚体IL2受体,但TCR激活的T细胞表达的三聚体受体水平高于调节性T细胞。因此,在受到抗原激发(antigen-challenged)的宿主中,抗原激活的T细胞的扩增显著超过了Treg的扩增。(Humblet-Baron,等(2016) *J Allergy Clin Immunol* 138 (1):200-209e208)。

[0014] IL2/IL2受体相互作用:单体IL2通过结合至细胞表面表达的受体组分的胞外结构域,与三聚体“高亲和力”形式的IL2受体和二聚体中等亲和力受体形成复合物(Wang,等(2005) *Science* 310:159-1163)。IL2至CD25的结合诱导IL2的构象变化,促进增加与CD122的结合。IL2突变体,模拟CD25结合诱导的构象变化,表现出与CD122的结合增加(Levin,等(2012) *Nature* 484 (7395):529-533)。CD132的缔合提供了二聚体中等亲和力或三聚体高亲和力受体复合物的形成,其与细胞内信号转导相关。除了通过JAK/STAT途径(例如STAT5的磷酸化)和其他细胞系统提供胞内信号转导外,hIL2与细胞上的hIL2高亲和力三聚体受体的相互作用启动了CD122内化的过程,CD25的膜结合形式作为可溶性蛋白(称为“可溶性

CD25”或“sCD25”)从激活的细胞中释放出来,并引发激活的细胞内源产生的IL2的释放,其能够以自分泌和/或旁分泌方式发挥作用。

[0015] IL2在治疗人癌症中的用途:重组hIL2适用于治疗成人转移性黑色素瘤和转移性肾细胞癌。高剂量hIL2 (HD-hIL2) 的治疗应用诱导高度免疫浸润的黑色素瘤和肾细胞癌的肿瘤排斥反应(Atkins, 等 (1999) *J Clin Oncol* 17 (7) :2105-2116)。然而,HD-hIL2治疗与严重的剂量限制性毒性有关,包括中性粒细胞功能受损、发热、低血压、腹泻,需要专家管理。Dutcher, 等 (2014) *J Immunother Cancer* 2 (1) :26。HD-hIL2治疗激活大多数淋巴细胞,包括主要表达中等亲和力受体 (CD122/CD132) 的初始T细胞和NK细胞,和表达高亲和力三聚体受体 (CD25/CD122/CD132) 的CD25+调节性T细胞 (Treg)。HD-hIL2单一疗法也可能诱导全身性毛细血管渗漏综合征 (generalized capillary leak syndrome),从而导致死亡。这将HD-IL2疗法的使用限制在大多数年轻、非常健康的心肺功能正常的患者身上。HD-IL2疗法通常在医院环境中应用,并且经常需要进入重症监护室。

[0016] 临床经验表明,HD-IL2治疗激活主要表达中等亲和力受体的初始T细胞和NK细胞,以及介导CD8+ T细胞活性的CD25+调节性T细胞 (Treg)。由于他们组成型表达CD25, Treg对IL2特别敏感。为了避免优先激活Treg,已经开发了IL2变体并引入临床开发,这些变体被设计为避免结合至CD25,而具有与中等亲和力CD122/CD132受体的增强结合,以激活NK细胞和静息CD8+T细胞。这种IL2突变蛋白在文献中常被称为“非- $\alpha$ -IL2”或“ $\beta/\gamma$ -IL2”突变蛋白。然而,这种“非- $\alpha$ -IL2”或“ $\beta/\gamma$ -IL2”突变蛋白,由于其结合至CD25减少,也避免了结合至抗原激活的T细胞,而抗原激活T细胞已被鉴定为抗肿瘤T细胞反应的主要介导物 (Peace, D. J. 和 Cheever, M. A. (1989) *J Exp Med* 169 (1) :161-173)。

[0017] 此外,临床前实验表明,NK细胞是IL2介导的急性毒性的主要机制。Assier E, 等 (2004) *J Immunol* 172:7661-7668。由于NK细胞表达中等亲和力 (CD122/CD132;  $\beta/\gamma$ ) IL2受体,这种 $\beta/\gamma$ -IL2突变蛋白的性质是增强这种NK细胞的增殖,其可能导致毒性增强。此外,尽管Treg与CD8+ T细胞的下调有关,但Treg也已被证明限制IL2介导的肿瘤外毒性 (Li, 等 (2017) *Nature Communications* 8 (1) :1762)。尽管已经提出一氧化氮合酶抑制剂可以改善VLS的症状,但是当观察到VLS时的常规做法是撤出IL2治疗。为了减轻与HD IL2治疗相关的VLS,已在患者中测试了低剂量IL2方案。虽然低剂量IL2治疗方案确实部分减轻了VLS毒性,但这种较低的毒性是以牺牲肿瘤治疗中的最佳治疗结果为代价的。

[0018] 鉴于hIL2的多能性作用,及其经证明的调节与人疾病相关的多种细胞类型的活性的能力,保留了该天然分子的某些所需特征同时根据治疗场景将不需要的特征最小化的IL2突变蛋白仍然是一个活跃的研究领域。

## 发明内容

[0019] 本发明涉及对于一个或多个IL2受体表现出改变的结合特性的人白细胞介素-2 (IL2) 突变蛋白及其在治疗肿瘤性疾病中的用途。本发明的hIL2突变蛋白保留了IL2的所需的生物学功能,例如T细胞增殖和对抗原激活的T细胞的细胞毒性活性,而没有与HD IL2治疗相关的全身性毒性。此外,与野生型IL2或 $\beta/\gamma$ -IL2突变蛋白相比,本发明的组合物表现出显著较低水平的NK介导的毒性,包括但不限于毛细血管渗漏综合征。本发明的hIL2突变蛋白保留了与CD25和CD122的结合,但表现出对CD132的结合减弱,且相较于NK细胞,优先激

活CD25+ T细胞。

[0020] IL2突变蛋白:本发明提供了包含人IL2(“hIL2”)突变蛋白的组合物和采用该突变蛋白的方法,该突变蛋白在治疗和/或预防肿瘤性疾病方面是有用的,其中,相较于野生型hIL2(“wt hIL2”),hIL2突变蛋白表现出对CD132的结合亲和力下降。在一些实施方式中,相较于wt hIL2,hIL2突变蛋白表现出对CD132的结合亲和力下降,并保留对CD122和/或CD25的显著的结合亲和力。在一些实施方式中,相较于wt hIL2,hIL2突变蛋白表现出对CD132的结合亲和力下降,保留了相当于或大于wt hIL2的对CD122的结合亲和力。在一些实施方式中,相较于wt hIL2,hIL2突变蛋白表现出对CD132的结合亲和力下降,保留了相当于或大于wt hIL2的对CD25的结合亲和力。在一些实施方式中,相较于wt hIL2,hIL2突变蛋白表现出对CD132的结合亲和力下降,保留了相当于或大于wt hIL2的对CD122和CD25的结合亲和力。在一些实施方式中,相较于wt hIL2,hIL2突变蛋白表现出对CD132的结合亲和力下降,且在CD25(膜结合CD25或sCD25)存在的情况下表现出对CD122的结合亲和力增加,与wt hIL2相当或更大。在一些实施方式中,相较于wt hIL2,hIL2突变蛋白表现出对CD132的结合亲和力下降,并且在sCD25存在的情况下表现出对CD122的结合亲和力增加,与wt hIL2相当或更大。在一些实施方式中,相较于wt hIL2,hIL2突变蛋白表现出对hCD132的结合亲和力下降,相较于wt hIL2,表现出对hCD25/hCD122受体复合物和/或高亲和力hCD25/hCD122/hCD132受体复合物的结合亲和力增加。在一方面,本发明提供hIL2突变蛋白,与wt hIL2相比,其表现出对hCD25显著或增强的结合亲和力,和对hCD132受体胞外结构域降低的结合亲和力。在一些实施方式中,本发明的hIL2突变蛋白包含减少CD132受体结合亲和力的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方式中,所述减少CD132受体结合亲和力的一个或多个氨基酸取代选自hIL2突变蛋白的第18、22和126位的氨基酸取代,根据成熟wt hIL2编号。

[0021] 用于肿瘤性疾病的方法:本发明提供了一种预防和/或治疗需要治疗或预防的哺乳动物对象的肿瘤性疾病的方法,该方法包括以下步骤:向需要治疗的对象给予治疗或预防有效量的hIL2突变蛋白,其中该hIL2突变蛋白选自下述的hIL2:(a)相较于wt hIL2,表现出对CD132的结合亲和力下降;(b)相较于wt hIL2,表现出对CD132的结合亲和力下降,保留对CD122和/或CD25显著的结合亲和力;(c)相较于wt hIL2,表现出对CD132的结合亲和力下降,保留相当于或高于wt hIL2的对CD122的结合亲和力;(d)相较于wt hIL2,表现出对CD132的结合亲和力下降,保留相当于或高于wt hIL2的对CD25的结合亲和力;(e),相较于wt hIL2,表现出对CD132的结合亲和力下降,保留相当于或高于wt hIL2的对CD122和CD25的结合亲和力;(f)相较于wt hIL2,表现出对CD132的结合亲和力下降,在存在CD25的情况下,表现出与wt hIL2相当或更高的增加的对CD122的结合亲和力;或(g)相较于wt hIL2表现出对CD132的结合亲和力下降,而在存在sCD25的情况下,相较于wt hIL2表现出对CD122的结合亲和力增加。

[0022] 在一些实施方式中,该方法进一步包括向哺乳动物对象给予一种或多种补充剂的步骤,包括但不限于一种或多种化疗剂、免疫检查点调节剂、放疗和/或物理干预治疗方法(例如手术)。

[0023] 在一些实施方式中,补充剂是治疗性抗体。在一些实施方式中,治疗性抗体结合至肿瘤细胞抗原。

[0024] 在一些实施方式中,补充剂是免疫细胞。在一些实施方式中,免疫细胞是工程改造

的免疫细胞,其包括但不限于CAR T细胞、工程改造的NK细胞、TCR工程改造细胞或工程改造Treg,或包含一种或多种这种工程改造免疫细胞的细胞群。在一些实施方式中免疫细胞是肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)或包含一种或多种TIL的细胞群。在一些实施方式中,本发明提供了用本发明的IL2突变蛋白治疗对象的方法,其中给药导致对象体内IL2突变蛋白的血清浓度所达水平足以促进表达高亲和力IL2受体的T细胞(例如抗原激活T细胞)增殖,但低于足以实质上诱导主要表达中等亲和力受体的T细胞(例如NK细胞)激活的浓度。

[0025] 本发明进一步提供了编码本发明的hIL2突变蛋白的核酸。

[0026] 本发明进一步提供了包含编码本发明的hIL2突变蛋白的核酸的重组载体,该核酸与一个或多个表达控制序列操作性地连接在用于重组生产的宿主细胞中。

[0027] 本发明进一步提供了一种预防和/或治疗需要治疗的哺乳动物对象的肿瘤性疾病的方法,该方法包括以下步骤:给予对象治疗性或预防性有效量的编码本发明的hIL2突变蛋白的核酸或编码本发明的hIL2突变蛋白的重组载体。在一些实施方式中,重组载体可以是非病毒载体(如质粒或其他非病毒递送系统)或病毒载体,其包括复制能力型、复制缺陷型和条件性复制型的病毒载体。

[0028] 本发明进一步提供了包含重组载体的工程改造细胞,该重组载体包含编码本发明的hIL2突变蛋白的核酸,该核酸操作性地连接至一个或多个表达控制序列。

[0029] 本发明进一步提供了一种预防和/或治疗需要治疗的哺乳动物对象的肿瘤性疾病的方法,该方法包括以下步骤:给予对象治疗性或预防性有效量的工程改造的真核细胞,该工程改造的真核细胞包含重组载体,该重组载体包含编码本发明的hIL2突变蛋白的核酸,其操作性地连接至一个或多个在真核细胞中的操作性表达控制序列。在一些实施方式中,所述真核细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方式中,哺乳动物细胞是免疫细胞。在一些实施方式中,哺乳动物免疫细胞是工程改造的免疫细胞。

[0030] 本发明进一步提供本发明的hIL2突变蛋白的修饰形式,其中hIL2突变蛋白被修饰以增加其在哺乳动物对象中的作用时间。这种修饰的例子包括但不限于偶联至一个或多个运载体蛋白、PEG化、酰化、或hIL2突变蛋白的氨基酸序列修饰、取代或缺失。

[0031] 本发明进一步提供了制造本发明的hIL2突变蛋白的方法。这种制造hIL2突变蛋白的方法的例子包括但不限于在原核细胞或真核细胞中重组生产或化学合成。

[0032] 本发明进一步提供了本发明的hIL2突变蛋白的药学上可接受的制剂或包含操作性连接至一个或多个在目标细胞中活跃的表达控制序列的编码hIL2突变蛋白的核酸序列的重组载体。在一些实施方式中,药学上可接受的制剂可包含一种或多种补充剂。

[0033] 本发明提供了一种预防和/或治疗哺乳动物对象的肿瘤性疾病的方法,该方法包括以下步骤:给予对象包含治疗性或预防性有效量的hIL2突变蛋白的药学上可接受的剂型或给予需要治疗的对象包含编码本发明的hIL2突变蛋白的核酸的载体。

[0034] 本发明进一步提供一种试剂盒,该试剂盒包括本发明的hIL2突变蛋白的药学上可接受的剂型和使用说明。该药物剂型可提供在一个预填充注射器中。该试剂盒任选地进一步提供一定量的溶液,用于与hIL2突变蛋白的药学上可接受的剂型混合,其中该溶液包括但不限于一种或多种稀释剂、重建缓冲剂、激活剂、制剂、张力剂或包括但不限于可生物降解或可生物蚀解的生物相容性聚合物的控释制剂的组分。该试剂盒可以任选地提供包含一种或多种补充剂的药学上可接受的制剂。该试剂盒任选地包括便于给药的医疗装置(例如,

注射器或自动注射器装置)。该试剂盒还提供一个或多个组件,用于将该试剂盒及其组件长期保持在冷藏温度下,例如一个或多个凝胶冰袋和/或隔热包装。

[0035] Garcia等(国际申请号PCT/US2018/062122,2019年5月31日公开的PCT国际公开号WO 2019/104092 A1,以下称为“Garcia '092”)描述了某些具有包括第18、22和126位的修饰的IL2突变蛋白,此外,其表现出对CD132的结合减弱,同时保留部分IL2活性,该活性在本发明所述的方法的实践中是有用的。

[0036] 在一些实施方式中,本发明提供了一种治疗患有肿瘤性疾病、紊乱或病症的对象的方法,通过将与式:1的多肽至少95%同源的多肽给予所述对象:

[0037] (AA1) a- (AA2) b- (AA3) c- (AA4) d- (AA5) e- (AA6) f- (AA7) g- (AA8) h- (AA9) i- T10-Q11-L12-Q13-L14-E15-H16-L17- (AA18) -L19-D20-L21- (AA22) -M23-I24-L25-N26-G27-I28-N29-N30-Y31-K32-N33-P34- (AA35) -L36-T37- (AA38) - (AA39) -L40-T41-F42-K43-F44-Y45-M46-P47-K48-K49-A50-T51-E52-L53-K54- (AA55) -L56-Q57-C58-L59-E60-E61-E62-L63-K64-P65-L66-E67-E68- (AA69) -L70-N71-L72-A73- (AA74) -S75-K76-N77-F78-H79- (AA80- (AA81) -P82-R83-D84- (AA85) - (AA86) -S87-N88- (AA89) -N90- (AA91) - (AA92) -V93-L94-E95-L96- (AA97) -G98-S99-E100-T101-T102-F103- (AA104) -C105-E106-Y107-A108- (AA109) -E110-T111-A112- (AA113) -I114-V115-E116-F117-L118-N119-R120-W121-I122-T123-F124- (AA125) - (AA126) -S127-I128-I129- (AA130) -T131-L132-T133

[0038] 其中:

[0039] a、b、c、d、e、f、g、h和i各自单独地选自0或1;

[0040] AA1是A(野生型,a=1)或缺失(a=0);

[0041] AA2是P(野生型,b=1)或缺失(b=0);

[0042] AA3是T(野生型,c=1)、C、A、G、Q、E、N、D、R、K、P或缺失(c=0);

[0043] AA4是S(野生型,d=1)或缺失(d=0);

[0044] AA5是S(野生型,e=1)或缺失(e=0);

[0045] AA6是S(野生型,f=1)或缺失(f=0);

[0046] AA7是T(野生型,g=1)或缺失(g=0);

[0047] AA8是K(野生型,h=1)或缺失(h=0);

[0048] AA9是K(野生型,i=1)或缺失(i=0);

[0049] AA18是L(野生型)或R、L、G、M、F、E、H、W、K、Q、S、V、I、Y、H、D或T;

[0050] AA22是Q(野生型)或F、E、G、A、L、M、F、W、K、S、V、I、Y、H、R、N、D、T或F;

[0051] AA35是K(野生型)或E;

[0052] AA38是R(野生型)、W或G;

[0053] AA39是M(野生型)、L或V;

[0054] AA55是H(野生型)或Y;

[0055] AA69是V(野生型)或A;

[0056] AA74是Q(野生型)、P、N、H、S;

[0057] AA80是L(野生型)、F或V;

[0058] AA81是R(野生型)、I、D或T;

[0059] AA85是L(野生型)或V;

- [0060] AA86是I(野生型)或V;
- [0061] AA89是I(野生型)或V;
- [0062] AA92是I(野生型)或F;
- [0063] AA97是K(野生型)或Q;
- [0064] AA104是M(野生型)或A;
- [0065] AA109是D(野生型)、C或具有激活的侧链的非天然氨基酸;
- [0066] AA113是T(野生型)或N;
- [0067] AA125是C(野生型)、A或S;
- [0068] AA126是Q(野生型)或H、M、K、C、D、E、G、I、R、S或T;和
- [0069] AA130是S(野生型)、T、G或R。
- [0070] 在一些实施方式中,该多肽包含以下突变:
- [0071] AA18选自下组:L(野生型)或R、L、G、M、F、E、H、W、K、Q、S、V、I、Y、H、D或T;
- [0072] AA22选自下组:Q(野生型)或F、E、G、A、L、M、F、W、K、S、V、I、Y、H、R、N、D、T或F;和
- [0073] AA126选自下组:Q(野生型)或H、M、K、C、D、E、G、I、R、S或T。
- [0074] 在一些实施方式中,该多肽包含以下突变:
- [0075] a=0;
- [0076] AA18选自下组:L(野生型)或R、L、G、M、F、E、H、W、K、Q、S、V、I、Y、H、D或T;
- [0077] AA22选自下组:Q(野生型)或F、E、G、A、L、M、F、W、K、S、V、I、Y、H、R、N、D、T或F;和
- [0078] AA126选自下组:Q(野生型)或H、M、K、C、D、E、G、I、R、S或T。
- [0079] 在一些实施方式中,该多肽包含一组突变,其选自以下突变组:L18R、Q22E和Q126H;L18R、Q22E和Q126K;L18R、Q22E和Q126M;L18R、Q22E、Q126T;L18R;Q22E;V91K;V91R;Q126H;L18R和Q126H;Q22E和Q126H;L18G、Q22E和Q126H;L18A、Q22E和Q126H;L18M、Q22E和Q126H;L18F、Q22E和Q126H;L18W、Q22E和Q126H;L18K、Q22E和Q126H;L18Q、Q22E和Q126H;L18E、Q22E和Q126H;L18S、Q22E和Q126H;L18V、Q22E和Q126H;L18I、Q22E和Q126H;L18Y、Q22E和Q126H;L18H、Q22E和Q126H;L18N、Q22E和Q126H;L18D、Q22E和Q126H;L18T、Q22E和Q126H;L18R、Q22G和Q126H;L18R、Q22A和Q126H;L18R、Q22L和Q126H;L18R、Q22M和Q126H;L18R、Q22F和Q126H;L18R、Q22W和Q126H;L18R、Q22K和Q126H;L18R、Q22S和Q126H;L18R、Q22V和Q126H;L18R、Q22I和Q126H;L18R、Q22Y和Q126H;L18R、Q22H和Q126H;L18R、Q22R和Q126H;L18R、Q22N和Q126H;L18R、Q22D和Q126H;和L18R、Q22T和Q126H。
- [0080] 在一些实施方式中,该多肽是PEG化的。在一些实施方式中,这种PEG化多肽的PEG组分的分子量为约10kD至约70kD。在一些实施方式中,这种PEG化多肽的PEG组分的分子量为约40kD。
- [0081] 在一些实施方式中,多肽是融合蛋白。在一些实施方式中,融合蛋白包含Fc结构域。
- [0082] 还提供了编码上述或本文其他地方所述多肽的核酸。在一些实施方式中,核酸是DNA。
- [0083] 还提供了包含如上所述核酸的重组表达载体。
- [0084] 在一些实施方式中,所述载体是病毒载体。在一些实施方式中,所述载体是非病毒载体。

[0085] 还提供了用如上所述的载体转化的宿主细胞。

[0086] 还提供了包含如上所述的多肽、如上所述核酸或如上所述载体的药物制剂。

[0087] 还提供了一种治疗患有肿瘤性病症的疾病、紊乱的哺乳动物对象的方法，所述方法包括给予治疗有效量的如上所述药物制剂。在一些实施方式中，所述方法还包括给予所述对象补充剂。在一些实施方式中，所述补充剂选自下组：化疗剂、抗体、免疫检查点调节剂、TIL、CAR-T细胞和物理方法。在一些实施方式中，补充剂是免疫检查点调节剂。在一些实施方式中，免疫检查点调节剂是抗-PD-1抗体或抗-PD-L1抗体。在一些实施方式中，该补充剂是选自下组的抗体：[fam]-德喜曲妥珠单抗(trastuzumab deruxtecan)、恩诺单抗维多汀(enfortumab vedotin)、泊洛妥珠单抗维多汀(polatuzumab vedotin)、切米普单抗(cemiplimab)、莫妥昔单抗假单抗(moxetumomab pasudotox)、莫格利珠单抗(mogamizumab)、替拉珠单抗(tildrakizumab)、伊巴珠单抗(ibalizumab)、度伐鲁单抗(durvalumab)、伊妥珠单抗(inotuzumab)、奥佐米星(ozogamicin)、阿维鲁单抗(avelumab)、阿特珠单抗(atezolizumab)、奥拉单抗(olaratumab)、伊克珠单抗(ixekizumab)、达雷妥尤单抗(aratumumab)、依洛珠单抗(elotuzumab)、奈昔妥珠单抗(necitumumab)、地努妥昔单抗(dinutuximab)、纳武单抗(nivolumab)、博纳吐单抗(blinatumomab)、派姆单抗(pembrolizumab)、雷莫芦单抗(ramucirumab)、司妥昔单抗(siltuximab)、奥滨尤妥珠单抗(obinutuzumab)、阿多曲妥珠单抗美坦(ado-trastuzumab emtansine)、帕妥珠单抗(pertuzumab)、本妥昔单抗维多汀(brentuximab vedotin)、伊匹单抗(ipilimumab)、奥法木单抗(ofatumumab)、聚乙二醇化赛妥珠单抗(certolizumab pegol)、卡妥索单抗(catumaxomab)、帕尼单抗(panitumumab)、贝伐单抗(bevacizumab)、西妥昔单抗(cetuximab)、托西莫单抗(tositumomab)-I131、替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan)、吉妥珠单抗(gemtuzumab)、奥佐米星(ozogamicin)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、英夫利昔单抗(infliximab)、利妥昔单抗(rituximab)和依决洛单抗(edrecolomab)。

[0088] 在一些实施方式中，该肿瘤性疾病、紊乱或病症选自下组：腺瘤，纤维瘤，血管瘤，增生，异型，化生，发育异常，癌，白血病，乳腺癌，肉瘤，白血病，淋巴瘤，泌尿生殖系统癌，卵巢癌，尿道癌，膀胱癌，前列腺癌，胃肠道癌，结肠癌，食道癌，胃癌，肺癌；骨髓瘤；胰腺癌；肝癌；肾癌；内分泌癌；皮肤癌；胶质瘤，成神经细胞瘤，星形细胞瘤，骨髓增生异常症；宫颈原位癌；肠息肉；口腔白斑病；组织细胞增多症(histiocytoses)，增生型疤痕，包括瘢瘤，呼吸系统癌，胃肠系统癌，泌尿生殖系统癌，睾丸癌，乳腺癌，前列腺癌，内分泌系统癌，黑色素瘤，腺癌，骨髓增生性肿瘤，伴嗜酸性细胞增多症的骨髓和淋巴疾病，骨髓增生性/骨髓增生异常性肿瘤，骨髓增生异常综合征，急性髓性白血病和相关前体肿瘤，和不明细胞系急性白血病，早幼粒细胞白血病(promyeloid leukemia) (APML)，急性髓性白血病(AML)和慢性髓系白血病(chronic myelogenous leukemia) (CML)，前体淋巴性肿瘤(precursor lymphoid neoplasms)，成熟B细胞肿瘤，成熟T细胞肿瘤，霍奇金淋巴瘤和免疫缺陷相关的淋巴增生性疾病，淋巴细胞白血病(ALL)，其包括B系ALL和T系ALL，慢性淋巴细胞性白血病( CLL)，幼淋巴细胞白血病(prolymphocytic leukemia) (PLL)，毛细胞白血病(HLL)和华氏巨球蛋白血症(WM)；成红细胞白血病和急性成巨核细胞白血病，恶性淋巴瘤，包括但不限于非霍奇金淋巴瘤及其变种，外周T细胞淋巴瘤，成人T细胞白血病/淋巴瘤(ATL)，皮肤T细胞淋巴瘤。

(CTCL), 大颗粒淋巴细胞白血病 (LGF), 霍奇金病和里-斯氏病 (Reed-Sternberg disease)。

[0089] 在一些实施方式中, 该方法包括给予所述对象治疗有效量的hIL2突变蛋白, 其足以使血清浓度维持大于约50%的至少24小时的时间段, 所述血清浓度处于或高于足以促进CD3-激活的原代人T细胞的增殖的IL2突变蛋白的有效浓度, 处于或低于足以诱导T细胞由所述IL2突变蛋白激活的所述IL2突变蛋白的血清浓度。

## 附图说明

[0090] 结合附图, 通过以下详述更好地理解本发明。需要强调, 按照惯例, 附图的各个特征不成比例。相反, 各种特征的尺寸被任意放大或者缩小以清楚显示。

[0091] 附图图1提供了用含有指示的IL2突变蛋白 (和对照) 的293T转染上清处理的NKL细胞中所测pSTAT5水平的图形表示, 如实施例中所述。纵轴表示根据实施例测量的IL2活性水平, 各柱表示与构建体相关的特定IL2肽的活性水平, 如实施例中所述, 由其3字母缩写确定。

[0092] 附图图2提供了用含有指示的IL2突变蛋白 (和对照) 的293T转染上清处理的CD25阳性和CD25阴性YT细胞中pSTAT5活性的比较, 如实施例中所述。纵轴是选择性的测量, 计算为在CD25阳性YT细胞上观察到的pSTAT5活性水平除以在CD25阴性YT细胞上测得的pSTAT5活性水平的比率, 各柱表示被评估的特定IL2肽的活性水平, 由其3字母缩写确定, 如实施例中所述。

[0093] 图3以表格形式提供了数据, 说明在不同稀释度下, 相较于野生型hIL2, hIL2突变蛋白在CD25阳性YT CD25细胞上 (相较于CD25阴性YT细胞) 表现出优先的pSTAT5信号转导活性。

[0094] 图4提供了与hIL2突变蛋白接触的3F8细胞的细胞增殖有关的数据, 更全面地描述于说明书和实施例8中。

[0095] 图5提供了关于与hIL2突变蛋白接触的3F8细胞产生的干扰素  $\gamma$  的数据, 更全面地描述于说明书和实施例8中。

[0096] 图6提供了通过荧光流式细胞术验证的关于YT CD25细胞上IL-2受体组分的表达的数据。分图A表示CD25 (IL2Ra) 的表达, 分图B表示CD122 (IL2Rb) 的表达, 分图C表示YT CD25 NKL细胞的CD132 (IL2Rg) 的表达。填充直方图表示染色的细胞, 虚线直方图表示未染色的对照细胞。门表示每种染色的阳性细胞百分比。

[0097] 图7提供数据说明wt hIL-2和STK-012在相似的剂量范围内诱导NKL细胞增殖, 证明STK-012在人免疫细胞中保留了与wt hIL2相当的诱导pSTAT5的能力。

[0098] 图8提供了用野生型IL-2 (分图A) 或STK-012 (分图B) 处理后所示细胞系的P-STAT5-阳性细胞百分比的相关数据。显示了由4参数拟合计算的趋势线。x-轴表示蛋白质浓度, 以log10刻度 (scale)。未处理的细胞的数值在y-轴上表示。

[0099] 图9提供了与用所列各种剂量和试剂处理的小鼠的生存相关的数据, 并在说明书中作了更全面的描述。

[0100] 图10提供了与用mIL-2或STK-014处理的小鼠的肺部含水量相关的数据, 计算为湿肺的重量减去干燥后的肺部的差值。在研究结束时或过早终止或死亡时 (在mIL-2处理的动物中) 收获肺部。

[0101] 图11提供了用mIL-2或STK-014在不同剂量下处理的小鼠的肺部重量占体重的百分比的相关数据。在研究结束时或过早终止或死亡时(在mIL-2处理的动物中)收获肺部。

[0102] 图12提供了在CT-26结肠癌模型研究过程中,小鼠响应于STK-014治疗、PEGmIL2和对照组的肿瘤体积的相关数据。

[0103] 图13提供了在CT-26结肠癌模型研究中,响应于STK-014,与CD8+和CD8+CD25+T细胞的瘤内扩增有关的免疫组化评估的相关数据。

[0104] 图14提供了在CT-26结肠癌模型研究中,响应于STK-014,在小鼠脾脏中,与CD8+和CD25+T细胞的扩增有关的免疫组织化学评估的相关数据。

[0105] 图15提供了与MC38结肠癌模型研究过程中的肿瘤体积(Y-轴)有关的数据,说明响应STK-014和PEG-mIL-2,肿瘤体积随时间的变化。

[0106] 图16A和图16B提供了在用STK-014和PEG-mIL-2治疗间隔结束时,通过IHC分别对MC38肿瘤内的CD8+ T细胞和CD25+CD8+ T细胞进行量化的相关数据。

[0107] 图17提供了响应于用STK-014和PEG-mIL-2治疗,MC38肿瘤的瘤内CD8+T细胞对调节性T细胞的有关数据。

[0108] 图18提供了治疗期结束时MC38肿瘤中CD8+T细胞和Treg的IHC分析定量的相关数据。

[0109] 图19提供了响应于所示的治疗,MC38肿瘤模型中的小鼠体重的变化有关的数据。

[0110] 图20提供了响应于用STK-014与抗-PD-1治疗组合,小鼠中MC38肿瘤模型中的肿瘤体积有关的数据。

[0111] 图21提供了响应于用STK-014、抗-PD1抗体和STK014与抗-PD-1的治疗组合,小鼠中MC38肿瘤模型中的瘤内T细胞水平有关的数据。

[0112] 图22提供了在非人灵长类动物中评估的不同剂量STK-012的全身暴露相关数据。STK-012的浓度(按所示第1/8天所示的剂量)与一剂阿地白介素(Proleukin)相比(相当于大剂量(HD)阿地白介素)。

[0113] 图23提供了响应于STK-012的pSTAT5的相关数据,在非人灵长类动物的FACS分析中,从STK-012治疗的食蟹猕猴(cynomolgus monkey)分离的CD25+CD4+T细胞中的P-STAT5显示,单剂量给予STK-012诱导持续的p-STAT5信号转导,持续7天。

[0114] 图24提供了与STK-012的血清浓度相关的在三种来自外周血的细胞类型(CD25-CD122-CD8+ T细胞、CD25+CD122-CD8+ T细胞和CD25+CD122+CD8+ T细胞)中,相对于STK-012血清浓度的STAT5磷酸化的数据(Y-轴)。

[0115] 图25提供了STK-012(0.1/0.35mg/kg)在CD8+CD25+ T细胞和CD25阴性细胞中诱导增殖(KI67+)的相关数据。

[0116] 图26提供了在NHP对STK-012的反应中CD8 T细胞的记忆T细胞的浓度有关的数据。

## 具体实施方式

[0117] 为了使本发明更容易被理解,下文以及整个说明书中对某些术语和短语进行了定义。本文提供的定义是非限制性的,应根据本领域技术人员的知识阅读。

[0118] 在描述本发明的方法和组合物之前,应理解,本发明不限于所述的方法或组合物,因为它们当然可能变化。还应理解,本文中使用的术语仅意在描述特定实施方式,并不旨在

进行限制。

[0119] 提供数值范围时,也应视作具体公开了该范围的上限和下限之间以下限单位十分之一为间隔的各中间数值,除非上下文另有明确说明。本发明还包括设定范围内任何设定数值或中间数值和该设定范围内任何其它设定数值或中间数值之间的较小范围。取决于设定范围内任何明确排除的限值,所述范围可独立地包含或排除这些较小范围的上下限,本发明也包括这些较小范围不包含限值、包含任一或两个限值的各范围。设定范围包含一个或两个限值时,本发明也包括排除所述限值之一个或两个的范围。

[0120] 除非另有说明,本文所用的所有科技术语与本发明所属领域普通技术人员所理解的通常含义相同。虽然也可采用与本文所述类似或等同的任何方法和材料实施或测试本发明,但在此描述一些潜在和优选的方法和材料。本文提及的所有出版物均通过引用纳入本文,以公开和描述与所引用出版物相关的方法和/或材料。

[0121] 应注意,本文和所附权利要求书所用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数含义,除非上下文另有明确说明。因此,例如,提到“细胞”包括多个这样的细胞,提到“所述肽”包括本领域技术人员已知的一或多个肽及其等同物,例如多肽,等等。

[0122] 提供本文讨论的出版物仅针对其在本申请提交日之前的公开。本文中所有内容均不应解释为承认本发明不能凭借在先发明而先于这些出版物。此外,所提供的出版日期可能与实际公开日期不同,这可能需要单独确认。

[0123] 除非另有说明,份数是重量份数,分子量是重均分子量,温度是摄氏度(°C),压力是大气压或接近大气压。使用标准缩写, bp=碱基对; kb=千碱基; s或sec=秒; min=分钟; h或hr=小时; AA或aa=氨基酸; kb=千碱基; nt=核苷酸; pg=皮克; ng=纳克; ug=微克; mg=毫克; g=克; kg=千克; p1=皮升; d1或dL=分升;  $\mu$ l、ul或 $\mu$ L=微升; m1或mL=毫升; l或L=升;  $\mu$ M或uM=微摩尔; pM=皮摩尔; nM=纳摩尔; fm=飞摩尔(femtomolar); mM=毫摩尔; M=摩尔; kDa=千道尔顿; SC或SQ=皮下(经皮下); QD=每日一次; QW=每周一次; QM=每月一次; BW=体重; U=单元; ns=无统计学显著性; PBS=磷酸盐缓冲盐水; HSA=人血清白蛋白; MSA=小鼠血清白蛋白; 以及提供于下表1的那些缩写:

[0124]

表 1.其他缩写

缩写	说明
----	----

表 1.其他缩写	
缩写	说明
ADA	抗-药物抗体
ADCC	抗体依赖性细胞介导的细胞毒性
AEC	阴离子交换色谱
ALT	丙氨酸转氨酶
AST	天冬氨酸转氨酶
AUC	曲线下面积(药理学暴露)
BID	每日两次
CD8+ T 细胞	细胞毒性 CD8+T 细胞
clULN	临床实验室正常值上限
C <sub>最大</sub>	最大药物浓度
C <sub>最小</sub>	最小药物浓度
CR	完全缓解(无可测量的残留肿瘤)
CRC	结直肠癌
CTCAE	不良事件通用术语标准
DLT	剂量限制毒性
ECG	心电图
ECOG	东部合作肿瘤小组
EDTA	乙二胺四乙酸二钠盐二水合物
ELISA	酶联免疫吸附分析
HIC	疏水相互作用色谱
HNSTD	最高非严重毒性剂量
HP-IEC	高效离子交换色谱
HP-SEC	高效尺寸排阻色谱
HPLC	高效液相色谱
IEF	等电聚焦
IFNg, IFN	干扰素 $\gamma$
IHC	免疫组织化学

[0125]

表 1. 其他缩写	
缩写	说明
ID 或 i.d.	皮内
IM 或 i.m.	肌内
IV 或 i.v.	静脉内
KD	平衡解离常数
kDa	千道尔顿
LAL	鲎阿米巴样细胞裂解物(内毒素试验)
LC/MS	液相色谱-质谱
MCB	主细胞库
MTD	最大耐受剂量
n/d; nd	不可检; 未检出; 低于检测下限
NHL	非霍奇金淋巴瘤
NHP	非人灵长类动物
NK	自然杀伤细胞
nM	纳摩尔( $10^{-9}$ 摩尔)
NSG	NOD-scid-IL2R $\gamma$ -空(null)免疫受损小鼠品系
PCR	聚合酶链式反应
PEG	聚乙二醇
PK	药代动力学
q.d.; qg	拉丁文: 每天一次(quaque die); “每天一次(once per day)”
q.o.d.; qod	拉丁文: 每天一次(quaque die); “每天一次(once per day)”
RP-HPLC	反相 HPLC
RT-PCR	逆转录聚合酶链式反应
SAE	严重不良事件
SC 或 s.c.	皮下
SDS-Page	十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳
SEC	尺寸排阻色谱
T <sub>1/2</sub>	半衰期

[0126]

表 1.其他缩写	
缩写	说明
TK	毒物动力学(Toxicokinetics)
TIL	肿瘤浸润淋巴细胞
UF/DF	超滤/渗滤

[0127] 应理解,在本公开内容中,根据单字母或三字母代码提及氨基酸。为了方便阅读者,单字母和三字母氨基酸代码在下表2中提供:

表 2.氨基酸缩写		
G	甘氨酸	Gly
P	脯氨酸	Pro
A	丙氨酸	Ala
V	缬氨酸	Val
L	亮氨酸	Leu
I	异亮氨酸	Ile
M	甲硫氨酸	Met
C	半胱氨酸	Cys
F	苯丙氨酸	Phe
Y	酪氨酸	Tyr
W	色氨酸	Trp
H	组氨酸	His
K	赖氨酸	Lys
R	精氨酸	Arg
Q	谷氨酰胺	Gln
N	天冬酰胺	Asn
E	谷氨酸	Glu
D	天冬氨酸	Asp
S	丝氨酸	Ser

[0129]

表 2.氨基酸缩写		
T	苏氨酸	Thr

[0130]

[0131] 科学文献中描述了分子生物学的标准方法(参见,例如,Sambrook和Russell(2001)《分子克隆》(Molecular Cloning),第3版,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),纽约冷泉港;和Ausubel,等(2001)《新编分子生物学指南》(Current Protocols in Molecular Biology),卷1-4,约翰威利父子公司(John Wiley and Sons, Inc.)纽约州纽约,其描述了在细菌细胞中克隆和DNA定点诱变(卷1)、哺乳动物细胞中和酵母中的克隆(卷2)、糖偶联物和蛋白质表达(卷3),以及生物信息学(卷4))。科学文献描述了用于蛋白质纯化的方法,包括免疫沉淀、层析、电泳、离心和结晶,以及化学分析、化学修饰、翻译后修饰、融合蛋白的生产和蛋白糖基化(参见,例如,Coligan,等(2000)《新编蛋白质科学方案》(Current Protocols in Protein Science),卷.1-2,约翰威利父子公司(John Wiley and Sons, Inc.),纽约州)。

[0132] 除非另有说明,下述术语意在具有如下含义。在整个说明书中定义了其他术语。

[0133] 定义:

[0134] 激活:本文所用术语“激活”用于指受体或受体复合物以反映激动剂配体与受体结合的生物学效应。激动剂是指增加、激活、促进、增强激活、敏化或上调的分子,例如,基因、蛋白质、配体、受体或细胞。例如,IL2激动剂与IL2受体(如高亲和力的CD25/CD122/CD132受体复合物)的结合“激活”该受体的信号转导,以产生一种或多种胞内生物学效应(例如STAT5的磷酸化)。

[0135] 活性:如本文所用,术语“活性”是针对分子而言,以描述分子相对于测试系统(例如,试验)的特性、生物学或化学特性(例如该分子结合至另一分子的程度)或材料或细胞的物理学特性(例如细胞膜电位的改变)。这种生物学功能的例子包括但不限于生物剂的催化活性、刺激胞内信号转导的能力、基因表达、细胞增殖、调节免疫学活性(如炎症反应)的能力。“活性”通常表示为每个单元的给予试剂的生物活性,例如[催化活性]/[mg蛋白质]、[免疫活性]/[mg蛋白质],活性的国际单位(IU),[STAT5磷酸化]/[mg蛋白质]、[T-细胞增殖]/[mg蛋白质]、噬斑形成单位(plaque forming units)(pfu)等。

[0136] 给药/给予:术语“给予”和“施用”在本文中可互换使用,指的是接触对象的行为,包括用试剂与对象体外、体内和/或离体的细胞、组织、器官或生物流体接触(例如,hIL2突变蛋白、编码hIL2突变蛋白的载体、表达hIL2突变蛋白的工程改造细胞、化疗剂、抗体或包含上述一种或多种的药物制剂)。试剂的给予可以通过多种本领域认可的方法中的任一种实现,包括但不限于局部给予、血管内注射(包括静脉或动脉内输注)、皮内注射、皮下注射、肌内注射、腹膜内注射、颅内注射、瘤内注射、经皮、经粘膜、离子电渗透递送(iontophoretic delivery)、淋巴管内注射、胃内输注、前列腺内注射、膀胱内输注(如:膀胱)、吸入(例如呼吸道吸入器,包括干粉吸入器)、眼内注射、腹内注射、病灶内注射、卵巢内注射、脑内输注或注射、脑室内注射(ICVI)等。术语“给予”包括试剂与细胞、组织或器官的接触,以及试剂与液体的接触,其中液体与细胞接触。术语“给予”包括细胞(或细胞群)的离体接触,可以从对象分离出该细胞(或细胞群)并与药剂接触,该细胞(或细胞群)被给予同一对象(如自体细胞转移)或不同对象(如同种异体细胞转移)。

[0137] 不良事件:如本文所用,术语“不良事件”是指与在对象中使用治疗性或预防性试剂有关的任何不期望的经历。不良事件不一定是由给予治疗或预防试剂(例如IL2突变蛋白)引起的,也可能由无关的情况引起。不良事件通常被分为轻度、中度或严重。如本文所使

用的不良事件的分类符合美国卫生与公众服务部、国家卫生研究院和国家癌症研究所于2017年11月27日公布的不良事件通用术语标准v5.0 (CTCAE)。

[0138] 亲和力:如本文所用术语“亲和力”是指第一分子(例如配体)特异性结合至第二分子(例如受体)的程度,并通过以 $K_d$ 表示的结合动力学衡量,其为分子与其靶标之间的解离常数( $K_{off}$ )和分子与其靶标之间的缔合常数( $K_{on}$ )的比率。

[0139] 激动剂:如本文所用,术语“激动剂”是指特异性结合至第二试剂(“靶标”)并与靶标相互作用以引起或促进靶标激活的增加的第一试剂。在一些情况下,激动剂是受体蛋白的激动剂,可以调节细胞激活、增强激活、使细胞对第二试剂的激活敏感、或上调一个或多个基因、蛋白质、配体、受体、生物学通路,其可能导致细胞增殖或导致细胞周期停止,或导致细胞死亡(如通过凋亡)的通路的表达。在一些实施方式中,激动剂是结合至受体并改变受体状态,导致生物学反应的试剂,其模拟受体的内源配体的作用。术语“激动剂”包括部分激动剂、完全激动剂和超级激动剂。当激动剂导致所研究的受体诱发的基本完全的生物响应(即与天然存在的配体/受体结合相互作用有关的响应)时,可将这种激动剂描述为“完全激动剂”,或者,激动剂也可以被描述为部分激动剂。”超级激动剂”是能够产生大于靶受体的内源性激动剂的最大响应的激动剂,因此具有超过天然配体的100%的活性。超级激动剂通常是合成分子,在比较试验中以类似的浓度评估时,在分子的天然存在形式的可评估的定量或定性参数中,其表现出大于110%、或者大于120%、或者大于130%、或者大于140%、或者大于150%、或者大于160%、或者大于170%的响应。对于hIL2突变蛋白,当在比较试验中以类似浓度的评估时,根据WHO国际标准(NIBSC编码:86/500)野生型成熟人IL2的表达hIL2突变蛋白的活性。应该注意的是,与完全激动剂相关的生物效应可能在程度和/或种类上与部分或超级激动剂的那些生物效应不同。与激动剂相反,拮抗剂可以特异性地结合至受体,但不导致通常由受体启动的信号级联,并且可以改变激动剂在该受体上的作用。反向激动剂是指产生与激动剂方向相反的药理反应的药剂。

[0140] 与激动剂相反,拮抗剂可以特异性地结合至受体,但不导致通常由受体启动的信号级联,并且可以改变激动剂在该受体上的作用。”超级激动剂”是能够产生大于靶受体的内源性激动剂的最大反应的激动剂,因此具有超过100%的效力。在比较试验中以类似的浓度评估时,本发明的IL2超级激动剂可以具有WHO国际标准(NIBSC编码:86/500)的野生型成熟hIL2的活性的大于110%、或者大于120%、或者大于130%、或者大于140%、或者大于150%、或者大于160%、或者大于170%的活性。反向激动剂是指产生与激动剂方向相反的药理反应的药剂。

[0141] 拮抗剂:如本文所用,术语“拮抗剂”或“抑制剂”是指与激动剂一种或多种作用相对的分子。拮抗剂可以防止、减少、抑制或中和激动剂的活性,而且拮抗剂也可以防止、抑制或减少靶标(如靶受体)的组成型活性,即使没有鉴定的激动剂。抑制剂是减少、阻断、防止、延迟激活、失活、脱敏或下调,例如,基因、蛋白质、配体、受体、生物学通路(包括免疫检查点通路)或细胞的分子。

[0142] 抗体:如本文所用,术语“抗体”统称指:(a) 糖基化的和非糖基化的免疫球蛋白(包括但不限于哺乳动物免疫球蛋白类别IgG1、IgG2、IgG3和IgG4),它们特异性结合至靶分子,和(b) 免疫球蛋白衍生物,其包括但不限于 $IgG(1-4) \Delta C_H 2, F(ab')_2, Fab, ScFv, V_H, V_L$ 、四抗、三抗、双抗、dsFv、 $F(ab')_3, scFv-Fc$ 和 $(scFv)_2$ ,它们与其来源的免疫球蛋白竞争结合至靶分

子。术语抗体不限于来自任何特定哺乳动物物种(包括小鼠、人、马、骆驼)的免疫球蛋白、人抗体。术语抗体包括所谓的“重链抗体”或“VHH”或“纳米抗体®”，通常获取自骆驼科(包括骆驼、美洲驼和羊驼)的免疫(参见,例如Hamers-Casterman,等(1993)Nature 363:446-448)。具有给定特异性的抗体也可以来源于非哺乳动物来源,例如从软骨鱼(包但不限于鲨鱼)的免疫中获得的VHH。术语“抗体”包括可从天然来源或用抗原免疫后从动物身上分离的抗体,以及工程改造抗体,包括单克隆抗体、双特异性抗体、三特异性、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、CDR移植的、饰面(veneered)的或去免疫化的(例如,去除T细胞表位)抗体。术语“人抗体”包括从人获得的抗体,以及从包含人免疫球蛋白基因的转基因哺乳动物中获得的抗体,使得,在抗原刺激后,转基因动物产生包含人产生的抗体的氨基酸序列特征的抗体。该术语包括亲本抗体及其衍生物,如亲和成熟的、饰面的、CDR移植的(包括CDR移植的VHH)、人源化的、骆驼源化的(在非骆驼衍生的VHH的情况下),或非免疫球蛋白支架中包的抗体的结合结构域(如CDR)的结合分子。术语“抗体”不限于任何特定的合成方式,包括可从天然来源分离的天然存在的抗体,以及通过“重组”手段制备的工程改造抗体分子,所述工程改造的抗体分子包括从转人免疫球蛋白基因的转基因动物或由其制备的杂交瘤分离的抗体,从转化了导致抗体表达的核酸构建体的宿主细胞中分离出的抗体,从组合抗体文库(包括噬菌体展示文库)中分离出的或化学合成(例如固相蛋白合成)的抗体。在一个实施方式中,“抗体”是哺乳动物的免疫球蛋白。在一些实施方式中,该抗体是“全长抗体”,其包括提供结合和效应功能的可变和恒定结构域。在大多数情况下,全长抗体包括两条轻链和两条重链,各轻链包括可变区和恒定区。在一些实施方式中,术语“全长抗体”用于指常规的IgG免疫球蛋白结构,包括两条轻链和两条重链,各轻链包括提供结合和效应功能的可变区和恒定区。术语抗体包括抗体偶联物,其包括为延长作用时间而进行的修饰,例如融合蛋白或与偶联至聚合物(如PEG化的),在下文更详细地描述。

[0143] 生物样品:如本文所用术语“生物样品”或“样品”表示获自或源自对象的样品。举例而言,生物样品包括选自下组的材料:体液、血液、全血、血浆、血清、粘液分泌物、唾液、脑脊液(CSF)、支气管肺泡灌洗液(BALF)、眼液(如玻璃体液、房水)、淋巴液、淋巴结组织、脾脏组织、骨髓,以及来自这些组织中一种或多种的富集了免疫球蛋白的部分。在一些实施方式中,样品获取自己经暴露于包括IL2突变蛋白的药物制剂的治疗方案的对象,例如重复暴露于同一IL2突变蛋白。在其他实施方式中,样本获取自最近没有暴露于IL2突变蛋白的对象,或在计划给予IL2突变蛋白之前从对象处获得。

[0144] “CAR”或“嵌合抗原受体”:如本文所用,术语“嵌合抗原受体”和“CAR”可互换使用,指的是包含多个功能结构域的嵌合多肽,其从氨基端到羧基端的序列依次排列为:(a)包含抗原结合结构域(ABD)的胞外结构域(ECD)和“铰链”结构域;(b)跨膜结构域(TD);和(c)一个或多个胞质信号转导结构域(CSD),其中上述结构域可以任选地由一个或多个间隔子结构域连接。CAR还可进一步包括信号肽序列,其通常在翻译后处理过程中被去除,并在用包含编码CAR的核酸序列的表达载体转化的细胞表面呈递CAR。CAR可以按照本领域众所周知的原理制备。参见,例如,Eshhaar等,美国专利号7,741,465B1,2010年6月22日授权;Sadelain,等(2013)Cancer Discovery 3(4):388-398;Campana和Imai(美国专利号8,399,645,2013年3月19日授权)Jensen和Riddell(2015)《新编免疫学观点》(Current Opinions in Immunology)33:9-15;Gross,等(1989)PNAS(USA)86(24):10024-10028;Curran,等

(2012) J Gene Med 14 (6) :405-15; Brogdon, 等(美国专利10,174,095,2019年1月8日授权) Guedan, 等(2019) 嵌合抗原受体的工程改造和设计(Engineering and Design of Chimeric Antigen Receptors) (2019) Molecular Therapy: Methods&Clinical Development第12卷:145-156。

[0145] CAR-T细胞:如本文所用,术语“嵌合抗原受体T-细胞”和“CAR-T细胞”可互换使用,指的是经过重组修饰以表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞。市售可得CAR-T细胞产品的例子包括阿基伦赛(axicabtagene ciloleucel)(从吉利德制药公司(Gilead Pharmaceuticals)以名称Yescarta®市售可得)和替沙伦赛(tisagenlecleucel)(从诺华(Novartis)以名称Kymriah®市售可得)。

[0146] CD25:如本文所用,术语“CD25”、“IL2受体α”、“IL-2Ra”、“IL2Ra”和“p55”可互换使用指55kD的多肽,其在Treg细胞中组成型表达,并响应激活(例如,被CD3CD25,其在文献中也被称为“低亲和力”IL2受体)激活于其他T细胞上诱导型表达。人CD25的核酸和蛋白序列可分别在Genbank登录号NM\_000417和NP\_0004Q8中找到。人CD25表达为272个氨基酸的前蛋白,其包含21个氨基酸的信号序列,信号序列在翻译后被去除,以产生251个氨基酸的成熟蛋白质。氨基酸22-240(成熟蛋白的氨基酸1-219)对应于胞外结构域。氨基酸241-259(成熟蛋白的氨基酸220-238)对应于跨膜结构域。氨基酸260-272(成熟蛋白的氨基酸239-251)对应于胞内结构域。hCD25的成熟形式的氨基酸序列为:

[0147] ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMNLCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQ

[0148] CTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTEMQSPMQPVDQASLPGHCREEPPPWEATERIYH

[0149] FVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQA

[0150] SPEGRPESETSCLVTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQVAVAGCVFLLISVLLSGLTW

[0151] QRRQRKSRRTI (SEQ ID NO.2)

[0152] CD122:如本文所用,术语“CD122”、“白细胞介素-2受体β”、“IL2Rb”、“IL2R $\beta$ ”、“IL15R $\beta$ ”和“p70-75”可互换使用,指人CD122跨膜蛋白。人CD122(hCD122)表达为551个氨基酸的蛋白质,前26个氨基酸包括信号序列,其在成熟的525个氨基酸的蛋白质中翻译后被裂解。氨基酸27-240(成熟蛋白的氨基酸1-214)对应于胞外结构域,氨基酸241-265(成熟蛋白的氨基酸225-239)对应于跨膜结构域,氨基酸266-551(成熟蛋白的氨基酸240-525)对应于胞内结构域。如本文所用,术语CD122包括CD122蛋白的天然存在的变体,其包括S57F和D365E(按照成熟的hCD122蛋白的编号)。hCD122在UniProtKB数据库中被引为条目P14784。人CD122的核酸和蛋白序列可分别在Genbank登录号NM\_000878和NP\_000869中找到。成熟hCD122蛋白的氨基酸序列为:

[0153] AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDGALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWAC

[0154] NLILGAPDSQKLTTDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENRLRMAPISLQVHVETH

[0155] RCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDTQYEF

[0156] QVRVKPLQGEFTTWSQPLAFRTKPAALGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLIN

[0157] CRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFSSFSPGGLAPEISPLE

[0158] VLERDKVTQLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDP

[0159] YSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQLSGEDDAYCTFPSRDDLFFSPSLLGGPSPPSTAPG

[0160] GSGAGEERMPPLSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVREAGEEVPDAGPR

[0161] EGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPYHLV

[0162] (SEQ ID NO.3)

[0163] hCD122的胞外结构域的氨基酸序列为：

[0164] AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDGALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWAC

[0165] NLILGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRLMAPISLQVVHVETH

[0166] RCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDTQYEF

[0167] QVRVKPLQGEFTTWSPLSQPLAFRTKPAALGKDT (SEQ ID NO.4)

[0168] CD132:如本文所用,术语“CD132”、“IL2受体 $\gamma$ ”、“IL2Rg”、“IL2R $\gamma$ ”是1型细胞因子受体,被IL-4、IL-7、IL-9、IL-15和IL21的受体复合物共有,因此被称为“共有” $\gamma$ 链。人CD132(hCD132)表达为369个氨基酸的前蛋白,包括22个氨基酸的N-末端信号序列。氨基酸23-262(成熟蛋白的氨基酸1-240)对应于细胞外结构域,氨基酸263-283(成熟蛋白的氨基酸241-262)对应于21个氨基酸的跨膜结构域,氨基酸284-369(成熟蛋白的氨基酸262-347)对应于胞内结构域。hCD132在UniProtKB数据库中被引为条目P31785。人CD132的核酸和蛋白质序列可分别在Genbank登录号NM\_000206和NP\_000197中找到。成熟hCD132蛋白的氨基酸序列为：

[0169] LNTTILTPNGNEDTTADFFLTTMPTDSVSTLPLPEVQCFVFNVEMNCTWNSSSEPQP

[0170] TNLTLYWYKNSDNDKVQKCSHYLFSEEITSGCQLQKKEIHLYQTFVQLQDPREPRRQA

[0171] TQMLKLQNLVIPWAPENLTLHKLSESQLELNWNNRFLNHCLEHLVQYRTDWDHSWTEQSV

[0172] DYRHKFLPSVDGQKRYTFRVRSRFNPLCGSAQHWSEWSHPIHWGSNTSKENPFLFALEA

[0173] VVISVGSMGLIISLLCVYFWLERTMPRIPLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQ

[0174] PDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPNCNQHSPYWAPPCTLKPET (SEQ ID NO.5)

[0175] CDR:如本文所用,术语“CDR”或“互补决定区”是指在重链和轻链多肽免疫球蛋白多肽的可变区内发现的非连续抗原结合位点。CDR已由Kabat等,J.Biol.Chem.252,6609-6616(1977);Kabat等,(1991)U.S.美国卫生及公共服务部出版物题为“免疫学热门蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)”(本文中也称为“Kabat 1991”或“Kabat”);Chothia等,J.Mol.Biol.196:901-917(本文中也称为“Chothia”);以及MacCallum等(1996),J.Mol.Biol.262:732-745(1996)描述,其中定义包括当彼此比较时氨基酸残基的重叠或子集。不过,述及抗体或移植抗体或其变体的CDR定义意在落在本文定义或所用术语范围之内。在本发明的上下文中,CDR位置的编号是根据Kabat编号法提供的。

[0176] 相当的:如本文所用,术语“相当的”用于描述可评价的定量或定性参数的两个测量结果的差异程度。例如,当可评价的定量参数(例如通过CTLL-2增殖或磷酸化-STAT5试验确定的IL2活性水平)的第一测量结果和该可评价参数的第二测量结果没有偏离本领域技术人员将会认为两个结果之间不会产生统计学显著性差异的范围,那么这两个测量将被视为“相当的”。在一些情况下,如果一个测量结果偏离另一个测量结果少于30%、或者少于25%、或者少于20%、或者少于15%、或者少于10%、或者少于7%、或者少于5%、或者少于4%、或者少于3%、或者少于2%或者少于1%,则测量结果可被视为“相当的”。在特定的实施方式中,如果一个测量结果偏离参考标准少于15%、或者少于10%、或者少于5%,则该测量结果与参考标准是相当的。

[0177] 保守氨基酸取代:如本文所用的术语“保守的氨基酸取代”是指对多肽的氨基酸序

列进行修改,将一个氨基酸残基改为另一个氨基酸残基,使所产生的蛋白质在类似的测试系统中保持与母体多肽相当的活性。在一些实施方式中,本发明的IL2突变蛋白可以进一步包含在野生型IL2氨基酸序列中的一个更保守的氨基酸取代。这种保守取代的例子包括那些由Dayhoff描述于《蛋白质序列和结构图册5》(The Atlas of Protein Sequence and Structure 5) (1978),以及由Argos描述于EMBO J., 8:779-785 (1989)。通常根据表3中示出的以下表格进行保守取代:

表 3: 示例性保守氨基酸取代

野生型残基	保守取代(一个或多个)
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu, Met, Leu, Ile
Phe	Met,Leu,Tyr,Trp
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

[0178]

[0179] 通过选择比表3中示出的那些更不保守的氨基酸取代(“非保守氨基酸取代”),可以进行功能或免疫学特性中的实质性改变。非保守氨基酸取代的例子,如那些可以进行更显著地影响多肽骨架结构或破坏二级或三级元件的取代,包括用具有大电荷侧链(天冬酰胺)取代具有小的无电荷侧链的氨基酸(例如甘氨酸)。

[0180] 来源于:如本文所用术语“来源于”,在氨基酸序列或多核苷酸序列的上下文中(例如“来源于”IL2多肽的氨基酸序列)意为表示多肽或核酸具有基于参考多肽或核酸的序列

(例如天然存在的IL2多肽或编码IL2的核酸),不意在被限制为制备蛋白质或核酸的来源或方法。举例而言,术语“来源于”包括参考氨基酸或DNA序列的同源物或变体。

[0181] 有效浓度(EC):如本文所用,术语“有效浓度”或其缩写“EC”互换使用表示试剂(例如,hIL2突变蛋白)的浓度为足以使测试系统中给定参数产生反应的量。缩写“E”指的是当测试系统被暴露于测试试剂时,测试系统中观察到的给定生物学效应的量级。当反应的量级以测试试剂的浓度(“C”)的因数表示时,使用缩写“EC”。在生物系统的环境下,术语E<sub>最大</sub>指的是在响应于激活测试试剂的饱和浓度中观察到的给定生物学效应的最大量级。当提供带下标的缩写EC(例如,EC<sub>40</sub>、EC<sub>50</sub>等)时,下标是指在该浓度观察到生物学效应的E<sub>最大</sub>的百分比。例如,在测试系统中,响应于此测试试剂,测试试剂足以导致可测量的生物学参数减少这种可测量的生物学参数的最大水平的30%的浓度,针对此生物学参数,其被称为该测试试剂的“EC<sub>30</sub>”。类似地,术语“EC<sub>100</sub>”用于表示试剂的有效浓度,该浓度使得可测量参数对该试剂产生最大(100%)反应。类似地,术语EC<sub>50</sub>(其通常用于药代动力学领域)是指足以导致可测量参数半最大(50%)改变的试剂浓度。术语“饱和浓度”是指在标准温度和压力的条件下,测试试剂能够溶于标准体积的特定溶剂(例如水)的最大可能量。在药代动力学中,药物的饱和浓度通常用于表示足以使所有可用受体被药物占据的药物浓度,而EC<sub>50</sub>是给予半最大效应的药物浓度。测试试剂的特定有效浓度的EC可以相对于特定参数和测试系统的方面进行缩写。例如,诱导CD25+T-细胞中STAT5磷酸化最大水平的50%的浓度IL2突变蛋白可以缩写为“EC<sub>50</sub><sup>pSTAT5-CD25+</sup>”或类似的,取决于上下文。由于E<sub>最大</sub>是被测参数的要素(如pSTAT5诱导、增殖),测试试剂(如特定的IL2突变蛋白,例如下文所述的“REH”)和测试系统(例如CD25+人T细胞、人CD25-细胞、原代人T细胞),E<sub>最大</sub>的确定和足以产生E<sub>最大</sub>的一定百分比(例如EC<sub>20</sub>、EC<sub>50</sub>等)的测试试剂的浓度可在特定的测试系统中根据经验确定。在一些情况下,已经为分子建立了标准化的认可的生物活性的度量。例如,对于hIL2效力,以国际单位(IU)评估hIL2效力的标准方法是在鼠细胞毒性T细胞系CTLL-2中按照Wadhwa,等(2013)“白细胞介素-2(IL2)的第二国际标准:合作研究的报告(The 2nd International standard for Interleukin-2(IL2) Report of a collaborative study)”Journal of Immunological Methods 397:1-7中更充分描述的标准化程序测量的。在本发明的上下文中应注意,鼠IL2受体功能与人IL2受体不同,特别是对于需要三聚体受体复合物的所有组分来提供胞内信号转导的信号转导(例如STAT5磷酸化)。参见,例如,Horta,等,(2019)人和鼠IL2受体对免疫细胞因子的人-IL2组分的响应不同(“Human and murine IL2 receptors differentially respond to the human-IL2 component of immunocytokines”)Oncoimmunology 8(6):e1238538-1,e1238538-15和Nemoto,等(1995)人和小鼠的白细胞介素-2(IL2)受体系统差异:功能性小鼠IL2受体的形成需要α链(“Differences in the interleukin-2(IL2) receptor system in human and mouse:alpha chain is required for formation of the functional mouse IL2 receptor”)European JImmunology 25(11)3001-5。因此,在评估本发明的hIL2突变蛋白的活性时,特别是在对于CD25的选择性方面,优选使用重现人低、中、高亲和力IL2受体和受体复合物的生物学特性的人细胞或系统,在鼠测试系统(例如体外测试系统)中表现出选择性结合或激活的分子可能在人系统(例如使用人细胞的体外测试系统或人对象的体内)测试系统中不能重现这种选择性活性。

[0182] EC增殖:术语“足以诱导CD3激活的原代人T细胞增殖的有效浓度”(在本文中缩写

为“EC<sup>PRO</sup>”）是指足以诱导CD3激活的原代人T-细胞增殖的IL2突变蛋白的有效浓度，该浓度根据本领域的标准方案的教导而确定。评估CD3激活的原代人T-细胞的增殖的这种标准方案的例子包括生物发光试验，该试验产生与存在的ATP的量成比例的发光信号，而ATP与存在于培养物中的细胞的量成正比，如Crouch, 等 (1993) “使用ATP生物发光衡量细胞增殖和细胞毒性” (“The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity”) J. Immunol. Methods 160:81-8所述，或标准化的市售可得的试验系统，例如CellTiter-Glo® 2.0细胞活力试验或CellTiter-Glo® 3D细胞活力试剂盒，其可商购自普洛麦格公司 (Promega Corporation) , 伍兹霍尔路2800号 (2800 Woods Hollow Road) , 麦迪逊WI 53711, 货号G9241和G9681，并分别基本按照制造商提供的说明书进行。当缩写EC<sup>PRO</sup>与下标一起使用时，表示通过给定的测试方案测量，测试试剂的浓度足以诱导所指示的响应于测试试剂反应的最大原代人T细胞增殖的百分比。作为说明，缩写EC<sub>30</sub><sup>PRO</sup>可用于hIL2突变蛋白，以指示与CD3激活的原代人T细胞响应于这种IL2突变蛋白的最大增殖水平的30%关联的浓度，该浓度由CellTiter-Glo® 2.0细胞活力试验测定。

[0183] EC激活: 术语“足以诱导T细胞激活的有效浓度”(本文中缩写为“EC<sup>ACT</sup>”)是指足以诱导人T细胞激活和/或分化的IL2突变蛋白的有效浓度。衡量T细胞激活的可评价参数在本领域中是众所周知的。在一些实施方式中，响应于测试试剂的给予的T细胞的激活水平可以通过所述流式细胞术方法测定，如通过STAT5磷酸化水平测定，根据本领域众所周知的方法。可以使用流式细胞术技术测量STAT5磷酸化，如Horta, 等, 同上, Garcia, 等, 同上, 所述，或使用市售试剂盒，例如磷酸-STAT5 (Tyr694) 试剂盒 (商购自铂金埃尔默/cisbio (Perkin-Elmer/cisbio) , 马萨诸塞州沃尔瑟姆，部件号64AT5PEG) , 基本根据制造商的教导进行。当缩写EC<sup>ACT</sup>与下标一起使用时，表示根据测试方案测量，响应于测试试剂的应用，测试试剂的浓度足以在T细胞中诱导最大STAT5磷酸化的指示的百分比。作为说明，缩写EC<sub>30</sub><sup>PRO</sup>可用于hIL2突变蛋白，以指示用测定的，响应于这种IL2突变蛋白，与T细胞中最大增殖水平的30%关联的浓度。

[0184] 富集的: 如本文所用的术语“富集的”是指对样品进行非天然操作，使感兴趣的物质(例如分子或细胞)以下特点存在: (a) 比物质在起始样品(如生物样品，例如在该样品中分子天然存在或在给药后存在)中的浓度高(例如，至少高3倍、或者至少高5倍、或者至少高10倍、或者至少高50倍、或者至少高100倍、或者至少高1000倍)；或 (b) 浓度高于制备该分子的环境(例如，如在重组修饰的细菌或哺乳动物细胞中)。

[0185] 胞外结构域: 如本文所用术语“胞外结构域”或其缩写“ECD”是指细胞质膜外侧的细胞表面蛋白质部分(例如细胞表面受体)。细胞表面蛋白可以是跨膜蛋白、细胞表面或膜关联蛋白。

[0186] 同一性: 对于多肽或DNA序列本文所用的术语“同一性”是指两个分子之间的亚单位序列同一性。当两个分子中的亚单位位置被相同的单体亚单位(即相同的氨基酸残基或核苷酸)占据时，那么这两个分子在该位置是相同的。两个氨基酸或两个核苷酸序列之间的相似性是相同位置的量的直接函数。通常，比对序列以获得最高阶匹配。如有必要，可以用已公开的技术和广泛使用的计算机程序来计算同一性，例如GCS程序包 (Devereux等, (1984) Nucleic Acids Res. 12:387) 、BLASTP、BLASTN、FASTA (Atschul等, (1990) J. Molecular Biol. 215:403-410)。适合测定序列同一性百分数和序列相似性百分数的算

法是BLAST和BLAST 2.0算法,描述于Altschul等(1990) J.Mol.Biol.215:403-410和Altschul等(1977) Nucleic Acids Res.25:3389-3402。进行BLAST分析的软件可从国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information) (NCBI) 网站公开获得。此算法包括:首先通过鉴定查询序列中长度为W的短字来鉴定高评分序列对(HSP),与数据库序列中长度相同的字比对时它们能匹配或满足一些正值的阈值评分“T”。T称为相邻字评分阈值(Altschul等,同上)。这些初始相邻字命中(word hit)用作启动搜索的种子,以便找到含有它们的较长HSP。然后,沿各序列在两个方向上延伸该字命中,直到提高累积的比对评分。就核苷酸序列而言,采用参数“M”(一对匹配残基的奖励评分;总是>0)和“N”(错配残基的罚分;总是<0)计算累积评分。就氨基酸序列而言,用评分矩阵计算累积评分。出现以下情况时中止字命中在各个方向上的延伸:(a)累积比对评分比其最大获得值降低X;由于一个或多个负评分残基比对的累积,累积评分变为零或零以下;或者(b)达到任一序列的末端。BLAST算法参数“W”、“T”和“X”确定该比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(用于核苷酸序列)功能类似但采用的默认值如下:字长(“W”)28,期望值(“E”)10,M=1,N=-2,以及比较两条链。就氨基酸序列而言,BLASTP程序使用如下默认值:字长(W)为3,期望值(E)为10和BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff和Henikoff,(1989) PNAS (USA) 89:10915-10919)。IL2:如本文所用,术语“白细胞介素-2”或“IL2”是指具有IL2活性的天然存在的IL2多肽。在一些实施方式中,IL2是指成熟的野生型人IL2。成熟的野生型人IL2(hIL2)是133个氨基酸的成熟多肽(减去由附加的20个N-末端氨基酸组成的信号肽),如Fujita,等,PNAS USA,80,7437-7441(1983)所述。如本文所用,hIL2突变蛋白的残基的编号是基于hIL2序列UniProt ID P60568,不包括与SEQ ID NO:1的相同的信号肽。成熟的野生型人IL2(hIL2)的天然存在的变体的氨基酸序列是:

[0187] APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRMLTFKFYMPKKA

[0188] TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELKGSE

[0189] TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT (SEQ ID NO:1)

[0190] IL2活性:术语“IL2活性”是指对细胞与有效量的IL2多肽接触响应的细胞上的一个或多个生物学效应。可以测量IL2活性,例如,在细胞增殖试验中使用CTLL-2小鼠细胞毒性T细胞,基本按照Gearing,A.J.H.和C.B.Bird(1987)在《淋巴因子和干扰素:实用方法》(Lymphokines and Interferons,A Practical Approach.)Clemens,M.J.等(编):IRL Press.295中的教导。重组人IL2(rhIL2)的比活性约为 $2.1 \times 10^4$ IU/ $\mu$ g,其针对重组人IL2 WHO国际标准(NIBSC编码:86/500)校准。在一些实施方式中,IL2活性水平可以表达为STAT5磷酸化水平,其可以通过本领域已知的流式细胞术方法确定。

[0191] IL2突变蛋白:如本文所用,术语“IL2突变蛋白”是指从天然存在形式的IL2中衍生突变蛋白,其包含对IL2分子的氨基酸序列的修饰。IL2突变蛋白特征在于天然亲本IL2多肽链的一个或多个位点或其他残基上的氨基酸插入、缺失、取代和修饰。在一些实施方式中,本发明的IL2突变蛋白保留了CD122的结合活性,当在比较试验中以类似浓度的评估时,与WHO国际标准(NIBSC编码:86/500)野生型成熟人IL2的活性相当。示例性的突变蛋白可以包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多氨基酸的取代。

[0192] 以足以产生反应/响应/缓解(response)的量:如本文所使用的短语“以足以产生反应/响应/缓解(response)的量”用于指在对于测试系统应用测试试剂之前(如基线水平)

和之后足以提供所测指标水平的可检测的变化的测试试剂的量。在一些实施方式中,测试系统是细胞、组织或生物体。在一些实施方式中,测试系统是体外测试系统,例如荧光试验。在一些实施方式中,测试系统是体内系统,其涉及在将测试剂应用于细胞、组织或生物体之前和之后测量反映生物功能的细胞、组织或生物体的参数水平的变化。在一些实施方式中,该指标反映了在试验中评估的细胞的生物功能或发育状态,以响应于一定量的测试试剂的给予。在一些实施方式中,测试系统涉及在将一种或多种测试试剂应用于细胞、组织或生物体之前和之后测量反映生物功能的细胞、组织或生物体的指示剂水平的变化。术语“足以产生反应的量”可以是足以治疗有效的量,但也可能多于或少于治疗有效量。需要治疗的:本文所用术语“需要治疗的”是指医生或其他护理人员对对象作出的判断,关于对象和对象需要或将有可能从治疗中受益。这种判断是基于医生或护理人员的专业知识领域中的多种因素作出的。

[0193] 需要预防的:本文所用术语“需要预防的”是指医生或其他护理人员对对象作出的判断,关于对象其对象需要或将有可能从预防护理中受益。这种判断是基于医生或护理人员的专业知识领域中的多种因素作出的。抑制剂:如本文所用术语“抑制剂”是减少、阻断、防止、延迟激活、失活、脱敏或下调的分子,例如,基因、蛋白质、配体、受体或细胞。抑制剂也可以被定义为减少、阻断或失活细胞或生物体的组成型活性的分子。

[0194] 分离的:如本文所使用的术语“分离的”是指感兴趣的多肽,如果是天然存在的,其环境与它可能天然存在的环境不同。“分离的”意指包括在样品中的多肽,其基本上富集了感兴趣的多肽和/或感兴趣的多肽被部分或基本上纯化了。如果多肽不是天然存在的,“分离的”表示该多肽已经从其通过合成的环境中分离出来,例如从包含工程改造以表达该多肽的细胞的重组细胞培养物中分离出来,或通过来自固相合成方式产生的溶液。Kabat编号:本文所用的术语“Kabat编号”是抗体工程改造领域公认的术语,指的是对免疫球蛋白的重链和轻链区域中比其他氨基酸残基更可变的氨基酸残基(例如,高变残基(hypervariable residues))进行编号的系统(Kabat,等,(1971)Ann.NY Acad.Sci.190:382-93;Kabat,等,(1991)《免疫学感兴趣的蛋白质的序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第五版,美国卫生与公共服务部,NIH出版号91-3242)。出于本公开的目的,本文所述的抗体可变区域中CDR的定位遵循Kabat编号或简称为“Kabat”。

[0195] 转移:如本文所用术语“转移”描述了癌细胞从原发癌向周围组织和向远端器官的传播

[0196] 配体:如本文所用,术语“配体”是指特异性结合受体并导致受体变化的分子,其使得受体的活性发生改变或在表达受体的细胞中发生反应。在一个实施方式中,术语“配体”是指可以作为受体的激动剂或拮抗剂的分子或其复合物。如本文所用,术语“配体”包括天然和合成的配体。“配体”也包括小分子,细胞因子和抗体的肽模拟物。配体和受体的复合物被称为“配体-受体复合物”。配体可以包括多蛋白或融合蛋白的一个结构域(例如,或抗体/配体融合蛋白的结构域)配体和受体的复合物被称为“配体-受体复合物”。修饰的IL2突变蛋白:如本文所用的术语“修饰的IL2突变蛋白”用于指包括一个或多个附加进一步修饰(即除了IL2突变蛋白的核心氨基酸序列的修饰)的IL2突变蛋白,例如PEG化、糖基化(N-和O-连接)、酰基化或多聚唾液酸化或通过与其他多肽运载体分子偶联(无论是化学还是融合蛋白),包括但不限于白蛋白融合多肽,其包含血清白蛋白(例如人血清白蛋白(HSA)或牛血清

白蛋白 (BSA) 或Fc-融合蛋白,或具有靶向部分(例如包含IL2正交多肽融合蛋白的IgG),靶向IL2突变蛋白多肽,例如ScFv-IL2突变蛋白多肽融合蛋白和VHH-IL2突变蛋白多肽融合蛋白。可以制备修饰的IL2突变蛋白,以增强一种或多种特性,例如,调节免疫原性;增加水溶性、生物利用度、血清半衰期和/或治疗半衰期的方法;和/或调节生物活性。某些修饰也可用于,例如,提高用于检测试验的抗体(例如,表位标签)和提供以便于蛋白质纯化。在一些实施方式中,修饰的IL2突变蛋白与SEQ ID N0:1至少95、96、97、98或99%的同一性,并具有表4中所列的相较于SEQ ID N0:1的三种修饰的组合之一。

[0197] 调节:如本文所用,术语“调节”、“调制”等是指测试试剂在系统(包括生物系统或生化途径)中引起反应的能力,可以是积极或消极的,也可以是直接或间接的。术语调节剂包括激动剂(包括部分激动剂、完全激动剂和超级激动剂)和拮抗剂。

[0198] 突变蛋白:如本文所用,术语“突变蛋白”是指野生型多肽的修饰形式,包括对这种多肽的一级结构(即氨基酸序列)的修饰。术语突变蛋白可以指多肽本身、包含多肽的组合物或编码其的核酸序列。在一些实施方式中,突变蛋白多肽相对于亲本多肽包括约1至约10个氨基酸修饰,或者相对于亲本的约1至约5个氨基酸修饰,或者相对于亲本的约1至约3个氨基酸修饰,或者相对于亲本的1至2个氨基酸修饰,或者相对于亲本的单一氨基酸修饰。突变蛋白可以与亲本多肽至少有约99%的同一性,或者至少约98%的同一性、或者至少约97%的同一性、或者至少约95%的同一性、或者至少约90%的同一性。

[0199] N-末端:如本文在多肽结构的上下文中使用,“N-末端”(或“氨基末端”)和“C-末端”(或“羧基末端”)分别指多肽的极氨基端和羧基端,而术语“N-末端的”和“C-末端的”分别指多肽的氨基酸序列中朝向N-末端和C-末端的相对位置,并可分别包括N-末端和C-末端残基。“近邻N-末端的”或“近邻C-末端的”是指第一氨基酸残基相对于第二氨基酸残基的位置,其中第一和第二氨基酸残基共价结合以提供连续的氨基酸序列。肿瘤性疾病:如本文所用和如下文更详细地讨论,术语“肿瘤性疾病”指的是对象中由细胞过度增殖或失控(或失调)的细胞复制引起的紊乱或病症。术语肿瘤性疾病指对象中存在肿瘤引起的紊乱。肿瘤可以分类为:(1)良性(2)恶变前(或“癌前”);和(3)恶性(或“癌性”)。术语“肿瘤性疾病”包括肿瘤相关疾病、紊乱和病症,指的是与肿瘤性疾病直接或间接相关的病症,包括例如血管生成和癌前病症,例如发育异常(dysplasia)或缓慢进展型多发性骨髓瘤(smoldering multiple myeloma)。由细胞复制失调引起良性紊乱的例子包括肥厚性疤痕,例如瘢瘤(keloid scar)。

[0200] 核酸:术语“核酸”、“核酸分子”、“多核苷酸”等在本文中可互换使用,并且是指任何长度的核苷酸的聚合形式,即脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸,或其类似物。多核苷酸的非限制性例子包括线性和环形核酸、信使RNA(mRNA)、互补DNA(cDNA)、重组多核苷酸、载体、探针、引物等。根据IL2编号:如本文所用术语“根据IL2编号”是指特定氨基酸的位置的鉴定参考在成熟野生型hIL2的成熟序列中天然存在的氨基酸所在位置,例如R81是指在SEQ ID N0:1存在的第81位氨基酸,精氨酸。

[0201] 操作性地连接:在本文中使用术语“操作性地连接”指的是分子之间的关系,通常是多肽或核酸,它们被安排在构建体中,使得各组分分子的功能得以保留,尽管操作性连接可能导致构建体中单独组成部分的活性被正向或负向地调控。例如,聚乙二醇(PEG)分子操作性连接至野生型蛋白,可能导致构建体中该蛋白的生物活性相对于野生型分子降低,但

两者仍被视为操作性地连接。当术语“操作性地连接”用于指编码不同功能的多个核酸序列在组合成单个核酸分子的关系时,例如,当使用重组技术将其引入细胞时,提供能够在细胞中实现特定核酸序列的转录和/或翻译的核酸。例如,如果它导致前蛋白的表达,编码信号序列的核酸序列可以被认为操作性地连接至编码多肽的DNA,由此信号肽促进多肽分泌;如果它影响序列的转录,启动子或增强子被认为操作性地连接至编码序列;或如果它被定位以促进翻译,核糖体结合位点被认为操作性地连接至编码序列。通常,在核酸分子的上下文中,术语“操作性地连接”意为被连接的核酸序列是连续的,在分泌型前导或分子的相关联亚结构域的上下文中,其为连续的并且处于阅读段。然而,某些遗传元件,如增强子,可以在一定距离处发挥功能,不需要与它们产生作用的序列连续,不过可以被认为操作性地连接。

[0202] 亲本多肽:如本文所用,术语“亲本多肽”或“亲本蛋白”互换使用以表示第二多肽(例如衍生物或变体)的来源,相对于第一“亲本”多肽,第二蛋白经修饰。在一些情况下,亲本多肽是蛋白的野生型或天然存在形式。在一些情况下,亲本多肽可以经修饰,形成进一步修饰的天然存在的蛋白。术语“亲本多肽”可以指多肽自身或包含亲本多肽的组合物(例如糖基化的或PEG化形式和/或包含亲本多肽的融合蛋白)。

[0203] 部分激动剂:如本文所用,术语“部分激动剂”是指特异性结合结合至并激活给定受体的分子,但相对于完全激动剂,它只具有部分激活受体。部分激动剂可以同时表现激动和拮抗作用。例如,当完全激动剂和部分激动剂同时存在时,部分激动剂作为竞争性拮抗剂,通过与完全激动剂竞争对受体的结合,相对于在不存在部分激动剂的情况下受体与完全激动剂的接触,导致受体激活净减少。临幊上,当内源性配体存在的数量不足时,部分激动剂可用于激活受体,以提供所需的亚最大反应,或者当内源性配体数量过多时,它们可减少对受体的过度刺激。部分激动剂产生的最大反应(E<sub>max</sub>)被称为其固有活性,当完全激动剂产生100%的反应时,可以用百分比表示其固有活性。在比较试验中以类似的浓度评估时,本发明的IL2部分激动剂可以具有WHO国际标准(NIBSC编码:86/500)的野生型成熟人IL2的活性的大于10%、或大于20%、或大于30%、或大于40%、或大于50%、或大于60%、或大于70%、或大于10%但低于100%、或大于20%但低于100%、或大于30%但低于100%、或大于40%但低于100%、或大于50%但低于100%、或大于60%但低于100%、或大于70%但低于100%、或大于80%但低于100%、或大于90%但低于100%。

[0204] PEG-IL2突变蛋白:如本文所用的术语“PEG-IL2突变蛋白”是指共价结合至至少一个聚乙二醇(PEG)分子的IL2突变蛋白,至少一个PEG分子共价附接至IL2突变蛋白的至少一个氨基酸残基。PEG化的多肽还可以称为单聚乙二醇化、二聚乙二醇化、三聚乙二醇化(等),以表示分别包含附接至IL2突变蛋白的一个、两个、三个(或更多)PEG部分的PEG-IL2突变蛋白。在一些实施方式中,PEG可以直接地共价附接至IL2突变蛋白(例如,通过赖氨酸侧链、半胱氨酸的巯基或N-末端胺)或任选地在PEG和IL2突变蛋白之间采用接头。在一些实施方式中,PEG-IL2突变蛋白包含多于一个的PEG分子,每个分子附接至不同的氨基酸残基上。在一些实施方式中,PEG-IL2突变蛋白来源于SEQ ID NO:1(天然存在的hIL2)。IL2的PEG化形式和IL2多肽的PEG化的方法是本领域众所周知的(参见,例如,Katre,等,美国专利4,931,544,1990年6月5日授权;Katre,等,美国专利5,206,344,1993年4月27日授权;和Bossard,等,美国专利号9,861,705,2018年1月9日授权)。在一些实施方式中,IL2突变蛋白可以通过纳入非天然氨基酸进行修饰,具有非天然存在的氨基酸侧链以促进位点特异性PEG化,如

Ptacin, 等美国专利申请公开US20170369871A1所述, 公开于2017年12月28日。在其他实施方式中, 可以在IL2分子内的不同位置纳入半胱氨酸残基, 以促进通过半胱氨酸侧链的位点特异性PEG化, 如Greve等的PCT国际专利申请号PCT/US2015/044462, 2016年2月18日以W02016/025385公开。

[0205] 多肽: 如本文所用术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文可互换使用, 并且指任何长度的氨基酸的聚合形式, 其可以包括遗传编码的或非遗传编码的氨基酸, 化学或生物化学修饰的或衍生的氨基酸, 和具有修饰的多肽主链的多肽。术语多肽包括融合蛋白, 包括但不限于具有异源氨基酸序列的融合蛋白; 具有异源和同源前导序列的融合蛋白; 具有或不具有N-末端甲硫氨酸残基的融合蛋白; 具有促进纯化的氨基酸序列(例如螯合肽)的融合蛋白; 具有免疫学标签蛋白的融合蛋白; 包含具有免疫学活性多肽片段(例如抗原性白喉或破伤风毒素或毒素片段)的肽的融合蛋白等等。

[0206] 预防/防止: 本文所用的术语“预防”、“防止”等是指在对象疾病、紊乱、病症或其症状发生之前启动的行动过程, 使得暂时或永久地预防、减轻、抑制或减少对象患某种疾病、紊乱、病症或类似疾病的风险(例如通过没有临床症状来确定), 或推迟其发作, 一般是在对象由于遗传、经验或环境因素而易患某种特定疾病、紊乱或病症的情况下。在某些情况下, 术语“预防”、“防止”也被用来指减缓疾病、紊乱或病症从目前的状态向更有害的状态发展。

[0207] 受体: 如本文所用, 术语“受体”是指具有特异性结合配体的结构域的多肽, 该配体的结合导致该多肽的至少一种生物学特性的改变。在一些实施分数中, 受体是“可溶性”受体, 不与细胞表面关联。hCD25的可溶性形式是特异性结合hIL2的可溶性受体的例子。在一些实施方式中, 受体是细胞表面受体, 其包括胞外结构域(ECD)和膜关联结构域, 后者用于将ECD锚定至细胞表面。在细胞表面受体的一些实施方式中, 受体是跨膜多肽, 其包括由通常称为跨膜结构域(transmembrane domain)(TM)的跨膜的结构域(membrane spanning domain)连接的胞内结构域(ICD)和胞外结构域(ECD)。配体结合至受体导致受体的构象变化, 从而产生可测量的生物学效应。在一些情况下, 如果受体是包括ECD、TM和ICD的跨膜多肽, 配体结合至ECD导致由ICD的一个或多个结构域介导的可测量的胞内生物学效应, 以响应于配体结合至ECD。在一些实施方式中, 受体是多组分复合物的组分, 以促进胞内信号转导。例如, 配体可以结合细胞表面分子, 该分子不单独与任何胞内信号转导相关联, 但在配体结合后促进异源多聚体(包括异二聚体(例如中等亲和力CD122/CD132 IL2受体)、异三聚体(例如高亲和力CD25/CD122/CD132 hIL2受体)或同源多聚体(例如同二聚体、同三聚体、同四聚体)复合物的形成, 导致胞内信号转导级联(例如Jak/STAT途径)的激活。

[0208] 重组: 如本文所用, 术语“重组的”用作形容词指使用重组DNA技术修饰多肽、核酸或细胞的方法。“重组蛋白”是指使用重组DNA技术产生的蛋白, 通常在蛋白名称前缩写为小写“r”, 以表示产生蛋白的方法(例如重组产生的人生长激素通常缩写为“rhGH”)。类似地, 如果细胞经修饰, 通过使用重组DNA技术纳入(例如转染、转导、感染)外源核酸(例如ssDNA、dsDNA、ssRNA、dsRNA、mRNA、病毒或非病毒载体、质粒、黏粒等), 则细胞被称为“重组细胞”。重组DNA技术的技术和方案在本领域中是众所周知的。

[0209] 反应/响应/缓解: 术语“反应/响应/缓解”, 例如, 细胞、组织、器官或生物体的反应, 包括可评估的生化或生理参数(例如, 浓度、密度、粘附性、增殖、激活、磷酸化、迁移、酶活、基因表达水平、基因表达率、能量消耗率(rate of energy consumption)、分化水平或

状态)的定量或定性变化,其中该变化与激活、刺激或处理相关,或与外源试剂接触或内部机制(如遗传编程)相关。在某些情况下,术语“激活”、“刺激”等是指由内部机制以及外部或环境因素调节的细胞激活;而术语“抑制”、“下调”等则是指相反的效果。“反应”可以在体外评估,例如通过使用试验系统、表面等离子体共振、酶活、质谱、氨基酸或蛋白质测序技术。“反应/响应/缓解”可以体内定量评估,通过评估客观生理参数,例如体温、体重、肿瘤体积、血压、X-射线或其他成像技术的结果,或通过报告的主观感受(幸福、抑郁、忧虑或疼痛)的变化定性评估。在一些实施方式中,CD3激活的原代人T细胞的增殖水平可以在生物发光试验中评估,该试验产生与存在的ATP的量成比例的发光信号,而ATP与存在于培养物中的细胞的量成比例,如Crouch,等(1993)J.Immunol.Methods 160:81-8所述,或通过使用市售可得的试验,例如CellTiter-Glo® 2.0细胞活力实验或CellTiter-Glo® 3D细胞活力试剂盒,其可商购自普洛麦格公司(Promega Corporation),麦迪逊WI 53711,货号G9241和G9681。在一些实施方式中,响应于测试试剂的给予的T细胞的激活水平可以通过所述流式细胞术方法测定,如通过STAT(例如STAT1、STAT3、STAT5)磷酸化水平测定,根据本领域众所周知的方法。例如,可以使用流式细胞术技术测量STAT5磷酸化,如Horta,等,同上,Garcia,等,同上,所述,或使用市售试剂盒,例如磷酸-STAT5 (Tyr694) 试剂盒(商购自铂金埃尔默(Perkin-Elmer),马萨诸塞州沃尔瑟姆,部件号64AT5PEG),基本根据制造商提供的说明书进行。

[0210] 选择性:如本文所用,术语“选择性”用于是指某一物质基于某种细胞的群的某种特性而优先结合至和/或激活该特定细胞类型的特性。在一些实施方式中,本发明提供了具有CD25选择性的突变蛋白,即相对于表达CD132受体的细胞,这种突变蛋白显示出对表达CD25和/或CD25/CD122受体的细胞的优先激活。通常在对配体/受体结合反应诱导的活性的表征试验中通过活性测量评估选择性。在一些实施方式中,选择性的IL2突变蛋白表现出显著减少的结合。在一些实施方式中,选择性的度量通过表达CD25的细胞(例如YTCD25POS或YT<sup>CD25+</sup>细胞)的激活对比表现出显著更低(优选不可检测的)的CD25水平的细胞(例如YTCD25NEG或YT<sup>CD25-</sup>细胞)的激活来进行。在一些实施方式中,选择性的度量通过表达CD25的T细胞(例如Treg)的激活对比CD25水平低的T细胞(非刺激的CD8+或CD4+ T细胞)的激活来进行。在一些实施方式中,在同一试验中,本发明的IL2突变蛋白在CD25+对比CD25-细胞上测量的EC50中具有至少3倍、至少5倍、或者至少10倍、或者至少20倍、或者至少30倍、或者至少40倍、或者至少50倍、或者至少100倍、或者至少200倍的差异。

[0211] 显著减少的结合:如本文所用,术语“表现出显著减少的结合”用于相较于第一分子的亲本形式,第一分子(例如配体)的变体对于第二分子(例如受体)表现出显著减少的亲和力。如果变体对受体的天然形式的结合为该变体所来源于的亲本抗体的小于20%、或小于约10%、或小于约8%、或小于约6%、或小于约4%、或小于约2%、或小于约1%、或小于约0.5%,则对于抗体变体,抗体变体“表现出显著减少结合”。类似地,如果变体配体结合至受体的亲和力为该变体配体所来源于的亲本配体的小于20%、或小于约10%、或小于约8%、或小于约6%、或小于约4%、或小于约2%、或小于约1%、或小于约0.5%,则对于变体配体,变体配体“表现出显著减少结合”。类似地,如果变体受体结合的亲和力为该变体受体所来源于的亲本受体的小于20%、或小于约10%、或小于约8%、或小于约6%、或小于约4%、或小于约2%、或小于约1%、或小于约0.5%,则对于变体受体,变体配体“表现出显著减少结合”。

合”。

[0212] 小分子:术语“小分子”指的是分子量小于约10kDa、小于约2kDa或小于约1kDa的化学化合物(通常是药学活性化合物)小分子包括但不限于无机分子、有机分子、包含无机组分的有机分子、包含放射性原子的分子和合成分子。术语“小分子”是制药业普通技术人员所熟知的术语,通常用于区分有机化学化合物和生物制剂。

[0213] 可溶性hCD25:如本文所用的术语“可溶性CD25”、“可溶性人CD25”、“可溶性hCD25”和“shCD25”在本文中可以互换使用,指的是包含hCD25的ECD、缺乏跨膜和胞内结构域的hCD25分子。如前所述,人CD25(“hCD25”)表达为272个氨基酸的前蛋白,其包含21个氨基酸的信号序列,信号序列在翻译后被去除,以产生251个氨基酸的成熟蛋白质。氨基酸22-240(成熟蛋白的氨基酸1-219)对应于胞外结构域。氨基酸241-259(成熟蛋白的氨基酸220-238)对应于跨膜结构域。氨基酸260-272(成熟蛋白的氨基酸239-251)对应于胞内结构域。hCD25的成熟形式的氨基酸序列作为SEQ ID NO:2提供。

[0214] 特异性结合:本文所用的术语“特异性结合”是指一个分子结合至另一个分子的选择性或亲和性/亲和力的程度。在结合对(如配体/受体、抗体/抗原、抗体/配体、抗体/受体结合对)的上下文中,当结合对的第一分子不以显著量结合至样品中存在的其他组分时,就称作结合对的第一分子特异性结合至结合对的第二分子。当结合对的第一分子对第二分子的亲和力比第一分子对样品中存在的其他组分的亲和力至少大2倍、或至少大5倍、或至少大10倍、或至少大20倍、或至少大100倍时,结合对的第一分子被称为特异性结合至结合对的第二分子。在特定实施方式中,当结合对中的第一分子是抗体时,如果结合对的抗体和第二分子之间的平衡解离常数大于约 $10^6$ M、或者大于约 $10^8$ M、或者大于约 $10^{10}$ M、或者大于约 $10^{11}$ M、或者大于约 $10^{10}$ M、或者大于约 $10^{12}$ M,例如通过Scatchard分析确定,该抗体特异性结合至结合对中的第二分子(例如,蛋白质、抗原、配体或受体)(Munzen等,1980 *Analyst Biochem.* 107:220-239)。在其中配体是IL2突变蛋白,受体包括正交CD122 ECD的一个实施方式中,如果IL2突变蛋白/正交CD122 ECD的平衡解离常数大于约 $10^5$ M、或大于约 $10^6$ M、或大于约 $10^7$ M、或大于约 $10^8$ M、或大于约 $10^9$ M、或大于约 $10^{10}$ M、或大于约 $10^{11}$ M,则该IL2突变蛋白特异性结合。特异性结合可使用本领域已知的技术进行评估,包括但不限于竞争ELISA、放射性配体结合试验(例如,饱和结合、斯卡查德图(Scatchard plot)、非线性曲线拟合程序和竞争结合试验);非放射性配体结合试验(例如,荧光偏振(fluorescence polarization)(FP)、荧光共振能量转移(FRET)和表面等离子体共振试验(参见,例如, Drescher等, *Methods Mol Biol.* 493:323-343(2009),使用商购自GE医疗生命科学公司(GE Healthcare Bio-Sciences)的仪器,例如Biacore 8+、Biacore S200、Biacore T200(GE医疗生命科学公司,地址:100Results Way,Marlborough MA 01752));液相配体结合试验(例如,实时聚合酶链式反应(RT-qPCR)和免疫沉淀);和固相配体结合试验(例如,多孔板试验、珠上配体结合试验、柱上配体结合试验和过滤试验)。

[0215] 对象:术语“受体”、“个体”、“对象”和“患者”在本文中可互换使用,并指任何需要诊断、处理或治疗的哺乳动物对象,特别是人。用于治疗目的的“哺乳动物”是指被分类为哺乳动物的任何动物,包括人、家养和农场动物、非人灵长类动物,以及动物园、运动或宠物动物,例如狗、马、猫、奶牛、绵阳、山羊、猪等。在一些实施方式中,哺乳动物为人。

[0216] 患有:如本文所用,术语“患有”是指医生根据本领域公认的鉴定疾病、紊乱或病症

的现有信息(包括但不限于X-射线、CT-扫描、常规实验室诊断测试(例如血细胞计数等)、基因组数据、蛋白质表达数据、免疫组织化学)对对象做出的其需要或将受益于治疗的判断。术语患有通常与特定疾病状态结合使用,例如“患有肿瘤疾病”指患者被诊断为携带肿瘤。

[0217] 基本上纯的:如本文所用,术语“基本上纯的”表示组合物的组分占组合物总含量的大于约50%、或大于约60%、或大于约70%、或大于约80%、或大于约90%、或大于约95%。“基本上纯的”蛋白质占组合物总含量的大于约50%、或大于约60%、或大于约70%、或大于约80%、或大于约90%、或大于约95%。

[0218] T-细胞:如本文所用术语“T-细胞”或“T细胞”以其常规意义使用,是指在胸腺中分化的淋巴细胞,拥有特定细胞表面抗原受体,包括一些控制细胞介导的免疫和体液免疫和其他裂解携带抗原的细胞的起始或抑制的。在一些实施方式中,T细胞包括但不限于初始CD8<sup>+</sup>T细胞、细胞毒性CD8<sup>+</sup>T细胞、初始CD4<sup>+</sup>T细胞、辅助T细胞,例如T<sub>H</sub>1、T<sub>H</sub>2、T<sub>H</sub>9、T<sub>H</sub>11、T<sub>H</sub>22、T<sub>FH</sub>;调节性T细胞,例如T<sub>R</sub>1、Treg、诱导型Treg;记忆性T细胞,例如中心记忆T细胞、效应记忆T细胞、NKT细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)和此类T细胞的工程改造变体,包括但不限于CAR-T细胞、重组修饰TIL和TCR工程改造细胞。

[0219] 末端/末端的:如本文在多肽结构的上下文中使用,“N-末端”(或“氨基末端”)和“C-末端”(或“羧基末端”)分别指多肽的极氨基端和羧基端,而术语“N-末端的”和“C-末端的”分别指多肽的氨基酸序列中朝向N-末端和C-末端的相对位置,并可分别包括N-末端和C-末端残基。“近邻N-末端的”是指连续多肽序列中第一氨基酸残基相对于第二氨基酸残基的位置,第一氨基酸距多肽的N-末端更近。“近邻C-末端的”是指连续多肽序列中第一氨基酸残基相对于第二氨基酸残基的位置,第一氨基酸距多肽的C-末端更近。

[0220] 治疗有效量:本文使用的短语“治疗有效量”是指向对象给予试剂,单独地或作为药物组合物或治疗方案的一部分,以单剂量或作为系列剂量的一部分,以能够对疾病、紊乱或病症的任何症状、方面或特征产生任何可检测的、积极影响的量。治疗有效量可以通过测量相关的生理效应来确定,并且可以结合给药方案和对对象病情的诊断分析等来调整。用于确定试剂的治疗有效量的评估参数由医生使用公认的诊断标准确定,包括但不限于指标例如年龄、体重、性别、总体健康状况、ECOG评分、可观察到的生理参数、血液浓度、血压、心电图、计算机断层扫描、X-射线等。或者或此外,还可以监测临床情境中通常评估的其他参数,以确定是否对对象给予了治疗有效量的试剂,如体温,心率,血液化学的正常化,血压的正常化,胆固醇水平的正常化,或疾病、紊乱或病症的任何症状、方面或特征,生物标志物(如炎症细胞因子、IFN- $\gamma$ 、颗粒酶等),血清肿瘤标志物的减少,实体瘤反应评估标准(RECIST)的改善、免疫相关缓解标准(irRC)的改善、生存期的延长、无进展生存期的延长、进展时间的延长、治疗失败时间的延长、无事件生存期的延长、下次治疗时间的延长、客观缓解率的改善、缓解持续时间的改善、肿瘤负担的减轻、完全缓解、部分缓解、稳定的疾病等,本领域的临床医生基于这些评估对象对给予试剂的反应的状况改善。如本文所用,涉及靶病灶的术语“完全缓解(CR)”、“部分缓解(PR)”、“稳定的疾病(SD)”和“进展性疾病(PD)”,涉及非靶病灶的术语“完全缓解(CR)”、“不完全缓解/稳定的疾病(SD)”和“进展性疾病(PD)”,应理解为RECIST标准中所定义。如本文所用术语“免疫相关完全缓解(irCR)”、“免疫相关部分缓解(irPR)”、“免疫相关进展性疾病(irPD)”和“免疫相关稳定的疾病(irSD)”如根据免疫相关缓解标准(irRC)定义。如本文所用,术语“免疫相关缓解标准(irRC)”是指用

于评估免疫治疗的缓解的体系,如描述于Wolchok,等(2009)评估实体瘤中免疫治疗活性的指南:免疫相关缓解标准(Guidelines for the Evaluation of Immune Therapy Activity in Solid Tumors:Immune-Related Response Criteria),Clinical Cancer Research 15 (23):7412-7420。在对象疗程期间,可以根据给药方案和/或对象病情的评估及前述因素的变化调整治疗有效量。在一个实施方式中,治疗有效量是在哺乳动物对象给药过程中当单独使用或与另一试剂组合使用时不导致不可逆的严重不良事件的试剂的量。

[0221] 跨膜结构域:术语“跨膜结构域”或“TM”是指跨膜多肽(如CD122或CD132或CAR等跨膜多肽)的结构域,当该跨膜多肽与细胞膜相关联时,该结构域嵌入细胞膜中,并与跨膜多肽的胞外结构域(ECD)和胞内结构域(ICD)以肽基键连接(peptidyl linkage)。跨膜结构域可以与胞外和/或胞内结构域中的一个或两个同源(天然相关联)或异源(不天然相关联)。跨膜结构域可以与胞外和/或胞内结构域中的一个或两个同源(天然相关联)或异源(不天然相关联)。在一些实施方式中,在受体是包括源自第一亲本受体的胞内结构域和源自第二不同亲本受体的第二胞外结构域的嵌合受体的情况下,嵌合受体的跨膜结构域是通常与衍生嵌合受体的亲本受体的ICD或ECD相关联的跨膜结构域。或者,受体的跨膜结构域可以是跨越质膜的人工氨基酸序列。在一些实施方式中,在受体是包括源自第一亲本受体的胞内结构域和源自第二不同亲本受体的第二胞外结构域的嵌合受体的情况下,嵌合受体的跨膜结构域是通常与衍生嵌合受体的亲本受体的ICD或ECD相关联的跨膜结构域。

[0222] 治疗:术语“治疗”、“疗法”、“处理”等是指在诊断、观察到对象的疾病、紊乱或病症或其症状后,起始的行动过程(例如给予IL2突变蛋白或包含其的药物组合物)或类似情况,以便暂时或永久地消除、减少、抑制、减轻或改善困扰对象的这种疾病、紊乱或病症的至少一个根本原因,或与这种疾病、紊乱或病症相关的至少一个症状。治疗包括对患有疾病的对象采取的行动过程,其中该行动过程导致对象的疾病被抑制(例如,阻止疾病、紊乱或病症的发展或改善与此相关的一个或多个症状)。

[0223] Treg细胞或调节性T细胞。本文所用的术语“调节性T细胞”或“Treg细胞”是指CD4<sup>+</sup> T细胞的类型,其能够抑制其他T细胞的反应,包括但不限于效应T细胞(Teff)。Treg细胞特征在于表达CD4、IL2受体的α亚基(CD25)和转录因子叉头盒P3(FOXP3)(Sakaguchi, Annu Rev Immunol 22, 531-62 (2004))。“常规CD4<sup>+</sup> T细胞”意指除调节性T细胞以外的CD4<sup>+</sup> T细胞。

[0224] 变体:术语“蛋白质变体”或“变体蛋白质”或“变体多肽”在本文中可互换使用,指的是由于至少一个氨基酸修饰而与亲本多肽不同的多肽。该亲本多肽可以是天然存在的或野生型(WT)多肽,也可以是WT多肽的修饰形式(即,突变蛋白)。

[0225] 野生型:“野生型”或“WT”或“天然”在本文中是指在自然界中存在的氨基酸序列或核苷酸序列,包括等位基因变异。野生型蛋白质,多肽,抗体,免疫球蛋白,IgG等具有未经人工修饰的氨基酸序列或核苷酸序列。

[0226] 命名法惯例:

[0227] 在一些实施方式中,相较于wt hIL2 (SEQ ID N0:1) 氨基酸序列,本发明的hIL2突变蛋白包含取代、缺失或插入。在本文中残基可以用一个字母或三个字母的氨基酸代码指定,后接wt hIL2氨基酸位置,例如“Cys125”或“C125”是指wt hIL2 (SEQ ID N0:1) 的第125位的半胱氨酸残基。本文使用以下命名法以表示取代、缺失或插入。本文指定取代是通过wt hIL2残基的一字母氨基酸代码后接IL2的氨基酸位置,后接新取代的氨基酸的一字母氨基

酸代码。例如,“K35A”是指SEQ ID NO:1的第35位的赖氨酸(K)残基被丙氨酸(A)残基取代。缺失被称为“des”,后接氨基酸残基及其在wt hIL2 (SEQ ID NO:1)中的位置。例如术语“des-Ala1”或“desA1”是指wt hIL2 (SEQ ID NO:1)的多肽的第1位的丙氨酸缺失。

[0228] hIL2突变蛋白

[0229] 在一些实施方式中,在本发明的方法的实践中有用的作为部分激动剂的主题hIL2突变蛋白与wt hIL2相比,具有一种或多种减少的功能。在一些实施方式中,与wt hIL2 (SEQ ID NO:1)相比,hIL2突变蛋白具有仅1、2、3、4、1、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸取代、修饰或缺失。

[0230] 本发明提供了包含人IL2 (“hIL2”)突变蛋白的组合物和采用该突变蛋白的方法,其在治疗和/或预防肿瘤性疾病方面是有用的,其中,相较于野生型hIL2 (“wt hIL2”, SEQ ID NO:1)多肽,人IL2突变蛋白表现出对CD132的结合亲和力下降,包含根据下式1的氨基酸序列。

[0231]

(AA1)<sub>a</sub>-(AA2)<sub>b</sub>-(AA3)<sub>c</sub>-(AA4)<sub>d</sub>-(AA5)<sub>e</sub>-(AA6)<sub>f</sub>-(AA7)<sub>g</sub>-(AA8)<sub>h</sub>-  
(AA9)<sub>i</sub>-T10-Q11-L12-Q13-L14-E15-H16-L17-(AA18)-L19-D20-  
L21-(AA22)-M23-I24-L25-N26-G27-L28-N29-N30-Y31-K32-N33-  
P34-(AA35)-L36-T37-(AA38)-(AA39)-L40-T41-F42-K43-F44-  
Y45-M46-P47-K48-K49-A50-T51-E52-L53-K54-(AA55)-L56-  
Q57-C58-L59-E60-E61-E62-L63-K64-P65-L66-E67-E68-(AA69)-  
L70-N71-L72-A73-(AA74)-S75-K76-N77-F78-H79-(AA80-  
(AA81)-P82-R83-D84-(AA85)-(AA86)-S87-N88-(AA89)-N90-  
(AA91)-(AA92)-V93-L94-E95-L96-(AA97)-G98-S99-E100-T101-  
T102-F103-(AA104)-C105-E106-Y107-A108-(AA109)-E110-  
T111-A112-(AA113)-I114-V115-E116-F117-L118-N119-R120-  
W121-H122-T123-F124-(AA125)-(AA126)-S127-H128-H129-  
(AA130)-T131-L132-T133

1

[0232] 其中:

[0233] a、b、c、d、e、f、g、h和i各自单独地选自0或1;

[0234] AA1是A(野生型,a=1)或缺失(a=0);

[0235] AA2是P(野生型,b=1)或缺失(b=0);

[0236] AA3是T(野生型,c=1)、C、A、G、Q、E、N、D、R、K、

[0237] P或缺失(c=0);

[0238] AA4是S(野生型,d=1)或缺失(d=0);

[0239] AA5是S(野生型,e=1)或缺失(e=0);

[0240] AA6是S(野生型,f=1)或缺失(f=0);

[0241] AA7是T(野生型,g=1)或缺失(g=0);

[0242] AA8是K(野生型,h=1)或缺失(h=0);

[0243] AA9是K(野生型,i=1)或缺失(i=0);

[0244] AA18是L(野生型)或R、L、G、M、F、E、H、W、K、Q、

[0245] S、V、I、Y、H、D或T;

[0246] AA22是Q(野生型)或F、E、G、A、L、M、F、W、K、S、

[0247] V、I、Y、H、R、N、D、T或F;

- [0248] AA35是K(野生型)或E;
- [0249] AA38是R(野生型)、W或G;
- [0250] AA39是M(野生型)、L或V;
- [0251] AA55是H(野生型)或Y;
- [0252] AA69是V(野生型)或A;
- [0253] AA74是Q(野生型)、P、N、H、S;
- [0254] AA80是L(野生型)、F或V;
- [0255] AA81是R(野生型)、I、D或T;
- [0256] AA85是L(野生型)或V;
- [0257] AA86是I(野生型)或V;
- [0258] AA89是I(野生型)或V;
- [0259] AA92是I(野生型)或F;
- [0260] AA97是K(野生型)或Q;
- [0261] AA104是M(野生型)或A;
- [0262] AA109是D(野生型)、C或具有激活的侧链的非天然氨基酸;
- [0263] AA113是T(野生型)或N;
- [0264] AA125是C(野生型)、A或S;
- [0265] AA126是Q(野生型)或H、M、K、C、D、E、G、I、R、S或T;和
- [0266] AA130是S(野生型)、T、G或R。
- [0267] 如果本发明的hIL2突变蛋白以<70%、或<65%、或<60%、或<55%、或<50%、或<45%、或<40%、或<35%、或<25%、或<20%、或<15%、或<10%、或<5%的wt hIL2 (SEQ ID NO:1)对于hCD132(或其胞外结构域)的亲和力结合,则该hIL2突变蛋白对hCD132 (SEQ ID NO:5)或hCD132的胞外结构的结合亲和力下降。
- [0268] 在某些实施方式中,hIL-2突变蛋白破坏CD122与CD132的结合,使得该CD122/CD132的相互作用相对于野生型hIL2减少了约2%、约5%、约10%、约15%、约20%、约50%、约75%、约90%、约95%或更多。
- [0269] 在一些实施方式中,相较于wt hIL2,hIL2突变蛋白表现出对CD132的结合亲和力下降,并保留对CD122和/或CD25的显著的结合亲和力。
- [0270] 在一些实施方式中,相较于wt hIL2,hIL2突变蛋白表现出对CD132的结合亲和力下降,并表现出相当于或大于wt hIL2的对hCD122 (SEQ ID NO:3)或其ECD (SEQ ID NO:4)的结合亲和力。如果hIL2突变蛋白结合至hCD122(或其ECD),具有wt hIL2 (SEQ ID NO:1)对于野生型人CD122 (SEQ ID NO:3)或其ECD的结合亲和力的大于约50%、或>60%、或>65%、或>70%、或>75%、或>80%、或>85%、或>90%、或>90%、或>95%、或>100%、或>105%、或>110%、或>115%、或>125%、或>150%、或>200%、或>300%、或>400%、或>500%,则IL2突变蛋白保留了相当于或大于wt hIL2的对于hCD122(或其ECD)结合亲和力。
- [0271] 在一些实施方式中,相较于wt hIL2,hIL2突变蛋白表现出对CD132的结合亲和力下降,并保留了相当于或大于wt hIL2的对CD25的结合亲和力。如果hIL2突变蛋白结合至hCD25,具有wt hIL2 (SEQ ID NO:1)对于野生型hCD25 (SEQ ID NO:2)和/或shCD25的亲和力的大于约50%、或>60%、或>65%、或>70%、或>75%、或>80%、或>85%、或>90%、或>90%

的野生型IL2的亲和力、或>95%、或>100%的野生型IL2的亲和力、或>105%、或>110%、或>115%、或>125%、或>150%、或>200%、或>300%、或>400%、或>500%，则hIL2突变蛋白保留了相当于或大于wt hIL2的对于hCD25的结合亲和力。

[0272] 在一些实施方式中，相较于wt hIL2，hIL2突变蛋白表现出对CD132的结合亲和力下降，保留了相当于或大于wt hIL2的对CD122和CD25的结合亲和力。

[0273] 在一些实施方式中，相较于wt hIL2，hIL2突变蛋白表现出对hCD132的结合亲和力下降，相较于wt hIL2，表现出对hCD25/hCD122受体复合物和/或高亲和力hCD25/hCD122/hCD132受体复合物的结合亲和力增加。

[0274] 在一些实施方式中，相较于wt hIL2，hIL2突变蛋白表现出对hCD132的结合亲和力下降，表现出相当于或大于wt hIL2的对hCD25/hCD122受体复合物的结合亲和力。如果hIL2突变蛋白结合至hCD25/hCD122复合物，具有wt hIL2 (SEQ ID N0:1) 对于hCD25/hCD122受体复合物的亲和力的大于约50%、或>60%、或>65%、或>70%、或>75%、或>80%、或>85%、或>90%、或>90%的野生型IL2的亲和力、或>95%、或>100%的野生型IL2的亲和力、或>105%、或>110%、或>115%、或>125%、或>150%、或>200%、或>300%、或>400%、或>500%，则相较于wt hIL2 hIL2突变蛋白表现出对于hCD132的结合亲和力降低，且表现出相当于或大于wt hIL2的对于hCD25/hCD122受体复合物结合亲和力。

[0275] 在一些实施方式中，相较于wt hIL2，hIL2突变蛋白表现出对hCD132的结合亲和力下降，表现了相当于或大于wt hIL2的对hCD25/hCD122/CD132受体复合物的结合亲和力。如果hIL2突变蛋白结合至hCD25/hCD122/CD132复合物，具有wt hIL2 (SEQ ID N0:1) 对于hCD25/hCD122/CD132受体复合物的亲和力的大于约50%、或>60%、或>65%、或>70%、或>75%、或>80%、或>85%、或>90%、或>90%的野生型IL2的亲和力、或>95%、或>100%的野生型IL2的亲和力、或>105%、或>110%、或>115%、或>125%、或>150%、或>200%、或>300%、或>400%、或>500%，则相较于wt hIL2，hIL2突变蛋白表现出对于hCD132的结合亲和力降低，且表现出相当于或大于wt hIL2的对于hCD25/hCD122/CD132受体复合物的结合亲和力。

[0276] 在一些实施方式中，相较于wt hIL2，hIL2突变蛋白表现出对hCD132的结合亲和力下降，相较于wt hIL2，表现出对hCD25/hCD122受体复合物和高亲和力hCD25/hCD122/hCD132受体复合物的结合亲和力增加。在一些实施方式中，相较于wt hIL2，hIL2突变蛋白表现出对CD132的结合亲和力下降，且在CD25(膜结合CD25或sCD25)存在的情况下表现出对CD122的结合亲和力增加，与wt hIL2相当或更大。在一些实施方式中，本发明的hIL2突变蛋白包含减少CD132受体结合的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方式中，所述降低CD132受体结合亲和力的一个或多个氨基酸取代选自hIL2和hCD132之间界面处的那些氨基酸。hIL2的晶体结构及其与hCD132的界面已经公开，并已经进行了其他研究，鉴定了hIL2分子中那些被鉴定为与hIL2与CD132结合相互作用的位置，包括残基L18、Q22、Q126、T123、S127、I129和S130。在一些实施方式中，L18处的取代包括L18R、L18G、L18M、L18F、L18E、L18H、L18W、L18K、L18Q、L18S、L18V、L18I、L18Y、L18H、L18D、L18N和L18T。在一些实施方式中，Q22处的取代包括Q22F、Q22E、Q22G、Q22A、Q22L、Q22M、Q22F、Q22W、Q22K、Q22S、Q22V、Q22I、Q22Y、Q22H、Q22R、Q22N、Q22D、Q22T和F。在一些实施方式中，Q126处的取代包括Q126H、Q126M、Q126K、Q126C、Q126D、Q126E、Q126G、Q126I、Q126R、Q126S或Q126T。在一些实施方式中，S130

处的取代包括S130R和S130G。

[0277] 在一些实施方式中,相较于wt hIL2,表现出对hCD132的结合亲和力下降的hIL2突变蛋白纳入了对野生型IL2的一级结构的修饰,在第18、22和/或126位的修饰,根据野生型hIL2编号。在一些实施方式中,当对野生型IL2的一级结构进行修饰时,相较于wt hIL2,表现出对hCD132的结合亲和力下降的hIL2突变蛋白纳入了根据野生型hIL2编号的L18、Q22和/或Q126之一的单取代,其包括但不限于氨基酸取代:[Q126H],本文中也称为“LQH”;[Q22E],本文中也称为“LEQ”;和[L18R],本文中也称为“RQQ”。

[0278] 在一些实施方式中,相较于wt hIL2,表现出对hCD132的结合亲和力下降的hIL2突变蛋白纳入了野生型IL2的一级结构的修饰,纳入根据野生型hIL2编号的L18、Q22和/或Q126之一的单取代,其包括但不限于氨基酸取代组:[Q22E,Q126H],本文中也称为“LEH”;和[L18R;Q126H],本文中也称为“RQH”。

[0279] 在某些实施方式中,本发明提供的hIL2突变蛋白包括第18、22和126位的取代,其中第18、22和126位的取代选自。

[0280] L18R、L18G、L18M、L18F、L18E、L18H、L18W、L18K、L18Q、L18S、L18V、L18I、L18Y、L18H、L18D、L18N和L18T之一;

[0281] Q22F、Q22E、Q22G、Q22A、Q22L、Q22M、Q22F、Q22W、Q22K、Q22S、Q22V、Q22I、Q22Y、Q22H、Q22R、Q22N、Q22D、Q22T和F之一;和

[0282] Q126H、Q126M、Q126K、Q126C、Q126D、Q126E、Q126G、Q126I、Q126R、Q126S和Q126T之一。

[0283] 根据野生型hIL2编号,包含在第18、22和126位的取代的示例性hIL2突变蛋白包含下表4中提供的氨基酸取代组。

[0284]

表 4.18、22 和 126 取代 hIL2 突变蛋白			
	hIL2 残基位置		
缩写	18	22	126
AEH	A	E	H
AEK	A	E	K
DEH	D	E	H
EEH	E	E	H
EEK	E	E	K
FEH	F	E	H
GEH	G	E	H
HEH	H	E	H
HEK	H	E	K
IEH	I	E	H
IEK	I	E	K
KEH	K	E	H
MEH	M	E	H
NEH	N	E	H
QEH	Q	E	H
RAH	R	A	H
RDH	R	D	H
REH	R	E	H
REE	R	E	E

表 4.18、22 和 126 取代 hIL2 突变蛋白

hIL2 残基位置			
缩写	18	22	126
REK	R	E	K
REM	R	E	M
RET	R	E	T
REV	R	E	V
REL	R	E	L
REF	R	E	F
REN	R	E	N
RER	R	E	R
REY	R	E	Y
RFH	R	F	H
RGH	R	G	H
RHH	R	H	H
RIH	R	I	H
RKH	R	K	H
RLH	R	L	H
RMH	R	M	H
RNH	R	N	H
RRH	R	R	H
RSH	R	S	H

[0285]

表 4.18、22 和 126 取代 hIL2 突变蛋白

hIL2 残基位置			
缩写	18	22	126
RTH	R	T	H
RTK	R	T	K
RVH	R	V	H
RWH	R	W	H
RYH	R	Y	H
SEH	S	E	H
TEH	T	E	H
VEH	V	E	H
VEK	V	E	K
WEH	W	E	H
YEH	Y	E	H

[0286] 应注意,特定的IL2突变蛋白的三字母缩写反映了具有第18、22和126位突变的IL2突变蛋白,例如,“FEH”是包含L18F、Q22E和Q126H取代的IL2突变蛋白的速记术语。以上提供的名称在本说明书中用于指代本文评估的hIL2突变蛋白中的一组或多组氨基酸取代。

[0287] 在一些实施方式中,本发明的hIL2突变蛋白包含增加hCD122受体(或结合至hCD122的ECD)的结合的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方式中,在本发明的方法的实践中有用的对CD132受体的结合亲和力降低的hIL2突变蛋白进一步包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多增加CD122结合亲和力的突变。在某些实施方式中,在本公开的方法的实践中有用的主题IL2突变蛋白相对于wt hIL-2包含至少一个突变(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个氨基酸残基的缺失、添加或取代),使得该hIL2突变蛋白以高于wt hIL-2的亲和力结合CD122。在某些实施方式中,hIL2突变蛋白结合CD122的亲和力比野生型IL2大至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。IL2突变蛋白的结合亲和力也可以表示为对CD122的亲和力比wt hIL2大1.2、1.4、1.5、2、5、10、15、20、25、50、100、200、250或更多倍。

[0288] 在一些实施方式中,所述增加hCD122受体结合亲和力的一个或多个氨基酸取代选

自hIL2和hCD122之间界面处的那些氨基酸。基于hIL2及其受体的晶体结构,那些位置已经鉴定为与hIL2至hCD122的结合相互作用的位置,包括但不限于Q74、L80、R81、L85、I86、I89V和I92,根据成熟wt hIL2编号。增强CD122结合亲和力的氨基酸取代的例子包括但不限于Q74N、Q74H、Q74S、L80F、L80V、R81D、R81T、L85V、I86V、I89V和/或I92F或其组合。在某些实施方式中,增加CD122结合亲和力的氨基酸取代包括:L80F、R81D、L85V、I86V和I92F。在一些实施方式中,增加CD122结合亲和力的氨基酸取代包括:N74Q、L80F、R81D、L85V、I86V、I89V和I92F。在一些实施方式中,增加CD122结合亲和力的氨基酸取代包括:Q74N、L80V、R81T、L85V、I86V和I92F。在某些实施方式中,增加CD122结合亲和力的氨基酸取代包括:Q74H、L80F、R81D、L85V、I86V和I92F。在一些实施方式中,增加CD122结合亲和力的氨基酸取代包括:Q74S、L80F、R81D、L85V、I86V和I92F。在某些实施方式中,增加CD122结合亲和力的氨基酸取代包括:Q74N、L80F、R81D、L85V、I86V和I92F。在某些实施方式中,增加CD122结合亲和力的氨基酸取代包括:Q74S、R81T、L85V和I92F,根据成熟wt hIL2编号。

[0290] 在一方面,本发明提供hIL2突变蛋白,与野生型人IL2 (hIL2) 相比,其表现出对hCD25显著或增强的结合亲和力,和对hCD132 (或hCD132的胞外结构域) 受体降低的结合亲和力。在一些实施方式中,本发明的hIL2突变蛋白包含增加hCD132结合的一个或多个氨基酸取代。在一些实施方式中,所述增加hCD25受体结合亲和力的一个或多个氨基酸取代选自hIL2和hCD25之间界面处的那些氨基酸。在一些实施方式中,IL2突变蛋白在IL2序列的位置中包含一个或多个突变,其或接触CD25或改变接触CD25的其他位置的取向,导致IL2突变蛋白对于CD25的亲和力增加。基于hIL2及其受体的晶体结构和其它研究,那些位置已经鉴定为与hIL2至hCD25的结合相互作用的位置,包括V69和Q74,根据成熟wt hIL2编号。在一些实施方式中,本发明的IL2突变蛋白包含一个或多个取代:V69A和Q74P。

[0291] 其他序列修饰:

[0292] 除了前述对wt hIL2序列的氨基酸取代和修饰,其调节hIL2突变蛋白对于CD25、CD122和/或CD132的结合亲和力,hIL2可以任选地可以提供对一级序列提供其他益处的一种或多种修饰。

[0293] 去除糖基化位点:本发明的hIL2突变蛋白可以包含消除Thr3 (T3) 位的O-糖基化位点的修饰,以在真核表达系统,特别是在哺乳宿主动物细胞(例如CHO或HEK细胞)中表达IL2突变蛋白时促进非糖基化hIL2突变蛋白的产生。在一个实施方式中,本发明的hIL2突变蛋白包含在人IL2的Thr3 (T3) 位的氨基酸修饰、缺失或取代位点,以防止T3处的O-糖基化。在一个实施方式中,T3处的修饰是氨基酸取代。示例性的氨基酸取代包括T3A、T3G、T3Q、T3E、T3N、T3D、T3R、T3K和T3P,其去除位置3处的糖基化位点而没有消除生物学活性(参见美国专利号5,116,943;Weiger等,(1989) Eur. J. Biochem., 180:295-300)。在一个实施方式中,hIL2突变蛋白包含氨基酸取代T3A。

[0294] 最小化血管渗漏综合征:在本发明的一些实施方式中,IL2突变蛋白包含氨基酸取代以避免血管渗漏综合征,血管渗漏综合征是在人中使用IL2疗法的实质性负面和剂量限制性的副作用,而不会出现效力上的实质性损失。参见,Epstein,等,美国专利号7,514,073B2,2009年4月7日授权。在一个实施方式中,hIL2突变蛋白进一步包含一个或多个氨基酸取代,选自R38W、R38G、R39L、R39V、F42K和H55Y。

[0295] 抗氧化性M104A在本发明的一些实施方式中,hIL2突变蛋白包含用丙氨酸残基取

代甲硫氨酸104的氨基酸取代(M104A)。这种IL2突变蛋白可以对氧化性更有抗性且更少丧失活性(参见Koths,等美国专利4,752,585,授权于1988年6月21日)。

[0296] Cys125:wt hIL2序列在125位包含未配对的半胱氨酸残基。未配对的半胱氨酸有机会通过半胱氨酸巯基基团之间不正确的二硫桥导致蛋白质的错误折叠。当在细菌中重组表达hIL2突变蛋白并从包涵体中分离时,这可能是一个特别的问题。因此,本发明的hIL2突变蛋白可以任选地包含125位的氨基酸取代。在一些实施方式中,该取代是C125A或C125S。

[0297] V91:在一些实施方式中,在本发明的方法的实践中有用的CD25偏向化IL2突变蛋白包含第91位的氨基酸取代。在一些实施方式中,本发明的方法包括用包含选自V91K、V91R、V91K的第91位的取代的IL2突变蛋白治疗肿瘤性疾病。在一些实施方式中,本发明的方法包括用包含选自V91K、V91R、V91K的第91位的取代的IL2突变蛋白治疗肿瘤性疾病,IL2突变蛋白以Fc融合体的形式使用,更全面地描述于如Gavin等人的美国专利9,580,486B2,于2017年2月28日授权,其中关于包含第91位取代的IL2突变蛋白的构建Fc融合体的教导通过引用纳入本文。

[0298] 纳入非天然氨基酸:在一些实施方式中,在本发明的方法的实践中有用的CD25偏向化IL2突变蛋白包括纳入PEG结构以干扰与CD132的结合并使分子的活性偏向CD25+T细胞。已公开的对治疗炎症和自身免疫性适应症有用的这种分子的例子包括Ptacin等(PCT国际申请号:PCT/US2018/045257,2018年8月3日提交,2019年2月7日以国际公开号W0 2019/028419A1公开)描述的分子。这种PEG IL2突变蛋白的一个实施方式是PEG化的IL2分子,被鉴定为THOR-809,描述于Ptacin,等(2019)THOR-809:一种来自扩展的遗传字母表的工程改造的IL2,可能用于治疗自身免疫性疾病(THOR-809:An IL2Engineered from an Expanded Genetic Alphabet for the Potential Treatment of Autoimmune Disorders),摘要89,2019PACR/ARP Annual Meeting,11月8-13,2019Atlanta;Arthritis Rheumatol 2019:71(补充10)。

[0299] 亲和力成熟:在一些实施方式中,hIL2突变蛋白被亲和成熟以增强其对CD25和/或CD122的亲和力,产生对该hIL2突变蛋白的氨基酸序列的修饰。“亲和成熟的”多肽是在一个或多个残基上具有一个或多个改变的多肽,与不拥有这些一个或多个改变的亲本多肽相比,这导致多肽对其受体的亲和力改进,或反之亦然。与亲本IL2突变蛋白多肽相比,进行亲和成熟以增加IL2突变蛋白的结合亲和力至少约10%、或至少约50%、或至少约100%、或至少约150%、或2倍、3倍、4倍或5倍。

[0300] N-末端缺失:IL2突变蛋白可进一步包括在第1-9位(上式1中a、b、c、d、e、f、g、h和i均为零的化合物)、或在第1-8位(上式1中a、b、c、d、e、f、g和h均为零的化合物)、或在第1-7位(上式1中a、b、c、d、e、f和g均为零的化合物)、或在第1-6位(上式1中a、b、c、d、e和f均为零的化合物)、或在第1-5位(上式1中a、b、c、d和e均为零的化合物)、或在第1-4位(上式1中a、b、c和d均为零的化合物)、或des1-3位(上式1中a、b和c均为零的化合物)、或在第1-2位(上式1中a和b均为零的化合物)、或在第1位(上式1中a为零的化合物)中的一或者者处消除N-末端氨基酸,同时保留IL2活性并减少对CD132的结合亲和力。

[0301] IL2突变蛋白可以包含头两个氨基酸的缺失(desAla1-desPro2),以及用半胱氨酸残基取代Thr3糖基化以促进选择性N-末端修饰,特别是半胱氨酸的巯基基团的聚乙二醇化(参见,例如,Katre,等美国专利号5,206,344,授权于1993年4月27日)。

[0302] Wt hIL2在哺乳动物细胞中内源性表达时,表达为包含信号肽的前蛋白,该信号肽在哺乳动物细胞中被高效裂解,导致成熟的hIL2多肽的N-末端氨基酸为丙氨酸残基(Ala1)。虽然在哺乳动物细胞中表达hIL2突变蛋白是可能的,但它通常比细菌细胞生产更昂贵,而且在哺乳动物细胞中表达也可能导致hIL2的非天然糖基化,这取决于所用的细胞系。因此,在某些情况下,可能优选在细菌细胞中生产hIL2突变蛋白。然而,在细菌细胞中直接表达(即不作为融合蛋白)hIL2多肽会导致N-末端甲硫氨酸残基的添加。如果保留wt IL2序列的Ala1,这将导致在相对于N-末端甲硫氨酸的+2位置出现脯氨酸。当相对于N-末端甲硫氨酸的+2位置存在脯氨酸时,内源性的细菌甲硫氨酰氨基肽酶(MAP)不能高效地裂解N-末端甲硫氨酸。因此,细菌直接表达Met-IL2产生IL2种类的混合物,部分具有N-末端甲硫氨酸,另一种缺乏N-末端甲硫氨酸。这种IL2种类的混合物很难通过常规的制造程序解析,其导致加工处理增加、产品损失,并在试图将IL2突变蛋白偶联至N-末端部分(例如靶向部分或PEG分子)时造成困难。然而,通过从IL2突变蛋白中缺失Ala1,相对于N-末端甲硫氨酸的+2位置的残基是苏氨酸(T3),这导致N-末端甲硫氨酸的非常高效的裂解,并促进IL2突变蛋白的细菌生产。在一些实施方式中,本发明提供了包含第1位的丙氨酸缺失的hIL2突变蛋白(des-Ala1;根据hIL2编号的des-A1)。

[0303] 激动剂活性:在一些实施方式中,本发明的hIL2突变蛋白对于免疫细胞(例如T细胞,包括工程改造的T细胞或分离的T细胞)的激活和/或增殖是部分激动剂、完全激动剂或超级激动剂。在一些实施方式中,本发明的hIL2突变蛋白是免疫细胞中STAT5磷酸化的部分激动剂、完全激动剂或超级激动剂。在一些实施方式中,本发明的hIL2突变蛋白是部分激动剂,其在hIL2受体阳性免疫细胞中诱导STAT5磷酸化的水平是野生型IL2在相同细胞类型中刺激STAT5磷酸化的水平的1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更低。在一些实施方式中,本发明的hIL2突变蛋白是完全激动剂,其在hIL2受体阳性免疫细胞中诱导STAT5磷酸化的水平是野生型IL2在相同细胞类型中刺激STAT5磷酸化的水平的95%至105%。在一些实施方式中,本发明的hIL2突变蛋白是超级激动剂,其在hIL2受体阳性免疫细胞中诱导STAT5磷酸化的水平是野生型IL2在相同细胞类型中刺激STAT5磷酸化的水平的大于105%、或大于110%、或大于120%、或大于150%、或大于200% (两倍)、或大于300% (三倍)。在特定的实施方式中,免疫细胞是T细胞。在特定的实施方式中,免疫细胞是CD8+ T细胞。在一些实施方式中,CD8+ T细胞是新鲜分离的CD8+T细胞。在一些实施方式中,新鲜分离的CD8+细胞是TIL。在其他实施方式中,CD8+ T细胞是激活的CD8+ T细胞。在特定实施方式中,免疫细胞是工程改造的免疫细胞,包括但不限于CAR T细胞、TCR工程改造细胞、工程改造的Treg或工程改造的NK细胞。

[0304] 在一些实施方式中,本发明的hIL2突变蛋白是hIL2受体阳性免疫细胞中pERK1/ERK2信号转导的部分激动剂、完全激动剂或超级激动剂。在一些实施方式中,本发明的hIL2突变蛋白是部分激动剂,其刺激pERK1/ERK2信号转导的水平是野生型IL2在相同细胞类型中刺激pERK1/ERK2信号转导的水平的1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更低。在一些实施方式中,本发明的hIL2突变蛋白是完全激动剂,其在hIL2受体阳性免疫细胞中刺激pERK1/ERK2信号转导的水平是野生型IL2在相同细胞类型中刺激pERK1/ERK2信号转导的水平的95%至

105%。在一些实施方式中,本发明的hIL2突变蛋白是超级激动剂,其在hIL2受体阳性免疫细胞中刺激pERK1/ERK2信号转导的水平是野生型IL2在相同细胞类型中刺激pERK1/ERK2信号转导的水平的大于105%、或大于110%、或大于120%、或大于150%、或大于200% (两倍)、或大于300% (三倍)。在特定的实施方式中,免疫细胞是T细胞。在特定的实施方式中,免疫细胞是CD8+ T细胞。在一些实施方式中,CD8+ T细胞是新鲜分离的CD8+ T细胞。在一些实施方式中,新鲜分离的CD8+细胞是TIL。在其他实施方式中,CD8+ T细胞是激活的CD8+ T细胞。在特定实施方式中,免疫细胞是工程改造的免疫细胞,包括但不限于CAR T细胞、TCR工程改造细胞、工程改造的Treg或工程改造的NK细胞。

[0305] STAT5和ERK1/2信号转导可以被测量,例如,通过使用本领域已知的任何合适的方法对STAT5和ERK1/2进行磷酸化。例如,STAT5和ERK1/2的磷酸化可以用这些分子的磷酸化形式的特异性抗体来测量。

[0306] 在某些实施方式中,本发明的方法实践中有用的本发明的突变蛋白之hIL2突变蛋白是部分、完全或超级激动剂,其为与野生型hIL2相比,以hIL2突变蛋白诱导淋巴细胞增殖的能力来衡量的。在一些实施方式中,本发明的hIL2突变蛋白是部分激动剂,其诱导淋巴细胞增殖的水平是野生型IL2在相同细胞类型中诱导淋巴细胞增殖的水平的1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更低。在一些实施方式中,本发明的hIL2突变蛋白是完全激动剂,其在hIL2受体阳性免疫细胞中诱导淋巴细胞增殖的水平是野生型IL2在相同细胞类型中诱导淋巴细胞增殖的水平的95%至105%。在一些实施方式中,本发明的hIL2突变蛋白是超级激动剂,其在hIL2受体阳性免疫细胞中诱导淋巴细胞增殖的水平是野生型IL2在相同细胞类型中诱导淋巴细胞增殖的水平的大于105%、或大于110%、或大于120%、或大于150%、或大于200% (两倍)、或大于300% (三倍)。在特定的实施方式中,免疫细胞是T细胞。在特定的实施方式中,免疫细胞是CD8+ T细胞。在一些实施方式中,CD8+ T细胞是新鲜分离的CD8+ T细胞。在一些实施方式中,新鲜分离的CD8+细胞是TIL。在其他实施方式中,CD8+ T细胞是激活的CD8+ T细胞。在特定实施方式中,免疫细胞是工程改造的免疫细胞,包括但不限于CAR T细胞、TCR工程改造细胞、工程改造的Treg或工程改造的NK细胞。在一些实施方式中,淋巴细胞是T细胞。在特定的实施方式中,淋巴细胞是原代CD8+ T细胞。在其他实施方式中,淋巴细胞是激活的CD8+ T细胞。免疫细胞增殖可以使用任何本领域公知的合适方法进行测定。例如,淋巴细胞增殖可以用羧基荧光素二乙酸盐琥珀酰亚胺二酯(carboxyfluorescein diacetate succinimidyl diester) (CFSE) 稀释试验或通过[31-1]-胸昔纳入测量,如本文所述。

[0307] 由于式1的hIL2突变蛋白保留了结合至CD122和CD132受体组分,该hIL2突变蛋白可作为自然杀伤(NK)细胞的部分激动剂。NK细胞的IL2激活可以通过本领域已知的任何合适的方法来测量,例如,通过测量IL2诱导的CD69表达和/或细胞毒性,如本文所述。

[0308] hIL2突变蛋白的体外评估:

[0309] 为了证明相较于本公开的野生型hIL2具有对CD132的结合亲和力下降的hIL2突变蛋白的活性,及其对CD25表达细胞的优先激活,制备了一系列hIL2突变蛋白并评估了其对YT细胞、表达中等亲和力二聚体形式的IL2受体的NK细胞和被称为YT CD25的YT细胞变体(其为一种YT细胞,其已经被修饰为在其表面表达CD25 (iCD25+) 从而产生表达高亲和力三聚体IL2受体所有三个组分的人免疫细胞)提供选择性激活的能力。

[0310] 制备并测试了一系列式1的示例性hIL2突变蛋白,其包含在与CD132相互作用的第18、22和/或126位的氨基酸取代。这些分子的制备和测试基本根据本文实施例1-7的教导。这些实验的结果在附图中的图1、2和3中提供。如图1所示,包含参与hIL2与hCD132的结合的第18、22和/或126位的氨基酸取代的hIL2突变蛋白在YT CD25细胞中显示出pSTAT5信号转导的显著增加,表明hIL2突变蛋白相较于wt hIL2保留了显著的hIL2活性。如图2所示,本发明的hIL2突变蛋白相较于CD25阴性的YT细胞在CD25阳性的YT CD25细胞上,相较于野生型hIL2,表现出优先的pSTAT5信号转导活性。这些分子的稀释的数据在附图的图3中提供。

[0311] 进行了一项附加的研究,以评估本发明的其他hIL2突变蛋白在CD4阳性人T细胞、3F8细胞中的活性。3F8细胞系是通过用EBV转化的B细胞系JY激活从健康人供体获得的PBMC产生的。CD4阳性T细胞克隆3F8表达CD25和CD122,响应于IL-2增殖并产生IFN $\gamma$ 。根据本文实施例8的教导,评估了下文表5中详述的式1的其他代表性hIL2突变蛋白在3F8细胞中的增殖活性和IFN $\gamma$ 产生情况。该实验的数据在下表5和附图图4(细胞增殖)和图5(IFN $\gamma$ 产生)中提供。IC<sub>50</sub>是根据转染上清液中的蛋白质浓度进行校正的。

[0312]

表 5. 响应于 hIL2 突变蛋白的人 CD4 阳性 T 细胞克隆 3F8 的增殖和 IFN $\gamma$  产生

构建体	增殖 IC <sub>50</sub> (pM)	IFN $\gamma$ 产生 IC <sub>50</sub> (pM)
IL-2	30.7	19.7
REK	14.2	17.7
REE	33.0	18.4
REM	32.6	12.7
REV	20.8	21.2
REL	68.4	33.8
REF	37.6	38.3

表 5. 响应于 hIL2 突变蛋白的人 CD4 阳性 T 细胞克隆 3F8 的增殖和 IFN $\gamma$  产生

构建体	增殖 IC <sub>50</sub> (pM)	IFN $\gamma$ 产生 IC <sub>50</sub> (pM)
REN	13.7	15.7
RER	13.1	13.1
REY	19.3	22.1
AEK	13.7	19.0
EEK	36.0	58.7
VEK	15.5	4.6
HEK	20.9	30.4
IEK	10.0	8.8
RTK	62.8	NA

[0313] 表5和图4和5中的上述数据表明,相较于wt hIL2,本发明的对CD132的结合亲和力下降的hIL2突变蛋白有效地刺激CD25+/CD122+人免疫细胞的增殖和产生IFN $\gamma$ 。

[0314] 抗肿瘤活性的评估

[0315] 本发明提供了使用hIL2突变蛋白治疗和/或预防肿瘤性疾病的组合物和方法,其中所述人IL2突变蛋白,相较于wt hIL2,表现出对CD132的结合亲和力下降等性质。为了证明这种方法的效用,还另进行了体外特征研究和体内研究,以评估啮齿类动物和非人灵长类动物的疗效、毒性和药代动力学,详见下文。累积地,这些研究的结果表明,本发明的hIL2突变蛋白在治疗上有效且耐受性良好的剂量和暴露下,可提供: (a) 选择性激活和/或增殖表达高亲和力hIL-2受体的人免疫细胞,特别是抗原激活的T细胞、经历抗原的T细胞和调节性T细胞; (b) 比wt hIL2的毒性显著低,包括血管渗漏综合征(VLS)的证据更低;以及 (c) 同时对NK细胞或初始、CD25阴性T细胞的生物活性显著降低。

[0316] hIL2突变蛋白测试试剂:为了进行这些广泛的体外表征研究和体内研究,证明本发明的hIL2突变蛋白在有效治疗哺乳动物对象的肿瘤性疾病方面的效用,作为式1化合物的代表性成员,评估了包含L18、Q22和Q126位置的氨基酸取代的式1的示例性hIL2突变蛋白。如前所述,在L18、Q22和Q126位置对hIL2的修饰提供了一种hIL2突变蛋白,其对hCD132的亲和力有所改变,但通常对hCD25和hCD122表现出与wt hIL2相当的结合。两种代表性的L18、Q22和Q126修饰的hIL2突变蛋白(STK-008和STK-011)和一个替代的(surrogate)鼠IL2(mIL2)突变蛋白(STK-014)被用于这些研究,它们的结构在下文中提供。

[0317] STK-008:式1的示例性hIL2突变蛋白是包含氨基酸取代L18R、Q22E和Q126H,另外还包含A1a1缺失的,本文称为des-A1a1 REH,REH和STK-008的人IL2突变蛋白。STK-008的氨基酸序列提供如下(SEQ ID NO:7):

[0319] PTSSSTKKTQLQLEHLRLDLEMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEV  
LNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCHSIISTLT (SEQ ID NO:7)

[0320] STK-011:式1的第二种示例性hIL2突变蛋白是包含L18R、Q22E和Q126K的氨基酸取代和另外包含Ala1缺失的,本文称为des-Ala1 REK,REK和STK-011的人IL2突变蛋白。STK-011的氨基酸序列提供如下(SEQ ID NO:8):

[0321] PTSSSTKKTQLQLEHLRLDLEMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEV  
LNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCKSIISTLT (SEQ ID NO:8)

[0322] STK-011和STK-008多肽的样品在大肠杆菌中使用常规重组DNA技术重组产生,并通过常规程序包括透析、离子交换色谱和尺寸排除色谱分离出基本纯的形式。通过缺失通常存在于hIL2分子第1位的丙氨酸,由于在N-末端甲硫氨酸旁边的位置为脯氨酸而非丙氨酸,N-末端甲硫氨酸被细菌生产细胞更高效地去除,导致表达和回收基本上更多hIL2的同质性产物,提供经济和技术优势,例如增加加工效率、更低的成本以及简化的纯化和再折叠,以产生基本纯净的同质性蛋白产品,当其他试剂(例如运载体或靶向分子)被偶联至hIL2多肽的N-末端时,其产生会产生更一致的试剂。正如先前的报告所指出的和本研究所证实的那样,消除第1位的丙氨酸并没有实质性地改变所产生的hIL2多肽的生物活性。

[0323] 在YT CD25 (CD25阳性) 和YT (CD25阴性) 细胞中评估REH和REK通过IL2受体提供信号转导的能力,其为由相对于wt hIL2的STAT5的磷酸化评估的,与先前的研究基本一致,并在实施例1-7中更充分地描述。简言之,用IL-2突变蛋白构建体转染293T细胞,2-3天后,去除含有可溶性hIL2突变蛋白的上清液。20分钟刺激后,上清被加至YT和YT CD25细胞。YT细胞是NK淋巴瘤细胞系,其无法内源性表达可检测水平的CD25。比较了YT细胞和外源性表达CD25的衍生YT细胞("YT CD25")的IL-2反应。通过荧光流式细胞术验证YT CD25细胞上IL-2受体组分的表达,数据展示于附图图6,分图A和B分别展示了YT细胞和YT CD25细胞的CD25 (IL2Ra)、CD122 (IL2RB) 和CD132 (IL2R $\gamma$ ) 的表达。填充直方图表示染色的细胞,虚线直方图表示未染色的对照细胞。门表示每种染色的阳性细胞百分比。通过流式细胞术测量pSTAT5水平。上清中的IL-2浓度由MSD试验测量。本实验产生的平均荧光强度数据在下表6和7中提供。

表 6. 处理的 YT CD25+细胞中的 pSTAT5 MFI

上清稀释度	未转染		空		wt hIL2		REH		REK	
1:2	99	10	10	10	21	20	22	23	21	22
	1	58	21	15	882	337	248	922	176	404
1:4	10	10	11	10	20	22	20	22	21	21
	94	84	80	80	568	024	858	407	255	241
1:8	10	11	10	10	21	21	21	21	20	21
	69	50	19	84	583	557	464	675	648	053
1:16	11	10	11	10	19	22	20	20	20	20

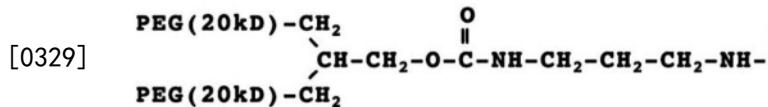
表 6. 处理的 YT CD25+ 细胞中的 pSTAT5 MFI										
上清稀释度	未转染		空		wt hIL2		REH		REK	
	33	48	58	67	846	331	627	841	951	588
[0325]	1:32	11	10	11	10	19	20	21	21	19
		75	81	22	44	023	522	164	890	600
	1:64	10	10	10	11	20	20	20	21	20
		65	15	57	20	967	823	651	139	283
	1:128	10	10	10	10	18	21	23	20	18
		68	90	99	44	118	921	158	999	482

表 7. 处理的 YT (CD25 阴性) 细胞中的 P-STAT5 MFI											
上清稀释度	未转染		空		wt hIL2		REH		REK		
	95	98	93	94	25	26	24	26	20	20	
[0326]	1:2	9	8	0	1	483	572	955	085	485	835
		93	10	92	85	23	23	21	23	12	13
	1:4	1	15	4	6	197	079	713	060	843	798
		86	95	92	84	21	22	19	18	83	79
	1:8	8	2	0	3	160	836	475	404	74	07
		96	92	85	10	22	21	17	15	43	42
	1:16	1	6	2	93	670	882	282	044	63	80
		98	91	88	91	21	21	12	11	25	24
	1:32	3	2	6	7	323	734	086	940	64	67
		96	88	92	92	19	19	74	68	18	15
	1:64	4	4	0	5	220	045	56	95	34	79
		97	99	90	98	17	18	47	47	15	13
	1:128	6	9	2	2	318	179	66	11	51	86

[0327] 如上述表6和7中的数据所示,相较于CD25阴性T细胞,REH和REK提供了CD25阳性T细胞的选择性激活,其通过以下证明:表达高亲和力三聚体CD25/CD122/CD132 hIL2受体的人免疫细胞(YT CD25细胞)中pSTAT5的产生相较于表达中等亲和力二聚体CD122/CD132 hIL2受体的人免疫细胞,YT细胞,中pSTAT5的产生增强(与wt hIL2相当)。

[0328] STK-010和STK-012:为了在体内提供有利的药代动力学(例如延长作用时间),STK-008和STK-011突变蛋白的N-末端脯氨酸通过接头偶联至40kD(20kD x2臂)支链PEG部分,以提供本文分别称为STK-010和STK-012的化合物。支链40kD PEG和接头偶联至STK-008和STK-011的N-末端脯氨酸以产生的STK-010和STK-012具有以下结构:



[0330] STK-012的体外表征:通过使用NKL细胞进行增殖生物试验评估STK-012的生物学活性。NKL是自然杀伤细胞系,其表达野生型人高亲和力IL-2受体(CD25/CD122/CD132),并对人IL-2有反应。通过荧光流式细胞术验证IL-2受体组分的表达(图6)。正如所展示的数据所示,三聚体、高亲和力IL-2R的表达使NK L细胞对STK-012有反应。野生型人IL-2和STK-012的生物学活性都是用NKL细胞系(一种人成淋巴NK细胞系)进行增殖试验评估的。STK-012对表达CD25的细胞的特异性是在YT细胞和YT CD25的pSTAT5活性试验中确定的。如附图图7中的数据所示,人IL-2和STK-012在相似的剂量范围内诱导NKL细胞增殖,表明STK-012在人免疫细胞中保留了与wt hIL2相当的诱导pSTAT5的能力。

[0331] STK-014:STK-012鼠替代物(Surrogate)用于小鼠的效力研究:IL2及其受体组分之间的界面在啮齿类(如小鼠)IL2和灵长类(如人)IL2分子之间略有不同。因此,为了证明人IL2突变蛋白在鼠模型中的活性,选择了本发明中代表性的人IL2突变蛋白(STK-012),并开发了鼠IL2突变蛋白替代物(STK-014),用于小鼠体内研究,以关联啮齿类(小鼠)和灵长类(人)环境之间的活性。STK-014的鼠IL2(mIL2)多肽组分的氨基酸序列为:

[0332] A P T S S S T S S S T A E A Q Q Q Q Q  
 H L E Q L R M D L E E L L S R M E N Y R  
 N L K L P R M L T F K F Y L P K Q A T E L  
 K D L Q C L E D E L G P L R H V L D L T  
 Q S K S F Q L E D A E N F I S N I R V T V  
 V K L K G S D N T F E C Q F D D E S A T  
 V V D F L R R W I A F C H S I I S T S P O

[0333] 上述IL2多肽用PEG接头结构被N-末端PEG化,所述接头与上述STK-010和STK-012的制备中所用的结构一样,以完成STK-014的分子。

[0334] 为了证明STK-014是STK-012的有效替代物,进行了一项研究以评估小鼠和人细胞上的靶特异性。通过比较每个分子在被抗-CD3/抗-CD28刺激激活的原代人CD8+ T细胞和原代人NK细胞中诱导磷酸化-STAT5 (pSTAT5) 的EC<sub>50</sub>。这两种细胞类型都是从新鲜供者的外周血单核细胞 (PBMC) 中分离出来的。由于STK-014是鼠IL2突变蛋白,所以在从小鼠脾脏新鲜分离出来的同等细胞群上进行了测试。该研究的结果在下表8中提供:

表8. 人和鼠IL2突变蛋白在pSTAT5试验中的效力				
	测试条件	hIL2	STK-012	STK-014
[0335]	CD25+ CD8+ / NK 选择性(p-STAT5)	5.6	> 10 <sup>3</sup>	> 10 <sup>6</sup>
	CD25+ CD8+ / CD25- CD8 选择性 (p-STAT5)	1.75	> 10 <sup>3</sup>	> 10 <sup>6</sup>

[0336] 表8中提供的数据表明,STK-014是STK-012在体内疗效模型中的有效替代物,因为STK-014在小鼠细胞上具有类似于STK-012在人细胞上显示的靶特异性。

[0337] STK-014在小鼠体内的效力研究

[0338] STK-014作为人STK-012的小鼠替代物,在小鼠体内进行了体内效力和体内药理学研究。进行这些研究是为了评估STK-014在体内扩增和激活抗原激活T细胞的能力,并以测试STK-014单独以及与抗-PD-1组合在小鼠肿瘤模型中的抗肿瘤疗效和毒性。此外,在参与毒理学研究的动物中评估了所给予分子的毒性。STK-014的活性与聚乙二醇化野生型小鼠IL-2 (mPEG-IL-2) 进行了比较。与mPEG-IL-2相比,STK-014显示出改进的抗肿瘤活性和增加的T细胞肿瘤浸润,以及相较于mPEG-IL-2的改进的毒性,包括显著降低致死率和减少毛细血管渗漏综合症 (CLS) 的证据。STK-014没有显示致死率或显著的CLS证据。

[0339] 建立STK-014的最大耐受剂量:在临床肿瘤学实践中,IL-2以最大耐受剂量 (MTD) 或接近最大耐受剂量 (MTD) 给药,每天3次给药,以保持高的血清暴露,以克服重组IL-2的短半衰期 (Atkins, 等同上)。为了建立PEGmIL2和/或STK-014在体内研究中的最大耐受剂量,建立了重组mIL-2的MTD,一种聚乙二醇化小鼠野生型IL-2,其具有共价连接至N-末端 (PEGmIL-2) 和STK-014的40kD PEG部分。C57BL/6小鼠每天用药3次,持续5天。wt IL-2给药为3次/天。所有其他分子每隔一天给药一次,第3天给错药,所以给药时间为第0-2-3-5-7-9天,用重组mIL-2,每隔一天用PEG-mIL2或STK-014,剂量提供于图9的图例,研究结果的Kaplan-Meier生存图见附图图9。如图9中的数据所示,使用mIL-2和PEGmIL-2 (剂量等于和大于5 $\mu$ g q.o.d. 时) 均可观察到致死性,但STK-014则没有。上述数据表明,本发明的hIL2突变蛋白相较于wt hIL2具有降低的毒性,并表明相较于HD-hIL2具有显著的安全性优势。

[0340] 响应于PEGmIL-2和STK-014的毛细血管渗漏的评估:接受HD-IL-2治疗的患者在接受3天或更长时间的连续的HD-IL-2治疗后,或间隔8小时给予8个剂量的中值后出现急性低血压和CLS。在上述建立MTD肺的研究中,在研究结束时或过早终止或死亡时 (在mIL-2治疗的动物中),收获肺部。作为CLS的度量,用mIL-2或STK-014治疗的小鼠的肺部含水量被计算为新鲜肺的重量减去干燥后的肺部重量的差值。这项研究的结果示于附图图10。如图10提供的数据所示,用HD-IL-2或PEGmIL-2治疗的动物而非用STK-014治疗的小鼠湿肺重量增加,表明毛细血管渗漏。

[0341] 为了在CLS早期发病时直接比较STK-014和IL-2,用PEG-mIL2或STK-014的两个剂量治疗小鼠3天,间隔两天,剂量水平见图11图例所示。此外,以12.2ug的剂量给予wt mIL2 (非PEG化) (HD-小鼠IL-2) 以模拟HD-hIL2疗法。确定湿肺重量与起始总体重的关系。该研究

的结果示于附图图11。如图11提供的数据所示,用HD-IL-2、PEGmIL-2治疗的动物而非用STK-014治疗的小鼠,其肺部湿重与体重之比率增加,表明毛细血管渗漏。上述数据表明,相较于wt hIL2,本发明的hIL2突变蛋白具有降低CLS的风险,并表明相较于HD-hIL2在治疗人对象方面具有显著的安全优势。

[0342] STK-014在同系CT26结肠癌模型中的评估:

[0343] 在Balb/C小鼠中测试STK-014在鼠CT-26结肠癌模型中的抗肿瘤效力。研究设计和治疗组总结于下表9:

表9 研究设计评估 STK-014 的抗肿瘤效力				
组	细胞	处理	剂量和给药	小鼠/组
[0344]	1 CT-26 (3x10 <sup>5</sup> 个细胞)	PBS	qod.	9
	2 CT-26 (3x10 <sup>5</sup> 个细胞)	mIL-2 天然	10 μg q.d.	9
	3 CT-26 (3x10 <sup>5</sup> 个细胞)	PEG-mIL-2	2μg qod	9
	4 CT-26 (3x10 <sup>5</sup> 个细胞)	STK-014	10 μg qod	9

[0345] 简言之,CT-26结肠癌 (3x10<sup>5</sup>个细胞) 被皮下注射,肿瘤被允许生长到>100mm<sup>3</sup>的大小,在肿瘤细胞植入10天后开始治疗。小鼠被按照表9给药。在治疗阶段,每周用卡尺测量两次肿瘤大小。该CT26研究的结果在附图图12中以图表形式呈现。如图12所示,在CT-26结肠癌模型中,只有STK-014治疗组(第4组)导致大于50%的小鼠对肿瘤产生排斥反应。该数据表明,相较于wt hIL2治疗,本发明的hIL2突变蛋白(包括其PEG化变体)在人对象中具有改进的抗肿瘤效力。

[0346] CT-26肿瘤模型中肿瘤浸润性T细胞的分析:从上述CT26肿瘤模型研究的动物身上收获的器官通过免疫组织化学进行了评估。组织的免疫组织化学分析表明,与PEG-mIL-2相比,STK-014治疗的小鼠的肿瘤显示出瘤内CD8+ T细胞的强扩增(图13分图A)。在肿瘤中观察到更强的瘤内CD25+CD8+ T细胞的扩增,表明STK-014的CD25选择性(图13分图B)。在脾脏中,CD25+ T细胞,包括Treg也因STK-014治疗而强扩增,而PEG-IL-2的扩增程度较小(图14)。人肿瘤中T细胞的浸润在预后上与改进的患者生存相关联,与肿瘤分期无关(Fridman,等2012)。类似地,对免疫检查点阻断的反应与肿瘤中CD8+ T细胞的高浸润有关(Tumeh,等2014)。因此,用STK-014(式1的hIL2突变蛋白的鼠替代品)观察到的CD8+T的瘤内浸润增加,表明本发明的hIL2突变蛋白类似地表现出这种瘤内T细胞的增加,其与人癌症患者的临床转归改进有关。

[0347] MC38同系结肠癌模型:

[0348] 除了前述CT-26结肠癌研究外,还在MC-38结肠癌模型中评估了本发明的代表性组合物和方法。MC38研究的研究设计和治疗组在下表10中进行了总结。

表10. 研究设计评估MC-38结肠癌的抗肿瘤效力				
组	细胞	处理	给药	小鼠/组
[0349]	1 MC-38 (1x10 <sup>6</sup> 个细胞)	PBS	q.d.	8
	2 MC-38 (1x10 <sup>6</sup> 个细胞)	PEG-mIL-2	2 µg q.o.d.	8
	3 MC-38 (1x10 <sup>6</sup> 个细胞)	STK-014	3.3 µg q.o.d.	8
	4 MC-38 (1x10 <sup>6</sup> 个细胞)	STK-014	10 µg q.o.d.	8

[0350] 简言之,将MC-38结肠癌细胞(1x10<sup>6</sup>个细胞)皮下注射到小鼠体内并允许形成局部肿瘤18天。小鼠不作治疗或从第18天开始用STK-014治疗。STK-014治疗持续整个观察期。该研究的结果见附图图15。如图所示,用STK-014治疗导致肿瘤控制和消退,而PEG-mIL-2单药治疗显示控制肿瘤的能力下降。

[0351] 瘤内CD8+ T细胞增加:从上述MC38肿瘤模型研究的动物身上收获的器官通过免疫组织化学进行了评估。组织的免疫组织化学分析表明,与PEG-mIL-2相比,STK-014治疗的小鼠的肿瘤显示出瘤内CD8+ T细胞的强劲扩增。如图16A所示,用PEG-mIL-2治疗增加了MC-38肿瘤的瘤内CD8+ T细胞数量,但用STK-014治疗进一步改善了T细胞对MC-38肿瘤的浸润。类似地,如图16B所示,STK-014也增加了MC-38肿瘤中CD8+CD25+ T细胞的数量。

[0352] 血管渗漏综合征:如前所述,wt hIL2(特别是HD-hIL2)治疗导致显著的毒性,特别是由血管渗漏综合征(VLS)引起的。本发明的示例性hIL2突变蛋白在小鼠和非人灵长类动物体内进行了评估,下文将详细讨论。在小鼠毒性模型中,STK-014显示毒性降低,没有诱发血管渗漏综合征。在STK-014在同系(syngeneic)小鼠肿瘤模型中的效力研究中,本发明的hIL2突变蛋白所致毒性相较于wt hIL2更为有利。

[0353] 小鼠VLS的评估:由于VLS与体重增加和湿器官重量增加有关,但由于倦怠(letargy)而导致总体重损失。简言之,进行了实验,其中小鼠被每天给予ST K-014,剂量为1.25、2.5 5和10微克,以磷酸盐缓冲胜利盐水作为对照。如图18所示,该实验的结果没有证明体重显著损失(测试动物的体重损失低于8%,表明小鼠响应于用本发明的组合物治疗没有VLS。除了与VLS有关的体重增加外,体重的大幅损失也表明小鼠的全身性毒性。进行了实验以评估野生型鼠IL2的效果,其剂量为12.2微克,每天给予三次,以及40kD N-末端PEG化的wt mIL2分子的剂量为2.5、5和10微克。实验结果在附图图19中以图表形式提供。如图19所示,wt mIL2导致小鼠体重显著损失,而延长时间的PEG化wt mI L2分子又加剧了这种情况。相反,图19中的数据表明,类似的PEG化的mIL2REH变体并没有引起显著体重损失。总的来说,这些数据表明,本发明的分子相较于野生型IL2的天然和长期作用形式都具有降低的毒性。

[0354] 小鼠体内药理学数据总结:免疫治疗的益处通常与效应T细胞与调节性T细胞的相对增加有关。STK-014最显著地增加了肿瘤中的CD8/Treg比率(图17)。在STK-014在同系(syngeneic)小鼠中的效力研究中,与wt-mIL-2相比,STK-014诱导的瘤内T细胞的激活和扩增显著更强。对接受治疗的小鼠肿瘤中的T细胞的分析表明,与PEG-IL-2相比,瘤内CD8+T细胞响应于STK-014有强扩增。在CD25+CD8+ T细胞中观察到更大的增加,表明STK-014的CD25选择性。在脾中,包括Treg在内的CD25+ T细胞也因STK-014治疗而强烈扩增,而PEG-IL-2引

起的程度则较小。此外,STK-014治疗没有诱导HD-IL-2相关的致死和小鼠毛细血管渗漏综合征。STK-014诱导同系(syngeneic)肿瘤模型的肿瘤控制/完全缓解。STK-014给药增加了肿瘤浸润CD8+ T细胞、CD25+CD8+ T细胞和颗粒酶(数据未显示)表达细胞的数量。

[0355] STK-014与抗PD-1的组合效力:抗PD-1免疫检查点阻断是人肿瘤免疫治疗的特征。在MC-38肿瘤中评估STK-014与抗-PD-1的组合治疗,其对抗-PD-1治疗部分缓解。在治疗开始前已经建立了MC-38肿瘤,以允许形成免疫调节的肿瘤微环境。小鼠被单独或组合使用抗-PD-1、PEG-mIL-2或STK-014治疗(表11)。

[0356] 表11.用STK-014和PD1抑制剂组合治疗MC38肿瘤模型的研究设计

组	细胞	治疗	给药	小鼠
1	MC-38 (1x10 <sup>6</sup> 个细胞)	PBS	q.d.	10
2	MC-38 (1x10 <sup>6</sup> 个细胞)	抗-PD-1	10 mg/kg q4d	10
3	MC-38 (1x10 <sup>6</sup> 个细胞)	PEG-mIL-2	0.125 mg/kg qod	10
4	MC-38 (1x10 <sup>6</sup> 个细胞)	STK-014	0.5 mg/kg qod	8
5	MC-38 (1x10 <sup>6</sup> 个细胞)	抗-PD-1 / PEG-mIL-2	10 mg/kg q4d / 0.125 mg/kg qod	10
6	MC-38 (1x10 <sup>6</sup> 个细胞)	抗-PD-1 / STK-014	10 mg/kg q4d / 0.5 mg/kg qod	8

[0358] 上述研究的结果见附图20。PEG-IL-2和STK-014在该肿瘤模型中都具有单药效力,引起部分缓解。其中任何一种试剂与抗-PD-1的组合增加了抗肿瘤的效力,STK-014+抗-PD-1的组合100%完全缓解(图20)。此外,对瘤内T细胞的存在进行了如上评估,结果见附图图21。如图所示,STK-014和抗-PD-1的组合在小鼠模型中导致了肿瘤的根除,并且与瘤内CD8+T细胞的数量增加相关联。

[0359] 非人灵长类动物研究:

[0360] 除了上述的小鼠毒性研究外,还在非人灵长类动物(NHP)毒理学研究中评估了STK-012。在为期2周的药代动力学(PK)和耐受性研究中,STK-012在超有效(supra-efficacious)的剂量和暴露下耐受。总之,STK-012及其鼠替代物STK-014尽管暴露显著较高,但没有显示与聚乙二醇化鼠IL-2相关的毒性。

[0361] STK-012在非人灵长类动物中的非-GLP耐受性和毒理学研究赞助商已在食蟹猕猴中对STK-012进行了非-GLP耐受性和毒代动力学(toxicokinetic)多剂量递增(MAD)研究。非人灵长类动物(NHP)给药多达两周并多达如下两个剂量的STK-012(表12):

[0362] 表12.在非人灵长类动物中非-GLP耐受性和毒理学研究的给药频率和给药水平

组	测试材料	给药频率	给药水平(mg/kg)	
			第1天	第8天
1	阿地白介素(对照)	单次给药	0.037	-
2	STK-012	q7d	0.01	0.05
3	STK-012	q7d	0.1	0.36

[0364] 在整个研究中进行血清PK、细胞因子分析、细胞流式细胞术、临床化学和血液学分析。器官的宏观和微观分析是在终点解剖(terminal takedown)时进行的。重组人IL-2(阿地白介素)被用作阳性对照。

[0365] STK-012的毒代动力学(Toxicokinetic Analysis)分析:STK-012的血清浓度在STK-012SC注射后迅速增加,在注射后(PI)24h达到C<sub>最大</sub>。STK-012的暴露稳定,各次给药之间

(7天)清除慢(图22),与类似大小的PEG-IL-2突变蛋白结合中等IL-2受体相比,其T1/2为11h(Milla,等2018)。STK-012的T1/2在第一次给药后为23-27小时(表13)。

[0366] 表13. STK-012在食蟹猕猴中的药代动力学数据

组	STK-012 / 天	给药频率	剂量(mg/kg)		T <sub>1/2</sub> (h)	AUC (h*ng/mL)
			剂量 (mg/kg)	C <sub>最大</sub> (ng/mL)		
[0367]	1 阿地白介素	单次给药	0.037	7.66	n.d.	n.d.
	2 STK-012 第1天	q7d	0.01	154	27.53	13,800
	2 STK-012 第8天	q7d	0.5	970	19.18	60,400
	3 STK-012 第1天	q7d	0.1	1570	23.43	155,000
	3 STK-012 第8天	q7d	0.36	2920	13.78	210,000

[0368] STK-012的药效动力学评估:在NHP研究中,STK-012显示出生物学活性,包括仅限于CD25+CD122+T细胞亚群的STAT5磷酸化(图24)。STK-012的剂量等于或大于0.05mg/kg时,在血液中的CD25+CD4+ T细胞亚群中诱导磷酸化STAT5(P-STAT5)。在整个剂量区间内,STK-012维持在足以维持STK-012敏感群的P-STAT5阳性的水平(图23)。STK-012旨在特异性靶向最近有TCR介导的CD25和CD122的上调的T细胞。取决于浓度,STK-012特异地诱导表面表达高水平CD25和CD122的细胞中的STAT5磷酸化(图24)。STK-012在体外和食蟹猕猴中特异地结合并激活CD25+T细胞(图24)。支持STK-012的特异性,CD25+CD8+ T细胞比CD25-CD8+ T细胞更早增殖(通过KI-67+检测),并且对STK-012的反应的百分比更高(图25)。CD25-CD8+ T细胞的增殖相对于STK-012给药和CDD25+CD8+ T细胞的增殖是延迟的,可能是CD25+ T细胞分泌wtIL-2的结果。CD28+CD95+CD8+中央记忆T细胞(Tcm)代表了经历抗原的T细胞群。在黑色素瘤患者中,用抗-PD-1抗体治疗诱导CD28+ Tcm的增殖和扩增,与肿瘤缓解相关(Huang,等2017)。STK-012治疗诱导NHP的血液中CD28+CD95+CD8+ T细胞的扩增(图26)。

[0369] 非临床研究中的临床观察总结:在第8天以0.36mg/kg给予STK-012,在临床观察中与行为变化有关,包括驼背姿势、嗜睡、眼睑肿胀、皮肤剥落、软便和液态便。雄性在第9、12、14和15天出现驼背姿势,雌性在第14和15天出现驼背姿势。雄性在第9天和第12天出现嗜睡,第12天活动减少,第15天双侧眼睑肿胀,第9天和第12天左后肢出现皮肤剥落,第11至13天出现软便,第9和10天出现液态便。在其他STK-012给药水平的动物中没有发现与测试品有关的临床观察。因此,本研究中的最高非严重毒性剂量(HNSTD)为100μg/kg。

[0370] 病理评估总结在用STK-012给药的动物的肝、肾和脾中注意到与测试品有关的显微镜发现:肝脏中最小到中等的血管周围混合炎症细胞浸润(STK-012,0.01/0.05和0.1/0.36mg/kg);脾红髓(spleen red pulp)中单核细胞的细胞性(cellularity)增加极小(STK-012,0.1/0.36mg/kg);肾皮质有轻度单核细胞浸润(STK-012,0.01/0.05和0.1/0.36mg/kg)。受影响的区域主要包括血管周围区域,包括门静脉和中央静脉,但未见肝细胞明显变性或坏死。血清转氨酶未见异常。

[0371] STK-012是结构修饰的IL-2,其只结合和激活高亲和力人IL-2R(CD25、CD122和CD132)。这种靶细胞选择性可能会减少靶介导的清除。与阿地白介素(本研究)或文献中描述的其他类似的聚乙二醇化的IL-2相比,STK-012表现出清除降低和高暴露(Milla,Ptacin等,2018)。尽管STK-012的血清暴露量高,但在多至100μg/kg且持续高血清浓度的剂量下,STK-012是耐受的。由CD25+T细胞中的P-STAT5指示,STK-012显示出强大和持续的生物活

性。

[0372] 具有改变的药代动力学的hIL2突变蛋白：

[0373] 本发明进一步提供了具有改变的药代动力学 (PK) 特性的修饰的hIL2突变蛋白。在一些实施方式中,本发明的具有改变的PK特性的hIL2突变蛋白被修饰以增加其在哺乳动物对象体内的作用时间。这种PK改变的例子包括但不限于与偶联至一个或多个运载体蛋白、PEG化、酰化、或hIL2突变蛋白的氨基酸序列修饰、取代或缺失。

[0374] 在一些实施方式中,具有改变的药代动力学 (PK) 特性的修饰的hIL2突变蛋白在人对象体内的血浆半衰期大于4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、18小时、24小时、2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、14天、或30天。

[0375] 氨基酸修饰:在一些实施方式中,hIL2突变蛋白可以包含某些氨基酸取代,其修饰hIL2突变蛋白的PK从而导致延长体内寿命。例如,Dakshinamurthi,等(International Journal of Bioinformatics Research (2009) 1 (2) :4-13)描述在hIL2多肽中一个或多个取代V91R、K97E和T113N提供拥有增强的稳定性和活性的hIL2变体。在一些实施方式中,本发明的hIL2突变蛋白包含一个、两个或全部三个V91R、K97E和/或T113N修饰。

[0376] 偶联至运载体分子:在一些实施方式中,本发明的具有改变的PK特性的hIL2突变蛋白偶联至一个或多个运载体分子。在一些实施方式中,IL2突变蛋白可以共价地连接至IgG的Fc结构域、白蛋白或其他分子以延长其半衰期,例如,通过本领域已知的聚乙二醇化、糖基化、脂肪酸酰化等。

[0377] 在一些实施方式中,本发明的具有改变的PK特性的hIL2突变蛋白被表达为与白蛋白分子(例如人血清白蛋白)的融合蛋白质,其在本领域中是已知的,以促进延长体内暴露。在本发明的实施方式中,hIL2突变蛋白被偶联至白蛋白,在本文中称为“hIL2突变蛋白白蛋白融合体”。在hIL2类似物白蛋白融合体的上下文中使用术语“白蛋白”时,包含白蛋白,例如人血清白蛋白(HSA)、食蟹猴血清白蛋白(cyno serum albumin)和牛血清白蛋白(BSA)。在一些实施方式中,相较于野生型HSA序列,HSA包含C34S或K573P氨基酸取代。根据本发明,白蛋白可以在羧基末端、氨基末端、羧基和氨基末端以及内部偶联至hIL2突变蛋白(例如,参见USP 5,876,969和USP 7,056,701)。在本发明所预期的HSA-hIL2突变蛋白多肽偶联物中,可以使用多种形式的白蛋白,例如白蛋白分泌前序列(albumin secretion pre-sequence)及其变体、其片段和变体和HSA变体。这种形式通常具有一种或多种所需的白蛋白活性。在其他实施方式中,本发明涉及包含hIL2类似物多肽直接或间接融合至白蛋白、白蛋白片段和白蛋白变体等的融合蛋白,其中融合蛋白比未融合的药物分子具有更高的血浆稳定性和/或融合蛋白保留了未融合药物分子的治疗活性。在一些实施方式中,直接融合是通过接头实现的,例如肽接头或其修饰的形式,如下文更充分地讨论的。

[0378] 或者,hIL2突变蛋白白蛋白融合体包含IL2突变蛋白,其为包含白蛋白结合结构域(ABD)多肽序列和IL2突变蛋白多肽的融合蛋白。如上所述,包含白蛋白结合结构域(ABD)多肽序列和hIL2类似物多肽的融合蛋白能够,例如,通过遗传操作实现,使得编码HSA的核酸或其片段被接合至编码一种或多种IL2突变蛋白序列的核酸。在一些实施方式中,白蛋白结合肽包括氨基酸序列ICLPRWGCLW (SEQ ID NO:6)。

[0379] 在一些实施方式中,本发明的具有改变的PK特性的hIL2突变蛋白通过偶联至大的、缓慢代谢的大分子实现,所述大分子例如蛋白质;多糖,例如琼脂糖(sepharose)、琼脂

糖(agarose)、纤维素或纤维素珠；聚氨基酸，例如聚谷氨酸或聚赖氨酸；氨基酸共聚物；灭活的病毒颗粒；灭火的细菌毒素，例如来自白喉、破伤风、霍乱的类毒素或白细胞毒素分子；灭活的细菌、树突细胞、甲状腺球蛋白；破伤风类毒素；白喉类毒素；聚氨基酸例如聚(D-赖氨酸:D-谷氨酸)；轮状病毒VP6多肽；流感病毒血蓝蛋白(hemagglutinin)、流感病毒核蛋白；钥孔戚血蓝素(Keyhole Limpet Hemocyanin) (KLH)；和乙肝病毒核心蛋白和表面抗原。如果需要，这种偶联形式可用于产生针对本发明的多肽的抗体。

[0380] 在一些实施方式中，本发明的具有改变的PK特性的hIL2突变蛋白通过偶联至XTEN实现，其提供了延伸的类似于PEG化的延长的持续时间，可在大肠杆菌中以重组融合蛋白形式生产。适合与本发明的IL2突变蛋白偶联的XTEN聚合物提供于Podust, 等(2016)“通过XTEN蛋白聚合物延长生物活性分子的体内半衰期(Extension of in vivo half-life of biologically active molecules by XTEN protein polymers)”, J Controlled Release 240:52-66和Haeckel等(2016)“XTEN作为PEG化的生物学替代方案，允许完全表达基于蛋白酶可激活的杀伤性细胞抑制剂(XTEN as Biological Alternative to PEGylation Allows Complete Expression of a Protease-Activatable Killin-Based Cytostatic)”PLOS ONE|DOI:10.1371/journal.pone.0157193,2016年6月13日。XTEN聚合物融合蛋白可以在XTEN多肽和IL2突变蛋白之间纳入蛋白酶敏感裂解位点，例如MMP-2裂解位点。

[0381] 本发明的IL2突变蛋白可以使用众所周知的化学偶联方法化学偶联至此类运载体分子。双功能交联剂例如本领域已知的同功能和异功能交联剂可用于此目的。使用的交联剂的类型取决于将要偶联至IL2突变蛋白的分子的性质，本领域技术人员可以很容易地确定。或者或另外，IL2突变蛋白和/或意在与之偶联的分子可以被化学衍生化，使得二者在单独地反应中被偶联，这也是本领域众所周知的。

[0382] PEG化:在一些实施方式中，IL2突变蛋白偶联至一个或多个水溶性聚合物。在本发明实践中有用的水溶性聚合物的例子包括聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇(PPG)、多糖(聚乙烯吡咯烷酮、乙二醇和丙二醇的共聚物、聚(氧乙基化多元醇)、聚烯烃醇(polyolefinic alcohol)、多糖、聚- $\alpha$ -羟基酸、聚乙烯醇(PVA)、聚磷腈、聚噁唑啉(polyoxazoline) (POZ)、聚(N-丙烯酰吗啉)，或其组合。在一些实施方式中，IL2突变蛋白偶联至一个或多个聚乙二醇分子或“聚乙二醇化/PEG化”。尽管PEG附接至IL2突变蛋白的方法或位点可能不同，在某些实施方式中聚乙二醇化不改变或仅在最小程序上改变IL2突变蛋白的活性。在一些实施方式中，半胱氨酸可以被取代为第3位的苏氨酸(3TC)以促进使用特定化学方法的N-末端聚乙二醇化。

[0383] 在一些实施方式中，IL2突变蛋白的选择性PEG化(例如通过纳入具有侧链的非天然氨基酸以促进选择性PEG偶联化学反应，如描述于Ptacin, 等(2018年8月3日提交的PCT国际申请号PCT/US2018/045257，并于2019年2月7日作为国际公开号W0 2019/028419A1公开)可用于产生对IL2受体复合物的一个或多个亚基(如CD25、CD132)的亲和力降低的IL2突变蛋白。例如，其中在IL2的经鉴定为与CD25相互作用的那些序列或残基(包括氨基酸34-45、61-72和105-109)处纳入具有可PEG化的特定部分的非天然氨基酸的hIL2突变蛋白通常能提供对CD25结合性减弱的IL2突变蛋白。相似地，其中在IL2的经鉴定为与hCD132相互作用的那些序列或残基(包括氨基酸18、22、109、126或119-133)处纳入具有可PEG化的特定部分

的非天然氨基酸的hIL2突变蛋白通常能提供对hCD132结合性减弱的IL2突变蛋白。

[0384] 在某些实施方式中,半衰期的增加大于生物学活性的任何减少。适合偶联至多肽序列的PEG通常在室温溶于水,并且具有通式R(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O-R,其中R是氢或保护基团,例如烷基或烷醇基,其中n是1-1000的整数。当R是保护基团时,其通常具有1-8个碳。偶联至多肽序列的PEG可以是直链的或支链的。本发明考虑了支化PEG衍生物,“星形-PEG(star-PEG)”和多臂PEG。

[0385] 本发明中使用的PEG的分子量不限于任何特定范围。PEG-IL2突变蛋白的PEG组分可以具有大于约5kDa、大于约10kDa、大于约15kDa、大于约20kDa、大于约30kDa、大于约40kDa、或大于约50kDa的分子量。在一些实施方式中,分子量为约5kDa至约10kDa,约5kDa至约15kDa,约5kDa至约20kDa,约10kDa至约15kDa,约10kDa至约20kDa,约10kDa至约25kDa或约10kDa至约30kDa。直链或支链PEG分子的分子量从约2,000至约80,000道尔顿,或者约2,000至约70,000道尔顿,或者约5,000至约50,000道尔顿,或者约10,000至约50,000道尔顿,或者约20,000至约50,000道尔顿,或者约30,000至约50,000道尔顿,或者约20,000至约40,000道尔顿,或者约30,000至约40,000道尔顿。在本发明的一个实施方式中,PEG为包含两个20kD臂的40kD支链PEG。

[0386] 本发明还考虑了偶联物的组合物,其中PEG具有不同的n值,因此在特定的比率下存在多种不同的PEG。例如,一些组合物包含偶联物的混合物,其中n=1、2、3和4。在一些组合物中,n=1的偶联物的百分比为18-25%,n=2的偶联物的百分比为50-66%,n=3的偶联物的百分比为12-16%,n=4的偶联物的百分比多达5%。这种组合物可以通过本领域已知的反应条件和纯化方法生产。层析可用于分辨偶联物的馏分,然后鉴定包含具有例如附接所需数量的PEG的偶联物的馏分,从未修饰的蛋白质序列和具有附接其他数量PEG的偶联物中纯化出来。

[0387] 适合偶联至多肽序列的PEG通常在室温溶于水,并且具有通式R(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O-R,其中R是氢或保护基团,例如烷基或烷醇基,其中n是1-1000的整数。当R是保护基团时,其通常具有1-8个碳。

[0388] 两种广泛使用的第一代激活的单甲氧基PEG(mPEG)是琥珀酰亚胺基碳酸酯PEG(SC-PEG;参见,例如,Zalipsky,等(1992)Biotechnol.Appl.Biochem15:100-114)和苯并三唑甲酯PEG(BTC-PEG;参见,例如Dolence,等美国专利号5,650,234),其优选与赖氨酸残基反应以形成氨基甲酸酯连接,但也已知与组氨酸和酪氨酸残基反应。使用PEG-醛接头通过还原性胺化靶向多肽的N-末端单个位点。

[0389] 聚乙二醇化经常发生在多肽N-末端的α-氨基基团,赖氨酸残基侧链上的ε氨基基团和组氨酸残基侧链上的咪唑基团。由于大多数重组多肽具有单个α基团和若干ε基团和咪唑基团,根据接头的化学性质,可以产生许多位置异构体。本领域中已知的一般聚乙二醇化策略可本文中应用。

[0390] PEG可以通过末端反应性基团(“间隔子”)结合至本发明的IL2突变蛋白,该基团在一个或多个多肽序列的游离氨基或羧基与聚乙二醇之间介导结合。具有可结合至游离氨基基团的间隔子的PEG包括N-羟基琥珀酰亚胺聚乙二醇,它可以通过用N-羟基琥珀酰亚胺激活聚乙二醇的琥珀酸酯来制备。

[0391] 在一些实施方式中,通过纳入带有独特侧链的非天然氨基酸以促进特定位点的

PEG化来促进IL2突变蛋白的PEG化。将非天然氨基酸纳入多肽以提供功能部分以实现此类多肽的位点特异性聚乙二醇化是本领域中已知的。参见,例如Ptacin,等,(PCT国际申请号PCT/US2018/045257,2018年8月3日提交并公开于2019年2月7日,国际公开号W0 2019/028419A1。在一个实施方式中,本发明的IL2突变蛋白在IL2突变蛋白的D109位纳入非天然氨基酸。在本发明的一个实施方式中,IL2突变蛋白是IL2突变蛋白的109位PEG化的,PEG分子分子量约为20kD,或约30kD,或约40kD。

[0392] 偶联至多肽序列的PEG可以是直链的或支链的。本发明考虑了支化PEG衍生物,“星形-PEG (star-PEG)”和多臂PEG。本发明的实践中有用的具体实施方式PEG包括10kDa直链PEG-醛(例如, Sunbright® ME-100AL、NOF美国公司 (NOF America Corporation), 北百老汇 (One North Broadway), 纽约州白原市 (White Plains, NY) 10601USA)、10kDa直链PEG-NHS酯(例如, Sunbright® ME-100CS, Sunbright® ME-100AS, Sunbright® ME-100GS, Sunbright® ME-100HS, NOF)、20kDa直链PEG-醛(例如 Sunbright® ME-200AL, NOF、20kDa直链PEG-NHS酯(例如, Sunbright® ME-200CS, Sunbright® ME-200AS, Sunbright® ME-200GS, Sunbright® ME-200HS, NOF)、20kDa 2-臂支链PEG-醛, 该20kDa PEG-醛, 其包含两个10kDa直链PEG分子(例如, Sunbright® GL2-200AL3, NOF)、20kDa 2-臂支链PEG-NHS酯, 该20kDa PEG-NHS酯, 其包含两个10kDa直链PEG分子(例如, Sunbright® GL2-200TS, Sunbright® GL200GS2, NOF)、40kDa 2-臂支链PEG-醛, 该40kDa PEG-醛, 其包含两个20kDa直链PEG分子(例如, Sunbright® GL2-400AL3)、40kDa 2-臂支链PEG-NHS酯, 该40kDa PEG-NHS酯, 其包含两个20kDa直链PEG分子(例如, Sunbright® GL2-400AL3, Sunbright® GL2-400GS2, NOF)、直链30kDa PEG-醛(例如, Sunbright® ME-300AL)和直链30kDa PEG-NHS酯。

[0393] 如前所述,PEG可以直接或通过接头分子附接至IL2突变蛋白。合适的接头包括“柔性接头”,其长度通常足以允许修饰的多肽序列与连接的组分和分子之间有一些移动。接头分子通常约6-50个原子长。接头分子也可以是,例如,芳基乙炔、含有2-10个单体单元的乙二醇寡聚物、二胺、二酸、氨基酸或其组合。合适的接头可以容易地选择,可以是任何合适的长度,例如1个氨基酸(如Gly)、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10-20、20-30、30-50或超过50个氨基酸。柔性接头的例子包括甘氨酸聚合物( $G$ )<sub>n</sub>、甘氨酸-丝氨酸聚合物、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和其他柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是相对非结构化的,因此可以用作组分之间的中性系链(tether)。柔性接头的其他例子包括甘氨酸聚合物( $G$ )<sub>n</sub>、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物、甘氨酸-丝氨酸聚合物。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是相对非结构化的,因此可以用作组分之间的中性系链(tether)。这些接头序列的多聚体(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10-20、20-30或30-50)可以连接在一起,以提供柔性接头,可用于将异源氨基酸序列偶联至本文公开的多肽。

[0394] 此外,这种接头可用于将IL2突变蛋白连接至本文所述的其他异源多肽组分,异源氨基酸序列可以是信号序列和/或融合伴侣,例如,白蛋白、Fc序列等。

[0395] 酰化:在一些实施方式中,本发明的IL2突变蛋白可以是通过偶联至脂肪酸分子酰化的,如描述于Resh (2016)《脂质研究进展》(Progress in Lipid Research) 63:120-131。可被偶联的脂肪酸的例子包括肉豆蔻酸、棕榈酸和棕榈油酸。肉豆蔻酸通常被连接至N-末

端甘氨酸,但赖氨酸也可以被肉豆蔻酰化。棕榈酰化通常通过对游离的半胱氨酸-SH基团的酶促修饰来实现,例如DHHC蛋白催化S-棕榈酰化。丝氨酸和苏氨酸残基的棕榈酰化通常通过使用PORCN酶酶促实现。

[0396] 乙酰化:在一些实施方式中,IL2突变蛋白在N-末端通过与N-末端乙酰转移酶和,例如,乙酰CoA的酶促反应被乙酰化。替代地或除了N-末端乙酰化之外,IL2突变蛋白在一个或多个赖氨酸残基处乙酰化,例如通过与赖氨酸乙酰转移酶的酶促反应。参见,例如,Choudhary等(2009) *Science* 325 (5942) :834L2 ortho840。

[0397] Fc融合体:在一些实施方式中,IL2融合蛋白可以纳入来源于IgG抗体亚类的Fc区,其缺乏IgG重链可变区。“Fc区”可以是天然存在或合成的多肽,其与用木瓜蛋白酶消化IgG产生的IgG C-末端结构域同源。IgG Fc的分子量约为50kDa。突变的IL2多肽可以包含整个Fc区,或保留延长其作为嵌合多肽的部分的循环半衰期能力的较小部分。此外,全长或片段的Fc区可以是野生型分子的变体。即,它们可以包含可能影响或不影响多肽功能的突变;正如下文进一步描述的那样,在所有情况下都不需要或不希望有天然活性。在某些实施方式中,IL2突变蛋白融合蛋白(如本文所述的IL2部分激动剂或拮抗剂)包括IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区。示例性Fc区可以包括抑制补体固定和Fc受体结合的突变,或者它可以是裂解性的,即能够结合补体或通过另一种机制如抗体依赖性补体裂解(ADCC)来裂解细胞。

[0398] 在一些实施方式中,IL2突变蛋白包含Fc融合体嵌合多肽分子的功能域。Fc融合体偶联物已被证明可以增加生物药物的全身半衰期,因此,生物药物产品可以不需要频繁给药。Fc结合至衬垫在血管的内皮细胞中的新生Fc受体(FcRn),结合后,Fc融合分子被保护,不被降解并重新释放到循环中,使分子在循环中保持更长的时间。这种Fc结合被认为是内源性IgG保持其长血浆半衰期的机制。最近的Fc融合体技术将一份生物药物的单拷贝连接至抗体的Fc区,与传统的Fc融合体偶联物相比,优化了生物药物的药代动力学和药效动力学特性。用于制备Fc融合体的“Fc区”可以是天然存在或合成的多肽,其与用木瓜蛋白酶消化IgG产生的IgG C-末端结构域同源。IgG Fc的分子量约为50kDa。IL2突变蛋白可以提供整个Fc区,或保留延长其作为嵌合多肽的循环半衰期能力的较小部分。此外,全长或片段的Fc区可以是野生型分子的变体。在一个典型的呈现中,二聚体Fc的每个单体携带异源多肽,异源多肽是相同或不同的。

[0399] 在一些实施方式中,当IL2突变蛋白要以Fc融合体的形式给予时,特别是在那些偶联至Fc二聚体的各个亚单位的多肽链不同的情况下,Fc融合体可以被工程改造为具有“杵臼(knob-into-hole)修饰”。杵臼修饰更全面地描述于Ridgway,等(1996)《蛋白质工程改造》(Protein Engineering) 9 (7) :617-621和1998年3月24日授权的美国专利号5,731,168。杵臼修饰是指在CH3结构域中两个免疫球蛋白重链之间界面的修饰,其中:i)在第一条重链的CH3结构域中,氨基酸残基被具有较大侧链的氨基酸残基(例如,酪氨酸或色氨酸)替代,从表面产生突起(“杵”)和ii)在第二条重链的CH3结构域中,氨基酸残基被具有较小侧链的氨基酸残基(如丙氨酸或苏氨酸)替代,从而在第二CH3结构域的界面内产生空腔(“臼”),其中第一条重链的突出侧链(“杵”)被第二CH3结构域中的空腔接收。在一个实施方式中,“杵臼修饰”包括抗体重链之一中的氨基酸取代T366W和任选地氨基酸取代S354C,和另一个抗体重链中的氨基酸取代T366S、L368A、Y407V和任选地Y349C。此外,Fc结构域可以通过在S354和Y349位置引入半胱氨酸残基进行修饰,从而在Fc区的两个抗体重链之间产生稳定的

二硫键(Carter, 等(2001) *Immunol Methods* 248, 7-15)。杆臼形式用于促进在具有“杆”修饰的第一Fc单体上第一多肽(如IL2突变蛋白)的表达和在具有“臼”修饰的第二Fc单体上的第二多肽的表达,以促进异二聚体多肽偶联物的表达。

[0400] Fc区可以是“溶解性”或“非溶解性”的,但通常是非溶解性的。非溶解性Fc区通常缺乏高亲和力Fc受体结合位点和Clq结合位点。鼠 IgG Fc的高亲和力Fc受体结合位点包括IgG Fc第235位的Leu残基。因此,Fc受体结合位点可以通过突变或缺失Leu 235而被抑制。例如,用Glu取代Leu 235抑制Fc区结合至高亲和力Fc受体的能力。通过突变或缺失IgG的Glu 318、Lys 320和Lys 322残基,可以在功能上破坏鼠Clq结合位点。例如,用Ala残基取代Glu318、Lys 320和Lys 322,使IgG1 Fc不能引导抗体依赖性补体裂解。与此相反,溶解性IgG Fc区具有高亲和力Fc受体结合位点和Clq结合位点。高亲和力的Fc受体结合位点包括IgG Fc的235位Leu残基,而Clq结合位点包括IgG1的Glu 318、Lys 320和Lys 322残基。溶解性IgG Fc在这些位点具有野生型残基或保守的氨基酸取代。溶解性IgG Fc可以针对细胞进行抗体依赖性细胞毒性或补体定向细胞溶解(CDC)。人IgG的适当突变也是已知的(参见,例如,Morrison等, *The Immunologist* 2:119-124, 1994; 和Brekke等, *The Immunologist* 2: 125, 1994)。

[0401] 在某些实施方式中,本发明的IL2突变蛋白的氨基或羧基末端可与免疫球蛋白Fc区(如人Fc)融合,以形成融合体偶联物(或融合分子)。Fc融合体偶联物已被证明可以增加生物药物的全身半衰期,因此,生物药物产品可以不需要频繁给药。Fc结合至衬垫在血管的内皮细胞中的新生Fc受体(FcRn),结合后,Fc融合分子被保护,不被降解并重新释放到循环中,使分子在循环中保持更长的时间。这种Fc结合被认为是内源性IgG保持其长血浆半衰期的机制。最近的Fc融合体技术将一份生物药物的单拷贝连接至抗体的Fc区,与传统的Fc融合体偶联物相比,优化了生物药物的药代动力学和药效动力学特性。

[0402] 在一些实施方式中,Fc结构域单体包括相对于野生型人IgG1、IgG2或IgG4 Fc区域的至少一个突变,如美国专利号10,259,859B2所述,其全部教导通过引用纳入本文。在一些实施方式中,与具有野生型人IgG Fc区的多肽相比,该多肽在吞噬试验中表现出吞噬作用的降低。在一些实施方式中,Fc结构域单体连接至包含第二Fc结构域单体的第二多肽,形成Fc结构域二聚体。

[0403] 嵌合多肽/融合蛋白:在一些实施方式中,IL2突变蛋白可以包含嵌合多肽的功能域。本发明的IL2突变蛋白融合蛋白可以通过本领域已知的技术通过重组DNA方法容易地生产,通过构建重组载体,该载体包含核酸序列,该核酸序列包括在框内的编码IL2突变蛋白的核酸序列与编码IL2突变蛋白的N-末端或C-末端融合伴侣的核酸序列,该序列可任选地进一步包括在框内的编码接头或间隔子多肽的核酸序列。

[0404] 抗原标签:在其他的实施方式中,IL2突变蛋白可以任选地被修饰以纳入功能为抗原标签的其他多肽序列,例如FLAG序列。如本文所述,FLAG序列可被生物素化、高特异性的抗-FLAG抗体识别(参见例如,Blanar等(1992) *Science* 256:1014和LeClair, 等(1992) *PNAS-USA* 89:8145)。在一些实施方式中,IL2突变蛋白多肽进一步包括C-末端的c-myc表位标签。

[0405] 用于偶联至本发明的hIL2突变蛋白的其他候选分子包括那些适用于分离或纯化的分子。特定的非限制性例子包括结合分子,例如生物素(生物素-亲和素特异性结合对)、

抗体、受体、配体、凝集素或包含固体支持物(包括,例如塑料或聚苯乙烯珠、板或珠、磁珠、测试条和膜)的分子。

[0406] His标签:在一些实施方式中,本发明的hIL2突变蛋白(包括这种IL2突变蛋白的融合蛋白)被表达为具有一个或多个过渡金属螯合多肽序列的融合蛋白。纳入这种过渡金属螯合结构域促进纯化固定化金属亲和层析(IMAC),如Smith等1986年2月11日授权的美国专利第4,569,794号所述。在本发明的实践中有用的过渡金属螯合多肽的例子描述于Smith等(同上)以及Dobeli等的1995年5月10日授权的美国专利第5,320,663号,其中的全部教导通过引用纳入此处。在本发明的实践中有用的具体过渡金属螯合多肽是包含3-6个连续的组氨酸残基的肽,例如6-组氨酸肽(His)<sub>6</sub>,在本领域经常被称为“His-标签”。

[0407] 靶向hIL2突变蛋白:在一些实施方式中,IL2突变蛋白被提供为具有多肽序列(“靶向结构域”)的融合蛋白,以促进选择性地结合到特定的表达特异性结合至这种靶向域的细胞表面分子的细胞类型或组织,任选地在IL2突变蛋白序列和融合蛋白的靶向结构域序列之间纳入1-40(或2-20、或5-20、或10-20)个氨基酸的接头分子。在其他实施方式中,可以产生包含hIL2突变蛋白和其抗体或抗原结合部分的嵌合多肽。嵌合蛋白的抗体或抗原结合部分可以作为靶向部分。例如,它可以用来自将嵌合蛋白定位到特定的细胞亚群或靶分子。产生细胞因子-抗体嵌合多肽的方法描述于,例如,美国专利号6,617,135。编码突变的IL2的核酸分子。

[0408] 在一些实施方式中,hIL2突变蛋白融合蛋白的靶向结构域特异性地结合至肿瘤细胞的细胞表面分子。在一个实施方式中,其中CAR-T细胞的CAR的ECD特异性地结合至CD-19,IL2突变蛋白可以作为具有CD-19靶向部分的融合蛋白提供。例如,在一个实施方式中,其中CAR-T细胞的CAR的ECD是提供特异性结合至CD-19的scFv分子,IL2突变蛋白作为与CD-19靶向部分(例如特异性结合至CD-19的单链抗体(例如scFv或VHH))的融合蛋白提供。在一些实施方式中,融合蛋白包括hIL2突变蛋白和抗-CD19 scFv FMC63(Nicholson,等(1997)Mol Immunol 34:1157-1165)。

[0409] 类似地,在一些实施方式中,其中CAR-T细胞的CAR的ECD特异性结合至BCMA,hIL2突变蛋白可以作为与BCMA靶向部分的融合蛋白提供,所述靶向部分例如包含Kalled等(美国专利9,034,324,2015年5月9日授权)所述的抗BCMA抗体的CDR的抗体或包含Brogdon等(美国专利号10,174,095,2019年1月8日授权)所述的CDR的抗体。在一些实施方式中,hIL2突变蛋白作为与GD2靶向部分的融合蛋白提供,所述靶向部分例如包含Cheung等(美国专利号9,315,585,2016年4月19日授权)所述CDR,或来自ME36.1(Thurin等,(1987)Cancer Research 47:1229-1233)、14G2a、3F8(Cheung等,1985Cancer Research 45:2642-2649)、hu14.18、8B6、2E12或ic9的CDR的抗体。

[0410] 在替代性实施方式中,本发明的靶向hIL2突变蛋白可与CAR-T细胞疗法组合给予,以提供基于CAR-T细胞的胞外受体的IL2突变蛋白至CAR-T细胞的靶向递送,例如通过采用包含抗-FMC63抗体的靶向hIL2突变蛋白构建体,以将IL2活性靶向CAR-T细胞,并再生体内耗尽的CAR-T细胞。因此,本发明的实施方式包括通过将这种IL2突变蛋白偶联至设计为与CAR-T细胞的特定细胞表面分子相互作用的抗体或配体来靶向递送IL2突变蛋白。这种分子的例子可以是抗-FMC63-hIL2突变蛋白。

[0411] 在其他实施方式中,嵌合多肽包括突变IL2多肽和异源多肽,其功能为增强突变

IL2多肽的表达或指导细胞定位,例如Aga2p凝集素亚基(参见,例如,Boder和Wittrup,Nature Biotechnol.15:553-7,1997)。

[0412] 蛋白质转导结构域融合蛋白:在一些实施方式中,IL2突变蛋白可以操作性地连接至“蛋白质转导结构域”或“PTD”。PTD是多肽、多核苷酸、碳水化合物、或有机或无机分子,其有利于穿越脂质双分子层、胶束、细胞膜、细胞器膜或囊泡膜。PTD纳入IL2突变蛋白有利于分子穿越膜。在一些实施方式中,PTD共价连接至IL2突变蛋白的氨基或羧基末端。在一些实施方式中,PTD作为PTD-IL2突变蛋白融合蛋白的部分,纳入分子的N末端或C末端。示例性的蛋白质转导结构包括但不限于最小的十肽蛋白转导结构域(对应于HIV-1TAT的残基47-57);聚精氨酸序列,其包括足以指导进入细胞的精氨酸残基数量(例如,3、4、5、6、7、8、9、10或10-50个精氨酸);VP22结构域(Zender等(2002)Cancer Gene Ther.9 (6):489-96);果蝇触角足突变(*Drosophila Antennapedia*)蛋白转导结构域(Noguchi等(2003)Diabetes 52 (7):1732-1737);截短的人降血钙素肽(Trehin等(2004)Pharm.Research 21:1248-1256);聚赖氨酸(Wender等(2000)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:13003-13008)、转运蛋白(如描述于Wierzbicki,等,(2014)Folio Histomchemica et Cytobiologica 52 (4):270-280和Pooga,等(1998)FASEB J 12 (1) 67-77且可以商购自AnaSpec,目录号AS-61256);KALA(如描述于Wyman等,(1997)Biochemistry 36 (10) 3008-3017且可商购自AnaSpec,目录号AS-65459);触角足突变肽(如描述于Pietersz等,(2001)Vaccine 19:1397且可商购自AnaSpec,目录号AS-61032);TAT 47-57(可商购自AnaSpec,目录号AS-60023)。

[0413] 偶联补充治疗剂:在一些实施方式中,hIL2突变蛋白可以连接至一个或多个其他治疗剂,包括但不限于抗炎化合物或抗肿瘤剂、治疗性抗体(例如赫赛汀)、靶向部分(例如抗-肿瘤抗原抗体)、免疫检查点调节剂、免疫检查点抑制剂(例如抗-PD1抗体)或癌症疫苗。抗微生物剂包括氨基糖苷类(包括庆大霉素),抗病毒化合物,例如利福平(rifampicin)、3'-叠氮-3'-脱氧胸昔(AZT)和阿昔洛韦(acyclovir),抗真菌剂,例如唑类,包括氟康唑(fluconazole)、大环内酯(macrolide),例如两性霉素B和杀念菌素(candidin),抗寄生生物化合物等。IL2突变蛋白可以被偶联至其他细胞因子如CSF、GSF、GMCSF、TNF、促红细胞生成素(erythropoietin),免疫调节剂或细胞因子,例如干扰素或白细胞介素,神经肽,生殖激素,例如HGH、FSH或LH,甲状腺激素,神经递质,如乙酰胆碱,激素受体,例如雌激素受体。还包括非甾体抗炎药,例如吲哚美辛、醋酸水杨酸、布洛芬、舒林酸、吡罗昔康和萘普生,以及麻醉剂或镇痛剂。还包括放射性同位素,如那些对成像以及治疗有用的放射性同位素。

#### [0414] IL2突变蛋白的合成

[0415] 本发明的IL2突变蛋白可以通过用于构建多肽的常规方法生产,包括重组或固相合成。

[0416] 化学合成:除了通过已经通过重组分子生物技术改变的核酸分子的表达产生突变多肽之外,主体hIL2突变蛋白可以化学合成。化学合成多肽可以由本领域技术人员常规地生产。化学合成包括通过化学方式进行的编码表现出所述特性的IL2突变蛋白的蛋白质序列的肽的直接合成。该方法可以在影响IL2和CD25、CD122和CD132的相互作用的位置纳入天然和非天然的氨基酸。

[0417] 在一些实施方式中,本发明的IL2突变蛋白可以通过化学合成制备。IL2突变蛋白的化学合成可以通过液相或固相进行。固相肽合成(SPPS)允许纳入非天然氨基酸和/或肽/

蛋白质骨架修饰。可用于合成本发明的IL2突变蛋白的SPPS的多种形式是本领域已知的(例如, Ganesan A. (2006) *Mini Rev. Med. Chem.* 6:3-10; 和Camarero等, (2005) *Protein Pept Lett.* 12:723-8)。在化学合成的过程中,  $\alpha$ 官能团和任何反应性侧链可以用酸不稳定或碱不稳定基团保护, 其在供酰胺键连接的条件下是稳定的, 但可易于在不损害已形成的肽链的情况下被裂解。

[0418] 在固相合成中, 多肽的N-末端或C-末端氨基酸可以被偶联至合适的支持材料。合适的支持材料是那些对合成过程中逐步缩合和裂解反应的试剂盒反应条件惰性的材料, 并且不溶解于正在使用的反应介质。市售可得的支持材料的例子包括用活性基团和/或聚乙二醇修饰的苯乙烯/二乙烯基苯共聚物; 氯甲基化的苯乙烯/二乙烯基苯共聚物; 羟甲基化或氨基甲基化的苯乙烯/二乙烯基苯共聚物等。被保护氨基酸的连续偶联可以根据肽合成中的常规方法进行, 通常在自动肽合成仪中进行。

[0419] 在固相合成结束时, 从支持材料上将多肽裂解下来, 同时裂解侧链保护基团。所获得的多肽可以通过多种层析方法纯化, 包括但不限于疏水吸附层析、离子交换层析、分配层析、高压液相色谱和反相HPLC。

[0420] 重组生产:或者, 通过重组DNA技术生产本发明的IL2突变蛋白。在多肽的重组生产的典型实践中, 编码所需多肽的核酸序列被纳入适合用于将要完成表达的宿主细胞的表达载体中, 核酸序列被操作性地连接至该载体编码的一个或多个表达控制序列, 并在目标宿主细胞中发挥功能。如果在多肽中纳入分泌前导序列(信号肽), 重组蛋白可以通过破坏宿主细胞或从细胞介质中回收。重组蛋白可以被纯化和浓缩用于进一步用途, 包括纳入。IL2多肽的重组生产的过程是本领域已知的, 描述于Fernandes和Taforo, 美国专利号4,604,377, 1986年8月5日授权, 以及IL2突变蛋白描述于Mark等美国专利号4,512,584, 1985年5月21日授权, Gillis, 美国专利号4,401,756, 1983年8月30日授权, 其全部教导通过引用纳入本文。

[0421] 编码IL2突变蛋白的核酸序列的构建:在一些实施方式中, IL突变蛋白通过重组方法生产, 使用编码IL2突变蛋白(或包含IL2突变蛋白的融合蛋白)的核酸序列。编码所需hIL2突变蛋白的核酸序列可以使用寡核苷酸合成仪通过化学方式合成。核酸序列不限于编码多肽的序列; 也可以包括位于编码序列(例如, hIL2的编码序列)的上游或下游的部分或全部非编码序列。分子生物学的本领域技术人员熟知用于分离核酸分子的常规操作。例如, 他们可以用限制性核酸内切酶处理基因组DNA或通过进行聚合酶链式反应(PCR)产生。如果核酸分子是核糖核酸(RNA), 分子可以, 例如, 通过体外转录产生。

[0422] 编码IL2突变蛋白的核酸分子(及其融合体)可以包含天然存在的序列或不同于天然存在序列的序列, 但由于遗传密码的简并性, 其编码相同的多肽。这些核酸分子可以由以下组成:RNA或DNA(例如基因组DNA、cDNA或合成DNA, 例如通过基于亚磷酰胺的合成产生的)或这些类型核酸内核苷酸的组合或修饰。此外, 核酸分子可以是双链的或单链的(即正义链或反义链)。

[0423] 编码IL突变蛋白的核酸序列可以获取自提供定制核酸序列的多种商业来源。生产本发明的IL2突变蛋白的IL多肽的氨基酸序列变体是基于本领域众所周知的遗传密码将合适的核苷酸变化纳入编码序列来制备的。这种变体表示所指出的残基的插入、取代和/或特异性缺失。插入、取代和/或特异性缺失的任何组合都可以得到最终的构建体, 只要最终的

构建体拥有本文定义的所需生物活性。

[0424] 构建编码hIL2突变蛋白的DNA序列和在合适的转化的宿主中表达这些序列的方法包括但不限于使用PCR-辅助诱变技术。也可以用标准重组技术向hIL2多肽中制造由氨基酸残基缺失或添加组成的突变。如果缺失或添加,编码hIL2的核酸分子任选地用合适的限制性核酸内切酶消化。所得片段可以直接表达,或通过,例如,连接至第二片段来进一步操作。如果核酸分子的两个末端包含相互重叠的互补核苷酸,则可以促进连接,但也可以连接平末端片段。PCR产生的核酸也可以用于产生多种突变序列。

[0425] 本发明的IL2突变蛋白不仅可以直接重组生产,而且可以与异源多肽(例如信号序列或其他在成熟IL2突变蛋白的N-末端或C-末端具有特定裂解位点的多肽)的融合多肽形式生产。通常,信号序列可以是载体的组分,也可以是插入到载体中的编码序列的部分。所选择的异源信号序列优选是被宿主细胞识别和处理(即被信号肽酶裂解)的序列。在一些实施方式中,信号序列是与IL2突变蛋白天然相关联的信号序列(即人IL2信号序列)。信号序列的包含取决于其是否需要从制备的重组细胞分泌hIL2突变蛋白。如果所选细胞是原核细胞,通常优选DNA序列不编码信号序列。如果所选细胞是真核细胞,通常优选编码信号序列,最优先使用野生型hIL2信号序列。或者,异源哺乳动物信号序列也是合适的,例如来自相同或相关物种的分泌多肽的信号序列,以及病毒分泌前导序列,例如单纯疱疹gD信号。当重组宿主细胞是酵母细胞,例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)时,可以使用 $\alpha$ 交配因子分泌信号序列(alpha mating factor secretion signal sequence)以实现IL2突变蛋白的胞外分泌,进入培养基,如描述于Singh,美国专利号7,198,919B1,2007年4月3日授权。

[0426] 如果要表达的IL2突变蛋白待以嵌合体(chimera)形式表达(例如包含IL2突变蛋白和异源多肽序列的融合蛋白),则嵌合蛋白可以由杂交核酸分子编码,其包含编码所有或部分hIL2突变蛋白的第一序列和编码所有或部分异源多肽的第二序列。例如,本文所述的主体hIL2突变蛋白可以被融合至六-组氨酸标签,以促进细菌表达的蛋白的纯化,或融合至血凝素标签,以促进真核细胞中表达的蛋白的纯化。所谓第一和第二,不应理解为限制融合蛋白的元件取向,异源多肽可以被连接至IL2突变蛋白的N-末端和/或C-末端。例如,N-末端可以被连接至靶向部分,C-末端连接至六-组氨酸标签纯化柄。

[0427] 要表达的多肽(或融合体/嵌合体)的完整氨基酸序列可以被用于构建回译基因(back-translated gene)。可以合成含有编码hIL2突变蛋白的核苷酸序列的DNA寡聚物。例如,可以合成编码部分所需多肽的一些小寡核苷酸,然后连接。单个的寡核苷酸通常包含5'或3'突出端用于互补组装。

[0428] 密码子优化:在一些实施方式中,编码IL2突变蛋白的核酸序列可以是“密码子优化”的以促进在特定宿主细胞类型中的表达。在多种表达系统,包括哺乳动物、酵母和细菌宿主细胞中密码子优化的技术是本领域众所周知的,且有在线工具以提供用于在多种宿主细胞类型中表达的密码子优化的序列。参见例如,Hawash,等(2017)9:46-53和Mauro和Chappell在《哺乳动物细胞中重组蛋白表达:方法和方案》(Recombinant Protein Expression in Mammalian Cells:Methods and Protocols),David Hacker编(胡马纳出版社(Human Press)纽约)。此外,有多种基于网络的在线软件可以免费使用,以协助制备密码子优化的核酸序列。

[0429] 表达载体:

[0430] 组装(通过合成、定点诱变或另一方式)后,编码hIL2突变蛋白的核酸序列将被插入表达载体。可以使用用于多种宿主细胞中的多种表达载体,通常是基于用于表达的宿主细胞选择。表达载体通常包含但不限于以下一个或多个:复制起点,一个或多个标志物基因,增强子元件、启动子和转录终止序列。载体包括病毒载体、质粒载体、整合载体等。质粒是非病毒载体的例子。

[0431] 可选择标志物:表达载体通常包含选择基因,也被称为可选择标志物。该基因编码转化的宿主细胞在选择性培养基中生长的存活或生长所必需的蛋白质。未用含有选择基因的载体转化的宿主细胞无法在培养基中存活。典型的选择基因编码蛋白质,其将(a)赋予对抗生素或其他毒素例如氨苄青霉素、新霉素、甲氨蝶呤或四环素的抗性;(b)弥补营养缺陷型缺陷;或(c)提供无法从复合培养基中获得的关键营养素。

[0432] 调控序列:为了促进重组多肽的高效表达,要表达的编码多肽序列的核酸序列被操作性地连接至在所选的表达宿主中发挥功能的转录和翻译调控序列。用于本发明的IL2突变蛋白的表达载体包含调节序列,其被宿主生物体识别且操作性地连接至编码IL2突变蛋白的核酸序列。术语“调控序列”、“调节序列”或“表达控制序列”在本文中可互换使用,指启动子、增强子和其他表达控制元件(例如聚腺苷酸化信号)。参见,例如Goeddel(1990)于《基因表达技术:酶学方法》(Gene Expression Technology:Methods in Enzymology)185(学术出版社(Academic Press),美国加利福尼亚州圣地亚哥。调节序列包括在许多类型的宿主细胞中引导组成型表达的核苷酸序列,和仅在某些宿主细胞中引导表达的核苷酸序列(例如,组织特异性调节序列)。本领域技术人员将理解,表达载体的设计可能取决于例如要转化的宿主细胞的选择,所需蛋白质的表达水平等因素。在表达控制序列的选择中,本领域技术人员理解将要考虑多种因素。这些包括,例如,序列的相对强度、它的可控性,以及它与编码主体hIL2突变蛋白的实际DNA序列的相容性,特别是关于潜在的二级结构。

[0433] 启动子:在一些实施方式中,调节序列是启动子,其选择基于,例如,寻求在其中表达的细胞类型。启动子是位于结构基因起始密码子上游(5')的非翻译序列(通常在约100到1000bp内),其控制与其操作性地连接的特定核酸序列的转录和翻译。这种启动子通常分为两类,诱导型的和组成型的。诱导型启动子是对培养条件的某些变化(如营养物的存在或不存在或温度的变化)反应,从其控制下的DNA启动增加转录水平的启动子。多种潜在的宿主细胞所识别的大量启动子是众所周知的。

[0434] 在细菌中可以使用T7启动子,在昆虫细胞中可以使用多角体蛋白启动子,在哺乳动物细胞中可以使用巨细胞病毒或金属硫蛋白(metallothionein)启动子。另外,在高等的真核细胞的情况下广泛使用组织特异性和细胞特异型启动子。这些启动子以其在给定的体内组织或细胞类型中核酸分子的指导表达的能力而命名。技术人员知晓许多可用于核酸的指导表达的启动子和其他调节元件。

[0435] 哺乳动物宿主细胞中载体的转录可以被控制,由,例如,从病毒基因组中获得的启动子,例如多瘤病毒、牛痘病毒、腺病毒(如人腺病毒血清型5)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒(如鼠干细胞病毒)、乙肝病毒和最理想的猿猴病毒40(SV40),来自异源哺乳动物的启动子,例如,肌动蛋白启动子、PGK(磷酸甘油酸激酶)或免疫球蛋白启动子,来自热休克启动子,只要这些启动子与宿主细胞系统相容。SV40病毒的早期和晚期启动子可方便地以SV40限制性片段形式获得,该片段也含有SV40病毒的复制起点。

[0436] 增强子:高等真核生物的转录通常通过在载体中插入增强子序列来增加。增强子是DNA的顺式作用元件,通常约为10至300bp,它作用于启动子以增加其转录。增强子的取向和位置相对独立,在转录单元的5'和3'处、内含子内以及编码序列本身内都有发现。现在已经从哺乳动物基因(珠蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、甲胎蛋白和胰岛素)中得知了许多增强子序列。然而,通常人们会使用来自真核细胞病毒的增强子。例子包括复制起点后侧的SV40增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、复制起点后侧的多瘤增强子和腺病毒增强子。增强子可以被剪接到表达载体中编码序列的5'或3'的位置,但优选是位于离启动子5'的位置。用于真核宿主细胞的表达载体还将包含用于终止转录和用于稳定化mRNA所必需的序列。这种序列通常可以从真核生物或病毒DNA或cDNA的5',偶尔3'非翻译区获得。含有一个或多个上述组分的合适载体的构建采用了标准技术。

[0437] 除了促进插入核酸分子的转录的序列之外,载体可以包含复制起点和其他编码可选择标志物的基因。例如,新霉素-抗性(neoR)基因赋予其表达细胞G418抗性,因而允许对转染的细胞进行表型选择。标志物或报告基因的其他例子包括β-内酰胺酶、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、腺苷脱氨酶(ADA)、二氢叶酸还原酶(DHFR)、潮霉素-B-磷酸转移酶(HPH)、胸苷激酶(TK)、lacZ(编码β-半乳糖苷酶)和黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(XGPRT)。本领域技术人员可以容易地确定给定的调节元件或可选择标志物适合或不适合用于特定表达环境。

[0438] 表达载体的正确组装可以通过核酸测序、限制性图谱和在合适宿主中生物活性多肽的表达来确认。

[0439] 宿主细胞:

[0440] 本发明进一步提供原核或真核细胞,其包含和表达编码本发明的hIL2突变蛋白的核酸分子。本发明的细胞是转染的细胞,即核酸分子进入的细胞,例如已经通过重组DNA技术引入编码突变hIL2多肽的核酸分子的。这种细胞的子代也被认为在本发明的范围内。

[0441] 通常根据它们与所选表达载体的相容性、本发明DNA序列编码的产物的毒性、它们的分泌特性、它们正确折叠多肽的能力、它们的发酵或培养要求、以及DNA序列编码的产物的纯化难易程度来选择宿主细胞。用于克隆或表达本文载体中DNA的合适宿主细胞是上述的原核细胞、酵母或高等真核细胞。

[0442] 在一些实施方式中重组hIL2突变蛋白或其生物活性变体也可以在真核细胞中制备,例如酵母或人细胞。合适的真核宿主细胞包括昆虫细胞(例如在培养的昆虫细胞中可用于蛋白表达的杆状病毒载体(例如Sf9细胞)包括pAc系列(Smith等(1983)Mol.Cell Biol.3:2156-2165)和pVL系列(Lucklow和Summers(1989)Virology 170:31-39));酵母细胞(例如用于在酵母啤酒酵母(S.cerevisiae)(包括pYEPSec1)中表达的载体(Baldari等(1987)EMBO J.6:229-234),pMFa(Kurjan和Herskowitz(1982)Cell 30:933-943),pJRY88(Schultz等(1987)Gene 54:113-123),pYES2(英杰公司(Invitrogen Corporation),加利福尼亚州圣地亚哥)和pPicZ(英杰公司,加利福尼亚州圣地亚哥));或哺乳动物细胞(哺乳动物表达载体包括pCDM8(Seed(1987)Nature 329:840)和pMT2PC(Kaufman等(1987)EMBO J.6:187:195))。

[0443] 有用的哺乳动物宿主细胞系的例子为,小鼠L细胞(L-M[TK-],ATCC号CRL-2648)、由SV40转化的猴肾CV1细胞系(COS-7,ATCC CRL 1651);人胚胎肾细胞系(HEK293或HEK293细胞亚克隆,在悬浮培养中生长;幼仓鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞/-

DHFR (CHO) ; 小鼠塞尔托利氏细胞 (TM4) ; 猴肾细胞 (CV1 ATCC CCL 70) ; 非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRL-1 587) ; 人宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL 2) ; 犬肾细胞 (MDCK, ATCC CCL 34) ; 水牛鼠肝细胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442) ; 人肺细胞 (W138, ATCC CCL 75) ; 人肝细胞 (Hep G2, HB 8065) ; 小鼠乳腺肿瘤 (MMT 060562, ATCC CCL51) ; TRI细胞 ; MRC 5细胞 ; FS4细胞 ; 和人肝癌细胞系 (Hep G2)。在哺乳动物细胞中, 表达载体的控制功能通常通过病毒调控元件提供。例如, 常用的启动子源自多瘤病毒、腺病毒2型、巨细胞病毒和猿猴病毒40。

[0444] hIL2突变蛋白可以在原核宿主中, 例如细菌大肠杆菌, 或在真核宿主中, 例如昆虫细胞 (例如Sf21细胞) 或哺乳动物细胞 (例如COS细胞、NIH 3T3细胞或HeLa细胞) 中生产。这些细胞可以从许多来源获得, 包括美国典型培养物保藏中心 (弗吉尼亚州马萨纳斯)。在选择表达系统时, 最重要的是各组分之间相容。本领域技术人员能够做这种决定。此外, 如果在选择表达系统时需要指导, 本领域技术人员可以查阅Ausubel等 (《新编分子生物学方案》 (Current Protocols in Molecular Biology), John Wiley and Sons, 纽约州纽约, 1993) 和 Pouwels等 (《克隆载体: 实验室手册》 (Cloning Vectors: A Laboratory Manual), 1985增刊 1987)。

[0445] 在一些实施方式中, 获得的hIL2突变蛋白将是糖基化的或未糖基化的, 取决于用于生产突变蛋白的宿主生物体。如果选择细菌作为宿主, 那么生产的hIL2突变蛋白将是未糖基化的。另一方面, 真核细胞将糖基化该IL2突变蛋白, 虽然或许与天然-IL2糖基化的方式不同。

[0446] 关于用于原核和真核细胞的其他表达系统, 参见Sambrook等 (1989) 《分子克隆: 实验室手册》 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual) (第2版, 冷泉港实验室出版社, 纽约州普莱恩维尤) 的第16和17章。参见, Goeddel (1990) 于《基因表达技术: 酶学方法》 (Gene Expression Technology: Methods in Enzymology) 185 (学术出版社, 加利福尼亚州圣地亚哥)。

[0447] 转染:

[0448] 该表达构建体可以被引入宿主细胞以从而生产本文公开的hIL2突变蛋白, 或以生产其生物学活性突变蛋白。载体DNA可以通过常规转化或转染技术被引入原核或真核细胞。关于用于转化或转染宿主细胞的合适的方法可以在Sambrook等 (1989) 《分子克隆: 实验室手册》 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual) (第2版, 冷泉港实验室出版社, 纽约州普莱恩维尤) 中和其他标准分子生物学实验手册中找到。

[0449] 为了促进目标细胞的转染, 可以在有利于摄取非病毒载体的条件下使目标细胞直接暴露于非病毒载体。促进哺乳动物细胞摄取外源核酸的条件的例子在本领域是众所周知的, 包括但不限于化学手段 (例如 Lipofectamine<sup>®</sup>, 赛默飞世尔科技 (Thermo-Fisher Scientific)), 高盐和磁场 (电穿孔)。

[0450] 细胞培养:

[0451] 细胞可以在被改良为适合用于诱导启动子、选择转化子或扩增编码所需序列的基因的常规营养培养基中培养。哺乳动物宿主细胞可以在多种培养基中培养。市售可得的培养基如汉姆氏F10 (Ham's F10) (西格玛 (Sigma))、最小必需培养基 ((MEM), 西格玛)、RPMI 1640 (西格玛) 和达氏改良的伊氏培养基 ((DMEM), 西格玛) 都适合培养宿主细胞。任何这些培养基可根据需要补充激素和/或其他生长因子 (例如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、

盐类(如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲剂(如HEPES)、核昔(如腺昔和胸昔)、抗生素、微量元素和葡萄糖或等同的能量来源。任何其他必需的补充剂也可以以本领域技术人员已知的适当浓度包含在内。培养条件,如温度、pH值等,是以前用于选择表达的宿主细胞的条件,对普通技术人员来说是显而易见的。

[0452] 重组蛋白回收:

[0453] 如果使用分泌前导序列,重组生产的IL2突变蛋白多肽可以以分泌多肽形式从培养基中回收。或者,IL2突变蛋白多肽也可以从宿主细胞裂解物中回收。蛋白酶抑制剂,例如苯基甲基磺酰氟(PMSF)可以在从细胞裂解物种回收阶段中使用,以抑制纯化过程中的蛋白酶降解,并可包括抗生素以防止外源污染物的生长。

[0454] 纯化:

[0455] 各种纯化步骤是本领域已知的,并且可以寻用,例如亲和层析。亲和层析利用了通常存在于生物大分子中的高度特异性结合位点,根据分子与特定配体结合的能力将其分离。共价键将配体附接至不溶性的多孔支持介质上,使配体明显地呈现在蛋白质样品上,从而利用一种分子种类的天然特异性结合,从混合物中分离和纯化第二种类。抗体通常用于亲和层析。也可以使用尺寸选择步骤,例如,凝胶过滤层析(也被称为尺寸排阻或分子筛层析)用于根据蛋白质的尺寸进行分离。在凝胶过滤中,蛋白质溶液通过由半透性多孔树脂填充的柱。半透性树脂具有孔径范围,决定了可以用该柱分离的蛋白质的大小。

[0456] 由转化的宿主生产的hIL2突变蛋白可以根据任何合适的方法纯化。用于纯化IL2的各种方法是已知的。参见,例如《新编蛋白质科学方案》(Current Protocols in Protein Science),卷2.编者:John E. Coligan, Ben M. Dunn, Hidde L. Ploehg, David W. Speicher, Paul T. Wingfield, 第6.5单元(1997, 约翰威利父子公司(John Wiley and Sons, Inc.) 版权所有。hIL2突变蛋白可以从大肠杆菌中产生的包涵体中分离出来,或从生产特定突变蛋白的哺乳动物或酵母培养物的条件培养基中,使用阳离子交换、凝胶过滤和或反相液相色谱分离出来。

[0457] 重组多肽的基本纯化形式可以用常规的生化程序从表达系统中纯化出来,并可以如本文所述,作为治疗剂使用。

[0458] hIL2突变蛋白的生物学活性可以通过任何合适的本领域已知方法评估,并且可以作为基本纯化形式评估,或者当使用分泌前导序列表达时作为细胞裂解物或细胞培养基的部分评估。这种活性试验包括CTLL-2增殖、T细胞中磷酸化-STAT5(pSTAT5)活性的诱导、PHA-原始增殖(PHA-blast proliferation)和NK细胞增殖。

[0459] 制剂:

[0460] 在本发明的治疗性方法的实施方式中,包括给予需要治疗的对象包含IL2突变蛋白(和/或编码IL2突变蛋白的核酸)的药物制剂。给予对象可以通过静脉内注射,以推注或通过一段时间内连续输注的方式实现。给予的替代性途径包括肌肉内、腹膜内、脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部或吸入途径。IL2突变蛋白还可以适合地通过瘤内、瘤旁、病灶内、结内或病灶周围途径给予,或给予淋巴以发挥局部以及全身治疗作用。

[0461] 在一些实施方式中,主体hIL2突变蛋白(和/或编码hIL2突变蛋白的核酸)可以被纳入组合物,包括药物组合物。这种组合物通常包括多肽或核酸分子和药学上可接受的运载体。制备药物组合物以相容于其意在给予的途径,且相容于治疗用途,用于给予需要治疗

或预防的对象IL2突变蛋白。

[0462] 肠胃外制剂:在一些实施方式中,本发明的方法包括hIL2突变蛋白的肠胃外给予。肠胃外途径的示例包括,例如静脉内、皮内、皮下、透皮(局部)、经粘膜和直肠给药。肠胃外制剂包括用于肠胃外应用的溶液或悬浮液,可以包括载剂和缓冲剂。适于肠胃外给药的药物制剂包括无菌水性溶液(水溶性时)或分散液,以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。

[0463] 运载体:运载体包括无菌稀释剂,例如注射用水、盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂。运载体可以是包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物的溶剂或分散介质。可以维持合适的流动性,例如通过使用诸如卵磷脂的涂覆材料、分散液情况下通过保持所需粒度以及通过使用表面活性剂,例如十二烷基硫酸钠。对于静脉内给药,合适的运载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor ELTM(巴斯夫(BASF),新泽西州帕西潘尼)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

[0464] 缓冲剂:术语缓冲剂包括缓冲剂,例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐,以及用于调节pH值的试剂,例如氯化钠或右旋糖。pH可以用酸或碱调整,例如单-和/或双-碱基磷酸钠、盐酸或氢氧化钠(例如至pH约为7.2-7.8,例如7.5)。

[0465] 分散体:通常,将活性活化物掺入含有碱性分散介质和上述其它所需成分的无菌载剂中制备分散液。在制备无菌注射液的无菌粉剂时,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,由之前无菌过滤的溶液得到活性组分和任何其它所需组分的粉末。

[0466] 防腐剂:用于肠胃外给予对象的药物制剂应当是无菌的并且应当是流动的以促进易注射性。它应当在制造和储存条件下稳定,并且被保存时抵抗污染。防止微生物的作用可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂来实现,例如,例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,例如乙二胺四乙酸、对羟基苯甲酸酯类(parabens)、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等。可将所需量的活性化合物和一种上述组分或其组合根据需要掺入合适溶剂后过滤灭菌,从而制备无菌溶液。

[0467] 张力剂:在许多情况下,组合物中可优选地包含张力剂,例如糖、多元醇如甘露醇、山梨醇、氯化钠。

[0468] 口服组合物:如果使用口服组合物通常包括惰性稀释剂或可食用运载体。对于口服治疗给药目的,可用赋形剂将活性化合物掺入并以片剂、含片或胶囊的形式使用,例如明胶胶囊。口服组合物也可以使用液体运载体制备以用作漱口水。可以包含药学上相容的粘合剂和/或佐剂材料作为组合物的部分。片剂、丸剂、胶囊、含片等可含有任何以下成分或具有相似特性的化合物:粘合剂例如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂例如淀粉或乳糖,崩解剂例如海藻酸、羧甲基淀粉(PrimogelTM)或玉米淀粉;润滑剂例如硬脂酸镁或完全氢化植物油(SterotesTM);助流剂例如二氧化硅胶体;甜味剂例如蔗糖或糖精;或调味剂例如薄荷、水杨酸甲酯、或橙调味剂。

[0469] 吸入制剂:在通过吸入给药的情况下,主体hIL2突变蛋白或编码它的核酸以来自含合适推进剂(例如,如二氧化碳气体)或喷雾剂的受压容器或分配器的气雾剂喷雾形式递送。这类方法包括描述于美国专利号6,468,798中的那些。

[0470] 粘膜和透皮:也可以通过经粘膜或透皮方式全身给予主体hIL2突变蛋白或核酸。对于经粘膜或透皮给药,在制剂中采用适合渗透屏障的渗透剂。这类渗透剂通常为本领域

已知,并包括例如用于经粘膜给药的去污剂、胆汁盐和夫西地酸衍生物。经粘膜给药可以通过使用鼻腔喷雾剂或栓剂栓剂(例如使用常规的栓剂基料,如可可油或其它甘油酯)或滞留灌肠剂的形式制备化合物用于直肠递送。对于透皮给药,将活性化合物配制成药膏、软膏、凝胶或霜剂,如本领域通常已知的那样,并可纳入渗透促进剂,如乙醇或羊毛脂。

[0471] 延长释放和储库制剂:在本发明的方法的一些实施方式中,IL2突变蛋白在提供IL2突变蛋白试剂的延长释放的制剂中被给予需要治疗的对象。可注射组合物的延长释放制剂的例子可以通过在组合物中包含延迟吸收的试剂(如单硬脂酸铝和明胶)来实现。在一个实施方式中,用运载体制备主体hIL2突变蛋白或核酸,其将保护该突变的hIL2多肽不被身体快速清除,如控释制剂,包括植入物和微囊化递送系统。可以使用可生物降解的生物相容性聚合物,例如乙烯-乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸。可以使用标准技术制备这种制剂。所述材料还可购自阿尔扎公司(Alza Corporation)和诺华制药股份有限公司(Nova Pharmaceuticals, Inc.)。脂质体悬浮液(包含用单克隆抗体对病毒抗原靶向感染的细胞的脂质体)还可以用作药学上可接受的运载体。这些可按本领域技术人员已知的方法制备,例如,如美国专利号4,522,811中所述。

[0472] 编码IL2突变蛋白的核酸的给予(基因治疗):

[0473] 在本发明的方法的一些实施方式中,编码IL2突变蛋白的核酸通过转染或感染给予对象,使用本领域已知的方法,包括但不限于描述于McCaffrey等(Nature 418:6893, 2002), Xia等(Nature Biotechnol. 20:1006-1010, 2002), 或Putnam(Am. J. Health Syst. Pharm. 53:151-160, 1996, erratum于Am. J. Health Syst. Pharm. 53:325, 1996)中的方法。在一些实施方式中,IL2突变蛋白通过重组表达载体的药学上可接受的制剂的给予被给予对象。在一些实施方式中,重组表达载体是病毒载体。在一些实施方式中,重组载体是重组病毒载体。在一些实施方式中重组病毒载体是重组腺相关病毒(rAAV)或重组腺病毒(rAd),特别是源自人腺病毒血清型3和/或5的复制缺陷的腺病毒。在一些实施方式中,复制缺陷的腺病毒具有一个或多个对E1区的修饰,这干扰病毒在人细胞中启动细胞循环和/或凋亡途径的能力。复制缺陷的腺病毒载体可以任选地在E3结构域中包含缺失。在一些实施方式中,腺病毒是复制能力型腺病毒。在一些实施方式中腺病毒是复制能力型重组病毒,其被工程改造为选择性地在淋巴细胞中复制。

[0474] 在一个实施方式中,提供IL2突变蛋白制剂,根据Fernandes和Taforo,美国专利号4,604,377,1986年8月5日授权,其教导通过引用纳入本文。和Yasui,等美国专利号4,645,830。

[0475] 胃肠外制剂可封装在安瓿、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。在一个实施方式中,在用于肠胃外给予的预先填充的注射器中提供制剂。

[0476] 治疗方法

[0477] 本发明提供了治疗使用IL2突变蛋白治疗患有肿瘤性疾病紊乱或病症的对象的方法,通过给予治疗有效量的如本文所述的IL2突变蛋白(或编码IL2突变蛋白的核酸,包括编码IL2突变蛋白的重组病毒)。

[0478] 本发明提供了治疗和/或预防肿瘤性疾病、紊乱或病症的方法和组合物,其通过给予治疗有效量的hIL2突变蛋白,该hIL2突变蛋白对CD132的结合亲和力减少,而保留了与野生型人IL2的活性相当的对CD122和/或CD25的显著的结合亲和力。

[0479] 在一些实施方式中,本发明的治疗和/或预防肿瘤性疾病、紊乱或病症的方法和组合物,其通过给予治疗有效量的人IL2突变蛋白且给予补充剂与之组合,该IL-2突变蛋白对CD132的结合亲和力减少,但保留了与野生型hIL-2的活性相当的对CD122和/或CD25的显著的结合亲和力,所述补充剂包括但不限于化疗、免疫检查点调节剂、放疗和/或物理干预治疗(如手术)中的一个或多个。

[0480] 在一些实施方式中,本发明提供了人白细胞介素-2(IL2)突变蛋白,其提供了对一种或多种IL2受体的改变的结合特性,用于治疗肿瘤性疾病。

[0481] 适合治疗的肿瘤:本发明的组合物和方法用于治疗患有肿瘤性疾病的对象,其特征为存在肿瘤,包括良性和恶性肿瘤,以及肿瘤性疾病。

[0482] 适合用本发明的组合物和方法治疗的良性肿瘤的例子包括但不限于腺瘤、纤维瘤、血管瘤和脂肪瘤。适合用本发明的组合物和方法进行治疗的恶变前(*pre-malignant*)肿瘤的例子包括但不限于增生、异型(*atypia*)、化生和发育异常(*dysplasia*)适合使用本发明的组合物和方法治疗的恶性肿瘤的例子包括但不限于癌(起源于上皮组织的癌,例如皮肤或衬里(*line*)内脏器官的组织)、白血病、淋巴瘤和肉瘤(通常起源于骨脂肪、肌肉、血管或结缔组织)。术语肿瘤还包括病毒诱发的肿瘤,例如疣和EB病毒诱发的疾病(即传染性单核细胞增多症)、瘢痕形成、增殖性血管疾病,包括内膜平滑肌细胞增生、再狭窄(*restenosis*)和血管阻塞(*vascular occlusion*)等。

[0483] 术语“肿瘤性疾病”包括以实体瘤和非实体瘤为特征的癌症,包括但不限于乳腺癌;肉瘤(包括但不限于骨肉瘤和血管肉瘤及纤维肉瘤),白血病,淋巴瘤,泌尿生殖系统癌症(包括但不限于卵巢癌、尿道癌、膀胱癌和前列腺癌);胃肠道癌症(包括但不限于结肠食道癌和胃癌);肺癌;骨髓瘤;胰腺癌;肝癌;肾癌;内分泌癌;皮肤癌;以及脑或中枢和外周神经(CNS)系统肿瘤,恶性的或良性的,包括胶质瘤和成神经细胞瘤、星形细胞瘤、骨髓增生异常症;宫颈原位癌;肠息肉;口腔白斑病;组织细胞增多症(*histiocytose*),增生性瘢痕,包括瘢痕疙瘩,血管瘤;增生性动脉狭窄,银屑病,炎症性关节炎;角化过度和丘疹鳞屑性皮疹(*papulosquamous eruption*),包括关节炎。

[0484] 术语肿瘤性疾病包括癌。术语“癌”是指上皮或内分泌组织的恶性肿瘤,包括呼吸系统癌、胃肠系统癌、泌尿生殖系统癌、睾丸癌、乳腺癌、前列腺癌、内分泌系统癌和黑色素瘤。术语肿瘤性疾病包括腺癌。“腺癌”是指起源于腺组织或其中肿瘤细胞形成可识别的腺体结构的癌症。如本文所用,术语“造血肿瘤性疾病(hematopoietic neoplastic disorder)”是指涉及造血来源的增生/肿瘤细胞的肿瘤性疾病,例如,起源于骨髓、淋巴或红细胞谱系,或其前体细胞。

[0485] 髓系肿瘤包括但不限于骨髓增生性肿瘤、带有嗜酸性粒细胞增多症的骨髓和淋巴紊乱、骨髓增生性/骨髓增生异常性肿瘤、骨髓增生异常综合征、急性髓性白血病和相关的前体肿瘤,以及不明谱系急性白血病(*acute leukemia of ambiguous lineage*)。适合根据本发明内容治疗的示例性髓系紊乱包括但不限于急性早幼粒细胞白血病(*APML*)、急性髓细胞白血病(*acute myelogenous leukemia*)(*AML*)和慢性髓细胞白血病(*chronic myelogenous leukemia*)(*CML*)。

[0486] 淋巴肿瘤包括但不限于前体淋巴肿瘤、成熟B细胞肿瘤、成熟T细胞肿瘤、霍奇金淋巴瘤和免疫缺陷相关的淋巴增生性紊乱。适合根据本发明内容治疗的示例性淋巴疾病包括

但不限于急性淋巴细胞白血病(ALL),其包括B谱系ALL和T谱系ALL、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、原淋巴细胞白血病(PLL)、毛细胞白血病(HLL)和华氏巨球蛋白血症(WM)。

[0487] 在一些情况下,造血肿瘤性疾病产生于分化不良的急性白血病(如红细胞白血病和急性巨核细胞白血病)。如本文所用,术语“造血肿瘤性疾病”是指恶性淋巴瘤,包括但不限于非霍奇金淋巴瘤及其变体、外周T细胞淋巴瘤、成人T细胞白血病/淋巴瘤(ATL)、皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)、大颗粒淋巴细胞白血病(LGF)、霍奇金病和里-斯氏病。

[0488] 确定对象是否“患有肿瘤疾病”指的是由医生根据本领域公认的鉴定疾病、紊乱或病症的现有信息(包括但不限于X-射线、CT-扫描、常规实验室诊断测试(例如血细胞计数等)、基因组数据、蛋白质表达数据、免疫组织化学)对对象做出的其需要或将受益于治疗的判断。

[0489] 肿瘤突变负荷和免疫疗法:适应性免疫系统会识别某些细胞表面蛋白的展示,以应对肿瘤突变,促进识别和消除肿瘤细胞。拥有较高肿瘤突变负荷(TMB)的肿瘤更有可能表现出这种“肿瘤抗原”。事实上,临床经验表明,由表现出高肿瘤突变负荷的肿瘤细胞构成的肿瘤更有可能对免疫疗法产生反应,所述免疫疗法包括免疫检查点阻断(Rizvi,等(2015)Science 348 (6230):124-128;Marabelle,等(2020)Lancet Oncol 21 (10):1353-1365)。肿瘤突变负荷用作生物标志物,以鉴定对免疫疗法(如本发明中提供的疗法)敏感性增加的肿瘤。

[0490] 在一些实施方式中,本发明的组合物和方法用于治疗与形成表现为中等或高肿瘤突变负荷(TMB)的实体瘤有关的肿瘤性疾病。在一些实施方式中,本发明的组合物和组合物和方法用于治疗表现出中等或高肿瘤突变负荷(TMB)的免疫敏感实体瘤。适合用本发明的组合物和方法治疗的与具有中等或高肿瘤突变负荷的实体瘤的形成相关联的肿瘤性疾病的例子,包括但不限于非小细胞肺癌和肾细胞癌。在一个实施方式中,本发明的组合物和方法用于治疗表现出中等或高TMB的非小细胞肺癌(NSCLC)。NSCLC细胞通常富含大量突变,因此对免疫疗法更加敏感。目前NSCLC的治疗标准是根据癌症起始机制分层的,一般遵循NCCN或ASCO的建议。很大一部分NSCLC具有增加的TMB,因此最初对免疫疗法更敏感。然而,大多数肿瘤最终在免疫检查点抑制下复发。与免疫检查点抑制前的病灶相比,复发的肿瘤患者通常表现为肿瘤中T细胞浸润减少,全身T细胞耗竭,免疫反应受到抑制。因此,需要改进免疫疗法,重新激活和扩增耗竭的、稀有肿瘤浸润T细胞。

[0491] 肿瘤突变负荷:如本文所用,术语“肿瘤突变负荷(TMB)”是指肿瘤样品中存在的体细胞突变的数量,以每兆碱基的突变数表示,由核酸测序确定,其中肿瘤样品中至少0.2兆碱基的核酸被测序,或者其中肿瘤样品至少0.5兆碱基的核酸被测序,或者其中肿瘤样品至少1兆碱基的核酸被测序,或者其中肿瘤样品至少5兆碱基或者其中至少10兆碱基的核酸被测序。应理解,肿瘤突变负荷的比率在不同的肿瘤性疾病中是不同的,所以肿瘤突变负荷应该在特定疾病类型的背景下进行评估。例如,某些类型的癌症表现出广泛的突变率,从每兆碱基少于1个突变到每兆碱基数百个突变。如Chalmers,等(2017)Genome Medicine 9:34所述,使用FoundationOne®试验评估低肿瘤突变负荷(低TMB)的准确性得到提高(Foundation Medicine, Cambridge MA,如Frampton,等(2013)Nature Biotechnology 31:1023-31;He,等(2016)Blood 127:3004-14所述)。

[0492] 高、低和中等TMB:在临床实践中,肿瘤通常被表征为表现出“高”、“低”或“中等”的

肿瘤突变负荷。如本文所用,术语“中等肿瘤突变负荷”是指肿瘤突变负荷大于在特定上下文中适用于术语低突变负荷的肿瘤突变负荷水平的上阈值。在一些实施方式中,术语中等肿瘤突变负荷为大于每兆碱基测序的约15个突变,但小于每兆碱基测序的约100个突变,或者大于每兆碱基测序的约10个突变,但小于每兆碱基测序的75个突变,或者大于每兆碱基测序的约5个突变,但小于每兆碱基测序的约50个突变,或者大于每兆碱基测序的约1个突变,但小于每兆碱基测序的约30个突变,或者大于每兆碱基测序的约1个突变,但小于每兆碱基测序的约20个突变。如本文所用,术语高肿瘤突变是指肿瘤突变负荷超过中等肿瘤突变负荷每兆碱基测序的大于或等于100个突变,或者每兆碱基测序的大于或等于75个突变,或者每兆碱基测序的大于或等于50个突变,或者每兆碱基测序的大于或等于30个突变,或者每兆碱基测序的大于或等于20个突变,或者每兆碱基测序的大于或等于10个突变。如本文所用,术语“低肿瘤突变负荷”是指肿瘤突变负荷小于或等于每兆碱基测序15个突变,或者小于或等于每兆碱基测序10个突变,或者小于或等于每兆碱基测序7个突变,或者小于或等于每兆碱基测序5个突变,或者小于或等于每兆碱基测序2个突变,或者小于或等于每兆碱基测序1个突变。评估TMB的测序可以通过各种本领域公认的方法实现,包括部分基因组测序、全外显子组测序(WES)或使用本领域公认的下一代测序(NGS)技术的全基因组测序(WGS)。尽管评估TMB的准确性随着核酸测序量而增加,但在具有TMB的样品中,百分比偏差较低,从而,高TMB可以通过仅几百个基因的靶向测序来有效鉴定,而中等TMB则通过至少0.5Mb测序的测序来提高,而低TMB的可靠评估则通过对肿瘤样品中5兆碱基,或者10兆碱基或更多的核酸测序来提高。

[0493] 评估抗肿瘤效力:本发明的方法在治疗癌症方面的效力的确定一般与实现一个或多个本领域公认的参数有关,例如病灶减少,特别是转移性病灶的减少、转移减少、肿瘤体积减少、ECOG评分的改善等等。确定对治疗的反应可以通过测量生物标志物来评估,这些生物标志物可以提供在IL2突变蛋白治疗的任何方面有用的可再现的信息,包括对象对这种治疗的反应的存在和程度以及这种治疗引起的不良反应(untoward effects)的存在和程度。例如但不限于,生物标志物包括IFN  $\gamma$  的增强,以及颗粒酶A、颗粒酶B和穿孔素的上调;CD8+ T细胞数量和功能的增加;IFN  $\gamma$  的增强,CD8+ T细胞上ICOS表达的增加,表达IL-10的T<sub>Reg</sub>细胞增强。对治疗的反应通过临床疗效的常规衡量的改善来表征,可以使用例如,如完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、稳定的疾病(SD)和关于靶病灶的,完全缓解(CR),“不完全缓解/稳定的疾病(SD),如RECIST定义的,以及免疫相关的完全缓解(irCR)、免疫相关的部分缓解(irPR)和免疫相关的稳定的疾病(irSD),如免疫相关缓解标准(irRC)所定义,是本领域技术人员考虑作为证明在哺乳动物(如人)对象中治疗肿瘤性疾病的疗效。

[0494] 血清浓度的维持:在本发明的一些实施方式中,本发明提供了用于治疗和/或预防肿瘤性疾病、紊乱或病症的方法和组合物,通过给予治疗有效量的hIL2突变蛋白,该突变蛋白对CD132的结合亲和力下降,但保留了与野生型hIL2相当的对CD122和/或CD25的显著的结合亲和力,其中hIL2突变蛋白的血清浓度维持一段时间(例如,至少24小时,或者至少48小时,或者至少72小时,或者至少96小时,或者至少120小时,或者至少144小时,或者至少7天,或者至少10天,或者至少12天,或者至少14天,或者至少28天,或者至少45天,或者至少60天,或者更长)的大部分(即,大于约50%的时间段,或者大于约60%,或者大于约70%,或者大于约80%,或者大于约90%),该血清浓度处于或高于足以促进由该IL2突变蛋白所致

CD3-激活的原代人T细胞的增殖的该IL2突变蛋白的有效浓度(例如,等于或大于EC<sub>10</sub><sup>PRO</sup>,或者等于或大于EC<sub>20</sub><sup>PRO</sup>,或者等于或大于EC<sub>30</sub><sup>PRO</sup>,或者等于或大于EC<sub>40</sub><sup>PRO</sup>,或者等于或大于EC<sub>50</sub><sup>PRO</sup>,或者等于或大于EC<sub>60</sub><sup>PRO</sup>),但是该血清浓度处于或低于足以诱导由该IL2突变蛋白所致T细胞激活的该IL2突变蛋白血清浓度的有效浓度(例如,等于或小于EC<sub>100</sub><sup>PRO</sup>,或者等于或小于EC<sub>100</sub><sup>PRO</sup>,或者等于或小于EC<sub>90</sub><sup>PRO</sup>,或者等于或小于EC<sub>80</sub><sup>PRO</sup>,或者等于或小于EC<sub>70</sub><sup>PRO</sup>,或者等于或小于EC<sub>60</sub><sup>PRO</sup>,或者等于或小于EC<sub>50</sub><sup>PRO</sup>)。

[0495] IL2突变蛋白与补充治疗剂的组合:

[0496] 本发明提供了本发明的IL2突变蛋白与一种或多种其他活性剂(“补充剂”)组合的用途。

[0497] 这种进一步的组合可互换地称为“补充组合”或“补充组合疗法”,而那些与本发明的IL2突变蛋白组合使用的治疗剂被称为“补充剂”。如本文所用,术语“补充剂”包括可分别给予或引入的试剂,例如,为单独给予而单独配制的试剂(例如,可在试剂盒中提供)和/或可与hIL2突变蛋白组合给予或引入的治疗。

[0498] 与……组合:如本文所用,术语“与……组合”在指给予对象多种试剂时是指给予对象第一试剂至少一种其它(即第二、第三、第四、第五,等)试剂。出于本发明的目的,如果在给予第二试剂时,因给予第一试剂而产生的生物学效应在对象体内持续,使第一试剂和第二试剂的治疗作用叠加,则认为一种试剂(如hIL2突变蛋白)与第二试剂(例如免疫检查点途径的调节剂)组合给予。例如,PD1免疫检查点抑制剂(例如纳武单抗或派姆单抗)通常通过IV输注每两周或每三周给予一次,而本发明的hIL2突变蛋白通常可以更频繁地给予,如每天、BID或每周。然而,第一试剂(如派姆单抗(pembrolizumab))的给药在较长的时间内提供治疗作用,第二试剂(如hIL2突变蛋白)的给予在第一试剂的治疗作用仍在进行时提供其治疗作用,因此第二试剂被认为是与第一试剂组合给予,即使第一试剂可能是在离第二试剂给予时间很远的时间点(如几天或几周)进行的。在一个实施方式中,如果第一和第二试剂同时(在彼此的30分钟内)、同期或依次给予,则认为一种试剂与第二试剂组合给予。在一些实施方式中,如果第一试剂和第二试剂在彼此约24小时内,优选在彼此约12小时内,优选在彼此约6小时内,优选在彼此约2小时内,或优选在彼此约30分钟内给予,则第一试剂被视为与第二试剂“同期”给予。术语“与……组合”也应理解为适用于第一试剂和第二试剂共同配制在单一药学上可接受的制剂中并将该共同制剂给予对象的情况。在某些实施方式中,hIL2突变蛋白和一种或多种补充剂是依次给予或应用的,例如,在给予一种试剂后给予一个或多个其他试剂。在其他实施方式中,hIL2突变蛋白和一种或多种补充剂同时给予,例如,在同一时间或大约同一时间给予两种或多种试剂;这两种或多种试剂可以存在于两种或多种分别的制剂中,或组合成单一制剂(即共同制剂)。无论这些试剂是依次或同时给予,出于本发明的目的,它们都被认为是组合给予的。

[0499] 确立最佳组合疗法:进一步的实施方式包括一种方法或模型,用于确定组合中试剂的最佳量。最佳量可以是,例如,在对象或对象群体中实现最佳效果的量,或达到治疗效果同时最小化或消除与一种或多种试剂相关的不良反应的量。在一些实施方式中,涉及hIL2突变蛋白和补充剂的组合的方法,其为已知或已被确定对治疗或预防本文所述的对象(例如人)或对象群体中所述的疾病、紊乱或病症(如癌症病症)有效,滴定试剂的量而一种或多种其他药剂的量保持恒定。通过以这种方式操纵一种或多种试剂的量,临床医生能够

确定用于,例如,治疗特定的疾病、紊乱或病症,或消除不良反应或减少不良反应的最有效的试剂的比率,使得其在这种情况下是可接受的。

[0500] 补充剂:

[0501] 化学治疗剂:在一些实施方式中,补充剂是化学治疗剂/化疗剂。在一些实施方式中,补充剂是多种化疗剂的“混合物(cocktail)”。在一些实施方式中,化疗剂或混合物与一种或多种物理方法(如放射疗法)组合给予。术语“化疗剂”包括但不限于:烷化剂,例如噻替哌和环磷酰胺;烷基磺酸盐,如白消安、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮杂环丙烷,例如苯并多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、米得哌(memredopa)和乌瑞替哌(uredopa);乙烯亚胺和甲基三聚氰胺(methylamelamine),包括六甲蜜胺(alretamine)、三乙烯三聚氰胺(triethylenemelamine)、三吖啶基氧化磷(triethylenephosphoramide)、三亚乙基硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramide)和三羟甲基三聚氰胺(trimethylolomelamine);氮芥类,例如苯丁酸氮芥(chiorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷酰胺(cholophosphamide)、雌氮芥(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、氮芥(mechlorethamine)、盐酸甲氧氮芥、美法仑、新氮芥(novembichin)、苯乙酸氮芥胆甾醇酯(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶芥(uracil mustard);亚硝基脲类(nitrosureas),例如卡莫司汀、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)、雷莫司汀(ranimustine);抗生素,例如阿克拉霉素(aclacinomysins)、放射菌素(actinomycin)、氨茴霉素(authramycin)、氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycin)(例如博来霉素A<sub>2</sub>)、放线菌素C(cactinomycin)、加利车霉素(calicheamicin)、卡柔比星(carabacin)、洋红霉素(carminomycin)、嗜癌霉素(carzinophilin)、色霉素(chromomycinis)、放线菌素D(dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)及其衍生物,例如去甲氧道诺霉素(demethoxy-daunomycin)、11-脱氧柔红霉素(11-deoxydaunorubicin)、13-脱氧柔红霉素(13-deoxydaunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、衣索比星(esorubicin)、伊达比星(idambicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素(mitomycin),例如mitomycin C,N-methyl mitomycin C;霉酚酸、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素(peplomycin)、泊非霉素(poffiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素(streptonigrin)、链脲菌素(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin);抗代谢药,例如氨甲蝶呤(methotrexate)和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,例如二甲叶酸(denopterin)、氨甲蝶呤、蝶罗呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate);二去氮杂四氢叶酸(dideazatetrahydrofolic acid),和叶酸;嘌呤类似物,例如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤(6-mercaptopurine)、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤(thioguanine);嘧啶类似物,例如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)、5-FU;雄激素类,例如卡普睾酮(calusterone)、丙酸甲雄烧酮(dromostanolone propionate)、环硫雄醇

(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睾内酯(testolactone)；抗肾上腺类,例如氨鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；叶酸补充剂,例如亚叶酸(folinic acid)；醋葡内酯(aceglatone)；醛磷酰胺糖昔(aldophosphamide glycoside)；氨基- $\gamma$ -酮戊酸(aminolevulinic acid)；安吖啶(amsacrine)；苯塔布希(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；依达曲沙(edatraxate)；地弗法明(defofamine)；秋水仙胺(demecolcine)；地吖醌(diaziquone)；依氟鸟氨酸(elfornithine)；依利醋铵(elliptynium acetate)；依托格鲁(etoglucid)；硝酸镓；羟基脲；香菇多糖(lentinan)；氯尼达明(lonidamine)；米托胍腙(mitoguazone)；米托蒽醌(mitoxantrone)；莫哌达醇(mopidamol)；硝氨丙吖啶(nitracrine)；喷司他丁(pentostatin)；蛋氨氮芥(phemamet)；吡柔比星(pirarubicin)；鬼臼酸(podophyllinic acid)；2-乙基酰肼(2.2-ethylhydrazide)；丙卡巴肼(procarbazine)；雷佐生(razoxane)；西佐喃(sizofiran)；锗螺胺(spirogermanium)；包菌丽酸(tenuazonic acid)；三亚胺醌酸(triaziqone acid)；2,2',2"-三氯三乙胺；乌拉坦(urethan)；长春地辛(vindesine)；达卡巴嗪(dacarbazine)；甘露莫司汀(mannomustine)；二溴甘露醇(mitobronitol)；二溴卫矛醇(mitolactol)；哌泊溴烷(pipobroman)；甘托欣(gacytosine)；阿糖胞昔(Ara-C)；环磷酰胺；噻替哌；紫杉烷类,例如紫杉醇、nab-paclitaxel和多西紫杉醇；氯胺丁；吉西他滨；6-硫鸟嘌呤；巯基嘌呤；甲氨蝶呤；铂和铂配位络合物,例如顺铂、奥沙利铂(oxaplatin)和卡铂；长春花碱；多西它赛；铂；依托泊昔(VP-16)；异环磷酰胺；丝裂霉素C；米托蒽醌；长春新碱；长春瑞滨；诺维本(navelbine)；诺肖林(novantrone)；替尼泊昔；道诺霉素(daunomycin)；氨蝶呤(aminopterin)；希罗达(xeloda)；伊班膦酸钠(ibandronate)；CPT11；拓扑异构酶抑制剂；二氟甲基鸟氨酸(DMFO)；维甲酸；埃斯培拉霉素(esperamicins)；卡培他滨；紫杉烷,例如紫杉醇,多西他赛,卡巴他赛；洋红霉素(carminomycin),阿霉素,例如4'-表阿霉素(4'-epiadriamycin),4-阿霉素-14-苯甲酸酯(4-adriamycin-14-benzoate),阿霉素-14-辛酸酯(adriamycin-14-octanoate),阿霉素-14-萘乙酸酯(adriamycin-14-naphthaleneacetate)；秋水仙素(cholchicine)和任何上述药物的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0502] 术语“化疗剂”还包括调节或抑制激素对肿瘤作用的抗激素剂,如抗雌激素,包括例如他莫昔芬、雷洛昔芬、抑制芳香化酶的4(5)-咪唑类、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬(trioxifene)、克沃昔芬(keoxifene)、奥那司酮(onapristone)和托瑞米芬；和抗雄激素,例如氟他胺、尼鲁米特(nilutamide)、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林；以及上述任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0503] 在一些实施方式中,补充剂是一种或多种本领域中鉴定的对治疗肿瘤性疾病有用的化学或生物试剂,包括但不限于:细胞因子或细胞因子拮抗剂,例如IL-12、INF $\alpha$ 或抗表皮生长因子受体、伊立替康；四氢叶酸抗代谢剂,例如培美曲塞；针对肿瘤抗原的抗体、单克隆抗体和毒素的复合物、T细胞助剂、骨髓移植、或抗原呈递细胞(例如树突状细胞治疗)、抗肿瘤疫苗、复制能力型病毒、信号传导抑制剂(如Gleevec $\circledR$ 或Herceptin $\circledR$ )或免疫调节剂,以实现对肿瘤生长的补充或协同抑制、非甾体抗炎药(NSAID)、环氧合酶-2(COX-2)抑制剂、类固醇、TNF拮抗剂(如Remicade $\circledR$ 和Enbrel $\circledR$ )、干扰素- $\beta$ 1a(Avonex $\circledR$ )和干扰素- $\beta$ 1b(Betaseron $\circledR$ )以及本领域熟练的临床医生容易理解的已知化疗治疗方案中的上述一种或

多种的组合,包括但不限于TAC、FOLFOX、TPC、FEC、ADE、FOLFOX-6、EPOCH、CHOP、CMF、CVP、BEP、OFF、FLOX、CVD、TC、FOLFIRI、PCV、FOLFOXIRI、ICE-V、XELOX和其他。

[0504] 在一些实施方式中,hIL2突变蛋白与BRAF/MEK抑制剂、激酶抑制剂(如舒尼替尼)、PARP抑制剂(如奥拉帕尼)、EGFR抑制剂(如奥西替尼(osimertinib)) (Ahn, 等(2016) J Thorac Oncol 11:S115)、IDO抑制剂(如依帕司他(epacadostat)) ,和溶瘤病毒(如塔利兰帕(talimogene laherparepvec)) (T-VEC) 组合给予。

[0505] 与治疗性抗体的组合

[0506] 在一些实施方式中,“补充剂”是治疗性抗体(包括结合至一个或多个肿瘤相关抗原的双特异性和三特异性抗体,包括但不限于双特异性T细胞接合(BITE)、双亲和靶向(DART)构建体和三特异性杀伤性接合(TriKE)构建体)。

[0507] 在一些实施方式中,治疗性抗体是结合至至少一种肿瘤抗原的抗体,其选自下组:HER2(例如曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、阿多-曲妥珠单抗-美坦),柄蛋白-4(如恩诺单抗),CD79(如泊洛妥珠单抗维多汀),CTLA4(如伊匹单抗),CD22(如莫妥昔单抗假单抗),CCR4(如莫格利珠单抗(magamuzumab)),IL23p19(如替拉珠单抗(tildrakizumab)),PDL1(如度伐鲁单抗,阿维鲁单抗,阿特珠单抗),IL17a(如伊克珠单抗),CD38(如达雷木单抗),SLAMF7(如埃洛妥单抗(elotuzumab)),CD20(如利妥昔单抗,托西莫单抗,替伊莫单抗和奥法木单抗),CD30(如本妥昔单抗维多汀),CD33(如吉妥珠单抗奥佐米星),CD52(如阿仑单抗),EpCam,CEA,fpA33,TAG-72,CAIX,PSMA,PSA,叶酸结合蛋白,GD2(如地努妥昔单抗(dinutuximab)),GD3,IL6(如司妥昔单抗(silutxumab)) GM2,Le<sup>y</sup>,VEGF(如贝伐单抗),VEGFR,VEGFR2(如雷莫芦单抗(ramucirumab))、PDGFR(如奥拉木单抗(olartumumab))、EGFR(如西妥昔单抗、帕尼单抗和奈西妥单抗(necitumumab)),ERBB2(如曲妥珠单抗),ERBB3,MET,IGF1R,EPHA3,TRAIL R1,TRAIL R2,RANKL RAP,生腱蛋白(tenascin),整合素V3和整合素41。

[0508] 经FDA批准并可作为补充剂用于治疗肿瘤性疾病的抗体治疗剂的例子包括下文表14中提供的那些:

表 14.批准的抗肿瘤疾病抗体和适应症				
	名称	商品名	靶标; 形式	适应症
[0509]	[fam]-德喜曲妥珠单抗(trastuzumab deruxtecan)	Enhertu	HER2; 人源化 IgG1 ADC	HER2+乳腺癌
	恩诺单抗维多汀	Padcev	柄蛋白-4(Nectin-4); 人 IgG1 ADC	尿路上皮癌

表 14. 批准的抗肿瘤疾病抗体和适应症

名称	商品名	靶标; 形式	适应症
泊洛妥珠单抗 维多汀 (Polatuzumab vedotin)	Polivy	CD79b; 人源化 IgG1 ADC	弥漫性大 B 细胞淋巴瘤
西米普利单抗	Libtayo	PD-1; 人 mAb	皮肤鳞状细胞癌
莫妥昔单抗假单抗	Lumoxiti	CD22; 鼠 IgG1 dsFv 免疫毒素	毛细胞白血病
莫格利珠单抗	Poteligeo	CCR4; 人源化 IgG1	皮肤 T 细胞淋巴瘤
替拉珠单抗	Ilumya	IL23p19; 人源化 IgG1	斑块状银屑病
伊巴珠单抗 (Ibalizumab)	Trogarzo	CD4; 人源化 IgG4	HIV 感染
德瓦鲁单抗	IMFINZI	PD-L1; 人 IgG1	膀胱癌
伊妥珠单抗奥佐米星 (Inotuzumab ozogamicin)	BESPONSA	CD22; 人源化 IgG4, ADC	血液恶性肿瘤
阿维鲁单抗	Bavencio	PD-L1; 人 IgG1	默克细胞癌
阿特珠单抗	Tecentriq	PD-L1; 人源化 IgG1	膀胱癌
奥拉单抗	Lartruvo	PDGRF $\alpha$ ; 人 IgG1	软组织肉瘤
伊克珠单抗	Taltz	IL-17a; 人源化 IgG4	银屑病
达雷木单抗	Darzalex	CD38; 人 IgG1	多发性骨髓瘤

[0510]

表 14. 批准的抗肿瘤疾病抗体和适应症

名称	商品名	靶标; 形式	适应症
依洛珠单抗	Empliciti	SLAMF7; 人源化 IgG1	多发性骨髓瘤
奈西妥单抗	Portrazza	EGFR; 人 IgG1	非小细胞肺癌
地努妥昔单抗	Unituxin	GD2; 嵌合 IgG1	成神经细胞瘤
纳武单抗	Opdivo	PD1; 人 IgG4	黑色素瘤, 非小细胞肺癌
[0511]	博纳吐单抗	Blincyto CD19, CD3; 鼠双特异性 串联 scFv	急性淋巴细胞性白血病
	派姆单抗	PD1; 人源化 IgG4	黑素瘤
	雷莫昔单抗	VEGFR2; 人 IgG1	胃癌
	司妥昔单抗	Sylvant IL-6; 嵌合 IgG1	卡斯特曼病(Castleman disease)
	奥贝努妥珠单 抗	Gazyva CD20; 人源化 IgG1; 糖 工程改造的	慢性淋巴细胞性白血病
	阿多曲妥珠单 抗美坦	Kadcyla HER2; 人源化 IgG1, ADC	乳腺癌
	帕妥珠单抗	Perjeta HER2; 人源化 IgG1	乳腺癌
	本妥昔单抗维 多汀	Adcetris CD30; 嵌合 IgG1, ADC	霍奇金淋巴瘤, 全身间变 性大细胞淋巴瘤(systemic anaplastic large cell lymphoma)
	伊匹单抗	Yervoy CTLA-4; 人 IgG1	转移性黑色素瘤
	奥法木单抗	Arzerra CD20; 人 IgG1	慢性淋巴细胞性白血病

表 14. 批准的抗肿瘤疾病抗体和适应症

名称	商品名	靶标; 形式	适应症
PEG 化赛托珠单抗	Cimzia	TNF; 人源化 Fab, 聚乙二醇化的	克罗恩病
卡妥索单抗	Removab	EPCAM/CD3; 大鼠/小鼠双特异性 mAb	恶性腹水
帕尼单抗	Vectibix	EGFR; 人 IgG2	结直肠癌
贝伐单抗	Avastin	VEGF; 人源化 IgG1	结直肠癌
西妥昔单抗	Erbitux	EGFR; 嵌合 IgG1	结直肠癌
托西莫单抗 -I131	Bexxar	CD20; 鼠 IgG2a	非霍奇金淋巴瘤
替伊莫单抗 (Gemtuzumab ozogamicin)	Zevalin	CD20; 鼠 IgG1	非霍奇金淋巴瘤
吉妥珠单抗奥佐米星 (Gemtuzumab ozogamicin)	Mylotarg	CD33; 人源化 IgG4, ADC	急性髓系白血病
曲妥珠单抗	Herceptin	HER2; 人源化 IgG1	乳腺癌
英夫利昔单抗	Remicade	TNF; 嵌合 IgG1	克罗恩病
利妥昔单抗	MabThera, Rituxan	CD20; 嵌合 IgG1	非霍奇金淋巴瘤
依决洛单抗	Panorex	EpCAM; 鼠 IgG2a	结直肠癌

[0512]

[0513] 在一些实施方式中, 其中抗体是靶向第一和第二肿瘤抗原的双特异性抗体, 例如 HER2 和 HER3 (缩写为 HER2 x HER3), FAP x DR-5 双特异性抗体, CEA x CD3 双特异性抗体, CD20 x CD3 双特异性抗体, EGFR-EDV-miR16 三特异性抗体, gp100 x CD3 双特异性抗体, Ny-eso x CD3 双特异性抗体, EGFR x cMet 双特异性抗体, BCMA x CD3 双特异性抗体, EGFR-EDV 双特异性抗体, CLEC12A x CD3 双特异性抗体, HER2 x HER3 双特异性抗体, Lgr5 x EGFR 双

特异性抗体,PD1 x CTLA-4双特异性抗体,CD123 x CD3双特异性抗体, gpA33x CD3双特异性抗体,B7-H3 x CD3双特异性抗体,LAG-3x PD1双特异性抗体,DLL4 x VEGF双特异性抗体,钙粘蛋白-P x CD3双特异性抗体,BCMA x CD3双特异性抗体,DLL4 x VEGF双特异性抗体,CD20 x CD3双特异性抗体,Ang-2x VEGF-A双特异性抗体,

[0514] CD20 x CD3双特异性抗体,CD123 x CD3双特异性抗体,SSTR2 X CD3双特异性抗体,PD1 x CTLA-4双特异性抗体,HER2 x HER2双特异性抗体, GPC3 x CD3双特异性抗体,PSMA x CD3双特异性抗体,LAG-3x PD-L1双特异性抗体,CD38 x CD3双特异性抗体,HER2 x CD3双特异性抗体, GD2 x CD3双特异性抗体和CD33 x CD3双特异性抗体。这种治疗性抗体可以直接或通过接头,特别是酸、碱或酶促不稳定接头,进一步偶联至一种或多种化疗剂(如抗体药物偶联物或ADC)。

[0515] 与物理方法组合:在一些实施方式中,补充剂是一种或多种非药物治疗方式(例如,局部放疗或全身放疗或手术)。举例而言,本发明内容考虑了治疗方案,其中在放射阶段之前或之后,用包含IL2突变蛋白和一种或多种补充剂的治疗方案进行治疗。在一些实施方式中,本发明进一步考虑将IL2突变蛋白与手术(如肿瘤切除术)组合使用。在一些实施方式中,本发明进一步考虑将IL2突变蛋白与骨髓移植、外周血干细胞移植或其他类型的移植疗法组合使用。

[0516] 与免疫检查点调节剂的组合:在一些实施方式中,“补充剂”是免疫检查点调节剂,用于治疗和/或预防对象的肿瘤性疾病以及与肿瘤性疾病相关的疾病、紊乱或病症。术语“免疫检查点途径”是指由表达在抗原呈递细胞(APC)上的第一分子(例如PD1等蛋白)结合至第二分子(例如PDL1等蛋白)所触发的生物学反应,后者在免疫细胞(例如T细胞)上表达,其或通过刺激免疫反应(例如T细胞活性的上调)或抑制(例如T细胞活性的下调)调节免疫反应。参与形成调节免疫反应的结合对的分子通常被称为“免疫检查点”。由这种免疫检查点途径调节的生物学反应是由胞内信号转导途径介导的,其导致下游的免疫效应途径,例如细胞激活、细胞因子产生、细胞迁移、细胞毒性因子分泌和抗体产生。免疫检查点途径通常由第一细胞表面表达的分子结合至与免疫检查点途径相关的第二细胞表面分子而触发(例如PD1结合至PDL1,CTLA4结合至CD28等)。免疫检查点途径的激活可以导致免疫反应的刺激或抑制。

[0517] 其激活导致免疫反应的抑制或下调的免疫检查点在本文中被称为“负向免疫检查点途径调节剂”。负向免疫检查点调节剂的激活导致的免疫反应的抑制减弱了宿主免疫系统识别外来抗原(例如肿瘤相关抗原)的能力。术语负向免疫检查点途径包括但不限于通过PD1结合至PDL1、PD1结合至PDL2,以及CTLA4结合至CD28/CD137调控的生物学途径。这种负向免疫检查点拮抗剂的例子包括但不限于拮抗剂(例如拮抗剂抗体),其结合T细胞抑制性受体,包括但不限于PD1(也被称为CD279)、TIM3(T细胞膜蛋白3;也被称为HAVcr2)、BTLA(B和T淋巴细胞减弱剂;也称为CD272)、VISTA(B7-H5)受体、LAG3(淋巴细胞激活基因3;也称为CD233)和CTLA4(细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4;也称为CD152)。

[0518] 在一个实施方式中,其激活导致免疫反应的刺激的免疫检查点途径在本文中被称为“正向免疫检查点途径调节剂”。术语正向免疫检查点途径调节剂包括但不限于由ICOSL结合至ICOS( CD278)、B7-H6结合至NKP30、CD155结合至CD96、OX40L结合至OX40、CD70结合至CD27、CD40结合至CD40L和GITRL结合至GITR调节的生物学途径。激动正向免疫检查点的分

子(例如刺激免疫反应的结合对的组分的天然或合成配体)对上调免疫反应是有用的。这种正向免疫检查点激动剂的例子包括但不限于结合T细胞激活受体的激动剂抗体,例如ICOS(例如JTX-2011,Jounce Therapeutics)、OX40(例如MEDI6383,Medimmune)、CD27(例如伐立鲁单抗(varlilumab),Celldex Therapeutics)、CD40(例如达西组单抗(dacetuzmumab)CP-870,893,Roche,Chi Lob 7/4)、HVEM、CD28、CD137 4-1BB、CD226和GITR(例如MEDI1873,Medimmune;INCAGN1876,Agenus)。

[0519] 如本文所用,术语“免疫检查点途径调节剂”是指在包括免疫健全的哺乳动物在内的生物系统中抑制或刺激免疫检查点途径的活性的分子。免疫检查点途径调节剂可通过结合至免疫检查点蛋白(例如表达在抗原呈递细胞(APC)表面的那些免疫检查点蛋白,例如癌细胞和/或免疫T效应细胞)而发挥其作用,或可对免疫检查点途径中的上游和/或下游反应发挥其作用。例如,免疫检查点途径调节剂可以调节SHP2的活性,参与PD-1和CTLA-4信号转导的酪氨酸磷酸酶。术语“免疫检查点途径调节剂”包括能够至少部分下调抑制性免疫检查点功能的免疫检查点途径调节剂(本文称为“免疫检查点途径抑制剂”或“免疫检查点途径拮抗剂”)和能够至少部分上调刺激性免疫检查点功能的一种或多种免疫检查点途径调节剂(本文称为“免疫检查点途径效应物”或“免疫检查点途径激动剂”)。

[0520] 由免疫检查点途径介导的免疫反应并不限于T细胞介导的免疫反应。例如,NK细胞的KIR受体可以调节由NK细胞介导的对肿瘤细胞的免疫反应。肿瘤细胞表达称为HLA-C的分子,其抑制NK细胞的KIR受体,导致抗肿瘤免疫反应或减弱。给予拮抗HLA-C结合至KIR受体的试剂,例如抗-KIR3mab(例如,利鲁单抗(lirilumab),BMS)抑制HLA-C与NK细胞抑制性受体(KIR)结合的能力,从而恢复NK细胞检测和攻击癌细胞的能力。因此,由HLA-C结合至KIR受体介导的免疫反应是负向免疫检查点途径的例子,对其的抑制导致非T细胞介导的免疫反应的激活。

[0521] 在一个实施方式中,免疫检查点途径调节剂是负向免疫检查点途径抑制剂/拮抗剂。在另一实施方式中,与IL2突变蛋白组合使用的免疫检查点途径调节剂是正向免疫检查点途径激动剂。在另一实施方式中,与IL2突变蛋白组合使用的免疫检查点途径调节剂是免疫检查点途径拮抗剂。

[0522] 术语“负向免疫检查点途径抑制剂”是指干扰负向免疫检查点途径的激活,导致免疫反应的上调或增强的免疫检查点途径调节剂。示例性的负向免疫检查点途径抑制剂包括但不限于程序性死亡-1(PD1)通路抑制剂、程序性死亡配体-1(PDL1)通路抑制剂、TIM3通路抑制剂和抗-细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA4)通路抑制剂。

[0523] 在一个实施方式中,免疫检查点途径调节剂是抑制PD1结合至PDL1和/或PDL2的负向免疫检查点途径的拮抗剂(“PD1途径抑制剂”)。PD1途径抑制剂导致刺激一些有利的免疫反应,如逆转T细胞耗竭,恢复细胞因子的产生,以及扩增抗原依赖性T细胞。PD1途径抑制剂已被确定为多种癌症有效的,并获得USFDA批准用于治疗各种癌症,包括黑色素瘤、肺癌、肾癌、霍奇金淋巴瘤、头颈癌、膀胱癌和尿道癌。

[0524] 术语PD1途径抑制剂包括干扰PD1至PDL1和/或PDL2的结合的单克隆抗体。抗体PD1途径抑制剂在本领域中是众所周知的。干扰PD1结合至PDL1和/或PDL2的市售可得的单克隆抗体的PD1通路抑制剂的例子包括纳武单抗(Opdivo®,BMS-936558,MDX1106,商购自Bristol Myers Squibb公司,新泽西州普林斯顿),派姆单抗(Keytruda®MK-3475,兰姆单

抗,商购自默克公司(Merck and Company),新泽西州肯尼尔沃斯)和阿特珠单抗(Tecentriq®,基因泰克/罗氏(Genentech/Roche),加利福尼亚州南旧金山)。其他PD1通路抑制剂抗体在临床开发中,包括但不限于杜瓦鲁单抗(MEDI4736,阿斯利康/米迪缪尼(Medimmune/AstraZeneca))、匹利珠单抗(CT-011,CureTech)、PDR001(诺华(Novartis))、BMS-936559(MDX1105,BristolMyers Squibb),以及阿维鲁单抗(MSB0010718C,默克/辉瑞(Merck Serono/Pfizer))和SHR-1210(因赛特医疗(Incyte))。2012年7月10日授权的美国专利号8,217,149(基因泰克公司)、2012年5月1日授权的美国专利号8,168,757(默沙东(Merck Sharp and Dohme Corp))、2011年8月30日授权的美国专利号8,008,449(美达莱(Medarex))、2011年5月17日授权的美国专利号7,943,743(美达莱公司)中描述了其他抗体PD1通路抑制剂。

[0525] 术语PD1途径抑制剂不限于拮抗剂抗体。非抗体生物制剂PD1途径抑制剂也在临床开发中,包括AMP-224,PD-L2 IgG2a融合蛋白,和AMP-514,PDL2融合蛋白,正由Amplimmune和Glaxo SmithKline进行临床开发。文献中还描述了用作PD1途径抑制剂的适体化合物(Wang,等(2018)145:125-130.)。

[0526] 术语PD1途径抑制剂包括肽基PD1途径抑制剂,例如描述于Sasikumar,等,美国专利号9,422,339,授权于2016年8月23日,和Sasikumar,等,美国专利号8,907,053,授权于2014年12月9日中的那些。据报道,CA-170(AUPM-170,Aurigene/Curis)是靶向免疫检查点PDL1和VISTA的口服生物可利用小分子。Pottayil Sasikumar,等靶向PD-L1/VISTA或PD-L1/Tim3的口服免疫检查点拮抗剂用与癌症治疗(Oral immune checkpoint antagonists targeting PD-L1/VISTA or PD-L1/Tim3 for cancer therapy.)[摘要].于:美国癌症研究协会第107届年会论文集(Proceedings of the 107th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research);2016年4月16-20;洛杉矶新奥尔良.费城(PA):AACR;Cancer Res 2016;76(14Suppl):Abstract No.4861.CA-327(AUPM-327,Aurigene/Curis)据报道为口服可及的小分子,其抑制免疫检查点、程序性死亡配体-1(PDL1)和T-细胞免疫球蛋白和含粘蛋白结构域蛋白-3(TIM3)。

[0527] 术语PD1通路抑制剂包括小分子PD1通路抑制剂。在本发明的实践中有用的小分子PD1通路抑制剂的例子在本领域中描述,包括Sasikumar,等,1,2,4-噁二唑和噻二唑化合物作为免疫调节剂(1,2,4-oxadiazole and thiadiazole compounds as immunomodulators)(PCT/IB2016/051266,2016年3月7日提交,公开为W02016142833A1,2016年9月15日)和Sasikumar,等3-取代的-1,2,4-噁二唑和噻二唑(3-substituted-1,2,4-oxadiazole and thiadiazole)PCT/IB2016/051343,提交于2016年3月9日并公开为W02016142886A2),BMS-1166和Chupak LS和Zheng X.用作免疫调节剂的化合物(Compounds useful as immunomodulators).百时美施贵宝公司(Bristol-Myers Squibb Co.)(2015)W0 2015/034820 A1,EP3041822 B1,2017年8月9日授予;W02015034820A1;和Chupak,等用作免疫调节剂的化合物(Compounds useful as immunomodulators).百时美施贵宝公司(2015)W0 2015/160641 A2.W0 2015/160641 A2,Chupak,等用作免疫调节剂的化合物(Compounds useful as immunomodulators).百时美施贵宝公司,Sharpe,等免疫抑制受体PD-1的调节剂及其使用方法(Modulators of immunoinhibitory receptor PD-1, and methods of use thereof),W0 2011082400 A2,公开于2011年7月7日;美国专利号7,488,

802(惠氏(Wyeth)),授权于2009年2月10日;

[0528] 在一些实施方式中,IL2突变蛋白和一种或多种PD1免疫检查点调节剂的组合用于治疗PD1通路抑制剂在人中通过FDA批准治疗的疾病或在临床试验中显示出临床效力的肿瘤性疾病,包括但不限于黑色素瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、头颈癌、肾细胞癌、膀胱癌、卵巢癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、子宫肉瘤、胃癌、食道癌、DNA错配修复缺陷的结肠癌、DNA错配修复缺陷的子宫内膜癌、肝细胞癌、乳腺癌、默克尔细胞癌、甲状腺癌、霍奇金淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、蕈样真菌病(mycosis fungoides)、外周T细胞淋巴瘤。在一些实施方式中,IL2突变蛋白和PD1免疫检查点调节剂的组合用于治疗肿瘤,其特征为PDL1的高水平表达,其中肿瘤具有肿瘤突变负荷,肿瘤中有高水平的CD8+ T细胞,与IFN  $\gamma$ 相关的免疫激活特征和缺乏转移性疾病(特别是肝转移)。

[0529] 在一些实施方式中,IL2突变蛋白与抑制CTLA4结合至CD28的负向免疫检查点途径的拮抗剂("CTLA4途径抑制剂")组合给予。CTLA4途径抑制剂的例子在本领域是众所周知的(参见,例如,美国专利号6,682,736(Abgenix),2004年1月27日授权;美国专利号6,984,720(美达莱公司(Medarex, Inc.)),2007年5月29日授权;美国专利号7,605,238(美达莱公司(Medarex, Inc.)),2009年10月20日授权)。

[0530] 在一些实施方式中,IL2突变蛋白与抑制BTLA结合至HVEM的负向免疫检查点途径的拮抗剂("BTLA途径抑制剂")组合给予。已经评估了许多使用抗-BTLA抗体和拮抗性HVEM-Ig的靶向BTLA/HVEM途径的方法,这些方法已经表明在许多疾病、紊乱和病症下有前景的效用,包括移植、感染、肿瘤和自身免疫疾病(参见例如,Wu,等,(2012)Int.J.Biol.Sci.8:1420-30)。

[0531] 在一些实施方式中,IL2突变蛋白与抑制TIM3结合至TIM3-激活配体能力的负向免疫检查点途径的拮抗剂("TIM3途径抑制剂")组合给予。TIM3通路抑制剂的例子在本领域是已知的,有代表性的非限制性例子描述于2016年9月15日公开的PCT国际专利公开号W0 2016/144803;Lifke,等美国专利公开号US 20160257749 A1,公开于2016年9月8日(F.Hoffman-LaRoche);Karunsky,美国专利号9,631,026,授权于2017年4月27日;Karunsky,Sabatos-Peyton等,美国专利号8,841,418,授权于2014年9月23日;美国专利号9,605,070;Takayanagi,等,美国专利号8552156,授权于2013年10月8日。

[0532] 在一些实施方式中,IL2突变蛋白与LAG3和PD1的抑制剂组合给予,因为LAG3和PD1的阻断已被认为在慢性感染的情况下能协同逆转肿瘤特异性CD8+ T细胞和病毒特异性CD8+ T细胞之间的无反应性。IMP321(Immufact)正在黑色素瘤、乳腺癌和肾细胞癌中评估。通常参见Woo等,(2012)Cancer Res 72:917-27;Goldberg等,(2011)Curr.Top.Microbiol.Immunol.344:269-78;Pardoll(2012)Nature Rev.Cancer 12:252-64;Grosso等,(2007)J.Clin.Invest.117:3383-392。

[0533] 在一些实施方式中,IL2突变蛋白与A2aR抑制剂组合给予。A2aR通过刺激CD4+ T细胞向TReg细胞发育而抑制T细胞反应。A2aR在肿瘤免疫中特别重要,因为肿瘤中细胞更新引起的细胞死亡率很高,而死亡的细胞释放腺苷,其为A2aR的配体。此外,A2aR的缺失与感染的炎症反应增强有关,有时是病理性的。A2aR的抑制可以通过给予分子(例如阻断腺苷结合的抗体或腺苷类似物)来实现。此类试剂可以与IL2突变蛋白组合使用,用于治疗紊乱,例如癌症和帕金森病。

[0534] 在一些实施方式中,IL2突变蛋白与IDO(吲哚胺2,3-双加氧酶(Indoleamine2,3-dioxygenase))的抑制剂组合给予。IDO下调免疫反应,通过氧化色氨酸介导,从而抑制T细胞的激活和诱导T细胞凋亡,创造使肿瘤特异性细胞毒性T淋巴细胞在功能上失活或不再能够攻击对象的癌症细胞的环境。吲哚莫德(indoximod)(NewLink Genetics)是IDO抑制剂,正在对转移性乳腺癌进行评估。

[0535] 如前所述,本发明提供了一治疗哺乳动物对象的肿瘤性疾病(如癌症)的方法,通过IL2突变蛋白与调节至少一种免疫检查点途径的一种或多种试剂组合给予,其包括调节两个、三个或更多免疫检查点途径的免疫检查点途径调节剂。

[0536] 在一些实施方式中,IL2突变蛋白与能够调节多个免疫检查点途径的免疫检查点调节剂组合给予。可通过给予能够作为多种免疫检查点途径的调节剂的多功能分子来调节多种免疫检查点途径。这种多重免疫检查点途径调节剂的例子包括但不限于双特异性或多特异性抗体。能够用作多种免疫检查点途径或的调节剂的多特异性抗体的例子在本领域是已知的。例如,美国专利公开号2013/0156774描述了双特异性和多特异性试剂(例如抗体),以及它们的使用方法,用于靶向共表达PD1和TIM3的细胞。此外,BTLA和PD1的双重阻断已被证明可增强抗肿瘤免疫(Pardoll, (2012年4月) Nature Rev.Cancer 12:252-64)。本发明考虑hIL2突变蛋白与靶向多种免疫检查点途径的免疫检查点途径调节剂组合使用,包括但不限于结合至PD1和LAG3的双特异性抗体。因此,可以在多个层面上增强抗肿瘤免疫力,鉴于各种机制上的考虑,可以产生组合策略。

[0537] 在一些实施方式中,IL2突变蛋白可与两种、三种、四种或更多的检查点通路调节剂组合给予。这种组合可能是有利的,因为免疫检查点途径可能有不同的作用机制,这就提供了从多个不同的治疗角度攻击潜在疾病、紊乱或病症的机会。

[0538] 应注意,对免疫检查点途径抑制剂的治疗缓解往往比对传统化疗(如酪氨酸激酶抑制剂)的缓解表现得晚得多。在一些情况下,在开始使用免疫检查点途径抑制剂治疗后,可能需要六个月或更长时间才能观察到治疗缓解的客观指标。因此,确定是否用一种或多种免疫检查点途径抑制剂与本发明的IL2突变蛋白组合治疗,必须经过经常比传统化疗更长的进展时间(time-to-progression)。所期望的缓解可以是在这种情况下认为有利的任何结果。在一些实施方式中,期望的缓解是防止疾病、紊乱或病症的进展,而在其他实施方式中,期望的缓解是疾病、紊乱或病症的一个或多个特征的消退或稳定(例如,肿瘤大小的减少)。在另一些实施方式中,期望的缓解是减少或消除与该组合的一种或多种试剂有关的一种或多种不良反应。

[0539] 作为补充剂的细胞治疗剂和方法:

[0540] 在一些实施方式中,本发明的方法可以包括IL2突变蛋白的给予与细胞疗法形式的补充剂的组合,以治疗肿瘤性、自身免疫性或炎症性疾病。适合与本发明的方法组合使用的细胞疗法的例子包括但不限于工程改造的T细胞产品,其包括一种或多种激活的CAR-T细胞、工程改造的TCR细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、工程改造的Treg细胞。由于工程改造的T细胞产品在给予对象之前通常离体激活,因此提供了上调的CD25水平,包括这种激活的工程改造T细胞类型的细胞产品适合通过给予本文所述的CD25偏向化IL2的突变蛋白以进一步支持。

[0541] CAR-T细胞

[0542] 在本发明的方法的一些实施方式中,补充剂为“嵌合抗原受体T-细胞”和“CAR-T细胞”,其可互换使用,指的是经过重组修饰以表达嵌合抗原受体的T细胞。如本文所用,术语如本文所用,术语“嵌合抗原受体”和“CAR”可互换使用,指的是包含多个功能结构域的嵌合多肽,其从氨基端到羧基端的序列依次排列为:(a)抗原结合结构域(ABD);(b)跨膜结构域(TD);和(c)一个或多个胞质信号转导结构域(CSD),其中上述结构域可以任选地由一个或多个间隔子结构域连接。CAR还可进一步包括信号肽序列,其通常在翻译后处理过程中被去除,并在用包含编码CAR的核酸序列的表达载体转化的细胞表面呈递CAR。在本发明的实践中有用的CAR可以按照本领域众所周知的原理制备。参见,例如,Eshhaar等,美国专利号7,741,465B1,2010年6月22日授权;Sadelain,等(2013)Cancer Discovery 3(4):388-398;Jensen和Riddell(2015)《新编免疫学观点》(Current Opinions in Immunology)33:9-15;Gross,等(1989)PNAS(USA)86(24):10024-10028;Curran,等(2012)J Gene Med 14(6):405-15。可以被修饰以纳入本发明的正交受体的市售可得CAR-T细胞产品的例子包括阿基伦赛(axicabtagene ciloleucel)(从吉利德制药公司(Gilead Pharmaceuticals)以名称Yescarta®市售可得)和替沙伦赛(tisagenlecleucel)(从诺华(Novartis)以名称Kymriah®市售可得)。

[0543] 如本文所用,术语抗原结合结构域(ABD)是指特异性结合至靶细胞表面表达的抗原的多肽。ABD可以是任何多肽,其可以特异性结合至靶细胞表面表达的一个或多个细胞表面分子(例如肿瘤抗原)。在一些实施方式中,ABD是特异性结合至与肿瘤细胞相关的细胞表面分子的多肽,其选自下组:GD2、BCMA、CD19、CD33、CD38、CD70、GD2、IL3R 2、CD19、间皮素、Her2、EpCam、Muc1、ROR1、CD133、CEA、EGRFRVIII、PSCA、GPC3、Pan-ErbB和FAP。在一些实施方式中,ABD是一种抗体(如上文所定义,包括例如一种或多种VHH、scFv等分子),其特异性结合至与肿瘤细胞相关的至少一种细胞表面分子(即至少一种肿瘤抗原),其中与肿瘤细胞相关的细胞表面分子选自下组:GD2、BCMA、CD19、CD33、CD38、CD70、GD2、IL3R 2、CD19、间皮素、Her2、EpCam、Muc1、ROR1、CD133、CEA、EGRFRVIII、PSCA、GPC3、泛-ErbB和FAP。在本发明的方法的实践中用作补充剂的CAR-T细胞的例子包括但不限于表达CAR的CAR-T细胞,该CAR包括ABD,其进一步包括以下至少之一:抗-GD2抗体、抗-BCMA抗体、抗-CD19抗体、抗-CD33抗体、抗-CD38抗体、抗-CD70抗体、抗-GD2抗体和IL3R 2抗体、抗-CD19抗体、抗-间皮素抗体、抗-Her2抗体、抗-EpCam抗体、抗-Muc1抗体、抗-ROR1抗体、抗-CD133抗体、抗-CEA抗体、抗-PSMA抗体、抗-EGRFRVIII抗体、抗-PSCA抗体、抗-GPC3抗体、抗-泛-ErbB抗体、抗-FAP抗体,

[0544] 本发明的方法的实践中用的CAR-T细胞的CAR进一步包括跨膜结构域,将ABD连接(或接头,如果采用的话,参见下文对接头的讨论)至CAR的胞内胞质结构域。跨膜结构域由任何在真核细胞膜中热力学上稳定的多肽序列构成。跨膜结构域可以来自天然存在的跨膜蛋白的跨膜结构域,也可以是合成的。在设计合成的跨膜结构域时,优选使用有利于 $\alpha$ -螺旋结构的氨基酸。用于构建CAR的跨膜结构域由约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、22、23或24个有利于形成具有 $\alpha$ -螺旋二级结构的氨基酸构成。具有有利于 $\alpha$ -螺旋构象的氨基酸在本领域是众所周知的。参见,例如Pace,等(1998)Biophysical Journal 75:422-427。特别有利于 $\alpha$ 螺旋构象的氨基酸包括甲硫氨酸、丙氨酸、亮氨酸、谷氨酸和赖氨酸。在一些实施方式中,CAR跨膜结构域可来自于I型跨膜蛋白的跨膜结构域,如CD3 $\zeta$ 、CD4、CD8、CD28等。

[0545] CAR多肽的胞质结构域包括一个或多个胞内信号结构域。在一个实施方式中,胞内信号结构域包括在抗原受体接合后启动信号转导的T细胞受体(TCR)和共受体的胞质序列,以及其功能性衍生物和亚片段。胞质信号转导结构域,例如那些来自T细胞受体 $\zeta$ -链的信号域,被用作CAR的部分,以在嵌合受体与靶抗原接合后产生刺激T淋巴细胞增殖和效应功能的信号。胞质信号转导结构域的例子包括但不限于CD27的胞质结构域、CD28的胞质结构域S、CD137的胞质结构域(也被称为4-1BB和TNFRSF9)、CD278的胞质结构域(也称为ICOS),PI3激酶的p110 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\delta$ 催化亚基、人CD3 $\zeta$ -链,CD134的胞质结构域(也称为OX40和TNFRSF4)、Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ 和 $\beta$ 链、MB1(Ig $\alpha$ )链、B29(Ig $\beta$ )链等等)、CD3多肽( $\delta$ 、 $\Delta$ 和 $\epsilon$ )、syk家族酪氨酸激酶(Syk、ZAP 70等)、src家族酪氨酸激酶(Lck、Fyn、Lyn等)和其他参与T细胞转导的分子,如CD2、CD5和CD28。

[0546] 在一些实施方式中,CAR还提供共刺激结构域。术语“共刺激结构域”,是指CAR的刺激结构域,通常是胞内结构域(endodomain),其提供二级非特异性激活机制,通过该机制传播一级特异性刺激。共刺激结构域指的是CAR的部分,其能增强记忆细胞的增殖、生存或发育。共刺激的例子包括在通过T细胞受体的抗原特异性信号转导后,抗原非特异性T细胞共刺激,和在通过B细胞受体的信号转导后,抗原非特异性B细胞共刺激。共刺激,例如T细胞共刺激,以及所涉及的因素已描述于Chen和Flies.(2013) Nat Rev Immunol 13 (4):227-42。在本发明的一些实施方式中,CSD包括一个或多个TNFR超家族成员,CD28、CD137(4-1BB)、CD134(OX40)、Dap10、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40或其组合。

[0547] 在本发明的方法的实践中有用的CAR可以任选地包括连接CAR的结构域的一个或多个多肽间隔子,特别是ARD与CAR的跨膜结构域之间的接头。虽然不是CAR结构的必要元件,但通常认为包含间隔子结构域以促进ARD的抗原识别是需要的。与本文所述的CAR-T细胞计数一起使用时,术语“接头”、“接头结构域”和“接头区”是指长度约1至100个氨基酸的多肽。接头通常由允许多肽具有柔性的氨基酸残基构成(如甘氨酸和丝氨酸),从而为CAR的相邻结构域提供更大的相对运动自由。尽管没有特定定义的氨基酸序列是间隔子实现其功能所必需的,但间隔子的典型特性是柔性,以使ARD能够自由移动,以促进靶向抗原识别。类似地,人们发现,在保留CAR功能的同时,间隔子的长度也有相当的宽松性。Jensen和Riddell(2014) Immunol. Review 257 (1) 127-144。在本发明的实践中有用的CAR的构造中用作间隔子的序列包括但不限于IgG1的铰链区、免疫球蛋白1CH2-CH3区、IgG4铰链-CH2-CH3、IgG4铰链-CH3和IgG4铰链。铰链和跨膜结构域可以来自同一分子,如CD8- $\alpha$ 的铰链和跨膜结构域。Imai,等(2004) Leukemia 18 (4):676-684。

[0548] CAR通常称为第一代、第二代、第三代或第四代。术语第一代CAR指的是CAR其中的胞质结构域仅通过单个信号转导结构域传递来自抗原结合的信号,例如来自CD3 $\zeta$ 链或IgE Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ 的高亲和力受体的信号转导结构域。该结构域包含一个或三个基于免疫受体酪氨酸的激活基序[ITAM],用于抗原依赖的T细胞激活。基于ITAM的激活信号赋予T细胞对抗原结合反应进行裂解靶肿瘤细胞和分泌细胞因子的能力。第二代CAR除了CD3 $\zeta$ 信号外,还包括共刺激信号。共刺激信号的共同递送增强细胞因子的分泌和CAR转导的T细胞诱导的抗肿瘤活性。共刺激结构域通常是相对于CD3 $\zeta$ 结构域的膜近端。第三代CAR包括三方信号转导结构域,例如包括CD28、CD3 $\zeta$ 、OX40或4-1BB信号转导区。在第四代,或“武装(armored car)”CAR

T细胞被进一步修饰,以表达或阻断分子和/或受体,以增强免疫活性,例如表达IL-12、IL-18、IL-7和/或IL-10;4-1BB配体、CD-40配体。包含可纳入本发明的CAR的胞内信号转导结构域的例子包括(氨基到羧基):CD3 $\zeta$ ;CD28-41BB-CD3 $\zeta$ ;CD28-0X40-CD3 $\zeta$ ;CD28-41BB-CD3 $\zeta$ ;41BB-CD-28--CD3 $\zeta$ 和41BB-CD3 $\zeta$ 。

[0549] 术语CAR还包括CAR变体,包括但不限于分裂CAR、开-开关CAR、双特异性或串联CAR、抑制性CAR(iCAR)和诱导多能干(iPS)CAR-T细胞。术语“分裂CAR”是指CAR,其中CAR的胞外部分、ABD和胞质信号转导结构域存在于两个不同的分子上。CAR变体还包括开-开关CAR,其为条件性可激活的CAR,例如,包括分裂CAR,其中分裂CAR的两个部分的条件性异源二聚体是药理学受控的。CAR分子及其衍生物(即CAR变体)被描述于,例如,在PCT申请号US2014/016527、US1996/017060、US2013/063083中;Fedorov等Sci Transl Med (2013);5(215):215ra172;Glienke等Front Pharmacol (2015) 6:21;Kakarla和Gottschalk 52Cancer J (2014) 20(2):151-5;Riddell等Cancer J (2014) 20(2):141-4;Pegram等Cancer J (2014) 20(2):127-33;Cheadle等Immunol Rev (2014) 257(1):91-106;Barrett等Annu Rev Med (2014) 65:333-47;Sadellain等Cancer Discov (2013) 3(4):388-98;Cartellieri等, J Biomed Biotechnol (2010) 956304;其公开内容通过引用全文纳入本文。术语“双特异性或串联CAR”是指包含能够放大或抑制一级CAR的活性的二级CAR结合结构域的CAR。术语“抑制性嵌合抗原受体”或“iCAR”在本文中可互换使用,指的是CAR其中结合iCAR使用双重抗原靶向,通过配备二级CAR结合结构域的抑制性信号转导结构域的第二抑制性受体的接合,关闭活性CAR的激活,导致一级CAR的激活的抑制。抑制性CAR(iCAR)设计为通过抑制性受体信号转导模块激活来调节CAR-T细胞活性。这种方法组合了两个CAR的活性,其中一个产生显性负信号,限制由激活受体激活的CAR-T细胞的反应。iCAR当结合至仅由正常组织表达的特异性抗原时,可以关闭抵消激活子CAR反应。通过这种方式,iCAR-T细胞可以区分癌细胞和健康细胞,并以抗原选择性的方式可逆地阻断转导的T细胞的功能。iCAR中的CTLA-4或PD-1胞内结构域触发T淋巴细胞上的抑制性信号,导致细胞因子产生减少,靶细胞裂解效率降低,淋巴细胞运动性改变。术语“串联CAR”或“TanCAR”是指通过两个嵌合受体的接合介导T细胞的双特异性激活的CAR,这两个嵌合受体设计为对两个不同的肿瘤相关抗原的独立接合反应而递送刺激或共刺激性信号。

[0550] 通常,嵌合抗原受体T-细胞(CAR-T细胞)是通过转导编码CAR的表达载体而重组修饰的T细胞,基本根据上述教导。

[0551] 在一些实施方式中,工程改造的T细胞对于被治疗的个体是同种异体的。Graham等(2018)Cell 7(10)E155。在一些实施方式中同种异体工程改造T细胞是完全HLA匹配的。然而并非所有患者都具有完全匹配的供者,适合所有患者的独立于HLA类型的细胞产品提供了替代方案。

[0552] 由于细胞产品可能由对象自身的T细胞组成,所以要给予对象的细胞群必然是可变的。因而鉴定最优浓度此外,由于CAR-T细胞试剂是可变的,对这种试剂的反应也可能不同,因此涉及到持续监测和管理与治疗有关的毒性,其通过在给予CAR-T细胞治疗之前进行药物免疫抑制或B细胞耗竭的过程来管理。通常,至少将要给予 $1\times10^6$ 个细胞/kg,至少 $1\times10^7$ 个细胞/kg,至少 $1\times10^8$ 个细胞/kg,至少 $1\times10^9$ 个细胞/kg,至少 $1\times10^{10}$ 个细胞/kg,或更多,通常受收集期间获得的T细胞数量限制。工程改造细胞可以在任何生理上可接受的介质中通

过任何方便的给药途径输给对象,通常是血管内,尽管其也可以通过其他途径引入细胞能够找到适合生长的部位。

[0553] 如果用于本发明的实践的T细胞是同种异体T细胞,这种细胞可以被修饰以减少移植植物抗宿主病。例如,本发明的工程改造细胞可以是通过基因编辑技术实现TCRa $\beta$ 受体敲除的。TCRa $\beta$ 是异二聚体,α和β链都需要存在才能被表达。一个基因编码α链(TRAC),2个基因编码β链,因此为此目的缺失TRAC基因座K0。许多不同的方法被用于完成此缺失,例如CRISPR/Cas9;兆核酸酶(meganuclease);工程改造的I-CreI归巢内切核酸酶等。参见,例如,Eyquem等(2017)Nature 543:113-117,其中TRAC编码序列被CAR编码序列替代;和Georgiadis等(2018)Mol.Ther.26:1215-1227,其将CAR表达与TRAC破坏通过规律成簇的间隔短回文重复序列(CRISPR)/Cas9连接起来,而不直接将CAR纳入TRAC基因座。防止GVHD的替代性策略修饰T细胞以表达TCRa $\beta$ 信号转导的抑制剂,例如使用CD3ζ的截短形式作为TCR抑制分子。

[0554] 作为补充剂的趋化因子和细胞因子试剂:

[0555] 在一些实施方式中,IL2突变蛋白与其他细胞因子组合给予,包括但不限于IL-7、IL-12、IL-15和IL-18,包括其各自的类似物和变体。

[0556] 激活诱导的细胞死亡抑制剂

[0557] 在一些实施方式中,IL2突变蛋白与一种或多种抑制激活诱导的细胞死亡(AICD)的补充剂组合给予。AICD是一种由Fas受体(例如Fas、CD95)与Fas配体(例如FasL、CD95配体)的相互作用产生的程序性细胞死亡形式,有助于维持外周免疫耐受。AICD效应物细胞表达FasL,在表达Fas受体的细胞中诱导细胞凋亡。激活诱导的细胞死亡是激活的T淋巴细胞因其T细胞受体的反复刺激而产生的负向调节剂。可与本文所述的IL2突变蛋白组合使用的抑制AICD的试剂的例子包括但不限于环孢菌素A(Shih,等,(1989)Nature 339:625-626,IL-16和类似物(包括rhIL-16,Idziorek,等,(1998)Clinical and Experimental Immunology 112:84-91),TGFb1(Genesteir,等,(1999)J Exp Med 189 (2) :231-239),和维生素E(Li-Weber,等,(2002)J Clin Investigation 110 (5) :681-690)。

[0558] 物理方法在一些实施方式中,补充剂是抗-肿瘤性物理方法,包括但不限于放疗、冷冻疗法、高温疗法、手术、激光消融和质子疗法。

[0559] 剂量:这种主体IL2突变蛋白或核酸化合物的剂量、毒性和疗效可以通过标准制药程序在细胞培养物或实验动物中确定。从细胞培养试验和动物研究中获得的数据可用于制定用于人的剂量范围。这种化合物的剂量优选在循环浓度范围内,其包括具有最小可接受毒性的ED<sub>50</sub>。该剂量可根据所用的剂型和所用的给药途径在此范围内变化。对于本发明方法中使用的任何化合物,治疗性有效剂量可以从细胞培养试验中初步估计。然后可以在动物模型中配制剂量,以实现循环血浆浓度范围,包括在细胞培养中确定的IC<sub>50</sub>。可利用这类信息更精确地确定人用剂量。血浆中的水平可以通过例如高效液相色谱来测量。

[0560] 如本文定义,主体IL2突变蛋白的治疗有效量(即有效剂量)取决于所选择的多肽。例如,可以给予约0.001至0.1mg/kg患者体重的单剂量;在一些实施方式中,可以给予约0.005、0.01、0.05mg/kg。在一些实施方式中,给予600,000IU/kg(IU可由淋巴细胞增殖生物测定法确定,并以世界卫生组织第一代白细胞介素-2(人)国际标准确立的国际单位(IU)表示)。

[0561] 在一些实施方式中,按照Klatzman等的美国专利号9,669,071和10,293,028B2所

述的“低剂量”治疗方案,将发明的IL2突变蛋白的药学可接受形式给予对象,其全部教导通过引用纳入本文。其他低剂量方案描述于Smith, K.A. (1993) Blood 81 (6) :1414-1423, He, 等(2016) Nature Medicine 22 (9) :991-993。

[0562] 在本发明的一些实施方式中,本发明提供了用于治疗和/或预防对象中的肿瘤性疾病、紊乱或病症的方法和组合物,通过给予对象治疗有效量的本发明的hIL2突变蛋白,其中该治疗有效量维持一段时间(例如,至少24小时,或者至少48小时,或者至少72小时,或者至少96小时,或者至少120小时,或者至少144小时,或者至少7天,或者至少10天,或者至少12天,或者至少14天,或者至少28天,或者至少45天,或者至少60天,或者更长)的大部分(即,大于约50%的时间段,或者大于约60%,或者大于约70%,或者大于约80%,或者大于约90%),对于这种IL2突变蛋白,以血清浓度等于或大于IL2突变蛋白的足以促进CD3-激活的原代人T细胞的有效浓度(例如,等于或大于EC<sub>10</sub><sup>PRO</sup>,或者等于或大于EC<sub>20</sub><sup>PRO</sup>,或者等于或大于EC<sub>30</sub><sup>PRO</sup>,或者等于或大于EC<sub>40</sub><sup>PRO</sup>,或者等于或大于EC<sub>50</sub><sup>PRO</sup>,或者等于或大于EC<sub>60</sub><sup>PRO</sup>)的增殖,但是对于这种IL2突变蛋白,以血清浓度等于或小于这种IL2突变蛋白足以诱导T细胞激活的有效浓度(例如,等于或小于EC<sub>100</sub><sup>PRO</sup>,或者等于或小于EC<sub>100</sub><sup>PRO</sup>,或者等于或小于EC<sub>90</sub><sup>PRO</sup>,或者等于或小于EC<sub>80</sub><sup>PRO</sup>,或者等于或小于EC<sub>70</sub><sup>PRO</sup>,或者等于或小于EC<sub>60</sub><sup>PRO</sup>,或者等于或小于EC<sub>50</sub><sup>PRO</sup>)。

[0563] 在本发明的一些实施方式中提供了用于治疗和/或预防对象肿瘤性疾病、紊乱或病症的方法和组合物,通过给予该对象其中治疗有效量的hIL2突变蛋白,其足以维持所述人IL2突变蛋白的血清浓度等于或大于IL2突变蛋白足以促进CD3-激活的原代人T细胞的有效浓度(>EC<sub>10</sub><sup>PRO</sup>),和对于这种IL2突变蛋白而言,等于或小于这种IL2突变蛋白足以诱导T细胞激活的血清浓度(即,小于EC<sub>90</sub><sup>PRO</sup>),持续至少24小时、或至少96小时、或至少120小时、或至少144小时、或至少7天、或至少10天、或至少12天、或至少14天、或至少28天、或至少45天、或至少60天或更长的时间段的大于约50%、或大于约60%、或大于约70%、或大于约80%、或大于约90%)。

[0564] 在本发明的一些实施方式中提供了用于治疗和/或预防对象肿瘤性疾病、紊乱或病症的方法和组合物,通过给予该对象其中治疗有效量的hIL2突变蛋白,其足以维持所述人IL2突变蛋白的血清浓度等于或大于IL2突变蛋白足以促进CD3-激活的原代人T细胞的有效浓度(>EC<sub>10</sub><sup>PRO</sup>),和对于这种IL2突变蛋白而言,等于或小于这种IL2突变蛋白足以诱导T细胞激活的血清浓度(即,小于EC<sub>90</sub><sup>PRO</sup>),持续至少24小时、或至少96小时、或至少120小时、或至少144小时、或至少7天、或至少10天、或至少12天、或至少14天、或至少28天、或至少45天、或至少60天或更长的时间段的大于约50%、或大于约60%、或大于约70%、或大于约80%、或大于约90%),其中该IL2一种hIL2多肽,包含选自下组的突变组的一组突变:L18R、Q22E和Q126H;L18R、Q22E和Q126K;L18R、Q22E和Q126M;L18R、Q22E、Q126T;L18R、Q22E;V91K;V91R;Q126H;L18R和Q126H;Q22E和Q126H;L18G、Q22E和Q126H;L18A、Q22E和Q126H;L18M、Q22E和Q126H;L18F、Q22E和Q126H;L18W、Q22E和Q126H;L18K、Q22E和Q126H;L18Q、Q22E和Q126H;L18E、Q22E和Q126H;L18S、Q22E和Q126H;L18V、Q22E和Q126H;L18I、Q22E和Q126H;L18Y、Q22E和Q126H;L18H、Q22E和Q126H;L18N、Q22E和Q126H;L18D、Q22E和Q126H;L18T、Q22E和Q126H;L18R、Q22G和Q126H;L18R、Q22A和Q126H;L18R、Q22L和Q126H;L18R、Q22M和Q126H;L18R、Q22F和Q126H;L18R、Q22W和Q126H;L18R、Q22K和Q126H;L18R、Q22S和Q126H;L18R、Q22V和Q126H;

L18R、Q22I和Q126H;L18R、Q22Y和Q126H;L18R、Q22H和Q126H;L18R、Q22R和Q126H;L18R、Q22N和Q126H;L18R、Q22D和Q126H;和L18R、Q22T和Q126H。

[0565] 根据本发明的另一方面,提供了通过给予本发明的IL2突变蛋白刺激动物免疫系统的方法。该方法对于治疗宿主免疫反应不足的疾病状态是有用的。在治疗对象时,给予治疗有效剂量的化合物(即活性成分)。治疗有效剂量是指产生改善症状或延长对象生存期的活性成分的量。有效剂量将随将要给予的IL2突变蛋白的特征、待治疗对象的身体特征、疾病或病症的性质等而变化。单次给予可从约50,000IU/kg至约1,000,000IU/kg或更多,更典型的是约600,000IU/kg。这可以每天重复几次(例如,每天2-3次),持续几天(例如,大约连续3-5天),然后可以在休息一段时间(例如,大约7-14天)后重复一次或多次。因此,有效剂量可包括仅一单词给予或在一段时间内多次给予(例如,在约10-20天内给予约20-30次单独给予,每次约600,000IU/kg)。

[0566] 该组合物可以每日一次或数次,至每周一次或数次给予,包括每隔一天一次。本领域技术人员还将理解的是,某些因素可能影响有效治疗对象所需的剂量和时间,包括但不限于,疾病或失调的严重程度,之前的治疗,对象的年龄和/或一般健康情况,以及存在的其他疾病。另外,用治疗有效量的主体IL2突变蛋白治疗对象可包括一次治疗或一系列治疗。在一个实施方式中,组合物每8小时给予一次,持续5天,然后是2至14天的休息期,例如9天,之后再每8小时给予,再持续5天。在另一个实施方式中,组合物在至少6天的时间段内隔日给予,任选地至少10天,任选地至少14天,任选地至少30天,任选地至少60天。本领域技术人员将认识到,该疗法可用于治疗慢性病症和防止慢性病症状的再次发生,例如自身免疫疾病(例如银屑病、IBD等)。

[0567] 这些药物组合物可与给药说明书一同包括在容器、包装或分配器内。

[0568] 虽然可以使用展现出毒性副作用的试剂,但是设计递送系统时需注意,所述递送系统将这种化合物靶向受影响组织的位点为了使对未转染细胞的潜在损伤最小化,从而降低副作用。IL2突变蛋白的毒性和疗效可以通过标准制药程序在细胞培养物或实验动物中确定。细胞培养试验和动物研究可用于确定LD<sub>50</sub>(对50%的群体致死的剂量)和ED<sub>50</sub>(对50%的群体有治疗作用的剂量)。毒性和治疗作用之间的剂量比率是治疗指数,它可以表示为LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>的比率。优选表现出大的治疗指数的IL2突变体。从细胞培养试验和动物研究中获得的数据适用于制定用于人的剂量范围。这种突变体的剂量优选在循环浓度范围内,其包括几乎或没有毒性的ED<sub>50</sub>。该剂量可根据多种因素变化,例如所用的剂型、所用的给药途径、对象的病症等,在此范围内变化。

[0569] 治疗有效剂量可以通过确定EC<sub>50</sub>而从细胞培养试验中初步估计出来。然后可以在动物模型中配制剂量,以实现循环血浆浓度范围,包括在细胞培养中确定的EC<sub>50</sub>。可利用这类信息更精确地确定人用剂量。血浆中的水平可以通过例如HPLC来测量。具体制剂、给药途径和剂量可以由单个医师根据患者的状况来选择。

[0570] 用IL2突变蛋白治疗的患者的主治医生将知道如何以及何时因毒性、器官功能障碍等原因终止、中断或调整给药。相反,如果临床反应不充分(排除毒性),主治医师还将知晓将治疗调整到更高的水平。在感兴趣的紊乱的管理中,给药剂量的大小将随待治疗的病症的严重程度、给药途径等而变化。例如,病症的严重程度可以部分地通过标准的预后评估方法进行评估。此外,剂量和可能的剂量频率也将根据个别病人的年龄、体重和反应而变

化。

[0571] 试剂盒:本发明还考虑了包含药物组合物IL2突变蛋白及其药物组合物的试剂盒。该试剂盒通常为容纳各种成分的物理结构形式,如下文所述,并可用于例如实施上述方法。试剂盒可以包括IL2突变蛋白,其形式为适合给予对象的药物组合物,其可以是现成的,或需要制备的形式,例如,在给予前解冻、重建或稀释。当IL2突变蛋白是需要由使用者重建的形式时,试剂盒还可以包括无菌容器,提供包括缓冲剂、药学上可接受的赋形剂等的重建介质。本发明的试剂盒可以设计为适当维持其中所含组分的必要条件(例如,冷藏或冷冻)。试剂盒可进一步包含标签或包装插页,包括其中的组分的鉴定信息和使用说明。试剂盒中的各组分可以被封装在单独的容器中,所有的各种容器可以在一个单独包装中。标签或插页可以包括制造商信息,如批号和失效日期。标签或包装插页可以,例如,整合到容纳组分的物理结构中,分别地包含在物理结构中,或固定在试剂盒的组分上(例如,安瓿、注射器或小瓶)。标签或插页可以以物理形式或计算机可读介质提供。在一些实施方式中,实际说明书并不存在于试剂盒中,而是试剂盒提供了从远程获得说明书的方法,例如,通过互联网网站,包括通过提供符合政府法规(例如,HIPAA)的密码(或可扫描的代码,如IL2突变蛋白或包含试剂盒的容器上的条形码或QR码)的安全访问。

[0572] 本说明书中给出的每个最大的数字限制旨在包括每个较低的数字限制,就如同这些较低的数字限制明确写在本文中。本说明书中给出的每个最小数字限制将包括每个较高的数字限制,就如同这些较高的数字限制明确写在本文中。本说明书中给出的每一个数字范围都将包括落入这种较宽的数字范围的每个较窄的数字范围,就如同所述较窄的数字范围都明确写在本文中。

[0573] 本文的任何引用不作为承认构成现有技术。对参考文献的讨论说明了其作者的主张,发明人保留对所引用文件的准确性和相关性提出质疑的权利。应理解,尽管本文引用了一些信息来源,包括科学期刊文章、专利文件和教科书;但这种引用并不构成承认这些文件中的任何一个构成本领域常见常识的一部分。

[0574] 本文对一般方法的讨论仅用于说明目的。在阅览本发明内容时,其他替代性方法和替代方案对本领域的技术人员将是显而易见的并将其纳入本申请的精神和范围内。

#### [0575] 实施例

[0576] 提供下面的实施例以描述本发明的某些实施方式,不应解释为限制性的。

#### [0577] 实施例1:人IL2表达载体pcDNA3.1/hygro (+) - huIL2的产生

[0578] 人IL2 DNA开放阅读框(“ORF”) (Genbank NM\_000586.3) 被合成(生命技术公司(Life Technologies) GeneArt服务,加利福尼亚州卡尔斯巴德)并通过PCR使用Platinum SuperFi II DNA聚合酶试剂盒(市售可得,目录号12361050,赛默飞世尔(ThermoFisher))基本按制造商的方案扩增,使用引物5' TATAGTCAGCGCCACCATGTCAGGATGCAACTCCTGTC 3',其纳入NheI限制性位点,和5' TATAGGGCCCTATCAAGTCAGTGTGAGATG 3',其纳入ApaI限制性位点。PCR片段在1%的琼脂糖凝胶(货号#54803,隆萨公司(Lonza),缅因州洛克兰(Rockland,ME))上可视化,从凝胶上切除并纯化,使用QIAquick PCR纯化试剂盒(市售可得,目录号28106,凯杰公司(Qiagen),德国),根据制造商的方案。

[0579] 纯化的PCR片段和哺乳动物表达载体pcDNA3.1/Hygro (+) (市售可得,目录号V87020,赛默飞世尔加利福尼亚州卡尔斯巴德)用NheI和ApaI(市售可得,目录号R0111S和

目录号R0114L,新英格兰生物实验室公司(New England Biolabs),马萨诸塞州伊普斯维奇)限制酶消化。表达载体用快速去磷酸化试剂盒(市售可得,目录号M0508L,新英格兰生物实验室公司)根据制造商的方案进一步处理。PCR片段被连接至pcDNA 3.1/Hygro (+),使用快速DNA连接试剂盒(市售可得,目录号11635379001,西格玛奥德里奇(Sigma Aldrich),密苏里州圣路易斯),基本根据制造商的方案,转化到One Shot TOP10化学感受态的大肠杆菌(市售可得,目录号C404006,生命技术公司,加利福尼亚州卡尔斯巴德)中,接种到LB琼脂板上,其含有100ug/ml羧苄青霉素(市售可得,目录号L1010,Teknova,加利福尼亚州霍利斯特)并在37C生长过夜。

[0580] 次日,挑出单菌落并用于在含有100ug/ml氨苄青霉素(市售可得,目录号A9626,Teknova)的LB肉汤(编号10855-001,生命技术公司)中开始3ml细菌培养。培养物在37C下生长过夜。次日,沉淀大肠杆菌(6,000rpm,10分钟,台式离心机,编号5424,市售可得,商品目录Eppendorf,纽约州霍波格),以及使用QIAprep Spin小抽试剂盒(编号27106,凯杰公司)分离DNA表达载体。质粒DNA经过序列验证(MCLab,加利福尼亚州南旧金山)。

[0581] 实施例2.人IL2 REH表达载体pcDNA3.1/hygro (+) -huIL2-REH的产生

[0582] 表达载体将三个突变引入人IL2 ORF(L38R、Q42E和Q146H;所有编号基于全长人IL2 ORF NM\_000586.3编号,即表达的hIL2,包括信号肽而不是成熟的hIL2分子的20个氨基酸序列)基本按照实施例1的教导组装,除了以下不同之处:合成用于PCR的初始模板DNA,其含有L38R(成熟蛋白的L18R)、Q42E(成熟蛋白的Q22E)和Q146H(成熟蛋白的Q126H)突变。

[0583] 实施例3.人IL2 REM表达载体pcDNA3.1/hygro (+) -huIL2-REM的产生

[0584] 表达载体将三个突变引入人IL2 ORF(L38R、Q42E和Q146M;所有编号基于全长人IL2 ORF NM\_000586.3编号),完全按照pcDNA3.1/Hygro (+)中人IL2表达载体所述组装,除了以下例外:合成用于PCR的初始模板DNA,含有L38R、Q42E和Q146M突变。

[0585] 实施例4.将突变或回复突变引入pcDNA3.1/hygro (+) -huIL2和pcDNA3.1/hygro (+) -huIL2REH表达载体

[0586] 所有突变或回复突变(将pcDNA3.1/hygro (+) -huIL2-REH中的突变恢复到与野生型IL2 ORF匹配)被引入pcDNA3.1/Hygro (+) -huIL2或pcDNA3.1/Hygro (+) -huIL2-REH表达载体,使用Quik Change II定点诱变试剂盒(编号200524,安捷伦科技公司(Agilent Technologies),加利福尼亚州圣克拉拉)基本按照制造商的方案操作。表15和16列出了产生的突变,引入突变的模板,以及用于引入突变的引物组。将Quik Change PCR反应转化进大肠杆菌中,以及质粒DNA的分离和序列分析,是使用与产生pcDNA3.1/Hygro-huIL2表达载体相同的方案进行的。

[0587]

表 15.Quik Change 定点诱变						
全 ORF 数	38	4 2	14 6	*模板		
成熟肽 数	18	2 2	12 6	IL2: pcDNA3.1/hygro(+-)huIL2 IL2 REH: pcDNA3.1/Hygro(+-)huIL2 REH IL2 REK: pcDNA3.1/Hygro(+-)huIL2 REK IL2 AEH: pcDNA3.1/Hygro(+-)huIL2 AEH IL2 EEH: pcDNA3.1/Hygro(+-)huIL2 EEH IL2 VEH: pcDNA3.1/Hygro(+-)huIL2 VEH IL2 HEH: pcDNA3.1/Hygro(+-)huIL2 HEH IL2 IEH: pcDNA3.1/Hygro(+-)huIL2 IEH IL2 RTH: pcDNA3.1/Hygro(+-)huIL2 RTH		
hIL2 野生型 人 IL2 残基	L	Q	Q	引物组(5'→3')		
REE	R	E	E	GATGGATTACCTTTGTGAGAGCATCATCTC AACAA TGTTGAGATGATGCTCTCACAAAAGGTAA TCCATC		
				IL2 REK		

[0588]	REM	R	E	M	GGATTACCTTTGTATGAGCATCATCTCAAC GTTGAGATGATGCTCATACAAAAGGTAAT CC	IL2 REK
	REV	R	E	V	GGATTACCTTTGTGTGAGCATCATCTCAAC AC GTGTTGAGATGATGCTCACACAAAAGGTA ATCC	IL2 REK
	REL	R	E	L	GGATTACCTTTGTCTGAGCATCATCTCAAC AC GTGTTGAGATGATGCTCAGACAAAAGGTA ATCC	IL2 REK
	REF	R	E	F	GGATTACCTTTGTTCAGCATCATCTCAAC AC GTGTTGAGATGATGCTGAAACAAAAGGTA ATCC	IL2 REK
	REN	R	E	N	GGATTACCTTTGTAACAGCATCATCTCAAC AC GTGTTGAGATGATGCTGTTACAAAAGGTA ATCC	IL2 REK
	RER	R	E	R	GGATTACCTTTTAGGAGCATCATCTCAA CAC GTGTTGAGATGATGCTCCTACAAAAGGTA ATCC	IL2 REK
	REY	R	E	Y	GGATTACCTTTGTTACAGCATCATCTCAAC AC GTGTTGAGATGATGCTGTAACAAAAGGTA ATCC	IL2 REK

[0589]

AEK	A	E	K	GGATTACCTTTGTAAGAGCATCATCTC GAGATGATGCTCTACAAAAGGTAATCC	IL2 AEH
EEK	E	E	K	GGATTACCTTTGTAAGAGCATCATCTC GAGATGATGCTCTACAAAAGGTAATCC	IL2 EEH
VEK	V	E	K	GGATTACCTTTGTAAGAGCATCATCTC GAGATGATGCTCTACAAAAGGTAATCC	IL2 VEH
HEK	H	E	K	GGATTACCTTTGTAAGAGCATCATCTC GAGATGATGCTCTACAAAAGGTAATCC	IL2 HEH
IEK	I	E	K	GGATTACCTTTGTAAGAGCATCATCTC GAGATGATGCTCTACAAAAGGTAATCC	IL2 IEH
RTK	R	T	K	GGATTACCTTTGTAAGAGCATCATCTC GAGATGATGCTCTACAAAAGGTAATCC	IL2 RTH

表 16. hIL2 直向同源物构建体

[0590]

名称	引物组(5'→3') +	模板
REE	GATGGATTACCTTTGTGAGAGCATCATCTC AAC TGTTGAGATGATGCTCTCACAAAAGGTAAT CCATC	pExSyn2.0 - hIL2 REK
REM	GGATTACCTTTGTATGAGCATCATCTAAC GTTGAGATGATGCTCATACAAAAGGTAATC C	pExSyn2.0 - hIL2 REK
REV	GGATTACCTTTGTGTGAGCATCATCTAAC AC GTGTTGAGATGATGCTCACACAAAAGGTAAC TCC	pExSyn2.0 - hIL2 REK

表 16. hIL2 直向同源物构建体		
名称	引物组(5'→3') +	模板
REL	GGATTACCTTTGTCTGAGCATCATCTCAAC AC GTGTTGAGATGATGCTCAGACAAAAGGTAA TCC	pExSyn2.0 - hIL2 REK
REF	GGATTACCTTTGTTTCAGCATCATCTCAAC AC GTGTTGAGATGATGCTGAAACAAAAGGTAA TCC	pExSyn2.0 - hIL2 REK
REN	GGATTACCTTTGTAACAGCATCATCTCAAC AC GTGTTGAGATGATGCTGTTACAAAAGGTAA TCC	pExSyn2.0 - hIL2 REK
RER	GGATTACCTTTGTAGGAGCATCATCTCAAC AC GTGTTGAGATGATGCTCCTACAAAAGGTAA TCC	pExSyn2.0 - hIL2 REK
REY	GGATTACCTTTGTTACAGCATCATCTCAAC AC GTGTTGAGATGATGCTGTAACAAAAGGTAA TCC	pExSyn2.0 - hIL2 REK
REK + N88R	GACTTAATCAGCCGTATCAACGTAATA TATTACGTTGATACGGCTGATTAAGTC	pExSyn2.0 - hIL2 REK
REK + N88D	GGACTTAATCAGCGATATCAACGTAAT ATTACGTTGATATCGCTGATTAAGTCC	pExSyn2.0 - hIL2 REK
REK + N88G	GGGACTTAATCAGCGGTATCAACGTAAT ATTACGTTGATACCGCTGATTAAGTCCC	pExSyn2.0 - hIL2 REK

[0591]

表 16. hIL2 直向同源物构建体		
名称	引物组(5'→3') +	模板
REK + N88I	GGACTTAATCAGCATTATCAACGTAAT ATTACGTTGATAATGCTGATTAAGTCC	pExSyn2.0 - hIL2 REK
REK + D20I	GCATTAAAGGCTGATTTAGAGATGATTTG CAAAATCATCTCTAAAATCAGCCTTAAATGC	pExSyn2.0 - hIL2 REK
REK + D20H	GAGCATTAAAGGCTGCATTTAGAGATG CATCTCTAAATGCAGCCTTAAATGCTC	pExSyn2.0 - hIL2 REK
REK + D20T	GCATTAAAGGCTGACTTTAGAGATGATTTG CAAAATCATCTCTAAAGTCAGCCTTAAATGC	pExSyn2.0 - hIL2 REK
REK + D20G	GCATTAAAGGCTGGTTAGAGATGA TCATCTCTAAACCCAGCCTTAAATGC	pExSyn2.0 - hIL2 REK
REK + D20A	GCATTAAAGGCTGGCTTAGAGATGATTTG CAAAATCATCTCTAAAGCCAGCCTTAAATGC	pExSyn2.0 - hIL2 REK
AEH + V91K	CAGCAATATCAACAAAGATAGTTCTGGAAC GTTCCAGAACTATCTTGTGATATTGCTG	pExSyn2.0 - hIL2 AEH
EEH + V91K	CAGCAATATCAACAAAGATAGTTCTGGAAC GTTCCAGAACTATCTTGTGATATTGCTG	pExSyn2.0 - hIL2 EEH
VEH + V91K	CAGCAATATCAACAAAGATAGTTCTGGAAC GTTCCAGAACTATCTTGTGATATTGCTG	pExSyn2.0 - hIL2 VEH
HEH + V91K	CAGCAATATCAACAAAGATAGTTCTGGAAC GTTCCAGAACTATCTTGTGATATTGCTG	pExSyn2.0 - hIL2 HEH
IEH + V91K	CAGCAATATCAACAAAGATAGTTCTGGAAC GTTCCAGAACTATCTTGTGATATTGCTG	pExSyn2.0 - hIL2 IEH
RTH + V91K	CAGCAATATCAACAAAGATAGTTCTGGAAC GTTCCAGAACTATCTTGTGATATTGCTG	pExSyn2.0 - hIL2 RTH
REE +	CAGCAATATCAACAAAGATAGTTCTGGAAC	pExSyn2.0 - hIL2

[0592]

表 16. hIL2 直向同源物构建体		
名称	引物组(5'→3') +	模板
V91K	GTTCCAGAACTATCTTGTGATATTGCTG	REE
[0593]	GGATTACCTTTGTAAGAGCATCATCTC GAGATGATGCTCTTACAAAAGGTAATCC	pExSyn2.0 - hIL2 AEH
EEK	GGATTACCTTTGTAAGAGCATCATCTC GAGATGATGCTCTTACAAAAGGTAATCC	pExSyn2.0 - hIL2 EEH
VEK	GGATTACCTTTGTAAGAGCATCATCTC GAGATGATGCTCTTACAAAAGGTAATCC	pExSyn2.0 - hIL2 VEH
HEK	GGATTACCTTTGTAAGAGCATCATCTC GAGATGATGCTCTTACAAAAGGTAATCC	pExSyn2.0 - hIL2 HEH
IEK	GGATTACCTTTGTAAGAGCATCATCTC GAGATGATGCTCTTACAAAAGGTAATCC	pExSyn2.0 - hIL2 IEH
RTK	GGATTACCTTTGTAAGAGCATCATCTC GAGATGATGCTCTTACAAAAGGTAATCC	pExSyn2.0 - hIL2 RTH
N88R	GACTTAATCAGCCGTATCAACGTAATA TATTACGTTGATACGGCTGATTAAGTC	pExSyn2.0 - hIL2

[0594] 实施例5. HEK293细胞中的瞬时转染

[0595] 所有表达载体被瞬时转染进HEK293细胞(编号CRL-1573, ATCC, 弗吉尼亚州马纳萨斯)。约1E6 HEK293细胞被接种到6孔组织培养板的各孔中的补充有10%胎牛血清(编号SH30071.03, Fisher Scientific, 美国伊利诺伊州芝加哥)的2ml DMEM(编号10569044, 生命技术公司)中, 并在37C和5%CO<sub>2</sub>下生长过夜。第二天用Lipofectamine 3000试剂(编号L3000150, 生命技术公司)转染细胞, 按照制造商的方案, 每次转染使用2.5ug DNA、5ul P3000试剂和7.5ul Lipofectamine 3000。转染的细胞在37C, 5%CO<sub>2</sub>生长48-72小时然后收获条件培养基。

[0596] 实施例6. 蛋白质表达分析

[0597] 通过ELISA测量蛋白质表达, 使用人IL2 V-PLEX ELISA试剂盒(编号K151QQD-4, Mesoscale Diagnostics, 马里兰州巴尔的摩市), 按照制造商的方案(转染培养基最初以1:4稀释, 然后1:2连续稀释)。在Meso Quickplex SQ120 (Mesoscale Diagnostics) 上使用制造商为该ELISA试剂盒预设的设置读取平板。该试剂盒中的人IL2标准品被用来计算条件培养基样品中的近似表达水平。

[0598] 实施例7确定CD25- 和CD25+细胞上的IL2活性(STAT5)

[0599] 经过2-3天的孵育, 根据上述实施例5制备含有可溶性IL2蛋白的293T细胞的上清样品, 并将其加至YT细胞(CD25NEG) 和已经被工程改造为组成型表达CD25的YT

(YTCD25POS),持续约20分钟。通过流式细胞术测量磷酸化-STAT5 (pSTAT5) 的诱导水平。pSTAT5水平的诱导倍数的结果显示在附图2中。IL2蛋白对CD25状态的选择性被计算为CD25<sup>+</sup>YT细胞上磷酸化-STAT5升高的水平 (pSTAT5<sup>YTCD25</sup>) 除以CD25阴性YT细胞中磷酸化-STAT5的水平 (pSTAT5<sup>YT</sup>)。这些实验的结果提供于附图图2中。

[0600] 从所呈现的数据可以看出,本发明的IL2突变蛋白提供了对CD25阳性细胞上pSTAT5的选择性诱导,并保留了显著的IL2活性。

[0601] 实施例8.在人T细胞克隆3F8中评估直向同源物的活性

[0602] 评估一组有代表性的hIL-2突变蛋白在CD4阳性人T细胞克隆3F8细胞中的活性。CD4阳性T细胞克隆3F8是由健康供者的PBMC与EBV转化的B细胞系JY在两轮连续的混合白细胞反应中激活,然后通过有限稀释的单细胞克隆产生的,如描述于(Yssel和Spits (2002)《新编免疫学指南》(Current Protocols in Immunology) 7.19.1-7.19.12) CD4阳性T细胞克隆3F8表达CD25和CD122,对IL-2反应增殖并产生IFN  $\gamma$ 。

[0603] 3F8细胞与转染了hIL-2突变蛋白的293T细胞的上清液接触,如下:细胞以每ml 20万个细胞在由Yssel氏培养基(Iscove氏改良的Dulbecco氏培养基(赛默飞世尔)、0.25%w/v%人白蛋白(西格玛)、1%青霉素/链霉素(赛默飞世尔)、1%ITS-X胰岛素、转铁蛋白、硒(吉布可公司(Gibco))、30mg/L转铁蛋白(罗氏公司(Roche))、2mg/L棕榈酸(西格玛)、1%LA-OA-白蛋白亚油酸、油酸(西格玛)、1%人血清(Gemini)组成的生长培养基中生长(Yssel等(1984) J Immunol Methods 72:219-227),50Gy辐照的JY细胞以每孔10万个细胞,40Gy辐照的同种异体PBMC以每mL 100万个细胞。经过六天的培养和用100pM的人IL-2扩增后,细胞被洗涤并接种到黑色透明底的96孔板(科斯塔(Costar))中,每孔5万个细胞,75 $\mu$ l生长培养基。将转染的293T细胞上清在生长培养基中进行五倍的连续稀释,并将75 $\mu$ l各稀释液加入3F8细胞的平板中,设双重复,最终滴定比例从1:2到1:78125。平板被转移到加湿培养箱(赛默飞世尔),在37摄氏度、5%的二氧化碳条件下孵育三天。

[0604] 将平板从培养箱中取出,在96孔平底板(科斯塔)中收获40 $\mu$ l培养上清液。汇集重复的孔中的上清。根据制造商的说明,每孔加入100 $\mu$ l CelltiterGlo(普洛麦格公司(Promega))裂解细胞。细胞裂解物在定轨摇床(VWR科学公司(VWR Scientific))上以300rpm混合两分钟,然后在室温下保持10分钟。3F8细胞裂解物的发光在Envision 2103多标签读板仪(铂金埃尔默(Perkin Elmer))上以每秒计数读取。

[0605] 根据制造商的说明,使用MSD IFN  $\gamma$  V-Plex试剂盒(MSD K151Q0D)测量培养物上清中IFN  $\gamma$ 的产生。简言之,预包被mAb的MSD IFN  $\gamma$ 试验板用150 $\mu$ L Tris洗涤缓冲液洗涤3次,在稀释液2中稀释IFN  $\gamma$ 标准品。用稀释液2将培养物上清1:1稀释,将50 $\mu$ L样品和标准品加入IFN  $\gamma$ 试验板中,并在室温下以300rpm在定轨摇床(VWR科学公司)上孵育120分钟。用Tris洗涤缓冲液洗涤平板3次,并在每个孔中加入25 $\mu$ L稀释液3中的1 $\times$ 检测抗体。室温下,平板在定轨摇床(VWR科学公司)上以300rpm孵育60分钟。用Tris洗涤缓冲液洗板3次,每孔加入150 $\mu$ L 2x读出缓冲液T,用Mesoscale Quickplex SQ120仪器读取发光信号。用MSD软件根据标准曲线计算上清中IFN  $\gamma$ 的浓度。

[0606] 为了比较每种hIL-2突变蛋白对3F8细胞增殖和IFN  $\gamma$ 产生的影响,将用上清处理的细胞的CelltiterGlo值和IFN  $\gamma$ 浓度与单独用生长培养基、野生型IL-2转染或人REK IL-2转染的上清处理的对照细胞进行比较。这些实验所得数据见表5和图4。这些数据证明了

hIL-2突变蛋白诱导增殖和IFN  $\gamma$ 产生的活性之间的关联性。

[0607] 非正式序列表

[0608]

Seq ID NO	名称或描述	AA 序列
1	野生型人 IL2	APTSSTKKTQLQLEHLLLQMLNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQS KNFHLRPRDLISNINVIVLEKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFCQSIISTLT
2	成熟 hCD25	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRI KSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQV TPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPP WENEATERIYHFVVGQMYYYQCVQGYRALHRGPAE SVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQA SPEGRPESETSCLVTTDFQIQTemaATMETSIFTTEY QVAVAGCVFLLISVLLSGLTWQRRQRKSRTI
3	成熟 hCD122	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDGALQDTSCQVH AWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKL TTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENRLMA PISLQVHVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTL SPGHTWEEAPLLTLKQKQEWCLETLPDTQYEFQVR VKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPAALGKDTPWL HLLVGLSGAFGFIILVYLLINCRNTGPWLKKVLKCNTP DPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSPPFSSSFSPGGLAPEI SPLEVLERDKVTQLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFT NQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVA GAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLSPSLL GGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPL

		GPPTPGVPDLVDFQPPPELVREAGEEVPDAGPREGV SFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQD PTHLV
4	hCD122 的 ECD	AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDGALQDTSCQVH AWPDERRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKL TTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRLMA PISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTL SPGHTWEEAPLLTLKQKQEWCLETLPDTQYEFQVR VKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPAALGKDT
[0609]	成 熟 hCD132 蛋 白	LNTTILTPNGNEDTTADFFLTTMPTDSLSVSTLPLPEVQ CFVFNVEYMNCWNSSSEPQPTNLTLYWYKNSDND KVQKCSHYLFSEEITSGCQLQKKEIHLYQTFVVQLQD PREPRRQATQMLKLQNLVIPWAPENLTLHKLSESQLEL NWNNRFLNHCLEHLVQYRTDWDHSWTEQSVDYRHK FSLPSVDGQKRYTFRVRSRFNPLCGSAQHWSEWSHPI HWGSNTSKENPFLFALEAVVISVGSMGLIISLLCVYFW LERTMPRIPLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAE SLQPDYSERLCLVSEIPPKGALGEGPGASPCNQHSPY WAPPCYTLKPET
5	白蛋白结合 肽	ICLPRWGCLW
6	Des Ala1 REH (STK-008)	PTSSSTKKTQLQLEHL <u>RLDLE</u> EMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVNLNAQS KNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFC <u>HSIISTLT</u>
7	Des Ala1 REK (STK-011)	PTSSSTKKTQLQLEHL <u>RLDLE</u> EMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVNLNAQ SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADET

		ATIVEFLNRWITFC <u>K</u> SIISTLT (SEQ ID NO:8)
[0610]	9	STK-014 PTSSSTSSSTA EAQQQQQQQQQQHLEQLRMDLEEL LSRMENYRNLKLPRMLTFKFYLPKQATELKDLQLED ELGPLRHVLDLTQS KSFSQLEDAENFISNIRVTVVKLKG SDNTFECQFDDESATVVDFLRRWIAFCHSIISTSPQ

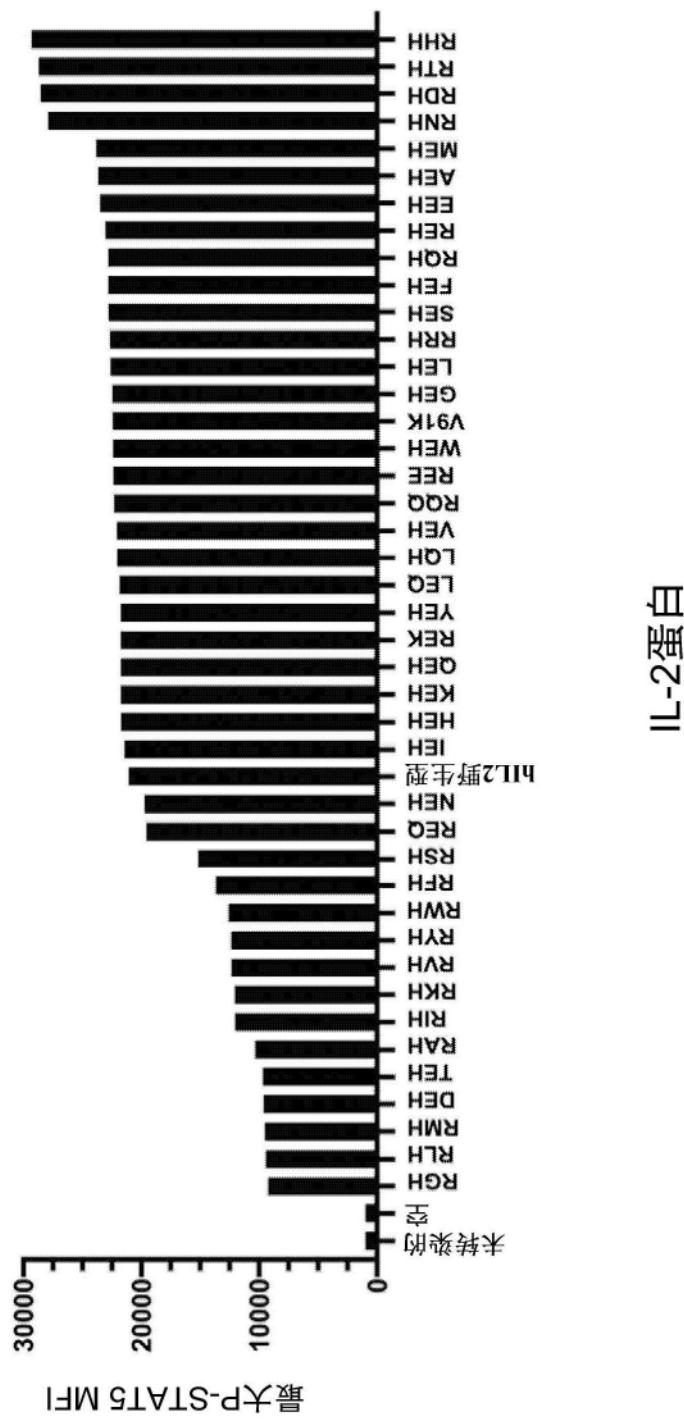


图1

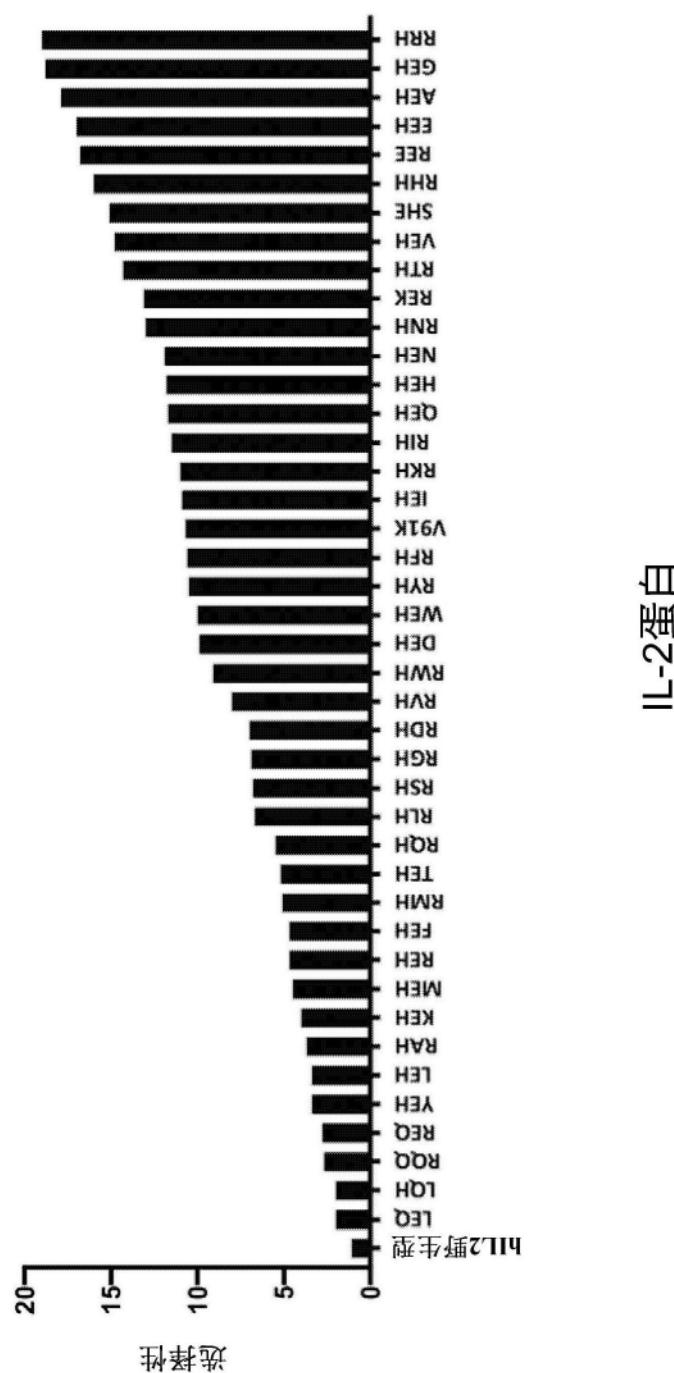


图2

图3

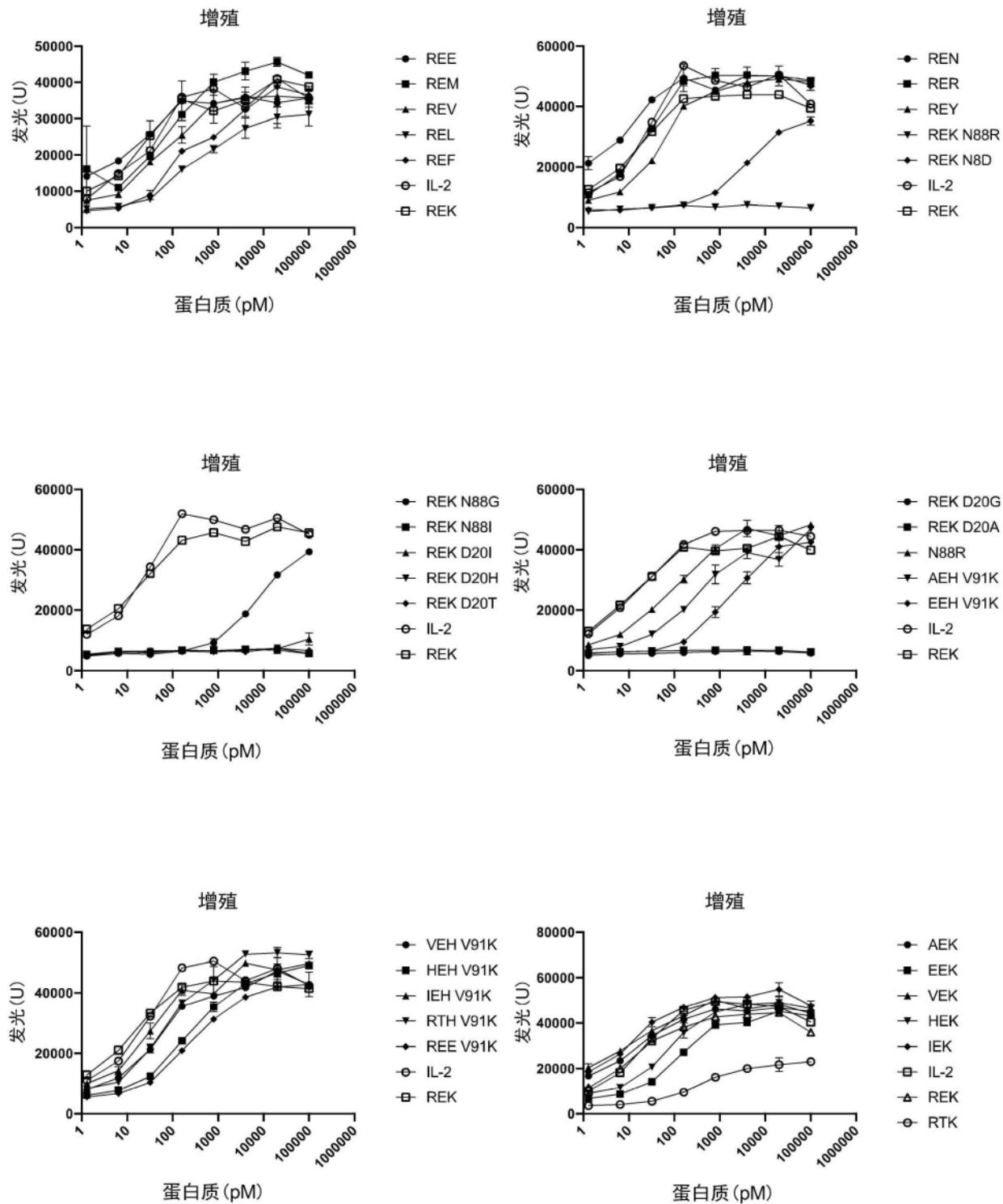


图4

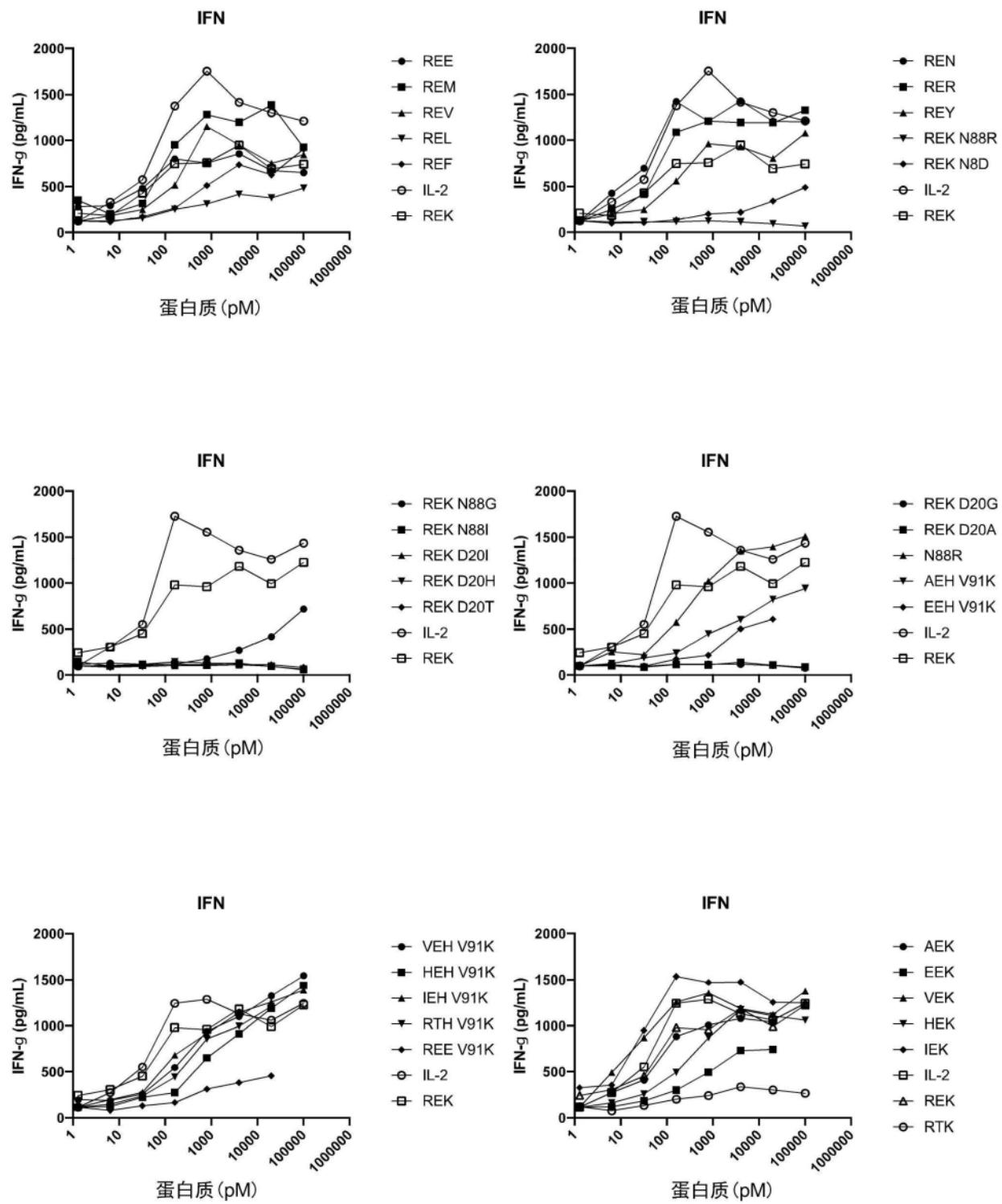


图5

流式细胞术以测量YT、YT CD25和NKL细胞的IL-2R表达

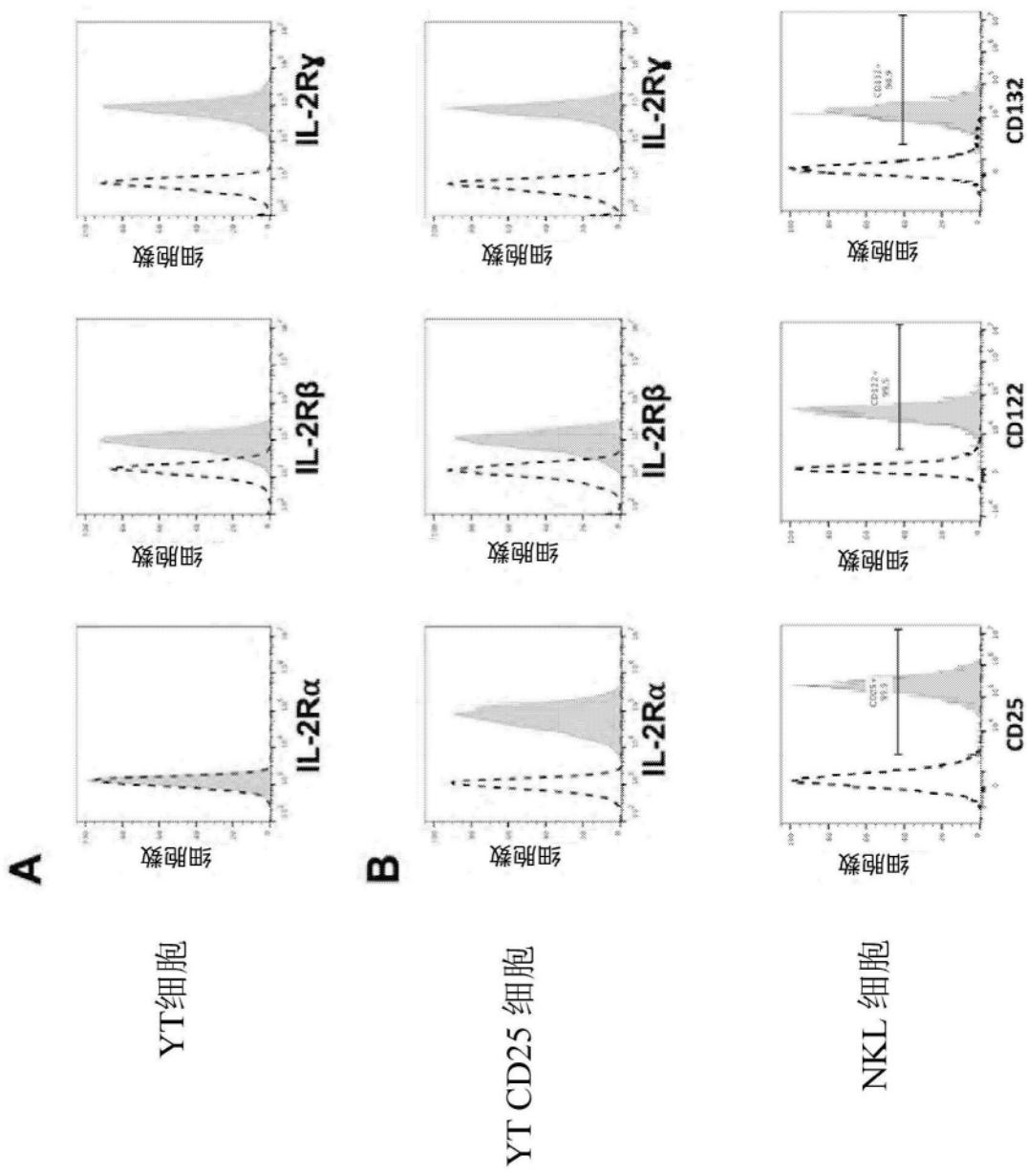


图6

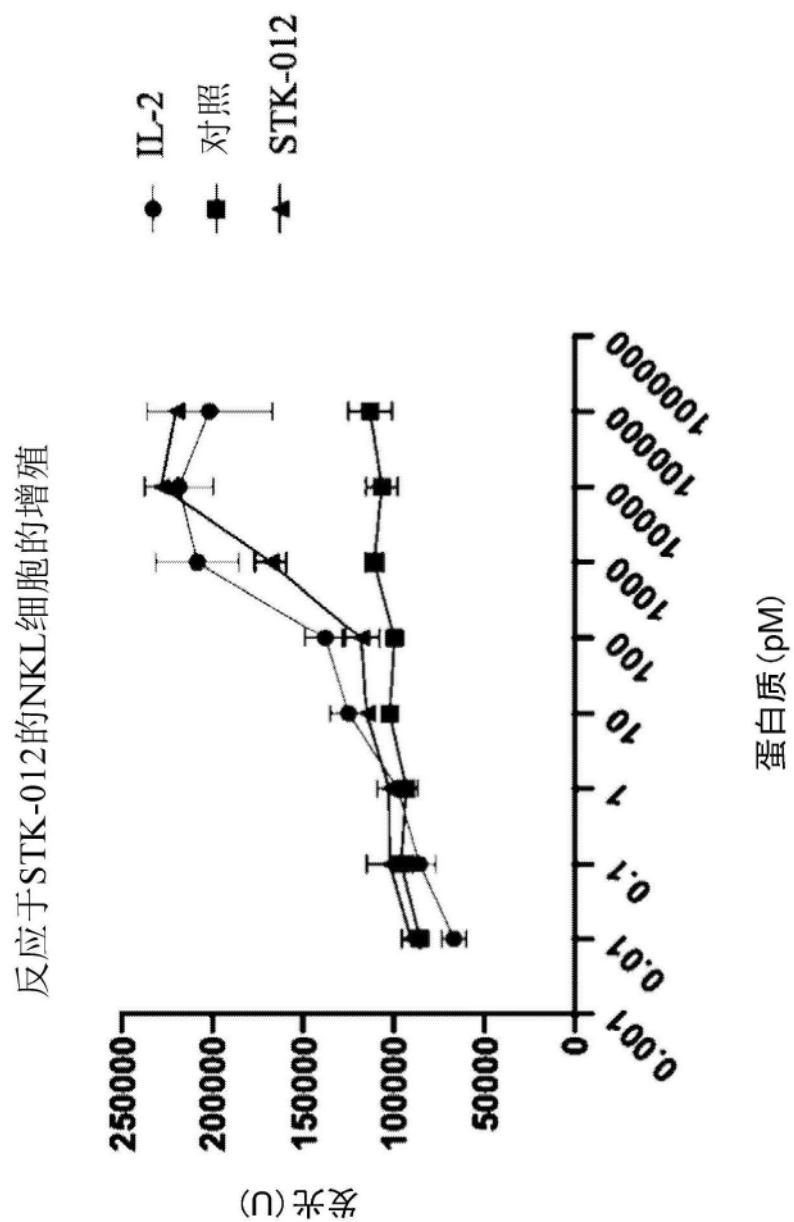


图7

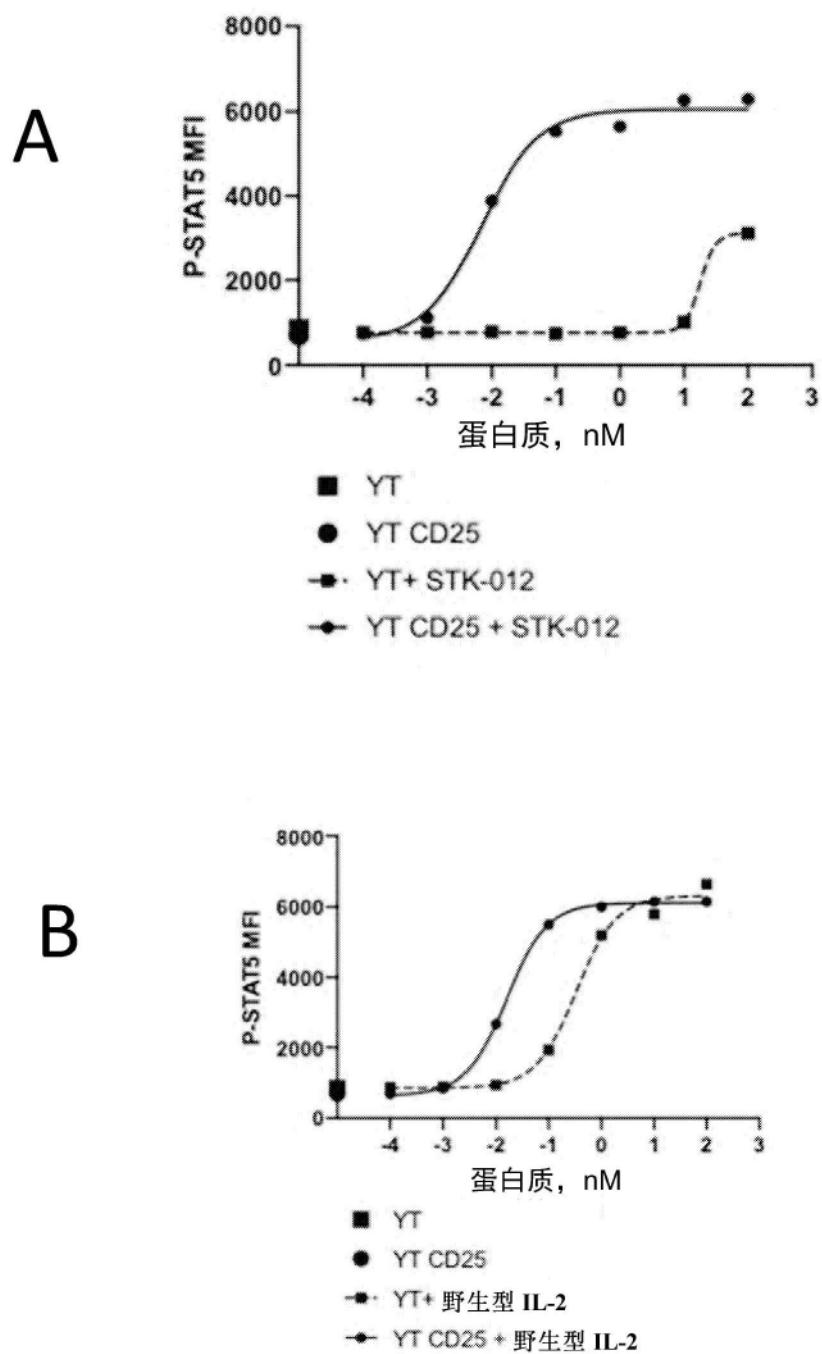


图8

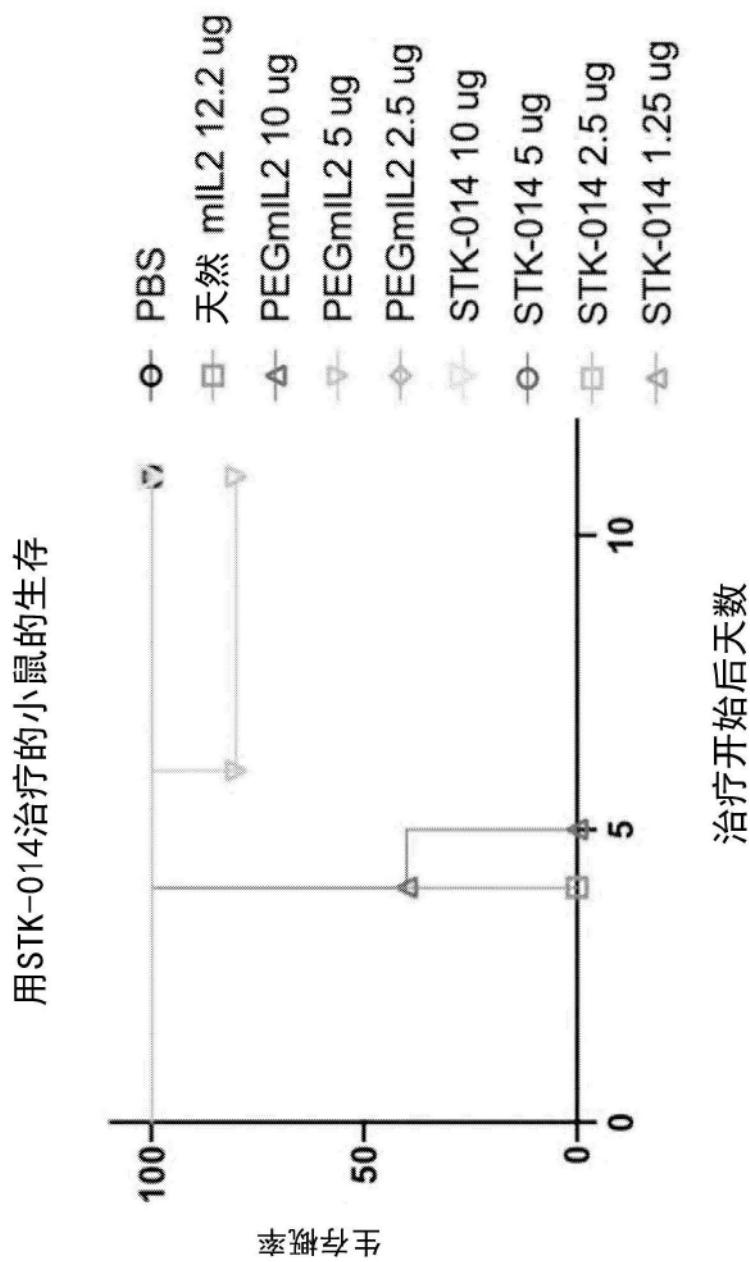


图9

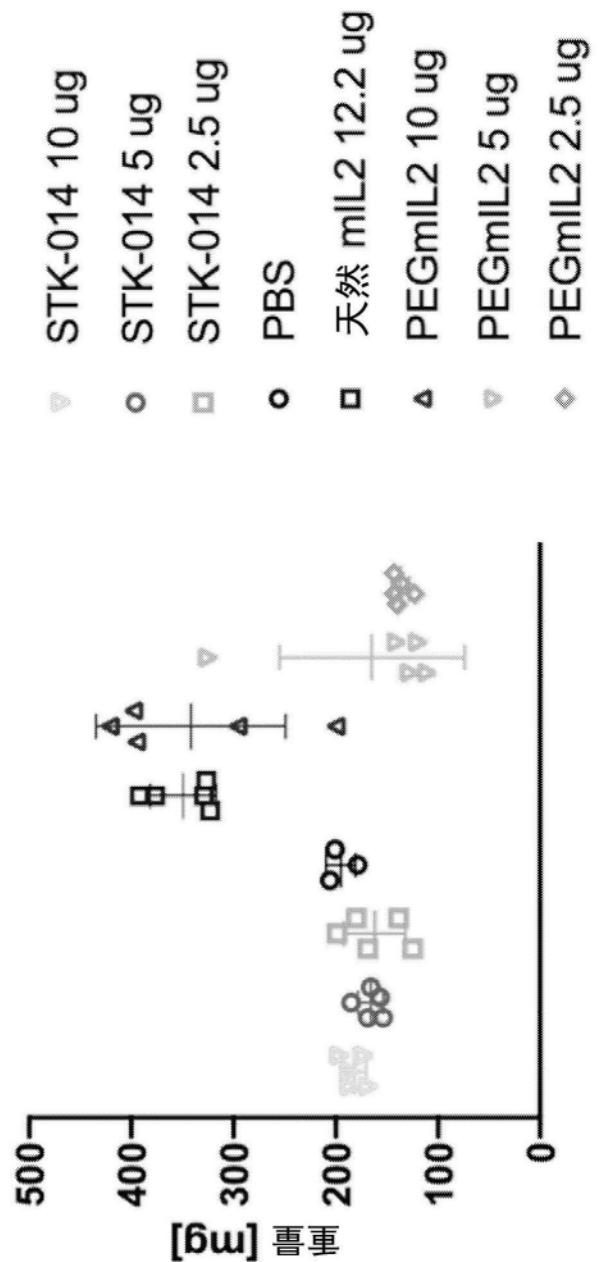


图10

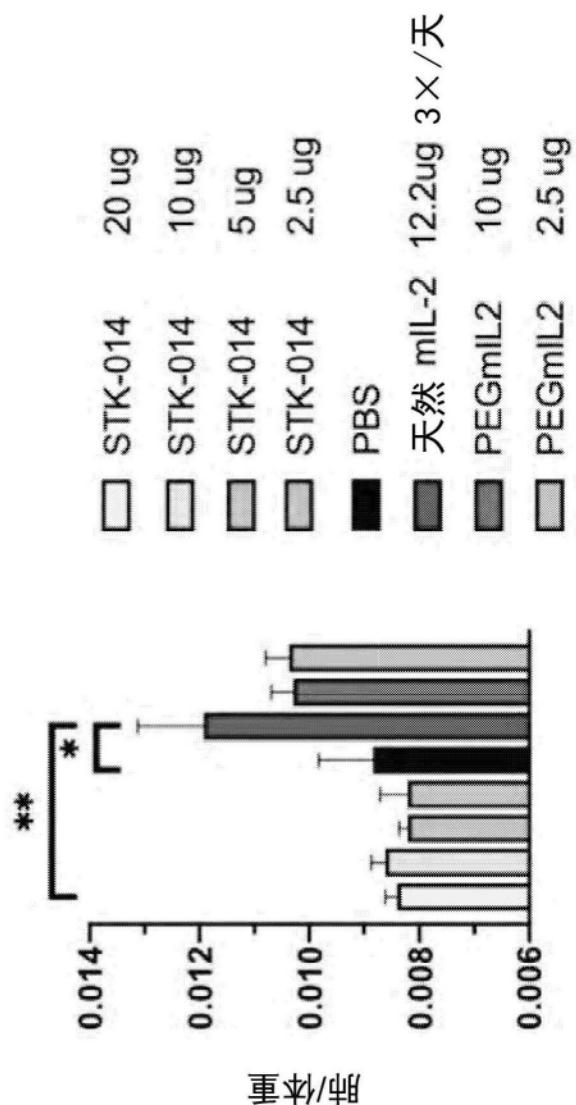


图11

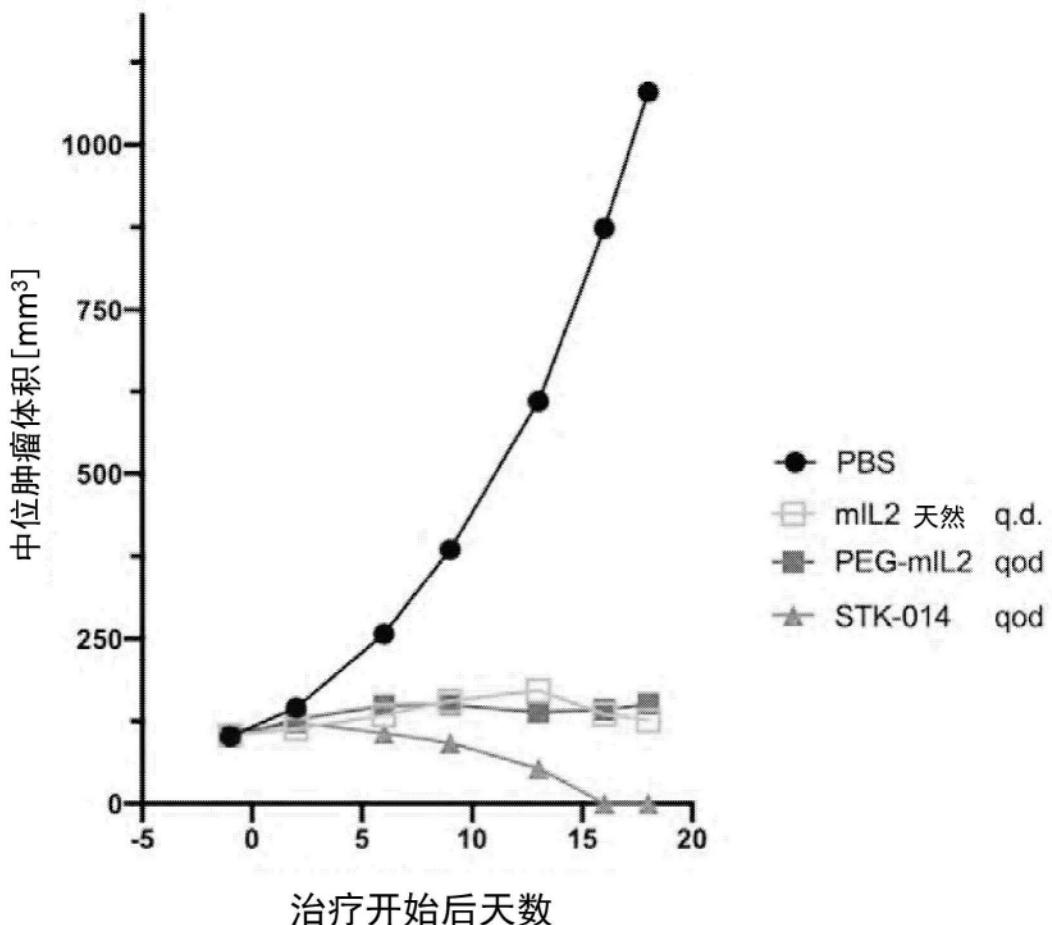


图12

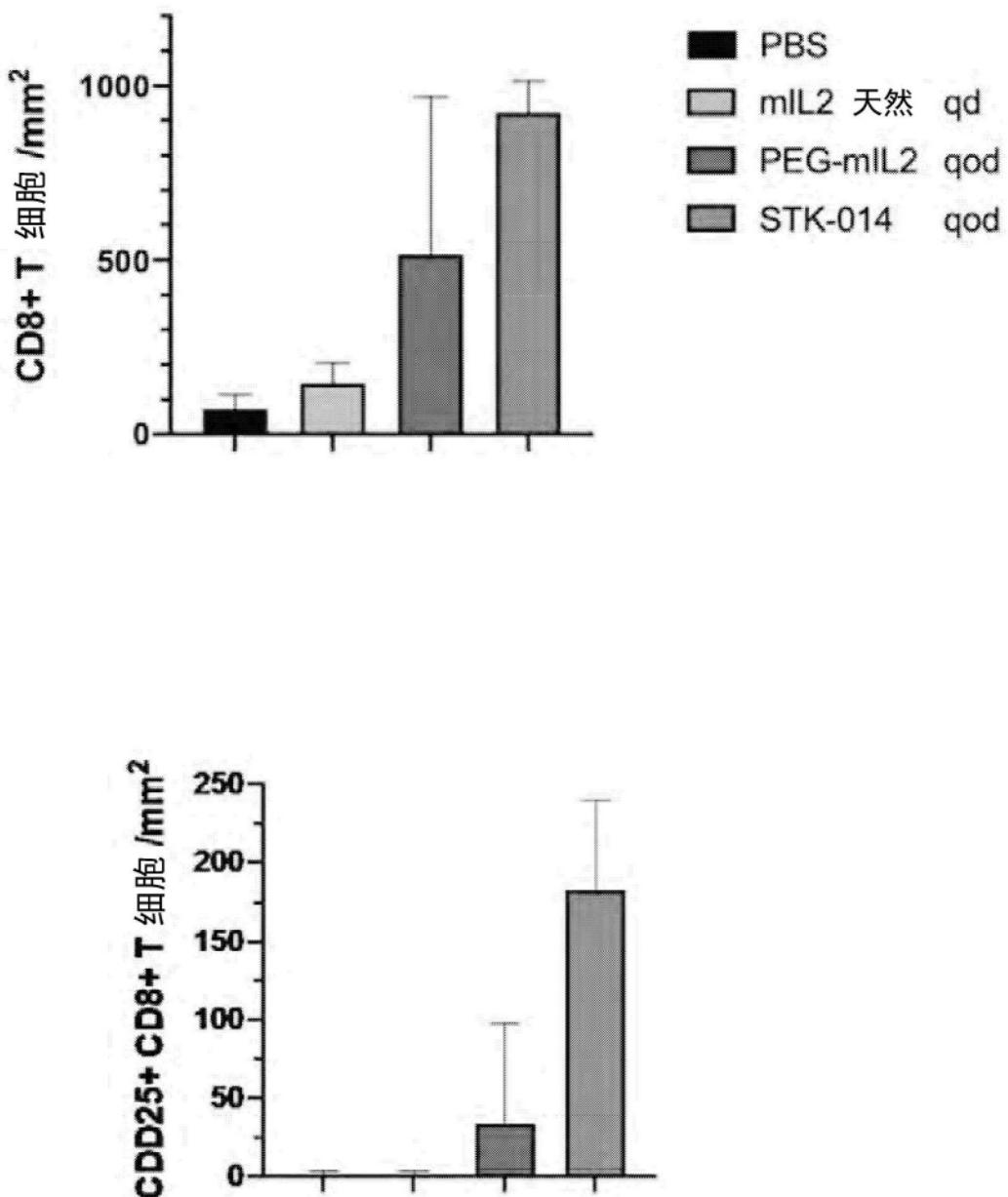


图13

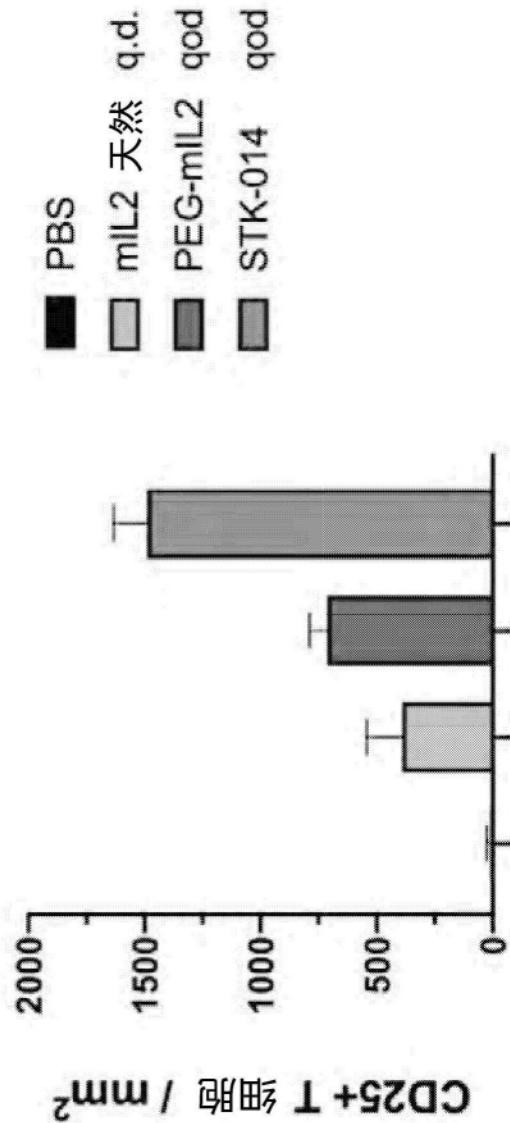


图14

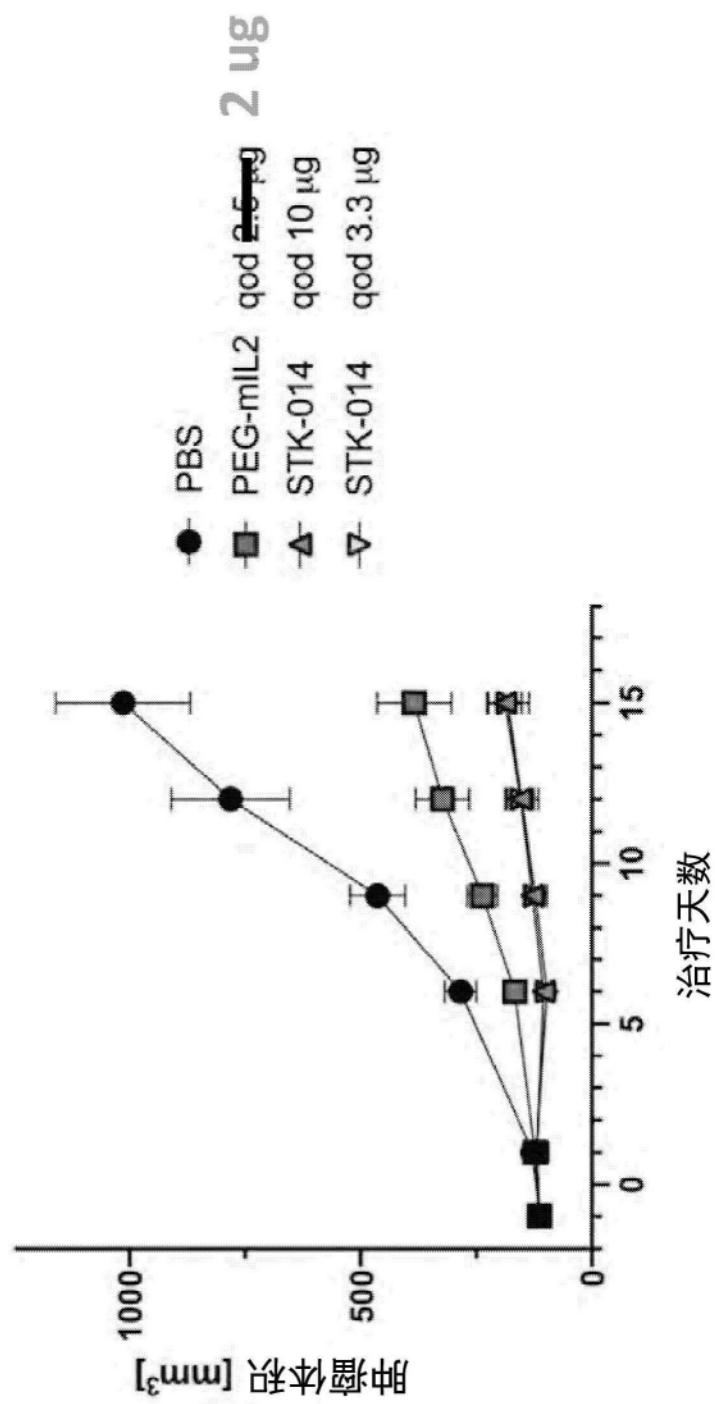
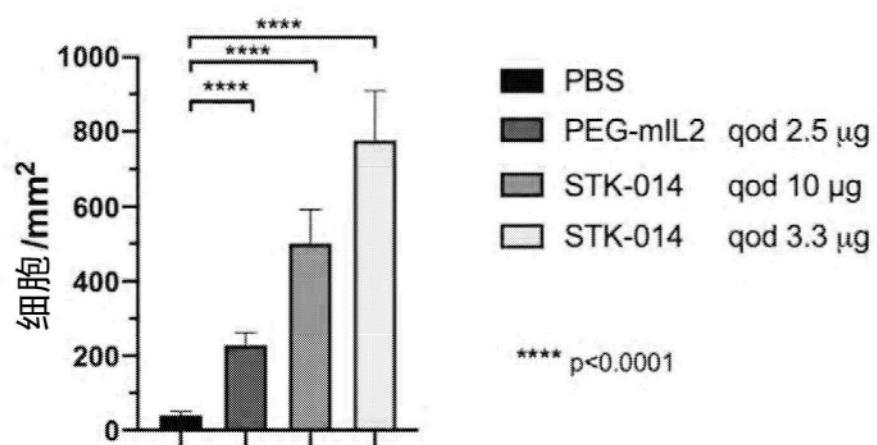


图15

A.



B.

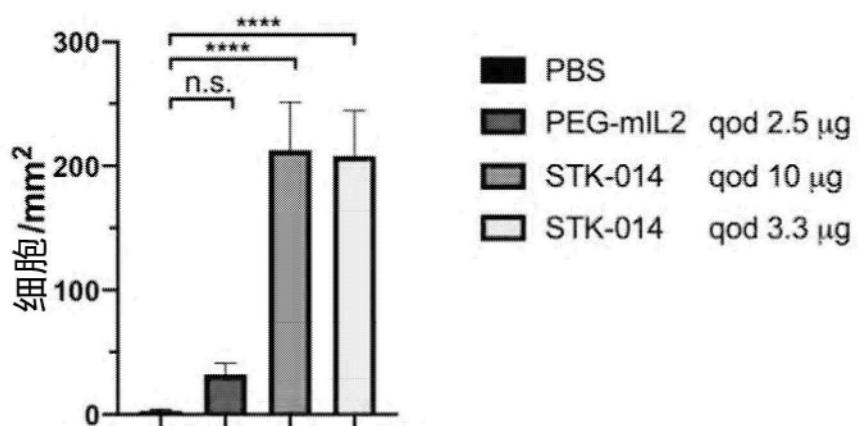


图16

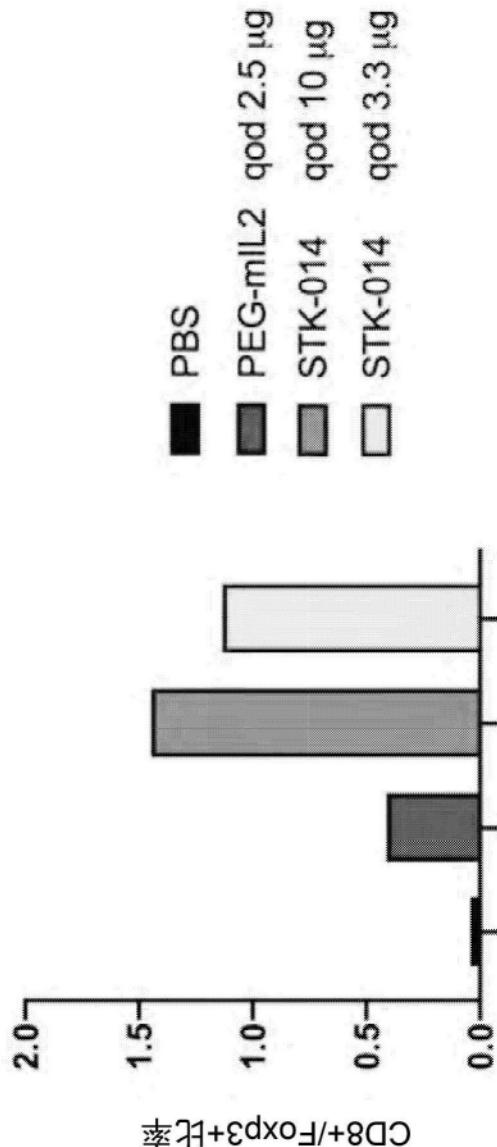


图17

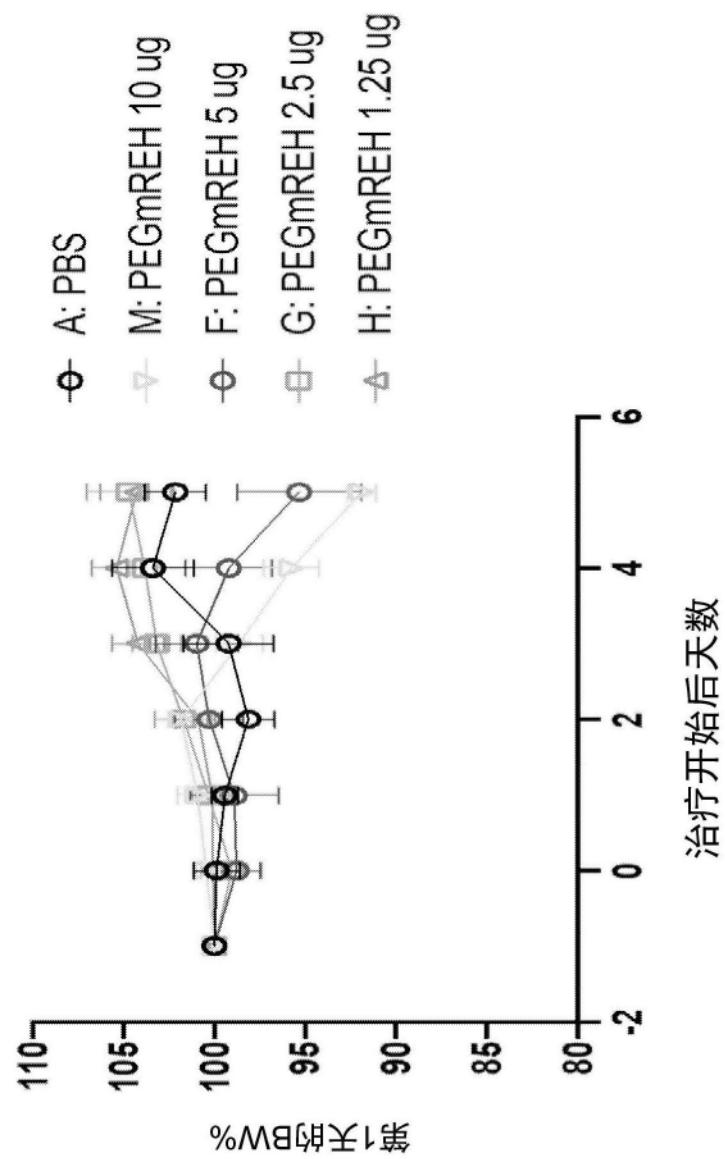


图18

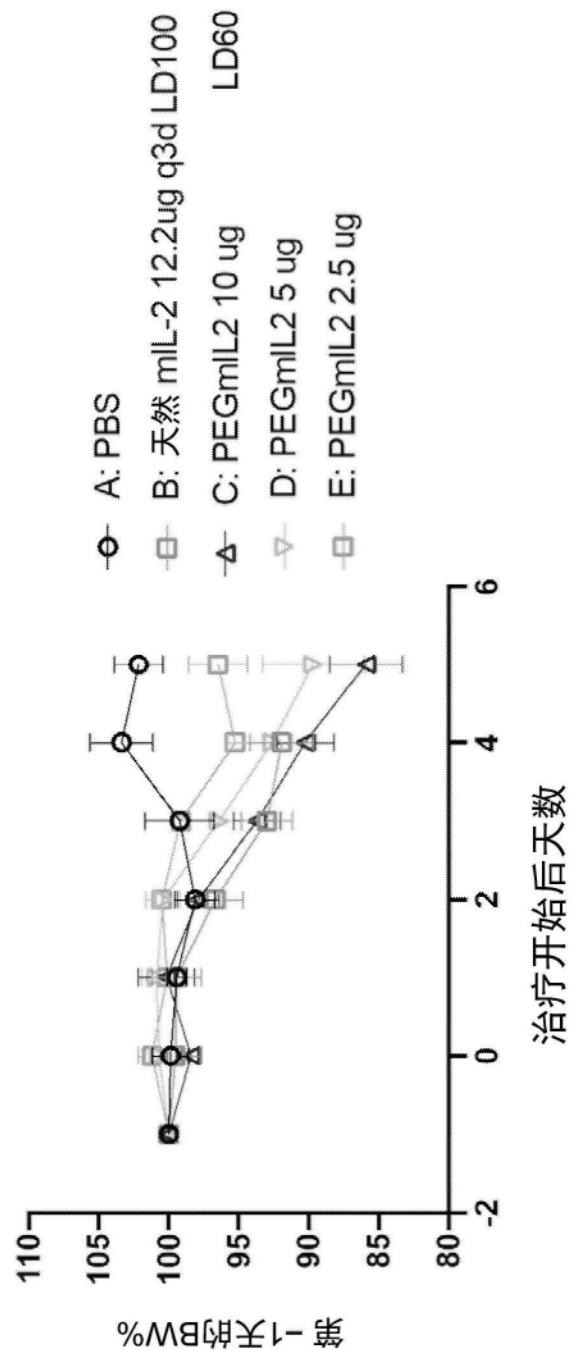


图19

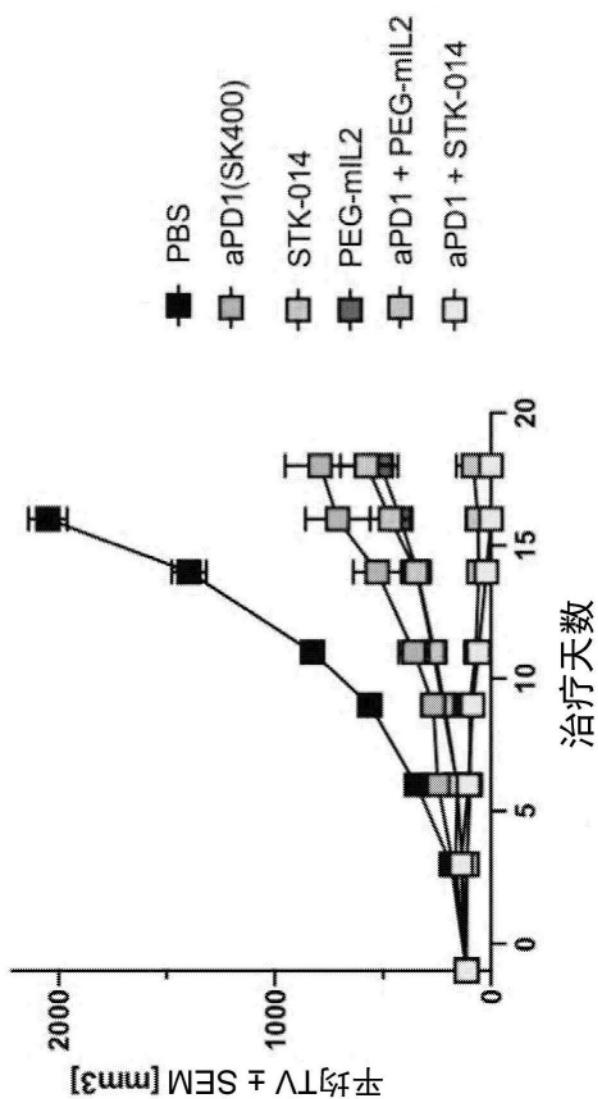


图20

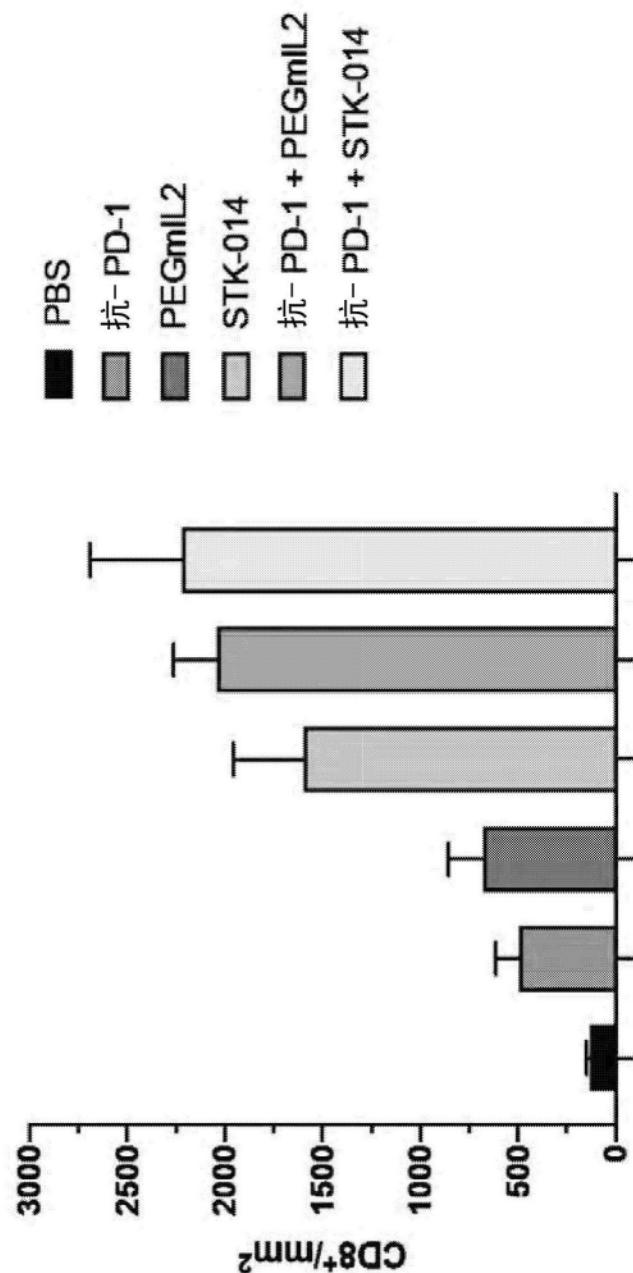


图21

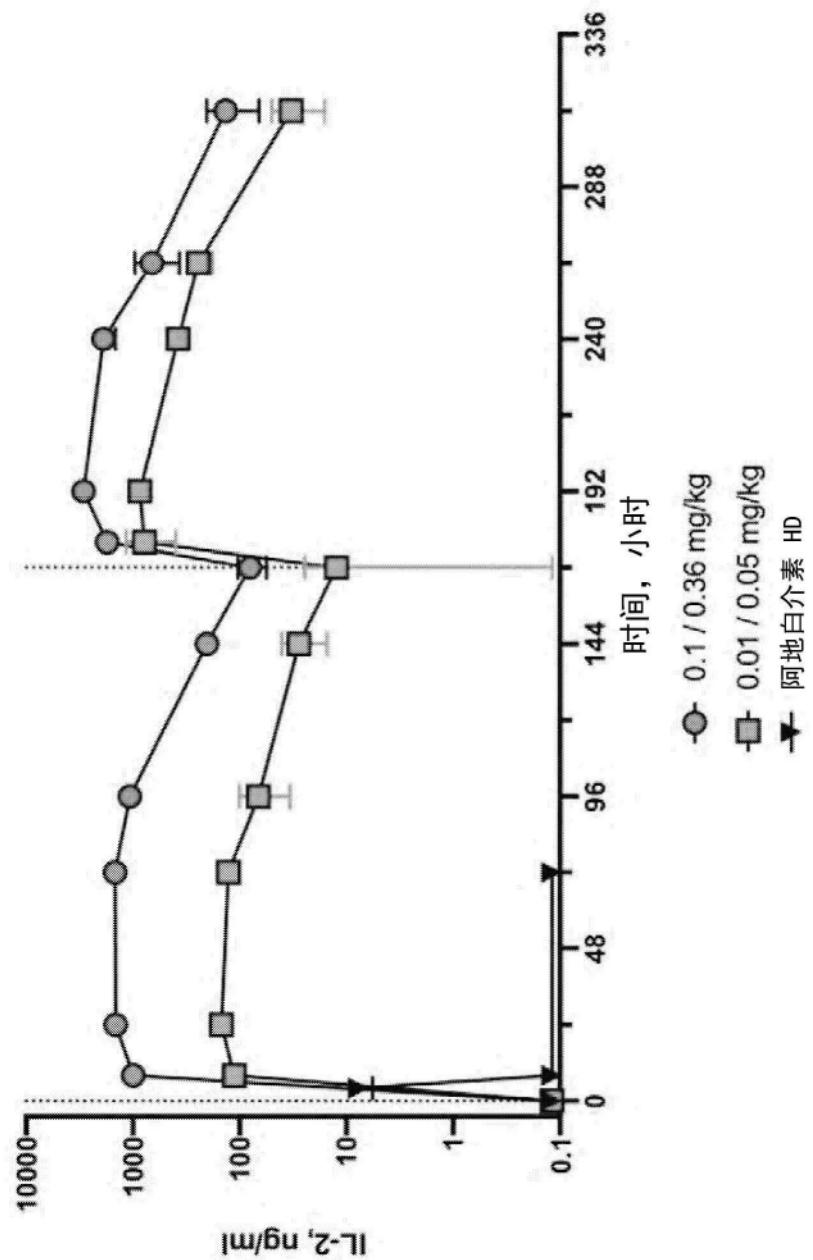


图22

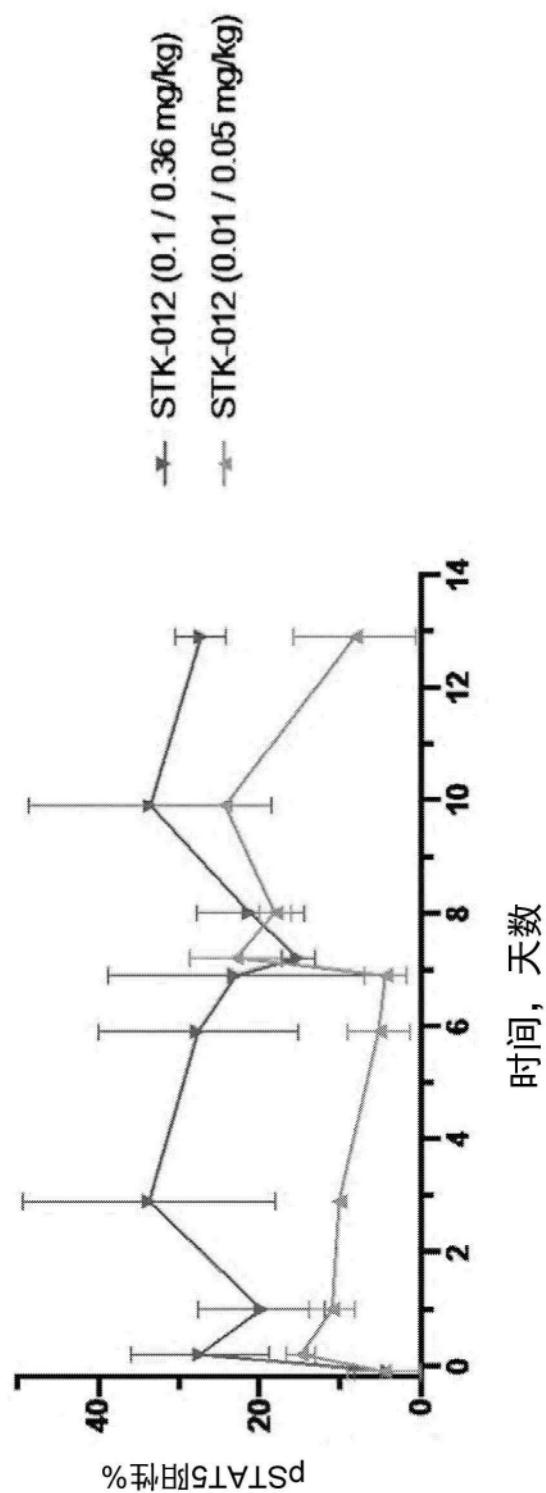


图23

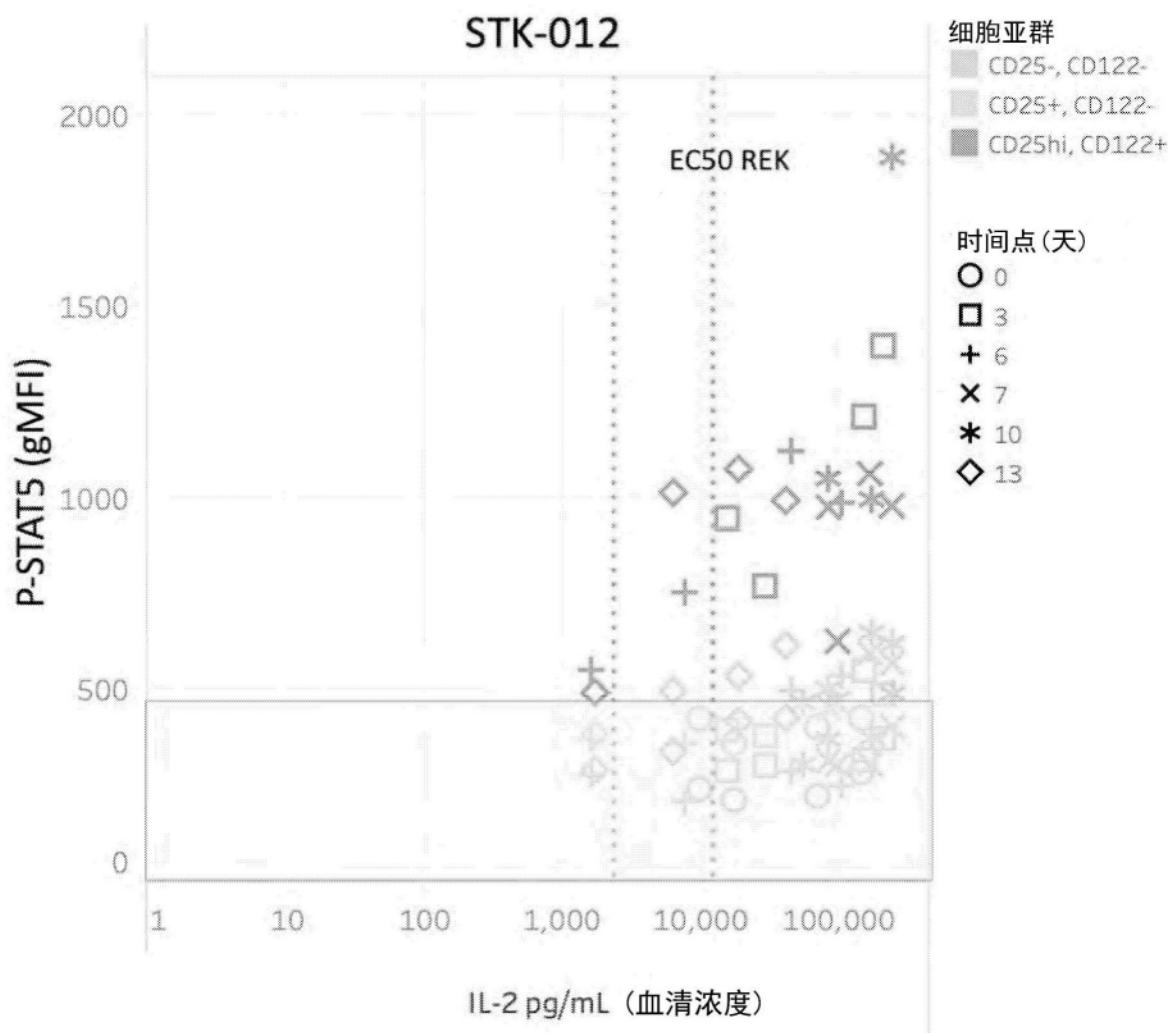


图24

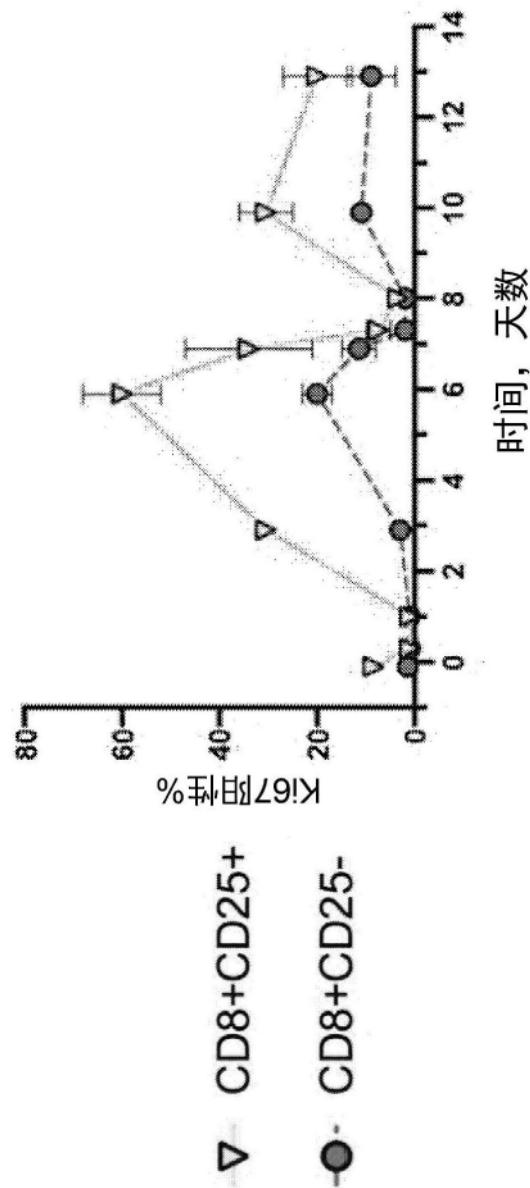


图25

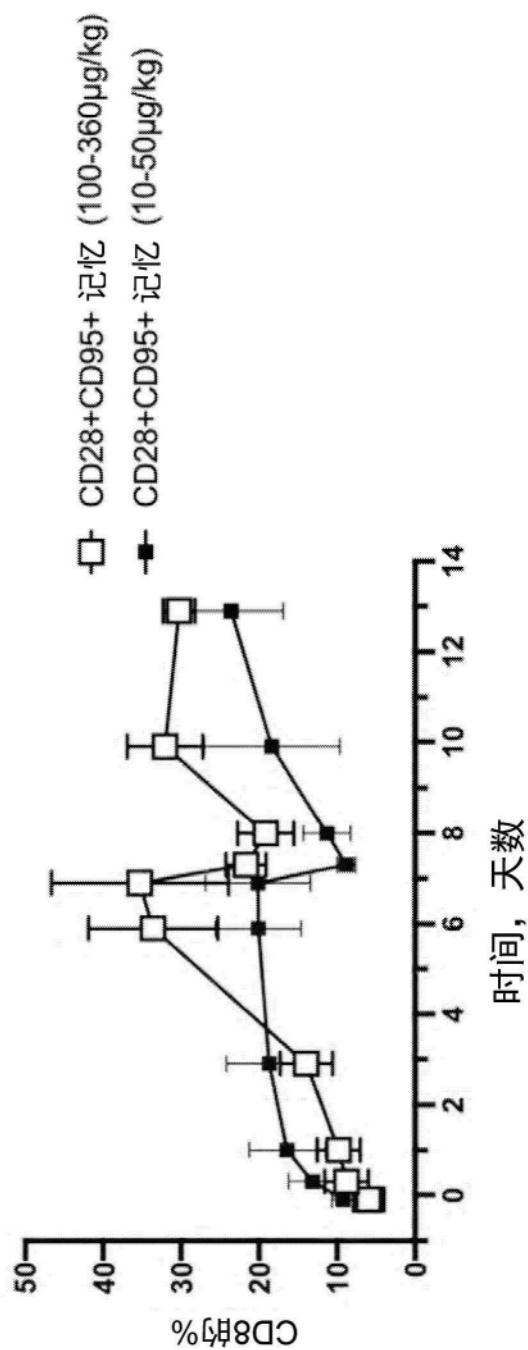


图26