



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119790064 A

(43) 申请公布日 2025. 04. 08

(21) 申请号 202380061464.0

姜锡瓚 朴范 朴庠炫 赵善贞

(22) 申请日 2023.08.21

(74) 专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理有限公司 11205

(30) 优先权数据

专利代理师 马雯雯 刘芳

10-2022-0105643 2022.08.23 KR

10-2023-0057361 2023.05.02 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2025.02.21

C07K 14/55 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2023/012348 2023.08.21

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02024/043643 KO 2024.02.29

A61K 39/00 (2006.01)

(71) 申请人 马斯得生物有限公司

地址 韩国首尔市九老区数码路26街, 123, 503-2 (邮政编码:08390)

权利要求书2页 说明书26页

序列表(电子公布) 附图11页

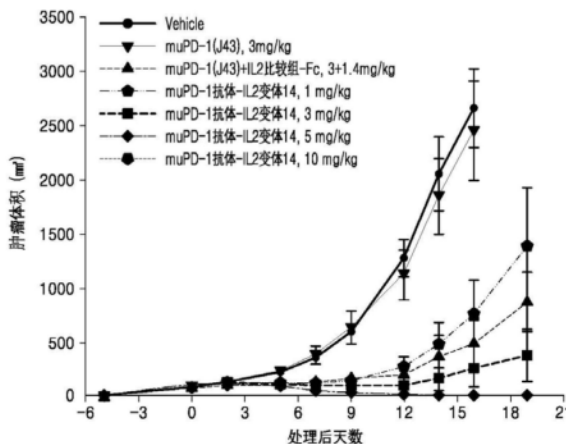
(72) 发明人 房孝住 郑容峻 郑圣烨 朴永振

(54) 发明名称

IL2变体和包括该IL2变体的蛋白复合体

(57) 摘要

本公开涉及IL2变体和包括所述IL2变体的蛋白复合体,其产生方法以及用途。所述蛋白复合体可以通过选择性地增加效应T细胞的活性来降低副作用并尽量提高抗癌活性,因此可以用于预防或治疗与癌症有关的各种免疫疾病。



1. 一种包括白细胞介素2 (IL2) 变体的蛋白质, 其中, 所述IL2变体包括第35位的谷氨酸 (E), 第38位的丙氨酸 (A), 第42位的赖氨酸 (K), 以及125位的丝氨酸 (S)。

2. 根据权利要求1所述的蛋白, 其中, 所述IL2变体在选自第18位和第19位组成的组中的一个或更多位置进一步包括选自蛋氨酸 (M)、精氨酸 (R)、丙氨酸 (A)、亮氨酸 (L)、丝氨酸 (S)、苯丙氨酸 (F)、缬氨酸 (V)、异亮氨酸 (I)、谷氨酰胺 (Q)、色氨酸 (W)、天冬酰胺 (N)、以及苏氨酸 (T) 组成的组中的一个或更多氨基酸。

3. 根据权利要求2所述的蛋白质, 其中, 所述IL2变体包括第18位的蛋氨酸 (M) 或精氨酸 (R); 以及第19位的丝氨酸 (S)。

4. 根据权利要求1所述的蛋白质, 其中, 所述IL2变体进一步包括第126位的选自苏氨酸 (T)、以及异亮氨酸 (I) 组成的组中的一个或更多氨基酸。

5. 根据权利要求1所述的蛋白质, 其中, 所述IL2变体包括选自SEQ ID NO:1至15组成的组中的氨基酸。

6. 根据权利要求1所述的蛋白质, 其包括由连接子或载体结合的Fc区域。

7. 一种蛋白复合体, 其包括第一多肽和第二多肽, 所述第一多肽包括第一CH3抗体恒定区, 所述第二多肽包括第二CH3抗体恒定区, 所述第一多肽和所述第二多肽形成异源二聚体 (heterodimer), 其中,

所述第一多肽或所述第二多肽中任一个或更多的N-末端包括对免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitor) 的抗体或其抗原结合片段, 或者对肿瘤相关抗原 (tumor associated antigen) 的抗体或其抗原结合片段, 并且,

所述第一多肽或第二多肽的N-末端或C-末端中的任一个或更多包括IL2变体。

8. 根据权利要求7所述的蛋白复合体, 其中, 所述第一CH3抗体恒定区在第366位包括色氨酸 (W), 所述第二CH3抗体恒定区在第366位包括丝氨酸 (S), 在第368位包括丙氨酸 (A), 以及在第407位包括缬氨酸 (V); 以及

在第二CH3抗体恒定区的第351位包括甘氨酸 (G) 或苯丙氨酸 (F) (其中, 所述氨基酸位置是根据Kabat EU index)。

9. 根据权利要求7所述的蛋白复合体, 其中, 所述第一CH3抗体恒定区包括第366位的丝氨酸 (S)、第368位的丙氨酸 (A)、以及第407位的缬氨酸 (V), 所述第二CH3抗体恒定区包括第366位的色氨酸 (W); 以及

第一CH3抗体恒定区中第351位的甘氨酸 (G) 或苯丙氨酸 (F) (其中, 所述氨基酸位置是根据Kabat EU index)。

10. 根据权利要求7所述的蛋白复合体, 其中, 所述第一CH3抗体恒定区包括第366位的色氨酸 (W), 所述第二CH3抗体恒定区包括第351位的甘氨酸 (G)、第366位的丝氨酸 (S)、第368位的丙氨酸 (A), 以及第407位的缬氨酸 (V); 以及

第一CH3抗体恒定区中第351位的苯丙氨酸 (F) 或色氨酸 (W) (其中, 所述氨基酸位置是根据Kabat EU index)。

11. 根据权利要求7所述的蛋白复合体, 其中, 所述第一CH3抗体恒定区包括第351位的甘氨酸 (G)、第366位的丝氨酸 (S)、第368位的丙氨酸 (A), 以及第407位的缬氨酸 (V), 所述第二CH3抗体恒定区包括第366位的色氨酸 (W); 以及

第二CH3抗体恒定区包括第351位的苯丙氨酸(F)或色氨酸(W)(其中,所述氨基酸位置是根据Kabat EU index)。

12. 根据权利要求7所述的蛋白复合体,其中,所述第一CH3抗体恒定区包括第351位的甘氨酸(G)、第366位的丝氨酸(S)、第368位的丙氨酸(A)、以及第407位的缬氨酸(V),所述第二CH3抗体恒定区包括第366位的色氨酸(W);以及

第二CH3抗体恒定区包括第351位的苯丙氨酸(F)或色氨酸(W)(其中,所述氨基酸位置是根据Kabat EU index)。

13. 根据权利要求7所述的蛋白复合体,其中,所述免疫检查点抑制剂为选自由细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)、程序性死亡受体1(PD-1)、淋巴细胞激活基因3(LAG-3)、V结构域Ig抑制因子(VISTA)、B淋巴细胞弱化因子(BTLA)、T细胞米娜一球蛋白粘蛋白3(TIM-3)、T细胞免疫球蛋白和ITIM结构域蛋白(TIGIT)以及细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)组成的组中的任一种或多种。

14. 根据权利要求7所述的蛋白复合体,其中,肿瘤相关抗原为选自由细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)、表皮生长因子受体(EGFR)、人表皮生长因子受体-2(HER-2)、B7H3、磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(GPC3)、癌胚抗原(CEA)、人滋养细胞表面糖蛋白抗原(TROP)以及前列腺特异性膜抗原(PSMA)组成的组中的任一种或多种。

15. 根据权利要求7所述的蛋白复合体,其中,所述第二多肽;以及所述IL2变体由一个或更多连接子或载体结合。

16. 根据权利要求15所述的蛋白复合体,其中,所述连接子包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

17. 一种多核苷酸,其用于编码根据权利要求1至16中任一项所述的蛋白质或蛋白复合体。

18. 一种蛋白或蛋白复合体的制备方法,其包括将用于编码根据权利要求1至17中任一项所述的蛋白质或蛋白复合体的表达载体转染于细胞的步骤。

19. 一种包括IL2变体的蛋白复合体,其中,所述蛋白复合体是通过根据权利要求18所述的方法制备的。

20. 一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,其包括根据权利要求1至17中任一项所述的蛋白质或蛋白复合体作为有效成分。

21. 一种预防或治疗癌症的方法,其包括将根据权利要求1至17中任一项所述的蛋白质或蛋白复合体施用于需要所述蛋白质或蛋白复合体的个体的步骤。

22. 一种根据权利要求1至17中任一项所述的蛋白质或蛋白复合体在制备癌症治疗剂中的用途。

IL2变体和包括该IL2变体的蛋白复合体

技术领域

[0001] 本申请主张于2022年08月23日提出的韩国专利申请第10-2022-0105643号和于2023年05月02日提出的韩国专利申请第10-2023-0057361号的优先权,所述说明书全部通过引用并入于本申请。

[0002] 本申请涉及IL2变体和包括所述IL2变体的蛋白复合体,其产生方法,以及用途。

背景技术

[0003] 免疫检查点(immune checkpoints)是指癌细胞为了避免免疫体系的攻击而使用的免疫细胞的表面蛋白。癌细胞通过在细胞表面上表达细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)并与程序性死亡受体1(PD-1)即T细胞的免疫检查点的一种结合来抑制T细胞的激活和癌细胞凋亡能。免疫检查点抑制剂能够通过激活体内免疫系统来使免疫细胞选择性地攻击癌细胞来部分地解决直接攻击癌细胞的现有抗癌剂的副作用和耐药性问题。并且,通过确认对各种癌症的效力,多个免疫检查点抑制剂得到了销售承认。然而,其总缓解率(overall response rate, ORR)为平均30%内外,还需要克服很多问题。为了提高免疫检查点抑制剂的效力以克服所述问题,白细胞介素作为与免疫检查点抑制剂的联合施用和双重激动剂的一种受重视。

[0004] 其中,白细胞介素-2(IL2; interleukin-2)具有133个氨基酸长度,且为对产生淋巴细胞、生存以及体内稳态发挥关键作用的15.5kDa的球状糖蛋白。IL2由激活的T细胞中尤其主要CD4+辅助T细胞(helper T cell)被生物合成来刺激T细胞的增殖和分化,并刺激细胞毒性T淋巴细胞(Cytotoxic T lymphocyte, CTL)的生成和自然杀伤细胞(Natural Killer cell, NK cell)的生成、增殖活性。因此,由于IL2能够增加生物体内的淋巴细胞个体群并增强所述免疫细胞的功能,因此,使用IL2的治疗已被承认且使用于患有转移性肾细胞癌和恶性黑色素瘤的患者。

[0005] IL2对淋巴细胞的活性是通过与三种不同的IL2受体(IL2R)组合的结合来介导的,这三种受体分别是IL2受体 α (IL2 receptor α , IL2R α ; CD25)、IL2受体 β (IL2 receptor β , IL2R β ; CD122)以及通用共同细胞因子受体 γ (IL2R γ ; CD132)。各亚基受体的分布根据细胞不同,与IL2的结合力也在各受体中显著不同。高亲和性IL2R由三种亚基(α 、 β 、 γ)的三聚体构成,将由 β 和 γ 亚基形成的二聚体性IL2受体称为中间亲和性IL2R。二聚体性中间亲和性IL2R以低于三聚体性高亲和性受体约100倍的亲和性与IL2结合,然而,所述二聚体性IL2R和三聚体性IL2R可以在IL2结合时传递信号。因此, α -亚基,CD25为IL2信号传递不是必须的。所述 α -亚基对其受体赋予高亲和性结合,而, β -亚基、以及 γ -亚基对信号传递很重要。包括CD25的三聚体性IL2由调节性T细胞(regulatory T cell)和内皮细胞表达。并且,所述三聚体性IL2R在常规的激活的T细胞上被暂时诱导,相反地,所述T细胞在休止状态只表达二聚体性IL2R(Nature Review Immunology, 2012 12:180-190)。

[0006] 调节性T细胞为调节免疫系统的T细胞中的一个集团,保持对自身抗原的免疫耐受(Immune-tolerance)并参与自身免疫疾病,通常抑制或下调效应T细胞(effector T cell)

的激活诱导和增殖来阻碍癌症治疗的效力。调节性T细胞持续表达最高水平的CD25,表现出比效应T细胞中更高的IL2结合力,因此在使用IL2进行癌症治疗时作为阻碍效力的问题出现。

[0007] 关于IL2免疫疗法,由于重组人IL2治疗产生的副作用正在引起问题。接收高容量IL2治疗的患者通常会体会重症的心血管、肺、肾脏、肝脏、胃肠、神经、皮肤、血液疾病等全身负面效应,这需要集中的监督和患者住院管理。可以依据所谓血管(或毛细管)渗漏综合征(vesicular leakage syndrom, VLS)的发生说明这种负面效应发生的主要原因。所述血管渗漏综合征为在多个脏器中到达体液血管外流出(例如导致肺和皮肤浮肿以及肝细胞损伤)和血管内体液枯竭(导致血压降低和补偿性心率增加)的、血管渗透性的病态增加。除了中止IL2施用之外,对所述VLS没有其它的治疗方法。为了避免VLS,已对患者进行了IL2低容量施用试验,反而发生了癌症治疗效率降低的不佳治疗代价。曾经认为VLS由于源自经IL2-激活的NK细胞的炎症细胞因子,例如肿瘤坏死因子(TNF)- α 的释放引起的,然而,最近表明了由于IL2引起的肺浮肿通过IL2直接结合至肺内皮细胞(表达了低水平或中间水平的三聚体性IL2R)生成(International Immunology, 2006vol.18, no.10:1461至1471)。

[0008] 因此,即使IL2作为对免疫抗癌治疗剂具有可能性,为了减少毒性和副作用并提高治疗学效能,需要开发一种新的治疗方法,其能够通过使用选择性地激活效应T细胞(effector T cell)的IL2变体和对它的可结晶片段(Fc, fragment crystallizable)区域、免疫检查点抑制剂和对癌细胞特异性抗原的抗体等尽量减少由于所述IL2引起的癌治疗副作用且提高效率。

发明内容

[0009] 技术问题

[0010] 一方面提供包括白细胞介素2(IL2)变体的蛋白质。

[0011] 另一方面提供一种蛋白复合体,包括:IL2变体、包括第一CH3抗体恒定区的第一多肽和包括第二CH3抗体恒定区的第二多肽;以及对免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitor)的抗体或其抗原结合片段或肿瘤相关抗原(tumor associated antigen)的抗体或其抗原结合片段。

[0012] 另一方面提供制备所述蛋白质或所述蛋白复合体的方法。

[0013] 另一方面提供用于预防或治疗癌症的药物组合物,所述药物组合物包括所述蛋白质或所述蛋白复合体作为有效成分。

[0014] 另一方面提供治疗癌症的方法,其包括施用所述蛋白质或所述蛋白复合体的步骤。

[0015] 另一方面提供所述蛋白质或蛋白复合体在制备癌症治疗剂中的用途。

[0016] 技术方案

[0017] 一方面提供一种包括白细胞介素(IL2)变体的蛋白质,其中,所述IL2变体在选自由第35位、第38位、第42位、以及第125位组成的组中的一个或更多位置包括选自由谷氨酸(E)、丙氨酸(A)、赖氨酸(K)、以及丝氨酸(S)组成的组中的一个或更多氨基酸。

[0018] 所述IL2变体可以是包括SEQ ID NO:16的氨基酸的野生型IL2的氨基酸中的一个或更多被取代的。只要IL2的活性被保持,所述IL2变体可以是1个、2个、3个、4个、5个、6个、7

个、8个、9个、或10个或更多氨基酸被取代的。例如,所述IL2变体可以是包括选自SEQ ID NO:16的氨基酸的野生型IL2氨基酸的第18位、第19位、第35位、第38位、第42位、第125位、以及第126位组成的组中的一个或更多位置被取代的。

[0019] 具体地,所述IL2变体可以在选自第18位、第19位、第35位、第38位、第42位、第125位、以及第126位组成的组中的一个或更多位置包括选自蛋氨酸(M)、精氨酸(R)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、丝氨酸(S)、苯丙氨酸(F)、缬氨酸(V)、异亮氨酸(I)、谷氨酰胺(Q)、色氨酸(W)、天冬酰胺(N)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)、以及赖氨酸(K)组成的组中的一个或更多氨基酸。

[0020] 所述IL2变体与IL2受体的结合力可以通过氨基酸取代增加或减少。例如,可以减少与IL2R α 和/或IL2R β γ 的结合力。因此,所述IL2减少与IL2R的结合力,从而可以与阻碍IL2造成的免疫活性的调节性T细胞相比选择性地激活效应T细胞。

[0021] 根据一实施方式,所述IL2变体可以包括第35位的谷氨酸(E)、第38位的丙氨酸(A)、第42位的赖氨酸(K)、以及第125位的丝氨酸(S)。

[0022] 根据另一实施方式,所述IL2变体可以在选自第18位和第19位组成的组中的一个或更多位置进一步包括选自亮氨酸(L)、蛋氨酸(M)、精氨酸(R)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苯丙氨酸(F)、缬氨酸(V)、异亮氨酸(I)、谷氨酰胺(Q)、色氨酸(W)、天冬酰胺(N)、以及苏氨酸(T)组成的组中的一个或更多氨基酸。

[0023] 根据另一实施方式,所述IL2变体可以进一步包括第126位的选自苏氨酸(T)和异亮氨酸(I)组成的组中的一个或更多氨基酸。

[0024] 例如,所述IL2变体可以包括选自下列项目组成的组中的氨基酸:

[0025] 第18位的选自蛋氨酸(M)、精氨酸(R)、丙氨酸(A)、亮氨酸(L)、丝氨酸(S)、苯丙氨酸(F)、缬氨酸(V)、异亮氨酸(I)、以及谷氨酰胺(Q)组成的组中的氨基酸;

[0026] 第19位的选自丝氨酸(S)、亮氨酸(L)、色氨酸(W)、天冬酰胺(N)、异亮氨酸(I)、苏氨酸(T)、丙氨酸(A)、蛋氨酸(M)、以及苯丙氨酸(F)组成的组中的氨基酸;

[0027] 第35位的谷氨酸(E);

[0028] 第38位的丙氨酸(A);

[0029] 第42位的赖氨酸(K);

[0030] 第125位的丝氨酸(S);以及

[0031] 第126位的选自苏氨酸(T)和异亮氨酸(I)组成的组中的氨基酸。

[0032] 具体地,所述IL2变体可以包括选自下列项目组成的组中的氨基酸:

[0033] 第35位的谷氨酸(E)、第38位的丙氨酸(A)、第42位的赖氨酸(K)、以及第125位的丝氨酸(S);

[0034] 第18位的蛋氨酸(M)、第19位的丝氨酸(S)、第35位的谷氨酸(E)、第38位的丙氨酸(A)、第42位的赖氨酸(K)、以及第125位的丝氨酸(S);

[0035] 第18位的丙氨酸(A)、第19位的丝氨酸(S)、第35位的谷氨酸(E)、第38位的丙氨酸(A)、第42位的赖氨酸(K)、以及第125位的丝氨酸(S);

[0036] 第18位的精氨酸(R)、第19位的丝氨酸(S)、第35位的谷氨酸(E)、第38位的丙氨酸(A)、第42位的赖氨酸(K)、以及第125位的丝氨酸(S);

[0037] 第18位的蛋氨酸(M)、第19位的亮氨酸(L)、第35位的谷氨酸(E)、第38位的丙氨酸

(A)、第42位的赖氨酸(K)、以及第125位的丝氨酸(S)；

[0038] 第18位的亮氨酸(L)、第19位的丝氨酸(S)、第35位的谷氨酸(E)、第38位的丙氨酸(A)、第42位的赖氨酸(K)、以及第125位的丝氨酸(S)；

[0039] 第18位的丝氨酸(S)、第19位的色氨酸(W)、第35位的谷氨酸(E)、第38位的丙氨酸(A)、第42位的赖氨酸(K)、以及第125位的丝氨酸(S)；第18位的苯丙氨酸(F)、第19位的天冬酰胺(N)、第35位的谷氨酸(E)、第38位的丙氨酸(A)、第42位的赖氨酸(K)、以及第125位的丝氨酸(S)；

[0040] 第18位的缬氨酸(V)、第19位的异亮氨酸(I)、第35位的谷氨酸(E)、第38位的丙氨酸(A)、第42位的赖氨酸(K)、第125位的丝氨酸(S)；

[0041] 第18位的异亮氨酸(I)、第19位的苏氨酸(T)、第35位的谷氨酸(E)、第38位的丙氨酸(A)、第42位的赖氨酸(K)、以及第125位的丝氨酸(S)；

[0042] 第18位的谷氨酸(Q)、第19位的丙氨酸(A)、第35位的谷氨酸(E)、第38位的丙氨酸(A)、第42位的赖氨酸(K)、以及第125位的丝氨酸(S)；

[0043] 第18位的蛋氨酸(M)、第19位的蛋氨酸(M)、第35位的谷氨酸(E)、第38位的丙氨酸(A)、第42位的赖氨酸(K)、以及第125位的丝氨酸(S)；

[0044] 第18位的蛋氨酸(M)、第19位的苯丙氨酸(F)、第35位的谷氨酸(E)、第38位的丙氨酸(A)、第42位的赖氨酸(K)、以及第125位的丝氨酸(S)；

[0045] 第35位的谷氨酸(E)、第38位的丙氨酸(A)、第42位的赖氨酸(K)、第125位的丝氨酸(S)、以及第126位的苏氨酸(T)；以及

[0046] 第35位的谷氨酸(E)、第38位的丙氨酸(A)、第42位的赖氨酸(K)、第125位的丝氨酸(S)、以及第126位的异亮氨酸(I)。

[0047] 根据另一实施方式,所述IL2变体可以包括选自由SEQ ID NO:1至15组成的组中的氨基酸。并且,所述IL2变体可以包括用于编码所述氨基酸的多核苷酸。具体地,所述多核苷酸可以选自由SEQ ID NO:56至70组成的组中。

[0048] 并且,所述蛋白可以包括通过连接子或载体结合的Fc区域。例如,所述连接子可以包括1个至50个氨基酸、白蛋白或其片段、聚乙二醇等共聚物。

[0049] 根据一实施方式,所述连接子可以包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

[0050] 根据另一实施方式,所述Fc区域可以包括选自由SEQ ID NO:19至21;SEQ ID NO:22至24;SEQ ID NO:25至27;SEQ ID NO:28至30;SEQ ID NO:31至33;SEQ ID NO:34至36;SEQ ID NO:37至39;SEQ ID NO:40至42;SEQ ID NO:43至45;以及SEQ ID NO:46至48组成的组中的一个或更多氨基酸序列。

[0051] 并且,所述蛋白可以进一步包括对免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitor)的抗体或其抗原结合片段。所述免疫检查点抑制剂可以位,例如,细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)、程序性死亡受体1(PD-1)、淋巴细胞激活基因3(LAG-3)、V结构域Ig抑制因子(VISTA)、B淋巴细胞弱化因子(BTLA)、T细胞米娜一球蛋白粘蛋白3(TIM-3)、T细胞免疫球蛋白和ITIM结构域蛋白(TIGIT)以及细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)等。

[0052] 并且,所述蛋白可以进一步包括对肿瘤相关抗原(tumor associated antigen)的抗体或其抗原结合片段。所述肿瘤相关抗原可以为,例如,细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)、表皮生长因子受体(EGFR)、人表皮生长因子受体-2(HER-2)、B7H3、磷脂酰肌醇蛋白聚糖3

(GPC3)、癌胚抗原(CEA)、人滋养细胞表面糖蛋白抗原(TROP)以及前列腺特异性膜抗原(PSMA)等。

[0053] 因此,另一方面提供一种蛋白复合体,其包括:IL2变体;以及Fc区域。

[0054] 并且,另一方面提供一种蛋白复合体,其包括:IL2变体;以及对免疫检查点抑制剂(immune cechkpoint inhibitor)的抗体或其抗原结合片段。

[0055] 并且,另一方面提供一种蛋白复合体,其包括:IL2变体;以及对肿瘤相关抗原(tumor associated antigen)的抗体或其抗原结合片段。

[0056] 在本说明书中,术语“蛋白复合体”是由两个或更多相关多肽组成的复合体,是指在一种蛋白质基因上连接一个或更多其他蛋白质的基因后进行表达的人工重组蛋白质,且可以与“融合蛋白(fusion protein)”互换使用。由于所述蛋白复合体是通过连接两个或更多蛋白而形成的,可以期待其功能上的上升效果。因此,作为包括Fc区域的结合体、蛋白复合体、或融合蛋白质,所述蛋白复合体可以通过取代IL2的特定氨基酸来选择性地增加效应T细胞相对于调节性T细胞的活性。并且,所述蛋白复合体能够特异性分布于肿瘤微环境中、抑制免疫检查点、激活免疫细胞来有效地诱导癌细胞的凋亡,因此,可以提供一种治疗剂,其与现有的治疗剂相比具有降低的副作用和极大化的抗癌活性。

[0057] 另一方面提供一种蛋白复合体,其包括第一多肽和第二多肽,所述第一多肽包括第一CH3抗体恒定区,所述第二多肽包括第二CH3抗体恒定区,所述第一多肽和所述第二胎形成异源二聚体(heterodimer),其中,所述第一多肽或所述第二多肽中的任一个或更多的N-末端包括对免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitor)的抗体或其抗原结合片段、或对肿瘤相关抗原(tumor associated antigen)抗体或其抗原结合片段,并且,在所述第一多肽或所述第二多肽的N-末端或C-末端中的任一个或更多包括IL2变体。

[0058] 图4包括根据一实施方式的、包括IL2变体的蛋白复合体的结构。

[0059] 参照图4,所述蛋白复合体可以在包括第一CH3抗体恒定区的第一多肽的N-末端包括对免疫检查点抑制剂的抗体或其抗原结合片段、或对肿瘤相关抗原的抗体或其抗原结合片段,且可以在包括第二CH3抗体恒定区的第二多肽的N-末端包括IL2变体。

[0060] 并且,所述蛋白复合体可以在包括第一CH3抗体恒定区的第一多肽和包括第二CH3抗体恒定区的第二多肽的N-末端包括对免疫检查点抑制剂的抗体或其抗原结合片段、或对肿瘤相关抗原的抗体或其抗原结合片段,且可以在第一多肽或第二多肽的C-末端包括IL2变体。

[0061] 关于所述IL2变体、免疫检查点抑制剂、以及肿瘤相关抗原的具体内容如上所述。在所述蛋白复合体中,所述对免疫检查点抑制剂的抗体或其抗原结合片段与癌细胞或T细胞之间的结合力优于T细胞与IL2受体之间的结合力。因此,所述对免疫检查点抑制剂的抗体或其抗原结合片段主要通过结合癌细胞或癌细胞周围的T细胞,从而可以减少由于能够在全身诱导免疫细胞激活的IL2受体结合引起的副作用。并且,所述对肿瘤相关抗原的抗体或其抗原结合片段不但与癌细胞特异性结合,并且,对癌细胞的结合力优于与IL2受体结合蛋白的结合力。因此,所述对肿瘤相关抗原的抗体或其抗原结合片段可以与癌细胞一次性结合来减少优于可能在全身诱导免疫细胞活性的IL2受体结合引起的副作用。

[0062] 所述免疫检查点抑制剂和/或肿瘤相关抗原的抗体或其抗原结合片段可以为,例如、抗体、抗原-结合片段(Fab)、单链可变区片段(scFv)、纳米抗体(nanobody)。

[0063] 在本说明书中,术语“抗体(antibody)”与“免疫球蛋白(immunoglobulin:Ig)”互换使用。完整的抗体为具有两个全长(full length)轻链和两个全长重链的结构,各轻链通过二硫键(disulfide bond:SS-bond)与重链结合。所述轻链(light chain)具有 λ 、 κ 两种,由大约211个至217个氨基酸组成。在人的每一个抗体中,均仅存在一种轻链。轻链由连续的恒定区和可变区组成。所述重链(heavy chain)有5种(γ 、 δ 、 α 、 μ 、 ϵ),重链确定抗体的种类。 α 和 γ 由450个氨基酸组成, μ 和 ϵ 由550个氨基酸组成。重链具有两种区域,即可变区和恒定区。所述可变区(variable region)是指抗体中抗原结合的区域。所述可变区可以包括互补决定区(complementarity determining region:CDR),其赋予与抗原的结合特异性。

[0064] 所述抗体可以包括抗原结合片段(Fab,antigen-binding fragment)区域和可结晶片段(Fc,fragment crystallizable)区域,所述Fab区域结合至抗原,所述Fc区域结合至细胞表面受体。使用木瓜蛋白酶(papain)进行切割时,完整的抗体可以被切割成两个Fab和一个Fc区域。Fab区域可以是包括重链的可变区(VH)结构域和重链的第一恒定区(CH1)结构域的多肽与包括轻链的可变区(VL)结构域和轻链的恒定区(CL)结构域的多肽通过二硫键连接而成的。Fc区域可以是包括重链的第二恒定区(CH2)结构域和第三恒定区(CH3)结构域的两个多肽彼此连接而成的。Fc区域可以形成铰链区。所述CH3抗体恒定区是指抗体中的第三重链恒定区结构域。

[0065] 通常,对于抗体的效应器(effector)功能而言,Fc区域与作为其受体的Fc γ 受体或作为补体成分(complement components)分子的C1q结合并引起抗体依赖性细胞毒性(ADCC,antibody dependent cell cytotoxicity)或补体依赖性细胞毒性(CDC,complement dependent cytotoxicity)。免疫细胞因具有众多Fc γ 受体而可能诱导不佳免疫细胞的凋亡,因此优选除去效应器功能。因此,所述CH3抗体恒定区可以修饰为减少对Fc γ 受体的结合力、没有效应器(effector)功能或大幅减少所述功能而具有高稳定性。并且,所述CH3抗体恒定区可以被修饰为抗体依赖性细胞毒性(Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity,ADCC)减少。

[0066] 根据一实施方式,所述Fc区域可以在第一CH3抗体恒定区的第366位包括色氨酸(W),在第二CH3抗体恒定区的第366位包括丝氨酸(S)、在第368位包括丙氨酸(A)、以及在第407位包括缬氨酸(V),并在第二CH3抗体恒定区的第351位包括甘氨酸(G)或苯丙氨酸(F)。

[0067] 并且,所述Fc区域可以在第一CH3抗体恒定区的第366位包括丝氨酸(S)、在第368位包括丙氨酸(A)、以及在第407位包括缬氨酸(V)、在所述第二CH3抗体恒定区的第366位包括色氨酸(W);以及在第一CH3抗体恒定区的第351位包括甘氨酸(G)或苯丙氨酸(F)。

[0068] 并且,所述Fc区在第一CH3抗体恒定区的第366位包括色氨酸(W),在所述第二CH3抗体恒定区的第351位包括甘氨酸(G)、在第366位包括丝氨酸(S)、在第368位包括丙氨酸(A),以及在第407位包括缬氨酸(V);以及在第一CH3抗体恒定区的第351位包括苯丙氨酸(F)或色氨酸(W)。

[0069] 并且,所述Fc区域可以在第一CH3抗体恒定区的第351位包括甘氨酸(G)、在第366位包括丝氨酸(S)、在第368位包括丙氨酸(A)、以及在第407位包括缬氨酸(V),在所述第二CH3抗体恒定区的第366位包括色氨酸(W);以及在第二CH3抗体恒定区的第351位包括苯丙氨酸(F)或色氨酸(W)。

[0070] 根据另一实施方式,所述第一CH抗体恒定区和第二CH抗体恒定区可以在选自第

234、235、329、297、331以及265位组成的组中的一个或更多位置进一步包括选自由丙氨酸(A)、甘氨酸(G)、谷氨酰胺(Q)、苯丙氨酸(F)、谷氨酸(E)、以及丝氨酸(S)组成的组中的一个或更多氨基酸。具体地,所述CH2抗体恒定区可以为CH2抗体恒定区。

[0071] 例如,所述第一CH2抗体恒定区和第二CH2抗体恒定区中,第234位和第235位的亮氨酸(L)可以被丙氨酸(A)进一步取代(L234A/L235A)。

[0072] 并且,在所述第一CH2抗体恒定区和第二CH2抗体恒定区中,第234位和第235位的亮氨酸(L)可以被丙氨酸(A)取代,以及第329位的脯氨酸(P)被甘氨酸(G)进一步取代(L234A/L235A/P329G)。

[0073] 并且,所述第一CH2抗体恒定区和第二CH2抗体恒定区中,第297位的天冬酰胺(N)可以被丙氨酸(A)、谷氨酰胺(Q)、或甘氨酸(G)进一步取代(N297A、N297Q、或N297G)。

[0074] 并且,在所述第一CH2抗体恒定区和第二CH2抗体恒定区中,第234位和第235位的亮氨酸(L)被苯丙氨酸(F)和谷氨酸(E)取代,以及第331位的脯氨酸(P)被丝氨酸(S)进一步取代(L234F/L235E/P331S)。

[0075] 并且,在所述第一CH2抗体恒定区和第二CH2抗体恒定区中,第234位和第235位的亮氨酸(L)被苯丙氨酸(F)和谷氨酸(E)取代,以及第265位的天冬氨酸(D)被丙氨酸(A)进一步取代(L234F/L235E/D265A)。

[0076] 并且,根据另一实施方式,所述Fc区域可以包括选自由SEQ ID NO:19至21;SEQ ID NO:22至24;SEQ ID NO:25至27;SEQ ID NO:28至30;SEQ ID NO:31至33;SEQ ID NO:34至36;SEQ ID NO:37至39;SEQ ID NO:40至42;SEQ ID NO:43至45;以及SEQ ID NO:46至48组成的组中的一个或更多氨基酸序列。

[0077] 并且,根据另一实施方式,所述第一多肽或第二多肽;以及所述IL2变体可以通过连接子或载体结合。所述连接子可以包括(GGGGS)_n的氨基酸序列,所述“n”可以为1至10的自然数。具体地,所述连接子可以包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

[0078] 所述第一多肽和所述第二多肽可以形成抗体的Fc区域。

[0079] 所述异源二聚体(heterodimer)是指由氨基酸残基的顺序、数量、或种类彼此不同的两个多肽结合。所述蛋白复合体可以为与不同靶特异性结合的两个多肽结合而形成的蛋白复合体。

[0080] 所述蛋白复合体可以为抗体或其抗原-结合片段、受体与激动剂(agonist)的结合物、受体与拮抗剂(antagonist)的结合物、受体与配体(ligand)的结合物、或配体与诱骗(decy)受体的结合物。并且,所述蛋白复合体可以包括由抗原-结合片段(Fab)、单链可变区片段(scFv)、膜受体的细胞外结构域、激动剂(agonist)、拮抗剂(antagonist)、配体(ligand)、诱骗(decy)受体、细胞因子、凝血因子、以及亲和性标签组成的组中的项目。

[0081] 所述抗体可以例如为IgA、IgD、IgE、IgG、或IgM。所述抗体可以为单克隆抗体或多克隆抗体。所述抗体可以为动物来源抗体、小鼠-人嵌合抗体(chimeric antibody)、人源化抗体(humanized antibody),或人抗体。

[0082] 在本说明书中,术语“抗原-结合片段(antigen-binding fragment)”为整个免疫球蛋白结构的其片段,是指包括能够与抗原结合的部分的多肽中的一部分。例如,抗原结合片段可以为scFv、(scFv)₂、Fv、Fab、Fab'、Fv F(ab')₂,或其组合。

[0083] 在本说明书中,术语“受体(receptor)”是指用于接收或传递能够通过生物学系统

传递的信号的物质。所述受体可以为蛋白受体。所述受体可以结合至激动剂(agonist)、拮抗剂(antagonist)、配体(ligand)、或细胞因子(cytokine)。所述激动剂可以为通过与受体结合并激活受体来诱导生物学反应的物质。所述拮抗剂可以为通过与受体结合并抑制受体来抑制生物学反应的物质。所述配体可以为结合至受体的物质。所述配体可以与诱骗(decoy)受体结合。诱骗受体是指通过特异性结合至配体来阻碍通过实际受体的信号传递的受体。所述细胞因子是指作用于细胞的信号传递、炎症过程的调节和保持的小型蛋白。

[0084] 所述蛋白复合体可以为经修饰的。例如,所述蛋白复合体可以为通过共轭(conjugation)或结合、糖基化(glycosylation)、标签附着、或其组合修饰的。所述抗体可以与抗癌剂等其它药物接合。例如,所述蛋白复合体可以与辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase:HRP)、碱性磷酸、半抗原(hapten)、生物素、链霉亲和素、荧光物质、放射性物质、量子点、聚乙二醇(polyethylene glycol:PEG)、组氨酸标签,或其组合结合。所述荧光物质可以为Alexa Flour[®]532、Alexa Flour[®]546、Alexa Flour[®]568、Alexa Fluor[®]680、Alexa Fluor[®]750、Alexa Fluor[®]790、或Alexa Fluor[®]350。

[0085] 所述Fc区域或CH2、以及CH3区域的氨基酸的位置是根据Kabat EU index(记载于‘Kabat等.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,贝塞斯达,MD.(1991)’中的EU-索引)。所述CH3结构域的氨基酸位置以及与所述氨基酸位置相对应的氨基酸种类以人IgG1为准。

[0086] 另一方面提供一种多核苷酸,其编码根据一方面的蛋白质或根据另一方面的蛋白复合体。

[0087] 关于所述蛋白质或蛋白复合体的具体内容如上所述。

[0088] 根据一实施方式,所述多核苷酸可以包括选自由SEQ ID NO:56至70组成的组中的一个或更多多核苷酸;以及选自由SEQ ID NO:74至76组成的组中的一个或更多多核苷酸。

[0089] 根据另一实施方式,所述多核苷酸可以包括:选自由SEQ ID NO:56至70组成的组中的一个或更多多核苷酸;包括SEQ ID NO:73的多核苷酸;以及选自由SEQ ID NO:74至76组成的组中的一个或更多多核苷酸。

[0090] 根据另一实施方式,所述多核苷酸可以包括:选自由SEQ ID NO:56至70组成的组中的一个或更多多核苷酸;包括SEQ ID NO:73的多核苷酸;选自由SEQ ID NO:74至76组成的组中的一个或更多多核苷酸;以及选自由SEQ ID NO:77至82组成的组中的一个或更多多核苷酸。

[0091] 另一方面提供一种制备蛋白质或蛋白复合体的方法,所述方法包括将编码根据一方面的蛋白质或根据另一方面的蛋白复合体的表达载体转染于细胞来表达所述蛋白质或所述蛋白复合体的步骤。并且,另一方面提供包括通过所述方法制备的、包括IL2变体的蛋白质或蛋白复合体。

[0092] 关于所述蛋白质或蛋白复合体的具体内容如上所述。

[0093] 表达载体为能够在适当的宿主细胞中表达靶蛋白的表达载体,且是指一种载体,其包括可操作地连接的必须调节因子以表达所插入的核酸序列。所述“可操作地连接(operably linked)”是指核酸表达调节序列与编码目标蛋白的核酸功能性地连接以执行常规功能。所述表达载体可以包括编码所述蛋白复合体的多核苷酸。所述表达载体可以包括表达基因所需的调节部位,例如,增强子(enhancer)、启动子、多(A)序列等。

[0094] 所述细胞可以为癌细胞。所述细胞可以为体外 (in vitro) 细胞。所述细胞可以为细菌、酵母、植物细胞、或哺乳动物细胞。所述细菌可以为大肠杆菌。所述哺乳动物细胞是指源自小鼠、大鼠、兔、狗、猫、羊、牛、马、猴、黑猩猩、或人的细胞。所述细胞可以为细胞株。所述细胞例如选自中国仓鼠卵巢细胞 (chinese hamster ovary: CHO) 细胞、人胚胎肾细胞 (human embryonic kidney L HEK) 细胞、幼仓鼠肾 (baby hamster kidney: BHK) 细胞、NSO 细胞、人胚胎视网膜细胞 (PER.C6) 细胞、人宫颈癌 (HeLa) 细胞、马丁达比狗肾上皮细胞 (MDCK, Madin-Darby Canine Kidney) 细胞、SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞、COS-7、以及 YB2/0 大鼠骨髓瘤细胞组成的组中。所述 CHO 细胞可以为 CHO DG44、CHO-K1、CHO-S、GS-CHO、或 CHO DUKX (DXB11) 细胞。所述 HEK 细胞可以为 HEK293 细胞。

[0095] “转染 (transformation)” 是指通过将特定核酸片段插入细胞基因内以使所插入的核酸表达的方法。

[0096] 根据一实施方式, 所述方法可以包括将编码在第一多肽或第二多肽中任一个或更多的 N-末端包括对免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitor) 的抗体或其抗原结合片段或对肿瘤相关抗原 (tumor associated antigen) 的抗体或其抗原结合片段的第一多肽和/或第二多肽的表达载体和编码在所述 N-末端或 C-末端包括 IL2 变体的第一多肽或第二多肽的表达载体共转染 (co-transfection) 于细胞的步骤。并且, 所述方法可以包括将编码在所述 N-末端包括对免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitor) 的抗体或其抗原结合片段或对肿瘤相关抗原 (tumor associated antigen) 的抗体或其抗原结合片段的第一多肽和/或第二多肽的表达载体和编码在所述 N-末端或 C-末端包括 IL2 的第一多肽或第二多肽的表达载体分别转染于两种或更多种的细胞的步骤。

[0097] 所述细胞可以在细胞培养基中培养。细胞培养基是指含有为培养细胞所需的营养成分的溶液。所述培养基包括用于培养细胞的、商业的或制造的培养基。所述细胞培养基可以包括抗生素。所述细胞培养基可以包括 G418 (遗传霉素 (geneticin))、嘌呤霉素 (Puromycin)、杀稻瘟菌素 (Blasticidin)、博莱霉素 (Zeocin)、或其组合。所述细胞培养基可以包括化学成分明确的培养基 (chemically defined medium)。

[0098] 所述细胞在允许细胞的存活或增殖的条件下培养。所述允许细胞的存活或增殖的条件可以根据细胞种类不同。所述细胞可以在约 25°C 至约 42°C、约 25°C 至约 40°C、约 30°C 至约 40°C、约 30°C 至约 37°C、或约 37°C 下培养。所述细胞可以在约 1% CO₂ 至约 10% 的 CO₂、或约 5% 的 CO₂ 至约 10% 的 CO₂ 的空气存在下培养。所述细胞可以在约 pH6 至约 pH8、约 pH6.2 至约 pH7.8、约 pH6.4 至约 pH7.6、约 pH6.6 至约 pH7.4、或约 pH6.8 至约 pH7.2 的培养基培养。所述细胞可以在溶解氧约 10% 至约 80%、约 15% 至约 70%、或约 20% 至约 60% 的条件下培养。

[0099] 所述培养可以根据细胞种类不同。所述培养可以使用已知的方法进行。所述培养可以在平板、烧瓶等进行。所述培养可以通过附着于基质或悬浮在培养液中的方法进行。所述培养可以为传代培养 (subculture)、分批培养 (batch culture)、补料分批培养 (fed-batch culture)、灌注培养 (perfusion culture), 或其组合。在所述培养时, 细胞培养基可以定期更换为新鲜培养基。可以培养所述细胞约 1 天或更长、约 2 天或更长、约 3 天或更长、约 4 天或更长、约 5 天或更长、约 6 天或更长、约 1 周或更长、约 10 天或更长、约 2 周或更长、约 3 周或更长、约 1 个月或更长、约 1 天至约 1 个月、约 1 天至约 3 周、约 1 天至约 2 周、约 2 天至约 2 周、约 3 天至约 2 周、约 4 天至约 2 周、约 5 天至约 2 周、约 6 天至约 2 周、或约 1 周至约 2 周。

[0100] 可以包括从所述细胞或细胞培养液获得蛋白复合体的步骤。

[0101] 所述细胞培养液可以为不含有所述细胞的培养液。

[0102] 在将所述表达载体共转染于细胞的情况下,可以从所述细胞或细胞培养液获得包括第一多肽和第二多肽的蛋白复合体,所述第一多肽在N-末端包括对免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitor) 的抗体或其抗原结合片段、或对肿瘤相关抗原 (tumor associated antigen) 的抗体或其抗原结合片段,所述第二多肽在N-末端或C-末端包括IL2变体。当将编码在所述N-末端包括对免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitor) 的抗体或其抗原结合片段或对肿瘤相关抗原 (tumor associated antigen) 的抗体或其抗原结合片段的第一多肽的表达载体和编码在所述N-末端或C-末端包括IL2变体的第二多肽的表达载体分别转染于两种或更多种细胞时,可以从所述细胞或细胞培养液分别获得:第一多肽,其在N-末端包括对免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitor) 的抗体或其抗原结合片段或对肿瘤相关抗原 (tumor associated antigen) 的抗体或其抗原结合片段;以及在N-末端或C-末端包括IL2变体的第二多肽。

[0103] 获得所述蛋白复合体的步骤可以包括通过孵化第一多肽和第二多肽来形成蛋白复合体,其中,所述第一多肽在所获得的N-末端包括对免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitor) 的抗体或其抗原结合片段或对肿瘤相关抗原 (tumor associated antigen) 的抗体或其抗原结合片段,所述第二多肽在所获得的N-末端或C-末端包括IL2变体步骤。所述孵育可以在还原条件下执行。所述还原条件可以为2-巯基乙醇 (2-mercaptoethanol:2-ME)、二硫苏糖醇 (dithiothreitol:DTT),或其组合的存在下。

[0104] 获得所述蛋白复合体的步骤可以包括纯化所述蛋白复合体的步骤。所述纯化可以通过过滤、离心、色谱法、透析、免疫沉淀、或其组合执行。

[0105] 另一方面提供一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,所述药物组合物包括根据一方面的蛋白质或根据另一方面的蛋白复合体。另一方面提供根据一方面的蛋白质或根据另一方面的蛋白复合体在制备用于预防或治疗癌症的药剂中的用途。

[0106] 关于所述蛋白质或所述蛋白复合体的具体内容如上所述。

[0107] 所述癌症可以为固态瘤或非固态瘤。固态瘤是指例如在肝脏、肺、乳房、皮肤等脏器中发生癌瘤。非固态瘤为在血液内发生的癌症,也称为血癌。所述癌症可以为癌 (carcinoma)、肉瘤 (sarcoma)、源自造血细胞的癌、生殖细胞瘤 (germ cell tumor)、或母细胞瘤 (blastoma)。所述癌可以选自由乳癌、皮肤癌、头颈部癌、胰腺癌、肺癌、大肠癌、结肠直肠癌、胃癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、尿道癌、肝癌、肾癌、透明细胞肉瘤、黑色素瘤、脑脊髓肿瘤、脑癌、胸腺瘤、间皮瘤、食道癌、胆道癌、睾丸癌、生殖细胞瘤、甲状腺癌、副甲状腺癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、淋巴瘤、骨髓增生异常综合征 (myelodysplastic syndroms: MDS)、骨髓纤维化 (myelofibrosis)、急性白血病、慢性白血病、多发性骨髓瘤、霍奇金病 (Hodgkin's Disease)、神经内分泌肿瘤以及肉瘤组成的组中。

[0108] 所述“预防”是指通过施用所述药物组合物抑制疾病或拖延所述疾病的发生的所有行为。所述“治疗”是指通过施用所述药物组合物使疾病症状好转或变得有利的所有行为。

[0109] 所述药物组合物可以包括药学上可接收的载体。所述载体使用为包括赋形剂、稀释剂、或辅助剂的意义。所述载体例如可以选自由乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、木

糖醇、赤鲜糖、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯胶、海藻酸盐、明胶、磷酸钙、磷酸硅、纤维素、甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、生理盐水、诸如PBS的缓冲液、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石粉、硬脂酸镁、以及矿物油组成的组中。所述组合物可以包括填充剂、抗凝剂、润滑剂、湿润剂、风味剂、乳化剂、保存剂、或其组合。

[0110] 所述药物组合物可以根据常规方法制备成任意剂型。所述组合物可以配制成，例如，经口施用剂型（例如，粉末、锭剂、胶囊剂、糖浆、丸剂、或颗粒）或肠胃外剂型（例如，注射剂）。并且，所述组合物可以被配制成全身剂型或局部剂型。

[0111] 所述药物组合物可以进一步包括其它抗癌剂。所述抗癌剂可以为西妥昔单抗（cetuximab）、帕尼单抗（Panitumumab）、厄罗替尼（erlotinib）、吉非替尼（Gefitinib）、曲妥珠单抗（trastuzumab）、T-DM1、帕妥珠单抗（Perjeta）、拉帕替尼（lapatinib）、紫杉醇、紫杉、他莫昔芬、顺氯氨铂、或其组合。所述药物组合物可以为单一组合物或个别的组合物。例如，所述抗体或其抗原结合片段的组合物可以为肠胃外施用剂型的组合物，抗癌剂可以为经口施用剂型的组合物。

[0112] 所述药物组合物可以包括有效量的所述蛋白复合体。术语“有效量”是指在施用于需要预防或治疗疾病的个体时足以发挥预防或治疗的效果的量。所述有效量是可以由普通技术人员根据所选的细胞或个体适当选择的。可以根据包括疾病严重程度、患者的年龄、体重、健康、性别、对药物的患者敏感性、施用时间、施用途径以及排出比率、治疗期间、与所施用的组合物配合或同时使用的药物的要素以及其它医学领域的公知要素确定所述有效量。所述有效量在每个所述药物组合物中可以为约0.5 μ g至约2g、约1 μ g至约1g、约10 μ g至约500mg、约100 μ g至约100mg、或约1mg至约50mg。

[0113] 例如，所述药物组合物的施用量可以以成年人为准在约0.001mg/kg至约100mg/kg、约0.01mg/kg至约10mg/kg、或约0.1mg/kg至约1mg/kg的范围内。可以进行所述施用每天1次、每天多次、或每周1次、两周1次、三周1次、或四周1次至1年1次。

[0114] 另一方面提供预防或治疗癌症的方法，其包括将根据一方面的蛋白质或根据另一方面的蛋白复合体施用于细胞或个体的步骤。

[0115] 关于所述蛋白质、蛋白复合体、细胞、癌症、预防、或治疗的具体内容如上所述。

[0116] 所述个体可以为哺乳动物，例如，人、牛、马、猪、狗、羊、山羊、或猫。所述个体可以为已患有癌症或患癌症的可能性较高的个体。

[0117] 所述方法可以进一步包括向所述个体施用第二有效成分。所述第二有效成分可以为用于预防或治疗癌症的有效成分。所述有效成分可以与蛋白复合体同时、各自、或依次施用。

[0118] 所述蛋白质或蛋白复合体例如可以通过经口、静脉内、肌肉内、经口、经皮（transdermal）、粘膜、鼻腔内（intranasal）、气管内（intratracheal）、或皮下施用的任意手段直接施用于个体。所述蛋白复合体可以施用于全身或局部，且可以单独或与其它药物活性化合物一起施用。

[0119] 所述蛋白质或蛋白复合体的优选使用量根据患者状态以及体重、疾病程度、药物形式、施用途径以及期间不同，但是可以由普通技术人员适当选择。例如，所述施用量可以以成年人为准在约0.001mg/kg至约100mg/kg、约0.01mg/kg至约10mg/kg、或约0.1mg/kg至约1mg/kg的范围内。可以进行所述施用每天1次、每天多次、或每周1次、两周1次、三周1次、

或四周1次至1年1次。

[0120] 有益效果

[0121] 根据一方面的蛋白质可以通过取代IL2的特定氨基酸序列来选择性增加效应T细胞相对于调节性T细胞的活性。并且,针对包括所述蛋白质的药物组合物,与现有治疗剂相比,可以降低副作用且极大化抗癌活性,因此可以使用于预防或治疗癌症。

附图说明

[0122] 图1a示出使用蛋白-A亲和柱纯化方法对根据一实施方式的PD-L1抗体-IL2变体2蛋白复合体进行纯化的结果。

[0123] 图1b示出使用阳离子交换树脂柱纯化方法对根据一实施方式的PD-L1抗体-IL2变体2蛋白复合体进行纯化的结果。

[0124] 图1c示出通过尺寸排阻高效液相色谱(SE-HPLC)分析对根据一实施方式的PD-L1抗体-IL2变体2蛋白复合体的纯度进行分析的结果。

[0125] 图2a示出对根据一实施方式的PD-L1抗体-IL2变体2蛋白复合体以及阳性对照组(阿维鲁单抗(Avelumab)、以及Avelumab和阿地白介素(Aldesleukin)的联合施用)和阴性对照组在大肠癌移植小鼠中的抗癌效果进行比较的结果。

[0126] 图2b示出对根据一实施方式的PD-L1抗体-IL2变体2蛋白复合体在大肠癌移植小鼠中每个体的癌细胞生长抑制和完全缓解活性进行确认的结果。

[0127] 图2c示出阴性对照组和阳性对照组(Avelumab、以及Avelumab和Aldesleukin的联合施用)在大肠癌移植小鼠中各个体的癌细胞生长抑制和完全缓解效果。

[0128] 图3示出对根据一实施方式的PD-L1抗体-IL2变体4蛋白复合体在大肠癌移植小鼠中的抗癌效果的结果。

[0129] 图4示出根据一实施方式的、包括IL2变体的蛋白复合体的结构。

[0130] 图5a示出使用蛋白-A亲和柱纯化方法对根据一实施例方式的小鼠PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(a+c)进行纯化的结果。

[0131] 图5b示出使用疏水性互动柱纯化方法来对根据一实施方式的小鼠PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(a+c)进行纯化的结果。

[0132] 图5c示出对根据一实施方式的小鼠PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(a+c)的纯度进行分析的结果。

[0133] 图6a示出对根据一实施方式的小鼠PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(a+c)、阴性对照组以及阳性对照组在大肠癌移植小鼠模型中的抗癌效果进行比较的结果。

[0134] 图6b示出将根据一实施方式的小鼠PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(a+c)、阴性对照组和阳性对照组施用于大肠癌移植小鼠模型后对大肠癌移植小鼠模型的体重变化进行比较的结果。

具体实施方式

[0135] 以下,提出优选实施例以帮助对本发明的理解。然而,以下实施例仅是为了使本发明更加易懂清楚提供的,本发明的内容并不限于以下实施例。

[0136] [实施例]

[0137] 实施例1、IL2变体蛋白的制备和活性确认

[0138] 1-1、IL2变体蛋白的克隆和培养

[0139] 通过取代野生型IL2氨基酸 (SEQ ID NO:16) 中一部分位置的氨基酸来制备了IL2变体。具体地,使用ThermoFisher Scientific社的Invitrogen GeneArt Gene Synthesis服务对编码附着6X His标签 (tagging) 的IL2变体的多核苷酸进行合成后,并将所合成的多核苷酸插入pCDNA3.1表达载体的APAI NheI酶位点制备了表达IL2变体的表达载体。在所述IL2变体中,各氨基酸取代部位和所取代的氨基酸如以下表1所示。然后,使用ExpiFectamine™ CHO感染试剂盒 (ThermoFisher) 将所述表达载体转染于ExpiCHO-S™细胞株。将经转染的细胞在32°C、5% CO₂孵化器中以120rpm培养了12天。12天后,分离并回收了培养液上清,并通过灭菌过滤器进行过滤来获得了IL2变体蛋白。

[0140] [表1]

[0141]

	35	38	42	125	18	19	126
wt-IL2	K	R	F	C	L	L	Q
IL2对照组	E			S			
IL2变体1	E	A	K	S			
IL2变体2	E	A	K	S	M	S	
IL2变体3	E	A	K	S	A	S	
IL2变体4	E	A	K	S	R	S	
IL2变体5	E	A	K	S	M	L	
IL2变体6	E	A	K	S	L	S	
IL2变体7	E	A	K	S	S	W	
IL2变体8	E	A	K	S	F	N	
IL2变体9	E	A	K	S	V	I	
IL2变体10	E	A	K	S	I	T	
IL2变体11	E	A	K	S	Q	A	
IL2变体12	E	A	K	S	M	M	
IL2变体13	E	A	K	S	M	F	
IL2变体14	E	A	K	S			T
IL2变体15	E	A	K	S			I

[0142] 1-2. IL2变体蛋白的纯化

[0143] 使用通过所述实施例1-1获得的培养液确保的IL2变体蛋白上附着的His标签来进行纯化之后,确保了纯度95%或更高的高纯度物质。

[0144] 首先,将在所述实施例1-1中获得的培养液进行离心并分离成培养细胞和培养基。然后,通过0.22μm过滤器 (Thermo Scientific社) 过滤过程从经分离的培养基中的IL2蛋白除去了微细残留物。使用咪唑亲和层析 (Ni-SepFast, Biotoolomics社) 对经过滤过程的培养基进行一次纯化后,经过脱盐过程和浓缩过程除去了存在于纯化物中的咪唑缓冲剂成分。然后,对最终纯化物的含量和纯度进行了分析。具体地,将经过滤的培养基投入使用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline) (pH7.4) 稳定化的Ni-SepFast柱后,使用相同的缓冲液洗涤没有结合的非特异性蛋白质,并使用咪唑缓冲溶液 (0M和0.5M, pH7.4) 通过咪唑浓

度上升梯度方式溶出了特异性结合至Ni-SepFast柱的蛋白。通过使用磷酸盐缓冲液(pH7.4)进行脱盐过程稳定化所确保的IL2变体蛋白后,使用尺寸排阻高效液相色谱(HPLC)(TSK-3000SWxL,7.8mm×30cm,Tosoh社)来对所纯化的IL2变体蛋白的纯度进行了分析。并且,通过SDS-PAGE分析确认了分子量。

[0145] 1-3、确认IL2变体蛋白对人免疫细胞的激活

[0146] 确认了在所述实施例1-2中纯化的IL2变体-蛋白复合体对人免疫细胞的激活。具体地,人外周血单核细胞(Stem cell社)和对效应CD8+T细胞(CD3+、CD8+)以及Treg细胞(CD4+、CD25+)特异性附着荧光标记的抗体在4°C遮光来进行反应30分钟,然后通过离心除去了没有附着于细胞的抗体。然后,通过处理在所述实施例1-2中纯化的IL2变体2、4、14蛋白来在37°C下遮光20分钟进行反应,并使用1mL的固定缓冲液(BD,美国)固定12分钟。此时,使用了阿地白介素(Aldesleukin)(Proleukin注,Novartis,瑞士)作为阳性对照组,以0.01至8,000nM浓度使用各药物进行了处理。然后,使用1.5mL的Perm3缓冲液(BD,美国)处理固定(Fixation)结束的人外周血单核细胞的细胞质中并在4°C下进行反应35分钟以使荧光标记能够浸透细胞质内部,并对所磷酸化的STAT-5和Treg细胞标志物的Foxp3+蛋白附着荧光标记进行反应30分钟。然后,通过流式细胞术对在效应CD8+T和Treg细胞中IL2变体蛋白处理组的STAT-5磷酸化程度进行了比较。

[0147] [表2]

	STAT5 磷酸化 (phosphorylation) (EC50, nM)	
	Treg 细胞	CD8+T 细胞
[0148] 阿地白介素	0.048	0.78
IL2 变体 2 蛋白	0.91	0.55
IL2 变体 4 蛋白	2.16	1.22
IL2 变体 14 蛋白	0.30	1.7

[0149] 结果,如图2所示,阳性对照组(阿地白介素)中,CD8+T细胞/调节性T细胞的EC₅₀值的比率呈现为16.3,由此可知诱导Treg细胞的活性更强者于CD8+T细胞的活性。

[0150] 相反地,IL2变体2、4、14蛋白中CD8+T细胞/调节性T细胞的EC₅₀值的比率各呈现为0.6、0.56以及5.6,由此可以确认与阳性对照组相比选择性地激活CD8+T细胞的活性。

[0151] 实施例2、IL2变体-Fc蛋白复合体的制备和特性确认

[0152] 2-1、IL2变体-Fc蛋白复合体的克隆和培养

[0153] 制备了包括IL2变体的Fc蛋白复合体。具体地,使用ThermoFisher Scientific社的Invitrogen GeneArt Gene Synthesis服务合成编码Fc区域的多核苷酸,然后将所合成的多核苷酸插入pCH01.0表达载体的Avr II -BstZ17I酶位点来制备了表达Fc区域的第一表达载体。使用同样的服务对编码在所述实施例1中制备的IL2变体1、2、4、以及14和连接子以及Fc区域的复合体的多核苷酸进行合成后,将所合成的多核苷酸插入pCH01.0表达载体的Avr II -BstZ17I酶位点来制备了表达IL2变体-Fc的第二表达载体。然后,使用ExpiFectamine™ CHO转染试剂盒(ThermoFisher)以1:1混合所述第一表达载体和第二表达载体,并转染于ExpiCHO-S™细胞株。将经转染的细胞在32°C、8% CO₂孵化器中以125rpm培养了12天。12天后,分离并回收了培养液上清,并通过灭菌过滤器进行过滤来获得了包括Fc

和IL2变体-Fc的蛋白复合体。

[0154] 2-2、IL2变体-Fc蛋白复合体的纯化

[0155] 纯化通过培养所述实施例2-1中制备的细胞株来确保的IL2变体-Fc蛋白复合体来确保了高纯度物质。

[0156] 首先,将在所述实施例2-1中获得的培养液进行离心并分成培养细胞和培养基。然后,使用0.22 μ m过滤器(Thermo Scientific社)来从所分离的培养基内的IL2变体-Fc蛋白复合体除去了微细残留物。使用蛋白A亲和柱(MabSelect Prisma,Cytiva社)对经过过滤过程的培养基进行了一次纯化。具体地,将经过滤的培养基投入使用磷酸缓冲溶液(pH7.4)稳定化的蛋白-A柱后,使用同样的缓冲液来洗涤没有结合的非特异性蛋白质,使用包括0.02M的柠檬酸的pH5.0和pH3.5的两种溶液所形成的pH梯度来溶出了与蛋白-A柱特异性结合的蛋白质,并使用1M的Tris将试料中化为pH7.2。然后,使用磷酸盐缓冲液(pH7.4)稳定化所确保的IL2变体-Fc蛋白复合体,并使用尺寸排阻高效液相色谱(HPLC)(TSK-3000SWxL,7.8mm \times 30cm,Tosoh社)来对所纯化的IL2变体-Fc蛋白复合体的纯度进行了分析。

[0157] 2-3、确认IL2变体-Fc蛋白复合体对人免疫细胞的激活

[0158] 确认了在所述实施例2-2中纯化的IL2变体-Fc蛋白复合体对人免疫细胞的激活。具体地,人外周血单核细胞(Stem cell社)和对效应CD8+T细胞(CD3+、CD8+)以及Treg细胞(CD4+、CD25+)特异性附着荧光标记的抗体在4 $^{\circ}$ C下遮光来进行反应30分钟,然后通过离心除去了没有附着于细胞的抗体。然后,对在所述实施例2-2中纯化的IL2变体1-Fc蛋白复合体、IL2变体2-Fc蛋白复合体、IL2变体4-Fc蛋白复合体、以及IL2变体14-Fc蛋白复合体进行处理并在37 $^{\circ}$ C下遮光20分钟来进行反应,并使用1mL的固定缓冲液(BD,美国)固定12分钟。此时,使用了阿地白介素(Aldesleukin)(Proleukin注,Novartis,瑞士)作为阳性对照组,并以0.01至8,000nM浓度使用各药物进行了处理。然后,使用1.5mL的Perm3缓冲液(BD,美国)处理固定(Fixation)结束的人外周血单核细胞的细胞质中并在4 $^{\circ}$ C下进行反应35分钟以使荧光标记能够浸透细胞质内部,并对所磷酸化的STAT-5和Treg细胞标志物的Foxp3+蛋白附着荧光标记进行反应30分钟。然后,通过流式细胞术对效应CD8+T细胞和Treg细胞中IL2变体-Fc蛋白复合体处理组的STAT-5磷酸化程度进行了比较。

[0159] [表3]

	STAT5 磷酸化 (phosphorylation) (EC50, nM)	
	Treg 细胞	CD8+T 细胞
[0160] 阿地白介素	0.03	1
IL2 变体 1-Fc 蛋白复合体	2.91	2.31
IL2 变体 2-Fc 蛋白复合体	13.3	19.6
IL2 变体 4-Fc 蛋白复合体	24.3	35
IL2 变体 14-Fc 蛋白复合体	64.84	209.1

[0161] 结果,如图3所示,阳性对照组(阿地白介素)中,CD8+T细胞/调节性T细胞的EC₅₀值的比率为33.3,由此可以确认Treg细胞的活性诱导为高于CD8+T细胞的活性。

[0162] 相反地,IL2变体1-Fc蛋白复合体、IL2变体2-Fc蛋白复合体、IL2变体4-Fc蛋白复合体以及IL2变体14-Fc蛋白复合体中CD8+T细胞/调节性T细胞的EC₅₀值的比率呈现为0.79至3.2,由此可以确认,与阳性对照组相比更加选择性地激活CD8+T细胞的活性。

[0163] 即,可知根据一方面的IL2变体即使在附加有Fc的结构中也与调节性T细胞相比更加选择性地激活CD8⁺细胞。

[0164] 实施例3、PD-L1抗体-IL2变体蛋白复合体的制备和特性确认

[0165] 3-1、PD-L1抗体-IL2变体蛋白复合体的克隆和培养

[0166] 制备了包括PD-L1抗体和IL2变体的蛋白复合体。具体地,使用与所述实施例2-1中使用的相同的服务来分别合成了编码PD-L1抗体重链可变区-重链恒定区的多核苷酸和编码PD-L1抗体轻链恒定区-轻链可变区的多核苷酸。然后,将编码所述PD-L1抗体重链可变区-重链恒定区的多核苷酸和编码所述PD-L1抗体轻链恒定区-轻链可变区的多核苷酸分别插入pCH01.0表达载体的Avr II -BstZ17I酶位点和EcoRV-PacI酶位点来制备了表达PD-L1抗体的第一表达载体。使用同样的服务对包括在所述实施例1中制备的IL2变体1至15中的一个和连接子以及Fc区域的复合体的多核苷酸进行合成,然后将其插入pCH01.0表达载体的Avr II -BstZ17I酶位点来制备了表达IL2变体-Fc的第二表达载体。然后,除了使用了所述第一表达载体和第二表达载体之外,通过与所述实施例2-1使用的方法相同的方法获得了包括抗PD-L1 Fab-Fc和IL2变体-Fc的PD-L1抗体-IL2变体蛋白复合体。

[0167] 3-2、PD-L1抗体-IL2变体蛋白复合体的纯化

[0168] 纯化通过培养所述实施例3-1中制备的细胞株确保的PD-L1抗体-IL2变体1蛋白复合体至PD-L1抗体-IL2变体15蛋白复合体来确保了高纯度物质。

[0169] 首先,将在所述实施例3-1中获得的培养液离心来分成培养细胞和培养基。然后,使用0.22 μ m过滤器(Thermo Scientific社)来从所分离的培养基内的PD-L1抗体-IL2变体蛋白复合体来除去了微细的残留物。使用蛋白A亲和柱(MabSelect Prisma,Cytiva社)对经过过滤过程的培养基进行了一次纯化。具体地,将经过滤的培养基投入使用磷酸盐缓冲液(pH7.4)稳定化的蛋白-A柱后,使用同样的缓冲液洗涤没有结合的非特异性蛋白质,使用包括0.05M柠檬酸(pH3.9)的缓冲溶液溶出了特异性结合至蛋白-A柱的蛋白质,并使用1M的Tris将试料中化为pH 7.2。然后,为了除去通过亲和性柱分离的试料中残留的物质来源杂质,使用阳离子交换色谱(Source30S,Cytiva社)来进行了二次纯化。具体地,向在蛋白-A柱中溶出和中化的试料添加1M的柠檬酸来滴定至pH 6.0后,将其产物投入使用20mM磷酸钠(pH 6.0)缓冲液稳定化的Source30S柱,使用同样的缓冲液洗涤没有结合的非特异性蛋白质,并使用包括0.3M氯化钠(pH 6.0)的缓冲溶液以上升梯度方式进行溶出来确保了复数的PD-L1抗体-IL2变体蛋白复合体。然后,使用磷酸盐缓冲液(pH 7.4)稳定化所确保的复数的PD-L1抗体-IL2变体蛋白复合体,使用尺寸排阻高效液相色谱(HPLC)(TSK-3000SWxL,7.8mm \times 30cm,Tosoh社)来对所纯化的PD-L1抗体-IL2变体蛋白复合体的纯度进行了分析。

[0170] 图1a示出使用蛋白-A亲和柱纯化方法对根据一实施方式的PD-L1抗体-IL2变体2蛋白复合体进行纯化的结果。

[0171] 图1b示出使用阳离子交换树脂柱纯化方法对根据一实施方式的PD-L1抗体-IL2变体2蛋白复合体进行纯化的结果。

[0172] 图1c示出通过SE-HPLC分析对根据一实施方式的PD-L1抗体-IL2变体2蛋白复合体的纯度进行分析的结果。

[0173] 结果,如图1a所示,可以确认通过在蛋白-A亲和柱纯化使用的溶出缓冲液与所述柱特异性结合的蛋白。具体地,可以确认在溶出液为1500至1550ml时与所述柱特异性结合

的PD-L1抗体-IL2变体蛋白复合体。

[0174] 并且,如图1b所示,可以确认除去了与蛋白-A亲和柱中使用的溶出液中残留的杂质和非特异性结合的蛋白。

[0175] 并且,如图1c所示,可以确认通过蛋白-A亲和柱纯化和阳离子交换树脂纯化确保的PD-L1抗体-IL2变体2蛋白复合体在停滞时间16.717分处呈现99%的纯度。

[0176] 即,可知根据一方面的PD-L1抗体-IL2变体蛋白纯化为高纯度。

[0177] 3-3、确认PD-L1抗体-IL2变体蛋白复合体的受体结合力

[0178] 通过表面等离子体共振 (SPR, Surface Plasmon Resonance) 分析确认了根据一方面的PD-L1抗体-IL2变体蛋白复合体的受体结合力。具体地,将人PD-L1和人IL2R α 、IL2R β γ ,以及IL2R $\alpha\beta\gamma$ 通过共价键固定于CM5传感器芯片(sensor chip),并以分别不同的浓度(0.391至400nM浓度范围内以2倍连续稀释)展开在所述实施例3-2中制备的PD-L1抗体-IL2变体2蛋白复合体和PD-L1抗体-IL2变体4蛋白复合体来确认了对人PD-L1和IL2受体(IL2 receptor, IL2R)各自的结合动力学(binding kinetics)。之后,使用所测定的结合常数(association constant, K_a)和解离常数(dissociation constant, K_d)来计算了结合亲和力(binding affinity, K_D)。此时,使用BIAlogue kinetics evaluation software执行了SPR sensogram分析。使用了avelumab和aldesleukin作为阳性对照组,将其结果表示在以下表4和表5中。

[0179] [表4]

配体	实验组	结合亲和力 (KD, nM)
hPD-L1	阿维鲁单抗	0.12
	PD-L1 抗体-IL2 变体 2 蛋白复合体	0.48

[0181] [表5]

实验组	结合亲和力 (nM, SPR 分析)			
	人 IL2R α	人 IL2R $\beta\gamma$	人 IL2R $\alpha\beta\gamma$	$\beta\gamma/\alpha\beta\gamma$
阿地白介素	15.8	0.25	0.05	5
PD-L1 抗体-IL2 变体 2 蛋白复合体	没有结合	37.9	17.3	2.19
PD-L1 抗体-IL2 变体 4 蛋白复合体	没有结合	23.8	30.6	0.78

[0183] 图2a示出确认根据一实施方式的PD-L1抗体-IL2变体2蛋白复合体对人PD-L1抗原的结合力的结果。

[0184] 图2b示出确认Avelumab对人PD-L1抗原的结合力的结果。

[0185] 结果,如图2a和表4所示,可以确认在实施例3-2中制备的PD-L1抗体-IL2变体2蛋白复合体和阳性对照组结合至人PD-L1抗原。具体地,所述蛋白变体呈现0.48nM的结合力,阳性对照组呈现0.12nM的结合力,可以确认呈现出低约4.1倍的结合力。

[0186] 即,认为因为阳性对照组作为单抗具有二价(bivalent)形式的抗-PD-L1臂(arm)所述PD-L1抗体-IL2变体2蛋白复合体却具有单价(monovalent)形式的抗-PD-L1臂(arm)而

呈现出结合力上的差异。

[0187] 并且,如表5所示,在实施例2中制备的PD-L1抗体-IL2变体2蛋白复合体分别以37.9nM和17.3nM的结合亲和力结合至IL2R β γ 和IL2R $\alpha\beta$ γ ,但不与IL2R α 反应的样态。而且,PD-L1抗体-IL2变体2蛋白复合体分别以23.8nM和30.6nM的结合亲和力结合至IL2R β γ 和IL2R $\alpha\beta$ γ ,但不与IL2R α 反应的样态。

[0188] 即,可以确认根据一方面的PD-L1抗体-IL2变体2蛋白复合体和PD-L1抗体-IL2变体4蛋白复合体不与IL2受体 α 结合。

[0189] 相反地,如表5中所示,可以确认阳性对照组分别以35.7nM、1.55nM以及0.10nM的结合亲和力结合至IL2R α 、IL2R β γ 以及IL2R $\alpha\beta$ γ 。

[0190] 可以确认,与阳性对照组相比,所述PD-L1抗体-IL2变体2蛋白复合体和PD-L1抗体-IL2变体4蛋白复合体对IL2R β γ 的结合力分别减少了约24.5倍和15.4倍。并且,根据通过对IL2R $\alpha\beta$ γ 的结合力结果计算 β γ / $\alpha\beta$ γ 比率的结果,所述PD-L1抗体-IL2变体2蛋白复合体和PD-L1抗体-IL2变体4蛋白复合体的 β γ / $\alpha\beta$ γ 的比率分别呈现为2.19和0.78,阳性对照组中呈现为15.5,由此可以确认,PD-L1抗体-IL1变体蛋白复合体的IL2R β γ / $\alpha\beta$ γ 的比率与阳性对照组显著降低了。即可知,所述PD-L1抗体-IL2变体2蛋白复合体和PD-L1抗体-IL2变体4蛋白复合体不但不与IL2R α 结合,与IL2R β γ 的结合也弱化了。

[0191] 因此,根据一方面的PD-L1抗体-IL2变体蛋白复合体为用于在CD8+T细胞中诱导比调节性T细胞更高的激活,其特征在于为了选择性地诱导表达IL2R β γ 的CD8+细胞的激活而除去对IL2R α 的结合力并通过取代所述特定氨基酸来调节了对IL2R β γ 的结合力。

[0192] 3-4、确认PD-L1抗体-IL2变体蛋白复合体对人免疫细胞的活性

[0193] 确认了根据一方面的PD-L1抗体-IL2变体1蛋白复合体至PD-L1抗体-IL2变体15蛋白复合体对人免疫细胞激活的影响。具体地,将人外周血单核细胞(Stem cell社)与特异性附着荧光标记的效应CD8+T细胞(CD3+、CD8+)和调节性T细胞(CD4+、CD25+、FoxP3+)抗体各自在4°C下遮光30分钟来进行反应。然后,通过离心除去没有附着于细胞的抗体,并使用在所述实施例3-2中制备的PD-L1抗体-IL2变体1蛋白复合体至PD-L1抗体-IL2变体15蛋白复合体根据浓度(0.001至8000nM)处理人外周血单核细胞,在37°C下遮光20分钟来进行反应,使用1mL的固定缓冲液(BD,美国)固定12分钟。为了将荧光标记附着于细胞质内磷酸化STAT-5,使用1.5mL的Perm缓冲剂(BD,美国)进行处理并在4°C下进行反应40分钟以使荧光标记能够侵入。然后,将荧光标记附着于磷酸化STAT-5蛋白来进行反应30分钟后通过FACS分析在效应CD8+T和调节性T细胞各自中确认了STAT-5被磷酸化的细胞比率。使用了阿地白介素(Proleukin,Norvatis,瑞士)作为阳性对照组,将其结果表示在以下表6中。

[0194] [表6]

	STAT5 磷酸化 (phosphorylation) (EC50, nM)	
	Treg 细胞	CD8+T 细胞
[0195] 阿地白介素	0.007	0.44
PD-L1 抗体-IL2 对照组蛋白复合体	0.01	0.22
PD-L1 抗体-IL2 变体 1 蛋白复合体	0.12	0.3

[0196]	PD-L1 抗体-IL2 变体 2 蛋白复合体	0.59	0.33
	PD-L1 抗体-IL2 变体 3 蛋白复合体	N.S	682.7
	PD-L1 抗体-IL2 变体 4 蛋白复合体	0.9	0.4
	PD-L1 抗体-IL2 变体 5 蛋白复合体	1.45	0.68
	PD-L1 抗体-IL2 变体 6 蛋白复合体	0.28	0.28
	PD-L1 抗体-IL2 变体 7 蛋白复合体	N.S	404.2
	PD-L1 抗体-IL2 变体 8 蛋白复合体	18.11	52.15
	PD-L1 抗体-IL2 变体 9 蛋白复合体	0.38	0.29
	PD-L1 抗体-IL2 变体 10 蛋白复合体	1.78	1.01
	PD-L1 抗体-IL2 变体 11 蛋白复合体	10.6	1.71
	PD-L1 抗体-IL2 变体 12 蛋白复合体	0.27	0.37
	PD-L1 抗体-IL2 变体 13 蛋白复合体	0.45	0.49
	PD-L1 抗体-IL2 变体 14 蛋白复合体	0.75	0.53
	PD-L1 抗体-IL2 变体 15 蛋白复合体	11.57	3.25

[0197] *N.S:没有在高浓度中饱和(Not Saturated at high concentration)

[0198] 结果,如表6所示,阳性对照组和PD-L1抗体-IL2比较组的CD8+T细胞/调节性T细胞的EC₅₀值的比率分别呈现为62.9和22,在所述实施例3-2中制备的PD-L1抗体-IL2变体1蛋白复合体至PD-L1抗体-IL2变体15蛋白复合体的CD8+T细胞/调节性T细胞的EC₅₀值的比率呈现为0.16至2.88。即可以确认,在阳性对照组和PD-L1抗体-IL2比较组中调节性T细胞高度激活,在所述实施例3-2中制备的PD-L1抗体-IL2变体1蛋白复合体至PD-L1抗体-IL2变体15蛋白复合体与调节性T细胞相比更加选择性地激活CD8+T细胞即效应T细胞。

[0199] 因此,根据一方面的PD-L1抗体-IL2变体蛋白复合体可以通过诱导效应T细胞活性更强于调节性T细胞来参与抗癌效果相关的免疫反应。

[0200] 3-5、确认PD-L1抗体-IL2变体蛋白复合体的抗癌活性(1)

[0201] 确认了根据一方面的PD-L1抗体-IL2变体蛋白复合体的抗癌活性。具体地,将MC38细胞(1×10^6 细胞)以0.2mL/只的容量皮下施用于C57BL/6小鼠(雌性、6周龄、Jabio)来制备了大肠癌移植小鼠模型(syngeneic mouse model)。在接种后第5天,以8mg/kg和16mg/kg的容量各自以Q2D×两次腹腔施用了在所述实施例3-2制备的PD-L1抗体-IL2变体2蛋白复合体。施用所述复合体后,通过测定小鼠的肿瘤体积(3次/周)对抗癌活性进行了比较。作为阳性对照组,将Avelumab(Merck,德国)以10mg/kg的剂量腹腔施用(Q2D×两次),并联合施用了Avelumab和Aldesleukin(Aldesleukin 0.46 mg/kg, QD×5次,腹腔注射(i.p.))+Avelumab 10mg/kg/,第5天、第7天,腹腔注射(i.p.))。

[0202] 图2a示出对根据一实施方式的PD-L1抗体-IL2变体2蛋白复合体和阳性对照组的抗癌活性进行比较的结果。

[0203] 图2b示出对根据一实施方式的PD-L1抗体-IL2变体2蛋白复合体对大肠癌抑制小鼠的根据个体的癌细胞生长抑制效果和完全缓解活性的结果。

[0204] 图2c示出对阴性对照组和阳性对照组(Avelumab和Avelumab与Aldesleukin的联合施用)对大肠癌抑制小鼠的癌细胞生长抑制效果和完全缓解活性的结果。

[0205] 结果,可以确认如图2a所示,阴性对照组(vehicle)和阳性对照组中的肿瘤体积从施用后随着时间增加,相反地,在所述实施例3-2制备的PD-L1抗体-IL2变体2蛋白复合体表

现出强力的癌细胞生长抑制效果。具体地,可以确认所述PD-L1抗体-IL2变体2蛋白复合体容量16mg/kg时肿瘤大部分消失了。并且,与所述PD-L1抗体-IL2对照组蛋白复合体不同,对于PD-L1抗体-IL2变体2蛋白复合体而言,与施用容量无关没有出现体重减少和死亡的个体。

[0206] 并且可以确认,如图2b和图2c所示,在阴性对照组和阳性对照组中的肿瘤体积在施用后随着时间增加,呈现出完全缓解(complete response,CR)的小鼠为同一施用组的10只试验动物中0至2只,即较少。相反地,对于所述PD-L1抗体-IL2变体2蛋白复合体而言,可以确认呈现出完全缓解的小鼠的数为同一施用组的10只实验动物中6至9只,即容量依赖性地增加,且与阴性对照组和阳性对照组相比表现出显著的抗癌活性。

[0207] 即,可知根据一方面的PD-L1抗体-IL2变体蛋白复合体与现有的抗体治疗剂Avelumab和/或Avelumab和Aldesleukin的联合施用表现出更优异的抗癌活性。

[0208] 3-6、确认PD-L1抗体-IL2变体蛋白复合体的抗癌活性确认(2)

[0209] 确认了根据一方面的PD-L1抗体-IL2变体蛋白复合体的抗癌活性。除了施用PD-L1抗体-IL2变体4蛋白复合体且将Avelumab(Merck,德国)以10mg/kg的容量腹腔施用(Q2D×2次)作为阳性对照组之外,通过与所述实施例3-5相同的方法确认了抗癌活性。

[0210] 图3示出确认根据一实施方式的PD-L1抗体-IL2变体4蛋白复合体的抗癌活性的结果。

[0211] 结果,可以确认如图3所示,阴性对照组(vehicle)中的肿瘤体积从施用后随着时间增加,相反地,在所述实施例3-2制备的PD-L1抗体-IL2变体4蛋白复合体表现出与阴性对照组相比更强力的癌细胞生长抑制效果。具体地,可以确认所述PD-L1抗体-IL2变体4蛋白复合体在施用8mg/kg、16mg/kg容量时肿瘤体积变化显著少于在阳性对照组中施用10mg/kg容量时。并且,在阳性对照中呈现出完全缓解的小鼠的数为同一施用组的10只实验动物中只有1只,相反地,在所述PD-L1抗体-IL2变体4蛋白复合体中,呈现出完全缓解的小鼠增加到同一施用组的10只实验动物中4至5只,由此可以确认与阳性对照组相比表现出显著的抗癌活性。

[0212] 即,根据一方面的PD-L1抗体-IL2变体蛋白复合体与现有的免疫抗癌抗体治疗剂相比选择性地增加效应T细胞相对于调节性T细胞的活性,因此可以有用于预防或治疗包括癌症的各种免疫疾病。

[0213] 因此,根据一方面的PD-L1抗体-IL2变体蛋白复合体不但具有优异的抗癌活性,且减少优于IL2引起的副作用,由此可以提供与现有的免疫抗癌治疗剂更安全的治疗剂。

[0214] 实施例4、小鼠PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(a+b)的制备和活性确认

[0215] 4-1、小鼠PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(a+b)的克隆和培养

[0216] 除了使用了PD-1抗体和在所述实施例1中制备的IL2变体1和4之外,通过与所述实施例3-1相同的方法获得了包括抗小鼠PD-1Fab-Fc(以下称“a”)和IL2变体-Fc(以下称“b”)的蛋白复合体(a+b)(参照图4a)。

[0217] 4-2、小鼠PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(a+b)的纯化

[0218] 通过与所述实施例3-2相同的方法对通过培养在所述实施例4-1中制备的细胞株来确保的小鼠PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(a+b)进行纯化来确保了高纯度物质。

[0219] 4-3、确认小鼠PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(a+b)对人免疫细胞的活性

[0220] 为了确认在所述实施例4-2中确保的小鼠PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(a+b)对人免疫细胞激活的影响,通过与所述实施例3-4相同的方法执行了实验。

[0221] [表7]

[0222]		STAT5 磷酸化 (EC50, nM)	
		Treg 细胞	CD8+ T 细胞
	阿地白介素	0.029	0.42
	小鼠 PD-1 抗体 IL2 变体 4 蛋白复合体	3.10	2.86

[0223] 结果,如表7所示,可以确认阳性对照组和小鼠PD-1抗体-IL2变体4蛋白复合体(a+b)的CD8+T细胞/调节性T细胞的比率各自呈现为14.5和0.92。即可确认,在阳性对照组中高度激活调节性T细胞,相反地,在所述实施例4-2中制备的小鼠PD-1抗体-IL2变体4蛋白复合体(a+b)比调节性T细胞选择性激活CD8+T细胞即效应T细胞。

[0224] 由此可知,根据一方面的IL2变体在除了PD-L1之外的其它免疫检查点抑制剂形成复合体的情况下也能够很好地保持本来的特性且促进效应T细胞的活性来参与免疫反应。

[0225] 实施例5、小鼠PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(a+c)的制备和活性确认

[0226] 5-1、小鼠PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(a+c)的克隆和培养

[0227] 制备了包括小鼠PD-1抗体和IL2变体1、2、3、4、7、8、14以及15的蛋白复合体。具体地,使用ThermoFisher Scientific社的Invitrogen GeneArt Gene Synthesis服务来分别合成了编码小鼠PD-1抗体重链可变区-恒定区的多核苷酸和编码小鼠PD-1抗体轻链恒定区-轻链可变区的多核苷酸。然后,将所述各多核苷酸插入pCH01.0表达载体的Avr II - Bstz17I酶位点和EcoRV-PacI酶位点来制备了表达小鼠PD-1抗体的第一表达载体。使用同样的服务合成在编码小鼠PD-1抗体重链可变区-恒定区的多核苷酸的C末端包括所述实施例1的IL2变体1、2、3、4、7、8、14以及15中的任一个和连接子的复合体的多核苷酸后插入pCH01.0表达载体的Avr II - BstZ17I酶位点,并将所述小鼠PD-1抗体轻链恒定区-轻链可变区插入EcoRV-PacI酶位点来制备了第二表达载体。然后,通过与所述实施例2-1相同的方法获得了包括抗小鼠PD-1Fab-Fc(a)和抗小鼠PD-1Fab-Fc-C末端IL2变体(以下称“c”)的蛋白复合体(a+c)(参照图4b)。

[0228] 5-2、小鼠PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(a+c)的纯化

[0229] 通过纯化通过在所述实施例5-1中制备的细胞株培养确保的小鼠PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(a+c)来确保了高纯度物质(纯度98%或更高)。

[0230] 首先,除了使用小鼠PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(a+c)之外与所述实施例3-2相同的方法除去微细残留物后,进行了一次纯化。然后,经过滤过程的培养基投入使用磷酸盐缓冲液(pH 7.4)稳定化的蛋白A柱后,使用同样的缓冲液来洗涤没有结合的非特异性蛋白质,并使用包括0.05M柠檬酸(pH 5.0)的缓冲溶液再次洗涤了。然后,使用0.02M柠檬酸(pH 5.0和pH 3.5)来以pH下降梯度方式溶出了特异性结合至蛋白-A柱的蛋白质,并使用1M的Tris将试料中化为pH 7.2。

[0231] 然后,为了除去通过亲和性柱分离的试料中残留的物质来源杂质,使用疏水性互动柱(Phenyl HP,Cytiva社)来进行了二次纯化。具体地,将1M的柠檬酸添加至在蛋白-A柱

中溶出并中华的试料中并滴定至pH 7.0来投入于用0.02M磷酸钠(pH 7.0)缓冲液和0.8M硫酸氨酸(pH 7.0)稳定化的Phenyl HP柱中,并使用同一的缓冲液洗涤了没有结合的非特异性蛋白。然后,使用包括0.02M的磷酸钠(pH 7.0)的缓冲溶液来以盐浓度下降梯度方式进行溶出并确保了小鼠PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(a+c)。使用磷酸盐缓冲液(pH 7.4)稳定化所确保的小鼠PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(a+c),并使用尺寸排阻HPLC(TSK-3000SWxL, 7.8mm×30cm,Tosoh社)来进行纯度分析。

[0232] 图5a示出使用蛋白-A亲和柱纯化方法对根据一实施例方式的小鼠PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(a+c)进行纯化的结果。

[0233] 图5b示出使用疏水性互动柱纯化方法来对根据一实施方式的小鼠PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(a+c)进行纯化的结果。

[0234] 图5c示出对根据一实施方式的小鼠PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(a+c)的纯度进行分析的结果。

[0235] 结果,如图5a所示,可以确认通过在蛋白-A亲和柱纯化中使用的溶出缓冲液与所述柱特异性结合的蛋白。具体地,可以确认在溶出液2800至2900ml处与所述柱特异性结合的小鼠PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(a+c)。

[0236] 并且,如图5b所示,可以确认除去了与蛋白-A亲和柱中使用的溶出液中残留的杂质和非特异性结合的蛋白质。

[0237] 并且,如图5c所示,可以确认通过上述的所有纯化过程确保的小鼠PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(a+c)在停止时间15.639分处呈现98.6%的纯度。

[0238] 即,可知根据一方面的小鼠PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(a+c)纯化为高纯度。

[0239] 5-3、确认小鼠PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(a+c)的受体结合力

[0240] 除了在1.56至8000nM的浓度范围内将在所述实施例5-2中制备的小鼠PD-1抗体-IL2变体1蛋白复合体(a+c)和小鼠PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(a+c)各自连续稀释两倍来展开之外,通过与所述实施例3-3相同的方法确认了小鼠PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(a+c)的受体结合力。

[0241] [表8]

实验组	结合亲和力 (nM, SPR 分析)		
	人 IL2R β	人 IL2R $\beta\gamma$	人 IL2R $\alpha\beta\gamma$
muPD-1 抗体-IL2 变体 1 蛋白复合体	5,610	4.51	1.01
[0242] muPD-1 抗体-IL2 变体 14 蛋白复合体	6,290	35.3	25.7
muPD-1 抗体-IL2 变体 14/muPD-1 抗体-IL2 变体 1 (结合力相对比率)	1.1	7.8	25.4

[0243] 结果,如图8所示,小鼠PD-1抗体-IL2变体1蛋白复合体(a+c)和小鼠PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(a+c)对IL2R β 分别呈现5,610nM和6,290nM的结合亲和力,因此可以确认以类似的水平结合。相反地,对IL2R $\beta\gamma$ 分别呈现4.51nM和35.3nM的结合亲和力,由此可以确认,与小鼠PD-1抗体-IL2变体1蛋白复合体(a+c)相比,在小鼠PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(a+c)中的结合力减少了约7.8倍左右。

[0244] 这表示,在小鼠PD-1抗体-IL2变体1蛋白复合体(a+c)和小鼠PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(a+c)对IL2R β 的结合力相似的状态下,小鼠PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(a+c)对IL2R γ 的结合力与小鼠PD-1抗体-IL2变体1蛋白复合体(a+c)减少了约7.8倍。

[0245] 5-4、确认小鼠PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(a+c)对人免疫细胞的活性

[0246] 除了使用了在所述实施例5-2中制备的小鼠PD-1抗体-IL2变体1蛋白复合体、小鼠PD-1抗体-IL2变体2蛋白复合体、小鼠PD-1抗体-IL2变体3蛋白复合体、小鼠PD-1抗体-IL2变体4蛋白复合体、小鼠PD-1抗体-IL2变体7蛋白复合体、小鼠PD-1抗体-IL2变体8蛋白复合体、小鼠PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体以及小鼠PD-1抗体-IL2变体15蛋白复合体和小鼠PD-1抗体-IL2变体比较组之外,通过与所述实施例3-4相同的方法确认了小鼠PD-1抗体IL2变体蛋白复合体(a+c)对人免疫细胞激活的影响。

[0247] [表9]

	STAT5 磷酸化 (phosphorylation) (EC ₅₀ , nM)	
	Treg 细胞	CD8+T 细胞
阿地白介素	0.035±0.02	0.75±0.5
muPD-1 抗体-IL2 变体 1 蛋白复合体	11.91±8.02	9.61±1.44
muPD-1 抗体-IL2 变体 2 蛋白复合体	12.5±0.5	7.81±1.7
muPD-1 抗体-IL2 变体 3 蛋白复合体	124.2±62.4	135.9±121.9
muPD-1 抗体-IL2 变体 4 蛋白复合体	19.01±7.56	23.2±4.85
muPD-1 抗体-IL2 变体 7 蛋白复合体	104.5	125.4
muPD-1 抗体-IL2 变体 8 蛋白复合体	159.1	170.1
muPD-1 抗体-IL2 变体 14 蛋白复合体	320.7±279.1	161.1±70.3
muPD-1 抗体-IL2 变体 15 蛋白复合体	772.2±43.6	576.5±361.6

[0248] 结果,可以确认如表9中所示,与阳性对照组(阿地白介素)中CD8+T细胞/调节性T细胞的EC₅₀值的比率呈现为21.4相反,在所述实施例5-2中制备的小鼠PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(a+c)中呈现为0.5至1.2。即可知,与阳性对照组更强地激活调节性T细胞相反,根据一实施方式的小鼠PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(a+c)与调节性T细胞相比选择性地激活效应T细胞的CD8+T细胞。即可知,IL2变体在连接至Fc区域中C末端的结构中也很好地保持选择性地激活CD8+T细胞的固有特性。

[0249] 并且,与小鼠PD-1抗体-IL2变体1蛋白复合体(a+c)对T reg和CD8+T细胞的活度分别为11.91±8.02nM和9.61±1.44nM相反,小鼠PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(a+c)对T reg和CD8+T细胞的活度分别呈现为320.7±279.1nM和161.1±70.3nM,由此确认小鼠PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(a+c)对T reg和CD8+T细胞的活度与小鼠PD-1抗体-IL2变体1蛋白复合体(a+c)相比减少了。可知,如在所述实施例5-3中确认,这种减少是由于对IL2R γ 的结合力减少(约7.8倍)引起的。而且,效应T细胞/调节性T细胞的EC₅₀值的比率为0.5,可知与调节T细胞相比选择性地激活效应T细胞(CD8+T细胞)。

[0250] 因此,根据一方面的小鼠PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(a+c)可以通过与调节性T细胞相比选择性地激活效应T细胞来参与与抗癌效果相关的免疫反应。

[0251] 5-5、确认小鼠PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(a+c)的抗癌活性

[0252] 确认了根据一方面的小鼠PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(a+c)的抗癌活性。具体

地,使用MC38细胞(1.0×10^6 细胞/只)对经过1周的驯化期间的C57BL/6小鼠(雌性,6周龄,(株)koatech)的右肋进行皮下注射来制备了大肠癌移植小鼠模型(syngeneric mouse model)。然后,在小鼠内肿瘤大小到达约70至120mm³时,根据药物施用组以3至6只分类,将在所述实施例5-2中制备的小鼠PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(a+c)以1、3、5以及10mg/kg分别腹腔施用1周1次、总共两次。此时,使用vehicle作为阴性对照组,使用作为抗-PD1抗体的J43(克隆(clone))3mg/kg和J43 3mg/kg+IL2比较组-Fc复合体1.4mg/kg作为阳性对照组。然后,到首次药物使用后的第19天观察了由于药物使用产生的肿瘤生长抑制效果。

[0254] 图6a示出对根据一实施方式的小鼠PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(a+c)、阴性对照组和阳性对照组在大肠癌移植小鼠模型中的抗癌活性进行比较的结果。

[0255] 图6b示出根据一实施方式的小鼠PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(a+c)、阴性对照组和阳性对照组抗癌活性的大肠癌移植小鼠模型的体重变化进行比较的结果。

[0256] 结果,如图6a和6b所示,可以确认阴性对照组和阳性对照组中的肿瘤体积随着时间增加,相反地,在所述实施例5-2中制备的小鼠PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(a+c)与施用后相比容量依赖性表现出癌细胞生长抑制效果。尤其,与阳性对照组和联合施用组相比,在施用所述小鼠PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(a+c)5mg/kg和10mg/kg的情况下,可以确认表现出优异的癌细胞生长效果。即,可以确认所述小鼠PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(a+c)与联合施用PD-1单抗和IL2比较组-Fc蛋白复合体的情况相比表现出显著优异的抗癌活性。

[0257] 因此,根据一方面的小鼠PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(a+c)与现有的免疫抗癌治疗剂相比特异性激活效应T细胞,因此可以有用于预防或治疗与癌症相关的各种免疫疾病。

[0258] 实施例6、人PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(A+C)的制备

[0259] 6-1、人PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(A+C)的克隆和培养

[0260] 分别制备了包括人PD-1抗体和IL2比较组、IL2变体1和IL2变体14的蛋白复合体。具体地,除了使用编码人PD-1抗体重链可变区-恒定区的多核苷酸和编码人PD-1抗体轻链恒定区-轻链可变区的多核苷酸之外,通过与实施例5-1相同的方法获得了包括抗人PD-1Fab-Fc(以下称“A”)和包括抗人PD-1Fab-Fc-C末端IL2变体(以下称“C”)的蛋白复合体(A+C)。

[0261] 6-2、人PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(A+C)的纯化

[0262] 通过与所述实施例5-2相同的方法纯化通过在所述实施例6-1中制备的细胞株培养来确保的人PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(A+C)后,使用磷酸缓冲液(pH7.4)稳定来确保了高纯度的人PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(A+C)。以后,通过与所述实施例5-2相同的方法执行了纯度分析。

[0263] 6-3、确认人PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(A+C)的结合力

[0264] 除了将在所述实施例6-2中制备的人PD-1抗体-IL2比较组蛋白复合体(A+C)、人PD-1抗体-IL2变体1蛋白复合体(A+C)、人PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(A+C)在1.56至8000nM的浓度范围内各自连续稀释为2倍来展开之外,通过与所述实施例3-3相同的方法确认了人PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(A+C)的受体结合力。此时,使用了派姆单抗(Pembrolizumab)作为对人PD-1的阳性对照组,使用了人PD-1抗体-IL2变体1作为对照组,

将其结果表示在以下表10和表11中。

[0265] [表10]

配体	实验组	结合亲和力 (KD, nM)
	[0266] hPD-1	派姆单抗
huPD-1 抗体-IL2 对照组蛋白复合体		2.95
huPD-1 抗体-IL2 变体 1 蛋白复合体		2.25
huPD-1 抗体-IL2 变体 14 蛋白复合体		2.60

[0267] [表11]

实验组	结合亲和力 (nM, SPR 分析)			
	人 IL2R α	人 IL2R β	人 IL2R $\beta\lambda$	人 IL2R $\alpha\beta\lambda$
[0268] huPD-1 抗体-IL2 对照组蛋白复合体	105	6.506	3.08	0.023
huPD-1 抗体-IL2 变体 1 蛋白复合体	没有结合	5.462	2.92	0.782
huPD-1 抗体-IL2 变体 14 蛋白复合体	没有结合	5.611	68.3	25.5
huPD-1 抗体-IL2 变体 14/huPD-1 抗体-IL2 变体 1 (结合力相对比率)	-	1.03	23.4	32.6

[0269] 结果,如表10中所示,在所述实施例6-2中制备的huPD-1抗体-IL2比较组蛋白复合体(A+C)、人PD-1抗体-IL2变体1蛋白复合体(A+C)和人PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(A+C)和阳性对照组呈现出2.25至2.95nM的结合力,由此可以确认均对人PD-1呈现出类似水平的结合力。

[0270] 另一方面可以确认,如表11所示,人PD-1抗体-IL2变体1蛋白复合体(A+C)和人PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(A+C)呈现出不与IL2R α 反应的状态。相反地,可以确认人PD-1抗体-IL2变体1蛋白复合体(A+C)和人PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(A+C)对IL2R β 分别呈现出5.462nM的5.611nM的结合亲和力,即呈现出类似水平的结合力,并且,人PD-1抗体-IL2变体1蛋白复合体(A+C)和人PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(A+C)分别以2.92nM和68.3nM的结合亲和力结合至IL2R $\beta\lambda$ 。鉴于如上所述的结果可知,人PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(A+C)对IL2R β 的结合力与人PD-1抗体-IL2变体1蛋白复合体(A+C)类似,相反地,对IL2R γ 的结合力减少了。具体地,可以确认人PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(A+C)对IL2R $\beta\lambda$ 和IL2R $\alpha\beta\lambda$ 的结合力与人PD-1抗体-IL2变体1分别减少了约23.4倍和32.6倍。即可知,人PD-1抗体-IL2变体1蛋白复合体(A+C)和人PD-1抗体-IL2变体14蛋白复合体(A+C)不但与IL2R α 结合,而且与IL2R γ 的结合也弱化了。

[0271] 因此,根据本发明的人PD-1抗体-IL2变体蛋白复合体(A+C)用于在CD8+T细胞中诱导比调节性T细胞更高度的激活,其特征在于除去对IL2R α 的结合力以诱导表达IL2R $\beta\lambda$ 的CD8+T的选择性激活并通过取代特定氨基酸来调节对IL2R γ 的结合力。

[0272] 如上所述的内容旨在提供示例,本发明所属领域的普通技术人员应当能够理解在不改变本发明技术思想或必须特征的情况下能够将本发明容易改变为其它具体形式。因

此,在上文中描述的实施例从所有角度应当理解为示例性的,而不是限制性的。

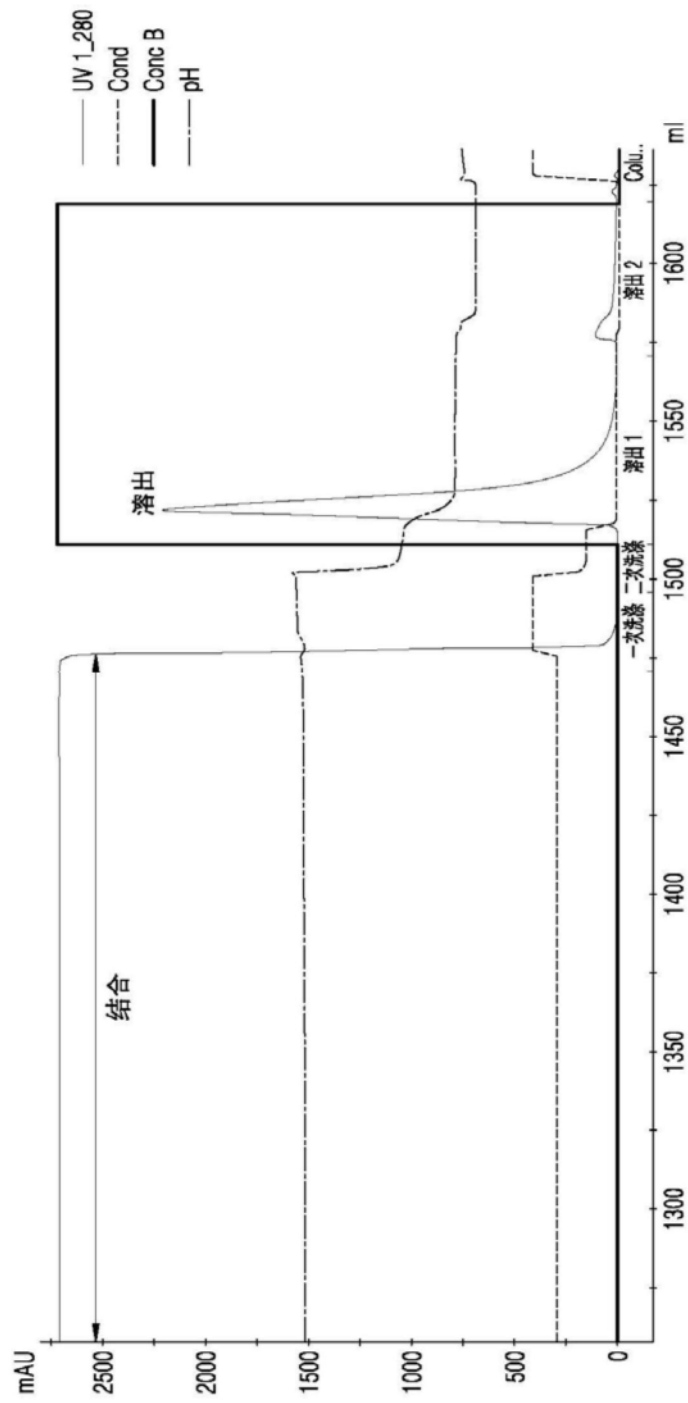


图1a

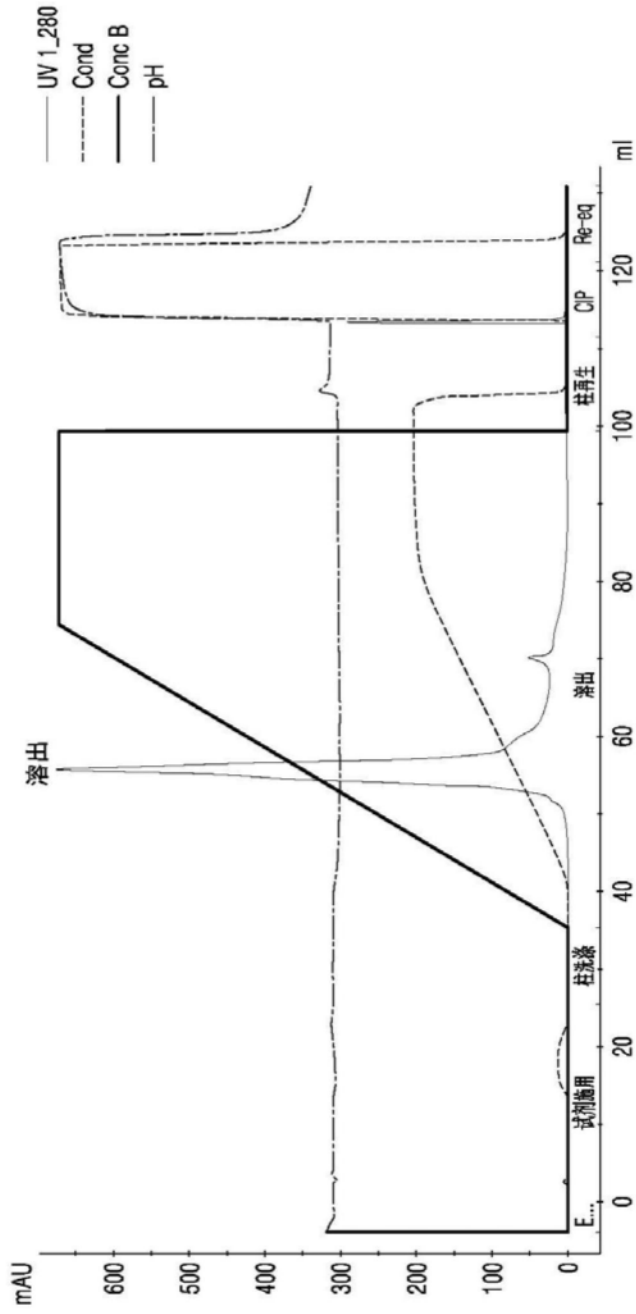


图1b

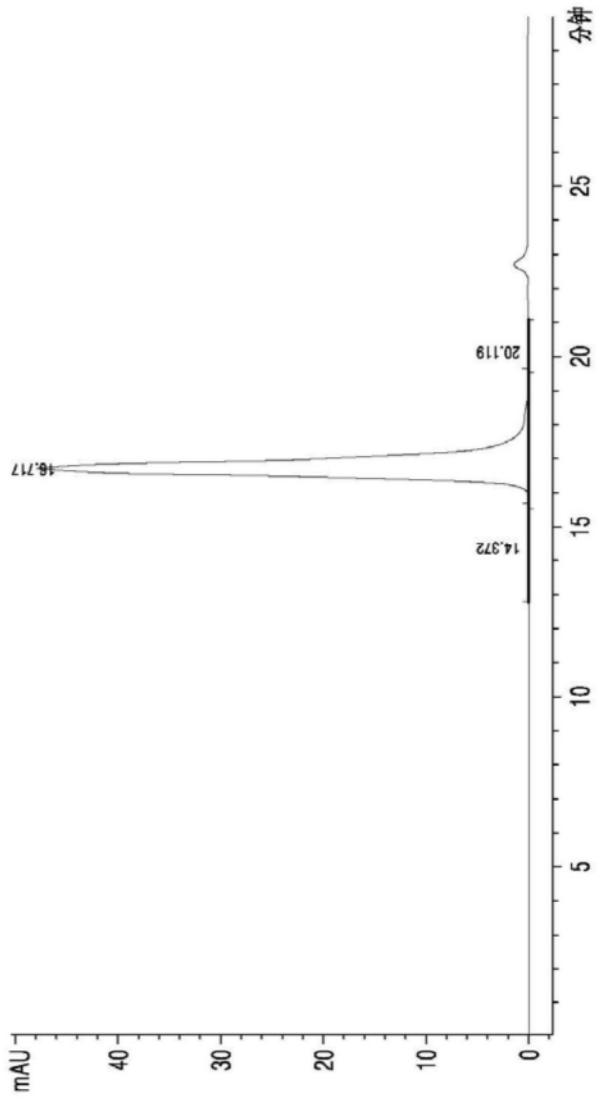


图1c

在MC38同基因小鼠中的体外抗肿瘤效果
(被接种MC38的C57BL/6小鼠, n=10, ip)

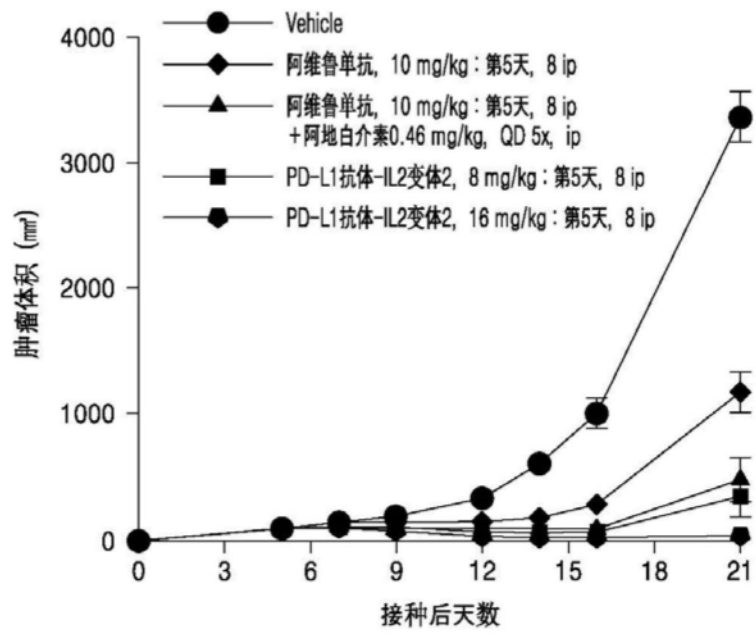


图2a

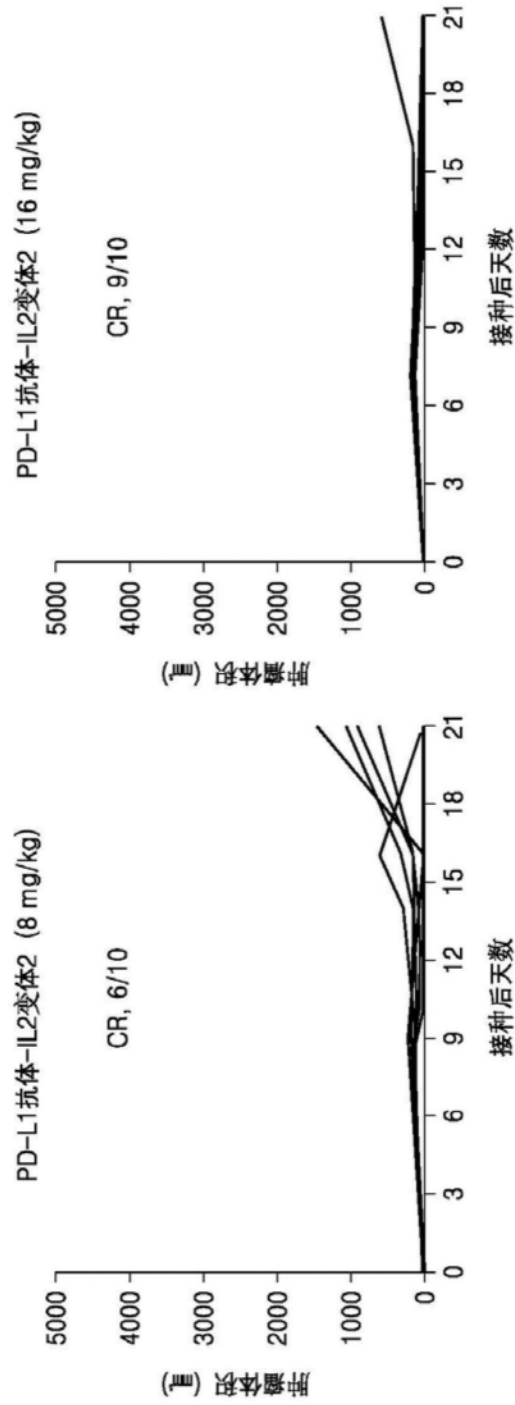


图2b

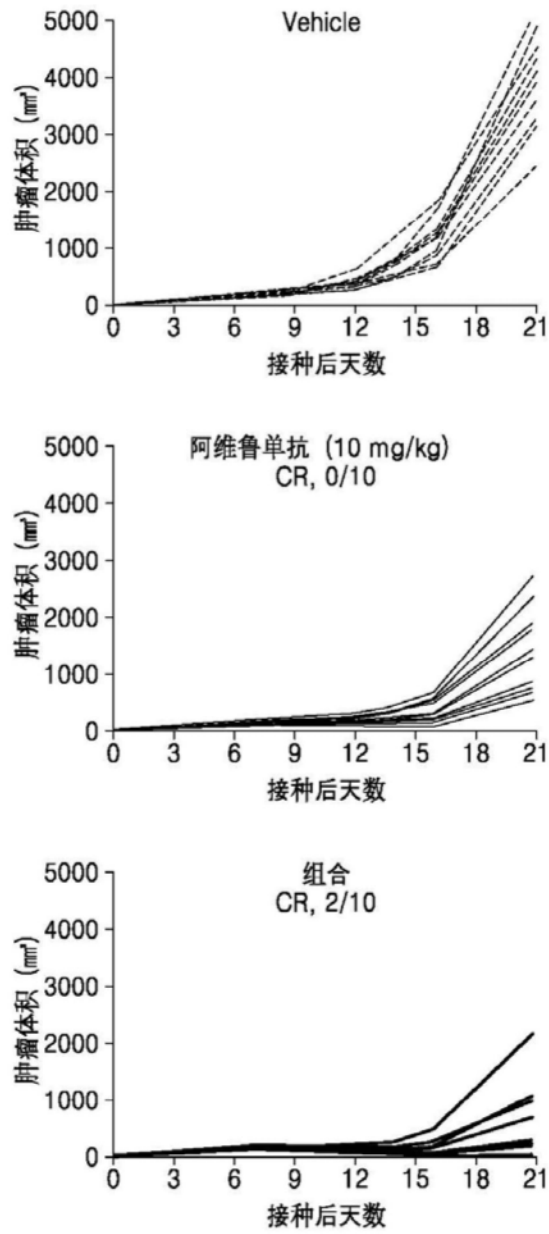


图2c

大肠癌同基因模型
(C57BL/6小鼠, MC38接种, n = 7~10, ip, QWx2)

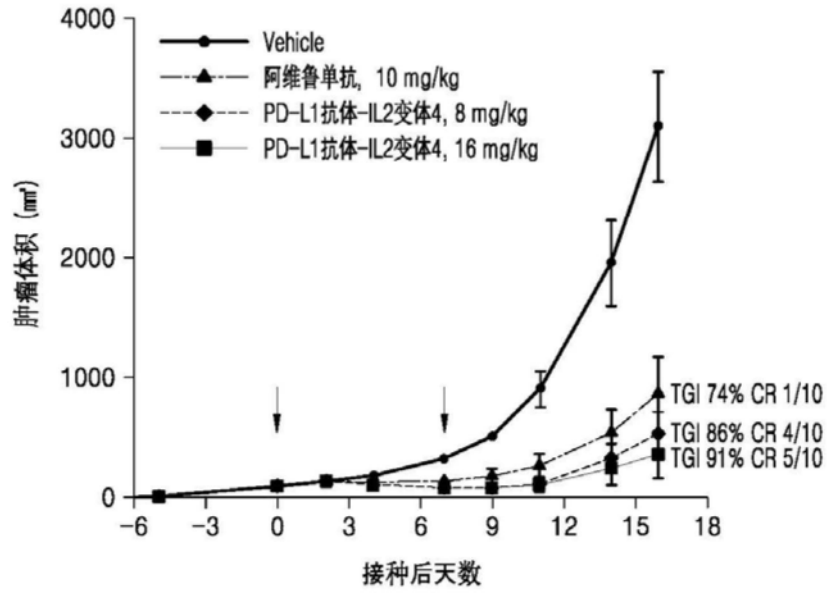
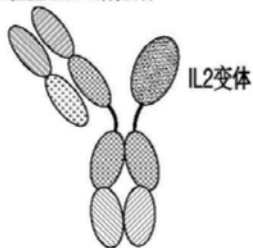


图3

肿瘤相关抗原或免疫检查点抑制剂抗体



肿瘤相关抗原或免疫检查点抑制剂抗体

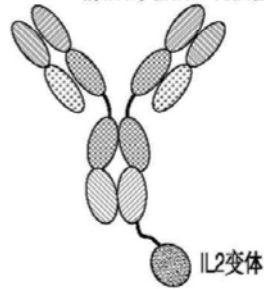


图4

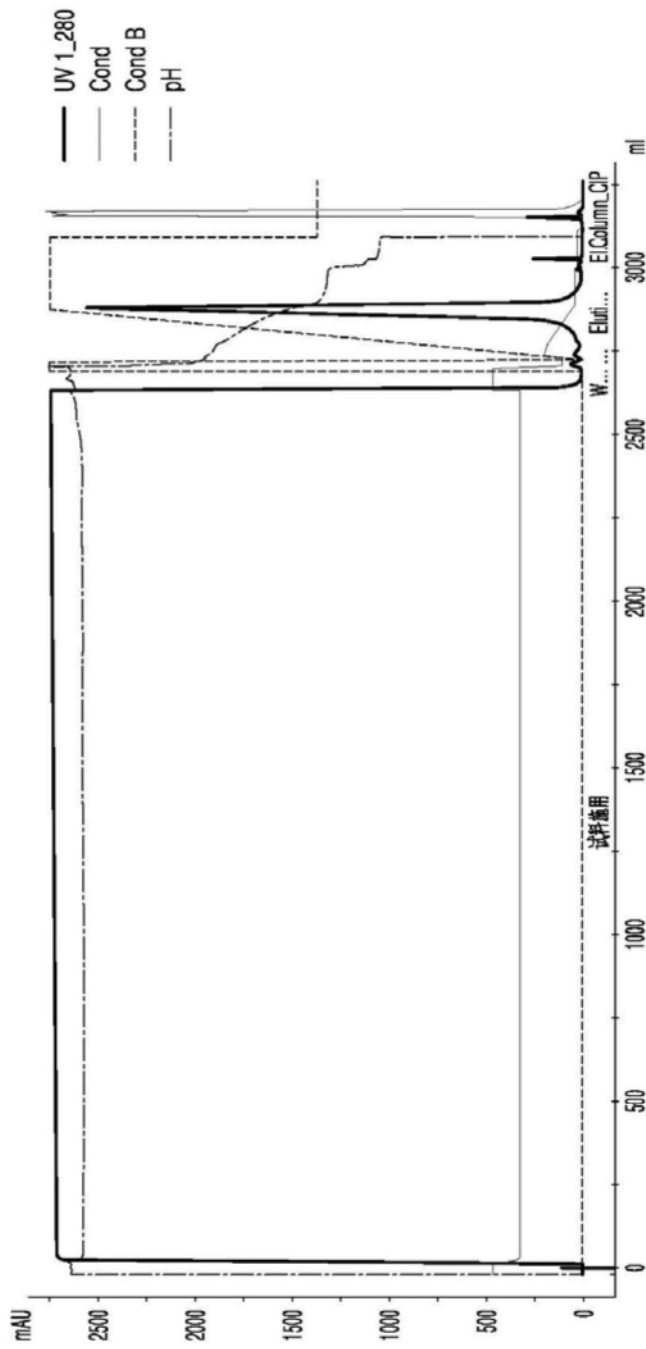


图5a

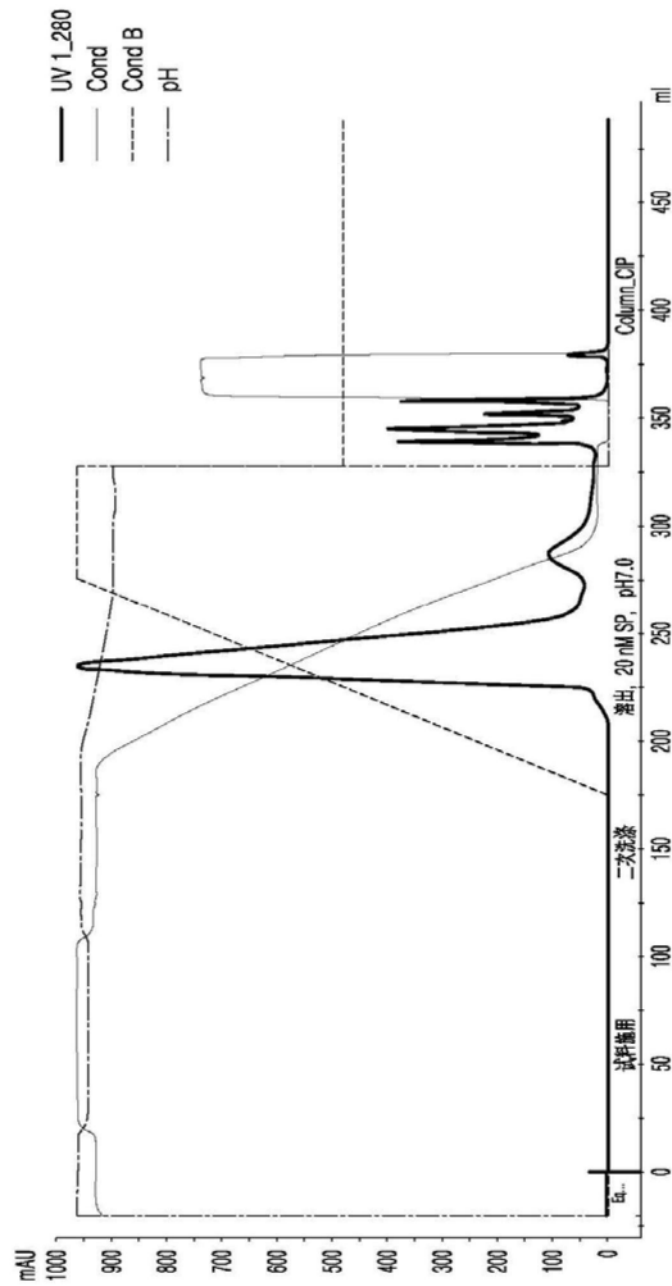


图5b

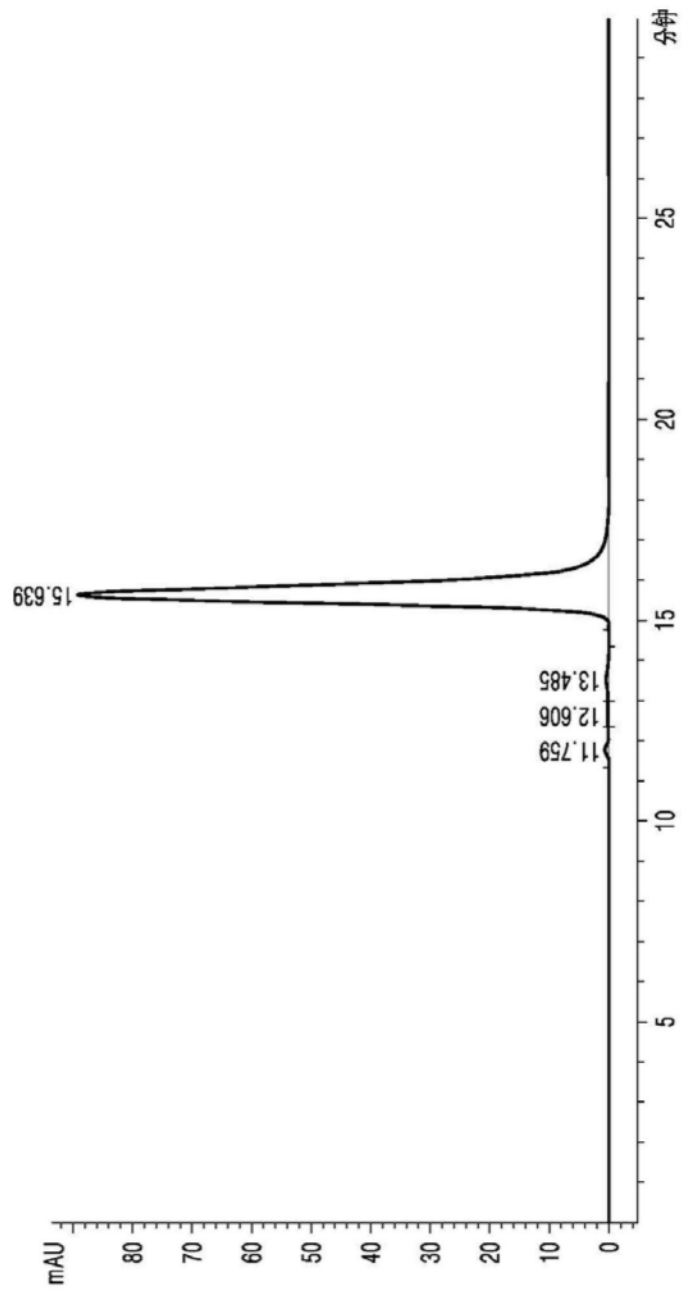


图5c

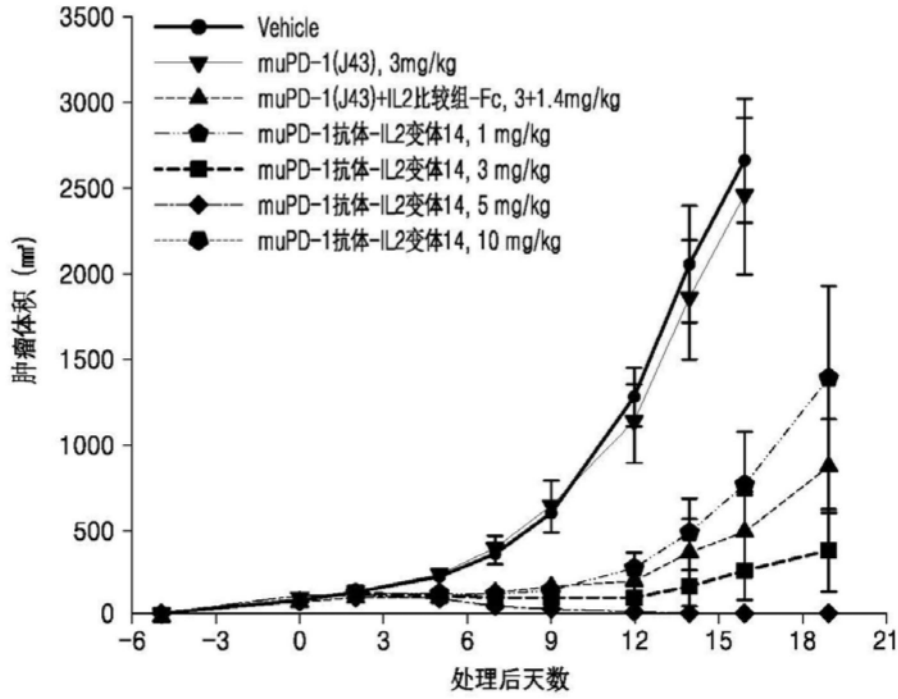


图6a

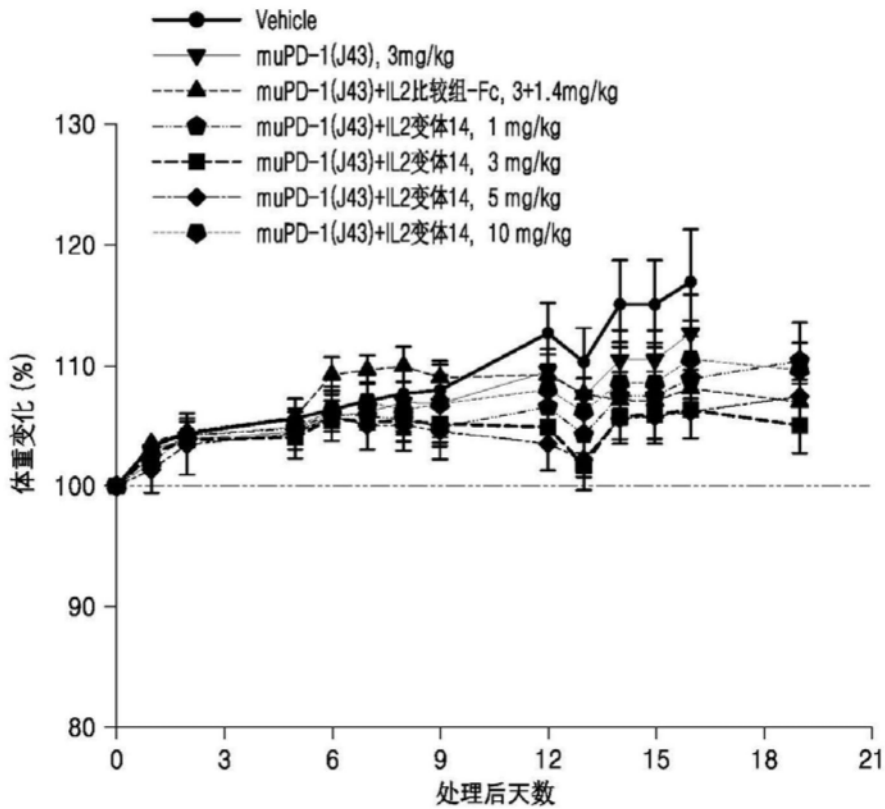


图6b