(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118414160 A
(43)申请公布日 2024.07.30

(21)申请号 202280067635.6
(22)申请日 2022.10.06
(30)优先权数据
21306399.3 2021.10.06 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.04.07
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2022/077847 2022.10.06
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/057588 EN 2023.04.13
(71)申请人 艾尔图制药公司
地址 法国
申请人 索邦大学
公共事业救济局-巴黎医院
法国国家卫生及研究医学协会
(72)发明人 大卫·克拉茨曼 艾莲·泰德古伊
托马斯·瓦兹奎兹
尼古拉斯·比里尔德
(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司 11219
专利代理师 辛怡 杨青
(51)Int.Cl.
A61K 38/00(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61P 37/06(2006.01)
C07K 14/47(2006.01)
C07K 14/55(2006.01)
C07K 16/18(2006.01)
C07K 16/44(2006.01)
C07K 16/46(2006.01)
A61K 39/39(2006.01)

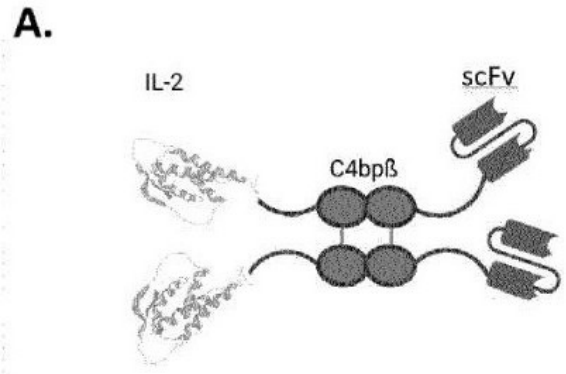
权利要求书2页 说明书25页
序列表（电子公布） 附图11页

(54)发明名称

对发炎组织具有靶向特异性的白介素2嵌合构建体

(57)摘要

本发明涉及一种靶向嵌合构建体,其包含i)白介素2(IL2)部分和ii)结合氧化蛋白质或氧化脂质的靶向部分。所述靶向部分优选是结合特定的氧化蛋白质或氧化脂质的抗体或scFv,并且将融合蛋白靶向至炎性组织。所述嵌合构建体优选还包含C4b结合蛋白(C4BP)的β链,其能够形成二聚体蛋白质。



CN 118414160 A

1.一种嵌合构建体,其包含:

i)至少一个白介素2(IL2)部分;和

ii)至少一个靶向部分,所述靶向部分结合氧化蛋白质或氧化脂质。

2.根据权利要求1所述的嵌合构建体,其中所述靶向部分结合促炎性氧化蛋白质或氧化脂质。

3.根据权利要求1或2所述的嵌合构建体,其中所述靶向部分结合氧化特异性表位(OSE)。

4.根据前述权利要求中的任一项所述的嵌合构建体,其中所述靶向部分结合(i)丙二醛(MDA)表位,(ii)2-(ω-羧基乙基)吡咯(CEP)表位,(iii)4-羟基壬烯醛(4-HNE)表位,或(iv)氧化磷脂(OxPL)如含磷酸胆碱的氧化磷脂(PC-OxPL)、氧化磷脂酰乙醇胺(OxPE)、氧化磷脂酰丝氨酸(OxPS)或氧化心磷脂(OxCL),优选含磷酸胆碱的氧化磷脂(PC-OxPL)。

5.根据前述权利要求中的任一项所述的嵌合构建体,其中所述靶向部分是抗体或抗体片段,如单链可变片段(scFv),优选其中所述靶向部分选自:E06抗体或E06抗体片段,如E06 scFv;LR04抗体或LR04抗体片段,如LR04 scFv;NA17抗体或NA17抗体片段,如NA17 scFv;E014抗体或E014抗体片段,如E014 scFv;MDA2抗体或MDA2抗体片段,如MDA2 scFv;IK17抗体或IK17抗体片段,如IK17 scFv;LR01抗体或LR01抗体片段,如LR01 scFv,及其功能变体。

6.根据权利要求5所述的嵌合构建体,其中所述靶向部分是E06scFv或其变体,所述E06 scFv或其变体包含:

-包含如SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列或者与SEQ IDNO:12具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或至少99%同一性的氨基酸序列的可变重链(VH)结构域;以及

-包含如SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:11具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或至少99%同一性的氨基酸序列的可变轻链(VL)结构域。

7.根据前述权利要求中的任一项所述的嵌合构建体,其中所述IL-2部分是人IL-2或其同源变体,其中所述变体与人野生型IL-2具有至少85%氨基酸同一性,优选其中所述变体是与人野生型IL-2具有至少90%氨基酸同一性的人IL-2活性类似物,其中所述IL-2部分优选是在SEQ ID NO:2的N88位上包含取代,更优选包含取代N88R或N88D的IL2突变蛋白。

8.根据前述权利要求中的任一项所述的嵌合构建体,其中所述IL2部分和所述靶向部分框内融合或通过氨基酸接头,优选通过polyG接头融合。

9.根据前述权利要求中的任一项所述的嵌合构建体,所述嵌合构建体还包含能够形成二聚体蛋白质的C4b结合蛋白的β链(C4BPβ)或其至少一个片段或功能变体,优选其中C4BPβ片段包含C4BPβ的氨基酸残基194至252或C4BPβ的在N端至多延伸到氨基酸135的较长片段,或者由其组成。

10.根据权利要求9所述的嵌合构建体,其包含C4BPβ的功能变体,所述功能变体包含:

a)所述C4BPβ片段的修饰序列,其中所述片段中少于25%、优选少于10%的氨基酸被切掉或替换,其中位于202位和216位的半胱氨酸以及每个半胱氨酸上游和下游的至少3个氨基酸得以保留;或

b)所述C4BPβ片段的修饰序列,其中负责二聚的半胱氨酸被优选选自丙氨酸、缬氨酸、

苯丙氨酸、脯氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和色氨酸的氨基酸取代,所述片段的另一个氨基酸被半胱氨酸取代;或

c)通过在负责二聚的半胱氨酸之间插入与β链异源的序列进行修饰的C4BPβ片段的序列;或

d)通过切掉负责二聚的半胱氨酸之间的氨基酸进行修饰的C4BPβ片段的序列。

11.根据权利要求9或10中任一项所述的嵌合构建体,其中所述IL-2部分融合在C4BPβ或其所述片段的N端,其中C4BPβ或其所述片段的C端优选与所述靶向部分连接。

12.一种核酸,其编码根据权利要求1至11中任一项所述的嵌合构建体。

13.一种载体,其包含根据权利要求12所述的核酸。

14.一种宿主细胞,其包含根据权利要求12所述的核酸或根据权利要求13所述的载体。

15.根据权利要求1至11中的任一项所述的嵌合构建体,其用于治疗自身免疫疾病和/或炎性疾病。

对发炎组织具有靶向特异性的白介素2嵌合构建体

技术领域

[0001] 本发明涉及包含IL2和对发炎组织具有特异性的靶向部分的嵌合构建体。

背景技术

[0002] 白介素-2(IL2或IL-2)是一种调节免疫系统的关键方面的细胞因子。已尝试将IL2用于增强癌症以及自身免疫疾病和/或炎性疾病患者的免疫应答。IL2是一种有效的T细胞生长因子,它促进免疫应答(包括抗原激活T细胞的克隆扩增),驱动CD4+辅助性T细胞(Th)1和Th2细胞的发育,最终分化CD8+细胞毒性T淋巴细胞(CTL)并抑制CD4+Th17和滤泡辅助性T细胞(Tfh)的发育。IL2还塑造T细胞记忆召回应答。

[0003] 已使用低剂量的IL2选择性地增强耐受性,以抑制与自身组织的自身免疫样攻击相关的不需要的免疫应答。迄今为止的经验表明,这种疗法是安全的,没有迹象表明会再激活自身攻击性T细胞,同时几乎所有患者的调节性T细胞(Treg)都会增加,伴随临床改善。

[0004] 尽管如此,可以对作为治疗剂的IL2进行改善。值得注意的是,需要通过使IL2靶向目标组织,从而局部增加目标组织处的浓度来改善治疗功效。还需要提供具有靶向特异性的IL-2构建体,以限制与无处不在的能够响应于IL-2而被激活的淋巴细胞群体有关的潜在“脱靶”效应。

发明内容

[0005] 本发明提供了一种对炎性组织具有靶向特异性的IL2嵌合构建体。

[0006] 令人惊讶地,发明人已经证明这些靶向嵌合构建体显著改善了IL2治疗的功效。特别地,本发明的发明人已经证明,使用本发明的靶向嵌合构建体导致被征募到炎性部位的Treg的数量增加和Treg的增殖增加。

[0007] 具体地,本发明的嵌合构建体包含(i)至少一个白介素2部分;和ii)至少一个靶向部分,所述靶向部分结合氧化蛋白质或氧化脂质,如促炎性氧化蛋白质或氧化脂质。

[0008] 在一个优选实施方式中,所述靶向部分结合氧化特异性表位(OSE)。

[0009] 在一个特定的实施方式中,所述靶向部分结合(i)丙二醛(MDA)表位,(ii)2-(ω-羧基乙基)吡咯(CEP)表位,(iii)4-羟基壬烯醛(4-HNE)表位,或(iv)氧化磷脂(OxPL)如含磷酸胆碱的氧化磷脂(PC-OxPL)、氧化磷脂酰乙醇胺(OxPE)、氧化磷脂酰丝氨酸(OxPS)或氧化心磷脂(OxCL),优选含磷酸胆碱的氧化磷脂(PC-OxPL)。

[0010] 在一个特定的实施方式中,所述靶向部分是抗体或抗体片段,如单链可变片段(scFv)。

[0011] 在一个特定的实施方式中,所述靶向部分选自:E06抗体或E06抗体片段,如E06 scFv;LR04抗体或LR04抗体片段,如LR04 scFv;NA17抗体或NA17抗体片段,如NA17 scFv;E014抗体或E014抗体片段,如E014 scFv;MDA2抗体或MDA2抗体片段,如MDA2 scFv;IK17抗体或IK17抗体片段,如IK17 scFv;LR01抗体或LR01抗体片段,如LR01 scFv,及其功能变体。

[0012] 在一个优选实施方式中,所述靶向部分是E06抗体或E06抗体片段,如E06 scFv,或

其功能变体。在一个特定的实施方式中,所述E06scFv包含:

[0013] -包含如SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:12具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或至少99%同一性的氨基酸序列的可变重链(VH)结构域;以及

[0014] -包含如SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:11具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或至少99%同一性的氨基酸序列的可变轻链(VL)结构域。

[0015] 在一个特定的实施方式中,所述IL-2部分是人IL-2或其同源变体,其中所述变体与人野生型IL-2具有至少85%氨基酸同一性,优选其中所述变体是与人野生型IL-2具有至少90%氨基酸同一性的人IL-2活性类似物,其中所述IL-2部分优选是在SEQ ID NO:2的N88位上包含取代,更优选包含取代N88R或N88D的IL2突变蛋白。

[0016] 在一个特定的实施方式中,所述IL2部分和所述靶向部分框内融合或通过氨基酸接头,优选通过polyG接头融合。

[0017] 在一个特定的实施方式中,所述嵌合构建体还包含能够形成二聚体蛋白质的C4b结合蛋白的β链(C4BPβ)或其至少一个片段或功能变体。

[0018] 在一个特定的实施方式中,C4BPβ片段包含C4BPβ的氨基酸残基194至252或C4BPβ的在N端至多延伸到氨基酸135的较长片段,或者由其组成。

[0019] 在一个特定的实施方式中,所述嵌合构建体包含C4BPβ的功能变体,所述功能变体包含:

[0020] a)所述C4BPβ片段的修饰序列,其中所述片段中少于25%、优选少于10%的氨基酸被切掉或替换,其中位于202位和216位的半胱氨酸以及每个半胱氨酸上游和下游的至少3个氨基酸得以保留;或

[0021] b)所述C4BPβ片段的修饰序列,其中负责二聚的半胱氨酸被优选选自丙氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和色氨酸的氨基酸取代,所述片段的另一个氨基酸被半胱氨酸取代;或

[0022] c)通过在负责二聚的半胱氨酸之间插入与β链异源的序列进行修饰的C4BPβ片段的序列;或

[0023] d)通过切掉负责二聚的半胱氨酸之间的氨基酸进行修饰的C4BPβ片段的序列。

[0024] 在一个特定的实施方式中,所述IL-2部分融合在C4BPβ或其所述片段的N端,其中C4BPβ或其所述片段的C端优选与靶向部分融合。

[0025] 在一个特定的实施方式中,所述嵌合构建体是二聚体形式,其中所述单体通过C4BPβ的两个半胱氨酸之间的共价键合相关联。下面更详细描述了同二聚体和异二聚体。

[0026] 本发明的另一个方面涉及一种编码本发明的嵌合构建体的核酸。本发明还涉及一种包含所述核酸的载体,以及一种包含所述核酸或所述载体的宿主细胞。

[0027] 本发明还涉及本发明的嵌合构建体,其用于治疗自身免疫疾病和/或炎性疾病。

附图说明

[0028] 图1:靶向融合蛋白的功能设计的体外评价。

[0029] 用含有编码各个靶向融合蛋白的转基因的慢病毒载体转导的稳定HEK 293T细胞

系放在无血清培养基中培养48小时。

[0030] A)靶向融合蛋白的设计

[0031] B)通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)在稳定HEK 293T细胞上清液中进行靶向融合蛋白检测。

[0032] C)然后使用经浓缩和过滤的上清液,通过使用一级多克隆抗人IL-2抗体或一级多克隆抗组氨酸抗体的蛋白质印迹法对IL2-C4bpβ-scFv和IL2N88R-C4bpβ-scFv进行表征。

[0033] D)通过使用流式细胞术评价人CD4+调节性T细胞、CD4+常规T细胞、CD8+T细胞和NK细胞中的STAT5磷酸化(pSTAT5)应答来评估靶向融合蛋白的功能活性。

[0034] 图2:靶向融合蛋白在结肠炎炎性实验模型中的治疗效果。

[0035] A)将六至八周龄C57BL/6(Jrj)雌性小鼠(n＝6)通过腹膜内途径注射编码IL2、scFvE06、IL2-C4bpβ-scFvE06或$IL2_{N88R}$-C4bpβ-scFvE06的AAV的5.10^{10}至5.10^{11}vg(病毒基因组)或不进行处理,七天后通过连续6天口服施用稀释在水中的葡聚糖硫酸钠(2%)进行免疫。AAV注射后七天对外周血中的CD4+Treg和CD25 MFI、CD4+Tconv CD25+和NK细胞进行免疫监测分析(B)。

[0036] 临床疾病评价基于体重减轻(C)、大便软硬度(D)、出血情况(E)和疾病活动指数(F)。肱淋巴结和主动脉旁淋巴结中表达整合素α4β7(G)和Ki67(H)的Treg的免疫监测分析。使用GraphPad Prism 6.00版计算AUC后,评价不同的治疗组之间的统计显著性,并使用Mann-Whitney检验(平均数比较、未配对检验、非参数检验、双尾P值)进行计算,以P<0.05(*)为统计显著性(**P<0.01,***P<0.001)。对于所有的图,误差线都表示平均值标准误差(SEM)。

[0037] 图3是报告单次注射IL2或IL2-C4bpβ-scFvE06后的小鼠药代动力学的图。

[0038] 图4是一组DSS诱导结肠炎小鼠模型中的免疫化学染色的图。只有用IL-2-C4bpβ-scFvE06处理的小鼠显示在结肠中检测到IL2和6X-HisTag。

具体实施方式

[0039] 定义

[0040] 欲治疗的“受试者”或“患者”可以是任何哺乳动物,优选人类。人类受试者可以是儿童、成人或老人。

[0041] 术语“治疗”或“处理”意指疾病的任何改善。它包括减轻至少一种症状,或降低疾病的严重程度或发展。当所述疾病是炎性病症和/或自身免疫病症时,该术语更特别地包括降低急性发作(发作)的风险、发生率或严重程度。术语“治疗”或“处理”涵盖减缓疾病进展。特别地,本发明涵盖预防或减缓疾病进展。术语“治疗”或“处理”还涵盖通过降低疾病发作风险或延迟疾病发作进行预防性治疗,尤其是在无症状但已被诊断为“有风险”的受试者中。

[0042] “调节性T细胞”或“Treg”是具有免疫抑制活性的T淋巴细胞。天然Treg表征为CD4+CD25+Foxp3+细胞。Treg在控制炎性疾病方面起重要作用,但还不清楚它们在这种疾病中的作用模式。事实上,在大多数炎性疾病中,Treg耗竭会加重疾病,而Treg增加则会减轻疾病。大多数Treg是CD4+细胞,但也有罕见的具有抑制活性的CD8+Foxp3+T淋巴细胞群体。

[0043] 在本申请的上下文内,“效应T细胞”(或“Teff”)表示除Treg之外的常规T淋巴细胞

(文献中有时也称为Tconv),其表达一种或多种T细胞受体(TCR)并执行效应功能(例如细胞毒性活性、细胞因子分泌等)。根据本发明,人Teff的主要群体包括CD4+辅助性T淋巴细胞(例如,Th0、Th1、Th2、Th9、Th17、Tfh)和CD4+或CD8+细胞毒性T淋巴细胞,并且它们可以对自身或非自身抗原具有特异性。Teff不包含Foxp3+调节性CD8+T细胞。

[0044] 在本申请的上下文内,"滤泡辅助性T细胞"(或"Tfh")表示表达BcL6、CXCR5和PD1,是Foxp3-并提供B细胞辅助的T CD4+淋巴细胞。

[0045] 在本申请的上下文内,"滤泡调节性T细胞"(或"Tfr")表示CD4+CXCR5+PD-1+Bc16+Foxp3+CD25-T淋巴细胞。

[0046] 如果抗体以比它与其它物质结合时更大的亲和力、亲合力、更容易和/或以更大的持续时间结合靶抗原,则所述抗体"特异性结合"靶抗原。"特异性结合"或"优先结合"未必需要(但可包括)排他性结合。通常(但未必),提到结合意指优先结合。本领域中已知多种测量结合亲和力的方法,出于本公开的目的,可以使用其中任一种。

[0047] "抗体片段"仅包括抗体的一部分,其中所述部分通常保留了存在于完整抗体中时通常与该部分相关的至少一种、更通常大部分或全部功能。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')2和Fv片段;双功能抗体;线性抗体;单链抗体分子;以及由抗体片段形成的多特异性抗体。在一个实施方式中,抗体片段包含原始抗体的抗原结合位点,因此保留了结合抗原的能力。在另一个实施方式中,抗体片段,例如包含Fc区的抗体片段,保留了存在于原始抗体中时通常与Fc区相关的至少一种生物功能,如FcRn结合、抗体半衰期调节、ADCC功能和补体结合。

[0048] 抗原结合区或抗原结合片段对应于抗体的Y形结构的臂,这些臂由与重链VH和CH1结构域配对的各个完整轻链组成,并称为"Fab片段"(即抗原结合片段)。首先通过在链间二硫键的氨基端一侧的铰链区中切割抗体分子,从而释放出两个相同的抗原结合臂的木瓜蛋白酶消化,由天然免疫球蛋白分子产生Fab片段。其它蛋白酶,如胃蛋白酶,也在铰链区中但是在链间二硫键的羧基端一侧切割抗体分子,从而释放出由两个相同的Fab片段组成并通过二硫键保持连接的片段;还原F(ab')2片段中的二硫键产生了Fab'片段。

[0049] 与VH和VL结构域对应的抗原结合区部分称为Fv片段(即可变片段);它含有互补性决定区(CDR),所述互补性决定区形成了抗原结合位点(也称为互补位)。

[0050] 抗体的效应区负责其与效应分子或细胞结合,对应于Y形结构的茎干,含有重链的配对CH2和CH3结构域(或CH2、CH3和CH4结构域,取决于抗体的类别),并称为Fc区(即片段可结晶区)。

[0051] "单链Fv"或"scFv"抗体片段包含抗体的VH和VL结构域,其中这些结构域存在于单一多肽链中。通常,scFv多肽还包含在VH与VL结构域之间的多肽接头,这使得scFv能够形成抗原结合所需要的结构。接头通常富含甘氨酸(出于柔性目的)以及丝氨酸或苏氨酸(出于溶解度的目的),并且可以连接VH的N端与VL的C端,或连接VH的C端与VL的N端。该scFv片段保留了原始抗体的特异性,但去除了恒定区并引入了接头。

[0052] 序列表示出了以下序列:

[0053] SEQ ID NO:1是野生型人IL2(253个氨基酸,包括信号肽)

[0054] SEQ ID NO:2是成熟野生型人IL2(233个氨基酸,无信号肽)

[0055] SEQ ID NO:3是C4BPβ链(1-252)

[0056] SEQ ID NO:4是C4BPβ链的片段194-252

[0057] SEQ ID NO:5是C4BPβ链的片段137-252

[0058] SEQ ID NO:6是与C4BPβ的C端区融合的人IL-2的氨基酸序列(Hi2cb),包括信号肽

[0059] SEQ ID NO:7是与C4BPβ的C端区融合的突变IL-2(N88R)的氨基酸序列(Hi2mcb),包括信号肽

[0060] SEQ ID NO:8是GGGGS模式(接头)

[0061] SEQ ID NO:9是与C4BPβ的C端区融合的人IL-2的氨基酸序列(Hi2cb),无信号肽

[0062] SEQ ID NO:10是与C4BPβ的C端区融合的突变IL-2(N88R)的氨基酸序列(Hi2mcb),无信号肽

[0063] SEQ ID NO:11是E06 scFv VL结构域的序列

[0064] SEQ ID NO:12是E06 scFv VH结构域的序列

[0065] SEQ ID NO:13是E06 scFv的序列(无HIS标签)

[0066] SEQ ID NO:14是接头GGGGSGGGGSGGGGS

[0067] SEQ ID NO:15是靶向融合蛋白IL-2-C4bpβ-scFvE06的序列(无肽信号,无HIS标签)

[0068] SEQ ID NO:16是靶向融合蛋白IL-2-C4bpβ-scFvE06的序列(有肽信号,但无HIS标签)

[0069] SEQ ID NO:17是靶向融合蛋白IL-2N88R-C4bpβ-scFvE06的序列(无肽信号,无HIS标签)

[0070] SEQ ID NO:18是靶向融合蛋白IL-2N88R-C4bpβ-scFvE06的序列(有肽信号,但无HIS标签)

[0071] SEQ ID NO:19是靶向融合蛋白IL-2-C4bpβ-scFvE06的序列(有肽信号,有HIS标签)

[0072] SEQ ID NO:20是靶向融合蛋白IL-2N88R-C4bpβ-scFvE06的序列(有肽信号,有HIS标签)

[0073] 本发明的嵌合构建体包含(i)至少一个白介素2部分;和ii)至少一个靶向部分。

[0074] IL-2部分

[0075] 如本文所用,白介素-2(IL-2)涵盖哺乳动物野生型白介素-2及其变体。优选地,IL-2是人IL-2或其变体。

[0076] 文献中已公开了IL-2的活性变体。天然IL-2的变体可以是其片段、类似物和衍生物。“片段”意指仅包含多肽序列的一部分的多肽。“类似物”表示包含具有一个或多个氨基酸取代、插入或缺失的天然多肽序列的多肽。突变蛋白和假肽是类似物的具体实例。“衍生物”包括任何修饰的天然IL-2多肽或其片段或类似物,如糖基化、磷酸化、与另一个多肽或分子融合、聚合等,或者通过化学修饰或酶修饰或添加以改善IL-2的性质(例如,稳定性、特异性等)。活性变体的IL-2部分通常与参考IL-2多肽,例如成熟野生型人IL-2的氨基酸序列相同具有至少75%,优选至少80%、85%,更优选至少90%或至少95%氨基酸序列同一性。

[0077] 如本文所用,“野生型IL-2”意指IL-2,无论是天然的还是重组的,都包含天然人IL-2的133个正常存在的氨基酸序列,其氨基酸序列描述于Fujita等,PNAS USA,80,7437-7441(1983)中。SEQ ID NO:2(133个氨基酸)是不含由额外的20个N端氨基酸组成的信号肽

的人IL-2序列。SEQ ID NO:1(153个氨基酸)是包括所述信号肽的人IL-2序列。

[0078] 如本文所用,“IL-2突变蛋白”意指已对成熟人白介素-2蛋白进行了特定的氨基酸取代的多肽。除非另有说明,否则氨基酸的编号全都相对于SEQ ID NO:2的成熟人白介素-2蛋白。

[0079] 在一些实施方式中,125位的半胱氨酸被中性氨基酸如丝氨酸(C125S)、丙氨酸(C125A)、苏氨酸(C125T)或缬氨酸(C125V)代替。

[0080] 例如,当活性变体在哺乳动物细胞如CHO或HEK细胞中表达时,消除O-糖基化位点会产生更均质的产物。

[0081] 在某些实施方式中,活性变体包含额外的氨基酸突变,由此消除了与人IL-2的残基3相对应的位置上的IL-2的O-糖基化位点。在一个实施方式中,所述消除了与人IL-2的残基3相对应的位置上的IL-2的O-糖基化位点的额外的氨基酸突变是氨基酸取代。示例性氨基酸取代包括T3A、T3G、T3Q、T3E、T3N、T3D、T3R、T3K和T3P。在一个具体实施方式中,所述额外的氨基酸突变是氨基酸取代T3A。

[0082] 选择性促进T-reg细胞增殖、存活、激活和/或功能的活性IL-2变体特别可用于治疗炎性病症和/或自身免疫病症。

[0083] “选择性促进”意指活性变体促进T-reg细胞的活性,但在非调节性T细胞中促进活性的能力有限或缺乏。本文还描述了筛选选择性促进T-reg细胞增殖、存活、激活和/或功能的活性变体的测定法。确定变体IL-2多肽是否具有活性的方法可得自本领域。例如,见WO2016/014428。活性变体定义为显示出刺激Treg的能力的变体,包括与野生型IL-2或阿地白介素(如下文所定义)相比在刺激Treg方面的能力改善或能力类似或甚至能力降低的变体,其刺激Teff的程度不超过其刺激Treg的程度。测试候选分子是否刺激T细胞(特别是Treg)或NK细胞的方法是众所周知的。可以测试变体刺激效应T细胞(如CD8+T细胞)、CD4+Foxp3+Treg或NK细胞的能力。在一个优选实施方式中,与野生型IL2或阿地白介素相比,活性变体显示出刺激NK细胞的能力降低。如Yu等,Diabetes 2015;64:2172-2183所述,监测STAT5磷酸化是一种评估变体优先刺激Treg而不是Teff的能力的简单途径。在一个特定的实施方式中,当在比其它免疫细胞(包括Teff)低至少10倍的剂量下对于Treg实现所给水平的STAT5磷酸化时,变体特别有用。

[0084] 所述活性变体诱导优先诱导Treg细胞存活、增殖、激活和/或功能的信号传导事件。在某些实施方式中,所述IL-2变体保留了在Treg细胞中刺激STAT5磷酸化和/或IL-2R下游信号传导分子,例如p38、ERK、SYK和LCK中的一个或多个磷酸化的能力。在其它实施方式中,所述IL-2变体保留了在Treg细胞中刺激对Treg细胞存活、增殖、激活和/或功能重要的基因或蛋白质如FOXP3、Bcl-2、CD25或IL-10的转录或蛋白质表达的能力。在其它实施方式中,所述IL-2变体表现出了刺激CD25+T细胞表面上的IL-2/IL-2R复合物内吞的能力降低。在其它实施方式中,所述IL-2变体表现出了对PI3-激酶信号传导刺激的低效、降低或不存在,如AKT和/或mTOR(雷帕霉素的哺乳动物靶标)磷酸化的低效、降低或不存在。在其它实施方式中,所述IL-2变体保留了野生型IL-2刺激Treg细胞中的STAT5磷酸化和/或IL-2R下游信号传导分子中的一个或多个磷酸化的能力,还表现出了FOXP3-CD4+或CD8+T细胞或NK细胞中IL-2R下游的STAT5、AKT和/或mTOR或其它信号传导分子磷酸化的低效、降低或不存在。在其它实施方式中,所述IL-2变体低效或不能刺激FOXP3-CD4+或CD8+T细胞或NK细胞存活、

生长、激活和/或功能。

[0085] 在所有情况下,这些变体都有能力刺激细胞系,如CTLL-2或HT-2,这可以普遍用于确定它们的生物活性。例如,IL-2的生物活性可以通过对生长依赖于IL-2的HT-2细胞系(克隆A5E,ATCC®CRL-1841TM)进行基于细胞的测定来确定。将在存在一定范围的测试白介素-2产品的情况下的细胞生长与在IL-2国际标准物(白介素2(人类,rDNA来源)的WHO第2国际标准物NIBSC编码:86/500)下记录的生长进行比较。加入[3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺酸基苯基)-2H-四唑鎓(内盐,MTS)并通过活性活细胞转化为甲臜后,测量细胞生长。然后通过分光光度法在490nm下测量甲臜浓度。

[0086] 例如,在EP109748、EP136489、US4,752,585、EP200280、EP118617、WO99/60128、EP2288372、US9,616,105、US9,580,486、WO2010/085495、WO2016/164937中公开了IL-2变体的实例。

[0087] 例如,某些突变可能导致对IL-2受体(IL-2Rβ/CD122和/或IL-2Rγ/CD132)的信号传导链的亲和力降低和/或诱导IL-2受体的一个或两个亚单位的信号传导事件的能力降低。其它突变可赋予对CD25(IL-2Rα)的更高亲和力。在这两种情况下,那些突变都定义了优先诱导Treg的存活、增殖、激活和/或功能的活性变体。可以使用表面等离子体共振来监测这种特性。

[0088] 有用变体的特定实例包括显示出在根据野生型IL-2编号的位置D20、N30、Y31、K35、V69、Q74、N88、V91或Q126上的至少一个氨基酸取代的IL-2突变蛋白,这意味着所选氨基酸是参考该氨基酸在SEQ ID NO:2的野生型IL-2的成熟序列中通常出现的位置鉴定的。

[0089] 优选的IL-2突变蛋白包含在位置D20H、D20I、D20Y、N30S、Y31H、K35R、V69AP、Q74、N88R、N88D、N88G、N88I、V91K或Q126L上的至少一个取代。

[0090] 在一些实施方式中,所述IL-2突变蛋白分子包含V91K取代。在一些实施方式中,所述IL-2突变蛋白分子包含N88D取代。在一些实施方式中,所述IL-2突变蛋白分子包含N88R取代。在一些实施方式中,所述IL-2突变蛋白分子包含H16E、D84K、V91N、N88D、V91K或V91R取代,其任何组合。在一些实施方式中,这些IL-2突变蛋白分子还包含如本文所述的在125位上的取代。在一些实施方式中,所述IL-2突变蛋白分子包含选自以下的一个或多个取代:T3N、T3A、L12G、L12K、L12Q、L 12S、Q13G、E15A、E15G、E15S、H16A、H16D、H16G、H16K、H16M、H16N、H16R、H16S、H16T、H16V、H16Y、L19A、L19D、L19E、L19G、L19N、L19R、L19S、L19T、L19V、D20A、D20E、D20H、D20I、D20Y、D20F、D20G、D20T、D20W、M23R、R81A、R81G、R81 S、R81T、D84A、D84E、D84G、D84I、D84M、D84Q D84R、D84S、D84T、S87R、N88A、N88D、N88E、N88I、N88F、N88G、N88M、N88R、N88S、N88V、N88W、V91D、V91E、V91G、V91 S、I92K、I92R、E95G和Q126。在一些实施方式中,所述IL-2突变蛋白分子的氨基酸序列与成熟IL-2序列中所示的氨基酸序列不同,其具有C125A或C125S取代并且具有一个选自以下的取代:T3N、T3A、L12G、L12K、L12Q L12S、Q13G、E15A、E15G、E15S、H16A、H16D、H16G、H16K、H16M、H16N、H16R、H16S、H16T、H16V、H16Y、L19A、L19D、L19E、L19G、L19N、L19R、L19S、L19T、L19V、D20A、D20E、D20F、D20G、D20T、D20W、M23R、R81A、R81G、R81 S、R81T、D84A、D84E、D84G、D84I、D84M、D84Q、D84R、D84S、D84T、S87R、N88A、N88D、N88E、N88F、N88I、N88G、N88M、N88R、N88S、N88V、N88W、V91D、V91E、V91G、V91 S、I92K、I92R、E95G、Q126I、Q126L和Q126F。在一些实施方式中,所述IL-2突变蛋白分子与成熟IL-2序列中所示的氨基酸序列不同,具有C125A或C125S取代并且具有一个选自以下的取

代:D20H、D20I、D20Y、D20E、D20G、D20W、D84A、D84S、H16D、H16G、H16K、H16R、H16T、H16V、I92K、I92R、L12K、L19D、L19N、L19T、N88D、N88R、N88S、V91D、V91G、V91K和V91S。在一些实施方式中,所述IL-2突变蛋白包含N88R和/或D20H突变。

[0091] 这些取代可以单独使用或彼此组合使用。在一些实施方式中,所述突变蛋白包含这些取代中的每一个。在一些实施方式中,所述突变蛋白包含这些突变中的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个或8个。

[0092] 在一些实施方式中,所述IL-2突变蛋白包含N88R或N88D突变,优选N88R。在一些实施方式中,所述IL-2突变蛋白包含C125A或C125S突变。这些取代可以单独使用或彼此组合使用。在一些实施方式中,所述突变蛋白包含这些突变中的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个或8个。在一些实施方式中,所述突变蛋白包含这些取代中的每一个。

[0093] 在一个特定的实施方式中,所述IL-2部分是阿地白介素。阿地白介素是Proleukin®的活性成分。阿地白介素是成熟人IL-2的变体,与成熟人IL-2的序列(SEQ ID NO:2)相比,它包含两个氨基酸修饰:缺失第一氨基酸(丙氨酸)和在125位以丝氨酸取代半胱氨酸。

[0094] 涵盖IL-2的其它位置(即,对突变蛋白的二级或三级结构影响很小的那些位置)上的保守修饰和取代。这些保守取代包括Dayhoff,The Atlas of Protein Sequence and Structure 5(1978)以及Argos,EMBO J.,8:779-785(1989)所述的那些保守取代。例如,属于以下各组之一的氨基酸表示保守变化:-ala、pro、gly、gln、asn、ser、thr;-cys、ser、tyr、thr;-val、ile、leu、met、ala、phe;-lys、arg、his;-phe、tyr、trp、his;以及-asp、glu。

[0095] 不优选具有破坏与IL-2R的α亚单位结合的突变的变体,因为那些突变体刺激Treg的能力可能会降低。

[0096] 促进Teff细胞增殖、存活、激活和/或功能的活性IL-2变体可用于治疗癌症。

[0097] 与野生型IL-2多肽相比,IL-2的这些活性变体各自包含至少一个氨基酸突变,所述氨基酸突变消除或降低了突变IL-2多肽对IL-2受体的α-亚单位(CD25)的亲和力并保留了突变IL-2多肽对中等亲和力IL-2受体的亲和力。可以使用表面等离子体共振来监测这种特性。

[0098] 优选的活性变体包括包含F42A、K43N、Y45A和/或E62A取代的IL-2突变蛋白。

[0099] 例如,可以通过在氨基酸位置35、38、42、43、45、62或72或其组合(相对于人IL-2序列SEQ ID NO:2的编号)处的氨基酸取代产生对CD25的亲和力降低的活性变体,如人IL-2(hIL-2)突变体。示例性氨基酸取代包括K35E、K35A、R38A、R38E、R38N、R38F、R38S、R38L、R38G、R38Y、R38W、F42L、F42A、F42G、F42S、F42T、F42Q、F42E、F42N、F42D、F42R、F42K、K43E、Y45A、Y45G、Y45S、Y45T、Y45Q、Y45E、Y45N、Y45D、Y45R、Y45K、E62G、E62A、E62S、E62T、E62Q、E62E、E62N、E62D、E62R、E62K、L72G、L72A、L72S、L72T、L72Q、L72E、L72N、L72D、L72R和L72K。可用于本发明的嵌合构建体中的特定活性变体包含在与人IL-2的残基42、45或72相对应的氨基酸位置上的氨基酸突变或其组合。在一个实施方式中,所述氨基酸突变是选自F42A、F42G、F42S、F42T、F42Q、F42E、F42N、F42D、F42R、F42K、Y45A、Y45G、Y45S、Y45T、Y45Q、Y45E、Y45N、Y45D、Y45R、Y45K、L72G、L72A、L72S、L72T、L72Q、L72E、L72N、L72D、L72R和L72K的氨基酸取代,更具体是选自F42A、Y45A和L72G的氨基酸取代。与IL-2突变体的野生型形式相比,这些活性变体对中等亲和力IL-2受体表现出了基本上类似的结合亲和力,而对IL-2受体的

α-亚单位和高亲和力IL-2受体(IL2Rαβγ)的亲和力大大降低。

[0100] 可用活性变体的其它特性可以包括诱导带有IL-2受体的T和/或NK细胞增殖的能力,诱导带有IL-2受体的T和/或NK细胞中的IL-2信号传导的能力,使NK细胞产生干扰素(IFN)-γ作为二级细胞因子的能力,外周血单核细胞(PBMC)诱导二级细胞因子(特别是IL-10和TNF-α)精制的能力降低,激活调节性T细胞的能力降低,诱导T细胞凋亡的能力降低,以及体内毒性特性降低。

[0101] 特定的活性变体包含三个氨基酸突变,所述氨基酸突变消除或降低了活性变体对IL-2受体的α-亚单位的亲和力,但保留了活性变体对中等亲和力IL-2受体的亲和力。在一个实施方式中,所述三个氨基酸突变在与人IL-2的残基42、45和72相对应的位置上。在一个实施方式中,所述三个氨基酸突变是氨基酸取代。在一个实施方式中,所述三个氨基酸突变是选自F42A、F42G、F42S、F42T、F42Q、F42E、F42N、F42D、F42R、F42K、Y45A、Y45G、Y45S、Y45T、Y45Q、Y45E、Y45N、Y45D、Y45R、Y45K、L72G、L72A、L72S、L72T、L72Q、L72E、L72N、L72D、L72R和L72K的氨基酸取代。在一个具体实施方式中,所述三个氨基酸突变是氨基酸取代F42A、Y45A和L72G(相对于SEQ ID NO:2的人IL-2序列的编号)。

[0102] 在某些实施方式中,所述氨基酸突变使突变IL-2多肽对IL-2受体的α-亚单位的亲和力降低了至少5倍,具体是至少10倍,更具体是至少25倍。在存在多于一个降低活性变体对IL-2受体的α-亚单位的亲和力的氨基酸突变的实施方式中,这些氨基酸突变的组合可以使活性变体对IL-2受体的α-亚单位的亲和力降低至少30倍、至少50倍,甚至至少100倍。在一个实施方式中,所述氨基酸突变或氨基酸突变的组合消除了活性变体对IL-2受体的α-亚单位的亲和力,因此通过表面等离子体共振不能检测到结合。

[0103] 当活性变体对中等亲和力IL-2受体表现出IL-2突变体的野生型形式的亲和力的大于约70%时,实现了基本上类似的与中等亲和力受体的结合,即保留了突变IL-2多肽对所述受体的亲和力。可用于本发明的活性变体可以表现出这种亲和力的大于约80%、甚至大于约90%。

[0104] 降低IL-2对IL-2受体的α-亚单位的亲和力,同时消除IL-2的O-糖基化,导致IL-2蛋白具有改善的特性。

[0105] 在一个具体实施方式中,活性变体可以引发选自以下的细胞应答中的一种或多种:活化T淋巴细胞的增殖,活化T淋巴细胞的分化,细胞毒性T细胞(CTL)的活性,活化B细胞的增殖,活化B细胞的分化,自然杀伤(NK)细胞的增殖,NK细胞的细胞毒性活性,NK细胞的分化,活化T细胞或NK细胞的细胞因子分泌,NK/淋巴细胞活化杀伤(LAK)抗肿瘤细胞毒性。

[0106] 在一些实施方式中,这些活性变体还包含如本文所述的在125位上的取代。

[0107] 靶向部分

[0108] 所述嵌合构建体还包含靶向部分,所述靶向部分能够使IL-2靶向炎性组织。

[0109] 特别地,所述靶向部分结合氧化蛋白质或氧化脂质。在本发明的上下文中,所述氧化蛋白质或氧化脂质见于炎性组织中。在一个特定的实施方式中,所述靶向部分结合促成炎症或参与炎性应答的氧化蛋白质或氧化脂质。在一个特定的实施方式中,所述靶向部分结合由氧化损伤和炎症诱导和/或促成氧化损伤和炎症的氧化蛋白质或氧化脂质。

[0110] 在一个特定的实施方式中,所述靶向部分结合促炎性氧化蛋白质或氧化脂质。“促炎性”意指氧化蛋白质或脂质是炎症的阳性介体。例如,促炎性蛋白质或脂质可以诱导炎性

细胞因子的分泌和/或效应细胞如单核细胞和巨噬细胞的募集。炎性细胞因子是一种由辅助性T细胞(Th)和巨噬细胞等免疫细胞以及某些其它促进炎症的细胞类型分泌的信号传导分子。它们包括白介素-1(IL-1)、IL-12和IL-18,肿瘤坏死因子α(TNF-α),干扰素γ(IFNγ),或粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。

[0111] 在一个特定的实施方式中,所述氧化蛋白质或氧化脂质参与或触发无菌炎症。"无菌炎症"是一种在没有任何微生物的情况下发生的炎症,并且是由响应于组织损伤局部释放的损伤相关分子模式(DAMP)引起。DAMP是通常不被免疫系统感知,但在组织损伤时被释放或被修饰成改变的自体分子的细胞内和细胞外宿主衍生分子。与病原体诱导的炎症类似,无菌炎症是通过以模式识别受体(PRR)识别DAMP来激活先天免疫应答,从而增强细胞因子和趋化因子的分泌而触发。膜结合PRR如Toll样受体(TLR)和细胞内PRR如发炎体是无菌炎症的关键介体。已经提出属于白介素-1(IL-1)家族的细胞因子是无菌炎症的重要驱动因素。初始损伤部位的细胞因子和趋化因子分泌增加最终导致免疫细胞如中性粒细胞和巨噬细胞的募集增强。无菌炎症的消退应该导致组织修复和重建体内平衡。未消退的无菌炎症牵涉若干种医学疾患如自身免疫疾病、痛风、阿尔茨海默病和动脉粥样硬化的发展。

[0112] 在一个特定的实施方式中,所述靶向部分结合"氧化特异性表位"(OSE)。所述氧化特异性表位(OSE)存在于如上文所定义的氧化蛋白质或氧化脂质上。

[0113] 细胞产生反应性氧物质(ROS),其生物学效果取决于所产生的量。在低浓度下,ROS参与增殖、分化和细胞代谢,而在高浓度下,它们参与促进微生物消除的中性粒细胞胞外陷阱(NET)的形成。响应于某些外源和内源刺激如炎症,这种平衡会被破坏,导致参与氧化应激的ROS积累,从而导致DNA、RNA、蛋白质和脂质发生不可逆的变化。氧化应激的一个主要后果是脂质过氧化,由此产生了许多高反应性分解产物,这些产物又与脂质、载脂蛋白和蛋白质反应,从而形成了稳定的共价加合物并产生了"氧化特异性表位"(OSE)。OSE可被识别为分离的脂质或与蛋白质共价缔合。OSE的实例包括氧化磷脂(OxPL)。关于综述和实例,参见例如Binder等,(2016)Nat Rev Immunol,16(8):485-97。通过用截短的磷脂如氧化磷脂酰胆碱、氧化心磷脂(OxCL)、氧化磷脂酰丝氨酸(OxPS)和氧化磷脂酰乙醇胺(OxPE)修饰蛋白质,可以生成OSE。OSE的其它实例包括丙二醛(MDA)表位、2-(ω-羧基乙基)吡咯(CEP)表位和4-羟基壬烯醛(4-HNE)表位。

[0114] 氧化脂蛋白中以及死亡细胞和循环微粒表面上都有OSE的记录,并且已经证明了它们能够触发强烈的促炎应答(Tsiantoulas等(2015),循环微粒携带氧化特异性表位且被天然IgM抗体识别(Circulating microparticles carry oxidation-specific epitopes and are recognized by natural IgM antibodies)1.J.Lipid Res.56,440-448)。特别地,"模式识别受体"(PRR)识别被视为病原体相关分子模式("PAMP")的OSE,将诱导促炎性细胞因子的表达以及单核细胞和巨噬细胞等细胞效应子的激活(Miller等(2011).氧化特异性表位是被先天免疫模式识别受体识别的危险相关分子模式(Oxidation-Specific Epitopes are Danger Associated Molecular Patterns Recognized by Pattern Recognition Receptors of Innate Immunity).Circ.Res.108,235-248.)。

[0115] 由于它们在炎性疾患中积累,因此OSE修饰的蛋白质或脂质可以用作靶标,用于使IL-2部分靶向炎性组织。

[0116] 在一个特定的实施方式中,所述靶向部分结合OSE,其中所述OSE是:丙二醛(MDA)

表位;2-(ω-羧基乙基)吡咯(CEP)表位;4-羟基壬烯醛(4-HNE)表位、氧化磷脂(OxPL)、含磷酸胆碱的氧化磷脂(PC-OxPL)、氧化磷脂酰乙醇胺(OxPE)、氧化磷脂酰丝氨酸(OxPS)或氧化心磷脂(OxCL)。

[0117] 在一个优选实施方式中,所述靶向部分结合氧化磷脂(OxPL)。

[0118] 优选地,所述靶向部分结合含磷酸胆碱的氧化磷脂(PC-OxPL)。具有磷酸胆碱头部基团的氧化磷脂被证明是高度促炎性的和促动脉粥样硬化性的,都由氧化损伤和炎症诱导并传播氧化损伤和炎症。它们存在于多种炎性疾病中,包括动脉粥样硬化、类风湿性关节炎、糖尿病性肾病、包括多发性硬化症在内的CNS疾病,以及急慢性肺病谱。

[0119] 在一个特定的实施方式中,所述靶向部分是抗体或抗体片段,如Fab、Fab'、F(ab')2、Fv或scFv片段。

[0120] 在一个优选实施方式中,所述靶向部分是scFv片段。事实上,scFv片段缺乏Fc结构域,因此具有沉默效应功能。

[0121] 在一个特定的实施方式中,所述靶向部分选自:E06抗体或E06抗体片段,如E06 scFv;LR04抗体或LR04抗体片段,如LR04 scFv;NA17抗体或NA17抗体片段,如NA17 scFv;E014抗体或E014抗体片段,如E014 scFv;MDA2抗体或MDA2抗体片段,如MDA2 scFv;IK17抗体或IK17抗体片段,如IK17 scFv;以及LR01抗体或LR01抗体片段,如LR01 scFv。

[0122] 在一个优选实施方式中,所述靶向部分是E06抗体或E06抗体片段,如E06抗体的Fab、Fab'、F(ab')2、Fv或scFv片段,或其功能变体。E06是从载脂蛋白E缺陷小鼠(apoE-/-)克隆的天然IgM自身抗体,它结合氧化磷脂而非正常磷脂的磷酸胆碱(PC)头部基团(Friedman等(2001),抗磷脂抗体识别与合成氧化磷脂结构的相关性:希夫碱形成和醛醇缩合的重要性(Correlation of antiphospholipid antibody recognition with the structure of synthetic oxidized phospholipids:Importance of Schiff base formation and Aldol condensation).J Biol Chem.;277:7010-7020)。有趣的是,E06在结构和功能上与来源于B-1细胞且据报告可最佳地预防强毒性肺炎球菌感染的经典"天然"小鼠T15抗PC抗体相同。

[0123] 在一个特定的实施方式中,所述靶向部分是E06 scFv或其功能变体。

[0124] 术语"功能变体"或"衍生物"表示通过缺失、取代或插入一个或若干个氨基酸而与亲本序列不同但基本上不影响抗体或其片段的功能的序列。优选地,所述功能变体显示与天然序列具有75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或至少99%同一性。抗体或其片段的功能变体相对于参考抗体具有类似的抗原结合亲和力(例如,KD小于1×10^{-7}M、10^{-8}M,优选小于1×10^{-9}或1×10^{-10}M)。结合亲和力由术语缔合速率常数(ka)、解离速率常数(kd)或平衡解离(KD)来定义。通常,特异性结合在用于抗体时是指特异性结合("识别")其靶标的抗体,亲和力(KD)值小于10^{-7}M,优选小于10^{-8}M,例如小于10^{-9}M或10^{-10}M。KD值越低表示结合亲和力越高(即结合越强),因此KD值为10^{-9}表示结合亲和力高于KD值为10^{-8}时。

[0125] 在一个特定的实施方式中,所述E06 scFv包含:

[0126] -包含如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:12具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或至少99%同一性的氨基酸序列或者由其组成的可变重链(VH)结构域;以及

[0127] -包含如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:11具有至少75%、80%、

85％、90％、95％、96％、97％、98％或至少99％同一性的氨基酸序列或者由其组成的可变轻链(VL)结构域。

[0128] 在一个特定的实施方式中,E06 scFv的VH结构域和VL结构域通过氨基酸接头融合。术语“接头”是指包含5至80个氨基酸,优选包含5至30个,更优选包含10至20个氨基酸的(多)肽。合适的接头是本领域已知的。在一些实施方式中,所述接头包含GGGGS(SEQ ID NO:8)重复序列。由小的非极性(例如Gly)或极性(例如Ser或Thr)氨基酸构成的接头提供了柔性,并允许连接功能结构域移动。在一个优选实施方式中,所述接头是SEQ ID NO:14的接头或氨基酸序列与SEQ ID NO:14具有至少75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或至少99％同一性的接头。

[0129] 在一个特定的实施方式中,E06 scFv片段包含如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:13具有至少75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或至少99％同一性的氨基酸序列或者由其组成。

[0130] 在另一个特定的实施方式中,所述靶向部分是LR04抗体或LR04抗体片段,如LR04抗体的Fab、Fab’、F(ab’)2、Fv或scFv片段,或其功能变体。LR04是一种从摄取致动脉粥样硬化饮食的小鼠Ldlr-/-脾脏克隆的针对MDA表位的单克隆IgM抗体(Amir等,丙二醛表位的肽模拟表位在心血管疾病中的临床应用(Peptide mimotopes of malondialdehyde epitopes for clinical applications in cardiovascular disease).J Lipid Res.2012;53:1316-1326)。

[0131] 在另一个特定的实施方式中,所述靶向部分是NA17抗体或NA17抗体片段,如NA17抗体的Fab、Fab’、F(ab’)2、Fv或scFv片段,或其功能变体。NA17是一种从B-1细胞重构Rag1-/-小鼠的脾脏克隆的MDA特异性天然mAb(Chou等,氧化特异性表位是小鼠和人类先天天然抗体的主要靶标(Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans).J Clin Invest.2009;119(5):1335-1349)。

[0132] 在另一个特定的实施方式中,所述靶向部分是E014抗体或E014抗体片段,如E014抗体的Fab、Fab’、F(ab’)2、Fv或scFv片段,或其功能变体。E014是一种从动脉粥样硬化Apoe-/-小鼠的脾脏克隆的单克隆IgM NAb,已被证明结合MDA表位(Palinski等(1996).从载脂蛋白E缺陷小鼠克隆针对氧化脂蛋白表位的单克隆自身抗体.在人血浆中展示氧化低密度脂蛋白的表位(Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice.Demonstration of epitopes of oxidized low density lipoprotein in human plasma.).J.Clin.Invest.98,800-814)。

[0133] 在另一个特定的实施方式中,所述靶向部分是MDA2抗体或MDA2抗体片段,如MDA2抗体的Fab、Fab’、F(ab’)2、Fv或scFv片段,或其功能变体。MDA2是MDA-赖氨酸表位特异性鼠类单克隆IgG型抗体。它特异性结合MDA-LDL和其它MDA修饰的蛋白(Rosenfeld等(1990).氧化特异性脂质-蛋白质加合物和载脂蛋白B在WHHL兔的不同严重程度的动脉粥样硬化病变中的分布(Distribution of oxidation specific lipid-protein adducts and apolipoprotein B in atherosclerotic lesions of varying severity from WHHL rabbits).Arteriosclerosis.;10:336-349)。

[0134] 在另一个特定的实施方式中,所述靶向部分是IK17抗体或IK17抗体片段,如IK17

抗体的Fab、Fab'、F(ab')2、Fv或scFv片段,或其功能变体。IK17是一种结合MDA-LDL和铜OxLDL的人单克隆IgG抗体片段(Shaw等(2001).人源性抗氧化LDL自身抗体阻断巨噬细胞摄取氧化LDL并在体内定位于动脉粥样硬化病变(Human-derived anti-oxidized LDL autoantibody blocks uptake of oxidized LDL by macrophages and localizes to atherosclerotic lesions in vivo).Arterioscler Thromb Vasc Biol.;21:1333-1339)。IK17是从对MDA-LDL具有高血浆自身抗体滴度的冠状动脉病患者的噬菌体展示文库中分离的。由于IK17是人自身抗体,因此它相较于鼠类抗体具有诸多潜在优点,包括改善药代动力学和减少免疫反应。

[0135] 在另一个特定的实施方式中,所述靶向部分是LR01抗体或LR01抗体片段,如LR01抗体的Fab、Fab'、F(ab')2、Fv或scFv片段,或其功能变体。LR01是从动脉粥样硬化Ldlr-/-小鼠脾脏分离的生殖系编码NAb。发现LR01针对氧化心磷脂而非天然心磷脂(Tuominen等(2006).氧化心磷脂的天然抗体结合氧化低密度脂蛋白、凋亡细胞和动脉粥样硬化病变(A natural antibody to oxidized cardiolipin binds to oxidized low-density lipoprotein,apoptotic cells,and atherosclerotic lesions).Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.26,2096-2102)。

[0136] 具有二聚特性的可选部分

[0137] 包含IL-2部分和靶向部分的本发明的嵌合构建体可任选地包含具有多聚特性的部分,即能够形成多聚体蛋白质的片段或部分。

[0138] 优选地,包含IL-2部分和靶向部分的本发明的嵌合构建体可任选地包含具有二聚特性的部分,即能够形成二聚体蛋白质的片段或部分。

[0139] 例如,所述嵌合构建体还可包含IgG的Fc片段或其功能变体,其能够形成至少一种二聚体例如同二聚体或异二聚体、三聚体、四聚体或含有不同数量的嵌合构建体的任何多聚体。

[0140] 在一个特定的实施方式中,包含IL-2部分和靶向部分的本发明的嵌合构建体可任选地包含能够形成二聚体蛋白质的C4b结合蛋白的β链(C4BPβ)或其至少一个片段或功能变体。

[0141] C4BPβ或C4BPβ片段

[0142] C4BP蛋白参与凝血和补体系统。C4BP的主要形式由7个相同的75kDα链和一个45kDβ链构成。α链和β链分别含有8个和3个短共有重复序列(SCR)结构域,这些基序见于许多补体调节蛋白并由组织成β折叠的50至70个氨基酸构成。人C4BP的β链的氨基酸序列显示为SEQ ID NO:3。

[0143] Hillarp和Dahlback(1990,PNAS,第87卷,第1183-1187页)也描述了与该多肽序列相对应的核酸序列。Kask等(Biochemistry 2002,41,9349-9357)研究了α链在C4BP蛋白聚合中的作用。这些作者已经证明,当α链在异源系统中表达时,α链的C端部分,特别是其螺旋结构和存在的两个半胱氨酸,是C4BP蛋白聚合所必需的。

[0144] 欧洲专利申请2 227 030描述了通过使用与目标多肽融合的C4BP蛋白α链和β链C端片段来生产异多聚体重组蛋白。美国专利7,884,190描述了C4BP蛋白β链的使用,与其和C4BP蛋白α链联合用于生产二聚体蛋白质无关。

[0145] 有利地,用于进行本发明的C4BP蛋白是人C4BP蛋白。

[0146] 在一个优选实施方式中,所述嵌合构建体含有包含至少氨基酸194至252(SEQ ID NO:4)或由其组成的C4BPβ链片段。

[0147] 还可以使用编码β链的较长片段或甚至整个β链的序列。对于某些应用,优选避免使用编码能够结合参与凝血的S蛋白的β链的序列。如果所选序列编码含有β链的两个第一SCR基序的片段,则这些将优选根据型式通过氨基酸添加、缺失或取代而发生突变,以切断与S蛋白相互作用的可能性。可以添加SCR基序和/或[GS]结构域以调节,例如增加所得融合多肽的柔性,或允许嵌合蛋白质采用合适的构象以形成多聚体,特别是二聚体。

[0148] 可以使用C4BPβ的在N端至多延伸到氨基酸135的较长片段。

[0149] 在一个特定的实施方式中,C4BPβ链片段可以包含至少氨基酸185至252、180至252、175至252、170至252、165至252、160至252、155至252、150至252、145至252、140至252或135至252(相对于SEQ ID NO:3)或由其组成。

[0150] 在一个特定的实施方式中,C4BPβ链片段包含至少氨基酸137至252(SEQ ID NO:5)或由其组成。

[0151] 可以使用C4BPβ的功能变体。所述功能变体保持了形成至少一种二聚体例如同二聚体或异二聚体、三聚体、四聚体或含有不同数量的嵌合蛋白质的任何多聚体的能力。

[0152] 在本发明的上下文内,术语“C4BPβ链片段的功能变体”意指使用本发明的方法,通过缺失、取代或添加一个或多个氨基酸对β链片段的序列进行修饰的多肽序列,然而,所述修饰的序列保留了形成至少一种二聚体蛋白质的能力。更确切地,使用编码所述片段的功能变体的序列产生的二聚体蛋白质可等于在相同表达系统中用编码所述片段的天然序列(SEQ ID NO:3或其片段)得到的二聚体蛋白质的至少80%,优选至少90%,更优选95%。优选地,所述变体使其含有的融合多肽的超过80%在根据本发明的真核表达系统中以二聚体的形式产生。

[0153] 在一个特定的实施方式中,β链片段的变体由能够在严格条件下与编码所述片段的野生型序列杂交的核酸编码,如Hillarp和Dahlback(1990,PNAS,第87卷,第1183-1187页)所述。

[0154] 术语“严格条件”意指允许两个单链DNA序列在约65℃下,例如在6*SSC溶液和0.5% SDS、5*Denhardt溶液和100μg非特异性DNA或任何其它具有等效离子强度的溶液中并且在65℃下,例如在至多0.2*SSC溶液和0.1% SDS或任何其它具有等效离子强度的溶液中洗涤后进行特异性杂交的条件。

[0155] 优选地,编码所述野生型片段的功能变体并在严格条件下与编码所述片段的序列杂交的核苷酸序列在杂交部分中的长度是编码所述片段的序列的长度的至少50%,优选是至少80%。在一个特定的实施方式中,编码所述片段的功能变体并在严格条件下与编码所述片段的序列杂交的核苷酸序列在杂交部分中的长度与编码所述片段的序列基本相同。

[0156] 在另一个实施方式中,功能变体是野生型片段的修饰序列,其中对二聚功能不必要的一个或多个氨基酸已被去除或取代,和/或二聚所必需的一个或多个氨基酸已被具有等效官能团的氨基酸代替(保守取代)。特别建议保留位于201位和215位的两个半胱氨酸以及这些半胱氨酸周围的肽结构,以允许形成二聚所必需的二硫桥,例如,通过保留每个半胱氨酸上游和下游的至少3个氨基酸。特别地,通过在负责二聚的半胱氨酸之间插入β链的异源序列,特别是C4BP的α链的结构域,或者相反,通过去除这些相同半胱氨酸之间存在的某

些氨基酸,也可以得到功能变体。或者,通过对二聚过程中牵涉的某些氨基酸进行点修饰,特别是用中性氨基酸(例如氨基酸A、V、F、P、M、I、L和W)取代负责二聚的半胱氨酸,同时用半胱氨酸取代另一个氨基酸以保留在半胱氨酸之间形成链内和/或链间二硫桥的能力,可以产生功能变体。因此,这些修饰导致参与多聚过程,特别是二聚的各个半胱氨酸之间距离发生了变化。

[0157] 优选地,除去或代替194至252片段的氨基酸的不到50%,优选不到25%或甚至不到10%(例如5个以下氨基酸)或不到5%(例如1个或2个氨基酸)。

[0158] 在一个特定的实施方式中,所述功能变体包含以下各物或由其组成:

[0159] a)C4BPβ片段(优选194-252片段)的修饰序列,其中所述片段(优选194-252片段)的氨基酸的少于25%,优选少于10%已被切掉或代替,其中位于202位和216位的半胱氨酸(相对于SEQ ID NO:3的编号)以及每个半胱氨酸上游和下游的至少3个氨基酸得以保留;或

[0160] b)C4BPβ片段(优选194-252片段)的修饰序列,其中负责二聚的半胱氨酸被优选选自丙氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和色氨酸的氨基酸取代,并且所述片段的另一个氨基酸被半胱氨酸取代;或

[0161] c)通过在负责二聚的半胱氨酸之间插入与β链异源的序列进行了修饰的C4BPβ片段(优选194-252片段)的序列;或

[0162] d)通过切掉负责二聚的半胱氨酸之间的氨基酸进行了修饰的C4BPβ片段(优选194-252片段)的序列。

[0163] 嵌合构建体

[0164] 优选地,所述嵌合构建体的IL2部分和靶向部分彼此融合。所述IL2部分可以融合到所述靶向部分的N端或C端。在一个优选实施方式中,所述IL-2部分融合到所述靶向部分的N端。优选地,所述IL-2部分的C端融合到所述靶向部分的N端。

[0165] 所述IL2部分和所述靶向部分可以框内融合(直接)或通过氨基酸接头,优选通过polyG接头融合。在本发明的上下文中,术语"接头"是指包含5至80个氨基酸,优选包含5至30个氨基酸,更优选包含10至20个氨基酸的(多)肽。合适的接头是本领域已知的。在一些实施方式中,所述接头包含GGGGS(SEQ ID NO:8)重复序列,但本领域技术人员应认识到还可以使用遵循一般建议的其它序列(Argos,1990,JMol Biol.20;211(4):943-58;George R,Heringa J.蛋白质结构域接头的分析:其分类和在蛋白质折叠中的作用(An analysis of protein domain linkers:their classification and role in protein folding).Protein Eng.2002;15:871-879)。由小的非极性(例如Gly)或极性(例如Ser或Thr)氨基酸构成的接头提供了柔性,并允许连接功能结构域移动。在一个优选实施方式中,所述IL2部分和所述靶向部分通过SEQ ID NO:14的接头或氨基酸序列与SEQ ID NO:14具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或至少99%同一性的接头连接。

[0166] 在一个特定的实施方式中,所述嵌合构建体还包含具有二聚特性的部分,如C4BPβ或其功能片段,如上所述。这种嵌合构建体优选形成同二聚体,或可用于产生异二聚体,如下所述。在一个特定的实施方式中,(i)所述IL2部分、(ii)所述靶向部分和(iii)所述具有二聚特性的部分彼此框内融合(直接)或通过氨基酸接头融合。

[0167] 在一个优选实施方式中,所述IL-2部分融合在C4BPβ或其所述功能片段的N端。优选地,所述IL-2部分通过氨基酸接头,优选通过polyG接头融合在C4BPβ或其所述功能片段

的N端。在一些实施方式中,所述IL-2部分经由包含GGGGS(SEQ ID NO:8)重复序列的接头,优选经由SEQ ID NO:14的接头或氨基酸序列与SEQ ID NO:14具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或至少99%同一性的接头与C4BPβ部分融合。

[0168] 在一个特定的实施方式中,对应于与C4BPβ部分融合的IL-2部分("IL2-C4BPβ")的氨基酸序列包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10或由其组成。

[0169] 在一个优选实施方式中,所述IL-2部分的C端融合在C4BPβ或其所述功能片段的N端,其中所述C4BPβ或其所述片段的C端与所述靶向部分的N端连接。

[0170] 在一个特定的实施方式中,所述嵌合构建体从N端到C端包含:

[0171] IL-2部分;

[0172] 任选的接头;以及

[0173] 靶向部分。

[0174] 在一个优选实施方式中,所述嵌合构建体从N端到C端包含:

[0175] IL-2部分;

[0176] 任选的接头;

[0177] 具有二聚特性的部分,如C4BPβ或其功能片段;

[0178] 任选的接头;以及

[0179] 靶向部分。

[0180] 在一个优选实施方式中,所述嵌合构建体包含SEQ ID NO:15至20的氨基酸序列或由其组成,或者包含与SEQ ID NO:15至20具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或至少99%同一性的氨基酸序列或由其组成。在一个优选实施方式中,所述嵌合构建体包含SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:17的氨基酸序列或由其组成,或者包含与SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:17具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或至少99%同一性的氨基酸序列或由其组成。

[0181] 在另一个特定的实施方式中,所述嵌合构建体从N端到C端包含:

[0182] 靶向部分;

[0183] 任选的接头;以及

[0184] IL-2部分。

[0185] 在一个优选实施方式中,所述嵌合构建体从N端到C端包含:

[0186] 靶向部分;

[0187] 任选的接头;

[0188] 具有二聚特性的部分,如C4BPβ或其功能片段;

[0189] 任选的接头;以及

[0190] IL-2部分。

[0191] 同二聚体和异二聚体构建体

[0192] 本文描述了一种生产重组二聚体蛋白质的方法,所述方法包括:

[0193] a)用允许表达编码嵌合构建体的核苷酸序列的载体转染宿主细胞,所述嵌合构建体是融合多肽,其包含i)至少一个白介素2(IL2)部分,ii)能够形成二聚体蛋白质的部分,如C4b结合蛋白的β链(C4BPβ)或其至少一个片段或功能变体,以及iii)至少一个如上所述的靶向部分;

[0194] b)在适合表达编码所述融合多肽的核苷酸序列并且适合两个融合多肽在体内共价缔合形成二聚体蛋白质的条件下培养转染的细胞;

[0195] c)回收并优选纯化所形成的二聚体蛋白质。

[0196] 转染的细胞优选不含任何允许表达编码参与C4BP蛋白聚合的C4BP蛋白α链C端片段的核苷酸序列的核酸。

[0197] 在一个特定的实施方式中,本文描述了一种产生异二聚体的方法,所述方法包括:

[0198] a.用一个或多个载体转染宿主细胞以允许表达一个或多个核苷酸序列,所述核苷酸序列编码:

[0199] i.第一融合多肽,其包含i)至少一个白介素2(IL2)部分,和ii)能够形成二聚体蛋白质的部分,如C4b结合蛋白的β链(C4BPβ)或其至少一个片段或功能变体;以及

[0200] ii.第二融合多肽,其包含i)至少一个如上所述的靶向部分,如E06scFv或其功能变体,和ii)能够形成二聚体蛋白质的部分,如C4b结合蛋白的β链(C4BPβ)或其至少一个片段或功能变体;

[0201] b.在适合表达一个或多个编码所述第一融合多肽和第二融合多肽的核苷酸序列并且适合两个融合多肽在体内缔合形成异二聚体蛋白质的条件下培养转染的细胞;

[0202] c.回收并优选纯化所形成的异二聚体蛋白质..

[0203] 在一个特定的实施方式中,本文描述了一种产生异二聚体的方法,所述方法包括:

[0204] a.用一个或多个载体转染宿主细胞以允许表达一个或多个核苷酸序列,所述核苷酸序列编码:

[0205] i.第一融合多肽,其包含i)至少一个白介素2(IL2)部分,ii)能够形成二聚体蛋白质的部分,如C4b结合蛋白的β链(C4BPβ)或其至少一个片段或功能变体,和iii)至少一个如上所述的靶向部分,如E06 scFv或其功能变体;以及

[0206] ii.第二融合多肽,其包含i)至少一个异源多肽,其中所述异源多肽定义为与所述第一融合多肽的白介素2(部分)不同,ii)能够形成二聚体蛋白质的部分,如C4b结合蛋白的β链(C4BPβ)或其至少一个片段或功能变体,和iii)任选的至少一个如上所述的靶向部分,如E06 scFv或其功能变体;

[0207] b.在适合表达一个或多个编码所述第一融合多肽和第二融合多肽的核苷酸序列并且适合两个融合多肽在体内缔合形成异二聚体蛋白质的条件下培养转染的细胞;

[0208] c.回收并优选纯化所形成的异二聚体蛋白质。

[0209] 优选地,在第二融合多肽中,C4BPβ或所述片段融合到异源多肽的C端末端。

[0210] 当提及异源多肽时,术语“不同”意指一级氨基酸序列与第一融合多肽的白介素2(部分)的一级序列有至少一个氨基酸不同的多肽。或者,术语“不同”还涵盖具有相同的一级序列但具有不同的翻译后修饰的异源多肽,所述翻译后修饰是例如就乙酰化、酰胺化、生物素化、羧基化、羟基化、甲基化、磷酸化或磺酸化而言或者通过添加脂质(异戊烯基化、棕榈酰化和肉豆肉酰化)、糖类(糖基化)或多肽(泛素化)进行。

[0211] 在一个优选实施方式中,所述异源多肽不是IL2。

[0212] 这些异二聚体蛋白质也是本发明的一部分。

[0213] 在一个特定的实施方式中,宿主细胞允许共表达两种融合多肽:第一融合多肽A,其包含i)至少一个白介素2(IL2)部分,ii)能够形成二聚体蛋白质的C4b结合蛋白β链(C4BP

β)或其至少一个片段或功能变体,和iii)至少一个如上所述的靶向部分,如E06 scFv或其功能变体;以及第二融合多肽A,其包含i)至少一个白介素2(IL2)部分,ii)能够形成二聚体蛋白质的C4b结合蛋白β链(C4BPβ)或其至少一个片段或功能变体,和iii)至少一个如上所述的靶向部分,如E06 scFv或其功能变体。在这个特定的实施方式中,共表达两种融合多肽还可允许产生同二聚体A-A。

[0214] 在一个特定的实施方式中,宿主细胞允许共表达两种融合多肽:第一融合多肽A,其包含i)至少一个白介素2(IL2)部分,ii)能够形成二聚体蛋白质的C4b结合蛋白β链(C4BPβ)或其至少一个片段或功能变体,和iii)至少一个如上所述的靶向部分,如E06 scFv或其功能变体;以及第二融合多肽B,其包含i)至少一个异源多肽,ii)能够形成二聚体蛋白质的C4b结合蛋白β链(C4BPβ)或其至少一个片段或功能变体,和iii)至少一个如上所述的靶向部分,如E06 scFv或其功能变体;其中所述异源多肽定义为与所述第一融合多肽的白介素2(部分)不同。在这个特定的实施方式中,共表达两种融合多肽还可允许产生同二聚体A-A和B-B以及产生异二聚体A-B。

[0215] 还提供了一种重组真核细胞,所述重组真核细胞允许合成如上文所定义的二聚体或异二聚体蛋白质,并且可通过进行上文所定义的生产方法的步骤a)来得到。下文描述了在宿主细胞中生产的更多细节。

[0216] 生产方法

[0217] 融合蛋白形式的嵌合构建体以及同二聚体或异二聚体可通过DNA重组技术在合适的表达载体中或通过RNA分子生产。

[0218] 表达载体根据引入所述构建体的宿主细胞的功能来选择。优选地,所述表达载体选自允许在真核细胞中表达的载体,尤其是选自染色体载体或附加型载体或病毒衍生物,特别是来源于质粒、酵母染色体或来源于杆状病毒、乳多泡病毒或SV40、逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒或其组合等病毒的载体,特别是噬菌粒和粘粒。在一个特定的实施方式中,它是允许表达能够感染昆虫细胞的杆状病毒的载体。

[0219] 必要时,编码所述融合多肽的序列还优选在其5'部分包含编码用于分泌融合多肽的信号肽的序列。通常,信号肽的序列是15至20个氨基酸的序列,富含疏水性氨基酸(Phe、Leu、Ile、Met和Val)。

[0220] 所述载体包含表达编码所述融合多肽的序列所必需的所有序列。特别地,它包含根据将要引入所述构建体的宿主细胞的功能选择的合适的启动子。

[0221] 在本发明的上下文内,术语"宿主细胞"意指能够表达被所述细胞的异源核酸携带并通过转染方法引入该细胞的基因组中的基因的细胞。

[0222] 优选地,宿主细胞是真核细胞。真核宿主细胞特别选自酵母细胞如酿酒酵母(S cerevisiae)、丝状真菌细胞如曲霉属(Aspergillus sp)、昆虫细胞如果蝇S2细胞或夜蛾sf9、哺乳动物细胞和植物细胞。特别可引用的哺乳动物细胞是哺乳动物细胞系,如CHO、COS、HeLa、C127、3T3、HepG2或L(TK-)细胞。在一个优选实施方式中,所述宿主细胞选自真核细胞系,优选Sf9昆虫细胞。美国专利7,884,190中描述了在sf9昆虫细胞中制备重组二聚体蛋白质的方法。技术人员已知的用于生产表达异源核酸的细胞的任何转染方法都可用于进行所述方法的步骤a)。例如,Sambrook等,2001,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold

Spring Harbor,N.Y.中描述了转染方法。

[0223] 或者,可以通过化学肽合成来生产嵌合构建体。例如,可以通过平行合成较短的肽,随后组装以产生具有正确二硫桥的蛋白质的完整序列来生产蛋白质。例如,Asahina等,Angewandte Chemie International Edition,2015,第54卷,第28期,8226-8230中说明了IL-2的合成,所述文献的公开内容通过引用并入本文。

[0224] 在另一个实施方式中,嵌合蛋白可以在对受试者施用编码所述嵌合蛋白的核酸后在体内表达。在一个优选实施方式中,所述核酸由RNA或病毒载体,如腺病毒相关病毒(AAV)携带。

[0225] 制剂和施用途径

[0226] 还提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含如本文所述的嵌合构建体、核酸、载体或蛋白质,优选与药学上可接受的媒剂、载体或赋形剂缔合(例如在溶液、悬浮液或混合物中)。

[0227] 合适的赋形剂包括任何等渗溶液、生理盐水溶液、缓冲溶液、缓释制剂等。液体、冻干或喷雾干燥组合物在本领域中是已知的,并且可制备为水性或非水性溶液或悬浮液。优选地,所述药物组合物包含适当的稳定剂、缓冲剂、增积剂或组合。

[0228] 所述药物组合物还可含有另一种活性成分,或可与任何其它活性成分组合施用。

[0229] 所述药物组合物可使用任何方便的途径,包括肠胃外,例如皮内、皮下或鼻内途径来施用。优选皮下途径。还涵盖口服、舌下或口腔施用。

[0230] 国际专利申请WO2017/068031中描述了适用于皮下注射的制剂的实例。

[0231] 自身免疫病症和/或炎性病症的治疗

[0232] 本文所述的药物组合物可用于治疗自身免疫病症和/或炎性病症的方法,如系统性红斑狼疮、I型糖尿病、HCV相关血管炎、葡萄膜炎、肌炎、系统性血管炎、牛皮癣、过敏、哮喘、克罗恩病、多发性硬化症、类风湿性关节炎、动脉粥样硬化、自身免疫性甲状腺疾病、自身炎性疾病、神经退行性疾病(包括阿尔茨海默病和肌萎缩性侧索硬化症)、急性和慢性移植物抗宿主病、自然流产和同种异体移植物排斥反应;实体器官移植排斥反应、血管炎、炎症性肠病(IBD)和过敏性哮喘;脊柱炎或强直性脊柱炎;斯耶格兰氏综合征(Sjogren's syndrome)、系统性硬化症、斑秃或溃疡性结肠炎。

[0233] 它还适用于需要激活Treg组织再生特性的情况,如肌肉疾病、神经变性、心脏或其它组织梗死。

[0234] 在一个优选实施方式中,本文描述了一种治疗自身免疫病症和/或炎性病症的方法,所述方法包括优选通过皮下途径每周一次或两次、或甚至每月一次或两次施用所述组合物。在一个实施方式中,优选剂量小于30MIU/天,优选小于20MIU/天,有利地小于10MIU/天或者在1MIU/天至8MIU/天之间。在另一个特定的实施方式中,使用1至5MIU/天,优选0.1至3.5MIU/天的剂量。

[0235] 一般而言,优选允许Treg数量增加1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍或5倍的剂量。IL-2量的标准量度是国际单位(IU),从技术上讲,它不是固定的重量,而是如世界卫生组织(WHO)确定的在特定细胞增殖测定中产生固定生物效应的量。原因是i)重量取决于分子的确切序列及其糖基化谱而变化,ii)重要的是活性,而不是分子的重量。

[0236] 确切地说,国际单位的原则是提供一个标准,任何IL-2分子都可以与之相比较(不

考虑其来源或其序列,包括野生型序列或活性变体序列)。

[0237] 在实践方面,WHO提供了含有经过校准并用作确定所给IL-2制剂的由其效力定义的剂量的参考物(同样不考虑所述IL-2的来源或序列)的IL-2分子的安瓿。例如,为了确定所给IL-2制剂的剂量,在使用IL-2依赖性细胞系如CTLL-2的标准细胞增殖测定中测量候选IL-2制剂的生物活性,并与标准物的生物活性进行比较。在存在不同剂量的标准物的情况下使细胞生长。确定IL-2的剂量-反应效应,其中IL-2的剂量作为IU绘制在X轴上,增殖量度(pr)绘制在Y轴上。当想要确定任何未知活性的IL-2产品的活性时,将所述产品用于使IL-2依赖性细胞生长并测量其增殖。然后将pr值绘制在Y轴上,并从该值绘制一条与X轴平行的线。然后从这条线与剂量反应线的交点开始,画一条与Y轴平行的线。它与X轴的交点提供了候选IL-2产品的活性,以IU为单位。

[0238] WHO标准安瓿的任何变化都不会影响国际单位,也不会影响任何IL-2制剂的剂量的确定。

[0239] 第1标准物(WHO国际标准物编码86/504,日期为1987年)含有来源于Jurkat细胞的纯化糖基化IL-2,并且被任意分配100IU/安瓿的效力。随着第1国际标准物(IS)的储备量减少,WHO不得不替换它。WHO提供了另一种经过校准的IL-2安瓿,这次使用大肠杆菌(E.coli)生产。第2标准物安瓿每安瓿含有210IU的生物活性。标准物安瓿的变化并非意指IU变化。因此,无论使用第1标准物安瓿还是第2标准物安瓿,或作为参考物的后续标准物安瓿,确定测试IL-2制剂的剂量都不会变化。

[0240] 在一个实施方式中,实现了长期施用,例如包括每3天施用一次至每三个月施用一次。需要时可以重复这些施用序列。

[0241] 在另一个实施方式中,每隔一天给予IL-2,持续1至2周,在施用中断后可以重复的循环中可以持续3天至3个月,优选一至4周。

[0242] 在另一个实施方式中,所述治疗可包括第一过程,也称为诱导过程,以及第二过程,即维持过程。

[0243] 在一个特定的实施方式中,所述治疗可包括至少第一过程,其中所述药物组合物在连续至少约2或3天内,优选在3至7天内,更优选在连续4至5天内每天施用一次,优选继之以维持剂量,例如在约六天或约1至约4周后。

[0244] 维持剂量通常可在至少一个月,优选至少约3个月,更优选至少约6个月内施用。在一个优选实施方式中,维持剂量施用约3个月至约12个月,优选约6个月至约12个月。

[0245] 在一个优选实施方式中,维持治疗由每周一次或两次、或每一周或两周一次、或每月一次施用所述药物组合物组成。

[0246] 在一个优选实施方式中,维持治疗由在至少一个月,优选约3个月至约12个月期间,每周一次或两次、每一周或两周一次、或每月一次施用白介素-2组成。

[0247] 优选地,所述维持剂量与第一过程剂量基本相同,或者它可以是更低或更高的剂量。

[0248] 癌症的治疗

[0249] 本文所述的药物组合物可用于治疗癌症的方法中。在一些实施方式中,受试者罹患局部晚期或转移性癌症。在一些实施方式中,所述癌症是实体瘤。在一些实施方式中,所述癌症是结肠癌、肺癌、卵巢癌、胃癌、膀胱癌、胰腺癌、子宫内膜癌、乳腺癌、肾癌、食道癌或

前列腺癌。在一个实施方式中,优选剂量小于30MIU/天,优选小于20MIU/天,有利地小于10MIU/天或者在3MIU/天至5MIU/天之间。在其它实施方式中,施用400,000-750,000IU/kg或550,000-750,000IU/kg,优选600,000-700,000IU/kg的IL2。剂量可类似于但预计小于PROLEUKIN®的处方剂量。

[0250] 所述组合物可以每天一次或多次至每周一次或多次施用;包括每隔一天一次。技术人员应了解,某些因素可能影响有效治疗受试者所需的剂量和时间,包括但不限于疾病的严重程度、先前的治疗、受试者的一般健康和/或年龄以及存在的其它疾病。此外,受试者的治疗可包括单一治疗,或可以包括一系列治疗。

[0251] 上文结合自身免疫病症和/或炎性病症所述的方案的实例可以相同或类似地应用于治疗癌症。或者,在另一个实例中,可以每8小时施用所述组合物,持续五天,然后是2至14天(例如9天)的休息期,然后是额外五天的每8小时施用。在一些实施方式中,施用是每4天施用3个剂量。

[0252] 实施例

[0253] 实施例1:体外和体内靶向

[0254] 材料和方法

[0255] 融合蛋白

[0256] 慢病毒载体用于生产IL-2融合蛋白和靶向蛋白。简而言之,在脾脏病灶形成病毒(SFFV)启动子下将与能够结合磷酸胆碱氧化脂质的scFvE06融合的人IL-2-C4bpβ(IL-2-C4bpβ-E06或IL-2N88R-C4bpβ-E06)整合到慢病毒质粒中。“IL-2-C4bpβ-E06”(SEQ ID NO:19)是与C4BPβ的N端融合的人IL-2,C4BPβ与scFVE06的N端融合。“IL-2N88R-C4bpβ-E06”(SEQ ID NO:20)是与C4BPβ的N端融合的突变IL-2,C4BPβ与scFVE06的N端区融合。

[0257] 使用聚乙烯亚胺(PEI)用慢病毒质粒以70%汇合转染HEK 293T细胞,在无血清培养基中培养24至30小时。然后过滤上清液,通过超速离心进行浓缩,重悬在适当的缓冲液中,然后在-80℃保存。为了得到稳定的转染细胞,用慢病毒以不同的感染倍数(MOI)感染HEK 293T细胞,然后对GFP+细胞进行分选,以确保100%的细胞产生IL-2融合蛋白。将稳定的细胞系在无血清培养基中培养48小时,收集上清液,并使用能够进行有效的固相金属亲和色谱(IMAC)纯化的HisPur Ni-NTA树脂(Thermofisher)进行纯化,然后进行浓缩、缓冲液交换和SDS-PAGE验证。

[0258] 对人类的pSTAT5分析

[0259] 健康志愿者的人类血液样品得自法国巴黎圣安托万医院的法国血液研究所(EFS)。获得了每个志愿者的知情同意书。在人CD4+调节性T细胞(Treg;CD4+Foxp3+CD127lo/-)、CD4+常规T细胞(Tconv;CD4+Foxp3-)、CD8+T细胞和自然杀伤细胞(CD3-CD56+)中使用流式细胞术评估人IL-2、融合蛋白和靶向蛋白对诱导STAT5磷酸化(pSTAT5)的效果。将人IL-2、融合蛋白和靶向蛋白的十倍稀释液与100μl全血在37℃混合15分钟,然后使用磷酸化表位暴露试剂盒(PERFIX EXPOSE试剂盒,Beckman Coulter)进行pSTAT5染色。结合细胞内pSTAT5信号,表面标记物允许对不同的淋巴细胞群进行活性比较和计算半最大有效浓度(EC_{50})值。

[0260] ELISA

[0261] 对于靶向蛋白检测,按照与上文所述相同的方案,但涂覆1μg/mL的捕获抗IL-2单

克隆抗体(MQ1-17h12)或磷酸胆碱-BSA(LGC Biosearch technologies),并使用1μg/mL的抗His抗体(1:1000;Thermofisher)进行检测,然后用超灵敏链亲和素-HRP(1:2000;Sigma Aldrich)显示来测量血浆水平和蛋白水平。

[0262] 流式细胞术和抗体

[0263] 全血:

[0264] 在小鼠血液溶血后,在4℃将分离的免疫细胞用以下抗体以预定的最佳稀释度染色20分钟:CD3-PEfluor610(Invitrogen),CD4V500(BD Bioscience),CD8AF700(BD Pharmingen),CD25PeCy7(Invitrogen),NKp46eF660(eBioscience)和CD19eF780(eBioscience)。使用FoxP3染色缓冲液试剂盒(eBioscience FoxP3/Transcription)对经过固定和渗透的细胞进行FoxP3-FITC(eBioscience)的细胞内检测。在cytoflex S(Beckman Coulter)上采集细胞并用FlowJo软件进行分析。通过正向/侧向散射门控排除死细胞。CD4+Treg定义为CD4+CD25+Foxp3+细胞;CD4+Teff定义为CD4+CD25+Foxp3-细胞,也称为Tconv CD4+CD25+;CD8+Treg定义为CD8+CD25+Foxp3+细胞;CD8+Teff也称为Tconv CD8+CD25+,定义为CD8+CD25+Foxp3+细胞;自然杀伤细胞定义为Nkp46+细胞;B细胞定义为CD19+细胞。

[0265] 对于STAT5测定,将人全血与以下抗膜蛋白抗体一起孵育15分钟:CD3-FITC、CD127-PC7、CD4-PB和CD8-KO、CD45RA-AF700和CD56-APC-eFluor780。在固定和渗透后,用细胞内p-STAT5-PE和Foxp3-APC抗体对细胞进行染色。

[0266] 结肠炎炎性实验模型

[0267] 通过在6天内口服施用含2.5%葡聚糖硫酸钠(DSS;Sigma)的饮用水对C57BL/6小鼠进行免疫接种。在10天内每天监测小鼠体重、其大便软硬度和大便中是否有血。以下评分系统用于评估严重程度:

[0268] 体重减轻在0-5%之间:1/5-10%:2/10-15%:3/超过15%:4。

[0269] 大便软硬度:正常大便:0/成形但柔软的大便:1/稀便:2/轻度腹泻:3/水泻:4。

[0270] 大量出血:不存在:0/存在:2/大量出血:4。

[0271] 结果

[0272] 靶向融合蛋白在体外识别其靶标、二聚并维持其生物活性的能力

[0273] 将IL-2构建体与组织选择性部分组合以靶向炎性组织而不改变其功能。详细来说,IL-2-C4bpβ或IL-2_{N88R}-C4bpβ在C4bpβ的C端部分与已知对氧化磷脂如磷酸胆碱(PC)特异的scFvE06融合(图1A)。

[0274] 为了确定靶向蛋白的体外结合,涂覆PC-BSA、抗hIL-2抗体或BSA,然后加入靶向蛋白或scFvE06上清液并使用抗His标签抗体显示(图1B)。在PC-BSA涂覆后,检测到三种构建体,这意味着蛋白质能够结合PC-BSA。此外,在hIL-2涂覆后,仅检测到靶向融合蛋白,这突出了靶向蛋白的良好构象被抗IL-2抗体和抗His抗体识别。最后,在BSA涂覆后观测到未检出靶向蛋白,证实了不存在非特异性结合,并且scFvE06对PC特异。

[0275] 在过滤、纯化和浓缩后,还在SDS-PAGE继之以考马斯蓝染色和免疫印迹后对重组靶向蛋白进行表征(图1C)。在对每种蛋白质进行考马斯染色后,在约98kDa检测到独特的信号,这意味着在非还原条件下样品中只有一种主要蛋白(图1C)。无论它们是由一级抗人IL-2抗体还是一级抗组氨酸抗体显示,在热和还原条件下,都观察到了所述蛋白质在其单体形

式(50kDa)和二聚形式(100kDa)下特有的IL-2-C4bpβ-E06和IL-2_{N88R}-C4bpβ-E06的谱带。此外,除所述条件外,在scFvE06特有的一级抗组氨酸抗体显示后,还观察到每个蛋白质在25kDa处的单个谱带。相比之下,仅使用在17kDa处观察到谱带的一级抗人IL-2抗体来显示天然人IL-2。

[0276] 再次进行测量STAT5磷酸化的人全血测定,以确定靶向融合蛋白对表达IL-2受体的不同细胞类型的影响。天然hIL-2的调节性T细胞EC_{50}是约5ng/mL,IL-2-C4bpβ-E06是约13ng/mL,IL-2_{N88R}-C4bpβ-E06是约650ng/mL,这意味着为了在Treg细胞上得到等效的pSTAT5应答,需要增加3倍的IL-2-C4bpβ-E06和130倍的IL-2_{N88R}-C4bpβ-E06(图1D)。在Tconv、CD8+细胞和NK细胞群体中也观察到了pSTAT5谱差异。

[0277] 事实上,在高达至少1000ng/mL的剂量下,在靶向融合蛋白的情况下观察到pSTAT5应答有所降低,而在100ng/mL的剂量下,在天然hIL-2的情况下在这些效应隔室上得到了应答。例如,响应于约10000ng/mL的IL-2_{N88R}-C4bpβ-E06,不到20%的Tconv、CD8+和NK细胞被激活。这些结果突出了由于与二聚体受体的结合亲和力降低导致的靶向融合蛋白的Treg选择性。

[0278] 靶向融合蛋白在结肠炎炎性实验模型中的功效的证据

[0279] 在结肠炎炎性实验模型中评估了靶向融合蛋白控制疾病严重程度的能力(图2A)。为了得到类似的Treg扩增,将rAAV剂量从IL-2处理组的5.10^{10}rAAV vg调整为scFvE06、IL-2-C4bpβ-scFvE06和IL-2_{N88R}-C4bpβ-scFvE06处理组的5.10^{11}rAAV vg。

[0280] 注射后七天,考虑到CD25 MFI增加了3至4倍,rhIL-2或靶向融合蛋白处理组中的Treg细胞扩增了2.5至3倍并且被激活(图2B)。突变蛋白不扩增效应群体,而hIL-2和IL-2-C4bpβ-scFvE06处理导致效应群体扩增3倍。此外,NK细胞仅在用hIL-2处理的小鼠中扩增,即使剂量低十倍。

[0281] 正如所料,5.10^{11}rAAV vg scFvE06注射后,对这四个参数没有观察到显著变化。

[0282] DSS施用六天后,未经治疗的小鼠出现了重要临床表现,其明显减轻初始体重的约10%,伴有轻度腹泻(大便评分为3.5),大便中有血,说明有严重结肠炎症(图2C、图2D、图2E)。

[0283] 与增加这些症状相对应,疾病活动指数(DAI)从第3天开始增加,直到第10天,并达到8分(满分12分),然后下降,直到第14天(图2F)。相比之下,用scFvE06处理的小鼠具有类似的体重减轻和大便软硬度,但几乎没有出血,这解释了与未处理的小鼠相比,DAI随时间推移略有下降。hIL-2处理部分控制了临床表现,其中体重减轻,大便非常柔软但并非水样而且几乎没有出血,解释了第一次DSS施用后十天的最高DAI评分是5。有趣的是,用靶向融合蛋白处理的小鼠具有明显减少的肠道临床表现,有成形并且部分柔软的大便(最高评分是2),几乎没有出血。最后,在每个靶向融合物组中,DAI从未超过4分,证实了这两种蛋白在治疗结肠炎中的治疗益处。

[0284] 有趣的是,在肱淋巴结和主动脉旁淋巴结中,用靶向融合蛋白处理后,表达通过肠道屏障所需的整合素α4β7的Treg的比例比天然IL-2更高。这些观察结果表明,在靶向蛋白组中,被征募到炎性部位的Treg的数量增加,间接表明用这些靶向蛋白处理的小鼠肠道中的IL-2含量更高,从而突出了IL-2-C4bpβ-scFvE06和IL-2_{N88R}-C4bpβ-scFvE06的靶向能力。同样,与天然IL-2相比,这两组中表达Ki67的Treg更多,意味着这些Treg在这两组中增殖更

多。

[0285] 实施例2:体内药代动力学

[0286] 方法

[0287] PK分析

[0288] 给7周龄雌性C57Bl/6小鼠皮下注射100μl 50KIU人IL-2或IL-2-C4bpβ-scFvE06。在不同的时间点取100μl血液以便通过ELISA得到hIL-2剂量:基线、1小时、2小时、4小时、6小时、8小时、10小时、24小时、48小时。在适当的缓冲液中将血浆样品10倍连续稀释到1/1000。使用供应商推荐进行Elisa,在450nm下读板。使用适当的标准曲线计算两组的hIL-2浓度。

[0289] IL-2-C4bpβ-scFvE06的体内结合

[0290] 牛皮癣模型

[0291] 通过在小鼠耳朵上每日施用5%咪喹莫特乳膏持续6天来诱导小鼠牛皮癣模型。作为内部对照组,按照相同的方案对每只小鼠的对照侧耳朵施用凡士林。在牛皮癣诱导前10天,给8周龄雌性Balb/c小鼠腹膜内注射编码IL-2-C4bpβ-scFvE06的5.10^{11}vg AAV。对照小鼠的牛皮癣未进行处理。在实验结束时,第一次施用后6天,对小鼠实施安乐死,取下耳朵,立即在OCT中冷冻。然后使用低温切片机对耳朵进行8μm横切,之后固定、渗透并用DAPI(核染色)和抗6X-HisTag-Cy5染色以进行IL-2-C4bpβ-scFvE06检测。使用荧光显微镜分析切片。

[0292] DSS诱导的结肠炎模型

[0293] 通过加入含3%葡聚糖硫酸钠的饮用水持续6天来诱导DSS诱导的小鼠结肠炎模型。在结肠炎诱导前10天,给8周龄雌性C57Bl/6小鼠腹膜内注射编码IL2或IL-2-C4bpβ-scFvE06的5.1011vg AAV。加入对照组小鼠并且不加处理。在实验结束时,即诱导后10天,在炎症最严重时,对小鼠实施安乐死,取出结肠,立即在OCT中冷冻。然后使用低温切片机对耳朵进行8μm横切,之后固定、渗透并用抗IL2-HRP或抗6X-HisTag-HRP染色以进行IL-2-C4bpβ-scFvE06检测。与金属增强DAB底物一起孵育后,得到组织化学棕色/黑色着色。

[0294] 结果

[0295] 药代动力学

[0296] 为了确定我们是否增加了分子的半衰期,在经皮下注射50kIU的IL2或IL-2-C4bpβ-scFvE06单次注射后,在小鼠体内进行药代动力学实验(图3)。1小时后IL2快速增加并达到Tmax,然后非常快速地下降,直到10小时,此时几乎无法检测到IL2。另一方面,IL-2-C4bpβ-scFvE06增加较慢,在注射后1小时至4小时达到Tmax。血浆浓度下降也较慢,在24小时仍可检测到分子。该结果表明,IL-2-C4bpβ-scFvE06的半衰期增加,在这种设置下算出增加约3倍。这可能会增加IL-2对Treg的有效持续时间,其中Treg增加保持较长时间。

[0297] IL-2-C4bpβ-scFvE06的体内靶向的概念验证

[0298] 我们开发了2个炎性疾病模型,即牛皮癣和结肠炎。

[0299] 通过对一只耳朵局部施用5%咪喹莫特乳膏来诱导牛皮癣,同时将对照侧耳朵用作炎症的内部对照组并施用凡士林。在这些条件下,一只耳朵出现炎症,其应该会被IL-2-C4bpβ-scFvE06靶向,而另一只耳朵没有出现炎症并且不会被特别靶向。简而言之,在每天施用咪喹莫德和凡士林后6天,对小鼠实施安乐死,取下耳朵,冷冻,进行横切,并用DAPI和

与花菁5荧光染料偶联的抗6X-HisTag染色以进行荧光显微术。尽管未处理的对照组小鼠没有显示任何6X-HisTag染色,凡士林处理的耳朵也没有,咪喹莫特处理的耳朵也没有,但我们在注射了编码IL-2-C4bpβ-scFvE06的AAV的小鼠中观察到我们的分子的染色,全都在出现炎症的耳朵周围。作为相同小鼠的对照组,在凡士林处理的耳朵中未检测到IL-2-C4bpβ-scFvE06,这说明我们的靶向分子在体内特异性结合发炎组织。

[0300] 我们还开发了DSS诱导的结肠炎模型,以便在不同的条件下测试我们的分子(图4)。在饮用水中加入3% DSS持续6天,以诱导结肠炎。在炎症最严重的第10天,对小鼠实施安乐死,取出结肠,冷冻,进行横切,并用与HRP偶联的抗hIL2或抗6X-HisTag进行染色。使用金属增强DAB底物进行免疫组织化学染色,其中在发现所述分子处出现了黑色或深棕色着色。因此,未治疗对照组和IL2治疗组都显示在结肠中没有检测到IL2或6X-HisTag。然而,用IL-2-C4bpβ-scFvE06处理的小鼠显示在结肠中检测到了IL2和6X-HisTag,再次证明了IL-2-C4bpβ-scFvE06在炎性条件下的体内特异性结合。

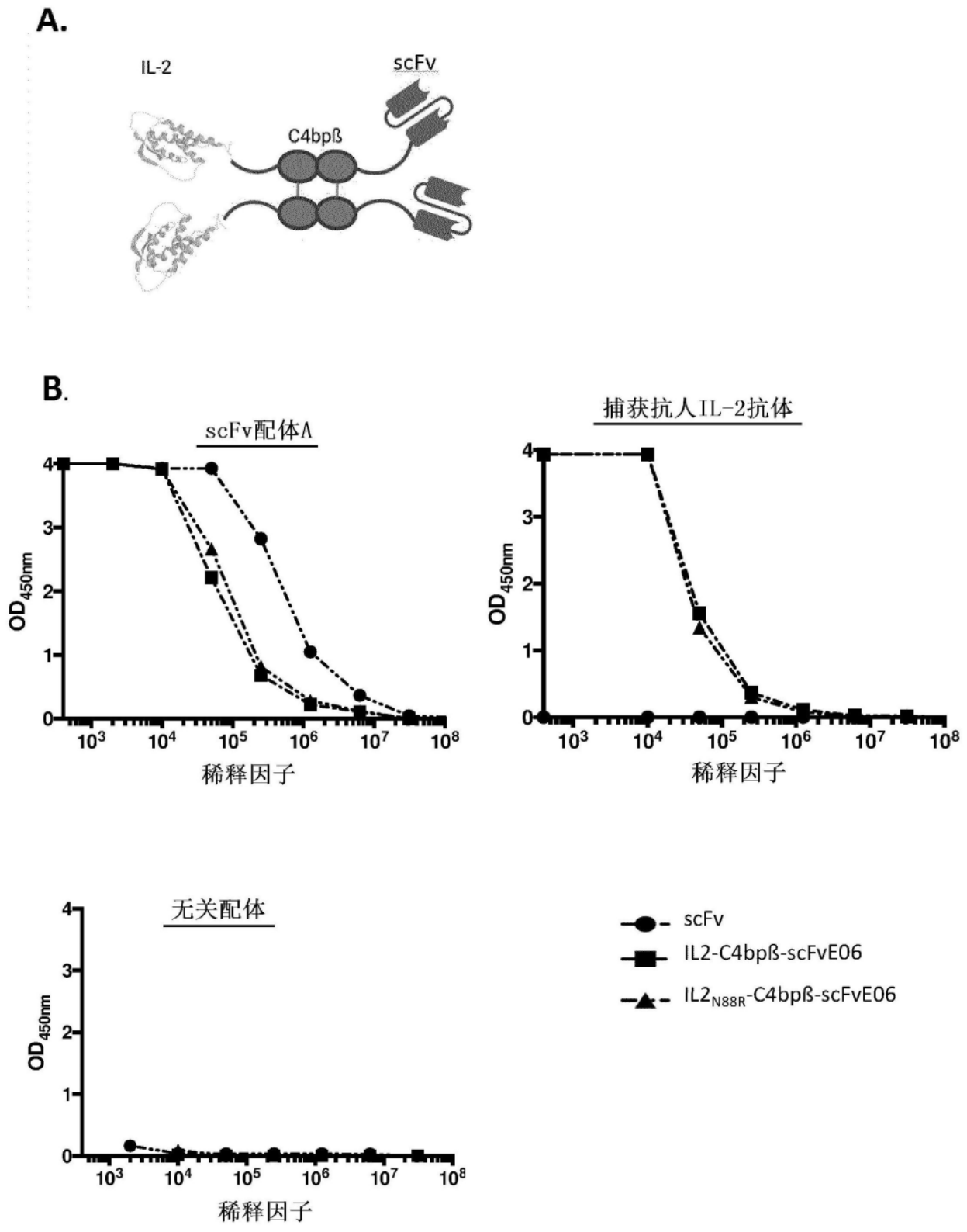

A.
IL-2
scFv
C4bpß
B.
scFv配体A
捕获抗人IL-2抗体
无关配体
OD450nm
稀释因子
scFv
IL2-C4bpß-scFvE06
IL2N88R-C4bpß-scFvE06

图1

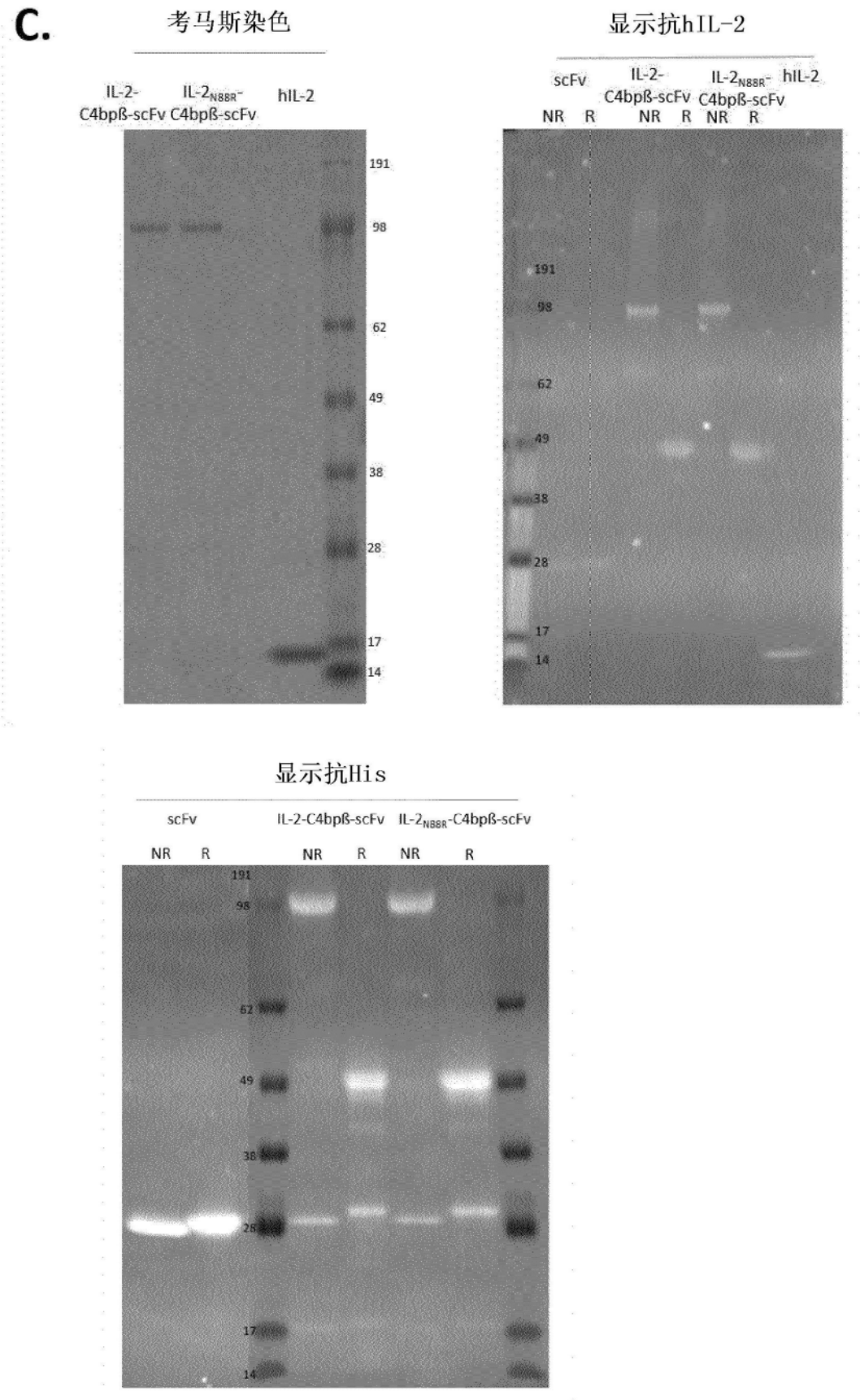

C.
考马斯染色
IL-2-C4bpß-scFv
IL-2N88R-C4bpß-scFv
hIL-2
191
98
62
49
38
28
17
14
显示抗hIL-2
scFv
IL-2-C4bpß-scFv
IL-2N88R-C4bpß-scFv
hIL-2
NR R NR R NR R
191
98
62
49
38
28
17
14
显示抗His
scFv
IL-2-C4bpß-scFv
IL-2N88R-C4bpß-scFv
NR R NR R NR R
191
98
62
49
38
26
17
14

图1(续)

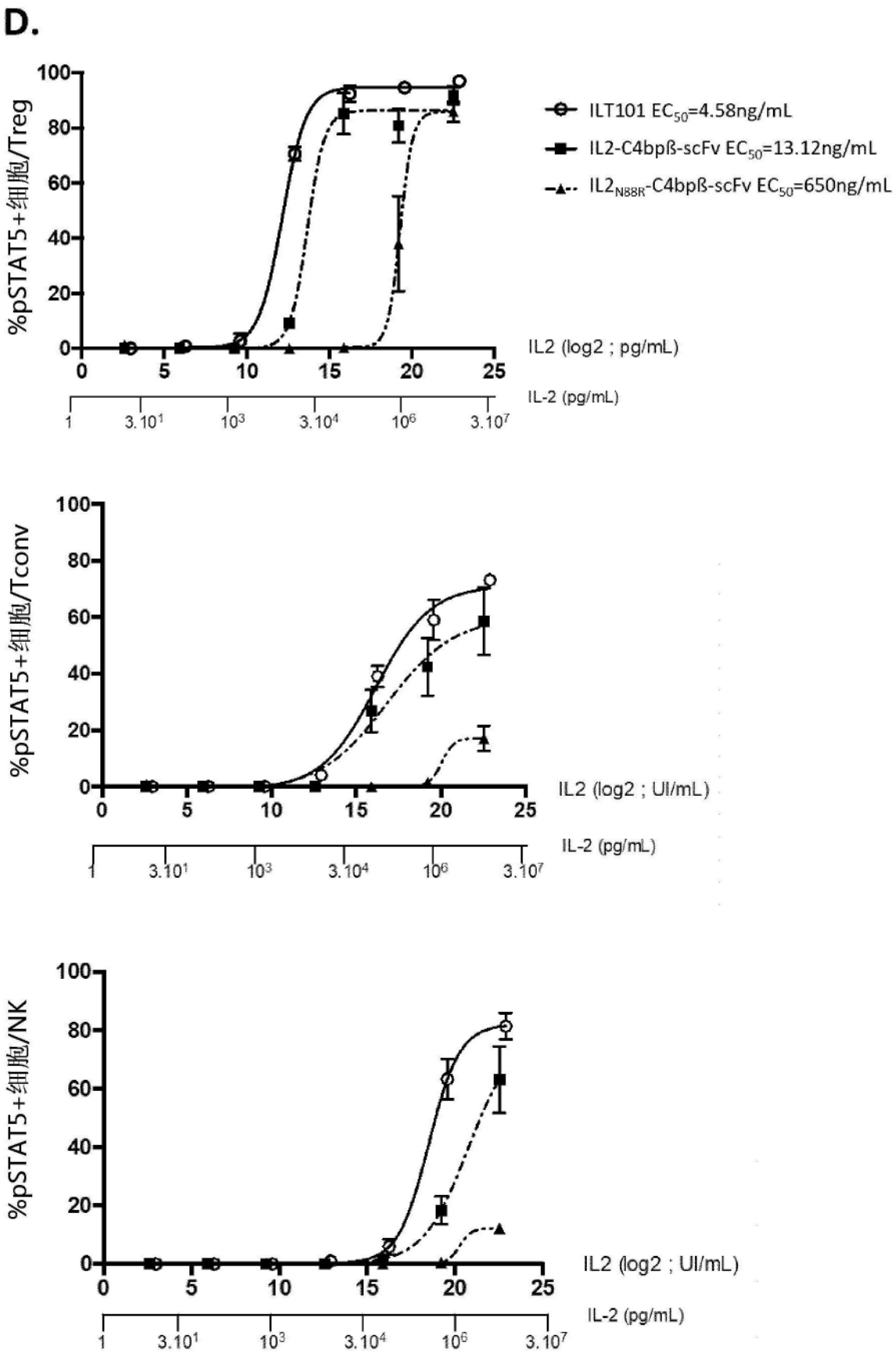

D.
%pSTAT5+细胞/Treg
ILT101 EC50=4.58ng/mL
IL2-C4bpß-scFv EC50=13.12ng/mL
IL2N88R-C4bpß-scFv EC50=650ng/mL
IL2 (log2 ; pg/mL)
IL-2 (pg/mL)
%pSTAT5+细胞/Tconv
IL2 (log2 ; UI/mL)
IL-2 (pg/mL)
%pSTAT5+细胞/NK
IL2 (log2 ; UI/mL)
IL-2 (pg/mL)

图1(续)

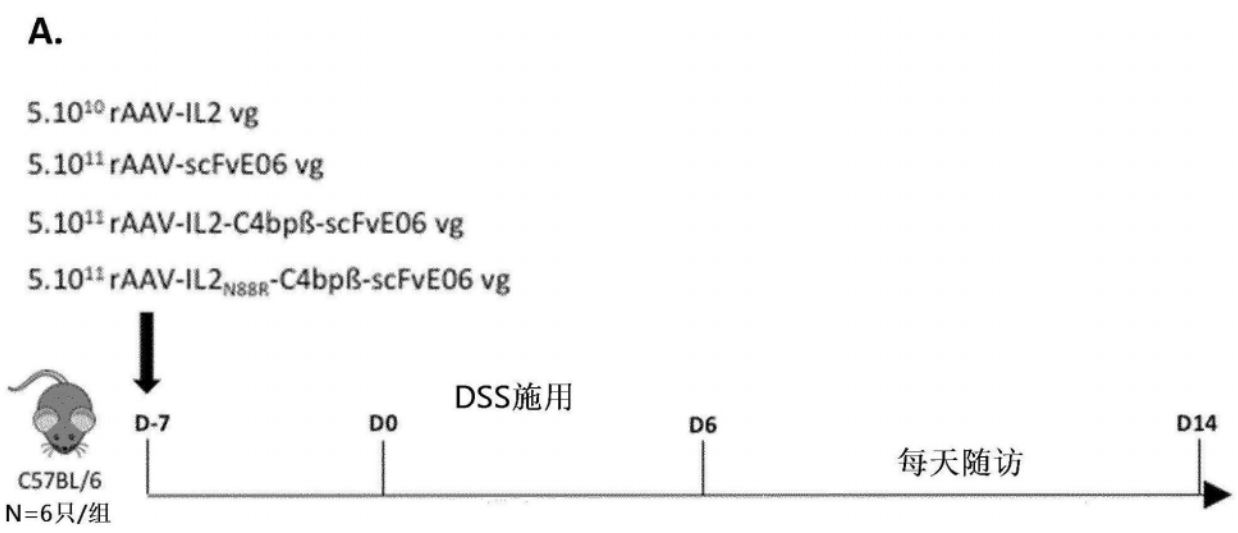

A.
5.10^10 rAAV-IL2 vg
5.10^11 rAAV-scFvE06 vg
5.10^11 rAAV-IL2-C4bpß-scFvE06 vg
5.10^11 rAAV-IL2N88R-C4bpß-scFvE06 vg
DSS施用
D-7
D0
D6
D14
每天随访
C57BL/6
N=6只/组

图2

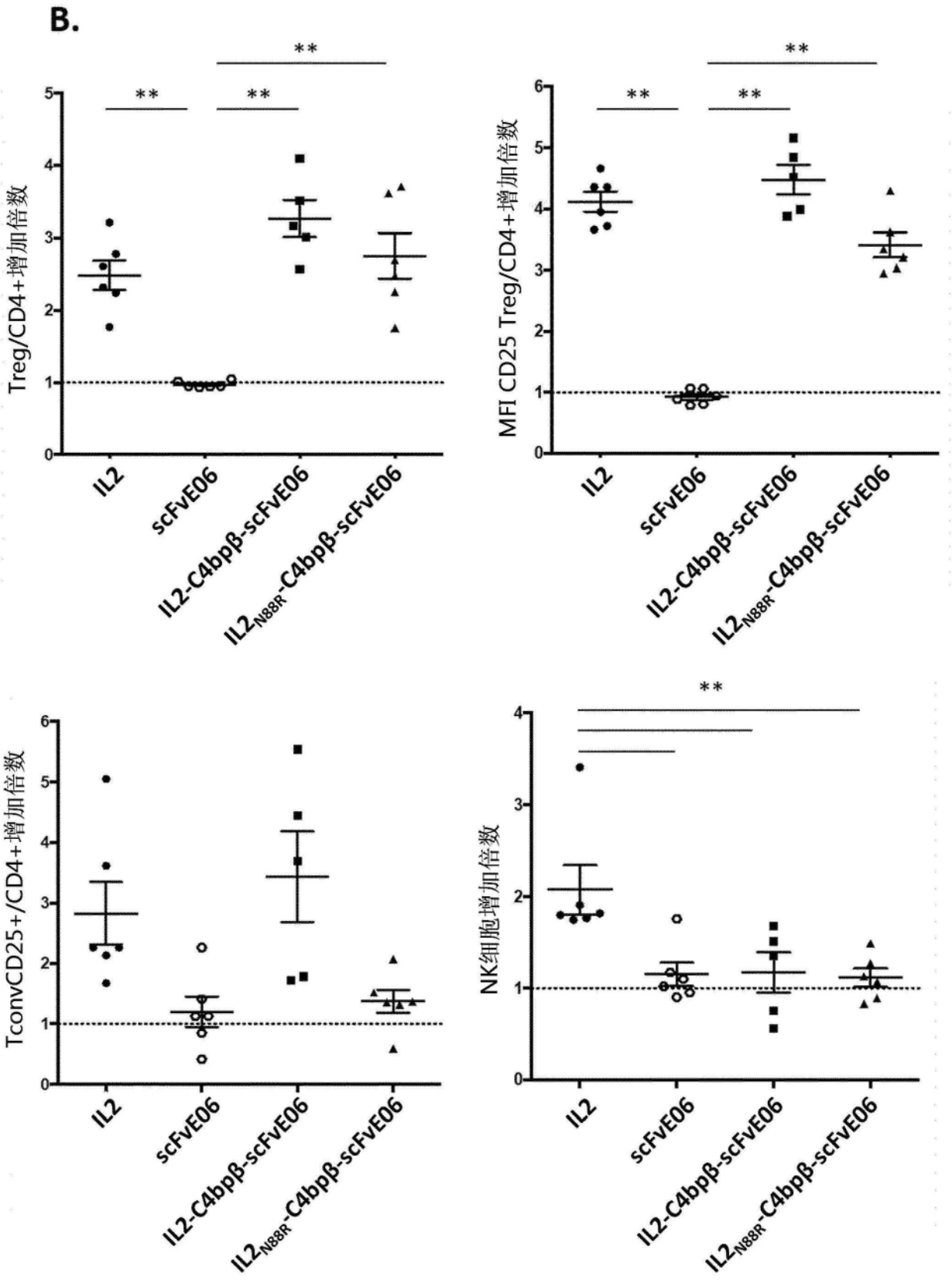

B.
Treg/CD4+增加倍数
MFI CD25 Treg/CD4+增加倍数
TconvCD25+/CD4+增加倍数
NK细胞增加倍数
**
IL2
scFvE06
IL2-C4bpβ-scFvE06
IL2N88R-C4bpβ-scFvE06

图2(续)

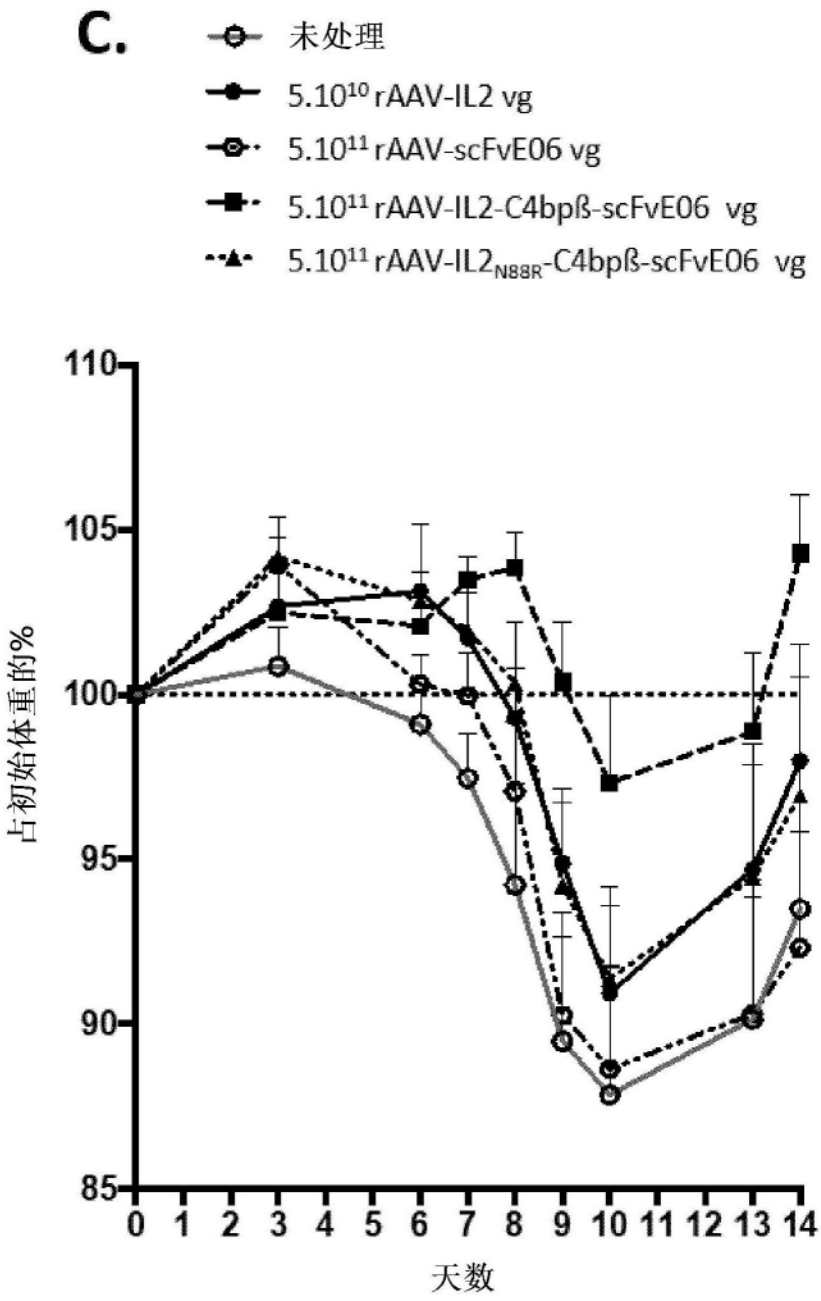

C.
未处理
5.10^10 rAAV-IL2 vg
5.10^11 rAAV-scFvE06 vg
5.10^11 rAAV-IL2-C4bpß-scFvE06 vg
5.10^11 rAAV-IL2N88R-C4bpß-scFvE06 vg
占初始体重的%
110
105
100
95
90
85
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
天数

图2(续)

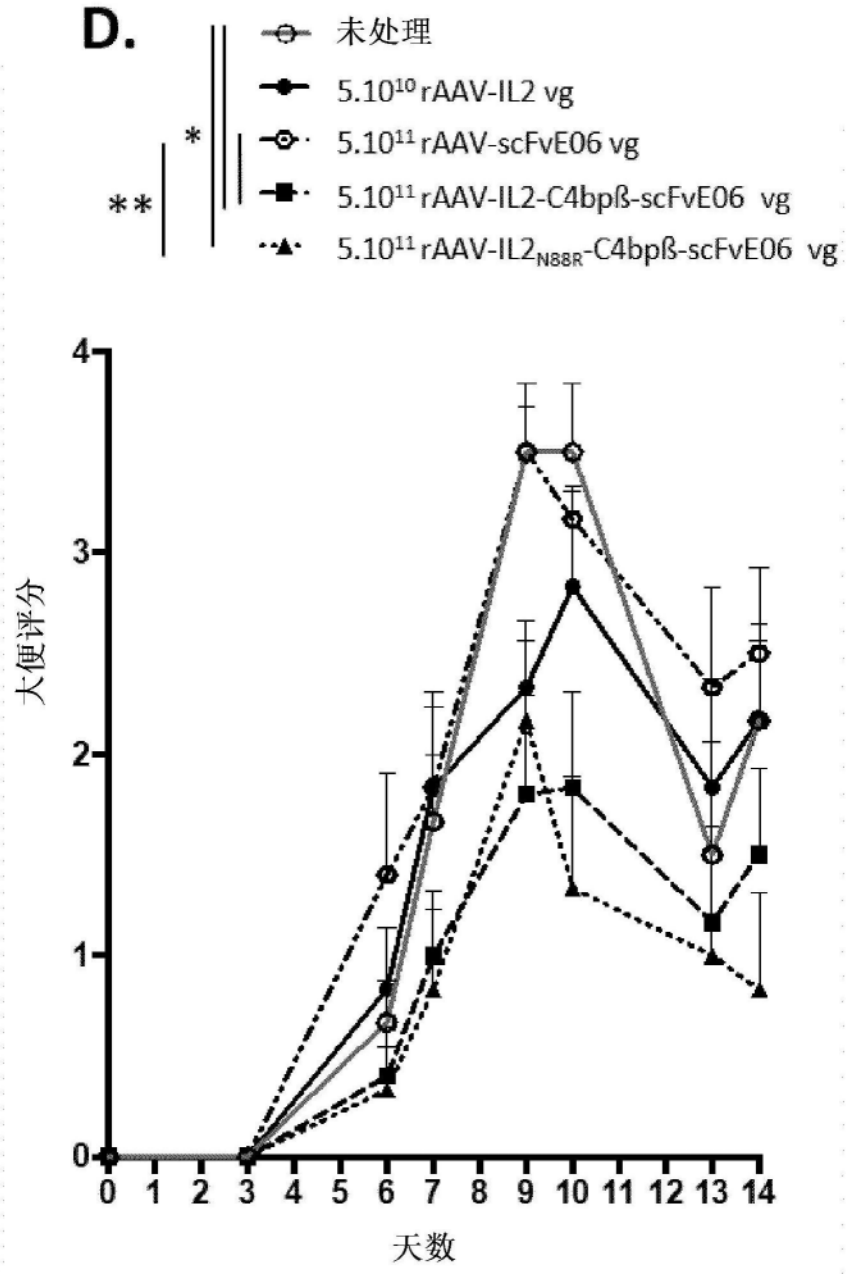

D.
未处理
5.10¹⁰ rAAV-IL2 vg
5.10¹¹ rAAV-scFvE06 vg
5.10¹¹ rAAV-IL2-C4bpß-scFvE06 vg
5.10¹¹ rAAV-IL2N88R-C4bpß-scFvE06 vg
*
**
大便评分
天数
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14

图2(续)

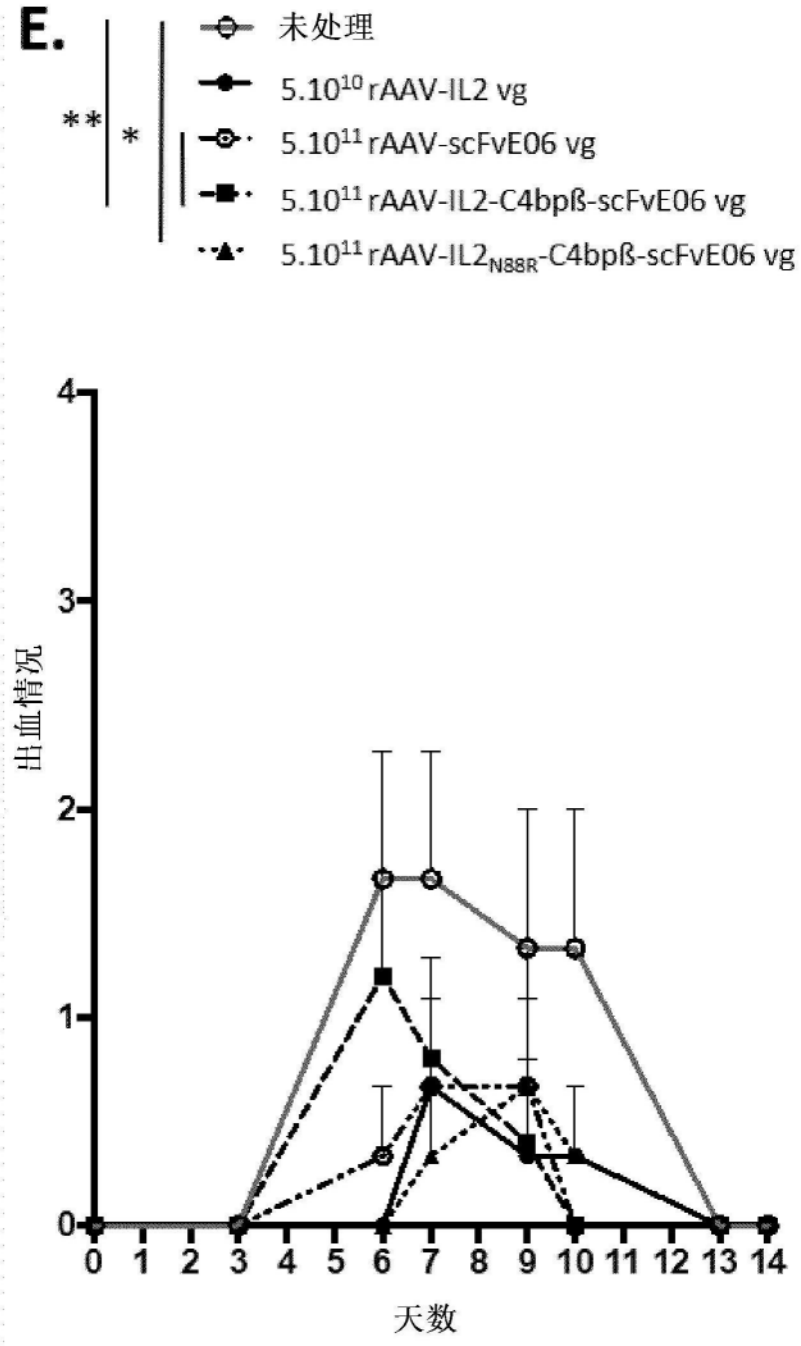

E.
**
*
未处理
5.10^10 rAAV-IL2 vg
5.10^11 rAAV-scFvE06 vg
5.10^11 rAAV-IL2-C4bpß-scFvE06 vg
5.10^11 rAAV-IL2N88R-C4bpß-scFvE06 vg
出血情况
0
1
2
3
4
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
天数

图2(续)

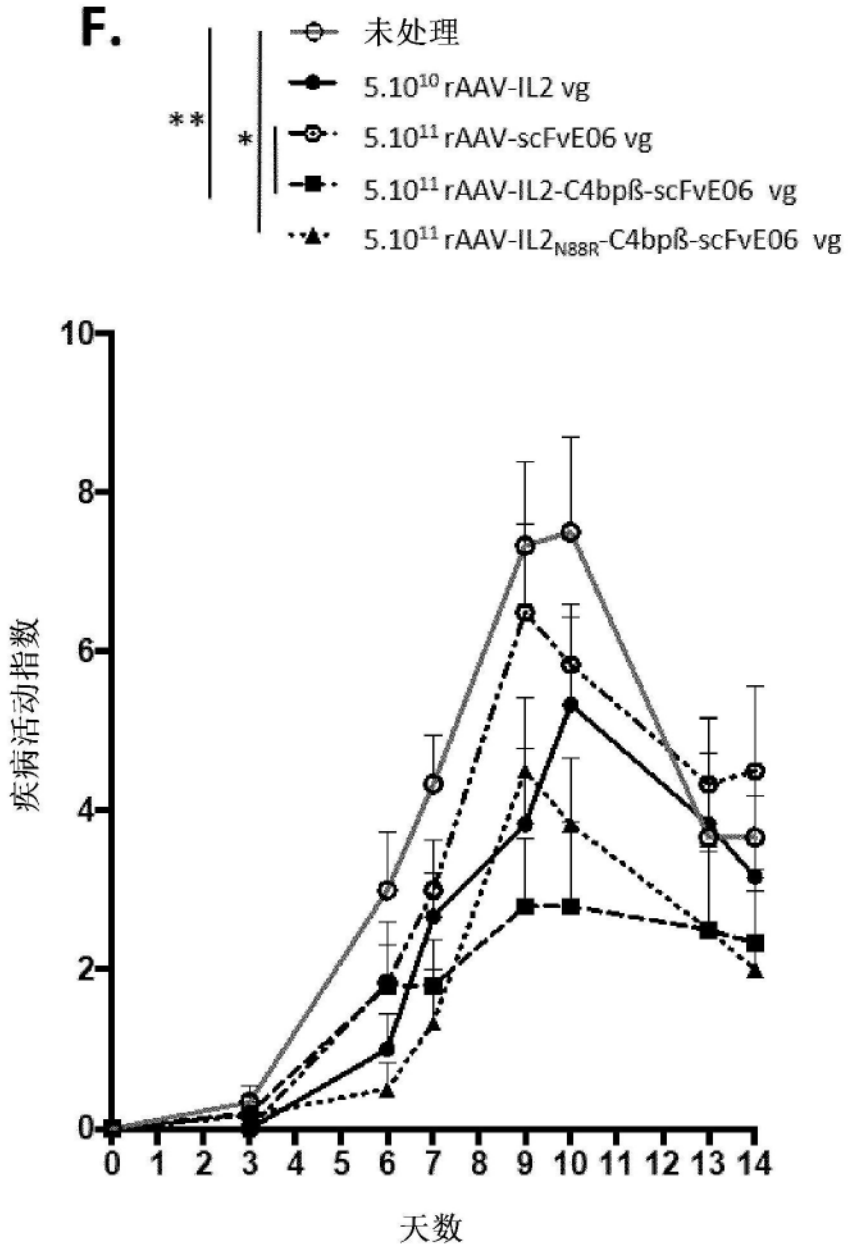

F.
**
*
未处理
5.10^10 rAAV-IL2 vg
5.10^11 rAAV-scFvE06 vg
5.10^11 rAAV-IL2-C4bpß-scFvE06 vg
5.10^11 rAAV-IL2N88R-C4bpß-scFvE06 vg
疾病活动指数
天数
0
2
4
6
8
10
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

图2(续)

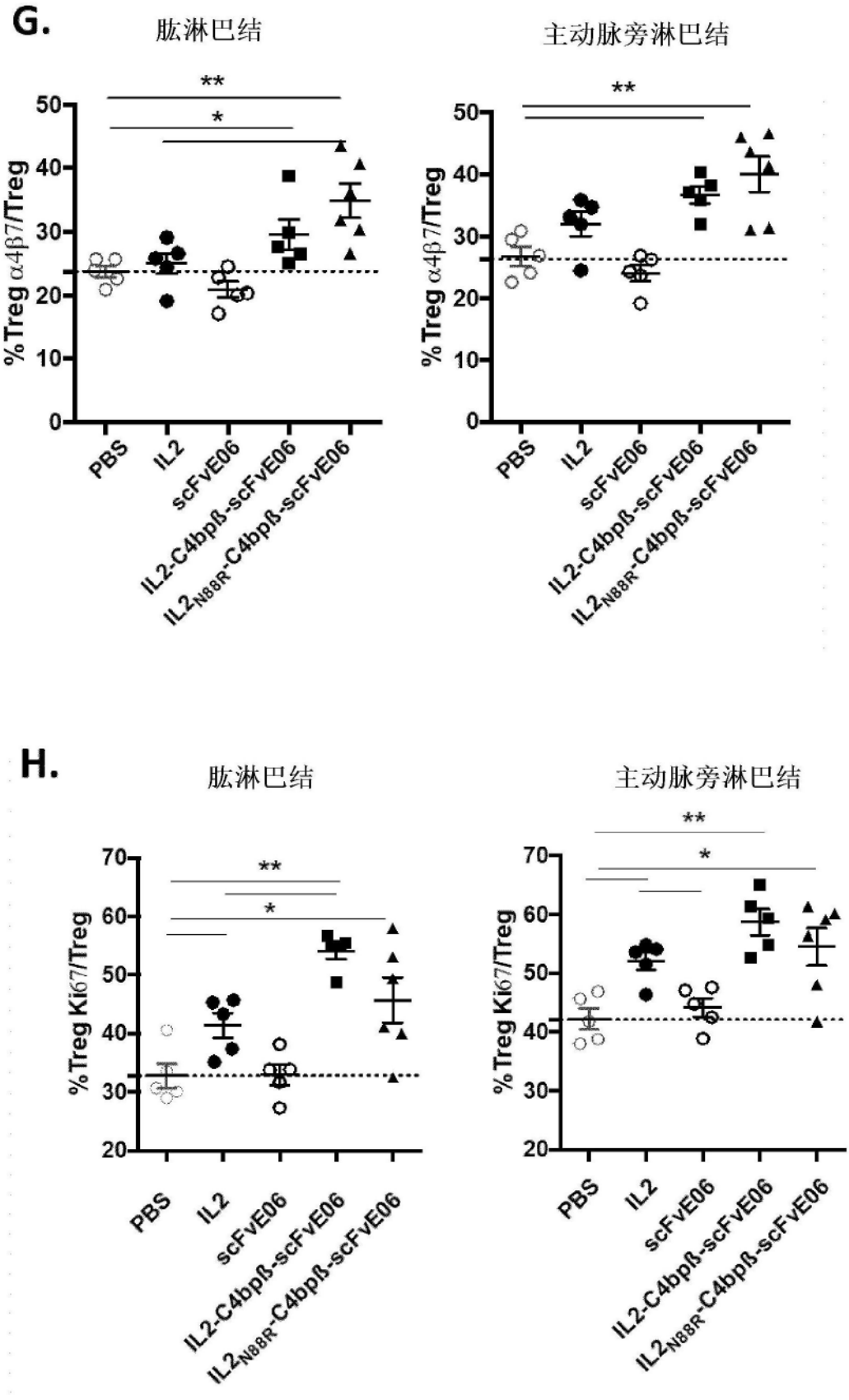

G.
肱淋巴结
主动脉旁淋巴结
% Treg α4β7/Treg
**
*
PBS
IL2
scFvE06
IL2-C4bpß-scFvE06
IL2N88R-C4bpß-scFvE06
H.
肱淋巴结
主动脉旁淋巴结
% Treg Ki67/Treg

图2(续)

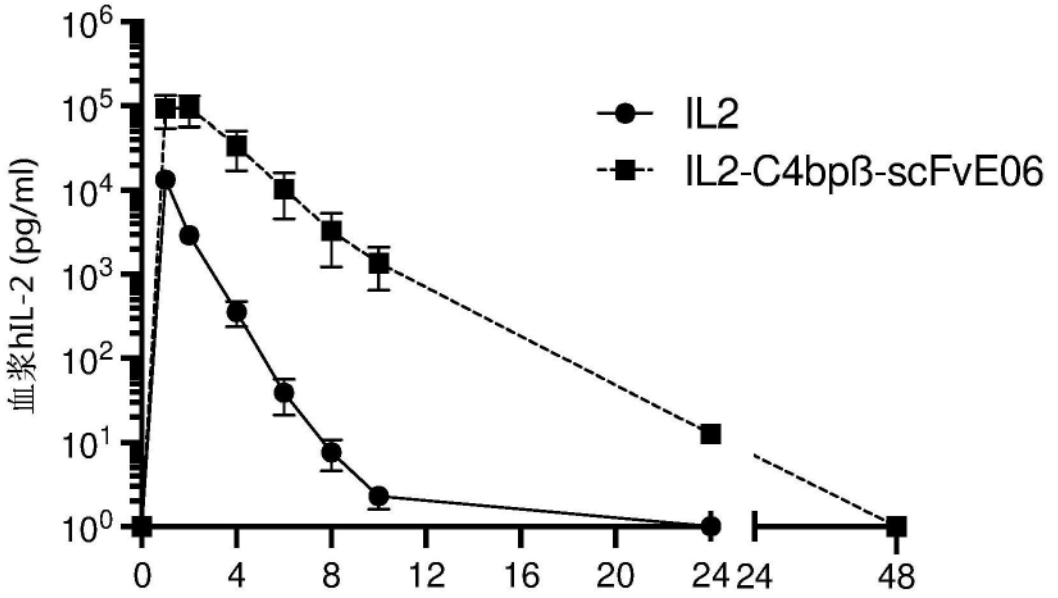

血浆hIL-2 (pg/ml)
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
0
4
8
12
16
20
24
24
48
IL2
IL2-C4bpß-scFvE06

图3

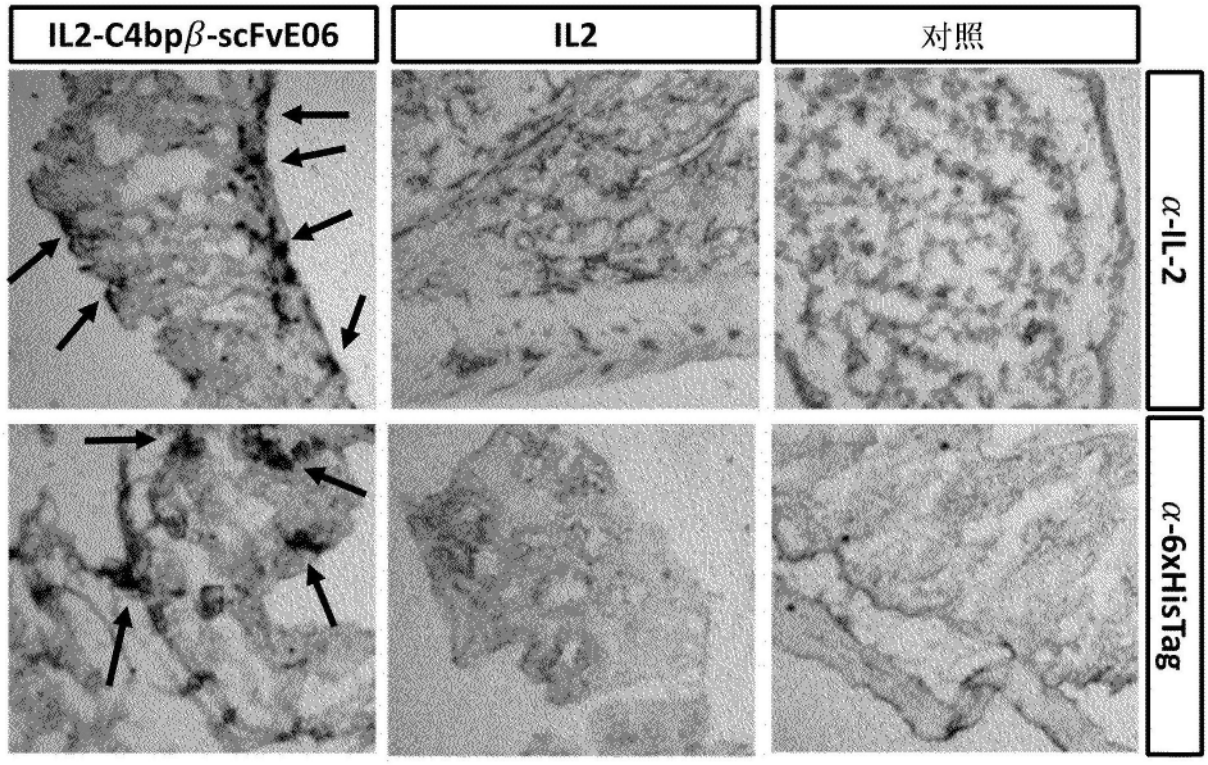

IL2-C4bpβ-scFvE06
IL2
对照
α-IL-2
α-6xHisTag

图4