



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110662762 A

(43)申请公布日 2020.01.07

(21)申请号 201880033883.2

(22)申请日 2018.05.22

(30)优先权数据

62/510,533 2017.05.24 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.11.22

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2018/053623 2018.05.22

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/215936 EN 2018.11.29

(71)申请人 诺华股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 J·迪恩 Y·迪亚兹-德-杜拉纳

M·迪多纳托 C·菲利皮

G·斯普拉贡

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 陈迎春 黄草生

(51)Int.Cl.

C07K 16/10(2006.01)

A61K 38/20(2006.01)

C07K 16/46(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

权利要求书3页 说明书46页

序列表47页 附图12页

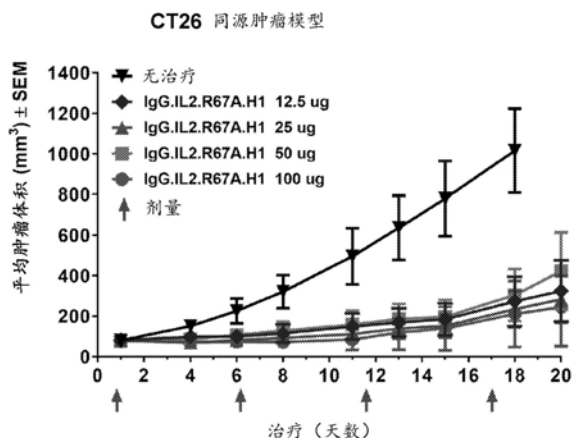
(54)发明名称

抗体细胞因子移植蛋白和用于治疗癌症的方法

(57)摘要

本披露提供了移植到抗体的CDR序列中的IL2,与临床上已知和使用的分子相比,其具有优选的治疗特性。特别地,所提供的抗体细胞因子移植蛋白组合物增加或维持CD8⁺T效应细胞,同时降低Treg细胞的活性。另外,所提供的组合物比重组人IL2配制品例如Proleukin®传达了改善的半衰期、稳定性和可生产性。

在CT26模型中, IgG.IL2R67A.H1显示了单一试剂功效



1. 一种抗体细胞因子移植蛋白,其包含:
 - (a) 重链可变区 (VH),所述重链可变区包含互补决定区 (CDR) HCDR1、HCDR2、HCDR3;和
 - (b) 轻链可变区 (VL),所述轻链可变区包含LCDR1、LCDR2、LCDR3;和
 - (c) 移植到所述VH或所述VL的CDR中的白细胞介素2 (IL2) 分子。
2. 如权利要求1所述的抗体细胞因子移植蛋白,其中所述IL2分子被移植到重链CDR中。
3. 如权利要求2所述的抗体细胞因子移植蛋白,其中重链CDR选自互补决定区1 (HCDR1)、互补决定区2 (HCDR2) 和互补决定区3 (HCDR3)。
4. 如权利要求3所述的抗体细胞因子移植蛋白,其中所述IL2分子被植到HCDR1中。
5. 如权利要求1所述的抗体细胞因子移植蛋白,其中所述IL2分子被移植到轻链CDR中。
6. 如权利要求5所述的抗体细胞因子移植蛋白,其中所述轻链CDR选自互补决定区1 (LCDR1)、互补决定区2 (LCDR2) 和互补决定区3 (LCDR3)。
7. 如权利要求1-6中任一项所述的抗体细胞因子移植蛋白,其中所述IL2分子含有突变,所述突变降低所述IL2分子对高亲和力IL2受体的亲和力。
8. 如权利要求1-7中任一项所述的抗体细胞因子移植蛋白,其中所述抗体细胞因子移植蛋白比重组IL2或**Proleukin®**,对CD8T效应细胞增殖刺激更大。
9. 如权利要求1-8中任一项所述的抗体细胞因子移植蛋白,其中所述抗体细胞因子移植蛋白比重组IL2或**Proleukin®**,对CD4T调节细胞增殖刺激更小。
10. 如权利要求1-9中任一项所述的抗体细胞因子移植蛋白,其中所述抗体细胞因子移植蛋白比重组IL2或**Proleukin®**,对NK细胞增殖刺激更大。
11. 如权利要求1-10中任一项所述的抗体细胞因子移植蛋白,其中所述抗体细胞因子移植蛋白比天然IL2或**Proleukin®**,具有更长半衰期。
12. 如权利要求1-11中任一项所述的抗体细胞因子移植蛋白,其中所述IL2分子由SEQ ID NO:4组成。
13. 如权利要求1-11中任一项所述的抗体细胞因子移植蛋白,其中所述IL2分子由SEQ ID NO:6组成。
14. 如权利要求1-13中任一项所述的抗体细胞因子移植蛋白,其进一步包含IgG类抗体重链。
15. 如权利要求14所述的抗体细胞因子移植蛋白,其中所述IgG类重链选自IgG1、IgG2和IgG4。
16. 如权利要求1-15中任一项所述的抗体细胞因子移植蛋白,其中所述CDR与靶标的结合特异性,通过所述移植IL2分子,降低了10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%或100%。
17. 如权利要求1-15中任一项所述的抗体细胞因子移植蛋白,其中所述CDR与靶标的结合特异性,在存在所述移植IL2分子的情况下,降低了10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%或100%。
18. 如权利要求1-17中任一项所述的抗体细胞因子移植蛋白,其中所述CDR的结合特异性不同于所述IL2分子的结合特异性。
19. 如权利要求1-18中任一项所述的抗体细胞因子移植蛋白,其中所述CDR的结合特异

性是针对非人抗原的。

20. 如权利要求19所述的抗体细胞因子移植蛋白,其中所述非人抗原是病毒。

21. 如权利要求20所述的抗体细胞因子移植蛋白,其中所述病毒是呼吸道合胞病毒(RSV)。

22. 如权利要求21所述的抗体细胞因子移植蛋白,其中所述RSV选自RSV亚组A和RSV亚组B。

23. 如权利要求1-22中任一项所述的抗体细胞因子移植蛋白,其中所述抗体细胞因子移植蛋白的抗体支架部分是人源化的或人的。

24. 一种抗体细胞因子移植蛋白,其包含:

(i) 重链可变区,所述重链可变区包含(a) SEQ ID NO:13的HCDR1、(b) SEQ ID NO:14的HCDR2、(c) SEQ ID NO:15的HCDR3,以及轻链可变区,所述轻链可变区包含:(d) SEQ ID NO:29的LCDR1、(e) SEQ ID NO:30的LCDR2、以及(f) SEQ ID NO:31的LCDR3;或

(ii) 重链可变区,所述重链可变区包含(a) SEQ ID NO:45的HCDR1、(b) SEQ ID NO:46的HCDR2、(c) SEQ ID NO:47的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含:(d) SEQ ID NO:61的LCDR1、(e) SEQ ID NO:62的LCDR2、以及(f) SEQ ID NO:63的LCDR3。

25. 一种抗体细胞因子移植蛋白,其包含:

(i) 含有SEQ ID NO:19的重链可变区(VH)、和含有SEQ ID NO:35的轻链可变区(VL);或

(ii) 含有SEQ ID NO:51的重链可变区(VH)、和含有SEQ ID NO:67的轻链可变区(VL)。

26. 如权利要求1-25中任一项所述的抗体细胞因子移植蛋白,其进一步包含对应于降低的效应子功能的经修饰的Fc区。

27. 如权利要求26所述的抗体细胞因子移植蛋白,其中所述经修饰的Fc区包含选自D265A、P329A、P329G、N297A、L234A和L235A中的一个或多个的突变。

28. 如权利要求27所述的抗体细胞因子移植蛋白,其中所述经修饰的Fc区包含选自D265A/P329A、D265A/N297A、L234/L235A、P329A/L234A/L235A和P329G/L234A/L235A中的一个或多个的突变的组合。

29. 一种抗体细胞因子移植蛋白,其包含SEQ ID NO:13的HCDR1、SEQ ID NO:14的HCDR2、SEQ ID NO:15的HCDR3、SEQ ID NO:29的LCDR1、SEQ ID NO:30的LCDR2、SEQ ID NO:31的LCDR3、含有所述突变D265A/P329A的经修饰的Fc区,其中当与**Proleukin®**相比时,所述抗体细胞因子移植蛋白刺激Treg细胞的激活较少。

30. 一种抗体细胞因子移植蛋白,其包含SEQ ID NO:45的HCDR1、SEQ ID NO:46的HCDR2、SEQ ID NO:47的HCDR3、SEQ ID NO:61的LCDR1、SEQ ID NO:62的LCDR2、SEQ ID NO:63的LCDR3、含有所述突变D265A/P329A的经修饰的Fc区,其中当与**Proleukin®**相比时,所述抗体细胞因子移植蛋白刺激Treg细胞的激活较少。

31. 一种分离的编码抗体细胞因子移植蛋白的核酸,所述抗体细胞因子移植蛋白包含:(i) SEQ ID NO:22的重链和SEQ ID NO:38的轻链;或(ii) SEQ ID NO:54的重链和SEQ ID NO:70的轻链。

32. 一种适于产生抗体细胞因子移植蛋白的重组宿主细胞,所述重组宿主细胞包含编码所述抗体细胞因子移植蛋白的重链和轻链多肽的如权利要求31所述的核酸,以及任选地分泌信号。

33. 如权利要求32所述的重组宿主细胞,其是哺乳动物细胞系。
34. 如权利要求33所述的重组宿主细胞,其中所述哺乳动物细胞系是CHO细胞系。
35. 一种药物组合物,其包含如权利要求1至30中任一项所述的抗体细胞因子移植蛋白,和药学上可接受的载体。
36. 一种在有需要的个体中治疗癌症的方法,所述方法包括向所述个体施用治疗有效量的如权利要求1-30中任一项所述的抗体细胞因子移植蛋白或如权利要求35所述的药物组合物。
37. 如权利要求36所述的方法,其中所述癌症选自下组,所述组由以下组成:黑色素瘤、肺癌、大肠癌、前列腺癌、乳腺癌和淋巴瘤。
38. 如权利要求36或37所述的方法,其中所述抗体细胞因子移植蛋白或药物组合物与另一种治疗剂组合施用。
39. 如权利要求38所述的方法,其中所述治疗剂是另一种抗体细胞因子移植蛋白。
40. 如权利要求38所述的方法,其中所述治疗剂是免疫检查点抑制剂。
41. 如权利要求40所述的方法,其中所述免疫检查点选自下组,所述组由以下组成:PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM3、CTLA-4、LAG-3、CEACAM-1、CEACAM-5、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和TGFR。
42. 一种在有需要的患者中扩增CD8 T效应细胞的方法,所述方法包括向所述患者施用如权利要求1-30中任一项所述的抗体细胞因子移植蛋白或如权利要求35所述的药物组合物。
43. 如权利要求42所述的方法,其中所述CD8 T效应细胞被扩增而Treg细胞不被扩增。
44. 如权利要求42所述的方法,其中所述CD8 T效应细胞被扩增而NK细胞不被扩增。
45. 如权利要求42-44中任一项所述的方法,所述方法还包括施用免疫检查点抑制剂。
46. 如权利要求45所述的方法,其中所述免疫检查点选自下组,所述组由以下组成:PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM3、CTLA-4、LAG-3、CEACAM-1、CEACAM-5、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和TGFR。
47. 抗体细胞因子移植蛋白在治疗癌症中的用途,所述抗体细胞因子移植蛋白包含:
- (i) 重链可变区,所述重链可变区包含(a) SEQ ID NO:13的HCDR1、(b) SEQ ID NO:14的HCDR2、(c) SEQ ID NO:15的HCDR3,以及轻链可变区,所述轻链可变区包含:(d) SEQ ID NO:29的LCDR1、(e) SEQ ID NO:30的LCDR2、以及(f) SEQ ID NO:31的LCDR3;或
- (ii) 重链可变区,所述重链可变区包含(a) SEQ ID NO:45的HCDR1、(b) SEQ ID NO:46的HCDR2、(c) SEQ ID NO:47的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含:(d) SEQ ID NO:61的LCDR1、(e) SEQ ID NO:62的LCDR2、以及(f) SEQ ID NO:63的LCDR3。
48. 如权利要求47所述的用途,其中所述抗体细胞因子移植蛋白与另一种治疗剂组合施用。
49. 如权利要求48所述的用途,其中所述治疗剂是免疫检查点抑制剂。
50. 如权利要求49所述的用途,其中所述免疫检查点选自下组,所述组由以下组成:PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM3、CTLA-4、LAG-3、CEACAM-1、CEACAM-5、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和TGFR。

抗体细胞因子移植蛋白和用于治疗癌症的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年5月24日提交的美国临时申请号62/510,533的权益,将其内容特此通过引用以其全文并入。

技术领域

[0003] 本发明涉及与白细胞介素2 (IL2) 低亲和力受体结合的抗体细胞因子移植蛋白,以及癌症治疗的方法。

[0004] 序列表

[0005] 本申请包含按ASCII格式以电子方式提交并且特此通过引用以其全文并入的序列表。所述ASCII副本创建于2018年4月5日,名称为PAT057462-W0-PCT_SL.txt,大小为69,489字节。

背景技术

[0006] IL2于1983年首次克隆 (Taniguchi等人,Nature[自然]1983,302:305-310,Devos等人,Nucleic Acid Res.[核酸研究]1983,11(13):4307-4323,Maeda等人,Biochem.Biophys.Res.Comm.[生物化学与生物物理研究通讯]1983,115:1040-1047)。IL2蛋白的长度为153个氨基酸,带有氨基酸1-20的信号肽,并且折叠成4个反平行的两亲性 α 螺旋结构 (Smith K.A.,Science[科学]1988,240:1169-1176)。

[0007] IL2通过经高亲和力或低亲和力受体信号传导介导其生物学作用 (Kreig等人,PNAS[美国国家科学院院刊]2010,107(26) 11906-11911)。高亲和力受体是三聚体,由IL2-R α (CD25)、IL2-R β (CD122) 和IL2-R γ (CD132) 组成。低亲和力受体是二聚体,仅由IL2-R β (CD122) 和IL2-R γ (CD132) 链组成。低亲和力受体与IL2结合,但其中亲和力比三聚体高亲和力受体低10-100倍,表明IL2-R α (CD25) 对于亲和力的增加很重要,但不是信号传导组分 (Kreig等人,同上)。IL2受体的表达也不同。高亲和力的IL2受体在激活的T细胞和CD4+/Foxp3+T调节细胞 (Treg) 上表达。相反,在CD8+T效应细胞和自然杀伤细胞 (NK) 上发现了低亲和力IL2受体。

[0008] 重组IL2 (rhIL2) 最初于1992年获批用于临床应用 (Coventry等人,Cancer Mgt Res.[癌症管理与研究]2012 4:215-221)。**Proleukin®** (阿地白介素 (Aldesleukin)) 是一种经修饰的IL2,所述IL2被无糖基化,缺乏N端丙氨酸,并且在氨基酸125上具有取代半胱氨酸的丝氨酸。**Proleukin®**最初被指定为恶性黑色素瘤和肾细胞癌的治疗方法,但已用于其他类型的癌症,例如结直肠癌、乳腺癌、肺癌和间皮瘤 (Coventry,同上)。一项从1986年至2006年对259例肾细胞癌患者进行的研究发现,23例患者完全缓解,并且30例部分缓解 (Klapper等人,Cancer[癌症]2008 113(2):293-301)。这占20%的总体客观缓解率,而在7%的肾细胞癌患者中肿瘤完全消退 (Klapper等人,同上)。

[0009] 然而,IL2治疗癌症并非没有副作用。259位患者的研究指出毛细血管/血管渗漏、血管舒张和尿少。还存在归因于中性粒细胞功能障碍的导管感染和普通感染的3级和4级感

染(Klapper等人,同上)。**Proleukin®**文献指出,**Proleukin®**与自身免疫疾病和炎性相关障碍的恶化有关,这些自身免疫疾病和炎性障碍例如克罗恩病、硬皮病、甲状腺炎、性关节炎、糖尿病、眼球-眼肌无力症、新月形IgA肾小球肾炎、胆囊炎、脑血管炎、史蒂文斯-约翰逊综合征和大疱性类天疱疮。

[0010] 发现Treg细胞组成型表达高亲和力IL2受体,并且针对存活和功能依赖IL2,这一发现表明为什么看到这种副作用(D' Cruz等人,Nat. Immuno.[自然免疫学]2005,6:1152-1159)。这说明需要具有改善的药代动力学和选择性通过低亲和力受体激活CD8+T细胞而不通过高亲和力受体激活Treg细胞的IL2治疗剂,因为这可以治疗癌症,而没有在**Proleukin®**的情况下所看到的不想要的副作用。

具体实施方式

[0011] 本披露提供了移植到抗体的CDR序列中的IL2,与临床上已知和使用的分子相比,其具有优选的治疗特性。特别地,所提供的抗体细胞因子移植蛋白组合物增加或维持CD8+T效应细胞,同时降低Treg细胞的活性。另外,所提供的组合物比重组人IL2配制品例如**Proleukin®**传达了改善的半衰期、稳定性和可生产性。因此,本披露提供了抗体细胞因子移植蛋白,其与IL2低亲和力受体结合并且通过IL2低亲和力受体促进了优选的信号传导,同时减少了与IL2高亲和力受体的结合。提供了抗体细胞因子移植蛋白,所述抗体细胞因子移植蛋白包含(i)免疫球蛋白重链序列,所述免疫球蛋白重链序列包含重链可变区(VH)和(ii)免疫球蛋白轻链序列,所述免疫球蛋白轻链序列包含轻链可变区(VL),并且其中将IL2分子移植到所述抗体的VH或VL的互补决定区(CDR)中。

[0012] 本披露的实施例提供了抗体细胞因子移植蛋白,其包含:

[0013] (a)重链可变区(VH),所述重链可变区包含互补决定区(CDR)HCDR1、HCDR2、HCDR3;和

[0014] (b)轻链可变区(VL),所述轻链可变区包含LCDR1、LCDR2、LCDR3;和

[0015] (c)移植到所述VH或所述VL的CDR中的白细胞介素2(IL2)分子。

[0016] 抗体细胞因子移植蛋白,其包含移植到重链CDR中的IL2分子。

[0017] 抗体细胞因子移植蛋白,其中IL2分子移植到选自以下的区域:互补决定区1(HCDR1)、互补决定区2(HCDR2)或互补决定区3(HCDR3)。

[0018] 抗体细胞因子移植蛋白,其包含移植到HCDR1中的IL2分子。

[0019] 抗体细胞因子移植蛋白,其包含移植到轻链CDR中的IL2分子。

[0020] 抗体细胞因子移植蛋白,其中IL2分子移植到选自以下的区域:互补决定区1(LCDR1)、互补决定区2(LCDR2)或互补决定区3(LCDR3)。

[0021] 抗体细胞因子移植蛋白,其包含IL2分子,所述IL2分子含有突变,所述突变降低所述IL2分子对高亲和力IL2受体的亲和力。

[0022] 抗体细胞因子移植蛋白,其中所述抗体细胞因子移植蛋白比重组IL2或**Proleukin®**,对CD8 T细胞效应子增殖刺激更小。

[0023] 抗体细胞因子移植蛋白,其中所述抗体细胞因子移植蛋白比重组IL2或**Proleukin®**,对Treg细胞增殖刺激更大。

[0024] 抗体细胞因子移植蛋白,其中所述抗体细胞因子移植蛋白比重组IL2或Proleukin®,对NK细胞增殖刺激更大。

[0025] 抗体细胞因子移植蛋白,其中所述抗体细胞因子移植蛋白比重组IL2或Proleukin®,具有更长半衰期。

[0026] 抗体细胞因子移植蛋白,其中所述IL2分子由SEQ ID NO:4组成。

[0027] 抗体细胞因子移植蛋白,其中所述IL2分子由SEQ ID NO:6组成。

[0028] 抗体细胞因子移植蛋白,其包含IgG类抗体重链。

[0029] 抗体细胞因子移植蛋白,其中所述IgG选自IgG1、IgG2或IgG4。

[0030] 抗体细胞因子移植蛋白,其中所述CDR与靶的结合特异性,通过所述移植的IL2分子,降低了10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%或100%。

[0031] 抗体细胞因子移植蛋白,其中所述CDR与靶的结合特异性,在存在所述移植的IL2分子的情况下,降低了10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%或100%。

[0032] 抗体细胞因子移植蛋白,其中所述CDR的结合特异性不同于所述IL2分子的结合特异性。

[0033] 抗体细胞因子移植蛋白,其中所述CDR的结合特异性是对非人靶的。

[0034] 抗体细胞因子移植蛋白,其中所述非人抗原是病毒。

[0035] 抗体细胞因子移植蛋白,其中所述病毒是呼吸道合胞病毒(RSV)。

[0036] 抗体细胞因子移植蛋白,其中所述RSV选自RSV亚组A和RSV亚组B。

[0037] 抗体细胞因子移植蛋白,其中所述抗体细胞因子移植蛋白的抗体支架部分是人源化的或人的。

[0038] 本披露的实施例提供了抗体细胞因子移植蛋白,所述抗体细胞因子移植蛋白包含:(i)重链可变区,所述重链可变区包含(a)SEQ ID NO:13的HCDR1、(b)SEQ ID NO:14的HCDR2、(c)SEQ ID NO:15的HCDR3,以及轻链可变区,所述轻链可变区包含:(d)SEQ ID NO:29的LCDR1、(e)SEQ ID NO:30的LCDR2、以及(f)SEQ ID NO:31的LCDR3;或(ii)重链可变区,所述重链可变区包含(a)SEQ ID NO:45的HCDR1、(b)SEQ ID NO:46的HCDR2、(c)SEQ ID NO:47的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含:(d)SEQ ID NO:61的LCDR1、(e)SEQ ID NO:62的LCDR2、以及(f)SEQ ID NO:63的LCDR3。

[0039] 本披露的实施例提供了抗体细胞因子移植蛋白,其包含:(i)含有SEQ ID NO:19的重链可变区(VH)、和含有SEQ ID NO:35的轻链可变区(VL);或(ii)含有SEQ ID NO:51的重链可变区(VH)、和含有SEQ ID NO:67的轻链可变区(VL)。

[0040] 抗体细胞因子移植蛋白,其中所述抗体包含对应于降低的效应子功能的经修饰的Fc区。

[0041] 抗体细胞因子移植蛋白,其中所述经修饰的Fc区包含选自D265A、P329A、P329G、N297A、L234A和L235A中的一个或多个的突变。

[0042] 抗体细胞因子移植蛋白,其中所述经修饰的Fc区包含选自D265A/P329A、D265A/N297A、L234/L235A、P329A/L234A/L235A和P329G/L234A/L235A中的一个或多个的突变的组合。

[0043] 本披露的实施例提供了一种抗体细胞因子移植蛋白,其包含SEQ ID NO:13的

HCDR1、SEQ ID NO:14的HCDR2、SEQ ID NO:15的HCDR3、SEQ ID NO:29的LCDR1、SEQ ID NO:30的LCDR2、SEQ ID NO:31的LCDR3、含有所述突变D265A/P329A的经修饰的Fc区,其中当与重组IL2或**Proleukin®**相比时,所述抗体细胞因子移植蛋白刺激更少的Treg细胞激活。

[0044] 本披露的实施例提供了一种抗体细胞因子移植蛋白,其包含SEQ ID NO:45的HCDR1、SEQ ID NO:46的HCDR2、SEQ ID NO:47的HCDR3、SEQ ID NO:61的LCDR1、SEQ ID NO:62的LCDR2、SEQ ID NO:63的LCDR3、含有所述突变D265A/P329A的经修饰的Fc区,其中当与重组IL2或**Proleukin®**相比时,所述抗体细胞因子移植蛋白刺激更少的Treg细胞激活。

[0045] 本披露的实施例提供了编码抗体细胞因子移植蛋白的分离的核酸,所述抗体细胞因子移植蛋白包含:(i) SEQ ID NO:22的重链和/或SEQ ID NO:38的轻链;或(ii) SEQ ID NO:54的重链和/或SEQ ID NO:70的轻链。

[0046] 本披露的实施例提供了适于产生抗体细胞因子移植蛋白的重组宿主细胞,所述重组宿主细胞包含本文披露的核酸,所述核酸编码所述蛋白的重链和轻链多肽,以及任选地分泌信号。

[0047] 重组宿主细胞,其是哺乳动物细胞系。

[0048] 重组宿主细胞,其中所述哺乳动物细胞系是CHO细胞系。

[0049] 本披露的实施例提供了药物组合物,其包含本文所披露的抗体细胞因子移植蛋白和一种或多种药学上可接受的载体。

[0050] 本披露的实施例提供了在有需要的个体中治疗癌症的方法,所述方法包括向所述个体施用治疗有效量的本文披露的抗体细胞因子移植蛋白或药物组合物。

[0051] 治疗癌症的方法,其中所述癌症选自下组,所述组由以下各项组成:黑色素瘤、肺癌、大肠癌、前列腺癌、乳腺癌和淋巴瘤。

[0052] 治疗癌症的方法,其中所述抗体细胞因子移植蛋白或所述药物组合物与另一种治疗剂组合施用。

[0053] 治疗癌症的方法,其中所述治疗剂是另一种抗体细胞因子移植蛋白。

[0054] 治疗癌症的方法,其中所述治疗剂是免疫检查点抑制剂。

[0055] 治疗癌症的方法,其中所述免疫检查点选自下组,所述组由以下各项组成:PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM3、CTLA-4、LAG-3、CEACAM-1、CEACAM-5、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和TGFR。

[0056] 本披露的实施例提供了在有需要的患者中扩增CD8 T效应细胞的方法,所述方法包括向所述患者施用本文所披露的抗体细胞因子移植蛋白或药物组合物。

[0057] 扩增CD8 T效应细胞的方法,其中CD8 T效应细胞被扩增而Treg细胞不被扩增。

[0058] 扩增CD8 T效应细胞的方法,其中CD8 T效应细胞被扩增而NK细胞不被扩增。

[0059] 扩增CD8 T效应细胞的方法,所述方法进一步包括施用免疫检查点抑制剂。

[0060] 扩增CD8 T效应细胞的方法,其中所述免疫检查点选自下组,所述组由以下组成:PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM3、CTLA-4、LAG-3、CEACAM-1、CEACAM-5、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和TGFR。

[0061] 本披露的实施例提供了抗体细胞因子移植蛋白在治疗癌症中的用途,所述抗体细胞因子移植蛋白包含:(i) 重链可变区,所述重链可变区包含(a) SEQ ID NO:13的HCDR1、(b) SEQ ID NO:14的HCDR2、(c) SEQ ID NO:15的HCDR3,以及轻链可变区,所述轻链可变区包含:

(d) SEQ ID NO:29的LCDR1、(e) SEQ ID NO:30的LCDR2、以及(f) SEQ ID NO:31的LCDR3;以及(ii)重链可变区,所述重链可变区包含(a) SEQ ID NO:45的HCDR1、(b) SEQ ID NO:46的HCDR2、(c) SEQ ID NO:47的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含:(d) SEQ ID NO:61的LCDR1、(e) SEQ ID NO:62的LCDR2、以及(f) SEQ ID NO:63的LCDR3。

[0062] 抗体细胞因子移植蛋白在治疗癌症中的用途,其中所述抗体细胞因子移植蛋白与另一种治疗剂组合施用。

[0063] 抗体细胞因子移植蛋白的用途,其中所述治疗剂是免疫检查点抑制剂的拮抗剂。

[0064] 用途,其中所述免疫检查点抑制剂的拮抗剂选自下组,所述组由以下组成:PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM3、CTLA-4、LAG-3、CEACAM-1、CEACAM-5、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和TGFR。

[0065] 在某些实施例中,抗体细胞因子移植蛋白包含IgG类抗体Fc区。在特定的实施例中,免疫球蛋白选自IgG1、IgG2或IgG4亚类Fc区。抗体、抗体片段、或抗原结合分子任选地含有至少一个修饰,其调节(即,增加或减少)抗体或抗体片段与Fc受体的结合。免疫球蛋白重链可任选地包含赋予经修饰的效应子功能的修饰。在特定的实施例中,免疫球蛋白重链可包含选自以下中任一种的赋予降低的效应子功能的突变:D265A、P329A、P329G、N297A、D265A/P329A、D265A/N297A、L234/L235A、P329A/L234A/L235A和P329G/L234A/L235A。

[0066] 在一些实施例中,抗体细胞因子移植蛋白也包含分子IL2部分的变异。所述变异可以是单个氨基酸变化、单个氨基酸缺失、多个氨基酸变化和多个氨基酸缺失。分子的IL2细胞因子部分的这些变化会降低抗体细胞因子移植蛋白对高亲和力IL2受体的亲和力。

[0067] 此外,本披露提供了编码如本文所述的抗体细胞因子移植蛋白的至少重链和/或轻链蛋白的多核苷酸。在另一相关方面,提供了适合于产生如本文所述的抗体细胞因子移植蛋白的宿主细胞。在特定的实施例中,宿主细胞包含编码抗体细胞因子移植蛋白的轻链和/或重链多肽的核酸。在仍另一方面,提供了产生抗体细胞因子移植蛋白的方法,这些方法包括在适合于抗体细胞因子移植蛋白的表达、形成和分泌条件下培养如本文所述的提供的宿主细胞,并且从培养物中回收抗体细胞因子移植蛋白。在另一方面,本披露进一步提供了试剂盒,这些试剂盒包含抗体细胞因子移植蛋白,如本文所述。

[0068] 在另一相关方面,本披露进一步提供了组合物,这些组合物包含抗体细胞因子移植蛋白,如本文所述,和药学上可接受的载体。在一些实施例中,本披露提供了用于向个体施用的包含抗体细胞因子移植蛋白的药物组合物。

[0069] 在另一方面,在有需要的个体中治疗癌症的方法,所述方法包括向该个体施用治疗有效量的抗体细胞因子移植蛋白,如本文所述。在另一方面,提供了抗体细胞因子移植蛋白,其用于治疗或预防个体中的癌症。

[0070] 在一些实施例中,患者患有细胞增殖障碍或癌症,例如,黑色素瘤、肺癌、大肠癌、前列腺癌、乳腺癌和淋巴瘤。

[0071] 定义

[0072] “抗体”是指包含四聚体结构单元的免疫球蛋白家族的分子。每个四聚体由两对相同的多肽链组成,每对具有通过二硫键连接的一条“轻”链(约25kD)和一条“重”链(约50-70kD)。公认的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因,以及无数的免疫球蛋白可变区基因。轻链分为 κ 或 λ 。重链分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,这些分别定义了免疫球蛋白类别IgG、

IgM、IgA、IgD和IgE。抗体可以是任何同种型/类别(例如IgG、IgM、IgA、IgD和IgE)或任何亚类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2)。

[0073] 将轻链和重链二者分成结构同源性区和功能同源性区。所述术语“恒定”和“可变”是在结构和功能上使用。每个链的N端定义了具有约100至110个或更多个氨基酸的一个可变(V)区或结构域,主要负责抗原识别。术语可变轻链(V_L)和可变重链(V_H)分别指轻链和重链的这些区域。 V_H 和 V_L 的配对一起形成单个抗原结合位点。除V区外,重链和轻链均含有恒定的(C)区或结构域。免疫球蛋白C区的分泌形式由三个C结构域,CH1、CH2、CH3,任选地CH4(C μ),和一个铰链区组成。膜结合形式的免疫球蛋白C区也具有膜结构域和细胞内结构域。每个轻链在N端都具有一个 V_L ,在其另一端带有一个恒定结构域(C)。轻链(CL)和重链(CH1、CH2或CH3)的恒定结构域赋予重要生物学特性例如分泌、经胎盘移动性(transplacental mobility)、Fc受体结合、补体结合等。按照惯例,恒定区结构域离抗体的抗原结合位点或者氨基末端越远,它的编号越大。N末端是可变区并且在C末端是恒定区;CH3和CL结构域实际上分别包含重链和轻链的羧基末端结构域。 V_L 与 V_H 对齐并且CL与重链的首个恒定结构域对齐。如本文所用,“抗体”涵盖常规抗体结构和抗体的变异。因此,在该概念的范围内的抗体细胞因子移植蛋白、全长抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体及其抗体片段。

[0074] 抗体以完整的免疫球蛋白链形式存在,或以用各种肽酶消化产生的许多充分表征的抗体片段形式存在。如本文所用,术语“抗体片段”是指保留六个CDR的抗体的一个或多个部分。因此,例如,胃蛋白酶消化铰链区中二硫键下方的抗体,以产生 $F(ab)'_2$,这是 Fab' 的二聚体,其本身是一条通过二硫键与 V_H -CH1连接的轻链。 $F(ab)'_2$ 可以在温和的条件下还原,以破坏铰链区的二硫键,从而将 $F(ab)'_2$ 二聚体转化为 Fab' 单体。 Fab' 单体本质上是具有一部分铰链区的 Fab (Paul, Fundamental Immunology[基础免疫学]第3版(1993))。虽然就完整抗体的消化而言定义了各种抗体片段,但是技术人员将理解,可以化学或通过使用重组DNA方法从头合成此类片段。如本文所用,“抗体片段”是指抗体的一个或多个部分,其通过修饰完整抗体或使用重组DNA方法从头合成而产生,其保留结合特异性和功能活性。抗体片段的实例包括Fv片段,单链抗体(ScFv)、 Fab 、 Fab' 、Fd(V_H 和CH1结构域)、dAb(V_H 和分离的CDR)以及具有相同的结合特异性的这些片段的多聚体形式(例如, $F(ab')_2$)。抗体细胞因子移植蛋白也可以包含实现所期望的结合特异性和活性所必需的抗体片段。

[0075] 在上下文中使用的“ Fab ”结构域包含重链可变结构域、恒定区CH1结构域、轻链可变结构域和轻链恒定区CL结构域。结构域之间的相互作用通过CH1和CL结构域之间的二硫键稳定。在一些实施例中, Fab 的重链结构域按从N末端至C末端的顺序,为 V_H -CH,并且 Fab 的轻链结构域按从N末端至C末端的顺序,为 V_L -CL。在一些实施例中, Fab 的重链结构域按从N末端至C末端的顺序,为CH- V_H ,并且 Fab 的轻链结构域按顺序,为CL- V_L 。在本披露的上下文中,尽管 Fab 片段在历史上是通过木瓜蛋白酶消化完整的免疫球蛋白来鉴定的,但是“ Fab ”通常是通过任何方法重组产生的。每个 Fab 片段在抗原结合方面是单价的,即,它具有单个抗原结合位点。

[0076] “互补性决定结构域”或“互补决定区”(“CDR”)可互换地是指 V_L 和 V_H 的高变区。CDR是抗体链的靶蛋白结合位点,该结合位点携带针对这种靶蛋白的特异性。每种人 V_L 或 V_H 中存在三个CDR(CDR1-3,从N末端顺序编号),构成约15%-20%的可变结构域。CDR在结构上与靶

蛋白的表位互补并且因此直接负责结合特异性。剩余的V_L或V_H区段(所谓的框架区(FR))表现出较少的氨基酸序列变异(Kuby, Immunology[免疫学], 第4版, 第4章, W.H. Freeman & Co. [W.H. 弗里曼公司], 纽约, 2000)。

[0077] CDR和框架区的位置可以使用本领域熟知的多种定义确定, 例如, 卡巴特(Kabat)、乔西亚(Chothia)、和AbM(参见, 例如, Kabat等人1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest[免疫学相关蛋白序列], 第五版, U.S. Department of Health and Human Services[美国卫生与公众服务部], NIH公开号91-3242, Johnson等人, Nucleic Acids Res.[核酸研究], 29:205-206 (2001); Chothia和Lesk, J. Mol. Biol.[分子生物学杂志], 196:901-917 (1987); Chothia等人, Nature[自然], 342:877-883 (1989); Chothia等人, J. Mol. Biol.[分子生物学杂志], 227:799-817 (1992); Al-Lazikani等人, J. Mol. Biol.[分子生物学杂志], 273:927-748 (1997))。抗原结合位点的定义还在以下文献中描述: Ruiz等人, Nucleic Acids Res.[核酸研究], 28:219-221 (2000); 和Lefranc, M.P., Nucleic Acids Res.[核酸研究], 29:207-209 (2001); (免疫遗传学 (IMGT) 编号) Lefranc, M.-P., The Immunologist[免疫学家], 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P.等人, Dev. Comp. Immunol.[发育与比较免疫学], 27, 55-77 (2003); MacCallum等人, J. Mol. Biol.[分子生物学杂志], 262:732-745 (1996); 和Martin等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA[美国国家科学院院刊], 86:9268-9272 (1989); Martin等人, Methods Enzymol.[酶学方法], 203:121-153 (1991); 和Rees等人, 于: Sternberg M.J.E. (编辑), Protein Structure Prediction[蛋白结构预测], Oxford University Press[牛津大学出版社], Oxford[牛津], 141-172 (1996)。

[0078] 根据卡巴特, 将V_H中的CDR氨基酸残基编号为31-35 (HCDR1)、50-65 (HCDR2)、和95-102 (HCDR3); 并且将V_L中的CDR氨基酸残基编号为24-34 (LCDR1)、50-56 (LCDR2)、和89-97 (LCDR3)。根据乔西亚, 将V_H中的CDR氨基酸编号为26-32 (HCDR1)、52-56 (HCDR2) 和95-102 (HCDR3); 并且将V_L中的氨基酸残基编号为26-32 (LCDR1)、50-52 (LCDR2) 和91-96 (LCDR3)。通过结合卡巴特和乔西亚二者的CDR定义, CDR由人V_H中的氨基酸残基26-35 (HCDR1)、50-65 (HCDR2) 和95-102 (HCDR3) 和人V_L中的氨基酸残基24-34 (LCDR1)、50-56 (LCDR2) 和89-97 (LCDR3) 组成。

[0079] 如本文所用, “抗体可变轻链”或“抗体可变重链”分别指包含V_L或V_H的多肽。内源性V_L由基因区段V(可变)和J(连接)编码, 并且内源性V_H由V、D(多样性)和J编码。V_L或V_H中的每一个都包括CDR和构架区(FR)。术语“可变区”或“V区”可互换地是指包含FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的重链或轻链。V区可以是天然存在的、重组的或合成的。在本申请中, 抗体轻链和/或抗体重链有时可统称为“抗体链”。如本文提供和进一步描述的, “抗体可变轻链”或“抗体可变重链”和/或“可变区”和/或“抗体链”任选地包含并入CDR中的细胞因子多肽序列。

[0080] 本文的包含例如CH2和CH3结构域的免疫球蛋白重链的C末端部分是“Fc”结构域。如本文所用, “Fc区”是指除了第一恒定区(CH1)免疫球蛋白结构域之外的抗体恒定区。Fc是指IgA、IgD和IgG的最后两个恒定区免疫球蛋白结构域, 以及IgE和IgM的最后三个恒定区免疫球蛋白结构域, 以及在这些结构域的N末端的柔性铰链。对于IgA和IgM, Fc可包括J链。对于IgG, Fc包含免疫球蛋白结构域C γ 2和C γ 3以及C γ 1与C γ 之间的铰链。在本领域中应理解, Fc区的边界可以变化, 然而, 人IgG重链Fc区通常被定义为在其羧基末端包含残基C226

或P230,其使用根据EU索引的编号,如见于Kabat等人(1991,NIH公开91-3242,National Technical Information Service[国家技术信息服务],斯普林菲尔德,弗吉尼亚州)。“Fc区”可以指分离的该区域或在抗体或抗体片段的上下文中的该区域。“Fc区”包括例如在CH2和CH3区中的Fc区的天然存在的等位基因变体,包括例如调节效应子功能的修饰。Fc区还包括不会导致生物学功能改变的变体。例如,从免疫球蛋白的Fc区的N端或C端缺失一个或多个氨基酸,而没有生物学功能的实质损失。例如,在某些实施例中,将C末端赖氨酸修饰、替换或去除。在特定的实施例中,Fc区中的一个或多个C末端残基被改变或去除。在某些实施例中,Fc中一个或多个C末端残基(例如末端赖氨酸)被缺失。在某些其他实施例中,Fc中的一个或多个C末端残基被替代氨基酸取代(例如,末端赖氨酸被替换)。根据本领域已知的一般规则选择这样的变体,从而对活性具有最小的影响(参见,例如,Bowie等人,Science[科学]247:306-1310,1990)。Fc结构域是免疫球蛋白(Ig)的一部分,该免疫球蛋白可被细胞受体(例如FcR)识别,并且与补体激活蛋白C1 q结合。在CH2外显子的5'部分中编码的下部铰链区在抗体内提供了与FcR受体结合的灵活性。

[0081] “嵌合抗体”是一种抗体分子,其中(a)恒定区或其一部份被改变、替换或交换,这样使得抗原结合位点(可变区)被连接至不同的或改变的类别、效应子功能和/或种类的恒定区,或连接至赋予该嵌合抗体新特性的完全不同的分子,例如酶、毒素、激素、生长因子、药物等;或(b)所述可变区或其部分被改变、替换或更换为具有不同或改变的抗原特异性的可变区。

[0082] “人源化”抗体是保留非人抗体的反应性(例如,结合特异性,活性)同时在人中具有较低免疫原性的抗体。例如,这可以通过保留非人CDR区并且将抗体的其余部分替换为人对应物来实现。参见,例如,Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊],81:6851-6855(1984);Morrison和Oi,Adv.Immunol.[免疫学进展],44:65-92(1988);Verhoeyen等人,Science[科学],239:1534-1536(1988);Padlan,Molec.Immun.[分子免疫学],28:489-498(1991);Padlan,Molec.Immun.[分子免疫学],31(3):169-217(1994)。

[0083] “人抗体”包括具有可变区的抗体,其中框架区和CDR区两者均衍生自人来源的序列。此外,如果抗体含有恒定区,则恒定区也衍生自此类人序列,例如人种系序列,或人种系序列的突变形式或含有衍生自人框架序列分析的共有框架序列的抗体,例如如Knappik等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]296:57-86,2000中所述。人抗体可以包括不是由人序列编码的氨基酸残基(例如,通过在体外随机诱变或位点特异性诱变、或通过在体内体细胞突变、或保守取代来引入突变以促进稳定性或制造)。

[0084] 术语“相应的人种系序列”是指编码人可变区氨基酸序列或子序列的核酸序列,与由人种系免疫球蛋白可变区序列编码的所有其他已知的可变区氨基酸序列相比,该人可变区氨基酸序列或子序列与参考可变区氨基酸序列或子序列具有最高确定的氨基酸序列同一性。相应的人种系序列还可以是指与全部其他评价的可变区氨基酸序列相比,与参考可变区氨基酸序列或子序列具有最高氨基酸序列同一性的人可变区氨基酸序列或子序列。相应的人种系序列可以是仅框架区、仅互补性决定区、框架区和互补性决定区、可变区段(如上文所定义)、或包含可变区的序列或子序列的其他组合。可以使用本文所述的方法,例如,使用BLAST、ALIGN或本领域已知的另一种比对算法比对两个序列,确定序列同一性。相应的人种系核酸或氨基酸序列可以与参考可变区核酸或氨基酸序列具有至少约90%、91%、

92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。

[0085] 如本文所用,术语“价”是指多肽中潜在靶结合位点的数目。每个靶结合位点特异性结合一个靶分子或靶分子上的特定位点。当多肽包含多于一个的靶结合位点时,每个靶结合位点可以特异性结合相同或不同的分子(例如,可以结合不同的分子,例如不同的抗原或相同分子上的不同表位)。例如,常规抗体具有两个结合位点并且是二价的;“三价”和“四价”是指在抗体分子中分别存在三个结合位点和四个结合位点。抗体细胞因子移植蛋白可以是单价的(即结合一个靶分子)、二价的或多价的(即结合多个靶分子)。

[0086] 当在描述靶(例如,蛋白)与抗体细胞因子移植蛋白之间的相互作用的上下文中使用时,短语“特异性结合”或“结合特异性”是指结合反应,该结合反应决定了蛋白质和其他生物制剂的异质群体中,例如,在生物样品(例如血液、血清、血浆或组织样品)中,靶的存在。因此,在某些指定条件下,具有特定结合特异性的抗体细胞因子移植蛋白与特定靶的结合至少是背景的两倍,并且基本上不与样品中存在的其他靶大量结合。在一个实施例中,在指定条件下,具有特定结合特异性的抗体细胞因子移植蛋白与特定抗原的结合至少是背景的十(10)倍,并且基本上不与样品中存在的其他靶大量结合。在这种条件下,与抗体细胞因子移植蛋白的特异性结合可能需要针对其对特定靶蛋白的特异性来选择抗体细胞因子移植蛋白。如本文所用,特异性结合包括与人IL2低亲和力受体选择性结合的抗体细胞因子移植蛋白,并且不包括与例如其他细胞因子受体超家族成员交叉反应的抗体细胞因子移植蛋白。在一些实施例中,选择与人IL2低亲和力受体选择性结合并且与非人灵长类IL2R(例如,食蟹猴IL2R)交叉反应的抗体细胞因子移植蛋白。在一些实施例中,选择与人IL2低亲和力受体选择性结合并且与另外的靶反应的抗体移植蛋白。可以使用多种形式来选择与特定靶蛋白特异性反应的抗体细胞因子移植蛋白。例如,固相ELISA免疫测定常规地用来选择与蛋白特异性免疫反应的抗体(关于可以用来确定特异免疫反应性的免疫测定方式和条件的描述,参见,例如Harlow和Lane,Using Antibodies,A Laboratory Manual[使用抗体:实验室手册](1998))。典型地,特异性或选择性结合反应将产生高于背景信号至少2倍和更典型地高于背景至少10至100倍的信号。

[0087] 术语“平衡解离常数(K_D ,M)”是指解离速率常数(k_d ,时间 $^{-1}$)除以缔合速率常数(k_a ,时间 $^{-1}$,M $^{-1}$)。可以使用本领域的任何已知方法,测量平衡解离常数。抗体细胞因子移植蛋白通常将具有小于约 10^{-7} 或 10^{-8} M,例如,小于约 10^{-9} M或 10^{-10} M,在一些实施例中,小于约 10^{-11} M、 10^{-12} M或 10^{-13} M的平衡解离常数。

[0088] 如本文所用,术语“表位”或“结合区”是指抗原蛋白中负责抗体CDR与抗原蛋白之间的特异性结合的结构域。

[0089] 如本文所用,术语“受体-细胞因子结合区”是指抗体细胞因子移植蛋白的移植的细胞因子部分中的结构域,其负责移植的细胞因子与其受体(例如,IL2低亲和力受体)之间的特异性结合。在每个抗体细胞因子移植蛋白中存在至少一个这样的受体-细胞因子结合区,并且每个结合区可以彼此相同或不同。

[0090] 术语“激动剂”可互换地是指能够激活受体以诱导完全或部分受体介导的反应的抗体。例如,IL2低亲和力受体的激动剂与IL2低亲和力受体结合并且诱导IL2介导的细胞内信号传导、细胞激活和/或CD8+T效应细胞和NK细胞增殖。在某些方面,与天然IL2配体相似,抗体细胞因子移植蛋白激动剂通过IL低亲和力受体刺激信号传导。IL2与IL2低亲和力受体

的结合诱导Jak1和Jak2激活,从而导致STAT5磷酸化。在一些实施例中,抗体细胞因子移植蛋白激动剂可以通过其结合IL2低亲和力的能力来鉴定,并且诱导STAT5磷酸化、和/或CD8⁺T效应细胞或NK细胞的增殖。

[0091] 术语“IL2”或“白细胞介素2(interleukin 2或interleukin-2)”或“IL-2”可互换地是指 α 螺旋细胞因子家族成员,其中天然蛋白在炎症过程的调节和维持中起作用。IL2的特性是N和C末端在空间上彼此靠近,这使得IL2细胞因子蛋白适合抗体移植。在激动剂抗体细胞因子移植蛋白的情况下,使用包含全长天然人的残基21-153的IL2。如本文所披露的人IL2在其全长上与氨基酸SEQ ID NO:2具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的序列同一性,并且保留了如本文所述的抗体细胞因子移植蛋白的优先激动剂活性,并且已以GenBank登录号NP_000577发布。SEQ ID NO:1是人IL2 cDNA序列。如本文披露的编码IL2蛋白的人IL2核酸在其全长上与SEQ ID NO:1的核酸序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的序列同一性,并且以GenBank登录号NM_000586发布。

[0092] 术语“抗体细胞因子移植蛋白”或“抗体细胞因子移植物”或“移植物”意指至少一个细胞因子直接并入抗体的CDR内,中断CDR的序列。可以将细胞因子并入HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2或LCDR3中。可以将细胞因子并入HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2或LCDR3中,并且向CDR的N末端序列或CDR的C末端序列并入。并入CDR的细胞因子可以破坏抗体部分与原始靶蛋白的特异性结合,或者抗体细胞因子移植蛋白可以保留其与靶蛋白的特异性结合。示例性细胞因子包括但不限于:IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、GM-CSF、MIP-1 α 、MIP-1 β 、TGF- β 、TNF- α 、和TNF- β 。也可以将细胞因子移植到抗体一个“臂”的特异性CDR中,并且将另一种不同的细胞因子移植到抗体的另一个“臂”的CDR中。例如,将IL2移植到抗体的一个“臂”的HCDR1中,并且将IL-7移植到抗体的细胞因子移植蛋白的另一“臂”的LCDR1中,可以产生双重功能的抗体细胞因子移植蛋白。

[0093] 当应用于核酸或蛋白时,术语“分离的”表示该核酸或蛋白基本上不含天然状态下与其结合的其他细胞组分。它优选处于同质状态。它可以是干燥的或者是水溶液。纯度和均质性典型地是使用分析化学技术(例如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱法)来确定的。作为制剂中存在的主要种类的蛋白基本上得到纯化。特别地,分离的基因与该基因侧翼的并且编码蛋白的可读框分开,除了目的基因。术语“纯化的”表示核酸或蛋白在电泳凝胶中基本上产生一条带。特别地,这意味着核酸或蛋白为至少85%纯、更优选地至少95%纯、以及最优选地至少99%纯。

[0094] 术语“核酸”或“多核苷酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其聚合物。除非特别限定,否则所述术语涵盖含有已知的天然核苷酸类似物的核酸,这些核酸具有与参考核酸类似的结合特性并且以与天然存在的核苷酸类似的方式进行代谢。除非另外指出,否则特定的核酸序列还隐含地涵盖其经保守修饰的变体(例如,简并密码子取代)、等位基因、直向同源物、SNP和互补序列以及明确指明的序列。具体地,简并密码子取代可以通过产生如下序列而获得,在这些序列中,一个或多个所选的(或全部)密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代(Batzer等人,Nucleic Acid Res.[核酸研究]19:5081(1991);Ohtsuka等人,J.Biol.Chem.[生物化学杂志]260:2605-2608(1985);和

Rossolini等人,Mol.Cell.Probes[分子与细胞探针]8:91-98(1994))。

[0095] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白”在本文中可互换使用来指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于氨基酸聚合物,其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物,以及适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。

[0096] 术语“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸,以及以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些氨基酸,以及后来修饰的那些氨基酸,例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-邻磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指与天然存在的氨基酸具有相同基本化学结构(即与氢、羧基基团、氨基基团和R基团结合的 α -碳)的化合物,例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。此类类似物具有经修饰的R基团(例如,正亮氨酸)或经修饰的肽骨架,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有如下结构的化合物,该结构与氨基酸的一般化学结构不同但是以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用。

[0097] “经保守修饰的变体”适用于氨基酸和核酸序列。对于特定核酸序列,经保守修饰的变体是指编码相同或基本上相同的氨基酸序列的那些核酸,或者在该核酸不编码氨基酸序列的情况下,是指基本上相同的序列。由于遗传密码的简并性,大量功能上相同的核酸编码任何给定的蛋白。例如,密码子GCA、GCC、GCG和GCU均编码氨基酸丙氨酸。因此,在密码子指定丙氨酸的每个位置,该密码子可以改变为任何所述的相应密码子而不改变编码的多肽。此类核酸变异是“沉默变异”,其是经保守修饰变异中的一种。本文编码多肽的每个核酸序列也描述了核酸的每种可能的沉默变异。技术人员应认识到,核酸中的每个密码子(除了通常是甲硫氨酸的唯一密码子的AUG和通常是色氨酸的唯一密码子的TGG)均可以被修饰以产生功能上相同的分子。因此,在每个所述序列中均隐含了编码多肽的核酸的每一种沉默变异。

[0098] 对于氨基酸序列,熟练的技术人员应当认识到,对一种核酸、肽、多肽或蛋白序列进行的单个取代、删除或添加(这在经编码的序列中改变、增加或删除一个单一氨基酸或小百分数的氨基酸)是一种“经保守修饰的变体”,其中该改变导致一种氨基酸被一种化学上相似的氨基酸取代。提供在功能上相似的氨基酸的保守取代表在本领域是熟知的。此类经保守修饰的变体相对于多态性变体、物种间同源物和等位基因是额外的并且不排除它们。以下八组含有互为保守取代的氨基酸:1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G);2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T);和8) 半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)(参见,例如,Creighton,Proteins[蛋白](1984))。

[0099] 通过在比较窗口上比较两个最佳比对的序列来确定“序列一致性的百分比”,其中比较窗口中的多核苷酸序列的部分可以包含与不包含添加或缺失的参考序列(例如,多肽)相比的添加或缺失(即,缺口)以使两个序列最佳比对。可以通过以下方法计算所述百分比:测定在这两个序列中出现相同核酸碱基或氨基酸残基的位置的数目以产生匹配位置数,将所述匹配位置数除以所述比较窗口中的位置总数,并且将结果乘以100,从而得到序列同一性百分比。

[0100] 在两个或更多个核酸或多肽序列的情况下,术语“相同”或“同一性”百分比可以指两个或更多个作为相同序列的序列或子序列。当在比较窗口或指定区域内进行比较和比对

以寻求使用以下序列比较算法之一或通过手动比对和目视检查所测量的最大对应时,如果两个序列具有规定百分比的相同的氨基酸残基或核苷酸(即,在规定区域上或当没有规定时则在参考序列的整个序列上,至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性),则两个序列是“基本上相同的”。本披露提供分别与本文例示的多肽或多核苷酸基本上相同的多肽或多核苷酸(例如,以SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:51、或SEQ ID NO:67中的任何一个为例的可变区)。同一性存在于长度为至少约15、25或50个核苷酸的区域上、或更优选地长度为100至500个或1000个或更多个核苷酸的区域上、或参考序列的全长上。关于氨基酸序列,同一性或基本同一性可以存在于长度为至少约5、10、15或20个核苷酸的区域上、任选地长度为至少约25、30、35、40、50、75或100个核苷酸的区域上、任选地长度为至少约150、200或250个核苷酸的区域上、或参考序列的全长上。关于较短的氨基酸序列,例如20个或更少的氨基酸的氨基酸序列,根据本文所定义的保守取代,当一个或两个氨基酸残基被保守取代时,存在实质同一性。

[0101] 对于序列比较,典型地一个序列充当参考序列,将测试序列与该参考序列比较。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入到计算机中,必要时指定子序列坐标,并且指定序列算法程序参数。可以使用默认程序参数,或者可以指定替代参数。然后,序列比较算法将基于程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0102] 如本文所用,“比较窗口”包括提及选自下组的多个邻接位置中的任何一个的区段,所述组由以下组成:20至600、通常约50至约200、更通常约100至约150,其中在两个序列最佳比对后,可以将序列与相同数目的邻接位置的参考序列进行比较。用于比较的序列比对方法在本领域中是熟知的。用于比较的序列的最佳比对可以通过以下来进行:例如,通过Smith和Waterman (1970) Adv. Appl. Math. [应用数学进展] 2:482c的局部同源性算法;通过Needleman和Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. [分子生物学杂志] 48:443的同源比对算法;通过搜索Pearson和Lipman (1988) Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊] 85:2444的相似性方法;通过这些算法的计算机化实现(科学路575号,麦迪逊市,威斯康星州)的遗传学计算机组(Genetics Computer Group)的威斯康星遗传学软件包(Wisconsin Genetics Software Package)中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA;或通过手动校准和目视检查(参见,例如,Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology [当代分子生物学实验指南] (1995增刊))。

[0103] 适用于确定序列同一性百分比和序列相似性的算法的两个实例是BLAST和BLAST 2.0算法,它们分别描述于Altschul等人, (1977) Nuc. Acids Res. [核酸研究] 25:3389-3402,和Altschul等人, (1990) J. Mol. Biol. [分子生物学杂志] 215:403-410。用于执行BLAST分析的软件可通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)公开地获得。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),当与数据库序列中的相同长度的字比对时,该长度为W的短字匹配或满足一些正值阈值得分T。T被称为邻域字得分阈值(Altschul等人,同上)。这些最初的邻域字命中点作为种子,用于启动搜索以找到包含它们的更长的HSP。字命中点沿着每个序列在两个方向上扩展,远至可以增加累积比对得分。对于核苷酸序列,使用参数M(一对匹配残基的奖励得分;总是>0)和N(错配残基的罚分;总是<0)计算累积得分。对于氨基酸序列,使用评分矩阵来计算累积得分。当出现以下情形时,字命中点向各方向的延伸终

止：累积比对得分从其最大获得值跌落数量X；由于一个或多个负评分残基比对的累积，累积得分走向零或更低；或到达任一序列的一端。BLAST算法参数W、T和X决定了比对的灵敏度和速度。BLASTN程序（对于核苷酸序列）使用字长（W）为11、期望值（E）为10、M=5、N=-4以及两条链的比较作为默认值。对于氨基酸序列，BLASTP程序默认使用字长为3、期望值（E）为10以及BLOSUM62评分矩阵（参见Henikoff和Henikoff（1989）Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]89:10915）比对（B）为50、期望值（E）为10、M=5、N=-4和两条链的比较。

[0104] 该BLAST算法还对两个序列之间的相似度进行统计学分析（参见，例如，Karlin和Altschul（1993）Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]90:5873-5787）。由BLAST算法提供的一种相似性量度是最小总和概率（P（N）），其提供了两个核苷酸或氨基酸序列之间偶然发生匹配的概率的指示。例如，如果在测试核酸与参考核酸的比较中的最小总和概率小于约0.2、更优选地小于约0.01、最优选地小于约0.001，则认为核酸与参考序列相似。

[0105] 两个核酸序列或多肽基本上相同的指示是由第一核酸编码的多肽与针对由第二核酸编码的多肽产生的抗体进行免疫交叉反应，如下所述。因此，多肽典型地与第二多肽基本上相同，例如其中两种肽仅通过保守取代而不同。两个核酸序列基本上相同的另一个指示是两个分子或它们的补体在严格条件下彼此杂交，如下所述。两个核酸序列基本上相同的又另一个指示是可使用相同的引物来扩增序列。

[0106] 当在描述结合区如何在本发明的抗体细胞因子移植蛋白内连接的上下文中使用时，术语“连接”涵盖用于物理上连接区的所有可能手段。多个结合区通常通过化学键连接，例如共价键（例如，肽键或二硫键）或非共价键，其可以是直接键（即，两个结合区之间没有接头）或间接键（即，借助两个或更多个结合区域之间的至少一个接头）。

[0107] 术语“受试者”、“患者”和“个体”可互换地是指哺乳动物，例如人或非人的灵长类哺乳动物。哺乳动物也可以是实验室哺乳动物，例如小鼠、大鼠、兔子、仓鼠。在一些实施例中，哺乳动物可以是农业哺乳动物（例如马、羊、牛、猪、骆驼科动物）或家养哺乳动物（例如犬科动物、猫科动物）。

[0108] 在一个实施例中，如本文所用，术语任何疾病或障碍的“治疗（treat、treating或treatment）”是指缓解疾病或障碍（即，减慢或阻止或减少疾病或其至少一种临床症状的发展）。在另一个实施例中，“治疗（treat、treating或treatment）”是指减轻或缓解至少一种身体参数、包括不能被患者辨别的那些。在又一个实施例中，“治疗（treat、treating或treatment）”是指在身体上（例如，可辨别的症状的稳定化）、在生理上（例如，身体参数的稳定化）或二者调节疾病或障碍。在又一个实施例中，“治疗（treat、treating或treatment）”是指预防或延缓疾病或障碍的发作或发展或进展。

[0109] 术语“治疗上可接受的量”或“治疗有效剂量”可互换地指足以实现所期望结果（即，炎症减小、抑制疼痛、防止炎症、抑制或预防炎症反应）的量。在一些实施例中，治疗上可接受的量不诱导或不引起不期望的副作用。可以通过首先施用低剂量并且随后递增地增加该剂量直至实现所期望效果来确定治疗上可接受的量。IL2抗体细胞因子移植蛋白的“预防有效剂量”和“治疗有效剂量”可以分别防止疾病症状的发作或导致严重程度的减轻，这些疾病症状包括与癌症和癌症治疗有关的症状。

[0110] 术语“共同施用”是指个体中同时存在两种（或更多种）活性剂。共同施用的活性试剂可以并行或依序递送。

[0111] 如本文所用,短语“基本上由……组成”是指方法或组合物中所包含的活性试剂以及对该方法或组合物的预期目的而言任何无活性的载体或赋形剂的类属或种类。在一些实施例中,短语“基本上由……组成”明确地排除包括除IL2抗体细胞因子移植蛋白之外的一种或多种另外的活性剂。在一些实施例中,短语“基本上由……组成”明确地排除包括除IL2抗体细胞因子移植蛋白和第二共同施用的试剂之外的多种另外的活性剂。

[0112] 除非上下文另外清楚指出,术语“一个/一种(a/an)”和“该(the)”包括复数个指示物。

附图说明

[0113] 图1是总结示例性IL2抗体细胞因子移植蛋白及其在CD8⁺T效应细胞上的活性的表。

[0114] 图2显示了IgG.IL2R67A.H1具有比**Proleukin®**更长的半衰期。IgG.IL2R67A.H1的半衰期为12-14小时,如图所示,而**Proleukin®**的T_{1/2}小于4小时,并且无法在图上显示。

[0115] 图3A-3C证明,在C57BL/6小鼠中,在100μg当量剂量下,在第4天、第8天以及第11天时间点,IgG.IL2R67A.H1比**Proleukin®**或IL2-Fc融合分子更有效扩增CD8⁺T效应细胞,并且毒性更小。

[0116] 图3D-3F证明,在C57BL/6小鼠中,在500μg当量剂量下,在第4天、第8天以及第11天时间点,IgG.IL2R67A.H1比**Proleukin®**或IL2-Fc融合分子更有效扩增CD8⁺T效应细胞,并且毒性更小。

[0117] 图4A显示了在NOD小鼠中,IgG.IL2R67A.H1选择性扩增CD8⁺T效应子,并且比**Proleukin®**耐受更好。

[0118] 图4B显示了描绘了在NOD小鼠中在CD8⁺T效应子上IgG.IL2R67A.H1和IgG.IL2F71A.H1的增加的活性的表。

[0119] 图5显示了在CT26肿瘤模型中IgG.IL2R67A.H1的单一试剂功效的图。

[0120] 图6呈现了在B16黑色素瘤小鼠模型中IgG.IL2R67A.H1作为单一试剂或与抗体组合的数据。图显示了IgG.IL2R67A.H1与TA99,抗TRP1抗体组合比单独的TA99、单独的IL2-Fc融合分子、TA99加IL2-Fc融合物更有效。在100和500μg剂量下,TA99和IgG.IL2R67A.H1具有协同作用。

[0121] 图7显示了图,该图有将IgG.IL2R67A.H1和IgG.IL2F71A.H1与**Proleukin®**相比,监测一组人细胞中pSTAT5活性的数值。

[0122] 图8显示了ELISA数据的图,该图显示了当将IL2移植到抗RSV抗体(IgG.IL2R67A.H1)的CDRH1中时,保持了RSV结合。然而,当将IL2移植到CDRL3或CDRH3时,与RSV的结合减少。当将IL2移植到不同的抗体主链(Xolair)中时,没有与RSV的结合。

[0123] 靶向IL2低亲和力受体的抗体细胞因子移植蛋白

[0124] 本文提供了包含IL2分子的蛋白构建体,该IL2分子被移植到抗体的互补决定区(CDR)中。本披露的抗体细胞因子移植蛋白显示出适合用于人患者的特性,例如,它们保留了与天然或重组人IL2相似的免疫刺激活性。然而,负面影响已减小。例如,存在较少的Treg

细胞的刺激。在整个说明书中还展示了其他活动和特征。因此,提供了抗体细胞因子移植蛋白,所述抗体细胞因子移植蛋白具有比先前已知的IL2和经修饰的IL2治疗剂(例如**Proleukin®**)改善的治疗特性,以及在癌症治疗中使用所提供的抗体细胞因子移植蛋白的方法。

[0125] 因此,本披露提供了抗体细胞因子移植蛋白,其是IL2低亲和力受体的激动剂,具有选择活性特性。所提供的抗体细胞因子移植蛋白包含免疫球蛋白重链序列和免疫球蛋白轻链序列。每个免疫球蛋白重链序列包含重链可变区(VH)和重链恒定区(CH),其中重链恒定区由CH1、CH2和CH3恒定区组成。每个免疫球蛋白轻链序列包含轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)。在每种抗体细胞因子移植蛋白中,IL2分子被并入到VH或VL的互补决定区(CDR)中。

[0126] 在一些实施例中,抗体细胞因子移植蛋白包含并入重链CDR中的IL2分子。在某些实施例中,将IL2分子并入重链互补决定区1(HCDR1)中。在某些实施例中,将IL2分子并入重链互补决定区2(HCDR2)中。在某些实施例中,将IL2分子并入重链互补决定区3(HCDR3)中。

[0127] 在一些实施例中,抗体细胞因子移植蛋白包含并入轻链CDR中的IL2分子。在某些实施例中,将IL2分子并入轻链互补决定区1(LCDR1)中。在某些实施例中,将IL2分子并入轻链互补决定区2(LCDR2)中。在某些实施例中,将IL2分子并入轻链互补决定区3(LCDR3)中。

[0128] 在一些实施例中,移植的抗体细胞因子包含并入CDR中的IL2序列,由此将IL2序列插入CDR序列中。插入可以在CDR的N末端区域处或附近,在CDR的中间区域中或在CDR的C末端区域处或附近。在其他实施例中,移植的抗体细胞因子包含并入CDR中的IL2分子,由此IL2序列不会将CDR序列移码。在其他实施例中,移植的抗体细胞因子包含并入CDR中的IL2分子,由此IL2序列替换了全部或部分CDR序列。替换可以在CDR的N末端区域处,在CDR的中间区域中或在CDR的C末端区域处或附近。替换可以是CDR序列或整个CDR序列中少至一个或两个氨基酸。

[0129] 在一些实施例中,将IL2分子直接移植到没有肽接头的CDR中,在CDR序列和IL2序列之间没有另外的氨基酸。

[0130] 在一些实施例中,抗体细胞因子移植蛋白包含IgG类抗体重链的免疫球蛋白重链。在某些实施例中,IgG重链是IgG1、IgG2或IgG4亚类中的任何一种。

[0131] 在一些实施例中,抗体细胞因子移植蛋白包含重链和轻链免疫球蛋白序列,其选自已知的临床上使用的免疫球蛋白序列。在某些实施例中,抗体细胞因子移植蛋白包含重链和轻链免疫球蛋白序列,其是人源化序列。在其他实施例中,抗体细胞因子移植蛋白包含重链和轻链免疫球蛋白序列,其是人序列。

[0132] 在一些实施例中,抗体细胞因子移植蛋白包含重链和轻链免疫球蛋白序列,其选自种系免疫球蛋白序列。

[0133] 在一些实施例中,抗体细胞因子移植蛋白包含重链和轻链免疫球蛋白序列,其具有免疫球蛋白可变域与不同于IL2分子结合特异性的靶的结合特异性。在一些实施例中,在存在该移植的细胞因子的情况下,免疫球蛋白可变结构域与其靶的结合特异性保留了10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、或100%。在某些实施例中,保留的结合特异性是针对非人靶的。在某些实施例中,保留的结合特异性是针对病毒,例如,RSV。在其他实施例中,结合特异性是针对结合IL2疗法具有治疗效用的人靶。在某

些实施例中,靶向免疫球蛋白的结合特异性将另外的治疗益处传递给IL2组分。在某些实施例中,免疫球蛋白与其靶的结合特异性传达了与IL2的协同活性。

[0134] 在仍其他实施例中,免疫球蛋白的结合特异性,通过移植IL2分子降低了10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、或100%。

[0135] 提供了抗体细胞因子移植蛋白,其包含移植到VH或VL的互补决定区(CDR)的IL2分子。在一些实施例中,IL2序列与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。在一些实施例中,IL2分子包含SEQ ID NO:4的序列。在一些实施例中,IL2分子由SEQ ID NO:4的序列组成。

[0136] 提供了抗体细胞因子移植蛋白,其包含移植到VH或VL的互补决定区(CDR)的IL2分子。在一些实施例中,IL2序列与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。在一些实施例中,IL2分子包含SEQ ID NO:6的序列。在一些实施例中,IL2分子由SEQ ID NO:6的序列组成。

[0137] 在一些实施例中,抗体细胞因子移植蛋白赋予促免疫调节特性,其优于人IL2、重组人IL2、**Proleukin®**或与Fc融合的IL2。与人IL2、重组人IL2、**Proleukin®**或与Fc融合的IL2相比,抗体细胞因子移植蛋白赋予CD8 T效应细胞增强的活性,同时提供减少的Treg活性。

[0138] 在一些实施例中,抗体细胞因子移植蛋白包含具有赋予经修饰的效应子功能的经修饰的Fc的经修饰的免疫球蛋白IgG。在某些实施例中,该经修饰的Fc区包含选自D265A、P329A、P329G、N297A、L234A和L235A中的一个或多个的突变。在特定的实施例中,免疫球蛋白重链可以包含选自以下中任一种的赋予降低的效应子功能的突变或突变组合:D265A、P329A、P329G、N297A、D265A/P329A、D265A/N297A、L234/L235A、P329A/L234A/L235A、和P329G/L234A/L235A。

[0139] 在一些实施例中,抗体细胞因子移植蛋白包含(i)与SEQ ID NO:19的重链可变区具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%氨基酸序列同一性的重链可变区,以及(ii)与SEQ ID NO:35的轻链可变区具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%氨基酸序列同一性的轻链可变区。免疫球蛋白链是选自IgG1、IgG2或IgG4的IgG类。在某些实施例中,免疫球蛋白任选地包含赋予减少的效应子功能的突变或突变的组合,这些突变选自D265A、P329A、P329G、N297A、D265A/P329A、D265A/N297A、L234/L235A、P329A/L234A/L235A、和P329G/L234A/L235A中的任一个。

[0140] 在一些实施例中,抗体细胞因子移植蛋白包含(i)与SEQ ID NO:51的重链可变区具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%氨基酸序列同一性的重链可变区,以及(ii)与SEQ ID NO:67的轻链可变区具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%氨基酸序列同一性的轻链可变区。免疫球蛋白链是选自IgG1、IgG2或IgG4的IgG类。在某些实施例中,免疫球蛋白任选地包含赋予减少的效应子功能的突变或突变的组合,这些突变选自D265A、P329A、P329G、N297A、D265A/P329A、D265A/N297A、L234/L235A、P329A/L234A/L235A、和P329G/L234A/L235A中的任一个。

L234A/L235A中的任一个。

[0141] 工程化的和经修饰的抗体细胞因子移植蛋白

[0142] 在某些方面,通过将IL2序列移植到免疫球蛋白支架的CDR区中来产生抗体细胞因子移植构建体。重链和轻链免疫球蛋白链均产生,以产生最终的抗体移植蛋白。抗体细胞因子移植蛋白赋予CD8⁺ T效应细胞优选的治疗活性,并且与天然或重组人IL2 (rhIL2或Proleukin®) 或与Fc融合的IL2相比,抗体细胞因子移植蛋白具有降低的Treg活性。

[0143] 为了工程化抗体细胞因子移植蛋白,将含有特异性突变蛋白的IL2序列 (SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6) 插入免疫球蛋白链支架蛋白的CDR环。可以使用已在临床环境中使用的多种已知免疫球蛋白序列、当前发现和/或临床开发中的已知免疫球蛋白序列、人种系抗体序列以及新颖抗体免疫球蛋白链的序列来制备移植的构建体。使用标准分子生物学方法、利用编码相关序列的重组DNA产生构建体。表2中描述了称为GFTX3b的示例性支架中的IL2的序列。基于可用的结构或同源性模型数据,将插入点选择为环的中点,然而,可以朝CDR环的N或C末端调整插入点。

[0144] 因此,本披露提供了抗体或其片段,其特异性与高亲和力IL2受体结合,所述高亲和力IL2受体包含重组插入异源抗体蛋白或多肽中以产生移植的蛋白的IL2蛋白。特别地,本披露提供了移植的蛋白,其包含本文所述的抗体或抗体的抗原结合片段或任何其他相关支架抗体多肽 (例如,全抗体免疫球蛋白、Fab片段、Fc片段、Fv片段、F(ab)₂片段、VH结构域、VH CDR、VL结构域、VL CDR等) 和异源细胞因子蛋白、多肽或肽,例如IL2。将蛋白、多肽或肽与抗体或抗体片段融合或缀合的方法是本领域已知的。参见,例如,美国专利号5,336,603、5,622,929、5,359,046、5,349,053、5,447,851、和5,112,946;欧洲专利号EP 307,434和EP 367,166;国际公开号W0 96/04388和W0 91/06570;Ashkenazi等人,1991, Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]88:10535-10539;Zheng等人,1995, J.Immunol.[免疫学杂志]154:5590-5600;和Vil等人,1992, Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]89:11337-11341。另外,可以通过基因改组、基序改组、外显子改组和/或密码子改组 (统称为“DNA改组”) 的技术生成抗体细胞因子移植蛋白。可采用DNA改组来制备移植的蛋白构建体和/或改变抗体或其片段 (例如,具有较高亲和力和较低解离速率的抗体或其片段) 的活性。通常参见,美国专利号5,605,793、5,811,238、5,830,721、5,834,252、和5,837,458;Patten等人,1997, Curr.Opinion Biotechnol.[当前生物技术观点]8:724-33;Harayama,1998, Trends Biotechnol.[生物技术趋势]16(2):76-82;Hansson等人,1999, J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]287:265-76;以及Lorenzo和Blasco,1998, Biotechniques[生物技术]24(2):308-313。抗体或其片段、或编码的抗体或其片段可以通过在重组之前通过易错PCR、随机核苷酸插入或其他方法进行随机诱变来改变。编码特异性结合目的抗原蛋白的抗体或其片段的多核苷酸可以与一种或多种异源细胞因子分子,例如,IL2,的一个或多个组分、基序、区段、部分、结构域、片段等重组,用于制备如本文提供的抗体细胞因子移植蛋白。

[0145] 抗体Fab含有六个CDR环,轻链中的3个 (CDRL1、CDRL2、CDRL3) 和重链中的3个 (CDRH1、CDRH2、CDRH3),它们可以用作细胞因子蛋白的潜在插入位点。为了确定插入细胞因子的CDR环,考虑了结构和功能上的考虑。由于不同抗体之间的CDR环大小和构象差异很大,因此对于每种特定的抗体/蛋白组合,可以凭经验确定最佳的插入CDR。另外,由于将细胞因

子蛋白插入CDR环,因此这可以对细胞因子蛋白的结构施加另外的限制,如实例1所述。

[0146] 免疫球蛋白链的CDR通过本领域已知的熟知的编号系统来确定,包括本文所述的那些。例如,CDR已经通过如下鉴定并且定义:(1)使用以下中所述的编号系统:Kabat等人(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest[具有免疫学意义的蛋白序列],”第5版Public Health Service[公共卫生服务],National Institutes of Health[国立卫生研究院],贝塞斯达市,马里兰州(“Kabat”编号方案),NIH公开号91-3242;以及(2)乔西亚,参见Al-Lazikani等人,(1997)“Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins[免疫球蛋白规范结构的标准构象],”J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]273:927-948。对于鉴定的长度少于20个氨基酸的CDR氨基酸序列,一个或两个保守氨基酸残基取代可以耐受,同时仍保留所期望的特异性结合和/或激动剂活性。

[0147] 还可以使用抗体作为起始材料来工程化经修饰的抗体细胞因子移植蛋白,从而制备抗体细胞因子移植蛋白,该抗体具有本文所示的一个或多个CDR和/或VH和/或VL序列(例如,表2),该经修饰的抗体细胞因子移植蛋白可以具有与起始抗体移植蛋白相比改变的特性。可替代地,任何已知的抗体序列都可以用作支架以工程化经修饰的抗体细胞因子移植蛋白。例如,可以将任何已知的临床上使用的抗体用作制备抗体移植蛋白的起始材料支架。已知的抗体和相应的免疫球蛋白序列包括,例如帕利珠单抗、阿利库单抗、美泊利单抗、耐昔妥珠单抗、纳武单抗、地那昔单抗、苏金单抗、依伏库单抗、博纳吐单抗、派姆单抗、雷莫芦单抗、维多珠单抗、司妥昔单抗、奥妥珠单抗、曲妥单抗、雷珠单抗、帕妥珠单抗、贝利单抗、伊匹单抗、地诺单抗、托珠单抗、奥法木单抗、康纳单抗、戈利木单抗、优特克单抗、赛妥珠单抗、卡妥索单抗、依库丽单抗、兰尼单抗、帕尼单抗、那他珠单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、依法利珠单抗、奥马珠单抗、托西莫单抗、替伊莫单抗、阿达木单抗、阿仑单抗、吉妥珠单抗、英夫利昔单抗、巴利昔单抗、达克珠单抗、利妥昔单抗、阿昔单抗、莫罗单抗、或其修饰。已知的抗体和免疫球蛋白序列也包括种系抗体序列。框架序列可以从包含种系抗体基因序列的公共DNA数据库或公开参考文献获得。例如,人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可以在“VBase”人种系序列数据库中找到,以及在卡巴特,E.A.,等人,1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest[免疫学相关蛋白序列],第五版,美国卫生与公众服务部(U.S.Department of Health and Human Services),NIH公开号91-3242;Tomlinson,I.M.等人,1992 J.fol.Biol.[分子生物学杂志]227:776-798;和Cox,J.P.L.等人,1994 Eur.J Immunol.[欧洲免疫学杂志]24:827-836中找到。在仍其他实例中,可以将来自可能处于早期发现和/或药物开发中的其他已知实体的抗体和相应的免疫球蛋白序列类似地用作起始材料,以工程化经修饰的抗体细胞因子移植蛋白。

[0148] 只要所得多肽包括至少一个容纳细胞因子(例如,IL2)并入的结合区,可以使用各种各样的抗体/免疫球蛋白构架或支架。此类框架或支架包括5种主要独特型的人免疫球蛋白或其片段,并且包括其他动物物种的免疫球蛋白,优选具有人源化和/或人方面。本领域技术人员将继续发现和开发新颖抗体、框架、支架和片段。

[0149] 可以使用本领域已知的方法产生抗体。为了制备单克隆抗体,可以使用本领域已知的任何技术(参见,例如,Kohler&Milstein,Nature[自然]256:495-497(1975);Kozbor等人,Immunology Today[今日免疫学]4:72(1983);Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy[单克隆抗体与癌症治疗],第77-96页艾伦丽思出版社公司(Alan R.Liss,

Inc.) 1985)。产生单链抗体的技术(美国专利号4,946,778)可适于产生用于抗体细胞因子移植蛋白的抗体。同样,转基因小鼠或其他生物,例如其他哺乳动物,可用于表达和鉴定灵长类或人源化或人抗体。可替代地,可以使用噬菌体展示技术来鉴定与选择的抗原特异性结合的抗体和异源Fab片段,以用于抗体细胞因子移植蛋白(参见,例如,McCafferty等人,同上;Marks等人,Biotechnology[生物技术],10:779-783, (1992))。

[0150] 灵长类化或人源化非人抗体的方法是本领域熟知的。通常,灵长类化或人源化抗体具有从非灵长类或非人来源引入的一个或多个氨基酸残基。这些非灵长类或非人氨基酸残基通常称为输入残基,这些残基典型地取自输入可变结构域。基本上可遵循Winter和同事的方法(参见,例如,Jones等人,Nature[自然]321:522-525 (1986);Riechmann等人,Nature[自然]332:323-327 (1988);Verhoeyen等人,Science[科学]239:1534-1536 (1988)和Presta,Curr.Op.Struct.Biol.[结构生物学最新观点]2:593-596 (1992)),通过将啮齿动物CDR或CDR序列取代为相应的人抗体序列进行人源化。因此,这种人源化抗体是嵌合抗体(美国专利号4,816,567),其中基本上小于完整的人可变结构域已经被来自非人物种的相应序列取代。在实践中,灵长类或人源化抗体通常是灵长类或人抗体,其中一些互补决定区(“CDR”)残基以及可能地一些构架(“FR”)残基被来自起源物种(例如,啮齿动物抗体)中类似位点的残基取代以赋予结合特异性。

[0151] 可替代地或另外,可以使用体内方法,用于用抗体中的人可变区替换非人抗体可变区,同时保持相对于非人抗体的相同结合特征或提供更好的结合特征,以将非人抗体转化为工程化人抗体。参见,例如,美国专利公开号20050008625,美国专利公开号2005/0255552。可替代地,人V区段文库可以通过顺序的卡盒替换来生成,其中最初,参考抗体V区段的仅一部分被人序列文库替换;并且然后在第二个文库筛选中重组在剩余参考抗体氨基酸序列的背景下支持结合的已鉴定人“盒”,以生成完整的人V区段(参见,美国专利公开号2006/0134098)。

[0152] 用于制备抗体细胞因子移植蛋白的各种抗体或抗原结合片段可通过对完整抗体进行酶促或化学修饰来产生,或使用重组DNA方法(例如,单链Fv)从头合成,或使用噬菌体展示文库进行鉴定(参见,例如McCafferty等人,Nature[自然]348:552-554,1990)。例如,可以使用本领域描述的方法产生小抗体,例如Vaughan和Sollazzo,Comb.Chem.High Throughput Screen[梳状化学高通量筛选]4:417-30 2001。双特异性抗体可以通过多种方法产生,包括移植杂交瘤或连接Fab'片段。参见,例如,Songsivilai&Lachmann,Clin.Exp.Immunol.[临床与实验免疫学]79:315-321 (1990);Kostelny等人,J.Immunol.[免疫学杂志]148,1547-1553 (1992)。可以使用噬菌体展示文库或核糖体展示文库、基因改组文库来鉴定单链抗体。可以从合成的、半合成的或天然的和免疫活性来源构建此类文库。因此,可以将选择的免疫球蛋白序列用于制备如本文提供的抗体细胞因子移植蛋白构建体。

[0153] 本披露中使用的抗体、抗原结合分子或抗体细胞因子移植分子进一步包括双特异性抗体。双特异性或双功能抗体是具有两个不同的重链/轻链对和两个不同的结合位点的人工杂合抗体。其他抗原结合片段或抗体部分包括二价scFv(双抗体),双特异性scFv抗体,其中抗体分子识别两个不同的表位,单结合域(dAb)和小抗体。因此,可以将选择的免疫球蛋白序列用于制备如本文提供的抗体细胞因子移植蛋白构建体。

[0154] 抗体的抗原结合片段,例如Fab片段,scFv,可以用作构建抗体细胞因子移植蛋白的构件,并且可以任选地包括多价形式。在一些实施例中,这样的多价分子包含抗体(例如,Fc)的恒定区。

[0155] 可以通过修饰抗体的一个或两个可变区(即,VH和/或VL)内,例如,在一个或多个CDR区内的一个或多个残基来工程化抗体细胞因子移植蛋白,并且这样的适应的VH和/或VL区序列被用于移植细胞因子或用于制备细胞因子移植。抗体主要通过位于六个重链和轻链互补决定区(CDR)中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。因此,CDR内的氨基酸序列在单个抗体之间比CDR外部的序列更加多样化。CDR序列负责大多数抗体抗原相互作用,可以通过构建表达载体来表达模拟特定天然存在的抗体的特性的重组抗体,所述表达载体包括被移植在来自具有不同特性的不同抗体的框架序列上的来自所特异性抗体的CDR序列(参见,例如,Riechmann,L.等人,1998Nature[自然]332:323-327;Jones,P.等人,1986Nature[自然]321:522-525;Queen,C.等人,1989Proc.Natl.Acad.,U.S.A.[美国国家科学院院刊]86:10029-10033;Winter的美国专利号5,225,539和Queen等人的美国专利号5,530,101、5,585,089、5,693,762和6,180,370)。在某些情况下,使框架区内的残基突变以维持或增强抗体的抗原结合能力是有益的(参见,例如,Queen等人的美国专利号5,530,101、5,585,089、5,693,762和6,180,370)。

[0156] 在某些方面,VH和/或VL CDR1、CDR2、和/或CDR3区内的氨基酸残基的突变,从而改善目的抗体的一种或多种结合特性(例如,亲和力),即“亲和力成熟”,可能是有益的,例如,结合细胞因子移植蛋白来优化抗体的抗原结合。可以进行定点诱变或PCR介导的诱变以引入一个或多个突变,并且可以在如本文所述的体外或体内测定中和/或本领域已知的替代或另外的测定中评估对抗体结合或其他目的功能特性的影响。可以引入保守修饰。所述突变可以是氨基酸取代、添加或缺失。此外,通常CDR区内不超过一个、两个、三个、四个或五个残基被改变。

[0157] 抗体片段的工程化抗体包括如下那些:其中已对VH和/或VL内的框架残基进行了修饰,例如以改善抗体的特性。在一些实施例中,进行这种框架修饰以降低抗体的免疫原性。例如,一种方法是将一个或多个框架残基变为对应的种系序列。更确切地,已经历体细胞突变的抗体可以含有与衍生抗体的种系序列不同的框架残基。可以通过将抗体框架序列与衍生抗体的种系序列进行比较来鉴定此类残基。为了使框架区序列恢复为其种系构型,可以通过例如定点诱变将体细胞突变“回复突变”为种系序列。另外的框架修饰包括使框架区内或甚至一个或多个CDR区内的一个或多个残基突变以去除T细胞表位,从而降低抗体的潜在免疫原性。此方法也称为“去免疫化”,并且在Carr等人的美国专利公开号20030153043中有进一步详细描述。

[0158] 用于制备抗体细胞因子移植蛋白的抗体或抗体片段的恒定区可以适当地是任何类型或亚型,并且可以选自通过本发明方法要治疗的受试者的物种(例如,人、非人灵长类动物或其他哺乳动物,例如,农业哺乳动物(例如马、羊、牛、猪、骆驼科动物),家养哺乳动物(例如犬科动物、猫科动物)或啮齿动物(例如大鼠、小鼠、仓鼠、兔子)。在一些实施例中,将抗体细胞因子移植蛋白中使用的抗体工程化以产生人源化或Humaneered®抗体。在一些实施例中,在抗体细胞因子移植蛋白中使用的抗体是人抗体。在一些实施例中,抗体恒定区同种型是IgG,例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。在某些实施例中,恒定区同种型是IgG1。在一

些实施例中,抗体细胞因子移植蛋白包含IgG。在一些实施例中,抗体细胞因子移植蛋白包含IgG1 Fc。在一些实施例中,抗体细胞因子移植蛋白包含IgG2 Fc。

[0159] 除了在框架或CDR区内进行的修饰之外或作为在框架或CDR区内进行的修饰的替代方案,可以将制造抗体细胞因子移植蛋白中使用的抗体或抗体片段工程化以包括Fc区内的修饰,通常是为了改变抗体的一种或多种功能特性,例如像血清半衰期、补体结合、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性。此外,抗体、其抗体片段、或抗体细胞因子移植蛋白可以经化学修饰(例如,一个或多个化学部分可以附接至抗体)或经修饰以改变其糖基化,从而再次改变抗体细胞因子移植蛋白的一种或多种功能特性。

[0160] 在一个实施例中,经修饰CH1的铰链区,使得铰链区中半胱氨酸残基的数目改变,例如增加或减少。例如,该方法在Bodmer等人的美国专利号5,677,425中进一步描述,其中改变CH1铰链区中半胱氨酸残基的数目,以便例如促进轻链和重链的组装或增加或降低抗体细胞因子移植蛋白的稳定性。在另一个实施例中,使抗体的Fc铰链区突变以改变抗体细胞因子移植蛋白生物半衰期。更具体地,将一个或多个氨基酸突变引入到Fc铰链片段的CH2-CH3结构域界面区域中,使得抗体细胞因子移植蛋白具有相对于天然Fc铰链结构域SpA结合而言受损的葡萄球菌蛋白A (SpA) 结合。该方法在Ward等人的美国专利号6,165,745中进一步详细描述。

[0161] 本披露提供了与IL2低亲和力受体特异性结合的抗体细胞因子移植蛋白,其在体内具有延长的半衰期。在另一个实施例中,修饰抗体细胞因子移植蛋白以增加其生物半衰期。可以采用各种方法。还可以生成具有增加的体内半衰期的抗体细胞因子移植蛋白,其将一个或多个氨基酸修饰(即,取代、插入或缺失)引入IgG恒定结构域或其FcRn结合片段(优选Fc或铰链Fc结构域片段)。例如,可以引入以下突变中的一种或多种:如在美国专利号6,277,375中由Ward所述的T252L、T254S、T256F。参见,例如,国际公开号W0 98/23289;国际公开号W0 97/34631;和美国专利号6,277,375。可替代地,为了增加生物半衰期,在CH1或CL区内改变抗体细胞因子移植蛋白,以含有取自IgG的Fc区的CH2结构域的两个环的补救受体结合表位,如Presta等人的美国专利号5,869,046和6,121,022中所述。在又其他实施例中,通过用不同的氨基酸残基替换至少一个氨基酸残基来改变Fc区,以改变抗体细胞因子移植蛋白的效应子功能。例如,可以用不同的氨基酸残基替换一个或多个氨基酸,使得抗体细胞因子移植蛋白对效应配体具有改变的亲和力,但保留亲本抗体的抗原结合能力。改变亲和力的效应配体可以是例如Fc受体 (FcR) 或补体的C1组分。该方法在Winter等人的美国专利号5,624,821和5,648,260中进一步详细描述。

[0162] 在另一个实施例中,选自氨基酸残基的一个或多个氨基酸可以用不同的氨基酸残基替换,使得抗体细胞因子移植蛋白具有改变的C1q结合和/或降低或消除的补体依赖性细胞毒性 (CDC)。该方法在Idusogie等人的美国专利号6,194,551中进一步详细描述。

[0163] 含有此类突变的抗体细胞因子移植蛋白介导降低的或没有的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 或补体依赖性细胞毒性 (CDC)。在一些实施例中,IgG1恒定区的氨基酸残基L234和L235被取代为Ala234和Ala235。在一些实施例中,IgG1恒定区的氨基酸残基N267被取代为Ala267。

[0164] 在另一个实施例中,改变一个或多个氨基酸残基,从而改变抗体细胞因子移植蛋白固定补体的能力。该方法在Bodmer等人的PCT公开W0 94/29351中进一步描述。

[0165] 在又一个实施例中,修饰Fc区以增加抗体介导抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 的能力和/或通过修饰一个或多个氨基酸来增加抗体细胞因子移植蛋白对Fc γ 受体的亲和力。该方法由Presta在PCT公开W0 00/42072中进一步描述。此外,已经绘制了人IgG1上针对Fc γ R1、Fc γ RII、Fc γ RIII和FcRn的结合位点,并且已经描述了具有改善的结合的变体(参见Shields,R.L.等人,2001 J.Biol.Chem.[生物化学杂志]276:6591-6604)。

[0166] 在还另一个实施例中,经修饰的抗体细胞因子移植蛋白的糖基化。例如,可以制备非糖基化的抗体细胞因子移植蛋白(即,抗体细胞因子移植蛋白缺乏糖基化)。可以改变糖基化以例如增加抗体对“抗原”的亲和力。此类碳水化合物修饰可以通过例如改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来实现。例如,可以进行一个或多个氨基酸取代,这导致消除一个或多个可变区框架糖基化位点,从而消除该位点的糖基化。这种无糖基化可以增加抗体对于抗原的亲和力。此类的方法在Co等人的美国专利号5,714,350和6,350,861中进一步详细描述。

[0167] 另外或可替代地,可以制备具有改变的糖基化类型的抗体细胞因子移植蛋白,如具有减少量的岩藻糖基残基的低岩藻糖基化抗体细胞因子移植蛋白或具有增加的二等分GlcNac结构的抗体。已经证明这类改变的糖基化模式增加了抗体的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 能力。这种碳水化合物修饰可以通过例如在具有改变的糖基化机制的宿主细胞中表达抗体细胞因子移植蛋白来实现。具有改变的糖基化机制的细胞已在本领域中描述,并且可用作宿主细胞,在该宿主细胞中表达重组抗体细胞因子移植蛋白,从而产生具有改变的糖基化的抗体细胞因子移植蛋白。例如,Hang等人的EP 1,176,195描述了具有功能破坏的FUT8基因的细胞系,其编码岩藻糖基转移酶,使得在这种细胞系中表达的抗体细胞因子移植蛋白显示出低岩藻糖基化。Presta在PCT公开W0 03/035835中描述了变体CHO细胞系Lec13细胞,其将岩藻糖附接至Asn(297)-连接的碳水化合物的能力降低,还导致在所述宿主细胞中表达的抗体细胞因子移植蛋白的低岩藻糖基化(还参见Shields,R.L.等人,2002 J.Biol.Chem.[生物化学杂志]277:26733-26740)。Umana等人的PCT公开W0 99/54342描述了如下细胞系,该细胞系被工程化以表达糖蛋白修饰糖基转移酶(例如, β (1,4)-N乙酰基葡萄糖胺基转移酶III (GnTIII)),使得在工程化细胞系中表达的抗体细胞因子转移蛋白显示出增加的二等分GlcNac结构,该二等分GlcNac结构导致抗体的ADCC活性增加(还参见Umana等人,1999Nat.Biotech.[自然生物技术]17:176-180)。

[0168] 在一些实施例中,抗体细胞因子移植蛋白的一个或多个结构域、或区通过接头,例如肽接头,例如本领域熟知的接头,连接(参见例如,Holliger,P.等人(1993) Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]90:6444-6448;Poljak,RJ.等人(1994) Structure[结构]2:1121-1123)。肽接头的长度可以变化,例如接头的长度可以是1-100个氨基酸,通常接头的长度是5至50个氨基酸,例如长度是5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、或50个氨基酸。

[0169] 在一些实施例中,IL2任选地与一个或多个肽接头序列一起被移植到CDR序列中。在某些实施例中,一个或多个肽接头独立地选自(Gly_n-Ser)_m序列(SEQ ID NO:71)、(Gly_n-Ala)_m序列(SEQ ID NO:72)或(Gly_n-Ser)_m/(Gly_n-Ala)_m序列(SEQ ID NOS:71-72)的任何组合,其中每个n独立地是1到5的整数,并且每个m独立地是0到10的整数。接头的实例包括但

不限于：基于甘氨酸的接头或gly/ser接头G/S，例如 $(G_mS)_n$ ，其中n是等于1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10的正整数，并且m是等于0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10的整数 (SEQ ID NO:73)。在某些实施例中，一个或多个接头包括 G_4S (SEQ ID NO:74) 重复序列，例如，Gly-Ser接头 $(G_4S)_n$ ，其中n是等于或大于1的正整数 (SEQ ID NO:74)。例如， $n=1, n=2, n=3, n=4, n=5$ ，以及 $n=6, n=7, n=8, n=9$ ，以及 $n=10$ 。在一些实施例中，Ser可以用Ala替换，例如接头G/A，例如 $(G_mA)_n$ ，其中n是等于1、2、3、4、5、6、7、8、9或10的正整数，并且m是等于0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10的整数 (SEQ ID NO:75)。在某些实施例中，一个或多个接头包括 G_4A (SEQ ID NO:76) 重复序列， $(G_4A)_n$ ，其中n是等于或大于1的正整数 (SEQ ID NO:76)。例如， $n=1, n=2, n=3, n=4, n=5$ ，以及 $n=6, n=7, n=8, n=9$ ，以及 $n=10$ 。在一些实施例中，接头包括接头的多个重复序列。在其他实施例中，接头包括 G_4S (SEQ ID NO:74) 和 G_4A (SEQ ID NO:76) 的组合和倍数。

[0170] 接头的其他实例包括基于柔性接头序列的那些，其在抗体中天然存在以使由接头和连接产生的免疫原性最小化。例如，抗体分子结构中的可变域和CH1恒定域之间存在天然的柔性键。该天然键包含约10-12个氨基酸残基，由V结构域C端的4-6个残基和CH1结构域N端的4-6个残基贡献。抗体细胞因子移植蛋白可以，例如，使用并入CH1的末端5-6个氨基酸残基或11-12个氨基酸残基的接头作为接头。CH1结构域的N末端残基，特别地前5-6个氨基酸残基，具有没有强二级结构的环构象，并且因此可以充当柔性接头。CH1结构域的N末端残基是可变结构域的自然延伸，因为它们是Ig序列的一部分，并且因此，在很大程度上将接头和连接可能引起的任何免疫原性减至最小。在一些实施例中，接头序列包括基于铰链序列的经修饰的肽序列。

[0171] 此外，抗体细胞因子移植蛋白可以包括标志物序列例如肽，以促进抗体细胞因子移植蛋白的纯化。在优选的实施例中，标志物氨基酸序列是六组氨酸肽 (SEQ ID NO:78)，例如pQE运载体中提供的标签 (凯杰公司 (QIAGEN, Inc.)，伊顿大街 (Eton Avenue) 9259号，加利福尼亚州查茨沃思 (Chatsworth)，91311) 等，其中许多是商购可得的。如Gentz等人，1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊] 86:821-824中所述，例如六组氨酸 (SEQ ID NO:78) 提供了移植的蛋白质的方便纯化。可用于纯化的其他肽标签包括但不限于对应于衍生自流感血凝素蛋白的表位 (Wilson等人，1984, Cell [细胞] 37:767) 的血凝素 (“HA”) 标签和“flag”标签。

[0172] 抗体也可以附接至固体支持物，这特别地可用于免疫测定或靶抗原的纯化。这种固体支持物包括但不限于玻璃、纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。

[0173] 抗体细胞因子移植蛋白活性的测定

[0174] 用于鉴定抗体细胞因子移植蛋白的测定是本领域已知的并且在本文中描述。激动剂抗体细胞因子移植蛋白与IL2低亲和力受体结合并且促进、诱导、刺激细胞内信号传导，从而导致CD8 T效应细胞增殖以及其他免疫刺激效应。

[0175] 抗体细胞因子移植蛋白与IL2低亲和力受体的结合可以使用本领域已知的任何方法来确定。例如，可以使用已知技术确定与IL2低亲和力受体的结合，包括但不限于ELISA、蛋白印迹、表面等离子共振 (SPR) (例如，BIAcore) 和流式细胞仪。

[0176] 通过IL2低亲和力受体的细胞内信号传导可以使用本领域已知的任何方法来测量。例如，通过IL2激活IL2低亲和力受体促进STAT5激活和信号传导。用于测量STAT5激活的

方法是本领域中标准的(例如,STAT5蛋白的磷酸化状态、报道基因测定、下游信号传导测定等)。通过IL2低亲和力受体激活扩增了CD8 T效应细胞,因此可以测定CD8 T效应细胞的绝对数,也可以测定CD8 T效应细胞与Treg的比率。测量细胞增殖的方法是本领域标准的(例如,³H-胸苷并入测定,CFSE标记)。测量细胞因子产生的方法是本领域熟知的(例如,ELISA测定,ELISpot测定)。在进行体外测定时,可以将与抗体细胞因子移植蛋白接触的测试细胞或来自测试细胞的培养上清液与尚未与抗体细胞因子移植蛋白接触和/或与重组人IL2(例如,**Proleukin®**)或IL2-Fc融合分子接触的对照细胞或来自对照细胞的培养上清液进行比较。

[0177] 抗体细胞因子移植蛋白的活性也可以离体和/或体内测量。在一些方面,如与未经治疗的对照动物和/或经**Proleukin®**类似治疗的动物相比,从用抗体细胞因子移植蛋白治疗的动物离体测量各种细胞类型中的STAT5激活的方法可用于显示细胞类型中的激动剂抗体移植蛋白的差异活性。优选的激动剂抗体细胞因子移植蛋白具有激活和扩增CD8 T效应细胞的能力。例如,可以使用本领域已知的任何方法,例如通过流式细胞术来测量CD8 T效应细胞的体内激活和扩增。优选的激动剂抗体细胞因子移植蛋白在治疗上可用于预防、减少、缓解或治疗癌症,例如:黑色素瘤、肺癌、大肠癌、前列腺癌、乳腺癌和淋巴瘤。细胞因子移植蛋白的功效可以通过向受试者施用治疗有效量的抗体细胞因子移植蛋白并且在施用抗体细胞因子移植蛋白之前和之后比较受试者来确定。抗体细胞因子移植蛋白的功效还可以通过向测试受试者施用治疗有效量的抗体细胞因子移植蛋白并且将测试受试者与未施用抗体的对照受试者进行比较和/或与类似用**Proleukin®**治疗的受试者的比较来确定。

[0178] 编码抗体细胞因子移植蛋白的多核苷酸

[0179] 在另一方面,提供了编码抗体细胞因子移植蛋白的重链和轻链蛋白的分离的核酸。抗体细胞因子移植蛋白可以通过本领域已知的任何手段产生,包括但不限于抗体四聚体的重组表达、化学合成、和酶促消化。重组表达可以来自本领域已知的任何适当的宿主细胞,例如哺乳动物宿主细胞、细菌宿主细胞、酵母宿主细胞、昆虫宿主细胞等。

[0180] 本文提供了编码以SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:68中的任何一个为例的可变区的多核苷酸。

[0181] 因此,本披露提供了编码本文所述的抗体细胞因子移植蛋白的轻链和/或重链多肽的多核苷酸,例如,编码轻链或重链可变区或包含如本文所述的互补决定区的区段的多核苷酸。在一些实施例中,编码重链可变区的多核苷酸包含与选自下组的多核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列同一性的序列,所述组由以下组成:SEQ ID NO:20、和SEQ ID NO:52。在一些实施例中,编码轻链可变区的多核苷酸包含与选自下组的多核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列同一性的序列,所述组由以下组成:SEQ ID NO:36、和SEQ ID NO:68。

[0182] 在一些实施例中,编码重链的多核苷酸与SEQ ID NO:22的多核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%核酸序列同一性。在一些实施例中,编码轻链的多核苷酸与SEQ ID NO:38的多核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%核酸序列同一性。

[0183] 在一些实施例中,编码重链的多核苷酸与SEQ ID NO:54的多核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%核酸序列同一性。在一些实施例中,编码轻链的多核苷酸与SEQ ID NO:70的所选择的多核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%核酸序列同一性。

[0184] 多核苷酸只能编码抗体细胞因子移植蛋白的可变区序列。它们还可以编码抗体细胞因子移植蛋白的可变区和恒定区。一些多核苷酸序列编码包含一种抗体细胞因子移植蛋白的重链和轻链的可变区的多肽。一些其他多核苷酸编码两种多肽区段,这两种多肽区段分别与一种抗体细胞因子移植蛋白的重链和轻链的可变区基本相同。

[0185] 在某些实施例中,多核苷酸或核酸包含DNA。在其他实施例中,多核苷酸或核酸包含RNA,其可以是单链或双链的。

[0186] 在一些实施例中,提供了重组宿主细胞,其包含编码抗体细胞因子移植蛋白的一个或多个免疫球蛋白链,以及任选地,分泌信号的核酸。在某些实施例中,重组宿主细胞包含编码一个免疫球蛋白链和分泌信号的载体。在其他某些实施例中,重组宿主细胞包含一个或多个编码抗体细胞因子移植蛋白和分泌信号的两条免疫球蛋白链的载体。在一些实施例中,重组宿主细胞包含单一载体,其编码抗体细胞因子移植蛋白和分泌信号的两条免疫球蛋白链。在一些实施例中,重组宿主细胞包含两个载体,一个载体编码抗体细胞因子移植蛋白的重链免疫球蛋白链,另一个编码轻链免疫球蛋白链,每个包括分泌信号。重组宿主细胞可以是原核或真核细胞。在一些实施例中,宿主细胞是真核细胞系。在一些实施例中,宿主细胞是哺乳动物细胞系。在一些实施例中,宿主细胞系是用于抗体产生的CHO细胞系。

[0187] 另外提供了用于产生抗体细胞因子移植蛋白的方法。在一些实施例中,该方法包括以下步骤:(i)在适合于表达、形成和分泌抗体细胞因子移植蛋白的条件下,培养包含一种或多种编码抗体细胞因子移植蛋白的免疫球蛋白链的载体的宿主细胞,并且(ii)回收抗体细胞因子移植蛋白。

[0188] 多核苷酸序列可以通过从头固相DNA合成或通过PCR诱变编码抗体细胞因子移植蛋白的多肽链的现有序列(例如,如本文所述的序列)来产生。核酸的直接化学合成可以通过本领域已知的方法完成,如Narang等人,Meth.Enzymol.[酶学方法]68:90,1979;Brown等人的磷酸二酯方法,Meth.Enzymol.[酶学方法]68:109,1979;Beaucage等人的二乙基亚磷酰胺方法,Tetra.Lett.[四面体快报],22:1859,1981;和美国专利号4,458,066的固体支持方法。通过PCR向多核苷酸序列引入突变可以如以下文献中所述进行,例如PCR Technology:Principles and Applications for DNA Amplification[PCR技术:DNA扩增的原理和应用],H.A.Erlich(编辑),Freeman Press[弗里曼出版社],纽约,纽约州,1992;PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications[PCR方案:方法和应用指南],Innis等人,(编辑),Academic Press[学术出版社],圣地亚哥,加利福尼亚州,1990;Mattila等人,Nucleic Acids Res.[核酸研究]19:967,1991;以及Eckert等人,PCR Methods and Applications[PCR方法和应用]1:17,1991。

[0189] 本披露还提供了表达载体和宿主细胞,用于产生上述抗体细胞因子移植蛋白。可以使用各种表达载体来表达编码抗体细胞因子移植蛋白的免疫球蛋白多肽链或片段的多核苷酸。基于病毒的载体和非病毒表达载体均可用于在哺乳动物宿主细胞中产生免疫球蛋

白。非病毒载体和系统包括质粒、附加型载体(典型地具有用于表达蛋白或RNA的表达盒)以及人类人工染色体(参见,例如,Harrington等人,Nat.Genet.[自然遗传学]15:345,1997)。例如,可用于哺乳动物(例如,人)细胞中表达抗体细胞因子移植蛋白多核苷酸和多肽的非病毒载体包括pThioHis A、B和C、pcDNA3.1/His、pEBVHis A、B和C(英杰公司(Invitrogen),加利福尼亚州圣地亚哥)、MPSV载体和本领域已知用于表达其他蛋白的许多其他载体。有用的病毒载体包括基于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒的载体,基于SV40、乳头瘤病毒、HBV EB病毒、牛痘病毒载体和塞姆利基森林病毒(Semliki Forest virus)(SFV)的载体。参见,Brent等人,同上;Smith,Annu.Rev.Microbiol.[微生物学年度评论]49:807,1995;和Rosenfeld等人,Cell[细胞]68:143,1992。

[0190] 表达载体的选择取决于要表达该载体的预期宿主细胞。典型地,表达载体含有与编码抗体细胞因子移植蛋白的免疫球蛋白的多核苷酸可操作地连接的启动子和其他调节序列(例如,增强子)。在一些实施例中,采用诱导型启动子以防止插入的序列在诱导条件之外的条件下表达。诱导型启动子包括例如阿拉伯糖、lacZ、金属硫蛋白启动子或热激启动子。可以在非诱导条件下、而不在偏向宿主细胞更好耐受其表达产物的编码序列的群体的情况下扩大经转化的生物体的培养。除了启动子以外,还可能需要或期望其他调节元件以有效表达免疫球蛋白链或抗体细胞因子移植蛋白的片段。这些元件典型地包括ATG起始密码子和相邻的核糖体结合位点或其他序列。此外,通过包含适合于使用中的细胞系统的增强子,可以提高表达效率(参见,例如,Scharf等人,Results Probl.Cell Differ.[细胞分化中的结果和问题]20:125,1994;和Bittner等人,Meth.Enzymol.[酶学方法],153:516,1987)。例如,SV40增强子或CMV增强子可以用来增加哺乳动物宿主细胞中的表达。

[0191] 表达载体还可以提供分泌信号序列位置,以形成抗体细胞因子移植蛋白,该抗体细胞因子移植蛋白从细胞中输出并且进入培养基。在某些方面,抗体细胞因子移植蛋白的插入的免疫球蛋白序列在包含在载体中之前与信号序列连接。用于接收编码免疫球蛋白轻链和重链可变结构域的序列的载体有时也编码恒定区或其部分。此类载体允许将可变区表达为具有恒定区的移植的蛋白,从而导致产生完整抗体细胞因子移植蛋白或其片段。典型地,此类恒定区是人的。

[0192] 用于携带和表达抗体细胞因子移植蛋白链的宿主细胞可以是原核或真核的。大肠杆菌是一种可用于克隆并且表达本披露多核苷酸的原核宿主。适合使用的其他微生物宿主包括杆菌(如枯草杆菌)和其他肠杆菌科(如沙门氏菌属、沙雷氏菌属)以及各种假单胞菌属的物种。在这些原核宿主中,还可以制备表达载体,其通常含有与宿主细胞相容的表达控制序列(例如,复制的起点)。此外,将存在任何数量的多种熟知的启动子,如乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统、 β -内酰胺酶启动子系统或来自噬菌体 λ 的启动子系统。启动子典型地任选使用操纵基因序列控制表达,并且具有核糖体结合位点序列等,以用于启动和完成转录和翻译。其他微生物,例如酵母,也可以用于表达抗体细胞因子移植蛋白多肽。也可以使用与杆状病毒载体组合的昆虫细胞。

[0193] 在一些优选的实施例中,哺乳动物宿主细胞用于表达和产生抗体细胞因子移植蛋白多肽。例如,它们可以是含有外源表达载体的哺乳动物细胞系。这些包括任何正常的必死或正常或异常的永生的动物或人细胞。例如,已经开发了许多能够分泌完整免疫球蛋白的合适宿主细胞系,包括CHO细胞系、各种Cos细胞系、HeLa细胞、骨髓瘤细胞系、转化的B细胞

和杂交瘤。利用哺乳动物组织细胞培养表达多肽一般在例如Winnacker, FROM GENES TO CLONES [从基因到克隆], VCH出版商, 纽约, 纽约州, 1987中讨论。哺乳动物宿主细胞的表达载体可包括表达控制序列如复制的起点、启动子和增强子(参见, 例如, Queen等人, Immunol. Rev. [免疫学评论] 89: 49-68, 1986) 和必要的处理信息位点如核糖体结合位点、RNA剪接位点、聚腺苷酸化位点和转录终止子序列。这些表达载体通常含有衍生自哺乳动物基因或衍生自哺乳动物病毒的启动子。合适的启动子可以是组成型的、细胞类型特异性的、阶段特异性的和/或可调控的或可调节的。可用启动子包括但不限于金属硫蛋白启动子、组成型腺病毒主要晚期启动子、地塞米松诱导型MMTV启动子、SV40启动子、MRP polIII启动子、组成型MPSV启动子、四环素诱导型CMV启动子(如人CMV立即早期启动子)、组成型CMV启动子和本领域已知的启动子-增强子组合。

[0194] 用于引入含有目的多核苷酸序列的表达载体的方法根据细胞宿主的类型而变化。例如, 氯化钙转染通常用于原核细胞, 而磷酸钙处理或电穿孔可用于其他细胞宿主(通常参见Sambrook等人, 同上)。其他方法包括例如电穿孔、磷酸钙处理、脂质体介导的转化、注射和显微注射、冲击法、病毒体、免疫脂质体、聚阳离子: 核酸缀合物、裸DNA、人工病毒粒子、所移植到的疱疹病毒结构蛋白VP22 (Elliot和O' Hare, Cell [细胞] 88: 223, 1997)、试剂增强的DNA摄取和离体转导。对于重组蛋白的长期高产量产生, 通常期望稳定的表达。例如, 可以使用含有病毒复制起点或内源性表达元件和可选择标志物基因的表达载体来制备稳定表达抗体细胞因子移植蛋白免疫球蛋白链的细胞系。在引入载体之后, 可以使细胞在富集的培养基中生长1-2天, 之后将它们转换至选择性培养基。选择性标志物的目的是赋予选择抗性, 并且它的存在允许在选择性培养基中成功地表达引入的序列的细胞的生长。可以使用适合于细胞类型的组织培养技术来增殖抗性、稳定转染的细胞。

[0195] 包含抗体细胞因子移植蛋白的组合物

[0196] 提供了药物组合物, 其包含与药学上可接受的载体一起配制的抗体细胞因子移植蛋白。任选地, 药物组合物另外包含适合于治疗或预防给定障碍的其他治疗剂。药学上可接受的载体使组合物强化或稳定, 或促进组合物的制备。药学上可接受的载体包括生理上相容的溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。

[0197] 本披露的药物组合物可通过本领域已知的各种方法施用。施用途径和/或方式根据所期望的结果而变化。优选的是通过肠胃外施用(例如, 选自静脉内, 肌肉内, 腹膜内, 鞘内, 动脉内或皮下中的任何一种) 进行施用, 或者在靶部位附近施用。药学上可接受的载体适合通过静脉内、肌内、腹膜内、鞘内、动脉内、皮下、鼻内、吸入、脊椎或表皮施用中的任何一种或多种(例如, 通过注射) 施用。取决于施用途径, 可以将活性化合物(例如, 抗体细胞因子移植蛋白) 包被在材料中, 以保护该化合物免受酸和可能使该化合物失活的其他自然条件的作用。在一些实施例中, 将药物组合物配制用于静脉内施用。在一些实施例中, 将药物组合物配制用于皮下施用。

[0198] 可以将抗体细胞因子移植蛋白单独或与其他合适的成分组合制成气雾剂(即可以“雾化”) 以通过吸入施用。可以将气溶胶配制品放入加压的可接受的推进剂中, 例如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等。

[0199] 在一些实施例中, 药物组合物是无菌的和流体的。可以例如通过使用包衣(如卵磷脂)、通过在分散液的情况下维持所需颗粒大小以及通过使用表面活性剂来维持适当的流

动性。在许多情况下,优选在组合物中包含等渗剂例如糖、多元醇(如甘露醇或山梨糖醇)和氯化钠。可以通过在组合物中包含延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝或明胶)来实现可注射组合物的长期吸收。在某些实施例中,可以使用合适的赋形剂(例如,蔗糖)将组合物制备成冻干形式储存。

[0200] 药物组合物可以按照本领域熟知和常规实施的方法制备。药学上可接受的载体部分地通过所施用的具体组合物、连同通过施用该组合物所使用的具体方法来确定。因此,存在多种合适的药物组合物配制品。例如在以下文献中可以找到用于配制抗体细胞因子移植蛋白并且确定适当给药和时序安排的适用方法,Remington:The Science and Practice of Pharmacy[雷明顿:药学科学与实践],第21版,费城科学大学,编辑,Lippincott Williams&Wilkins(2005);以及Martindale:The Complete Drug Reference[马丁代尔:完整的药物参考],Sweetman,2005,London:Pharmaceutical Press.[伦敦:制药出版社],以及Martindale,Martindale:The Extra Pharmacopoeia[马丁代尔:额外的药典],第31版.,1996,Amer Pharmaceutical Assn[美国医药协会],以及Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems[持续控制释放药物输送系统],J.R.Robinson编辑,Marcel Dekker,Inc.[马塞尔德克尔公司],纽约,1978。药物组合物优选在GMP条件下制造。典型地,在药物组合物中采用治疗有效剂量或有效剂量的抗体细胞因子移植蛋白。通过本领域技术人员已知的常规方法将抗体细胞因子移植蛋白配制成药学上可接受的剂型。调整剂量方案以提供所期望反应(例如,治疗反应)。在确定治疗或预防有效剂量时,可先施用低剂量,并且然后逐渐增加剂量,直至获得所期望的反应,具有极少或没有不期望的副作用。例如,如由治疗情况的紧急状态所指示的,可以施用单次推注,可以随着时间的推移施用若干个分次剂量,或可以按比例地减少或增加剂量。特别有利的是以剂量单位形式配制肠胃外组合物以便施用和剂量统一。如本文所用的剂量单位形式是指适合作为用于要治疗的受试者的单元剂量的物理上离散的单位;每个单位含有经计算与所要求的药物载体联合产生所期望的治疗效果的预定量的活性化合物。

[0201] 可以改变药物组合物中活性成分的实际剂量水平,以便获得一定量的活性成分,该活性成分的量有效地实现对于特定的患者、组合物和施用方式的所期望的治疗反应,而对该患者没有毒性。所选的剂量水平取决于多种药代动力学因素,包括所用的特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性、施用途径、施用时间、正在使用的特定化合物的排泄速率、治疗的持续时间、与所用特定组合物组合使用的其他药物、化合物和/或材料、正在治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、总体健康和既往病史。

[0202] 制品/试剂盒

[0203] 在某些方面,在制品(即,试剂盒)中提供了抗体细胞因子移植蛋白。提供的抗体细胞因子移植蛋白通常在小瓶或容器中。因此,制品包含容器和在容器上或与容器相关的标签或包装说明书。合适的容器包括,例如,瓶,小瓶,注射器,溶液袋等。适当地,抗体细胞因子移植蛋白可以是处于液体中或干燥(例如冻干)形式。该容器装有一种组合物,该组合物本身或与另一种组合物可有效地制备用于治疗、预防和/或缓解癌症的组合物。标签或包装说明书表明该组合物用于治疗、预防和/或缓解癌症。如本文所述,包含抗体细胞因子移植蛋白的制品(试剂盒)任选地含有一种或多种另外的试剂。在一些实施例中,制品(试剂盒)含有抗体细胞因子移植蛋白和药学上可接受的稀释剂。在一些实施例中,在制品(试剂盒)

中提供了抗体细胞因子移植蛋白,其在相同配制品中(例如,作为混合物)具有一种或多种另外的活性剂。在一些实施例中,在制品(试剂盒)中提供了抗体的细胞因子移植蛋白,其在分开的配制品中(例如,在分开的容器中)具有第二或第三试剂。在某些实施例中,制品(试剂盒)包含抗体细胞因子移植蛋白的等分试样,其中等分试样提供了一个或多个剂量。在一些实施例中,提供了用于多次施用的等分试样,其中剂量是均匀的或变化的。在特定的实施例中,适当时,变化的给药方案是逐步增加或减少。在一些实施例中,抗体细胞因子移植蛋白和第二试剂的剂量独立地均匀或独立地变化。在某些实施例中,制品(试剂盒)包含另外的试剂,例如抗癌剂或免疫检查点分子。一种或多种另外的试剂的选择将取决于剂量、递送和要治疗的疾病状况。

[0204] 治疗方法和组合物用于治疗癌症的用途

[0205] 经受治疗或预防的病症

[0206] 抗体细胞因子移植蛋白可用于治疗、缓解或预防癌症。在一方面,本披露提供了在有需要的个体中治疗癌症的方法,这些方法包括向该个体施用治疗有效量的抗体细胞因子移植蛋白,如本文所述。在一些实施例中,提供了抗体细胞因子移植蛋白,以用作治疗剂,用于治疗或预防个体中的癌症。在另一方面,本披露提供了组合物,其包含用于治疗或缓解有需要的个体中的癌症的这种抗体细胞因子移植蛋白。

[0207] 经受治疗的病症包括各种癌症适应症。出于治疗目的,个人被诊断出患有癌症。出于预防或预防目的,个体可以从癌症中缓解或可以预期将来发作。在一些实施例中,患者患有癌症,被怀疑患有癌症或从癌症中缓解。经受用抗体细胞因子移植蛋白的治疗的癌症通常受益于IL2低亲和力受体信号传导的激活,如本文所述。经受治疗的癌症适应症包括但不限于:黑色素瘤、肺癌、大肠癌、前列腺癌、乳腺癌和淋巴瘤。

[0208] 抗体细胞因子移植蛋白的施用

[0209] 医生或兽医可以以低于达到期望治疗效果所需的水平开始药物组合物中使用的抗体细胞因子移植蛋白的剂量,并且逐渐增加剂量直至达到期望效果。通常,组合物的有效剂量取决于许多不同因素而变化,这些因素包括要治疗的具体疾病或病症、施用手段、靶位点、患者的生理状态,无论患者是人还是动物,所施用的其他药物,以及治疗是预防性还是治疗性。治疗剂量通常需要滴定以优化安全性和功效。对于用抗体细胞因子移植蛋白施用,剂量范围为约0.0001至100mg/kg宿主体重,且更通常为0.01至5mg/kg宿主体重。例如,剂量可以是1mg/kg体重或10mg/kg体重、或在1-10mg/kg的范围内。根据需要或期望,给药可以是每天、每周、每两周、每月一次或更经常或不经常地进行。示例性治疗方案需要每周一次、每两周一次或每月一次或每3至6个月一次施用。

[0210] 抗体细胞因子移植蛋白可以单剂量或分剂量施用。抗体细胞因子移植蛋白通常多次施用。根据需要或期望,单次剂量之间的间隔可以是每周、每两周、每月或每年。间隔也可以是无规律的,如通过测量患者中抗体细胞因子移植蛋白的血液水平所指示的。在一些方法中,调节剂量以实现1-1000 μ g/mL的血浆抗体细胞因子移植蛋白浓度,并且在一些方法中是25-300 μ g/mL。可替代地,抗体细胞因子移植蛋白可以作为持续释放配制品施用,在这种情况下需要不太频繁的施用。剂量和频率根据患者中抗体细胞因子移植蛋白的半衰期而变化。通常,抗体移植蛋白的半衰期比天然IL2或重组细胞因子(如Proleukin®)更长。施用的剂量和频率可以根据治疗是预防性还是治疗性而变化。通常,对于预防性应用,在长时间

段内以相对不频繁的间隔施用相对较低的剂量。一些患者在其一生中继续接受治疗。通常，对于预防性应用，有时需要以相对较短的间隔用相对较高的剂量直至疾病进展减少或终止，并且优选直至患者显示疾病症状的部分或完全缓解。此后，可以向患者施用预防性方案。

[0211] 与第二试剂共同施用

[0212] 术语“组合疗法”是指施用两种或更多种治疗剂以治疗在本披露中描述的所治疗的病症或障碍。这种施用涵盖以基本上同时的方式共同施用这些治疗剂，如以具有固定比例的活性成分的单个胶囊施用。可替代地，这种施用涵盖在多个容器中或在每种活性成分的独立容器（例如，胶囊、粉末和液体）中共同施用。可以将粉末和/或液体在施用之前重构或稀释到所期望的剂量。此外，这种施用也涵盖在大致相同的时间或在不同的时间以依序方式使用每种类型的治疗剂。在任何一种情况下，治疗方案将在治疗本文所述的病症或障碍方面提供药物组合的有益作用。

[0213] 组合疗法可提供“协同作用”并证明是“协同的”，即，当活性成分一起使用时实现的效果大于单独使用化合物所产生的效果的总和。当将活性成分为下述情形时可以获得协同效应：(1) 共同配制并以组合的单位剂量配制品的形式同时施用或递送；(2) 以单独配制品的形式交替或平行递送；或(3) 通过一些其他方案进行。当以交替疗法递送时，可以在依序（例如通过在单独注射器中不同的注射）施用或递送化合物时获得协同效应。通常，在交替疗法期间，将有效剂量的每种活性成分依序地即顺次地施用，而在组合疗法中，将有效剂量的两种或更多种活性成分一起施用。

[0214] 在一方面，本披露提供了一种通过向有需要的受试者施用与一种或多种酪氨酸激酶抑制剂组合的抗体来治疗癌症的方法，该一种或多种酪氨酸激酶抑制剂包括但不限于EGFR抑制剂、Her2抑制剂、Her3抑制剂、IGFR抑制剂和Met抑制剂。

[0215] 例如，酪氨酸激酶抑制剂包括但不限于盐酸埃罗替尼(erlotinib) (Tarceva®)；利尼法尼(Linifanib) (N-[4-(3-氨基-1H-吡唑-4-基) 苯基]-N'-(2-氟-5-甲基苯基) 脲，也称为ABT 869，可购自基因泰克公司(Genentech)；苹果酸舒尼替尼(Sutent®)；柏舒替尼(Bosutinib) (4-[(2,4-二氯-5-甲氧基苯基) 氨基]-6-甲氧基-7-[3-(4-甲基哌嗪-1-基) 丙氧基] 喹啉-3-甲腈，也称为SKI-606，并且描述于美国专利号6,780,996中)；达沙替尼(Sprycel®)；帕唑帕尼(Votrient®)；索拉非尼(Nexavar®)；凡德他尼(ZD6474)；尼洛替尼(nilotinib) (Tasigna®)；瑞戈非尼(Regorafenib) (Stivarga®)和伊马替尼或甲磺酸伊马替尼(Gilvec®和Gleevec®)。

[0216] 表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂包括但不限于盐酸埃罗替尼(erlotinib) (Tarceva®)、吉非替尼(Iressa®)；N-[4-[(3-氯-4-氟苯基) 氨基]-7-[[(3"S)-4-氢-3-呋喃基] 氧基]-6-喹唑啉基]-4(二甲基氨基)-2-丁烯酰胺，Tovok®)；凡德他尼(Vandetanib) (Caprelsa®)；拉帕替尼(Tykerb®)；(3R,4R)-4-氨基-1-((4-((3-甲氧基苯基) 氨基) 吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-5-基) 甲基) 哌啶-3-醇(BMS690514)；二盐酸卡奈替尼(CI-1033)；6-[4-[(4-乙基-1-哌嗪基) 甲基] 苯基]-N-[(1R)-1-苯基乙基]-7H-

吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-胺(AEE788,CAS 497839-62-0);木利替尼(Mubritinib)(TAK165);培立替尼(EKB569);阿法替尼(BIBW2992);来那替尼(Neratinib)(HKI-272);N-[4-[[1-[(3-氟苯基)甲基]-1H-吡唑-5-基]氨基]-5-甲基吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-6-基]-氨基甲酸,(3S)-3-吗啉基甲酯(BMS599626);N-(3,4-二氯-2-氟苯基)-6-甲氧基-7-[[3 α ,5 β ,6 α]-八氢-2-甲基环戊二烯并[c]吡咯-5-基]甲氧基]-4-喹唑啉胺(XL647,CAS 781613-23-8);和4-[4-[(1R)-1-苯乙基]氨基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-基]-苯酚(PKI166,CAS 187724-61-4)。

[0217] EGFR抗体包括但不限于西妥昔单抗(**Erbix®**) ;帕尼单抗(**Vectibix®**) ;马妥珠单抗(EMD-72000);尼妥珠单抗(Nimotuzumab)(hR3);扎妥木单抗(Zalutumumab);TheraCIM h-R3;MDX0447(CAS 339151-96-1);和ch806(mAb-806,CAS 946414-09-1)。

[0218] 人表皮生长因子受体2(HER2受体)(也称为Neu、ErbB-2、CD340或p185)抑制剂包括但不限于曲妥珠单抗(**Herceptin®**) ;帕妥珠单抗(**Omnitarg®**) ;来那替尼(HKI-272,(2E)-N-[4-[[3-氯-4-[(吡啶-2-基)甲氧基]苯基]氨基]-3-氰基-7-乙氧喹啉-6-基]-4-(二甲基氨基)丁-2-烯酰胺,并且描述于PCT公开号W0 05/028443);拉帕替尼或二甲苯磺酸拉帕替尼(**Tykerb®**) ;(3R,4R)-4-氨基-1-((4-((3-甲氧基苯基)氨基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-5-基)甲基)哌啶-3-醇(BMS690514);(2E)-N-[4-[(3-氯-4-氟苯基)氨基]-7-[[3S]-四氢-3-呋喃基]氧基]-6-喹唑啉基]-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰胺(BIBW-2992,CAS 850140-72-6);N-[4-[[1-[(3-氟苯基)甲基]-1H-吡唑-5-基]氨基]-5-甲基吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-6-基]-氨基甲酸、(3S)-3-吗啉基甲酯(BMS 599626,CAS 714971-09-2);二盐酸卡奈替尼(PD183805或CI-1033);和N-(3,4-二氯-2-氟苯基)-6-甲氧基-7-[[3 α ,5 β ,6 α]-八氢-2-甲基环戊[c]吡咯-5-基]甲氧基]-4-喹唑啉胺(XL647,CAS 781613-23-8)。

[0219] HER3抑制剂包括但不限于LJM716、MM-121、AMG-888、RG7116、REGN-1400、AV-203、MP-RM-1、MM-111、和MEHD-7945A。

[0220] MET抑制剂包括但不限于卡博替尼(Cabozantinib)(XL184,CAS 849217-68-1);氟列替布(Foretinib)(GSK1363089,以前称为XL880,CAS 849217-64-7);替万替尼(Tivantinib)(ARQ197,CAS 1000873-98-2);1-(2-羟基-2-甲基丙基)-N-(5-(7-甲氧基喹啉-4-基氧基)吡啶-2-基)-5-甲基-3-氧代-2-苯基-2,3-二氢-1H-吡唑-4-甲酰胺(AMG 458);克唑替尼(**Xalkori®**,PF-02341066);(3Z)-5-(2,3-二氢-1H-吡啶-1-基磺酰基)-3-({3,5-二甲基-4-[(4-甲基哌嗪-1-基)羰基]-1H-吡咯-2-基}亚甲基)-1,3-二氢-2H-吡啶-2-酮(SU11271);(3Z)-N-(3-氯苯基)-3-({3,5-二甲基-4-[(4-甲基哌嗪-1-基)羰基]-1H-吡咯-2-基}亚甲基)-N-甲基-2-氧代吡啶-5-磺酰胺(SU11274);(3Z)-N-(3-氯苯基)-3-({3,5-二甲基-4-(3-吗啉-4-基丙基)-1H-吡咯-2-基}亚甲基)-N-甲基-2-氧代吡啶-5-磺酰胺(SU11606);6-[二氟[6-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-三唑并[4,3-b]哒嗪-3-基]甲基]-喹啉(JNJ38877605,CAS 943540-75-8);2-[4-[1-(喹啉-6-基甲基)-1H-[1,2,3]三唑并[4,5-b]吡嗪-6-基]-1H-吡唑-1-基]乙醇(PF04217903,CAS 956905-27-4);N-((2R)-1,4-二噁烷-2-基甲基)-N-甲基-N'-[3-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-5-氧代-5H-苯并[4,5]环庚并[1,2-b]吡啶-7-基]磺酰胺(MK2461,CAS 917879-39-1);6-[6-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-三唑并[4,3-b]哒嗪-3-基]硫代]-喹啉(SGX523,CAS 1022150-57-7);以及

(3Z)-5-[[(2,6-二氯苯基) 甲基] 磺酰基]-3-[[3,5-二甲基-4-[[(2R)-2-(1-吡咯烷基甲基)-1-吡咯烷基] 羰基]-1H-吡咯-2-基] 亚甲基]-1,3-二氢-2H-吡啶-2-酮 (PHA665752, CAS 477575-56-7)。

[0221] IGF1R抑制剂包括但不限于BMS-754807、XL-228、OSI-906、GSK0904529A、A-928605、AXL1717、KW-2450、MK0646、AMG479、IMCA12、MEDI-573和BI836845。参见例如, Yee, JNCI [国家癌症研究所杂志], 104;975 (2012) 的综述。

[0222] 在另一方面, 本发明提供了一种通过向有需要的受试者施用与一种或多种FGF下游信号传导途径抑制剂组合的抗体细胞因子移植蛋白来治疗癌症的方法, 该一种或多种FGF下游信号传导途径抑制剂包括但不限于MEK抑制剂、Braf抑制剂、PI3K/Akt抑制剂、SHP2抑制剂、以及还有mTor抑制剂。

[0223] 例如, 促分裂原活化蛋白激酶 (MEK) 抑制剂包括但不限于XL-518 (也称为GDC-0973, Cas号1029872-29-4, 可从ACC集团 (ACC Corp.) 获得); 2-[(2-氯-4-碘苯基) 氨基]-N-(环丙基甲氧基)-3,4-二氟-苯甲酰胺 (也称为CI-1040或PD184352, 并描述于PCT公开号W0 2000035436); N-[(2R)-2,3-二羟基丙氧基]-3,4-二氟-2-[(2-氟-4-碘苯基) 氨基]-苯甲酰胺 (也称为PD0325901, 并描述于PCT公开号W0 2002006213); 2,3-双[氨基[(2-氨基苯基) 硫代] 亚甲基]-丁二腈 (也称为U0126, 并描述于美国专利号2,779,780); N-[3,4-二氟-2-[(2-氟-4-碘苯基) 氨基]-6-甲氧基苯基]-1-[(2R)-2,3-二羟基丙基]-环丙烷磺酰胺 (也称为RDEA119或BAY869766, 并描述于PCT公开号W0 2007014011); (3S,4R,5Z,8S,9S,11E)-14-(乙基氨基)-8,9,16-三羟基-3,4-二甲基-3,4,9,19-四氢-1H-2-苯并氧杂环四癸炔-1,7(8H)-二酮] (也称为E6201, 并描述于PCT公开号W0 2003076424); 2'-氨基-3'-甲氧基黄酮 (也称为PD98059, 可从德国比亚芬股份有限公司 (Biaffin GmbH&Co., KG) 获得); 威罗菲尼 (PLX-4032, CAS 918504-65-1); (R)-3-(2,3-二羟基丙基)-6-氟-5-(2-氟-4-碘苯基氨基)-8-甲基吡啶并[2,3-d] 嘧啶-4,7(3H,8H)-二酮 (TAK-733, CAS 1035555-63-5);

[0224] 匹玛舍替 (Pimasertib) (AS-703026, CAS 1204531-26-9); 和二甲亚砷曲美替尼 (GSK-1120212, CAS 1204531-25-80)。

[0225] 磷酸肌醇3-激酶 (PI3K) 抑制剂包括但不限于4-[2-(1H-吡啶-4-基)-6-[[4-(甲磺酰基) 哌嗪-1-基] 甲基] 噻吩并[3,2-d] 嘧啶-4-基] 吗啉 (也称为GDC 0941并且描述于PCT公开号W0 09/036082和W0 09/055730); 2-甲基-2-[4-[3-甲基-2-氧代-8-(喹啉-3-基)-2,3-二氢咪唑并[4,5-c] 喹啉-1-基] 苯基] 丙腈 (也称为BEZ 235或NVP-BEZ 235, 并且描述于PCT公开号W0 06/122806); 4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉代嘧啶-4-基) 吡啶-2-胺 (也称为BKM120或NVP-BKM120, 并且描述于PCT公开号W0 2007/084786); 托扎舍替 (Tozasertib) (VX680或MK-0457, CAS 639089-54-6); (5Z)-5-[[4-(4-吡啶基)-6-喹啉基] 亚甲基]-2,4-噻唑烷二酮 (GSK1059615, CAS 958852-01-2); (1E,4S,4aR,5R,6aS,9aR)-5-(乙酰氧基)-1-[(二-2-丙烯基氨基) 亚甲基]-4,4a,5,6,6a,8,9,9a-八氢-11-羟基-4-(甲氧基甲基)-4a,6a-二甲基-环戊二烯并[5,6] 萘并[1,2-c] 吡喃-2,7,10(1H)-三酮 (PX866, CAS 502632-66-8); 和8-苯基-2-(吗啉-4-基)-色烯-4-酮 (LY294002, CAS 154447-36-6)。

[0226] mTor抑制剂包括但不限于坦罗莫司 (Torisel®); 地磷莫司 (ridaforolimus) (正式地称为deferolimus, (1R,2R,4S)-4-[(2R)-2[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-二羟基-19,30-二甲氧基-15,17,21,23,29,35-六

甲基-2,3,10,14,20-五氧杂-11,36-二氧杂-4-氮杂三环[30.3.1.0^{4,9}]三十六碳-16,24,26,28-四烯-12-基]丙基]-2-甲氧基环己基二甲基次膦酸酯,也称为AP23573和MK8669,并且描述于PCT公开号WO 03/064383中);依维莫司(**Afinitor®**或RAD001);雷帕霉素(AY22989,**Sirolimus®**);塞马莫德(simapimod)(CAS 164301-51-3);(5-{2,4-双[(3S)-3-甲基吗啉-4-基]吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-基}-2-甲氧基苯基)甲醇(AZD8055);2-氨基-8-[反式-4-(2-羟基乙氧基)环己基]-6-(6-甲氧基-3-吡啶基)-4-甲基-吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(8H)-酮(PF04691502,CAS 1013101-36-4);和N²-[1,4-二氧代-4-[[4-(4-氧代-8-苯基-4H-1-苯并吡喃-2-基)吗啉-4-基]甲氧基]丁基]-L-精氨酸甘氨酸-L-α-天冬氨酸L-丝氨酸-("L-精氨酸甘氨酸-L-α-天冬氨酸L-丝氨酸"披露为SEQ ID NO:77)、内盐(SF1126,CAS 936487-67-1)。

[0227] 在又另一方面,本披露提供了一种通过向有需要的受试者施用与一种或多种促凋亡剂组合的抗体细胞因子移植蛋白来治疗癌症的方法,该一种或多种促凋亡剂包括但不限于IAP抑制剂、Bcl2抑制剂、Mcl1抑制剂、Trail剂、Chk抑制剂。

[0228] 例如,IAP抑制剂包括但不限于NVP-LCL161、GDC-0917、AEG-35156、AT406、和TL32711。IAP抑制剂的其他实例包括但不限于WO 04/005284、WO 04/007529、WO 05/097791、WO 05/069894、WO 05/069888、WO 05/094818、US 2006/0014700、US 2006/0025347、WO 06/069063、WO 06/010118、WO 06/017295、和WO 08/134679中披露的那些。

[0229] BCL-2抑制剂包括但不限于4-[4-[[2-(4-氯苯基)-5,5-二甲基-1-环己烯-1-基]甲基]-1-哌嗪基]-N-[[4-[[[(1R)-3-(4-吗啉基)-1-[(苯硫基)甲基]丙基]氨基]-3-[(三氟甲基)磺酰基]苯基]磺酰基]苯甲酰胺(也称为ABT-263,并描述于PCT公开号WO 09/155386);四制癌素A;抗霉素;棉酚((-)BL-193);奥巴妥拉(Obatoclox);乙基-2-氨基-6-环戊基-4-(1-氰基-2-乙氧基-2-氧乙基)-4H色酮-3-甲酸酯(HA14-1);奥利默森(Oblimersen)(G3139,**Genasense®**);Bak BH3肽;(-)-棉酚乙酸(AT-101);4-[4-[(4'-氯[1,1'-二苯基]-2-基)甲基]-1-哌嗪基]-N-[[4-[[[(1R)-3-(二甲基氨基)-1-[(苯硫基)甲基]丙基]氨基]-3-硝基苯基]磺酰基]-苯甲酰胺(ABT-737,CAS 852808-04-9);和那维托克萊克斯(Navitoclox)(ABT-263,CAS 923564-51-6)。

[0230] 促凋亡受体激动剂(PARA)包括DR4(TRAILR1)和DR5(TRAILR2),包括但不限于度拉纳明(Dulanermin)(AMG-951,RhApo2L/TRAIL);玛帕妥木单抗(Mapatumumab)(HRS-ETR1,CAS 658052-09-6);来沙木单抗(Lexatumumab)(HGS-ETR2,CAS 845816-02-6);Apomab(**Apomab®**);西他土珠(Conatumumab)(AMG655,CAS 896731-82-1);和替加珠单抗(Tigatuzumab)(CS1008,CAS 946415-34-5,可购自第一三共株式会社(Daiichi Sankyo))。

[0231] 检查点激酶(CHK)抑制剂包括但不限于7-羟基星形孢菌素(UCN-01);6-溴-3-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-5-(3R)-3-哌啶基-吡唑并[1,5-a]嘧啶-7-胺(SCH900776,CAS 891494-63-6);5-(3-氟苯基)-3-脲基噻吩-2-羧酸N-[(S)-哌啶-3-基]酰胺(AZD7762,CAS 860352-01-8);4-[[[(3S)-1-氮杂二环[2.2.2]辛-3-基]氨基]-3-(1H-苯并咪唑-2-基)-6-氯喹啉-2(1H)-酮(CHIR 124,CAS 405168-58-3);7-氨基更生霉素(7-AAD)、Isogranulatimide、debromohymenialdisine;N-[5-溴-4-甲基-2-[(2S)-2-吗啉基甲氧基]-苯基]-N'-(5-甲基-2-吡嗪基)脲(LY2603618,CAS 911222-45-2);萝卜硫素(CAS

4478-93-7、4-甲基亚磺酰基丁基异硫氰酸盐);9,10,11,12-四氢-9,12-环氧-1H-二吡啶[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]吡咯并[3,4-i][1,6]苯并二氮芳辛-1,3(2H)-二酮(SB-218078, CAS 135897-06-2);和TAT-S216A(Sha等人, Mol. Cancer. Ther [分子癌症治疗学] 2007;6(1):147-153),和CBP501。

[0232] 在一方面,本披露提供了一种通过向有需要的受试者施用与一种或多种FGFR抑制剂组合的抗体细胞因子移植蛋白来治疗癌症的方法。例如,FGFR抑制剂包括但不限于丙氨酸布立尼布(BMS-582664, (S)-(R)-1-(4-(4-氟-2-甲基-1H-吡啶-5-基氧基)-5-甲基吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-6-基氧基)丙烷-2-基)2-氨基丙酸酯);维加特(Vargatef)(BIBF1120, CAS 928326-83-4);多韦替尼二乳酸(Dovitinib dilactic acid)(TKI258, CAS 852433-84-2);3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲(BGJ398, CAS 872511-34-7);达鲁舍替(Danuserib)(PHA-739358);和(PD173074, CAS 219580-11-7)。在一具体方面,本披露提供了一种通过向有需要的受试者施用与FGFR2抑制剂组合的抗体药物缀合物来治疗癌症的方法,所述FGFR2抑制剂例如3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯基)-1-(6((4-(4-乙基哌嗪-1-基)苯基)氨基)嘧啶-4-基)-1-甲基脲(也称为BGJ-398);或4-氨基-5-氟-3-(5-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)喹啉-2(1H)-酮(也称为多韦替尼(dovitinib)或TKI-258)。AZD4547(Gavine等人, 2012, Cancer Research [癌症研究] 72, 2045-56, N-[5-[2-(3,5-二甲氧基苯基)乙基]-2H-吡啶-3-基]-4-(3R,5S)-二甲基哌嗪-1-基)苯甲酰胺)、Ponatinib(AP24534;Gozgit等人, 2012, Mol. Cancer Ther. [分子癌症治疗学], 11;690-99;3-[2-(咪唑[1,2-b]哒嗪-3-基)乙炔基]-4-甲基-N-{4-[(4-甲基哌嗪-1-基)甲基]-3-(三氟甲基)苯基}苯甲酰胺, CAS 943319-70-8)。

[0233] 抗体细胞因子移植蛋白也可以与免疫检查点抑制剂组合施用。在一个实施例中,可以将抗体细胞因子移植蛋白与选自以下中的一个或多个的免疫检查点分子的抑制剂组合施用:PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM3、CTLA-4、LAG-3、CEACAM-1、CEACAM-5、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4或TGFR。在一个实施例中,免疫检查点分子抑制剂是抗PD-1抗体,其中所述抗PD-1抗体选自纳武单抗(Nivolumab)、派姆单抗(Pembrolizumab)或皮地利珠单抗(Pidilizumab)。在一些实施例中,抗PD-1抗体分子是纳武单抗。纳武单抗的替代性名称包括MDX-1106、MDX-1106-04、ONO-4538或BMS-936558。在一些实施例中,抗PD-1抗体是纳武单抗(CAS登记号:946414-94-4)。纳武单抗是特异性阻断PD1的完全人IgG4单克隆抗体。在US 8,008,449和WO 2006/121168中披露了与PD1特异性结合的纳武单抗(克隆5C4)和其他人单克隆抗体。

[0234] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是派姆单抗。派姆单抗(也称为Lambrolizumab, MK-3475, MK03475, SCH-900475或**KEYTRUDA**[®];默克公司(Merck)是与PD-1结合的人源化IgG4单克隆抗体。派姆单抗和其他人源化抗PD-1抗体在Hamid, O.等人(2013) New England Journal of Medicine [新英格兰医学杂志] 369(2):134-44、US 8,354,509和WO 2009/114335中披露。

[0235] 在一些实施例中,该抗PD-1抗体是匹地利珠单抗。匹地利珠单抗(CT-011;治疗科技公司(Cure Tech))是与PD1结合的人源化IgG1k单克隆抗体。匹地利珠单抗和其他人源化抗PD-1单克隆抗体公开于WO 2009/101611中。

[0236] 其他抗PD1抗体包括AMP 514(安普利穆尼公司),以及例如US 8,609,089、US 2010/028330、和/或US 2012/0114649和US 2016/0108123中披露的抗PD1抗体。

[0237] 在一些实施例中,可以将抗体细胞因子移植蛋白与US 2015/0218274中所披露的抗Tim3抗体一起施用。在其他实施例中,可以将抗体细胞因子移植蛋白与US 2016/0108123中所披露的抗PD-L1抗体、**Durvalumab®** (MEDI4736)、**Atezolizumab®** (MPDL3280A)或**Avelumab®**一起施用。

[0238] 实例

[0239] 实例1:IL2抗体细胞因子移植蛋白的产生

[0240] 通过将IL2序列工程化到各种免疫球蛋白支架的CDR区中,生成抗体细胞因子移植蛋白,然后使用免疫球蛋白链的重链和轻链生成最终的抗体细胞因子蛋白。抗体细胞因子移植蛋白赋予IL2优选的治疗特性;然而,如与rhIL2相比,抗体细胞因子移植蛋白具有减少的不期望的作用,例如增加的Treg细胞活性。

[0241] 为了产生抗体细胞因子移植蛋白,将含有突变蛋白的IL2序列(SEQ ID NO:4或6)插入免疫球蛋白链支架的CDR环中。使用多种已知的免疫球蛋白序列制备抗体细胞因子移植蛋白,所述免疫球蛋白序列以及种系抗体序列已用于临床环境。表2中描述了称为GFTX3b的示例性支架中的IL2的序列。基于可用的结构或同源性模型数据,将插入点选择为环的中点。使用标准分子生物学方法、利用编码相关序列的重组DNA产生抗体细胞因子移植蛋白。

[0242] 选择哪些CDR用于细胞因子移植的选择取决于以下参数:所需的生物学、生物物理特性和良好的发展概况。建模软件在预测哪个CDR和CDR中的哪个位置将提供所期望参数方面仅部分有用,因此要制造所有六种可能的抗体细胞因子移植物,并且然后在生物学测定中进行评估。如果实现了所需的生物学活性,则关于抗体细胞因子移植分子如何与相应细胞因子受体相互作用的生物物理特性,例如结构分辨率将得到解决。

[0243] 对于IL2抗体细胞因子移植分子,最初解决了考虑用于细胞因子移植的抗体候选物的结构。从此结构中,注意到互补位位于抗体“臂”的最N端,并且移植到该位置的细胞因子会将细胞因子呈递给其各自的受体。由于移植技术,每种抗体IL2移植蛋白都受到不同长度、序列和结构环境的CDR环的约束。这样,将IL2移植到所有六种CDR中,这六种CDR对应于LCDR-1、LCDR-2、LCDR-3和HCDR-1、HCDR-2和HCDR-3。图1的表中可以明显看出,抗体的细胞因子移植蛋白的活性不同,包括移植到CDR2的轻链中的IL2(IgG、IL2.L2)不表达。还观察到具有改变的Fc功能(例如,Fc沉默)的IL2抗体细胞因子移植物具有更好的特性。

[0244] 选择HCDR-1,因为它具有最佳的特性组合(生物物理和生物学的),并且所包括的IL2点突变增强了所期望的生物学特性。为了选择插入点,选择了CDR环的结构中心,因为这将两侧提供最大的空间(线性大小 $3.8\text{\AA}$ 残基数),并且不受任何理论的约束,这通过使IL2更容易独立折叠,从而提供了稳定的分子。由于已知移植支架GFTX3b的结构,因此每个CDR的结构中心也是已知的。这与使用乔西亚编号格式定义的CDR环序列的中心重合。如前所述,IL-2移植物的插入点偏离中心并且向CDR环的N或C末端部分转移。然而,在CDR环内转移IL2不会在生物学活性上产生显著差异。

[0245] 总之,每个CDR的插入点都是在结构基础上选择的,假设移植到CDR中会为IL2受体的单个亚基提供一定水平的空间位阻。哪种CDR移植物最适合特定的细胞因子的最后选择是基于所期望的生物学和生物物理特性。细胞因子受体的性质、细胞因子/受体相互作用和

信号传导机制也发挥了作用,并且这是通过比较每种单个抗体细胞因子分子各自的特性来完成的。

[0246] 表1

SEQ ID NO: 1	IL2 野生型 DNA	AGTTCCTATCACTCTCTTTAATCACTACTCACAGTAA CCTCAACTCCTGCCACAATGTACAGGATGCAACTCCTG TCTTGCAATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCACAAACAG TGCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTAC AACTGGAGCATTACTGCTGGATTACAGATGATTTTG AATGGAATTAATAATTACAAGAAATCCAAACTCACCAG GATGCTCACATTTAAGTTTTACATGCCCAAGAAGGCCA CAGAACTGAAACATCTTCAGTGTCTAGAAGAAGAACTC AAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGCAA AACTTTCACTTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATA TCAACGTAATAGTTCTGGAACATAAGGGATCTGAAACA ACATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCAT TGTAAGATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTTGTCAAA GCATCATCTCAACACTGACTTGATAATTAAGTGCTTCC CACTTAAACATATCAGGCCTTCTATTTATTTAAATAT TTAAATTTTATATTTATTTGTTGAATGTATGGTTGCTA CCTATTGTAACATTATTTCTTAATCTTAAACATAAAA TATGGATCTTTTATGATTCTTTTGTAGCCCTAGGGG CTCTAAATGGTTTCACTTATTTATCCCAAAATATTTA TTATTATGTTGAATGTTAAATATAGTATCTATGTAGAT TGGTTAGTAAACTATTTAATAAAATTTGATAAATATAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
SEQ ID NO: 2	IL2 蛋白	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLL LDLQIMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHL QCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVL ELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTL T
SEQ ID NO: 3	IL2 突变蛋白 DNA	CAAGTCACACTGCGTGAAAGCGGCCCTGCCCTGGTCAA GCCCACCCAGACCCTGACCCTGACCTGCACCTTCTCCG GCTTCAGCCTGGCCCCCTACCTCCTCCAGCACCAAGAAA ACCCAGCTGCAGCTCGAACATCTGCTGCTGGACCTGCA GATGATCCTGAACGGCATCAACAACACAAGAACCCCA AGCTGACCCGGATGCTGACCGCCAAGTTCTACATGCC AAGAAGGCCACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGCCTGGA AGAGGAACCTGAAGCCCCCTGGAAGAAGTCTGAACCTGG CCCAGTCCAAGAACTTCCACCTGAGGCCTCGGGACCTG ATCTCCAACATCAACGTGATCGTGTGGAACCTGAAGGG CTCCGAGACAACCTTCATGTGCGAGTACGCCGACGAGA CAGCCACCATCGTGGAATTTCTGAACCGGTGGATCACC TTCTGCCAGTCCATCATCTCCACCCTGACCTCCACCTC CGGCATGTCCGTGGGCTGGATCCGGCAGCCTCCTGGCA AGGCCCTGGAGTGGCTGGCCGACATTTGGTGGGACGAC AAGAAGGACTACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGCTGAC CATCTCCAAGGACACCTCCAAGAACCAAGTGGTGCTGA AAGTGACCAACATGGACCCCGCCGACACCGCCACCTAC TACTGCGCCCGGTCCATGATCACCAACTGGTACTTCGA CGTGTGGGGCGCTGGCACCACCGTGACCGTGTCTCT
SEQ ID NO: 4	IL2 突变蛋白, 突变蛋	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQIMILNGINNYKNPKLT A

[0247]

[0248]

	白氨基酸为粗体且加下划线	MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFCQSIISTLT
SEQ ID NO: 5	IL2 突变蛋白 DNA	GCCCCTACCTCCTCCAGCACCAAGAAAACCCAGCTGCA GCTCGAACATCTGCTGCTGGACCTGCAGATGATCCTGA ACGGCATCAACAACATAAGAACCCCAAGCTGACCCGG ATGCTGACCGCCAAGTTCTACATGCCAAGAAGGCCAC CGAGCTGAAACATCTGCAGTGCCTGGAAGAGGAAGTGA AGCCCCTGGAAGAAGTGCTGAACCTGGCCAGTCCAAG AACTTCCACCTGAGGCCTCGGGACCTGATCTCCAACAT CAACGTGATCGTGCTGGAAGTGAAGGGCTCCGAGACAA CCTTCATGTGCGAGTACGCCGACGAGACAGCCACCATC GTGGAATTTCTGAACCGGTGGATCACCTTCTGCCAGTC CATCATCTCCACCCTGACC
SEQ ID NO: 6	IL2 突变蛋白, 突变蛋白氨基酸为粗体且加下划线	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDQMILNGINNYKNPKLTR MLT A KFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFCQSIISTLT

[0249] 表2

[0250]

IgG. IL2R67A.H1		
SEQ ID NO: 7 (组合的)	HCDR1	GFS L APTSSSTKKTQLQLEHLLLDQMILNGINNYKNP KLT AMLTFFKYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNL AQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADE TATIVE FLNRWITFCQSIISTLTSTSGMSVG
SEQ ID NO: 8 (组合的)	HCDR2	DIWWDDKKDYNPSLKS
SEQ ID NO: 9 (组合的)	HCDR3	SMITNWYFDV
SEQ ID NO: 10 (卡巴特)	HCDR1	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDQMILNGINNYKNPK LTA MLT AMLTFFKYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNL AQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATI VEFLNR WITFCQSIISTLTSTSGMSVG
SEQ ID NO: 11 (卡巴特)	HCDR2	DIWWDDKKDYNPSLKS
SEQ ID NO: 12 (卡巴特)	HCDR3	SMITNWYFDV
SEQ ID NO: 13 (乔西亚)	HCDR1	GFS L APTSSSTKKTQLQLEHLLLDQMILNGINNYKNP KLT AMLTFFKYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNL AQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADE TATIVE FLNRWITFCQSIISTLTSTSGM
SEQ ID NO: 14 (乔西亚)	HCDR2	WWDDK
SEQ ID NO: 15 (乔西亚)	HCDR3	SMITNWYFDV
SEQ ID NO: 16 (IMGT)	HCDR1	GFS L APTSSSTKKTQLQLEHLLLDQMILNGINNYKNP KLT AMLTFFKYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNL AQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADE TATIVE FLNRWITFCQSIISTLTSTSGMS
SEQ ID NO: 17 (IMGT)	HCDR2	IWWDDKK
SEQ ID NO: 18 (IMGT)	HCDR3	ARSMITNWYFDV
SEQ ID NO: 19	VH	QVTLRESGPALVKPTQTTLTCTFSGFSL APTSSSTKK TQLQ LEHLLLDQMILNGINNYKNPK LTA MLTFFKYMP KKATE LKHLQCLEEEELKPLEEVLN L AQSKNFHLRPRDL ISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADE TATIVE FLNRWIT FCQSI ISTLTSTSGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWDD KKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATY

[0251]

		YCARSMITNWFYFDVWGAGTTVTVSS
SEQ ID NO: 20	DNA VH	CAAGTCACACTGCGTGAAAGCGGCCCTGCCCTGGTCAA GCCCACCCAGACCCTGACCCTGACCTGCACCTTCTCCG GCTTCAGCCTGGCCCCCTACCTCCTCCAGCACCAAGAAA ACCCAGCTGCAGCTCGAACATCTGCTGCTGGACCTGCA GATGATCCTGAACGGCATCAACAATAACAAGAACCCCA AGCTGACCGCCATGCTGACCTTCAAGTTCTACATGCCC AAGAAGGCCACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGCCTGGA AGAGGAAGTGAAGCCCCCTGGAAGAAGTGTGAACCTGG CCCAGTCCAAGAACTTCCACCTGAGGCCTCGGGACCTG ATCTCCAACATCAACGTGATCGTGCTGGAAGTGAAGGG CTCCGAGACAACCTTCATGTGCGAGTACGCCGACGAGA CAGCCACCATCGTGGAATTTCTGAACCGGTGGATCACC TTCTGCCAGTCCATCATCTCCACCCTGACCTCCACCTC CGGCATGTCCGTGGGCTGGATCCGGCAGCCTCCTGGCA AGGCCCTGGAGTGGCTGGCCGACATTTGGTGGGACGAC AAGAAGGACTACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGCTGAC CATCTCCAAGGACACCTCCAAGAACCAAGTGGTGTCTGA AAGTGACCAACATGGACCCCGCCGACACCGCCACCTAC TACTGCGCCCGGTCCATGATCACCAACTGGTACTTCGA CGTGTGGGGCGCTGGCACCACCGTGACCGTGTCTCT
SEQ ID NO: 21	重链	QVTLRESGPALVKPTQTLLTCTFSGFSL <u>APTSSSTKK</u> <u>TQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTAMLTFFKFYMP</u> <u>KKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL</u> <u>ISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT</u> <u>FCQSIISTLT</u> STSGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWDD KKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATY YCARSMITNWFYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVAVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALAAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHN HYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 22	DNA 重链	CAAGTCACACTGCGTGAAAGCGGCCCTGCCCTGGTCAA GCCCACCCAGACCCTGACCCTGACCTGCACCTTCTCCG GCTTCAGCCTGGCCCCCTACCTCCTCCAGCACCAAGAAA ACCCAGCTGCAGCTCGAACATCTGCTGCTGGACCTGCA GATGATCCTGAACGGCATCAACAATAACAAGAACCCCA AGCTGACCGCCATGCTGACCTTCAAGTTCTACATGCCC AAGAAGGCCACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGCCTGGA AGAGGAAGTGAAGCCCCCTGGAAGAAGTGTGAACCTGG CCCAGTCCAAGAACTTCCACCTGAGGCCTCGGGACCTG ATCTCCAACATCAACGTGATCGTGCTGGAAGTGAAGGG CTCCGAGACAACCTTCATGTGCGAGTACGCCGACGAGA CAGCCACCATCGTGGAATTTCTGAACCGGTGGATCACC TTCTGCCAGTCCATCATCTCCACCCTGACCTCCACCTC CGGCATGTCCGTGGGCTGGATCCGGCAGCCTCCTGGCA AGGCCCTGGAGTGGCTGGCCGACATTTGGTGGGACGAC AAGAAGGACTACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGCTGAC CATCTCCAAGGACACCTCCAAGAACCAAGTGGTGTCTGA AAGTGACCAACATGGACCCCGCCGACACCGCCACCTAC TACTGCGCCCGGTCCATGATCACCAACTGGTACTTCGA

[0252]

		CGTGTGGGGCGCTGGCACCACCGTGACCGTGTCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTCCCTCTGGCCCCCTCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGCACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAACCTCTGGCGCCCTGACCTCTGGCGTGACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTCACAGTGCCTTCAAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCCCTGCCCTGCTCTGAAGTGTCTGGGCGGCCCTTCTGTCTCCTGTTCCTCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGCCGTGTCCACGAGGATCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGGCCGCCCTATCGAAAGACAATCTCCAAGGCCAAGGCCAGCCTAGGGAACCCCAGGTGTACACCCTGCCACCCAGCCGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTACGGCCAGCCTGAGAACAATAACAAGACCAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTGTACTCCAACTGACCGTGGACAAGTCCCGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 23 (组合的)	LCDR1	KAQLSVGYMH
SEQ ID NO: 24 (组合的)	LCDR2	DTSKLAS
SEQ ID NO: 25 (组合的)	LCDR3	FQGSYPFT
SEQ ID NO: 26 (卡巴特)	LCDR1	KAQLSVGYMH
SEQ ID NO: 27 (卡巴特)	LCDR2	DTSKLAS
SEQ ID NO: 28 (卡巴特)	LCDR3	FQGSYPFT
SEQ ID NO: 29 (乔西亚)	LCDR1	QLSVGY
SEQ ID NO: 30 (乔西亚)	LCDR2	DTS
SEQ ID NO: 31 (乔西亚)	LCDR3	GSGYPF
SEQ ID NO: 32 (IMGT)	LCDR1	LSVGY
SEQ ID NO: 33 (IMGT)	LCDR2	DTS
SEQ ID NO: 34 (IMGT)	LCDR3	FQGSYPFT
SEQ ID NO: 35	VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKAQLSVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCFQGSYPFTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO: 36	DNA VL	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCCACCCTGTCCGCTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACTTGCAAGGCCAGCTGTCCGTGGGCTACATGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACGACACCTCAAGCTGGCCTCCGGCGTGCCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGAGTTCACCTGACCATCTCCAGCTGCAGCCCGACGACTTCGCCACCTACTACTGTTTTCAAGGCTCCGGCTACCCCTTACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAG

[0253]

SEQ ID NO: 37	轻链	DIQMTQSPSTLSASVGVDRVITITCKAQLSVGYMHWYQQK PGKAPKLLIYDTSKLSAGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS LQPDDEFATYYCFQGSYPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 38	DNA 轻链	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCCACCCTGTCCGC CTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACTTGCAAGGCC AGCTGTCCGTGGGCTACATGCACTGGTATCAGCAGAAG CCCGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACGACACCTC CAAGCTGGCCTCCGGCGTGCCCTCCAGATTCTCCGGCT CTGGCTCCGGCACCGAGTTCACCCGACCATCTCCGAGC CTGCAGCCCGACGACTTCGCCACCTACTACTGTTTTCA AGGCTCCGGCTACCCCTTCACCTTCGGCGGAGGCACCA AGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGCCGCTCCAGCGTG TTCATCTTCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGG CACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACC CCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGGAAGGTGGACAACGCC CTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCA GGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCC TGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAAGGTG TACGCTGCGAGGTGACCCACAGGGCCTGTCCAGCCC CGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
IgG.IL2F71A.H1		
SEQ ID NO: 39 (组合的)	HCDR1	<u>GFSLAPTSSSTKKTQQLQLEHLLDLQMI</u> LNGINNYKNP <u>KLTRMLTAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNL</u> <u>AQSKNFHLRPRDLISNINIVIVLELKGSETTFMCEYADE</u> <u>TATIVEFLNRWITFCQSIISTLT</u> STSGMSVG
SEQ ID NO: 40 (组合的)	HCDR2	DIWDDDKDYNPSLKS
SEQ ID NO: 41 (组合的)	HCDR3	SMITNWYFDV
SEQ ID NO: 42 (卡巴特)	HCDR1	<u>APTSSSTKKTQQLQLEHLLDLQMI</u> LNGINNYKNPKLTR <u>MLTAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNL</u> <u>AQSK</u> <u>NFHLRPRDLISNINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATI</u> <u>VEFLNRWITFCQSIISTLT</u> STSGMSVG
SEQ ID NO: 43 (卡巴特)	HCDR2	DIWDDDKDYNPSLKS
SEQ ID NO: 44 (卡巴特)	HCDR3	SMITNWYFDV
SEQ ID NO: 45 (乔西亚)	HCDR1	<u>GFSLAPTSSSTKKTQQLQLEHLLDLQMI</u> LNGINNYKNP <u>KLTRMLTAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNL</u> <u>AQSKNFHLRPRDLISNINIVIVLELKGSETTFMCEYADE</u> <u>TATIVEFLNRWITFCQSIISTLT</u> STSGM
SEQ ID NO: 46 (乔西亚)	HCDR2	WWDDK
SEQ ID NO: 47 (乔西亚)	HCDR3	SMITNWYFDV
SEQ ID NO: 48 (IMGT)	HCDR1	<u>GFSLAPTSSSTKKTQQLQLEHLLDLQMI</u> LNGINNYKNP <u>KLTRMLTAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNL</u> <u>AQSKNFHLRPRDLISNINIVIVLELKGSETTFMCEYADE</u> <u>TATIVEFLNRWITFCQSIISTLT</u> STSGMS
SEQ ID NO: 49 (IMGT)	HCDR2	IWDDKK
SEQ ID NO: 50 (IMGT)	HCDR3	ARSMITNWYFDV
SEQ ID NO: 51	VH	QVTLRESGPALVKPTQTTLTCTFSGFSL <u>APTSSSTKK</u> <u>TQQLQLEHLLDLQMI</u> LNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMP <u>KKATELKHLCLEELKPLEEVLNL</u> <u>AQSKNFHLRPRDL</u> <u>ISNINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT</u> <u>FCQSIISTLT</u> STSGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWDD

[0254]

		KKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATY YCARSMTNWFYFDVWGAGTTVTVSS
SEQ ID NO: 52	DNA VH	CAAGTCACACTGCGTGAAAGCGGCCCTGCCCTGGTCAA GCCCACCCAGACCCTGACCCTGACCTGCACCTTCTCCG GCTTCAGCCTGGCCCCTACCTCCTCCAGCACCAAGAAA ACCCAGCTGCAGCTCGAACATCTGCTGCTGGACCTGCA GATGATCCTGAACGGCATCAACAACACAAGAACCCCA AGCTGACCCGGATGCTGACCGCCAAGTTCTACATGCCC AAGAAGGCCACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGCCTGGA AGAGGAAGTGAAGCCCCTGGAAGAAGTGTGAACCTGG CCCAGTCCAAGAAGTCCACCTGAGGCCTCGGGACCTG ATCTCCAACATCAACGTGATCGTGCTGGAAGTGAAGGG CTCCGAGACAACCTTCATGTGCGAGTACGCCGACGAGA CAGCCACCATCGTGGAATTTCTGAACCGGTGGATCACC TTCTGCCAGTCCATCATCTCCACCCTGACCTCCACCTC CGGCATGTCCGTGGGCTGGATCCGGCAGCCTCCTGGCA AGGCCCTGGAGTGGCTGGCCGACATTTGGTGGGACGAC AAGAAGGACTACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGCTGAC CATCTCCAAGGACACCTCCAAGAACCAAGTGGTGTCTGA AAGTGACCAACATGGACCCCGCCGACACCGCCACCTAC TACTGCGCCCGGTCCATGATCACCAACTGGTACTTCGA CGTGTGGGGCGCTGGCACCACCGTGACCGTGTCTCTCT
SEQ ID NO: 53	重链	QVTLRESGPALVKPTQTLLTCTFSGFSI <u>LPTSSSTKK</u> <u>TQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMP</u> <u>KKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDL</u> <u>ISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWIT</u> <u>FCQSIISTLT</u> STSGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWDD KKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATY YCARSMTNWFYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVAVVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHN HYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 54	DNA 重链	CAAGTCACACTGCGTGAAAGCGGCCCTGCCCTGGTCAA GCCCACCCAGACCCTGACCCTGACCTGCACCTTCTCCG GCTTCAGCCTGGCCCCTACCTCCTCCAGCACCAAGAAA ACCCAGCTGCAGCTCGAACATCTGCTGCTGGACCTGCA GATGATCCTGAACGGCATCAACAACACAAGAACCCCA AGCTGACCCGGATGCTGACCGCCAAGTTCTACATGCCC AAGAAGGCCACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGCCTGGA AGAGGAAGTGAAGCCCCTGGAAGAAGTGTGAACCTGG CCCAGTCCAAGAAGTCCACCTGAGGCCTCGGGACCTG ATCTCCAACATCAACGTGATCGTGCTGGAAGTGAAGGG CTCCGAGACAACCTTCATGTGCGAGTACGCCGACGAGA CAGCCACCATCGTGGAATTTCTGAACCGGTGGATCACC TTCTGCCAGTCCATCATCTCCACCCTGACCTCCACCTC CGGCATGTCCGTGGGCTGGATCCGGCAGCCTCCTGGCA AGGCCCTGGAGTGGCTGGCCGACATTTGGTGGGACGAC AAGAAGGACTACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGCTGAC CATCTCCAAGGACACCTCCAAGAACCAAGTGGTGTCTGA AAGTGACCAACATGGACCCCGCCGACACCGCCACCTAC

[0255]

		TACTGCGCCCGGTCCATGATCACCAACTGGTACTTCGA CGTGTGGGGCGCTGGCACCACCGTGACCGTGTCTCTG CTAGACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCT TCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGCACAGCTGCTCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAG TGTCTTGGAACTCTGGCGCCCTGACCTCTGGCGTGCAC ACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTC CCTGTCTCCGTGGTCACAGTGCCTTCAAGCAGCCTGG GCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCT TCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTC CTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCCCTGCCCTGCTC CTGAACTGCTGGGCGGCCCTTCTGTGTTCCCTGTTCCCT CCAAAGCCCAAGGACACCCCTGATGATCTCCCGGACCCC TGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGCCGTGTCCACGAGG ATCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACA GTACAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCG TGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAG TGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGGCCGCCCTATCGA AAAGACAATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAAC CCCAGGTGTACACCCTGCCACCCAGCCGGGAGGAAATG ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGG CTTCTACCCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTA ACGCCAGCCTGAGAACAATAAGACCAACCCCTCCT GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACTCCAA ACTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACG TGTTCTCTGTCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAA G
SEQ ID NO: 55 (组合的)	LCDR1	KAQLSVGYMH
SEQ ID NO: 56 (组合的)	LCDR2	DTSKLAS
SEQ ID NO: 57 (组合的)	LCDR3	FQGSYPFT
SEQ ID NO: 58 (卡巴特)	LCDR1	KAQLSVGYMH
SEQ ID NO: 59 (卡巴特)	LCDR2	DTSKLAS
SEQ ID NO: 60 (卡巴特)	LCDR3	FQGSYPFT
SEQ ID NO: 61 (乔西亚)	LCDR1	QLSVGY
SEQ ID NO: 62 (乔西亚)	LCDR2	DTS
SEQ ID NO: 63 (乔西亚)	LCDR3	GSYPF
SEQ ID NO: 64 (IMGT)	LCDR1	LSVGY
SEQ ID NO: 65 (IMGT)	LCDR2	DTS
SEQ ID NO: 66 (IMGT)	LCDR3	FQGSYPFT
SEQ ID NO: 67	VL	DIQMTQSPSTLSASVGRVTITCKAQLSVGYMHWYQQK PGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS LQPDDEFATYYCFQGSYPFTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO: 68	DNA VL	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTCCACCCTGTCCGC CTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACTTGCAAGGCC AGCTGTCCGTGGGCTACATGCACTGGTATCAGCAGAAG CCCGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACGACACCTC CAAGCTGGCCTCCGGCGTGCCCTCCAGATTCTCCGGCT CTGGCTCCGGCACCGAGTTCACCTGACCATCTCCAGC CTGCAGCCCGACGACTTCGCCACCTACTACTGTTTTCA AGGCTCCGGCTACCCCTTACCTTCGGCGGAGGCACCA AGCTGGAATCAAG

[0256]

SEQ ID NO: 69	轻链	DIQMTQSPSTLSASVGVDRVITITCKAQLSVGYMHWYQQK PGKAPKLLIYDTSKLSAGVPSRFSGSGSGTEFTLTISS LQPDDFATYYCFQGSGYPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 70	DNA 轻链	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTCCACCCTGTCCGC CTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACTTGCAAGGCC AGCTGTCCGTGGGCTACATGCACTGGTATCAGCAGAAG CCCGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACGACACCTC CAAGCTGGCCTCCGGCGTGCCCTCCAGATTCTCCGGCT CTGGCTCCGGCACCAGATTACCCCTGACCATCTCCAGC CTGCAGCCCGACGACTTCGCCACCTACTACTGTTTTCA AGGCTCCGGCTACCCCTTCACCTTCGGCGGAGGCACCA AGCTGGAATCAAGCGTACGGTGCCGCTCCCAGCGTG TTCATCTTCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGG CACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACC CCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCC CTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCA GGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCC TGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTG TACGCTGCGAGGTGACCCACCAGGCCTGTCCAGCCC CGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGTC

[0257] 实例2:与**Proleukin®** (IL-2) 相比, IgG. IL2R67A.H1具有延长的半衰期

[0258] 初始CD-1小鼠腹膜内给药,并且在给药前,给药后1小时、3、7、24、31、48、55和72小时从所有动物收集血液。将血液样品离心,并且获得血浆样品。将所得血浆样品转移到单个聚丙烯管中,并且冷冻在-80℃下。分析所有样品,并且使用免疫测定测量血浆中IgG. IL2R67A.H1的浓度。计算药代动力学参数,例如半衰期。每个样品一式两份运行,其中每个重复的分析都需要5μL的以1:20稀释的样品。捕获:山羊抗人IL-2生物素化抗体(R&D系统公司(R&D Systems)BAF202)检测:Alexa 647抗人IL-2,克隆MQ1-17H12(生物传奇公司(Biolegend)号500315)所有免疫测定均使用具有Gyros CD-200的**Gyrolab®**Bioaffy200进行。如图2中的图所示, IgG. IL2R67A.H1的半衰期约为12小时,并且然后在接下来的48小时内减少。**Proleukin®**半衰期无法在此图上显示,因为其半衰期约为4小时。

[0259] 实例3:在正常B6小鼠中, IgG. IL2R67A.H1选择性扩增CD8 T效应子,并且比IL-2Fc或**Proleukin®**耐受更好

[0260] IgG. IL2R67A.H1增强CD8 T效应子超过Treg,不会引起在**Proleukin®**施用的情况下所看到的不良事件。在第1天给小鼠给药后,在第4天、第8天和第11天监测CD8 T效应子的扩增。在每个时间点,CD8 T效应细胞群体都被大大扩增,而没有Treg扩增。这与**Proleukin®**和IL-2Fc融合物形成对比,其中在等摩尔剂量的IL-2下观察到死亡和发病。

[0261] 在等摩尔浓度下,向B6雌鼠施用**Proleukin®** (5x每周)、IL-2 Fc和IgG. IL2R67A.H1 (1x/每周) 第一治疗后八天,处理脾脏以获得单细胞悬液,并且在RPMI (10%FBS) 中洗涤。用红细胞裂解缓冲液(西格玛公司(Sigma)号R7757)裂解红细胞,并且针对细胞数和活力对细胞计数。使用FACS缓冲液(1xPBS+0.5%BSA+0.05%叠氮化钠)在标准方案下进行FACS染色。将细胞用以下表面抗体染色:大鼠抗-小鼠CD3-eFluor 450 (Ebioscience公司号48-0032)、大鼠抗-小鼠CD4-Pacific Blue (BD Pharmingen公司号558107)、大鼠抗-小鼠CD8-PerCp (BD Pharmingen公司号553036)、大鼠抗-小鼠CD44 FITC

(Pharmingen公司号553133)、大鼠抗-小鼠CD25-APC (Ebioscience公司号17-0251)、大鼠抗-小鼠Nk1.1 (Ebioscience公司号95-5941) 和随后根据抗小鼠/大鼠FoxP3染色套装PE对FoxP3进行固定/透化和染色 (Ebioscience公司号72-5775)。在贝迪公司 (Becton-Dickinson) LSR **Fortessa**®或贝迪公司 (Becton-Dickinson) FACS LSR II分析细胞,并且用**FlowJo**®软件分析数据。

[0262] 图3A-3C显示了在**Proleukin**®等摩尔浓度 (IgG. IL2R67A.H1和IL2-Fc 100 μ g-1nmol IL2当量) 下,施用**Proleukin**® (5x每周)、IL2-Fc和IgG. IL2R67A.H1 (1x/每周) 后, B6雌性小鼠中CD8 T效应细胞的优先扩增。图中的数据证明CD8 T效应细胞增殖而没有类似的Treg增殖。将该数据与**Proleukin**®进行对比,后者可以扩增CD8 T效应子和Treg。注意, IgG. IL2R67A.H1在CD8 T效应细胞扩增的绝对数和在CD8 T效应细胞:Treg的比例均优于IL2-Fc融合构建体,证明存在IgG. IL2R67A.H1抗体细胞因子移植蛋白的结构和功能基础。图3D-3F显示了在更高剂量下, IgG. IL2R67A.H1的有益作用更加明显。当向B6小鼠施用500 μ g (5nmol IL2当量) 的IgG. IL2R67A.H1时,相对于与较低剂量相似的Treg细胞,可以看到CD8 T效应细胞的优先扩增。然而,在IL2-Fc治疗组中,在较高水平下仅单次给药后发现小鼠死亡 (数据未显示)。这表明IgG. IL2R67A.H1具有比IL2-Fc融合构建体更大的治疗指数,并且可以在更宽的剂量范围内安全施用。

[0263] 实例4: 在NOD小鼠中, IgG. IL2R67A.H1选择性扩增CD8 T效应细胞,并且比**Proleukin**®耐受更好

[0264] 非肥胖糖尿病 (NOD) 小鼠自发发展为1型糖尿病,并且通常被用作人1型糖尿病的动物模型。使用实例3中所述的B6小鼠的相同方案,在**Proleukin**®等摩尔当量下,向NOD小鼠施用IgG. IL2R67A.H1、IL2-Fc和**Proleukin**®。再次,以该剂量施用IgG. IL2R67A.H1优先扩增CD8 T效应细胞超过Treg,如图4A中的图所示。此外,施用IgG. IL2R67A.H1在NOD小鼠中未显示不良事件,然而**Proleukin**®治疗组具有5只垂死的小鼠和2例死亡。图4B是报告来自NOD小鼠模型的剂量、细胞倍数变化和细胞类型的图。

[0265] 实例5: IgG. IL2R67A.H1显示了在CT26结肠肿瘤小鼠模型中的单次试剂功效

[0266] 在研究IgG. IL2R67A.H1的安全性之后,在CT26小鼠模型中测试其单次试剂功效。鼠类CT26细胞是快速生长的IV级结肠癌细胞,已在500多个已发表的研究中使用,并且是药物开发中常用的细胞系和模型之一。使CT26 (ATCC CRL-2638) 细胞在具有5%CO₂的37℃培育箱中在无菌条件下生长。在补充有10%FBS的RPMI 1640培养基中培养细胞。每3-4天使细胞进行传代。在注射日,收获细胞 (第11代) 并且以 2.5×10^6 个/ml浓度重悬浮于HBSS中。对细胞进行针对支原菌及鼠类病毒的Radil测试。使用Balbc小鼠。对于各小鼠,通过皮下注射使用28g针 (100 μ l注射体积) 将 0.25×10^6 个细胞植入右侧腹中。植入后,一旦肿瘤明显,每周3次对动物进行测径并称重。使用(LxWxW)/2计算卡尺测量值。根据实验动物的护理和使用指南和机构动物护理和使用委员会的规定,用正常饮食喂养小鼠并且圈养在SPF动物设施中。

[0267] 当肿瘤达到约100mm³时,通过腹膜内途径施用小鼠12.5-100 μ g的IgG. IL2R67A.H1。一周两次测量肿瘤。使用Prism 5(**GraphPad**®)软件绘制平均肿瘤体积。当肿瘤大小达到1000mm³的体积时,达到了功效研究的终点。注射后,还密切监测小鼠的

临床恶化迹象。如果出于任何原因,小鼠显示出任何发病迹象,包括呼吸窘迫、驼背的姿势、活力下降、后腿麻痹、作为胸腔积液的迹象的呼吸急促、体重减轻接近20%或15%以及其他迹象,或者如果它们进行正常活动(进食,移动)受损,则对小鼠实施安乐死。

[0268] 在范围为12.5 μ g至100 μ g的剂量下,IgG.IL2R67A.H1在CT26小鼠模型中是有效的,其中在20天的研究中,在17天内4次施用IgG.IL2R67A.H1。图5中显示的肿瘤体积曲线表明IgG.IL2R67A.H1在这项研究中的功效,因为肿瘤体积会保持在200mm下持续15天,并且然后在400mm下持续其余5天。

[0269] 实例6:IgG.IL2R67A.H1和另外的癌症疗法显示了在B16小鼠模型中的功效

[0270] 为了评估IgG.IL2R67A.H1与其他癌症治疗剂组合的功效,使用了B16F10黑色素瘤小鼠模型。使B16F10细胞(ATCC CRL-6475)在具有5%CO₂的37℃培育箱中在无菌条件下生长两周。将B16F10细胞在DMEM+10%FBS中培养。收获细胞,并且以1 x 10⁶/100 μ l的浓度重悬浮于无FBS的培养基DMEM中。对B16F10细胞进行针对支原菌及鼠类病毒的Radil测试。使用28号针头(100 μ l注射体积)将细胞植入B6小鼠的右侧腹。植入后,一旦肿瘤明显,每周2次对小鼠进行测径并称重。使用(L x W x W)/2计算卡尺测量值。

[0271] 在这项研究中,IgG.IL2R67A.H1被作为单一试剂或与TA99抗体组合使用,该抗体与Trp1结合,后者是在B16F10细胞上表达的抗原。IL2-Fc融合物作为单一试剂或与TA99抗体组合施用。作为对照,将TA99抗体作为单一试剂施用。

[0272] 令人惊讶地的是,在该模型中以500 μ g剂量作为单一试剂施用,IgG.IL2R67A.H1是最有效的治疗(图6)次好的治疗方法是IgG.IL2R67A.H1(100 μ g)和TA99的组合。这种组合比作为单一试剂的100 μ g下的IgG.IL2F71A.H1、与500 μ g下的IgG.IL2F71A.H1组合的TA99和作为单一试剂的IL2-Fc或IL2-Fc/TA99组合更有效。当TA99作为单一试剂施用,没有作用,并且平均肿瘤体积与未治疗的对照组相似。该数据证明,IgG.IL2R67A.H1在黑色素瘤小鼠肿瘤模型中作为单一药剂是有效的,但是当与另一种抗癌剂配合时也是有效的。

[0273] 实例7:IgG.IL2R67A.H1和IgG.IL2F71A.H1在人细胞中的活性

[0274] 为了测试IgG.IL2R67A.H1对人CD8 T效应子的活性,测定了人外周血单核细胞(PBMC)的pSTAT5活性。将PBMC细胞置于无血清的测试培养基中,并且铺板。IgG.IL2R67A.H1、IgG.IL2F71A.H1或Proleukin®添加到PBMC,并且在37℃下孵育20分钟。20分钟后,将细胞用1.6%甲醛固定,洗涤并且用表面标志物染色。在室温下30分钟后,将样品洗涤,并且将重悬浮的细胞沉淀物用-20℃甲醇渗透,洗涤并且用pSTAT5和DNA嵌入剂染色。在Cytotof®上运行细胞,并且用FlowJo®软件分析数据以定量pSTAT5活性水平。图7中的表格证明了IgG.IL2R67A.H1对CD8 T效应细胞具有优先激活作用,并且使Treg细胞的激活最小化。

[0275] 实例8:抗体细胞因子移植蛋白的结合

[0276] 将含有突变蛋白的IL2序列(SEQ ID NO:4)插入免疫球蛋白链支架的CDR环中。使用多种已知的免疫球蛋白序列制备抗体细胞因子移植蛋白,所述免疫球蛋白序列以及种系抗体序列已用于临床环境。使用的抗体之一具有RSV作为其抗原。为了确定将IL2移植到该抗体的CDR中是否减少或取消了与RSV的结合,对PBS或碳酸盐缓冲液中的RSV蛋白进行了ELISA测定。如图8所示,这似乎受哪个CDR选择用于IL2移植的影响。例如,IgG.IL2R67A.H1具有与未移植(未经修饰)原始抗体相似的RSV结合。相反,将IL2移植到CDR3(CDR-L3)轻链

或CDR-H3中会降低结合。如所期望的,被移植到无关抗体(Xolair)中的IL2不产生结合。这证明抗体细胞因子移植蛋白可以保持与抗体支架原始靶的结合,或者可以减少这种结合。

[0277] 应理解,本文描述的实例和实施例用于举例说明目的,并且其各种修饰或改变对于本领域技术人员将是明了的,并且包括在本申请的精神和范围内和所附权利要求书的范围内。本文引用的所有公开物、序列登录号、专利和专利申请都出于所有目的以其全部内容而特此并入。

序列表

<110> 诺华公司

<120> 抗体细胞因子移植蛋白和用于治疗癌症的方法

<130> PAT057462-WO-PCT

<140>

<141>

<150> 62/510, 533

<151> 2017-05-24

<160> 78

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 822

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

	agttccctat cactctcttt aatcactact cacagtaacc tcaactcctg ccacaatgta	60
[0001]	caggatgcaa ctccgtgtctt gcattgcact aagtcttgca cttgtcacia acagtgcacc	120
	tacttcaagt tctacaaaga aaacacagct acaactggag catttactgc tggatttaca	180
	gatgatatttg aatggaatta ataattacaa gaatcccaaa ctcaccagga tgctcacatt	240
	taagttttac atgccaaga aggccacaga actgaaacat cttcagtgtc tagaagaaga	300
	actcaaacct ctggaggaag tgctaaattt agctcaaagc aaaaactttc acttaagacc	360
	cagggactta atcagcaata tcaacgtaat agttcttgaa ctaaagggat ctgaaacaac	420
	attcatgtgt gaatatgctg atgagacagc aaccattgta gaatttctga acagatggat	480
	taccttttgt caaagcatca tctcaacact gacttgataa ttaagtgtt cccacttaaa	540
	acatatcagg ccttctatctt atttaaataat ttaaatttta tattttattgt tgaatgtatg	600
	gtttgctacc tattgtaact attattctta atcttaaaac tataaatatg gatcttttat	660
	gattcttttt gtaagcccta ggggtctctaa aatggtttca cttattttatc ccaaaatatt	720
	tattattatg ttgaatgtta aatatagtat ctatgtagat tggtagtagta aactatttaa	780
	taaatttgat aaatataaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa	822

<210> 2

<211> 153

<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
50 55 60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
85 90 95

[0002]

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
145 150

<210> 3

<211> 759

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注意= “人工序列的描述：合成的多核苷酸”

<400> 3

caagtcacac tgcgtgaaag cggccctgcc ctggtcaagc ccacccagac cctgaccctg

60

```

acctgcacct tctccggtt cagcctggcc cctacctcct ccagcaccaa gaaaaccag      120
ctgcagctcg aacatctgct gctggacctg cagatgatcc tgaacggcat caacaactac      180
aagaacccca agctgaccgg gatgtgacc gccaaagttct acatgccccaa gaaggccacc      240
gagctgaaac atctgcagtg cctggaagag gaactgaagc ccctggaaga agtgtctgaac      300
ctggcccagt ccaagaactt ccacctgagg cctcgggacc tgatctccaa catcaacgtg      360
atcgtgctgg aactgaaggg ctccgagaca accttcattgt gcgagtacgc cgacgagaca      420
gccaccatcg tgaattttct gaaccggtgg atcaccttct gccagtccat catctccacc      480
ctgacctcca cctccggcat gtccgtgggc tggatccggc agcctcctgg caaggccctg      540
gagtggctgg ccgacatttg gtgggacgac aagaaggact acaaccccag cctgaagtcc      600
cggctgacca tctccaagga cacctccaag aaccaagtgg tgctgaaagt gaccaacatg      660
gaccccgccg acaccgccac ctactactgc gcccgtcca tgatcaccaa ctggtacttc      720
gacgtgtggg gcgctggcac caccgtgacc gtgtcctct      759

```

[0003] <210> 4
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注意= “人工序列的描述：合成的多肽”

<400> 4
 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

	85	90	95
	Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala 100 105 110		
	Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile 115 120 125		
	Ile Ser Thr Leu Thr 130		
	<210> 5 <211> 399 <212> DNA <213> 人工序列		
	<220> <221> 来源 <223> /注意= “人工序列的描述：合成的多核苷酸”		
	<400> 5 gccctacct cctccagcac caagaaaacc cagctgcagc tcgaacatct gctgctggac 60		
[0004]	ctgcagatga tcctgaacgg catcaacaac tacaagaacc ccaagctgac ccggatgctg 120		
	accgccaagt tctacatgcc caagaaggcc accgagctga aacatctgca gtgcctggaa 180		
	gaggaactga agcccctgga agaagtgtg aacctggccc agtccaagaa cttccacctg 240		
	aggcctcggg acctgatctc caacatcaac gtgatcgtgc tggaactgaa gggctccgag 300		
	acaaccttca tgtgcgagta cgccgacgag acagccacca tcgtggaatt tctgaaccgg 360		
	tggatcacct tctgccagtc catcatctcc accctgacc 399		
	<210> 6 <211> 133 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <221> 来源 <223> /注意= “人工序列的描述：合成的多肽”		
	<400> 6 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His 1 5 10 15		
	Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys 20 25 30		

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

[0005]

<210> 7

<211> 145

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注意= “人工序列的描述：合成的多肽”

<400> 7

Gly Phe Ser Leu Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
1 5 10 15

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
20 25 30

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Phe Lys Phe
35 40 45

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
50 55 60

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
65 70 75 80

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
85 90 95

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
100 105 110

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
115 120 125

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Ser Thr Ser Gly Met Ser Val
130 135 140

Gly
145

<210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

[0006]

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 8
Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 9
Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 10
<211> 141
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注意= “人工序列的描述：合成的多肽”

<400> 10

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

[0007]

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr Ser Thr Ser Gly Met Ser Val Gly
130 135 140

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 11

Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 12
 Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 13
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注意= “人工序列的描述：合成的多肽”

<400> 13
 Gly Phe Ser Leu Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
 1 5 10 15

[0008]

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
 20 25 30

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Phe Lys Phe
 35 40 45

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
 50 55 60

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
 65 70 75 80

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
 85 90 95

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
 100 105 110

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
 115 120 125

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Ser Thr Ser Gly Met
130 135 140

<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 14
Trp Trp Asp Asp Lys
1 5

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

[0009] <400> 15
Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 16
<211> 143
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的多肽”

<400> 16
Gly Phe Ser Leu Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
1 5 10 15

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
20 25 30

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Phe Lys Phe
35 40 45

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
50 55 60

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
65 70 75 80

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
85 90 95

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
100 105 110

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
115 120 125

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Ser Thr Ser Gly Met Ser
130 135 140

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

[0010]

<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 17

Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys
1 5

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 18

Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 19

<211> 253

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源
 <223> /注意= “人工序列的描述：合成的多肽”

<400> 19

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ala Pro Thr
 20 25 30

Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu
 35 40 45

Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys
 50 55 60

Leu Thr Ala Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr
 65 70 75 80

Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu
 85 90 95

[0011]

Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg
 100 105 110

Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser
 115 120 125

Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val
 130 135 140

Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Thr Ser Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro
 165 170 175

Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys
 180 185 190

Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr
 195 200 205

Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp
210 215 220

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe
225 230 235 240

Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 20

<211> 759

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注意= “人工序列的描述：合成的多核苷酸”

<400> 20

[0012]

caagtcacac tgcgtgaaag cggccctgcc ctggtcaagc ccaccagac cctgaccctg	60
acctgcacct tctccggett cagcctggcc cctacctcct ccagcaccaa gaaaaccag	120
ctgcagctcg aacatctgct gctggacctg cagatgatcc tgaacggcat caacaactac	180
aagaacccca agctgaccgc catgctgacc ttcaagttct acatgcccaa gaaggccacc	240
gagctgaaac atctgcagtg cctggaagag gaactgaagc ccctggaaga agtgcctaac	300
ctggcccagt ccaagaactt ccacctgagg cctcgggacc tgatctccaa catcaacgtg	360
atcgtgctgg aactgaaggg ctccgagaca accttcatgt gcgagtacgc cgacgagaca	420
gccaccatcg tggaatttct gaaccggtgg atcaccttct gccagtccat catctccacc	480
ctgacctcca cctccggcat gtccgtgggc tggatccggc agcctcctgg caaggccctg	540
gagtggctgg ccgacatttg gtgggacgac aagaaggact acaaccccag cctgaagtcc	600
cggctgacca tctccaagga cacctccaag aaccaagtgg tgctgaaagt gaccaacatg	660
gaccccgccg acaccgccac ctactactgc gcccggtcca tgatcaccaa ctggtacttc	720
gacgtgtggg gcgctggcac caccgtgacc gtgtcctct	759

<210> 21

<211> 583

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注意= “人工序列的描述：合成的多肽”

<400> 21

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ala Pro Thr
20 25 30

Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu
35 40 45

Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys
50 55 60

Leu Thr Ala Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr
65 70 75 80

Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu
85 90 95

[0013]

Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg
100 105 110

Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser
115 120 125

Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val
130 135 140

Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr
145 150 155 160

Leu Thr Ser Thr Ser Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro
165 170 175

Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys
180 185 190

Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr
195 200 205

Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp

	210		215		220														
	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Met	Ile	Thr	Asn	Trp	Tyr	Phe			
	225					230					235					240			
	Asp	Val	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr			
					245					250					255				
	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser			
				260					265					270					
	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu			
			275					280					285						
	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His			
	290						295					300							
	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser			
	305					310					315					320			
[0014]	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys			
					325					330					335				
	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu			
				340					345					350					
	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro			
			355					360					365						
	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys			
	370					375						380							
	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val			
	385					390					395					400			
	Ala	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp			
				405						410					415				
	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr			
			420						425					430					
	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp			

	435	440	445	
	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu 450	455	460	
	Ala Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg 465	470	475	480
	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys 485	490	495	
	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp 500	505	510	
	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys 515	520	525	
	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser 530	535	540	
[0015]	Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser 545	550	555	560
	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser 565	570	575	
	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 580			
	<210> 22 <211> 1749 <212> DNA <213> 人工序列			
	<220> <221> 来源 <223> /注意= “人工序列的描述：合成的多核苷酸”			
	<400> 22 caagtcacac tgcgtgaaag cggccctgcc ctggtcaagc ccacccagac cctgaccctg			60
	acctgcacct tctccggett cagcctggcc cctacctcct ccagcaccaa gaaaaccag			120
	ctgcagctcg aacatctgct gctggacctg cagatgatcc tgaacggcat caacaactac			180
	aagaacccca agctgaccgc catgctgacc ttcaagttct acatgcccac gaaggccacc			240

	gagctgaaac atctgcagtg cctggaagag gaactgaagc ccctggaaga agtgctgaac	300
	ctggcccagt ccaagaactt ccacctgagg cctcgggacc tgatctccaa catcaacgtg	360
	atcgtgctgg aactgaaggg ctccgagaca accttcatgt gcgagtacgc cgacgagaca	420
	gccaccatcg tggaaatttct gaaccggtgg atcaccttct gccagtccat catctccacc	480
	ctgacctcca cctccggcat gtccgtgggc tggatccggc agcctcctgg caaggccctg	540
	gagtggctgg ccgacatttg gtgggacgac aagaaggact acaaccccag cctgaagtcc	600
	cggctgacca tctccaagga cacctccaag aaccaagtgg tgctgaaagt gaccaacatg	660
	gaccccgccg acaccgccac ctactactgc gcccggtcca tgatcaccaa ctggtacttc	720
	gacgtgtggg gcgctggcac caccgtgacc gtgtcctctg ctagcaccaa gggcccctcc	780
	gtgttccctc tggcccttc cagcaagtct acctccggcg gcacagctgc tctgggctgc	840
	ctggtcaagg actacttccc tgagcctgtg acagtgtcct ggaactctgg cgccctgacc	900
	tctggcgtgc acaccttccc tgccgtgctg cagtcctccg gcctgtactc cctgtcctcc	960
	gtggtcacag tgccttcaag cagcctgggc acccagacct atatctgcaa cgtgaaccac	1020
[0016]	aagccttcca acaccaaggt ggacaagcgg gtggagccta agtcctgcga caagaccac	1080
	acctgtcctc cctgccctgc tcctgaactg ctgggcggcc cttctgtgtt cctgttccct	1140
	ccaaagccca aggacacct gatgatctcc cggaccctg aagtgacctg cgtgggtggtg	1200
	gccgtgtccc acgaggatcc tgaagtgaag ttcaattggt acgtggacgg cgtggaggtg	1260
	cacaacgcca agaccaagcc tcgggaggaa cagtacaact ccacctaccg ggtggtgtcc	1320
	gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg aacggcaaag agtacaagtg caaagtctcc	1380
	aacaaggccc tggccgcccc tatcgaaaag acaatctcca aggccaaggg ccagcctagg	1440
	gaaccccagg tgtacacct gccaccagc cgggaggaaa tgaccaagaa ccaggtgtcc	1500
	ctgacctgtc tggtaaggg cttctacct tccgatatcg ccgtggagtg ggagtctaac	1560
	ggccagcctg agaacaacta caagaccacc cctcctgtgc tggactccga cggctccttc	1620
	ttctgtact ccaaaactgac cgtggacaag tcccgtggc agcagggcaa cgtgttctcc	1680
	tgctccgtga tgcacgagc cctgcacaac cactacacc agaagtcct gtccctgtct	1740
	cccggcaag	1749
	<210> 23	
	<211> 10	

- <212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”
- <400> 23
Lys Ala Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met His
1 5 10
- <210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”
- <400> 24
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5
- [0017] <210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”
- <400> 25
Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
1 5
- <210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”
- <400> 26
Lys Ala Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met His
1 5 10
- <210> 27
<211> 7

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 27
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 28
Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
1 5

[0018] <210> 29
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 29
Gln Leu Ser Val Gly Tyr
1 5

<210> 30
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 30
Asp Thr Ser
1

<210> 31
<211> 6

- <212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”
- <400> 31
Gly Ser Gly Tyr Pro Phe
1 5
- <210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”
- <400> 32
Leu Ser Val Gly Tyr
1 5
- [0019] <210> 33
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”
- <400> 33
Asp Thr Ser
1
- <210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”
- <400> 34
Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
1 5
- <210> 35
<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注意= “人工序列的描述: 合成的多肽”

<400> 35

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

[0020]

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 36

<211> 318

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注意= “人工序列的描述: 合成的多核苷酸”

<400> 36

gacatccaga tgaccagag ccctccacc ctgtccgcct ccgtgggcga cagagtgacc 60

atcacttgca aggcccagct gtccgtgggc tacatgcact ggtatcagca gaagcccggc 120

aaggccccta agctgctgat ctacgacacc tccaagctgg cctccggcgt gccctccaga 180

ttctccggct ctggtccgg caccgagttc accctgacca tctccagcct gcagcccgcac 240

gacttcgcca cctactactg ttttcaaggc tccggtacc ccttcacctt cggcggaggc 300

accaagctgg aaatcaag

318

<210> 37

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注意= “人工序列的描述：合成的多肽”

<400> 37

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10						15	

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Gln	Leu	Ser	Val	Gly	Tyr	Met
			20					25					30		

His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
		35					40					45			

Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
	50					55					60				

[0021]

Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Asp
65					70					75					80

Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	Gly	Tyr	Pro	Phe	Thr
				85					90					95	

Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro
			100					105					110		

Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr
		115					120					125			

Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys
	130					135					140				

Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu
145					150					155					160

Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
				165					170					175	

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 38

<211> 639

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注意= “人工序列的描述：合成的多核苷酸”

<400> 38

gacatccaga tgacccagag cccctccacc ctgtccgcct ccgtgggcga cagagtgacc 60

atcacttgca aggcccagct gtccgtgggc tacatgcact ggatcagca gaagcccggc 120

aagggcccta agctgctgat ctacgacacc tccaagctgg cctccggcgt gccctccaga 180

ttctccggct ctggctccgg caccgagttc accctgacca tctccagcct gcagcccgc 240

gacttcgcca cctactactg ttttcaaggc tccggctacc ccttcacctt cggcggaggc 300

accaagctgg aaatcaagcg tacggtggcc gctcccagcg tgttcattct cccccccagc 360

gacgagcagc tgaagagcgg caccgccagc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 420

cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agagcggcaa cagccaggag 480

agcgtcaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 540

agcaaggccg actacgagaa gcataaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 600

tccagccccg tgaccaagag cttcaacagg ggcgagtg 639

<210> 39

<211> 145

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注意= “人工序列的描述：合成的多肽”

<400> 39

[0022]

Gly Phe Ser Leu Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
1 5 10 15

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
20 25 30

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe
35 40 45

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
50 55 60

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
65 70 75 80

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
85 90 95

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
100 105 110

[0023]

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
115 120 125

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Ser Thr Ser Gly Met Ser Val
130 135 140

Gly
145

<210> 40

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 40

Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 41

<211> 10

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 41
Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 42
<211> 141
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的多肽”

<400> 42
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

[0024] Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr Ser Thr Ser Gly Met Ser Val Gly
130 135 140

<210> 43
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 43
Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 44
Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

[0025]

<210> 45
<211> 142
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的多肽”

<400> 45
Gly Phe Ser Leu Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
1 5 10 15

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
20 25 30

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe
35 40 45

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
50 55 60

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
65 70 75 80

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
85 90 95

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
100 105 110

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
115 120 125

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Ser Thr Ser Gly Met
130 135 140

<210> 46
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

[0026]

<400> 46
Trp Trp Asp Asp Lys
1 5

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 47
Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 48
<211> 143
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的多肽”

<400> 48
 Gly Phe Ser Leu Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
 1 5 10 15

 Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
 20 25 30

 Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe
 35 40 45

 Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
 50 55 60

 Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
 65 70 75 80

 Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
 85 90 95

 Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
 100 105 110

 Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
 115 120 125

 Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Ser Thr Ser Gly Met Ser
 130 135 140

[0027]

<210> 49
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <221> 来源
 <223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

 <400> 49
 Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys
 1 5

 <210> 50
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 50
 Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 51
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注意= “人工序列的描述：合成的多肽”

<400> 51
 Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ala Pro Thr
 20 25 30

[0028]

Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu
 35 40 45

Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys
 50 55 60

Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr
 65 70 75 80

Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu
 85 90 95

Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg
 100 105 110

Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser
 115 120 125

Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val
 130 135 140

Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Cys	Gln	Ser	Ile	Ile	Ser	Thr	145	150	155	160
Leu	Thr	Ser	Thr	Ser	Gly	Met	Ser	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	165	170	175	
Gly	Lys	Ala	Leu	Glu	Trp	Leu	Ala	Asp	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Lys	Lys	180	185	190	
Asp	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	195	200	205	
Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Val	Leu	Lys	Val	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Ala	Asp	210	215	220	
Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Met	Ile	Thr	Asn	Trp	Tyr	Phe	225	230	235	240
Asp	Val	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser				245	250		

[0029]

<210> 52
 <211> 759
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注意= “人工序列的描述：合成的多核苷酸”

<400> 52
 caagtcacac tgcgtgaaag cggccctgcc ctggtcaagc ccacccagac cctgaccctg 60
 acctgcacct tctccggtt cagcctggcc cctacctct ccagcaccaa gaaaaccag 120
 ctgcagctcg aacatctgct gctggacctg cagatgatcc tgaacggcat caacaactac 180
 aagaacccca agctgaccgg gatgctgacc gccaagttct acatgcccaa gaaggccacc 240
 gagctgaaac atctgcagtg cctggaagag gaactgaagc ccctggaaga agtctgaac 300
 ctggcccagt ccaagaactt ccacctgagg cctcgggacc tgatctccaa catcaacgtg 360
 atcgtgctgg aactgaaggg ctccgagaca accttcatgt gcgagtacgc cgacgagaca 420
 gccaccatcg tggaatttct gaaccggtgg atcaccttct gccagtccat catctccacc 480
 ctgacctcca cctccggcat gtccgtgggc tggatccggc agcctcctgg caaggccctg 540

gagtggctgg cgcacatttg gtgggacgac aagaaggact acaaccccag cctgaagtcc 600
 cggtgacca tctccaagga cacctccaag aaccaagtgg tgctgaaagt gaccaacatg 660
 gaccccgccg acaccgccac ctactactgc gcccgggtcca tgatcaccaa ctggtacttc 720
 gacgtgtggg gcgctggcac caccgtgacc gtgtctct 759

<210> 53
 <211> 583
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注意= “人工序列的描述：合成的多肽”

<400> 53
 Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ala Pro Thr
 20 25 30

[0030] Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu
 35 40 45

Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys
 50 55 60

Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr
 65 70 75 80

Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu
 85 90 95

Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg
 100 105 110

Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser
 115 120 125

Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val
 130 135 140

Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr

	145		150		155		160
	Leu Thr Ser Thr	Ser Gly Met Ser Val	Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro	165	170	175	
	Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Asp	Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys	180	185	190		
	Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr	195	200	205			
	Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp	210	215	220			
	Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe	225	230	235			
	Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr	245	250	255			
[0031]	Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser	260	265	270			
	Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu	275	280	285			
	Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His	290	295	300			
	Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser	305	310	315			
	Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys	325	330	335			
	Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu	340	345	350			
	Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro	355	360	365			
	Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys						

	370		375		380	
	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val					
	385		390		395	400
	Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp					
			405		410	415
	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr					
			420		425	430
	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp					
			435		440	445
	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu					
			450		455	460
	Ala Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg					
	465		470		475	480
[0032]	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys					
			485		490	495
	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp					
			500		505	510
	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys					
			515		520	525
	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser					
			530		535	540
	Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser					
	545		550		555	560
	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser					
			565		570	575
	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys					
			580			

	<211> 1749	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注意= “人工序列的描述：合成的多核苷酸”	
	<400> 54	
	caagtcacac tgcgtgaaag cggccctgcc ctggtcaagc ccacccagac cctgaccctg	60
	acctgcacct tctccggett cagcctggcc cctacctcct ccagcaccaa gaaaaccag	120
	ctgcagctcg aacatctgct gctggacctg cagatgatcc tgaacggcat caacaactac	180
	aagaacccca agctgaccgg gatgctgacc gccaaagtct acatgcccaa gaaggccacc	240
	gagctgaaac atctgcagtg cctggaagag gaactgaagc ccctggaaga agtgcctgaac	300
	ctggcccagt ccaagaactt ccacctgagg cctcgggacc tgatctccaa catcaacgtg	360
	atcgtgctgg aactgaaggg ctccgagaca accttcatgt gcgagtacgc cgacgagaca	420
	gccaccatcg tggaatttct gaaccggtgg atcaccttct gccagtccat catctccacc	480
	ctgacctcca cctccggcat gtccgtgggc tggatccggc agcctcctgg caaggccctg	540
[0033]	gagtggctgg ccgacatttg gtgggacgac aagaaggact acaaccccag cctgaagtcc	600
	cggctgacca tctccaagga cacctccaag aaccaagtgg tgctgaaagt gaccaacatg	660
	gaccccgccg acaccgccac ctactactgc gcccggtcca tgatcaccaa ctggtaacttc	720
	gacgtgtggg gcgctggcac caccgtgacc gtgtcctctg ctagcaccaa gggccctcc	780
	gtgttccctc tggcccttc cagcaagtct acctccggcg gcacagctgc tctgggctgc	840
	ctggtcaagg actacttccc tgagcctgtg acagtgtcct ggaactctgg cgccctgacc	900
	tctggcgtgc acaccttccc tgccgtgctg cagtctctcg gcctgtactc cctgtcctcc	960
	gtggtcacag tgccttcaag cagcctgggc acccagacct atatctgcaa cgtgaaccac	1020
	aagccttcca acaccaaggt ggacaagcgg gtggagccta agtcctgcga caagaccac	1080
	acctgtcctc cctgccctgc tctgaactg ctggcgggcc cttctgtgtt cctgttccct	1140
	ccaaagccca aggacacct gatgatctcc cggaccctg aagtgacctg cgtggtggtg	1200
	gccgtgtccc acgaggatcc tgaagtgaag ttcaattggt acgtggacgg cgtggaggtg	1260
	cacaacgcca agaccaagcc tcgggaggaa cagtacaact ccacctaccg ggtggtgtcc	1320
	gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg aacggcaaag agtacaagtg caaagtctcc	1380
	aacaaggccc tggccgcccc tatcgaaaag acaatctcca aggccaaggg ccagcctagg	1440

gaaccccagg tgtacaccct gccacccagc cgggaggaaa tgaccaagaa ccaggtgtcc 1500
 ctgacctgtc tggtaaggg cttctaccct tccgatatcg ccgtggagtg ggagtctaac 1560
 ggccagcctg agaacaacta caagaccacc cctcctgtgc tggactccga cggtccttc 1620
 ttctgtact ccaaactgac cgtggacaag tcccgggtggc agcagggcaa cgtgttctcc 1680
 tgctccgtga tgcacgaggc cctgcacaac cactacacc agaagtcct gtccctgtct 1740
 cccggcaag 1749

<210> 55
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”
 <400> 55
 Lys Ala Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met His
 1 5 10

[0034]

<210> 56
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”
 <400> 56
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 57
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”
 <400> 57
 Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 58
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 58
Lys Ala Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met His
1 5 10

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 59
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

[0035]

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 60
Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 61
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 61
Gln Leu Ser Val Gly Tyr
1 5

<210> 62
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 62
Asp Thr Ser
1

<210> 63
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 63
Gly Ser Gly Tyr Pro Phe
1 5

[0036]

<210> 64
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 64
Leu Ser Val Gly Tyr
1 5

<210> 65
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 65
Asp Thr Ser
1

<210> 66
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

<400> 66
 Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 67
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注意= “人工序列的描述：合成的多肽”

<400> 67
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

[0037] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 68
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注意= “人工序列的描述：合成的多核苷酸”
 <400> 68
 gacatccaga tgaccagag cccctccacc ctgtccgcct ccgtgggcga cagagtgacc 60
 atcacttgca aggcccagct gtccgtgggc tacatgcact ggtatcagca gaagcccggc 120
 aaggccccta agctgctgat ctacgacacc tccaagctgg cctccggcgt gccctccaga 180
 ttctccgget ctggtccgg caccgagttc accctgacca tctccagcct gcagcccgc 240
 gacttcgcca cctactactg ttttcaaggc tccggtacc ccttcacctt cggcggaggc 300
 accaagctgg aaatcaag 318

<210> 69
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注意= “人工序列的描述：合成的多肽”

[0038]

<400> 69
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

[0039]

<210> 70
 <211> 639
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注意= “人工序列的描述：合成的多核苷酸”
 <400> 70
 gacatccaga tgaccagag cccctccacc ctgtccgcct ccgtagggcga cagagtgacc 60
 atcacttgca aggcccagct gtccgtgggc tacatgcact ggtatcagca gaagcccggc 120
 aaggccccta agctgctgat ctacgacacc tccaagctgg cctccggcgt gccctccaga 180
 ttctccggct ctggctccgg caccgagttc accctgacca tctccagcct gcagcccgac 240
 gacttcgcca cctactactg ttttcaaggc tccggtacc ccttcacctt cggcggaggc 300
 accaagctgg aaatcaagcg tacggtggcc gctcccagcg tgttcattctt cccccccagc 360
 gacgagcagc tgaagagcgg caccgccagc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 420
 cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agagcggcaa cagccaggag 480
 agcgtcaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 540

	agcaaggccg actacgagaa gcataaggtg tacgcctgcg aggtgacca ccagggcctg	600
	tccagccccg tgaccaagag cttcaacagg ggcgagtgc	639
	<210> 71	
	<211> 60	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注意= “人工序列的描述：合成的多肽”	
	<220>	
	<221> 尚未归类的特征	
	<222> (1).. (5)	
	<223> /注意= “此区域可以涵盖1-5个残基”	
	<220>	
	<221> 尚未归类的特征	
	<222> (7).. (11)	
	<223> /注意= “此区域可以涵盖1-5个残基”	
[0040]	<220>	
	<221> 尚未归类的特征	
	<222> (13).. (17)	
	<223> /注意= “此区域可以涵盖1-5个残基”	
	<220>	
	<221> 尚未归类的特征	
	<222> (19).. (23)	
	<223> /注意= “此区域可以涵盖1-5个残基”	
	<220>	
	<221> 尚未归类的特征	
	<222> (25).. (29)	
	<223> /注意= “此区域可以涵盖1-5个残基”	
	<220>	
	<221> 尚未归类的特征	
	<222> (31).. (35)	
	<223> /注意= “此区域可以涵盖1-5个残基”	
	<220>	
	<221> 尚未归类的特征	
	<222> (37).. (41)	
	<223> /注意= “此区域可以涵盖1-5个残基”	
	<220>	
	<221> 尚未归类的特征	
	<222> (43).. (47)	
	<223> /注意= “此区域可以涵盖1-5个残基”	

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (49).. (53)
 <223> /注意= “此区域可以涵盖1-5个残基”

 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (55).. (59)
 <223> /注意= “此区域可以涵盖1-5个残基”

 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1).. (60)
 <223> /注意= “此序列可以涵盖” 0-10个 ‘(Gly)_n-Ser’ 重复单元, 其中 n=1-5”

<400> 71
 Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser
 35 40 45

[0041] Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser
 50 55 60

<210> 72
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注意= “人工序列的描述: 合成的多肽”

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1).. (5)
 <223> /注意= “此区域可以涵盖1-5个残基”

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (7).. (11)
 <223> /注意= “此区域可以涵盖1-5个残基”

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (13).. (17)
 <223> /注意= “此区域可以涵盖1-5个残基”

	<220>
	<221> 尚未归类的特征
	<222> (19).. (23)
	<223> /注意= “此区域可以涵盖1-5个残基”
	<220>
	<221> 尚未归类的特征
	<222> (25).. (29)
	<223> /注意= “此区域可以涵盖1-5个残基”
	<220>
	<221> 尚未归类的特征
	<222> (31).. (35)
	<223> /注意= “此区域可以涵盖1-5个残基”
	<220>
	<221> 尚未归类的特征
	<222> (37).. (41)
	<223> /注意= “此区域可以涵盖1-5个残基”
	<220>
	<221> 尚未归类的特征
	<222> (43).. (47)
	<223> /注意= “此区域可以涵盖1-5个残基”
[0042]	<220>
	<221> 尚未归类的特征
	<222> (49).. (53)
	<223> /注意= “此区域可以涵盖1-5个残基”
	<220>
	<221> 尚未归类的特征
	<222> (55).. (59)
	<223> /注意= “此区域可以涵盖1-5个残基”
	<220>
	<221> 尚未归类的特征
	<222> (1).. (60)
	<223> /注意= “此序列可以涵盖” 0-10个 ‘(Gly) _n -Ala’ 重复单元, 其中 n=1-5”
	<400> 72
	Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly 1 5 10 15
	Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly 20 25 30
	Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ala 35 40 45
	Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ala 50 55 60

- <210> 73
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的多肽”
- <220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1)..(10)
<223> /注意= “此区域可以涵盖0-10个残基”
- <220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (12)..(21)
<223> /注意= “此区域可以涵盖0-10个残基”
- <220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (23)..(32)
<223> /注意= “此区域可以涵盖0-10个残基”
- [0043] <220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (34)..(43)
<223> /注意= “此区域可以涵盖0-10个残基”
- <220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (45)..(54)
<223> /注意= “此区域可以涵盖0-10个残基”
- <220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (56)..(65)
<223> /注意= “此区域可以涵盖0-10个残基”
- <220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (67)..(76)
<223> /注意= “此区域可以涵盖0-10个残基”
- <220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (78)..(87)
<223> /注意= “此区域可以涵盖0-10个残基”
- <220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (89)..(98)
<223> /注意= “此区域可以涵盖0-10个残基”

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (100)..(109)
 <223> /注意= “此区域可以涵盖0-10个残基”

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(110)
 <223> /注意= “此序列可以涵盖” 1-10个 ‘(Gly)n-Ser’ 重复单元, 其中 n=0-10”

<400> 73
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 35 40 45

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 50 55 60

[0044] Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 65 70 75 80

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 85 90 95

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110

<210> 74
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注意= “人工序列的描述: 合成的肽”

<220>
 <221> 来源
 <223> /注意= “针对取代和优选的实施例的详细描述, 参见所提交的说明书”

<400> 74

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 75

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注意= “人工序列的描述：合成的多肽”

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1).. (10)

<223> /注意= “此区域可以涵盖0-10个残基”

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (12).. (21)

<223> /注意= “此区域可以涵盖0-10个残基”

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (23).. (32)

[0045]

<223> /注意= “此区域可以涵盖0-10个残基”

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (34).. (43)

<223> /注意= “此区域可以涵盖0-10个残基”

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (45).. (54)

<223> /注意= “此区域可以涵盖0-10个残基”

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (56).. (65)

<223> /注意= “此区域可以涵盖0-10个残基”

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (67).. (76)

<223> /注意= “此区域可以涵盖0-10个残基”

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (78).. (87)

<223> /注意= “此区域可以涵盖0-10个残基”

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (89)..(98)
<223> /注意= “此区域可以涵盖0-10个残基”

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (100)..(109)
<223> /注意= “此区域可以涵盖0-10个残基”

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1)..(110)
<223> /注意= “此序列可以涵盖” 1-10个 ‘(Gly)_n-Ala’ 重复单元, 其中 n=0-10”

<400> 75
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30

Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly
35 40 45

[0046] Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
50 55 60

Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
85 90 95

Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala
100 105 110

<210> 76
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述: 合成的肽”

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “针对取代和优选的实施例的详细描述, 参见所提交的说明书”

<400> 76
Gly Gly Gly Gly Ala
1 5

<210> 77
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的肽”

[0047] <400> 77
Arg Gly Asp Ser
1

<210> 78
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意= “人工序列的描述：合成的6xHis标签”

<400> 78
His His His His His His
1 5

工程化以调节IL2-R选择性的蛋白

名称	产量 (mg/L)	聚集 (%)	T _m	LAL (EU/mg)	形式	Treg (扩增 倍数)	NK (扩增 倍数)	CD8 Teff (扩增 倍数)	IL-2Rαβγ (EC ₅₀ 与 IL-2)	IL-2Rβγ (EC ₅₀ 与 IL-2)
rhIL-2 (Proleukin)	N/A	N/A	N/A	N/A	非移植的	1.5	2.4	1.9	1	1
IgG.IL2R67A.H1	5.6	0.01	70.9/73.2	0.85	H1 中的 R38A	1.5	1	3.6	0.03	90
IgG.IL2F71A.H1	8.9	1.6	70.6/72.9	0.16	H1 中的 F42A	1.5	0.6	6.6	8	2
GFTX3b-IL2-H1	9.6	1.8	68.6	0.95	H1	1.5	0.8	2.1	1	0.3
GFTX3b-IL2-H2	6.6	1.6	67.4	0.76	H2	0.9	0.9	2.2	6	1
GFTX3b-IL2-H3	6.8	2.3	67	0.96	H3	1.1	1.2	1.3	250	3400
GFTX3b-IL2-L1	3.4	1.9	63.7/76.5	1.04	L1	0.9	0.5	2	1	0.5
GFTX3b-IL2-L2	-	-	-	-	L2	-	-	-	-	-
GFTX3b-IL2-L3	3.6	3.6	69.3	0.98	L3	1.5	0.7	4.1	4	4

图1

与Proleukin® (IL-2) 相比, IgG.IL2R67A.H1具有延长的半衰期

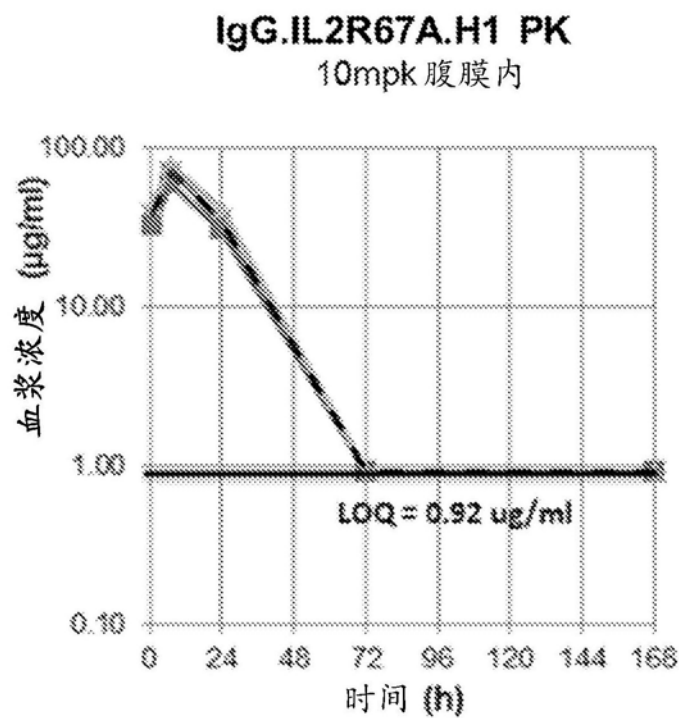


图2

在第1天给予的1剂量中的IgG.IL2R67A.H1/IL-2Fc 100 ug (约1 nmol的IL-2当量) 4.3 mg/kg
在5个连续每日剂量/周中Proleukin 3.41 ug (1 nmol的IL-2) 0.14 mg/kg

脾脏群
第4天

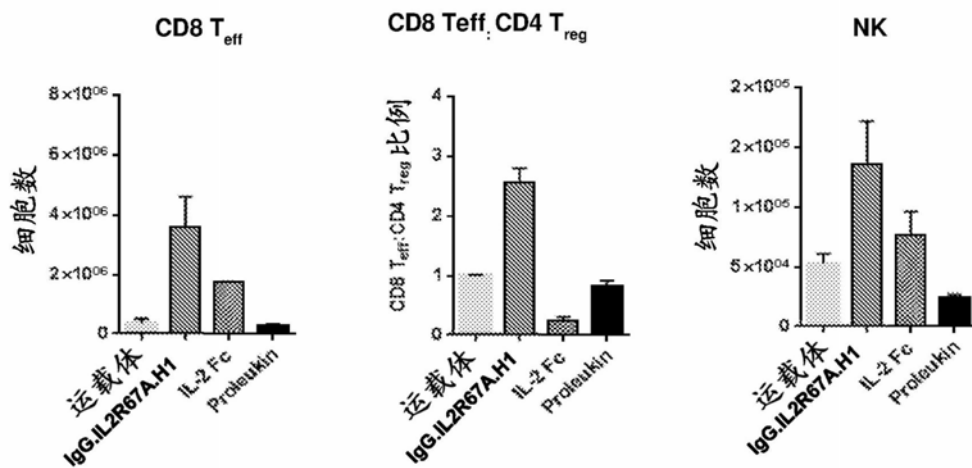


图3A

在第1天给予的1剂量中的IgG,IL2R67A.H1/IL-2Fc 100 ug (约1 nmol的IL-2当量) 4.3 mg每kg
在5个连续每日剂量/周中Proleukin 3.41 ug (1 nmol的IL-2) 0.14 mg每kg

脾脏群
第8天

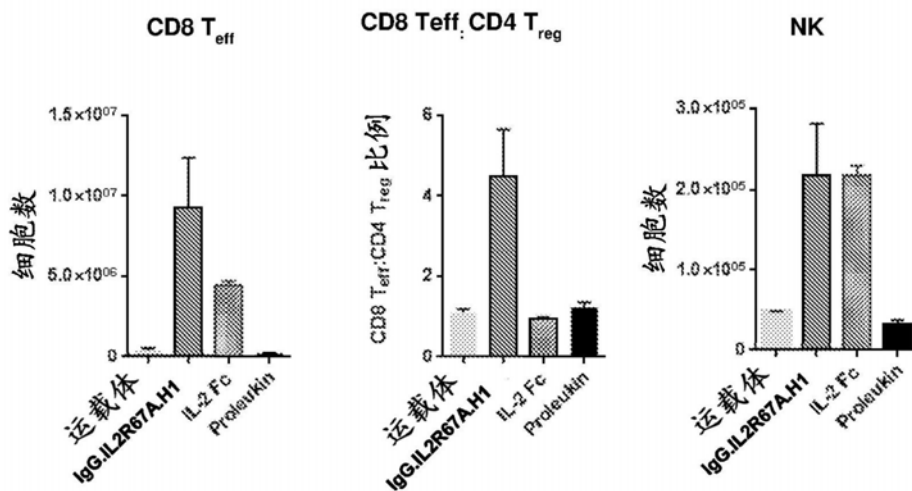


图3B

在第1天给予的1剂量中的IgG.IL2R67A.H1/IL-2Fc 100 ug (约1 nmol的IL-2当量) 4.3 mg/kg
在5个连续每日剂量/周中Proleukin 3.41 ug (1 nmol的IL-2) 0.14 mg/kg

脾脏群
第8天

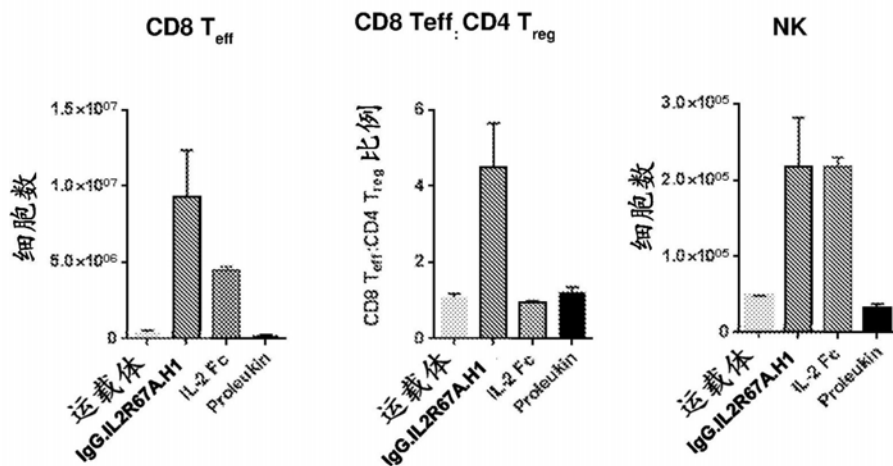


图3C

在第1天给予的I剂量中的IgG.IL2R67A.H1/IL-2Fc 500 ug (5 nmol) 21.7 mg每kg
在5个连续每日剂量/周中Proleukin 17.04 ug (5 nmol) 0.74 mg每kg

脾脏群
第4天

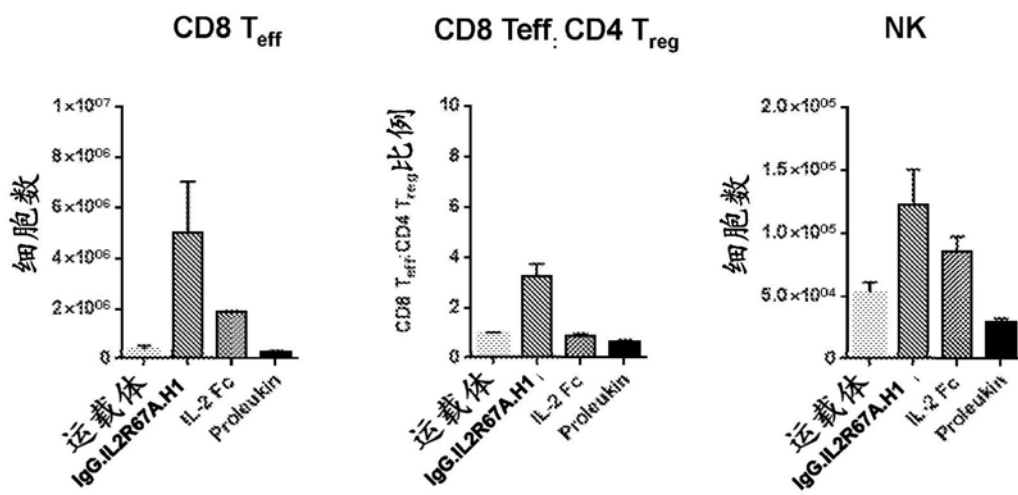


图3D

在第1天给予的1剂量中的IgG.IL2R67A.H1/IL-2Fc 500 ug (5 nmol) 21.7 mg每kg
在5个连续每日剂量/周中Proleukin 17.04 ug (5 nmol) 0.74 mg每kg

脾脏群
第8天

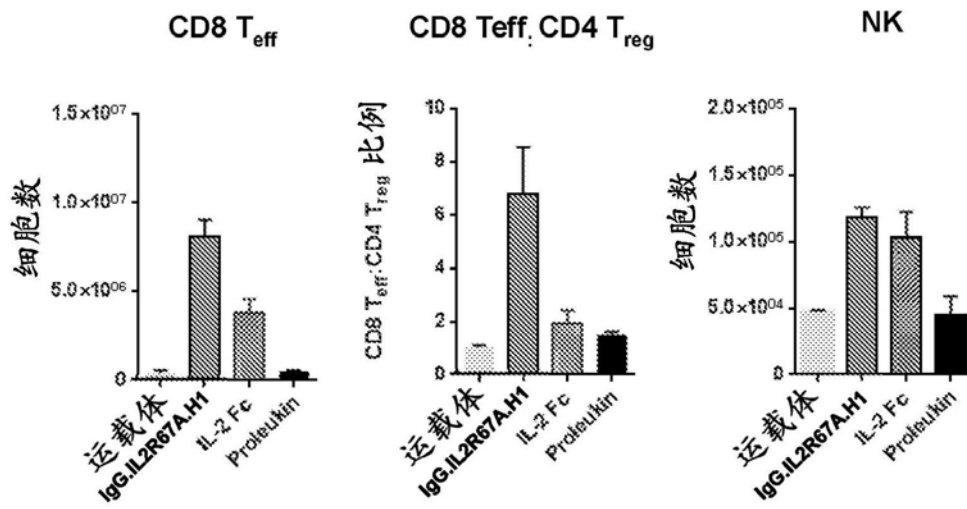


图3E

在第1天给予的1剂量中的IgG.IL2R67A.H1/IL-2Fc 500 ug (5 nmol) 21.7 mg每kg
在5个连续每日剂量/周中Proleukin 17.04 ug (5 nmol) 0.74 mg每kg

脾脏群
第11天

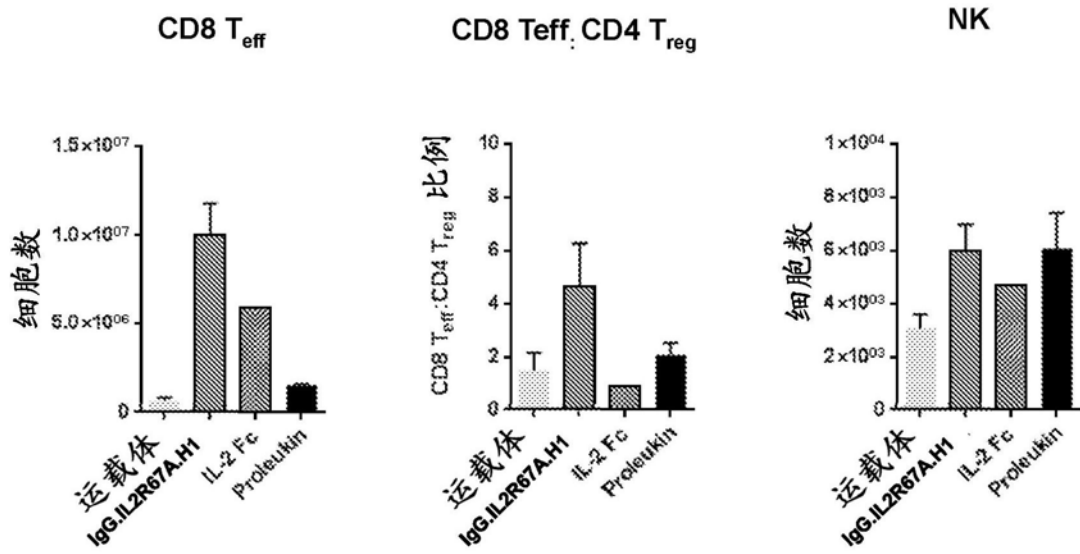


图3F

在NOD小鼠中，IgG.IL2R67A.H1选择性扩增CD8 T_{eff}，比Proleukin®耐受更好

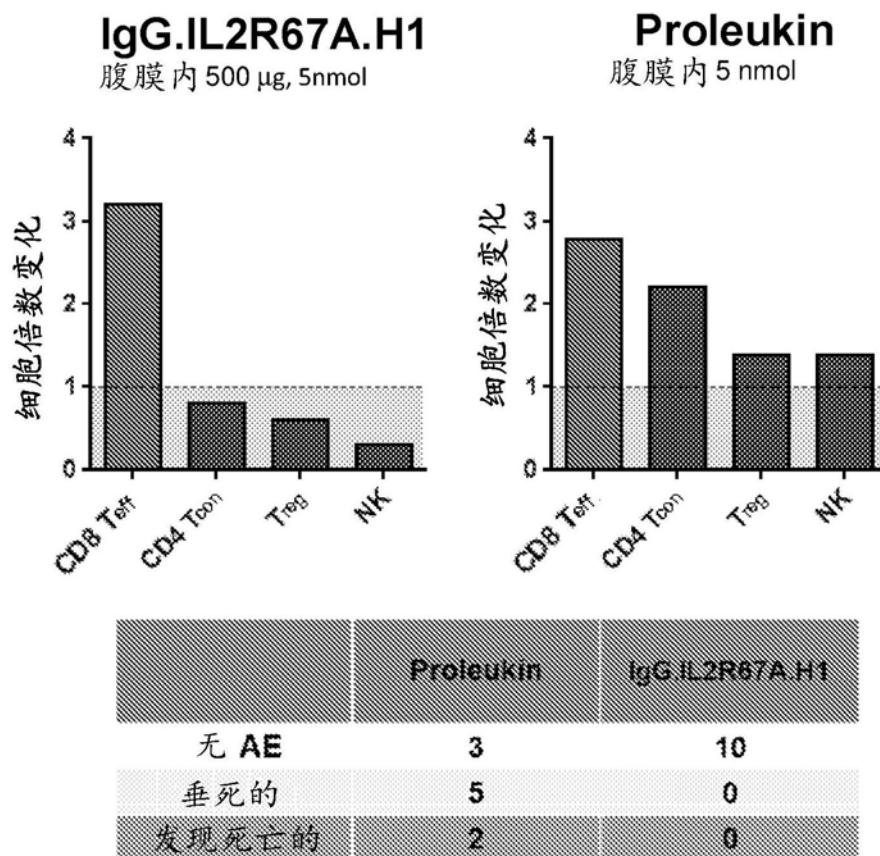


图4A

在NOD小鼠中，IgG.IL2R67A.H1选择性扩增CD8 T_{eff}，比Proleukin®耐受更好

细胞倍数变化
在前期糖尿病小鼠中
(治疗与运载体)

	剂量nmol IL-2 当量每 kg	IgG.IL2R67A.H1	IgG.IL2F71A.H1	IL-2 proleukin
CD8 T _{eff}	200	3.8	6.1	2.8
	40	1.7	2.2	0.9
T _{reg}	200	1.0	1.5	1.4
	40	0.9	1.2	1.1
CD4 T _{eff}	200	1.1	1.2	1.1
	40	1.0	1.1	0.8
NK	200	0.4	0.7	1.2
	40	0.4	0.6	0.9

图4B

在CT26模型中，IgG.IL2R67A.H1显示了单一试剂功效

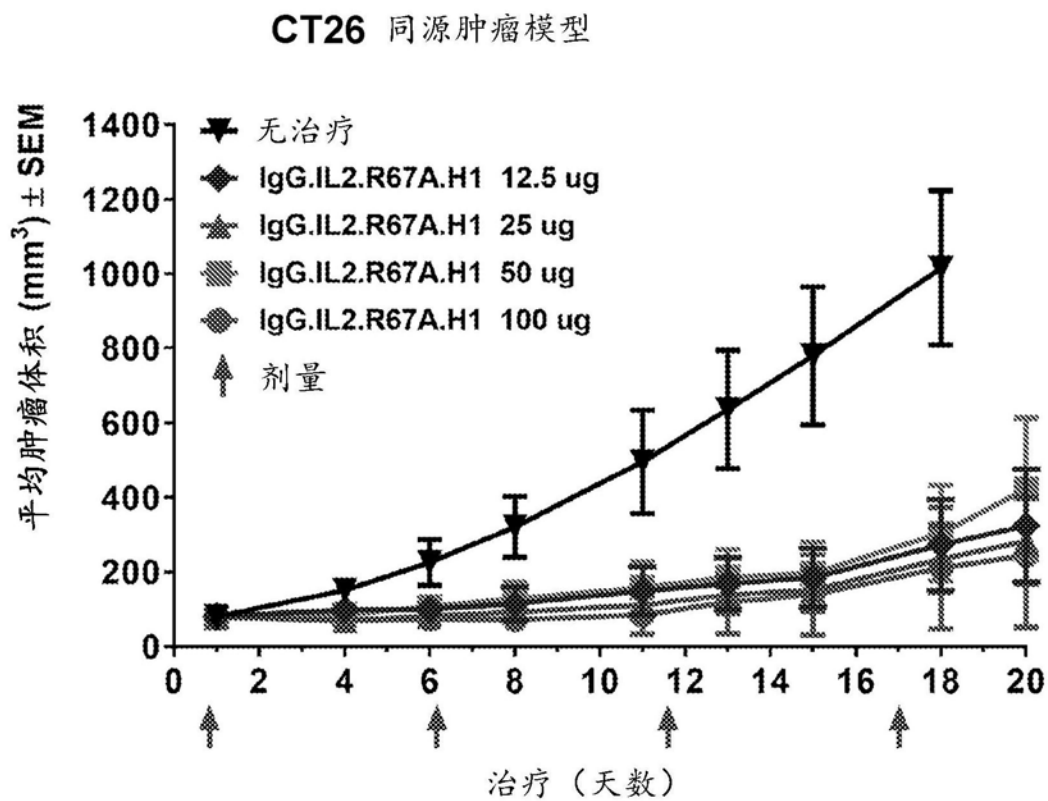


图5

在B16模型中，IgG.IL2R67A.H1+/-TA99显示了功效

在B16肿瘤模型中的功效

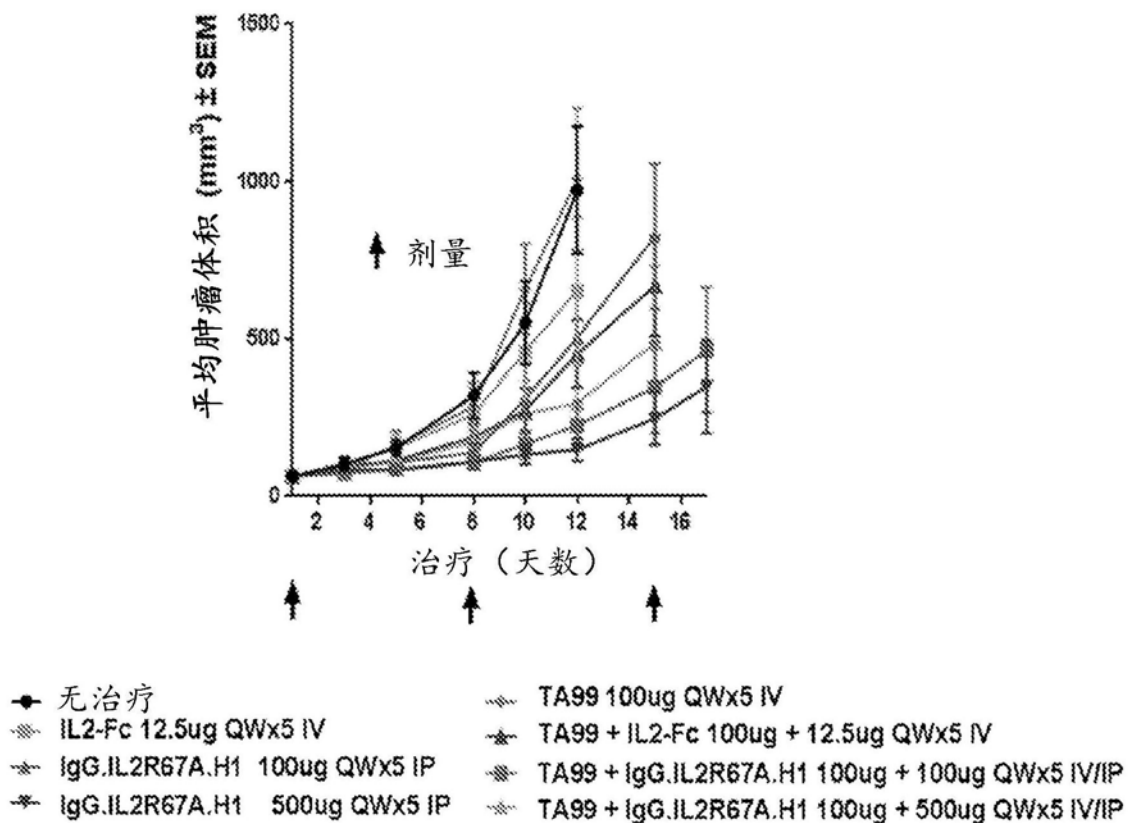


图6

在人细胞中的IL-2移植物的活性

等摩尔 移植物/IL-2 2nM	pSTAT5 倍数			
	CD8	NK	T _{reg}	CD4
Proleukin (IL-2)	102	71	30	300
GFTX3b_IL-2-H1	98	83	37	347
IgG_IL2R67A.H1	71	64	24	234
IgG_IL2F71A.H1	36	34	11	70
GFTX3b_IL-2-H2	20	28	13	142
GFTX3b_IL-2D113A	4	12	15	118

图7

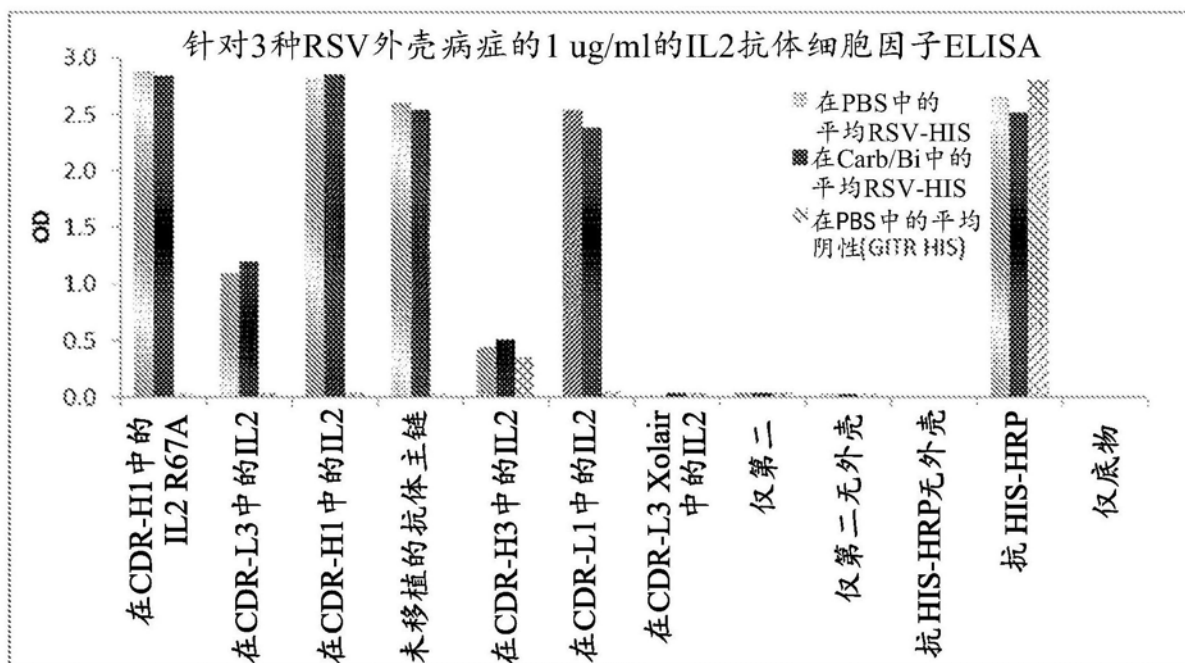


图8