



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105658669 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 08

(21) 申请号 201480040656. 4

代理人 孟锐

(22) 申请日 2014. 07. 01

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C07K 16/46(2006. 01)

13306045. 9 2013. 07. 19 EP

C07K 19/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016. 01. 18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2014/063976 2014. 07. 01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/007520 EN 2015. 01. 22

(71) 申请人 弗拉芒区生物技术研究

地址 比利时根特市

申请人 根特大学 法国国家科学研究中心

蒙彼利埃第二大学

蒙彼利埃大学医疗中心

(72) 发明人 J·塔威尼尔 L·扎比奥 G·尤则

F·保罗 Y·博达特 G·加尔辛

(74) 专利代理机构 北京市铸成律师事务所

11313

权利要求书1页 说明书9页 附图5页

(54) 发明名称

细胞因子拮抗剂的靶向

(57) 摘要

本发明涉及一种融合蛋白,其包含细胞因子拮抗剂和靶向部分,优选是抗体或抗体样分子。在一优选的实施方案中,所述细胞因子拮抗剂是结合受体,但不诱导受体信号传导的经修饰的细胞因子。本发明进一步涉及一种用于治疗癌症以及免疫或炎症相关的病症的根据本发明的融合蛋白。

1. 一种融合蛋白,其包含细胞因子拮抗剂和由抗体或抗体样分子组成的靶向部分。
2. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其中所述细胞因子拮抗剂是突变的细胞因子。
3. 根据权利要求1或2所述的融合蛋白,其中所述靶向部分是纳米抗体。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的融合蛋白,其中所述细胞因子拮抗剂是干扰素拮抗剂。
5. 根据权利要求4所述的融合蛋白,其中所述干扰素拮抗剂是IFN α 2-R120E突变体。
6. 根据前述权利要求中任一项所述的融合蛋白,其中使所述靶向部分特异性靶向癌细胞的标志物。
7. 根据权利要求1-5中任一项所述的融合蛋白,其中使所述靶向部分特异性靶向免疫细胞的标志物。
8. 根据权利要求1-6中任一项所述的融合蛋白,其用于治疗癌症。
9. 根据权利要求1-5以及7中任一项所述的融合蛋白,其用于治疗自体免疫疾病。
10. 根据权利要求8所述的用于治疗癌症的融合蛋白,其中使所述靶向部分特异性靶向癌细胞的标志物。
11. 根据权利要求10所述的用于治疗癌症的融合蛋白,其中所述细胞因子拮抗剂是IFN α 2-R120E突变体。
12. 根据权利要求9所述的用于治疗自体免疫疾病的融合蛋白,其中使所述靶向部分特异性靶向免疫细胞的标志物。
13. 根据权利要求12所述的用于治疗自体免疫疾病的融合蛋白,其中所述细胞因子拮抗剂是IFN α 2-R120E突变体。

细胞因子拮抗剂的靶向

[0001] 本发明涉及一种融合蛋白,其包含细胞因子拮抗剂和靶向部分,优选是抗体或抗体样分子。在一优选的实施方案中,细胞因子拮抗剂是结合受体,但不诱导受体信号传导的经修饰的细胞因子。本发明进一步涉及一种用于治疗癌症或用于治疗自体免疫疾病的根据本发明的融合蛋白。

[0002] 细胞因子是针对微生物侵袭和肿瘤发生的防御机制的关键介体。然而,它们的产生和活性必须受严密调控以防止可在不受控制的炎症和组织损伤中达到顶点的过度活性,如在许多自体免疫疾病的情况下所特征性观察。

[0003] 类风湿性关节炎是自体免疫疾病的经典实例,其中TNF α 、IL-1和IL-6在淋巴细胞和介导进行性关节破坏的其它类型的白细胞的募集中起突出作用。已显示TNF抑制剂会减轻症状,减缓疾病进展,以及改善许多类风湿性关节炎患者的生活质量(Moreland, 2009)。类似地,中和IL-12和IL-23的mAb(优特克单抗(ustekinumab))提供一种针对牛皮癣的潜在疗法(Elliott等, 2009),并且最先由FDA于2001年核准用于治疗类风湿性关节炎的重组人IL-1受体拮抗剂(阿那白滞素(anakinra), KineretTM)是一种用于治疗许多IL-1介导的自体炎症性疾病的有前途的药剂(Goldbach-Mansky, 2009)。

[0004] 若干条证据支持浆细胞样树突细胞过度产生I型干扰素是几种自体免疫疾病的主要发病机理的见解,所述自体免疫疾病包括全身性红斑狼疮;影响皮肤、肾脏、肌肉骨骼和血液组织的多系统自体免疫疾病;和干燥综合征(Sjogren's syndrome),即一种特征在于产生泪液和唾液的腺体被破坏,并且影响1-3%的人群的疾病。实际上,如果天然IFN产生不受适当调控,那么随之而来的延期I型IFN暴露可驱动自体抗体产生,此促进全身性自体免疫疾病的发作(Kiefer等, 2012)。因此,已开发靶向I型IFN的新型治疗剂。举例来说,两种中和IFN α 的单克隆抗体(西法木单抗(Sifalimumab)和罗利珠单抗(Rontalizumab))当前处于临床试验中(McBride等, 2012; Merrill等, 2011),并且也已设计I型IFN拮抗剂(Pan等, 2008)(PCT/US2009/056366)。

[0005] IL17A是IL17细胞因子家族的最充分表征成员。这个多效性细胞因子与由IL17RA和IL17RC亚单位组成的受体相互作用。IL17RA链被遍在表达,包括造血性、免疫、上皮、内皮细胞类型以及成纤维细胞。IL17A通常由Th17细胞在由包括IL-1、IL-6、IL-21和TGF β 的一个子组的细胞因子活化后产生,并且传播用于桥连先天性免疫应答和适应性免疫应答的早期炎症性信号。IL17是嗜中性白细胞的一种强力活化剂,并且在针对各种细胞外病原体的免疫防御中起重要作用。也明确确定的是IL17A促进自体免疫病变(Gaffen, 2009; Shen和Gaffen, 2008)。博达卢单抗(Brodalumab)、苏金单抗(Secukinumab)和伊赛珠单抗(Ixekizumab)靶向IL17A/IL17R轴以治疗自体免疫疾病,如牛皮癣和克罗恩氏病(Crohn's disease)。其全都可施以不利副作用,包括感染风险增强(Hueber等2012; Spuls和Hoofdt, 2012)。因此,使IL17A拮抗剂特异性靶向所选细胞类型(如气道上皮(哮喘)、星形细胞(多发性硬化症)、滑膜细胞和单核细胞/巨噬细胞(类风湿性关节炎)或角质化细胞(牛皮癣))可提供超过完全拮抗IL17功能的显著优势。

[0006] IL1 α 和IL1 β 是IL1细胞因子家族的创始成员。两者均是多效性的,并且通过遍在表

达的由I型IL-1受体(IL-1RI)和IL-1受体辅助蛋白(IL-1RAcP)组成的受体复合物起作用。这个IL-1轴的过度活化与许多人病变相关,所述病变包括类风湿性关节炎(RA)、慢性阻塞性肺病(COPD)、哮喘、炎症性肠病、多发性硬化症、动脉粥样硬化和阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease)。不同谱系的许多免疫细胞由IL-1活化,包括先天性免疫细胞,如树突细胞、巨噬细胞和嗜中性白细胞;以及适应性免疫应答中涉及的细胞,包括天然、Th17和CD8+T细胞以及B细胞(综述于Sims和Smith,2010中)。重组人IL-1RA(IL1受体拮抗剂,也称为阿那白滞素)可用于治疗类风湿性关节炎,并且正被评估用于广泛范围的自体炎症性疾病中(Dinarelli,2011)。然而,用阿那白滞素延期治疗的一个主要副作用是感染的发生增加。因此,选择性拮抗IL-1对仅仅一子组(免疫)细胞的活性可提供一种较安全的替代方案。可设想的是靶向抑制IL-1对所选先天性免疫细胞的作用,同时使它对T细胞区室的活性保持完好,仍然可显示治疗炎症性疾病的功效,而不影响宿主针对病原体的防御。

[0007] 尽管IL-7相关的细胞因子TSLP(胸腺基质淋巴细胞生成素(lymphopoietin))在促进Th2应答的情形下被最充分研究,但现在明确的是它对各种免疫和非免疫细胞类型起作用(综述于Roan等,2012中)。它的受体由与IL-7共有的IL-7R α 以及广泛表达的TSLPR α (也称为CRLF2)组成(Pandey等,2000)。TSLP通过作用于若干不同细胞类型来促进Th2型炎症,所述细胞类型包括树突细胞、CD4和CD8T细胞、B细胞、NKT细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞。它支持宿主针对蠕虫寄生虫的防御,但可促成过敏性炎症,并且拮抗TSLP被建议作为一种针对过敏性疾病的治疗。相反,在由加剧的Th1和Th17应答驱动的炎症性疾病,如炎症性肠病中,TSLP可具有保护性作用(综述于He和Geha,2010以及Roan等,2012中)。近来也发现TSLPR α 中的突变与癌症,包括具有不良预后的白血病相关联(Harvey等,2010;Yoda等,2010;Ensor等,2011),并且TSLP水平与乳腺癌进展(Olkhanud等,2011)以及胰腺癌中的存活期降低(De Monte等,2011)相关联。因此,使TSLP拮抗剂选择性靶向所选肿瘤细胞类型可提供一种选择性抗肿瘤策略,并且通过对所选免疫细胞的靶向拮抗作用达成的额外调节可用于进一步优化所述策略。也可针对非恶性疾病进行类似方法。

[0008] 伴随旨在中和细胞因子作用的治疗方法的主要问题是细胞因子拮抗剂未被靶向特异性涉及于自体免疫或自体炎症性疾病的发作中的细胞或组织。举例来说,可易于预见的是由单克隆抗体或IFN受体拮抗剂长期全身性中和I型IFN活性在病毒性感染易感性和肿瘤发展方面携有重大风险,因为I型IFN是在控制病毒性感染方面以及对于建立免疫应答(特别是控制癌细胞生长的那些)所必需的蛋白质家族(Gajewski等,2012)。类似地,预期全身性中和IL-1活性将影响抗原-细胞毒性T细胞在免疫应答期间的扩增、效应子功能、组织定位和记忆应答(Ben-Sasson等,2013)。

[0009] 惊人地,我们发现使细胞因子拮抗剂特异性靶向一子组靶标细胞允许实现治疗作用,而不具有全身性施加细胞因子拮抗剂的负性副作用。本发明通过使I型IFN拮抗剂的作用靶向表达给定细胞表面标志物的特定细胞类型来例示。所述方法被应用于设计和构建特异性抑制内源性IFN对可恶地涉及于自体免疫疾病的发作中的细胞子组的作用,同时使其它细胞和器官保持完全应答性的靶向IFN拮抗剂。

[0010] 尽管尚未被核准,但溶瘤性病毒正通过临床试验而推进(Russell等,2012)。溶瘤性病毒常通过工程改造它们对正常细胞干扰素介导的抗病毒应答的敏感性来被设计以在正常组织中具有减弱的复制能力。一实例是编码干扰素 β 的溶瘤性水泡性口炎病毒(Naik

等,2012)。预期所述病毒的治疗作用是使由许多肿瘤细胞展现的IFN应答有缺陷的结果。然而,影响IFN应答的肿瘤的遗传异质性是高度可变的,并且使病毒介导的肿瘤溶解的功效受损(Naik和Russell,2009)。因此,通过特异性抑制肿瘤细胞中的IFN应答,靶向肿瘤的IFN拮抗剂将允许由溶瘤性病毒特异性破坏肿瘤细胞。

[0011] 本发明的第一方面是一种包含细胞因子拮抗剂和由抗体或抗体样分子组成的靶向部分的融合蛋白。如此处所用的细胞因子拮抗剂可为本领域技术人员已知的任何细胞因子拮抗剂,包括但不限于可溶性受体、细胞因子结合抗体或突变的细胞因子。优选地,所述细胞因子拮抗剂是突变的细胞因子,甚至更优选地是结合受体,但不或仅微弱诱导细胞因子信号传导的突变体。优选地,突变体对受体的亲和力与野生型细胞因子的亲和力类似,甚至更优选地,它具有更高亲和力;优选地,由突变体诱导的信号传导小于野生型的信号传导的20%,甚至更优选小于野生型的信号传导的10%,甚至更优选小于5%,甚至更优选小于1%。最优选地,突变细胞因子的结合不导致可检测信号传导。所述突变体可充当细胞因子信号传导的竞争性抑制剂。如此处所用的抗体或抗体样分子是被特定设计以结合另一分子,优选是蛋白质分子,并且包含特定结合结构域的蛋白质。作为一非限制性实例,所述抗体或抗体样分子可为重链抗体(hcAb)、单结构域抗体(sdAb)、微抗体(Tramontano等,1994)、骆驼科重链抗体的可变结构域(VHH)、新抗原受体的可变结构域(VNAR)、亲和体(Nygren等,2008)、 α 体(alphabody)(W02010066740)、设计的锚蛋白重复结构域(DARPin)(Stumpp等,2008)、抗运载蛋白(anticalin)(Skerra等,2008)、打结素(knottin)(Kolmar等,2008)和工程改造的CH2结构域(纳米抗体;Dimitrov,2009)。如此处所用的定义排除抗体的Fc尾部(无结合结构域)。优选地,所述抗体或抗体样分子由单一多肽链组成,甚至更优选地,所述抗体不经翻译后修饰。如此处所用的翻译后修饰指示由活细胞在蛋白质合成期间或之后进行的修饰,但排除对分离的蛋白质进行的修饰,优选是化学修饰,如但不限于聚乙二醇化。甚至更优选地,所述抗体或抗体样分子包含源于抗体的互补决定区。最优选地,所述靶向抗体或抗体样分子是纳米抗体。

[0012] 优选地,所述细胞因子拮抗剂和所述靶向部分由连接子,优选是GGG连接子连接。优选地,所述GGG连接子含有至少5个GGG重复,更优选至少10个GGG重复,甚至更优选至少15个GGG重复,最优选至少20个GGG重复。

[0013] 在一优选实施方案中,根据本发明的细胞因子拮抗剂是干扰素拮抗剂;甚至更优选地,它是IFN α 2-R120E突变体。在另一优选实施方案中,根据本发明的细胞因子拮抗剂是IL17家族的细胞因子的拮抗剂,优选是IL17A拮抗剂。在另一优选实施方案中,根据本发明的细胞因子拮抗剂是IL1细胞因子家族的拮抗剂,优选是IL1 α 或IL1 β 拮抗剂。在另一优选实施方案中,根据本发明的细胞因子拮抗剂是TSLP拮抗剂。

[0014] 在一个优选实施方案中,抗体或抗体样分子针对癌细胞标志物。癌细胞标志物为本领域技术人员所知,并且包括但不限于CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD56、CD70、CD74、CD138、AGS16、HER2、MUC1、GPNMB和PMSA。优选地,所述癌症标志物是CD20或HER2。

[0015] 在另一优选实施方案中,抗体或抗体样分子针对免疫细胞,优选是炎症性细胞因子产生性免疫细胞上的标志物。如此处所用的免疫细胞是属于免疫系统的细胞,包括但不限于单核细胞、树突细胞和T细胞。优选地,所述免疫细胞是促炎症性细胞因子产生性细胞。

[0016] 炎症性细胞因子产生性细胞的标志物为本领域技术人员所知,并且包括但不限于

CD4、CD11b、CD26、唾液酸粘附素和fltt3受体。

[0017] 本发明的另一方面是一种用于治疗癌症的根据本发明的融合蛋白。本发明的另一方面是一种用于治疗自体免疫疾病的根据本发明的融合蛋白。

[0018] 本发明的另一方面是一种用以治疗癌症的方法,其包括(i)确定罹患癌症的患者中癌症的类型和癌细胞的适合靶向标志物,(ii)有可能连同适合的赋形剂一起向需要治疗的所述患者提供根据本发明的包含细胞因子拮抗剂和由抗体或抗体样分子组成的靶向部分的融合蛋白。对于本领域技术人员明显的是步骤(ii)的靶向部分将针对步骤(i)中鉴定的靶向标志物。可能的癌细胞标志物为本领域技术人员所知,并且包括但不限于CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD56、CD70、CD74、CD138、AGS16、HER2、MUC1、GPNMB和PMSA。

[0019] 本发明的另一方面是一种用以治疗自体免疫疾病的方法,其包括(i)确定罹患自体免疫疾病的患者中免疫细胞的适合靶向标志物,(ii)有可能连同适合的赋形剂一起向需要治疗的所述患者提供根据本发明的包含细胞因子拮抗剂和由抗体或抗体样分子组成的靶向部分的融合蛋白。如此处所用的免疫细胞包括但不限于树突细胞、CD4和CD8T细胞、B细胞、NKT细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞。

[0020] 附图简述

[0021] 图1:纳米抗体-hIFN α 2-R120E融合蛋白的结构元件的表示。

[0022] 图2:在HL116(A)和HL116-mLR10(B)细胞上,在存在或不存在(未处理)4-11-hIFN α 2-R120E融合蛋白下,由10pM hIFN α 2诱导的荧光素酶活性的定量。

[0023] 图3:在HL116(A)和HL116-mLR10(B)细胞上,在存在或不存在(未处理)4-11-hIFN α 2-R120E融合蛋白下,由1pM IFN β 诱导的荧光素酶活性的定量。

[0024] 图4:对未处理(左图)、用50pM hIFN α 2(居中)或用50pMhIFN α 2在靶向CD20的IFN拮抗剂存在下处理的CD19阳性和阴性人PBMC中的pY701-STAT1的FACS分析。

[0025] 图5:用以下组分处理的Daudi细胞培养物的密度:

[0026] A:未处理

[0027] B:hIFN α 2.2pM

[0028] C:hIFN α 2.2pM+2HCD25-20 $\times$ GGs-hIFN α 2-R120E.1 μ g/ml

[0029] D:hIFN α 2.2pM+2HCD25-20 $\times$ GGs-hIFN α 2-R120E.0.1 μ g/ml

[0030] E:hIFN α 2.2pM+2HCD25-20 $\times$ GGs-hIFN α 2-R120E-R149A.3 μ g/ml

[0031] F:hIFN α 2.2pM+2HCD25-20 $\times$ GGs-hIFN α 2-R120E-R149A.1 μ g/ml

[0032] G:hIFN α 2.2pM+2HCD25-20 $\times$ GGs-hIFN α 2-R120E-L153A.3 μ g/ml

[0033] H:hIFN α 2.2pM+2HCD25-20 $\times$ GGs-hIFN α 2-R120E-L153A.1 μ g/ml

实施例

[0034] 实施例的材料和方法

[0035] 纳米抗体-IFN拮抗剂融合物构建。

[0036] 使用QuikChange II-E定点诱变试剂盒(Agilent),将消除IFN-I FNAR1结合,并且赋予对人IFN α 2的拮抗特性的突变R120E(Pan等,2008)(PCT/US2009/056366)引入pMET7SIgK-HA-4.11-His-P AS-ybbr-IFN α 2构建体(PCT/EP2013/050787)中,所述构建体是针对鼠类瘦素(leptin)受体的纳米抗体与人IFN α 2之间的融合物。

[0037] 产生纳米抗体-IFN拮抗剂融合蛋白

[0038] 使用标准转脂胺方法(Invitrogen),用蛋白质融合构建体转染Hek293T细胞。在转染之后48小时,收集培养基并储存在-20℃下。

[0039] 细胞系

[0040] 使Hek 293T细胞在补充有10%FCS的DMEM中生长。HL116克隆(Uze等,1994)从人HT1080细胞系衍生。它含有由IFN诱导性6-16启动子控制的荧光虫荧光素酶基因。描述了表达鼠类瘦素受体的衍生HL116-mLR10克隆(PCT/EP2013/050787)。

[0041] 荧光素酶活性的测量

[0042] 通过定量对HL116细胞中以及表达mLR的HL116-mLR10上由IFN α 2或IFN β 诱导的荧光素酶活性的抑制来测量拮抗性IFN活性。用Prism软件(GraphPad),使用非线性数据回归来计算IC50值。在IFN刺激6小时之后,使用荧光素酶底物缓冲液(20mM三(羟甲基)甲基甘氨酸(Tricine)、1.07mM(MgCO₃)4Mg(OH)₂•5H₂O、2.67mM MgSO₄•7H₂O、0.1mM EDTA、33.3mM 二硫苏糖醇、270 μ M辅酶A、470 μ M荧光素、530 μ M ATP,最终pH 7.8),在Berthold Centro LB960光度计上测定荧光素酶活性。

[0043] 实施例1:纳米抗体-IFN α 2-R120E融合蛋白。

[0044] 如材料和方法中所述使针对鼠类瘦素受体的纳米抗体4-11融合于IFN α 2突变体R120E。

[0045] 图1显示用针对鼠类瘦素受体的纳米抗体4-11和人IFN α 2-R120E(如Piehler等,2000中进行编号)构建的纳米抗体-IFN拮抗剂融合蛋白的图示。

[0046] 实施例2:靶向抑制IFN α 对表达mLR的细胞的活性

[0047] 在由表达4-11-IFN α 2-R120E融合蛋白的Hek 293T细胞调节的若干稀释度的培养基存在下,用10pM IFN α 2处理亲本HL116细胞和表达小鼠瘦素受体的衍生HL116-mLR10细胞6小时。选择10pM IFN α 2剂量,因为它对应于IFN α 2对两种细胞系的EC50。接着使细胞溶解,并且定量IFN诱导的荧光素酶活性。在较高测试浓度下,4-11-IFN α 2-R120E融合蛋白不能抑制IFN α 2对未靶向的HL116细胞的作用(图2A)。相反,它对表达4-11纳米抗体的靶标的HL116-mLR10细胞的剂量依赖性抑制作用是明确的(图2B)。

[0048] 实施例3:靶向抑制IFN β 对表达mLR的细胞的活性

[0049] 在构成人I型IFN的亚型之中,IFN β 显示对IFN α / β 受体的最高亲和力。因此,我们测试4-11-IFN α 2-R120E融合蛋白是否也施加针对IFN β 作用的拮抗活性。

[0050] 在由表达4-11-IFN α 2-R120E融合蛋白的Hek 293T细胞调节的若干稀释度的培养基存在下,用1pM IFN β 处理亲本HL 116细胞和表达小鼠瘦素受体的衍生HL116-mLR10细胞6小时。选择1pM IFN β 剂量,因为它对应于IFN β 对两种细胞系的EC50。接着使细胞溶解,并且定量IFN诱导的荧光素酶活性。在较高测试浓度下,4-11-IFN α 2-R120E融合蛋白不能抑制IFN α 2对未靶向的HL116细胞的作用(图3A)。相反,它对表达4-11纳米抗体的靶标的HL116-mLR10细胞的剂量依赖性抑制作用是明确的(图3B)。

[0051] 实施例4.对人完全PBMC内的B细胞中的IFN α 2诱导STAT1磷酸化的特异性抑制

[0052] 通过用20个GGG重复基序制得的连接子序列使I型IFN拮抗剂IFN α 2-R120E融合于抗人CD20纳米抗体2HCD25。在大肠杆菌(E.coli)中产生融合蛋白,并且通过固定金属亲和色谱法(IMAC)纯化。

[0053] 预期人外周血液单核细胞(PBMC)含有约4%的特征可在于细胞表面表达CD19的B细胞。大多数循环B细胞也是CD20表达阳性的。

[0054] 经ficoll梯度(histopaque-1077, Sigma-Aldrich)从健康供体的血液样本分离PBMC。使细胞未经处理或与50pM人IFN α 2一起在不存在或存在10 μ g/ml 2HCD25纳米抗体-IFN α 2-R120E融合蛋白下孵育15分钟。

[0055] 接着将细胞固定(BD固定缓冲液I),进行可渗透化处理(BD渗透缓冲液III),并且用PE标记的抗pSTAT1(BD#612564)和APC标记的抗人CD19(BD#555415)标记。使用BD FACS Canto获得FACS数据,并且使用Diva(BD Biosciences)软件分析CD19阳性和阴性细胞群体中与pSTAT1相关的荧光。

[0056] 图4显示连接于对CD20具有特异性的纳米抗体的IFN拮抗剂特异性抑制大部分的B细胞群体中的IFN作用,同时使CD19阴性细胞群体中的IFN应答保持完好。

[0057] 实施例5. 靶向CD20的I型IFN拮抗剂抑制I型IFN的抗增殖活性。

[0058] 已确定2HCD25纳米抗体和IFN α 2-R120E的融合蛋白特异性抑制B细胞中IFN诱导的STAT1磷酸化,我们测试它是否可抑制I型IFN的抗增殖活性。此外,我们在与抑制性突变R120E组合下评估使IFN α 2对IFNAR2的亲和力分别降低10和100倍的IFN突变L153A和R149A的作用。

[0059] Daudi细胞是一种表达CD20的人成淋巴细胞样B细胞系。以 2.0×10^5 个细胞/毫升接种Daudi细胞,并且使其未经处理或在单独或与各种靶向CD20的IFN拮抗剂组合的2pM IFN α 2存在下培养72小时。接着将它们计数以估计对由IFN α 2诱导的增殖抑制的功效。图5显示靶向CD20的IFN拮抗剂完全抑制IFN α 2的抗增殖活性。也显示降低IFN-IFNAR2亲和力使拮抗活性降低,从而证明抑制作用实际上归因于靶向拮抗剂的结合。

[0060] 参考文献

[0061] Ben-Sasson, S.Z., Hogg, A., Hu-Li, J., Wingfield, P., Chen, X., Crank, M., Caucheteux, S., Ratner-Hurevich, M., Berzofsky, J.A., Nir-Paz, R., et al. (2013). IL-1 enhances expansion, effector function, tissue localization, and memory response of antigen-specific CD8T cells. *J Exp Med* 210, 491-502.

[0062] De Monte, L., Rani, M., Tassi, E., Clavenna, D., Papa, I., Recalde, H., Braga, M., Di Carlo, V., Doglioni, C. and Protti, M.P. (2011). Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J. Exp Med* 208, 469-478).

[0063] Dimitrov, D.S. (2009) Engineered CH2 domains (nanoantibodies). *mAbs* 1, 26-28.

[0064] Dinarello, C.A. (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 117, 3720-3732.

[0065] Ensor, H.M., Schwab, C., Russell, L.J., Richards, S.M., Morrison, H., Masic, D., Jones, L., Kinsey, S.E., Vora, A.J., Mitchell, C.D., Harrison, C.J. and Moorman, A.V. (2011). Demographic, clinical, and outcome features of children with acute lymphoblastic leukemia and CRLF2 deregulation: results from the MRC

ALL97clinical trial.Blood 117,2129-2136

[0066] Elliott,M.,Benson,J.,Blank,M.,Brodmerkel,C.,Baker,D.,Sharples,K.R., and Szapary,P.(2009).Ustekinumab:lessons learned from targeting interleukin-12/23p40in immune-mediated diseases.Ann N Y Acad Sci 1182,97-110.

[0067] Gaffen,S.L.(2009).Structure and signalling in the IL-17receptor family.Nat Rev Immunol 9,556-567.

[0068] Gajewski,T.F.,Fuertes,M.B.,and Woo,S.R.(2012).Innate immune sensing of cancer:clues from an identified role for type I IFNs.Cancer Immunol Immunother 61,1343-1347.

[0069] Goldbach-Mansky,R.(2009).Blocking interleukin-1in rheumatic diseases.Ann N Y Acad Sci 1182,111-123.

[0070] Harvey,R.C.,Mullighan,C.G.,Chen,I.M.,Wharton,W.,Mikhail,F.M.,Carroll,A.J.,Kang,H.,Liu,W.,Dobbin,K.K.,Smith,M.A.,Carroll,W.L.,Devidas,M.,Bowman,W.P.,Camitta,B.M.,Reaman,G.H.,Hunger,S.P.,Downing,J.R.and Willman,C.L.(2010).Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases,alteration of IKZF1,Hispanic/Latino ethnicity,and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia.Blood115,5312-5321.

[0071] He,R.and Geha,R.S.(2010).Thymic stromal lymphopoietin.Ann N Y Acad Sci(2010)1183,13-24.

[0072] Hueber,W.,Sands,B.E.,Lewitzky,S.,Vandemeulebroecke,M.,Reinisch,W.,Higgins,P.D.,Wehkamp,J.,Feagan,B.G.,Yao,M.D.,Karczewski,M.,Karczewski,J.,Pezous,N.,Bek,S.,Bruin,G.,Mellgard,B.,Berger,C.,Londei,M.,Bertolino,A.P.,Tougas,G.and Travis S.P.(2012).Secukinumab,a human anti-IL-17A monoclonal antibody,for moderate to severe Crohn's disease:unexpected results of a randomised,double-blind placebo-controlled trial.Gut 61,1693-1700.

[0073] Kiefer,K.,Oropallo,M.A.,Cancro,M.P.,and Marshak-Rothstein,A.(2012).Role of type I interferons in the activation of autoreactive B cells.Immunol Cell Biol 90,498-504.

[0074] Kolmar,H.(2008)Alternative binding proteins:biological activity and therapeutic potential of cysteine-knot miniproteins.FEBS J.275,2684-2690.

[0075] McBride,J.M.,Jiang,J.,Abbas,A.R.,Morimoto,A.,Li,J.,Maciucă,R.,Townsend,M.,Wallace,D.J.,Kennedy,W.P.,and Drappa,J.(2012).Safety and pharmacodynamics of rontalizumab in patients with systemic lupus erythematosus:results of a phase I,placebo-controlled,double-blind,dose-escalation study.Arthritis Rheum 64,3666-3676.

[0076] Merrill,J.T.,Wallace,D.J.,Petri,M.,Kirou,K.A.,Yao,Y.,White,W.I.,Robbie,G.,Levin,R.,Berney,S.M.,Chindalore,V.,et al.(2011).Safety profile and clinical activity of sifalimumab,a fully human anti-interferon alpha monoclonal antibody,in systemic lupus erythematosus:a phase I,multicentre,

double-blind randomised study. *Ann Rheum Dis* 70,1905-1913.

[0077] Moreland, L.W. (2009). Cytokines as targets for anti-inflammatory agents. *Ann N Y Acad Sci* 1182, 88-96.

[0078] Naik, S., Nace, R., Barber, G.N., and Russell, S.J. (2012). Potent systemic therapy of multiple myeloma utilizing oncolytic vesicular stomatitis virus coding for interferon-beta. *Cancer Gene Ther* 19, 443-450.

[0079] Naik, S., and Russell, S.J. (2009). Engineering oncolytic viruses to exploit tumor specific defects in innate immune signaling pathways. *Expert Opin Biol Ther* 9, 1163-1176.

[0080] Russell, S.J., Peng, K.W., and Bell, J.C. (2012). Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol* 30, 658-670.

[0081] Nygren, P-A. (2008) Alternative binding proteins: affibody binding proteins developed from a small three-helix bundle scaffold. *FEBS J.* 275, 2668-2676.

[0082] Olkhanud, P.B., Rochman, Y., Bodogai, M., Malchinkhuu, E., Wejksza, K., Xu, M., Gress, R.E., Hesdorffer, C., Leonard, W.J. and Biragyn, A. (2011). Thymic stromal lymphopoietin is a key mediator of breast cancer progression. *J. Immunol.* 186, 5656-5662.

[0083] Pan, M., Kalie, E., Scaglione, B.J., Raveche, E.S., Schreiber, G., and Langer, J.A. (2008). Mutation of the IFNAR-1 receptor binding site of human IFN-alpha2 generates type I IFN competitive antagonists. *Biochemistry* 47, 12018-12027.

[0084] Pandey, A., Ozaki, K., Baumann, H., Levin, S.D., Puel, A., Farr, A.G., Ziegler, S.F., Leonard, W.J. and Lodish, H.F. (2000). Cloning of a receptor subunit required for signaling by thymic stromal lymphopoietin. *Nat Immunol.* 1, 59-64.

[0085] Piehler, J., Roisman, L.C. and Schreiber, G. (2000). New structural and functional aspects of the type I interferon-receptor interaction revealed by comprehensive mutational analysis of the binding interface. *J. Biol. Chem* 275, 40425-40433.

[0086] Roan, F., Bell, B.D., Stoklasek, T.A., Kitajima, M., Han, H. and Ziegler, S.F. (2012). The multiple facets of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) during allergic inflammation and beyond. *J Leuk Biol*, 91, 877-886.

[0087] Shen, F. and Gaffen, S.L. (2008). Structure-function relationships in the IL-17 receptor: implications for signal transduction and therapy. *Cytokine* 41, 92-104.

[0088] Sims, J.E. and Smith, D.E. (2010). The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 10, 89-102.

[0089] Skerra, A. (2008) Alternative binding proteins: anticalins-harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. *FEBS J.* 275, 2677-2683.

- [0090] Spuls, P.I. and Hooft, L. (2012). Brodalumab and ixekizumab, anti-interleukin-17-receptor antibodies for psoriasis: a critical appraisal. *Br J Dermatol* 167, 710-713.
- [0091] Stump, M.T., Binz, H.K., Amstutz, P. (2008) DARPins: a new generation of protein therapeutics. *Drug Discov Today* 13, 695-701.
- [0092] Tramontano, A., Bianchi, E., Venturini, S., Martin, F., Pessi, A and Sollazzo, M. (1994) The making of the minibody: an engineered beta-protein for the display of conformationally constrained peptides. *J. Mol. Recognition* 7, 9-24.
- [0093] Uze, G., Di Marco, S., Mouchel-Vielh, E., Monneron, D., Bandu, M.T., Horisberger, M.A., Dorques, A., Lutfalla, G., and Mogensen, K.E. (1994). Domains of interaction between alpha interferon and its receptor components. *J Mol Biol* 243, 245-257.
- [0094] Yoda, A., Yoda, Y., Chiaretti, S., Bar-Natan, M., Mani, K., Rodig, S.J., West, N., Xiao, Y., Brown, J.R., Mitsiades, C., Sattler, M., Kutok, J.L., DeAngelo, D.J., Wadleigh, M., Piciocchi, A., Dal Cin, P., Bradner, J.E., Griffin, J.D., Anderson, K.C., Stone, R.M., Ritz, J., Foà, R., Aster, J.C., Frank, D.A., Weinstock, D.M. (2010). Functional screening identifies CRLF2 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 252-257.

Slgk前导物	HA 标签	纳米抗体 4-11	His 标签	PAS 连接子	ybbR 标签	IFNa2-R120E
---------	----------	-----------	-----------	------------	------------	-------------

图1

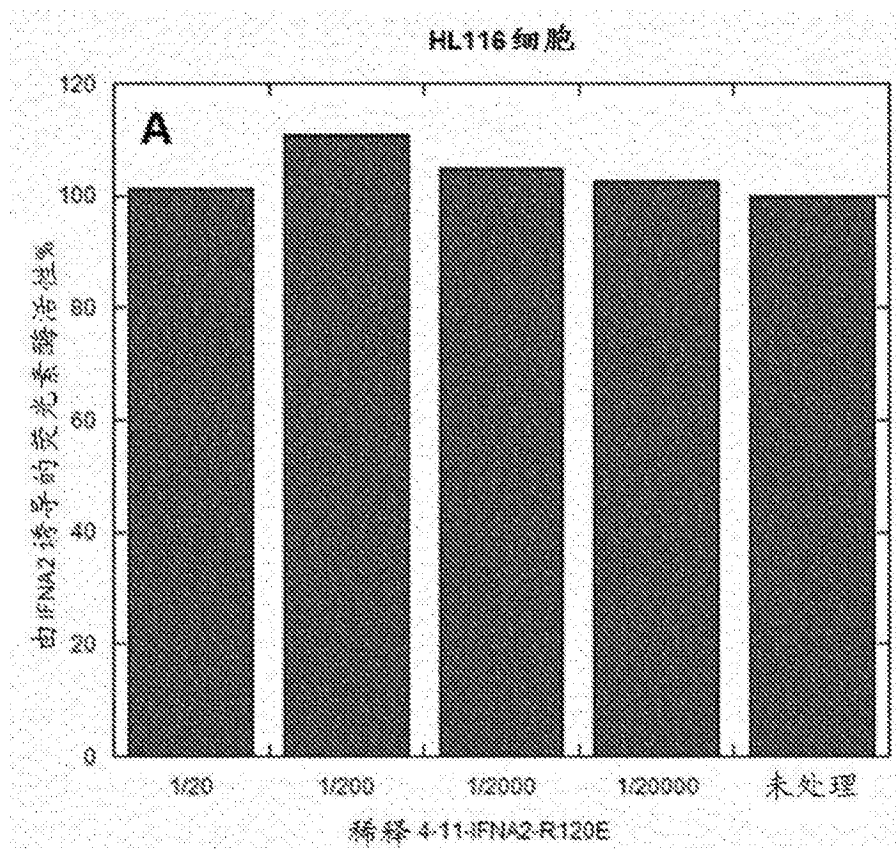


图2

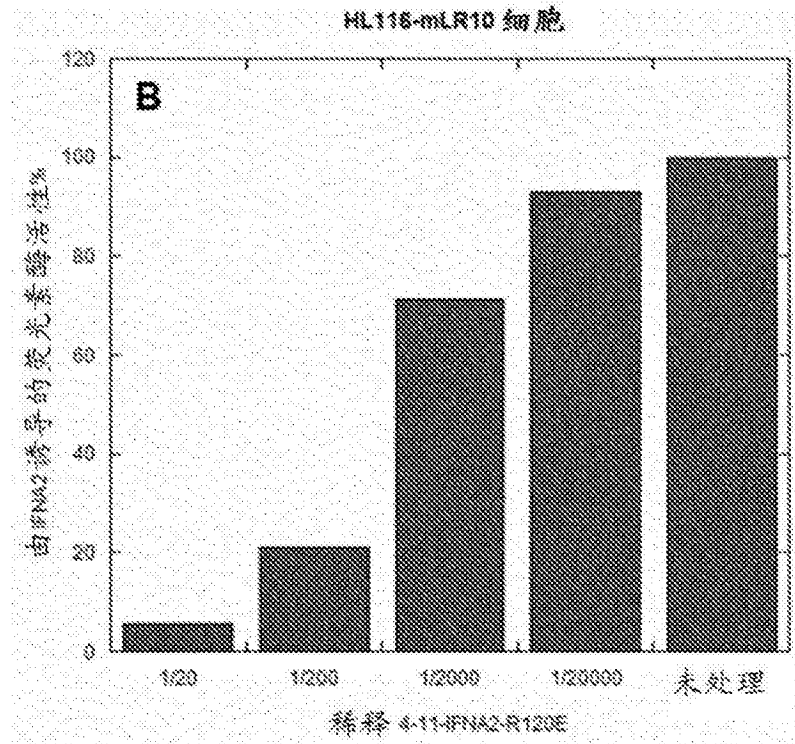


图2续

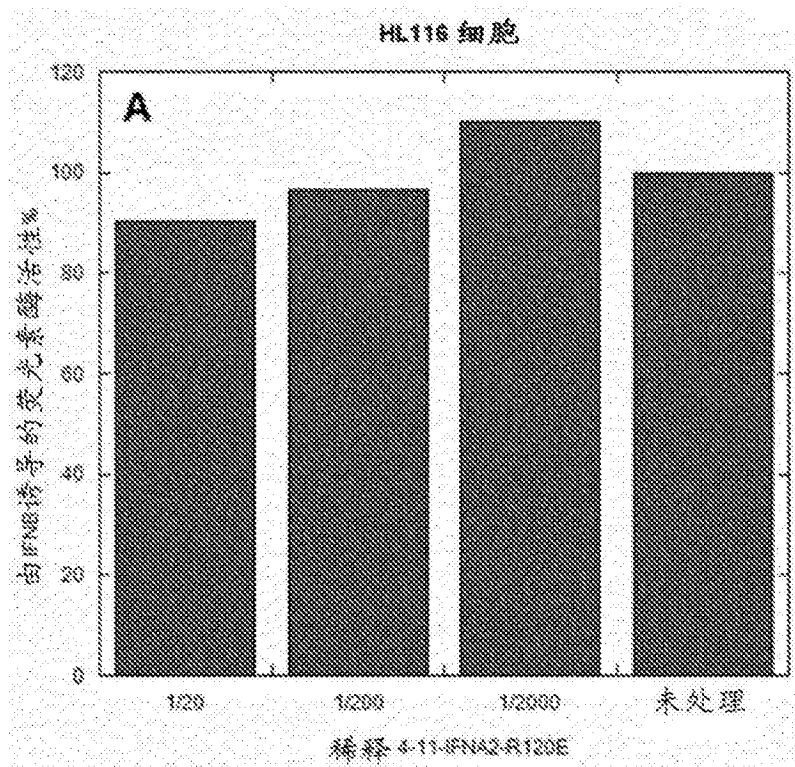


图3

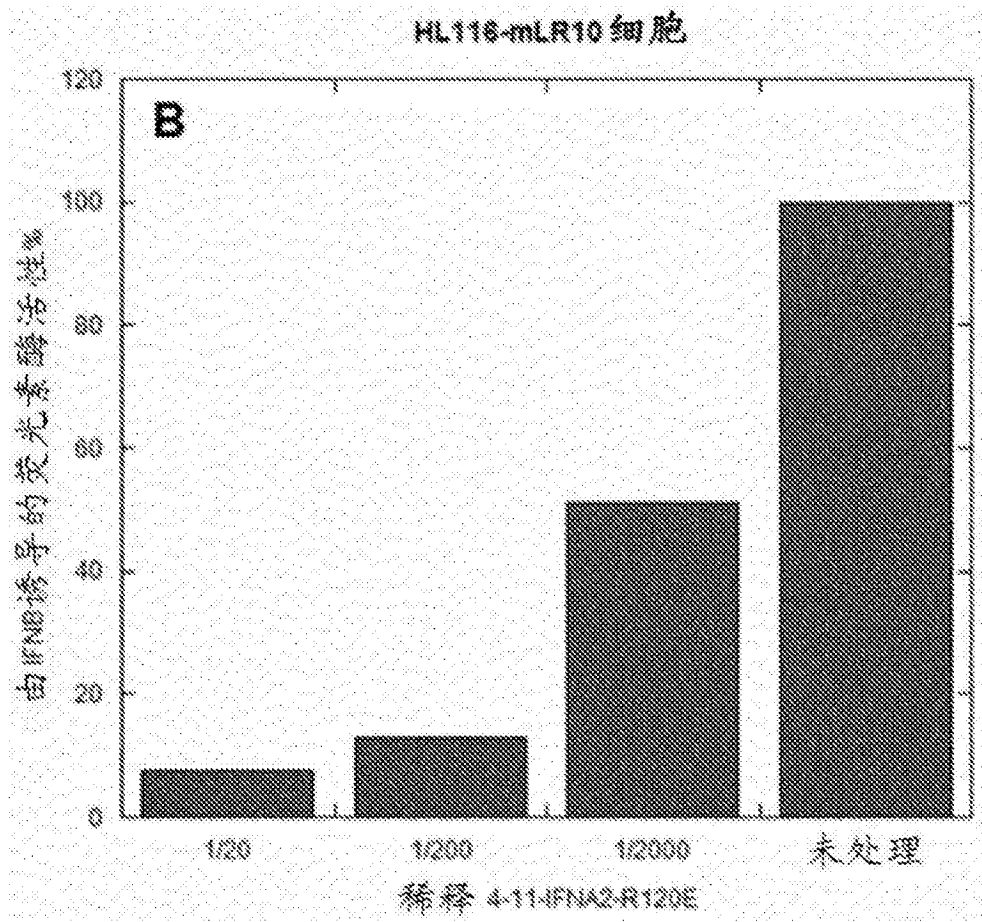


图3续

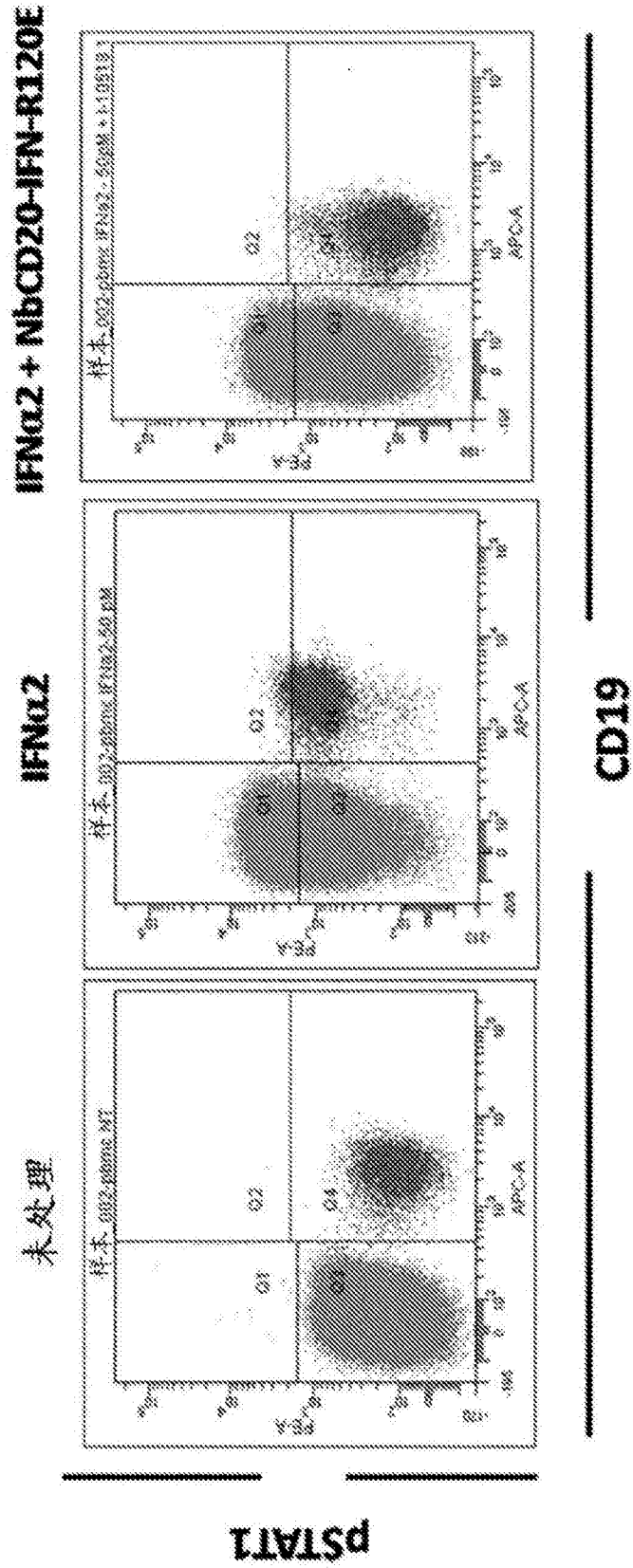


图4

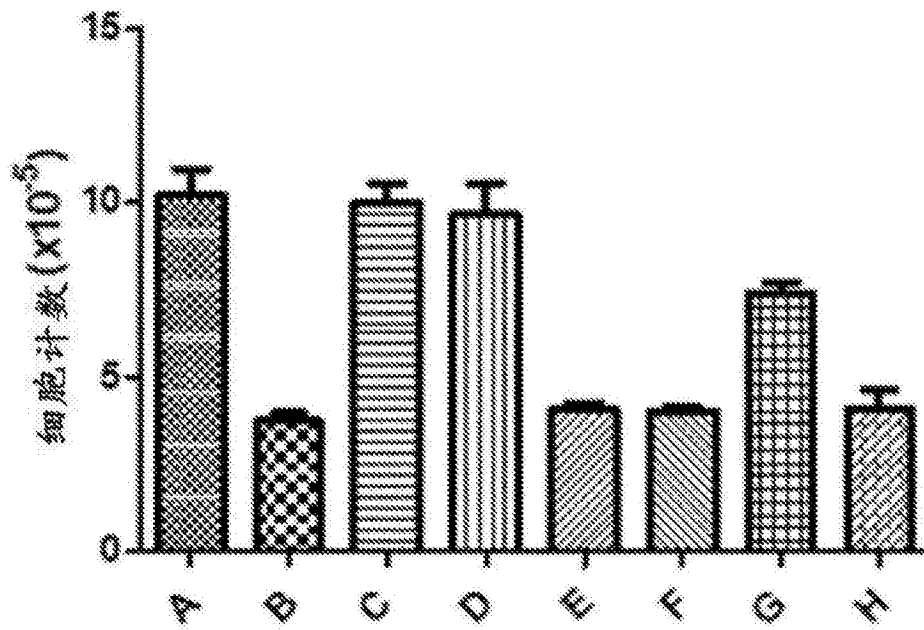


图5